



國立臺灣大學理學院應用物理研究所

碩士論文

Graduate Institute of Applied Physics

College of Science

National Taiwan University

Master Thesis

具表面修飾之磁性奈米粒子其交流磁場效應對乳癌細胞生長

影響

Effect of Alternating Magnetic Field for the Surface-Modified
Magnetic Nanoparticles on the Growth of Breast Cancer Cells

吳人翔

Jen-Hsiang Wu

指導教授：傅昭銘 博士

Advisor : Chao-Ming Fu, Ph.D.

中華民國 112 年 8 月

August 2023

口試委員會審定書



國立臺灣大學碩士學位論文 口試委員會審定書 MASTER'S THESIS ACCEPTANCE CERTIFICATE NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY

具表面修飾之磁性奈米粒子其交流磁場效應對乳癌細胞生長影響

Effect of Alternating Magnetic Field for the Surface-Modified Magnetic

Nanoparticles on the Growth of Breast Cancer Cells

本論文係吳人翔 (姓名) R08245020 (學號) 在國立臺灣大學
應用物理研究所 (系/所/學位學程) 完成之碩士學位論文，於
民國 112 年 7 月 30 日承下列考試委員審查通過及口試及格，
特此證明。

The undersigned, appointed by the Department / Institute of Applied Physics _____
on 30, July (month) 112 (year) have examined a Master's thesis entitled above presented
by Jen Hsiang, Wu (name) R08245020 (student ID) candidate and hereby
certify that it is worthy of acceptance.

口試委員 Oral examination committee:

傅昭銘 陳政維 沈嘉年
(指導教授 Advisor)

系主任/所長 Director:

張寶棟

致謝



長得越大，時間似乎就過得越快，剛進入台大時那一切陌生的景象彷彿還在眼前。現在也到了離別的時刻，準備離開這令人感到五味雜陳的地方。當初錄取時那激動的心情，經歷了風風雨雨後，也逐漸淡去。

能成功抵達終點，靠的是一路上許多人的幫助及支持。首先一定要感謝我的家人，爸爸、媽媽及哥哥，無論是遇到什麼困難，始終是我最強大的後盾。感謝指導教授傅昭銘老師的指導與幫助，在這一年間，總能感受到傅老師的溫暖。感謝沈湯龍老師出借實驗室及對生物領域的指導。感謝陳政維老師在口試時的指教。感謝實驗室的好同學們，林宏益、何俊廷、葛文昕、呂英樟、陳家偉及張良肇，有各位一起努力我才能完成這篇論文。感謝台灣大學生命科學院的科技共同空間 Techcomm 提供 TEM。感謝好友王伸吉，教導生物相關知識。感謝賴品瑄在課業上的幫助。

在台北這幾年，也要感謝朋友們的陪伴。感謝好友楊尚恩，總是對我有信心，相信我一定能成功。感謝好友田祐任，在調侃我的同時也不斷地給予幫助及建議。感謝律師高啟航提供法律協助。還有其他沒什麼貢獻的朋友，李伯仁、陳仕維、周柏穎、曾昱盛、溫貿丞、許庭瑋、陳孟灼、蔡政融、曾昕、王柏喻、陳芊瑾、陳品安、馬德儒、張毓庭、劉柏彥、李若寧、陳乃綺、陳冠融、王琮仁、賴瑞賢、林子平、陳冠霖、李政毅、毛衍鈞、李紹偉、陳俐螢、林昱辰。

摘要



熱療法已被廣泛應用於腫瘤及癌症的臨床治療。在熱療法中，磁性奈米顆粒（簡稱 MNP）被成功地運用；這種方法的基本原理是將 MNP 注射到患部，然後利用交流磁場來引發熱灸效應。當 MNP 被注射到患處後，癌細胞會吞噬這些顆粒。在施加交流磁場的情況下，MNP 在癌細胞內部受到磁場影響，產生轉動及熱效應，造成細胞結構的損傷及凋亡。

胞外體(Exosome)在癌症研究中扮演著關鍵角色。它們會在癌細胞之前先轉移到目的地，並釋放功能性蛋白來調整微環境。當環境適宜時，癌細胞接著轉移。利用這一特性，將 MNP 接上胞外體的表面，使其成為可被交流磁場處理的目標。本研究旨在探討 MNP 及其在交流磁場作用下對三陰性乳腺癌細胞系 MDA-MB-4175 的影響。此外，我們也研究了使用牛血清白蛋白(BSA)修飾 MNP 的過程，以優化其與胞外體的結合。

實驗主要分為乳癌細胞的生存狀態與表面修飾兩大部分。在乳癌細胞的部分，分別評估了癌細胞與作為正常細胞參照的 NIH 3T3 細胞，在多種 MNP 濃度和不同交流磁場持續時間下的存活情況。此外，透過特定的實驗設計，進一步探索了環境和細胞內 MNP 的具體影響。在表面修飾的部分，將 MNP 與 BSA 混合，並於不同的反應時間點測量 BSA 的濃度，以了解其在 MNP 上的結合比率。最後，利用 Rabbit IgG 作為接合橋樑，並在其上連接螢光抗體，再以顯微鏡進行觀察。

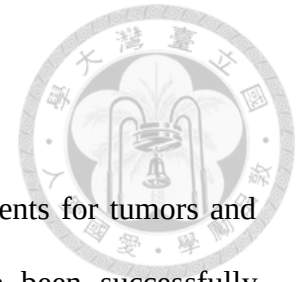
實驗結果表明，當細胞與 MNP 共同培養後，細胞會吞噬 MNP。隨著 MNP 濃度的增加，3T3 細胞和 MDA-MB-4175 細胞的存活率都會逐步下降，但在交流磁場作用下的 0 至 60 分鐘內並無明顯變化。然而，當被細胞吞噬的 MNP 受到交流



磁場的影響時，其在細胞內的旋轉和熱效應會進一步降低存活率，大約下降了20%。當 MNP 被 PEG-400 包裹後，其對細胞的毒性得以降低，使存活率提高約13%。至於 MNP 的表面修飾，研究發現在 37°C、0.1M 的 EDC 條件下，反應時間為 50 分鐘時，MNP 能成功地與 BSA 結合，其比例是每毫克 MNP 能結合 0.3 毫克的 BSA。免疫螢光影像也證實了這一成功的結合過程。

關鍵字： 磁性奈米粒子、乳腺癌、交流磁場、胞外體、表面修飾、聚乙二醇

Abstract



Thermal therapy has been widely applied to clinical treatments for tumors and cancers. In hyperthermia, Magnetic Nanoparticles (MNPs) have been successfully utilized; the fundamental principle of this method is the injection of MNPs into the afflicted area, followed by the application of an alternating magnetic field to induce a hyperthermic effect. After MNPs are injected into the affected area, cancer cells engulf these particles. When subjected to an alternating magnetic field, MNPs within the cancer cells respond to the magnetic influence, generating rotational and thermal effects, leading to cellular structural damage and apoptosis.

Exosomes play a pivotal role in cancer research. They migrate to target locations before cancer cells and release functional proteins to modify the microenvironment. Once the environment is conducive, cancer cells follow suit. Exploiting this characteristic, MNPs are attached to the surface of exosomes, turning them into targets for alternating magnetic field treatment. This research aims to investigate the impact of MNPs and their effects on the triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-4175 under an alternating magnetic field. Additionally, we studied the process of modifying MNPs using Bovine Serum Albumin (BSA) to optimize their binding with exosomes.

The experiments are divided into the survival state of breast cancer cells and surface modification. In the breast cancer cell segment, we evaluated the survival of cancer cells and NIH 3T3 cells, which served as a model for normal cells, under various MNP concentrations and alternating magnetic field durations. Furthermore, through specific experimental designs, we delved deeper into the precise impacts of the environment and intracellular MNPs. In the surface modification segment, we mixed

MNPs with BSA and measured the concentration of BSA at different reaction time points to understand its binding ratio on MNPs. Finally, we used Rabbit IgG as a binding bridge and attached fluorescent antibodies to it, followed by microscopic observation.

The results indicate that cells engulf MNPs after co-culturing. As the concentration of MNPs increases, the survival rates of both 3T3 cells and MDA-MB-4175 cells progressively decline, but no noticeable changes are observed within 0 to 60 minutes under the alternating magnetic field. However, when the MNPs ingested by cells are influenced by the alternating magnetic field, their intracellular rotation and thermal effects further reduce the survival rate, decreasing by approximately 20%. When MNPs are encapsulated with PEG-400, their cytotoxicity is diminished, leading to an increase in survival rate by about 13%. Regarding MNP surface modification, we discovered that at 37°C with 0.1M EDC conditions, with a reaction time of 50 minutes, MNPs successfully bind with BSA at a ratio of 0.3 mg BSA per mg of MNP. Immunofluorescence images also confirmed this successful binding process.

Keyword: magnetic nanoparticle 、 breast cancer 、 alternating magnetic field 、
exosome 、 surface modification 、 Polyethylene Glycol

目錄



口試委員會審定書	i
致謝	ii
摘要	iii
Abstract	v
目錄	vii
圖目錄	ix
第一章 緒論與文獻回顧	1
1.1 磁性材料理論探討及應用	2
1.1.1 磁性物質基本特性	2
1.1.2 磁性物質的分類	3
1.1.3 磁異向性	6
1.1.4 鐵氧體的磁疇與磁滯現象	6
1.1.5 鐵氧體的電磁動力行為	8
1.1.6 磁性奈米粒子之生醫應用	13
1.2 乳癌簡介	17
1.3 熱灸療法	24
1.4 研究目的	26
1.5 論文架構	27
第二章 實驗材料與方法	28
2.1 磁性奈米粒子之製備	28
2.1.1 製備磁性奈米粒子之藥品	28
2.1.2 製備磁性奈米粒子之設備	29
2.1.3 磁性奈米粒子製備步驟	29
2.2 細胞株與細胞培養液	30
2.3 細胞株培養	31
2.4 磁性奈米粒子與交流磁場用於細胞之處理	33
2.5 CCK-8 試驗測定細胞存活率	34

2.6 磁性奈米粒子以白蛋白進行表面修飾.....	34
2.7 蛋白含量之測量.....	35
2.8 磁粒子之免疫螢光.....	35
2.9 數據處理.....	36
第三章 實驗結果.....	37
3.1 磁性奈米粒子之交流磁場處理對乳癌細胞生長狀態之影響.....	37
3.1.1 MNP 及交流磁場對 MDA-MB-4175 細胞存活率影響	37
3.1.2 MNP 之交流磁場處理對 MDA-MB-4175 細胞存活率影響	41
3.1.3 PEG 包覆的 MNP 對 MDA-MB-4175 細胞存活率影響	44
3.2 磁性奈米粒子之表面修飾.....	47
第四章 結論與未來展望.....	51
4.1 磁性奈米粒子之交流磁場處理對乳癌細胞生長狀態之影響.....	51
4.2 磁性奈米粒子之表面修飾.....	53
4.3 未來研究方向建議.....	54
參考文獻.....	56

圖目錄



圖 1.1 多磁疇磁化過程.....	7
圖 1.2 磁滯曲線.....	8
圖 1.3 磁導率與頻率的關係.....	10
圖 1.4 磁性奈米粒子結合胞外體示意圖.....	26
圖 2.1 製備磁性奈米粒子之設備.....	29
圖 2.2 倒立式電子顯微鏡	32
圖 2.3 水浴槽.....	32
圖 2.4 離心機.....	32
圖 2.5 細胞培養箱.....	32
圖 2.6 交流磁場產生器.....	33
圖 3.1 MDA-MB-4175 細胞吞噬 MNP 前後比較圖.....	38
圖 3.2 MDA-MB-4175 細胞吞噬 MNP 後以磁鐵吸引	38
圖 3.3 FBS 濃度與吞噬 MNP 細胞比例之關係.....	39
圖 3.4 不同濃度 MNP 對 MDA-MB-4175 及 3T3 細胞存活率之影響	40
圖 3.5 不同時間的交流磁場對 MDA-MB-4175 存活率之影響.....	41
圖 3.6 MNP 以不同的交流磁場時間對 MDA-MB-4175 存活率之影響.....	42
圖 3.7 細胞加入 MNP 後施加交流磁場之溫度變化.....	43
圖 3.8 CCK-8 測定細胞存活率.....	44
圖 3.9 包覆 PEG 的 MNP 對 MDA-MB-4175 存活率之影響.....	45

圖 3.10 包覆 PEG 的 MNP 之交流磁場處理對細胞存活率影響.....	46
圖 3.11 CCK-8 測定細胞存活率.....	47
圖 3.12 MNP 表面修飾實驗示意圖.....	48
圖 3.13 反應時間對 BSA 修飾 MNP 比例之影響(質量比).....	48
圖 3.14 反應時間對 BSA 修飾 MNP 比例之影響(莫耳數比).....	49
圖 3.15 MNP 表面修飾抗體之免疫螢光影像.....	50



第一章 緒論與文獻回顧



奈米科技的快速進展為癌症治療開啟了新的篇章。其中，磁性奈米粒子 (Magnetic Nanoparticle, MNP) 在癌症治療中的角色備受矚目。透過表面修飾技術，這些奈米粒子能實現對癌細胞的精確輸送。再加上外部磁場的刺激，它們能產生熱效應及運動，達到熱灸消融或誘導細胞凋亡的效果，這也被稱為磁性熱療法。

不僅如此，磁性奈米粒子還有可能與癌症胞外體相結合。胞外體為癌細胞釋放的外部囊泡，扮演著調控腫瘤生長與轉移的角色。通過與胞外體結合，可利用其在體內的遷移特性，使磁性奈米粒子能夠到達並治療其他部位。

本研究首先著重於磁性奈米粒子在交流磁場中對癌症治療的應用。評估交流磁場如何影響癌細胞的生長，以及磁性奈米粒子的表面修飾技術如何影響其治療效果。接著，將深入研究奈米粒子與胞外體在癌症治療中的結合潛力及其帶來的潛在優勢。透過這項研究，期望能為癌症治療帶來新的策略和方法。

在本章節中，首先回顧磁性材料的理論基礎和其在醫學上的應用潛力，再深入探討乳癌與熱灸治療的相關知識。最終，介紹本研究的目標及其重要性。希望透過這些理論和實證研究，為磁性奈米粒子在乳癌治療上提供堅實的實驗基礎，並揭示其與胞外體結合的未來發展方向。



1.1 磁性材料理論探討及應用

1.1.1 磁性物質基本特性

物質的磁性來自於原子內的磁偶極矩(Magnetic Dipole Moment)，而各種物質內磁偶極矩的不同排列方式便產生了不同的巨觀磁現象。原子的磁矩來自於以下三個現象：

電子軌道(orbit)磁矩：由帶負電的電子繞行原子軌道產生

$$\mu_{orbit} = \frac{ehn}{4\pi mc}$$

電子自旋(spin)磁矩：由電子自轉產生

$$\mu_{spin} = \frac{eh}{4\pi mc}$$

n ：軌道量子數(Orbital Quantum Number)

e ：基本電荷(Elementary Charge, 1.602×10^{-19} C)

m ：電子質量(Electronic Mass, 9.11×10^{-31} kg)

c ：光速(Speed of Light, 3×10^8 m/s)

h ：普朗克常數(Plank Constant, 6.626×10^{-34} m² kg/s)

原子核(Nuclear)磁矩：原子核自旋產生，相較於軌道磁矩和自旋矩而言較弱，因此時常忽略不計。

原子的總磁矩可以表示為 $\mu_{\text{total}} = \mu_{\text{orbit}} + \mu_{\text{spin}} + \mu_{\text{nuclear}} \approx \mu_{\text{orbit}} + \mu_{\text{spin}}$

物質的磁化程度以磁化強度 M (Magnetization)來描述，磁化強度的定義為單位體積中的磁偶極矩總和。

$$\bar{M} = \lim_{\Delta V \rightarrow 0} \sum \frac{\sum_I \bar{\mu}_i}{\Delta V}$$

$\sum_I \bar{\mu}_i$ 為單位體積中的磁偶極矩之向量和。

而物質的整體磁化強度的來源除了上述的軌道磁矩(Orbital)、自旋磁矩(Spin)和原子核磁矩(Nuclear)外，還受到不同磁矩和晶格場(Lattices Field)相互耦合(Coupling)的影響，其中包含自旋-自旋耦合(Spin-Spin Coupling)、自旋-軌道耦合(Spin-Orbit Coupling)、自旋-晶格耦合(Spin Lattice Coupling)和軌道-晶格耦合(Orbit Lattice Coupling)[1]。

