

國立交通大學
理學院應用化學系碩士班

碩士論文

利用「自體螢光成像」及「拉曼光譜」技術探討白血球噬
菌動態過程

Spatio-temporal Characterization of the Phagocytic Process
Using Autofluorescence Imaging and Raman
Micro-spectroscopy

研究生: Yi-Cyun Yang (楊逸群)

指導教授: Dr. Ian Liau (廖奕翰 博士)

中華民國九十八年八月

利用「自體螢光成像」及「拉曼光譜」技術探討白血球噬菌動態過程

學生：楊逸群

指導教授：廖奕翰 博士

國立交通大學 應用化學系碩士班

摘要

白血球細胞如巨噬細胞 (macrophage) 受外來入侵物例如細菌刺激後，能藉由變形運動向入侵物靠近，接著靠其偽足將入侵物噬入細胞內，此過程稱為吞噬作用 (phagocytosis)。在吞噬作用之後，白血球細胞可利用具有高細胞毒性之活性氧化物 (reactive oxygen species, ROS) 或酵素將外來異物分解。過去觀察此過程主要仰賴電子顯微鏡或光學螢光成像技術。前者僅能提供高解析度之形貌 (morphology) 上的訊息，也無法觀測活細胞。光學螢光成像雖可提供專一性影像，但細胞染色過程不但繁瑣，染劑對免疫細胞本身也屬於一種異物刺激。在此，我們利用共焦自體螢光成像 (confocal autofluorescence imaging) 及共焦拉曼顯微光譜 (confocal Raman micro-spectroscopy) 系統研究巨噬細胞吞噬酵母菌 (yeast) 之動態過程。發現在受刺激後，巨噬細胞內之自體螢光顯著增強。我們更進一步發現當酵母菌被吞噬入細胞內之後，相同的自體螢光集中在酵母菌周圍。此自體螢光之光譜特徵與 NADPH 氧化酶中之黃素蛋白 (flavoprotein) 吻合。以上觀察可解釋為含黃素蛋白之 NADPH 氧化酶在巨噬細胞受刺激後表現量增加，而巨噬細胞將酵母菌吞噬後，含 NADPH 氧化酶之囊泡會向內含酵母菌之吞噬體靠近並啟動活性氧化物的製造。為了支持以上解釋，並驗證 NADPH 氧化酶產生的活性氧化物的確作用於入侵之酵母菌，我們利用拉曼顯微光譜技術觀察酵母菌在巨噬細胞吞噬後之動態光譜變化。我們發現隨吞噬過程進行，酵母菌不飽和碳鏈相關的振動譜線，如 1651 cm^{-1} (C=C) 以及 1266 cm^{-1} (=CH)，其強度逐漸減弱。此結果與酵母菌脂質的過氧化 (lipid peroxidation) 反應吻合。此外，在細胞外施加活性氧化物 (氫氧自由基、

次氯酸) 至酵母菌的對照實驗也發現有相似結果。而加入 NADPH 氧化酶抑制劑 - apocynin 後，此不飽和碳鍵振動譜線減弱的現象便不再發生。以上實驗結果均與上述解釋吻合。我們結合自體螢光成像及拉曼光譜技術成功觀察到巨噬細胞之活化及吞噬動態過程，也定量量測到巨噬細胞以活性氧化物為武器，氧化外來異物脂質。此方法之特色在於無需任何染色及細胞前處理便可對單一細胞之生理過程提供高解析度、動態及分子層次的訊息，也提供了一個新的定量白血球破壞能力之方法。我們預期相同技術未來亦可能進一步應用於研究活體動物 (living animal) 中之細胞過程 (cellular process)。



Spatio-temporal Characterization of the Phagocytic Process

Using Autofluorescence Imaging and Raman

Micro-spectroscopy

Student: Yi-Cyun Yang

Advisor: Dr. Ian Liau

Department of Applied Chemistry
National Chiao-Tung University

ABSTRACT

For the first time, kinetic Raman spectroscopy and time-lapse autofluorescence microscopy have been employed to follow the phagocytosis of invading yeasts by single macrophages in a label-free manner. We found the stimulated macrophages exhibit a drastic increase of autofluorescence in their cytoplasm, and, more remarkably, the autofluorescence localized around the phagocytosed yeasts. These observations can be rationalized with the assembly of FAD to NADPH oxidase, and the translocation of the assembled NADPH oxidase to phagosomes. In order to consolidate this hypothesis, we examined the kinetic Raman spectra of single phagocytosed yeasts and found the intensity of the band associated with the C=C stretching declined progressively as the phagocytic process proceeds. The same trend was also observed in *ex vivo* experiments on yeast cells treated with OH^\bullet and HOCl . In contrast, the treatment of an NADPH inhibitor – apocynin, entirely prevented the oxidation of phagocytic yeasts. These observations are consistent with the lipid peroxidation of phagocytosed yeasts by the action of reactive oxygen species (ROS) produced by macrophages. Our results demonstrate that confocal autofluorescence imaging and Raman micro-spectroscopy can reveal the spatio-temporal change of intracellular molecular processes without employing any labeling reagents. Most significantly, our approach demonstrates the

quantification of the bactericidal capability of phagocytic cells using label-free Raman micro-spectroscopy. This unique information is otherwise very difficult to obtain, if not possible, using other methods. We expect that the same approach can potentially be extended to investigate to the phagocytic process in living animals.



誌謝

一個人在人生旅途中會認識各式各樣的朋友，而其人生道路也在這些朋友的幫助之下更加順暢。在我碩士班的期間認識了一群有趣的朋友，他們使我能在愉悅的環境下渡過這段艱辛工作過程，當然，中間也受到他們多方幫忙，解決了很多實驗及生活上的困難。

首先，在剛加入實驗室時，鴻隆學長及秀蘭學姊幫我解答了很多儀器上的問題，使我對實驗室各項工具能快速的了解。而 Bush 和小龜學長則是每天和我們打成一片，使我能和實驗室其他成員很快的熟識，並且在碩一時各項實驗的疑難雜症也都有賴兩位學長熱心幫忙解答。而當了兩年同學的小蔥，雖然總是表現冷淡，但私下卻很關心實驗室大家的生活狀況，同時也常幫實驗室大家遇到的問題，提出絕妙的解答。再來是嘉仁、意玲、士豪、大衛等學弟妹以及不知道該稱呼學弟還是學長的學翰，你們幫實驗室帶來十足活力，雖然為原本嚴肅的研究室引來些許吵雜，但是這也是支持大家做實驗的動力。最後是專題生大胖、土豆、艾瑞克、爺爺、小傑、10、嘟嘟，你們雖然還未正式進入碩士班，但是每個人都很專心於實驗，幫實驗室學長姊們很多忙，也帶來歡樂。

除了這些朋友，也必需感謝廖奕翰博士，在碩士班兩年中教導了我們解決問題的方法與正確的工作態度。另外還有張維典醫師在研究相關問題上的指點，以及李耀坤教授實驗室學長姐在細菌培養上的幫助。最後，最重要的當然還是家人的支持，讓我可以無後顧之憂的專心於學業。

目 錄

	頁次
中文摘要	i
英文摘要	iii
誌謝	v
目錄	vi
圖目錄	viii
第一章、背景介紹	
1-1 白血球與免疫系統之簡介	1
1-1-1 巨噬細胞利用吞噬作用隔離入侵異物	3
1-1-2 巨噬細胞製造活性氧化物質消滅入侵異物	6
1-1-3 白血球功能異常之相關疾病	9
1-2 相關研究之文獻回顧	11
1-3 研究動機及目標	18
第二章、研究材料及實驗方法	
2-1 巨噬細胞細胞株之培養流程	20
2-2 酵母菌之培養流程	22
2-3 同位素標定酵母菌之流程	24
2-4 雷射共焦自體螢光顯微鏡技術應用於巨噬細胞吞噬酵母菌之動態成像	25
2-5 拉曼散射光譜技術應用於量測酵母菌於巨噬細胞內及細胞外之氧化傷害	26
第三章、結果與討論	
3-1 巨噬細胞吞噬酵母菌過程之動態自體螢光影像	28
3-2 單一酵母菌被巨噬細胞吞噬後之動態拉曼光譜變化	36

3-3 酵母菌之拉曼光譜分析	41
3-4 利用同位素取代法證明巨噬細胞內之酵母菌為拉曼光譜變化之來源 ...	43
3-5 培養液、酵母菌與巨噬細胞對所觀測拉曼光譜強度之貢獻	48
3-6 NADPH 氧化酶抑制劑 - apocynin 對巨噬細胞自體螢光影像及酵母菌 拉曼光譜之影響	50
3-7 利用化學方法產生活性氧化物模擬酵母菌氧化傷害與細胞內實驗結果 之比較	56
第四章、結論與未來展望	63
附錄、 I 光譜儀校正步驟	66
II 最佳化拉曼光譜系統之步驟	68
III 排除雷射對所觀測酵母菌拉曼光譜強度變化之影響	71
VI 脂質過氧化機制之簡介	74
參考文獻	77



圖目錄

頁次

圖 1-1 吞噬細胞 (phagocytes) 例如巨噬細胞 (macrophage) 對外來異物進行吞噬之示圖。	5
圖 1-2 NADPH 氧化酶組裝過程示意圖。	7
圖 1-3 組裝完成之 NADPH 氧化酶透過氧化細胞質內的 NADPH 在吞噬體內產生活性氧化物的過程。	8
圖 2-1 巨噬細胞細胞株 (RAW 264.7) 之培養流程。	21
圖 2-2 酵母菌 (<i>Pichia Pastoris</i>) 之培養流程。	23
圖 2-3 拉曼散射光譜系統架設圖。	27
圖 3-1 異物刺激後白血球自體螢光變化之影像及統計結果。	31
圖 3-2 吞噬作用後白血球自體螢光的分佈情形。	32
圖 3-3 吞噬作用前後酵母菌周圍螢光之變化。	33
圖 3-4 受吞噬後酵母菌之橫截面螢光強度分析。	34
圖 3-5 白血球細胞內自體螢光之放射光譜。	35
圖 3-6 吞噬作用後酵母菌隨時間之拉曼散射光譜變化。	38
圖 3-7 吞噬作用後酵母菌 1441 cm^{-1} 訊號隨時間之變化。	39
圖 3-8 吞噬作用後酵母菌拉曼光譜中， 1651 cm^{-1} 和 1441 cm^{-1} 譜線強度比例隨時間之變化情形。	40
圖 3-9 酵母菌拉曼散射光譜譜線解析。	42
圖 3-10 同位素取代過後酵母菌拉曼光譜解析。	45
圖 3-11 酵母菌隨同位素取代時間之動態拉曼光譜變化。	46
圖 3-12 同位素標定之酵母菌在吞噬作用後之動態拉曼光譜變化。	47
圖 3-13 培養液、巨噬細胞細胞質、酵母菌在拉曼散射光譜中的貢獻 (1651 cm^{-1} , C=C)。	49

圖 3-14 Apocynin 對 NADPH 氧化酶抑制方式示意圖。	52
圖 3-15 施加 NADPH 氧化酶抑制劑後，受吞噬酵母菌隨時間之動態拉曼光譜 變化。	53
圖 3-16 施加 NADPH 氧化酶抑制劑前後，受吞噬酵母菌拉曼光譜譜線 1651 cm ⁻¹ / 1441 cm ⁻¹ 隨時間之變化。	54
圖 3-17 施加 NADPH 氧化酶抑制劑巨噬細胞在吞噬作用後自體螢光之影響。	55
圖 3-18 酵母菌在 0.1 mM 氫氧自由基下，三十分鐘的拉曼光譜變化。	59
圖 3-19 酵母菌在 0.1 mM 過氧化氫下，四十五分的拉曼光譜變化。	60
圖 3-20 酵母菌在 0.1 mM 次氯酸下，三十分鐘的動態拉曼光譜變化。	61
圖 3-21 酵母菌在活性氧化物作用下，拉曼光譜譜線 1651 cm ⁻¹ / 1441 cm ⁻¹ 比 例隨時間的變化。	62
圖 I-1 Hg-Ar 光源之光譜。	67
圖 II-1 聚苯乙烯微粒之拉曼散射光譜。	69
圖 II-2 共焦光圈位置檢測。	70
圖 III-1 模擬酵母菌在白血球吞噬作用實驗下，雷射之破壞情形。	72
圖 III-2 酵母菌在三十分鐘雷射持續施加下拉曼光譜變化。	73
圖 VI-1 脂質過氧化過程示意圖	76

第一章、背景介紹

1-1 白血球與免疫系統之簡介

動、植物體利用所謂「免疫系統」以防衛微生物的入侵。一般的動植物皆具有兩層基本防衛體系：體表障礙和先天免疫系統 (innate immune system)。而脊椎動物又多了一道運作機制較複雜的後天免疫系統 (adaptive immune system)。

體表障礙正如其名，是由動植物體體表產生物理性、化學性或生物性的障礙來防止微生物進入體內的方式。葉子表面的角質層、蛋的殼膜和皮膚都是屬於物理障礙，也是最前線的防衛方式；眼淚和唾液中的抗菌性酵素、呼吸道和皮膚產生的抗生素則屬於化學屏障；動植物體的共生菌要和外來病菌爭奪生活空間和食物時，也會透過改變環境的酸鹼值或離子含量來增加自己存活的机会，這就是生物性的屏障。

一旦病菌突破體表障礙的防衛線而進入體內後，首先啟動的是非專一性也不具免疫記憶的「先天免疫系統」，而先天免疫系統又可分成吞噬作用 (phagocytosis)、發炎反應 (inflammation) 及補體系統 (complement system)。

具備吞噬功能的細胞稱為吞噬細胞 (phagocyte)。白血球細胞中的幾種類型例如顆粒細胞 (granulocytes)、單核細胞 (monocytes)、巨噬細胞 (macrophages) 及樹突細胞 (dendritic cell) 便為吞噬細胞。當外來異物例如病菌入侵時，吞噬細胞會穿過微血管或微淋管進入組織間隙，並將病菌吞入形成所謂的吞噬體 (phagosome)。吞噬體會再與帶有酵素的溶酶體 (lysosome) 結合而形成所謂噬溶體 (phagolysosome)。最後病菌便會被溶酶體內的酵素或所謂「活性氧化物質」破壞。本研究的主題便在吞噬細胞利用「活性氧化物質」氧化外來異物之動態過程。

發炎反應是在病原體侵入後組織局部產生紅、熱、腫、痛的徵狀。造成發炎反應的原因是受傷的組織細胞釋放出組織胺，使附近的血管擴張並增大微血管之通透性。血管

擴張會增加血流量，進而帶來更多的吞噬細胞和具破壞病原體能力的免疫球蛋白。通透性增加的微血管亦有助於吞噬細胞和免疫球蛋白穿過血管。然而，增大的血流會使組織附近產生紅、熱現象，微血管通透性變大也增加血漿滲出，造成腫脹，進而壓迫神經而產生疼痛。在發炎區域產生的黏稠狀液體一般稱之為膿。膿就是死亡的組織細胞、吞噬細胞、入侵的病原體及組織滲出液。

補體系統因其能補足抗體消滅致病原的能力而得名。整個補體系統包含二十個以上的蛋白質。補體反應能導致多種細胞如紅血球、血小板和細菌等產生免疫性溶解。當補體被活化結合到細胞膜時，細胞膜會出現腫脹和結構上改變，導致細胞溶解。當活化的補體蛋白黏附在外來的入侵物上，也能刺激吞噬細胞的吞噬作用（抗體覆蓋至入侵病原體也具有同樣的效果），這個過程稱為調理作用（opsonization）。並且，受到補體蛋白附著的入侵物，也會較容易黏附在血管壁的表面，這也提升在血液中流動的吞噬細胞對入侵物之吞噬效率。

先天免疫系統幾乎能消滅大部分的致病原。如果仍有無法清除的部份，就得由扮演第三道防線的後天免疫系統來處理。相較於先天免疫系統，後天免疫系統較具專一性，且具有免疫記憶。

後天免疫系統會根據巨噬細胞及樹突細胞提供的入侵物訊息，活化針對該入侵物的抑制性 T 細胞 (suppressor T cell)，使其分化且增殖成殺手 T 細胞 (killer T cell) 或輔助 T 細胞 (helper T cell)。殺手 T 細胞會負責清除被入侵物感染的細胞，而輔助 T 細胞則會把入侵物的訊息又傳遞給 B 細胞，造成針對該入侵物的 B 細胞活化、增殖，並篩選出對抗原最具親和力的抗體。抗體的變異區 (variable region) 能與抗原形成專一性結合，阻止它感染正常細胞，並用另一端和巨噬細胞結合，使巨噬細胞吞噬已結合抗原的細菌，進而達到滅菌的作用。受過第一次刺激的 B 細胞能轉變為記憶 B 細胞 (memory B cell)，可在下次受到相同入侵物攻擊時，迅速產生更多抗體。同時，記憶 B 細胞對特定抗原的感染具有終身保護作用，施打疫苗預防某些疾病便是基於此原理。

本論文的研究重點在於利用影像及光譜技術探討吞噬細胞（巨噬細胞）進行吞噬作用後，細胞內成分分佈的動態變化，以及入侵物受巨噬細胞破壞的情形。

1-1-1 巨噬細胞利用吞噬作用隔離入侵異物

巨噬細胞源自於單核細胞，當單核細胞受到受傷細胞、病原體或組織胺的刺激後，可穿過血管的內皮細胞層進入組織，再轉變成巨噬細胞。

巨噬細胞可同時參與先天免疫系統及後天免疫系統。在先天免疫系統中，巨噬細胞主要功能在清除死傷的細胞以及外來的塵埃和病原體。在組織產生發炎反應時，大量的嗜中性球會先佔據該受傷的區域。當這些細胞死亡以後，巨噬細胞就會負責清理這個區域。此外，巨噬細胞也會駐守在肺臟、肝臟、神經中樞的組織、骨或脾臟等器官，以即時吞噬外來的物質如塵埃或病原體。巨噬細胞吞噬外來入侵物後，會將外來入侵物存在由細胞膜摺疊組成的吞噬體內。接著，吞噬體會跟含有酵素和活性氧化物的溶酶體結合，形成所謂噬溶體。這些酵素和活性氧化物具細胞毒性，可破壞及殺死外來入侵物。最後巨噬細胞可再將入侵物之殘骸排出。因此吞噬作用的主要功能，不但可隔離入侵物，避免入侵病菌在動物體內繼續擴散，造成更大範圍的感染，同時也可破壞殺死入侵病菌。此外，巨噬細胞比嗜中性球的吞噬能力高五倍以上，能夠吞噬的外來物體體型也較大，可同時消化達一百個以上的細菌。

巨噬細胞除了在先天免疫系統中能施行吞噬作用外，更是眾多細胞中第一個呈遞抗原的細胞。巨噬細胞的另一個主要功能即是啟動後天免疫系統。當巨噬細胞消化病原體後，巨噬細胞會把抗原呈遞給相應的輔助 T 細胞。在這過程中，巨噬細胞會把抗原整合至細胞膜，並把抗原結合在主要組織相容性複合體 II 型分子 (MHCII) 之上，以告知其他白血球細胞。接著抗原呈遞導致了抗體的產生。抗體會附著在病原體的抗原上，使病原體更容易被巨噬細胞的細胞膜黏附，甚至被巨噬細胞吞噬。另外淋巴核中受感染的巨噬細胞的表面所發生的抗原呈遞會刺激 1 型輔助 T 細胞 (TH1) 增殖，當處於淋巴核中的 B 細胞通過其抗體來辨識病原體表面相同卻未受處理的抗原時，這些病原體就會被吞噬並處理。之後，被處理的抗原又會透過 B 細胞表面的 (MHCII) 呈遞，使 TH1 上的受體開始對抗原—MHCII 進行辨認，並導致 B 細胞產生可以幫助抗原調理作用的

抗體，使吞噬細胞可以更好清除致病原。

從以上的介紹可以知道，巨噬細胞不但能扮演清道夫的角色，主動清除入侵的病原體，還能變成傳令兵，吹響號角喚醒後天免疫系統，並和後天免疫系統互相配合，達到更佳的清除病原體效果，其在免疫系統的功能十分重要。



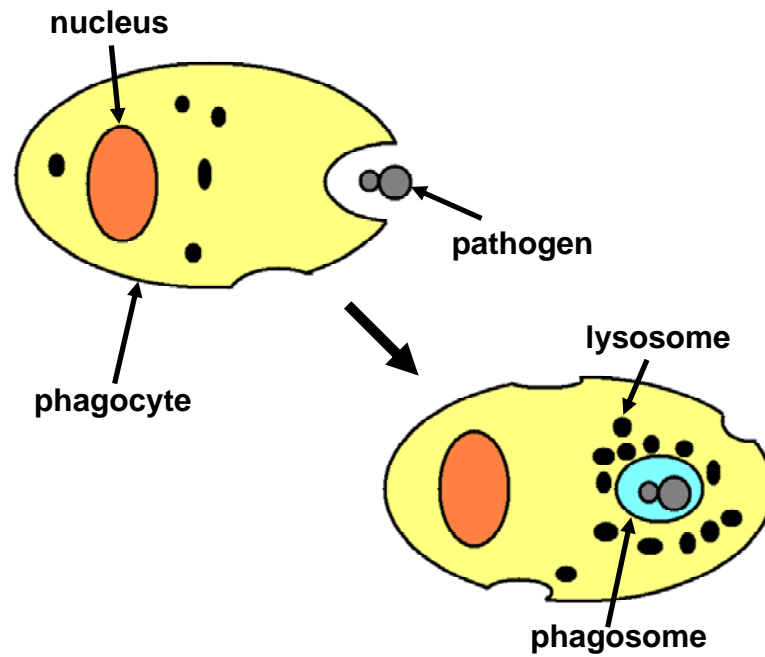


圖 1 - 1 吞噬細胞 (phagocytes) 例如巨噬細胞 (macrophage) 對外來異物進行吞噬之示意圖。外來入侵物受到巨噬細胞吞噬後，會存在由細胞膜摺疊組成的吞噬體內。吞噬體會跟內有酵素和活性氧化物的溶酶體結合，形成噬溶體。入侵物就會被這些酵素和活性氧化物破壞導致死亡，最後再被巨噬細胞排出。

1-1-2 巨噬細胞製造活性氧化物質消滅入侵異物

由前面章節所提到的資訊，我們知道白血球消滅入侵物的方法，是利用溶酶體裡面的酵素和所謂的活性氧化物質 (reactive oxygen species, ROS) 來破壞入侵物，最後導致入侵物死亡¹⁻³。接下來我們將進一步介紹白血球內產生活性氧化物質的過程。

白血球內產生活性氧化物質的媒介是 NADPH 氧化酶 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase, NADPH oxidase)。NADPH 氧化酶有時又稱為 respiratory burst 氧化酶，是一個連接在細胞膜或是吞噬體膜上的酵素複合體。NADPH 氧化酶由六個單元組成⁴，包括 Rho guanosine triphosphatase (GTPase, Rac1 或 Rac2)，以及五個 phox (phagocytic oxidase) 單元，gp91phox、p22phox、p40phox、p47phox 和 p67phox。

NADPH 氧化酶的主要功能是將細胞質中的 NADPH 氧化，並將吞噬體內的氧氣轉變成超氧化物 (O_2^-)。如圖 1-2 所示 cytochrome-b 是 NADPH 氧化酶其中的一部分。cytochrome-b 由 gp91phox 和 p22phox 在膜上組成，cytochrome-b 的其中一個還原中心接了 FAD (flavin adenine dinucleotide)⁵。NADPH 氧化酶就透過 NADPH 及 FAD 等物質間的電子交換，最後將氧氣轉變成超氧化物。在產生超氧化物後，白血球細胞會繼續將超氧化物轉換成過氧化氫 (hydrogen peroxide, H_2O_2)。過氧化氫可在其他酵素例如 myeloperoxidase (MPO) 作用下變成次氯酸 (HOCl)^{6,7}。這些和氧相關的氧化物統稱為活性氧化物質 (ROS)，是白血球用來攻擊入侵物的一項重要武器。

NADPH 氧化酶活化時，p47phox、p67phox 和 GTPase 等原本存在細胞質中的物質會開始向原本結合在膜上的 cytochrome-b (gp91phox 和 p22phox 組成) 移動並與其結合⁸，以造成電子的傳遞，最終導致氧氣被轉變成超氧化物。

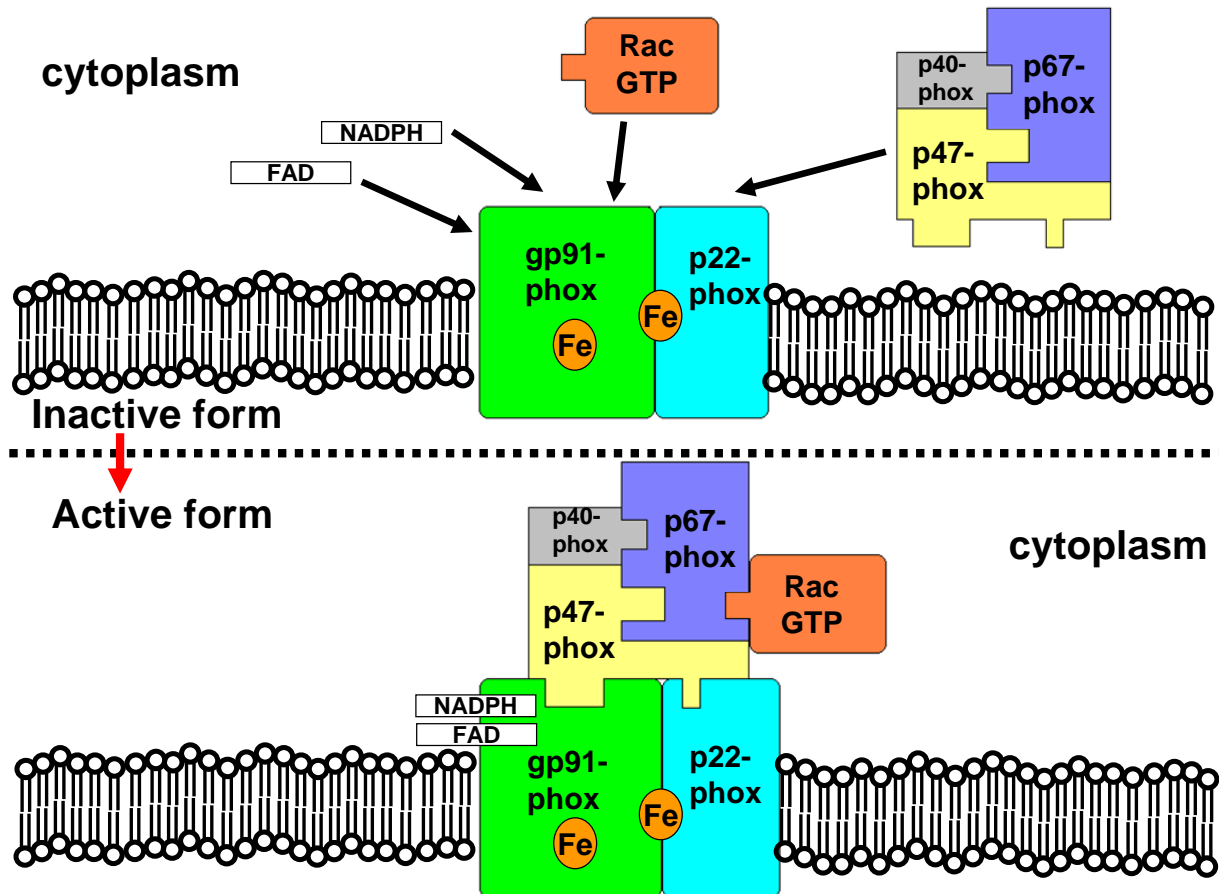


圖 1-2 NADPH 氧化酶組裝過程示意圖。當白血球受到異物刺激後，原本處於細胞質中的 NADPH 氧化酶次單元，會向膜上之次單元靠近、結合，而形成具活性氧化物產生功能之活化態。圖中 gp91phox 具有 FAD 之結合位置，為一種黃素蛋白。而 gp91 phox 與 p22phox 為含有鐵之次單元，兩者結合後稱為細胞色素 (cytochrome-b 或 flavocytochrome-b)。

