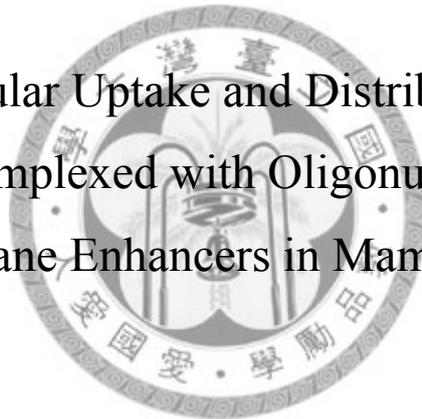


國立臺灣大學醫學院生物化學暨分子生物學研究所  
碩士論文

Graduate Institute of Biochemistry and Molecular Biology  
College of Medicine  
National Taiwan University  
Master Thesis

正價微脂體攜帶寡核苷酸複合物與穿膜促進劑在哺乳  
類細胞內之吸收與分佈分析

Analysis of Cellular Uptake and Distribution of Cationic  
Micelles Complexed with Oligonucleotides and  
Transmembrane Enhancers in Mammalian Cells



陳薇如

Wei-Ju Chen

指導教授：張富雄 博士

Adivisor: Fu-Hsiung Chang, Ph.D.

中華民國 九十八 年 七 月

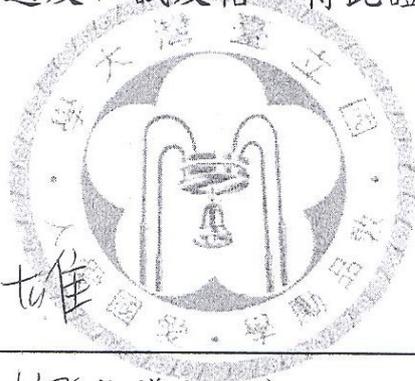
July, 2009

國立臺灣大學碩士學位論文  
口試委員會審定書

正價微脂體攜帶寡核苷酸複合物與穿膜促進劑在哺乳  
類細胞內之吸收與分佈分析

Analysis of Cellular Uptake and Distribution of Cationic Micelles  
Complexed with Oligonucleotides and Transmembrane Enhancers  
in Mammalian Cells

本論文係陳薇如君 (R96442012) 在國立臺灣大學醫學院生物化學暨分子生物學研究所完成之碩士學位論文，於民國 98 年 7 月 9 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：

張富雄

(簽名)

沈榮輝 (指導教授)

許金土

系主任、所長

(簽名)

(是否須簽章依各院系所規定)

## 謝 誌

在台大醫學院生化分生所二年的碩士生涯中，遇到許多的好朋友好同學，也聆聽了幾場精采的學術演講，這些無形中成為我寶貴的資源。在這邊首先我要感謝親愛的家人，雖然我常向您們訴苦，盡講一些你們都聽不懂的話，但從您們臉上微皺眉頭的样子，並靜靜地聽我發牢騷，我知道您們是真正關心我的人。另外，還要感謝我的指導教授張富雄老師，謝謝您在這兩年中對我的指導，也要謝謝兩位口試委員許金玉老師、莊榮輝老師，感謝您們在論文上的建議及修正。

感謝實驗室裡曾經與我接觸的人們，實驗室融洽的氣氛讓我在做實驗之餘還不時開懷大笑，謝謝你們帶給大家歡樂。感謝黃惠中老師在實驗上的建議，讓我能看到實驗上的不周全，以及您耐心地向我解答各種提問。感謝昭瑜學姊對實驗室事務的管理，還有提供寶貴的實驗經驗。感謝芷瑩學姊對實驗室各種行政事務和大小事物的管理，也很謝謝您時常對我們代課課程的提醒，讓我能如期完成。感謝實驗室裡的同伴威凱、宇均。感謝威凱在實驗上的幫助，雖然你總是來無影去無蹤，但對人的細心程度真讓我望塵莫及。感謝宇均，不時會提供一些冷笑話供我們消遣，還有耐心地幫忙教導學弟妹，說你是好幫手也不為過。因為有你們相互的幫忙與協助，讓我至少在研究生活中避開一些障礙，能夠認識你們是我的福氣。

感謝學弟妹若傑、俐臻、雅婷。有你們時常帶給我們的歡笑還有不時的協助，真得謝謝妳們。還有學長姐修德、逸祥、幸珊。當我碩一時耐心教導我實驗上的問題和技術，還有怡潔學姐的團購食物。感謝生化所同學們在實驗耗材上的襄助以及第二共研的黃先生，在顯微鏡上的協助與幫忙。感謝聽我發牢騷的千晴、之敏，在我實驗碰到瓶頸還有心情鬱悶時能適時提供協助與陪伴。當然還有許多感謝的人，才有這本論文，謝謝你們。

## 中文摘要

基因治療提供了治療疾病的前景，一般來說，利用奈米粒子來攜帶藥物或治療性的分子，例如：DNA、RNA、胜肽、蛋白質等進入標的細胞，對於核酸分子而言，有兩大標的位置—細胞質與細胞核；因此如何有效地將分子穿過細胞膜以到達每個標的位置是重要的課題。由於細胞膜是個動態的結構，傾向於親脂性的分子通過，而限制了親水性或帶電荷性的大分子物質的穿透，所以核酸類的物質比較難以自由進入到細胞內，為此，發展了以非病毒型的微脂體遞送系統，配合在奈米粒子的表面修飾物，提高進入細胞的效率；本篇研究利用微脂體-氧化鐵奈米粒子表面修飾生物素與鏈黴親和素融合 SV40-Tag 核位訊號 (NLS) 建構之蛋白質，階段式輔以磁力將奈米磁性粒子與螢光標定之寡核苷酸送入細胞質內後，並透過 NLS 與細胞內分子將奈米粒子送入細胞核內。

本論文提出利用磁力代替穿透膜胜肽的方法，觀察奈米粒子在癌細胞與老鼠骨髓間質幹細胞之細胞內分佈。實驗結果為 1. 施予磁力後可有效增加細胞對奈米粒子的吸收；2. 自然處理細胞後其 NLS-ST 蛋白質本身並不能進入細胞質，唯有加入磁力後可顯著加強細胞質中之奈米粒子進入細胞核；3. 奈米粒子進入細胞後可能脫離溶體路徑，有助於標靶奈米粒子進入細胞核。

**關鍵字:** 磁性奈米粒子、寡核苷酸、細胞核遞送

## Abstract

Gene therapy offers the promise of treating disease. In general, two target sites inside cells are cytoplasm or nucleus in case of delivering therapeutic molecules such as DNA, RNA, peptides and proteins by nanoparticles. There are complicated problems in targeting these molecules. It was difficult for the large charge molecules such as DNA to pass across plasma and nucleic membrane on their own. For these reasons, I developed a non-viral micelle delivery system using the surface-modified lipid nanoparticles. It was composed one positive charge lipid, called GEC-cholesterol with cholesterol, PEG lipid and biotinylated lipid. The surface-exposed biotin moiety could interact with the bifunctioned fusion protein containing streptavidin. Adding magnetic field sequentially could force the lipid nanoparticles complexed with oligonucleotides into the cytosol; meanwhile NLS associated with intracellular binding proteins then transported into the nucleus of cancer cells and rat bone marrow stem cells. The results indicated that manipulating the magnetic force could efficiently enhance nanoparticles transported into cells. Besides, NLS-Streptavidin fusion proteins themselves couldn't enter into the cytoplasm. But magnetic nanoparticles inside the lipid micelles were entered significantly into the nucleus with the assistant of magnetic fields. Thus, magnetic field might be benefit for targeting nanoparticles with cargos into nucleus.