1.1.2 磁性物質的分類

當物質受到外加磁場 H 時，他的磁化強度為 M ，兩者之間的關係式

$$M = \chi H$$

χ 是物質的磁化率(Magnetic Susceptibility)，顯示出物質磁化的難易程度。各類物質依照磁化率的大小可以分為順磁性(Paramagnetism)、反磁性(Diamagnetism)、

鐵磁性 (Ferromagnetism) 、反鐵磁性 (anti-Ferromagnetism) 和陶鐵磁性 (Ferrimagnetism)[2]。



1.順磁性

順磁性物質置於外加磁場 H 下，其磁化方向與 H 相同。磁化率約在 $10^{-3} \sim 10^{-6}$ 之間。順磁性物質的原子或分子內存在著不成對的電子，因此原子或分子的淨磁矩不為零，但是因為磁矩隨機的排列方向而抵銷，使得巨觀上的不具有磁性。在外加磁場的影響下，磁矩順著外加磁場的方向排列而產生磁化強度。當溫度上升時，磁矩受熱擾動而混亂，因此磁化率與溫度有關。部分的順磁性物質遵守居禮定律(Curie Law)：

$$\chi = \frac{C}{T}$$

另一部分則遵守居禮-外斯定律(Curie-Weiss Law):

$$\chi = \frac{C}{T - T_c}$$

其中 C 為居禮常數， T_c 是臨界溫度，又稱為居禮溫度。當系統溫度低於該溫度時，順磁性物質內的磁矩會規則的排列並表現出鐵磁性。

2.反磁性

反磁性磁化率 χ 約為 10^{-5} ，反磁性物質中每一個電子軌道中的電子都是成對的，且自旋方向相反，因此它們的軌道磁矩會互相抵銷。使得淨磁矩為零，也不

具有磁性。當置於外加磁場時，運動中的電子根據冷次定律(Lenz Law)會產生反向的磁場，因此所有物質都具有反磁性，然而反磁性的強度通常很小，在其他磁性材料中常常忽略不計。由於感應磁矩的方向與熱擾動無關，因此反磁磁化率與溫度無關。

3.鐵磁性

鐵磁性物質的磁化率 χ 約在 $10^3 \sim 10^6$ 之間，系統內的原子之間有交互作用使得相鄰磁矩會同向的排列而產生自發磁化量(Spontaneous Magnetization)。鐵磁性材料具有高磁導率，受到外加磁場後會產生非線性的磁化現象，且在外加磁場消退後仍保留永久的淨磁矩，此為磁滯現象(Hysteresis)。當溫度逐漸上升時，所產生的熱擾動將同向排列的磁矩打亂，使得磁化強度降低，超過居禮溫度時則轉變為順磁性。

4.反鐵磁性

反鐵磁物質的磁化率 χ 大約在 $10^{-3} \sim 10^{-6}$ 之間。反鐵磁物質間相鄰的磁矩會自發性的反向排列，當溫度超過臨界溫度時磁矩則因熱擾動而變的無序並轉變為順磁性，此臨界溫度稱為尼爾溫度(Neel Temperature)。

5.陶鐵磁性

又稱為亞鐵磁性，磁化率 χ 約在 $10^0 \sim 10^3$ 之間。亞鐵磁性物質在宏觀上類似鐵磁性，同樣有飽和磁化強度及磁滯現象，在微觀上則類似反鐵磁，內部具有反向

排列的磁矩，因為次晶格的大小不同使得相鄰的磁矩無法互相抵消，使得淨磁矩不為 0。當系統溫度高於臨界溫度時將表現出順磁性。



1.1.3 磁異向性

磁異向性(Magnetic Anisotropy)是指磁性物質在不同方向的磁化難易度。而磁矩在沿著某方向排列時所含的能量則稱為磁異向能(Magnetic Anisotropic Energy)，單位體積的磁異向能稱為磁異向能密度(Magnetic Anisotropic Energy Density)或磁異向常數(Magnetic Anisotropic Constant)。

成因有以下幾項，磁晶異向性、形狀異向性、應力異向性和誘導異向性。在有晶格的材料中，磁矩會受到晶格的影響而較容易朝著某些方向排列，此現象即為磁晶異向性；當材料的形狀為非球體，形狀也會影響材料的磁化，此特性即為形狀異向性。其中，只有磁晶異向性是物質本身的特性，其餘皆為外在條件影響所致[3]。

1.1.4 鐵氧體的磁疇與磁滯現象

在鐵氧體中，相鄰的原子存在著交互作用，使得區域中的磁矩自發地朝同方向排列，這種內含同向排列磁矩的區域便稱為磁疇(Magnetic Domain)，相鄰磁疇的交界面則稱為磁疇壁(Magnetic Domain Wall)。

當沒有外加磁場時，鐵氧體中的各個磁疇之磁矩的向量和為零，磁性互相抵銷而使得整體不表現出磁性。當外加磁場逐漸增加時，磁矩逐漸轉向，某些磁疇範圍增大，另一些則縮小，最終所有磁矩朝著外加磁場的方向排列並形成單磁疇的狀態。

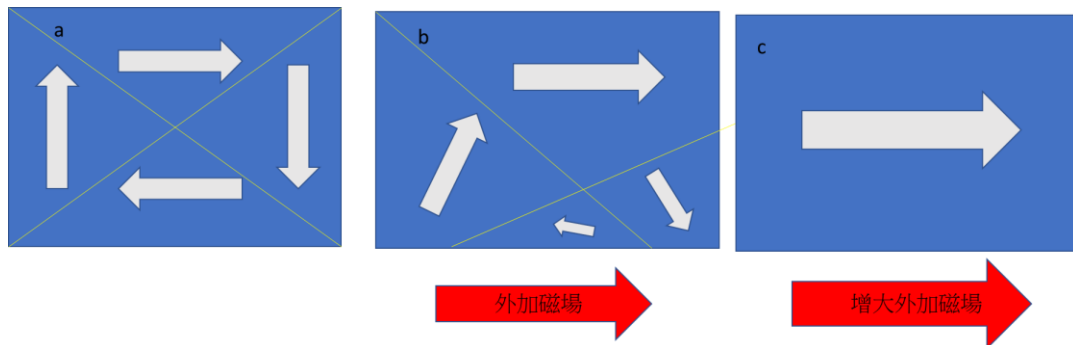


圖 1.1 多磁疇磁化過程

在所有磁矩都轉向磁場方向時，即使再增大外加磁場磁化量也不再增加，便達到材料的飽和磁化量 M_s (Saturation Magnetization)。外加磁場減弱時，一般物質中的磁矩會以最低能量方式排列達到穩定，因此磁化量會消失，但是在鐵磁材料中即使外加磁場為零，材料內部仍會存在未轉回的磁矩，這些磁矩表現出來的磁性稱為殘餘磁化量 M_r (Residual Magnetization)，此現象即為磁滯現象(Hysteresis)。若要完全消除殘餘磁化量，則需要施加反向的磁場，而使得磁化量歸零的磁場稱為矯頑磁力 H_c (Coercivity)。將外加磁場對磁化量作圖後得到的封閉曲線稱為磁滯曲線(Hysteresis Curve)[4]。

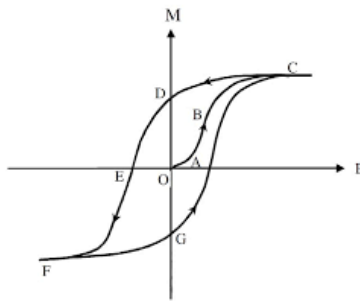


圖 1.2 磁滯曲線

1.1.5 鐵氧體的電磁動力行為

鐵氧體受到交流磁場影響的過程中存在的磁滯效應、渦電流損耗、磁頻散、磁後效應、磁璇共振、疇壁共振等現象。鐵磁性物質具有磁滯的現象，因此在交流磁場下磁矩的變化會落後於磁場，產生相位差，此現象稱為磁滯效應。在受到穩定磁場作用的磁化過程中，磁疇壁和磁矩方向都是以有限的速率進行，磁場方向突然改變時，磁化強度及方向在磁場穩定後還需要一段時間才能達到穩定，此稱為鬆弛過程。直流的穩定磁場下的鬆弛過程稱為磁後效應。在交流磁場下進行磁化時，磁化率 χ 為磁場大小和頻率的函數，此現象為磁頻散現象。

鐵磁性物質受到固定磁場 $\vec{H}$ 的作用，磁化強度 $\vec{M}$ 隨之改變。兩者的關係：

$$M = M_0 \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right) = \chi H (1 - e^{-t/\tau})$$

其中 M_0 為穩定狀態時磁化強度， τ 為等效鬆弛時間。

若受到週期性變化的交流磁場($\vec{H} = \vec{H}_0 e^{i\omega t}$)，由於磁滯、磁後、磁頻散等效應影響，磁通密度 $\vec{B}(t)$ 會落後交流磁場 $\vec{H}(t)$ 一個相位角 δ ，於是可以將磁通密度 $\vec{B}(t)$ 表示成向量 $\vec{B}(t) = \vec{B}_0 e^{i\omega t}$ 並定義複數相對磁導率(Permeability):

$$\tilde{\mu} \equiv \frac{\vec{B}}{\vec{H}} = \frac{B_0}{H_0} e^{-i\delta} = \mu' - i\mu''$$

由此得到磁導率的實部與虛部為:

$$\begin{cases} \mu' = \frac{B_0}{H_0} \cos \delta \\ \mu'' = \frac{B_0}{H_0} \sin \delta \end{cases}$$

複數的相對磁化率(Magnetic Susceptibility)則為:

$$\tilde{\chi} = \chi' - i\chi''$$

其中， $\chi' = \mu' - 1$ ，代表磁化率與交流磁場同相(in-phase)之實部； $\chi'' = \mu''$ ，代表磁化率與交流磁場異相(out-of-phase)之虛部。

以笛拜(Debye)磁化率模型表示:

$$\tilde{\chi} = \frac{\chi_0}{1 + i \frac{\omega}{\omega_0}}$$

其中， ω_0 為共振角頻率(Resonant Angular Frequency)。

由於交流磁場的能量損耗與虛部 χ'' 量值成正比。因此， χ'' 是樣品於交流磁場吸收能量的表象；不同物質對交流磁場的反應會隨著內部磁舉排列方式而有所不同

同，對鐵氧體來說，可能存在渦電流損耗、磁滯損耗、鬆弛損耗及磁疇壁共振等能量損耗，在不同頻率下會有不同的損耗發生，也導致磁導率實部 μ' 和虛部 μ'' 的不同且會隨著頻率變化而改變。此特徵的頻譜稱為磁譜[5]。典型鐵氧體大致上分為 5 個波段：

1. 低頻($<10^4\text{Hz}$): μ' 和 μ'' 變化極小

2. 中頻($10^4\sim 10^6\text{Hz}$): μ' 和 μ'' 變化仍然很小，有時 μ'' 出現峰值，有時出現尺寸共振和磁力共振現象。

3. 高頻($10^6\sim 10^8\text{Hz}$): μ' 快速下降而 μ'' 快速上升，主要由於鬆弛現象或磁疇壁共振影響。

4. 超高頻($10^8\sim 10^{10}\text{Hz}$): 主要為自然共振。

5. 極高頻($>10^{10}\text{Hz}$): 主要為自然共振交換。

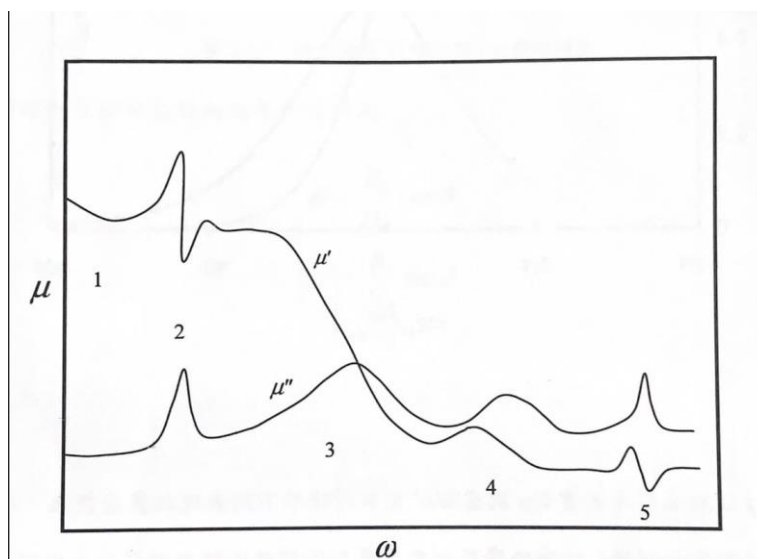


圖 1.3 磁導率與頻率的關係

鐵氧體受到交流磁場影響時的磁化過程中，存在著渦電流損耗、磁滯損耗、鬆弛損耗、磁疇壁共振及自然共振等等的能量損耗並因此產生熱能。然而當材料尺寸降低至奈米等級時，因尺寸小而形成單磁疇結構，不會產生磁疇壁共振及渦電流損耗；且本研究所使用的交流磁場頻率為 87kHz，自然共振亦不會產生。因此磁滯損耗及鬆弛損耗為其發熱機制。

1.1.5.1 磁滯損耗

當磁性材料受到磁場影響而開始磁化時，材料內部磁矩隨著外加磁場增大而有序排列，並產生磁性，最終達到飽和。在外加磁場減弱時，材料內磁矩的變化落後於外加磁場，若欲使磁化強度歸零則需施加反向磁場，此時的磁場強度稱為矯頑磁力(Coercivity)。隨著顆粒尺寸縮小，矯頑磁力會隨之增加，在某個特徵尺寸時達到最大值，隨後降低。而磁滯曲線的面積，即為整體磁矩翻轉需要的能量密度，因此產生磁滯損耗(Hysteresis Loss)，也是鐵磁材料最常見的損耗。磁滯損耗的發熱功率為[6][7]:

$$P_{\text{hysteresis}} = P_{\text{hys}} f M_s H_c$$

p_{hys} :常數因子(Constant)

f :交流磁場頻率(Frequency of Alternating Magnetic Field)

M_s :飽和磁化強度(Saturation Magnetization)

H_c :矯頑磁力(Coercivity)

1.1.5.2 鬆弛損耗

磁性物質受到外加交流磁場磁化過程中，內磁矩相位落後於外加磁場的現象稱為鬆弛(Relaxation)。鬆弛損耗分為李希特型(Richter)和約旦(Jordan)型兩種。李

希特型和溫度及頻率相關，約旦型則否。李希特型損耗是由於價電子在離子間的擴散而產生。約旦型損耗由熱變動(Thermal Flunctuation)產生，其中包含布朗運動(Brown Motion)及尼爾運動(Neel Motion)。磁性奈米粒子受到外加交流磁場動態磁化過程中約旦型為主要的發熱機制，約旦型又分為布朗運動及尼爾運動[8][9]。

(1) 布朗運動

磁性奈米粒子受到交流磁場影響時，整體粒子隨著磁矩變化而轉動稱為布朗運動。粒子旋轉時與周圍的分子摩擦生熱，因子容易受到系統溫度、黏滯係數、顆粒大小、旋轉速度及其他流體力學性質影響。布朗運動的鬆弛時間(Relaxation Time)可表示為[7]:

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{k_B T}$$

η :黏滯係數(Viscosity)

V_H :水合體積(Hydrodynamic Volume)

k_B :波茲曼常數(Boltzmann Constant)

T :絕對溫度(Absolute Temperature)

(2) 尼爾運動

磁性奈米粒子受到交流磁場影響時，粒子內磁矩隨著磁場而改變，粒子本身卻不轉動，稱為尼爾運動。在尼爾運動的過程中，粒子吸收磁能轉變為熱能，此種發熱機制不會受到外在環境影響，主要影響因素為本身的磁異向能(Magnetic Anisotropy Energy)。尼爾鬆弛時間可表示為[7]:



$$\tau_N = \frac{\tau_0}{2} \sqrt{\frac{\pi k_B T}{K V_M}} e^{\frac{K V_M}{k_B T}}$$

τ_0 : 尼爾鬆弛時間(Neel Relaxation Time)

V_M : 粒子體積(Volume)

K : 單位體積磁異向能(Anisotropy Energy per unit Volume)

k_B : 波茲曼常數(Boltzmann Constant)

T : 溫度(Temperature)

