

國立臺灣大學生物資源暨農學院生物機電工程學系

碩士論文

Department of Biomechatronics Engineering

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master's Thesis



以脫細胞化肝臟間質為基底之奈米藥物應用於代謝失能脂肪
肝病

Development of Decellularized Liver Matrix-based
Nanomedicine for MASLD Application

林泳亨

Yong-Heng Lin

指導教授：侯詠德 博士

Advisor: Yung-Te Hou, Ph.D.

中華民國 113 年 7 月

July, 2024

國立臺灣大學碩(博)士學位論文

口試委員會審定書

MASTER'S THESIS(DOCTORAL DISSERTATION) ACCEPTANCE CERTIFICATE NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY

以脫細胞化肝臟間質為基底之奈米藥物應用於代謝失能脂肪肝病

Development of Decellularized Liver Matrix-based Nanomedicine for MASLD Application

本論文係 林泳亨 (R11631030) 在國立臺灣大學
生物機電工程學(系/所/學位學程)完成之碩(博)士學位論文,於民國
113 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 / Graduate Institute of Biomechatronics engineering
on 30 (date) July (month) 2024 (year) have examined a Master's Thesis (Doctoral
Dissertation) entitled above presented by Yong Heng Lin
(name) R11631030 (student ID) candidate and hereby certify that it is worthy of
acceptance.

口試委員 Oral examination committee:

倪衍玄

(指導教授 Advisor)

侯詠德

黃文

鄭景冬

侯詠德

系(所、學位學程)主管 Director:

陳博宏

謝辭



想當初從學士班二年級進入研究領域後到現在即將完成碩士班的學業總共約五年多的時間，這一路上所完成的大大小的里程碑除了自身的努力外也受到了來自各方的幫助以及支持，希望能在完成這篇畢業論文之餘也能稍稍停下腳步，向曾經幫助過我的人表達我的感謝。首先我想感謝我的指導教授侯詠德教授從我大二的時候便開始指導我，到現在即將碩二畢業了；這一路上除了給予我許多學術上以及研究上的指導外，即使是在眾多外人不看好我的情況下也像是一個好戰友一般給予我很多鼓勵以及資源，讓我能夠在這條道路上累積了與眾不同的成就以及經驗，特別是從不會吝嗇向我介紹國內外的研究發展同時鼓勵我向外持續累積相關研究經驗。這五年多與老師的合作以來著實感受到備受照顧，再次感謝老師的諄諄教誨。接著也想感謝倪衍玄院長、黃凱文教授以及鄭蕙芬博士願意撥空擔任我的口試委員給予我研究上的諸多建議以及討論，使該研究更為完備。也需要特別感謝鄭蕙芬博士在當初體內實驗的設計上給予諸多實務上的建議，使實驗更加合理且研究方向更加明朗。另外也想要感謝京都大學的長船健二教授以及其研究團隊，願意讓我到該機構進行交流外也給予我諸多的實驗建議以及帶我體驗了日本學術文化。接著是我在求學的過程中所給予大大小小的學長姐以及同儕們：這邊想特別感謝林于哲學長、殷維容學姊以及鄭凱尹學長；于哲學長在我大二剛加入實驗室時就對我有著諸多照顧，作為我當時的主要 mentor，除了奠定了我基礎細胞、生化實驗的基礎外，也培養了我嚴謹的實驗態度以及實務操作。維容學姊以及凱尹學長則是在我進入碩士班的期間便對我給予諸多照顧，除了傳授各種實驗技巧以及經驗外，也在我因實驗以及其他因素造成心理上的影響時，給予我莫大的支持，他們也是使我能夠在茫茫的研究大海中，繼續一往無前的動力。三人從不吝嗇給予我耐心的指導以及待人接物的處世態度，著實是感到備受關愛。除了學術上的前輩們以外，也想感謝我的同儕舒郁，雖然身處不同領域的實驗室，但在課堂中的交流以及研究之餘的相互關懷都讓我感受到我在研究的路途上並非是孤單一人的。最後也想感謝我的父母、姊姊以及祈麟，給予我經濟或是心靈上的支持，使我在研究的路上毫無顧慮的向前邁進。



中文摘要



近年來人們在營養攝取過剩以及缺乏運動下，罹患非酒精性脂肪肝病 (Nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD) 的比例逐年攀升。而在最近的研究中也發現其對身體的傷害不僅僅限於肝臟且有可能擴展至全身性的代謝功能失常，因此近來更將 NAFLD 進一步定義為代謝失能相關脂肪肝病 (Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease; MASLD)。然而目前在臨床測試藥物的結果仍無法證明其有效性。為了能更有效的解決 MASLD，本研究擬嘗試開發一套能對 MASLD 有顯著回復效果的奈米藥物。

本研究旨在開發一種新穎的奈米藥物，進入肝臟後並促進病患之脂肪肝回復成健康肝臟。研究分為兩個部分：第一部分是奈米藥物的開發：利用脫細胞化肝臟間質 (Decellularized liver matrix; DLM) 與單寧酸 (Tannic acid; TA) 形成奈米藥物，並對其進行性質檢測；第二部分則是對該奈米藥物進行體外和體內試驗。在體外實驗中分別使用誘導性多能幹細胞 (induced pluripotent stem cells; iPSC) 所誘導而成之肝細胞以及大鼠初代成熟肝細胞與該奈米藥物進行共培養，並檢測其細胞活性和肝細胞機能。此外，本研究亦建立小鼠 MASLD 模型，並評估該奈米藥物對於 MASLD 小鼠代謝機能回復的能力。

在本研究的結果中可以發現 TA 與 DLM 確實具備合成奈米粒子的能力；且在投入到 MASLD 體外模型時，除了由於 TA 活化了 AMPK pathway 而展現了降低脂質堆積以及提升肝細胞機能的能力外、TA-DLM 奈米藥物也展現了相較於只投入 TA 有著更為有效的表現。最後再將 TA-DLM 奈米藥物投入到 MASLD 體內模型時，該奈米藥物也展現了改善肝內脂質堆積以及全身性的脂質代謝的潛力。本研究的成果有望為 MASLD 的治療提供新的方法和展望，並為 MASLD 治療領域帶來重要的突破。

關鍵字：脫細胞化肝臟間質 (Decellularized liver matrix; DLM)、奈米藥物 (Nanomedicine)、單寧酸 (Tannic acid; TA)、代謝失能脂肪肝病 (Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease; MASLD)、肝臟回復



英文摘要



In recent years, the incidence of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) has been increasing due to excessive nutritional intake and lack of exercise. Recent studies show that NAFLD can cause systemic metabolic dysfunction, leading to its redefinition as metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD). However, current clinical trials have not proven effective. This study aims to develop a nanomedicine with significant recovery effects on MASLD.

This study aims to develop a novel nanomedicine that enters the liver and promotes the recovery of fatty liver to a healthy liver in patients. The research is divided into two parts: the first part involves the development of the nanomedicine by forming nanoparticles using decellularized liver matrix (DLM) and tannic acid (TA) and characterizing their properties. The second part involves *in vitro* and *in vivo* experiments with the nanomedicine. In the *in vitro* experiments, hepatocytes derived from induced pluripotent stem cells (iPSC) and primary mature rat hepatocytes are co-cultured with the nanomedicine, and their cell viability and liver functions are detected. Additionally, a mouse MASLD model is established to evaluate the ability of the nanomedicine to restore metabolic function in MASLD mice.

The results indicate that TA and DLM can synthesize nanoparticles. In the *in vitro* MASLD model, TA activates the AMPK pathway, reducing lipid accumulation and enhancing hepatocyte function. The TA-DLM nanomedicine outperformed TA alone. In the *in vivo* MASLD model, TA-DLM nanomedicine improved intrahepatic lipid accumulation and systemic lipid metabolism. Therefore, this study offers new methods and prospects for MASLD treatment, potentially leading to significant breakthroughs in the field.

Keywords : Decellularized liver matrix (DLM), Nanomedicine, Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD), Liver regeneration

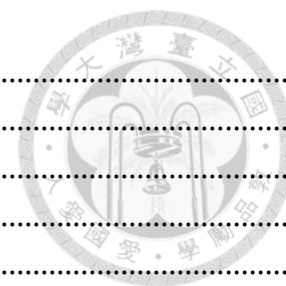


目次



謝辭.....	i
中文摘要.....	iii
英文摘要.....	v
目次.....	vii
圖次.....	x
第一章 緒論.....	1
1.1 前言.....	1
1.2 研究目的.....	4
第二章 文獻探討.....	6
2.1 MASLD/MASH 治療發展現況.....	6
2.2 蛋白質奈米藥物.....	8
2.2.1 脫細胞化肝臟間質.....	8
2.2.2 單寧酸 (Tannic acid; TA).....	11
2.2.3 蛋白質與單寧酸之間的交互作用.....	12
2.3 明確的目標 (Specific Aims).....	13
第三章 研究方法.....	15
3.1 實驗藥品、耗材、儀器設備與實驗動物.....	15
3.1.1 實驗藥品.....	15
3.1.2 實驗耗材.....	18
3.1.3 實驗儀器設備.....	19
3.1.4 實驗動物.....	20
3.2 脫細胞化肝臟間質 (DLM) 之製備.....	21
3.2.1 大鼠肝 DLM 之製作流程.....	21
3.2.2 豬肝 DLM 之製作流程.....	21
3.2.3 豬肝 DLM 之萃取流程.....	23
3.3 奈米藥物之製作流程與分析.....	24
3.3.1 奈米藥物之合成.....	24
3.3.2 FT-IR 之圖譜分析.....	25
3.3.3 奈米載體的粒徑分析.....	25
3.3.4 TEM 拍攝並觀察奈米藥物型態.....	26

3.3.5 TA-DLM 奈米藥物單寧酸釋放量檢測	27
3.4 誘導型多功能幹細胞誘導成肝細胞後之體外培養	28
3.4.1 健康人類與非酒精性脂肪肝病患之誘導型多功能幹細胞之繼代培養	28
3.4.2 誘導型多功能幹細胞分化成肝細胞之二維培養方式	29
3.5 大鼠初代肝細胞培養	31
3.5.1 大鼠初代成熟肝細胞採取與培養	31
3.6 體外毒化與奈米藥物回復	33
3.6.1 油酸毒化	33
3.6.2 體外毒化恢復試驗	34
3.7 體外實驗相關檢測方法	36
3.7.1 尿素分泌量檢測	36
3.7.2 細胞核、白蛋白免疫螢光染色	37
3.7.3 AdipoRed 細胞內脂質定量分析	38
3.7.4 乳酸脫氫酶 (LDH) 活性檢測	39
3.7.5 DNA 含量檢測	40
3.7.6 Interleukin 6 (IL-6) 表現量檢測	41
3.7.7 白蛋白 (Albumin) 表現量檢測	42
3.8 小鼠體內實驗	43
3.8.1 小鼠體內脂肪肝模型預試驗流程	43
3.8.2 小鼠體內脂肪肝模型主試驗流程	45
3.9 體內實驗相關檢測方法	47
3.9.1 血液分析	47
3.9.2 病理切片染色	48
3.9.3 肝內三酸甘油酯含量檢測	48
3.10 統計結果分析方法	49
第四章 實驗結果	50
4.1 脫細胞肝臟間質 (DLM) 之製備	50
4.1.1 大鼠肝臟 DLM (rDLM) 之製作	50
4.1.2 豬肝 DLM (pDLM) 之製作與萃取	51
4.1.3 rDLM 以及 pDLM DNA 含量檢測	52
4.2 奈米藥物之自組裝成果	54
4.2.1 FT-IR 圖譜分析聚乙二醇修飾成果	54
4.2.2 DLS 粒徑分析	55
4.2.3 TEM 觀察 TA-DLM 奈米藥物型態	56
4.2.4 TA-DLM 奈米藥物的單寧酸釋放曲線	57
4.3 TA-DLM 奈米藥物對 iPS 細胞誘導之肝細胞的影響	59



4.3.1 iPS 細胞誘導之肝細胞生長型態觀察.....	59
4.3.2 iPS 細胞誘導之肝細胞之 LDH 活性檢測.....	62
4.3.3 iPS 細胞誘導之肝細胞之尿素分泌量檢測.....	65
4.3.4 iPS 細胞誘導之肝細胞之白蛋白免疫螢光檢測.....	68
4.3.5 iPS 細胞誘導之肝細胞之白蛋白分泌量檢測.....	70
4.4 TA-DLM 奈米藥物對大鼠初代成熟肝細胞的影響.....	73
4.4.1 大鼠初代成熟肝細胞生長型態觀察.....	73
4.4.2 大鼠初代成熟肝細胞之 DNA 含量檢測.....	76
4.4.3 大鼠初代成熟肝細胞之 LDH 活性檢測.....	78
4.4.4 大鼠初代成熟肝細胞之尿素分泌量檢測.....	80
4.4.5 大鼠初代成熟肝細胞之白蛋白分泌量檢測.....	82
4.4.6 大鼠初代成熟肝細胞之 IL-6 分泌量檢測.....	84
4.4.7 大鼠初代成熟肝細胞之脂質累積量檢測.....	86
4.5 TA-DLM 奈米藥物對小鼠 MASLD 模型的影響.....	88
4.5.1 小鼠 MASLD 模型預試驗體重、肝臟重量結果.....	88
4.5.2 小鼠 MASLD 模型預試驗組織切片結果.....	92
4.5.3 小鼠 MASLD 模型預試驗血液分析結果.....	95
4.6 TA-DLM 奈米藥物對小鼠 MASLD 模型主試驗的影響.....	101
4.6.1 小鼠 MASLD 模型主試驗外型、體重、肝臟重量以及肝重/體重比例結果...	101
4.6.2 小鼠 MASLD 模型主試驗肝內三酸甘油酯檢測.....	106
4.6.3 小鼠 MASLD 模型主試驗組織切片分析結果.....	108
4.6.4 小鼠 MASLD 模型主試驗血液分析結果.....	111
第五章 結果討論、結論與未來展望.....	116
5.1 結果討論.....	116
5.2 結論.....	123
5.3 未來展望.....	124
參考文獻.....	126

圖次



圖一：本研究基本概念示意圖。.....	5
圖二：本研究進程示意圖。.....	14
圖三：大鼠肝臟以及豬隻肝臟 DLM 製作流程圖。.....	22
圖四：PEG 活化、DLM 聚乙二醇化以及與 TA 結合的反應機制。.....	24
圖五：iPS 細胞分化成肝細胞之二維培養方式之三階段。.....	30
圖六：體外 MASLD 模型毒化以及治療時程圖。.....	35
圖七：小鼠體內脂肪肝模型預試驗流程圖。.....	44
圖八：小鼠體內脂肪肝模型主試驗流程圖。.....	46
圖九：大鼠 DLM 製備成果。.....	50
圖十：豬肝 DLM 製備成果。.....	51
圖十一：大鼠肝臟與 rDLM DNA 含量結果。.....	53
圖十二：豬隻肝臟與 pDLM DNA 含量結果。.....	53
圖十三：mPEG-DLM 以及 DLM 之 FT-IR 檢測結果。.....	54
圖十四：不同濃度的單寧酸以及 DLM 所呈現的奈米顆粒之粒徑大小。.....	55
圖十五：以 TEM 拍攝 TA-DLM 奈米藥物之成果圖。.....	56
圖十六：TA-DLM 奈米藥物 TA 釋放曲線。.....	58
圖十七：585A1 iPS 細胞株誘導之肝細胞 MASLD 體外模型之生長情形。.....	60
圖十八：1535 No.1 iPS 細胞株誘導之肝細胞 MASLD 體外模型之生長情形。.....	61
圖十九：585A1 iPS 細胞誘導之肝細胞 MASLD 體外模型之 LDH 活性檢測結果。.....	64
圖二十：1535 No.1 iPS 細胞誘導之肝細胞 MASLD 體外模型之 LDH 活性檢測結果。.....	64
圖二十一：585A1 iPS 細胞誘導之肝細胞 MASLD 體外模型之尿素分泌量檢測結果。.....	67
圖二十二：1535 No.1 iPS 細胞誘導之肝細胞 MASLD 體外模型之尿素分泌量檢測結果。.....	67
圖二十三：585A1 iPS 細胞誘導之肝細胞 MASLD 體外模型之白蛋白分泌免疫螢光結果。.....	69

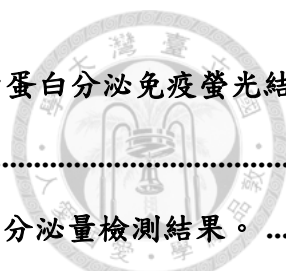


圖 二十四：1535 No.1 iPS 細胞誘導之肝細胞 MASLD 體外模型之白蛋白分泌免疫螢光結果。
..... 69

圖 二十五：585A1 iPS 細胞誘導之肝細胞 MASLD 體外模型之白蛋白分泌量檢測結果。 ... 72

圖 二十六：1535 No.1 iPS 細胞誘導之肝細胞 MASLD 體外模型之白蛋白分泌量檢測結果。
..... 72

圖 二十七：大鼠初代成熟肝細胞誘導之肝細胞 MASLD 體外模型之第一天生長情形。 74

圖 二十八：大鼠初代成熟肝細胞誘導之肝細胞 MASLD 體外模型之第二天生長情形。 74

圖 二十九：大鼠初代成熟肝細胞誘導之肝細胞 MASLD 體外模型之第四天生長情形。 75

圖 三十：大鼠初代成熟肝細胞 MASLD 體外模型之 DNA 含量檢測結果。 77

圖 三十一：大鼠初代成熟肝細胞 MASLD 體外模型之 LDH 活性檢測結果。 79

圖 三十二：大鼠初代成熟肝細胞 MASLD 體外模型之尿素分泌量檢測結果。 81

圖 三十三：大鼠初代成熟肝細胞 MASLD 體外模型之白蛋白分泌量檢測結果。 83

圖 三十四：大鼠初代成熟肝細胞 MASLD 體外模型之 IL-6 分泌量檢測結果。 85

圖 三十五：大鼠初代成熟肝細胞 MASLD 體外模型之脂質累積量檢測結果。 87

圖 三十六：小鼠體內 MASLD 模型預試驗體重數據。 90

圖 三十七：小鼠體內 MASLD 模型預試驗體重增長率數據。 90

圖 三十八：小鼠體內 MASLD 模型預試驗肝臟重量數據。 91

圖 三十九：小鼠體內 MASLD 模型預試驗肝重/體重比例數據。 91

圖 四十：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 H&E 組織切片染色結果。 93

圖 四十一：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 H&E 組織切片脂肪變性程度分析。 93

圖 四十二：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 Picro-Sirius Red 組織切片染色結果。 94

圖 四十三：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 AST 結果。 98

圖 四十四：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 ALT 結果。 98

圖 四十五：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 TG 結果。 99

圖 四十六：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 CHO 結果。 99

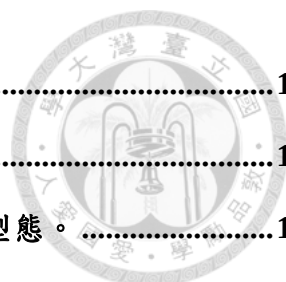


圖 四十七：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 HDL 結果。100

圖 四十八：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 LDL 結果。100

圖 四十九：小鼠體內 MASLD 模型主試驗小鼠外觀以及內臟、肝臟型態。103

圖 五十：小鼠體內 MASLD 模型主試驗體重數據。104

圖 五十一：小鼠體內 MASLD 模型主試驗體重增長率數據。104

圖 五十二：小鼠體內 MASLD 模型主試驗肝臟重量數據。105

圖 五十三：小鼠體內 MASLD 模型主試驗肝重/體重比例數據。105

圖 五十四：小鼠體內 MASLD 模型主試驗肝內三酸甘油酯含量數據。107

圖 五十五：小鼠體內 MASLD 模型主試驗 H&E 組織切片染色結果。109

圖 五十六：小鼠體內 MASLD 模型主試驗 H&E 組織切片脂肪變性程度分析。109

圖 五十七：小鼠體內 MASLD 模型主試驗 Picro-Sirius Red 組織切片染色結果。110

圖 五十八：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 AST 結果。113

圖 五十九：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 ALT 結果。113

圖 六十：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 CHO 結果。114

圖 六十一：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 TG 結果。114

圖 六十二：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 HDL 結果。115

圖 六十三：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 LDL 結果。115

圖 六十四：高密度與低密度聚乙二醇修飾於奈米粒子上的表現。125

表次

表一：健康以及 MASLD 患者 iPS 細胞株誘導成肝細胞之二維培養各階段培養液。.....	30
表二：一般飼料與高脂飼料營養成分表。.....	44
表三：小鼠體內 MASLD 模型預試驗血糖數據.....	97

第一章 緒論



1.1 前言

肝臟是脂肪的代謝器官，正常肝臟內約有 3-5% 重量的脂肪，但當血液帶入的脂肪酸量過多且消耗的速度在不成比例下，會導致過多脂肪堆積於肝臟；當造成肝臟脂肪重量超過整體器官之 5% 時，即屬於脂肪肝[1]。造成脂肪肝疾病的成因有許多，其中代謝失能相關脂肪肝病 (Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease; MASLD) 也就是原稱非酒精性脂肪肝病 (Nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD)，目前在全球盛行率約為 25-30%，是全球最常見的肝臟疾病[2]。隨著病程演進可能轉變為肝纖維化 (Liver fibrosis)、肝硬化 (Liver cirrhosis) 甚至是肝癌 (Hepatocellular carcinoma)[3]。此外，MASLD 亦是西方最常見之肝臟疾病，約占一般成年人的 20-30%；在肥胖、代謝症候群及糖尿病病人身上，盛行率更高達 70-90%。也因為 MASLD 與肥胖和代謝症候群有關，因此通常會藉由測量腰圍或推算 BMI 以作為預測 MASLD 的標的[4]。而在臨床診斷上，具侵入性且花費高的肝臟穿刺活組織檢查 (Liver biopsy) 仍為美國食品藥物管理局 (U.S. FDA) 唯一核准的檢驗方法。由於現今並無針對 MASLD 之有效藥物，因此目前針對 MASLD 患者的治療方針大多從患者原先之運動、飲食習慣著手。全球目前有數個針對 MASLD 之藥物開發的臨床試驗正在進行[5]。這些 MASLD 試驗中的藥物旨在減輕脂肪毒性和改善脂質積累、肝細胞損傷因子、死亡、肝硬化等相關機制；目前於臨床試驗中進展較快速的藥物則主要是針對脂質代謝 (如 Obeticholic acid, Elafibranor, Resmetirom)、發炎反應 (如 Selonsertib, Cenicriviroc) 或肝臟內纖維結締組織形成 (如 Emricasan) 之改善。但這些藥物目前在臨床試驗的結果仍無法證明其有效性[6]。因此，開發出對於 MASLD 有顯著回復效果、且與肝臟有高度生物相容性的奈米藥物，即為本研究主要目的。其中，藥物載體的選擇、藥物的標靶方式與包埋的藥物等說明如以下所示：

1. 以蛋白質為基底所做出的藥物載體被稱為蛋白質藥物載體 (Protein-based nanocarriers)，

近年來蛋白質藥物載體的發展十分快速，目前的技術已經可以根據所需要包埋的藥物規



格跟功能，量身訂做出指定大小的載體，進而控制藥物釋放的速率以提供持續療效之穩定性[7]。現今研究亦能利用表面醣蛋白之修飾做出組織特異性藥物傳遞的標靶型蛋白質藥物載體、甚至也能製作出如抗癌藥物或疫苗等其他種功能化的蛋白質微粒和奈米粒子等[8]。由於蛋白質藥物載體為生物可降解的材料，因此具有高度生物相容性，分解之後的產物也容易讓細胞所吸收[9]；而若將蛋白質藥物載體製成奈米級大小 (200 nm)，不但能進一步增加載體之表面積和滲透性之外、亦可以提高其在血液中之溶解度，使其能於體內更快地均勻分佈[10]而有助於細胞攝取速度的提升[11]。綜合以上所述，奈米化蛋白質藥物載體有望成為既安全又有效的藥物載體之潛在選項。

2. 脫細胞化肝臟間質 (Decellularized liver matrix; DLM) 已經被廣泛用於肝組織工程。脫細胞化 (Decellularization) 程序是在不影響到 Extracellular matrix (ECM) 的生化結構下，將肝臟內的細胞和血液以灌流方式洗去，利用蛋白質洗劑、核酸洗劑接續反覆的沖洗，最終只留下 ECM 的外間質部份[12]。經過脫細胞化後，原本的臟器的形狀和微血管網路都能夠完整保留，且其中還富含了肝臟再生所需的生長因子以及蛋白聚醣，因此可以將脫細胞化後的細胞支架在肝臟切除後的切口縫合，肝臟及可利用脫細胞化肝臟基質中的材料和微血管網路加速組織再生的速度，達到臟器重建 (Recellularization) 的效果[13]。脫細胞化的技術於近年來在生醫領域中蓬勃發展，目前已經被應用如血管[14]、肺[15]、心臟[16]等生物支架的製作。DLM 除去了血液和核酸因而降低了異種免疫反應，同時又具有高度生物相容性和足夠的機械強度[12]，除此之外亦能夠提供肝細胞喜愛的生存微環境，實為一種優良的肝組織工程之生物材料[17]。本研究擬使用 DLM 做為奈米化蛋白質藥物載體之基材，以期能夠最大限度的增加生物相容性以及降低免疫原性。
3. 單寧酸 (Tannic acid; TA) 因為具備抗氧化功能且能夠減緩發炎症狀[18]，先前研究也指出 TA 能夠消除自由基達到抗氧化的功效並抑制腫瘤生長[19]，另外，TA 對於四氯化碳 (Carbon tetrachloride; CCl₄) 誘導的肝纖維化小鼠亦具有顯著的肝臟保護作用[20]。更有研究說明 TA 能促進人類成骨細胞 hFOB 1.19 之增殖[21]。本實驗室繼往研究也證實了 TA 有促進正常肝細胞與肝前驅細胞維持機能的能力[22]、且具有讓受損肝細胞 (APAP-

injured hepatocytes and CCl₄-injured hepatocytes) 恢復其細胞生存率與細胞機能、且降低細胞毒性的功效[23]。修飾具有功能性分子的 TA 相信對於肝病治療極具潛力。

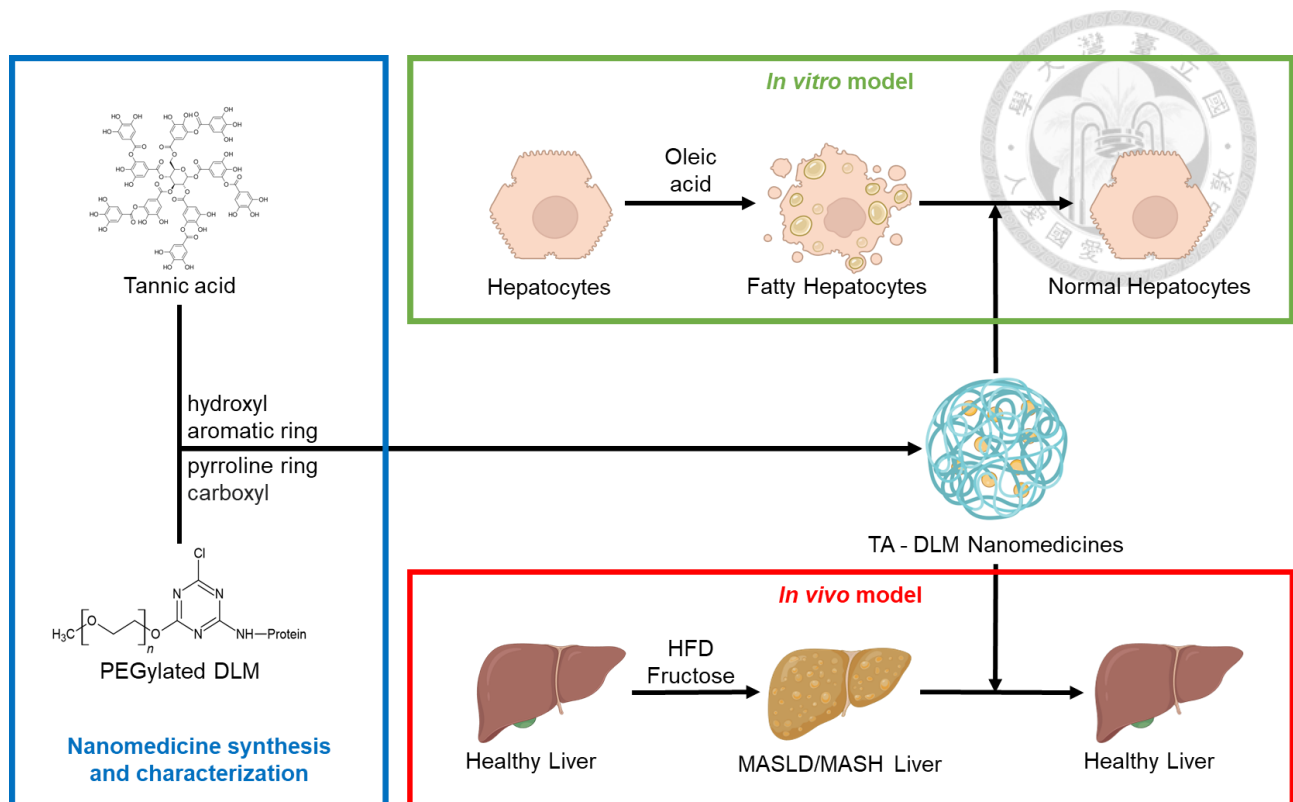
由於 MASLD 是多種成因造成代謝失衡所引發的肝臟疾病，因此除了肝功能之外也伴隨其他代謝組織功能異常。改善生活習慣 (如飲食、運動) 就成為了治療 MASLD 疾病的關鍵要素。然而遺憾的是，在藥物治療上仍無法在現今臨床試驗中獲得突破[6]。為此本研究主要針對 MASLD 提出一個新穎的治療方法：做法是將可在體內降解的天然自體性物質 DLM 進行聚乙二醇化 (PEGylation)：目的是運用聚乙二醇 (PEG) 來對 DLM 進行表面修飾以降低巨噬細胞對 DLM-based 奈米藥物的捕捉，最後再結合 TA 對於肝功能維持/促進的潛在功能，並透過 TA 與蛋白質的自組裝原理而形成一套以 DLM 為基底開發出新穎的奈米藥物 (TA-DLM nanomedicines)。由於目前尚未有相關文獻說明 TA 和 DLM 在 MASLD 治療中的具體效果，我們因此期許這種新型態的奈米藥物能作為未來治療 MASLD 疾病的潛在臨床選擇。



1.2 研究目的

由於「如何增加受損肝細胞的恢復能力和提升其肝機能」的議題已普遍受到重視。因此本研究主要針對受損肝細胞之恢復提出一個新穎的治療方法，本研究結合了藥物載體治療的概念和肝組織工程之研究，目的是合成出能夠增加受損肝細胞之恢復能力進而提升肝機能的奈米藥物。由於豬隻脫細胞化肝臟間質 (DLM) 與大鼠/小鼠肝臟成分相似而具有高度生物相容性[24]，我們因此希望進一步運用聚乙二醇 (PEG) 來對豬的 DLM 進行其表面修飾以降低巨噬細胞對 DLM-based 奈米藥物的捕捉，以期讓奈米藥物能精準的釋放到目標細胞。此外，我們更進一步使用能促進肝細胞再生的單寧酸 (TA) 作為奈米化蛋白質藥物載體內的包埋藥物，載體降解後其中的 DLM 由於內含豐富的蛋白質、醣類及生長因子等物質，不但能夠營造出肝臟細胞生長所需的微環境[25]，更預期能夠進一步提升受損肝臟細胞的恢復效果。相信這樣的藥物遞送策略在治療 MASLD 疾病中會有相當大的應用潛能。

本研究首先將從豬肝所萃取而來的天然自體性物質 DLM 進行聚乙二醇化 (PEGylation)，接著再利用 TA 和 DLM 中蛋白質的結合能力，製作出簡易且新穎的奈米藥物 (TA-DLM nanomedicines; TA-DLM Nms)，希冀能對於受損肝細胞的恢復效果與損害逆轉能有所助益，進而後續應用於脂肪肝病患者的受損肝臟回復。藉此，以「**脫細胞化肝臟間質為基底之奈米藥物應用於代謝失能相關脂肪肝病的治療**」將做為本研究之主題，其中：(1) 以脫細胞化肝臟間質為基底之奈米藥物的合成；(2) 以奈米藥物來提升脂肪肝模型中受損肝細胞之損害逆轉，將作為本研究的動機以及目標。圖一為本研究基本概念示意圖。



圖一：本研究基本概念示意圖。

第二章 文獻探討



2.1 MASLD/MASH 治療發展現況

目前全球尚無核准用於治療代謝功能障礙相關脂肪性肝炎 (MASLD/MASH) 的藥物[26]，而且在臨床診斷上，具侵入性且花費高的肝臟穿刺活組織檢查 (Liver biopsy) 為美國食品藥物管理局 (U.S. FDA) 唯一核准的檢驗方法[27]。為能改善 MASLD/MASH 藥物開發所面臨之困境，FDA 在 2018 年 12 月發表了針對開發治療非肝硬化但具肝纖維化之非酒精性脂肪肝炎患者藥物的規範草案 (Noncirrhotic Nonalcoholic Steatohepatitis with Liver Fibrosis: Developing Drugs for Treatment, Guidance for Industry)[28]。草案中提到，由於 MASLD/MASH 的高患病率及其相關病症的發病率、終末期肝病負擔的增加與肝臟器官移植的有限性，若能找出可減緩、停止或逆轉 MASLD/MASH 進展的治療方法，將能解決目前急迫的醫療需求。全球目前有數個針對 MASLD/MASH 藥物開發的臨床試驗正在進行[5]。MASLD/MASH 試驗中的藥物旨在減輕脂肪毒性和改善脂質積累、肝細胞損傷因子、死亡、肝硬化等相關症狀；而目前於臨床試驗中進展較快速的藥物則主要是針對脂質代謝、發炎或肝臟內纖維結締組織形成之改善[6]。下述先前試驗或正在試驗中的 MASLD/MASH 臨床試驗之藥物，但遺憾的是目前皆無法證明其有效性。

- Selonsertib

Selonsertib 也稱為 GS-4997，是由美國 Gilead Sciences 公司生產的凋亡訊息調節激酶 1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1; ASK1) 抑制劑。ASK1 能夠藉由活化激酶 JNK 與 p38 MAPK，調節肝臟星狀細胞活化與產生細胞因子，並參與細胞程式性死亡過程，抑制該過程有可能降低非 MASLD/MASH 患者的發炎及肝纖維化程度[29]，然而在臨床試驗二期未達到其預期療效[30]，因此其效果仍有待考證。

- Cenicriviroc

Cenicriviroc 是美國 Tobira Therapeutics 公司的一種 C-C motif chemokine receptor (CCR)

2/CCR5 的口服受體拮抗劑。當肝細胞受損時，庫氏細胞 (Kupffer cell) 會分泌 CCR2 的配體和 CCR5 的配體，分別刺激單核細胞 (Monocyte) 和淋巴細胞 (Lymphocyte) 在肝臟中聚集及成熟，並活化肝臟星狀細胞 (Hepatic stellate cells) 造成肝纖維化。因此，抑制 CCR2/CCR5 能夠降低肝臟星狀細胞的活化、減少肝臟發炎及纖維化的反應[31]。然而在抗纖維化的程度上並不如預期，雖說對於維持肝機能有一定程度的幫助，但在臨床上的應用仍有待改善[32]。

- Elafibranor

Elafibranor 也稱為 GFT505，是由法國 Genfit 公司所生產的雙重過氧化物酶體增植物激活受體 (Peroxisome proliferator-activated receptor; PPAR α/δ) 的活化劑。PPAR α 與 PPAR δ 為轉錄因子，可調節細胞的分化、發育與代謝，活化這些轉錄因子可改善 MASLD/MASH 中肝脂肪變性、發炎與纖維化。此外，Elafibranor 耐受性良好，不會引起體重增加或心臟問題，並且脂質/葡萄糖與全身性發炎的指標均降低[33]。然而，在臨床試驗中，除了發現血清肌酸酐 (Creatinine) 有增加的趨勢之外，由於該藥物無法在纖維化惡化的情況下達到 MASH 改善的效果，因此該藥物的臨床試驗也被中斷[34]。

- Obeticholic Acid

Obeticholic Acid 是由美國生技公司 Intercept Pharmaceuticals 所開發的的類法尼醇 X 受體 (Farnesoid X receptor; FXR) 的活化劑，為天然膽酸鵝去氧膽酸 (Chenodeoxycholic acid) 的半合成膽酸類似物。FXR 主要表達在腸道系統之中，在調節參與維持膽酸和膽固醇平衡的基因網絡中扮演重要的角色。另外，活化 FXR 能增加 FGF-19 分泌到小腸中，調節碳水化合物、脂質代謝和胰島素敏感性。在 Obeticholic Acid 的治療下，g-谷氨酰轉移酶 (g-glutamyltransferase)、丙胺酸轉胺酶 (Alanine aminotransferase) 與肝纖維化標誌物皆顯著降低，非酒精性脂肪肝病活性指數 (Nonalcoholic fatty liver disease activity score) 也得到顯著的改善[35]，但是患者可能出現搔癢症狀以及低密度脂蛋白 (Low-density lipoprotein) 升高的副作用[36]。



2.2 蛋白質奈米藥物

2.2.1 脫細胞化肝臟間質

肝臟的脫細胞化程序是在保持肝臟的生化結構不受影響的情況下，通過灌流蛋白質洗劑以及核酸洗劑方式洗去細胞和血液，只保留肝臟的外間質部份[12]。通過脫細胞化，肝臟的形狀和微血管網路得以完整保留，同時含有促進肝臟再生所需的生長因子和蛋白聚醣[13]。因此，可以將脫細胞化後的細胞支架應用於肝臟切除後的切口縫合，以加速組織再生，達到臟器重建的效果。脫細胞化技術在生醫領域得到了廣泛應用，如血管、肺、心臟等生物支架的製作[37, 38]。脫細胞化肝臟間質除去了血液和核酸，降低了異種免疫反應，同時具有高度生物相容性和足夠的機械強度，並提供肝細胞所需的生存環境。因此，脫細胞化肝臟間質是一種優質的肝組織工程材料。本研究將使用脫細胞化肝臟間質作為奈米化蛋白質藥物載體的基材，以提高生物相容性並降低免疫原性。在 DLM 物種的選擇上，根據過往研究顯示：豬的器官適合進行異種移植到人體，主要原因之一是它們在生理和解剖結構上與人體器官非常相似。豬的器官大小、功能和解剖結構與人類相似，使得豬的器官能夠在人體內正常運作，這減少了移植後功能失調的風險。此外，豬的白細胞抗原 (Swine Leukocyte Antigen; SLA) 與人類的白細胞抗原 (Human Leukocyte Antigen; HLA) 具有高度相似性。這種相似性有助於預測和管理移植過程中的抗體反應，從而提高移植成功的可能性。基於這些特點，豬成為異種移植研究中理想的器官來源，同時也作為合適的 DLM 物種來源[39]。

由於 DLM 的主要成分是膠原蛋白，在討論載體製備方法時，我們必須考慮如何利用膠原蛋白強大的自組裝特性來達到奈米化的目標。首先，我們探討膠原蛋白奈米化的成功案例：聚丙烯酸酯基聚合物可以透過增強膠原蛋白的穩定性以用於製造膠原蛋白奈米粒子。聚丙烯酸酯基聚合物是由丙烯酸酯和甲基丙烯酸酯聚合而成，是一種典型的兩親性嵌段共聚物，可以自組裝成核殼納米膠束。這些膠束可以與膠原蛋白結合，在較低的表面濃度下形成膠原蛋白奈米粒子，從而防止膠原蛋白在低表面濃度下展開，提高其穩定性[40]。儘管取得了顯著



的治療成果，但如何進一步修飾蛋白質載體 (如基於明膠的載體) 以實現可控性甚至多功能的藥物釋放，仍然是一大挑戰。

既往有研究顯示，透過乳化的方法可製備直徑約 3-40 微米的膠原蛋白微粒，並將其加入戊二醛溶劑中進行乳化交聯，能夠更好地製備出結構穩定的顆粒，且可以藉由不同變性條件的膠原蛋白來改變粒徑。近年的研究亦顯示，經聚乙二醇 (Polyethylene glycol; PEG) 表面修飾後的蛋白顆粒，通過奈米乳化技術可形成奈米級蛋白質載體，且在此過程中無需將蛋白質變性或添加額外的非天然交聯劑[41]。PEG 是常用於生物化學應用的兩性分子，其長鏈的立體結構能使分子之間相互隔開，減少蛋白質分子相互碰撞的機會，從而避免分子間再度交聯而聚集變大。此外，PEG 作為表面活性劑不僅降低了粒子間的凡德瓦力，也增加了粒子之間的排斥力。因此，經過 PEG 表面修飾的蛋白質藥物載體通常能夠將粒徑縮小至 50-200 nm。總體而言，PEG 表面修飾不僅能加強載體的機械性質，也能大幅提升載體在循環系統中的穩定性；除了延遲單核吞噬細胞系統 (Mononuclear phagocyte system; MPS) 的調理作用和攝取之外，亦延長其在血液循環中的時間，從而大幅提升藥物傳遞的效率。近年來，許多生物材料採用 PEG 進行表面修飾，奈米化蛋白質藥物載體經過 PEG 修飾後具備生物相容性和低免疫原性，PEG 對基材和包埋藥物也具有高度保護性質。這些特點使得未來生醫材料的開發有了更多的可能性與發展空間，這項技術也已廣泛受到臨床醫學的重視[42]。國際知名藥廠北極星藥業所研發的創新生物藥：PEGylated arginine deiminase (ADI-PEG 20)，是將精胺酸脫亞氨酶與聚乙二醇耦合後形成的。該藥物經肌肉注射後，能夠在人體內分解血液循環中的精胺酸。ADI-PEG 20 被應用於治療肝腫瘤，其作用機制包括增強胰島素敏感性、改善血脂異常，以及減少肥胖小鼠的肝脂肪，進而改善代謝紊亂。此外，ADI-PEG 20 也能促進全身性和肝細胞的自噬作用，從而影響能量平衡和代謝功能。在代謝性疾病模型中，肝細胞 FGF21 被證實介導了 ADI-PEG 20 對葡萄糖平衡和血脂異常的調節作用。該藥廠提出的研究顯示，ADI-PEG 20 能夠逆轉體重增加，改善胰島素敏感性，並降低食物誘導性肥胖小鼠的空腹血清甘油三酯、膽固醇和非酯化脂肪酸。最終，ADI-PEG 20 的治療效果通過肝細胞 FGF21 的介導，尤其在治療非酒精性脂肪肝 MASLD 方面具有潛在作用。總體而言，ADI-PEG 20 通

