

中華民國第 62 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 化學科

第一名

050212

奈米氧化鐵銅複合體應用於腫瘤協同治療

學校名稱：臺北市立第一女子高級中學

作者： 高二 謝子恬	指導老師： 許名智
---------------	--------------

關鍵詞：氧化鐵銅、奈米複合體、腫瘤協同治療

得獎感言

點燃火苗的勇氣

從高一開始，每個星期匆匆忙忙跑實驗室，時不時就被說明書和簡報追著跑，一天睡三小時成為常態，那些數不盡的焦頭爛額的夜晚、曾經懷疑過自己的付出是否值得的時刻，終於在站上頒獎舞台時，有種「幸好我當初沒有放棄」的感覺。一路上真的遇到太多太多難關，要感謝的人用十根手指頭也數不完，如果不是遇到那麼多支持及幫助我的人，我不會有機會站在這。這其實是我第一次做專題，兩年前懵懵懂懂地聽著學校老師在台上介紹科展，一片茫然及不知所措之間，心中其實偷偷羨慕及佩服那些學姊好久卻一直不敢說出口，直到今天我達成了當初看似遙不可及的目標，真的感覺很不真實。沒想過有一天我也會在聽著致詞的同時，腦海中竟浮現當初放學趕著去實驗室的自己、那聽不太懂印度英文而尷尬站在一旁觀摩的日常，以及因為第一次做海報說明書做不出來盯著電腦五天睡不到十小時，數不盡的焦頭爛額的夜晚。站上台的剎那，我確實感受到了，當初落下的汗水淚水終將值得，真的沒想過可以帶著自己的專研作品走這麼遠！

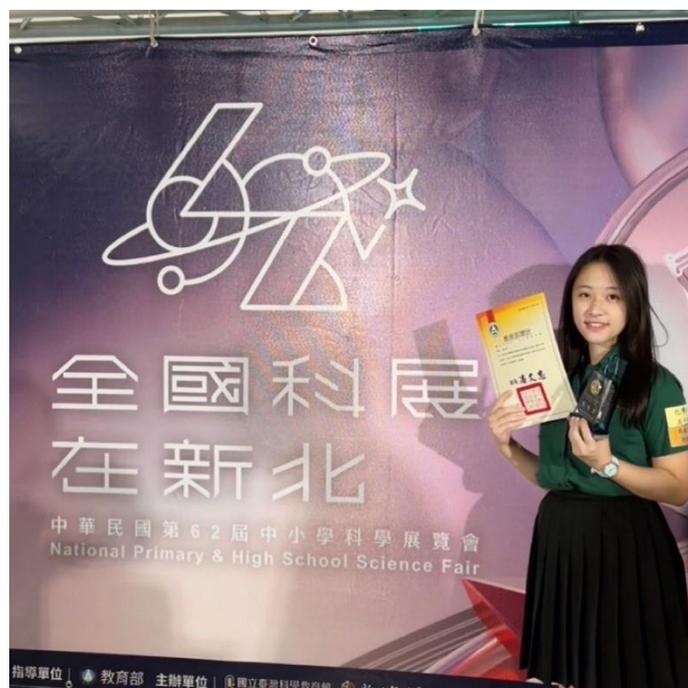
獨自一人進行兩年多的專題研究，過程實在不容易，曾興致滿滿的聽著教授學長解釋實驗原理卻依舊一頭霧水完全搞不清狀況，或是花了好多個下午做的實驗，出來的數據卻完全不能看。一次又一次的挫折，因為有好多人的陪伴，讓我得以堅持到現在。謝謝實驗室教授、學長總是不厭其煩的教我做實驗及修改說明書等等，還有學校的許多老師多次和我討論實驗相關問題並不斷地聽我練講，最後我要謝謝我的家人及同學過程中不斷鼓勵支持我，因為有你們，這份作品才得以完成。

科展與讀書考試是截然不同的兩件事，在科展及專題研究中，需要的不僅僅是許多高中學不到的實驗技術，還需要抱持著一顆熱忱的心，並且當這份熱血因為現實的種種而被澆熄時，要有勇氣重新自己點上火苗，重新燃燒，在自己的領域發光發熱。從小到大，我們走過的路途或許都太過安逸，藉由研究這條路，使我終於正視自己的不足，並在其中學會接受自己所犯下的種種錯誤且盡力改進。

有時，用心栽花時，花朵不一定會如期綻放，然而當初努力培育的養分卻會在你意想不到的時候結成甜美的果實，來個你措手不及。兩年內不知道放棄了多少東西才完成這項專題

研究，終於讓我親身體驗到，一切走過的路終將留下腳步，那種令人驚喜的感動絕對值得讓人放手一搏！

敢於嘗試、敢於犯錯、學會接受、學會感恩。追求完美，但不執著於自己沒有與失去的。知足並享受當下，我認為這是這段過程中，專題研究及科展教會我的人生至理。



頒獎典禮後的留念



和媽媽分享得獎的喜悅



在總統府拿到的可愛抱枕

摘要

本研究結合奈米技術及生物醫學，創新以牛血清蛋白為載體，以一步法合成全新 $\text{Cu}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4@BSA-IR780(\text{CFO}@BSA-IR780)$ 多功奈米複合材料。材料鑑定由 TEM、UV-Vis 等儀器進行組成及性質分析。

材料中 BSA 賦予其優異水溶性；鐵離子有益在腫瘤觸發內源性 H_2O_2 產生活性極高的氫氧自由基，進行化學動力治療(CDT)。且光敏劑 (IR780) 讓材料呈紅色螢光，在近紅外光照射兼具光熱(PTT)與光動力治療(PDT)特性。

然而腫瘤內源性穀胱甘肽(GSH)過量會消除自由基，限制 CDT/PDT 效果。因此材料摻雜銅離子，藉氧化數變化增強療效。

後續更將 CFO@BSA-IR780 實際運用於細胞測試、螢光顯影與 MRI 檢測，確認低毒性、治療效果佳，並率先結合兩種診斷。成功發展具 CDT、PDT、PTT 及腫瘤顯影之多功奈米複合材料，以多種方式提升效率並降低傷害，提供醫學新興之藥物材料。

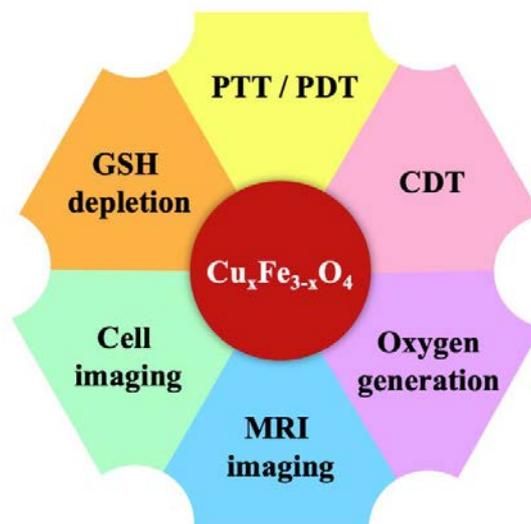
壹、前言

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，且蛋白質表面具豐富官能基團，有利後續發展。

因此，本研究率先獨創摻雜銅離子，並以牛血清蛋白（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（ $\text{Cu}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ ）作為主要合成對象，同時使療效更優於相關研究。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。並首度結合兩種診斷功能，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，得以更精確針對腫瘤對症下藥，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、文獻回顧

- (一) 多功奈米複合材料協同治療

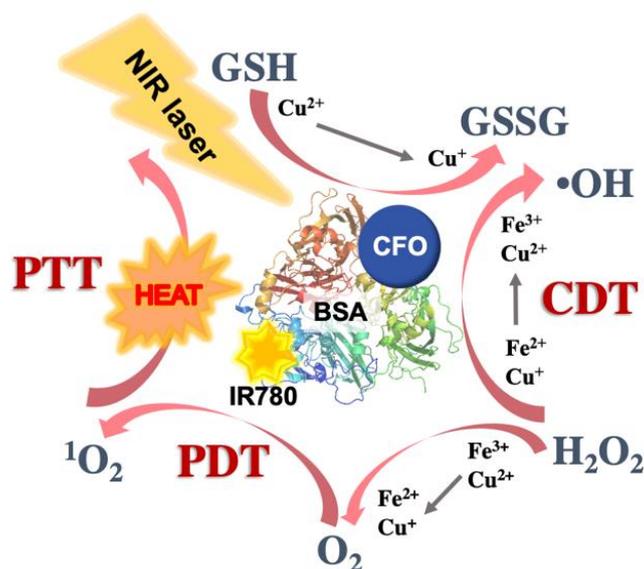


圖 1：多功奈米複合材料協同治療之反應機制圖

圖 1 為本研究材料理想反應機制，PDT (Photodynamic therapy) 為光動力治療，PTT (Photothermal therapy) 為光熱治療，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 $50 \sim 100 \times 10^{-6} \text{ M}$ ，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 ($\cdot\text{OH}$)，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

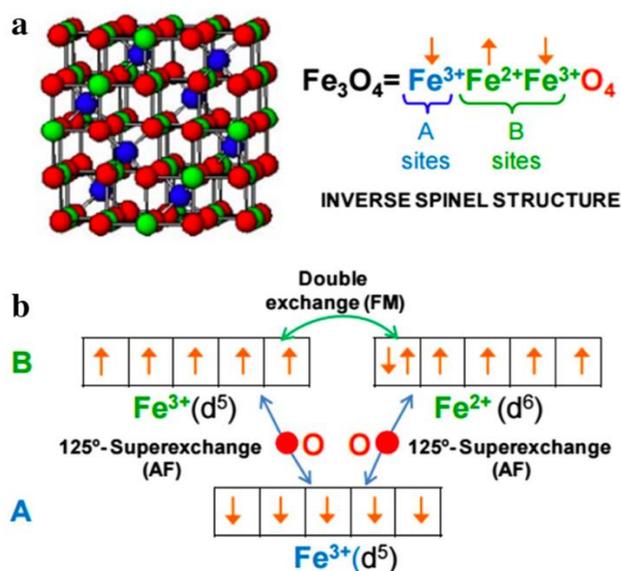


圖 2： Fe_3O_4 之晶格結構 (a) 及軌域 (b) (reference 3)

Fe_3O_4 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。 Fe^{3+} 佔據間隙四面體的 1/8，而等量的 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 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， Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 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 (CuFe_2O_4) 即為 Fe_3O_4 晶體之衍生物，將 Fe_3O_4 中的 Fe^{2+} 以 Cu^{2+} 取代，即可得 $\text{Cu}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ 。因為八面體位置的 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 的電子自旋耦合，而四面體位置的 Fe^{3+} 之自旋與八面體位置的自旋反平行耦合。又 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 的磁矩分別為 5 和 4 波耳磁子，因此產生的磁矩等於 $(\rightarrow 5 \leftarrow 4 \leftarrow 5) = 4$ 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 $\text{Cu}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$ 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情況下，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, $^1\text{O}_2$ ）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。

光熱療法是通過光敏劑吸收近紅外(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（ $\bullet\text{OH}$ ），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 $\cdot\text{OH}$ 。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 (還原型態) 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、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。

(六) MRI 磁振造影

人體內含有水 (H_2O)、脂肪、蛋白質等，而每 18 公克的水含有 $2 \times 6 \times 10^{23}$ 個氫原子，所以人體有無數個氫原子，而每個氫原子核只含有一個質子 (proton)，質子帶有電荷，並且不斷旋轉，電荷旋轉就像電磁鐵運動，會產生感應電流一樣，既然每一個氫原子核都像個小電磁鐵，那麼組合起來就很大。在正常情形，人體內原子核的旋轉排列是沒有一定方向，一旦將人體放入一個靜磁場內，氫原子排列變成相同方向的旋轉便具有磁性，如果在利用外加磁場垂直於靜磁場方向的無線電波，使原子核吸收能量改變排列方向，當關閉外加磁場後，原子核就會恢復原來的排列狀態，同時釋放出吸收的能量。激發後吸收的能量，會放出電磁波信號，由接收器收集、電腦分析，再經過傅立葉轉換，計算成磁振影像掃描圖形。

