

國立臺灣大學醫學院藥學所

碩士論文

Graduate Institute of Pharmacy
College of Medicine

National Taiwan University

Master thesis

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

A study of the internalization pathway and subcellular
distribution of hypericin in human hepatoma cells

楊穎奇

Young, In-Chi

指導教授：何蘊芳 博士

Advisor: Ho, Yunn-Fang, Ph.D.

誌謝

首先感謝指導教授何蘊芳博士，給我機會學習去面對困難與挑戰，並教導我在絕處創造轉機，使我雖經歷了三年的研究生活，但從老師一絲不苟的敬業風範中，也因此學到了”只要我有心，沒有做不到”的深刻體會。此外我也由衷的感謝顧記華博士、余秀瑛博士、施明智博士、蔡翠敏博士、陳進庭博士及林淑萍博士，每每在我的實驗遇到瓶頸時，給予及時的建議與技術指導，使我的碩士論文才能夠因此而順利誕生。

另外我也非常感謝藥學所柏政學長、依呈學姊與哲仁學長，教導我細胞實驗的基礎與操作，且每當我有困難時，總是會第一時間幫我解答；感謝光電所的育才學長教導我 liposomes 的製備與後續定性實驗，建立起我實驗的基礎；感謝中興生物物理所的明煌學長、崑寶和郁琦，教導我螢光顯微鏡的操作應用以及 liposomes 的知識；感謝同實驗室的裕瀚，讓我能無後顧之憂的完成論文。此外也感謝生理所頌婷的支持與幫助，使我在研究期間雖然挫折不斷，但終究還是走過來了。

最後我要感謝我的父母，給我這個機會能夠唸書，儘管過程並不順遂，但也從不刻意給我壓力，永遠給予我鼓勵，感謝你們的支持，在未來我一定會更加努力，不辜負你們的栽培與期望。

中文摘要

研究背景

金絲桃素 (hypericin, Hyp) 是由 *Hypericum perforatum* 萃取而得的親脂性螢光物質。由於特定波長的光源照射能激發 hypericin 產生光學活性 (photoactive properties)，並生成氧化能力極強的活性態氧 (reactive oxygen species, ROS)，因此被歸類為第二代光敏劑，運用於光動力治療 (photodynamic therapy, PDT) 研究，供腫瘤診斷及治療。PDT 主要為光敏劑經局部或全身性給藥後，再於腫瘤部位投予適當光源以激發照射部位之光敏劑，並藉由局部生成的 ROS，造成氧化壓力而達腫瘤組織破壞。然而，由於 ROS 的半衰期極其短暫，因此只能於其生成部位之鄰近處進行作用，因之，推測 PDT 所造成的腫瘤組織傷害程度及型式，將取決於光敏劑於生物體或細胞內的分佈位置；而光敏劑在細胞內的分佈傾向應會受到光敏劑的物化性質與細胞攝取路徑的影響。光敏劑進入細胞之攝取路徑，與其後續在細胞內分佈位置間關聯探討，將有助相關分子機制之瞭解，提昇 PDT 療效與安全性。

研究目的

本研究運用人類肝癌 Hep3B 細胞，培養於無血清 (serum-free)、添加低密度脂蛋白 (LDL) 或胎牛血清 (FBS) 的基質中，加入 free-form hypericin 及 liposomal hypericin，探討：(1) 不同 hypericin 製劑是否會影響其進入細胞之路徑及攝取量；(2) hypericin 進入細胞後，其於細胞內各類胞器間之運送或分佈，是否隨劑型及時間而異。簡言之，本研究藉由比較兩種劑型之 hypericin 於三類細胞培養基質中之細胞攝取及胞內傳送路徑，期釐清脂質分子對細胞攝取 hypericin 與對 hypericin 於胞內分佈路徑的影響。

研究方法

研究中之 liposomal hypericin 製備，係採用薄膜水合法製作成大粒徑的 liposomes 顆粒後，再藉由奈米擠壓器利用外力擠壓將粒徑大小控制在約 200 nm

的均一粒徑，最後再以管柱層析法去除未包覆的 hypericin。製備之 liposomal hypericin 再以粒徑分析儀及螢光光譜儀分別進行粒徑與包覆率的測定。在 liposomes 的粒徑穩定性測定方面，分別以保存穩定性、培養環境穩定性以及光照穩定性檢定，供確保後續細胞攝取或分佈實驗期間中，liposomal hypericin 是完整且均一的。以上製備之 liposomal hypericin 將供做下述實驗之用途。

在 Hep3B 細胞攝取實驗中，則藉由 hypericin 經光源激發後會產生紅色螢光的特性，分別將 cholesterol 含量不等的 liposomal hypericin [cholesterol 比例分別為 0%、10%及 50% (molar ratio)] 與 free-form hypericin，各以相當於 0.1 μM 之 hypericin 加入不同培養基質[如：無血清培養液、添加 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LDL 的培養液及添加 10% (v/v) FBS 的培養液]中培養 Hep3B 細胞，經 0.5 至 24 小時培養後，以流式細胞儀分析細胞攝取之螢光強度，並比較各類培養基質及劑型對細胞攝取 hypericin 效率影響。

後續在細胞內分佈的探討，則是利用搭載著控溫箱 (37°C) 及恆定濃度 CO_2 (5%) 之螢光顯微鏡，經特异性染劑針對胞器如內質網、粒線體、高基氏體與溶酶體進行染色後，再加入 liposomal hypericin 與 free-form hypericin 各 0.1 μM ，並以曠時攝影方式觀察 hypericin 被同一細胞攝取入胞內後，在細胞內各胞器間傳遞路徑之變化，並嘗試量化各胞器 hypericin 螢光強度，以估量 hypericin 於細胞中的分布傾向。

研究結果與討論

Liposome 粒徑穩定性測定結果顯示，當 liposome 中的 cholesterol 組成比例達總莫耳數的 50%時，可顯著提高 liposomal hypericin 的保存穩定性，減緩 liposomal hypericin 經培養液中 LDL 與 FBS 所引起的粒徑脹大的現象，並能有效抑制光照所造成的粒徑變化。而在細胞攝取研究中，發現 free-form hypericin 的細胞攝取量會受到培養液成分的影響。Free-form hypericin 在無血清培養液中藉由被動擴散能夠最快速地進入細胞；如在培養液中添加 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LDL，則得以輔助 hypericin 進入細胞，並在 9 小時後，其 hypericin 攝取量明顯高於無血清培養環境下的 hypericin 攝取量，或許與內包作用 (endocytosis) 相關；在添加 FBS

的培養環境下時，hypericin 的細胞攝取速率最慢，可能與 FBS 中含有之大分子物質與 hypericin 間相互作用，致延緩了 hypericin 進入細胞的速率有關。至於 liposomal hypericin 製劑在細胞攝取量及攝取速率變化上，皆慢於 free-form hypericin，推測在運送過程中因牽涉到 hypericin 於磷脂質與細胞外膜間的分配作用 (partition)，降低了 hypericin 與細胞接觸的機會，因而減緩其細胞攝取的量及速率。

在細胞內分佈實驗中發現，被動擴散的 free-form hypericin 主要集中於內質網，而藉由 LDL 協助進入細胞的 hypericin 則傾向分布於高基氏體。由 liposome 運送的 hypericin 主要出現在溶酶體，但於內質網或高基氏體的分布表現，仍分別可藉由無血清或添加 LDL 培養液的影響而增加。

結論

實驗結果證實 free-form hypericin 進入細胞的路徑，將影響其後續於細胞內的分布路徑。由於 hypericin 的高親脂性，其被動擴散速率明顯快於由 LDL、liposomes 或其他蛋白分子所導引的運輸機制，且在進入細胞後主要分佈至內質網區域；而在添加 LDL 的基質中，推測藉由 hypericin 與 cholesterol 的高度親和性，使得 hypericin 進入細胞後主要集中於高基氏體區域，且 hypericin 在粒線體的分布也相對提高。本實驗所使用的 liposome 劑型，雖能提昇 hypericin 在溶酶體的分布，但在短時間培養下仍不影響 hypericin 分布於內質網的傾向。未來若能針對 hypericin 與脂質或蛋白分子間的作用進行詳細探討，並研究在細胞毒性上的影響，便能夠在 PDT 的開發與運用上有所增益。

關鍵詞：金絲桃素，膽固醇，微脂粒，低密度脂蛋白，細胞內分佈

Abstract

Background

Hypericin, extracted from *Hypericum perforatum*, is a lipophilic fluorescent chemical with photoactive properties. Reactive oxygen species (ROSs) will be produced when hypericin is illuminated by light of proper wavelength. Hypericin is classified as a second generation photosensitizer with potential for photodynamic therapy (PDT) in the treatment or diagnosis of malignant diseases. PDT encompasses topical or systemic administration of a photosensitizer, followed by delivery of an excitation light to the site of lesion, to induce a locally generated ROS with high oxidative stress which leads to eradication of the target tissue. Since the extremely short-lived ROSs can only act closely to its site of generation, the extent and type of photodamage in a cell would greatly depend on the exact subcellular localization of the photosensitizer. It is possible that the intracellular distribution of a photosensitizer might be associated with its physical and chemical properties and by its cellular uptake pathway. As a result, to identify the relationship between cellular uptake pathway and the following subcellular localization of a photosensitizer is crucial for the future development of PDT.

Objectives

The human hepatoma Hep3B cells were cultured in three kinds of media (serum-free, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LDL, or 10% FBS) to study the impacts of different media on the cellular uptake and subsequent intracellular trafficking of free hypericin and liposomal hypericin over time. Furthermore, liposomal hypericin with various molar ratios of cholesterol was also employed to investigate the effect of cholesterol on the encapsulation efficiency, storage life, incubation and light irradiation stability of liposomal hypericin.

Methods

The multilamellar vesicles were made by thin-film hydration method and followed by extrusion and gel filtration to make uni-dispersed liposomes of particle size around

200 nm. The particle size and hypericin encapsulation rate were determined by a particle size analyzer and a spectrofluorometer, respectively. The storage life, incubation and light irradiation stability of liposomal hypericin were also assessed.

The cellular uptake capacity of free hypericin and liposomal hypericin (with 0%, 10%, or 50% cholesterol, in molar ratio) was examined. Cells were incubated in different culture medium (serum-free, LDL-enriched, FBS-enriched) for 0.5 to 24 hours and, then, subjected to flow cytometry analyses. The subcellular trafficking of hypericin was observed by a fluorescence microscopy mounted with a thermostatted incubation chamber and CO₂ supply. Subcellular organelles such as endoplasmic reticulum, mitochondria, Golgi apparatus, and lysosomes were all visualized by respective organelle-specific dyes. The intracellular localization of hypericin in a single cell was photographed by a time-lapsed microscopy, and the fluorescence intensity of hypericin within a certain organelle was estimated.

Results and Discussions

The liposomal stability study shows that cholesterol content, by 50% of total lipids in molar ratio, helped stabilizing liposomal hypericin, prolonging its storage life, and preventing particle size enlargement induced by LDL/FBS and light irradiation.

In cellular uptake study, the amount and rate of hypericin uptake were demonstrated to be dependent on the contents of cell culture media and its formulation. Free hypericin entered Hep3B cell rapidly, apparently through passive diffusion in a serum-free medium. With the addition of LDL, the uptake of hypericin by 9 hours of incubation was significantly increased, perhaps augmented by receptor-mediated endocytosis. The slowest uptake was observed in medium containing 10% FBS, probably due to hypericin-macromolecule interaction that retarded the cellular uptake efficiency. As for liposomal hypericin, the uptake was much less and far more slower than the free-form hypericin in all media mentioned above. Partitioning of hypericin between liposomes and the cell membrane is suspected.

The subsequent subcellular localization experiment revealed that trafficking pathways differs among incubation media and formulation. We found that, under the study condition, the passively diffused hypericin was mainly distributed into the endoplasmic reticulum, and the LDL-mediated hypericin uptake was geared to the Golgi apparatus. Although liposomal hypericin was localized mainly in lysosomes, an enhanced distribution of liposomal hypericin was found in endoplasmic reticulum and Golgi by serum-free or LDL-enriched medium, respectively.

Conclusion

The subcellular distribution of hypericin is associated with its cellular uptake pathway. The passively diffused hypericin entered cells faster than pathways mediated by LDL, liposomes, or other macromolecules such as FBS. It mainly distributed into endoplasmic reticulum regions. In the presence of LDL, hypericin was guided majorly to the Golgi apparatus region and the mitochondria distribution was also increased. The high affinity between cholesterol and hypericin might play an important role in this observation. Although the liposome preparations could increase the hypericin distribution in lysosomes, the endoplasmic reticulum was still the primary localization target of liposomal hypericin. Following our study, in the future, if the mode of interaction and affinity propensity among hypericin, lipids, and protein molecules could be thoroughly investigated, along with cytotoxicity studies, there would be a great improvement in the applications and development in the field of photodynamic therapy.

Key words: hypericin, Hep 3B, liposomes, low density lipoprotein, subcellular distribution

目錄

中文摘要.....	I
英文摘要.....	IV
圖目錄.....	XI
表目錄.....	XIV
附錄.....	XIV
英文縮寫名詞對照表.....	XV
一、文獻回顧	
1、Photodynamic Therapy (光動力治療).....	1
1-1、Photodynamic Therapy 簡介.....	1
1-2、Photodynamic Therapy 作用機轉.....	1
1-3、Photodynamic Therapy 特色.....	3
2、Hypericin (金絲桃素).....	7
2-1、Hypericin 簡介.....	7
2-2、Hypericin 特性.....	7
3、Liposomes (微脂粒).....	9
3-1、Liposomes 的構造與分類.....	9
3-2、Liposomes 與細胞間之作用方式.....	10
3-3、Phase Transition Temperature (轉相溫度).....	11
3-4、Liposomes 安定性簡述.....	12
3-4-1、Liposomes 化學安定性.....	12
3-4-2、Liposomes 物理穩定性.....	13
3-4-3、Liposomes 生理穩定性.....	13
3-5、Liposomes 於醫療的應用.....	14
4、Lipoproteins (脂蛋白) 概述.....	14

5、Endocytosis (內包作用)	16
5-1、LDL Receptor-mediated endocytosis.....	16
6、細胞內各胞器與其染劑簡述.....	18
6-1、內質網 (Endoplasmic Reticulum)	18
6-2、粒腺體 (Mitochondria)	18
6-3、高基氏體 (Golgi Apparatus)	19
6-4、溶酶體 (Lysosomes)	19
二、研究動機與目的.....	21
三、研究材料與方法.....	22
1、實驗器材.....	22
2、細胞培養.....	26
2-1、細胞培養液配製.....	26
2-2、細胞培養方法.....	26
3、Liposomes 製備與分析.....	27
3-1、Liposomal Hypericin 之製備.....	27
3-2、Liposomes 純化方式.....	28
3-3、Hypericin 吸收光與螢光光譜分析.....	29
3-4、Liposomes 包覆之 Hypericin 定量分析.....	29
3-5、Liposomes 之脂質定量分析.....	30
3-6、包覆率計算 (encapsulation efficiency%)	30
3-7、粒徑測定 (Determination of liposome size)	31
3-8、穩定性測定 (Stability Study)	33
3-8-1、保存穩定性分析.....	33
3-8-2、培養液中穩定性分析.....	33
3-8-3、光源照射穩定性分析.....	34
4、細胞攝取試驗.....	33



4-1、LDL concentration dependency	33
4-2、Culture medium dependency.....	34
4-3、結果分析.....	35
5、細胞內分佈試驗.....	35
5-1、細胞胞器染劑配製.....	36
5-2、細胞胞器染色.....	36
5-3、倒立螢光顯微鏡曠時攝影.....	38
5-4、顯微影像螢光定量分析.....	38
6、螢光衰退試驗.....	40
7、資料數據分析及統計分析.....	41
四、結果.....	42
1、Liposomes 之製備.....	42
1-1、Hypericin 光譜分析.....	42
1-2、Liposomes 包覆率分析.....	43
1-3、Liposomes 粒徑測定.....	44
1-4、Liposomes 保存穩定性分析.....	45
1-5、Liposomes 於各類培養液中的穩定性分析.....	46
1-6、Liposomes 之光照穩定度分析.....	53
2、Hypericin 細胞攝取試驗.....	54
2-1、LDL 濃度對細胞攝取 hypericin 量之影響.....	54
2-2、各類培養液對細胞攝取 hypericin 量之影響.....	56
3、細胞內分佈探討.....	60
3-1、Hypericin 細胞內之分佈.....	60
3-2、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 1) 細胞內分佈.....	67
3-3、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol =1 : 0.1) 細胞內分佈.....	74
4、螢光衰退試驗.....	80



五、討論.....	81
1、肝癌細胞特性.....	81
2、Cholesterol 含量對微脂粒的影響.....	81
3、各類培養液與 Hypericin 細胞攝取機制的關聯.....	82
4、細胞內分佈試驗.....	84
4-1、於無血清培養液.....	84
4-2、於添加 LDL 的培養液.....	86
4-3、於添加 FBS 的培養液.....	88
5、螢光衰退試驗.....	90
六、結論與未來方向.....	91
參考文獻.....	92
附錄.....	99



圖目錄

圖 1、Hypericin 之 photodynamic therapy 作用機轉圖示.....	2
圖 2、Hypericin 化學結構式.....	7
圖 3、脂蛋白之組成示意圖.....	15
圖 4、LDL 於細胞中的代謝路徑簡圖.....	17
圖 5、Liposomes 製備過程簡圖.....	28
圖 6、N4 Plus 儀器原理圖示.....	32
圖 7、磷脂質比例對 hypericin 於甲醇溶液中之吸收光光譜的影響.....	42
圖 8、磷脂質比例對 hypericin 於甲醇溶液中之螢光光譜的影響.....	43
圖 9、Liposomal Hypericin 包覆率：與 Cholesterol 組成比例之關聯.....	44
圖 10、Liposomal Hypericin 保存穩定度：與 Cholesterol 組成比例之關聯.....	45
圖 11、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 1) 於無血清培養液中之粒 徑分佈變化.....	47
圖 12、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 1) 於添加 LDL 的培養液 中之粒徑分佈變化.....	48
圖 13、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 1) 於添加 FBS 的培養液 中之粒徑分佈變化.....	49
圖 14、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 0.1) 於無血清培養液中之 粒徑分佈變化.....	50
圖 15、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 0.1) 於添加 LDL 的培養液 中之粒徑分佈變化.....	51
圖 16、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 0.1) 於添加 FBS 的培養液 中之粒徑分佈變化.....	52
圖 17、光照對 Liposomal Hypericin 粒徑穩定度的影響.....	53
圖 18、Hep3B 細胞之 Hypericin 攝取與培養液中 LDL 濃度之關聯.....	55

圖 19、細胞攝取實驗之流式細胞儀實驗結果示例圖.....	57
圖 20、Hypericin 在各類培養液中之細胞攝取.....	58
圖 21、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 1) 在各類培養液中之細胞 攝取.....	58
圖 22、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 0.1) 在各類培養液中之細 胞攝取.....	59
圖 23、Hypericin 於無血清培養液中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化分析.....	61
圖 24、Hypericin 於無血清培養液中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化圖.....	62
圖 25、Hypericin 於添加 LDL 的培養液中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化分析.....	63
圖 26、Hypericin 於添加 LDL 的培養液中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化圖.....	64
圖 27、Hypericin 於添加 FBS 的培養液中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化分析.....	65
圖 28、Hypericin 於添加 FBS 的培養液中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化圖.....	66
圖 29、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 1) 於無血清培養液中之 Hep3B 細胞胞器的分布變化分析.....	68
圖 30、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 1) 於無血清培養液中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化圖.....	69
圖 31、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 1) 於添加 LDL 的培養液 中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化分析.....	70
圖 32、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 1) 於添加 LDL 的培養液 中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化圖.....	71
圖 33、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 1) 於添加 FBS 的培養液 中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化分析.....	72
圖 34、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 1) 於添加 FBS 培養液中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化圖.....	73
圖 35、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 0.1) 於無血清培養液中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化分析.....	74
圖 36、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 0.1) 於無血清培養液中之	

Hep3B 細胞內胞器分布變化圖.....	75
圖 37、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 0.1) 於添加 LDL 的培養液中之 Hep3B 細胞胞器的分布變化分析.....	76
圖 38、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 0.1) 於添加 LDL 的培養液中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化圖.....	77
圖 39、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 0.1) 於添加 FBS 的培養液中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化分析.....	78
圖 40、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 0.1) 於添加 FBS 培養液中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化圖.....	79
圖 41、Hypericin 之螢光衰退與螢光顯微圖拍攝次數之關聯.....	80
圖 42、Cholesterol 結構圖.....	82
圖 43、Enrofloxacin 結構圖.....	82
圖 44、Hypericin 於無血清培養液下的胞器分佈圖說.....	85
圖 45、Liposomal Hypericin 於無血清培養液下的胞器分佈圖說.....	86
圖 46、Hypericin 於添加 LDL 的培養液下的胞器分佈圖說.....	87
圖 47、Liposomal Hypericin 於添加 LDL 的培養液下的胞器分佈圖說.....	88
圖 48、Hypericin 於添加 FBS 的培養液下的胞器分佈圖說.....	88
圖 49、Hypericin 細胞攝取途徑與於各胞器分佈之關係圖.....	90

表目錄

表 1、已上市及研發中之光敏劑.....	5
表 2、磷脂質碳鏈長度與轉相溫度 (T _m) 的關係.....	11
表 3、各胞器染劑之激發光與放射光波長基本資料.....	35
表 4、Axiovert 200M 配備之顯微濾鏡之激發光與分光鏡波長限制.....	38
表 5、Liposomal Hypericin 之包覆率.....	43
表 6、Liposomal Hypericin 之粒徑比較：Cholesterol 組成比例之影響.....	44
表 7、光照劑量對 liposomal Hypericin 粒徑的影響.....	53



附錄 1、RPMI-1640 培養液成份.....	99
附錄 2、Fetal bovine serum 成分分析報告.....	102
附錄 3、Sephadex™型號與性質分類表.....	104

英文縮寫名詞對照表

縮寫	全稱
BSA	Bovine serum albumin
DSPC	1,2-Distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
ER	Endoplasmic reticulum
FBS	Fetal bovine serum
Hyp	Hypericin
LDL	Low density lipoprotein
P. I.	Polydispersity index
ROS	Reactive oxygen species



一、文獻回顧

1、Photodynamic Therapy (光動力治療)

1-1、Photodynamic Therapy 簡介

光動力治療 (Photodynamic Therapy, PDT) 是一種新穎的治療模式，在微生物、病毒、黴菌及多種癌症的治療上提供了新的選擇且效果卓著。有別於傳統治療方式，PDT 療程主要以光敏劑 (photosensitizer) 進行局部性 (如 5-aminolevulinic acid) 或全身性給藥後，再針對患處局部投予激發光源。當經過充分光能的激發後，由光敏劑能量轉移所產生的活性態氧 (reactive oxygen species, ROS) 可藉由一連串的氧化作用造成標的組織的破壞。目前世界上已核可上市的光敏劑有 porfimer sodium (Photofrin[®], 福得靈)、tetra(meta-hydroxyphenyl)chlorine (Foscan[®])、5-aminolevulinic acid (Levulan[®])、benzoporphyrin derivative monoacid ring A (Visudyne[®], 維視達) 等，已分別應用於 PDT 治療肺癌、基底細胞癌 (basal cell carcinoma)、子宮頸癌、支氣管癌、老年黃斑病變及頭頸癌等 (Brown *et al.*, 2004; Dolmans *et al.*, 2005; Sibata, 2001) (表 1)。

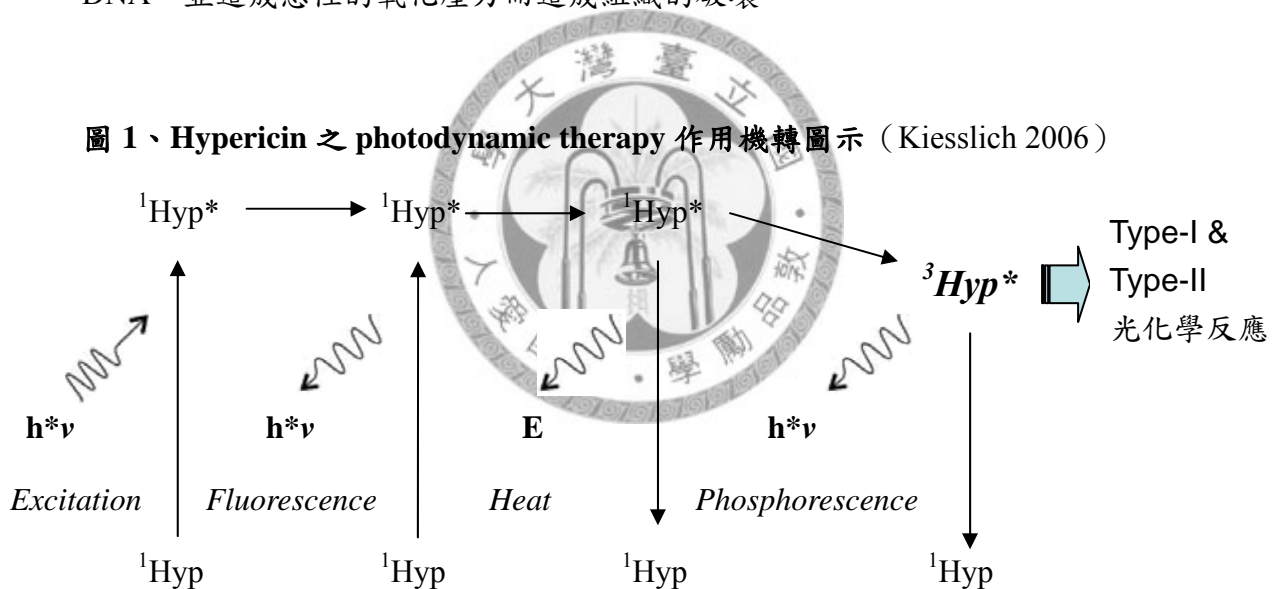
1-2、Photodynamic Therapy 作用機轉

當血液中的光敏劑被目標組織吸收後，利用適當波長的激發光源針對目標組織進行照射 (圖 1)，而在照射過程中，光敏劑藉由吸收光能而由基態 S_0 提升至第一激發單重態 S_1 (excited singlet state)，在此不穩定的能階上，光敏劑的能量隨後便經由螢光散射、放熱反應並伴隨著能階降轉而形成三重態光敏劑 T1 (triplet state)，相對穩定的三重態光敏劑 (存在約 10^{-3} 秒) 能與周邊分子作用形成細胞毒性物質 (Takemura *et al.*, 1989)，而這類作用則依反應生成物的類型而被歸類為 type-I 與 type-II 光化學反應 (photochemical reaction) (Castano *et al.*, 2004；

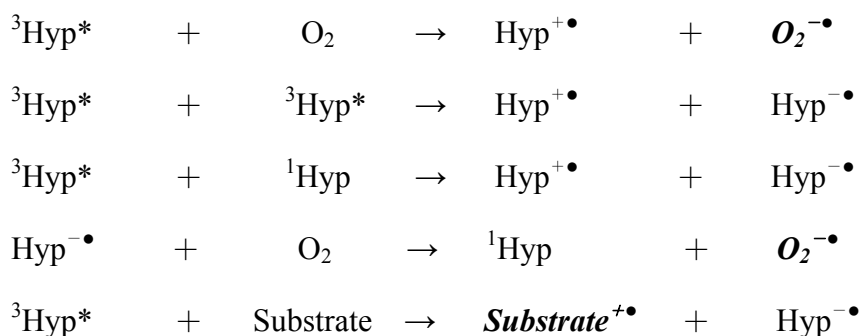
Ochsner, 1997 ; Phillips, 1997)。

Type-I 反應是由三重態光敏劑與其周邊氧分子、溶劑分子與光敏劑本身等進行電子或質子的轉移而產生氧自由基，如 hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$)、superoxide anion radical (O_2^-) 與 peroxides 等，而在 type-II 反應路徑中，經三重態的光敏劑將能量轉移至周邊氧分子，使氧分子由基態提升至激發態而形成具有高活性的單態氧 (singlet oxygen)，這些由 type-I 與 type-II 所產生的氧自由基與單態氧統稱為活性態氧 (reactive oxygen species, ROS)，而這些活性態氧能與能量釋放後的基態光敏劑進行連鎖反應並在短時間內生成更多的活性態氧，藉由這些活性態氧的高反應性來介入周邊組織結構中含有雙鍵的脂質、氨基酸 (半胱氨酸 cysteine、甲硫氨酸 methionine、酪氨酸 tyrosine、組氨酸 histidine 與色氨酸 tryptophan) 及 DNA，並造成急性的氧化壓力而造成組織的破壞。

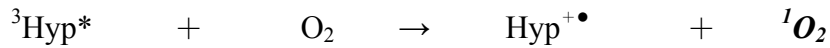
圖 1、Hypericin 之 photodynamic therapy 作用機轉圖示 (Kiesslich 2006)



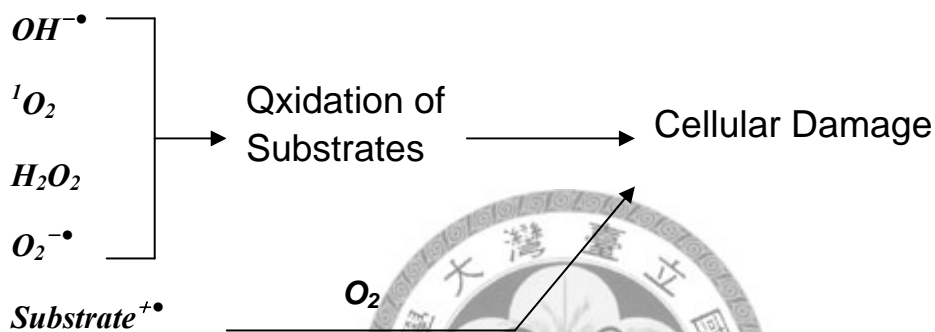
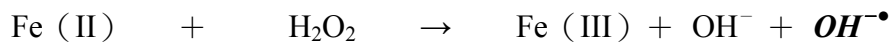
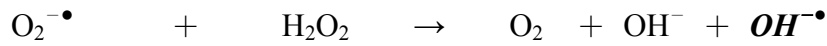
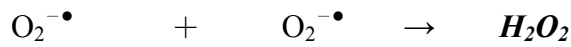
Type-I 光化學反應：



Type-II 光化學反應：



Secondary cytotoxic reactions：



在癌症治療方面，經過 PDT 療程後的腫瘤組織目前已歸納出三種死亡機制 (Castano *et al.*, 2005)，第一種如上述是經由活性態氧氧化壓力的產生而引起細胞凋亡 (apoptosis) 或壞死 (necrosis)，而第二種途徑則是藉由破壞腫瘤組織周邊的血管網絡，造成血管血栓或出血而使得腫瘤組織無法獲得足夠的養分與氧氣而死亡，最後一種則是藉由刺激細胞釋放細胞激素 (cytokines) 引起組織發炎，並誘導免疫細胞滲入組織引起細胞性免疫與抗體反應，且發展出長效性的腫瘤抗性；這三種機轉基本上會相互誘導影響，而其順序決定於光敏劑的性質、腫瘤(如血管網絡結構)的狀況，與患者的免疫力等。

1-3、Photodynamic Therapy 特色

相較於傳統的化學治療與放射線療法，PDT 在治療惡性腫瘤方面較安全且精確，其中的優勢在於：

(1) 於腫瘤選擇性上，某些光敏劑能特異性堆積於惡性組織，而這類特性目前認為是源於腫瘤細胞與正常細胞在生理性質上的差異，如腫瘤組織的淋巴液流動遲緩、血管壁較鬆散、pH 值偏酸性且有較多低密度脂蛋白受體等性質 (Firestone, 1994; Dougherty, 1987; Dougherty *et al.*, 1998)。另外，局部而密集的光源投與能夠將非腫瘤組織的傷害降到最低，且活性態氧的半生期與作用範圍短，因此會專一性在光敏劑分佈的位置上進行破壞 (Brown *et al.*, 2004)。

(2) PDT 療程中的活性態氧產量取決於光敏劑使用的劑量，且作用機轉不同於化學或放射線治療是藉由干擾細胞週期及活化 p53 而引起細胞凋亡 (Boulikas & Vougiouka, 2003)，因此在癌症治療手段方面提供另一項選擇。

(3) PDT 效果不受化學及放射線治療的交互抗性(cross-resistance)影響，因此可用於治療傳統療程後的再發性腫瘤 (Wilson *et al.*, 1997)。

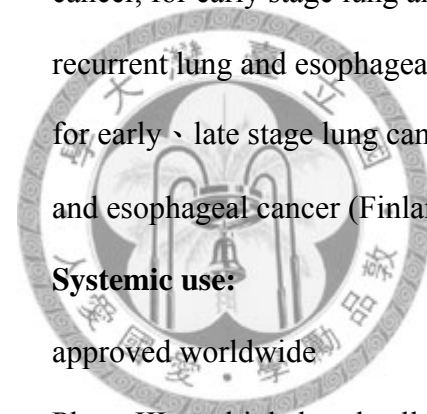
(4) 相較於傳統療程，目前核可的光敏劑在使用上並無最大累積劑量與毒性 (maximum cumulative dose/toxicity) 的顧慮，且無總使用劑量限制 (total dose limitations) 的報告出現，因此也提高了 PDT 療程的實用性與安全性 (Castano *et al.*, 2005)。

(5) 由於絕大部分的光敏劑都具有螢光特性，再加上許多腫瘤細胞相較於正常細胞能攝取更多的光敏劑而發出較強的螢光，因此在 PDT 治療上可更具特異性的找出腫瘤細胞的發生部位而減少正常細胞的傷害，另一方面，螢光顯色也可用來診斷腫瘤與正常組織，進而減少進行組織切片觀察的次數。

(6) PDT 治療的副作用小，且在恢復過程中不易留下疤痕，因此適用於門診或單天療程，增加病患的方便性。

表一、已上市及研發中之光敏劑 (Moan & Peng, 2003)

學名	商品名	照射光源波長 (nm)	光敏劑開發狀況
Porfimer sodium	Photofrin	632	<p>1993 for recurrent superficial papillary bladder cancer (Canada, first approval)</p> <p>1994-1999 for superficial lung cancer (The Netherlands), esophageal and gastric cancer, for early stage lung and cervical cancer and cervical dysplasia (Japan); for recurrent lung and esophageal cancer (France); for early stage lung cancer (Germany); for early 、 late stage lung cancer and esophageal cancer (US FDA); for advanced lung and esophageal cancer (Finland)</p>
Benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPD-MA)	Verteporfin Visudyne	690	<p>Systemic use: approved worldwide</p> <p>Phase III: multiple basal cell carcinoma</p>
Tetra(meta-hydroxyphenyl)chlorine (mTHPC)	Foscan	652	<p>Systemic use:</p> <p>Phase III: head and neck cancer</p> <p>Phase II: chest, gastrointestinal, pancreas</p> <p>Phase I/II: adjuvant therapy for late stage cancer</p>



Tin ethyletiopurpurin Purlytin 660
(SnET2)

Systemic use:

Phase III: age-related macular degeneration

Phase II/III: cutaneous cancer, AIDS-related Kaposi

Phase I: prostate cancer

Sulfonated Photosome 675
aluminium
phthalocyanine
(AlPcS)

Systemic use:

Phase I/II: cutaneous cancer, etc.