過促進自噬作用和調節精胺酸代謝，為解決 NAFLD 及相關代謝紊亂提供了有前景的新途徑 [43]。

由於本研究的首要目標為 DLM 的奈米化、同時也希望此製程能在未來有高發展性，在面對不同的功能化需求都能有所應對。而 PEG 因為有許多不同官能基所修飾的不同型態，因此可以根據目標修飾物來選擇反應基團型態，以利後續製備最適當的蛋白質藥物載體。



2.2.2 單寧酸 (Tannic acid; TA)

TA 又稱為鞣酸，屬於可水解單寧同源物的一種，為高等植物的代謝產物，是一種分子量介於 500~3000 且結構複雜的聚酚類 (Polyphenols) 化合物。TA 普遍存在於藥用植物與食用植物中，如：熊莓 (Bearberry)、旋果蚊子草 (Meadowsweet)、茶樹 (Camellia sinensis) 與葡萄 (Vitis) 等。目前 TA 已知具有抗氧化、促進膽固醇代謝，也具有抗病毒及抗菌特性以及良好的抗氧化能力[44]。除了具備優良的水溶性特徵之外、TA 在藥物應用中還具有賦形劑之功能[45]。TA 之低黏度及高生物相容性也是適合生醫應用的一項特色[44]。除此之外，TA 有抑制 Jak2/STAT3 的 pathway 以促進癌細胞凋亡的可能[46]。而在醫藥應用中，TA 在 CCl₄ 中毒模型的研究中顯示其具有降低細胞毒性的效果[47]。

先前提及有眾多文獻指出 TA 對於肝臟再生的益處、既往研究曾指出 TA 可能具有抗氧化和抗炎症的特性，這些對於 MASLD/MASH 患者之治療可能是有益的。然而針對 TA 與 MASLD/MASH 相關疾病模型的探討其實是會著重在 TA 是否降低細胞內脂肪堆積以及代謝路徑的阻斷方式。先前有文獻指出，兒茶素、花青素、白藜蘆醇等多酚類化合物對於以油酸 (Oleic acid; OA) 誘導成脂肪肝模型之 HepG2 細胞系有著降低細胞內脂肪堆積以及回復粒線體機能。此外該文獻也探討了可能作用的代謝路徑，認為多酚類得以加強粒線體的機能並加速 AMPK pathway 以達到加速脂質代謝的過程[48]。Chung et al. 亦指出 TA 是一種具有抗肥胖 (Anti-obesity effects) 的效果之 HAT inhibitor (HATi)。但儘管 MASLD/MASH 與代謝綜合症的組成部分：如肥胖、胰島素抵抗和血脂異常密切相關[49]，過去亦有一些初步的研究表明，TA 對於 MASLD/MASH 治療的潛在可能。然而 MASLD 與 TA 的關係目前還在研究階段，目前也尚未有足夠的證據支持 TA 在 MASLD 治療中的具體效果。而這也成為本研究需進一步探討的賣點與新穎性。



2.2.3 蛋白質與單寧酸之間的交互作用

日常飲食中會造成澀味的食物往往富含多酚類物質。雖然多酚類物質具有抗氧化的特性，被視為有益身體保健[50]，但這些多酚類物質會和人體的消化性酵素及食物中蛋白質結合，使得體內吸收蛋白質的效率降低，就營養學觀點來說，是個抗營養因子。然而人體唾液中的唾澀蛋白群可以吸附掉部份飲食中攝入的多酚類物質，如此一來攝入的食物中多酚類物質減少，人體相對就能夠從食物中吸收更多的蛋白質營養[51]。但是，唾澀蛋白群同時也是我們吃東西時感覺到澀味的主要來源。唾澀蛋白群含量約佔口腔腮腺所分泌蛋白量的 70%；有異於其他蛋白質，唾澀蛋白群本身不具摺疊立體結構，所以能輕易地以自由態的胜肽鏈和飲食中的多酚類物質互相纏繞形成複合體，並進而聚集產生不水溶的沉澱物。這些沉澱物會附著在舌頭和口腔壁上，使得唾液失去原有完整潤滑口腔的功能，由於口腔內的末梢神經感覺到壓力與觸覺，隨即傳遞訊號給大腦而引發澀味的感受[52, 53]。這種機制在演化上扮演的角色可能是保護且避免澀味物質直接碰觸到口腔黏膜。目前文獻指出多酚類物質和唾澀蛋白群之間的結合力主要分為兩種，分別為氫鍵作用力和疏水性作用力，多酚類物質的羥基團 (-OH) 會和唾澀蛋白群的羧基端 (-COOH) 產生氫鍵作用力[54]，而多酚類物質的芳香環會和唾澀蛋白群的脯氨酸之吡咯烷環 (Pyrrolidine ring) 產生疏水性作用力。因此多酚類物質可以分別和蛋白質、多醣類、核酸及某些生物鹼交互作用形成複合體[55]。

事實上，在其他生化研究中，TA 也表現出能和細胞中蛋白質作用、且具有改變蛋白質之表現量的潛力[56]。在早前的研究中，TA 與血清蛋白能結合並產生奈米等級之顆粒，對於藥物動力學應用也具有開發潛力[57]。TA 與蛋白質或礦物質混合會形成沉澱複合物，繼往文獻已經證明能透過離子對來降低化合物溶解度，使 TA 可以藉由奈米沉澱方法來製備奈米粒子 (10-100 nm)[58]。前人研究亦指出，肝臟的類洞內皮腔的孔洞 (Fenestration in sinusoidal endothelium) 大小約為 200 nm[59]，因此 TA 與蛋白質所形成的奈米粒子更容易藉由被動運輸 (Passive targeting) 的方式進入到肝細胞中。



2.3 明確的目標 (Specific Aims)

Specific Aims 1: 奈米藥物的合成與鑑定

本研究的第一個目標為開發以豬隻脫細胞化肝臟間質以及單寧酸為組成之奈米藥物。首先，將肝臟組織塊以浸泡的方式與 PBS, Triton X-100, SDS 溶液反應以去除血液、破壞細胞膜以及降解蛋白質，最後再以胃蛋白酶進行進一步的萃取以獲得脫細胞化完全之 DLM 樣品。接著是將 DLM 以及聚乙二醇透過三聚氰氯 (Cyanuric chloride) 將兩者接合後，利用 FT-IR 檢測其接合成功與否。最後將聚乙二醇化的 DLM (PEGylated DLM) 與單寧酸共溶於水中，便可獲得 TA-DLM 奈米藥物 (TA-DLM Nms)。後續會使用動態光散射粒徑分析儀 (Dynamic light scattering; DLS) 以及穿透式電子顯微鏡 (Transmission Electron Microscopy; TEM) 確認產物特徵。

Specific Aims 2: 將奈米藥物投入到體外 MASLD 模型中檢測其對肝細胞受損逆

轉之能力

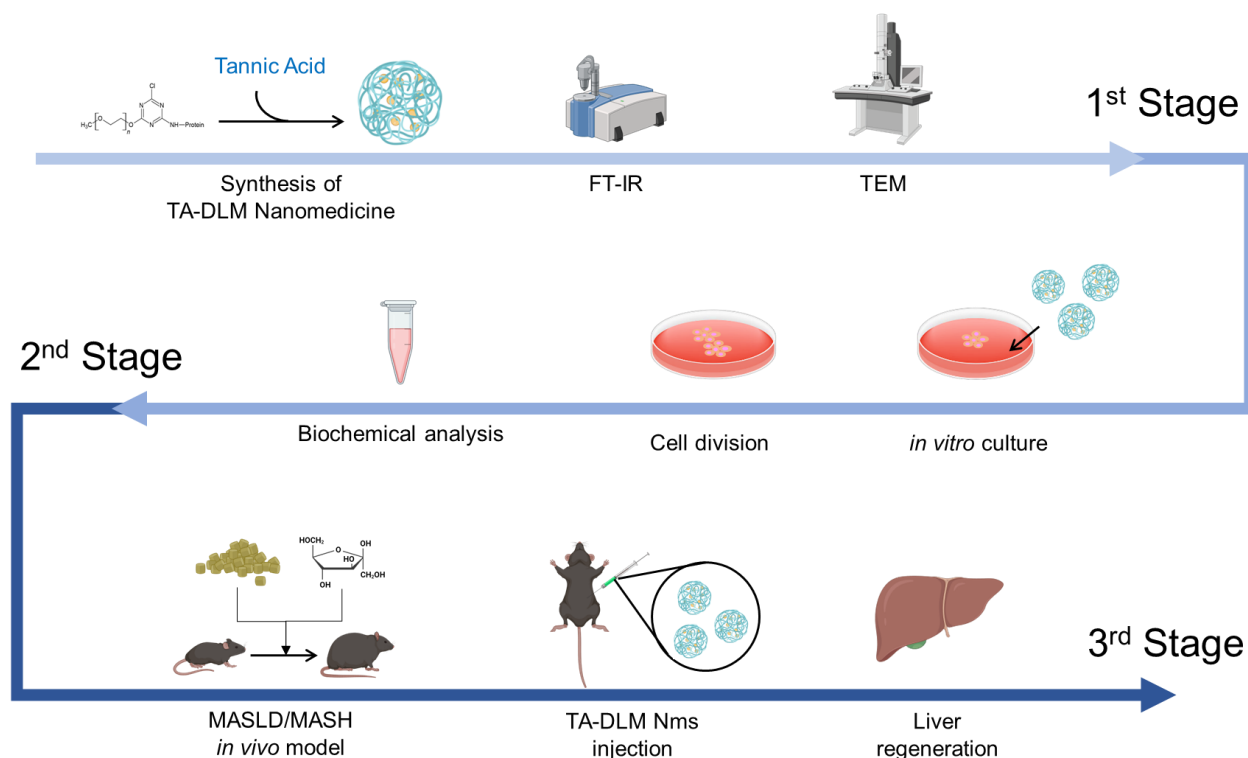
本研究的第二個目標為檢測 TA-DLM 奈米藥物在體外 MASLD 模型中對於肝臟細胞脂質堆積以及肝功能回復有著正向的影響。體外實驗分為兩種模型，第一種模型採用健康人類以及 MASH 病患的 iPS 細胞誘導之肝細胞，第二種模型採用大鼠初代成熟肝細胞，兩種模型皆使用油酸 (Oleic acid; OA) 將肝細胞誘導為脂肪肝細胞 (Fatty hepatocytes)，並使用不同濃度之 TA, DLM, TA-DLM Nms 檢測其對該模型之影響。透過觀察細胞盤內的細胞變化可以判斷測試物質是否有降低 hepatocytes ballooning 的能力，也可以透過 AdipoRed 螢光反應確認細胞內的脂質含量。在培養過程中同時會收集細胞上清液進行肝功能檢測的分析，如尿素、白蛋白等，進而判斷試驗物質對於肝功能回復的能力。



Specific Aims 3: 將奈米藥物投入到體內 MASLD 模型中檢測其對肝細胞脂質堆

積逆轉之能力

本研究的第三個目標為檢測 TA-DLM 奈米藥物在體內 MASLD 模型中對於肝臟脂質堆積、肝功能和全身性代謝能力是否具有正向的影響。體內實驗分為兩種模型：第一種模型為將 C57BL/6J 小鼠皮下注射鏈脲佐菌素 (Streptozotocin; STZ) 後，離乳後再持續餵食高脂飼料 (High fat diet; HFD) 誘導成 MASLD 模型，之後再進行不同濃度之 TA-DLM Nms 腹腔注射，以利檢測最佳的奈米藥物濃度；第二種模型為餵食 C57BL/6N 小鼠 HFD 以及果糖飲水誘導成 MASLD 模型，之後再分別腹腔注射 TA, DLM, 以及 TA-DLM Nms 以利檢測其三者對於 MASLD 模型的影響。實驗過程中會以心臟採血取得小鼠血清，以利進行後續生化分析；小鼠犧牲後則會將肝臟組織進行肝內之三酸甘油脂檢測以及組織切片，以利了解 TA-DLM Nms 是否能確實降低肝內脂質含量以及回復肝臟機能。



圖二：本研究進程示意圖。

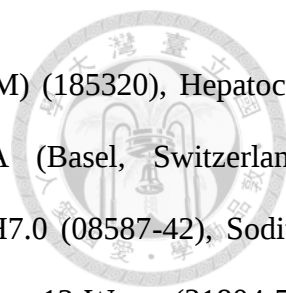
第三章 研究方法



3.1 實驗藥品、耗材、儀器設備與實驗動物

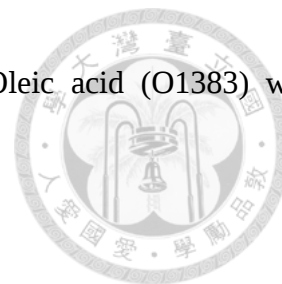
3.1.1 實驗藥品

AK02N medium (RCAK02N) was purchased from Ajinomoto (Tokyo, Japan). Triglyceride Assay Kit Quantification (ab65336) was purchased from abcam (Cambridge, UK). BD Matrigel Matrix Growth Factor Reduced (354230) was purchased from BD Biosciences (Franklin Lakes, New Jersey, USA). Rat Albumin ELISA Quantitation Set (E110-125) was purchased from Bethyl Laboratories (Montgomery, TX, USA). Urea Assay Kit (DIUR-100) was purchased from BioAssay Systems (Hayward, CA, USA). CHIR99021 (13122) was purchased from Cayman chemical (Michigan, United States). DNA Quantity Kit (PMC-AK06-COS) was purchased from COSMO Bio (Tokyo, Japan). 0.4 w/v% Trypan Blue Solution (207-17081), Collagenase (034-22363), Tannic acid (201-06332), Y-27632 (035-24593), Fibroblast Growth Factor (basic)(FGF-basic/bFGF/FGF2), Human, recombinant (154aa) (064-04541), Dexamethasone (047-18863) were purchased from FUJIFILM Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan). William's E medium (CC901-0500), DMEM/F12 medium (CC113-0500) were purchased from GeneDireX, Inc (Taoyuan, Taiwan). Penicillin-Streptomycin (15140122), Fetal bovine serum (26140079), Trypsin-EDTA (0.25%), Phenol red (25200072), B-27™ Supplement (50×), serum free (17504044), Advanced DMEM/F12 (12634028), Knockout serum replacement (10828028), L-glutamine (200mM) (25030-081). MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X) (11140050), Penicillin-Streptomycin (15140122), KnockOut™ DMEM (10829018) were purchased from Gibco (Grand Island, NY, USA). MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (M6494), Cell Viability Imaging Kit, Blue/Green (R37609), Rat IL-6 ELISA Kit (ERA31RB) were purchased



from Invitrogen (Waltham, MA, USA). Hepatocyte Basal Medium (HBM) (185320), Hepatocyte Culture Medium (HCM) (185389) were purchased from LONZA (Basel, Switzerland). Nicotinamide (24317-72), Albumin, Bovine Serum, Fatty Acid Free, pH7.0 (08587-42), Sodium chloride (31320-05), Potassium Chloride (28514-75), tri-Sodium Phosphate 12-Water (31804-75), di-Sodium Hydrogenphosphate 12-Water (31723-35), Sodium Dodecyl Sulfate (31607-65), Sodium hydroxide (31511-05), Phenol red (26807-21), Tris(hydroxymethyl)aminomethane (35406-75), Molecular Sieves 4 Å 1/16 (04172-95), Sodium Carbonate (31310-35), Sodium Tetraborate Decahydrate (31223-85), RPMI 1640 with L-Gln (30264-56), 2 - Propanol (29113-95) were purchased from Nacalai (Kyoto, Japan). iMatrix-511 silk (892021) was purchased from Nippi (Yokohama, Japan). Cellmatrix Type I -A (Collagen, Type I, 3 mg/mL, pH 3.0) was purchased from Nitta Gelatin (Osaka, Japan). Isoflurane was purchased from Panion & BF Biotech (Taipei, Taiwan). Recombinant Human Activin A (GMP120-14E), Recombinant Human Oncostatin M (300-10) were purchased from PeproTech (Cranbury, New Jersey, USA). Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (204001) was purchased from QIAGEN (Hilden, Germany). Recombinant Human FGF-4 Protein (235-F4), Recombinant Human HGF Protein (294-HG), Recombinant Human BMP-4 Protein (314-BP) were purchased from R&D (Minneapolis, Minnesota, USA). RNase, DNase-free (11119915001) was purchased from Roche (Basel, Switzerland). Lactate dehydrogenase activity assay kit (MAK066), glutaraldehyde solution (50% in H₂O) (340885), Triton X-100 (X-100), Dimethyl sulfoxide (D4540). Hydrochloric acid (320331), Urethane (U2500), L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate (A8960), L-Proline (P0380), Dexamethasone (D4902), PeroxiDetect™ Kit (PD1), Dimethyl sulfoxide (D5450), Pepsin from porcine gastric mucosa (P7000), Acrylamide/Bis-acrylamide, 30% solution (A3699), Glycine (410225), Ammonium sulfate (A4915), Methanol (179337), Bromophenol Blue (B0126), 2-Mercaptoethanol (M3148), Poly(ethylene glycol) methyl ether (202509), Cyanuric chloride (C95501), Benzene (anhydrous, 99.8%) (401765), Hexane (139386), Dichloromethane (D65100), Formaldehyde solution (252549),

HEPES (H3375), Retinoic acid (R2625), Sodium butyrate (B5887), Oleic acid (O1383) were purchased from Sigma-Aldrich (Munich, Germany).





3.1.2 實驗耗材

96-well ELISA plate (ELISA-PS-96F-F-H) was purchased from Advangene (Lake Forest, IL, USA). Blood collection tubes (367815), EDTA Tubes (367835), Heparin Tubes (367884) were purchased from BD Biosciences (Franklin Lakes, New Jersey, USA). 15 mL sterilized centrifuge tube (430052), 50 mL sterilized centrifuge tube (430290), 10 mL Polystyrene Sterile Serological Pipets (4488), 50 mL Polystyrene Sterile Serological Pipets (4500), TC-Treated 24 Well Plates (3527), 60 mm TC-treated Culture Dish (430166), 70 μ m Cell Strainer (352350), 100 μ m Cell Strainer (352360), 5 mL Round Bottom Polystyrene Test Tube, with Cell Strainer Snap Cap (352235) were purchased from Corning (Corning, New York, U.S.). Filter Unit (0.45 μ m) (SLHP033R), Filter Unit (0.22 μ m) (SLGV033R) were purchased from Millipore (Burlington, Massachusetts, USA). 200 mesh (01800-F) was purchased from Pentad Scientific (Hsinchu, Taiwan). 1.5 mL micro-centrifuge tubes (SMB-M1510-LRC), 0.5 mL micro-centrifuge tubes (SMB-M0510-C) were purchased from StarMoonBio (New Taipei, Taiwan). Tissue Culture Plates 24 well, Surface Treated (10062-896) were purchased from VWR International (Radnor, Pennsylvania, USA).



3.1.3 實驗儀器設備

Standard-Level Analytical Balances (HR-250AZ) was purchased from A&D (Tokyo, Japan). Tetra Handcast Systems (1658000FC) was purchased from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Light microscope (Axio Vert. A1) was purchased from Carl Zeiss AG (Oberkochen, Germany). Gravity Convection Oven (DS30), constant temperature water tank (G-10) were purchased from DENG YING (New Taipei, Taiwan). Centrifuge (5810R), Pipettes (20-200 μ L, 0.1-2.5 μ L, 100-1000 μ L) (3123000055, 3123000012, 3123000063) were purchased from Eppendorf (Hamburg, Germany). Fluorescence lamp illuminators (X-Cite 120Q) was purchased from EXCELITAS (Pittsburgh, PA, USA). Autoclave (SS-50E) was purchased from Ezmedica (New Taipei, Taiwan). Orbital Shaker (S101) was purchased from FIRSTEK (New Taipei, Taiwan). Zeta potential and particle size analyzer (SZ-100) was purchased from Horiba (Kyoto, Japan). Fluorescence spectrometer (FP-8300), UV/Vis spectrophotometer (V-530) were purchased from JASCO (Tokyo, Japan). Field Emission Transmission Electron Microscope (JEM-2100F) was purchased from JEOL (Tokyo, Japan). Precision digital quantitative peristaltic pump (DPH01) was purchased from LEFO SCIENCE (Taipei, Taiwan). Ultrasonic cell crusher (Q125-110) was purchased from Qsonica, LLC (Newtown, CT, USA). Automatic biochemical analyzer (Cobas c111) was purchased from Roche (Basel, Switzerland). Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (IRAffinity-1S) was purchased from SHIMADZU (Kyoto, Japan). Absorbance microplate reader (Sunrise) was purchased from Tecan (Mannedorf, Switzerland). -20 °C refrigerator (RL1517W) was purchased from TECO (Taipei, Taiwan). Incubator (370), pure water production equipment (50132373) were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).



3.1.4 實驗動物

Sprague Dawley (SD) 大鼠、C57BL/6N 小鼠購於樂斯科生物科技股份有限公司；C57BL/6J 小鼠購於國家實驗動物中心。1947 年美國 Jackson Laboratory 從 Dr, Little 引進 C57BL/6 小鼠進行培育，命名為 C57BL/6J，其中的“J”意思為 Jackson Laboratory；1951 年，美國國立衛生研究院 (National Institute of Health; NIH) 從 Jackson Laboratory 引入了第 32 代 C57BL/6J 並形成了亞種 C57BL/6N，其中的“N”意思為 National Institute of Health。本研究涉及實驗動物使用由台灣大學實驗動物照護及使用委員會所認可，而實驗者擁有台灣大學 A (實驗場所安全衛生管理訓練), B (危害通識訓練), D (生物安全訓練) 的教育訓練合格證書以及實驗動物使用者訓練課程證書，證書號碼：A (GNE1110162), B (HNE1110137), D (BNE1110943)、實驗動物使用者訓練課程證書 (111 台實動訓字第 30 號)。本研究進行之動物實驗已經由國立臺灣大學實驗動物照護及使用委員會審查並批准許可 (IACUC 批准號碼：NTU-112-EL-00219)。



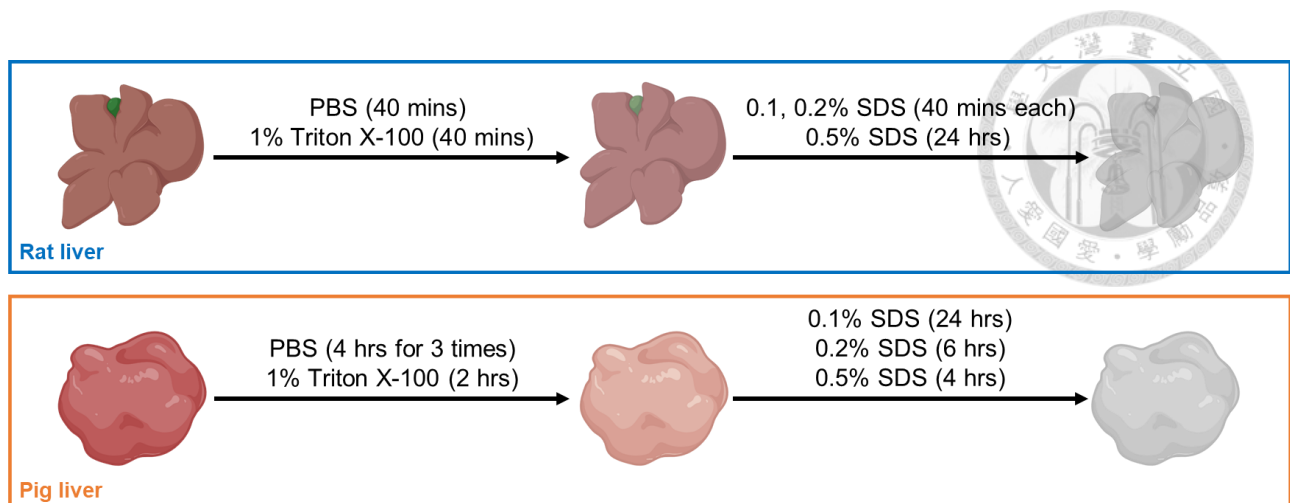
3.2 脫細胞化肝臟間質 (DLM) 之製備

3.2.1 大鼠肝 DLM 之製作流程

脫細胞化肝臟間質 (DLM) 的預實驗使用雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠肝臟，並由肝門靜脈以灌流方式進行脫細胞處理。首先將 18G 留置針以 6-0 手術線固定於肝門靜脈，並接上蠕動幫浦調整流速至 12 mL/min；接著灌流 500 mL PBS + 1% PS 溶液去除肝臟內的殘餘血液，開始灌流的同時剪斷下腔靜脈讓洗去的血液和組織排出。灌注約 40 分鐘後，下一步將肝臟和留置針移出體外放置於 15 cm dish 上，接上幫浦後依序灌流 500 mL 1% Triton X-100, 0.1% SDS 和 0.2% SDS (每一種溶液灌流約 40 分鐘)；接著以 0.5% SDS 以回流方式灌流 6-8 小時至 DLM 呈現白色透明，最後再以 500 mL PBS + 1% PS 沖洗除去殘留洗劑，即可得到脫細胞化完全的 DLM。脫細胞化完全的 DLM 在經過冷凍乾燥後即可放置於 4 °C 保存，製作流程圖如圖三所示。

3.2.2 豬肝 DLM 之製作流程

製備脫細胞化肝臟間質 (DLM) 的實驗使用市售豬隻之肝臟。首先將肝臟切成小塊並切碎，接著將其浸泡於 PBS 中，每隔 4 小時更換一次 PBS 並重複三次；下一步將豬肝組織換液至 1% Triton X-100 水溶液並浸泡 2 小時；接著將豬肝組織依序換液於不同濃度的十二烷基硫酸鈉 (Sodium dodecyl sulfate; SDS) 水溶液，分別為 0.1%, 0.2%, 0.5%，浸泡時間則分別為 24 小時、6 小時以及 4 小時。最後再浸於二次水沖洗 30 分鐘以去除殘餘溶液並利用冷凍乾燥去除水分即可得到豬肝 DLM, 此時 DLM 會呈現白色透明狀並保存於 -20 °C 冰箱備用，製作流程圖如圖三所示。



圖三：大鼠肝臟以及豬隻肝臟 DLM 製作流程圖。



3.2.3 豬肝 DLM 之萃取流程

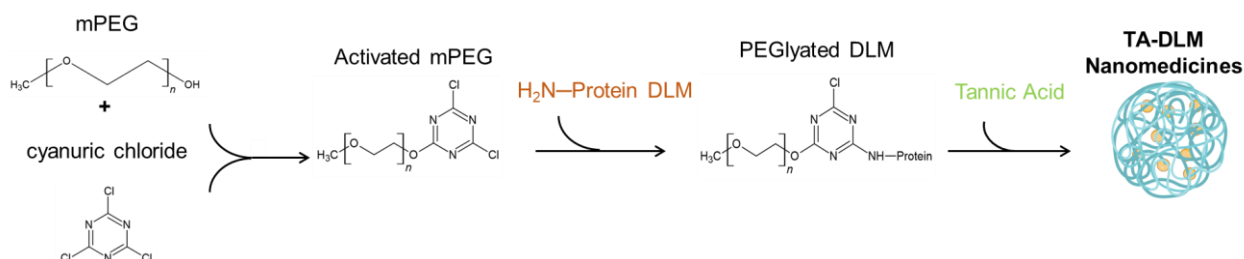
首先，將 3.2.1 節製作之豬肝 DLM 以最終濃度為 10 mg/mL 溶於 0.5 M 醋酸中，同時加入最終濃度為 3 mg/mL 的胃蛋白酶 (Pepsin)，然後將此溶液在 4 °C 下攪拌 80 小時。此萃取的目的是保持 DLM 的完整結構，為避免其過度降解為多肽鏈，因此反應在 4 °C 下進行。在 80 小時過後，將溶液移置室溫下繼續反應 4 小時。當萃取完成後，將未溶解的 DLM 過濾並使用 1 N 的 NaOH 來調整 pH 值至 9，以使 Pepsin 失活並停止反應。接著將樣品放入冷凍乾燥機在 -50 °C, 20 Pa 的環境下進行冷凍乾燥持續 48 小時，最後將樣品保存於 -20 °C 環境下備用。



3.3 奈米藥物之製作流程與分析

3.3.1 奈米藥物之合成

DLM 之聚乙二醇化 (PEGylation) 主要分成三個部分：(1) mPEG activation, (2) DLM PEGylation 以及 (3) PEGylated DLM 與 TA 之結合。(1) mPEG activation：首先將 2 g mPEG (mol.wt. : 2000 g/mol), 550 mg cyanuric chloride, 1 g molecular sieve (4 Å), 1 g Na₂CO₃ 與 40 mL 苯 (Benzene) 在錐形瓶中於室溫中持續攪拌反應 16 小時。利用濾紙過濾瓶內溶液後，將 60 mL 正己烷 (Hexane) 緩慢滴入攪拌中的溶液，以 4000 rpm, 4 °C 離心 15 min, 使產物沉澱析出，再以 40 mL Benzene 回溶後將產物離心沉澱析出，重複此清洗步驟直到未反應的 cyanuric chloride 完全去除，最後將純化後的產物 (activated mPEG) 減壓乾燥去除 Benzene 以及 Hexane 並保存於 -20 °C 環境中；(2) DLM PEGylation：將 7 μmol DLM, 1 mmol activated mPEG 溶至 20 mL borate buffer (0.1M, pH 10.0) 中以 40 °C 持續攪拌反應 2 小時，再將 pH 值調整為 6.0 以中止反應；接著將 phosphate buffer (pH 6.0) 作為透析液，以 12-14 kDa 的透析袋透析 24 小時，以除去未反應之 activated mPEG, 最後將產物 (PEGylated-DLM) 冷凍乾燥後保存於 -20 °C 環境中；(3) PEGylated DLM 與 TA 之結合：將 PEGylated-DLM 以及 TA 混合於水溶液後並使用 0.45 μm cell strainer 過濾後，冷凍乾燥後即可得到由 PEGylated-DLM 以及 TA 自組裝而形成之奈米藥物。圖四為 PEG 活化、DLM 聚乙二醇化以及與 TA 結合的反應機制。



圖四：PEG 活化、DLM 聚乙二醇化以及與 TA 結合的反應機制。



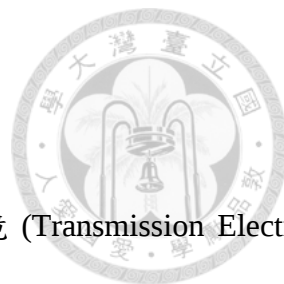
3.3.2 FT-IR 之圖譜分析

為了確保 DLM 之聚乙二醇化修飾成功，因此使用傅立葉轉換紅外光譜儀 (Fourier-transform infrared spectroscopy; FTIR) 檢驗是否在修飾過的 DLM 上有著聚乙二醇的表現[60]。量測方法如下：由於 KBr 在 FTIR 儀中不會有任何波段表現因此可以做為量測溶劑，量測前需要將樣本和 KBr 以 1:50 (w/w) 的比例混合。設定參數如下：量測模式為 Transmittance，掃描波段為 $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ ，scan 次數為 45 次，resolution 為 8 cm^{-1} 。最後將樣品量測三次並取三重複之平均值即為 FTIR 結果。

本次實驗配置 DLM, PEGylated-DLM 兩種樣品，依照這些分子中吸收紅外光的波段異同來判斷 DLM 的表面修飾是否成功。

3.3.3 奈米載體的粒徑分析

為了瞭解本研究所合成之奈米藥物尺寸大小，因此使用動態光散射粒徑分析儀 (Dynamic light scattering; DLS) 進行量測。在粒徑分析部分是先將樣品融入 PBS 中來分散樣品再以雷射照射含有待測粒子的溶液，由於粒子的布朗運動會造成散射光強度的變化，經過修正函數的處理之後，即可套用 Stokes-Einstein 公式得出待測物的水合直徑 (Hydrodynamic diameter)[11]。



3.3.4 TEM 拍攝並觀察奈米藥物型態

為了進一步驗證本研究的合成結果，實驗使用穿透式電子顯微鏡 (Transmission Electron Microscopy; TEM) 來觀察奈米載體的表面型態[61]。透過 TEM 的拍攝結果，可以直接確認此載體的大小是否均一，透過上述的檢測即可進一步證實其表面修飾是否完全。

使用 TEM 的準備如下：(1) 樣品先以二次水透析後再經過 0.45 μm 的針筒過濾器過濾；(2) 抽取 10 μL 的溶液滴至鍍碳銅網上，靜置大約 20 分鐘使粒子沉降到銅網上，接著以濾紙從下方吸去水分後靜置乾燥，若樣品濃度過低可以重複上樣品 (因為有時候樣品沉降到銅網上的數量過少，重複上樣品可以更容易觀察到)；(3) 最後將準備好的 sample 裝入盒子中即可送至臺灣大學貴重儀器中心拍攝 TEM。



3.3.5 TA-DLM 奈米藥物單寧酸釋放量檢測

在完成對 TA-DLM 奈米藥物的粒徑大小以及型態分析後，我們便進行藥物釋放的測試，確保 TA-DLM 奈米藥物確實具備釋放單寧酸的能力以及了解 TA-DLM 奈米藥物所攜帶的單寧酸含量。本研究將 0.5 mg/mL 以及 1 mg/mL 的 TA-DLM 奈米藥物溶於 PBS 中，將該溶液置於 12-14 kDa 的透析袋中並在燒杯中以 37 °C 的環境下進行透析，並分別在透析後第 0, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60, 72 取樣燒杯內的 PBS 進行單寧酸濃度的檢測分析，再換算成 TA-DLM 奈米藥物釋放了多少濃度的單寧酸。

單寧酸濃度檢測方法採用 Folin-Ciocalteu 方法檢測，檢測方法如下：首先將 2 M Folin-Ciocalteu 與去離子水以 1:10 的比例配置成 Folin-Ciocalteu 溶液，接著將 250 μ L 樣品與 1 mL Folin-Ciocalteu 溶液混合後等待 5 分鐘，5 分鐘後再加入 1 mL 10% Na_2CO_3 水溶液，最後利用分光光度計量測其在 765 nm 之吸光值。將吸光值帶入檢量線後便可得知樣品單寧酸濃度 [62]。



3.4 誘導型多功能幹細胞誘導成肝細胞後之體外培養

3.4.1 健康人類與非酒精性脂肪肝病患之誘導型多功能幹細胞之繼代培養

本次實驗所採用的誘導型多功能幹細胞系 (induced pluripotent stem cell; iPS) 為由京都大學 iPS 細胞研究所長船健二教授實驗室所提供的 585A1 健康人類 iPS 細胞株以及 1535 No.1 非酒精性脂肪肝病患 iPS 細胞株。當兩種細胞培養到第三或第四天時 (細胞數量成長到覆蓋該細胞盤 70% 至 80% 面積時)，即可進行繼代到另一新孔盤中、以利後續培養或分化使用。首先需配置 AK02N 培養液：AK02N 培養液組合含有 A, B, C 三種溶液，A 液為含有 21 種胺基酸、10 種維生素之培養液；B 液為含有五種礦物質之溶液；C 液為鹼性成纖維細胞生長因子 (Basic fibroblast growth factor; FGF2)；將 AK02N 組合中的 B 液與 C 液進行混合後，再將 B, C 混合液加入 A 液中，以鋁箔紙遮光後放置於室溫中 1 小時備用。接著將培養於 6 well 之 5851A1 從培養箱中取出，抽乾盤內培養液後，以每孔 2 mL 加入 EDTA 等待約 1 分鐘後，便可將 EDTA 抽出。接著每孔加入 200 μ L 之 EDTA 以及 Trypsin 混合液 (1:1)，放入培養箱中培養 3 分鐘。3 分鐘後將細胞盤放於顯微鏡下觀察，假使細胞脫附情形不佳，便再進行 1 分鐘培養箱反應。反應結束後，抽乾 EDTA/Trypsin 混合液後再每孔加入 2 mL PBS 並輕搖細胞盤。結束後抽乾 PBS 後再每孔加入 1 mL 之 AK02N 以及 Y27632 混合液 (1000:1)。使用較強力度的 Pipetting 將盤中的細胞打散成單一細胞，並懸浮於培養液中。在顯微鏡下觀察打散程度是否完全後，即可收集各盤中細胞懸浮液到一新離心管中。利用細胞計數器量測該細胞懸浮液濃度後，以 AK02N 以及 Y27632 混合液 (1000:1) 配置新細胞懸浮液 (細胞密度： 1×10^5 cells/mL)。接著在新細胞懸浮液中加入欲繼代孔數 $\times$ 2 μ L 之 iMatrix-511 silk. 最後以每孔 2 mL 之體積加入細胞懸浮液進行培養。1535 No.1 細胞株繼代方式同上述方法。



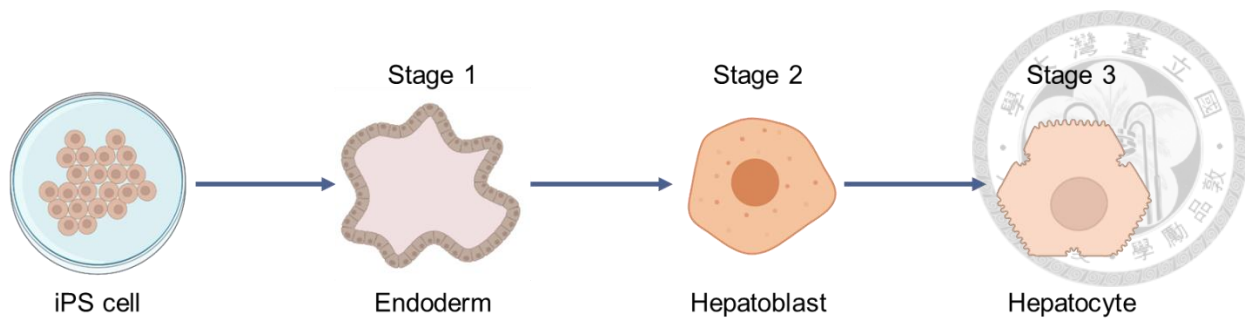
3.4.2 誘導型多功能幹細胞分化成肝細胞之二維培養方式

在進行肝細胞分化實驗前一天需要先進行 matrigel 塗覆於細胞盤之前置作業。首先取 10 mL 之 RPMI 1640 培養液於一新離心管中，再取其中 400 μ L 與 400 μ L 的 matrigel matrix 充分混合後再加入原先離心管中再充分混合。接著以每孔 500 μ L 加入 24 well 細胞盤中再以保鮮膜包覆完整後放入 4 $^{\circ}$ C 環境中過夜。根據文獻回顧，誘導型多功能幹細胞分化成肝細胞之二維培養有三個階段[63]：

第一階段為從 iPS 細胞株分化成內胚層 (Endoderm)：首先將 matrigel 塗覆之細胞盤拆封保鮮膜後放入培養箱中備用。接著配置 Stage 1 base 培養液：48.5 mL RPMI 1640 培養液 + 1 mL B-27 supplement + 0.5 mL Penicillin-Streptomycin。以 Stage 1 base 培養液為基礎再配置 Stage 1 Day 0 培養液：12.5 mL Stage 1 base medium + 125 μ L Activin A + 1.25 μ L CHIR99021 + 12.5 μ L Y27632。使用與 3.4.1 節提及之繼代手法得到 585A1 細胞懸浮液後，以細胞計數器量測該細胞懸浮液濃度再抽取所需細胞懸浮液量並以 800 rpm, 23 $^{\circ}$ C, 離心 3 分鐘。離心結束後抽取上清液再加入 Stage 1 Day 0 培養液以配成新細胞懸浮液 (細胞密度： 6×10^5 cells/mL)。將 matrigel 塗覆之細胞盤從培養箱中取出，抽取內部 matrigel 與 RPMI 1640 混合液後，最後以每孔 500 μ L 之體積加入細胞懸浮液可進行第一階段的培養。第一階段共有五天的分化時間，每天所需之培養液內容如表一所示。

第二階段為內胚層分化為肝母細胞 (Hepatoblast)。首先需配置 Stage 2 base 培養液：38.4 mL Knockout DMEM + 10 mL KSR + 500 μ L L-glutamin (200mM) + 500 μ L MEM-NEAA + 100 μ L 2-Mercaptoethanol + 250 μ L Penicillin-Streptomycin + 500 μ L DMSO。第二階段共有五天的分化時間，每天所需更換之培養液內容如表一所示。

第三階段為肝母細胞分化為肝細胞 (Hepatocytes)。第三階段共有四天的分化時間，每兩天所需更換之培養液內容如表一所示。1535 No.1 細胞株誘導成肝細胞之二維培養方式同上述方法。上述誘導型多功能幹細胞分化成肝細胞之二維培養方式之三個階段如圖五所示。



圖五：iPS 細胞分化成肝細胞之二維培養方式之三階段。

表一：健康以及 MASLD 患者 iPS 細胞株誘導成肝細胞之二維培養各階段培養液。

Stages	Day	Culture medium formula
Stage 1	Day 0	12.5 mL Stage 1 base medium + 100 ng/mL Activin + 1 μ M CHIR + 0.5 mM NaB(+/-)
	Day 1	12.5 mL Stage 1 base medium + 100 ng/mL Activin + 1 μ M CHIR
	Day 2	12.5 mL Stage 1 base medium + 100 ng/mL Activin + 1 μ M CHIR
	Day 3	12.5 mL Stage 1 base medium + 100 ng/mL Activin + 1 μ M CHIR
	Day 4	12.5 mL Stage 1 base medium + 100 ng/mL Activin
	Day 5	12.5 mL Stage 2 base medium + 10 ng/mL FGF2 + 20 ng/mL BMP4
Stage 2	Day 1	12.5 mL Stage 2 base medium + 10 ng/mL FGF2 + 20 ng/mL BMP4
	Day 2	12.5 mL Stage 2 base medium + 10 ng/mL FGF2 + 20 ng/mL BMP4
	Day 3	12.5 mL Stage 2 base medium + 10 ng/mL FGF2 + 20 ng/mL BMP4
	Day 4	12.5 mL Stage 2 base medium + 10 ng/mL FGF2 + 20 ng/mL BMP4
	Day 5	12.5 mL HCM + 20 ng/mL OsM + 20 ng/mL HGF
Stage 3	Day 2	12.5 mL HCM + 20 ng/mL OsM + 20 ng/mL HGF
	Day 4	12.5 mL HCM + 20 ng/mL OsM + 20 ng/mL HGF

