

國立臺灣大學醫學院藥學系

碩士論文

Graduate Institute of Pharmacy

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

金絲桃素微脂粒製劑於光動力治療之

細胞死亡機制探討

A Study on the Cell Death Mechanisms of Liposomal
Hypericin in Photodynamic Therapy

溫裕瀚

Yu-Han Wen

指導教授：何蘊芳 博士

Advisor: Yunn-Fang Ho, Ph.D.

中華民國 99 年 1 月

January, 2010

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

金絲桃素微脂粒製劑於光動力治療之細胞死亡機制探討

A Study on the Cell Death Mechanisms of Liposomal Hypericin
in Photodynamic Therapy

本論文係溫裕瀚 (r96423018) 在國立臺灣大學藥學系所
完成之碩士學位論文，於民國 99 年 1 月 25 日承下列考試委
員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

何 益 芳

博士

(指導教授)

余 秀 瑛

博士

顧 記 華

博士

中文摘要

研究背景

光動力治療 (photodynamic therapy; PDT) 是一種新興且低侵入性的治療方法，可應用於癌症及其它病症的治療。光動力治療可分為兩個步驟，含光敏感劑經由局部或全身性給藥並給予適當波長的光照。光敏感劑在適當波長的激發後，便會透過能量傳遞產生單態氧及活性氧分子，藉由這些毒性分子的產生，可導致細胞的死亡。但因單態氧的擴散距離短 (約 20 nm) 且持續時間短 (約 10^{-6} ~ 10^{-9} s)，所以光敏感劑於胞內的分布會決定光照後首要傷害的部位。金絲桃素 (hypericin; Hyp) 屬於第二代光敏感劑，具有光敏感與螢光的特性，適用於光動力治療及光動力診斷 (photodynamic diagnosis)，此外，Hyp 具單態氧高產率及低暗毒性等優點，故 Hyp 被認為在光動力治療應用上深具潛力；但因 Hyp 高脂溶性，在水溶液中易產生聚集 (aggregate) 的現象，將不利 Hyp 應用於未來動物或臨床試驗的進行與發展。

研究目的

本研究中，以人類肝癌細胞 Hep3B 做為體外研究模式的對象。我們利用微脂粒及低密度脂蛋白 (low density lipoprotein; LDL) 做為 Hyp 的藥物載體，並且研究各類 Hyp 製劑在細胞攝取、胞內分布及光動力處理後所引起細胞死亡機制的差異。

研究方法

本研究中以 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DSPC) 及膽固醇做為微脂粒的主要材料，並添加不同比例的正電荷脂質 stearylamine (SA)，依 SA 所佔之莫耳比分為 SA0 (莫耳比 0)、SA0.25 (莫耳比 0.25)、SA0.5 (莫耳比 0.5) 及 SA1.0 (莫耳比 1.0) 等四類 liposomal Hyp。製備之 liposomal Hyp 再以粒徑分析儀及螢光光譜儀分別進行粒徑及包覆率的測定。在微脂粒粒徑穩定性之分析，分別

以保存穩定性及光照穩定性檢定，以供確保後續細胞實驗進行期間，微脂粒的粒徑圍完整且均一的。

在細胞實驗中，以流式細胞儀分析 Hep3B 細胞與各類 Hyp 製劑於 serum-free 條件下處理 3 小時的攝取情形，我們利用螢光影像分析、MTT 細胞毒性實驗、流式細胞儀及西方墨點法，觀察各類 Hyp 製劑於胞內的分布及後續光照處理後引起細胞死亡機制的探討。

研究結果

SA0、SA0.25、SA0.5 及 SA1.0 等各類微脂粒制劑之粒徑依次為 183.57 ± 6.80 nm、 181.53 ± 10.55 nm、 174.87 ± 4.26 nm、 177.90 ± 15.50 nm。Hyp 包覆率分別為 0.094 ± 0.003 μ mole Hyp/mg DSPC、 0.067 ± 0.003 、 0.085 ± 0.006 及 0.078 ± 0.010 ，其中以 SA0 及 SA0.5 的包覆率較高。

在 Hyp 細胞攝取之研究中，Hep3B 細胞在 serum-free 培養液條件下六類 Hyp 製劑培養 3 小時，Hyp 攝取量之大小比較為：Hyp > Hyp + 2.5 μ g LDL/mL (Hyp-LDL) > SA0 > SA0.25 \cong SA0.5 \cong SA1.0。在 Hep3B 和各組 Hyp 製劑處理 3 小時後，發現各組製劑均主要以分布在內質網與高基氏體為主，但相較於正電荷 liposomal Hyp(SA0.25、SA0.5、SA1.0)等三類製劑組，Hyp 組、Hyp + 2.5 μ g LDL/mL 組及 liposomal Hyp (SA0) 組中，Hyp 之胞內分布較均勻散布於細胞質；而三種正電荷微脂粒組中，Hyp 之胞內分布則呈現顆粒狀，且有部份和溶酶體染劑 (LysoSensor) 產生 colocalization 的現象。在光動力處理後 24 小時，發現各組 Hyp 製劑之細胞毒性大小依序為：Hyp > Hyp-LDL > SA0 > SA0.25 \cong SA0.5 \cong SA1.0，在 2 J/cm^2 光照下，採用各組 Hyp 的 IC_{50} 進行後續的實驗，分別為：Hyp 組 28.26 nM、Hyp-LDL 組 45.26 nM、SA0 組 83.20 nM、SA0.25 組 522.89 nM、SA0.5 組 551.26 nM、SA1.0 組 635.16 nM。各正電荷微脂粒組在細胞攝取、胞內分布及細胞毒性的實驗上，彼此間無顯著差異，故僅以 Hyp 包覆濃度及包覆率較高的 SA0.5 製劑進行細胞凋亡機制探討。在 Hyp 組、Hyp-LDL、SA0 及 SA0.5 各組光動力處理後

30 分鐘即可發現 Hep3B 細胞內鈣離子濃度均有明顯上升，各組 Hyp 製劑和控制組相比均有明顯差異： 3.18 ± 0.78 ($p < 0.01$)、 4.33 ± 0.16 ($p < 0.001$)、 4.29 ± 0.42 ($p < 0.001$)、 3.38 ± 0.50 ($p < 0.01$)。在光照處理後 24 小時，Hep3B 細胞週期並無停滯現象，但四組之 Sub-G1 期(細胞凋亡)和控制組相比均有明顯增加(Hyp 組($22.36 \pm 8.67\%$; $p < 0.05$)、Hyp-LDL 組($18.75 \pm 7.64\%$; $p < 0.05$)、SA0 組($16.41 \pm 2.97\%$; $p < 0.01$)、SA0.5 ($18.76 \pm 3.42\%$; $p < 0.01$))。為了進一步探究四種 Hyp 製劑光動力處理後之細胞死亡機制，發現各組均可見 endoplasmic reticulum (ER) -stress 指標蛋白 C/EBP homologous protein(CHOP) 及 glucose-regulated protein 78(GRP-78) 的活化，在細胞凋亡相關蛋白可見到 caspase-3 及 PARP 被切割且活化的現象，顯示 Hyp 光動力處理後將會透過 ER-stress 引起 Hep3B 細胞產生細胞凋亡。在細胞自噬指標蛋白 LC3I/LC3II (microtubule associated protein light chain 3 I/II) 蛋白表現上，並未發現在 Hyp 光動力處理後 LC3II 表現有增加的現象，故在本研究處理條件下，Hyp 光照處理並未發現 Hep3B 細胞自噬的現象。

結論

在本研究中發現，各種 Hyp 製劑於胞內分布主要傾向分布於內質網及高基氏體，各類 Hyp 製劑光動力處理後將會透過 ER-stress (CHOP 及 GRP-78 的活化) 引起 Hep3B 細胞產生細胞凋亡 (caspase-3 及 PARP 被切割且活化)。此外，正電荷微脂粒有部份和溶酶體產生 colocalization 的現象，光動力處理後可能會導致後續細胞死亡機制的不同，但在後續細胞死亡機制的探討上，與其他類製劑組間並無明顯差異。未來如能就 Hyp 製劑的組織與細胞選擇性及光動力治療效率深入探討，在微脂粒的粒徑、電荷、表面修飾及低密度脂蛋白和 Hyp 間比例的設計最佳組合，將期能夠在 PDT 的開發及應用上有所進展。

關鍵詞：光動力治療、金絲桃素、低密度脂蛋白、微脂粒、細胞內分佈、細胞凋亡。

Abstract

Background

Photodynamic therapy (PDT) is a novel and minimally invasive treatment method for cancer and non-oncological disorders. PDT is a two-step therapeutic technique in which the topical or systemic delivery of photosensitizing drugs is followed by irradiation with appropriate wavelength. After irradiation with suitable wavelength, then activated photosensitizers transfer energy to molecular oxygen, generating singlet oxygen and reactive oxygen species (ROS) that cytotoxicity species could induce cell death. Since the short diffusion distance (20 nm) and half-life ($10^{-6}\sim 10^{-9}$ s) of singlet oxygen, direct photodamage commonly occurs at the sites where photosensitizer located. Hypericin (Hyp) is classified as second generation photosensitizer, since it has photosensitizing and fluorescence properties suited for photodynamic therapy and photodynamic diagnosis, in addition, Hyp have high quantum yield of photogeneration of singlet oxygen and relatively low dark toxicity, so Hyp is a potential phototherapeutic agent in photodynamic therapy. However, Hyp forms aggregates in aqueous solution, the hydrophobic nature of Hyp limits its ability to study *in vivo* and clinical trails.

Objectives

Human hepatoma cell line, Hep3B, was used as *in vitro* models. We used liposomes and low density lipoprotein (LDL) as Hyp carrier, and study the impacts of different Hyp formulation on cellular uptake, subcellular localization, and Hyp PDT induced cell death mechanisms.

Methods

In this study, Hyp entrapped liposomes composed of 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DSPC) and cholesterol (Chol) with or without addition of

different amounts of cationic lipid ,stearylamine (SA), The follow liposomal formulation were tested : SA0 (molar ratio: 0), SA0.25 (molar ratio: 0.25), SA0.5 (molar ratio: 0.5) and SA1.0 (molar ratio: 1.0).The particle size, Zeta potential and Hyp encapsulation of liposomal Hyp were determined by Zetasizer and spectrofluorometer. The liposomes storage and light irradiation stability were also assessed. *In vitro* study, we examined cellular uptake capacity of Hyp, Hyp-LDL and liposomal Hyp in serum-free medium for 3h by flow cytometry. We used fluorescence image, MTT assay, flow cytometry and western blotting to observe subcellular localization of Hyp and cell death mechanisms induced by PDT treatment.

Results

Size distribution of liposomes were comparable between four groups for SA0 (183.57 ± 6.80 nm), SA0.25 (181.53 ± 10.55 nm), SA0.5 (174.87 ± 4.26 nm) and SA1.0 (177.90 ± 15.50 nm). In the result of encapsulation efficacy: SA0 (0.094 ± 0.003 μmole Hyp/mg DSPC), SA 0.25 (0.067 ± 0.003), SA 0.5 (0.085 ± 0.006), SA1.0 (0.078 ± 0.010), SA0 and SA0.5 is higher than other groups.

In vitro study, Hep3B incubated with different Hyp formulation for 3h in serum-free medium, the extent of uptake is Hyp > Hyp-LDL > SA0 > SA0.25≅SA0.5≅SA1.0. Confocal microscopy confirmed the subcellular localization of different Hyp formulation, Hyp mainly colocalized with endoplasmic reticulum (ER) and Golgi apparatus in all Hyp formulation groups. For Hyp, Hyp-LDL and SA0 groups, the fluorescence was found to be diffuse. However, cationic liposomes show granular fluorescence and some colocalize with lysosome specific dye, LysoSensor. The result of Hyp PDT induced cytotoxicity showed at 24h after Hyp PDT treatment: Hyp > Hyp-LDL > SA0 > SA0.25 ≅ SA0.5 ≅ SA1.0, then we used IC₅₀ dose of Hyp (Hyp 28.26 nM、Hyp-LDL 45.26 nM、SA0 83.20 nM、SA0.25 522.89 nM、SA0.5 551.26

nM、SA1.0 635.16 nM) at 2 J/cm² to do following experiment. After Hyp PDT treatment, compared with control, cytosolic calcium concentration were significantly increase (Hyp— 3.18 ± 0.78 ($p < 0.01$)、Hyp-LDL— 4.33 ± 0.16 ($p < 0.001$)、SA0— 4.29 ± 0.42 ($p < 0.001$)、SA0.5— 3.38 ± 0.50 ($p < 0.01$)) and the percentage of Sub-G1 phase (apoptosis) of cell cycle were raise (Hyp ($22.36 \pm 8.67\%$; $p < 0.05$)、Hyp-LDL ($18.75 \pm 7.64\%$; $p < 0.05$)、SA0 ($16.41 \pm 2.97\%$; $p < 0.01$)、SA0.5 ($18.76 \pm 3.42\%$; $p < 0.01$)) after Hyp PDT treatment, ER-stress marker, C/EBP homologous protein (CHOP) and glucose-regulated protein 78 (GRP-78) were up-regulation, in caspases cascade, caspase-3 and PARP was also cleaved and activated. However, the autophagic marker, LC3I/LC3II (microtubule associated protein light chain 3 I/II), LC3II protein level was not affected by Hyp PDT treatment in Hep3B cell.

Conclusion

In summary, Hyp mainly localized with ER and Golgi apparatus in all Hyp formulation groups, We found Hyp PDT treatment could induce ER-stress (CHOP and GRP-78 were up-regulation) and led to apoptosis (caspase-3 and PARP was also cleaved and activated) in Hep3B cell. Cationic liposomes showed some colocalization with lysosome. However, there is no different between Hyp formulations in apoptosis signal. In the future, in order to improve tissue selectivity and therapeutic efficacy of Hyp formulation, we would study the size, charge and surface modification of liposomes, and the ratio of concentration of LDL to Hyp, there be a great improvement in the application and development in the field of PDT.

Key word : photodynamic therapy, hypericin, low density lipoprotein, liposomes, subcellular localization, apoptosis.

目錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	IV
圖目錄.....	XI
表目錄.....	XII
英文名詞與簡稱對照表.....	XIII
第壹章 文獻探討	1
1. 光動力治療 (Photodynamic Therapy ; PDT)	1
1.1 光動力治療發展史.....	1
1.2 光動力治療之作用機制.....	3
1.3 光動力治療所引起之細胞死亡.....	5
1.3.1 細胞凋亡 (Apoptosis)	5
1.3.2 細胞自噬 (Autophagy)	7
1.3.2 細胞壞死 (Necrosis)	8
2. 微脂粒 (Liposome).....	10
2.1 微脂粒的組成.....	10
2.2 微脂粒的特性與分類.....	10
2.2.1 微脂粒粒徑.....	10
2.2.2 微脂粒表面電荷.....	11
2.2.3 微脂粒於體內穩定性及表面修釋.....	11
2.3 微脂粒和細胞的交互作用.....	12
2.3.1 接觸釋放 (Contact-release)	12
2.3.2 吞噬作用 (Endocytosis)	12
2.3.3 融合 (Fusion)	12
2.3.4 膜組成交換 (Intermembrane Transfer)	13

2.4 轉相溫度 (Phase transition temperature)	13
3. 金絲桃素 (Hypericin) 綜述	14
3.1 金絲桃素簡介	14
3.2 金絲桃素特性	14
3.3 金絲桃素光動力處理後引起的細胞死亡	15
4. 脂蛋白 (Lipoprotein)	17
第貳章 研究動機	18
第參章 實驗材料	19
1. 實驗藥品	19
2. 抗體	21
3. 實驗儀器	22
第肆章 實驗方法	24
1. 微脂粒製備與分析	24
1.1 Liposomal Hypericin 製備	24
1.2 微型管柱之製備與應用	24
1.3 微脂粒粒徑及電荷測量	25
1.4 微脂粒之 Hypericin 包覆測量	27
1.5 微脂粒之 DSPC 含量測定	28
1.6 微脂粒包覆率計算	28
1.7 微脂粒穩定性分析	29
1.7.1 保存穩定性分析	29
1.7.2 光照穩定性分析	29
1.8 微脂粒轉相溫度測定	29
2. 細胞實驗	30



2.1 細胞培養.....	30
2.2 細胞計數.....	30
2.3 光照處理.....	30
2.4 細胞毒性分析.....	32
2.5 細胞內 Hypericin 含量測定.....	33
2.6 Hypericin 於細胞內之分布.....	34
2.7 細胞內鈣離子濃度測定.....	35
2.8 細胞凋亡測定.....	36
2.9 西方墨點法.....	36
第五章 實驗結果	40
1. 微脂粒樣品定性及定量.....	40
1.1 微脂粒粒徑、電荷及轉相溫度測量.....	40
1.2 微脂粒之 Hypericin 包覆率分析.....	41
1.3 微脂粒保存穩定性.....	42
1.4 微脂粒光照穩定性測量.....	44
2. 細胞對各類 Hypericin 製劑之攝取分析.....	45
3. 各類 Hypericin 製劑之胞內胞器分布比較.....	47
4. 各類 Hypericin 製劑之細胞毒性分析.....	53
5. 各類 Hypericin 製劑之胞內鈣離子濃度檢測.....	59
6. 各類 Hypericin 製劑對細胞週期及細胞凋亡影響.....	61
7. 各類 Hypericin 製劑對細胞凋亡及其相關蛋白表現之影響.....	64
8. 各類 Hypericin 製劑對細胞自噬相關蛋白表現之影響.....	67
第六章 討論	69
第七章 結論與未來發展方向	77

參考文獻.....78

附錄

附錄一、金斯桃素成份分析.....84
附錄二、低密度脂蛋白產品資訊.....85
附錄三、DSPC 產品資訊.....86
附錄四、Cholesterol 產品資訊.....87



圖目錄

圖一、光動力治療作用機轉.....	3
圖二、細胞凋亡機制.....	6
圖三、細胞自噬過程圖.....	8
圖四、Hypericin 結構式.....	14
圖五、Hypericin 光動力處理後所引發細胞死亡機制圖.....	16
圖六、微型管柱組裝圖.....	25
圖七、光照儀器 (96 孔盤圖).....	31
圖八、光照儀器 (6 公分培養皿) 圖.....	32
圖九、細胞毒性測試(MTT)實驗流程圖.....	33
圖十、胞內鈣離子測定實驗流程圖.....	35
圖十一、微脂粒保存穩定性分析.....	42
圖十二、光照對各類微脂粒製劑的影響.....	44
圖十三、在各類實驗條件下，Hep3B 細胞之 Hypericin 的攝取情形.....	45
圖十四、Hypericin 於各類實驗條件下於 Hep3B 細胞內胞器之分布.....	48
圖十五、Hypericin 光動力處理後 Hep3B 細胞之細胞毒性分析.....	54
圖十六、Hypericin 光動力處理後 Hep3B 細胞之胞內鈣離子濃度分析.....	59
圖十七、Hypericin 製劑經光動力處理後 Hep3B 細胞之細胞週期及細胞凋亡分析.....	62
圖十八、各類 Hypericin 製劑光動力處理後之細胞凋亡相關蛋白之表現.....	64
圖十九、各類 Hypericin 製劑對細胞自噬相關蛋白表現之影響.....	67
圖二十、各胞器光傷害後所引起的細胞凋亡.....	71
圖二十一、正電荷脂質結構比較圖.....	75

表目錄

表一、已上市或臨床試驗中之光敏感劑.....	2
表二、各類細胞死亡模式間之比較.....	9
表三、光照儀器(96孔盤)強度及時間表.....	31
表四、光照儀器(6公分培養皿)強度及時間表.....	32
表五、胞器染劑之激發與放射光波長比較.....	35
表六、各類微脂粒粒徑、電荷及轉相溫度比較.....	40
表七、各類微脂粒 Hyp 及 DSPC 包覆率.....	41
表八、各組製劑於 2 J/cm^2 光照強度下之 IC_{50}	53



英文名詞與簡稱對照表

縮寫	全稱
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor 1
Atg	Autophagy-related genes
BSA	Bovine serum albumin
Chol	Cholesterol
CHOP	C/EBP homologous protein
Cyto c	Cytochrome c
DLS	Dynamic Light Scattering
DSPC	1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
ER	Endoplasmic reticulum
EU	European Union
FDA	Food and drug administration
FBS	Fetal bovine serum
GRP-78	Glucose-regulated protein 78
GM1	Monosialoganglioside
HDL	High density lipoprotein
HpD	Haematoporphyrin derivative
Hyp	Hypericin

IAP	Inhibition of apoptosis protein
IUV	Intermediate unilamellar vesicle
LUV	Large unilamellar vesicle
LED	Light emitting diode
LDL	Low density lipoprotein
LC3	Microtubule associated protein light chain 3
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
MTT	Thiazolyl blue tetrazolium bromide
MPS	Mononuclear phagocyte system
PTS	Photosensitizer
PI3K	Phosphatidylinositol-3 kinase
PE	Phosphatidylethanolamine
PEG	Polyethylene glycol
SERCA2	Sarco (endo) plasmic-reticulum Ca^{2+} -ATPase 2
SA	Stearylamine
SUV	Small unilamellar vesicle
TNF	Tumor necrosis factor
VLDL	Very low density lipoprotein



第壹章 文獻探討

1. 光動力治療 (Photodynamic Therapy ; PDT)

1.1 光動力治療發展簡史

在 1900 年 Oscar Raab 就曾發現，當草履蟲在含 acridine 的環境下給予適當光照，便會造成草履蟲的死亡。同年，Prime 也發現服用 eosin 的癩癩病患，在陽光暴露後的局部皮膚有發炎的現象。直到 1903 年，Tappeiner 及 Jesionek 首次使用了 eosin 及白光於皮膚癌患者的治療上，他們更進一步發現，這樣的光敏感化反應需要氧氣的參與，便將這樣的反應過程稱為光動力作用(photodynamic action)；但可惜的是，這樣的發現在當時並未引起太多的關注[1]。而後於 1950 至 1960 年 Schwartz 和 Lipson 製備出 haematoporphyrin derivative (HpD)，HpD 除了光動力作用外，更兼具螢光的特性且能選擇性的累積在腫瘤細胞中，深具發展治療及診斷腫瘤的潛力。在 1976 年，Kelly 和同僚們首次應用 HpD 於膀胱癌患者的檢測及治療[2]。Dougherty 更於 1978 年利用 HpD 進行了大規模的臨床研究，並且得到了令人振奮的結果，從此光動力治療便漸漸受到重視且廣泛的研究[2-3]。終於在 1998 年，第一個光敏感 porfimer sodium (Photofrin[®]) 被核准用於治療早期肺癌，至今更發展出多種光敏感藥品，針對不同的病症以達到治療或診斷之目的[4](下表一)。

表一、已上市或臨床試驗中之光敏感劑[4]

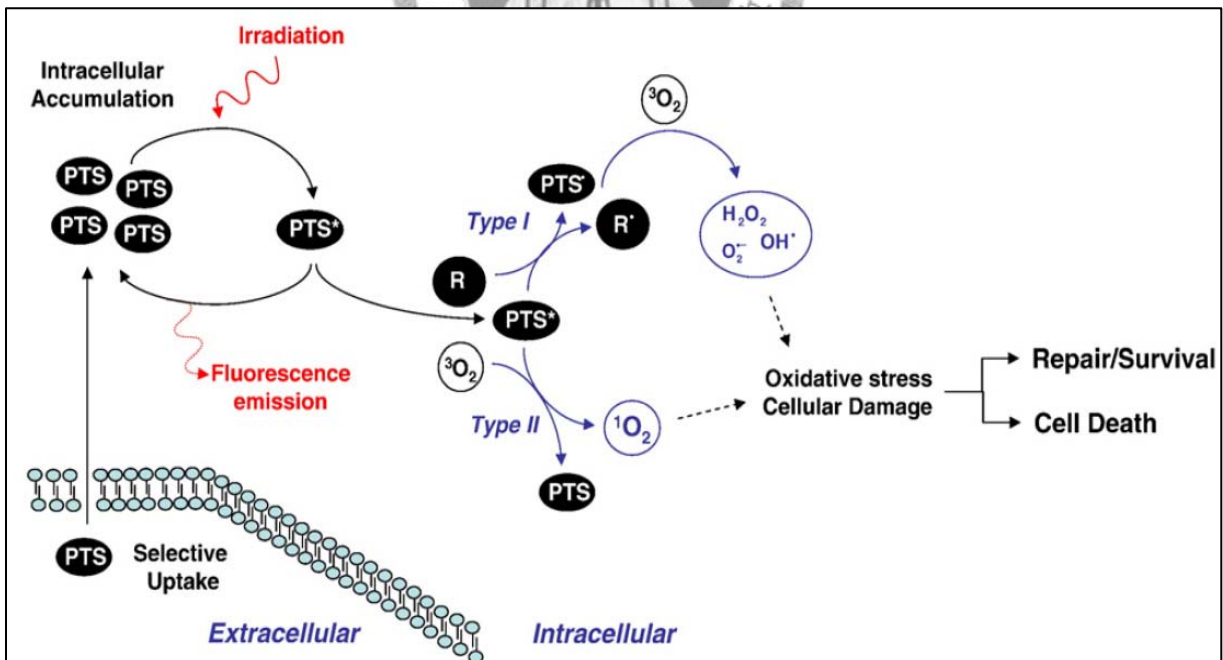
光敏感劑	商品名	核准情形	激發波長 (nm)	給藥-光照 間隔	排除時 間	治療部位
Porfimer sodium	Photofrin	1998 , 2003 (FDA)	630	48-150 h	4-6 weeks	Lung , Barrett's esophagus
δ -aminolevulinic acid-protoporphyrin IX (ALA-PpIX)	Levulan Keratastick	1999 (FDA)	405 , 635	14-18 h	~2 days	Actinic keratosis(AK)
Methyl aminolevulate- PpIX	Metvix	2004 (FDA)	405 , 635	3 h	~2 days	Actinic keratosis(AK)
Hexyl aminolevulate- PpIX	Hexivx	2005 (EU)	405	1-3 h	~2 days	Detection of bladder tumors
Benzoporphyrin derivative monoacid (BPD-MA)	Verteporin	2000 (FDA)	689	15 min	5 days	Choroidal neovascularization (CNV)
Tetra (m -hydroxy- phenyl) chlorin (mTHPC)	Foscan	Phase I trials , 2001 (EU)	652	48-110 h	48-110 h	Head and neck , prostate , pancreas , esophagus , mesothelioma
Motexafin Lutetium	MLu	Phase I trials	732	3 h		Prostate , atherosclerosis
Pd-bacteriopheophorbide	Tookad	Phase I trials	762	~30 min	~2 h	Prostate
Talaporfin sodium	LS11	Phase I and II trials	664	1 h		CNV , liver and colorectal metastasis
Silicon phthalocyanine 4	PC-4	Phase I trials	672	24-36 h		Skin

註： Food and Drug Administration (FDA)

European Union (EU)

1.2 光動力治療之作用機制

光動力治療是由光敏感劑 (photosensitizer; PTS)、適當波長的光及氧氣所組成；經由全身性或局部給藥後，使特定的細胞或組織吸收光敏感劑，再給予適當波長之光照，而光敏感劑吸收了光子便會由原本的基態躍升至激發態 (PTS*)，激發態之光敏感劑可經由放射螢光的方式回復至基態，或是經由系統內轉移 (intersystem crossing) 形成較穩定之三重激發態 (triplet excited state)，三重激發態之光敏感劑便透過第一型反應 (type I reaction) 和細胞內其他物質進行電子轉移，以產生 superoxides 及 hydrogen peroxide；或是經由第二型反應 (type II reaction) 透過能量轉移使氧分子能階的改變以形成單態氧 (singlet oxygen) [5]，第一型及第二型反應幾乎是同時發生，其兩種反應的比例會因不同之光敏感劑而有所差異。經由第一型及第二型反應所產生之自由基和活性態氧便會造成細胞的傷害，當這些傷害超過細胞的修復範圍便會造成細胞的死亡。



圖一、光動力治療作用機轉[5]

PTS : Photosensutuzer

PTS* : Excited photosensutuzer

R : Cellular substrates

光動力治療可透過下列三種機制造成腫瘤的破壞：

I. 直接毒殺腫瘤細胞 (direct tumor cell killing)

光動力治療可直接經由前述第一型及第二型反應，於腫瘤細胞內產生大量之自由基和單態氧，但因單態氧的擴散距離短（約 20 nm）[6]且持續時間短（約 $10^{-6}\sim 10^{-9}$ s）[7]，故光敏感劑於細胞內的標的位置顯得相對重要，因在照光後，此因素幾乎決定了細胞首要破壞位置及其後續機制及反應，進而影響細胞的死亡方式：細胞凋亡（apoptosis）、細胞自噬（autophagy）或細胞壞死（necrosis）[5]。

II. 血管傷害 (vascular damage)

腫瘤的生長需仰賴血管提供足夠的氧氣及養份，光動力治療可透過血管的破壞和血栓的形成，造成血液流動的靜止，使腫瘤產生缺氧及限制對腫瘤養份的提供，進而抑制了腫瘤細胞的生長[8-9]。