**Key word:** magnetic nanoparticles, oligonucleotides , nuclear targeting

# 目 錄

口試委員會審定書 .....	i
謝 誌 .....	ii
中文摘要 .....	iii
Abstract .....	iv
圖表目錄 .....	vii
第一章 緒 論 .....	1
1.1 物質進出細胞的機制 .....	1
1.2 細胞穿透性胜肽 .....	1
1.3 細胞核運輸機制與核位訊號 .....	2
1.4 細胞核的標靶遞送 .....	3
1.5 奈米粒子的細胞內命運 .....	4
1.6 研究動機 .....	5
第二章 實驗材料和方法 .....	6
2.1 實驗材料 .....	6
2.1.1 化學藥品 .....	6
2.1.2 儀器 .....	7
2.1.3 細胞株 .....	8
2.1.4 質體與寡核苷酸 .....	8
2.1.5 脂質 .....	8
2.1.6 奈米粒子 .....	9
2.2 實驗方法 .....	9
2.2.1 氧化鐵奈米粒子之製備 .....	9
2.2.2 TAT-PAST 與 NLS-ST 的蛋白質抽取 .....	11
2.2.3 蛋白質的定量與定性 .....	12

2.2.4	包覆奈米磁性粒子與蛋白質混和的製備	13
2.2.5	寡核苷酸吸附於奈米粒子之盤式試驗比例分析	15
2.2.6	細胞毒性試驗 (MTT assay)	15
2.2.7	雷射共軛焦顯微鏡與數據分析	16
第三章	實驗結果	17
3.1	脂質奈米粒子之特性分析：粒徑大小與表面電位	17
3.2	細胞生長與奈米粒子劑量毒性測試	17
3.3	奈米粒子於各個時間點在細胞內分布情形	18
3.4	磁力可以加強連接 NLS-ST 蛋白質之奈米磁性粒子遞送至細胞核	18
第四章	討論	20
第五章	圖表說明	22
第六章	參考文獻	26



## 圖表目錄

表一、脂質奈米粒子之特性分析：粒徑大小與表面電位.....	22
圖一、磁力可以加強帶有連接 NLS-ST 蛋白質之奈米磁性粒子遞送至細胞核.....	23
圖二、活細胞共軛焦影像擷取細胞遞送寡核苷酸奈米粒子情形.....	25



# 第一章 緒 論

## 1.1 物質進出細胞的機制

許多大分子物質，例如：蛋白質、核酸物質 (DNA、RNA)，基於其本身的大小限制與親水的特性，使得相對於脂溶性物質難以自由進入細胞。而發展出以正價脂質與正價聚合物為運輸的載體。細胞吞噬 (endocytosis) 是現今認為非病毒性載體進入細胞的主要機制，被吞噬的物質會進一步融合細胞膜後，內凹形成膜狀小囊泡被包裹在內，最後則有機會與細胞質中的溶體融合並分解。在基因遞送方面，可大致分為 1. 非內吞路徑，例如：細胞顯微注射、透化作用、電極穿孔法、融合法、穿透法。2. 內吞路徑：(1) Clathrin 依賴型路徑，發生在細胞膜上的一種特異配體-受器結合作用，大部分的哺乳類細胞均有此作用，主要吸收一些重要的營養成份、抗原分子、生長激素和微生物。代表物有低密度脂蛋白膽固醇 (LDL)、運鐵蛋白 (transferrin)。(2) Caveolae 依賴型路徑，caveolae 是一種由 caveolin 構成的瓶狀套疊，大多數細胞均有，其中以內皮細胞含量多；代表物有 SV40 病毒的穿胞或內吞作用與霍亂毒素。(3) 其他內吞路徑，包含由肌動蛋白控制的板狀偽足造成巨胞飲 (macropinocytosis) (Tkachenko et al., 2004)。

## 1.2 細胞穿透性胜肽

細胞穿透性胜肽 (cell penetrating peptide, CPP) 又稱蛋白傳遞區段 (protein-transduction domain, PTD)，其由 10-30 個胺基酸所組成的一段短鏈胜肽，能透穿細胞膜。大部份已知的 CPP 具有帶正電性且來源於病毒，例如：Tat(48-60), Oligoarginine、Penetratin、Pep-1、pVEC、VP22。Tat 是由兩個 exons 轉譯出 86 或 101 個胺基酸所組成的小型細胞核蛋白，若將 Tat 序列中 86 號位的 serine 替換替換為終止碼，對其原本的功能並無影響。本篇研究使用的是取自

HIV-1 Tat 高度保留的一段鹼性區域，由六個 arginine 和兩個 lysine 胺基酸組成 (YGRKKRRQRRR)，它除了能和 TAR (transactivation-responsive region) 結合外，還能當作一種核位訊號 (nuclear localization sequence, NLS) 介介 Tat 的細胞核內運輸功能 (Vives et al., 2003)。基於 Tat 能夠穿過細胞膜的能力，近年來一些研究團隊陸續地結合 Tat 來攜帶藥物、蛋白質或 DNA 進入細胞質；抑或在動物活體方面，穿過內皮細胞障礙，例如：血腦障壁 (BBB) 和表皮細胞障礙，例如：腸壁和肺部表皮細胞之細胞與細胞間聯結緊密的地方，並限制大部份分子進入腦部和血液循環系統的細胞內。

### 1.3 細胞核運輸機制與核位訊號

核膜為雙層膜構造，主要是由一種中間絲稱為 nuclear lamina 所交織而成的堅固網欄結構，網欄中則裝飾著 FG 重複序列的核孔蛋白 (nucleoporin) 分子形成的核孔複合體 (nuclear pore complexes, NPC)，除其他小於 9 nm 或小於 40-50 kDa 分子則是能自由性擴散於細胞核與細胞質之間外，核孔它能選擇性讓小於 30 nm 的分子進出，其他大分子則需要透過由其他輔助蛋白和其特有的核位訊號，主動性運輸至細胞核內。

一般來說，含 NLS 序列之蛋白是由 importin  $\alpha/\beta$  異構雙體輔助攜帶至細胞核內，它們可分為(1) 含單邊 NLS 序列之蛋白，如：SV 40 T-ag NLS (PKKKRKV) 序列；(2) 含雙邊 NLS 序列之蛋白，即兩端鹼性區之間以 10-12 個胺基酸序列區隔；(3) 含其他 NLS 序列之蛋白，由帶電或極性胺基酸構成，例如：c-myc NLS (PAAKRVKLD)。文獻指出利用 ELISA 和核運輸之細胞試驗證實 Tat 的 NLS 序列 (Tat-NLS) 無法與傳統的 importin  $\alpha/\beta$  異構雙體結合，同時也發現利用 Tat-NLS 可將分子量 476 kDa 的蛋白質  $\beta$ -galactosidase 有效帶入細胞核內，其過程需耗費 ATP 但不需要細胞內分子的輔助，意味著 Tat 進入細胞核之機制，可能有別於傳統 importin/Ran 路徑 (Efthymiadias et al., 1998)。

## 1.4 細胞核的標靶遞送

由於細胞核是裝載生物遺傳物質的心臟，因此在細胞層次方面對於疾病、癌症治療，如何設計出良好的載體探針遞送至細胞核，有效突破堅固的核膜限制，將治療性的試劑送入是一大挑戰 (Berry et al., 2007; de la Fuente et al., 2005; Liu et al., 2008)，例如：藥物分子和 DNA 的作用以控制抑制癌症、治療性基因、siRNA 或反義 ODN 來降低過度表現的基因、反義股 RNA 與目標 RNA 模板做選擇性切割或胜肽蛋白質使細胞轉型、分化。細胞核的標靶遞送面臨及克服有以下幾點：(1) 運輸載體的直徑大小 ( $< 100 \text{ nm}$ ) 可以藉由主動性運輸得以穿過核孔；或小於  $30 \text{ nm}$  做被動性擴散通透；(2) 不經過或逃脫細胞質內溶體分解路徑 (endosome/lysosome pathway)，使得有機會與輔物分子如 importins 接觸結合；(3) 低毒性。利用非病毒性的載體，將牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 共價鍵結於金奈米粒子的表面，並且連接修飾穿透性胜肽和核位訊號於 BSA 上，形成胜肽-BSA-金奈米粒子複合物，分別比較以不同類別的核位訊號修飾之奈米金粒子在細胞內的分布情形，發現奈米粒子的吸收在細胞株間呈現差異性，除此之外，細胞培養基中加入粒子複合物， $4^\circ\text{C}$  下處理細胞，發現以源自 SV40 之 T 抗原的 NLS 序列修飾之奈米粒子，其吸收受到抑制，推論是透過受體媒介型內吞作用進入細胞；由此可知奈米粒子本身的表面特性與如何跨越細胞膜屏障為首要面臨的問題，藉由結合多種標靶性胜肽，來解決傳統 SV40 之 T 抗原的 NLS 序列所連接之粒子即使進入細胞後卻可能被侷限於後期囊泡中，抑或結構受到改變而無法與核孔上的分子作用的問題，顯示細胞核的標靶遞送極具挑戰性 (Alexander et al., 2004)。

