

國立交通大學

生物科技學系研究所

碩士論文

開發多功能性磁性奈米粒子用於胰臟癌的早期
診斷

Development of multifunctional magnetic
nanoparticles for specific and early diagnosis of
pancreatic cancer

研究生：林昆諒

指導教授：王雲銘 教授

中華民國一百年八月

開發多功能性磁性奈米粒子用於胰臟癌的早期診斷

Development of multifunctional magnetic nanoparticles for specific
and early diagnosis of pancreatic cancer

研究生：林昆諒

Student：Kun Liang, Lin

指導教授：王雲銘 教授

Advisor：Yun Ming, Wang

國立交通大學

生物科技學系

碩士論文

A Thesis Submitted to Department of Bioscience and Technology College of National Chiao
Tung University in partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master
in

Bioscience and Technology

August 2011

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國一百年八月

開發多功能性磁性奈米粒子用於胰臟癌的早期診斷

學生：林昆諒

指導教授：王雲銘

中文摘要

本文研究的目的是為設計功能性的磁性奈米粒子應用於光學與磁振造影雙功能的對比劑，而我們將利用 MnMEIO-NH₂-mPEG 同樣修飾上 MUC4 之抗體，作為偵測胰臟癌細胞表面上的 MUC4 蛋白。本文研究奈中已經成功設計新型的高分子聚合物 mPEG-NH₂-silane 修飾到奈米粒子表面，其共軛胺基會在奈米內側形成而不會裸露在外，此時會降低非特異性的吸附或是鍵結，然而為了讓奈米粒子更接近電中性，利用半胱胺酸遮蔽內側胺基，使電性中和。動態光散射儀顯示，MnMEIO 鍵結 MUC4 抗體可使水合直徑由 $39.3 \pm 2.2 \text{ nm}$ 增加至 $55.9 \pm 5.6 \text{ nm}$ 。MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG 在 20 MHz， $37.0 \pm 0.1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下的 r_1 及 r_2 弛緩率分別為 35.7 ± 1.5 和 $216.1 \pm 4.4 \text{ mM}^{-1}\text{S}^{-1}$ ，在 MRI 體外顯影上針對表面 MUC4 蛋白之細胞株獲得很好的對比影像。因此，本文研究已成功設計出用於胰臟癌的高度專一性的功能性磁性奈米粒子，可用於胰臟癌的早期診斷。

Development of multifunctional magnetic nanoparticles for specific and early diagnosis of pancreatic cancer

Student : Kun Liang, Lin

Advisor : Yun-Ming, Wang

Abstract

Novel aspect of nanotechnology and biotechnology has been extensively exploited to develop multimodal contrast agent for cancer detection. We have developed highly specific dual modality T_2 weighted MR-optical imaging agents (MnMEIO-antiMUC4-Cy777-mPEG NPs) for early detection of pancreatic cancer. A novel PEG derivative, methoxypoly(ethylene glycol)-ethylamine-silane (mPEG-NH₂-silane), was strategically designed and synthesized such that amine group of NPs remain buried deep inside the entangled mPEG chains. Furthermore, in order to achieve nearly neutral surface charge of MnMEIO NPs, nonconjugated passively masked NH₂ was further blocked by cysteine. Dynamic light-scattering (DLS) measurements revealed that the mPEG-NH₂-silane coated MnMEIO NPs has a relatively narrow size distribution with mean size of 39.3 ± 2.2 nm which was increased 55.9 ± 5.6 nm upon conjugating anti-MUC4 mAb, and Cy777. The relaxivity values (r_1 and r_2) of the MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG NPs measured at 20 MHz and 37.0 ± 0.1 °C are 35.7 ± 1.5 and 216.1 ± 4.4 mM⁻¹s⁻¹, respectively. In vitro MR image shows significant contrast enhancement in MUC4 positive cell line. Therefore, we believe the highly sensitive and specific MnMEIO-antiMUC4-Cy777 NPs introduced in the present thesis could potentially be used for early detection of pancreatic cancer.

誌謝

驪歌響起，鳳凰花紛飛，記憶的碩士生涯已畫下句點。回首過去的種種，全都歷歷在目，艱辛而充滿挑戰的研究過程，充滿著未知且疑問的枷鎖，非得找出那初淺的基礎邏輯才能把深層的概念給釐清貫通，研究的目的是在於解釋實驗的矛盾之處，並把正確的實驗法則鉅細靡遺的排列出來，最後才可以發現原來實驗也有迷人之處，並可激起研究的熱忱。