當磁性奈米粒子同時受到兩種作用影響時，應考慮兩種運動之等效鬆弛時間:

$$\tau_{\text{eff}} = \frac{\tau_N \tau_B}{\tau_N + \tau_B}$$

1.1.6 磁性奈米粒子之生醫應用

目前磁性奈米粒子已廣泛應用於癌症治療及生醫領域，其中包含磁共振造影、藥物引導、磁性分離及磁流體熱灸療法。

1. 磁共振造影

磁共振造影(Magnetic Resonance Imaging, MRI)使用強磁場和無線電波來獲取人體內部組織的高解析度影像。人體置於強磁場中時，其內部的原子核（如氫核）會產生共振現象，即原子核在外加無線電波的作用下進行能量交換。這項非侵入性的檢查技術可以顯示腦部、脊椎、關節、內臟器官等組織的詳細結構和病變。檢查過程中使用的造影劑便是由磁性奈米粒子構成，注射此顯影劑後，磁性奈米粒子會改變體內局部的磁場，進而影響橫向鬆弛時間，以達到提高對比度的效果。

在腫瘤治療的研究中，Ketao Jin 等人在 2010 年發表的論文中提到 [10]，當 MNP 注入腫瘤小鼠體內時，因為腫瘤的血管新生較一般組織更強所產生的增強滲透滯留效應(Enhanced Permeability and Retention Effect)，使 MNP 累積在腫瘤當中，進而使 MRI 進行成像。

2018 年的研究中[11]，L. Gu 等人將磁性奈米粒子以兩親性多肽(Amphiphilic Peptide)進行表面修飾並用於標定老鼠體內的幹細胞。實驗結果表明表面修飾後的磁粒子有較低的毒性且在標記的效率上有顯著提升，顯示這個新方法的可行性。

2018 年的研究中 [12]，T.Tang 等人進一步將磁性奈米粒子表面以硫酸化右旋醣酐進行修飾，用於大腦小膠質細胞炎症的 MRI 成像。結果顯示，小膠質細胞的 A 類清道夫受體會使細胞大量吸收磁粒子，在小鼠模型中較其他顯影劑有更好的效果。

2. 磁性奈米粒子藥物引導

磁性奈米粒子的藥物引導是一種利用磁性奈米顆粒作為載體，將藥物準確且靶向地傳遞至特定治療區域的新型藥物遞送技術。這種藥物引導系統的基本原理是通過表面修飾的磁性奈米粒子，使其能夠靶向特定的組織、器官或細胞。當這些磁性奈米粒子進入人體後，可以通過外部磁場的作用將其引導至目標區域。在特定位置上，磁場可以被調整，以控制奈米粒子的位置和分佈，進而實現藥物的釋放。

在 Jacob Young 等人 2018 年研究膠質母細胞瘤的論文中[14]，由於腦血屏障(Brain Blood Barrier, BBB)的存在難以向中樞神經系統提供足夠的藥物治療，研究

人員將磁鐵礦奈米粒子包裹化療藥物替莫唑胺(Temozolomide)注入受試犬隻的腫瘤當中，隨後 MRI 圖像顯示藥物準確地分布於目標區域。此研究證明了磁粒子包裹藥物在犬隻膠質母細胞瘤中的可行性。



3. 生醫磁性分離

生醫磁性分離 (Biomedical Magnetic Separation) 是一種應用磁性材料技術在生物醫學領域進行生物分離和純化的方法。這種技術利用磁性材料 (通常是磁性顆粒或磁性微珠) 與特定生物分子 (如細胞、蛋白質、核酸等) 之間的特定結合，實現對這些生物分子的選擇性捕捉和純化。

首先將磁性粒子表面進行特定的修飾，例如蛋白質、抗體、或核酸的結合物。這些修飾使磁性顆粒能夠選擇性地與目標生物分子進行結合。再將修飾後的磁性顆粒加入待處理的生物樣品中，使其與目標生物分子相互結合。最後使用外加磁場便可輕易地將目標物分離。

生醫磁性分離技術在生物醫學研究和臨床應用中有許多重要的應用。例如，在診斷中，可以使用磁性粒子來捕捉和檢測特定疾病標誌物，從而實現早期診斷。在治療中，磁性分離可以用於純化治療蛋白、細胞、或核酸，從而提高治療效果並減少副作用。

此外，生醫磁性分離技術還被廣泛應用於生化感測領域，2000 年 Y.Poon 等人使用超導量子干涉元件(Superconductor Quantum Interference Device, SQUID)測量磁性奈米粒子與目標物結合時的鬆弛狀態變化，結果發現結合後會產生明顯的

鬆弛訊號，因此確定了免疫檢測應用的可能性[15]。K.Park 等人於 2005 年的研究使用磁性奈米粒子與螢光微粒，兩者結合的濃度由待測物濃度決定，由此做生化感測[16]。



4. 磁流體熱灸療法

磁流體熱灸療法（Magnetic Fluid Hyperthermia, MFH）是一種利用磁性流體產生高頻磁場進行治療的新型熱療法。在這種治療方法中，由成分為金屬氧化物（如氧化鐵、氧化鈷等）的磁流體被注射或以磁場引導至病灶區域，然後外加交流磁場以誘發磁性流體產生熱能，達到熱灸腫瘤細胞或其他病變組織的目的。

MFH 的優勢在於它能夠在局部熱灸腫瘤的同時保護周圍正常組織不受損傷。這是由於腫瘤組織通常有較高的新陳代謝率，熱敏感性更強，而正常組織則具有更好的熱積累和散熱能力。這使得在特定磁場和磁性流體濃度下，MFH 能夠實現高度局部化的熱療效果，減少對周圍組織的副作用。

2007 年 M. Johannsen 等人以磁流體熱療進行前列腺癌的臨床研究 [17]，招募 10 名前列腺癌患者，經過主要治療康復後注射磁流體作為輔助治療，每周進行熱療 60 分鐘，前列腺最高溫達 55°C。經一年的治療後未觀察到全身毒性且生活品質僅受到短暫影響，此外還觀察到 80% 的患者前列腺特異性抗原(Prostate Specific Antigen, PSA)下降。顯示出磁流體熱療對局部復發性前列腺癌患者的可行性及良好的耐受性。



2007 年 Klaus Maier Hauff 等人進行了多型性膠質母細胞瘤的臨床研究[18]，測試磁性奈米粒子顱內熱療協同體外放射線治療的可行性。結果顯示磁性奈米粒子熱療對所有的受試者都有很好的耐受性，且僅觀察到很小的副作用甚至沒有副作用。同一組團隊在 2011 年進行的療效研究顯示[19]，磁粒子熱療協同體外放療可以小幅增加總體存活時間 7.6 個月，且由於磁粒子的穩定性高，並不會產生明顯的副作用，可與其他療法組合使用。

此外，本實驗室中先前的研究者也使用磁性奈米粒子作出許多傑出的貢獻。使用具放射性的元素鎇(Tc)來標記磁粒子，接著將其注入小鼠體內，再以 Gamma Camera 監測磁粒子分布情形。結果顯示，約 80%的磁粒子會被肝臟所捕獲。還使用磁場來控制磁粒子在老鼠體內的位置，並藉此配合交流磁場進行熱灸，治療老鼠的結腸癌，取得卓越的成果。

1.2 乳癌簡介

乳癌是台灣婦女中發生率最高的癌症，尤其在 45 至 69 歲之間的年齡層呈現高峰，每十萬名婦女中約有 188 到 194 人罹患乳癌。根據衛生福利部的死因統計和國民健康署的癌症登記資料，女性乳癌的標準化發生率為 69.1，而每十萬人口的死亡率則為 12.0。每年有超過一萬名婦女被診斷出患有乳癌，這意味著每天約有 31 位婦女被確診罹患乳癌。更令人擔憂的是，乳癌每年導致超過兩千名婦女喪生，相當於每天失去六位寶貴的生命。

乳癌起源於乳房組織中的惡性細胞。乳房組織主要由皮膚、乳腺、輸乳管、結締纖維組織、脂肪組織，而乳癌通常發生在這些組織中的細胞中。乳癌的病因尚不完全清楚，但已經證實存在一些危險因子。其中包含[20][21]：

1. 雌激素水平：女性荷爾蒙雌激素在乳癌發生中起著關鍵作用。女性荷爾蒙的長期暴露或不平衡可能增加患乳癌的風險。例如，女性早經或晚經、晚育或不育、以及在更年期後仍在使用荷爾蒙替代療法的人群有較高的乳癌風險。

2. 遺傳變異：某些遺傳變異可能增加患乳癌的風險。其中最著名的是 BRCA1 和 BRCA2 基因變異，這些變異與乳癌和卵巢癌的風險明顯增加有關。然而，遺傳變異僅佔所有乳癌病例的一小部分。

3. 個人和家族史：有乳癌家族史的人群比一般人更容易患乳癌。如果一個人有一個一級親屬（如母親、姐妹）或多個二級親屬（如祖母、姑姑）患有乳癌，他們的乳癌風險可能會增加。

4. 年齡：乳癌的風險隨著年齡的增加而增加。大多數乳癌發生在 50 歲以上的女性身上。

5. 生活方式和環境因素：一些生活方式和環境因素也可能與乳癌風險有關，包括肥胖、缺乏體育鍛煉、飲食習慣（高脂肪飲食、酒精攝入過多）、暴露於放射線、乳房組織密度高等。

需要強調的是，這些因素僅是與乳癌風險有關的一些常見因素，並不意味著患有這些因素的人就一定會得乳癌。乳癌的發生是一個複雜的過程，受到多種因素的交互作用。



乳癌細胞依照所具有的類固醇激素受體(Steroid Hormone Receptor)的種類進行劃分，其中包含，雌激素受體(Estrogen Receptor, ER)、孕酮受體(Progesterone Receptor, PgR)及人類表皮生長因子受體 2(Human Epidermal Receptor 2, HER2)。依據這三個受體的存在與否可以將乳癌細胞大致分為三類，管狀型(Luminal-Like)、三陰性(Triple Negative)及 HER2 陽性型。管狀型乳癌細胞表現出 ER、PgR 陽性及 HER2 陰性；三陰性乳癌細胞中三個受體皆為陰性；HER2 陽性乳癌細胞中 HER2 受體過度表現。每一種乳癌細胞型態都有其適合的治療方式，早期發現和診斷對於確定最佳的治療策略至關重要。[22]

然而，即使沒有明確的危險因素，任何女性都有可能罹患乳癌。乳癌的症狀可能會有以下幾種：乳房結節或腫塊、乳房變形或腫脹、皮膚變化、乳房疼痛、淋巴結腫脹及皮膚潮紅或潮熱感等。然而，早期乳癌通常沒有症狀，所以定期進行乳房自檢和定期接受醫學檢查非常重要。乳癌的診斷通常包括乳房攝影術（乳房 X 光檢查）、乳房超聲波、磁共振成像和乳房組織活檢。一旦診斷確定，乳癌的治療方案將根據患者的情況而定，其中包括：

1. 手術：手術是治療乳癌的主要方式之一。乳房保留手術通常包括切除腫瘤及其周圍正常組織，並保留大部分乳房組織。這通常需要進行乳房整形手術，以使乳



房外觀更自然。全乳房切除手術則將整個乳房切除，並且也可以考慮乳房重建手術，使患者在適當情況下能夠恢復乳房形態。

2. 放射療法：放射療法利用高能輻射線照射乳房區域，以殺死潛在殘留的癌細胞或防止癌細胞再生。通常在手術後進行，稱為術後放療，以減少復發的風險。放射療法是局部治療方法，其目標是確保乳房組織內的癌細胞被完全消滅。

3. 化學療法：化學療法使用抗癌藥物，這些藥物可以透過口服或靜脈注射給予。藥物通過血液循環到達全身，以消滅癌細胞或防止其生長。這種治療方法可在手術前進行，稱為新輔助治療，以縮小腫瘤，使其更容易手術切除；或在手術後進行，稱為輔助治療，以減少復發的風險。

4. 免疫療法：免疫療法利用藥物或其他方法刺激患者自身免疫系統，以對抗癌細胞。免疫療法藥物可以增強免疫系統的反應，使其更有效地攻擊癌細胞。例如，免疫檢查點抑制劑可以阻止腫瘤細胞對免疫系統的抑制，從而增加對癌細胞的攻擊。

5. 荷爾蒙療法：荷爾蒙療法適用於荷爾蒙受體陽性乳癌，這些癌細胞對荷爾蒙的作用非常敏感。荷爾蒙療法使用藥物，如荷爾蒙阻斷劑，抑制荷爾蒙對癌細胞的刺激作用，從而抑制癌細胞的生長和擴散。

這些治療方法通常根據乳癌的分期、腫瘤的特性以及患者的整體健康狀況進行個別化選擇。治療方案可能包括單獨使用一種方法，也可能結合多種治療方式，以達到最佳效果。

在癌症病程發展到一定程度時，腫瘤細胞便會從起始部位移動到身體其他部位形成次生腫瘤，這也是癌症最危險和難以治療的特徵之一，也是造成死亡的主因之一。



癌症轉移過程非常複雜，涉及多個步驟和相互作用。以下是具體的癌症轉移過程：

1. 原發腫瘤的侵襲和侵入：癌細胞在原發腫瘤的局部環境中增殖和侵襲周圍組織。它們通過破壞細胞間連接、侵入基底膜和遷移至鄰近組織，逐漸擴大原發腫瘤的規模。
2. 血管新生（Angiogenesis）：原發腫瘤細胞可以釋放促進血管新生的信號分子，刺激周圍血管的生長和擴張，形成供應腫瘤的新血管網絡。
3. 血行轉移或淋巴轉移：一旦原發腫瘤的癌細胞侵入血管，它們可以通過血液循環系統進入身體的其他部位。癌細胞必須在血流中適應各種生理和機械壓力，並避免免疫系統的攻擊。某些癌症會侵入淋巴系統，藉由淋巴循環轉移至其他部位。
4. 循環中的生存：在血液中，大多數癌細胞無法存活。它們可能會受到循環壓力、缺氧、免疫細胞的攻擊等壓力。只有少數強大的癌細胞能夠逃避這些壓力，存活下來。

5. 循環過程中的轉移：存活的癌細胞可以在體內循環一段時間，並最終定居在遠離原發腫瘤的其他組織或器官。它們會通過侵入血管壁或淋巴管壁進入相應的組織。

6. 侵入和形成次生腫瘤：一旦癌細胞進入目標組織，它們會重新侵入和侵襲該組織，形成次生腫瘤灶。這些次生腫瘤灶在新的組織中生長並擴散，導致器官功能受損。

癌症轉移的成功取決於多個因素，包括癌細胞的侵襲能力、血管新生能力、免疫系統的反應、微環境的因素等。近期有學者研究發現，腫瘤細胞的胞外體可能是決定癌症轉移的關鍵性因素。

胞外體(Exosome)是細胞外囊泡(Extracellular Vesicles, EV)的一種，胞外體將功能性蛋白、代謝物和核酸包裹後運送到受體細胞，藉由此過程在廣泛的生理過程中扮演重要的角色，包含免疫反應、組織修復、幹細胞維持、中樞神經系統通訊、心血管疾病、神經病變、癌症和炎症等[23]。腫瘤衍生的胞外體能夠通過表達特定的整合素(Integrin)和其他分子，與特定的細胞類型和組織間質分子發生粘附作用，進而影響轉移的器官選擇。

2015 年的一篇研究中發現[24]，胞外體表達的整合素在轉移過程中起到關鍵的作用。例如，表達 ITG α v β 5 的胞外體能夠與肝臟的庫普弗細胞發生特異性粘附，從而介導肝臟的轉移趨勢；而表達 ITG α 6 β 4 和 ITG α 6 β 1 的胞外體則與肺部的成纖維細胞和上皮細胞發生粘附作用，影響肺部的轉移趨勢。

該研究發現胞外體能夠調節特定細胞類型的基因表達，導致轉移器官中相應的遷移和發炎反應。這些遷移相關的基因表達增加可能參與了轉移前微環境的形成，例如在肺部轉移中，胞外體表達的 ITG α 6 β 4 啟動 Src-S100A4 信號通路，從而影響肺部成纖維細胞的功能。

此外，研究還發現阻斷整合素的偽肽(Peptide)能夠有選擇性地阻斷腫瘤胞外體的粘附作用，這提供了一種有可能有效阻斷特定器官轉移的策略。這些研究結果表明，胞外體在預測轉移潛力和確定未來轉移器官位置方面具有潛在的應用價值。