## 1.5 奈米粒子的細胞內命運

為了瞭解利用奈米粒子來標誌細胞和追蹤細胞的研究，勢必需要了解奈米粒子在細胞內的分布位置 (Alexander et al., 2004) 以及粒子在細胞質內是否被代謝也是大家所感興趣的。研究以 CPP 修飾的微胞包裹的金奈米粒子在 HeLa 細胞中的分布 (Nativo et al., 2008)，大部份的金粒子被侷限在溶體的囊胞中，也有一些是單獨散落在細胞質中；比較 PEG 修飾的金奈米粒子加入 CPP—TAT、Pntn (GRQIKIWFQNRRMKWKK) 胜肽與 NLS 胜肽後，其奈米金粒子在細胞內的分佈情形，透過穿透式電子顯微鏡發現在細胞質、後期溶體和細胞核都有金粒子分佈，而絕大多數則聚集在細胞核膜的周圍膜狀構造內。除了在金奈米粒子的應用外，透過化學性共價鍵結生物性分子的量子點 (quantum dots, QDs) 作為細胞影像的螢光探針，也廣被應用在分子層次、細胞層次，以及生物體影像的分析。在活細胞方面，有研究團隊為了瞭解此種複合功能性的探針其在細胞內的運行情形，透過動力式共軛焦顯微鏡，觀察到以 TAT-QD 標定細胞後，量子點以胞吞的方式被細胞所吸收，在細胞內匯聚集於 microtubule organization center (MTOC) 後並形成小囊泡，接著被送到細胞外 (Ruan et al., 2007)。除了奈米粒子在癌細胞的研究外，愈來愈多研究團隊也致力於奈米粒子在幹細胞的研究，幹細胞為原始未分化的細胞，具有分化為其他細胞類型的潛力，成為再生醫學中疾病治療的研究標的 (Muller-Borer et al., 2007)，有研究者利用 Pep-1 此穿透膜胜肽連接之量子點，標誌間葉骨隨幹細胞，觀察量子點在細胞內的命運，以及觀察量子點對幹細胞的生理影響，發現在 28 天後存在細胞內的量子點數量減少且其可能造成細胞毒性與影響幹細胞的分化潛能 (Chang et al., 2008; Hsieh et al., 2006)。

## 1.6 研究動機

現今非病毒型的基因遞送載體主要依賴兩種物質作為媒介，分別為正價的脂質與正價的聚合物，並加入各種具功能性的衍生物，進而使整個遞送系統更有效力。因此有必要去探討細胞是如何吸收這些物質，以及載體與運輸物在細胞內的分佈機制，則有助於設計優良的遞送策略。一般來說，脂質與核酸物質形成的複合物進入細胞的可能機制是透過脂質與細胞膜之間的融合，進而將核酸物質釋放至細胞質，然而後續的支持性證據則是認為細胞內吞 (endocytosis) 為主要的機制。DNA、RNA、oligonucleotides 等核酸物質為帶有負電荷的分子，可利用脂質奈米粒子帶入細胞。此外，奈米鐵粒子具有均質勻相的大小與生物相容性，以及具有可被顯影的特性，透過以奈米鐵粒子當作核心，外層加上導向物質，用以攜帶治療性的基因分子，將可成為修補基因性缺失之疾病的治療性探針。由於大部分研究是利用穿透性胜肽當作穿透細胞膜屏障的工具，而以 CPP 修飾的微胞包裹的奈米粒子，通常由細胞內吞後，易堆積於溶體的囊泡中而被酵素分解，因此本篇實行的策略是利用奈米氧化鐵合成後其本身的磁性，取代傳統的穿透性胜肽，欲以磁力代替穿透膜胜肽 TAT，以攜帶 NLS-ST 之奈米磁性粒子進入細胞核。

## 第二章 實驗材料和方法

### 2.1 實驗材料

#### 2.1.1 化學藥品

1,2-十二烷二醇 (1,2-dodecandiol) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

青黴素 (Ampicillin) (Boehringer Mannheim Corp, SF, USA)

苯基醚 (Benzyl ether) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

氯霉素 (Chloramphenicol) (Boehringer Mannheim Corp, SF, USA)

三氯甲烷 (Chloroform) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

卡馬西藍 (Coomassie Blue R-250) (Bio-Rad Laboratories, Redmond, WA)

二甲基亞砜 (Dimethylsulfoxide, DMSO) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

DiI(C<sub>18</sub>) DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-teramethylindo carbocyanine perchlorate)  
(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

DSPE-PEG-biotin (Avanti Polar Lipids Inc, Alabaster, AL, USA)

DSPE-PEG 2000 (Avanti Polar Lipids Inc, Alabaster, AL, USA)

DMEM 培養基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

乙二胺四乙酸 (Ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria)

乙醯丙酮鐵(III) (Fe[acetylacetonate]<sub>3</sub>) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

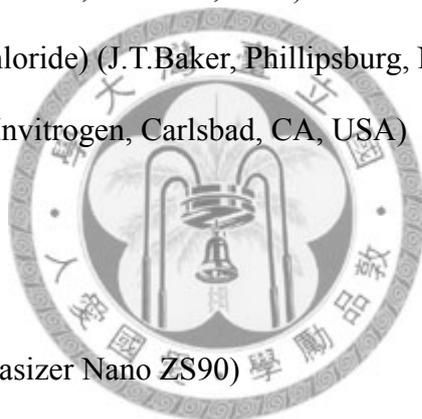
甘油 (Glycerol) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

葡萄糖 (Glucose) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

2-胍基-乙基-氨基甲酸 (GEC-cholesterol) (本實驗室自行合成)

正己烷 (Hexane) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

赫斯特染劑 (Hoescht 33342) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)  
三聚甲醛 (Paraformaldehyde) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)  
聚離氨酸 (Poly-L-Lysine) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)  
異丙基-β-D-硫代半乳糖 (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG) (Calbiochem, San Diego, CA, USA)  
LB 培養基 (Luria-Bertani, LB broth) (Zymeset Biology, Taiwan)  
溶酶體指示劑 (LysoTracker Red) (Invitrogen-Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA)  
硝酸鎳 (Nickel sulfate hexahydrate) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)  
油酸 (Oleic Acid) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)  
油胺 (Oleylamine) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)  
緩衝劑鹽酸鹽 (Tris hydrochloride) (J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA)  
胰蛋白酶 (Trypsin) (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)



## 2.1.2 儀器

動態光散射儀 (Malvern Zetasizer Nano ZS90)  
減壓濃縮機 (BÜCHI Rotavapors R-220)  
超音波細胞粉碎儀 (Misonix Sonicator 3000)  
電泳凝膠影像分析系統 (UVP BioDoc-IT Imaging System)  
自動酵素免疫分析儀 (Multiskan EX Microplate Photometer, Thermo Science)  
螢光顯微鏡 (Leica DM IRB system)  
雷射共軛焦顯微鏡 (Leica TCS SP5 spectral confocal system, Inverted laser scanning microscope Zeiss LSM 510)  
流式細胞儀 (Becton Dickinson FACS Calibur)

### 2.1.3 細胞株

- I. Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells (MDCK): 狗上皮癌細胞 (ATCC No. CCL-34™)。
- II. Rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC): 大鼠骨髓間葉幹細胞，自 Wister 品系之老鼠抽取分離 (由本實驗室黃威凱同學抽取)。

### 2.1.4 質體與寡核苷酸

- I. TAT-PAST: HIV-1-PTD (RKKRRQRRR)-Protein A-Streptavidin  
(由本實驗室劉昶辰同學構築)。  
NLS-ST : the SV40 large T-antigen-derived NLS (PKKKRKV)-Streptavidin  
(由本實驗室梁智超同學構築)。
- II. 寡核苷酸 (ODN):  
T7 F primer-6-FAM: FAM-5'-CCGGATCCATGAACACGATTAACATCGC-3'  
T7 R primer: 5'-CCGGATCCATGAACACGATTAACATCGC-3'  
(購自生工公司)。  
\* 6-FAM: 6-carboxyfluorescein-aminohexyl amidite

### 2.1.5 脂質

- I. GEC-cholesterol ([2-guanidino-ethyl]-carbamic acid-cholesterol) (本實驗室合成)
- II. DSPE-PEG2000 (1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[carboxy(polyethylene glycol)-2000]) (Avanti Polar Lipids Inc, Alabaster, AL, USA)
- III. DSPE-PEG2000-Biotin (1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[biotinyl(polyethylene glycol)-2000]) (Avanti Polar Lipids Inc, Alabaster, AL, USA)

## 2.1.6 奈米粒子

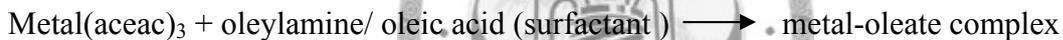
氧化鐵奈米粒子 ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (本實驗室自行合成，方法如下所述)