貳、研究設備及器材

一、設備與器材:

1. 微量電子天秤
2. 攪拌器
3. 可見光吸收光譜儀
4. 酸鹼度計
5. 加熱攪拌器
6. 光動力雷射系統
7. 雷射光導體激發器
8. 穿透式電子顯微鏡
9. 光激發螢光分析儀
10. 超音波洗淨器

二、藥品:

1. 氯化銅(copper(II) chloride pentahydrate), $\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
2. 氯化亞錫(Tin(II) chloride dihydrate), $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
3. 氯化亞鐵(iron(II) chloride tetrahydrate), $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
4. 牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)
5. IR-780 iodide, $\text{C}_{36}\text{H}_{44}\text{ClIN}_2$
6. 去離子水(Deionized water, DI water)
7. 氫氧化鈉(Sodium hydroxide), NaOH
8. 羥基丁二醯亞氨(N-Hydroxy succinimide, Sulfo-NHS), $\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$
9. 二甲基氨基丙基乙基碳酰胺(Ethyl(dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDC), $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3$

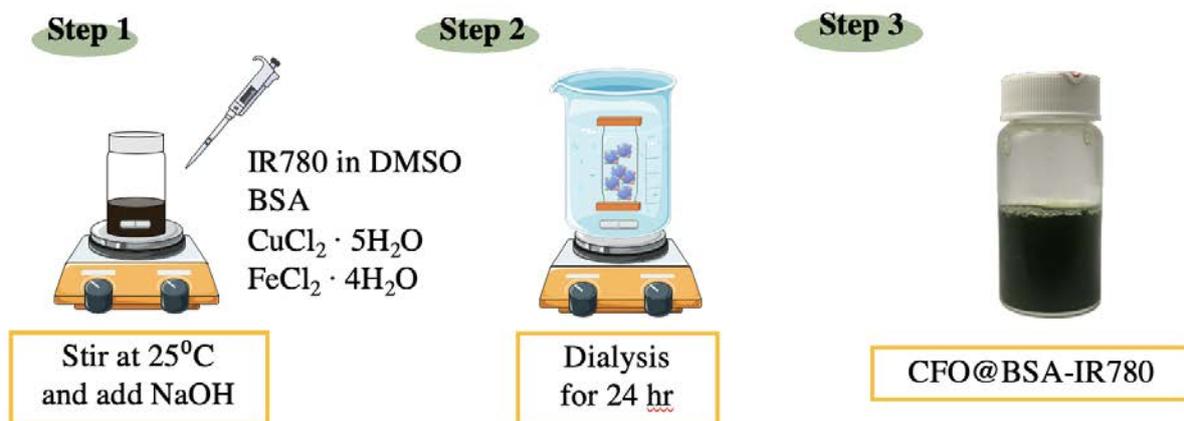
10. 二甲基亞砜(Dimethyl sulfoxide , DMSO) , $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$
11. 丙酮(Acetone) , CH_3COCH_3
12. 5,5'-二硫雙(2-硝基苯甲酸) (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) , DTNB) , $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$
13. 磷酸鹽緩衝生理鹽水(英語 : Phosphate buffered saline , PBS)
14. 過氧化氫(hydrogen peroxide) , H_2O_2
15. 二氫卟吩(Chlorin e6 , Ce6) , $\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_6$
16. 3,3' , 5,5'-四甲基聯苯胺(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine , TMB) , $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2$
17. 1,3-二苯基異苯並呋喃(1,3-Diphenylisobenzofuran , DPBF) , $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}$
18. 穀胱甘肽(Glutathione , GSH) , $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$
19. WST-1(4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) , Sigma-Aldrich

參、研究過程或方法

一、研究方法



二、實驗流程



(一) CFO@BSA 之合成

1. 秤 BSA (50 mg) + 2.0 mL water 加入樣品瓶，以磁石攪拌器均勻混合。
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-IR780 之合成

1. 秤量 BSA (50 mg) + IR780 (1 mg in 0.5 mL DMSO) + 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 DPBF/DMSO 溶液添加至 400 μl 100ppm 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 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 μ l 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. 藉盤式全光譜分析儀測量 450 nm 的 O.D.值，將實驗數據套式計算存活率。

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

(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. 將細胞取下，各加 10,000 隻 cell/mL 細胞液於含有蓋玻片之 6 盤孔培養。
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. 每孔重新注入培養液並加入 DCFH-DA 染劑以 10 μ M 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，並於以雷射照射。
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。

肆、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-IR780

(一) 結合光敏劑 (IR780)

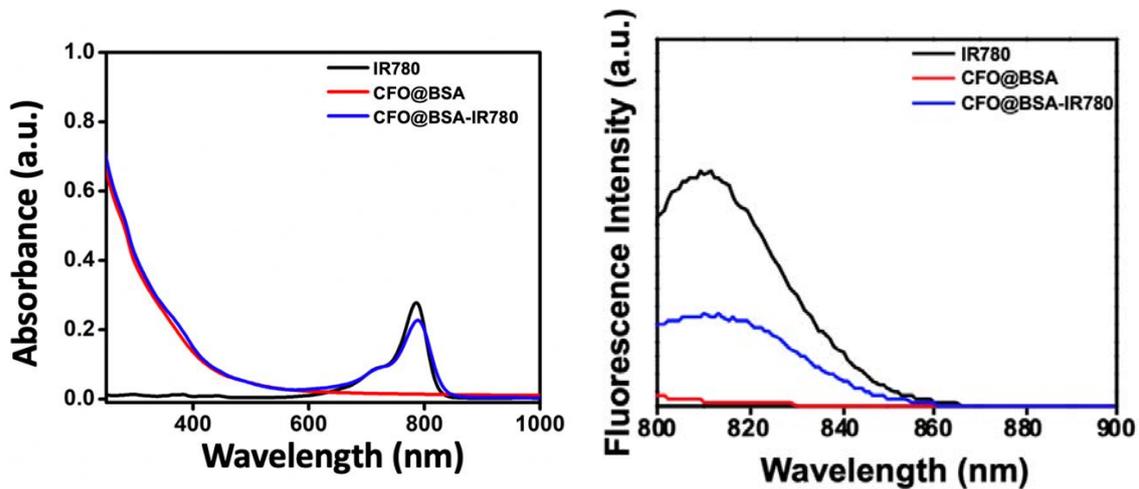


圖 4：CFO@BSA-IR780 之吸收光譜圖 圖 5：CFO@BSA-IR780 之光激發螢光頻譜圖

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

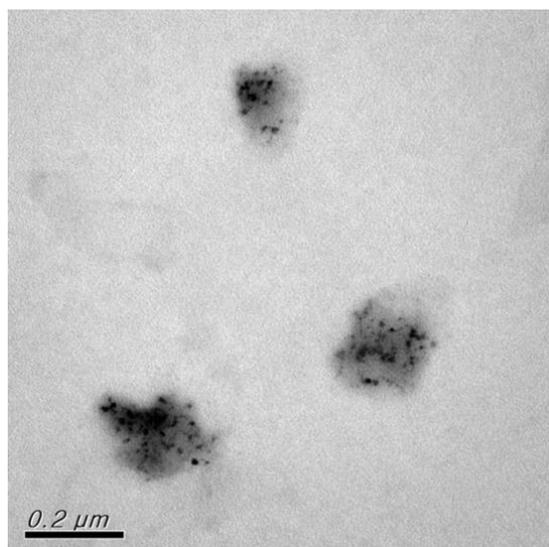


圖 6：CFO@BSA-IR780 之 TEM 成像

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) 主要元素分析

表 1：CFO@BSA-IR780 奈米複合材料之主要元素含量

Element	Amount ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
Cu	25.16
Fe	81.56
IR780	7.056

利用 ICP 測出銅與鐵的元素含量，並利用可見光光譜儀求出 IR780 的回歸曲線，藉此回推 IR780 在材料中的含量。由上表可以約略計算出材料中 CFO 之 x 值。 $25.16/63.546 \approx 0.396$ ， $81.56/55.845 \approx 1.46$ ， $0.396 : 1.46 \approx 1 : 3.7$ ，故 $x : 3-x \approx 1 : 3.7$ ，得 x 值約為 0.64。

(四) 產物平均粒徑

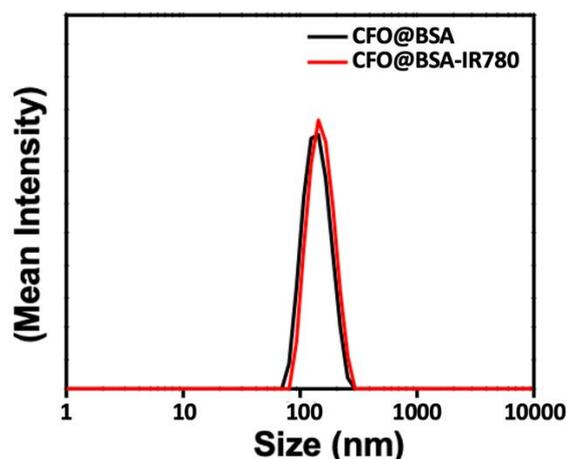


圖 7：CFO@BSA-IR780 粒徑分析

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 101.2 nm，CFO@BSA-IR780 平均粒徑約 107.6 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，符合進入癌細胞所需粒徑大小，可用於後續檢測及治療。