總結來說，胞外體在乳癌轉移過程中扮演著重要的角色，它攜帶著功能性蛋白(如整合素)遷移到轉移的目標器官，透過整合素及改變細胞基因表達的方式改變該器官的微環境，待環境適合後便會進行轉移。這些發現有助於深入研究胞外體在轉移過程中的角色。它也為探討胞外體上的整合素和蛋白質在其他器官轉移的潛在功能提供了基礎。

繼胞外體在乳癌轉移中的關鍵角色後，近年來的研究也開始關注磁性奈米粒子在乳癌治療中的潛在應用。

2018 年的臨床研究中 [13]，A. Karakatsanis 等研究者使用磁性奈米粒子作為前哨淋巴結的追蹤劑，旨在術前準確定位，從而簡化手術過程。他們招募了 12 名初次診斷為乳腺癌的患者，並在注射磁性奈米粒子後對其磁信號進行數周的持續監測。研究結果顯示，這些磁性粒子在前哨淋巴結中穩定累積，相較於以往方法，此技術更為迅速且方便。



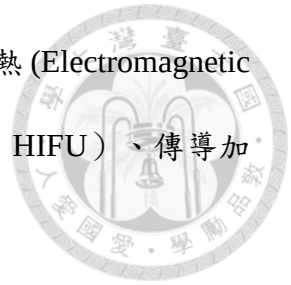
雖然磁性奈米粒子熱療法在多種癌症的臨床試驗中已展露出卓越的治療潛力，但在乳癌的治療領域，這一策略仍然是個相對未被充分探索的領域。考慮到乳癌的流行狀況和其對全球健康的嚴重影響，有理由認為磁性奈米粒子熱療法在乳癌的治療中能展現出強大的效果和價值。因此下節，將介紹熱療的基本概念及其在癌症治療中的應用。

1.3 熱灸療法

當人體受到外來病原體感染時，免疫系統會產生發炎反應，局部或全身性地發熱升溫，以達到抑制病原活性及活化免疫細胞，進而有效排除外來病原讓身體恢復健康[25]。除了身體自行發熱外，還可以利用外加的熱來協助治療某些疾病，也就是臨床使用的熱治療法(Hyperthermia)。

目前臨床熱治療法最常使用在癌症的治療，較常使用的溫度分別為 50 °C 以上的熱消融和 40 °C 到 45 °C 的熱療法[26]。熱消融是透過高溫造成細胞內蛋白凝固和變性，導致快速的細胞凋亡[27]，而熱療法則旨在利用高溫對細胞的毒性以及訊息傳遞路徑的改變對目標細胞造成影響，當腫瘤細胞溫度升高至 43°C 左右，便會啟動細胞中凋亡蛋白的訊號傳遞，例如 Bax/Bcl-2 [28]、p53[29]等，另外在腫瘤細胞中 DNA 損傷修補的抑制效果會在 41°C 以上隨溫度上升而增加，故而熱療法可以透過諸多機制的同步調控，使腫瘤細胞自然死亡。此外，熱療還可以促進藥物作用、提升膜通透性、改變細胞內離子平衡、重新排列細胞骨架等功用[30]，故基於上述原因，熱療也常與藥物一起使用產生協同效果[31][32]。

熱療中的加熱方法根據不同的病灶而分為電磁加熱(Electromagnetic Hyperthermia)、聚焦超音波(High-Intensity Focused Ultrasound, HIFU)、傳導加熱(Conductive Heat)和熱灌注(Hyperthermic Perfusion)[33]。



電磁加熱技術使用高頻電磁波使細胞內含電偶極矩的分子震動或旋轉而產熱，亦可調整其頻率產生不同穿透深度[34]。

聚焦超音波則是依症狀使用不同頻率的超音波，聚焦到小範圍的焦點或較小的區域中，此技術可以非侵入的方式產生熱消融或是誘導熱療[35]。除了熱效應之外，聚焦超音波還能利用其在血液或組織中造成的氣泡震盪所產生的空穴效應來增加細胞膜及血管的通透性，進而輔助某些藥物的作用[36]，例如有些科學家就想藉由此方法以突破腦血屏障使藥物得以進入到腦組織內部[37]，但由於軟組織和骨骼對聲波的吸收率有巨大差異，在使用時必須精確的評估其聲學通路，避免對非目標組織造成傷害[38]。

另外，對熱灌注技術來說，此方法通常和化療結合，可以將加熱後的化療藥物注入腫瘤組織或連同病灶區域一起加熱，此舉比傳統的給藥方式更能安全的輸送高劑量藥物進入腫瘤，並且可提升目標區的腫瘤組織對藥物的吸收[39]。

最後談到傳導加熱法，此作法除了直接對體表加熱外，近期也開發出利用磁性奈米粒子加熱的方式，將磁性粒子打入體內，以磁場控制其位置於患部，再利用高頻電磁場作用於奈米磁粒子，藉此可使其周遭的組織因此而受到加熱[40]。這也是本文的研究主題，研究中使用四氧化三鐵磁性奈米粒子與三陰性乳腺癌細胞共同培養MDA-MB-4175，配合外加交流磁場，測量其存活狀態。



1.4 研究目的

本研究中，結合前幾節提到的磁流體熱療法、磁性分離中所使用的表面修飾後結合特定分子、胞外體對癌症轉移的引導、放射線治療及標靶治療，提出一個全新的概念。預先將磁性奈米粒子與胞外體以抗體進行接合，此時癌症的胞外體攜帶著磁粒子在體內靶向地遷移到轉移器官內的特定區域，當癌細胞轉移時便可以利用交流磁場進行處理，達到殺死癌細胞的效果。

此方法可以比隨機投放磁粒子更精準的控制位置並減少用劑量。如圖 1.4 所示，磁粒子以化學共沉澱法製作完成後表面存在著氨基，將氨基與抗體上的羧基進行偶聯，再利用抗體與胞外體表面抗原的專一性進行結合。

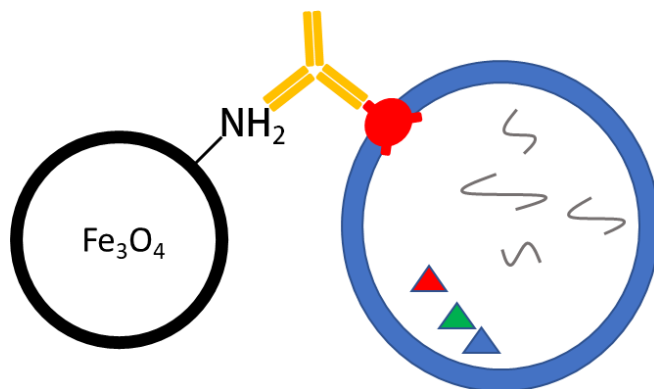


圖 1.4 磁性奈米粒子結合胞外體示意圖

為了達成此目的，實驗分為磁粒子交流磁場處理對癌細胞生存狀態影響及表面修飾兩部分。本實驗使用三陰性乳腺癌細胞系 MDA-MB-4175 及成纖維細胞 NIH 3T3 作為正常細胞模型。

第一部分，測量了癌細胞及 3T3 細胞接觸到磁性奈米粒子後的反應及存活率，在低毒性的磁粒子濃度下施加交流磁場，預期經此處理後存活率能進一步下降。接著以生醫領域常見的高分子化合物 PEG-400 包覆磁粒子，測試其細胞毒性變化。

第二部分，使用低成本的牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)代替抗體進行與磁粒子的鍵結，過程中以碳二亞胺鹽酸鹽(EDC)作為催化劑促進鍵結生成，測量不同的反應時間的接合比例，試圖初步驗證此想法的可行性。接著使用 Rabbit igG 進行接合，再接上螢光抗體以顯微鏡觀察實際接合結果。

1.5 論文架構

第一章略描述磁性物質、癌症及熱療三個領域中已知的知識，並說明本研究的主題。

第二章說明本文中所使用的儀器、細胞株及檢測方式。

第三章詳述實驗的結果，分為磁性奈米粒子對癌細胞存活狀態影響及表面修飾兩部分說明。第一部分首先測量了磁粒子及交流磁場對細胞的影響，再將細胞與磁粒子共同培養後再施加交流磁場，並預期在交流磁場的作用後可以進一步殺傷癌細胞，接著測量磁粒子以 PEG 包覆後對前項實驗的影響。第二部分以牛血清白蛋白(Fetal Bovine Serum) 對磁粒子進行表面修飾並計算接合之比例。再以免疫螢光實驗觀察實際接合情況。

第四章總結本文的研究成果，並簡述有潛力的應用方式。

第二章 實驗材料與方法



本章節中會詳述本文中所使用的儀器、設備、材料、細胞株及實驗方法。研究中使用化學共沉澱法製備四氧化三鐵奈米粒子，並以聚乙二醇(PEG-400)進行包覆。實驗第一部分，以三陰性乳腺癌細胞 MDA-MB-4175 及成纖維細胞 NIH 3T3 作為癌細胞及正常細胞的模型。在交流磁場的處理後以 CCK-8 試劑測量細胞存活率。第二部分，將 MNP 與 BSA 共同培養，過程中以 EDC 作為催化劑。接著以 BCA protein assay kit 測量蛋白濃度變化，便可反推接合數量。最後使用免疫螢光實驗驗證接合結果。

2.1 磁性奈米粒子之製備

製備磁性奈米粒子(Magnetic Nanoparticle, MNP)的方法有許多種，例如：熱分解法、真空蒸鍍法、膠溶法、機械研磨法、電解法、化學共沉澱法等。本文中使用成本較低且操作最方便的化學共沉澱法製作四氧化三鐵(Fe_3O_4)奈米粒子。所使用的藥品及詳細步驟如以下所述。

2.1.1 製備磁性奈米粒子之藥品

1. 氯化亞鐵，Ferrous Chloride，分子式 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ，廠牌：帝一化工
2. 氯化鐵，Ferric Chloride，分子式 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，廠牌：帝一化工
3. Ammonia Water，分子式 NH_4OH ，廠牌：島久試藥
4. 聚乙二醇，Poly Ethylene Glycol，分子式 $\text{HO}(\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{O})_n\text{H}$ ，廠牌：帝一化工



2.1.2 製備磁性奈米粒子之設備

A.蠕動幫浦

B.自製攪拌裝置

C.電源供應器

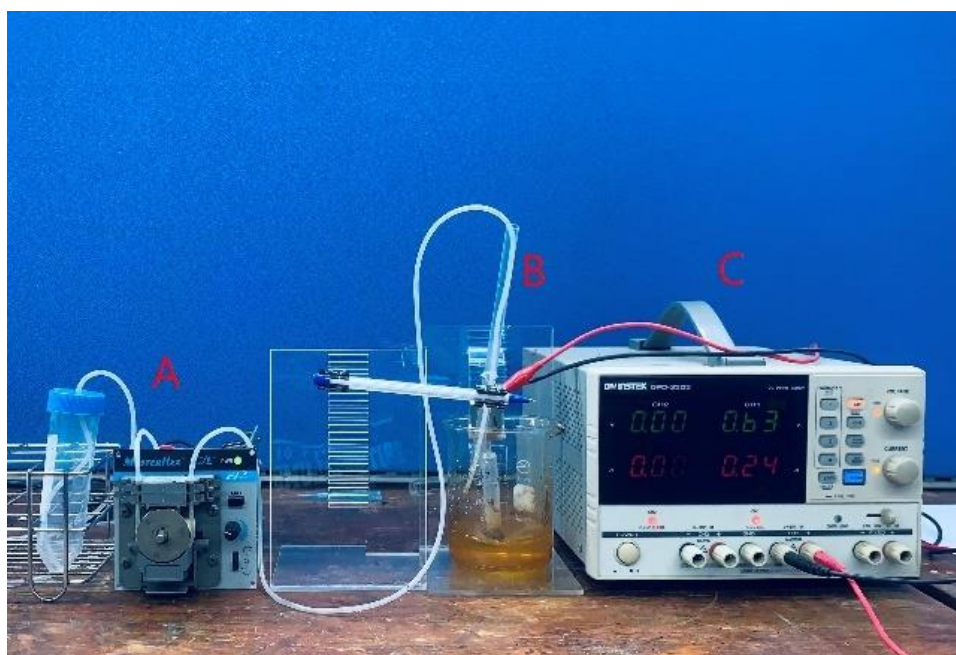


圖 2.1 製備磁性奈米粒子之設備

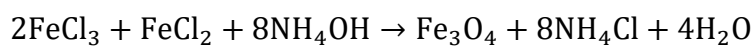
2.1.3 磁性奈米粒子製備步驟

以化學共沉澱法製作磁性奈米粒子之步驟如下：

1. 製作前先將去離子水經高壓滅菌釜滅菌後，通入氮氣 20 分鐘備用。
2. 秤量氯化亞鐵($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)0.2147 公克(0.00108 莫耳)及氯化鐵($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)0.5838 公克(0.00216 莫耳)完全溶解於 50 毫升去離子水中，再以濾紙過濾。配置氨水溶液 0.295M、50 毫升。

- 
3. 使用蠕動幫浦將氨水滴定至氯化鐵水溶液中，過程中以自製攪拌裝置持續攪拌，滴定速率為 2 ml/min。
 4. 滴定完成後持續攪拌約 10 分鐘，
 5. 接著以磁鐵將製作出的磁性奈米粒子吸引並倒出上清液
 6. 以去離子水潤洗兩次即可完成。
 7. 將 MNP 加入 15 毫升的 PEG-400，常溫下攪拌 12 小時即可完成包覆(此步驟視情況決定是否進行)。

其反應方程式為：



2.2 細胞株與細胞培養液

本論文中使用人類三陰性乳癌細胞系 MDA-MB-4175 及小鼠成纖維細胞 NIH 3T3，此二者所使用的培養液及培養方法相同

細胞培養液為提供細胞適合生長的 pH 值及養分，需根據細胞特性來進行配置。配置一公升的 MDA-MB-4175 培養液，需要 880 mL DMEM 培養液（購自 Hyclone）、100 mL 胎牛血清（Fetal Bovine Serum，FBS，購自 Hyclone）、10 mL 青黴素/鏈黴素溶液（Penicillin Streptomycin（P/S），購自 Gibco）、10ml 麩醯

胺酸（L-Glutamine，購自 Gibco）均勻混合後置於 4 °C 冰箱冷藏，待要使用時取出回溫。



2.3 細胞株培養

本實驗所使用的 MDA-MB-4175 及 3T3 細胞為貼壁型細胞。培養步驟如下：

1. 將培養液預先放入 37°C 水浴槽回溫約 20 分鐘。
2. 繼代時以移液管移除舊培養液，並以適量 PBS 潤洗細胞。
3. 移除 PBS 並加入胰蛋白酶（Trypsin-EDTA，購自 Gibco），並將培養瓶放入培養箱中等待約 1 分鐘，此步驟目的是為了將細胞從培養瓶底部移除。
4. 在 Trypsin 對細胞充分作用後，加入約 3 倍於 Trypsin 體積的培養液以中斷 Trypsin 的作用。
5. 將液體移入離心管，置入離心機，以 300rpm 常溫離心 5 分鐘。
6. 將上清液移除並留下底部沉澱的細胞，隨後加入新培養液並以移液器反覆吹打使細胞均勻分布。
7. 取少許含 MDA-MB-4175 細胞的培養液以 Trypan Blue 稀釋 10 倍，以細胞記數盤計算細胞數量，即可進行實驗。或將細胞以每毫升 50 萬個的濃度回種入培養瓶後放回 37 °C、二氧化碳濃度 5 % 的培養箱中，完成繼代流程。



圖 2.2 倒立式電子顯微鏡



圖 2.3 水浴槽



圖 2.4 離心機



圖 2.5 細胞培養箱

2.4 磁性奈米粒子與交流磁場用於細胞之處理

本研究將細胞與 MNP 共同培養並預期細胞將吞噬 MNP，隨後以交流磁場進行處理，結束後以 CCK-8 測量存活狀態。以下為詳細步驟:

1. $T = 0$ hr，將細胞以每孔每毫升 10 萬的濃度種入 24 孔盤中並置於 37°C 的細胞培養箱中培養 24 小時。
2. $T = 24$ hr，在細胞中加入適當濃度的 MNP 並輕微搖晃使其分布均勻，然後置於 37°C 的細胞培養箱中培養 24 小時。
3. $T = 48$ hr，將細胞置於交流磁場的線圈中，參數設定為磁場強度 $H = 11.3$ Oe、頻率 $f = 87$ kHz。進行處理的時間為 10 至 60 分鐘，結束後置於 37°C 的細胞培養箱中培養 24 小時。
4. $T = 72$ hr，以 CCK-8 測量細胞存活狀態。