## 2.2 實驗方法

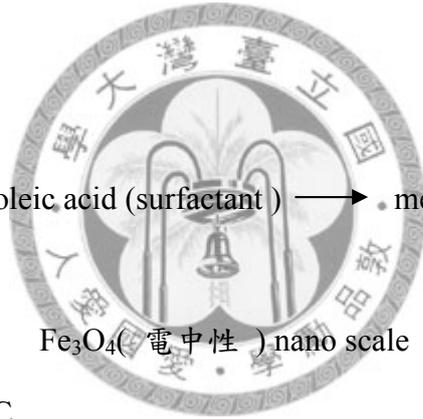
### 2.2.1 氧化鐵奈米粒子之製備

氧化鐵，又稱四氧化三鐵，化學式  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ，分子量 231.54，四氧化三鐵中有兩種化合物態，經研究證實為一種鐵(III)酸鹽，即  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{III}}\text{O}_4]$ 。氧化鐵的合成主要是利用熱裂解的方式，讓  $\text{Fe}(\text{acetylacetonate})_3$  原料在高溫之有機相中使鐵晶體緩慢而持續堆疊長成，此法易得到勻相且具單一散度的氧化鐵粒子。

熱裂解合成法：



(Benzyl ether)沸點 295-298°C



材料：

(表格一) 合成 6 nm 氧化鐵粒子

	材料	莫耳數	劑量	功能
a	$\text{Fe}(\text{acetylacetonate})_3$	2 mmol	0.7 g	precursor
b	1,2-dodecandiol	10 mmol	2.25 g	還原 $\text{Fe}^{+3} \rightarrow \text{Fe}^{+2}$
c	Oleic Acid	6 mmol	1.88 g	surfactant
d	Oleylamine	6 mmol	2.3 g	surfactant
e	Benzyl ether		20 ml	High boiling point solvent

(表格二) 合成 10 nm 與 12 nm 氧化鐵粒子

	材料	莫耳數	劑量
a	Fe(acetylacetonate) <sub>3</sub>	2 mmol	0.7 g
b	1,2-dodecandiol	10 mmol	2.25 g
c	Oleic Acid	2 mmol	0.63 g
d	Oleylamine	2 mmol	0.77 g
e	Benzyl ether		20 ml

**製備 6 nm 氧化鐵步驟如下:**

1. 依劑量加入材料 a、b、c、d、e 和攪拌子
2. 加熱至 300°C，1 h 後停止反應
3. 退溫至 200°C，拿掉乾鍋
4. 以 20 ml 的 95 % 酒精溶解(去除 surfactant 與 10 ml 正己烷以 2 比 1 之比例 (v/v) 加入，使氧化鐵較易析出而沉澱
5. 分裝至離心瓶
6. 以 16000 xg 離心 10 分鐘
7. 倒掉上清液，加入 10 ml 的 100 % 酒精與 10 ml 的 hexane，離心 10 分鐘
8. 重複步驟 7 三次
9. 最後回溶至 10 ml 的 hexane 保存 (若要長期保存可各加 5  $\mu$ l 的 oleic acid 與 oleylamine)或直接置於真空乾燥盒乾燥成粉末稱重

**製備 10 nm 與 12 nm 氧化鐵步驟如下:**

1. 依劑量加入材料 a、b、c、d、e 和攪拌子，攪拌均勻後
2. 加入 10 ml (即步驟九)的溶於正己烷 6 nm seeds (或 10 nm 晶種) 溶液，均勻攪拌

並開始加熱至 60°C 維持 20 分鐘(對於 12 nm 晶種: 加入 10 ml 溶於 hexane 含 84 mg 的 10 nm 氧化鐵)

3. 繼續升溫至 200°C , 2 hr (對於 12 nm 晶種: 100°C 30 min)
4. 再升溫至 300°C , 1 hr 後停止反應 (對於 12 nm 晶種: 200°C 1 hr , 300°C 2 hr 後停止反應)
5. 退溫至 200°C , 拿掉乾鍋
6. 分裝至離心管 , 此後清洗離心步驟同上

## 2.2.2 TAT-PAST 與 NLS-ST 的蛋白質抽取

### 蛋白質表達:

1. 第一天: 準備錐形瓶, 將菌株以 1000 倍稀釋, 小量培養於含抗生素 ampicilin、chlorophenicol LB 培養液(100 ml), 37°C 震盪培養 16-18 小時。
2. 第二天: 轉到大量培養至 800 ml 的 LB 培養液(含抗生素), 37°C 震盪下培養 2 小時, 確認菌液 OD<sub>600</sub> 吸光值大於 0.6。
3. 誘導蛋白質表現: 加入 90 µl 的 1 M IPTG (IPTG 最終濃度為 0.1 mM), 37°C 下 250 rpm 搖晃培養, 誘導 0、1、2、3、4 個小時時間點。並收集每個時間點 1ml 菌液, 並記錄 OD<sub>600</sub> 吸光值。
4. 將菌液 4°C , 5700 xg 離心 20 分鐘。
5. 移除上清液, 將菌置- 20°C 冰箱保存。

### 蛋白質純化—His-Tag 融合蛋白:

1. 加入 10 ml 1x binding buffer 細菌離心沉澱物並震盪均勻
2. 加入 10 mg lysozyme (最終濃度 1 mg/ml)
3. 放置於冰上 15 min
4. 置於冰上以超音波細胞粉碎儀震盪均勻, 呈現澄清狀

5. 14000 xg 離心 20 min
6. 加入 7.5 ml ddH<sub>2</sub>O 以平衡管柱
7. 加入 12.5 ml 的 1x charge buffer (2 次)，流下的 charge buffer 可回收利用
8. 加入 7.5 ml 的 1x binding buffer 以去除多餘的 Ni<sup>2+</sup>
9. 將離心後的上清液通過 0.45 μm filter 2 次
10. 加入清液加入 Ni<sup>2+</sup>管柱
11. 加入 25 ml 的 1x binding buffer 去除非特異性結合蛋白
12. 加入 15 ml 的 binding buffer: wash buffer = 2:3 buffer 去除非特異性結合蛋白
13. 加入 6 ml 的 1x elution buffer，將 His-Tag 融合蛋白過濾出來，共計六小管 1 ml 蛋白質樣品
14. 加入 12 ml 的 1x strip buffer 使管柱重生
15. 定量與定性分析過濾出來的蛋白質樣品
16. 以 PBS 或 HBS buffer (v/v = 1:2000) 透析 4°C，24 hr

\*Storage buffer 配製法:

1x binding buffer: 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM imidazole, pH7.9

1x charge buffer: 50 mM NiSO<sub>4</sub>

1x wash buffer: 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 60 mM imidazole, pH7.9

1x elution buffer: 1 M imidazole, 0.5 M NaCl, 20 mM tris-HCl, pH7.9

1x strip buffer: 0.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH7.9

### 2.2.3 蛋白質的定量與定性

SDS 膠體電泳的原理是利用界面活性劑 SDS (sodium dodecyl sulfate)，可使蛋白質變性，並且分子表面均勻附上一層負電荷，因此帶著分子往正極移動。由於 SDS 讓蛋白質呈線形展開，故分子的泳動率取決分子量大小，與原態型造成的構形影響無關。

Coomassie Blue 染色蛋白質定量方式為製備 BSA 標準液和樣品溶液，然後加入 Coomassie Blue G-250 試劑，靜置約 5 分鐘，加入平底 96 孔盤，測 OD<sub>595</sub> 吸光值，以標準曲線定出樣品濃度。

**PAST 融合蛋白質活性定性分析步驟如下：**

1. 加入 1 μg 的 IgG 溶於 200 μl 的 PBS 至 96-ELISA 平底盤，37°C 1 hr 或 4°C 隔夜
2. 移除 PBS，加入 200 μl 的 3 % BSA/PBS，室溫 1 hr
3. 移除 PBS，加入溶於 200 μl 的 PBS 之 PAST 蛋白質溶液
4. 以 PBS 潤濕 3 次，倒掉
5. 加入 200 μl 的 3 % BSA/PBS [含 100x Bio-HRP 10μl (= 0.1μg)]，室溫 1 hr
6. PBS 潤濕 3 次，倒掉
7. 加入 100 μl 的 TMB solution(v/v = 1/1) 室溫 30 min
8. 加入 50 μl 的 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(顏色變化由藍色變為黃色)
9. 讀取 OD<sub>450</sub> 吸光值



**2.2.4 包覆奈米磁性粒子與蛋白質混和的製備**

奈米粒子的組成: LNP: GEC-Chol/Chol, DSPE-PEG (25 %), DSPE-PEG-biotin (1 %), SPIO。

1. 將 GEC-Chol 與 cholesterol 以等莫耳數(molar ratio = 1:1)加入圓底瓶，以真空抽氣裝置，設定轉速為 130，並減壓至 -76 mmHg，且在 65°C 水浴中將氣仿抽乾，使脂質能均勻披覆在玻璃表面。
2. 加入 1 ml 的 5 % 葡萄糖水溶液，在約 80°C 水浴中利用超音波震盪機將脂質與糖水充分混合，製備而得 10 nmol/μl 的微胞。