III. 免疫反應 (immune response)

光動力治療可透過調控宿主之免疫反應，以達到抵制腫瘤生長的效果。最近研究發現，光動力治療可於標的之作用位置引起局部之發炎反應，以引發宿主之免疫反應產生，進而吸引樹狀細胞（dendritic cells）、中性粒細胞（neutrophils）、肥大細胞（mast cells）及巨噬細胞（macrophages）至發炎部位，這些細胞接著便會產生更多發炎介體（inflammatory mediators）引起更多免疫細胞至光動力作用部位，藉著這些局部或全身性的免疫反應，不僅可以造成局部腫瘤組織的破壞，更可以阻止癌細胞的復發及轉移[10]。

1.3 光動力治療所引起細胞死亡之機制

1.3.1 細胞凋亡 (Apoptosis)

細胞凋亡一詞源於拉丁文中代表”凋零”的意思，最早在 1960 年代後期，由 John Kerr 所觀察到，他稱之為”皺縮的細胞壞死”，之後於 1971 年命名為”細胞凋亡”[11]。細胞凋亡又稱作程式性死亡，真核多細胞生物在發育過程之中，除了產生新的細胞之外，也必需伴隨一些衰老細胞的死亡，細胞的增生與死亡必須維持在平衡狀態，以利生命體的正常生長，而細胞凋亡便在這樣的平衡中扮演重要角色。當細胞開始進行細胞凋亡，其特徵包括：細胞的皺縮、染色體濃縮及片段化，最後細胞分裂成多個不對稱之凋亡小體 (apoptotic bodies)，而這些凋亡小體便會被鄰近細胞或巨噬細胞所吞噬[12]，由於過程中細胞膜仍保持完整，故細胞內之物質並不會釋出而引起發炎反應[13]。

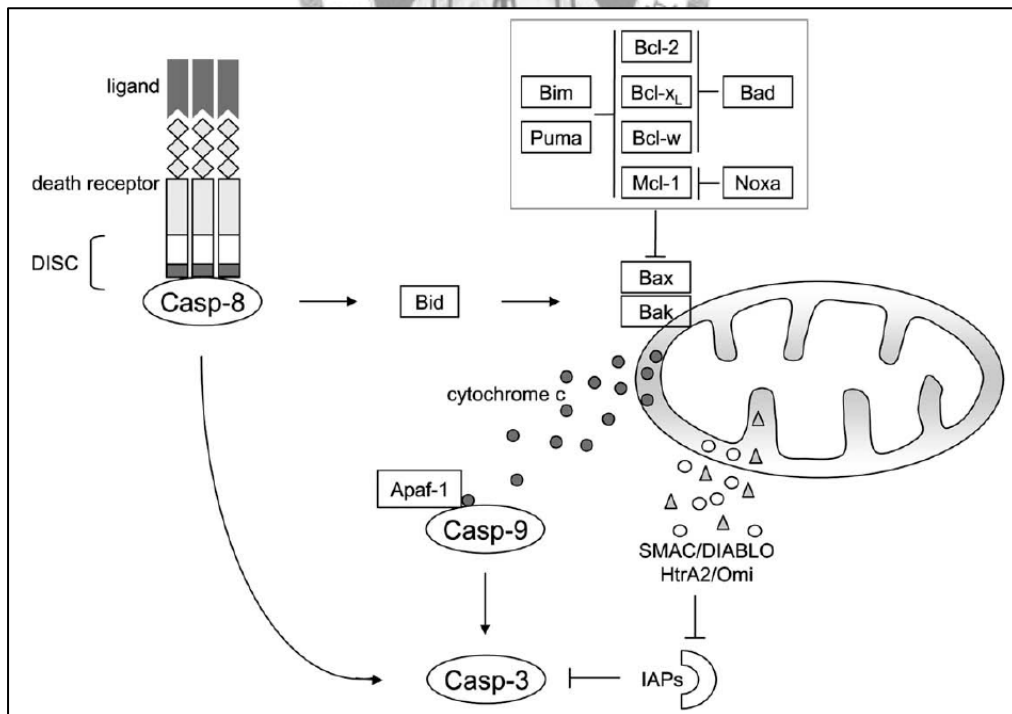
細胞凋亡的機制是由一系列半胱氨酸蛋白酶 (cysteine protease)，稱 caspases 所調控，這類的蛋白平常以不活化 (procaspase) 的型式存在於細胞質[14]。Caspase 可區為兩類，一類為啟始型 (initiator caspases)：常見的有 caspase-8 及 caspase-9，另一類為作用型 (effector caspases)：常見的有 caspase-3、caspase-6 及 caspase-7。一般而言，initiator caspases 可經由切割的方式活化 effector caspases，而活化的 effector caspases 便可去切割細胞內其他蛋白，使細胞走向細胞凋亡[15]。

細胞凋亡之機制可分為兩類 (圖二)：內生性路徑 (intrinsic pathway) 及外生性路徑 (extrinsic pathway)。

內生性路徑 (intrinsic pathway)：當細胞內之生長因子缺乏、染色體受損或氧化壓力的傷害，便會使粒線體外膜之通透性上升，進而造成一些促進細胞凋亡蛋白由粒線體釋放至細胞質，如 cytochrome c，而 Bcl-2 家族蛋白可調控此步驟的反應；Bcl-2 蛋白家族可區分為抑制細胞凋亡成員 (例如 Bcl-2、Bcl-x_L、Bcl-w 及 Mcl-1 等) 及促進細胞凋亡成員 (例如 Bid、Bim、Bad、Noxa 及 Puma)，其中促進細胞凋亡成員，如 Bax 及 Bak 可透過 oligomerization 或是透過其他促進細胞凋亡成員，

如：Bid 的結合而活化，使粒線體外膜上形成孔洞，促進 cytochrome c 由粒線體釋放至細胞質，而抑制細胞凋亡成員便可抑制這些促進細胞凋亡成員的作用，進而穩定粒線體的功能[16-18]；當 cytochrome c 由粒線體釋放至細胞質，便會和 apoptotic protease-activating factor 1 (Apaf-1)、ATP 及 procaspase-9 形成 apoptosome，進而造成 caspase-9 的自切割而活化，活化的 caspase-9 便會進一步活化下游其他 effector caspases[19-20]。

外生性路徑(extrinsic pathway):此路徑需要外來或內生的 ligand 與死亡受體(death receptor)結合，接著便引發死亡受體的 death domain 和接合蛋白及 initiator caspases (如：caspase-8) 的結合，此一複合體便稱作 death-inducing signaling complex (DISC)，接著便導致 caspase-8 迅速活化，活化的 caspase 8 可選擇直接活化下游的 effector caspases，或去切割存在於細胞質中的 Bid 蛋白造成 Bid 的活化，促使 Bax 或 Bak 蛋白活化，亦可造成 cytochrome c 由粒線體釋放至細胞質[21-22]。



圖二、細胞凋亡機制[16]

DISC : Death-inducing signaling complex

IAP : inhibition of apoptosis protein

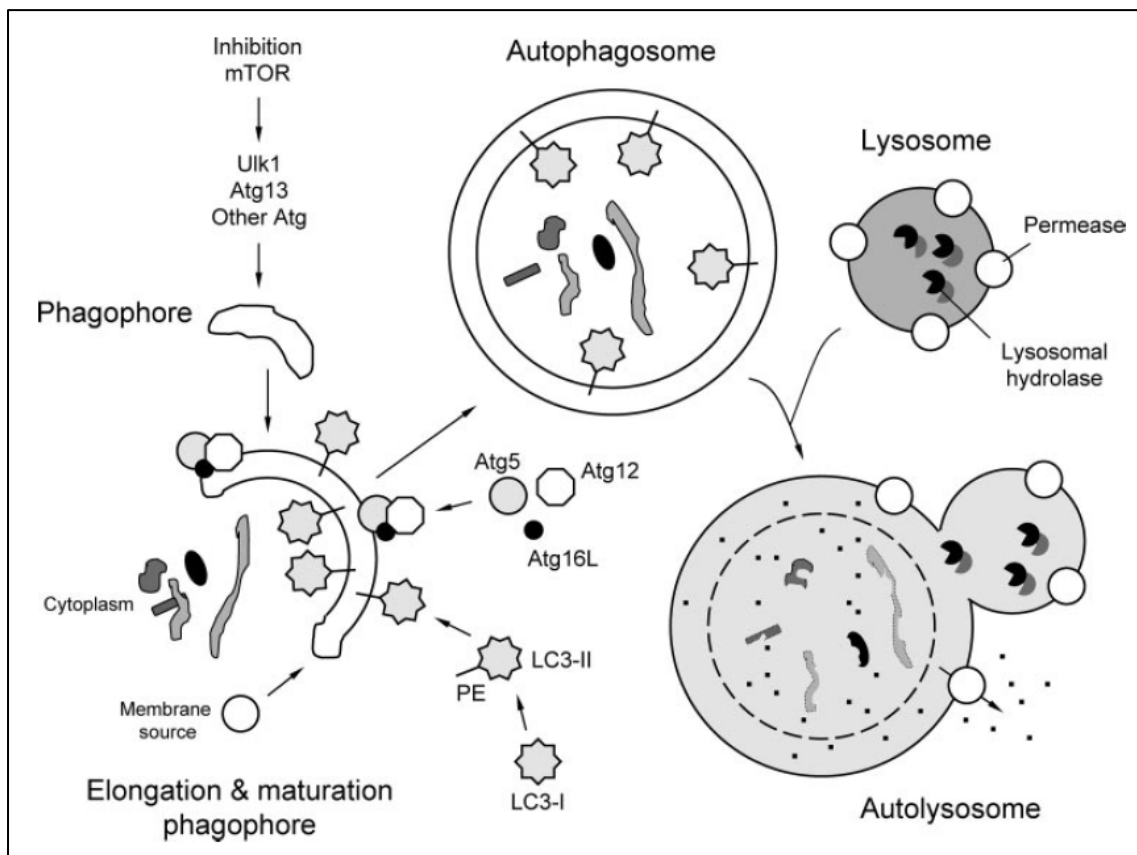
上述兩條路徑最終都將造成 effector caspases (如：caspase-3) 的活化，effector caspases 的活化其實仍會被細胞內其他蛋白質所抑制 (如：inhibition of apoptosis protein；IAP)，但當粒線體外膜的通透性增加時，SMAC/DIABLO 或 HtrA2/Omi 也會由粒線體釋放至細胞質並抑制 IAPs，使 effector caspases 能夠完全活化，並使細胞最終走向細胞凋亡[23-24]。

1.3.2 細胞自噬 (Autophagy)

細胞自噬是一種細胞用以抵禦及適應環境變化進而促進細胞存活的機制，當細胞處於養份缺乏或是缺氧的環境下，細胞便會透過細胞自噬將胞內蛋白或胞器降解，並將分解後產生的脂肪酸及胺基酸重新回收利用，它也可以幫助細胞移除受損的胞器、毒性代謝物和病原體[25-26]；然而，當細胞自噬的機制持續進行到最後，細胞也可能會因為胞內的胞器及蛋白質被分解殆盡而造成細胞的死亡。

在酵母菌細胞自噬的研究中即發現超過三十個和細胞自噬相關的基因 (autophagy-related genes；Atg)，其中大多數基因也可在哺乳類動物中發現，這表示在演化過程中，細胞自噬的相關機制也在哺乳類動物中被完整的保存下來。當細胞處於養份充足的環境下，環境中所存在的生長因子便會造成 class I phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) 的活化，進而造成 mammalian target of rapamycin(mTOR) 的活化，活化的 mTOR 便會抑制細胞自噬的啟始調控因子 Atg1 (在哺乳動物中稱為 Ulk1) 進而抑制細胞自噬的進行；一旦細胞處於養份缺乏或是 mTOR 抑制劑存在環境下，Atg1/Ulk1 便不再受 mTOR 的抑制而和其它 Atg 蛋白 (如：Atg13 及 Atg17) 形成一複合物而誘發細胞自噬的進行 (圖三)，當細胞自噬開始進行，便會於細胞質內隔離出雙層膜狀結構物，此膜狀結構物的來源目前尚未明確，但最近研究指出此結構可能來自細胞質內早已存在的膜狀物 (稱作 phagophore)，接著 phagophore 便會透過 Atg12-Atg5-Atg16 複合物及 microtubule associated protein light chain 3 II (LC3-II) 的結合而開始擴大並漸漸將細胞質中的部份蛋白及胞器包住，形成自噬泡 (autophagosome)，此步驟中 LC3-II 的結合是

細胞自噬研究上一項重要的特徵，LC-3 一開始於細胞質合成出便會立即被 Atg4 進行切割而形成 LC3-I，LC3-I 蛋白在形成自噬泡的過程中其 C 端會和 phosphatidylethanolamine (PE) 結合而形成 LC3-II；最後自噬泡便會和溶酶體 (lysosome) 進行融合而形成自噬溶酶體 (autolysosome)，溶酶體水解酵素 (lysosomal hydrolase) 便會將自噬溶酶體內的蛋白及胞器降解，並將降解後產生的脂質及胺基酸經由自噬溶酶體膜上之透性酶 (permease) 釋放至細胞質[27-31]。



圖三、細胞自噬過程圖[28]

mTOR : Mammalian target of rapamycin

Atg : Autophagy-related genes

LC3 (I/II) : Microtubule associated protein light chain 3 (I/II)

PE : Phosphatidylethanolamine

1.3.2 細胞壞死 (Necrosis)

細胞壞死其外觀上可見細胞和胞器的腫漲及細胞膜的破裂，最終導致細胞內的細胞激素及有毒物質釋放至鄰近組織，並引起嚴重的發炎反應，一般而言細胞

壞死是一種被動及非調控性的死亡方式，但最近研究發現在 caspases 被抑制的環境下，腫瘤壞死因子（tumor necrosis factor；TNF）與死亡受體（Fas receptor）的結合亦能夠促進細胞壞死的進行[5, 32]。

當細胞死亡時，其死亡模式大都不會僅有單一方式，而是以多種並存的模式進行，藉由了解各種細胞死亡的特徵（表二），可清楚了解經由光動力治療處理後細胞的主要死亡方式與機轉。

表二、各類細胞死亡模式間之比較

死亡模式	特徵
細胞凋亡	 <ol style="list-style-type: none"> 1. 染色質濃縮 2. DNA 片段化 3. 細胞膜皺縮 4. 細胞形態變圓
細胞自噬	<ol style="list-style-type: none"> 1. 大量囊泡累積在細胞質 2. 無染色質濃縮
細胞壞死	<ol style="list-style-type: none"> 1. 細胞及胞內胞器腫脹 2. 細胞膜破裂 3. 中度染色質濃縮

2. 微脂粒 (Liposome)

微脂粒的概念最早於 1965 年由 Bingham 首先提出，之後 Sessa 及 Weissmann 將這磷脂質的小球體正式命名為微脂粒 (liposome)，一開始微脂粒僅是應用於細胞膜的研究，一直到了 1970 年代，才開始將微脂粒應用於藥物遞送方面的研究 [33]。微脂粒的包覆可以減少藥物的毒性並改善治療效率，加上微脂粒是生物相容性 (biocompatible) 的藥物載體其相對毒性較低，在應用上更可透過改變微脂粒的粒徑、電荷、組成及表面修釋產生多種不同特性及功能的微脂粒，故至今微脂粒在藥物遞送上仍被廣泛研究 [34]。

2.1 微脂粒的組成

微脂粒是由雙層磷脂質所組成，磷脂質為一種兩性分子 (amphipathic molecules)，由一端親脂的長鏈脂肪酸及一端親水的基團所構成，當磷脂質懸浮於水溶液時，便會因為親脂-親脂及親水-親水的交互作用下產生自組裝 (self-organize) 的現象，最後便形成磷脂質的親水端朝外，而親脂端朝內的圓形球體，其排列方式與細胞膜相似，這樣由磷脂質自組裝後所形成的囊包便稱作微脂粒。微脂粒因具有將內部溶質和外環境隔離的功能，故可應用於藥物傳遞，水溶性藥物會包覆於微脂粒中心親水的部份，脂溶性藥物則較傾向包覆於磷脂雙層間 [33, 35]。

2.2 微脂粒的特性與分類

2.2.1 微脂粒粒徑

微脂粒的粒徑範圍可由 25 nm~15000 nm，當粒徑小於 100 nm 時，微脂粒可直接穿過血管壁以進行藥物遞送，若微脂粒粒徑範圍為 50~200 nm 時，可選擇性的累積在腫瘤組織中。微脂粒的粒徑也和動物體內的穩定性及包覆率有關，粒徑較大的微脂粒有較大的水相包覆體積，雖然具有較大的包覆能力，但較容易被體內的單核吞噬系統 (mononuclear phagocyte system; MPS) 捕獲並從血液循環中清除。依據微脂粒的粒徑可分類為：Large unilamellar vesicle (LUV; 粒徑約為 1000

nm)、Intermediate unilamellar vesicle (IUV; 粒徑約為 100 nm) 及 Small unilamellar vesicle (SUV; 粒徑約為 25 nm) [36]。

2.2.2 微脂粒表面電荷

帶電荷的微脂粒可防止在儲存過程中聚集現象的出現，但帶電荷的微脂粒較中性微脂粒更易被體內的循環系統清除。依據微脂粒表面電荷可分類為：中性、負電荷及正電荷微脂粒。相對於中性及負電荷微脂粒，正電荷的微脂粒被廣泛的應用在 DNA 傳遞的研究上，其原因有：

(1) 正電荷的微脂粒易和帶負電的 DNA 形成複合物而不必完全包覆於微脂粒中以進行傳遞。

(2) 正電荷的微脂粒容易和負電的細胞膜交互作用以促進 DNA 的傳遞。

(3) 正電荷微脂粒和 DNA 所形成的複合物可幫助 DNA 抵抗細胞內酵素的降解。

但是正電荷微脂粒在血清中的穩定性低，因正電荷微脂粒易和血清中負電的分子作用導致 DNA 傳遞的效率降低[37]。

有研究指出細胞表面富含許多負電荷的基團（如：phosphate、carboxylate 及 sulfate），正電荷微脂粒可透過和這些負電荷基團產生氫鍵或靜電力促進細胞與正電荷微脂粒的結合，使正電荷微脂粒容易經由胞吞作用進入細胞中[38]。

2.2.3 微脂粒於體內穩定性及表面修釋

(1) 傳統微脂粒 (conventional liposome)

傳統微脂粒又稱作第一代微脂粒，由磷脂質所組成且表面未經修飾的單層或多層微脂粒，這類的微脂粒在血液中的半生期大都較短，因為微脂粒容易被血中的調理素 (opsonins) 附著其表面接著便被單核吞噬系統所辨識並吞噬，血液中高密度脂蛋白 (High density lipoprotein; HDL) 也會與微脂粒產生脂質交換 (lipid exchange)，使微脂粒包覆的藥物釋出至血液中。藉由在微脂粒的組成中加入膽固醇 (cholesterol) 或是使用具有飽和脂肪酸鏈的磷脂質可以增加微脂粒在血液中的半生期及穩定性[39]。

(2) 長效循環型微脂粒 (long-circulating liposome)

長效循環型的微脂粒是在傳統微脂粒的表面進行修飾以增進微脂粒於血液循環系統中的穩定性。在微脂粒表面添加親水性的聚合物 (hydrophilic polymer) 或是醣脂分子 (glycolipid)，如：polyethylene glycol (PEG) 或 monosialoganglioside (GM1)，利用這些分子在微脂粒表面形成保護層，降低調理素與微脂粒的結合，進而減少單核吞噬系統的辨識與清除，使微脂粒於循環系統中的半生期延長數倍至百倍。

長效循環型微脂粒可逐漸累積在體內的某些器官及組織中，特別是在腫瘤組織，因為腫瘤組織的血管發育並不完整且缺乏具正常的淋巴系統，因此由血管外滲至組織的微脂粒便無法再回到循環系統，使得微脂粒漸漸累積在腫瘤組織中，此現象便稱作 enhanced permeability and retention (EPR) effect[34]。

(3) 標的型微脂粒 (targeted liposome)

為了進一步增加微脂粒藥物在特定組織或器官的累積以減少藥物副作用的產生，便發展出具有高度選擇性的標的型微脂粒。標的型微脂粒便是在傳統微脂粒或長效循環型微脂粒表面進行修飾，使微脂粒表面接上抗體、配體、生長因子或醣蛋白等分子，藉此不同的修飾以達到高度組織或器官標的選擇性，並降低藥物產品的副作用[40]。

2.3 微脂粒和細胞的交互作用

微脂粒可和細胞產生許多不同的交互作用，並透過多種路徑將包覆的藥物送入細胞中[41]：

2.3.1 接觸釋放 (Contact-release)

微脂粒和細胞接觸後，會使微脂粒的通透性增加，造成微脂粒水相藥物的釋出，這些藥物便會進一步進入細胞中，在某些特定的條件下，接觸釋放便會產生，例如當微脂粒的組成中含 30 莫耳百分比的膽固醇時，此現象便會容易發生。

2.3.2 吞噬作用 (Endocytosis)

細胞將微脂粒攝入胞內，形成內質體 (endosome)，接著內質體便會和溶小體融合，並在 pH 約 4.5 的環境下將微脂粒進行分解，並釋出微脂粒內容物，但在某些情況下也可能會將包覆藥物釋出至細胞質。當微脂粒表面帶有特殊抗體或配體，可藉由和細胞上受體的結合，以促進吞噬作用的進行。

2.3.3 融合 (Fusion)

當微脂粒和細胞距離夠短時，微脂粒和細胞膜產生融合，使微脂粒的脂質成份混入細胞膜，並將水相藥物送入細胞質；體外實驗發現，融合劑 (fusogens) 可促始融合的進行，常見融合劑有 lysolecithin、detergent 及 surfactant，但這些融合劑大都具有較大的細胞毒性，其他方法如使用仙台病毒融合蛋白 (sendai virus fusion protein) 當作促進融合的媒介或是在微脂粒的組成中加入油酸 (oleic acid) 及正電荷的脂質亦可達到促進融合的目的。

2.3.4 膜組成交換 (Intermembrane Transfer)

當微脂粒和細胞非常靠近時，便會發生部份脂質互換的現象，膜組成的交換可能是透過細胞膜上特定蛋白所驅動，此種現象通常是雙向的，脂質互換並不會造成微脂粒的破壞。微脂粒和脂蛋白也會發生類似的現象，但微脂粒和脂蛋白間產生的膜組成交換往往會造成微脂粒的破壞，其破壞程度會依據微脂粒和脂蛋白比例的不同而有所差異。

2.4 轉相溫度 (Phase transition temperature)

轉相溫度 (T_m) 是磷脂質分子從原本緊密排列的固態轉變為液態的溫度， T_m 會因磷脂質的脂肪酸碳鏈的碳數及不飽和鍵數而有所不同，一般而言來說當碳鏈數越高及不飽和鍵數越低時，磷脂質的 T_m 便會隨之增加。磷脂質的 T_m 和微脂粒的製造及應用有很大的關聯，藉由了解磷脂雙層膜的 T_m ，有利於評估磷脂雙層膜的通透性、聚集、蛋白質結合能力[42]。

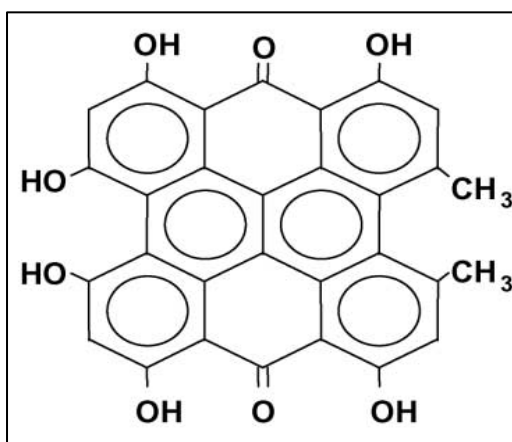
3. 金絲桃素 (Hypericin) 綜述

3.1 金絲桃素簡介

金絲桃素 (hypericin ; Hyp) 萃取自金絲桃草 (*Hypericum perforatum*) ; 金絲桃草又稱作貫葉連翹或聖約翰草 (St. John's wort) , 是一種多年生藥用草本植物 , 具有金黃色般的花朵 , 生長高度約為 30~90 公分。Hyp 為金絲桃草的二級代謝物 , 其功能目前尚未了解 , 但目前研究推測可能與金絲桃草的防止蟲害有關[43]。

3.2 金絲桃素特性

Hyp(1,3,4,6,8,13-hexahydroxy-10,11-dimethylphenanthro[1,10,9,8-apqr]perylene-7,14-dione) 結構 (圖四) 為 naphthodianthrone 的衍生物之一 , 分子量為 504.4。Hyp 在波長 200~600 nm 有多個螢光激發波峰 , 最大螢光放射波峰約為 600 nm , 在光動力治療的應用上最有效的激發波長範圍約為 590~610 nm , Hyp 在照光後具有高度螢光特性及光敏感性 , 故在光動力治療及光動力診斷 (Photodynamic diagnosis ; PDD) 應用上深具潛力 , 同時又具有較低的暗毒性 (dark toxicity) 等優點 , Hyp 目前已被廣泛用於抗腫瘤及抗病毒等研究 , 但唯因 Hyp 脂溶性高 , 於水相中易產生聚集的現象 , 降低光動力治療的效率[44]。

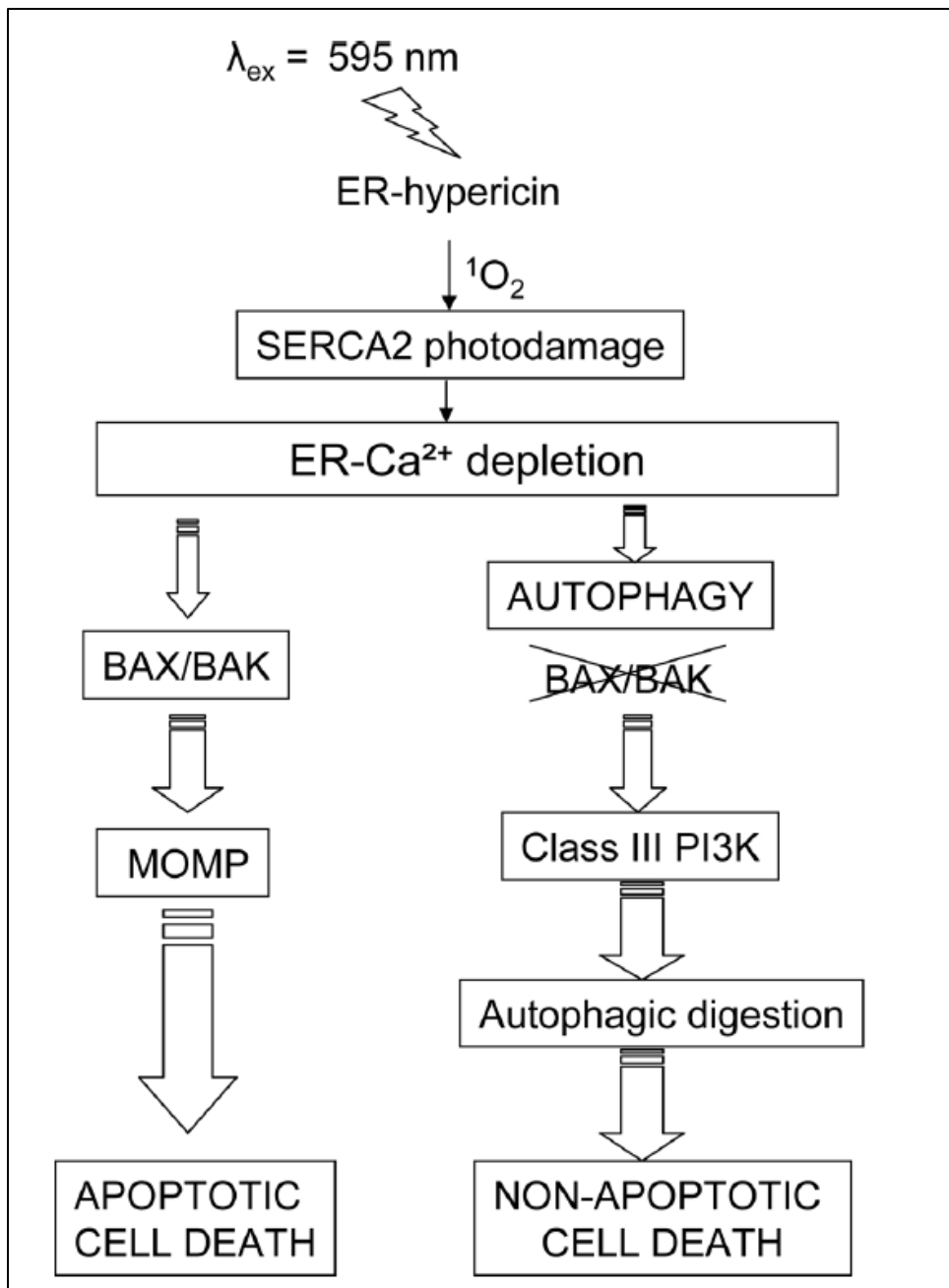


圖四、Hypericin 結構式

在光動力治療所引發的細胞死亡中，光敏感劑於細胞內的分布是一項重要的影響因素，光敏感劑於胞內的分不同，照光後往往也會造成細胞死亡方式的不同，基於 Hyp 高度親脂性的因素，使其進入細胞中傾向分布於胞內脂質膜上，如細胞膜、粒線體、內質網或高基氏體[45]，研究顯示當光敏感劑傾向分布於粒線體時，在光照後會迅速引發細胞凋亡的產生[46-48]；若分布於內質網及溶酶體亦發現有細胞凋亡現象，但當細胞凋亡的路徑被抑制時，細胞便會以細胞自噬的方式死亡[49-50]；若分布於細胞膜則傾向以細胞壞死的方式死亡[51]，光敏感劑於胞內的分布，會依據光敏感劑的種類及細胞的不同而有所差異，但也會受到血清內蛋白質的影響，如在培養液中含有低密度脂蛋白（low density lipoprotein；LDL）或是牛血清白蛋白（bovine serum albumin；BSA）亦會造成光敏感劑於胞內分布的不同[44]。