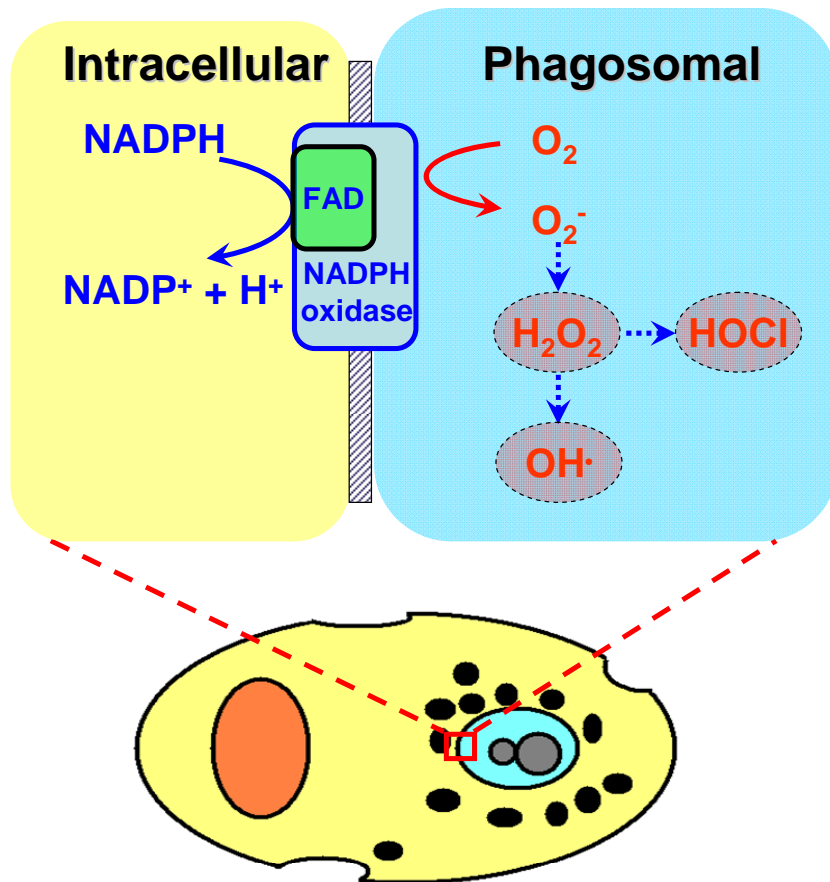


圖 1-3 組裝完成之 NADPH 氧化酶透過氧化細胞質內的 NADPH 在吞噬體內產生活性氧化物的過程。

1-1-3 白血球功能異常之相關疾病

由前面對免疫系統的介紹，我們可以了解白血球對人體防衛系統的重要性，所以，一旦白血球功能不正常，人體對外來物的抵抗能力就會減弱，容易造成疾病的產生。以下就介紹幾種因白血球功能異常的疾病。

(1) 慢性肉芽腫 (chronic granulomatous disease, CGD) :

慢性肉芽腫是一種遺傳性的疾病，遺傳模式有三分之二是性聯隱性遺傳，另外三分之一是體隱性遺傳，所以發病的患者大部分是男性，女性易為隱性帶原者，較少發病。之前我們介紹過，白血球是藉由產生活性氧化物質來消滅病原體，而產生活性氧化物的重要關鍵為 NADPH 氧化酶，慢性肉芽腫的病因是因為 NADPH 氧化酶的部分次單元 (cytochrome-b、p47phox、p67phox 等) 有缺陷，造成其無法被正常用來產生活性氧化物。所以在這樣的患者，其白血球雖然能正常的吞噬病原體，但是卻沒有足夠的活性氧化物來清除它，因此特別容易受到微生物感染，例如沙門氏菌、具有催化酶的金黃色葡萄球菌等。而由於其容易受到微生物的反覆感染，所以會在其肺臟、肝臟等地方發現膿瘍。

(2) Chediak-Higashi 症候群

又稱為遺傳性白血球顆粒異常綜合症，這種病的病因雖然還沒有明確得知，但是一般科學家認為這跟 LYST 基因的變異有關。LYST 是用來指示 lysosomal trafficking regulator 這種蛋白質製造的基因，而此種蛋白質會控制物質運輸進入溶酶體。所以在 LYST 無法正常運作下，溶酶體無法正常和吞噬體形成噬溶體。因此，在這種疾病下，微生物就算被吞噬進入白血球，也沒有辦法被溶酶體內的酵素和活性氧化物清除，所以造成跟慢性肉芽腫一樣，很容易受到微生物反覆感染。

(3) 免疫球蛋白 E 過多症 (hyperimmunoglobulin E syndrome)

免疫球蛋白 E 是造成大部分過敏反應的原因，過敏反應起始於過敏原與結合在白血球細胞表面的免疫球蛋白 E 接觸後，激發白血球細胞釋放出抗阻纖胺、前列腺素及調節細胞的細胞素等，這些物質都能造成發炎的效應。而在免疫球蛋白 E 過多症中，

其原因尚未清楚，一般猜測有可能是細胞性免疫失調造成免疫球蛋白數量過多，而產生過多的組織胺，或 T 細胞產生趨化抑制因子，而使吞噬細胞功能不良。常見的症狀為慢性濕疹樣皮膚炎及反覆的細菌感染。

(4) myeloperoxidase (MPO) 缺乏症

由前面章節可知，在 NADPH 氧化酶利用氧氣產生超氧化物 (O_2^-) 之後，白血球內仍有其他酵素會利用超氧化物或過氧化氫 (H_2O_2) 產生其他的活性氧化物質，myeloperoxidase 就是其中一個。myeloperoxidase 會在過氧呼吸過程利用過氧化氫和氯離子產生次氯酸 (HOCl)，而次氯酸亦是白血球用來消滅外來物的利器之一。雖然嚴重性不如 CGD，但是 MPO 缺乏症也會造成消滅微生物能力下降，而使患者易受感染。

由以上的疾病介紹可以發現，這些跟白血球相關的疾病，大部分均不影響白血球原有的吞噬能力，而是造成其破壞入侵物能力的下降。所以，如果單純觀察白血球吞噬能力的變化，是無法察覺這些疾病的存在。並且，這些疾病並不是讓白血球破壞病菌的能力完全消失，而是降低其效率，所以我們也需要一個可以直接定量白血球破壞能力的指標，幫助我們檢測出疾病的存在。但是，這也是現有技術比較缺乏的部份。

1-2 相關研究之文獻回顧

在此節裡面，我們將分別對本論文中兩種實驗技術（共焦自體螢光影像、拉曼光譜技術）在生物領域上的應用及白血球在吞噬作用後的反應做相關文獻回顧。這可以幫助我們了解在這個研究主題上，其他研究團隊對相關問題到目前的了解程度及欠缺的資訊，這將有助於我們從各方研究截長補短，提供一個較佳的研究方法。另外，從本實驗中所用兩種技術的回顧，也可以幫助我們了解該技術的優點、限制，以及預測我們將會碰到的困難。

自體螢光影像

首先，我們從自體螢光影像及拉曼光譜技術在生物領域上的應用做簡單回顧。生物體系是一個相當龐大的系統，其組成錯綜複雜，而其中很多物質已經被指出具有自體螢光 (autofluorescence) 的性質。自體螢光指的是我們不必外加染劑去做染色動作，該物質本身就能在激發之後放出螢光，這對生物系統的研究有相當大的助益。因為施加螢光染劑對細胞、組織造成干擾是必然的結果。因此，如果能利用生物體內的自體螢光來做研究，就能避免染劑的影響。而在相關文獻中指出，生物體內的很多維他命單元都具有自體螢光的效果⁹，例如維他命 A、維他命 B2、維他命 B6、維他命 B9、維他命 D3 等，其他還有像輔酶 (NAD(P)H)、彈性蛋白 (elastin) 還有胺基酸 (tyrosine、tryptophan 等) 也都有自體螢光的現象。而這些物質的激發波長大約在 300 ~ 500 nm (單光子激發) 和 700 ~ 800 nm (多光子激發)，放出螢光的範圍則約在 350 ~ 650 nm。

自體螢光相關的研究主題相當廣泛，例如 1995 年 Monici 等人¹⁰即利用不同波長光源激發下，不同種的白血球 (單核球、嗜中性球、嗜酸性球) 及淋巴細胞會有不同強度、峰值位置的自體螢光放射光譜，希望發展出一套能快速從血液中篩選不同種白血球的方法。

而自體螢光光譜及影像也常被用在組織、疾病上的探討，尤其是針對癌症的探討。例如 1996 年 Zonios 等人¹¹ 就用自體螢光探討了正常結腸細胞及癌化結腸細胞的差別。並推測兩者螢光強度的差異可能來自於血紅素吸收度的增加、黏膜區域螢光強度的減少以及腫瘤凸出處黏膜下層螢光的消失。而 Betz 等人¹² 則是研究口腔癌，發現在癌細胞的位置，綠光部分的螢光強度會較正常細胞弱。而 Brancalion 等人¹³ 在皮膚癌上的研究則是發現，在癌細胞的部分，胺基酸殘基所產生的訊號較正常細胞強，但是在真皮層中的膠原蛋白螢光卻較正常細胞弱，前者推測是因為表皮的增厚或過度增生所引起，後者則可能是癌細胞分泌酵素對周圍組織的破壞造成。

另外，還有很多的研究團隊則是專注在細胞、組織上 NADPH 及 FAD 這兩種氧化還原劑的螢光表現。因為這兩種氧化還原劑是細胞能量產生的重要物質，其大部分位於細胞的粒腺體中，參與了細胞產生 ATP 的電子傳遞鏈。並且，更有趣的是，他們只在其中一種氧化還原形式下才具有自體螢光，例如 NADPH 在被氧化成 NADP^+ 後即不具自體螢光效果，而 FAD 被還原成 FADH_2 後同樣消失產生自體螢光的能力。而在細胞內產生 ATP 的不同階段，此兩者的氧化還原狀態也會隨著改變，因此可以用來作為檢測細胞代謝能力的指標。例如在 1996 年，Bennett 等人¹⁴ 即利用胰島細胞的 NAD(P)H 自體螢光來觀察代謝表現，因為在他們之前的研究，大部分的研究都以分離出來的分散細胞來推測在完整胰島內之代謝表現，但是他們利用自體螢光發現在胰島內的細胞比分離出來的細胞具有更一致性的代謝表現。並且發現此細胞對葡萄糖的代謝反應隨濃度呈 S 型分佈，而轉折點在 8 mM，這支持了葡萄糖激酶 (glucokinase) 是胰島細胞葡萄糖反應的速率決定酵素。而 2000 年¹⁵，此團隊也同樣用胰島細胞做了葡萄糖刺激胰島素分泌的研究，而因為此行為與糖解作用 (glycolytic cycle) 及克氏循環 (Kreb's cycle) 皆有相關，所以他們分別對細胞質及粒腺體受葡萄糖影響後做探討，並且發現在細胞質中因葡萄糖刺激而造成的 NAD(P)H 濃度增加約 $7 \mu\text{M}$ ，而在粒腺體中約 $60 \mu\text{M}$ ，且反應時間比在細胞質中慢約 20 秒。2004 年¹⁶，此團隊利用另一種自體螢光物質 LipDH 的幫助，分辨出 NADH 及 NADPH 的貢獻。並且利用此方法證明了丙酮酸並不會使粒腺體內 NADH 有明顯增加的情形。2002 年 Huang 等人¹⁷，對

NAD(P)H、FAD、LipDH 等自體螢光物質做了完整的激發光譜、放射光譜及 cross-section 量測。並欲利用 FAD 和 NAD(P)H 的螢光強度比值，當作一個定量的數據，探討細胞代謝能力的好壞。而在 2007 年 PNAS 上¹⁸，Skala 等人也同樣利用 FAD 和 NADH 比值當做細胞代謝的指標，並且搭配螢光半生期及三維影像，探討癌症細胞和正常細胞代謝能力。不過在 FAD 及 NADH 比值上，他們發現差異性不大。而在螢光半生期的觀察，他們推測 NADH 半生期的下降和癌細胞較易行糖解作用有關，而 FAD 半生期的上升則和癌細胞 NAD^+ 量的下降有關。

拉曼散射光譜

拉曼光譜提供了化學結構資訊、免染色、可用於水溶液系統、可應用於活細胞動態過程觀察等適合用於生物系統的優點，使其近幾年來常被用於生物問題的探討。接下來，我們就分別對拉曼散射光譜在蛋白質、細胞、組織等不同生物層次的應用做回顧。

在 1999 年 Miura 等人¹⁹，利用拉曼光譜提供的化學結構資訊，探討了狂牛症蛋白和銅離子鍵結間的模式，以及在不同酸鹼值下的變化情形，並且結論出蛋白和銅離子鍵結的模型。在 2002²⁰ 年，Cao 等人則利用不同拉曼探針接合在不同 DNA 或 RNA 上，並藉由這個方式來快速區別不同的 DNA 或 RNA。

在細胞上的應用方面，2002 年 Xie 等人²¹取得了紅血球及酵母菌的光譜資訊，並且發現，酵母菌在死亡後，光譜譜線會有消失的情形。同樣的研究團隊在 2003 年²²，則是對酵母菌、大腸桿菌等做了變溫實驗，並發現在加熱之後，其蛋白質 (phenylalanine) 的訊號會有變化，並在驗證下，他們相信這是溫度升高後蛋白質變性所造成。此團隊後來也利用拉曼散射光譜觀察了在酒精影響下紅血球去活性的現象²³、發展在水溶液下快速辨識細胞、病菌的方法^{24,25}。而在其他團隊方面，2003 及 2005 年 Huang 等人^{26,27}，則是對酵母菌不同分裂期及不同區域做了光譜比較，並探討其不同分裂期時的組成變化。並且 2004 年²⁸則是發現了和酵母菌生命現象相關的拉曼譜線，並推測其是粒腺體所造成。2007 年²⁹則是利用養份差異、氧氣濃度及化學物質傷害下，酵母菌光譜的變

化，更進一步驗證他們所發現和生命現象相關的拉曼譜線。

而在組織層次上的應用，2003 年 Huang 等人³⁰，將拉曼用於肺癌的檢測。並發現在癌症組織區域的核酸及兩種脂肪酸 (tryptophan, phenylalanine) 之訊號較正常細胞豐富，但是磷脂質及 proline 和 valine 則較正常細胞少。在 2000 年 Hanlon 等人³¹的回顧文章中，也將拉曼在動脈粥狀硬化症、乳癌以及阿茲海默症上的研究做詳細回顧。而我們實驗室之前的研究裡，也將拉曼用於皮膚組成³²以及肝臟脂質³³的成分分析。

但是拉曼光譜訊號強度微弱一直是科學家們想解決的問題，因此，各種增強拉曼訊號的方法就被逐漸提出。例如共振拉曼光譜技術^{34, 35} (resonance Raman spectroscopy, RRS)、表面增強拉曼光譜技術^{36, 37} (surface-enhanced Raman scattering, SERS) 及同調反斯托克拉曼散射技術^{32, 33, 38, 39} (coherent anti-Stokes Raman scattering)。共振拉曼光譜相較於非共振拉曼光譜而言，在於其將物質分子激發到電子激發能階上，而非共振拉曼光譜只激發到虛態能階上，經過此種激發過程能有效的將拉曼訊號放大。表面增強拉曼是利用金屬表面因表面電漿共振 (surface plasmon resonance) 所形成的增幅電場，提升物體表面受測分子的拉曼訊號。同調反斯托克拉曼散射技術是一種非線性光學的過程，原理是增加處於振動激發態上的分子，使我們能得到較強的反斯托克散射訊號，其利用兩道波長不同的超快雷射，將物質分子引誘到一個分子的振動激發態能階上，並且同時另一道雷射將處在振動激發態上的分子激發，最後放出拉曼散射中的反斯托克散射訊號。

而為了在生物系統中量測單一細胞的化學結構，拉曼散射光譜技術也經常和其他的技術結合，例如雷射光鉗技術和拉曼影像技術。雷射光鉗指的是利用雷射在高度聚焦下所產生的光壓，在光焦點處鉗住甚至操控微小物體的一種技術，這對於在水溶液系統中的量測有很大的幫助，因為在雷射光鉗的作用下，我們可以確定量測到的訊號只來自於被鉗在雷射焦點處的樣品。在拉曼光譜結合雷射光鉗後所成的拉曼光鉗，就非常適合當作細胞^{21, 40-42}或微小物質⁴³⁻⁴⁶在水溶液中的研究工具。而在某些研究中，我們會想得到單一物質在整體環境中的分佈情形，或者相反的，我們想了解在一個複雜的樣品中到底有多少不同物質分佈其中，這時候，我們就會將拉曼光譜技術結合二維或三維的掃描技術，成為拉曼影像技術。例如有人利用這樣的技術來同時顯現細胞輪廓及受細胞吞噬的

微脂體位置⁴⁷；也有人用來觀察白血球吞噬入侵物後，細胞內產生物質和入侵物間的關係⁴⁸，或是白血球和生物降解性物質間的關係⁴⁹。

白血球免疫反應

最後，我們從白血球免疫反應相關的文獻做一個整理。吞噬作用及白血球相關的免疫行為研究已超過一世紀，研究的主題五花八門，從入侵物大小跟吞噬能力的比較、NADPH 氧化酶組成分析到活性氧化物產生的類型都有人感興趣且投入研究。

Champion⁵⁰ 等人在 2008 年作了一個有趣的實驗，他們想了解當一個聚合物入侵免疫系統後，聚合物的大小和其被吞噬效果間的關係。這個問題的根源，是因為現在很多藥物都會利用聚合物微粒來當載體，但是這些包埋在聚合物微粒中的藥物一進到人體之後，會碰到的第一個問題即是受到白血球細胞的吞噬而影響其運送，因為它本質上對人體也是一個外來物。實驗的結論發現，在 1~4 μm 左右的聚合物小球都有被吞噬的現象，且在 2~3 μm 左右的聚合物小球最容易受到吞噬。作者推測這和人體常見入侵物的大小有一定關係，造成白血球細胞有選擇性地對這些尺寸微粒有較好的吞噬效果。而本論文中所使用的入侵物 — 酵母菌，其大小也在此範圍內，預期能有不錯的吞噬效果。

在 2004 年的 Science 期刊上，Brinkmann⁵¹ 等人利用電子顯微鏡觀察到，當白血球受到刺激後，其周圍會產生絲狀結構，這和在受刺激前的形貌相當不同。並且當真正有微生物入侵時，這些微生物會被纏繞在絲狀結構上。這表示白血球不但能靠吞噬作用噬入並消化微生物，也可以靠著向外產生絲狀結構來避免微生物繼續擴散，並且也因為微生物位置被限制在白血球周圍，使白血球向外產生的破壞性物質能有效的來消滅入侵物，避免因為距離太遠而使濃度不夠。

接下來，有一大部分的科學家都致力於釐清白血球產生破壞性物質的方式及機制。例如在 1999 年，DeLeo 等人⁸ 觀察到在白血球受刺激後，科學家們所推測能產生破壞性物質（活性氧化物）的相關酵素 NADPH 氧化酶，其次單元中原本處於細胞膜的

cytochrome-b 會圍繞在入侵物周圍，這表示吞噬體的形成。並且處在細胞質中的次單元 p67phox、p47phox 等也會往吞噬體靠近。在經過實驗之後，他們認為產生活性氧化物過程的起始，和 p47phox 的磷酸化及向吞噬體轉移的動作有關，並且此過程的中止和 p46phox 及 p67phox 從吞噬體離開有關。在 2009 年 Casbon 等人⁵² 則是觀察了 NADPH 氧化酶上的 flavocytochrome-b，並且是在較少受研究的巨噬細胞上。而在這部份，他們發現未結合的 flavocytochrome-b 次單元 (gp91phox、p22phox) 會分佈在內質網，並且在結合後往細胞膜或吞噬體移動。而 flavocytochrome-b 會分佈在巨噬細胞內的囊泡，這些囊泡推測是用來儲存和運送 flavocytochrome-b 至細胞膜及吞噬體膜上。另外，在 2002 年的 Science² 及 Nature⁵³ 及其他論文也對白血球細胞受刺激前後，細胞內氧氣濃度、活性氧化物濃度^{6,7}、pH 值⁵⁴、酵素活性、入侵物存活率^{6,55} 等作了相當完整的探討。

當然也有研究團隊利用較不一樣的方式來探討這相關問題。例如 2000 年 Pacllet 等人⁵⁶ 就利用原子力顯微鏡 (atomic force microscopy, AFM)，觀察 NADPH 氧化酶的組裝情形。NADPH 氧化酶是一個多次單元的酵素，其次單元必須正確的組裝才能使酵素有正常功能。他們觀察到了 cytochrome-b 在去糖基化前後大小的改變，還有細胞質中 NADPH 氧化酶次單元組裝到細胞膜後使該酵素高度增高的情形。並且，在酵素組裝的模型上，他們認為，在細胞質中的次單元組裝到細胞膜上時，p67phox 會和 p40phox 脫離，而 Rac-GTP 是這其中的受動器。並且，他們也認為 p67phox 才是跟此酵素活化最有直接關係的次單元，p47phox 只是扮演增強效果的角色。

在 2005 年 Palazzolo 等人⁵⁷ 發現，受基因轉殖綠螢光蛋白 (GFP) 的大腸桿菌 (*E. coli*)，具有能選擇性呈現受白血球內 HOCl 影響的結果。在受到 HOCl 作用後，大腸桿菌的 GFP 螢光會有減弱的情形，而且此現象在其它活性氧化物 (H_2O_2 , OH^{\cdot}) 或含氮氧化物 (NO_2^{\cdot}) 都不明顯。這對過去用螢光染劑來偵測活性氧化物，但是專一性卻不足的缺點，相信是一大令人振奮的發現。

其它，也有同樣利用拉曼散射光譜從事跟免疫相關研究的團隊，這部份以 Otto 團隊有較深入的研究。在 2000 年⁵⁸，他們即利用拉曼光譜觀察到白血球內產生活性氧化

物的兩個酵素 (NADPH 氧化酶、MPO)，在受刺激過後其氧化還原狀態的改變，並推測其跟活性氧化物的產生有關。這個實驗提供了一個新的方式，而且是更直接的方式來解釋活性氧化物的產生。而在 2003 年 JACS 上³⁴，他們進一步使用拉曼散射影像技術，觀察到 NADPH 氧化酶的次單元 (cytochrome-b) 和入侵物微粒在白血球內的相關分佈情形。而在隔年同樣刊登在 JACS⁴⁹，他們從光譜上得知，聚合物微粒在受吞噬後其化學結構組成會有變化，這事實上也就代表了白血球消化物來物的一種過程。另外，從拉曼散射影像，他們更得到此聚合物微粒除了化學結構上的改變，其形貌上也會有所改變。這表示此種光譜技術不僅能得到化學結構資訊，更是一種很好的二維、三維影像的方法。在同一年⁵⁹，同樣利用拉曼散射影像技術，他們發現在利用化學物質和實際入侵物兩種不同刺激方法下，雖然 cytochrome-b 的量都有明顯增加，但是其分布情形會相當不同。在化學物質的刺激之下，cytochrome-b 的分布較靠近細胞膜，而在實際有入侵物 (聚合物微粒) 時，cytochrome-b 則大多聚集在入侵物周圍。這樣的情形和之前其他技術得到的結果相同，作者認為在沒有實際入侵物而受到刺激後，cytochrome-b 向細胞膜移動是為了向細胞外產生活性氧化物，以破壞它認為在細胞外的刺激源。而吞噬了入侵物後，則是要直接向入侵物產生活性氧化物，所以聚集在其周圍。而在 2005 年⁴⁸，他們發現和發炎反應相關的物質 AA (arachidonic acid) 有可能會儲存在白血球細胞內的脂肪體 (lipid bodies)，並且這些脂肪體和吞噬體間會有他們稱之為“kiss and run”的有趣行為，他們推測這樣的互動模式跟吞噬體的形成及 NADPH 氧化酶的活化有關。以上的研究相較於傳統的方法，利用振動光譜提供物質的內在化學資訊，使研究中不再需要染色，並且也不會有專一性的問題，是一項值得運用的技術。

1-3 研究動機及目標

根據前面章節的介紹，我們可以理解到，免疫反應是一個極為複雜且龐大的系統，很多跟免疫相關的疾病甚至免疫系統本身的資訊，都由於過去研究技術的限制，到目前細節還尚未了解。

探究過去的研究方式，大多建立在各種染色的方法上，藉助染劑的幫助來分別標定細胞中各胞器的位置，再藉由影像來觀察這個過程。但是染劑本身即是一個對細胞有干擾的物質，使用後細胞表現的行為是否還能跟正常時期一樣，一直是個爭議。而且染色的過程甚是繁複，染劑的專一性亦非百分之百，這些都是有可能造成後續判圖誤差的原因。另外也有些研究藉助電子顯微鏡來做觀察，雖然這樣的方法不需要做染色並且具有高解析度，但是最大的缺點是其需要在乾燥、真空下取得影像，因此就無法觀察活細胞的動態過程。另外如果欲觀測其中發生的化學變化，亦需透過特殊螢光染料的幫忙，例如用來觀測活性氧化物產生的 DCF^{8, 60, 61}、DHR⁶²、HE⁶²，偵測 pH 值變化的 BCECF AM⁶⁰，這也同樣遇到使用染料的疑慮。其它也有利用化學反應產物來推測活性氧化物造成破壞的方法，例如偵測活性氧化物造成脂質過氧化傷害後產物丙二醛 (MDA, malondialdehyde) 的化驗方法⁶³，此方法利用丙二醛和硫代巴比妥酸 (TBA, thiobarbituric acid) 反應後會產生螢光的原理，很常被用來做氧化傷害的檢測，但是畢竟訊號的來源並非跟傷害過程直接有關，所以獲得的資訊仍然有限。

