

國立臺灣大學生命科學院生化科技學系暨研究所

碩士論文

Department of Biochemical Science and Technology

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis



利用二氧化矽奈米顆粒裝載抗癌藥物發展的新型態癌

症結合療法

Development of a novel silica based combination therapy

with antitumor drug utility

陳郁夫

Yu-Fu Chen

指導教授：何佳安 博士

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

中華民國 106 年 7 月

July 2017



## 謝誌

很高興終於完成了碩士班的學業，在這兩年中我學習到了許多，除了作為一位科學家應有的素養及精神外，我也學到了很多為人處事應有的態度及觀念，這一路走來也曾有過低潮期，但當我灰心甚至感覺迷失了目標時，身旁總是會有一群貴人相助，在此我想好好地對這些貴人們說聲謝謝。

首先我想先謝謝我的指導教授，何佳安老師，何老師一直以來都為了我們這群學生不遺餘力，我們能有一個這麼優渥的實驗環境，真的都是何老師為了我們積極爭取來的，除此之外，何老師對於教育學生真的十分有熱忱，老師從來不會忽視我們每位學生提出的問題，並也會在聽到我們的問題後認真的跟我們討論，作為一名老師可謂模範，我認為我受到老師這樣積極正面的能量影響良多，也會更加期許自己以後能夠成為像老師一樣值得尊敬的人。再來我要感謝師丈，吳立真老師，吳老師擁有的專業知識在我的題目中真的幫我非常多，也都會在我不知道下一步該往哪走時指點迷津，而且老師對於跟學生相處上沒有任何架子，所以跟吳老師討論時總會像是和朋友聊天一樣沒有壓力，對我來說是一個非常舒適的學術討論空間，真的謝謝吳老師給予我的各方幫忙。另外要特別感謝清大的楊家銘老師，楊老師實驗室為了本研究合成了許多不同劑型的載體，其中所花費的時間與精力真的無法衡量，我會努力不辜負您們的。最後要感謝徐士蘭老師、鄭建中老師、陳平老師、廖明淵老師以及以上共 7 位老師擔任我的口試委員，在與各位老師的問答上相信我一定能獲益良多，並促使自己在學術報告的實力更上一層樓。

在實驗室的學長姐中，我想先感謝靜瑩學姊，靜瑩學姊作為本題目的領頭者為我奠定了許多實驗上的基礎條件，讓我省下了許多條件測試的時間，並在我有實驗上的疑難雜症時都會給予我十分有用的建議，感謝之意難以言表。再來我要感謝易德學長，易德學長在我碩班兩年中是我結交的最重要的朋友，不論是研究上的問題或是自己私人的一些心事，跟他聊聊總是能讓我有繼續努力的動力，此外在很多簡報修改或是作圖技巧上，學長也讓我學到許多，他是我嚮往的目標。接下來要謝謝 lulu 學姊，lulu 學姊雖然平常看來很酷但其實對於學弟妹的問題，她都會仔細傾聽，並傳授寶貴的知識及經驗給我們，真的謝謝 lulu 學姊這兩年的陪伴，請受小弟一



拜。英風學長及 Amily 學姊雖然是 biosensor 組的學長姐，但兩位都有各自很精通的專業知識，且也都會主動來關心我們這群學弟妹們，是非常溫暖的兩個學長姐。

再來是我的同學跟學弟妹們，嘉予跟立斌是很可靠的夥伴，嘉予知道很多我以前沒學過的動物實驗知識，所以如果在動物實驗操作上有什麼問題都可以先跟他聊聊；立斌對於研究一直以來都是比別人更加認真向上，這也會勉勵我要跟他一樣努力向學。學弟妹中，映晨絕對是我最感謝的一位，她擁有的知識及對於計畫的執行力，真的非常值得學習，而且只要跟她在一起做實驗、聊聊天的時光總是那麼開心，謝謝妳啦映晨；小劉和佩穎有時看我低落時也都會來主動關心我，是很可愛的學妹們；沛慈和翎鈞有時也會當我的實驗小幫手，謝謝妳們啦。還有清哥，清哥是個非常認真的學弟，他跟我一起籌劃了一次聖誕節的活動，也會陪我操作繁複的動物實驗，謝啦清哥。以上謝謝各位實驗室的同仁們給予我的各方幫忙及勉勵。最後我要感謝我的父母，他們對我的支持是我前進的動力，謝謝您們，我愛您們。

要感謝的人真的太多了，沒辦法於此一一道謝，在此我以這篇謝誌對於這兩年內的所有貴人們致上深深的謝意。

## 中文摘要



過去治療癌症通常是以化療藥物直接去毒殺癌症細胞，然而這樣的方式對於癌症治療有諸多的限制及副作用產生，這可能是由於化療藥物的非專一性、腫瘤本身產生的抗藥性及腫瘤環境血管分佈複雜等情形而產生。因此在近年來，科學家們轉而將治療癌症的目光放在了腫瘤周邊的各微環境因子，希望藉由調控不同微環境因子去達到更佳的抗癌治療策略。

在本題目中，我所針對的腫瘤微環境因子有二，其一為腫瘤環境中的巨噬細胞群，在腫瘤環境中，巨噬細胞會分化為兩種截然不同的型態，一種為M1型態，在早先的研究中，它被認為是一種會促進發炎反應的巨噬細胞型態，也因此被認為是一種能促進免疫反應的巨噬細胞；而另一種型態為M2型態，是在腫瘤環境中較常見的巨噬細胞型態，其被認為是一種能促進組織修復及抗免疫反應的巨噬細胞型態，因此在我自己的題目中，想藉由給予免疫調節藥物使腫瘤環境的巨噬細胞，分化為類似於M1的巨噬細胞，以達到免疫治療癌細胞的效果。

另一個我想針對的腫瘤微環境因子為低氧環境，在整個腫瘤中存在著一些血管難以到達的地方，這些地方的癌細胞由於長期處於缺氧環境下，產生了較強的轉移能力及抗藥性，因此若使用傳統化療策略可能將無法根治這些區域的癌細胞，導致療程失敗，在此我想利用一個處於低氧環境才會被活化的前驅藥物來專一性的清除位於低氧環境的癌細胞，希望能藉此避免產生對處於正常氧環境的正常細胞的副作用，同時也能根除這些難以清除的癌細胞。

在此，我使用了矽奈米載體同時裝載低氧環境前驅藥物跟免疫調節藥物，一方面轉變腫瘤環境巨噬細胞型態，另一方面則可以毒殺處於低氧環境的癌細胞，來達到免疫治療及化療的效果，並期望結合兩者促成更強大的協同效應來治療癌症。

在實驗方面，我們先以動態光散射確認載體在載藥後的大小，且也確認了藥物裝載效率為何；在細胞實驗中我們測試了奈米劑型化藥物的效果，我們先以MTT assay測試並發現裝載於載體中的低氧環境前驅藥物能夠達到更強的癌細胞毒殺能力，且用q-PCR及flow cytometry證實免疫調節藥物裝載於載體中能持續地使巨噬細胞轉變為M1-like 巨噬細胞。

在細胞實驗中我們已經確定了裝載於載體的兩種藥物均能達到原本的效用，最後在活體實驗上，我們可以看到兩種藥物奈米劑型化為單一載體後對於腫瘤的生長能力確實有抑制的作用，而且效果目前看來是比 free drug 形式來的更好的。



## 英文摘要



Chemotherapy is a category of traditional cancer treatment that uses one or more anti-cancer drugs as part of a standardized chemotherapy regimen to eliminate tumor cells, but its major problems including identification of the dose for best anti-tumor effect, and minimization of unpleasant adverse effect. In recent years, tumor microenvironment (TME) has caught a lot of attention in improving therapeutic efficiency for cancer. Tumor-associated macrophages (TAMs) are one of the major factors affecting tumor microenvironment, and two types of macrophages, M1 and M2- type, are found in the TME. M1-type macrophages are anti-tumor macrophages; however, macrophages reside in the TME are often M2-type, which function in promoting the tumor growth through the release of anti-inflammatory cytokines. Therefore, the regulation of the M1:M2 ratio may be a novel, effective and smart strategy for the anti-cancer strategy. Furthermore the hypoxia stands as another key microenvironmental factor regulating multiple phenomenon associated with tumor progression. In this study, silica mesoporous nanoparticles (MSNs) were used to deliver multiple drugs (a hypoxia-activated prodrug and an immunomodulator) via the enhanced permeability and retention (EPR). This combinational strategy was anticipated to inhibit tumor growth and concurrently activate the immune system, leading to the production of tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells. The brilliance of our newly designed combination therapy is to prevent the formation of secondary tumor by induction of the immune memory. Our preliminary results showed that hypoxia-activated prodrug was able to inhibit Lewis lung carcinoma (LLC2) growth in hypoxia condition, and immunomodulator was sufficient to induce polarization of M1-type macrophages. Also, we verified that our nanodrug exhibited better efficiency in

growth inhibition of LLC2 and M1 polarization. In summary, this silica based combination therapeutic strategy holds the promising potential for clinical use.



**keyword: tumor microenvironment, immunotherapy, drug delivery system**

# 目錄



謝誌 .....	I
中文摘要 .....	III
英文摘要 .....	V
第一章 緒論 .....	1
1.1 前言 .....	1
1.2 腫瘤微環境 .....	2
1.3 傳統化學治療癌症之限制 .....	4
1.3.1 存在於低氧環境的癌細胞特性及其導致的化學療法限制 .....	4
1.3.2 腫瘤環境中的免疫細胞和化療治療限制的關聯 .....	6
1.3.3 腫瘤相關巨噬細胞 (Tumor-Associated Macrophage, TAM) .....	7
1.3.4 針對巨噬細胞的療法 .....	10
1.4 解決腫瘤環境對化學療法的限制 .....	12
1.4.1 奈米載體 .....	12
1.4.2 多孔洞矽奈米顆粒 (Mesoporous silica nanoparticles, MSN) .....	13
1.4.3 結合療法 .....	16
1.5 Imiquimod (IMQ) .....	17
1.6 Tirapazamine (TPZ) .....	19
第二章 實驗材料與儀器 .....	21
2.1 藥品試劑 .....	21
2.1.1 細胞實驗 .....	21
2.2 實驗儀器 .....	23
2.3 細胞株 .....	24
2.4 氣體 .....	24
第三章 實驗方法 .....	25
3.1 輽體粒徑測量-動態光散射粒徑分析儀 Dynamic Light Scattering Analyzer (DLS) .....	25
3.2 Tirapazamine(TPZ)之裝載效率 (Encapsulation efficiency, EE) .....	25



3.3 Imiquimod(IMQ) 之裝載效率 (Encapsulation efficiency, EE) .....	26
3.4 細胞實驗 .....	26
3.4.1 細胞培養 .....	26
3.4.2 細胞繼代 .....	27
3.4.3 細胞冷凍保存 .....	28
3.4.4 細胞解凍 .....	28
3.4.5 缺氧環境培養細胞的作法 .....	29
3.4.6 免疫細胞的分化方法 .....	29
3.5 細胞存活率實驗 (MTT assay) .....	30
3.6 細胞計數 .....	31
3.6.1 血球計數器 .....	31
3.6.2 Nexcelon Cellometer Auto T4 自動細胞計數 .....	31
3.7 基因表現量測試 .....	32
3.8 流式細胞儀 (Flow cytometry) : 表面抗原辨識 (surface marker recognition) .....	34
3.9 動物實驗設計 .....	34
<b>第四章 實驗動機與設計 .....</b>	<b>36</b>
4.1 實驗動機 .....	36
4.2 實驗設計 .....	37
<b>第五章 實驗結果 .....</b>	<b>38</b>
5.1 砂奈米顆粒 MSN 能有效裝載兩種疏水性藥物 .....	38
5.2 奈米劑型化之低氧環境前驅藥 Tirapazamine(TPZ)對癌細胞株 LL/2 的生長有較強的抑制能力 .....	39
5.3 奈米劑型化之低氧環境前驅藥物 Tirapazamine (TPZ) 對 M2 型態巨噬細胞的生長有較強的抑制能力 .....	41
5.4 奈米劑型化之免疫調節藥物 Imiquimod(IMQ)可促使處於 M2 型態變化中的巨噬細胞轉換為趨向 M1 型態的巨噬細胞 .....	43
5.5 動物活體實驗 : TPZ+IMQ 複合藥物之奈米劑型能有效抑制腫瘤生長 .....	52
5.6 結論 .....	54

第六章 討論與未來展望 ..... 56

第七章 參考文獻 ..... 57





# 第一章 緒論

## 1.1 前言

過往臨牀上，在治療癌症的策略上使用最為廣泛的即為化學治療法 (chemotherapy)，但化學療法也在近年來被認為是一個擁有許多限制及副作用的抗癌手段<sup>1,2</sup>，因此在近年來，科學家們為了改善傳統化療的各種缺點，他們將抗癌策略開發的思考範疇轉移到如何去調控腫瘤微環境 (tumor microenvironment)<sup>3,4</sup>，藉由調控腫瘤周遭的各種因子來達到治療癌症的效果而並非傳統化學治療直接將癌細胞作為藥物作用對象。在本論文中，我們的實驗目的便是希望藉由改變腫瘤微環境的免疫細胞型態來做為治療癌症的方法。



## 1.2 腫瘤微環境

腫瘤微環境是近年來在癌症治療上十分受到關注的一個領域，他涵括了許多要素，包括腫瘤周邊的血管、免疫細胞、細胞間基質及信號傳遞分子<sup>5-7</sup>（圖 1-1），這些要素構成了一個複雜的腫瘤環境，他們之間的相互作用也對於腫瘤生長有所影響，也因此在近代醫學中，有很多抗癌策略的開發是藉由調控腫瘤微環境因素來達到治療癌症的效果，例如針對腫瘤周遭的血管增生進行抑制，使得固態腫瘤無法獲得足夠的氧氣及營養源，最終導致腫瘤消除的治療策略<sup>8</sup>，又或是藉由將腫瘤環境中的纖維母細胞清除，使得有更多的免疫細胞可以浸潤到腫瘤組織達到免疫治療癌症的效果<sup>9</sup>，諸如此類的抗癌策略皆非直接對癌細胞標靶治療，而是從其週邊的環境著手開發治療策略，因此我們也認為在現代醫學治療腫瘤來說，針對腫瘤微環境的抗癌策略開發將是未來的主要趨勢，藉此改善傳統化療的限制。

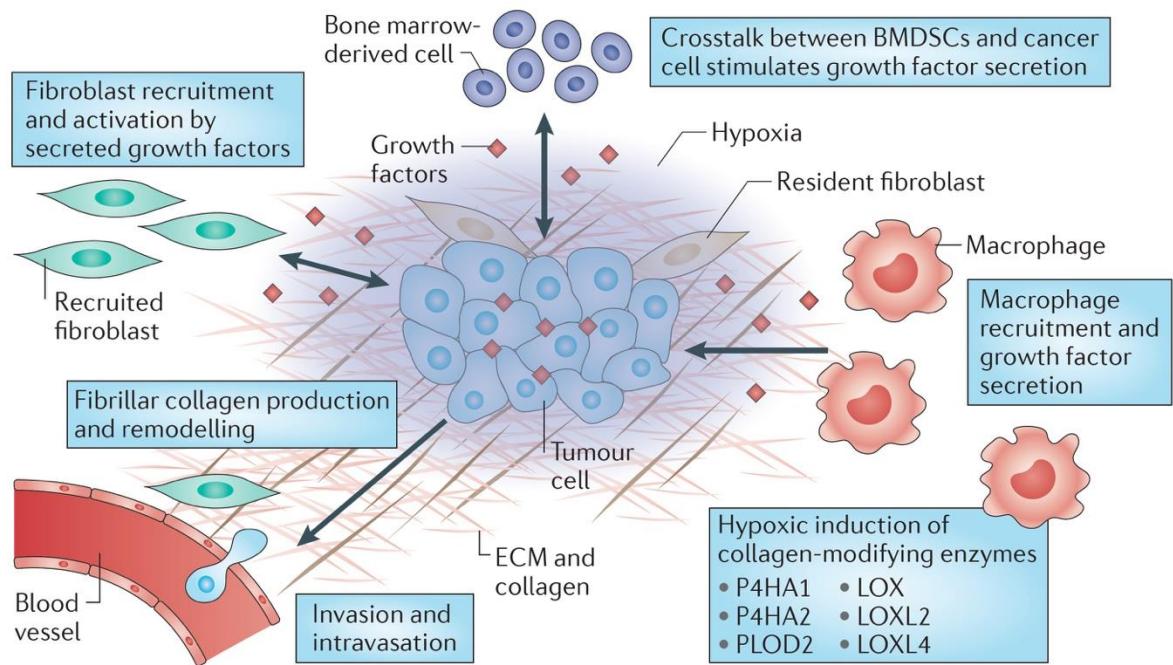


圖 1-1 腫瘤微環境的組成要素<sup>5-7</sup>



## 1.3 傳統化學治療癌症之限制

### 1.3.1 存在於低氧環境的癌細胞特性及其導致的化學療法限制

在整個固態腫瘤組織中，因為組織的不規則性，腫瘤周遭的血管很容易生長為分佈極度不均的狀態<sup>10</sup>（圖 1-2），而這樣的狀態將會使得腫瘤環境會分成血管分佈較多的正常氧環境，及血管難以伸達的低氧環境，其中，存在於低氧環境的癌細胞由於要在氧氣及養分較不充足的環境中生存，他們會衍生出較強的抗藥性及轉移能力<sup>7</sup>（圖 1-3），因此對於傳統化療而言，這些癌細胞常常是導致療程失敗的主要原因。除了上述低氧環境導致的細胞特性差異外，周邊血管的不均勻分佈也會使得化療藥物無法均勻地滲透進腫瘤組織（圖 1-2），使得大部分的藥物可能堆積在血管分佈較密集的腫瘤外側（圖 1-2），最終使得藥物無法將腫瘤細胞完全清除乾淨，倖存下來的癌細胞便有可能轉移到其他組織形成第二腫瘤，而假設想藉由提升藥物劑量的方式來克服藥物分佈不均的問題，又將可能產生藥物對於正常組織的副作用，因此如何去解決由於血管分佈不均所導致的化學治療限制，是科學家們現在面臨的一大難題。