圖 2.6 交流磁場產生器



2.5 CCK-8 試驗測定細胞存活率

本研究中使用 CCK-8(Cell Counting Kit-8)試劑來測量細胞存活率，其成分為四唑鹽（WST-8，2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium）是一種黃色的粉狀化合物，當 WST-8 試劑與活細胞粒線體中的琥珀酸去氫酶（Succinate Dehydrogenase，SDH）接觸反應時會產生紫色的 formazan 結晶。琥珀酸去氫酶在脫離粒線體細胞膜後會迅速失去活性，即死細胞中的 SDH 無法將 WST-8 還原成 formazan，因此 formazan 結晶的生成量與活細胞數量呈正比。以微盤讀孔機（如圖 2.11）測定樣品的吸光值，藉由吸光值得知 formazan 的量，以推估活細胞的數量，因此 CCK-8 可作為細胞存活的指標。

以下為具體操作步驟。

1. 將 CCK-8 溶液（購自 Sigma）以純水稀釋 50 倍。
2. 將 CCK-8 稀釋液加入 96 孔盤中，並將 96 孔盤移入培養箱，等待約 4 小時。
3. 置於搖晃台上搖晃 15 分鐘使其均勻分布。
4. 使用微盤讀孔機 ELISA 功能進行吸光值測定，讀取得波長設定為 450 奈米，背景波長為 690 奈米，數據處理後可得細胞相對的存活率。

2.6 磁性奈米粒子以白蛋白進行表面修飾

本研究中，將 MNP 表面修飾 BSA，過程中使用 EDC 作為催化劑，1-乙基-3[3-二甲基氨基丙基]碳二亞胺鹽酸鹽（1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide，EDC）是一種零長度交聯劑，用於將羧基偶聯至伯胺。本文中的磁性奈米粒子是利用氨水滴定製成，因此表面上存在著氨基，

研究中利用 EDC 將磁性奈米粒子與牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)之羧基進行鍵結。

取磁性奈米粒子 5mg、BSA 3mg 及 EDC 水溶液 0.1M，置入 1.5 毫升的離心管中並於 37°C 的震盪培養箱中培養 20 至 120 分鐘。反應結束後以磁鐵吸引奈米粒子，將上清液取出待測。

2.7 蛋白含量之測量

本研究中使用 BCA Protein Assay Kit 試劑盒(購自 thermo scientific)測量前一節中取出的上清液中蛋白濃度。詳細步驟如下：

1. 以去離子水配製濃度為 0~2000 μ g/ml 的 BSA 標準溶液。
2. 取適量的 reagent A 與 reagent B 以 50:1 混合後備用。
3. 取標準溶液和待測樣品 25 μ l 於 96 孔盤中，加入上一步驟中的混合液 200 μ l，放置於 37°C 的培養箱中 30 分鐘，便可看到溶液轉變為紫色。
4. 以分光光度計測量波長為 562 奈米的吸光值，以標準溶液的濃度繪製出標準曲線，便可計算待測樣品濃度。

2.8 磁粒子之免疫螢光

在以 Protein Assay Kit 測量間接推算出 MNP 接上的 BSA 後，進行免疫螢光試驗以顯微鏡實際觀察接合狀態。使用的試劑及設備包含 Normal Rabbit igG (購自 Croyez)、Goat anti-Rabbit igG-iFlour 488 (購自 Croyez)及倒立式螢光顯微鏡 (Olympus IX71)。詳細步驟如下：

- 
1. 取磁性奈米粒子 0.833mg、Normal Rabbit igG 0.5mg 及 EDC 水溶液 0.1M，置入 1.5 毫升的離心管中並於 37°C 的震盪培養箱中培養 120 分鐘。
 2. 反應結束後以磁鐵吸引 MNP，將上清液取出。
 3. 將 MNP 以 1%BSA 之 PBS 1 毫升進行稀釋。
 4. 取 MNP 水溶液 50 μ l 置於載玻片上待其乾燥。
 5. 乾燥後以 1 毫升 PBS 沖洗三次。
 6. 取 Goat anti-Rabbit igG-iFlour 濃度 10 μ l/ml、50 μ l 滴上玻片，30 分鐘後以 1 毫升 PBS 沖洗三次並以在玻片覆蓋即完成樣品製作。
 7. 以倒立式螢光顯微鏡進行觀察。

2.9 數據處理

本研究中，進行研究分析前，我們對原始數據進行符合統計原理的處理。將某些與大部分數據存在顯著偏差的數據去除。為了確保統計的有效性，至少保留三個數據點進行後續的分析。在探討個因子的關聯性時，採用單因子變數分析方法(ANOVA)來探討各因子與結果之間的關聯。對於每一個因子，計算其相對於結果的 p 值。根據 p 值的大小，將符合標準的統計結果以星星(*)進行標示，以便於快速識別其統計顯著性。

經過上述處理和分析步驟，獲得了一個更具代表性的數據集，為後續的研究和分析打下了穩固的基礎。

第三章 實驗結果



3.1 磁性奈米粒子之交流磁場處理對乳癌細胞生長狀態之影響

本節的實驗中使用三陰性乳腺癌細胞系 MDA-MB-4175，並以成纖維細胞 3T3 作為正常細胞模型，首先測量 MNP 及交流磁場(Alternating Magnetic Field, AMF) 對細胞生長狀態之影響，依據實驗結果選擇適當的 MNP 濃度和交流磁場的時間進行細胞交流磁場處理。最後再測量以 PEG 包覆的 MNP 對前項實驗的影響。

3.1.1 MNP 及交流磁場對 MDA-MB-4175 細胞存活率影響

本實驗中使用光學顯微鏡及 CCK-8 試劑，觀察細胞接觸到 MNP 及交流磁場後存活狀態的變化。首先，將 MNP 以 0.05mg/ml 的濃度與細胞株共培養 24 小時，再以光學顯微鏡觀察。

實驗結果表明細胞在接觸 MNP 後會進行胞吞作用(Endocytosis)，將 MNP 攝取到細胞內部。如圖 3.1 所示，其中圖 3.1A 展示了未加入 MNP 的正常細胞，而圖 3.1B 顯示了加入 MNP 後的細胞。從圖中明顯可見，細胞內部存在棕色的物質，證明 MNP 已被吞入。接著加入 Trypsin 使細胞與培養瓶壁分離，再以磁鐵吸引。觀察到細胞會隨著磁鐵吸引而移動，如圖 3.2 所示，也由此證明 MDA-MB-4175 細胞會對 MNP 進行胞吞。胞吞作用作為細胞獲取養分的機制，用來攝取無法穿過細胞膜的大分子。其作用可能會受到培養液中細胞養分來源 FBS 濃度的影響，因此測試了不同濃度的 FBS 對 MNP 胞吞作用的影響。將濃度為 0.1mg/ml 的 MNP 與細胞共同培養 24 小時後，以光學顯微鏡觀察計算吞噬的細胞數量。結果如圖 3.3 所示，當 FBS 濃度為 0 時，吞噬 MNP 的細胞數約為 33%，當 FBS 濃度提升到

2.5%時，吞噬比例降低至 21%，之後此比例並不隨著 FBS 濃度上升而有明顯的改變，FBS 濃度為 5%時，比例為 20%；FBS 濃度為 7.5%時，比例為 20%；FBS 濃度為 10%時，比例為 18%。

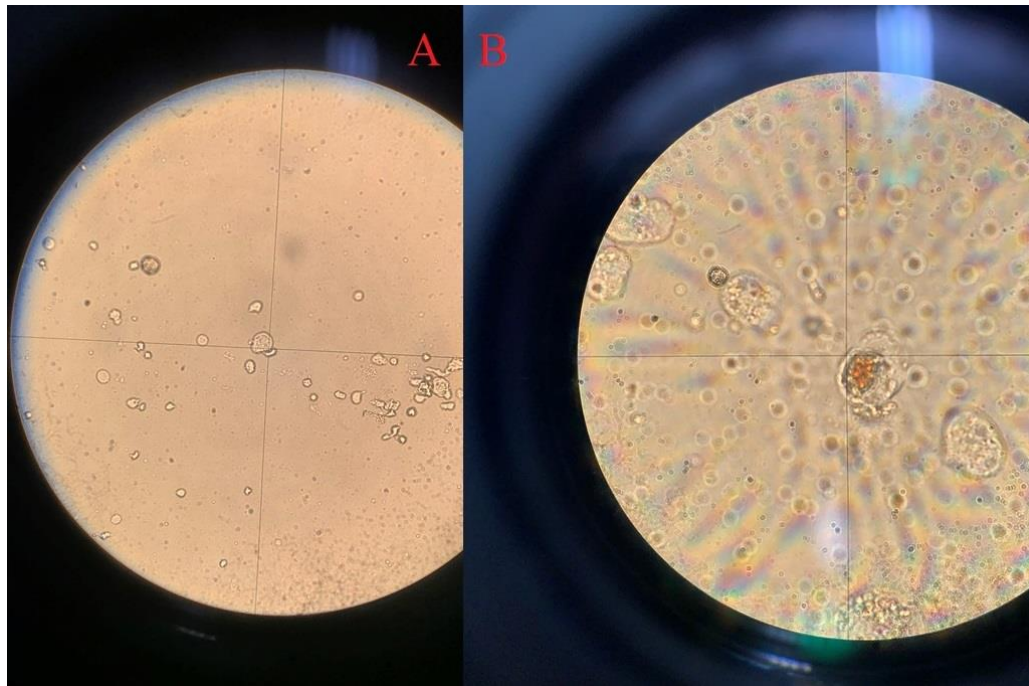


圖 3.1 MDA-MB-4175 細胞吞噬 MNP 前後比較圖。A.細胞接觸 MNP 前的狀態。B.細胞接觸 MNP 24 小時後的狀態。

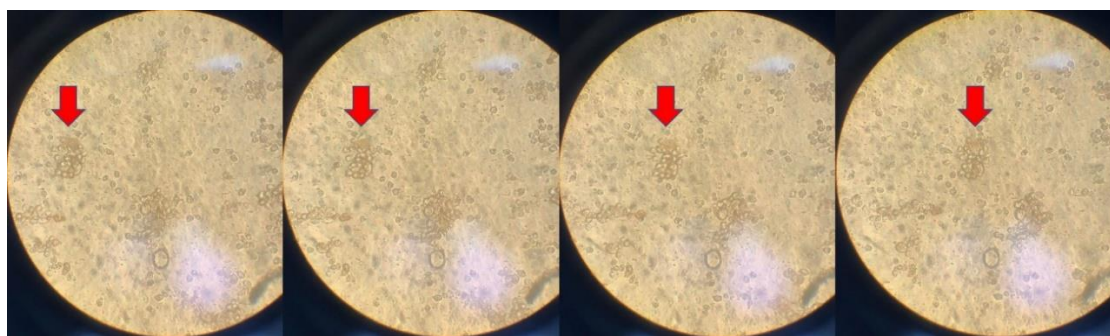


圖 3.2 MDA-MB-4175 細胞吞噬 MNP 後以磁鐵吸引

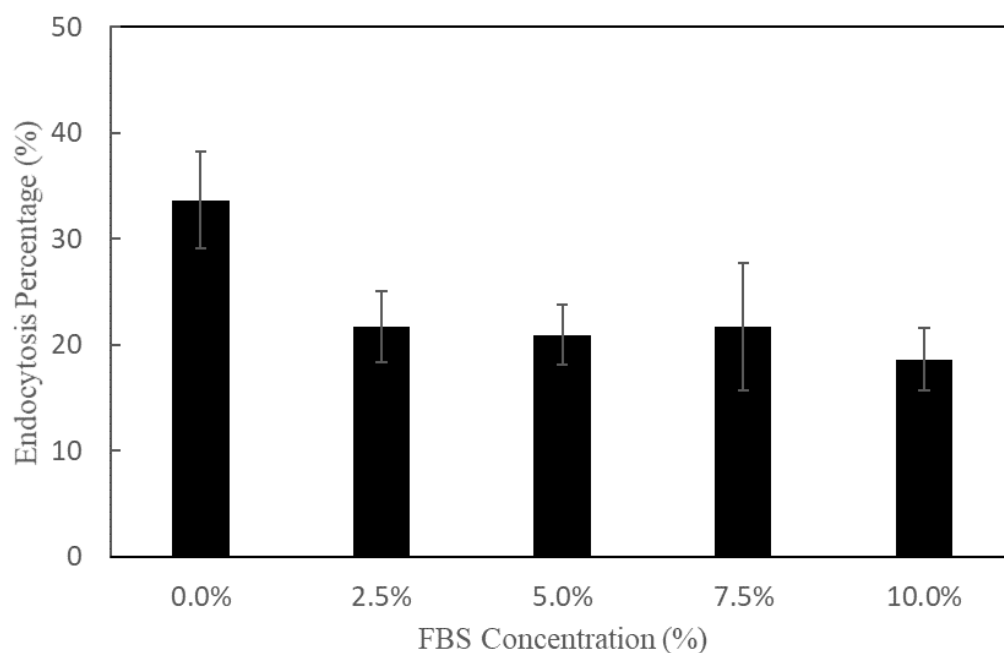


圖 3.3 FBS 濃度與吞噬 MNP 細胞比例之關係。

接著使用 CCK-8 來測定不同濃度的 MNP 對 MDA-MB-4175 及 3T3 存活率的影響。本文中使用 NIH 3T3 細胞作為正常細胞的模型。在此選用 0.05mg/ml 到 1.0mg/ml 作為濃度梯度的範圍，經過 24 小時的反應後透過吸光值數據做為存活率判斷依據。

結果如圖 3.4 中所示，當 MNP 濃度為 0.05mg/ml 時 MDA-MB-4175 存活率為 85%；3T3 存活率為 86%，濃度為 0.1mg/ml 時 MDA-MB-4175 存活率為 80%；3T3 存活率為 79%，隨後存活率隨著濃度上升而下降，當 MNP 濃度為 1.0mg/ml 時 MDA-MB-4175 存活率為 45%；3T3 存活率為 53%。由於研究中希望以 MNP 與交流磁場共同作用後殺傷癌細胞，並非單純以高濃度的 MNP 造成細胞死亡，且 3T3 細胞存活率亦會因 MNP 濃度升高而下降，因此選擇存活率 80%的濃度 0.1mg/ml 進行後續實驗，並且也需要測量交流磁場對細胞是否有影響。

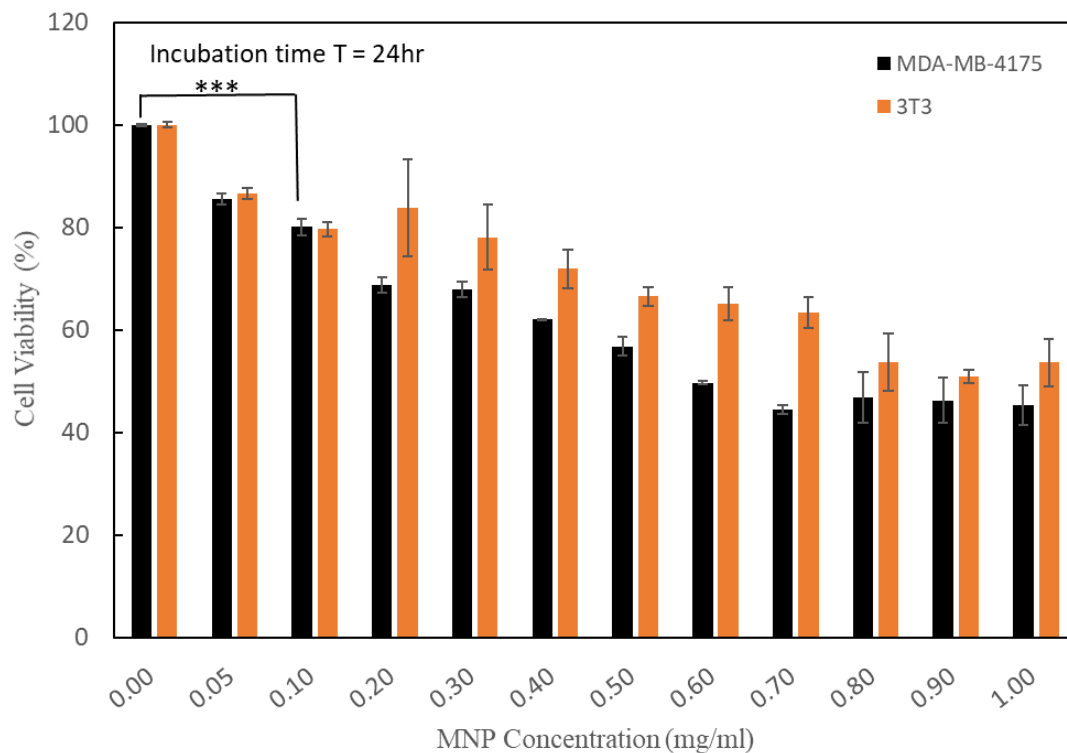


圖 3.4 不同濃度 MNP 對 MDA-MB-4175 及 3T3 細胞存活率之影響。(***) $P < 0.001$

接著同樣使用 CCK-8 來測定不同時間的交流磁場處理對 MDA-MB-4175 存活率的影響。研究中使用的交流磁場之磁場強度 $H=11.3\text{Oe}$ 、頻率 $f=87\text{ kHz}$ 。在此選用 0 min 到 60 min 作為時間的範圍，在施加交流磁場後 24 小時透過 CCK-8 吸光值數據做為存活率判斷依據。結果如圖 3.5 所示，在 0 到 60 分鐘的作用時間內交流磁場對 MDA-MB-4175 細胞的存活狀態並無顯著影響。