有了前面各種習知技術的啟發，我們欲發展出一套不必染色、對樣品低破壞性、具有分子層次化學結構資訊，並且能即時、動態獲取活細胞資訊的研究方法，來幫助釐清免疫系統中層層繁複的過程。拉曼散射光譜技術由於能即時提供分子結構、組成上的資訊，並且其不必經過染色或繁複的樣品處理就能得到具有化學資訊的訊息。而相較於另一種常用的振動光譜—紅外線光譜而言，拉曼散射光譜又不會有水的干擾，能在水溶液的系統下操作，這對於活細胞的長時間量測十分有利。又經過了長時間的技術改良、演進，拉曼光譜技術已經趨於成熟，因此近年來已經成為研究各種細胞資訊的良好工具。

共焦螢光顯微鏡技術，相較於傳統的螢光影像技術而言，在系統設計上多了所謂的共軛焦光圈 (confocal pinhole)，使其三維解析能力遠優於傳統螢光影像方法。並且搭配雷射來做激發光源，其具有一個單一波長的強光源。以上的改進方式，使共焦螢光顯微鏡技術不但具有高解析力，且獲取影像時間短，已經成為螢光影像技術中的新興利器。因此，我們結合以上兩種各具特色的工具，來獲取免疫過程中的資訊。

首先，我們欲了解，在外來物被白血球吞噬後，其被消化的過程中，可能經過何種機制。因為，以這方面的研究，大家提出了各種假設，包含利用溶酶體內的酵素或過氧呼吸後產生的活性氧化物來破壞入侵物，但是其中明確的機制尚未清楚。所以我們欲藉由共焦螢光影像來偵測活性氧化物產生的媒介物 FAD，透過其和入侵物的互動關係，解釋活性氧化物和白血球消化過程的相關性。接著，為更進一步證明活性氧化物和此消化過程的關係，我們也利用拉曼散射光譜所提供的化學結構資訊，觀察這個過程中化學結構的改變，並提出可能的機制。



第二章、 研究材料及實驗方法

2-1 巨噬細胞細胞株之培養流程

本實驗所用之白血球細胞為老鼠巨噬細胞株 RAW 264.7 (BCRC number: 60001, ATCC number: TIB-71)，是一個標準用來研究巨噬細胞表現系統的細胞株。培養步驟如下^{64, 65}：

步驟 1：培養基 (medium) 的配製，將 1000 mL 的 DMEM (11965, Invitrogen, U.S.A) 加入 10% 胎牛血清 (FBS, 26140, Invitrogen, U.S.A)) 及 1% 青黴素 - 鏈黴素溶液 (PS, 10378, Invitrogen, U.S.A)，混合均勻後通 0.2 μm 的濾網過濾掉細菌。

步驟 2：將細胞解凍後加培養基至 5 mL，並移到 polystyrene 材質之 25T 長頸瓶 (flask, 353108, BD Falcon, U.S.A)，最後放到 37 °C，5% CO₂ 的培養箱 (Incubator, NU-5500, Nuaire, U.S.A)。



步驟 3：當細胞數達到培養盤面積 70~80% 時進行繼代培養 (取 10% 細胞至新培養盤繼續培養)。

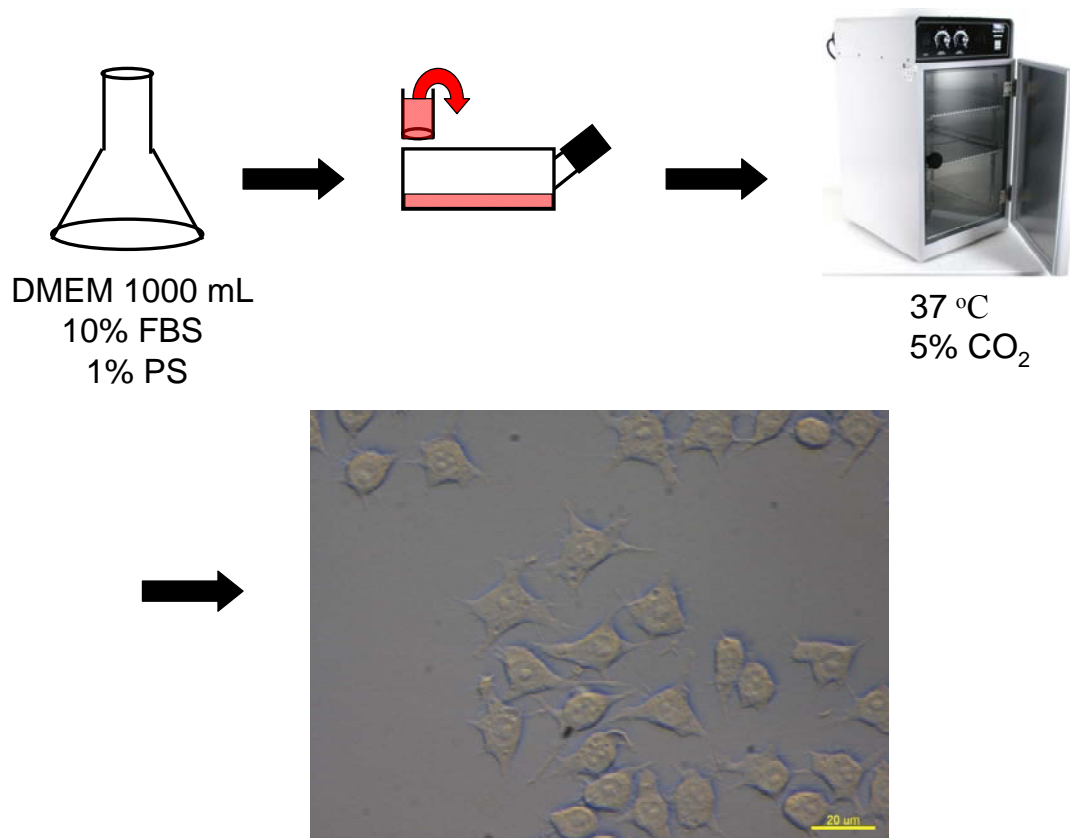


圖 2-1 巨噬細胞細胞株 (RAW 264.7) 之培養流程。

2-2 酵母菌之培養流程

本實驗所使用之酵母菌為 *Pichia pastoris* (X-33, Invitrogen, U.S.A)，因其生長速率快、容易培養在簡單的培養基內，並且也很適應一般的培養條件，是常被用來當蛋白質表現的模型系統之一^{66,67}。

步驟1：培養基 (medium) 的配製，將 100 mL 的 DI water 倒入三角燒瓶中，再加入 meat peptone 2g、酵母萃取物 (yeast extract) 1g 與葡萄糖 (glucose) 1g，再攪拌混合之。



步驟2：將燒瓶用錫箔紙緊密蓋住後，連同配好的培養基置入高溫高壓滅菌鍋內，以高溫高壓 (120 °C, 15 psi) 滅菌 60 min，用以除去可能存在的微生物。滅菌完成後，並待其溫度回到室溫。



步驟3：取 5 mL 之培養基溶液置入試管內，並取適量的酵母菌接種至試管中。



步驟4：將試管放入旋轉式細胞培養儀中，在室溫下 (25 °C~28 °C) 培養 12 小時。



步驟5：12 小時後，將試管取出，此時應可在試管底部周圍發現有白色的沉澱物，即為酵母菌。

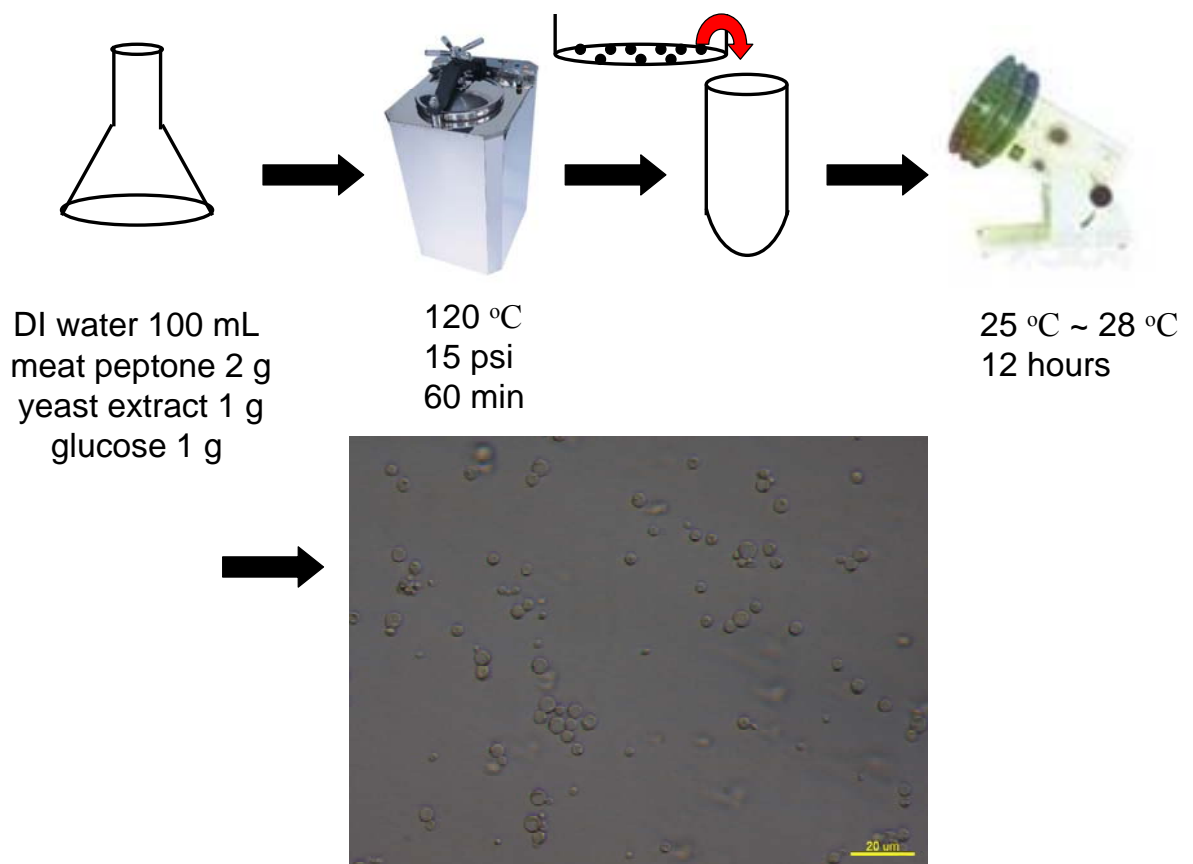


圖 2-2 酵母菌 (*Pichia Pastoris*) 之培養流程。

2-3 同位素標定酵母菌之流程

在同位素標定的部份，我們知道生物體內很多代謝過程都涉及水的利用，例如脂肪酸的分解、糖解作用（G6P 轉變成 F6P）、檸檬酸循環（延胡索酸轉變成蘋果酸、異檸檬酸轉變成琥珀酸）。所以，如果我們將原本培養酵母菌的去離子水，更換成重水，將可能藉由重水被代謝的結果，而將氫或氫氧基取代成氘或氘氧基。因此，在此同位素標定過程，其步驟和一般酵母菌的培養相同，唯一的差別只在培養基 (medium) 的配製。在培養基裡，我們將原本的去離子水更換成重水 (D_2O , 151882-100G, Sigma-Aldrich)，其他成分（酵母菌萃取物、葡萄糖、meat peptone）仍維持同樣的量。希望透過較自然的方式讓酵母菌具有同位素訊號，而不至於對其生長造成太大影響。

而在同位素取代過後酵母菌之拉曼光譜量測，我們會在實驗中所需之各時間點，將處於重水製備之培養液內的酵母菌離心（1100 rpm, 6 min），除去帶有重水之培養液，並以緩衝溶液 (PBS) 沖洗並離心兩次，最後保存在緩衝溶液內以量取光譜。

2-4 雷射共焦自體螢光顯微鏡技術應用於巨噬細胞吞噬酵母菌之動態成像

為了獲取細胞內自體螢光隨吞噬過程的變化，我們利用 FV300 共焦顯微鏡 (Olympus, Japan) 來達成此目的，使用的光源為 488 nm 之氬離子雷射 (CVI Melles Griot, USA)，搭配使用的物鏡為 60 倍水鏡 (UPLSAPO 60XW, N.A. = 1.20, Olympus, Japan)。掃描時所用的雷射強度約為 1 mW，每張影像為 15 次掃描 (1.65 s/frame) 的平均，掃描範圍約 $60\ \mu\text{m} \times 60\ \mu\text{m}$ (512 pixels \times 512 pixels)，共焦光圈大小為 $100\ \mu\text{m}$ 。使用的偵測器為 R7400U-02 (Hamamatsu, Japan)，並在偵測器前利用 510 nm 以上波長穿透的長波長穿透濾鏡 (BA510IF, Olympus, Japan)，收集在 500 ~ 750 nm 間來自黃素蛋白的自體螢光⁶⁸。影像中強度的分析及橫截面強度分析則是利用 Fluoview (Olympus, Japan)。在影像強度分析上，我們在每個掃描區域上均作 9 層之深度 (z 軸) 掃描 (每層間隔 $0.5\ \mu\text{m}$)，再從此 9 張影像中挑選強度最強的一張，並找影像中細胞邊界清晰者來做比較，以細胞扣除細胞核後的影像強度及面積大小之比值為比較值。而橫截面強度分析方面，我們以挑選後之截線兩旁各兩影像點 (pixel) 的強度作平均，因此每一個數據點之強度為鄰近五個點的平均結果。

2-5 拉曼散射光譜技術應用於量測酵母菌於巨噬細胞內及細胞外之氧化傷害

本論文中拉曼光譜的量測，所使用的是實驗室自行架設的系統，相關設備如下 (圖 2-3)。激發光源的部份，我們選用波長為 532 nm 的綠光固態雷射 (532-25, DPSS, USA)，並利用邊境濾光片 (edge filter, LP03-532RU-25, Semrock, U.S.A) 及反射鏡將雷射光引入顯微鏡 (IX71, Olympus, Japan)，靠著高 N.A. 值的物鏡 (UPLSAPO 100X Oil, Olympus, Japan) 將雷射光高度聚焦至樣品上。產生的 Stokes scattering 會經由同一個物鏡被收集並通過邊境濾光片。在邊境濾光片之後為一個 25 μm 之共軛焦光圈 (confocal pinhole)。最後，我們透過光纖將訊號傳送至光譜儀 (SR-303i-A, Andor Technology, U.S.A)，經過光譜儀分光處理後，再利用置於光譜之後的電荷耦合元件 (Charge-coupled Device, CCD, iDus DV420A-OE, Andor Technology, U.S.A) 收集光譜訊號，並由電腦來接收 CCD 獲得的光譜訊號。另外，由於我們也需要透過顯微鏡的亮視野影像 (bright field image) 來找尋樣品的位置，所以我們架設一個 CCD (Wat-902H, Watec, Japan) 於顯微鏡上，並將影像即時傳送至顯示器及電腦上。

在光譜的擷取條件，我們所使用的雷射強度為 7 mW (於物鏡聚焦後量測)，光譜的積分時間為 30 秒。另外，在白血球細胞內的實驗，每個擷取時間點皆只取一張光譜，且間隔時間內雷射會關閉，並不持續施加雷射在細胞上。而在細胞外模擬的部份，我們持續抓取同一個酵母菌 35~45 分鐘，光譜積分時間仍是 30 秒，而最後呈現光譜是 5 張光譜的平均 (例如第一張是 30~150 秒所取光譜的平均)。

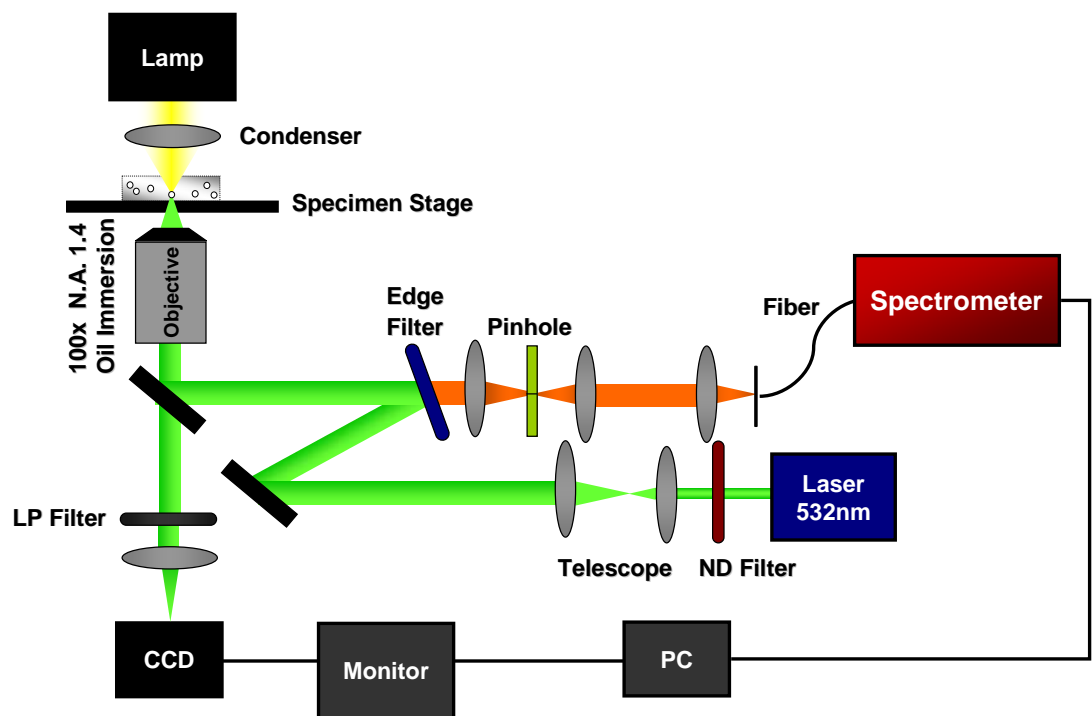


圖 2-3 拉曼散射光譜系統架設圖。

第三章、結果與討論

3-1 巨噬細胞吞噬酵母菌過程之動態自體螢光影像變化

由於我們想了解在白血球（巨噬細胞）噬入外來物後的消化過程，是否與 NADPH 氧化酶產生活性氧化物有關。我們追蹤白血球細胞中和活性氧化物產生相關的媒介物黃素蛋白（參考圖 1-2），利用其在吞噬作用後的變化情形，幫助我們理解其中相關性。

在追蹤黃素蛋白的方法，由之前提到的文獻中被證明，黃素蛋白具有自體螢光，能夠利用波長 400~500 nm 的光源來激發螢光，而其螢光的放射位置在 500~700 nm 之間^{16, 17, 68, 69}，因此我們利用波長 488 nm 的藍光雷射做細胞內黃素蛋白螢光激發，並收集 510 nm 以後的放射光，利用黃素蛋白的位置來追蹤活性氧化物產生的可能區域，及活性氧化物產生位置和酵母菌（入侵物）間的相互位置。

首先，我們利用脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激巨噬細胞，並觀察黃素蛋白螢光影像之變化。由於脂多醣是革蘭氏陰性細菌外膜所共有的醣脂，對白血球來說是一個可辨識的入侵物目標，因此有刺激白血球活性的作用。從實驗中我們欲得知黃素蛋白是否隨著巨噬細胞受刺激而改變，藉此理解 NADPH 氧化酶和吞噬作用後之殺菌過程的關聯性。圖 3-1 為在細胞培養液內添加脂多醣與否，對巨噬細胞內螢光的影響情形。從螢光變化可以發現，在加入脂多醣之後，細胞內的螢光訊號有大幅增加的情形。接著，我們將單一巨噬細胞內的螢光訊號強度除以其面積，利用此比例來比較脂多醣刺激前後的螢光變化。然而，我們發現在細胞核的位置並無明顯螢光訊號，因此，我們只取細胞質中的螢光訊號來做比較，其統計結果如圖 3-1 (C)。由該統計圖可知，加入脂多醣後，螢光強度和細胞質面積的比值有近六倍的增強 ($P = 1.9 \times 10^{-5}$, $n = 17$)，這表示在此過程中黃素蛋白訊號有增強的情形。我們推測這是因為在巨噬細胞受到異物刺激後，欲活化其細胞內之 NADPH 氧化酶以消滅入侵物，所以 NADPH 氧化酶上之黃素蛋白才會有被活化、增量的情形。

並且，從圖中我們可以發現，無論在脂多醣刺激前後，巨噬細胞內帶有較強螢光的部份皆屬於顆粒狀，而在受到脂多醣刺激後，螢光的增強也大多來自於這些顆粒狀物質的增多。這樣的現象，我們推測是在異物刺激過後，巨噬細胞內帶有黃素蛋白的囊泡被活化、增殖所造成，這也和文獻⁵²中發現巨噬細胞具有運送及儲存細胞色素(flavocytochrome-b，參考圖 1-2)的囊泡吻合。

接著，我們也想知道，巨噬細胞內螢光訊號跟入侵物(吞噬體)間會有何互動關係。因此，我們利用酵母菌當作入侵物，將酵母菌加至巨噬細胞培養液內，在酵母菌受吞噬後觀察巨噬細胞內之螢光影像變化。圖 3-2 即為典型之結果，我們可以觀察到，受吞噬的酵母菌和存在培養液中的酵母菌，螢光分布情形有很大的不同。存在培養液中的酵母菌雖然也有螢光訊號的貢獻，但是強度不高，且其分布屬於均勻散佈。但是受白血球吞噬的酵母菌螢光表現就截然不同，不但其分布趨向於圍繞在酵母菌周圍，螢光強度也強上數倍。

為了更進一步確認此種螢光的變化的確只出現在受吞噬的酵母菌，我們在同一區域內找到已被吞噬及正在被吞噬的兩種酵母菌(圖 3-3)。可以發現已被吞噬之酵母菌(圖中白色箭頭)如同先前觀察到的結果，圍繞著帶有螢光的物質，但是正在受吞噬的酵母菌(圖中紅色箭頭)則無此情形。更有趣的是，圖中欲吞噬該酵母菌(紅色箭頭)之巨噬細胞，靠近酵母菌的部分呈現半圓形的凹陷(圖 3-3(A))，和圖 1-1 中巨噬細胞欲吞噬入侵物的情形相同。並且大量帶有螢光訊號的顆粒也會在附近聚集。由這樣的結果，我們推測受吞噬後酵母菌周圍的螢光聚集情形，在巨噬細胞利用偽足靠近並欲進行吞噬時，已經開始產生。

而分析吞噬作用後圍繞在酵母菌外圍的螢光，又可以發現兩種現象，即一層較薄的區域(圖 3-2 白色箭頭)有螢光增強情形外，還有大量具有自體螢光的顆粒(圖 3-2 紅色箭頭)也聚集到酵母菌周圍。為更清楚了解螢光分部的情形，我們也將在培養液中及受吞噬的酵母菌做橫截面螢光強度分析(圖 3-4)。從圖中可以發現，在酵母菌中間的螢光強度於受吞噬前後並無明顯變化，但是圍繞在酵母菌周圍的螢光薄層強度卻在吞噬作用後增強了近七倍。我們推測以上現象和白血球細胞質內攜帶黃素蛋白的囊泡往吞

噬體靠近、補充有關。因為從文獻⁵²中得知，巨噬細胞內有大量帶有細胞色素 (flavocytochrom-b) 的囊泡，雖然其功能尚未確定，但是推測和細胞色素的儲存和運送有關。在本實驗中追蹤的黃素蛋白就是該細胞色素的組成之一 (參考圖 1-2)，我們觀察到這些儲存黃素蛋白的囊泡向吞噬體 (酵母菌) 聚集，同時吞噬體膜上的黃素蛋白螢光也被增強，這和文獻中推測該囊泡具有儲存和運送細胞色素的推測吻合。

為了更確定巨噬細胞內自體螢光來源，我們也量取了細胞內螢光的放射光譜。圖 3-5 為我們量取巨噬細胞內聚集在酵母菌旁螢光區域之螢光放射光譜，圖中紅色虛線為純的 FAD 之螢光放射光譜，黑色實線則為巨噬細胞內之自體螢光放射光譜。從兩者之比較可發現，其光譜特徵相似，但是聚集在酵母菌旁之螢光放射光譜較純的 FAD 寬，且峰值有些許位移。我們推測這是因為 FAD 結合至 NADPH 氧化酶形成黃素蛋白後，其結構受到周圍環境影響，而改變了螢光的放射特徵。並且我們量取到的巨噬細胞內自體螢光放射光譜，其特徵也跟文獻^{17, 68}中相似。所以，我們可以確定細胞內螢光的來源為黃素蛋白所造成。得到螢光影像上的結果，我們確定利用 NADPH 氧化酶產生活性氧化物的方式，在白血球消滅入侵物的過程的確具有一定貢獻。

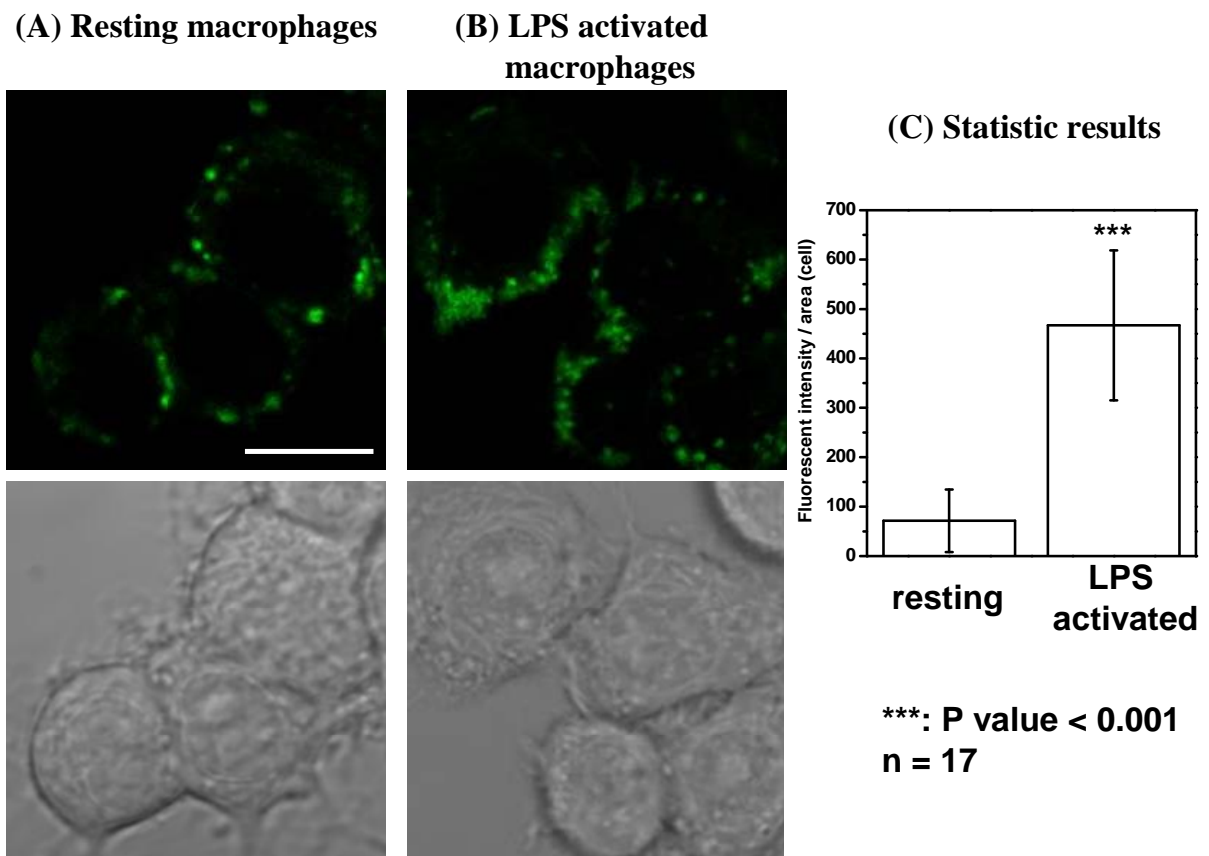


圖 3-1 異物刺激後白血球自體螢光變化之影像及統計結果。(A)、(B) 上圖為自體螢光影像，下圖為雷射穿透光影像。比例尺代表 10 μm 。(C) LPS 刺激與否，巨噬細胞細胞質之螢光強度與面積之比值。***： significantly different from control ($P < 0.001$)。

