

國立臺灣大學醫學院暨工學院醫學工程研究所

碩士論文

Graduate Institute of Biomedical Engineering

College of Medicine and Engineering

National Taiwan University

Master Thesis

以多光子螢光生命週期影像顯微術來鑑別正常與口腔

癌細胞

Multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy
(FLIM) of Bilirubin oxidants of oral cancer cells

黃成杰

Cheng-Jie Huang

指導教授：劉子銘 博士

Advisor: Tzu-Ming Liu, Ph.D.

中華民國 101 年 8 月

August, 2012

國立臺灣大學（碩）博士學位論文
口試委員會審定書

以多光子螢光生命週期影像顯微術來鑑別正常與口腔癌細胞
Multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) of
Bilirubin oxidants of oral cancer cells

本論文係黃成杰君（學號 R98548046）在國立臺灣大學醫學工程
學研究所完成之碩（博）士學位論文，於民國 101 年 7 月 31 日承下
列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

劉子銘

徐成光 (指導教授)

林博



高航

所長：

王兆麟

誌 謝

終於在碩士班的最後階段完成了這本論文，這一段促使自己成長不少的日子，也總算告一段落了，回想起來…若是單憑自己的能力實在有限，都是藉著許多人的支持、協助與鼓勵才能完成，因此要感謝的人非常非常的多，也不知道從何寫起，謝謝這些幫助我的人們。

首先要感謝的就是我的指導老師劉子銘教授，感謝老師一直以來都非常有耐心的跟我說明實驗的目的、架構與方法，還有做實驗的態度，此外也包容了我許多的錯誤，說實在的老師也花了一番苦心在我身上，如果不是老師一再的叮嚀我該做的事，以我懶惰的個性，最後這論文不知道還會寫多久，在這邊也要祝福老師未來的學術之路能夠順暢。

感謝孫啟光教授，雖然以往只是與跟孫教授在同一個 Group meeting，不過看著孫教授與其他學生的研究討論，真的可以從中學習到很多細微的部分，還有做研究一私不苟的態度，有時也會給我們的研究建議，也提醒我們一些沒注意到的問題，真的受益良多，此外也要謝謝孫教授對我們 Group 的學生都很親切，也提供了我們最大的幫助。

感謝我的口試委員們，謝達斌醫師人真的很親切，口試時很高興能與謝醫師討論了這麼久，謝醫師給的意見真的讓我覺得還有好多後續研究可以讓這篇論文更有價值。感謝高甫仁教授與林文澧教授在口試時給的許多建議與提醒，讓我能把這篇論文寫得更好。

在實驗室中，首先要感謝的就是明容學姊了，學姊真是不只人漂亮心腸又好，教了我許多實驗室相關的事物，也讓實驗室因此增添了许多回憶，謝謝學姊總是責罵我們的過錯，但其實妳事後又會偷偷問我們說妳剛剛會不會太兇，讓我發現其實都是因為我們實在太菜了，我覺得學姊真的做到了提醒我們，但又不會讓氣氛太尷尬，希望學姊也能夠順利畢業。此外要感謝建泰學長在我當初剛進實驗室

時的帶領，學長總是刻苦耐勞的做完許多實驗，也太為學弟著想，很感謝你當初在我做實驗到快要沒有捷運搭的時候都叫我先走，而你總是默默的就把許多事情做完，我也一直覺得很抱歉，在剛進來的時候因為個人的因素，沒能多幫你分擔實驗事務…。

陳裕興醫師真的能算是我在實驗室中的貴人，不過我想說的不是你總是請我們吃飯這件事，我覺得在你進實驗室後，你總是能讓實驗氣氛有趣的多，很可惜我們做的實驗並不是相同的系統，不然做起實驗來應該會很不枯燥吧！也要特別謝謝你，每次我在實驗室情緒非常低落的時候，你總是恰巧能鼓勵我，聊個幾句就能讓我覺得心情舒暢許多，又能重新思考下一步該怎麼做。

在老師的其他學生之中，特別感謝政翰總是會主動想到我，提醒我一些實驗室的資訊，你在剛進來的時候也上手得很快，系統幾乎都一次就學會，讓我這很混的學長不至於影響你太多，也謝謝你幫我分擔了很多的實驗，我沒能幫上一屆學長做到的事，你卻為我做了，謝謝你，希望你之後能趕快拿到博士學位！？如果有任何我幫得上忙的事，記得通知我。也要謝謝建國，真可惜你沒有當上建博，我覺得在你進實驗室之後，我們這邊的事情你能夠全部都 hold 住，實在太強大，也要謝謝你在最後口試的階段提供我很多訊息，畢業後希望你我都工作順利！此外我也很感謝實驗室的其他成員，佩純、宗原、佳宏、徹重、瑞婷，與你們的實驗雖然都不太相同，以至於實驗的交集較少，但是實驗室有你們在，偶爾可以聊天也真的是很好，謝謝你們在實驗與 meeting 以外的時間偶爾也跟我閒聊或討論各自的研究進度。

在其他實驗室的成員中協助我的人也很多，我想特別提起的就是丰毓跟功翰，雖然當初只是因為實驗事務而接觸，但是在碩二的時候認識你們，跟你們真正生物領域的研究生討論起來真的覺得很有趣，也因為你們讓我對自己的研究感興趣了起來，如果不是遇到你們，我在當時可能很少有這種覺得做實驗很開心的情緒

吧！希望丰毓你在日本這短短…應該快結束了的日子能夠多分享一些美食給我們看，哈哈…我覺得能夠去那邊學習真的超令人羨慕的，你也真的很厲害，功輸你也趕緊拿到博士學位吧！雖然還有點早，可是我覺得你真的是一個對研究有熱誠的人，將來一定會在學術界發光，祝你們一切順利。

此外其他幫助我的人真的是寫也寫不完，謝謝佳欣特別給了我一些細胞培養的資料閱讀，我一直很感激妳。謝謝成大謝達斌醫師的學生偉皇，你提供了我許多細胞培養的知識與經驗，感謝你職責之外還格外用心的幫助我。不知道我還有遺漏了誰，想起的時候，我依然非常感謝你們。

在生活中的朋友們之中，我要感謝兩年的室友兼高中同學們，俊宇、大餅、阿海、飄飄，雖然我們大家回去的時間都不相同，也很難找得到時間一起吃飯，但住在永和的那兩年真的回憶好多，搬走的時候我覺得好捨不得，希望之後大家每個人的工作、學業，都能很順利。

我也要感謝中原 AIKIDO 的成員們，感謝阿軟在考研究所、找指導教授、修業、畢業都一路互相分享心情與點滴，雖然最後你比我先走了一步，哈哈…不過我畢業你也退伍了，或許又能有許多事情分享了，還要感謝許多成員們，我怕把你們的名字打出來你們會不好意思！像是那個想跟我同時畢業的…你還有兩三年等我服完役還差不多？此外在最後的一年，很慶幸認識了一群小毛頭，自己應該知道我說的是哪些人吧！雖然你們可能看不到…哈，你們人太多，我為了公平起見也都不打名字上來了，以免你們以後見到我會無地自容，嘿嘿，你們的關心都在不斷的裱我(?)之中能夠讓我感受到，這在我畢業之後，我想還是會延續下去，好好的折磨你們的。

當然不能不感謝的就是蕾立，謝謝妳在我上台北的這段期間，總為我擔心，我沒吃飯妳就不開心，謝謝妳在我剛來台北的時候為我設想很多，也謝謝妳有數不清的次數安慰我的情緒，不然恐怕我早在第一年就放棄唸下去了吧，也真的要

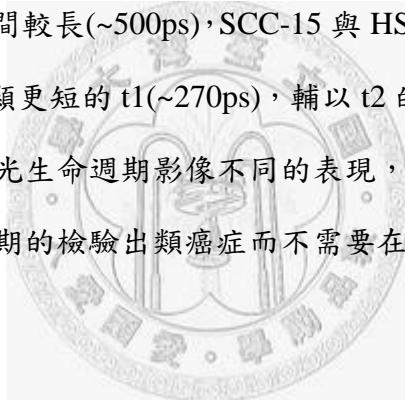
很感激你陪我去參加新加坡的研討會，讓我除了報告之外不用太煩惱其他交通等等的事情，只是辛苦你去了卻不太能到處去玩。在我碩二想要趕緊完成實驗 Data 的時候，也謝謝妳曾經半夜陪我做實驗，願意在外面等到我做完實驗，只為了擔心我會無聊，怕我沒吃東西，想拉我一起去吃點東西，也還要再謝謝妳無論如何總是站在我這邊，跟我一鼻孔出氣，我知道有時我不一定是對的，不過謝謝妳瞭解，我只是想要宣洩苦悶而已。

也要感謝中原大學的前學務長許政行教授、溫武義教授、鄭慧愷老師，如果不是因為教授們，我今天也沒有辦法完成這個學位，我會一直銘記在心的。

最後，一定要感謝的是家人，在這段期間內，家裡總是提供了非常多的支持，爸媽知道我事情很多，所以總是不會催促我回家，如果我說有事情要先做，就都完全配合我，這點真的讓我非常的感激，要不，我恐怕是苦悶又更苦悶吧！感謝姐姐、姐夫跟哥哥，謝謝你們都會不停的找我偶爾出去走走，雖然很多吐槽，不過這也就是我們的相處方式吧！謝謝你們總是跟我說趕快畢業，才能一起出去玩久一點，現在應該沒問題了！也要感謝爸爸在我入學前的奔波，其實，我也不希望帶給家裡太多的麻煩，因此在到台北這幾年來，我都很努力的學習自己做任何事，我想要在這段時間成長許多，其實有很多難過的時間，我不會對家裡說，因為我知道你們一定是會更擔心，我總希望能夠讓你們多放點心，不必為我們操心太多，我想，回應爸媽的栽培就是要讓自己能夠獨自處理更多事情，念了研究所不也為了讓你們將來能夠更放心？即使人不在家裡，我也能夠知道你們總是陪伴我的，再怎麼樣，家人都會提供最大的協助的，謝謝爸媽。

摘要

我們成功的以雙光子螢光生命週期影像之成份來辨別不同形態與階段的口腔癌細胞，並以單光子、雙光子螢光光譜與螢光生命週期研究了許多會造成其差異的因素。使用紅外光的鉻貴橄欖石飛秒鎖模雷射作為激發雙光子螢光的光源，可以避免在活體樣品中對細胞造成光傷害，並能有效的激發出細胞中膽綠素的紅螢光。我們以 DOK、OECM-1、SCC-15、HSC-3 及 SG 這五株人體口腔株化細胞株作為初步辨別，並以兩種生命週期(t_1 、 t_2)的成分來分析曲線。藉由細胞中紅螢光生命週期影像的表現，對應到膽綠素在細胞代謝中的差異，細胞中由於膽綠素代謝的能力不同，並會結合細胞中不同的蛋白而產生不同的生命週期，我們發現，DOK 與 OECM-1 的 t_1 時間較長(~500ps), SCC-15 與 HSC-3 相對的較短(~370ps)，而正常口腔細胞 SG 有明顯更短的 t_1 (~270ps)，輔以 t_2 的結果作分類，便可明顯的區別出五株細胞。藉由螢光生命週期影像不同的表現，我們未來可以在活體中檢測細胞的狀態，並可能早期的檢驗出類癌症而不需要在病變後才以粘膜來確認。



Abstract

We have observed the red fluorescence of five oral cell lines with multi-photon fluorescence lifetime and intensity. With lifetime trace, single photon, and two photon fluorescence spectrum, we found out that biliverdin is one of red fluorescence source (exciting spectrum peak around ~660nm). Four oral cancer cells from tongue and a non-cancer oral cell lines: S-G (normal oral cell as control group), DOK (pre-cancer oral cell), OECM-1, SCC-15, and HSC-3(different stage of malignancy) were investigated by a femtosecond Cr:forsterite laser -based multi-photon fluorescence lifetime image. Due to shift of metabolic status, we used two component to fit lifetime histogram and detected that DOK and OECM-1 has longer t₁ lifetime(~500ps), SCC-15 and HSC-3 have relatively short 370ps, and normal oral, S-G cells have much shorter t₁ lifetime(~270ps). In addition, S-G cell have visible shorter t₂ lifetime (~1.6ns), cancer cells general longer (~1.9ns). With our study result, we believe this lifetime of biliverdin fluorescence is potential to serve as an diagnostic index on the stage and malignancy of oral cancers in the future.

目錄

誌謝

摘要

第一章 緒論.....	1
1.1 細胞的能量代謝.....	1
1.2 瓦伯效應 (Warburg Effect).....	2
1.3 以 NADH / FAD 的代謝來診斷癌症.....	3
1.4 以紫質的代謝來診斷癌症.....	5
1.5 血基質代謝.....	7
1.6 膽色素的自發螢光.....	9
1.7 研究動機.....	9
第二章 基礎理論.....	11
2.1 螢光的激發.....	11
2.2 雙光子螢光激發.....	12
2.3 螢光生命週期影像(FLIM)系統.....	14
2.3.1 時間相關單光子計數技術(TCSPC)原理.....	14
2.3.2 恆比鑑別器(CFD).....	15
2.3.3 脈衝響應函數(IRF).....	17
2.4 株化細胞株.....	18
第三章 材料與方法.....	20
3.1 研究材料.....	20
3.1.1 細胞(Cell).....	20

3.1.2	標準品配製(Standard).....	21
3.1.3	細胞培養液配製(Medium).....	23
3.2	系統設置.....	24
3.2.1	光譜量測.....	25
3.2.2	聚焦位置定位方法.....	26
3.2.3	螢光生命週期量測.....	27
3.3	口腔癌細胞株.....	31
3.4	細胞培養.....	33
3.4.1	培養基的更換.....	33
3.4.2	繼代培養(Subculture).....	34
3.4.3	細胞冷凍保存.....	35
3.4.4	細胞解凍活化.....	36
3.5	微型細胞培養環境.....	37
第四章 實驗結果與討論.....	39	
4.1	雙光子螢光光譜.....	39
4.2	標準品螢光生命週期.....	40
4.3	口腔癌細胞的螢光生命週期影像.....	46
4.4	螢光生命週期累積統計圖表(Histogram).....	49
4.5	以螢光生命週期區別口腔癌細胞.....	51
第五章 結論.....	53	
文獻回顧(Reference).....	55	

第一章 緒論

1.1 細胞的能量代謝

正常分化狀態下的細胞，在代謝中需要藉由某些方式將葡萄糖分解以獲得細胞生長與代謝所需的能量，葡萄糖分解後獲得的能量通常會以不同的形式存在於細胞中，其中一種形式便是製造出一種稱為腺嘌呤核苷三磷酸(Adenosine triphosphate; ATP)的高能量化合物，ATP 是一種核糖核苷酸，可以較直接的供給細胞活動所需的能量，ATP 水解後，會失去一個磷酸根(Pi)而成為腺嘌呤核苷二磷酸(adenosine diphosphate; ADP)，並同時產生能量，其反應式為：



分裂旺盛的細胞在其代謝中，通常以無氧的乳酸發酵(Lactic Acid Fermentation)為其主要獲得 ATP 的方式(Gatenby RA et al., 2004)，如圖 1.1 上方的反應流程，此方式會將葡萄糖經由醣解作用後產生之丙酮酸(Pyruvic acid)經由乳酸脫氫酶(lactate dehydrogenase; LDH)直接轉換為乳酸(lactate acid)後直接排出細胞外，此過程中一分子的葡萄糖僅產生 2 個 ATP，此外，在細胞缺氧(Hypoxia)的狀態下，例如在肌肉組織運動中，細胞無法經由有氧循環來獲得能量，也會採用這種方式獲得 ATP(Matthew G. et al., 2009)；在正常細胞有充足的氧氣且分裂較不旺盛時，其主要獲取 ATP 的方式是藉由一種在粒線體中進行的有氧循環，如圖 1.1 所示，稱為檸檬酸循環(citric acid cycle)，此是把細胞獲得的葡萄糖(Glucose)經由醣解作用分解

為丙酮酸(pyruvate)與兩個 ATP 後，丙酮酸進入粒線體(mitochondria)中經由檸檬酸循環與氧化磷酸化反應(oxidative phosphorylation)與氧氣代謝產生 36 分子的 ATP，故一個分子的葡萄糖在經由有氧循環後可以獲得 36 個 ATP。

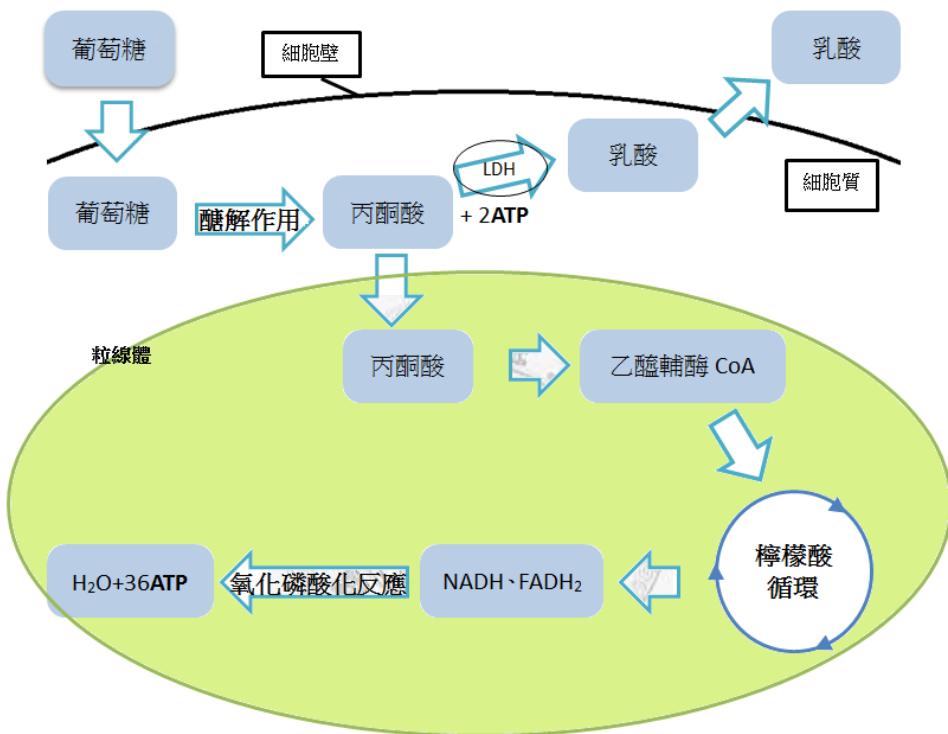


圖 1.1 細胞代謝葡萄糖取得能量的兩種方式

1.2 瓦伯效應 (Warburg Effect)