5-aminolevulinic acid Levulan 632
(ALA)

Topical use:

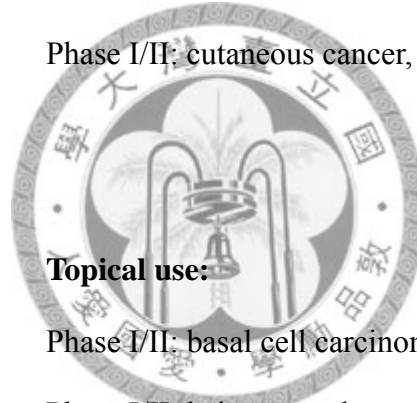
Phase I/II: basal cell carcinoma, Bowen's disease, psoriasis

Phase I/II: hair removal

Phase I/II: acne

Intravesical instillation:

Phase I/II: bladder cancer photodetection



2、Hypericin (金絲桃素)

2-1、Hypericin 簡介

Hypericin (1,3,4,6,8,13-hexahydroxy-10,11-dimethylphenanthro[1,10,9,8-*opqra*]perylene-7,14-dione, Hyp) 為一種親脂性天然螢光物質，其分子式為 $C_{30}H_{16}O_8$ ，分子量為 504.44g/mol，萃取自 *Hypericum perforatum* (又稱聖約翰草, St John's wort)，屬於 phenanthroperylenequinones (或稱 naphthodianthrones) 的多元環芳香化合物，其分子結構如下圖 2 所示。

由於 Hyp 經照光後具有細胞毒殺作用且無遺傳毒性 (genotoxicity) (Kersten *et al.*, 1999)，近年來又再度引起研究者的注意，並在 PDT 與光動力診斷 (photodynamic diagnosis, PDD) 中被歸類為新一代的光敏劑。以 Hyp 作為光敏劑的 PDT 療程日前已發現具有抗病毒、癌症的活性，並在在感染性疾病、腫瘤與眼部疾病方面展現出抑制血管新生 (anti-angiogenic) 的作用。

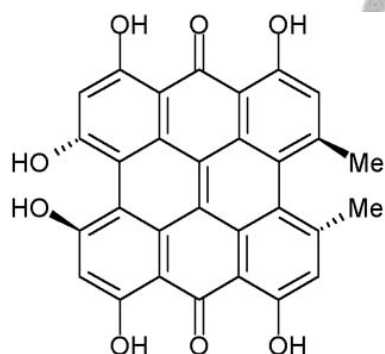


圖 2、Hypericin 化學結構式

2-2、Hypericin 特性

Hyp 在波長 260-600 nm 的光波長區段中具有多個吸收波峰，且在波長約 600 nm 區段散射出橘紅色螢光，而 Hyp 在 PDT 療程中，常使用波長 590-610 nm 的光源進行激發 (Wills *et al.*, 2001)，激發後的單態 Hyp 轉換成三重態 Hyp 並經由 type-I 或 type-II 途徑生成活性態氧，雖有研究指出 Hyp 經光源照射後其單態氧產率高 (type-II) (Malkin *et al.*, 1993)，但其主要途徑仍尚待釐清。

在生理上，Hyp 是以鉀鹽形式存在且主要以被動擴散 (Thomas & Pardini, 1992)，而部份經由細胞膜傳遞方式 (Weber *et al.*, 1994) 進入細胞，在 Siboni 等人的研究中發現 Hyp 與其類似物進入細胞的方式受到血清中的成份如 BSA (bovine serum albumin) 與 LDL (low-density lipoprotein) 影響，和 LDL 和 BSA 結合的 Hyp 會分別經由細胞膜以內包 (endocytosis) 的方式進入細胞，說明 Hyp 經由細胞膜傳遞進入細胞的機轉與血清和脂蛋白成份相關 (Siboni *et al.*, 2002)。而目前 Hyp 在細胞攝取路徑上已歸納出四種機制：

- (1) 被動擴散或分配 (diffusion-partitioning)。
- (2) 由細胞膜上受體協助的運送機制，主要為 LDL 受體所引導的內包作用 (LDL receptor-mediated endocytosis)。
- (3) 不經由受體協助而由細胞膜引導的機制，如胞飲 (pinocytosis)。
- (4) 上述三項機制的綜合。

基於 Hyp 的高親脂性使其在進入細胞後容易堆積於細胞內部的脂質膜上，如細胞膜 (plasma membrane)、內質網 (endoplasmic reticulum)、高基氏體 (Golgi apparatus) 及粒線體 (mitochondria) 等，因此許多研究認為 Hyp-PDT 引起的細胞毒殺作用歸因於這些胞器結構的破壞而引發後續的細胞死亡，如發生於粒線體的光化學反應會引發細胞凋亡，反之若反應發生在細胞膜或溶酶體經光激發後則會延緩細胞凋亡而使細胞傾向於壞死，其餘如內質網的破壞造成細胞內鈣離子失衡等現象，因此推測 Hyp-PDT 的細胞死亡機制將受到 Hyp 在細胞內分佈的影響。

除了分布影響外，Hyp 的親脂性使其在水溶液中不易溶解而傾向聚集在一起，由於聚集的 Hyp 分子會令癌細胞的吸收效果降低並減少活性態氧的產率而降低其 PDT 的療效，因此利用兼具親脂與親水性的載體將 Hyp 以單體 (monomer) 形式送進細胞將可能提高 Hyp 於癌細胞的攝取量同時增加 Hyp 的細胞毒殺效果，而這類載體包括微球 (microsphere)、微脂粒 (liposomes)、微膠粒 (micelle) 等 (Snyder *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 2005 ; Sugisaki *et al.*, 2008)。

3、Liposomes (微脂粒)

3-1、Liposomes 的構造與分類

Liposomes 組成為磷脂質 (phospholipid) 所構成之單層或多層水相和油相間隔的同心球結構，其油相是磷脂質雙層膜，排列模式類似細胞膜，疏水端相向排列，親水端裸露在外，也可稱為人工脂膜 (artificial membrane)。因具有油相和水相，因此可做為油性或水性藥品的載體，其中親脂性藥品傾向嵌入磷脂質雙層間，而親水性藥品則溶於 liposomes 水相中。

Liposomes 的製法有很多種，如逆向法 (reverse phase method)、震盪法 (vortex method)、Papahadjopoulos method、Deamer method 等 (Williams, 1990)。不同製法製成的 liposomes 有不同顆粒大小，不同層數，不同包覆空間。Liposomes 的顆粒大小一般屬於次微粒 (submicro level)，大小範圍從 0.1-100 μm ，在 1 μm 以下 liposomes 屬小顆粒型，在 1-100 μm 屬大顆粒型。在一般生理膜的表面孔洞大小如血管壁孔洞約 3 nm，腎臟的鮑氏囊約 10 nm，紅血球大約 7.5 μm ，而白蛋白的大小約 0.38 μm 。因此，屬於次微粒的 liposomes 在穿透生理膜的功能上有其生理意義。

依 liposomes 粒子的大小和脂質雙層結構的層數，可分為下列幾種：

- (1) Multilamellar vesicle (MLV) — 由多層磷脂質雙層結構形成的大型 liposomes，粒徑約 100-1000 nm，適合包覆脂溶性藥物，且具有層層緩釋的效果。
- (2) Large unilamellar vesicle (LUV) — 單一磷脂質雙層膜所形成的大型單層 liposomes，粒徑 >250 nm，由於內層水相較大，因此適合包覆親水性藥物。
- (3) Intermediate unilamellar vesicle (IUV) — 單一磷脂質雙層膜所建構成的中型單層微脂粒，粒徑約 100~300 nm。
- (4) Small unilamellar vesicle (SUV) — 單一磷脂質雙層膜所形成的小單層型 liposomes，粒徑約 25~100 nm。

3-2、Liposomes 與細胞間之作用方式

Liposomes 與細胞之間的作用方式取決於 liposomes 的製作方式、成分比例、實驗溫度及細胞種類等條件因素，而目前已歸納出幾種 liposomes 與細胞之間的作用機制 (Williams, 1990)，其中包括：

- (1) 脂質交換 (Lipid exchange) — 當 liposomes 與細胞接觸時，兩者的脂質雙層膜外層上的磷脂質會有轉換的情形發生，這種轉換的現象與磷脂質的磷酸基種類相關，但不涉及微脂粒的水層，而純粹只是磷脂質的轉換，這類脂質轉換的機轉目前認為是藉由細胞表面特異性的蛋白來控制，此外，liposomes 外膜與細胞外膜中的膽固醇也可藉由此機制在兩者之間移動並傾向在兩者之間達到一組成比例上的平衡。
- (2) 吸附作用 (Adsorption) — 當環境溫度低於磷脂質的轉相溫度時，liposomes 會傾向以完整且穩定的結構貼附於細胞表面，然而關於吸附後的 liposomes 是否會進行融合或內包作用進入細胞，目前仍無決定性的證據。
- (3) 膜融合作用 (Fusion) — 類似於吸附作用，當 liposomes 貼附在細胞表面時，liposomes 的磷脂質會與細胞膜融合，並將 liposomes 的內容物釋放到細胞質中。
- (4) 胞噬作用/內包作用 (Phagocytosis/Endocytosis) — 有些細胞具有吞噬作用，能將 liposomes 攝入細胞中，形成內質體 (endosomes)，此時細胞質中的溶酶體 (lysosomes) 會和內質體融合，在 pH 4.5 的環境下進行細胞內同化作用，分解 liposomes 並釋出內容物。此外，liposomes 也可利用抗原與抗體之間的專一性或接受器為媒介而進行內包作用 (endocytosis) 而進入細胞。當 liposomes 進入胃腸道中或血管內，會迅速與表皮細胞上的網狀內皮系統 (reticuloendothelial system, RES) 接觸，先與其細胞融合，經吞噬再經內包作用主動穿透細胞膜障礙，進入組織血管中，因此在含豐富 RES 系統的組織如：肝臟、脾臟、腎臟等，為 liposomes 分布最豐富且重要的器官，也因此有研究利用此特性，將抗癌的藥物包覆於 liposomes

內，利用其天然導向（natural targeting）的能力將藥物帶入肝細胞。

- (5) 細胞性滲漏（Cell-induced liposome leakage）—Liposomes 與細胞接觸時引起 liposomes 內容物釋出，推測是由附著在細胞表面的血清白蛋白與脂蛋白相關，而 liposomes 成分中添加膽固醇可明顯降低微脂粒的滲漏。

3-3、Phase Transition Temperature（轉相溫度）

轉相溫度（ T_m ）即因磷脂質分子結構改變所導致排列狀態改變時的溫度（Chapman *et al.*, 1967），會因為磷脂質分子的頭基、脂肪酸碳鏈長度、不飽和鍵的數目及外加膽固醇的多寡而有所差異，一般來說碳鏈越長或不飽和鍵數目越少，磷脂質的轉相溫度就越高。當溫度低於 T_m 時脂質雙層會呈現排列緊密的固狀凝膠態，而當溫度上升至 T_m 之上時，脂質分子中脂肪酸鏈的流動性增加而呈現液晶態，使得外來分子對脂質膜的通透性增加，因此實驗中通常以高於轉相溫度 5-10°C 進行藥物的包覆，以達到較高的包覆效率。表 1 為含不同碳鏈長度磷脂質的轉相溫度表。

表 2、磷脂質碳鏈長度與轉相溫度（ T_m ）的關係。（Silvius, 1982）

碳鏈長度:雙鍵數	T_m (°C)	碳鏈長度:雙鍵數	T_m (°C)
12:0 PC	-1	19:0 PC	60
13:0 PC	14	20:0 PC	66
14:0 PC	23	21:0 PC	72
15:0 PC	33	22:0 PC	75
16:0 PC	41	23:0 PC	79
17:0 PC	48	24:0 PC	80
18:0 PC	55		

PC : phosphatidyl choline

3-4、Liposomes 安定性簡述

3-4-1、Liposomes 化學安定性

Liposomes 的組成磷脂質會因為氧化 (oxidation) 及水解 (hydrolysis) 而造成微脂粒的穩定度降低 (Williams, 1990)。

(1) 磷脂質氧化：若是在溶液中含有過度金屬離子，或是在脂肪酸鏈具有不飽和鍵 (double bond)，就容易造成 Liposomes 產生氧化。氧化作用主要由於自由基的連鎖反應而產生，自由基會和氧分子行成過氧化物，若是脂肪酸鏈上具有多個不飽和鍵，則會產生雙鍵的重排與環氧化物的產生，因此若是要防止 Liposomes 的氧化破壞可以藉由：

A. 使用不具有不飽和鍵的磷脂質，如 DMPC

(1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine)、DPPC

(1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine)、DSPC

(1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine)。

B. 添加抗氧化劑，如維他命 E (tocopherol) 的添加。

C. 在 Liposomes 製備及保存過程中填充惰性氣體，如氮氣、氬氣。

D. 在溶液中加入 EDTA 去除溶液中的過渡金屬。

E. 磷脂質水解：水解作用往往會使磷脂質上脂肪酸鏈的 Carboxy ester 水解產生游離的脂肪酸鏈，再隨著水解時間的加長，最後產生 glycerophosphoric acid 的最終產物。若是要降低 liposomes 被水解的速率可以藉由降低儲存的溫度來保存。

3-4-2、Liposomes 物理穩定性

由於 liposomes 粒子間的凡得瓦力或靜電引力，容易造成 liposomes 的聚集 (aggregation) 或融合 (fusion)，因而造成 liposomes 的粒徑產生變化，以及藥物的滲漏 (Williams, 1990)，而下列幾種方式可以提高 liposomes 的物理穩定性：

- (1) 選用帶電性的磷脂質，或是在 liposomes 表面接上親水性的長鏈高分子，利用同電性相斥以及表面立體障礙的原理，避免 liposomes 的聚集與融合。
- (2) 選用全飽和脂肪酸鏈及碳鍊較長的磷脂質，並加入膽固醇，使得脂雙層膜通透性降低，彈性及緊密度增加，也具有提高 liposomes 穩定性的效果。

3-4-3、Liposomes 生理穩定性

Liposomes 在循環系統中，會與血液中的蛋白質產生作用，主要為：

- (1) 調理素 (opsonins)：當 liposomes 與調理素結合後，體內的免疫系統就會認定為外來物，而使得 liposomes 被 RES 所移除，降低了微脂粒在體內的半衰期 (Woodle, 1995；Wright *et al.*, 1989)。
- (2) 脂蛋白 (lipoproteins)：脂蛋白與微脂粒接觸後，容易與磷脂質產生交換干擾的作用，造成 liposomes 的穩定度降低甚至瓦解。

粒徑大小對於 liposomes 在身體內的穩定性也有相當大的影響，Liu 等人將微脂粒以靜脈注射方式打入老鼠體內，探討 liposomes 大小與網狀內皮系統 RES 作用的關係，實驗發現當粒徑大於 300 nm，liposomes 容易被脾臟的巨噬細胞所移除，造成半衰期的降低，若是粒徑小於 70 nm 微脂粒會自肝靜脈竇 (liver sinus) 上的膜孔，離開血液系統並外滲到周邊組織，因此要提高 liposomes 在血液循環系統的半衰期可選用中性且相轉移溫度高的磷脂質，並將粒徑控制在 70-300 nm (Liu & Huang, 1992)。

3-5、Liposomes 於醫療的應用

由於 liposomes 可經由細胞融合、內包及吞噬作用而穿透細胞膜，並可為生體所分解 (biodegradable) 且無毒性 (nontoxic)，被認為是一理想的藥物載體，可攜帶親水性 (hydrophilic) 或親脂性 (lipophilic) 的藥物，而被廣泛應用於藥物製劑及生物醫學的研究。其主要應用方面有：

- (1) 延長在血中藥物的釋離 (prolonged-release)。
- (2) 提高癌細胞選擇性。
- (3) 減低藥物作用於組織的毒性。
- (4) 保護藥物，避免未抵達作用組織前被代謝。

因此，無論在化學治療 (chemotherapy)、抗病毒 (antivirus)、單株抗體 (monoclonal antibody)、免疫分析 (immunoassay)、均被廣泛研究

4、Lipoproteins (脂蛋白) 概述

Lipoproteins 為蛋白質 (apolipoproteins) 與脂質組成的可溶性複合物，表面是由多種磷脂質參雜 cholesterol 與 apolipoproteins 組成的單層膜，而核心則攜帶三酸甘油 (triglycerols) 與 cholesterol ester，如圖 3。膜表面的 apolipoprotein 能引導 lipoproteins 與酵素，運送蛋白或細胞膜受體進行作用，指引 lipoprotein 至正確的作用位置。Lipoproteins 能將三酸甘油送至肌肉與脂肪組織，於組織中將三酸甘油結構中的脂肪酸進行儲存或代謝成能量。而 cholesterol 在 lipoproteins 中主要是以 cholesterol ester 的型態，於肝臟、小腸與周邊組織往來運送，用以合成細胞膜、荷爾蒙及膽酸。

Lipoproteins 依其密度由小到大分為乳糜微粒 (chylomicrons, CM)、極低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL)、低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 與高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL)，並依所攜帶的 apolipoprotein 與脂質成分的不同決定 lipoprotein 的功能。乳糜微粒是由小腸生成用來運送食物代謝後所生成的三酸甘油與 cholesterol，經由微血管中的

endothelial lipase 代謝釋放出三酸甘油至組織後，乳糜微粒轉變為密度較大的乳糜微粒殘餘（chylomicron remnants，CMR），並藉由肝臟上的 LDL 受體帶入肝臟。相較於乳糜微粒，VLDL 則是由肝臟生成用以運送內生性的三酸甘油與 cholesterol，在循環過程中 VLDL 同樣經由 endothelial lipase 代謝後釋放出三酸甘油並轉變為 LDL，而 LDL 則會將 cholesterol ester 經由組織細胞表面的 LDL 受體送進週邊組織或回到肝臟。HDL 可經由肝臟、小腸生成或藉由其他 lipoproteins 代謝後產生，能將組織細胞中過多的 cholesterol 送回肝臟及固醇類生成組織（steroidogenic tissues）而將 cholesterol 代謝或排除。

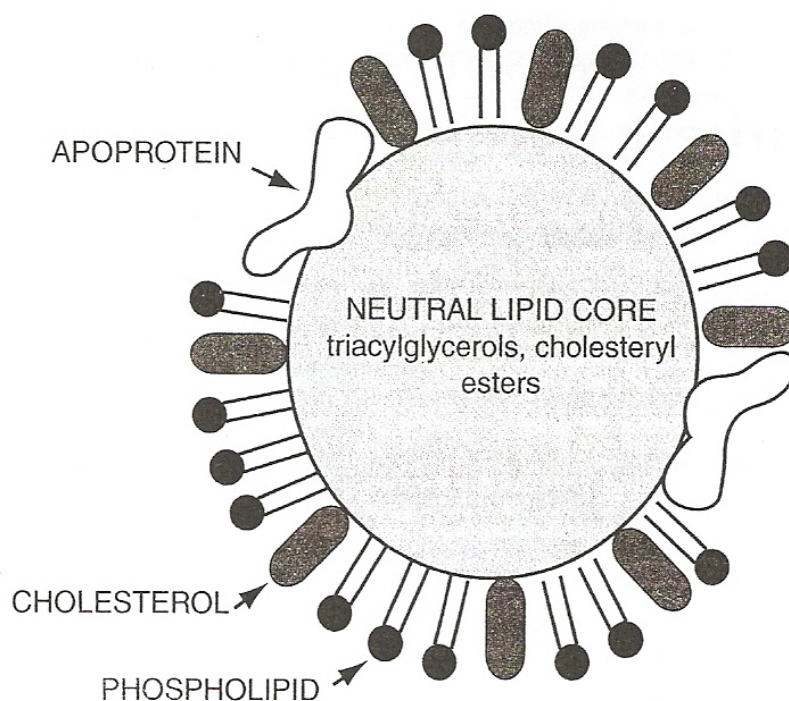


圖 3、脂蛋白之組成示意圖（Voelker, 2008）

5、Endocytosis（內包作用）

細胞外的分子透過細胞膜包覆形成包囊（endocytic vesicle）並運送至溶酶體的過程稱為內包作用（Alberts *et al.*, 2008），且藉由包囊的大小將內包作用分為兩類：

- (1) 胞噬作用（phagocytosis）：將大分子物質如微生物或死細胞帶入細胞並形成直徑>250 nm 的包囊（phagosomes）。胞噬在主要發生在特異性的吞噬細胞（phagocytes）中，如白血球中的巨噬細胞（macrophages）、嗜中性白血球（neutrophils）及樹突細胞（dendritic cells），這類細胞主要能將外來微生物進行吞噬及代謝以保護細胞受到感染。
- (2) 胞飲作用（pinocytosis）：對於液體或溶質進行包覆並形成直徑約 100 nm 大小的包囊（pinocytic vesicles）。胞飲作用主要起始於細胞膜上富含被膜小窩（clathrin-coated pits）的區域，約佔細胞表面積的 2%。在真核細胞中，細胞膜會持續且非特異性的對細胞外液體進行包覆並帶入細胞，並在細胞內將包覆物質代謝後隨即回到細胞膜上以維持細胞表面積的恆定，這整個過程又稱為 fluid-phase endocytosis。然而除了非特異性的溶質，細胞外的部份大分子（如 cholesterol）仍可藉由與位在被膜小窩上的特異性受體結合後形成包囊而進入細胞，而這類過程則稱為 receptor-mediated endocytosis。

5-1、LDL Receptor-mediated endocytosis

Cholesterol 在血液中主要是以 cholesteryl esters 形式由 LDL 進行運送，並藉由與 LDL 受體（LDL receptor, LDLR）結合而進入細胞。LDL 受體總量的 60~70% 集中於肝臟，但 LDL 受體並非均勻分布於細胞表面，80% 的受體集中於細胞膜上僅佔細胞表面積 2% 的特定區域，在這些膜區域的細胞質側含有大量的被膜小窩（clathrin-coated pits, c.p.），當 LDL 與受體結合後，被膜小窩會夾帶 LDL-受體複合物並內陷進入細胞質形成被膜小泡（clathrin-coated vesicle, c.v.）。被膜

小泡於細胞內經酸化後會除去被膜形成內質體 (endosomes, end.) 並造成 LDL 與其受體的分離，脫離受體的 LDL 隨即被送入溶酶體進行代謝以釋出 cholesterol，而 LDL 受體則被回收回細胞表面並準備進行下一趟 LDL 的運送，如圖 4。

由 LDL 帶入細胞的 cholesterol 目前歸納出有 3 種作用：

- (1) 經 acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) 作用將 cholesterol 再轉回 cholesterol ester 儲存。
- (2) 做為膽酸、固醇類荷爾蒙及細胞膜的生合成前驅物。
- (3) 轉變成 oxysterols 等具有調控功能的結構，能抑制 cholesterol 合成酵素的作用並減少 LDL 受體的生成。

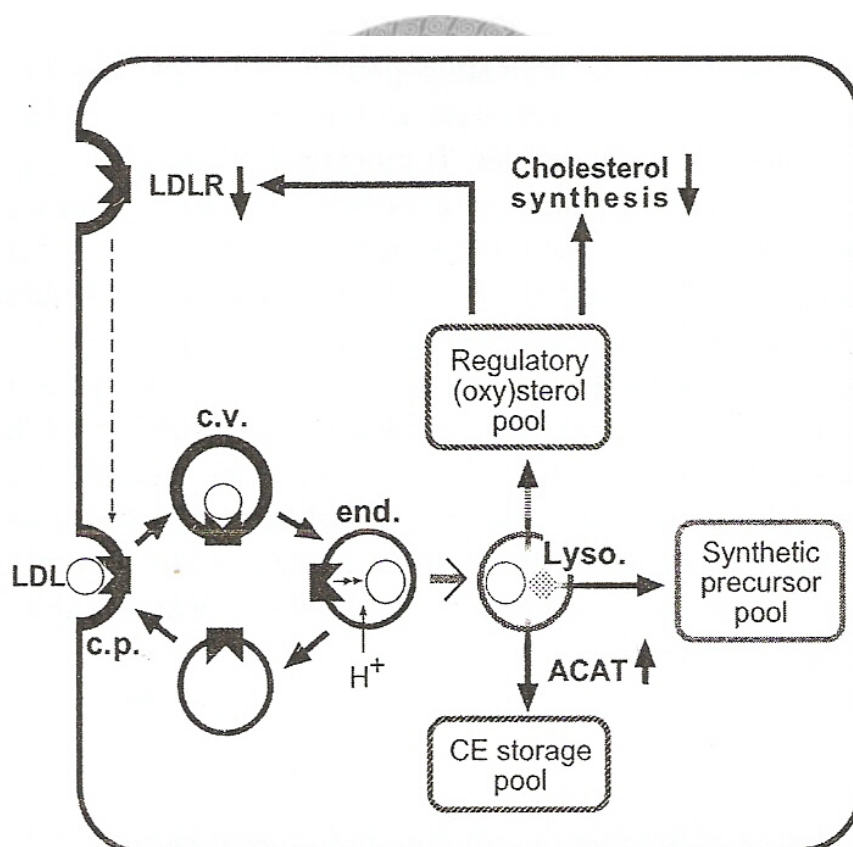


圖 4、LDL 於細胞中的代謝路徑簡圖 (Voelker, 2008)

6、細胞內各胞器與其染劑簡述

6-1、內質網 (Endoplasmic Reticulum)

內質網是由分枝狀的細管與液囊所組成的密集網絡，約佔細胞總體積的10%，其主要功能為進行細胞內蛋白質與脂質的生合成，如高基氏體、溶酶體、細胞膜以及內質網本身所需的蛋白質和脂質都是由內質網膜合成後再以運輸囊泡 (transport vesicles) 進行輸送，而粒線體所需的脂質則是經由磷脂質運輸蛋白 (phospholipid transfer protein) 由內質網膜轉移至粒線體外膜，此外細胞中絕大部分的蛋白質都會先運送至內質網後才陸續分配至高基氏體或溶酶體 (Alberts *et al.*, 2008)。

部份的內質網膜會與核糖體結合並具有引導蛋白質合成的作用，這類內質網稱為 rough ER，反之不與核糖體結合的內質網則稱為 smooth ER。在脂質代謝旺盛的細胞中常含有較大比例的 smooth ER，如負責將 cholesterol 代謝成固醇類荷爾蒙的細胞，另外在負責合成與代謝脂蛋白的肝細胞 (hepatocyte) 中也有大量的 smooth ER。

內質網本身膜一般的光學顯微鏡無法分辨內質網結構，因此需要搭配染劑進行觀察。由於內質網主要是由親脂性膜所組成，一般具高親脂性的染劑雖能進入內質網堆積，但也因此不易溶於細胞培養液中，而 carboncyanine 類染劑則同時具有親脂性及足夠親水性可用於細胞染色 (Terasaki *et al.*, 1984)，因此實驗中使用 carboncyanine 類的 DiOC₅ (3) 進行內質網的染色。

6-2、粒線體 (Mitochondria)

細胞活動過程中絕大部分的能量是由粒線體藉著氧化 NADH₂、FADH₂ 等核苷酸所生成，也因此使得粒線體的內膜帶負電。在基因學研究發現粒線體功能缺陷與遺傳性的神經肌肉退化疾病相關 (Wallace, 1995)，此外粒線體與細胞凋亡 (apoptosis) 的進行也有關聯 (Green and Kroemer, 1998; Green and reed, 1998)。

對粒線體進行螢光染色的機轉是利用其內膜帶有負電荷的特性，可使帶正電

的親脂性螢光分子進入且聚集於粒線體內，目前已上市多種粒線體染劑，本實驗中是利用 MitoTracker Green FM 進行粒線體染色。

MitoTracker Green FM 可由波長 488 nm 的氬雷射進行激發後散射出綠光，其散射區段遠窄於 rhodamine 123 (最遠至 620 nm 橘光區)，可避免與橘-紅光相互干擾，因此 MitoTracker Green FM 常用於多重染色的實驗，此外 MitoTracker Green FM 染色過程中並不會影響粒線體的生理機能。

6-3、高基氏體 (Golgi Apparatus)

高基氏體是由多層膜與其相鄰的囊泡聚集而成，其與碳水化合物的生合成、醣蛋白的修飾，以及晚期將醣蛋白送入溶酶體、分泌囊泡或細胞膜等功能相關。其膜脂質 ceramide 為其特異性染劑的標靶，ceramide 是由一分子 sphingosine 及一長鏈脂肪酸組成，為 sphingomyelin 的組成成分之一，正常細胞的內生性 ceramide 是於內質網合成後經由消耗 ATP 而被轉送到高基氏體，並於高基氏體轉變成 sphingomyelin 及 glucosylceramide 後再送至細胞膜，因此 ceramide 為構成脂質雙層的重要成分之一 (Fukunaga, T. *et al*, 2000)。

外生性的短鏈 (碳數<7) ceramide 能快速的進入細胞且堆積於高基氏體，並抑制高基氏體將蛋白質向外傳遞的功能且能維持高基氏體的結構；當短鏈 ceramide 與 transport block 並用時，可以觀察到高基氏體的膨脹且型成大型的囊泡。除此之外，六碳鏈-ceramide 同時能抑制部份外來物質進入細胞。實驗中使用的 NBD C6-ceramide 便是利用短鏈 ceramide 的特性，將螢光物質 NBD 與六碳鏈-ceramide 結合送至細胞以觀察高基氏體。

6-4、溶酶體 (Lysosomes)

溶酶體能將細胞內的大分子包埋後進行代謝並將代謝產物再吸收或排出細胞，溶酶體內部為酸性環境 (pH<5.0)，此酸性環境也利於其代謝酵素的作用，而這些特性也提供了溶酶體染色的特異性；鹼性且有透膜性的螢光染劑，能夠進

入且堆積於溶酶體，而染劑的螢光量能表現出溶酶體的數量。另外也可利用螢光染劑前驅物，當前驅物進入溶酶體並經過酵素代謝後便能發出螢光，可用來測試代謝酵素的活性。本實驗中選用的 LysoSenser Yellow/Blue DND-160 包含上述兩種染劑的特性，染劑本身具有親酸性且帶有弱鹼性的側鏈，當染劑進入溶酶體並由酵素將側鏈代謝後便能釋放出螢光，適用於活細胞溶酶體數量上的觀察。



二、研究動機與目的

自從第一代光動力治療 (PDT) 藥物 Photofrin 被證實可用於食道及肺癌後，為癌症提供了另一條治療的方向，並陸續引起許多新穎光敏劑的研發與測試的興起，其中具有螢光特性的天然性金絲桃素 (hypericin, Hyp) 被列為第二代光敏劑。

PDT 作用機制主要藉由適當波長的光源激發光敏劑後生成大量的活性態氧 (ROS)，如 $^1\text{O}_2$ 來引發細胞死亡，但由於活性態氧的半生期短暫而只能在生成部位周圍 (20 nm) 發生作用 (Moan, 1990)，因此 PDT 對細胞所造成的傷害將決定於光敏劑在細胞中分佈的位置，也因此光敏劑在細胞內去向的確立與掌控將會是在 PDT 療程中所需要釐清的。然而各篇研究報告在 Hyp 細胞內分佈的結果並不一致且無確定的結論，如部分研究指出 Hyp 在細胞中傾向堆積於內質網與高基氏體而不見於粒線體，但也有研究指出粒線體是 Hyp 光毒性作用的首要目標。(English *et al.*, 1999 ; Vandenbogaerde *et al.*, 1997 ; Weber *et al.*, 1994 ; Theodossiou *et al.*, 2006) 因此實驗中將利用螢光顯微鏡以曠時攝影技術觀察 Hyp 在不同培養環境下經不同路徑進入細胞後於胞器分布上的變化，並以微脂粒包覆劑型交叉比較，藉此研究在人類肝癌細胞 Hep3B 對於 Hyp 的攝取及細胞內分布變化的影響。

三、研究材料與方法

1、實驗器材

1. 細胞培養：

Penicillin-Streptomycin Solution (含 penicillin G 10,000 units/mL 與 streptomycin sulfate 10 mg/mL)	Biological Industries Kibbutz Beit Haemek, Israel
---	--

RPMI-1640 medium、 fetal bovine serum (FBS)、 trypsin-EDTA solution (含 2.5 g/L trypsin 與 0.38 g/L EDTA · 4Na 於 Hanks' Blanced Salt Solution)	Molecular Probes /Invitrogen Carlsbad, CA, USA
--	---

人類 B 肝帶源肝癌細胞 (Hep3B)	American Type Culture Collection Manassas, VA, USA
----------------------	---

2. 微脂粒材料：

1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (DSPC, powder)、cholesterol (powder)	Avanti Polar Lipids Alabaster, AL, USA
---	---

3. 一般試藥：

Dimethylsulfoxide (DMSO, 99.5% GC grade)、	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA
--	-------------------------------------

low density lipoprotein (LDL)、 bovine serum albumin (BSA) -fatty acid free	
---	--

Sodium bicarbonate (NaHCO ₃)、 methanol (99.9% GC grade)	Merck & Co. Whitehouse Station, NJ, USA
--	--

Hypericin	Alexis Biochemicals
-----------	---------------------

	Industriestrasse, Lausen, Switzerland
Sephadex G-50 Fine (powder)	GE Healthcare Chalfont St., Giles, UK
Chloroform (99.8% GC grade)	Mallinckrodt. Hazelwood, MO, USA
Ethanol (95% v/v)	台灣菸酒股份有限公司 Taipei, Taiwan, ROC
4. 細胞染劑：	
MitoTracker [®] Green FM、	Molecular Probes/Invitrogen
NBD C6-ceramide、DiOC ₅ (3)、Hoechst 33342、	Carlsbad, CA, USA
LysoSensor Yellow/Blue DND-160	
5. 實驗耗材	
75 cm ² & 25 cm ² 細胞培養盤	TPP Tissue Culture Labware Zollstrasse, Trasadingen, Switzerland
Falcon 10 mL 吸管、	Becton-dickinson Labware
15 mL & 50 mL 離心管	Franklin Lakes, NJ, USA
Steritop 過濾杯 (0.22 μm 孔徑)	MILLIPORE Billerica, MA, USA
微量 UV cuvette	Hellma Müellheim, Baden, Germany
6 孔細胞培養盤、	NUNC
Lab-Tek Chambered Coverglass (4 或 8 well)	Rochester, NY, USA
1.5 mL 棕色微量離心管	Labcon North America Petaluma, CA, USA

50 mL 磨口圓底燒瓶

信德儀器

Polycarbonate 濾膜 (0.2 μ M pore size)

Nucleopore track-etch membrane,
GE Healthcare
Chalfont St., Giles, UK

6. 儀器

加熱板

Fisher Scientific

(Hot plate)

Park Lane Drive, PA, USA

層析管柱

Econo-Column, Bio-Rad Laboratories

(1.0 \times 30 cm , 20 μ m bed support pore size)

Hercules, CA, USA

(Chromatography Columns)

微量天平

AG245, METTLER TOLEDO

(Analytical balance)

Greifensee, Switzerland

高壓蒸氣滅菌器

HL-343P, Huxley Medical Instruments

(Autoclave)

Taipei, Taiwan, ROC

二氧化碳細胞培養箱

進基科技股份有限公司

(Cell incubator)

Taipei County, Taiwan, ROC

垂直式無菌操作櫥

Cellstar, 海天科學股份有限公司

(Laminar flow cabinet)

Taipei, Taiwan, ROC

倒立顯微鏡

CK2, OLYMPUS

(Inverted microscope)

Nishi-Shinjuku, Tokyo, Japan

恆溫水槽

B601D, FIRSTEK

(Water bath)

Taipei County, Taiwan, ROC

酸鹼測量儀

pH meter 445, CORNING

(pH meter)

Corning, NY, USA

高速離心機

5804 R, Eppendorf

(High speed centrifuge)	Barkhausenweg, Hamburg, Germany
多功能全光譜分析儀 (Spectrofluorometer)	SpectraMax M5, Molecular Devices Sunnyvale, CA, USA
旋轉減壓濃縮機 (Rotary evaporator)	VV2011, Heidolph Elektro GmbH & Co. KG Starenstraße, Kelheim, Germany
奈米擠壓器 (Mini Extruder)	Mini Extruder, Avanti Polar Lipids Alabaster, AL, USA
粒徑分析儀 (Submicron particle sizer)	COULTER N4 Plus, Beckman Coulter Fullerton, CA, USA
粒徑分析儀操作軟體	N4 plus software ver. 1.10 (1994-1995), Beckman Coulter Fullerton, CA, USA
流式細胞儀 (Flow cytometer)	FACSCalibur, Becton-Dickinson Labware Franklin Lakes, NJ, USA
流式細胞儀操作分析軟體 (Acquisition and analysis software)	Cell Quest™ Pro. ver. 6.0 (1994-2007), Becton-Dickinson Labware Franklin Lakes, NJ, USA
	
7. 顯微攝影器材	
倒立螢光顯微鏡	Axiovert 200M, Carl Zeiss Maple Grove, MN, USA
控溫箱	Incubator XL, Carl Zeiss Maple Grove, MN, USA
CCD 相機	Zeiss AxioCam, Carl Zeiss Maple Grove, MN, USA
顯微鏡影像處理軟體	Metamorph ver. 7.1.3.0 (1992-2007), Molecular Devices

	Sunnyvale, CA, USA
溫度控制器	Tempcontrol 37-2 digital, PeCon Ziegeleistraße, Erbach, Germany
CO ₂ 控制器	PeCon Ziegeleistraße, Erbach, Germany
HBO 100W 螢光汞燈電源	Osram Hellabrunner Strasse, Munich, Germany

2、細胞培養

2-1、細胞培養液配製

參考 Phelan 的作法 (Phelan, 2007) 進行 RPMI-1640 培養液的配置與 Hep3B 細胞培養。

依照欲泡製的培養液容積，每一公升培養液須取 16.35 g RPMI-1640 培養液乾粉 (Molecular Probes/Invitrogen) 與 2.2 g NaHCO₃ (Merck & Co.) 溶於 900 mL 去離子水中，當乾粉溶解後將培養液的 pH 值調整至 7.2~7.3，再加入 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin Solution (Biological Industries) 及 100 mL 去活化胎牛血清 (FBS, Molecular Probes/Invitrogen) 配製最終含 10% FBS (v/v)、100 U/mL penicillin G 及 100 µg/mL streptomycin sulfate 的培養液，再以 0.22 µm 孔徑過濾杯進行過濾後即完成含 10% FBS 的 RPMI-1640 培養液的配製。於 4°C 冷藏儲存。

2-2、細胞培養方法

將含有 B 型肝炎表面抗原的人類肝癌細胞株 Hep3B 培養於 75 cm² 培養盒，以含有 10% FBS 的 RPMI-1640 培養液培養，並將培養盒放置於維持 37°C 與 5% CO₂ 的細胞培養箱中。每隔二到三天換一次培養液；待細胞長滿後，先以 10 mL PBS (phosphate buffered saline, KCl 2 g/L、Na₂HPO₄ 14.2 g/L、KH₂PO₄ 2.4 g/L

和 NaCl 80 g/L) 潤洗細胞，再加入 1 mL trypsin-EDTA 溶液 (2.5 g/L trypsin 和 0.38 g/L EDTA · 4Na in Hanks' Blanced Salt Solution) 與細胞作用 3 分鐘後，以 5 mL 培養液將細胞沖下，再取 1 mL 細胞懸浮液 (1:5 稀釋) 與 10 mL 培養液置入新的 75 cm² 培養盒進行繼代培養 (subculture)，其餘的細胞懸浮液可種在培養盤中以進行實驗。

3、Liposomes 製備與分析

3-1、Liposomal Hypericin 之製備

為避免 liposomes 在細胞培養環境下因溫度 (37°C) 或被空氣氧化造成結構不穩定，實驗中選用全飽和脂肪酸長鏈且轉相溫度 T_m 為 55°C 的 distearoylphosphocholine (DSPC, Avanti Polar Lipids) 作為 liposomes 的主成分。並參考 Martin (1990) 與 Tsai 等人 (2009) 的方法 (Martin, 1990; Tsai *et al.*, 2009)，以薄膜水合法 (thin-film hydration method) 與濾膜擠壓法 (extrusion method) 製備 liposomes。