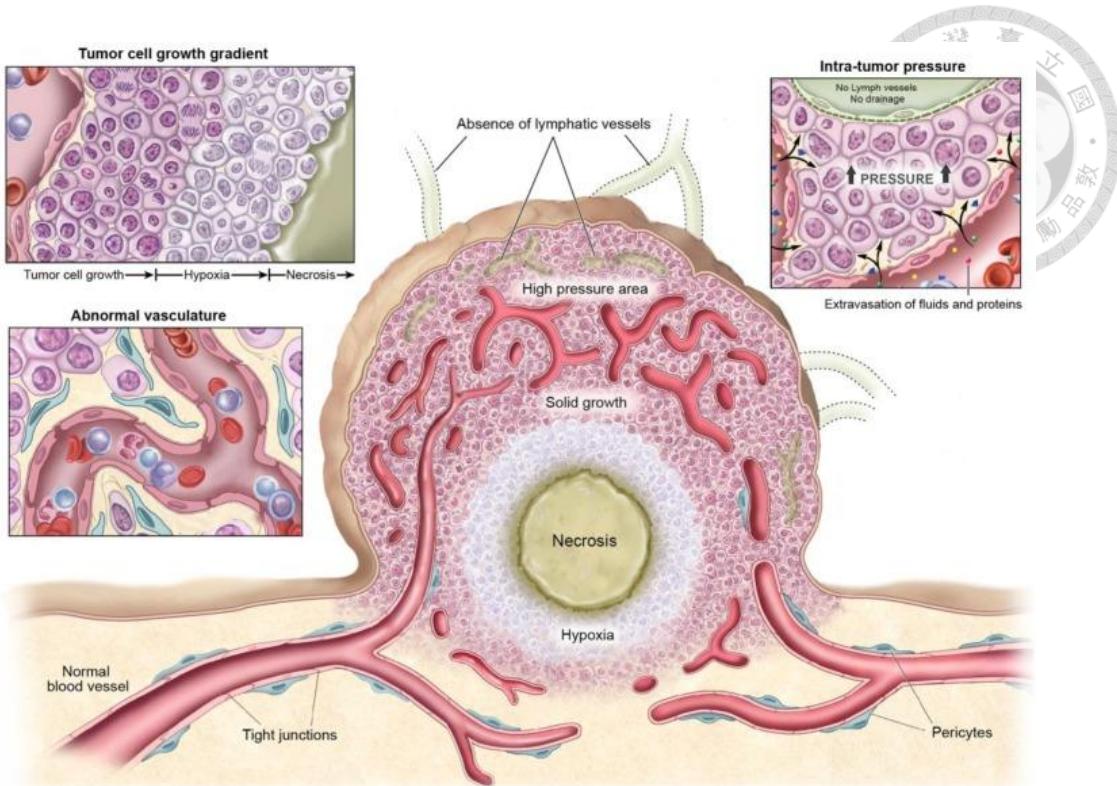


圖 1-2 腫瘤血管分佈不均導致的腫瘤血管分佈不均導致的低氧環境<sup>10</sup>

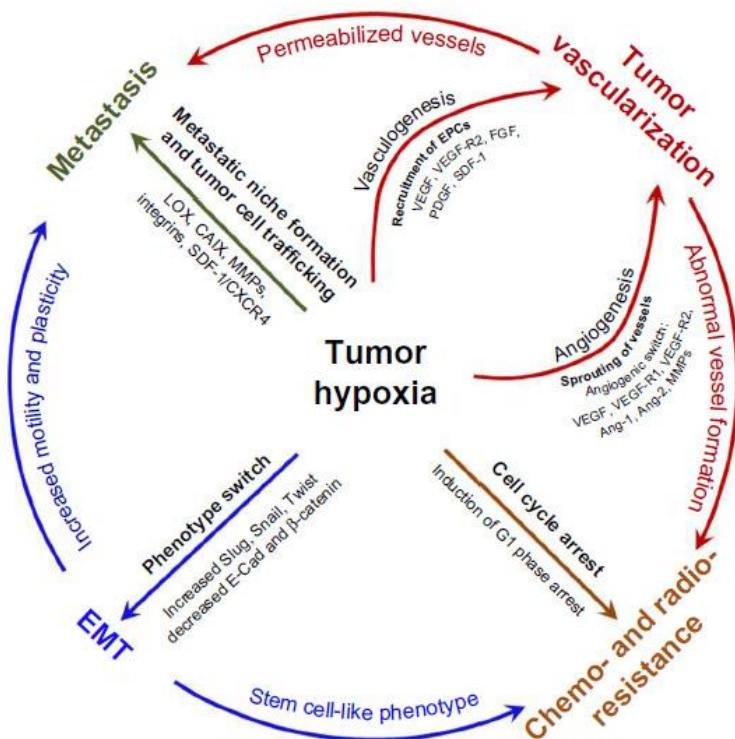


圖 1-3 處於低氧環境的癌細胞有較強的抗藥性及轉移能力<sup>7</sup>

### 1.3.2 腫瘤環境中的免疫細胞和化療治療限制的關聯



一般來說，免疫系統執行對象皆為外來的病源，無論是病毒或是細菌等皆為如此，只有在一些特殊的情況，免疫系統才會將原本就存在於體內的細胞作為病原清除，癌細胞即為這樣的特殊例子之一<sup>11</sup>。癌細胞為一高度變異的人體內細胞，其產生原因有許多，包括人暴露於輻射線中、病毒感染導致的細胞不正常化、飲食作息不正常等皆有可能是癌症產生的原因，而這樣的細胞癌化過程中，會使細胞不正常增生導致惡性腫瘤的形成，這就是我們一般認知的癌症，而由於癌症細胞的高度變異性，使其成為了可以被人體免疫系統辨識的目標，因此免疫系統本來應該是會將這樣的危險因子從體內排除，然而在近年來的研究中，科學家們發現腫瘤環境的細胞，不論是癌細胞本身或是周邊的免疫細胞，會藉由分泌特定的蛋白或是將特定蛋白表現於細胞膜上，來規避免疫系統的辨認<sup>12</sup>，使其可以抑制住免疫系統的消滅，此外也有研究指出在長期化學治療的療程中，癌細胞似乎會衍生出更為強大的免疫抑制能力<sup>8,13</sup>，因此在現代醫學中，評估腫瘤環境的各項免疫因素且進行改善也是一個十分重要的課題。

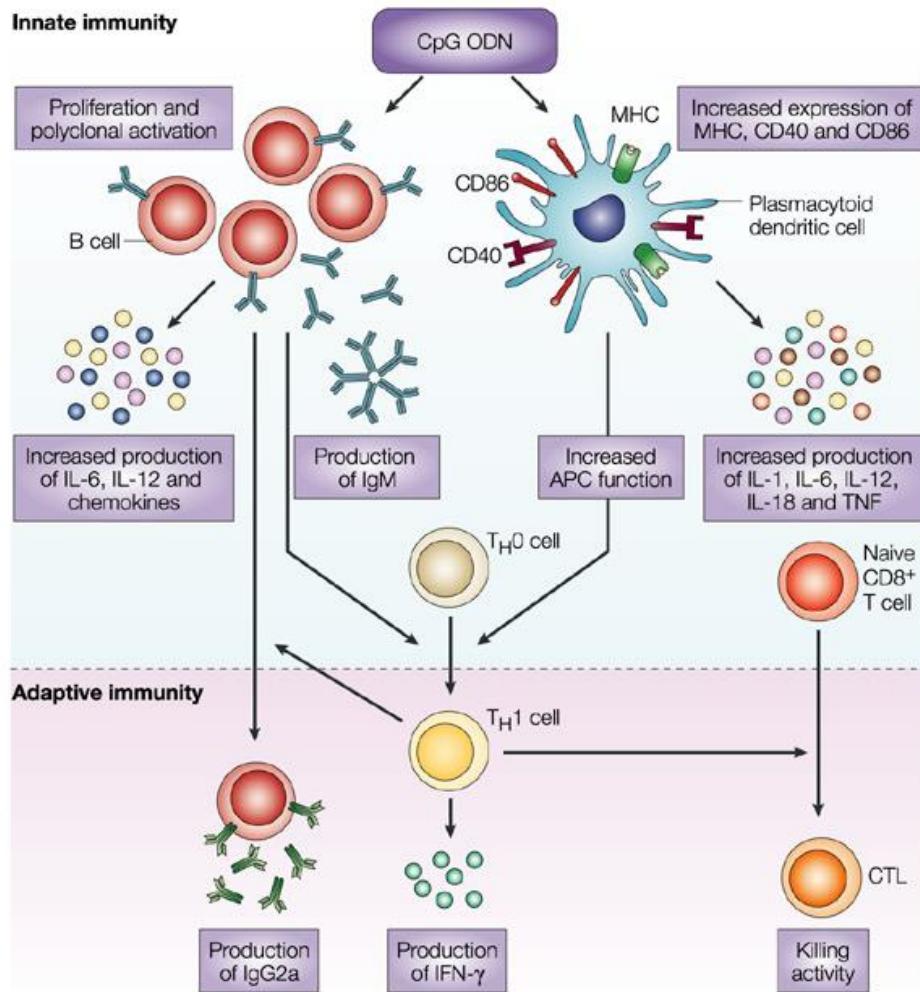
### 1.3.3 腫瘤相關巨噬細胞 (Tumor-Associated Macrophage, TAM)

巨噬細胞在一般的免疫系統中主要扮演的角色為抗原呈現細胞 (Antigen presenting cell, APC) ，這樣的細胞能夠將被免疫系統認定為外來病原的因子作為抗原將其呈現給下游未活化的 T 細胞，使其活化並產生對該抗原具有專一性的毒殺性 T 細胞<sup>14</sup>，因此對於正常組織來說，巨噬細胞是十分重要的免疫細胞可以用於對抗外來病原。而在腫瘤環境中的免疫細胞群中，主要存在的細胞種類便為巨噬細胞，科學家們將其稱為腫瘤相關巨噬細胞 (TAM)<sup>15</sup>，在早先的文獻中甚至指出這些腫瘤內的巨噬細胞甚至可以達到整體腫瘤質量的五成以上<sup>16</sup>，且也有許多的研究指出這些腫瘤相關巨噬細胞在腫瘤內的累積是和腫瘤治療的成功率成反比的<sup>17-19</sup>。而在腫瘤相關巨噬細胞中，我們又可以將其分為兩種型態，分別為 M1 型態及 M2 型態。

M1 型態為促免疫反應型的巨噬細胞，他在腫瘤中扮演的角色即為吸引並活化其他的免疫細胞，以攻打逐漸惡化的腫瘤細胞，他們在免疫系統中能夠分泌許多促發炎因子 (proinflammatory cytokine) 、活性氧化物及一氧化氮<sup>20</sup>、能夠吸引自然殺手細胞 (NK cells)<sup>21</sup> 等免疫細胞的趨化因子 (chemokine) 、T<sub>H</sub>1 免疫反應相關物質<sup>22</sup>、表現共刺激分子等物質。促進 T<sub>H</sub>1 免疫反應的發生是 M1 細胞在清除外來病原及癌細胞時很重要的一環，T<sub>H</sub>1 免疫反應的示意圖<sup>22</sup> (圖 1-4)，未受活化的 naive T 細胞會在和抗原呈現細胞接觸後，而決定往 T<sub>H</sub>1 或是 T<sub>H</sub>2 的方向進行分化，若抗原呈現細胞分泌的細胞因子為促發炎類型的 IL-12<sup>16</sup>，他將會使得 naive T 細胞往 T<sub>H</sub>1 的方向進行分化，而在活化後進一步活化下游的 CD8 T 細胞活化為針對特定抗原具有毒殺性的胞殺性 T 細胞。在早先的文獻中，M1 型態的巨噬細胞被發現會分泌會吸引 T<sub>H</sub>1 免疫反應相關的細胞到腫瘤組織中，包括有 CXCL9、CXCL10 等趨化因子<sup>23</sup>，此外也會分泌特定細胞因子如 IL-12 直接促使 T<sub>H</sub>1 免疫反應的進行<sup>23</sup>，最終就如同上述所說，會產生針對癌細胞具有專一性的毒殺性 T 細胞，達到一個免疫治療癌症的效果。

M2 型態的巨噬細胞在腫瘤中扮演的角色是和 M1 完全相反的，在研究中發現腫瘤內的巨噬細胞大部份都是以 M2 型態存在<sup>18</sup>，而 M2 型態的巨噬細胞能藉由分泌特定生長因子來增加組織修復效率<sup>21</sup>，因此在腫瘤中能夠促使癌細胞增生，

且它亦會分泌促使細胞轉移能力上升的蛋白，使得癌細胞能夠脫離第一腫瘤的病灶至別的位置產生第二腫瘤，更有研究指出他能夠分泌趨化因子吸引調節性 T 細胞到達腫瘤區域，調節性 T 細胞在正常組織中是扮演一個抑制免疫反應的細胞，因為有時過度的發炎或是免疫反應反而會導致組織修復速度過慢，因此才需要能夠在適當的時間抑制免疫反應的調節性 T 細胞，但在腫瘤組織中這樣的細胞反而成為了腫瘤免疫抑制能力的幫手<sup>24</sup>，使得本該對抗癌細胞的免疫細胞群無法正常發揮作用<sup>24</sup>，而 M2 細胞除了上述幾點免疫抑制能力外，他也能夠 T<sub>H</sub>2 反應的進行，T<sub>H</sub>2 相關的細胞又能夠分泌細胞因子回饋活化更多的 M2 型態巨噬細胞，使得腫瘤細胞增生旺盛，因此如何去改變腫瘤環境的巨噬細胞型態比例，是一個十分吸引人的研究方向，如果可以使腫瘤內的 M2 型態巨噬細胞轉變為類似 M1 的型態，就可以扭轉腫瘤內的免疫抑制環境。



Nature Reviews | Immunology

圖 1-4 由抗原呈現細胞產生的 T<sub>H</sub>1 免疫反應<sup>22</sup>



### 1.3.4 針對巨噬細胞的療法

由於腫瘤環境的巨噬細胞大部份均以 M2 的型態存在<sup>18</sup>，對於腫瘤的生長及轉移能力都具有正向調控的影響，因此在早先的研究中，也有許多針對腫瘤內巨噬細胞的抗癌策略開發<sup>25</sup>（圖 1-5），在此提出的文獻是由 Roheena Z Panni 等人於 2013 年所發表的著作整理<sup>26</sup>，他們將這些針對巨噬細胞的療法分為以下幾個類別（附表 1-1）：（1）防止未分化為巨噬細胞的單核球細胞從血管進入腫瘤中，藉此降低腫瘤內的巨噬細胞數（2）藉由藥物抑制腫瘤內巨噬細胞分化為 M2 型態（3）直接以藥物毒殺腫瘤內 M2 巨噬細胞（4）以藥物作用於不同於巨噬細胞的其他免疫細胞來扭轉因為 M2 而導致的腫瘤免疫抑制環境（5）將腫瘤內的促腫瘤生長巨噬細胞轉變為促免疫反應的巨噬細胞，從上述幾個治療類別中我們可以發現，針對 M2 巨噬細胞的治療策略中也存在著將其轉變為 M1 的策略，因此也證明了我們實驗的可行性。

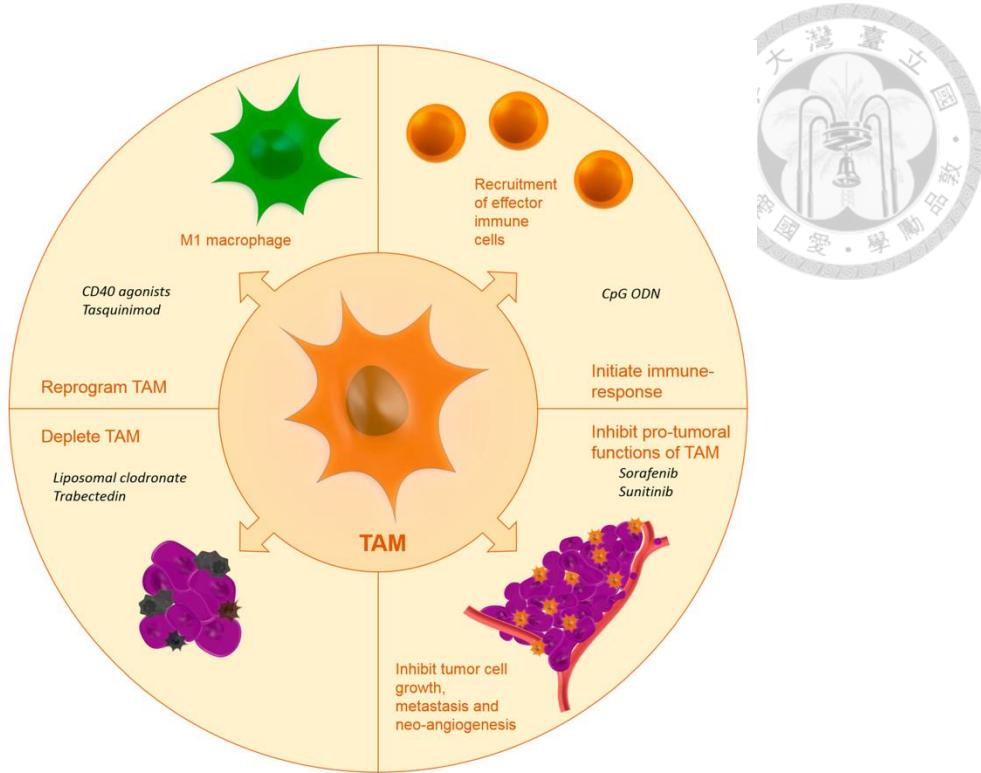


圖 1-5 調控腫瘤相關巨噬細胞的免疫治療策略示意圖<sup>25</sup>

Targeting strategies for tumor-associated macrophages in mouse models.

Target or drug	Mechanism of action
CCL2-CCR2 axis	Prevents monocyte recruitment
CSF1-CSF1R axis	Inhibits/reprograms TAMs
CXCL12-CXCR4 axis	Prevents recruitment of macrophages
DNA repair mechanisms (trabectedin)	Targets TAMs
Clodronate and zoledronic acid	Induces macrophage apoptosis
Anti-CpG and IL-10 Ab	Prevents antitumor to protumor macrophage polarization
CD40 agonist	Restores tumor immunity
Sibulin	Suppresses NF- $\kappa$ B and STAT3 phosphorylation, blocks angiogenesis

Ab: Antibody; CSF1R: CSF1 receptor; TAM: Tumor-associated macrophage.

