

國立交通大學

應用化學系

碩士論文

利用螢光相關光譜與拉曼光譜技術探討
活性氧化物質對脂質膜流動性與結構之影響

Structure-Fluidity Interplay of Model Membranes

- A Raman and Fluorescence Correlation Spectroscopy Study

研 究 生：戴菀俞

指 導 教 授：廖奕翰 博士

中 華 民 國 九 十 八 年 八 月

利用螢光相關光譜與拉曼光譜技術探討

活性氧化物質對脂質膜流動性與結構之影響

Structure-Fluidity Interplay of Model Membranes

- A Raman and Fluorescence Correlation Spectroscopy Study

研究生：戴菀俞

Student : Wan-Yu Tai

指導教授：廖奕翰

Advisor : Ian Liao



A Thesis

Submitted to Department of Applied Chemistry
College of Science
National Chiao Tung University
in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master
in
Applied Chemistry

August 2009

Hsinchu, Taiwan

中華民國九十八年八月

利用螢光相關光譜與拉曼光譜技術探討

活性氧化物質對脂質膜流動性與結構之影響

學生：戴菀俞

指導教授：廖奕翰

國立交通大學理學院應用化學系碩士班

摘 要

脂質為細胞膜以及細胞內胞器膜的主要成分。細胞膜流動性是脂質膜的重要特徵，維持適當的流動性對脂質膜正常功能十分重要。細胞內粒線體的電子傳遞鏈以及其他反應會產生各種活性氧化物質 (reactive oxygen species, ROS)，例如超氧自由基 (superoxide, $O_2^{\cdot-}$)、氫氧自由基 (hydroxyl radical, OH^{\cdot}) 和過氧化氫 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 等。這些活性氧化物質容易和生物分子，例如脂質、DNA 或是蛋白質分子產生反應，改變其功能。由於脂質膜上含有不飽和脂質，因此容易受到氧化物質的影響造成脂質過氧化，脂質被氧化之後除可能造成結構上的改變外，也會影響脂質膜的正常流動性，造成細胞傷害。過去文獻上較少系統性探討脂質過氧化後脂質膜結構變化與脂質膜流動性改變之間的關係。在本研究中，我利用成分單純的脂質體 (liposome) 作為研究細胞脂質膜的模型系統，並利用螢光相關光譜 (fluorescence correlation spectroscopy, FCS) 與拉曼光譜 (Raman spectroscopy) 技術觀察在活性氧化物質的影響之下，脂質受到氧化之後其結構與流動性變化之間的關係。我也分別探討不同的抗氧化物質以及不同膽固醇比例對於脂質過氧化後的流動性與結構之影響。螢光相關光譜實驗結果顯示，加入過氧化氫對脂質體膜流動性沒有影響，而氫氧自由基則會造成脂質膜流動性顯著增快；拉曼光譜則顯示氫氧自由基對脂質雙鍵和單鍵都有破壞，而過氧化氫對脂質膜沒有明顯的結構破壞。以上結果可以解釋為氫氧自由基對於脂質過氧化造成碳鏈變短，導致脂質膜流動性的增快。我也探討加入了維他命 C 和維他命 E 兩種抗氧化劑的影響，結果發現兩者對於氫氧自由基造成的脂質體膜流動性增快與脂質結構破壞均有明顯抑制效果。最後，我探討不同比例膽固醇對於脂質過氧化後膜流動性與結構改變的影響。我發現膽固醇的比例越高，對於氫氧自由基造成脂質膜流動性增快的現象有抑制的趨勢，同時對於脂質雙鍵被破壞也有保護作用。較特別的是對含高比例膽固醇的脂質體加入氫氧自由基後，有造成脂質雙鍵的破壞但是脂質膜流動性並未變快，我也提出一個反應機制解釋以上現象。我的研究成果展現了應用螢光相關光譜與拉曼技術探討脂質膜過氧化之後流動性與結構改變之間的關係。

Structure-Fluidity Interplay of Model Membranes

- A Raman and Fluorescence Correlation Spectroscopy Study

Student : Wan-Yu Tai

Advisor : Ian Liao

Department of Applied Chemistry
National Chiao Tung University

Abstract

The membrane of biological cells or intra-cellular organelles plays an important role in maintaining cellular physiological functions. For example, the lateral fluidity of membranes is essential to regulate cellular activities occurring on membranes such as enzymatic reactions, cell-cell communication, and endocytosis. Unsaturated lipids, one of the main components of biological membranes, are susceptible to the attack of reactive oxygen species (ROS). The oxidation of lipids can lead to structural derangement of membranes, which may eventually compromise the membrane fluidity. Herein, we employ fluorescence correlation spectroscopy (FCS) and Raman spectroscopy to systematically characterize the membrane fluidity and lipid structures under the treatment of ROS, respectively. We show that hydrogen peroxide does not either change the membrane fluidity or modify the lipid structure. In contrast, hydroxyl radical induces a significant increase in membrane fluidity. This observation is rationalized with the diminished $-CH_2$ and $C=C$ moieties in lipids. We also show that vitamin C and vitamin E can protect membranes by preventing lipid peroxidation induced fluidity change. Most remarkably, a high percentage of cholesterol contents in membranes can effectively inhibit the attack of ROS to membranes. All the above observation can be accounted with the result of Raman on membrane. Our study demonstrates a correlative approach using FCS and Raman spectroscopy to address the structure-fluidity interplay of membranes, providing new insight to the modified membrane fluidity induced by ROS attack.

誌謝

回首念研究所兩年，感謝許多曾經指導過我、幫助過我與替我加油打氣的師長、學長姐、同學與學弟妹們。

首先要感謝廖奕翰老師在研究所的指導，生物物理這個領域，是我在進研究所之前都尚未接觸；但在老師的指導之下，不僅在學業與知識，還有做研究與平時做事的態度與熱情，都讓我在學習到了不少。另外也要感謝清大江昀緯老師與交大吳淑祿老師擔任我的口試委員，對於我的研究提出了指教，使這份論文可以更加完善。感謝陽明大學的白佳中學姐在脂質體製備的指點，讓我在樣品製備上有很大的幫助。

在研究所生活的兩年中，一起生活的研究夥伴讓我的研究所生涯增添了許多趣味。感謝秀蘭學姐在我一進入研究所中帶領我架設系統與認識實驗室環境，鍾昭宇學長在實驗過程中給與實驗技術改進想法與程式撰寫，Bush 學長在實驗程式撰寫，逸群在拉曼光譜測量幫忙。另外還要謝謝曾經在實驗上指點我的美方學姐、鴻隆學長、小龜學長，還有一起生活的意玲、嘉仁、士豪、學翰、大衛、宥宗，重藤真介老師實驗室的依純與李耀坤老師實驗室的暉婷和慧貞學姐，在暑假短短相處但是帶給實驗室許多歡樂的專題生依霖、毓君、俊彥、昱成、彥廷、俊傑和士弘。在做研究的過程中也許曾經覺得疲累或是迷惘，但是有你們的陪伴與打氣，讓我能夠繼續的去鑽研與克服遇到的問題。

此外也要感謝一起在交大念書的大學同學們，Murphy、茉莉、阿烈和豔如與在清大念書的大學同學可樂和阿億，讓我在念研究所的時候可以與你們分享在實驗室的點滴與研究和課業上的精進。

感謝從大學就陪伴我到現在的小蕃茄，特別是在研究所的這兩年中，能夠與你交流科學的想法，分享生活上的點滴；也謝謝你在我難過的時候總是替我打氣與鼓勵，讓我能夠克服遇到的難題，渡過研究所兩年的日子。

最後要感謝我的家人們，爸爸媽媽讓我沒有後顧之憂，可以專心去完成研究所的研究；阿媽每天幫我準備水果讓我營養均衡；與姐妹們和弟弟一起分享研究生活與心情。雖然在這兩年的時間待在家裡與你們相處的時間並不多，但你們永遠是我最牽掛也最愛的家人，謝謝你們！

目錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
誌謝.....	iii
目錄.....	iv
表目錄.....	vi
圖目錄.....	vii
第一章 背景介紹.....	1
1-1 細胞膜流動性.....	1
1-1-1 細胞膜簡介.....	1
1-1-2 細胞膜流動性.....	2
1-2 活性氧化物質.....	3
1-2-1 活性氧化物質生成途徑.....	3
1-2-2 活性氧化物質對流動性的影響.....	4
1-3 測量流動性方法介紹.....	5
1-4 脂質體.....	9
1-5 研究動機與目標.....	10
第二章 研究方法與原理.....	11
2-1 螢光相關光譜.....	11
2-2 拉曼光譜.....	16
第三章 研究方法與實驗.....	17
3-1 研究方法.....	17
3-1-1 藥品.....	18
3-1-2 微脂體製備.....	19
3-1-3 氧化物質與抗氧化劑配法.....	20
3-2 螢光相關光譜.....	23

3-2-1	螢光相關光譜系統架設	23
3-2-2	系統校正方法	24
3-2-3	實驗步驟	26
3-3	拉曼光譜	31
3-3-1	拉曼系統架設	31
3-3-2	實驗步驟	32
3-4	統計分析	34
第四章	結果與討論	39
4-1	脂質體之基本鑑定	39
4-2	不同氧化物質的影響	48
4-3	抗氧化劑的效應	59
4-4	膽固醇比例的效應	67
4-4-1	不同比例膽固醇造成膜流動性變化	67
4-4-2	氫氧自由基加入對於流動性與結構變化	70
第五章	結論	82
	參考文獻	83

表目錄

表 4-1 氫氧自由基及過氧化氫對脂質體 DOPC 膜流動性影響的整理結果	53
表 4-2 不同抗氧化劑對脂質體 DOPC 加入氫氧自由基後膜流動性影響的整理結果	64
表 4-3 含不同比例膽固醇的脂質體在加入氫氧自由基後膜流動性影響的整理結果	76



圖目錄

圖 2-1 螢光相關光譜觀察螢光分子在二維和三維空間移動的示意圖.....	15
圖 3-1 研究方法示意圖.....	17
圖 3-2 藥品結構.....	21
圖 3-3 脂質體製作流程.....	22
圖 3-4 螢光相關光譜系統架構圖.....	27
圖 3-5 雷射光源、主要光學組件與螢光染料之特性光譜.....	28
圖 3-6 Alexa 633 在 PBS 溶液中的自相關函數與擬合.....	29
圖 3-7 DiD 在脂質體 DOPC 膜上的自相關曲線與螢光強度變化.....	30
圖 3-8 拉曼光譜系統架構圖.....	33
圖 3-9 利用 excel 計算 p 值.....	36
圖 3-10 t 檢定計算結果.....	37
圖 3-11 t 檢定計算結果.....	38
圖 4-1 利用電生成法所製備脂質體之顯微影像.....	42
圖 4-2 將單一脂質體對雷射焦點進行軸向掃描，並記錄螢光強度之結果.....	43
圖 4-3 在不同聚焦深度對脂質體進行螢光強度及螢光相關光譜量測的結果.....	44
圖 4-4 在不同聚焦深度對脂質體做螢光相關光譜測量結果.....	45
圖 4-5 對水溶液中染料 (Alexa 633) 及在 DOPC 磷脂膜上之染料 (DiD) 進行螢光自相 關函數測量之結果.....	46
圖 4-6 DOPC 脂質體之拉曼光譜.....	47
圖 4-7 不同氧化物對膜流動性之影響.....	51
圖 4-8 量測氫氧自由基及過氧化氫對 DOPC 膜流動性影響之統計結果.....	52
圖 4-9 加入氫氧自由基及過氧化氫後 DOPC 脂質分子之動態拉曼光譜變化.....	54
圖 4-10 加入氫氧自由基及過氧化氫後脂質 C=C 雙鍵的拉曼譜峰強度隨時間變化....	55
圖 4-11 脂質體加入氧化物前後之單鍵-CH ₂ 和雙鍵 C=C 拉曼譜峰強度隨時間變化..	56
圖 4-12 脂質過氧化機制.....	57

圖 4-13 DOPC 加入氫氧自由基之共軛焦影像掃描	58
圖 4-14 含維他命 C 或脂質嵌入維他命 E 的脂質體在加入氫氧自由基前後染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動得到的自相關函數曲線	62
圖 4-15 含不同抗氧化劑的脂質體加入氫氧自由基前後膜之流動性變化統計圖	63
圖 4-16 含不同抗氧化劑的脂質體加入氫氧自由基後脂質 C=C 雙鍵的拉曼譜峰強度隨 時間變化	65
圖 4-17 含不同抗氧化劑的脂質體加入氫氧自由基後脂質 C=C 雙鍵的拉曼譜峰強度隨 時間變化統計圖	66
圖 4-18 含不同比例膽固醇的脂質體膜之自相關函數曲線	68
圖 4-19 含不同比例膽固醇的 DOPC 膜之流動性的統計結果	69
圖 4-20 含不同比例膽固醇的脂質體加入氫氧自由基前後膜之自相關函數曲線	74
圖 4-21 含不同比例膽固醇的 DOPC 加入氫氧自由基之流動性變化統計圖	75
圖 4-22 含不同比例膽固醇的 DOPC 加入氫氧自由基之流動性變化量比率	77
圖 4-23 含不同膽固醇的 DOPC 之拉曼光譜	78
圖 4-24 含不同比例膽固醇的脂質體加入氫氧自由基後脂質 C=C 雙鍵的拉曼譜峰強度 隨時間變化	79
圖 4-25 含不同比例膽固醇的脂質體加入氫氧自由基後脂質 C=C 雙鍵的拉曼譜峰強度 隨時間變化統計圖	80
圖 4-26 含 32.9% 膽固醇的脂質體加入氫氧自由基後在不同時間之拉曼光譜譜峰擬合	81

第一章 背景介紹

1-1 細胞膜流動性

1-1-1 細胞膜簡介

細胞膜是動物細胞最外層的結構¹。細胞膜的結構主要由脂質 (lipid) 組成，外加一些蛋白質與醣類。脂質主要由一個極性端接上兩條碳長鏈所構成，一般脂質碳鏈數量約為 14~24 個碳；細胞膜的性質可因脂質上碳鏈長短、極性端所接的官能基 (functional group) 和碳鏈飽和程度有所不同。細胞膜厚度大約 4-10 nm，主要由脂質長度所決定，會因為脂質的排列情形和脂質中所嵌入的膽固醇含量使得細胞膜厚度有稍微變化²。在細胞膜上的脂質是以脂雙層 (lipid bilayer) 的形式排列，脂質的極性端朝外部，與水靠近。極性端的部分可分成：磷脂酸 (phosphatidic acid, PA)、磷脂醯膽鹼 (phosphatidyl choline, PC)、磷脂醯乙醇胺 (phosphatidyl ethanolamine, PE)、磷脂醯絲氨酸 (phosphatidyl serine, PS)、磷脂醯肌醇 (phosphatidyl inositol, PI) 與磷脂醯甘油 (phosphatidyl glycerol, PG)，其中有帶電荷的為磷脂醯絲氨酸、磷脂醯肌醇和磷脂醯甘油。在哺乳細胞的外層膜主要是由磷脂醯膽鹼、鞘磷脂 (sphingomyelin)、磷脂醯乙醇胺和膽固醇所構成，內層主要是由磷脂醯乙醇胺和磷脂醯絲氨酸構成，在正常生理 pH 值的情況下哺乳細胞的外層膜是呈現電中性；相對於哺乳細胞，細菌的外層膜則主要是有帶負電的磷脂質如磷脂醯甘油所構成³。

脂雙層中鉗入的蛋白質提供了細胞膜功能，例如通道 (channel)、受器 (receptor) 和運輸 (transport) 等。細胞膜的功能很多，最基本功能就是隔離細胞質與細胞外的環境，且形成一個可通透的膜層；細胞內與外在環境的能量、物質和訊息交換也是透過細胞膜控制⁴⁻⁶。膜上的蛋白提供了細胞膜的功能，許多重要的生理過程例如細胞識別、細胞免疫、神經傳導與代謝調控等與細胞膜相關，細胞膜上的膜蛋白也提供了細胞與細胞之間的溝通。細胞膜的物理與化學特性主要由脂質做調節，流動性是脂質重要的物理特性，維持一定的流動性才能使細胞膜功能發揮^{7,8}。

1-1-2 細胞膜流動性

細胞膜流體鑲嵌模型在 1972 年被提出⁹，對於後來人類思考細胞膜的組織、物質通透和細胞膜分子側向擴散性質是一個偉大的啟發⁷。

細胞膜的流動性是細胞膜的重要特徵，合適的流動性對生物膜表現正常功能具有十分重要的作用；許多細胞功能例如能量轉換、物質運送、信息傳遞、細胞分裂、細胞融合、胞吞、胞吐以及激素作用等都與細胞膜的流動性相關。維持適當的細胞膜流動性對於細胞來說是非常重要的，例如巨噬細胞在吞噬外來物時，適當的膜流動性對於吞噬量是有幫助的；在正常膜流動速度範圍內，膜流動速度越快其吞噬效果越佳¹⁰。膜蛋白在膜上側向移動 (lateral diffusion)，與細胞分裂時能有適當的分離有關⁸。細胞膜流動性的快慢會影響膜蛋白的功能，當膜流動性改變可能會造成膜蛋白功能失效⁸。

細胞膜流動性的快慢可以分成兩個部分因素影響，一是外在因素，另一是細胞膜成分因素。外在如溫度增加會使膜流動性增快，壓力增加則使膜流動性變慢，脂質極性端造成的 pH 變化也會使流動性改變。細胞膜成分因素例如膽固醇、鞘磷脂、蛋白質與脂質比例、碳鏈飽和與不飽和比例和碳鏈長度，以上因素的增加都會造成流動性的變慢^{1, 11, 12}。膜流動性與細胞膜成分有極重要的關係，當細胞膜處於流動態時，碳數一樣的脂質，不飽和鍵數量較多的脂質流動速度較快；而當不飽和鍵數量相同或是沒有不飽和鍵時，碳數越短的脂質流動速度較快；碳數短比不飽和鍵增多造成的流動性改變較大。此外，分子排列的緊密度也會影響細胞膜流動速度。

在生物系統中，維持細胞膜正常的流動性是維持脂質飽和與不飽和鍵的平衡。細胞膜流動性的快慢與其脂質成分有極大的關係，細胞膜在相轉變溫度之下時處於液晶態，膜上的脂質排列整齊 (order)；但是當環境高於膜相轉變溫度時，細胞膜是處於流動態，膜上的脂質排列較零亂 (disorder)。增加細胞膜上脂質的不飽和鍵數量與減短脂質的碳長鏈都能降低細胞膜的相轉變溫度，在一些變溫動物或是植物細胞為了在低溫下維持細胞膜流動，則會改變本身脂質的結構使其相轉變溫度維持在外界溫度之下，此現象稱為恆黏適應性 (homeoviscous adaptation)⁵。

1-2 活性氧化物質

1-2-1 活性氧化物質生成途徑

活性氧化物質 (reactive oxygen species, ROS) 是指含有氧分子，容易與其他物質發生反應的物質，其中含有自由基的活性氧化物質較容易造成生物體系統傷害。適當的活性氧化物質是細胞發揮正常功能所必需的，例如生物體內對付外來入侵物質、細胞間信息傳遞、精蟲的頂體反應和精卵結合細胞生長調節等。但是在活性氧化物質過量的情況下，生物體內的抗氧化基機制無法去除過多的活性氧化物質，將會造成細胞膜、DNA 和蛋白質的損傷，並且導致相關疾病發生。

活性氧化物質的生成可從外界與生物體內來區分，外界如 UV、酒精、輻射或藥物等都是生成活性氧化物質的來源，生物體則主要是從粒線體、酵素作用和金屬的催化反應為主要來源¹³。

在生物體中常見的活性氧化物質為超氧自由基 (superoxide, $O_2^{\cdot-}$)、過氧化氫 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 和氫氧自由基 (hydroxyl radical, OH^{\cdot})。超氧自由基雖然有帶一個自由基，但是對於生物體的傷害卻不嚴重；超氧自由基在自然環境中很容易發生氧化還原，會和金屬離子反應，在生物體內也是生成過氧化氫的來源之一。過氧化氫屬於氧化劑，在生物體中過氧化氫是多種氧化物質的來源，和金屬離子反應則會生成氫氧自由基，和過氧化氫酶 (catalase) 反應形成水；只有在高濃度過氧化氫對細胞有傷害，在一般濃度下過氧化氫如果不與金屬離子反應，對於生物體的傷害是很小的。氫氧自由基含有不成對電子，半衰期短，是反應性極高的氧化物質。不成對電子容易從其他物質如脂質、DNA 或蛋白質搶走氫離子，造成結構改變；對於細胞膜，可能造成脂質過氧化甚至是造成膜上蛋白質與蛋白質交聯，使膜蛋白失去功能。氫氧自由基的半生期極短 (約 10^{-8} 秒)¹⁴，生成之後能夠擴散的範圍極小 (約 $10\ \mu\text{m}$)，但是一旦被氫氧自由基接觸，則會造成一定的傷害^{15,16}。

1-2-2 活性氧化物質對流動性的影響

細胞膜是活性氧化物質反應的主要目標之一¹⁷，由於細胞膜上含有大量的不飽和脂質，容易受到氧化物質反應之後造成脂質過氧化；一旦發生了脂質過氧化之後，可能會減少不飽和鍵的含量或是產生丙二醛等副產物¹⁸，使脂質結構改變，進而影響細胞膜的流動性質。

在文獻上針對脂質過氧化後造成細胞膜流動性變化有許多不一致的結果。大多數提出的研究結果是加入氧化劑形成脂質過氧化後，造成流動性變慢¹⁹⁻²⁹，但是也有人提出在細胞膜在加入氧化劑之後流動速度會變快³⁰⁻³²。有文獻提出在精蟲的不同部位做膜流動性的測量，發現不同部位受到氧化劑作用之後，其流動性的變化不一致³³。在文獻上決定細胞膜流動性的方法大多是利用電子自旋共振與螢光極化法，這些測量方法不是直接偵測細胞膜脂質的流動，而是利用細胞膜上的脂質之間排列緊密程度來推測細胞膜流動性質，可能是造成脂質過氧化後細胞膜流動性沒有一致結果的原因。



1-3 測量流動性方法介紹

測量細胞膜流動性的方法，目前文獻上使用下列幾種方法做為測量：螢光各向異性 (fluorescence anisotropy)、螢光極化法 (fluorescence polarization)、電子自旋共振 (electron spin resonance, ESR)、螢光漂白再恢復 (fluorescence recovery after photobleach, FRAP)、單分子影像追蹤 (single particle tracking, SPT) 和螢光相關光譜 (fluorescence correlation spectroscopy, FCS)。我們將針對這幾種測量方式做簡單原理介紹：

1. 螢光各向異性和螢光極化法

螢光各向異性和螢光極化法通常使用染料 1,6-Diphenylhexatriene (DPH) 在膜上做標定。DPH 的結構是非極性、類似柱狀的對稱性，且由許多反式的烯類構成。DPH 會嵌在膜當中，在膜上時會讓自己的結構傾向與脂質的碳鏈平行。在測量螢光的時候，光源前加上極化片 (polarizer) 以產生一特定極化方向的激發光，使 DPH 分子被光源激發之後分子能夠形成一致的特定方向排列；隨著膜上脂質碳鏈因流動狀態不同，排列方向與有序度也不同，DPH 分子傾向於平行脂質碳鏈位置而有不同方向的翻轉。最後在偵測器前放置極化片，測量 DPH 分子在不同方向的翻轉之後，平行與垂直激發光的螢光強度，再換算成參數³⁴：

$$\text{Fluorescence anisotropy: } A = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}} \quad (1)$$

$$\text{Fluorescence polarization: } A = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + I_{\perp} G} \quad (2)$$

$I_{//}$ 、 I_{\perp} ：在平行與垂直方向測量到的螢光強度

G：系統參數

根據此參數的大小判斷細胞膜流動性的快慢，值越大代表流動速度越慢，值越小代表流動速度越快。當細胞膜處於高流動狀態時其脂質碳鏈排列較不緊密且沒有一定的排序，碳鏈整體沒有一定的方向，所以 DPH 在平行與垂直於激發光極化方向的螢光強度幾乎相同；換算參數會得到一個極小值，所以從參數上可以判斷細胞膜的流動性質。

2. 電子自旋共振

電子自旋共振是在膜上標定自旋脂肪酸偵測劑 (spin fatty acid probe)，常用的是 5-Doxyl-stearic acid (5-DS) 或 12-Doxyl-stearic acid (12-DS)，這種偵測分子的特性為結構上有一碳長鏈，一端含有 NO 官能基；官能基上含有一個穩定自由基，使偵測分子在各個位置皆能被偵測到。測量時改變極化方向，從測量到的 T 張量換算成排列參數 (order parameter)³⁵：

$$S = \frac{T_{//} - T_{\perp}}{T_{zz} - 0.5(T_{xx} + T_{yy})} \quad (3)$$

$T_{//}$ 、 T_{\perp} ：平行與垂直極化方向測得的 T 張量

T_{xx} 、 T_{yy} 、 T_{zz} ：NO 分子在三個維度的 T 張量

根據排列參數大小判斷流動性的快慢，值越大代表流動性變慢，其原理與螢光極化法測量的方法類似，細胞膜處於流動狀態脂質排列較無一定的方向性，水平與垂直方向的強度會較接近，排列參數較小。

3. 螢光漂白再恢復

螢光漂白再恢復常使用來觀察膜上蛋白的流動，在欲觀察流動性質的樣品上標定染料，先利用雷射或高強度的光源將部分區域的螢光破壞使其光漂白 (photobleach)。再觀測因為整體的流動，周圍的螢光分子會流至光漂白區域，使光漂白區域螢光再恢復 (recovery)。利用式子(4)去擬合 (fitting) 螢光漂白的區域 (region of interesting, ROI) 螢光隨時間的變化，得到整體擴散係數³⁶，得知細胞膜流動性³⁷。

$$I(t) = I_{\infty} \left(1 - \sqrt{\frac{s}{s + 4\pi Dt}} \right) \quad (4)$$

I_{∞} ：無限久時間的螢光恢復強度

s ：螢光漂白範圍

D ：擴散係數

4. 單分子影像追蹤

單分子影像是在膜上標定極少量的染料，利用高靈敏度的電荷耦合元件 (charge couple device, CCD) 記錄在短時間內螢光染料的影像，利用影像結果來追蹤染料在膜上的流動性質^{37, 38}。

5. 螢光相關光譜

在細胞膜上標定極少量的類脂質螢光染料，觀察極少螢光分子進出雷射聚焦時形成的有限觀測體積，針對其螢光分子造成的螢光擾動，將螢光擾動帶入自相關函數，運用訊號間的相關性，一致性將訊號加權放大；在數學上利用相關函數表示成 $G(\tau)$ ，隨時間的螢光變化強度 $F(t)$ ，其自相關函數定義為式子(5)。經計算之後可以求得一隨著時間增長相關性衰減的曲線，此曲線則是螢光相關曲線^{37, 39}

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t+\tau)F(t) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (5)$$

利用數學式子(6)去擬合自相關函數曲線，在相關值一半的所對應到的相關時間即為染料在細胞膜上的擴散時間，代入式子(7)可換算出染料的擴散係數

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left[1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right]^{-1} \quad (6)$$

$$\tau_{diff} = \frac{r_0^2}{4D} \quad (7)$$

這些測量膜流動性的方法在使用上有幾個限制：

(1) 無法對於擴散係數做直接定量：螢光極化法和電子自旋共振觀察流動性是在觀測分子不同極化方向測量，將測量強度換算成參數，利用這個參數變大或變小來判斷流動性的變化，無法直接得到擴散係數。

(2) 必須使用大量的螢光染料或標定物 (> 1 μM)：螢光極化法、螢光漂白再恢復技術和電子自旋共振需要標定大量螢光染料或標定物，而螢光染料或有機分子本身具有毒性，對於細胞來說，大於 1 μM 的螢光染料或有機分子除了對細胞環境是大量的外來物

