

2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 030010

參展科別 化學

作品名稱 多工奈米複合材料合成與其協同治療應用

得獎獎項

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 許名智、張家耀

作者姓名 謝子恬

關鍵詞 光治療、化學動力療法、CuFe₂O₄ 奈米材料

作者簡介



我是北一女中數理資優班的謝子恬，因緣際會下進入實驗室開啟了化學專題之路，有幸進入平常未曾接觸的領域學習，體會到科學研究的種種酸甜苦辣。非常感謝一路上不斷給予我協助的老師、教授、學長們，及所有曾經鼓勵過我的人，讓我能順利完成實驗，獲得許多寶貴的經驗及知識，在高中生活中留下豐富難忘的回憶！

摘要

本研究結合奈米合成技術及生物醫學應用，以牛血清蛋白（BSA）為載體，裝載具化學動力療法的金屬氧化物（ CuFe_2O_4 , CFO）及具光治療功能的光敏劑（IR780），製備 CFO@BSA-IR780 多功能奈米複合材料。

材料鑑定方面由 TEM、DLS 與 UV-Vis 等儀器進行組成及光學性質分析。特性方面， CuFe_2O_4 在腫瘤環境由芬頓反應，促使 H_2O_2 產生活性極高的氫氧自由基（ $\cdot\text{OH}$ ）。並且 IR780 在近紅外光照射下同時具光熱與光動力治療特性，可殺死癌細胞。同時 CuFe_2O_4 中的 Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 進行氧化還原將腫瘤部位的穀胱甘肽（GSH）轉化成氧化型穀胱甘肽，強化化學動力療法及光動力治療效果。

最後，本研究將 CFO@BSA-IR780 奈米材料實際運用於細胞毒性測試與細胞螢光顯影，確認其效果及低毒性。成功發展出同時具備化學動力療法、光動力治療、光熱治療及細胞螢光顯影之多功能奈米複合材料，期許在醫學治療提供一項新興藥物材料。

Abstract

In this research, we present the combined therapeutic application of nano-synthesized metal oxide (CuFe_2O_4 , CFO) nanoparticles (NPs) in nanomedicine. In the system, the photosensitizer (IR780 dye), which is photodynamic therapy (PDT) and photothermal (PTT) agent, was loaded onto the surface of bovine serum albumin (BSA) at room temperature. The optical and morphological characterizations of the as-prepared nanocomposite (denoted as CFO@BSA-IR780) was investigated using TEM, DLS and UV-Visible spectroscopy. The presence of Cu^{2+} and Fe^{3+} ions in CuFe_2O_4 NPs enables to possess peroxidase-like activity, and confirmed by TMB assay in which CuFe_2O_4 NPs produce hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) in the presence of hydrogen peroxide (H_2O_2). Moreover, the glutathione (GSH) depletion was studied using CuFe_2O_4 NPs, resulting formation of oxidized GSH (GSSG) that can enhance the chemodynamic efficacy. On the other hand, the PDT and PTT performances of IR780 dye was examined under 808nm laser light, resulting generation of reactive oxygen species generation and good photothermal conversion efficiency, respectively. Successfully prepared CFO@BSA-IR780 multifunctional nanocomposites show better biocompatibility towards cancer cells. In the presence of laser irradiation and H_2O_2 supply, the CFO@BSA-IR780 nanocomposites produce cancer cell death due to the synergistic effect of PDT, CDT and PTT therapeutic activity. Additionally, the fluorescence imaging results confirms that the CFO@BSA-IR780 nanocomposite was comfortably uptaken by the cancer cell via endocytosis pathway. Therefore, the CFO@BSA-IR780 nanocomposites developed in our study performed combined therapeutic activity via PDT, CDT and PTT, and could be promising candidates in the future nanomedicine.

壹、前言

一、研究動機

癌症成為人類健康的主要威脅，對於癌症的治療是當前和未來的重要醫療課題。目前主要的治療方法包含放射療法、化學療法、免疫療法和手術切除等，然而這些療法不可避免地容易損害正常細胞，並具有嚴重副作用。因此，近年來研究人員致力於發展安全且有效的治療方法。

奈米技術在醫學上的應用，也被稱為奈米醫學，在腫瘤治療中顯示出巨大的潛力。對於當今高比率罹患癌症的社會上，奈米材料與生物醫藥的結合提供患者一個新的選擇方向。將低毒性與高生物相容性的奈米材料，送入生物組織系統中，奈米材料藉由結合不同功能之分子，同時擁有藥物載體、標靶治療、病理追蹤、藥物釋放等能力。同時，利用蛋白質作為合成的模板，控制奈米材料的尺寸、結構與形狀，由於蛋白質纏繞，奈米材料具有良好的穩定性與生物相容性，且蛋白質表面具有豐富的官能基團，有利於後續發展。

因此，本研究以牛血清蛋白（BSA）作為載體，提高材料生物相容性且提供大量官能基團，包覆具備化學動力療法的奈米粒子（ CuFe_2O_4 ）作為主要合成對象。更進一步與光敏劑（IR780）結合，賦予材料光動力治療與光熱治療之效果，形成一個新穎性的奈米複合材料。並利用其磁性特質發展腫瘤顯影，達到檢測與治療一體的功用，希望能在腫瘤治療上提供一項新興的藥物材料。

二、研究目的

- （一）合成 CFO@BSA-IR780 奈米複合材料
- （二）測量並探討 CFO@BSA-IR780 奈米材料的性質
- （三）CFO@BSA-IR780 的應用

三、研究原理

(一) 多工奈米複合材料協同治療

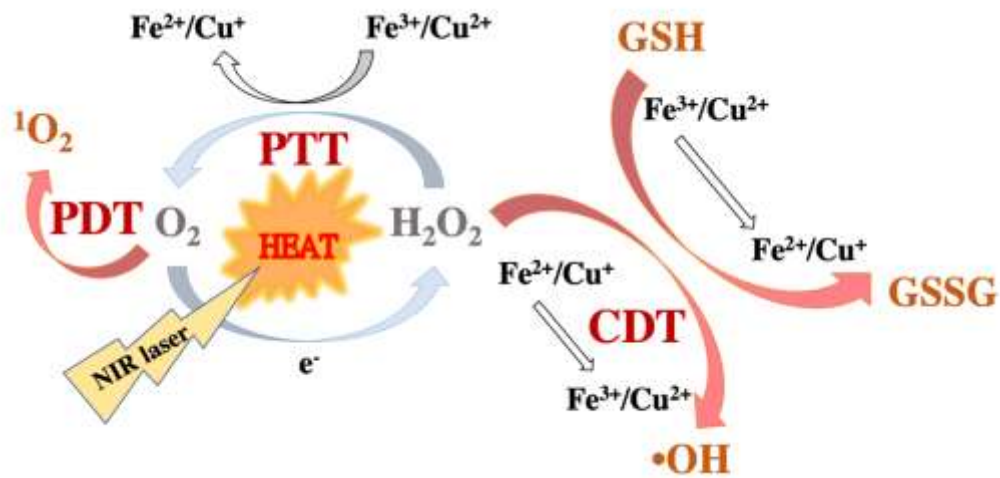


圖 1：多工奈米複合材料協同治療之反應機制圖

圖 1 為本研究之材料理想反應機制，其中，PDT (Photodynamic therapy) 為光動力治療，PTT (Photothermal therapy) 為光熱治療，而 CDT (Chemodynamic Therapy) 為化學動力療法。

腫瘤微環境 (Tumor microenvironment, TME) 具有許多獨特特徵，例如：弱酸環境、缺氧 (Hypoxia)、發炎 (Inflammation) 和產生過量的過氧化氫 (H_2O_2)。腫瘤缺氧是大多數實體瘤的共同特徵，其定義為腫瘤組織中的氧氣水平下降，這主要是由於癌細胞的快速增殖和低效率的微血管系統引起的氧氣消耗和攝取之間的失衡。一般腫瘤中， H_2O_2 濃度大約為 $50\sim 100\times 10^{-6}$ M，而過量的 H_2O_2 已被用於釋放或產生內源性之 O_2 ，用於氧敏感性癌症治療。

本研究中，腫瘤內 H_2O_2 可以透過亞鐵與亞銅離子的氧化，還原為活性極高之氫氧自由基 ($\bullet\text{OH}$)，表現 CDT 之效用；或者經由鐵與銅離子的還原，氧化成為氧氣分子，不僅可提供 PDT 在適當波長雷射照射後產生單態氧 ($^1\text{O}_2$)，並可以同時改善缺氧的腫瘤微環境，抑制癌細胞的生長及轉移，有望克服長期以來癌症治療的主要障礙。