(五) 材料粒徑之穩定性

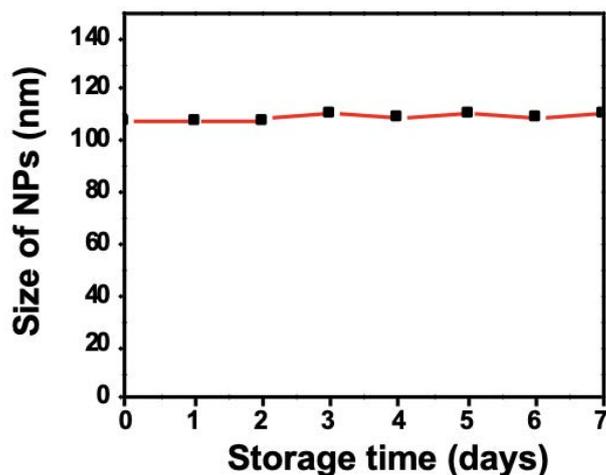


圖 8：CFO@BSA-IR780 粒徑隨時間變化趨勢

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酶催化活性。其機制如圖 9。

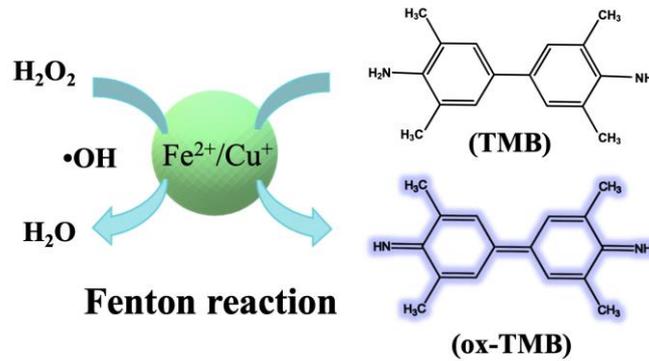


圖 9：TMB 氧化成 ox-TMB 之流程圖

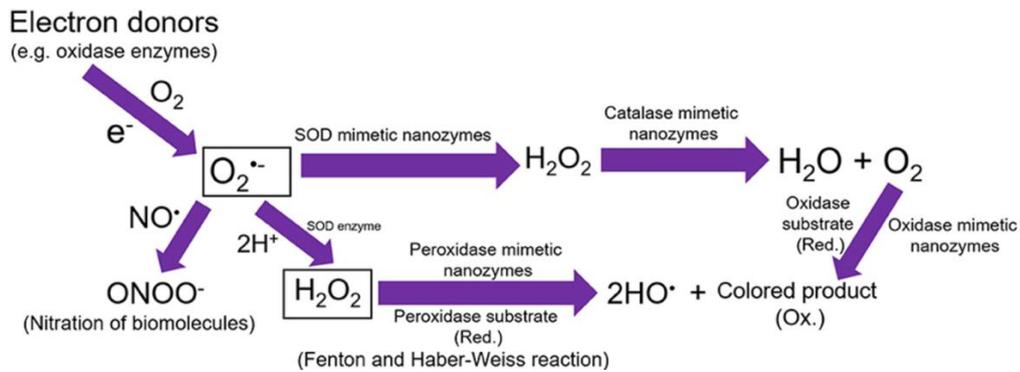


圖 10：各類型酶之間電子流動示意圖

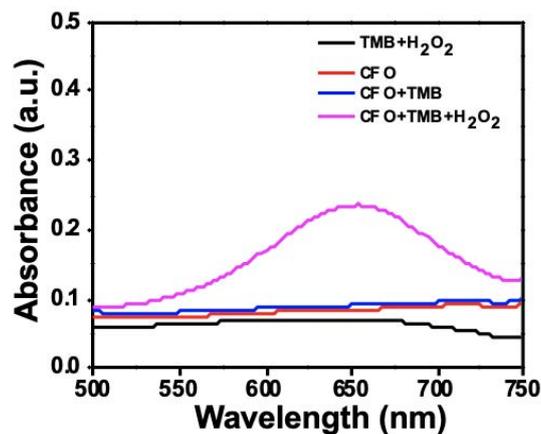


圖 11：不同物質反應下，ox-TMB 之吸收光譜圖

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 $\cdot\text{OH}$ 。

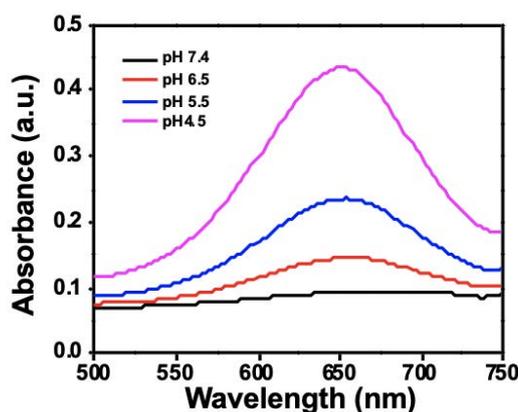
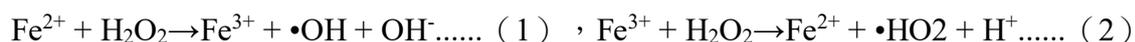


圖 12：不同 pH 值下， ox-TMB 的吸收光譜圖

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 $\cdot\text{OH}$ 的效果愈佳，相反的，當 $\text{pH}=7.4$ 時，幾乎沒有任何 $\cdot\text{OH}$ 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 $\cdot\text{OH}$ 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 $\cdot\text{OH}$ 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， $\cdot\text{OH}$ 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。



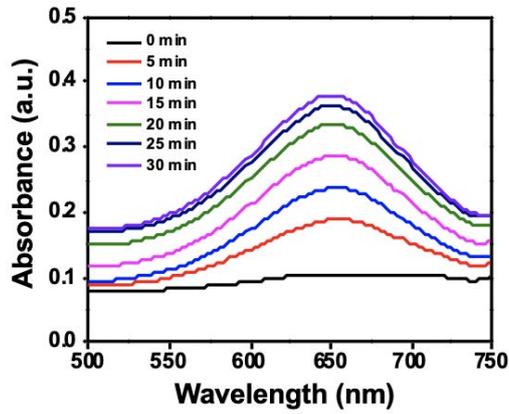


圖 13：不同反應時間下，ox-TMB 的吸收光譜圖

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

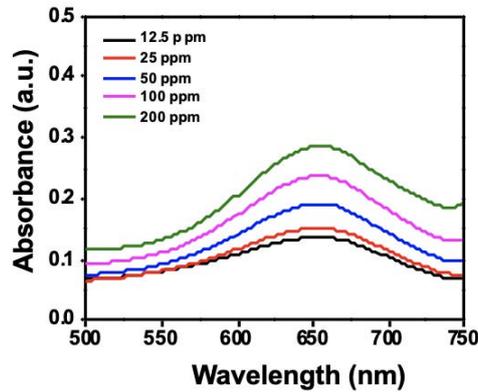


圖 14：不同 CFO 濃度下，ox-TMB 的吸收光譜圖

在此配置不同濃度之 CFO@BSA-IR780，加入 $10\mu l$, $5mM$ 之 H_2O_2 ，與 $100\mu l$, $1mM$ 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。

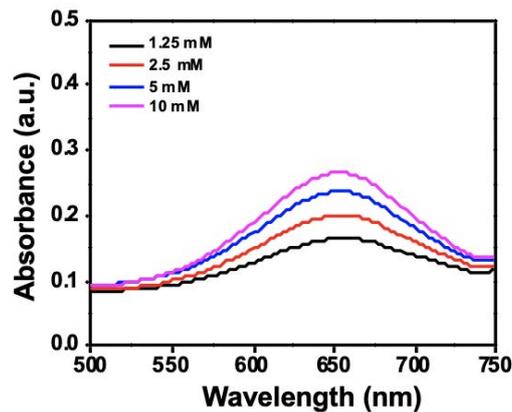


圖 15：不同 H_2O_2 濃度下，OX-TMB 的吸收光譜圖

在此配置 25 μl [CFO@BSA-IR780] = 100 ppm，加入 10 μl 不同濃度之 H_2O_2 ，與 100 μl , 1 mM TMB 於 pH = 5.5 環境下反應。圖 15 顯示出當 H_2O_2 濃度愈高，反應所產生的 $\cdot\text{OH}$ 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。

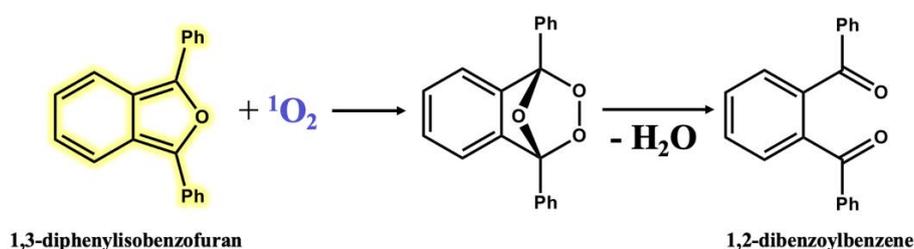


圖 16：DPBF 與 $^1\text{O}_2$ 反應式

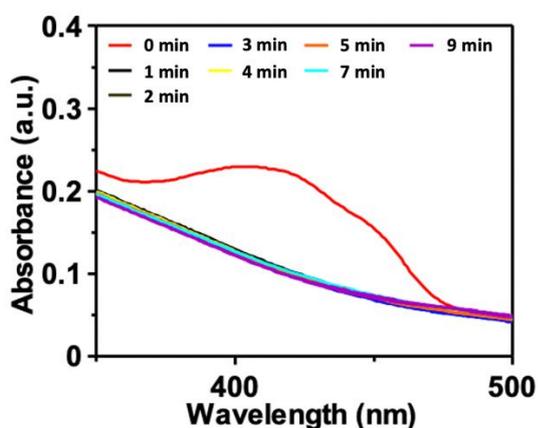


圖 17：不同時間下，DPBF 吸收光譜圖 (CFO@BSA-IR780)

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。

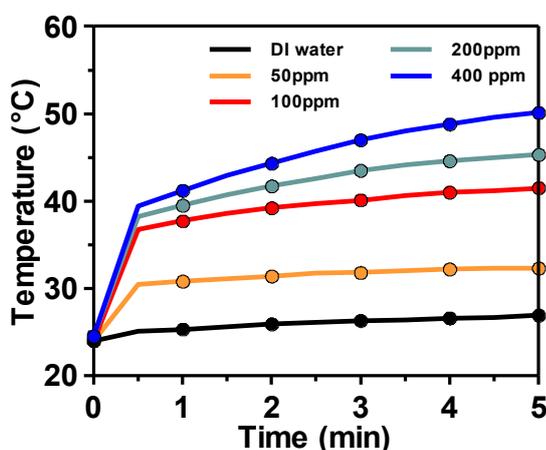


圖 18：在雷射激發光 (808nm, $2 \text{ W}/\text{cm}^2$) 的照射下，不同濃度下 CFO@BSA-IR780 奈米複合物溫度變化圖

本實驗由水溶液相之 CFO@BSA-IR780 奈米複合物經由照射 808 nm 單一波長之雷射光後，在不同濃度下之水溶液相之 CFO@BSA-IR780 奈米複合物其溫度的變化，當隨著濃度的增加會使得材料的溫度變化有增加的趨勢。如圖 18 所示，在雷射激發光 (808 nm , $2 \text{ W}/\text{cm}^2$) 的照射下，先比較控制組，當使用 DI water 來進行光熱實驗時，在五分鐘內，溫度從室溫 25°C 上升至 25.8°C ，溫度差僅有 0.8°C ，而當 CFO@BSA-IR780 奈米複合物濃度為 400

ppm 時，在 5 分鐘內，從室溫 25 °C 上升至 50.2 °C，其溫度差高達 25.2 °C，且在實驗的過程中都不會發生水溶液中固體沉澱之情形發生。

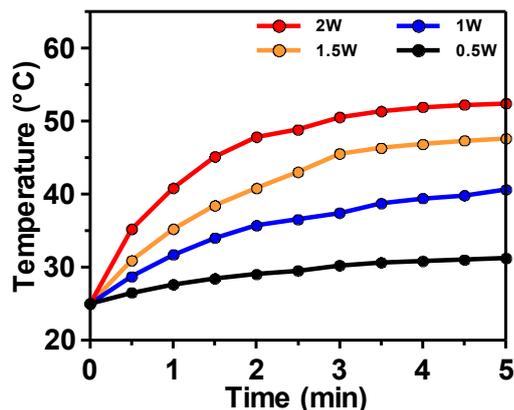


圖 19：在不同雷射激發光的能量密度下，

400 ppm 的 CFO@BSA-IR780 奈米複合物溫度變化圖

除了比較不同濃度下的 CFO@BSA-IR780 奈米複合物溫度變化圖，還需要改變不同雷射的能量密度 (Power density) 下，在相同的濃度下，CFO@BSA-IR780 奈米複合物溫度變化圖，由圖 19 所示，隨著能量密度的增加，經過 5 分鐘，在相同濃度為 400 ppm 之 CFO@BSA-IR780 奈米複合物的水溶液溫度有明顯的增加趨勢。