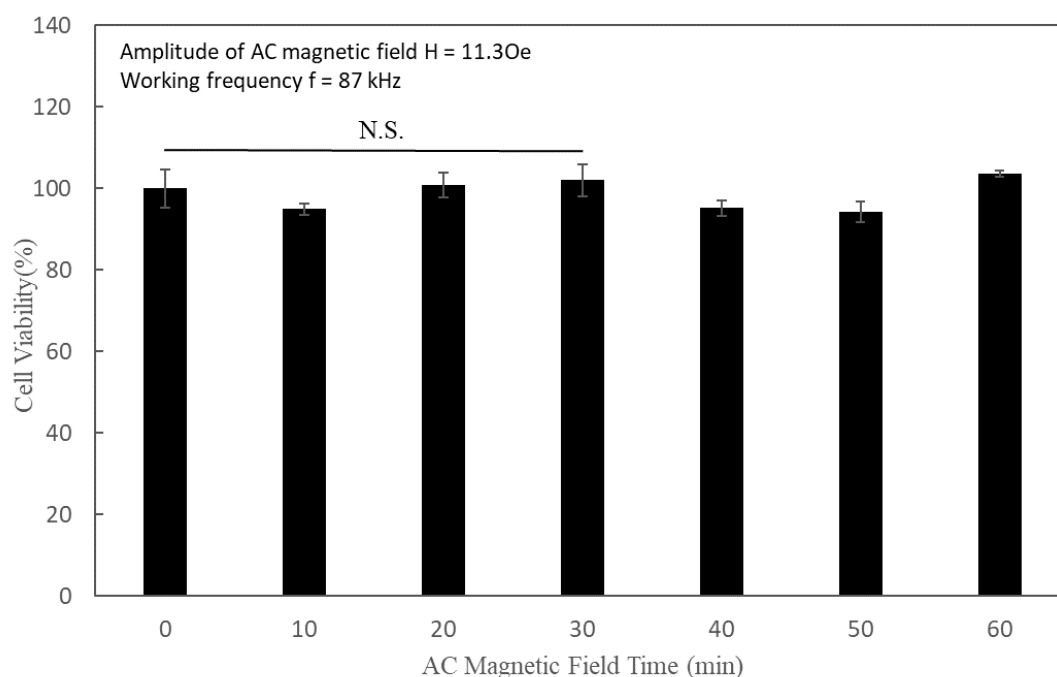


圖 3.5 不同時間的交流磁場對 MDA-MB-4175 存活率之影響。

3.1.2 MNP 之交流磁場處理對 MDA-MB-4175 細胞存活率影響

在 3.1.1 節中說明了 MNP 及交流磁場對細胞的影響，細胞存活率隨著 MNP 濃度升高而下降，而 60 分鐘內的交流磁場處理則沒有顯著影響。本節的實驗中讓細胞與 MNP 共同培養 24 小時後施加交流磁場，結束後 24 小時再以 CCK-8 測量存活率。我們推測 MNP 被細胞吞噬後受到外加磁場作用產生的布朗運動(Brown Motion)可以在細胞內部殺傷癌細胞，而非高溫所致，因此也測量了過程中的溫度及透過移除環境中 MNP 的方式證明此推論。

首先研究測量了在 MNP 濃度為 0.1mg/ml 的情況下，施加不同時間的交流磁場對存活率的影響。實驗中使用的磁場強度 $H=11.3\text{Oe}$ 、頻率 $f=87\text{ kHz}$ ，選擇 0 min 到 60 min 作為時間的範圍。受到 MNP 本身的細胞毒性影響，存活率在未施

加交流磁場的 0 分鐘時為 80%。施加交流磁場 10 分鐘後存活率降低至 56%，有趣的是隨著時間的增加存活率沒有隨之變化，反而都維持約 60%。並且 30 分鐘組與控制組和 0 分鐘組皆有顯著差異，實驗結果如圖 3.6 所示。

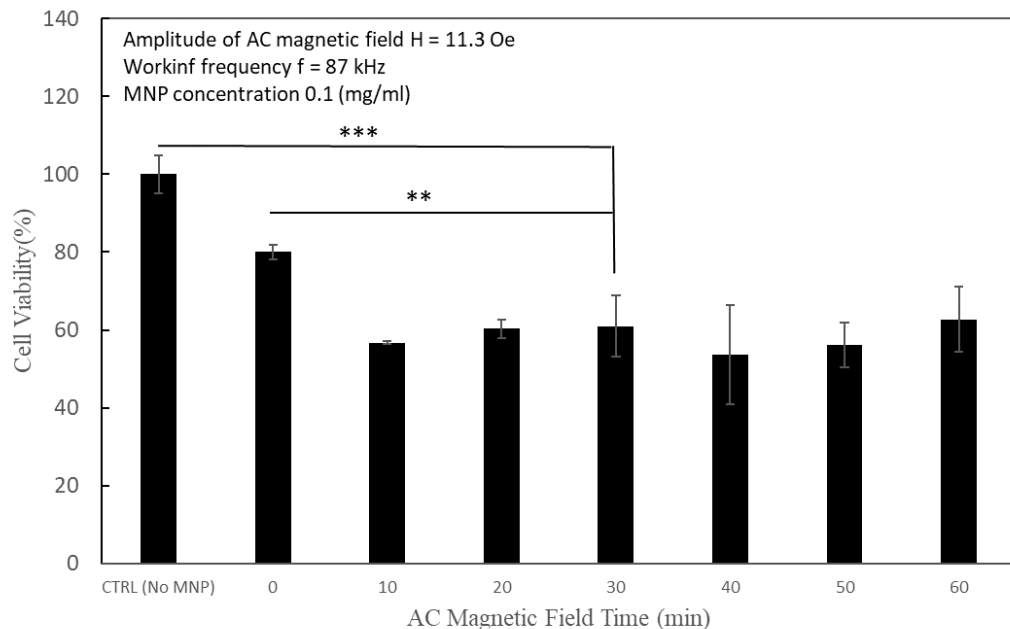


圖 3.6 MNP 以不同的交流磁場時間對 MDA-MB-4175 存活率之影響。(** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$)

接著以紅外線熱影像儀測量了 MNP 濃度為 0.1mg/ml 時系統受交流磁場影響的溫度變化。結果如圖 3.7 所示，可以看到在施加磁場的 30 分鐘內系統溫度在 21°C 到 23.5°C 之間規律的變化，此現象是受到磁場產生器冷卻水循環的影響。當 MNP 濃度為 0.1mg/ml 時溫度並不會有明顯的變化，因此可以推論本研究中並不是利用高溫來殺傷癌細胞。

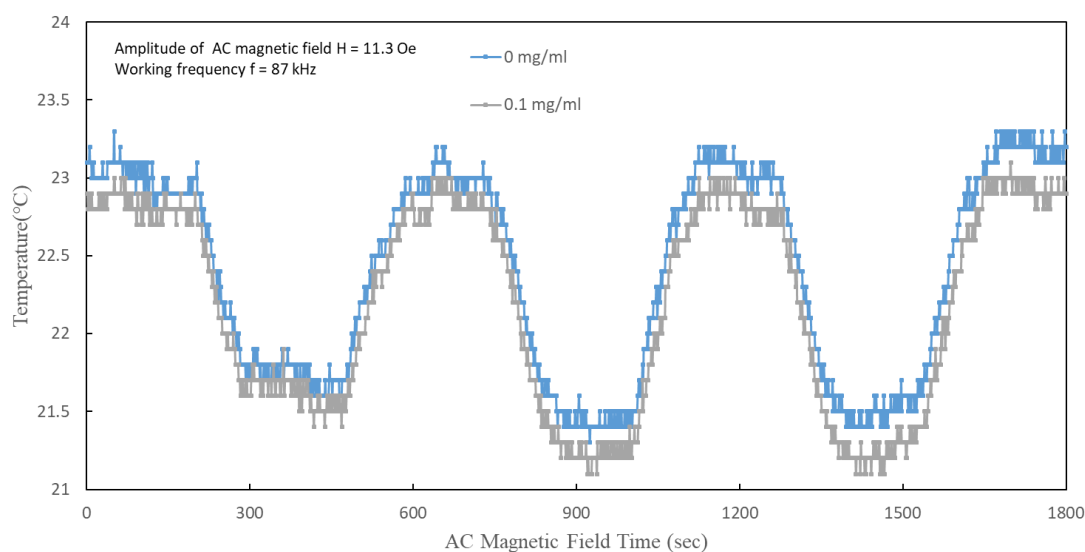


圖 3.7 細胞加入 MNP 後施加交流磁場之溫度變化

在排除掉溫度的影響後，透過移除環境中 MNP 的方式驗證前述的推論，也就是被細胞吞噬的 MNP 受交流磁場而產生的布朗運動可以殺傷癌細胞。

實驗中分為五組，未進行任何操作的控制組(C)、加入濃度為 0.1mg/ml 的 MNP 組(MNP)、施加交流磁場組(AMF，磁場強度 $H = 11.3$ Oe、頻率 $f = 87$ kHz)、加入 MNP 後 24 小時施加磁場組(MNP+AMF)、加入 MNP 後 24 小時，將培養液中的 MNP 移除後施加磁場組(MNP+AMF remove)。

施加交流磁場的 24 小時後以 CCK-8 測量存活率。實驗結果如圖 3.8 所示，MNP 組如同 3.2.1 節的結果，存活率降至約 80%，AMF 組則幾乎不受影響。MNP+AMF 組的存活率降至約 50%且與 MNP 組有顯著差異，即受到交流磁場影響的 MNP 確實對癌細胞有殺傷效果。最後一組 MNP+AMF (remove)在移除環境中的 MNP 後再施加交流磁場，存活率為 46%，與 MNP+AMF 組沒有顯著差異，由此說明環境中的 MNP 並不會對癌細胞產生影響，並且可以進一步推論細胞體內的

MNP 受到交流磁場影響而破壞細胞，依據目前所了解的 MNP 動態磁化過程中的運動方式，極有可能是因為布朗運動破壞了細胞內骨架或胞器所致。

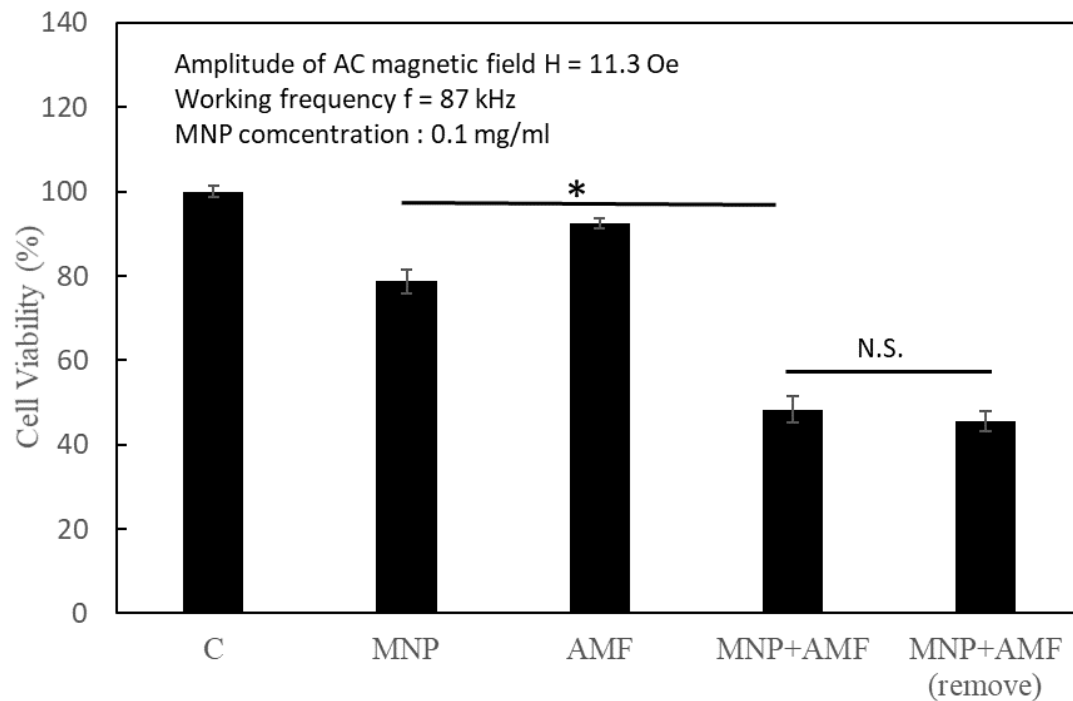


圖 3.8 CCK-8 測定細胞存活率。(** $P < 0.001$)

3.1.3 PEG 包覆的 MNP 對 MDA-MB-4175 細胞存活率影響

3.1.2 節中施加交流磁場在以吞噬 MNP 的細胞上，測量了系統的溫度得知溫度並沒有明顯變化，並透過移除環境中 MNP 的方式說明了 MNP 在細胞內部的運動可以降低存活率。本節的實驗中在 MNP 外包覆了 PEG-400 (MNP@PEG)並測量其細胞毒性和交流磁場處理的效果變化。PEG 是一種長鏈有機化合物，常用於化妝品、藥物等生物醫學領域，文獻指出 PEG 可以透過改變疏水性、表面電荷等生物效應的方式降低細胞毒性 [41]。

首先測量 MNP 和 MNP@PEG 的細胞毒性差異。實驗中將濃度為 0.1mg/ml 的 MNP 和 MNP@PEG 與細胞共培養 24 小時後，以 CCK-8 測量存活率。結果如圖 3.9 所示，MNP 組的存活率約為 75%，而包覆了 PEG 的 MNP 使細胞存活率上升至 88%且與 MNP 組有顯著的差異。由此說明了 PEG 降低細胞毒性的效果。

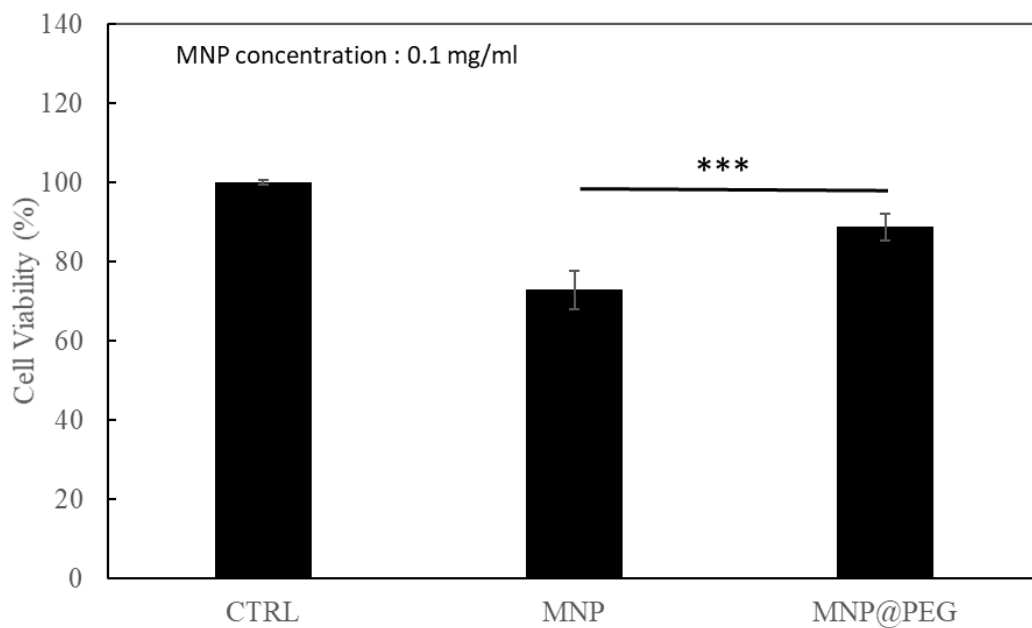


圖 3.9 包覆 PEG 的 MNP 對 MDA-MB-4175 存活率之影響。(***) $P < 0.001$)