感謝王老師在實驗室提供研究環境，並感謝光美、存洧、彥豪和山雞學長姐在實驗上的鼓舞與解答，也感謝宗憲、英姪和善淳在我不想吃飯時候還極力邀請我去吃爭鮮，更重要的是參加各項論文研究、學術研討會以及發表論文演說所產生的革命情感；再感謝宗倫、淳珊以及心平學弟妹帶給實驗室頑皮的氣氛，最後感謝新進碩一新生的學習與幫助，讓我能給予他們指導與教誨；特別感謝已經畢業的彥勳還有辛加安在實驗上給予的協助與參與，並討論出許多的實驗盲點，尤其是在夜晚的酒精暢談更能了解原來乙醇能帶給研究樂趣。

最後感謝我的家人以及在背後支持我的朋友，沒有你們相信在研究以外的生活也會暗淡無味，結束了碩二的生涯，轉往下一個旅程，挑戰的路將再繼續。

目錄

中文摘要.....	I
Abstract.....	II
誌謝.....	III
表目錄.....	VII
圖目錄.....	VIII
一、緒論.....	1
1-1 MRI 技術演進.....	1
1-2 磁性奈米粒子(Magnetic nanoparticles).....	5
1-3 磁性奈米粒子的合成.....	6
1-4 化學共沉澱法製備氧化鐵奈米粒子.....	6
1-5 高溫裂解方式製備超順磁氧化鐵奈米粒子.....	7
1-6 生物相容性聚合物-聚乙二醇(Polyethylene Glycol, PEG).....	8
1-7 胰臟癌標定蛋白-黏蛋白.....	10
二、研究動機與目的.....	12
三、實驗儀器與試藥.....	13
四、實驗步驟及方法.....	17
4-1 超順磁氧化鐵奈米粒子參雜錳(MnMEIO)之製備與合成(5).....	17
4-2 mPEG-acrylate (mPEG-Ac)之合成(1).....	18
4-3 N-acryl-(3-aminopropyl)triethoxy silane (APTES-Ac)之合成(2).....	18
4-4 N,N'-APTES -N-Boc(ethylenediamine)-mPEG (mPEG-NBoc-silane)之合成(3).....	19
4-5 N,N'-APTES -N-Boc(ethylenediamine)-mPEG(mPEG-NBoc-silane)的水解 (N,N'-APTES-ethylamine-mPEG) (4).....	19
4-6 近紅外光螢光團 CyTE777 之合成(7).....	20
4-7 近紅外光螢光團 CyTE777-NHS ester 之合成(8).....	21
4-8 NSMP (N-succinimidyl-3-maleimidopropionate) linker 之合成(10).....	22
4-9 超順磁氧化鐵-錳奈米粒子(MnMEIO)表面修飾 PEG 聚分子(6).....	23

4-10 水溶性超順磁氧化鐵-錳奈米粒子之表面胺基測定.....	24
4-11 近紅外光螢光基團鍵結至磁性奈米粒子上 MnMEIO(NH ₂)-Cy777-mPEG 之合成(9)...	25
4-12 MnMEIO-linker-Cy777-mPEG 之合成(11).....	25
4-13 Anti-MUC4 抗體修飾硫基之合成	26
4-14 Anti-MUC4 抗體鍵結至超順磁氧化鐵-錳奈米粒子之合成	27
4-14.1 實驗組 MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG	27
4-14.2 對照組 MnMEIO-Cys-Cy777-mPEG.....	28
4-15 穿透式電子顯微鏡(TEM)之鑑定	28
4-16 X 光能量分散光譜(Energy Dispersive Spectroscopy, EDS)之磁性奈米粒子內部元素鑑定	28
4-17 超導量子干涉磁量儀(SQUID)磁性之測定	29
4-18 X 繞射光譜儀 (power X-ray diffraction, XRD)之晶體鑑定	29
4-19 核磁共振光譜儀(NMR)之鑑定	30
4-20 傅利葉轉換紅外線光譜儀(FT - IR)鑑定	30
4-21 動態光散射儀(Dynamic Light Scattering, DLS)測定	31
4-22 表面電位(zeta potential)測定.....	31
4-23 縱向弛緩率(r_1)及橫向弛緩率(r_2)之測定	32
4-24 蛋白質定量檢測 (BSA assay).....	32
4-25 細胞培養.....	33
4-26 流式細胞儀(Flow cytometry)測定	33
4-27 體外(In vitro) MRI 細胞造影	34
五、結果與討論	36
5-1 磁性奈米粒子內部結構與其物、化性探討	36
5-1.1 Energy-dispersive spectrometer (EDS)鑑定	36
5-1.2 超順磁氧化鐵-錳奈米粒子之晶體結構.....	36
5-1.3 TEM 之奈米粒子大小測定	37
5-1.4 超導量子干涉儀(SQUID)之磁性分析	37