另一方面，在近紅外光的照射下，材料可以增加溫度以消滅癌細胞，這是屬於 PTT 的治療範疇。最後，透過鐵與銅離子的還原，將腫瘤部位之穀胱甘肽 (GSH) 氧化為 GSSG，以提升光動力治療及化學動力療法之治療效果。

(二) 鐵酸銅基底材料

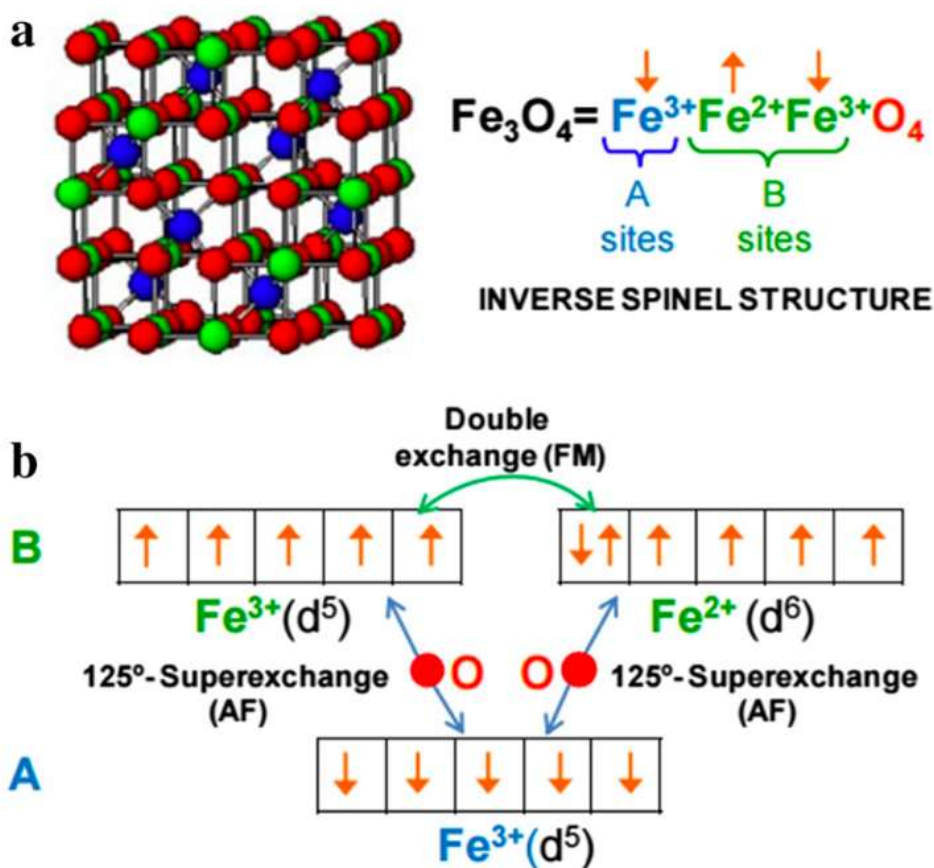


圖 2：Fe₃O₄ 之晶格結構 (a) 及軌域 (b) (reference 4)

Fe₃O₄ 是典型的磁性氧化鐵，具有立方反尖晶石結構，其中氧形成面心立方密堆積。Fe³⁺ 佔據間隙四面體的 1/8，而等量的 Fe³⁺ 和 Fe²⁺ 填充空間群中可用八面體位點的一半。由於鐵原子之間的 d 軌域重疊，Fe²⁺ 和 Fe³⁺ 在八面體位點之間存在雙交換相互作用，額外的自旋向下電子可以在相鄰的八面體位點之間跳躍，從而導致高電導率。

本研究所使用之金屬氧化物 (CuFe₂O₄) 即為 Fe₃O₄ 晶體之衍生物，將 Fe₃O₄ 中的 Fe²⁺ 以 Cu²⁺ 取代，即可得 CuFe₂O₄。因為八面體位置的 Cu²⁺ 和 Fe³⁺ 的電子自旋耦合，而四面體位置的 Fe³⁺ 之自旋與八面體位置的自旋反平行耦合。又 Fe³⁺ 和 Fe²⁺ 的磁矩分別為 5 和 4 波耳磁子，因此產生的磁矩等於 (→5←4←5) = 4 波耳磁子。這種淨效應使兩組的磁貢獻不平衡，提高了永久磁性，故本材料為磁性物質，可應用於磁振造影 (MRI)。

另外，本研究使用牛血清蛋白 (BSA) 包覆 CuFe₂O₄ 奈米材料，使 CFO@BSA-IR780 奈米複合材料擁有良好的生物相容性。並且，蛋白質中的化學基團豐富，有利於後續有機分子的結合。

（三）光治療

近年來，相較於手術或放射性治療等傳統腫瘤治療，低侵入性且低副作用之光治療已逐漸在癌症治療領域受到重視，其中，光動力治療（Photodynamic therapy, PDT）及光熱治療（Photothermal therapy, PTT）皆屬於其範疇，為兩種主要光療方法。本研究所使用光敏劑 IR780，是一種在近紅外光（NIR）具有強吸收度之分子，可同時用於光動力及光熱治療。

光動力治療需具備三個要素：光敏劑、適當波長之雷射、氧氣分子。其原理是指存在組織氧的清況下，經過適當波長的雷射照射後，光敏劑通過短壽命的單重態（SI），被激發至較長壽命的三重態（Excited triplet state），接著能量轉換至周圍的分子中，同時產生高生物毒性的單態氧(Singlet oxygen, 1O_2)與其他活性氧物質（ROS），導致細胞膜的損傷並對細胞造成不可逆的損害，並有效地促使細胞的死亡。其中，因為單態氧反應活性高、半衰期短，所以 PDT 僅直接影響產生在腫瘤環境區域附近的生物基質。

光熱療法是通过光敏劑吸收近紅外(NIR)區域（波長 700~1100 nm），然後將其轉化為熱量，藉由高溫導致癌細胞死亡。典型人體組織（水與血紅蛋白）所顯示的吸收光譜，在波段 700~400 nm 具有較低的吸收與散射，代表此波段能夠穿透組織至深處，因此，光熱治療材料需在近紅外光區有明顯的吸收波段。

（四）化學動力療法（Chemodynamic Therapy, CDT）

化學動力療法是一種新開發的腫瘤治療方法，藥物在酸性條件及含有 H_2O_2 的環境下，會透過芬頓反應（Fenton reaction），生成有毒的氫氧自由基（ $\bullet OH$ ），以攻擊腫瘤細胞，達到治療目的。

本實驗使用之金屬氧化物（ $CuFe_2O_4$ ）中的 Fe^{2+} 與 Cu^+ 在酸性環境下具有過氧化物酶的活性，可以將 H_2O_2 轉化成劇毒的活性氧（ROS）中的 $\bullet OH$ 。因為這種位點特異性，在腫瘤的弱酸性微環境下，氫氧自由基的產生可以誘導細胞的凋亡和死亡。

（五）氧化穀胱甘肽（glutathione, GSH）

穀胱甘肽(Glutathione, GSH)，又稱巯胺基硫，由巯胺酸、半胱胺酸及甘胺酸三肽所構成，在分子中半胱胺酸巯基是該化合物的主要功能基團。作為動物細胞抗氧化劑，可

以保護 DNA 免於氧化。穀胱甘肽以兩種型態存在於人體，一是還原型態，另一是氧化型態。Glutathione 在細胞中調節還原反應相關訊息傳遞。藉由氧化還原反應改變細胞中 GSH（還原態）與 GSSG（氧化態）的比例。Glutathione 是人體內非常重要的抗氧化物質，常被稱為「抗氧化之母」。

然而，因本研究中的化學動力療法、光動力療法所產生出的活性氧類（ROS）及單態氧（ $^1\text{O}_2$ ）會被穀胱甘肽還原而消耗，而降低其治療效果，影響其成效。故希望 CFO@BSA-IR780 奈米複合材料能夠透過 $\text{Cu}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 的還原，具備消耗穀胱甘肽的能力，使 GSH 氧化為 GSSG，以提升 CFO@BSA-IR780 在化學動力療法、光動力療法中的效果。

貳、研究方法及過程

一、研究方法



二、實驗流程

(一) CFO@BSA 之合成

1. 秤量 BSA (50 mg) + 2.0 mL water 加入樣品瓶中，以磁石攪拌器使其均勻混合。
2. 秤量 $\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (3.5 mg) + $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (10 mg) + 1.0 ml water 加入樣品瓶中，以磁石攪拌器使其均勻混合。
3. 混合過程中滴入 1M NaOH (0.4 ml)。
4. 透析 24 小時。
5. 將材料冷凍乾燥後，測濃度。