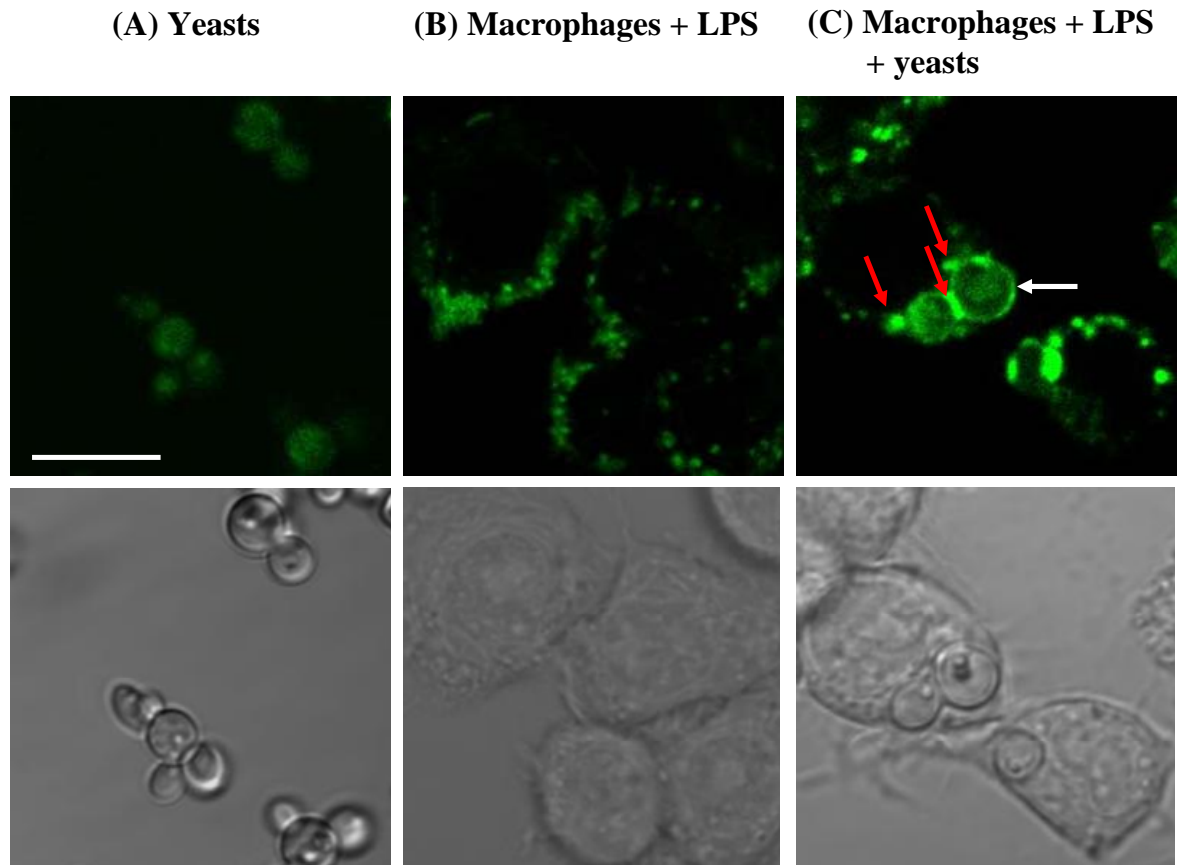


圖 3-2 吞噬作用後白血球自體螢光的分佈情形。(A)、(B)、(C)上圖為自體螢光影像，下圖為雷射穿透光影像。比例尺代表 10 μm 。(C) 圖中白色箭頭為酵母菌外圍具螢光之薄層，紅色箭頭為具有自體螢光之顆粒。

(A) autofluorescence

(B) bright field

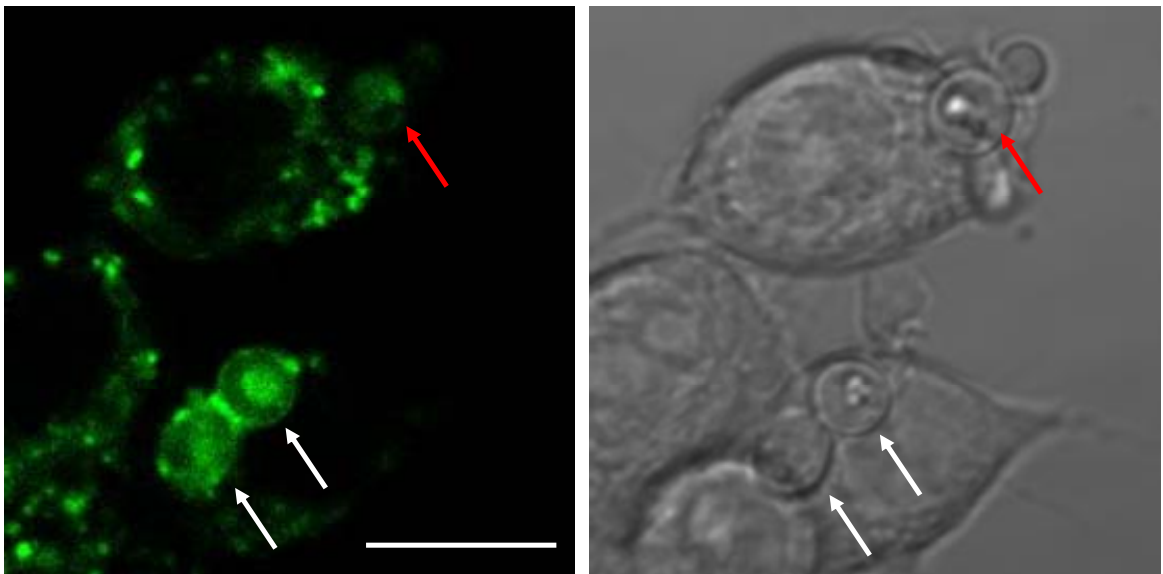


圖 3-3 吞噬作用前後酵母菌周圍螢光之變化。白色箭頭為已受吞噬之酵母菌，紅色箭頭為正在受吞噬之酵母菌。比例尺為 10 μm 。

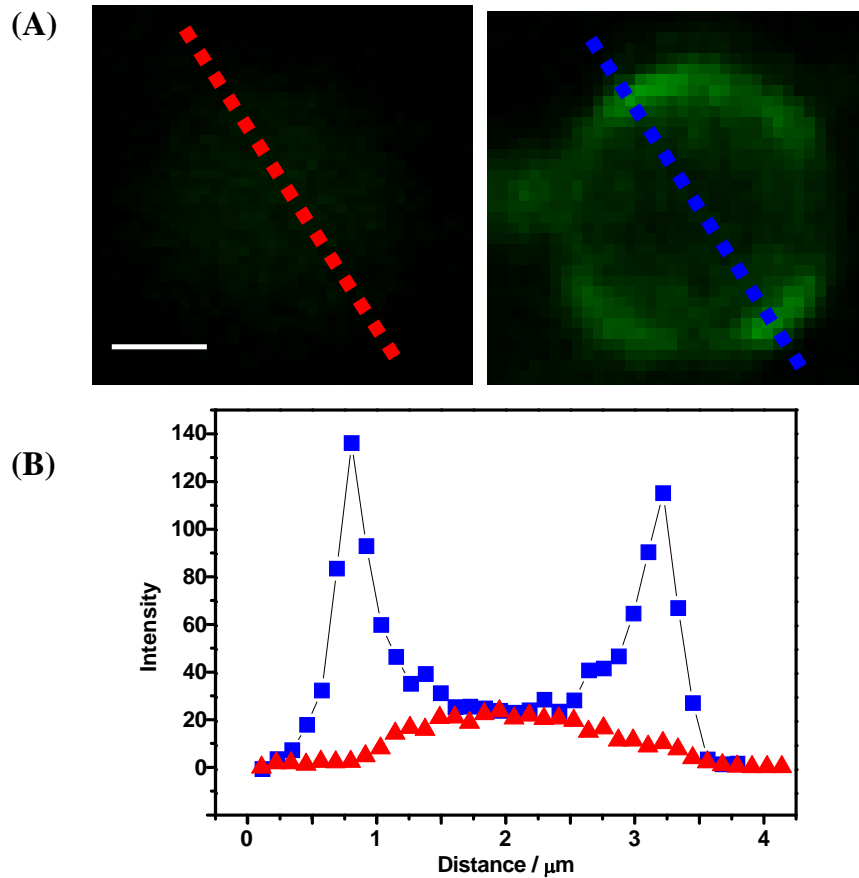


圖 3-4 受吞噬後酵母菌之橫截面螢光強度分析。(A) 圖左方為未受吞噬之酵母菌自體螢光影像，右方為受吞噬之酵母菌自體螢光影像。紅色及藍色虛線為 (B) 圖中橫截面螢光強度分析中所選擇之切面。比例尺為 $1 \mu\text{m}$ 。

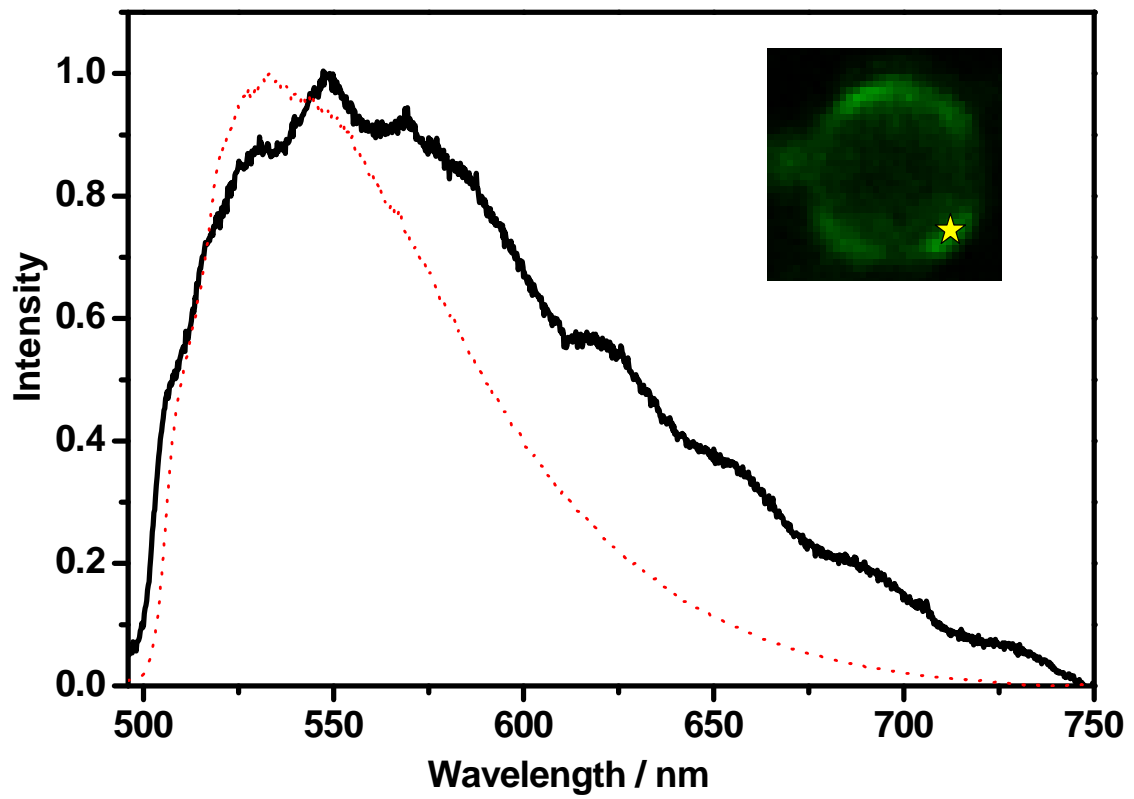


圖 3-5 白血球細胞內自體螢光之放射光譜。右上角附圖為受白血球吞噬酵母菌之典型自體螢光影像，圖中星號為量取螢光放射光譜的位置。紅色虛線則是純 FAD 之放射光譜。

3-2 單一酵母菌被巨噬細胞吞噬後之動態拉曼光譜變化

更進一步，我們也想利用拉曼散射光譜，提供受巨噬細胞吞噬之酵母菌的化學結構變化，搭配之前螢光影像的結果，希望能對活性氧化物的產生及破壞機制有更多證據。因此，同自體螢光的實驗方式，我們將酵母菌加至巨噬細胞之培養液，並在酵母菌受吞噬不同時間下，量取酵母菌拉曼光譜的變化。

圖 3-6 為此動態過程的一種典型變化趨勢，右側是相對應時間的亮視野影像，紅色框框內為一個酵母菌，並且也是我們拉曼光譜量取的區域，左側則是受巨噬細胞吞噬後不同時間點下，同一個酵母菌之拉曼光譜。在光譜隨時間的變化方面，可以看到一個很明顯的趨勢，即在 1265 cm^{-1} 及 1651 cm^{-1} 的拉曼光譜譜線，相較於 1300 cm^{-1} 及 1441 cm^{-1} 的譜線而言，有隨著時間變弱的傾向。

為了確認此相對變化是來自於 1265 cm^{-1} 及 1651 cm^{-1} 譜線之下降，而非 1300 cm^{-1} 及 1441 cm^{-1} 譜線的增強，我們將動態光譜中每個時間點的 1441 cm^{-1} 譜線絕對強度做比較 (圖 3-7)。從 1441 cm^{-1} 譜線強度隨時間之變化可發現，其在吞噬作用後各時間點沒有太明顯的變化，只呈現小幅度的擾動。因此，我們可以確定酵母菌光譜上的相對變化，是來自於拉曼光譜譜線 1265 cm^{-1} 及 1651 cm^{-1} 之下降。

由於我們觀察到在吞噬作用發生後，酵母菌本身光譜的訊號，在 1265 cm^{-1} 及 1651 cm^{-1} 的部份會有下降的傾向。我們也將此兩者隨時間變化的比例 ($1651\text{ cm}^{-1} / 1441\text{ cm}^{-1}$) 作成統計圖 (圖 3-8, 1265 cm^{-1} 之資料未展現)，藉由此比例來比較下降之幅度。從圖中可以觀察到，在兩個小時之中， 1651 cm^{-1} 和 1441 cm^{-1} 比例下降至 81.0% (標準差 9.5%, $n = 3$)，和起始點相比變化顯著 ($P = 7.2 \times 10^{-5}$)。再將此結果與對照組 (對照組之討論請參考附錄 III) 相比，在第 2 小時實驗組與對照組比較也有明顯之改變 ($P = 0.00022$)，再次說明了此變化之可信度。

雖然，在此尚未清楚以上拉曼光譜譜線所代表的官能基，但是我們總結出在酵母菌受到巨噬細胞吞噬後，其結構組成上 1265 cm^{-1} 及 1651 cm^{-1} 譜線所代表的官能基會隨

著時間有減少的趨勢。因此，在下個章節，我們將對酵母菌拉曼光譜上的各特徵譜線作分析，找出其代表的官能基振動模式，以解釋我們在此看到的變化情形。



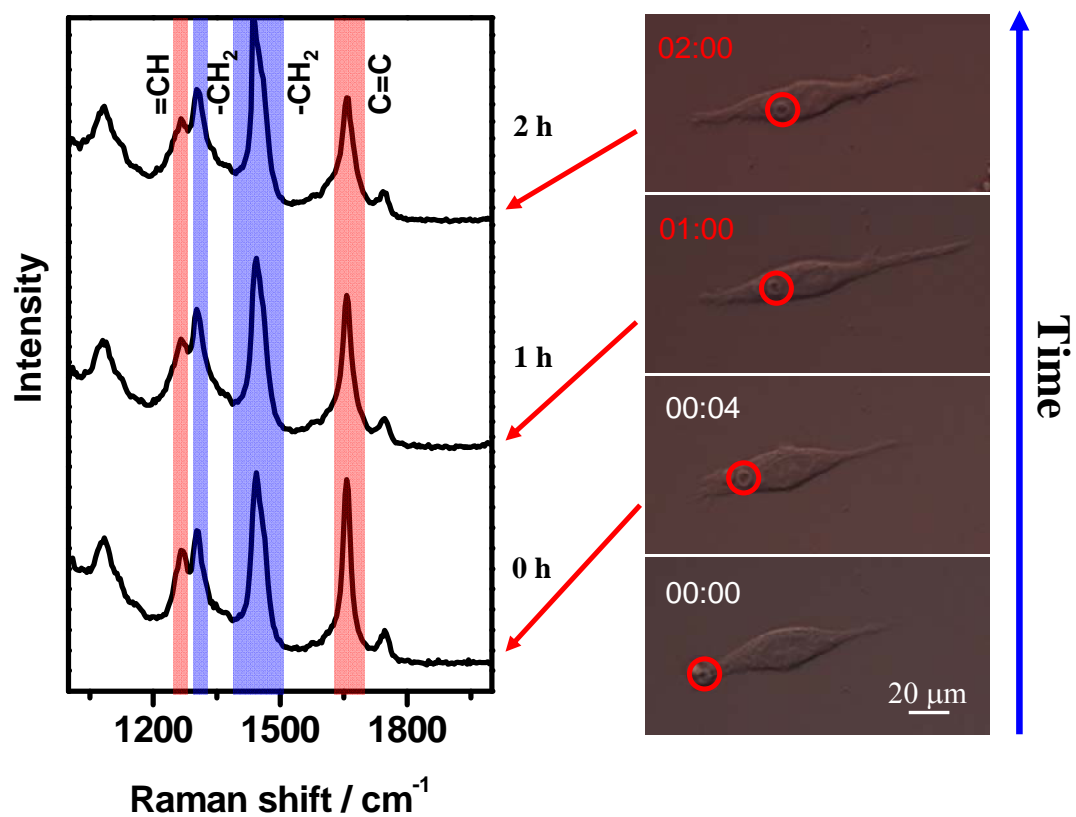


圖 3-6 吞噬作用後酵母菌隨時間之拉曼散射光譜變化。右圖為酵母菌受巨噬細胞吞噬之亮視野動態影像。紅色圓圈標示為一酵母菌細胞。左圖為此動態過程中各時間點之拉曼光譜變化。

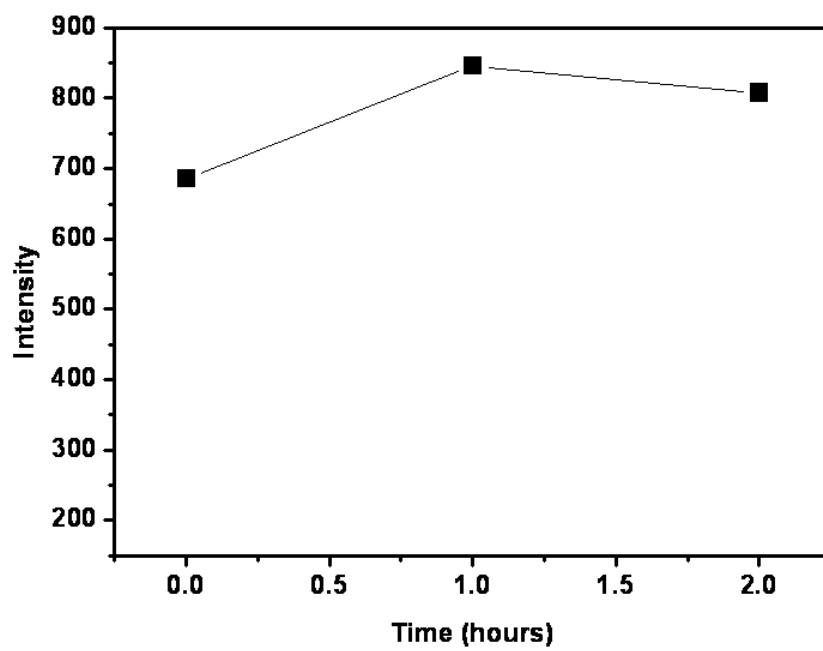


圖 3-7 吞噬作用後酵母菌 1441 cm^{-1} 訊號隨時間之變化。為圖 3-6 中拉曼動態光譜之 1441 cm^{-1} 譜線強度隨時間變化情形。

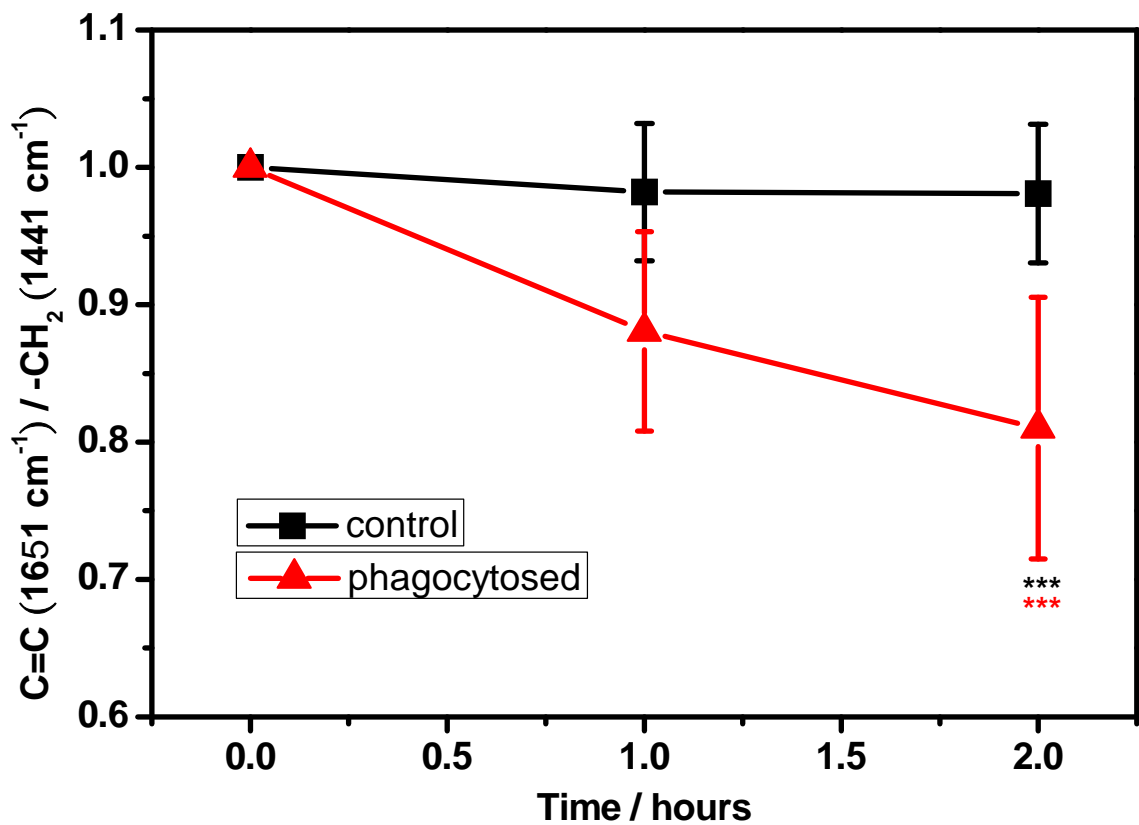


圖 3-8 吞噬作用後酵母菌拉曼光譜中， 1651 cm^{-1} 和 1441 cm^{-1} 譜線強度比例隨時間之變化情形。***： significantly different from control ($P < 0.001$)。***： significantly different from start ($P < 0.001$)。

3-3 酵母菌之拉曼光譜分析

從上一個章節在細胞中的觀察，我們發現到在受巨噬細胞吞噬後的酵母菌，其 1265 cm^{-1} 及 1651 cm^{-1} 的拉曼光譜譜線會有隨時間變弱的情形。我們想更進一步了解此譜線下降所代表的涵意，因此，我們必須先了解單一酵母菌光譜上每個特徵譜線所代表的官能基。圖 3-9 即是處在緩衝溶液內酵母菌所量測到的拉曼光譜，其各譜線位置，和常見脂質的形式相當類似。並且由文獻可以知道，酵母菌的細胞膜組成大部分（可近 70%）是不飽和脂肪酸，細胞整體含不飽和脂肪酸的比例也可高達 81%^{70, 71}。雖然此比例會隨不同細胞分裂週期和生長環境（溫度或培養液成分等）而改變，但是整體而言，酵母菌仍是一個富含不飽和脂肪酸的細胞。

因此，我們挑選了一種酵母菌脂肪酸組成的種類 – PC (phosphatidylcholine)，選擇該種類中不飽和雙鍵數不同，並且光譜已經熟知的脂質 DOPC^{72, 73} 及 DLPC⁷³（其中 DOPC 帶有兩個不飽和的雙鍵，而 DLPC 為飽和脂質），利用兩者的拉曼光譜來幫助我們判別酵母菌拉曼光譜中的訊號來源。

經過和兩種脂質的比較，我們整理出酵母菌拉曼光譜中五個較明顯訊號的來源，分別是 =CH bending vibration (1266 cm^{-1})、 $-\text{CH}_2$ twisting vibration (1300 cm^{-1})、 $-\text{CH}_2$ bending vibration (1441 cm^{-1})、cis C=C stretching vibration (1651 cm^{-1}) 及 C=O stretching vibration (1740 cm^{-1})。因此，從上個實驗所觀察到的結果，即 1266 cm^{-1} 和 1651 cm^{-1} 隨時間會有變弱的趨勢，但 1300 cm^{-1} 與 1441 cm^{-1} 並無明顯變化，就可以解釋為酵母菌受吞噬後，和碳鏈雙鍵相關的訊號會有下降的情形，而和碳鏈單鍵相關的訊號則無變化。更進一步，我們推測此情形為酵母菌脂質組成上的 C=C 結構，在受到巨噬細胞吞噬之後，遭到巨噬細胞產生之活性氧化物破壞的結果。

