

國立交通大學

生物科技研究所

碩士論文

奈米鑽石刀獵殺癌症細胞之分子機制

**Molecular mechanism study of growth
hormone conjugated nanodiamonds in cancer
cell hunting and eliminating**

研究生：周靖淳

指導教授：張家靖 教授

中華民國九十八年七月

奈米鑽石刀獵殺癌症細胞之分子機制

Molecular mechanism study of growth hormone conjugated
nanodiamonds in cancer cell hunting and eliminating

研究生：周靖淳

Student：Ching-Chung Chou

指導教授：張家靖

Advisor：Chia-Ching Chang

國立交通大學

生物科技研究所



Submitted to Department of Biological Science and Technology
National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master

in

Department of Biological Science and Technology

July 2009

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十八年七月

奈米鑽石刀獵殺癌症細胞之分子機制

學生:周靖淳

指導教授:張家靖 教授

國立交通大學生物科技研究所 碩士班

摘要

現今奈米生物科技是個很熱門的研究領域，主要是因為當某材料的空間中尺寸達到 100 nm 以下時，其物理及化學特性相較於一般塊材會有所改變，而奈米鑽石也不例外。早期的奈米鑽石多用於機械上的工業加工或是表面處理，但有近來之研究發現奈米鑽石具有螢光特性，可當作生物分子的追蹤器(bio-tracer)；並有其他文獻指出奈米鑽石不具有細胞毒性且能進行表面官能基的修飾，因此奈米鑽石更具有跨足生醫領域的潛能。而奈米鑽石在吸收奈秒脈衝雷射能量後，其內部的官能基會由 $-C-N=O$ 裂解成 $-C + N \equiv O$ ，更進一步來說，也就是奈米鑽石吸收了能量產生了熱聲子效應，使得鑽石間的軌域由鑽石的核心結構 sp^3 轉變成石墨的結構 sp^2 就由如爆炸一般。因此利用奈米鑽石吸收能量具有爆炸的特性，且結合一生長激素蛋白，使具有大量表現生長激素受體的癌症細胞與奈米鑽石-生長激素附合體結合，再搭配雷射能量系統使得奈米鑽石爆炸，並隨後引發一連串的細胞凋亡反應。而本實驗利用聲子所引起的奈米級爆炸，猶如奈米刀般應用在奈米級生物醫學治療上。

Molecular Mechanism Study of Growth hormone Conjugated Nanodiamonds in Cancer Cell Hunting and Eliminating

Advisee: Ching-Chung Chou

Adviser: Dr. Chia-Ching Chang

Department of Biological Science and Technology
National Chiao Tung University

Abstract

Nano biotechnology is a cutting edge research, recently. "Nano" is defined the length under 100 nm and the physical and chemical properties are quite different than its bulk material. Nanodiamond (ND) surrounds with layers of graphite on its surface. This unique structure feature creates unusual fluorescence spectra which can be used as an indicator to monitor its surface modification. Meanwhile, it contains nitrosol (-C-N=O) inside the ND and this impurity can absorb nanosecond laser radiation to cleavage the -C-N=O chemical functional group into -C + N≡O. Moreover, the NO gas molecules are heated by hot phonon of ND and generate huge pressure inside the diamond core to facilitate the sp³ diamond core transforming into sp² graphite structure as a nano-blast. Therefore, the growth hormone receptor (GHR) of cell surface can be destroyed by growth hormone conjugated-ND (NDGH) and then be triggered the process of cell apoptosis. This photo-trigger nanoblast can be used as nano-knives in nano-medicine application.

誌謝

在研究所這兩年的時間裡，讓我成長很多，要感謝的人也很多，謝謝你們不論是在精神上的支持亦或是實驗上的幫助，真的由衷的感謝你們！

首先要感謝家人的支持，讓我在念研究所的時候，給予我很大的鼓勵與力量；再者感謝我的指導老師-張家靖博士，讓我從這研究題目中學習多向性以及跨領域的研究及合作，結合生物與物理領域，是個非常有挑戰性的研究。

謝謝鄭財木博士、曾信華博士從旁的指導協助；朱學亮學長的兩年來的幫忙讓我能順利完成論文；葉奕辰學長在生活上給我很多歡樂，讓研究生生活裡多了很多色彩；瑤真、芳馨、子正一路的扶持，你們的”指導”我往後進入社會也會銘記在心！也感謝以前社團的夥伴們陪伴我度過低潮！以及感謝實驗室的大家，名字雖不一一列出，但你們的幫忙我都記在心裡！

感謝在實驗上幫助的各位：儀科陳至信博士、蘇健穎與朱念南，羅韻晴工程師……等，真的謝謝各位！一切的感謝，盡在不言中。



目錄

摘要	I
Abstract	II
誌謝	III
目錄	IV
表目錄	VI
圖目錄	VI
第一章 緒論	1
1-1 奈米材料在生物上的應用	1
1-2 奈米醫學影像追蹤的應用	3
1-3 生物標靶性治療介紹	4
1-4 奈米鑽石對癌症標靶性的開發	5
1-5 細胞凋亡(apoptosis)與壞死(necrosis)的介紹	5
第二章 研究動機	7
第三章 實驗架構	8
3-1 魚類和哺乳類動物生長激素的胺基酸序列與親緣關係與演化分析	8
3-2 青石斑魚生長激素是人類生長激素的相似物	8
3-3 青石斑魚重組生長激素的取得與表現	10
3-4 羧酸化奈米鑽石和蛋白質的鍵結	12
3-5 奈米鑽石和羧酸化奈米鑽石在生物特性與毒性的檢測	12
3-6 青石斑魚的重組生長激素(rEaGH)和重組基因魚類生長激素-羧酸化奈米鑽石複合體(cND-rEaGH complex)的生物特性檢測	13
3-7 選定何種癌症細胞為奈米鑽石-生長激素複合體的標靶細胞	13
3-8 熱聲子(hot phonon)效應對 5 nm 奈米鑽石的影響	14
3-9 奈秒脈衝雷射對奈米鑽石-生長激素複合體的應用	14
第四章 實驗原理	16
4-1 大量獲得青石斑魚的重組生長激素	16
4-2 5 nm 奈米鑽石表面羧酸化	16
4-3 5 nm 羧酸化奈米鑽石螢光光譜測定	16
4-4 動態光散色儀測定羧酸化奈米鑽石的粒徑	16
4-5 共價鍵結合的羧酸化奈米鑽石-蛋白質複合體	17
4-6 細胞的培養	18

4-7	奈秒雷射能量對 cND-rEaGH 在細胞上的影響	18
4-8	檢測 cND-rEaGH 在細胞上經熱聲子效應後的分析	18
4-8-1	細胞型態學(Morphology).....	18
4-8-2	掃描式電子顯微鏡(Scanning Electron Microscope, SEM).....	19
4-8-3	免疫細胞化學染色(Immunocytochemistry, ICC)	19
4-8-4	雷射共軛焦螢光顯微鏡(Confocal Microscope)	19
4-8-5	細胞存活率分析(statistics of cell viability).....	20
4-8-6	發炎反應蛋白(Inter-Cellular Adhesion Molecule, ICAM)	20
	分析	20
4-9	cND-rEaGH 在癌症治療上的應用	21
第五章	結果	22
5-1	生長激素與生長激素受體的偵測	22
5-1-1	青石斑魚重組生長激素的取得與表現	22
5-1-2	確認肺腺癌細胞具有生長激素的受體	23
5-2	羧酸化奈米鑽石理化特性分析	25
5-2-1	確認羧酸化奈米鑽石的粒徑大小	25
5-2-2	檢測 5 nm 羧酸化奈米鑽石螢光光譜	26
5-3	奈秒雷射能量測定與選定	27
5-4	確認在細胞上羧酸化奈米鑽石與青石斑魚重組生長激素的結合	28
5-5	經雷射處理後細胞巨觀觀察	30
5-5-1	經 cND、rEaGH、cND-rEaGH 處理和雷射轟炸前後的細胞 形態	30
5-5-2	經 cND、rEaGH、cND-rEaGH 處理和雷射轟炸前後的存活 細胞數目	33
5-6	經奈秒雷射處理後細胞致死機制分析與觀測	35
5-6-1	觀察經 cND-rEaGH 處理和雷射轟炸前後的細胞凋亡誘導 因子(Apoptosis-inducing factor, AIF)	36
5-6-2	觀察經 cND-rEaGH 處理和雷射轟炸前後的細胞凋亡小體 (apoptotic body)	39
5-6-3	經 cND、rEaGH、cND-rEaGH 處理和雷射轟炸前後的 發炎反應蛋白(ICAM)分析	42
第六章	討論	44

6-1 奈米鑽石的生物物理特性	44
6-2 5 nm cND-rEaGH 的特性與應用	44
6-3 奈米鑽石與青石斑魚重組生長激素的結合方法探討	44
6-4 不同雷射能量使奈米鑽石爆炸並對細胞的影響	45
6-5 奈米鑽石經雷射轟炸後的應用	46
6-6 細胞經 cND-rEaGH 處理和雷射轟炸後的死亡表現與可能反應路 徑	47
6-7 了解細胞的表面受體能有助於標靶治療的發展	48
6-8 奈米鑽石的發展潛力	50
第七章 參考文獻	51

表目錄

表 1 細胞自然凋亡與壞死介紹	6
表 2 正常細胞與惡性腫瘤細胞所具有的受體種類	48

圖目錄

圖 3-1-1 魚類和哺乳類動物的親源演化樹	8
圖 3-9-1 奈秒脈衝雷射對奈米鑽石-生長激素複合體在癌症細胞 上的應用示	15
圖 4-5-1 羧酸化奈米鑽石與青斑魚重組生長激素結合示意圖 ...	18
圖 5-1-1 青石斑魚重組生長激素(rEaGH)的表現電泳分析圖	22
圖 5-1-2 確認肺腺癌細胞(A549)具有生長激素受體	24
圖 5-2-1 利用動態光散射儀所測量 5 nm 奈米鑽石的實際粒徑大 小	25
圖 5-2-2 5 nm 羧酸化奈米鑽石的三維螢光光譜	26
圖 5-3-1 奈秒雷射能量的選定	27
圖 5-4-1 利用雷射共軛焦顯微鏡檢視肺腺癌細胞上的 cND 是否 與 rEaGH 接合	29
圖 5-5-1 以掃描式電子顯微鏡觀察 A549 的細胞型態	31
圖 5-5-2 以倒立式光學顯微鏡觀察 A549 分別加入 rEaGH、5 nm cND、5 nm ND-rEaGH，有與無奈秒雷射轟炸處理並培養 0 以及 20 小時的細胞型態	32

圖 5-5-3 經 cND、rEaGH、cND-rEaGH 處理和雷射轟炸前後的存活細胞數目	34
圖 5-6-1 利用西方轉漬法偵測 caspase 3 在細胞分子層次上的表現	35
圖 5-6-2 caspase 以及 caspase-independent 路徑示意圖	36
圖 5-6-3 利用共軛焦顯微鏡觀察 A549 細胞分別經 rEaGH、cND、cND-rEaGH 處理和有無雷射轟炸後，細胞凋亡誘導因子 AIF 的分布情況	39
圖 5-6-4 肺腺癌細胞加入 5 nm cND-rEaGH 有與無雷射處理的細胞核型態	41
圖 5-6-5 經 cND、rEaGH、cND-rEaGH 處理和雷射轟炸前後的發炎反應蛋白	43
圖 6-4-1 利用倒立式顯微鏡觀察使用過高能量雷射處理細胞後的外觀	46
圖 6-6-1 細胞經 cND-rEaGH 處理及雷射照射後的細胞凋亡可能反應路徑	47



第一章 緒論

1-1 奈米材料在生物上的應用

一般來說，定義「奈米」的大小為在三維空間中一物質的尺寸約為 1~100 nm 則稱之為奈米顆粒[1]；當物質以「奈米」等級存在時，其導電性、磁性、光學、物理和化學性質會有很大改變[2]，因此具有很多特殊現象及特性可供利用，所以在近幾十年內大量應用在各個領域如化妝品工業、紡織業、電腦工業、半導體等等中，更是應用在生醫領域的一大新契機。因為在生物體微觀的世界裡皆是由奈米尺度的分子所組成，像是生命分子 DNA、蛋白質、脂質.....等等，且生命現象的運作也是由細胞中奈米等級的胞器協助完成的，因此利用奈米材料在生醫上可以有效的達到分子層次上的治療而直達病灶[3,4]；現今在生物醫學領域裡奈米技術的研發大致可囊括藥物傳遞與釋放[5,6]、醫療診斷上生物晶片[7,8]、基因治療[9,10]、智慧藥物[11]、生物醫學奈米機械以及仿生材料[12,13]等應用。

以下將簡述一些奈米材料的特性並在生物醫學上的應用。

(1.) 量子點(Quantum dot): 量子點具有獨特的光譜吸收特性能取代現有的化學螢光染劑[14]。由於傳統的化學染劑其激發波峰(excitation peak)和放射波峰(emission peak)常有部分的光譜重疊(cross talk)，所以化學染劑經由激發後所放射出的螢光訊號易受到激發光源的干擾，又螢光消失(photo-bleaching)的速度極快，不同的化學染劑甚至須要不同波長的光源來激發[15]，相較之下量子點具有許多化學螢光染劑所沒有的優點。

不同粒徑大小的量子點可激發出不同顏色的螢光，而且它們只需由單一波長的光源來激發[16]，其螢光的半衰期長且有較高的 quantum yield，綜合以上幾個優點，可以運用不同粒徑大小的量子點同時並長時間觀察追蹤多種標定蛋白質在細胞內的動向，是不錯的生物影像追蹤器[17]。雖說量子點螢光特性是優於傳統化學染劑，但量子點的核心是由半導體材料如硒化鎘或硒化鉛等有毒物質所組成[18]，長期接觸這些有毒物質會對細胞甚至是基因層次造成傷害[19]，因此量子點對活生物體來說是具有毒性的[20]。

(2.) 奈米金(Nanogold): 奈米金顆粒的光學性質會因為粒徑的改變而

有所變化；隨著粒徑的逐漸縮小，吸收光譜變化會往長波長方向移動 [21,22]；如市售的驗孕棒即是利用此特性，將帶有人類絨毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin)抗體的奈米金粒子製成檢驗試劑，當懷孕3~4周的婦女將尿液滴入驗孕棒中，就會呈現鮮紅直線，即是抗原抗體的結合[23]。且表面也可以修飾成很多官能基，與生物分子做鍵結，以電化學做為基礎做生物樣品如 DNA 等等檢測也具有發展性[24,25]。

(3.) 奈米碳管(Nanotube): 奈米碳管具有良好的導電及彎曲扭轉特性 [26]，在工業發展方面是具有潛力的奈米物質，而在生物醫學應用上來說，在過去傳統的組織工程技術已經成功培養出一些新生的組織，例如皮膚與軟骨[27]等，但是無法培養出功能完備的器官；因此利用奈米碳管來導引人工器官的細胞生長及支架使形成許多細微的管道[28,29]，建構出有如人體中的循環系統的類網絡系統，更進一步發展出細密的血管網，即可以提供氧氣和營養物給實驗室中培養的肝臟與腎臟。但有文獻指出奈米碳管對於細胞是有傷害性的，其傷害性不在於如量子點般具有有毒物質毒害細胞，而是在於奈米碳管的結構有如針尖般刺穿細胞膜，使得細胞死亡[30]。因此奈米碳管若應用到生物體內如藥物傳遞等，此物質的結構是需要考量的重點。

(4.) 奈米鐵氧粒子(Iron oxide nanoparticle): 此類奈米材料有很多種，如 α - Fe_2O_3 、 γ - Fe_2O_3 、 Fe_3O_4 等等的磁性粒子[31,32]，而此類物質會隨著粒徑大小的改變，一些磁性特性也會發生變化，如由抗磁性(diamagnetic)轉變為順磁性(paramagnetic)[33]，因此可以利用此磁力變化特性應用在生物醫學方面。像是磁泳技術(magnetophoresis)[34]可以使生物分子分離或更進一步用在診斷治療的基礎上。而在治療腫瘤細胞方面的主要應用，是將此磁性材料作為靶向藥物運輸的磁性載體，以及利用外加交變磁場的作用產生高熱效應(magnetic fluid hyperthermia)，以達到殺死腫瘤的目的 [35,36]，但是外加交變磁場的作用對正常細胞是否有影響，還待加研究。

(5.) 奈米鑽石(nanodiamond): 奈米鑽石粉末有些是由爆炸的炸藥直接轉換而成，是利用炸藥(TNT / RDX)爆炸時，於負氧平衡反應中未氧化的碳原子重新聚集、排列形成奈米鑽石；製備過程係是將混合炸藥在充以保

護性氣體(惰氣、氮氣或二氧化碳等)的密閉容器中爆炸，主要是目的是防止剛生成的類鑽石物質被氧化並減弱其石墨化，因此所形成的奈米鑽石是雜有氮、氧、氫原子的奈米材料原料[37]。

由於奈米鑽石是利用在高溫及高壓爆炸過程產生的，因此其晶格內部含有大量的缺陷存在，稱做氮空缺中心(nitrogen-vacancy defect centers, N-V 中心)[38]。這晶格的缺陷使得奈米鑽石具有螢光的特性，此外更有學者直接利用高能量的質子光束照射奈米鑽石，增加晶格缺陷的數目，達到強化奈米鑽石發光的效能[39]。而與 N-V 中心不同的是 5 nm 的奈米鑽石吸收螢光光譜是連續的，具有作為生物探針(bio-probe)的潛能[40]，

而奈米鑽石可跨足生物醫學領域，除了具有產生螢光特性可當作生物標定[41]外更是因其大多是由碳原子所組成的，具有高度的生物相容性及對細胞無毒性[42]，並且奈米鑽石吸收奈秒脈衝雷射的能量後[43]，經熱聲子效應的關係，其結構會由原先的 sp^3 轉變成 sp^2 ，而這爆炸效應使分子軌域產生的變化將應用在本實驗中，並加以探討奈米鑽石結合生物分子的複合體吸收奈秒脈衝雷射能量後對癌症細胞的影響[44]。

1-2 奈米醫學影像追蹤的應用

藉由醫學影像的發展，可以藉此來了解人體中組織器官的型態與功能變化。而醫學影像的技術通常是藉由外場的能量束，如磁場等等作用於生命體，再收集信號變化來反應生命體的結構以及其他資訊。又因為不同組織，如骨頭、脂肪、肌肉等吸收外在能量也會有所不同，因此為了增強這信號的差異會在人體內注入醫學對比劑以增加組織間、組織與病變之間的對比度，以取得更好的影像[45]。

(1.) 磁振造影(magnetic resonance imaging, MRI)，是利用生物體內不同組織在外加磁場下產生不同的磁共振信號來成像，而信號的強弱決定於組織內水分子的質子鬆弛時間(relaxation time)[46]。因此需要奈米等級的磁振造影對比試劑以增強鬆弛時間的差別使組織影像對比度增加，此奈米等級材料有超順磁氧化鐵(superparamagnetic iron oxide, SPIO)[47]、超小超順磁性氧化鐵(ultrasmall superparamagnetic iron oxide, USPIOs)[48]、釷(Gd^{3+})[49]基影像劑、富勒烯(fullerene)[50,51]等，由於這些奈米材料在生命體內具有循環時間長與靶向給藥等功能，可應用在腫瘤影像偵測領域中

[52]。

(2.) 三倍頻(Third-harmonic-generation, THG)近年來在生物影像中提供一個非侵入性的偵測方式，具有非線性光學特性可以有內部光學切片的能力，及因有虛擬過度態(virtual transition state)而無能量散失等優點，因此基本上是利用物質同時和三個相同能量的光子來作用，物質受到這三個光子的激發後以放光的形式回到基態，所放出來的光就叫三倍頻訊號。因此必須在同一位置、時間上有很高的光子密度，才能達到同時吸收三個光子的效果[53]。更有學者加入銀奈米粒子的對比試劑，是利用銀奈米粒子表面電漿共振效應(Surface Plasmon Resonance)來增強物體表面電場以提高非線性光學的訊號，此技術可提供很高的三維解析能力，適合用來做3D成像[54]。

(3.) 光聲技術(optoacoustic technique)是讓生物體吸收電磁能量(例如雷射光、微波)之後，產生聲波，然後偵測此聲波，利用超音波的成像原理，組合出生物體內部構造的影像[55]。光聲影像之信號具有光學之高對比與聲學之低散射性質，可運用於生醫影像之研究，像是乳癌造影[56]、腦部功能性與結構性造影[57,58]、即時血氧監測[59]、血紅素濃度量測[60]、腫瘤之血管新生等[61]。在偵測時可利用奈米金接上抗體，以抗體辨認抗原的原理將奈米金帶到欲想檢測的部位，再應用光聲技術以產生高對比、高訊號強度的影像[62]。

1-3 生物標靶性治療介紹

近幾十年來衛生署所公布的國人十大死因，癌症仍居榜首，因此如何發展治療方式及開發癌症治療藥物有效治療癌症以降低死亡率則是全球需要共同努力的課題。

而近年來分子生物學的研究突飛猛進，對於腫瘤生物學的了解也漸漸成熟，因此有關腫瘤的特殊抗原、腫瘤血管新生相關因子、特殊生長因子受體、癌細胞特殊訊息傳遞路徑中的各類分子，及癌細胞內細胞週期和細胞凋亡之調控分子，都有已有深入的探討。從這些分子生物學上的基礎，從中尋找抗癌藥物可直接作用於腫瘤位置，進而抑制其存活、增生、侵犯及轉移[63]。目前許多治療癌症的藥物，就是針對這些重要的標靶因子，

設計出有如導彈般直接命中腫瘤細胞的靶向性藥物，而且不會傷害到正常細胞，也就不會引起其他的副作用，這也就是標靶治療 (target therapy) 的概念[64-66]。

一個理想的標靶分子設計需要有下列幾個特點：(1)大多數癌細胞具有此標靶能與正常細胞區別，(2)其作用對正常細胞要較少或無異常影響，(3)與癌細胞的生存功能有關，(4)此標靶分子在腫瘤中要少變異性或低突變率，(5)不易由細胞表面脫落或分泌[67]。因此本實驗的設計是用上述幾點特點作出一標靶治療的平台，並加以探討癌症細胞死亡的機制。

1-4 奈米鑽石對癌症標靶性的開發

現今具高療效率治療癌症即是標靶藥物的開發，但即使是現有的抗癌藥物、標靶藥物除有抗藥性的問題存在外，還有藥物不易達到腫瘤細胞以致被癌細胞吸收率過低問題，還有研究指出標靶藥物必須使用在適合的病患身上才能發揮最大的藥效，如目前肺癌治療上相當熱門的標靶藥物-艾瑞莎(Iressa)，病患需要有上皮生長因子基因突變才會具有較高的療效[65,68]；用於治療大腸癌之爾必得舒(Erbitux)、用於治療乳癌之賀癌平(Herceptin)也都要有一定的病理檢查，才能讓這些標靶藥物發揮最高治療效果[69]。而且這些標靶藥物的價錢非常昂貴，一年下來的醫藥費藥動輒需要一、兩百萬，對一個家庭來說是不小的經濟負擔。

相較於昂貴的標靶藥物，本實驗利用在生醫領域中新興的奈米材料且價錢平易近人中之-奈米鑽石作為開發標靶癌症治療的基材。奈米鑽石不僅對細胞無毒性、還具有連續螢光光譜特性，可以應用在醫學影像領域裡[40]，更令人興奮的是，奈米鑽石經由奈秒脈衝雷射(nanosecond pulse LASER)處理後，因熱聲子[70]效應使奈米鑽石如爆炸般，使其鑽石的分子結構由 sp^3 轉變成 sp^2 ，因此體積增大了十幾倍之多[44]。

本實驗利用表面羧酸化的奈米鑽石，結合一個具有標靶性的蛋白質形成一複合體，此羧酸化奈米鑽石-標靶性蛋白質複合體會與癌症細胞結合，再利用脈衝雷射，藉著熱聲子效應使得奈米鑽石產生物理性的爆炸，於癌細胞表面產生許多孔洞，受傷嚴重的癌細胞將走入死亡的途徑。