(二) CFO@BSA-IR78 之合成

1. 秤量 BSA (50 mg) + IR780 (1 mg in 0.5 mL DMF) + 2.0 mL water 加入樣品瓶中，以磁石攪拌器使其均勻混合。
2. 秤量 $\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (3.5 mg) + $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (10 mg) + 1.0 ml water 加入樣品瓶中，以磁石攪拌器使其均勻混合。
3. 混合過程中滴入 1M NaOH (0.4 ml)
4. 透析 24 小時。
5. 將材料冷凍乾燥後，測濃度。

(三) 光動力分析

1. 將 DPBF 溶於 DMSO，配製成濃度為 1.5 mg/ml。
2. 將 5 μl 的 DPBF/DMSO 溶液添加至 400 μl 100ppm 的 CFO@BSA-IR780 水溶液中。
3. 將該溶液用 808 nm laser (2 W/cm^2) 一次照射 5 分鐘用紫外光/可見光吸收光譜儀檢測至 30 分鐘。
4. 比較 DPBF 在 417nm 處的吸收強度。

(四) 光熱分析

1. 取 3 ml 之 100ppm CFO@BSA-IR780，注入特製玻璃品中。
2. 以波長 808 nm 2W 之雷射照射，每 30 秒紀錄一次溫度。
3. 同上述實驗，改變 CFO@BSA-IR780 之濃度。

4. 同上述實驗，改變雷射瓦數。

(五) 化學動力分析

1. 取 105 μl , pH = 5.5 的 PBS buffer + 25 μl , 100ppm CFO@BSA-IR780，再注入 10 μl , 5mM H_2O_2 + 100 μl , 1mM TMB。
2. 每 5 分鐘用紫外光/可見光吸收光譜儀檢測至 30 分鐘。
3. 比較 ox-TMB 在 652nm 處的吸收強度。
4. 同上述實驗一，更改濃度或 pH 值。

(六) 氧化谷胱甘肽分析

1. 配置 100 ppm CFO@BSA- IR780 250 μl ，加入 1.5 mM GSH 250 μl 均勻混合。
2. 放置不同時間使其反應
3. 加入 DTNB 50 mM 2 μl
4. 比較 DTNB 在 300 nm 及 TNB 在 412 nm 處的吸收強度
5. 重複上述步驟，將不同反應時間改成不同材料濃度

(七) 體外細胞毒性分析

本實驗利用 WST-1 Cell proliferation colorimetric assay 進行體外細胞毒性測試，WST-1 可與電子傳遞鏈中的 NADH 粒線體脫氫酶 (dehydrogenase) 結合，生成橙黃色的 formazan dye。利用測定 O.D. 450 nm，即可推算細胞存活率。當活細胞越多，顏色愈深；反觀細胞毒性越多，死細胞越多，顏色就會比較淺。

由於 WST-1 結晶為水溶性，相對傳統 MTT 法不需要清洗與回溶，因此實驗操作上較方便，也適用於大批樣品的量測，詳細步驟如下：

1. 繼代完細胞後，計算細胞業內每毫升含有之細胞數，96 孔盤內各加入 5000 cell 與 100 μl 培養液，放回培養箱培養 24 小時。
2. 將 96 孔盤移入無菌操作台內，移除培養液並以 PBS 清洗三次，加入欲試驗之材料至 96 孔盤內，而材料濃度於孔盤中分別為 0、25、50、75、100、200 ppm，均勻搖晃數次後，放回培養液 24 小時。

3. 移除含有試驗材料的培養液，並以 PBS 清洗兩次，每個孔洞各加入 100 μ l 培養液，放回培養箱培養 24 小時。
4. 藉由盤式全光譜分析儀測量 450 nm 的 O.D.值，最後將實驗數據套入式計算出細胞存活率。

$$\text{細胞存活率 (\%)} = \frac{\text{實驗組的O.D.值}}{\text{控制組的O.D.值}} \times 100\%$$

控制組：細胞培養於 medium 中

實驗組：細胞培養於含有欲試驗材料之 medium 中

(八) 體外細胞之光動力檢測螢光顯影片製作

(本實驗使用人體子宮頸癌細胞 Hela Cells，進行體外光動力檢測)

1. 將細胞從培養瓶取下，計算細胞液每毫升含有細胞數，各加入 10,000 隻 cell/mL 細胞液於含有蓋玻片之 6 盤孔內，放回培養箱 24 小時。
2. 將 6 孔盤移入無菌操作台，把孔盤的培養液吸出，以 PBS 清洗 3 次。
3. 每孔內重新注入新的培養液並加入試驗材料至各孔洞中，均勻搖晃數次後，放回培養箱培養 24 小時。
4. 將含有材料之培養液吸出，並以 PBS 清洗三次。
5. 每孔內重新注入新的培養液並加入 DCFH-DA 染劑以 10 μ M 的濃度培養 1.5 小時。
6. 移除含有 DCFH-DA 之培養液，注入新的培養液，並於每孔以 671 nm² W/cm²之雷射照射。
7. 移除培養液並以 PBS 清洗 3 次，加入 2 mL,70%酒精靜置 10 分鐘，靜置完後同樣以 PBS 清洗 3 次。
8. 加入 2 mL 的 DAPI 染劑，進行避光染色 20 分鐘。
9. 待染色完成後，移除孔盤內的 DAPI 染劑，以 PBS 清洗 5 次。
10. 之後將做好的蓋玻片以細胞那側蓋上已滴有甘油之載玻片上，以透明指甲油將四周固定，並用鋁箔紙包覆後寫上實驗條件與日期。

參、研究結果與討論

一、CFO@BSA-IR780 奈米材料

成功合成出 CFO@BSA-IR780 奈米複合材料，如圖 3。



圖 3：CFO@BSA- R780

(一) 結合光敏劑 (IR780)

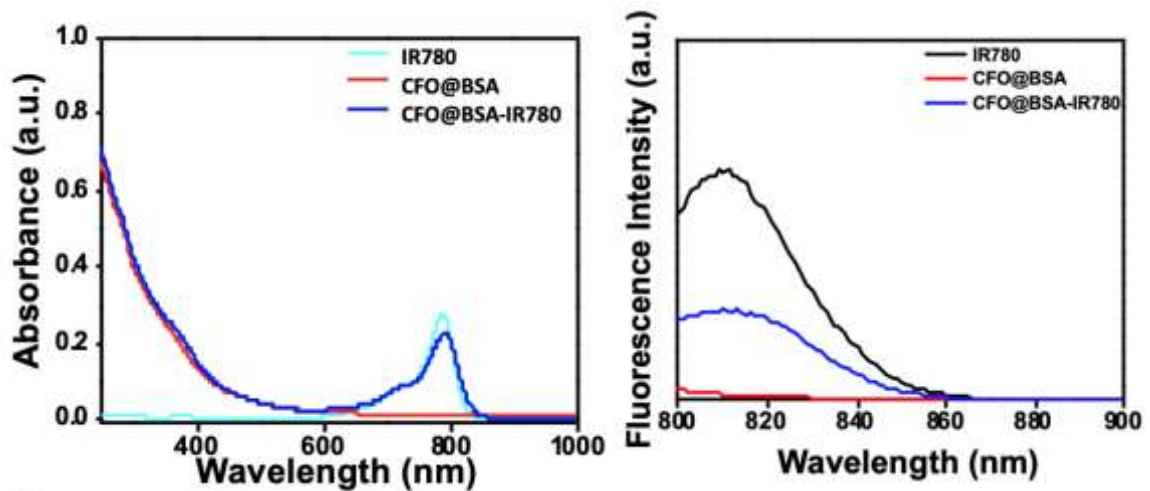


圖 4：CFO@BSA-IR780 之吸收光譜圖 圖 5：CFO@BSA-IR780 之光激發螢光頻譜圖

由圖 4 可知光敏劑 (IR780) 在 780 nm 的近紅外光處有明顯的吸收峰，而我們的產物在 780nm 處也具有明顯的吸收峰，說明 IR780 成功吸附於 CFO@BSA 上。並且，圖 5 中，透過光激螢光 (photoluminescence, PL) 光譜可見，CFO@BSA-IR780 與 IR780 放射出波長同為 810nm 之放射光譜，可再次證明 IR780 之吸附。因此可將 CFO@BSA-IR780 奈米複合材料用於後續之光熱及光動力檢測及治療。