從上述的結果可以看出，CFO@BSA-IR780 奈米複合物不但是一個良好的光熱材料，且水中穩定性佳，適合用於細胞治療中。

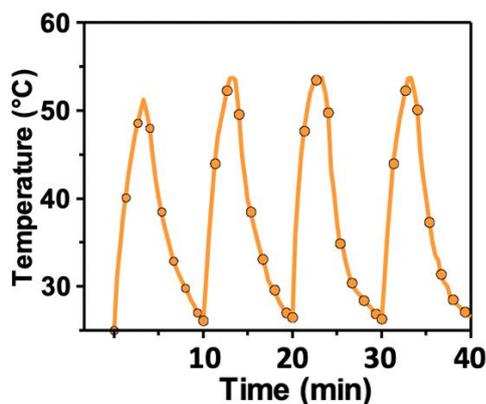


圖 20：在雷射激發光 (808nm, 2W/cm²) 的照射下，濃度為 400 ppm 之 CFO@BSA-IR780 奈米複合物之光熱穩定度測試

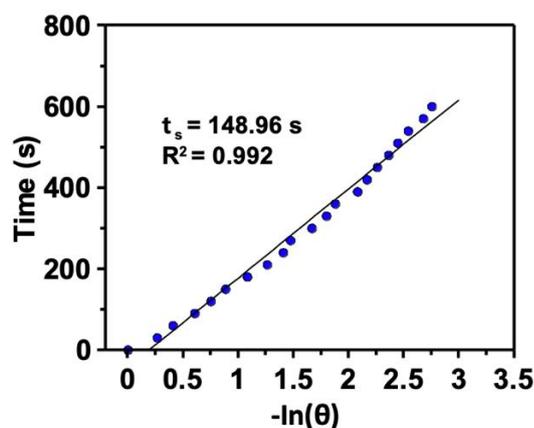


圖 21：CFO@BSA-IR780 之時間 (t) 與溫度函數對數 (-lnθ) 之關係圖

為了更確切得知 CFO@BSA-IR780 奈米複合物對 808 nm 雷射光之光熱性質，可藉由 Roper's report 所提出的理論來計算材料之光熱轉換效率。其光熱轉換效率是利用整體系統上總能量平衡時，材料內部累積之內能與雷射所提供之光能來進行比較後所推導出，可得 400 ppm 之 CFO@BSA-IR780 奈米複合物之光熱轉換效率為 42.1%。

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 22。

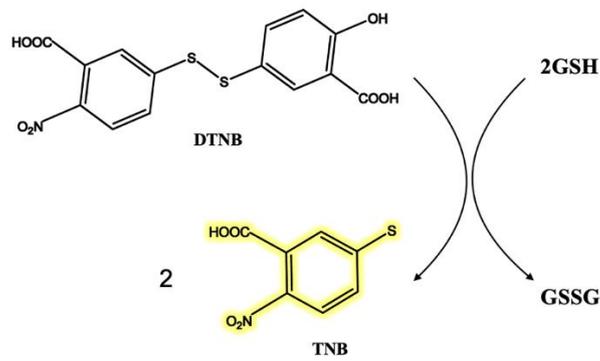


圖 22：DTNB 實驗原理示意圖

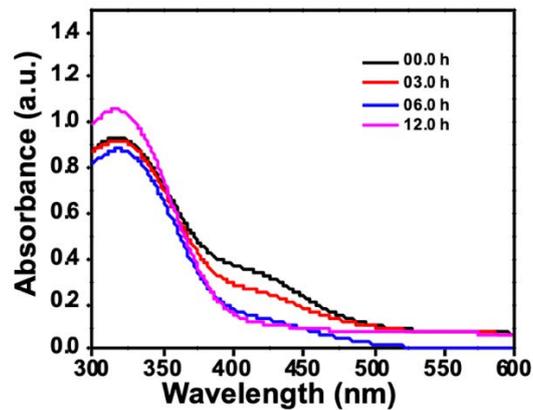


圖 23：不同反應時間下，DTNB/TNB 吸收光譜圖

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 23 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。

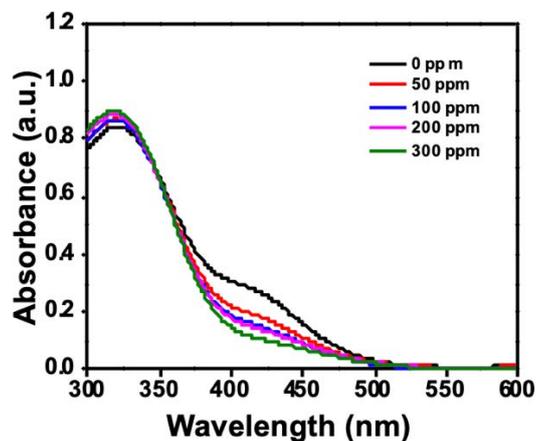


圖 24：不同 CFO@BSA-IR780 濃度下，DTNB/TNB 吸收光譜圖

配置不同濃度之 CFO@BSA-IR780 與 1.5 mM GSH 各 250 μ l 均勻混合，放置 6 小時後，加入 2 μ l DTNB 50mM，觀察波峰變化。由圖 24 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。

五、CFO@BSA-IR780 奈米材料催化 H₂O₂ 產生氧氣之檢測

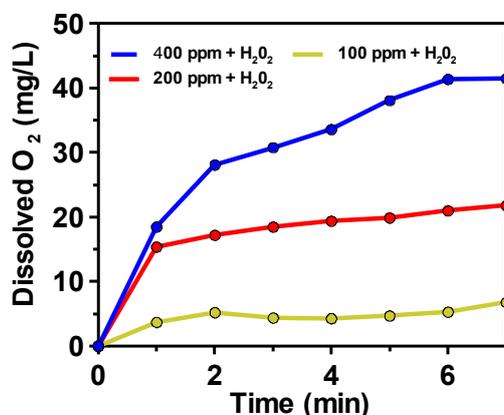


圖 25：不同濃度 CFO@BSA- IR780 與 H₂O₂ 反應之溶氧量與時間之關係圖

缺氧是腫瘤微環境的基本特徵之一，也是決定腫瘤惡性化發展的重要因素。缺氧不但會誘導癌細胞產生耐藥性等問題，還會促進癌細胞的生長和轉移。因此，本研究希望可以透過 CFO@BSA-IR780 催化 H₂O₂ 產生氧氣，改善腫瘤缺氧微環境，促進治療效果。由圖 25 可看出，隨著 CFO@BSA-IR780 濃度及時間的增加，其所產生的氧氣也逐漸增加，可以證明 CFO@BSA-IR780 具備催化 H₂O₂ 產生氧氣之能力，可應用於後續之腫瘤治療。

六、CFO@BSA-IR780 奈米材料對人體子宮頸癌細胞（HeLa cells）毒性

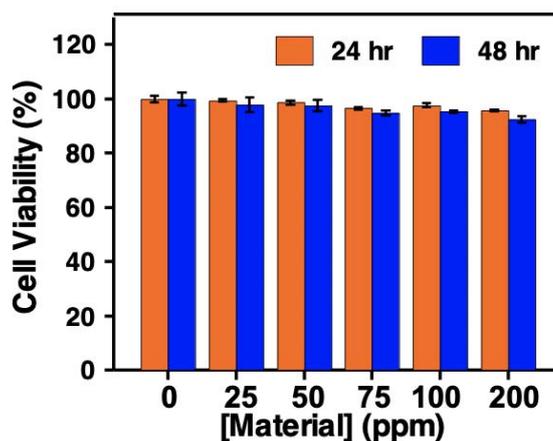


圖 26：不同濃度 CFO@BSA-IR780 於 HeLa 细胞 分別培養 24、48 小時後之細胞存活率

實驗分別以 0、25、50、75、100、200 ppm 之材料濃度對 HeLa cells (人體子宮頸癌細胞) 進行培養，再藉由 WST-1 法評估其材料毒性。如圖 26 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，HeLa 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 奈米材料之協同治療

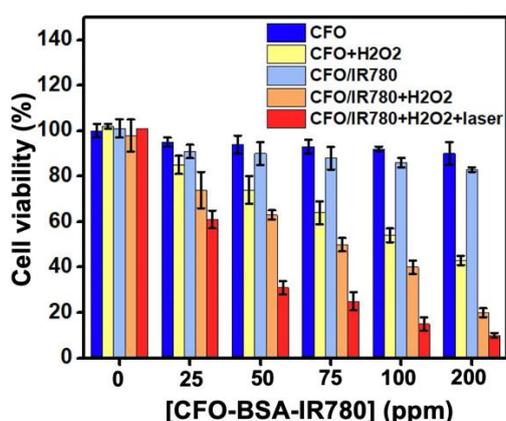


圖 27： HeLa 细胞在不同濃度之 CFO@BSA-IR780 下的協同治療之細胞存活率

在確認完生物相容性後，可以得知在高濃度的材料培養下不會影響細胞存活率，所以接下來要進行細胞治療之討論。從圖中可以看到當只有材料 (CFO、CFO/IR780) 時，細胞存活率皆有 90% 以上，然而在逐步加入 H₂O₂ 及照射雷射後，細胞存活率大量減少，當同時加入兩者時，細胞存活率僅剩不到 10%，可得 CFO@BSA-IR780 奈米複合材料擁有高腫瘤治療效率之功能，並且，可以印證前面敘述之光動力、光熱及化學動力療法的作用。

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

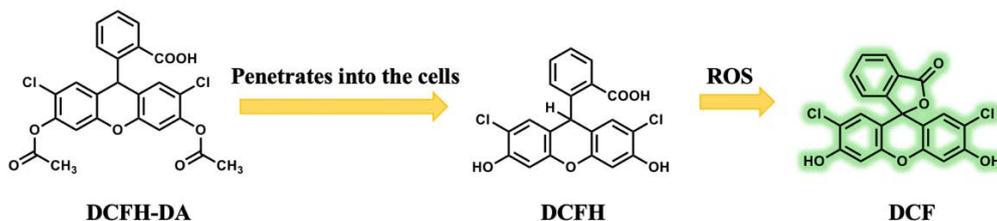


圖 28： DCFH-DA 與 ROS 氧化反應生成 DCF 之機制圖

除使用 DPBF 檢測是否有 ROS 的生成，本實驗另使用 DCFH-DA 染劑於細胞的檢測。DCFH-DA 進入細胞會被細胞的酯解酶（Esterase）去乙醯化成具有極性的 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 反應時會氧化成 DCF（2,7-Dichlorofluorescein），若以 450-490 nm 波長的光束激發，可放出 510-550 nm 波長的綠色螢光。

本實驗先以 CFO@BSA-IR780 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（Confocal）進行螢光的成像。

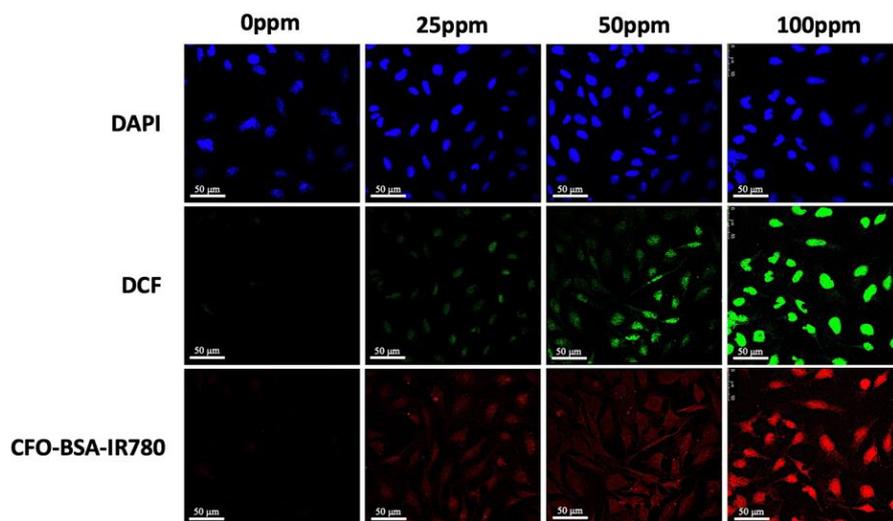


圖 29：CFO@BSA-IR780 奈米複合材料於 HeLa Cells 培養 24 小時後，經由共軛焦雷射顯微鏡擷取之平面細胞影像圖

由圖 29 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 29 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。