3.3 金絲桃素光動力處理後引起的細胞死亡

Hyp 於光動力處理後可引起細胞中訊息傳遞的進行，並決定細胞的生存或死亡，當 Hyp 及光照的劑量較高時，便會造成細胞內大量 ROS 的產生，並造成細胞迅速以細胞壞死的方式死亡；若透過調整 Hypericin 及光照的劑量，使適當量 ROS 產生，便可透過細胞凋亡的機制引起細胞走向細胞凋亡[43]。已有文獻指出 sarco (endo) plasmic-reticulum Ca^{2+} -ATPase 2 (SERCA2) 為 Hyp 光動力處理所標的主要蛋白（圖五）；SERCA2 為內質網上一種蛋白質，可透過 ATP 水解以將細胞質的鈣離子轉送至內質網，以維持胞內鈣離子濃度的恆定，因此，經由 Hyp 光動力處理可透過 ROS 的產生而造成細胞內質網上 SERCA2 蛋白的破壞，並使胞內鈣離子濃度的上升，接著 Bax/Bak 蛋白便轉位（translocation）至粒線体外膜上，使粒線体外膜通透性增加，並造成 cytochrome c 由粒線體釋出至細胞質，使細胞最終以細胞凋亡的方式死亡。但當 Bax/Bak 蛋白表現被抑制而無法轉位至粒線体外膜上，並引發後續細胞凋亡機制時，便會透過活化 class III PI3K 使細胞透過細胞自噬的方式死亡[50]。



圖五、Hypericin 光動力處理後所引發細胞死亡機制圖[50]

ER : Endoplasmic reticulum

SERCA2 : Sarco (endo) plasmic-reticulum Ca²⁺-ATPase 2

MOMP : Mitochondrial outer membrane permeabilization

PI3K : Phosphatidylinositol-3 kinase

4. 脂蛋白 (Lipoprotein)

在人體的血液循環系統中可透過脂蛋白運送脂溶性的脂質或其他物質。脂蛋白可依組成分類為四大類，包括：乳糜微粒 (chylomicron)、極低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein ; VLDL)、高密度脂蛋白 (high density lipoprotein ; HDL) 及低密度脂蛋白 (low density lipoprotein ; LDL)。

在多種脂蛋白中，LDL 所調控藥物之專一性運送及釋放至腫瘤細胞中扮演重要角色，因高度增生之癌細胞需要大量之膽固醇來源，以滿足合成細胞膜所需，故大部份癌細胞和正常細胞相比都具有大量之低密度脂蛋白的受體，藉以獲得大量之低密度脂蛋白，故在藥物遞送之設計上便可透過此一特性完成專一標的給藥之目的。利用 LDL 做為藥物載體，其優點包括[52]：

- (1) 因 LDL 為內生性之脂蛋白，故不會產生免疫反應，且可逃脫單核吞噬系統的辨識及吞噬，因此在血液循環系統中的半生期較長。
- (2) LDL 的大小約為 23 nm，可直接經由擴散方式直接通過血管壁。
- (3) LDL 中心組成份適合脂溶性藥物的攜帶，並可維持藥物在血液循環系統中的穩定，此外，在 LDL 中心傳遞的脂溶性藥物並不會影響細胞表面 LDL 受體的辨識。

第貳章 研究動機

光動力治療發展至今已有第一代光敏感藥物 profimer sodium 可用於臨床治療上，但因 profimer sodium 結構複雜且為多種結構之聚合物，使製備上不易掌控，加上激發光源波長較短，於組織穿透力有限，且易殘留於皮膚造成皮膚的光敏感副作用等缺點，故現今開始以單一結構化合物、可迅速由體內排除及較長波長的激發光源為目標，尋找第二代新興之光敏感劑。

本研究使用 Hyp 做為光敏感藥物，利用微脂粒包覆以改善 Hyp 的溶解度，並以 stearylamine(SA)使微脂粒帶有正電荷，目前已知正電荷微脂粒在 DNA 及 RNA 轉染已有很好的效果，但較少研究探討正電微脂粒在藥物遞送的效率及應用，有部份研究指出正電荷微脂粒可和細胞膜上的負電荷產生靜電作用，促使細胞將微脂粒吞噬至胞內，以促進藥物遞送的進行。另一方面，有研究指出當 Hyp 在 LDL 存在下可透過和 LDL 的結合以進行藥物傳遞，進而改變 Hyp 進入細胞的機制及原本於細胞內分布的特性，並可能進一步影響光動力治療後的結果[53]。

本研究即探討 Hyp 包覆於中性及正電荷微脂粒間的穩定性、包覆率及藥物遞送，並比較 Hyp 在中性及正電荷微脂粒包覆及 LDL 存在的環境下，是否可造成人類肝癌細胞株 Hep 3b 對 Hyp 的吸收、胞內分布及光動力治療結果的差異。

第參章 實驗材料

1. 實驗藥品

名稱	廠牌 / 產地
Hypericin	Alexis Biochemicals / Switzerland
1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine (DSPC)	Avanti Polar Lipids / U.S.A.
Cholesterol	Avanti Polar Lipids / U.S.A.
Fetal bovine serum (FBS)	Gibco / U.S.A.
Penicillin–Streptomycin (PS)	Gibco / U.S.A.
RPMI Media 1640	Gibco / U.S.A.
0.5% Trypsin-0.2% EDTA (w/v)	Gibco / U.S.A.
Potassium phosphate (KCl)	Sigma / U.S.A
Sodium bicarbonate (NaHCO_3)	Sigma / U.S.A
Sodium chloride (NaCl)	Sigma / U.S.A
Sodium phosphate (Na_2HPO_4)	Sigma / U.S.A
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma / U.S.A
Trypan Blue	Sigma / U.S.A
Ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA)	Sigma / U.S.A
Dithiothreitol	Sigma / U.S.A

Phenylmethyl-sulfonyl fluoride (PMSF)	Sigma / U.S.A
Leupeptin	Sigma / U.S.A
MitoTracker Green FM	Invitrogen / U.S.A.
NBD C ₆ -ceramide	Invitrogen / U.S.A.
LysoSensor™ Yellow/Blue DND-160	Invitrogen / U.S.A.
DiOC ₅ (3)	Invitrogen / U.S.A.
Hoechst 33342	Invitrogen / U.S.A.
Methanol (CH ₃ OH)	Merck / Germany
Hydrochloric acid (HCl)	Merck / Germany
Sodium hydroxide (NaOH)	Merck / Germany
Methyl Sulfoxide (DMSO)	J.T. Baker / U.S.A.
Chloroform (CHCl ₃)	J.T. Baker / U.S.A.
Sephadex G-50 fine	GE Healthcare / U.K.
ECL™	GE Healthcare / U.K.
Ammonium thiocyanate	Ridel-dehaen / Germany
Iron(III) chloride hexahydrate	Alfa-Aesar / U.S.A.
Stearylamine (SA)	Aldrich / U.S.A.
蛋白質定量套組 (Bio-Rad Protein Assay Kit)	Bio-Rad / U.S.A.

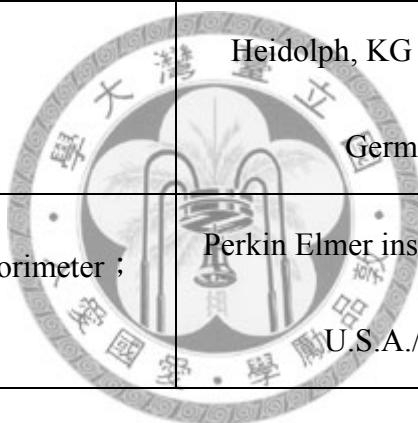
2. 抗體

名稱	廠牌 / 產地
Caspase-8 first antibody	Cell Signaling / U.S.A.
Caspase-9 first antibody	Cell Signaling / U.S.A.
Caspase-3 first antibody	Santa Cruz Biotechnology / U.S.A.
PARP first antibody	Santa Cruz Biotechnology / U.S.A.
HRP-conjugated anti-mouse IgGs	Santa Cruz Biotechnology / U.S.A.
HRP-conjugated anti-rabbit IgGs	Santa Cruz Biotechnology / U.S.A.
GRP-78 first antibody	Santa Cruz Biotechnology / U.S.A.
CHOP (GADD153) first antibody	Affinity BioReagents / U.S.A.
LC3 Antibody (APG8b)	Abgent / U.S.A.

3. 實驗儀器

名稱	廠牌 / 型號
無菌操作台 (Laminar flow)	海天科學股份有限公司, Taipei Taiwan, ROC/ 4BH-24
二氧化碳培養箱 (CO ₂ incubator)	Dotmed , NY, U.S.A./ Cellstar
微量天平 (Analytical balance)	Mettler Toledo Greifensee, Switzerland/ AG245
純水製造機	Millipore / Direct-Q5
酸鹼測定器 (pH meter)	Corning, NY, U.S.A./ pH meter 445
加熱板 (Hot plate)	Fisher scientific, Park Lane Drive, PA, U.S.A./ 11-498-7SH
螢光光譜儀 (Fluorescence spectrophotometer)	Hitachi, Tokyo, Japan / F-4500
微盤光譜儀 (Microplate spectrophotometer)	Molecular Devices, Sunnyvale, U.S.A. / SpectraMax Plus
雷射奈米粒徑暨界面電位量測儀 (Zetasizer)	Malvern, Worcestershire, UK / Zeta-3000HS
流式細胞儀 (Flow cytometer)	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, U.S.A. / FACSCalibur
流式細胞儀分析軟體	Becton-Dickinson / Cell Quest™ Pro. Ver. 6.0 (1994-2007)

正立共軛焦螢光顯微鏡 (Confocal Microscopy)	Zeiss, Maple Grove, MN, U.S.A. / Axiovert 200M
正立共軛焦螢光顯微鏡分析軟體	Zeiss / LSM Image Browser ver. 4,2,0,121 (1997-2006)
高速離心機 (High speed centrifuge)	Eppendorf, Barkhausenweg, Hamburg, Germany / 5804R
奈米擠壓器 (Mini Extruder)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, U.S.A./ Mini Extruder
減壓濃縮機 (Rotatory evaporator)	Heidolph, KG Starenstrabe, Kelheim, Germany / VV2011
示差掃描熱分析儀 (Differential scanning calorimeter ; DSC)	Perkin Elmer instruments, Massachusetts, U.S.A./ Diamond DSC



第肆章 實驗方法

1. 微脂粒製備與分析

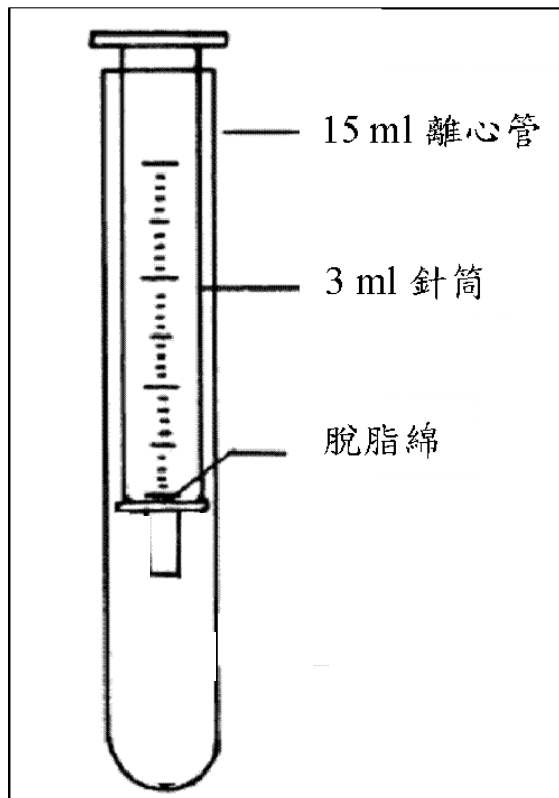
1.1 Liposomal Hypericin 製備

將 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DSPC) 5 μ mole、cholesterol 5 μ mole、stearylamine (SA) 0、1.25、2.5 或 5 μ mole (SA 莫耳百分比分別為 0%、11%、20%及 33%) 及 Hyp 0.25 μ mole [預於氯仿及甲醇之混合液中 (體積比=2:1)] 同置於 50 mL 圓底燒瓶中混合均勻。將脂質混合物於 60°C 水浴槽中使用旋轉減壓濃縮機並開啟氮氣吹乾，接著以真空幫浦真空乾燥一整晚；待完全乾燥後，加入 1.3 mL 0.9% NaCl，將旋轉減壓濃縮機之旋轉速開至 255 rpm 持續 2 小時，使圓底燒瓶內部之薄膜沖下，接著利用含 0.22 μ m 聚碳酸酯 (polycarbonate; Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, U.S.A.) 濾膜之奈米擠壓器於 60°C 下擠壓前述含微脂粒之溶液至澄清 (約 9 次)，在擠壓過程需小心過膜以防止膜破掉；之後利用填充微型管柱以分離未包覆及已包覆 Hyp 微脂粒，最後於無菌操作台內，利用 0.22 μ m 濾膜過濾滅菌，並加入 0.9% NaCl 使最後體積為 1.5 mL，置於 4°C 冰箱中供後續實驗使用。

1.2 微型管柱之製備與應用

微型管柱之製備乃參考 Parkinson 及 Fry 等人之做法[54-55] (如圖六)；首先取 Sephadex G-50 Fine 10g 浸於 120 mL 0.9% NaCl，使其於室溫膨脹約 5 小時，之後置於 4°C 冷藏以待用。取 6 隻 3 mL 針筒，於其內部塞入一小片脫脂棉以支撐管柱，接著分別將針筒插入 15 mL 之塑膠離心管 (Becton-Dickinson Labware) 中，再分次取 3 mL 的 Sephadex G-50 Fine 於針筒內，以旋翼式轉子 (swinging-bucket rotor) 轉速為 1000 g (2364 rpm) 離心 3 分鐘以除去多餘之液體，之後更換 15 mL 之離心管，並加入 0.2 mL 微脂粒之溶液於針筒內以轉速 50 g (529 rpm) 離心 10 分鐘接著再以轉速 1000 g (2364 rpm) 離心 3 分鐘，待離

心完成後，收集底部 1.5 mL 離心管內之微脂粒溶液。



圖六、微型管柱組裝圖

1.3 微脂粒粒徑及界面電位測量

微脂粒的粒徑及電位測定乃利用雷射奈米粒徑暨界面電位量測儀 (Zetasizer, Malvern, Worcestershire, UK) 測定之。

微脂粒的粒徑測量原理是利用動態光散射 (dynamic light scattering; DLS) 的方式進行測量，動態光散射法是一種靈敏、對樣品不具傷害性且僅需少量樣品(小於 400 μL) 即可完成測量的方法[56]。當雷射光源通過含有懸浮粒子的樣品槽時，這些粒子便會將光源散射，使得偵測器得以在不同角度接受到訊號，然而粒子於懸浮溶液中並非靜止，而是持續產生不規則的布朗運動，這樣的結果便會使散射光強度隨時間持續的變化，藉由偵測散射光強度的變化便可以推算粒子的擴散速率，進而經由 Stokes-Einstein 方程式 (如下) 得知粒子的直徑[57]。

Stokes-Einstein 方程式：

$$D \propto \frac{kT}{3\pi\eta S}$$

D : diffusion coefficient

S : particle diameter

k : Boltzman's constant

T : temperature

η : viscosity

進行微脂粒粒徑測量時，取 100 μL 微脂粒樣品以二次水稀釋至 2 mL，充分混勻後置於四面透光之比色管內，並將儀器條件設定如下：

Scattering angle of the laser beam : 90°

Temperature : 25°

Refractive Index : 1.33

Viscosity : 0.89 centipoise

微脂粒界面電位（Zeta potential）的測量原理是測量帶電粒子懸浮在通有電場的液體環境中之移動速率，帶電粒子在通有電場的環境下便會產生靜電力，使粒子朝著和本身電荷相反的電極移動，但粒子在溶液中移動的同時也會受到溶液本身的黏滯力所阻擾，當電極對帶電粒子產生的靜電力及溶液對帶電粒子產生的黏滯力到達平衡時，帶電粒子的移動速率便回維持定值。藉由得知帶電子粒子的移動速率及電場強度、溶液的介電常數（dielectric constant）和黏度，便可利用 Henry equation（如下）換算出界面電位：

$$U_E = \frac{2\varepsilon Z f(Ka)}{3\eta}$$

Z : Zeta potential.

U_E : electrophoretic mobility.

ε : dielectric constant.

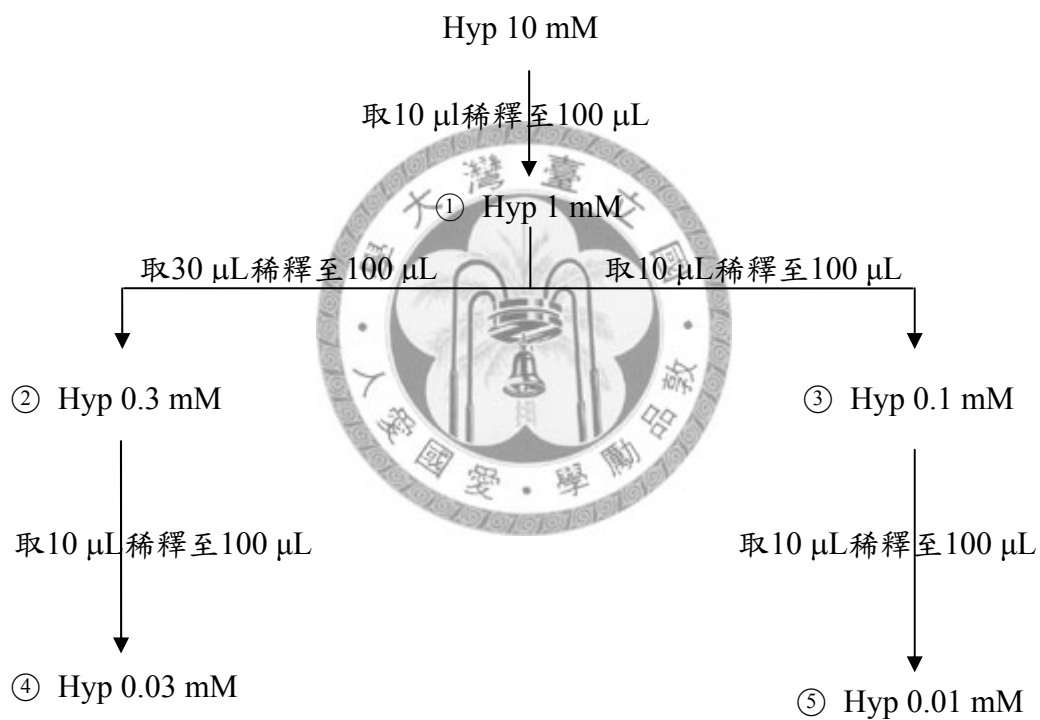
η : viscosity.

$f(Ka)$: Henry's function

每次測量微脂粒界面電位，取 100 μL 微脂粒樣品以二次水稀釋至 3 mL，充分混合後，以 3 mL 注射針筒吸取樣品，並緩慢注入儀器以避免氣泡產生。

1.4 微脂粒之 Hypericin 包覆量測量

參考 Galanou 的人之實驗方法[58]，以 10 mM 之 Hyp 做為標準溶液，並以 DMSO 稀釋後，並依下列流程圖配置出下列各濃度之標準品。



待各濃度之 Hyp 溶液配置完成，取各標準品 (①~⑤) 或微脂粒樣品 0.02 mL 和 3.98 mL 甲醇充分混合後，各取 3 mL 於四面透明的塑膠比色管 (cuvette) 內，並測其於波長 485 nm 光源激發後，在 590 nm 之螢光量值，並製作校正曲線並於校正取線上以內差法求得微脂粒樣品中 Hyp 之含量。

1.5 微脂粒之 DSPC 含量測定

配製 Ammonium ferrocyanide 試劑：將 27.03 g Ferric chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 和 30.04 g Ammonium thiocyanate (NH_4SCN) 溶於 1 L 去離子水中。

將磷脂質 (DSPC) 溶於氯仿調配成總濃度為 0.1 mg DSPC/mL 之標準溶液，接著依照下表比例調配後置玻璃試管內：

試管編號	DSPC (mL)	氯仿 (mL)	Ammonium ferrocyanide (mL)
1	0	2	2
2	0.1	1.9	2
3	0.2	1.8	2
4	0.4	1.6	2
5	0.6	1.4	2
6	0.8	1.2	2
7	1	1	2

將每隻試管混勻振盪 15 秒，接著於 4°C 以 1000 rpm 離心 5 分鐘，待離心完成後，取下層氯仿溶液，測其於 470 nm 之吸光值並將結果做校正曲線，接著取各微脂粒樣品 25 μL 和 2 mL ammonium ferrocyanide 及 2 mL 氯仿混合依上述方法求得吸光值，並於校正曲線上以內插法求得樣品濃度。

1.6 微脂粒包覆率計算

包覆率之計算方式乃參考 Venosa 等人之方法[59]，其公式如下：

$$\text{包覆率} = \frac{\text{微脂粒中 Hyp 莫耳數 } (\mu\text{mole})}{\text{微脂粒 DSPC 量 } (\text{mg})}$$

1.7 微脂粒穩定性分析

1.7.1 保存穩定性分析

將製備好的微脂粒樣品各取 100 μL ，分裝於 1.5 mL 棕色離心管中，儲存於 4°C 環境下，並於製備完成後第 0、1、5、10、15、20、30 天分別取出分析其粒徑變化。

1.7.2 光照穩定性分析

將製備好的微脂粒樣品各取 100 μL 至 96 孔盤中，以波長 590~610 nm 的 LED 光源以 1 J/cm^2 、5 J/cm^2 、10 J/cm^2 及 20 J/cm^2 之光照強度分別進行光照後，將微脂粒取出，並測量粒徑變化。

1.8 微脂粒轉相溫度測定

將 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DSPC) 5 μmole 、cholesterol 5 μmole 、stearylamine (SA) 0、1.25、2.5 或 5 μmole (SA 莫耳百分比分別為 0%、11%、20%及 33%) 及 Hyp 0.25 μmole [預於氯仿及甲醇之混合液中 (體積比=2:1)] 同置於 50 mL 圓底燒瓶中混合均勻。將脂質混合物於 60°C 水浴槽中使用旋轉減壓濃縮機並開啟氮氣吹乾，接著以真空幫浦真空乾燥一整晚，添充氮氣至圓底燒瓶內，並以 parafilm 封住圓底燒瓶開口，存放於 -20°C。將圓底燒瓶底部的脂質薄膜以刮杓括下，以鋁製樣品盤精確秤取圓底燒瓶內固體基質，置入示差掃描熱分析儀 (differential scanning calorimeter; DSC) 樣品槽，以 5 °C/min 的速度由 35°C 開始升溫至 85°C。

2. 細胞實驗

2.1 細胞培養

人類肝癌細胞株 Hep 3B 培養於 75 cm² 培養瓶中，加入含有 10% 胎牛血清（fetal bovine serum；FBS）及抗生素（100 U/mL penicillin 與 100 µg/mL streptomycin）的 RPMI-1460 培養液，培養箱設定 5% CO₂、37°C 恆溫的環境，細胞密度維持在 2×10⁵~1×10⁶ cell/mL，每週更換培養基 2~3 次。當細胞長至 9 分滿時，先以 PBS 沖洗培養瓶，接著以 0.05% trypsin-0.02% EDTA（w/v）作用使細胞自培養瓶底部脫離，接著以新鮮培養液依 5：1 的比例稀釋，再將細胞繼續培養於新的 75 cm² 培養瓶中。

2.2 細胞計數

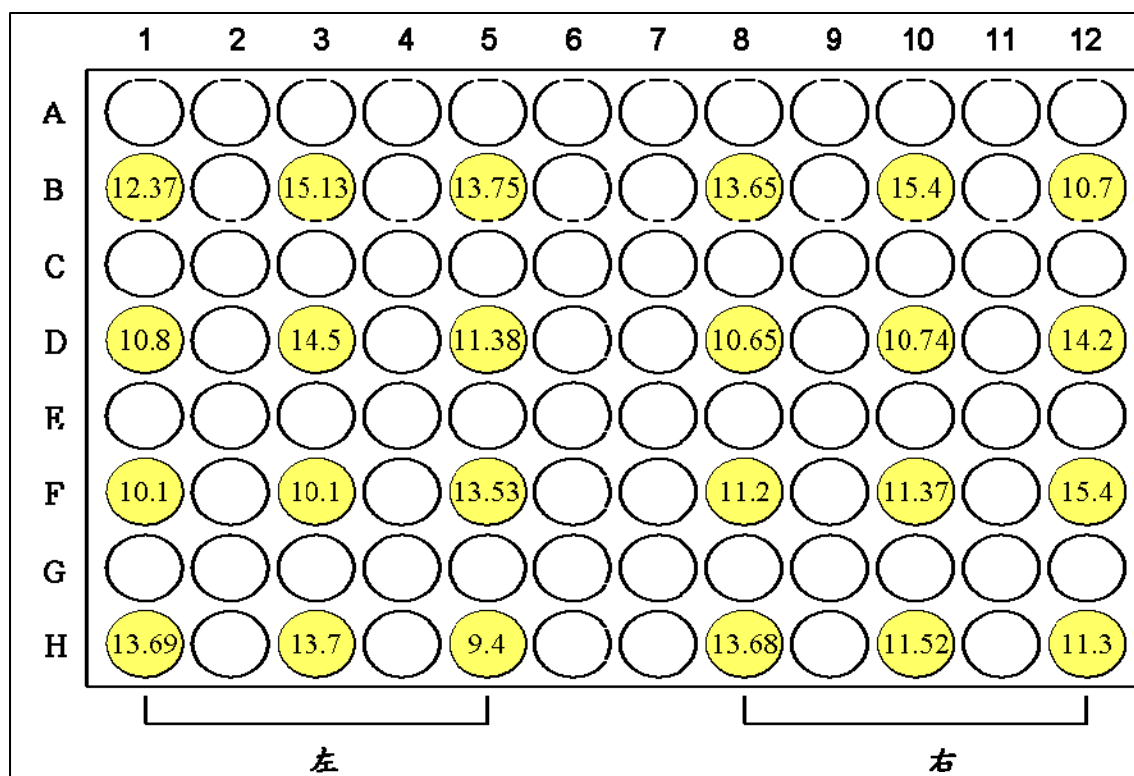
將經由 0.05% trypsin-0.02% EDTA（w/v）作用後的細胞，以 RPMI-1460 培養液將細胞沖散，並取 50 µL 的細胞懸浮液和 450 µL PBS 混合均勻，接著將稀釋後之細胞液取出，和 0.4% trypan blue 以 1：1 比例混合均勻，接著以血球計數盤記算細胞數目。

2.3 光照處理

光照儀器由中興大學物理系施明智老師研究室所設計提供：

96 孔光照儀器：96 孔光照儀器之示意圖如下（圖七），電流設定為 0.3 安培，光照進行時置於黑色底盤上，以防止光線反射及折射產生的干擾。孔內數字即為孔正上方 10 mm 的 LED 燈光照強度（單位為 mW）。照光控制方式乃分為左右兩組，故能量計算方式為分別將左右兩組之光照強度平均，求出其左右平均光照強度。