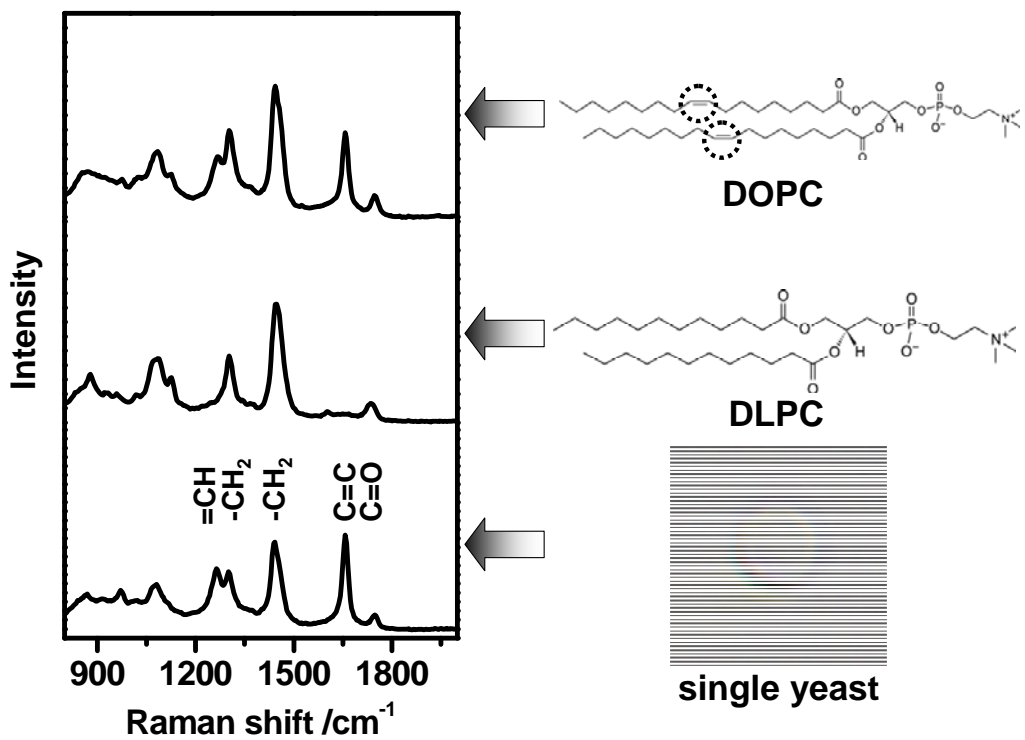


圖 3-9 酵母菌拉曼散射光譜譜線解析。右列為 DOPC、DLPC 兩種脂質之化學結構，以及酵母菌之亮視野影像。左列分別為上述三物之拉曼光譜。

3-4 利用同位素取代法證明巨噬細胞內之酵母菌為拉曼光譜變化之來源

一般細胞內組成胞器十分複雜，並且部份胞器組成的結構也都含有脂質（粒腺體、高基氏體等），所以在得到受吞噬酵母菌雙鍵結構會改變的結果後，我們為排除此結果是由巨噬細胞內物質進入到量測範圍內而造成。我們必須對受吞噬之酵母菌做標定，並藉由標定之訊號在巨噬細胞內明確的找出酵母菌及取得其光譜，如此即可避免前述之問題。

而在酵母菌標定的方法上，我們想藉由重水中的氘或氘氧基來取代酵母菌原本結構上的氫或氫氧基，再利用其產生的特殊光譜訊號，來幫助我們找出在巨噬細胞中的酵母菌。用此種標定方法的好處，在於我們不必搭配其它儀器，能夠在量取酵母菌拉曼散射光譜的同時，從光譜中氘或氘氧的特殊振動光譜譜線，確認是否為受過標定的酵母菌。並且，相較於使用染劑作標定的方式，重水對一般生物的影響相對較小，可避免因標定對酵母菌造成傷害，影響到最後的實驗結果。

在此，我們必須先了解，在同位素取代的過程前後，酵母菌本身的光譜訊號到底有哪些變化。圖 3-10 分別為重水、去離子水、緩衝溶液 (PBS, Phosphate Buffered Saline)、同位素取代過後的酵母菌及一般酵母菌的拉曼光譜。我們發現在同位素取代過後的酵母菌，於 $2100\text{ cm}^{-1} \sim 2250\text{ cm}^{-1}$ 間有一個很寬的拉曼峰，經文獻的查找後得知其為 C-D stretching 的訊號^{47, 74, 75}。因此，看到此訊號的出現，表示該酵母菌的確有經過同位素的取代，將原本 C-H 置換成 C-D。將圖 3-10 同位素取代後的酵母菌和一般酵母菌的拉曼光譜局部放大（紅色方框），可發現在 $2100\text{ cm}^{-1} \sim 2250\text{ cm}^{-1}$ 的 C-D stretching 訊號的確為經過重水處理後才會有。並且，從實驗中使用的去離子水、細胞實驗中使用的緩衝溶液以及用於同位素取代的重水之光譜來看，他們的光譜在 $2100\text{ cm}^{-1} \sim 2250\text{ cm}^{-1}$ 也無譜線出現，因此，我們可以排除上述變化是由水溶液造成。

另外，圖 3-11 為在重水中培養不同時間之酵母菌的拉曼光譜，可看到隨著在重

水中培養的時間增長， $2100\text{ cm}^{-1} \sim 2250\text{ cm}^{-1}$ 訊號越來越強，這也更加確定此訊號的來源的確跟同位素取代有關，並且隨著取代時間越長，其訊號表現越明顯，表示受到取代之碳氫鍵越多。

在確定了同位素取代的效果無異之後，我們也重複了在細胞內的實驗，利用受過同位素取代的酵母菌當作入侵物，隨著被巨噬細胞吞噬後不同時間點，量取其拉曼散射光譜之變化。一來可以確認同位素取代是否對酵母菌受到破壞之狀況產生影響，再來即是證明之前觀察到受吞噬之酵母菌碳鏈雙鍵受到破壞之情形，的確是反映自目標酵母菌本身的光譜變化，而非巨噬細胞內之胞器往量測範圍靠近引起。最後，我們得到的結果的確和先前沒有同位素取代之酵母菌相同（圖 3-12），皆觀察到雙鍵訊號隨著時間有下降的情形，並且從光譜中帶有的同位素訊號，我們也能確定所量測之位置的確是受到標定之酵母菌。這樣的結果表示此種標定的方法不但有效讓我們確定光譜的來源，也不會對酵母菌結構造成重大變化，而對觀察之過程有明顯影響。



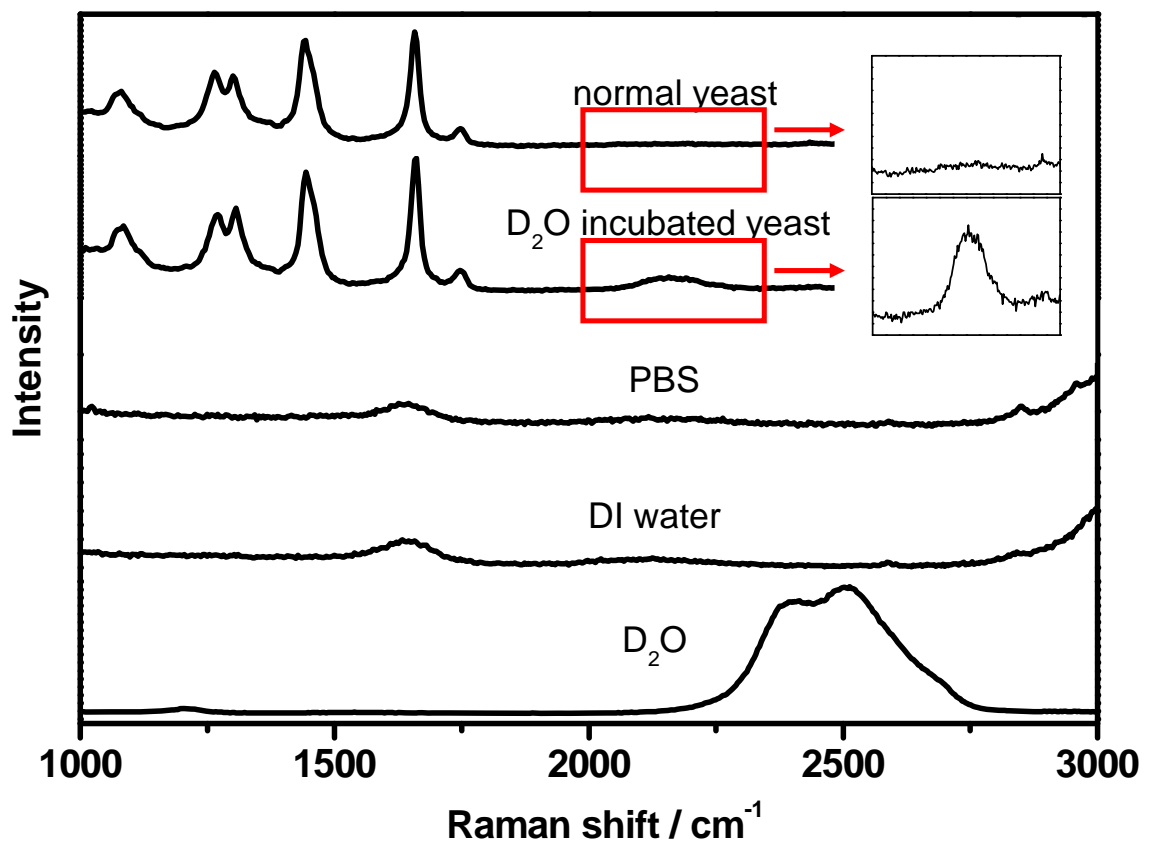


圖 3-10 同位素取代過後酵母菌拉曼光譜解析。最上方兩光譜右側為紅色方框區域內之局部放大圖。

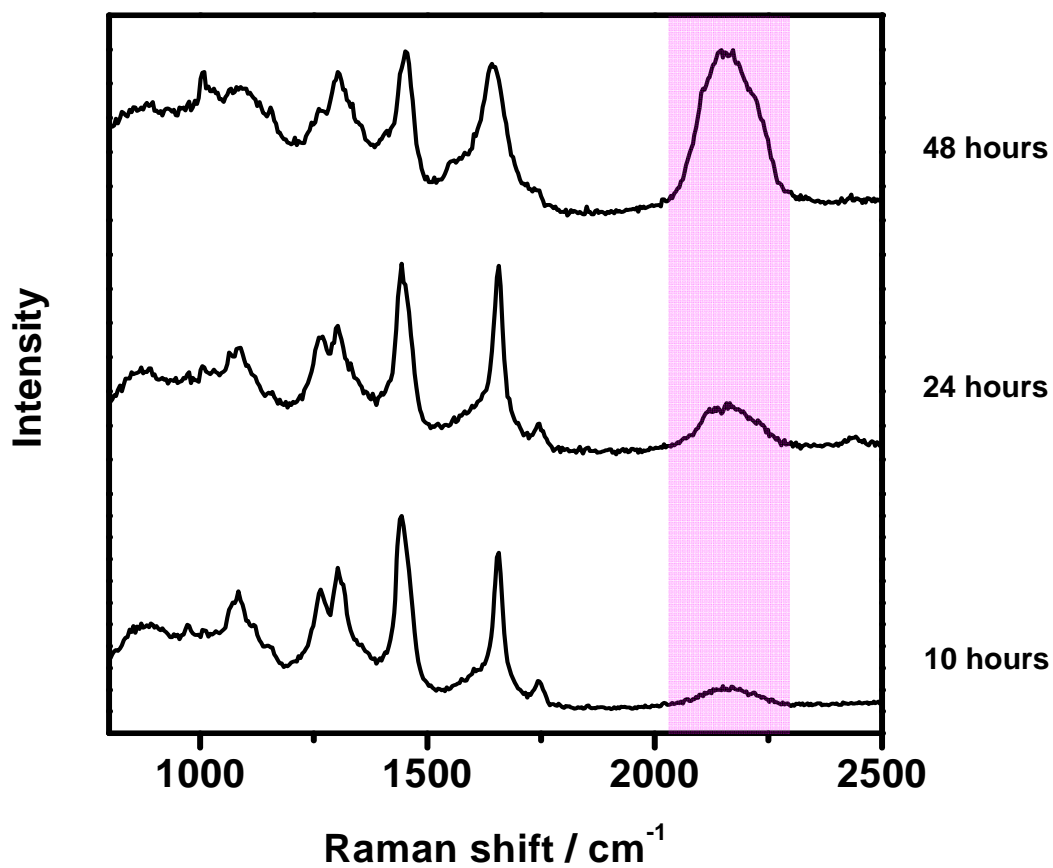


圖 3-11 酵母菌隨同位素取代時間之動態拉曼光譜變化。紫色區域之拉曼譜線為 C-D stretching 之振動譜線。

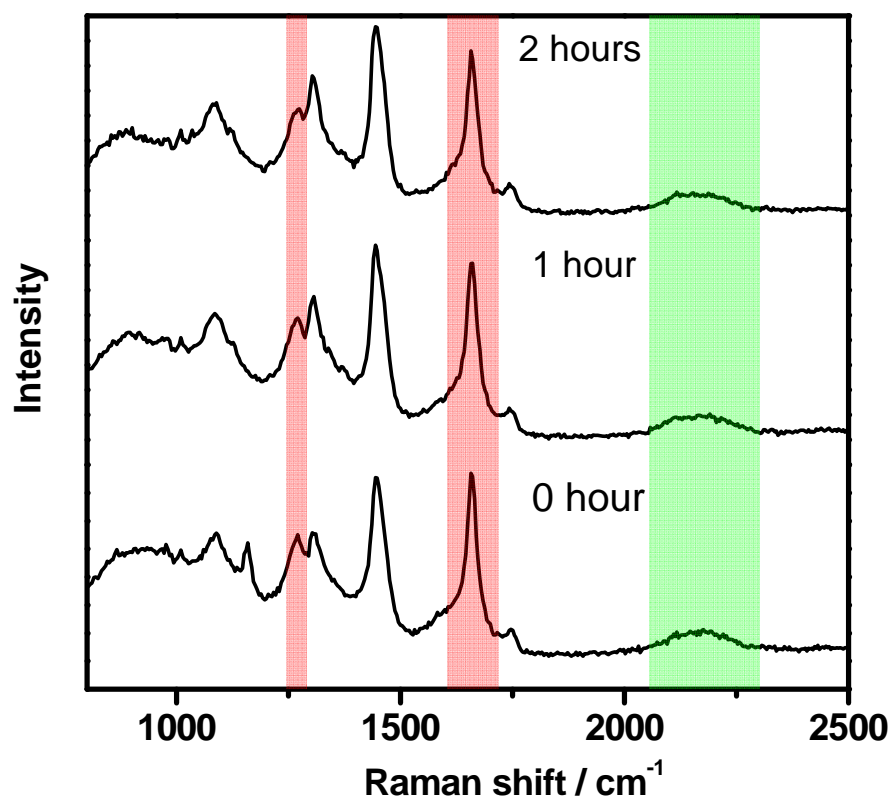


圖 3-12 同位素標定之酵母菌在吞噬作用後之動態拉曼光譜變化。綠色區域為 C-D stretching 之拉曼譜線，紅色區域為碳鏈雙鍵相關之譜線。

3-5 培養液、酵母菌與巨噬細胞對所觀測拉曼光譜強度之貢獻

在做了同位素取代之後，我們還必須進一步了解，巨噬細胞內的複雜組成及細胞外大量的培養液是否如預期對酵母菌拉曼光譜訊號無干擾。因此，我們在同一個巨噬細胞的三個不同位置（巨噬細胞外的細胞培養液、巨噬細胞之細胞質、巨噬細胞內有酵母菌的位置），以同一個高度為起點，作細胞 z 軸（從細胞貼至蓋培養皿之細胞底部往上方之細胞膜）的光譜掃描，以分辨三種組成在拉曼光譜強度上之貢獻。圖 3-13 是以此三種位置所量到的 C=C (1651 cm^{-1}) 光譜譜線強度和其 z 軸高度所畫出的關係圖。可以看到在有酵母菌的位置，此光譜譜線的訊號強度比在培養液或巨噬細胞細胞質的位置強很多，並且在只有培養液或巨噬細胞細胞質的位置，其訊號幾乎跟背景訊號強度一樣，無太大貢獻。而用 $-\text{CH}_2$ (1441 cm^{-1}) 光譜譜線強度來做比較的話，也得到同樣的結果（文中沒有展現）。所以，由於光譜譜線強度上有極大的差異，使我們可以從實驗中得到之酵母菌拉曼光譜變化，排除培養液和巨噬細胞細胞質的貢獻，確認光譜訊號的變化只跟酵母菌本身結構改變有關。

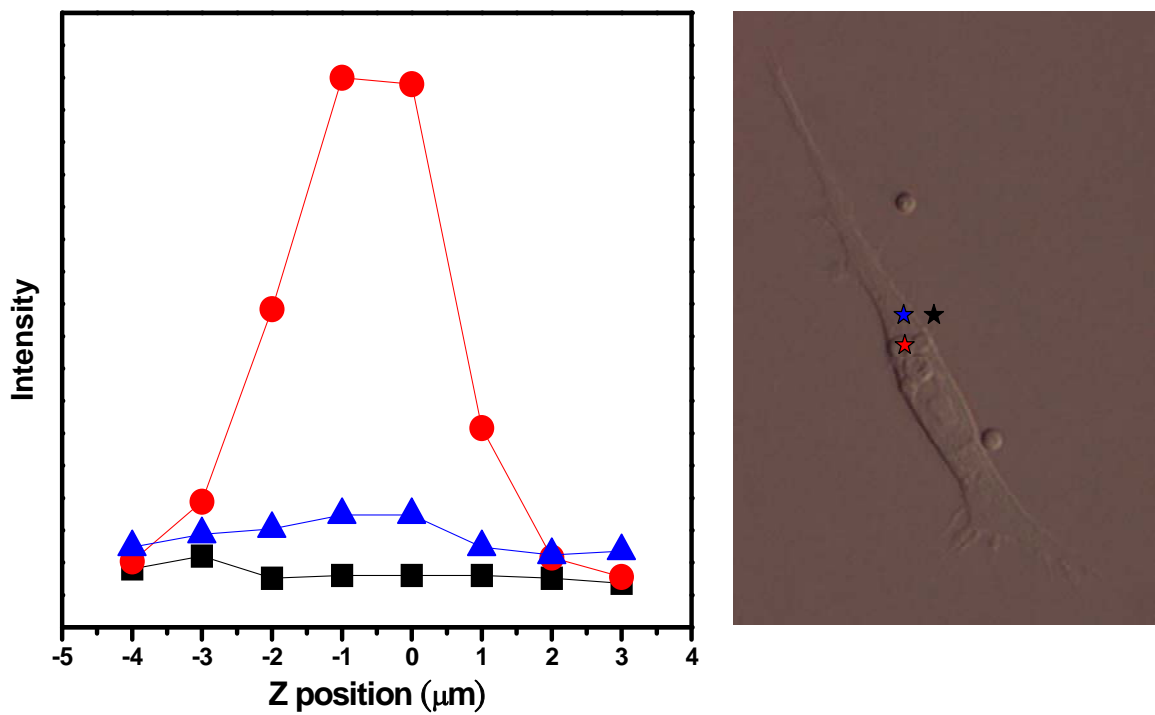


圖 3-13 培養液、巨噬細胞細胞質、酵母菌在拉曼散射光譜中的貢獻 (1651 cm^{-1} , $\text{C}=\text{C}$)。右圖中不同顏色星號分別為培養液 (黑色)、巨噬細胞細胞質 (藍色) 及受巨噬細胞吞噬之酵母菌 (紅色) 三個不同的量測位置。左圖為上述三個量測 (顏色表示同右圖) 位置隨 z 軸變化的拉曼光譜譜線強度變化。

3-6 NADPH 氧化酶抑制劑 - apocynin 對巨噬細胞自體螢光影像及酵母菌拉曼光譜之影響

在前面章節中，我們從巨噬細胞自體螢光影像隨吞噬作用後之變化，以及單一酵母菌受巨噬細胞吞噬後之拉曼散射光譜變化，推測在巨噬細胞吞噬並破壞入侵物的過程，需要 NADPH 氧化酶產生的活性氧化物之參與。因此，為了驗證此假設，在此章節我們透過抑制 NADPH 氧化酶產生活性氧化物之功能，再次利用自體螢光影像及拉曼散射光譜，觀察影像及光譜之結論是否符合假設。

從之前文獻^{76, 77}的查找，我們發現了能夠抑制白血球細胞內 NADPH 氧化酶的藥物 apocynin，此藥物現在雖然還沒有明確的抑制機制，但是一般推測是其阻礙了細胞質內的 NADPH 氧化酶次單元 (p47phox、p67phox 等) 向吞噬體膜 (或細胞膜) 上的次單元移動。缺少了這些次單元的結合，NADPH 氧化酶不能完整組裝成活性態，因此利用電子傳遞以製作活性氧化物的功能就會被終止 (圖 3-14)。在此，我們利用此種抑制藥物加至細胞培養液中，以停止 NADPH 氧化酶之功能 (活性氧化物的製造)，觀察在這種狀態下，受吞噬的酵母菌其雙鍵被破壞的情形是否會被抑制，如果會即表示此破壞過程跟活性氧化物及 NADPH 氧化酶有一定關聯。另外，也利用自體螢光影像，觀察 NADPH 氧化酶受抑制後，黃素蛋白在巨噬細胞內含量及分布的變化，藉此也可幫助我們了解 apocynin 的抑制機制是否跟黃素蛋白有關。

圖 3-15 是在細胞培養液中施加 apocynin 後，受巨噬細胞吞噬之酵母菌在兩小時內的光譜變化情形，可以看到在觀測時間內，酵母菌本身各特徵譜線並無明顯變化。並且從圖 3-16 的統計結果來看，如果在正常處理條件下 (僅有脂多醣)，酵母菌光譜中的雙鍵訊號與單鍵訊號之比例下降了 20%。但是在細胞培養液中添加 apocynin 來抑制 NADPH 氧化酶活性後，兩小時觀察時間內，實驗組碳鏈雙鍵和單鍵之譜線強度比例下降至 97.4% (標準差 1.7%，n = 5)，對照組則為 98.1% (標準差 5.1%，n = 10)，實驗組和對照組無明顯之差異 (P = 0.86)。說明了 NADPH 氧化酶受抑制後，雙鍵比例下

降之趨勢的確消失了。此實驗的結果展現 apocynin 對 NADPH 氧化酶抑制後，由於 NADPH 氧化酶無法產生活性氧化物來破壞入侵物，使入侵物（酵母菌）組成上之碳鏈雙鍵受破壞的情形消失。符合我們一開始認為 NADPH 氧化酶產生之活性氧化物為巨噬細胞破壞入侵物之重要成分的假設，也說明了用拉曼散射光譜技術探究巨噬細胞破壞入侵物能力的可能性。

而從自體螢光影像（圖 3 - 17）的部份，我們則是發現，不管細胞培養液內存在 apocynin 與否，巨噬細胞在吞嚥作用後，吞嚥體周圍的螢光皆有變強，且顆粒狀的自體螢光物質同樣有聚集在吞嚥體周圍的現象。因此，我們認為在巨噬細胞的 NADPH 氧化酶受到抑制之後，巨噬細胞細胞質內之 FAD 組裝至吞嚥體上 NADPH 氧化酶的功能並不會受到阻礙（參考圖 1 - 2），而且攜帶細胞色素 (cytochrom-b) 的囊泡仍會往吞嚥體聚集，這使我們對 apocynin 抑制 NADPH 氧化酶的機制有更進一步的了解。



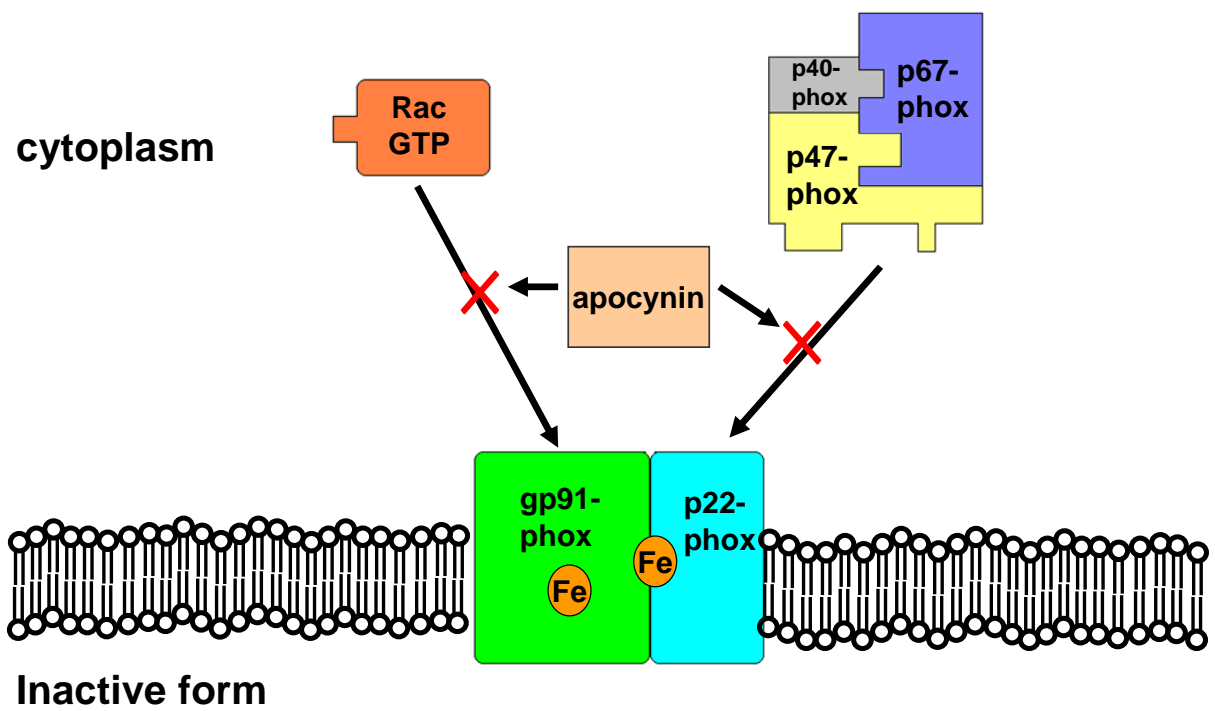


圖 3-14 apocynin 對 NADPH 氧化酶抑制方式示意圖。apocynin 阻擾了在細胞質中的 NADPH 氧化酶次單元向膜上聚集，在不能完整組裝下，NADPH 氧化酶即失去其產生活性氧化物的能力。