七、Fe:CFO@BSA-IR780 磁振造影分析 (MRI)

表 2：不同 Fe 濃度下所測得 Fe : CFO@BSA-IR780 之 T1 與 T2 遲緩時間值

mM	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
T ₁ (ms)	2700.70	2612.38	2582.47	2560.98	2495.08	2450.58
T ₂ (ms)	665.18	461.11	302.92	183.59	160.98	158.03

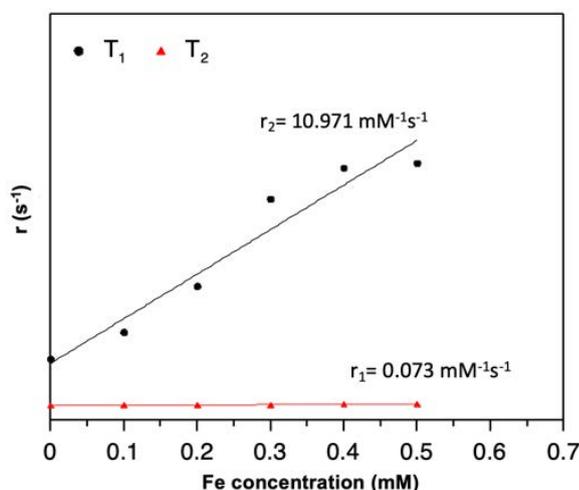


圖 30：不同 Fe 濃度下所得到之 T1 與 T2 遲緩時間倒數值與 Fe 濃度關係圖

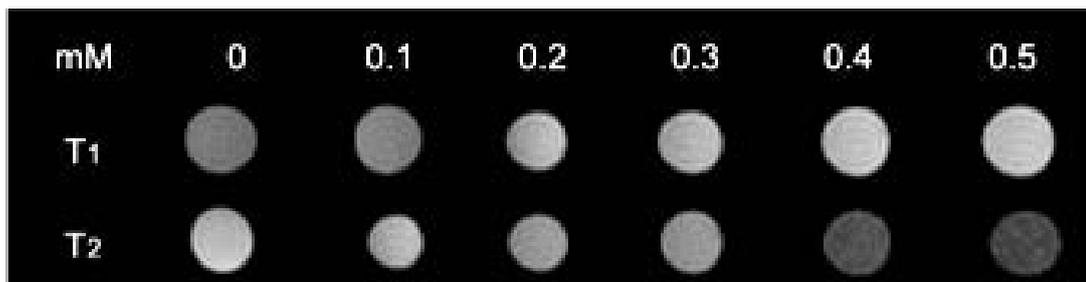


圖 31：不同 Fe 濃度下所得到之 T1 與 T2 磁振造影圖

本實驗使用鐵來作為 MRI 的顯影劑，鐵為順磁性，自旋運動時產生磁場效應，可減緩周遭環境氫原子的遲緩時間，使縱軸訊號快速增加，進而縮短 T1 遲緩時間值，在 T1 磁振

影像中會產生正向對比，造成影像對比亮度增加，擷取影像時可獲得較亮的影像，達到正向顯影之目的，故 Fe 在 MRI 的應用中可作為正向顯影劑。

實驗首先使用 ICP 測量 CFO@BSA-IR780 中 Fe 含量，接著配置含有 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mM Fe 之樣品溶液，使用 MRI 測量可得 T1 遲緩時間與 T2 遲緩時間值，接著將 T1 與 T2 遲緩時間值之倒數值對 Fe 濃度作圖，可得到 T1 與 T2 之遲緩速率值（ r_1 與 r_2 ），如圖 24。在 T1 部分，可以看到隨著 Fe 濃度增加，T1 遲緩時間值逐漸變少，經過計算後，可得 r_1 值為 $0.073 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，而在 T2 部分，可發現 T2 遲緩時間值一樣隨著 Fe 濃度增加而逐漸減少，經由計算後，得到 r_2 值為 $10.971 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 。由圖 31 可看出隨著 Fe 的增加，T1 的磁振影像圖亮度逐漸增加而 T2 磁振影像圖逐漸變暗，證實經由 Fe 摻雜之 Fe : CFO@BSA-IR780 在後續生物醫學磁振造影顯影方面擁有良好的發展潛力。

伍、結論與應用

一、結論

- (一) 本研究成功以一步性反應製備 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) 在光熱部分顯示出優秀的光熱轉換效率 (42.1%)，當 CFO@BSA-IR780 奈米複合材料濃度為 400 ppm 時可於 808 nm 下雷射照射 5 分鐘即可達 50.2°C，約上升 25°C，經過 4 次開關雷射的循環中展現極佳的光熱穩定性。
- (五) 由 DTNB 與 TNB 的吸收度得知，CFO@BSA-IR780 奈米複合材料相較其他研究，率先發現銅離子具備良好氧化消耗 GSH 的能力，且藉由奈米粒催化 H₂O₂ 產生氧氣之能力可提升治療效果。
- (六) HeLa 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。然而在加入 H₂O₂ 及照射雷射後依然具備良好的治療效果，可有效殺死癌細胞。
- (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。
- (八) 由 MRI 檢測可以證明，CFO@BSA-IR780 奈米複合材料可作為顯影劑，創先同時結合兩種診斷，在後續生物醫學磁共振造影顯影方面擁有良好的發展潛力。

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、一步性反應、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，材料表面擁有豐富的官能基，未來可與葡萄糖氧化酶（GOx）或腫瘤辨識分子等多種物質結合，提升材料功能並使其增加飢餓療法（Starvation therapy）之效果。也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。

陸、參考文獻資料

1. G. M. F. Calixto, J. Bernegossi, L. M. D. Freitas, C. R. Fontana, and M. Chorilli. *Molecules*. 2016, 21, 342
2. M. Meimandi, M.R. Talebi Ardakani, A.Esmaeil Nejad, P. Yousefnejad, K. Saebi, M. H. Tayeed, *J. Lasers Med. Sci.* 2017, 8, S7–S11.
3. Y. Chen, Y. Feng, J. G. Deveaux, M. A. Masoud, F. S. Chandra, H. Chen, D. Zhang, and F. Lin. *Minerals*. 2019, 9, 68
4. Y. Chen, Z. Li, H. Wang, Y. Wang, H. Han, Q. Jin, J. Ji, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2016, 8, 6852–6858.
5. E. K. Fodjo, K. M. Gabriel, B. Y. Serge, Dan Li, Cong Kong, and A. Trokourey. *Chemistry Central Journal*. 2017, 11:58
6. Z. J. JIAN, *Taiwan Medical Journal*, 2020, 63, 5

【評語】 050212

本研究的優點在於合成具備多功能化學動力療法的奈米粒子 CFO@BSA-IR780，具光動力治療與光熱治療之效果，並在，在 HeLa（人體子宮頸癌細胞）癌細胞中的安全性及加入 H₂O₂ 及照射雷射後的殺癌細胞能力都有測試。些可再改進的缺點或可更清楚說明的詳列於下：

1. 在 Introduction 可加強說明金屬氧化奈米粒子用來抗癌的例子。
2. 要解釋 CFO@BSA 中 BSA 蛋白是靠什麼鍵結和 CFO 形成複體。分子比例為何？最好有晶體結構證明。
3. CFO@BSA 又如何與 IR780 鍵結？CFO@BSA CFO@BSA 經由 DLS 分析可得平均粒徑為 101.2 nm，CFO@BSA-IR780 平均粒徑約 107.6 nm，由此可初步說明 CFO@BSA 有成功與 IR780 鍵結。但只看粒徑差不多在誤差範圍內。
4. 本研究均採 in-vitro 實驗，應考慮實際應用時如何施予雷射光源，如何知道 CFO@BSA-IR780 所在位置？如何讓 CFO@BSA-IR780 結合腫瘤等？並利用多種不同的癌細胞，及正常體細胞來測試奈米氧化鐵銅複合體毒性及加入 H₂O₂ 及照射雷射後的殺癌細胞能力。
5. 最好有動物活體實驗證據。

作品簡報

中華民國第62屆中小學科學展覽會

奈米氧化鐵銅複合體
應用於腫瘤協同治療

組別：高級中等學校

科別：化學科

編號：050212

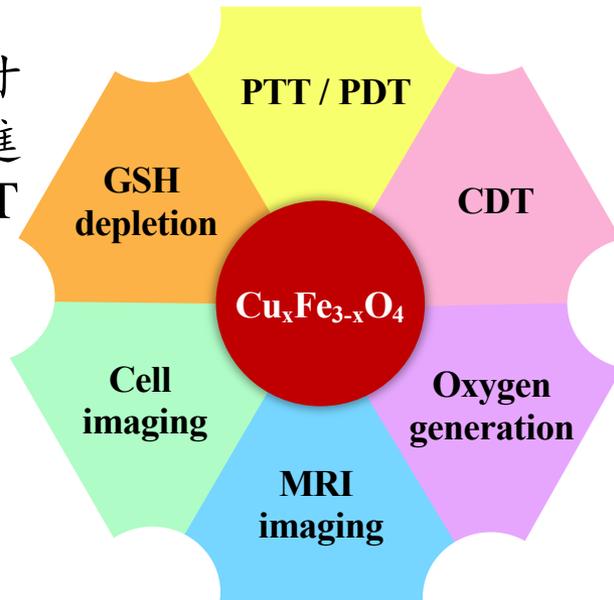
簡介

1. 合成**全新之多功能奈米複合材料 $\text{Cu}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4@BSA-IR780$** ，以多種方式治療腫瘤，提升效率並降低傷害
2. 率先**獨創摻雜銅離子並以蛋白質包覆**，使其療效優於相關研究
3. 材料除了治療，更**首度結合兩種診斷**功能，得以更精確針對腫瘤細胞，對症下藥