(二) 產物之 TEM 成像

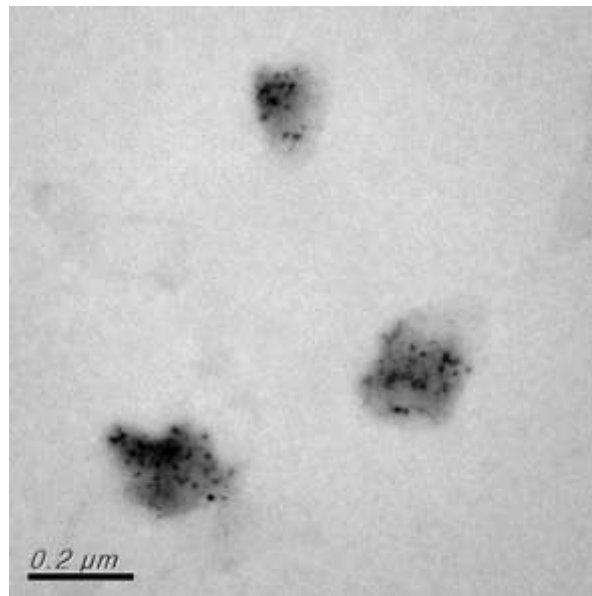


圖 6：CFO@BSA-IR780 之 TEM 成像

為了更清楚得知 CFO@BSA-IR780 奈米複合材料的物理性質分析，本研究先藉由穿透式電子顯微鏡(TEM)探討 CFO@BSA-IR780 奈米複合材料之表面型態、粒徑尺寸等。

由圖 6 可看見有黑色顆粒在較大 (100 nm) 顆粒中，其中較大顆粒為牛血清蛋白分子，而黑色顆粒為包覆在內的 CuFe_2O_4 金屬氧化物。光敏劑因為是有機分子，分子過小，故不會於 TEM 成像，因此沒辦法看到。

(三) 產物平均粒徑

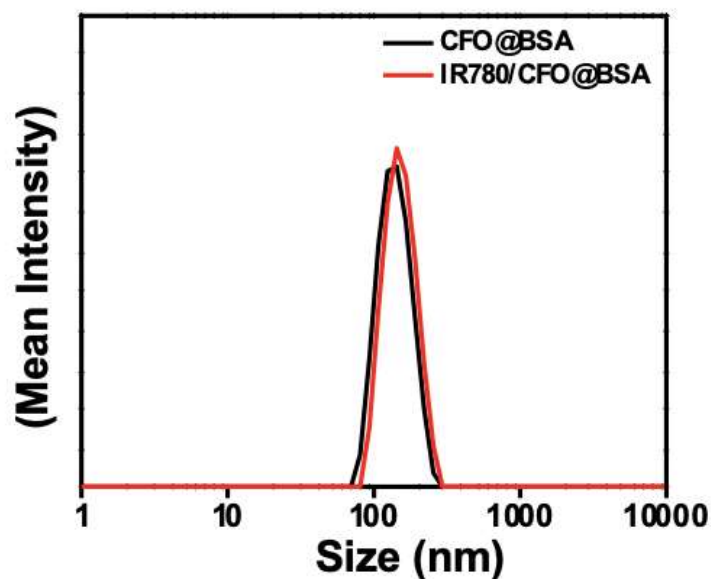


圖 7：CFO@BSA-IR780 粒徑分析

此外實驗使用動態光散射儀 (DLS) 量測 CFO@BSA-IR780 之平均粒徑與百分比粒徑趨勢。由圖 7 所示，CFO@BSA 經由 DLS 分析可得平均粒徑為 104 nm，CFO@BSA-IR780 平均粒徑約 110 nm，由此可初步說明 CFO@BSA 有成功與 IR780 鍵結。並且，材料之平均粒徑小於 200 nm，符合進入癌細胞之所需粒徑大小，可用於後續之檢測及治療。

(四) 材料粒徑之穩定性

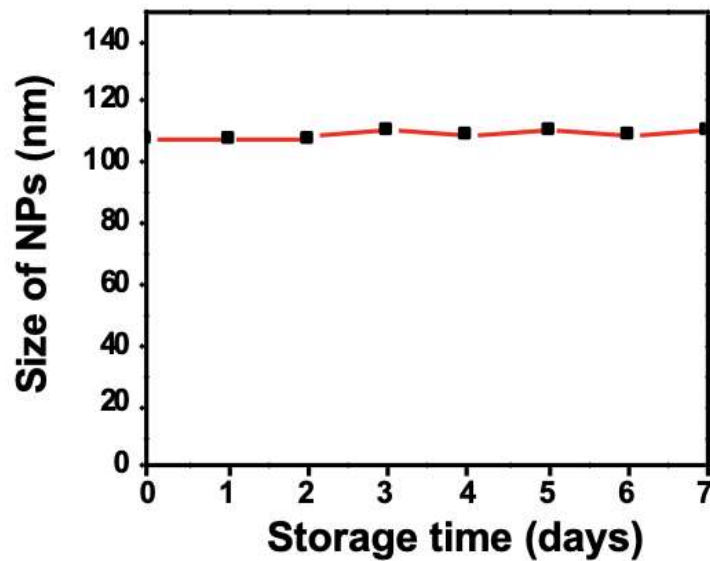


圖 8：CFO@BSA-IR780 粒徑隨時間變化趨勢

將 CFO@BSA-IR780 材料置於約 0°C 之環境下七天，測量其平均粒徑變化，確認材料在範圍 7 天內皆有極高穩定性，粒徑大小皆約為 110 nm，並不會隨時間降解或團聚，穩定度極高。

二、CFO@BSA-IR780 奈米材料之化學動力療法

為了評估 CFO@BSA-IR780 奈米材料之過氧化物酶 (Peroxidase-like) 特性，且由於 $\text{Cu}^+/\text{Fe}^{2+}$ 具有 Peroxidase-like 之活性， H_2O_2 可以在 $\text{Cu}^+/\text{Fe}^{2+}$ 的催化下產生 $\cdot\text{OH}$ ，因此在此通過 3,3',5,5'-四甲基苯胺 (TMB) 的比色法，以測試 CFO@BSA-IR780 奈米複合材料的過氧化物催化活性。其機制如圖 9。

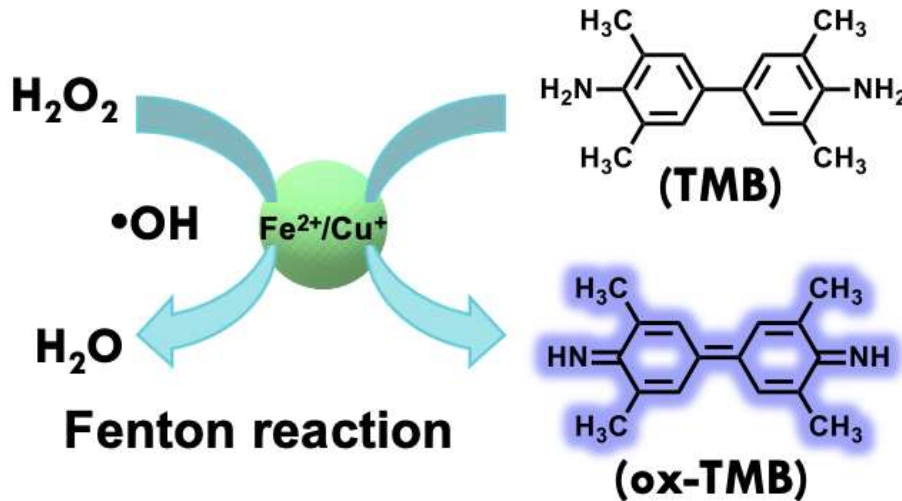


圖 9：TMB 氧化成 ox-TMB 之流程圖

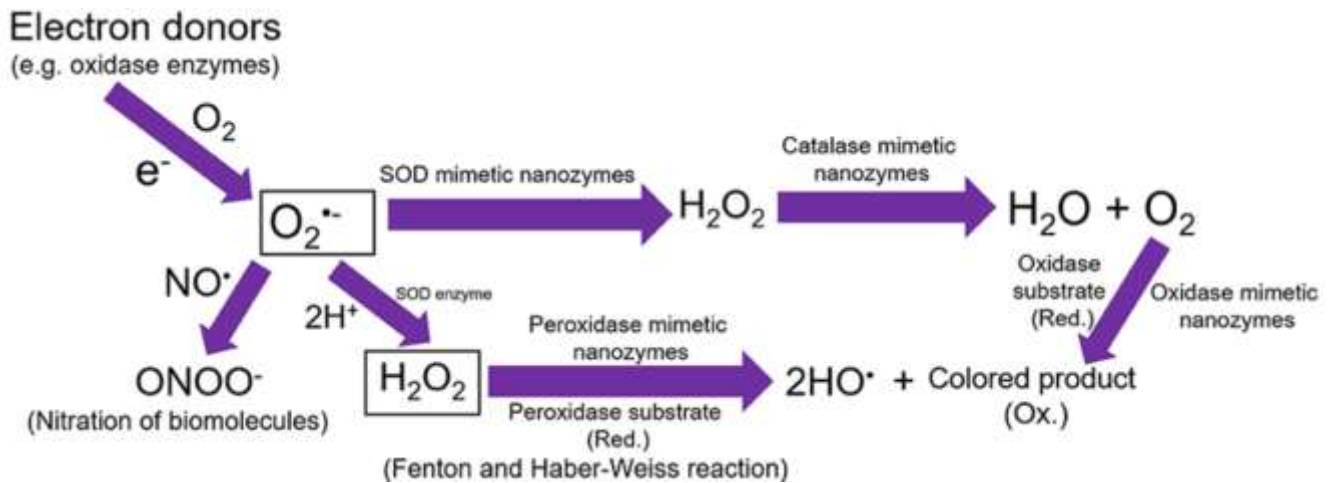


圖 10：各類型酶之間電子流動示意圖 (reference 5)