- Stage 1 base medium: 48.5 mL RPMI 1640 medium + 1 mL B-27 supplement + 0.5 mL Penicillin-Streptomycin
- Activin: Activin A
- CHIR: CHIR99021
- NaB(+/-): Sodium butyrate
- Stage 2 base medium: 38.4 mL Knockout DMEM + 10 mL KSR + 500 μ L L-glutamin (200 mM) + 500 μ L MEM-NEAA + 100 μ L 2-Mercaptoethanol + 250 μ L Penicillin-Streptomycin + 500 μ L DMSO
- FGF2: Basic fibroblast growth factor 2
- BMP4: Bone Morphogenetic Protein 4
- HCM: Hepatocyte Culture Medium
- OsM: Oncostatin M
- HGF: Hepatocyte Growth Factor



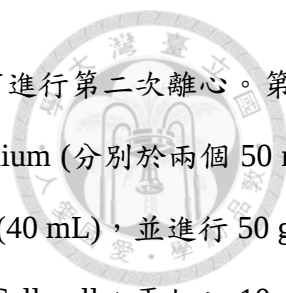
3.5 大鼠初代肝細胞培養

3.5.1 大鼠初代成熟肝細胞採取與培養

首先在大鼠肝臟採取部分使用 6-8 周雄性 SD 大鼠，將其放置於 5% 異氟醚 (Isoflurane) 的麻醉盒中進行氣體麻醉；待其進入第三期麻醉後，便可開始開腹。接著使用 24G 留置針從肝門靜脈插入，進行 Seglen 於 1976 年開發的 two-step collagenase perfusion[64]，此步驟完全清洗肝臟內的血液並初步降解肝臟組織。灌流過程中，先使用 80 mL 的 Buffer A 將大部分肝臟內的血液洗出，再使用 60 mL 含有 66 mg collagenase 的 Buffer B 進行灌流。Buffer A 和 Buffer B 的配方如下：

- Buffer A (16.013 g NaCl, 0.805 g KCl, 0.156 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.301 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 4.766 g HEPES, 0.012 g Phenol red, 0.353 g NaHCO_3 , 0.190 g EGTA, 0.901 g Glucose 溶於 2 L 的二次水，並使用 1 N 的 NaOH 調整 pH 值在 7.2-7.4 之間)。
- Buffer B (16.013 g NaCl, 0.805 g KCl, 0.156 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.301 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 4.766 g HEPES, 0.012 g Phenol red, 0.353 g NaHCO_3 , 溶於 2 L 的二次水，並使用 1 N 的 NaOH 調整 pH 值為 7.5)。

初代成熟肝細胞的分離步驟如下：在灌流結束後從大鼠體內取出肝臟後，將其放置在直徑為 90 mm 的培養皿中，並浸泡於含有 1% Penicillin-streptomycin 的 WE 培養基中。然後，使用解剖刀以平行下刀的方式將肝臟組織分解，以利形成肝細胞懸浮液，並使用適當的 pipetting 將肝細胞懸浮液混合均勻。之後再吸取肝細胞懸浮液以 7 cm × 7 cm 的消毒紗布過濾並收集至兩管 50 mL 的離心管中，重複進行上述動作直到肝臟組織大致被切碎為止。接著使用 100 μm 的 filter 過濾上述收集到的肝細胞懸浮液至新的兩管 50 mL 的離心管中 (約可收集到 20-30 mL 肝細胞懸浮液/每管)，不足額的量再以 WE medium 添加至肝細胞懸浮液中直到總量為 30-40 mL 肝細胞懸浮液/每管為止。我們接著再以 50 g, 4 °C, 1 min 的條件下將上述收集完成的兩管肝細胞懸浮液進行第一次離心。去除上清液後，接著再加入 30-40 mL 的



WE medium 至離心管並均勻混合後，再以 50 g, 4 °C, 1 min 的條件下進行第二次離心。第二次離心完留下的初代成熟肝細胞沉澱物再分別加入 20 mL 的 WE medium (分別於兩個 50 mL 的離心管中) 並均勻混和，最後再將兩管的肝細胞懸浮液整合為一管 (40 mL)，並進行 50 g, 4 °C, 1 min 的第三次離心。最後第三次離心完後所留下的成熟肝細胞 Cell pellet 再加入 10 mL 的 WE medium (於 50 mL 的離心管中) 並均勻混合，即可得到最終的初代肝實質細胞的懸浮液 (Cell suspension)。最後再利用 Trypan blue 染色來計算細胞生存率，確保要進行培養的細胞懸浮液細胞生存率均高於 90% 以上。



3.6 體外毒化與奈米藥物回復

3.6.1 油酸毒化

體外毒化實驗使用 585A1 健康人類 iPS 細胞株, 1535 No.1 非酒精性脂肪肝病患 iPS 細胞株所誘導之肝細胞以及大鼠初代成熟肝細胞，在培養液中加入油酸 (Oleic acid; OA) 進行二維共培養後，使其進而誘導成脂肪肝疾病模型[65]。以利後續進行奈米藥物的治療模型實驗之進行。

在兩種 iPS 細胞株誘導出的肝細胞之培養中，在培養液中加入最終濃度為 5 mM 的 OA；由於油酸本身無法確實混合於培養液中，因此先將 OA 以 1 M 的濃度溶於二甲基亞楓 (Dimethyl sulfoxide; DMSO)，再根據所需要的量加入培養液中。培養毒化時間不是在第三階段第 4 天的時候加入含有 OA 的培養液，並在第三階段第八天的時候更換為含有實驗組之培養液嘗試進行回復。分別在第三階段第 9 天、第 11 天的時候抽取上清液以利後續生化分析。

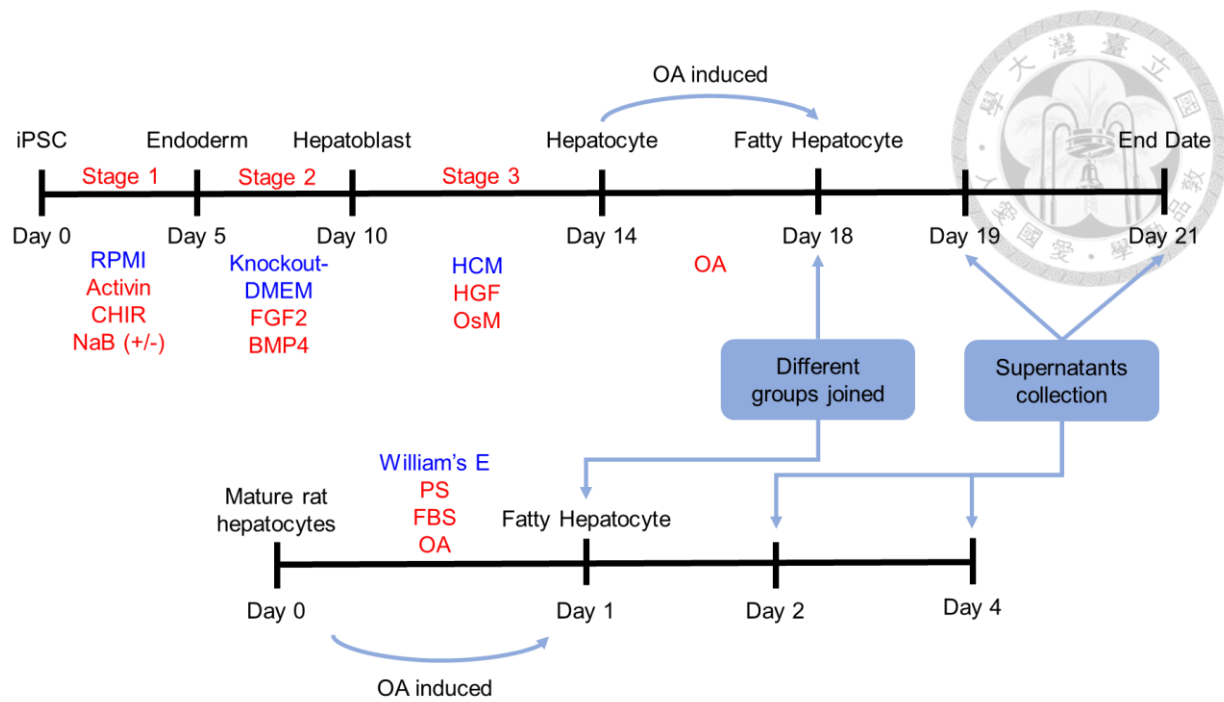
在大鼠初代肝細胞的培養中，將細胞以 5.0×10^5 cells/mL 的培養密度培養於 24 well 細胞盤中，經過 4 小時後將培養液更換為含有 1 mM OA 的 WE 培養液。在經過 24 小時的培養後，再將培養液更換為實驗組之培養液嘗試進行回復，並分別在開始回復後第 1 天、第 3 天時抽取上清液以利後續生化分析。



3.6.2 體外毒化恢復試驗

在兩種 iPS 細胞株誘導出的肝細胞之二維培養中，在經過四天的 OA 誘導成脂肪肝模型後，會開始著手於加入奈米藥物以及其兩種主要成分共 5 組實驗組以及 1 組控制組進行回復試驗。分別為：控制組、陰性控制組 (Culture medium + 5 mM OA)、單寧酸組 (Culture medium + 1 μ g/mL TA)、DLM 組 (Culture medium + 3 μ g/mL DLM)、兩組自組裝奈米藥物組 (Culture medium + 0.1 μ g/mL TA-DLM nanomedicines, Culture medium + 1 μ g/mL TA-DLM nanomedicines)。總共進行三天的回復試驗，並在加入後第 1 天以及第 3 天抽取上清液進行生化分析。此外當第 3 天試驗結束時，會進行多聚甲醛 (Paraformaldehyde; PFA) 細胞固定化進行細胞免疫染色分析。

在大鼠初代肝細胞的培養中，在經過一天的 OA 誘導成脂肪肝模型後，會開始著手於加入奈米藥物以及其兩種主要成分共 4 組實驗組以及 2 組控制組進行回復試驗。分別為：控制組、陰性控制組 (Culture medium + 1 mM OA)、兩組單寧酸組 (Culture medium + 1 μ g/mL TA, Culture medium + 5 μ g/mL TA)、兩組 TA-DLM 奈米藥物組 (Culture medium + 1 μ g/mL TA-DLM nanomedicines, Culture medium + 5 μ g/mL TA-DLM nanomedicines)。總共進行三天的回復試驗，並在加入後第 1, 3 天抽取上清液進行生化分析。此外當第 4 天試驗結束時，會進行多聚甲醛 (Paraformaldehyde; PFA) 細胞固定化進行螢光染色分析。上述兩種體外 MASLD 模型建立與恢復時程如圖六所示。



圖六：體外 MASLD 模型毒化以及治療時程圖。



3.7 體外實驗相關檢測方法

3.7.1 尿素分泌量檢測

本檢測採用 Quantic Chrom™ urea assay kit (DIUR-100) 檢測 iPS 誘導之肝細胞以及大鼠初代成熟肝細胞尿素分泌量。使用連續稀釋法將 Urea Standard (50 mg/dL) 用超純水稀釋成 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 0 mg/dL 等標準品濃度。接著配置 Working reagent：以 1:1 之比例混合 Reagent A 以及 Reagent B (96 well 每孔需要 100 μ L 之 Working reagent)。將標準品以及試驗樣品以每孔 5 μ L 加入黑色 96 well 孔盤中，再加入 100 μ L Working reagent 與盤中標準品或樣品充分混合後，在室溫且不透光環境下培養 50 分鐘。完成後即可利用微量盤式分光光度計量測在 430 nm 之吸光值。將標準品濃度與其吸光值 (扣除 blank 吸光值) 製作出檢量線後，即可將樣品吸光值 (扣除 blank 吸光值) 代入求得樣品尿素濃度[66]。



3.7.2 細胞核、白蛋白免疫螢光染色

在進行免疫螢光染色前需要先將細胞以 PFA 固定化，便可以將細胞盤保存於 4 °C 環境下保存至螢光染色實驗開始。PFA 固定化步驟如下：首先將細胞盤內培養液去除，並在 24 well 細胞盤內每孔加入 400 μ L 之 4% PFA. 在常溫下反應 10 分鐘後，去除盤內 PFA 後再加入 400 μ L 之 PBS 即可完成細胞固定化。

以下為免疫螢光染色之步驟：首先配置 PBS-T 作為溶劑，在 PBS 中加入最終濃度為 5% 之 TritonX-100. 接著根據所需要的量配置 Blocking buffer (950 μ L PBS-T + 50 μ L Donkey serum) 以及 Antibody buffer (950 μ L PBS-T + 50 μ L Donkey serum + 2 μ L Goat anti-Human Albumin antibody)。去除細胞盤內 PBS 後，每孔加入 400 μ L Blocking buffer, 並在室溫且不透光環境下培養 30 分鐘。完成後去除 Blocking buffer, 並在盤內每孔加入 400 μ L Antibody buffer. 在 4 °C 且不透光環境下培養 overnight。到了隔天，每孔進行 500 μ L PBS 清洗兩次，接著加入 Dye solution (950 μ L PBS-T + 50 μ L Donkey serum + 1 μ L Donkey anti-Goat IgG (H+L) + 1 μ L Hoechst) 進行染色，並在室溫且不透光環境下培養 1 小時。最後在每孔進行 500 μ L PBS 清洗兩次後，每孔加入 1 mL PBS 後即可利用螢光顯微鏡檢測。Hoechst 可以將細胞核染色，可以用 DAPI filter cube 觀察。Donkey anti-Goat IgG (H+L) 是一種 Alexa Fluor 488 染劑，可以將盤內的白蛋白染色，可以用 GFP filter cube 觀察。



3.7.3 AdipoRed 細胞內脂質定量分析

本研究採用 AdipoRed 試劑進一步定量細胞內的脂質含量，AdipoRed 試劑會與細胞內的脂質產生螢光反應，因此可以檢測細胞盤內螢光量進而比較各實驗組之細胞內脂質含量 [67]。首先將細胞盤內培養液去除，於每孔內加入 1 mL PBS 潤洗一次後，再加入 1 mL PBS 以及 30 μ L 之 AdipoRed 試劑，並於常溫下等待 10 分鐘。接著以超音波震盪將細胞盤內細胞打碎充分混合於溶液中，再以螢光分光光度計量測其螢光強度 (Excitation: 485 nm, emission: 572 nm)。最後在數據處理時會將 Control 組螢光值作為 100%，與其餘實驗組比較增長或降低多少脂質堆積比例。



3.7.4 乳酸脫氫酶 (LDH) 活性檢測

乳酸脫氫酶 (Lactate Dehydrogenase, LDH) 是一種氧化還原酶，專責於催化丙酮酸和乳酸之間的相互轉化。在組織受損或紅血球溶血發生後，細胞會釋放 LDH 至血液中。由於其穩定性，LDH 已被廣泛應用於評估組織和細胞是否受損或受到毒性物質的影響[68]。本實驗採用 Lactate dehydrogenase activity assay kit 檢測 LDH 活性，檢測方式如下：首先利用使用連續稀釋法將 NADH Standard (1.25 mM) 用 LDH assay buffer 稀釋成 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 nmole/well 等標準品濃度。接著取以每孔 50 μ L 將標準品以及待測樣品到黑色 96 well 中。另外需要配置 Master Reaction Mix: 每孔需要 48 μ L LDH Assay Buffer + 2 μ L LDH Substrate Mix. 在盤內利用 pipetting 充分混合後，使用鋁箔紙將黑色 96 well 包覆放到培養箱中培養 3 分鐘。完成後即可利用微量盤式分光光度計量測在 450 nm 之吸光值。



3.7.5 DNA 含量檢測

為了檢測細胞盤內每孔所含的細胞數量，因此會對細胞盤進行 DNA 含量檢測。本檢測採用 DNA Quantity Kit (PMC-AK06-COS) 檢測大鼠初代成熟肝細胞細胞盤中之 DNA 含量。該試驗組合中包含三種溶液：Color Development Regent, Dilution Buffer 和 DNA 標準品 (100 $\mu\text{g/mL}$)。首先使用 DNA Quantity Kit 中的 DNA 標準品和超純水製備 50, 25, 12.5 和 0 $\mu\text{g/mL}$ 的 DNA 標準品溶液。各取 50 μL 的 DNA 溶液和 1 mL Dilution Buffer 混合後，再加入 50 μL Color Development Regent 後即可利用螢光分光光度計量測螢光值建立檢量線。

接著是將待測細胞盤之培養液抽出，加入 500 μL 的 PBS 潤洗細胞盤表面。抽出 PBS 後，加入 500 μL 的 Dilution Buffer 並進行超音波震盪使細胞破裂釋放出 DNA 與 Dilution Buffer 混合。從細胞盤中取出 50 μL 細胞 DNA 溶液後，與 50 μL Color Development Regent 後即可利用螢光分光光度計量測螢光值，再根據檢量線得到樣品之 DNA 濃度[69]。



3.7.6 Interleukin 6 (IL-6) 表現量檢測

本檢測採用 Rat IL-6 ELISA Kit (ERA31RB) 進行。實驗方法如下：首先將標準品、樣品以及所需的試劑放置於室溫下回溫，並確保其中無冰晶存在。將標準品以及樣品以每孔 100 μL 的體積加入 IL-6 Antibody Coated 96 孔盤中將抗體與抗原結合，於室溫下靜置 2.5 小時；接著去除標準品以及樣品，加入 wash buffer (300 $\mu\text{L}/\text{well}$) 清洗四次後，將孔盤往紙巾上拍打確保盤內無溶液留存；加入 biotin conjugate (100 $\mu\text{L}/\text{well}$)，於室溫下靜置 1 小時；接著去除 biotin conjugate，加入 wash buffer (300 $\mu\text{L}/\text{well}$) 清洗四次後，將孔盤往紙巾上拍打確保盤內無溶液留存；加入 Streptavidin-HRP (100 $\mu\text{L}/\text{well}$)，於室溫下靜置 45 分鐘；接著去除 Streptavidin-HRP，加入 wash buffer (300 $\mu\text{L}/\text{well}$) 清洗四次後，將孔盤往紙巾上拍打確保盤內無溶液留存；加入 TMB substrate (100 $\mu\text{L}/\text{well}$)，於室溫下靜置 30 分鐘；接著加入 stop solution (100 $\mu\text{L}/\text{well}$)，於室溫下靜置 30 分鐘，便可使用 ELISA reader 量測其在 450 nm 之吸光值[70]。



3.7.7 白蛋白 (Albumin) 表現量檢測

為了檢測單寧酸以及 TA-DLM 奈米藥物對於肝細胞功能性的影響，因此在經過細胞培養後抽取上清液進行 Rat Albumin ELISA 分析。白蛋白是一種肝臟分泌的球型蛋白，作用是維持體內的滲透壓，因此白蛋白被普遍用於檢驗肝臟機能。本檢測採用 Rat Albumin ELISA Kit (E111-125) 進行[71]。

實驗方法如下：首先將標準品、樣品以及所需的試劑放置於室溫下回溫，並確保其中無冰晶存在。將標準品以及樣品以每孔 100 μ L 的體積加入 albumin antibody coated 96 孔盤中將抗體與抗原結合，於室溫下靜置 1 小時；接著去除標準品以及樣品，加入 wash buffer (300 μ L/well) 清洗四次後，將孔盤往紙巾上拍打確保盤內無溶液留存；加入 anti-Albumin detection antibody (100 μ L/well)，於室溫下靜置 1 小時；接著去除 anti-Albumin detection antibody，加入 wash buffer (300 μ L/well) 清洗四次後，將孔盤往紙巾上拍打確保盤內無溶液留存；加入 HRP Solution A (100 μ L/well)，於室溫下靜置 45 分鐘；接著去除 HRP Solution A，加入 wash buffer (300 μ L/well) 清洗四次後，將孔盤往紙巾上拍打確保盤內無溶液留存；加入 TMB substrate (100 μ L/well)，於室溫下靜置 30 分鐘；接著加入 stop solution (100 μ L/well)，於室溫下靜置 30 分鐘，便可使用 ELISA reader 量測其在 450 nm 之吸光值。



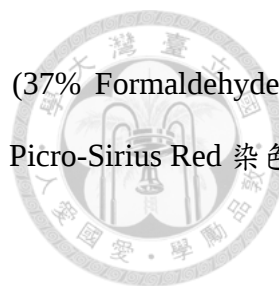
3.8 小鼠體內實驗

在利用 iPS 細胞誘導之肝細胞以及大鼠初代成熟肝細胞進行體外實驗以確認 TA-DLM 奈米藥物對於 MASLD 體外模型的影響後，接著將著手進行 MASLD 體內模型的建立與治療。體內實驗有兩項主要目的：首先是確認 TA-DLM 奈米藥物在 MASLD 體內模型的最佳濃度，再根據該最佳濃度進而了解 TA, DLM 和 TA-DLM 奈米藥物對於 MASLD 體外模型的治療差異性。因此本研究會建立兩種體外模型分別探討上述兩種研究目的。

3.8.1 小鼠體內脂肪肝模型預試驗流程

首先為了了解 TA-DLM 奈米藥物在 MASLD 體內模型的最佳治療濃度，本研究設計了一項預試驗流程測試不同濃度的 TA-DLM 奈米藥物對於 MASLD 體內模型的影響。本試驗採用 C57BL/6JNarl 小鼠，在其出生後 2 至 3 天後以 200 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 的濃度和 30G 的針頭皮下注射鏈脲佐菌素 (Streptozotocin; STZ) 到小鼠體內。到了小鼠 4 週齡離乳後，開始餵食含有 60% Kcal 的以豬油為主要配方的高脂肪飼料 (High fat diet; HFD)[72]，高脂肪飼料與一般飼料的成分比較表如表二餵食 4 週 (8 週齡) 後，開始進行 4 週的治療，並於 12 週齡時犧牲。

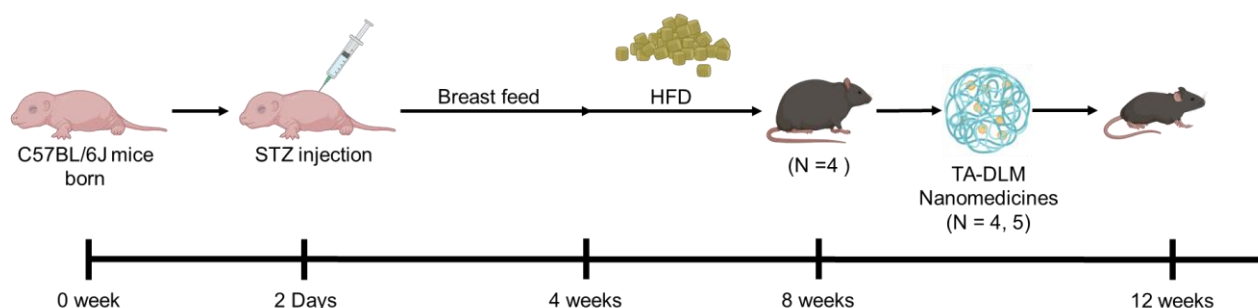
在 4 週的治療程序中，會根據所需的濃度將 TA-DLM 奈米藥物溶於 PBS 中，再以腹腔注射 (Intraperitoneal injection; IP) 的方式注射 300 μL 之 TA-DLM 奈米藥物溶液於小鼠體內，頻率為每週注射一次，共注射 4 次。本次預試驗總共會測試 4 種濃度，分別是 0.25, 0.5, 0.75, 1 mg/mL 之 TA-DLM 奈米藥物溶液。4 週的治療程序結束後，會於 12 週齡時進行心臟採血和肝臟組織切片。心臟採血結束後，先以全血進行血糖值量測，之後會在 4000 rpm, 20 $^{\circ}\text{C}$ 的條件下離心 20 分鐘，取出血清保存於 -20 $^{\circ}\text{C}$ 環境下，之後送至鴻泓科技有限公司進行血清生化分析，分析項目為：天門冬胺酸胺基轉移酶 (Aspartate Transaminase; AST)、丙胺酸胺基轉移酶 (Alanine Transaminase; ALT)、高密度脂蛋白 (High-Density Lipoprotein; HDL)、低密度脂蛋白 (Low-Density Lipoprotein; LDL)、總膽固醇 (Total Cholesterol; CHO) 以及三酸甘油



酯 (Triglycerides; TG)。在取出肝臟後，秤重後保存於 3.7% 福馬林 (37% Formaldehyde 和 PBS 以 1:9 的比例混合) 中，之後送至拓生科技有限公司進行 H&E 和 Picro-Sirius Red 染色分析。圖七為小鼠體內脂肪肝模型預試驗流程圖。

表二：一般飼料與高脂飼料營養成分表。

	Chow diet (MFG)	High fat diet (D12492)
Product		
Proteins (%)	25.7	26
Carbonhydrate (%)	60.7	26
Fat (%)	13.6	35
Total	3.57 kcal/g	5.24 kcal/g



圖七：小鼠體內脂肪肝模型預試驗流程圖。



3.8.2 小鼠體內脂肪肝模型主試驗流程

接著為了了解 TA, DLM 和 TA-DLM 奈米藥物對於 MASLD 體外模型的治療差異性，本研究設計了一項主試驗流程以測試單寧酸、脫細胞化肝臟間質以及 TA-DLM 奈米藥物對於 MASLD 體內模型的影響。本試驗採用 C57BL/6NCrl 小鼠，在其 10 週齡時開始餵食含有 60% Kcal 的以豬油為主要配方的高脂肪飼料 (High fat diet; HFD) 以及 4% 果糖飲水，高脂肪飼料與一般飼料的成分比較表如表三所示。餵食 16 週後 (24 週齡) 開始進行 4 週的治療[73]。

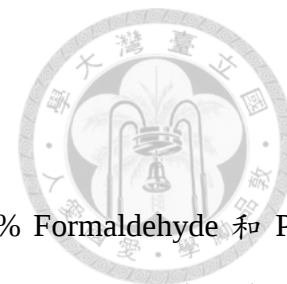
在治療程序中有三種治療組別，分別為：TA, DLM 以及 TA-DLM 奈米藥物組別，會根據所需的濃度將 TA, DLM 以及 TA-DLM 奈米藥物溶於 PBS 中，再以腹腔注射 (Intraperitoneal injection; IP) 的方式注射 300 μ L 於小鼠體內，頻率為每週注射一次，共注射 4 次，每 2 週會進行一次臉頰採血，結束後會在 4000 rpm, 20 $^{\circ}$ C 的條件下離心 20 分鐘，取出血清保存於 -20 $^{\circ}$ C 環境下，之後送至鴻洺科技有限公司進行血清生化分析，分析項目為 HDL, LDL, CHO, TG。4 週的治療程序結束後，會於 30 週齡時進行心臟採血和肝臟組織切片。心臟採血結束後，在 4000 rpm, 20 $^{\circ}$ C 的條件下離心 20 分鐘，取出血清保存於 -20 $^{\circ}$ C 環境下，之後送至鴻洺科技有限公司進行血清生化分析，分析項目為 AST, ALT, HDL, LDL, CHO, TG。在取出肝臟後，秤重後切下左右肝葉於 3.7% 福馬林 (37% Formaldehyde 和 PBS 以 1:9 的比例混合) 中，浸泡 24 至 48 小時後轉移至 PBS 中，並於 4 $^{\circ}$ C 環境下保存。事後送至拓生科技有限公司進行石蠟和冷凍包埋以利進行 H&E 和 Picro-Sirius Red 染色分析。圖八為小鼠體內脂肪肝模型主試驗流程圖。



3.9 體內實驗相關檢測方法

3.9.1 血液分析

肝臟產生的肝酶可透過血液檢查來測定，並以此測量數值判定肝臟機能的好壞，其中最常見的肝酶檢測即是 AST 和 ALT。AST 和 ALT 均會隨著體重增加而升高，但 ALT 比 AST 更為顯著。一些研究認為，ALT 水平的變化可能先於脂肪肝，並且是由肝臟中胺基酸 (尤其是麩胺酸) 轉氨作用增強所致[74]。除了檢測對肝臟機能具有指標性的 AST, ALT 數值外，我們也將進行 TG, HDL, LDL, CHO 的血清生化分析檢測，這些數值的表現可以說明脂肪肝病患的疾病進程如何。這是因為脂肪肝病患在過多的營養攝取以及代謝失衡的情況下，會有過高的 TG, LDL, CHO 表現，同時降低 HDL 的程度使過量的膽固醇在肝臟積累[75]。在 4 週的治療時程以及將小鼠犧牲後分別會使用臉頰採血以及心臟採血取得小鼠血液樣本。臉頰採血步驟如下：將小鼠保定後，提起小鼠頸背皮膚，使臉頰部位露出，使用三角採血針對小鼠眼睛尾端以及嘴角連線相交處以垂直下針的方式刺入，再以微量離心管承接血液。心臟採血步驟如下：在犧牲小鼠前，先以 5% isoflurane 進行氣麻，用手感覺心臟位置後再以 27G 針頭和 1 mL 針筒抽取小鼠右心室血液 0.5 至 0.7 mL。收集血液樣本後，先以血糖機和其試紙量測全血血糖濃度後，在 4000 rpm, 20 °C 的條件下離心 20 分鐘，取出血清保存於 -20 °C 環境下，之後送至鴻泓科技有限公司進行血清生化分析，分析項目為 AST, ALT, HDL, LDL, CHO, TG (假如血清量不足則以 HDL, LDL, CHO, TG 為優先量測項目)。



3.9.2 病理切片染色

將小鼠的肝臟取下後，秤重後切下左右肝葉於 3.7% 福馬林 (37% Formaldehyde 和 PBS 以 1:9 的比例混合) 中，浸泡 24 至 48 小時後轉移至 PBS 中，並於 4 °C 環境下保存。事後送至拓生科技有限公司進行石蠟和冷凍包埋以利進行 H&E 和 Picro-Sirius Red 染色分析。

另外會針對 H&E 組織切片染色結果進行掃片拍攝後，再將每張照片切成 2000*2000 像素後，匯入到 ImageJ 軟體中修改成 8-bit 的黑白圖像。接著進行實質組織面積的計算，將臨界值設定為 57% 後，接著計算軟體標記的像素後除以 4000000 像素乘上 100% 即可得到實質組織的面積百分比。接著用 100% 扣除後即可得到空洞部分的面積百分比。

3.9.3 肝內三酸甘油酯含量檢測

本檢測採用 Triglyceride Quantification Colorimetric Assay Kit (ab65336) 進行[76]。將小鼠的肝臟取下後，秤重後切下 100 mg 右肝葉保存於液態氮中冷凍保存。接著將冷凍過後的肝葉搗碎後，加入 1 mL 5% Triton X-100 的水溶液並在 80 °C 中隔水加熱 5 分鐘，此時樣品會呈現混濁狀；待其降至室溫後，重複隔水加熱並回到室溫一次。接著在 4 °C 環境下以 10000 G 離心 10 分鐘，以去除底層不溶物質。接著便著手製備標準品：首先混合 50 μ L Triglyceride Standard + 50 μ L Triglyceride Assay Buffer，這樣可以形成 0.5 mM 的 Triglyceride Standard。在 96 孔盤中每孔內分別加入 0, 8, 16, 24, 32, 40 μ L 的 0.5 mM 的 Triglyceride Standard，再於每孔內加入 60, 52, 44, 36, 28, 20 μ L 的 Triglyceride Assay Buffer，這樣可以製作出 0, 1, 2, 3, 4, 5 nmol/ well 的三酸甘油酯標準品。在加入 60 μ L 的樣品於其他孔後，在每孔內加入 8 μ L 的 Lipase，和標準品以及樣品混合後，在室溫下避光反應 40 分鐘。接著製備 reaction mix：30 μ L Triglyceride Assay Buffer + 8 μ L Triglyceride Probe + 2 μ L Triglyceride Enzyme Mix，於每孔內加入 40 μ L 的 reaction mix 後，便可量測其在 590 nm 之吸光值。



3.10 統計結果分析方法

在各項量化的實驗結果中，實驗數據皆以平均值 $\pm$ 標準差表示。當比較兩組實驗組之間的顯著性則採用雙尾無配對司徒頓 t 檢定 (Student's t-test)，軟體使用 Microsoft Excel 2017；當比較多組實驗組之間的顯著性則採用單因子變異數分析 (one-way analysis of variance, one-way ANOVA)，比較完多組之間的顯著性後，再使用 Tukey 的事後檢定 (Post-hoc) 分析，進一步釐清組與組之間的顯著性，軟體使用 jamovi 2.3.24。P 值 < 0.05 代表有顯著性差異。

第四章 實驗結果

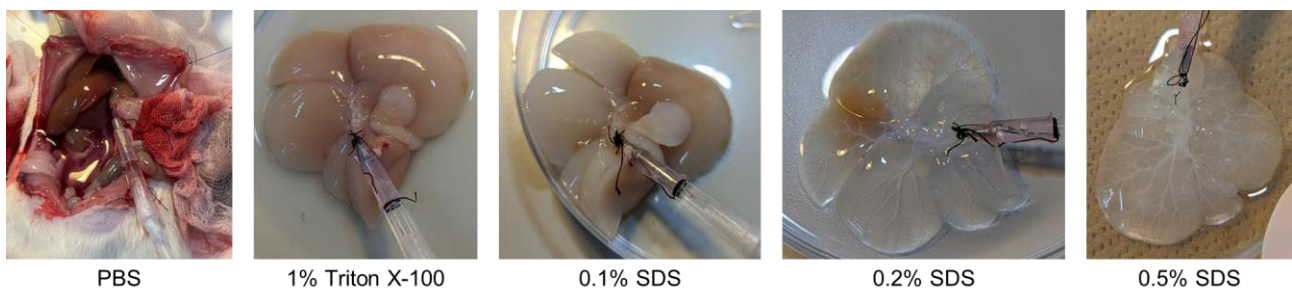


4.1 脫細胞肝臟間質 (DLM) 之製備

在現今的研究中說明了眾多肝臟脫細胞化的實驗方法，各種方法涉及的肝臟來源、試劑種類、試劑濃度、時間、順序都不盡相同。本研究採用 Jaramillo 等人所使用的脫細胞化肝臟間質製備方法[77]，肝臟來源為 SD 大鼠以及市售豬隻之肝臟，並使用 PBS, Triton X-100 溶液, SDS 溶液進行鼠肝 DLM (rDLM) 以及豬肝 DLM (pDLM) 之製作。

4.1.1 大鼠肝臟 DLM (rDLM) 之製作

大鼠脫細胞肝臟成果如下圖九所示：首先在 PBS 灌流後，肝臟組織從具有血色的深紅色逐漸轉為淺褐色，表現肝臟內的殘餘血液逐漸被洗去的過程。接著將肝臟以及灌流針移到 30 cm dish 上，並將灌流液體更換為 1 % Triton X-100，Triton X-100 可以將細胞膜破壞以達到使細胞脫附於 ECM 上的目的[78]；接著更換液體為 0.1%, 0.2%, 0.5% SDS 溶液；SDS 除了可以使細胞脫附 ECM 外，也可以將蛋白質的四級、三級結構解開形成二級結構[79]，使 DLM 結構更為鬆散。由觀察可以發現，在經過 Triton X-100 以及 SDS 灌流後，肝臟細胞部分大致都被洗去，並可以完整保存白色以及透明的脫細胞化肝臟間質。



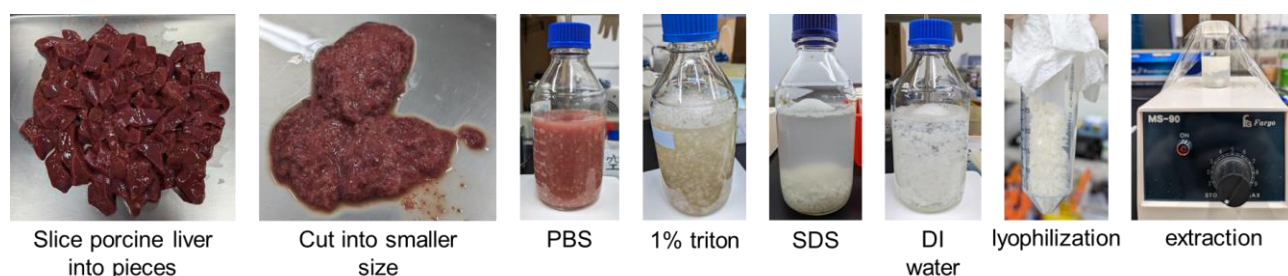
圖九：大鼠 DLM 製備成果。



4.1.2 豬肝 DLM (pDLM) 之製作與萃取

脫細胞化成果如圖十所示：可以看到經過 PBS 浸泡、沖洗過後，豬肝組織顏色從原先的深紅色轉變為淺褐色。接著將組織換液於 1% Triton X-100 溶液，由於 Triton X-100 有著破壞細胞膜的功能，因此可以將附著於細胞骨架的細胞破壞以達到脫細胞化的作用[78]，也可以看到此時組織本身會越趨近於白色透明狀，表示內部細胞正逐漸被洗去。接著將組織換液於 0.1%, 0.2%, 0.5% 的 SDS 溶液中，SDS 有著將蛋白質四級、三級結構降解成二級結構的功能，因此可以觀察到原本成群、成塊的蛋白質逐漸分解成一絲絲的結構，說明其主結構正逐漸被降解[79]。最後使用二次水將殘餘的 Triton X-100, SDS 溶液洗去，冷凍乾燥後即可得到 pDLM 產物。

由於考量到經過上述的脫細胞化流程所得之脫細胞化豬肝仍會有雜質殘留導致不利於後續製作成奈米藥物 (不易溶解於溶劑中)，因此需要進一步的純化步驟。在胃蛋白酶以及酸性環境的作用下，pDLM 會部分溶解於溶液中，此時剔除不溶解的物質後再將溶液凍乾後即可得到純化後的 pDLM。



圖十：豬肝 DLM 製備成果。



4.1.3 rDLM 以及 pDLM DNA 含量檢測

在完成大鼠肝臟以及豬隻肝臟的脫細胞化處理後，我們分別對兩種物種的肝臟組織塊以及 DLM 樣品進行 DNA 含量分析，確認脫細胞化的成功與否。圖十一為大鼠肝臟組織與 rDLM 樣品的 DNA 含量比較，兩者分別表現了 7.55 ± 0.01 , $0.73 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ 的 DNA 含量，可以觀察到 rDLM 的結果是顯著小於大鼠肝臟組織的，說明其中大部分的細胞被本研究之 DLM 製作方法所洗去[80]。圖十二為豬隻肝臟組織與 pDLM 樣品的 DNA 含量比較，兩者分別表現了 27.98 ± 0.12 , $0.7 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ 的 DNA 含量，可以觀察到 pDLM 的結果是顯著小於豬隻肝臟組織的，說明其中大部分的細胞被本研究之 DLM 製作方法所洗去[81]。

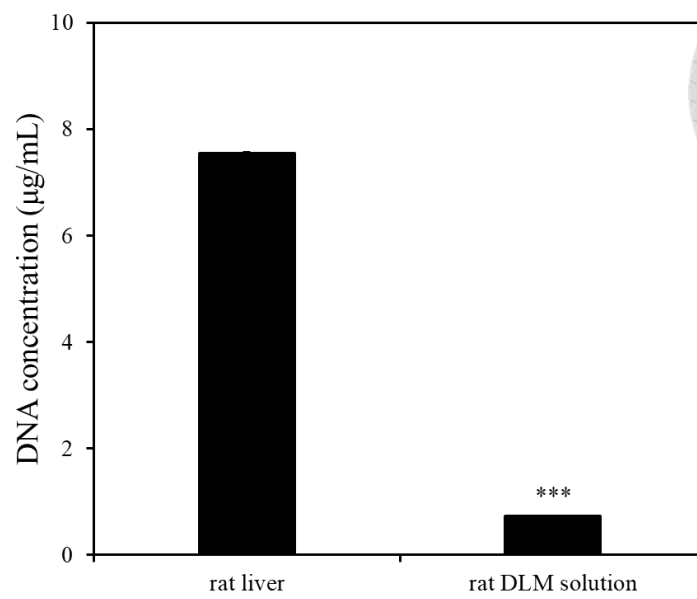


圖 十一：大鼠肝臟與 rDLM DNA 含量結果。
 (***) $p < 0.001$, significant differences vs. rat liver respectively).

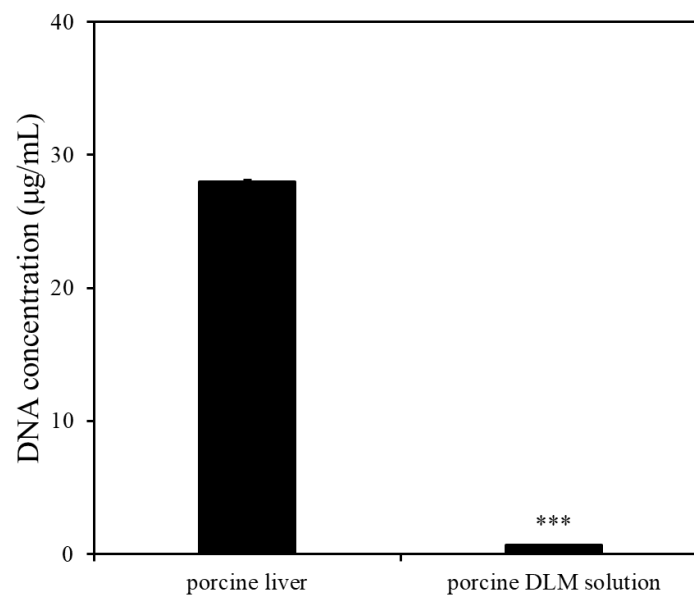


圖 十二：豬隻肝臟與 pDLM DNA 含量結果。
 (***) $p < 0.001$, significant differences vs. porcine liver respectively).