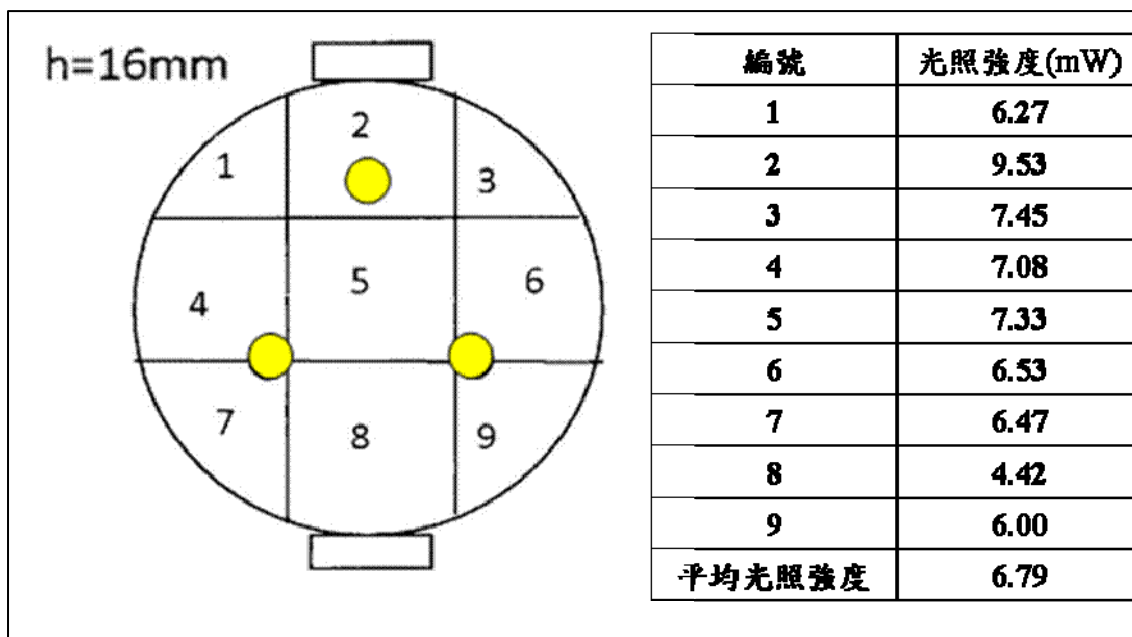
圖七、光照儀器（96孔盤圖）

孔內數字即為孔正上方 10 mm 的 LED 燈光照強度（單位為 mW）。

表三、光照儀器（6公分培養皿）強度及時間表

	96孔盤光照儀器左半部	96孔盤光照儀器右半部
平均光照強度 (mW)	12.37	12.48
光照 1 J/cm ² 所需時間 (s)	81	80
光照 2 J/cm ² 所需時間 (s)	162	160
光照 4 J/cm ² 所需時間 (s)	323	320
光照 5 J/cm ² 所需時間 (s)	404	400
光照 10 J/cm ² 所需時間 (s)	808	801
光照 20 J/cm ² 所需時間 (s)	1617	1603

6 公分培養皿光照儀器：高度 16 mm 的 6 公分培養皿光照儀器之示意圖如下（如圖八），電流設定為 0.35 安培，其圓形即代表 LED 燈泡位置，編號 1~9 分別代表 6 公分培養皿各區域於光照下所量測的光照強度，能量計算方式為分別將 1~9 之光照強度平均，求出其平均光照強度。培養皿置於黑色塑膠墊片上進行光照，以防止光線反射及折射產生的干擾。



圖八、光照儀器（6 公分培養皿）

表四、光照儀器（6 公分培養皿）強度及時間表

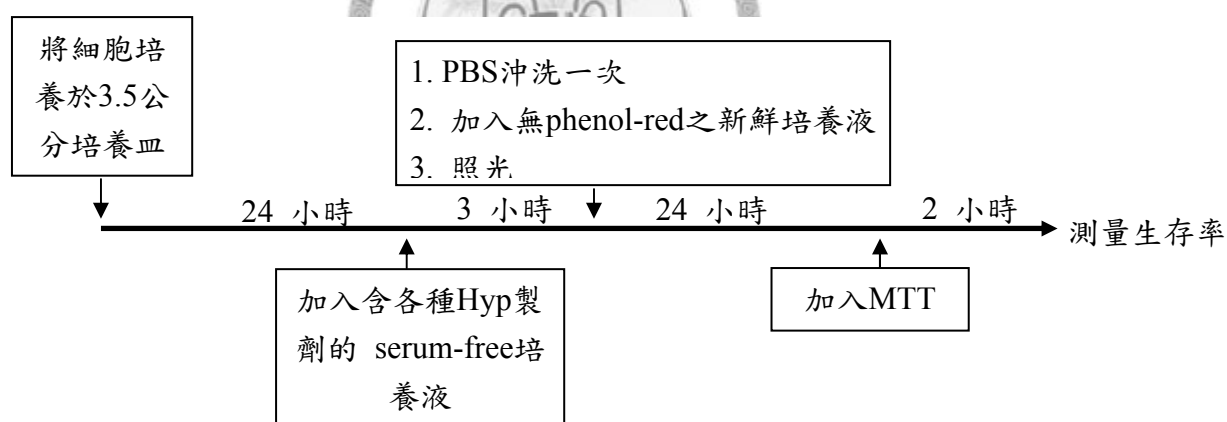
6 公分培養皿光照儀器	
平均光照強度 (mW)	6.79
光照 2 J/cm ² 所需時間 (s)	295

2.4 細胞毒性分析

MTT assay 之偵測原理乃是利用粒線體中之琥珀酸去氫酶 (succinate dehydrogenase) 可將黃色水溶性的 tetrazolium salt 還原為藍紫色的 formazan，由於最後的 formazan 並不溶於水，但溶於 DMSO 等有機溶劑，故最後可將 formazan

溶解，藉由吸光讀值得知細胞粒線體的活性，因粒線體是細胞維持存活的重要胞器，故可利用此方法得知細胞存活率[60]。

細胞於培養皿培養至九分滿，以 0.05% trypsin-0.02% EDTA (w/v) 將細胞由培養皿脫離，用 PBS 沖洗後，以培養基將細胞濃度調整為 10^5 cell/mL，並分別取 0.1 mL 之細胞液培養於 96 孔盤各孔中。待培養 24 小時細胞貼壁後，更換培養液為 serum-free 之 RPMI-1460 培養液，並同時加入 Hyp、Hyp + 2.5 μ g LDL/mL (Hyp-LDL) 及四種 liposomal Hyp (Hyp 濃度範圍均調整為 0.01~3 μ M) 培養 3 小時，接著將培養液吸除，並以 0.1 mL 的 PBS 沖洗一次，之後再更換為含 10% FBS 且不含 phenol-red 之培養液，接著以 96 孔光照儀器分別給予光照 0 J/cm²、1 J/cm²、2 J/cm² 及 4 J/cm²，於光照後繼續培養 24 小時，之後再更換培養基並同時加入 500 μ g MTT/mL 反應 2 小時，除去培養基後，最後以 0.1 mL DMSO 將紫色的 formazan 結晶溶解，並於波長 560 nm 下測定吸光值。



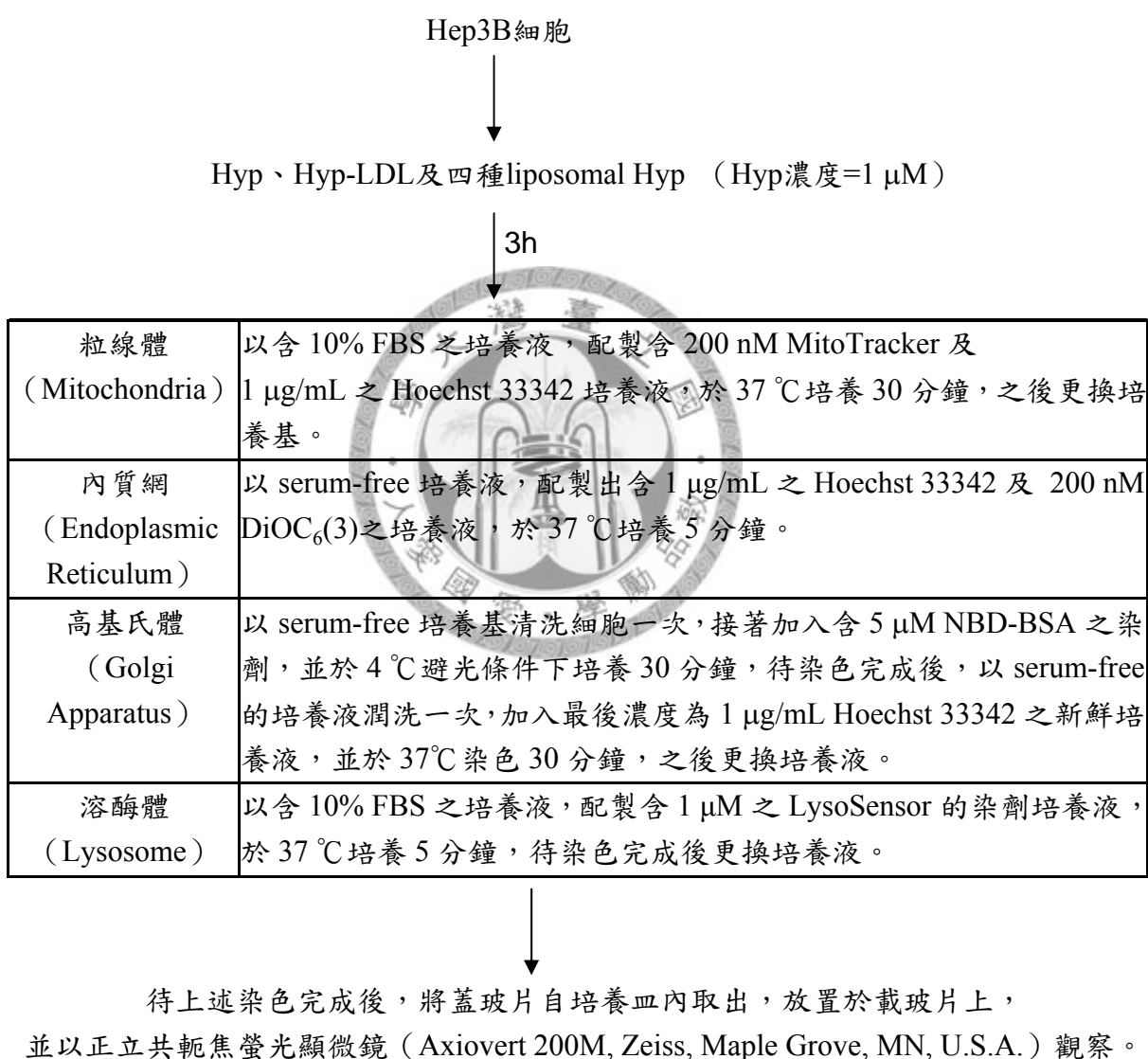
圖九、細胞毒性測試 (MTT) 實驗流程圖

2.5 細胞內 Hypericin 含量測定

將細胞培養至九分滿，以 0.05% trypsin-0.02% EDTA (w/v) 將細胞由培養皿脫離，並將細胞液培養於 6 公分的培養皿 (3×10^5 cells/dish)，待培養 24 小時後，更換為 serum-free 之培養液並同時加入 Hyp、Hyp-LDL 及四種 liposomal Hyp (Hyp 濃度範圍均為 0.01~3 μ M) 並培養 3 小時，待培養完成後將細胞以 trypsin-EDTA 將

細胞由培養皿脫離，以 1 mL PBS 沖洗後，離心 1000 rpm 5 分鐘，除去上層液，只留下沉澱細胞部份，最後置於冰上，以流式細胞儀測定。以 FL2 channel 做分析，各樣品均收集分析 10000 個細胞數。

2.6 Hypericin 於細胞內之分布

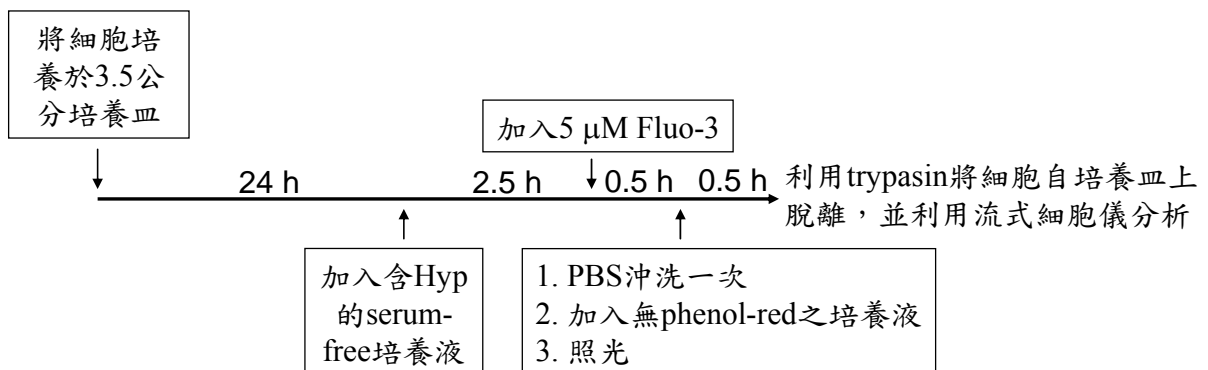


表五、胞器染劑之激發與放射光波長比較

染劑	染色部位	λ_{ex} -- λ_{em} (nm)
MitoTracker Green FM	粒線體	490--516
DiOC5 (3)	內質網	484--500
NBD C ₆ -ceramide	高基氏體	466--539
LysoSensor™ Yellow/Blue DND-160	溶酶體	329--440

2.7 細胞內鈣離子濃度測定

將細胞液培養於 3.5 公分的培養皿 (3×10^5 cells/dish)，待培養 24 小時後，更換為 serum-free 之培養液並同時加入 Hyp、Hyp-LDL、SA0 及 SA0.5 (濃度採用在 2 J/cm^2 光照下，各組之 Hyp IC₅₀，分別為：Hyp 組 28.26 nM、Hyp-LDL 組 45.26 nM、SA0 組 83.20 nM、SA0.5 組 551.26 nM) 培養 2.5 小時，接著加入 $5 \mu\text{M}$ Fluo-3 繼續培養 0.5 小時，待培養完成後以 3 mL 的 PBS 沖洗細胞，並更換為含 10% FBS、無 phenol-red 之培養液，接著以 6 公分培養皿光照儀器給予光照 2 J/cm^2 ，於光照後繼續培養 0.5 小時，之後將細胞以 trypsin-EDTA 將細胞由培養皿脫離，以 PBS 沖洗後，離心 2000 rpm 10 分鐘，除去上層液，保留沉澱細胞部份，最後置於冰上，以流式細胞儀 (FACSCalibur, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, U.S.A.) 測定。以 FL1 channel 做分析，各樣品均收集分析 10000 個細胞數。



圖十、胞內鈣離子測定實驗流程圖

2.8 細胞凋亡分析

將細胞培養於 6 公分的培養皿 (3×10^5 cells/dish)，待培養 24 小時後，更換為 serum-free 之培養液並同時加入 Hyp、Hyp-LDL、SA0 及 SA0.5 (濃度採用在 2 J/cm^2 光照強度下，各組 Hyp 的 IC_{50} ，分別為：Hyp 組 28.26 nM、Hyp-LDL 組 45.26 nM、SA0 組 83.20 nM、SA0.5 組 551.26 nM) 培養 3 小時，待培養完成後以 3 mL 的 PBS 沖洗細胞，並更換為含 10% FBS 且不含 phenol-red 之培養液，接著以 6 公分培養皿光照儀器給予光照 2 J/cm^2 ，之後置於培養箱繼續培養 24 小時。待培養完成後將細胞以 trypsin-EDTA 將細胞由培養皿脫離，以 PBS 沖洗後，離心 2000 rpm 10 分鐘，除去上層液，保留沉澱細胞部份，以 70%酒精將細胞沖散，置於 -20°C 冰箱 24 小時，之後離心 2000 rpm 10 分鐘，吸除上清液，並以 PBS 沖洗沉澱細胞，接著離心 2000 rpm 10 分鐘，留下沉澱細胞部份，最後於避光條件下加入 DNA 染劑(含 1% Triton X-100、100 $\mu\text{g/mL}$ RNase A 及 80 $\mu\text{g/mL}$ propidium iodide 溶於 PBS) 染色 30 分鐘後，即可以流式細胞儀分析細胞週期和細胞凋亡情形。以 FL2 channel 做分析，各樣品均收集分析 10000 個細胞數。

2.9 西方墨點法

蛋白收集：將細胞液培養於 6 公分的培養皿 (5×10^5 cells/dish)，待培養 24 小時後，更換為 serum-free 之培養液並同時加入 Hyp、Hyp-LDL、SA0 及 SA0.5 (濃度採用在 2 J/cm^2 光照劑量下，各組之 Hyp 的 IC_{50} ，分別為：Hyp 組 28.26 nM、Hyp-LDL 組 45.26 nM、SA0 組 83.20 nM、SA0.5 組 551.26 nM) 並培養 3 小時，待培養完成後以 3 mL 的 PBS 沖洗細胞，並更換為含 10% FBS、無 phenol-red 之培養液，接著以 6 公分培養皿光照儀器給予光照 2 J/cm^2 ，之後置於培養箱繼續培養 24 小時。待培養完成後，收集細胞液，接著以冰的 PBS 沖洗培養皿底部細胞，並收集沖洗液，接著以 0.05% trypsin-0.02% EDTA (w/v) 收集細胞，將收集完的細胞懸浮液以 1000 rpm 離心 5 分鐘，接著將上清液吸除，底部細胞沉澱部份以 50 μL lysis

buffer (1% Triton X-100、20 mM Tris-HCl (pH=7.5)、0.5 mM EGTA、2 mM EDTA、1 mM dithiothreitol、0.5 mM phenylmethyl-sulfonyl fluoride 與 10 µg/mL leupeptin) 混合均勻並置於冰上 40 分鐘，接著以 14000 rpm 離心 15 分鐘，收集上清液並置於 -80°C 冰箱保存。

蛋白定量：蛋白質定量乃利用 Bio-Red 蛋白質測量套件 (protein assay kit) 進行測量，將白蛋白 (BSA) 溶於 PBS 中調配成總濃度為 0.1 mg BSA/mL 之標準溶液，接著依照下表比例調配置試管內：

標準品編號	BSA 溶液 (µL)	去離子水 (µL)	Bio-Rad protein dye (µL)
1	3	797	200
2	6	794	200
3	9	791	200
4	12	788	200
5	15	785	200

將上表配製完成之標準樣品於 595 nm 之吸光值並將其結果做校正曲線，接著取 1 µL 蛋白質收集液和 799 µL 去離子水及 200 µL Bio-Rad protein dye (Bio-Rad) 混合依上述方法求得吸光值，並採內插法於校正曲線求得樣品濃度。

蛋白質樣品變性：將蛋白質收集液以 5 倍 sample buffer (0.156 M Tris (Tris (hydroxymethyl) -aminomethane)、1% Sodium dodecyl sulfate (SDS)、25% glycerol、12.5% β-mercaptoethanol 與 0.2% bromophenol blue) 以 4 : 1 (蛋白質收集液 : 5 倍 sample buffer) 的比例混合均勻，於 95°C 加熱 15 分鐘，待加熱完成置於 -20°C 保存。

硫酸十二酯聚鈉丙醯胺膠電泳 (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel

Electrophoresis ; SDS-PAGE) : 首先製作電泳膠片，依不同配方比例製作下層膠，而上層膠為 5% stacking gel，並在膠凝前以齒狀模板做出樣品槽，接著將製作完成的膠片架於電泳槽內，倒入 running buffer (pH=8.3，含 Tris 3g、glycine 14.4g、SDS 1g 溶於 1 L 去離子水中)，並將處理好的蛋白質樣品注入樣品槽，之後上層膠以 70 mA、下層膠以 110 mA 的電流，跑至指示樣品位置的染劑到達膠片底部，即可關閉電源。

下層膠的配方			上層膠的配方
	12%	14%	5% stacking gel
H ₂ O	5 mL	4 mL	4 mL
30% acrylamide (w/v)	6 mL	7 mL	1 mL
1.5 M Tris (pH=8.8)	3.75 mL		
1.5 M Tris (pH=6.8)			1 mL
10% AP (w/v)	150 μL		60 μL
10% SDS (w/v)	150 μL		60 μL
TEMED	15 μL		10 μL

Tris : Tris (hydroxymethyl)-aminomethane

AP : Alkaline phosphatase

SDS : Sodium dodecyl sulfate

TEMED : Tetramethylethylenediamine

蛋白質轉漬 (Transfer) : 首先先將 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane 浸泡於甲醇中 5 分鐘，接著以 transfer buffer (pH=8.3，含 Tris-base 25 mM、glycine 192 mM、methanol 20%) 浸泡 15 分鐘。將海綿、western blotting filter papers (Bio-Rad)、電泳膠片、浸泡過 transfer buffer 的 PVDF membrane、western blotting filter papers、海綿依續疊好，並確定電泳膠片及 PVDF membrane 間並無氣泡產生，之後置於內含冰 transfer buffer 的轉漬槽中，以 80 mV 固定電壓進行蛋白質轉漬約 2 小時。

免疫墨點法 (Immunoblotting): 將前述轉漬完成的 PVDF membrane 浸泡在含 5% 脫脂奶粉的 PBST (phosphate buffer saline Tween 20) (PBS+1% Tween 20) 溶液，搖晃 1 小時，接著用 PBST 清洗 PVDF membrane 30 分鐘，接著加入含有一級抗體的 PBST 溶液，置於 4°C 輕搖一整晚，之後以 PBST 清洗 PVDF membrane 30 分鐘後，加入含二級抗體 (specify antibody) 的 PBST 溶液，輕搖 1 小時後，再以 PBST 清洗 PVDF membrane 30 分鐘，待清洗完成於暗房內加入 ECLTM 溶液，並以 X 光片觀測蛋白表現。



第五章 實驗結果

1. 微脂粒定性分析

1.1 微脂粒粒徑、電荷及轉相溫度測量

本研究中微脂粒之組別分類乃依 SA 之添加比例做區別，為方便簡化各組微脂粒在組成比例上所代表的意義，其簡稱以 SA 在各組微脂粒的組成百分比為依據（表六），即 SA0 即代表不含 SA 之微脂粒，SA0.25 即代表 SA 莫耳比為 0.25，以此類推。微脂粒及電荷測量結果如表四所顯示，有無添加 SA 及其添加比例在各組微脂粒粒徑間並無明顯差異，且所有微脂粒間之粒徑均小於 200 nm 且 polydispersity index 也小於 0.2，代表各組粒徑均屬於分布均一的群體。在微脂粒表面電荷分析結果，當隨 SA 添加比例的增加，其 Zeta potential 也有逐漸增加的趨勢。轉相溫度則以 SA0.25 最高（72.56°C），其次分別依序為 S0（69.03°C）、SA0.5（62.31°C）及 SA1.0（61.47°C）。

表六、各類微脂粒粒徑、電荷及轉相溫度比較

組別代號	組成比例 (molar ratio)	Average Size (nm)	Polydispersity Index	Zeta Potential (mV)	Phase transition temperature
SA0	DSPC:Chol:Hyp =1:1:0.05	183.57 ± 6.80	0.136 ± 0.018	2.33 ± 2.01	69.03°C
SA0.25	DSPC:Chol:SA:Hyp =1:1:0.25:0.05	181.53 ± 10.55	0.116 ± 0.043	45.00 ± 5.89	72.56°C
SA0.5	DSPC:Chol:SA:Hyp =1:1:0.5:0.05	174.87 ± 4.26	0.086 ± 0.027	50.40 ± 5.82	62.31°C
SA1.0	DSPC:Chol:SA:Hyp =1:1:1:0.05	177.90 ± 15.50	0.151 ± 0.047	64.40 ± 6.89	61.47°C

註：表中數值為 mean ± SD。各組微脂粒粒徑之間並無明顯差異(p>0.05)。

表內數據均為重覆三次 (n=3) 的測量結果。

1.2 微脂粒之 Hypericin 包覆率

在 SA 比例不同的各組微脂粒間，分別計算最終微脂粒樣品內所含的 Hyp 及 DSPC 的濃度，並將結果換算之包覆率即代表最後單位 DSPC 脂質 (mg) 包覆的 Hyp 量 (μmole)。其包覆率結果 (表七)，SA 0.25 組的包覆率和 SA0 相比較在統計上有明顯差異 (0.067 ± 0.003 vs. 0.094 ± 0.003 , $p < 0.001$)，SA1.0 雖然和 SA0 及 SA0.5 相比較在統計上並無明顯差異，但其最終 Hyp 及 DSPC 濃度卻低得許多。

表七、各類微脂粒 Hyp 及 DSPC 包覆率

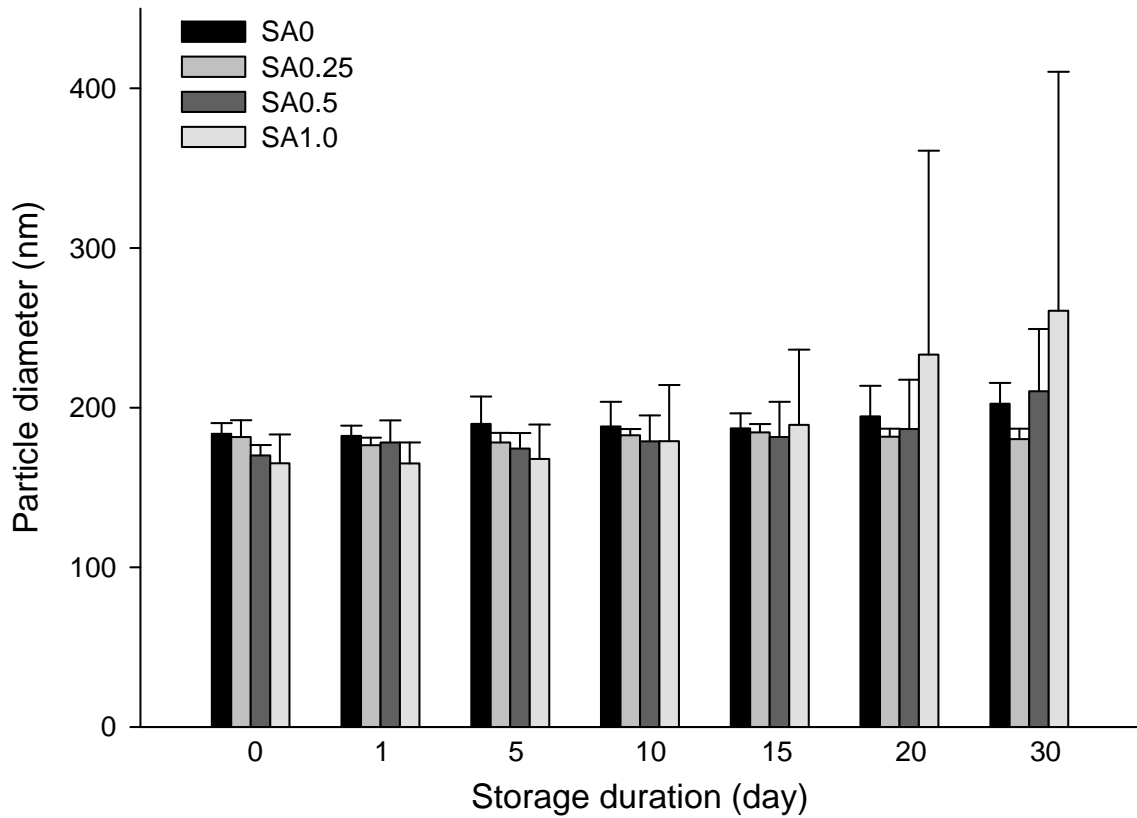
微脂粒組別	Encapsulation concentration		Encapsulation efficacy ($\mu\text{mole Hyp/mg DSPC}$)
	Hyp ($\mu\text{mole}/\mu\text{L}$)	DSPC ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	
SA0	89.91 ± 7.79	0.96 ± 0.09	0.094 ± 0.003
SA0.25	77.54 ± 4.68	1.15 ± 0.09	$0.067 \pm 0.003^{***}$
SA0.5	83.90 ± 6.82	0.99 ± 0.12	0.085 ± 0.006
SA1.0	$60.78 \pm 2.01^{**}$	0.79 ± 0.09	0.078 ± 0.010

註：表中數值為 mean \pm SD。

** ($p < 0.01$)，*** ($p < 0.001$)，與 SA0 組相比有統計差異，以上各組實驗均為三重覆 ($n=3$) 之統計結果。

1.3 微脂粒保存穩定性測量

本研究實驗利用具飽和脂肪酸鏈的磷脂質 DSPC 做為微脂粒的主要原料，並且加入膽固醇以增加微脂粒之穩定性，本實驗即測試不同比例 SA 的添加是否會影響正電荷微脂粒之保存穩定性。微脂粒保存穩定性結果顯示(圖十一)，SA0.5 及 SA1.0 其平均粒徑及標準差皆有變大的趨勢，本實驗中其它組別的微脂粒樣品則在經過 4°C 保存 30 天內在粒徑變化上則無明顯變化。本研究中，後續細胞實驗採用存放於 4°C 且存放時間不超過 10 天的微脂粒。