全程皆在避光狀態下進行。於 50 mL 磨口圓底燒瓶中，取 DSPC 儲備溶液 (10 mg/mL in chloroform) 400 μ L 並加入 cholesterol (1 mg/mL in chloroform) 0 μ L、222 μ L、2000 μ L 以配置含 cholesterol 莫耳百分比依序為 0%、10%、50% 的 liposomes，再加入甲醇使溶液中氯仿：甲醇 = 2:1 (體積比)，最後加入 Hyp 儲備溶液 (5 mg/mL in DMSO) 25 μ L，搖勻後裝置於旋轉減壓濃縮機 (Heidolph, VV2011)，並在 65°C 恆溫水浴鍋中，25 rpm 下以抽氣幫浦減壓抽氣過夜以除去殘餘溶劑並於圓底燒瓶底部形成一脂質薄膜，之後以氮氣解除真空後，加入 1 mL 去離子水至磨口圓底燒瓶中，並在 65°C 恆溫水浴中以旋轉減壓濃縮機以 260 rpm 旋轉約 30 分鐘，直至薄膜由圓底瓶底部完全震落而形成 multilamellar vesicle (MLV) 溶液。將 MLV 溶液加入配有 0.2 μ m 孔徑 polycarbonate 濾膜 (GE Healthcare, Nucleopore track-etch membrane) 的奈米擠壓器 (Avanti Polar Lipids, Mini Extruder) 中，由加熱板控溫於 65°C，並擠壓過濾 11 次，之後將濾液收集

至 1.5 mL 微量離心管。簡易製備過程如下圖 5。

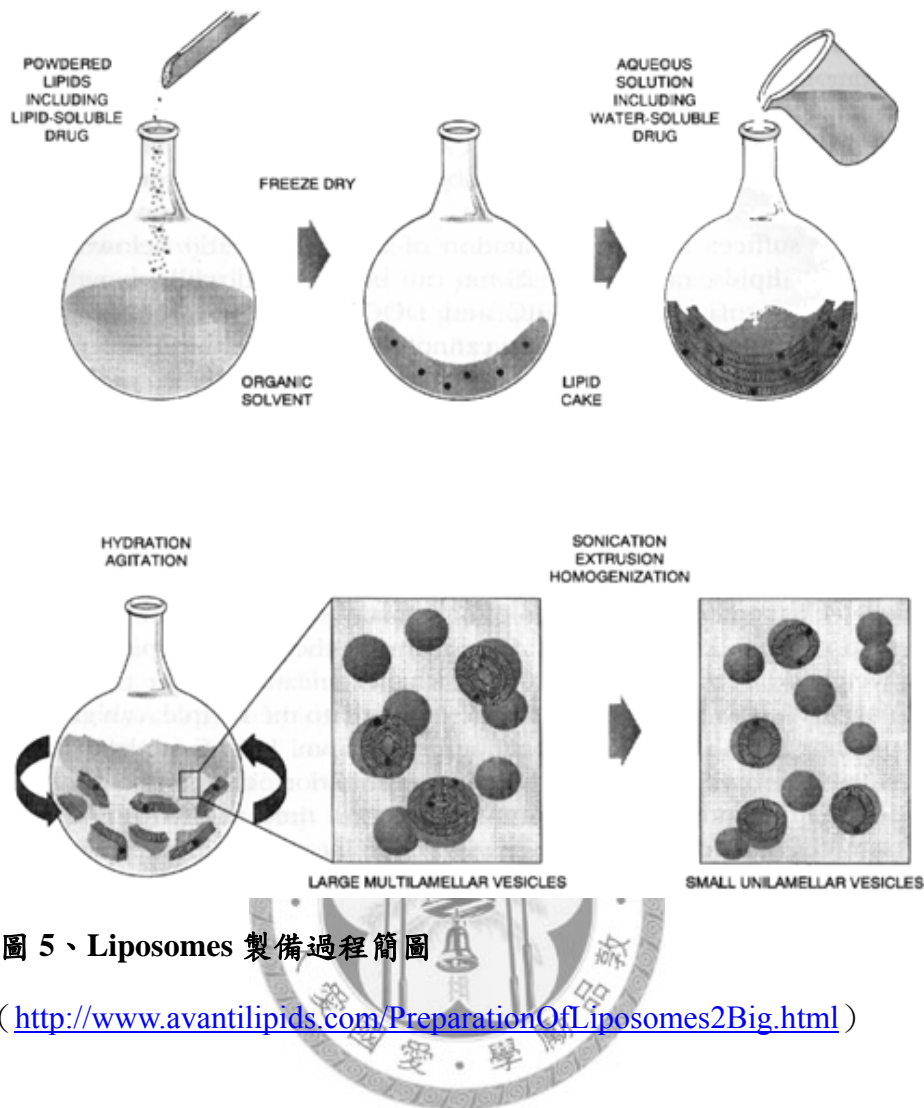


圖 5、Liposomes 製備過程簡圖

(<http://www.avantilipids.com/PreparationOfLiposomes2Big.html>)

3-2、Liposomes 純化方式

參考 Tsai 等人的方法 (Tsai *et al.*, 2009)，實驗中以 gel filtration 管柱層析方式來純化 liposomes，其中管柱填充物 (Sephadex) 的型號與性質請參考附錄三。以 0.9% (w/v) 的 NaCl 120 mL 配製 12 mL/g 的 Sephadex G-50 Fine 懸浮液，並於 4°C 冷藏過夜使 Sephadex 顆粒充分水合。將層析管柱 (1 cm ID, 30 cm length) 以去離子水潤濕後以鐵架垂直架設好，將管柱底蓋 (end caps) 旋緊後加入 5 mL 0.9% 的 NaCl，再將 Sephadex G-50 Fine 懸浮液延管壁填充至層析管柱中使白色 Sephadex 填充高度 (gel bed height) 達 10 cm，再以 0.9% NaCl 做為沖提液，將底蓋打開後以總量約 20 mL (~2 倍填充高度) 的沖提液分次沖提使填充物排列

更緊實。當沖提液面與填充物面齊平時加入 1 mL liposomal Hyp 懸浮液，待懸浮液完全滲入填充物後再延管壁補充沖提液，約 5 分鐘後當 liposomal Hyp 層（紅色）接近管柱底部時，以 2 mL 微量離心管收集沖提液 1.5 mL，並於 4°C 避光冷藏儲存，即完成 liposomal Hyp 的純化。

3-3、Hypericin 吸收光與螢光光譜分析

參考 Chang 等人的作法 (Chang *et al.* 2008)，取 Hyp 儲備溶液 (5 mg/mL in DMSO) 1 μ g，並依添加 DSPC 溶液的量，調配成重量比 Hyp/Lipid (%) 為 1.4、1.76、2、2.5、3.12、5、10 比例的甲醇溶液，並分別取 200 μ L 加入 96 孔盤後，以多功能光譜分析儀進行 Hyp 吸收光譜與螢光光譜的分析。吸收光光譜波長的範圍設定在 450 至 700 nm。而螢光光譜的分析，則設定在波長 480 nm 光源的激發下，於 560 至 700 nm 範圍的螢光散射強度，並將 cutoff 設定於 550 nm。

3-4、Liposomes 包覆之 Hypericin 定量分析

參考 Galanou 等人的作法 (Galanou *et al.*, 2008)，取 Hyp 儲備溶液 (5 mg/mL in DMSO) 1 μ L 加入甲醇 2 mL 調配成濃度為 2.5 μ g/mL 的標準溶液，並依照下表比例調配至 96 孔微量測定盤內，以螢光光譜儀測其螢光量值後製作標準曲線。

試管編號 No.	Hyp 標準液 (μ L)	甲醇 (μ L)	配置濃度 (μ g/200 μ L)
0	0	200	0
1	20	180	0.05
2	40	160	0.1
3	80	120	0.2
4	120	80	0.3
5	160	40	0.4
6	200	0	0.5

於 96 孔微量測定盤取 1 μL 的 liposomes 樣本配置成 200 μL 的甲醇溶液，架於螢光光譜儀後震盪 1 分鐘以確保 liposomes 溶解。利用螢光光譜儀定溫在 25 $^{\circ}\text{C}$ ，以波長 485 nm 光源激發後，測定在 590 nm 的螢光量值，並於校正曲線上以內差法求得樣品中藥物的含量。

3-5、Liposomes 之脂質定量分析

參考 Stewart 的作法 (Stewart, 1980)，取 DSPC 儲備溶液 (10 mg/mL in chloroform)，分別於玻璃離心管中，配置 0、10、20、30、40、50 $\mu\text{g}/2\text{ mL}$ chloroform 的 DSPC 溶液，並於每管加入 2 mL ferrothiocyanate 溶液，使管中溶液分成 ferrothiocyanate 層(上層)與 chloroform 層(下層)。並震盪 30 秒使 ferrothiocyanate 層能與 chloroform 層中的脂質作用，靜置 5 分鐘後，再以玻璃吸管取約 1 mL 的 chloroform 層加入石英製 cuvette 中，以吸光光譜儀測定在波長 488 nm 下，樣品的吸收光值，並製作標準曲線。之後再將待測 liposomes 的磷脂質濃度稀釋至標準曲線的範圍內，以相同方式測其吸光值，再以內差法求出其磷脂質的濃度。

3-6、包覆率計算 (encapsulation efficiency%)

$$\text{Encapsulation efficiency (\%)} = \frac{P_f / P_i}{L_f / L_i} \times 100$$

L_i ：製備 liposomes 的磷脂質用量

L_f ：磷脂質的回收量 (μg)

P_i ：製備 liposomes 的 Hyp 用量

P_f ：Hyp 的回收量 (μg)

3-7、粒徑測定 (Determination of liposome size)

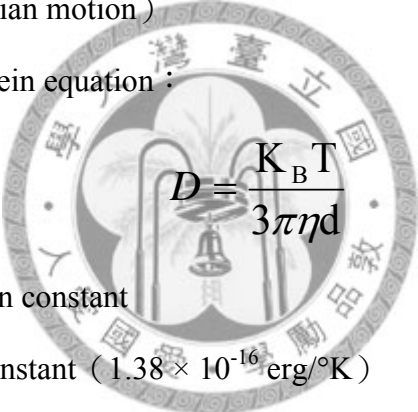
參考 Yu 等人的方法 (Yu *et al.*, 2002)。微脂粒粒徑的測定是用 Coulter N4 Plus 粒徑分析儀 (Beckman Coulter)，它是利用 photon correlation spectroscopy (PCS) 藉由粒子在溶液中的布朗運動和來偵測粒子大小，其原理簡述如下：

(1) Photon correlation spectroscopy (PCS)

以固定角度雷射光射入含有粒子的溶液中，當雷射光撞擊到粒子後會產生散射光，而由於粒子處於非絕對零度的溶液中會產生不規則的布朗運動，且粒子大小會影響其擴散速度與布朗運動，使得散射光訊號到達偵測器時會產生干涉影響光線強度，且粒子位置會隨時間改變，因此散射光亦會隨時間改變，故要配合理論後才可計算出平均粒徑。

(2) 布朗運動 (Brownian motion)

根據 Stoke's-Einstein equation：


$$D = \frac{K_B T}{3\pi\eta d}$$

D : rate of diffusion constant

K_B : Boltzmann constant (1.38×10^{-16} erg/°K)

T : temperature (°K)

η : diluent viscosity (poise)

d : equivalent spherical diameter (centimeters)

若已知溶液的溫度、黏度，再由儀器測得 liposomes 擴散速率後，則可經由計算而得到 liposomes 的粒徑大小。

每次分析樣品前，需讓儀器熱機 30 分鐘，並設定所需的條件：

· Scattering angle of the laser beam : 90°

· Temperature : 25°C

· Refractive Index : 1.33

· Viscosity : 0.89 centipoise

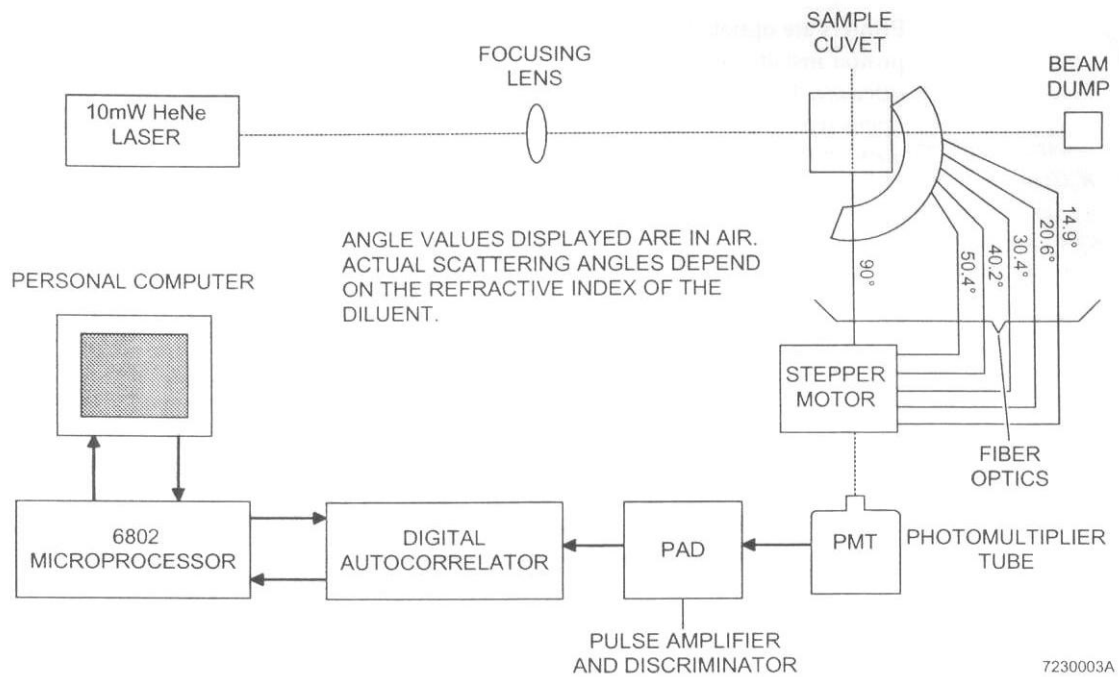


圖 6、N4 Plus 儀器原理圖示 (Reference Manual, Beckman Coulter, 1995)

取 Hyp 微脂粒樣本 40 μL 至 cuvette 中以 0.9% (w/v) NaCl 稀釋至 3 mL，使測量樣本顆粒數為 $5.5 \times 10^5 \sim 5.6 \times 10^5$ 間 (儀器可測量之顆粒數範圍為 $10^4 \sim 10^6$)，量測時間為五分鐘。經儀器測定出 liposomes 粒徑與粒徑分佈後 (size distribution) 後，可經由下列公式換算成分佈指數 (polydispersity index, P.I.)。分佈指數為膠體溶液中，粒子分布情形呈現的重要指標。當 P.I. 值為 0.03-0.06 時，定義為單一分佈群體 (monodisperse population)，即所製備出的 liposomes 群體粒徑大致相同。而在 0.1-0.2 時定義為分佈均一 (narrow size distribution) 之群體，大於 0.5 時，則代表製備出的粒徑分佈非常的寬廣 (very broad size)。

$$SD = d \times CV, \quad CV = \frac{1}{\sqrt{\frac{1}{2 \times P.I.} + 4}}$$

SD：標準差 (standard deviation)

d：平均粒徑 (mean diameter)

CV：變異係數 (coefficient of variation)

P.I.：分佈指數 (polydispersity index)

3-8、穩定性測定 (Stability Study)

3-8-1、保存穩定性分析

於製備好的 liposomes 樣本中各取 100 μL ，分裝在 1.5 mL 棕色微量離心管，避光保存在 4°C 冰箱中，於製備完成後第 0、1、5、10、15、20、30 天取出分析其粒徑的改變。粒徑的測定方式同 3-4。

3-8-2、培養液中穩定性分析

於製備好的 liposomes 樣本中取 20 μL 至 1.5 mL 棕色微量離心管中，並加入 1 mL 無血清培養液/添加 LDL 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的培養液或/含 10% FBS 的培養液，置於 37°C 恆溫水浴中，於水浴後 0、3、6、9、12、24 小時後取出樣本培養液並移至 cuvette 中，以 37°C 培養液稀釋至 3 mL 後隨即進行 liposomes 粒徑測定。再將粒徑測定的結果，依 liposomes 於各粒徑分佈的百分比【Intensity (%)】進行紀錄。

3-8-3、光源照射穩定性分析

於製備好的 liposomes 樣本中取 20 μL 至 96 孔盤中，以波長 590~610 nm 的 LED 光源各別進行 1 J/cm^2 、5 J/cm^2 及 10 J/cm^2 的照射後，將 liposomes 取出並移至 cuvette 中，以 0.9% (w/v) NaCl 稀釋至樣本顆粒數為 $5.5 \times 10^5 \sim 5.6 \times 10^5$ 間，即進行 liposomes 粒徑測定。

4、細胞攝取試驗

4-1、LDL concentration dependency

將 Hep3B 細胞種入 6 孔細胞培養盤 (5×10^5 cells/well)，培養 24 小時後將各孔的細胞培養液以 1 mL 無血清培養液替換，於流式細胞儀測定前 24、12、9、6、3 小時時各取一孔做為實驗組加入 Hyp (0.1 mM in DMSO) 或 liposomal Hyp

(in 0.9% NaCl) 使培養液最終含 0.03 μM Hyp。而一孔則不加藥做為對照組。於流式細胞儀測定前以 pipette 取各孔中的既有培養液將細胞打落盤底後取 700 μL 收集至 1.5 mL 棕色微量離心管，以高速離心機 (Eppendorf, 5804 R, Germany) 以 $405 \times g$ (1,500 rpm) 於 4°C 離心 10 分鐘，將上清液倒除後把細胞懸浮於 350 μL PBS (KCl 2 g/L、 Na_2HPO_4 14.2 g/L、 KH_2PO_4 2.4 g/L 和 NaCl 80 g/L) 中，便可以流式細胞儀進行分析。分析隨培養時間的增加，細胞中螢光累積量的變化。

以相同實驗步驟，比較 Hyp 及 liposomal Hyp 於添加 1、2.5、5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LDL 的無血清培養液中螢光累積量的變化。

流式細胞儀分析的條件設定：

Excitation : 488 nm (氬離子雷射)

Emission : 585 ± 21 nm (FL2 PMT)

每個樣品收 10,000 顆細胞進行螢光分析。

4-2、Culture medium dependency

將 Hep3B 細胞種入 6 孔細胞培養盤 (5×10^5 cells/well)，培養 24 小時後將各孔的細胞培養液以 1 mL 無血清培養液替換，於流式細胞儀測定前 24、12、9、6、3、2、1.5、1、0.5 小時時各取一孔做為實驗組加入 Hyp (0.1 mM in DMSO) 或 liposomal Hyp (in 0.9% NaCl) 使培養液最終含 0.1 μM Hyp。一孔不加藥做為對照組。以 pipette 取各孔中的既有培養液將細胞打落盤底後取 700 μL 收集至 1.5 mL 棕色微量離心管，再以 $405 \times g$ (1,500 rpm) 於 4°C 離心 10 分鐘，將上清液倒除後把細胞懸浮於 350 μL PBS 中，便可以流式細胞儀進行分析。分析隨培養時間的增加，細胞中螢光累積量的變化。

以相同實驗步驟，比較 0.1 μM Hyp/liposomal Hyp 於(A)添加 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LDL 的無血清培養液與 (B) 含 10% FBS 培養液中螢光累積量的變化。

4-3、結果分析

實驗結果以分析軟體 (Becton-Dickinson Labware, Cell Quest™ Pro.) 進行結果分析，以相對螢光單位 (relative fluorescence unit, RFU) 來表示 Hyp 於細胞累積的量，計算方式為：

$$\text{RFU} = \text{各時間點的螢光平均值} \div \text{對照組的螢光平均值}$$

5、細胞內分佈試驗

由於 Hyp 本身經光源激發後會散射出紅色螢光，因此為了表現 Hyp 在細胞中的分布位置，實驗中同時使用綠色及藍色的胞器染劑以呈現特定胞器的位置，並利用活細胞曠時攝影技術 (time-lapse microscopy) 紀錄 Hyp 於細胞中分部變化的情形，再以影像處理軟體 (Molecular Devices, Metamorph ver. 7.1.3.0) 計算 Hyp 於特定胞器分佈並堆積的螢光量以量化表現 Hyp 的細胞內分佈傾向。各胞器染劑的激發光與散射光波長紀錄於表 2。

表 3、各胞器染劑之激發光與放射光波長基本資料

染劑	染色部位	$\lambda_{\text{ex}}-\lambda_{\text{em}}$ (nm)
NBD C6-ceramide	Golgi apparatus	466—539
MitoTracker® Green FM	Mitochondria	490--516
LysoSensor™ Yellow/Blue DND-160 (1 mM solution in DMSO)	Lysosomes	329--440
DiOC ₅ (3)	ER	484 --500

5-1、細胞胞器染劑配製

胞器染劑	染劑配製步驟
MitoTracker [®] Green FM (粒線體)	以含 10% FBS 培養液，配置同時含 MitoTracker 200 nM 及 Hoechst 33342 0.5 µg/mL 的染劑培養液。
NBD C ₆ -ceramide (高基氏體)	以氯仿：乙醇 = 19：1 (v/v) 為溶劑配置 1 mM NBD C ₆ -ceramide 溶液，取 50 µL 至 10 mL 圓底瓶中並以氮氣吹乾，再以旋轉蒸發器抽氣一小時後以 200 µL 純酒精稀釋；取 10 mL 無血清 RPMI-1640 培養液並加入 3.4 mg (0.34 mg/mL) 的脫脂 BSA (bovine serum albumin-fatty acid free)，搖勻並加入 200 µL NBD C ₆ -ceramide 酒精溶液，即配置出最終濃度含 5 µM NBD C ₆ -ceramide 與 5 µM BSA 的染劑。
DiOC ₅ (3) (內質網)	以無血清的 RPMI-1640 培養液，配製同時含 DiOC ₅ (3) 200 nM 及 Hoechst 1 µg/mL 的染劑培養液。
LysoSensor Yellow/Blue DND-160 (溶酶體)	以 37°C 含 10% FBS 的 RPMI-1640 培養液，配置 LysoSensor 1 µM 的染劑培養液。

5-2、細胞胞器染色

參考 Poot 的方法 (Poot, 2001) 及染劑使用說明，將細胞以 12,000 cells/200 µL/well 的數量種入 8 well chambered coverglass (NUNC, U.S.A.) 後培養 24 小時，再依使用染劑進行不同染色步驟，每次實驗針對一種胞器進行染色，如下表：

胞器染劑	細胞染色步驟
MitoTracker [®] Green FM (粒線體)	以含染劑培養液 400 µL 替換 → 37°C 染色 30 分鐘 → PBS 潤洗一次

NBD C6-ceramide (高基氏體)	以無血清培養液潤洗一次 → 加入 5 μ M NBD-BSA 400 μ L 染劑 → 4 $^{\circ}$ C 避光染色 30 分鐘 → 以無血清培養 液潤洗一次 → 加入 Hoechst 33342 0.5 μ g/mL 染劑 400 μ L 於 37 $^{\circ}$ C 培養 30 分鐘 → PBS 潤洗一次
DiOC ₅ (3) (內質網)	以染劑培養液 400 μ L 替換 → 於 37 $^{\circ}$ C 染色 5 分鐘 → 吸除培養液
LysoSensor Yellow/Blue DND-160 (溶酶體)	以 LysoSensor 染劑培養液 400 μ L 替換 → 於 37 $^{\circ}$ C 培 養 5 分鐘 → PBS 潤洗一次

於染色完成後，每格 coverglass 加入 400 μ L 無血清培養液，並將細胞如下表分組。Hyp/liposomal Hyp 先與培養液（無血清、添加 LDL 或 FBS）混合 30 分鐘，於螢光顯微鏡設定好後再加入 coverglass 中，使培養液最終濃度含 Hyp/liposomal Hyp 0.1 μ M。各組依指示添加試劑使培養液最終含表內所示的試劑濃度，即進行螢光顯微鏡定位。

分組	Hyp/Liposomal Hyp (0.1 μ M)	LDL (2.5 μ g/mL)	FBS [*] (10% (v/v))
對照組 I	—	—	—
對照組 II	—	+	—
對照組 III	—	—	+
實驗組 I	+	—	—
實驗組 II	+	+	—
實驗組 III	+	—	+

* 於染色後直接以含 10% FBS 培養液替換。

5-3、倒立螢光顯微鏡曠時攝影

於拍攝前 1 小時先將顯微鏡之控溫箱環境控制在 37°C 與 5% CO₂。於避光下，將 8 well chambered coverglass 架設於螢光顯微鏡上 (Axiovert 200M, Carl Zeiss)，使用放大倍率 100X 的油鏡 (物鏡) 進行觀察，先以目視找出觀察焦距，再以影像處理軟體選取好欲拍攝的細胞座標、拍攝間隔與總拍攝時間、各色螢光固定的曝光時間，並以穿透光影像作為軟體自動對焦 (auto focus) 的依據。於每一格設定拍攝 4 組細胞樣本，之後依穿透光→紅光→綠光→藍光影像的順序以每小時拍攝一次的頻率進行五小時的曠時攝影，顯微鏡各螢光光源與染劑之激發 (excitation) 與散射 (emission) 波長如表 3 所示，其中粒線體、高基氏體與內質網會呈現綠色螢光，細胞核與溶酶體則會呈藍色螢光，而 Hyp 及 liposomal Hyp 則隨時間逐漸出現紅色螢光。

表 4、Axiovert 200M 配備之顯微濾鏡之激發光與分光鏡波長限制

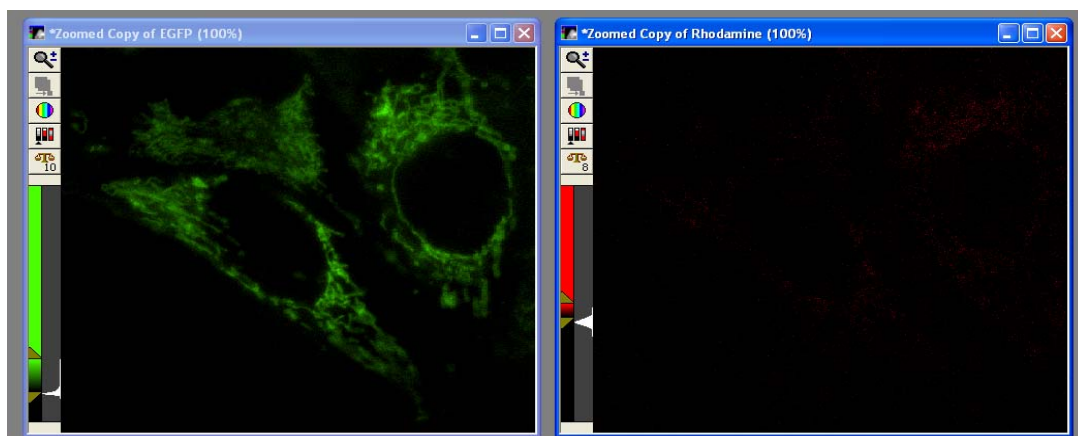
濾鏡(filter)	Excitation Filter Bandwidth (nm)	Dichromatic Mirror Cutoff (nm)
DAPI (藍)	365 ± 10	395
EGFP (綠)	480 ± 20	535 ± 25
Rhodamine (紅)	530 ± 20	615 ± 35

5-4、顯微影像螢光定量分析

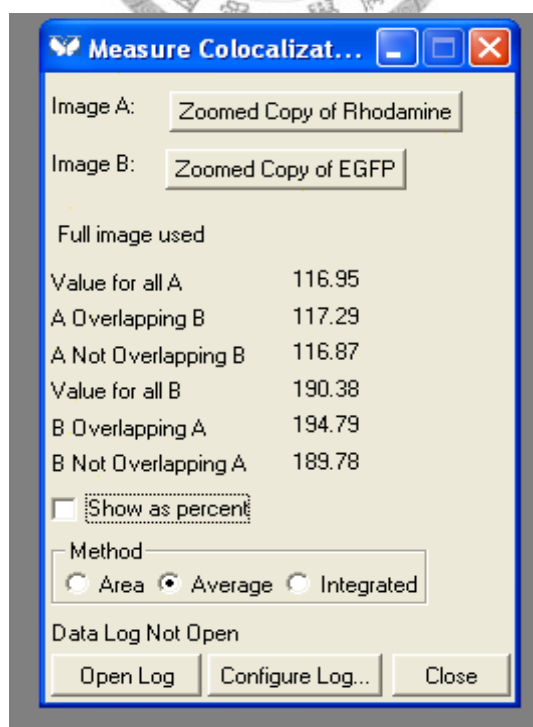
藉由 Metamorph 影像處理軟體，開啟每組樣本於同一時間點下，所拍攝出的胞器染劑螢光照 (綠光或藍光) 及 Hyp/liposomal Hyp 螢光照 (紅光)，並藉由軟體之 Measure Colocalization 功能。分別選取同拍攝時間點下，Hyp/liposomal Hyp 與胞器染劑的螢光圖進行定量，並藉由調整閾值 (inclusive threshold) 的方式，選取圖片中螢光顯著的部位，Metamorph 軟體便會將選取部位的螢光值計算出來，並同時將 Hyp/liposomal Hyp 與胞器螢光圖片中，螢光重疊部位的螢光強

度進行定量，並將呈現的數值進行紀錄，以最後一個拍攝時間點的 Hyp/liposomal Hyp 螢光圖，其螢光值作為參考值（100%），觀察 Hyp/liposomal Hyp 於各培養時間的分布變化。計算過程如下示例。

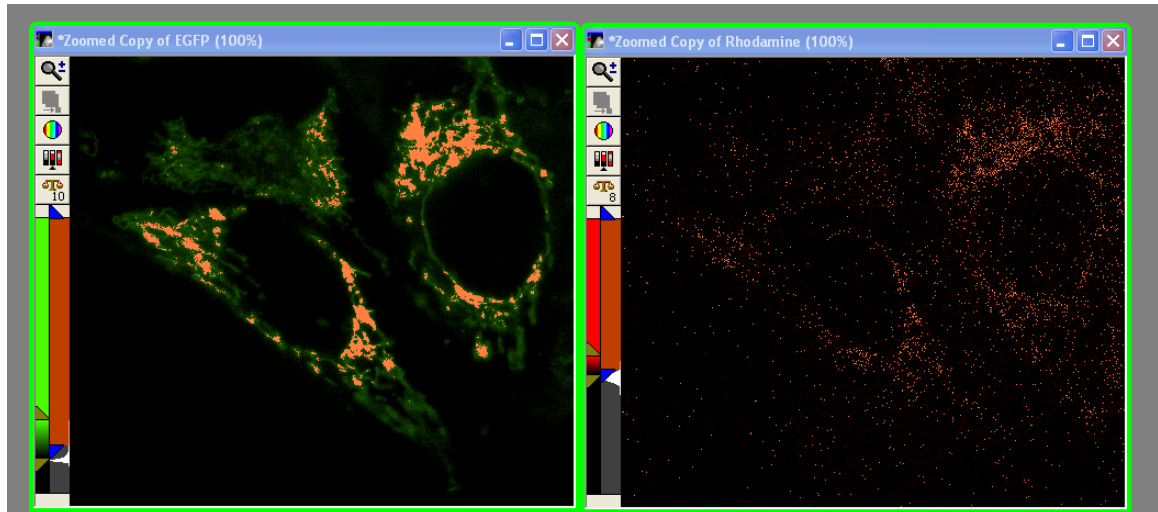
Step 1. 開啟 Mitochondria（左）與 free-form Hyp（右）於同一拍攝時間點（0 h）的螢光圖。



Step 2. 點選 Metamorph 功能表 Apps → Measure Colocalization，並將 Image A 設定為 free-form Hyp 螢光圖，而 Image B 設定為 mitochondria 螢光圖。



Step 3. 調整圖片左側之閾值表（橘色），將各螢光圖中螢光顯著的部位含蓋之後，兩圖螢光重疊部位中，free-form Hyp 的螢光值將會於功能欄中，以 A Overlapping B 的數值呈現，即表示 free-form Hyp 在加入細胞 0 h 後，於 mitochondria 的分布量。



6、螢光衰退試驗

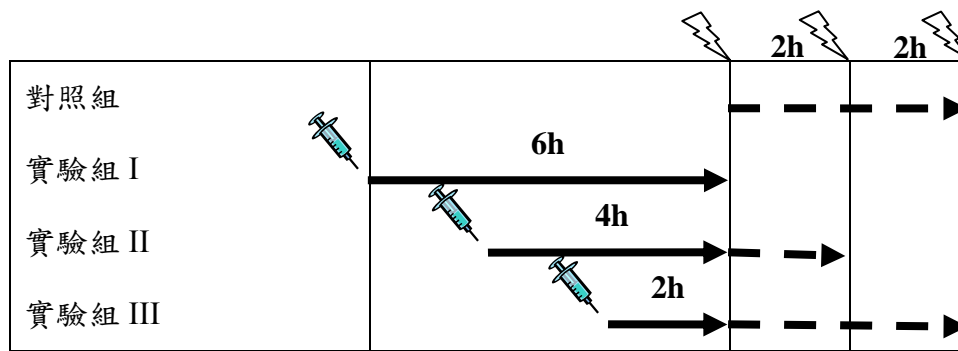
將細胞以 16,000 cells/400 μ L/well 的數量種入 4 well chambered coverglass，培養 24 小時後以無血清培養液替換，並分成 4 組，依指示進行給藥與拍攝。

對照組：拍攝前不加 Hyp/Liposomal Hyp，以倒立螢光顯微鏡每 2 小時拍攝一次，共拍攝 4 小時。

實驗組 I：拍攝前加 0.1 μ M Hyp/Liposomal Hyp 培養 6 小時後，以倒立螢光顯微鏡拍攝一次。

實驗組 II：拍攝前加 0.1 μ M Hyp/Liposomal Hyp 培養 4 小時後，以倒立顯微鏡每 2 小時拍攝一次，共拍攝 2 小時。

實驗組 III：拍攝前加 0.1 μ M Hyp/Liposomal Hyp 培養 2 小時後，以倒立顯微鏡每 2 小時拍攝一次，共拍攝 4 小時。



 : 給予 0.1 μM Hyp/Liposomal Hyp。

 : 以倒立顯微鏡拍攝。

之後藉由調整閾值 (inclusive threshold) 突顯影像中紅光的部位，並於該部位擷取 5×5 pixels 的區塊，並記錄區塊中的紅色螢光值。每組樣本於各時間點取 3 張不同視野下的影像進行記錄。螢光值計算方式同 5-4。觀察螢光強度是否會隨照射次數而改變。

7、資料數據分析及統計分析

實驗結果 (包括 liposomes 粒徑、穩定性與包覆率實驗、細胞攝取與排除實驗) 以 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 來表示。並以 Student's t-test 進行統計檢定，當 p 值小於 0.05 時，表其差異為具有統計上的意義。

四、結果

1、Liposomes 之製備

1-1、Hypericin 光譜分析

實驗中將 Hyp 進行吸收光與螢光光譜的分析，並同時比較添加磷脂質對 Hyp 光譜表現的影響。結果發現 Hyp 在甲醇溶液中，吸收波峰主要出現在波長 595 nm 的位置，而次峰則是在 550 nm (圖 7)。而在螢光表現上，Hyp 經激發後所生成的螢光波峰主要出現在波長 596 nm，而次峰出現在波長 639 nm 的位置 (圖 8)。而在添加不同比例磷脂質的情形下，Hyp 在吸收光及螢光波峰發生的位置與強度上，並無顯著差異，因此對於 liposomes 中所包覆 Hyp 的定量上，可利用甲醇溶液進行 Hyp 標準曲線的製作。