5-1.5 FTIR (Fouries tranform infrared, FTIR)分析磁性奈米氧化鐵表面特定官能基之吸收振動 頻率分析	37
5-1.6 縱向弛緩率(r_1)及橫向弛緩率(r_2)之分析	38
5-1.7 超順磁氧化鐵-錳奈米粒子表面電價與 pH 變化之分析	39
5-1.8 pH 值對超順磁氧化鐵-錳奈米粒子穩定性的探討	40
5-2.1 流式細胞儀對磁性奈米粒子上的抗體其專一性功能進行分析	40
5-2.2 體外(In vitro) MRI 造影實驗之探討	41
六、結論	43
七、參考文獻	44
表目錄	48
圖目錄	51



表目錄

表一、傅立葉轉換紅外光光譜儀分析 MnMEIO/oleic acid/oleylamine(5), mPEG-NH ₂ -silane(4), and MnMEIO(NH ₂)-mPEG(6)°.....	48
表二、MnMEIO(NH ₂)-mPEG、MnMEIO-linker-Cy777-mPEG、MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG、MnMEIO-Cys-Cy777-mPEG 之水合直徑與弛緩率之分析。.....	49
表三、表面電位對 MnMEIO(NH ₂)-mPEG、MnMEIO-linker-Cy777-mPEG、MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG、MnMEIO-Cys-Cy777-mPEG 之測定，其偵測濃度控制在 25.0 ± 0.1 °C 下，樣品濃度為 1 mg/mL。.....	50



圖目錄

圖一、核磁共振造影之技術演進。.....	51
圖二、針對不同的胰臟癌細胞，利用西方點墨法判別不同程度的 MUC4 表現量。.....	52
圖三、MnMEIO-linker-Cy777-mPEG 合成流程圖。.....	53
圖四、APTES-Ac 之 ^1H -NMR 光譜圖。.....	54
圖五、mPEG-Ac 之 ^1H -NMR 光譜圖。.....	55
圖六、mPEG-NBoc-silane 之 ^1H -NMR 光譜圖。.....	56
圖七、mPEG-NH ₂ -silane 之 ^1H -NMR 光譜圖。.....	57
圖八、NSMP 之 ^1H -NMR 光譜圖。.....	58
圖九、超順磁氧化鐵-錳奈米粒子之 TEM 影像，平均粒徑為 $8.8 \pm 0.8 \text{ nm}$ ， 焦距(A) 200,000 倍率；(B)500,000 倍率。.....	59
圖十、室溫下超順磁氧化鐵-錳奈米粒子之磁性分佈圖(A)飽和磁化率 = 101 emu/g；(B)矯頑磁力 $\sim 10.1 \text{ Oe}$ 。.....	59
圖十一、超順磁氧化鐵-錳之 EDS 元素分析，(A)疏水性超順磁裸核氧化鐵- 錳奈米粒子；(B)親水性超順磁氧化鐵-錳奈米粒子。.....	60
圖十二、超順磁氧化鐵-錳奈米粒子之 XRD 繞射分析。.....	61
圖十三、FT-IR 光譜分析 (A) MnMEIO/oleic acid/oleylamine；(B) mPEG-NH ₂ -silane；(C) MnMEIO(NH ₂)-mPEG。.....	62

圖十四、超順磁氧化鐵-錳表面電價與 pH 變化之分析圖，(◆)	
MnMEIO(NH ₂)-mPEG 及(■) MnMEIO-linker-Cy777-mPEG。	63
圖十五、pH 值對超順磁氧化鐵-錳奈米粒子(◆)MnMEIO(NH ₂)-mPEG 及(■)	
MnMEIO-linker-Cy777-mPEG 穩定性的探討。	64
圖十六、超順磁氧化鐵-錳奈米粒子針對細胞株表面蛋白(MUC4)專一性作分	
析，(A) HPAC (positive); (B) BxPC-3 (positive) ; (C) Panc 1 (negative)。(C：	
control；P：MnMEIO-Cys-Cy777-mPEG；PA：	
MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG)。	65
圖十七、磁性奈米粒子鐵離子濃度(MnMEIO-Cys-Cy777-mPEG、	
MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG 及 Resovist™)之磁振造影訊號圖。	65
圖十八、磁性奈米粒子鐵離子濃度(◆)MnMEIO-Cys-Cy777-mPEG；(■)	
MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG；(▲) Resovist™)之磁振造影訊號分析圖。	66
圖十九、MUC4 高表現之細胞株(HPAC、BxPC-3)與 MUC4 低表現之細胞株	
(Panc 1)，由實驗組 MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG 與對照組	
MnMEIO-Cys-Cy777-mPEG 反應之體外(In vitro) 磁振造影影像。	67
圖二十、MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG、MnMEIO-Cys-Cy777-mPEG 體外(In	
vitro)磁振造影之影像訊號分析。	68