入侵，更有可能會直接傷害細胞，造成細胞死亡。

(3) 無法觀察側向移動資訊：在細胞膜上蛋白質在膜上的移動膜是主要是側向移動，利用螢光極化性或電子自旋共振係觀察脂質分子的排列，得知膜的流動情形，無法觀測到膜側向移動的資訊。

(4) 容易受到生物自體螢光干擾：螢光相關光譜標定的極少染料螢光分子進出觀測體積造成的螢光擾動，而生物體本身的自體螢光可能會干擾判讀螢光染料分子擾動情形，造成結果上的誤差。

(5) 單分子影像是利用影像方法分析，由於影像紀錄需要一定的積分時間，在液晶態的膜流動速度比影像紀錄的時間還快，無法判斷在這個範圍內染料的移動路徑，所以單分子大多是應用在凝膠態的膜觀察，與真實細胞膜的流動形態不同。



1-4 脂質體

脂質體 (liposome) 1964 年被研究發表，之後常被利用作為研究細胞膜的模型。脂質體是以磷脂質構成，與細胞膜基本組成脂質類似，整體結構上也類似細胞膜是以脂雙層形式存在；細胞膜含有的物理特性在脂質體上都存在，例如膜流動性、通透性和相轉換等⁴⁰，所以脂質體常被使用做為細胞膜物理性質研究模型。

利用脂質體作為研究細胞膜的模型的優點在脂質體的成分單純。細胞膜組成除了脂質外還有蛋白質、醣類的存在，如果僅研究單純的細胞膜的單一性質，真實細胞膜研究可能會因為其他物質存在造成干擾。如果要探討結膜構變化，細胞膜上不同部位成分不相同，則無法專一的探討脂質結構變化的趨勢。而脂質體大多是利用單一成分的脂質體所構成，對於特定脂質的探討較有幫助。



1-5 研究動機與目標

(1) 在脂質過氧化後對於膜流動性的影響有許多不一致的結果：細胞膜流動性對於細胞要維持正常功能非常重要，然而細胞膜容易受到活性氧化物質而發生脂質過氧化，脂質過氧化則會影響細胞膜流動性，可能造成細胞膜功能喪失。在之前文獻對於脂質過氧化造成細胞膜流動性有許多不一致的結果，可能是因為研究方法限制與研究系統的複雜，使得結果不一。在本實驗將利用螢光相關光譜，觀察成分單純的脂質體在脂質過氧化後膜流動性變化。

(2) 較少同時探討脂質過氧化後結構變化與膜流動性變化之間的關係：在之前文獻上較少同時探討脂質過氧化後膜流動性與結構之間的關係，而我們將同時利用螢光相關光譜和拉曼光譜，測量脂質過氧化後膜流動性與結構變化，且探討流動性與結構變化之間的關係。

(3) 探討抗氧化劑對於脂質過氧化造成膜流動性的影響：生物體內含有多種抗氧化劑如維他命 C、維他命 E、過氧化氫酶與超氧歧化酶等等。這些抗氧化劑的功能皆不同，有些是扮演酵素的角色，抑制氧化劑生成或是與氧化劑競爭反應；有些抗氧化劑是有捕捉自由基功能，在自由基攻擊脂質之前先清除自由基；有些抗氧化劑是破壞脂質過氧化的鏈連鎖反應⁸。在本實驗中將使用人體內重要抗氧化劑維他命 C (水溶性) 和維他命 E (脂溶性)，觀察因為氫氧自由基造成細胞膜流動性改變或是結構改變，是否有因為抗氧化劑的加入造成抑制或是其他改變。

(4) 膽固醇對於脂質過氧化造成膜流動性的影響目前也尚未有人詳細的探討：膽固醇在細胞膜中扮演著重要的角色，主要功能為鞏固細胞膜結構與調節細胞膜流動性；對於膽固醇在脂質過氧化後膜結構與膜流動性，目前尚未有人仔細的探討。在本實驗中也在脂質體中加入不同比例膽固醇，讓脂質體能夠與真實細胞膜的結構更相似，同時也觀察含有不同比例膽固醇的脂質體在加入氫氧自由基後膜流動性與結構改變之間的關係。

在本實驗中將利用脂質體模擬細胞膜系統，加入氧化物質後利用螢光相關光譜觀察脂質膜流動性和拉曼光譜觀察脂質體結構改變；同時我們也加入膽固醇和抗氧化劑，比較其在加入氧化物質後是否有造成脂質過氧化後膜流動性的差異。

第二章 研究方法與原理

2-1 螢光相關光譜

自從 1972 年 Magde D. 等人開發出螢光相關光譜技術³⁹後，此技術就常被應用於觀察分子在水溶液中之運動行為，之後更應用於觀察細胞內酵素之動態行為。螢光相關光譜發展至今已經三十多年，其技術上從一開始的自相關到後來發展了異相關，解析度也配合光學解析度的技術增進，使得應用上更為廣闊，可以測量濃度、移動性、粒子尺寸、結合 (binding)、體外 (in vitro) 與體內 (in vivo) 的實驗。螢光相關光譜非常適合觀察生物體內動力學研究，目前應用範圍也非常的廣。

螢光相關光譜開發到現在已與許多技術結合，使螢光相關光譜在生物系統上的應用更加多元：1993年將共軛焦系統與螢光相關光譜 (confocal-FCS) 結合，改善了實驗系統靈敏度與減低背景雜訊⁴¹。1995年雙光子螢光相關光譜 (two-photon fluorescence correlation spectroscopy)⁴²發明，雙光子激發光譜利用非線性光學原理，讓只在雷射聚焦焦點處的螢光分子被激發，改善了在焦點處外的雜訊干擾。1997年單光子雙色螢光異相關光譜 (one-photon dual-color cross-correlation spectroscopy)⁴³ 和2002年雙光子螢光異相關光譜 (two-photon dual-color cross-correlation spectroscopy)⁴⁴的研發，對於觀察分子之間的動力學研究開啟另一個研究方向。掃描螢光相關光譜 (scanning-FCS)在1986年開始發展⁴⁵，藉由雷射光束掃描樣品或是樣品的移動使之通過雷射光束，觀察偵測體積內的螢光強度擾動，與標準的螢光相關光譜相同，觀察相關函數的振幅可以推論螢光分子個數。將相同的想法應用在影像相關光譜 (image correlation spectroscopy)，影像相關光譜在1993年被報導⁴⁶，將原先是使用時間上的相關性，以空間區域間的相關性來換算。1981年全反射螢光相關光譜 (TIR-FCS) 的發明⁴⁷，對於光學的縱向解析度是一大躍進；由於只觀察200 nm內的螢光擾動，對於觀察薄膜表面變化是一大利器。2005年受激發射損耗螢光相關光譜 (STED-FCS) 的問世⁴⁸，將光學橫向解析度降到次微米程度，對於生物上將推進更小尺寸內的觀察。

1976 年 Elson, E.L. 等人使用螢光相關光譜觀察真實細胞膜上染料的橫向移動⁴⁹。

1977 年 Fahey P. F. 等人首次使用螢光相關光譜觀察在脂質薄膜上的脂質側向移動⁵⁰。1999 年 Jonas Korlac 等人使用螢光相關光譜與共軛焦掃描顯微鏡結合觀察脂雙層結構上因為不同脂質與膽固醇，形成脂質雙層有區域的相分離狀態⁵¹。在 1999 年由 Petra Schuille 等人發表在老鼠嗜鹼性白血球細胞上利用 DiIC-12 標定，利用螢光相關光譜測量真實細胞膜的流動性⁵²。2002 年 Kirsten Bacia 等人在霍亂病毒 AB 兩端各標定不同顏色螢光染料，利用雙色螢光相關光譜觀察霍亂病毒在進入細胞內後，AB 兩端在細胞內不同區域分離的情形⁵³。1998 年 Ulrich Haupts 等人利用螢光相關光譜觀察綠色螢光蛋白的螢光擾動⁵⁴。1998 年 Ulrich Kettling 等人首次發表利用雙色異相關螢光相關光譜即時的觀察酵素動力學行為⁵⁵。2004 年 Kirsten Bacia 等人使用雙光子螢光相關光譜測量活體器官上的腫瘤細胞外的物質，同時觀測分子尺寸不同的樣品在活體腫瘤細胞外含有玻尿酸酶與膠原蛋白酶時的擴散係數表現，此項報導有助於了解研究藥物至腫瘤細胞間的傳遞行為。2009 年 Christian Eggeling 等人將螢光相關光譜與受激發射損耗 (stimulated emission depletion, STED) 技術結合，觀察活體細胞膜上脂質更小區域的動力學行為，為螢光相關光譜的技術推進更細微尺度的觀察⁵⁶。利用自相關螢光相關光譜可觀察生物體內的 pH 值變化、濃度變化、生物分子尺寸變化、環境黏致性和分子與細胞膜結合等，利用異相關螢光相關光譜可觀察生物分子之間的結合或解離、酵素動力學和分子定位 (colocalization) 等。螢光相關光譜用來觀測細胞內的動力學是非常合適的工具。

螢光相關光譜技術利用高倍物鏡及共焦距小孔 (confocal pinhole) 形成的有限觀測體積，觀察並紀錄螢光分子進出此雷射聚焦時造成的螢光訊號擾動。再利用硬體相關計算器 (hardware correlator) 即時計算此時間變化 (time varying) 螢光訊號之自相關函數 (auto-correlation function)。若將隨時間變化的螢光強度表示為 $F(t)$ ，自相關函數表示為 $G(\tau)$ ， τ 為相關時間 (correlation time)，則自相關函數 $G(\tau)$ 可定義為^{57,58}

$$G(\tau) \equiv \frac{\langle F(t+\tau)F(t) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (8)$$

自相關函數為延遲時間的函數，其數值(或稱振幅)會隨著延遲時間衰減。螢光訊號之相關函數曲線亦稱為螢光相關曲線 (correlation curve)。

自相關函數可以有不同的表示法如下:

$$G(\tau) \equiv \frac{\langle F(t+\tau)F(t) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{\langle \delta F(t+\tau)\delta F(t) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} + 1 = \frac{\langle \delta F(\tau)\delta F(0) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} + 1 \quad (9)$$

其中， $\delta F \equiv F(t) - \langle F \rangle$ ，代表在時間 t 時的螢光強度和平均螢光強度 $\langle F \rangle$ 的差異量，也表示螢光強度在某一時間點的時變擾動量。因此， δF 可表示為

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F \rangle = \int d^3\vec{r} I(\vec{r}) Q \delta C(\vec{r}, t) \quad (10)$$

其中 $I(\vec{r})$ 代表激發光強度在空間的分佈； Q 為樣品之螢光激發效率； $\delta C(\vec{r}, t)$ 為樣品濃度之擾動量，為位置及時間的函數。如果假設激發光強度之空間分布為一個高斯函數，則 $I(\vec{r})$ 可表示為

$$I(\vec{r}) = I_0 \exp\left(-\frac{2(x^2 + y^2)}{\omega_{xy}^2} - \frac{2z^2}{\omega_z^2}\right) \quad (11)$$

其中， I_0 代表激發雷射光束在焦點的強度； ω_{xy} 為自聚焦中心開始，光強度下降至 $1/e^2$ 的橫向距離； ω_z 為自聚焦中心開始光強度下降至 $1/e^2$ 的縱向距離。將式子(11)代入式子(10)，再將式子(10)代入式子(9)並簡化後可得

$$G(\tau) = \frac{Q^2 \int_V \int_V d^3r d^3r' I(\vec{r}) I(\vec{r}') \langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}', \tau) \rangle}{(Q \bar{C} \int_V I(\vec{r}) d^3r)^2} + 1 \quad (12)$$

若只考慮單一成分的物质在溶液中的自由擴散，則必須遵照擴散定律

$$\frac{\partial \delta C(\vec{r}, t)}{\partial t} = D \nabla^2 \delta C(\vec{r}, t) \quad (13)$$

將式子(13)帶入式子(12)並簡化後可得當螢光分子在溶液中行布朗運動 (Brownian motion)，在一個有限觀測體積中進出所造成的螢光訊號變化之相關函數為

$$\begin{aligned}
G(\tau) &= \frac{1}{V_{eff}\bar{C}} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{diff}}\right)^{-1} \left[1 + \left(\frac{\omega_{xy}}{\omega_z}\right)^2 \frac{\tau}{\tau_{diff}}\right]^{-1/2} + 1 \\
&= \frac{1}{N} \left(1 + \frac{4D\tau}{\omega_{xy}^2}\right) \left(1 + \frac{4D\tau}{\omega_z^2}\right)^{-1/2} + 1
\end{aligned} \tag{14}$$

其中 $V_{eff} \equiv \pi^{3/2} r_0^2 z_0$ 為有效觀測體積； N 為有限觀測體積內的平均分子數目； \bar{C} 為溶液平均濃度； D 為分子之擴散係數； ω_{xy} 及 ω_z 之定義如前述； $\tau_{diff} \equiv \frac{\omega_{xy}^2}{4D}$ 為橫向擴散時間。

當分子運動被侷限在二維空間，例如脂質分子在細胞膜上流動，則分子只能以水平運動的方式進出觀測體積。其相關函數可將式子 (14) 中的 z 趨近於 0 得到，表示式如下

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left[1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right]^{-1} \tag{15}$$

圖 2-1 的示意圖顯示了螢光分子在三維空間自由運動以及侷限在二維空間上移動的差異，也顯示了此兩種運動情形之相關函數。在本實驗中，我們先量測螢光分子在水溶液中的運動，由已知螢光分子的擴散係數，再將實驗得到的相關函數利用式子 (13) 作擬合，便可決定系統參數 r_0 。接著再決定嵌在脂質膜上的染料分子的相關函數並用式子

(14) 作擬合得到相關時間。最後再將相關時間帶入 $\tau_{diff} \equiv \frac{r_0^2}{4D}$ 得到染料分子在膜上運

動之擴散係數，進而得知脂質膜的流動性。有別於之前介紹的幾種方法，螢光相關光譜只需要加入極少量的染料分子 (~1 nM) 便可以直接得到脂質膜的流動性，避免了外加染料分子對脂質膜性質的可能影響。

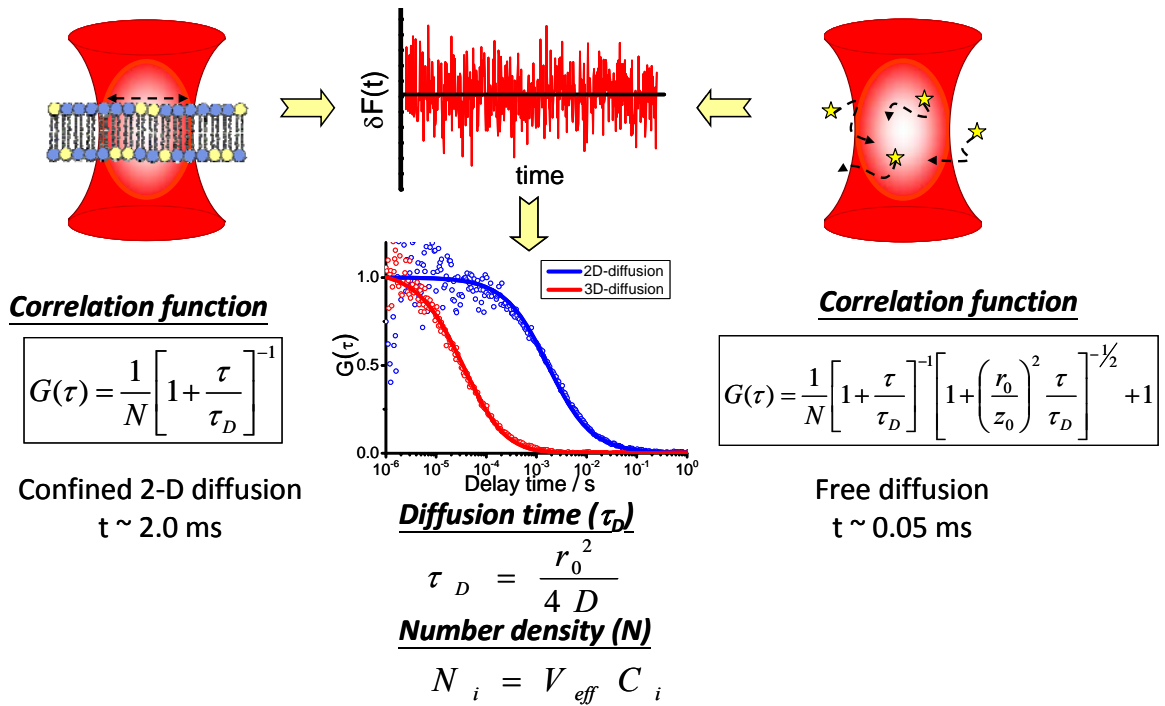


圖 2-1 螢光相關光譜觀察螢光分子在二維和三維空間移動的示意圖

螢光分子在三維空間自由進出或是侷限在二維空間上移動，其螢光相關光譜曲線可以使用不同的數學式子去做擬合，同時可以發現同一個分子在不同環境做移動時會造成流動速度上有明顯的差異。

2-2 拉曼光譜

當光子與分子之間在碰撞的過程中發生了能量轉換導致散射光子頻率與波長發生變化，這種散射稱為拉曼散射。雷射將分子的電子激發到一個虛擬能階 (virtual state) 之後，電子自虛擬能階分別掉到不同振動能階上，反應出這個分子的不同振動能階資訊。從拉曼光譜中可以得到分子振動能階，提供化學資訊，在測量時比較於紅外光光譜，水的訊號干擾較小，所以拉曼光譜更適合應用在生物方面的測量⁵⁹。

在本實驗中我們利用拉曼光譜技術決定脂質體在受到氧化物質的作用之後之結構變化，並探討結構變化與膜流動性的變化之關係。實驗中我們利用雷射光鉗技術鉗住單一脂質體⁶⁰，並利用此雷射產生脂質體之拉曼散射觀察脂質分子受到氧化物質的影響之結構變化。



第三章 研究方法與實驗

3-1 研究方法

本實驗將使用螢光相關光譜觀察細胞膜的流動性，同時配合拉曼光譜即時觀測脂質體隨時間的結構變化。如圖 3-1 所示。

在脂質體上標定類脂質螢光染料，取 20 μm 大小的脂質體做觀察，螢光分子進出雷射聚焦所有體積造成擾動，螢光擾動代入自相關函數，從自相關函數的擴散時間求得染料在脂質體膜上的擴散速度，得知脂質體膜流動性；同時利用拉曼光鉗系統鉗住約 5 μm 大小的脂質體，在雷射光激發之後，在拉曼光譜結果顯示脂質分子本身不同的振動模式，從光譜強度變化得知脂質結構變化。

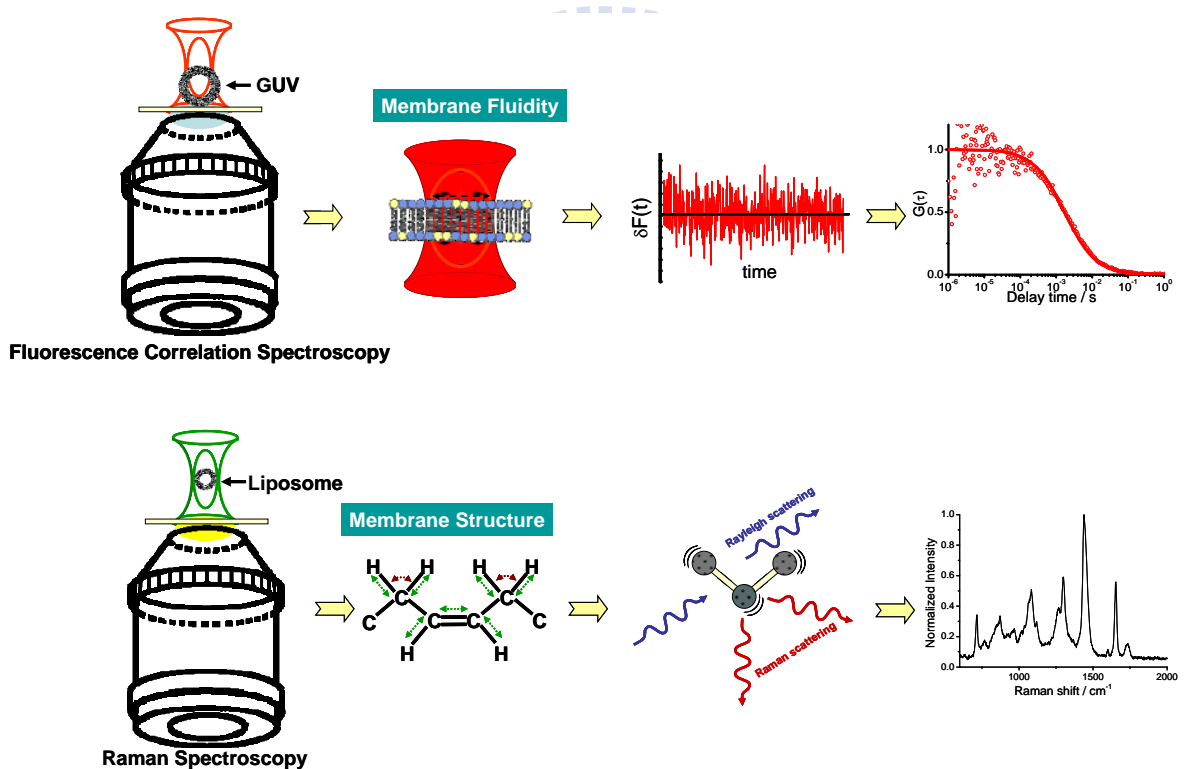


圖 3-1 研究方法示意圖

3-1-1 藥品

1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (DOPC); Avanti Polar Lipids, U.S.A.

Cholesterol; Sigma Aldrich, U.S.A.

1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate (DiD); Molecular Probes, U.S.A.

1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI); Molecular Probes, U.S.A.

3,3'-dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate (DiO); Molecular Probes, U.S.A.

Alexa Flour 633; Molecular Probes, U.S.A.

Glucose; Sigma Aldrich, U.S.A.

NaCl; Sigma Aldrich, U.S.A.

Choloform; J.T. Baker, U.S.A.

Methanol; J.T. Baker, U.S.A.

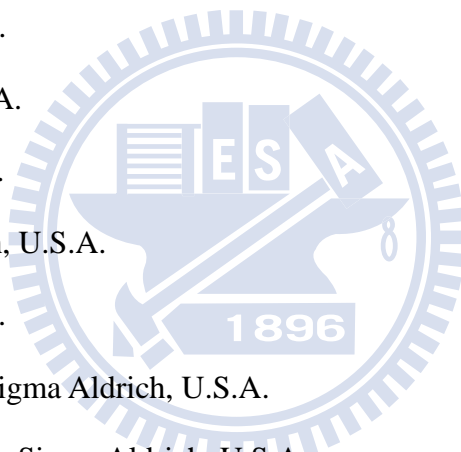
FeSO₄•7H₂O; Sigma Aldrich, U.S.A.

H₂O₂; Sigma Aldrich, U.S.A.

α-Tocopherol (vitamin E); Sigma Aldrich, U.S.A.

L-ascorbaic acid (vitamin C); Sigma Aldrich, U.S.A.

脂質、膽固醇和抗氧化劑結構如圖 3-2。



3-1-2 微脂體製備

本實驗所使用的脂質體做法使用電生成法 (electroformation)⁶¹，脂質體電生成法在 1986 年發明後，對於生成大尺寸的脂質體的方法有很大的進展，也是最常被利用來生成大尺寸脂質體方法。脂質在使用前存放於攝氏-20 度，在使用前放到回到室溫在開啟使用。脂質溶入氯仿/甲醇 (體積比 9/1) 的溶劑中 (5mg/mL)，製作脂質體前先與染料混合 (拉曼實驗不加入染料)，共軛焦掃描影像使用的染料濃度與脂質莫耳數比為 1 比 1000，螢光相關光譜使用染料濃度與脂質的莫耳數比為 1 比 100000。氧化銦錫 (indium tin oxide, ITO) 玻璃在使用之前以甲醇擦拭過後，分別在兩片氧化銦錫玻璃導電面上用銅膜膠帶固定電線當作電傳專用，之後分別在兩片氧化銦錫玻璃導電面上各滴上 20 μ L 脂質或脂質染料混合的溶液，使其均勻分布在氧化銦錫玻璃上；待其有機溶劑揮發之後，讓氧化銦錫玻璃置於真空環境 1 小時。之後將氧化銦錫玻璃從真空環境取出後，在氧化銦錫玻璃上放上 O 環 (O-ring) 當做間隔，在 O 環中加入 0.2 M 葡萄糖溶液，再將兩片氧化銦錫玻璃上有脂質層的面對夾，使脂質都能與葡萄糖溶液接觸後，將電線接上波型產生器 (function generator)。啟動波型產生器，並將參數調整為 10 赫茲、正弦波、3 伏 (peak to peak)，通電三小時後取出脂質體溶液放入深褐色的小離心管中待實驗時使用。製作流程見圖 3-3。

在膽固醇的實驗，將膽固醇分別與脂質的莫耳數比為 5%、10%、20%、25%、33% 和 50% (質量比為 2.5%、5.1%、10.9%、14%、19.4% 和 32.9%)，在脂質體要溶解時加入，一起製備成脂質體。

由於氧化銦錫玻璃在實驗後可能會有有機物或是髒汙殘留，為了避免這些髒汙會影響脂質體的生成或是環境，在每次要使用氧化銦錫玻璃前會依造下列清洗溶劑與浸泡時間配合超音波清洗機清洗：

- (1) 玻璃清潔劑 10 min；
- (2) 丙酮 10min
- (3) 玻璃清潔劑 10 min
- (4) 純水 10 min
- (5) 異丙醇 10 min

3-1-3 氧化物質與抗氧化劑配法

在實驗中所使用的氧化物質有氫氧自由基 (OH^\bullet) 與過氧化氫 (H_2O_2) 兩種，反應持續一個小時，在流動性的實驗觀察反應前與反應後流動性的差異，在結構上的變化則是觀察隨時間變化。

過氧化氫的實驗在使用時將 35% (約 15.834 M) 的過氧化氫稀釋成 3 mM，再取等量體積的脂質體溶液與 0.1 M 氯化鈉溶液混合，過氧化氫最終濃度為 1 mM。

氫氧自由基的生成方法使用芬頓反應 (Fenton reaction)⁶²，利用 Fe^{2+} 與 H_2O_2 反應。



取等量體積脂質體溶液、0.15 mM 硫酸亞鐵、1.5 mM 過氧化氫混和可生成 0.05mM 的氫氧自由基。

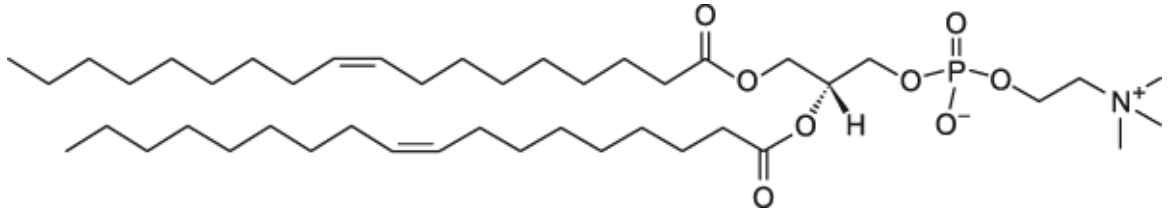
在實驗中所使用的抗氧化劑有維他命 C 和維他命 E 兩種，反應持續一個小時，在流動性的實驗觀察反應前與反應後流動性的差異，在結構上的變化則是觀察隨時間變化。

維他命 C 為水溶性的抗氧化劑，在實驗的時候先配成 4 mM 的維他命 C 溶液，與等量體積的脂質體溶液先預混合後，在與等量體積的 0.2 mM 硫酸亞鐵、2 mM 過氧化氫混合，維他命 C 最終濃度為 1 mM，氫氧自由基最終濃度為 0.05 mM。