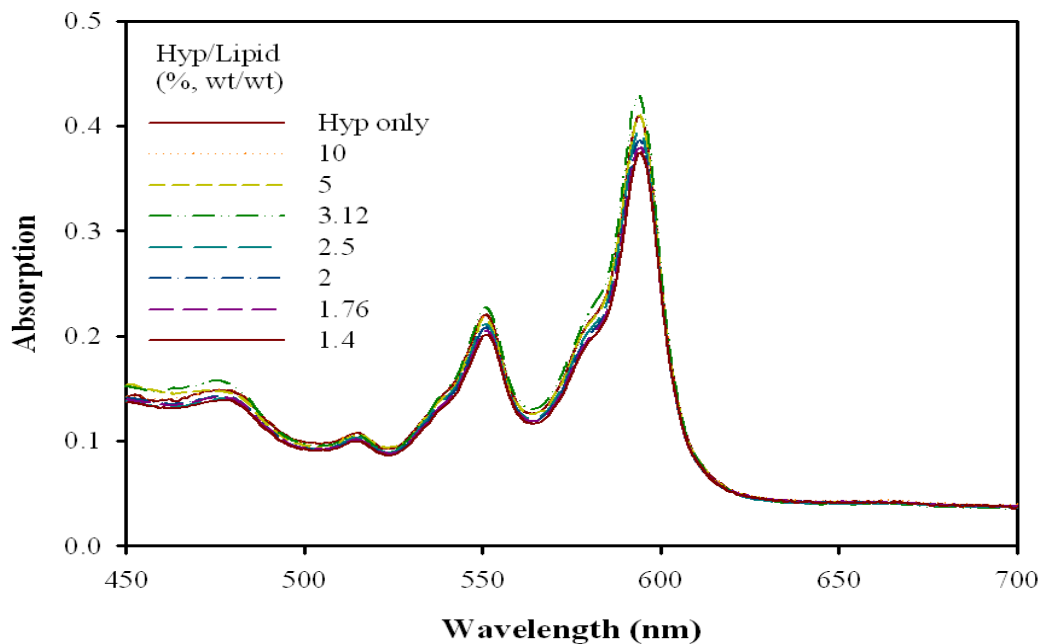


圖 7、磷脂質比例對 hypericin 於甲醇溶液中之吸收光光譜的影響

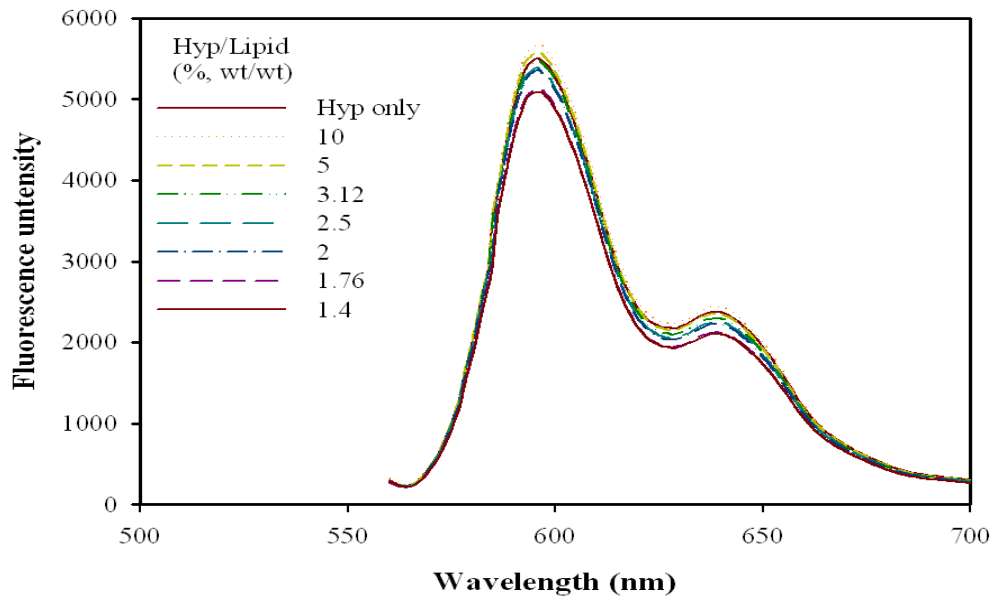


圖 8、磷脂質比例對 hypericin 於甲醇溶液中之螢光光譜的影響

1-2、Liposomes 包覆率分析

實驗中使用的 liposomes 依所添加 cholesterol 比例分成三組，在包覆率結果方面，於 liposomes 配方中添加 10% 總莫耳數的 cholesterol 情況下其 Hyp 的包覆率明顯低於只以 DSPC 製作的 liposomes ($p < 0.01$)，但是當 cholesterol 的組成比例提高至 50% 時，Hyp 的包覆率亦隨之提升，因此在 liposomes 配方中添加 cholesterol 會改變 Hyp 於 liposomes 的包覆方式，且隨著 cholesterol 使用比例的增加而提高 Hyp 的包覆率，如下圖 9。

表 5、Liposomal Hypericin 之包覆率

DSPC : Cholesterol (molar ratio)	Encapsulation ratio (%)	n
1 : 0	78.71 ± 6.77 (69.01~90.11)	9
1 : 0.1	60.57 ± 6.66 (52.94~70.31) *	7
1 : 1	81.11 ± 6.37 (70.00~90.50)	9

註：表中數值為 mean ± SD (range)。*表示和 DSPC : Cholesterol = 1 : 0 組相比有明顯差異 ($p < 0.05$)。

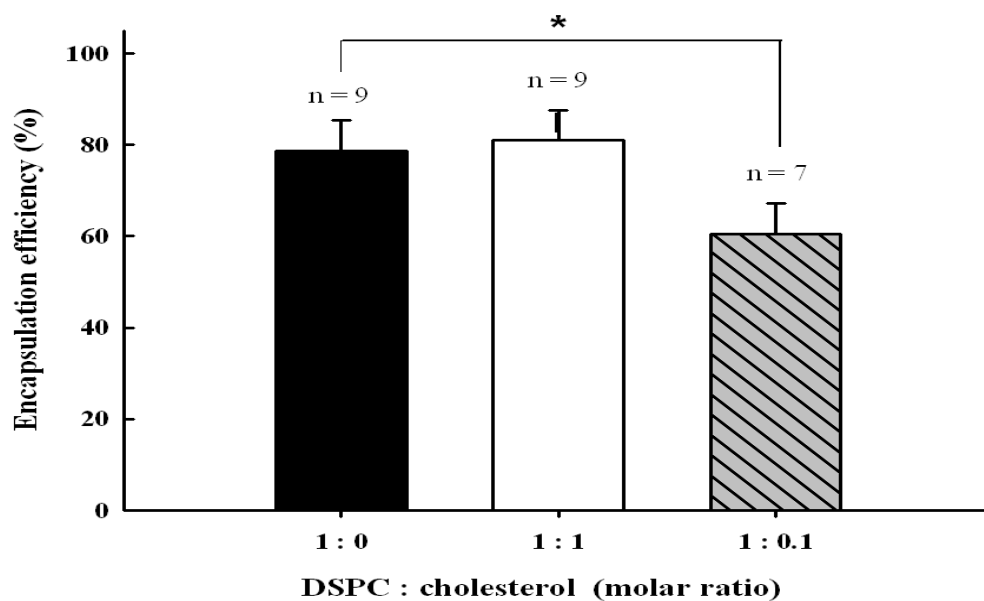


圖 9、Liposomal Hypericin 包覆率：與 cholesterol 組成比例之關聯

*表示和 DSPC : cholesterol = 1 : 0 組相比有明顯差異 ($p < 0.05$)。

1-3、Liposomes 粒徑測定

粒徑測量結果如表 5 顯示，有無添加 cholesterol 及添加比例在 liposomes 的粒徑上並無顯著差異 ($p > 0.05$)，但三種 cholesterol 含量不等之 liposomal hypericin 之粒徑範圍皆介於 100 ~ 300 nm 間，且 polydispersity index < 0.5 屬於分佈均一之群體，符合實驗設計的條件。

表 6、Liposomal Hypericin 之粒徑比較：Cholesterol 組成比例之影響

DSPC : Cholesterol (molar ratio)	Average size (nm)	Polydispersity index	n
1 : 0	191.33 ± 5.63 (180.3~198.8)	0.05 ± 0.02	8
1 : 0.1	183.80 ± 5.98 (176.1~190.6)	0.08 ± 0.05	4
1 : 1	196.58 ± 9.00 (188.4~209.3)	0.09 ± 0.06	4

註：表中數值為 mean ± SD (range)。各組之間無明顯差異。

1-4、Liposomes 保存穩定性分析

保存穩定性結果顯示，只使用 DSPC 作為材料的 liposomal Hyp 其粒徑隨著保存時間的增加有逐漸變大的趨勢，且部分 liposomes 在保存 20 天後其粒徑超過 300 nm，已突破實驗設計時維持 IUV 大小的條件，而後在 30 天時所測得的粒徑分佈已由均一粒徑分裂出第二粒徑。而隨著提高 liposomes 組成中 cholesterol 的比例能有效延緩其於粒徑上的變化，增加 liposomes 在結構上的穩定性。如圖 10。

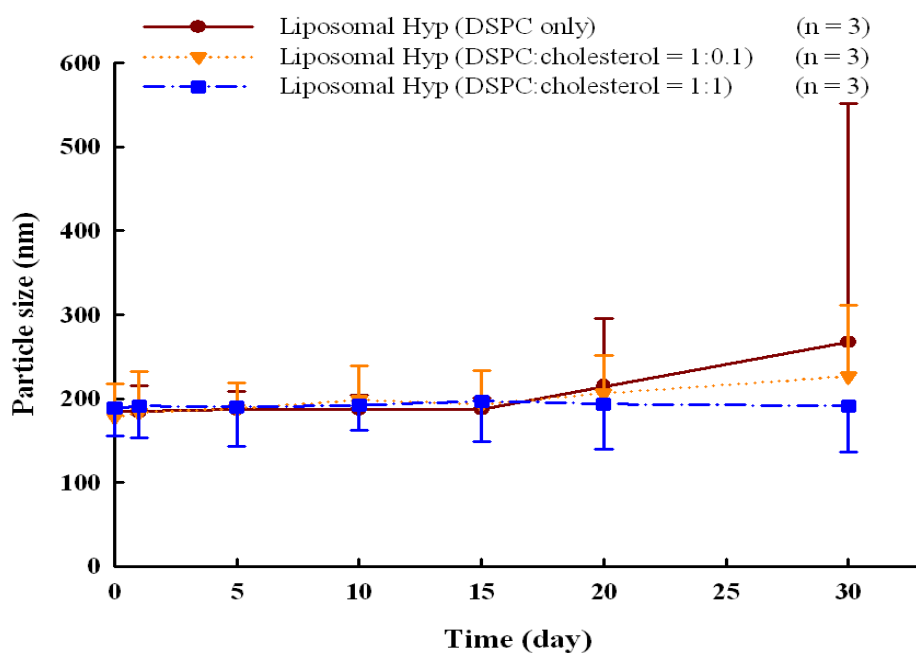


圖 10、Liposomal Hypericin 保存穩定度：與 cholesterol 組成比例之關聯

分別於 liposomes 製備完成後第 0、2、5、10、15、20、30 天測定其粒徑的變化，每次進行三重複（triplicate）測定。

1-5、Liposomes 於各類培養液中的穩定性分析

為了確保在之後的細胞攝取實驗上 liposomes 能維持其結構的穩定以區分 Hyp 進入細胞的路徑，因此將 liposomes 置於各培養液中並隨著時間觀察 liposomes 於粒徑上的變化。結果顯示 DSPC : cholesterol = 1:1 的 liposomal Hyp 在無血清、添加 LDL 與 FBS 的培養液中，liposomes 的粒徑大小 80% 都分布在 150~300 nm 的範圍之內，如圖 11~13。而在 DSPC : cholesterol = 1:0.1 的 liposomal Hyp 方面，在無血清、添加 LDL 與 FBS 的培養液中，分別於 12 小時、3 小時以及 9 小時時，有超過 50% 以上的粒徑大小已超出 300 nm 的範圍，如圖 14~16，顯示出 liposomes 組成中 DSPC : cholesterol 為 1 : 1 時，受培養液成分的影響較小。

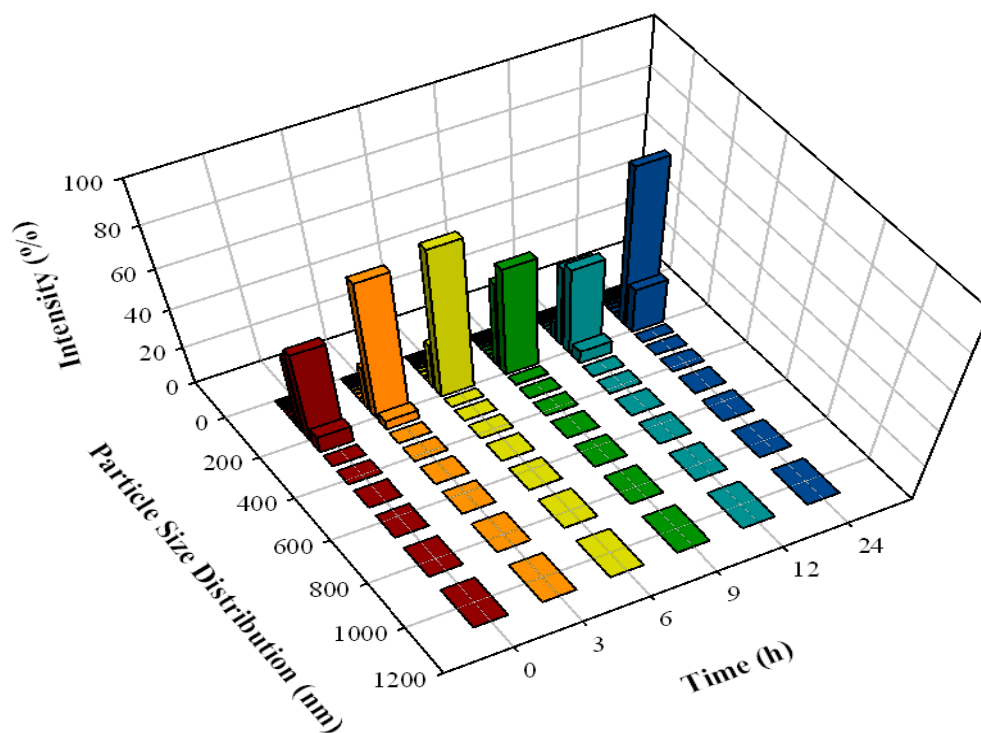


圖 11、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 1) 於無血清培養液中之
粒徑分佈變化

圖中 X 軸代表 liposomes 於培養液中的培養時間

Y 軸代表粒徑的分布範圍

Z 軸為粒徑呈現的百分比



Intensity (%)	Particle size distribution (nm)				Dust *
	1.00 ~ 132.95	132.95 ~ 271.70	271.70 ~ 894.00	>894.00	
0h	15.23 ± 11.84	54.80 ± 37.29	29.97 ± 26.06	0.00 ± 0.00	4.06 ± 7.03
3h	4.80 ± 8.14	94.30 ± 9.44	0.83 ± 1.44	0.00 ± 0.00	7.06 ± 1.53
6h	4.53 ± 7.59	87.87 ± 20.76	7.60 ± 13.16	0.00 ± 0.00	1.57 ± 1.49
9h	0.10 ± 0.17	99.93 ± 0.21	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	5.06 ± 1.45
12h	3.13 ± 5.08	96.83 ± 5.06	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	3.81 ± 2.59
24h	4.30 ± 7.36	95.70 ± 7.36	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.94 ± 0.86

*當 particle 的粒徑超過測量時所設定的粒徑最大值 (1000 nm) 時，則被歸類為 dust。

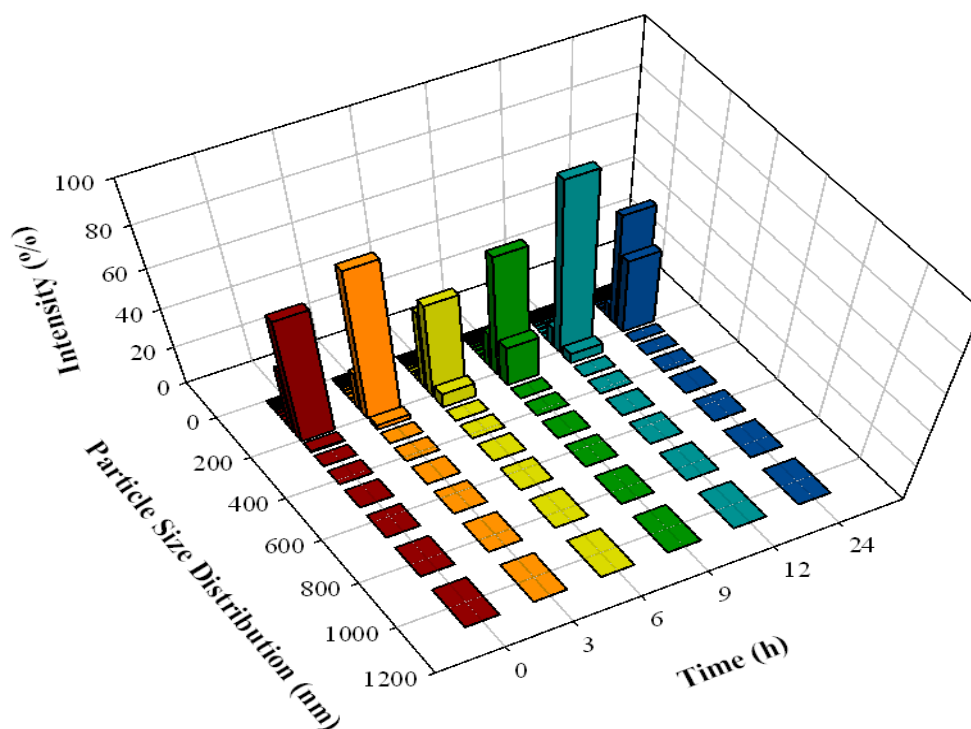
圖 12、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 1) 於添加 LDL 的培養

液中之粒徑分佈變化

圖中 X 軸代表 liposomes 於培養液中的培養時間

Y 軸代表粒徑的分布範圍

Z 軸為粒徑呈現的百分比



Intensity (%)	Particle size distribution (nm)				Dust *
	1.00 ~ 132.95	132.95 ~ 271.70	271.70 ~ 894.00	>894.00	
0h	10.50 ± 9.12	67.17 ± 29.64	22.30 ± 20.70	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
3h	4.80 ± 7.88	94.97 ± 8.37	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	5.54 ± 1.65
6h	7.27 ± 9.79	92.73 ± 9.87	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
9h	12.53 ± 10.61	82.73 ± 15.07	4.70 ± 5.74	0.00 ± 0.00	1.25 ± 2.16
12h	11.83 ± 10.59	88.17 ± 10.50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.58 ± 0.74
24h	6.10 ± 4.44	82.57 ± 22.81	11.30 ± 19.57	0.00 ± 0.00	2.57 ± 2.44

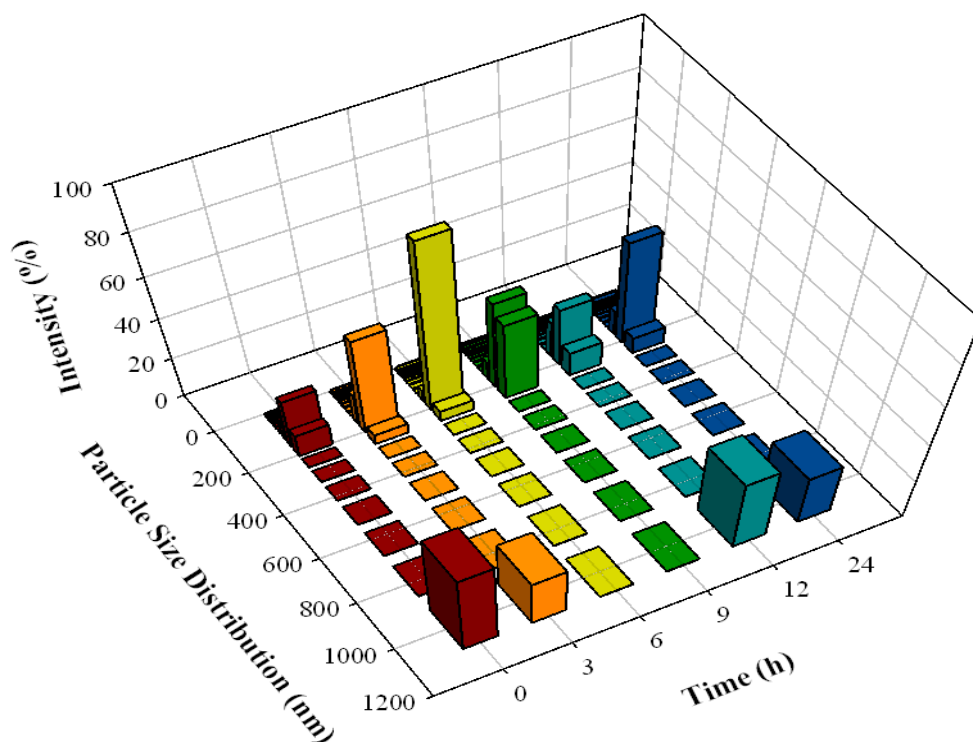
*當 particle 的粒徑超過測量時所設定的粒徑最大值 (1000 nm) 時，則被歸類為 dust。

圖 13、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 1) 於添加 FBS 的培養液中之粒徑分佈變化

圖中 X 軸代表 liposomes 於培養液中的培養時間

Y 軸代表粒徑的分布範圍

Z 軸為粒徑呈現的百分比



Intensity (%)	Particle size distribution (nm)				Dust *
	1.00 ~ 132.95	132.95 ~ 271.70	271.70 ~ 894.00	>894.00	
0h	20.23 ± 13.11	57.83 ± 30.05	6.93 ± 12.01	14.20 ± 24.60	10.65 ± 8.04
3h	9.37 ± 3.58	75.70 ± 14.76	3.57 ± 6.18	11.30 ± 12.24	8.17 ± 3.64
6h	10.00 ± 4.94	82.43 ± 18.22	7.57 ± 13.11	0.00 ± 0.00	10.82 ± 10.56
9h	7.07 ± 3.00	89.17 ± 7.01	2.67 ± 4.62	0.00 ± 0.00	13.47 ± 2.51
12h	6.43 ± 0.31	81.60 ± 21.04	0.00 ± 0.00	11.93 ± 20.67	10.72 ± 5.57
24h	5.73 ± 2.21	70.10 ± 21.56	0.00 ± 0.00	24.17 ± 23.86	5.24 ± 5.54

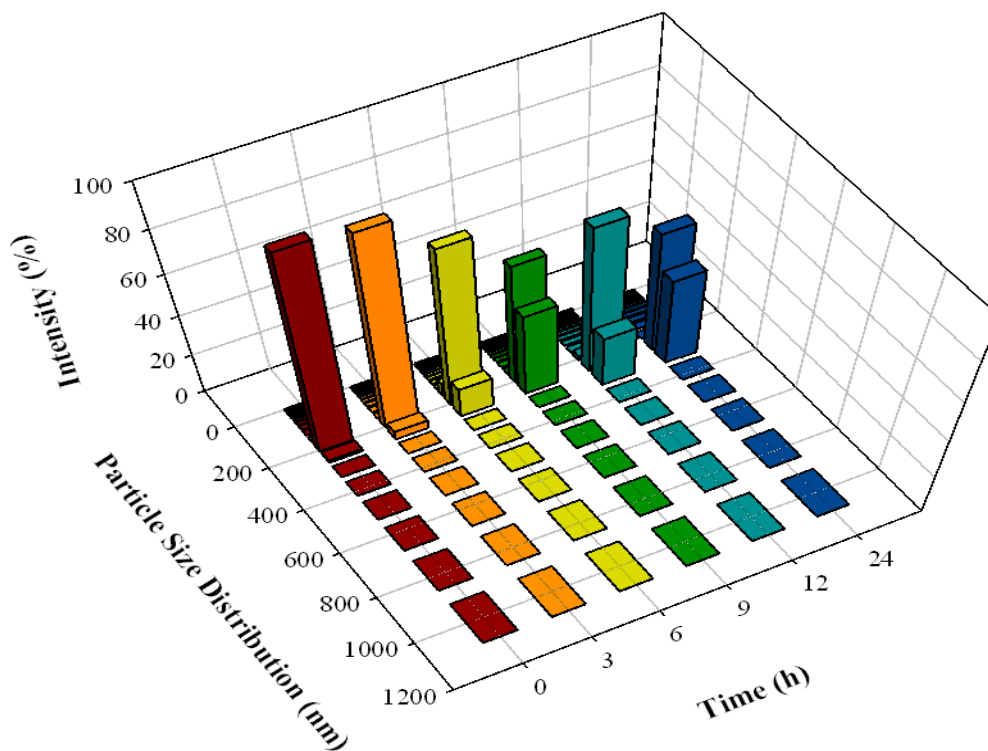
*當 particle 的粒徑超過測量時所設定的粒徑最大值 (1000 nm) 時，則被歸類為 dust。

圖 14、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 0.1) 於無血清培養液中
之粒徑分佈變化

圖中 X 軸代表 liposomes 於培養液中的培養時間

Y 軸代表粒徑的分布範圍

Z 軸為粒徑呈現的百分比



Intensity (%)	Particle size distribution (nm)				Dust *
	1.00 ~ 132.95	132.95 ~ 271.70	271.70 ~ 894.00	>894.00	
0h	0.30 ± 0.26	93.00 ± 10.23	0.00 ± 0.00	6.27 ± 10.85	7.64 ± 5.12
3h	0.13 ± 0.12	93.30 ± 11.35	6.57 ± 11.37	0.00 ± 0.00	3.81 ± 2.79
6h	0.27 ± 0.46	99.70 ± 0.44	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	14.63 ± 18.07
9h	0.33 ± 0.58	99.67 ± 0.58	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	3.96 ± 3.47
12h	0.70 ± 0.89	53.97 ± 20.41	45.30 ± 21.25	0.00 ± 0.00	4.93 ± 4.94
24h	0.40 ± 0.10	33.23 ± 29.81	66.43 ± 29.82	0.00 ± 0.00	2.34 ± 4.04

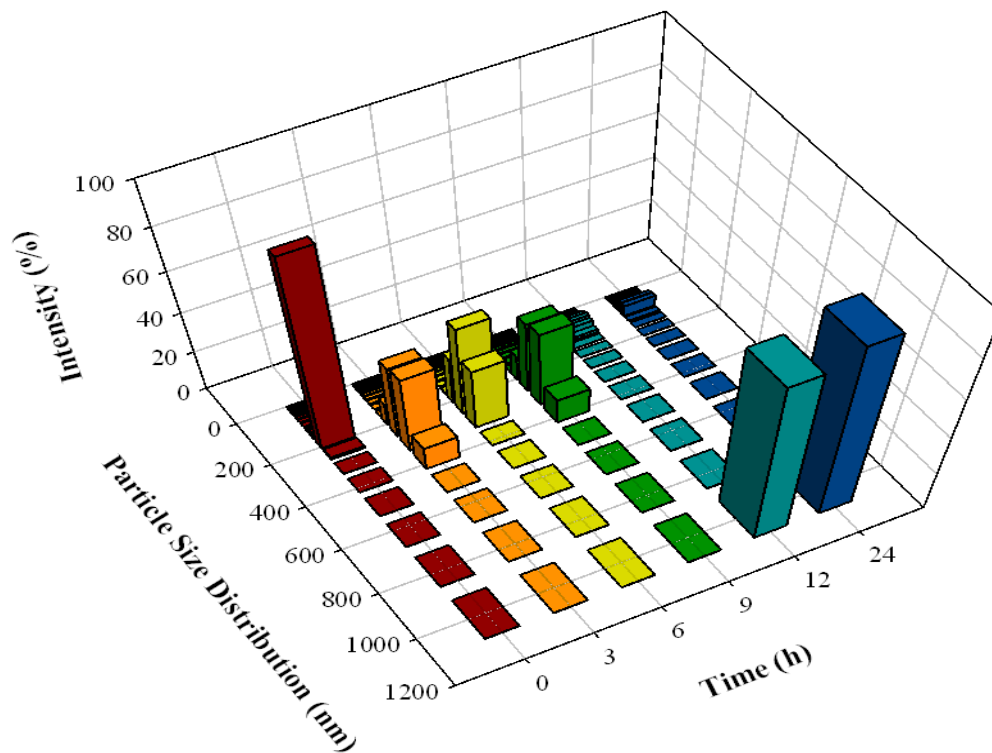
*當 particle 的粒徑超過測量時所設定的粒徑最大值 (1000 nm) 時，則被歸類為 dust。

圖 15、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 0.1) 於添加 LDL 的培養液中之粒徑分佈變化

圖中 X 軸代表 liposomes 於培養液中的培養時間

Y 軸代表粒徑的分布範圍

Z 軸為粒徑呈現的百分比



Intensity (%)	Particle size distribution (nm)				Dust *
	1.00 ~ 132.95	132.95 ~ 271.70	271.70 ~ 894.00	>894.00	
0h	2.27 ± 3.59	87.20 ± 11.51	10.53 ± 9.12	0.00 ± 0.00	5.79 ± 5.16
3h	2.73 ± 3.97	26.40 ± 24.57	70.27 ± 26.14	0.47 ± 0.81	6.11 ± 10.59
6h	0.83 ± 0.61	31.67 ± 32.97	64.03 ± 29.14	3.43 ± 5.95	6.25 ± 8.65
9h	3.43 ± 2.86	34.70 ± 15.55	61.83 ± 16.86	0.00 ± 0.00	14.60 ± 1.15
12h	13.37 ± 4.24	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	86.60 ± 4.29	32.74 ± 20.65
24h	10.60 ± 3.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	89.40 ± 2.93	27.60 ± 9.01

*當 particle 的粒徑超過測量時所設定的粒徑最大值 (1000 nm) 時，則被歸類為 dust。

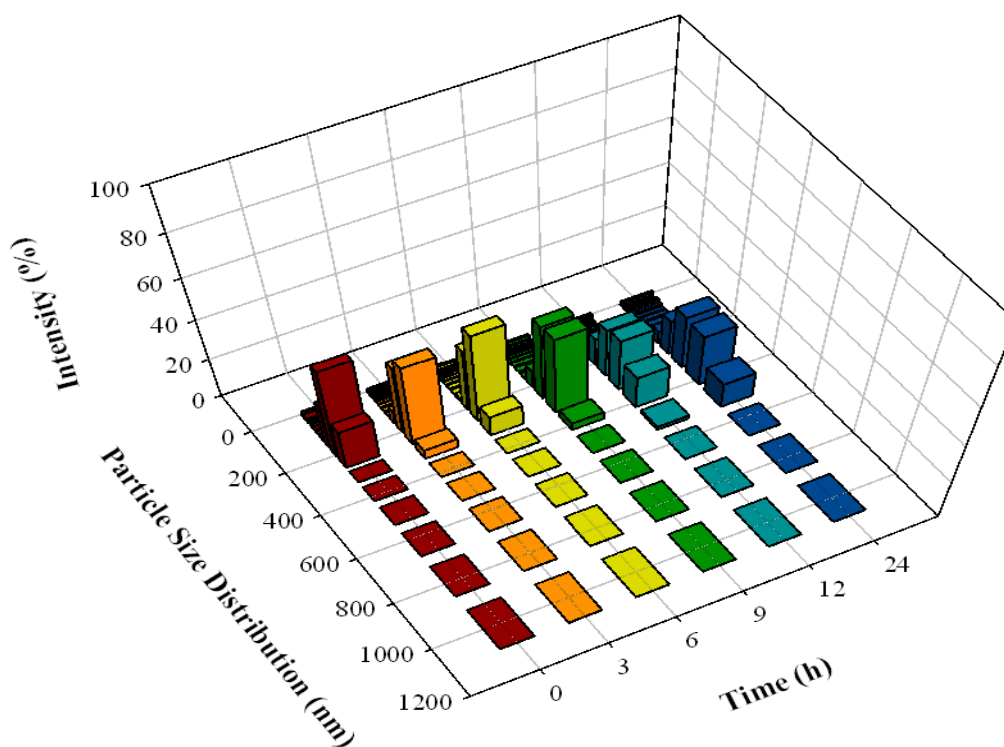
圖 16、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 0.1) 於添加 FBS 的培養

液中之粒徑分佈變化

圖中 X 軸代表 liposomes 於培養液中的培養時間

Y 軸代表粒徑的分布範圍

Z 軸為粒徑呈現的百分比



Intensity (%)	Particle size distribution (nm)				Dust *
	1.00 ~ 132.95	132.95 ~ 271.70	271.70 ~ 894.00	>894.00	
0h	10.63 ± 6.16	61.97 ± 22.57	12.07 ± 20.90	15.43 ± 26.73	2.61 ± 2.41
3h	16.27 ± 5.52	69.00 ± 26.99	14.73 ± 21.66	0.00 ± 0.00	3.40 ± 3.19
6h	10.40 ± 0.92	86.33 ± 6.70	3.33 ± 5.77	0.00 ± 0.00	7.52 ± 4.81
9h	10.27 ± 0.81	5.33 ± 28.91	32.40 ± 28.74	0.00 ± 0.00	2.93 ± 1.64
12h	14.93 ± 1.31	40.50 ± 20.09	44.60 ± 21.57	0.00 ± 0.00	1.67 ± 2.89
24h	12.73 ± 1.15	34.07 ± 18.82	53.13 ± 17.71	0.00 ± 0.00	5.03 ± 5.17

*當 particle 的粒徑超過測量時所設定的粒徑最大值 (1000 nm) 時，則被歸類為 dust。

1-6、Liposomes 之光照穩定度分析

在實驗結果顯示，以 DSPC : cholesterol = 1 : 0.1 配方組成的 Liposomal Hyp 在經過 590~610 nm 的光源照射後會顯著的造成 liposomes 的粒徑增加 ($p < 0.05$)，但與光照能量無直接相關。而在 DSPC : cholesterol = 1 : 1 配方中的 liposomes 經光照後於粒徑上並無明顯變化。顯示在 liposomes 配方中提高 cholesterol 的組成比例至 50% 能有效降低光源對 Liposomal Hyp 造成的粒徑變化，如圖 17。

表 7、光照劑量對 liposomal Hypericin 粒徑的影響

DSPC : cholesterol (molar ratio)	Light Dose (J/cm^2)			
	0	1	5	10
1 : 1	192.83 \pm 6.28	189.07 \pm 4.70	187.93 \pm 3.71	187.70 \pm 4.77
9 : 1	189.10 \pm 2.19	213.97 \pm 6.75	223.00 \pm 16.41	214.07 \pm 5.93

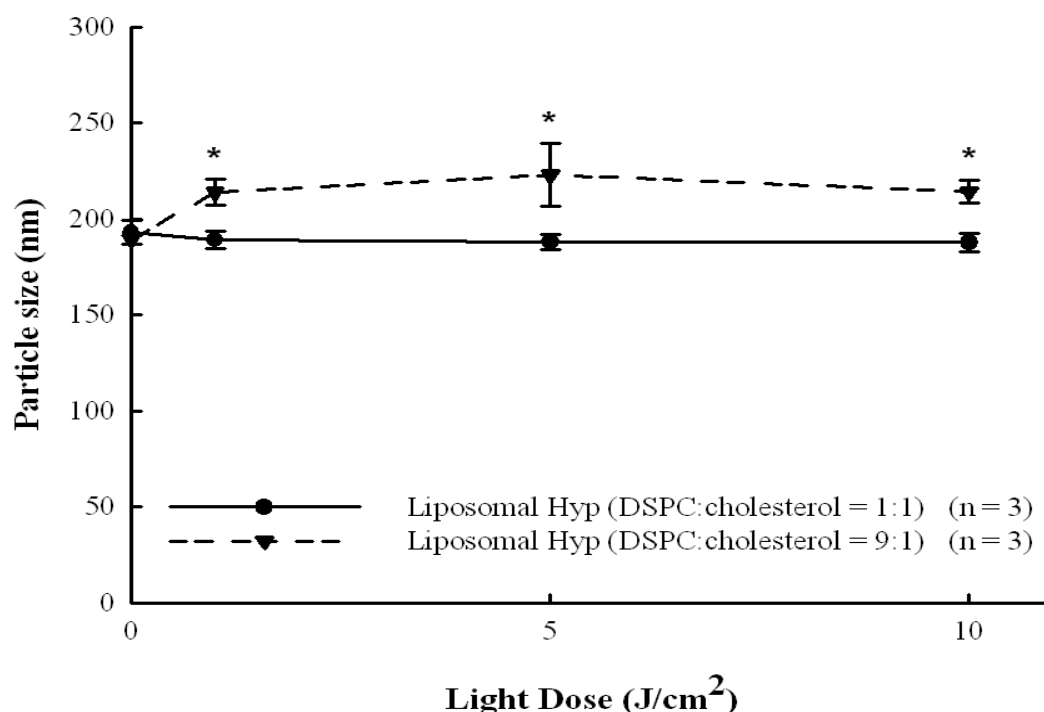


圖 17、光照對 Liposomal Hypericin 粒徑穩定度的影響

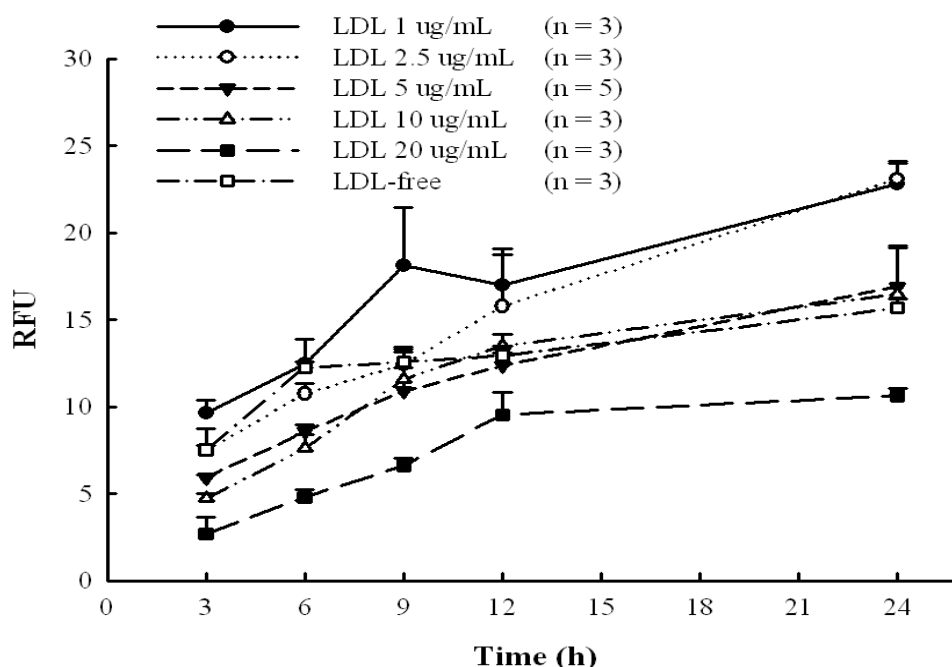
*表示與未照光 (0 J) 的對照組間有顯著差異 ($p < 0.05$)