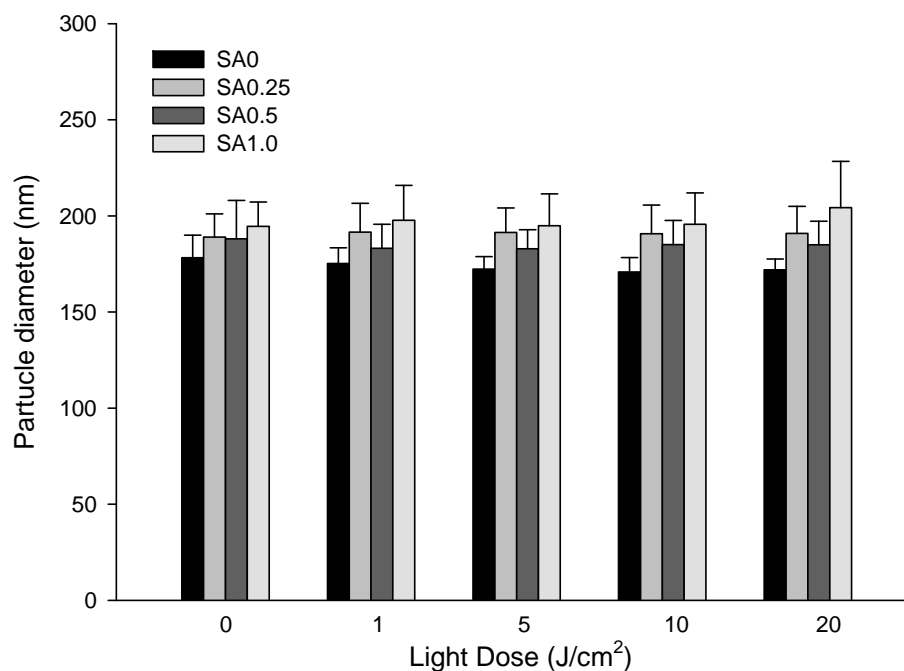
組別 時間	SA0	SA0.25	SA0.5	SA1.0
0 day	183.57 ± 6.80 nm	181.53 ± 10.55 nm	170.07 ± 6.60 nm	165.23 ± 17.96 nm
1 days	182.37 ± 6.31 nm	176.43 ± 4.74 nm	178.13 ± 13.89 nm	165.03 ± 13.01 nm
5 days	189.87 ± 17.07 nm	178.10 ± 6.16 nm	174.27 ± 9.83 nm	167.90 ± 21.60 nm
10 days	188.17 ± 15.49 nm	182.77 ± 3.91 nm	178.93 ± 16.27 nm	179.03 ± 35.19 nm
15 days	187.03 ± 9.45 nm	184.43 ± 5.23 nm	181.57 ± 22.14 nm	189.2 ± 47.14 nm
20 days	194.57 ± 19.11 nm	181.80 ± 4.98 nm	186.63 ± 30.83 nm	233.23 ± 127.73 nm
30 days	202.43 ± 13.03 nm	180.33 ± 6.40 nm	210.27 ± 39.00 nm	260.63 ± 149.62 nm

圖十一、微脂粒保存穩定性分析

將製備好的各組微脂粒樣品於避光條件下儲存於4°C，分別在製備好後的第0、1、5、10、15、20、30天，將微脂粒樣品取出，以二次水稀釋至2 mL，並置於四面透光之比色管內混合均勻，利用雷射奈米粒徑暨界面電位量測儀進行粒徑的分析，以上各組實驗均為三重覆（n=3）之統計結果。實驗數據如圖十一所示。

1.4 微脂粒光照穩定性

各組微脂粒的光照穩定性檢測如下圖十二，各組微脂粒在光照劑量 0 至 20 J/cm² 下，其粒徑並無明顯差異，顯示在本實驗之光照條件中，SA 的添加莫耳比例自 0 至 1 對於微脂粒的光照穩定性並無直接影響。



光照 \ 組別	SA0	SA0.25	SA0.5	SA1.0
0 J/cm ²	178.20 ± 11.78 nm	188.97 ± 12.13 nm	188.00 ± 20.00 nm	194.57 ± 12.71 nm
1 J/cm ²	175.27 ± 8.08 nm	191.53 ± 15.02 nm	183.13 ± 12.46 nm	197.67 ± 18.18 nm
5 J/cm ²	172.27 ± 6.53 nm	191.43 ± 12.67 nm	182.83 ± 9.96 nm	194.90 ± 16.56 nm
10 J/cm ²	170.87 ± 7.41 nm	190.77 ± 14.87 nm	185.03 ± 12.54 nm	195.60 ± 16.40 nm
20 J/cm ²	171.93 ± 5.61 nm	190.90 ± 14.10 nm	185.00 ± 12.21 nm	204.30 ± 24.04

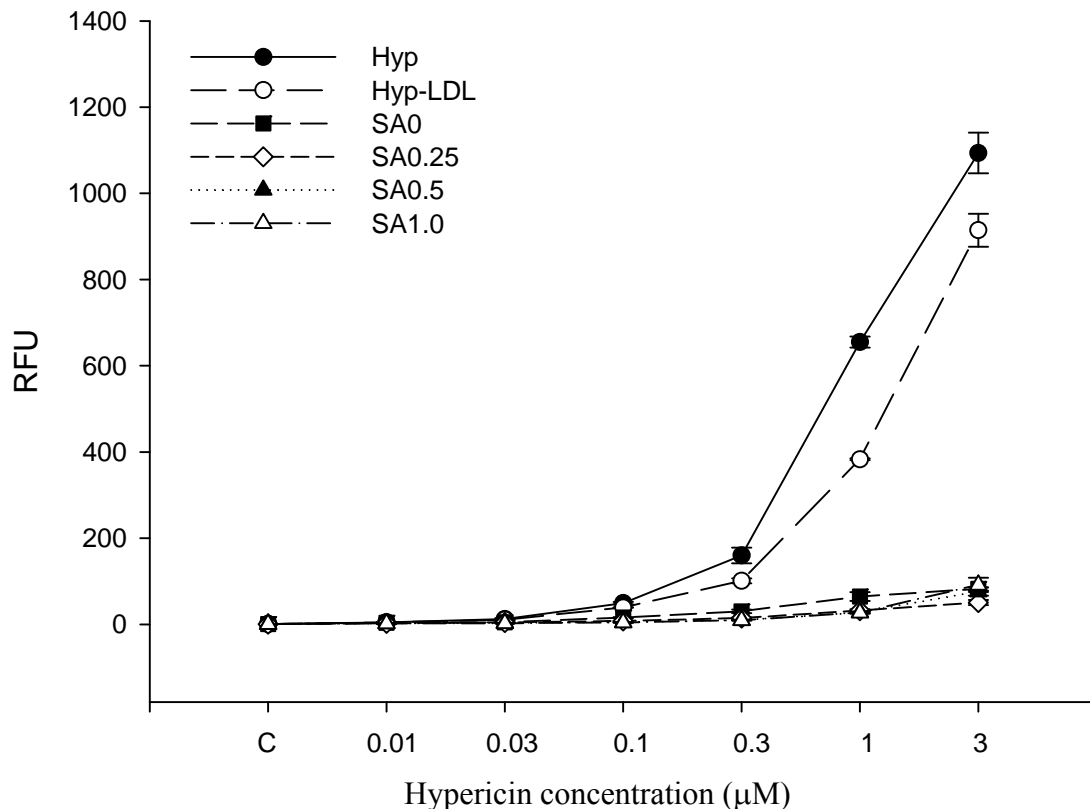
圖十二、光照對各類微脂粒製劑的影響

各組微脂粒分別取 100 μL 置於 96 孔盤中，以波長 590~610 nm 的 LED 光源進行 0、1、5、10、20 J/cm² 的照射後，將微脂粒樣品取出，以二次水稀釋至 2 mL，並置於四面透光之比色管內混合均勻後，利用雷射奈米粒徑暨界面電

位量測儀進行粒徑的分析，以上各組實驗均為三重覆 (n=3) 之統計結果。實驗數據如圖表所示。

2. 細胞對各類 Hypericin 製劑之攝取分析

Hypericin 在 488 nm 激發光照射下，在 590 nm 可產生明顯的放射光，故可應用流式細胞儀觀察細胞對 Hyp 的攝取情形。本研究利用流式細胞儀於 FL2 channel 下，在 Hep3B 於各類 Hyp 製劑之培養液中處理 3 小時，測量胞內螢光強度，其測量結果如圖十三。在本實驗之無血清的培養條件下，隨 Hyp 濃度提高，各組相對螢光強度均有增加的趨勢，其中以 Hyp 組增加最為明顯，Hyp + 2.5 μg LDL/mL (Hyp-LDL) 次之，而各微脂粒組包覆的 Hyp 進入細胞的量則相對較低。在各微脂粒組中，SA0 組之 Hyp 被細胞攝取的量較正電荷微脂粒稍高，添加 SA 的正電荷微脂粒組中，僅在 Hyp 濃度為 3 μM 時有隨 SA 比例增加有略增的趨勢，但在統計上並無明顯差異。



Hyp 劑量 組別	Control	0.01 μ M	0.03 μ M	0.1 μ M	0.3 μ M	1 μ M	3 μ M
Hyp	1	4.80 \pm 1.56	12.55 \pm 3.39	49.58 \pm 4.74	159.92 \pm 31.76	655.20 \pm 22.48	1093.50 \pm 81.36
Hyp-LDL	1	4.20 \pm 1.22	10.66 \pm 2.71	39.19 \pm 0.77	101.16 \pm 10.19	383.19 \pm 3.77	914.36 \pm 66.15
SA0	1	3.86 \pm 2.66	4.91 \pm 1.13	15.82 \pm 1.99	30.20 \pm 6.95	64.63 \pm 17.77	82.29 \pm 6.33
SA0.25	1	2.41 \pm 0.23	4.43 \pm 0.40	7.82 \pm 0.73	14.68 \pm 3.17	32.03 \pm 5.07	50.60 \pm 10.04
SA0.5	1	2.34 \pm 0.39	3.30 \pm 0.32	5.05 \pm 0.63	9.81 \pm 0.45	28.08 \pm 3.24	76.18 \pm 16.32
SA1.0	1	2.02 \pm 0.18	2.74 \pm 0.61	4.43 \pm 0.75	9.90 \pm 2.09	27.26 \pm 3.68	91.76 \pm 28.87

圖十三、在各類實驗條件下，Hep3B 細胞之 Hypericin 的攝取情形

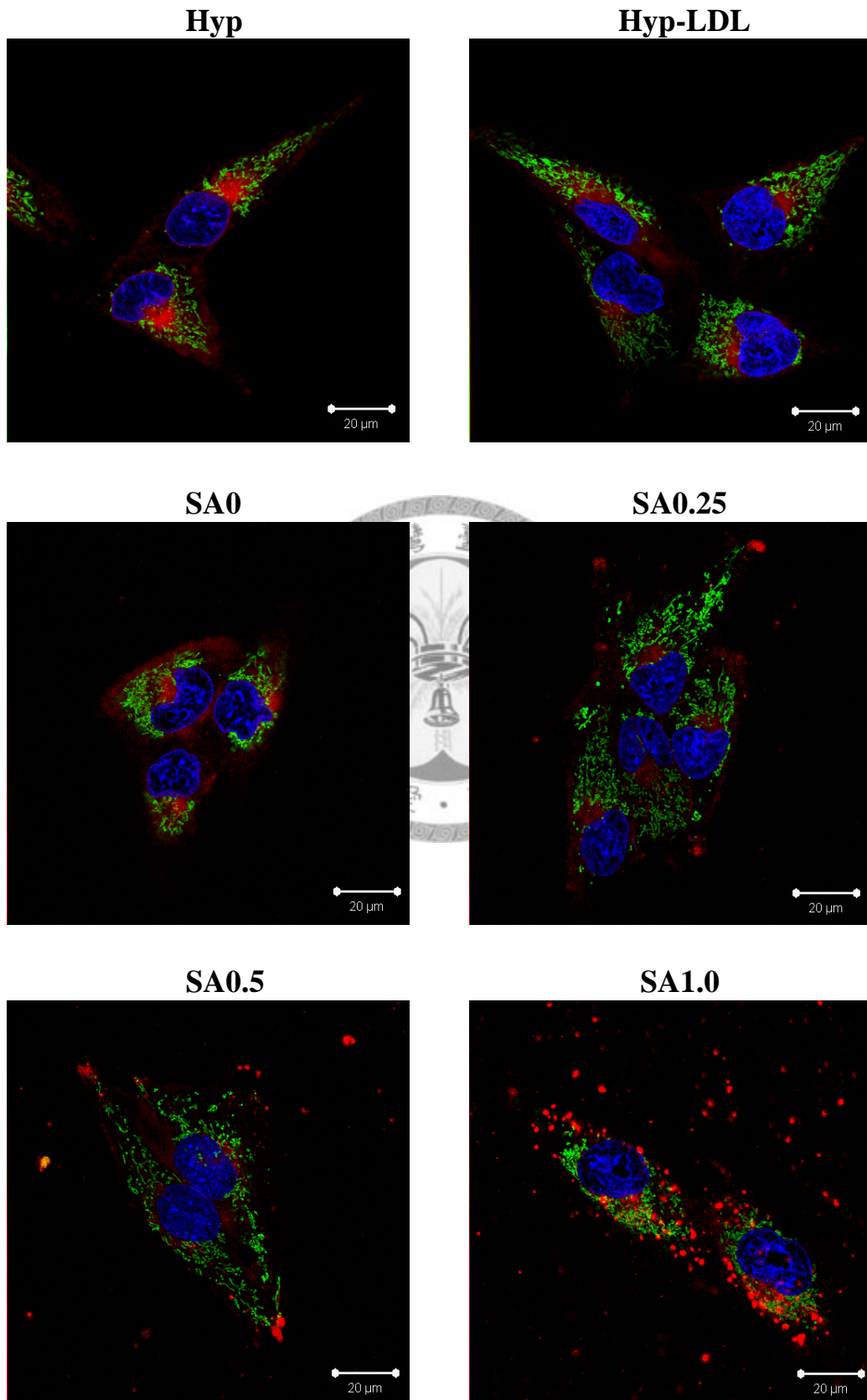
將細胞培養至九分滿，以 0.05% trypsin-0.02% EDTA (w/v) 將細胞由培養皿脫離，並將細胞液培養於 6 公分的培養皿 (3×10^5 cells/dish)，待培養 24 小時後，更換為 serum-free 之培養液並同時加入 Hyp、Hyp-LDL 及四種 liposomal Hyp (Hyp 濃度範圍均為 0.01~3 μ M) 並培養 3 小時，待培養完成後將細胞以 trypsin-EDTA 將細胞由培養皿脫離，以 1 mL PBS 沖洗後，離心 1000 rpm 5 分鐘，除去上層液，只留下沉殿細胞部份，最後置於冰上，以流式細胞儀測定。以 FL2 channel 做分析，各樣品均收集分析 10000 個細胞數。每組實驗均為三重覆之統計結果 (n=3)。實驗數據如圖十三所示。

3. 各類 Hypericin 製劑之胞內胞器分布比較

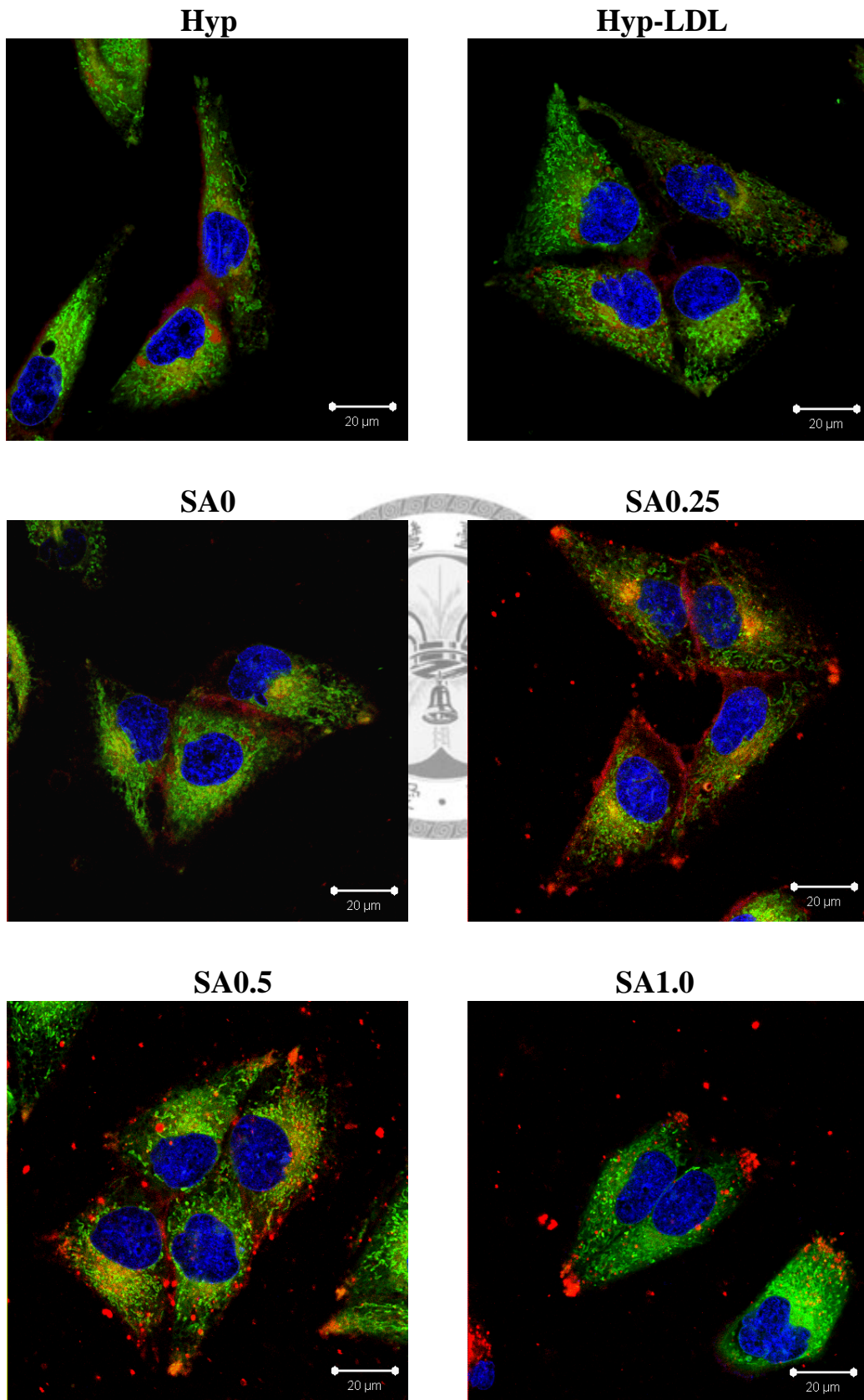
Hypericin 在 488 nm 的激發光照射下產生紅色螢光，故可應用正立共軛焦螢光顯微鏡觀察其胞內之分布。Hyp 具單態氧高產率，因單態氧的擴散距離短（約 20 nm）且持續時間短（約 $10^{-6}\sim 10^{-9}$ s），所以 Hyp 於胞內的分布會決定光照後首要傷害的部位。在本實驗中發現，在無血清的培養條件，將 Hep3B 細胞和 Hyp、Hyp-LDL 及四種 liposomal Hyp 製劑分別培養 3 小時，接著利用正立共軛焦螢光顯微鏡可觀察到各組 Hyp 均有分布在內質網（圖十四 B）及高基氏體的現象（圖十四 C）；在粒線體（圖十四 A）的染色下，各組實驗條件均無發現 Hyp 有明顯分布於粒線體的現象。在 Hyp、Hyp-LDL 及 SA0 組別中，其 Hyp 於細胞質的分布較為分散，且有些微分布於溶酶體（圖十四 D）。SA0.25、SA0.5 及 SA1.0 的組別中，Hyp 的螢光則呈現顆粒狀，且部份顆粒狀的 Hyp 有和溶酶體 colocalize 的現象。



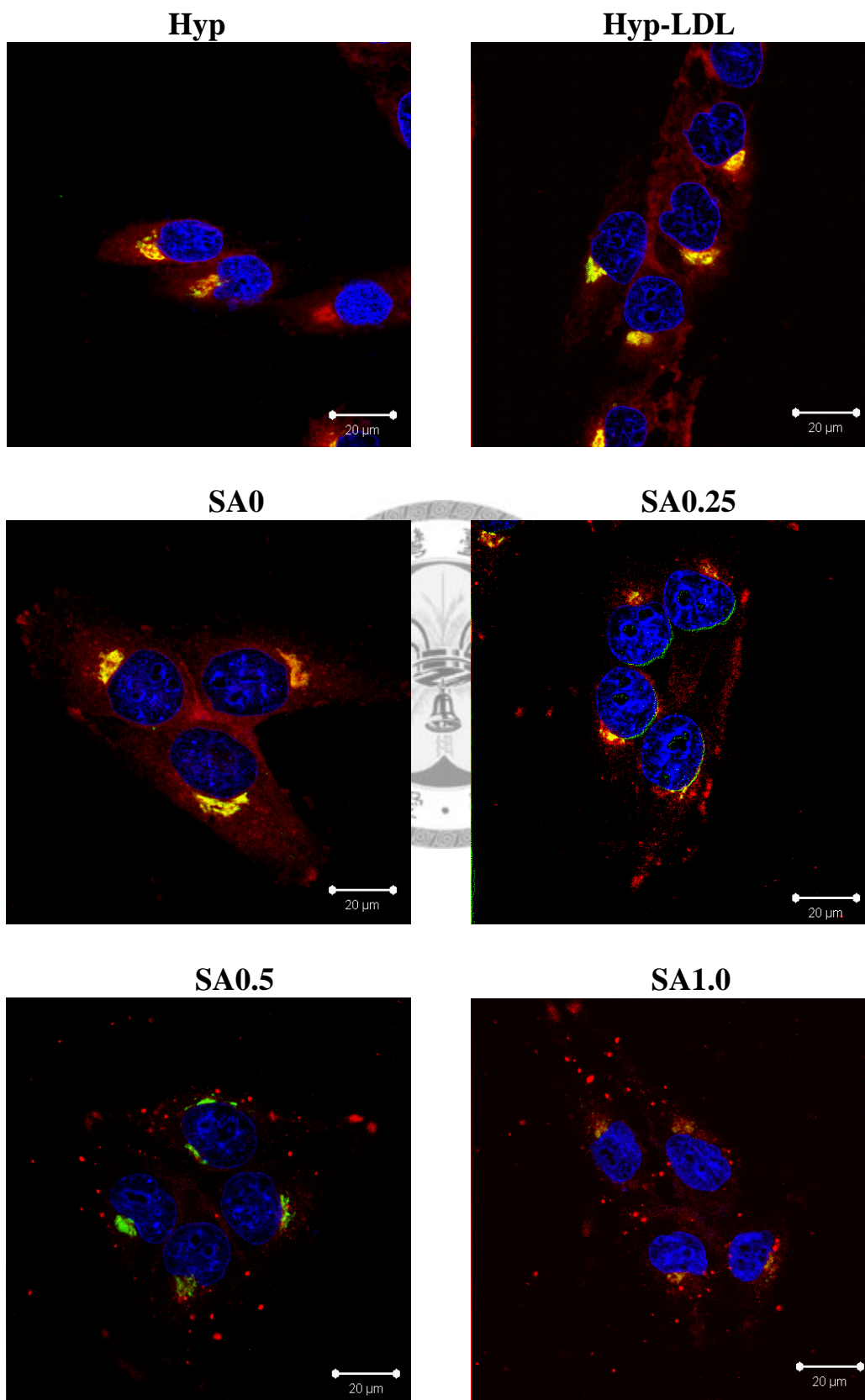
圖十四 A 粒線體



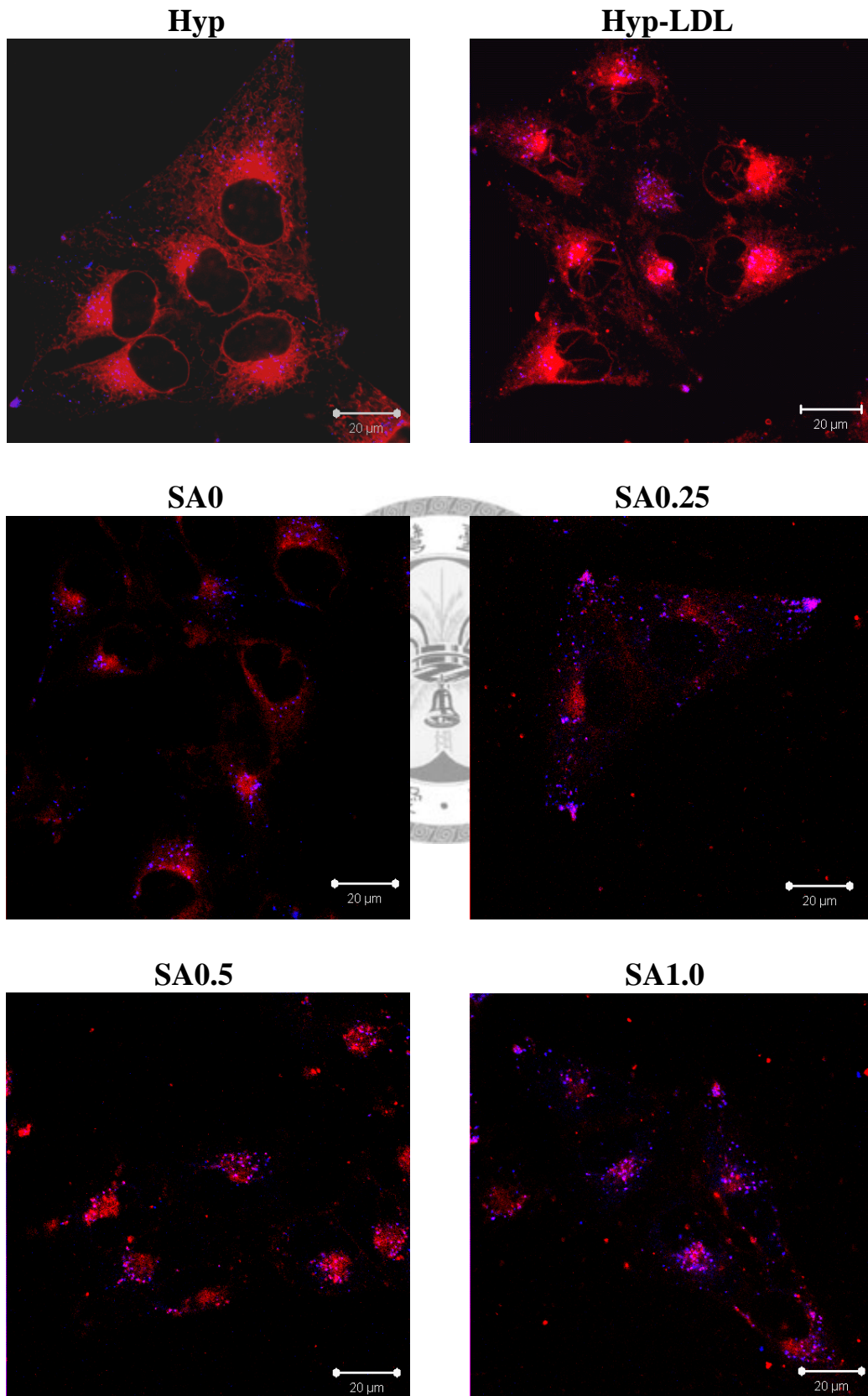
圖十四 B 內質網



圖十四 C 高基氏體



圖十四 D 溶酶體



圖十四、Hypericin 於各類實驗條件下於 Hep3B 細胞內胞器之分布
將細胞培養於含 2.4 公分已滅菌圓形蓋玻片的 6 公分培養皿內 (3×10^5 cells/dish)，待培養約 24 小時後，更換為無血清之培養液並分別加入 Hyp、Hyp-LDL 及四種 liposomal Hyp，Hyp 濃度均調整為 $1 \mu\text{M}$ ，待培養 3 小時後，分別進行 (A) 粒線體 (B) 內質網 (C) 高基氏體 (D) 溶酶體的染色，待染色完成後將蓋玻片自培養皿中取出，並置於載玻片上，接著以 Zeiss Axiovert 200M 正立共軛焦顯微鏡進行觀察。圖 (A)~圖 (C) 的粒線體、內質網及高基氏體皆為綠色螢光，紅色螢光皆為 Hyp，圖 (A)~圖 (C) 的藍色螢光為細胞核，圖 (D) 的藍色螢光為溶酶體。