4.2 奈米藥物之自組裝成果

4.2.1 FT-IR 圖譜分析聚乙二醇修飾成果

為了確認 mPEG 是否有確實修飾到 DLM 上，因此利用 FT-IR 儀分別量測了 DLM 樣品以及修飾後的 mPEG-DLM 樣品檢驗兩者之間的紅外光吸收度差異性。從圖十三的結果中可以看出，兩者在各波段的吸收度呈現相似的結果，除了在 1186–1089.6 cm^{-1} 的波段中，mPEG-DLM 樣品呈現了較強的吸收度，而該波段則主要是 C-O 單鍵的伸張振動表現。由於聚乙二醇中有著許多的 C-O 單鍵表現[82]，因此可以辨別該結果為 DLM 被 mPEG 修飾成功的證明。

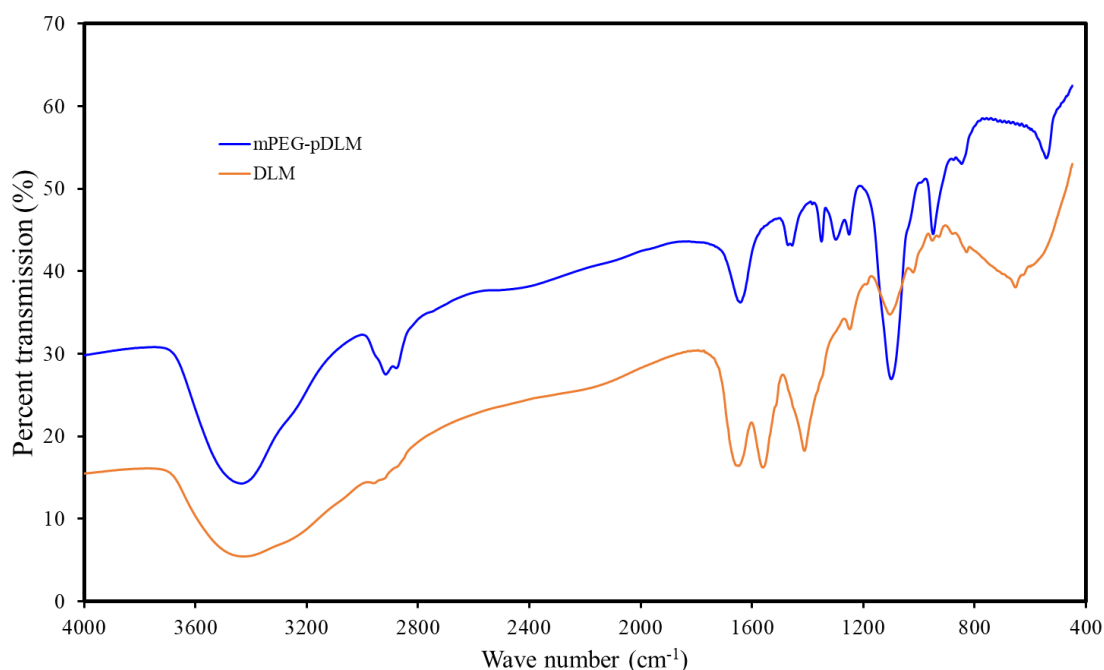
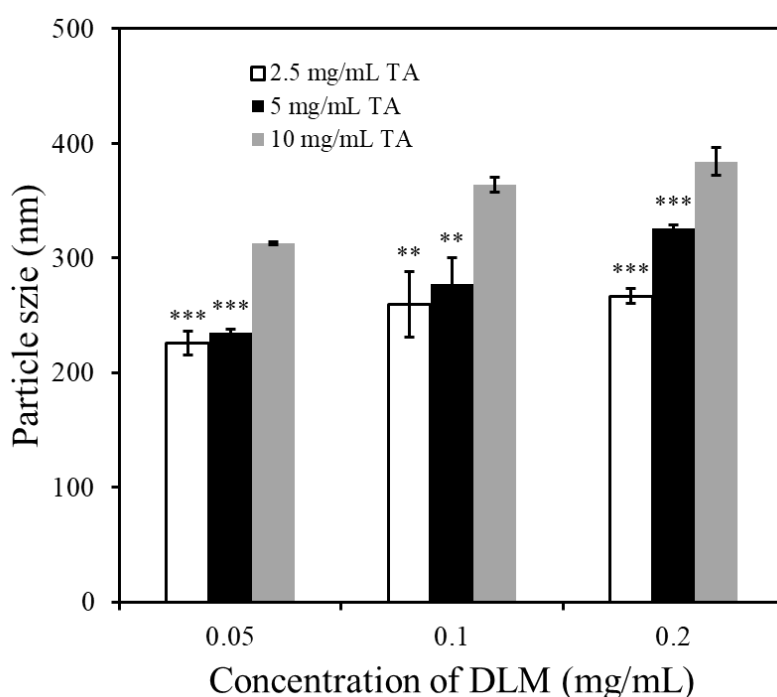


圖 十三：mPEG-DLM 以及 DLM 之 FT-IR 檢測結果。



4.2.2 DLS 粒徑分析

為了了解單寧酸和蛋白質之間形成奈米顆粒的能力，因此利用。本研究將單寧酸以及 DLM 共同溶解於 PBS 當中並測試了數種兩者的濃度搭配，再分別測試其產生的粒徑大小。結果如圖十四所示：當 2.5 mg/mL 的單寧酸分別與 0.05 mg/mL, 0.1 mg/mL 以及 0.2 mg/mL 的 DLM 混合時，可以得到 226.13 ± 10.54 , 259.56 ± 28.36 和 266.9 ± 6.82 nm 的粒徑；而當 5 mg/mL 的單寧酸分別與 0.05 mg/mL, 0.1 mg/mL 以及 0.2 mg/mL 的 DLM 混合時，可以得到 234.93 ± 2.65 , 277.03 ± 23.15 和 326.2 ± 2.3 nm 的粒徑；而當 10 mg/mL 的單寧酸分別與 0.05 mg/mL, 0.1 mg/mL 以及 0.2 mg/mL 的 DLM 混合時，可以得到 313.2 ± 1.31 , 364.06 ± 6.2 和 384.33 ± 11.95 nm 的粒徑。從該結果中可以觀察到不論是隨著 DLM 或是單寧酸的濃度提升時，皆能提高產生的奈米顆粒之粒徑大小[83]。這項結果除了說明兩者確實有著產生奈米顆粒的能力外，也能隨著濃度改變製作出所需的奈米顆粒大小。

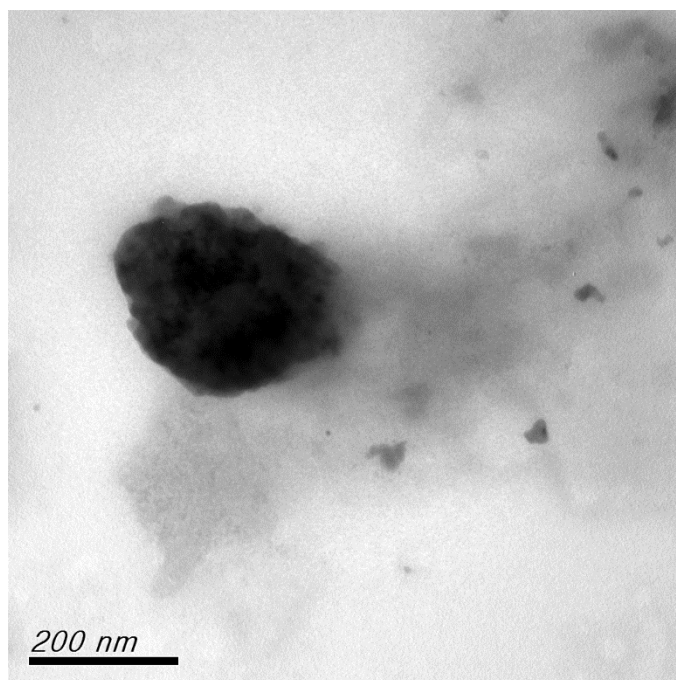


圖十四：不同濃度的單寧酸以及 DLM 所呈現的奈米顆粒之粒徑大小。
(**p < 0.01, ***p < 0.001, significant differences vs. 10 mg/mL TA respectively).



4.2.3 TEM 觀察 TA-DLM 奈米藥物型態

為了進一步確認 TA-DLM 奈米藥物型態以及大小是否符合 DLS 結果以及奈米藥物之定義，因此採用了在 DLS 結果中粒徑最小的濃度組別：最終濃度為 2.5 mg/mL 的 TA 以及 0.05 mg/mL 之 DLM 作為拍攝 TEM 之濃度。成果如圖十五所示：由圖中可以觀察到 TA-DLM 奈米藥物型態符合在 DLS 結果中所觀察到的 200-250 nm 之粒徑大小，除此之外由於奈米藥物內部的陰影程度不一說明奈米藥物內部結構並不均一，代表載體內部有著縫隙呈現的是蛋白質鏈結構的特徵，如此便可以經由物理性的纏繞與單寧酸產生分子之間的鍵結。



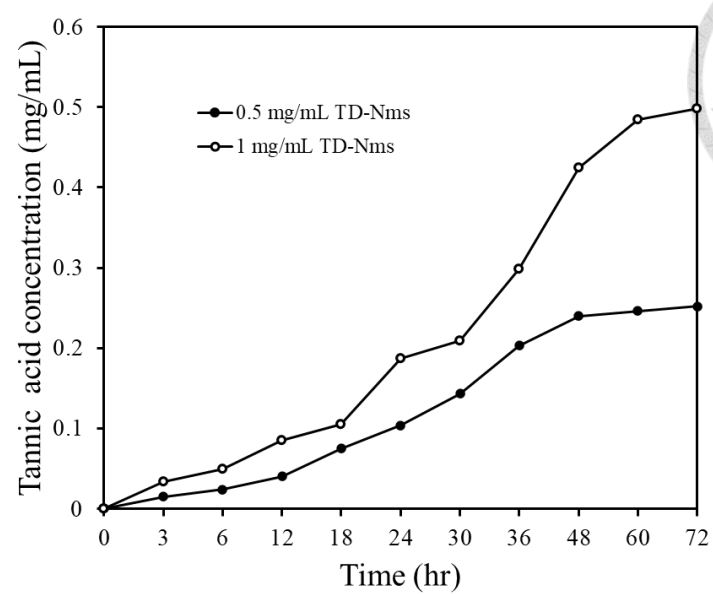
圖十五：以 TEM 拍攝 TA-DLM 奈米藥物之成果圖。



4.2.4 TA-DLM 奈米藥物的單寧酸釋放曲線

在完成對 TA-DLM 奈米藥物的粒徑大小測試以及型態觀察後，我們為了進一步了解 TA-DLM 奈米藥物釋放單寧酸的能力，以便後續的體內實驗在濃度測試上的選用，因此便著手利用 3.3.5 節的方法對 TA-DLM 奈米藥物量測其在不同時間點釋放單寧酸的能力。

圖十六為 0.5 以及 1 mg/mL TA-DLM 奈米藥物的單寧酸釋放曲線，可以觀察到兩種濃度所釋放的單寧酸濃度皆會隨著時間有上升的趨勢。在該結果中可以觀察到分為三階段的釋放，在 0-18 小時之間 TA-DLM 奈米藥物的釋放速率會較緩，而在 18-48 小時之間釋放速率會大幅提升，而到了 48-72 小時則會進入平台期。推測該釋放曲線的快與否歸因於 DLM 的自然降解速度；在過往的研究中，DLM 在體內的降解時間為 18-48 小時之間[84]，因此當在這個期間 DLM 被降解後，勢必同時會降低與單寧酸交聯的能力藉此釋放出單寧酸。最後兩種濃度之 TA-DLM 奈米藥物平台期的終點落在 0.252 mg/mL 以及 0.498 mg/mL，說明在 TA-DLM 奈米藥物中分別有著 50.4% 以及 49.8% 的單寧酸比重。說明在預期測試的 TA-DLM 奈米藥物濃度區間內，投入 TA-DLM Nms 到體內約 3 天內會釋放出約 50% TA-DLM Nms 重量的 TA。



圖十六：TA-DLM 奈米藥物 TA 釋放曲線。



4.3 TA-DLM 奈米藥物對 iPS 細胞誘導之肝細胞的影響

4.3.1 iPS 細胞誘導之肝細胞生長型態觀察

我們接著觀察 iPS 細胞誘導之肝細胞於體外培養之生長型態。使用 3.4.2 節之方法將 iPS 細胞誘導成肝細胞，接著利用 3.6.1 節提及之油酸毒化後，最後按照 3.6.2 節的時程加入實驗組企圖回復油酸毒化造成的損害。在加入實驗組後的第 1 天以及第 3 天分別用 Axio Vert.A1 倒立式顯微鏡觀察並拍攝肝細胞之生長狀況。

首先是健康人類 iPS 細胞 (585A1) 誘導之肝細胞觀察結果。從圖十七的結果中可以觀察到當培養到第三階段第 11 天時陰性對照組相對於其他組別呈現較大面積的細胞凋亡 (圖十七 B)。相較於陰性控制組，其餘實驗組別均有著較好的細胞生長表現；首先在 TA, DLM 以及 TA-DLM 奈米藥物組別均可以觀察到相較於控制組細胞膨脹的情形，說明在油酸的誘導下細胞呈現出肝細胞肥大的現象，同時也是細胞脂質堆積的表現[65]。然而相較於陰性控制組，不論是 TA, DLM 以及 TA-DLM 奈米藥物組別均能維持較大面積的細胞生長，並不會有大面積細胞死亡的情形 (圖十七 C, D, E, F)，推測四組治療組別有著抑制油酸毒化所造成的細胞死亡。

接著是脂肪肝患者之 iPS 細胞 (1535 No.1) 誘導之肝細胞觀察結果。從圖十八的結果中可以觀察到當培養到第三階段第 11 天時陰性對照組相對於其他組別呈現較大面積的細胞凋亡 (圖十八 B)，另外與健康人類的 iPS 細胞誘導之肝細胞相比，陰性控制組有著更大面積的細胞凋亡。相較於陰性控制組，其餘實驗組別均有著較好的細胞生長表現；在 TA, DLM 以及 TA-DLM 奈米藥物組別均可以觀察到相較於控制組細胞膨脹的情形，說明在油酸的誘導下細胞呈現出肝細胞肥大的現象，同時也是細胞脂質堆積的表現。然而相較於陰性控制組，不論是 TA, DLM 以及 TA-DLM 奈米藥物組別均能維持較大面積的細胞生長，並不會有大面積細胞死亡的情形，推測四組治療組別有著抑制油酸毒化所造成的細胞死亡之能力。

對比兩種 iPS 細胞所誘導之肝細胞可以發現兩者最為顯著的差異性在於 Negative 組，在

OA 誘導的情況下，1535 No.1 會有更嚴重的細胞凋亡。推測的可能原因是在於內質網壓力的部分：當飽和脂肪酸含量過高改變內質網穩態時，就會引發內質網應激信號通路，特別是未折疊蛋白反應 (UPR) 途徑。這種破壞會在 MASLD 進展過程中在肝臟中造成脂毒性環境。如果未通過激活 UPR 恢復途徑來恢復穩態，則對內質網刺激的不當反應會引發肝臟脂肪堆積和發炎反應、胰島素抵抗和細胞凋亡，以上這些都是 MASLD 的標誌。因此病患之 iPS 細胞所分化之肝細胞會較容易對過多的脂肪酸產生內質網壓力[85]，導致更快的細胞凋亡。

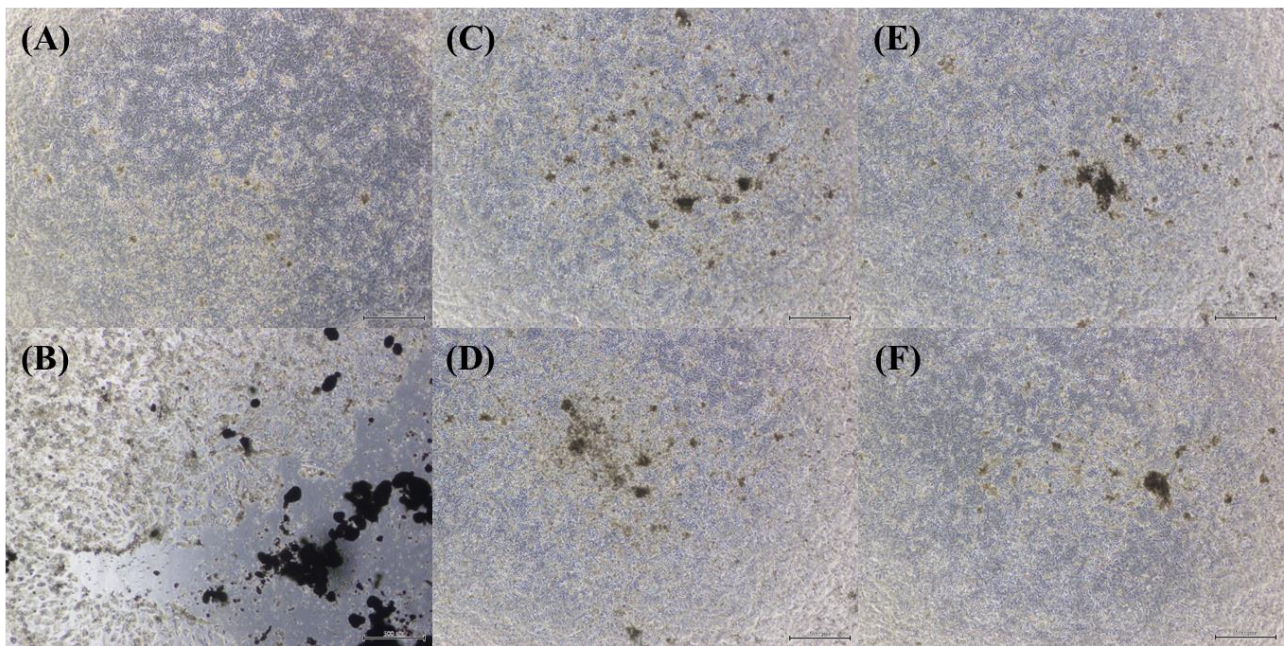


圖 十七：585A1 iPS 細胞株誘導之肝細胞 MASLD 體外模型之生長情形。

- A. 第三階段第 11 天以正常條件培養之肝細胞
- B. 第三階段第 11 天經過油酸毒化後，以正常條件培養之肝細胞
- C. 第三階段第 11 天經過油酸毒化後，加入 1 $\mu\text{g/mL}$ TA 培養之肝細胞
- D. 第三階段第 11 天經過油酸毒化後，加入 3 $\mu\text{g/mL}$ DLM 培養之肝細胞
- E. 第三階段第 11 天經過油酸毒化後，加入 0.1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM 奈米藥物養之肝細胞
- F. 第三階段第 11 天經過油酸毒化後，加入 1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM 奈米藥物培養之肝細胞

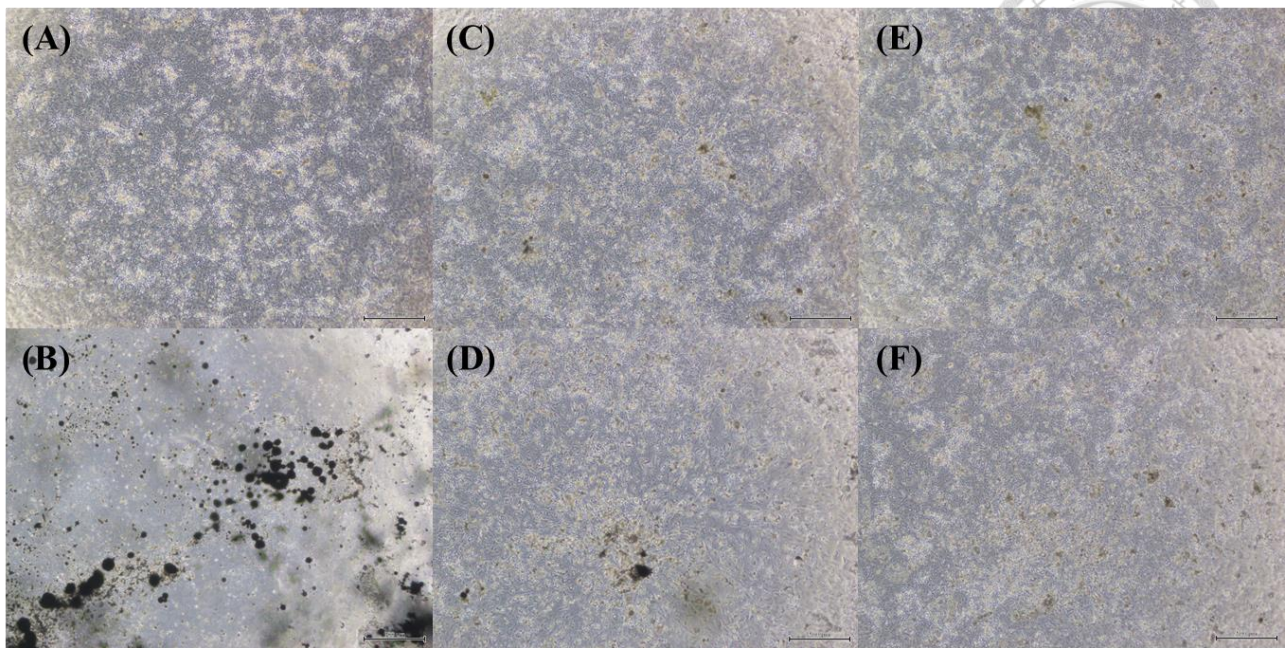


圖 十八：1535 No.1 iPS 細胞株誘導之肝細胞 MASLD 體外模型之生長情形。

- A. 第三階段第 11 天以正常條件培養之肝細胞
- B. 第三階段第 11 天經過油酸毒化後，以正常條件培養之肝細胞
- C. 第三階段第 11 天經過油酸毒化後，加入 1 $\mu\text{g/mL}$ TA 培養之肝細胞
- D. 第三階段第 11 天經過油酸毒化後，加入 3 $\mu\text{g/mL}$ DLM 培養之肝細胞
- E. 第三階段第 11 天經過油酸毒化後，加入 0.1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM 奈米藥物養之肝細胞
- F. 第三階段第 11 天經過油酸毒化後，加入 1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM 奈米藥物培養之肝細胞



4.3.2 iPS 細胞誘導之肝細胞之 LDH 活性檢測

在完成對型態的觀察後，接著我們繼續探究 TA-DLM 奈米藥物是否能減低肝細胞之凋亡，減緩油酸所帶來的毒性。首先使用 3.4.2 節之方法將 iPS 細胞誘導成肝細胞，接著利用 3.6.1 節提及之油酸毒化後，最後按照 3.6.2 節的時程加入實驗組企圖回復油酸毒化造成的損害。在加入實驗組後的第 1 天以及第 3 天分別抽取細胞上清液並進行 LDH 活性檢測分析。

圖十九為 585A1 iPS 細胞所誘導之肝細胞的結果：在治療第一天的表現中，可以觀察到 Control 與 Negative 組別分別表現了 110.83 ± 18.19 , 139.67 ± 11.46 milliunits/mL 的 LDH 活性，可以看出來 Negative 組別相對於 Control 組有著 LDH 顯著上升表現。而在四組實驗組別中 (TA, DLM, $0.1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms, $1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms) 則分別表現了 134.26 ± 17.46 , 133.61 ± 5.27 , 125.07 ± 15.84 , 118.05 ± 8.62 milliunits/mL 的 LDH 活性，除了均略低於 Negative 組別的表現外，在 $1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 組別則與 Negative 組別有著顯著差異。在治療第三天的表現中，可以觀察到 Control 與 Negative 組別分別表現了 112.57 ± 32.51 , 126.71 ± 13.15 milliunits/mL 的 LDH 活性，可以觀察到 Negative 組別維持較高的表現。而在四組實驗組別中 (TA, DLM, $0.1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms, $1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms) 則分別表現了 108.02 ± 2.47 , 130.24 ± 11.39 , 122.77 ± 10.08 , 104.28 ± 3.35 milliunits/mL 的 LDH 活性，除了 TA, $0.1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 和 $1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 組低於 Negative 組別的表現外，在 TA 和 $1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 組別則與 Negative 組別有著顯著差異。由上述結果可以說明：在 585A1 iPS 細胞所誘導之肝細胞的體外 MASLD 模型中，特定濃度的 TA 以及 TA-DLM Nms 均有著降低油酸所造成的細胞毒性的效果。

圖二十為 1535 No.1 iPS 細胞所誘導之肝細胞的結果：在治療第一天的表現中，可以觀察到 Control 與 Negative 組別分別表現了 104.89 ± 17.52 , 127.72 ± 21.86 milliunits/mL 的 LDH 活性，可以發現 Negative 組別相對於 Control 組有著 LDH 顯著上升表現，然而兩者間並無顯著性差異。而在四組實驗組別中 (TA, DLM, $0.1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms, $1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms) 則分別表現了 91.25 ± 3.07 , 106.2 ± 3.45 , 89.74 ± 4.59 , 88.73 ± 9.22 milliunits/mL 的 LDH



活性，除了均低於 Negative 組別的表現外，在 TA, 0.1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms, 1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 組別則與 Negative 組別有著顯著差異。在治療第三天的表現中，可以觀察到 Control 與 Negative 組別分別表現了 127.52 ± 8.14 , 144.59 ± 3.62 milliunits/mL 的 LDH 活性，可以觀察到 Negative 組別維持較高的表現，且與 Control 組別間出現了顯著性差異。而在四組實驗組別中 (TA, DLM, 0.1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms, 1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms) 則分別表現了 105.09 ± 13.45 , 106.51 ± 4.42 , 114.28 ± 18.78 , 101.25 ± 9.09 milliunits/mL 的 LDH 活性，除了 TA, DLM, 0.1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 和 1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 組低於 Negative 組別的表現外，在 TA, 0.1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 和 1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 組別則與 Negative 組別有著顯著差異。由上述結果可以說明：在 1535 No.1 iPS 細胞所誘導之肝細胞的體外 MASLD 模型中，特定濃度的 TA 以及 TA-DLM Nms 均有著降低油酸所造成的細胞毒性的效果。最後與 585A1 iPS 細胞所誘導之肝細胞的結果 (圖十五) 相比較，TA 以及 TA-DLM Nms 對於 1535 No.1 iPS 細胞所誘導之肝細胞有著較為顯著的影響，可以較大程度的降低 OA 所帶來的細胞毒性。

綜合上述兩種 iPS 細胞所誘導之肝細胞的 LDH 表現可以說明：(1) 由油酸所誘導之 MASLD 模型確實會造成 LDH 表現量上升，說明細胞毒性的上升。(2) 1 $\mu\text{g/mL}$ TA 以及 0.1, 1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 可以較大程度的降低在 1535 No.1 iPS 細胞所誘導之肝細胞模型中的細胞毒性。

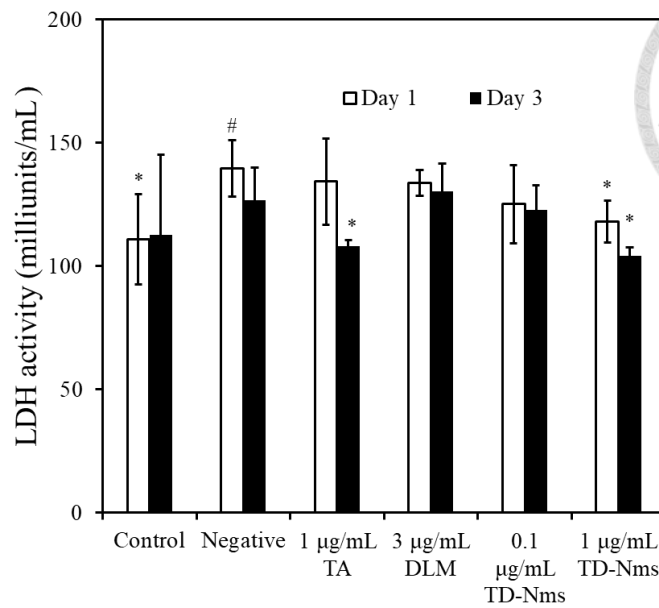


圖 十九：585A1 iPS 細胞誘導之肝細胞 MASLD 體外模型之 LDH 活性檢測結果。

(*p < 0.05 significant differences vs. Negative on day 1, 3, respectively;

#p < 0.05 significant differences vs. Control on day 1, 3, respectively).

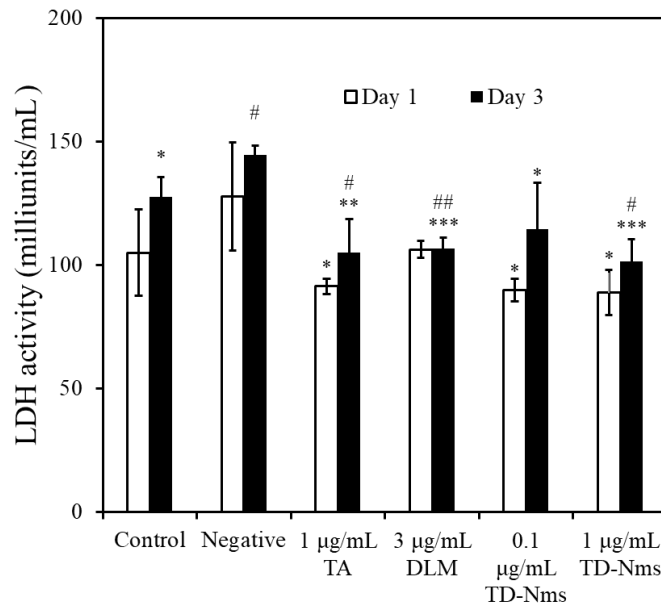


圖 二十：1535 No.1 iPS 細胞誘導之肝細胞 MASLD 體外模型之 LDH 活性檢測結果。

(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, significant differences vs. Negative on day 1, 3, respectively;

#p < 0.05, ##p < 0.01 significant differences vs. Control on day 1, 3, respectively).



4.3.3 iPS 細胞誘導之肝細胞之尿素分泌量檢測

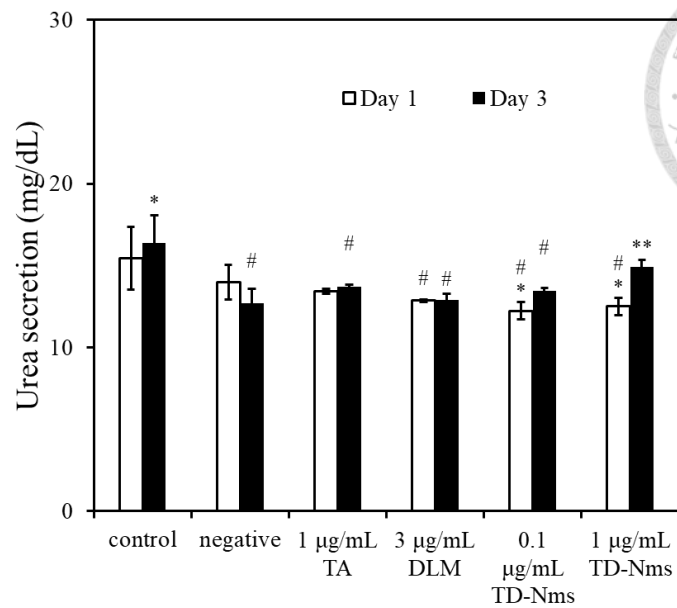
在完成對細胞凋亡之分析後，接著我們繼續探究 TA-DLM 奈米藥物是否能在承受油酸毒化的同時，提升肝臟的機能，因此我們探討了該體外模型在尿素分泌量的表現。首先使用 3.4.2 節之方法將 iPS 細胞誘導成肝細胞，接著利用 3.6.1 節提及之油酸毒化後，最後按照 3.6.2 節的時程加入實驗組企圖回復油酸毒化造成的損害。在加入實驗組後的第 1 天以及第 3 天分別抽取細胞上清液並進行尿素分泌檢測分析。

圖二十一為 585A1 iPS 細胞所誘導之肝細胞的結果：在治療第一天的表現中，可以觀察到 Control 與 Negative 組別分別表現了 15.46 ± 1.92 , 13.97 ± 1.05 mg/dL 的尿素濃度，可以看出來 Negative 組別相對於 Control 組有著略低的尿素表現，然而兩者在第一天並無顯著性差異。而在四組實驗組別中 (TA, DLM, $0.1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms, $1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms) 則分別表現了 13.45 ± 0.15 , 12.86 ± 0.08 , 12.24 ± 0.54 , 12.5 ± 0.54 mg/dL 的尿素濃度，在 TA, DLM 以及 $0.1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 組別與 Negative 組並無顯著差異，而 $1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 組則是更顯著低於 Negative 組。在治療第三天的表現中，可以觀察到 Control 與 Negative 組別分別表現了 16.4 ± 1.67 , 12.67 ± 0.89 mg/dL 的尿素濃度，可以觀察到此時 Control 組則有了顯著較高的尿素分泌量。而在四組實驗組別中 (TA, DLM, $0.1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms, $1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms) 則分別表現了 13.71 ± 0.11 , 12.91 ± 0.38 , 13.46 ± 0.17 , 14.94 ± 0.38 mg/dL 的尿素濃度，除了 TA, DLM $0.1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 和 $1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 組均略高於 Negative 組別的表現外，僅有 $1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 組別則與 Negative 組別有著顯著差異，且與 Control 組別並無差異。由上述結果可以說明：在 585A1 iPS 細胞所誘導之肝細胞的體外 MASLD 模型中，特定濃度的 TA-DLM Nms 均有著回復肝細胞功能性的效果。

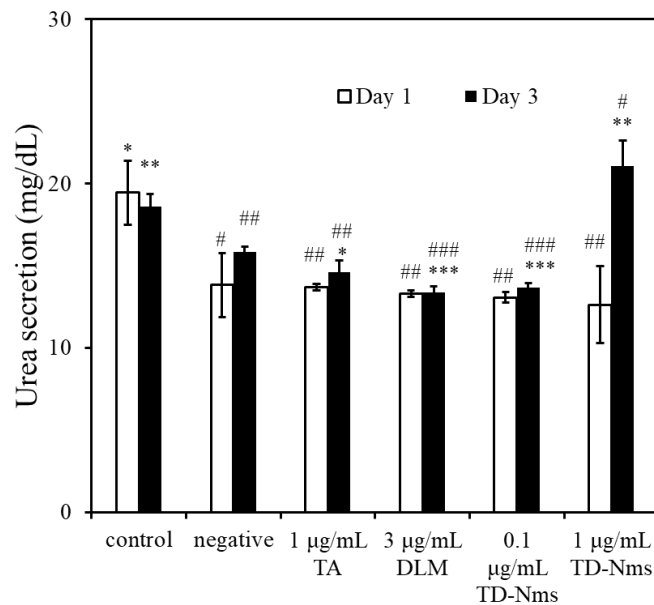
圖二十二為 1535 No.1 iPS 細胞所誘導之肝細胞的結果：在治療第一天的表現中，可以觀察到 Control 與 Negative 組別分別表現了 19.44 ± 1.96 , 13.81 ± 1.93 mg/dL 的尿素濃度，可以看出來 Negative 組別相對於 Control 組有著顯著降低的尿素表現。而在四組實驗組別中 (TA, DLM, $0.1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms, $1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms) 則分別表現了 13.69 ± 0.18 ,

13.31 ± 0.21, 13.05 ± 0.32, 12.62 ± 2.34 mg/dL 的尿素濃度，檢測數據顯示四組實驗組均與 Negative 組並無顯著差異。在治療第三天的表現中，可以觀察到 Control 與 Negative 組分別表現了 18.61 ± 0.75, 15.81 ± 0.33 的尿素濃度，可以觀察到此時 Control 組維持顯著較高的尿素分泌量。而在四組實驗組別中 (TA, DLM, 0.1 µg/mL TA-DLM Nms, 1 µg/mL TA-DLM Nms) 則分別表現了 14.61 ± 0.71, 13.36 ± 0.38, 13.66 ± 0.26, 21.08 ± 1.54 mg/dL 的尿素濃度，僅有 1 µg/mL TA-DLM Nms 組別則與 Negative 組別有著顯著差異，且也顯著高於 Control 組。此外，與 585A1 iPS 細胞所誘導之肝細胞 (圖十八) 相比，1 µg/mL TA-DLM Nms 在 1535 No.1 iPS 細胞模型中可以回復較高比例的尿素分泌量。由上述結果可以說明：在 1535 No.1 iPS 細胞所誘導之肝細胞的體外 MASLD 模型中，特定濃度的 TA-DLM Nms 均有著回復肝細胞功能性的效果。

綜合上述兩種 iPS 細胞所誘導之肝細胞的尿素結果可以說明：(1) 由油酸所誘導之 MASLD 模型確實會造成尿素表現下降，說明肝細胞功能性的下降。(2) 特定濃度的 TA-DLM Nms 均有著抑制油酸所造成細胞功能性下降的效果。(3) 1 µg/mL TA-DLM Nms 可以較大程度的提升在 1535 No.1 iPS 細胞所誘導之肝細胞模型中的尿素分泌量。



圖二十一：585A1 iPS 細胞誘導之肝細胞 MASLD 體外模型之尿素分泌量檢測結果。
 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ significant differences vs. Negative on day 1, 3, respectively;
 # $p < 0.05$ significant differences vs. Control on day 1, 3, respectively).



圖二十二：1535 No.1 iPS 細胞誘導之肝細胞 MASLD 體外模型之尿素分泌量檢測結果。
 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significant differences vs. Negative on day 1, 3, respectively;
 # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, significant differences vs. Control on day 1, 3, respectively).