2、Hypericin 細胞攝取試驗

2-1、LDL 濃度對細胞攝取 hypericin 量之影響

在 LDL 濃度測試方面，各組螢光量皆隨著培養時間增加，顯示 Hyp 與 liposomal Hyp 在無血清培養液中皆能隨時間陸續吸附或吸收於細胞，然而 Hyp 唯有在添加相對低濃度的 LDL (1 & 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 於培養液的情況下，其細胞攝取效果才與無 LDL 組有明顯差異，且隨著 LDL 添加濃度的上升 (5 \rightarrow 10 \rightarrow 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，Hyp 的攝取量卻逐漸下降，且 LDL 濃度越高細胞攝取量上升的趨勢越緩慢，如圖 18 (A)。相較於 Hyp，含有 cholesterol 的 liposomal Hyp 在所有測試的 LDL 濃度下其細胞攝取量皆明顯比無 LDL 時來的高，然而 LDL 濃度的改變對於 liposomal Hyp 的細胞攝取量與上升趨勢的影響並不明顯，如圖 18 (B)。由於 Hyp 在添加低濃度 LDL 的情況下細胞攝取效果最好，在後續細胞攝取與細胞內分佈實驗中的 LDL 濃度皆使用 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 進行測試。

(A)



(B)

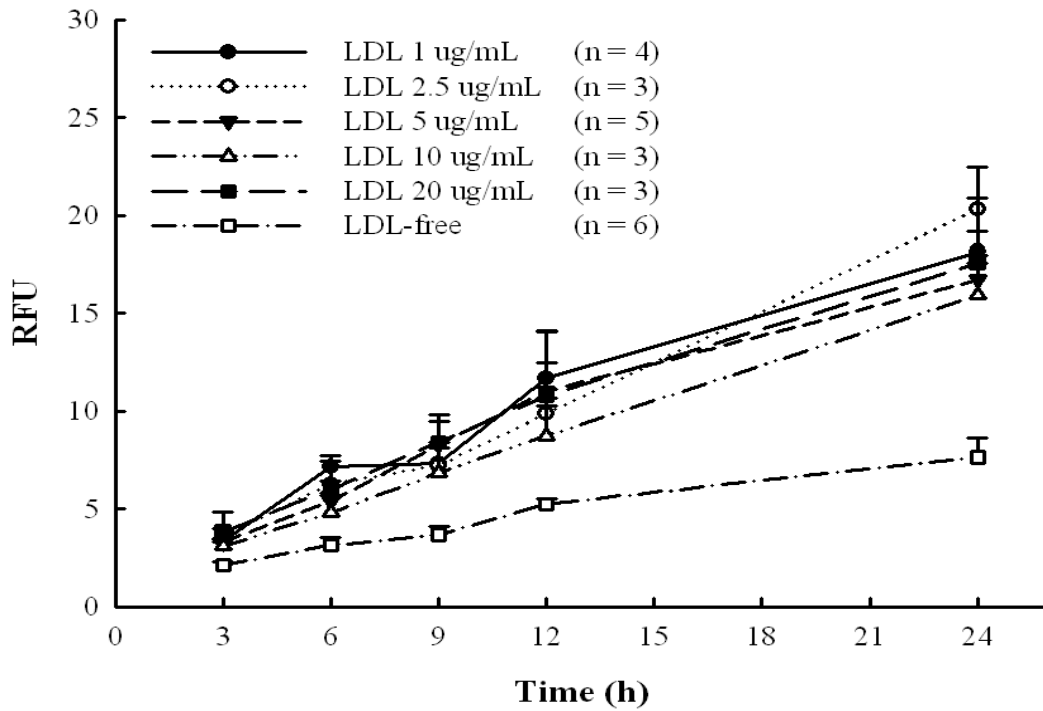


圖 18、Hep3B 細胞之 hypericin 攝取與培養液中 LDL 濃度之關聯

於添加 LDL 濃度 (1、2.5、5、10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的無血清細胞培養液中分別加入 (A) Hyp 與 (B) liposomal Hyp，並與細胞培養 3、6、9、12、24 小時後測量細胞中 Hyp 的相對螢光值 (Relative fluorescence unit, RFU)。

2-2、各類培養液對細胞攝取 Hypericin 量之影響

實驗結果是以流式細胞儀測定而得，以細胞中測得的螢光強度，來代表被細胞所攝取的 Hyp 量值上的表現。測定結果示例如圖 19。

Hyp (0.1 μ M) 在無血清、添加 10% FBS 與 2.5 μ g/mL LDL 的培養液中隨著時間由細胞攝取的情形，發現各組的 Hyp 細胞攝取量皆隨時間上升。相較於在添加 FBS 的培養環境下，Hyp 在無血清及添加 LDL 的培養液中的細胞攝取變化較快速，在細胞攝取 0.5 小時開始即有顯著差異 ($p < 0.01$)。Hyp 在無血清培養液中的細胞攝取變化在培養初期與添加 LDL 培養液的攝取結果並無明顯差異，直到培養時間達到 9 小時後，Hyp 在添加 LDL 的培養環境中的細胞攝取量才開始明顯高於無血清環境 ($p < 0.05$)，如圖 20。

當 Hyp 以 DSPC : cholesterol = 1 : 1 比例製備成 liposomal Hyp 後進行細胞投與，各組 Hyp 細胞攝取量亦皆隨時間上升，但細胞攝取量在培養 24 小時後只有約單純給予 Hyp 的一半。培養液成分 (無血清、添加 LDL 或 FBS) 在 9 小時培養時間以前對 liposomal Hyp 的細胞攝取上並無顯著差異，直到 12 小時後，liposomal Hyp 在添加 LDL 的培養液中的細胞攝取量才明顯較無血清與添加 FBS 兩組為高 ($p < 0.05$)，如圖 21。當降低 liposomal hypericin 組成中 cholesterol 的比例使 DSPC : cholesterol = 9 : 1 後進行細胞投與，其攝取結果在不同培養液環境下同樣無顯著差異，且持續至 24 小時，如圖 22。

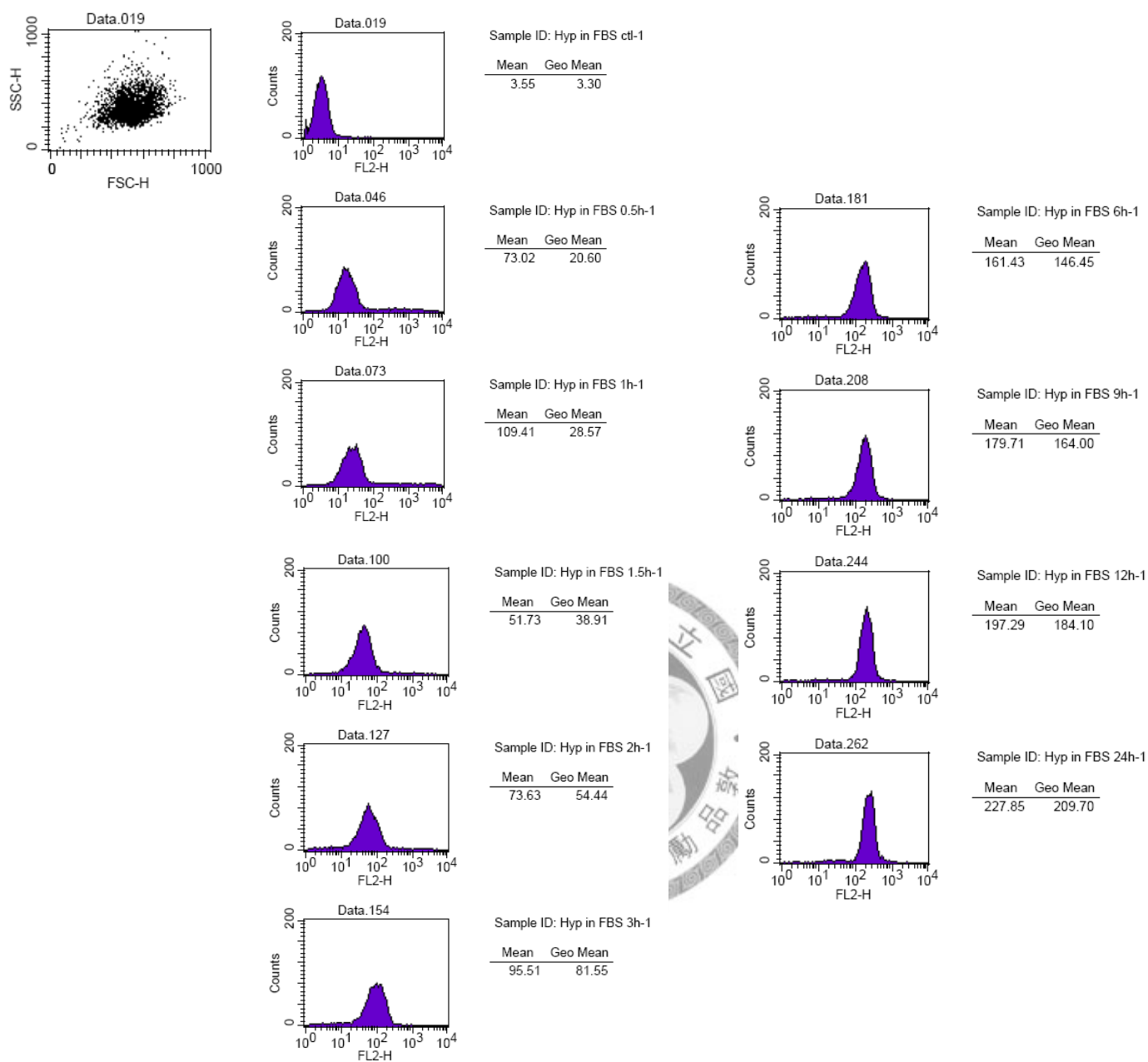


圖 19、細胞攝取實驗之流式細胞儀實驗結果示例圖

範例樣本為 Hyp 0.1 μ M 於 10%FBS 培養液中經細胞攝取 0.5、1、1.5、2、3、6、9、12、24 小時後由流式細胞儀測得之 Hyp 攝取量與時間變化圖。

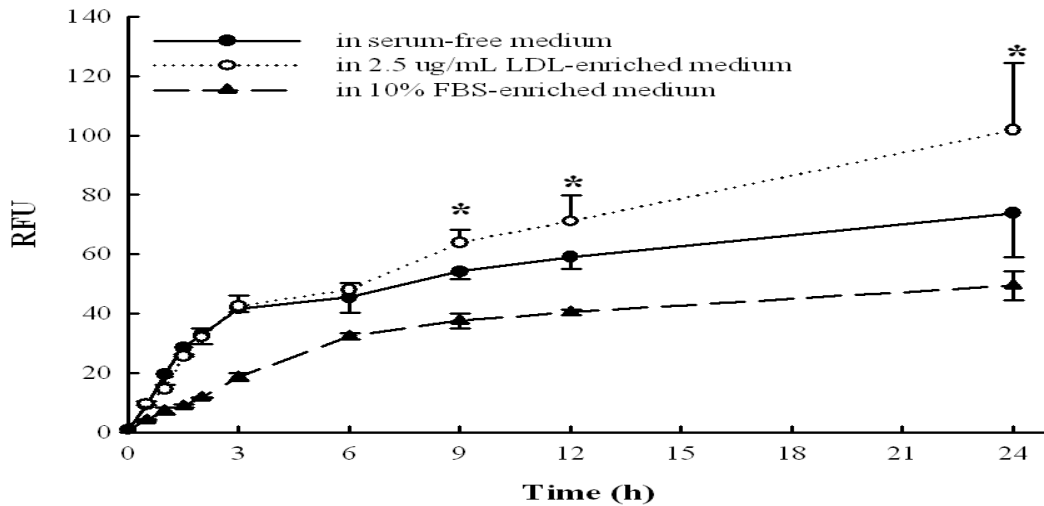


圖 20、Hypericin 在各類培養液中之細胞攝取

取 Hyp 0.1 μM 分別加入無血清培養液、添加 LDL 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 培養液與添加 10% FBS 培養液中，並於培養 0.5、1、1.5、2、3、6、9、12 及 24 小時後測定其相對螢光強度 (RFU)。*和無血清組相比有明顯差異 ($p < 0.05$)。

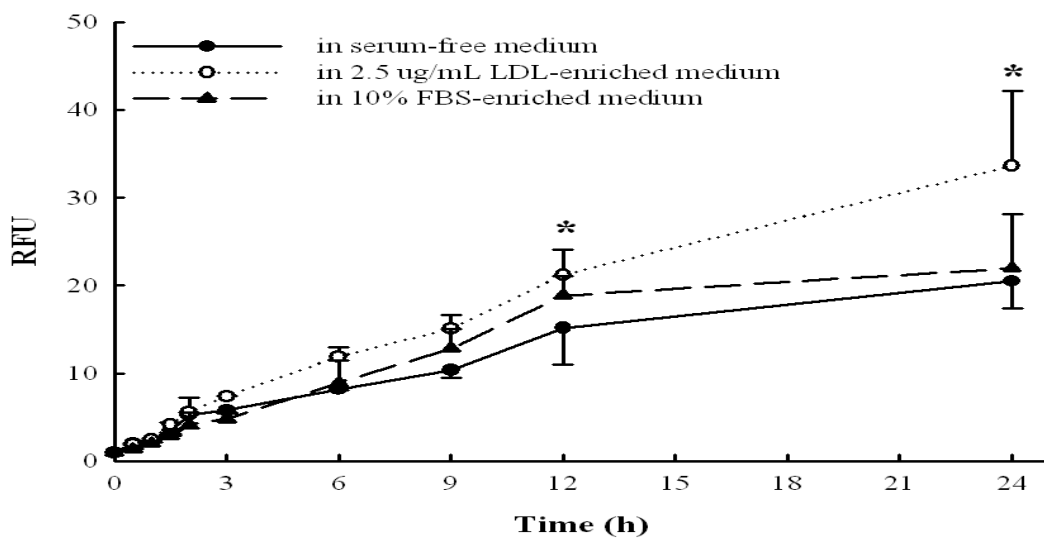


圖 21、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 1) 在各類培養液中之細胞攝取

取 Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 1) 0.1 μM 分別加入無血清培養液、添加 LDL 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 培養液與添加 10% FBS 培養液中，並於培養 0.5、1、1.5、2、3、6、9、12 及 24 小時後測定其相對螢光強度 (RFU)。*和無血清組相比有明顯差異 ($p < 0.05$)。

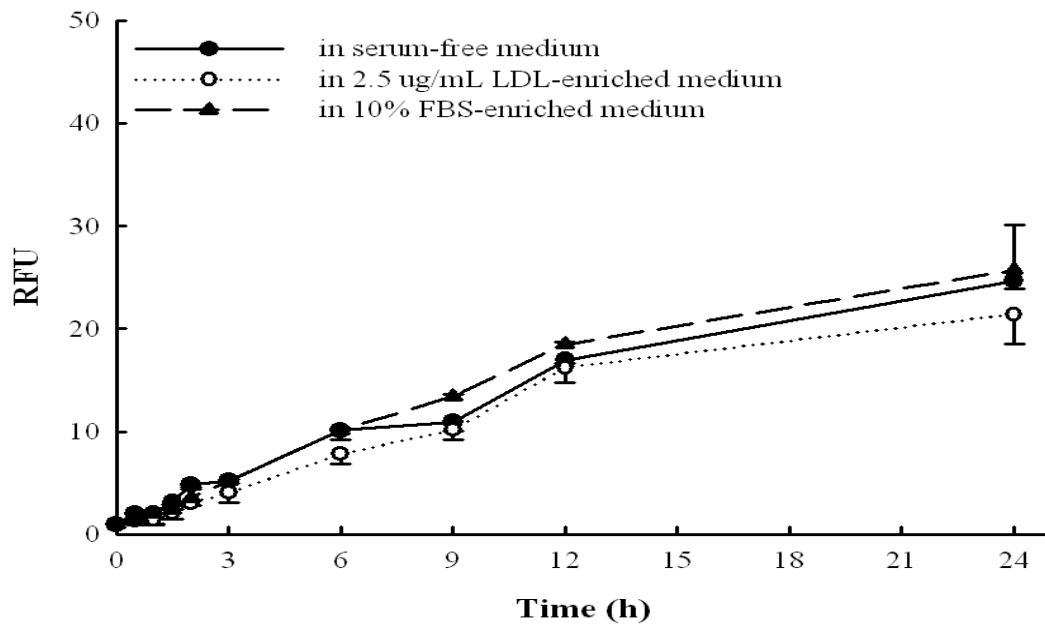


圖 22、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 0.1) 在各類培養液中之細胞攝取

取 Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 0.1) 分別加入無血清培養液、添加 LDL 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 培養液與添加 10% FBS 培養液中，並於培養 0.5、1、1.5、2、3、6、9、12 及 24 小時後測定其相對螢光強度 (RFU)。

3、細胞內分佈探討

3-1、Hypericin 細胞內之分佈

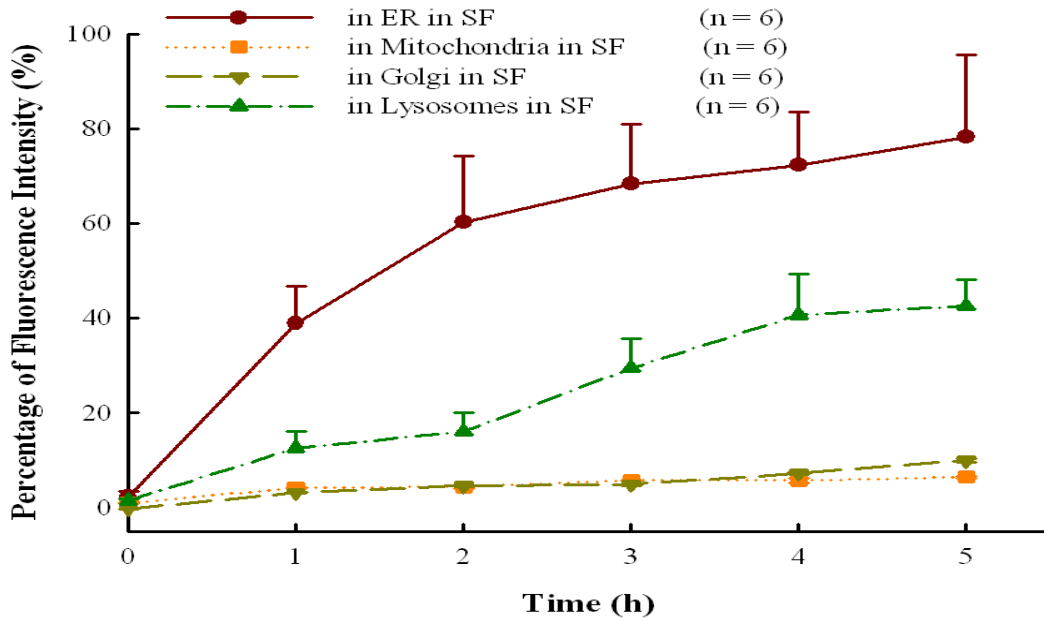
在無血清培養液的環境下，發現給予 Hyp (0.1 μM) 處理後，Hyp 分佈於內質網的量最大且分佈速度最快，其次溶酶體，而 Hyp 在高基氏體及粒線體的分佈則相對緩慢。在分佈速度的變化上，內質網 Hyp 的量於 2~4 小時之間分佈速率逐漸減緩，而溶酶體中的 Hyp 則於 2~4 小時間快速增加，如圖 23&圖 24。

在添加 LDL 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 培養液的環境下，Hyp 進入到高基氏體的量最多且速度最快，並持續到 5 小時，其次依序為內質網、溶酶體及粒線體。相較於無血清培養液，Hyp 於 LDL 存在下高基氏體與粒線體的分佈量明顯增加，反之內質網與溶酶體的 Hyp 分佈量則出現下降的情形，如圖 25&圖 26。

在添加 10% FBS 培養液的環境下，Hyp 進入到內質網的量最多，並持續到 5 小時。而高基氏體、粒線體、溶酶體方面則隨著時間互有增減。在分佈速度的變化上，內質網在觀察時間 2 小時時在分佈速率變化上開始趨緩，如圖 27&圖 28。



(A)



(B)

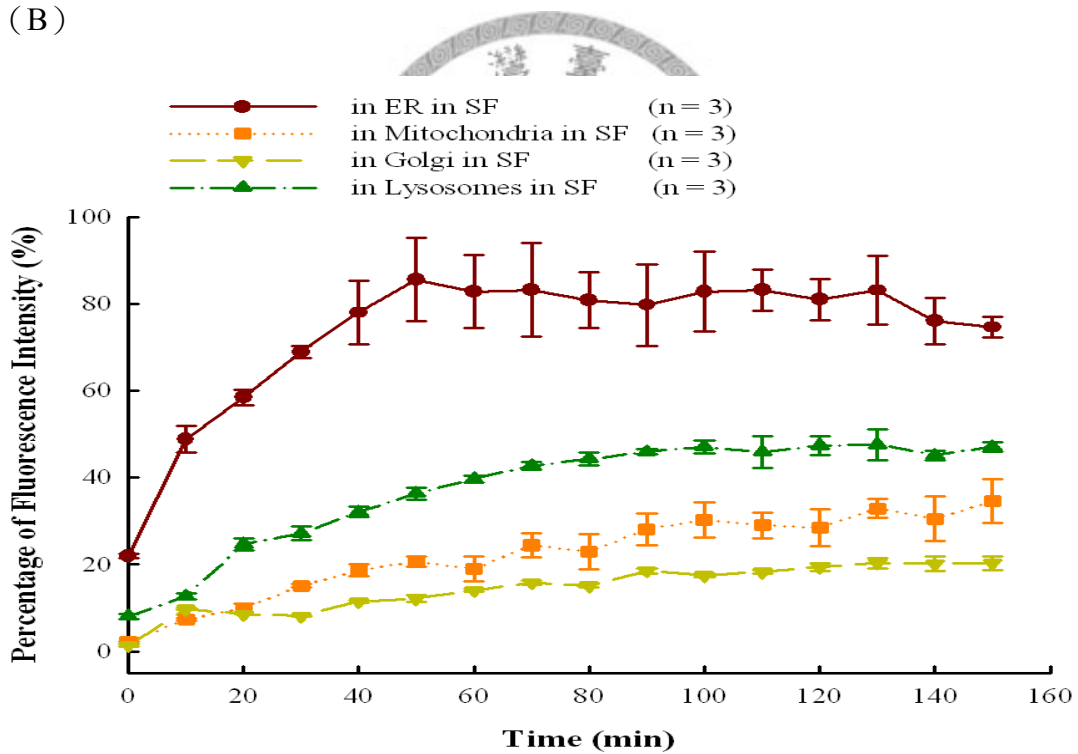


圖 23、Hypericin 於無血清培養液中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化分析

將 Hep3B 細胞胞器個別染色後，於無血清培養液中以螢光顯微鏡定位，在加入 hypericin 0.1 μM 後隨即以 (A) 拍攝頻率 1 小時/次進行 5 小時連續拍攝或 (B) 10 分鐘/次進行 150 分鐘連續拍攝，並記錄 hypericin 於各胞器的分佈螢光強度之變化百分比。

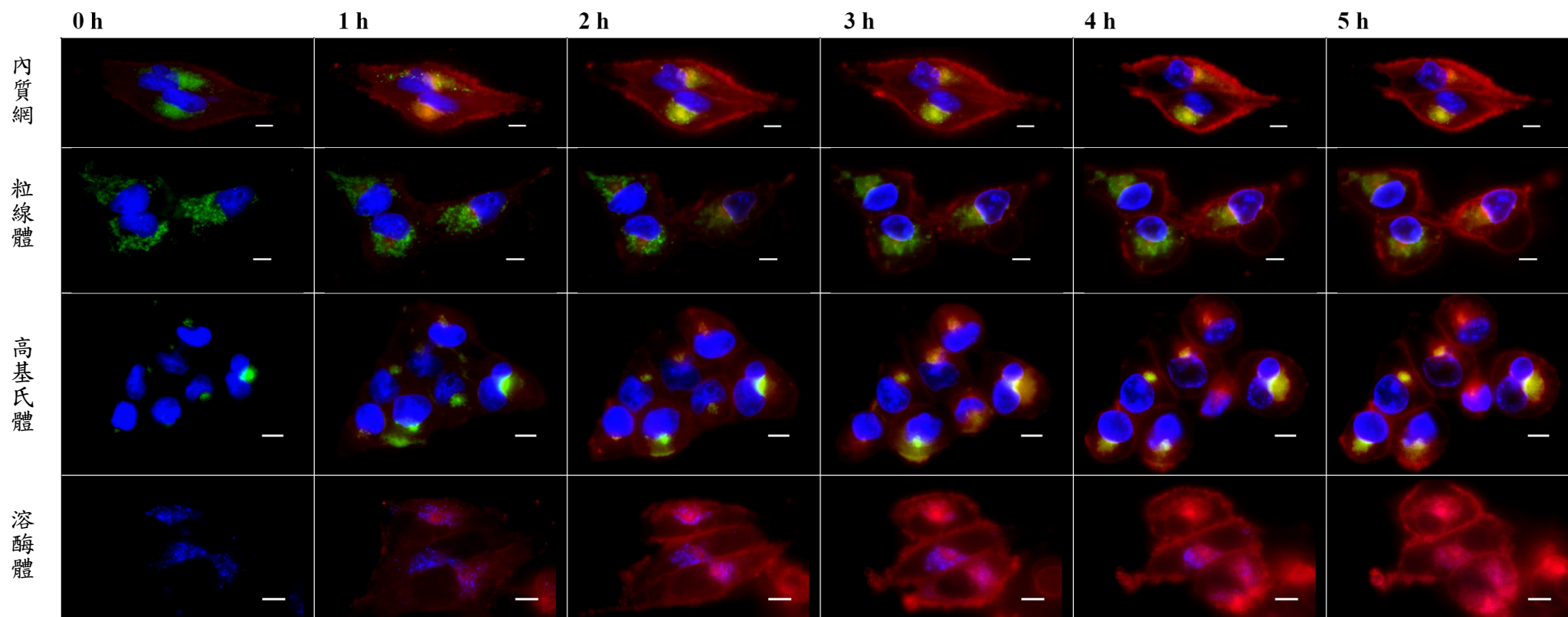


圖 24、Hypericin 於無血清培養液中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化圖

Hep3B 細胞經過胞器染劑分別進行內質網、粒線體、高基氏體與溶酶體染色後，加入無血清培養液並在螢光顯微鏡定位拍攝前，加入 hypericin 0.1 μM 並隨即於 0、1、2、3、4、5 小時時進行拍攝。圖中內質網、粒線體與高基氏體會釋放綠色螢光，溶酶體與細胞核呈現藍色螢光，而 hypericin 則是放出紅色螢光。各圖中的比例尺長度為 10 μm 。

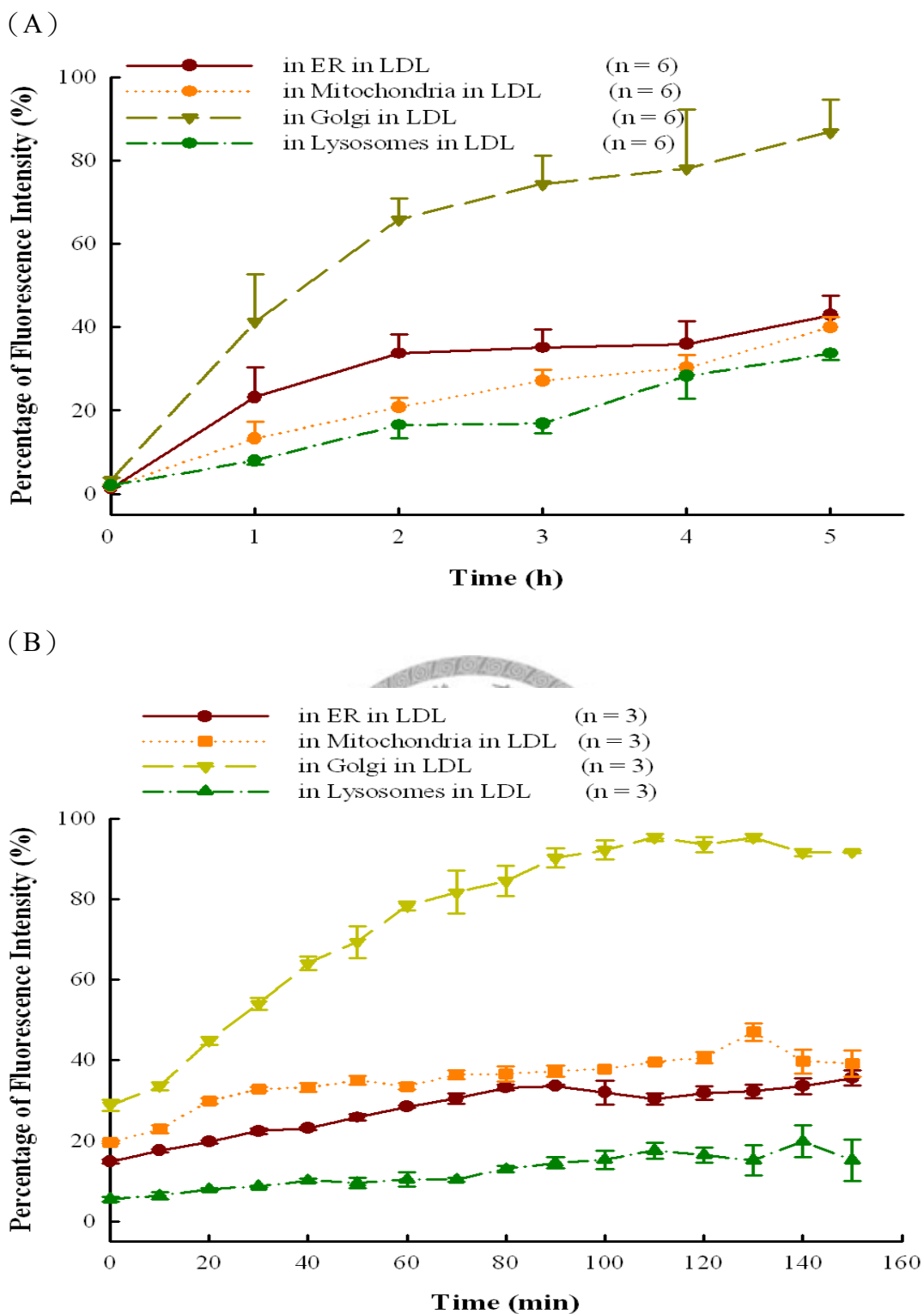


圖 25、Hypericin 於添加 LDL 的培養液中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化分析

將 Hep3B 細胞胞器個別染色後，於添加 LDL 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的培養液中以螢光顯微鏡定位，在加入 hypericin 0.1 μM 後隨即以 (A) 拍攝頻率 1 小時/次進行 5 小時連續拍攝或 (B) 10 分鐘/次進行 150 分鐘連續拍攝，並記錄 hypericin 於各胞器的分佈螢光強度之變化百分比。

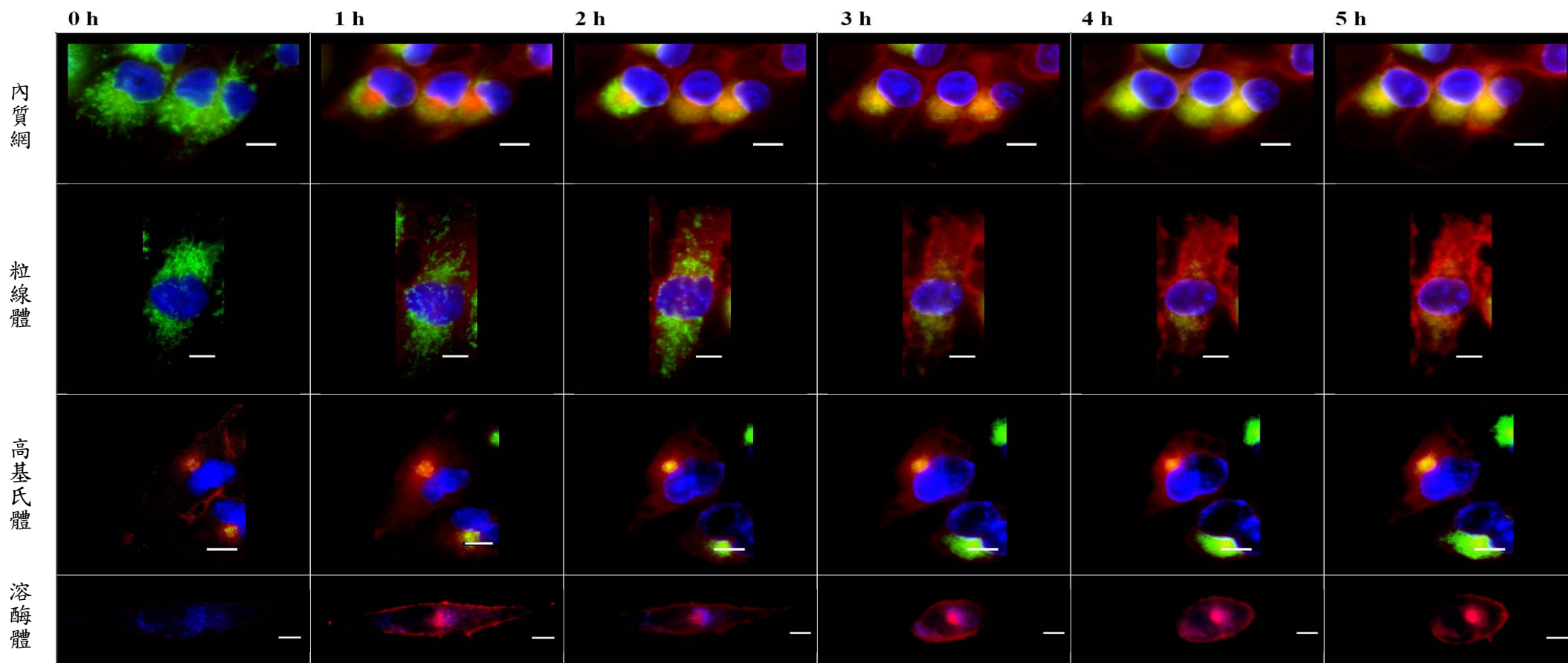
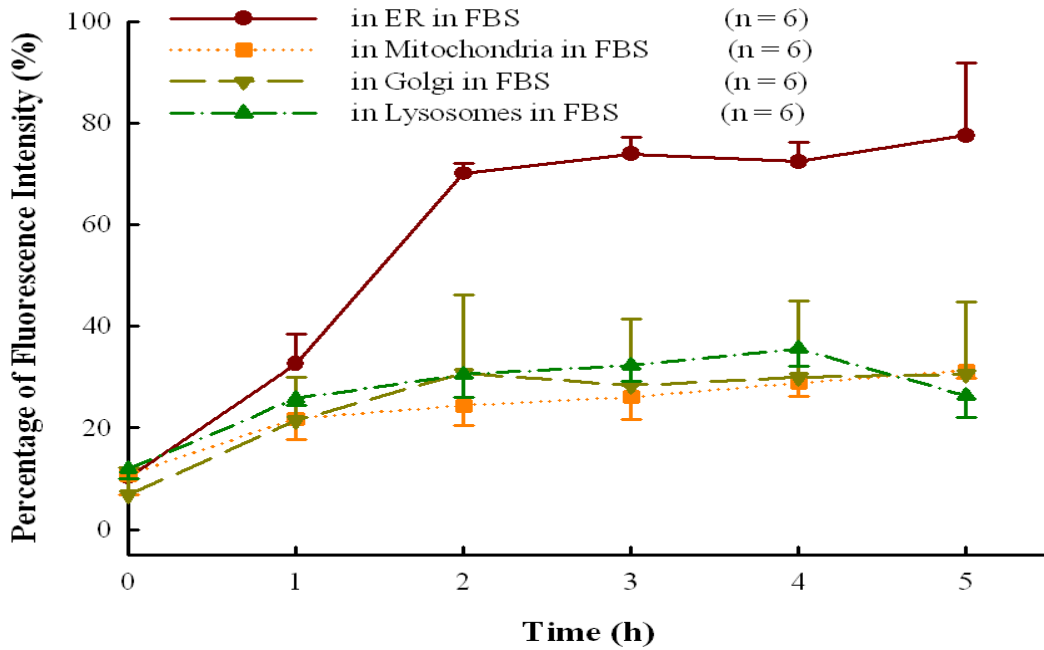


圖 26、Hypericin 於添加 LDL 的培養液中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化圖

Hep3B 細胞經過胞器染劑分別進行內質網、粒線體、高基氏體與溶酶體染色後，加入添加 LDL 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的血清培養液並在螢光顯微鏡定位拍攝前，加入 hypericin 0.1 μM 並隨即於 0、1、2、3、4、5 小時時進行拍攝。圖中內質網、粒線體與高基氏體會釋放綠色螢光，溶酶體與細胞核呈現藍色螢光，而 hypericin 則是放出紅色螢光。各圖中的比例尺長度為 10 μm 。

(A)



(B)