1-5 細胞凋亡(apoptosis)與壞死(necrosis)的介紹

細胞死亡可分為兩部分，細胞凋亡(apoptosis)以及細胞壞死

(necrosis)，因此兩種死亡路徑對細胞的型態、分子層次間，如生理學都不一樣[71]。下表為分類兩種死亡途徑的差異。本實驗是針對非小細胞肺癌細胞(non small lung cancer cell, A549)給予羧酸化奈米鑽石結合一標靶蛋白質分子複合體經脈衝雷射照射(irradiation)後死亡，並以結果去探討證實非小細胞肺癌細胞是經由凋亡路徑而死亡的。

表 1 細胞自然凋亡與壞死介紹

細胞凋亡(apoptosis)	細胞壞死(necrosis)
細胞型態學[72,73]	
活組織內只單顆細胞受影響	組織結構被破壞、成片的細胞死亡
細胞膜皺縮	細胞腫脹後溶胞
細胞膜完整，但有出泡現象	質膜完全破壞
胞器均保持完整	胞器腫脹、破壞
細胞核固縮、核酸會有序的斷裂	核酸隨機的斷裂
會形成凋亡小體	完全溶胞，不會形成凋亡小體
生物化學特徵[74]	
需要能量(ATP)、主動發生	不需要能量、被動發生
開始核酸就斷裂	溶胞後核酸才斷裂
有離子調節其平衡	無離子調節平衡
跑電泳時，DNA 呈梯狀	電泳 DNA 呈現條帶狀
生理學特徵[75,76]	
生理性(如細胞老化)刺激誘發	不會出現於正常生理條件
由鄰近或巨噬細胞吞噬	由巨噬細胞吞噬
無發炎反應產生	有急性發炎產生

第二章 研究動機

標靶治療是目前醫療發展的趨勢，是為了達到有效殺死腫瘤細胞而對正常細胞不會造成傷害，更不讓病人因化療而造成身體不適及副作用，故本實驗室將結合現今蓬勃發展的奈米科技與具有標靶追蹤性的生物分子，開發出此一複合物的標靶治療系統。

奈米材料由工業應用跨足到醫學及生物科技領域，是奈米科學發展的重要研究方向；現今奈米等級的材料在生物醫學領域上之應用，需考量如生物相容性、生物穩定性、對細胞是否具毒性等層面的問題，因此本實驗中所選用的奈米鑽石，具有高度生物相容性、無毒性[42,77]、並由於其由碳原子組成反應活性不高，不易造成非預期的生理反應。其中奈米鑽石最令人驚豔的特點是具有連續的螢光光譜，可利用此一特性協助追蹤奈米鑽石在生物體中的位置做為生物標定(bio-maker)，以及吸收脈衝能量後，會使奈米鑽石的分子結構由 sp^3 轉變成 sp^2 ，體積也隨之變大十幾倍，稱之為奈米爆炸效應。

本實驗將研究與探討針對非小細胞肺腺癌細胞(non small lung cancer cell, A549)，給予上述特性的奈米鑽石結合一標靶蛋白質分子複合體，經脈衝雷射照射(irradiation)後其癌症細胞的死亡機制與此複合體的靶向性，發展出一套可消滅癌細胞的標靶治療的平台。

第三章 實驗架構

3-1 魚類和哺乳類動物生長激素的胺基酸序列與親緣關係與演化分析

已知魚類和哺乳類動物的生長激素都可經由活化生長激素受體而誘發一連串的訊號傳遞[78,79]，因此在功能上具有顯著的相似性，然而隨著演化時間的增加，不同物種間的歧異度會逐漸加深，因此比對魚類及哺乳類生長激素的胺基酸序列將使我們了解物種在演化過程中的序列保留度和其差異性[80]。瞭解這些差異性可使我們對得知魚類和人類在親源演化上的歧異度。並利用這些親緣關係圖以便找出能與奈米鑽石作結合且不影響細胞增長活性的標靶蛋白。

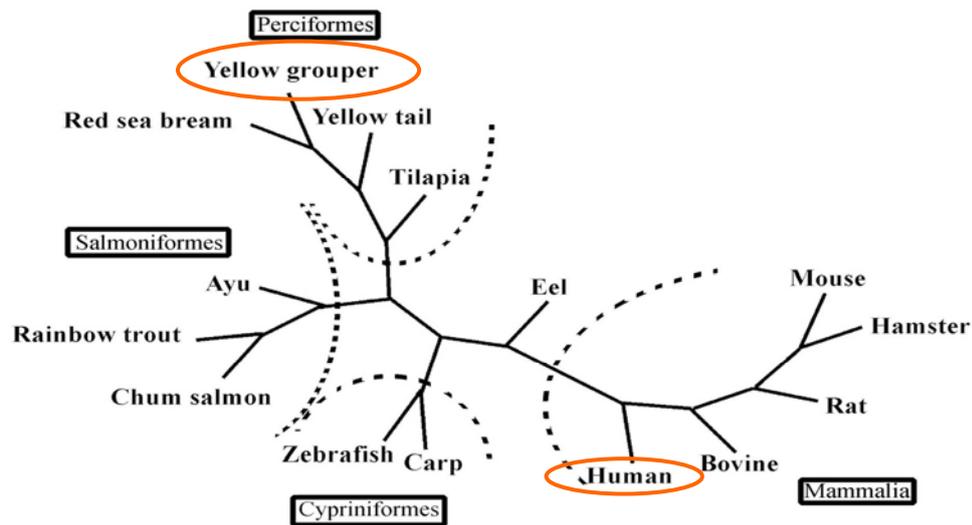


圖 3-1-1 魚類和哺乳類動物的親源演化樹

是以 15 個物種間的生長激素的胺基酸序列的保留性來推算其演化距離。圖中鱸形目 (Perciformes) 包含了青石斑 (Yellow group)、真鯛 (Red sea bream)、黃鰭鯛 (Yellow tail) 和吳郭魚 (Tilapia)，鮭形目 (Salmoniformes) 包含虹鱒 (Rainbow trout)、鮭 (Chum salmon) 和香魚 (Ayu)，斑馬魚 (Zebrafish) 和鯉魚 (Carp) 屬於鯉形目 (Cypriniformes)，鰻魚 (Eel) 是鰻鱺目 (Anguilliformes)，而中國倉鼠 (Hamster)、老鼠 (Mouse)、大老鼠 (Rat)、牛 (Bovine) 和人類 (Human) 則是哺乳綱 (Mammalia)。

3-2 青石斑魚生長激素是人類生長激素的相似物

人類屬於高等脊椎動物，而魚類卻是低等脊椎動物，但其生長激素有相似的功能。圖 3-2-1 是利用 NCBI 比對此兩物種間的胺基酸序列，得知

青石斑魚的生長激素和人類生長激素在演化上的歧異度大，但在胺基酸序列上仍保有 32.4 % 的一致性，青石斑魚和斑馬魚則保有 54 % 的序列一致性，斑馬魚和人類則有 40 % 的序列一致性，先前也證實了 10 pM 的人類生長激素仍可使斑馬魚的肝臟細胞有 10 % 的增生效果[81]，故使用斑馬魚生長激素刺激人類細胞仍有誘使人類細胞增生的可能性，因此們選用親源演化距離更遠的青石斑魚生長激素作為功能性結合奈米鑽石的生物分子，使奈米鑽石複合體具有標靶性但卻不因蛋白質的功能而引發生物細胞內部的高度訊號傳遞，產生無法預期的副作用。由圖 3-2-2 序列比對下可得知青石斑魚的生長激素與人類生長激素，兩者間具有 32.4 % 的相同度和 50.2 % 的相似性，因此可以將青石斑魚的生長激素視為人類生長激素的相似物。

```
# Aligned_sequences: 2
# 1: HuGH
# 2: EaGH
# Matrix: EBL0SUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 225
# Identity:      73/225 (32.4%)
# Similarity:   113/225 (50.2%)
# Gaps:         29/225 (12.9%)
# Score: 245.5
#=====
HuGH      1 MATGSRTSLLLAFLGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLA      50
           ..|.|||:..|.: |:|. ....|||.:|. .|. .|. .|
EaGH      1  MDRVVLLLSVVSLGV-----SSQPITDGGQLRFSIAVSRVQHLHLA      41

HuGH      51 FDTYQEFEEAYIPKEQKY---SFLQNPQTSLCFSESIPTPSMREETQQKS      97
           .:|. .|:|. .:|. .|:|. .|:|. .|:|. .|:|. .|:|. .|
EaGH      42 QRLFSDFESSLQTEEQRLMKIFLQD----FCNSDYIISPDKHETQRSS      87

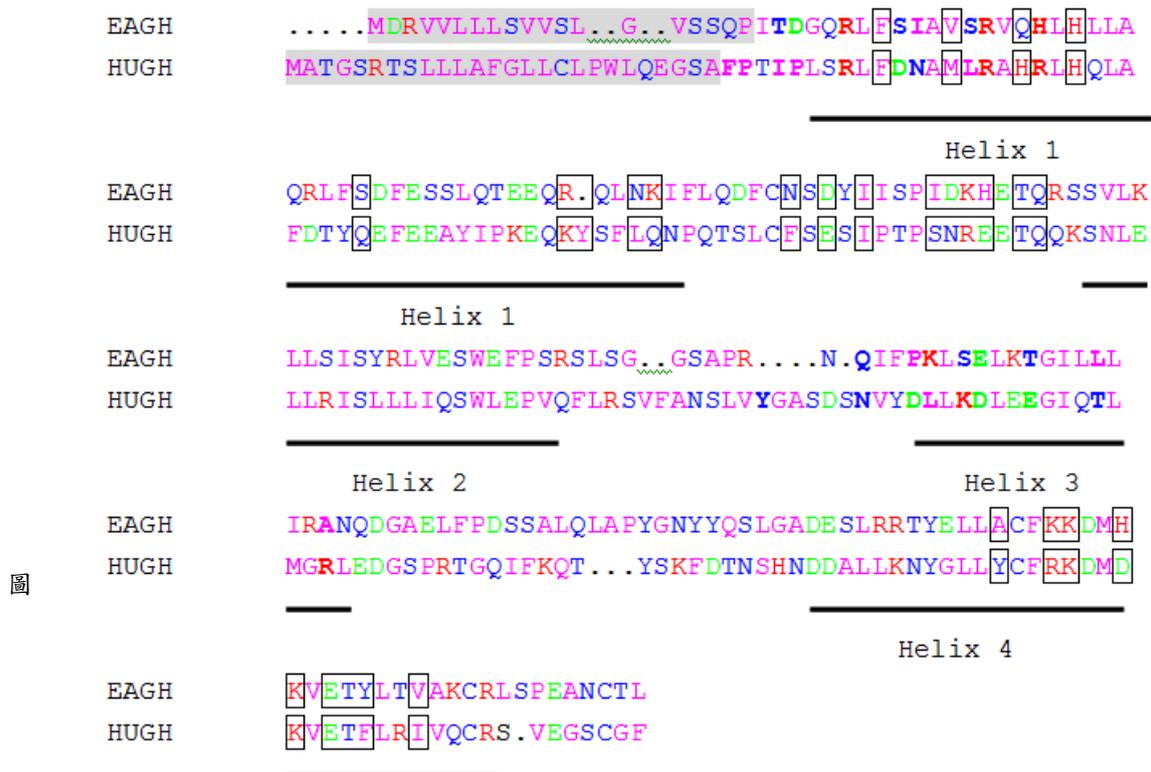
HuGH      98 NLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSN-VYDLLKDLLEEG      146
           .|:|. .|:|. .|:|. .|:|. .|:|. .|:|. .|:|. .|:|. .|
EaGH      88 VLKLLSISYRLVESWEFP-----SRSLSGGSAPRNQIFPKLSELKGT      129

HuGH      147 IQTLMGRLEDGS---PRTGQIFKQTYSKFDTNSHMDDALLKNYGLLYCFR      193
           |.:|. .:|. .|:|. .|:|. .|:|. .|:|. .|:|. .|:|. .|
EaGH      130 ILLLIRANQDGAELFPDSSALQLAPYGMYYQSLGADES LRRTYELLACFK      179

HuGH      194 KMDKVETFLRIVQCR-SVEGSCGF      217
           |||. |||:|. .:|. .|:|. .|:|. .|:|. .|:|. .|
EaGH      180 KDMHKVETYLTVAKRLSPEANCTL      204

#-----
```

圖 3-2-1 人類和青石斑魚的生長激素的胺基酸序列比對上排序列為人類生長激素，下排為青石斑魚的生長激素。



3-2-2 人類和青石斑魚的生長激素結合位的胺基酸序列比對。

圖中紅色、綠色、藍色和粉紅色分別為正電、負電、極性和非極性的胺基酸；灰色區域為訊號序列(signal peptide)；置底黑線表螺旋區域；框住的區域為生長激素對應生長激素受體的特定結合位置 1 (epitope)；粗體字為生長激素的特定結合位置 2。

3-3 青石斑魚重組生長激素的取得與表現

青石斑魚的蛋白質序號為 AAL36937，為本實驗室先前將其基因重組蛋白 rEaGH 表現出來的[82]，由 NCBI 網站取得青石斑魚的基因序列後並設計出新的重組蛋白基因，並將重組基因送入大腸桿菌中表現此重組蛋白質。圖 3-3-1 (a)為青石斑魚生長激素 EaGH 的胺基酸序列，紅色部份為訊號序列，在重組生長激素中是不具此紅色區域中的序列；圖 3-3-1 (b)為青石斑魚重組生長激素(recombinant EaGH, rEaGH) 的胺基酸序列，藍色部份為人工合成並加入的區域；圖 3-3-1 (c)為青石斑魚重組生長激素 DNA 序列重組生長激素是經由去除訊號序列(紅色區域)並加上人工合成(藍色區域)的序列所構成。

當大腸桿菌開始成長時，細胞中就含有許多不同種類的可溶性蛋白質，一旦加入 IPTG 誘導 rEaGH 蛋白質表現時，細菌中的蛋白質組成比例將有所改變。收集大腸桿菌並經由細胞破碎機的壓迫將所有的蛋白質萃取

出，藉由離心分離將蛋白質分為可溶性及不可溶的兩大類蛋白質，不可溶的蛋白質大多是由 rEaGH 所組成，因 rEaGH 在大腸桿菌中被視為不具價值的物質，經由 IPTG 的誘導及長時間的培養，大量的 rEaGH 以錯誤的摺疊形式囤積在內含體(incusion body)中，因此在培養 16 小時的全細胞溶液(total cell lysate)中有許多 rEaGH 的存在。其分子量為 22.3kDa。

(a) EaGH amino acid sequence

1 MDRVLLLLSVVSLGVSSQPITDGQRLFSIAVSRVQHLHLLAQRLFSDFESSLQTEEQRQL
61 NKIFLQDFCNSDYIISPIDKHETQRSSVLKLLSISYRLVESWEFPSRSLSGGSAPRNQIF
121 PKLSELKTGILLLIRANQDGAELFPDSSALQLAPYGNYYQSLGADESLRRTYELLACFKK
181 DMHKVETYLTVAKCRLSPEANCTL

(b) rEaGH amino acid sequence

1 MITDGQRLFSIAVSRVQHLHLLAQRLFSDFESSLQTEEQRQLNKIFLQDFCNSDYIISPI
61 DKHETQRSSVLKLLSISYRLVESWEFPSRSLSGGSAPRNQIFPKLSELKTGILLLIRANQ
121 DGAELFPDSSALQLAPYGNYYQSLGADESLRRTYELLACFKKDMHKVETYLTVAKCRLSP
181 EANCTLLEHHHHHH

(c) rEaGH DNA sequence

1 ATGATCACAG ACGGCCAGCG ACTGTTCTCC ATCGCTGTCA GCAGAGTTCA
51 ACATCTCCAC CTGCTTGCTC AGAGACTCTT CTCCGACTTT GAGAGCAGTC
101 TGCAGACAGA GGAGCAGCGA CAGCTCAACA AGATCTTCCT GCAGGACTTT
151 TGTA ACTCTG ATTACATCAT CAGCCCCATT GACAAGCATG AGACGCAGCG
201 CAGCTCCGTG TTGAAGCTGT TGTGATCTC CTATCGGTTG GTGGAGTCCT
251 GGGAGTTCCC CAGTCGGTCC CTGTCCGGAG GTTCTGCTCC CAGAAACCAG
301 ATTTTCCCA AACTGTCTGA ATTGAAA ACT GGGATCCTGC TGCTGATCAG
351 GGCCAATCAG GACGGAGCGG AGCTCTTTCC TGACAGCTCC GCCCTCCAGT
401 TGGCTCCTTA TGGGA ACTAT TATCAGAGTC TGGGCGCAGA CGAGTCGCTG
451 CGACGAACGT ACGAACTGCT GGCGTGTTTC AAGAAAGACA TGCACAAGGT
501 GGAGACCTAC CTGACGGTGG CTAATGTGCG ACTCTCTCCT GAGGCCAACT
551 GTACCCTGCT CGAGCACCAC CACCACCACC ACTGA

圖 3-3-1 (a)、(b)、(c) 青石斑魚生長激素的胺基酸序列及其重組生長激素的 DNA 及胺基酸序列。(a)為青石斑魚生長激素 EaGH 的胺基酸序列，紅色部份為訊號序列(b)為青石斑魚重組生長激素(recombinant EaGH, rEaGH) 的胺基酸序列，藍色部份為人工合成並加入的區域；(c)為青石斑魚重組生長激素 DNA 序列重組生長激素是經由去除訊號序列(紅色區域)並加上人工合成(藍色區域)的序列所構成。

3-4 羧酸化奈米鑽石和蛋白質的鍵結

為了產生具有生物標靶性的奈米鑽石，利用物理吸附或是化學鍵結合方式將生物分子與奈米鑽石結合是必需的。雖然物理吸附也可得到奈米鑽石-生物分子複合體[83]，且其反應方式也較為簡便，但利用物理吸附於奈米鑽石表面的生物分子往往也會因週遭環境的改變如溫度或 pH 質而改變其電性等物理特性，使生物分子脫附[84]。因此物理吸附雖可得到奈米鑽石-生物分子複合體的產物，但產物較難長期穩定性的存在，且具有環境變異性的奈米鑽石-生物分子複合體不適用於高風險的醫學治療，因此化學鍵結合是較為恰當的方式。

生物分子是由碳、氫、氧、氮等多種元素構成，故在一般的生物分子上多具有氫氧基(-OH)、硫醇基(-SH)、羧酸基(-COOH)、羰基(-C=O)、胺基(-NH₂)等各式的官能基，可作為化學表面修飾結合的選擇依據，又經強酸氧化的奈米鑽石也具有特殊官能基，故化學鍵結合將考量奈米鑽石和生物分子的官能基種類及數量，選擇出具有最高合成效率的化學反應作為開發具標靶性、穩定性的生物分子-奈米鑽石複合體的依據。而本實驗室先前實驗已利用基質輔助雷射脫附游離時序飛行式質譜儀(MALDI-TOF)證明此實驗所用的生物標靶分子(rEaGH)與奈米鑽石所形成的複合體是藉由化學反應生成共價鍵的方式互相結合，並以 rEaGH:cND = 2:1 的個數比作為鍵結。

3-5 奈米鑽石和羧酸化奈米鑽石在生物特性與毒性的檢測

將奈米鑽石和羧酸化奈米鑽石投入到癌症細胞作其標靶藥物前，所要考慮的就是其生物相容性及是否細胞造成毒性傷害。而在本實驗室與合作夥伴們先前研究中證實沒有經過表面修飾的奈米鑽石對細胞不會造成毒害且具有生物相容性的[42]；而羧酸化過的奈米鑽石在先前實驗中也證實羧酸化的奈米鑽石對 A549 細胞生長也無影響[85]，因此奈米鑽石與經由表面

羧酸化過後的奈米鑽石都是具有生物相容性的，是可以應用在生物醫學領域。

3-6 青石斑魚的重組生長激素(rEaGH)和重組基因魚類生長激素-羧酸化奈米鑽石複合體(cND-rEaGH complex)的生物特性檢測

在 3-5 節中已說明羧酸化奈米鑽石是具有生物相容性對細胞不具有毒性，且在 3-2 節中的序列比對下得知青石斑魚生長激素是為人類生長激素的相似物，但是需要釐清青石斑魚的重組生長激素(rEaGH)和重組基因魚類生長激素-羧酸化奈米鑽石複合體(cND-rEaGH complex)是否可以被生物體接受而不會造成毒性；而由本實驗室先前實驗的結果顯示對 A549 細胞加入青石斑魚的重組激素(rEaGH)和重組基因魚類生長激素-羧酸化奈米鑽石複合體(cND-rEaGH complex)對其細胞生長數目都不會造成顯著影響。因此重組基因魚類生長激素-羧酸化奈米鑽石複合體(cND-rEaGH complex)可為無毒性的標靶性藥物。

3-7 選定何種癌症細胞為奈米鑽石-生長激素複合體的標靶細胞

由上述可得知 rEaGH 是人類生長激素的相似物，因此認為 cND-rEaGH 對具有生長激素受體的細胞會有靶向性，所以須找出何種細胞具有生長激素受體。因此利用西方墨點法來分析肺腺癌細胞(A549)、中國倉鼠卵巢癌細胞(CHO-K1)、肝癌細胞(Hep G2)此三細胞株何種帶有生長激素的受體。

而從本實驗室先前實驗所做出的結果顯示(圖 3-7-1)生長激素受體存在於 A549 和 Hep G2，而 CHO-K1 並不具有生長激素受體，且 A549 的生長激素受體表現量又多於 Hep G2，因此本實驗選用 A549 作為 cND-rEaGH 的靶向細胞[86]。

以西方墨點法檢測生長激素受體的免疫染色過程中，是利用抗人類生長激素受體的多株抗體做為一抗，偵測人類生長激素受體是否存在，且利用抗人類肌動蛋白(actin)的單株抗體，偵測 β -actin 作為樣本間的對照組(internal control)。

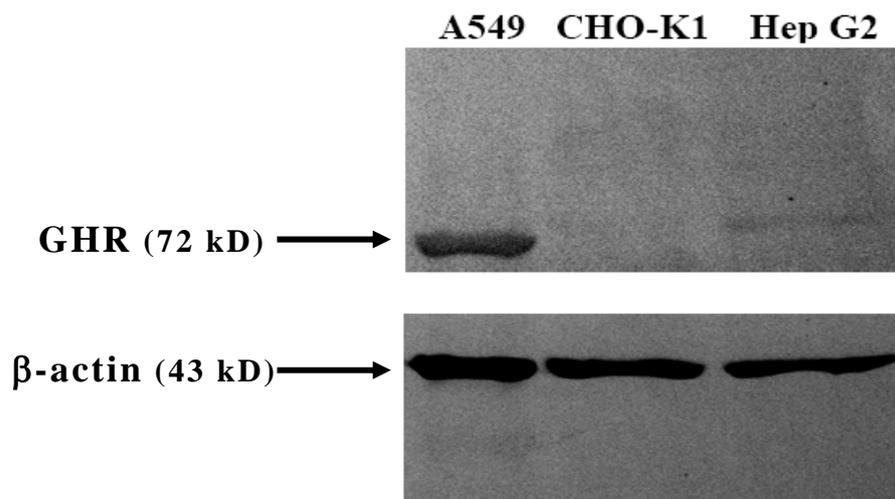


圖 3-7-1 利用西方墨點法免疫呈色法偵測不同細胞之人類生長激素受體(GHR)的表現差異。下圖以β-actin作為本實驗的對照組。

3-8 熱聲子(hot phonon)效應對 5 nm 奈米鑽石的影響

在物理角度來說，聲子(phonon)是指在堅硬的結晶晶格中發生震動的量子化模式。而在生物領域中，聲子的振動模式理論被應用在原子間擾動或斷鍵的基礎模式，其原因是由於聲子會形成一頻率與波動可以使原子間造成移位，這樣的轉換可以使原子間進行斷鍵與新的鍵結形成[87]。

本實驗為了產生熱聲子(hot phonon)效應[70,88]，利用奈秒脈衝雷射使 5 nm 奈米鑽石從原本內部具有 nitrosol(-C-N=O)官能基，瞬間轉換變成了 -C 和 N≡O。此熱聲子效應使得在奈米鑽石核心中的一氧化氮(NO)氣體被釋放出來，整體分子結構由 sp^3 轉變成 sp^2 ，瞬間體積膨脹幾十倍之多，就猶如爆炸效應一般。因此此實驗利用熱聲子效應使奈米鑽石結構的劇烈改變，應用在生醫領域上，並加以詳細探討[44,89]。