➤ **光熱治療 (PTT)**：以高溫殺死癌細胞

➤ **光動力治療 (PDT)**：以單態氧($^1\text{O}_2$)殺死癌細胞

➤ 氧化谷胱甘肽，以促進CDT及PDT



➤ **腫瘤顯影**

➤ **化學動力療法**：
產生氫氧自由基($\cdot\text{OH}$)殺死癌細胞

➤ 產生氧氣改善腫瘤缺氧環境，同時提供 O_2 給PDT

創新：

- ✓ 三種療法
- ✓ 摻雜銅離子
- ✓ 蛋白質包覆
- ✓ 結合兩種診斷

➤ **磁共振造影MRI**：材料可作為MRI顯影劑

研究設計

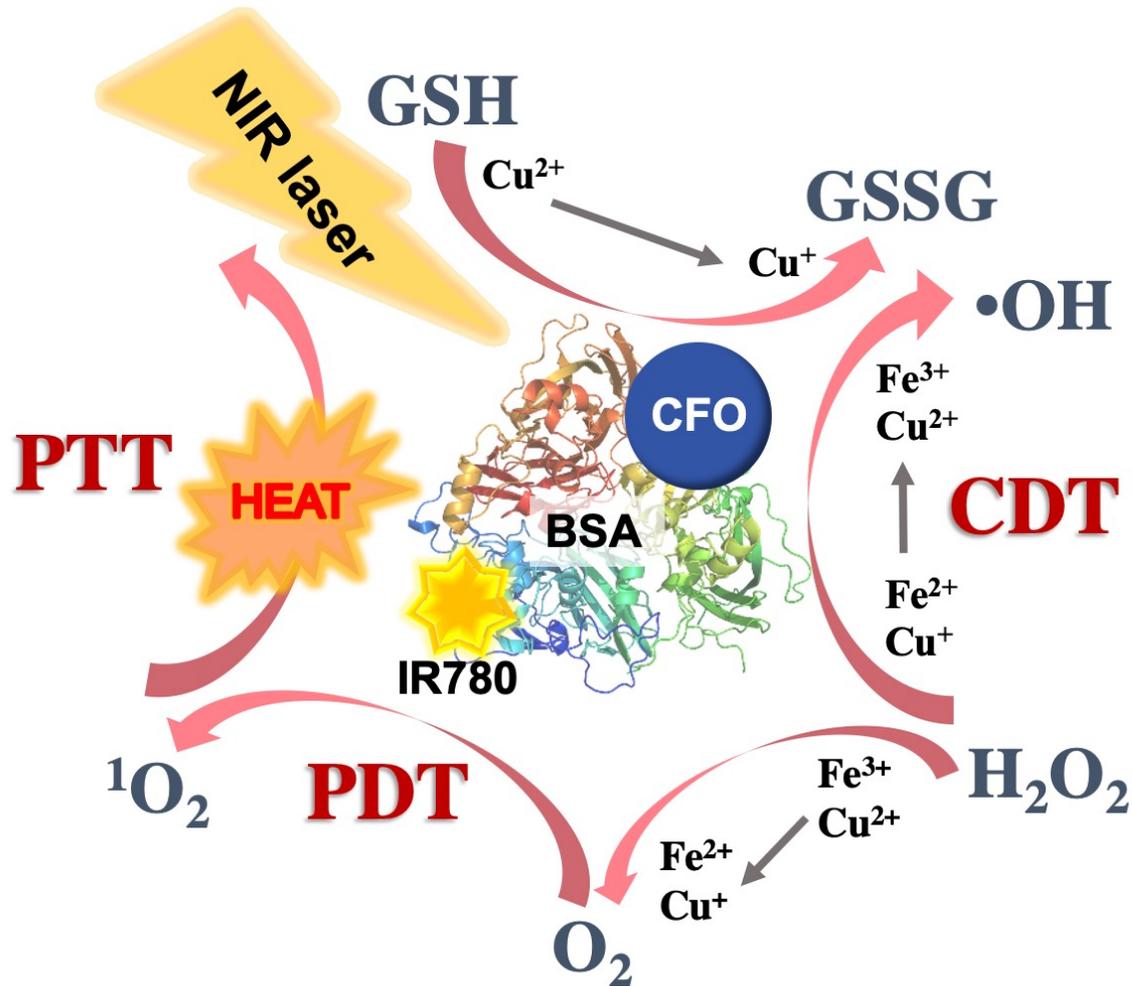
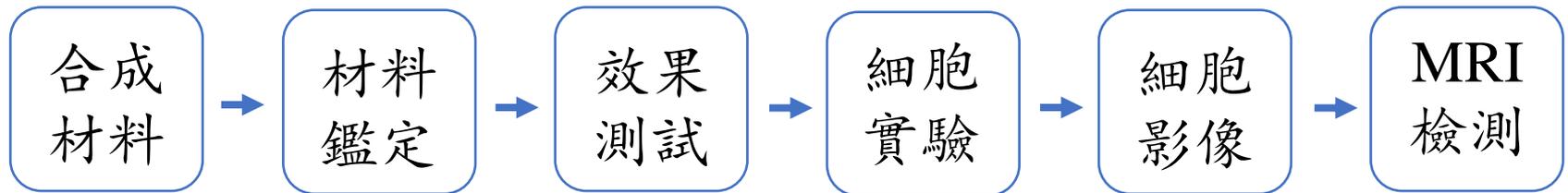


Fig.1

- **CFO:**
 $\text{Cu}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$, 氧化銅鐵奈米粒
- **BSA:**
牛血清蛋白, 提升生物相容性
並提供官能機包覆複合材料
- **IR780:**
光敏劑, 吸收780 nm近紅外光,
具光熱及光動效果
- **GSH:**
穀胱甘肽, 存於細胞, 會抑制
光動及化動

研究方法與過程

研究方法



材料配製

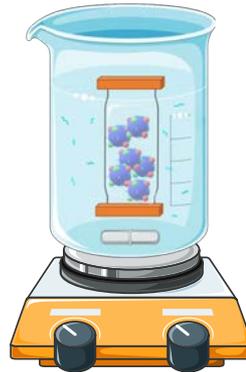
Step 1



IR780 in DMSO
BSA
 $\text{CuCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Stir at 25°C
and add NaOH

Step 2



Dialysis
for 24 hr

Step 3



CFO@BSA-IR780

結果與討論

- CFO@BSA-IR780材料鑑定

TEM 成像

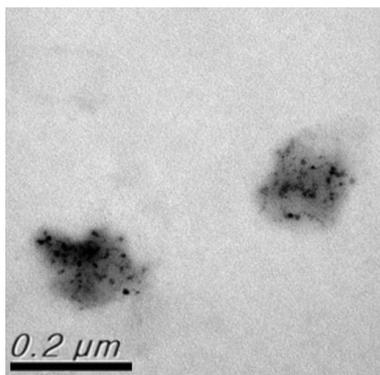


Fig.2

主要物質含量

Table.1

Element	Amount (μg/mg)
Cu	25.16
Fe	81.56
IR780	7.056

(Cu Fe by ICP, IR780 by UV)

UV-PL 光譜圖

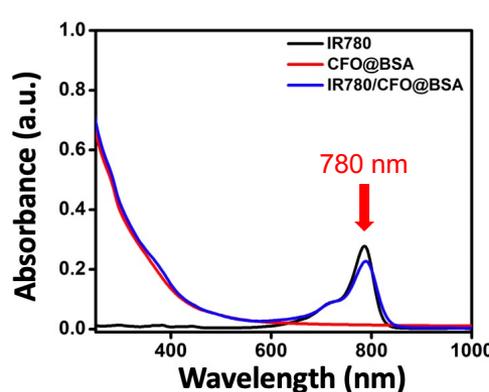


Fig.3

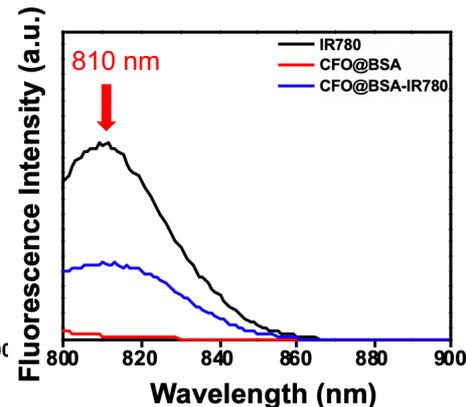


Fig.4

粒徑分析

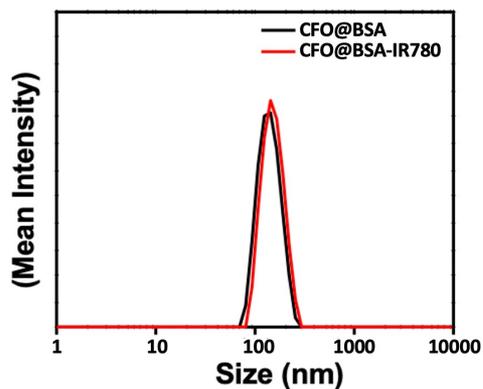


Fig.5

😊 CFO@BSA = 101.2 nm,
CFO@BSA-IR780 = 107.6 nm,
因低於200 nm, 可以輕易被細胞吞噬

穩定度測試

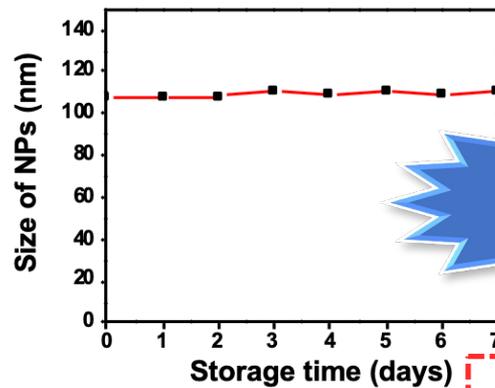
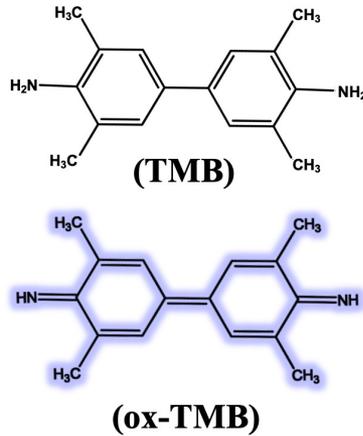
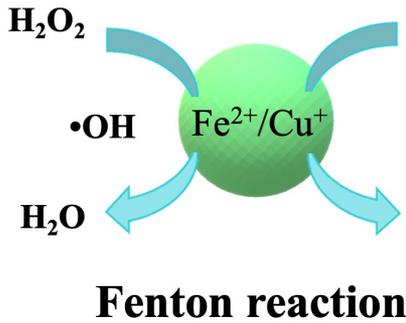