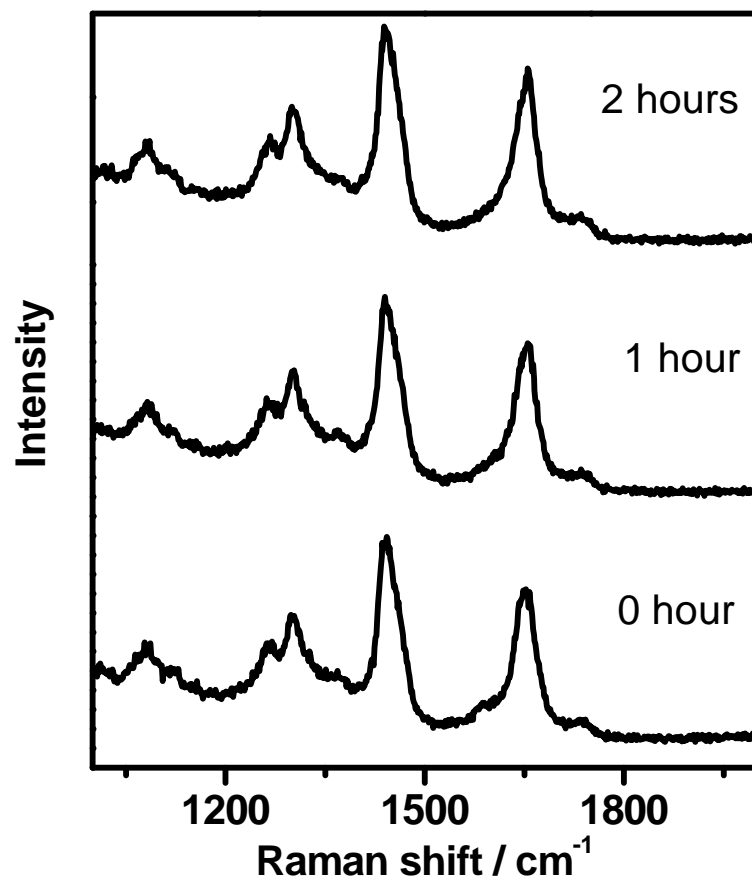


圖 3-15 施加 NADPH 氧化酶抑制劑後，受吞噬酵母菌隨時間之動態拉曼光譜變化。

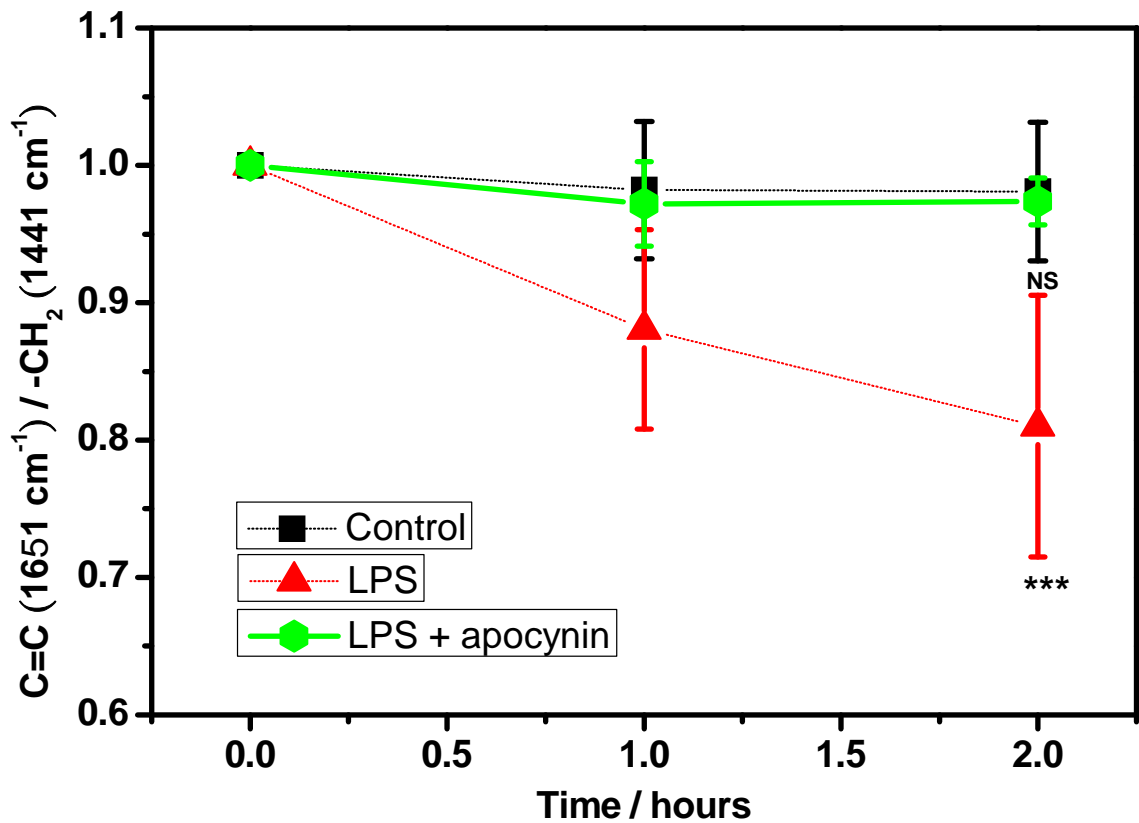


圖 3 - 16 施加 NADPH 氧化酶抑制劑前後，受吞噬酵母菌拉曼光譜譜線 1651 cm^{-1} / 1441 cm^{-1} 隨時間之變化。黑色方框為對照組、紅色三角形為在巨噬細胞培養液內添加脂多醣之實驗組、綠色六邊形則為添加脂多醣及 apocynin 之實驗組。***： significantly different from control ($P < 0.001$)，NS： non-significantly different from control ($P > 0.05$)。

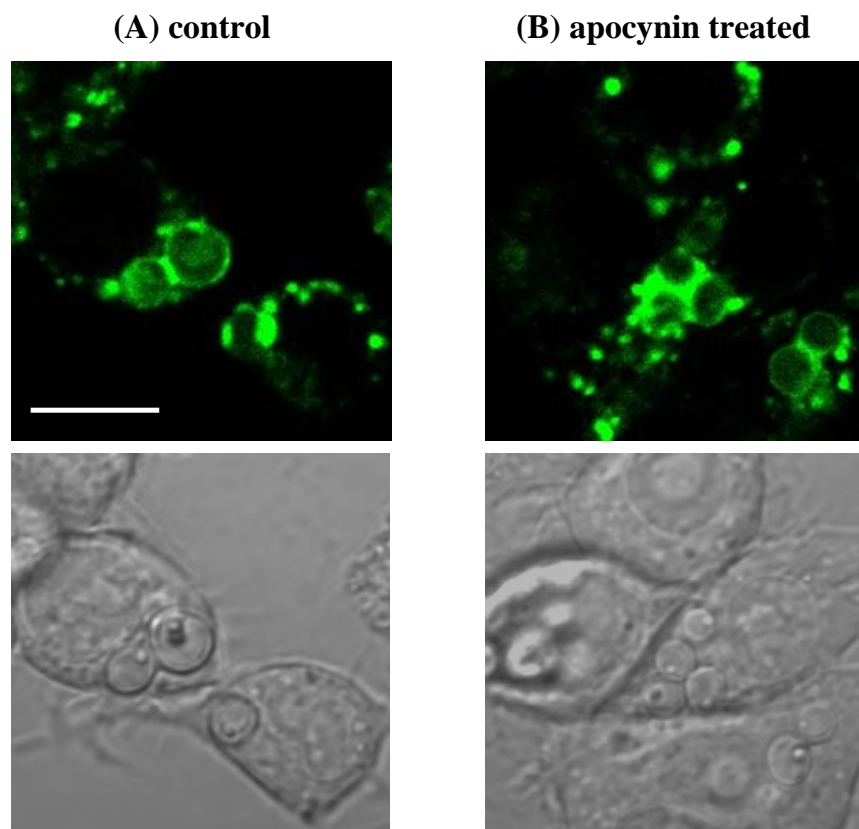


圖 3 - 17 施加 NADPH 氧化酶抑制劑對巨噬細胞在吞噬作用後自體螢光之影響。

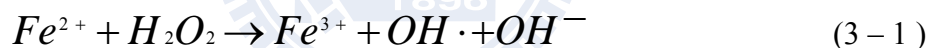
(A)、(B) 上圖為自體螢光影像，下圖為雷射穿透光影像。比例尺為 10 μm 。

3-7 利用化學方法產生活性氧化物模擬酵母菌氧化傷害與細胞

內實驗結果之比較

由之前觀察到受巨噬細胞吞噬之酵母菌的拉曼光譜變化情形，其結論為和雙鍵相關的譜線會隨著時間有下降的趨勢，我們推測此變化為巨噬細胞產生之活性氧化物對酵母菌脂質造成脂質過氧化傷害的結果。因此，為了確認酵母菌碳鏈雙鍵之變化，是否為活性氧化物所造成，我們設計了實驗來驗證此假設。即假使酵母菌拉曼光譜上和雙鍵相關譜線的變化是由巨噬細胞產生活性氧化物所導致，那我們在細胞外同樣利用活性氧化物施加在酵母菌上，應該會觀察到相同的光譜變化情形。所以，在這部分我們挑選了三種活性氧化物（過氧化氫、次氯酸、氫氧自由基，參考圖 1-3）來做細胞外實驗，觀察光譜的變化情形。實驗中所使用的濃度皆為 0.1 mM，而產生的方法如下。

產生氫氧自由基的方法是透過 Fenton reaction，這是一個在生物體內就具有的自由基產生機制，此方法產生氫氧自由基的過程如下：



大致來說，在有金屬離子 (Fe^{2+}) 存在下，過氧化氫會和鐵離子反應，產生大量的氫氧自由基，而且氫氧自由基也被推論為白血球細胞中，清除外來物的物質之一。

另外，我們也同時使用白血球細胞中具有的過氧化氫來做相關的實驗，一方面可以幫助我們了解過氧化氫是否具有清除外來物的能力，另一方面也可以幫助我們了解，在我們的操作條件下，Fenton reaction 是否有產生氫氧自由基。

而在次氯酸的產生方式，我們是利用次氯酸鈉 (NaOCl) 水溶液來調配，根據以下反應式



我們可以利用次氯酸鈉加上水來產生次氯酸，並且利用次氯酸在 292 nm (吸收係數為 $350 M^{-1}cm^{-1}$) 下的吸收值來求得其濃度⁷⁸。

首先，我們利用 Fenton reaction 在酵母菌所處環境中製造 0.1 mM 氫氧自由基，

並持續量取其拉曼光譜之變化 (圖 3-18)。從動態光譜變化可以發現，這和受巨噬細胞吞噬之酵母菌情形相同，都是在 1265 cm^{-1} 及 1651 cm^{-1} 的拉曼光譜譜線會隨著時間比例下降，其它的譜線並無太明顯變化。再從圖 3-18 (B) 中拉曼光譜譜線的強度比例 ($1651\text{ cm}^{-1} / 1441\text{ cm}^{-1}$)，可以更清楚看到，在 30 分鐘裡， 1651 cm^{-1} 的訊號下降至 43.7% (標準差 9.6%， $n = 11$)，第 0 分鐘和第 30 分鐘比較之下變化非常明顯 ($P = 2.8 \times 10^{-9}$)。以上譜線的變化，根據先前對酵母菌訊號的分析，代表的是碳鏈雙鍵訊號隨時間減弱。更進一步，我們推測這是因為酵母菌在氫氧自由基的環境下，組成成分中之碳鏈雙鍵受到破壞的結果。

再來，我們也檢測過氧化氫對酵母菌破壞的情形。在這個部份，我們想得到兩個資訊，第一，過氧化氫是否也會對酵母菌造成破壞，如果有，破壞情形是否和細胞內實驗相同。第二，由於在利用 Fenton reaction 產生氫氧自由基時，會利用到過氧化氫，我們想確認在進行 Fenton reaction 時，如果有過量的過氧化氫殘留，是否也會對細胞造成破壞，以分辨氫氧自由基和過氧化氫的貢獻。圖 3-19 展示了在 0.1 mM 過氧化氫下酵母菌 45 分鐘內的拉曼光譜變化，在這部份，由於前 30 分鐘並無明顯變化，因此，我們延長至 45 分鐘。從圖中我們可以發現，這和氫氧自由基下的變化不同，在 30 分鐘的觀察時間內，光譜各譜線均無明顯改變。再由 3-19 (B) 中拉曼光譜譜線的強度比例 ($1651\text{ cm}^{-1} / 1441\text{ cm}^{-1}$) 變化，可以得知在經過 30 分鐘後， 1651 cm^{-1} 只些微的下降至 95.9% (標準差 5.7%， $n = 4$)，第 0 分鐘和第 30 分鐘比較之下並無明顯差異 ($P = 0.25$)。這樣的結果表示在過氧化氫作用之下，酵母菌雙鍵在觀察時間內並無可見之變化，這和在巨噬細胞內之情形不同。因此，我們推測雖然過氧化氫是產生後續活性氧化物的重要物質，但是在白血球消滅外來物的貢獻並非主要。另外，此結果也佐證了先前氫氧自由基實驗中的結論，因為由這邊的實驗，我們發現在單純只有過氧化氫的狀態下酵母菌並不會有受破壞的情形，所以如果氫氧自由基沒有被產生，在先前實驗中酵母菌的雙鍵相關譜線不會有如此劇烈之變化。

最後，我們測試次氯酸對酵母菌的破壞行為，濃度同樣是 0.1 mM。從圖 3-20 之動態光譜變化情形，發現他造成和巨噬細胞內及細胞外添加氫氧自由基相似的結果，皆

是使拉曼光譜之 1265 cm^{-1} 及 1651 cm^{-1} 譜線隨著時間下降。而從拉曼光譜譜線強度 ($1651\text{ cm}^{-1} / 1441\text{ cm}^{-1}$) 的統計結果 (圖 3-20 (B)) 可以看到，在 30 分鐘內 1651 cm^{-1} 比例下降至 64.6% (標準差 3.6%, $n = 7$)，第 0 分鐘和第 30 分鐘相比之下差異明顯 ($P = 2.2 \times 10^{-7}$)。這說明了在次氯酸環境下，酵母菌碳鏈結構上的雙鍵也同樣會受到破壞的情形。也再一次證明拉曼光譜能夠用來量測活性氧化物對外來物破壞的情形，並且可以透過雙鍵和單鍵強度的比例，觀察該活性氧化物破壞能力，以找出白血球細胞內最可能利用的活性氧化物種類。

圖 3-21 為在酵母菌環境下分別添加以上三種活性氧化物，對酵母菌拉曼光譜譜線 ($1651\text{ cm}^{-1} / 1441\text{ cm}^{-1}$) 隨時間影響的統計圖總合 (對照組請參考附錄 III)。從此統計的資料我們可以清楚了解，這三種不同活性氧化物在相同濃度下，以氫氧自由基造成的比例變化最明顯，而過氧化氫最不具效果，次氯酸也具有一定的影響能力，不過其程度略小於氫氧自由基。這樣的結果展現了拉曼光譜能藉由酵母菌特徵光譜中，雙鍵 (1651 cm^{-1}) 和單鍵 (1441 cm^{-1}) 的比例變化，成為檢測活性氧化物破壞能力，甚至是白血球活性能量的定量工具，這也是本論文的貢獻之一。

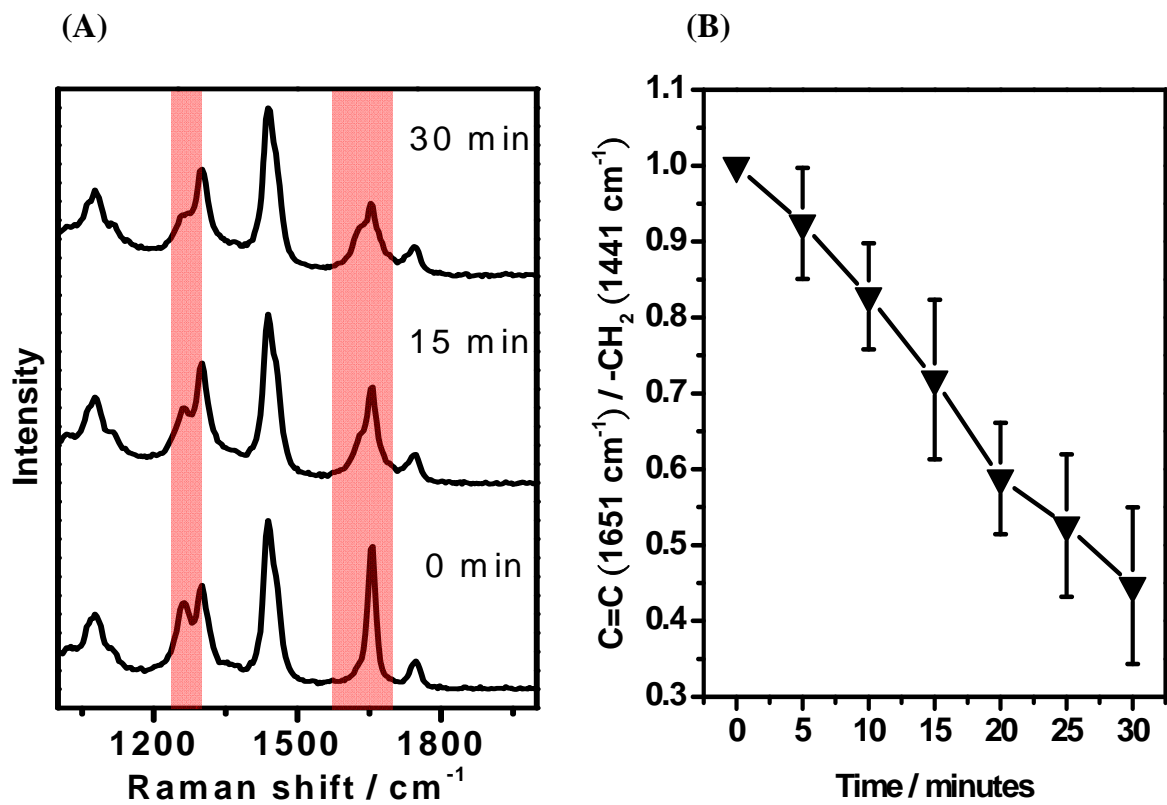


圖 3-18 酵母菌在 0.1 mM 氫氧自由基下，三十分鐘的拉曼光譜變化。(A) 動態拉曼光譜變化，(B) 拉曼光譜中譜線 $1651 \text{ cm}^{-1} / 1441 \text{ cm}^{-1}$ 比例隨時間變化的統計資料。

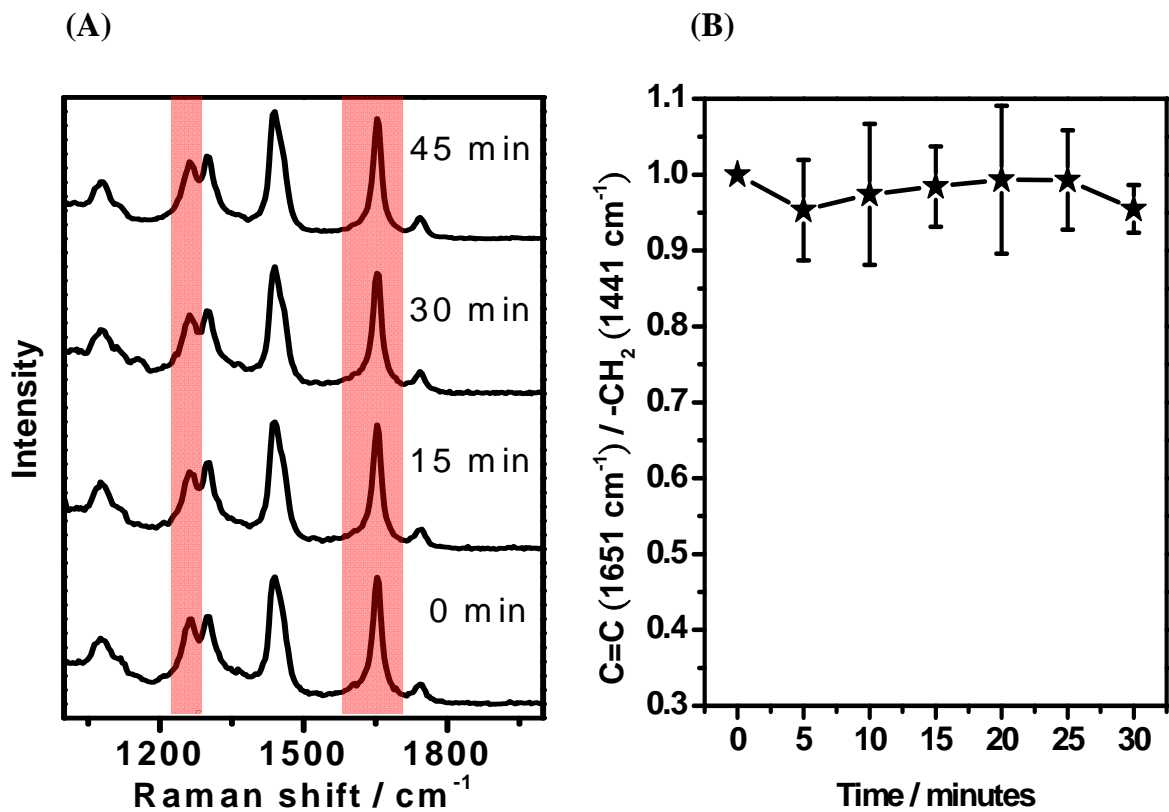


圖 3-19 酵母菌在 0.1 mM 過氧化氫下，四十五分的拉曼光譜變化。(A) 動態拉曼光譜變化，(B) 拉曼光譜中譜線 $1651 \text{ cm}^{-1} / 1441 \text{ cm}^{-1}$ 比例隨時間變化的統計資料。

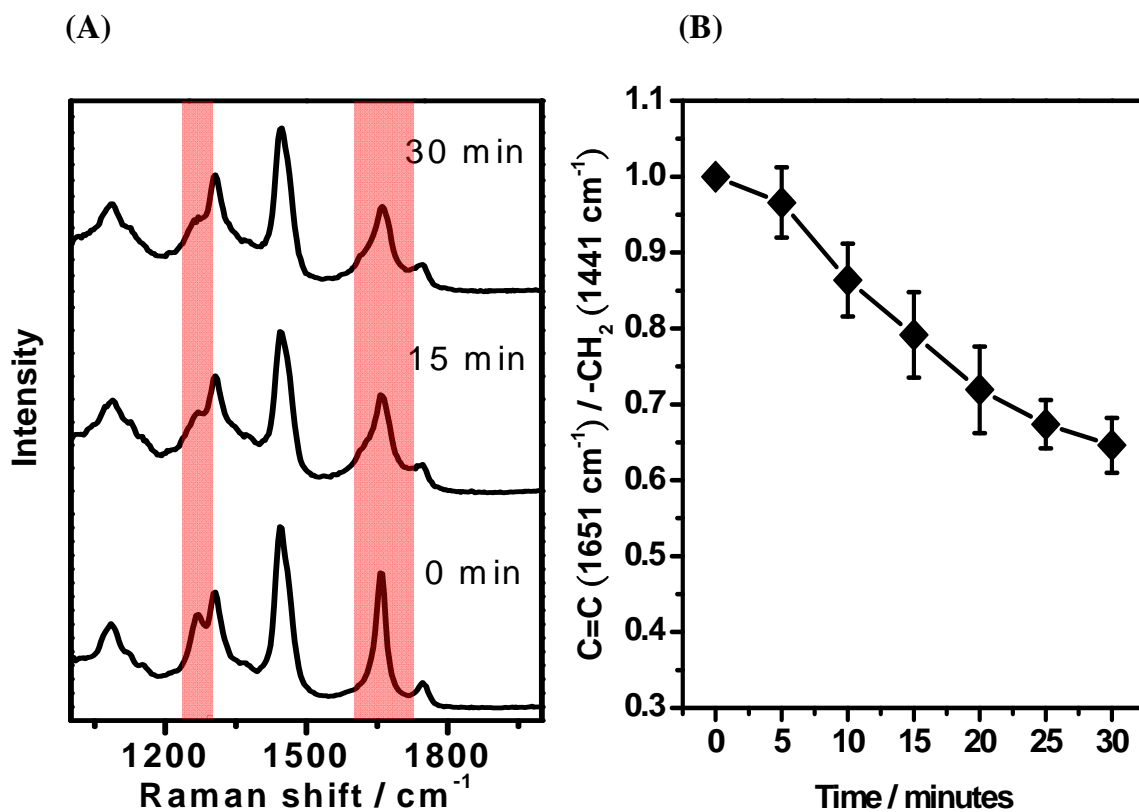


圖 3-20 酵母菌在 0.1 mM 次氯酸下，三十分鐘的動態拉曼光譜變化。(A) 動態拉曼光譜變化，(B) 拉曼光譜中譜線 $1651 \text{ cm}^{-1} / 1441 \text{ cm}^{-1}$ 比例隨時間變化的統計資料

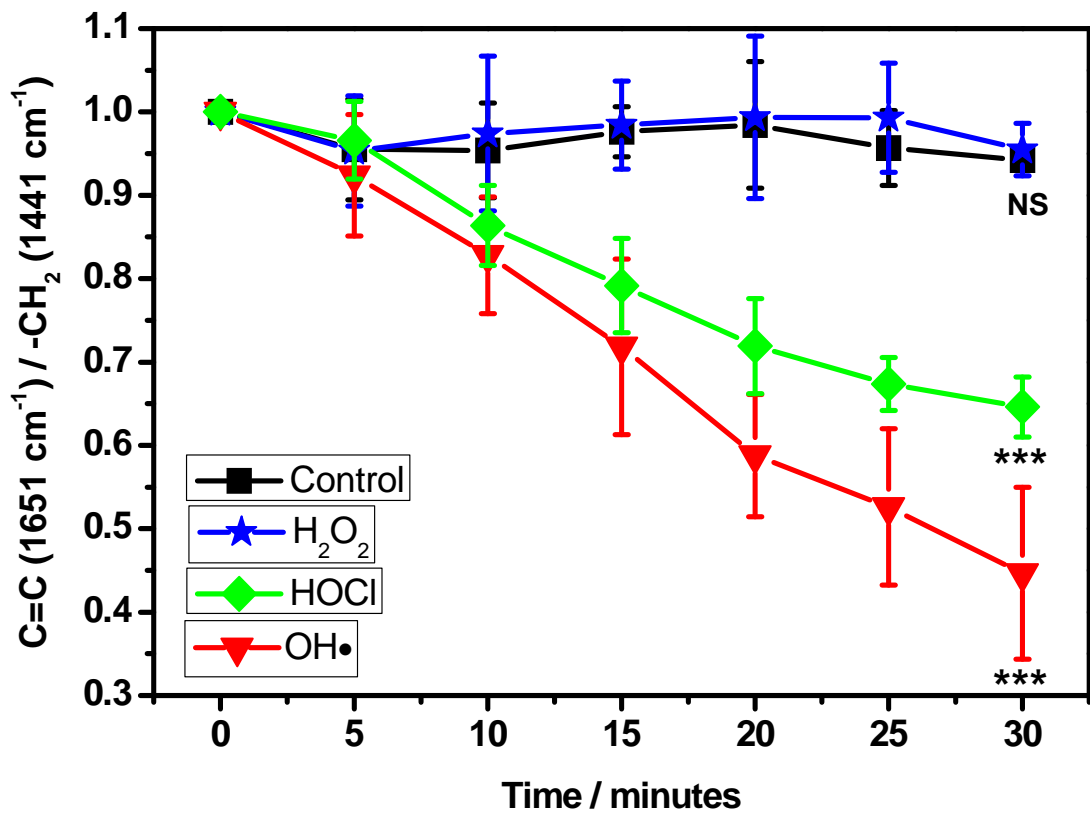


圖 3-21 酵母菌在活性氧化物作用下，拉曼光譜譜線 $1651\text{ cm}^{-1} / 1441\text{ cm}^{-1}$ 比例隨時間的變化。NS： non-significantly different from control, ($P > 0.05$)，***： significantly different from control ($P < 0.001$)。