自西元 1924 年開始，德國的生化學家瓦伯(Otto Heinrich Warburg)做了三十年的細胞研究後，於 1956 年提出了一項重要的理論(Warburg O et al., 1956)，他首次認為癌症細胞之所以生長速度遠大於正常細胞，原因是由於兩者之間主要獲取能

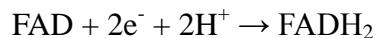
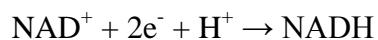
量的方式不同，瓦伯提出的理論是認為癌細胞的異常使得細胞提升了糖解作用，藉由大量的進行糖解作用來取得所需的 ATP，而癌細胞即使在正常的氧分壓下依然具有高糖解作用的特性。此外，分裂旺盛的癌細胞在糖解代謝上，走的是乳酸發酵的途徑(Peggy P. Hsu et al.,2008)。

瓦伯效應廣泛的出現在一般的癌細胞中，運用這個效應，糖解作用的增加可以成為一種偵測癌症存在的方式，由於無氧糖解作用的效益較一般經由檸檬酸循環差許多，癌細胞對於葡萄糖的需求量便會比一般細胞要高出許多倍，因此癌細胞此種特性運用在現今已廣泛使用的正子攝影技術(positron emission tomography; PET)，這種方式是使用帶有放射性的同位素弗-18 以合成方式合成與葡萄糖相似的分子，稱為弗化去氧葡萄糖(FDG)，將之注入體內循環至體內各處，由於癌細胞對葡萄糖的需求量大，在攝取大量的 FDG 時便會在正子攝影技術的影像上產生亮點，藉以在癌組織尚為小的時候檢測出來。PET 的優點是準確率高(約 92~98%)，並且靈敏度高，約群聚的癌細胞超過 0.5 公分時，便可容易的檢測出來，且使用目前並不會對人體造成顯著不良的影響。

1.3 以 NADH / FAD 的代謝來診斷癌症

在氧化磷酸化的糖解代謝途徑中，NADH 與 FADH_2 這兩種分子在細胞中扮演了一種能量貨幣的角色，也就是說由這兩種分子的含量可以代表細胞中最終獲

得能量 ATP 的多寡，在檸檬酸循環中，循環後期的產物乙醯輔酶會生成二氧化碳並脫出一個氫離子，這個脫出的氫離子與煙醯胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)及黃素腺嘌呤(FAD)反應，會生成 NADH 與 FADH₂，在獲得了氧氣之後進一步經由氧化磷酸化反應(呼吸作用)生成 ATP 與氫(產生的氫會再次與 NAD⁺與 FAD²⁻結合成 NADH 與 FADH₂的形式)，其氧化還原反應式如下：



這是一個在粒線體中發生的電子傳遞鏈過程(electron transport chain)，這個過程中 NADH 與 FAD 會與粒線體內膜表面的蛋白質結合並產生交互作用，由於 NADH 與 FAD 均為內生性螢光物質，這些與環境蛋白質或分子的結合狀態，會影響他的螢光生命週期，因此便可以以 NADH 與 FAD 的螢光性質來檢測細胞代謝中部份的狀態(Ahmed A Heikal, 2010)，由於當未鍵結的(free) NAD⁺濃度逐漸變高時，FAD 的濃度變也會逐漸的升高，這說明了細胞的呼吸作用旺盛，因而產生許多的 NAD⁺與 FAD，由呼吸作用的代謝旺盛，可以探討細胞代謝的表現。

一般 NADH 分子的螢光有短的與長的兩種生命週期，其中短的是未與其他物質結合的(free) NADH，長的是蛋白結合(protein-bound)狀態下的 NADH (Joseph R. Lakowicz. et al., 1992)，這些現象已經以細胞實驗(Melissa C. et al., 2007)測試過，利用細胞中的內生性分子 NADH 與 FAD 的螢光生命週期影像(fluorescence lifetime

image; FLIM)也可以量得 NADH 的微環境狀態並診斷是否上皮細胞出現異常增生或癌前病變，並透過 NADH/FAD 螢光生命週期的量測，推得 NADH/FAD 的比例，此研究結果認為，當上皮細胞由正常狀態逐漸走向癌症病變或角質增生，NADH 的生命週期會逐漸的變短(free state)，而 FAD 的結果則顯示生命週期逐漸變長，單獨觀察長的生命週期(t_2)的話，正常細胞的生命週期會較長(約 2ns)，而在高密度與低密度的癌細胞皆較正常細胞為短(約 1.5~1.8ns)，這些研究說明了生物體中代謝的內生性的螢光分子可以做為診斷，判別細胞或組織是否走向惡性的狀態。



1.4 以紫質的代謝來診斷癌症

除了 NADH，在人類口腔癌的組織，也發現有紫質(Porphyrin;或稱為卟啉)的代謝異常，紫質的代謝是從檸檬酸循環的後端產物琥珀酰(succinyl)甘氨酸(glycine)開始，兩者合成了 δ -ALA(aminolevulinic acid)，兩個 ALA 生成紫質膽色素原(Porphobilinogen)，然後再成為羥甲基(Porphobilinogen)，接著羥甲基便合成成為尿紫質(Uroporphyrin III)，再放出四個二氧化碳後形成糞紫質(Coproporphyrin)，代謝產物回到粒線體，再形成原紫質(protoporphyrin)此時若原紫質能夠獲得鐵離子，變成構生成亞鐵螯合酶(ferrochelatase)而生成血基質(Heme)，細胞如果沒有足夠的能力以代謝原紫質，紫質(PpIX)便會累積，一般說來，由於癌症細胞的代謝速率比一般細胞快，所以產生紫質的速率也會較快，細胞來不及代謝掉生成的紫質，紫質

便開始累積(accumulation)，紫質(PpIX)在累積之後，原先微弱的 UV 激發螢光便會累積而增強，於是便可以用光偵測器檢測出累積的位置，即是癌症的位置。此外癌症的紫質螢光生命週期也會有所不同，為了檢測螢光生命週期，可以使用ALA-treat，即加入大量的 ALA 以產生更多的紫質以利觀測，以螢光生命週期的判別找出癌症的部位。這些方式說明了細胞中的另一種內生性螢光物質紫質也被廣泛的結合螢光生命週期用以檢測生物體中的狀態。

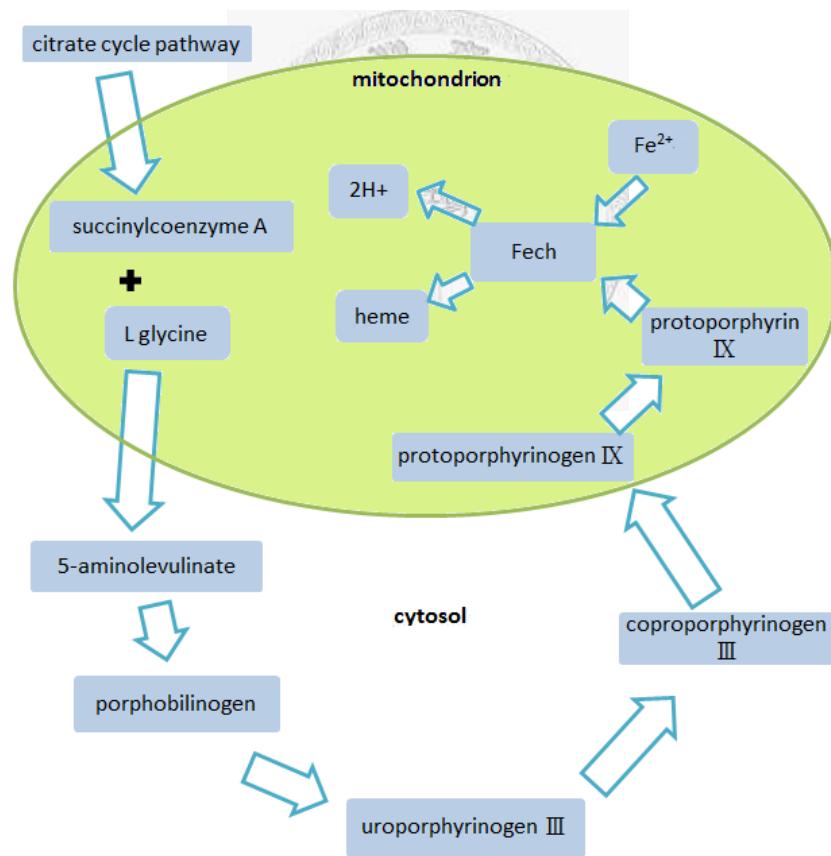


圖 1.2 紫質的代謝循環過程

1.5 血基質代謝

由於紫質在口腔癌的異常代謝，可以推測其下游的血基質代謝也可能會有異常的，血基質是架構血紅素(Hemoglobin)重要的輔基(prosthetic groups)，血紅素是由四個血基質與四條多肽鏈(polyptide)與鐵所組成，大部分在網狀內皮細胞中的鐵離子是由血液攝取或直接在細胞內經由血紅素降解所產生，如圖 1.3，血液中的鐵是由腸道攝取的鐵質經由膜鐵轉運蛋白(ferroportin)與亞鐵氧化酶(hephaestin)形成可在血液中自由傳遞的轉鐵蛋白(apotransferrin)後進入細胞使用，而細胞代謝後產生的鐵離子又再運輸到骨髓中重新造血生成新的血紅素以供循環再利用。

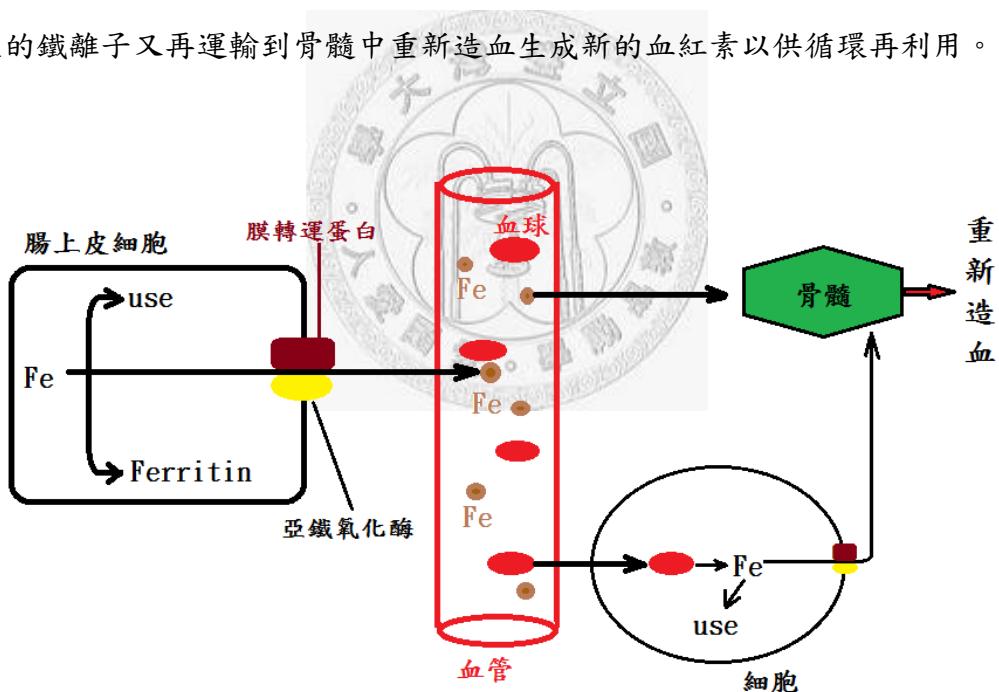


圖 1.3 鐵離子的代謝循環

細胞中血基質的降解是在經由血紅素氧化酶(Heme oxygenase-1; HO-1)的作用下，會產生細胞色素膽綠素(biliverdin; BV)，膽綠素是細胞代謝後的廢棄物，需要

被細胞排除體外，所以會再由膽綠素還原酶(biliverdin reductase; BVR)與與輔酶NADPH 還原成膽紅素(bilirubin; BR)，在此過程中也仍會有部分的膽紅素再被ROS氧化成為膽綠素，形成膽紅素與膽綠素的氧化還原循環過程，此一循環已經被證實是細胞中清除自由基的一種機制(Valko M et al., 2007)，由於膽紅素的親水團在分子中形成六個分子內氫鍵，因此膽紅素是非極性的脂溶性分子，但對白蛋白(Albumin)有極高的親和力，可以經由載體蛋白移出細胞膜後被血液中的白蛋白結合，經由血液運輸並排泄，細胞的正常工作狀態也影響了膽綠素與膽紅素的代謝循環是否正常，所以若是細胞上游的代謝機制產生問題，血基質的代謝也很有可能產生問題導致膽綠素與膽紅素的特性異常。

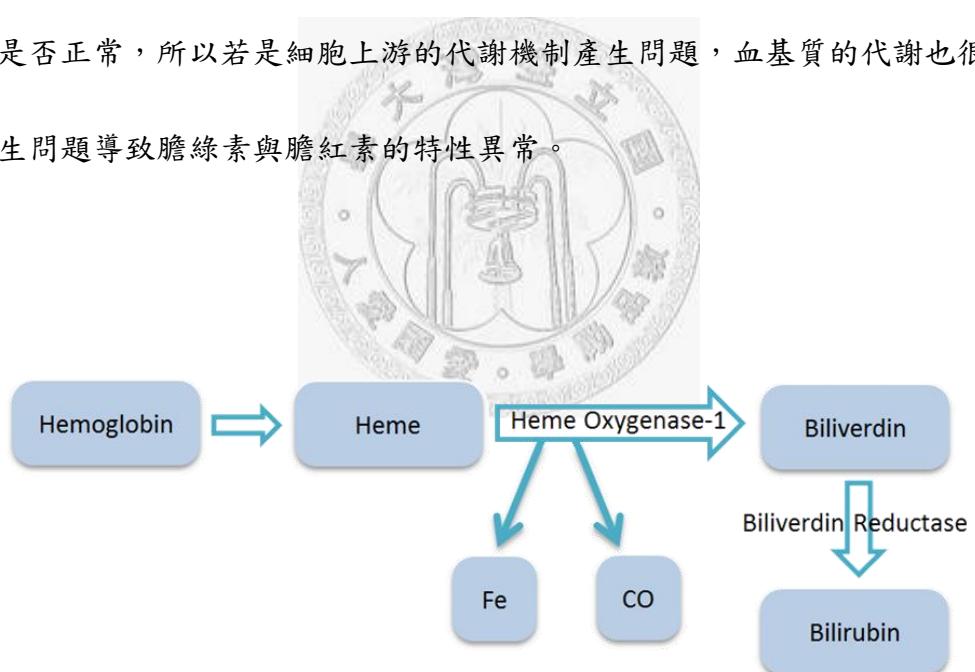
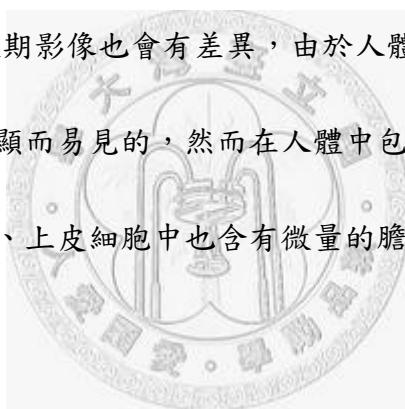


圖 1.4 血基質與膽色素的代謝流程

1.6 膽色素的自發螢光

目前已有越來越多的研究顯示膽色素也是一種生物體的內生性螢光物質，膽紅素與膽綠素原先是細胞代謝後的廢棄物，但其螢光表現近年來漸漸的被重視，從文獻中可知，膽綠素的螢光放光中心波長約在 680nm 附近(Dortay H et al., 2011)，膽紅素約在 534 ± 3 nm(Glushko V et al., 1982)，有研究顯示可以在肝癌組織切片中觀察腫瘤切片與正常肝臟組織中的膽紅素螢光強度與螢光生命週期，結果發現肝臟切片在腫瘤的情況下螢光強度比正常組織切片還要弱許多(Tzu-Ming Liu et al., 2011)，此外在螢光生命週期影像也會有差異，由於人體中大多數的膽色素都在肝臟中，所以此研究結果是顯而易見的，然而在人體中包括血液中運送膽紅素的白蛋白也含有大量的膽紅素、上皮細胞中也含有微量的膽紅素與膽綠素，亦可能有許多研究的價值。