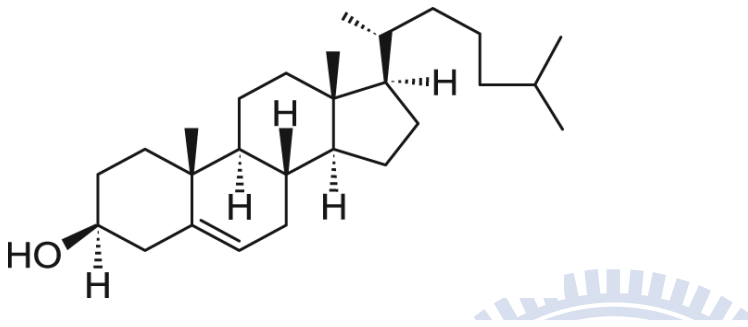
維他命 E 為脂溶性的抗氧化劑，在實驗時須在脂質體生成時與脂質溶液先混合，再利用電生成法生成脂質體。在生成脂質體時加入 0.25 mM 維他命 E，生成的脂質體取等量體積脂質體溶液、0.15 mM 硫酸亞鐵、1.5 mM 過氧化氫混和，氫氧自由基最終濃度為 0.05 mM。

實驗為求對照組的條件相同，所以過氧化氫、硫酸亞鐵、維他命 C 和維他命 E 在配製與稀釋均使用 0.1 M 的氯化鈉溶液。

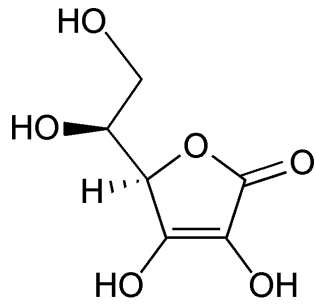
(a)



(b)



(c)



(d)

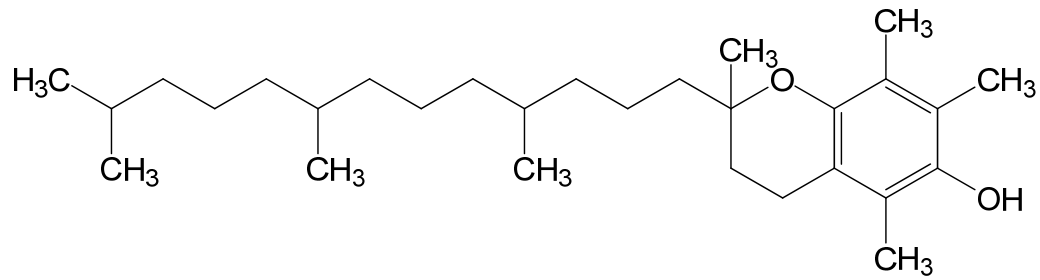


圖 3-2 藥品結構

(a) DOPC; (b) cholesterol; (c) vitamin C; (d) vitamin E

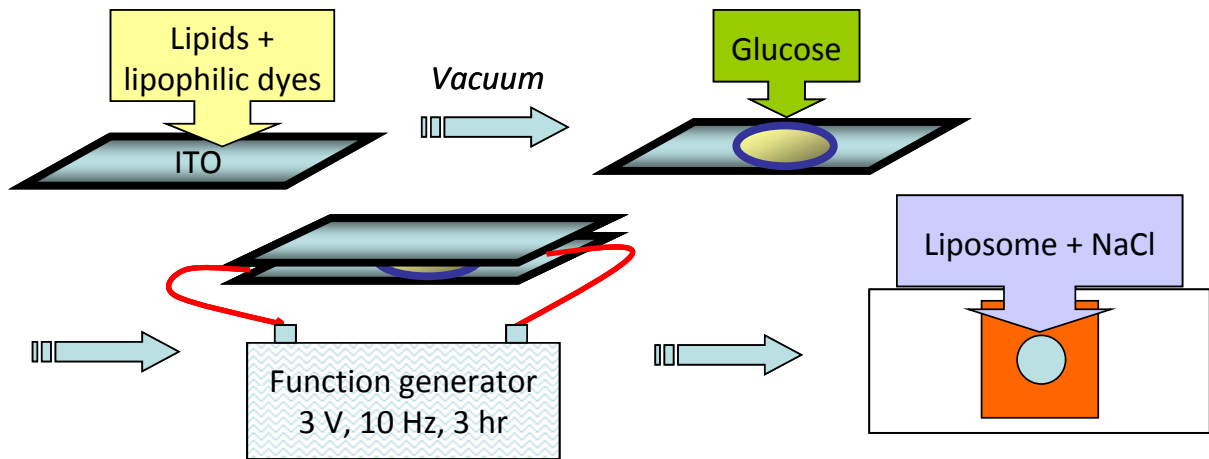


圖 3-3 脂質體製作流程

脂質溶入氯仿/甲醇（體積比 9/1）的溶劑中（5mg/mL），製作脂質體前先與染料混合（拉曼實驗不加入染料），共軛焦掃描影像使用的染料濃度與脂質莫耳數比 1:1000，螢光相關光譜使用染料濃度與脂質莫耳數比 1:100000。之後分別在兩片氧化銻錫玻璃導電面上各滴上 20 μL 脂質或脂質染料混合的溶液，使其均勻分布在氧化銻錫玻璃上；待其有機溶劑揮發之後，讓氧化銻錫玻璃置於真空環境 1 小時。之後將氧化銻錫玻璃從真空環境取出後，在氧化銻錫玻璃上放上 O 環當做間隔，在 O 環中加入 0.2 M 葡萄糖溶液，再將兩片氧化銻錫玻璃上有脂質層的面對夾，使脂質都能與葡萄糖溶液接觸後，將電線接上波型產生器。啟動波型產生器，並將參數調整為 10 赫茲、正弦波、3 伏（peak to peak），通電三小時後取出脂質體溶液放入深褐色的小離心管中待實驗時使用。觀察的時候，取 20 μL 的脂質體溶液與 40 μL 氯化鈉溶液加進已黏上玻片的墊片中。

3-2 螢光相關光譜

3-2-1 螢光相關光譜系統架設

在實驗中所使用的螢光相關光譜系統為自行組裝之系統如圖 3-4。激發光是波長 632.8 nm 的氦氖雷射 (1137P; JDS Uniphase, U.S.A.)，利用 ND filter 去調整實驗所需要的雷射功率 (laser power)；在螢光相關光譜系統中，雷射形狀需要形成高斯光束 (Gaussian beam) 激發，所以在光路上加上空間濾波器 (spatial filter)，一方面將雷射光束放大，以填滿物鏡的背面孔徑 (back aperture) 使其配合高數值孔徑 (numerical aperture, N.A.) 的物鏡達到最佳聚焦效果，另一方面空間濾波器可以只讓中間強度較均勻的部分通過，使螢光可以均勻受光。雷射經過兩色濾光片 (dichroic mirror) (FF500/646; Semrock, U.S.A.) 反射進顯微鏡，系統使用倒立式顯微鏡 (IX-71, inverted microscope; Olympus, Japan)，雷射經過浸水式物鏡 (water immersion objective, UPLSAPO 60xW, N.A. 1.2; Olympus, Japan) 激發樣品後螢光延著物鏡往回到原光路上；螢光的波長較雷射光源長，可穿過兩色濾光片。穿過兩色濾光片的光，再經過透鏡聚焦，而聚焦前螢光會通過分光鏡 (50/50 beam splitter) 讓螢光均勻分成兩道之後，同時通過適當波段的濾光片 (HQ680/60m; Chroma, U.S.A.) 以蒐集大量的螢光，再聚焦到共焦針孔上，我們以孔徑 50 μm 取代共焦針孔，目的是為了以營造一個有限的偵測體積，再導入偵測器；在這裡使用雪崩光電二極管 (Avalanched photodiode, SPCM-AQR-15-FC; PerkinElmer, U.S.A.) 做為偵測器，光子訊號會轉為電子脈衝訊號，電子訊號再傳送到時間相關單光子計數器 (Flex02-01D; Correlator, U.S.A.)，再利用時間相關單光子計數器計算出螢光分子的相關情形。雷射與所使用的光學組件與染料光譜見圖 3-5。

3-2-2 系統校正方法

系統校正時使用 1nM 的螢光染料 Alexa Fluor 633 (溶在 PBS 溶液，擴散係數為 $1.35 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$)⁶³。理想的螢光相關光譜系統參數決定於聚焦處體積 (focal volume) 的 r/z 值，理想的值約在 0.17~0.33。在系統的校正上，會先利用移動平台調整光纖收光的位置，粗調到螢光最強的位置後，在細調光纖 z 方向的位置。找到螢光值都沒有太大變化之後就微調物鏡的修正環 (correction ring)。螢光相關光譜對於玻片的厚度非常地靈敏，所以要得到最佳系統參數必須要將修正環作細調，調整到可以得到最佳參數的位置。在做系統調整的時候曾經遇到過 r/z 值為極小 (< 0.0001)，參考文獻後試過下列方法作調整⁵：

- (1) 調整空間濾波器 (spatial filter) 的針孔 (pinhole) 位置：調整針孔的位置使其針孔能發揮最佳功能，針孔位置位於光束聚焦點前會導致光通過的量過少，位於光束聚焦點後面則會因光已經發散而沒有效果，準確位於光束聚焦點才能使針孔效果最佳。
- (2) 調整空間濾波器的透鏡 (lens) 位置，確定光束是平行 (collimator)：因所使用的物鏡需要平行光源才有最佳的聚焦效果。
- (3) 更換空間濾波器的透鏡，使光束的大小改變：我們會在空間濾波器之後放一個 IRIS 來調整光通過的量的大小，如果經過了空間濾波器後光束放大那可以只選擇中間品質較好的光通過。
- (4) 調整進入顯微鏡前雷射光束的大小：進入物鏡的雷射光束大小會影響在利用物鏡聚焦之後光束的形狀，而在文獻上有提到進入物鏡前的雷射雙束在單光子 (single photon) 螢光相關光譜只需比物鏡背面孔徑小一點 (under filled)，而在雙光子 (two photon) 螢光相關光譜則需大於物鏡背面孔徑 (over filled)。
- (5) 更換收光前聚焦的透鏡：因收光的部分是利用光纖代替針孔 (pinhole)，所以螢光光束在經透鏡聚焦時形成的的角度須與光纖配合，利用焦距較短的透鏡會讓聚焦光束的角度較大，反之焦距較長的透鏡會讓聚焦光束的角度較小。
- (6) 將原先在收光會分成兩道光束的雙色鏡 (dichroic mirror) 換成分光鏡 (50/50 beam splitter)：因收光的位置是為了反應物鏡聚焦處的情形，而在光路架設上發現有時後使用雙色鏡會讓光束的形狀變形，所以換成分光鏡有減少光束的形狀變形的現象。
- (7) 更換收光的光纖大小：收光的光纖大小會影響收光的量，測到 r 值太小有可能是光

纖的孔徑太小。

- (8) 調整與光軸平行方向的光纖位置：光纖在光行進方向的位置非常的要求精確，在實驗上需要仔細的調整光纖的位置已達到最佳的系統設定。

本實驗系統已經利用上述方式校正後，測量已知擴散係數染料 Alexa Flour 633（溶在 PBS 溶液） 1nM（diffusion coefficient 為 $1.35 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ）⁶³ 的自相關函數。將測量到

的自相關函數利用式子 $G(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{diff}} \right)^{-1} \left[1 + \left(\frac{r_0}{z_0} \right)^2 \frac{\tau}{\tau_{diff}} \right]^{-1/2} + 1$ 做擬合。擬合結果顯示

系統參數 (r/z) 達 0.18， r_0 為 203 nm，結果如圖 3-6。



3-2-3 實驗步驟

脂質體在測量時，先將中間有直徑 25 mm 孔洞的墊片 (chamber: FW-9; Grace Bio-Labs) 與玻片 (cover glass: Electron Microscopy Science) 黏貼後，加入 0.1 M 40 μL 氯化鈉溶液，再加入脂質體溶液 20 μL 。利用脂質體內外密度與折射率不同，脂質體會沉到玻片上且可以清楚看見脂質體的輪廓。因為要模擬真實細胞大小，所以在實驗時所挑選測量的脂質體的大小選擇在 20~30 μm ；測量時雷射功率約為 47 μW ，每顆脂質體測量 10 次，每次 10 秒，10 次的數據取平均後則為此顆脂質體的數據。在尋找膜的位置，配合使用電動移動平台移動脂質體；測量所使用的軟體為 flex02-01C，隨時間相關單光子計數器 (correlator) 所附軟體。

因為下層膜會受到玻片的影響，所以在實驗中都是觀察上層膜的訊號。先在亮視野 (bright field) 下將脂質體的中心移到雷射光束聚焦的點上，之後切換顯微鏡的轉盤使雷射進入，讓雷射在上層脂質膜聚焦，之後利用光子數和粒子數與擴散時間 (diffusion time) 來決定膜的位置。延著光行進的方向 (縱軸) 對不同位置的脂質體做掃描，從圖 3-6 的結果得知：當找到正確膜的位置會得到 (1) 光子數最高；(2) 粒子數最少 (即螢光相關函數曲線的振幅 (amplitude) 最大，相關值最大)；(3) 擴散時間 (diffusion time) 最短⁶⁴。

在分析經螢光相關光譜所得到的數據時，利用以下三個原則決定這組數據是否可使用：(1) 起始 count rate 至少大於 10000 counts；(2) 只取 count rate 大於 3000 counts 的數據；(3) 10 次的測量其標準差 (standard deviation) 在 10% 內，符合以上三個條件此顆脂質體的結果才使用。

實驗測量結果將利用 $G(\tau) = \frac{1}{N} \left[1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right]^{-1}$ 做擬合 (fitting)。每次做實驗前先測量系統

參數得到當次實驗系統 r_0 值，再將脂質體上測量到的流動時間利用 $\tau_{diffusion} = \frac{r_0^2}{4D}$ 換算成擴散係數做比較。

圖 3-7 是 DiD 在脂質體 DOPC 膜上量到自相關函數，擬合結果所得到的擴散時間 1.57 ms，與三維自相關函數所求得的系統半徑 203 nm，求得擴散係數為 $6.56 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ 。

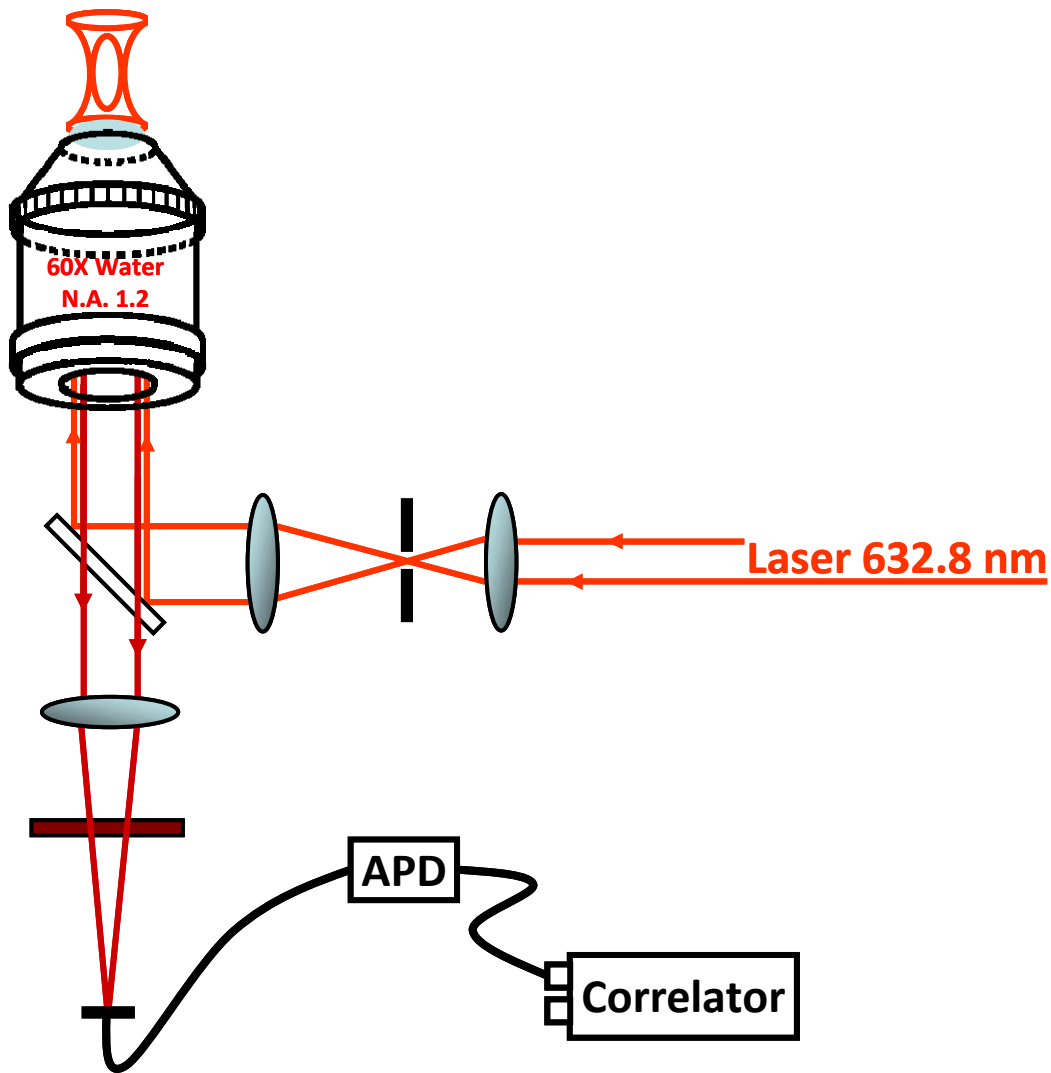


圖 3-4 螢光相關光譜系統架構圖

激發光是波長 632.8 nm 的氦氖雷射 (1137P; JDS Uniphase, U.S.A.)，雷射形狀需要形成高斯光束 (Gaussian beam) 激發，所以在光路上加上空間濾波器 (spatial filter)，一方面將雷射光束放大，以填滿物鏡的背面孔徑 (back aperture) 使其配合高數值孔徑 (numerical aperture, N.A.) 的物鏡達到最佳聚焦效果，另一方面空間濾波器可以只讓中間強度較均勻的部分通過，使螢光可以均勻受光。雷射經過兩色濾光片 (dichroic mirror) (FF500/646; Semrock, U.S.A.) 反射進顯微鏡，系統使用倒立式顯微鏡 (IX-71, inverted microscope; Olympus, Japan)，雷射經過浸水式物鏡 (water immersion objective, UPLSAPO 60xW, N.A. 1.2; Olympus, Japan) 激發樣品後螢光隨著物鏡往回到原光路上。穿過兩色濾光片的光，再經過透鏡聚焦，同時通過適當波段的濾光片 (HQ680/60m; Chroma, U.S.A.) 再聚焦到共焦針孔上，我們以孔徑 50 μm 取代共焦針孔，再導入偵測器雪崩光電二極管 (Avalanched photodiode, SPCM-AQR-15-FC; PerkinElmer, U.S.A.)，光子訊號會轉為電子脈衝訊號，電子訊號再傳送到時間相關單光子計數器 (Flex02-01D; Correlator, U.S.A.)，再利用時間相關單光子計數器計算出螢光分子的相關情形。

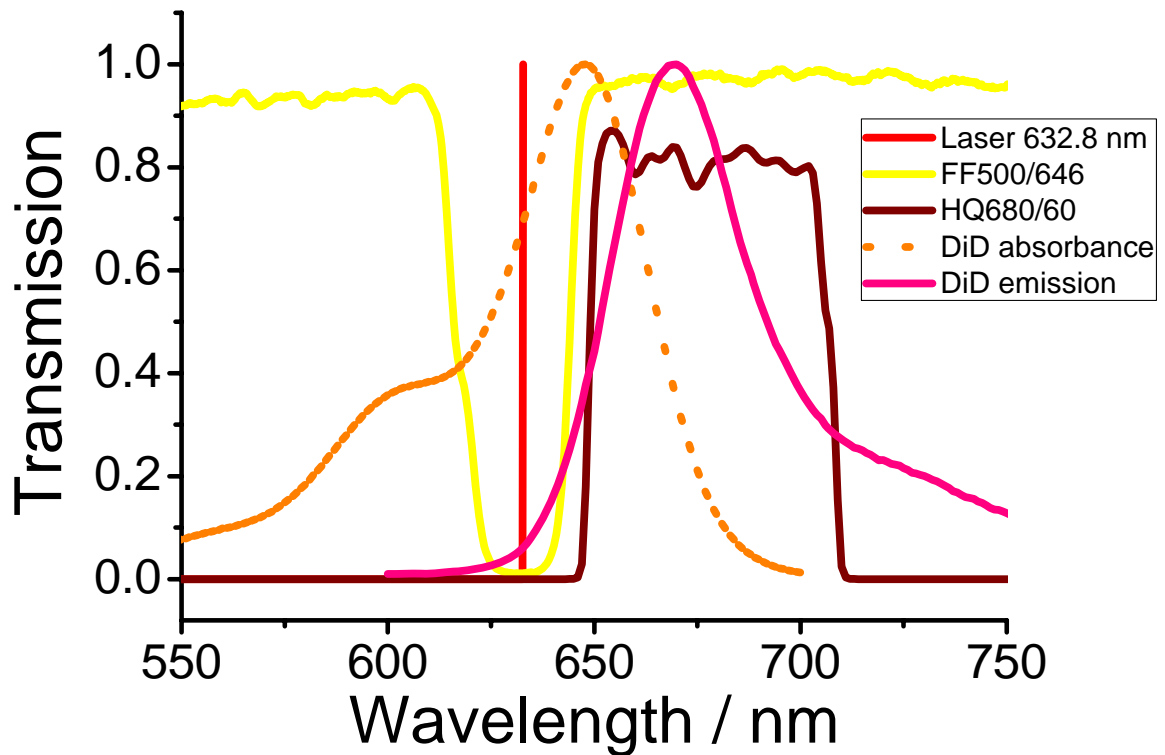


圖 3-5 雷射光源、主要光學組件與螢光染料之特性光譜

激發光是波長 632.8 nm 的氦氖雷射 (1137P; JDS Uniphase, U.S.A.)，雷射經過兩色濾光片 (dichroic mirror) (FF500/646; Semrock, U.S.A.) 反射進顯微鏡，螢光會通過分光鏡 (50/50 beam splitter) 讓螢光均勻分成兩道之後，同時通過適當波段的濾光片 (HQ680/60m; Chroma, U.S.A.) 以蒐集大量的螢光。

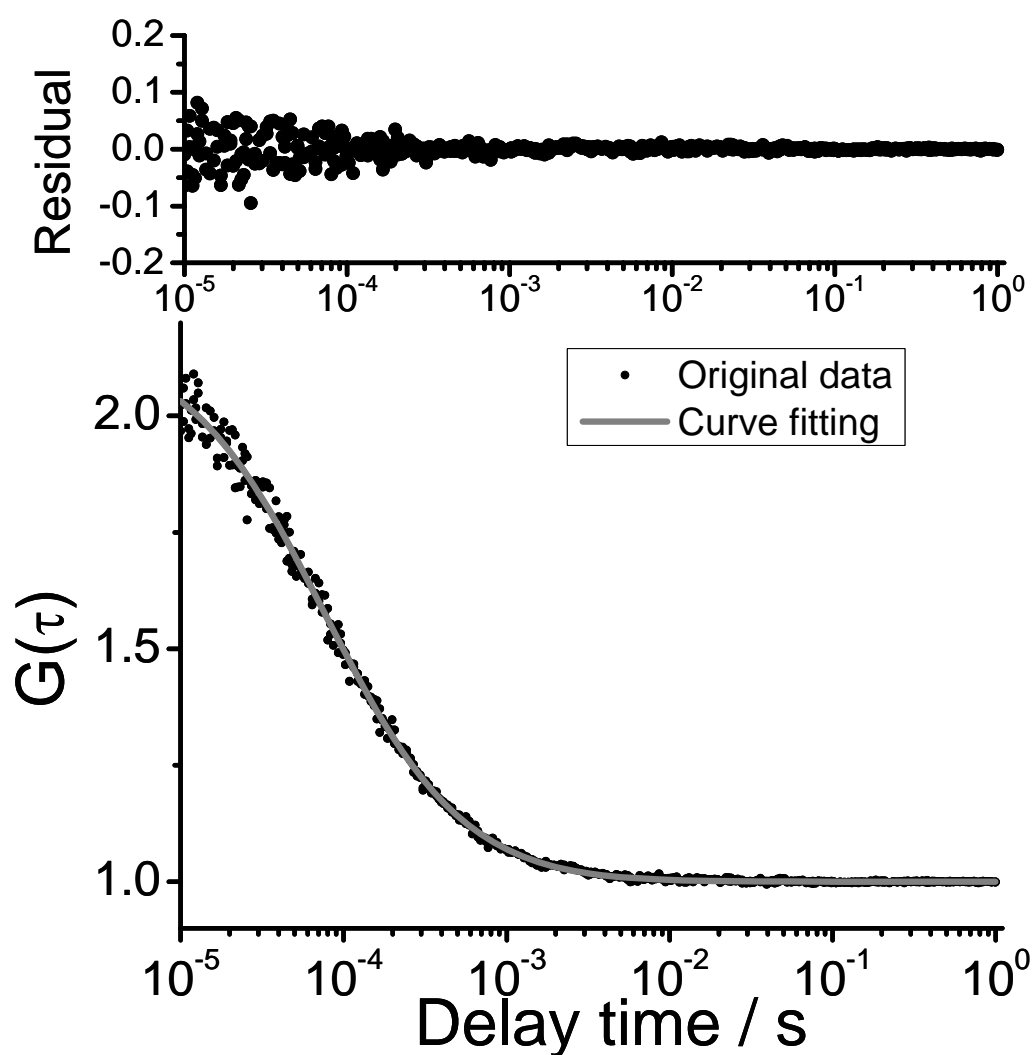


圖 3-6 Alexa 633 在 PBS 溶液中的自相關函數與擬合

測量已知擴散係數染料 1nM 的 Alexa 633 (溶在 PBS 溶液，擴散係數為 $1.35 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$)⁶³ 的自相關函數。將測量到的自相關函數利用式子

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{diff}} \right)^{-1} \left[1 + \left(\frac{r_0}{z_0} \right)^2 \frac{\tau}{\tau_{diff}} \right]^{-1/2} + 1$$