一、緒論

1-1 MRI 技術演進

自古以來，不藉由手術的方式，而能夠探視人體內的器官與組織架構，一直是醫師的夢想。為了瞭解藥物在人體內的循環與治療效果，醫學診斷的成像模式已經快速且有目的性的擴展，舉例來說，目前現有用來診斷人體內部的功能性成像系統有：X射線(X-ray)、電腦斷層掃描(computed tomography, CT)、正子斷層造影(positron emission tomography, PET)、單光子發射電腦斷層掃描(single-photon emission computed tomography, SPECT)、超音波影像(ultrasound)和核磁共振造影(magnetic resonance imaging, MRI)^[1]，每個系統都依據其物理原理創造出成像資訊，但有各其優缺點^[2]。在電腦斷層掃描(CT)裡，利用單一軸面的X射線旋轉照射人體，根據不同密度的人體組織對X射線的吸收度不同，如骨骼阻擋了大部分的X射線，而軟組織及體液則沒有，最後以電腦的運算技術重建三維的影像訊號，把斷層影像堆疊累加形成立體影像。進行正子斷層造影(PET)掃描時，會使用半衰期較短的放射性同位素追蹤劑(如氟化去氧葡萄糖fluorodeoxyglucose, FDG，其放射性同位素為氟-18，常用於腫瘤成像)，將其注入血液中時，衰變的過程會放出正電子(β 衰變)，正電子將會與生物體內的一個電子結合，產生幾乎相反方向的光子，當光子遇到偵測器內的閃爍晶體時會形成光點，隨即被光敏感

的光電倍增管或是光電二極體所探測到，因此當放射性同位素進入人體後，須使其進入分子生物的代謝系統中，並集中於感興趣的腫瘤或是器官，進而得到活體成像。單光子發射電腦斷層掃描(SPECT)的基本原理與正子斷層造影(PET)相似，但其偵測訊號為放射性同位素衰變所產生的伽瑪射線，使用2D鏡頭獲得多個視角，然後利用層析重建算法獲得3D的影像數據，與正子斷層造影(PET)相同的缺點為空間的解析度上有不足。超聲波造影(ultrasound)適用於高於人耳聽力的20千赫，典型的掃描儀器操作採用的範圍為2至13兆赫的超聲波，利用頻率穿透人體進行圖像的空間解析度(例如，較低頻率會給予較低的空間解析度但更大的成像深度)。現有超聲波造影劑製成的微泡可注入人體，這些微泡有高度的迴聲並可以結合抗體鍵結到血管內的受體，因此影像的對比是經由微泡迴聲而偵測出周圍組織間的差異性。空間解析度最好的非核磁共振造影(MRI)莫屬，相較於低解析度的電腦斷層掃描以及超聲波，磁共振造影提供50微米的空間解析度，因此，顯微電腦斷層掃描(micro-CT)以及顯微超聲波(micro-US)也將踏入臨床應的與開發的階段。比起其他成像技術而言，超聲波是觀測較小目標的理想方法，但針對組織中較小的患部的變異處卻顯得不足，其原因為偵測小部位的能量訊號會彼此覆蓋而造成影像訊號的流失^[3]。而另外正子斷層造影(PET)和單光子發射電腦斷層掃描(SPECT)有著極佳的偵測靈敏度以及生物體內三維的空間資訊^[4,5]，雖然可以提供疾病的發病過程以及生理代謝活動的機制^[6,7]，

但放射性的同位素對人體造成的額外副作用也不能忽視。

磁振造影(MRI)是目前臨床醫學最安全的掃描儀器，由強大的磁場控制著氫原子的內在磁場，並產生訊號的增減差異性，用來偵測人體內水分子在不同組織與器官分布的情形^[8-10]，值得注意的是，其原理為利用核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)與氫原子內核自旋間所產生的交互作用而得到MRI訊號的成像技術^[1,11]。因此，像是應用於體內快速流動的血液之功能性磁振造影(fMRI)^[1,11,12]，其功能可偵測腦內不同磁性的含氧或脫氧紅血球蛋白，進而得知局部腦血容量或是血栓疾病等特徵^[13]，除此之外磁振造影也可提供血液流速的技術，稱之為核磁共振血管造影(magnetic resonance angiography, MRA)，其原理為血液通過毛細管時，透過動脈自旋標記和動態訊號增強的核磁造影技術可以追蹤血液在組織分布的情形^[1]，值得注意的是，為了收集更好的量測訊號，需要更好的無線電頻率輔助，才可架構更好的立體形象^[14-16]。核磁造影技術有其獨特的潛力，比較其他可用的檢測方式，核磁共振造影探討體內水分子的擴散(即分子隨機運動模式)，能夠帶給病人方便以及非侵入性的診斷結果^[17-22]。核磁共振造影的演進與其新的進展如圖一所示^[23-29]。現在多模組功能的成像技術開始發展，提供不同的影像解析層級，如：CT/PET, CT/SPECT和MRI/PET等例子的組合。另一種核磁共振造影與光學成像的方式也還在試驗動物的階段。可在體內循環的氧化鐵奈米粒子(magnetic iron oxide