1.7 研究動機

從這些相關的資訊中，由於癌症細胞與正常細胞在代謝上的異常，將可以藉由一些特定分子做為指標分辨出正常細胞與癌細胞，從已知的背景知識得知，癌細胞從獲得能量的主要方式便與正常細胞有所不同，相對必定影響到能量代謝循環中某些分子的濃度會不同，若可以以光學的方式檢測出其中之一是哪種分子，並且能明顯的判別出差異，未來將可能會成為一種新的癌症檢測指標。此外因為

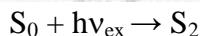
癌細胞由紫質合成成為血基質的過程可能會產生異常，在代謝上游的過程中發生異常，我們可以合理的猜測代謝下游的分子也會產生異常，或許由於血基質合成的效率不同，更下游的分子表現也會不同，目前膽紅素與膽綠素是我們在先前的研究中已知會產生紅螢光的內生性物質且位於代謝的末端，我們預測在末端的表現差異有可能會更明顯，因此我們想要知道是否有可能從膽色素的螢光表現做為診斷的切入點，並且注重在膽綠素對於惡性與正常細胞間表現的差異，藉由單獨激發膽綠素的雙光子螢光光譜以對照同樣條件下癌細胞的雙光子螢光光譜，有無吻合的光譜形狀，以確認目標分子膽綠素是否為可行的量測目標，而先前的資訊也顯示有許多學者以螢光生命週期影像(FLIM)做為螢光光譜之外的另一個靈敏的螢光分子特性檢測工具，所以我們希望藉由螢光生命週期影像量測體外培養的株化口腔癌細胞，初期研究條件較單純的株化口腔癌細胞之螢光生命週期，並探討膽綠素與其他蛋白質之間作用的表現是否是造成螢光生命週期差異的原因。

第二章 基礎理論

2.1 螢光的激發

螢光最早在 1852 年由 George G. Stokes 所發現(Anthony W. Czarnik, 1994)，他在研究中發現某些特定物質能夠吸收光並產生另一種不同波長的光子，於是將之命名為螢光。自然界中有許多的螢光物質，可能由光激發的過程被激發出螢光，此種分子在常溫下電子大多處在穩定狀態(Steady State)，此時的電子能階為基態(S_0)，能量最低且最穩定，而每一種螢光分子都會吸收某些特徵頻率波段的光子，

依此人們能夠以各種波長的光波來測試此分子對於各波長會吸收多少，稱為螢光分子的吸收光譜(Absorption spectrum)。當此分子吸收了特定頻率的光子後，原先能階位於穩態的基態電子獲得了光子的能量後會產生電子躍遷(B. Stevens, 1962)而變成第一激發態(S_1)與第二激發態(S_2)等，即：

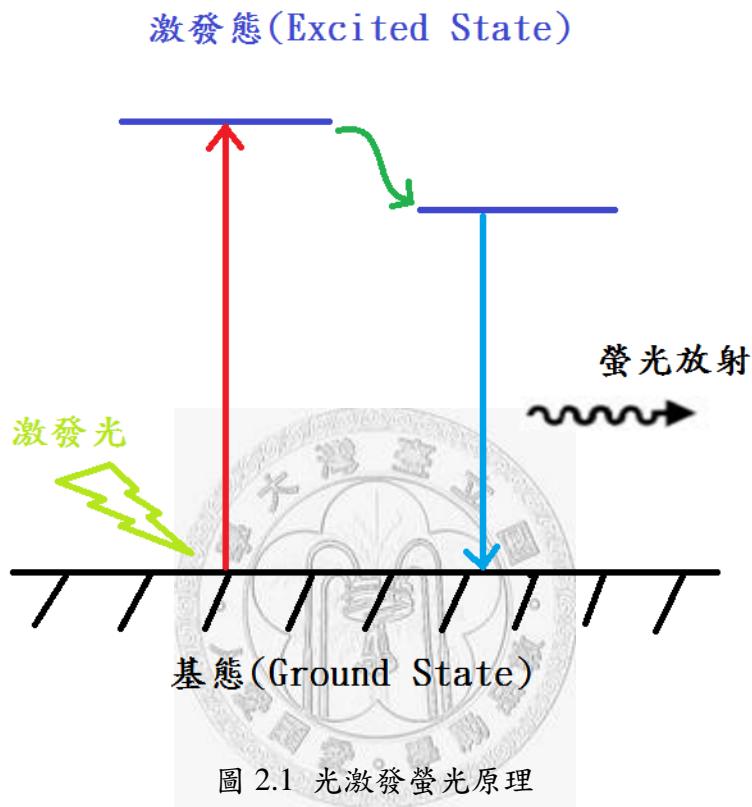


其中 h 為普朗克常數， ν_{ex} 為吸收光頻率。較高的激發態通常會迅速的以無輻射躍遷方式降落至第一激發態，部分的能量便在第一激發態中互相碰撞而消滅掉，留下大多位於第一激發態的電子，在停留數個奈秒(ns)後便會降回基態，此過程中多餘的能量便會以光的形式輻射出來，此即為螢光，激發過程如圖 2.1 所示。

反應式如下：



其中 v_f 為散射出的螢光頻率。以光譜儀接收輻射出的螢光後可以獲得螢光光譜(Excitation spectrum)。



2.2 雙光子螢光激發

在 1931 年 Maria Goppert-Mayer 便已預測出雙光子激發螢光的原理(Göppert-Mayer et al., 1931)，不同於常見的單光子激發，雙光子激發方式是指螢光分子同時吸收兩個激發光光子而躍遷，如圖 2.2 所示，例如同時吸收頻率為 v_1 與 v_2 的兩個光子，吸收到的能量就等同於頻率為 $v_1 + v_2$ 的單光子激發光，但雙光子激發需要同時被兩個光子激發，所以其躍遷率(Transition rate)受激發光強度(E_{tp})的影響

(Sauter et al., 1996)，螢光強度(I_{tp})表示式如下：

$$I_{tp} = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{\epsilon_0}{\mu_0}} |E_{tp}|^2$$

因此， $I_{tp} \propto E_{tp}^2$ ，又因為雙光子的吸收截面很小，所以如果有較強的激發光，則需要比較高的瞬間激發功率才容易激發出螢光，因此激發光通常需要使用到脈衝雷射。此外由於激發光(或入射光)的波長越長，穿透深度會越深，而需要以兩倍波長來激發螢光的雙光子激發方式恰好能有較長的入射光波長，雙光子激發的優點在於對樣本能夠有更深的穿透深度，

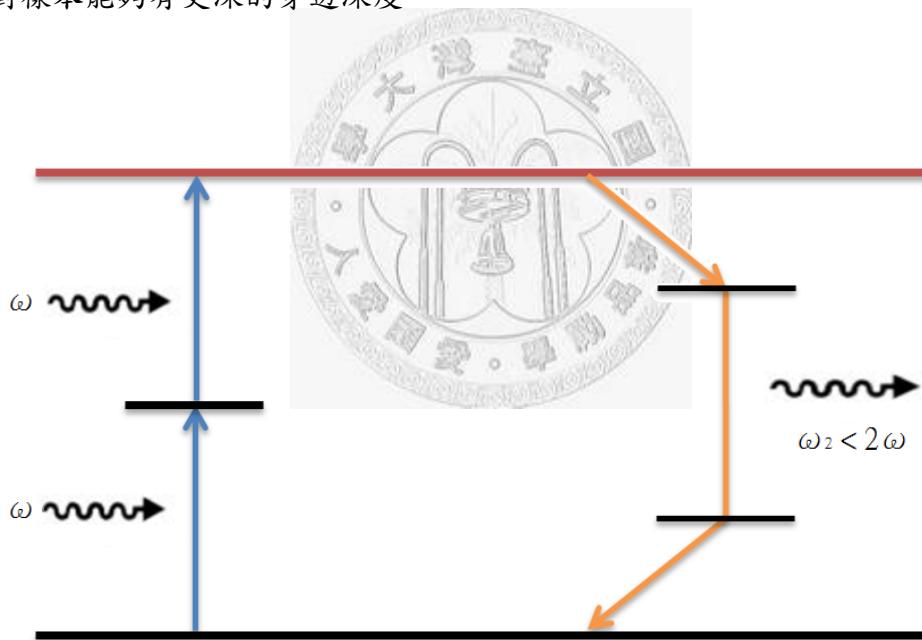


圖 2.2 雙光子螢光激發原理示意圖

2.3 螢光生命週期影像(FLIM)系統

2.3.1 時間相關單光子計數技術(TCSPC)原理

螢光生命週期影像系統主要使用 TCSPC(Time Correlated Single Photon Counting)的系統，基本原理在於紀錄低強度、訊號重複率高的訊號時，由於光訊號非常微弱，意味著光子的數量並不是非常多，所以在每一個訊號探測的週期中能夠偵測到一個光子的機率趨近於零，我們統計在每個訊號週期中偵測到的一個光子，並記錄下它們在訊號週期中相對於參考脈衝函數發出後的時間點，以此來建立一個偵測到光子的時間分布長條圖(S. Kinoshita et al., 1981)，如圖 2.3 所示。

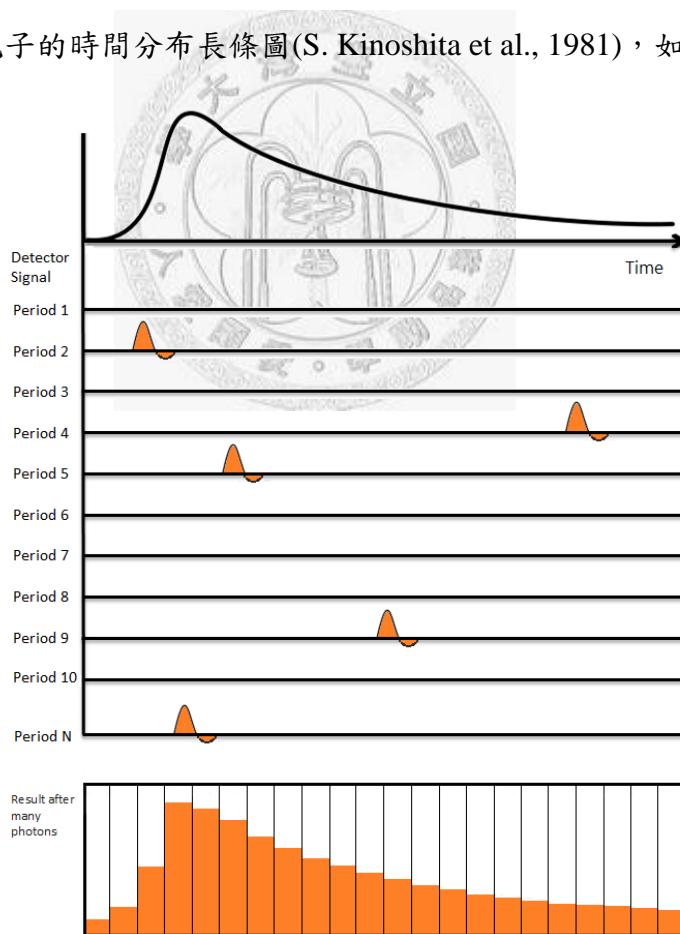


圖 2.3 TCSPC 技術的基本原理

2.3.2 恒比鑑別器(CFD)

由於一般從探測器(PMT)對訊號的放大過程具有隨機性，因此所輸出的脈衝就會產生幅度抖動，意即放大倍率的差異會造成脈衝上升時間(Raise time)與速率的不同，對於簡單的鑑別器來說，一般輸入脈衝上升到到達設定的閾值時就會觸發，而幅度抖動就影響到觸發閾值的時間點會有所不同(Wolfgang Becker et al., 2003)，如圖 2.4 所示，如此一來訊號的強弱不同，脈衝上升時間不同，便影響到測量時間的精準度。

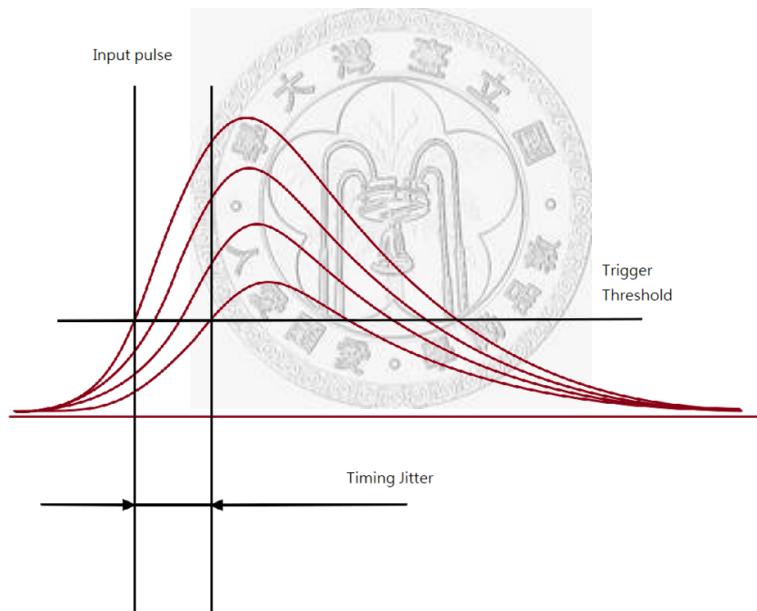


圖 2.4 幅度抖動造成的誤差

為了解決幅度抖動造成的时间誤差，TCSPC 系統使用了恒比鑑別器(Constant-fraction discriminator, CFD)，CFD 的時間觸發是在某個脈衝幅度固定比例處，因此 CFD 將收到的脈衝延遲一個時間相位，再以差分的形式相減，在相減後

的波形中，通過零點的地方是由於延遲前後的波形高度已是在固定值，如圖 2.5 所示，因此若觸發點決定在過零點處，便與放大器增益的不同幅度無關，從而解決了幅度抖動的問題，TCSPC 由於使用了恆比鑑別器(CFD)，能夠非常準確的測量到處發點的時間參數(A Kilpelä et al., 1998)。

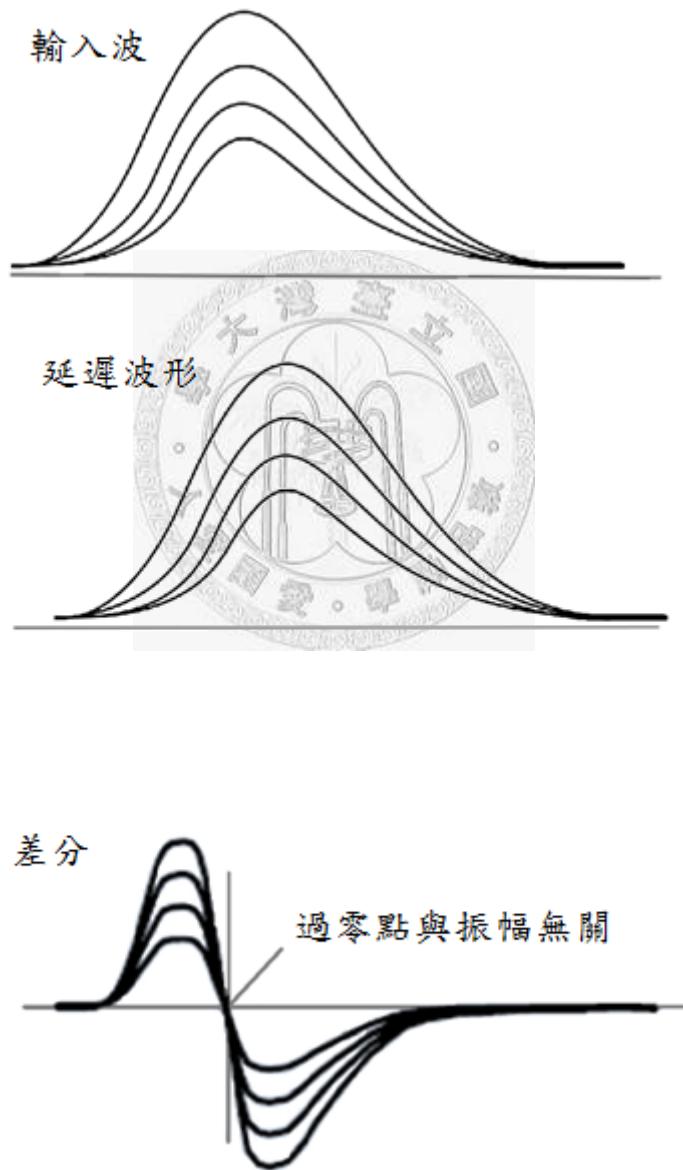


圖 2.5 恒比鑑別器以差分的形式修正了幅度抖動

2.3.3 脈衝響應函數

TCSPC 的儀器有效分辨率(resolution)決定於其儀器的響應函數(instrument response function, IRF)，若想要測量螢光生命週期，也需要測量適當的 IRF，然後將螢光衰減曲線 $F(t)$ 和 IRF 做褶積運算(Convolution)表示式如下：