擬合。擬合結果顯示系統參數 (r/z) 達 0.18，

r_0 為 203 nm。

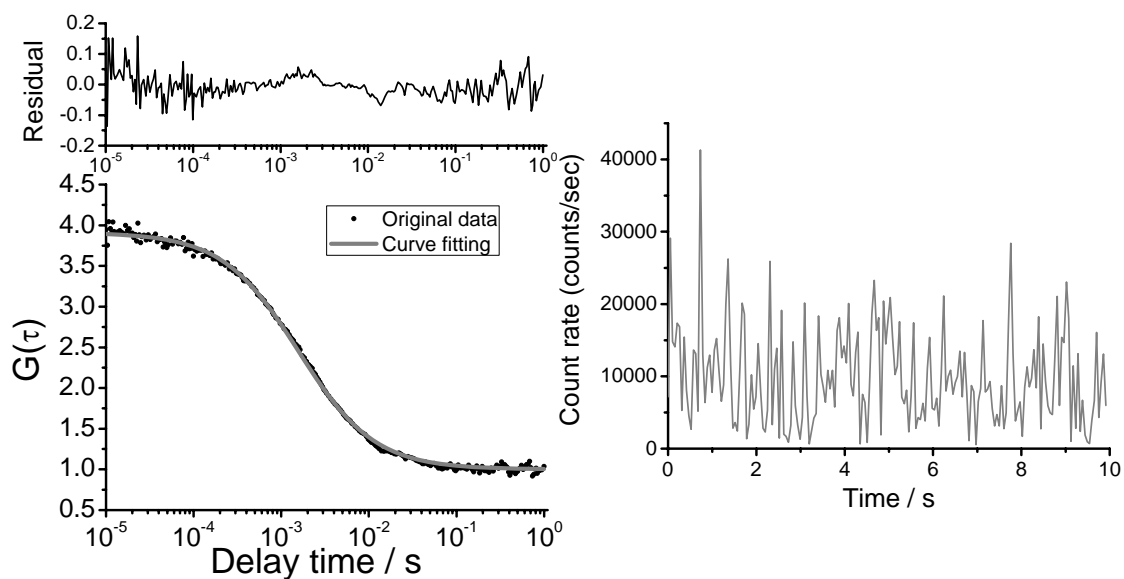


圖 3-7 DiD 在脂質體 DOPC 膜上的自相關曲線與螢光強度變化

圖左為 DiD 在脂質體 DOPC 膜上的自相關曲線，圖右是 DiD 在脂質體 DOPC 膜上的隨時間螢光強度變化，圖上是擬合函數與數據之誤差。利用二維自相關函數將擬合結果所得到的擴散時間 1.57 ms，與三維自相關函數所求得的系統半徑 203 nm，代入

$$\tau_{diffusion} = \frac{r_0^2}{4D}$$

求得擴散係數為 $6.56 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ 。

3-3 拉曼光譜

3-3-1 拉曼系統架設

在實驗中所使用的螢光相關光譜系統為自行組裝之系統如圖 3-8。激發光使用的是波長 532 nm 的 DPSS 雷射 (532-25; DPSS, U.S.A.)，雷射經過擴束裝置，將雷射光束放大，以填滿物鏡的背面孔徑 (back aperture) 使其配合高數值孔徑 (numerical aperture, N.A.) 的物鏡達到最佳聚焦效果，之後雷射經過 Edge filter (LP03-532RS; Semrock, U.S.A.) 反射進顯微鏡，系統使用倒立式顯微鏡 (IX-71, inverted microscope; Olympus, Japan)，雷射經過浸油式物鏡 (oil immersion objective, UPLSAPO 100x Oil, N.A. 1.4; Olympus, Japan) 後激發樣品，其拉曼訊號由同一個物鏡蒐集往回經原路徑；此時因拉曼主要蒐集 Stokes 的訊號，屬於長波長的訊號，所以會通過反射進顯微鏡的 Edge Filter，再利用光譜儀 (Shamrock SR-303i-A; Andor, U.S.A. & iDus DV420A-OE; Andor, U.S.A.) 收集訊號。在光譜儀之前使用針孔 (pinhole)，可去除非焦點上的樣品的訊號例如水，讓收集到的訊號大都是來自雷射聚焦處樣品訊號。



3-3-2 實驗步驟

- (1) 開啟 laser 電源，待開啟一小時後雷射較穩定，再開始測量。
- (2) 開始光譜儀程式，等待 CCD 的溫度冷卻達到較低的 dark count。
- (3) 調整 Grating 為 600 l/mm，設定觀察波長範圍。
- (4) 測量當日的 laser 波長，在 Calibrate→X-calibrate 將測量改成 Raman Shift 後鍵入當日的 laser 波長。
- (5) 測量 2 μm polystyrene 的訊號，在 Calibrate→manual calibrate 對照標準光譜後校正訊號位置。
- (6) 放上樣品，先在亮視野 (bright field) 下尋找約 5~10 μm 大小的脂質體後移至雷射聚焦處。
- (7) 切換顯微鏡的 cube 讓雷射進來，雷射會把脂質體給鉗住在聚焦的位置。
- (8) 積分 30 秒確定這顆脂質體的訊雜比是否夠清楚 (判斷~2900 cm^{-1} 的 C-H stretching 強度是否大於 3000 cm^{-1} 的 OH stretching 強度)。
- (9) Acquire→setup acquirement 調整測量為每次積分 60 秒，共測六十分鐘。

分析拉曼光譜數據則是將每張光譜先扣除背景值後，將光譜分類成 0 min、10 min 等。0 min 指雷射連續抓住脂質體一小時時，第一至第五張光譜取平均，10 min 指雷射連續抓住脂質體一小時時，第五至第十張光譜取平均，20 min 指雷射連續抓住脂質體一小時時，第十五至第二十張光譜取平均，以下類推。分析光譜使用兩種方法：

(1) 每組光譜對 1440 cm^{-1} 的 C=C 做強度的均一化 (normalize) 後 (即將強度都除以 1440 cm^{-1} 的強度)，再將每組 1653 cm^{-1} 均一化後的強度除以第 0 min 組的 1653 cm^{-1} 均一化後的強度，觀察 C=C 鍵強度的變化。

(2) 每個時間點的光譜除以第 0 min 時間的光譜，觀察 1440 cm^{-1} 與 1653 cm^{-1} 的強度隨時間的變化。

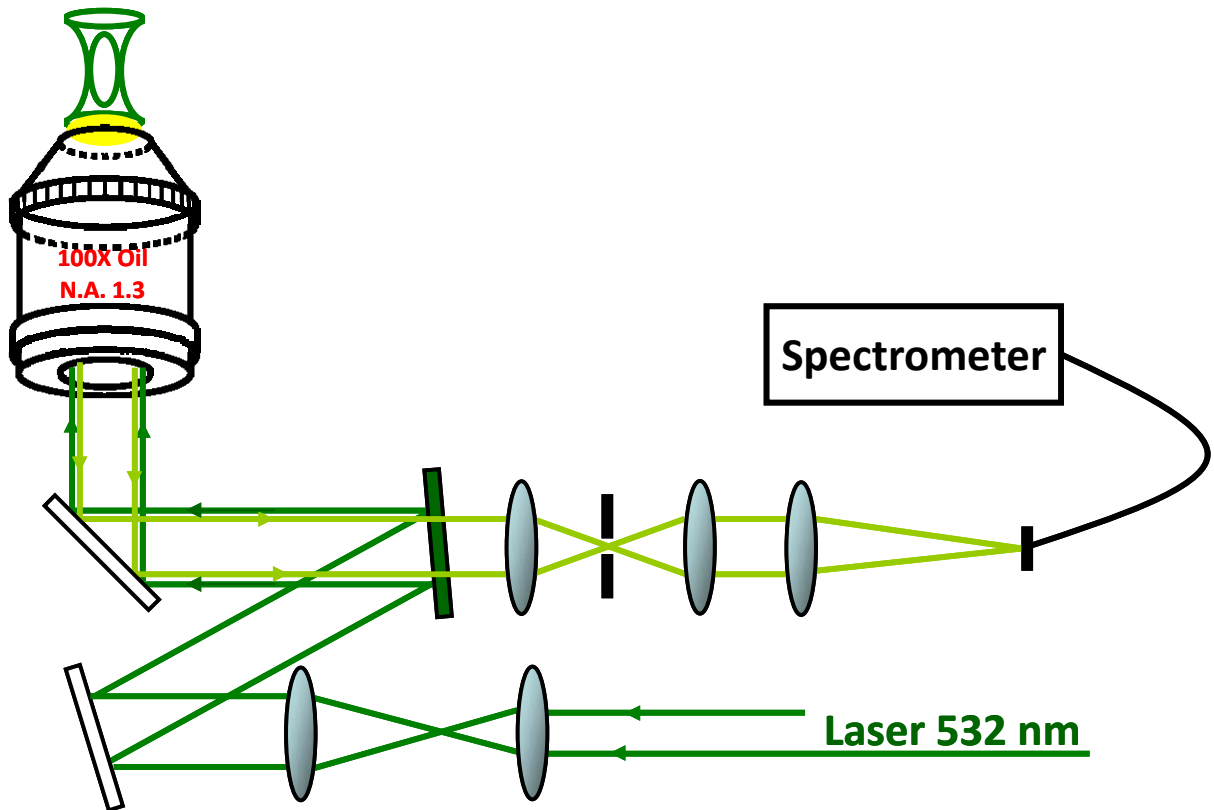


圖 3-8 拉曼光譜系統架構圖

激發光使用的是波長 532 nm 的 DPSS laser，雷射經過擴束裝置，將雷射光束放大，以填滿物鏡的背面孔徑 (back aperture) 使其配合高數值孔徑 (numerical aperture, N.A.) 的物鏡達到最佳聚焦效果，之後雷射經過 Edge filter (LP03-532RS; Semrock, U.S.A.) 反射進顯微鏡，系統使用倒立式顯微鏡 (IX-71, inverted microscope; Olympus, Japan)，雷射經過浸油式物鏡 (oil immersion objective, UPLSAPO 100x Oil, N.A. 1.4; Olympus, Japan) 後激發樣品，其拉曼訊號由同一個物鏡蒐集往回經原路徑，再利用光譜儀收集訊號。

3-4 統計分析

虛無假設 (null hypothesis, H_0) : $\mu_1 = \mu_2$

虛無假設是指假設所比較母群體間之母數無差異。亦即要比較之兩組所對應的母體平均數(μ)是相同的，有時候比較的不一定是平均數，也有可能是比值。

對立假設 (alternative hypothesis, H_1) : $\mu_1 \neq \mu_2$

對立假設是指兩組作對應的母體平均數是不同亦即是有差異的。

實驗結果的數據使用的 t 檢定 (t-test) 來判斷是否有實驗結果之間顯著差異。由於是比較加入氧化劑前後的差異，我們假設實驗前後數據的變異數數值不相等，則我們檢定實驗前後的平均值是否有顯著差異，計算方法如下：

$$t' = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}$$

\bar{X}_1, \bar{X}_2 = 母體平均值

$\mu_1 - \mu_2$ = 假設的平均數差

S_1, S_2 = 母體標準差

n_1, n_2 = 母體樣本數



此統計量為近似 t 分布，其自由度為

$$v = \frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{S_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 - 1}}$$

其計算結果可得一 t 值，即對照 t-test 表可以得到一個 p 值，判斷此 p 值的量來鑑定兩樣本數平均值是否有顯著差異。p 值代表的是虛無假設成立的機會，若檢定有統計差異則推翻虛無假設，接受對立假設；若檢定無統計差異則不要推翻即接受虛無假設。

顯著水準即要推翻或成立虛無假設所設的臨界值，一般臨界值通常是定 0.05；當 p 值小於或等於顯著水準時，就如同樣本資料計算而得的檢定統計數值落於拒絕區，意指

要成立虛無假設的機會過小（小於 5%），推翻虛無假設，這時稱此假設檢定於顯著水準下達統計顯著。⁶⁵

實驗結果使用 Microsoft Office Excel 2003 資料分析工具中的「t 檢定：兩個母群體平均數差的檢定，假設變異數不相等」來做統計，檢定的信賴度 α 定為 0.05。

利用本實驗的結果，檢定 DOPC 加入氫氧自由基與過氧化氫前後的流動性變化是否有顯著差異，步驟如下：

1. 將實驗得到的數據貼到 excel 上。
2. 選取【工具】→【資料分析】→【t 檢定：兩個母群體平均數差的檢定，假設變異數不相等】
3. 在對話視窗中

在【變數 1 的範圍】選取 control 組的 data

在【變數 2 的範圍】選取 OH[•]組的 data

在【假設的均數差】輸入 0，假設兩組 data 沒有差異

如果有打上每組資料的標籤，則【標記】勾選。

【 α 】代表顯著水準，在本實驗輸入 0.05

在輸出選項選擇結果要輸入在同一工作表上的任一儲存格或是使用新的工作表或是活頁簿

圖 3-9(a)是實驗中的原始數據，3-9(b)為計算 t 檢定的對話視窗。

(a)

	A	B	C
1	Control	OH	H2O2
2	6.49E-08	1.04E-07	6.74E-08
3	6.25E-08	1.23E-07	6.89E-08
4	6.78E-08	1.08E-07	6.50E-08
5	6.17E-08	6.62E-08	6.79E-08
6	6.20E-08	9.44E-08	6.85E-08
7	6.32E-08	6.97E-08	7.29E-08
8	6.59E-08	9.88E-08	6.17E-08
27	6.12E-08	9.14E-08	
28	7.04E-08	8.72E-08	
29	6.22E-08	1.06E-07	
30	6.46E-08	1.33E-07	
31		1.64E-07	
32		8.91E-08	
33		8.00E-08	

(b)

圖 3-9 利用 excel 計算 p 值

(a) 實驗數據; (b) 「t 檢定：兩個母群體平均數差的檢定，假設變異數不相等」對話視窗

	A	B	C	D	E
1	t 檢定：兩個母體平均數差的檢定，假設變異數不相等				
2					
3		Control	OH		
4	平均數	6.52E-08	1.1E-07		
5	變異數	1.07E-17	1.31E-15		
6	觀察值個數	29	32		
7	假設的均數差	0			
8	自由度	32			
9	t 統計	-7.02074			
10	P(T<=t) 單尾	2.93E-08			
11	臨界值：單尾	1.693889			
12	P(T<=t) 雙尾	5.87E-08			
13	臨界值：雙尾	2.036933			

圖 3-10 t 檢定計算結果

從圖 3-10 輸出的結果可以得到兩組 data 各別的平均數、變異數與個數，也可以得到這兩組 data 之間自由度，最重要的是可以得到一個 t 統計值。如果將得到的資料去對 t 統計值查表，可以知道 p 值是落在 <0.005 的區域即拒絕區域，而從 excel 的結果可以知道此 data 的 t 統計值落在雙尾臨界值 (± 2.036933) 外，即代表 p 值 < 0.05 (設定的顯著水準值)，data 的 p 值為 5.87×10^{-8} ，拒絕兩組 data 平均數相等的假設。因為假設的平均數差為 0 所以觀察雙尾的結果，如果假設平均數差為 >0，則需觀察單尾的結果。

	A	B	C	D	E
1	t 檢定：兩個母體平均數差的檢定，假設變異數不相等				
2					
3		Control	H2O2		
4	平均數	6.52E-08	6.49E-08		
5	變異數	1.07E-17	3.86E-17		
6	觀察值個數	29	12		
7	假設的均數差	0			
8	自由度	14			
9	t 統計	0.142901			
10	P(T<=t) 單尾	0.444202			
11	臨界值：單尾	1.76131			
12	P(T<=t) 雙尾	0.888404			
13	臨界值：雙尾	2.144787			

圖 3-11 t 檢定計算結果

如果改成選擇 control 組與 H₂O₂ 組的比較，從圖 3-11 的結果查表可以知道得到的 t 統計值落在雙尾臨界值內 (± 2.144787) 屬於非拒絕區，p 值為 0.89，顯示加入 H₂O₂ 後對於 control 組的擴散係數平均值沒有顯著的改變。

在本實驗中後續實驗將使用「t 檢定：兩個母群體平均數差的檢定，假設變異數不相等」來判斷 p 值，以確定實驗組之間是否有顯著的差異。

第四章 結果與討論

4-1 脂質體之基本鑑定

在此研究工作我利用電生成法製備脂質體。為能對同一個脂質體進行長時間觀察，我在製備脂質體時加入 0.2 M 葡萄糖溶液；觀察的時候，溶液再加入 0.1 M 氯化鈉溶液，使脂質體內溶液的密度大於脂質體外溶液的密度。這時大多數的脂質體會下沉到玻片表面，維持靜止，且因為脂質體內外溶液的折射率不同，可以明顯觀察脂質的輪廓。

以下我將討論脂質體基本鑑定的實驗結果：

首先我利用雷射共軛焦掃描顯微鏡 (laser confocal scanning microscopy) 觀察脂質體的形貌。為了利用螢光成像方法觀察脂質體，我在電生成法製備脂質體時加入少量類脂質染料 DiO (DOPC 與 DiO 之莫耳數比為 1000 比 1) 做螢光標定。圖 4-1(a) 是脂質體之共軛焦螢光影像，圖 4-1(b) 則是在同時間取得之亮場 (bright field) 影像。圖 4-1 的結果顯示電生成法可成功的製備單一雙層 (single bilayer) 的脂質體，而直徑大多在 20 至 30 μm 之間。這個尺寸的脂質體非常適合應用於螢光相關光譜技術測量膜的流動性。

為了應用螢光相關光譜技術測量膜的流動性，我在 DOPC 脂質膜上標定更少量的類脂質染料 DiD (DOPC 與 DiD 之莫耳數比為 100000 比 1)，再利用自行架設的螢光相關光譜系統配合電動移動平台，做脂質體橫向與縱向掃描。圖 4-2 是脂質體隨著電動移動平台的移動，螢光強度的變化，橫向掃描為每步 0.1 μm ，縱向掃描為每步 0.2 μm 。從圖 4-2 的結果可知，不論是做橫向或是縱向的掃描，最強的螢光強度只出現在脂質體膜的位置，可確定染料只標定在脂質上。將圖 4-2 分別對橫向與縱向掃描的螢光強度峰用高斯函數 (Gaussian function) 做擬合 (fitting)，從最佳擬合函數之半高寬可得到實驗系統的橫向解析度達 0.3 μm ，而縱向解析度達 1.1 μm 。此結果反映出我的實驗系統已調整到最佳狀態。脂質體縱向掃描結果顯示螢光強度在脂質體下層膜似乎較大，這可能是受到玻片反射的影響。為一致起見，之後的螢光相關光譜實驗結果均是由測量脂質體上層膜獲得。

在脂質體上層膜不同高度取螢光相關光譜測量，自相關曲線和隨著時間變化的螢光

如圖 4-3 所示。從圖 4-3 的結果顯示只有在雷射準確聚焦在膜的位置時可得到最大的相關值 (amplitude 最大)。這是由於當雷射焦距與膜重合時，偵測範圍最小，偵測到的分子數也最少，因此可得到最大的螢光擾動。

在不同聚焦深度所測得到的螢光相關光譜數據可利用 $G(\tau) = \frac{1}{N} \left[1 + \frac{\tau}{\tau_D} \right]^{-1}$ 做擬合，

求得偵測範圍內的螢光分子數目 N (number of molecule) 與相關時間 (correlation time)

或有時稱為擴散時間 τ_D (diffusion time) 值。決定 τ_D 值後，再利用 $D = \frac{r_0^2}{4\tau_{diff}}$ 以及獨立

得到的系統參數 r_0 決定擴散係數 D 。圖 4-4 顯示擴散係數與聚焦深度的關係。圖 4-4

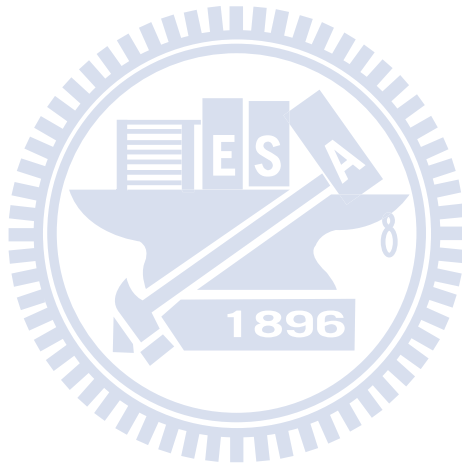
的結果顯示，當雷射準確聚焦在膜的位置時，由於偵測範圍最小，會偵測到數目最少的分子，且得到最小的擴散時間 (進而得到最大的擴散係數)。這些特徵都與文獻上所提到相同⁶⁴，此結果顯示本實驗系統可準確的觀察脂質體上膜的流動性。

接下來的實驗將利用上述步驟找到脂質體上層膜的位置，並觀察染料分子在脂質體膜上水平運動造成的螢光訊號自相關曲線，並依此決定膜的流動性。圖 4-5 是染料分子 Alexa 633 在溶液中，以及染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動得到的螢光自相關曲線及擬合的結果。自相關曲線圖的橫軸代表相關時間，縱軸代表相關程度，圖 4-5 已經對於相關值做均一化的處理，從相關值 0.5 所對應到的相關時間即代表樣品的擴散時間。從圖 4-5 的結果明顯分出染料分子在水溶液中進行三維空間自由移動與被侷限在二維空間上移動其擴散時間有極大差異。從多次測量的結果得到染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動的擴散係數為 $6\sim 7 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ ，與文獻值一致。

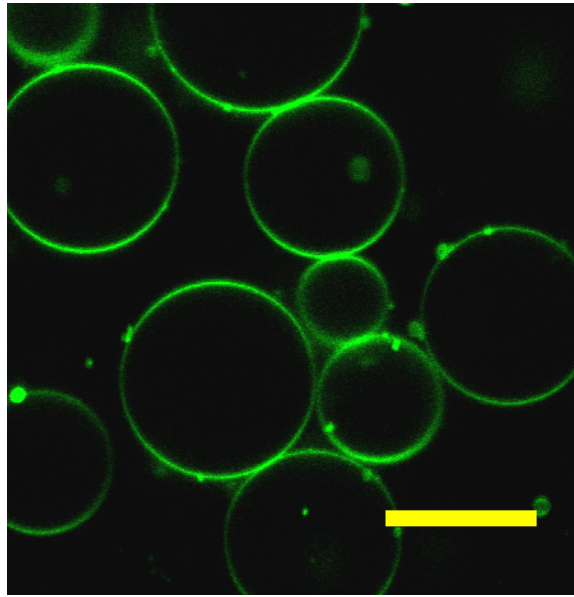
接下來將利用未標定染料的小尺寸脂質體做為拉曼光鉗系統樣品，利用電生成法製備的脂質體有些生成尺寸較小 ($< 10 \mu\text{m}$)，是光鉗較容易抓住的尺寸。圖 4-6 是利用光鉗抓住單一 DOPC 脂質體所量測到的拉曼光譜。圖中的光譜強度已經對最強強度峰 1440 cm^{-1} 做均一化的處理。圖 4-6 的結果參考文獻將這些峰值所代表的振動模式找出⁶⁶，其結果如下：① 714 cm^{-1} : C-N/choline group；② 877 cm^{-1} : C-C-N+ symmetric stretching；③ 1064 cm^{-1} : Skeletal C-C stretch of lipids；④ 1083 cm^{-1} : C-N stretching；⑤ 1119 cm^{-1} : C-C stretch；⑥ 1267 cm^{-1} : C-H (lipid)；⑦ 1300 cm^{-1} : $\alpha(\text{CH}_2)$ (lipids)；⑧ 1440 cm^{-1} : $\delta(\text{CH}_2)$

(lipids) ; ⑨ 1653 cm^{-1} : C=C stretch (lipids) ; ⑩ 1740 cm^{-1} : C=O stretch。在之後的實驗我們將利用 1440 cm^{-1} 的強度做均一化之後，觀察 1653 cm^{-1} 的 C=C 在加入氧化物質前後強度變化，並以此訊號之變化代表脂質的氧化程度；我們也將未對 1440 cm^{-1} 均一化的光譜，觀察 1440 cm^{-1} 與 1653 cm^{-1} 隨時間的強度變化。

接下來將利用螢光相關光譜測量 DOPC 脂質體膜的流動性，並利用拉曼光鉗系統測量 DOPC 脂質體的分子結構變化，並探討不同氧化物質、抗氧化劑和膽固醇這些因素對於流動性與結構變化的影響。



(a)



(b)

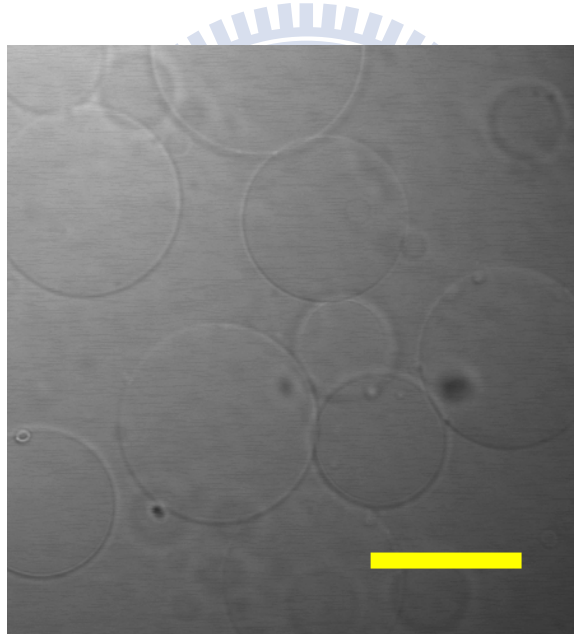


圖 4-1 利用電生成法所製備脂質體之顯微影像

圖 4-1(a)是共軛焦掃描影像，圖 4-1(b)是同時取得之亮場 (bright field) 影像；由圖之結果顯示，利用電生成法製備的脂質體之直徑大多在 $20\ \mu\text{m}$ 上下。Scale bar = $20\ \mu\text{m}$ 。

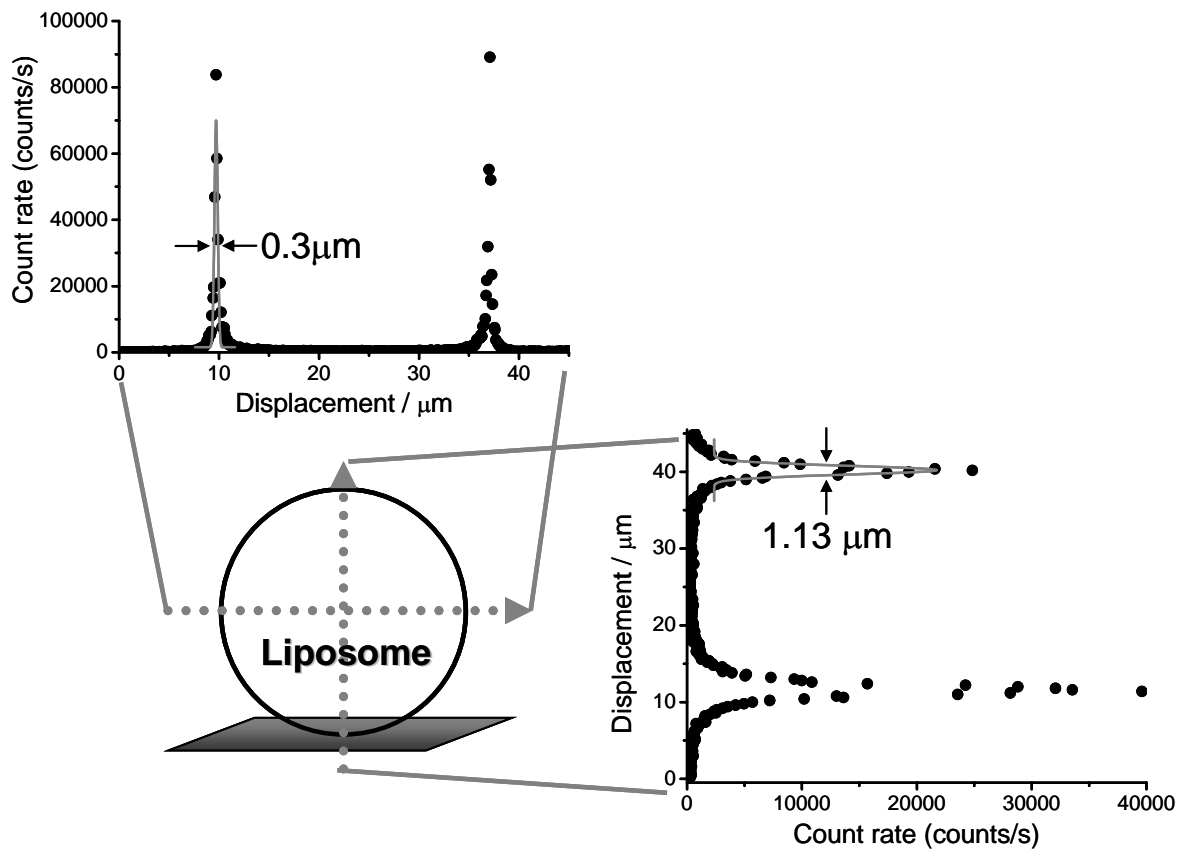


圖 4-2 將單一脂質體對雷射焦點進行軸向掃描，並記錄螢光強度之結果

圖中黑色點為原始數據，灰色線為利用高斯函數擬合 (fitting) 之結果。從擬合函數的半高寬 (FWHM) 可知顯微鏡系統之橫向及縱向解析度分別為 0.3 μm 及 1.1 μm 。