- 將微胞以探針打成約 100 nm 大小或通過脂質體擠壓 (extruder apparatus) 得到微胞後進行奈米氧化鐵粒子的包覆。
- 以 GEC-Chol/Chol: DSPE-PEG: DSPE-PEG-biotin 實際莫耳數比為 200 nmol: 50 nmol: 2 nmol 分別加入 400  $\mu$ l 的 5 % 葡萄糖水溶液與 400  $\mu$ l 的 ddH<sub>2</sub>O，與 40  $\mu$ l 的氧化鐵 (Stock Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: 5 mg/ml) 以及 20  $\mu$ l 的 DiI (0.5  $\mu$ g /  $\lambda$ ) 以超音波探針均勻打散。
- 以約 80-90°C 水浴將氯仿蒸散，過程中需不時搖晃試樣瓶。
- 打開蓋子靜置於抽風櫃約 3 分鐘，再加入 18  $\mu$ l 的氯仿以探針打至乳糜色狀，重複步驟 5。
- 視情況而定補水至總體積為 1 ml。

	NLS-ST/ TAT-PAST	Major lipid:Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	DiI*
24-well	0.5 nmole/ 0.5 nmole	25 nmol: 25 $\mu$ g(0.1 nM)	1.25 $\mu$ g

(\*DiI working solution = 0.5  $\mu$ g /  $\lambda$  in DMSO).

- 以上表各成分組成依序將蛋白質加入氧化鐵溶液中，溫和攪拌 2 次，靜置 1 小時。
- 以磁鐵吸附 2-3 分鐘，吸取上清液轉移至新的 1.5 ml 離心管，再以磁鐵吸附 overnight。
- 移除上清液後，去除游離的 DiI，收取被磁力吸附之沉澱物，加入無血清之 DMEM 混合均勻加入細胞中。
- 若製備氧化鐵與 ODN 複合物，則移除上清液後，補 ddH<sub>2</sub>O 至總體積 50  $\mu$ l；同時將 ODN 溶於 50  $\mu$ l 的 ddH<sub>2</sub>O 後將其加入氧化鐵混合液，溫和攪拌一次，靜置於室溫 25 分鐘，加入無血清之 DMEM 混合均勻加入細胞中。

\* 蛋白質與主要脂質比例為 1 nmol 的 NLS-ST 比上 50 nmol 的 GEC-Chol/Chol。螢光標定之 ODN 與 未標定之 ODN 以莫耳數 1:1 與 SPIO-LNP 形成複合物。ODN 對主要脂質之氮磷比例為 N/P=3，即 5 nmol 的 GEC-Chol/Chol 加入 60 pmol 的 ODN；最終反應濃度為 300 pmol/ml 的 ODN 於 24 孔盤中。

### 2.2.5 寡核苷酸吸附於奈米粒子之盤式試驗比例分析

1. 將 150 pmol 的 6-FAM-ODN 與 150 pmol 的 ODN 之混合液加入含 25 nmol 的氧化鐵奈米粒子溶液，室溫靜置 20 分鐘。
2. 以磁力吸附 24 小時後，收取含游離 ODN 之上清液與奈米鐵粒子-ODN 複合。
3. 以多重標定冷光偵測技術儀 (Multilabel counter, Wallac) 偵測 6-FAM 之螢光 (激發光 450 nm，吸收光偵測於 535 nm)。

### 2.2.6 細胞毒性試驗 (MTT assay)

4. 96 孔盤中種植  $1 \times 10^4$  之細胞數目於 100  $\mu$ l 細胞培養液中 18 小時。
5. 孔槽加入氧化鐵溶液培養 24 小時。
6. 每孔加入 50  $\mu$ l 的 MTT 試劑 (以每 ml 之 PBS 加入 5 mg 的 MTT 後過濾)，搖晃 96 孔盤數分鐘使之充分混合，37°C 培養 4 小時。
7. 倒掉溶液後，每孔加入 100  $\mu$ l 的 DMSO 將紫色結晶溶解並盡可能搖晃孔盤使混和液均勻。
8. 以酵素免疫分析儀讀取 OD 595 吸光值。

## 2.2.7 雷射共軛焦顯微鏡與數據分析

準備 24 孔盤，先過火殺菌後 0.17 mm 之圓形玻璃片放入孔盤內，加入 Poly-L-lysine (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 置於室溫以 UV 燈照至少 1 小時。吸去上清液，每孔種入約  $6 \times 10^4$  顆細胞，經培養 18 小時，處理奈米粒子。

活細胞影像擷取利用 Leica TCS SP5 共軛焦影像顯微鏡 (spectral confocal system) 與 Zeiss LSM 510 Inverted Meta 雷射；使用物鏡為 40x/1.0 oil 與 63x/1.4 oil Plan-Apochromat。所有影像擷取設定值為：光束分束器 HFT UV/488/543/633；各個螢光物質設定為 Hochescct 33342：激發光 405 nm，偵測於 420-480 nm  
6-FAM：激發光 488 nm，偵測於 500-530 nm bandpass (BP) filter；DiI：激發光 543 nm，偵測於 575 longpass (LP) filter。影像是透過序列式擷取，以降低螢光分子之間的交互影響。定量分析方式為目測計數紅色、綠色、黃色螢光，若細胞核位置含三個螢光點以上則確定進核的細胞，並計算其占總細胞數的比例。



## 第三章 實驗結果

### 3.1 脂質奈米粒子之特性分析：粒徑大小與表面電位

根據奈米粒子本身與表面化學特性，對於標的不同的細胞也會有些微差異。本篇利用帶正電荷之脂質 GEC-Chol (2-guanidino-ethyl-carbamic acid-cholesterol) 及與不同比例之 PEG-脂質混合，依 GEC-Chol 的實際莫耳數為百分之一百計算，並插入 1 % 的 DSPE-PEG-biotin，使得帶有鏈黴親和素的融合蛋白質能與脂質上的生物素結合，而可製備成為標靶性之奈米粒子。比較插入 25 % 的 DSPE-PEG 之微胞奈米鐵粒子複合物與加上各個分子後，前後的粒徑大小與表面靜電位變化。由粒徑分析儀測得結果為：(1) 插入 25 % 的 DSPE-PEG 其粒子表面電位維持正電荷；(2) 包覆氧化鐵後可使整體粒徑變小，即使加入蛋白質與寡核苷酸 (ODN) 後，粒徑均能維持在約 80-100 nm 左右(表一)。為了瞭解綠色螢光標誌之寡核苷酸與奈米鐵粒子複合物之吸附情形，將粒子以磁力分離後，利用微盤式螢光分析含游離態 ODN 之上清液的螢光光譜讀值，再回推粒子吸附 ODN 之比例，實驗結果為加入 NLS-ST 蛋白質之奈米鐵粒子吸附寡核苷酸比例約 40 %，而單純奈米鐵粒子吸附寡核苷酸比例約 80 %。

### 3.2 細胞生長與奈米粒子劑量毒性測試

本實驗以奈米鐵粒子標誌細胞，為了得知在不影響細胞生長之粒子標定最大劑量，故利用 MTT 試驗來求取合適的奈米粒子操作濃度。將 MDCK 細胞分別處理不同濃度 (5、25、50、100  $\mu\text{g/ml}$ ) 之奈米粒子，經過 24 小時後，將細胞處理 25  $\mu\text{g/ml}$  的氧化鐵濃度仍有將近百分之九十以上的存活率，若處理 50  $\mu\text{g/ml}$  的氧化鐵濃度，細胞則有百分之七十的存活率，而處理 100  $\mu\text{g/ml}$  的氧化鐵濃度，則細胞存活率降低到百分之四十，故取 25  $\mu\text{g/ml}$  之氧化鐵濃度作為後續實驗標誌細胞的濃度。

### 3.3 奈米粒子於各個時間點在細胞內分布情形

由於本篇研究目的是遞送物質進入細胞核，因此吾人企圖取得各株細胞對奈米粒子的吸收情形達平原期 (plateau state)，並進而在細胞分裂前取得影像，控制了解這些奈米粒子在細胞內的命運為何。將奈米磁性粒子以螢光物質 DiI 混入 GEC-Chol/Chol 微胞中，觀察細胞內奈米粒子的分佈量是否有隨著時間的增加而上升。在 MDCK 細胞方面，奈米粒子於細胞內的分佈量呈現時間效應 (time dependent)，在處理細胞 8 小時後，使用共軛焦顯微鏡觀察發現細胞內奈米趨近於飽和，並以流式細胞儀分析之標定程度。將奈米粒子以每 ml 含 25  $\mu\text{g}$  之濃度分別處理 BMSC 細胞 2、8、18 小時後進行觀察，細胞吸收奈米粒子之情形亦呈現時間效應，並在 18 小時達到最高峰。為了瞭解此方法是否確實標誌細胞，故將處理奈米粒子之 MDCK 細胞以胰蛋白酶處理離心後，並輕微攪拌使其呈現單細胞懸浮液後以磁座收集已標誌之細胞，重新種植於新的培養盤中，18 小時後分析 DiI 之螢光，幾乎所有收集下來的細胞均被標定奈米粒子，顯示此法標定細胞之效率佳並能應用磁力吸附來加以收集細胞。