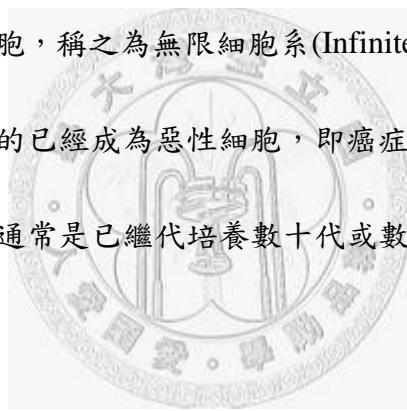
$$M(t) = \text{IRF}(t) * F(t)$$

如此便可以得到螢光衰減的生命週期 $M(t)$ (D. V. O'Connor et al., 1984)。IRF 函數中包括激發光源的脈衝波型、光路系統中造成的散射影響、及電路系統的誤差等等...，因此根據想要達到的量測精準度，量測到越短的 IRF 能夠有較高的時間分辨率。而在 TCSPC 的技術中，平均每個訊號週期測量到的光子數目應該在 0.1 到 0.01 個之間，因此訊號的光強度不能過高，避免過多的光子數量，如果計數率太高，就有可能使訊號重疊而產生堆積效應，測得的訊號就會失真，因此在測量 IRF 的時候也不能以過強的訊號測量。

測量 IRF 時，通常會需要一個參考樣品(J. R. Lakowicz et al., 1999)，將此樣品被激發出的光訊號導入光路中，再由偵測器接收這個訊號，而此樣品的螢光光譜波長越為近似所需量測到的螢光波長越好，如此一來其光訊號特性越接近，比較不會有其他的變因影響，通常較理想上會使用能激發出單純的二倍頻或三倍頻訊號的樣品。

2.4 株化細胞株

目前已知的細胞株，是指一些型態比較均一，生長增值穩定且生物性狀態清楚的細胞，則文獻中稱為已鑑定的細胞。首先在細胞純化的過程中，第一階段便是初代培養，是從體內取出的細胞、組織或器官並進行第一次的培養，而初代培養的細胞一旦經過了繼代培養(Subculture)，便稱之為細胞系(Cell Line)，若細胞系的生存期限有限，則稱為有限細胞系(Finite Cell Line)，這種細胞能夠繼續繼代培養的次數或稱代數有限，包括正常組織細胞等可能逐漸老化的細胞；此外若是已經獲得無限繁殖能力的細胞，稱之為無限細胞系(Infinite Cell Line)，無限細胞大部分都已經生長異常化，有的已經成為惡性細胞，即癌症細胞(Tumor Cell)，腫瘤細胞大多是類上皮型細胞，通常是已繼代培養數十代或數百代以上，具有不死性和異體接觸致瘤性。



能夠建立為細胞株並被學術界所接受的細胞，通常有一些要求：組織的來源必須確定、來自人類或老鼠或其他、原生者的年齡性別、取出的器官或組織部位、固定的細胞型態、適應的培養積極培養條件與方式等。

細胞純化的過程中，首先就是取材，通常由外科手術或剛切除的組織腫瘤，取密度較高且活力較好的部分，經患者同意後培養，以胸腹水或腫瘤淋巴結作為初代培養環境，在腫瘤組織中常有混雜的纖維細胞，培養時也會一起成長，使得想要培養的細胞成長受阻，因此會在培養過程中予以除去，首次於體外培養的細

胞其實存活不易，要能夠建立到繼代培養更是困難，因此首次繼代時需要適應新環境的培養，這時通常會有一些輔助措施，例如先在培養盤底部塗上能幫助各種細胞生長的因子等，如果能夠順利地繼代成功，便能夠成為一株新的細胞株而被持續的培養並供為動物實驗或人體實驗前的研究先驅。



第三章材料與方法

3.1 研究材料

3.1.1 細胞(Cell)

本論文中使用的口腔癌細胞株為 DOK、OECM-1、SCC-15、HSC-3，以及做為控制組的正常口腔細胞 S-G 共五株，其細胞來源如表 3-1。

細胞簡稱	細胞全名	來源
DOK	Dysplastic oral keratinocyte	國立成功大學口腔醫學研究所 謝達斌醫師實驗室
OECM-1	Oral epidermoid carcinoma cell Meng-1	國立成功大學口腔醫學研究所 謝達斌醫師實驗室
SCC-15	Squamous cell carcinoma-15	國立成功大學口腔醫學研究所 謝達斌醫師實驗室
HSC-3	Oral squamous carcinoma cell line with high metastatic potential	國立成功大學口腔醫學研究所 謝達斌醫師實驗室
S-G	Smulow-Glikcman gingival cell	國立台灣大學臨床牙醫研究所 陳敏慧醫師實驗室

表 3-1 口腔細胞全名與來源

3.1.2 標準品配製(Standard)

為了探討螢光來源與成因，我們配製了數種與膽紅素螢光相關的蛋白分子以做為測試使用，購買廠商與配製方法如下：

膽綠素鹽酸鹽(Biliverdin hydrochloride)

購自 Forntier Scientific，分子量 619 道耳吞，配置 500 μ M 膽綠素方法：

取 1g 的氫氧化鈉(NaOH)加入 9ml 的二次水(ddH₂O)至完全溶解，再以微量天秤量取約 3.01mg 的 Biliverdin hydrochloride 粉末加入氫氧化鈉水溶液，搖晃至膽綠素鹽酸鹽完全溶解，最後以少量 EDTA 滴定至 pH7.5，然後續加少量二次水至 10ml。



最後以二次水稀釋至 400 μ M、200 μ M、100 μ M、40 μ M、20 μ M 等濃度分裝以備量測。

光氧化膽紅素氧化物(Bilirubin Oxidants)

配製膽紅素溶液：使用膽紅素鹽酸鹽(Bilirubin hydrochloride)，購自 Sigma，分子量 584 道耳吞，取 1g 的氫氧化鈉(NaOH)加入 9ml 的二次水(ddH₂O)至完全溶解，再以微量天秤量取約 2.5mg 的膽紅素鹽酸鹽粉末加入氫氧化鈉水溶液，以震盪器(Vortex)搖晃至膽紅素鹽酸鹽完全溶解，最後以少量稀釋十五倍的鹽酸(HCl)滴定至 pH7.5，然後續加少量二次水至 10ml。

將配製好的膽紅素溶液置於光照下 48 小時，進行光氧化

(Antony F. McDonagh, 1972) (R Bonnett and J C Stewart, 1972)，獲得膽紅素氧化物溶液，如圖 3.1，左管為未經光照下的膽紅素溶液，右管為同批配製的膽紅素溶液經過 48 小時的光照後成為氧化物，呈現綠色。

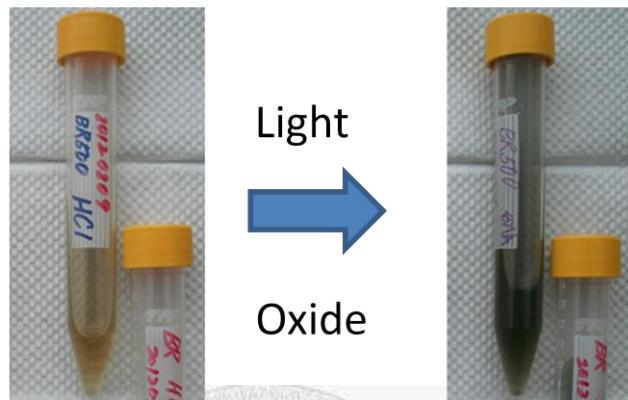


圖 3.1 光氧化膽紅素照光後與未照光的對照組

膽綠素還原酶(Biliverdin Reductase A)

購自 Sigma，分子量 33.3k 道耳吞，批次重量 50 μg ，取含量 50 μg (產品已將 50 μg 粉末溶於緩衝溶液中)的膽綠素還原酶溶液，加入二次水(ddH₂O)至 37 μl 稀釋後，可得濃度 40 μM 的 Biliverdin Reductase A

胎牛血清(Fetal Bovine Surem)

購自 GIBCO，取 FBS 0.5ml，加入二次水稀釋至 5ml (模擬一般細胞培養液含量，為 10%FBS)

人體血紅素加氧酶(Heme Oxygenase -1)

購自 Enzo Life Science，分子量 32k 道耳吞，批次重量 50 μg ，取含量 50 μg (產品已將 50 μg 粉末溶於緩衝溶液中)的血紅素加氧酶，加入二次水至 40 μl 稀釋後，

可得濃度 40 μ M 的人類血紅素加氧酶溶液。

脂質(Lipid)

來源自台灣大學分子生物學研究所，配製好濃度 40 μ M 溶液。

量測前將配置好濃度的 BVR、HO-1、FBS、lipid 分別取 40 μ M 與膽紅素氧化物 40 μ M 以 1：1 的比例混合，可得到 20 μ M 的 BV-BVR、BV-HO、BV-lipid 及 BV-FBS(一般細胞培養環境下的 FBS 含量)。

3.1.3 細胞培養液配製(Medium)

細胞株的培養上，根據細胞來源的實驗室所提供的培養基與培養液配製方法如下表 3-2 所示：

細胞簡稱	培養液
DOK	DMEM +FBS10%+PSF1%+400ng/ml Hydrocortisone+ 2mM Glutamine
OECM-1	RPMI1640+FBS10%+PSF1%
SCC-15	DMEM/F12 +FBS10%+PSF1%+400ng/ml Hydrocortisone
HSC-3	MEM+FBS10%+PSF1%
S-G	RPMI1640+FBS10%+PSF1%

表 3-2 細胞培養液對照表

抗生素(PSF)使用 Antibiotic-Antimycotic solution，購自 Sigma。

RPMI1640、MEM、DMEM、DMEM/F12，購自 GIBCO。

Hydrocortisone、Glutamine，購自 Sigma。

3.2 系統設置

我們使用中心波長在 1230nm 的飛秒鎖模雷射做為螢光激發光源(S.-W. Chu, et al., 2001)，輸出功率約為 500mw，經由兩個光圈(Iris)校正光路的水平與垂直的準直方向，校正完光路後於光路中放置功率衰減器(ND filter)，將出物鏡之功率降至 40mw 以避免傷害樣品或造成光漂白(Photo bleach)，激發光源校正完後進入掃描單元(Scan Unit, FV300, Olympus)，掃描單元內主要有兩個高反射鏡，用以由程式控制掃描焦點的移動，其中一個控制水平方向，另一個控制垂直方向的掃描，通過掃描單元後的雷射進入倒立顯微鏡系統後，穿過 865nm 的分光鏡(Dichroic Beam Splitter)，由物鏡(60X, NA0.9 水鏡，Olympus)聚焦後激發樣本上的螢光，如圖 3.2。



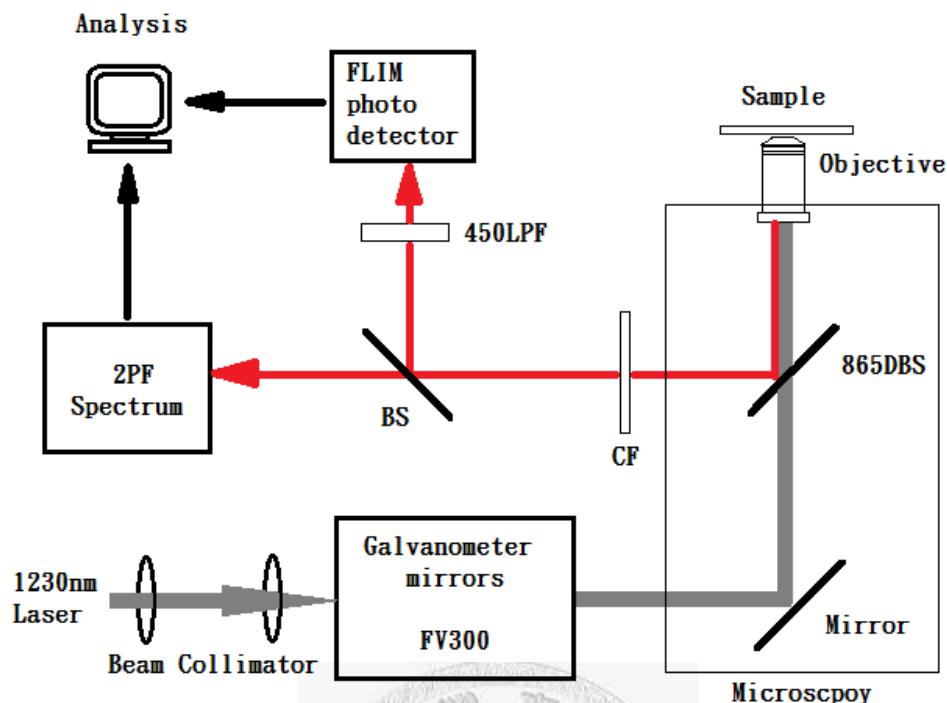


圖 3.2 實驗系統光路圖

3.2.1 光譜量測

為了量測樣品激發出的雙光子螢光波段與波形，我們以頻譜儀(Spectrum；型號 ANDOR, Newton, model: SR-303i-B)量測螢光光譜，螢光經由物鏡收集後，如圖 3.2 所示，我們所欲接收的紅螢光訊號會被 865nm 的分光鏡所反射到另一條接收光訊號的路徑中，經由一個色濾鏡(Color filter；KG-5)濾除掉夾雜的 1230nm 激發光訊號(fundamental)，再導向頻譜儀(Spectrum)接收，頻譜儀的光譜擷取範圍在 330nm 至 865nm 之間。

使用頻譜儀方面，為了降低儀器高溫造成訊號的雜訊，要先設定頻譜儀的溫度調降為 -70 度，頻譜儀內的冷卻器(Cooler)會持續將溫度維持在 -70 度。在光路的

校正上，我們使用葉子做為校正的樣本，由於 1230nm 飛秒雷射光能明顯激發出葉子很強的紅螢光，因此我們以頻譜儀接收激發葉子後的訊號，由收到的訊號強度與形狀確認光路是否準確的導向並會聚至頻譜儀的狹縫(slit)，要使頻譜儀接收到的訊號最佳，我們調整光路至葉子的頻譜強度(counts)至少在 20000 以上，葉子頻譜如圖 3.3 所示，如此可以確保微弱的樣本訊號也能容易的接收到。

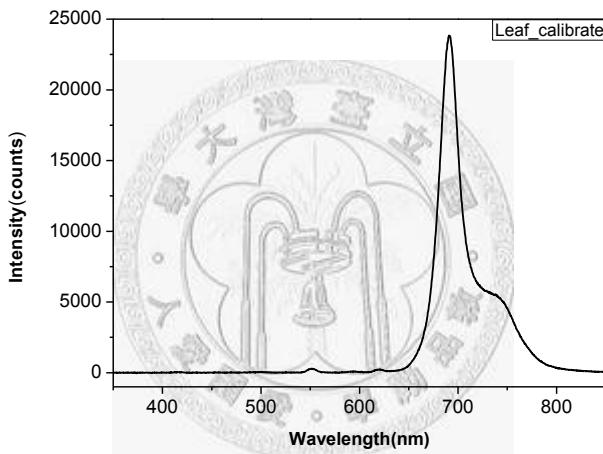


圖 3.3 校正頻譜儀光路後的葉子螢光光譜

3.2.2 聚焦位置定位方法

為了確認雷射確實聚焦在細胞或標準品樣本的內部，我們先在倒立顯微鏡系統放上一片蓋玻片，由雷射直接激發玻片上緣的介面三倍頻，在 1230nm 的激發波長下，三倍頻的波長為 410nm，以頻譜儀確認焦點是否位於介面上，介面三倍頻的頻譜如圖 3.4 所示，確認聚焦在玻片上緣後，我們以整合的系統之電動平台將焦

點向上調整 $10\mu\text{m}$ ，此即為本研究中固定的聚焦深度(z 方向)。

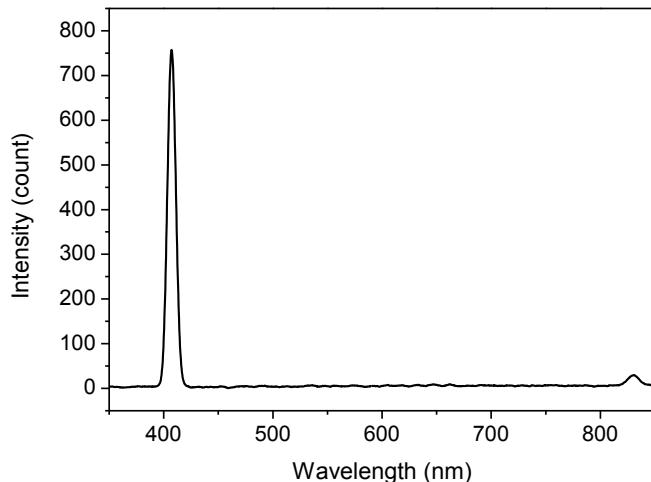


圖 3.4 介面三倍頻的頻譜

3.2.3 螢光生命週期量測

樣品的雙光子螢光在經由 865nm 的分光鏡分出 865nm 以下的螢光訊號，再經由色濾鏡(KG-5)濾除掉可能夾雜的基頻光之後，由於在不連續的介面皆會產生三倍頻(Third-harmonic-generation；THG)訊號(Chi-Kuang Sun et al., 2004)，波長為基頻的三分之一，410nm，在玻片與水的介面上也會被激發出介面三倍頻(Surface Third-harmonic-generation；THG)，為了除去此非螢光的訊號，接收螢光訊號時會再使其通過一個 450nm 高通的濾鏡(450nm long pass filter；450lp filter)後，由螢光生命週期影像系統的接收器(PMC-100-1, Becker & Hickl)接收並計算螢光生命週期或影像等訊息，系統校正時仍以葉子來調整光路是否聚焦在偵測器上，微調聚焦透鏡使面板上顯示的光子訊號強度為最大。