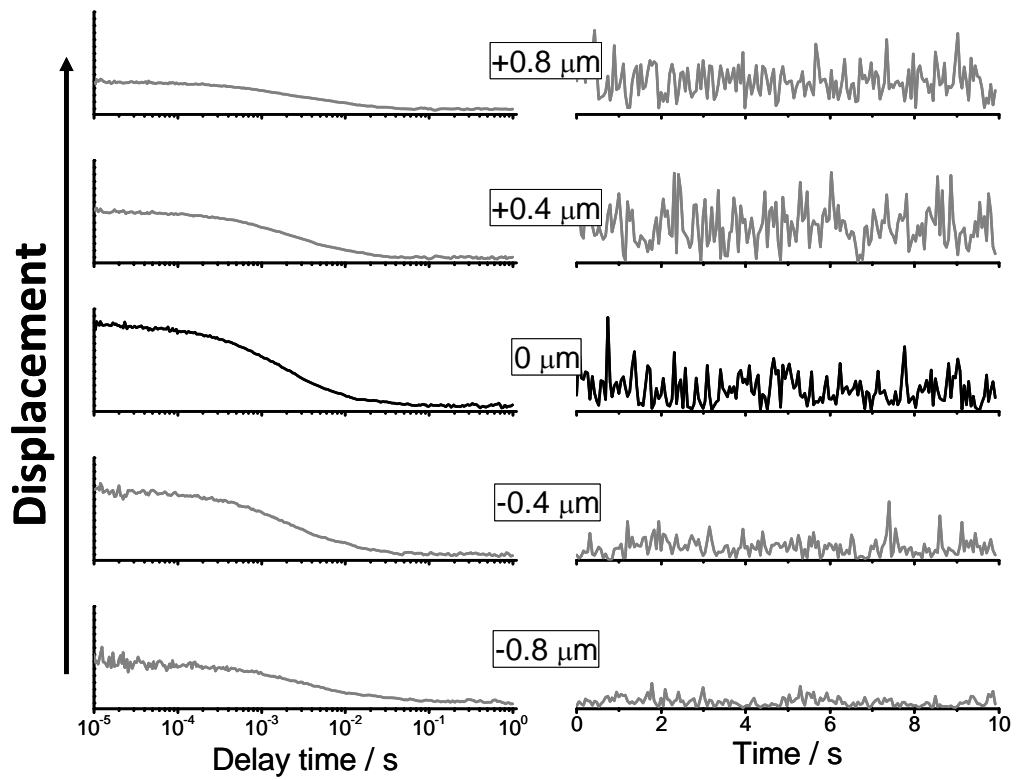


圖 4-3 在不同聚焦深度對脂質體進行螢光強度及螢光相關光譜量測的結果

圖右為螢光強度隨時間的變化，圖左為對應之螢光相關光譜函數。由圖之結果顯示，當雷射聚焦在膜上時（以黑色線表示），螢光相關光譜的相關值最大。

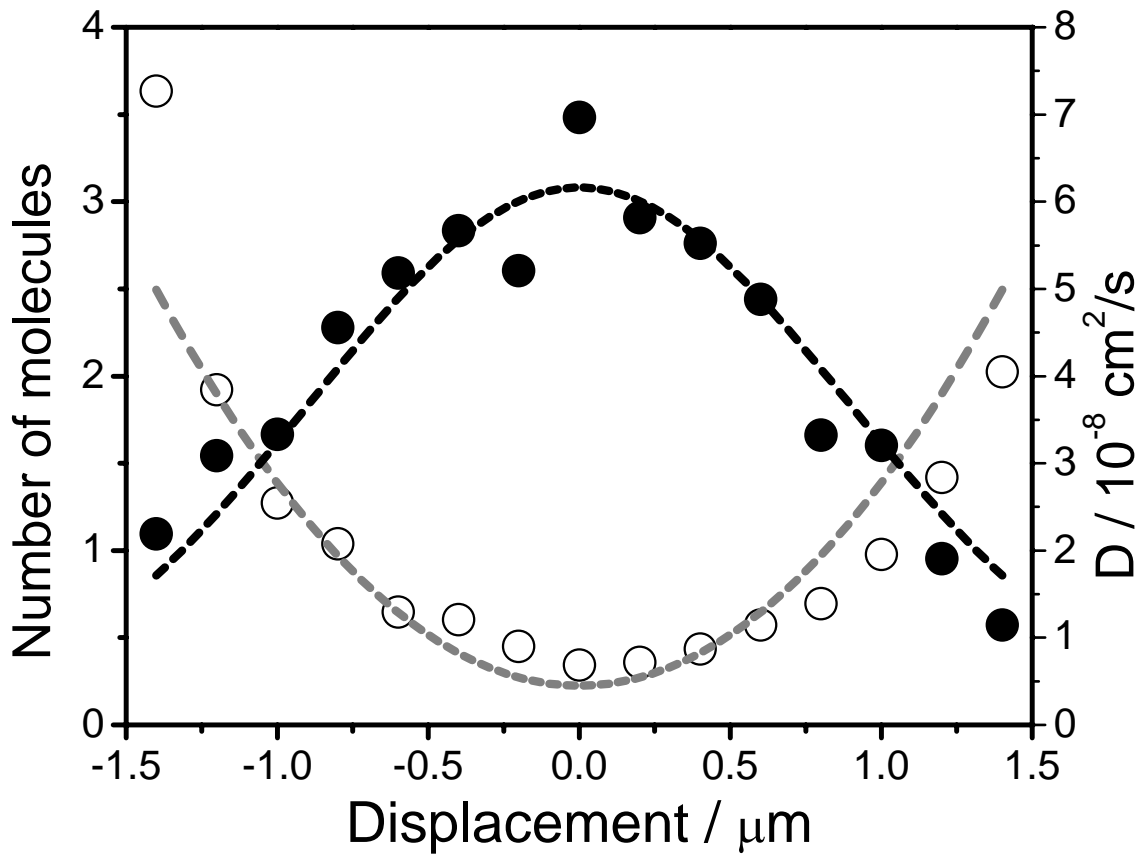


圖 4-4 在不同聚焦深度對脂質體做螢光相關光譜測量結果

圖中黑色實心點為不同深度所測量到的擴散係數，灰色空心點為不同深度所測量到的平均螢光分子數量。結果顯示當雷射聚焦在脂質體膜上將測到最少螢光分子數與最大擴散係數值。

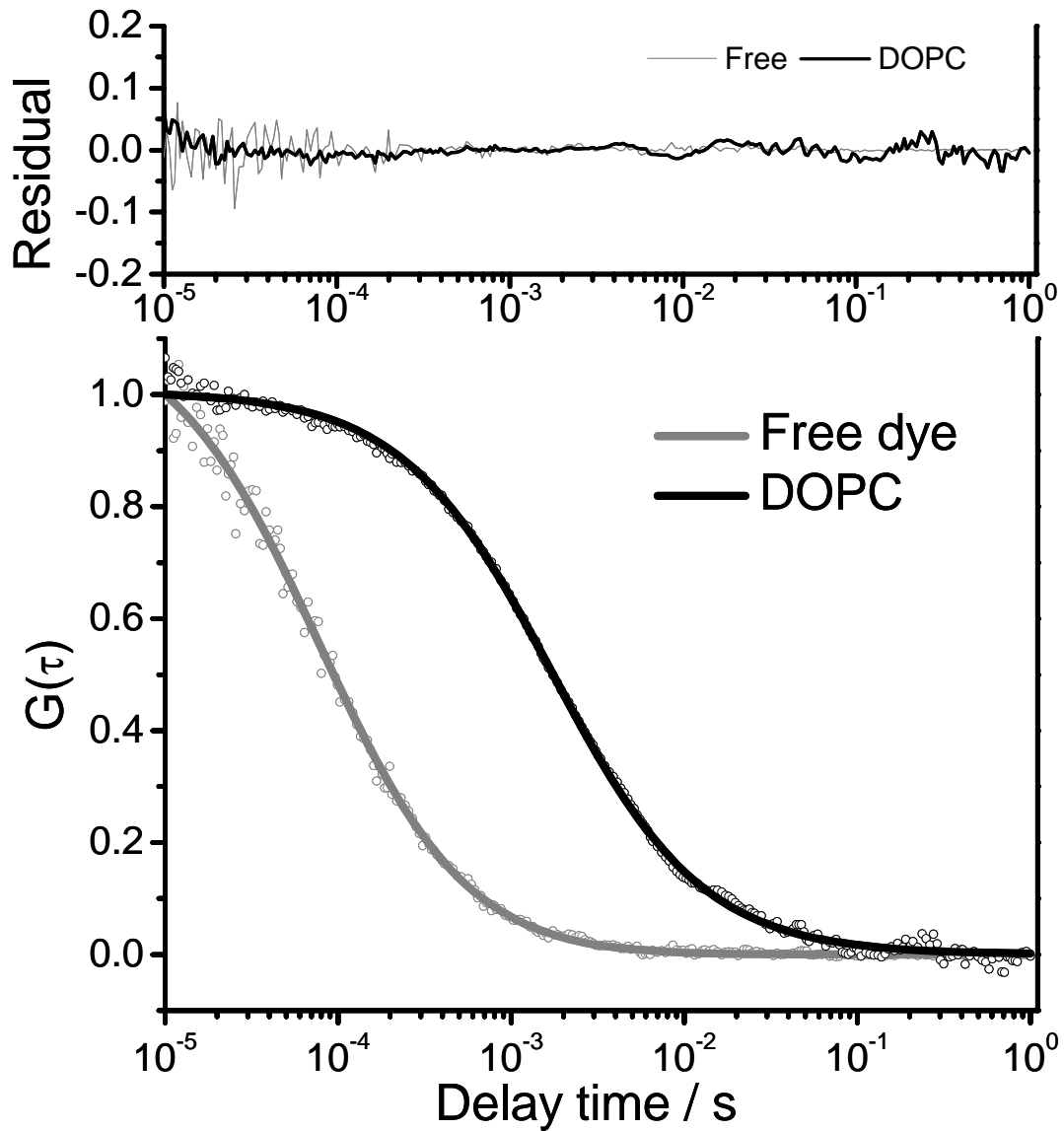


圖 4-5 對水溶液中染料 (Alexa 633) 及在 DOPC 磷脂膜上之染料 (DiD) 進行螢光自相關函數測量之結果

圖中灰色圓及線分別為對水溶液中染料測量之數據及利用三維擴散模型擬合之結果；黑色圓及線則為對膜上之染料測量之數據及利用二維擴散模型擬合之結果。上圖則為擬合函數與數據之誤差。由擬合結果可得到染料分子在水溶液中及膜上運動之擴散係數分別為 $1.35 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ 和 $6.5 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ 。以上結果顯示染料分子在水溶液中之擴散遠快於在膜上之運動。

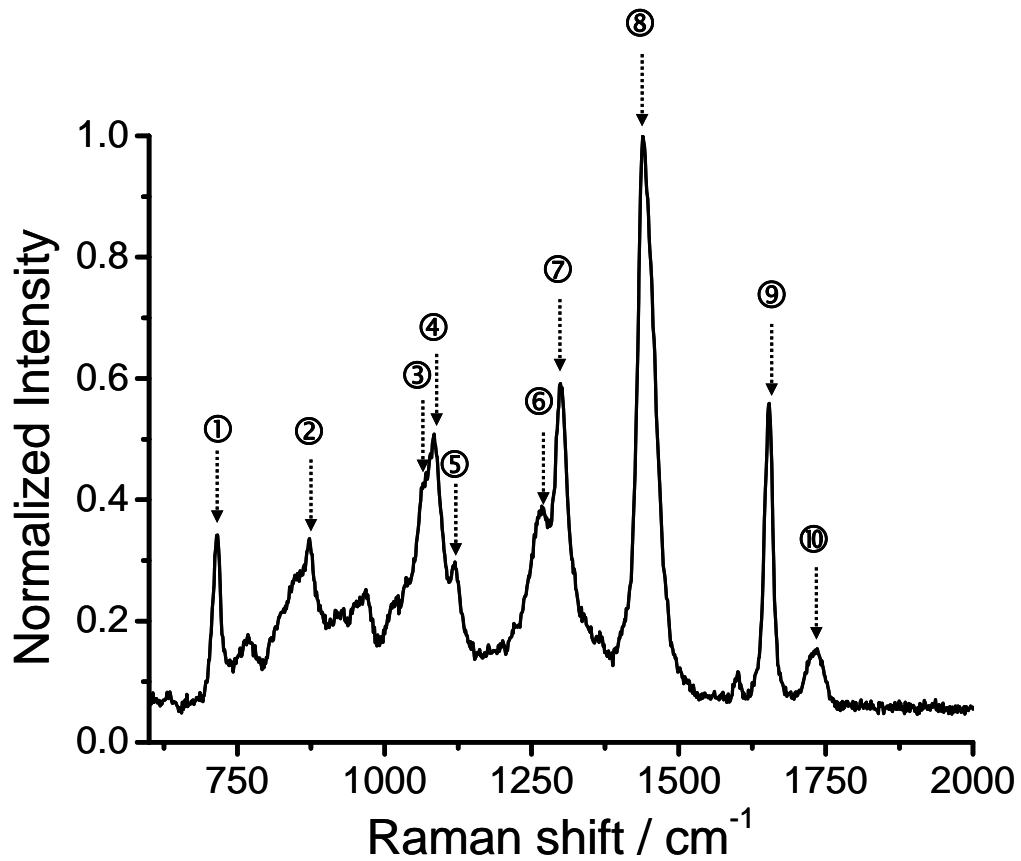


圖 4-6 DOPC 脂質體之拉曼光譜

脂質體拉曼光譜之主要譜峰分別對應到以下脂質之官能基振動：

- ① 714 cm⁻¹: C-N/choline group
- ② 877 cm⁻¹: C-C-N⁺ symmetric stretching (lipids)
- ③ 1064 cm⁻¹: skeletal C-C stretch of lipids
- ④ 1083 cm⁻¹: C-N stretching
- ⑤ 1119 cm⁻¹: C-C stretch
- ⑥ 1267 cm⁻¹: C-H (lipid)
- ⑦ 1300 cm⁻¹: α (CH₂) (lipids)
- ⑧ 1440 cm⁻¹: δ (CH₂) (lipids)
- ⑨ 1653 cm⁻¹: C=C stretch (lipids)
- ⑩ 1740 cm⁻¹: C=O stretch

4-2 不同氧化物質的影響

在生物體內的活性氧化物質中，過氧化氫和氫氧自由基屬於常見的兩種。過氧化氫與金屬離子或酵素反應形成其它活性氧化物質，而氫氧自由基在生物體內主要由過氧化氫與金屬離子反應生成。接下來我們將觀察過氧化氫和氫氧自由基是否會對脂質體 DOPC 膜流動性與結構造成改變，並且探討流動性改變與結構改變之間的關係。

我們在脂質體 DOPC 中加入 0.05 mM 氫氧自由基和 1 mM 過氧化氫，反應一小時之後，利用螢光相關光譜測量反應前後染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動的擴散時間。圖 4-6 是脂質體 DOPC 加入 0.05 mM 氫氧自由基和 1 mM 過氧化氫反應前後染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動得到的螢光自相關曲線，且相關值已做均一化的處理。從圖 4-7 的結果顯示加入氫氧自由基的脂質體 DOPC，其染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動得到的擴散時間明顯較未加入之前短，而加入過氧化氫其染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動得到的擴散時間與未加入之前比較無差異。

利用二維移動式子擬合得到擴散時間，代入 $D = \frac{r_0^2}{4\tau_{diff}}$ 得到擴散係數，將多次測量結果做統計，統計結果如圖 4-8 與表 4-1 所示。結果顯示未加入氧化物質前的染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動得到的平均擴散係數為 $6.52 \pm 0.33 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ ($n = 29$)，加入氫氧自由基的染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動得到的平均擴散係數為 $10.59 \pm 2.67 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ ($n = 31$)，相較於未加入氫氧自由基之前的脂質體 DOPC，染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動得到的擴散係數有顯著變大，反映脂質體 DOPC 膜流動速度有顯著的增快 ($P = 5.87 \times 10^{-8}$)；加入過氧化氫的染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動得到的平均擴散係數為 $6.49 \pm 0.62 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ ($n = 12$)，相較於未加入過氧化氫之前的脂質體 DOPC，染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動得到的擴散係數沒有顯著的差異，反映膜流動速度沒有顯著改變 ($P = 0.89$)。

將相同的實驗條件，利用拉曼光鉗系統抓住脂質體 DOPC，測量脂質體 DOPC 隨著時間變化的拉曼光譜。圖 4-9 是脂質體 DOPC 在未加入氧化物質 (control) 和分別加入 0.05 mM 氫氧自由基與 1 mM 過氧化氫隨時間變化的拉曼光譜，第 0 分鐘係指在 0~5 分

鐘測量到的光譜平均，第 10 分鐘係指 6~10 分鐘測量到的光譜平均，依此類推；每個時間的光譜均扣除背景值後強度對 1440 cm^{-1} 均一化處理。從圖 4-9 結果可以看出在未加入氧化物質前與加入過氧化氫後， 1653 cm^{-1} 的強度沒有明顯的變化，但是加入了氫氧自由基後則有隨時間強度下降的趨勢。圖 4-10 是用圖 4-9 處理方式再取多筆數據平均統計的結果。統計的結果顯示，加入氫氧自由基 60 分鐘後脂質的 C=C 雙鍵強度下降約 15% ($P = 0.004$)，但是加入過氧化氫 60 分鐘後雙鍵強度並無顯著差異 ($P = 0.3$)。從拉曼光譜的結果推論脂質體 DOPC 的 C=C 有受到氫氧自由基破壞，但是不受過氧化氫影響。在文獻上有人提出在活性氧化物質中，氫氧自由基會造成脂質過氧化，而過氧化氫不會，而我們也測量到氫氧自由基的確造成了流動性與結構變化。接下來我們將對流動性與結構變化提出解釋。

圖 4-11 是未加入氧化物質的脂質體與加入氫氧自由基或過氧化氫的脂質體未做過均一化處理的拉曼光譜，將每個時間光譜除以第 0 分鐘光譜，觀察脂質體 DOPC 1440 cm^{-1} ($-\text{CH}_2$) 與 1653 cm^{-1} (C=C) 隨著時間的強度變化。圖 4-11 的結果顯示未加入氧化物質前的脂質體其單鍵與雙鍵之強度隨著時間幾乎沒有變化；加入氫氧自由基的脂質體其單鍵與雙鍵之強度隨著時間都有下降，加入氫氧自由基一小時後單鍵強度約下降 10%，雙鍵強度約下降 25%；加入過氧化氫的脂質體其單鍵強度隨著時間幾乎沒有變化，雙鍵強度在加入過氧化氫一小時後約下降 10%。

從螢光相關光譜得到的結果是氫氧自由基造成脂質體 DOPC 膜流動性增快，過氧化氫則沒有造成膜流動速度變化；從拉曼光譜得到的結果是加入氫氧自由基後脂質體 DOPC 的雙鍵強度有隨時間下降，但是加入過氧化氫卻沒有，且氫氧自由基加入也會造成脂質體 DOPC 的單鍵破壞。從結構變化與流動性變化的結果推論：脂質體 DOPC 在氫氧自由基的加入後，會影響結構的變化，造成雙鍵與單鍵的破壞，但是碳鏈變短使脂質體 DOPC 的流動性增快，我們將利用圖 4-12 來說明脂質過氧化機制。

從圖 4-12 所提出的機制來看，氫氧自由基會攻擊雙鍵旁邊碳上氫，使之脫氫後，將不成對電子留在碳鏈上；由於雙鍵兩邊的碳上氫都有可能被攻擊，所以反應將有兩種趨勢產生。隨著環境中氧氣加入，氧分子會接在原本不成對電子的位置上，中間可能會形成過氧化狀態，最終碳鏈斷鍵生成醛類。最後的片段有可能是斷鍵之後雙鍵與醛類接

在靠近極性端，也有可能是接在碳長鏈上的那端。

文獻上提到，較短的碳鏈和雙鍵數量的增加都能夠增加膜的流動性，但是在兩個條件皆存在下，碳鏈較短的脂質流動速度會比含有雙鍵的脂質更快。拉曼結果顯示脂質體加入氫氧自由基後，碳鏈雙鍵與單鍵皆有破壞情形，但是脂質體碳鏈變短影響流動速度較大，所以在脂質體受到氫氧自由基的攻擊之下可以得到流動性增快的情形。

在進行加入氫氧自由基的實驗時，發現在玻片底部有脂質碎片的形成。從圖 4-12 提出的機制推論有可能是因為氫氧自由基加入造成脂質體 DOPC 碳鏈變短，碳鏈變短讓脂質體結構不穩定，有些脂質體會破裂，所以形成碎片。為了鑑定這些碎片是否真的是脂質體 DOPC 的碎片，我們在脂質體上標定濃度較高的染料，且加入濃度更高的氫氧自由基 (0.1 mM)，做長時間的共軛焦掃描影像觀察。圖 4-13 是在不同時間的共軛焦掃描影像結果，結果顯示隨著加入氫氧自由基的時間增長，在玻片底部的碎片越來越多，由於染料只會標定在脂質上，所以可以確認這些碎片都是脂質碎片。從圖 4-13 的結果印證我們所提出的機制：脂質體加入氫氧自由基會造成碳鏈變短，讓脂質體結構不穩定，有些脂質體會破裂，所以形成碎片。

我們利用了螢光相關光譜與拉曼光譜測量了氧化物對於脂質體 DOPC 流動性與結構上的變化，同時利用結構變化的結果來解釋流動性的改變；我們得到的結果是氫氧自由基會造成脂質碳鏈的變短，促使流動性增快，而過氧化氫則沒有影響脂質體的流動性與結構。接下來將利用螢光相關光譜與拉曼光譜繼續研究抗氧化劑與膽固醇如何影響脂質過氧化後流動性與結構變化。

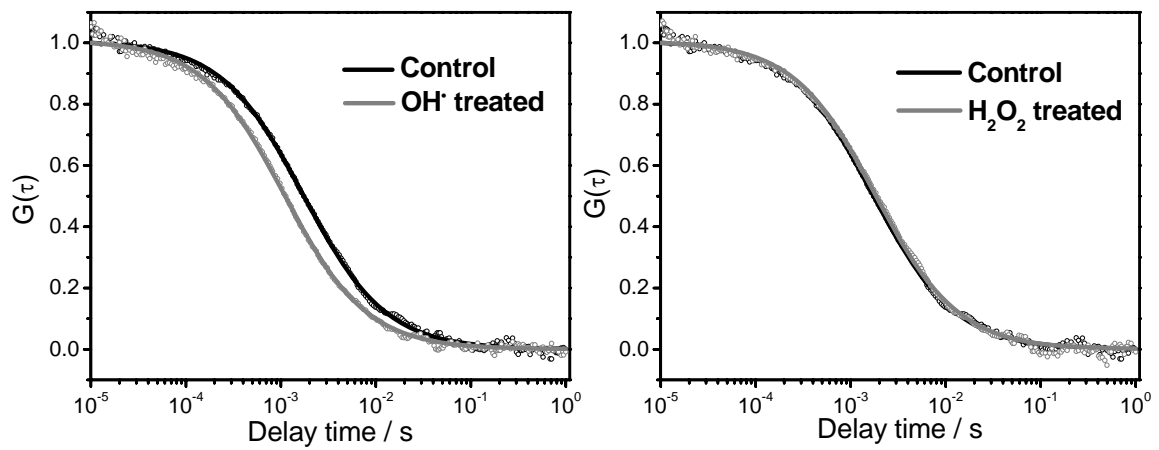


圖 4-7 不同氧化物質對膜流動性之影響

左圖中黑色及灰色線分別為未加氫氧自由基之控制組與加入氫氧自由基 0.05 mM 之實驗組的結果。右圖黑色及灰色線分別為未加氫氧自由基之控制組與過氧化氫 1 mM 實驗之結果。以上數據顯示過氧化氫對膜的流動性沒有顯著影響，而加入了氫氧自由基後則造成膜的流動性有顯著增加。



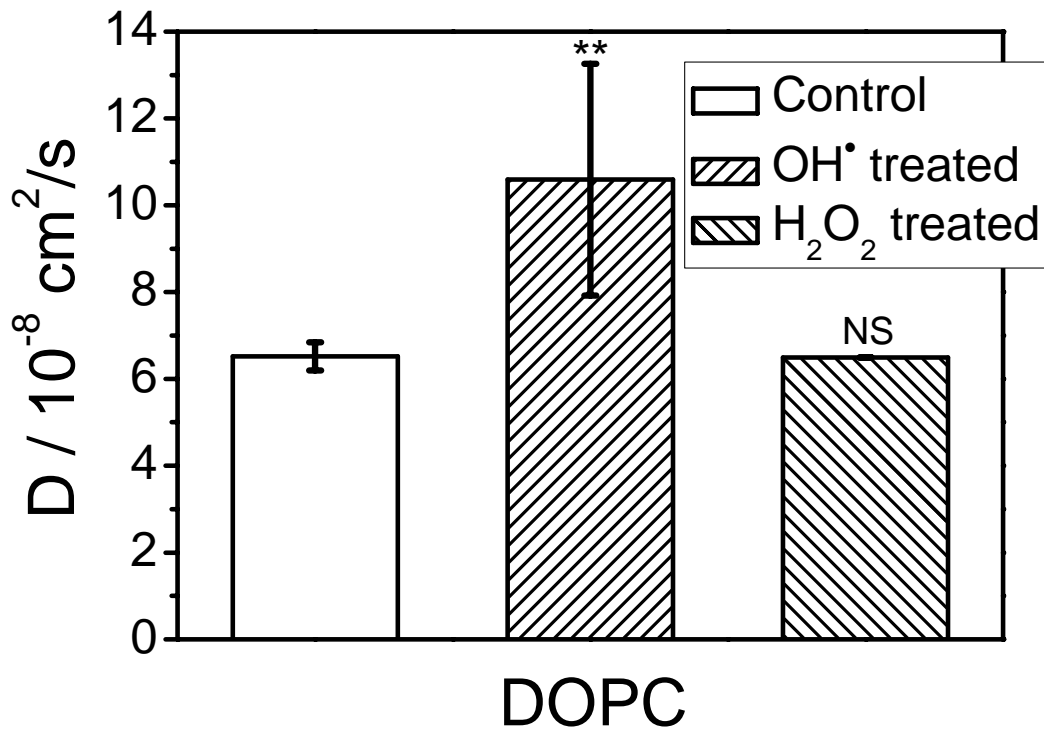


圖 4-8 量測氫氧自由基及過氧化氫對 DOPC 膜流動性影響之統計結果

以上結果顯示，在加入氫氧自由基後 DOPC 膜的流動性有顯著增快 ($D = 6.52 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ vs. $D = 10.59 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$, $P = 5.87 \times 10^{-8}$)，加入過氧化氫後膜的流動性則無顯著差異 ($D = 6.52 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ vs. $D = 6.49 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$, $P = 0.88$)。

*: significantly different from the control ($P < 0.05$),

** : significantly different from the control ($P < 0.01$),

NS : non-significant ($P > 0.05$).