nanoparticles, MION)，其奈米粒子能擴散至淋巴結，因此被用於標記近紅外光螢光物質(near-infrared fluorescence, NIRF)，並可應用於光學造影的螢光探針^[30]，也可在奈米表面修飾胜肽或是生物標的蛋白(如：腫瘤相關蛋白酶)，使得腫瘤相對應的組織環境有奈米粒子的沉積，藉此提高局部螢光訊號^[30]。然而，螢光在體內的偵測有時需要藉由手術或是侵入性的方式來獲取光學資訊，因為深部組織不適用於螢光成像方法，主要在於血液中的血球蛋白及血漿會吸收600波長內的螢光放射波長，因此考慮以近紅外光的螢光放射波長可大大降低背景訊號的干擾。近期研究已有將螢光物質藉由靜脈注射的方是注射入老鼠體內，並觀測骨髓細胞分化成骨頭的過程^[31,32]。除此之外，導管型的光學成像也被利用於人類冠狀動脈的量測，藉由導管方射超聲波與反射紅外光的方式進行測量，此種新穎的技術稱為光學相干斷層掃描(optical coherence tomography, OCT)^[33,34]，這是使用光對生物組織進行高分辨橫截面成像的新的影像學檢查方法，其中的顯微光學成像技術可結合可見光、螢光、共軛焦與雙光子顯微鏡。

在奈米技術發展的過去20年來，由於核磁造影技術的日漸普及，新型的磁性奈米粒子相對應的開發中，導致生物醫學在奈米粒子應用於磁振造影的熱潮開始展開，包括治療與診斷的應(theragnostics)如：熱療^[35,36]、幹細胞追蹤^[37-39]、基因表現^[40-44]、血管生成^[43-46]、癌症檢測^[47-49]、炎症^[50-52]、細胞凋亡檢測^[53-55]和動脈硬化^[56,57]。

1-2 磁性奈米粒子(Magnetic nanoparticles)

在過去的十年中，合成超順磁氧化鐵奈米粒子已經發展快速，不僅提高科學在醫學上的效益，也包含了許多技術的應用，其中包含著磁性物質的載體的應用，如：生物感測器^[58]、醫療應用、標靶藥物^[59,60]、核磁共振造影對比劑和磁性噴墨等應用價值。能控制粒子分散在溶液中並保持顆粒性的一致與均勻性是非常重要的議題，因為功能性的奈米晶體很大的效益取決在於奈米粒子的尺寸。要了解磁力線體的行為並提高應用程序與發開價值，並須認真看待相關流體的穩定性，控制表面活性劑、顆粒的大小、材料以及物理行為是不可或缺的一環。

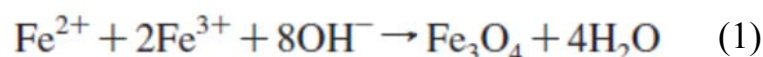
超順磁氧化鐵奈米粒子具有適當的表面化學結構可用於多種組織與活體應用，如：核磁共振造影的對比強度提升、組織修復的情形、免疫學、解毒過程中的生物內分泌動向、藥物輸送和細胞分化^[61]。所有的醫學應用必須要求這些磁性奈米粒子需要較高的磁化率，而且須小於100奈米層次並顆粒分明，其中還包括了磁性奈米粒子的表面塗層須無毒害，且生物相容性高，當然這些磁性奈米粒子也要具備有穩定的特異性鍵結能力(如針對腫瘤受體的抗體功能)。這些結合蛋白質、藥物、酵素與抗體的奈米粒子可用於組織的追蹤，或是在核磁共振造影下具有增加器官對比性的特徵^[62]。因此，在本論文綜述中將介紹如何得到一個超順磁氧化鐵奈米粒子。

1-3 磁性奈米粒子的合成

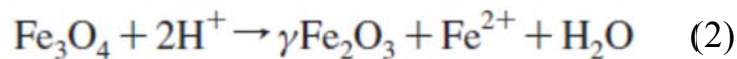
許多化學方式可用於合成磁性奈米粒子應用於醫療成像系統，如微乳膠液法、溶膠-凝膠聚合法(so-gel)、超聲波化學法、水熱反應、水解和熱解法、注入式合成法以及電解法。超順磁氧化鐵的合成是非常複雜的過程，因為主要是膠體性質，並須注意幾項規則：(1)確定反應過程中粒子分布情形。(2)合成過程是可重複的反應，而且可以工業化並沒有任何複雜的純化過程。如：超速離心篩選、體積管柱層析篩選或是磁過濾法。然而，最常見合成磁性奈米粒子的方法為化學共沉澱技術。