4.3.4 iPS 細胞誘導之肝細胞之白蛋白免疫螢光檢測

在完成對尿素分泌量之分析後，接著我們繼續探究該模型在另一項肝細胞重要機能表現的指標：白蛋白，因此我們對該模型進行了白蛋白免疫螢光檢測進行定性分析。首先使用 3.4.2 節之方法將 iPS 細胞誘導成肝細胞，接著利用 3.6.1 節提及之油酸毒化後，最後按照 3.6.2 節的時程加入實驗組企圖回復油酸毒化造成的損害。並按照 3.7.2 節的方法進行細胞核以及白蛋白之免疫螢光染色。

圖二十三為 585A1 iPS 細胞誘導之肝細胞免疫螢光結果，根據圖中的結果可以觀察到相較於 Control 組，Negative 組所呈現的白蛋白反應較為微弱；而在其餘四組實驗組中 (TA, DLM, 0.1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms, 1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms)，TA 與 DLM 組有著白蛋白表現回復的跡象，而在 0.1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 以及 1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 組則是呈現可與 Control 組相比擬的白蛋白反應。由上述結果可以說明 TA-DLM Nms 在 585A1 iPS 細胞所誘導之肝細胞的體外 MASLD 模型中有著提升細胞機能的效果。

圖二十四為 1535 No.1 iPS 細胞誘導之肝細胞免疫螢光結果，根據圖中的結果可以觀察到相較於 Control 組，Negative 組中的白蛋白反應甚為微弱；而在其餘四組實驗組中 (TA, DLM, 0.1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms, 1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms)，四組均表現了可觀的白蛋白反應。由上述結果可以說明 TA, DLM 以及 TA-DLM Nms 在 1535 No.1 iPS 細胞所誘導之肝細胞的體外 MASLD 模型中有著提升細胞機能的效果。

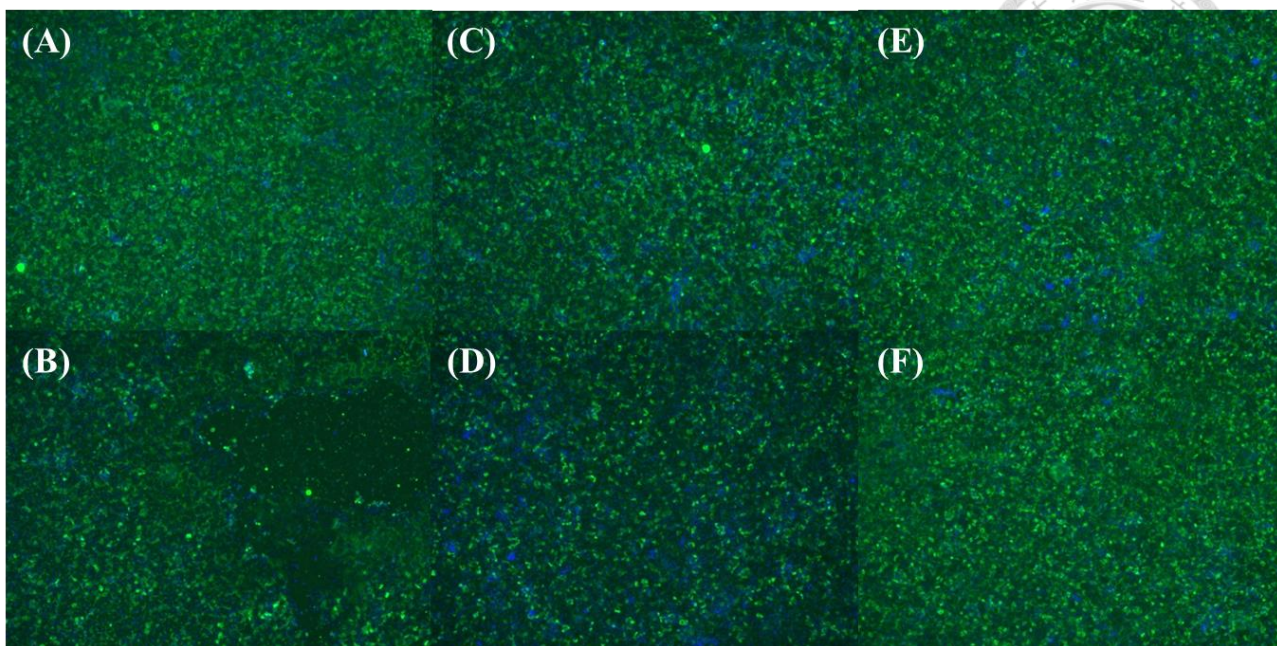


圖 二十三：585A1 iPS 細胞誘導之肝細胞 MASLD 體外模型之白蛋白分泌免疫螢光結果。

(A: Control 組, B: Negative 組, C: 1 $\mu\text{g/mL}$ TA 組, D: 3 $\mu\text{g/mL}$ DLM 組, E: 0.1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 組, F: 1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 組；藍色為細胞核，綠色為白蛋白)。

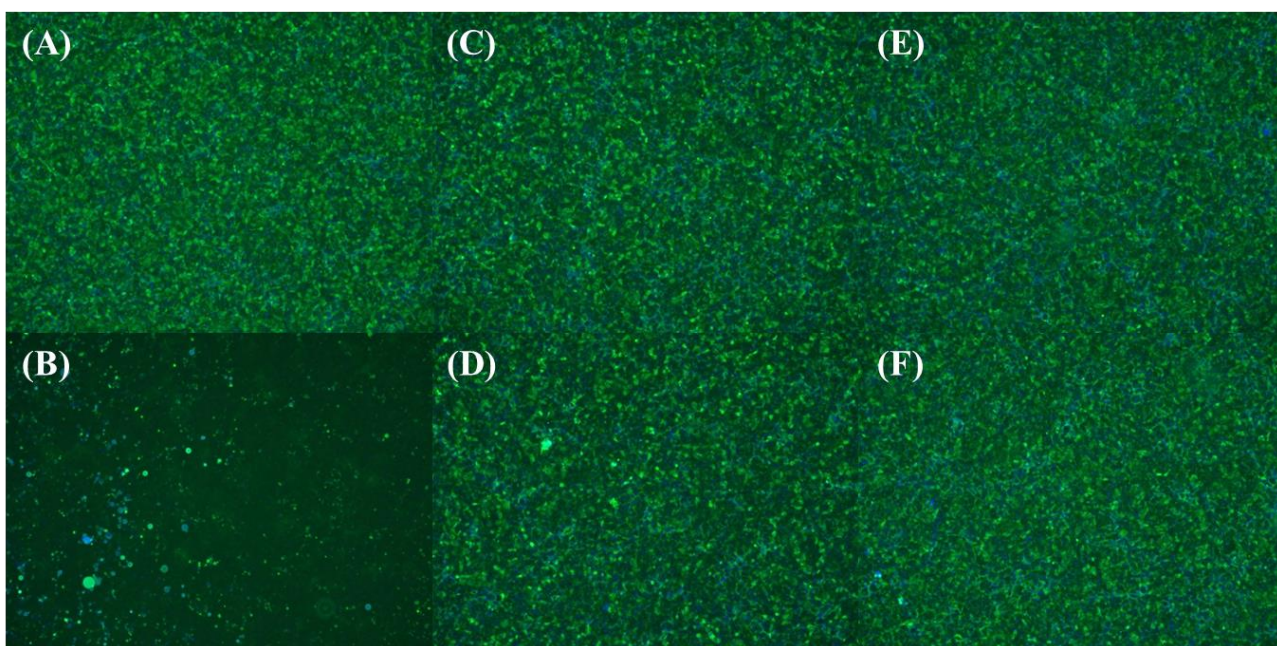


圖 二十四：1535 No.1 iPS 細胞誘導之肝細胞 MASLD 體外模型之白蛋白分泌免疫螢光結果。

(A: Control 組, B: Negative 組, C: 1 $\mu\text{g/mL}$ TA 組, D: 3 $\mu\text{g/mL}$ DLM 組, E: 0.1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 組, F: 1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 組；藍色為細胞核，綠色為白蛋白)。



4.3.5 iPS 細胞誘導之肝細胞之白蛋白分泌量檢測

在完成對白蛋白的定性分析後，我們著手對該體外模型進行白蛋白分泌量的定量分析。首先使用 3.4.2 節之方法將 iPS 細胞誘導成肝細胞，接著利用 3.6.1 節提及之油酸毒化後，最後按照 3.6.2 節的時程加入實驗組企圖回復油酸毒化造成的損害。在加入實驗組後的第 1 天以及第 3 天分別抽取細胞上清液並進行白蛋白分泌量分析。

圖二十五為 585A1 iPS 細胞所誘導之肝細胞的結果：在治療第一天的表現中，可以觀察到 Control 與 Negative 組別分別表現了 3.89 ± 0.16 , 3.75 ± 0.01 ng/mL 的白蛋白濃度，可以看出來 Negative 組別相對於 Control 組有著略低的白蛋白表現，然而兩者在第一天並無顯著性差異。而在四組實驗組別中 (TA, DLM, $0.1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms, $1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms) 則分別表現了 4.64 ± 0.06 , 5.42 ± 0.03 , 9.18 ± 0.05 , 3.19 ± 0.01 ng/mL 的白蛋白濃度，可以觀察到 TA, DLM 以及 $0.1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 組均表現顯著較高的白蛋白分泌量，然而 $1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 組則是更顯著低於 Control 以及 Negative 組。在治療第三天的表現中，可以觀察到 Control 與 Negative 組別分別表現了 12.18 ± 2.4 , 6.79 ± 2.43 的白蛋白分泌量，可以觀察到此時 Control 組則有了顯著較高的白蛋白分泌量。而在四組實驗組別中 (TA, DLM, $0.1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms, $1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms) 則分別表現了 5.44 ± 2.55 , 4.04 ± 1.84 , 5.79 ± 2.37 , 15.95 ± 6.15 的白蛋白分泌量，TA, DLM 和 $0.1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 與 Negative 組別並無顯著差異，僅有 $1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 組別則與 Negative 組別有著顯著差異，且與 Control 組別並無差異。由上述結果可以說明：在 585A1 iPS 細胞所誘導之肝細胞的體外 MASLD 模型中，特定濃度的 TA-DLM Nms 均有著回復肝細胞機能的效果。

圖二十六為 1535 No.1 iPS 細胞所誘導之肝細胞的結果：在治療第一天的表現中，可以觀察到 Control 與 Negative 組別分別表現了 10.33 ± 0.72 , 5.5 ± 0.01 ng/mL 的白蛋白濃度，可以看出來 Negative 組別相對於 Control 組有著顯著較低的白蛋白表現。而在四組實驗組別中 (TA, DLM, $0.1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms, $1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms) 則分別表現了 3.57 ± 0.01 , 2.64 ± 0.01 , 4.19 ± 0.02 , 22.35 ± 0.29 的白蛋白濃度，可以觀察到 TA, DLM 以及 $0.1 \mu\text{g/mL}$ TA-DLM



Nms 組均無表現白蛋白回復的跡象，然而 1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 組則是有著相較於 Control 與 Negative 組別有著顯著的上升。在治療第三天的表現中，可以觀察到 Control 與 Negative 組別分別表現了 14.63 ± 0.41 , 5.27 ± 0.02 的白蛋白分泌量，可以觀察到此時 Control 組則持續維持顯著較高的白蛋白分泌量。而在四組實驗組別中 (TA, DLM, 0.1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms, 1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms) 則分別表現了 4.41 ± 0.01 , 3.4 ± 0.03 , 4.66 ± 0.02 , 14.34 ± 0.2 的白蛋白分泌量，TA, DLM 和 0.1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 均低於 Negative 組別分泌量，僅有 1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 組別則與 Negative 組別有著顯著差異，且與 Control 組別並無差異。此外，與 585A1 iPS 細胞所誘導之肝細胞 (圖二十四) 相比，1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 在 1535 No.1 iPS 細胞模型中可以回復較高比例的尿素分泌量。由上述結果可以說明：在 1535 No.1 iPS 細胞所誘導之肝細胞的體外 MASLD 模型中，特定濃度的 TA-DLM Nms 均有著回復肝細胞機能的效果。

綜合上述兩種 iPS 細胞所誘導之肝細胞的白蛋白結果可以說明：(1) 由油酸所誘導之 MASLD 模型確實會造成白蛋白表現下降，說明肝細胞功能性的下降。(2) 特定濃度的 TA-DLM Nms 均有著抑制油酸所造成細胞功能性下降的效果。(3) 1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 可以較大程度的提升在 1535 No.1 iPS 細胞所誘導之肝細胞模型中的白蛋白分泌量。

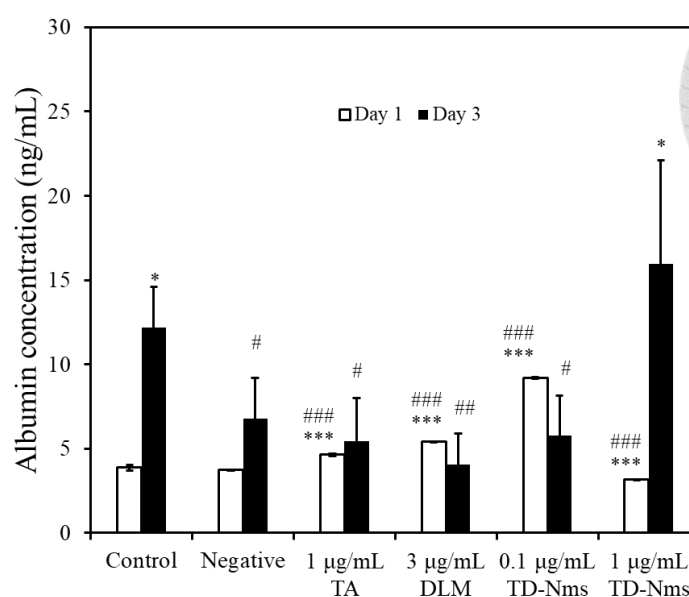


圖 二十五：585A1 iPS 細胞誘導之肝細胞 MASLD 體外模型之白蛋白分泌量檢測結果。

(* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, significant differences vs. Negative on day 1, 3, respectively;
$p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, significant differences vs. Control on day 1, 3, respectively).

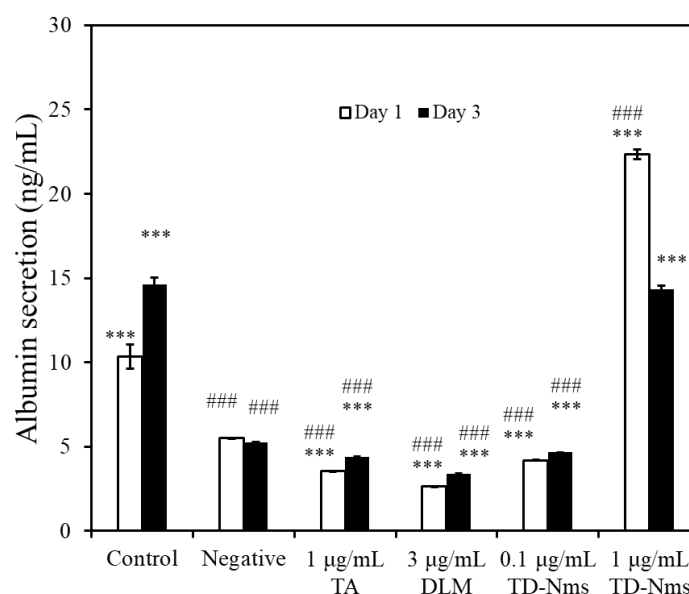


圖 二十六：1535 No.1 iPS 細胞誘導之肝細胞 MASLD 體外模型之白蛋白分泌量檢測結果。

(*** $p < 0.001$, significant differences vs. Negative on day 1, 3, respectively;
$p < 0.001$, significant differences vs. Control on day 1, 3, respectively).



4.4 TA-DLM 奈米藥物對大鼠初代成熟肝細胞的影響

4.4.1 大鼠初代成熟肝細胞生長型態觀察

首先如 3.5.1 節進行大鼠肝臟灌流、採取以及分離出初代成熟肝細胞進行培養後，於種植細胞 4 小時後，將培養液更換為含有 1 mM OA 之培養液進行毒化後，再於種植細胞 24 小時後再將實驗組之培養液分別更換為含有 TA 以及 TA-DLM 奈米藥物的培養液。在加入實驗組後每天更換一次培養液，使用 Axio Vert.A1 倒立式顯微鏡觀察並拍攝肝細胞之生長狀況。

在圖二十七中，Control 組中的正常肝細胞顯示細胞形態良好，排列緊密。而在 Negative 組中，添加了油酸誘導形成脂肪肝細胞，可以明顯看到細胞出現脂肪變性，並且有顯著的肝細胞肥大現象。

圖二十八為添加不同濃度之 TA 以及 TA-DLM Nms 一天後的結果。加入 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 TA 後，部分脂肪肝細胞的形態有所改善，但仍存在脂肪變性現象。5 $\mu\text{g/mL}$ 的 TA 顯著改善了細胞形態，脂肪變性減少，細胞排列較為緊密。加入 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 TA-DLM Nms 後，細胞形態有進一步改善，脂肪變性減少。5 $\mu\text{g/mL}$ 的 TA-DLM Nms 則顯示出最佳效果，幾乎完全消除了脂肪變性，恢復了細胞的正常形態和排列。

圖二十九顯示了治療三天後的結果。與治療一天 (圖二十八) 後相比，1 $\mu\text{g/mL}$ 的 TA 組繼續顯示出部分改善，但脂肪變性現象仍然存在。5 $\mu\text{g/mL}$ 的 TA 組在三天後的效果更加顯著，脂肪變性進一步減少，細胞排列更為緊密。1 $\mu\text{g/mL}$ 的 TA-DLM Nms 組也顯示出持續的改善，脂肪變性減少。5 $\mu\text{g/mL}$ 的 TA-DLM Nms 組在三天後的效果最好，幾乎完全消除了脂肪變性，並恢復了細胞的正常形態和排列。

總結來說，油酸 (OA) 能夠在 24 小時內誘導肝細胞形成脂肪肝細胞，顯著增加細胞內脂肪變性。TA 和 TA-DLM Nms 均能有效減少脂肪肝細胞的脂肪變性，恢復細胞形態，並且隨治療時間的增加，效果更加顯著。特別是 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 TA-DLM Nms 組表現出最優異的效果，在三天內幾乎完全消除了脂肪變性現象，顯示其在保護由油酸誘導的 MASLD 模型方面的潛

力。

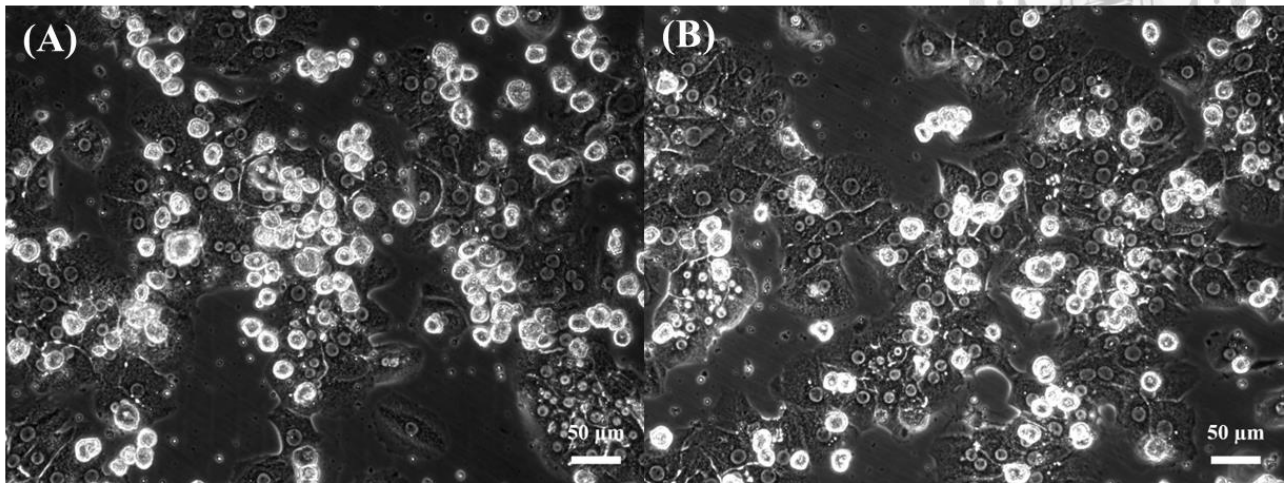


圖 二十七：大鼠初代成熟肝細胞誘導之肝細胞 MASLD 體外模型之第一天生長情形。

(A: Control 組；B: Negative 組)

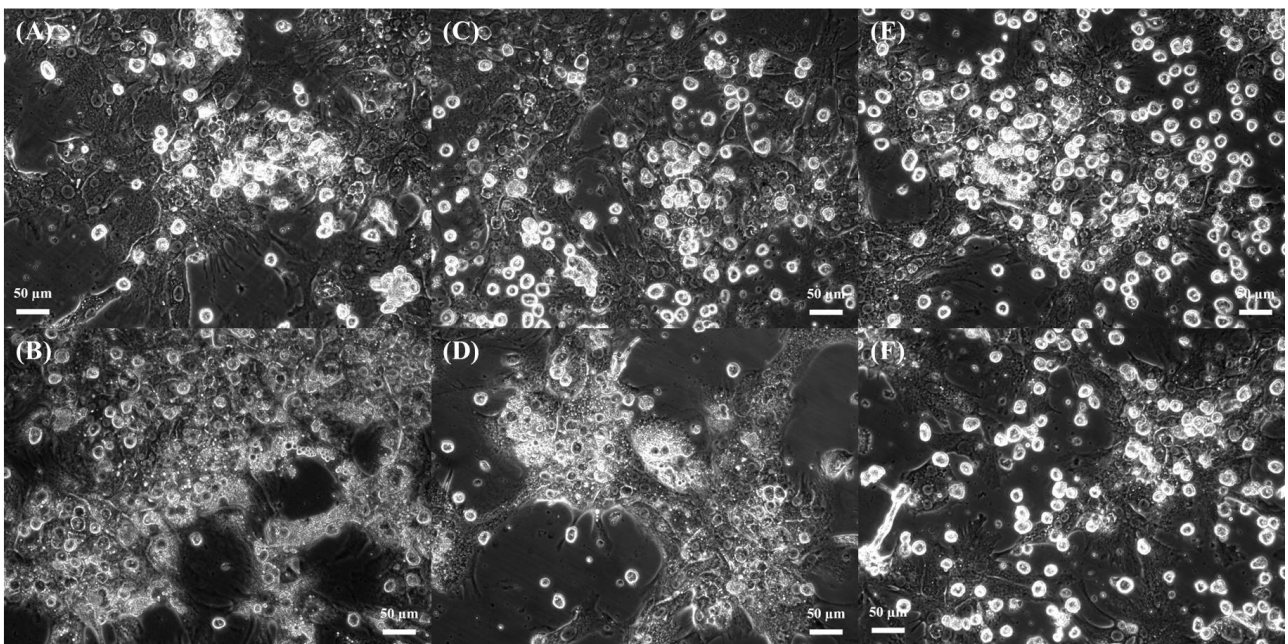


圖 二十八：大鼠初代成熟肝細胞誘導之肝細胞 MASLD 體外模型之第二天生長情形。

(A: Control 組；B: Negative 組；C: 1 $\mu\text{g/mL}$ TA 組；D: 5 $\mu\text{g/mL}$ TA 組；E: 1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 組；F: 5 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 組)。

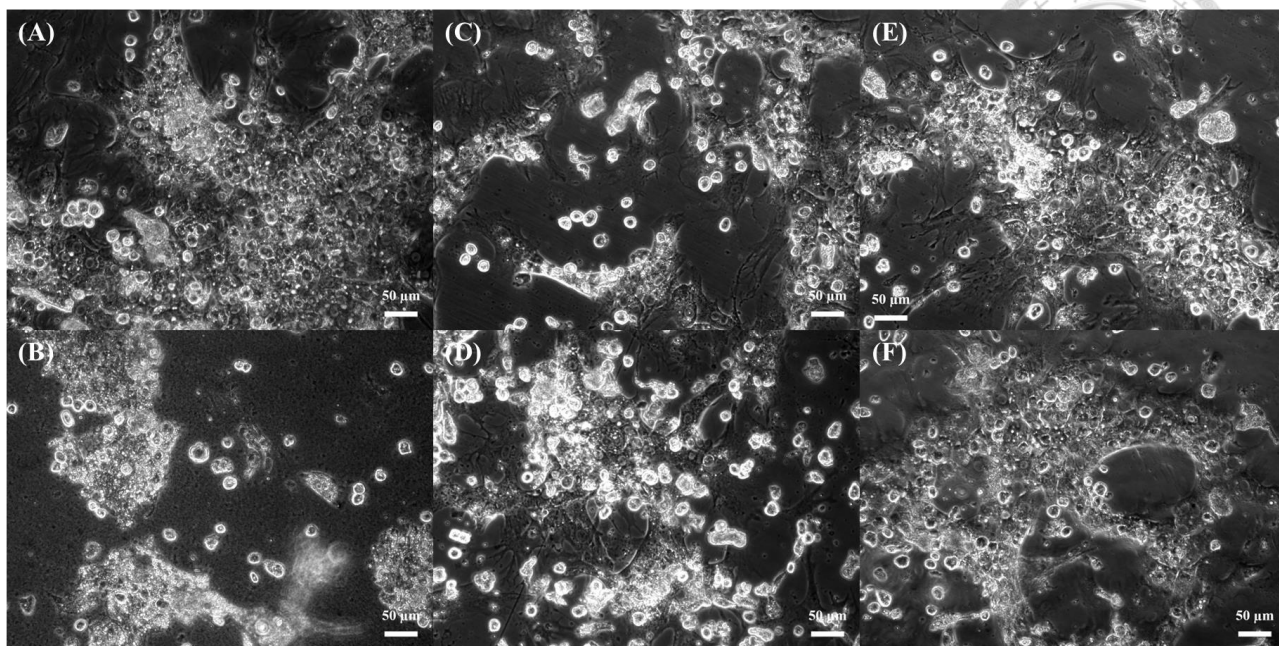


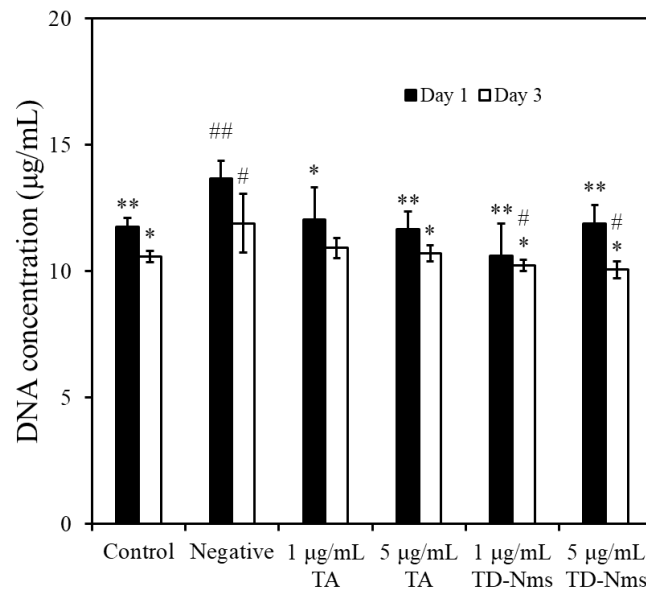
圖 二十九：大鼠初代成熟肝細胞誘導之肝細胞 MASLD 體外模型之第四天生長情形。
 (A: Control 組；B: Negative 組；C: 1 $\mu\text{g/mL}$ TA 組；D: 5 $\mu\text{g/mL}$ TA 組；E: 1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM
 Nms 組；F: 5 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 組)。



4.4.2 大鼠初代成熟肝細胞之 DNA 含量檢測

在完成對細胞型態的觀察後，我們接著量測細胞盤內各組的 DNA 含量。首先如 3.5.1 節進行大鼠肝臟灌流、採取以及分離出初代成熟肝細胞進行培養後，於種植細胞 4 小時後，將培養液更換為含有 1 mM OA 之培養液進行毒化後，再於種植細胞 24 小時後再將實驗組之培養液分別更換為含有 TA 以及 TA-DLM 奈米藥物的培養液。在加入實驗組後每天更換一次培養液，接著收集治療一天以及治療三天後的細胞盤進行 DNA 含量檢測。

圖三十為大鼠初代肝細胞的結果：在治療第一天的表現中，可以觀察到 Control 與 Negative 組別分別表現了 11.77 ± 0.32 , 13.67 ± 0.69 $\mu\text{g/mL}$ 的 DNA 含量，Negative 組別相較於 Control 組有著顯著較高的趨勢；而在四組實驗組別中 (1 $\mu\text{g/mL}$ TA, 5 $\mu\text{g/mL}$ TA, 1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms, 5 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms) 則分別表現了 12.06 ± 1.26 , 11.66 ± 0.72 , 10.62 ± 1.25 , 11.9 ± 0.72 $\mu\text{g/mL}$ 的 DNA 含量。四組均表現了相較於 Negative 組顯著較低的 DNA 含量，且與 Control 組無顯著性差異。在治療第三天的表現中，可以觀察到 Control 與 Negative 組別分別表現了 10.58 ± 0.21 , 11.9 ± 1.16 $\mu\text{g/mL}$ 的 DNA 含量，Negative 組別相較於 Control 組有著顯著較高的表現，呈現與第一天相同的趨勢；而在四組實驗組別中 (1 $\mu\text{g/mL}$ TA, 5 $\mu\text{g/mL}$ TA, 1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms, 5 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms) 則分別表現了 10.93 ± 0.4 , 10.71 ± 0.31 , 10.24 ± 0.22 , 10.06 ± 0.33 $\mu\text{g/mL}$ 的 DNA 含量，除了 1 $\mu\text{g/mL}$ TA 組以外，其餘三組皆表現了與 Negative 組顯著較低的 DNA 含量。由上述結果可知，OA 可以促進肝細胞的增值，目的或許是可以加速對脂質的代謝；而 TA 以及 TA-DLM Nms 有著減緩此趨勢的能力[86]。



圖三十：大鼠初代成熟肝細胞 MASLD 體外模型之 DNA 含量檢測結果。
 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ significant differences vs. Negative on day 1, 3, respectively;
 $^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#}p < 0.01$ significant differences vs. Control on day 1, 3, respectively).



4.4.3 大鼠初代成熟肝細胞之 LDH 活性檢測

在完成對細胞盤內 DNA 含量的檢測後，接著我們繼續探究 TA-DLM 奈米藥物是否能減低肝細胞之凋亡，減緩油酸所帶來的毒性。首先使用 3.5.1 節之方法將大鼠初代肝細胞從肝臟分離培養後，接著利用 3.6.1 節提及之油酸毒化後，最後按照 3.6.2 節的時程加入實驗組企圖回復油酸毒化造成的損害。在加入實驗組後的第 1 天以及第 3 天分別抽取細胞上清液並進行 LDH 活性檢測分析。檢測到的 LDH 活性數據會再除以該細胞培養盤孔中的 DNA 含量，以正規化出單一細胞中的 LDH 活性。

圖三十一為大鼠初代肝細胞的結果：在治療第一天的表現中，可以觀察到 Control 與 Negative 組別分別表現了 2.56 ± 0.42 , 4.1 ± 1.71 milliunits/mL/ μ g DNA 的 LDH 活性，Negative 組別相較於 Control 組有著略為提高的趨勢然而並不具備顯著性；而在四組實驗組別中 (1μ g/mL TA, 5μ g/mL TA, 1μ g/mL TA-DLM Nms, 5μ g/mL TA-DLM Nms) 則分別表現了 4.78 ± 1.14 , 5.98 ± 1.32 , 8.85 ± 3.37 , 5.4 ± 0.68 milliunits/mL/ μ g DNA 的 LDH 活性。四組均表現了相較於 Control 組顯著較高的 LDH 活性，且除了 1μ g/mL TA-DLM Nms 以外，其餘三組均與 Negative 組別有著相似的表現。在治療第三天的表現中，可以觀察到 Control 與 Negative 組別分別表現了 9.35 ± 1.35 , 19.13 ± 1.07 milliunits/mL/ μ g DNA 的 LDH 活性，Negative 組別相較於 Control 組有著顯著較高的表現；而在四組實驗組別中 (1μ g/mL TA, 5μ g/mL TA, 1μ g/mL TA-DLM Nms, 5μ g/mL TA-DLM Nms) 則分別表現了 7.27 ± 1.4 , 11.57 ± 1.93 , 11.88 ± 0.96 , 11.76 ± 1.72 milliunits/mL/ μ g DNA 的 LDH 活性，四者均表現了相較於 Negative 組顯著較低的 LDH 活性。這些結果顯示，在治療一天後，所有實驗組均表現出較高的 LDH 活性，這表明這些處理對肝細胞在短期內仍存在一定的細胞毒性。然而，在治療第三天後， 1μ g/mL TA 和 5μ g/mL TA-DLM Nms 組別表現出顯著降低的 LDH 活性，顯示出相較於 Negative 組顯著的保護效果，減少了油酸誘導的細胞損傷。這表明 TA 和 TA-DLM Nms 能夠在抑制油酸毒性所致肝細胞損傷方面具有潛力。

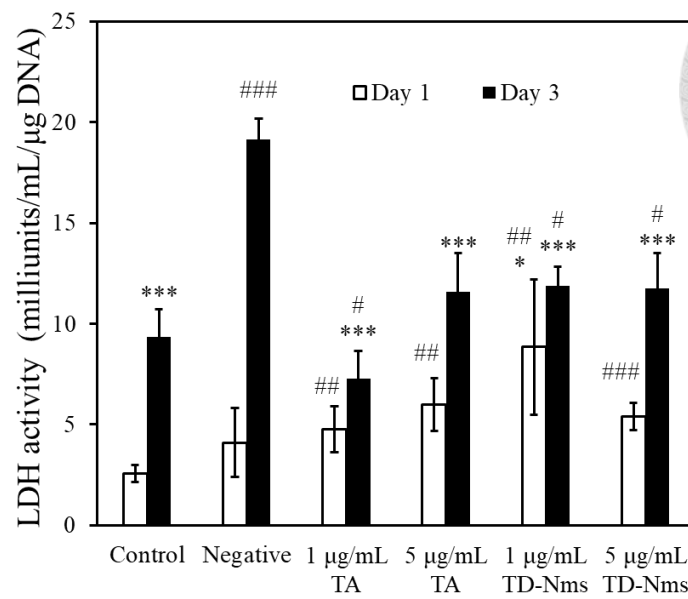


圖 三十一：大鼠初代成熟肝細胞 MASLD 體外模型之 LDH 活性檢測結果。

(* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, significant differences vs. Negative on day 1, 3, respectively;

$p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, significant differences vs. Control on day 1, 3, respectively).



4.4.4 大鼠初代成熟肝細胞之尿素分泌量檢測

在完成對細胞凋亡之分析後，接著我們繼續比較了 TA 以及 TA-DLM 奈米藥物是否能在承受油酸毒化的同時，提升初代肝細胞的機能，因此我們探討了該體外模型在尿素分泌量的表現。首先使用 3.5.1 節之方法將大鼠初代肝細胞從肝臟分離培養後，接著利用 3.6.1 節提及之油酸毒化後，最後按照 3.6.2 節的時程加入實驗組企圖回復油酸毒化造成的損害。在加入實驗組後的第 1 天以及第 3 天分別抽取細胞上清液並進行尿素檢測分析。檢測到的尿素含量數據會再除以該細胞培養盤孔中的 DNA 含量，以正規化出單一細胞中的尿素分泌能力。

圖三十二為大鼠初代成熟肝細胞的結果：在治療第一天的表現中，可以觀察到 Control 與 Negative 組別分別表現了 2.7 ± 0.15 , 1.64 ± 0.1 mg/dL/ μ g DNA 的尿素分泌量，說明此時 Control 組相較於 Negative 組有著顯著較高的尿素分泌量；而在四組實驗組別中 (1 μ g/mL TA, 5 μ g/mL TA, 1 μ g/mL TA-DLM Nms, 5 μ g/mL TA-DLM Nms) 則分別表現了 2.21 ± 0.11 , 2.36 ± 0.36 , 3.69 ± 0.54 , 2.53 ± 0.16 的尿素分泌量。可以觀察到在四組中，1 μ g/mL TA-DLM Nms 表現了最高的尿素分泌量，且四組均表現了與 Negative 組有著顯著較高的尿素分泌量。在治療第三天的表現中，Control 與 Negative 組別分別表現了 4.52 ± 0.56 , 2.56 ± 0.06 mg/dL/ μ g DNA 的尿素分泌量，與治療第一天相同，Control 組相較於 Negative 組持續有著顯著較高的尿素分泌量；在四組實驗組別中 (1 μ g/mL TA, 5 μ g/mL TA, 1 μ g/mL TA-DLM Nms, 5 μ g/mL TA-DLM Nms) 則分別表現了 3.23 ± 0.51 , 3.07 ± 0.13 , 6.29 ± 0.24 , 7.13 ± 0.3 的尿素分泌量。由結果中可以觀察出 TA 組別均有回復現象，但仍低於 Control 組的表現；反觀 TA-DLM Nms 組別則是相較於 Control 組以及 Negative 組均有顯著較高的尿素分泌量。由該檢驗結果可以推論，TA 具有回復由油酸所導致的機能降低外，TA-DLM Nms 有著將肝細胞機能再更提升的潛能。

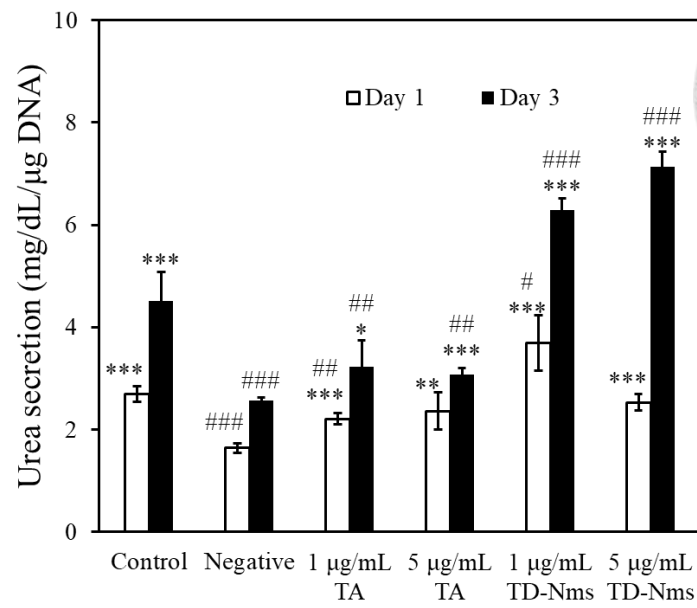


圖 三十二：大鼠初代成熟肝細胞 MASLD 體外模型之尿素分泌量檢測結果。

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significant differences vs. Negative on day 1, 3, respectively;
 $\#p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, significant differences vs. Control on day 1, 3, respectively).



4.4.5 大鼠初代成熟肝細胞之白蛋白分泌量檢測

在完成對尿素分泌量的檢測後，我們便著手對肝細胞機能的另一項指標——白蛋白進行檢測。首先使用 3.5.1 節之方法將大鼠初代肝細胞從肝臟分離培養後，接著利用 3.6.1 節提及之油酸毒化後，最後按照 3.6.2 節的時程加入實驗組企圖回復油酸毒化造成的損害。在加入實驗組後的第 1 天以及第 3 天分別抽取細胞上清液並進行白蛋白檢測分析。檢測到的白蛋白含量數據會再除以該細胞培養盤孔中的 DNA 含量，以正規化出單一細胞中的白蛋白分泌能力。

圖三十三為大鼠初代成熟肝細胞的結果：在治療第一天的表現中，可以觀察到 Control 與 Negative 組別分別表現了 1.35 ± 0.12 , 0.7 ± 0.19 $\mu\text{g/mL}/\mu\text{g DNA}$ 的白蛋白分泌量，Negative 組別的白蛋白分泌量是顯著低於 Control 組的；而在四組實驗組別中 (1 $\mu\text{g/mL}$ TA, 5 $\mu\text{g/mL}$ TA, 1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms, 5 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms) 則分別表現了 1.38 ± 0.18 , 1.09 ± 0.07 , 1.87 ± 0.16 , 1.17 ± 0.05 $\mu\text{g/mL}/\mu\text{g DNA}$ 的白蛋白分泌量。可以觀察到在四組中，1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 有著最高的白蛋白分泌量且與 Control 組以及 Negative 組有著顯著性差距，說明其在治療第一天對於細胞機能的正相關影響。在治療第三天的表現中，可以觀察到 Control 與 Negative 組別分別表現了 1.06 ± 0.05 , 0.63 ± 0.16 $\mu\text{g/mL}/\mu\text{g DNA}$ 的白蛋白分泌量，Negative 組別的白蛋白分泌量與 Day 1 呈現相同的趨勢是顯著低於 Control 組的；而在四組實驗組別中 (1 $\mu\text{g/mL}$ TA, 5 $\mu\text{g/mL}$ TA, 1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms, 5 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms) 則分別表現了 0.95 ± 0.15 , 0.93 ± 0.15 , 1.27 ± 0.14 , 1.31 ± 0.07 $\mu\text{g/mL}/\mu\text{g DNA}$ 的白蛋白分泌量。可以觀察到在四組中，兩組 TA-DLM Nms 組別均有著最高的白蛋白分泌量且與 Control 組以及 Negative 組有著顯著性差距。由該檢驗結果可以推論，TA-DLM Nms 有著將肝細胞機能回復的潛能。

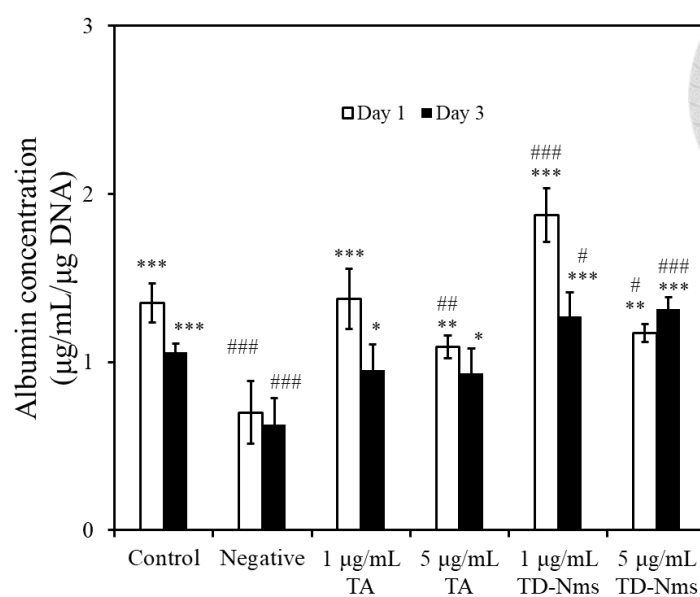


圖 三十三：大鼠初代成熟肝細胞 MASLD 體外模型之白蛋白分泌量檢測結果。

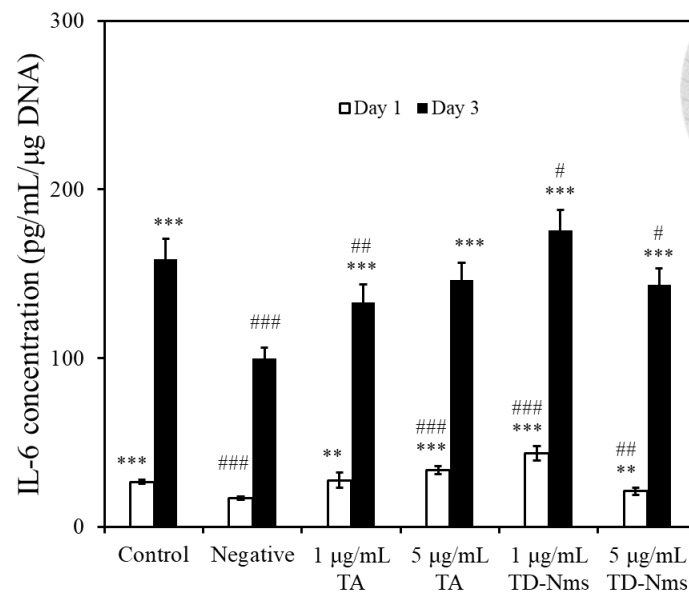
(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significant differences vs. Negative on day 1, 3, respectively;
 $^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#}p < 0.01$, $^{\#\#\#}p < 0.001$, significant differences vs. Control on day 1, 3, respectively).



4.4.6 大鼠初代成熟肝細胞之 IL-6 分泌量檢測

在完成對白蛋白分泌量的檢測後，由於單寧酸會藉由 AMPK signaling pathways 來提升肝細胞粒線體代謝脂質的能力[87]，而 IL-6 這種 cytokine 則是在 AMPK signaling pathways 扮演了正相關的角色[88]。因此我們著手測試了細胞盤內 IL-6 的分泌濃度。首先使用 3.5.1 節之方法將大鼠初代肝細胞從肝臟分離培養後，接著利用 3.6.1 節提及之油酸毒化後，最後按照 3.6.2 節的時程加入實驗組企圖回復油酸毒化造成的損害。在加入實驗組後的第 1 天以及第 3 天分別抽取細胞上清液並進行 IL-6 檢測分析。檢測到的 IL-6 含量數據會再除以該細胞培養盤孔中的 DNA 含量，以正規化出單一細胞中的 IL-6 分泌能力。

圖三十四為大鼠初代成熟肝細胞的結果：在治療第一天的表現中，可以觀察到 Control 與 Negative 組別分別表現了 15.46 ± 1.92 , 13.97 ± 1.05 pg/mL/ μ g DNA 的 IL-6 分泌量，Negative 組別的 IL-6 分泌量是顯著低於 Control 組的；而在四組實驗組別中 (1 μ g/mL TA, 5 μ g/mL TA, 1 μ g/mL TA-DLM Nms, 5 μ g/mL TA-DLM Nms) 則分別表現了 13.45 ± 0.15 , 12.86 ± 0.08 , 12.24 ± 0.54 , 12.5 ± 0.54 pg/mL/ μ g DNA 的 IL-6 分泌量。可以觀察到在四組中，1 μ g/mL TA-DLM Nms 有著最高的 IL-6 分泌量且四組皆與 Control 組以及 Negative 組有著顯著性差距，說明其在治療第一天對於 AMPK signaling pathways 的正相關影響。在治療第三天的表現中，可以觀察到 Control 與 Negative 組別分別表現了 158.62 ± 11.84 , 99.61 ± 6.69 pg/mL/ μ g DNA 的 IL-6 分泌量，Negative 組別的 IL-6 分泌量與 Day 1 呈現相同的趨勢是顯著低於 Control 組的；而在四組實驗組別中 (1 μ g/mL TA, 5 μ g/mL TA, 1 μ g/mL TA-DLM Nms, 5 μ g/mL TA-DLM Nms) 則分別表現了 132.98 ± 10.53 , 146.42 ± 10.05 , 175.68 ± 12.02 , 143.3 ± 10.07 pg/mL/ μ g DNA 的 IL-6 分泌量。與治療第一天呈現的趨勢相同，1 μ g/mL TA-DLM Nms 有著最高的 IL-6 分泌量且四組皆與 Control 組以及 Negative 組有著顯著性差距。以上的結果說明，TA 以及 TA-DLM Nms 有著刺激 IL-6 的分泌量並進而影響 AMPK signaling pathways 對於粒線體的脂質代謝功能。



圖三十四：大鼠初代成熟肝細胞 MASLD 體外模型之 IL-6 分泌量檢測結果。

(** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significant differences vs. Negative on day 1, 3, respectively;
 $^{\#}p < 0.05$, $^{\# \#}p < 0.01$, $^{\# \# \#}p < 0.001$, significant differences vs. Control on day 1, 3, respectively).