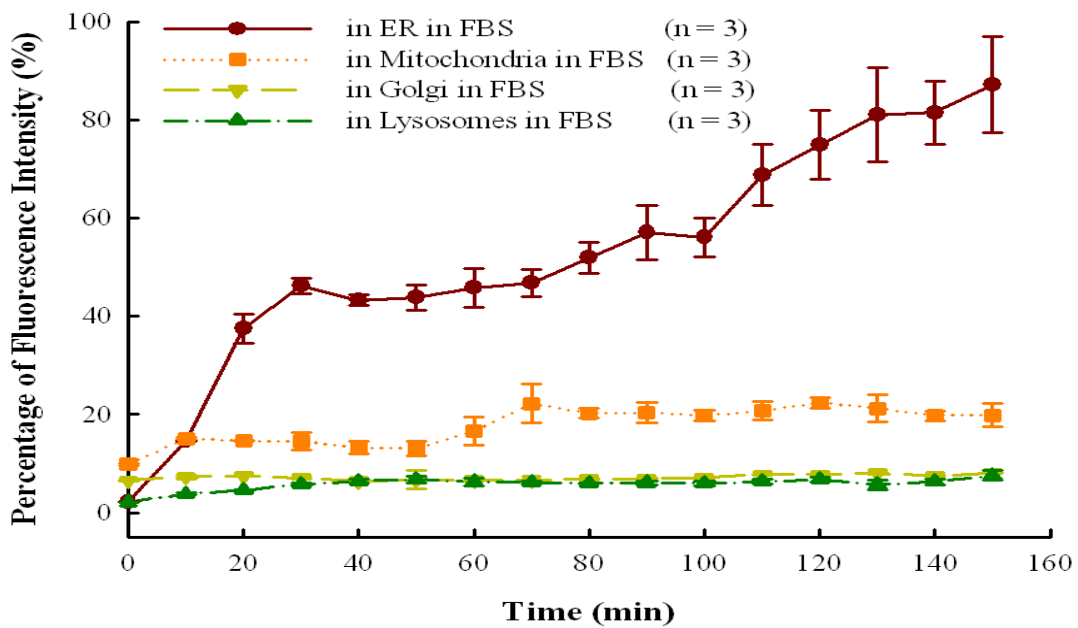


圖 27、Hypericin 於添加 FBS 的培養液中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化分析

將 Hep3B 細胞胞器個別染色後，於添加 10% (v/v) FBS 的培養液中以螢光顯微鏡定位，在加入 hypericin 0.1 μ M 後隨即以 (A) 拍攝頻率 1 小時/次進行 5 小時連續拍攝或 (B) 10 分鐘/次進行 150 分鐘連續拍攝，並記錄 hypericin 於各胞器的分佈螢光強度之變化百分比。

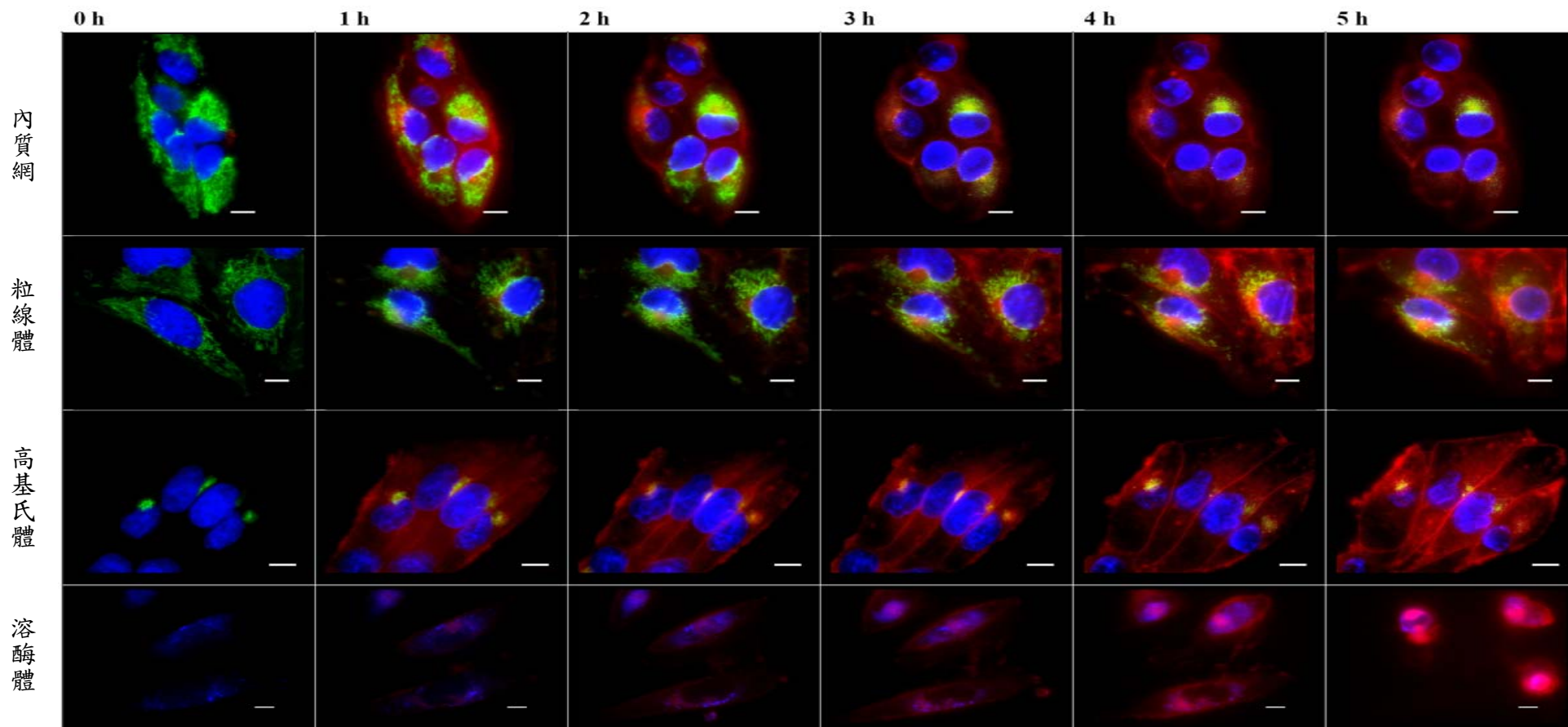


圖 28、Hypericin 於添加 FBS 的培養液中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化圖

Hep3B 細胞經過胞器染劑分別進行內質網、粒線體、高基氏體與溶酶體染色後，加入添加 10% FBS 的血清培養液並在螢光顯微鏡定位拍攝前，加入 hypericin 0.1 μM 並隨即於 0、1、2、3、4、5 小時時進行拍攝。圖中內質網、粒線體與高基氏體會釋放綠色螢光，溶酶體與細胞核呈現藍色螢光，而 hypericin 則是放出紅色螢光。各圖中的比例尺長度為 10 μm 。

3-2、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 1) 細胞內分佈

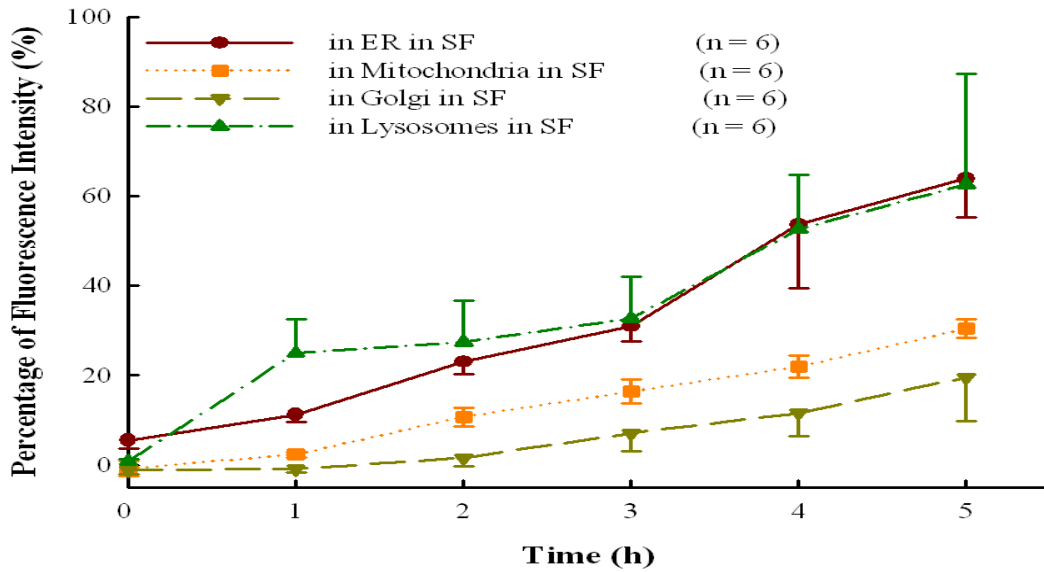
在無血清培養液的環境下，發現在給予 Liposomal Hyp (DSPC : cholesterol = 1:1) 0.1 μ M 處理後，Liposomal Hyp 主要進入溶酶體與內質網，並持續到 5 小時。其次為粒線體及高基氏體。在分佈變化上，Liposomal Hyp 在高基氏體的分佈速率緩慢，而溶酶體、內質網與粒腺體的 Liposomal Hyp 分佈量則以穩定的速率增加。如圖 29&圖 30。

在添加 LDL 2.5 μ g/ml 培養液的環境下，Liposomal Hyp 進入到各胞器的量互有增減。相較於無血清培養液，在 LDL 中內質網與溶酶體的 Liposomal Hyp 分佈量下降，高基氏體於 1 小時至 5 小時的分佈量提高，而粒線體的變化則不明顯。如圖 31&圖 32。

在添加 10% FBS 培養液的環境下，從觀察時間 4 小時開始，Liposomal Hyp 主要進入到內質網、高基氏體與溶酶體，而進入到粒線體的量最低。如圖 33&圖 34。



(A)



(B)

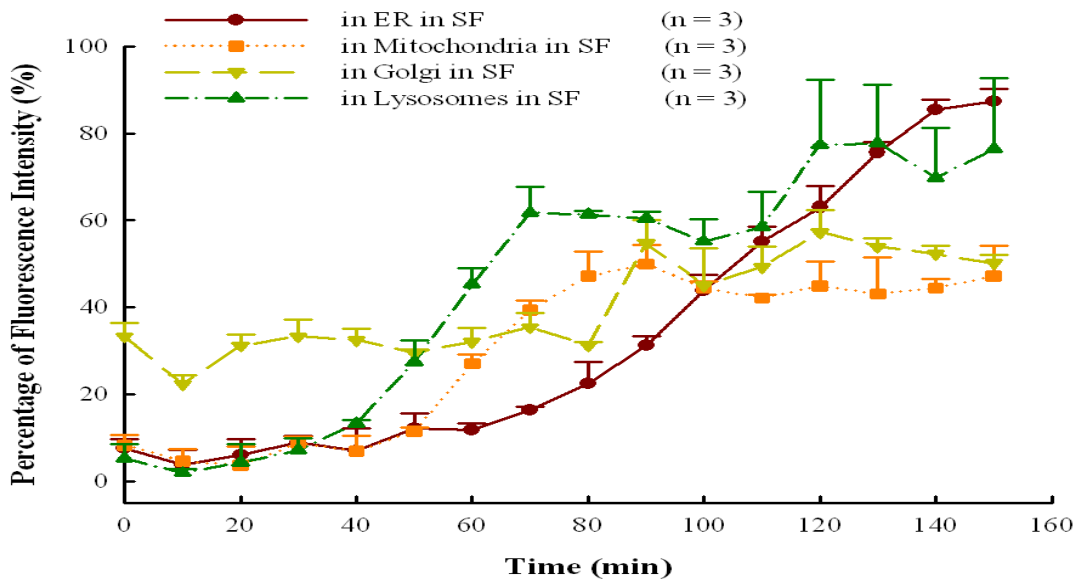


圖 29、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 1) 於無血清培養液中之

Hep3B 細胞胞器的分布變化分析

將 Hep3B 細胞胞器個別染色後，於無血清培養液中以螢光顯微鏡定位，加入 Liposomal Hypericin 0.1 μM 後隨即以 (A) 拍攝頻率 1 小時/次進行 5 小時連續拍攝或 (B) 10 分鐘/次進行 150 分鐘連續拍攝，並記錄 hypericin 於各胞器的分佈螢光強度之變化百分比。

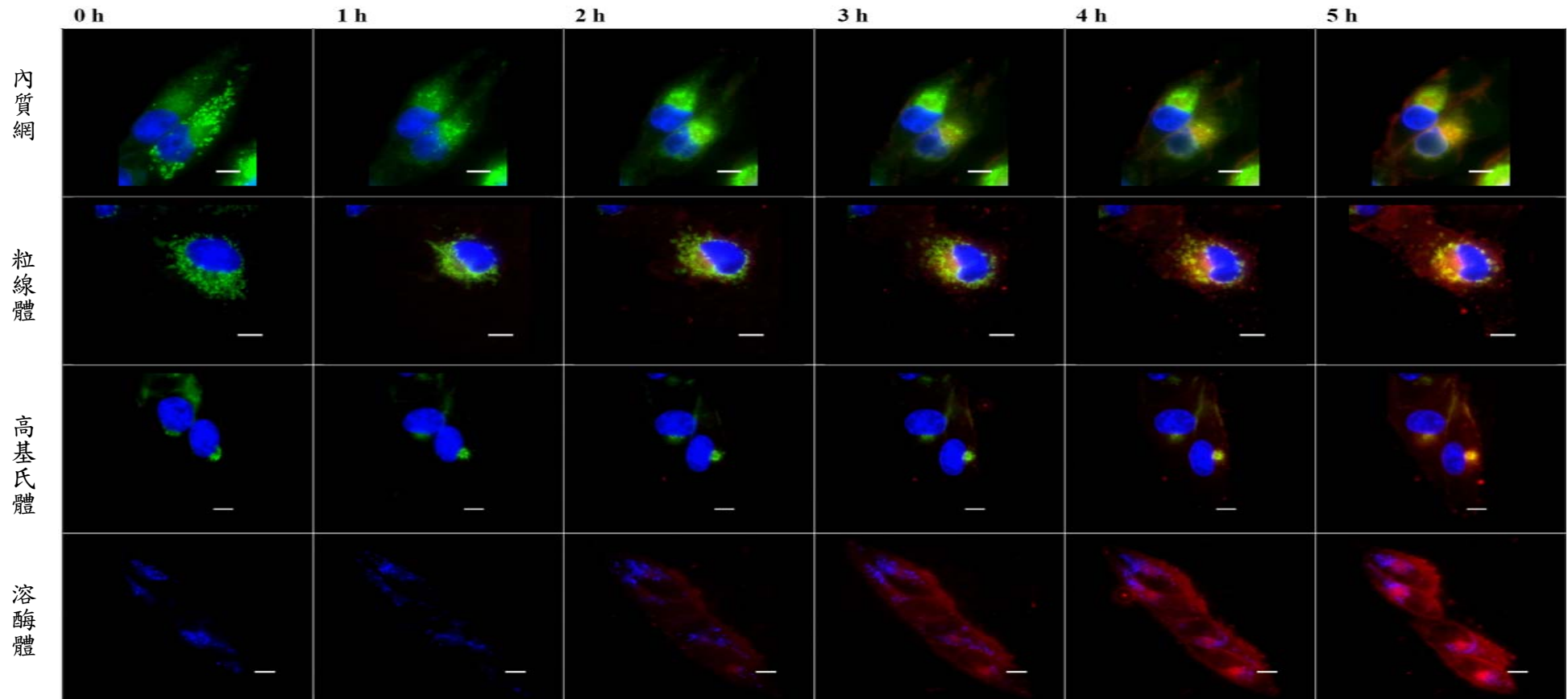
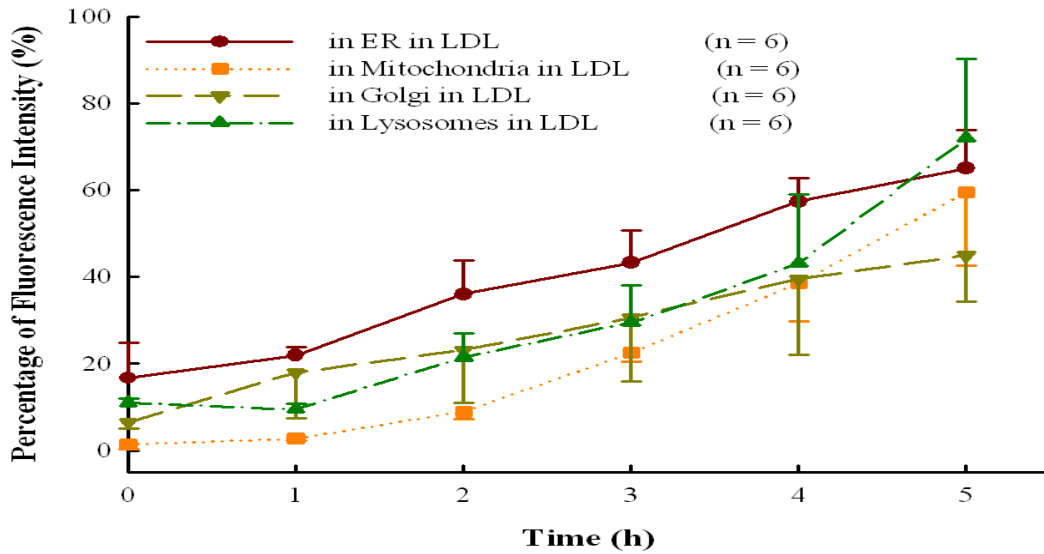


圖 30、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 1) 於無血清培養液中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化圖

Hep3B 細胞經過胞器染劑分別進行內質網、粒線體、高基氏體與溶酶體染色後，加入無血清培養液並在螢光顯微鏡定位拍攝前，加入 DSPC : cholesterol = 1 : 1 的 Liposomal Hypericin 0.1 μ M 並隨即於 0、1、2、3、4、5 小時時進行拍攝。圖中內質網、粒線體與高基氏體會釋放綠色螢光，溶酶體與細胞核呈現藍色螢光，而 hypericin 則是放出紅色螢光。各圖中的比例尺長度為 10 μ m。

(A)



(B)

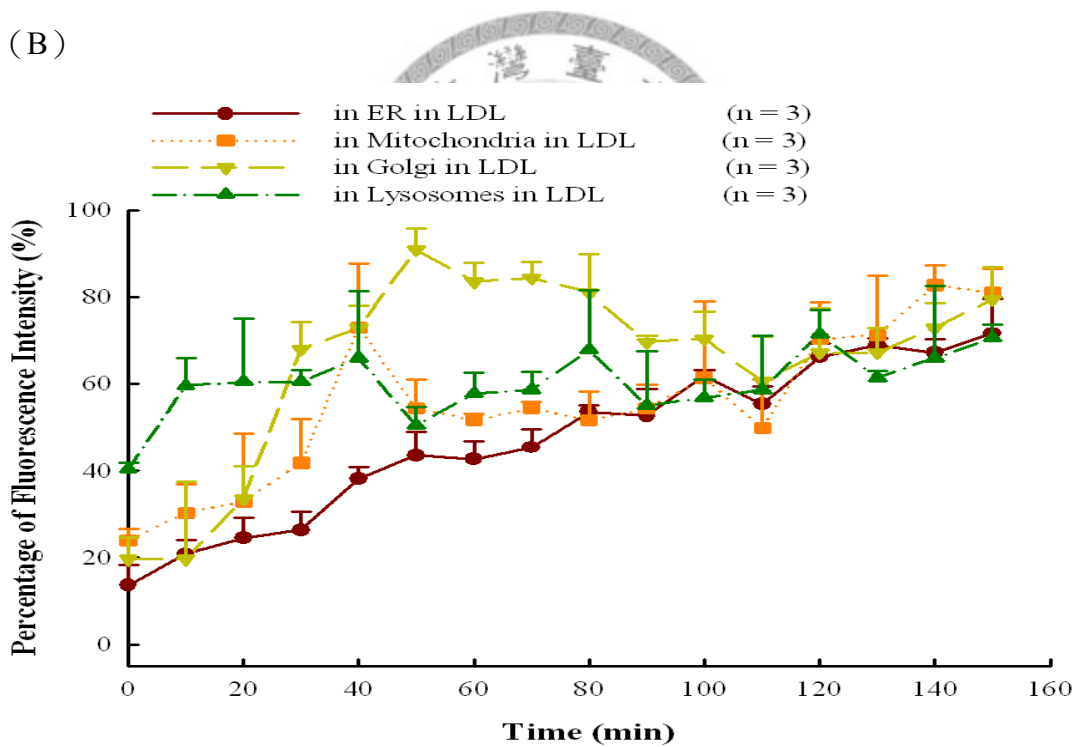


圖 31、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 1) 於添加 LDL 的培養液中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化分析

將 Hep3B 細胞胞器個別染色後，於添加 LDL 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的培養液中以螢光顯微鏡定位，細胞在加入 Liposomal Hypericin 0.1 μM 後隨即以 (A) 拍攝頻率 1 小時/次進行 5 小時連續拍攝或 (B) 10 分鐘/次進行 150 分鐘連續拍攝，並記錄 hypericin 於各胞器的分佈螢光強度之變化百分比。

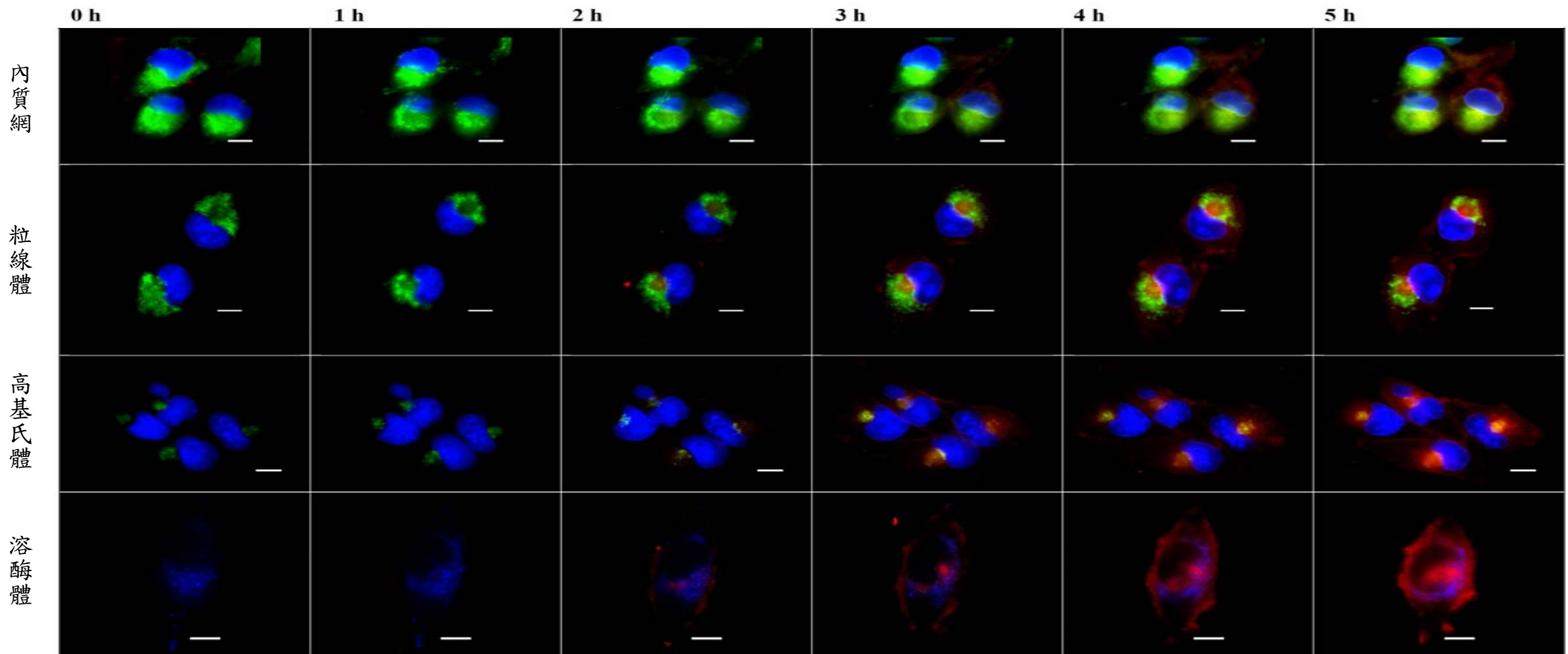
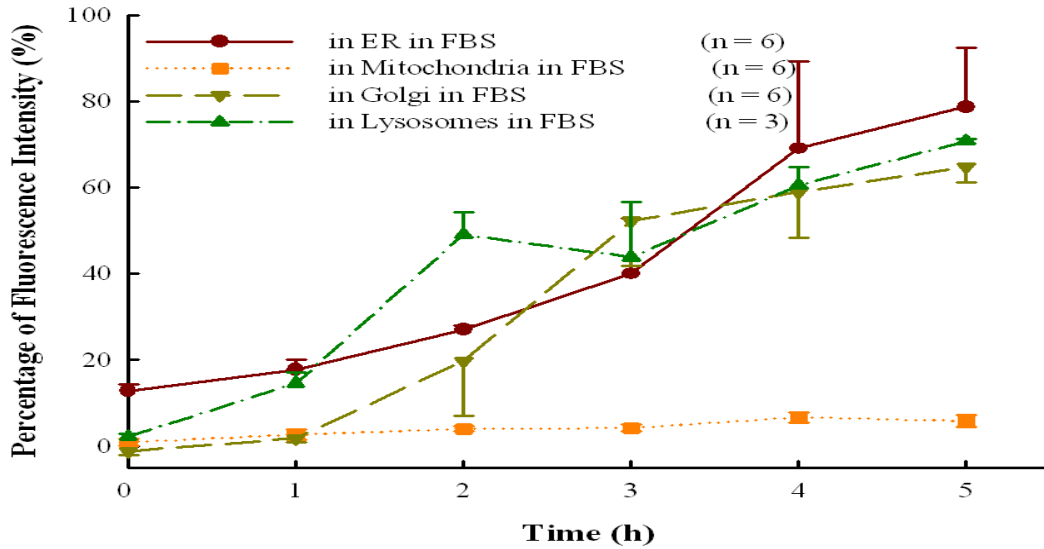


圖 32、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 1) 於添加 LDL 的培養液中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化圖

Hep3B 細胞經過胞器染劑分別進行內質網、粒線體、高基氏體與溶酶體染色後，加入添加 LDL 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的培養液並在螢光顯微鏡定位拍攝前，加入 DSPC : cholesterol = 1 : 1 的 Liposomal Hypericin 0.1 μM 並隨即於 0、1、2、3、4、5 小時時進行拍攝。圖中內質網、粒線體與高基氏體會釋放綠色螢光，溶酶體與細胞核呈現藍色螢光，而 hypericin 則是放出紅色螢光。各圖中的比例尺長度為 10 μm 。

(A)



(B)

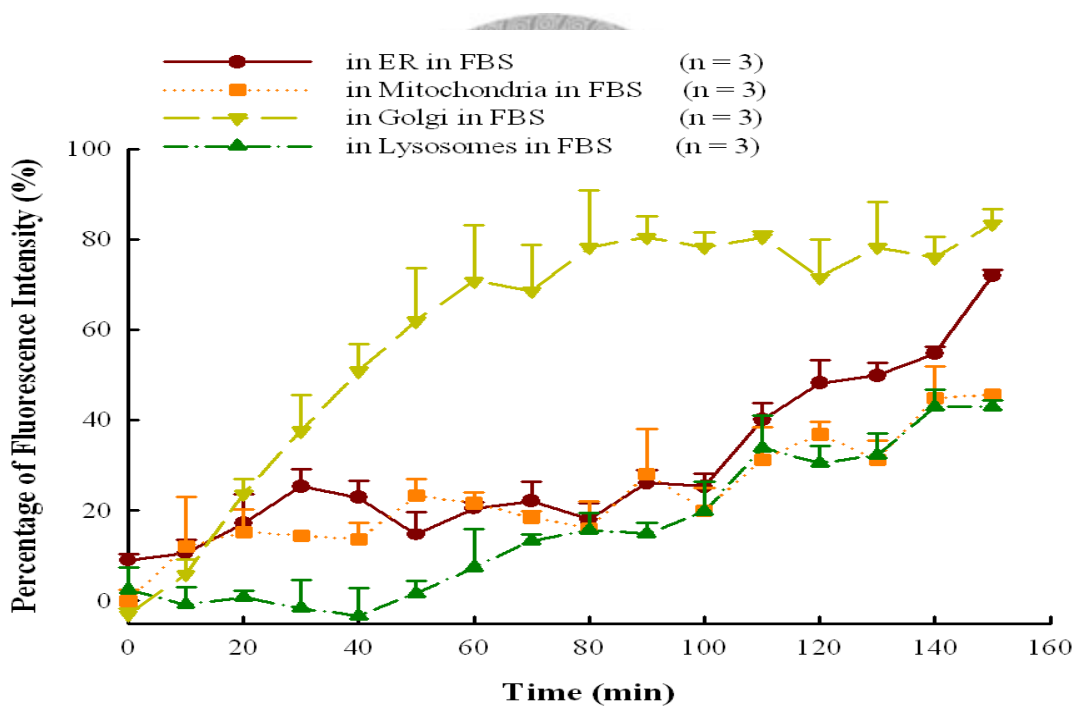


圖 33、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 1) 於添加 FBS 的培養液

中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化分析

將 Hep3B 細胞胞器個別染色後，於添加 10% (v/v) FBS 的培養液中以螢光顯微鏡定位拍攝，在加入 Liposomal Hypericin 0.1 μ M 後隨即以 (A) 拍攝頻率 1 小時/次進行 5 小時連續拍攝或 (B) 10 分鐘/次進行 150 分鐘連續拍攝，並記錄 hypericin 於各胞器的分佈螢光強度之變化百分比。

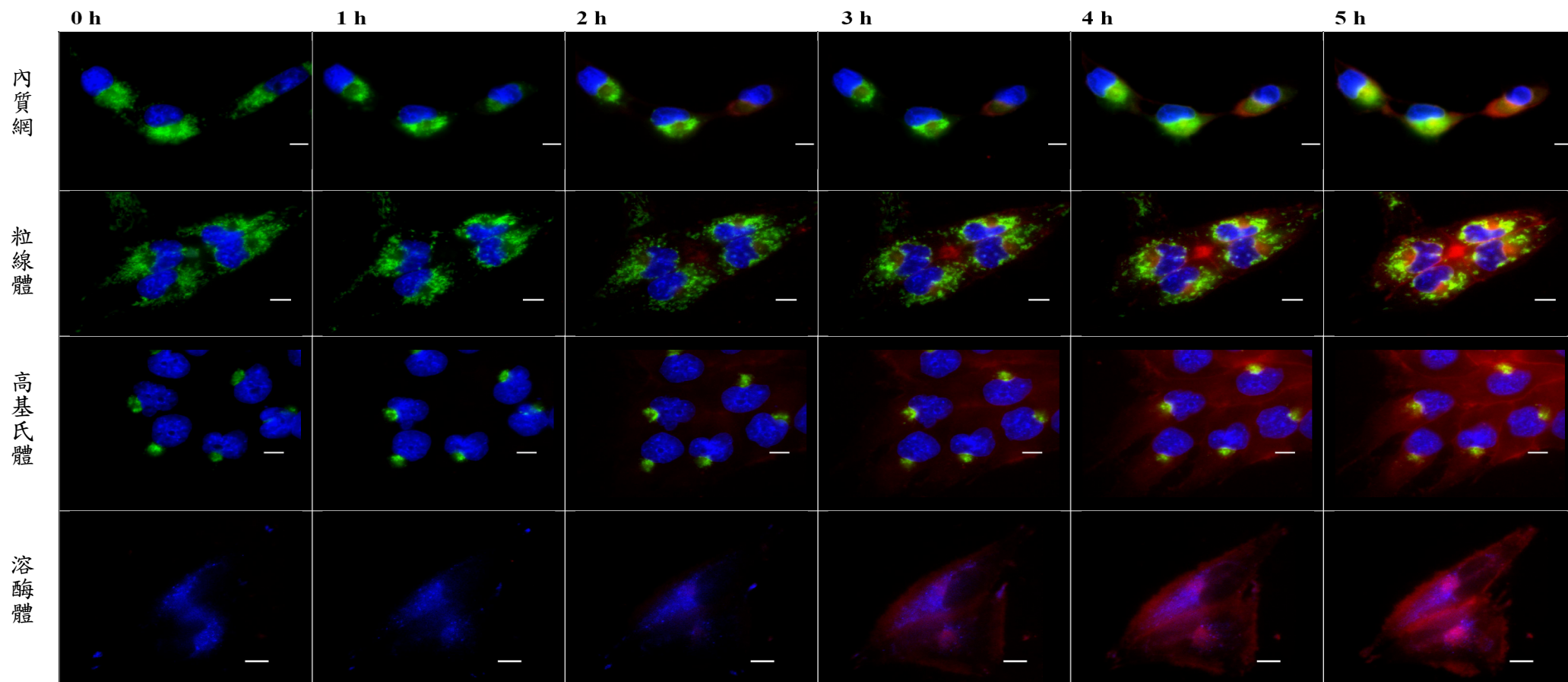
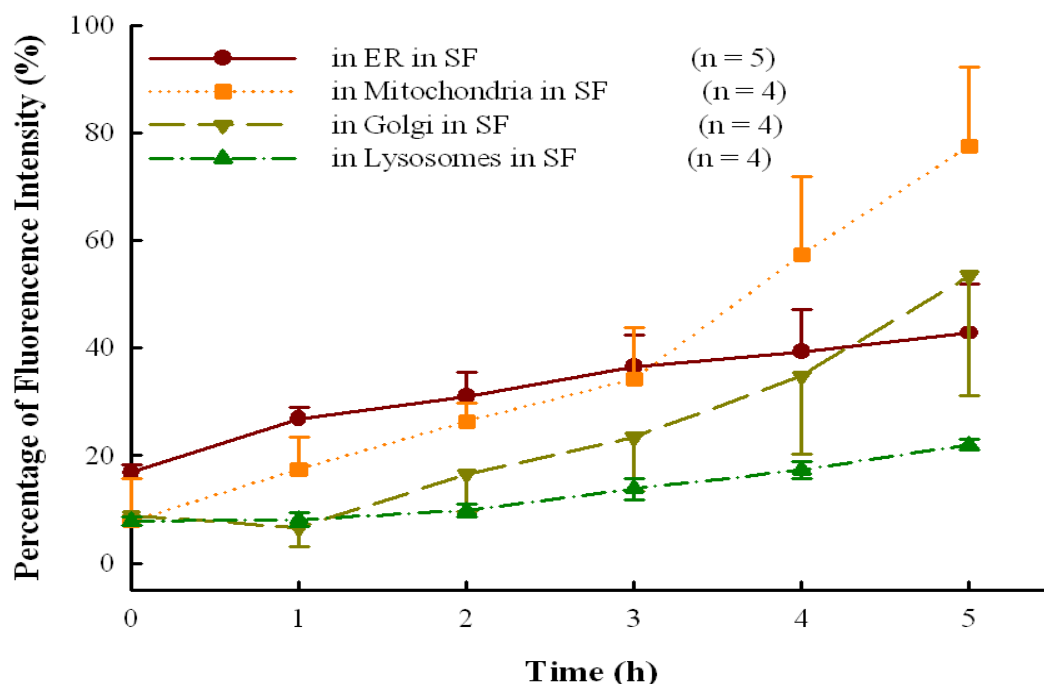


圖 34、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 1) 於添加 FBS 培養液中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化圖

Hep3B 細胞經過胞器染劑分別進行內質網、粒線體、高基氏體與溶酶體染色後，加入添加 10% FBS 的培養液並在螢光顯微鏡定位拍攝前，加入 DSPC : cholesterol = 1 : 1 的 Liposomal Hypericin 0.1 μ M 並隨即於 0、1、2、3、4、5 小時時進行拍攝。圖中內質網、粒線體與高基氏體會釋放綠色螢光，溶酶體與細胞核呈現藍色螢光，而 hypericin 則是放出紅色螢光。各圖中的比例尺長度為 10 μ m。

3-3、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol =1 : 0.1) 細胞內分佈

在無血清培養液的環境下，發現在給予 Liposomal Hyp (DSPC : cholesterol = 1:0.1) 0.1 μ M 處理後，Liposomal Hyp 於粒線體、內質網及高基氏體中分佈較多，而在溶酶體中最少。類似的分佈情形也發生在添加 LDL 的培養環境中，如圖 35~圖 38。



在添加 FBS 培養液的環境下，Liposomal Hyp 集中分佈至溶酶體、粒線體以及內質網，而在高基氏體的分佈量最低。如圖 37&圖 38。

圖 35、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 0.1) 於無血清培養液中 之 Hep3B 細胞內胞器分佈變化分析

將 Hep3B 細胞的內質網、粒線體、高基氏體與溶酶體個別染色後，於無血清培養液中以螢光顯微鏡定位拍攝，細胞在加入 Liposomal Hypericin 0.1 μ M 後隨即於 0、1、2、3、4、5 小時定時進行拍攝，並記錄 hypericin 於各胞器的分佈螢光強度之變化百分比。