### 3.4 磁力可以加強連接 NLS-ST 蛋白質之奈米磁性粒子遞送至細胞核

由於大部分研究是利用穿透性胜肽當作穿透細胞膜屏障的工具，而本篇實行的策略是善用奈米氧化鐵合成後期本身的磁性，取代傳統的穿透性胜肽。為了研究磁力是否能增加奈米粒子進入細胞的效率，將 MDCK 細胞處理脂質包覆之氧化鐵奈米粒子，分別比較 NLS-ST 與磁力對細胞吸收奈米粒子的影響。以粒子單獨處理 MDCK 細胞 8 小時，在有外加磁場的作用下，接近全部的細胞均確實增加吸收奈米粒子，但絕大部分的奈米粒子分佈於細胞質，但在 BMSC 方面，在有外加磁場的作用，可分析到將近百分之六十的 BMSC 的細胞核均有奈米粒子的存在，而有百分之三十的

MDCK 細胞之細胞核有奈米粒子的存在；另外比較加入 NLS-ST 蛋白質後，細胞對於奈米粒子吸收之情形，在磁力作用下，NLS-ST 在此有少許影響進核的效果 (圖一 A, B)，由實驗證明，磁力對於奈米粒子進入細胞核之效率的提升大於 NLS-ST 蛋白質。而在寡核苷酸的遞送方面，大部分的寡核苷酸均跟奈米粒子有共位在一起 (圖二)。



## 第四章 討 論

本實驗室已發展出利用 GEC-Chol/Chol 所形成的微胞奈米粒子包裹奈米粒子的技術，由先前的數據結果得知由 GEC-Chol/Chol 微胞的粒徑大小約莫 120 nm 左右，加入 PEG-脂質比較不同比例對包裹量子點及攜帶 ODN 的效率；10 % 的 PEG-脂質可增加於活體內血液巡流時間，且在體外實驗中細胞吸收的效率佳，但若包裹 50 % 的 PEG-脂質則可顯著抑制細胞吸收量子點奈米粒子。另外，實驗室也結合 TAT-PAST 此種穿透性胜肽融合蛋白與 NLS-ST 核位訊號融合蛋白，利用 DOTAP 此種正價脂質插入 PEG-脂質，並包裹奈米磁性粒子，有機會讓粒子進入細胞核。由於細胞核膜是雙層膜且具有選擇性，可讓一些粒徑小於 10 nm 的物質做被動性擴散進入，因此本篇結合運用先前發展之優點，將 GEC-Chol/Chol 加入 PEG-脂質，並再加入融和蛋白與 ODN，可維持奈米粒子之於 80-100 nm 左右，並且能降低非專一性之遞送情形。

近年來，有許多研究應用無機性奈米材料於細胞影像的追蹤，例如：金奈米粒子、矽鐵奈米粒子與量子點。雖然量子點 (quantum dots) 擁有良好的螢光訊號，且不容易有光漂白作用，在生物體外方面應用廣泛，但是其主成分為硒化鎘 (CdSe)，因近年研究其會誘導細胞氧化壓力的產生，使細胞走向凋亡 (Li et al., 2008)。利用穿透性胜肽 Pep-1 攜帶量子點進入骨髓幹細胞 (Chang et al., 2008)，雖然如此文獻提到其潛在毒性而受限。於再生醫學領域中，氧化鐵為另一良好的奈米粒子可應用於追蹤幹細胞與研究幹細胞分化的研究，且由於超順磁的氧化鐵奈米粒子具  $T_2$  加權影像的訊號，為良好的 MRI 顯影劑，在活體應用上能偵測這些已標定之幹細胞於受損組織的修補情形，抑或配合其他技術可做微盤式篩選標的細胞。在細胞毒性試驗中的實驗結果看來，標定奈米磁性粒子對細胞的生長有九成以上的存活率，故不會造成顯著的影響，往後還可再降低氧化鐵的濃度。

細胞核的基因遞送面臨的困難在於需要突破多層生物膜之重重障礙，又其本身遭遇在細胞質環境的酵素分解或牢困於膜狀構造內，進而影響遞送的效果不彰。本實驗室先前研究利用穿透性胜肽 TAT-PAST 與 NLS-ST 共同結合至以正價脂質 DOTAP 形成之微脂體，研究其奈米粒子在 HeLa 細胞中的進核情形。有鑑於其組成成分容易在細胞質中遭受溶體酵素所分解，造成核位訊號失去活性，進而降低遞送效率。因此本篇研究利用以膽固醇為基礎的正價脂質 GEC-Chol 來當作主要脂質材料，此正價脂質在先前研究中，發現其針對核酸物質的包裹與遞送都具有良好的效果，且相較於其他正價脂質也較無毒性；實驗結果比較 NLS-ST 輔以磁力作用，效果的確比先前研究結合 TAT-PAST 與 NLS-ST 兩者顯著。針對以上優點，輔以磁力作用的概念，對於 ODN 的遞送，甚至未來應用於 siRNA 的遞送是有所裨益的。

大部分非病毒型載體遞送系統是經由細胞進行胞吞作用後，將大分子物質送到膜狀的囊泡中進行運送，例如：利用修飾過的幾丁質聚醣所形成的奈米顆粒來遞送細胞，以穿透性電子顯微鏡中可觀察粒子位於溶體中 (Nam et al., 2009)。先前研究已知以 GEC-Chol/Chol 遞送量子點的效果能在 4°C 處理下被抑制，而在本篇研究也觀察到遞送氧化鐵亦有相同的抑制作用，顯示奈米粒子是經由細胞內吞作用進入。為了瞭解此法遞送 ODN 後在胞內的位置，初步結果顯示將粒子處理 MDCK 細胞後 8 小時，溶體指示劑 (lysotraker Red) 訊號並無與 ODN 共位在一起，而在 BMSC 方面，可以發現有少部分訊號共位在一起，另外也觀測到大部分奈米粒子會集中至細胞核周圍附近，推測 8 小時內 GEC-Chol/Chol 可能已經逃脫 endosome/ lysosome 路徑。輔以本篇研究利用磁力的策略，奈米粒子可有效地攜帶 ODN 進入細胞核中，但還需要進一步以其他胞器標誌劑確認。