1-4 化學共沉澱法製備氧化鐵奈米粒子

在共沉澱法技術中，為最簡單且最有效率的化學合成途徑用來製備鐵的氧化物(Fe_3O_4 或 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)，通常準備由化學劑量算出的鐵和鐵鹽類在水中進行反應，四氧化三鐵的反應式(1)如下：



根據熱力學的反應，要完成此反應必須使pH值維持在8到14間，以化學劑量來看鐵三價和鐵兩價的比例須為2：1，而且反應過程中必須保持在無氧的環境下攪拌，不過由於四氧化三鐵不是在空氣下不是很穩定，容易被氧化，因此自然界中的磁鐵礦(Fe_3O_4)接觸氧氣的環境下容易氧化成赤鐵礦($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)，其反應式(2)如下：



共沉澱法的主要優勢為可生產大量的奈米粒子，然而控制粒子的分佈卻是有限的，因為只有動力學因素控制著晶體的生長。因此，在共沉澱法的過程中涉及兩個階段，其一為晶核發生的過程快速且短暫，須等到該物質到達臨界過度飽和態才會發生，其二為晶核增長的過程是緩慢且須考慮到溶質的化學特性。此兩個階段必須分開，原因在於要形成單分散的奈米微粒，必須在晶核生成的同時使得表面晶體得以擴散成長並窄化在特定大小，所以反應的過程必須快速進行，改變溶質濃度可調節氧化鐵奈米粒子生成的大小以及磁特性。不過由於共沉澱法的奈米粒子性不是非常完整，且磁特性比起高溫裂解的方式來得低，因此開始有相對應的高溫合成氧化鐵開始發展。

1-5 高溫裂解方式製備超順磁氧化鐵奈米粒子

熱裂解法主要是在有機相中，在有界面活性劑(surfactant)的高溫環境下合成奈米粒子，其最大的優點是合成出的粒子粒徑分佈範圍非常小，但製備出的奈米材料是非水溶性的。水熱法是以水為主要溶劑在高溫高壓的環境之下合成，其優點是產物純度高且適用大部分的金屬，但是無法大量製備且反應過程複雜。有機相合成的奈米粒子通常是在高沸點的溶液中(如：1-octadecene^[63,74-76]、phenol ether^[65,66,77,78]、dioctyl ether^[67,70,79]、octadecane^[68]、dososane^[68,80] 及 eicisane^[68,80]等)，而不同沸點的溶劑能形成的粒子粒徑大

小不同，且高沸點的溶液在高溫下為惰性試劑。反應需加熱至 200~400°C 以裂解有機金屬離子錯合物。其反應速度快、所得奈米粒子結晶程度良好而且粒徑均勻，但表面吸附大量疏水性賦形劑，需經過配位基交換或是包覆以增加其生物相容性。

在眾多的高溫裂解前驅物(precursor)如： $\text{Fe}(\text{CO})_5$ ^[48,54,57,66,68]、 $\text{Fe}(\text{acac})_3$ ^[52,53,64,65]、 $\text{Fe}(\text{nitrile})_3$ ^[19]、 $\text{Fe}(\text{olate})_3$ ^[50,61,62,69,70]和 $\text{Fe}(\text{olate})_2$ ^[61]之中，本研究嘗試以正三價乙醯丙酮鐵錯合物 $\text{Fe}(\text{acac})_3$ 作為前驅物合成氧化鐵奈米粒子，或加上正二價乙醯丙酮錳錯合物 $\text{Mn}(\text{acac})_2$ ，合成氧化鐵參雜錳之奈米粒子。以乙醯丙酮鐵錯合物為前驅物有三項原因：第一點是前驅物為市售，取得容易且成本不高；第二點是合成的奈米粒子粒徑均勻；第三點以乙醯丙酮鐵錯合物為前驅物的奈米粒子，尺寸的控制很自由(8~50 nm)，無需製作核種後再次反應以增加尺寸，只要利用不同濃度的前驅物或是改變界面活性劑(surfactant)的比例即可。本研究就利用固定前驅物以及界面活性劑的量，只改變溶劑多寡從而調整反應濃度，以達到控制奈米粒子生成粒徑的目的。

1-6 生物相容性聚合物-聚乙二醇(Polyethylene Glycol, PEG)

近年來奈米技術的興起提供了觀察更細微部分以及從事其相關領域研究的突破。要應用在生物體內必須符合三大基本要件，分別是無生物毒性、水溶性以及生物相容性。無生物毒性為首要考量因素，一旦材料本身會對