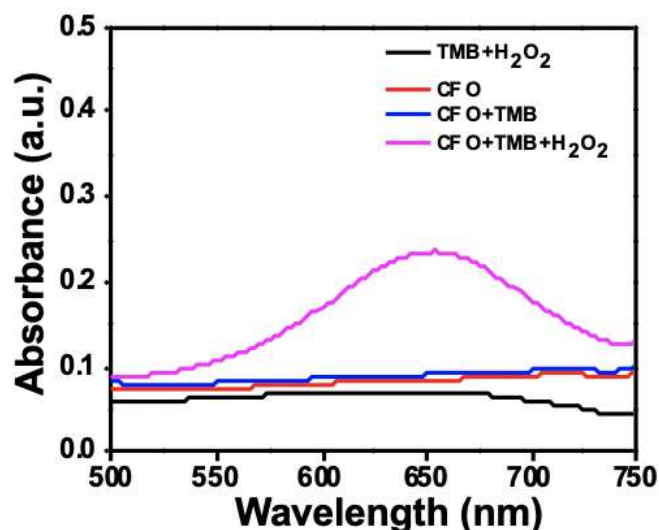


圖 11：不同物質反應下，ox-TMB 之吸收光譜圖

在存在 H_2O_2 的情況下， CFO@BSA-IR780 催化 TMB 的氧化，形成藍色的氧化的 TMB (ox-TMB)，從而在 652 nm 處具有特徵吸收峰。可能的反應機制涉及兩個步驟，其中將 H_2O_2 分子中的 $\text{O}=\text{O}$ 鍵分解為 $\cdot\text{OH}$ ，然後通過 $\cdot\text{OH}$ 將 TMB 氧化形成 ox-TMB，接著用紫外光/可見光吸收光譜 (UV-Vis) 用於測量 ox-TMB。

在不存在 CFO@BSA-IR780 的情況下，吸收值可以忽略不計，這表明 TMB 和 H_2O_2 的混合物未發生氧化還原反應。但是，將 CFO@BSA-IR780 加入 TMB 與 H_2O_2 混合溶液 (pH5.5) 中 5 分鐘，可以得到明顯的藍色溶液並在 652nm 處有明顯的 ox-TMB 吸收峰，這證實了 CFO@BSA-IR780 奈米複合材料和 H_2O_2 產生 $\cdot\text{OH}$ 。

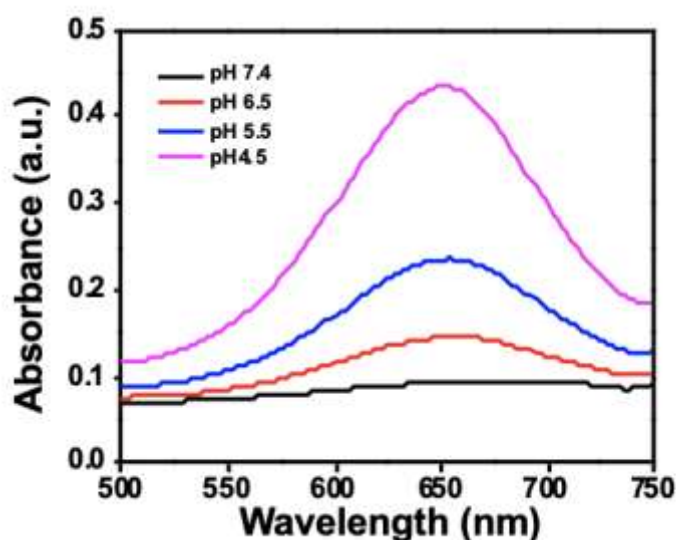


圖 12：不同 pH 值下，ox-TMB 的吸收光譜圖

於腫瘤酸性微環境下，腫瘤部位的 pH 值約為 5.5，而正常細胞部位的 pH 值約為 7.4，利用腫瘤環境酸性強度高於正常細胞的情況，以不同酸鹼度模擬生物體，並測試 CFO@BSA-IR780 奈米材料之過氧化物酶特性。由圖 12 可明顯看見在愈酸的環境下，材料催化產生 $\bullet\text{OH}$ 的效果愈佳，相反的，當 pH=7.4 時，幾乎沒有任何 $\bullet\text{OH}$ 產生。

推論此原因為在芬頓反應 (Fenton reaction) 中，pH 值過高時， Fe^{3+} 易形成 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 膠體或 $\text{Fe}(\text{OH})_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 不定形沉澱，導致催化活性下降或消失，不利於 $\bullet\text{OH}$ 的產生。同時， Fe^{2+} 的濃度降低也不利於式 (1) 向正方向進行。反之，pH 值過低時， H^+ 是 $\bullet\text{OH}$ 的清除劑，對於式 (2) 來說，由於 H^+ 的濃度增加，使反應向左進行， Fe^{2+} 的再生受到抑制， $\bullet\text{OH}$ 的生成也受到影響而增加。基於此原理，可以顯示出 CFO@BSA-IR780 奈米複合材料在化學動力療法方面，對正常細胞的影響極低，不會傷害到正常組織。

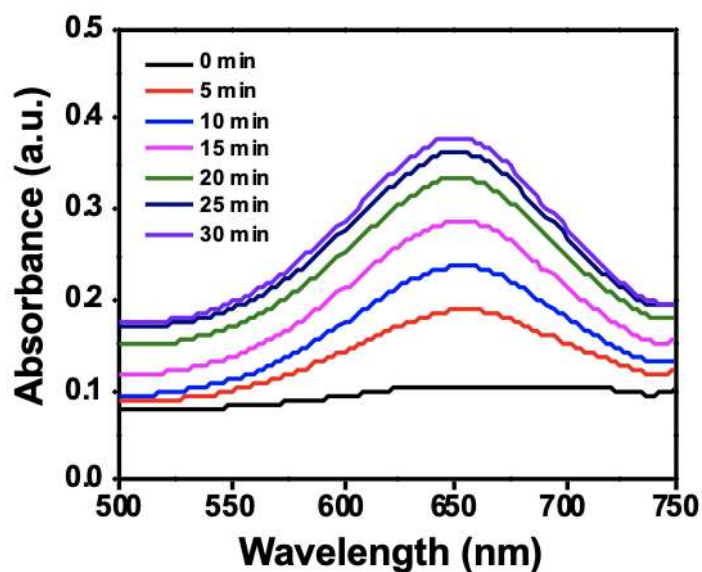
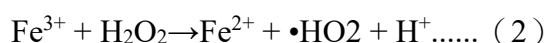
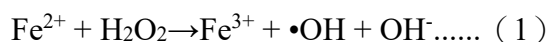


圖 13：不同反應時間下，ox-TMB 的吸收光譜圖

由圖 13 可知，CFO@BSA-IR780 與 H_2O_2 的反應時間越長，所產生的 $\bullet\text{OH}$ 濃度越高，至大約 30 分鐘則趨近飽和。

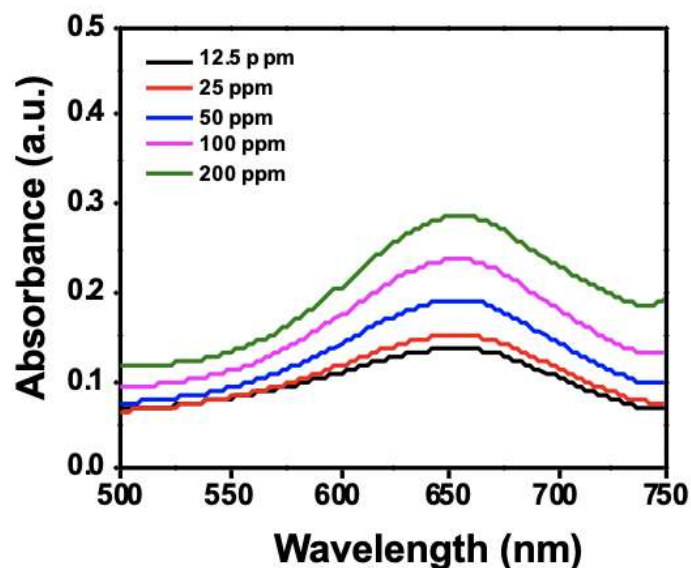


圖 14：不同 CFO 濃度下，ox-TMB 的吸收光譜圖

在此配置不同濃度之 CFO@BSA-IR780，加入 10 μ l, 5mM 之 H₂O₂，與 100 μ l, 1mM TMB 於 pH=5.5 環境下反應。圖 14 顯示出當 CFO@BSA-IR780 濃度愈高，反應所產生的 \bullet OH 濃度愈高。