表 4-1 氫氧自由基及過氧化氫對脂質體 DOPC 膜流動性影響的整理結果

	Diffusion coefficient / 10^{-8} cm ² /s	<i>P</i> value
Control	6.52±0.33 (n = 29)	
Treated with 0.05 mM OH [•]	10.59±2.67 (n = 31)	5.87×10 ⁻⁸
Treated with 1 mM H ₂ O ₂	6.49±0.62 (n = 12)	0.88



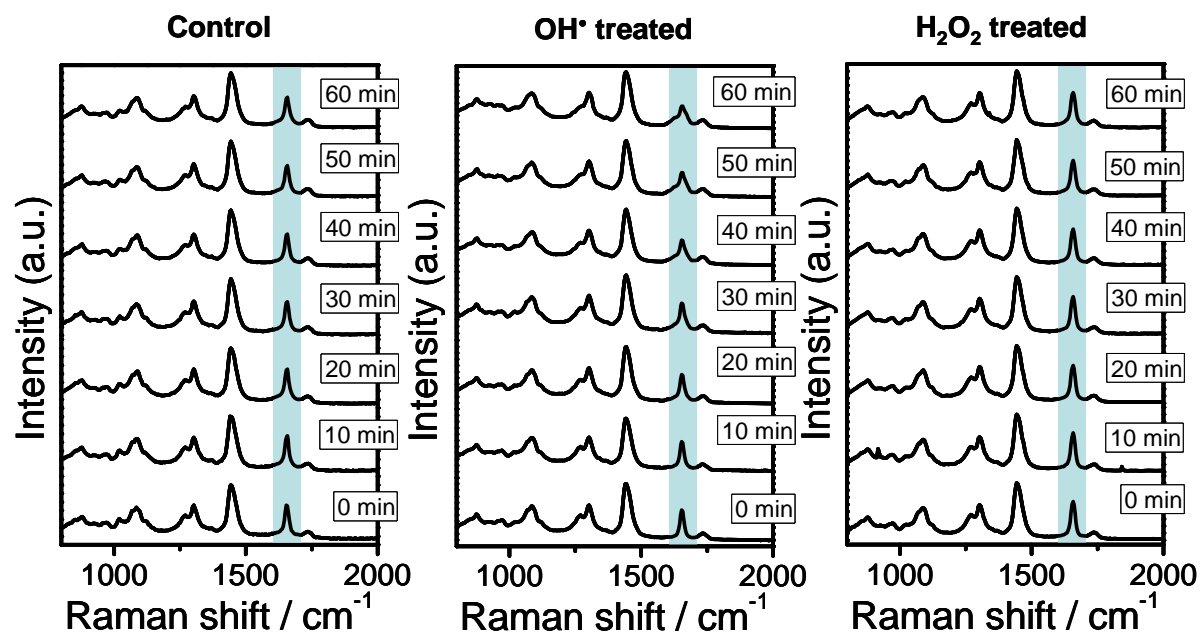


圖 4-9 加入氫氧自由基及過氧化氫後 DOPC 脂質分子之動態拉曼光譜變化

左、中及右圖分別為控制組、加入氫氧自由基和加入過氧化氫。為便於比較，圖中對應到脂質 C=C 雙鍵的拉曼譜峰均以藍色標定。上面之結果顯示，加入氫氧自由基後，對應到脂質 C=C 雙鍵的拉曼譜峰強度隨時間有明顯下降的趨勢；而加入過氧化氫後，對應到脂質 C=C 雙鍵的拉曼譜峰強度隨時間沒有明顯的變化。

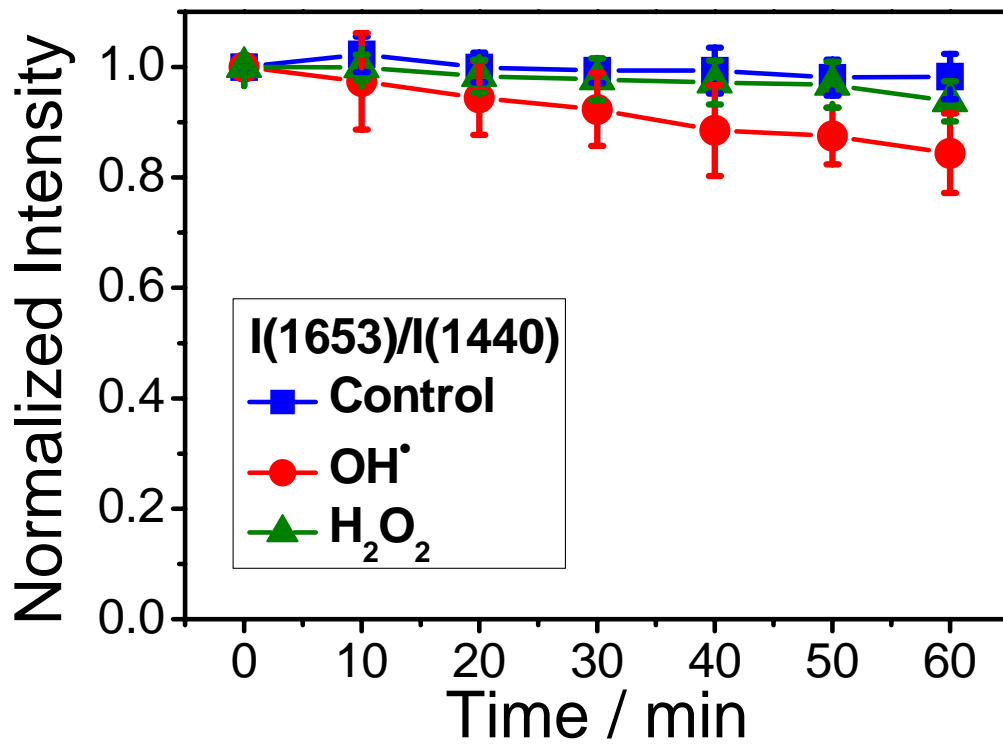


圖 4-10 加入氫氧自由基及過氧化氫後脂質 C=C 雙鍵的拉曼譜峰強度隨時間變化

藍、紅及綠色分別代表控制組、加入氫氧自由基及加入過氧化氫。上面之結果顯示，加入氫氧自由基 60 分鐘後脂質的 C=C 雙鍵強度下降約 15% ($P = 0.004$)，但是加入過氧化氫 60 分鐘後雙鍵強度並無顯著差異 ($P = 0.3$)。

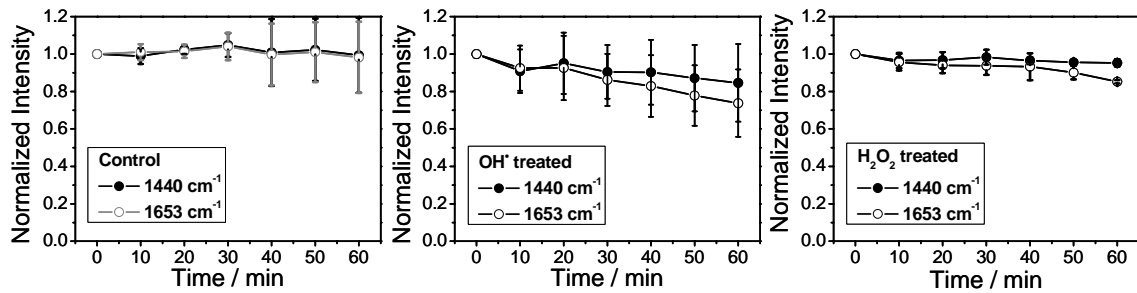


圖 4-11 脂質體加入氧化物前後之單鍵-CH₂和雙鍵 C=C 拉曼譜峰強度隨時間變化

圖左到右依序是未加入氧化物、加入氫氧自由基及加入過氧化氫的脂質體拉曼光譜隨時間強度變化，黑色實心代表 1440 cm⁻¹ 強度，灰色空心代表 1653 cm⁻¹ 強度，將每個時間光譜除以第 0 分鐘光譜，觀察脂質體單鍵 1440 cm⁻¹ (-CH₂) 與雙鍵 1653 cm⁻¹ (C=C) 隨著時間的強度變化。未加入氧化物前的脂質體其單鍵與雙鍵之強度隨著時間幾乎沒有變化；加入氫氧自由基的脂質體其單鍵與雙鍵之強度隨著時間都有下降，加入氫氧自由基一小時後單鍵強度約下降 15% ($P = 0.13$)，雙鍵強度約下降 25% ($P = 0.016$)；加入過氧化氫的脂質體其單鍵強度隨著時間幾乎沒有變化，雙鍵強度在加入過氧化氫一小時後約下降 10% ($P = 0.0011$)。



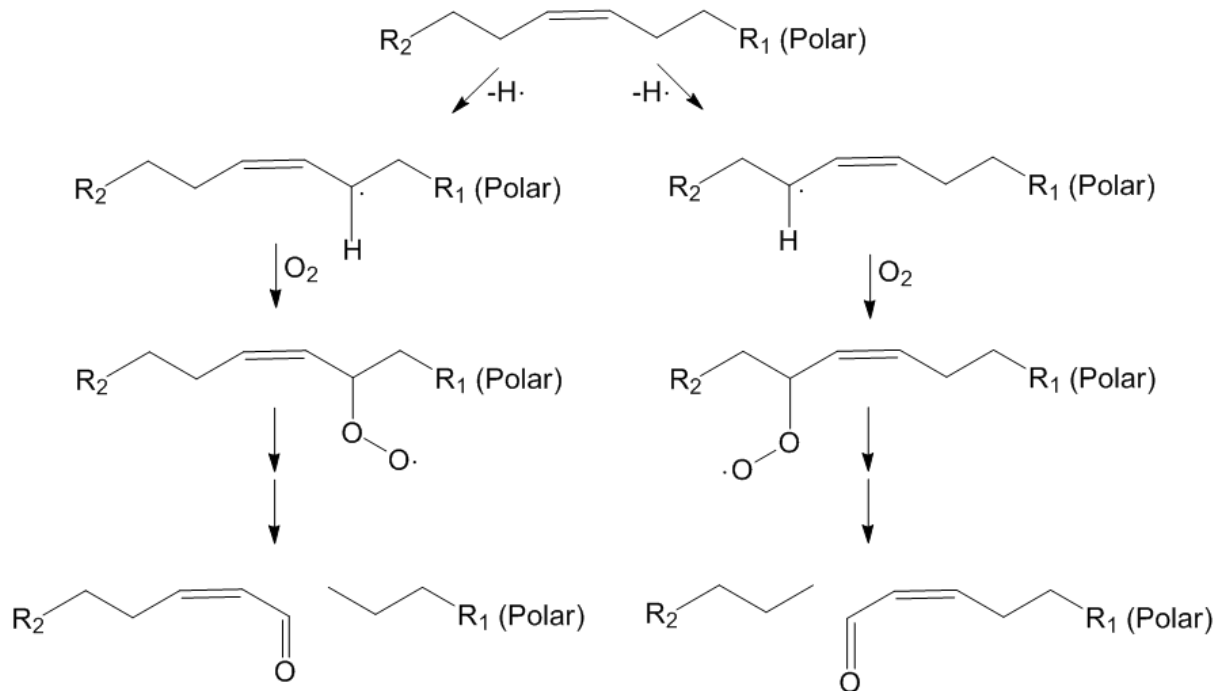


圖 4-12 脂質過氧化機制

氫氧自由基會攻擊雙鍵旁邊碳上氫，使之脫氫後，將不成對電子留在碳鏈上；由於雙鍵兩邊的碳上氫都有可能被攻擊，所以反應將有兩種趨勢產生。隨著環境中氧氣加入，氧分子會接在原本不成對電子的位置上，中間可能會形成過氧化狀態，最終碳鏈斷鍵生成醛類。最後的片段有可能是斷鍵之後雙鍵與醛類接在靠近極性端，也有可能是接在碳長鏈上的那端。

Immediately after adding OH[•]

10 min

60 min

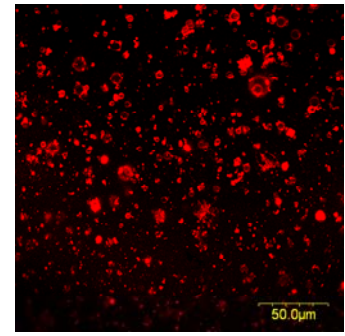
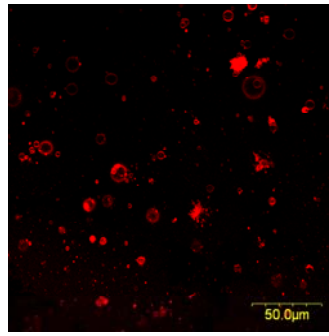
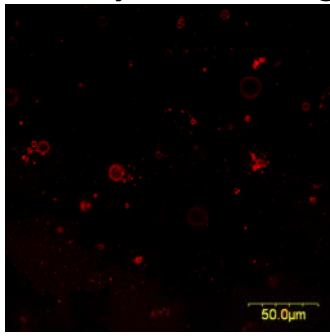


圖 4-13 DOPC 加入氫氧自由基之共軛焦影像掃描

從左到右依序是剛加入氫氧自由基、加入 10 分鐘後與加入 60 分鐘後脂質體的共軛焦掃描影像結果，結果顯示隨著加入氫氧自由基的時間增長，在玻片底部的碎片越來越多。



4-3 抗氧化劑的效應

抗氧化劑在人體中是不可或缺，抗氧化劑可以分為是預防型或是阻斷型，預防型的例如過氧化氫酶 (catalase) 或是超氧歧化酶 (SOD)，其消除鏈反應引發階段的自由基，減少自由基生成的可能；阻斷型的例如維他命E、維他命C和維他命A等，其捕捉或消除鏈反應中產生的自由基，中斷或延遲鏈反應的進行⁸。接下來我們將觀察阻斷型抗氧化劑維他命C和維他命E如何影響在氫氧自由基加入後脂質體DOPC的流動性與結構改變。

在實驗中使用水溶性抗氧化劑維他命 C 與脂質體 DOPC 先預混合後，加入氫氧自由基；同時也將脂溶性維他命 E 與脂質混合後製備脂質體，加入氫氧自由基，利用螢光相關光譜與拉曼光譜測量流動性與結構變化。

圖 4-14 是脂質體 DOPC 與 1 mM 維他命 C 預混合和脂質與 0.25 mM 維他命 E 混和後製備成脂質體，加入 0.05 mM 氫氧自由基後染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動得到的自相關曲線。圖 4-14 的結果顯示，預先混合維他命 C 或維他命 E 已嵌在脂質體中的脂質體 DOPC，加入了氫氧自由基後其染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動得到的擴散時間沒有明顯的增快或變慢。

擴散時間換算成擴散係數，將多組測量結果做平均，統計結果如圖 4-15 和表 4-2 所示。在含有維他命 C 的脂質體 DOPC 在未加入氫氧自由基前，染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動得到的平均擴散係數為 $5.74 \pm 0.66 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ ($n = 14$)，比未含有維他命 C 的脂質體 DOPC 其染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動得到的擴散係數略小；但是再加入氫氧自由基後，染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動得到的平均擴散係數為 $5.93 \pm 0.84 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ ($n = 16$)，比起未加入氫氧自由基之前沒有顯著的變化 ($P = 0.494$)。脂質中嵌入維他命 E 的脂質體 DOPC 在未加入氫氧自由基前，染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動得到的平均擴散係數為 $5.98 \pm 0.43 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ ($n = 22$)，也比脂質中未嵌入維他命 E 的脂質體 DOPC 其染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動得到的擴散係數略小；加入了氫氧自由基後，染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動得到的平均擴散係數為 $5.61 \pm 0.85 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ ($n = 22$)，比起未加入氫氧自由基前也沒有顯著的變化 ($P = 0.081$)。從螢光相關光譜測量的結果顯示，相較於未含有抗氧化劑的脂質體 DOPC，含有維他命 C 或脂質中嵌入維他命 E 的脂質體

DOPC，流動性皆不會受到氫氧自由基的影響而增快。

將相同的實驗條件，利用拉曼光鉗系統測量，圖 4-16 是脂質體 DOPC 預先與維他命 C 混合和和脂質體中嵌入維他命 E 再加入氫氧自由基，隨時間變化的拉曼光譜，光譜均先將每個時間的光譜均扣除背景值後對 1440 cm^{-1} 均一化處理。從結果得知，脂質體預先加入了抗氧化劑維他命 C 和維他命 E，再加入氫氧自由基後，造成 1653 cm^{-1} (C=C) 強度下降有明顯的抑制效果。圖 4-17 是用圖 4-16 處理光譜的方式，取多筆數據平均統計的結果。圖 4-17 統計的結果顯示，含有維他命 C 和脂質中嵌入維他命 E 的脂質體 DOPC，其碳鏈雙鍵強度都沒有隨時間下降。從拉曼光譜的結果得到脂質體 DOPC 在氫氧自由基加入會有雙鍵破壞的現象，而預先加入了維他命 C 或維他命 E 對於雙鍵破壞皆有明顯的抑制效果。

維他命 E 雖然是抗氧化劑中重要的一種，但是與脂質的比值也會影響脂質體結構穩定性，影響脂質體的生成。在製備脂質體的時候曾經嘗試加入更濃的維他命 E，結果造成大部分脂質體無法生成大顆單層脂質體；最後找到合適的維他命 E 濃度，在配製的時候只加入 0.25 mM ，約是脂質濃度的二十分之一，在此濃度下不影響脂質體的生長。

維他命 C 和維他命 E 皆屬於阻斷型的抗氧化劑，但是抗氧化的方法不同：維他命 C 屬於水溶性抗氧化劑，是人體內本身含有的抗氧化劑之一，主要是利用捕捉自由基來達到抗氧化的作用。維他命 E 屬於脂溶性的抗氧化劑，也是人體內本身就含有的抗氧化劑，主要抗氧化的方法是破壞在發生氧化作用的連鎖反應 (chain breaking)，使其氧化效果減少。維他命 E 多種形式中 α -tocopherol 的活性最強，是生物體內最重要的抗氧化劑。

從螢光相關光譜的結果和拉曼光譜的結果顯示，加入了維他命 C 或維他命 E 的脂質體 DOPC，對於氫氧自由基造成的結構破壞有顯著抑制效果，同時也觀察到流動性增快抑制的現象。我們推論是氫氧自由基被維他命 C 和維他命 E 抑制，無法破壞脂質體 DOPC 的結構，所以也沒有觀察到流動性的改變。

在本實驗中探討的抗氧化劑屬於阻斷型抗氧化劑，針對於氫氧自由基造成結構與流動性的變化皆有抑制的效果。在文獻上有提到抗氧化劑對於氧化劑造成流動性影響，大多也是使用阻斷型的抗氧化劑例如 flavonoid⁶⁷、pyruvate⁶⁸，有些可以有效的抑制氫氧自由基造成的流動性改變，有些則無法。而我們所使用的抗氧化劑維他命 C 和維他命 E

皆一致的觀察到可以抑制流動性的變化，同時也抑制了結構變化。

我們利用了螢光相關光譜與拉曼光譜技術得到：含有抗氧化劑維他命 C 或脂質中嵌入維他命 E 的脂質體 DOPC 能夠有效的抑制氫氧自由基造成的結構上變化，也抑制了氫氧自由基造成的流動性的增快，也顯示維他命 C 與維他命 E 均達到抗氧化劑的功效。



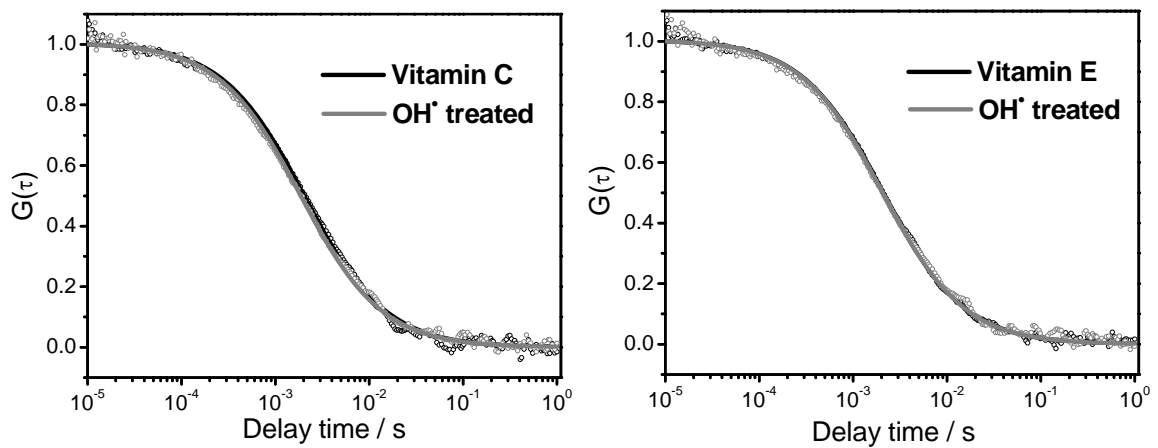


圖 4-14 含維他命 C 或脂質嵌入維他命 E 的脂質體在加入氫氧自由基前後染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動得到的自相關函數曲線

圖左是含維他命 C 的脂質體膜之自相關函數曲線，圖右是脂質嵌入維他命 E 的脂質體膜之自相關函數曲線，黑色線代表未加入氫氧自由基前，灰色線代表加入氫氧自由基後。結果顯示含有維他命 C 和維他命 E 的脂質體，加入氫氧自由基後，其染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動得到的的自相關曲線沒有明顯的變化。



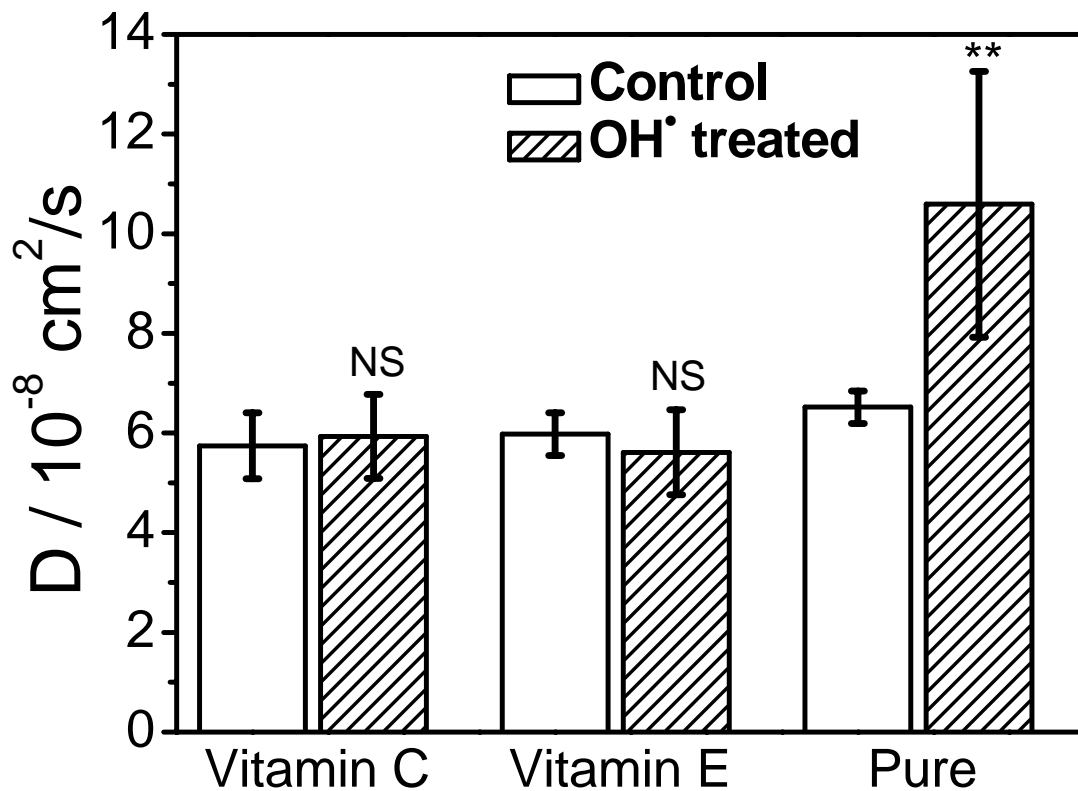


圖 4-15 含不同抗氧化劑的脂質體加入氫氧自由基前後膜之流動性變化統計圖

空白線條部分代表未加入氫氧自由基，虛線線條部分代表加入氫氧自由基。結果顯示，含有維他命 C 或是維他命 E 的脂質體，加入了氫氧自由基後染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動得到的擴散係數沒有顯著差異。

*: significantly different from the control ($P < 0.05$),

** : significantly different from the control ($P < 0.01$),

NS : non-significant ($P > 0.05$).