生物體產生毒性或造成不良影響時，即不被考慮做為應用的材料。第二項則是水溶性，因為生物體內水分占了極大比例，若材料是非水溶性則會造成排斥或堵塞。最後的是生物相容性，以人為例，人體內存在著巨噬細胞(macrophages)，當異物或細菌侵入人體時，體內各處的巨噬細胞可吞噬清除異物，此一機制系統，稱為單核球吞噬細胞系統(mononuclear phagocyte system, MPS)。由於氧化鐵奈米粒子有較大的表面積比，使得氧化鐵奈米粒子容易產生聚集及吸附血漿蛋白(plasma proteins)。因此，當氧化鐵奈米粒子注射到人體後，一旦氧化鐵奈米粒子有聚集或吸附現象產生，會迅速被單核球吞噬細胞系統之巨噬細胞吞噬，將氧化鐵奈米粒子從血液中快速排除，而無法到達組織細胞。因此為了滿足這三項考量，使用高分子來做為包覆在奈米粒子的薄膜是最常用的方法，此薄膜的材料必須具備高度的生物相容性(biocompatible)、非免疫性(nonimmunogenic)、非抗原性(nonantigenic)和抗蛋白質吸附(protein-resistant)。常見的高分子有二氧化矽(silica)、聚二乙醇(PEG)、聚醚鹽胺(PEI)、聚離氨酸(poly-lysine)、葡萄糖聚糖(dextran)等。經修飾之氧化鐵奈米粒子，即可避免其聚集與吸附，使氧化鐵奈米粒子減少被單核球吞噬細胞系統吞噬，而能順利到達組織細胞。

聚乙二醇(poly(ethylene glycol), PEG)^[16,18,19,40,41,67,68]是一個低毒性不帶電荷的親水性殘基，並且可於體內分解代謝，因此在近十年來，有許多藥物是藉由接上PEG來改善它們的生物相容性，防止被蛋白質吸附，進而增

加藥物在血液中的循環時間和被細胞攝入，使PEG 在藥物設計上具有高度的應用性。所以在氧化鐵奈米粒子的表面修飾PEG，預期能提高氧化鐵奈米粒子的生物相容性。

1-7 胰臟癌標定蛋白-黏蛋白

胰臟癌是人類在五年內生存率不到 5%的致命癌症，死亡率高的主要原因在於不會有明顯的病兆，直到癌症晚期才診斷出癌細胞已經擴散。現階段的成像方式往往缺乏具有敏感性的偵測，因此利用新型的奈米生物技術來偵測癌症並用於核磁共振造影的應用已經廣泛的發展。然而，目前有許多作為對比劑的功能性奈米粒子因表面電荷的正電性而與細胞膜進行非特異性的交互作用，導致專一性的標定特性降低，此時會得到靈敏度欠佳的影像訊號。所以除了發展功能性的奈米載體外，也需要專一性的標定蛋白來提高生物探針的靈敏度。

而黏蛋白(Mucins)是在生理功能表現上的重要生物分子，由於這蛋白能專一的針對胰臟癌表現的病人給予正確的診斷，這是因為除了癌症外，慢性胰臟炎和一般的胰腺表現黏蛋白的程度大有不同，藉此我們可以利用這樣特殊的蛋白標記來診斷以及區分腫瘤與普通疾病的差異性。2001 年，Batra S. K.等人針對黏蛋白的大家族進行分析，收集腫瘤細胞的細胞株、癌症病人以及慢性胰臟炎實驗組，對其黏蛋白之 RNA 的鑑定進行反轉錄並做西方

點墨法分析，這說明了，MUC4 蛋白佔有多數細胞株的表現量，並藉此研究團隊也針對 43-84 歲間的胰臟炎患者進行 RT-PCR 分析，此結果也說明了 MUC4 在病患在不同年齡層也有不同的表現量存在，然而研究團隊最後也針對一般胰臟炎的患者進行比較，可以看出 MUC4 這蛋白不僅可以區分一般正常細胞與癌症細胞的不同，同時也開啟了新的標定蛋白。由於目前國內、外針對胰臟癌的研究與診斷的資訊還在開發的階段。

因此，Batra S. K. 團隊藉由黏蛋白的表現量成功的區分癌症病患與一般胰臟炎病患的差異性。2004 年，Batra S. K. 團隊針對此蛋白成功的純化出專一的抗體，並利用此抗體針對不同細胞株作西方點墨法(如圖二所示)，可以看出不同細胞株表現 MUC4 蛋白的情形，因此，我們實驗室打算利用此抗體 (Anti-MUC4 antibody) 修飾到氧化鐵奈米表面，並針對有高表現的腫瘤細胞株(HPAC、BxPC-3)以及低表現的細胞株(Panc1)進行實驗研究，且以此構想開發新型的對比劑及其醫學診斷之應用。