4.4.7 大鼠初代成熟肝細胞之脂質累積量檢測

在了解 IL-6 在該模型中的表現量後，我們也使用 Adipored 試劑以針對 TA 以及 TA-DLM Nms 改善盤內的脂質堆積的能力進行探討。首先使用 3.5.1 節之方法將大鼠初代肝細胞從肝臟分離培養後，接著利用 3.6.1 節提及之油酸毒化後，最後按照 3.6.2 節的時程加入實驗組企圖回復油酸毒化造成的損害。在加入實驗組後的第 3 天依照 3.7.4 節的方法進行細胞內脂質含量分析。

圖三十五為大鼠初代成熟肝細胞的結果：可以觀察到如果將 Control 組中的脂質含量設為 100% 時，Negative 組以及四組實驗組則分別有著 218.64 ± 10.97 , 164.21 ± 2.96 , 147.7 ± 1.34 , 138.95 ± 2.35 , $141.78 \pm 6.8\%$ 的脂質堆積比例。首先可以觀察到相較於 Control 組，Negative 組有著顯著較高的脂質堆積表現，說明在該毒化模式下確實會有著較高的脂質累積。接著在四組實驗組中皆相對於 Negative 組有著顯著下降的趨勢，說明 TA 以及 TA-DLM Nms 皆具備著降低細胞內脂質堆積的能力，然而 TA 組與 TA-DLM Nms 組之間並無明顯的差異性。

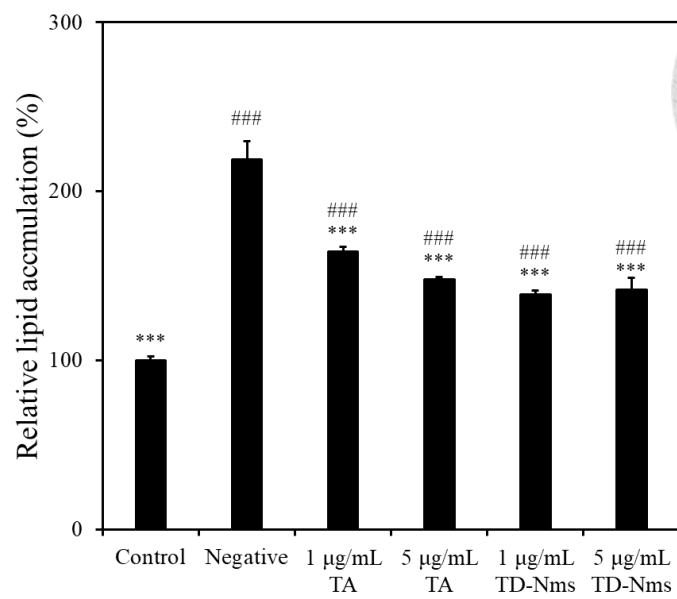


圖 三十五：大鼠初代成熟肝細胞 MASLD 體外模型之脂質累積量檢測結果。
 (***) $p < 0.001$, significant differences vs. Negative on day 1, 3, respectively ;
 (###) $p < 0.001$, significant differences vs. Control on day 1, 3, respectively)



4.5 TA-DLM 奈米藥物對小鼠 MASLD 模型的影響

在完成對體外實驗的結果後，我們便著手將 TA-DLM Nms 投入到體內實驗的模型中，檢測其在體內是否能有與體外模型中相似的結果。體內實驗分為兩個部分：首先為了了解 TA-DLM Nms 在體內的最佳濃度，因此利用皮下注射 STZ 以及餵食 HFD 以建立小鼠 MASLD 模型後，再分別注射不同濃度之 TA-DLM Nms 以測試最佳的 TA-DLM Nms 濃度；另外，在測試過最佳之 TA-DLM Nms 濃度後，便將該濃度之 TA-DLM Nms 拆分測試，測試其中所含之 TA, DLM 以及 TA-DLM Nms 本身對於 MASLD 體內模型的影響。因此透過餵食 HFD 以及果糖建立小鼠 MASLD 模型後，再分別以 IP 注射上述三種物質到小鼠體內以驗證三者對於體內模型的影響。

4.5.1 小鼠 MASLD 模型預試驗體重、肝臟重量結果

圖三十六為預試驗 4 週齡至 12 週齡體重結果，而圖三十七為將各週之體重數據再除以第 4 週齡之體重以顯示其體重增長幅度，在小鼠 4 週齡至 9 週齡時 Negative 組與 4 組實驗組呈現相似的體重增長趨勢，先是在 4 至 6 週齡時體重攀升，而在 6 至 9 週齡時體重增長趨勢逐漸趨緩，圖三十七之體重增長率數據也顯示相同的趨勢，9 週齡時整體的體重數值約落在 15-23 克，增長率約落在 150-180%。該現象可歸因於該模型的誘導方式為透過皮下注射 STZ 破壞小鼠胰臟內的 β 細胞使胰島素無法被分泌形成第一型糖尿病，而第一型糖尿病的特徵除了高血糖外也會導致體重減輕，故該批小鼠的體重都較健康的小鼠較瘦小[89]。在 9 週齡至 12 週齡則為注射了不同濃度之 TA-DLM Nms 後的體重數據以及體重增長率的結果，可以觀察到在注射後體重數據呈現了略為的分野現象：Negative 組與 4 組實驗組 (0.25, 0.5, 0.75, 1 mg/mL TA-DLM Nms) 分別在 12 週齡時呈現了 17.58 ± 2.18 , 18.4 ± 1.95 , 17.2 ± 2.14 , 18.84 ± 1.49 , 20.48 ± 0.94 g 的體重以及 168.33 ± 9.79 , 175.48 ± 6.29 , 163.49 ± 12.89 , 177.64 ± 8.76 , $193.14 \pm 5.49\%$ 的體重增長率。可以觀察到 1 mg/mL TA-DLM Nms 有著最高的體重以及體重

增長率的表現，而 0.5 mg/mL TA-DLM Nms 有著最低的體重以及體重增長率的表現，然而 5 組之間並沒有出現濃度依存性以及顯著性差距。

接著我們探討了各組別之肝臟重量以及肝重/體重比例：圖三十八為各組肝臟重量結果，Negative 以及 4 組實驗組分別有著 1.68 ± 0.17 , 1.41 ± 0.14 , 1.37 ± 0.2 , 1.23 ± 0.09 , 1.49 ± 0.16 g 的肝臟重量。由於在此 MASLD 模型中，肝臟內會累積過多的脂質，因此會使肝臟重量相較於健康的肝臟較重，這也說明了 Negative 組肝臟重量較高的原因[90]；另外在 4 組實驗組則是在 0.75 mg/mL TA-DLM Nms 有著最低的肝臟重量，且與 Negative 組別有著顯著性差異，然而在該結果中並無出現濃度依存性。接著我們將各隻小鼠的肝臟重量除以其體重，圖三十九為肝重/體重比例結果，Negative 以及 4 組實驗組分別有著 9.62 ± 1.27 , 7.67 ± 0.28 , 7.99 ± 0.69 , 6.58 ± 0.59 , $7.31 \pm 0.99\%$ 的肝臟/體重比例。首先由於肝臟累積較多的脂肪，因此 MASLD 模型之小鼠其肝臟會佔身體重量較高的比例（一般為 4-6%），因此 Negative 組別會有較高的肝重/體重比例；而可以觀察到 4 組實驗組均相較於 Negative 組有著顯著較低的肝重/體重比例，且 0.75 mg/mL TA-DLM Nms 有著最低的表現，該結果說明了 TA-DLM Nms 確實可以影響該模型小鼠的肝臟重量，且 0.75 mg/mL TA-DLM Nms 有著最顯著的表現。

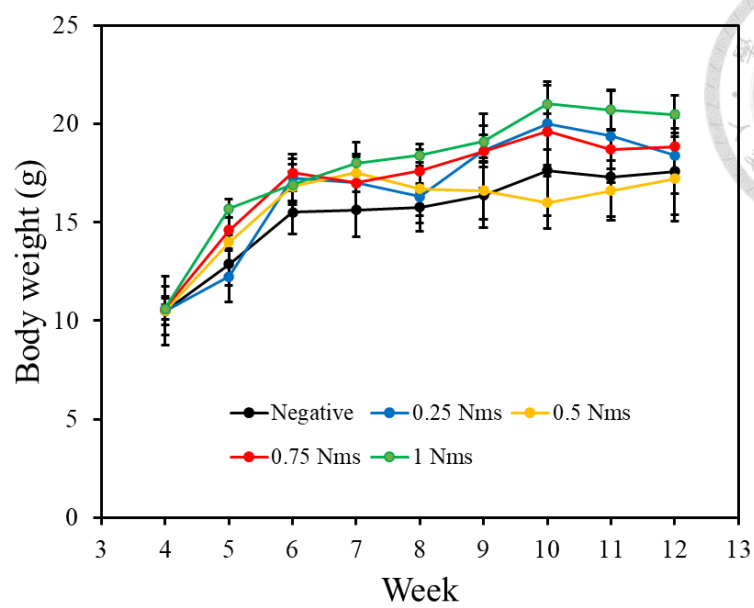


圖 三十六：小鼠體內 MASLD 模型預試驗體重數據。

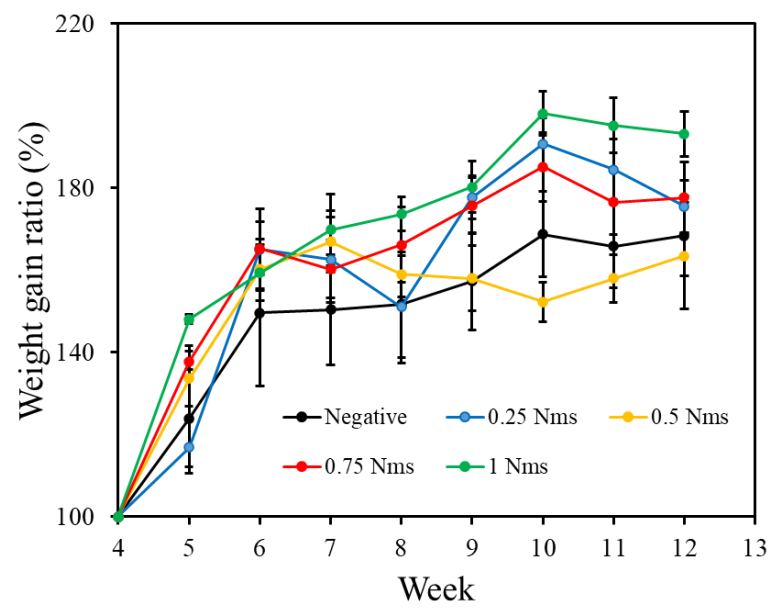
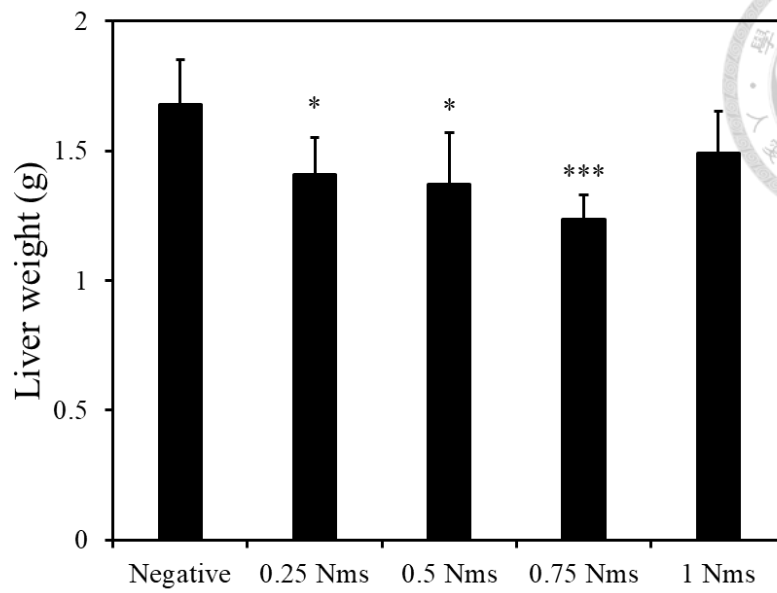
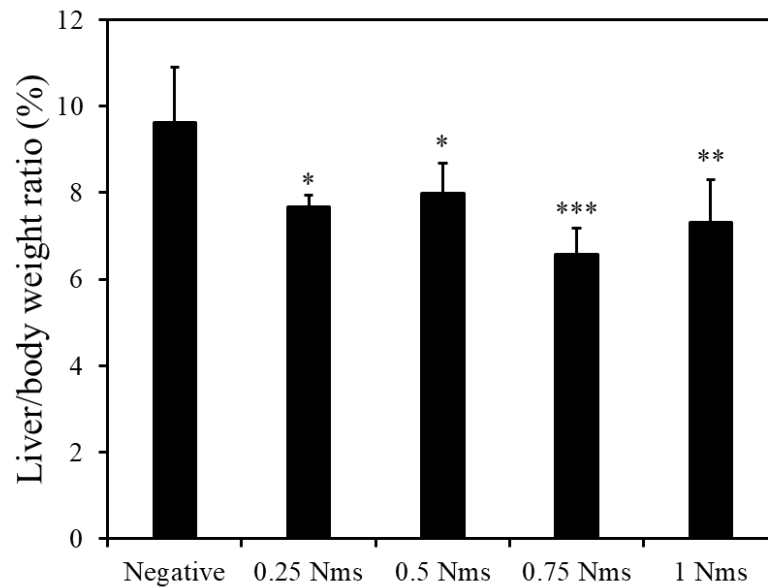


圖 三十七：小鼠體內 MASLD 模型預試驗體重增長率數據。



圖三十八：小鼠體內 MASLD 模型預試驗肝臟重量數據。

(* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, significant differences vs. Negative, respectively)



圖三十九：小鼠體內 MASLD 模型預試驗肝重/體重比例數據。

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significant differences vs. Negative, respectively)



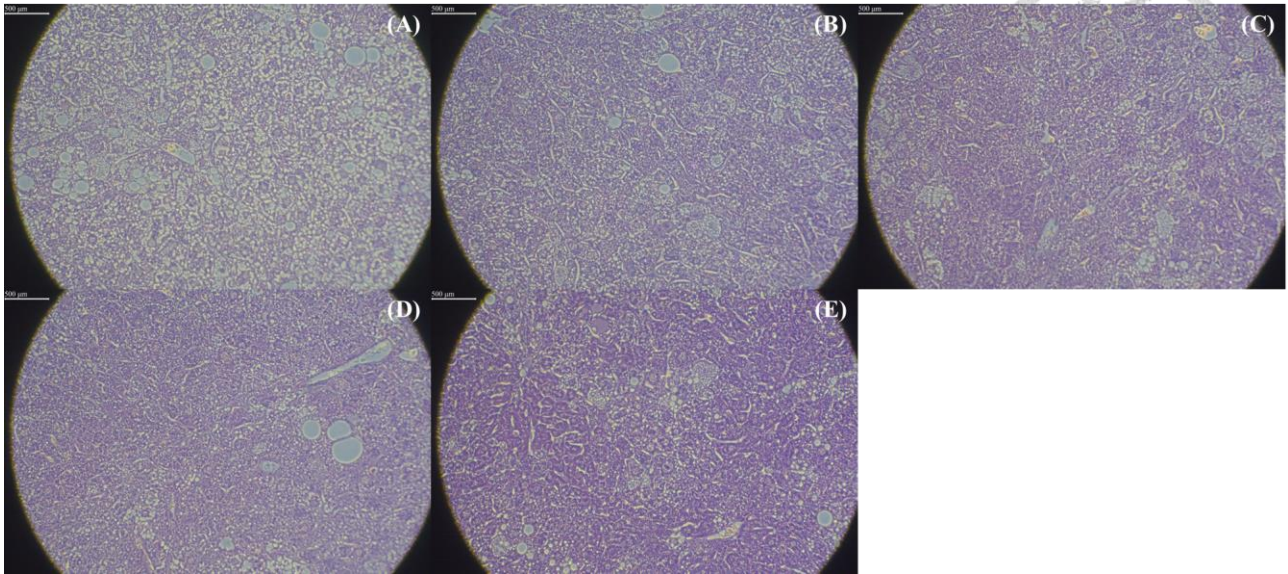
4.5.2 小鼠 MASLD 模型預試驗組織切片結果

在完成對小鼠 MASLD 模型預試驗的血液分析後，我們為了了解不同濃度之 TA-DLM Nms 對於該模型的肝臟內部細胞的影響，因此在犧牲小鼠後，取其肝臟左右肝葉於 3.7% 福馬林 (37% Formaldehyde 和 PBS 以 1:9 的比例混合) 中，浸泡 24 至 48 小時後轉移至 PBS 中，並於 4 °C 環境下保存。事後送至拓生科技有限公司進行石蠟和冷凍包埋以利進行 H&E 和 Picro-Sirius Red 染色分析。

圖四十為 H&E 的組織染色結果：可以觀察到由於油脂堆積的緣故，在 Negative 組的肝細胞出現了大量的變形，除了難以觀察到最為基本的六角形細胞排列型態外，也有著許多的空腔。接著可以觀察到四組實驗組 (0.25, 0.5, 0.75, 1 mg/mL TA-DLM Nms) 有著相較於 Negative 組較少的空腔，甚至在 1 mg/mL TA-DLM Nms 可以觀察到典型的肝臟細胞六角形排列，顯示 TA-DLM Nms 降低肝臟脂質堆積的能力。

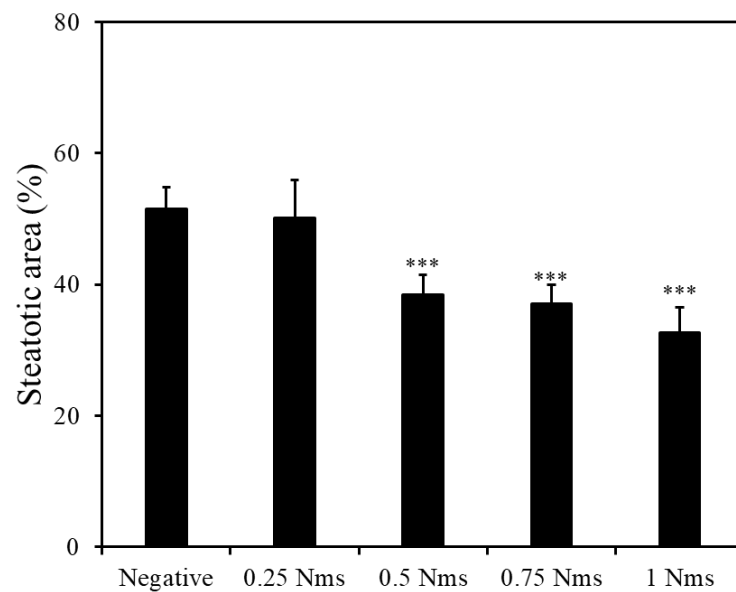
為了進一步定量各組的空腔程度，在拍攝各組之 H&E 的組織切片玻片後，將影像利用 ImageJ 軟體進行脂肪變性程度分析[43]，結果如圖四十一所示：Negative 與四組實驗組分別表現了 51.58 ± 3.27 , 50.2 ± 5.77 , 38.39 ± 3.06 , 37.1 ± 2.79 , $32.63 \pm 3.96\%$ 的脂肪變性程度。可以觀察到在四組實驗組中，0.5, 0.75, 1 mg/mL TA-DLM Nms 均能與 Negative 組相比有著顯著較低的結果，說明 TA-DLM Nms 有著降低肝臟脂肪變性的能力。

圖四十二為 Picro-Sirius Red 的組織染色結果，可以觀察到各組均無產生明顯的紅色染色的表現，說明在 STZ 以及 HFD 誘導模式下組織中並沒有膠原纖維 (Collagen fiber) 產生，因此也無肝纖維化的趨勢，初步說明在本研究中所著重的疾病模型為 MASLD 而非 MASH。另外在投入了不同濃度之 TA-DLM Nms 也不會有紅色染色區域產生，說明在該濃度區間之 TA-DLM Nms 並不會使肝臟產生纖維化的趨勢。



圖四十：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 H&E 組織切片染色結果。

(A: Negative 組；B: 0.25 mg/mL TA-DLM Nms 組；C: 0.5 mg/mL TA-DLM Nms 組；D: 0.75 mg/mL TA-DLM Nms 組；E: 1 mg/mL TA-DLM Nms 組)。



圖四十一：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 H&E 組織切片脂肪變性程度分析。

(*** $p < 0.001$, significant differences vs. Negative, respectively)

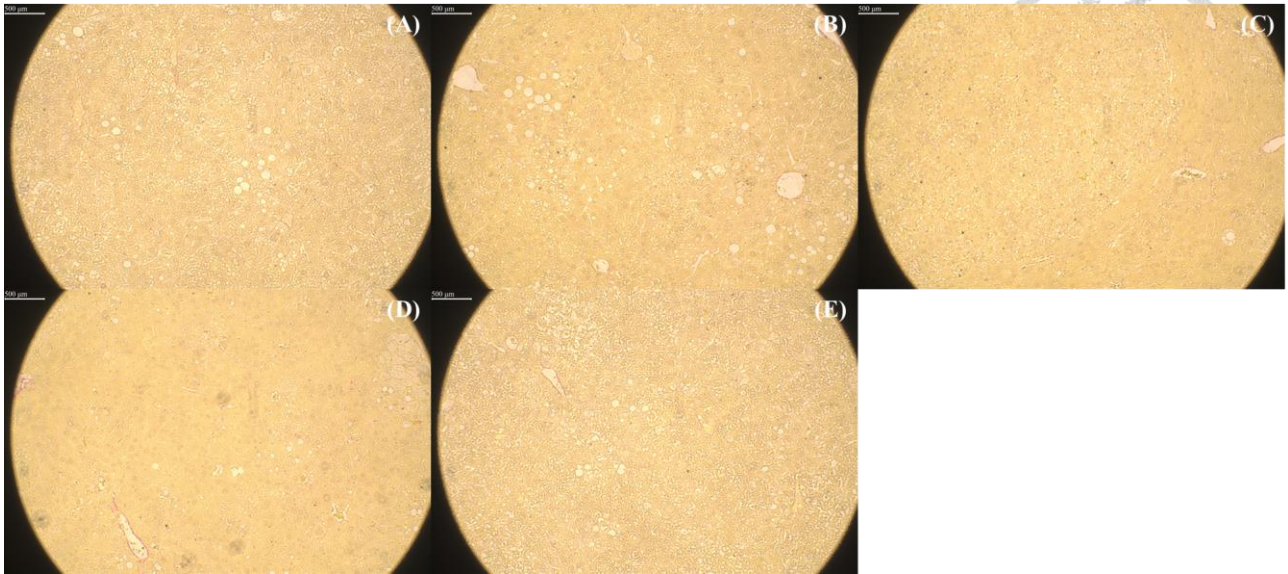


圖 四十二：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 Picro-Sirius Red 組織切片染色結果。

(A: Negative 組；B: 0.25 mg/mL TA-DLM Nms 組；C: 0.5 mg/mL TA-DLM Nms 組；D: 0.75 mg/mL TA-DLM Nms 組；E: 1 mg/mL TA-DLM Nms 組)。



4.5.3 小鼠 MASLD 模型預試驗血液分析結果

在完成體重數據的長期追蹤以及比較肝臟重量和肝重/體重比例後，我們想了解不同濃度的 TA-DLM Nms 對於 MASLD 小鼠的全身性的生理數值影響為何，因此在小鼠 12 週齡時進行心臟採血並對 AST, ALT, CHO, HDL, LDL, TG, Glucose 進行血液生化分析。

表三為 Glucose 的檢測結果，本研究檢測了小鼠在 6 週齡 (開始餵食 HFD 前) 以及 12 週齡 (結束治療後) 時的血糖數值。可以觀察到在 6 週齡時各組小鼠血糖數值約落在 400-600 mg/dL 之間，而到了 12 週齡時各組小鼠血糖數值則落在 480-600 以上 mg/dL 之間。可以觀察到在 6 週齡或是 12 週齡的結果各組之血糖數值均落在 200 mg/dL 以上，說明不論是在開始餵食 HFD 之前以及在治療結束後的時間點，各組之小鼠均維持在糖尿病的狀況中[91]。根據這樣的結果可以推知兩件事：(1) 在高劑量的 STZ 誘導下，健康小鼠可以被誘導為糖尿病模型；(2) TD-Nms 無法回復由 STZ 所誘導之高血糖情形。

圖四十三、四十四分別為 AST, ALT 的結果。首先在 AST 的結果中，Negative 與四組實驗組分別表現了 162.23 ± 43.28 , 104.93 ± 31.56 , 175.63 ± 37.59 , 99.45 ± 29.16 , 135.73 ± 41.42 U/L 的 AST 濃度。可以觀察到 0.25, 0.75 以及 1 mg/mL 的組別相較於 Negative 組有著下降結果，然而僅有 0.75 mg/mL 的組別與 Negative 組有著顯著性差異。接著在 ALT 的結果中，Negative 與四組實驗組分別表現了 70.13 ± 6.37 , 37.57 ± 12.25 , 74.4 ± 21.35 , 44.94 ± 15.62 , 49.56 ± 7.14 U/L 的 ALT 濃度。可以觀察到 0.25, 0.75 以及 1 mg/mL 的組別相較於 Negative 組有著顯著下降結果。由上述結果可以觀察到部分濃度的 TA-DLM Nms 有助於減少肝發炎指數，特別是加速對 ALT 的代謝。

圖四十五、四十六分別為 TG 以及 CHO 的結果。首先在 TG 的結果中，Negative 與四組實驗組分別表現了 230.33 ± 67.66 , 328.2 ± 37.62 , 285.1 ± 117.66 , 137.23 ± 47.92 , 120.2 ± 78.96 mg/dL 的 TG 濃度。可以觀察到 0.75 以及 1 mg/mL 的組別相較於 Negative 組別有著較低的 TG 濃度，然而僅有 0.75 mg/mL 的組別有著顯著性的結果。接著在 CHO 的結果中，Negative 與四組實驗組分別表現了 210.35 ± 45.55 , 181.33 ± 14.17 , 238 ± 66.28 , 180.82 ± 26.72 ,

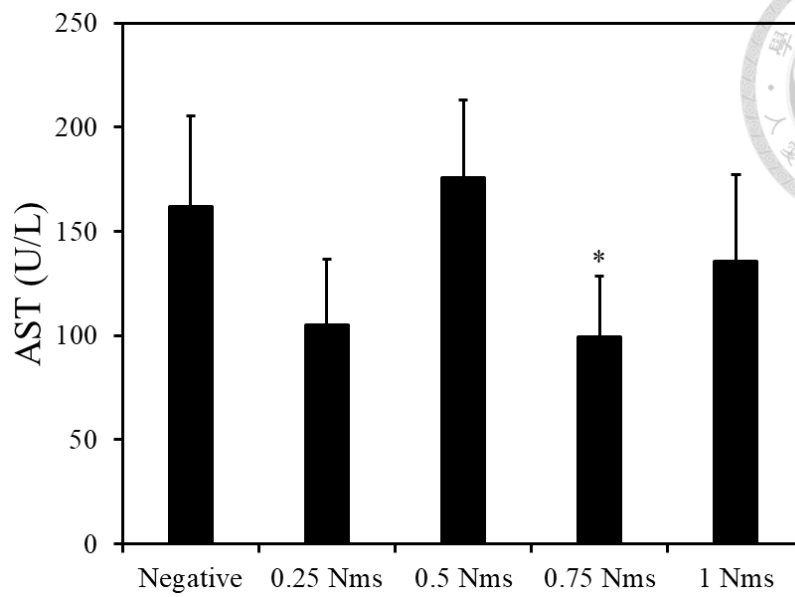
154.54 ± 20.63 mg/dL 的 CHO 濃度。可以觀察到 0.25, 0.75 以及 1 mg/mL 的組別相較於 Negative 組別有著較低的 TG 濃度，然而僅有 1 mg/mL 的組別有著顯著性的結果。由上述結果可以觀察到特定濃度的 TA-DLM Nms 有助於減少全身性的脂質含量，說明 TA-DLM Nms 展現了加速脂質代謝的功效。

圖四十七、四十八分別為 HDL 以及 LDL 的結果。首先在 HDL 的結果中，Negative 與四組實驗組分別表現了 128.13 ± 9.54, 106.1 ± 37.66, 119.98 ± 32.37, 123.44 ± 19.58, 114.44 ± 13.7 mg/dL 的 HDL 濃度。可以觀察到四組實驗組均與 Negative 組無顯著的差異性。接著在 LDL 的結果中，Negative 與四組實驗組分別表現了 39.63 ± 1.57, 41.17 ± 4.36, 45.58 ± 5.02, 41.14 ± 18.89, 28.66 ± 5.32 mg/dL 的 LDL 濃度。可以觀察 1 mg/mL 的組別相較於 Negative 組別有著顯著較低的 LDL 濃度，然而僅有 1 mg/mL 的組別有著顯著性的結果。由上述結果可以觀察到 TA-DLM Nms 並不會影響 HDL 的多寡，可以推知是由於該模型中的飲食類型均為相同之 HFD 所致[92]。而在 LDL 中的結果可以觀察到特定濃度之 TA-DLM Nms 可以有效降低低密度膽固醇的比例，說明其對於血脂異常的改善功能。

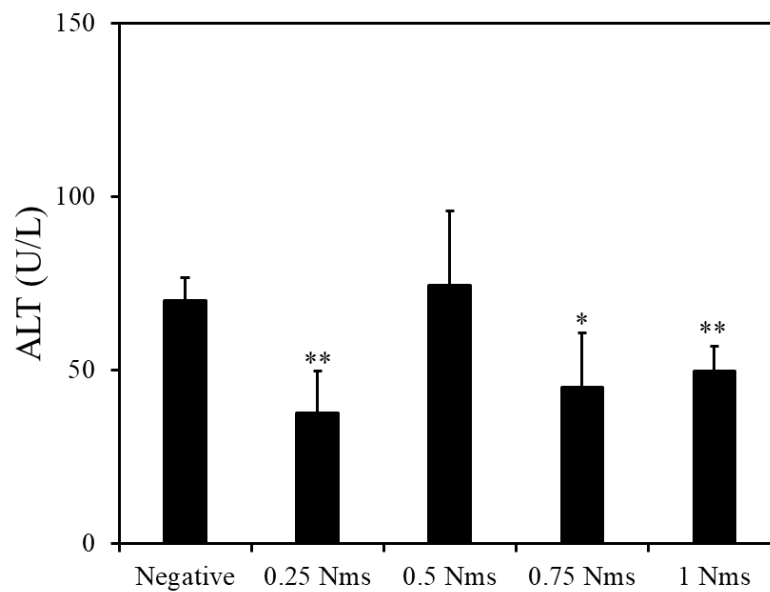
表三：小鼠體內 MASLD 模型預試驗血糖數據

Groups	N	Week 6 Blood glucose (mg/dL)	Week 12 Blood glucose (mg/dL)
Negative control	N=1	581	548
	N=2	536	575
	N=3	461	585
	N=4	544	High
0.25 mg/mL TD-Nms	N=1	548	High
	N=2	549	High
	N=3	505	High
	N=4	583	High
0.5 mg/mL TD-Nms	N=1	485	428
	N=2	572	High
	N=3	503	High
	N=4	429	High
	N=5	492	High
0.75 mg/mL TD-Nms	N=1	515	High
	N=2	473	High
	N=3	465	High
	N=4	487	High
	N=5	558	565
1 mg/mL TD-Nms	N=1	522	482
	N=2	477	High
	N=3	544	High
	N=4	497	534
	N=5	548	High

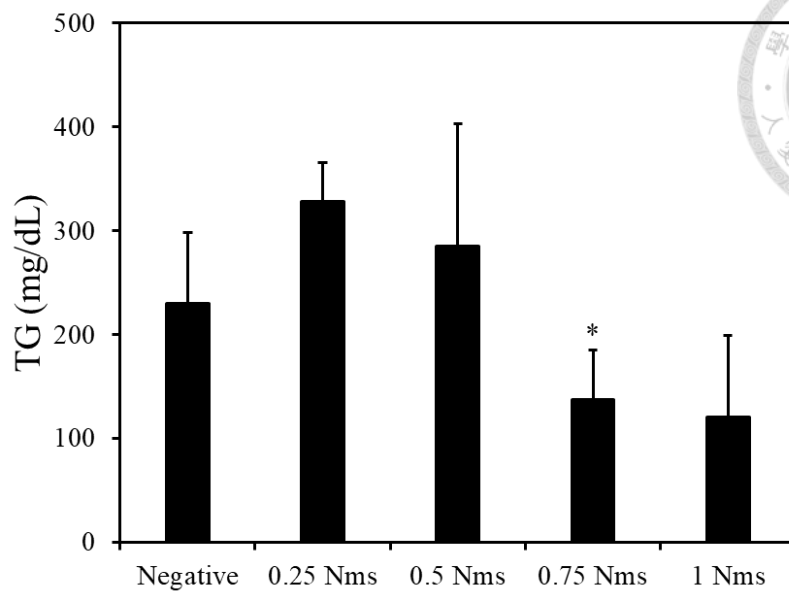
(High：血糖值超過儀器檢測上限 600 mg/dL)



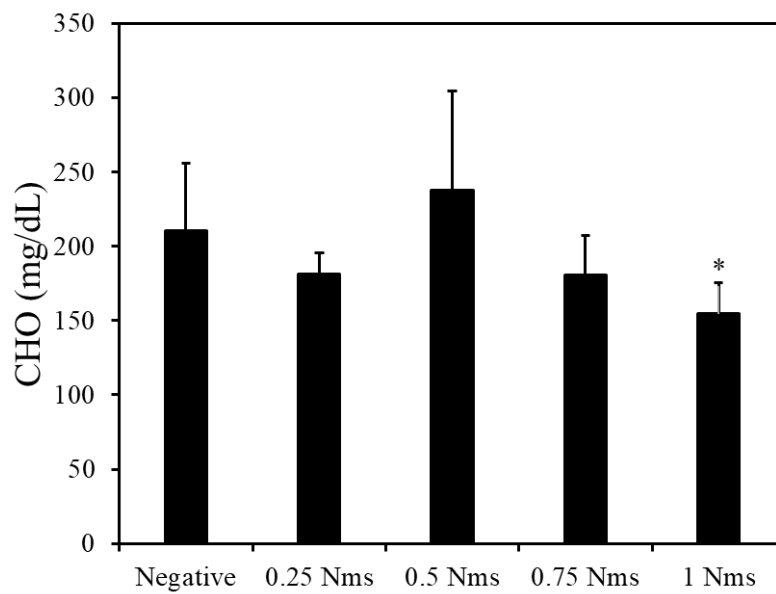
圖四十三：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 AST 結果。
(* $p < 0.05$ significant differences vs. Negative, respectively)



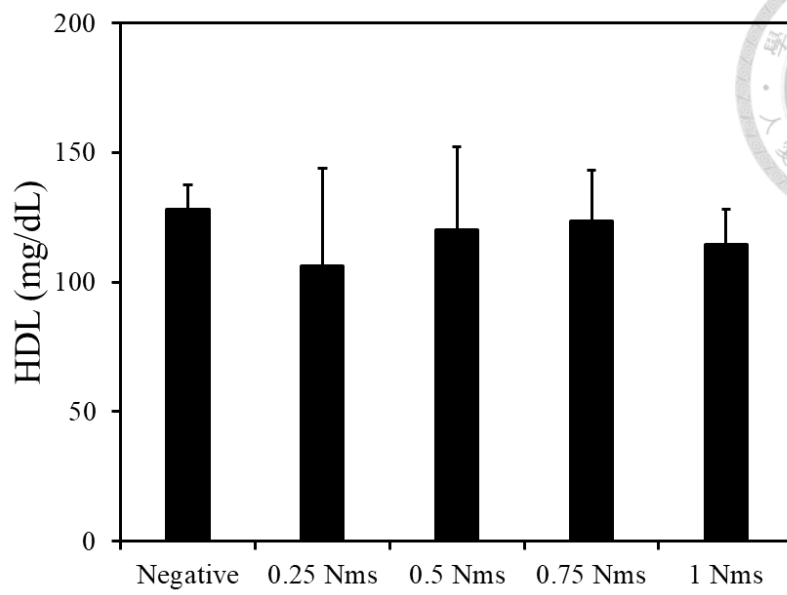
圖四十四：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 ALT 結果。
(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ significant differences vs. Negative, respectively)



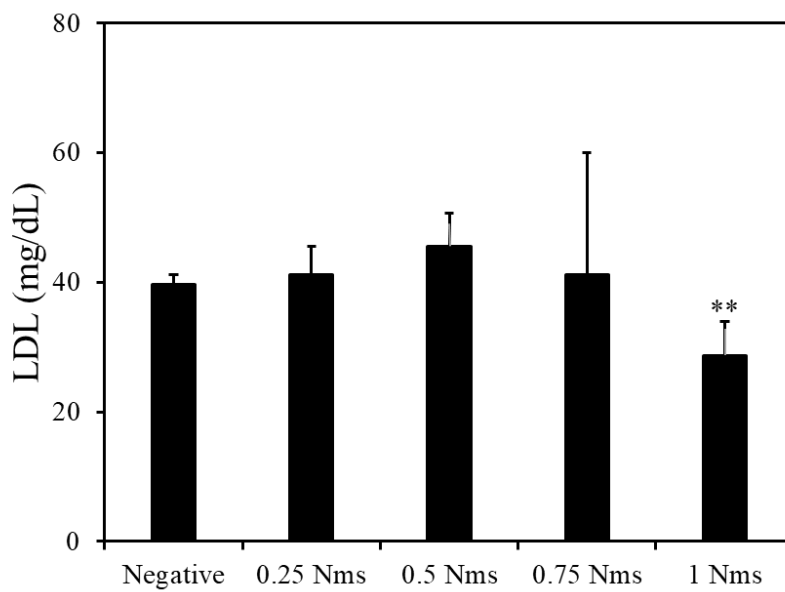
圖四十五：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 TG 結果。
(*p < 0.05 significant differences vs. Negative, respectively)



圖四十六：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 CHO 結果。
(*p < 0.05 significant differences vs. Negative, respectively)



圖四十七：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 HDL 結果。



圖四十八：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 LDL 結果。

(**p < 0.01 significant differences vs. Negative, respectively)



4.6 TA-DLM 奈米藥物對小鼠 MASLD 模型主試驗的影響

在測試過最佳之 TA-DLM Nms 濃度後，我們決定採用 1 mg/mL TA-DLM Nms 作為最佳的測試濃度，便將該濃度之 TA-DLM Nms 拆分測試，測試其中所含之 TA, DLM 以及 TA-DLM Nms 本身對於 MASLD 體內模型的影響。因此透過餵食 HFD 以及果糖建立小鼠 MASLD 模型後，再分別以 IP 注射上述三種物質 (0.5 mg/mL TA, 0.5 mg/mL DLM, 1 mg/mL TA-DLM Nms) 到小鼠體內以驗證三者對於體內模型的影響。

4.6.1 小鼠 MASLD 模型主試驗外型、體重、肝臟重量以及肝重/體重比例結果

圖四十九為該實驗中小鼠的外型差異以及內臟型態差異。從圖四十九 A 與 B 的結果可以看出是否餵食 HFD 以及果糖飲水會對體態造成明顯的差異性，在餵食過 HFD 以及果糖飲水後會使小鼠體型較為肥胖；而從圖四十九 C 與 D 的結果可以看出肥胖的原因是來自於過多的脂肪堆積於腹腔中。最後在圖四十九 E 的結果可以看出在餵食過 HFD 以及果糖飲水後，肝臟的體積會明顯較大，組織之間也會出現明顯的間隙，推測是因為脂質堆積過多導致細胞排列變形所致。

除了觀察該模型小鼠的外在型態以及內臟型態外，我們也對該模型小鼠的體重數據進行長期追蹤。圖五十為主試驗 12 週齡至 29 週齡體重結果，而圖五十一為將各週之體重數據再除以第 12 週齡之體重以顯示其體重增長幅度。在體重結果中，Control 組在 12 週齡至 29 週齡期間的體重大約落在 25 g 至 35 g 之間，而 Negative 組與 3 組實驗組 (TA, DLM, TA-DLM Nms) 在 12 週齡至 29 週齡期間的體重大約落在 35 g 至 55 g 之間。ANOVA 以及 Tukey 事後檢定分析顯示 Control 組與其餘 4 組有著顯著性差異，而 Negative 組與 3 組實驗組並無顯著性差異。圖五十一之體重增長率數據也顯示相同的趨勢，Control 組在 29 週齡的體重增長率約落在 130%，而 Negative 組與 3 組實驗組在 29 週齡的體重增長率約落在 150-160%。ANOVA 以及 Tukey 事後檢定分析顯示 Control 組與其餘 4 組有著顯著性差異，而 Negative 組與 3 組實驗組並無顯著性差異。該結果首先表現了餵食 HFD 以及果糖飲水確實會對體重

以及體重增長率造成顯著性的差異，與先前外在型態和內臟型態觀察結果相符 (圖五十 A, B, C, D)。另外該結果也顯示了 3 種試驗物質在 4 週的腹腔注射後並不會對體重產生顯著影響。

接著我們探討了各組別之肝臟重量以及肝重/體重比例：圖五十二為各組肝臟重量結果，Control 組與 Negative 組分別表現了 1.35 ± 0.08 , 3.06 ± 0.53 g 的肝臟重量；3 組實驗組則分別表現了 2.8 ± 0.52 , 2.72 ± 0.6 , 2.61 ± 0.6 g 的肝臟重量。可以觀察到 Negative 組與 3 組實驗組之肝臟重量相對於 Control 組有著顯著上升的趨勢；3 組實驗組則相較於 Negative 組有著略為下降的趨勢，然而並無顯著性差異。接著我們將各隻小鼠的肝臟重量除以體重，圖五十三為肝重/體重比例結果，Control 組與 Negative 組分別有著 3.92 ± 0.25 , $5.7 \pm 0.72\%$ 的肝臟/體重比例；3 組實驗組則分別表現了 5.37 ± 0.71 , 5.61 ± 0.27 , $4.58 \pm 0.44\%$ 的肝臟/體重比例。與肝臟重量的結果相同，Negative 組與 3 組實驗組之肝臟/體重比例相對於 Control 組有著顯著上升的趨勢，且 3 組實驗組則相較於 Negative 組有著略為下降的趨勢，而僅有 TA-DLM Nms 相對於 Negative 組有著顯著性差異。以上的結果說明了兩項結果：(1) 在 HFD 以及果糖飲水的誘導下，確實會對該模型小鼠之肝臟重量以及肝臟/體重比例造成影響。(2) TA-DLM Nms 具備降低肝臟重量以及影響肝臟/體重比例的潛力。