螢光生命週期影像系統的主系統 SPCM 控制面板如圖 3.5 所示，左下角色條為訊號的強度量表，我們使用到的 SPCM 模式為 Single 與 Scan Sync In 兩種，其參數設定如圖 3.6 所示，在量測單一衰減曲線(Single trace)時，ADC resolution 設定為 4096，積分時間(Collection)通常使用 60 秒，在螢光訊號較弱的時候，我們通常使用 Single trace 模式來量測單一衰減曲線，以維持足夠的光子數據。樣本訊號強度較強的時候，便可以選用影像模式(Scan Sync In)，並需將 ADC resolution 設定為 256，掃描範圍(Scan pixels X、Y)均設定為 256，在此論文中積分時間都是使用 900 秒。

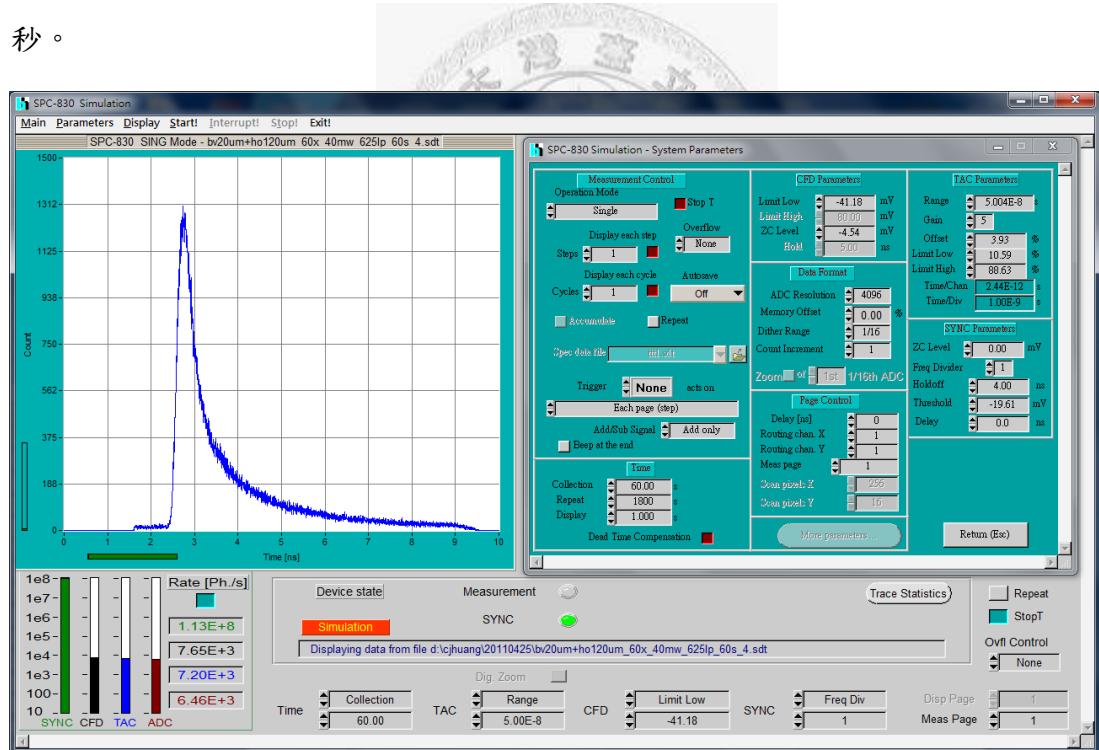


圖 3.5 螢光生命週期影像系統的操作軟體介面

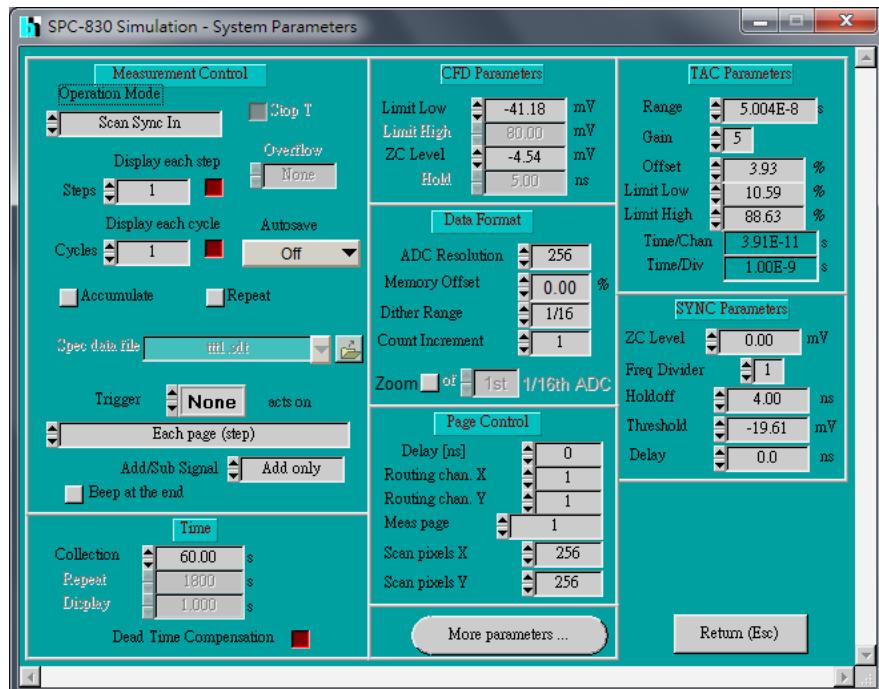


圖 3.6 螢光生命週期系統的參數設置面板

我們在螢光生命週期影像系統上使用倒立顯微鏡(IX-71)，並使用掃描單元的控制系統為 FLUOVIEW，掃描單元型號為 FV-300，在生命週期影像的量測(Scan Sync In mode)時，為了使 FLUOVIEW 與螢光生命週期系統的影像同步，在掃描單元的視野上使用 2 倍(2x)，並使用 FLUOVIEW 的中等(medium)掃瞄速度，如此一來在 FLUOVIEW 與 FLIM 系統的影像畫面視野皆為 $240\mu\text{m} \times 240\mu\text{m}$ ，在畫面中每一個像素的積分時間(pixel time)為 $3.7\mu\text{s}$ ，在此論文中使用雷射源的重複率(repetition rate)為 110MHz ，可以分辨出低於 9.09ps 的生命週期。

在第二章提到，螢光生命週期的分析中，我們需要以一個參考函數與量測到的衰減函數做褶積運算，此函數為單衝響應函數(Instrument response function; IRF)，

在量測單衝響應函數，我們使用由國立成功大學化學系葉晨聖老師所提供的矽奈米粒子(C.-C. Huang et al., 2011)做為樣本，由於此奈米粒子乾燥後，在我們的雷射系統激發下會產生強烈的二倍頻(Second-harmonic-generation；SHG)，我們選擇此奈米粒子做為單衝響應函數是由於二倍頻為同調(coherent)非線性效應，訊號即時的產生而沒有生命週期，其產生的二倍頻訊號能顯強烈且二倍頻波長為 615nm，與此論文中研究的紅螢光波長(~680nm)極為接近，最為適合當作響應函數使用，此奈米粒子的二倍頻頻譜如圖 3.7 所示，附近並無多餘的螢光干擾單衝響應的量測。

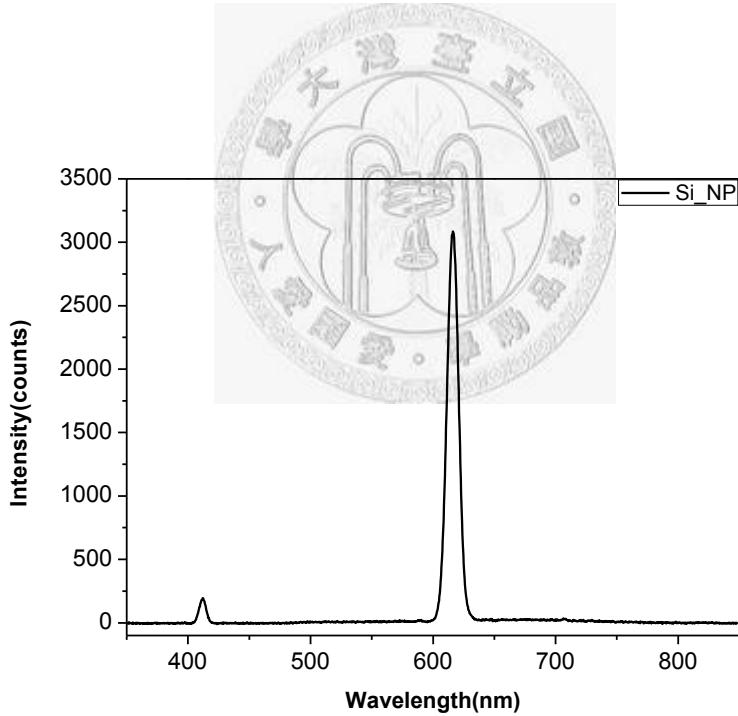


圖 3.7 做為單衝響應函數的矽奈米粒子光譜

3.3 口腔癌細胞株

本論文中所使用的五株口腔細胞株均取自人類，分別為不同階段與特性的口腔細胞，以利比較其差異性，包含癌前細胞、不同型態的癌症、具轉移能力的癌細胞、與正常的口腔細胞等幾種，分別說明如下：

Dysplastic oral keratinocyte (DOK)

DOK 細胞是取自於人類的舌頭背面的上皮細胞，是一種角質異常增生的口腔上皮細胞，尚未發展成癌症，但是已出現異常生長的細胞株，可以稱之為前期惡性(Pre-cancer)細胞，很可能發展為癌症。(Chang SE et al., 1992)

Oral epidermoid carcinoma cell Meng-1 (OECM-1)

OECM-1 細胞取自人類的舌頭上皮細胞癌，是口腔癌中常見的鱗狀上皮細胞癌，這株細胞由於容易培養且生長快速，目前已是口腔癌細胞的研究中常使用到的一株細胞。(Yang, C.Y. et al., 1994)

Squamous cell carcinoma-15 (SCC-15)

SCC-15 是取自一位 55 歲的男性病人舌頭上未轉移的鱗狀細胞癌，是目前已分離出的鱗狀細胞癌的其中一種，目前已知的鱗狀細胞癌中歸類為 SCC 的眾多細胞株彼此間仍有些微的特性與表現差異，本研究中取 SCC-15 做為代表試驗。(Rheinwald JG et al., 1980)

Oral squamous carcinoma cell line with high metastatic potential (HSC-3)

HSC-3 是由一位 64 歲病患的舌頭上取得的鱗狀癌細胞，這株癌細胞經過變種，具有極高的轉移性，與其他組織接觸後容易快速的侵入接踵到的組織中並發展成其他癌症。(Momose,F. et al., 1989)

Smulow-Glikcman gingival cell (S-G)

S-G 細胞是正常人類口腔株化細胞，做為本研究中的控制組與癌細胞比較差異。
(Kasten et al.,1989)



3.4 細胞培養

3.4.1 培養基的更換

培養液是否需要更換可視細胞生長速率與密度而定，通常每兩至三天更換一次，一般由於培養基中含有酸鹼指示劑，一旦培養基開始變色表示酸鹼值已經開始改變，就必須馬上更換，以維持適合細胞成長的 pH 值。

細胞培養必須在無菌的環境下操作，因此只能在抽風櫃(Hood)中操作，雙手必須洗淨、噴灑酒精擦拭後戴上手套，手套上也需要以酒精噴灑過。使用抽風櫃前須先以紫外光(UV 燈)照射至少三十分鐘，以減少抽風櫃中的污染物，並打開抽風，避免外界空氣中的污染物進入，接著關閉紫外光後，要先在桌面噴酒精(70%~95%)擦拭，擦拭方法由內而外，由左至右。確保抽風櫃的清潔之後，拿取滅菌過後的玻璃滴管接至抽取廢液的管口上，並踩住真空幫浦以吸住 1 個 tip，做為抽取廢液使用。環境準備工作結束後，在拿取培養盤(Flask)進入抽風櫃之前也要先噴灑酒精擦拭表面及底盤，由於培養盤的瓶口容易沾附感染源，會先將培養盤的瓶口過火，輕輕繞過酒精燈或本生燈的上面約三次，打開蓋子後也可以再過火一次，並且打開後蓋子需放在遠處，操作過程中手不能由上而過，以避免汙染源或落塵掉進去造成感染。

接著抽取掉需更換的舊培養液，以玻璃滴管及真空幫浦抽掉需更換的培養液，此過程需將培養盤略為傾斜並從角落吸取，以避免吸起細胞，然後用滅菌過後的

電動滴管(Pipette)吸取 3ml 的磷酸緩衝液(PBS)，從側面清洗細胞表面，這個過程也是為了避免直接沖洗到細胞表面，造成細胞脫落，微晃數次以清洗表面的漂浮物或雜質，以 PBS 沖洗的目的是在於洗去多數的雜質，倘若細胞生長存活狀況良好，一般的情況更換培養液不需要清洗細胞表面，以維持細胞已經習慣的生長環境，最後加入約 3~5ml 的新鮮培養液至培養盤中，蓋上蓋子，然後放回恆溫培養箱(Incubator)，培養條件：37°C 5% CO₂。

3.4.2 繼代培養(Subculture)

當細胞持續成長至高密度時，繼續培養會造成細胞擠壓或其他型態上的改變，此時就需要進行繼代培養，或者以刮勺刮去部分的細胞，控制細胞的數量以維持細胞生長空間與環境，方法如下。



環境準備工作與更換培養液時相同，進抽風櫃前要先在桌面噴酒精擦拭（方法由內而外，由左至右），培養皿移進抽風櫃前也要噴酒精擦拭表面及底盤，培養皿打開前須先過火，在酒精燈上略燒瓶口 3 次，避免汙染，然後打開蓋子，並將其放至最遠處，過程中手不能從上面經過，以避免汙染，接著用玻璃滴管與真空幫浦抽去舊的培養液，將培養皿傾斜並從角落吸取，以免吸到細胞，並電動滴管吸取 3ml 的 PBS，清洗細胞表面（從側面沖以避免沖下細胞），微晃數次清洗表面漂浮物，然後加入 1ml 的 0.05% 胰蛋白酵素(Trypsin)，此過程是為了切下貼附在培養盤中的細胞，因此可以直接沖洗細胞表面，並放回 37°C 的恆溫培養箱 5 分鐘以

切下細胞，處理時間過久會對細胞造成傷害。拿一個 15ml 的離心管寫上標籤，然後將切下的細胞懸浮液加入 1ml 含血清的培養基以終止 Trypsin 的反應，再吸至離心管內蓋好蓋子，用離心機分離細胞與培養液，離心條件：1250rpm，5 分鐘，需對稱放入兩支重量相當的離心管以平衡，由於細胞較培養液為重，離心完的細胞會沉澱在管底，接著在抽風櫃中打開離心管，略為傾斜管身，以真空幫浦吸取上清廢液，留下純細胞。再加入 1ml 的培養基沖開打散細胞，以電動滴管 pipet 約 50 次，以免細胞過於集中，接著拿取新的培養盤，加入培養液 3~5ml，回種約 200λ (200μl)的細胞懸浮液，視情況調整，並均勻混合分散細胞，最後在新盤上標示細胞名稱、日期及操作員後，放回 incubator，培養條件：37°C 5% CO₂。

3.4.3 細胞冷凍保存

細胞在冷凍保存前，較好的狀態是生長至八成滿的密度，細胞數量不宜過少，欲冷凍的前一天更換一次培養基，以確保細胞是在養分充足、生長狀況良好的狀態，做好操作細胞培養的環境準備後，事先將 7% 抗凍劑(DMSO)加入到新鮮培養液中，一般細胞通常使用 5~10% 抗凍劑，S-G 細胞較為特殊，使用 10% 抗凍劑與 90% 胎牛血清做為冷凍保存培養液，必須新鮮配製，然後依照繼代培養的過程以胰蛋白酵素洗下細胞，離心後去除上清液，留下純細胞，接著加入含抗凍劑之細胞冷凍保存液，混合均勻後以每個凍管 1ml 分裝，並標示細胞名稱、冷凍日期。

冷凍過程是將分裝凍管插入保麗龍後，依序放入 4°C 冰箱十分鐘，-20°C 三十

分鐘，-80°C 二十四小時，最後移入液態氮中保存。

一般癌症細胞冷凍於-80°C 冰箱最多可維持半年，細胞存活率會逐漸減低，冷凍於液態氮中可保存一年以上。

3.4.4 細胞解凍活化

細胞解凍的重點在於快速解凍，解凍過程中尚未完全解凍的部分冰晶會再次凝結，很可能因此刺破細胞，導致細胞存活率不高。解凍前預先打開水浴槽(Water bath)，將溫度設定至 37°C，並等待水浴槽升溫完成，取出冷凍管後立即放入水浴槽中回溫，輕輕搖晃使冰塊完全溶解，過程中留意勿讓液面高過凍管瓶口，以免解凍時汙染細胞，接著將解凍後之細胞懸浮液加入 5ml 的新鮮培養基中培養，某些種類的細胞較為脆弱，需要先離心去除抗凍劑，大部分癌細胞則不需要，僅需在解凍後培養隔日更換培養液以排除抗凍劑。

細胞剛解凍活化後較為脆弱，需要繼代一至二次後才能恢復其原先的細胞特性以進行實驗。

3.5 微型細胞培養環境

為了能夠觀測活體且在正常狀態下的細胞螢光，我們設計了一個能夠架設在倒立顯微鏡上的微型細胞培養箱，如圖 3.3，這能夠讓細胞在顯微鏡下仍然維持細胞生長的環境、溫度與酸鹼度，相較於傳統固定之後封片的細胞，量測出來的數據更為接近培養箱中健康生長的細胞。