3-9 奈秒脈衝雷射對奈米鑽石-生長激素複合體的應用

奈米鑽石經由奈秒脈衝雷射照射後，因熱聲子效應使奈米鑽石讓其分子結構由 sp^3 轉變成 sp^2 ，此時就像爆炸一樣，體積膨脹了十幾倍之多[44]；因此與腫瘤細胞結合的奈米鑽石-生長激素複合體經體外雷射的照射變形而破壞腫瘤細胞，達到不侵入活體，而能移除腫瘤的目的。如圖 3-9-1 所示。

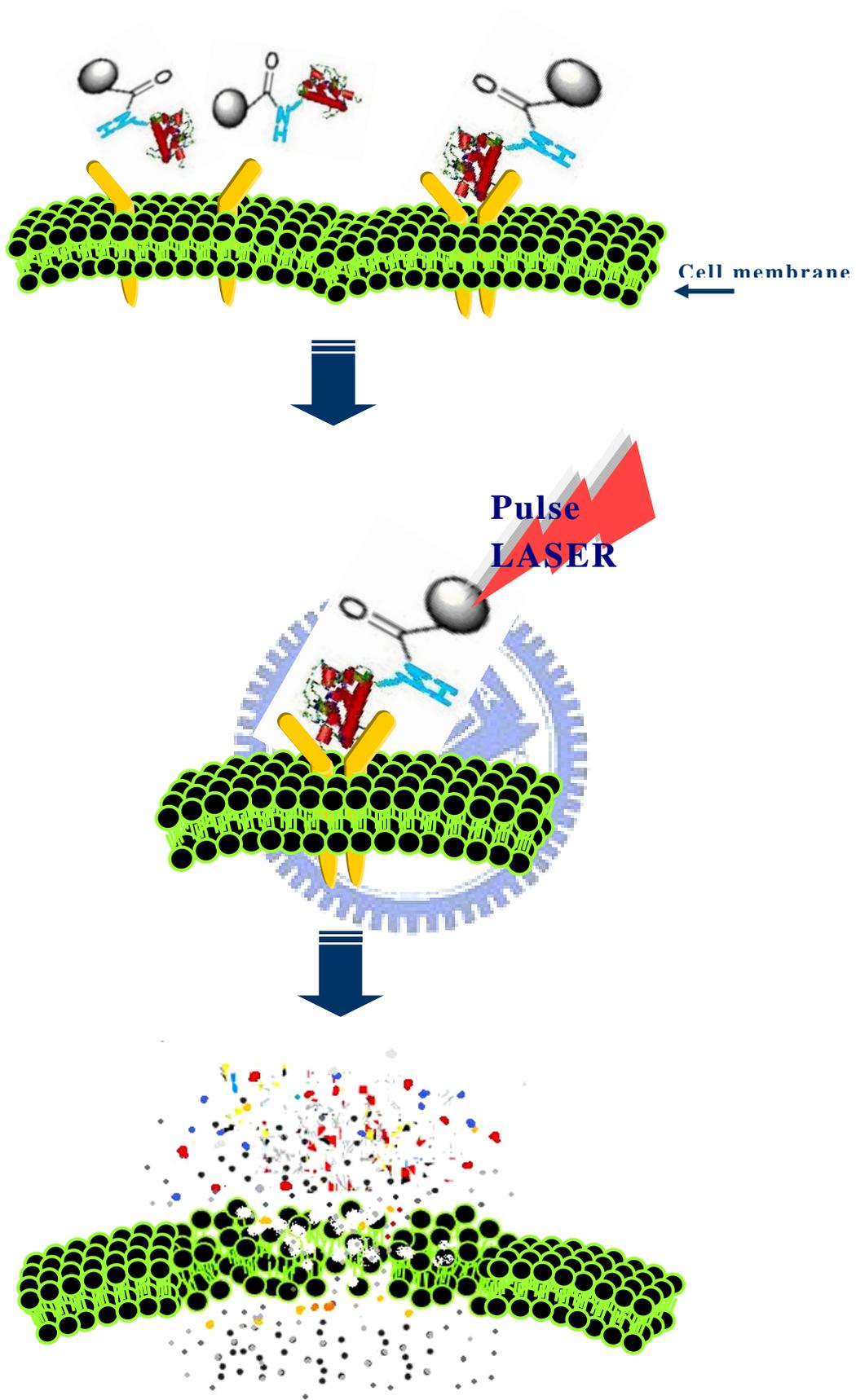


圖 3-9-1 奈秒脈衝雷射對奈米鑽石-生長激素複合體在癌症細胞上的應用示

第四章 實驗原理

4-1 大量獲得青石斑魚的重組生長激素

將已轉殖之青石斑魚重組基因的大腸桿菌於在開始快速(O.D.約 0.3~0.6)成長時，配合 IPTG 的誘導 14~16 小時的長時間培養產生大量青石斑魚的重組生長激素(rEaGH)，其產量為每一公升的菌液經由可產生約 250 mg 的內含體(inclusion body)蛋白質，但此時的 rEaGH 蛋白質卻無法直接使用，因為其錯誤摺疊形式不具有任何生物功能性，為了使所培養出來的蛋白質具有正常的活性，因此必須使蛋白質重新摺疊回到正確的摺疊型式，而摺疊的第一步就是對維持蛋白質一級結構的胜肽鍵(peptide bond)之外的所有鍵結加以破壞，如雙硫鍵，並利用本實驗室已發展成熟的蛋白質摺疊技術[90]重新摺疊內含體中錯誤的青石斑魚重組蛋白質[82,91]。

4-2 5 nm 奈米鑽石表面羧酸化

為了讓奈米鑽石與蛋白質(青石斑魚的重組生長激素)以化學鍵的型式鍵結，不至於像物理吸附(如電性吸附)般容易受溶液環境影響而脫落；且又因蛋白質有很多的羧酸基(-COOH)和胺基(-NH₂)，因此將 5 nm 的奈米鑽石的表面羧酸化，使其表面帶有(-COOH)的官能基，可以與蛋白質用分子連結劑(crosslinker)作化學鍵的鍵結，形成 5 nm 奈米鑽石-青石斑魚重組生長激素複合體。

4-3 5 nm 羧酸化奈米鑽石螢光光譜測定

在先前的文獻中已說明過[39]，因為奈米鑽石的晶格缺陷因此有螢光產生，為了需要更加了解 5 nm 羧酸化後的奈米鑽石的螢光光譜以利之後激發波段的選用。本實驗使用 Hitachi F-7000 機型去分析羧酸化的奈米鑽石的三維(3D)螢光光譜；在一個未知其螢光光譜的物質，三維螢光光譜提供了一個了解其全波段螢光的分析方法；因此將羧酸化的奈米鑽石溶於去離子水後，放入樣品分析槽中後，設定掃描三維全螢光光譜，進行分析。

4-4 動態光散色儀測定羧酸化奈米鑽石的粒徑

動態光散射儀 (dynamic light scattering ,DLS)：DLS 又稱為光子關聯光譜法 (photon correlation spectroscopy, PCS) [92]，其利用雷射光射入含

有粒子的溶液中，當雷射光撞擊到粒子後會產生散射光，而散射光強度會隨時間產生變化，因此量測散射光而計算出粒子之粒徑分佈。主要是由於粒子處於溶液中，本身具有動能而產生不規則的布朗運動 (Brownian motion)，粒子的大小可影響粒子之擴散速度與布朗運動，且在雷射光照射的區域粒子數量和位置不同，使得訊號到達偵測器時會產生強度差異，產生光線強度，且粒子位置會隨時間改變，因此散射光強度亦會隨時間改變，利用時序上的自我關聯的函數來求得其擴散係數，帶入 Stokes-Einstein function 中，即可求得蛋白質粒子水合半徑的分布 [93,94]。Stokes-Einstein 方程式：

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H} \quad (1)$$

D 是擴散係數，k 是波茲曼常數，T 是絕對溫度， η 為溶液之黏滯係數， R_H 為水合半徑。本實驗所使用的為 Brookhaven Instruments Corporation (Long Island, NY, USA) 型號 BI-200SM 的 DLS。透過 DLS 的分析可以幫助瞭解奈米鑽石粒徑大小分布狀況。

4-5 共價鍵結合的羧酸化奈米鑽石-蛋白質複合體

為了將羧酸化的奈米鑽石與蛋白質以化學鍵結的方式結合在一起，因此本實驗選用零鍵結長度的分子連結劑 (cross-linker) 1-乙基-3-(3-二甲胺丙基) 碳二醯胺鹽酸 ((1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride), EDC) [95] 做為連結羧酸化奈米鑽石的羧酸基 ($-\text{COO}^-$) 和青石斑魚重組生長激素蛋白質的胺基 (NH_3^+) 的工具。其中一開始 EDC 須在酸性環境中將帶有羧酸基的分子活化，形成活化的氧乙醯化異尿素酯 (O-acylisourea reactive ester) 中間產物，才能加入胺基分子，以形成穩定存在的胜肽鍵 (peptide bond)，而最終的反應產物是羧酸化奈米鑽石-青石斑魚重組生長激素蛋白質的複合體 (5 nm cND-rEaGH complex)。

使用 EDC 作為分子連結劑有許多的優點：(1) EDC 是作用於兩個不同官能基間的分子連結劑，故具有特定的活化順序；(2) EDC 僅協助兩個分子間進行鍵結，作用完後並不會有任何部分被併入產物中，也就是不會對產物進行任何不必要修飾，因此 EDC 將完全由產物中被移除。進行鍵結時需注意溶液中不能含有任何胺基，像是一般常用的三羥甲基氨基甲烷緩衝

溶液(tris[hydroxymethyl]aminomethane buffer, Tris buffer)就含有胺基，會和我們所加入的胺基分子共同競爭羧酸的鍵結反應，應注意避免使用。

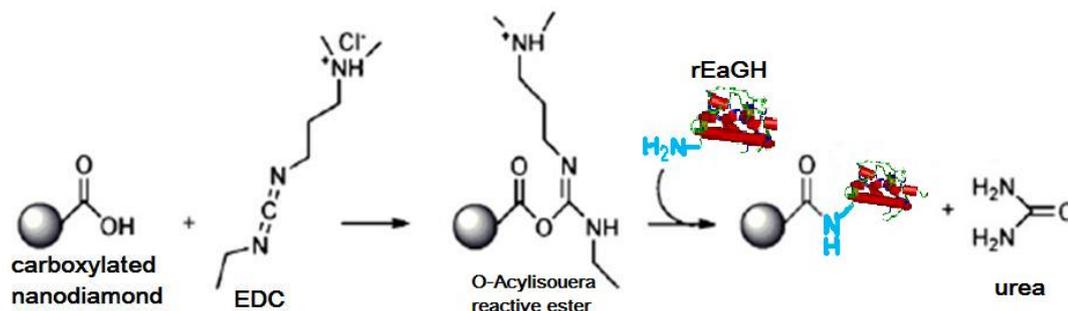


圖 4-5-1 羧酸化奈米鑽石與青斑魚重組生長激素結合示意圖。利用 1-乙基-3-(3-二甲胺丙基) 碳二醯胺鹽酸將羧基分子與胺基分子進行共價鍵的結合。

4-6 細胞的培養

本實驗所選用的細胞是非小細胞肺腺癌細胞(non small cell lung cancer, A549)[96]，此細胞來源為 ATCC；其原始來源是從一 58 歲白種男性的肺癌組織所取得的。此細胞是用 Ham-F12 培養液並加入 10% 胎牛血清 (FBS) 及 100 unit/ml 盤尼西林(penicillin)、100 µg/ml 鏈黴素(streptomycin) 抗生素等所培養的，並在具有 5% 二氧化碳、95% 濕度及溫度維持在 37°C 的培養箱中生長。

4-7 奈秒雷射能量對 cND-rEaGH 在細胞上的影響

在雷射能量的選用上是須考慮以下兩點：(1) 在無加入奈米鑽石複合體的肺腺癌細胞 A549 情況下，在雷射處理下，細胞能藉由熱傳導的方式將能量傳走，對細胞本身不會有傷害性的；(2) 對加入奈米鑽石複合體的肺腺癌細胞 A549，會因細胞上的奈米鑽石吸收雷射能量而產生熱聲子效應，使其爆炸，讓細胞受到傷害；因此在能量選擇上，是需要讓有與無加入奈米鑽石，並經奈秒雷射處理後的肺腺癌細胞 A549 所造成的影響是有差異性的。

4-8 檢測 cND-rEaGH 在細胞上經熱聲子效應後的分析

4-8-1 細胞型態學(Morphology)

細胞在經過外界環境所給予的一些壓力、藥物等等，因為細胞已受到傷害，所以從外觀就可觀察到其型態已發生改變，如拉長或無法附著在培養皿上；因此本實驗藉由倒立式螢光顯微鏡觀察分別加入青石

斑石重組生長激素(rEaGH)、羧酸化奈米鑽石(cND)、羧酸化奈米鑽石-青石斑石重組生長激素複合體(cND-rEaGH)以及對照組(control)，再分別有奈米雷射照射與無奈秒雷射照射，前後 20 小時，共 16 組，觀察細胞型態的改變。

4-8-2 掃描式電子顯微鏡(Scanning Electron Microscope, SEM)

在掃描式電子顯微鏡中，被電磁透鏡聚集的電子束經由兩組掃描線圈(scanning coils)使之規則的在樣品上來回移動，即是所謂的掃描，其掃描的範圍與速度是可以控制的。當電子束撞擊在樣品上特定的位置時，所產生的二次電子或背向散射電子被偵測器接收後經轉換放大傳送至螢光幕即可顯像[97]。

本實驗利用掃描式電子顯微鏡來觀察前後加入羧酸化奈米鑽石-青石斑石重組生長激素複合體(cND-rEaGH)以及加入羧酸化奈米鑽石-青石斑石重組生長激素複合體(cND-rEaGH)並經奈秒雷射照射後的肺腺癌細胞(A549)型態。

4-8-3 免疫細胞化學染色(Immunocytochemistry, ICC)

此分析方法是指在抗體上結合螢光或可呈色的化學物質，利用免疫學原理中抗原和抗體間專一性的結合反應，檢測細胞或組織中是否有目標抗原的存在，此方式不只可以用來測知抗原的表現量也可觀察抗原所表現的位置。只要是能夠讓抗體結合的物質，也就是具有抗原性的物質包括蛋白質、核酸、多醣、病原體等都可偵測。免疫組織化學的優勢在於專一性、靈敏度、簡便快速以及成本低廉，所以此法對基礎研究及診療上都是相當重要的一個方法。

本實驗利用此方法來驗證，人類肺腺癌細胞(A549)具有生長激素的受體，可與先前實驗室利用西方轉漬法所得出來的結果互相呼應。

4-8-4 雷射共軛焦螢光顯微鏡(Confocal Microscope)

由於傳統的光學顯微鏡受到光波繞射的限制，以至於無法提供無限放大的可能性且其成像方式依舊是停留在平面成像。並且由於景深的關係使得螢光顯微鏡無法僅觀測某一斷層，以至所拍出的螢光影像常是一團模糊，無法分辨染色的部位是位於何處，如細胞膜上或是內部；如此

利用冷凍切片製作技術來解決這問題，但缺點是切片完後無法觀測活體樣品並難將樣品恢復成原狀。此時發明了共軛焦顯微鏡以解決上述的難題。

而雷射共軛焦顯微鏡是利用針孔遮罩(pinhole aperture)排除離焦面所產生的雜訊。掃描取像結構是利用雷射光源及掃瞄器內掃瞄鏡控制機構及光電倍增管取得單點螢光強度訊號，以構成 XY 平面共軛焦影像，並利用顯微鏡中的 XYZ 軸控制，即可取得一組高解析度的標本光學切片，可提供三維空間重組之用。它的優點是可使影像品質提高、高對比、高解析度、厚標本沒有離焦的影像問題、好的螢光亮度平衡以及較少的 cross talk 現象產生。

本實驗利用具有上述優點的雷射共軛焦顯微鏡來觀察羧酸化奈米鑽石-青石斑石重組生長激素複合體(cND-rEaGH)在人類肺腺癌細胞(A549)的位置。

4-8-5 細胞存活率分析(statistics of cell viability)

本實驗室利用此技術去算分別加入青石斑石重組生長激素(rEaGH)、羧酸化奈米鑽石(cND)、羧酸化奈米鑽石-青石斑石重組生長激素複合體(cND-rEaGH)以及對照組(control)，且分別有奈米雷射激光與無奈秒雷射照射處理，共 8 組，再培養 20 小時後，之後細胞的存活率(MTT 技術)及個數(數細胞技術)。

4-8-6 發炎反應蛋白(Inter-Cellular Adhesion Molecule, ICAM)分析

細胞死亡主要可分為兩路徑，自然凋亡(apoptosis)與細胞壞死(necrosis)而在這兩條死亡路徑在細胞型態學、生物化學、生理學中所表現是有差異的，在表 1 中有加以詳細說明；其中在生理學特徵中若是細胞走自然凋亡路徑死亡是無發炎現象產生，反之，走細胞壞死途徑死亡則因為細胞間質流出是有發炎現象產生的。而發炎反應發生時則會有 Inter-Cellular Adhesion Molecule, ICAM³¹ 蛋白質產生，因此可以藉由偵測此蛋白以檢測細胞的死亡途徑。

本實驗因肺腺癌細胞加入羧酸化奈米鑽石-青石斑石重組生長激素複合體(cND-rEaGH)且經由奈米雷射照射處理後，觀察到存活細胞數目

減少，故用此 ICAM 蛋白質來檢測細胞死亡是經由自然凋亡或細胞壞死路徑而死亡的。

4-9 cND-rEaGH 在癌症治療上的應用

本實驗利用青石斑魚的重組生長激素使奈米鑽石成為具有標靶性的 cND-rEaGH 複合體後，且證實了奈米鑽石可藉由熱聲子效應產生型態上的劇烈爆炸，但奈米鑽石的爆炸是否可用於治療癌症卻是尚未探索的領域，於是選用具有生長激素受體的肺腺癌細胞 A549 作為 cND-rEaGH 標靶的細胞，配合奈秒雷射照射對奈米鑽石的激發，探討並期望 cND-rEaGH 能藉由奈米鑽石的爆炸效應對 A549 細胞造成傷害，因此在細胞的巨觀跟微觀層次上分別來評估 cND-rEaGH 在奈秒雷射激發系統的配合下是否具有達到殺死癌細胞的能力。

推測 cND-rEaGH 經由奈秒雷射照射後，因奈米鑽石的體積膨脹效應使奈米鑽石爆炸而可以傷害癌細胞，如離子通道(ion channel)的破壞等等，使得癌細胞走向死亡的路徑，以建立一個不需要侵入活體就可以殺死腫瘤細胞的治療平台。



第五章 結果

5-1 生長激素與生長激素受體的偵測

5-1-1 青石斑魚重組生長激素的取得與表現

當大腸桿菌開始成長時，加入 IPTG 誘導青石斑魚重組生長激素(rEaGH) 蛋白質表現，並培養 16 小時菌液後，收集大腸桿菌並使用細胞破碎機，將所有的蛋白質可藉由離心分離法分為可溶性(上清液)及不可溶(沉澱物)的兩大類蛋白質；如圖 5-1-1 所示，可發現不可溶的蛋白質多是由分子量為 22.3 kD 的 rEaGH 所組成，因 rEaGH 在大腸桿菌中被視為不具價值的物質，經由 IPTG 的誘導及長時間的培養，大量的 rEaGH 以錯誤的摺疊形式囤積在內含體(incusion body)中，因此利用實驗室所建立的蛋白質摺疊技術將 rEaGH 摺回到正確的型態[91]，而從內含體中所取出的 rEaGH 量比上清液多，產量高 1L 菌液可獲得約 470 mg 的蛋白質且純度也高達 95%。

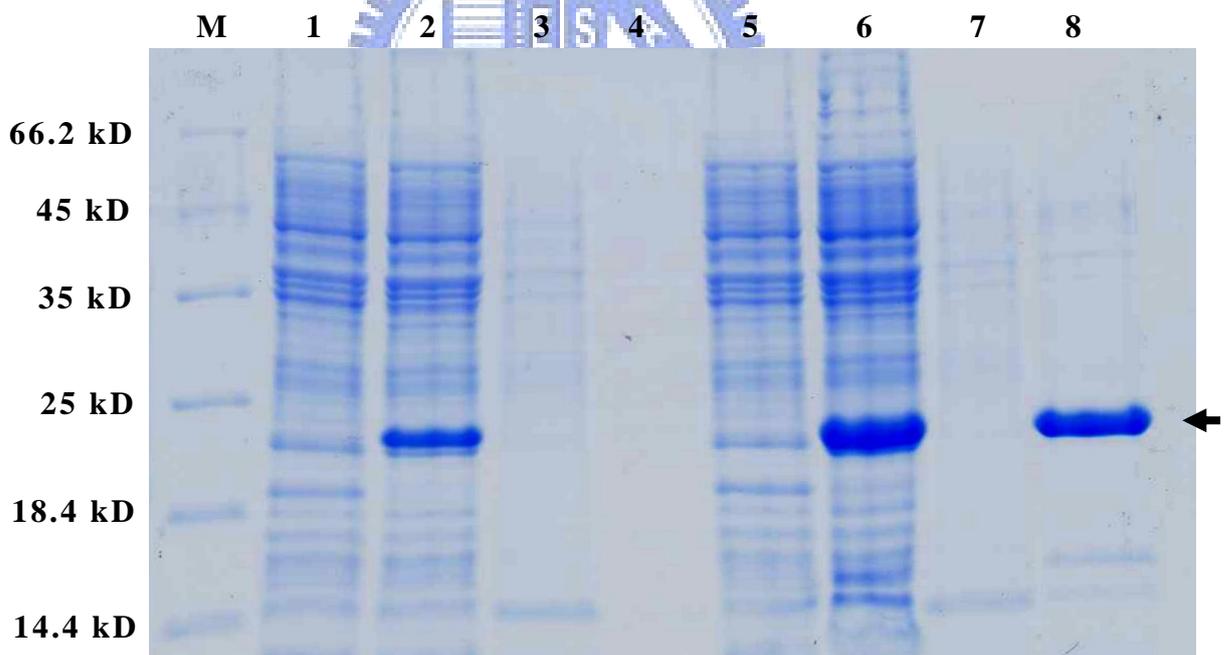


圖 5-1-1 青石斑魚重組生長激素(rEaGH)的表現電泳分析圖。圖中 M:標準分子量的蛋白質標記(marker)；1:空載體(PET 30a)；2:培養 16 小時的大腸桿菌細胞全懸浮液(total cell lysate)；3:破菌後離心上清液；4:破菌後離心沉澱物；5: 空載體(PET 30a)；6: 培養 16 小時的大腸桿菌細胞全懸浮液；7: 破菌後離心上清液；8:破菌後離心沉澱物腸桿菌全懸浮液經離心後所得的沉澱部分。1、2、3、4 無加入 IPTG 誘導，5、6、7、8 有加入 IPTG 誘導。箭頭標示為 22.3 kD 的 rEaGH。

5-1-2 確認肺腺癌細胞具有生長激素的受體

在實驗室先前實驗中，將細胞全部打碎後，以西方點墨法分析，並以生長激素受體(growth hormone receptor, GHR)的抗體去辨識 GHR 蛋白質，證明 A549 細胞較其他兩者細胞(CHO-K1、Hep-G2)具有較多生長激素受體的表現(圖 3-7-1)，本實驗則以免疫細胞化學染色法(Immunocytochemistry, ICC)，再次證明，A549 此細胞株是具有生長激素受體的表現。將培養 24 小時的肺腺癌細胞 A549，利用 4% 三聚甲醛(paraformaldehyde) 將細胞固定並隨後使用不同染劑標定細胞內部的不同部分或蛋白質圖 5-1-2 A 為利用 Phase contrast 在目鏡放大 10 倍，物鏡放大 60 倍，觀察細胞型態；在圖 B 中可發現肺腺癌細胞 A549 是有生長激素受體的表現。由於此圖是在穿透式顯微鏡下所觀察到的，所以染生長激素受體(紅色)會將所有 Z 軸所收到的光累積起來，而不會有像在共軛焦顯微鏡下觀察，生長激素受體只有在細胞的周圍的影像。圖 5-1-3 為將染生長激素受體(紅色)、染細胞核(藍色)、染細胞骨架(綠色)此三張圖疊在一起的影像。