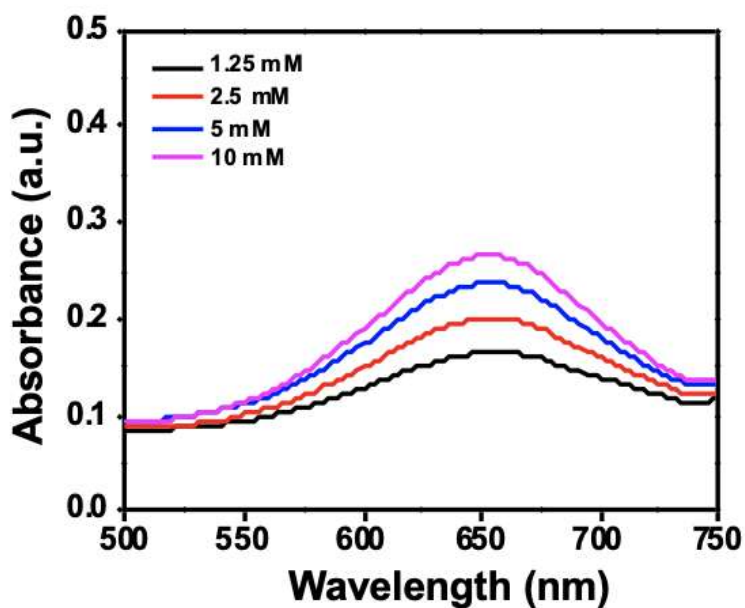


圖 15：不同 H₂O₂ 濃度下，OX-TMB 的吸收光譜圖

在此配置 25 μ l [CFO@BSA-IR780] = 100 ppm，加入 10 μ l 不同濃度之 H₂O₂，與 100 μ l, 1 mM TMB 於 pH = 5.5 環境下反應。圖 15 顯示出當 H₂O₂ 濃度愈高，反應所產生的 \bullet OH 濃度愈高。

三、CFO@BSA-IR780 奈米材料之光動力治療

本實驗藉由 1,4-二苯基 1-2,3-苯並呋喃 (DPBF) 來檢測 CFO@BSA-IR780 奈米複合材料是否有活性氧類 (reactive oxygen species, ROS) 的產生。DPBF 是一種黃色，對光和空氣敏感的結晶性固體，可溶於許多有機溶劑，在溶液中最大吸收值為 417nm，且會產生強烈的螢光。

其原理為 DPBF 與生成的 $^1\text{O}_2$ 發生不可逆反應，形成不穩定的過氧化物，該過氧化物水解為 (無色) 1,2-二苯甲酰苯，從而降低了 DPBF 吸收強度，反應式如圖 16 所示，因此我們可以藉由吸收值之變化來評估 CFO@BSA-IR780 奈米複合材料的 $^1\text{O}_2$ 生成能力。

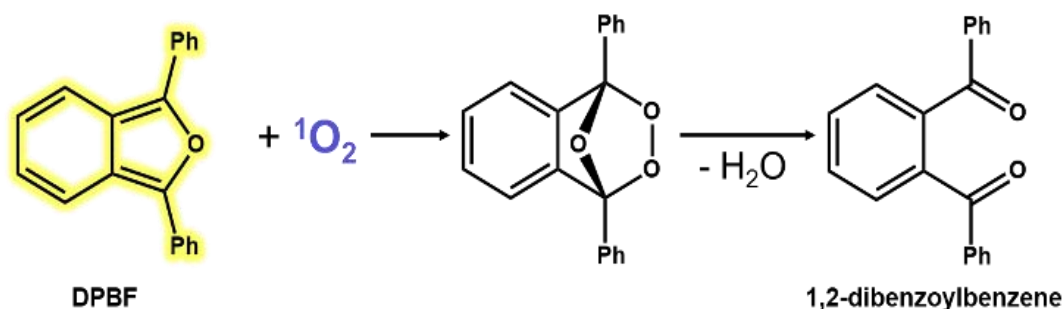


圖 16：DPBF 與 $^1\text{O}_2$ 反應式

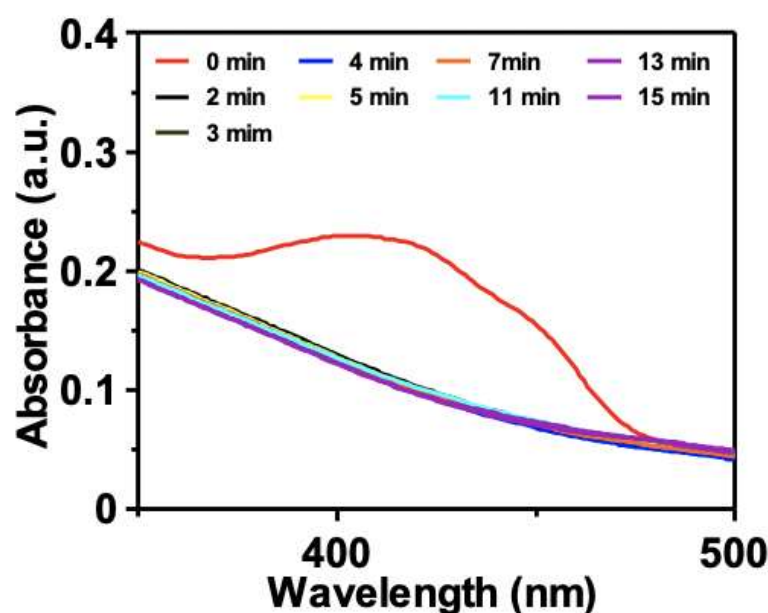


圖 17：不同時間下，DPBF 吸收光譜圖 (CFO@BSA-IR780)

本實驗將 400 μl , 100 ppm 的 CFO@BSA-IR780 加入至濃度為 1.5 mg/ml 的 5 μl DPBF 中，以 808nm 雷射光 ($2 \text{ W}/\text{cm}^2$) 照射不同時間後，觀察 DPBF 吸收強度的變化。由圖 17 可見 CFO@BSA-IR780 確實具有光動力之效果，417nm 的吸收強度在與生成的 ROS 反應時不可逆地降低，反應極快。

四、CFO@BSA-IR780 奈米材料之光熱治療

近幾年，腫瘤細胞治療上有許多熱治療之相關研究，其最具代表性之研究即為光熱治療，而光熱治療所需之光熱材料也成為重要課題之一。

由於在 600-900 nm 範圍內生物組織具有較低的吸收值，較不會損害正常之生物組織。同時因為 CFO@BSA-IR780 奈米複合材料之紫外光/可見光 (UV-Vis) 吸收光譜儀分析的結果，在波長約 780 nm 處有明顯的吸收波段出現。並且，由於光熱材料需為進入腫瘤細胞中，以至於需要波長較長的近紅外光來進行更深入之體內治療，因此本實驗使用波長為 808 nm 雷射，進行光熱分析與鑑定。

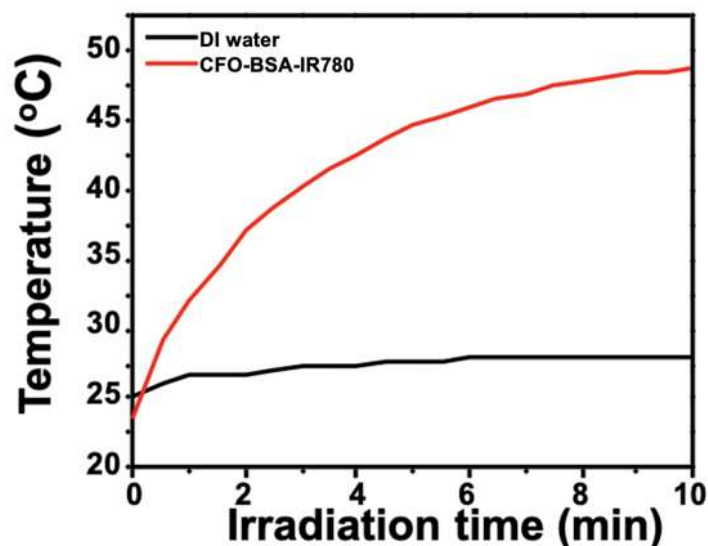


圖 18：不同階段反應產物之時間與溫度趨勢圖

由圖 18 所示，可以觀察到 CFO@BSA-IR780 經過波長 808 nm， $2 \text{ W}/\text{cm}^2$ 雷射照射 10 分鐘後，100 ppm 之 CFO@BSA-IR780 溫度可升至約 46°C ，且 CFO@BSA-IR780 與純水之溫度差達到約 20°C 之差距。