表 1-1 針對腫瘤內的巨噬細胞開發的抗癌策略<sup>26</sup>

## 1.4 解決腫瘤環境對化學療法的限制

### 1.4.1 奈米載體

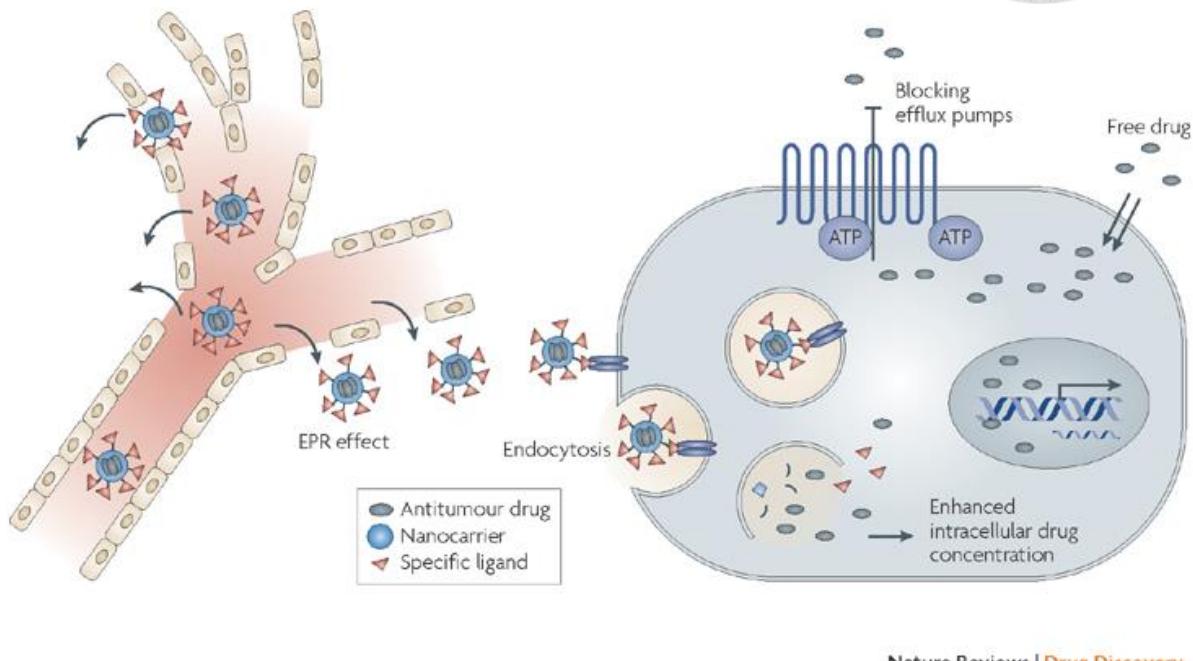


載體的直徑若小於  $1\mu\text{m}$  我們將其定義為奈米載體，但實際上理想的大小範圍應在  $20\text{-}300\text{ nm}$  間，因為小於  $20\text{ nm}$  的載體較容易被腎臟系統所排出，而大於  $300\text{ nm}$  的載體又容易被體內的網狀內皮系統（Reticuloendothelial system, RES）辨識清除，因此適當大小的奈米載體能有效延長藥物在體內的循環時間，而利用這樣的奈米載體裝載藥物還可以解決許多臨床用藥的缺點<sup>27,28</sup>。最常見的如化學治療法，利用將化學治療藥物裝載進奈米載體中，可以減低藥物對正常細胞的副作用<sup>10</sup>，且可以使原本疏水性質的藥物能應用於體內，此外由於載體的保護下，許多容易被分解的藥物或是 siRNA 可以增加其在體內的半衰期，以延長藥物或是 siRNA 的療效<sup>29</sup>，並減低整個療程中的藥物投予量。另外也可以在載體上修飾具有專一性的抗體<sup>30</sup>、適體<sup>31</sup>、多醣類，藉此可以將載體累積在特定細胞群，防止藥物堆積在非目標的器官中<sup>28</sup>，此外在早先研究中也有針對載體本身設計讓藥物可以有緩慢釋放於特定病灶的能力<sup>32</sup>、多重治療能力<sup>33</sup>等功能。

從細胞層級也能夠看出奈米劑型化的優勢，奈米劑型化的藥物可以增加細胞吞噬（Endocytosis）的能力<sup>34</sup>，使藥物可以以較大量的形式進入單一細胞（圖 1-6），這樣的特性改善了以往小分子藥物只能藉由擴散作用的方式穿越細胞膜，導致藥物進入細胞的藥量十分不穩定的缺點，因為細胞膜上有許多的運輸蛋白鑲嵌於此，而其中又有許多特定的傳輸蛋白在細胞膜上扮演著守門員的角色，可以將欲擴散進入細胞內的藥物再排出，增加細胞的藥物抗性，因此若改以奈米載體將藥物傳輸到腫瘤細胞，應當能避免癌細胞膜上的藥物傳輸蛋白將藥物給排出（圖 1-6），這樣的奈米化藥物也是現代醫學的主流趨勢之一。

從上述整理下來，適當大小的奈米載體可以（1）避免藥物被快速清除，增加藥物半衰期（2）避免藥物對正常細胞的副作用（3）使疏水性藥物得以進入血液循環（4）增加藥物被細胞吞噬的能力，改善小分子藥物進入細胞的困難度（5）減少藥物總投予量

值得一提的是，奈米載體在材料的選擇上也十分重要，如何選出藥物裝載效率高、藥物釋放能力佳且又不會對生物體產生額外副作用的載體是幾個重要的篩選條件。



Nature Reviews | Drug Discovery

圖 1-6 利用奈米載體傳輸藥物可以提高藥物在單一細胞的累積量並防止細胞膜上的藥物傳輸蛋白將藥物排出<sup>34</sup>

#### 1.4.2 多孔洞矽奈米顆粒 (Mesoporous silica nanoparticles, MSN)

矽奈米載體是在藥物傳遞系統上已經應用的十分廣泛的一種材料，其中又以多孔洞矽奈米顆粒 (Mesoporous silica nanoparticles, MSN) 應用性最廣，由於多孔洞矽奈米顆粒在結構上是由許多矽骨架構成的載體，構成的載體外圍本身就可以進行一些修飾來攜帶藥物或是抗體，而每個矽骨架又有各自的空間可以去裝載藥物或是螢光染劑，因此這樣的載體作為一個藥物傳輸系統是非常合適的。

除了上述提到的結構優勢外，多孔洞矽奈米顆粒還有許多優勢之處<sup>35</sup> (圖 1-7)，例如 (1) 由於其高度穩定性可以在體內有較長久的循環時間 (2) 多孔洞矽奈米顆粒由於它擁有大小約在 2-50 nm 的複數孔洞，可以大幅增加藥物裝載的量，且孔洞大小可以依照使用需求進行調整 (3) 矽奈米顆粒為生物可降解的材料，因此不會在人體內產生額外副作用 (4) 在藥物確認極性的條件下，選擇適當的溶劑便可以

將藥物裝載進矽奈米顆粒中，無論是疏水性藥物或是親水性藥物均可以有一定程度的裝載能力。綜上所述，我們認為在本題目的載體選擇上，多孔洞矽奈米顆粒是非常合適的選擇。



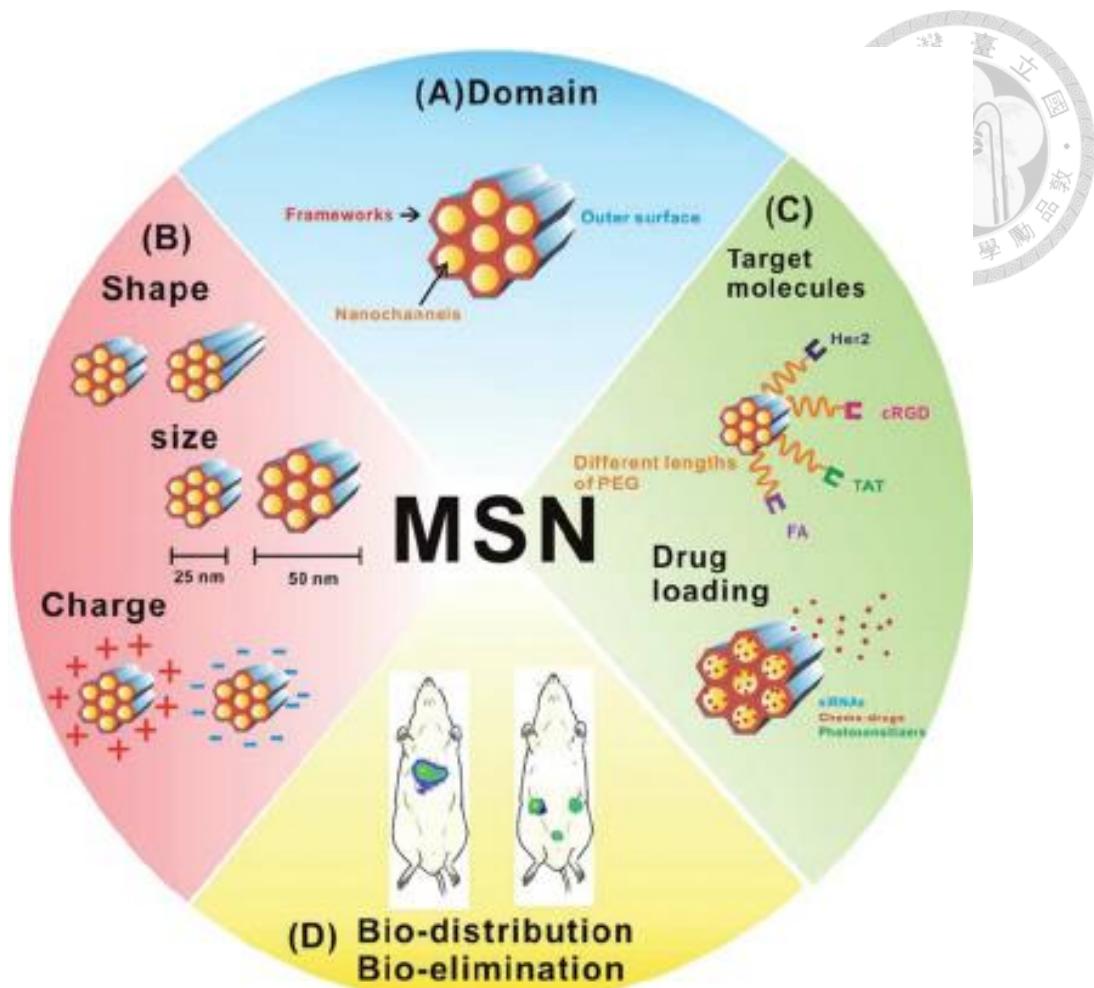


圖 1-7 多孔洞矽奈米顆粒的優勢<sup>35</sup>



### 1.4.3 結合療法

誠如前面所提到的，單一化學治療腫瘤有許多的限制及副作用，因此在現代醫學中，對於癌症的治療策略常常是兩種以上的方法去做合併<sup>36</sup>，藉此達到互補兩種策略不足之處，舉例來說，光熱治療由於外部光源的限制經常只能用於清除黑色素瘤等表皮細胞病變產生的癌症，因此有許多的研究中便會以合併化學治療的方式來彌補光熱治療無法清除的深處腫瘤的不足之處<sup>33</sup>。而腫瘤微環境中的各項因素，在現代醫學也很常被拿來作為癌症治療的目標之一<sup>37,38</sup>，藉由傳統化學治療加上對腫瘤周邊免疫細胞的活化，也確實在諸多文獻中發現兩者的結合能有效抑制腫瘤生長。

## 1.5 Imiquimod (IMQ)



Imiquimod，簡稱為 IMQ，化學式為 1-(2-methylpropyl)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amine，結構式如圖（圖 1-8），分子量為 240.304 g/mol，為疏水性極高的小分子藥物。此藥物為免疫調節劑，藥物作用機制為接上 toll-like receptor (TLR) 並活化下游促免疫反應的轉錄因子<sup>39,40</sup>，產生促發炎反應相關細胞因子。在一般臨床應用上因為其疏水性大部份都是用於塗抹劑型用以治療菜花、尖形濕疣、淺層基底細胞癌等疾病<sup>41</sup>。其作用受體 toll-like receptor-7 (TLR-7) 是位於細胞 endosome 內的受體<sup>42</sup>，TLR-7 生物體中的主要功能是辨識外來病原，並加以排除外來病原。而在早先的研究中我們也發現 TLR-7 為抗原呈現細胞常常表現的受體之一，包括巨噬細胞、樹突細胞<sup>43</sup> 及少數癌細胞上<sup>44</sup>，當抗原呈現細胞要將抗原呈現給下游未活化的免疫細胞時，會藉由 TLR-7 活化下游 NF-κB (nuclear factor-kappa B) 路徑，啟動促發炎反應相關的細胞因子蛋白表現<sup>45-48</sup>（圖 1-9）。NF-κB 平常是以二聚體形式存在且在未活化時會和抑制蛋白 IκBα 形成複合體，當其被激活時，NF-κB 和抑制蛋白 IκBα 形成的複合體會因為 IκB 激酶，使 IκBα 蛋白磷酸化，這將導致 IκBα 的泛素化，使得 IκBα 從 NF-κB 上脫離下來，最終 IκBα 被蛋白酶體所降解。被激活的 NF-κB 接下來轉移到細胞核內，在這裡會結合到 DNA 上的特異性序列上<sup>49,50</sup>（圖 1-1）。DNA 和 NF-κB 形成的複合體接下來會招募其它蛋白，如輔激活物與 RNA 聚合酶，這些蛋白將下游的 DNA 轉錄為 mRNA 並轉而被轉譯為蛋白質，這些蛋白最終導致細胞功能發生改變，產生促發炎反應相關細胞因子。

IMQ 對於治療癌症主要利用的即為影響腫瘤內巨噬細胞的型態，在早先的文獻中也確實有看到巨噬細胞再給予了 IMQ 後能夠轉變為與 M1 較相似的型態<sup>15,51</sup>，且在同篇文獻的 *in vitro* 實驗中也觀察到了，因為給予 IMQ 而轉變成的類 M1 巨噬細胞確實能分泌與發炎反應相關的細胞因子。此外，也有些許文獻指出 IMQ 抑制腫瘤生長的原因有部分是藉由直接促使癌細胞的死亡<sup>52,53</sup>。

綜上所述，我們認為若以 IMQ 作為免疫調節藥物來治療癌症應該是個可行的策略，但礙於其極度疏水的特性而限制了它治療癌症的潛力<sup>41,54</sup>，除此之外，這樣的免疫調節藥物若是以一種系統性的給藥方法也很可能導致全身產生過強的發炎反應<sup>48</sup>，在此我們便想利用矽奈米顆粒來裝載 IMQ，希望能藉此拓展 IMQ 在臨床使用上的範圍，達到一個更佳有效的癌症免疫治療效果。

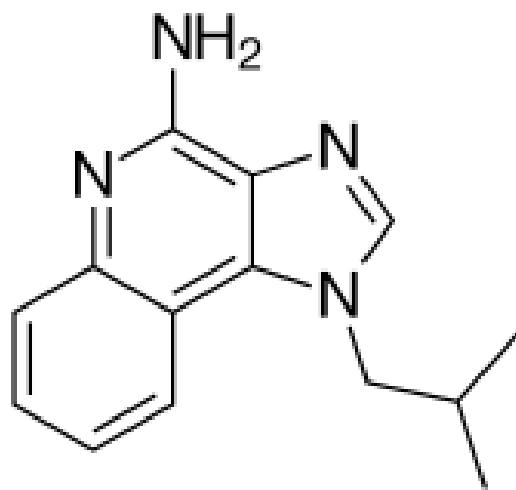


圖 1-8 Imiquimod (IMQ)化學結構式<sup>55</sup>

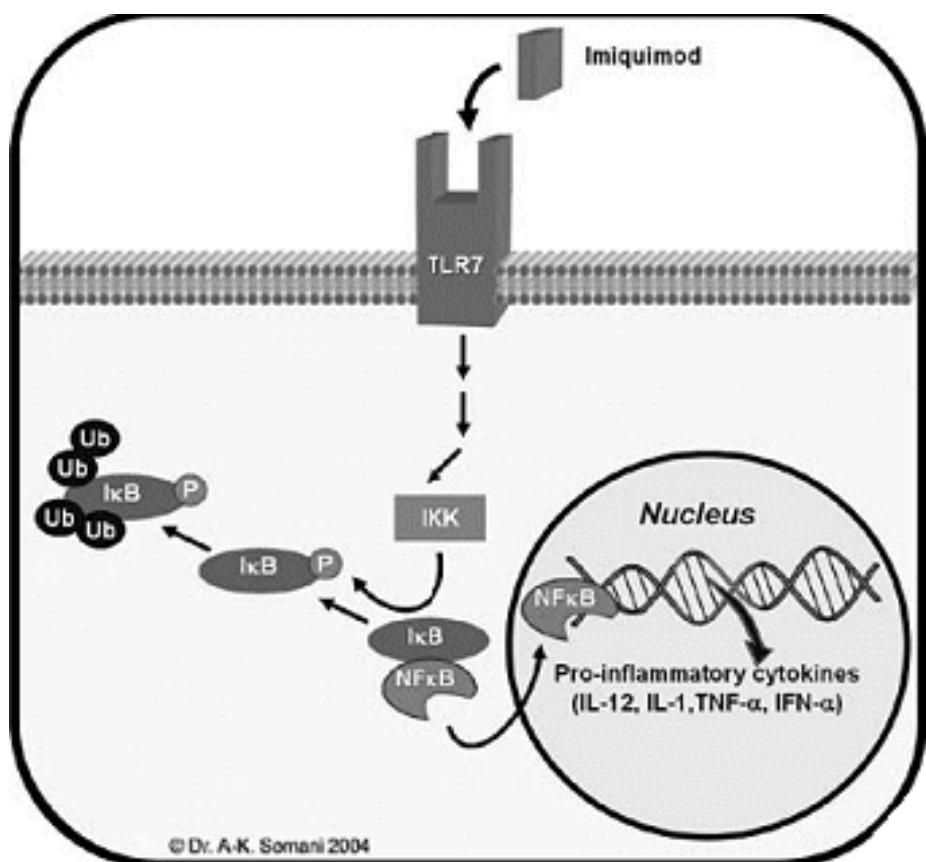


圖 1-9 Imiquimod 作用機制示意圖<sup>47</sup>



## 1.6 Tirapazamine (TPZ)

Tirapazamine，簡稱為 TPZ，化學式為 3-Amino-1,2,4-benzotriazine-1,4 Dioxide，結構式如圖（圖 1-10），分子量為 178.158 g/mol，亦為疏水性較強的藥物。此藥物為一生物還原性藥物，可以在低氧環境下被癌細胞內的還原酶還原為具有自由基的活化態，並對這些處於低氧環境的癌細胞進行專一性的毒殺作用，其作用機制為利用被還原酶氧化而產生的自由基去攻擊 DNA 的結構，使 DNA 斷裂而造成細胞凋亡（圖 1-11）；另外也有研究指出自由基亦會去攻擊 DNA 合成相關的拓樸酶（DNA topoisomerase），因而導致 DNA 無法執行正常的修復程序，導致細胞凋亡<sup>56</sup>。目前 TPZ 已經在許多研究中被發現可以對癌細胞產生毒殺性，且進入臨床三期的階段<sup>57</sup>。

綜上所述，我們認為這樣的低氧環境前驅藥物應該能有效清除處於低氧環境的癌細胞，然而在早先的文獻中也指出<sup>58,59</sup>，TPZ 在 2D 培養的細胞中雖能發揮十分良好的細胞毒殺能力，但換到 3D 培養的細胞中效果卻下降許多，這是由於 TPZ 要滲透進腫瘤必須穿過許多物理屏障，而在過程中便會逐漸活化使得毒殺低氧環境的癌細胞效果不如預期，因此本篇研究就是想利用矽奈米顆粒來作為藥物傳輸系統，增加 TPZ 於癌症治療上的效果。

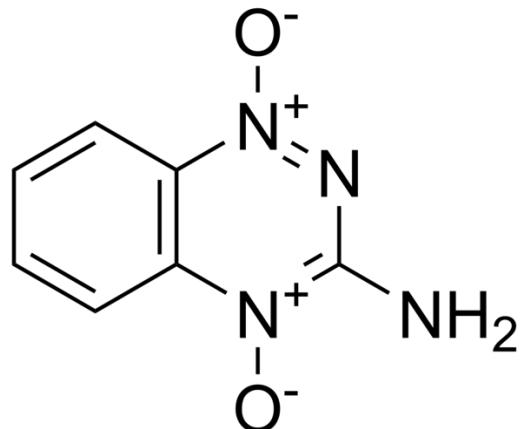
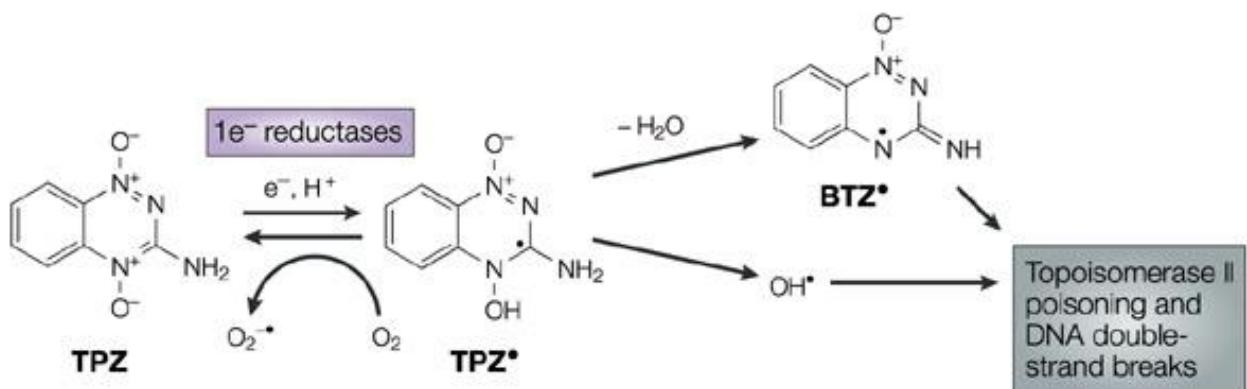