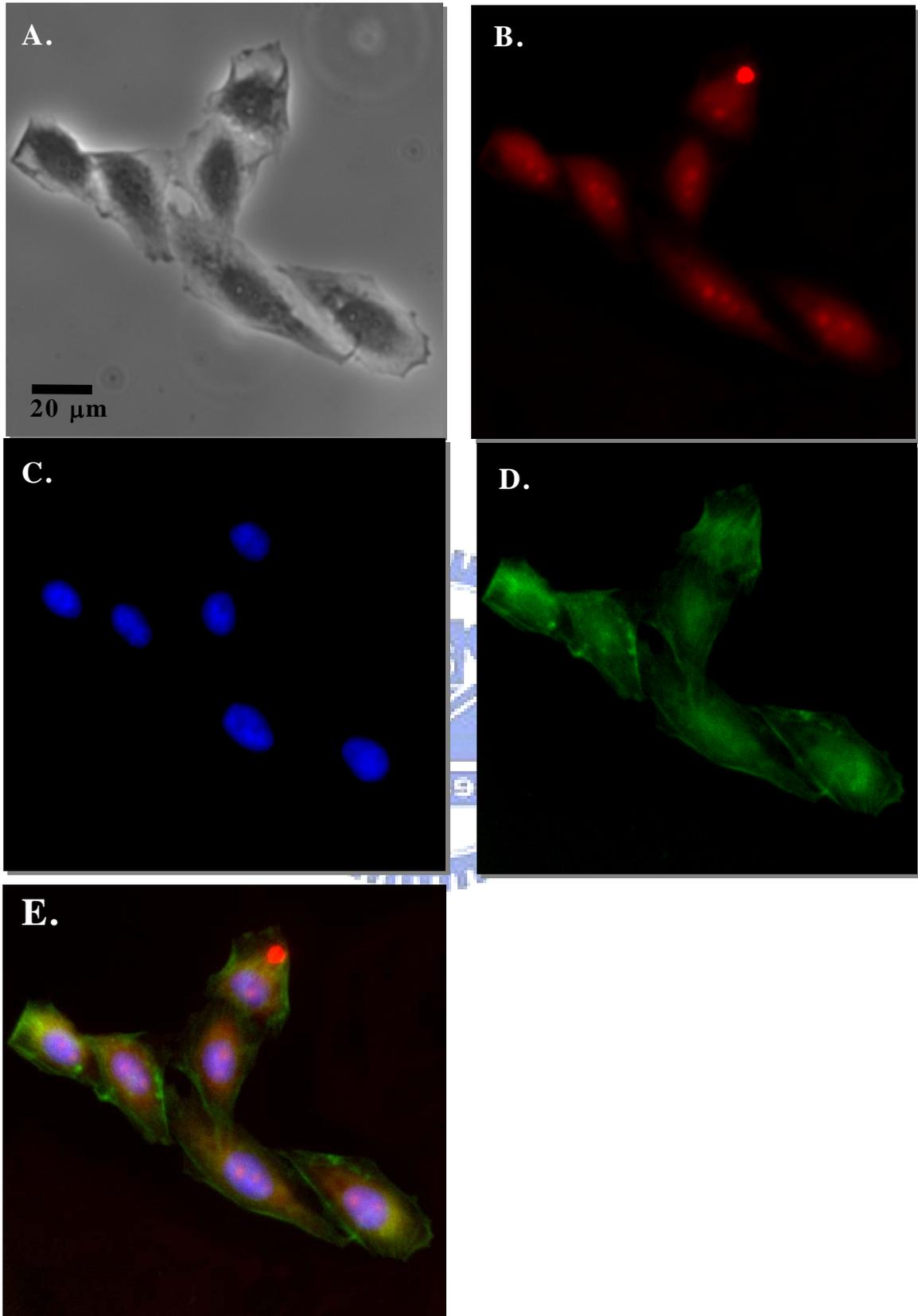


圖 5-1-2 利用免疫螢光染色法，確認肺腺癌細胞(A549)具有生長激素受體。圖 A 為利用 phase contrast 明視野下所觀察的細胞型態、圖 B 為標定染生長激素受體(紅色)、

圖 C 染細胞核(藍色)、圖 D 染細胞骨架(綠色)、圖 E 為生長激素受體(紅色)、細胞核(藍色)、細胞骨架(綠色)疊圖結果，圖 A、B、C、D、E 皆為放大倍率為六百倍。

5-2 羧酸化奈米鑽石理化特性分析

5-2-1 確認羧酸化奈米鑽石的粒徑大小

利用動態光散射儀(DLS)測量羧酸化後的奈米鑽石實際粒徑大小。圖 5-2-1 為 5 nm 羧酸化後奈米鑽石(cND)的粒徑大小。實際測量粒徑大小為 5.41 ± 0.21 nm，其中黑線代表累加百分比的數值，因此可以確定所獲得的奈米鑽石經過羧酸化後的粒徑大小與預期的 5 nm 是相近的。

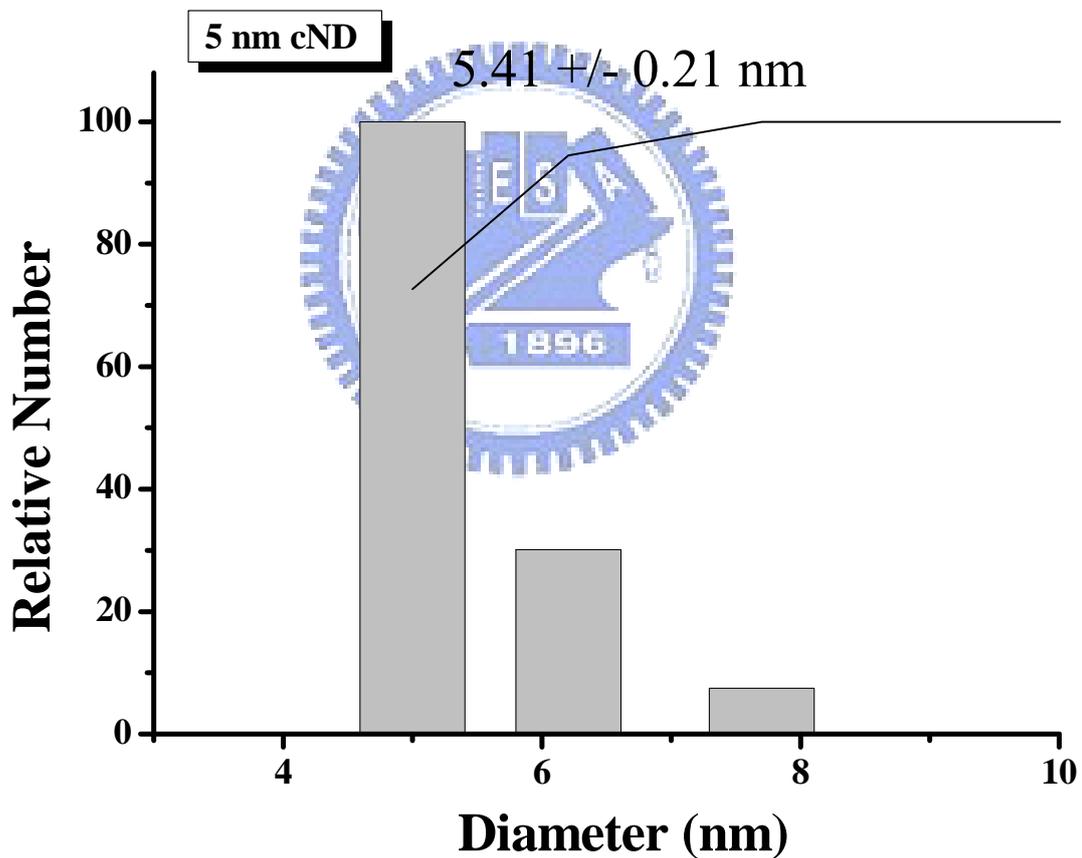


圖 5-2-1 利用動態光散射儀所測量 5 nm 奈米鑽石的實際粒徑大小，測量粒徑大小為 5.41 ± 0.21 nm，其中黑線代表累加百分比的數值

5-2-2 檢測 5 nm 羧酸化奈米鑽石螢光光譜

奈米鑽石具有特殊螢光特性，而本實驗利用三維(3D)全波段螢光光譜儀檢視，經過羧酸化後的 5 nm 奈米鑽石是否依然具有螢光的特性。實驗結果如圖 5-2-2 顯示，縱軸為激發光波長 (excitation wavelength)，橫軸為放射波長(emission wavelength)；紅色虛線所框起來的部分為 5 nm 羧酸化奈米鑽石的三維螢光圖譜，圖譜顯示 5 nm 羧酸化奈米鑽石具有連續性的光譜特徵，並且放射波長是激發波長加上 110 nm，也就是說如果用 543 nm 的波長激發 5 nm 羧酸化奈米鑽石，其會放出約 653 nm 的放射光，因此可利用此連續螢光光譜特性來監測奈米鑽石的位置，可作為生物分子的 bio-tracer。

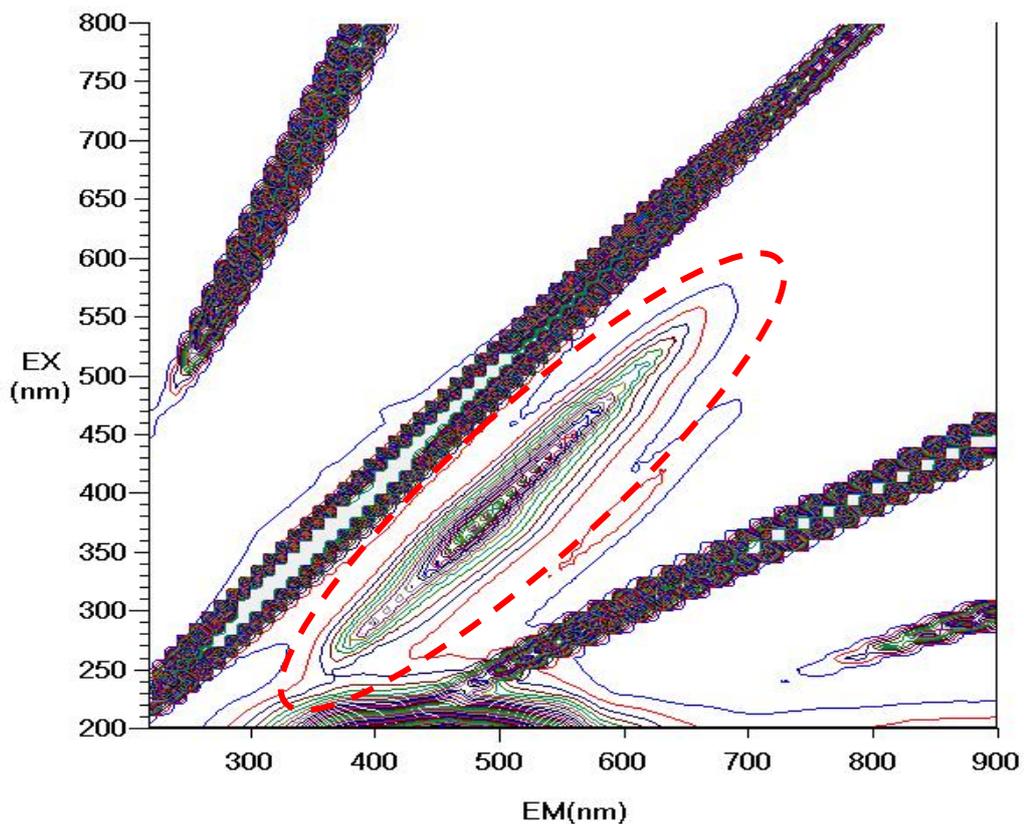


圖 5-2-2 5 nm 羧酸化奈米鑽石的三維螢光光譜。全波段螢光掃描激發光波長 200~800 nm，收放射光波長 220~900 nm；此 5 nm 羧酸化奈米鑽石具有連續光譜的特性。

5-3 奈秒雷射能量測定與選定

選用一雷射能量讓奈米鑽石能產生結構上的劇烈改變，但對細胞本身不會造成傷害，如此一來才能有選擇性的殺死癌細胞。圖 5-3-1 顯示，在使用奈秒雷射能量到達 300 mJ 照射時，不管是對照組抑或是只加入奈米鑽石與奈米鑽石-青石斑魚重組生長激素複合體，細胞存活率都大量下降，使得此三組無區別性；而在使用奈秒雷射能量達 100 mJ 照射時，在對照組與單加入奈米鑽石組裡，發現細胞反而有增長的現象，此現象會在第六章裡討論；加入奈米鑽石-青石斑魚重組生長激素複合體組，在使用 200 mJ 的奈秒雷射此條件下，相較其他組別，細胞存活率有下降趨勢，因此本實驗選用 200 mJ 的雷射能量做為奈米鑽石爆炸的能量條件。

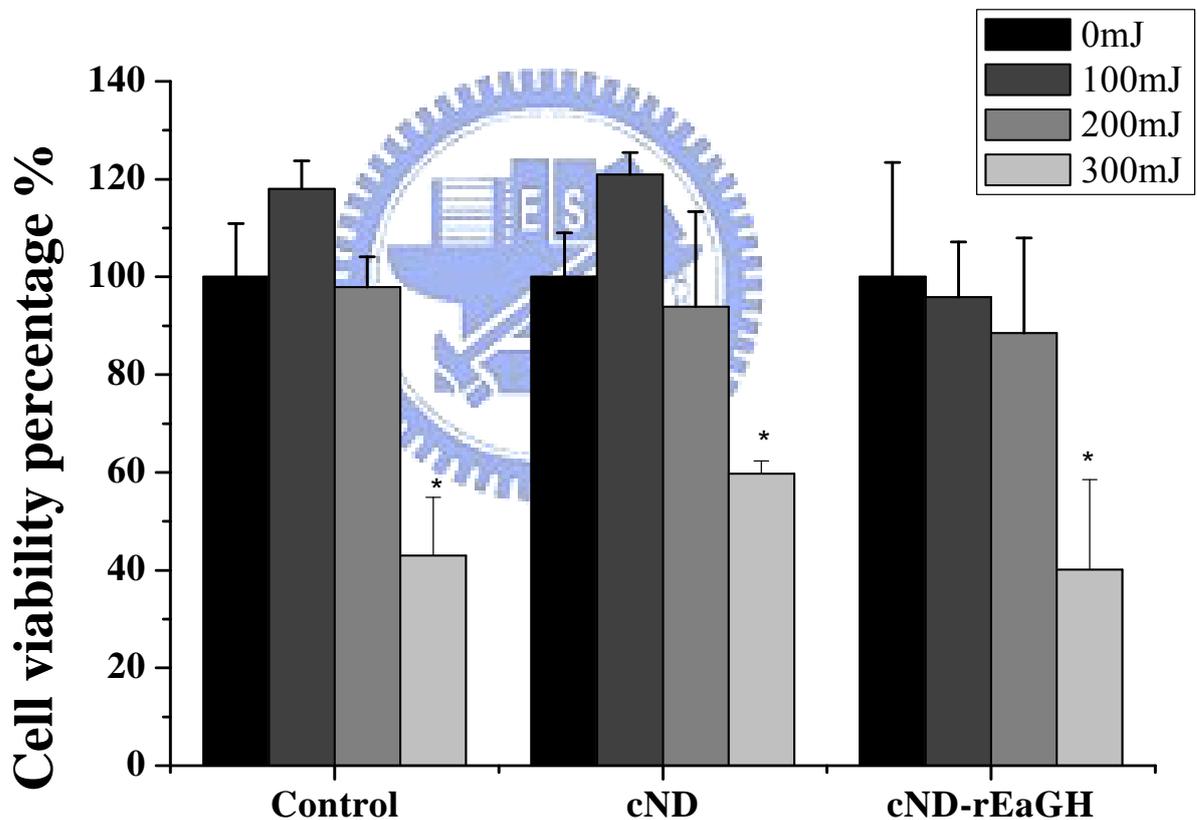


圖 5-3-1 奈秒雷射能量對奈米鑽石-青石斑魚重組生長激素複合體在癌細胞上標靶治療的測定與選定。其中選用 200 mJ 的雷射能量條件做為本實驗使奈米鑽石爆炸的能量條件。n 值=3，* $p < 0.05$ 。

5-4 確認在細胞上羧酸化奈米鑽石與青石斑魚重組生長激素的結合

利用雷射共軛焦顯微鏡檢視在細胞上羧酸化奈米鑽石是否與青石斑魚重組生長激素有結合。分別有對照組、只加入青石斑魚重組生長激素、只加入 5 nm 羧酸化奈米鑽石、加入 5 nm 羧酸化奈米鑽石-青石斑魚重組生長激素複合體到肺腺癌細胞 A549 中；其中標示” Nuclei” 是為 Heochst 33342 染細胞核的圖示；標示”Growth hormone”為標定生長激素(growth hormone ,GH)抗體(abcam, no. ab8490, USA)的圖示，二抗接 FITC 的發光物質，利用 488 nm 波長激發，收 505~525 nm 的放射光；標示”cND”為利用 543 nm 波長激發 5 nm 奈米鑽石，因為奈米鑽石會放出比激發光多出 110 nm 波長的放射光，因此收放射光為 560 nm long pass 的濾片組；標示”Merge”表示分別為對照組、青石斑魚重組生長激素組、5 nm 羧酸化奈米鑽石組以及 5 nm 羧酸化奈米鑽石-青石斑魚重組生長激素複合體個別染核、標定生長激素、標定 5 nm 羧酸化奈米鑽石的疊圖。以上皆在放大 600 倍的倍率下所觀察的細胞圖。

結果顯示在對照組因為沒有加入青石斑魚重組生長激素與 5 nm 羧酸化奈米鑽石所以只有核被標定到；而在只加入青石斑魚重組生長激素組，被生長激素抗體標定，並可證明青石斑魚重組生長激素是可與肺腺癌細胞 A549 的生長激素受體作結合，因此在疊圖可以看到標定核與生長激素的螢光；只加入 5 nm 羧酸化奈米鑽石此組，因為加入 5 nm 羧酸化奈米鑽石培養的時間為一小時，細胞未大量將 5 nm 羧酸化奈米鑽石以胞噬作用吞噬進入細胞內，隨後又以 PBS 將殘存的 5 nm 羧酸化奈米鑽石沖洗掉，因此以雷射共軛焦顯微鏡下觀察不到 5 nm 羧酸化奈米鑽石所放出的螢光，在疊圖部分只能看到標定核的部分；在 5 nm 羧酸化奈米鑽石-青石斑魚重組生長激素複合體此組可以看到以 FITC 作為二抗的生長激素抗體所發出的綠色螢光以及 5 nm 羧酸化奈米鑽石所發出的紅色螢光，在疊圖部分可以看出發出綠螢光的生長激素抗體與發紅螢光的 5 nm 羧酸化奈米鑽石因結合在一起而產生黃色的螢光，可以證明 5 nm 羧酸化奈米鑽石與青石斑魚重組生長激素有結合一起。

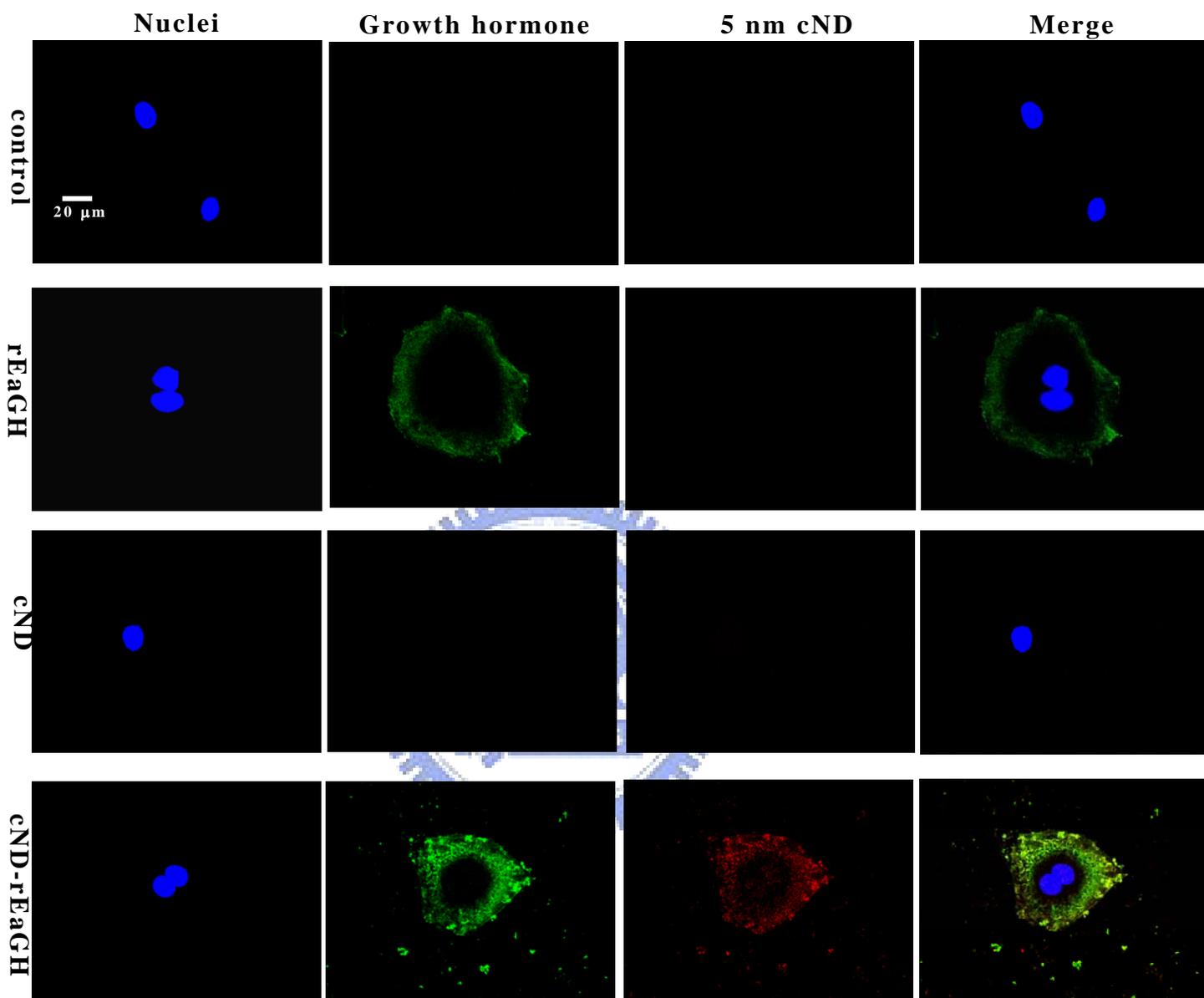


圖 5-4-1 利用雷射共軛焦顯微鏡檢視肺腺癌細胞上的 cND 是否與 rEaGH 接合。分別有對照組、加入 rEaGH 組、加入 cND 組、加入 cND-rEaGH 複合體組四組。使用 Heochst 33342 染細胞核(Nuclei)；標定生長激素抗體(Growth hormone)，二抗接 FITC 發光物質，利用 488 nm 波長激發，偵測 505~525 nm 的放射光；使用 543 nm 波長激發 5 nm 奈米鑽石(5 nm cND)，因為奈米鑽石會放出比激發光多出 110 nm 波長的放射光，因此偵測放射光為 560 nm long pass 的濾片組；染核、標定生長激素、標定 5 nm 羧酸化奈米鑽石的疊圖(Merge)。以上圖所觀察細胞放大倍率為六百倍。

5-5 經雷射處理後細胞巨觀觀察

5-5-1 經 cND、rEaGH、cND-rEaGH 處理和雷射轟炸前後的細胞形態

經由掃描式電子顯微鏡所觀察未經任何處理的肺腺癌細胞 A549 影像圖 5-5-1(A.)，而在實驗室先前結果可以看出加入 5 nm 羧酸化奈米鑽石-青石斑魚重組生長激素複合體後圖 5-5-1(B.)，其複合體會藉由生長激素受體而附著於細胞膜外層，圖中箭頭即指向附著於肺腺癌細胞表面的 5 nm 羧酸化奈米鑽石-青石斑魚重組生長激素複合體；圖 5-5-1(C.) 部分則是加入 5 nm 羧酸化奈米鑽石-青石斑魚重組生長激素複合體，再經過奈秒雷射轟炸過後，在培養 24 小時的細胞型態。因經由奈秒雷射轟炸過後的奈米鑽石會有爆炸的現象發生，此現象會對於細胞造成許多微創型傷口，使得細胞受傷呈現細胞膜皺摺的狀態。此細胞的皺摺現象，即代表細胞受傷而逐漸走向死亡。