五、CFO@BSA-IR780 奈米材料之消耗穀胱甘肽能力

穀胱甘肽為動物細胞抗氧化劑，以 GSH（還原態）與 GSSG（氧化態）兩種型態存於人體。然而，因本研究中的化學動力療法、光動力療法所產生出的活性氧類會被穀胱甘肽還原，影響其成效，故希望 CFO@BSA-IR780 奈米材料能夠透過 $\text{Cu}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 的還原，具備氧化穀胱甘肽的能力，以提升其治療效果。

本實驗使用 5,5'-二硫代雙 2-硝基苯甲酸（DTNB）來檢測 CFO@BSA-IR780 奈米複合材料是否具備消耗谷胱甘肽之能力。其原理為 DTNB 會和 GSH 反應生成黃色的 2-硝基-5-硫代苯甲酸（TNB）。其中，DTNB 溶液的最大吸收值為 300 nm，而 TNB 則是 412 nm，故可藉由比較兩者之吸收強度，檢測溶液中 GSH 的多寡，進而得知 CFO@BSA-IR780 是否成功氧化 GSH。其機制如圖 19。

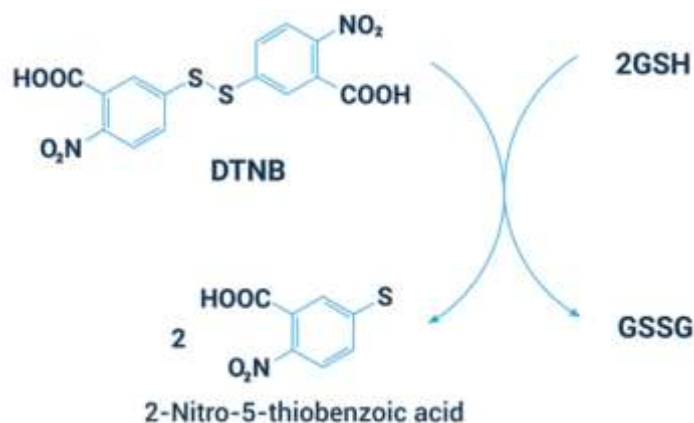


圖 19：DTNB 實驗原理示意圖

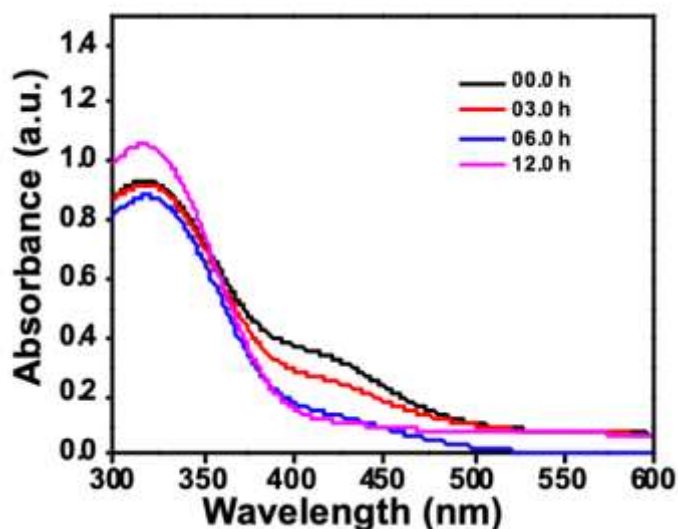


圖 20：不同反應時間下，DTNB/TNB 吸收光譜圖

在此配置 100 ppm CFO@BSA- IR780 與 1.5 mM GSH，兩者皆為 250 μ l 均勻混合，在放置時間不同的情況下，加入 DTNB 50 mM, 2 μ l，觀察其波峰變化。由圖 20 可見在 300 nm 的 DTNB 吸收度隨反應時間增加而上升，相對在 412 nm 的 TNB 吸收度則隨反應時間增加而下降，可知 CFO@BSA- IR780 確實具備氧化 GSH 之功用，且隨時間增加，GSH 在溶液中濃度逐漸下降，氧化為 GSSG。

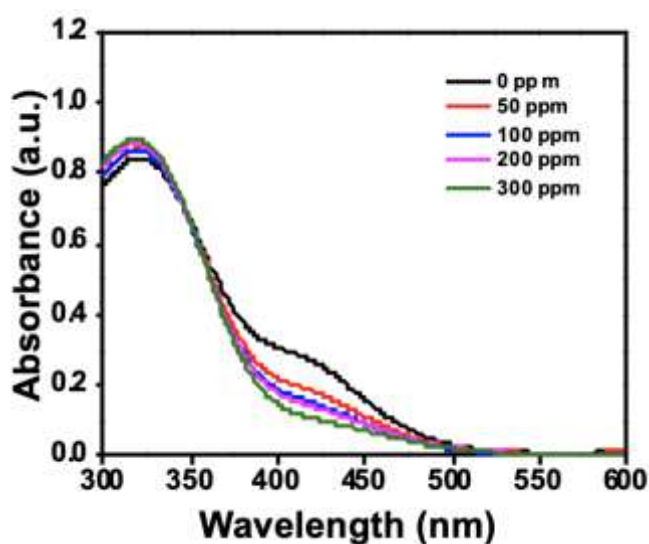


圖 21：不同 CFO@BSA- IR780 濃度下，DTNB/TNB 吸收光譜圖

接著配置不同濃度之 CFO@BSA- IR780 與 1.5 mM GSH，兩者皆為 250 μ l 均勻混合，在放置時間為 6 小時的情況下，加入 DTNB 50mM, 2 μ l，觀察其波峰變化。由圖 21 可見在 300 nm 的 DTNB 吸收度隨材料濃度增加而上升，相對在 412 nm 的 TNB 吸收度則隨材料濃度增加而下降，可再次確認 CFO@BSA- IR780 的氧化 GSH 效果，且隨材料濃度增加，GSH 在溶液中濃度逐漸下降，氧化為 GSSG。

六、CFO@BSA-IR780 奈米材料對小鼠腫瘤細胞毒性

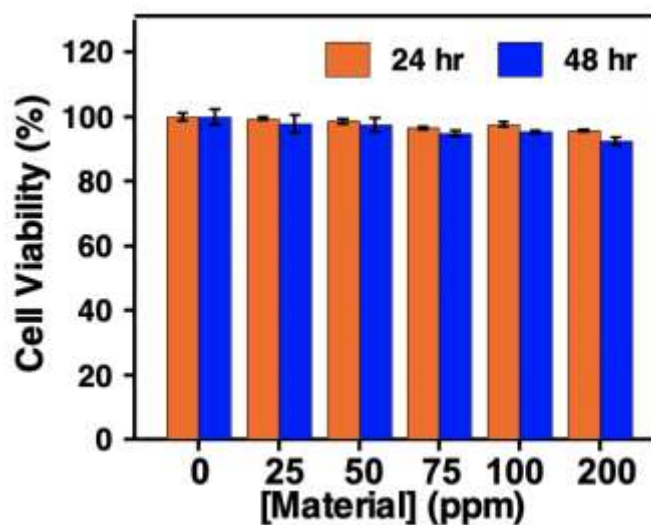


圖 22：不同濃度 CFO@BSA-IR780 於小鼠黑色素瘤細胞
分別培養 24、48 小時後之細胞存活率

實驗分別以 0、25、50、75、100、200 ppm 之材料濃度對 B16F1 cells（小鼠黑色素瘤細胞）進行培養，再藉由 WST-1 法評估其材料毒性。如圖 22 所示，在 200 ppm CFO@BSA-IR780 奈米複合材料之濃度劑量培養 24 小時後，B16F1 cells 之細胞存活率約 97%，證實 CFO@BSA-IR780 具有良好的生物相容性，為低細胞毒性材料。

七、CFO@BSA-IR780 奈米材料對 HeLa Cells 之細胞顯影應用

除了使用 DPBF 來檢測是否有 ROS 的生成外，本實驗另外有使用 DCFH-DA 染劑於細胞上的檢測。DCFH-DA 進入細胞後會被細胞內的酯解酶（Esterase）去乙酰化形成具有極性的 DCFH（2,7-Dichlorodihydrofluorescein），此時 DCFH 因無法自由穿透細胞膜而留在細胞內，當 DCFH 與本實驗 ICG 照射雷射所產生之 ROS，反應時會氧化形成 DCF（2,7-Dichlorofluorescein），若以 450-490 nm 波長的光束激發，則可放出 510-550 nm 波長的綠色螢光。