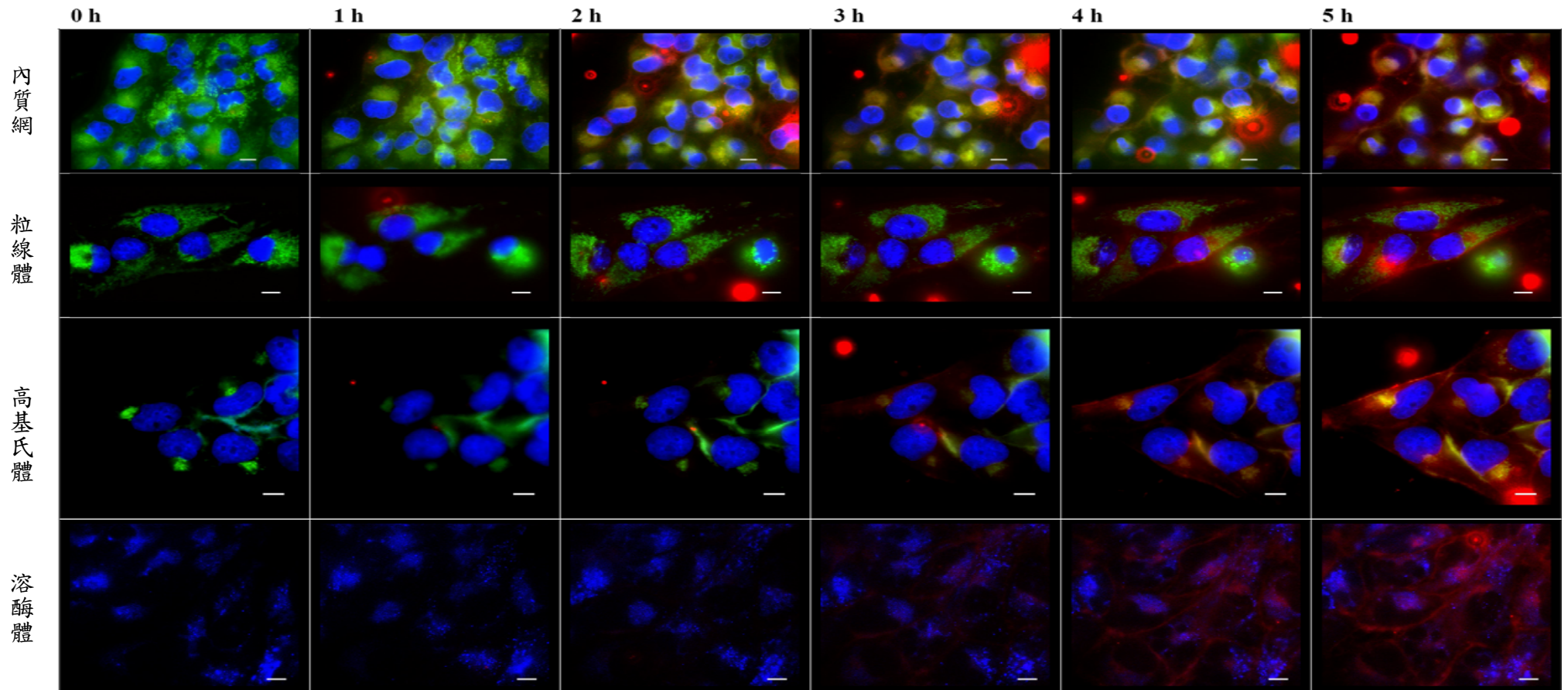


圖 36、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 0.1) 於無血清培養液中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化圖

Hep3B 細胞經過胞器染劑分別進行內質網、粒線體、高基氏體與溶酶體染色後，加入無血清培養液並在螢光顯微鏡定位拍攝前，加入 DSPC : cholesterol = 9 : 1 的 Liposomal Hypericin 0.1 μ M 並隨即於 0、1、2、3、4、5 小時時進行拍攝。圖中內質網、粒線體與高基氏體會釋放綠色螢光，溶酶體與細胞核呈現藍色螢光，而 hypericin 則是放出紅色螢光。各圖中的比例尺長度為 10 μ m。

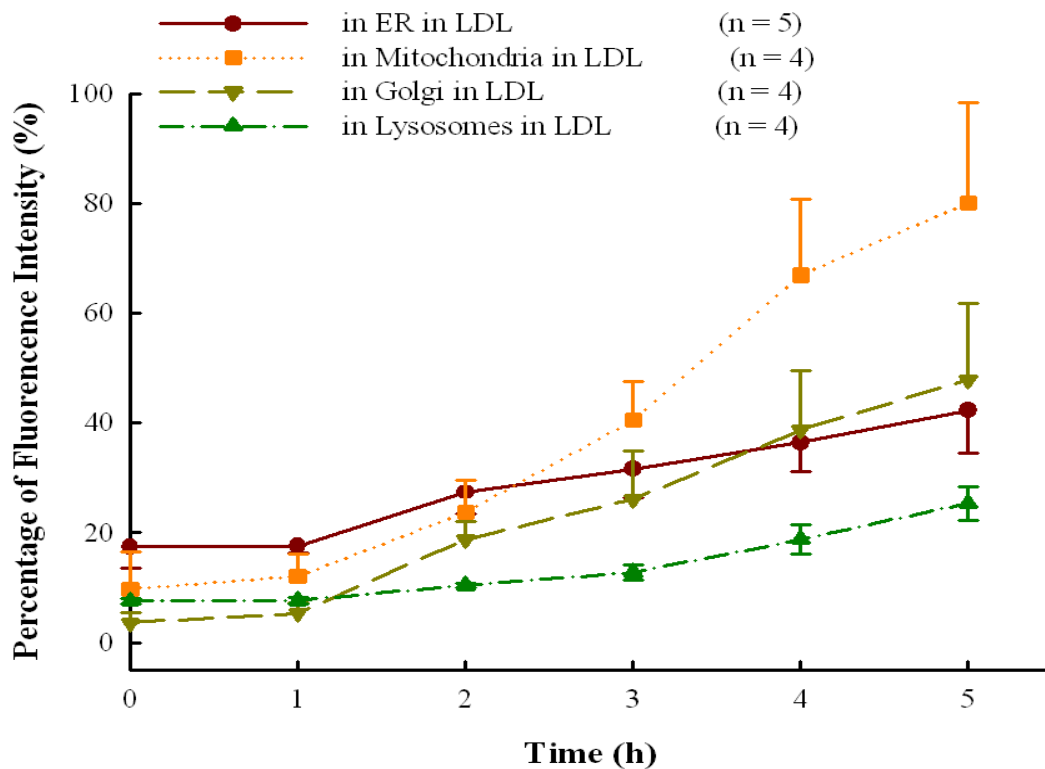


圖 37、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 0.1) 於添加 LDL 的培養液中之 Hep3B 細胞胞器的分布變化分析

將 Hep3B 細胞的內質網、粒線體、高基氏體與溶酶體個別染色後，於添加 LDL 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的培養液中以螢光顯微鏡定位拍攝，細胞在加入 Liposomal Hypericin 0.1 μM 後隨即於 0、1、2、3、4、5 小時定時進行拍攝，並記錄 hypericin 於各胞器的分佈螢光強度之變化百分比。

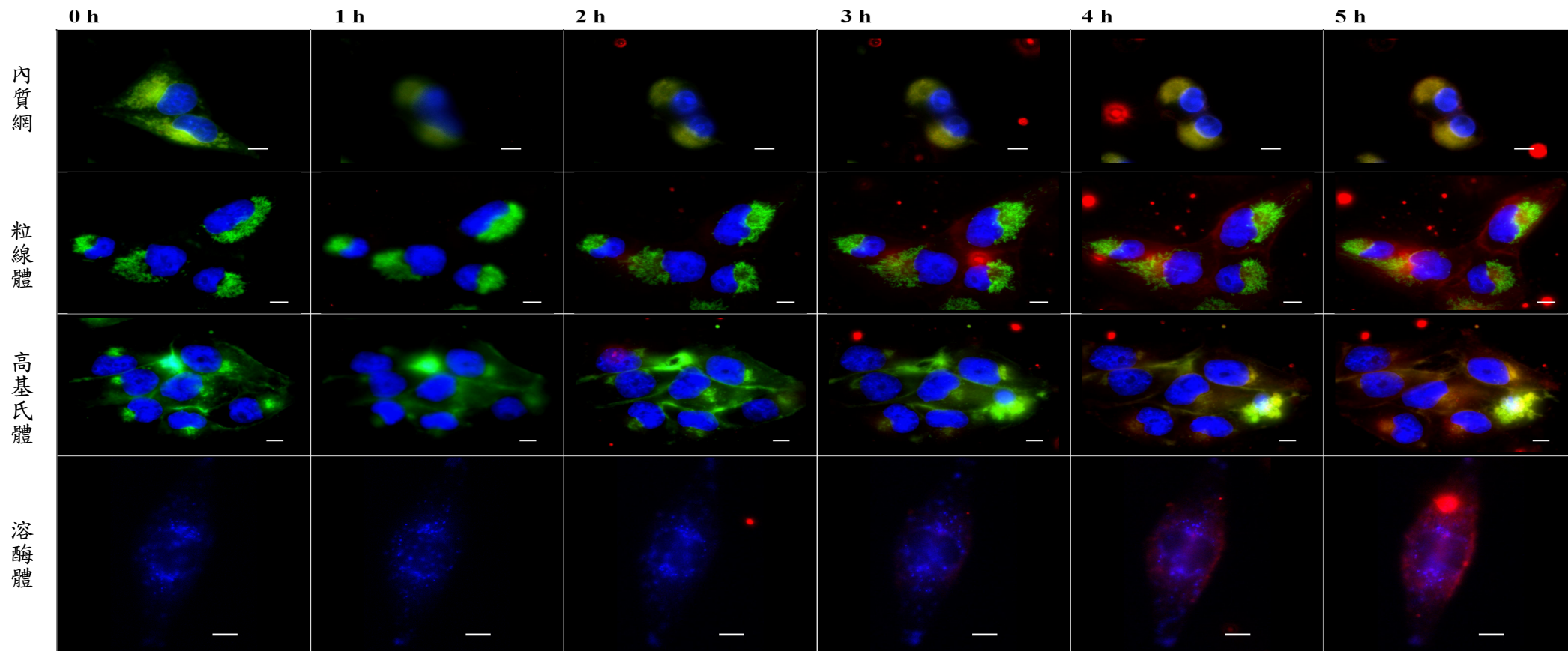


圖 38、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 0.1) 於添加 LDL 的培養液中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化圖

Hep3B 細胞經過胞器染劑分別進行內質網、粒線體、高基氏體與溶酶體染色後，加入添加 LDL 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的培養液並在螢光顯微鏡定位拍攝前，加入 DSPC : cholesterol = 9 : 1 的 Liposomal Hypericin 0.1 μM 並隨即於 0、1、2、3、4、5 小時時進行拍攝。圖中內質網、粒線體與高基氏體會釋放綠色螢光，溶酶體與細胞核呈現藍色螢光，而 hypericin 則是放出紅色螢光。各圖中的比例尺長度為 10 μm 。

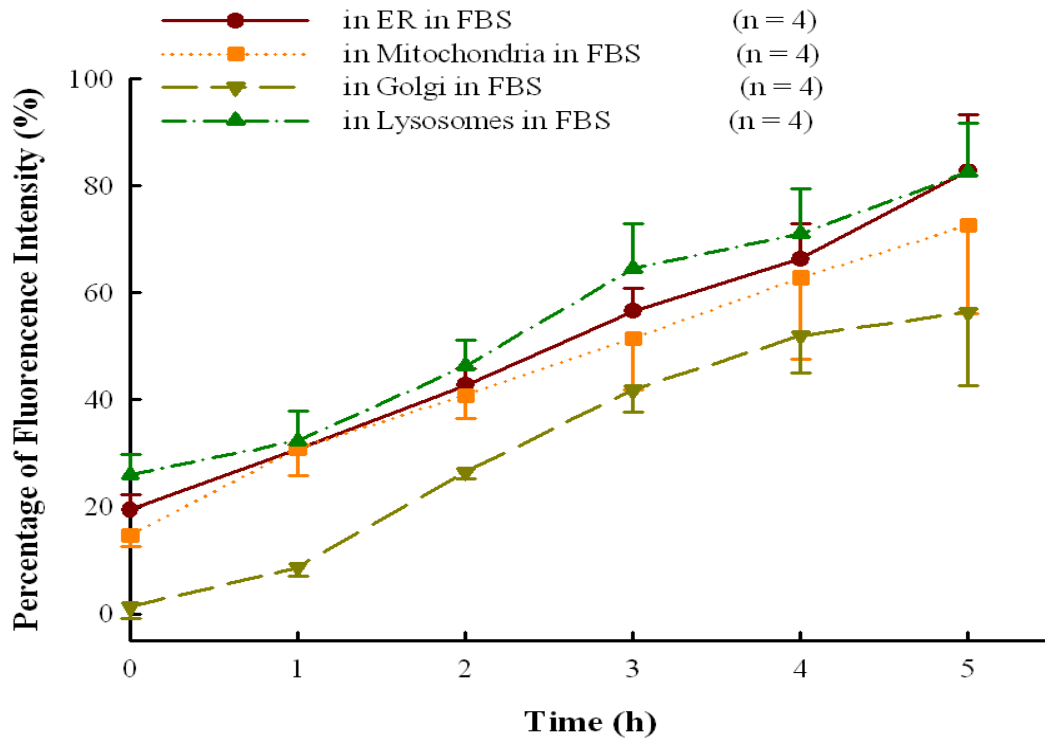


圖 39、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 0.1) 於添加 FBS 的培養

液中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化分析

將 Hep3B 細胞的內質網、粒線體、高基氏體與溶酶體個別染色後，於添加 10% (v/v) FBS 的培養液中以螢光顯微鏡定位拍攝，細胞在加入 Liposomal Hypericin 0.1 μ M 後隨即於 0、1、2、3、4、5 小時定時進行拍攝，並記錄 hypericin 於各胞器的分佈螢光強度之變化百分比。

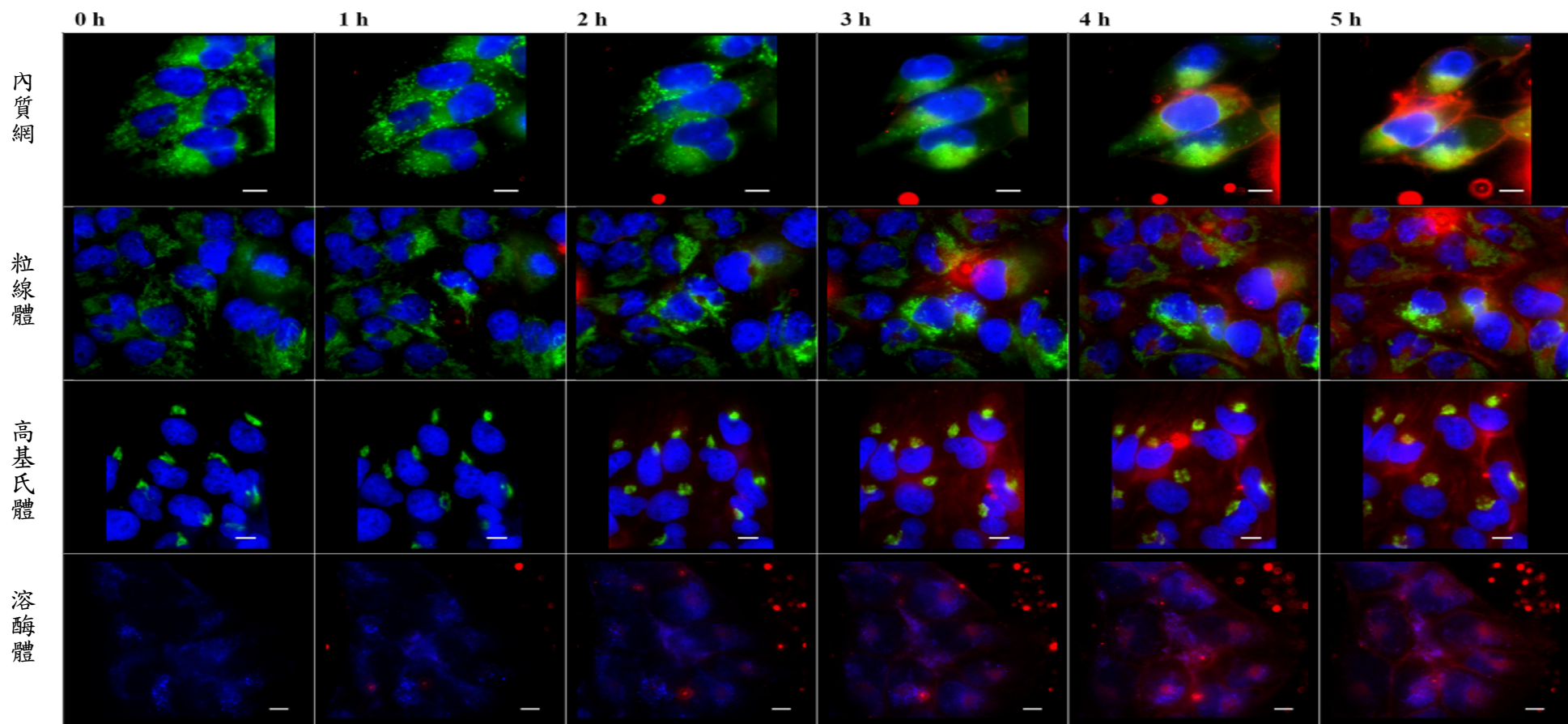


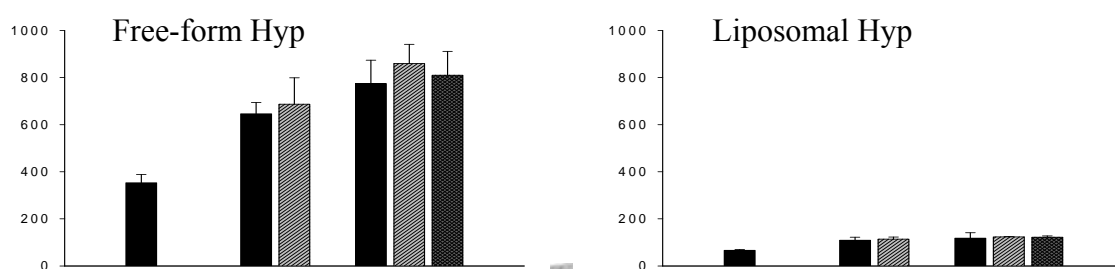
圖 40、Liposomal Hypericin (DSPC : cholesterol = 1 : 0.1) 於添加 FBS 培養液中之 Hep3B 細胞內胞器分布變化圖

Hep3B 細胞經過胞器染劑分別進行內質網、粒線體、高基氏體與溶酶體染色後，加入添加 10% FBS 的培養液並在螢光顯微鏡定位拍攝前，加入 DSPC : cholesterol = 9 : 1 的 Liposomal Hypericin 0.1 μ M 並隨即於 0、1、2、3、4、5 小時時進行拍攝。圖中內質網、粒線體與高基氏體會釋放綠色螢光，溶酶體與細胞核呈現藍色螢光，而 hypericin 則是放出紅色螢光。各圖中的比例尺長度為 10 μ m。

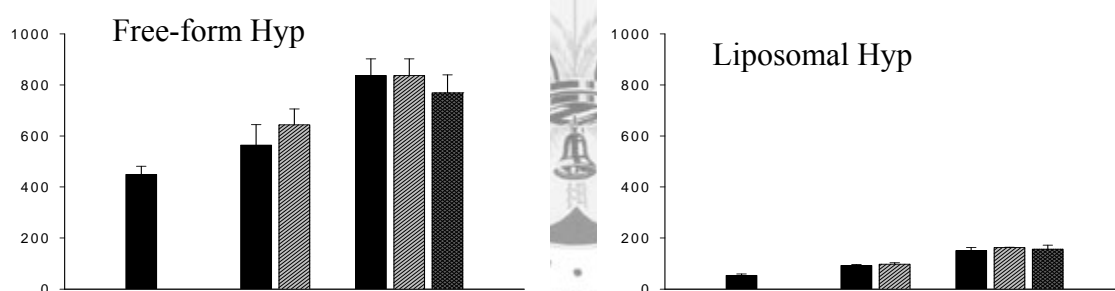
4、螢光衰退試驗

在螢光衰退試驗中，發現加入 0.1 μM free-form Hyp 或 0.1 μM Liposomal Hyp 於無血清培養液、含 10% FBS 或 LDL 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 培養液後，螢光強度雖然隨著培養時間增加而增加，但是在相同培養時間下，如培養 6 小時情況下，已經過 2 次拍攝的圖 (■)，與首次拍攝的圖 (▣) 之螢光強度並無明顯差異，顯示螢光強度受拍攝次數的增加，而造成螢光衰退的現象並不明顯。如圖 41。

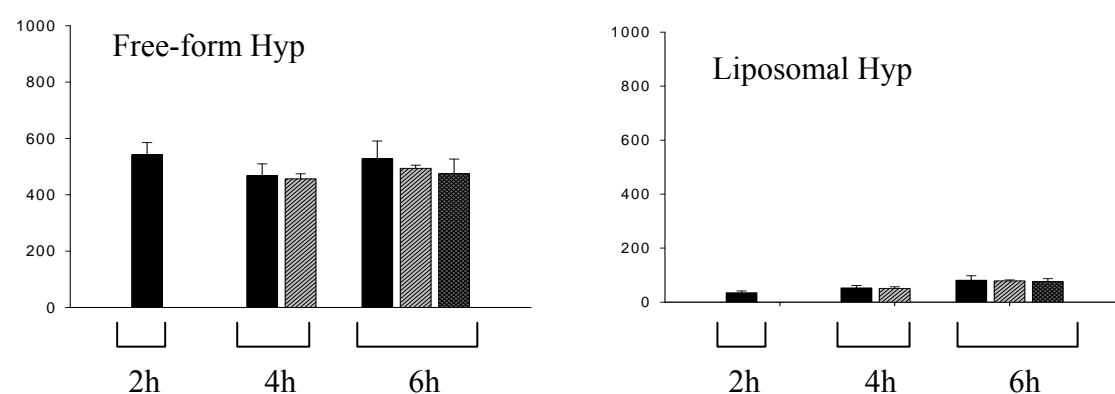
(A) Serum free medium



(B) Medium contains 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LDL



(C) Medium contains 10% FBS



Percentage of Fluorescence Intensity (%)

Preincubation Time (h)

圖 41、Hypericin 之螢光衰退與螢光顯微圖拍攝次數之關聯

Hyp 或 Liposomal Hyp 0.1 μM 於 (A) 無血清培養液 (B) 添加 LDL 培養液與 (C) 添加 FBS 培養液中與細胞培養兩小時 (■)、四小時 (▣)、六小時 (▤) 後進行 2 小時/次的拍攝頻率所得螢光值的比較。(n=3)

五、討論

1、肝癌細胞特性

由於肝實質細胞 (parenchymal cells) 缺乏連續性的基底膜結構且其內皮層具有孔洞，因此肝臟是人體中少數可直接與血液中成份進行作用的器官，也因此肝實質細胞，即肝細胞 (hepatocyte) 適合作為藥物遞送研究的對象 (Wisse, E. *et al.*, 1982)。因此研究初期選用 HepG2 與 Hep3B 兩種肝癌細胞進行實驗。HepG2 與 Hep3B 同樣屬於人類肝癌細胞，唯 Hep3B 細胞帶有 B 型肝炎的表面抗原，且外觀上呈紡錘型，相較於 HepG2 外觀為圓球型，顆粒較小且易堆積成團且，不利於細胞內分佈實驗的螢光判讀，因此實驗中以 Hep3B 作為主要研究對象。

2、Cholesterol 含量對微脂粒的影響

在 liposomes 組成方面，當組成比例 DSPC : cholesterol 由 1 : 0 增加至 1 : 1 時，Hyp 的包覆率也隨之提高，顯示出 cholesterol 在 liposomes 的形成過程中能吸引及引導 Hyp，並藉由 cholesterol 與磷脂質的結合，使 Hyp 也能穩定的貼附於磷脂質並順利形成 liposomes，而其中可能歸因於 Hyp 與 cholesterol 在結構上同樣屬於剛性平面構型 (rigid planar configuration)，因此在立體空間中 Hyp 能夠有效的與 cholesterol 疊合而突現出兩者之間的高親和性，使得 cholesterol 藉由其親和力攜帶 Hyp 進入 liposomes 而因此提高了 Hyp 的包覆率。類似的情形也出現在近年來的文獻中，Ho 等人發現在組成比例為 DPPC (dipalmitoyl phosphocholine) : DOPC (dioleoyl phosphocholine) : cholesterol = 2 : 2 : 1 的 liposomes 中，Hyp 於 liposomes 中傾向分佈於 DPPC/cholesterol 聚集的微疇域 (micro-domains) 部位，顯示出 Hyp 與 cholesterol 的高親和性 (Ho *et al.*, 2009)，此外，Sezer 等人使用 DPPC 製備 MLV (multi-lamellar vesicle) liposomes 並用來包覆親脂性的 enrofloxacin 時，發現當 liposomes 成分中 cholesterol 的莫耳比例越

高（總脂質莫耳數的 60%至 75%），enrofloxacin 的包覆效果也相對提高（76.5%至 93.1%）（Sezer *et al.*, 2007）。

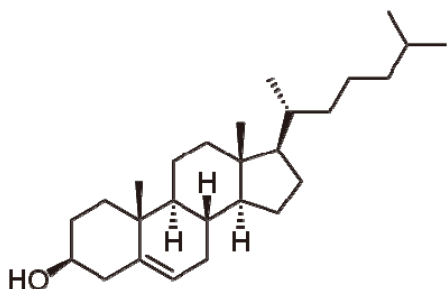


圖 42、Cholesterol 結構圖

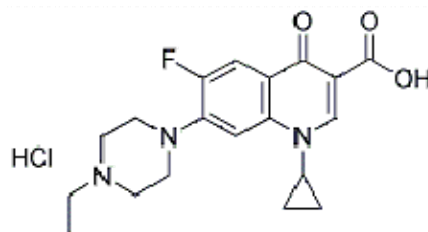


圖 43、Enrofloxacin 結構圖

在 liposomes 穩定性及在不同培養液中的粒徑變化上，由於 FBS 中的脂蛋白如 HDL、LDL 等會藉由 apolipoprotein 的作用而造成 liposomes 結構的不穩定，因此在添加 FBS 或 LDL 的培養液中，liposomes 之間聚合（aggregate）而使得粒徑隨著時間逐漸變大，但藉由將 cholesterol 的成分比例由 10 mol % 提升到 50 mol % 時則能減緩 liposomes 粒徑增大的趨勢，降低 liposomes 因結構不穩定而造成 Hyp 流失的可能性。由於 cholesterol 在 liposomes 中主要集中在脂質雙層的位置，因此藉由其穩定的剛性結構而能提高脂質雙層的黏性、降低脂質膜的穿透性且在生理環境中能穩定 liposomes 膜結構以保持 liposomes 的完整性（Plessis *et al.*, 1996），因此 liposomes 中 cholesterol 由 10 mol % 提升至 50 mol % 時，liposomes 的穩定性也隨之增加。此外，Guo 等人也指出在以 egg-phosphocholine 為主成分製備的 liposomes 中，當 cholesterol 的成分超過 37 mol % 時，可以抑制脂蛋白中 apolipoprotein A1 與 apolipoprotein E 所引起的 liposomes 滲漏（Guo *et al.*, 1980）。

3、各類培養液與 Hypericin 細胞攝取機制的關聯

由於 Hyp 進入細胞的路徑受到培養液成份的影響，因此藉由不同培養液環境，來比較各種成份與其引導的細胞攝取機制之間的關係。其中無血清培養液中含無機鹽類、必需氨基酸、維他命與葡萄糖（附錄一），而 10% FBS 的成分則含有生長因子、荷爾蒙、脂質、礦物質與蛋白分子等（產品說明 & 附錄二）。在

實驗中 Hep3B 細胞在不同培養液成分中對 Hyp 表現出不同程度的攝取效率，顯示出血清（FBS）或脂蛋白（LDL）的添加確實改變了細胞對 Hyp 的攝取機制。

Hyp 在細胞攝取路徑上主要經由四種機制（Siboni *et al.*, 2002）：

- (1) 被動擴散或分配（diffusion-partitioning）。
- (2) 由細胞膜上受體協助的運送機制，主要為 LDL 受體所引導的內包作用（LDL receptor mediate-endocytosis）。
- (3) 不經由受體協助而由細胞膜引導的機制，如胞飲（pinocytosis）。
- (4) 上述三項機制的綜合。

於無血清的培養液中，由於 Hyp 的親脂性的結構使其能夠順利的穿過細胞膜，並藉由細胞內外 Hyp 濃度梯度的影響，使得 Hyp 在 3 小時之內便快速進入細胞，也顯示出 Hyp 即使在沒有蛋白分子的影響下本身仍是能夠順利由細胞攝取。在另一方面，由於在 Hyp 已知的細胞攝取路徑中，被動擴散是其中較快速的攝取方式，因此在無蛋白分子的影響下，推測 Hyp 主要是藉由被動擴散的方式進入細胞。

相較於在添加了 LDL 的培養環境，Hyp 的細胞攝取量在 6 小時以前與無血清環境比較並無明顯差異，直到培養 9 小時後才能看見 Hyp 的細胞攝取量經由 LDL 的影響而明顯的增加。主要是因為 LDL 能協助 Hyp 以內包方式進入細胞，但是在過程中取決於 clathrin-coated vesicle 形成的速率，因此在細胞攝取速率上較被動擴散來的慢（Kongshaug *et al.*, 1989），也因此經由 LDL 協助所增加的 Hyp 攝取量在 9 小時的培養之後才顯著高於無血清培養液。而在添加 FBS 的培養液中發現 Hyp 由細胞攝取的效率最低。FBS 中除了 LDL 及 cholesterol 外尚含多種蛋白成分（Price & Gregory, 1982），即便 LDL 能夠提升 Hyp 於細胞的攝取量，但過多的大分子可能一方面會個別與 Hyp 或 LDL 結合，而佔去了 Hyp 可與 LDL 接觸的機會，而另一方面也可能與 Hyp 競爭位於細胞膜上的受體，導致 Hyp 在添加 FBS 的培養液中反而延緩了 Hyp 進入細胞的時間。

在 liposomes 包覆劑型方面，liposomal Hyp 的細胞攝取量較單純 Hyp 來的低，且持續至 24 小時，主要是因為在 liposomes 的包覆下，Hyp 能直接與細胞膜

接觸而擴散進入細胞的機會降低，轉而經由 liposomes 以膜融合 (fusion) 或脂質交換 (lipid exchange)，亦或藉由內包作用等較緩慢的方式將 Hyp 送入細胞 (Derycke & de Witte, 2004)，且 liposomal Hyp 在進入細胞的過程中牽涉到 Hyp 在 liposomes 與細胞膜之間的分配，因此降低了 Hyp 在無血清或是添加 FBS 的培養液中的細胞攝取速率；然而在添加 LDL 的培養液環境下發現，當 liposomes 中 cholesterol 的組成比例由 10% 提升至 50%，liposomal Hyp 的細胞攝取量也明顯增加，顯示出 liposomes 劑型中的 cholesterol 能夠藉由 LDL 的協助而增加 Hyp 的細胞攝取量，而其中 Hyp 與 cholesterol 的親和性可能是造成這項結果的原因之一。而類似的情形也發生在文獻中，Rodrigues 等人使用 cholesterol-rich emulsion (LDE) 作為 paclitaxel 的載體，發現 cholesterol 成分可能幫助 paclitaxel 經由 LDL 受體以內包作用的方式提高細胞攝取量並影響其細胞毒性 (Rodrigues *et al.*, 2002)，與本實驗的結果相符。

4、細胞內分佈試驗

由於物質藉由不同的細胞攝取機制將會改變物質後續於細胞中的分佈位置，如 LDL 藉由 receptor-mediated endocytosis 進入細胞後主要出現於溶酶體 (Alberts *et al.*, 2008)，此外物質本身的物理性質如親脂性與分子量也會影響其與細胞胞器的親和性而改變其細胞內的分佈傾向，因此藉由螢光顯微鏡曠時攝影來觀察細胞內特定胞器中 Hyp 在分布量上的變化，並比較 Hyp 在不同培養液成分與 liposomes 劑型下其分布趨勢的變化。

4-1、於無血清培養液

在 5 小時細胞分佈過程初期便可在內質網區域發現 Hyp 的分佈，主要由於內質網結構是由大表面積的脂質膜組織而成，有利於親脂性物質的吸附，且內質網在細胞中主要負責蛋白質與脂質的合成，經內質網膜上的特定受體與合成好的蛋白質或脂質結合後，再藉由運輸囊泡 (transport vesicle) 的形成或運輸蛋白

(transfer protein) 將這些合成前驅物發送至高基氏體及粒線體 (Alberts *et al.*, 2008), 然而在 Hyp 分佈初期於高基氏體及粒線體方面並無明顯的分佈, 且持續至 5 小時, 故推測在無血清環境中, 由於 Hyp 持續且快速的附著於內質網膜上, 降低了內質網膜的流動性並阻礙運輸囊泡與運送蛋白的作用, 因而抑制了內質網將 Hyp 分配至高基氏體或粒線體的功能。另一方面, 一部分的 Hyp 出現在溶酶體中, 顯示出即便在無血清培養液中, 仍有部分 Hyp 可經由細胞膜內包作用而進入溶酶體, 進而受到代謝後釋出細胞。示意圖如圖 44。

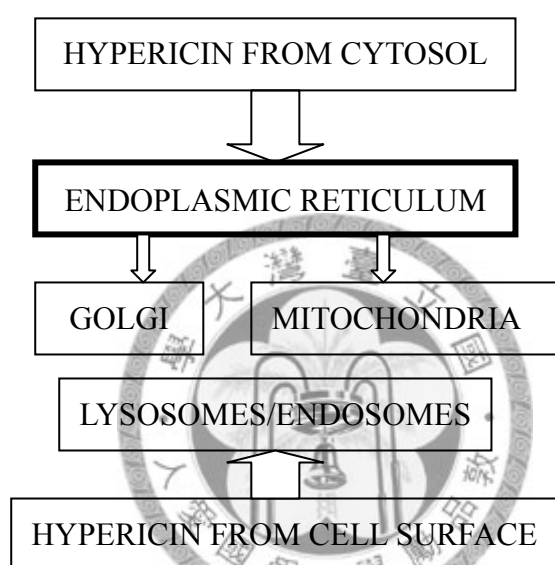


圖 44、Hypericin 於無血清培養液下的胞器分佈圖說

而在微脂粒劑型包覆的 Hyp 0.1 μM (DSPC:cholesterol = 1:1 liposomal Hyp) 方面, 結果顯示出 liposomal Hyp 在進入細胞途徑上與單純 Hyp 的路線相似, 即 liposomal Hyp 在分佈初期主要也出現在內質網與溶酶體中, 之後 Hyp 再經由內質網分配至高基氏體與粒線體, 而由於在無血清培養液中 liposomal Hyp 在細胞攝取上較慢, 因此在各胞器分佈趨勢上的變化較單純 Hyp 時來的不明顯。此外 Hyp 在溶酶體的分佈量在 1 小時間便已顯著高於其他胞器, 也顯示出 liposomal Hyp 在進入細胞的過程中主要仍是藉由內包作用進入細胞, 而小部份才是經由 liposomes 與細胞膜作用而將 Hyp 釋放至內質網。示意圖如圖 45。

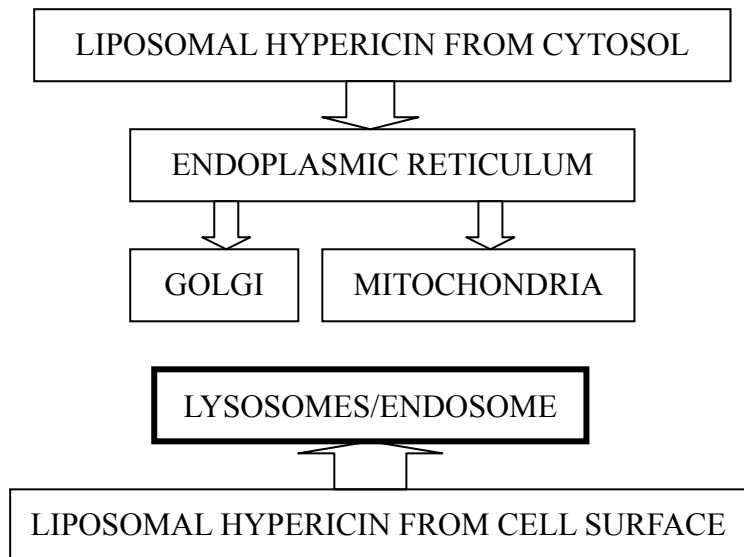


圖 45、Liposomal Hypericin 於無血清培養液下的胞器分佈圖說

4-2、於添加 LDL 的培養液

在添加 LDL 的培養環境下，Hyp 主要分佈至高基氏體與內質網，而由於 LDL 中富含 cholesterol (LDL 總脂質重的 10~12%) 及 cholesteryl esters (LDL 總脂質重的 47~51%)，因此在添加 LDL 的培養環境中，cholesterol 與 Hyp 之間的作用將會是影響 Hyp 細胞內分佈的主要因素。在外生性 cholesterol 的代謝路徑中，cholesterol 主要經 LDL-內包作用的方式進入溶酶體，隨後在溶酶體中 70%的 cholesterol 將分配至高基氏體後再送至細胞膜，而 30%則分布至內質網 (Voelker, 2008)；而內生性的 cholesterol 同時為荷爾蒙 pregnenolone 的合成前驅物，因此細胞中的 cholesterol 能藉由電壓性陰離子通道進入粒線體內膜後進行生合成

(Voelker, 2008)，也因此 Hyp 在 LDL 培養環境下，憑藉 Hyp 與 cholesterol 的高親和性，使得 Hyp 在高基氏體與粒線體的分佈量提升，如圖 46。此外在文獻中提到以 DPPC (dipalmitoyl phosphocholine) liposomes 包覆光敏劑 hematoporphyrin 時，liposomes 組成中添加 cholesterol 或心磷脂 (cardiolipin) 能提高 hematoporphyrin 於粒線體的分佈量 (Ricchelli *et al.*, 1993)。