圖 1-10 Tirapazamine (TPZ)化學結構式<sup>57</sup>



Nature Reviews | Cancer

圖 1-11 Tirapazamine 作用機制圖<sup>60</sup>

## 第二章 實驗材料與儀器

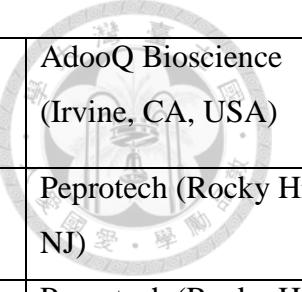
### 2.1 藥品試劑



表一 實驗藥品表單

#### 2.1.1 細胞實驗

藥品名稱	分子式/縮寫	製造廠商
Cell culture Dimethyl Sulfoxide	DMSO	MDBio, Inc (Qingdao, China)
Sodium chloride	NaCl	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Potassium chloride	KCl	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Sodium phosphate dibasic	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Potassium phosphate monobasic	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Trypan blue (0.4%)	C <sub>34</sub> H <sub>24</sub> N <sub>6</sub> Na <sub>4</sub> O <sub>14</sub> S <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Thiazolyl blue tetrazolium bromide	MTT	MDBio, Inc (Qingdao, China)
	iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
	iQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
	Griess reagent (modified)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
1-isobutyl-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amine	IMQ	TCI (Tokyo, Japan)



3-Amino-1,2,4-benzotriazine-1,4 Dioxide	TPZ	AdooQ Bioscience (Irvine, CA, USA)
Recombinant Murine interleukin 4	IL-4	Peprotech (Rocky Hill, NJ)
Recombinant Murine Interferon gamma	IFN- $\gamma$	Peprotech (Rocky Hill, NJ)
Lipopolysaccharides from Escherichia coli 055: B5	LPS	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
	Anti-mouse CD86 antibody	Biolegend (San Diego, CA, USA)
	Anti-mouse CD206 antibody	Biolegend (San Diego, CA, USA)
Chloroform	CHCl <sub>3</sub>	Merck (Whitehouse Station, NJ, USA)
Isopropanol ether	CH <sub>3</sub> CHOHCH <sub>3</sub>	J.T.Baker (Phillipsburg, NJ, USA)

## 2.1.2 引子序列

基因名稱	Accession Number	序列 (從 5 端至 3 端)
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH	NM_008084	F-ATCTTGGGCTACACTGAGGA
		R-GCCGTATTCAATTGTACATACCA
Interleukin 12p40 subunit, IL-12p40	NM_008352	F-CCATTCCCTACTTCTCCCTCAA
		R-GCATTGGACTTCGGTAGATG
Inducible nitric oxide synthase 2, iNOS	NM_0110927	F-CTCCTCCACCCTACCAAGTA
		R-AAGGAAGAGTGAGAGAGGCAAAG
Chemokine (C-X-C motif) ligand 10, CXCL10	NM_021274	F-AGTGGATGGCTAGTCCTAAT
		R-AATTCTGCTTCGGCAGTTA

## 2.2 實驗儀器



表二 實驗儀器表單

儀器名稱	廠牌型號
恆溫水浴槽 (Water bath)	Precision 280 series Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
恆溫培養箱 (Cell incubator)	SCA-165DS ASTEC (Japan)
動態光散射儀 (Dynamic light scattering, DLS)	Zetasizer Nano ZS Malvern (Worcestershire, UK)
微孔盤分析儀 (Microplate reader)	Sunrise TECAN (Männedorf, Switzerland)
溫度梯度核酸即時定量分析 (Real-Time PCR)	CFX Connect Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
超聲波液體振盪器 (Ultrasonic Cleaner)	Aquanonic 75D VWR (NY, USA)
高速離心機 (Centrifuge)	Z 36 HK HERMLE (Wehingen, Germany)
螢光光譜儀 (Fluorescence spectrophotometer)	Cary Eclipse Varian (Palo Alto, CA, USA)
酸鹼度計 (pH meter)	PB-10 Sartorius AG (Göttingen, Germany)
流式細胞儀 (Flow cytometry)	FACSCabular Becton Dickinson (NJ, USA)
振盪器 (Vortex-Genie 2)	G-560 Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
細胞自動計數儀 (Cellometer)	Auto T4 Nexcelom Bioscience (San Diego, California, USA)



## 2.3 細胞株

表三 實驗細胞株表單

細胞株名稱	所屬種類	來源
LL/2	<i>Mus musculus, mouse</i>	NCKU (Tainan, Taiwan)
RAW264.7	<i>Mus musculus, mouse</i>	BCRC (Hsinchu, Taiwan)

## 2.4 氣體

表四 實驗氣體清單

氣體比例	廠商
1% O <sub>2</sub> 、5%CO <sub>2</sub> 、94% N <sub>2</sub>	巧充 (Taipei, Taiwan) 信華 (Taipei, Taiwan)
5% O <sub>2</sub> 、5%CO <sub>2</sub> 、90% N <sub>2</sub>	巧充 (Taipei, Taiwan) 信華 (Taipei, Taiwan)
10% O <sub>2</sub> 、5%CO <sub>2</sub> 、85% N <sub>2</sub>	巧充 (Taipei, Taiwan) 信華 (Taipei, Taiwan)

## 第三章 實驗方法



### 3.1 載體粒徑測量-動態光散射粒徑分析儀 Dynamic Light Scattering

#### Analyzer (DLS)

原理：一般認知上，物質若處於溶液中會行布朗運動，且物質在被光照射後將會產生散射光，因此可以利用不同物質在溶液中散色光之變化，來推算出該粒子大小的方式。

步驟：

1. 將已裝載藥物的 MSN 以電子秤量約 1mg 於已滅菌之 eppendorf
2. 以 ddWater 回溶載體
3. 取適當量和適當體積的回溶夜偵測
4. 同一條件之組別測量三次
5. 選取適當之結果

### 3.2 Tirapazamine(TPZ)之裝載效率 (Encapsulation efficiency, EE)

原理：TPZ 在約 460 nm 時有一吸收光譜可作為定量之依據，故可以使用 ELISA reader 測量其吸收光作為測量藥物含量的方法。

步驟：

1. 將已裝載藥物的 MSN 以電子秤量約 1mg 於已滅菌之 eppendorf
2. 以 500 $\mu$ l 的 ddWater 回溶載體，並於室溫下超音波震盪 10 分鐘將藥物釋出
3. 以 10000 rpm, 25°C 的條件離心 10 分鐘，並收取上清液
4. 重複上述 3 步驟 3 次
5. 以 ELISA reader 讀取上清液在 460 的最高吸光值
6. 做 TPZ 的標準曲線
7. 內插入樣品的讀值

8. 計算  $EE\% = (\text{實際測出載體內的藥物含量} / \text{載體合成時使用之藥物總量}) \times 100\% \text{ (公式一)}$

### 3.3 Imiquimod(IMQ) 之裝載效率 (Encapsulation efficiency, EE)



原理：IMQ 本身具備散發螢光的特性，因此可利用特定波長之激發光誘導其螢光激發，再以螢光儀作為測量藥物含量的方法。

步驟：

1. 將已裝載藥物的 MSN 以電子秤量約 1mg 於已滅菌之 eppendorf
2. 以  $100\mu\text{l}$  的 PBS 回溶載體，並放置約 24 小時使載體完全瓦解，使藥物釋出。
3. 將回溶於 PBS 的瓦解載體至於  $60^\circ\text{C}$  將 PBS 蒸乾
4. 以  $500\mu\text{l}$  DMSO 回溶藥物
5. 利用螢光儀，激發光  $300\text{nm}$ ，收取散發光  $360\text{nm}$  左右的最高峰讀值
6. 作 IMQ 的標準曲線
7. 內插入樣品的讀值
8. 計算  $EE\% = (\text{實際測出載體內的藥物含量} / \text{載體合成時使用之藥物總量}) \times 100\% \text{ (公式一)}$

## 3.4 細胞實驗

### 3.4.1 細胞培養

放置在恆溫、恆  $\text{CO}_2$  壓力的培養箱內培養

細胞株	溫度	$\text{CO}_2$	培養基
LL/2	$37^\circ\text{C}$	5%	DMEM +10% FBS +1% PS
RAW264.7	$37^\circ\text{C}$	5%	DMEM +10% FBS +1% PS

兩隻細胞株約 2~3 天繼代一次，繼代時約 7~8 成滿。



### 溶液配置

(1) DMEM/high glucose

每罐粉末共配 5L

+ Sodium bicarbonate 3.7g/L

調整 pH 值在 7.2~7.4 之間

依需求調整：

+ 10% FBS

+1% PS

(2) PBS

NaCl 8g/L

KCL 0.2g/L

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44g/L

KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.24g/L

調整 pH 值在 7.2~7.4 之間

### 3.4.2 細胞繼代

步驟：

1. 先於 37°C 水浴槽將 DMEM 及 PBS 預熱
2. 將準備繼代之就細胞培養基吸入 15 mL 離心管
3. 以 5 mL 的 PBS 潤洗細胞
4. 加入 500 µl 的 trypsin，使其浸潤過整個細胞面
5. 將培養盤至於 37°C 培養箱 3 分鐘
6. 輕拍培養盤邊緣，觀察細胞是否已被 trypsin 完全作用並打下
7. 以約 9mL 之 DMEM 將細胞沖下、打散
8. 將細胞懸浮液收入新的 15 mL 離心管
9. 將兩管 15 mL 離心管至於離心機平衡，以低速離心 5 分鐘
10. 將上清液倒掉，留下細胞 pellet
11. 用 1 mL DMEM 將細胞回溶
12. 依適當比例種回新的培養基中



### 3.4.3 細胞冷凍保存

原理：若需將細胞冷凍在液態氮內做長期保存，為了避免在低溫時水分子會變成冰晶穿破細胞膜使細胞受損，因此需要加入抗凍，例如 DMSO，且利用緩慢降溫的方式將細胞冷凍。

步驟：

1. 事先配置好具有 7% DMSO 的培養液
2. 切下細胞步驟同細胞繼代
3. 將離心後之細胞 pellet 以 7% DMSO 的培養液回溶
4. 以每管 1mL 的體積將細胞分裝到各個冷凍小管
5. 採取漸進式冷凍法冷凍細胞：依序為 4°C，10 分鐘
6. -20°C，30 分鐘
7. -80°C，overnight
8. 放置於液態氮前先解凍一管確認細胞狀況是否良好
9. 將其餘冷凍小管置於液態氮中

### 3.4.4 細胞解凍

步驟：

1. 預熱水浴槽
2. 將冷凍小管置於水浴槽中約 5 分鐘，帶冰塊狀細胞融化
3. 將 1mL 的細胞懸浮液緩慢加入已有新鮮培養液之培養盤中
4. 放置於 37°C 培養箱培養
5. 隔天將培養液換掉
6. 待細胞穩定後，2~3 天進行繼代



### 3.4.5 缺氧环境培养细胞的作法

原理：利用 hypoxia bag (圖 3-1) 將細胞置於缺氧環境 1%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>、94%N<sub>2</sub> 的條件下進行培養，並觀察在不同氧壓下的細胞基因、蛋白、型態是否有所差異。

步驟：

1. 準備好 hypoxia bag
2. 準備好 1%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>、94%N<sub>2</sub> 的混合氣體鋼瓶
3. 將氣體緩緩灌入 hypoxia bag、並用 O<sub>2</sub> 氣體感測器測量氧氣條件是否正確
4. 將 hypoxia bag 置於 37°C 培養箱進行培養
5. 每 24 小時後進行換氣以確保氧壓條件的正確性

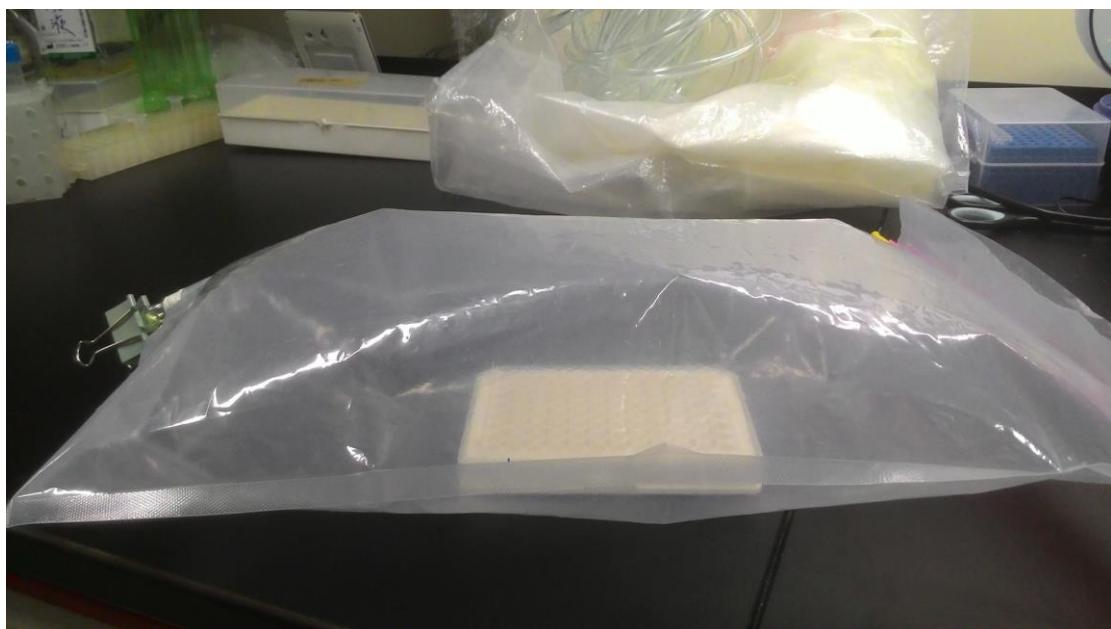


圖 3-1 Hypoxia bag

### 3.4.6 免疫細胞的分化方法

原理：利用不同條件將巨噬細胞株 RAW264.7 誘導分化為類 M1 型態或類 M2 型態，以模擬腫瘤環境內巨噬細胞的分化情形。巨噬細胞的分化條件係參考已發表的文獻，M1 型態的誘導為正控制組，可用於和接受 IMQ 誘導的巨噬細胞做比較；M2 型態則作為負控制組，用於模擬腫瘤環境中佔多數的巨噬細胞型態，並可用於觀察再給予了 IMQ 後，是否能將原本呈現 M2 型態的巨噬細

胞誘導為類 M1 型態的巨噬細胞，其中 M2 在分類上依據已發表的文獻可細分為不同次型態，本篇研究中是將巨噬細胞誘導為 M2a 型態。



步驟：

1. 於分化前一日種下 RAW264.7 於符合實驗需求的培養盤中，待其貼盤 12 小時
2. 加入不同的藥物或重組蛋白誘導，根據實驗需求主要有以下幾種  
Control: 置換培養液為新鮮的培養液  
M1 (positive control): IFN- $\gamma$  20 ng/mL + LPS 50 ng/mL  
M2 (negative control): IL-4 20ng/mL  
Free-form drug 組：IL-4 + IMQ 1  $\mu$ g/mL  
MSN-IMQ 組：IL-4 + MSN-IMQ 1  $\mu$ g/mL  
MSN-TPZ&IMQ 組：IL-4 + MSN-TPZ&IMQ 1  $\mu$ g/mL
3. 依據實驗需求調整收取細胞的時間點做後續的實驗

### 3.5 細胞存活率實驗 (MTT assay)

原理：MTT 試劑原為呈螢光黃的狀態，在透過活細胞內粒線體的酵素作用後，會被還原為紫色且不溶於水的結晶狀（附圖），該結晶可以 DMSO 回溶，並以該結晶於 570nm 的吸收光譜得以回推細胞存活的數量。

步驟：

1. 將 MTT 試劑配置成 10 倍稀釋的濃度以利實驗（過程中需避光）
2. 將細胞上清液移去，加入 PBS 沖洗兩次
3. 於每格加入 200 $\mu$ L 的 10 倍稀釋 MTT 試劑 (0.5mg/mL)
4. 將細胞放回 37°C 培養箱，培養 1.5 個小時
5. 利用針筒將 MTT 試劑完全抽乾
6. 於每格加入 100 $\mu$ L 的 DMSO 回溶紫色結晶
7. 將細胞盤置於 shaker 上使 DMSO 均勻溶解紫色結晶
8. 將紫色液體移至 ELISA plate 測其吸收光
9. 觀察紫色結晶於 570nm 的吸收光譜
10. 計算細胞存活率 = (實驗組吸收光值/控制組吸收光值) X 100%



### 3.6 細胞計數

#### 3.6.1 血球計數器

原理：血球計數器為蓋玻片和載玻片的組合，利用載玻片上的九宮格，可以計算出視野下的細胞顆數，每格九宮格的體積為  $0.1\text{mm}^3(\mu\text{L})$ ，可以藉由計算 4 格格子的總細胞數後在平均，再除以細胞液體積，即得到細胞液濃度

步驟：

1. 細胞液稀釋（視野下細胞計數盤每格有約 50~150 顆細胞）
2. 將稀釋細胞液與染劑 trypan blue 以 1:1 比列混合
3. 將  $10\mu\text{L}$  上述混合液加到血球計數盤中
4. 計算 4 個角落的格子細胞數總合並平均
5. 算出細胞液濃度，細胞濃度公式： $(4 \text{ 格總細胞數}/4) \times 2 \text{ (trypan blue 稀釋)} \times \text{稀釋倍率} \times 10^4 = \text{細胞濃度 (cells/mL)}$

#### 3.6.2 Nexcelon Cellometer Auto T4 自動細胞計數

原理：此儀器為自動的細胞計數儀，其原理和血球計數類似，但是由電腦判定視野下的什麼會算一顆細胞，因此必須設定細胞大小條件、背景的雜質去除和焦距及背景色差。操作上會依循廠商的操作手冊。

步驟：

1. 細胞液稀釋
2. 將稀釋細胞液與染劑 trypan blue 以 1:1 比列混合
3. 將  $20\mu\text{L}$  上述混合液加到計數器中
4. 打開電腦軟體
5. 設定細胞大小參數
6. 儀器自動計數