表 4-2 不同抗氧化劑對脂質體 DOPC 加入氫氧自由基後膜流動性影響的整理結果

	Diffusion coefficient / $10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$		<i>P value</i>
	Control	OH [•] treated	
Pure	6.52±0.33 (n = 29)	10.59±2.67 (n = 31)	5.87×10 ⁻⁸
Incubation with 1 mM vitamin C	5.74±0.66 (n = 14)	5.93±0.84 (n = 16)	0.494
Incorporation with 0.25 mM vitamin E	5.98±0.43 (n = 22)	5.61±0.85 (n = 22)	0.081



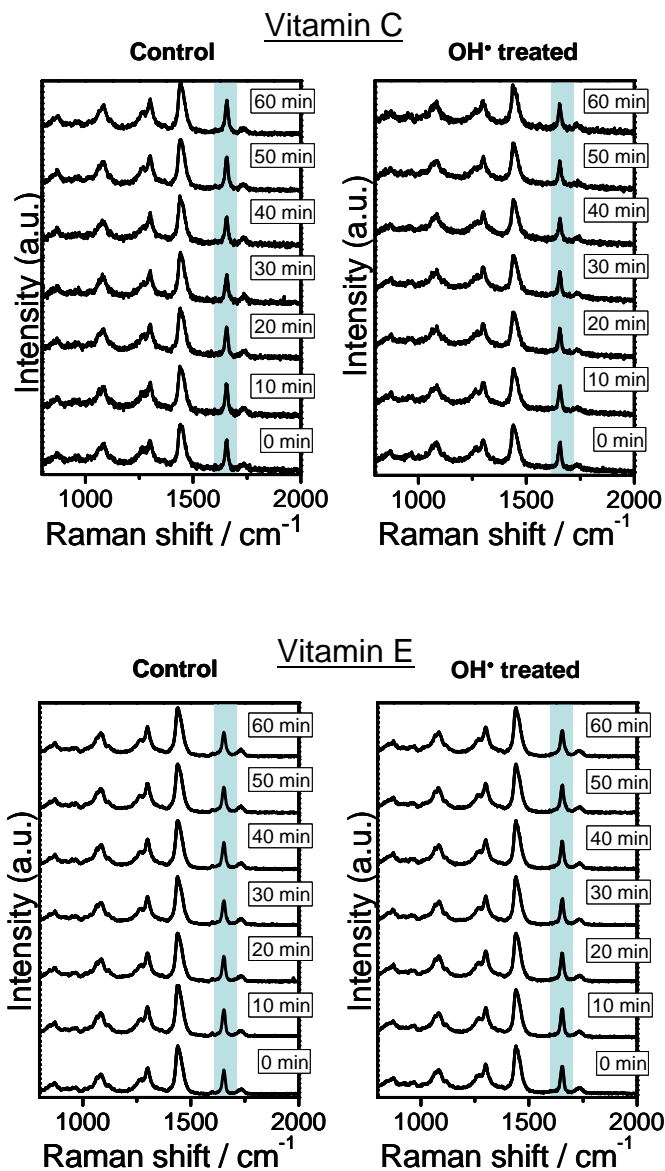


圖 4-16 含不同抗氧化劑的脂質體加入氫氧自由基後脂質 C=C 雙鍵的拉曼譜峰強度隨時間變化

上圖：維他命 C；下圖：維他命 E，為便於比較，圖中對應到脂質 C=C 雙鍵的拉曼譜峰均以藍色標定。結果顯示含維他命 C 和維他命 E 的脂質體加入氫氧自由基後，脂質碳鏈雙鍵強度隨時間皆沒有明顯的變化。

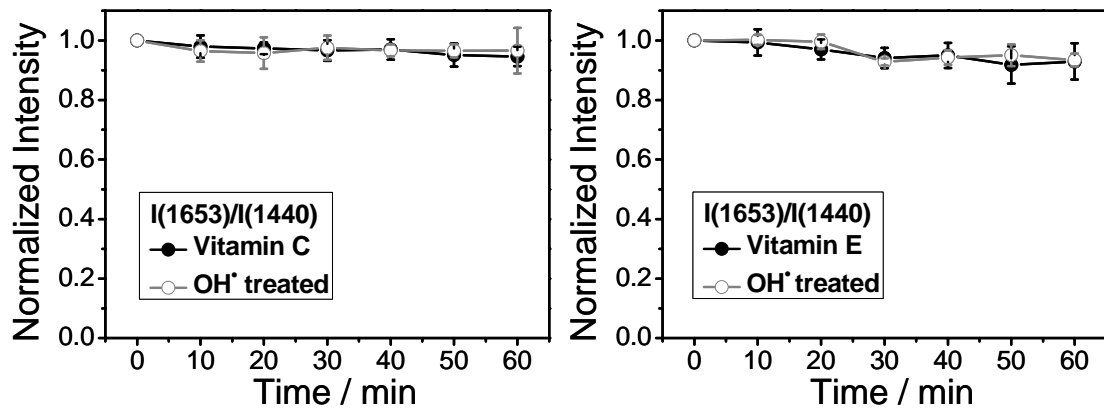


圖 4-17 含不同抗氧化劑的脂質體加入氫氧自由基後脂質 C=C 雙鍵的拉曼譜峰強度隨時間變化統計圖

圖左是含維他命 C 的脂質體，圖右是含維他命 E 的脂質體，黑色實心代表未加入氫氧自由基，灰色空心代表加入氫氧自由基，拉曼光譜對 1440 cm^{-1} 均一化後，觀察 1653 cm^{-1} 強度隨時間的變化。結果顯示維他命 C 和維他命 E 對於脂質雙鍵被氫氧自由基破壞的皆有減少的現象。



4-4 膽固醇比例的效應

膽固醇在細胞膜中扮演著重要的角色。類似脂質分子，膽固醇的結構可有極性與非極性端。膽固醇在細胞膜當中是以極性端與脂質的極性端靠近，嵌在脂質之間，穩固細胞膜結構。除了鞏固細胞膜結構之外，膽固醇另一個重要功能是調節細胞膜流動性：當環境處於膜相變化溫度之上時，膽固醇會干擾分子醯脂鏈的旋轉異構化運動，降低膜的流動性；但是當環境在相變化溫度之下，膽固醇的存在會阻止醯脂鏈的有序排列，使細胞膜相變化溫度下降，抑制成為凝膠狀，保持膜的流動性。⁸ 在這一節我將先討論不同比例的膽固醇對於脂質體 DOPC 膜的流動性影響，接著討論膽固醇比例如何影響脂質氧化造成的膜流動性改變。

4-4-1 不同比例膽固醇造成膜流動性變化

我在製備脂質體時在 DOPC 脂質溶液中加入了不同比例的膽固醇(膽固醇與脂質的質量比分別為 2.5%、5.1%、10.9%、14%、19.4%和 32.9%)，並利用螢光相關光譜觀察脂質體含有不同比例膽固醇其膜流動性的變化。

針對不同膽固醇比例(膽固醇與脂質質量比 0%、5.1%、14%和 32%)的染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動所得到的螢光自相關曲線如圖 4-18 所示。從圖 4-18 的結果顯示隨著膽固醇比例增加，擴散時間有變長的趨勢，將相關時間在 0.005 秒到 0.01 秒的範圍放大來看，可以更清楚看出擴散時間變慢。

將擴散時間換成擴散係數後，多筆數據平均結果如圖 4-19 所示。圖 4-19 顯示隨著膽固醇的比例越來越多，造成流動性的變慢的趨勢也越來越明顯。此結果與文獻報導知結果吻合⁶⁹。膽固醇在細胞膜當中功能之一就是鞏固細胞膜的結構，使細胞膜的結構更緊密；然而排列緊密的細胞膜較不容易流動。膽固醇含量增多的時候使膜結構更加穩定，進而造成膜流動性的變慢的現象。

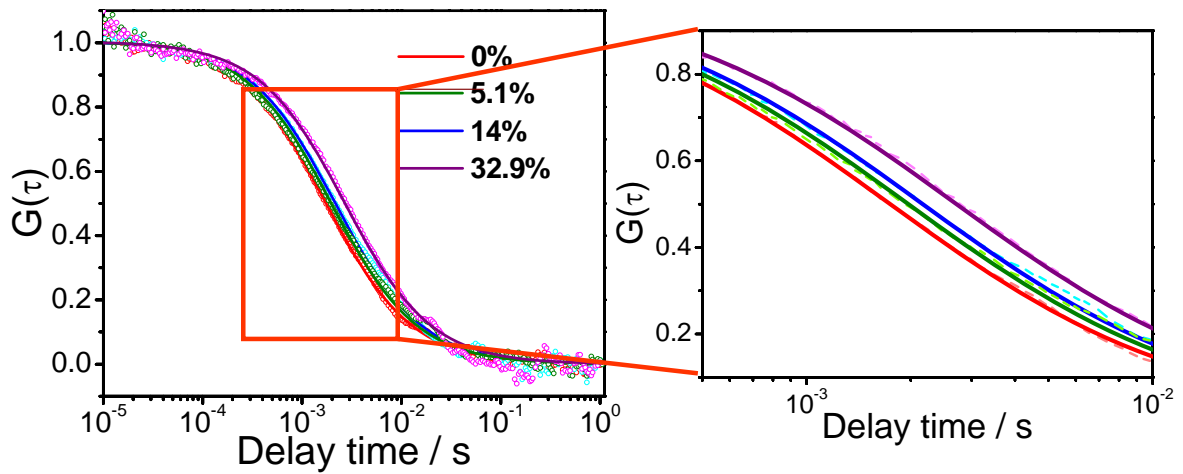


圖 4-18 含不同比例膽固醇的脂質體膜之自相關函數曲線

圖中紅線代表未含膽固醇脂質體膜的自相關曲線，綠線代表含 5.1% 膽固醇脂質體膜的自相關線，藍線代表含 14% 膽固醇脂質體膜的自相關曲線，紫線代表含 32.9% 膽固醇脂質體膜的自相關曲線。結果顯示隨著脂質體含膽固醇比例增加，脂質體膜自相關曲線向右移，即代表擴散時間變長或膜的流動性下降。



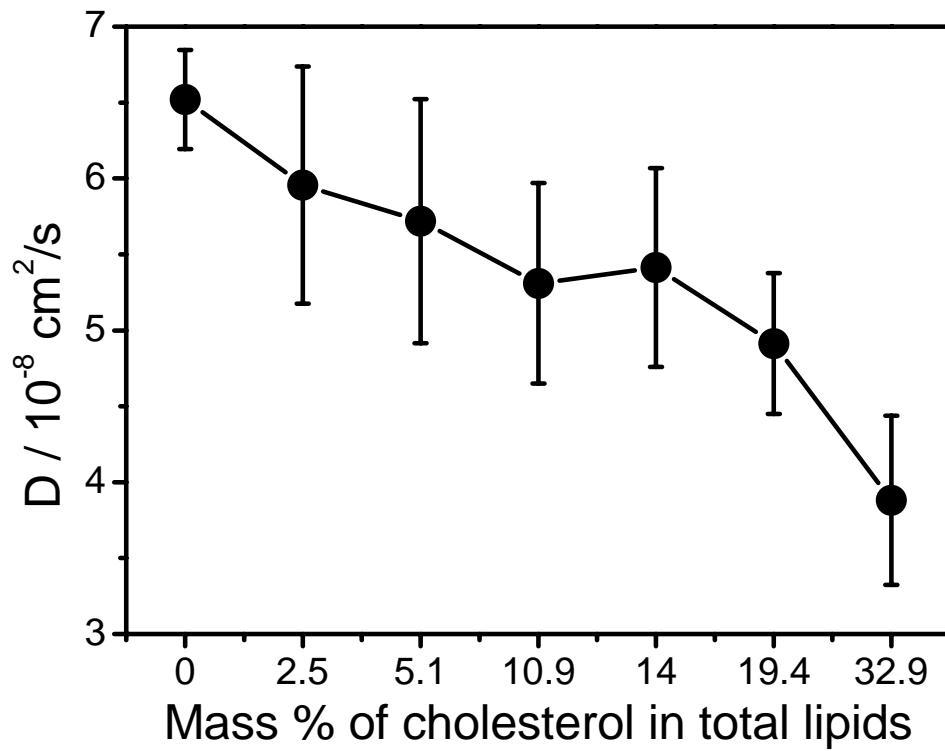


圖 4-19 含不同比例膽固醇的 DOPC 膜之流動性的統計結果

將多組自相關函數結果取平均顯示隨著脂質體上膽固醇的含量增加，染料分子在脂質體膜上運動的擴散係數顯著變小，代表膜的流動性下降

4-4-2 氫氧自由基加入對於流動性與結構變化

在脂質體 DOPC 中加入了不同比例的膽固醇（與脂質的質量比為 2.5%、5.1%、10.9%、14%、19.4%和 32.9%），利用螢光相關光譜觀察脂質體加入 0.05 mM 氫氧自由基前後流動性的變化。

含不同比例膽固醇的脂質體 DOPC 加入 0.05 mM 氫氧自由基後染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動得到的自相關曲線結果如圖 4-20 所示，圖 4-20 是含有 0%、5.1%、14% 和 32.9% 膽固醇的脂質體 DOPC 的加入氫氧自由基前後染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動得到的自相關曲線。從圖 4-20 結果顯示在未含有膽固醇的脂質體 DOPC，加入了氫氧自由基後，從自相關曲線的結果顯示擴散時間是變短的，但是當脂質體 DOPC 含有膽固醇的時候，在含 5.1% 膽固醇的脂質體 DOPC 加入氫氧自由基後擴散時間也是變短的情形，但是在含有 14% 和 32.9% 膽固醇的脂質體 DOPC 加入氫氧自由基後擴散時間只有些微的變快。從圖 4-20 的結果得到含有膽固醇的脂質體 DOPC 在加入氫氧自由基後，其膜擴散時間增快的現象有減緩。

將擴散時間換算成擴散係數後，取多筆數據平均結果統計，統計的結果如圖 4-21 和表 4-3 所示。圖 4-21 的結果顯示在脂質體 DOPC 含有少量的膽固醇（2.5% 和 5.1%）時，加入氫氧自由基後還是有明顯造成流動性增快的現象；但是隨著膽固醇比例的增高（10.9%、14% 和 19%），加入氫氧自由基造成流動性增快的現象有被抑制；含有高比例膽固醇（32.9%）的脂質體 DOPC 加入氫氧自由基造成的流動性增快現象則完全被抑制，加入氫氧自由基前後染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動得到的擴散係數沒有顯著的差異。從圖 4-21 的結果得到原先在加入氫氧自由基會造成流動性增快的脂質體 DOPC，隨著膽固醇存在的比例增加，流動性增快的現象有抑制的現象，甚至在含高比例（32.9%）膽固醇的脂質體 DOPC 在加入氫氧自由基之後沒有顯著的增快現象。

因為含不同比例膽固醇的脂質體 DOPC 在加入氫氧自由基前的擴散係數皆不同，所以我們比較加入氫氧自由基後的擴散係數改變量，結果如圖 4-22 所示。比起沒有含膽固醇的脂質體 DOPC，含有膽固醇的脂質體 DOPC 加入氫氧自由基後，染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動得到的擴散係數其增加量較少；隨著加入的膽固醇量增高，加入氫氧自由基造成染料分子 DiD 在 DOPC 膜上運動得到的擴散係數其上昇現象越來越緩和，

此結果與圖 4-21 統計結果得到的趨勢相符，可以推論為含有膽固醇的存在可以抑制因氫氧自由基造成的流動性增快的現象。

相同的實驗條件，我們也觀察含不同量膽固醇的脂質體 DOPC 在加入氫氧自由基後其拉曼光譜的變化。

首先，先測量含有膽固醇的脂質體 DOPC 的拉曼光譜。我們觀察不含膽固醇、含 5.1%、14% 和 32.9% 的膽固醇量的脂質體 DOPC，結果如圖 4-23 所示。圖 4-23 結果顯示含膽固醇的脂質體 DOPC 在 700 cm^{-1} 和小於 700 cm^{-1} 有屬於膽固醇的特徵峰出現；在 C=C 鍵的部分，DOPC 的 C=C 鍵出現在 1653 cm^{-1} ，而膽固醇上的 C=C 鍵是出現在 1670 cm^{-1} ⁶⁶，這些特徵在含 32.9% 膽固醇的脂質體 DOPC 較為明顯，含 5.1% 和 14% 膽固醇的脂質體 DOPC 的 1670 cm^{-1} 強度較不明顯。

圖 4-24 是含 5.1%、14% 和 32.9% 膽固醇的脂質體 DOPC 加入氫氧自由基前後隨著時間變化的拉曼光譜，光譜均先將每個時間的光譜均扣除背景值後對 1440 cm^{-1} 均一化處理。圖 4-24 的結果顯示含 5.1% 膽固醇的脂質體 DOPC 在加入氫氧自由基後， 1653 cm^{-1} 強度有下降與峰變寬的情形；含 14% 膽固醇的脂質體 DOPC 光譜變化上也有類似含 5.1% 膽固醇的脂質體 DOPC 的情形，但是有較為趨緩；相較於含 5.1% 和 14% 膽固醇的脂質體 DOPC，含 32.9% 膽固醇的 DOPC 加入氫氧自由基後在 1653 cm^{-1} 強度變化較小，且也沒有觀察到峰變寬的現象。

將多筆數據的結果平均統計，結果如圖 4-25 所示。統計的結果加入氫氧自由基後，含膽固醇 5.1% 的脂質體其 1653 cm^{-1} 強度隨著時間下降量較多，加入氫氧自由基一小時後強度下降了約 30%；含 14% 膽固醇的脂質體其 1653 cm^{-1} 強度隨著時間下降量有減少，加入氫氧自由基一小時後強度下降約 20%；含 32.9% 膽固醇的脂質體其 1653 cm^{-1} 強度隨著時間下降量最小，加入氫氧自由基一小時後其 1653 cm^{-1} 強度隨著時間下降約 10%。

含 32.9% 膽固醇的脂質 DOPC 在加入了氫氧自由基之後，脂質雙鍵有被破壞的情形，但是從流動性的結果卻沒有顯著的改變，我們將對含 32.9% 膽固醇的脂質體 DOPC 加入氫氧自由基後的光譜做分析。光譜在扣除背景值後皆先對 1440 cm^{-1} 做均一化的處理，將光譜分別對脂質雙鍵 1653 cm^{-1} 和膽固醇雙鍵 1670 cm^{-1} 做峰擬合分析。從圖 4-26 擬合的結果顯示加入氫氧自由基之後隨著時間變化，脂質雙鍵強度有隨著時間下降，但

是膽固醇雙鍵強度卻沒有隨著時間下降。在這裡我們推測在加入氫氧自由基之後，大多數氫氧自由基造成脂質的雙鍵氧化，所以脂質雙鍵強度下降；但是膽固醇只受到少量的氫氧自由基影響，所以強度上沒有明顯變化。

圖 4-22 的結果觀察到隨著膽固醇比例增加，脂質體 DOPC 受到氫氧自由基影響造成流動性上升的現象有減緩的趨勢。膽固醇在細胞膜中其中一個角色就是鞏固細胞膜的結構，在含大量膽固醇的脂質體 DOPC 受到氫氧自由基的攻擊後，膽固醇本身被氧化的比例很少，所以鞏固細胞膜結構的功能還在，抑制了因為氫氧自由基攻擊造成流動速度變快的現象。在比例較少膽固醇的脂質體 DOPC，雖然膽固醇被氧化的比例很少，但是膽固醇的含量較少，沒有辦法完整鞏固細胞膜結構，使得脂質體 DOPC 受到氧化造成流動性增快的現象只有少量的抑制。

在文獻上有提到膽固醇在細胞膜當中也有類似抗氧化劑的功能，其抗氧化的方式與維他命 E 相同，皆是破壞脂質氧化連鎖鏈⁷⁰。推測可能在本實驗中，膽固醇也發揮破壞 DOPC 被氫氧自由基破壞的連鎖鏈，所以在實驗結果才有隨著膽固醇含量的增多而脂質雙鍵下降的趨勢減緩現象。同時在本實驗中流動性測量也有觀察到：隨著膽固醇的比例越來越高，氫氧自由基造成流動性增快現象有減緩，甚至在更高比例膽固醇的時候還能有效的抑止流動性增快；配合結構變化的觀察也有觀察到：膽固醇的比例增加能減緩脂質雙鍵被氫氧自由基破壞的現象，這或許可以說明膽固醇確實有保護脂質的結構穩定。在文獻上也有提到當脂質含有膽固醇時，會抑制脂質在沒有膽固醇時受到銅誘導的脂質過氧化現象，這部分也可以說明膽固醇有抑制脂質氧化的功能。

從螢光相關光譜與拉曼光譜的結果得到，含有膽固醇的脂質體 DOPC 會減緩氫氧自由基造成的流動性增快；隨著膽固醇的比例增多，抑制流動性增快的現象越為明顯。同時也觀察到隨著膽固醇比例的增多，脂質雙鍵受到破壞的現象也有抑制的效果。

不同種類的細胞或胞器的膜所含膽固醇量皆不相同，例如粒線體 (mitochondrion) 的膜含膽固醇約 3%、神經 (neuron) 的膜含膽固醇約 11%、人類紅血球 (human erythrocyte) 的膜含膽固醇約 20%、髓鞘 (myelin) 的膜含膽固醇約 28% (以上皆是膽固醇在所有脂質中的重量比值)。在這些細胞當中，粒線體膜上的膜蛋白種類最多，本身功能性最複雜，但是膽固醇量最少；髓鞘細胞膜上膜蛋白種類最少，功能也十分單純，

膜上的膽固醇比例最多。由於粒線體本身容易生成活性氧化物質，同時也是最容易受到氧化物質破壞的位置。在本實驗結果得到含膽固醇比例較少的脂質膜，容易受到氫氧自由基的影響造成脂質過氧化與流動性變快；我們可以推論粒線體受到氧化物質如氫氧自由基攻擊時，因為膜上的膽固醇比例很少，所以膜容易受到氧化而造成流動性增快，流動性的異常增快則有可能造成膜上蛋白的功能失效，更有可能會造成粒線體的死亡。



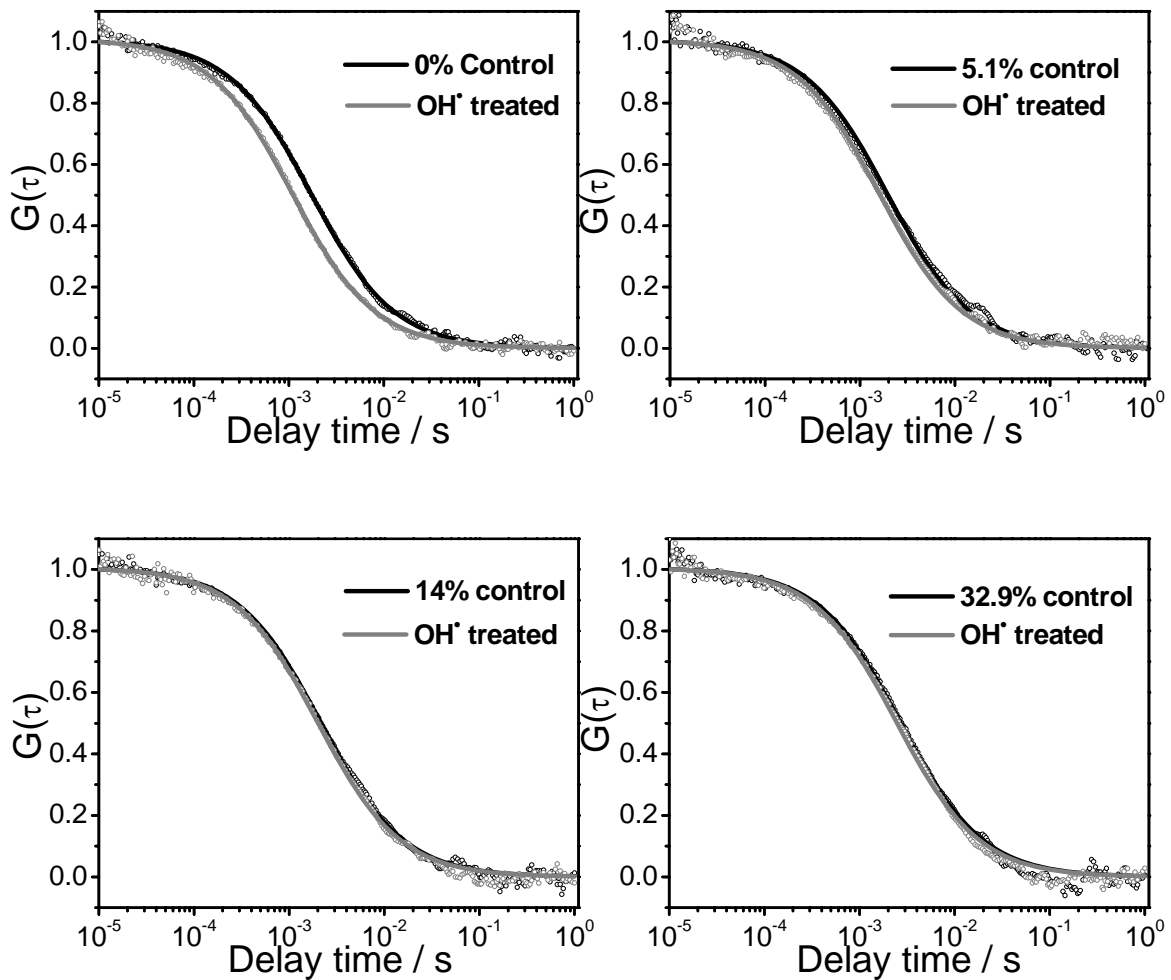


圖 4-20 含不同比例膽固醇的脂質體加入氫氧自由基前後膜之自相關函數曲線

圖左上是不含膽固醇的脂質體、圖右上是含 5.1% 膽固醇的脂質體、圖左下是含 14% 膽固醇的脂質體及圖右下是含 32.9% 膽固醇的脂質體，黑線代表未加入氫氧自由基膜的自相關曲線，灰線代表加入氫氧自由基後膜的自相關曲線。結果顯示隨著膽固醇量的增加，加入氫氧自由基造成流動速度變快有被抑制的現象。

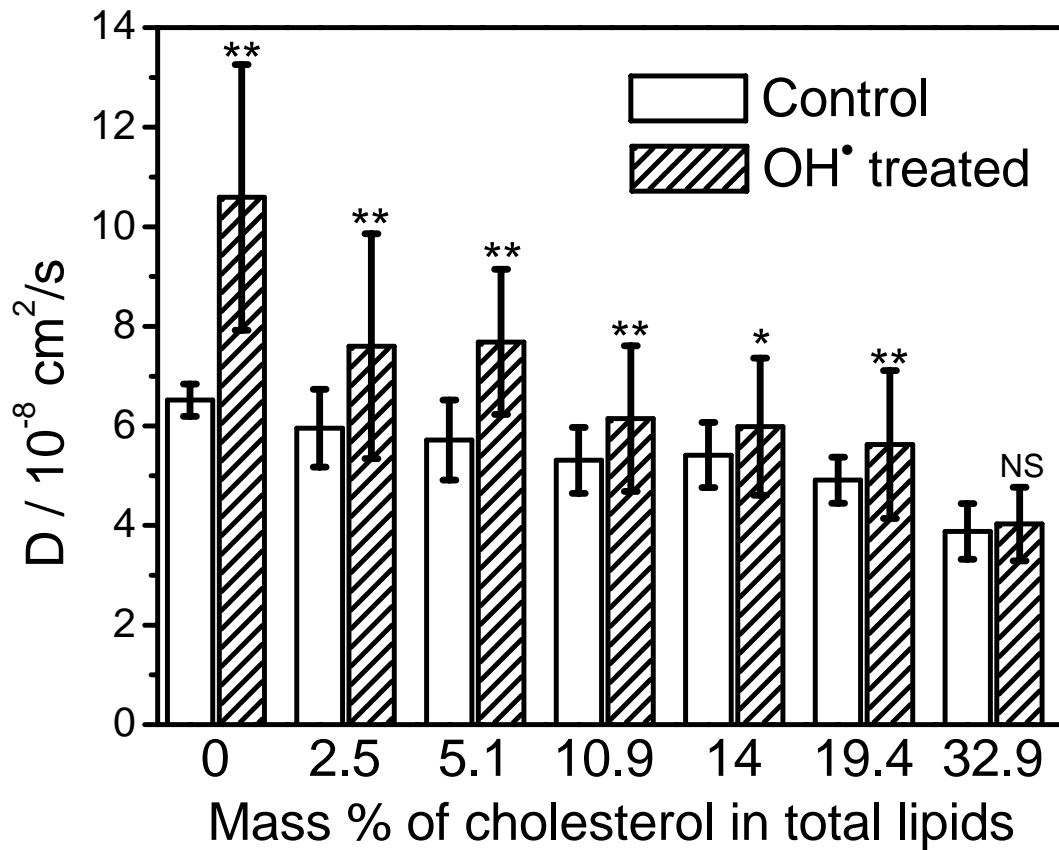


圖 4-21 含不同比例膽固醇的 DOPC 加入氫氧自由基之流動性變化統計圖

空白線條部分表示未加入氫氧自由基，斜線線條部分表示加入氫氧自由基。結果顯示隨著膽固醇量的比例增加，加入氫氧自由基造成流動性變快的現象有抑制，在含 32.9% 膽固醇的脂質體加入氫氧自由基後沒有變化。

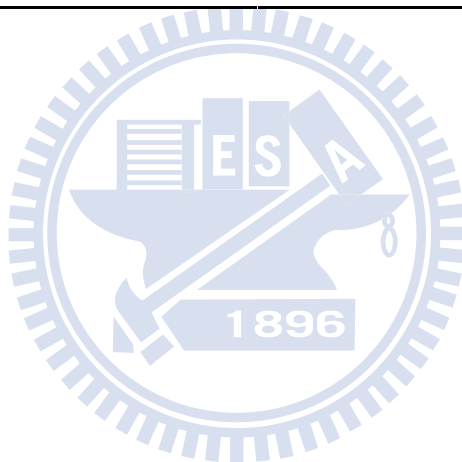
*: significantly different from the control ($P < 0.05$),

** : significantly different from the control ($P < 0.01$),

NS : non-significant ($P > 0.05$).