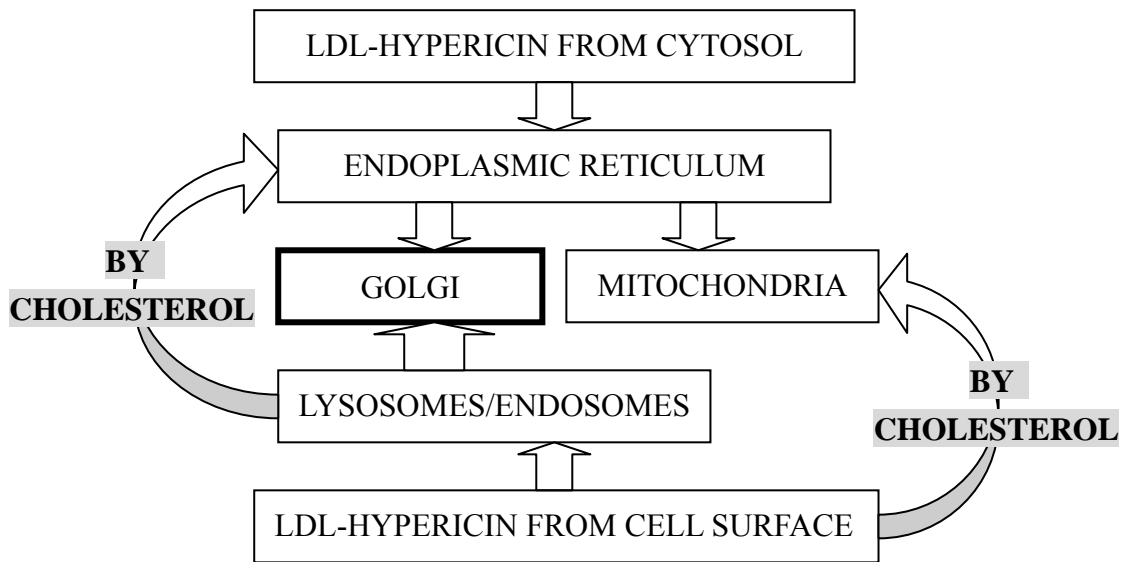


圖 46、Hypericin 於添加 LDL 的培養液下的胞器分佈圖說

而在 DSPC : cholesterol = 1 : 1 的 liposomal Hyp 中，由於 Hyp 處於 liposomes 的包覆下，不容易與培養液中的 LDL 作用，只有部份的 Hyp 能脫離微脂粒而與 LDL 結合，而另一部分的 Hyp 仍在微脂粒間以 liposomal Hyp 方式進行分佈，因此在 Hyp 的分佈上不單只是單一種運送途徑，其中同時參雜了 Hyp 在 LDL 與 liposomes 之間的分配問題，因此在分佈結果的呈現上類似於結合了無血清培養液 (liposomal Hyp) 條件以及添加 LDL 培養液 (LDL-Hyp) 的分佈特性，即與 LDL 結合的 Hyp 傾向分佈至高基氏體與粒線體，而位於 liposomes 中的 Hyp 則主要分佈至內質網及溶酶體的位置，因此在添加 LDL 的培養環境中，liposomal Hyp 在高基氏體的分佈量明顯高於在無血清條件時的分佈量，因此也顯示在 LDL 環境下 Hyp 確實會傾向分佈至高基氏體。而在其他胞器分佈方面，由於在兩種培養條件下皆有分佈至粒線體的表現，因此即使兩種培養液條件各佔一部分，在粒線體分佈的變化上也無明顯變化，而由 LDL 運送的 Hyp 在分佈至內質網溶酶體的比例上較少，因此在結合了 liposomal Hyp 與 LDL-Hyp 的情況下，造成了內質網與溶酶體在分佈量的降低。如圖 47。

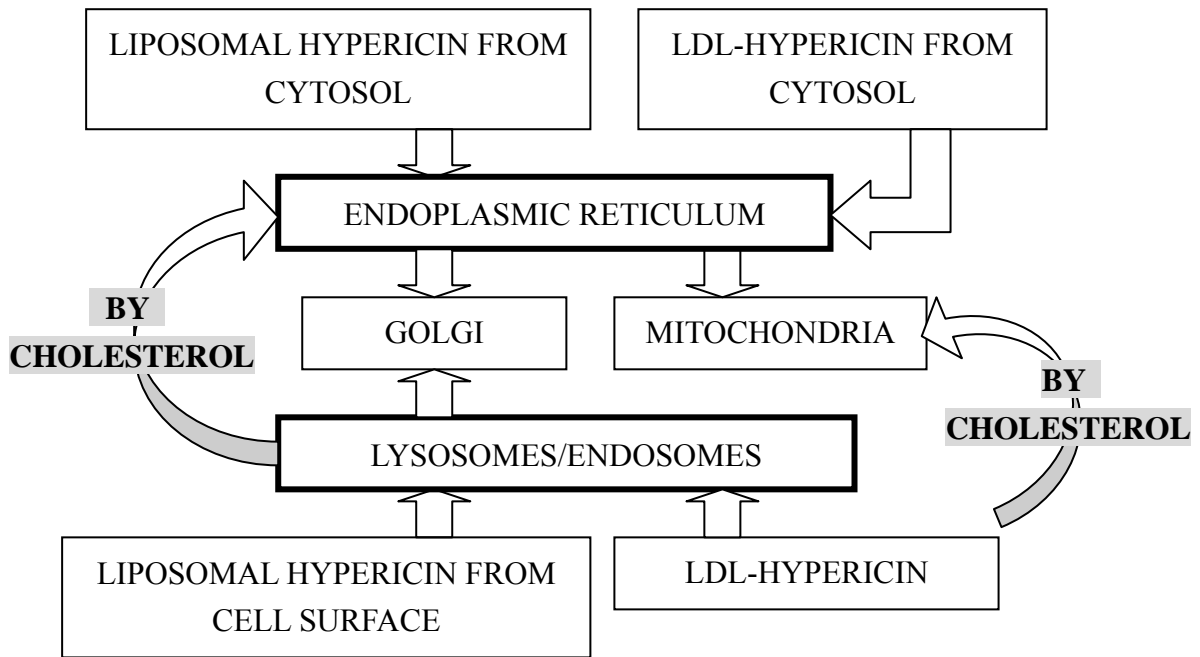


圖 47、Liposomal Hypericin 於添加 LDL 的培養液下的胞器分佈圖說

4-3、於添加 FBS 的培養液

在添加 10% FBS 的培養液中的分佈變化方面，即便 FBS 中的蛋白分子在細胞攝取上會減緩 Hyp 的吸收速度，但經過 2 小時的攝取後大部份進入細胞的 Hyp 仍快速的分佈至內質網，再次顯示出 Hyp 與脂質膜結構的親和性，而部份的 Hyp 藉由與 FBS 中的蛋白分子結合而提高了高基氏體與粒線體的分佈量。如圖 48。

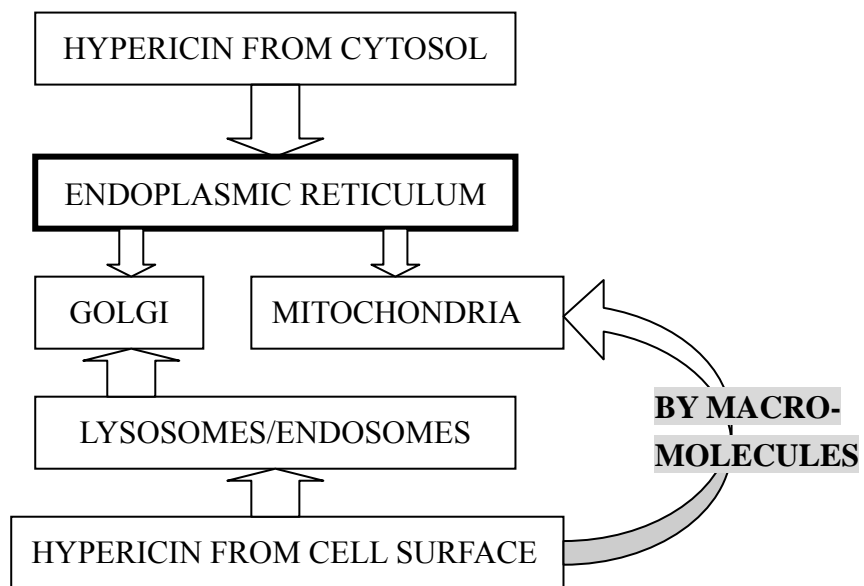


圖 48、Hypericin 於添加 FBS 的培養液下的胞器分佈圖說

Liposomal Hyp 在 10% FBS 培養液中，基本上仍遵循實驗預測的方式進行分佈，即 liposomal Hyp 主要分佈至內質網與溶酶體，而由 cholesterol 或其他蛋白分子協助運送的 Hyp 則傾向分佈至高基氏體，然而在粒線體的 Hyp 分佈變化上卻無明顯的增加，一方面粒線體在脂質來源的獲得方式不同於內質網、高基氏體與溶酶體是藉由運輸囊泡進行運送，而是利用輸送蛋白的方式由內質網轉移至粒線体外膜，因此在 Hyp 的運送方面可能會因此受到影響，而另一方面也由於 FBS 中的成分無法確實定量，因此在蛋白分子與 Hyp 之間的關係在目前的實驗當中尚無法確實釐清，尚需要對 FBS 中的成分個別進行測試。

最後在 liposomal Hyp 配方方面，由於 DSPC : cholesterol = 9 : 1 配方的 liposomal Hyp 在先前穩定性測試發現此配方的 liposomes 結構易隨時間及光源照射而造成 liposomes 粒徑的變化，且在螢光影像拍攝過程中常出現滲露且聚集成塊的 Hyp 分子團，因此在細胞內分佈的結果上比較難判斷其進入細胞時的狀況，故所呈現的結果只列為參考用。

綜合 Hyp 於不同培養液成分與劑型，於 Hep3B 細胞的進入途徑與分佈的結果表現於圖 49。



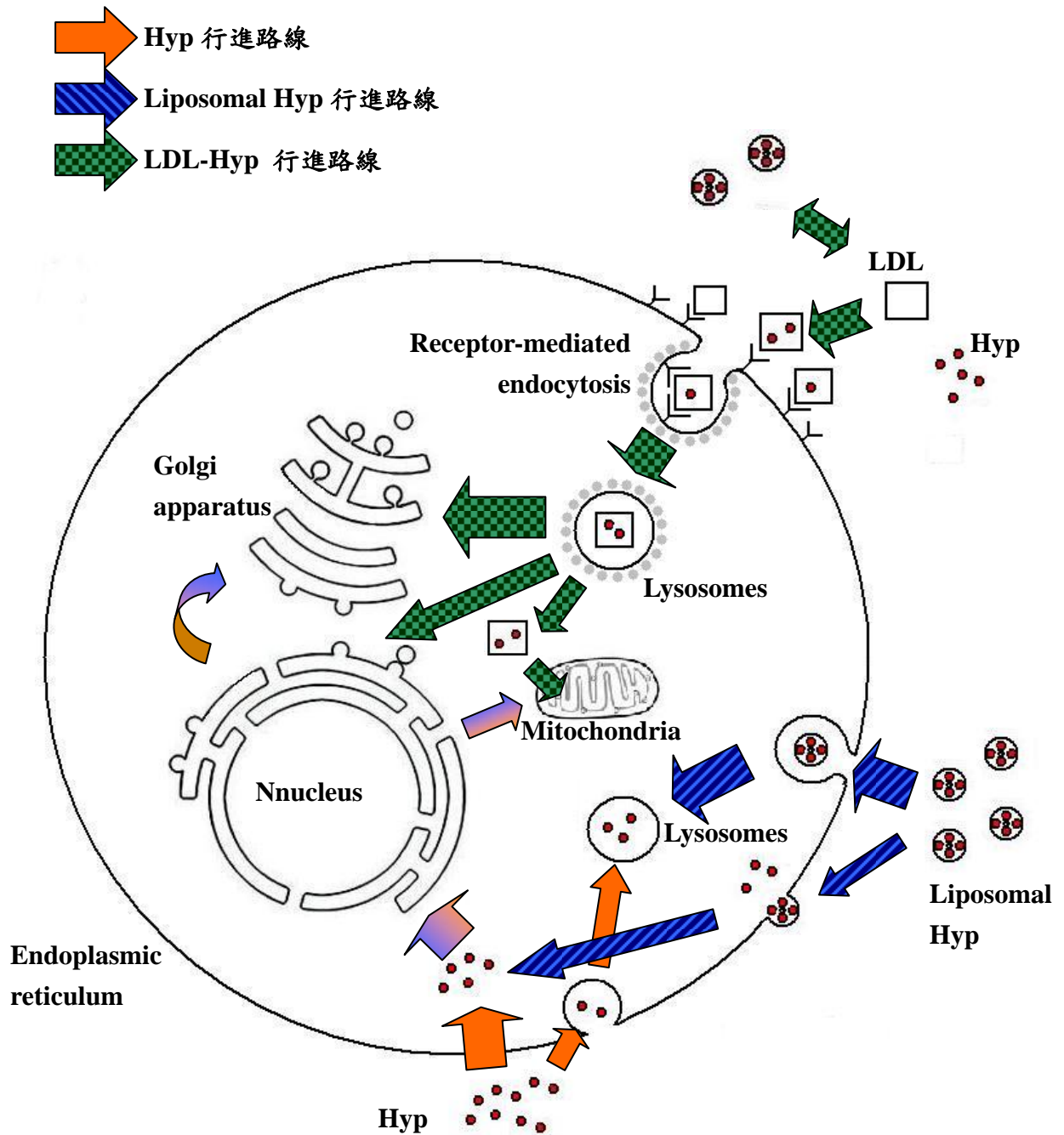


圖 49、Hypericin 細胞攝取途徑與於各胞器分佈之關係圖

5、螢光衰退試驗

為了確認照射次數是否會造成螢光衰退而降低螢光強度，因此透過拍攝次數的不同來觀察是否會影響螢光強度的表現。而由實驗結果發現，無論在拍攝一次、兩次及三次的情形下，並不會影響到螢光強度的表現。因此可以確定照射次數並不會影響 Hyp 及 liposomal Hyp 在細胞內分布的情形。

六、結論與未來方向

在本實驗中發現在 hypericin 的 liposomes 包覆劑型的穩定性方面，將 liposomes 組成配方中的 cholesterol 由 10% 提升至 50% 莫耳分率能顯著抑制溫度、培養液或光源所造成的 liposomes 粒徑變化，使得在後續實驗中能確保 liposomal-Hyp 在細胞攝取與分佈實驗時仍是以穩定的 liposomes 劑型呈現而不至於因外界因素影響而造成結果的誤判。

在 hypericin 進入 Hep3B 細胞的過程中，hypericin 的高親脂性造成其被動擴散速率明顯快於由 LDL、liposomes 或其他蛋白分子所引導的運輸機制，且在進入細胞後主要分佈至內質網區域，但也因此抑制了內質網的運輸作用；而在添加適量 LDL 的環境下，LDL 提供 hypericin 藉由 LDL-內包作用進入細胞的途徑並在 9 小時後顯著提升了 Hyp 的細胞攝取量，此外藉由 Hyp 與 cholesterol 的高親和性，使得 Hyp 在進入細胞後主要集中於高基氏體區域且提高 Hyp 在粒線體的分佈，而實驗中使用的 liposomes 劑型雖然能提高 hypericin 在溶酶體的分佈，但仍不影響 hypericin 分佈於內質網的傾向。因此實驗結果證實藉由調整 hypericin 進入細胞的路徑，將改變其後續於細胞內的分佈傾向與變化量。

在本實驗結果中初步對光敏劑 hypericin 於細胞中的運送路線進行分析推論，未來若能進一步針對 hypericin 及其結構類似物，與 cholesterol、磷脂質、以及蛋白分子間的親和性作詳細的研究探討，並研究其細胞毒性的影響，在光敏劑的使用上，將更能掌握其於生理環境中的去向與影響，對於光動力治療的開發與應用將會有所貢獻。

參考文獻

- 孫斌 角質細胞靶向性微脂粒基因載體之研究；指導教授：余秀瑛 教授，藥學研究所，國立臺灣大學（2000）
- 楊育才 以微脂粒包覆光感物質之光動力效應探討；指導教授：蔡翠敏 教授，生物醫學材料研究所，臺北醫學大學（2004）
- 呂維明 & 戴怡德 粉體粒徑量測技術（高立圖書有限公司，台北，1998）
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. in *Molecular Biology of The Cell*. 749-812 (Garland Science, Oxford, 2008)
- Berthet, J., Berthet, L., Appelmans, F. & De Duve, C. Tissue fractionation studies. 2. The nature of the linkage between acid phosphatase and mitochondria in rat-liver tissue. *Biochem. J.* **50**, 182-189 (1951)
- Boulikas, T. & Vougiouka, M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. *Oncol. Rep.* **10**, 1663-1682 (2003)
- Brown, S. B., Brown, E. A. & Walker, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol.* **5**, 497-508 (2004)
- 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 (2004)
- 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 (2005)
- Chang, C. C., Yang, Y. T., Yang, J. C., Wu, H. D. & Tsai, T. Absorption and emission spectral shifts of rose bengal associated with DMPC liposomes. *Dyes pigm.* **79**, 170-175 (2008)

- Chapman, D. Thermotropic and lyotropic mesomorphism of some 1,2-diacyl-phosphatidylcholines (lecithins). *chem. phys. lipids* **1**, 445-475 (1967)
- Chen, B., Pogue, B. W. & Hasan, T. Liposomal delivery of photosensitising agents. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2**, 477-487 (2005)
- Derycke, A. S. L. & de Witte, P. A. M. Liposomes for photodynamic therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 17-30 (2004)
- Dolmans, D. E., Fukumura, D. & Jain, R. K. Photodynamic therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 380-387 (2003)
- Dougherty, T. J. Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors. *Photochem. Photobiol.* **45**, 879-889 (1987)
- Dougherty, T. J. *et al.* Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 889-905 (1998)
- English, D. S., Doyle, R. T., Petrich, J. W. & Haydon, P. G. Subcellular distributions and excited-state processes of hypericin in neurons. *Photochem. Photobiol.* **69**, 301-305 (1999)
- Firestone, R. A. Low-density lipoprotein as a vehicle for targeting antitumor compounds to cancer cells. *Bioconjug. Chem.* **5**, 105-113 (1994)
- Fukunaga, T., Nagahama, M., Hatsuzawa, K., Tani, K., Yamamoto, A. & Tagaya, M. Implication of sphingolipid metabolism in the stability of the Golgi apparatus. *J. Cell Sci.* **113**, 3299-3307 (2000)
- Galanou, M. C., Theodossiou, T. A., Tsiourvas, D., Sideratou, Z. & Paleos, C. M. Interactive transport, subcellular relocation and enhanced phototoxicity of hypericin encapsulated in guanidinylated liposomes via molecular recognition. *Photochem. Photobiol.* **84**, 1073-1083 (2008)
- Giese, A.C. Hypericium. *Photochem. Photobiol. Rev.* **5**, 229-255 (1980)

- Green, D & Kroemer, G. The central executioners of apoptosis: Caspases or mitochondria? *Trends Cell. Biol.* **8**, 267-271 (1998)
- Green, D. R. & Reed, J. C. Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312. (1998)
- Guo, L. S., Hamilton, R. L., Goerke, J., Weinstein, J. N. & Havel, R. J. Interaction of unilamellar liposomes with serum lipoproteins and apolipoproteins. *J. Lipid Res.* **21**, 993-1003 (1980)
- Hofmann, J. & Sernetz, M.. A kinetic study on the enzymatic hydrolysis of fluorescein diacetate and fluorescein-di- β -D-galactopyranoside. *Anal. Biochem.* **131**, 180-186 (1983)
- Ho, Y. F., Wu, M. H., Cheng, B. H., Chen, Y. W., Shih, M. C. Lipid-mediated preferential localization of hypericin in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1788**, 1287-1295 (2009)
- Kongshaug, M., Moan, J. & Brown, S. B. The distribution of porphyrins with different tumour localising ability among human plasma proteins. *Br. J. Cancer* **59**, 184-188 (1989)
- Liu, D. & Huang, L. Size homogeneity of a liposome preparation is crucial for liposome biodistribution in vivo. *J. Liposome Res.* **2**, 57-66 (1992)
- Malkin, J. & Mazur, Y. Hypericin derived triplet states and transients in alcohol and water. *Photochem. Photobiol.* **57**, 929-933 (1993)
- Martin, F. J. in *Specialized Drug Delivery Systems* (eds Tyle, P.) 267-316 (Marcel Dekker, New York, 1990)
- Miskovsky, P. Hypericin-A new antiviral and antitumor photosensitizer: mechanism of action and interaction with biological macromolecules. *Curr. Drug Targets* **3**, 55-84 (2002)
- Moan, J. Properties for optimal PDT sensitizers. *J. Photochem. Photobiol. B.* **5**, 521-524 (1990)

- Moan, J. & Peng, Q. An outline of the hundred-year history of PDT. *Anticancer Res.* **23**, 3591-3600 (2003)
- Ochsner, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors. *J. Photochem. Photobiol. B* **39**, 1–18 (1997)
- Phelan, M. C. in *Current Protocols in Cell Biology* (eds Bonifacino J. S., Dasso, M., Harford, J. B., Lippincott-Schwartz, J. & Yamada, K. M.) 1.1.1-1.1.18 (John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2007)
- Phillips, D. Chemical mechanisms in photodynamic therapy with phthalocyanines. *Prog. Reaction Kinetics* **22**, 175–300 (1997)
- Plessis, J., Ramachandran, C., Weiner, N., & Müller, D. G. The influence of lipid composition and lamellarity of liposomes on the physical stability of liposomes upon storage. *Int. J. Pharm.* **127**, 273–278 (1996)
- Poot, M. in *Current Protocols in Cytometry* (eds Robinson J. P.) 9.4.1-9.4.24 (John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2001)
- Postigo, F., Mora, M., De Madariaga, M. A., Nonell, S. & Sagrista, M. L. Incorporation of hydrophobic porphyrins into liposomes: characterization and structural requirements. *Int. J. Pharm.* **278**, 239-254 (2004)
- Price, P. J. & Gregory, E. A. Relationship between in vitro growth promotion and biophysical and biochemical properties of the serum supplement. *In Vitro.* **18**, 576-584 (1982)
- Ricchelli, F., Gobbo, S., Jori, G, Moreno, G, Vinzens, F. & Salet, C. Photosensitization of mitochondria by liposome-bound porphyrins. *Photochem. Photobiol.* **58**, 53– 58 (1993)
- Rodrigues, D. G., Covolan, C. C., Coradi, S. T., Barboza, R. & Maranhão, R. C. Use of a cholesterol-rich emulsion that binds to low-density lipoprotein receptors as a vehicle for paclitaxel. *J. Pharm. Pharmacol.* **54**, 765-772 (2002)
- Sezer, A. D., Akbuğa, J. & Baş, A. L. In vitro evaluation of enrofloxacin-loaded MLV

- liposomes. *Drug Deliv.* **14**, 47-53 (2007)
- Sibata, C. H., Colussi, V. C., Oleinick, N. L. & Kinsella, T. J. Photodynamic therapy in oncology. *Exp. Opin. Pharmacother.* **2**, 917–927 (2001)
- Siboni, G., Weitman, H., Freeman, D., Mazur, Y., Malik, Z. & Ehrenberg, B. The correlation between hydrophilicity of hypericins and helianthrone: internalization mechanisms, subcellular distribution and photodynamic action in colon carcinoma cells. *Photochem. Photobiol. Sci.* **7**, 483-91 (2002)
- Siboni, G., Weitman, H., Freeman, D., Mazur, Y., Malik, Z. & Ehrenberg, B. The correlation between hydrophilicity of hypericins and helianthrone: internalization mechanisms, subcellular distribution and photodynamic action in colon carcinoma cells. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1**, 483-491 (2002)
- Silvius J. R., *Lipid-Protein Interactions* (John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 1982)
- Snyder, J. W., Greco, W. R., Bellnier, D. A., Vaughan, L. & Henderson, B. W. Photodynamic therapy: a means to enhanced drug delivery to tumors. *Cancer Res.* **63**, 8126-8131 (2003)
- Stewart, J. C. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Anal. Biochem.* **104**, 10-14 (1980)
- Sugisaki, K., Usui, T., Nishiyama, N., Jang, W. D., Yanagi, Y., Yamagami, S., Amano, S. & Kataoka, K. Photodynamic therapy for corneal neovascularization using polymeric micelles encapsulating dendrimer porphyrins. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **49**, 894-899 (2008)
- Takemura, T., Ohta, N., Nakajima, S. & Sakata, I. Critical importance of the triplet lifetime of photosensitizer in photodynamic therapy of tumor. *Photochem. Photobiol.* **50**, 339–344 (1989)

- Terasaki, M., Song, J., Wong, J. R., Weiss, M. J. & Chen, L. B. Localization of endoplasmic reticulum in living and glutaraldehyde-fixed cells with fluorescent dyes. *Cell* **38**, 101-108 (1984)
- Theodossiou, T. A., Dutra, A. N. & Hothersall, J. S. Mitochondria are a primary target of hypericin phototoxicity: Synergy of intracellular calcium mobilisation in cell killing. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 1946-1956 (2006)
- Thomas, C. & Pardini, R. S. Oxygen dependence of hypericin-induced phototoxicity to EMT6 mouse mammary carcinoma cells. *Photochem. Photobiol.* **55**, 831-837 (1992)
- Tsai, T., Yang, Y. T., Wang, T. H., Chien, H. F. & Chen, C. T. Improved photodynamic inactivation of gram-positive bacteria using hematoporphyrin encapsulated in liposomes and micelles. *Lasers Surg. Med.* **41**, 316-322 (2009)
- Vandenbogaerde, A. L., Cuveele, J. F., Proot, P., Himpens, B. E., Merlevede, W. J., de Witte, P. A. Differential cytotoxic effects induced after photosensitization by hypericin. *J. Photochem. Photobiol. B.* **38**, 136-142 (1997)
- Voelker, D. R. in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (eds Vance, D. E. & Vance, J. E.) 441-484 (Elsevier, Amsterdam, 2008)
- Wallace, D.C. Mitochondria DNA variation in human evolution, degenerative disease, and aging. *Am. J. Hum. Genet* **57**, 201-223 (1995)
- Weber, N. D., Murray, B. K., North, J. A. & Wood, S. G. The antiviral agent hypericin has in vitro activity against HSV-1 through non-specific association with viral and cellular membranes. *Antiviral. Chem. Chemother.* **5**, 83-90 (1994)
- Williams, A. P. *Liposomes: A Practical Approach* (Oxford University Press, New York, 1990)
- Wills, N. J., Park, J., Wen, J., Kesavan, S., Kraus, G. A., Petrich, J. W. & Carpenter, S.

Tumor cell toxicity of hypericin and related analogs. *Photochem. Photobiol.* **74**, 216-220 (2001)

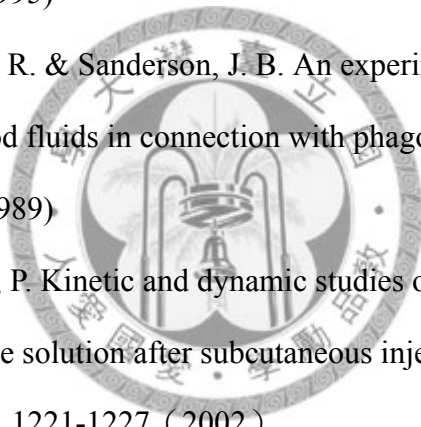
Wilson, B. C., Olivo, M. & Singh, G. Subcellular localization of Photofrin and aminolevulinic acid and photodynamic cross-resistance in vitro in radiation-induced fibrosarcoma cells sensitive or resistant to photofrin-mediated photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **65**, 166-176 (1997)

Wisse, E., De Zanger, R. & Jacobs, R. in *Sinusoidal Liver Cells* (eds Knook, D.L & Wisse, E.) 61-67 (Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1982)

Woodle, M. C. Sterically stabilized liposome therapeutics. *Adv. Drug Delivery Rev.* **16**, 249-265 (1995)

Wright, A. E., Douglas, S. R. & Sanderson, J. B. An experimental investigation of the role of the blood fluids in connection with phagocytosis. *Rev. Infect Dis.* **11**, 827-834 (1989)

Yu, H. Y., Li, S. D. & Sun, P. Kinetic and dynamic studies of liposomal bupivacaine and bupivacaine solution after subcutaneous injection in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **54**, 1221-1227 (2002)



附錄

附錄 1、RPMI-1640 培養液成份 (Molecularprobes/Invitrogen 產品資訊，

http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/media_formulation.119.html)

COMPONENTS	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	mM
Amino Acids			
Glycine	75	10	0.133333
L-Arginine	174	200	1.149425
L-Asparagine	132	50	0.378788
L-Aspartic acid	133	20	0.150376
L-Cystine 2HCl	313	65	0.207668
L-Glutamic Acid	147	20	0.136054
L-Glutamine	146	300	2.054794
L-Histidine	155	15	0.096774
L-Hydroxyproline	131	20	0.152672
L-Isoleucine	131	50	0.381679
L-Leucine	131	50	0.381679
L-Lysine hydrochloride	183	40	0.218579
L-Methionine	149	15	0.100671

L-Phenylalanine	165	15	0.090909
L-Proline	115	20	0.173913
L-Serine	105	30	0.285714
L-Threonine	119	20	0.168067
L-Tryptophan	204	5	0.02451
L-Tyrosine disodium salt dihydrate	261	29	0.111111
L-Valine	117	20	0.17094
Vitamins			
Biotin	244	0.2	0.00082
Choline chloride	140	3	0.021429
D-Calcium pantothenate	477	0.25	0.000524
Folic Acid	441	1	0.002268
Niacinamide	122	1	0.008197
Para-Aminobenzoic Acid	137	1	0.007299
Pyridoxine hydrochloride	206	1	0.004854
Riboflavin	376	0.2	0.000532
Thiamine hydrochloride	337	1	0.002967
Vitamin B12	1355	0.005	0.000004
i-Inositol	180	35	0.194444
Inorganic Salts			
Calcium nitrate (Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O)	236	100	0.423729
Magnesium Sulfate (MgSO ₄ -7H ₂ O)	246	48.84	0.198537

Potassium Chloride (KCl)	75	400	5.333334
Sodium Chloride (NaCl)	58	6000	103.44827
Sodium Phosphate dibasic (Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O)	268	800	2.985074
Other Components			
D-Glucose (Dextrose)	180	2000	11.111111
Glutathione (reduced)	307	1	0.003257
Phenol Red	376.4	5	0.013284



附錄 2、Fetal bovine serum 成分分析報告 (Price & Gregory, 1982)

Description	Average	Range	N
Endotoxin	0.356 ng/ml	0.008-10.0	39
pH	7.4	7.20-7.60	40
Inorganic Salts			
Calcium (Ca ²⁺)	13.6/100 ml	12.6-14.3	43
Chloride (Cl ⁻)	103 meq/L	98-108	43
Inorganic Phosphorous	9.8 mg/100 ml	4.3-11.4	43
Potassium (K ⁺)	11.2 meq/L	10.0-14.0	43
Selenium	0.026 µg/ml	0.014-0.038	25
Sodium (Na ⁺)	137 meq/L	125-143	43
Other Components			
Alkaline Phosphatase	255 mU/ml	111-352	43
Blood Urea Nitrogen	16 mg/100 ml	14-20	43
Creatine	3.1 mg/100 ml	1.6-4.3	43
Direct Bilirubin	0.2 mg/100 ml	0.0-0.5	43
Glucose	125 mg/100 ml	85-247	43
Hemoglobin	11.3 mg/100 ml	2.4-18.1	17
Lactate Dehydrogenase	864 mU/ml	260-1,215	43
Serum Glutamate Oxalacetate Transaminase	130 mU/ml	20-201	43
Total Bilirubin	0.4 mg/100 ml	0.3-1.1	43
Uric Acid	2.9 mg/100 ml	1.3-4.1	43
Steroids and Hormones			
Cholesterol	31 mg/100 ml	12-63	43
Cortisol	0.5 µg/ml	<0.1-2.3	43
Follicle Stimulating Hormone	9.5 ng/ml	<2-33.8	34
Growth Hormone	39.0 ng/ml	18.7-51.6	40
Leutinizing Hormone	0.79 ng/ml	0.12-1.8	38
Parathyroid Hormone	1,718 pg/ml	85-6,180	41
Progesterone	8 ng/100 ml	<0.3-36	42
Prolactin	17.6 ng/ml	2.00-49.55	40
Prostaglandin E	5.91 ng/ml	0.5-30.48	37
Prostaglandin F	12.33 ng/ml	3.77-42.00	38
T3	119 ng/100 ml	56-233	41
T4	12.1 ng/100 ml	7.8-15.6	42
Testosterone	40 ng/100 ml	21-99	42
Thyroid Stimulating Hormone	1.22 ng/ml	<0.2-4.5	40
Protein			
Total Protein	3.8 g/100 ml	3.2-7.0	43
Albumin	2.3 g/100 ml	2.0-3.6	43
Insulin	10 mU/ml	6-14	40

Certificate of Analysis

Page No. : 1
 Catalogue No : 10091
 Batch No. : 545627
 Expiration Date : 29 Mar 2010
 Country of Origin : New Zealand

Triple 0.1 micron filtered.
 For in vitro diagnostic use.

Store -5 to -20 C

TEST	SPECIFICATION	ACTUAL
Electrophoretic Profile (1)	Normal	NORMAL
Endotoxin (2)	Check and record	0.857 EU/mL
Haemoglobin (3)	Check and record	16.4 mg/100mL
Mycoplasma - Supplemental Testing(H-Stain) (4)	Negative	NEGATIVE
Mycoplasma Screen (5)	Negative	NEGATIVE
Osmolality (6)	Check and record	314 mmol/kg
pH (7)	Check and record	7.0
Relative Cloning Efficiency (RCE) (8)	Check and record	101 %
Relative Growth Promotion (RGP) (9)	Check and record	127 %
Relative Plating Efficiency (RPE) (10)	Check and record	107 %
Sterility (11)	Negative	NEGATIVE
Total Protein (12)	25 - 55 g/L	40 g/L
Virus: Bluetongue Virus (13)	Negative	NEGATIVE
Virus: Bovine Adenovirus (14)	Negative	NEGATIVE
Virus: Bovine Parvovirus (15)	Negative	NEGATIVE
Virus: Bovine Viral Diarrhoea Virus (16)	Tested	TESTED
Virus: BRSV (17)	Negative	NEGATIVE
Virus: Cytopathogenic Agents (18)	Negative	NEGATIVE
Virus: Haemadsorbing Agents (19)	Negative	NEGATIVE
Virus: Rabies Virus (20)	Negative	NEGATIVE
Virus: Reovirus (21)	Negative	NEGATIVE

B. Muller
 Quality Assurance Department

21/06/05
 Date

REFERENCES:

- 1 Cellulose Acetate Electrophoresis
- 2 LAL Chromogenic
- 3 Determined Spectrophotometrically, Clin. Chem. 12, 67, 1965
- 4 Hoescht H-Stain, Chen, T.R. (1977) Exp. Cell Res.104, 255-262 Modified
- 5 Barile, M.F. & Kern, J. (1971) P.S.E.M.B. 138, 432.
- 6 Freezing Point Depression
- 7 Combined Electrode
- 8 Sp2/O-Ag14 cell line. Adams R.L.P. (1990). Cell Culture for Biochemists. 2nd Rev. Ed., 117-120.
- 9 Cell line MRC-5. Doyle et al. (1995). Cell and Tissue Culture: Lab. Procedures 6A:1.1 - 1.3 2.3 - 2.6.
- 10 Cell Line A549. Adams R.L.P. (1990). Cell Culture for Biochemists. 2nd Rev. Ed., 117-120.
- 11 Current edition of USP
- 12 Biuret Method: Dumas et al. (1975). Clin. Chem. 21, 1159.
- 13 Code of Federal Regulations, (CFR), Title 9, Part 113.53 (c) [113.46, 113.47].
- 14 Code of Federal Regulations, (CFR), Title 9, Part 113.53 (c) [113.46, 113.47].
- 15 Code of Federal Regulations, (CFR), Title 9, Part 113.53 (c) [113.46, 113.47].
- 16 Code of Federal Regulations, (CFR), Title 9, Part 113.53 (c) [113.46, 113.47].
- 17 Code of Federal Regulations, (CFR), Title 9, Part 113.53 (c) [113.46, 113.47].

附錄 3、Sephadex™ 型號與性質分類表

(<https://www.chromatography.amershambiosciences.com/Aptrix/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&parentid=549&moduleid=6844&zone=Labsep#content>)

Medium	Working pH range	Particle size range wet bead (µm)	Bed vol. (ml/g) in distilled water	Fractionation Range (M _r): dextrans	Fractionation Range (M _r): globular proteins	Max. flow rate (ml/min)	Max. oper. pressure (bar)
Sephadex™ G-10	2~13	55~165	2~3	$< 7 \times 10^2$	$< 7 \times 10^2$	D	D
Sephadex™ G-15	2~13	60~180	2.5~3.5	$< 1.5 \times 10^3$	$< 1.5 \times 10^3$	D	D
Sephadex™ G-50 Coarse	2~10	200~610	9~11	$5 \times 10^2 \sim 1 \times 10^4$	$1.5 \times 10^3 \sim 3 \times 10^4$	D	D
Fine		40~160					
Medium		100~300					
Superfine		20~80					

D. The beads behave as rigid spheres obeying Darcy's Law.