4. 各類 Hypericin 製劑之細胞毒性分析

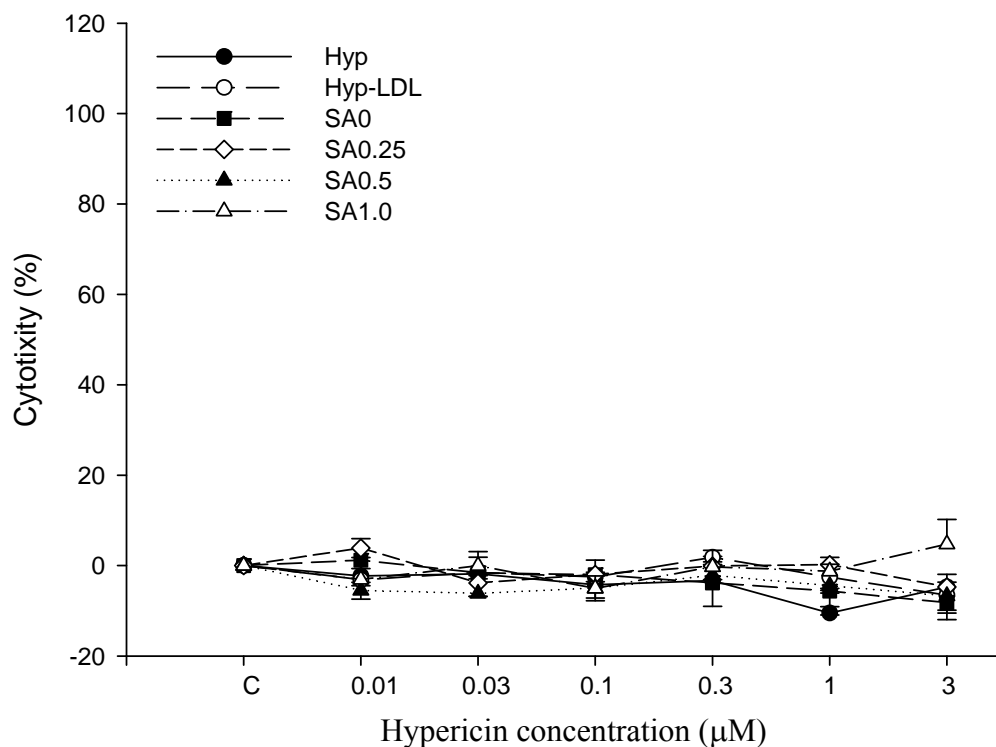
本研究以 MTT assay 進行在細胞毒性分析，Hyp、Hyp-LDL 及四組包覆 Hyp 的微脂粒分別與 Hep3B 於 serum-free 培養液條件下培養 3 小時，並照光 0、1、2、4 J/cm² 後，繼續培養 24 小時測量細胞毒性。Hep3B 與各組 Hyp 之光動力處理後的細胞毒性（圖十五），其結果顯示 Hyp、Hyp-LDL 及四組包覆 Hyp 的微脂粒，其各組均有隨 Hyp 濃度及光照強度的增加，細胞毒性均有明顯增加的現象，唯在各組未照光僅處理不同濃度 Hyp 的結果中（圖十五之一）並未顯示有明顯細胞毒性。在不同光照強度的結果顯示（圖十五之二~四），單處理 Hyp 光照後的細胞毒性最大，其次是 Hyp-LDL 組，再來是 SA0 組，各組添加 SA 的微脂粒其細胞毒性則較低，且各組間並無明顯差異。

在微脂粒組成中添加 SA 的各組微脂粒，在細胞攝取（圖十三）、胞內分布（圖十四）及細胞毒性（圖十五）的實驗上皆無較明顯之差異，故後續實驗僅以 Hyp 包覆濃度及包覆率較高（表七）的 SA0.5 進行後續之實驗。由細胞毒性分析結果發現，各組分別在不同光照強度下對 Hep3B 細胞之細胞毒性差異甚大，當 Hyp 濃度及光照強度太大可能會使細胞產生過量的單態氧及 ROS 使細胞以細胞壞死的型式死亡，故之後實驗我們即選擇中間光照強度（即 2 J/cm²），並選用各組 Hyp 的 IC₅₀（表八）進行後續細胞死亡機制探討。

表八、各組製劑於 2 J/cm² 光照強度下之 IC₅₀

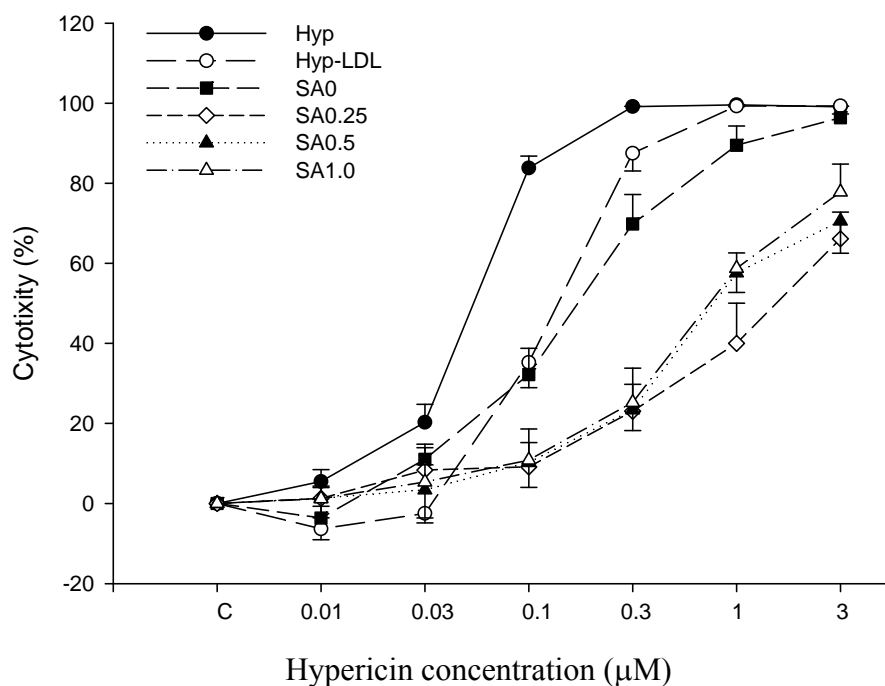
光照	Hyp	Hyp-LDL	SA0	SA0.25	SA0.5	SA1.0
2 J/cm ² Hyp IC ₅₀	28.26 nM	45.26 nM	83.20 nM	522.89 nM	551.26 nM	635.16 nM

(一) 光照 0 J/cm²



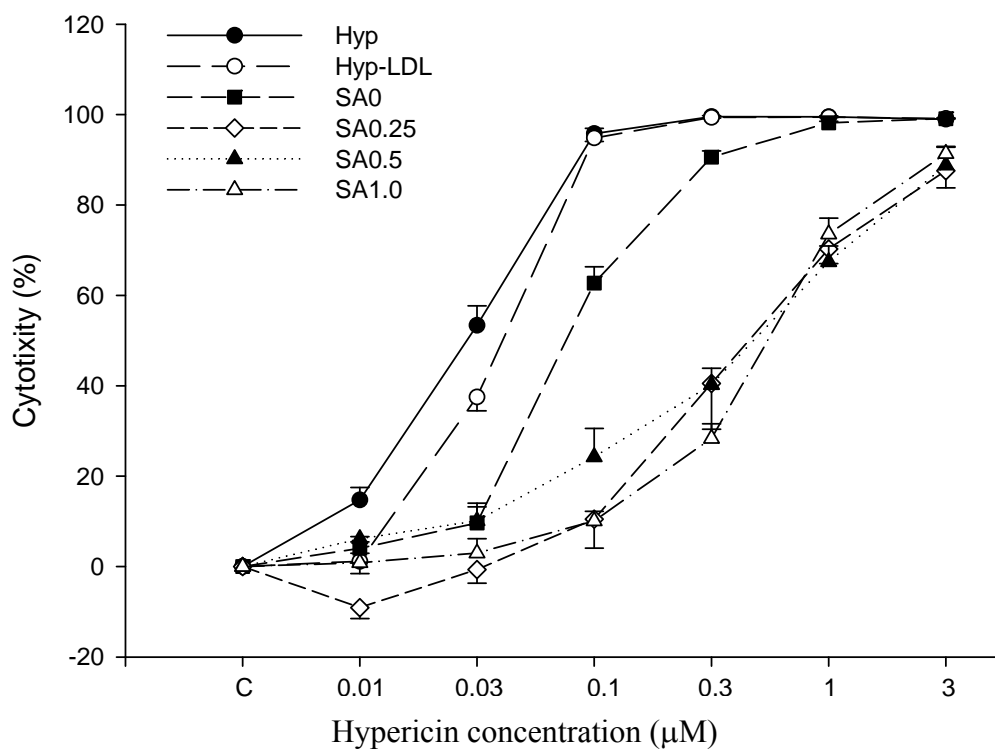
Hyp 濃度 組別	Control	0.01 µM	0.03 µM	0.1 µM	0.3 µM	1 µM	3 µM
Hyp	0%	-2.27 ± 7.03 %	-1.81 ± 6.37 %	-4.23 ± 4.79 %	-3.32 ± 9.27 %	-10.51 ± 2.46 %	-4.73 ± 1.84 %
Hyp-LDL	0%	-3.13 ± 2.32 %	-1.52 ± 2.45 %	-2.50 ± 1.82 %	1.82 ± 2.73 %	-2.57 ± 4.30 %	-6.53 ± 5.76 %
SA0	0%	1.20 ± 8.51 %	-1.60 ± 9.07 %	-2.01 ± 8.94 %	-3.81 ± 9.00 %	-5.65 ± 9.18 %	-8.21 ± 6.46 %
SA0.25	0%	3.88 ± 3.62 %	-3.81 ± 2.78 %	-1.95 ± 5.52 %	-0.09 ± 5.99 %	0.23 ± 2.76 %	-4.72 ± 4.84 %
SA0.5	0%	-5.49 ± 3.33 %	-6.14 ± 1.14 %	-4.96 ± 4.85 %	-2.14 ± 1.67 %	-4.43 ± 2.87 %	-6.70 ± 6.55 %
SA1.0	0%	-3.06 ± 4.13 %	-0.01 ± 5.37 %	-5.05 ± 4.82 %	-0.28 ± 1.97 %	-1.24 ± 2.67 %	4.74 ± 9.49 %

(二) 光照 1 J/cm²



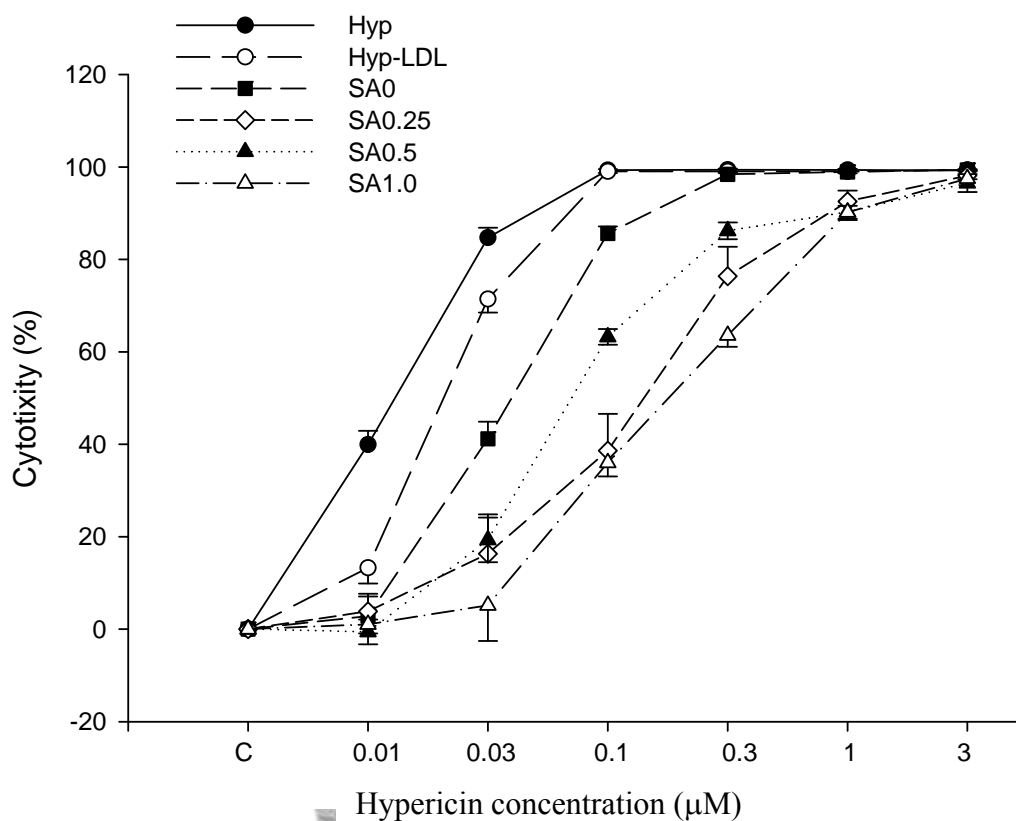
Hyp 濃度 組別	Control	0.01 μM	0.03 μM	0.1 μM	0.3 μM	1 μM	3 μM
Hyp	0%	5.49 ± 5.18 %	20.27 ± 7.87 %	83.82 ± 5.13 %	99.13 ± 0.14 %	99.60 ± 0.11 %	99.11 ± 0.23 %
Hyp-LDL	0%	-6.36 ± 4.66 %	-2.47 ± 4.11 %	35.21 ± 10.83 %	87.49 ± 7.68 %	99.29 ± 0.25 %	99.30 ± 0.03 %
SA0	0%	-3.62 ± 5.05 %	11.02 ± 6.63 %	32.20 ± 11.38 %	69.86 ± 12.72 %	89.48 ± 8.37 %	96.34 ± 1.63 %
SA0.25	0%	1.29 ± 4.74 %	8.36 ± 9.71 %	9.13 ± 10.53 %	23.04 ± 11.64 %	40.00 ± 17.41 %	66.12 ± 11.56 %
SA0.5	0%	1.32 ± 8.52 %	3.43 ± 12.23 %	10.25 ± 10.72 %	23.40 ± 8.98 %	57.63 ± 8.49 %	70.57 ± 13.90 %
SA1.0	0%	1.19 ± 5.50 %	5.38 ± 7.40 %	10.83 ± 13.50 %	25.28 ± 14.76 %	58.71 ± 6.71 %	77.81 ± 12.05 %

(三) 光照 2 J/cm^2



Hyp 濃度 組別	Control	0.01 μM	0.03 μM	0.1 μM	0.3 μM	1 μM	3 μM
Hyp	0%	14.74 ± 4.82 %	53.37 ± 7.48 %	95.78 ± 1.99 %	99.54 ± 0.34 %	99.51 ± 0.35 %	98.98 ± 0.11 %
Hyp-LDL	0%	1.17 ± 4.69 %	37.51 ± 5.27 %	94.83 ± 1.34 %	99.36 ± 0.24 %	99.44 ± 0.18 %	99.12 ± 0.03 %
SA0	0%	4.06 ± 2.43 %	9.66 ± 6.18 %	62.74 ± 6.23 %	90.56 ± 2.40 %	98.18 ± 0.59 %	99.07 ± 0.35 %
SA0.25	0%	-9.08 ± 4.20 %	-0.65 ± 5.23 %	10.47 ± 11.10 %	40.53 ± 17.53 %	70.28 ± 5.63 %	87.57 ± 6.58 %
SA0.5	0%	6.13 ± 0.91 %	10.14 ± 6.74 %	24.29 ± 10.87 %	40.24 ± 6.30 %	67.43 ± 6.10 %	88.81 ± 6.89 %
SA1.0	0%	0.85 ± 3.60 %	2.98 ± 5.34 %	10.10 ± 3.66 %	28.35 ± 5.61 %	73.57 ± 6.14 %	91.37 ± 2.71 %

(四) 光照 4 J/cm²



Hyp 濃度 組別	Control	0.01 μM	0.03 μM	0.1 μM	0.3 μM	1 μM	3 μM
Hyp	0%	39.94 ± 5.16 %	84.67 ± 3.79 %	99.31 ± 0.37 %	99.39 ± 0.43 %	99.35 ± 0.44 %	99.25 ± 0.11 %
Hyp-LDL	0%	13.29 ± 5.90 %	71.42 ± 5.05 %	99.02 ± 0.61 %	99.02 ± 0.52 %	99.00 ± 0.58 %	99.37 ± 0.18 %
SA0	0%	2.82 ± 7.37 %	41.17 ± 6.44 %	85.61 ± 2.66 %	98.39 ± 0.55 %	98.92 ± 0.39 %	99.35 ± 0.27 %
SA0.25	0%	3.84 ± 6.62 %	16.33 ± 14.74 %	38.63 ± 13.79 %	76.37 ± 10.97 %	92.51 ± 4.12 %	98.13 ± 1.54 %
SA0.5	0%	-0.57 ± 4.64 %	19.32 ± 8.38 %	63.24 ± 2.93 %	86.19 ± 3.14 %	90.21 ± 2.42 %	96.51 ± 3.35 %
SA1.0	0%	1.03 ± 3.40 %	5.14 ± 13.33 %	36.01 ± 5.11 %	63.55 ± 4.22 %	90.17 ± 2.84 %	97.49 ± 0.23 %

圖十五、Hypericin 光動力處理後 Hep3B 細胞之細胞毒性分析

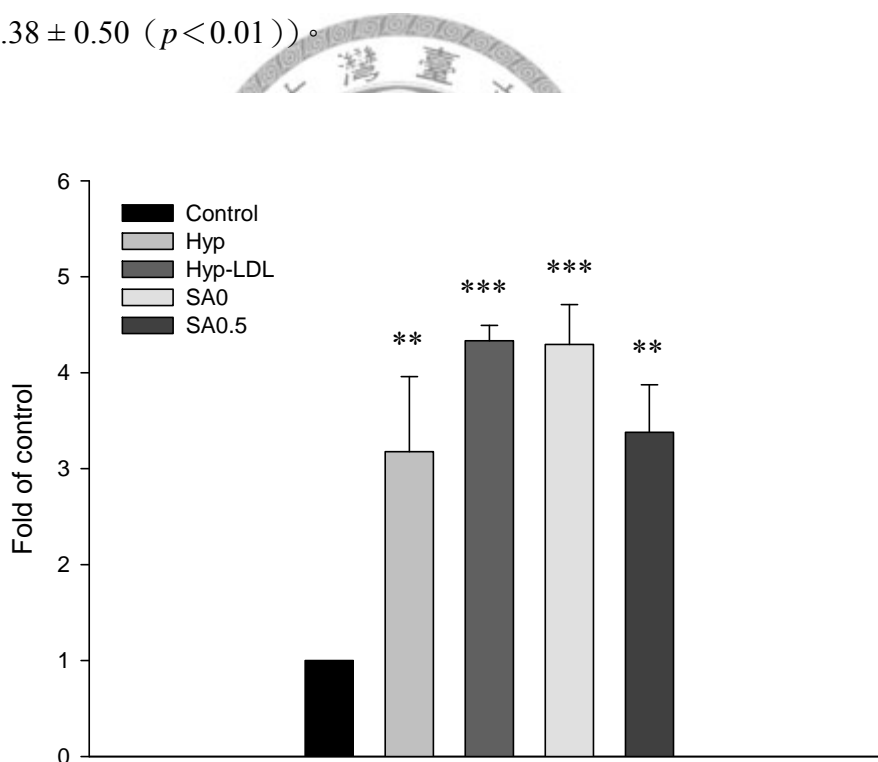
細胞於培養皿培養至九分滿，以 0.05% trypsin-0.02% EDTA (w/v) 將細胞由培養皿脫離，用 PBS 沖洗後，以培養基將細胞濃度調整為 10^5 cell/mL，並分別取 0.1 mL 之細胞液培養於 96 孔盤各孔中。待培養 24 小時細胞貼壁後，更換培養液為 serum-free 之 RPMI-1460 培養液，並同時加入 Hyp、Hyp-LDL 及四種 liposomal Hyp (Hyp 濃度範圍均調整為 0.01~3 μ M) 培養 3 小時，接著將培養液吸除，並以 0.1 mL 的 PBS 沖洗一次，之後再更換為含 10% FBS 且不含 phenol-red 之培養液，接著以 96 孔光照儀器分別給予光照 0 J/cm^2 、1 J/cm^2 、2 J/cm^2 及 4 J/cm^2 ，於光照後繼續培養 24 小時，之後再更換培養基並同時加入 500 μg MTT/mL 反應 2 小時，除去培養基後，最後以 0.1 mL DMSO 將紫色的 formazan 結晶溶解，並於波長 560 nm 下測定吸光值。每組實驗均為三重覆之統計結果 (n=3)。實驗數據如圖十五所示。



5. 各類 Hypericin 製劑之胞內鈣離子濃度檢測

本實驗以 Fluo 3-AM 測量胞內鈣離子濃度，Fluo 3-AM 本身並不會與鈣離子結合而產生螢光，而是當 Fluo 3-AM 進入細胞中，便會被細胞內的酯解酶 (esterase) 作用產生 Fluo 3，Fluo 3 會鈣離子結合，並同時產生螢光特性，其激發波長為 488 nm，並在 525 nm 產生放射光，據此特性，故可利用流式細胞儀進行分析。

在本實驗中採用 2 J/cm^2 光照劑量條件下，各組 Hyp 的 IC_{50} 進行，並在照光之後 30 分鐘偵測胞內鈣離子濃度。實驗結果顯示 (圖十六)，在照光後 30 分鐘，各組胞內鈣離子濃度均會明顯增加，但各組之間並無明顯差異 (和 control 組相比增加倍數依次為： 3.18 ± 0.78 ($p < 0.01$)、 4.33 ± 0.16 ($p < 0.001$)、 4.29 ± 0.42 ($p < 0.001$)、 3.38 ± 0.50 ($p < 0.01$))。



組別	Control	Hyp	Hyp-LDL	SA0	SA0.5
相對螢光強度	1	$3.18 \pm 0.78^{**}$	$4.33 \pm 0.16^{***}$	$4.29 \pm 0.42^{***}$	$3.38 \pm 0.50^{**}$

圖十六、Hypericin 光動力處理後 Hep3B 細胞之胞內鈣離子濃度分析

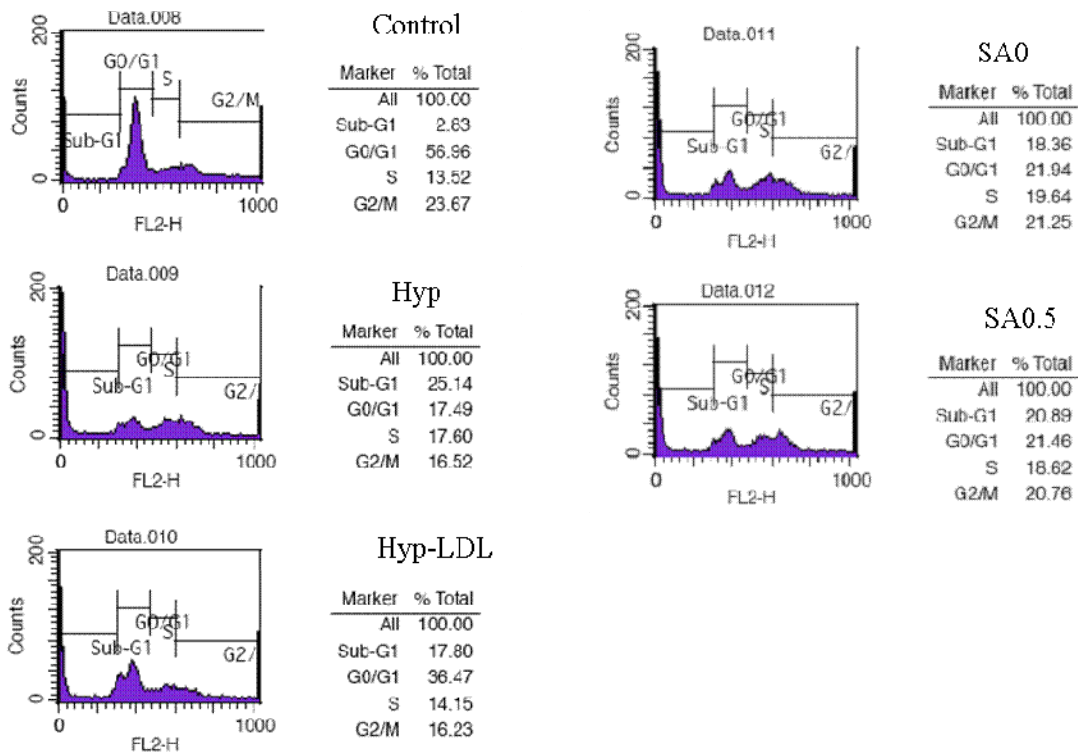
胞液培養於 3.5 公分的培養皿 (3×10^5 cells/dish)，待培養 24 小時後，更換為

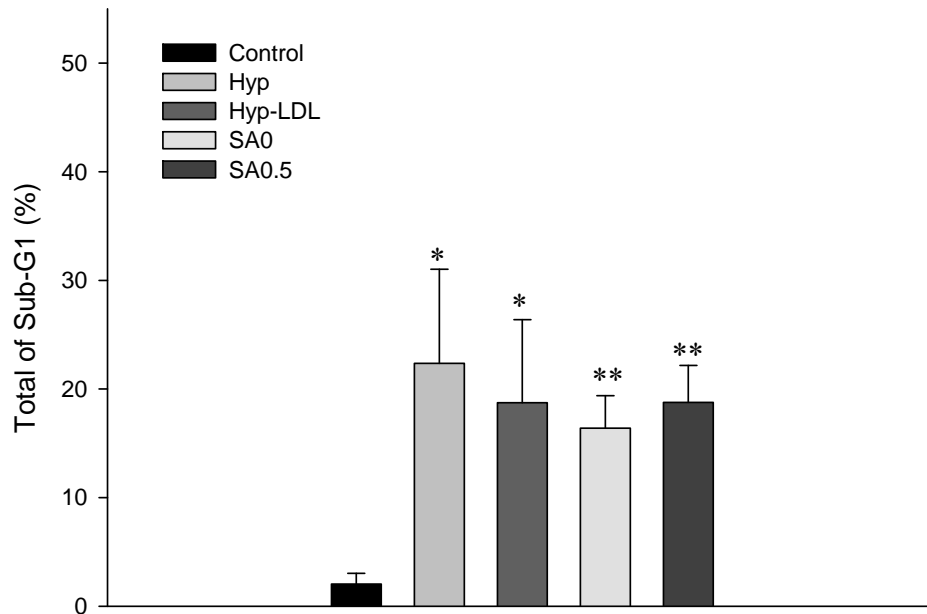
serum-free 之培養液並同時加入 Hyp、Hyp-LDL、SA0 及 SA0.5 (濃度採用在 2 J/cm^2 光照下, 各組 Hyp 的 IC_{50} , 分別為: Hyp 組 28.26 nM 、Hyp-LDL 組 45.26 nM 、SA0 組 83.20 nM 、SA0.5 組 551.26 nM) 培養 2.5 小時, 接著加入 $5 \mu\text{M}$ Fluo-3 繼續培養 0.5 小時, 待培養完成後以 3 mL 的 PBS 沖洗細胞, 並更換為含 10% FBS、無 phenol-red 之培養液, 接著以 6 公分培養皿光照儀器給予光照 2 J/cm^2 , 於光照後繼續培養 0.5 小時, 之後將細胞以 trypsin-EDTA 將細胞由培養皿脫離, 以 PBS 沖洗後, 離心 2000 rpm 10 分鐘, 除去上層液, 保留沉澱細胞部份, 最後置於冰上, 以流式細胞儀測定。以 FL1 channel 做分析, 各樣品均收集分析 10000 個細胞數。 $** (p < 0.01)$, $*** (p < 0.001)$, 與 control 組相比有統計差異, 每組實驗均為三重覆之統計結果 ($n=3$)。實驗數據如圖十六所示。



6. 各類 Hypericin 製劑對細胞週期及細胞凋亡影響

在本實驗中 Hyp 濃度均調整為在 2 J/cm^2 光照劑量下，各組 Hyp 製劑 IC_{50} 進行實驗，由細胞週期及細胞凋亡分析結果如圖十七，在細胞週期的分析並無停滯的跡象，但各組 Sub-G1 期的細胞比例皆有明顯增加，其此結果代表在本實驗條件下，光動力處理後的 24 小時即可發現其 DNA 有斷裂的現象，而當細胞進行細胞凋亡時，DNA 的斷裂便是其一項重要特徵，藉由本實驗發現利用 Hyp 進行的光動力處理後，確實可透過造成細胞凋亡的方式造成 Hep3B 細胞的死亡。





組別	Control	Hyp	Hyp-LDL	SA0	SA0.5
Sub-G1 phase	2.04 ± 1.00 %	22.36 ± 8.67 % *	18.75 ± 7.64 % *	16.41 ± 2.97 % **	18.76 ± 3.42 % **

圖十七、Hyp 製劑經光動力處理後 Hep3B 細胞之細胞週期及細胞凋亡分析

胞培養於 6 公分的培養皿 (3×10^5 cells/dish)，待培養 24 小時後，更換為 serum-free 之培養液並同時加入 Hyp、Hyp-LDL、SA0 及 SA0.5 (濃度採用在 2 J/cm² 光照劑量下，各組 Hyp 製劑的 IC₅₀，分別為：Hyp 組 28.26 nM、Hyp-LDL 組 45.26 nM、SA0 組 83.20 nM、SA0.5 組 551.26 nM) 培養 3 小時，待培養完成後以 3 mL 的 PBS 沖洗細胞，並更換為含 10% FBS 且不含 phenol-red 之培養液，接著以 6 公分培養皿光照儀器給予光照 2 J/cm²，之後置於培養箱繼續培養 24 小時。待培養完成後將細胞以 trypsin-EDTA 將細胞由培養皿脫離，以 PBS 沖洗後，離心 2000 rpm 10 分鐘，除去上層液，保留沉澱細胞部份，以 70%酒精將細胞沖散，置於 -20°C 冰箱 24 小時，之後離心