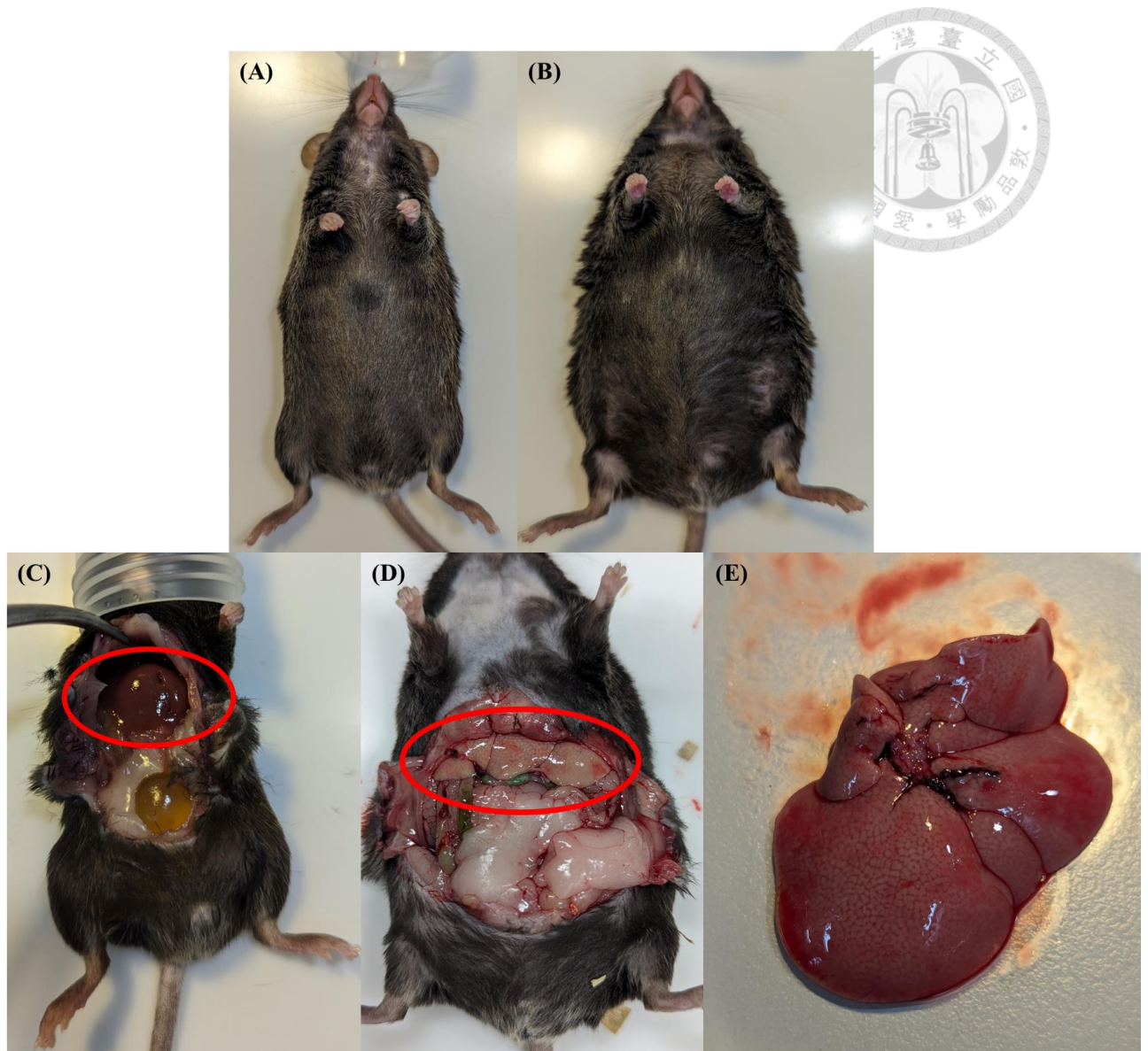


圖 四十九：小鼠體內 MASLD 模型主試驗小鼠外觀以及內臟、肝臟型態。

(A：Control 組小鼠外觀；B：餵食 HFD 以及果糖飲水小鼠外觀；C：Control 組小鼠內臟型態；D：餵食 HFD 以及果糖飲水小鼠內臟型態；E：餵食 HFD 以及果糖飲水小鼠肝臟型態)

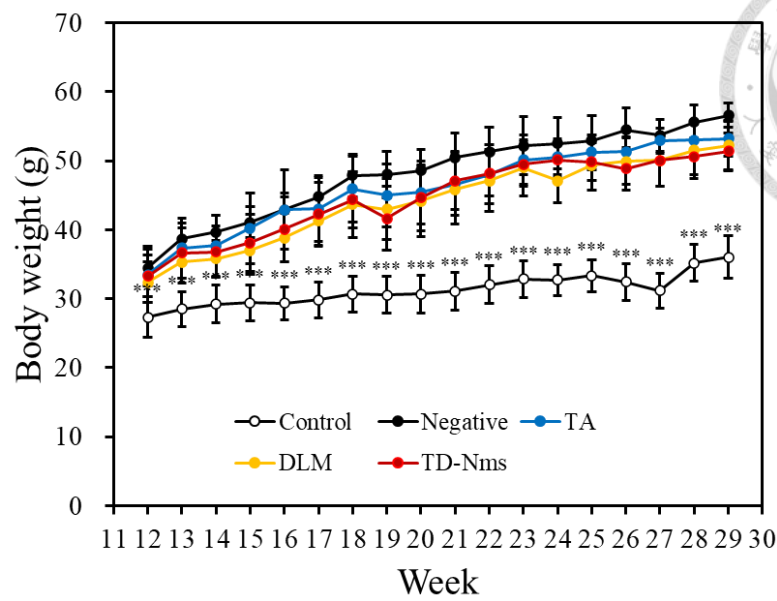


圖 五十：小鼠體內 MASLD 模型主試驗體重數據。
 (***) $p < 0.001$, significant differences vs. Control, respectively)

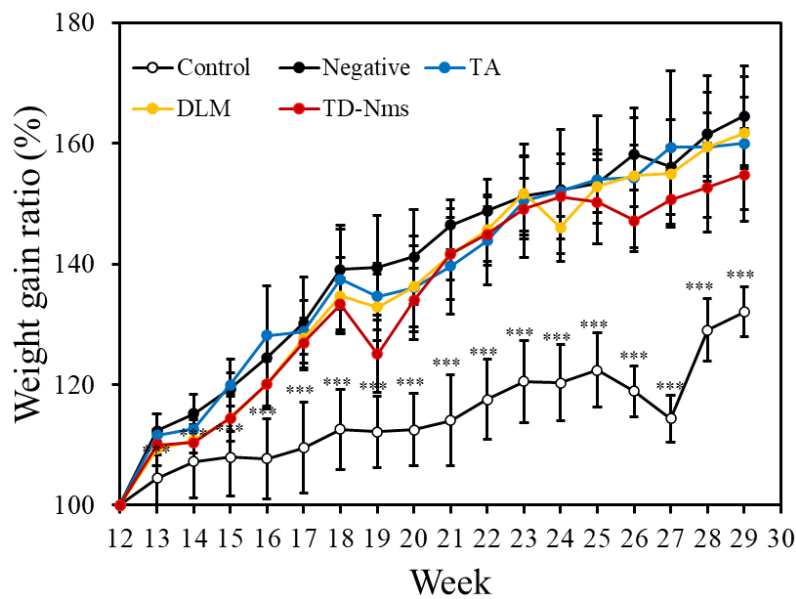


圖 五十一：小鼠體內 MASLD 模型主試驗體重增長率數據。
 (***) $p < 0.001$, significant differences vs. Control, respectively)

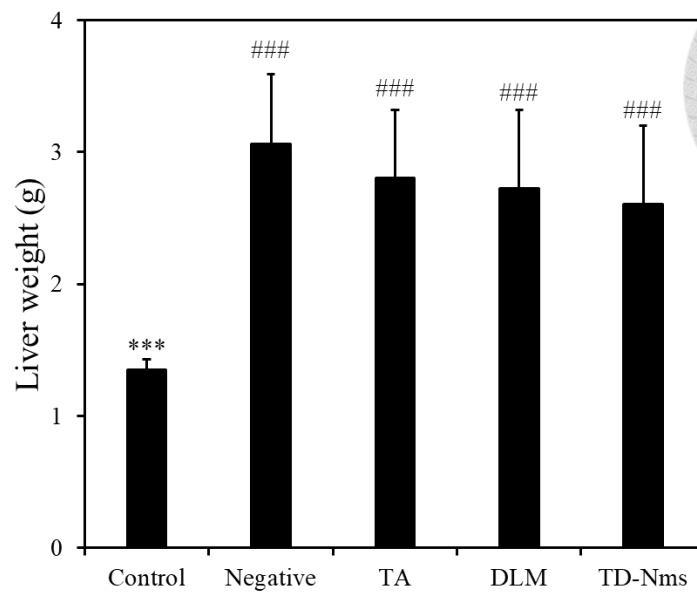


圖 五十二：小鼠體內 MASLD 模型主試驗肝臟重量數據。

(###p < 0.001, significant differences vs. Control, respectively ;

***p < 0.001, significant differences vs. Negative, respectively)

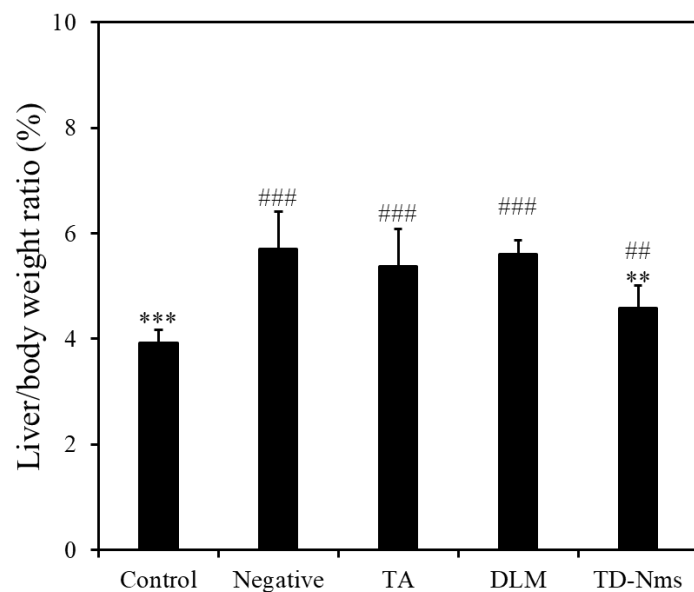


圖 五十三：小鼠體內 MASLD 模型主試驗肝重/體重比例數據。

(###p < 0.001, significant differences vs. Control, respectively ;

p < 0.01, *p < 0.001, significant differences vs. Negative, respectively)



4.6.2 小鼠 MASLD 模型主試驗肝內三酸甘油酯檢測

在了解該模型中試驗物質對於體重以及肝臟重量的影響後，我們進一步測試了試驗物質對於肝臟內三酸甘油酯含量的影響，確認是否與肝臟重量的影響呈現相關性。

圖五十四為各組肝內三酸甘油脂 (TG) 含量結果，Control 組與 Negative 組分別表現了 5.49 ± 1.28 , 10.11 ± 2.11 mg/mg tissue 的肝內 TG 含量；3 組實驗組則分別表現了 8.5 ± 1.06 , 9.74 ± 2.03 , 7.93 ± 0.53 mg/mg tissue 的肝內 TG 含量。可以觀察到 Negative 組與 3 組實驗組之肝內 TG 含量相對於 Control 組有著顯著上升的趨勢；3 組實驗組則相較於 Negative 組有著略為下降的趨勢，然而僅有 TA-DLM Nms 組別。以上結果說明了兩項結論：(1) 在 HFD 及果糖飲水的誘導下，確實會顯著增加該模型小鼠的肝內 TG 含量。(2) TA-DLM Nms 具有降低肝內脂肪積累的潛力，顯示出對 MASLD 疾病的改善能力。

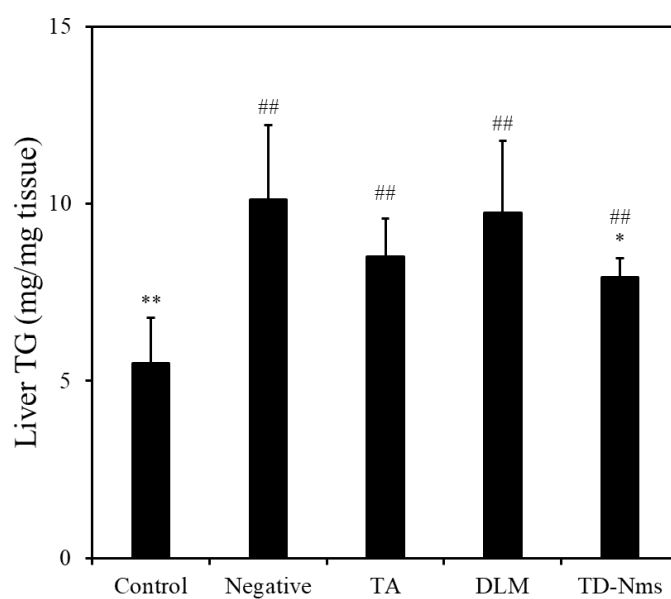


圖 五十四：小鼠體內 MASLD 模型主試驗肝內三酸甘油脂含量數據。

(##p < 0.01 significant differences vs. Control, respectively ;

*p < 0.05, **p < 0.01 significant differences vs. Negative, respectively)



4.6.3 小鼠 MASLD 模型主試驗組織切片分析結果

在完成對小鼠 MASLD 模型主試驗的血液分析後，我們為了了解 TA, DLM 以及 TA-DLM Nms 對於該模型的肝臟內部細胞的影響，因此在犧牲小鼠後，取其肝臟左右肝葉於 3.7% 福馬林 (37% Formaldehyde 和 PBS 以 1:9 的比例混合) 中，浸泡 24 至 48 小時後轉移至 PBS 中，並於 4 °C 環境下保存。事後送至拓生科技有限公司進行石蠟和冷凍包埋以利進行 H&E 和 Picro-Sirius Red 染色分析。

圖五十五為 H&E 的組織染色結果：首先比較 Control 組 (圖五十五 A) 與 Negative 組 (圖五十五 B) 的結果可以觀察到 Negative 組明顯有著更大面積的空洞部分說明在 HFD 以及果糖飲水誘導模式下肝臟內堆積了較多脂質故使空洞程度較大。接著比較 TA, DLM 以及 TA-DLM Nms 組 (圖五十五 C, D, E)，可以觀察到 TA 組以及 TA-DLM Nms 組可以有較大面積的恢復面積，然而 DLM 組本身並沒有空洞狀態的恢復表現。該結果說明了 TA 以及 TA-DLM Nms 具備降低肝內脂質的潛力。

為了進一步定量各組的空腔程度，在拍攝各組之 H&E 的組織切片玻片後，將影像利用 ImageJ 軟體進行脂肪變性程度分析[43]，結果如圖五十六所示：Control 組與 Negative 組分別表現了 30.67 ± 7.72 , $58.48 \pm 3.95\%$ 的脂肪變性程度，而 3 組實驗組則表現了 47.73 ± 2.67 , 57.13 ± 4.6 , $39.81 \pm 5.94\%$ 的脂肪變性程度。從該結果可以首先觀察到 Negative 組有著顯著高於 Control 組的脂肪變性程度，符合在圖五十五之描述。接著在 3 組實驗組的結果中，TA 組以及 TA-DLM Nms 表現了顯著較低程度的脂肪變性程度且 DLM 組與 Negative 組並無顯著性差異，說明 TA 以及 TA-DLM Nms 的降低脂肪累積的能力。

圖五十七為 Picro-Sirius Red 的組織染色結果，可以觀察到不論是 Negative 組 (圖五十七 B) 以及 3 組實驗組 (圖五十七 C, D, E) 均無產生明顯的紅色染色的表現，說明在 HFD 以及果糖飲水誘導模式下組織中並沒有膠原纖維 (Collagen fiber) 產生，因此也無肝纖維化的趨勢，初步說明在本研究中所著重的疾病模型為 MASLD 而非 MASH。另外在投入 TA, DLM 以及

TA-DLM Nms 也不會有紅色染色區域產生，說明在該濃度區間之 TA-DLM Nms 並不會使肝臟產生纖維化的趨勢。

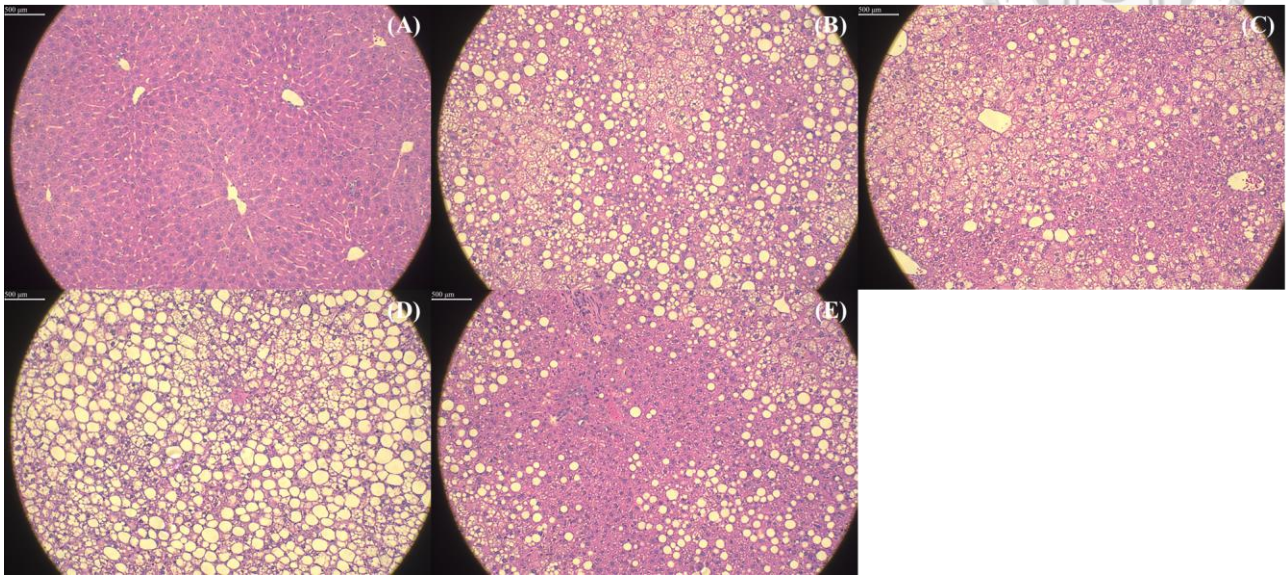


圖 五十五：小鼠體內 MASLD 模型主試驗 H&E 組織切片染色結果。
(A: Control 組；B: Negative 組；C: TA 組；D: DLM 組；E: TA-DLM Nms 組)。

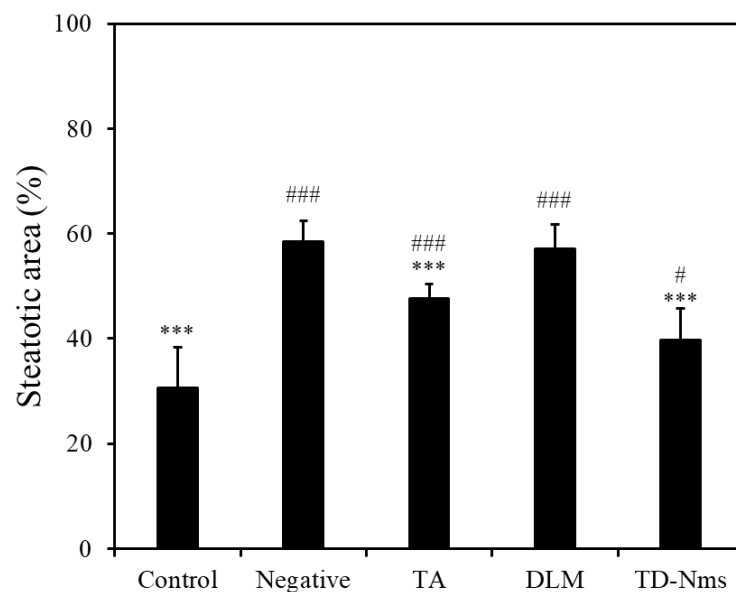


圖 五十六：小鼠體內 MASLD 模型主試驗 H&E 組織切片脂肪變性程度分析。
(# $p < 0.05$, ### $p < 0.001$, significant differences vs. Control, respectively ;
*** $p < 0.001$, significant differences vs. Negative, respectively)

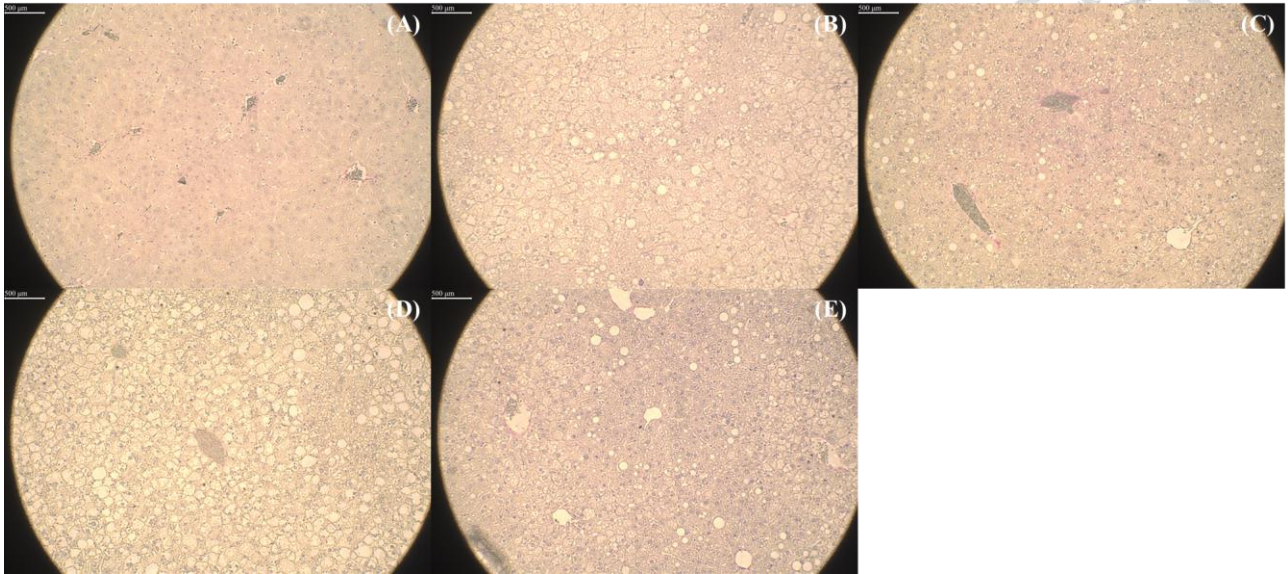


圖 五十七：小鼠體內 MASLD 模型主試驗 Picro-Sirius Red 組織切片染色結果。
(A: Control 組；B: Negative 組；C: TA 組；D: DLM 組；E: TA-DLM Nms 組)。



4.6.4 小鼠 MASLD 模型主試驗血液分析結果

在完成體重數據的長期追蹤以及比較肝臟重量和肝重/體重比例後，我們想了解 TA, DLM 以及 TA-DLM Nms 對於 MASLD 小鼠的全身性的生理數值影響為何，因此在小鼠 12 週齡時進行心臟採血並對 AST, ALT, CHO, HDL, LDL, TG 進行血液生化分析。

圖五十八、五十九分別為 AST, ALT 的結果。首先在 AST 的結果中，Control 組與 Negative 組分別表現了 76.1 ± 16.76 , 347.97 ± 97.48 U/L 的 AST 濃度，3 組實驗組則分別表現了 240.25 ± 37.9 , 136.28 ± 32.13 , 153.73 ± 38.05 U/L 的 AST 濃度。首先可以觀察到 Negative 組相對於 Control 組有著顯著上升的趨勢，說明在 HFD + 果糖飲水誘導模式下，肝臟分泌 AST 量有著上升的趨勢；接著可以觀察到 3 組實驗組均相對於 Negative 組有著顯著下降的趨勢，說明 3 種試驗物質均可以下降由 HFD + 果糖飲水所產生的高濃度之 AST。接著在 ALT 的結果中，Control 組與 Negative 組分別表現了 26.98 ± 5.9 , 723.77 ± 46.72 U/L 的 ALT 濃度，3 組實驗組則分別表現了 212.68 ± 59.86 , 157.48 ± 42.27 , 159.9 ± 36.51 U/L 的 ALT 濃度。首先可以觀察到 Negative 組相對於 Control 組有著顯著上升的趨勢，說明在 HFD + 果糖飲水誘導模式下，肝臟分泌 ALT 量有著上升的趨勢；接著可以觀察到 3 組實驗組均相對於 Negative 組有著顯著下降的趨勢，說明 3 種試驗物質均可以下降由 HFD + 果糖飲水所產生的高濃度之 ALT。首先可以觀察到 Negative 組相較於 Control 組有著顯著下降的趨勢，然而 3 組實驗組均與 Negative 組別無顯著性差異。

圖六十、六十一分別為 CHO 以及 TG 的結果。首先在 CHO 的結果中，Control 組與 Negative 組分別表現了 91.78 ± 8.87 , 222.77 ± 69.75 mg/dL 的 CHO 濃度，3 組實驗組則分別表現了 243.39 ± 27.04 , 216.69 ± 38.97 , 216.81 ± 36.02 mg/dL 的 CHO 濃度。可以觀察到 Negative 組相較於 Control 組有著顯著上升的趨勢，然而在 3 組實驗組則與 Negative 組無顯著性差異。該結果說明了該誘導方式確實可以提升全身性的 CHO 濃度，然而 3 種試驗物質並不會對 CHO 有著顯著影響。接著在 TG 的結果中，Control 組與 Negative 組分別表現了 26.25 ± 6.16 , 71.33 ± 19.5 mg/dL 的 TG 濃度，3 組實驗組則分別表現了 24.5 ± 5.43 , $21.46 \pm$

1.49, 32.82 ± 7.9 mg/dL 的 TG 濃度。於該結果可以觀察到 Negative 組相較於 Control 組有著顯著上升的趨勢，且 3 組實驗組相較於 Negative 組有著顯著下降的趨勢。該結果說明了該誘導方式確實可以提升全身性的 TG 濃度，且 3 種試驗物質可以有效降低全身性的 TG 濃度。

圖六十二、六十三分別為 HDL 以及 LDL 的結果。首先在 HDL 的結果中，Control 組與 Negative 組分別表現了 76.12 ± 4.99 , 96.47 ± 1.33 mg/dL 的 HDL 濃度，3 組實驗組則分別表現了 163.8 ± 17.62 , 148.38 ± 24.02 , 145.18 ± 22.24 mg/dL 的 HDL 濃度。可以觀察到 Negative 組相較於 Control 組有著顯著上升的趨勢，而在 3 組實驗組則與 Negative 組有著顯著上升的趨勢。該結果說明了該誘導方式確實可以提升全身性的 HDL 濃度，而 3 種試驗物質更能進而提升 HDL 的比例，增加脂質被代謝的速率。接著在 LDL 的結果中，Control 組與 Negative 組分別表現了 11.57 ± 2.5 , 74.63 ± 7.78 mg/dL 的 LDL 濃度，3 組實驗組則分別表現了 58.51 ± 10.88 , 50.43 ± 10.88 , 50.87 ± 7.09 mg/dL 的 LDL 濃度。於該結果可以觀察到 Negative 組相較於 Control 組有著顯著上升的趨勢，且 3 組實驗組相較於 Negative 組有著顯著下降的趨勢。該結果說明了該誘導方式確實可以提升全身性的 LDL 濃度，且 3 種試驗物質可以有效降低全身性的 LDL 濃度。

綜合以上血液生化分析的結果，可以得知以下結論：(1) 在 HFD 以及果糖飲水的誘導下，小鼠的肝指數、脂質代謝以及高低密度脂蛋白數值均會受到影響；(2) TA, DLM, TA-DLM Nms 均展現了不同程度之回復效果，然而 TA-DLM Nms 並沒有展現相較於其餘兩組更為顯著之治療效果。

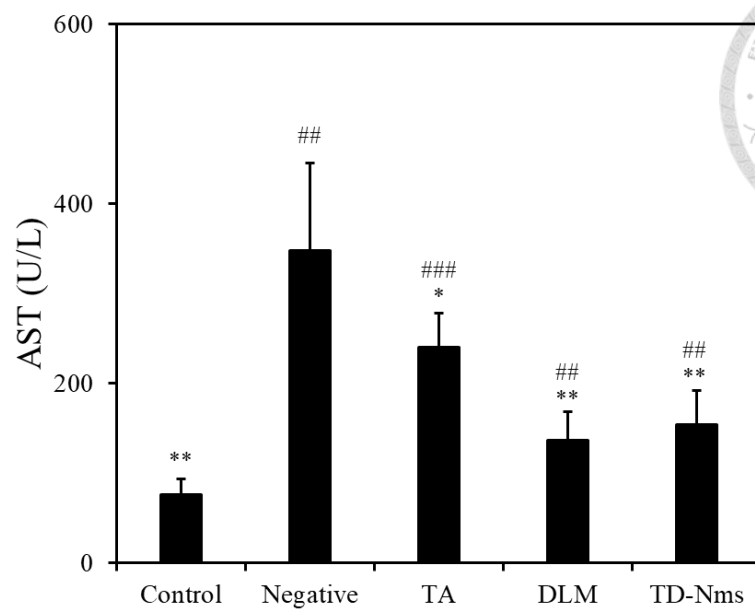


圖 五十八：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 AST 結果。

(## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, significant differences vs. Control, respectively ;
 $*p < 0.05$, ** $p < 0.01$ significant differences vs. Negative, respectively)

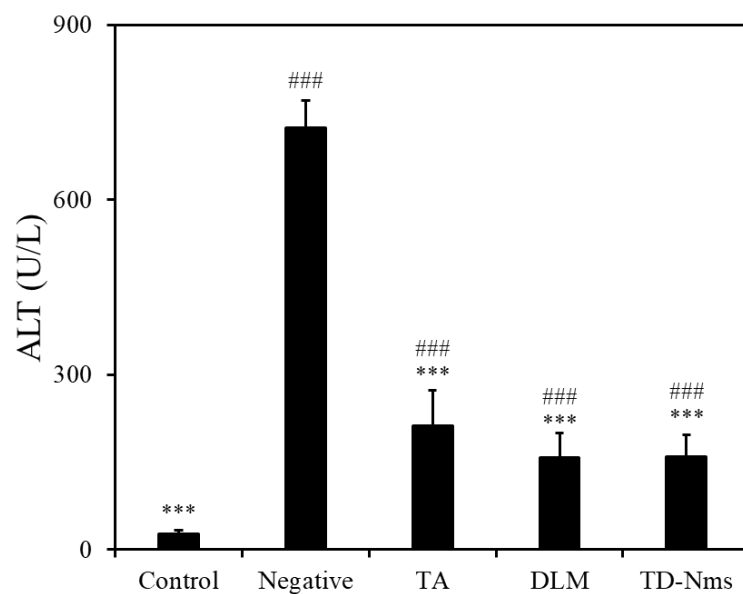
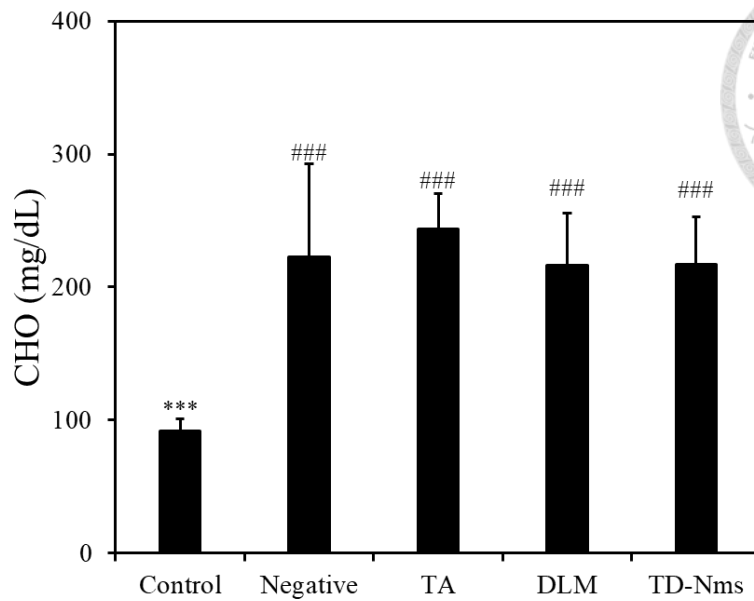
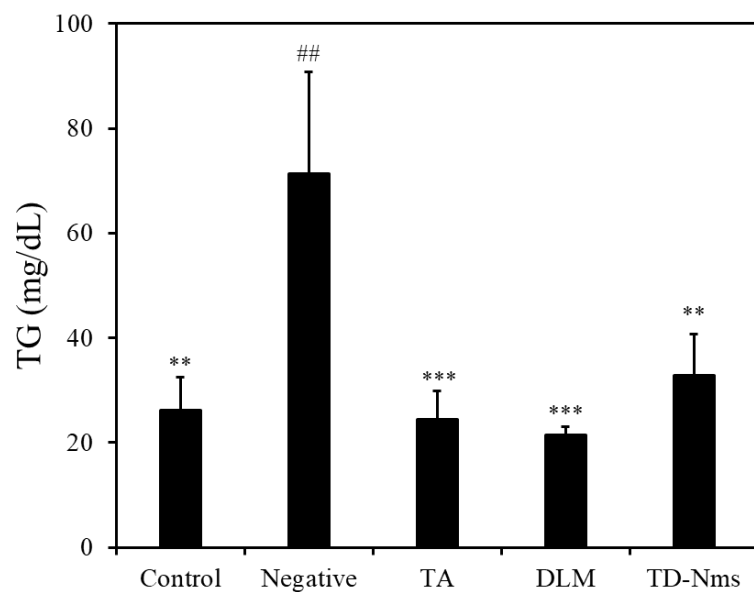


圖 五十九：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 ALT 結果。

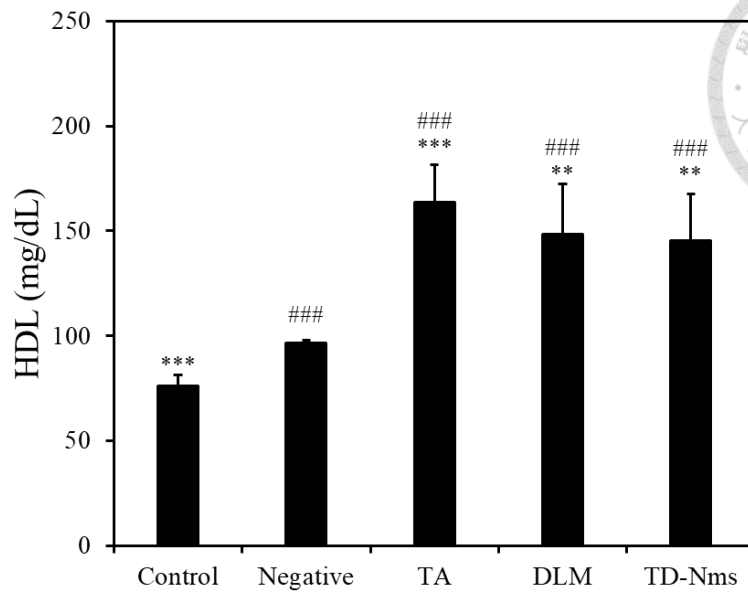
(### $p < 0.001$, significant differences vs. Control, respectively ;
 $***p < 0.001$, significant differences vs. Negative, respectively)



圖六十：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 CHO 結果。
 (### $p < 0.001$, significant differences vs. Control, respectively ;
 *** $p < 0.001$, significant differences vs. Negative, respectively)



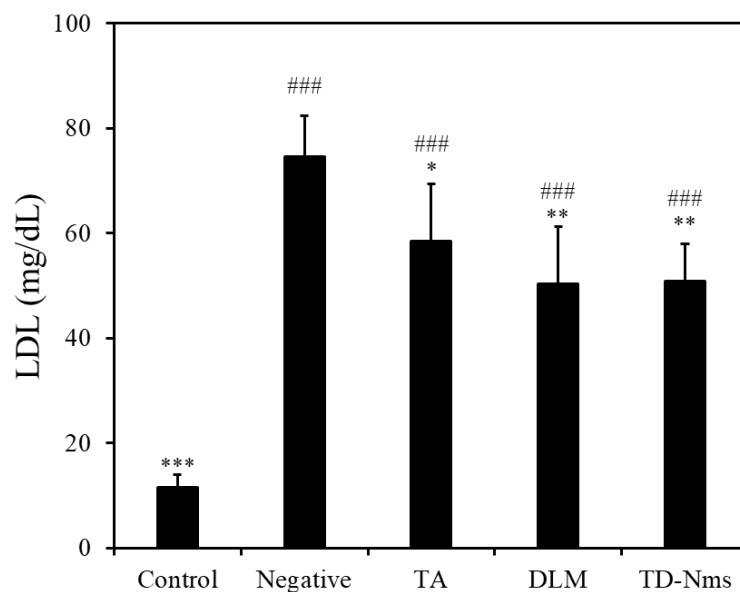
圖六十一：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 TG 結果。
 (## $p < 0.01$ significant differences vs. Control, respectively ;
 ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significant differences vs. Negative, respectively)



圖六十二：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 HDL 結果。

(### $p < 0.001$, significant differences vs. Control, respectively ;

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significant differences vs. Negative, respectively)



圖六十三：小鼠體內 MASLD 模型預試驗 LDL 結果。

(### $p < 0.001$, significant differences vs. Control, respectively ;

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significant differences vs. Negative, respectively)

第五章 結果討論、結論與未來展望



5.1 結果討論

本研究在經過多次嘗試以及驗證後，成功在大鼠肝臟以及豬隻肝臟中分別以灌流和浸泡 PBS, SDS, Triton X-100 溶液的方式取得 DLM 樣品，且在經過 DNA 分析後可以得知兩種不同來源之 DLM 樣品其中的 DNA 濃度皆有顯著下降的趨勢，說明該脫細胞化流程之有效性。由於豬隻在產量上的優勢以及抗原上的相似性，我們決定採用豬隻 DLM 進行後續的實驗。接著我們嘗試了將該豬隻 DLM 樣品聚乙二醇化，透過修飾 PEG 到 DLM 的蛋白質上藉此降低其在體內之免疫原性。本研究利用 FT-IR 圖譜分析了 DLM 樣品以及 mPEG-DLM 樣品的差異性，結果顯示在 mPEG-DLM 樣品顯現了 C-O 單鍵的顯著表現，說明本研究成功將聚乙二醇修飾到 DLM 上。接著我們將不同濃度之 DLM 樣品與單寧酸混合，檢測兩者結合成奈米藥物的能力以及大小。本研究利用 DLS 檢測各濃度之粒徑大小，從結果觀察到隨著降低單寧酸以及 DLM 的濃度，奈米藥物的粒徑就會隨之漸小，進而展現粒徑大小對於兩者濃度的依存性，同時也藉此尋得形成奈米藥物的最佳濃度 (2.5 mg/mL 的 TA 以及 0.05 mg/mL 的 DLM)。接著我們想要了解該奈米藥物的實際型態為何，因此本研究利用了 TEM 對該奈米藥物進行觀察；從拍攝出的結果可以觀察到其粒徑符合在奈米等級的定義且型態為顆粒狀，故我們認為該奈米藥物之粒徑大小和型態是符合我們的預期。最後我們對 TA-DLM 奈米藥物進行藥物釋放的測試，發現其確實有著釋放單寧酸的能力外，也了解該奈米藥物攜帶單寧酸的比重為何，便可應用於後續體內實驗的藥物動力學研究中。

接著我們將該 TA-DLM 奈米藥物投入到體外試驗的模型中，首先我們將健康人類以及 MASH 病患的 iPS 細胞誘導成肝細胞後，進而利用 5 mM 油酸將肝細胞誘導為 MASLD 模型後，再分別測試 TA, DLM 以及 TA-DLM 奈米藥物對於該細胞模型在型態、肝細胞機能上的影響。首先在 MASLD 模型建立上可以在型態上觀察到初期會有明顯的肝細胞肥大的情形，培養後期則是會有較大面積的細胞凋亡情形產生，而在 OA 誘導結束後便將細胞與 TA, DLM 以及 TA-DLM Nms 一同培養，發現 3 種試驗物質均能維持細胞生長，抑制大面積的細



胞凋亡。除了利用顯微鏡觀察其型態外，我們也收集細胞培養上清液進行生化分析。可以觀察到有著顯著 LDH 上升的結果，該情形說明了 5 mM OA 的培養環境下會對 iPS 細胞誘導之肝細胞產生顯著的細胞凋亡。之所以會產生細胞凋亡原因可以歸因於當過多的脂肪酸被肝細胞吸收時，肝細胞在代謝脂肪酸的過程中會進行多次的蛋白質組裝、修飾與摺疊；當超過內質網的負荷後未摺疊的蛋白質會在內質網內聚集造成未折疊蛋白反應 (unfolded protein response; UPR)，同時提高內質網壓力以及細胞凋亡[93]。而在 3 種試驗物質的 LDH 結果中可以觀察到 1 $\mu\text{g/mL}$ TA 以及 1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 在兩種 iPS 細胞的模型中均有顯著降低 LDH 的表現，說明其抑制細胞凋亡的能力。之所以兩者有著抑制細胞凋亡的原因在於 TA 本身具備透過活化 AMPK pathway 降低內質網壓力進而抑制細胞凋亡的反應[94]，然而在該結果中 TA 與 TA-DLM Nms 並無顯著性差異。接著我們進一步檢測細胞培養上清液其中的尿素含量進一步了解在該疾病模型以及治療後的肝機能變化。首先可以觀察到在 5 mM OA 的誘導下，尿素分泌量會有顯著降低的趨勢。尿素分泌量之所以會下降的原因是因為當過多的脂肪酸攝取後，會降低肝細胞中的精氨酸生成，同時也在肝細胞尿素循環中的要素，因此尿素分泌就會隨之降低[43]。而在 3 種試驗物質的尿素結果中可以觀察到 1 $\mu\text{g/mL}$ TA 以及 1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 在 iPS 細胞的模型中均有顯著提升的尿素表現。該結果可以歸因於 TA 本身具有降低自由基以及活化粒線體代謝的功能，藉此回復精氨酸的分泌同時提高尿素的分泌量。而之所以 TA-DLM Nms 可以有較高的回復效果可能的原因為其奈米尺寸以及 DLM 上的負電性使其較容易被細胞吞吸收其中的單寧酸。接著我們對該模型中另一項肝機能的指標-白蛋白進行定性以及定量分析。首先可以觀察到在 5 mM OA 的誘導下，白蛋白分泌量會有顯著降低的趨勢。白蛋白分泌量之所以會下降的原因是由於過多的脂肪酸會產生過多的自由基以及高內質網壓力會干擾白蛋白的合成[95]，因此會有顯著較低的白蛋白表現；而在 3 種試驗物質的結果中：1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 在該模型中會有顯著較高的表現，除了同樣展現了 TA 對於加速粒線體脂質代謝的能力之外也可以說明肝細胞對於 TA-DLM Nms 有著較高的偏好，使 TA 更容易被肝細胞所吸收。