## 第五章 圖表說明

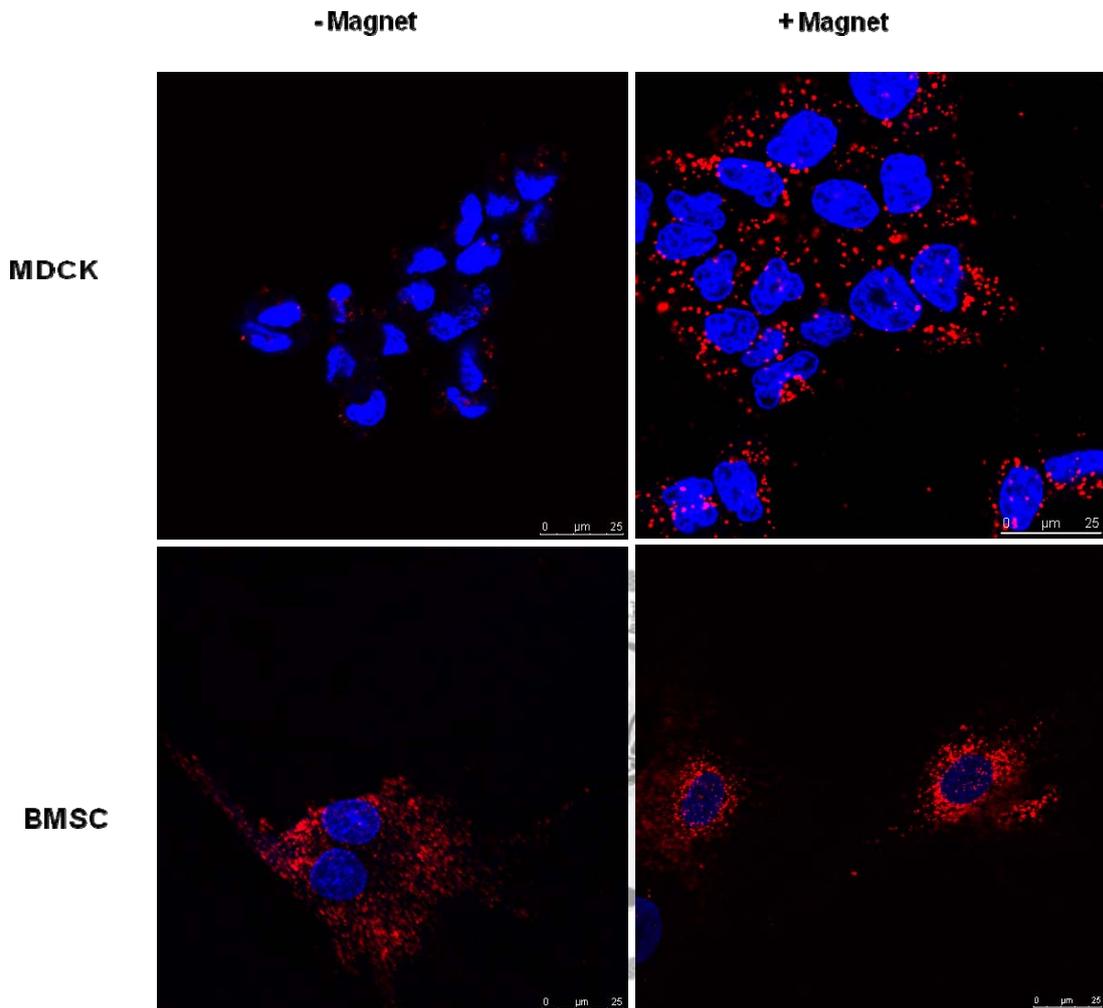
表一、脂質奈米粒子之特性分析：粒徑大小與表面電位

Lipid nanopartiles formulation	Particle size (nm)	Zeta potential (mV)
SPIO-LNP	110.3	24.6
SPIO-LNP-NLS	96.52	-0.12
SPIO-LNP-ODN	104.3	-14.8
SPIO-LNP-NLS-ODN	90.05	-18.2

LNP = GEC-Chol/Chol: DSPE-PEG (1:1:0.25) , SPIO = superparamagnetic iron oxide nanoparticles



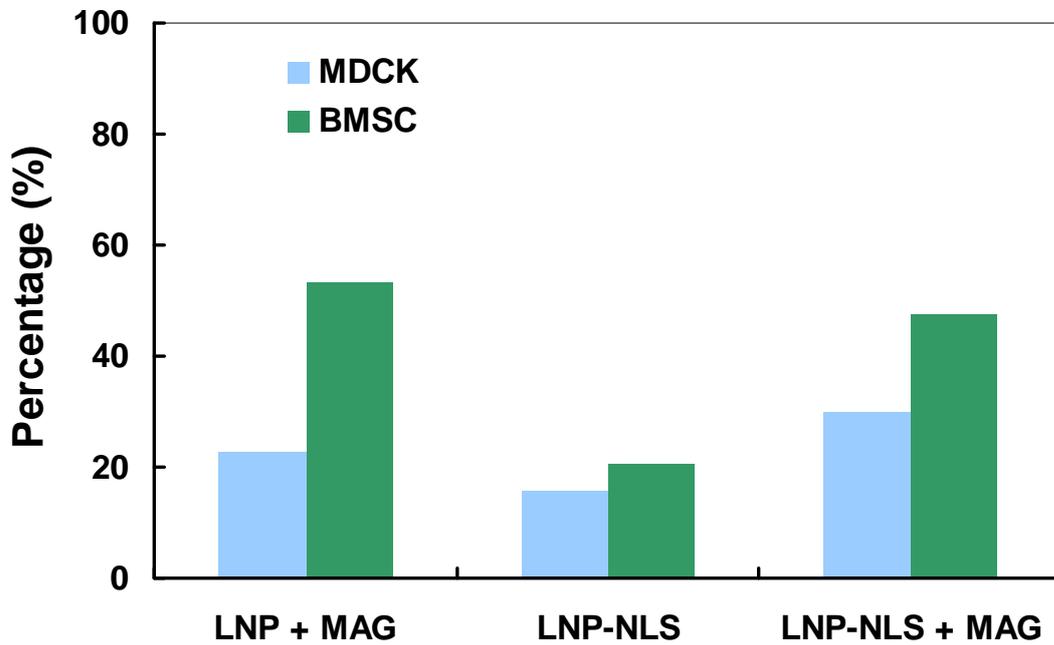
A



圖一、磁力可以加強帶有連接 NLS-ST 蛋白質之奈米磁性粒子遞送至細胞核

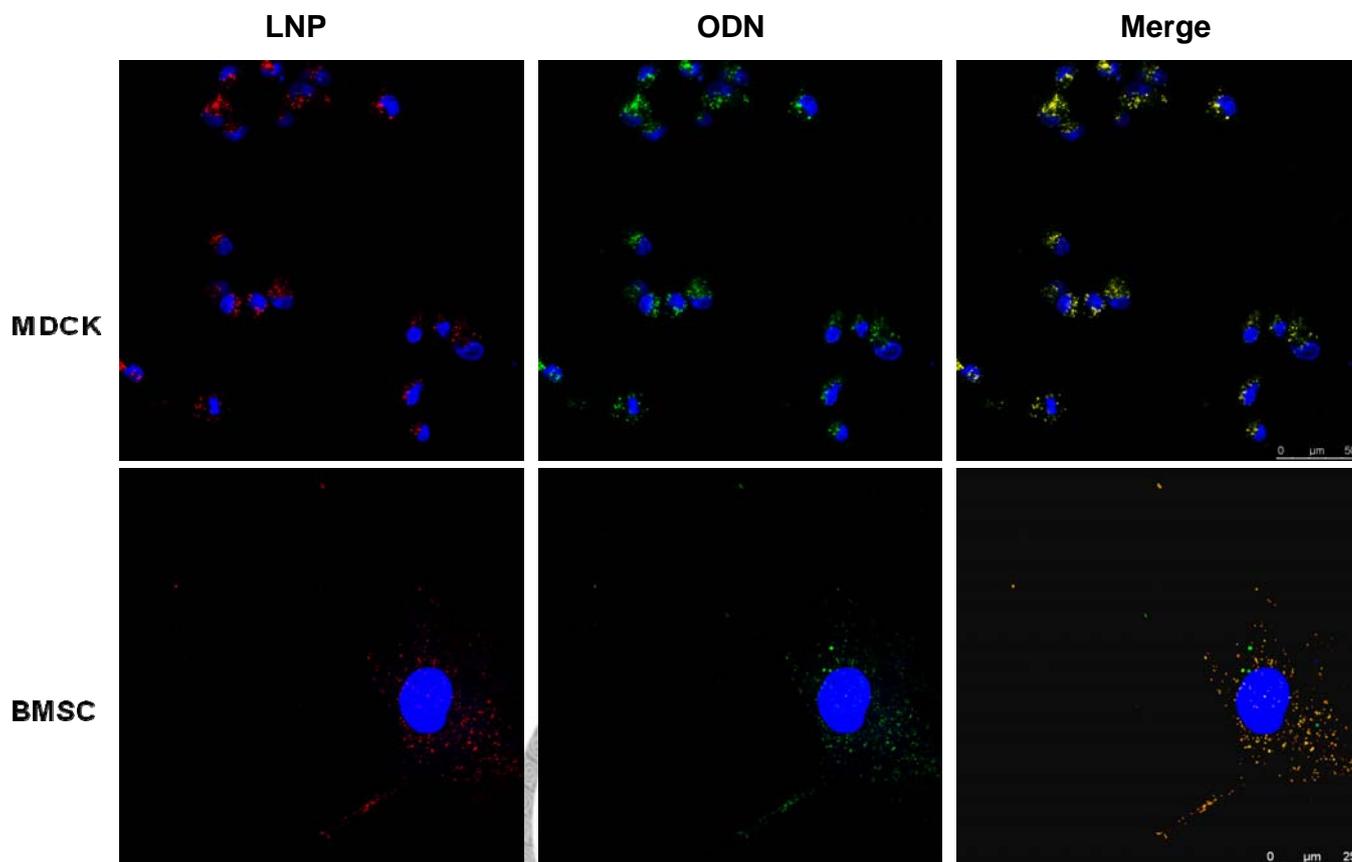
(A) LNP-NLS 之奈米粒子，以 DiI 做為奈米粒子的追蹤劑，細胞處理奈米粒子後施予磁力 2 小時並置於 37 °C、8 小時。分別比較 NLS-ST 與磁力對奈米粒子進入 MDCK 細胞(上圖) 與 BMSC (下圖)之影響。圖中 bar 的長度為 25 μm。