第四章、結論與未來展望

本論文中，我們成功的利用自體螢光影像，觀察到巨噬細胞在受異物刺激及吞噬作用後，NADPH 氧化酶的增量及重新分佈，以及運送細胞色素的囊泡往吞噬體聚集的情形。並且利用共軛焦拉曼散射光譜技術，觀察到巨噬細胞對入侵物（酵母菌）施加活性氧化物並破壞其雙鍵結構的過程。以上都是在活細胞內，以非染色，無破壞性的方法得到之即時、動態之資訊。

首先，我們使用共焦螢光影像來追蹤巨噬細胞內黃素蛋白和入侵物（酵母菌）間的相對關係，黃素蛋白為產生活性氧化物的重要媒介者，因此，我們可以藉由他的位置來觀測活性氧化物產生的位置。實驗中我們發現，在加入脂多醣活化巨噬細胞之後，細胞內的螢光強度有近六倍的增強情形。我們推測這是巨噬細胞在接受外來的刺激後，啟動其防衛機制，即是利用 NADPH 氧化酶產生活性氧化物來抵禦外來物，因此過程必須先產生大量具有黃素蛋白的細胞色素，以組裝成足夠的 NADPH 氧化酶。並且，在吞噬作用後，我們發現吞噬體膜上的螢光訊號會增強，並且有顆粒狀的自體螢光物質會向吞噬體（酵母菌）聚集。我們將此現象解釋為巨噬細胞在吞噬作用後，欲產生大量的活性氧化物來有效消滅入侵物，因此在吞噬體膜上開始組裝大量的 NADPH 氧化酶。並且，也同時促使帶有 NADPH 氧化酶次單元（黃素蛋白）的囊泡向吞噬體補充，以持續提供足夠的活性氧化物。

接著，為了驗證在自體螢光影像上的變化的確跟 NADPH 氧化酶產生活性氧化物有關，並且也從化學結構上的資訊來解釋巨噬細胞破壞酵母菌的過程，我們利用拉曼散射光譜來觀察吞噬作用後，入侵物結構上的改變情形。發現在受巨噬細胞吞噬之酵母菌，其拉曼光譜中 1266 cm^{-1} (=CH bending vibration) 及 1651 cm^{-1} (cis C=C stretching vibration) 譜線有明顯的強度下降。而 1300 cm^{-1} (-CH₂ twisting vibration) 和 1441 cm^{-1} (-CH₂ bending vibration) 譜線隨時間只有些微的擾動情形。這表示在巨噬細胞消滅酵母菌的過程中，酵母菌結構組成中的雙鍵受到了破壞，而單鍵的部分卻無太大影響。上述

酵母菌雙鍵結構的變化，在我們將巨噬細胞可能產生的活性氧化物（氫氧自由基、次氯酸）拿至細胞外測試時，得到同樣的結果。並且在加入 NADPH 氧化酶抑制劑後，此情形受到了抑制。由此兩種證據，再搭配之前自體螢光影像上的結果，我們可以確定 NADPH 氧化酶及其產生的活性氧化物，是巨噬細胞消滅入侵物的重要工具之一。並且破壞入侵物的方式，可能是經由活性氧化物對入侵物之脂質結構造成脂質過氧化傷害的結果。因為在脂質過氧化傷害過程中，不飽和脂肪酸的雙鍵會受到自由基攻擊，造成雙鍵斷裂而生成丙二醛（見附錄 IV）。這和拉曼散射光譜上觀察到入侵物（酵母菌）雙鍵訊號受到破壞的情形吻合。巨噬細胞可能透過脂質過氧化破壞入侵物的細胞膜組成，造成其細胞膜的功能（細胞膜流動性、離子通道的開關...）改變，或者更進一步靠著破壞性酵素及活性氧化物直接破壞細胞胞器（粒線體、細胞核...），而導致入侵物死亡。

另外，由本論文中的結果，我們也提出了幾項發現。首先，在自體螢光影像的部份，我們觀察到巨噬細胞在受刺激後會具有大量含有黃素蛋白自體螢光之顆粒，證實了 Casbon 等人在 2009 年發表的文章中，提出巨噬細胞內具有運輸及儲存細胞色素之囊泡的推論。再者，在 NADPH 氧化酶抑制劑 – apocynin 的抑制機制上，我們由施加 apocynin 前後自體螢光的分佈，認為 apocynin 並不會影響巨噬細胞內 FAD 結合至 NADPH 氧化酶以形成黃素蛋白，也不會阻礙攜帶細胞色素之囊泡往吞噬體聚集之現象。而在拉曼光譜方面，我們首度利用此種振動光譜方法，研究活細胞（巨噬細胞）產生之化學物質對另一活細胞（酵母菌）的影響情形，並可依受破壞之入侵物光譜譜線的比例 ($1651\text{ cm}^{-1} / 1441\text{ cm}^{-1}$) 當作一定量之數據，提供該白血球之活性比較。這樣的方法，解決了以往螢光影像或電子顯微鏡的缺點，即此兩種常用之量測技術，皆難以提供直接相關且可定量的數據，來描述入侵物受破壞的程度。並且我們以相同的光譜比例方法，也比較出白血球可能具有之活性氧化物對入侵物破壞的程度，得到的結論為氫氧自由基強於次氯酸，而過氧化氫之效用則最弱。因此，我們推測氫氧自由基及次氯酸較有可能是白血球用以破壞入侵物之活性氧化物。

本論文提供了一種免染色、無破壞性且又能即時、動態獲取單一活細胞化學資訊的研究方法，而且成功的應用在巨噬細胞破壞入侵微生物的機制研究上，相信此方法將來

可以被廣泛的應用在白血球活性的量測，更可以進一步推廣至活體細胞及免疫疾病的檢驗。



附錄

I 光譜儀校正步驟

為了使每天量測到的光譜在訊號強度及譜線位置維持固定，所以在每次實驗開始之前，皆會對系統做基本的檢測及校正。

首先，我們必須確定每天光譜儀在波長位置上的表現是一樣的，這樣才不會造成每次雖然量測相同物質，但是譜線位置卻不相同的情形。所以，我們利用一個已經明確知道所有譜線位置的 Hg - Ar 光源，來校正我們光譜儀的位置。

步驟 1：打開光譜儀控制程式 (Andor iDus)，並等待光譜儀後方之 CCD 降溫至負六十度。



步驟 2：打開 Hg - Ar 光源，並連接至光譜儀收光用的光纖。



步驟 3：量取一張 Hg - Ar 光源的光譜，並和標準光譜做對照。



步驟 4：如兩者之間有位移，則打開光譜儀的校正常式 (Calibrate -> Manual X calibration)



步驟 5：將游標指向有位移的譜線上，並按下 capture 以抓取該譜線的位置，接著輸入正確的譜線數值，最後按下 calibrate 完成校正。

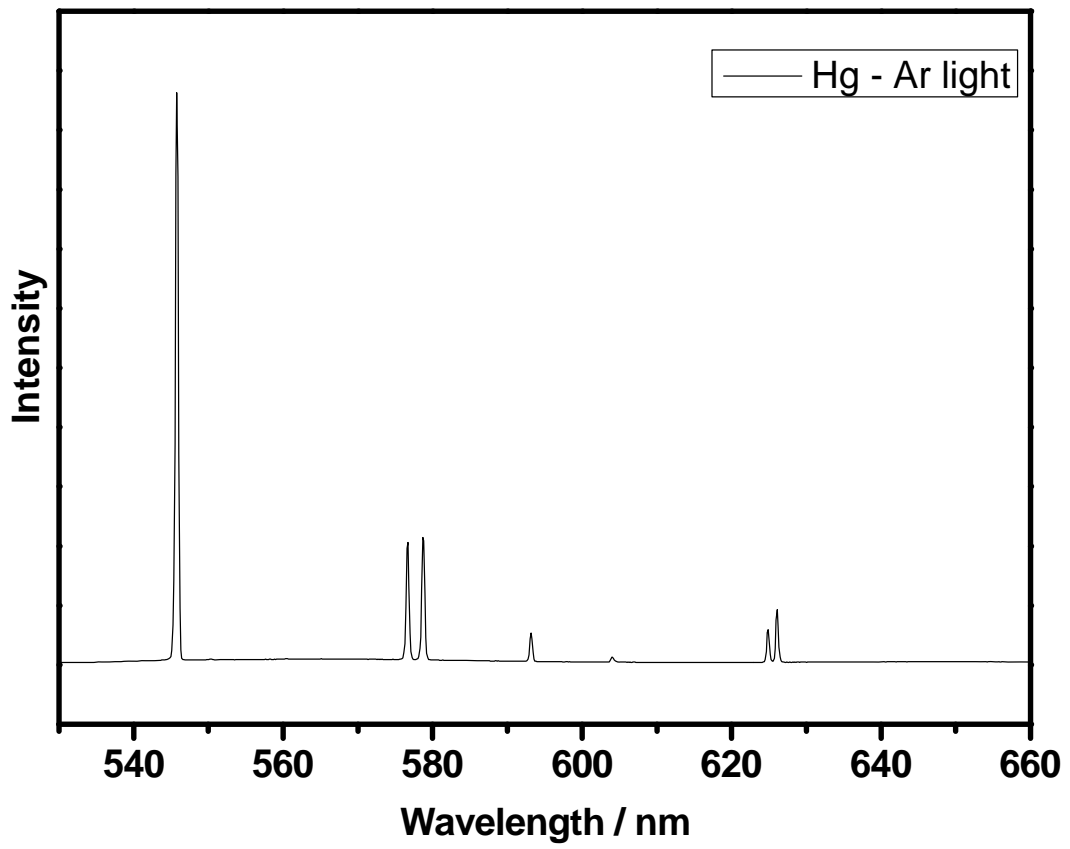


圖 I-1 Hg-Ar 光源之光譜。

II 最佳化拉曼光譜系統之步驟

為了了解當天系統是否有重大變化而造成光譜量測效率變差，我們必須使用一個標準的樣品來檢測系統效率。而在這邊我們利用的是聚苯乙烯微粒的光譜訊號，根據其特徵譜線 (1001 cm^{-1} , Breathing vibration of benzene ring) 當天量測到的強度，判斷系統有無重大問題。

接著，由之前拉曼系統架設可知，在光進入光纖之前，架設了一組共焦光圈，由於此共焦光圈的位置非常重要，稍微有點偏差，樣品的光譜訊號受到周圍培養液及細胞影響會相當明顯。因此，在使用系統開始當天實驗前，也會測試當天共焦光圈位置是否正確。使用的方法是量測在水溶液中的單顆聚苯乙烯微粒，如果在共焦光圈位置不對時，將量到水在 $3100\text{ cm}^{-1} \sim 3600\text{ cm}^{-1}$ 很寬的譜線，及 1700 cm^{-1} 之前不太平整的訊號，表示此時共焦光圈選擇到的位置有部分在水溶液裡；相反的，如果共焦光圈選擇的位置正確，即使在水溶液中，水的訊號亦不會有明顯的貢獻。這樣的比較可由圖 II-2 理解，在裝置了共焦光圈之後，雖然因為些許光 (非來自樣品焦點裡的訊號) 被其阻擋住，造成最後訊號強度稍微降低，但是來自樣品之外 (例如水) 的訊號將有效的被消除。

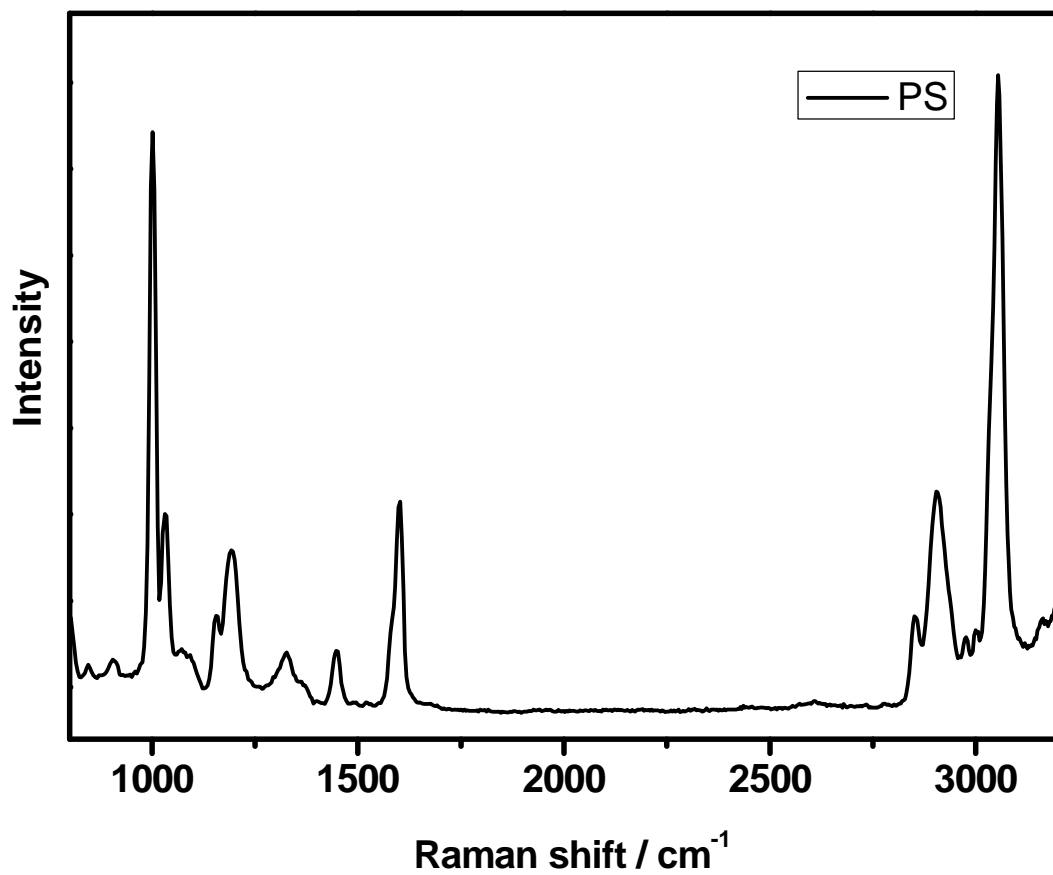


圖 II-1 聚苯乙烯微粒之拉曼散射光譜。

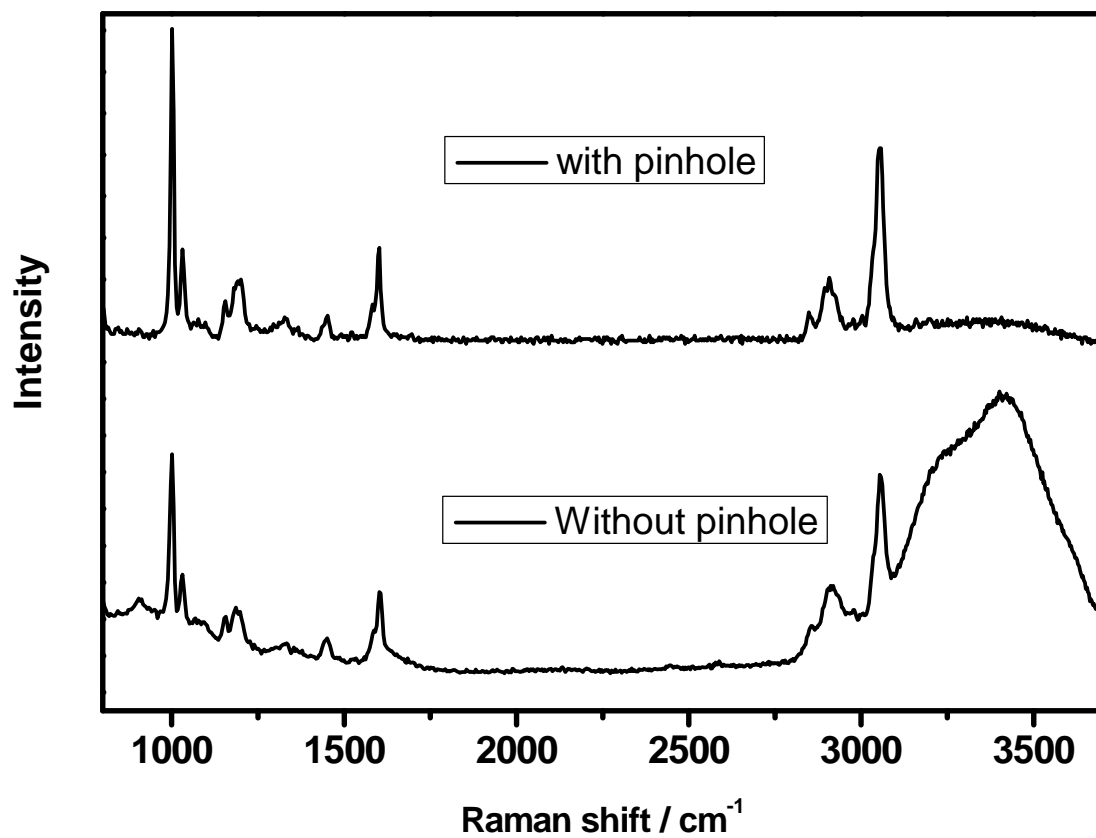


圖 II-2 共焦光圈位置檢測。

III 排除雷射對所觀測酵母菌拉曼光譜強度變化之影響

不管在細胞內抑或是細胞外之光譜實驗，光譜量取過程我們會短暫施與雷射在酵母菌上。我們必須確定所有量測到的酵母菌光譜變化，皆不是源自於雷射對酵母菌產生的破壞。所以我們利用和兩種實驗情況（細胞內及細胞外模擬）下一樣的量取方式，在細胞外正常培養環境，觀察單一酵母菌於此雷射照射下隨時間的變化情形。圖 III - 1 為模擬細胞內實驗之對照組，在此條件之下，單一酵母菌於兩個小時的觀察時間之內，光譜並無明顯變化。圖 III - 1 (B) 為拉曼光譜譜線 $1651\text{ cm}^{-1} / 1441\text{ cm}^{-1}$ 比例隨時間的統計資料，從統計結果可以看到，在 2 小時內 1651 cm^{-1} 比例只下降至 98.0% (標準差 5.0%， $n = 10$)，第 0 小時和第 2 小時相比並無明顯差異 ($P = 0.24$)。表示在此量測條件下，酵母菌無明顯雙鍵受到破壞情形，所以可以確認在細胞內光譜變化之可信度，並搭配之前做過的同位素取代及光譜貢獻分析，我們可以證明酵母菌光譜上的變化的確來自於巨噬細胞對其之影響。而圖 III - 2 為模擬在細胞外添加活性氧化物時，酵母菌受雷射影響的情形，同樣，從動態光譜我們沒有看到明顯改變。再從拉曼光譜譜線的強度比例 ($1651\text{ cm}^{-1} / 1441\text{ cm}^{-1}$) 變化 (圖 III - 2 (B))，可以得知在經過 30 分鐘後， 1651 cm^{-1} 只些微的下降至 97.4% (標準差 5.6%， $n = 7$)，第 0 分鐘和第 30 分鐘比較無明顯變化 ($P > 0.05$)。此結果顯示在添加活性氧化物的實驗條件下，雷射並無對酵母菌造成破壞的情形，因此，同樣確認了光譜上的變化反映至活性氧化物對酵母菌的影響。

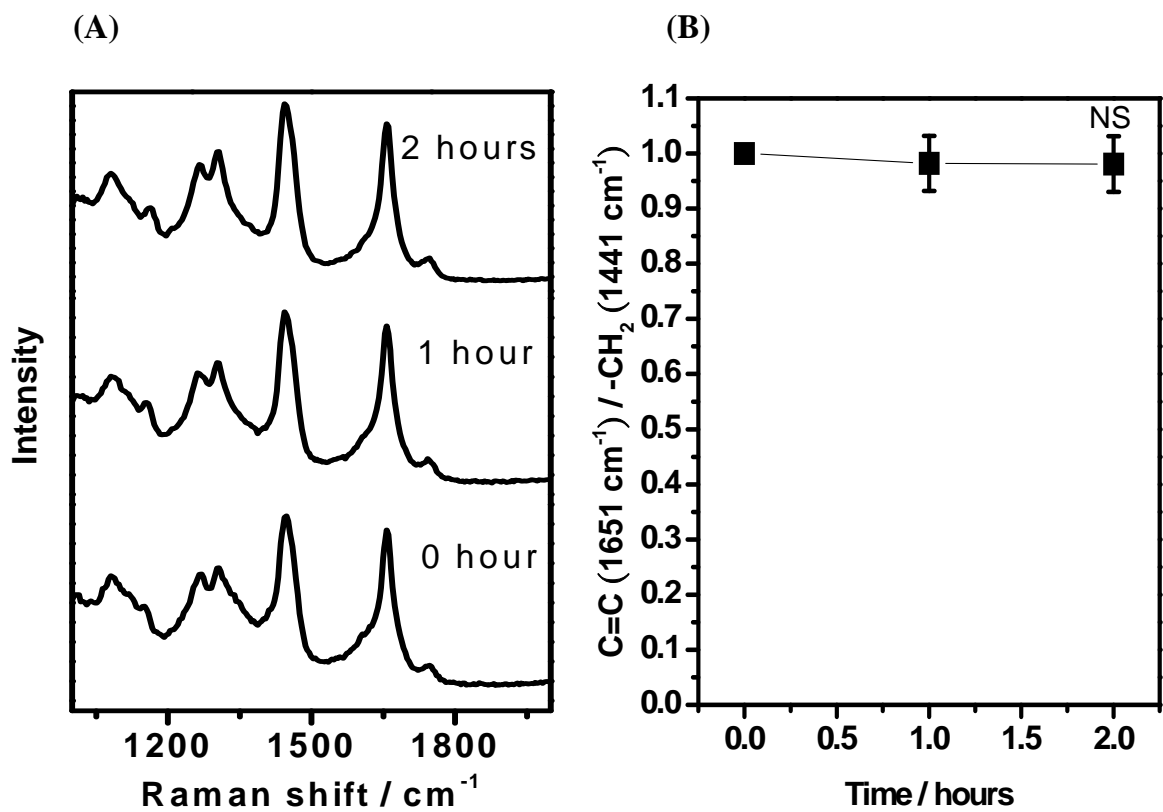


圖 III-1 模擬酵母菌在白血球吞噬作用實驗下之雷射破壞測試。(A) 動態拉曼光譜變化，(B) 拉曼光譜中譜線 $1651\text{ cm}^{-1} / 1441\text{ cm}^{-1}$ 比例隨時間變化的統計資料。NS： non-significantly different from control, $P > 0.05$ 。

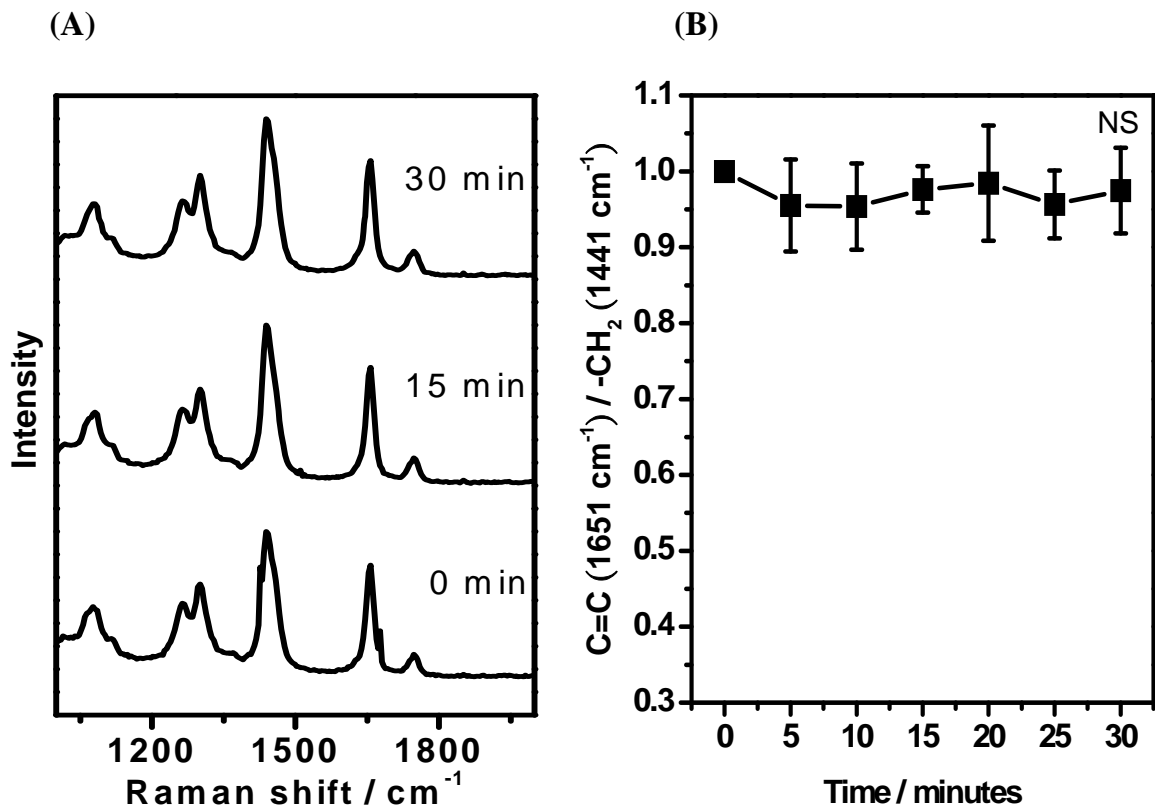
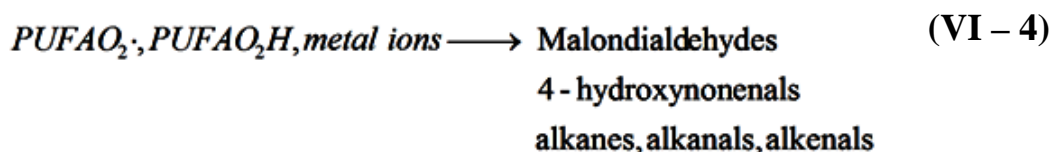
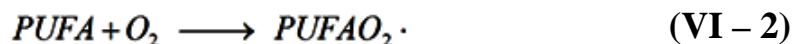
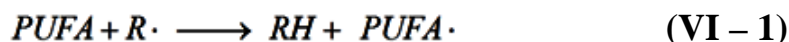