Fig.6

😊 材料具有極高的穩定性

結果與討論 – 化學動力治療



☺ 因為Fenton reaction在酸性環境下利於•OH的產生，因此可以推論CFO@BSA-IR780在腫瘤環境下所造成的影響會遠大於正常細胞

☺ CFO@BSA-IR780可以催化H₂O₂產生•OH，表現化學動力治療的效果

ox-TMB之吸收光譜圖

■ 不同物質

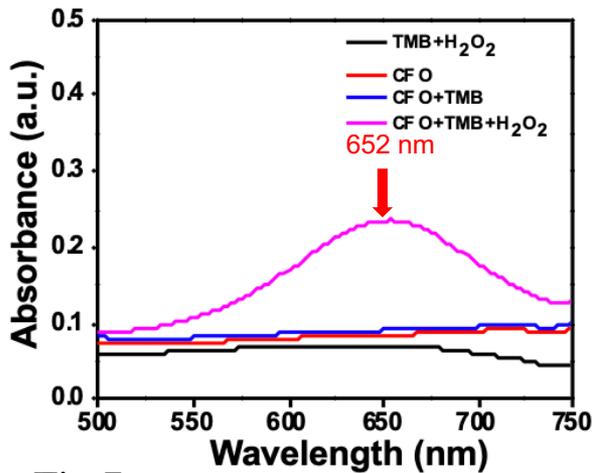


Fig.7

■ 不同反應時間

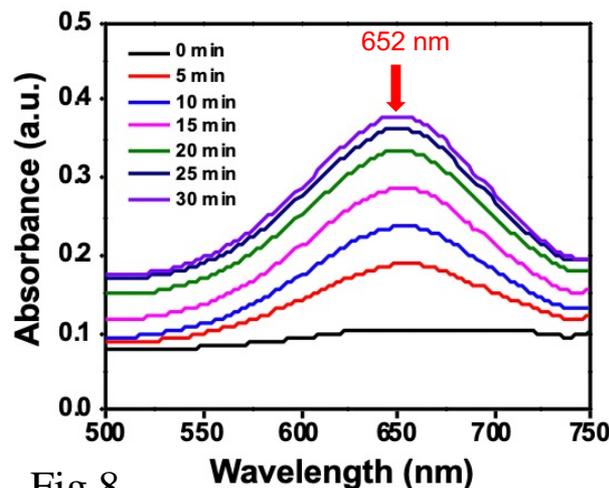


Fig.8

■ 不同酸鹼度

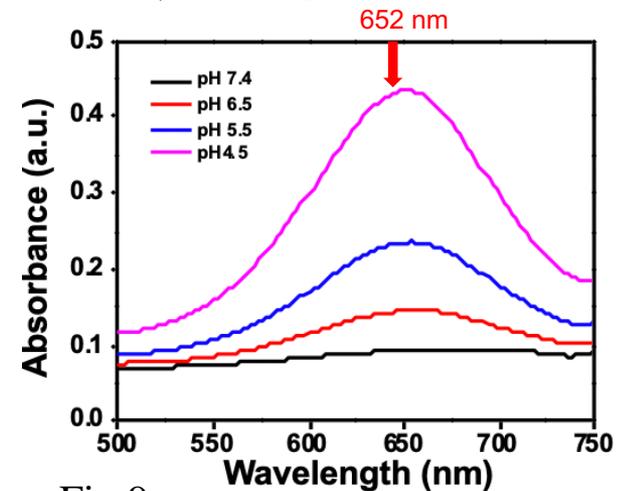


Fig.9

結果與討論 – 光熱 & 光動力治療

雷射後溫度變化

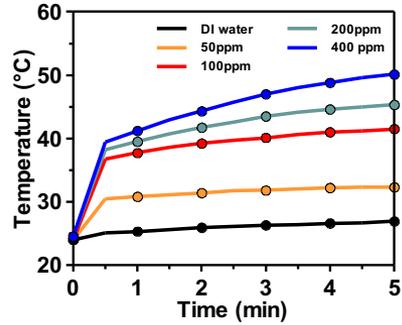


Fig. 10

光熱穩定度

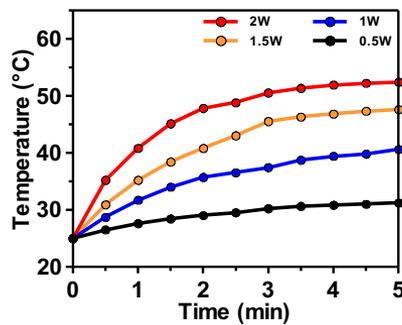


Fig. 11

光熱轉換效率

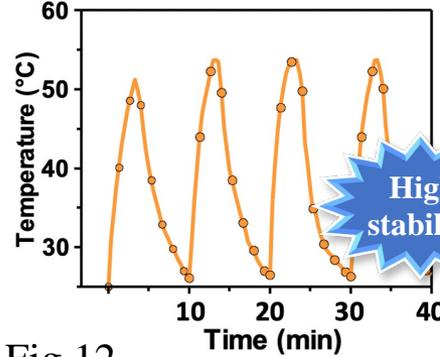


Fig. 12

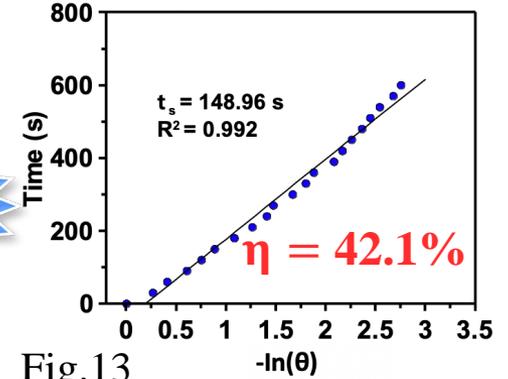


Fig. 13

利用DPBF檢測單態氧 (1O_2) 的產生

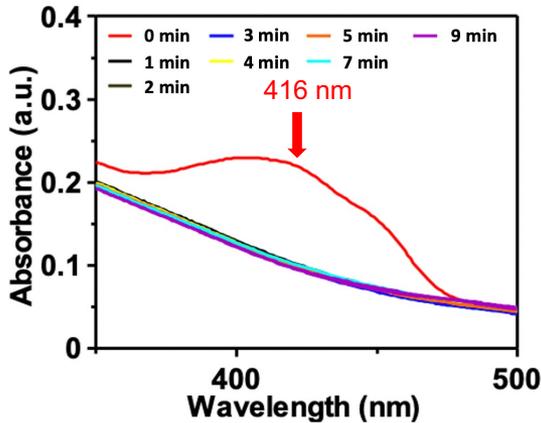
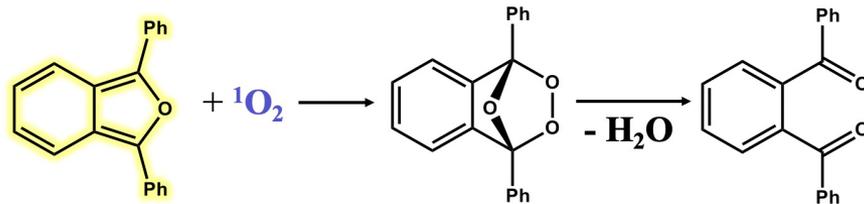


Fig. 14

☺ 由DPBF在416 nm處的吸收峰急速下降，可以證明CFO@BSA-IR780具有良好的光動力效果

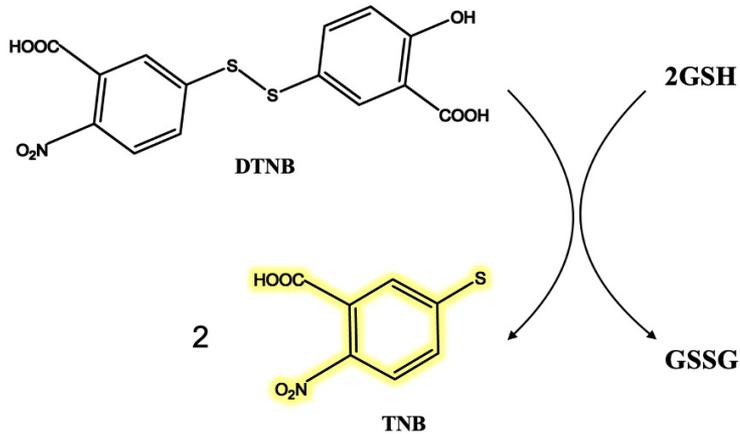


1,3-diphenylisobenzofuran

1,2-dibenzoylbenzene

雷射波長: 808 nm
雷射強度: 2 W/cm²
(Fig. 10)
材料濃度: 400 ppm
(Fig. 11&12)
照射時間: 5 min

結果與討論 – GSH之消耗 & 產氧效果



☺ 可以有效降低GSH，增進CDT和PDT的治療效率

☺ CFO@BSA-IR780改善腫瘤缺氧微環境，解決長久以來的治療困境

DTNB與TNB之吸收光譜圖

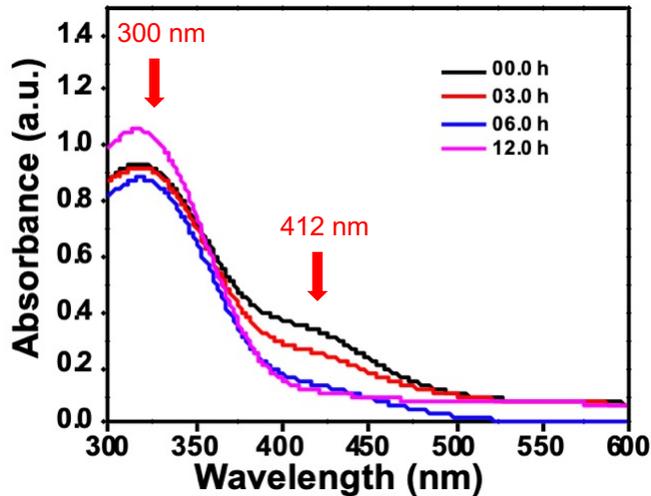


Fig.15

[H₂O₂] = 15 μM

溶氧量測試

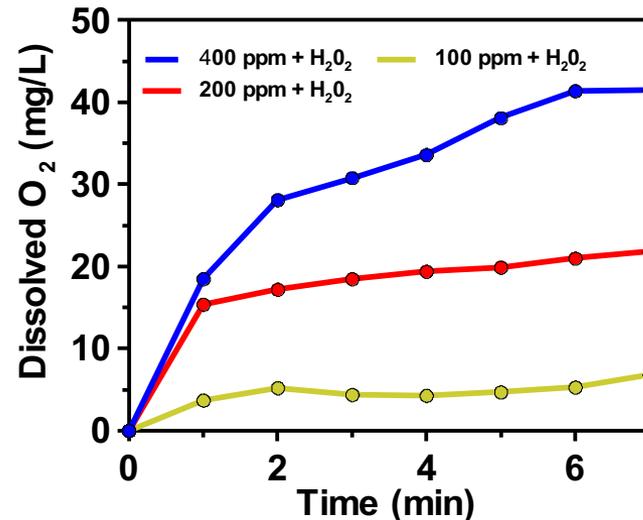
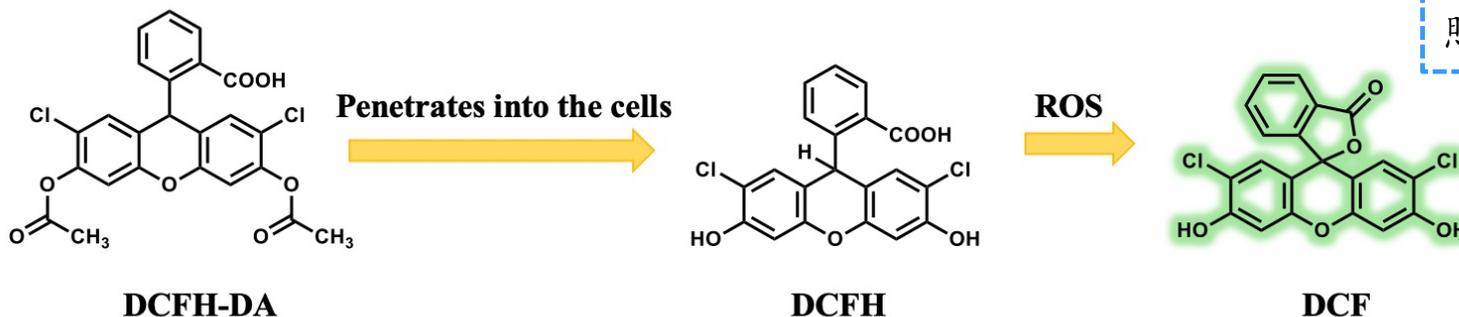