在物鏡 20 倍、目鏡 10 倍，phase contrast 的倒立式光學顯微鏡觀察下，分別有對照組為無加入任何藥劑、加入青石斑魚重組生長激素、只加入 5 nm 羧酸化奈米鑽石、而加入 5 nm 羧酸化奈米鑽石-青石斑魚重組生長激素複合體並分別培養 1 小時。在圖 5-5-2 中是有與無經過奈秒雷射轟炸處理過的細胞，並培養 0 以及 20 小時後的細胞型態；其中沒有經過奈秒雷射轟炸處理過的細胞，培養 0 小時後的細胞型態良好，而持續培養 20 小時後，可以觀察到細胞數目變多且型態無任何改變；在經奈秒雷射轟炸處理過的細胞，培養 0 小時後的細胞細胞外觀型態並無明顯改變，而持續培養 20 小時後觀察，可以觀察到其中加入 5 nm 羧酸化奈米鑽石-青石斑魚重組生長激素複合體的細胞在數目及型態上相較於其他三圖有明顯的差異，此現象是由於細胞加入 5 nm 羧酸化奈米鑽石-青石斑魚重組生長激素複合體，再經過奈秒雷射轟炸過後，細胞可能受到無法修復的微創型傷害，如離子通道受損等，而失去完整結構及功能而走向死亡途徑。

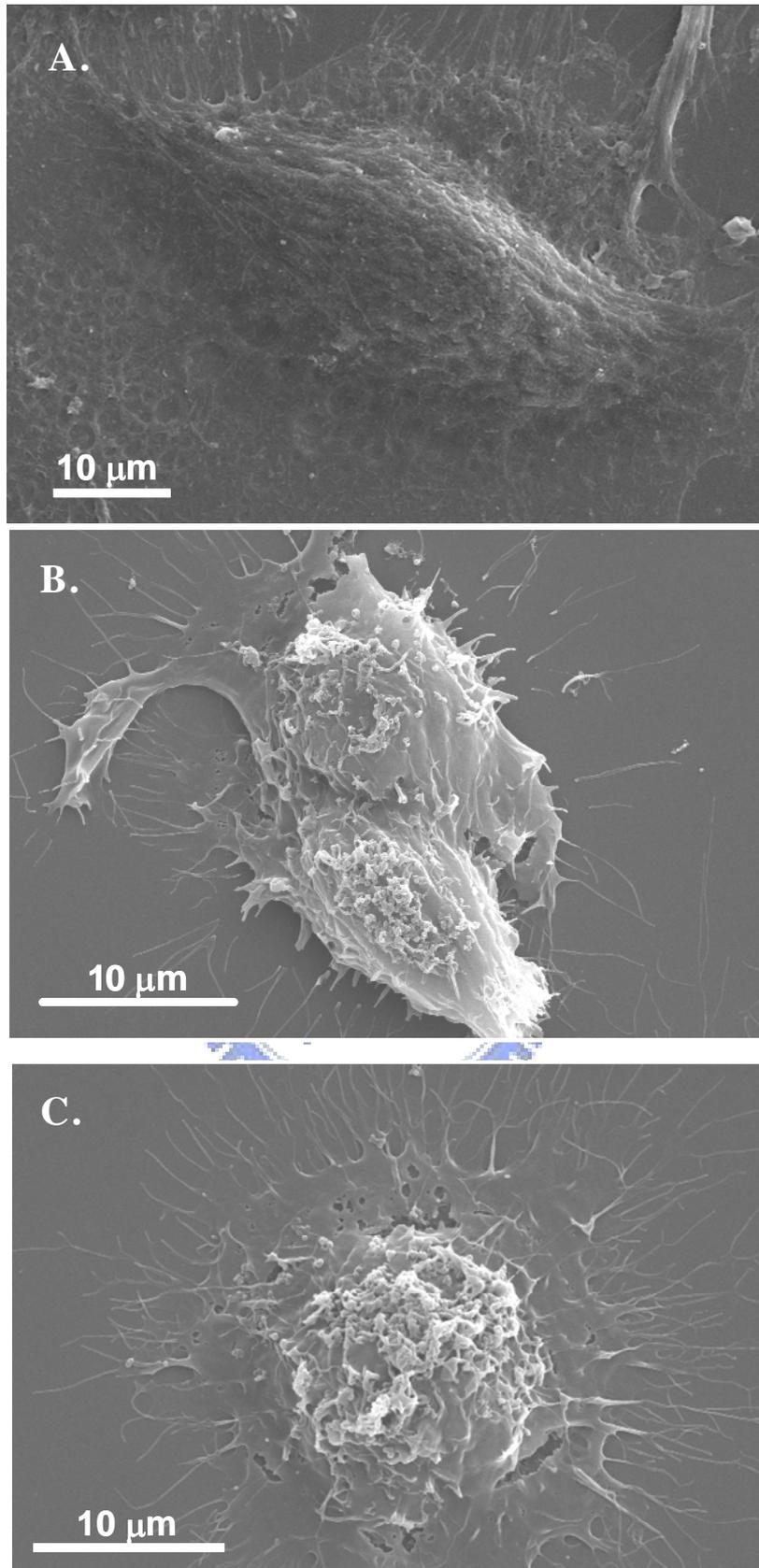


圖 5-5-1 以掃描式電子顯微鏡觀察 A549 的細胞型態。A. 為培養 24 小時後，無加入 5 nm cND-rEaGH 的肺腺癌細胞的細胞型態；B. 將肺腺癌細胞 A549 加入 5 nm cND-rEaGH 後，持續培養 24 小時後，由於奈米鑽石接上青石斑魚重組生長激素，會與細胞上的生

長激素受體做結合；C.為 A549 經加入 5 nm cND-rEaGH 與奈秒雷射轟炸處理，培養 24 小時後的細胞型態，由於 5 nm cND-rEaGH 附著於細胞表面上，並經由雷射轟炸後，奈米鑽石的爆炸會對細胞產生微創型的傷口，因此細胞膜呈現皺摺的狀態。

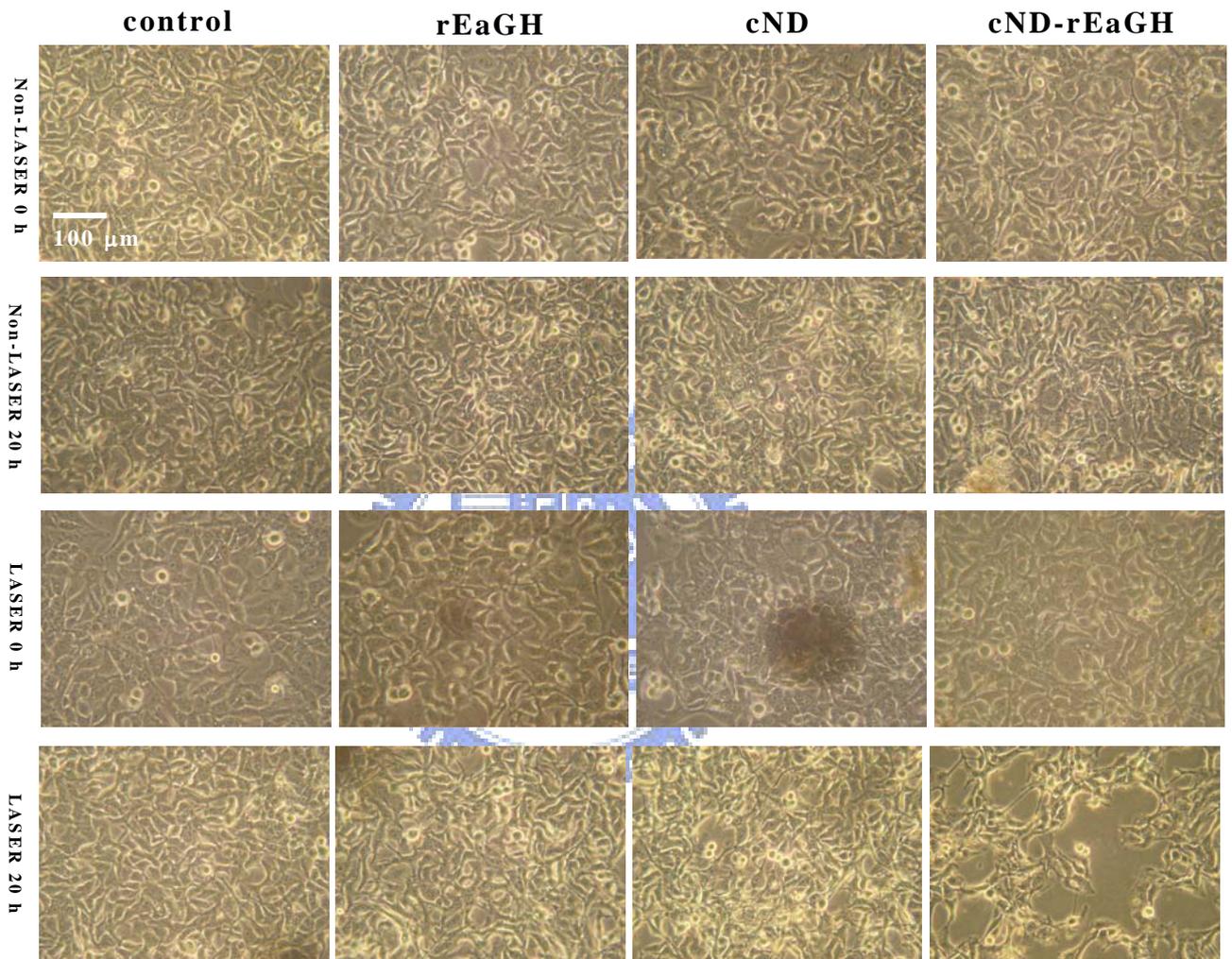


圖 5-5-2 以倒立式光學顯微鏡觀察 A549 分別加入 rEaGH、5 nm cND、5 nm ND-rEaGH，有與無奈秒雷射轟炸處理並培養 0 以及 20 小時的細胞型態。在 9 公分培養盤中培養 5×10^6 個 A549 細胞；其中加入 5 nm ND-rEaGH 並經雷射處理持續培養 20 小時後，由於 5 nm cND-rEaGH 中的奈米鑽石爆炸，使得細胞受到傷害，因此可觀察到其外觀有拉長變形、細胞數目變少等等的情況，而其餘組別由於細胞無受到外在的傷害因此其外觀並無拉長或變形等等的情況，此放大倍率為 200 倍下所觀察的細胞型態。

5-5-2 經 cND、rEaGH、cND-rEaGH 處理和雷射轟炸前後的存活細胞數目

由 5-4 節中雷射共軛焦顯微鏡觀察下已知青石斑魚重組生長激素可使 5 nm 羧酸化奈米鑽石-青石斑魚重組生長激素複合體對具有生長激素受體的細胞產生標定的特性，因此當肺腺癌細胞 A549 經 5 nm 羧酸化奈米鑽石-青石斑魚重組生長激素複合體處理後，並且利用奈秒雷射照射複合體中的奈米鑽石，以了解奈米鑽石的爆炸是否對細胞活性造成影響。實驗結果中以不經藥劑處理也不經雷射處理的 A549 細胞數目視為 100 %。

圖 5-5-3 是 A549 細胞分別為對照組、加入青石斑魚重組生長激素組、加入 5 nm 羧酸化奈米鑽石組和 5 nm 羧酸化奈米鑽石-青石斑魚重組生長激素組四種處理下，並選擇是否經由雷射轟炸，再持續培養 20 小時後的細胞存活率。圖中不加任何藥劑但經雷射轟炸的 A549 細胞數目百分比為 $91.6 \pm 6.07\%$ ；經 rEaGH 處理的細胞其雷射轟炸前後的細胞數目百分比分別為 $104.5 \pm 9.68\%$ 和 $110.0 \pm 4.49\%$ ；經 cND 處理的細胞其雷射轟炸前後的細胞數目百分比分別為 $89.8 \pm 7.28\%$ 和 $83.9 \pm 4.78\%$ ；而 cND-rEaGH 處理的細胞其雷射轟炸前後的細胞數目百分比分別為 $104.3 \pm 7.80\%$ 和 $75.7 \pm 2.24\%$ 。因此可得知此雷射的照射會造成對照組的細胞約有 9 % 的細胞死亡，而先前已證實奈米鑽石可穿透細胞膜進入細胞質及細胞核，比較雷射轟炸前後會約有 6 % 的細胞是經由奈米鑽石爆炸而死亡，因此奈米鑽石的爆炸現象確實可用來破壞細胞，造成細胞死亡。而在具有標定性的 cND-rEaGH 的處理下，比較雷射轟炸前後的細胞存活率，有約 29 % 的細胞是經由雷射轟炸所死亡，因此得知具有標靶性的 cND-rEaGH 在雷射激發系統的配合下，會有最多的細胞因奈米鑽石爆炸而死亡。

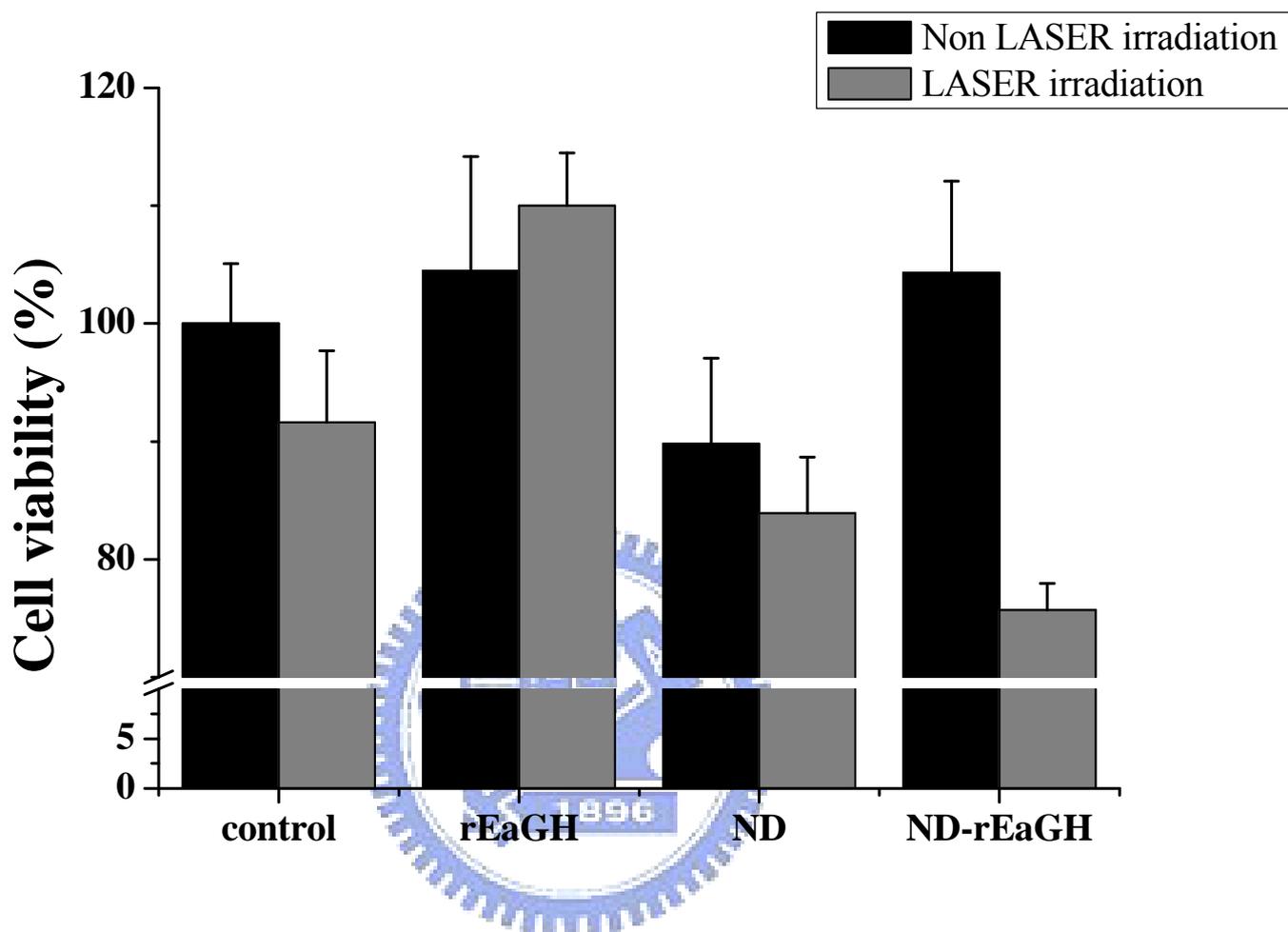


圖 5-5-3 經 cND、rEaGH、cND-rEaGH 處理和雷射轟炸前後的存活細胞數目。6 公分培養盤中培養 1×10^6 個 A549 細胞，經由雷射轟炸後，在繼續培養 20 小時，由於 5 nm ND-rEaGH 中的奈米鑽石爆炸，使得細胞受到微創型的傷害，因此加入 5 nm ND-rEaGH 組會相較於其他組別，前後雷射照射的細胞數目比例來得減少許多。

5-6 經奈秒雷射處理後細胞致死機制分析與觀測

細胞凋亡主要可分為兩個主要路徑，caspase 路徑以及 caspase-independent 路徑；其中 caspase 路徑是細胞接受到凋亡的訊息後由粒腺體中釋放出細胞色素 c (cytochrom c)再與細胞質中的凋亡蛋白酶激活分子-1 (Apaf-1)以及 Caspase 9 做為結合形成 apoptosome 後活化一連串 caspase 3、6、7 等下游分子，再續活化細胞死亡標定物(caspase-activated DNase, CAD)，隨後易位至細胞核中，使其細胞核進行染色體濃縮及 DNA 斷裂，以進行細胞凋亡的反應。而 caspase-independent 路徑中是由細胞接受到凋亡訊息後，由粒體中釋放出細胞凋亡誘導因子 AIF (apoptosis-inducing factor)蛋白至細胞質，在由細胞質易位至細胞核中，使其細胞核進行染色體濃縮及大片斷的 DNA 斷裂，以進行細胞凋亡的反應。圖 5-6-2 為 caspase 路徑以及 caspase-independent 路徑的示意圖。

在圖 5-6-1 中，利用西方轉漬法偵測 caspase 路徑中的蛋白分子 caspase 3 的表現量，而此結果發現 caspase 3 的 pro-form 並無明顯改變，也偵測不到其 active form，因此屏除掉其細胞死亡是經由 caspase 此路徑，而再續檢測是否細胞的死亡是經由 caspase-independent 的路徑。

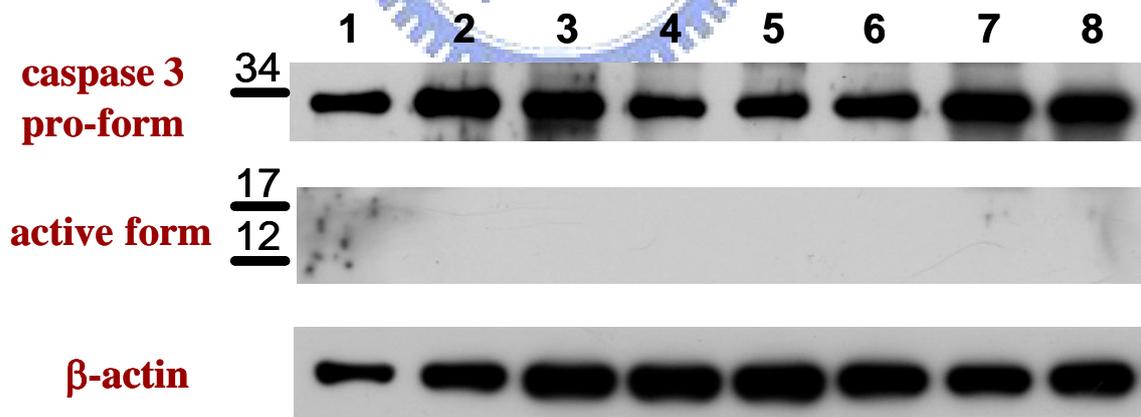


圖 5-6-1 利用西方轉漬法偵測 caspase 3 在細胞分子層次上的表現。1 與 5 為對照組、2 與 6 為加入青石斑魚重組生長激素、3 與 7 為加入羧酸化奈米鑽石、4 與 8 為加入羧酸化奈米鑽石-青石斑魚重組生長激素複合體；1、2、3、4 為無雷射系統處理；5、6、7、8 為經雷射系統處理。β-actine 為 internal control。