表 4-3 含不同比例膽固醇的脂質體在加入氫氧自由基後膜流動性影響的整理結果

Mass % of cholesterol in total lipids	Diffusion coefficient / 10^{-8} cm ² /s		<i>P</i> value
	Control	OH [•] treated	
0	6.52±0.33 (n = 29)	10.59±2.67 (n = 31)	5.87×10 ⁻⁸
2.5	5.96±0.78 (n = 24)	7.6±2.26 (n = 24)	0.00217
5.1	5.72±0.8 (n = 25)	7.69±1.46 (n = 32)	2.91×10 ⁻⁷
10.9	5.31±0.66 (n = 23)	5.97±1.16 (n = 25)	0.00841
14	5.41±0.65 (n = 26)	6.18±1.62 (n = 23)	0.0281
19.4	4.91±0.46 (n = 33)	5.63±1.48 (n = 36)	0.008067
32.9	3.88±0.56 (n = 22)	4.03±0.73 (n = 21)	0.21898



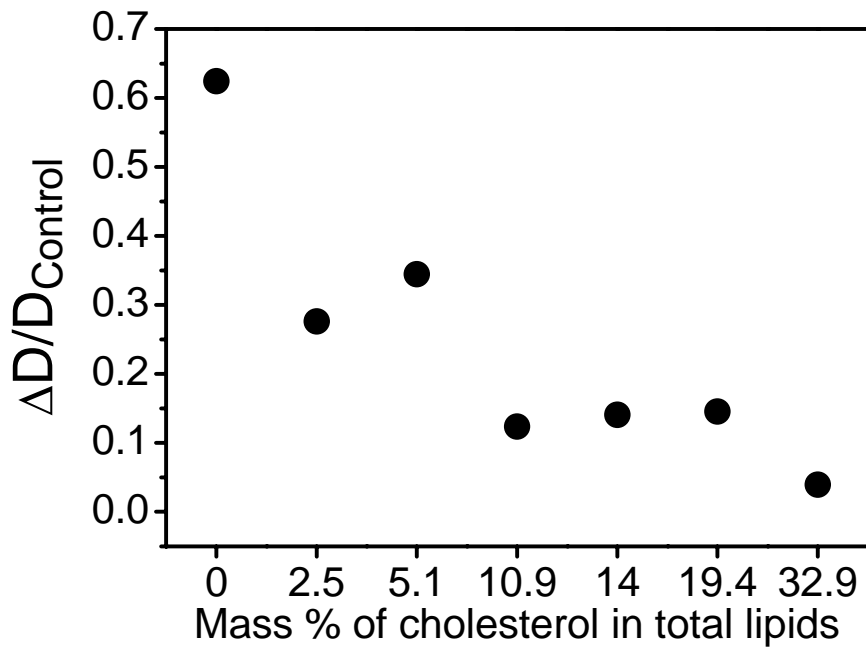


圖 4-22 含不同比例膽固醇的 DOPC 加入氫氧自由基之流動性變化量比率

含不同比例膽固醇的脂質體，將加入氫氧自由基前後的膜擴散係數差除以未加入氫氧自由基的膜擴散係數。結果顯示隨著膽固醇量的增加，氫氧自由基造成脂質體膜流動速度增快的現象有抑制的效果。

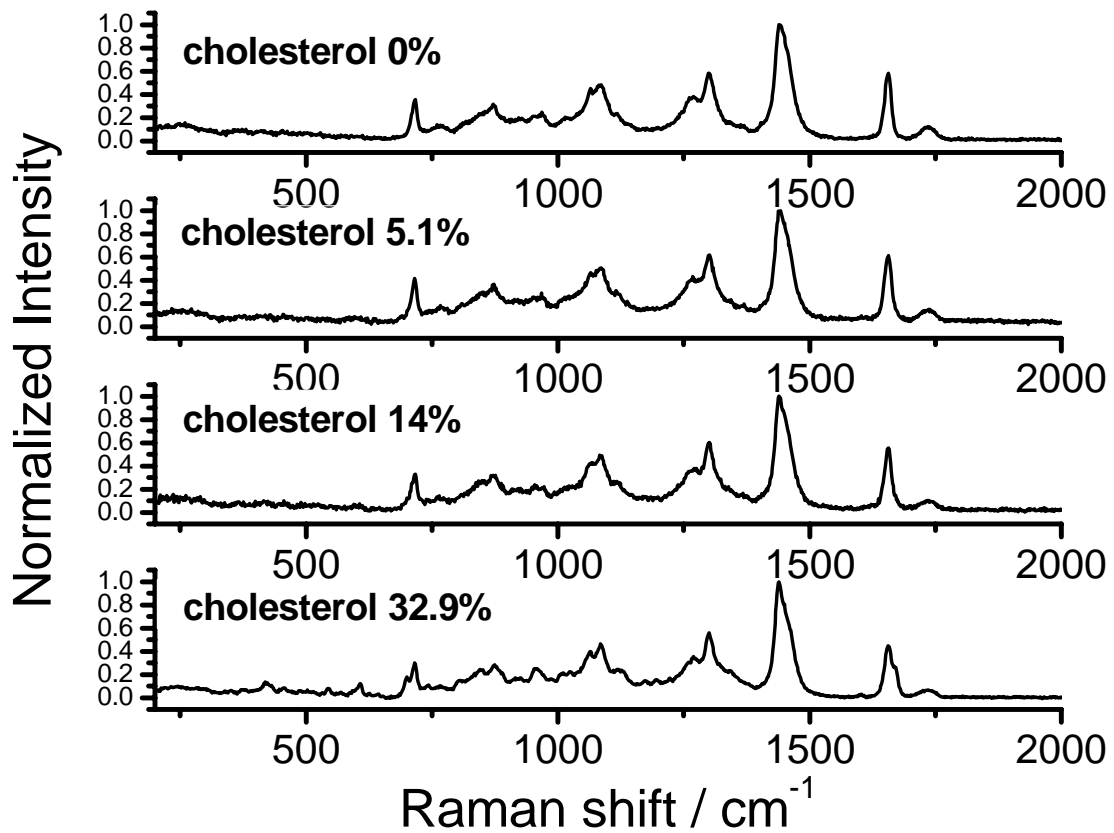


圖 4-23 含不同膽固醇的 DOPC 之拉曼光譜

圖由上到下為不含膽固醇的脂質體、含 5.1% 膽固醇的脂質體、含 14% 膽固醇的脂質體及含 32.9% 膽固醇的脂質體之拉曼光譜。含膽固醇的脂質體 DOPC 在 700 cm^{-1} 和小於 700 cm^{-1} 有屬於膽固醇的特徵峰出現；在 C=C 鍵的部分，DOPC 的 C=C 鍵出現在 1653 cm^{-1} ，而膽固醇上的 C=C 鍵是出現在 1670 cm^{-1} 。以上特徵在含 32.9% 膽固醇的脂質體 DOPC 較為明顯，含 5.1% 和 14% 膽固醇的脂質體則較不明顯。

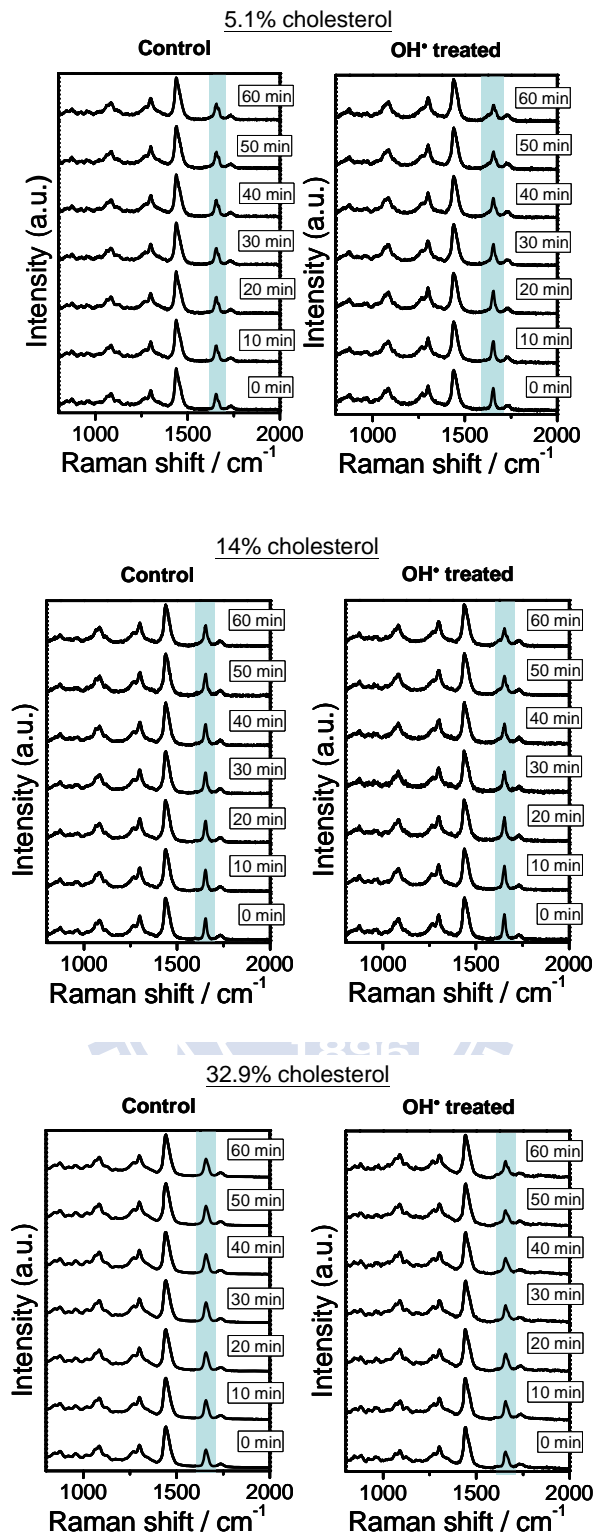


圖 4-24 含不同比例膽固醇的脂質體加入氫氧自由基後脂質 C=C 雙鍵的拉曼譜峰強度隨時間變化

圖上為含 5.1% 膽固醇的脂質體，圖中為含 14% 膽固醇的脂質體，圖下為含 32.9% 膽固醇的脂質體。結果顯示脂質體在含有膽固醇的情況下，加入氫氧自由基後其脂質雙鍵皆有隨著時間強度減少的現象。

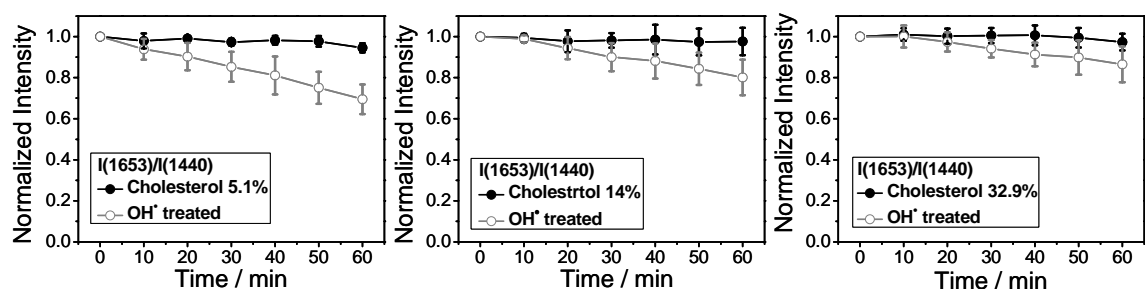


圖 4-25 含不同比例膽固醇的脂質體加入氫氧自由基後脂質 C=C 雙鍵的拉曼譜峰強度隨時間變化統計圖

圖左到右依序為含膽固醇 5.1% 的脂質體、含膽固醇 14% 的脂質體及含膽固醇 32.9% 的脂質體，黑色實心代表未加入氫氧自由基，灰色空心代表加入氫氧自由基，拉曼光譜對 1440 cm^{-1} 均一化後，觀察 1653 cm^{-1} 強度隨時間的變化。結果顯示加入氫氧自由基後，含膽固醇 5.1% 的脂質體其 1653 cm^{-1} 強度隨著時間下降量較多，加入氫氧自由基一小時後強度下降了約 30%；含 14% 膽固醇的脂質體其 1653 cm^{-1} 強度隨著時間下降量有減少，加入氫氧自由基一小時後強度下降約 20%；含 32.9% 膽固醇的脂質體其 1653 cm^{-1} 強度隨著時間下降量最小，加入氫氧自由基一小時後其 1653 cm^{-1} 強度隨著時間下降約 10%。



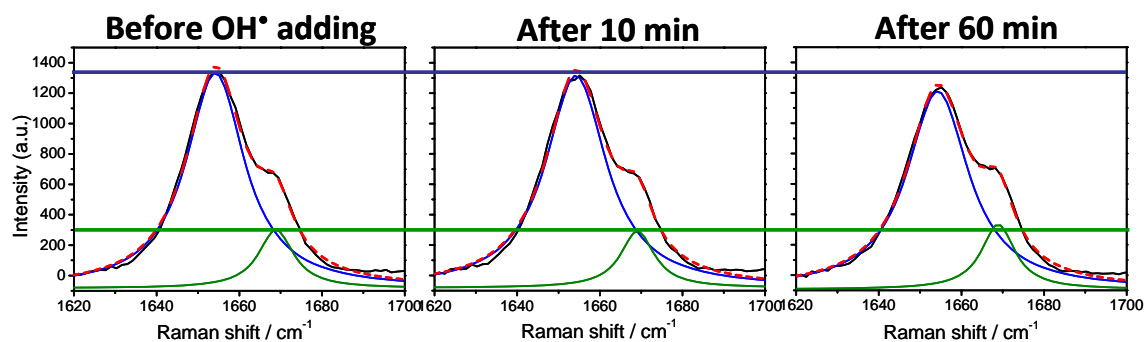


圖 4-26 含 32.9%膽固醇的脂質體加入氫氧自由基後在不同時間之拉曼光譜譜峰擬合
圖左到右依序是加入氫氧自由基前、加入氫氧自由基 10 分鐘和加入氫氧自由基 60 分鐘
的拉曼光譜，範圍取 1620 cm^{-1} 到 1700 cm^{-1} ，且對 1653 cm^{-1} 和 1670 cm^{-1} 譜峰做擬合。
擬合結果顯示：加入了氫氧自由基，含 32.9%膽固醇的脂質體其脂質雙鍵 1653 cm^{-1} 強
度有隨著時間下降，但是膽固醇雙鍵 1670 cm^{-1} 卻沒有隨時間有明顯的變化。



第五章 結論

在本實驗中利用螢光相關光譜測量脂質體 DOPC 的膜流動性，配合拉曼光譜測量脂質體 DOPC 的結構變化。實驗中加入過氧化氫對於脂質體 DOPC 膜的流動性與結構沒有明顯的變化；加入氫氧自由基後對於 DOPC 的流動性有顯著的增快情形，同時觀察結構變化也發現脂質體的雙鍵有受到破壞的現象。我們推論是因為脂質受到氧化之後造成碳鏈變短，使得流動性變快。

在實驗中也分別在脂質體加入了水溶性抗氧化劑維他命 C 和脂質中嵌入脂溶性抗氧化劑維他命 E，這兩種抗氧化劑皆屬於阻斷氧化反應持續生成的抗氧化劑。從實驗結果得到含有抗氧化劑的脂質體對於加入氫氧自由基造成流動性變快的現象，有明顯抑制的結果，脂質雙鍵被破壞的情形也有減緩，確實脂質體是因為發生氧化造成結構破壞與流動性增快。

為了讓脂質體模型更接近真實細胞膜，我們在脂質體膜上也嵌入不同比例的膽固醇。含有膽固醇的脂質體 DOPC 在膜流動性上有隨著膽固醇比例增加而減慢；加入了氫氧自由基後含有少量膽固醇的脂質體 DOPC 還是有膜流動性增快的現象。但是在含 32.9% 膽固醇的脂質體 DOPC 卻沒有變快；從拉曼光譜的結果在每種含膽固醇的脂質體 DOPC 皆有脂質雙鍵被破壞的情形。我們推斷是大部分氫氧自由基是破壞脂質雙鍵，僅有少量受到氫氧自由基破壞膽固醇結構，然而在高比例膽固醇存在的時候，大部分膽固醇沒有被破壞所以還是有維持細胞膜結構的功能存在，穩固了脂質體 DOPC 因為氫氧自由基的攻擊造成的流動速度變快現象。

我們利用了螢光相關光譜和拉曼光譜推論出了脂質過氧化膜流動性與結構變化之間的關係，未來將可以使用這次實驗所得到的技術，研究其他不同模型。真實細胞上含有蛋白質的存在，可以使用紅血球造影 (red blood cell ghost)，將研究模型推進真實細胞。利用螢光相關光譜技術也更準確與直接的定量膜流動性的改變，未來也可以使用螢光相關光譜研究真實細胞膜的流動性與使用拉曼光譜觀察是否有結構上的變化，了解脂質過氧化後，流動性與結構之間的相關性。

參考文獻

1. Oghalai, J.S., Zhao, H.-B., Kutz, J.W. & Brownell, W.E. Voltage- and tension-dependent lipid mobility in the outer hair cell plasma membrane. *Science* **287**, 658-661 (2000).
2. Tulenko, T.N., Chen, M., Mason, P.E. & Mason, R.P. Physical effects of cholesterol on arterial smooth muscle membranes: evidence of immiscible cholesterol domains and alterations in bilayer width during atherogenesis. *Journal of Lipid Research* **39**, 947-956 (1998).
3. Ishitsuka, Y., Pham, D.S., Waring, A.J., Lehrer, R.I. & Lee, K.Y.C. Insertion selectivity of antimicrobial peptide protegrin-1 into lipid monolayers: Effect of head group electrostatics and tail group packing. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1758**, 1450-1460 (2006).
4. Garcia-Saez, A.J. & Schwille, P. Fluorescence correlation spectroscopy for the study of membrane dynamics and protein/lipid interactions. *Methods* (2008).
5. Wayne M. Becker, L.J.K., Jeff Hardin The World of the Cell, Edn. 6th. Benjamin Cummings, 2005.
6. Vereb, G. *et al.* Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 8053-8058 (2003).
7. Marguet, D., Lenne, P.F., Rigneault, H. & He, H.T. Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *Embo Journal* **25**, 3446-3457 (2006).
8. 王鏡岩、朱聖庚、徐長法，生物化學，藝軒圖書出版社，2007年4月。
9. Singer, S.J. & Nicolson, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes *Science* **175**, 720-731 (1972).
10. Schroit, A.J. & Gallily, R. Macrophage fatty-acid composition and phagocytosis - effect of unsaturation on cellular phagocytic activity. *Immunology* **36**, 199-205 (1979).

11. Tocanne, J.F., Dupouzezanne, L., Lopez, A. & Tournier, J.F. Lipid lateral diffusion and membrane organization. *Febs Letters* **257**, 10-16 (1989).
12. Christian Le Grimellec, Gerard Friedlander, El Hossain El Yandouzi, Philippe Zlatkine & Giocondi, M.-C. Membrane fluidity and transport properties in epithelia. *Kidney International* **42**, 825-826 (1992).
13. Becker, L.B. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovascular Research* **61**, 461-470 (2004).
14. Matsumi, Y., Kono, M., Ichikawa, T., Takahashi, K. & Kondo, Y. Laser-induced fluorescence instrument for the detection of tropospheric OH radicals. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **75**, 711-717 (2002).
15. Naziroglu, M. New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochemical Research* **32**, 1990-2001 (2007).
16. Winterbourn, C.C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology* **4**, 278-286 (2008).
17. Ingraham, L.M., Boxer, L.A., Haak, R.A. & Baehner, R.L. Membrane fluidity changes accompanying phagocytosis in normal and in chronic granulomatous-disease polymorphonuclear leukocytes. *Blood* **58**, 830-835 (1981).
18. Marnett, L.J. Lipid peroxidation - DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **424**, 83-95 (1999).
19. Choe, M., Jackson, C. & Yu, B.P. Lipid-peroxidation contributes to age-related membrane rigidity. *Free Radical Biology and Medicine* **18**, 977-984 (1995).
20. Choi, J.H. & Yu, B.P. Brain synaptosomal aging - free-radicals and membrane fluidity. *Free Radical Biology and Medicine* **18**, 133-139 (1995).
21. Grassi, W., Serretti, R., Core, P., Muti, S. & Cervini, C. Influence of nifedipine on plasma-membrane fluidity and oxidative burst of polymorphonuclear leukocytes. *Rheumatology International* **14**, 221-225 (1995).

22. Verstraeten, S.V., Nogueira, L.V., Schreier, S. & Oteiza, P.I. Effect of trivalent metal ions on phase separation and membrane lipid packing: Role in lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **338**, 121-127 (1997).
23. Garcia, J.J. *et al.* Melatonin enhances tamoxifen's ability to prevent the reduction in microsomal membrane fluidity induced by lipid peroxidation. *Journal of Membrane Biology* **162**, 59-65 (1998).
24. Borst, J.W., Visser, N.V., Kouptsova, O. & Visser, A. Oxidation of unsaturated phospholipids in membrane bilayer mixtures is accompanied by membrane fluidity changes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1487**, 61-73 (2000).
25. Gazawi, H. *et al.* The effects of bile acids on beta-adrenoceptors, fluidity, and the extent of lipid peroxidation in rat cardiac membranes. *Biochemical Pharmacology* **59**, 1623-1628 (2000).
26. Chen, L.J., Yang, X.Q., Jiao, H.L. & Zhao, B.L. Tea catechins protect against lead-induced cytotoxicity, lipid peroxidation, and membrane fluidity in HepG2 cells. *Toxicological Sciences* **69**, 149-156 (2002).
27. Cazzola, R., Rondanelli, M., Russo-Volpe, S., Ferrari, E. & Cestaro, B. Decreased membrane fluidity and altered susceptibility to peroxidation and lipid composition in overweight and obese female erythrocytes. *Journal of Lipid Research* **45**, 1846-1851 (2004).
28. Yoshimoto, M. *et al.* Phosphatidylcholine vesicle-mediated decomposition of hydrogen peroxide. *Langmuir* **23**, 9416-9422 (2007).
29. Folmer, V. *et al.* H₂O₂ induces rapid biophysical and permeability changes in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1778**, 1141-1147 (2008).
30. Kunimoto, M., Inoue, K. & Nojima, S. Effect of ferrous ion and ascorbate-induced lipid-peroxidation on liposomal membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta* **646**, 85

- 169-178 (1981).
31. Sergent, O. *et al.* Role for membrane fluidity in ethanol-induced oxidative stress of primary rat hepatocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **313**, 104-111 (2005).
 32. Nourissat, P. *et al.* Ethanol induces oxidative stress in primary rat hepatocytes through the early involvement of lipid raft clustering. *Hepatology* **47**, 59-70 (2008).
 33. Christova, Y., James, P.S. & Jones, R. Lipid diffusion in sperm plasma membranes exposed to peroxidative injury from oxygen free radicals. *Molecular Reproduction and Development* **68**, 365-372 (2004).
 34. Fushimi, K., Dix, J.A. & Verkman, A.S. Cell-membrane fluidity in the intact kidney proximal tubule measured by orientation-independent fluorescence anisotropy imaging. *Biophysical Journal* **57**, 241-254 (1990).
 35. Zubenko, G.S., Kopp, U., Seto, T. & Firestone, L.L. Platelet membrane fluidity individuals at risk for Alzheimer's disease: a comparison of results from fluorescence spectroscopy and electron spin resonance spectroscopy. *Psychopharmacology* **145**, 175-180 (1999).
 36. Fukaya, T. *et al.* Arachidonic acid preserves hippocampal neuron membrane fluidity in senescent rats. *Neurobiology of Aging* **28**, 1179-1186 (2007).
 37. Chen, Y., Lagerholm, B.C., Yang, B. & Jacobson, K. Methods to measure the lateral diffusion of membrane lipids and proteins. *Methods* **39**, 147-153 (2006).
 38. Day, C.A. & Kenworthy, A.K. Tracking microdomain dynamics in cell membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1788**, 245-253 (2009).
 39. Magde, D., Elson, E. & Webb, W.W. Thermodynamic fluctuations in a reacting system: measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Physical Review Letters* **29**, 705-708 (1972).
 40. Dietrich, C. *et al.* Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophysical Journal* **80**, 1417-1428 (2001).

41. Rigler, R., Mets, U., Widengren, J. & Kask, P. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low-background - analysis of translational diffusion. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **22**, 169-175 (1993).
42. Berland, K.M., So, P.T.C. & Gratton, E. Two-photon fluorescence correlation spectroscopy - method and application to the intracellular environment. *Biophysical Journal* **68**, 694-701 (1995).
43. Schwille, P., MeyerAlmes, F.J. & Rigler, R. Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. *Biophysical Journal* **72**, 1878-1886 (1997).
44. Heinze, K.G., Rarbach, M., Jahnz, M. & Schwille, P. Two-photon fluorescence coincidence analysis: Rapid measurements of enzyme kinetics. *Biophysical Journal* **83**, 1671-1681 (2002).
45. Petersen, N.O. Scanning fluorescence correlation spectroscopy .1. Theory and simulation of aggregation measurements. *Biophysical Journal* **49**, 809-815 (1986).
46. Petersen, N.O., Hoddellius, P.L., Wiseman, P.W., Seger, O. & Magnusson, K.E. Quantitation of membrane-receptor distributions by image correlation spectroscopy - concept and application. *Biophysical Journal* **65**, 1135-1146 (1993).
47. Thompson, N.L., Burghardt, T.P. & Axelrod, D. Measuring surface dynamics of biomolecules by total internal-reflection fluorescence with photobleaching recovery or correlation spectroscopy. *Biophysical Journal* **33**, 435-454 (1981).
48. Kastrup, L., Blom, H., Eggeling, C. & Hell, S.W. Fluorescence fluctuation spectroscopy in subdiffraction focal volumes. *Physical Review Letters* **94** (2005).
49. Elson, E.L., Schlessinger, J., Koppel, D.E., Axelrod, D. & Webb, W.W. Measurement of lateral transport on cell surfaces. *Progress in clinical and biological research* **9**, 137-147 (1976).
50. Fahey, P.F. *et al.* Lateral diffusion in planar lipid bilayers. *Science* **195**, 305-306 (1977).

51. Korlach, J., Schwille, P., Webb, W.W. & Feigenson, G.W. Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 8461-8466 (1999).
52. Schwille, P., Haupts, U., Maiti, S. & Webb, W.W. Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation. *Biophysical Journal* **77**, 2251-2265 (1999).
53. Bacia, K., Majoul, I.V. & Schwille, P. Probing the endocytic pathway in live cells using dual-color fluorescence cross-correlation analysis. *Biophysical Journal* **83**, 1184-1193 (2002).
54. Haupts, U., Maiti, S., Schwille, P. & Webb, W.W. Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 13573-13578 (1998).
55. Kettling, U., Koltermann, A., Schwille, P. & Eigen, M. Real-time enzyme kinetics monitored by dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 1416-1420 (1998).
56. Eggeling, C. *et al.* Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* **457**, 26 (2009).
57. Krichevsky, O. & Bonnet, G. Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications. *Reports on Progress in Physics* **65**, 251-297 (2002).
58. 顏秀蘭. 利用「螢光相關光譜技術」與「螢光光鉗」探討蛋白質與微脂體的交互作用. 國立交通大學碩士論文, 民國 96 年 7 月.
59. 林鴻隆. 利用拉曼光鉗技術觀測單一細胞之氧化傷害過程. 國立交通大學碩士論文, 民國 96 年 7 月.
60. Puppels, G.J. *et al.* Laser irradiation and raman-spectroscopy of single living cells and

- chromosomes - sample degradation occurs with 514.5nm but not with 660nm laser-light. *Experimental Cell Research* **195**, 361-367 (1991).
61. Angelova, M.I. & Dimitrov, D.S. Liposome electroformation. *Faraday Discussions* **81**, 303-311 (1986).
 62. Halliwell, B. & Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology* **142**, 231-255 (2004).
 63. Van den Bogaart, G., Krasnikov, V. & Poolman, B. Dual-color fluorescence-burst analysis to probe protein efflux through the mechanosensitive channel MscL. *Biophysical Journal* **92**, 1233-1240 (2007).
 64. Benda, A. *et al.* How to determine diffusion coefficients in planar phospholipid systems by confocal fluorescence correlation spectroscopy. *Langmuir* **19**, 4120-4126 (2003).
 65. 郭寶錚、陳玉敏，生物統計入門，五南圖書出版股份有限公司，2007。
 66. Movasaghi, Z., Rehman, S. & Rehman, I.U. Raman spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews* **42**, 493-541 (2007).
 67. Arora, A., Byrem, T.M., Nair, M.G. & Strasburg, G.M. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **373**, 102-109 (2000).
 68. Gabbianelli, R., Cifani, C., Massi, M., Polidori, C. & Falcioni, G. Oxidative damage in rat erythrocyte membranes following ethanol intake: Effect of ethyl pyruvate. *Chemico-Biological Interactions* **169**, 122-131 (2007).
 69. Kahya, N. & Schwille, P. How phospholipid-cholesterol interactions modulate lipid lateral diffusion, as revealed by fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of Fluorescence* **16**, 671-678 (2006).
 70. Schnitzer, E., Pinchuk, I., Bor, A., Leikin-Frenkel, A. & Lichtenberg, D. Oxidation of liposomal cholesterol and its effect on phospholipid peroxidation. *Chemistry and*

Physics of Lipids **146**, 43-53 (2007).