接著比較 MNP 和 MNP@PEG 在受到交流磁場後對細胞存活率的影響。同樣的，將 MNP 和 MNP@PEG 與細胞共培養 24 小時後施加交流磁場，磁場強度 $H = 11.3 \text{ Oe}$ 、頻率 $f = 87 \text{ kHz}$ 、時間為 30 分鐘，結束後 24 小時測量存活率。結果如圖 3.10 所示，MNP 組的存活率為 68%，MNP@PEG 組的存活率上升至 80%。因此我們得知 PEG 降低細胞毒性的效果在施加 AMF 後仍然存在。

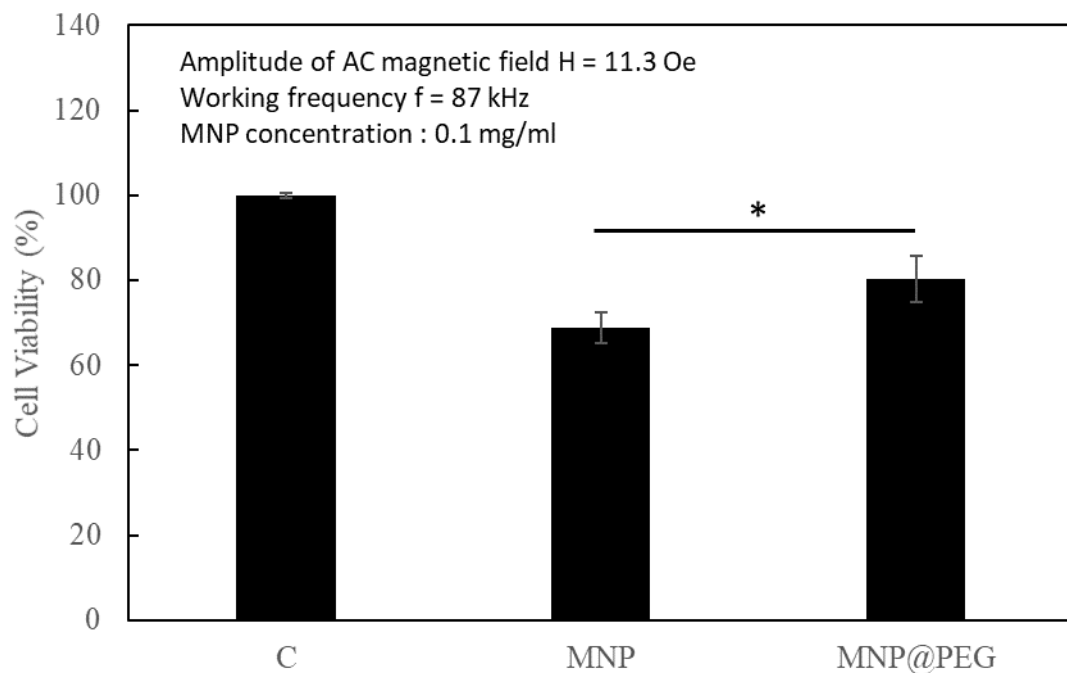


圖 3.10 包覆 PEG 的 MNP 之交流磁場處理對細胞存活率影響。(* $P < 0.05$)

由上述兩個實驗可以知道，MNP 在以 PEG 包覆後可以降低細胞毒性，將存活率提升約 13%，在經過交流磁場處理後也得到類似的結果，存活率上升 12%。

接著利用 3.1.2 節中移除環境中 MNP 的方式試圖驗證 MNP 被吞噬後受交流磁場的影響。

實驗中分為五組，未進行任何操作的控制組(C)、加入濃度為 0.1mg/ml 以 PEG 包覆的 MNP 組(MNP@PEG)、施加交流磁場組(AMF，磁場強度 $H = 11.3$ Oe、頻率 $f = 87$ kHz)、加入 MNP@PEG 後 24 小時施加磁場組(MNP@PEG+AMF)、加入 MNP@PEG 後 24 小時，將培養液中的 MNP@PEG 移除後施加磁場組(MNP+AMF remove)。

結果如圖 3.11 所示，加入 MNP@PEG 後存活率降到 87%，經過交流磁場處理後存活率為 88%，加入 MNP 後再施加交流磁場使存活率降至 71%且與未經

磁場影響組有顯著差異，說明了 MNP 被 PEG 包覆後仍然可以用交流磁場處理殺傷癌細胞。當環境中的 MNP 被去除後再施加交流磁場，存活率為 72%且與未移除的組別沒有顯著差異，由此亦可以說明環境中的 MNP 不會影響存活率，造成存活率下降的主因仍是細胞吞噬的 MNP 被交流磁場處理所導致。

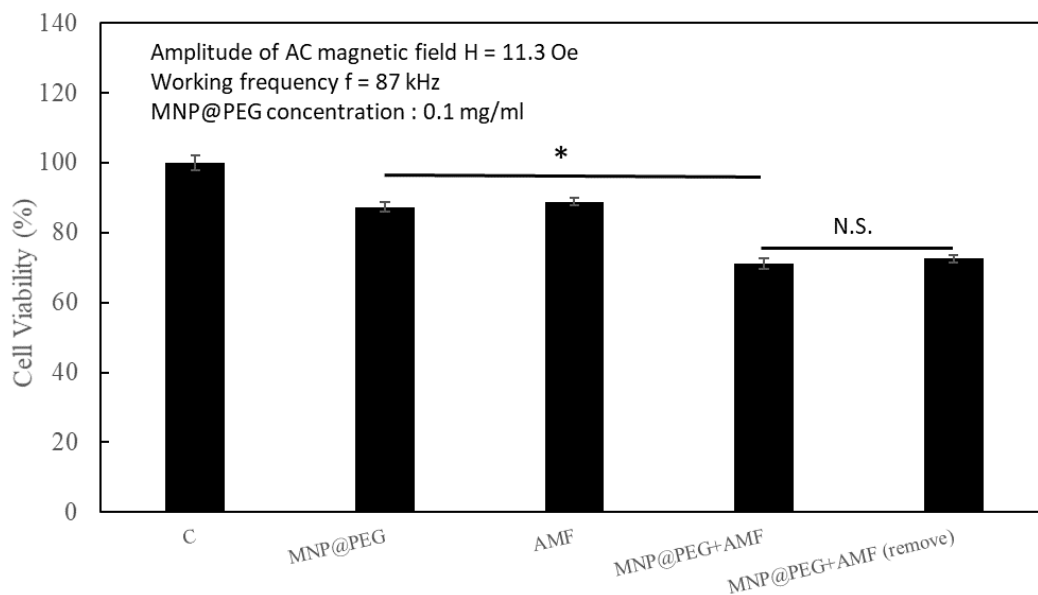


圖 3.11 CCK-8 測定細胞存活率。(***) $P < 0.05$

3.2 磁性奈米粒子之表面修飾

3.1 節中說明了 MNP 對三陰性乳癌細胞生存狀態的影響，及進一步使用交流磁場的刺激及外層包覆 PEG 並研究其造成的影響。本節的研究中使用牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)進行 MNP 的表面修飾。MNP 用化學共沉澱法製作時其表面會存在著氨基，氨基與 BSA 上的羧基可以進行偶聯，過程中使用 1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亞胺鹽酸鹽 (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDC) 作為催化劑，加速整個反應的過程。實驗過程如圖所示，將 MNP 5mg(3.33mg/ml)、EDC 0.1M、BSA 3mg (2mg/ml)放入

離心管中，至於 37°C 培養箱中培養 20 到 120 分鐘，結束後以磁鐵吸引 MNP，測量溶液中 BSA 濃度變化，並回推 MNP 與 BSA 接合的比例。

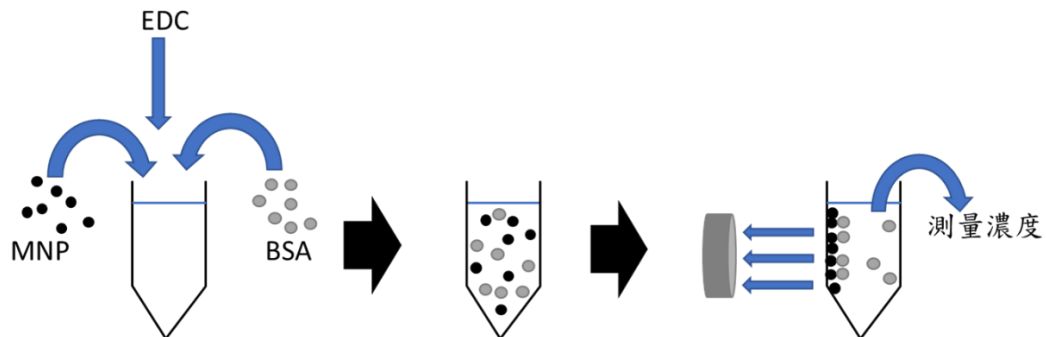


圖 3.12 MNP 表面修飾實驗示意圖

在反應進行 20 分鐘時，每毫克的 MNP 可以接合 0.25 毫克的 BSA。值得注意的是，即使反應時間增加，接合量也未見明顯變化，直到反應時間達到 100 分鐘，當時每毫克 MNP 的接合量提升到 0.3 毫克 BSA。具體數據和變化趨勢，如圖 3.13 和 3.14 所示。

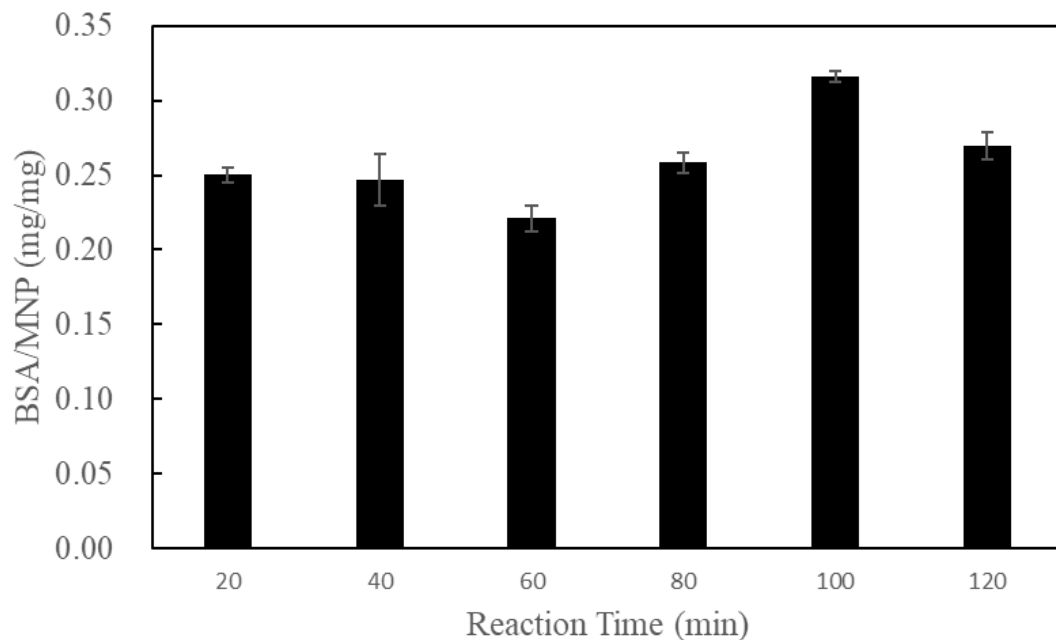


圖 3.13 反應時間對 BSA 修飾 MNP 比例之影響(質量比)

MNP 和 BSA 接合的莫耳數比，BSA 的莫耳質量約為 66000，MNP(Fe_3O_4)為 232，經換算後結果如圖 3.14 所示，反應 20 分鐘時每莫耳的 MNP 可以接上 $8.7 \cdot 10^4$ 莫耳的 BSA。反應時間增加到 100 分鐘時每莫耳的 MNP 可以接上 $11 \cdot 10^4$ 莫耳的 BSA。

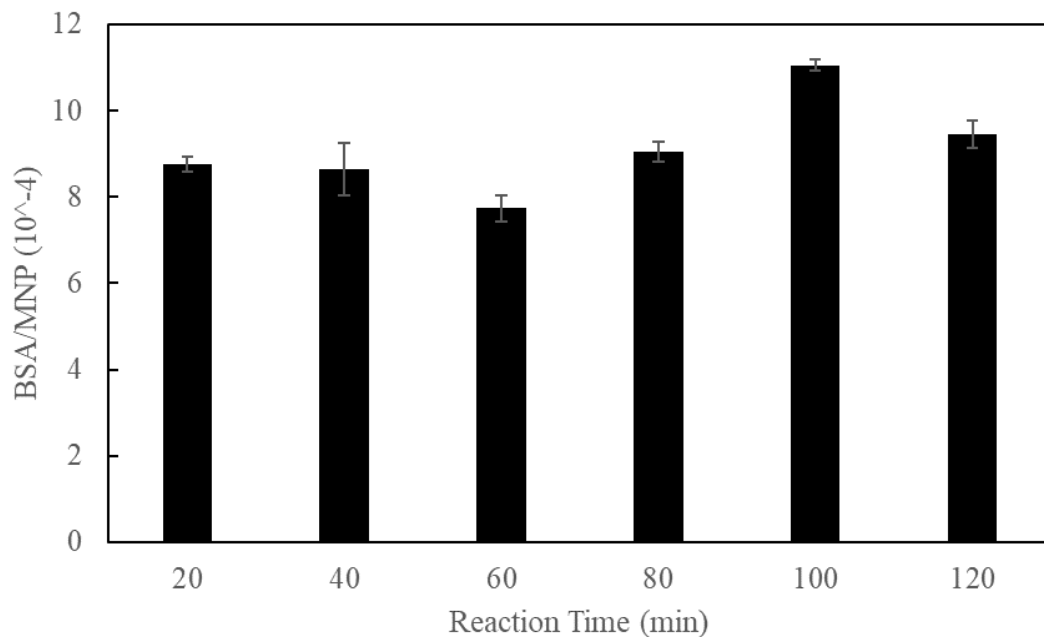


圖 3.14 反應時間對 BSA 修飾 MNP 比例之影響(莫耳數比)

本節中的實驗目的是以抗體進行表面修飾，試圖利用抗體對抗原的專一性與胞外體結合。前項實驗中為了節約成本，以 BSA 代替抗體，在間接推算出 MNP 接合 BSA 之比例後，再以免疫螢光實驗觀察 MNP 接合抗體的實際情況。實驗結果如圖 3.15 所示，圖 3.15(A)是未進行表面修飾之 MNP、(B)是以 Normal Rabbit igG 進行表面修飾後之 MNP。圖(B)中可以看到綠色的螢光訊號，顯示已成功接合。