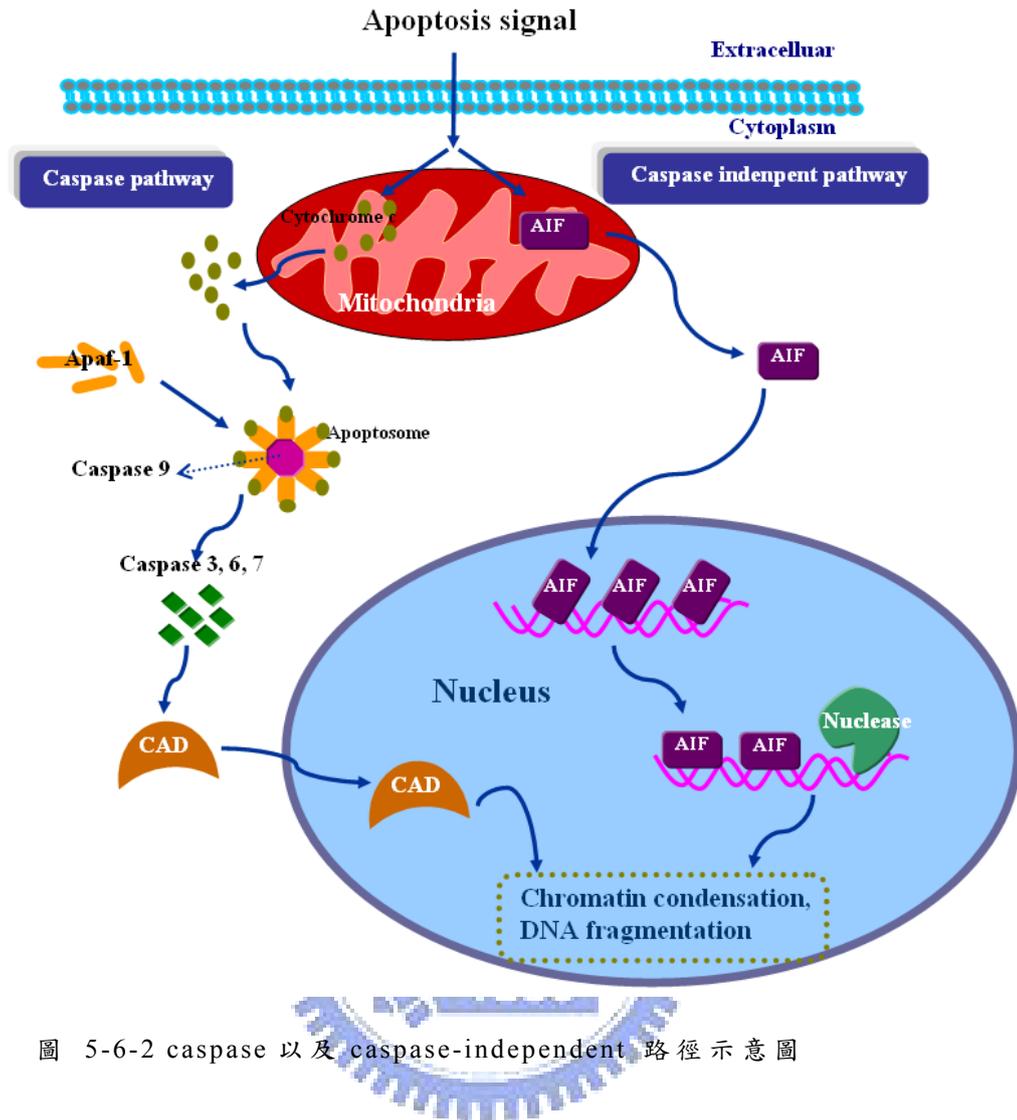


圖 5-6-2 caspase 以及 caspase-independent 路徑示意圖

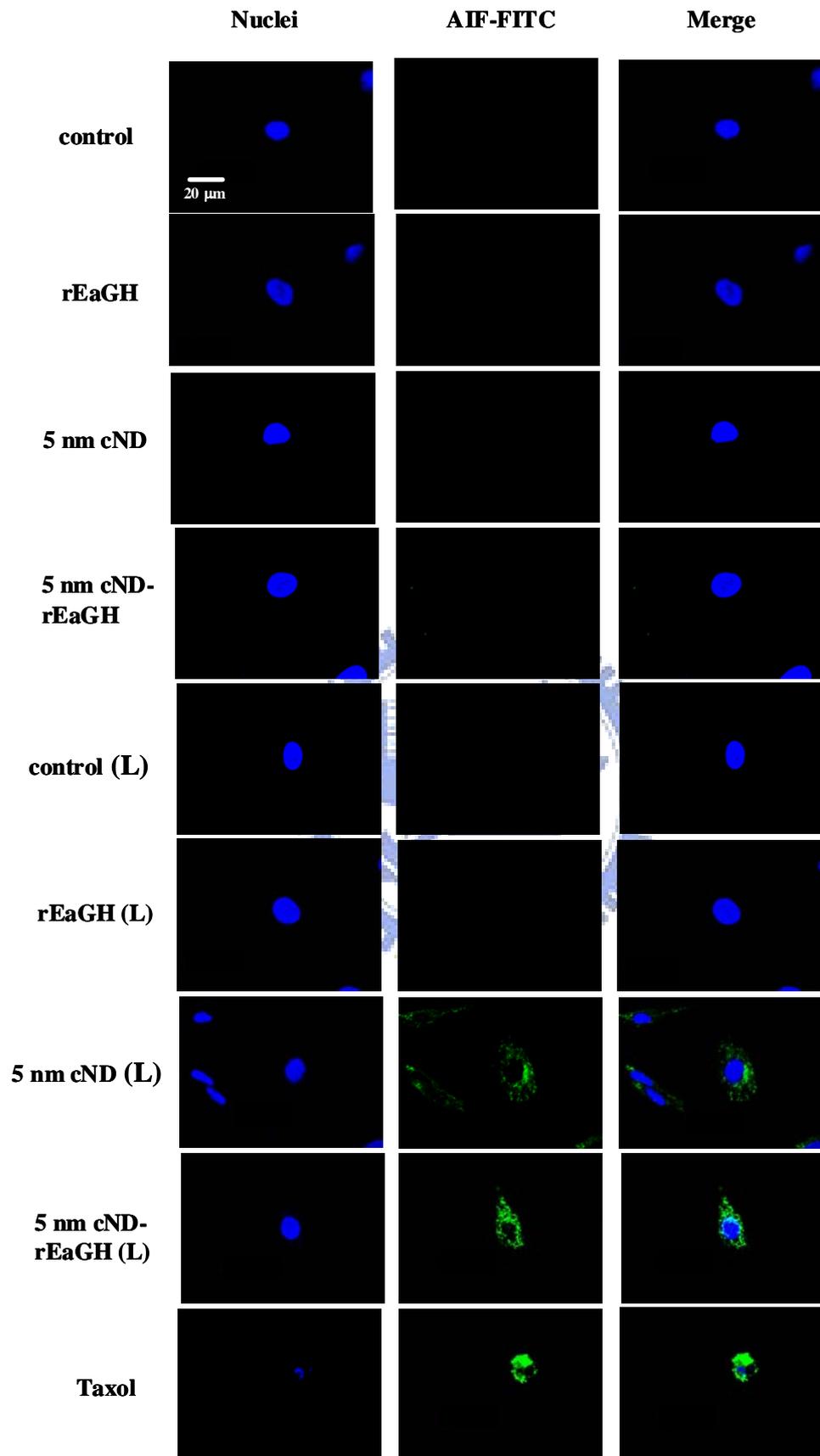
5-6-1 觀察經 cND-rEaGH 處理和雷射轟炸前後的細胞凋亡誘導因子(Apoptosis-inducing factor, AIF)

細胞凋亡誘導因子 AIF (apoptosis-inducing factor) 蛋白，為粒線體蛋白，一開始在細胞質時分子量為 67 kDa，而當跑到粒線體時，其 MLS (mitochondrial localization sequence) 會被切斷，分子量減為 62 kDa，此時為成熟的細胞凋亡誘導因子蛋白。在細胞正常情形下，細胞凋亡誘導因子在粒線體內膜中，會和熱休克蛋白 70 (heatshock protein 70, HSP 70) 結合，並將其 NLS (nuclear localization sequence) 結構遮蔽住 [98]，而當粒線體受到破壞，細胞凋亡誘導因子被釋放到細胞質，此時熱休克蛋白 70 就會脫離，將 NLS 裸露出來，幫助細胞凋亡誘導因子進一步跑到核內，此時，分子量又減為 57 kDa，在核內的細胞凋亡誘導因子會將染色

質濃縮並造成大片段的 DNA 斷裂[99]。在 1999 年，由 Susin 等人研究報告指出，將重組的細胞凋亡誘導因子轉殖至子宮頸癌細胞(HeLa cell)的細胞核中，再將其細胞核分離出，發現染色質呈現濃縮且 DNA 斷裂成大片段，並沒有小片段 DNA 形成[100]，陸續相關的研究說明了細胞凋亡誘導因子可以在不需要 caspase 蛋白參與的情況下誘導細胞凋亡[101-103]。

而在圖 5-6-3 中，是分別將肺腺癌細胞 A549 加入青石斑魚重組生長激素、5 nm 羧酸化奈米鑽石、5 nm 羧酸化奈米鑽石-青石斑魚重組生長激素複合體、對照組，並分別有無雷射照射處理以及 200 nM taxol 的細胞免疫螢光圖；有雷射處理後的細胞，在照射完雷射後再續培養 12 小時後，將細胞固定後並使用凋亡誘導因子的抗體標定，二抗接 FITC 的發光物質。以加入 Taxol 的圖當作 positive control，由圖中可發現加入 200 nM Taxol 培養 48 小時的肺腺癌細胞 A549，其細胞凋亡誘導因子已經由細胞質易位至細胞核中，並且核質已有皺縮的現象發生，此時細胞正走向凋亡的途徑[104]；而在結果發現其中只加入 5 nm cND 並經過雷射處理過(圖標縮寫”L”)的 A549 細胞，細胞凋亡誘導因子只在細胞質中未易位至細胞核中，此現象是推測由於細胞本身會有胞吞作用[85]或者是細胞表面具有黏性的蛋白將奈米鑽石抓住，因此在經過雷射照射後，細胞亦有相關反應產生，但也可更加說明奈米鑽石搭配雷射系統是具有發展成消滅癌症細胞的潛力。

而在加入 5 nm cND-rEaGH 並經過雷射照射過的 A549 細胞，其細胞凋亡誘導因子已經由細胞質易位至細胞核內，推測此時細胞正走向細胞核皺縮、DNA 斷裂成大片斷的凋亡路徑中。而相較於其他組則無細胞凋亡誘導因子標定抗體的螢光產生，因此可得知具有標向性的 5 nm cND-rEaGH 搭配雷射激發系統，肺腺癌會因為奈米鑽石的爆炸效應而引起細胞凋亡反應導致死亡，而此死亡路徑推測是走向 caspase-independent 的路徑。



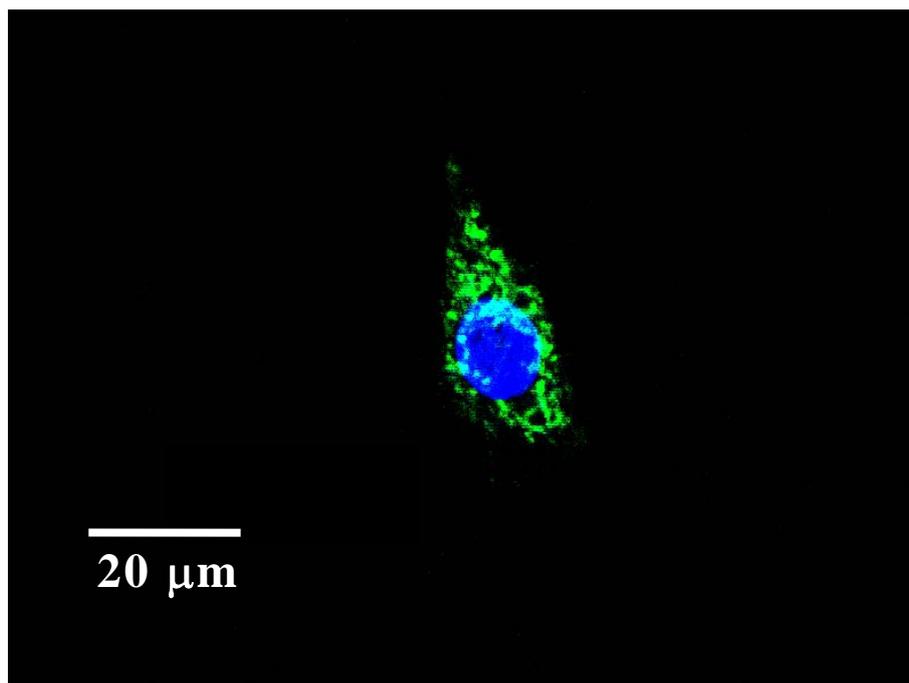


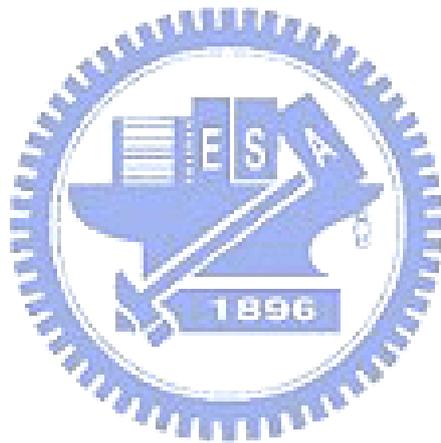
圖 5-6-3 利用共軛焦顯微鏡觀察 A549 細胞分別經 rEaGH、cND、cND-rEaGH 處理和有無雷射轟炸後，細胞凋亡誘導因子 AIF 的分布情況。其中利用 Heochst 33342 染細胞核；AIF 抗體標定，二抗接 FITC 發光物質，利用 488 nm 波長激發，收 505~525 nm 的放射光；Merge 為核與 AIF 抗體標定圖示的疊圖。下圖為加入 5 nm cND-rEaGH 並經雷射激發後，細胞中 AIF 易位至核裡的放大圖。

5-6-2 觀察經 cND-rEaGH 處理和雷射轟炸前後的細胞凋亡小體 (apoptotic body)

細胞若經由凋亡途徑死亡，其核 DNA 在核小體連接處斷裂成核小體片段，並聚集形成濃縮的染色質塊。隨著染色質不斷聚集，核纖層(nuclear lamina)斷裂消失，核膜在核孔處斷裂，形成核碎片。且同時在細胞凋亡過程中，由於不斷脫水，細胞質不斷濃縮，細胞體積減小。凋亡細胞經核碎裂形成的染色質塊(核碎片)，而後整個細胞以出泡方式形成一些大小不等的球形突起，內含胞質、細胞器及核碎片的小體即稱為凋亡小體 (apoptotic body)。

圖 5-6-4 A. 是加入 5 nm 羧酸化奈米鑽石-青石斑魚重組生長激素複合體後沒有經過雷射照射的肺腺癌細胞核，可以觀察到經由 Heochst 33342 所染出來的核型完整無 DNA 斷裂的現象發

生，而相較於圖5-6-4 B.是加入5 nm羧酸化奈米鑽石-青石斑魚重組生長激素複合體後經過雷射照射處理並再繼續培養20小時的肺腺癌細胞核的形貌，可觀察到其中有一顆顆大小不一的凋亡小體形成，此現象可以說明，此時細胞正走向凋亡的路徑死亡。因此可以說明具有標靶性的cND-rEaGH 在雷射照射下，會有肺腺癌細胞因奈米鑽石爆炸而死亡，並走向凋亡途徑。



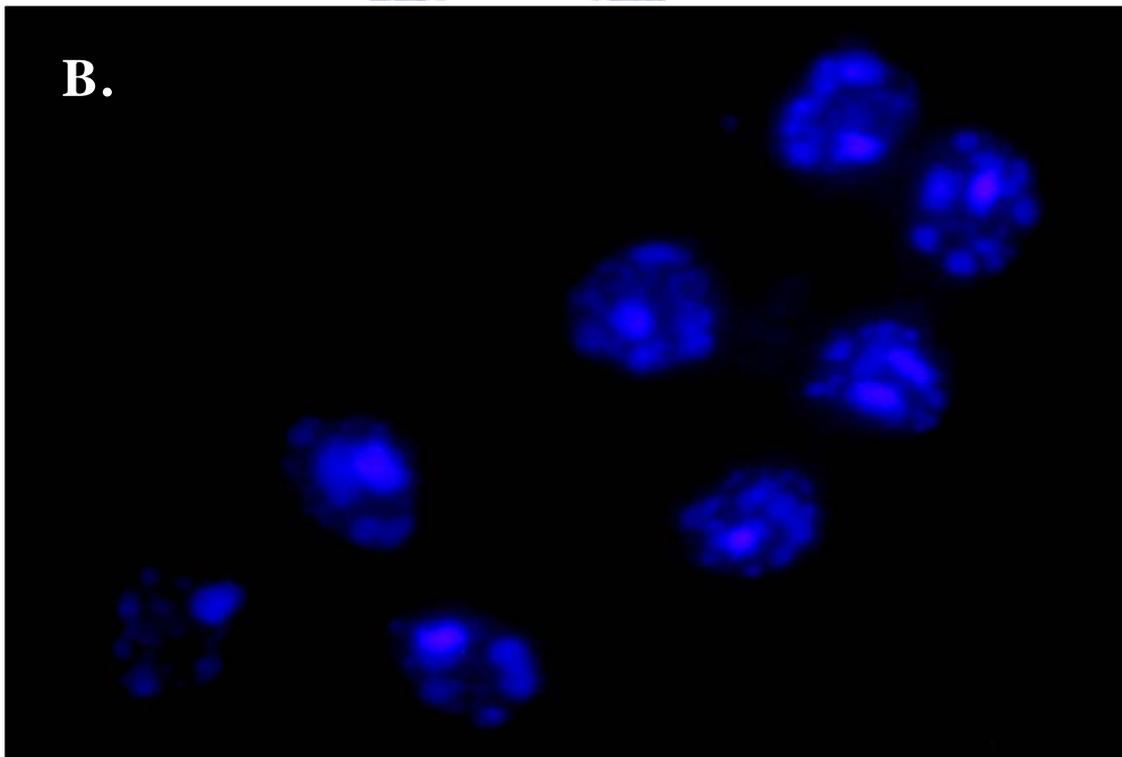
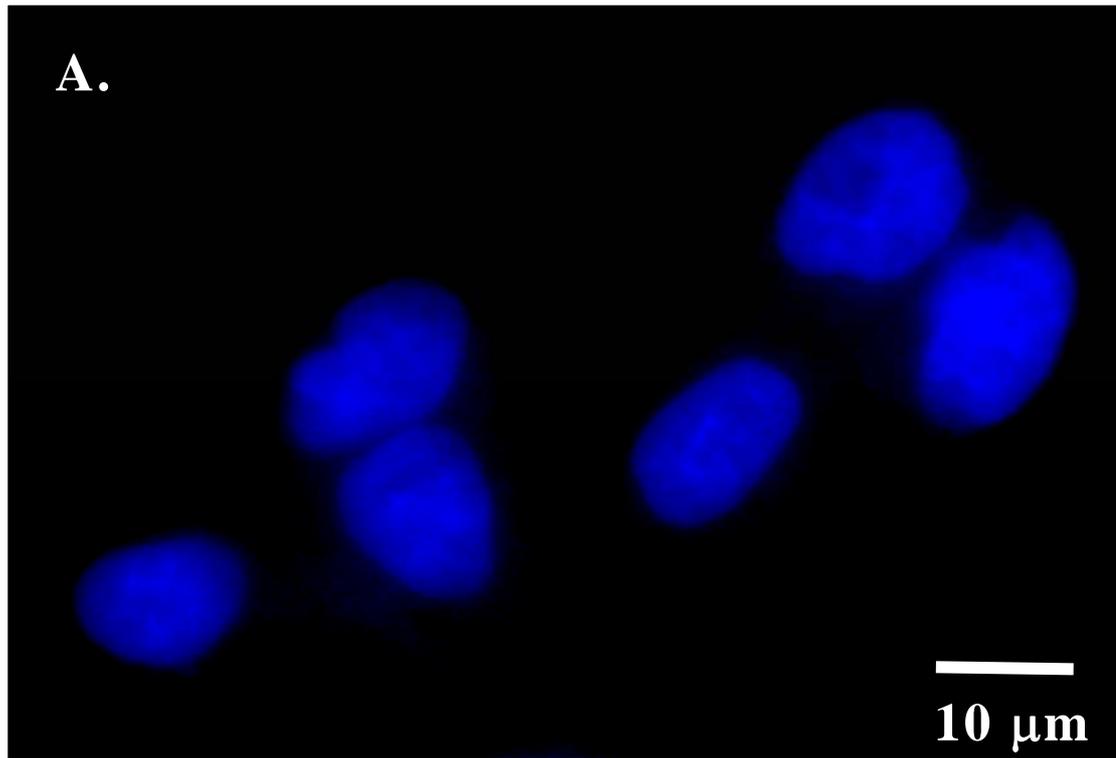


圖 5-6-4 肺腺癌細胞加入 5 nm cND-rEaGH 有與無雷射處理的細胞核型態。利用 Hechst 33342 染細胞核；A.由於無雷射的轟炸，奈米鑽石並無爆炸，因此細胞核型態完整無缺；B.經由雷射轟炸後，在繼續培養 20 小時，由於 5 nm ND-rEaGH 被雷射轟炸後，使得奈米鑽石爆炸，因此細胞核型態已有凋亡小體產生，以走向凋亡路徑死亡。圖放大倍率為 400 倍。

5-6-3 經 cND、rEaGH、cND-rEaGH 處理和雷射轟炸前後的發炎反應蛋白(ICAM)分析

在 4-9-7 節中已說明到，細胞死亡主要可分為兩路徑，自然凋亡與細胞壞死，其中在生理學特徵中若是細胞走壞死途徑死亡則因為細胞間質流出而有發炎現象產生；走自然凋亡路徑死亡則無。而發炎反應發生時則會有 Inter-Cellular Adhesion Molecule, ICAM 此蛋白質表現量增加，因此藉由偵測此蛋白以檢測肺腺癌細胞在加入 5 nm 羧酸化奈米鑽石-青石斑石重組生長激素複合體(cND-rEaGH)且經由奈米雷射照射處理後細胞的死亡途徑。

本實驗以加入 TNF- α 會引起細胞的發炎反應[105,106]產生當成 positive control，而加入 oxaliplatin 會使細胞走向凋亡途徑當成 negative control，並實驗結果中以不經藥劑處理但分別有無雷射處理的 A549 細胞 ICAM 蛋白的表現量視為 100 %。

由圖 5-6-5 實驗結果中經 rEaGH 處理的細胞其雷射轟炸前後的細胞 ICAM 蛋白表現量百分比分別為 $102.0 \pm 19.66\%$ 和 $113.0 \pm 26.91\%$ ；經 cND 處理的細胞其雷射轟炸前後的 ICAM 蛋白表現量百分比分別為 $98.0 \pm 5.79\%$ 和 $108.9 \pm 27.52\%$ ；經 cND-rEaGH 處理的細胞其雷射轟炸前後的 ICAM 蛋白表現量百分比分別為 $90.8 \pm 20.57\%$ 和 $110.3 \pm 10.89\%$ ；經 oxaliplatin 處理的細胞其雷射轟炸前後的 ICAM 蛋白表現量百分比分別為 $95.0 \pm 7.89\%$ 和 $109.7 \pm 24.01\%$ ；而經 TNF- α 處理的細胞其雷射轟炸前後的 ICAM 蛋白表現量百分比分別為 $172.9 \pm 15.92\%$ 和 $215.2 \pm 26.04\%$

因此相較於加入 TNF- α (positive control) 處理的肺腺癌細胞有大量的發炎蛋白 ICAM 產生，可得知雷射的照射對對照組、rEaGH 組、cND 組、cND-rEaGH 組的細胞是無發炎反應產生的，而先前實驗結果顯現肺腺癌細胞加入 5 nm 羧酸化奈米鑽石-青石斑魚重組生長激素複合體並經由奈秒雷射轟炸後細胞數目會比其他組相對的少，因此綜合兩個實驗結果推測細胞的減少且死亡可能是經由凋亡這條路徑而死亡的。

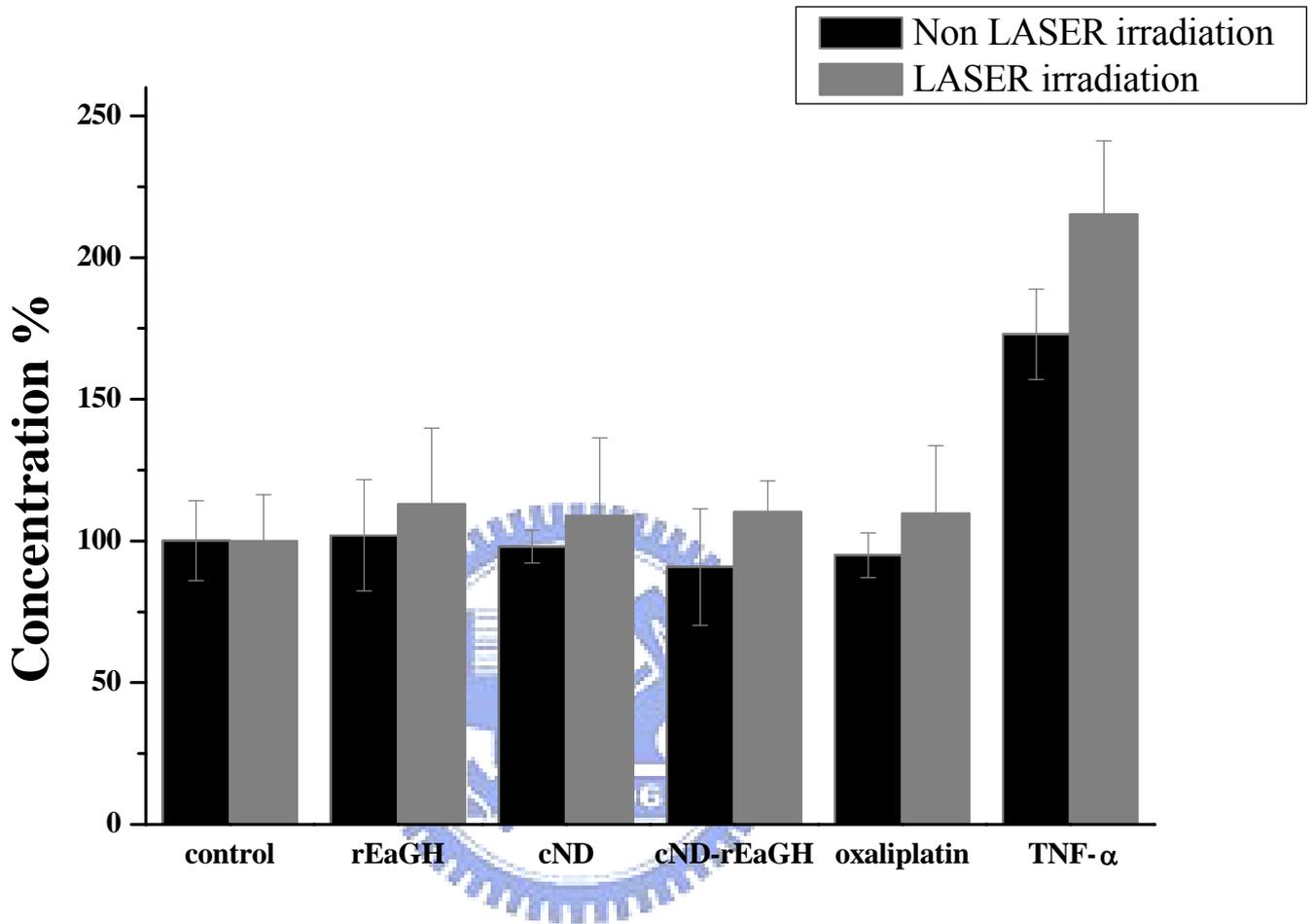


圖 5-6-5 經 cND、rEaGH、cND-rEaGH 處理和雷射轟炸前後的發炎反應蛋白 ICAM 分析。以 A549 加入 oxaliplatin 不會有發炎反應產生，當作 negative control；而 A549 加入 TNF- α 則會有發炎反應產生，當作 positive control；可以得知經 cND、rEaGH、cND-rEaGH 處理和雷射轟炸前後，細胞沒有大量發炎反應，推測 A549 加入 5 nm cND-rEaGH 並經由雷射處理後，細胞的死亡是經由凋亡路徑。