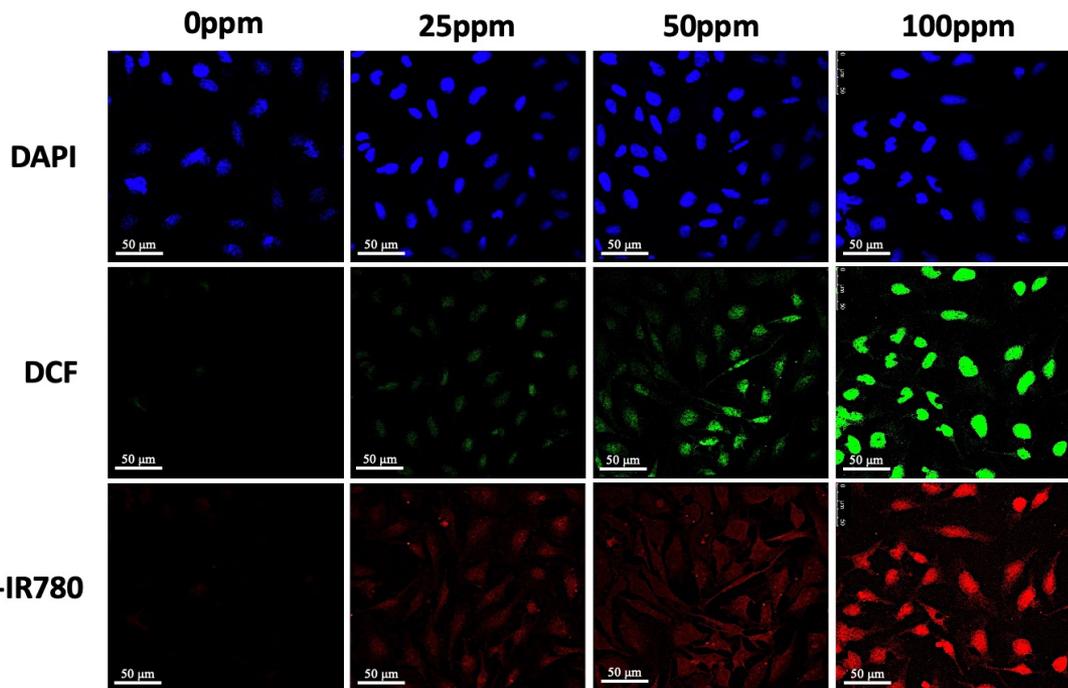
Fig.16

應用 - 細胞顯影

培養時間: 24 hr
雷射波長: 808 nm
雷射強度: 2 W/cm²
照射時間: 5 min



細胞顯影 & ROS 檢測



☺ 由DCF所發出的綠色螢光可以證明材料有確實在細胞內產生ROS

☺ 由IR780所激發出的綠色螢光可以直接證明，CFO@BSA-IR780 有確實進入腫瘤細胞內，擁有細胞顯影的功能

Fig.17

應用 – 試管內細胞分析

細胞毒性測試

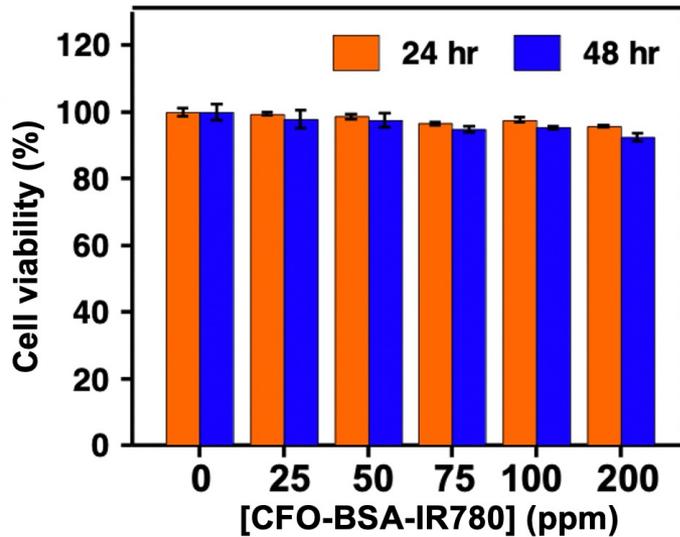


Fig.18

CDT、PDT、PTT 對細胞的效果

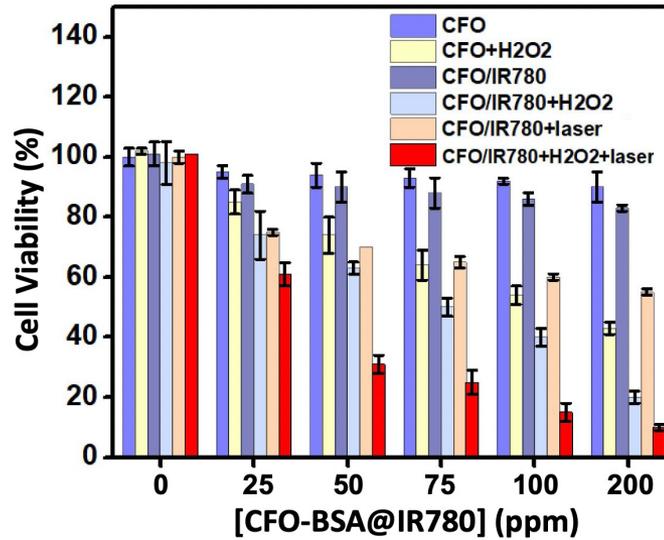


Fig.19

[H₂O₂] : 15 μM
雷射波長: 808 nm
雷射強度: 2 W/cm²
照射時間: 5 min

☺ CFO@BSA-IR780 擁有低毒性
與高生物相容性

☺ 材料在與微量的H₂O₂混合，及照射雷射後，可以表現出高治療效率，有效殺死人體子宮頸癌細胞，展現多重治療效果

應用 – MRI檢測

不同Fe濃度下，所測得之遲緩時間值

Table. 2

mM	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
T ₁ (ms)	2700.70	2612.38	2582.47	2560.98	2495.08	2450.58
T ₂ (ms)	665.18	461.11	302.92	183.59	160.98	158.03

不同Fe濃度下，T1與T2磁振造影圖

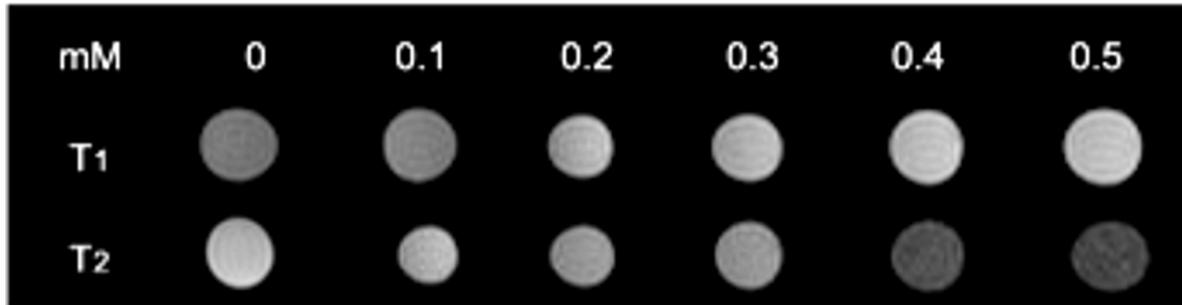
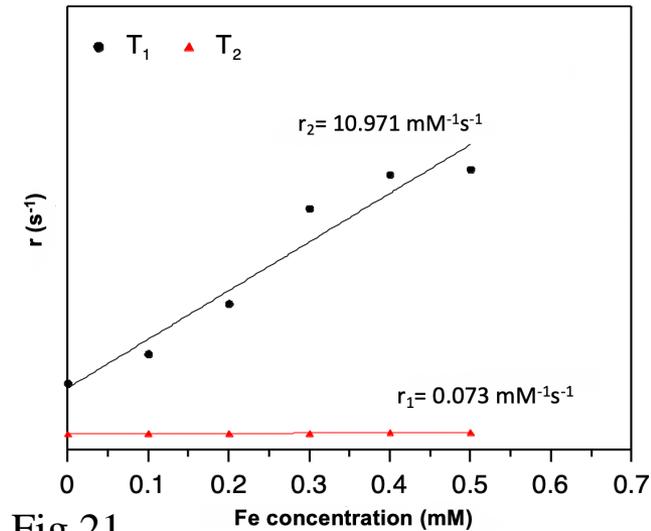


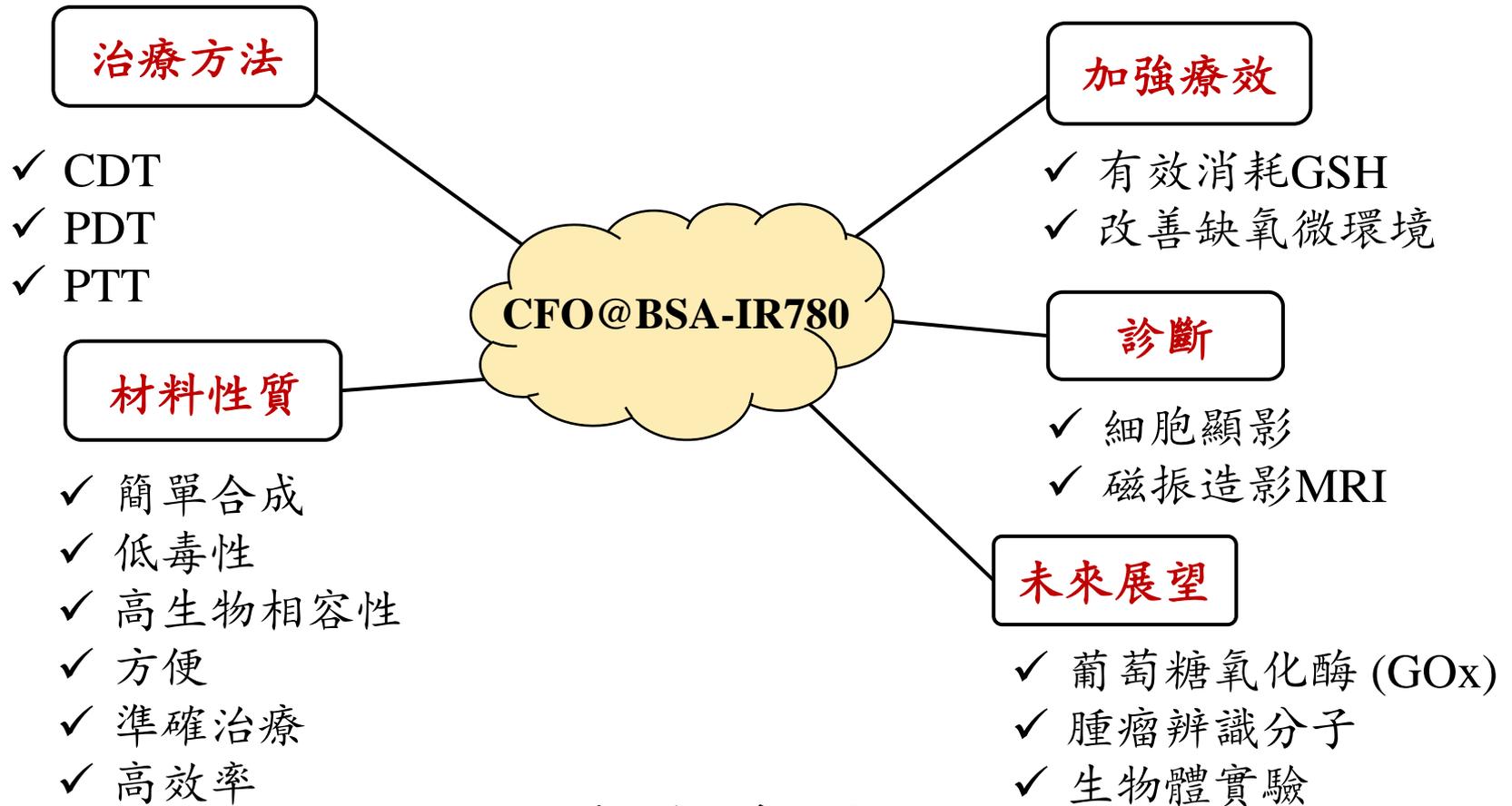
Fig.20

不同Fe濃度下所得到之T1與T2，遲緩時間倒數值與Fe濃度關係圖



😊 材料可以作為MRI之顯影劑，以提升治療時的準確性與效率

結論



參考資料

1. G. M. F. Calixto, J. Bernegossi, L. M. D. Freitas, C. R. Fontana, and M. Chorilli. *Molecules*. 2016, 21, 342
2. E. K. Fodjo, K. M. Gabriel, B. Y. Serge, Dan Li, Cong Kong, and A. Trokourey. *Chemistry Central Journal*. 2017, 11:58
3. Y. Chen, Z. Li, H. Wang, Y. Wang, H. Han, Q. Jin, J. Ji, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2016, 8, 6852–6858.
4. Y. Chen, Y. Feng, J. G. Deveaux, M. A. Masoud, F. S. Chandra, H. Chen, D. Zhang, F. Lin. *Minerals*. 2019, 9, 68