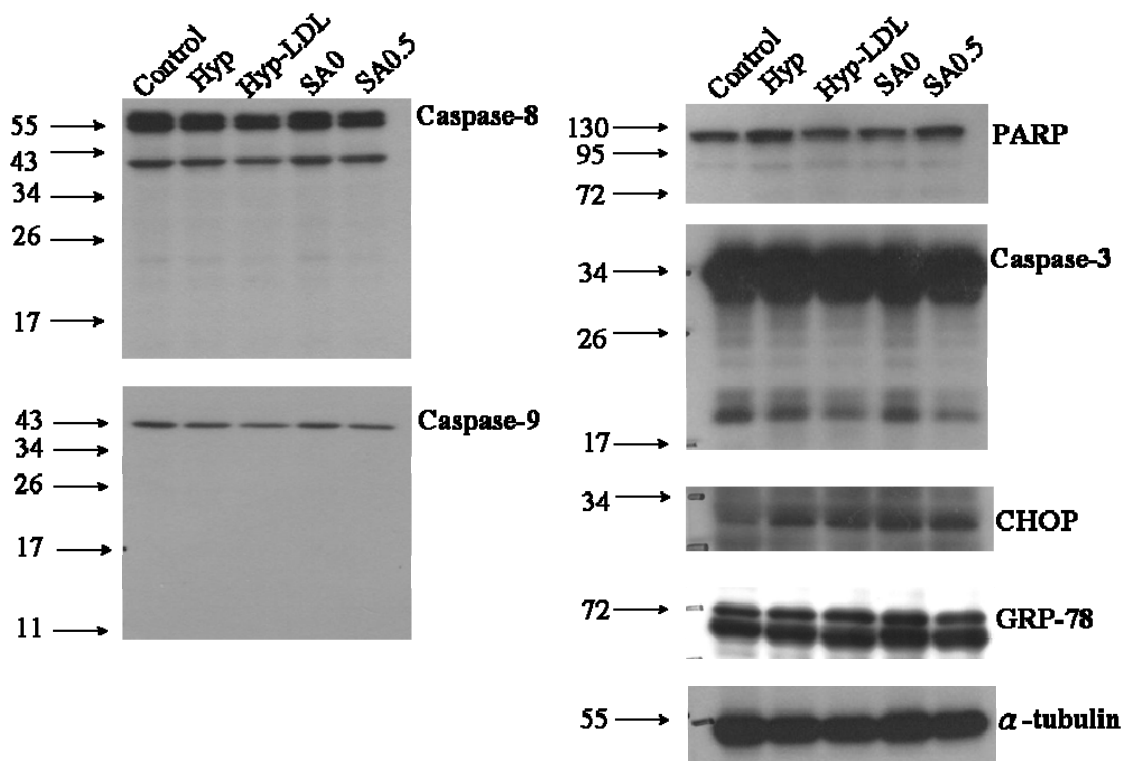
2000 rpm 10 分鐘，吸除上清液，並以 PBS 沖洗沉澱細胞，接著離心 2000 rpm 10 分鐘，留下沉澱細胞部份，最後於避光條件下加入 DNA 染劑(含 1% Triton X-100、100 g/mL RNase A 及 80 g/mL propidium iodide 溶於 PBS) 染色 30 分鐘後，即可以流式細胞儀分析細胞週期和細胞凋亡情形。以 FL2 channel 做分析，各樣品均收集分析 10000 個細胞數。 $*(p < 0.05)$ ， $** (p < 0.01)$ ，與 control 組相比有統計差異每組實驗均為三重覆之統計結果 (n=3)。實驗數據如圖十七所示。



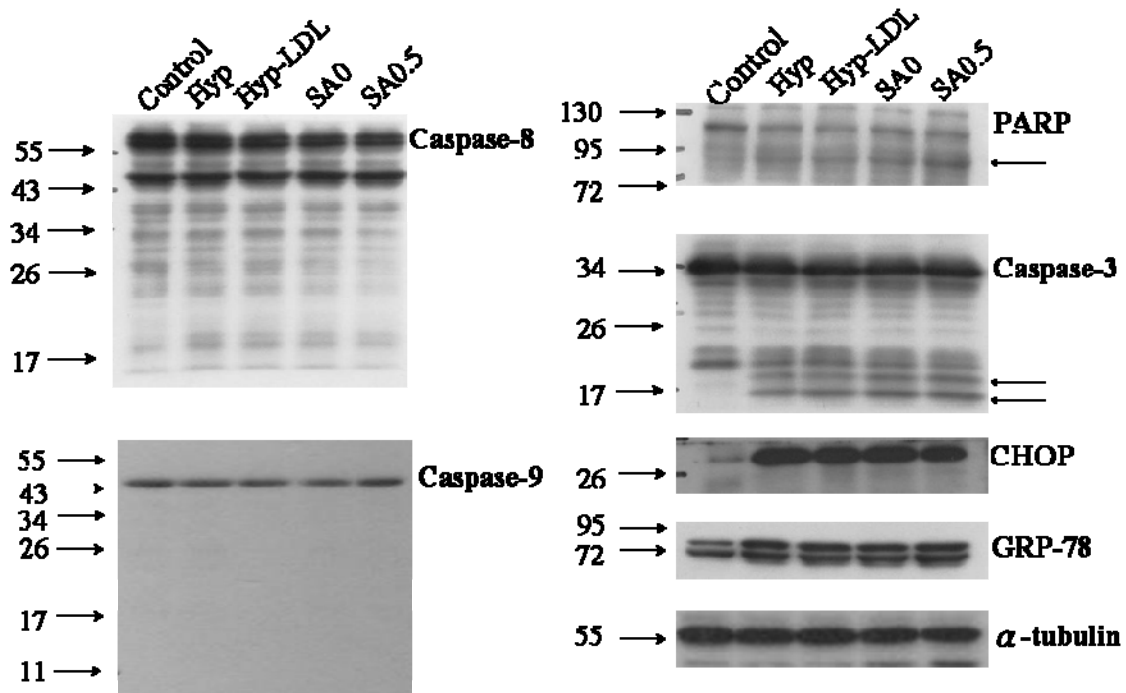
7. 各類 Hypericin 製劑對細胞凋亡及其相關蛋白表現之影響

為了更進一步證實 Hyp 於光照後所引發 Hep3B 細胞凋亡之路徑，故本實驗即利用西方點墨法，進行細胞凋亡相關蛋白的活性檢測。由西方點墨法實驗發現，當 Hyp 濃度均調整為在 2 J/cm^2 光照劑量下，以各組 Hyp 製劑 IC_{50} 進行實驗，當各組進行光動力處理後 6 小時（圖十七之（一）），各組 C/EBP homologous protein（CHOP）蛋白均有明顯活化之現象，但其它蛋白如：caspase-3，-8，-9，PARP 及 GRP-78 並無明確活化之跡象。當光動力處理後的 24 小時（圖十七之（二）），各組之 glucose-regulated protein 78（GRP-78）有明顯活化的現象，而 CHOP 的活化情形和光照後 6 小時相比亦有明顯的增加；細胞凋亡相關蛋白如：caspase-3 有活化的現象，其在分子量 17 及 19 kDa 處出現明顯的 cleaved form，而在各組也可發現 PARP 在分子量 113 kDa 處的 pro-form 有明顯減少，且分子量 89 kDa 處的 cleaved form 有明顯被切割的現象，但 caspase-8，-9 並無活化的現象。經由本實驗結果可知，Hyp 在光照處理後短時間（6 小時）即可造成 Hep3B 細胞 ER stress 的產生，並在長時間（24 小時）可透過細胞凋亡的方式引起 Hep3B 細胞的死亡。

（一） 光照處理後 6h



(二) 光照處理後 24h



圖十八、各類 Hypericin 製劑光動力處理後之細胞凋亡相關蛋白之表現

將細胞液培養於 6 公分的培養皿 (3×10^5 cells/dish)，待培養 24 小時後，更換為 serum-free 培養液並同時加入 Hyp、Hyp-LDL、SA0 及 SA0.5 培養 3 小時，濃度採用在 2 J/cm^2 光照強度，各組 Hyp 的 IC_{50} 分別為：Hyp 組 28.26 nM、Hyp-LDL 組 45.26 nM、SA0 組 83.20 nM、SA0.5 組 551.26 nM)，待培養完成後以 3 mL 的 PBS 沖洗細胞，並更換為含 10% FBS 且不含 phenol-red 之培養液，接著以 6 公分培養皿光照儀器給予光照 2 J/cm^2 ，於光照後分別繼續培養 6 及 24 小時，將細胞以 trypsin-EDTA 將細胞由培養皿打下，以 PBS 沖洗後，離心 2000 rpm 10 分鐘，除去上層液，只留下沉澱細胞部，以 lysis buffer 於冰上作用 15 分鐘，用 12000 rpm 離心 15 分鐘，取上清液蛋白定量後，將蛋白質收集液以 5 倍 sample buffer (0.156 M Tris、1% SDS、25% glycerol、12.5% β -mercaptoethanol 與 0.2% bromophenol blue) 以 4:1 (蛋白質收集液:5 倍 sample buffer) 的比例混合均勻，於 95°C 加熱 15 分鐘，接著以 SDS-PAGE 將蛋白分離，接著轉漬至 PVDF membrane 上後，以 10% 脫脂牛奶阻斷非特異性蛋白的結合，並使用特定之一級及二

級抗體辨認相關蛋白，最後加入 ECL™ 溶液至 PVDF membrane 上，並於暗房以 X 光片觀測蛋白表現。

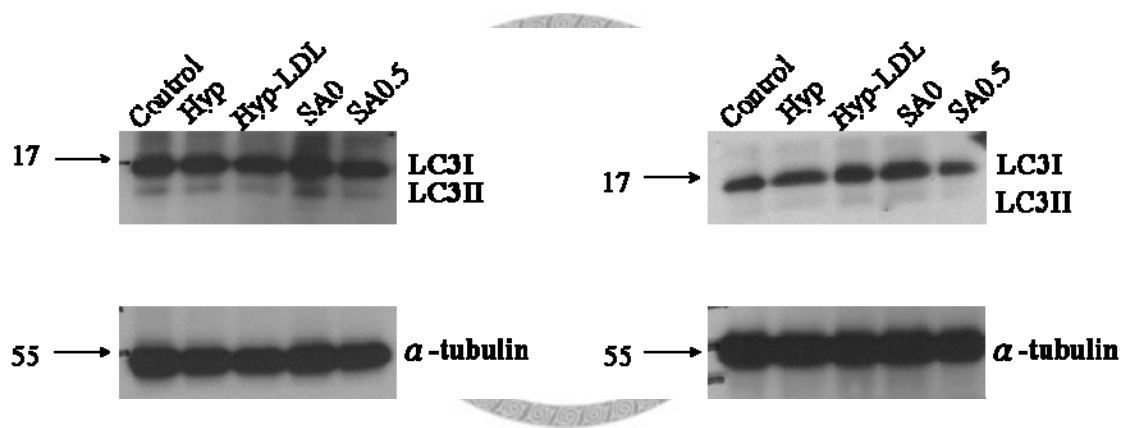


8. 各類 Hypericin 製劑對細胞自噬相關蛋白表現之影響

在光動力治療中所引起的細胞死亡中，細胞自噬扮演重要角色，因細胞可透過細胞自噬將胞內受損胞器及蛋白分解，進而提高細胞的存活，但當細胞自噬過度活化，亦可能引起細胞的死亡。在細胞自噬指標蛋白 LC3I/LC3II (microtubule associated protein light chain 3 I/II) 的蛋白表現結果 (圖十九之 (一) 及 (二))，在各組 Hyp 濃度均調整為 IC₅₀ 劑量時，並在照光後的 6 小時及 24 小時均未發現 LC3I 有轉型成 LC3II 的現象，此結果顯示在本實驗條件下，Hyp 於光照後所引起 Hep3B 細胞的死亡並未涉及細胞自噬的路徑。

(一) 光照後 6h

(二) 光照後 12h



圖十九、各類 Hypericin 製劑對細胞自噬相關蛋白表現之影響

將細胞液培養於 6 公分的培養皿 (3×10^5 cells/dish)，待培養 24 小時後，更換為 serum-free 培養液並同時加入 Hyp、Hyp-LDL、SA0 及 SA0.5 培養 3 小時，濃度採用在 2 J/cm^2 光照劑量下，各組之 Hyp 的 IC₅₀，分別為：Hyp 組 28.26 nM、Hyp-LDL 組 45.26 nM、SA0 組 83.20 nM、SA0.5 組 551.26 nM)，待培養完成後以 3 mL 的 PBS 沖洗細胞，並更換為含 10% FBS 且不含 phenol-red 之培養液，接著以 6 公分培養皿光照儀器給予光照 2 J/cm^2 ，於光照後分別繼續培養 6 及 24 小時，將細胞以 trypsin-EDTA 將細胞由培養皿打下，以 PBS 沖洗後，離心 2000 rpm 10 分鐘，除去上層液，只留下沉澱細胞部，以 lysis buffer

於冰上作用 15 分鐘，用 12000 rpm 離心 15 分鐘，取上清液蛋白定量後，將蛋白質收集液以 5 倍 sample buffer (0.156 M Tris、1% SDS、25% glycerol、12.5% β -mercaptoethanol 與 0.2% bromophenol blue) 以 4:1 (蛋白質收集液: 5 倍 sample buffer) 的比例混合均勻，於 95°C 加熱 15 分鐘，接著以 SDS-PAGE 將蛋白分離，接著轉漬至 PVDF membrane 上後，以 10% 脫脂牛奶阻斷非特异性蛋白的結合，並使用特定之一級及二級抗體辨認相關蛋白，最後加入 ECLTM 溶液至 PVDF membrane 上，並於暗房以 X 光片觀測蛋白表現。



第陸章 討論

實驗光源限制

在光動力治療中，除了光敏感藥物外，光源的提供亦扮演同等的重要角色，因光敏感劑需倚靠適合波長的光源以產生光動力治療及光動力診斷的目的，目前應用在光動力治療研究上的光源有[7, 61]：

雷射 (laser)：

雷射光源可提供單一波長及高輸出能量等特性，故可縮短光動力治療時激發光敏感劑所需的光照時間，但也因為雷射的單一波長特性，故在考慮光敏感劑激發波長的考量下，雷射光源的選擇上便顯得較受限制，也因為雷射光源儀器較為昂貴、低光照面積及低輕便性等缺點，限制了雷射光源應用於光動力治療研究使用的普及性。

廣波長光源 (broadband lamp)：


常見的光波長照射器如：氙氣燈 (xenon arc lamp) 及金屬鹵化物燈 (metal halide lamp)，此類型的光源著便宜及易操作等優點，廣波長光源可作為多種光敏感劑之激發光源，但也因廣波長之特性，故在使用上需加裝濾鏡以過濾其它波長的光，如紫外線及紅外線。和雷射光源相比雖具有較大的光照面積，但在光源強度上卻比雷射低得許多，故在光動力治療上也需要較多光照時間以活化光敏感劑。

發光二極體 (light emitting diode ; LED)：

LED 光源和廣波長光源相似，都具有便宜及易操作等優點，但不同的 LED 光源擁有的不同的激發波長，其波長選擇範圍可從 350 nm 至 1100 nm，且 LED 光源的波長較為集中 (bandwidth 約 5~10 nm)，唯因能量輸出較低故限制了 LED 光源於光動力治療的應用性。

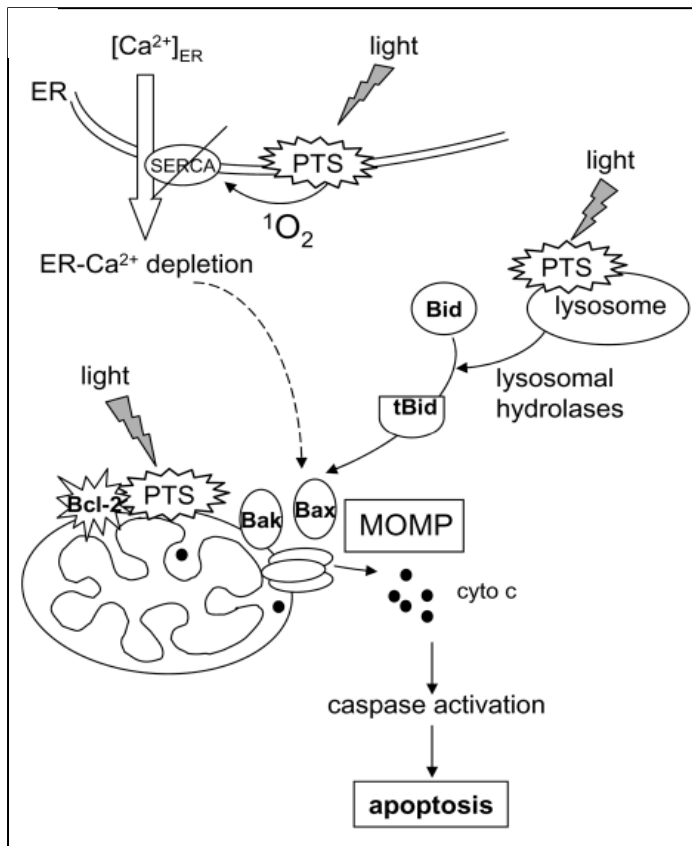
本實驗利用 LED 燈作為光敏感劑激發光源，96 孔盤光照儀器及 6 公分培養皿光照儀器之能量輸出表即可發現，各 LED 光源之能量間仍有差異，且因各光源間距的問題，可能使實驗進行光照時，其各光源可能有折射及光照面積重疊等干擾

影響，進而影響實際換算之光照劑量，並造成實驗上的誤差。本實驗中利用 Hyp 螢光的特性，進行了微脂粒包覆率的測定及細胞攝取實驗，但微脂粒的成份（如：DSPC、Chol 及 SA）可能會對螢光讀值產生影響，故在實驗進行前，可先針對未包覆 Hyp 的微脂粒進行螢光讀值的測定，或是針對不同比例的磷脂質成份和 Hyp 混合，觀察螢光讀值是否會隨磷脂質比例的不同產生變化。在胞內分布實驗結果發現，帶有正電荷的微脂粒（SA0.25、SA0.5 及 SA1.0）在螢光影像上在細胞外也發現許多顆粒狀的紅色螢光，可能在正電荷的微脂粒和細胞培養的過程亦會貼附於蓋玻片表面，並在之後染色的結果上影響結果的判讀，故在之後進行帶電荷微脂粒的分布實驗，可同時針對明視野及螢光影像的結果進行分析，以釐清胞內及胞外 Hyp 的分布情形。



各種光敏感劑都具有不同的特性，故在進入細胞後的胞器分布亦有所不同，因光敏感劑於光照處理後產生的單態氧及 ROS 作用範圍及半生期都不長，故光敏感劑所標的的胞器也等於光動力處理後首要破壞的地方，進而決定後續細胞內訊息傳遞所引起的反應(圖二十)：當光敏感劑分布於粒線體時(如：silicon phthalocyanine 4；PC-4)，在光照處理後便立即引起 Bcl-2 蛋白的破壞，使粒線體內促進細胞凋亡的物質(如：cytochrome c)釋出至細胞質，並引起細胞凋亡的進行[62]。當光敏感劑分布於內質網時(如：Hyp)，便在光照處理後造成 SERCA 蛋白的破壞，造成胞內鈣離子的失恆，接著便引起 Bax 轉位至粒線体外膜上，並造成粒線体外膜通透性的增加，使粒線體內促進細胞凋亡的物質釋出至細胞質，並引起後續細胞凋亡機制的進行[50]，在本研究結果也發現，Hyp 於光照處理後會引起 Hep3B 細胞內鈣離子的失衡，並透過產生 ER-stress 造成後續細胞凋亡機制的進行，但是否和文獻上透過 SERCA 蛋白的破壞而引起，仍有待進一步探討。當光敏感劑分布溶酶體時如：(mono-L-aspartyl chlorin e6；NPe6)，在光照處理後造成溶酶體膜的破壞，使溶酶體水解酶(如：cathepsin D)釋出至細胞質，溶酶體水解酶接著便會透

過切割 Bid 蛋白，使 Bid 活化引起粒線體外膜通透性的增加，造成 cytochrome c 由粒線體適放至細胞質而引起 caspase-9 及 caspase-3 的活化，並使細胞最後產生細胞凋亡[50, 63-64]。本研究將各組 Hyp 製劑與細胞培養 3 小時，觀察到 Hyp 均有明顯分布於內質網及高基氏體，並在 2 J/cm² 光照處理後 24 小時可造成細胞凋亡的現象，在本實驗室先前研究發現，Hyp 在和細胞培養 1 小時則觀察到 Hyp 有明顯分布在細胞膜的現象[65]，文獻指出，當光敏感劑分布於細胞膜時，在光照處理後則容易造成細胞壞死的現象[66-67]。



圖二十、各胞器光傷害後所引起的細胞凋亡 [64]

PTS : Photosensitizers

SERCA : Sarco (endo) plasmic-reticulum Ca²⁺-ATPase 2

ER : Endoplasmic reticulum


MOMP : Mitochondrial outer membrane permeabilization

Cyto c : Cytochrome c

許多研究指出，Hyp 於細胞內主要分布於內質網及高基氏體，本研究中亦發現相似的結果，在 Hyp 胞內分布實驗結果（圖十四）發現，Hyp 於 Hep3B 細胞內主要分布於高基氏體及內質網，細胞凋亡實驗結果（圖十七）顯示，在 2 J/cm^2 光照劑量，採用各組 Hyp 製劑的 IC_{50} 進行後續的實驗，在光照後 30 分鐘及 24 小時分別可見胞內鈣離子濃度的增加（圖十六）及到細胞週期 Sub-G1 象限有明顯增加，並在細胞凋亡相關蛋白表現（圖十八）發現，光照後 6 小時即可發現 CHOP 蛋白有明顯活化，光照後 24 小時更可見 GRP-78 有明顯活化，CHOP 及 GRP-78 為 ER-stress 產生的重要指標，且光照後 24 小時也 PARP 及 caspase-3 蛋白有明顯被切割且活化的跡象，但 caspase-8 及 caspase-9 並無活化現象，此結果說明 Hyp 於光照後可引起 Hep3B 細胞引起 ER-stress，最後便會透過細胞凋亡的路徑引起 Hep3B 細胞的死亡。在光動力處理後的 6 小時及 24 小時分別檢測細胞自噬的指標蛋白 LC3I/LC3II 的蛋白表現（圖十九），其結果並未發現 LC3 I 有轉型為 LC3II 的現象，故在本研究中並未發現 Hep3B 細胞在 Hyp 光動力處理後有引起細胞自噬的現象，但在其他研究中指出，當 Hyp 光動力處理後所引起的細胞凋亡現象被抑制時，細胞自噬便會主要細胞死亡的方式[50]，故當 Hyp 光動力處理對細胞凋亡機制具抵抗力的細胞時，細胞自噬可能成為主要的死亡方式。

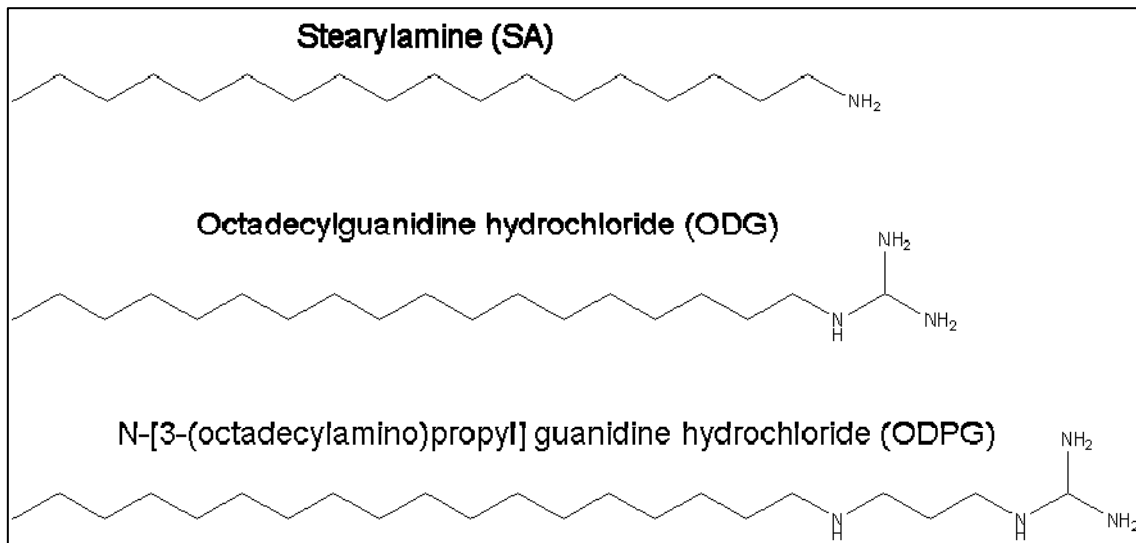
Hyp 高脂溶性，在水溶液中易產生聚集（aggregate）的現象，不利 Hyp 應用於未來動物或臨床試驗的進行與發展。本研究使用微脂粒及低密度脂蛋白做為 Hyp 的藥物載體，以利 Hyp 在於未來動物或臨床試驗的進行與發展。本研究使用飽和脂肪酸的磷脂質 DSPC，並在組成中添加膽固醇以提高微脂粒的穩定性，並利用 SA 作為正電荷微脂粒的材料，其電荷量可由 Zetasizer 測量結果得知（表六），其電荷量隨 SA 莫耳比例的增加而有增加的趨勢。有研究顯示在組成中添加 SA 將會使微脂粒的粒徑增加[68]，但本研究因考量後續細胞實驗的進行，故在粒徑上將不同組成之微脂粒粒徑均控制在 170 nm 左右，使後續細胞實驗進行時將各組粒徑差

異所產生的干擾因素降至最近，在微脂粒保存穩定性結果可見，SA1.0 組的微脂粒在保存 10 天後平均粒徑有變大的趨勢，原因可能是因為當 SA 莫耳比提高時可能改變原本 DSPC 及膽固醇於微脂粒上的排列且 SA 可能在微脂粒表面分布不均，造成微脂粒膜表面的不穩定，微脂粒為了趨於最穩定的狀態，可能造成 SA 從膜上脫離形成 micelles，造成微脂粒的變小，這些粒徑較小的微脂粒可能又會繼續聚集或融合，使微脂粒的粒徑產生變化。在包覆率結果（表七）可見 SA0.5 脂粒的組成比例其包覆率及最終 Hyp 的濃度皆較其它比例組成的正電荷微脂粒高，且因各組正電荷微脂粒在細胞攝取實驗（圖十三）、Hyp 之胞內各胞器分布研究（圖十四）及細胞毒性測試（圖十五）皆無明顯差異，故後續細胞實驗部份便僅以 SA0.5 組進行。



文獻指出正電荷的微脂粒可透過和細胞膜表面的負電荷基團結合以促進微脂粒將藥物傳遞至細胞內[69-70]，但在本研究中，細胞攝取實驗（圖十三）結果發現，Hep3B 細胞對帶正電荷微脂粒攝取反而較中性微脂粒低。細胞毒性測試結果發現（圖十五），各組在未給予光照的條件下，若僅處理藥物並未對 Hep3B 細胞的生存率產生影響，此結果可說明 Hyp 對於 Hep3B 細胞不具有暗毒性且各組劑型也不會對 Hep3B 細胞產生毒性，但在給予不同光照劑量條件下，可發現各組正電荷微脂粒劑型所包覆 Hyp 經光動力處理後所產生的毒性仍為最低，但此結果和細胞攝取實驗結果相似，故從細胞攝取實驗亦可解釋細胞毒性實驗結果，因 Hep3B 細胞對帶正電荷微脂粒之攝取量較差，使得胞內 Hyp 濃度較低，使得在光動力處理後，其產生之毒性亦較低。在 Hyp 胞內分布實驗結果發現（圖十四），帶正電荷微脂粒（SA0.25、SA0.5、SA1.0）和中性微脂粒、Hyp 及 Hyp + 2.5 μg LDL/mL（Hyp-LDL）組別相比，Hyp 的螢光呈現較為集中且呈現顆粒性，並有部份和溶酶體產生 colocalization 的現象，但在後續胞內鈣離子濃度實驗（圖十六）及細胞凋亡實驗（圖十七、十八）中，當各組 Hyp 濃度均調整為 IC_{50} 時，並未發現正電

荷微脂粒結果和其它組相比有明顯差異，但也有研發現當部份 Hyp 分布於溶酶體時，在光照後未發現溶酶體有受損且也未發現溶酶體內水解酵素，因在微脂粒的光照穩定性檢測結果（圖十二），各組微脂粒在光照 20 J/cm^2 條件下仍未看到微脂粒穩定性有受影響，所以可能因為微脂粒的組成穩定，故分布於溶酶體內的 Hyp 在光照處理後並未對溶酶體產生破壞，也可能因為分布於溶酶體的 Hyp 的量不足，所以在光照後並未對溶酶體產生影響，故詳細情形仍有待進一步探討。帶正電荷微脂粒之實驗結果和本實驗起初之實驗目的有所不同，其推測原因可能為正電荷材質的結構因素所導致，有研究發現，當使用碳數較多的正電荷脂質時（N-[3-(octadecylamino)propyl] guanidine hydrochloride；ODPG），比低碳數的正電荷脂質（octadecylguanidine hydrochloride；ODG）有更好的藥物遞送效果（圖二十一），因使用碳數較多的正電荷脂質時，在微脂粒表面便可產生較大的正電荷基團，使微脂粒能更有效及迅速的和負電荷表面的細胞膜結合，並促進微脂粒的傳遞，但在本研究中，所使用的 SA 其正電荷基團較小，所以推測可能需更多的時間與細胞膜結合，以進行藥物遞送[58]。另一方面，有研究比較肝組織對中性、正電荷及負電荷微脂粒的攝取情形發現，負電荷微脂粒分布於肝組織的量比正電荷及中性的微脂粒多[71-72]，在本研究中並未針對負電荷的微脂粒做相關的分析及探討，故後續便可同時針對中性、正電荷及負電荷進行比較，以釐清帶電荷微脂粒在藥物傳遞中的影響為何。