### 3.7 基因表現量測試



原理：萃取細胞內的 mRNA 並將其轉換為較穩定的 cDNA，而後利用聚合酶連鎖反應（PCR）將片段放大，使得額外添加的訊號分子夾雜在一步步放大的 DNA 中直到可偵測範圍。而由於不同 mRNA 在細胞中表現量的差異，使得訊號在達到可偵測範圍所需進行的放大次數（稱為  $C_t$  值）有所差異， $C_t$  值若越小，則表示該段 mRNA 在細胞內的量越多，最後再將不同種類的 mRNA 的表現量和 house keeping gene 相互比較，即可得到基因的相對表現量，最後再進行不同組別間的比較。

步驟：

#### STEP 1. 從細胞中萃取 RNA

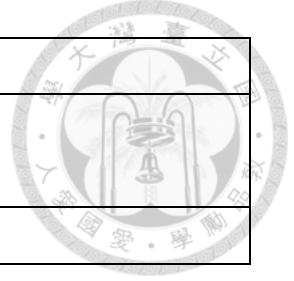
將藥物作用到預計時間點的細胞培養液吸除，以 PBS 潤洗細胞 2 次，加入 TriPure (200  $\mu$ L/well) 將細胞溶解並收下到 eppendorf 中靜置 5 分鐘，加入  $CHCl_3$  (200  $\mu$ L/mL TriPure)，震盪並靜置 10 分鐘，將預冷到 4°C 的離心機設定轉速為 12000 rcf，15 分鐘離心，離心後小心地將上層透明層的上清液收至新的 eppendorf 內，加入 isopropanol (500  $\mu$ L/mL TriPure)，輕輕地上下搖晃約 10 次，等待 RNA 析出 10 分鐘，將預冷到 4°C 的離心機設定轉速為 12000 rcf，15 分鐘離心，離心後將上清液吸除留下白色 RNA 沈澱物，加入 75% 酒精 (1000  $\mu$ L/mL TriPure)，溫柔地搖晃 eppendorf 清洗 RNA 沈澱物，將預冷到 4°C 的離心機設定轉速為 7500 rcf，5 分鐘離心，離心後將上清液吸乾（盡量吸乾），在 laminar flow 中將殘留之有機溶液抽乾。待沈澱物乾燥後，以滅過菌之乾淨二次水回溶，-20°C 保存。在下次使用前測量 RNA 的濃度為何，純度高的 RNA : 260/280 1.8~2.2；無有機物殘留 : 260/230 2~2.2。

◆ 本過程中所使用之實驗器材均需滅過菌

#### STEP 2. 將 mRNA 轉換成 cDNA

本實驗使用 iScript cDNA Synthesis Kit，總體積為 20  $\mu$ L 配置如下表格：

Reagents	Volume
5x iScript reaction mix	4 $\mu$ L



iScript reverse transcriptase	1 $\mu$ L
Nuclease-free water	Total 15 $\mu$ L
RNA template (1 $\mu$ g)	
Total volume 20 $\mu$ L	

再配好反應溶液後，將 eppendorf 移至控溫振盪器，並設定反應條件如下：

溫度	時間
25°C	5 分鐘
42°C	30 分鐘
85°C	5 分鐘

### STEP 3. 將 cDNA 放大並以 real-time PCR 定量 mRNA 表現情形

primer stock 濃度為 100  $\mu$ M，再將其稀釋 10 倍在使用。

本實驗使用 iQ SYBR Green Supermix，每個反應為 10  $\mu$ L 的體積，配置如下圖：

Reagents	Volume
iQ SYBR Green Supermix (2x)	5 $\mu$ L
Forward and reverse primers	0.3 $\mu$ L + 0.3 $\mu$ L
DNA template	1 $\mu$ L
RT-PCR water	3.4 $\mu$ L
Total volume 10 $\mu$ L	

Real-time PCR 機型為 CFX Connect system

Setting mode 選擇 SYBR only

### STEP 4. Real-time PCR 數據整理

將反應完成後得到的不同基因及組別間的  $C_t$  值

和同處理的 house keeping gene 相減做 normalization

得到  $\Delta C_t 1 = C_t (X \text{ gene-treated}) - C_t (\text{house keeping gene-treated})$

另外在做控制組的 normalization

得到  $\Delta C_t 2 = C_t (X \text{ gene-treated}) - C_t (\text{house keeping gene-treated})$

將兩者相減得到處理組別的 A 基因和控制組的差異

得  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t 1 - \Delta C_t 2$

將  $C_t$  值轉換成基因實際的表現量

$$\text{Relative normalized expression } (\Delta\Delta C_t) = 2^{\Delta\Delta C_t}$$

### 3.8 流式細胞儀 (Flow cytometry)：表面抗原辨識 (surface marker

#### recognition)



原理：流式細胞儀為利用流體力學的特性可以偵測到單顆細胞的直散色光 (forward-scattered light, FSC) 、側散色光 (side-scattered light, SSC) 和螢光強度，因此除了可以利用細胞大小 (FSC) 以及顆粒特性 (SSC) 去區分不同細胞外，也可以藉由攜帶螢光的抗體去辨識細胞上不同的特定蛋白，藉此區分有表現特定蛋白的細胞及沒表現的細胞。在誘導細胞型態變化的實驗中，可以藉由流式細胞儀，將處理過藥物的組別和控制組做比較，觀察在給藥後，有無特定表面蛋白的表現。

步驟：

1. 將細胞刮下，離心
2. 以  $700 \mu\text{L}$  PBS 離心
3. 細胞計數取約  $10^6$  個細胞
4. 進行抗體染色，30 分鐘，過程需避光
5. 離心，以  $500 \mu\text{L}$  PBS 清洗
6. 將細胞通過篩網進玻璃管準備上機
7. 將管內 PBS 體積補到約 1 mL
8. 開始分析

### 3.9 動物實驗設計

原理：在細胞層級中，無法證明在藥物作用後所引發之下游免疫反應，故選用具備正常免疫系統之 C57BL/6 小黑鼠來作為活體試驗之模式動物，藉此驗證治療策略可行性。

步驟：



1. 由樂斯科購買週齡為 5 週的雌性 C57BL/6 小黑鼠
2. 於週齡為 6 週大時，在小黑鼠背部接近大腿前端處皮下施打  $1 \times 10^6$  的 LL/2 細胞株
3. 在腫瘤接種約 7 天後開始給予藥物處理，藥物處理組別如下：
  - (1) Control：每顆腫瘤組織注射 100  $\mu\text{L}$  PBS
  - (2) 1.1 mg 的 MSN-TPZ&IMQ：每顆腫瘤組織注射 100  $\mu\text{L}$  含有 1.1 mg 的 MSN-TPZ&IMQ 的 PBS
  - (3) 2.2 mg 的 MSN-TPZ&IMQ：每顆腫瘤組織注射 100  $\mu\text{L}$  含有 2.2 mg 的 MSN-TPZ&IMQ 的 PBS
  - (4) 4.4 mg 的 MSN-TPZ&IMQ：每顆腫瘤組織注射 100  $\mu\text{L}$  含有 4.4 mg 的 MSN-TPZ&IMQ 的 PBS
  - (5) free-form TPZ + IMQ (藥物劑量等同於 4.4 mg/mouse 的 MSN-TPZ&IMQ)：每顆腫瘤組織注射 100  $\mu\text{L}$  含有藥物劑量等同於 4.4 mg/mouse 的 MSN-TPZ&IMQ 的兩種 free drug
4. 純予藥物頻率為每兩天一劑，共純予 6 劑
5. 在每次給藥前都先測量腫瘤大小及老鼠體重

## 第四章 實驗動機與設計

### 4.1 實驗動機



免疫治療(immunotherapy)是除了手術切除、化學療法和放射線治療之外，第四個被美國國家衛生院(NIH)列為治療癌症的模式，免疫療法主要是改變免疫系統與癌細胞之間的平衡，活化體內自有的防禦機制清除癌細胞等外來物質。治療的方式有利用小分子藥物、大分子抗體和干擾素等<sup>61-63</sup>，刺激免疫系統對癌細胞進行毒殺或直接消滅促癌相關之免疫細胞的產生，也有藉由分離血液中T淋巴球在體外進行免疫刺激或基因改造後再打回體內進行癌症治療等模式。而在免疫反應中除了T淋巴細胞，巨噬細胞也扮演重要的角色，從吞噬抗原而促進細胞激素(TNF、IL-1、IL-6等)的分泌影響T淋巴細胞的分化<sup>64</sup>、呈現抗原促進T淋巴球活化、影響組織的再生與重整。巨噬細胞是聯結著非特異性免疫反應轉換成特異性免疫反應的關鍵執行者，在癌症生長的過程中對於腫瘤微環境中的發炎現象也具有重要的影響，先前文獻指出腫瘤內的巨噬細胞甚至可以達到整體腫瘤質量的五成以上<sup>16</sup>，且也有許多的研究指出這些腫瘤相關巨噬細胞在腫瘤內的累積是和腫瘤治療的成功率成反比關係，因此如何去調控腫瘤內的巨噬細胞產生的免疫活性對於癌症免疫治療來說是重要的。

在另一方面，腫瘤的低氧環境對癌症治療的限制也是近年來被科學家們所關注的課題之一，在整個固態腫瘤組織中，因為組織的不規則性，腫瘤周遭的血管很容易生長為分佈極度不均的狀態<sup>10</sup>，而這樣的狀態將會使得腫瘤環境會分成血管分佈較多的正常氧環境，及血管難以伸達的低氧環境，其中又以存在於低氧環境的癌細胞由於要在氧氣及養分較不充足的環境中生存，他們會衍生出較強的抗藥性及轉移能力。對於傳統化療而言，這些癌細胞常常是導致療程失敗的主要原因，如何去治療這些存在於低氧環境的癌細胞對於癌症治療來說也是一個重要的課題。



## 4.2 實驗設計

本實驗的治療策略是利用 TPZ 在低氧環境下有良好的毒殺能力使癌症細胞死亡而其所產生的細胞殘骸可作為抗原活化腫瘤周邊的免疫細胞，再輔以 IMQ 誘導產生類 M1 巨噬細胞來增強該腫瘤組織周邊的免疫反應，為此我們在本題目中將利用矽奈米顆粒 MSN 同時裝載 TPZ 及 IMQ，希望能以載體型式將兩種藥物送達腫瘤位置，以避免兩種藥物在傳輸過程中的副作用及損失要，實驗探討流程如下：

1. 奈米載體的裝載效率，材料的基本鑑定
2. 評估矽奈米粒子裝載之 TPZ 在不同氧氣濃度環境下對癌細胞的毒殺力
3. 評估在不同氧氣濃度下利用矽奈米粒子裝載之 TPZ，對腫瘤相關巨噬細胞生存率的影響
4. 以矽奈米粒子裝載之 IMQ 對 M2 轉化成 M1 之功效進行評估(M1 相關之基因與蛋白質分析)
5. 合併使用 TPZ 及 IMQ 進行活體實驗，比較 free drug 及奈米劑型之功效差異

## 第五章 實驗結果

### 5.1 矽奈米顆粒 MSN 能有效裝載兩種疏水性藥物



在本研究中所使用的奈米化藥物是使用矽奈米顆粒 MSN 來裝載低氧環境藥物 TPZ 及免疫調節藥物 IMQ，裝載過程如下：首先，利用毛細原理將同時含有 TPZ 及 IMQ 的藥物溶液含浸至 MSN 中，接著加入 1 mL poly-lysine 溶液攪拌，將矽奈米顆粒上的孔洞蓋住防止藥物流出，最後加入 DDW，離心並去除上清液，真空抽乾得到裝載藥物的載體。在藥物裝載進奈米載體後，我們先以 DLS 測量奈米粒子大小，得到此奈米粒子的大小落在  $235.3 \pm 17.25$  nm (圖 5-1)。之後，我們將載體置於 PBS 中，以超音波震盪 10 分鐘，將藥物 TPZ 震出，並離心收取上清液測定藥物裝載效率 (參考公式一)，經測定後 TPZ 的裝載效率為 23.42%。另一方面，由於 IMQ 的高度不水溶性，我們測定其裝載效率的方法為先以 PBS 溶解載體 24 小時，待矽奈米顆粒完全瓦解後，再將 PBS 高溫蒸散，以 DMSO 溶解 IMQ 測定其裝載效率，經測定後 IMQ 的裝載效率為 40.98%。

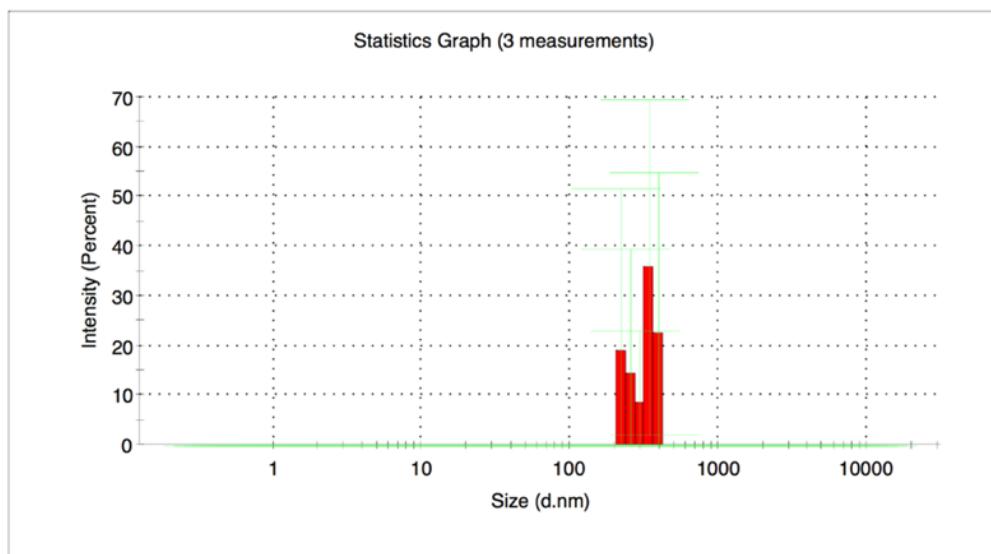


圖 5-1 MSN 包覆 TPZ 及 IMQ 後的 DLS 粒徑分析圖。結果顯示此奈米粒子的大小約為  $235.3 \pm 17.25$  nm。

## 5.2 奈米劑型化之低氧環境前驅藥 Tirapazamine(TPZ)對癌細胞株



### LL/2 的生長有較強的抑制能力

過去研究指出小分子藥物以奈米劑型裝載能有效提高藥物在腫瘤的滯留時間，並增加細胞吞噬藥物的能力，因此本實驗的目的在於評估 TPZ 在裝載進矽奈米顆粒 MSN 後是否還具有毒殺低氧環境癌細胞的能力及奈米劑型化後能否增強其毒殺癌細胞的能力，因此我們使用 MTT assay 進行細胞存活率的測試。*In vitro* 的結果顯示，在正常氧環境 (10 % O<sub>2</sub>) 下，無論是 free-form 或是奈米劑型的 TPZ 接不會對癌細胞產生過大的毒殺力，但在缺氧環境 (1 % O<sub>2</sub>) 下，由於 TPZ 被還原為具有自由基的活化態，無論是 free-form 或是奈米劑型的 TPZ 都會對癌細胞產生顯著的毒殺能力（圖 5-2），且在奈米劑型化之後，在和 free-form 的 TPZ 在相同藥物濃度下，奈米劑型有更強的細胞毒殺力，在藥物濃度在 5 μM 且於低氧條件下時，free-form 的 TPZ 促使 LL/2 的存活率下降到約 40 %，與此同時奈米劑型化的 TPZ 能夠使 LL/2 的存活率下降到約 10 %，由此實驗可以證明奈米劑型化後的 TPZ 能夠對於毒殺癌細胞有更強的能力。

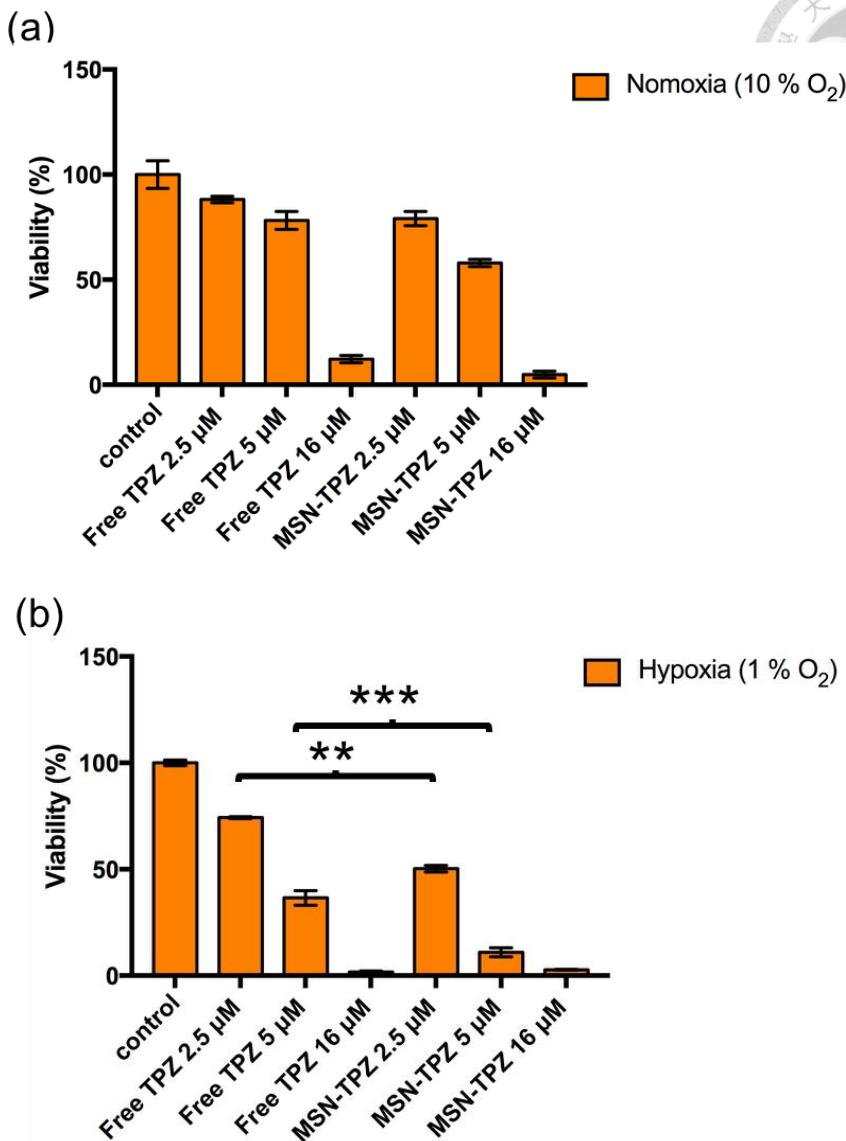


圖 5-2 在正常氧環境(10 % O<sub>2</sub>)及缺氧環境(1 % O<sub>2</sub>)中培養 48 小時下，Free TPZ 和 MSN-TPZ 對於 LL/2 的生長存活率影響。結果顯示，在正常氧環境下 (a)，由於 TPZ 未被活化，因此在藥物濃度低於 5 μM 時並不會對 LL/2 有顯著的毒殺能力，反之在低氧環境下 (b)，TPZ 因確實被還原為活化態，故對 LL/2 產生生長抑制作用，且在藥物濃度在 5 μM 且於低氧條件下時，free-form 的 TPZ 促使 LL/2 的存活率下降到約 40 %，與此同時奈米劑型化的 TPZ 能夠使 LL/2 的存活率下降到約 10 %，由此可得知奈米劑型化後 TPZ 對於癌細胞的毒殺能力有顯著提升。(\* p<0.05 ; \*\*p<0.01 )