在完成在人類 iPS 細胞誘導之肝細胞的 MASLD 模型的體外試驗後，我們將體外試驗的



對象轉到大鼠初代成熟肝細胞，著重檢測不同濃度之 TA 以及 TA-DLM Nms 對於該模型的影響。首先在油酸誘導結束後，可以觀察到由於過多的脂肪酸累積導致同樣產生了肝細胞肥大的情況，明顯會有細胞膨脹的情形，而在加入了 1 $\mu\text{g/mL}$ 和 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 TA 或 TA-DLM Nms 可以觀察到有較低程度的膨脹情形，然而僅從顯微鏡的觀察難以看出其中差異性。接著我們檢測了各組細胞盤中的 DNA 含量進而了解各盤中的細胞數量；從 DNA 的結果可以得知：在經過 OA 的誘導後，肝細胞的數量會有顯著上升的趨勢，而 TA 以及 TA-DLM Nms 可以顯著降低該趨勢。呈現出該結果的原因可以歸因於油酸本身的促進肝細胞增殖的能力，而在 TA 以及 TA-DLM Nms 的加速脂質代謝下，則會抑制這樣的效果。接著我們收集上清液進行生化分析檢測：首先在 LDH 活性的結果中可以觀察到 1 mM OA 對於大鼠初代成熟肝細胞會產生較高的細胞毒性，說明 OA 同樣在該細胞中產生了較高的內質網壓力增加細胞凋亡程度，而在 TA 以及 TA-DLM Nms 的結果中可以觀察到均有著降低 LDH 活性的能力且 1 $\mu\text{g/mL}$ TA 有著最為顯著的效果。推測可能的原因為由於 TA 活化了 AMPK pathway 以降低內質網壓力同時抑制細胞凋亡[94]。接著我們量測了上清液中的尿素濃度：從結果中可以看到在該疾病模型中 OA 同樣會抑制尿素的生成說明 OA 在該肝細胞中可能也抑制了細胞內精氨酸的生成同時抑制了尿素循環中尿素的分泌[43]。而在 TA 以及 TA-DLM Nms 的結果中則可以觀察到 5 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 可以有著最高的尿素濃度，說明 TA-DLM Nms 透過活化 AMPK pathway 降低了由 OA 所導致的尿素循環抑制現象，且加上細胞對奈米顆粒的胞吞效果，恢復了肝細胞機能。在了解對尿素分泌量的影響後，我們接著檢測肝機能的另一項指標：白蛋白進行檢測。與 iPS 誘導之肝細胞的結果相同，在大鼠初代成熟肝細胞中，OA 同樣會因為造成肝細胞內的高內質網壓力降低白蛋白的合成，因此白蛋白的分泌會降低[95]。而在 TA 以及 TA-DLM Nms 的結果中則可以觀察到 1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 可以有著最高的白蛋白濃度，說明 TA-DLM Nms 透過活化 AMPK pathway 降低了由 OA 所導致的白蛋白分泌抑制現象，且再加上細胞對奈米顆粒的胞吞效果，恢復了肝細胞機能。接著我們為了了解 TA 以及 TA-DLM Nms 是否皆會活化 AMPK pathway 以此達到加速脂質代謝的功能，而根據過往文獻可以得知 IL-6 這種細胞激素對於 AMPK pathway 的活性化與否有著正相關的意義，



因此對上清液中的 IL-6 進行檢測。可以觀察到在 OA 的誘導下，IL-6 的分泌量有著顯著降低的趨勢，而在經由 TA 以及 TA-DLM Nms 的治療後會有顯著上升的趨勢，且 1 $\mu\text{g/mL}$ TA-DLM Nms 有著最佳的回復效果，說明 TA-DLM Nms 有著更甚的刺激 AMPK pathways 的潛力。最後我們想了解是否 TA 以及 TA-DLM Nms 具備降低細胞內脂質堆積的能力，因此我們測試了各組細胞內的脂質堆積量。可以觀察到在 OA 的誘導下會有顯著較高的脂質堆積，而在加入了 TA 以及 TA-DLM Nms 後均能顯著降低細胞內的脂質堆積，該結果也呼應了在顯微鏡下觀察的結果，說明了 TA 以及 TA-DLM Nms 降低脂質堆積的能力。由在兩種體外實驗模型中 (人類 iPS 細胞誘導之肝細胞以及大鼠初代成熟肝細胞) 測量了上述的細胞毒性、脂質堆積量、IL-6 以及肝細胞機能的指標結果可以觀察到：TA 以及 TA-DLM Nms 皆具備著抑制 OA 所造成的脂質堆積、細胞毒性以及肝細胞機能損傷，而 TA-DLM Nms 相較於 TA 更具備優勢的原因在於其內含的 TA 濃度是較 TA 實驗組來的較低的；由於過去的研究發現高濃度的 TA 會有加速肝細胞凋亡的效果[18]，而根據 TA-DLM 奈米藥物釋放曲線的結果可以得知：TA-DLM 奈米藥物內約占了 50% 的 TA，說明在投入相同濃度的 TA 以及 TA-DLM Nms 時，TA-DLM Nms 可以在攜帶較低濃度的 TA 就產生了與 TA 實驗組相似甚至是更甚的治療效果，且與過往研究的結果有著相似的表現[96]，如此便體現了 TA-DLM Nms 的優勢所在。

在完成體外實驗的驗證後，我們便著手進行體內實驗的驗證。首先我們想了解 TA-DLM Nms 在體內的最佳濃度，因此本研究利用了 C57BL/6J 小鼠進行 STZ 皮下注射以及餵食 HFD 建立 MASLD 小鼠體內預試驗模型，並腹腔注射了不同濃度之 TA-DLM Nms 檢測其效果。首先我們追蹤了各組小鼠的長時間的體重數據變化，首先可以觀察到由 STZ 誘導的糖尿病模型會導致體重普遍較低[97]，在投入該濃度區間的 TA-DLM Nms 並不會對該模型小鼠體重有著顯著性的影響。接著我們收集了預試驗的肝重以及肝重/體重比例的結果：可以觀察到 0.75 mg/mL TA-DLM Nms 可以顯著降低肝臟的重量，且 0.75 mg/mL 以及 1 mg/mL TA-DLM Nms 有著較低的肝重/體重比例，說明 0.75 或 1 mg/mL 的 TA-DLM Nms 有助於降低肝臟重量。推測可能的原因為 TA-DLM Nms 透過加速肝細胞對於脂質代謝的能力，故降



低了肝內的脂質堆積同時降低了肝臟重量。接著我們也對預試驗小鼠進行血液生化分析，在 AST, ALT 的結果中 0.25, 0.75 以及 1 mg/mL 均展現了下降的趨勢，推測可能的原因為 TA-DLM Nms 確實展現了來自於 TA 的抗發炎能力，然而在 ALT 的表現較為顯著而在 AST 的表現較不顯著[98]。接著我們檢測了 4 種濃度對於全身性 TG 以及 CHO 的影響，發現 0.75 mg/mL 以及 1 mg/mL TA-DLM Nms 有著顯著較低的表現，說明在 TA-DLM Nms 加速了肝臟對於脂質的代謝後，對於全身性的脂質含量也有著顯著影響。最後我們探討了不同濃度 TA-DLM Nms 對於 HDL, LDL 的影響，從結果可以觀察到 TA-DLM Nms 對於 HDL 並沒有顯著影響，但 1 mg/mL TA-DLM Nms 則對 LDL 有著顯著下降的趨勢。因此我們認為根據血液分析的結果：1 mg/mL TA-DLM Nms 該濃度有著抵抗肝臟發炎反應以及提升全身性的脂質代謝效率的效果。最後我們在犧牲小鼠後進行了組織染色切片分析，從 H&E 的定性以及定量的結果可以觀察到 1 mg/mL TA-DLM Nms 組別有著顯著最低的組織脂肪變性程度。最後根據 Picro-sirus red 的結果發現並無纖維化的反應產生說明本疾病模型為 MASLD 模型而非 MASH 模型。然而後續需要進行肝內的發炎反應量測才能進一步釐清該動物模型的發病階段。綜合整個預試驗的結果我們認為 1 mg/mL TA-DLM Nms 在大多數的結果中表現穩定因此做為後續主試驗的主要測試濃度。

接著我們便將 1 mg/mL TA-DLM Nms 拆分為 3 組實驗組：0.5 mg/mL TA, 0.5 mg/mL DLM 以及 1 mg/mL TA-DLM Nms 投入到以 HFD 和果糖飲水誘導的小鼠 MASLD 體內主試驗模型中檢測三者對於該模型的影響。首先我們對該模型小鼠進行了長期的體重追蹤，發現在 HFD 和果糖飲水誘導後體重會有顯著性的提升，而 TA, DLM 以及 TA-DLM Nms 均不會對體重有著顯著性影響。接著我們比較了肝臟重量以及肝重/體重比例的結果，首先在 HFD 和果糖飲水誘導下肝臟重量會有顯著的提升，然而 3 組實驗組均無法對肝臟重量產生顯著性差異，此時我們在比較了肝重/體重比例時發現 TA-DLM Nms 產生了顯著降低的趨勢，該結果說明了相較於 TA, TA-DLM Nms 更能有助於降低肝臟在體內的比重；推測可能的原因是因為 TA-DLM Nms 作為一種 stealth nanoparticles 藉由本身的奈米尺度更能透過被動運輸進入到肝臟中被細胞吞釋放 TA 作用到肝細胞[42]。接著我們比較了該模型的肝內三酸甘油



脂的結果，觀察到 TA-DLM Nms 有著顯著較低的肝內三酸甘油脂含量說明先前降低的肝臟在體內的比重可以歸因於肝內脂質的降低。接著我們也對主試驗小鼠進行血液生化分析，在 AST, ALT 的結果中我們可以觀察到 TA-DLM Nms 皆表現了顯著較低的表現，說明其在抗肝臟發炎反應的潛能。接著我們檢測了 3 種試驗物質對於 CHO, TG 的影響，首先發現 HFD 以及果糖飲水會對全身性的 CHO 以及 TG 產生顯著上升的趨勢；而 3 種試驗物質均不會對 CHO 產生顯著性影響，而在 TG 則是 3 種試驗物質均表現了顯著性下降的趨勢。該結果說明了在該模型下肝臟因為接收了更多的脂質故會使有更多的膽固醇在體內循環，而由於本試驗中的 TA, DLM, TA-DLM Nms 主要作用於肝臟，因此主要影響的數值為三酸甘油脂的高低，故不會對 CHO 有著顯著性差異。接著我們也檢測了 HDL 以及 LDL 的結果以進一步了解三者對於脂質代謝的影響；觀察到 3 者均顯著提升了 HDL 的數值以及下降了 LDL 的數值，說明 3 種試驗物質對於全身性脂質代謝的正相關效果。推測是由於 TA, DLM, TA-DLM Nms 加速了肝內的脂質代謝速率故從肝臟合成出的脂蛋白大多為高密度脂蛋白。然而根據近期的研究指出，HDL 以及 LDL 對於體內脂質代謝的好與壞應該根據其「帶陰電性」程度再區分。陰電性低密度脂蛋白以及陰電性高密度脂蛋白更容易淤積於血管中，造成血管阻塞[92]，在後續的研究中可以根據這兩種脂蛋白進行更進一步的研究。最後我們在犧牲小鼠後進行了組織染色切片分析，從 H&E 的定性以及定量的結果可以觀察到 TA-DLM Nms 組別有著顯著最低的組織脂肪變性程度。最後根據 Picro-sirus red 的結果發現並無纖維化的反應產生可以初步說明本疾病模型為 MASLD 模型而非 MASH 模型[99]，然而後續需要進行肝內的發炎反應量測才能進一步釐清該動物模型的發病階段。綜合整個主試驗的結果我們認為 TA-DLM Nms 在大多數的結果中均表現了穩定且顯著的治療 MASLD 疾病的效果。

從以上的研究中可以發現到 TA, DLM 以及 TA-DLM Nms 對於體外以及體內模型中分別都有著各自出色的表現，然而我們認為對於 MASLD 情況而言 TA-DLM Nms 是較為有利的治療方式。首先雖然 TA 本身在低濃度時具備良好的抗氧化特性，然而根據文獻指出其在高濃度時具備細胞毒性以及基因毒性，對於肝細胞機能回復有著負面的影響，因此不適合高濃度的投放[18]；且在先前文獻探討提及單寧酸與蛋白質的高度結合的能力，導致其生物利用



率低，在口服後僅有一小部分會被吸收到血液中。這是因為它能夠與食物中的蛋白質和其他分子結合，從而降低了其被吸收的能力[51]。另外在 DLM 的部分則是由於其在本研究的多數脂質堆積影響的結果中並沒有展現良好的降低脂質堆積的表現，雖然其本身作為藥物載體在過去的研究中有著優秀的機制[84]，然而在 MASLD 模型的治療中仍缺乏有效的療效。綜合上述的種種原因，TA-DLM Nms 便可以有效的解決了這些困境，首先由於 TA 與 DLM 在製備的過程中優先結合，因此在投入到體內時，便可降低 TA 在體內受到其他蛋白質的干擾，提升其生物利用率。接著，由於 TA-DLM Nms 本身的奈米化以及 PEGylation 的修飾，增加其在體內循環的停留時間使其可以透過被動運輸的方式穿過類洞內皮累積於肝臟中，最後由於 DLM 本身易於降解的特性，在釋放低濃度 TA 的同時也可以釋放 DLM 上的營養蛋白，達到降低脂質堆積以及提升肝臟細胞機能的作用。透過上述原因，我們認為，TA-DLM Nms 是具備治療 MASLD 疾病的潛力藥物。



5.2 結論

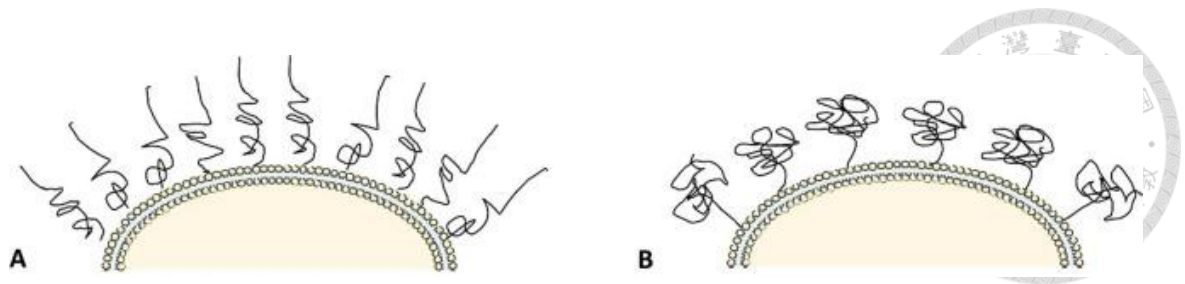
本研究從口腔澀味來源作為啟發，仿造了單寧酸與口腔蛋白的交聯能力結合了單寧酸與脫細胞化肝臟間質製作成 TA-DLM 奈米藥物投入到 MASLD 體外以及體內疾病模型，並成功的在奈米藥物本身的檢測分析、iPSC 誘導之肝細胞體外模型、大鼠初代成熟肝細胞體外模型、小鼠體內 MASLD 預試驗以及主試驗模型中均有著優秀的藥物輸送以及治療效果的表現，在展現單寧酸的抗發炎反應能力的同時也說明該藥物輸送策略的有效性，期待其在往後 MASLD 臨床治療中的應用。



5.3 未來展望

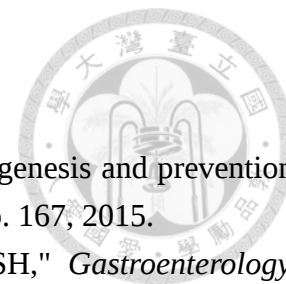
在本研究的 TA-DLM 奈米藥物採用聚乙二醇作為增加奈米藥物在血液循環停留時間的策略，然而根據過去的研究發現 PEG 的聚合物鍊長短與否以及修飾在奈米粒子上的型態為條狀或葦狀也會對藥物動力學產生影響。根據過往的研究發現，低密度的 PEG (< 5 wt%) 修飾到奈米粒子上會形成「蘑菇狀」的型態 (圖六十四 A)，PEG 分子內部會相互折疊，有效地覆蓋奈米顆粒表面並形成親水層，從而產生抗蛋白質吸附的隱身效果；而高密度的 PEG (> 5 wt%) 則會形成「條狀」修飾在表面 (圖六十四 B)，雖然這種構型仍然可以提供隱身效果，但它也可能導致奈米顆粒與細胞的交互作用減少，因為 PEG 鏈可能會阻礙靶向配體或細胞表面受體[42]。故在未來也可以測試在本研究所開發之 TA-DLM 奈米藥物的聚乙二醇修飾程度進行探討，覓得最佳化修飾條件。

本研究所製作的 TA-DLM 奈米藥物的藥物釋放策略為製作一種 Stealth nanoparticles 透過被動運輸的方式輸送至肝臟類洞內皮中藉此達到治療效果。然而在現今的主流奈米藥物輸送策略上在奈米粒子上接上適當的標靶已蔚為主流，且同時可以增加藥物輸送的效率。根據過往的研究，甘草次酸 (Glycyrrhetic Acid; GA) 在近年已被用做肝臟靶向的配體，而且 GA 自身就有抗肝癌的效果：如抑制腫瘤生長和誘導肝癌細胞凋亡等[100]，同時 GA 亦展現出其抗氧化的特性而具有保肝的能力[101]。因此假使在往後能將 GA 與 PEG 同時修飾於 DLM 上再與 TA 或是其他對 MASLD 治療具備潛力之藥物，可以預期該奈米藥物可以有著更為有效的藥物輸送系統。

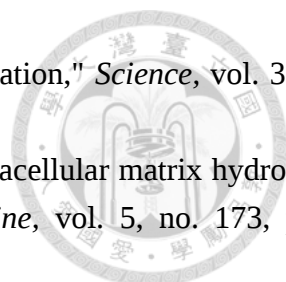


圖六十四：高密度與低密度聚乙二醇修飾於奈米粒子上的表現。
(A：高密度 PEG 所呈現的條狀修飾；B：低密度 PEG 所呈現的蘑菇狀修飾)

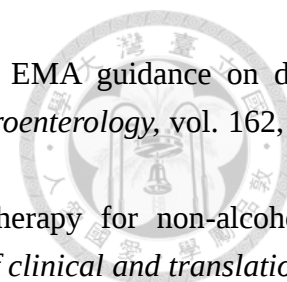
參考文獻



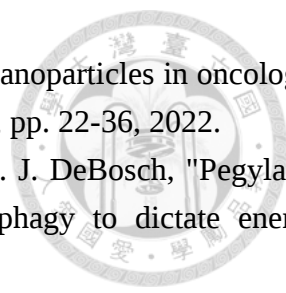
- [1] F. Nassir, R. S. Rector, G. M. Hammoud, and J. A. Ibdah, "Pathogenesis and prevention of hepatic steatosis," *Gastroenterology & hepatology*, vol. 11, no. 3, p. 167, 2015.
- [2] G. R. Lichtenstein, "Shifting Our Focus From NASH to MASH," *Gastroenterology & Hepatology*, vol. 19, no. 9, p. 511, 2023.
- [3] M. Barbara, A. Scott, and N. Alkhouri, "New insights into genetic predisposition and novel therapeutic targets for nonalcoholic fatty liver disease," *Hepatobiliary surgery and nutrition*, vol. 7, no. 5, p. 372, 2018.
- [4] G. Targher, C. P. Day, and E. Bonora, "Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease," *New England Journal of Medicine*, vol. 363, no. 14, pp. 1341-1350, 2010.
- [5] O. E. Hegazi *et al.*, "NAFLD and nutraceuticals: A review of completed phase III and IV clinical trials," *Frontiers in Medicine*, vol. 10, 2023.
- [6] R. R. Nathani and M. B. Bansal, "Update on clinical trials for nonalcoholic steatohepatitis," *Gastroenterology & Hepatology*, vol. 19, no. 7, p. 371, 2023.
- [7] S. Pottanam Chali and B. J. Ravoo, "Polymer nanocontainers for intracellular delivery," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 59, no. 8, pp. 2962-2972, 2020.
- [8] F. Chen and G. Huang, "Application of glycosylation in targeted drug delivery," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 182, p. 111612, 2019.
- [9] A. Mahapatro and D. K. Singh, "Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines," *Journal of nanobiotechnology*, vol. 9, pp. 1-11, 2011.
- [10] X. Huang, M. Li, D. C. Green, D. S. Williams, A. J. Patil, and S. Mann, "Interfacial assembly of protein-polymer nano-conjugates into stimulus-responsive biomimetic protocells," *Nature communications*, vol. 4, no. 1, p. 2239, 2013.
- [11] G. Sahay, D. Y. Alakhova, and A. V. Kabanov, "Endocytosis of nanomedicines," *Journal of controlled release*, vol. 145, no. 3, pp. 182-195, 2010.
- [12] B. E. Uygun *et al.*, "Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix," *Nature medicine*, vol. 16, no. 7, pp. 814-820, 2010.
- [13] H. Shimoda *et al.*, "Decellularized liver scaffolds promote liver regeneration after partial hepatectomy," *Scientific reports*, vol. 9, no. 1, p. 12543, 2019.
- [14] C. Quint, Y. Kondo, R. J. Manson, J. H. Lawson, A. Dardik, and L. E. Niklason, "Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, no. 22, pp. 9214-9219, 2011.



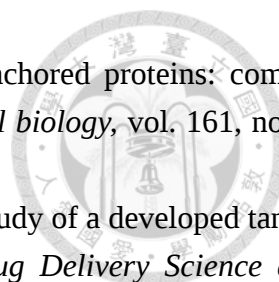
- [15] T. H. Petersen *et al.*, "Tissue-engineered lungs for in vivo implantation," *Science*, vol. 329, no. 5991, pp. 538-541, 2010.
- [16] S. B. Seif-Naraghi *et al.*, "Safety and efficacy of an injectable extracellular matrix hydrogel for treating myocardial infarction," *Science translational medicine*, vol. 5, no. 173, pp. 173ra25-173ra25, 2013.
- [17] S. Nakamura and H. Ijima, "Solubilized matrix derived from decellularized liver as a growth factor-immobilizable scaffold for hepatocyte culture," *Journal of bioscience and bioengineering*, vol. 116, no. 6, pp. 746-753, 2013.
- [18] A. Baldwin and B. W. Booth, "Biomedical applications of tannic acid," *Journal of Biomaterials Applications*, vol. 36, no. 8, pp. 1503-1523, 2022.
- [19] R. A. Youness, R. Kamel, N. A. Elkasabgy, P. Shao, and M. A. Farag, "Recent advances in tannic acid (gallotannin) anticancer activities and drug delivery systems for efficacy improvement; a comprehensive review," *Molecules*, vol. 26, no. 5, p. 1486, 2021.
- [20] J. Castro, "Mechanistical studies and prevention of free radical cell injury," in *IUPHAR 9th International Congress of Pharmacology: Proceedings Volume 2*, 1984: Springer, pp. 243-250.
- [21] H. Hapidin, N. A. A. Romli, and H. Abdullah, "Proliferation study and microscopy evaluation on the effects of tannic acid in human fetal osteoblast cell line (hFOB 1.19)," *Microscopy research and technique*, vol. 82, no. 11, pp. 1928-1940, 2019.
- [22] P.-Y. Chen, Y.-H. Liao, W.-T. Huang, Y.-C. Lin, and Y.-T. Hou, "Effects of tannic acid on liver function in a small hepatocyte-based detachable microfluidic platform," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 190, p. 108757, 2023.
- [23] Y.-H. Lin, Y.-C. Lin, and Y.-T. Hou, "Prospective Application of Tannic Acid in Acetaminophen (APAP)-Induced Acute Liver Failure," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 25, no. 1, p. 317, 2024. [Online]. Available: <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/1/317>.
- [24] G. Mazza *et al.*, "Decellularized human liver as a natural 3D-scaffold for liver bioengineering and transplantation," *Scientific reports*, vol. 5, no. 1, p. 13079, 2015.
- [25] R. O. Hynes and A. Naba, "Overview of the matrisome—an inventory of extracellular matrix constituents and functions," *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 4, no. 1, p. a004903, 2012.
- [26] M. Sharma, M. Premkumar, A. V. Kulkarni, P. Kumar, D. N. Reddy, and N. P. Rao, "Drugs for non-alcoholic steatohepatitis (NASH): quest for the holy grail," *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, vol. 9, no. 1, p. 40, 2021.
- [27] Y. Sumida, A. Nakajima, and Y. Itoh, "Limitations of liver biopsy and non-invasive diagnostic tests for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis," *World journal of gastroenterology: WJG*, vol. 20, no. 2, p. 475, 2014.



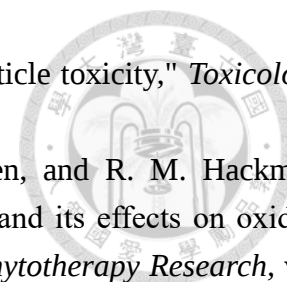
- [28] R. Loomba *et al.*, "Expert panel review to compare FDA and EMA guidance on drug development and endpoints in nonalcoholic steatohepatitis," *Gastroenterology*, vol. 162, no. 3, pp. 680-688, 2022.
- [29] J. J. Connolly, K. Ooka, and J. K. Lim, "Future pharmacotherapy for non-alcoholic steatohepatitis (NASH): review of phase 2 and 3 trials," *Journal of clinical and translational hepatology*, vol. 6, no. 3, p. 264, 2018.
- [30] S. A. Harrison *et al.*, "Selonsertib for patients with bridging fibrosis or compensated cirrhosis due to NASH: results from randomized phase III STELLAR trials," *Journal of hepatology*, vol. 73, no. 1, pp. 26-39, 2020.
- [31] V. Ratziu *et al.*, "Cenicriviroc treatment for adults with nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis: final analysis of the phase 2b CENTAUR study," *Hepatology*, vol. 72, no. 3, pp. 892-905, 2020.
- [32] Q. M. Anstee *et al.*, "Cenicriviroc Lacked Efficacy to Treat Liver Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis: AURORA Phase III Randomized Study," *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2023.
- [33] V. Ratziu *et al.*, "Elafibranor, an agonist of the peroxisome proliferator- activated receptor- α and- δ , induces resolution of nonalcoholic steatohepatitis without fibrosis worsening," *Gastroenterology*, vol. 150, no. 5, pp. 1147-1159. e5, 2016.
- [34] H.-C. Tsai *et al.*, "Elafibranor inhibits chronic kidney disease progression in NASH mice," *BioMed Research International*, vol. 2019, 2019.
- [35] C. Keshvani, J. Kopel, and H. Goyal, "Obeticholic Acid—A Pharmacological and Clinical Review," *Future Pharmacology*, vol. 3, no. 1, pp. 238-251, 2023.
- [36] Z. M. Younossi *et al.*, "Obeticholic acid impact on quality of life in patients with nonalcoholic steatohepatitis: REGENERATE 18-month interim analysis," *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, vol. 20, no. 9, pp. 2050-2058. e12, 2022.
- [37] S.-W. Cho *et al.*, "Small-diameter blood vessels engineered with bone marrow-derived cells," *Annals of surgery*, vol. 241, no. 3, pp. 506-515, 2005.
- [38] S.-W. Cho *et al.*, "Evidence for in vivo growth potential and vascular remodeling of tissue-engineered artery," *Tissue Engineering Part A*, vol. 15, no. 4, pp. 901-912, 2009.
- [39] J. M. Ladowski, H. Hara, and D. K. Cooper, "The role of SLAs in xenotransplantation," *Transplantation*, vol. 105, no. 2, pp. 300-307, 2021.
- [40] A. Kandamachira, S. Selvam, N. Marimuthu, S. Janardhanan Kalarical, and N. Fathima Nishter, "Collagen-nanoparticle interactions: type I collagen stabilization using functionalized nanoparticles," *Soft Materials*, vol. 13, no. 1, pp. 59-65, 2015.
- [41] R. Zhao and C. W. Macosko, "Slip at polymer-polymer interfaces: Rheological measurements on coextruded multilayers," *Journal of rheology*, vol. 46, no. 1, pp. 145-167, 2002.



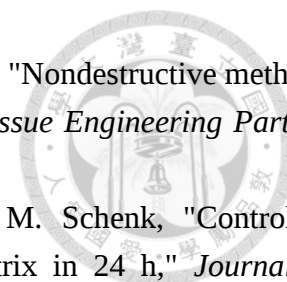
- [42] S. Zalba, T. L. Ten Hagen, C. Burgui, and M. J. Garrido, "Stealth nanoparticles in oncology: Facing the PEG dilemma," *Journal of Controlled Release*, vol. 351, pp. 22-36, 2022.
- [43] Y. Zhang, C. B. Higgins, B. A. Van Tine, J. S. Bomalaski, and B. J. DeBosch, "Pegylated arginine deiminase drives arginine turnover and systemic autophagy to dictate energy metabolism," *Cell Reports Medicine*, vol. 3, no. 1, 2022.
- [44] J. K. Jackson and K. Letchford, "The effective solubilization of hydrophobic drugs using epigallocatechin gallate or tannic acid-based formulations," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 105, no. 10, pp. 3143-3152, 2016.
- [45] P. Chowdhury *et al.*, "Tannic acid-inspired paclitaxel nanoparticles for enhanced anticancer effects in breast cancer cells," *Journal of colloid and interface science*, vol. 535, pp. 133-148, 2019.
- [46] P. Darvin *et al.*, "Tannic acid inhibits the Jak2/STAT3 pathway and induces G1/S arrest and mitochondrial apoptosis in YD-38 gingival cancer cells," *International journal of oncology*, vol. 47, no. 3, pp. 1111-1120, 2015.
- [47] X. Chu *et al.*, "Ameliorative effects of tannic acid on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in vivo and in vitro," *Journal of pharmacological sciences*, vol. 130, no. 1, pp. 15-23, 2016.
- [48] H. Rafiei, K. Omidian, and B. Bandy, "Dietary polyphenols protect against oleic acid-induced steatosis in an in vitro model of NAFLD by modulating lipid metabolism and improving mitochondrial function," *Nutrients*, vol. 11, no. 3, p. 541, 2019.
- [49] M.-Y. Chung *et al.*, "Tannic acid, a novel histone acetyltransferase inhibitor, prevents non-alcoholic fatty liver disease both in vivo and in vitro model," *Molecular metabolism*, vol. 19, pp. 34-48, 2019.
- [50] A. E. Hagerman and L. G. Butler, "Condensed tannin purification and characterization of tannin-associated proteins," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 28, no. 5, pp. 947-952, 1980.
- [51] A. E. Hagerman and L. G. Butler, "Determination of protein in tannin-protein precipitates," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 28, no. 5, pp. 944-947, 1980.
- [52] A. E. Hagerman and L. G. Butler, "The specificity of proanthocyanidin-protein interactions," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 256, no. 9, pp. 4494-4497, 1981.
- [53] G. Luck *et al.*, "Polyphenols, astringency and proline-rich proteins," *Phytochemistry*, vol. 37, no. 2, pp. 357-371, 1994.
- [54] A. J. Charlton *et al.*, "Polyphenol/peptide binding and precipitation," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 50, no. 6, pp. 1593-1601, 2002.
- [55] G. Agorastos, O. van Nielen, E. van Halsema, E. Scholten, A. Bast, and P. Klosse, "Lubrication behavior of ex-vivo salivary pellicle influenced by tannins, gallic acid and mannoproteins," *Heliyon*, vol. 8, no. 12, 2022.



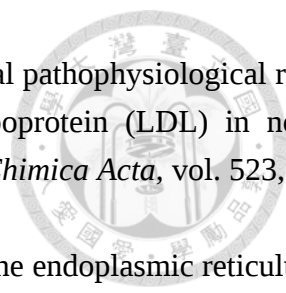
- [56] N. Borgese, S. Colombo, and E. Pedrazzini, "The tale of tail-anchored proteins: coming from the cytosol and looking for a membrane," *The Journal of cell biology*, vol. 161, no. 6, pp. 1013-1019, 2003.
- [57] N. Ahmad *et al.*, "A comparative brain Toxicopharmacokinetics study of a developed tannic acid nanoparticles in the treatment of epilepsy," *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 76, p. 103772, 2022.
- [58] L. Wu *et al.*, "Effects of tannic acid and its related compounds on food mutagens or hydrogen peroxide-induced DNA strands breaks in human lymphocytes," *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 556, no. 1-2, pp. 75-82, 2004.
- [59] V. C. Cogger *et al.*, "Three-dimensional structured illumination microscopy of liver sinusoidal endothelial cell fenestrations," *Journal of structural biology*, vol. 171, no. 3, pp. 382-388, 2010.
- [60] A. Sanden, S. Suhm, M. Rüdte, and J. Hubbuch, "Fourier-transform infrared spectroscopy as a process analytical technology for near real time in-line estimation of the degree of PEGylation in chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 1608, p. 460410, 2019.
- [61] C. R. Henry, "Morphology of supported nanoparticles," *Progress in surface science*, vol. 80, no. 3-4, pp. 92-116, 2005.
- [62] M. Musci and S. Yao, "Optimization and validation of Folin–Ciocalteu method for the determination of total polyphenol content of Pu-erh tea," *International journal of food sciences and nutrition*, vol. 68, no. 8, pp. 913-918, 2017.
- [63] M. Kajiwara *et al.*, "Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, no. 31, pp. 12538-12543, 2012.
- [64] P. O. Seglen, "Hepatocyte suspensions and cultures as tools in experimental carcinogenesis," *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, vol. 5, no. 2-3, pp. 551-560, 1979.
- [65] A. Moravcová, Z. Červinková, O. Kučera, V. Mezera, D. Rychtrmóc, and H. Lotkova, "The effect of oleic and palmitic acid on induction of steatosis and cytotoxicity on rat hepatocytes in primary culture," *Physiological research*, vol. 64, 2015.
- [66] C. J. Vorland *et al.*, "Effect of ovariectomy on the progression of chronic kidney disease-mineral bone disorder (CKD-MBD) in female Cy/+ rats," *Scientific reports*, vol. 9, no. 1, p. 7936, 2019.
- [67] O. Huttala, J.-R. Sarkanen, M. Mannerström, T. Toimela, T. Heinonen, and T. Ylikomi, "Development of novel human in vitro vascularized adipose tissue model with functional macrophages," *Cytotechnology*, vol. 72, pp. 665-683, 2020.



- [68] X. Han *et al.*, "Validation of an LDH assay for assessing nanoparticle toxicity," *Toxicology*, vol. 287, no. 1-3, pp. 99-104, 2011.
- [69] S. Kalgaonkar, H. Nishioka, H. B. Gross, H. Fujii, C. L. Keen, and R. M. Hackman, "Bioactivity of a flavanol-rich lychee fruit extract in adipocytes and its effects on oxidant defense and indices of metabolic syndrome in animal models," *Phytotherapy Research*, vol. 24, no. 8, pp. 1223-1228, 2010.
- [70] P. M. Aja *et al.*, "Hesperidin protects against cadmium-induced pancreatitis by modulating insulin secretion, redox imbalance and iNOS/NF- κ B signaling in rats," *Life Sciences*, vol. 259, p. 118268, 2020.
- [71] W. Kang *et al.*, "Development and application of a transcriptomic signature of bioactivation in an advanced in vitro liver model to reduce drug-induced liver injury risk early in the pharmaceutical pipeline," *Toxicological Sciences*, vol. 177, no. 1, pp. 121-139, 2020.
- [72] J. Chao *et al.*, "Gallic acid ameliorated impaired lipid homeostasis in a mouse model of high-fat diet—and streptozotocin-induced NAFLD and diabetes through Improvement of β -oxidation and Ketogenesis," *Frontiers in pharmacology*, vol. 11, p. 606759, 2021.
- [73] A. Sclafani, S. Zukerman, and K. Ackroff, "Fructose-and glucose-conditioned preferences in FVB mice: strain differences in post-oral sugar appetite," *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 307, no. 12, pp. R1448-R1457, 2014.
- [74] M. Botros and K. A. Sikaris, "The de Ritis ratio: the test of time," *The Clinical Biochemist Reviews*, vol. 34, no. 3, p. 117, 2013.
- [75] X. Han, J. Kong, H. Zhang, Y. Zhao, Y. Zheng, and C. Wei, "Triglycerides Mediate the Influence of Body Mass Index on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in a Non-Obese Chinese Population with Normal Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels," *Obesity Facts*, 2024.
- [76] D. Zou, L. Liu, Y. Zeng, H. Wang, D. Dai, and M. Xu, "LncRNA MEG3 up-regulates SIRT6 by ubiquitinating EZH2 and alleviates nonalcoholic fatty liver disease," *Cell Death Discovery*, vol. 8, no. 1, p. 103, 2022.
- [77] M. Jaramillo, H. Yeh, M. L. Yarmush, and B. E. Uygun, "Decellularized human liver extracellular matrix (hDLM)-mediated hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells (hIPSCs)," *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, vol. 12, no. 4, pp. e1962-e1973, 2018.
- [78] D. Koley and A. J. Bard, "Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM)," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no. 39, pp. 16783-16787, 2010.
- [79] A. K. Bhuyan, "On the mechanism of SDS-induced protein denaturation," *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, vol. 93, no. 2, pp. 186-199, 2010.



- [80] S. Geerts, S. Ozer, M. Jaramillo, M. L. Yarmush, and B. E. Uygun, "Nondestructive methods for monitoring cell removal during rat liver decellularization," *Tissue Engineering Part C: Methods*, vol. 22, no. 7, pp. 671-678, 2016.
- [81] N. E. M. Bühler, K. Schulze-Osthoff, A. Königsrainer, and M. Schenk, "Controlled processing of a full-sized porcine liver to a decellularized matrix in 24 h," *Journal of bioscience and bioengineering*, vol. 119, no. 5, pp. 609-613, 2015.
- [82] F. Tavakoli *et al.*, "Effects of nano-encapsulated curcumin-chrysin on telomerase, MMPs and TIMPs gene expression in mouse B16F10 melanoma tumour model," *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, vol. 46, no. sup2, pp. 75-86, 2018.
- [83] B. Adamczyk, J. P. Salminen, A. Smolander, and V. Kitunen, "Precipitation of proteins by tannins: effects of concentration, protein/tannin ratio and pH," *International journal of food science & technology*, vol. 47, no. 4, pp. 875-878, 2012.
- [84] Y.-C. Hsieh, W.-R. Yin, Y.-Y. Xu, and Y.-T. Hou, "HGF/heparin-immobilized decellularized liver matrices as novel hepatic patches for hepatocyte regeneration in an acute liver injury model," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 180, p. 108354, 2022.
- [85] M. Parafati, R. J. Kirby, S. Khorasanizadeh, F. Rastinejad, and S. Malany, "A nonalcoholic fatty liver disease model in human induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes, created by endoplasmic reticulum stress-induced steatosis," *Disease models & mechanisms*, vol. 11, no. 9, p. dmm033530, 2018.
- [86] W. Liu *et al.*, "Effects of linoleic acid and eicosapentaenoic acid on cell proliferation and lipid-metabolism gene expression in primary duck hepatocytes," *Molecular and cellular biochemistry*, vol. 352, pp. 19-24, 2011.
- [87] J. Fang, L. Zeng, Y. He, X. Liu, T. Zhang, and Q. Wang, "Effects of dietary tannic acid on obesity and gut microbiota in C57BL/6J mice fed with high-fat diet," *Foods*, vol. 11, no. 21, p. 3325, 2022.
- [88] X.-L. Chen *et al.*, "Effects of interleukin-6 and IL-6/AMPK signaling pathway on mitochondrial biogenesis and astrocytes viability under experimental septic condition," *International immunopharmacology*, vol. 59, pp. 287-294, 2018.
- [89] E. Adeghate *et al.*, "Streptozotocin causes pancreatic beta cell failure via early and sustained biochemical and cellular alterations," *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*, pp. 699-707, 2010.
- [90] S. Yang *et al.*, "Ginsenoside Rh4 improves hepatic lipid metabolism and inflammation in a model of NAFLD by targeting the gut liver axis and modulating the FXR signaling pathway," *Foods*, vol. 12, no. 13, p. 2492, 2023.
- [91] J. Ventura-Sobrevilla *et al.*, "Effect of varying dose and administration of streptozotocin on blood sugar in male CD1 mice," in *Proc West Pharmacol Soc*, 2011, vol. 54, no. 5, p. 9.



- [92] H. Vural, F. Armutcu, O. Akyol, and R. Weiskirchen, "The potential pathophysiological role of altered lipid metabolism and electronegative low-density lipoprotein (LDL) in non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular diseases," *Clinica Chimica Acta*, vol. 523, pp. 374-379, 2021.
- [93] C. L. Gentile, M. A. Frye, and M. J. Pagliassotti, "Fatty acids and the endoplasmic reticulum in nonalcoholic fatty liver disease," *Biofactors*, vol. 37, no. 1, pp. 8-16, 2011.
- [94] S. Li, H. Y. Tan, N. Wang, F. Cheung, M. Hong, and Y. Feng, "The potential and action mechanism of polyphenols in the treatment of liver diseases," *Oxidative medicine and cellular longevity*, vol. 2018, no. 1, p. 8394818, 2018.
- [95] J. Han and R. J. Kaufman, "The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity," *Journal of lipid research*, vol. 57, no. 8, pp. 1329-1338, 2016.
- [96] Y.-C. Chiu, K.-W. Huang, Y.-H. Lin, W.-R. Yin, and Y.-T. Hou, "Development of a decellularized liver matrix-based nanocarrier for liver regeneration after partial hepatectomy," *Journal of Materials Science*, vol. 58, no. 38, pp. 15162-15180, 2023.
- [97] P. Lertpatipanpong *et al.*, "The anti-diabetic effects of NAG-1/GDF15 on HFD/STZ-induced mice," *Scientific reports*, vol. 11, no. 1, p. 15027, 2021.
- [98] A. Sonmez *et al.*, "Low-and high-density lipoprotein subclasses in subjects with nonalcoholic fatty liver disease," *Journal of clinical lipidology*, vol. 9, no. 4, pp. 576-582, 2015.
- [99] S. K. Bansal and M. B. Bansal, "Pathogenesis of MASLD and MASH—role of insulin resistance and lipotoxicity," *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, vol. 59, pp. S10-S22, 2024.
- [100] Y. Cai, Y. Xu, H. F. Chan, X. Fang, C. He, and M. Chen, "Glycyrrhetic acid mediated drug delivery carriers for hepatocellular carcinoma therapy," *Molecular pharmaceutics*, vol. 13, no. 3, pp. 699-709, 2016.
- [101] H. NISHINO *et al.*, "Glycyrrhetic acid inhibits tumor-promoting activity of teleocidin and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage mouse skin carcinogenesis," *Japanese Journal of Cancer Research GANN*, vol. 77, no. 1, pp. 33-38, 1986.