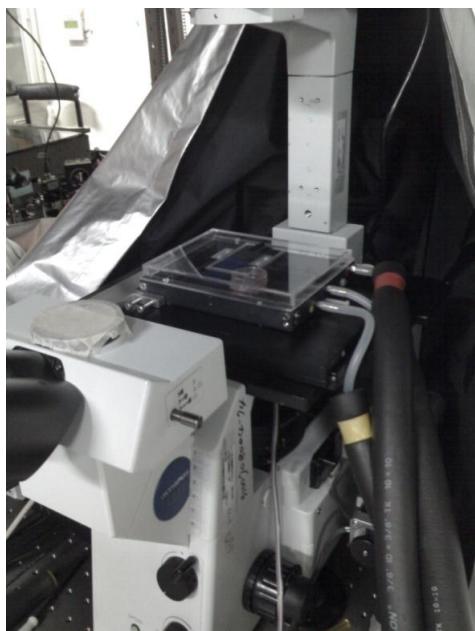


圖 3.3 架設在倒立顯微鏡系統上的細胞培養環境

微型培養環境所用來調控溫度的方式是以循環恆溫水來加熱顯微鏡載台與培養箱，考慮到顯微鏡載台上的溫度散失，我們實際測試培養箱周圍循環水溫設定在 50°C 的時候，如圖 3.4 左圖，培養箱中心的溫度大約為 37°C。並且培養箱設計以圖 3.4 右圖的調控設備將 5% 二氧化碳混合水蒸氣之後亦經由培養箱之循環氣槽流動，周遭有小孔向培養箱內釋出水氣以調整濕度，二氧化碳以調整酸鹼值，循環方式如圖 3.5 所示。



圖 3.4 循環水溫設定為 50°C 以及氣體混合裝置

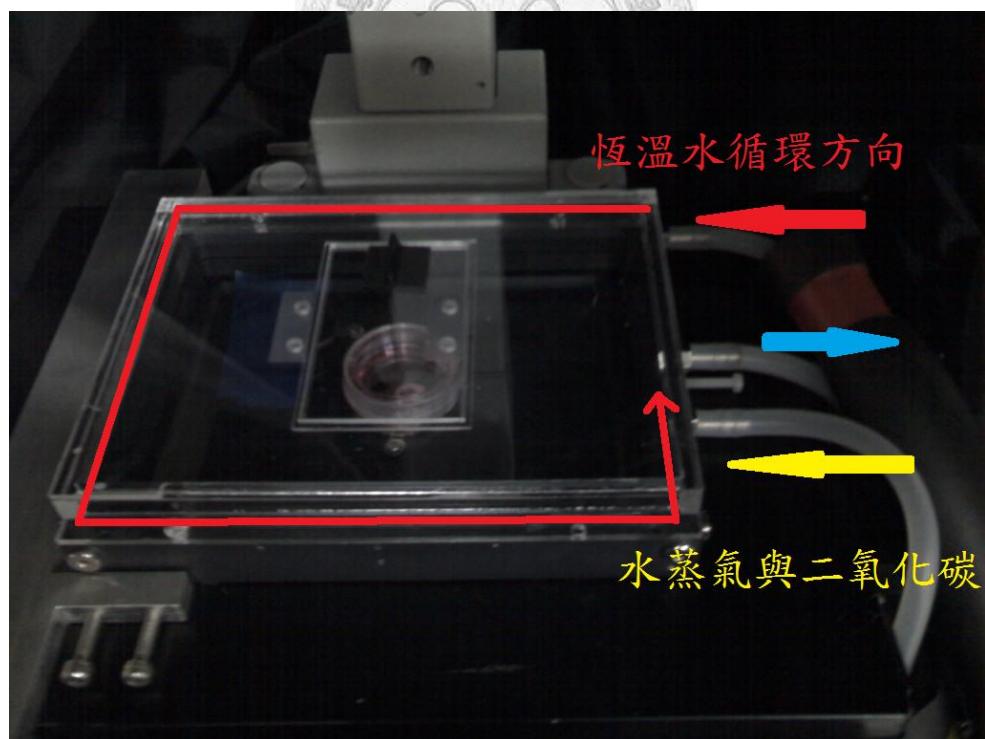


圖 3.5 微型細胞培養盤的環境調控方式

第四章 實驗結果與討論

4.1 雙光子螢光光譜

本研究中為了辨識在口腔癌細胞中的背景紅螢光來源，量測了 DOK、OECM-1、SCC-15、HSC-3 四株口腔癌細胞的雙光子螢光光譜，如圖 4.1 所示，我們可以發現在細胞的螢光光譜中，峰值大致上都座落於 660~670nm 之間。與在本研究中的光學系統能有效激發出螢光的內源性螢光分子—膽紅素氧化物極為相似，膽紅素氧化物的雙光子螢光光譜如圖 4.2 所示，因此口腔癌細胞中的紅螢光成分大多數極有可能是來自於膽紅素氧化物所產生。

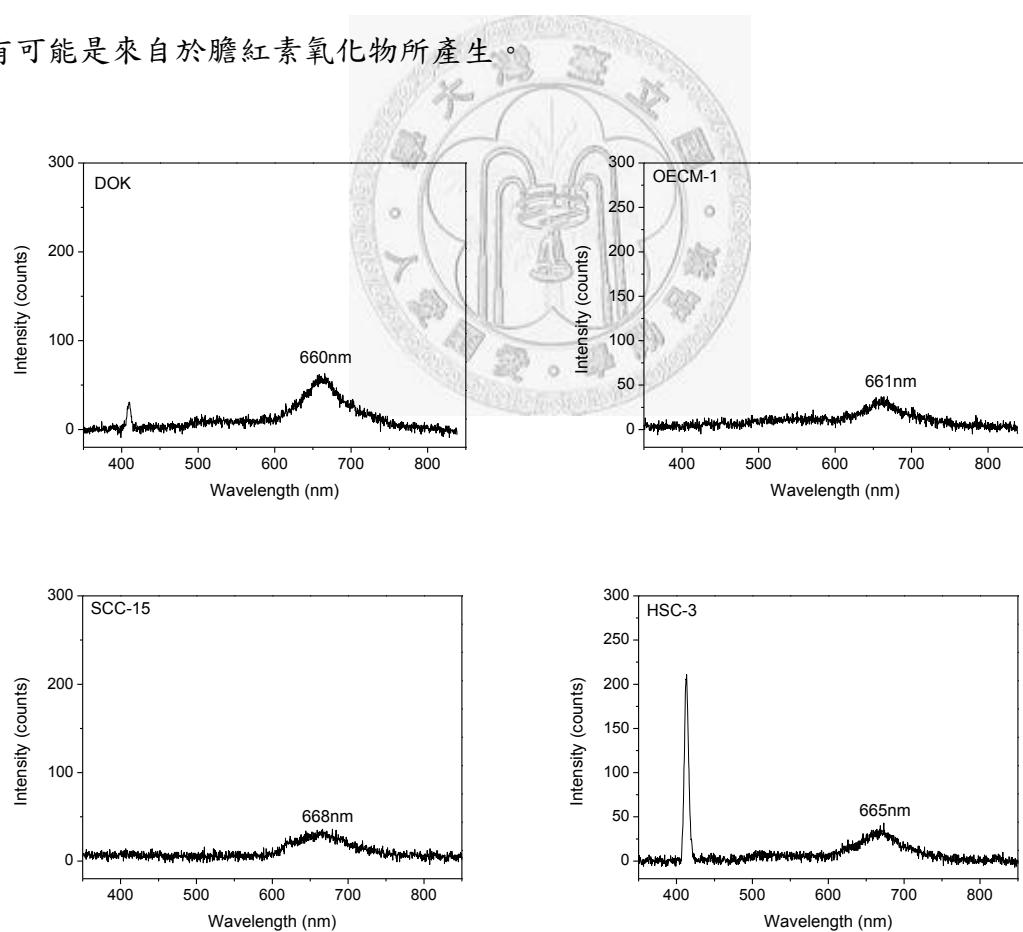


圖 4.1 口腔癌細胞的雙光子螢光光譜

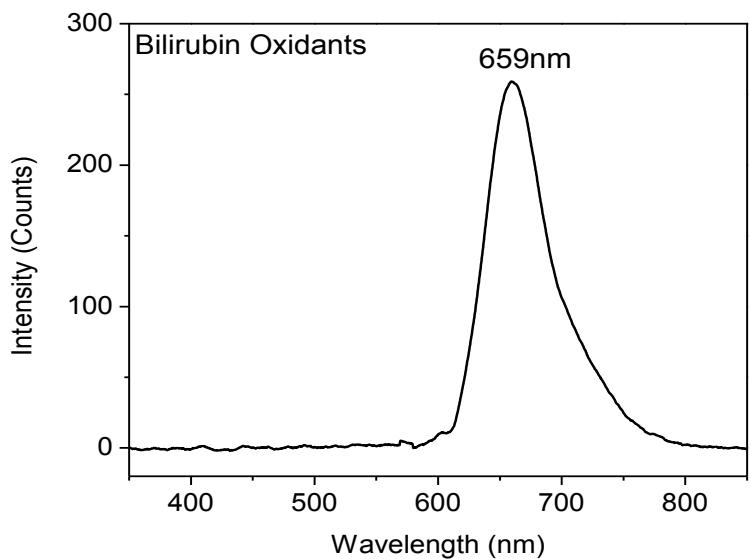


圖 4.2 膽紅素氧化物的雙光子螢光光譜



4.2 標準品螢光生命週期

我們量測了濃度均在 $20\mu\text{M}$ 的光氧化膽紅素氧化物及其與膽綠素還原酶、胎牛血清、血紅素加氧酶、脂質等蛋白結合後的五種標準溶液之螢光生命週期衰減曲線，衰減曲線如圖 4.3。由圖中可以初步看出膽紅素氧化物的光子數目衰減速度較快，表示螢光生命週期較短，膽紅素氧化物與膽綠素還原酶、脂質結合後生命週期並沒有明顯的改變，在與細胞培養時使用的胎牛血清結合，會將生命周期延長，而與血紅素加氧酶的結合又更加的拉長螢光生命週期。

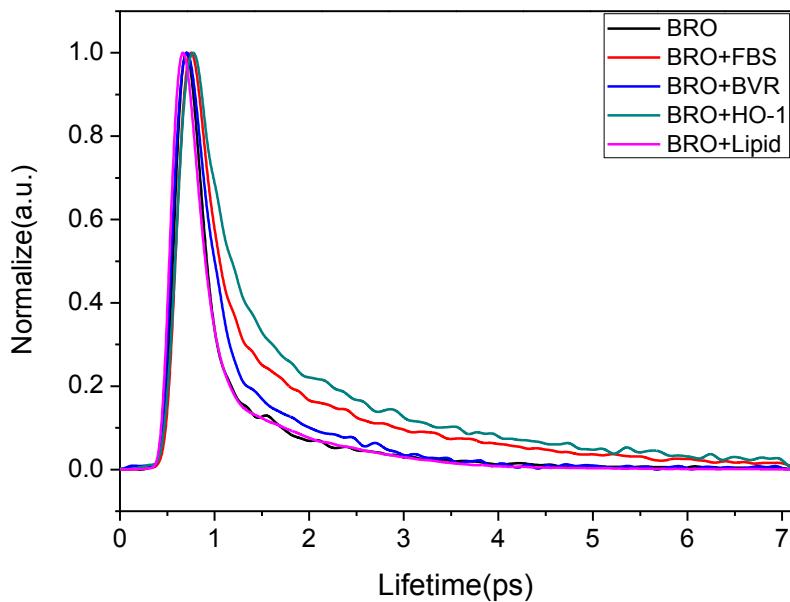
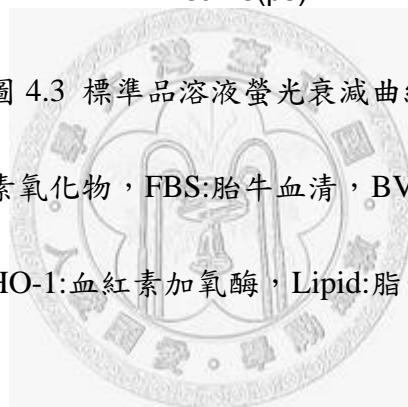


圖 4.3 標準品溶液螢光衰減曲線

BRO:光氧化膽紅素氧化物，FBS:胎牛血清，BVR:膽綠素還原酶，

HO-1:血紅素加氧酶，Lipid:脂質



藉由螢光生命週期影像系統的近似模擬來計算衰減時間常數的準確差異，我們使用兩種時間常數成分(Two component)的模擬方法，結果如圖 4.4 所示，使用兩種時間常數成分的模擬方式能夠使原始量測資料(Measurement Data)與模擬近似曲線的誤差最小平方和(χ^2)為最小，使得模擬結果的可信度提高。

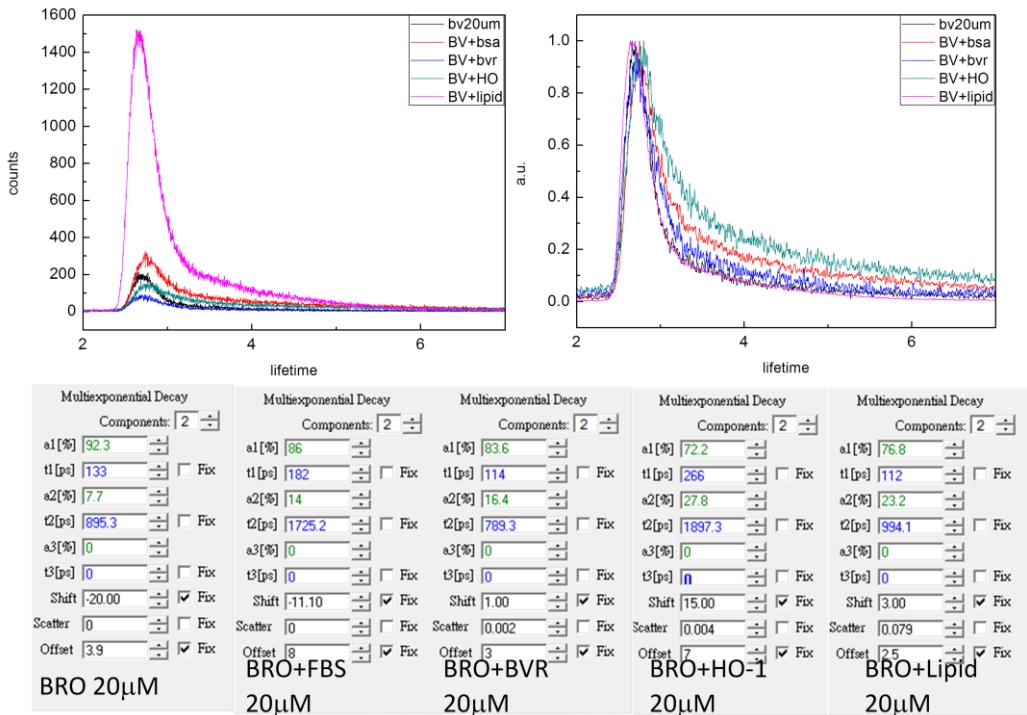


圖 4.4 標準溶液的時間常數模擬計算結果

結果顯示光氧化膽紅素氧化物生命週期的兩個時間常數約在 t_1 為 130 ps 與 t_2 為 900 ps (ps:皮秒, 兆分之一秒), 而對應個別成分占有比例 a_1 為 92.3%、 a_2 為 7.7%。總觀五種標準溶液均是以第一種成分的時間常數比例為主，因此我們著重於觀察 t_1 的時間常數改變情況，並以各標準溶液 t_1 的時間常數結果做為後續研究的參考數據。

為了比較並證實膽紅素氧化物與某些蛋白結合後生命週期有明顯改變，我們製作了長方圖並將重要的標準溶液重複測量數次。

由於在細胞中膽紅素的氧化物濃度可能因為細胞類型或代謝狀態不同而有所差異，我們量測了膽紅素氧化物不同的濃度變化對其生命週期的影響，結果如圖

4.5 所示，我們稀釋了濃度分別為 $100\mu\text{M}$ 、 $75\mu\text{M}$ 、 $50\mu\text{M}$ 與 $25\mu\text{M}$ 的四種濃度做為量測樣品，結果發現 t_1 的生命週期約在 130ps 上下， t_2 約在 $550\sim750\text{ps}$ 之間， t_2 變動幅度較大，但在這微量的濃度變化間與生命週期的結果並沒有顯著的相關性。