### 5.3 奈米劑型化之低氧環境前驅藥物 Tirapazamine (TPZ) 對 M2 型



#### 態巨噬細胞的生長有較強的抑制能力

在腫瘤組織中，除了癌細胞外也包含著其他種類的細胞，例如：纖維母細胞、白血球、巨噬細胞等，其中又以巨噬細胞對於腫瘤生長的影響最為顯著<sup>65,66</sup>。因此我們希望能夠了解假使奈米化劑型之 TPZ 被腫瘤環境之巨噬細胞所吞噬，TPZ 對於兩種不同的巨噬細胞型態將有不同的毒殺力，並在預期上是希望是對於促進腫瘤生長之 M2 型態巨噬細胞有較強大的毒殺力，而較不去影響 M1 型態的巨噬細胞，我們一樣使用 MTT assay 作為細胞存活率的測量方法。*In vitro* 的結果顯示，TPZ 對於兩種不同型態之巨噬細胞確實如同預期中有不同的毒殺能力，TPZ 對於促腫瘤生長的 M2 型態巨噬細胞有較強大的毒殺力（見圖 5-3、5-4），在低氧環境下且藥物濃度達到  $16 \mu\text{M}$  時，M1 巨噬細胞的存活率為 50 %，而 M2 巨噬細胞則下降至 10 %。推測其可能的原因是因為兩種型態的巨噬細胞生長速度的差異，在培養中我們有觀察到 M1 型態的巨噬細胞在生長速度上是慢於 M2 型態的巨噬細胞，這樣的生長速度差異可能是因為兩種細胞在 DNA 複製上速度的差異，而 TPZ 在藥物作用機制上是在低氧環境時被還原酶還原為活化態，在藉由活化態產生的自由基去攻擊 DNA 合成時的 DNA 拓樸酶，因此對於 DNA 複製相對來說較不旺盛的 M1 細胞來說，TPZ 產生的毒殺性可能就會比 M2 型態來的小。

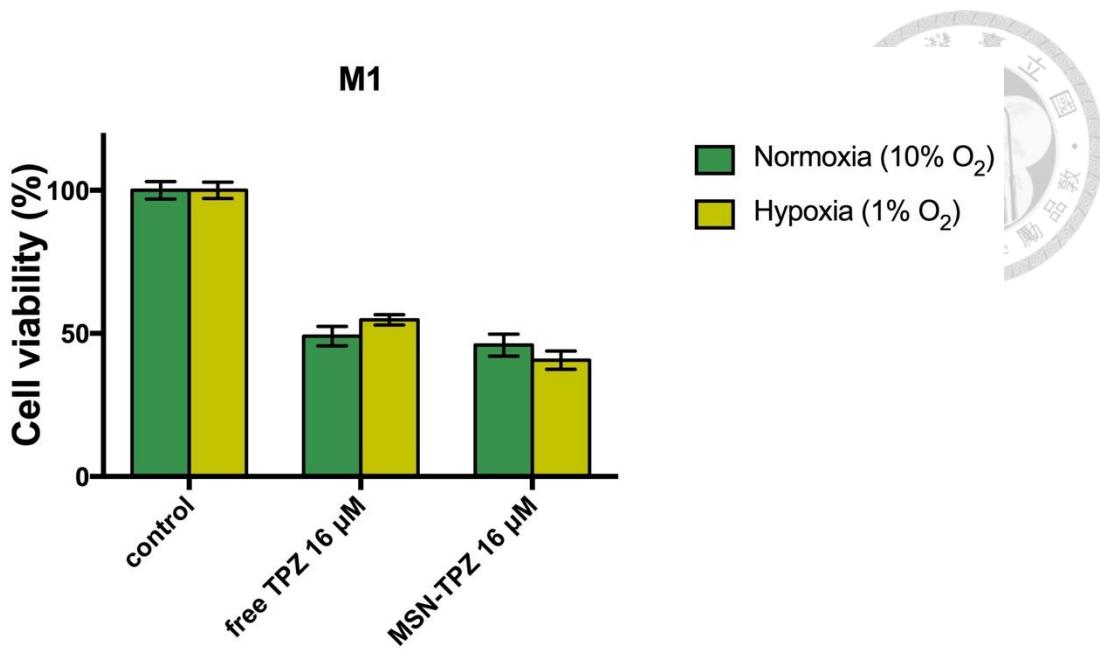


圖 5-3 在正常氧環境(10% O<sub>2</sub>)及缺氧環境下(1% O<sub>2</sub>)的培養下，Free TPZ 和 MSN-TPZ 對於不同型態的 RAW264.7 的生長存活率影響。結果顯示，在缺氧環境下，TPZ 濃度為 16 μM 時，M1 型態的巨噬細胞生存率下降到約 50 % 存活率。

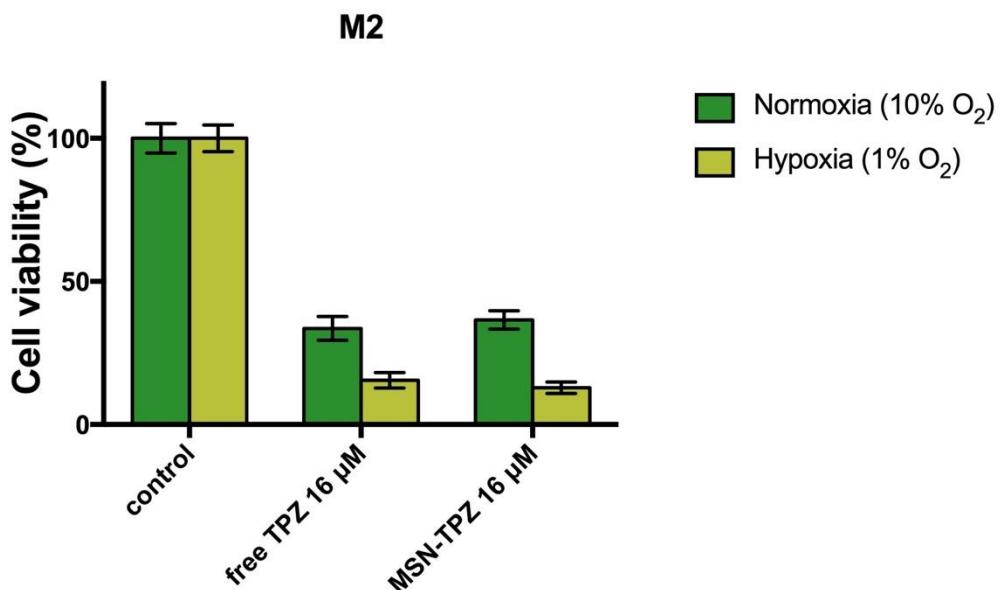


圖 5-4 在正常氧環境(10% O<sub>2</sub>)及缺氧環境下(1% O<sub>2</sub>)的培養下，Free TPZ 和 MSN-TPZ 對於不同型態的 RAW264.7 的生長存活率影響。結果顯示，在缺氧環境下，TPZ 濃度為 16 μM 時，M2 型態的巨噬細胞生存率下降到約 20 % 存活率。

## 5.4 奈米劑型化之免疫調節藥物 Imiquimod(IMQ)可促使處於 M2 型

### 態變化中的巨噬細胞轉換為趨向 M1 型態的巨噬細胞

先前的研究中指出 IMQ 確實能透過和 TLR-7 結合促使巨噬細胞能分泌 M1 型態巨噬細胞的促發炎反應型態細胞因子，使得巨噬細胞朝向類 M1 型態分化，因此本實驗的目的在於證實在免疫調節藥物 IMQ 裝入奈米載體後是否還具有促進巨噬細胞分化為類 M1 型態的能力及奈米劑型化後是否能延長 IMQ 對於誘導巨噬細胞分化的能力。在 *In vitro* 實驗中我們模擬腫瘤環境中巨噬細胞的分化，在加入 IMQ(促使細胞分化為類 M1 型態巨噬細胞的藥物)處理之 RAW264.7 組別將會同時加入可以使巨噬細胞誘導分化為 M2 型態的蛋白質 IL-4，藉由觀察在兩種物質的競爭下，IMQ 將能促使巨噬細胞分化為 M1 型態，本實驗中將會利用 q-PCR 及流式細胞儀進行巨噬細胞 M1 相關基因及蛋白質的分析。

組別以及誘導的方法分別為：

- (1) Control
- (2) M1 型態(IFN- $\gamma$  20 ng/mL + LPS 50 ng/mL)：M1 型態的 positive control
- (3) M2 型態(IL-4 20 ng/mL)：模擬腫瘤中的 M2 型態巨噬細胞
- (4) 類 M1 型態(IL-4 + IMQ 1  $\mu$ g/mL)：模擬腫瘤中 IMQ 誘導後的分化情形
- (5) 類 M1 型態(IL-4 + MSN-IMQ 1  $\mu$ g/mL)：模擬腫瘤中 IMQ 誘導後的分化情形
- (6) 類 M1 型態(IL-4 + MSN-IMQ & TPZ 1  $\mu$ g/mL)：模擬腫瘤中 IMQ 誘導後的分化情形

M1 型態巨噬細胞相關基因、蛋白及各自之功能：

- (1) *IL-12p40*：該基因的功能為表現 IL-12 的次級單元，IL-12 的功能一般被認為和啟動 T<sub>H</sub>1 免疫反應是有關的<sup>67</sup>。
- (2) *iNOS*：該基因表現之蛋白為一酵素家族，該酵素家族功能為產生 NO，一般被認為是巨噬細胞用來清除外來物質之重要酵素蛋白<sup>68</sup>。
- (3) *CXCL10*：該基因表現一趨化因子蛋白，是巨噬細胞分泌用以吸引更多 T<sub>H</sub>1 免疫反應相關細胞到免疫反應執行處的重要蛋白<sup>69</sup>。
- (4) *CD86*：為抗原呈現細胞用以活化 T 細胞的共刺激因子，其功能為和未分化之 T

細胞結合，並促使其活化<sup>70</sup>。



首先，我們觀察了在給予藥物或奈米劑型化藥物後，巨噬細胞在型態上是否真的有轉變為相似於 M1 型態的巨噬細胞，其結果如圖（見圖 5-5），於相片中我們可以發現，再給予了藥物 IMQ 後，無論是 free-form 或是奈米劑型都具有誘導巨噬細胞分化為類 M1 型態的能力。

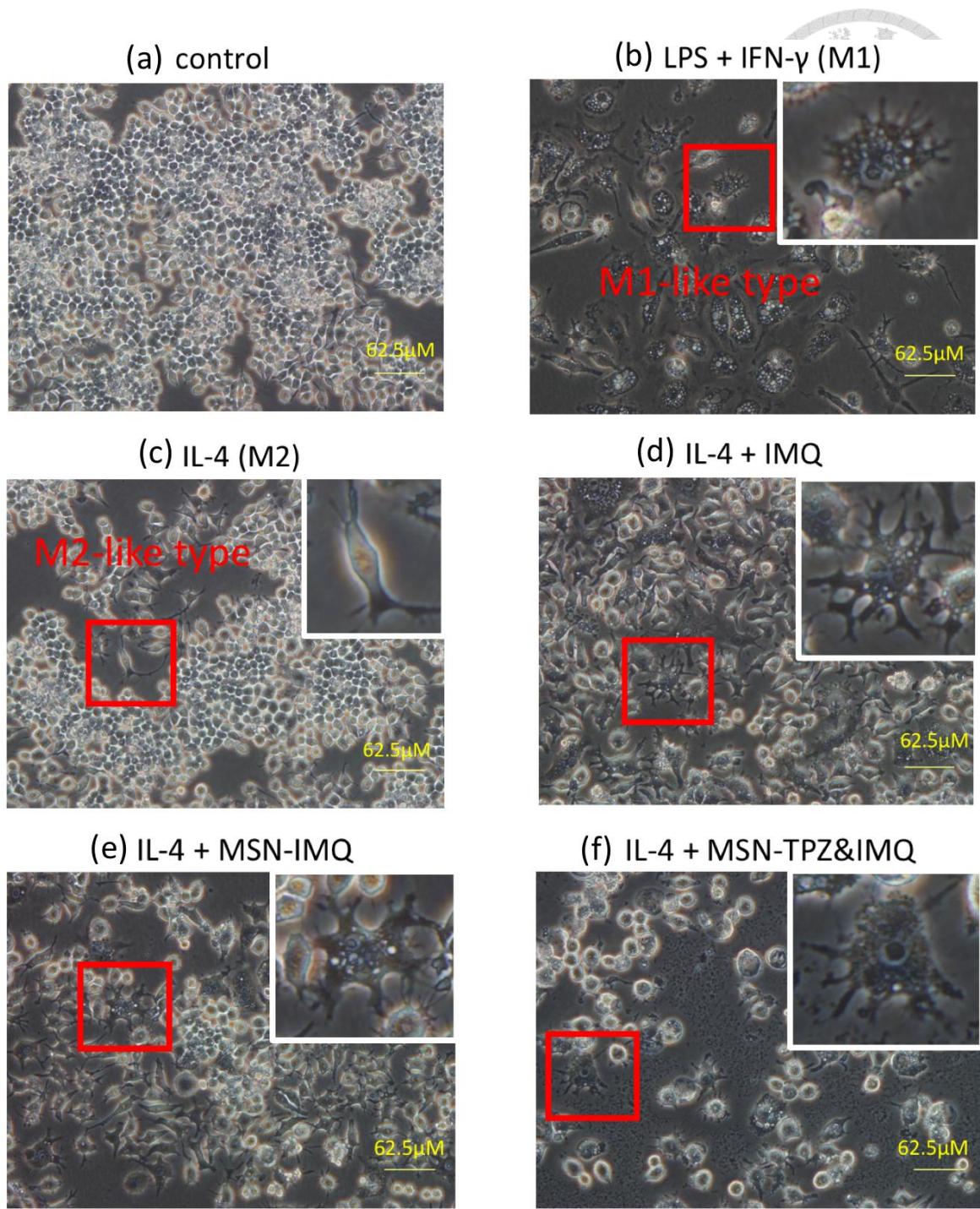


圖 5-5 RAW264.7 在給予了不同的誘導條件下，24 小時後各個組別間的細胞型態的差異。結果顯示相較於 M2 組別，加入了 IMQ 的組別在型態上會分化為較相似於 M1 型態的巨噬細胞。

除了觀察細胞型態在給予藥物後的轉變外，我們也測量了在給予藥物或奈米劑型化藥物後，巨噬細胞是否會表現 M1 相關細胞因子的基因，在 *in vitro* 實驗中，RAW264.7 在受到不同物質誘導分化後，其 M1 相關基因表現的結果如圖（見圖 5-6-11），結果中可以發現，在 IMQ、MSN-IMQ 及 MSN-IMQ&TPZ 作用巨噬細胞株 RAW264.7 約 6 小時後，與單純只有加入 IL-4 的組別（類 M2 型態巨噬細胞）相比，M1 相關基因的表現量有顯著的提升；而在 12 小時後，free-form 的藥物 IMQ 其誘導巨噬細胞轉換的能力明顯下降許多，而奈米劑型的 IMQ，則相對於 free-form 的藥物 IMQ 有較恆定的誘導能力，可以認為以載體裝載的 IMQ 由於其緩慢釋放的特性，對於巨噬細胞來說，可以有更長久的誘導能力。

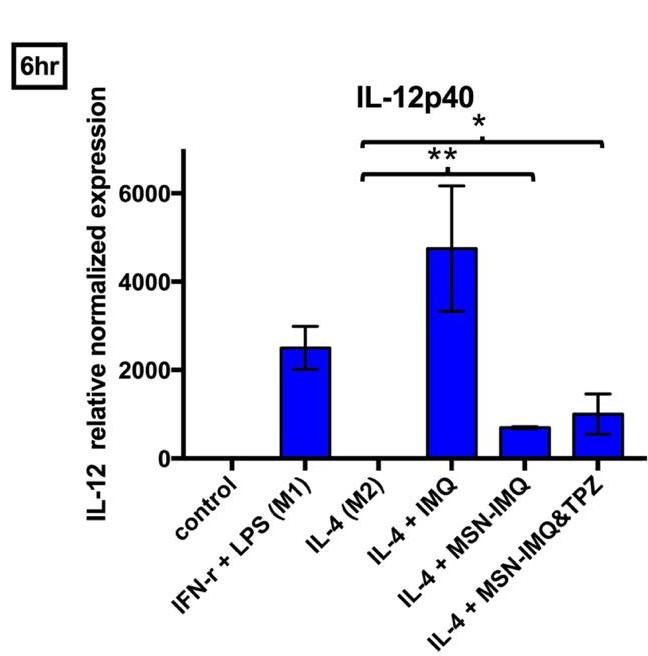


圖 5-6 RAW264.7 在給予了不同的誘導條件下，6 小時後各個組別間的 IL-12p40 基因表現的差異。結果顯示相較於 M2 組別，加入了 IMQ 的組別在 IL-12p40 的基因表現上來的更高。 (\*p<0.05 ; \*\*p<0.01 )

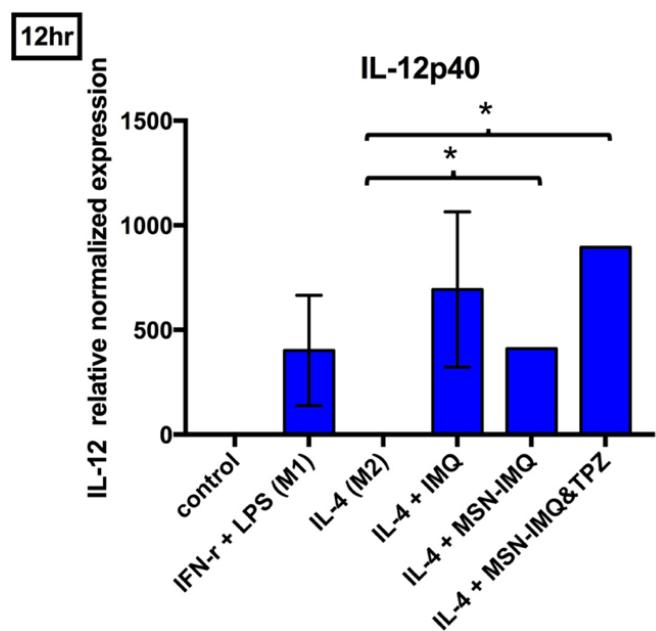


圖 5-7 RAW264.7 在給予了不同的誘導條件下， 12 小時後各個組別間的 IL-12p40 基因表現的差異。結果顯示相較於 M2 組別，加入了 IMQ 的組別在 IL-12p40 的基因表現上來的更高。 (\*p<0.05 ; \*\*p<0.01 )