第六章 討論

6-1 奈米鑽石的生物物理特性

由先前與以上實驗結果證實奈米鑽石是具有生物相容性的奈米顆粒，即便細胞經由 10 $\mu\text{g/ml}$ 的奈米鑽石處理後，仍不見細胞活性有顯著的改變，甚至可觀察到細胞數目增加，因此奈米鑽石具有做為生醫奈米材料的潛力。且奈米鑽石具有連續性螢光光譜特性，經由激發光源 543 nm 產生比激發光源波長增加 110 nm 的放射光，可協助觀察奈米鑽石的定位，雖然量子點也有相同的特性不會被光漂白(photo-bleaching)，但此具有硒化鎘、硒化鉛等有毒物質會對生物體本身造成不能預期的變病，因此奈米鑽石更具有發展成為生物分子追蹤(bio-tracer)的潛能。而熱聲子的效應使得奈米鑽石分子結構中的 sp^3 鍵結轉變為 sp^2 鍵結，在粒徑形態上發生顯著的改變，此爆炸效應嘗試用於生醫治療方面。而在本實驗結果顯示，在比較雷射轟炸前後的細胞存活率，會有最多的肺腺癌細胞是加入具有標靶性的 cND-rEaGH 並搭配雷射激發系統所死亡，因此在本實驗架構下，細胞會因奈米鑽石爆炸而死亡，並也具有在生物醫療方面的發展潛力。

6-2 5 nm cND-rEaGH 的特性與應用

奈米鑽石是不具有毒性的奈米粒子，本實驗將奈米鑽石加上一標靶性生物分子-青石斑魚重組生長激素 rEaGH，使得奈米鑽石對肺腺癌細胞具有標靶性，而 5 nm cND-rEaGH 已由本實驗室做過毒性測試，其結果已證實為不具毒性的複合體，並在實驗結果圖 5-4-1 中的結果也顯示了 5 nm cND-rEaGH 具有生物辨識能力，會結合到具有生長激素受體的肺腺癌細胞 A549 上，並在圖 5-5-3 中可以發現加入具有標靶性生物分子-rEaGH 的奈米鑽石再經由奈秒雷射轟炸後，相較於其他組別細胞數目有減少許多，因此 5 nm cND-rEaGH 的物理性爆炸機制有產生破壞癌細胞的效能並開發成為臨床醫療技術的潛能。

6-3 奈米鑽石與青石斑魚重組生長激素的結合方法探討

經過酸化後的奈米鑽石表面具有羧酸($-\text{COO}^-$)的官能基，能使其水溶性增加，也可以更容易與生物分子(本實驗使用青石斑魚重組生長激素)

的羧酸基或胺基，利用分子連結劑(如 EDC)進行化學共價鍵的結合。而本實驗室先前基質輔助雷射脫附游離時序飛行式質譜儀(MALDI-TOF)實驗結果顯示，奈米鑽石與青石斑魚重組生長激素所形成具有共價鍵結合的附合體是以 1:2 的個數比作為鍵結；為了更增加奈米鑽石與生物分子的結合個數以及增加其水溶性，亦嘗試以具有醇基(-OH)的 PEG-200 來包覆奈米鑽石與青石斑魚重組生長激素，但是由於隨後的實驗步驟使用到奈秒雷射，PEG 是屬於會吸收熱能但不易散熱的物質，因此會將細胞悶燒死使此實驗無區別性，故此結合方法不宜使用在此實驗架構下。因此使用 EDC 方法將具有羧基的奈米鑽石與具有胺基的青石斑魚重組生長激素以共價鍵結合，作為在本實驗架構下一具有標靶性的生物複合體分子。

6-4 不同雷射能量使奈米鑽石爆炸並對細胞的影響

奈米鑽石物理性的爆炸產生需借由奈秒雷射的幫助，才能使奈米鑽石有結構性的改變，因此在雷射能量選用也是一重要課題，奈秒雷射能量選定必須能使得奈米鑽石因熱聲子效應產生軌域上的改變，但其能量對細胞本身卻不能造成傷害。在實驗結果圖 5-3-1 中，奈米鑽石經 100 mJ 雷射能量照射後，在對照找組與只加入奈米鑽石組，細胞有增長的現象，也就是此能量既不會使奈米鑽石爆炸也不會使細胞造成傷害，推測此能量具有對細胞助於刺激生長的可能性；若使用高能量或 300 mJ 的雷射能量照射，在圖 6-4-1 可以發現細胞已全部被過高雷射能量整片翻起死亡，此時細胞有無標定 5 nm cND-rEaGH 已無區別性，故本實驗亦無法將此能量來照射奈米鑽石；因此選用雷射能量為 200 mJ，則可使得 5 nm cND-rEaGH 配合著雷射激發系統有著標靶性治療的區別。

在結果圖 5-5-3 中加入具有靶向性的 5 nm cND-rEaGH 並搭配著雷射激發系統，可使奈米鑽石產生爆炸，使得細胞約有 30% 的死亡比率，而這結果可能是因為雷射系統本身能量不均，或是光束能量直徑大小 (beam size) 無法全面性地照射全部細胞，以導致以巨觀分析細胞分子層次的方法，如西方轉漬法 (western blotting)、DNA 斷裂分析方法 (DNA fragment assay) 無法看出顯著的差異性。

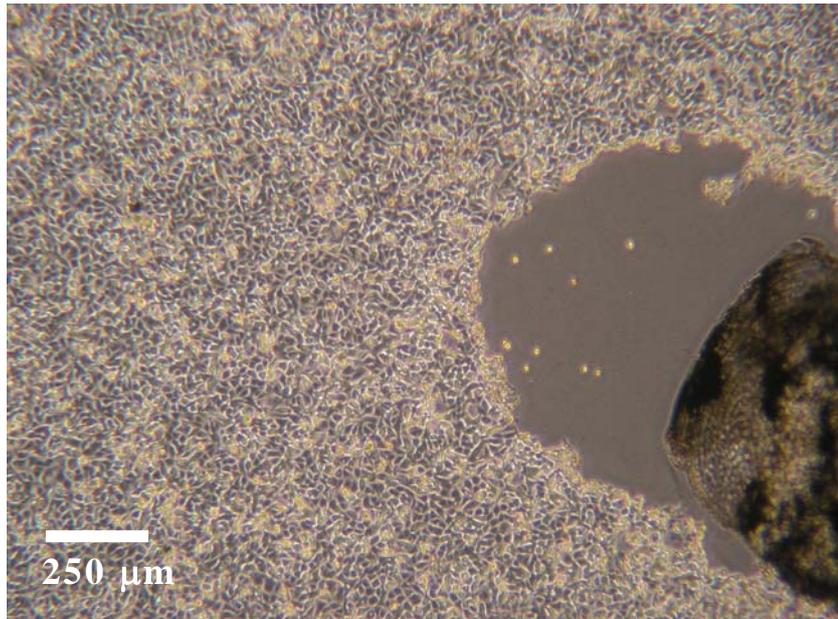


圖 6-4-1 利用倒立式顯微鏡觀察使用過高能量雷射處理細胞後的外觀。將 100 mW 的雷射能量連續處理 10 秒鐘，細胞因為過高的能量而整片翻起死亡，此觀察倍率為放大 100 倍。

6-5 奈米鑽石經雷射轟炸後的應用

奈米鑽石需要有外界提供瞬間高能量，產生熱聲子效應使得表面軌域發生改變，由 sp^3 轉變為 sp^2 ，猶如爆炸般使奈米鑽石體積膨脹十幾倍之大，而本實驗利用奈秒雷射照射可以提供奈米鑽石瞬間能量產生爆炸，而目前此雷射系統是體外 (*in vitro*) 的細胞實驗，結果發現有加入奈米鑽石-重組青石斑魚生長激素複合體的肺腺癌細胞並經過雷射處理過後的細胞數目相較其他組別有減少的情況，可以做為一癌症標靶治療的平台；而日後應用在生物體上 (*in vivo*) 可以使用以下幾種方法已達治療的目的：(1) 若是固態腫瘤 (solid tumor)，可在腫瘤位置開個微型傷口，直接將雷射打到病灶上的奈米鑽石，使其爆炸消除腫瘤細胞，相較化學療法的副作用減少很多 (2) 改變雷射光源，利用較長的波長，如遠紅外光可以穿透皮膚，以照射在體內腫瘤上的奈米鑽石，對正常細胞也不會有影響 (3) 或使用非線性光學-三倍頻 (Third-harmonic-generation) 方式，使奈米鑽石同時並在同一位置接受三個光子的能量，使奈米鑽石產生物理性爆炸達到非侵入式治療癌症的目的。

6-6 細胞經 cND-rEaGH 處理和雷射轟炸後的死亡表現與可能反應路徑

在選定一雷射能量能使具有標靶性的奈米鑽石爆炸，而不會對細胞造成傷害後，將肺腺癌細胞在加入 5 nm 羧酸化奈米鑽石-青石斑魚重組生長激素複合體並經由奈秒雷射激發後，因為奈米鑽石的爆炸，使得細胞受到傷害，喪失其完整架構而逐漸走向死亡；在實驗結果圖 5-6-3 中顯示肺腺癌細胞在加入 5 nm cND-rEaGH 處理並經過雷射照射後，持續培養 12 小時後，有凋亡誘導因子 AIF 由細胞質易位至細胞核中，並且再培養 20 小時後，有凋亡小體圖 5-6-4 B. 的產生，因此可以推測肺腺癌細胞 A549 在加入 5 nm cND-rEaGH 處理並搭配雷射照射系統，細胞受到傷害後的凋亡路徑會由粒線體釋放出凋亡誘導因子到細胞質，再由細胞質易位至細胞核中，使得細胞核皺縮、DNA 斷裂成大片斷、凋亡小體的產生，圖 6-6-1。

而在發炎反應蛋白 ICAM 圖 5-6-5 分析中無明顯增加，更可以輔助說明癌症細胞的死亡很有可能是走向凋亡路徑，因此綜合以上這些結果得知癌症細胞的死亡機制與 5 nm cND-rEaGH 的靶向性，可發展出一套消滅癌細胞的標靶治療的平台。

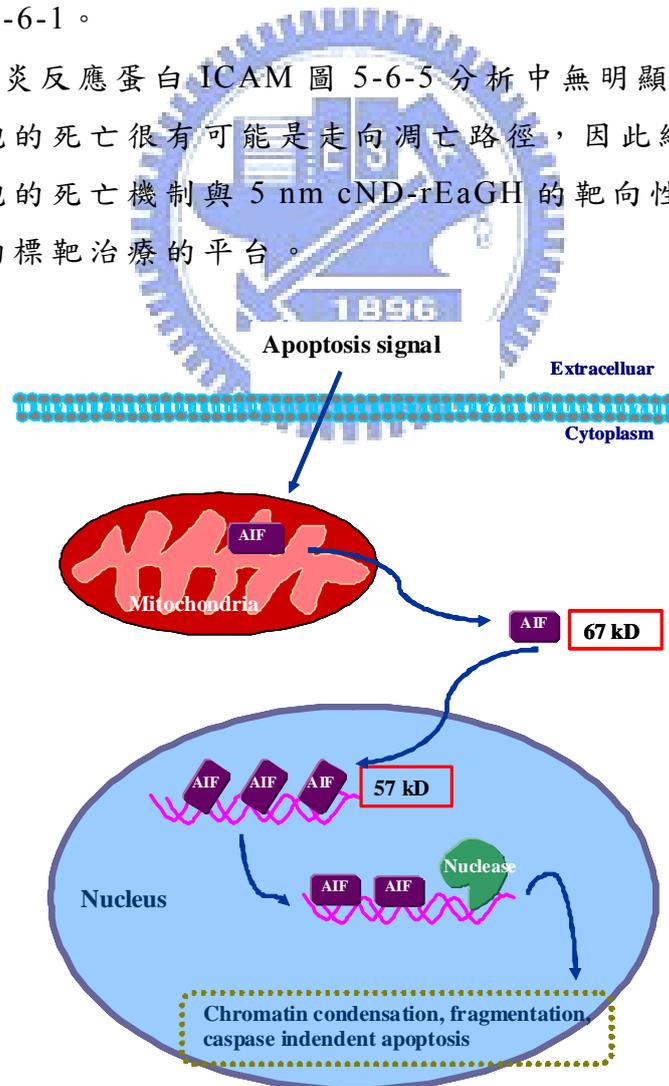


圖 6-6-1 細胞經 cND-rEaGH 處理及雷射照射後的細胞凋亡可能反應路徑

6-7 了解細胞的表面受體能有助於標靶治療的發展

本實驗利用青石斑魚的重組生長激素將奈米鑽石能有效帶向細胞，而會使用青石斑魚重組生長激素當作標靶蛋白是由於(1)在本實驗室先前實驗中發現肺腺癌細胞 A549 具有相較於其他細胞，中國倉鼠卵巢癌細胞(CHO-K1)、肝癌細胞(Hep G2)具有較多表現人類生長激素受體(2)若使用人類生長激素當作攜帶奈米鑽石的標靶蛋白，雖說能與人類肺腺癌細胞產生最高的結合率，但卻會促使癌細胞大量增生，對生物體本身或治療的面向而言是有害的。因此本實驗利用生長激素蛋白在演化上具有一定保留的特性，去尋找在不同物種間的生長激素，以利找尋到對人類細胞低活化特性的人類生長激素相似物；而在圖 3-2-2 中可發現不同物種間的生長激素受體結合位(epitope)，在區域性序列中依然有著高度的保留性，因此青石斑魚重組生長激素與人類細胞的生長激素受體在結構上是具有一定比例的結合率。

所以可以針對不同的癌症細胞找尋此細胞是具有何種受體，並結合結構學去探討、協助了解配體與受體的結合機制，藉此找尋低活化特性的相似物，在標靶治療上可達到專一性殺死癌細胞的目的，並可除去化學治療對正常細胞的傷害以及副作用。下表 2 為正常細胞及癌症細胞所具有的受體種類。

表 2 正常細胞與惡性腫瘤細胞所具有的受體種類

生長激素受體表現	正常細胞	惡性腫瘤細胞
Insulin receptor	cytotrophoblast (CT), syncytiotrophoblast (ST)[107]	Prostate[108]
Insulin-like growth factor receptor 1	CT, ST	Adrenocortical[109]
Insulin-like growth factor receptor 2	villous cytotrophoblast (vCTB)	Adrenocortical[109]
Corticotrophin-releasing factor receptor 2	CT[110]	Central and peripheral nervous system[111]
Epidermal growth factor	CT, ST[112]	Breast[113]

receptor		Ovarian[114] Pancreas[115] Lung
Hepatocyte growth factor receptor	CT[116]	Colon[117] Gastric[118]
Erythropoietin receptor	vCTB, ST, extravillous cytotrophoblast (evCTB)[119]	Lung[120] Breast[121]
Vascular endothelial growth factor receptor	evCTB[122]	Breast[123] Pancreas[124]
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor	vCTB, evCTB[125]	Prostate[126]
Granulocyte CSFR	evCTB[127]	Colon
ERBB2	evCTB[128]	Breast[113], Gastric, Cervical ovary
colony-stimulating factor receptor	evCTB[129], ST[130]	Prostate[131] Breast[132] Liver Endometrial carcinoma[133]
Platelet-derived growth factor receptor	trophoblast[134]	Breast[135]
Growth hormone receptor	Adipocyte[136], Liver[137], Thymocyte[138]	Colon[139], Breast[140], cutaneous squamous cell carcinoma[141]

6-8 奈米鑽石的发展潜力

本實驗在先前已證實了奈米鑽石具有穿透細胞的能力且不具毒性，因此奈米鑽石可做為攜帶藥物、DNA、RNA 的生物載體，取代質譜儀鑑定中攜帶樣本的帶電性載體(matrix)，並提高偵測靈敏度[142]，甚至是可以取代傳統免疫螢光染色的染劑，藉由其穩定的螢光發光特性而開發出生物探針(bio-probe)，更可搭配雷射的激發系統使其有爆炸效應產生，已建立能標靶性治療癌症的平台，因此奈米鑽石並能藉由各種化學表面修飾產生全新極具發展潛能的生物奈米材料。



第七章 参考文献

1. Medina C, Santos-Martinez MJ, Radomski A, Corrigan OI, Radomski MW: Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *Br. J. Pharmacol.* 2007, **150**,552-558.
2. Rusanov AI: Striking world of nanostructures. *Russ. J. Gen. Chem.* 2002, **72**,495-511.
3. Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J: Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 2005, **113**,823-839.
4. Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, Carter J, Karn B, Kreyling W, Lai D, et al.: Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. 2005.
5. Dobson J: Magnetic Nanoparticles for Drug Delivery. 2006, **67**,6.
6. Zheng XL, Lu JP, Deng L, Xiong Y, Chen JM: Preparation and characterization of magnetic cationic liposome in gene delivery. *Int. J. Pharm.* 2009, **366**,211-217.
7. Weidong D, Wei L, Gang C, Huimin C, Huayang T, Xianfa T, Qinghui J, Zhongwu S, Hui Z, Wenming Z, et al.: Detection of known base substitution mutations in human mitochondrial DNA of MERRF and MELAS by biochip technology. *Biosens. Bioelectron.* 2009, **24**,2371-2376.
8. Ramachandran PP, Christensen SM, Iqbal SM: Electronic detection of selective proteins using non antibody-based CMOS chip. In *2009 IEEE/NIH Life Science Systems and Applications Workshop (LiSSA 2009) 9-10 April; Bethesda, MD*,: Ieee: 2009:1-4.
9. Li Z, Xiang J, Zhang W, Fan S, Wu M, Li X, Li G: Nanoparticle delivery of anti-metastatic NM23-H1 gene improves chemotherapy in a mouse tumor model. *Cancer Gene Ther.* 2009, **16**,423-429.
10. Singh SR, Grossniklaus HE, Kang SJ, Edelhauser HF, Ambati BK, Kompella UB: Intravenous transferrin, RGD peptide and dual-targeted

- nanoparticles enhance anti-VEGF intrareceptor gene delivery to laser-induced CNV. *Gene Ther.* 2009, **16**,645-659.
11. Hu XY, Jiang P, Xin C, Yang H, Gong QH: Nano-Ag:polymeric composite material for ultrafast photonic crystal all-optical switching. *Appl. Phys. Lett.* 2009, **94**,3.
 12. Patel PA, Eckart J, Advincula MC, Goldberg AJ, Mather PT: Rapid synthesis of polymer-silica hybrid nanofibers by biomimetic mineralization. *Polymer* 2009, **50**,1214-1222.
 13. Smith AM, Banwell EF, Edwards WR, Pandya MJ, Woolfson DN: Engineering increased stability into self-assembled protein fibers. *Adv. Funct. Mater.* 2006, **16**,1022-1030.
 14. Yasuoka N, Kawaguchi K, Ebe H, Akiyama T, Ekawa M, Morito K, Sugawara M, Arakawa Y: Quantum-Dot Semiconductor Optical Amplifiers With Polarization-Independent Gains in 1.5- μ m Wavelength Bands. *IEEE Photonics Technol. Lett.* 2008, **20**,1908-1910.
 15. Manzoor K, Johnny S, Thomas D, Setua S, Menon D, Nair S: Bio-conjugated luminescent quantum dots of doped ZnS: a cyto-friendly system for targeted cancer imaging. *Nanotechnology* 2009, **20**,13.
 16. Corrado C, Jiang Y, Oba F, Kozina M, Bridges F, Zhang JZ: Synthesis, Structural, and Optical Properties of Stable ZnS:Cu,Cl Nanocrystals. *J. Phys. Chem. A* 2009, **113**,3830-3839.
 17. Voura EB, Jaiswal JK, Mattoussi H, Simon SM: Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy. *Nat. Med.* 2004, **10**,993-998.
 18. Ung Thi Dieu T, Nguyen Quang L, Do Xuan T, Protiere M, Reiss P: Optical transitions in polarized CdSe, CdSe/ZnSe, and CdSe/CdS/ZnS quantum dots dispersed in various polar solvents. *Appl. Phys. Lett.* 2007, **91**,241908-241901-241908-241908-241903.
 19. Choi AO, Brown SE, Szyf M, Maysinger D: Quantum dot-induced epigenetic and genotoxic changes in human breast cancer cells. *J. Mol. Med.* 2008, **86**,291-302.
 20. Weng JF, Ren JC: Luminescent quantum dots: A very attractive and

- promising tool in biomedicine. *Curr. Med. Chem.* 2006, **13**,897-909.
21. Guo CX, Boullanger P, Jiang L, Liu T: Highly sensitive gold nanoparticles biosensor chips modified with a self-assembled bilayer for detection of Con A. *Biosens. Bioelectron.* 2007, **22**,1830-1834.
 22. Hu M, Chen JY, Li ZY, Au L, Hartland GV, Li XD, Marquez M, Xia YN: Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* 2006, **35**,1084-1094.
 23. Jiang ZL, Zou MJ, Liang AH: An immunonanogold resonance scattering spectral probe for rapid assay of human chorionic gonadotrophin. *Clin. Chim. Acta* 2008, **387**,24-30.
 24. Zhang W, Yang T, Jiang C, Jiao K: DNA hybridization and phosphinothricin acetyltransferase gene sequence detection based on zirconia/nanogold film modified electrode. *Appl. Surf. Sci.* 2008, **254**,4750-4756.
 25. Liu T, Tang Ja, Jiang L: The enhancement effect of gold nanoparticles as a surface modifier on DNA sensor sensitivity. 2004, **313**,3-7.
 26. Isaji S, Bin YZ, Matsuo M: Electrical conductivity and self-temperature-control heating properties of carbon nanotubes filled polyethylene films. *Polymer* 2009, **50**,1046-1053.
 27. Supronowicz PR, Ajayan PM, Ullmann KR, Arulanandam BP, Metzger DW, Bizios R: Novel current-conducting composite substrates for exposing osteoblasts to alternating current stimulation. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002, **59**,499-506.
 28. Yang Z, Chen XH, Xia SZ, Pu YX, Xu HY, Li WH, Xu LS, Yi B, Pan WY: Covalent attachment of poly (acrylic acid) onto multiwalled carbon nanotubes functionalized with formaldehyde via electrophilic substitution reaction. *J. Mater. Sci.* 2007, **42**,9447-9452.
 29. Harrison BS, Atala A: Carbon nanotube applications for tissue engineering. *Biomaterials* 2007, **28**,344-353.
 30. Hirano S, Kanno S, Furuyama A: Multi-walled carbon nanotubes injure the plasma membrane of macrophages. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008, **232**,244-251.