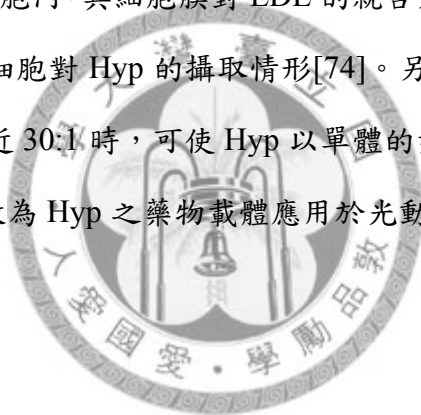


圖二十一、正電荷脂質結構比較圖

在本研究中，細胞攝取的量是 Hyp 組較多，其次為 Hyp-LDL 組，各組微脂粒則相對較低，但並不代表微脂粒在研究及應用上毫無價值，因為在本研究中並無利用正常的細胞做為比較，所以 Hyp 組有可能進入正常細胞的量也很大，並對正常細胞產生毒性，在微脂粒製劑中，雖然細胞的攝取量較低，但在正常細胞的攝取量可能相對更低，並在癌細胞與正常細胞間產生選擇性。過去文獻針對大鼠的正常肝組織及肝癌組織的細胞膜成份進行分析，結果顯示肝癌組織細胞膜上的膽固醇和磷脂質的莫耳比值（膽固醇/磷脂質）有明顯上升的現象，此結果說明肝癌組織的細胞膜流動性（fluidity）和正常肝組織相比較低，在磷脂質的分析上也發現肝癌組織細胞膜成份和正常肝臟相比，phosphatidylethanolamine（PC）的量有明顯減少且 phosphatidylethanolamine（PE）有明顯增加的現象，PE 可和鄰近磷脂質負電荷基團（如：磷酸根）的氧分子產生氫鍵，進一步造成細胞膜流動性的降低 [73]，細胞膜的流動性改變便可能會改變細胞與微脂粒間的作用，並進一步影響細胞對微脂粒的攝取情形，在後續研究亦利用細胞實驗，針對正常細胞與癌細胞間進行微脂粒的攝取比較，以進一步了解細胞膜流動性與微脂粒攝取的關係。

在 Hyp-LDL 組中，在 Hyp 的攝取實驗結果（圖十三）發現，在 LDL 的存在

下會減低 Hep3B 細胞對 Hyp 的攝取情形，因此在細胞毒性的實驗結果（圖十五）可見，在光動力處理後 Hyp-LDL 組的 Hep3B 細胞毒性仍較 Hyp 低。在 Hyp 胞內分布實驗結果（圖十四）中並未發現 Hyp-LDL 組和 Hyp 組之 Hyp 胞內分布有明顯差異，在後續胞內鈣離子濃度實驗（圖十六）及細胞凋亡實驗（圖十七、十八）中，當各組 Hyp 製劑在 2 J/cm^2 光照劑量下，採用各組之 Hyp 的 IC_{50} 進行後續實驗，未發現 Hyp-LDL 組和 Hyp 組間有明顯差異。在本研究中，在 Hyp 的攝取實驗（圖十四）及細胞毒性的實驗結果（圖十五）中均發現 Hyp-LDL 組的實驗結果較 Hyp 組低，其原因可考量至兩種相反的效應，一種是 LDL 的存在可能會對細胞膜和 Hyp 結合及攝取產生競爭作用，另一種效應是細胞透過胞噬作用將 LDL 和 Hyp 結合的複合物吞噬至胞內，其細胞膜對 LDL 的親合力及 LDL 受體表現的程度便會影響在 LDL 存在下細胞對 Hyp 的攝取情形[74]。另一方面，有文獻指出 Hyp 和 LDL 間的莫耳比率將近 30:1 時，可使 Hyp 以單體的形式存在於 LDL 中，而非聚集的形式，故將 LDL 做為 Hyp 之藥物載體應用於光動力治療時仍需將此因素做為考量[75]。



第柒章 結論與未來發展方向

在本實驗中初步利用中性、正電荷的傳統微脂粒及 LDL 作為 Hyp 的藥物載體，本研究結果發現不同製劑會影響 Hep3B 細胞對 Hyp 的攝取情形，進而影響光動力處理後所產生的毒性，不同 Hyp 製劑於胞內主要分布於內質網及高基氏體，正電荷微脂粒則另有部份分布於溶酶體的現象，在 Hyp 光動力處理所引起細胞死亡的機制結果發現，Hyp 光動力處理會產生 ER-stress 而引起胞內鈣離子濃度的失衡，並造成 GRP-78 及 CHOP 蛋白的活化，最後便透過細胞凋亡的路徑使細胞死亡。

本實驗對 Hyp 於胞內的主要分布及光動力處理實驗的設計及操作已有初步的認知，為了改善 Hyp 高脂溶性的缺點，我們初步應用了傳統微脂粒及 LDL 做為 Hyp 的藥物載體，未來若能進一步對微脂粒的組成、粒徑、電荷及表面修飾加以設計，並且針對 LDL 與 Hyp 間濃度比例的調整及相關蛋白分子間作用力作進一步的研究，設計出各種不同功能與選擇性的藥物載體，便可改善光敏感劑的組織選擇性、治療效率、暗毒性及副作用，將有利於高脂溶性光敏感劑未來應用於動物或臨床試驗的進行與發展。

參考文獻

1. Allison, R.R., V.S. Bagnato, R. Cuenca, G.H. Downie, and C.H. Sibata, *The future of photodynamic therapy in oncology*. *Future Oncol*, 2006. **2**: p. 53-71.
2. Ackroyd, R., C. Kelty, N. Brown, and M. Reed, *The history of photodetection and photodynamic therapy*. *Photochem Photobiol*, 2001. **74**: p. 656-69.
3. Dolmans, D.E., D. Fukumura, and R.K. Jain, *Photodynamic therapy for cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**: p. 380-7.
4. Zhu, T.C. and J.C. Finlay, *The role of photodynamic therapy (PDT) physics*. *Med Phys*, 2008. **35**: p. 3127-36.
5. Buytaert, E., M. Dewaele, and P. Agostinis, *Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1776**: p. 86-107.
6. Moor, A.C., *Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy*. *J Photochem Photobiol B*, 2000. **57**: p. 1-13.
7. Calzavara-Pinton, P.G., M. Venturini, and R. Sala, *Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology*. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2007. **21**: p. 293-302.
8. Star, W.M., H.P. Marijnissen, A.E. van den Berg-Blok, J.A. Versteeg, K.A. Franken, and H.S. Reinhold, *Destruction of rat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed in vivo in sandwich observation chambers*. *Cancer Res*, 1986. **46**: p. 2532-40.
9. Dolmans, D.E., A. Kadambi, J.S. Hill, C.A. Waters, B.C. Robinson, J.P. Walker, D. Fukumura, and R.K. Jain, *Vascular accumulation of a novel photosensitizer, MV6401, causes selective thrombosis in tumor vessels after photodynamic therapy*. *Cancer Res*, 2002. **62**: p. 2151-6.
10. Qiang, Y.G., C.M. Yow, and Z. Huang, *Combination of photodynamic therapy and immunomodulation: current status and future trends*. *Med Res Rev*, 2008. **28**: p. 632-44.
11. Lockshin, R.A. and Z. Zakeri, *Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**: p. 545-50.
12. Edinger, A.L. and C.B. Thompson, *Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy*. *Curr Opin Cell Biol*, 2004. **16**: p. 663-9.
13. Lockshin, R.A. and Z. Zakeri, *Apoptosis, autophagy, and more*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. **36**: p. 2405-19.
14. Launay, S., O. Hermine, M. Fontenay, G. Kroemer, E. Solary, and C. Garrido, *Vital functions for lethal caspases*. *Oncogene*, 2005. **24**: p. 5137-48.
15. Ozben, T., *Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy*. *J Pharm*

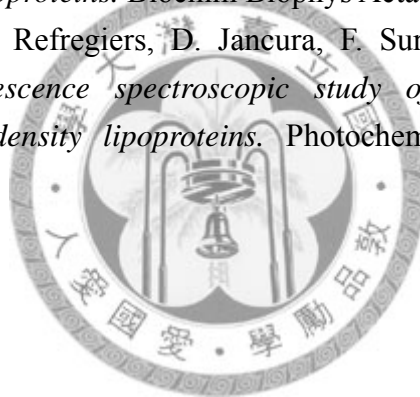
- Sci, 2007. **96**: p. 2181-96.
16. de Bruin, E.C. and J.P. Medema, *Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response*. *Cancer Treat Rev*, 2008. **34**: p. 737-49.
 17. Susnow, N., L. Zeng, D. Margineantu, and D.M. Hockenbery, *Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress*. *Semin Cancer Biol*, 2009. **19**: p. 42-9.
 18. Szegezdi, E., D.C. Macdonald, T. Ni Chonghaile, S. Gupta, and A. Samali, *Bcl-2 family on guard at the ER*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009. **296**: p. C941-53.
 19. Ledgerwood, E.C. and I.M. Morison, *Targeting the apoptosome for cancer therapy*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**: p. 420-4.
 20. D'Amelio, M., E. Tino, and F. Cecconi, *The apoptosome: emerging insights and new potential targets for drug design*. *Pharm Res*, 2008. **25**: p. 740-51.
 21. Broughton, B.R., D.C. Reutens, and C.G. Sobey, *Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia*. *Stroke*, 2009. **40**: p. e331-9.
 22. Fulda, S., *Caspase-8 in cancer biology and therapy*. *Cancer Lett*, 2009. **281**: p. 128-33.
 23. Martinez-Ruiz, G., V. Maldonado, G. Ceballos-Cancino, J.P. Grajeda, and J. Melendez-Zajgla, *Role of Smac/DIABLO in cancer progression*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2008. **27**: p. 48.
 24. Saelens, X., N. Festjens, L. Vande Walle, M. van Gorp, G. van Loo, and P. Vandenabeele, *Toxic proteins released from mitochondria in cell death*. *Oncogene*, 2004. **23**: p. 2861-74.
 25. Jin, S. and E. White, *Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress*. *Autophagy*, 2007. **3**: p. 28-31.
 26. Kourtis, N. and N. Tavernarakis, *Autophagy and cell death in model organisms*. *Cell Death Differ*, 2009. **16**: p. 21-30.
 27. Kondo, Y., T. Kanzawa, R. Sawaya, and S. Kondo, *The role of autophagy in cancer development and response to therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**: p. 726-34.
 28. Martinet, W. and G.R. De Meyer, *Autophagy in atherosclerosis: a cell survival and death phenomenon with therapeutic potential*. *Circ Res*, 2009. **104**: p. 304-17.
 29. Cao, Y. and D.J. Klionsky, *Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein*. *Cell Res*, 2007. **17**: p. 839-49.
 30. Hotchkiss, R.S., A. Strasser, J.E. McDunn, and P.E. Swanson, *Cell death*. *N Engl J Med*, 2009. **361**: p. 1570-83.
 31. Melendez, A. and T.P. Neufeld, *The cell biology of autophagy in metazoans: a developing story*. *Development*, 2008. **135**: p. 2347-60.
 32. MacFarlane, M., *Cell death pathways--potential therapeutic targets*.

- Xenobiotica, 2009. **39**: p. 616-24.
33. Ranson, M., A. Howell, S. Cheeseman, and J. Margison, *Liposomal drug delivery*. Cancer Treat Rev, 1996. **22**: p. 365-79.
 34. Torchilin, V.P., *Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**: p. 145-60.
 35. Lasic, D.D., *Novel applications of liposomes*. Trends Biotechnol, 1998. **16**: p. 307-21.
 36. Vemuri, S. and C.T. Rhodes, *Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review*. Pharm Acta Helv, 1995. **70**: p. 95-111.
 37. Banerjee, R., *Liposomes: applications in medicine*. J Biomater Appl, 2001. **16**: p. 3-21.
 38. Jung, S.H., H. Seong, S.H. Cho, K.S. Jeong, and B.C. Shin, *Polyethylene glycol-complexed cationic liposome for enhanced cellular uptake and anticancer activity*. Int J Pharm, 2009. **382**: p. 254-61.
 39. Immordino, M.L., F. Dosio, and L. Cattel, *Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential*. Int J Nanomedicine, 2006. **1**: p. 297-315.
 40. Derycke, A.S. and P.A. de Witte, *Liposomes for photodynamic therapy*. Adv Drug Deliv Rev, 2004. **56**: p. 17-30.
 41. Pagano, R.E. and J.N. Weinstein, *Interactions of liposomes with mammalian cells*. Annu Rev Biophys Bioeng, 1978. **7**: p. 435-68.
 42. 黃真宜, *微脂粒包覆 Bupivacaine 之體外藥物釋離研究*, in 藥學研究所. 2001, 國立臺灣大學. p. 113.
 43. Agostinis, P., A. Vantieghe, W. Merlevede, and P.A. de Witte, *Hypericin in cancer treatment: more light on the way*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**: p. 221-41.
 44. Kiesslich, T., B. Krammer, and K. Plaetzer, *Cellular mechanisms and prospective applications of hypericin in photodynamic therapy*. Curr Med Chem, 2006. **13**: p. 2189-204.
 45. Davids, L.M., B. Kleemann, D. Kacerovska, K. Pizinger, and S.H. Kidson, *Hypericin phototoxicity induces different modes of cell death in melanoma and human skin cells*. J Photochem Photobiol B, 2008. **91**: p. 67-76.
 46. Zhao, B., J.J. Yin, P.J. Bilski, C.F. Chignell, J.E. Roberts, and Y.Y. He, *Enhanced photodynamic efficacy towards melanoma cells by encapsulation of Pc4 in silica nanoparticles*. Toxicol Appl Pharmacol, 2009. **241**: p. 163-72.
 47. Lam, M., N.L. Oleinick, and A.L. Nieminen, *Photodynamic therapy-induced apoptosis in epidermoid carcinoma cells. Reactive oxygen species and mitochondrial inner membrane permeabilization*. J Biol Chem, 2001. **276**: p.

- 47379-86.
48. Kessel, D. and M. Castelli, *Evidence that bcl-2 is the target of three photosensitizers that induce a rapid apoptotic response*. Photochem Photobiol, 2001. **74**: p. 318-22.
 49. Ichinose, S., J. Usuda, T. Hirata, T. Inoue, K. Ohtani, S. Maehara, M. Kubota, K. Imai, Y. Tsunoda, Y. Kuroiwa, K. Yamada, H. Tsutsui, K. Furukawa, T. Okunaka, N.L. Oleinick, and H. Kato, *Lysosomal cathepsin initiates apoptosis, which is regulated by photodamage to Bcl-2 at mitochondria in photodynamic therapy using a novel photosensitizer, ATX-s10 (Na)*. Int J Oncol, 2006. **29**: p. 349-55.
 50. Buytaert, E., G. Callewaert, N. Hendrickx, L. Scorrano, D. Hartmann, L. Missiaen, J.R. Vandenheede, I. Heirman, J. Grooten, and P. Agostinis, *Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy*. FASEB J, 2006. **20**: p. 756-8.
 51. Ahn, W.S., S.M. Bae, S.W. Huh, J.M. Lee, S.E. Namkoong, S.J. Han, C.K. Kim, J.K. Kim, and Y.W. Kim, *Necrosis-like death with plasma membrane damage against cervical cancer cells by photodynamic therapy*. Int J Gynecol Cancer, 2004. **14**: p. 475-82.
 52. Konan, Y.N., R. Gurny, and E. Allemann, *State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy*. J Photochem Photobiol B, 2002. **66**: p. 89-106.
 53. Siboni, G., H. Weitman, D. Freeman, Y. Mazur, Z. Malik, and B. Ehrenberg, *The correlation between hydrophilicity of hypericins and helianthrone: internalization mechanisms, subcellular distribution and photodynamic action in colon carcinoma cells*. Photochem Photobiol Sci, 2002. **1**: p. 483-91.
 54. Fry, D.W., J.C. White, and I.D. Goldman, *Rapid separation of low molecular weight solutes from liposomes without dilution*. Anal Biochem, 1978. **90**: p. 809-15.
 55. Boddapati, S.V., G.G. D'Souza, S. Erdogan, V.P. Torchilin, and V. Weissig, *Organelle-targeted nanocarriers: specific delivery of liposomal ceramide to mitochondria enhances its cytotoxicity in vitro and in vivo*. Nano Lett, 2008. **8**: p. 2559-63.
 56. Lawrie, A.S., A. Albanyan, R.A. Cardigan, I.J. Mackie, and P. Harrison, *Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma*. Vox Sang, 2009. **96**: p. 206-12.
 57. O'Neal, D., P. Harrip, G. Dragicevic, D. Rae, and J.D. Best, *A comparison of LDL size determination using gradient gel electrophoresis and light-scattering methods*. J Lipid Res, 1998. **39**: p. 2086-90.

58. Galanou, M.C., T.A. Theodossiou, D. Tsiourvas, Z. Sideratou, and C.M. Paleos, *Interactive transport, subcellular relocation and enhanced phototoxicity of hypericin encapsulated in guanidinylated liposomes via molecular recognition*. Photochem Photobiol, 2008. **84**: p. 1073-83.
59. Di Venosa, G., L. Hermida, A. Batlle, H. Fukuda, M.V. Defain, L. Mamone, L. Rodriguez, A. MacRobert, and A. Casas, *Characterisation of liposomes containing aminolevulinic acid and derived esters*. J Photochem Photobiol B, 2008. **92**: p. 1-9.
60. Hayon, T., A. Dvilansky, O. Shpilberg, and I. Nathan, *Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukemia*. Leuk Lymphoma, 2003. **44**: p. 1957-62.
61. Brancalion, L. and H. Moseley, *Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy*. Lasers Med Sci, 2002. **17**: p. 173-86.
62. Usuda, J., S.M. Chiu, E.S. Murphy, M. Lam, A.L. Nieminen, and N.L. Oleinick, *Domain-dependent photodamage to Bcl-2. A membrane anchorage region is needed to form the target of phthalocyanine photosensitization*. J Biol Chem, 2003. **278**: p. 2021-9.
63. Reiners, J.J., Jr., J.A. Caruso, P. Mathieu, B. Chelladurai, X.M. Yin, and D. Kessel, *Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage*. Cell Death Differ, 2002. **9**: p. 934-44.
64. Buytaert, E., G. Callewaert, J.R. Vandenheede, and P. Agostinis, *Deficiency in apoptotic effectors Bax and Bak reveals an autophagic cell death pathway initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum*. Autophagy, 2006. **2**: p. 238-40.
65. 楊穎奇, 金絲桃素於人類肝癌細胞的攝取路徑與細胞內分佈之探討, in 藥學研究所, 臺灣大學. p. 104.
66. Uzdensky, A., D. Bragin, M. Kolosov, O. Dergacheva, G. Fedorenko, and A. Zhavoronkova, *Photodynamic inactivation of isolated crayfish mechanoreceptor neuron: different death modes under different photosensitizer concentrations*. Photochem Photobiol, 2002. **76**: p. 431-7.
67. Dellinger, M., *Apoptosis or necrosis following Photofrin photosensitization: influence of the incubation protocol*. Photochem Photobiol, 1996. **64**: p. 182-7.
68. Manconi, M., R. Isola, A.M. Falchi, C. Sinico, and A.M. Fadda, *Intracellular distribution of fluorescent probes delivered by vesicles of different lipidic composition*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2007. **57**: p. 143-51.
69. Yoshida, T., N. Oide, T. Sakamoto, S. Yotsumoto, Y. Negishi, S. Tsuchiya, and Y. Aramaki, *Induction of cancer cell-specific apoptosis by folate-labeled cationic*

- liposomes*. J Control Release, 2006. **111**: p. 325-32.
70. Molinari, A., M. Colone, A. Calcabrini, A. Stringaro, L. Toccaceli, G. Arancia, S. Mannino, A. Mangiola, G. Maira, C. Bombelli, and G. Mancini, *Cationic liposomes, loaded with m-THPC, in photodynamic therapy for malignant glioma*. Toxicol In Vitro, 2007. **21**: p. 230-4.
71. Wu, J. and M.A. Zern, *Modification of liposomes for liver targeting*. J Hepatol, 1996. **24**: p. 757-63.
72. Yu, H.Y. and C.Y. Lin, *Uptake of charged liposomes by the rat liver*. J Formos Med Assoc, 1997. **96**: p. 409-13.
73. Mahler, S.M., P.A. Wilce, and B.C. Shanley, *Studies on regenerating liver and hepatoma plasma membranes--I. Lipid and protein composition*. Int J Biochem, 1988. **20**: p. 605-11.
74. Mojzisova, H., S. Bonneau, C. Vever-Bizet, and D. Brault, *Cellular uptake and subcellular distribution of chlorin e6 as functions of pH and interactions with membranes and lipoproteins*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1768**: p. 2748-56.
75. Kascakova, S., M. Refregiers, D. Jancura, F. Sureau, J.C. Maurizot, and P. Miskovsky, *Fluorescence spectroscopic study of hypericin-photosensitized oxidation of low-density lipoproteins*. Photochem Photobiol, 2005. **81**: p. 1395-403.



附錄一、金斯桃素成份分析



CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product : **Hypericin (native)**

Product No. : 350-030-M005

Batch No. : L15535/a

Formula : C₃₀H₁₆O₈

MW : 504.4

CAS : [548-04-9]

Page : 1

M.I. : 13: 4889


Tests	Specifications	Results
Appearance	Black to black-red powder.	Black-red powder.
Identity determined by ¹ H-NMR	Identical to standard reference	Confirms
Purity (TLC)	Single spot	Single spot, R _f 0.69
Purity (HPLC), 220 nm	≥ 98.0 %	> 99.1 %
Purity (HPLC), 590 nm	≥ 98.0 %	> 99.2 %
Solubility	Soluble in DMSO, 100 % ethanol, methanol, acetone, ethylmethylketone, pyridine or other organic solvents and bases.	Confirms

Further Information	Isolated from <i>Hypericum perforatum</i> . Inhibitor of protein kinase C (PKC). Anti-viral and anti-retroviral activity. Also inhibits casein kinase II and MAP kinase. Bright red fluorescence emission and photostability.
---------------------	---

Handling	If you are not fully trained or are unaware of the hazards involved, do not use these compounds! WARNING: TOXIC. Do not take internally. Wear gloves and mask when handling this product. Avoid contact by all modes of exposure.
----------	--

Prolonged Storage/Stability	Keep cool and dry at +4 °C. PROTECT FROM LIGHT. High purity hypericin tautomerizes to 1,6-dioxo tautomer in the presence of water contained in solvents
-----------------------------	---

Date: June 3, 2005

Signature: 

附錄二、低密度脂蛋白產品資訊 (2009-8-4)



3050 Spruce Street
Saint Louis, Missouri 63103 USA
Telephone 800-325-5832 • (314) 771-5765
Fax (314) 286-7828
email: techserv@sial.com
sigma-aldrich.com

Product Information

Lipoprotein, Low Density from human plasma

Product No. **L8292**
Storage Temperature 2–8 °C

Synonyms: LDL; β -lipoprotein

Product Description

Low density lipoprotein, LDL, constitutes 50% of the total lipoprotein mass in plasma and is the major carrier of cholesterol and cholesteryl esters. LDL levels strongly correlate with coronary heart disease. In a normal fasting individual, LDL concentrations range from 2.0 to 3.5 g/L.

LDL is a large protein (3,500 kDa) with a diameter of 25.8 nm.¹ It is composed of 20-25% protein and 75-80% lipid. The lipid portion can be further described as 9% free cholesterol, 42% cholesteryl ester, 20-24% phospholipid, and 5% triglyceride.^{2,3,4}

The product is supplied as a lyophilized powder. When reconstituted with 1 ml of deionized water the solution will contain approximately 150 mM NaCl, pH 7.4, and 0.01% EDTA.

Purity: Minimum 95% (SDS PAGE)

Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Material Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

Low density lipoprotein is prepared from fresh human plasma, shown to be non-reactive for HbsAG, anti-HCV, anti-HBc, and negative for anti-HIV 1 & 2 by FDA approved tests.

Storage/Stability

All solutions of lipoproteins should be stored at 2–8 °C. Freezing may cause structural or compositional changes.

References

1. Margolis, S., J. Lipid Res., **8**, 501 (1967).
2. Fellin, R.B. *et al.*, Clin. Chim. Acta., **54**, 325 (1975).
3. Rudel, L.L. *et al.*, Biochem. J., **139**, 89 (1974).
4. Shui, S.P. *et al.*, Clin. Chim. Acta., **203**, 109 (1991).

RBG/MAM 07/05-1

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc.

Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.

附錄三、DSPC 產品資訊 (2009-3-11)

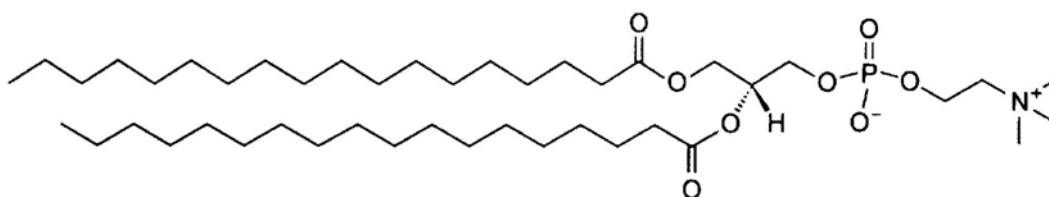


www.avantilipids.com

18:0 PC (DSPC)
1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine
850365

850365C		850365P	
Chloroform		Powder	
25 mg	\$30.00	25 mg	\$20.00
200 mg	\$47.00	200 mg	\$37.00
500 mg	\$82.00	500 mg	\$72.00
1 g	\$115.00	1 g	\$105.00

All Prices in US Dollars.



Data

Synonyms	1,2-dioctadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine DSPC PC(18:0/18:0)
Molecular Formula	C ₄₄ H ₈₈ NO ₈ P
Molecular Weight	790.145
Exact Mass	789.625
Percent Composition	C 66.88% H 11.23% N 1.77% O 16.20% P 3.92%
Transition Temp	55°C

This material is available on www.avantilipids.com. Unauthorized reproduction is prohibited.

附錄四、Cholesterol 產品資訊 (2009-4-6)



www.avantilipids.com

cholesterol
cholesterol (ovine wool, >98%)
700000

700000P

Powder

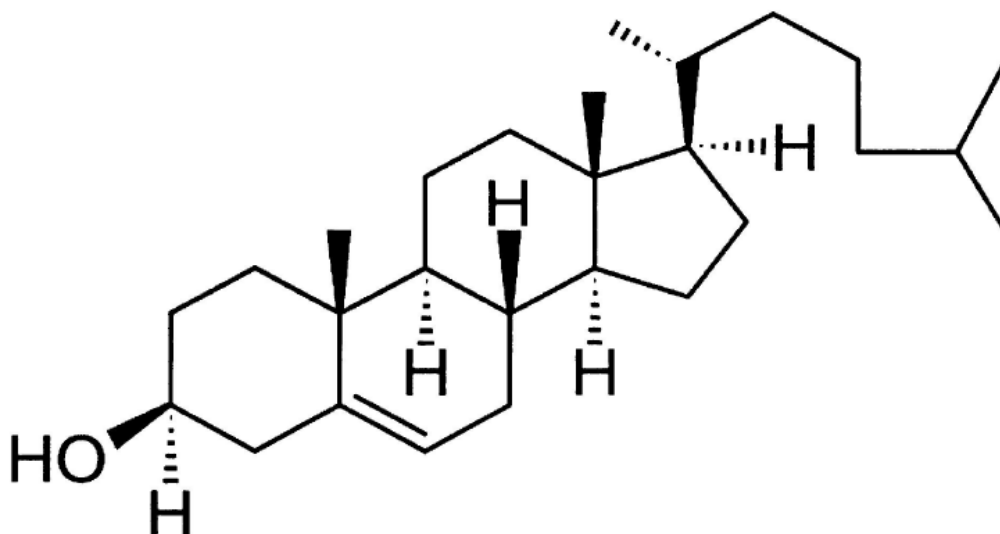
100 mg \$21.00

500 mg \$31.00

1 g \$49.00

5 g \$115.00

All Prices in US Dollars.



Data

Molecular Formula $C_{27}H_{46}O$

Molecular Weight 386.654

Exact Mass 386.355

Percent Composition C 83.87% H 11.99% O 4.14%

This material is available on www.avantilipids.com. Unauthorized reproduction is prohibited.