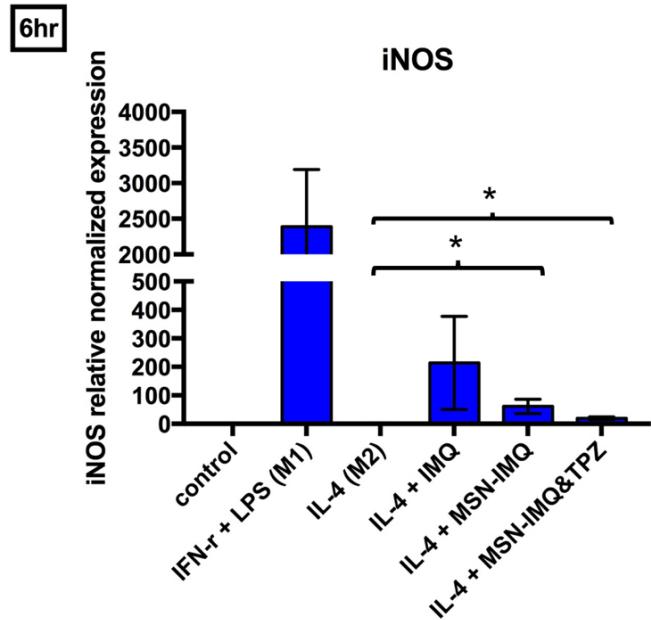


圖 5-8 RAW264.7 在給予了不同的誘導條件下，6 小時後各個組別間的 iNOS 基因表現的差異。結果顯示相較於 M2 組別，加入了 IMQ 的組別在 IL-12p40 的基因表現上來的更高。 (\*p<0.05 ; \*\*p<0.01)

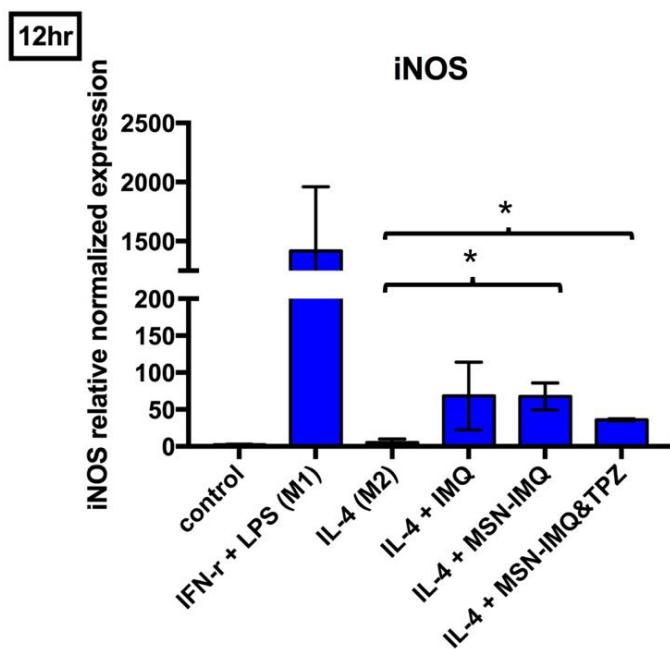


圖 5-9 RAW264.7 在給予了不同的誘導條件下，12 小時後各個組別間的 iNOS 基因表現的差異。結果顯示相較於 M2 組別，加入了 IMQ 的組別在 IL-12p40 的基因表現上來的更高。 (\*p<0.05 ; \*\*p<0.01)

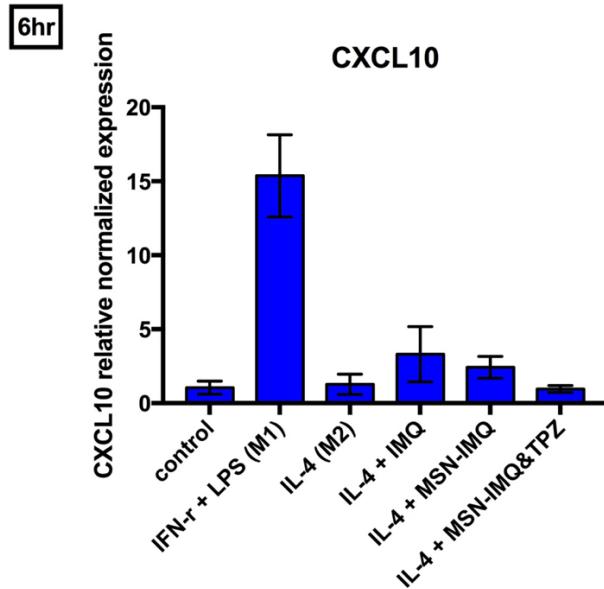


圖 5-10 RAW264.7 在給予了不同的誘導條件下，6 小時後及 12 小時後各個組別間的 CXCL10 基因表現的差異。結果顯示相較於 M2 組別，加入了 IMQ 的組別在 IL-12p40 的基因表現上來的更高。 (\*p<0.05 ; \*\*p<0.01)

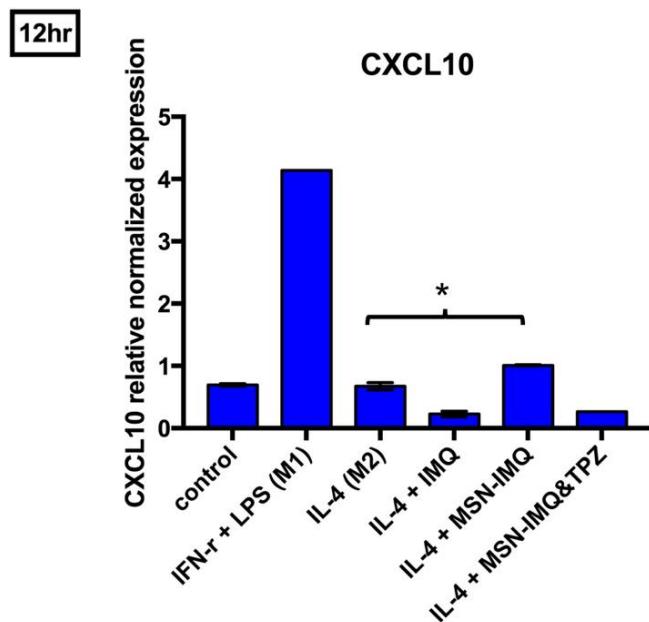


圖 5-11 RAW264.7 在給予了不同的誘導條件下，6 小時後及 12 小時後各個組別間的 CXCL10 基因表現的差異。結果顯示相較於 M2 組別，加入了 MSN-IMQ 的組別在 IL-12p40 的基因表現上來的更高。 (\*p<0.05 ; \*\*p<0.01)

最後我們也觀察了在給予藥物後，巨噬細胞的表面蛋白是否有所差異，藉此判斷巨噬細胞型態的型態，如前文所述，CD86 為作為抗原呈現細胞不可或缺的重要共刺激因子，因此觀察及的表現量是否上升，可以作為巨噬細胞是否轉變為類 M1 型

態巨噬細胞的指標，在 *in vitro* 實驗中，我們利用流式細胞儀去鑑定 CD86 於巨噬細胞表面上的表現情形（圖 5-12），在不同組別給予藥物的 24 小時後，可以發現給予了 IMQ 藥物的組別和單純只有加入 IL-4 處理的組別相比，CD86 的表現量確實有明顯上升的趨勢，而奈米劑型化之 IMQ 處理的組別也看到一樣的趨勢，因此我們認為 IMQ 是確實能將巨噬細胞誘導分化為類 M1 的巨噬細胞型態，且奈米劑型化後並不會影響其誘導能力。

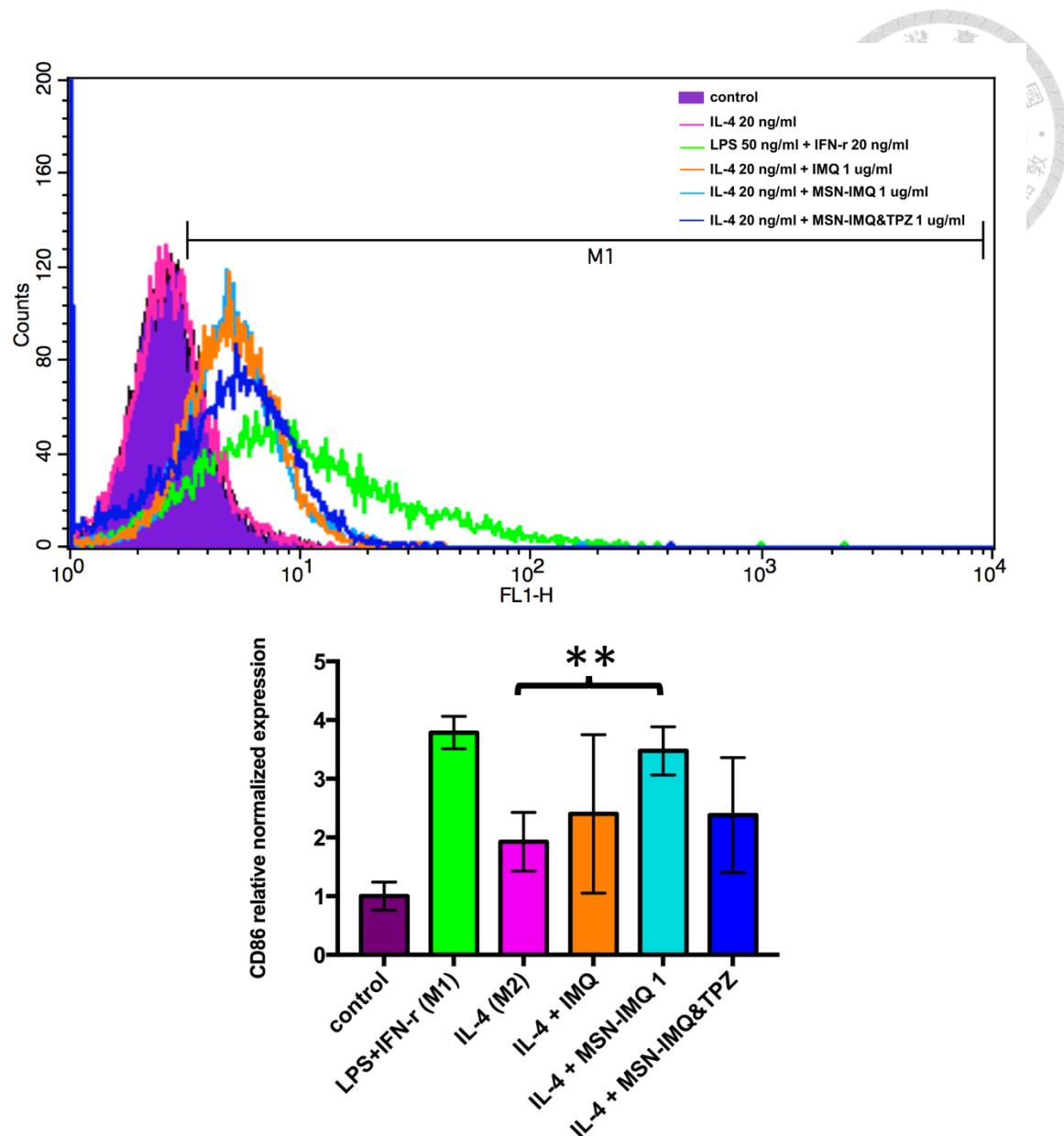


圖 5-12 RAW264.7 在給予了不同的誘導條件下，48 小時後各個組別間的細胞表面蛋白 CD86 的差異。結果顯示相較於 M2 組別，加入了 IMQ 的組別在 CD86 的表現上皆比 M2 的組別來得高，以此可以佐證 IMQ 促使巨噬細胞分化為類 M1 型態的巨噬細胞型態。 (\* $p<0.05$  ; \*\* $p<0.01$  )

## 5.5 動物活體實驗：TPZ+IMQ 複合藥物之奈米劑型能有效抑制腫瘤

### 生長



首先要確認在怎樣程度的藥物劑量下，可以看到比較明顯的腫瘤生長抑制效果及比較奈米化藥物跟 free drug 對於抑制腫瘤生長能力的差異，並觀察在劑型奈米化後抑制腫瘤生長的能力是否提升。本次實驗使用的老鼠為由樂斯科購買週齡為 5 週的 C57BL/6 雌性小黑鼠，待老鼠週齡達 6 週大時，於小黑鼠背部靠近大腿前端的位置施打  $1 \times 10^6$  的 LL/2 的細胞株，約在施打一週後開始給予藥物處理，組別分別為 Control，劑量為 1.1 mg/mouse 的 MSN-TPZ&IMQ，劑量為 2.2 mg/mouse 的 MSN-TPZ&IMQ，劑量為 4.4 mg/mouse 的 MSN-TPZ&IMQ 以及 free-form TPZ + IMQ（藥物劑量等同於 4.4 mg/mouse 的 MSN-TPZ&IMQ），從結果中我們可以發現（見圖 5-13），隨著藥物劑量的增加，腫瘤的生長確實有被抑制，且在使用最高劑量 4.4 mg 時，發現其抑制腫瘤生長速率的能力較為顯著；除此之外，我們也觀察到在奈米化藥物在和 free drug 相同藥物劑量的情況下，奈米化藥物有更佳的腫瘤抑制能力，這樣的差異可能是由於在藥物奈米化後在腫瘤環境的滯留時間較長的緣故。

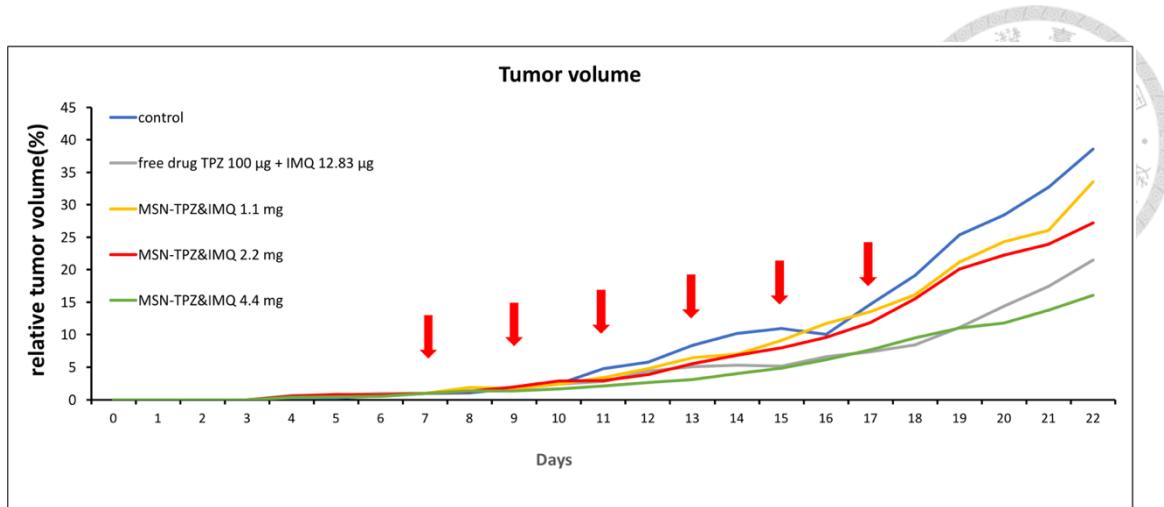


圖 5-13 在給予了不同劑量的載體及 free-form 藥物後，由外觀量測腫瘤大小之統計結果。結果顯示在載體劑量到達每次給藥為 4.4 mg 時可以明顯看到腫瘤生長受到抑制，且在相同藥物劑量下，奈米化藥物有更佳的腫瘤抑制能力。（紅色箭頭為施打藥物的時間點）

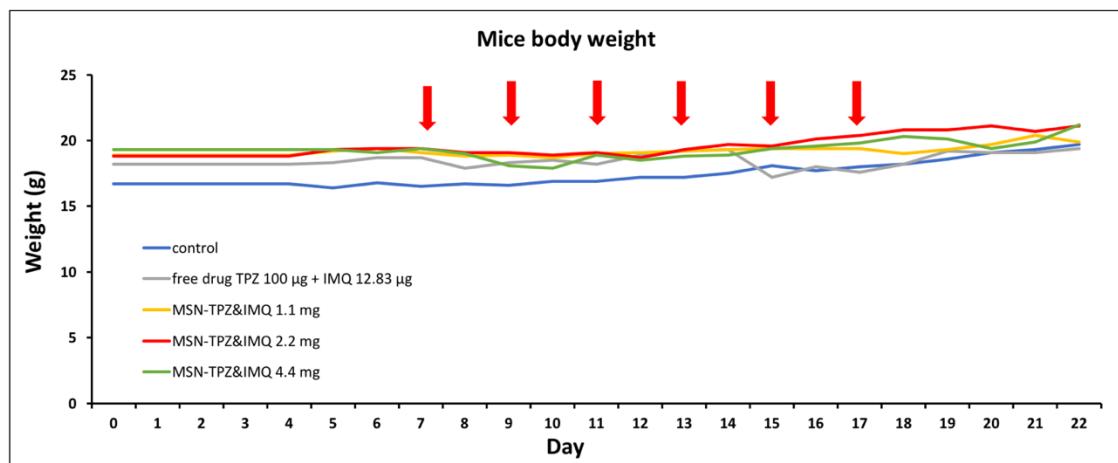


圖 5-14 在給予了不同劑量的載體及 free-form 藥物後，觀察小黑鼠的體重變化結果。結果顯示除了 free drug 組別在第 14 天時體重略有下降的情形外，奈米化藥物的組別其老鼠體重均無明顯變化（紅色箭頭為施打藥物的時間點）



## 5.6 結論

從以上實驗中我們觀察到，TPZ 在低氧環境下確實能抑制癌細胞株 LL/2 生長，且將 TPZ 奈米劑型化後其毒殺癌細胞的能力會更為顯著；此外，IMQ 也確實能將巨噬細胞株 RAW264.7 誘導分化為類 M1 的巨噬細胞型態，且在奈米劑型化後由於載體可以持續釋放藥物的能力，則可以發現相較於 free drug，奈米劑型 IMQ 誘導巨噬細胞分化的能力更加長效，而在載體搭載雙藥物的情況下，我們也證實了即使 TPZ 會對巨噬細胞產生毒殺力，其對於 M2 的毒殺力是大於 M1 許多的，而存活下來的 M2 則可以藉由載體內的 IMQ 轉換為類 M1 型態的巨噬細胞，最後在活體實驗上，我們可以看到兩種藥物奈米劑型化為單一載體後對於腫瘤的生長能力確實有抑制的作用，而且效果目前看來是比 free drug 形式來的更好的。

本篇研究結果發現（圖 5-16），MSN-TPZ&IMQ 能滯留在腫瘤環境中將藥物緩慢釋放，除了 TPZ 本身能有效促進缺氧環境下的癌細胞死亡，癌細胞殘骸也可作為活化腫瘤周邊免疫細胞的抗原；而 IMQ 也會促進 M2 巨噬細胞轉化成類 M1 型態巨噬細胞提昇腫瘤環境的 TH1 免疫反應，吸引更多毒殺性 T 細胞及自然殺手細胞到腫瘤環境。因此相較於傳統化療法，我們提出的以矽奈米粒子裝載 TPZ 與 IMQ 藥物的新型態抗癌策略能達到更完全的免疫治療癌症效果。