圖 III-2 酵母菌在三十分鐘雷射持續施加下拉曼光譜變化。(A) 動態拉曼光譜變化，(B) 拉曼光譜中譜線 $1651 \text{ cm}^{-1} / 1441 \text{ cm}^{-1}$ 比例隨時間變化的統計資料。NS： non-significantly different from control, $P > 0.05$ 。

VI 脂質過氧化機制之簡介

由之前白血球吞噬酵母菌後，酵母菌光譜訊號隨時間變化的趨勢，我們歸納出此免疫反應過程，促使酵母菌脂質組成中的雙鍵部份受到破壞，但是跟單鍵相關的訊號卻無太大變化，因此，我們推論這個過程應該是屬於脂質過氧化 (lipid per-oxidation) 反應。以下將對脂質過氧化機制做基本介紹，並探討此機制跟實驗結果的相關性。

以公式 VI-1 ~ VI-4 為例，這是一個多元不飽和脂肪酸 (PUFA, polyunsaturated fatty acid) 脂質過氧化反應的過程。如果多元不飽和脂肪酸受到自由基 (radical, R·) 的攻擊，其 C=C 旁的氫有可能會被自由基抓走，形成脂質自由基 (lipid radical, PUFA·)。並且原本處於 cis C=C 的脂肪酸長碳鏈，會折疊成 trans C=C 的形式，並和氧反應，進一步形成脂質過氧化自由基 (lipid peroxy radical, PUFAO₂·)。再來可能會有兩種主要的反應途徑，第一種是脂質過氧化自由基從其他脂質上取得一個氫原子，形成脂質過氧化物 (lipid peroxide, PUFAO₂H)，而脂質過氧化物如果在過渡金屬 (如 Fe²⁺) 存在的環境之下，會被轉變成脂質自由基，如此一來又可回到反應初期再被利用。另一個路徑則是脂質過氧化自由基會經過一連串的環化 (cyclization)，形成內生環過氧化物 (cyclic endoperoxide)，最後被水解 (hydrolysis) 生成丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、4-hydroxynonenal (4-HNE) 和各式各樣的烷類、醛類。其中丙二醛及 4-HNE 也是一般生化檢測中，常被用來觀察脂質過氧反應程度的根據。



另外，從 VI-1 的圖解也能幫助我們更進一步從化學結構來了解脂質過氧化的過程。並且，從圖中我們可以總結出，在一連串的脂質過氧化反應之後，原本帶有數個雙鍵的不飽和脂肪酸，在 C=C 的位置會被氧化形成 C=O，導致 C=C 的數量減少，但是單鍵的部分卻不會受到自由基攻擊，因此，並不會產生任何變化。這樣的結果和之前拉曼光譜所得到的結論十分吻合，因為之前得到的光譜資訊告訴我們，在白血球吞噬酵母菌之後，酵母菌脂質訊號中的 1265 cm^{-1} 及 1651 cm^{-1} 會有隨時間明顯下降的傾向，但是 1300 cm^{-1} 及 1441 cm^{-1} 卻沒有明顯的變化趨勢。而經由更前面章節對酵母菌光譜訊號的分析， 1265 cm^{-1} 和 1651 cm^{-1} 分別代表 =CH bending vibration 及 cis C=C stretching vibration，皆和雙鍵有關。而 1300 cm^{-1} 及 1441 cm^{-1} 則是 $-\text{CH}_2$ twisting vibration 和 $-\text{CH}_2$ bending vibration，是和單鍵相關的訊號。機制和實驗結果皆表示，在脂質過氧化傷害後，脂質雙鍵會受到破壞，而單鍵不會受到影響。



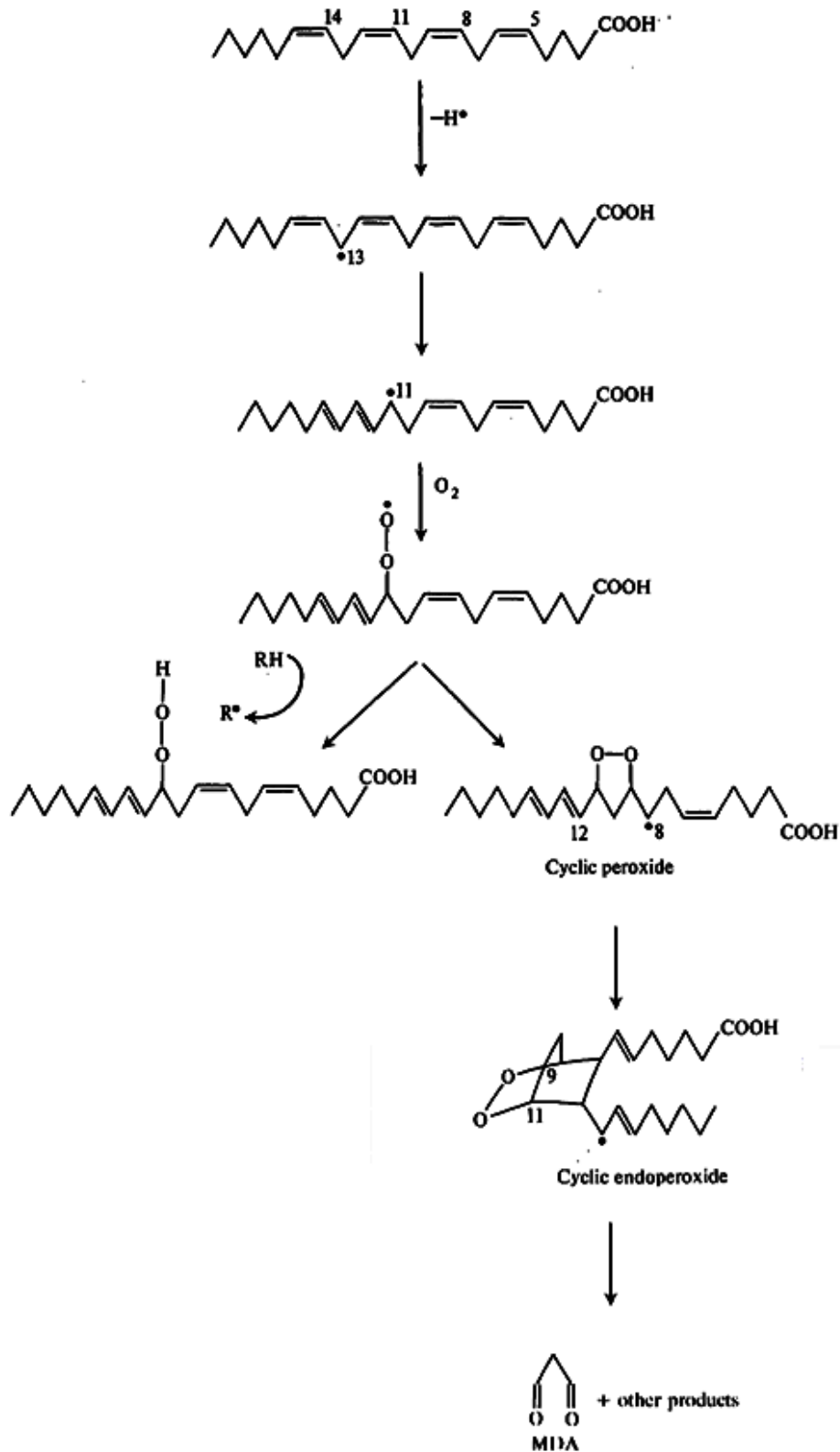


圖 VI-1 脂質過氧化過程示意圖

参 考 文 献

1. El-Benna, J.; Dang, P. M. C.; Gougerot-Pocidallo, M. A.; Elbim, C., Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis* **2005**, 53, (3), 199-206.
2. Roos, D.; Winterbourn, C. C., Immunology - Lethal weapons. *Science* **2002**, 296, (5568), 669-671.
3. Hampton, M. B.; Kettle, A. J.; Winterbourn, C. C., Inside the neutrophil phagosome: Oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* **1998**, 92, (9), 3007-3017.
4. DeLeo, F. R.; Quinn, M. T., Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: Molecular interaction of oxidase proteins. *Journal of Leukocyte Biology* **1996**, 60, (6), 677-691.
5. Fujii, H.; Hashida, S. In *Binding of fad to cytochrome B-558 is facilitated during activation of NADPH oxidase in phagocytes*, 11th Annual Meeting of the Society-for-Free-Radical-Biology-and-Medicine, St Thomas, VI, Nov 17-21, 2004; St Thomas, VI, 2004; pp S64-S64.
6. Saran, M.; Beck-Speier, I.; Fellerhoff, B.; Bauer, G., Phagocytic killing of microorganisms by radical processes: Consequences of the reaction of hydroxyl radicals with chloride yielding chlorine atoms. *Free Radical Biology and Medicine* **1999**, 26, (3-4), 482-490.
7. Painter, R. G.; Wang, G. S., Direct measurement of free chloride concentrations in the phagolysosomes of human neutrophils. *Analytical Chemistry* **2006**, 78, (9), 3133-3137.
8. DeLeo, F. R.; Allen, L. A. H.; Apicella, M.; Nauseef, W. M., NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. *Journal of Immunology* **1999**, 163, (12), 6732-6740.
9. Zipfel, W. R.; Williams, R. M.; Christie, R.; Nikitin, A. Y.; Hyman, B. T.; Webb, W. W., Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, 100, (12), 7075-7080.

10. Monici, M.; Pratesi, R.; Bernabei, P. A.; Caporale, R.; Ferrini, P. R.; Croce, A. C.; Balzarini, P.; Bottioli, G., Natural fluorescence of white blood-cells -spectroscopic and imaging study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **1995**, 30, (1), 29-37.
11. Zonios, G. I.; Cothren, R. M.; Arendt, J. T.; Wu, J.; VanDam, J.; Crawford, J. M.; Manoharan, R.; Feld, M. S., Morphological model of human colon tissue fluorescence. *Ieee Transactions on Biomedical Engineering* **1996**, 43, (2), 113-122.
12. Betz, C. S.; Mehlmann, M.; Rick, K.; Stepp, H.; Grevers, G.; Baumgartner, R.; Leunig, A., Autofluorescence imaging and spectroscopy of normal and malignant mucosa in patients with head and neck cancer. *Lasers in Surgery and Medicine* **1999**, 25, (4), 323-334.
13. Brancalion, L.; Durkin, A. J.; Tu, J. H.; Menaker, G.; Fallon, J. D.; Kollias, N., In vivo fluorescence spectroscopy of nonmelanoma skin cancer. *Photochemistry and Photobiology* **2001**, 73, (2), 178-183.
14. Bennett, B. D.; Jetton, T. L.; Ying, G. T.; Magnuson, M. A.; Piston, D. W., Quantitative subcellular imaging of glucose metabolism within intact pancreatic islets. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, 271, (7), 3647-3651.
15. Patterson, G. H.; Knobel, S. M.; Arkhammar, P.; Thastrup, O.; Piston, D. W., Separation of the glucose-stimulated cytoplasmic mitochondrial NAD(P)H responses in pancreatic islet beta cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, 97, (10), 5203-5207.
16. Rocheleau, J. V.; Head, W. S.; Piston, D. W., Quantitative NAD(P)H/flavoprotein autofluorescence imaging reveals metabolic mechanisms of pancreatic islet pyruvate response. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279, (30), 31780-31787.
17. Huang, S. H.; Heikal, A. A.; Webb, W. W., Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein. *Biophysical Journal* **2002**, 82, (5), 2811-2825.
18. Skala, M. C.; Riching, K. M.; Gendron-Fitzpatrick, A.; Eickhoff, J.; Eliceiri, K. W.; White, J. G.; Ramanujam, N., In vivo multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, 104, (49), 19494-19499.
19. Miura, T.; Hori-i, A.; Mototani, H.; Takeuchi, H., Raman spectroscopic study on the

- copper(II) binding mode of prion octapeptide and its pH dependence. *Biochemistry* **1999**, 38, (35), 11560-11569.
20. Cao, Y. W. C.; Jin, R. C.; Mirkin, C. A., Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science* **2002**, 297, (5586), 1536-1540.
21. Xie, C. G.; Dinno, M. A.; Li, Y. Q., Near-infrared Raman spectroscopy of single optically trapped biological cells. *Optics Letters* **2002**, 27, (4), 249-251.
22. Xie, C. G.; Li, Y. Q.; Tang, W.; Newton, R. J., Study of dynamical process of heat denaturation in optically trapped single microorganisms by near-infrared Raman spectroscopy. *Journal of Applied Physics* **2003**, 94, (9), 6138-6142.
23. Deng, J. L.; Wei, Q.; Zhang, M. H.; Wang, Y. Z.; Li, Y. Q., Study of the effect of alcohol on single human red blood cells using near-infrared laser tweezers Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* **2005**, 36, (3), 257-261.
24. Xie, C.; Mace, J.; Dinno, M. A.; Li, Y. Q.; Tang, W.; Newton, R. J.; Gemperline, P. J., Identification of single bacterial cells in aqueous solution using confocal laser tweezers Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry* **2005**, 77, (14), 4390-4397.
25. Xie, C. G.; Chen, D.; Li, Y. Q., Raman sorting and identification of single living micro-organisms with optical tweezers. *Optics Letters* **2005**, 30, (14), 1800-1802.
26. Huang, Y. S.; Karashima, T.; Yamamoto, M.; Hamaguchii, H., Molecular-level pursuit of yeast mitosis by time- and space-resolved Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* **2003**, 34, (1), 1-3.
27. Huang, Y. S.; Karashima, T.; Yamamoto, M.; Hamaguchi, H., Molecular-level investigation of the structure, transformation, and bioactivity of single living fission yeast cells by time- and space-resolved Raman spectroscopy. *Biochemistry* **2005**, 44, (30), 10009-10019.
28. Huang, Y. S.; Karashima, T.; Yamamoto, M.; Ogura, T.; Hamaguchi, H., Raman spectroscopic signature of life in a living yeast cell. *Journal of Raman Spectroscopy* **2004**, 35, (7), 525-+.
29. Huang, Y. S.; Nakatsuka, T.; Hamaguchi, H. O., Behaviors of the "Raman Spectroscopic Signature of Life" in single living fission yeast cells under different nutrient, stress, and

atmospheric conditions. *Applied Spectroscopy* **2007**, 61, (12), 1290-1294.

30. Huang, Z. W.; McWilliams, A.; Lui, H.; McLean, D. I.; Lam, S.; Zeng, H. S., Near-infrared Raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer. *International Journal of Cancer* **2003**, 107, (6), 1047-1052.

31. Hanlon, E. B.; Manoharan, R.; Koo, T. W.; Shafer, K. E.; Motz, J. T.; Fitzmaurice, M.; Kramer, J. R.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S., Prospects for in vivo Raman spectroscopy. *Physics in Medicine and Biology* **2000**, 45, (2), R1-R59.

32. Jhan, J. W.; Chang, W. T.; Chen, H. C.; Lee, Y. T.; Wu, M. F.; Chen, C. H.; Liao, I., Integrated multiple multi-photon imaging and Raman spectroscopy for characterizing structure-constituent correlation of tissues. *Optics Express* **2008**, 16, (21), 16431-16441.

33. Wu, Y. M.; Chen, H. C.; Chang, W. T.; Jhan, J. W.; Lin, H. L.; Liao, I., Quantitative Assessment of Hepatic Fat of Intact Liver Tissues with Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy. *Analytical Chemistry* **2009**, 81, (4), 1496-1504.

34. van Manen, H. J.; Uzunbajakava, N.; van Bruggen, R.; Roos, D.; Otto, C., Resonance Raman imaging of the NADPH oxidase subunit cytochrome b(558) in single neutrophilic granulocytes. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, (40), 12112-12113.

35. Uchida, T.; Kitagawa, T., Mechanism for transduction of the ligand-binding signal in heme-based gas sensory proteins revealed by resonance Raman spectroscopy. *Accounts of Chemical Research* **2005**, 38, (8), 662-670.

36. Xu, H. X.; Bjerneld, E. J.; Kall, M.; Borjesson, L., Spectroscopy of single hemoglobin molecules by surface enhanced Raman scattering. *Physical Review Letters* **1999**, 83, (21), 4357-4360.

37. Alexander, T. A.; Pellegrino, P. M.; Gillespie, J. B., Near-infrared surface-enhanced-Raman-scattering-mediated detection of single optically trapped bacterial spores. *Applied Spectroscopy* **2003**, 57, (11), 1340-1345.

38. Fu, Y.; Huff, T. B.; Wang, H. W.; Wang, H. F.; Cheng, J. X., Ex vivo and in vivo imaging of myelin fibers in mouse brain by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Optics Express* **2008**, 16, (24), 19396-19409.

39. Murugkar, S.; Evans, C. L.; Xie, X. S.; Anis, H., Chemically specific imaging of

cryptosporidium oocysts using coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy. *Journal of Microscopy-Oxford* **2009**, 233, (2), 244-250.

40. Singh, G. P.; Volpe, G.; Creely, C. M.; Grotsch, H.; Geli, I. M.; Petrov, D., The lag phase and G(1) phase of a single yeast cell monitored by Raman microspectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* **2006**, 37, (8), 858-864.

41. Chen, K.; Qin, Y. J.; Zheng, F.; Sun, M. H.; Shi, D. R., Diagnosis of colorectal cancer using Raman spectroscopy of laser-trapped single living epithelial cells. *Optics Letters* **2006**, 31, (13), 2015-2017.

42. Chen, D.; Huang, S. S.; Li, Y. Q., Real-time detection of kinetic germination and heterogeneity of single Bacillus spores by laser tweezers Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry* **2006**, 78, (19), 6936-6941.

43. Ajito, K.; Torimitsu, K., Single nanoparticle trapping using a Raman tweezers microscope. *Applied Spectroscopy* **2002**, 56, (4), 541-544.

44. Ajito, K., Combined near-infrared Raman microprobe and laser trapping system: Application to the analysis of a single organic microdroplet in water. *Applied Spectroscopy* **1998**, 52, (3), 339-342.

45. Ajito, K.; Torimitsu, K., Near-infrared Raman spectroscopy of single particles. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **2001**, 20, (5), 255-262.

46. Houlne, M. P.; Sjoström, C. M.; Uibel, R. H.; Kleimeyer, J. A.; Harris, J. M., Confocal Raman microscopy for monitoring chemical reactions on single optically trapped, solid-phase support particles. *Analytical Chemistry* **2002**, 74, (17), 4311-4319.

47. Matthaeus, C.; Kale, A.; Chernenko, T.; Torchilin, V.; Diem, M., New ways of imaging uptake and intracellular fate of liposomal drug carrier systems inside individual cells, based on Raman microscopy. *Molecular Pharmaceutics* **2008**, 5, (2), 287-293.

48. van Manen, H. J.; Kraan, Y. M.; Roos, D.; Otto, C., Single-cell Raman and fluorescence microscopy reveal the association of lipid bodies with phagosomes in leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, 102, (29), 10159-10164.

49. van Apeldoorn, A. A.; van Manen, H. J.; Bezemer, J. M.; de Bruijn, J. D.; van

- Blitterswijk, C. A.; Otto, C., Raman imaging of PLGA microsphere degradation inside macrophages. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, (41), 13226-13227.
50. Champion, J. A.; Walker, A.; Mitragotri, S., Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharmaceutical Research* **2008**, 25, (8), 1815-1821.
51. Brinkmann, V.; Reichard, U.; Goosmann, C.; Fauler, B.; Uhlemann, Y.; Weiss, D. S.; Weinrauch, Y.; Zychlinsky, A., Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **2004**, 303, (5663), 1532-1535.
52. Casbon, A. J.; Allen, L. A. H.; Dunn, K. W.; Dinauer, M. C., Macrophage NADPH Oxidase Flavocytochrome b Localizes to the Plasma Membrane and Rab11-Positive Recycling Endosomes. *Journal of Immunology* **2009**, 182, (4), 2325-2339.
53. Reeves, E. P.; Lu, H.; Jacobs, H. L.; Messina, C. G. M.; Bolsover, S.; Gabella, G.; Potma, E. O.; Warley, A.; Roes, J.; Segal, A. W., Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature* **2002**, 416, (6878), 291-297.
54. Yates, R. M.; Hermetter, A.; Taylor, G. A.; Russell, D. G., Macrophage activation downregulates the degradative capacity of the phagosome. *Traffic* **2007**, 8, (3), 241-250.
55. Persson, T.; Andersson, P.; Bodelsson, M.; Laurell, M.; Malm, J.; Egesten, A., Bactericidal activity of human eosinophilic granulocytes against Escherichia coli. *Infection and Immunity* **2001**, 69, (6), 3591-3596.
56. Paclet, M. H.; Coleman, A. W.; Vergnaud, S.; Morel, F., p67-phox-mediated NADPH oxidase assembly: Imaging of cytochrome b(558) liposomes by atomic force microscopy. *Biochemistry* **2000**, 39, (31), 9302-9310.
57. Palazzolo, A. M.; Suquet, C.; Konkol, M. E.; Hurst, J. K., Green fluorescent protein-expressing Escherichia coli as a selective probe for HOCl generation within neutrophils. *Biochemistry* **2005**, 44, (18), 6910-6919.
58. Sijtsema, N. M.; Tibbe, A. G. J.; Segers-Nolten, I.; Verhoeven, A. J.; Weening, R. S.; Greve, J.; Otto, C., Intracellular reactions in single human granulocytes upon phorbol myristate acetate activation using confocal Raman microspectroscopy. *Biophysical Journal* **2000**, 78, (5), 2606-2613.
59. van Manen, H. J.; Kraan, Y. M.; Roos, D.; Otto, C., Intracellular chemical imaging of

heme-containing enzymes involved in innate immunity using resonance Raman microscopy. *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, 108, (48), 18762-18771.

60. Alexandratou, E.; Yova, D.; Loukas, S., A confocal microscopy study of the very early cellular response to oxidative stress induced by zinc phthalocyanine sensitization. *Free Radical Biology and Medicine* **2005**, 39, (9), 1119-1127.
61. Zuckerbraun, B. S.; Chin, B. Y.; Bilban, M.; d'Avila, J. C.; Rao, J.; Billiar, T. R.; Otterbein, L. E., Carbon monoxide signals via inhibition of cytochrome c oxidase and generation of mitochondrial reactive oxygen species. *Faseb Journal* **2007**, 21, (4), 1099-1106.
62. Bassoe, C. F.; Li, N. Y.; Ragheb, K.; Lawler, G.; Sturgis, J.; Robinson, J. P., Investigations of phagosomes, mitochondria, and acidic granules in human neutrophils using fluorescent probes. *Cytometry Part B-Clinical Cytometry* **2003**, 51B, (1), 21-29.
63. Rajesh, M.; Sulochana, K. N.; Punitham, R.; Biswas, J.; Lakshmi, S.; Ramakrishnan, S., Involvement of oxidative and nitrosative stress in promoting retinal vasculitis in patients with Eales' disease. *Clinical Biochemistry* **2003**, 36, (5), 377-385.
64. Vivancos, M.; Moreno, J. J., Effect of resveratrol, tyrosol and beta-sitosterol on oxidised low-density lipoprotein-stimulated oxidative stress, arachidonic acid release and prostaglandin E-2 synthesis by RAW 264.7 macrophages. *British Journal of Nutrition* **2008**, 99, (6), 1199-1207.
65. Scarfi, S.; Magnone, M.; Ferraris, C.; Pozzolini, M.; Benvenuto, F.; Benatti, U.; Giovine, M., Ascorbic acid pre-treated quartz stimulates TNF-alpha release in RAW 264.7 murine macrophages through ROS production and membrane lipid peroxidation. *Respiratory Research* **2009**, 10.
66. Cereghino, J. L.; Cregg, J. M., Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Fems Microbiology Reviews* **2000**, 24, (1), 45-66.
67. Cregg, J. M.; Vedvick, T. S.; Raschke, W. C., Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia-Pastoris*. *Bio-Technology* **1993**, 11, (8), 905-910.
68. Kindzelskii, A.; Petty, H. R., Fluorescence spectroscopic detection of mitochondrial flavoprotein redox oscillations and transient reduction of the NADPH oxidase-associated flavoprotein in leukocytes. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **2004**, 33, (4), 291-299.

69. Reinert, K. C.; Dunbar, R. L.; Gao, W. C.; Chen, G.; Ebner, T. J., Flavoprotein autofluorescence imaging of neuronal activation in the cerebellar cortex in vivo. *Journal of Neurophysiology* **2004**, 92, (1), 199-211.
70. Blagovic, B.; Mesaric, M.; Maric, V.; Rupcic, J. In *Characterization of lipid components in the whole cells and plasma membranes of baker's yeast*, Congress of the Croatian-Society-of-Biochemistry-and-Molecular-Biology, Bjelolasica, CROATIA, Sep 30-Oct 02, 2004; Bjelolasica, CROATIA, 2004; pp 479-484.
71. Blagovic, B.; Rupcic, J.; Mesaric, M.; Maric, V., Lipid analysis of the plasma membrane and mitochondria of Brewer's yeast. *Folia Microbiologica* **2005**, 50, (1), 24-30.
72. Sanderson, J. M.; Ward, A. D., Analysis of liposomal membrane composition using Raman tweezers. *Chemical Communications* **2004**, (9), 1120-1121.
73. Cherney, D. P.; Conboy, J. C.; Harris, J. M., Optical-trapping Raman microscopy detection of single unilamellar lipid vesicles. *Analytical Chemistry* **2003**, 75, (23), 6621-6628.
74. van Manen, H. J.; Lenferink, A.; Otto, C., Noninvasive Imaging of Protein Metabolic Labeling in Single Human Cells Using Stable Isotopes and Raman Microscopy. *Analytical Chemistry* **2008**, 80, (24), 9576-9582.
75. Xie, X. S.; Yu, J.; Yang, W. Y., Perspective - Living cells as test tubes. *Science* **2006**, 312, (5771), 228-230.
76. Vejrazka, M.; Micek, R.; Stipek, S., Apocynin inhibits NADPH oxidase in phagocytes but stimulates ROS. production in non-phagocytic cells. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* **2005**, 1722, (2), 143-147.
77. Yu, J. J.; Weiwer, M.; Linhardt, R. J.; Dordick, J. S., The role of the methoxyphenol apocynin, a vascular NADPH oxidase inhibitor, as a chemopreventative agent in the potential treatment of cardiovascular diseases. *Current Vascular Pharmacology* **2008**, 6, (3), 204-217.
78. Zavodnik, I. B.; Lapshina, E. A.; Zavodnik, L. B.; Bartosz, G.; Soszynski, M.; Bryszewska, M., Hypochlorous acid damages erythrocyte membrane proteins and alters lipid bilayer structure and fluidity. *Free Radical Biology and Medicine* **2001**, 30, (4), 363-+.