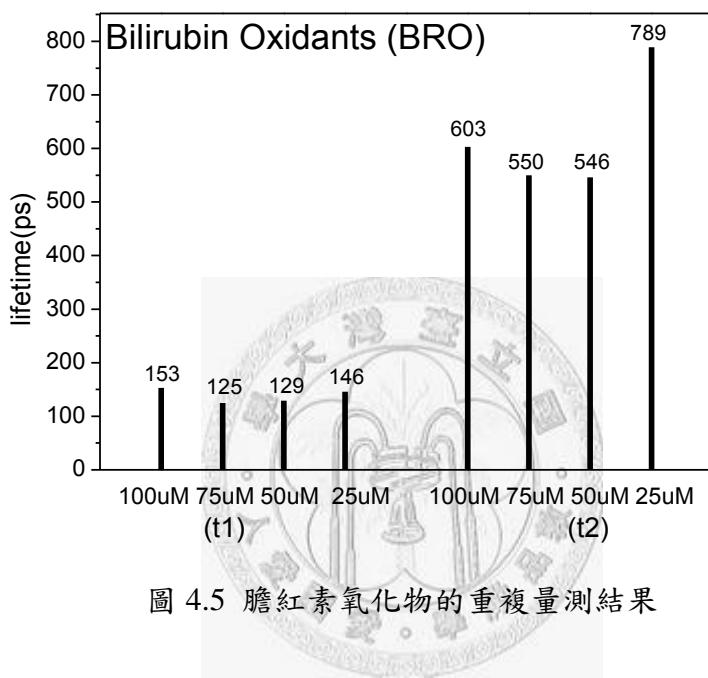


圖 4.5 膽紅素氧化物的重複量測結果

我們也重複量測了膽紅素氧化物與血紅素加氧酶濃度 $20\mu\text{M}$ 的生命週期，藉以確認生命週期的變化是否受到結合過程的時間因素影響，如圖 4.6 所示，血紅素加氧酶與膽紅素氧化物結合後的 t_1 生命週期大致穩定呈現在 350 皮秒，而 t_2 由剛開始略高的 2 奈秒逐漸穩定至 1.5 奈秒，膽紅素氧化物與血紅素加氧酶結合後生命週期明顯的被拉長。

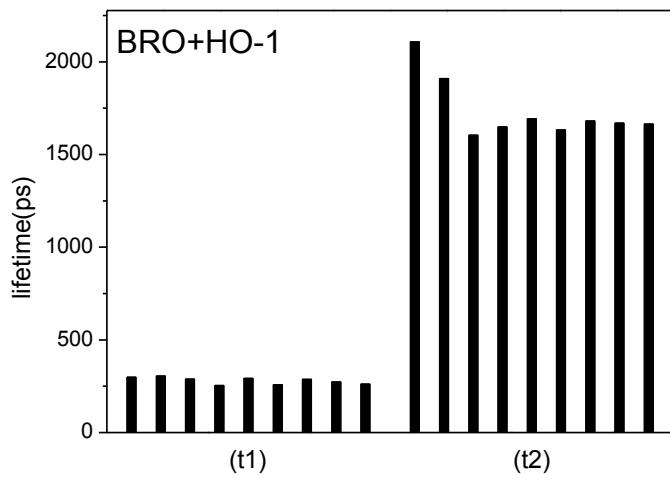


圖 4.6 膽紅素氧化物與血紅素加氧酶結合的重複量測結果

在量測膽紅素氧化物與脂質、膽綠素還原酶的量測結果發現，多次量測結果
 生命週期幾乎沒有改變，因此以平均數值表示如圖 4.7 所示，這兩種分子與膽紅素
 氧化物結合後可能並不直接影響到生命週期的表現。

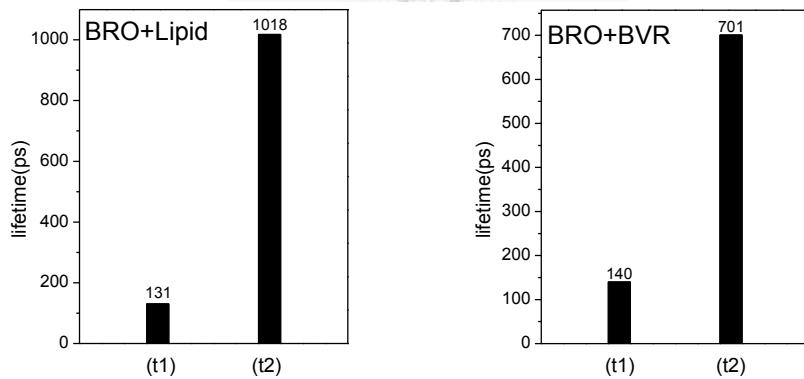


圖 4.7 膽紅素氧化物與脂質、膽綠素還原酶結合後的生命週期

對於胎牛血清的影響，我們額外測試逐漸稀釋的膽紅素氧化物與胎牛血清的混合溶液，實驗結果如圖 4.8，我們發現在高濃度上的混合溶液生命週期會較長，而逐漸稀釋後仍然具有提升膽紅素氧化物螢光生命週期的能力，無論如何胎牛血清均會對實驗的結果造成影響，但為了考慮在人體中細胞的環境並不會有胎牛血清的存在，因此在細胞實驗中，必須排除掉細胞培養基中胎牛血清對實驗結果的影響(F. R. Trull et al., 1992)，我們使用的解決方法為在量測活體細胞前以磷酸緩衝液(PBS Buffer) 輕晃清洗細胞表面兩次，再以磷酸緩衝液浸潤細胞以保持細胞的濕度。

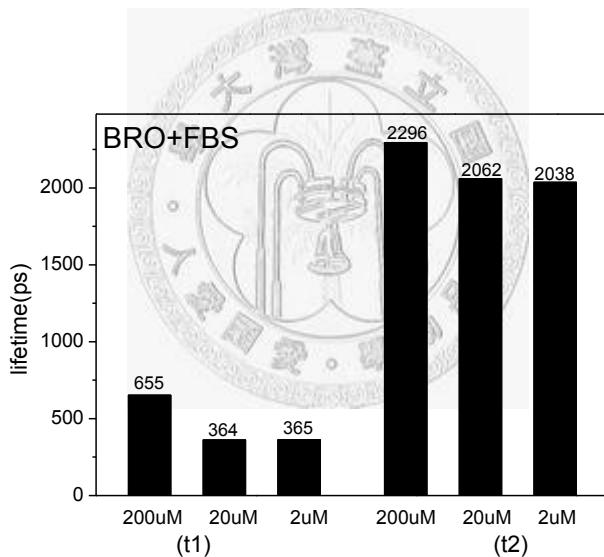


圖 4.8 膽紅素氧化物與胎牛血清結合後的濃度差異測試

4.3 口腔癌細胞的螢光生命週期影像

量測細胞生命週期與標準溶液不同，標準溶液由於混合均勻，理論上溶液均是均勻混合鍵結的分子，因此我們量測其單一螢光衰減曲線便足以代表溶液各處的表現。在細胞實驗中，細胞質的各種胞器可能存在著不同的分子，造成單一的衰減曲線並不能代表細胞中各處的螢光表現，我們使用二維的螢光生命週期影像來產生整個細胞切面的螢光生命週期分布，由二維細胞影像中能較清楚的看出細胞外觀與型態。如圖 4.9 所示，口腔角質異常增生的癌前細胞 DOK，螢光分部主要在細胞核外，而細胞輪廓並不明顯，表示在細胞膜上螢光的表現並不活躍，而其餘三株的癌症細胞則主要會較集中分布在細胞內質網中，此外在細胞膜的表面上也有一些螢光表現，能看出細胞輪廓，可以由此得知四株細胞內的分子活動有些異常值得探討。

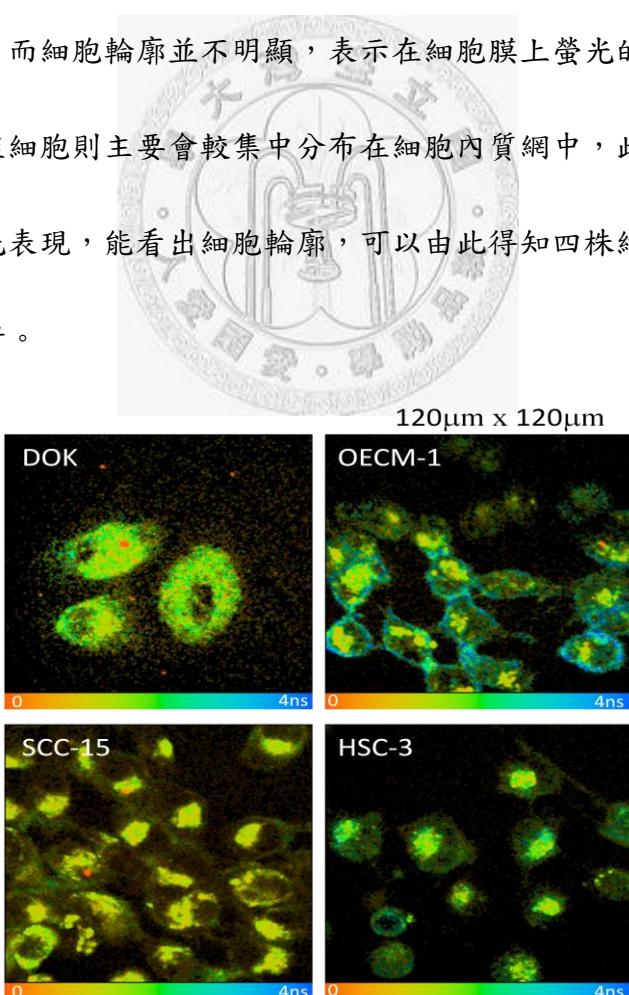


圖 4.9 口腔癌細胞的平均螢光生命週期影像

圖 4.9 為四種口腔癌細胞的平均生命週期影像，即為 t1 與 t2 兩種成分依其光子數比例加成後所得的平均生命週期 t_m ，如下式：

$$t_m = t1 \times a1(\%) + t2 \times a2(\%)$$

接著我們將量測到的螢光生命週期影像分為 t1 與 t2 的影像做為比較的方式，觀察正常口腔癌細胞與四種不同口腔癌細胞間的生命週期與分布差異，t1 影像與強度分別如圖 4.10 所示，上圖為 t1 分布影像，色彩代表 0~2 奈秒(ns)的生命週期時間，由此可以比較得知正常(S-G)口腔細胞的 t1 生命週期明顯的較其他口腔癌細胞為短，口腔癌細胞間又可粗分為較短的生命週期(SCC-15 與 HSC-3)及較長的生命週期(DOK 與 OECM-1)，下圖為對應的強度灰階影像。

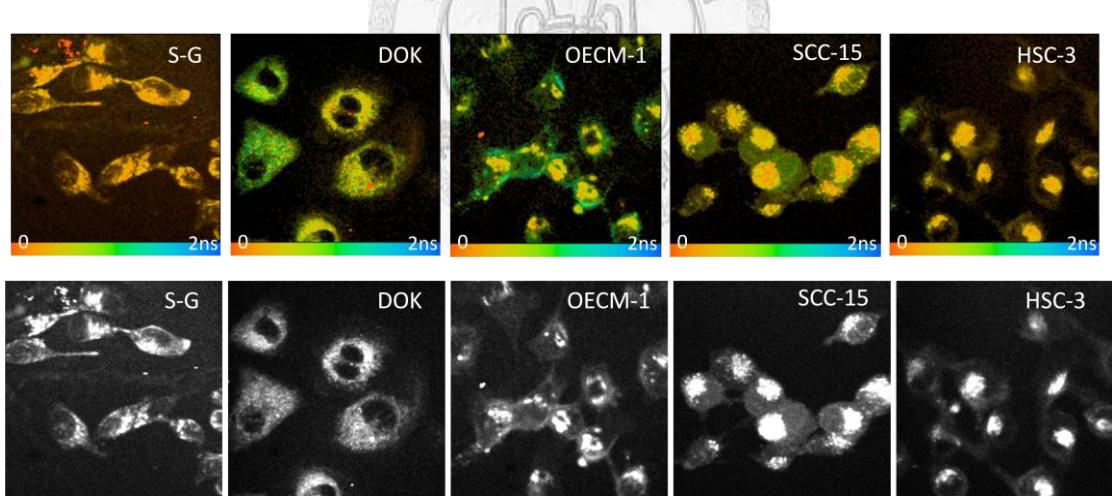


圖 4.10 正常與口腔癌細胞的 t1 融光生命週期影像與強度
(S-G:正常口腔細胞、DOK:口腔角質異常增生細胞、
HSC-3:具高度轉移性口腔癌細胞、OECM-1 與 SCC-15:鱗狀上皮細胞癌)

細胞生命週期 t2 的影像如圖 4.11 上圖所示，色彩代表 0~5 奈秒的時間，在 t2 的影像中則沒有辦法如 t1 一般具有明顯的差異，大略可以觀察出正常口腔細胞的生命週期仍然較短，HSC-3 次之，其餘三株癌細胞則相當接近，下圖為影像強度灰階圖。

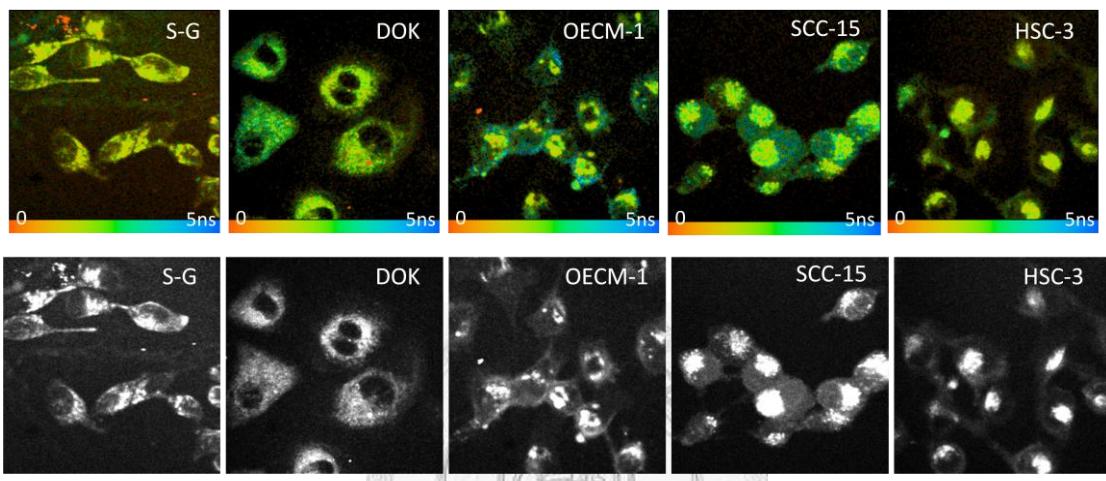


圖 4.11 正常與口腔癌細胞的 t2 螢光生命週期影像與強度
(S-G:正常口腔細胞、DOK:口腔角質異常增生細胞、
HSC-3:具高度轉移性口腔癌細胞、OECM-1 與 SCC-15:鱗狀上皮細胞癌)

4.4 螢光生命週期累積統計圖表(Histogram)

將量測到的螢光生命週期影像經由 TCSPC 程式統計每個像素的螢光生命週期後，可以獲得累積統計的螢光生命衰減週期分布，以二維的螢光生命週期影像分析的優點是可由 TCSPC 其下的 SPCImage 程式，選擇影像中想要分析的區域單獨做分析，在實驗結果的分析中，我們將每一顆細胞分別計算其衰減曲線，為了具有足夠的統計樣本點，需要使每一株細胞量測到至少三十顆完整的細胞來分析，並除去少數型態異常的細胞，這類的細胞可能正在進行細胞分裂、或者即將死亡等等因素，為統一標準我們不採用這類資料，以便統計生長正常的細胞狀態。將三十顆細胞的衰減曲線做加總後標準化以便排除掉強度差異，而觀察彼此間峰值的不同。



下圖 4.12 是 t1 的累積統計圖表，從 t1 可以明顯的看出細胞間峰值明顯的差異，正常細胞(S-G)峰值約為 250ps、SCC-15 約為 400ps、HSC-3 約為 550ps、DOK 與 OECM-1 約為 700ps，能夠看出其間有明顯的差異存在，這可做為辨別口腔癌的依據。其中 DOK 為癌前角質異常增生細胞，在 DOK 細胞的生命週期曲線中能看出兩種成分存在，其一是峰值約在 700ps 的主要成分，這部分近似其他的癌細胞，具有較長的生命週期；另一種成分峰值約在 250ps，與正常細胞的生命週期非常類似，我們認為這是口腔細胞漸趨癌化的階段性表現，然後推論可能經由此階段後細胞中某種分子或是微環境的變化，導致逐漸的拉長膽紅素氧化物的螢光生命週期。

而在已經癌化的口腔癌細胞中，OECM-1 較明顯也有兩個峰值的成分存在，600 皮秒與 450 皮秒，主要的成分幾乎是在 600 皮秒左右，這項表現與轉移的 HSC-3 性質類似，SCC-15 異於其他惡性細胞，有單一又集中的短峰值在 450 皮秒左右，但與正常細胞的 250 皮秒又有明顯的區別。