本實驗首先以 CFO@BSA-IR780 奈米複合材料與 HeLa Cells 培養 24 小時，並使用藍色螢光細胞核染劑 DAPI 進行染色，接著以共軛焦顯微影像系統（Cofocal）進行螢光的成像。

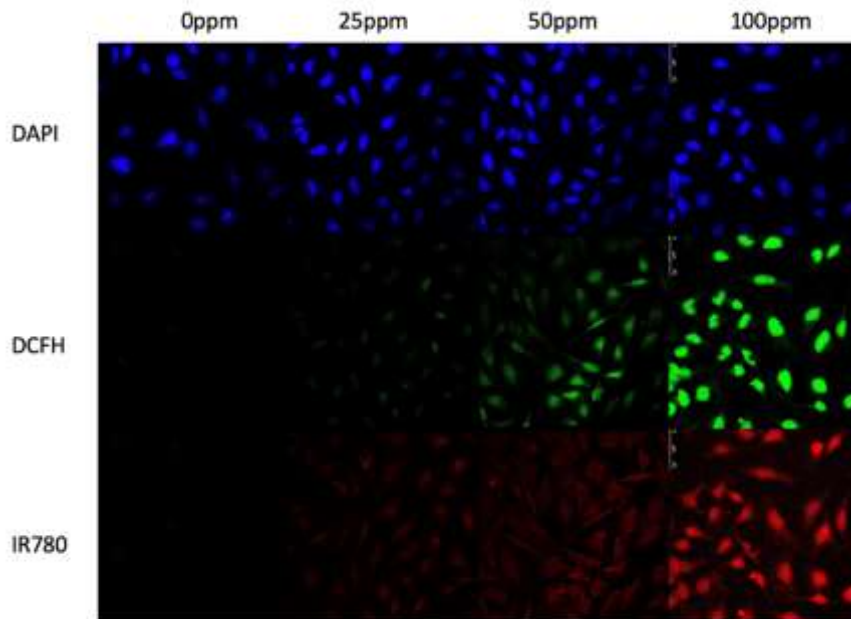


圖 23：CFO@BSA-IR780 奈米複合材料於 HeLa Cells 培養 24 小時後，
經由共軛焦雷射顯微鏡擷取之平面細胞影像圖

由圖 23 所示，在沒有添加 CFO@BSA-IR780 奈米複合材料（0 ppm）經由雷射照射（波長 = 808 nm）後，由於沒有 CFO@BSA-IR780 奈米材料，因此經由雷射照射後也沒有產生 ROS，因此沒有產生綠色螢光的 DCF。

而有添加 CFO@BSA-IR780 奈米材料（25、50、100 ppm）經雷射照射後，可以看出有綠色螢光的 DCF 產生，因此我們可以判斷出 CFO@BSA-IR780 奈米材料經由雷射照射後有 ROS 的產生。

且可以看出，藉由增加 CFO@BSA-IR780 奈米複合物的濃度後，導致經由雷射照射後的 ROS 量增加，因此綠色螢光的 DCF 也會增加。另一方面，從藍色螢光 DAPI 和紅色螢光之 CFO@BSA-IR780 奈米材料可以看出，紅色螢光與細胞核之藍色螢光幾乎重疊，因此可以判斷出 CFO@BSA-IR780 奈米材料有攝取進入細胞核周圍。且隨著 CFO@BSA-IR780 濃度的增加，細胞中的紅色螢光 CFO@BSA-IR780 螢光強度會增加，導致綠色螢光 DCF 螢光強度也會增加。

最後，由圖 23 可以看出細胞內部之螢光分布，已經可以確認 CFO@BSA-IR780 奈米複合材料可以在癌細胞內產生 ROS，可以用來殺死癌細胞。

肆、結論與應用

一、結論

- (一) 本研究成功製備出大量 BSA 包覆之 CFO@BSA-IR780 奈米複合材料。
- (二) 在 Peroxidase-like 的實驗中，隨著時間或材料濃度的增加，ox-TMB 在 652 nm 處吸收度逐漸上升，證實 H₂O₂ 可被 CFO@BSA-IR780 奈米複合材料經由芬頓反應 (Fenton reaction) 催化產生高毒性的 •OH，表現化學動力療法之效果。且藉由改變反應時的 pH 值，得知 CFO@BSA-IR780 在腫瘤等酸性環境下造成影響較中性環境中顯著。
- (三) 在 DPBF 實驗中可見，隨著照射雷射時間增加，417 nm 之吸收度不可逆地降低，證明 CFO@BSA-IR780 奈米複合材料經 808 nm 雷射照射後有產生 ¹O₂ 的能力，表現光動力治療之效果。
- (四) 在光熱部分顯示出，當 CFO@BSA-IR780 奈米複合材料濃度為 100 ppm 時可於 808 nm 下雷射照射 10 分鐘即可達 46°C，約上升了 21°C，可做為光熱治療的材料。
- (五) 由 DTNB 與 TNB 的吸收度得知，CFO@BSA-IR780 奈米複合材料具備氧化消耗 GSH 的能力，可提升其光動力治療及化學動力療法之效果。
- (六) 小鼠黑色素瘤細胞毒性實驗中，細胞在 200 ppm CFO@BSA-IR780 奈米複合材料之濃度劑量培養 24 小時後，細胞存活率約 97% 的結果可以看出，CFO@BSA-IR780 為低毒性且具備良好生物相容性之材料。
- (七) 透過對 Hela Cells 之光動力檢測螢光顯影片中，DCFH-DA 與 ROS 的反應，證實 CFO@BSA-IR780 可於細胞內產生 ROS。並且經由材料所發出之紅色螢光，證實其細胞螢光顯影之功能。

二、應用與未來展望

本研究開發出一種新穎性的奈米複合材料，具有簡便、低成本、耗時短與高生物相容性的特色，可以多功能治療癌症。另外，因 CFO@BSA-IR780 為具備磁性之奈米複合材料，故目前正致力於發展其應用於磁振造影 (MRI) 之功用。未來將會在 CFO@BSA-IR780 奈米複合材料接上葡萄糖氧化酶 (GOx)，使其增加飢餓療法 (Starvation therapy) 之功能。並且，希望能夠將實驗延伸至老鼠等活體實驗，期許能在生物醫學上有更廣泛的應用。

伍、參考文獻

1. Lili Feng, Bin Liu, Rui Xie, Dongdong Wang, Cheng Qian, Weiqiang Zhou, Jiawei Liu, Deblin Jana, Piaoping Yang,* and Yanli Zhao*, 2020 ,An Ultrasmall SnFe₂O₄ Nanozyme with Endogenous Oxygen Generation and Glutathione Depletion for Synergistic Cancer Therapy.
2. Xingshu Li , Jonathan F. Lovell, Juyoung Yoon and Xiaoyuan Chen, 2020, Clinical development and potential of photothermal and photodynamic therapies for cancer.
3. Kaicheng Liang, Haitao Sun, Zebin Yang, Huizhu Yu, Jie Shen, Xiaolin Wang, and Hangrong Chen, 2021, Breaking the Redox Homeostasis: an Albumin-Based Multifunctional Nanoagent for GSH Depletion-Assisted Chemo-/Chemodynamic Combination Therapy.
4. Essy Kouadio Fodjo , Koffi Mouroufié Gabriel , Brou Yapi Serge , Dan Li , Cong Kong and Albert Trokourey, 2017, Selective synthesis of Fe₃O₄AuxAgy nanomaterials and their potential applications in catalysis and nanomedicine.
5. Sanjay Singh, 2019 , Nanomaterials Exhibiting Enzyme-Like Properties (Nanozymes): Current Advances and Future Perspectives.

【評語】 030010

本研究是合成 CFO@BSA-IR780 奈米複合材料，通過細胞毒性測試與細胞螢光顯影。並檢視此材料在化學動力療法、光動力治療、光熱治療的多樣功能。研究構想新穎，實驗結果詳實，並展示出初步的效果。有幾項建議：

1. 在 CFO@BSA-IR780 的合成中，使用的強鹼對 BSA 的影響為何？又 BSA 在本研究中扮演的角色為何？需做說明。
2. 各檢測法，都應寫出反應機制，如 DPBF 般。又 ox-TMB、DPBF、DTNB 等試劑，反應前、後之標準光譜都應列出。
3. 產物之 TEM 圖，看似有強小黑點在較大(100 nm)顆粒中，應加強說明。
4. 不確定如何推論出「此材料可在人體中消耗，不會遺留副作用。」。
5. 一般藥物均只有單一有效機制，本研究要發展多重機制，反而容易失焦，建議聚焦在其中一項最有效的應用，做深入的研究。