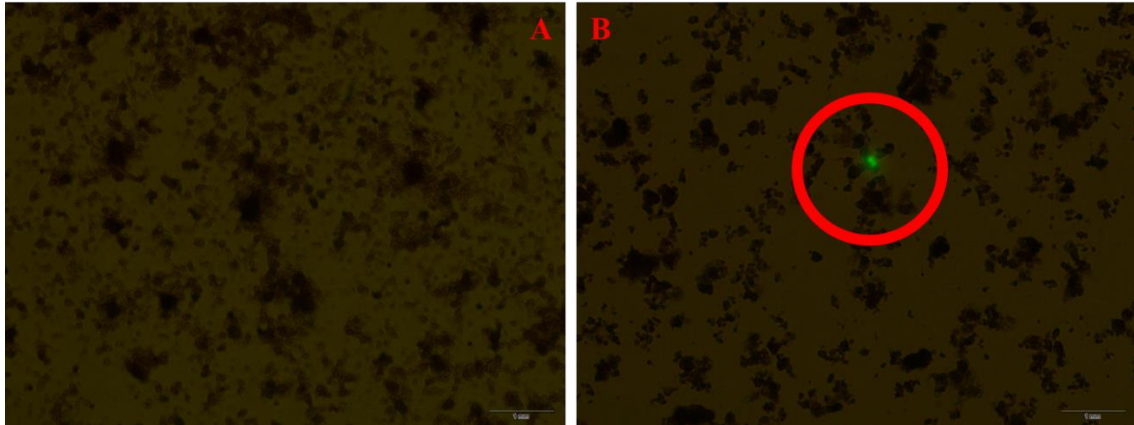


圖 3.15 MNP 表面修飾抗體之免疫螢光影像。



第四章 結論與未來展望

本論文實驗研究的目的是探討 MNP 的交流磁場效應對乳癌細胞生長狀態的影響及使用抗體進行 MNP 的表面修飾。本章對實驗的研究成果進行總結並提出未來可能的發展方向。

4.1 磁性奈米粒子之交流磁場處理對乳癌細胞生長狀態之影響

如 3.1 節所述，實驗進行將 MNP 與三陰性乳腺癌細胞 MDA-MB-4175 共同培養 24 小時後觀察細胞的反應，結果顯示細胞會將 MNP 吞噬進細胞內部，並且在光學顯微鏡下可以明顯地觀察到細胞內部的 MNP，使用磁鐵吸引時細胞的移動也能證明此事。胞吞作用作為細胞獲取養分的機制之一，會受到 FBS 濃度的影響，當 FBS 濃度為 0% 時，吞噬 MNP 的細胞比例是 33%，當濃度提升至 2.5% 時，比例為 21%，並且在濃度提升至 5%、7.5%、10% 時，比例皆為 20% 左右，四者皆沒有明顯的差異。在進行交流磁場處理前必須先找出 MNP 對細胞傷害較低的濃度，因此研究中以成纖維細胞 3T3 作為正常細胞模型，MNP 濃度為 0.05mg/ml 時 MDA-MB-4175 及 3T3 細胞存活率分別為 85% 及 86%，濃度為 0.1mg/ml 時細胞存活率分別降為 80% 及 79%，隨後存活率便隨著濃度上升而下降，在濃度為 1.0mg/ml 時存活率分別為 45% 及 53%。根據 MDA-MB-4175 的結果以指數方程式進行回歸可以得到回歸方程式：

$$C = 16.895 * \exp(-0.064 * V)$$

其中，C 為 MNP 濃度、V 為細胞存活率。

由此可以計算出 MNP 對 MDA-MB-4175 的半致死濃度(IC50)為 0.687mg/ml，而使存活率為 80%的濃度為 0.1mg/ml。由於高濃度的 MNP 亦會對正常細胞 3T3 造成傷害，而這正是需要避免的情況。因此選擇 0.1mg/ml 為後續交流磁場處理之濃度。本研究中用來進行處理的交流磁場也可能對細胞產生不同程度的影響，然而，實驗結果顯示，強度為 11.3 奧斯特、頻率為 87 kHz 的交流磁場在 0 到 60 分鐘的作用時間內對細胞都不會有顯著的影響。

下一步使用交流磁場對 MNP 及細胞進行處理，首先測量在 MNP 濃度為 0.1mg/ml 的情況下不同時間的交流磁場之影響。結果顯示，10 分鐘的交流磁場處理使細胞存活率降低至 56%，當時間增加至 20、30、40、50、60 分鐘時存活率卻沒有隨之有明顯改變，數值皆落在 53%到 62%之間。當使用紅外線熱影像儀測量溫度時發現在 0.1mg/ml 的 MNP 濃度下進行交流磁場處理，系統的溫度並沒有明顯的改變。此外，還將細胞培養液中未被吞噬的 MNP 移除後再進行交流磁場處理，移除與未移除兩組的比較並沒有顯著差異。由此可以推論 MNP 交流磁場處理造成細胞存活率下降是由 MNP 在細胞內部受磁場影響的運動破壞了細胞內部結構所致。

得到上述結果後，研究使用聚乙二醇包覆 MNP 的影響。聚乙二醇(Poly Ethylene Glycol, PEG)是一種具有親水性和電中性的高分子材料，作為改變生物物理與化學性質的關鍵因素，可以有效減少巨噬細胞的去除及降低細胞毒性[42]。本研究中將 MNP 表面包覆 PEG，結果發現在 0.1mg/ml 的濃度下，相較於沒有包覆 PEG 的 MNP，包覆後的細胞存活率顯著上升了 13%。在以交流磁場進行處理

後存活率也是顯著上升 12%。移除環境中的 MNP 後進行交流磁場處理的實驗中發現，環境中的 MNP 並沒有顯著影響。



4.2 磁性奈米粒子之表面修飾

在 3.2 節的實驗中，將 MNP 表面的氨基與牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)上的羧基形成醯胺鍵進行表面修飾，過程中利用 1-乙基-3[3-二甲基氨基丙基]碳二亞胺鹽酸鹽 (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDC) 作為催化劑。實驗結果顯示在 EDC 濃度 0.1M、溫度 37°C 時，經過 20 分鐘的反應時間後每毫克的 MNP 可以接上 0.25 毫克的 BSA(每莫耳的 MNP 可以接上 $8.7 \cdot 10^{-4}$ 莫耳的 BSA)，時間增加到 100 分鐘時每毫克 MNP 可以接上 0.3 毫克 BSA(每莫耳的 MNP 可以接上 $11 \cdot 10^{-4}$ 莫耳的 BSA)。在隨後的免疫螢光試驗中也可以看到綠色的螢光訊號，顯示 MNP 表面成功接合抗體。

總結來看，基於上述的實驗結果，可以得出以下結論：

1. 三陰性乳腺癌細胞 MDA-MB-4175 在接觸到磁性奈米粒子(MNP)後會將其吞噬，且隨著 MNP 濃度的增加，細胞存活率下降。當濃度為 0.1mg/ml 時，存活率為 80%；濃度 1.0mg/ml，存活率為 45%。
2. 在交流磁場處理下，以 0.1mg/ml 濃度培養的 MNP 在細胞內運動或熱效應破壞細胞結構，進一步降低存活率 20%。
3. 使用 PEG 包覆的 MNP 可降低對細胞的毒性，存活率上升 12%，使用交流磁場處理的情況下存活率上升 13%。

4. 在表面修飾的實驗中，已成功將 MNP 與抗體結合，初步驗證了接合胞外體的可行性。



4.3 未來研究方向建議

基於本研究的結果，可以提出以下幾點未來可能的研究方向：

1. 研究精準控制磁性奈米粒子粒徑的製程，因為粒徑可能對細胞的吞噬及電磁動力行為有不同程度的影響。
2. 研究測量細胞內溫度的方法。在本文中測量了 MNP 在濃度為 0.1mg/ml 時以交流磁場處理時的巨觀溫度變化，結果無明顯變化，依此結果配合後續的實驗設計說明了細胞死亡是 MNP 布朗運動的機械力導致。然而，存在著另一種可能性是 MNP 在細胞內部微觀上的升溫造成細胞死亡，若能測量微觀的溫度變化，便能更清楚了解 MNP 的交流磁場處理造成細胞死亡的機制為何。若是機械力造成，便能降低交流磁場的頻率，避免交流磁場對生物體不同程度的影響。
3. 更精確測量細胞吞噬 MNP 數量的方法。本研究中使用肉眼觀察吞噬的細胞數量，此方法有一定誤差，若能以精確得知吞噬情況，便能更好地進行後續研究。
4. 研究細胞吞噬機制配合表面修飾造成專一性的吞噬。當細胞要吞噬物體時，細胞表面的受體會感測物體表面的受體後再進行吞噬，若能找到只存在在癌細胞，而正常細胞不具備的受體，便可將該受體的配體修飾在 MNP 上，造成專一性的吞噬，在利用交流磁場處理便可防止正常細胞受影響。

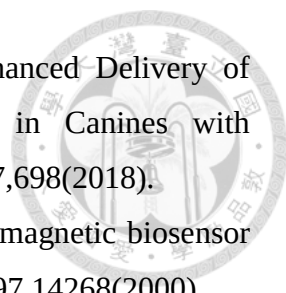
- 
5. MNP 接合抗體及胞外體的最優化。研究不同的製成參數，將接合的效率最大化。
 6. 胞外體攜帶 MNP 遷移的可行性。將接合 MNP 的胞外體放回生物體內，便可使用 MRI 觀察其分布，在未來胞外體的研究上能起到一定的幫助。亦可進行交流磁場處理進行治療。

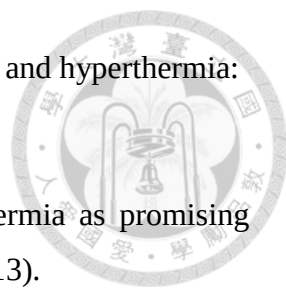
綜上所述，這項研究為磁性奈米粒子在癌細胞治療和細胞影像學領域的應用開辟了新的可能性。本研究的發現提供了重要的基礎和啟示，為未來的研究和臨床實踐指明了方向。相信透過不斷的努力和深入研究，人們能夠進一步揭示磁性奈米粒子在癌症治療中的潛力，為患者帶來更有效和安全的治療方法。

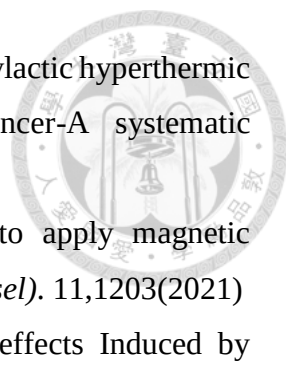
參考文獻



1. 李景明,張慶瑞,林正雄. 磁性技術手冊. 中華民國磁性技術協會.5(2002).
2. Y. Liu, D.J. Sellmyer, D. Shindo. Handbook of Advanced Magnetic Materials. Springer. 1(2006).
3. 洪連輝, 劉立基, 魏榮君. 固態物理學導論. 高立圖書有限公司. 335(2006).
4. 戴道生, 錢昆明. 凝態物理學叢書-鐵磁學(下). 科學出版社.1(2000).
5. G. Bertotti. Hysteresis in Magnetism: For Physicists, Materials Scientists, and Engineers. Academic Press. 424(1998).
6. A. Jordan, P. Wust, H. Faehling, et al. *Int. J. Hyperthermia*. 9,51(1993).
7. M. I. Shliomis, A. F. Pshenichnikov, K. I. Morozov, S. I. Yu, J. Magn. *Magn. Mater.*85,40(1990).
8. M. Hanson. *J. Magn. Magn. Mater.* 96,105(1991).
9. P. C. Fannin. *J. Magn. Magn. Mater.* 446,258(2003).
10. Jin K, Teng L, Shen Y, et al. Patient-derived human tumour tissue xenografts in immunodeficient mice: a systematic review. *Clin Transl Oncol*. 12,473(2010).
11. L. Gu, X. Li, J. Jiang. Stem Cell Tracking Using Effective Self-Assembled Peptide-Modified Superparamagnetic Nanoparticles. *Nanoscale*. 10,34(2018).
12. Tang T, Valenzuela A, Petit F, et al. In Vivo MRI of Functionalized Iron Oxide Nanoparticles for Brain Inflammation. *Contrast Media Mol Imaging*. 2018(2018).
13. Karakatsanis A, Olofsson H, Stalberg P, et al. Simplifying Logistics and Avoiding the Unnecessary in Patients with Breast Cancer Undergoing Sentinel Node Biopsy. A Prospective Feasibility Trial of the Preoperative Injection of Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Scandinavian Journal of Surgery*. 107,130(2018).

- 
14. Young JS, Bernal G, Polster SP, et al. Convection-Enhanced Delivery of Polymeric Nanoparticles Encapsulating Chemotherapy in Canines with Spontaneous Supratentorial Tumors. *World Neurosurg.* 117,698(2018).
 15. Chemla YR, Grossman HL, Poon Y, et al. Ultrasensitive magnetic biosensor for homogeneous immunoassay. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97,14268(2000).
 16. Kyu Sung K, Je-Kyun P. Magnetic force-based multiplexed immunoassay using superparamagnetic nanoparticles in microfluidic channel. *Lab on a Chip.* 6(2005).
 17. Johannsen M, Gneveckow U, Taymoorian K, et al. Morbidity and quality of life during thermotherapy using magnetic nanoparticles in locally recurrent prostate cancer: results of a prospective phase I trial. *Int J Hyperthermia.* 23,315(2007).
 18. Maier-Hauff K, Rothe R, Scholz R, et al. Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 81,53(2007).
 19. Maier-Hauff K, Ulrich F, Nestler D, et al. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 103,317(2011).
 20. Akram M, Iqbal M, Daniyal M, et al. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biol Res.* 50,33(2017).
 21. Merino Bonilla JA, Torres Tabanera M, Ros Mendoza LH. Breast cancer in the 21st century: from early detection to new therapies. *Radiologia.* 59,368(2017)
 22. Nadia H, Michael G. Breast cancer. *The Lancet.* 389,1134(2017).
 23. Tai YL, Chen KC, Hsieh JT, Shen TL. Exosomes in cancer development and clinical applications. *Cancer Sci.* 109,2364(2018).
 24. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature.* 527,329(2015).
 25. Mackowiak PA. Fever: blessing or curse? A unifying hypothesis. *Ann. Intern. Med.* 120,1037(1994).
 26. Roti Roti JL. Cellular responses to hyperthermia (40-46 degrees C): cell killing and molecular events. *Int J Hyperthermia.* 24,3(2008).

- 
27. Zhang Y, Calderwood SK. Autophagy, protein aggregation and hyperthermia: a mini-review. *Int J Hyperthermia*. 27,409(2011).
28. Ahmed K, Zaidi SF. Treating cancer with heat: hyperthermia as promising strategy to enhance apoptosis. *J Pak Med Assoc*. 63,504(2013).
29. Basile A, Bizziato D, Sherbet GV, et al. Hyperthermia inhibits cell proliferation and induces apoptosis: relative signaling status of P53, S100A4, and Notch in heat sensitive and resistant cell lines. *J. Cell. Biochem*. 103,212(2008).
30. Zhao P, Jiang H, Su D. Inhibition of cell proliferation by mild hyperthermia at 43°C with Paris Saponin I in the lung adenocarcinoma cell line PC-9. *Mol. Med. Rep*. 11,327(2014).
31. Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G et al. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol*. 3,487(2002).
32. Seifert G, Budach V, Keilholz U, et al. Regional hyperthermia combined with chemotherapy in paediatric, adolescent and young adult patients: current and future perspectives. *Radiat Oncol*. 11,65(2016).
33. Youssef I, Amin NP. Hyperthermia for chest wall recurrence. StatPearls. 2022.
34. van Rhoon GC, Paulides MM, van Holthe JM, et al. Hyperthermia by electromagnetic fields to enhanced clinical results in oncology. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*. 359(2016).
35. Zhu L, Altman MB, Laszlo A, et al. Ultrasound hyperthermia technology for radiosensitization. *Ultrasound Med Biol*. 45,1025(2019).
36. Maloney E, Hwang JH. Emerging HIFU applications in cancer therapy. *Int J Hyperthermia*. 31,302(2015).
37. Fishman PS, Fischell JM. Focused ultrasound mediated opening of the blood-brain barrier for neurodegenerative diseases. *Front Neurol*. 12,749047(2021).
38. Józefczak A, Kaczmarek K, Bielas R. Magnetic mediators for ultrasound theranostics. *Theranostics*. 11,10091(2021).

- 
39. Brenkman HJF, Päeva M, van Hillegersberg R, et al . Prophylactic hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) for gastric cancer-A systematic review. *J Clin Med.* 8,1685(2019).
40. Fatima H, Charinpanitkul T, Kim KS. Fundamentals to apply magnetic nanoparticles for hyperthermia therapy. *Nanomaterials(Basel).* 11,1203(2021)
41. Sun H, Jiang C, Wu L, et al. Cytotoxicity-Related Bioeffects Induced by Nanoparticles: The Role of Surface Chemistry. *Front Bioeng Biotechnol.* 12,414(2019).
42. Shi LW, Zhang JQ, Zhao M, et al. Effects of polyethylene glycol on the surface of nanoparticles for targeted drug delivery. *Nanoscale.* 13,10748(2021).