B



圖一、磁力可以加強帶有連接 NLS-ST 蛋白質之奈米磁性粒子遞送至細胞核

(B) LNP-NLS 之奈米粒子，以 DiI 做為奈米粒子的追蹤劑，細胞處理奈米粒子後施予磁力 2 小時並置於 37 °C、8 小時。分別比較 NLS-ST 與磁力對奈米粒子進入 MDCK 細胞 與 BMSC 之影響。以目視計數定量奈米磁性粒子遞送至細胞核之細胞群數效率分析。



圖二、活細胞共軛焦影像擷取細胞遞送寡核苷酸奈米粒子情形

將 MDCK 細胞與老鼠間質骨髓幹細胞處理 LNP-NLS-ODN，比較分別施予磁力後置於 37 °C、8 小時。蛋白質與主要脂質比例為 1 nmol 的 NLS-ST 比上 50 nmol GEC-Chol/Chol。螢光標定之 ODN 與 未標定的 ODN 以莫耳數 1:1 與 LNP-NLS 之奈米粒子形成複合物。ODN 對主要脂質之氮磷比例為 N/P = 3，即 5 nmol 的 GEC-Chol/Chol 加入 60 pmol 的 ODN，最終反應濃度為 300 pmol/ml 的 ODN 於 24 孔盤中。圖中 bar 的長度為 25 μm 與 50 μm。

## 第六章 參考文獻

Alexander G. Tkachenko, Huan Xie, Yanli Liu, Donna Coleman, Joseph Ryan, Wilhelm R. Glomm, Mathew K. Shipton, Stefan Franzen, and Daniel L. Feldheim (2004) Cellular Trajectories of Peptide-Modified Gold Particle Complexes: Comparison of Nuclear Localization Signals and Peptide Transduction Domains. *Bioconjug. Chem.*, **15**, 482-490.

Berry, C.C., de la Fuente, J.M., Mullin, M., Chu, S.W.L. and Curtis, A.S.G (2007) Nuclear localization of HIV-1 tat functionalized gold nanoparticles. *IEEE Trans. Nanobioscience*, **6**, 262-9.

Cartiera, M.S., Johnson, K.M., Rajendran V., Caplan, M.J. and Saltzman, W.M. (2009) The uptake and intracellular fate of PLGA nanoparticles in epithelial cells. *Biomaterials*, **30**, 2790-2798.

De la Fuente, J.M. and Berry, C.C. (2005) Tat peptide as an efficient molecule to translocate gold nanoparticles into the cell nucleus. *Bioconjug. Chem.*, **16**, 1176-80.

Maysinger D. (2007) Nanoparticles and cells: good companions and doomed partnerships. *Org. Biomol. Chem.*, **5**, 2335–2342.

Edwige Gros, Sebastien Deshayes, May C. Morris, Gudrun Aldrian-Herrada, Julien Depollier, Frederic Heitz and Gilles Divita. (2006) A non-covalent peptide-based strategy for protein and peptide nucleic acid transduction. *Biochimica. et Biophysica. Acta.*, **1758**, 384–393.

Funnell, W.R. and Maysinger D. (2006) Three-dimensional reconstruction of cell nuclei, internalized quantum dots and sites of lipid peroxidation. *J. Nanobiotech.*, **20**, 4-10.

Garden, O.A., Reynolds, P.R., Yates J., Larkman, D.J., Marelli-Berg, F.M., Haskard, D.O., Edwards, A.D. and George, A.J. (2006) A rapid method for labelling CD4+ T cells with ultrasmall paramagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging that preserves proliferative, regulatory and migratory behaviour in vitro. *J. Immunol. Methods*, **31**, 123-33.

Ho, Y.P., Chen, H.H., Leong, K.W. and Wang, T.H. (2006) Evaluating the intracellular stability and unpacking of DNA nanocomplexes by quantum dots-FRET. *J. Control. Rel.*, **116**, 83-89.

Jae-Hyun Lee, Kyuri Lee, Seung Ho Moon, Yuhan Lee, Tae Gwan Park and Jinwoo Cheon. (2009) All-in-One Target-Cell-Specific Magnetic Nanoparticles for Simultaneous Molecular Imaging and siRNA Delivery. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 4174–4179.

James, J. Lu, Robert Langer, and Jianzhu Chen. (2009) A Novel Mechanism Is Involved in Cationic Lipid-Mediated Functional siRNA Delivery. *Mol. Pharm.*, **6**, 763-771.

Jui-Chih Chang, Hong-Lin Su and Shan-hui Hsu. (2008) The use of peptide-delivery to protect human adipose-derived adult stem cells from damage caused by the internalization of quantum dots. *Biomaterials*, **29**, 925–936.

Liu L., Guo K., Lu J., Venkatraman, S.S., Luo D., Ng, K.C., Ling, E.A., Moochhala S. and Yang, Y.Y. (2008) Biologically active core/shell nanoparticles self-assembled from cholesterol-terminated PEG-TAT for drug delivery across the blood-brain barrier. *Biomaterials*, **29**, 1509-17.

Liu X., Wang Y., Nakamura K., Kubo A. and Hnatowich, D.J. (2008) Cell studies of a three-component antisense MORF/tat/Herceptin nanoparticle designed for tumor delivery. *Cancer Gene Ther.*, **15**, 26-32.

Li, S.D. and Huang L. (2008) Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Mol. Pharm.*, **5**, 496-504.

Maysinger D., Lovrić J., Eisenberg A. and Savić R. (2007) Fate of micelles and quantum dots in cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **65**, 270-281.

Mikhaylova M., Stasinopoulos I., Kato Y., Artemov D. and Bhujwala, Z.M. (2009) Imaging of cationic multifunctional liposome-mediated delivery of COX-2 siRNA. *Cancer Gene Ther.*, **16**, 217–226.

Nam, H.Y., Kwon, S.M., Chung H., Lee, S.Y., Kwon, S.H., Jeon H., Kim Y., Park, J.H., Kim J., Her S., Oh, Y.K., Kwon, I.C., Kim K. and Jeong, S.Y. (2009) Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles. *J. Controlled Release*, **135**, 259-67.

Ruan G., Agrawal A., Marcus, A.I. and Nie S. (2007) Imaging and tracking of tat peptide-conjugated quantum dots in living cells: new insights into nanoparticle uptake, intracellular transport, and vesicle shedding. *J. Am. Chem. Soc.*, **28**, 14759-14766.

Ryan, J.A., Overton, K.W., Speight, M.E., Oldenburg, C.N., Loo L., Robarge W., Franzen S. and Feldheim, D.L. (2007) Cellular uptake of gold nanoparticles passivated with BSA-SV40 large T antigen conjugates. *Anal. Chem.*, **79**, 9150-9159.

Shu-Chen Hsieha, Fung-Fang Wangb, Ching-Shih Lina, Yu-Ju Chena, Shih-Chieh Hungc and Yng-Jiin Wangd. (2006) The inhibition of osteogenesis with human bone marrow mesenchymal stem cells by CdSe/ZnS quantum dot labels. *Biomaterials*, **27**, 1656–1664.

Tkachenko, A.G., Xie H., Liu Y., Coleman D., Ryan J., Glomm, W.R., Shipton, M.K., Franzen S. and Feldheim, D.L. (2004) Cellular trajectories of peptide-modified gold particle complexes: comparison of nuclear localization signals and peptide transduction domains. *Bioconjug. Chem.*, **15**, 482-90.

Vives E., Richard, J.P., Rispal C. and Lebleu B. (2003) TAT peptide internalization: seeking the mechanism of entry. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **4**, 125–132.

Wadia, J.S., Stan, R.V. and Dowdy, S.F. (2004) Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat. Med.*, **10**, 310–315.

Yanli Liu and Stefan Franzen. (2008) Factors Determining the Efficacy of Nuclear Delivery of Antisense Oligonucleotides by Gold Nanoparticles. *Bioconjugate Chem.*, **19**, 1009–1016.

Ziegler A., Nervi P., Dürrenberger M. and Seelig J. (2005) The cationic cell-penetrating peptide CPP(TAT) derived from the HIV-1 protein TAT is rapidly transported into living fibroblasts: optical, biophysical, and metabolic evidence. *Biochemistry*, **44**, 138-48.

劉逸祥. (2008) 結合 Tat 和 NLS 胜肽於磁性奈米粒子表面對細胞分佈之研究. 國立台灣大學醫學院生物化學暨分子生物學研究所碩士論文.