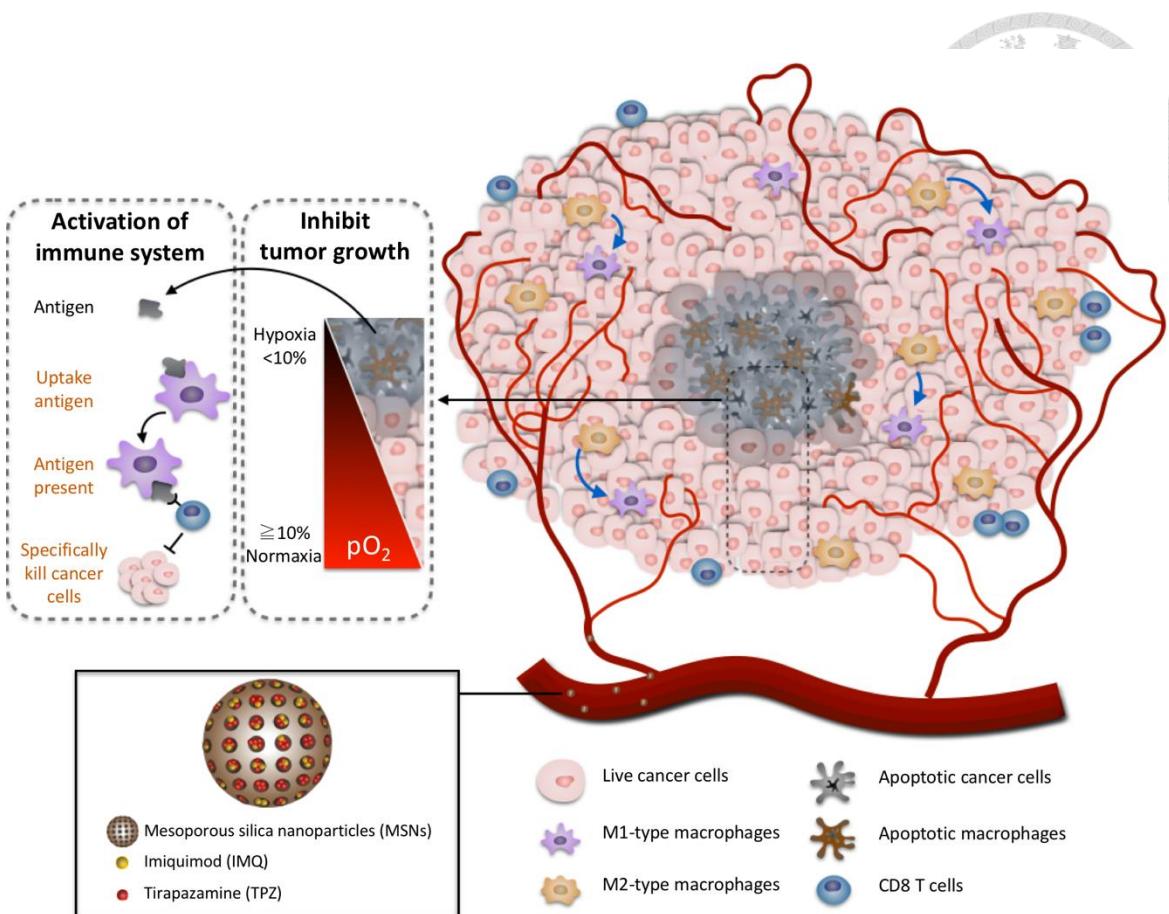


圖 5-15 奈米劑型藥物達成活化腫瘤環境免疫系統及抑制腫瘤生長之示意圖。TPZ 首先毒殺位於低氧環境之癌細胞；而 IMQ 則是將腫瘤環境之 M2 型態巨噬細胞轉換為類 M1 型態之巨噬細胞，藉此改善腫瘤環境抑制免疫系統的功能，轉換為促免疫反應的環境，最終這些類 M1 型態之巨噬細胞將活化下游之  $T_{H1}$  免疫反應，吸引更多的殺手型 T 細胞及自然殺手細胞到腫瘤環境，以達到完整之免疫治療癌症的效果。

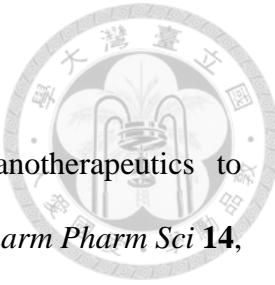
## 第六章 討論與未來展望



在我們的研究中，主要是以轉換巨噬細胞從原本的促腫瘤生長型態 M2 藉由 IMQ 將其轉換為促免疫型態 M1，而在早先針對巨噬細胞的癌症免疫治療中較常見的是藉由化療藥將 M2 直接從腫瘤中清除，我們認為相較於這樣的治療策略我們的優勢在於我們是將已經處於腫瘤環境中的巨噬細胞轉換為 M1 型態，且 M1 型態的巨噬細胞能直接活化下游免疫反應，而下游被活化的免疫細胞群會持續促使整體腫瘤的免疫反應激活，藉此達到一個扭轉 M1/M2 比例的結果，但若是直接將巨噬細胞清除，未分化的單核球細胞依舊可能從血管再次進入腫瘤在分化為 M2，而腫瘤內由於 M1 的數量也並未增加，因此免疫反應也可能還是會被抑制住，而導致療程失敗。並由於我們除了免疫治療外，還合併了針對低氧環境癌細胞的化學治療策略，因此對於腫瘤的生長抑制能力來說我們認為是更佳的。

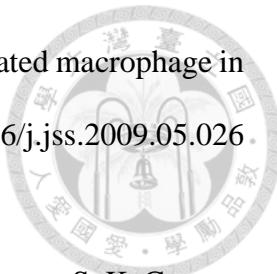
在未來我們將會進行組別更加完善的動物實驗，以印證兩種藥物在合併使用後是否有比一種藥單一使用時有更好的腫瘤抑制能力，且會以免疫組織染色切片的方式證實在我們的治療策略下巨噬細胞能有效轉換為類 M1 的形式，而後也希望能在接受藥物的老鼠脾臟中萃取出毒殺性 T 細胞，並和 LL/2 共培養觀察其是否有針對 LL/2 的專一性毒殺能力，最終以施打第二腫瘤並觀察其生長情形的方式，驗證在免疫療程結束後是否產生免疫記憶性防止腫瘤的再次形成，以上述實驗來完整驗證我們的合併治療的可行性。

## 第七章 參考文獻



- 1 Chidamaram, M., Manavalan, R. & Kathiresan, K. Nanotherapeutics to overcome conventional cancer chemotherapy limitations. *J Pharm Pharm Sci* **14**, 67-77 (2011).
- 2 Widakowich, C., de Castro, G., Jr., de Azambuja, E., Dinh, P. & Awada, A. Review: side effects of approved molecular targeted therapies in solid cancers. *Oncologist* **12**, 1443-1455, doi:10.1634/theoncologist.12-12-1443 (2007).
- 3 Quail, D. F. & Joyce, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* **19**, 1423-1437, doi:10.1038/nm.3394 (2013).
- 4 Mbeunkui, F. & Johann, D. J., Jr. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer Chemother Pharmacol* **63**, 571-582, doi:10.1007/s00280-008-0881-9 (2009).
- 5 Gilkes, D. M., Bajpai, S., Chaturvedi, P., Wirtz, D. & Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) promotes extracellular matrix remodeling under hypoxic conditions by inducing P4HA1, P4HA2, and PLOD2 expression in fibroblasts. *J Biol Chem* **288**, 10819-10829, doi:10.1074/jbc.M112.442939 (2013).
- 6 Gilkes, D. M. *et al.* Collagen prolyl hydroxylases are essential for breast cancer metastasis. *Cancer Res* **73**, 3285-3296, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3963 (2013).
- 7 Gilkes, D. M. & Semenza, G. L. Role of hypoxia-inducible factors in breast cancer metastasis. *Future Oncol* **9**, 1623-1636, doi:10.2217/fon.13.92 (2013).
- 8 Chen, F. *et al.* New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC Med* **13**, 45, doi:10.1186/s12916-015-0278-7 (2015).

- 9 Zhen, Z. *et al.* Protein Nanocage Mediated Fibroblast-Activation Protein Targeted Photoimmunotherapy To Enhance Cytotoxic T Cell Infiltration and Tumor Control. *Nano Lett* **17**, 862-869, doi:10.1021/acs.nanolett.6b04150 (2017).
- 10 Kobayashi, H., Watanabe, R. & Choyke, P. L. Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; what is the appropriate target? *Theranostics* **4**, 81-89, doi:10.7150/thno.7193 (2013).
- 11 Gajewski, T. F., Schreiber, H. & Fu, Y. X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol* **14**, 1014-1022, doi:10.1038/ni.2703 (2013).
- 12 Lindau, D., Gielen, P., Kroesen, M., Wesseling, P. & Adema, G. J. The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology* **138**, 105-115, doi:10.1111/imm.12036 (2013).
- 13 Dijkgraaf, E. M. *et al.* Chemotherapy alters monocyte differentiation to favor generation of cancer-supporting M2 macrophages in the tumor microenvironment. *Cancer Res* **73**, 2480-2492, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3542 (2013).
- 14 Blum, J. S., Wearsch, P. A. & Cresswell, P. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol* **31**, 443-473, doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095910 (2013).
- 15 Tang, X., Mo, C., Wang, Y., Wei, D. & Xiao, H. Anti-tumour strategies aiming to target tumour-associated macrophages. *Immunology* **138**, 93-104, doi:10.1111/imm.12023 (2013).
- 16 Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A. & Allavena, P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* **86**, 1065-1073, doi:10.1189/jlb.0609385 (2009).



- 17 Kurahara, H. *et al.* Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. *J Surg Res* **167**, e211-219, doi:10.1016/j.jss.2009.05.026. (2011).
- 18 Mantovani, A., Germano, G., Marchesi, F., Locatelli, M. & Biswas, S. K. Cancer-promoting tumor-associated macrophages: new vistas and open questions. *Eur J Immunol* **41**, 2522-2525, doi:10.1002/eji.201141894 (2011).
- 19 Qian, B. Z. & Pollard, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**, 39-51, doi:10.1016/j.cell.2010.03.014 (2010).
- 20 Sica, A. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* **122**, 787-795, doi:10.1172/JCI59643 (2012).
- 21 Biswas, S. K. & Mantovani, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* **11**, 889-896, doi:10.1038/ni.1937 (2010).
- 22 Klinman, D. M. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol* **4**, 249-258, doi:10.1038/nri1329 (2004).
- 23 Traves, P. G., Luque, A. & Hortelano, S. Macrophages, inflammation, and tumor suppressors: ARF, a new player in the game. *Mediators Inflamm* **2012**, 568783, doi:10.1155/2012/568783 (2012).
- 24 Allavena, P., Sica, A., Solinas, G., Porta, C. & Mantovani, A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol* **66**, 1-9, doi:10.1016/j.critrevonc.2007.07.004 (2008).
- 25 Binnemars-Postma, K., Storm, G. & Prakash, J. Nanomedicine Strategies to Target Tumor-Associated Macrophages. *Int J Mol Sci* **18**, doi:10.3390/ijms18050979 (2017).

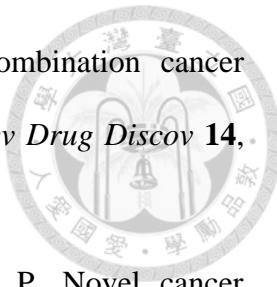


- 26 Panni, R. Z., Linehan, D. C. & DeNardo, D. G. Targeting tumor-infiltrating macrophages to combat cancer. *Immunotherapy* **5**, 1075-1087, doi:10.2217/imt.13.102 (2013).
- 27 Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z. G. & Shin, D. M. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res* **14**, 1310-1316, doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1441 (2008).
- 28 Davis, M. E., Chen, Z. G. & Shin, D. M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 771-782, doi:10.1038/nrd2614 (2008).
- 29 Draz, M. S. *et al.* Nanoparticle-mediated systemic delivery of siRNA for treatment of cancers and viral infections. *Theranostics* **4**, 872-892, doi:10.7150/thno.9404 (2014).
- 30 Chahibi, Y., Akyildiz, I. F. & Sang Ok, S. Antibody-based molecular communication for targeted drug delivery systems. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* **2014**, 5707-5710, doi:10.1109/EMBC.2014.6944923 (2014).
- 31 Gilboa, E., Berezhnoy, A. & Schrand, B. Reducing Toxicity of Immune Therapy Using Aptamer-Targeted Drug Delivery. *Cancer Immunol Res* **3**, 1195-1200, doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0194 (2015).
- 32 Fan, N. C., Cheng, F. Y., Ho, J. A. & Yeh, C. S. Photocontrolled targeted drug delivery: photocaged biologically active folic acid as a light-responsive tumor-targeting molecule. *Angew Chem Int Ed Engl* **51**, 8806-8810, doi:10.1002/anie.201203339 (2012).
- 33 Tao, Y. *et al.* Engineered, self-assembled near-infrared photothermal agents for combined tumor immunotherapy and chemo-photothermal therapy. *Biomaterials* **35**, 6646-6656, doi:10.1016/j.biomaterials.2014.04.073 (2014).

- 34 Zhang, S., Gao, H. & Bao, G. Physical Principles of Nanoparticle Cellular  
Endocytosis. *ACS Nano* **9**, 8655-8671, doi:10.1021/acsnano.5b03184 (2015).
- 35 Chen, N. T. *et al.* Theranostic applications of mesoporous silica nanoparticles and  
their organic/inorganic hybrids. *J Mater Chem B* **1**, 3128-3135,  
doi:10.1039/c3tb20249f (2013).
- 36 Lehar, J. *et al.* Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically  
relevant selectivity. *Nat Biotechnol* **27**, 659-666, doi:10.1038/nbt.1549 (2009).
- 37 Bracci, L., Schiavoni, G., Sistigu, A. & Belardelli, F. Immune-based mechanisms  
of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-  
based combined treatments against cancer. *Cell Death Differ* **21**, 15-25,  
doi:10.1038/cdd.2013.67 (2014).
- 38 Vanneman, M. & Dranoff, G. Combining immunotherapy and targeted therapies  
in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* **12**, 237-251, doi:10.1038/nrc3237 (2012).
- 39 Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune  
responses. *Nat Immunol* **5**, 987-995, doi:10.1038/ni1112 (2004).
- 40 Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate  
immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* **11**, 373-384,  
doi:10.1038/ni.1863 (2010).
- 41 Bachelder, E. M. *et al.* In vitro analysis of acetalated dextran microparticles as a  
potent delivery platform for vaccine adjuvants. *Mol Pharm* **7**, 826-835,  
doi:10.1021/mp900311x (2010).
- 42 Lee, J. *et al.* Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine  
nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A*  
**100**, 6646-6651, doi:10.1073/pnas.0631696100 (2003).

- 43 Chinnery, H. R., Leong, C. M., Chen, W., Forrester, J. V. & McMenamin, P. G. TLR9 and TLR7/8 activation induces formation of keratic precipitates and giant macrophages in the mouse cornea. *J Leukoc Biol* **97**, 103-110, doi:10.1189/jlb.3AB0414-216R (2015).
- 44 Saint-Jean, M., Knol, A. C., Nguyen, J. M., Khammari, A. & Dreno, B. TLR expression in human melanoma cells. *Eur J Dermatol* **21**, 899-905, doi:10.1684/ejd.2011.1526 (2011).
- 45 Kawai, T. & Akira, S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* **13**, 460-469, doi:10.1016/j.molmed.2007.09.002 (2007).
- 46 Zhang, G. & Ghosh, S. Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest* **107**, 13-19, doi:10.1172/JCI11837 (2001).
- 47 Soman, N. & Rivers, J. K. Imiquimod 5% cream for the treatment of actinic keratoses. *Skin Therapy Lett* **10**, 1-6 (2005).
- 48 Schon, M. P. & Schon, M. TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy. *Oncogene* **27**, 190-199, doi:10.1038/sj.onc.1210913 (2008).
- 49 Hoesel, B. & Schmid, J. A. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* **12**, 86, doi:10.1186/1476-4598-12-86 (2013).
- 50 Lawrence, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a001651, doi:10.1101/cshperspect.a001651 (2009).
- 51 Smith, K. J., Hamza, S. & Skelton, H. Topical imidazoquinoline therapy of cutaneous squamous cell carcinoma polarizes lymphoid and monocyte/macrophage populations to a Th1 and M1 cytokine pattern. *Clin Exp Dermatol* **29**, 505-512, doi:10.1111/j.1365-2230.2004.01593.x (2004).

- 52 Schon, M. *et al.* Tumor-selective induction of apoptosis and the small-molecule immune response modifier imiquimod. *J Natl Cancer Inst* **95**, 1138-1149 (2003).
- 53 Sohn, K. C. *et al.* Imiquimod induces apoptosis of squamous cell carcinoma (SCC) cells via regulation of A20. *PLoS One* **9**, e95337, doi:10.1371/journal.pone.0095337 (2014).
- 54 Chollet, J. L. *et al.* Development of a topically active imiquimod formulation. *Pharm Dev Technol* **4**, 35-43, doi:10.1080/10837459908984222 (1999).
- 55 Chosidow, O. & Dummer, R. Imiquimod: mode of action and therapeutic potential. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*, 8-11 (2003).
- 56 Peters, K. B. & Brown, J. M. Tirapazamine: a hypoxia-activated topoisomerase II poison. *Cancer Res* **62**, 5248-5253 (2002).
- 57 Wilson, W. R. & Hay, M. P. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **11**, 393-410, doi:10.1038/nrc3064 (2011).
- 58 Durand, R. E. & Olive, P. L. Evaluation of bioreductive drugs in multicell spheroids. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **22**, 689-692 (1992).
- 59 Durand, R. E. & Olive, P. L. Physiologic and cytotoxic effects of tirapazamine in tumor-bearing mice. *Radiat Oncol Investig* **5**, 213-219, doi:10.1002/(SICI)1520-6823(1997)5:5<213::AID-ROI1>3.0.CO;2-0 (1997).
- 60 Brown, J. M. & Wilson, W. R. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* **4**, 437-447, doi:10.1038/nrc1367 (2004).
- 61 Farkona, S., Diamandis, E. P. & Blasutig, I. M. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Med* **14**, 73, doi:10.1186/s12916-016-0623-5 (2016).



- 62 Mahoney, K. M., Rennert, P. D. & Freeman, G. J. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. *Nat Rev Drug Discov* **14**, 561-584, doi:10.1038/nrd4591 (2015).
- 63 Sharma, P., Wagner, K., Wolchok, J. D. & Allison, J. P. Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps. *Nat Rev Cancer* **11**, 805-812, doi:10.1038/nrc3153 (2011).
- 64 Ginhoux, F. & Jung, S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol* **14**, 392-404, doi:10.1038/nri3671 (2014).
- 65 Chanmee, T., Ontong, P., Konno, K. & Itano, N. Tumor-Associated Macrophages as Major Players in the Tumor Microenvironment. *Cancers* **6**, 1670-1690, doi:10.3390/cancers6031670 (2014).
- 66 Noy, R. & Pollard, J. W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* **41**, 49-61, doi:10.1016/j.jimmuni.2014.06.010 (2014).
- 67 Vignali, D. A. & Kuchroo, V. K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol* **13**, 722-728, doi:10.1038/ni.2366 (2012).
- 68 Lechner, M., Lirk, P. & Rieder, J. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. *Semin Cancer Biol* **15**, 277-289, doi:10.1016/j.semancer.2005.04.004 (2005).
- 69 Liu, M., Guo, S. & Stiles, J. K. The emerging role of CXCL10 in cancer (Review). *Oncol Lett* **2**, 583-589, doi:10.3892/ol.2011.300 (2011).
- 70 Jablonski, K. A. *et al.* Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *PLoS One* **10**, e0145342, doi:10.1371/journal.pone.0145342 (2015).