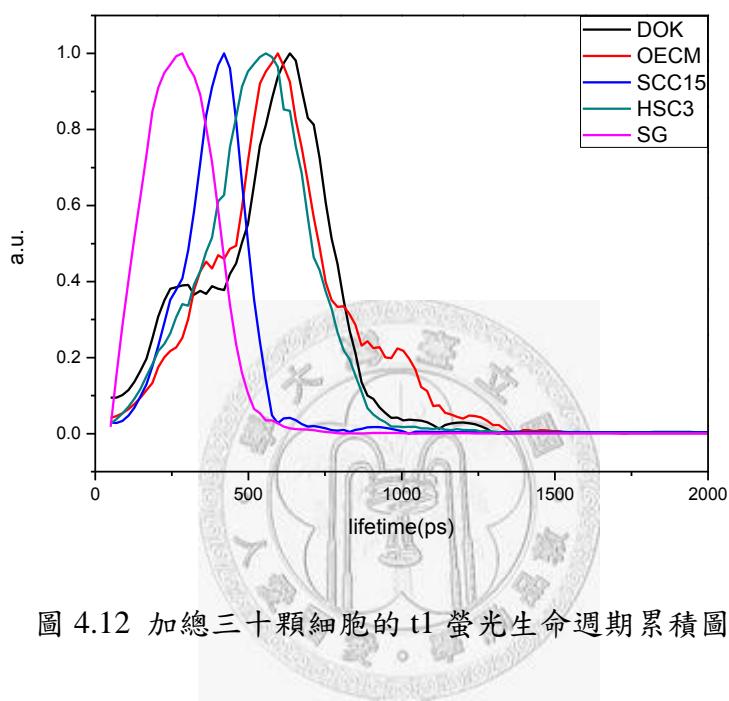


圖 4.12 加總三十顆細胞的 t1 螢光生命週期累積圖表

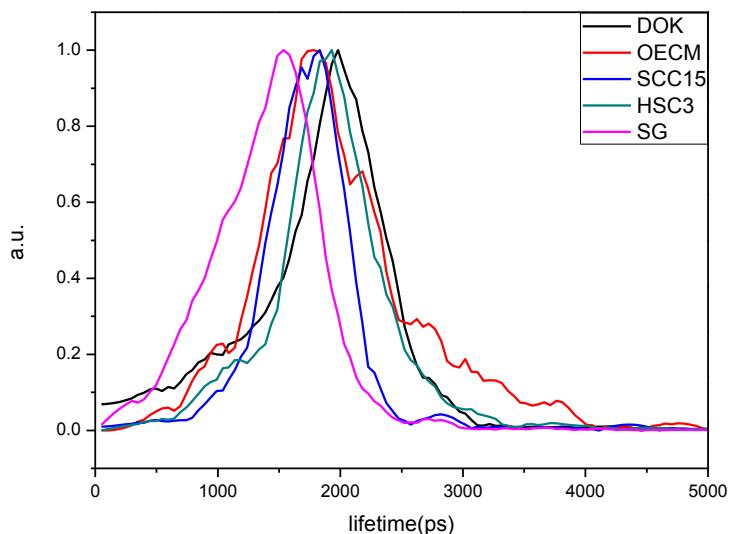


圖 4.13 加總三十顆細胞的 t2 融光生命週期累積圖表

而在圖 4.13 是 t2 的生命週期累積統計圖，t2 的生命週期表現便沒有明顯的差異性，或者說期影響到的成分可能更為複雜與紊亂，不過在峰值仍然可見正常細胞約在 1.5ns 左右，與癌症細胞有些微的區別，其餘峰值皆趨近於 1.9ns，峰值的差異性略為能與 t1 結果相呼應，但 t2 的成分可能有較多不確定性的因素干擾著，因此主要仍以 t1 的差異較具有象徵性。

4.5 以螢光生命週期區別口腔癌細胞

最後我們統計每一顆細胞的生命週期峰值落點，製成圖表以分析個細胞生命週期峰值的離散性，t1 統計結果如圖 4.14 所示。

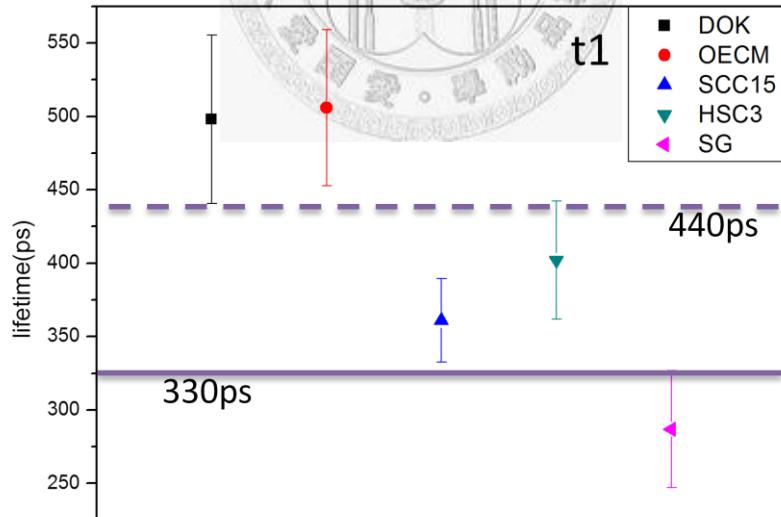


圖 4.14 口腔細胞的 t1 生命週期離散性

由圖中清楚的可看見三個區域，實線部分以 330ps 的界限區分出正常口腔細胞與口腔癌細胞， t_1 生命週期較 330 為短的是正常的口腔細胞，而較為長的均是口腔癌細胞。在口腔癌細胞之中又可以分為兩個區域，以 440ps 的界限劃分出 DOK 與 OECM-1 以及 SCC-15 與 HSC-3，不同的區域有著接近的生命週期，我們推論這可能代表著具有相似的代謝方式或機制，也因此正常細胞與癌症細胞有著迥然的差異，詳細的機制需要更多的生化分析來確認。

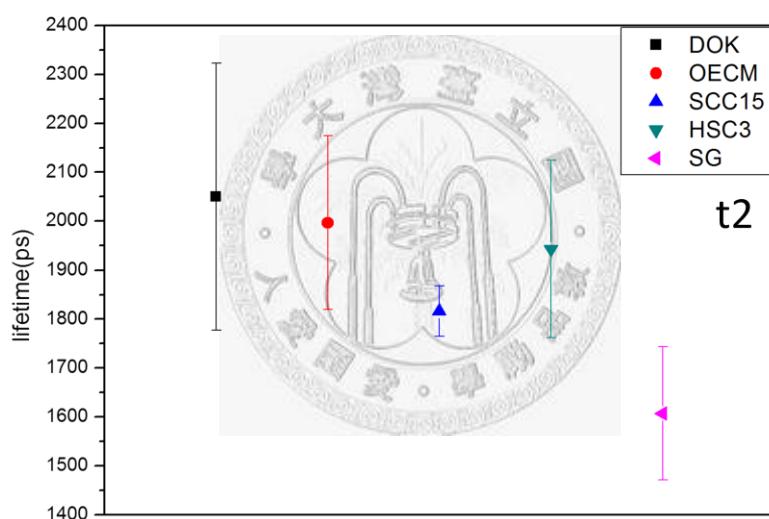


圖 4.15 口腔細胞的 t_2 生命週期離散性

在 t_2 的分析中，也能發現正常細胞的生命週期在 1.75ns 以下，如圖 4.15 所示，DOK 細胞橫跨了很長的時間區段，可能代表著癌前細胞的分子有許多與膽紅素氧化物的結合，形成一個較廣的分布範圍， t_2 的生命週期依然具有著區分癌細胞的可能性。

第五章 結論

藉由螢光生命週期影像，我們已經初步的從細胞實驗中得知，螢光生命週期可做為區別口腔癌細胞與正常細胞的工具，在以往的文獻中亦有許多應用螢光生命週期來檢測癌症的研究(Damian K, et al., 2005)，在我們的研究中判斷能夠以 330 皮秒的界線區別了正常與口腔癌細胞，並且在口腔癌細胞中又能再以 440 皮秒區分為兩類，330 皮秒至 440 皮秒之間是鱗狀口腔癌細胞 SCC-15 與聚轉移特性的 HSC-3 細胞，440 皮秒以上的是角質異常增生的 DOK 細胞與鱗狀上皮細胞癌 OECM-1。



我們已知膽紅素的氧化物在細胞中是一種螢光來源，且由先前標準溶液的測試得知螢光生命週期約在 130ps，在細胞代謝後會產生許多的自由膽紅素氧化物，因此在正常細胞狀態下，可能有大量的自由膽紅素氧化物使得正常口腔細胞的生命週期很短(~250ps)，而在惡性化後的口腔細胞可能由於代謝異常或其他因素，使得膽紅素的氧化物大量偏好鍵結在某些蛋白質上而改變生命週期，目前我們已發現其中一種內生性且會明顯影響到生命週期的便是血紅素加氧酶(HO-1)，他使得原先生命週期短的膽紅素氧化物鍵結後拉長了生命週期，成為約 300ps，我們推論這可能是惡性腫瘤生命週期(>330ps)指標的成因之一，除此之外其他或許尚有某些因素可能影響到細胞的生命週期變化，如細胞的 pH 值(Hai-Jui Lin, et al., 2003)，仍是將來除了蛋白質以外可以做進一步探討與研究的許多變因之一。

在以往的文獻中顯示(Schwertner et al.,1994)，最早在 1994 年即發現膽紅素的濃度與某些疾病的發病率呈現負相關，意即當細胞或組織代謝後排至血液的膽紅素濃度不高時，器官的發病率就會提高。已知膽紅素代謝是清除自由基的一種機制(Yingru Liua et al.,2006)，一般正常細胞代謝均會產生一些自由的膽綠素，再由膽綠素還原酶還原為膽紅素，其中血紅素加氧酶是反應中的限速酶，使得細胞依正常的不掉代謝掉膽綠素與自由基。假定細胞代謝發生異常，而產生大量的自由基，這時候也同時產生大量的自由膽綠素，為了代謝掉自由基，膽綠素還原為膽紅素的程序持續且大量的進行，便可能有較高數量的膽綠素(或膽紅素氧化物)與限速酶(血紅素加氧酶)的作用，我們推測因此實驗結果的差異是肇因於，異常的口腔癌細胞的膽紅素氧化物與血紅素加氧酶的作用頻繁，所以容易被光學系統偵測到較長的螢光生命週期，或者是膽紅素氧化物與血紅素加氧酶作用後，因為缺少某些未知的因素，無法順利轉換為膽紅素，才產生代謝異常，綜合以上的推論，膽色素的行為與代謝雖然是微量的，但在將來的研究中，仍然具有許多可能突破生醫檢測的潛能，是極具探討價值的分子生物指標之一。

文献回顧 (Reference)

Gatenby RA, Gillies RJ, "Why do cancers have high aerobic glycolysis?" Nat Rev Cancer, 4:891–899 (2004).

Matthew G. Vander Heiden, Lewis C. Cantley, Craig B. Thompson, "Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation" Science. 324(5930): 1029–1033 (2009).

Warburg O, "On the origin of cancer cells." Science. 123(3191):309–14(1956).

Peggy P. Hsu, David M. Sabatini, "Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond" Cell. Vol.134:703–707 (2008).

Ahmed A Heikal, "Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies" Biomark Med.Vol.4: 241–263 (2010).

Joseph R. Lakowicz, Henryk Szmacinski, Kazimierz Nowaczyk, Michaell. Johnson, "Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH" Biochemistry, Vol. 89, 1271–1275 (1992).

Melissa C. Skala, Kristin M. Riching, Annette Gendron-Fitzpatrick, Jens Eickhoff, Kevin W. Eliceiri, John G. White, and Nirmala Ramanujam, "In vivo multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia" PNAS, Vol.104, No.49: 19494–19499 (2007)

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J, "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol. Vol.39:44–84 (2007).

Dortay H, Akula UM, Westphal C, Sittig M, Mueller-Roeber B, "High-Throughput Protein Expression Using a Combination of Ligation-Independent Cloning (LIC) and Infrared Fluorescent Protein (IFP) Detection." PLoS ONE 6(4): e18900 (2011).

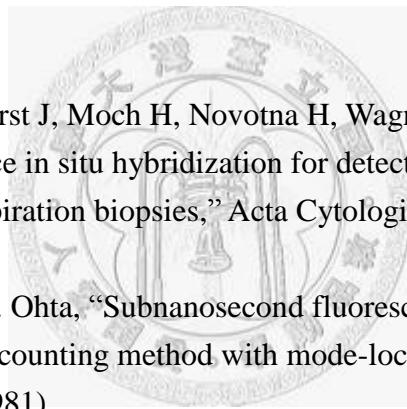
Glushko V, Thaler M, Ros M, "The fluorescence of bilirubin upon interaction with human erythrocyte ghosts." Biochim Biophys Acta, 719:65–73 (1982).

Tzu-Ming Liu, Chien-Tai Hsieh, Yu-Shing Chen, Fu-Lien Huang, Hsin-Yi Huang, Wen-Jeng Lee, Chun-Ta Kung, Chi-Kuang Sun, “Diagnosing hepatocellular carcinoma with the intensity and the lifetime of two-photon red autofluorescences,” Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering, Vol. 7903, 79032Z (2011).

Anthony W. Czarnik, “Chemical Communication in Water Using Fluorescent Chemosensors” Acc. Chem., Vol.27, No.10, 302–308 (1994).

B. Stevens, “Some effects of molecular orientation on fluorescenceemission and energy transfer in crystalline aromatic hydrocarbons” Spectrochimica Acta, Vol.18, 439–448 (1962).

Goppert-Mayer M, “Über Elementarakte mit zwei Quantensprungen.” Ann. Phys. Vol.9,273–95 (1931).



Sauter G, Feichter G, Torhorst J, Moch H, Novotna H, Wagner U, Dürmüller U, Waldman FM, “Fluorescence in situ hybridization for detecting erbB-2 amplification in breast tumor fine needle aspiration biopsies,” Acta Cytologica, 40:164-173 (1996).

S. Kinoshita, T. Kushida, H. Ohta, “Subnanosecond fluorescence-lifetime measuring system using single photon counting method with mode-locked laser excitation,” Rev. Sci. Instrum 52,572-575 (1981).

Wolfgang Becker, Axel Bergmann,Christoph Biskup, Laimonas Kelbauskas, Thomas Zimmer, Nikolaj Klöcker,Klaus Benndorf, “High resolution TCSPC lifetime imaging,” Proc. SPIE 4963 (2003).

A. Kilpelä, J. Ylitalo, K. Määttä, J. Kostamovaara, “Timing discriminator for pulsed time-of-flight laser rangefinding measurements,” Rev. Sci. Instrum. 69, 1978-1984 (1998).

D. V. O’Connor, D. Phillips, “Time-correlated single photo counting ,” Academic Press, London (1984).

J. R. Lakowicz, “Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd edn,” Plenum Press, New York (1999).

Antony F. McDonagh “Evidence for singlet oxygen quenching by biliverdin IX- α dimethyl ester and its relevance to bilirubin photo-oxidation,” Biochemical and Biophysical Research Communications Vol.48 Pages 408–415 (1972).

Lightner DA, Quistad GB “Imide products from photo-oxidation of bilirubin and mesobilirubin,” Nat New Biol. 1972 Apr 19;236(68):203–205 (1972).

S.-W. Chu, I-H. Chen, T.-M. Liu, P.-C. Chen, C.-K. Sun, and B.-L. Lin, “Multimodal nonlinear spectral microscopy based on a femtosecond Cr:forsterite laser,” Opt. Lett. 26, 1909-1911 (2001).

Chi-Kuang Sun, Shi-Wei Chu, Szu-Yu Chen, Tsung-Han Tsai, Tzu-Ming Liu, Chung-Yung Lin, and Huai-Jen Tsai. “Higher harmonic generation microscopy for developmental biology,” Journal of Structural Biology 147, 19–30 (2004).

C.-C. Huang, K.-Y. Chuang, C.-J. Huang, T.-M. Liu*, and C.-S. Yeh* “Graphite-shelled Si nanoparticles and their Au/Si heterodimers: preparation, photoluminescence, and second harmonic generation,” Journal of Physical Chemistry C 115, 9952-9960(2011).

Chang SE, Foster S, Betts D, Marnock WE. “DOK, a cell line established from human dysplastic oral mucosa, shows a partially transformed non-malignant phenotype,” Int J Cancer. Dec 2;52(6):896-902 (1992).

Yang, C.Y. and Meng, C.L. “Regulation of PG synthase by EGF and PDGF in human oral, breast, stomach, and fibrosarcoma cancer cell lines,” J. Dent. Res. 73, pp. 1407–1415 (1994).

Rheinwald JG, Beckett MA . “Defective terminal differentiation in culture as a consistent and selectable character of malignant human keratinocytes,” Cell 22: 629-632 (1980).

Momose,F., Araida,T., Negishi,A., Ichijo,H., Shioda,S., and Sasaki,S. “Variant sublines with different metastatic potentials selected in nude mice from human oral squamous

cell carcinomas," J. Oral Pathol. Med., 18: 391-395 (1989).

Kasten, F.H., Pineda, L.F.R., Schneider, P.E., Rawls, H.R., Foster, T.A., "Biocompatibility testing of an experimental fluoride releasing resin using human gingival epithelial cells in vitro," In Vitro Cell. Dev. Biol. 25, 57-62 (1989).

F. R. Trull, O. Ibars, and D. A. Lightner, "Conformation inversion of bilirubin formed by reduction of the biliverdin-human serum albumin complex: evidence from circular dichroism," Arch. Biochem. Biophys. 298, 710-714 (1992).

Damian K. Bird, Long Yan, Kristin M. Vrotsos, Kevin W. Eliceiri, Emily M. Vaughan, Patricia J. Keely, John G. White, and Nirmala Ramanujam, "Metabolic Mapping of MCF10A Human Breast Cells via Multiphoton Fluorescence Lifetime Imaging of the Coenzyme NADH" Cancer Research, (2005).

Hai-Jui Lin, Petr Herman, and Joseph R. Lakowicz, "Fluorescence Lifetime-Resolved pH Imaging of Living Cells" Cytometry Part A :77- 89 (2003)

Yingru Liua, Jie Liub, Wolfram Tetzlaffb, Donald W. Patyc, Max S. Cynader "Biliverdin reductase, a major physiologic cytoprotectant, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis" Free Radical Biology and Medicine Vol.40, Pages 960-967 (2006)

Schwertner HA, Jackson WG, Tolan G. Association of low serum concentration of bilirubin with increased risk of coronary artery disease. Clin Chem Vol.40,18-23(1994).