31. Dong J, Xu ZH, Kuznicki SM: Magnetic Multi-Functional Nano Composites for Environmental Applications. *Adv. Funct. Mater.* 2009, **19**,1268-1275.
32. Hsiao JK, Tai MF, Chu HH, Chen ST, Li H, Lai DM, Hsieh ST, Wang JL, Liu HM: Magnetic nanoparticle labeling of mesenchymal stem cells without transfection agent: Cellular behavior and capability of detection with clinical 1.5 T magnetic resonance at the single cell level. *Magn. Reson. Med.* 2007, **58**,717-724.
33. Jin X, Zhao Y, Richardson A, Moore L, Williams PS, Zborowski M, Chalmers JJ: Differences in magnetically induced motion of diamagnetic, paramagnetic, and superparamagnetic microparticles detected by cell tracking velocimetry. *Analyst* 2008, **133**,1767-1775.
34. Fuh CB, Su YS, Tsai HY: Determination of magnetic susceptibility of various ion-labeled red blood cells by means of analytical magnetophoresis. In *26th International Symposium on Capillary Chromatography and Electrophoresis May 18-22; Las Vegas, Nevada*: Elsevier Science Bv: 2003:289-296.
35. He J, VanBrocklin HF, Franc BL, Seo Y, Jones EF: Nanoprobes for medical diagnosis: Current status of nanotechnology in molecular imaging. *Curr. Nanosci.* 2008, **4**,17-29.
36. Drake P, Cho HJ, Shih PS, Kao CH, Lee KF, Kuo CH, Lin XZ, Lin YJ: Gd-doped iron-oxide nanoparticles for tumour therapy via magnetic field hyperthermia. *J. Mater. Chem.* 2007, **17**,4914-4918.
37. Krueger A: New carbon materials: Biological applications of functionalized nanodiamond materials. *Chem.-Eur. J.* 2008, **14**,1382-1390.
38. Chang HC, Chen KW, Kwok S: Nanodiamond as a possible carrier of extended red emission. *Astrophys. J.* 2006, **639**,L63-L66.
39. Yu SJ, Kang MW, Chang HC, Chen KM, Yu YC: Bright fluorescent nanodiamonds: No photobleaching and low cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, **127**,17604-17605.
40. Chao J-I, Perevedentseva E, Chung P-H, Liu K-K, Cheng C-Y, Chang C-C,

- Cheng C-L: Nanometer-Sized Diamond Particle as a Probe for Biolabeling. 2007, **93**,2199-2208.
41. Fu CC, Lee HY, Chen K, Lim TS, Wu HY, Lin PK, Wei PK, Tsao PH, Chang HC, Fann W: Characterization and application of single fluorescent nanodiamonds as cellular biomarkers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007, **104**,727-732.
42. Amanda M. Schrand HH, Cataleya Carlson, John J. Schlager, Eiji Oh sawa,, Dai SMHaL: Are Diamond Nanoparticles Cytotoxic? 2007, **111**,2-7.
43. Glinka YD, Lin KW, Chang HC, Lin SH: Multiphoton-excited luminescence from diamond nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* 1999, **103**,4251-4263.
44. Chang CC, Chen PH, Chu HL, Lee TC, Chou CC, Chao JI, Su CY, Chen JS, Tsai JS, Tsai CM, et al.: Laser induced popcornlike conformational transition of nanodiamond as a nanoknife. *Appl. Phys. Lett.* 2008, **93**,3.
45. Huang SN, Liu C, Dai GP, Kim YR, Rosen BR: Manipulation of tissue contrast using contrast agents for enhanced MR microscopy in ex vivo mouse brain. *Neuroimage* 2009, **46**,589-599.
46. Burdette JH, Elster AD, Ricci PE: Acute cerebral infarction: Quantification of spin-density and T2 shine-through phenomena on diffusion-weighted MR images. *Radiology* 1999, **212**,333-339.
47. Konig CW, Trubenbach J, Fritz J, Lauer UM, Claussen CD, Pereira PL: Contrast enhanced MR-guided biopsy of hepatocellular carcinoma. *Abdom. Imaging* 2004, **29**,71-76.
48. Trivedi RA, Mallawarachi C, U-King-Im JM, Graves MJ, Horsley J, Goddard MJ, Brown A, Wang LQ, Kirkpatrick PJ, Brown J, et al.: Identifying inflamed carotid plaques using in vivo USPIO-enhanced MR imaging to label plaque macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006, **26**,1601-1606.
49. Zech SG, Eldredge HB, Lowe MP, Caravan P: Protein binding to lanthanide(III) complexes can reduce the water exchange rate at the lanthanide. *Inorg. Chem.* 2007, **46**,3576-3584.
50. Zhang EY, Shu CY, Feng L, Wang CR: Preparation and characterization of

- two new water-soluble endohedral metallofullerenes as magnetic resonance imaging contrast agents. *J. Phys. Chem. B* 2007, **111**,14223-14226.
51. Sitharaman B, Tran LA, Pham QP, Bolskar RD, Muthupillai R, Flamm SD, Mikos AG, Wilson LJ: Gadofullerenes as nanoscale magnetic labels for cellular MRI. *Contrast Media Mol. Imaging* 2007, **2**,139-146.
52. Cheng FY, Wang SPH, Su CH, Tsai TL, Wu PC, Shieh DB, Chen JH, Hsieh PCH, Yeh CS: Stabilizer-free poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for multimodal biomedical probes. *Biomaterials* 2008, **29**,2104-2112.
53. Shih-Peng T, Tsung-Han T, Wen-Jeng L, Dar-Bin S, Yi-Hua L, Hsin-Yi H, Zhang KYJ, Hsiang-Lin L, Chi-Kuang S: Optical biopsy of fixed human skin with backward-collected optical harmonics signals. *Opt. Express* 2005, **13**.
54. Tai SP, Wu Y, Shieh DB, Chen LJ, Lin KJ, Yu CH, Chu SW, Chang CH, Shi XY, Wen YC, et al.: Molecular imaging of cancer cells using plasmon-resonant-enhanced third-harmonic-generation in silver nanoparticles. *Adv. Mater.* 2007, **19**,4520-+.
55. Olsson E, Forsberg F: Three-dimensional selective imaging of sound sources. *Opt. Eng.* 2009, **48**,035801 (035808 pp.)-035801 (035808 pp.).
56. Esenaliev RO, Karabutov AA, Tittel FK, Fornage BD, Thomsen SL, Stelling C, Oraevsky AA: Laser optoacoustic imaging for breast cancer diagnostics: Limit of detection and comparison with X-ray and ultrasound imaging. In *Conference on Optical Tomography and Spectroscopy of Tissue - Theory, Instrumentation, Model, and Human Studies II Feb 09-12; San Jose, Ca*, Edited by Chance B, Alfano RR: Spie - Int Soc Optical Engineering: 1997:71-82.
57. Wang XD, Ku G, Wegiel MA, Bornhop DJ, Stoica G, Wang LHV: Noninvasive photoacoustic angiography of animal brains in vivo with near-infrared light and an optical contrast agent. *Opt. Lett.* 2004, **29**,730-732.
58. Larina IV, Larin KV, Esenaliev RO: Real-time optoacoustic monitoring of temperature in tissues. *J. Phys. D-Appl. Phys.* 2005, **38**,2633-2639.

59. Wang XD, Ku G, Xie XY, Wang YW, Stoica G, Wang LV: Non-invasive functional photoacoustic tomography of blood oxygen saturation in the brain. In *Conference on Photons Plus Ultrasound Jan 25-26; San Jose, CA*, Edited by Oraevsky AA, Wang LV: Spie-Int Soc Optical Engineering: 2004:69-76.
60. Petrova IY, Esenaliev RO, Petrov YY, Brecht HPE, Svensen CH, Olsson J, Deyo DJ, Prough DS: Optoacoustic monitoring of blood hemoglobin concentration: a pilot clinical study. *Opt. Lett.* 2005, **30**,1677-1679.
61. Xiang LZ, Xing D, Gu HM, Yang DW, Yang SH, Zeng LM, Chen WR: Real-time optoacoustic monitoring of vascular damage during photodynamic therapy treatment of tumor. *J. Biomed. Opt.* 2007, **12**,8.
62. Yang CY, Wei CW, Lin YP, Tseng HC, Wu YN, Chen CC, Shieh DB, Li PC: Applications of carbohydrate-gold nanoparticles for volumetric flow measurements using an opto-acoustic technique. *J. Chin. Chem. Soc.* 2008, **55**,103-108.
63. Daoud SS, Munson PJ, Reinhold W, Young L, Prabhu VV, Yu QA, LaRose J, Kohn KW, Weinstein JN, Pommier Y: Impact of p53 knockout and topotecan treatment on gene expression profiles in human colon carcinoma cells: A pharmacogenomic study. *Cancer Res.* 2003, **63**,2782-2793.
64. Kanerva A, Zinn KR, Chaudhuri TR, Lam JT, Suzuki K, Uil TG, Hakkarainen T, Bauerschmitz GJ, Wang MH, Liu B, et al.: Enhanced therapeutic efficacy for ovarian cancer with a serotype 3 receptor-targeted oncolytic adenovirus. *Mol. Ther.* 2003, **8**,449-458.
65. Tsai CM, Levitzki A, Wu LH, Chang KT, Cheng CC, Gazit A, Perng RP: Enhancement of chemosensitivity by tyrphostin AG825 in high-p185(neu) expressing non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* 1996, **56**,1068-1074.
66. Park CC, Zhang H, Paravicini M, Gray JW, Baehner F, Park CJ, Bissell MJ: beta(1) integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and in vivo. *Cancer Res.* 2006,

- 66,1526-1535.
67. Streit M, Detmar M: Angiogenesis, lymphangiogenesis, and melanoma metastasis. *Oncogene* 2003, **22**,3172-3179.
68. Tsai CM, Chang KT, Li L, Perng RP, Yang LY: Interrelationships between cellular nucleotide excision repair, cisplatin cytotoxicity, HER-2/neu gene expression, and epidermal growth factor receptor level in non-small cell lung cancer cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 2000, **91**,213-222.
69. Willett CG, Duda DG, Czito BG, Bendell JC, Clark JW, Jain RK: Targeted therapy in rectal cancer. *Oncology-NY* 2007, **21**,1055-1065.
70. Zhuang W, Prohofsky EW: HOT PHONON-INDUCED BOND BREAKING - APPLICATION TO THE ADVANCE OF A REPLICATING FORK IN DNA. *Phys. Rev. Lett.* 1993, **71**,2150-2153.
71. Eriksson JE: REGULATION OF APOPTOSIS IN THE FEMALE REPRODUCTIVE SYSTEM. 2002.
72. Allen RT, Hunter WJ, Agrawal DK: Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 1997, **37**,215-228.
73. Sidhu RS, Tuor UI, DelBigio MR: Nuclear condensation and fragmentation following cerebral hypoxia-ischemia occurs more frequently in immature than older rats. *Neurosci. Lett.* 1997, **223**,129-132.
74. Collins JA, Schandl CA, Young KK, Vesely J, Willingham MC: Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J. Histochem. Cytochem.* 1997, **45**,923-934.
75. Reed JC: Drug insight: cancer therapy strategies based on restoration of endogenous cell death mechanisms. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2006, **3**,388-398.
76. Reed JC, Doctor K, Rojas A, Zapata JM, Stehlik C, Fiorentino L, Damiano J, Roth W, Matsuzawa S, Newman R, et al.: Comparative analysis of apoptosis and inflammation genes of mice and humans. *Genome Res.* 2003, **13**,1376-1388.
77. Liu K-K, Wang C-C, Cheng C-L, Chao J-I: Endocytic carboxylated nanodiamond for the labeling and tracking of cell division and

- differentiation in cancer and stem cells. In Press, Corrected Proof.
78. Zhu T, Goh ELK, Graichen R, Ling L, Lobie PE: Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cell. Signal.* 2001, **13**,599-616.
 79. Kopchick JJ, Andry JM: Growth Hormone (GH), GH Receptor, and Signal Transduction. 2000, **71**,293-314.
 80. Lee LTO, Nong G, Chan YH, Tse DLY, Cheng CHK: Molecular cloning of a teleost growth hormone receptor and its functional interaction with human growth hormone. *Gene* 2001, **270**,121-129.
 81. Roch GJ, Wu S, Sherwood NM: Hormones and receptors in fish: Do duplicates matter? 2009, **161**,3-12.
 82. Chang C-C, Tsai C-T, Chang C-Y: Structural restoration of inactive recombinant fish growth hormones by chemical chaperonin and solvent restraint approaches. 2002, **15**,437-441.
 83. Houjin H, Pierstorff E, Osawa E, Ho D: Protein-mediated assembly of nanodiamond hydrogels into a biocompatible and biofunctional multilayer nanofilm. *ACS Nano* 2008, **2**,203-212.
 84. Houjin H, Pierstorff E, Osawa E, Ho D: Active nanodiamond hydrogels for chemotherapeutic delivery. *Nano Lett.* 2007, **7**,3305-3314.
 85. Liu KK, Cheng CL, Chang CC, Chao JI: Biocompatible and detectable carboxylated nanodiamond on human cell. *Nanotechnology* 2007, **18**,10.
 86. Cheng CY, Perevedentseva E, Tu JS, Chung PH, Cheng CL, Liu KK, Chao JI, Chen PH, Chang CC: Direct and in vitro observation of growth hormone receptor molecules in A549 human lung epithelial cells by nanodiamond labeling. *Appl. Phys. Lett.* 2007, **90**,3.
 87. Saxena A, Jacobson J, Yamanashi W, Scherlag B, Lamberth J, Saxena B: A hypothetical mathematical construct explaining the mechanism of biological amplification in an experimental model utilizing picoTesla (PT) electromagnetic fields. *Med. Hypotheses* 2003, **60**,821-839.
 88. Gao Y, Prohofsky EW: A MODIFIED SELF-CONSISTENT PHONON THEORY OF HYDROGEN-BOND MELTING. *J. Chem. Phys.* 1984, **80**,2242-2243.
 89. Gao SW: Quantum kinetic theory of vibrational heating and bond breaking

- by hot electrons. *Phys. Rev. B* 1997, **55**,1876-1886.
90. Chang C-C, Yeh X-C, Lee H-T, Lin P-Y, Kan L-S: Refolding of lysozyme by quasistatic and direct dilution reaction paths: A first-order-like state transition. 2004, **70**,011904.
91. Chang CC, Su YC, Cheng MS, Kan LS: Protein folding by a quasi-static-like process: A first-order state transition. *Phys. Rev. E* 2002, **66**,8.
92. Poniewierski A, Holyst R, Price AC, Sorensen LB, Kevan SD, Toner J: Dynamic correlation functions for finite and infinite smectic-A systems: Theory and experiment. *Phys. Rev. E* 1998, **58**,2027-2040.
93. Kim S, Kim CA, Choi YH, Jung MY: Synthesis of Polystyrene Nanoparticles with Different Surface Modification by Emulsion Polymerization and Measurement of IgG Adsorption and Stability for the Application in Latex-Protein Complex Based Solid-Phase Immunoassay. 2009, **62**,23-32.
94. Promega c: CellTiter 96 aqueous one soluteion cell prolifxeration assay.
95. Grabarek Z, Gergely J: ZERO-LENGTH CROSSLINKING PROCEDURE WITH THE USE OF ACTIVE ESTERS. *Anal. Biochem.* 1990, **185**,131-135.
96. amaxa: Optimized Protocol for A549 cell line.7.
97. 陳家全、李家維、楊瑞森：生物電子顯微鏡學。1991。
98. Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maisse C, Daugas E, Zamzami N, Mak T, Jaattela M, Penninger JM, Garrido C, et al.: Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat. Cell Biol.* 2001, **3**,839-843.
99. Cande C, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzami N, Kroemer G: Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. **84**,215-222.
100. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, et al.: Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999, **397**,441-446.

101. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CYJ, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HYM, Ravagnan L, et al.: Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 2001, **410**,549-554.
102. Yu SW, Wang HM, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL: Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 2002, **297**,259-263.
103. Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu SW, Dawson TM, Dawson VL, Park DS, Kroemer G, et al.: Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J. Cell Biol.* 2002, **158**,507-517.
104. Ahn HJ, Kim YS, Kim JU, Han SM, Shin JW, Yang HO: Mechanism of taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian carcinoma cells. *J. Cell. Biochem.* 2004, **91**,1043-1052.
105. BurkeGaffney A, Hellewell PG: Tumour necrosis factor-alpha-induced ICAM-1 expression in human vascular endothelial and lung epithelial cells: Modulation by tyrosine kinase inhibitors. *Br. J. Pharmacol.* 1996, **119**,1149-1158.
106. Babbar N, Hacker A, Huang Y, Casero RA: Tumor necrosis factor alpha induces spermidine/spermine N-1-acetyltransferase through nuclear factor kappa B in non-small cell lung cancer cells. *J. Biol. Chem.* 2006, **281**,24182-24192.
107. Jones CJP, Hartmann M, Blaschitz A, Desoye G:
ULTRASTRUCTURAL-LOCALIZATION OF INSULIN-RECEPTORS IN HUMAN PLACENTA. In *40th Annual Meeting of the Society-for-Gynecologic-Investigation Mar 31-Apr 03; Toronto, Canada*: Munksgaard Int Publ Ltd: 1993:136-145.
108. Ilvesmaki V, Kahri AI, Miettinen PJ, Voutilainen R: INSULIN-LIKE GROWTH-FACTORS (IGFS) AND THEIR RECEPTORS IN ADRENAL-TUMORS - HIGH IGF-II EXPRESSION IN FUNCTIONAL ADRENOCORTICAL CARCINOMAS. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1993,

77,852-858.

109. Reubi JC, Waser B, Vale W, Rivier J: Expression of CRF1 and CRF2 receptors in human cancers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003, **88**,3312-3320.
110. Florio P, Franchini A, Reis FM, Pezzani I, Ottaviani E, Petraglia F: Human placenta, chorion, amnion and decidua express different variants of corticotropin-releasing factor receptor messenger RNA. *Placenta* 2000, **21**,32-37.
111. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A: Timeline - The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2004, **4**,361-370.
112. Maruo T, Matsuo H, Otani T, Mochizuki M: Role of epidermal growth factor (EGF) and its receptor in the development of the human placenta. In *1st International Meeting of World Placenta Associations Oct 24-28; Sydney, Australia: C S I R O Publications: 1994:1465-1470.*
113. Hynes NE, Lane HA: ERBB receptors and cancer: The complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* 2005, **5**,341-354.
114. Resnick MB, Routhier J, Konkin T, Sabo E, Pricolo VE: Epidermal growth factor receptor, c-MET, beta-catenin, and p53 expression as prognostic indicators in stage II colon cancer: A tissue microarray study. *Clin. Cancer Res.* 2004, **10**,3069-3075.
115. Hu WG, Liu T, Xiong JX, Wang CY: Blockade of sonic hedgehog signal pathway enhances antiproliferative effect of EGFR inhibitor in pancreatic cancer cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 2007, **28**,1224-1230.
116. Kauma S, Hayes N, Weatherford S: The differential expression of hepatocyte growth factor and Met in human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997, **82**,949-954.
117. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF: Met, metastasis, motility and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003, **4**,915-925.
118. Han SU, Lee HY, Lee JH, Kim WH, Nam H, Kim H, Cho YK, Kim MW, Lee KU: Modulation of E-cadherin by hepatocyte growth factor induces aggressiveness of gastric carcinoma. *Ann. Surg.* 2005, **242**,676-683.

119. Benyo DF, Conrad KP: Expression of the erythropoietin receptor by trophoblast cells in the human placenta. *Biol. Reprod.* 1999, **60**,861-870.
120. Acs G, Zhang PJ, Rebbeck TR, Acs P, Verma A: Immunohistochemical expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in breast carcinoma. *Cancer* 2002, **95**,969-981.
121. Meunier-Carpentier S, Dales JP, Djemli A, Garcia S, Bonnier P, Andrac-Meyer L, Lavaut MN, Allasia C, Charpin C: Comparison of the prognosis indication of VEGFR-1 and VEGFR-2 and Tie2 receptor expression in breast carcinoma. *Int. J. Oncol.* 2005, **26**,977-984.
122. Tseng JJ, Chou MM, Hsieh YT, Wen MC, Ho ESC, Hsu SL: Differential expression of vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in placentae from pregnancies complicated by placenta accreta. *Placenta* 2006, **27**,70-78.
123. Rivas CI, Vera JC, Delgado-Lopez F, Heaney ML, Guaiquil VH, Zhang RH, Scher HI, Concha, II, Nualart F, Cordon-Cardo C, et al.: Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptors in human prostate cancer. *Blood* 1998, **91**,1037-1043.
124. Abdelrahim M, Baker CH, Abbruzzese JL, Sheikh-Hamad D, Liu SX, Cho SD, Yoon K, Safe S: Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-1 expression by specificity proteins 1, 3, and 4 in pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 2007, **67**,3286-3294.
125. Jokhi PP, King A, Jubinsky PT, Loke YW: DEMONSTRATION OF THE LOW-AFFINITY ALPHA-SUBUNIT OF THE GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR-RECEPTOR (GM-CSF-R-ALPHA) ON HUMAN TROPHOBLAST AND UTERINE CELLS. *J. Reprod. Immunol.* 1994, **26**,147-164.
126. Yang X, Liu F, Xu Z, Chen C, Wu X, Li G, Li J: Expression of granulocyte colony stimulating factor receptor in human colorectal cancer. *Postgrad. Med. J.* 2005, **81**,333-337.
127. McCracken SA, Grant KE, MacKenzie IZ, Redman CWG, Mardon HJ: Gestational regulation of granulocyte-colony stimulating factor receptor

- expression in the human placenta. *Biol. Reprod.* 1999, **60**,790-796.
128. Fulop V, Mok SC, Genest DR, Szigetvari I, Cseh I, Berkowitz RS: c-myc, c-erbB-2, c-fms and bcl-2 oncoproteins - Expression in normal placenta, partial and complete mole, and choriocarcinoma. *J. Reprod. Med.* 1998, **43**,101-110.
129. Jokhi PP, Chumbley G, King A, Gardner L, Loke YW: EXPRESSION OF THE COLONY STIMULATING FACTOR-I RECEPTOR (C-FMS PRODUCT) BY CELLS AT THE HUMAN UTEROPLACENTAL INTERFACE. *Lab. Invest.* 1993, **68**,308-320.
130. Gurski MR, Gonzalez E, Brown EG: Immunochemical localization of platelet-derived growth factor in placenta and its possible role in pre-eclampsia. *J. Invest. Med.* 1999, **47**,128-133.
131. Sugihara A, Maeda O, Tsuji M, Tsujimura T, Nakata Y, Akedo H, Kotake T, Terada N: Expression of cytokines enhancing the osteoclast activity, and parathyroid hormone-related protein in prostatic cancers before and after endocrine therapy: An immunohistochemical study. *Oncol. Rep.* 1998, **5**,1389-1394.
132. Sapi E: The role of CSF-1 in normal physiology of mammary gland and breast cancer: An update. *Exp. Biol. Med.* 2004, **229**,1-11.
133. Smith HO, Anderson PS, Kuo DYS, Goldberg GL, Devictoria CL, Boocock CA, Jones JG, Runowicz CD, Stanley ER, Pollard JW: THE ROLE OF COLONY-STIMULATING FACTOR-1 AND ITS RECEPTOR IN THE ETIOPATHOGENESIS OF ENDOMETRIAL ADENOCARCINOMA. *Clin. Cancer Res.* 1995, **1**,313-325.
134. Nixon T, Green H: PROPERTIES OF GROWTH-HORMONE RECEPTORS IN RELATION TO THE ADIPOSE CONVERSION OF 3T3-CELLS. *J. Cell. Physiol.* 1983, **115**,291-296.
135. Carvalho I, Milanezi F, Martins A, Reis RM, Schmitt F: Overexpression of platelet-derived growth factor receptor a in breast cancer is associated with tumour progression. *Breast Cancer Res.* 2005, **7**,R788-R795.
136. Zou LL, Burmeister LA, Sperling MA: Isolation of a liver-specific promoter for human growth hormone receptor gene. *Endocrinology* 1997,

- 138**,1771-1774.
137. de Mello-Coelho V, Gagnerault MC, Souberbielle JC, Strasburger CJ, Savino W, Dardenne M, Postel-Vinay MC: Growth hormone and its receptor are expressed in human thymic cells. *Endocrinology* 1998, **139**,3837-3842.
138. Huang E, Cheng SH, Dressman H, Pittman J, Tsou MH, Horng CF, Bild A, Iversen ES, Liao M, Chen CM, et al.: Gene expression predictors of breast cancer outcomes. *Lancet* 2003, **361**,1590-1596.
139. Dy DY, Whitehead RH, Morris DL: SMS-201.995 INHIBITS INVITRO AND INVIVO GROWTH OF HUMAN COLON CANCER. *Cancer Res.* 1992, **52**,917-923.
140. Wagner K, Hemminki K, Grzybowska E, Bermejo JL, Butkiewicz D, Pamula J, Pekala W, Forsti A: Polymorphisms in the growth hormone receptor: A case-control study in breast cancer. *Int. J. Cancer* 2006, **118**,2903-2906.
141. Ginarte A, Garcia-Caballero T, Fernandez-Redondo V, Beiras A, Toribio J: Expression of growth hormone receptor in benign and malignant cutaneous proliferative entities. *J. Cutan. Pathol.* 2000, **27**,276-282.
142. Kong XL, Huang LCL, Hsu CM, Chen WH, Han CC, Chang HC: High-affinity capture of proteins by diamond nanoparticles for mass spectrometric analysis. *Anal. Chem.* 2005, **77**,259-265.
143. Chan ECY, Ho PC: Preparation and characterization of immunogens for antibody production against metanephrine and normetanephrine. 2002, **266**,143-154.
144. Roche AS: Cell Proliferation Kit I (MTT).