二、 研究動機與目的

由於MRI 是藉由組織器官型態改變作為主要的影像診斷依據，而MRI 對比劑的使用可加強型態改變之對比訊號強度，可於組織病變之早期即時發現，提升疾病早期治療的診斷效率。因此若要提升MRI的檢查效果，除了儀器本身的改良進步之外，開發具有高度對比效果的對比劑，便是另一個努力的方向。

因此本文的設計合成是基於能增強MRI之影像訊號的對比性為前期目標，將利用高溫裂解的方式將錳離子鑲進 Fe_3O_4 的結構中，取代亞鐵離子(Fe^{2+})的位置，使得弛緩率上升。並利用生物相容性PEG聚分子修飾到磁性奈米粒子表面，增加其水溶性與在體內的循環時間並降低其生物毒性；除此之外，後期的目標為新合成的磁性奈米粒子將接上Anti-MUC4知單株抗體，用來診斷胰臟癌所表現的特殊蛋白(MUC4)，最後目的為達成光學與MRI雙功能性的生物奈米對比劑。

三、實驗儀器與試藥

I. 儀器(Instrumentation)：

1. 核磁共振光譜儀(Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer, NMR)：核磁共振光譜測定使用 Varian Gemini-300 proton/carbon FT - NMR 系統。化學位移(chemical shift)以 δ 值 ppm(part per million)表示，內部標準以 solvent peak(CDCl_3 , D_2O , TMS)為基準。提供化學之分子研究與分子結構實驗。
2. 20 MHz relaxometer：採用 NMS-120 Minispec Bruker。提供作為對比劑(T_2)橫向弛緩時間及(T_1)縱向弛緩時間之測定。
3. 穿透式電子顯微鏡(transmission electron microscope, TEM)：採用 JEOL JEM-2000 EX II。觀察氧化鐵奈米粒子的分散情形並計算核心尺寸。
4. 粒徑分析儀 (Dynamic Light Scattering, DLS)：採用 ZetaSizer Nano-90(Malvern Instruments, United Kingdom)。測量氧化鐵奈米粒子的粒徑以及表面電位測定。
5. 高速冷凍離心機：採用日本 KUBOTA 5910。提供奈米粒子純化。
6. 超導量子干涉磁量儀(Superconducting Quantum Interference Device Magnetometer, SQUID)：採用美國 QUANTUM DESIGN MPMS5。提供磁性物質之感應磁場及飽和磁化率測定。
7. 紫外光-可見光光譜儀(UV-Visible spectrophotometer)：採用 Hitach, U-3010 Spectrophotometer。提供化學結構特定吸收波長之測定。

8. 傅立葉轉換紅外光譜儀(Fourier Transform Infrared Spectrometry, FT-IR)：
採用 Perkin Elmer System 2000 FT-IR。提供化學結構官能基特定吸收波數之測定。
9. 質譜分析儀(mass spectrometry)：採用 Micromass, Q-Tof, UltimaTM。提供化合物分子量之測定。
10. X 光能譜散佈分析儀(Energy Dispersive Spectrometer, EDS)：利用掃描式電子顯微鏡的附加 X 射線能量分散光譜儀分析系統進行電子微探元素分析，採用 Hitachi S-3000N 掃描電子顯微鏡及附加 Horiba EX-250 EDS，其加速電壓為 20 KeV，並使用 EMAX 之操作軟體，可測量奈米內部的金屬元素含量。
11. X 光繞射光譜儀(X-ray Diffraction)：此為鑑定晶格結構分析，採用 Bruker D8 Advance 型號，以 $2\theta = 20^\circ \sim 80^\circ$ 角為掃描範圍，每分鐘 1° 角為間隔，持續一小時。
12. 感應耦合電漿原子發射光譜分析儀(Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission, ICP-AES)：採用 Perkin Elmer optima 2000 PV。提供奈米粒子中鐵、錳含量的測定。
13. 酵素免疫分析儀(Enzyme-linked Immunosorbent reader, ELISA reader)：採用 Sunrise 型號(Tecan Co., Grödingen, Austria)的 ELISA reader，其系統偵測 595 以下之波長，可用於測定抗體濃度。
14. 流式細胞儀(Flow Cytometer)：採用 Becton Dickinson 型號，利用雷射光

激發螢光染體及散射偏光之測量原理，對微顆立體 (0.5mm~50mm)例如

細胞做定量之統計分析，可作為免疫染色之分析。

II. 實驗藥品(Reagents)：

Agar Scientific：

S162 Scientific Formvar/Carbon 200 Mesh Cu(50)

Aldrich：

Iron (III) acetylacetonate, 99.9+ %

Manganese (II) acetylacetonate, 99%

Oleic acid, 90%

Oleylamine, 90%

1,2-Hexadecandiol, 90%

methyl poly(ethylene glycol) (M_w :2000 , mPEG)

Maleic anhydride, 99%

β -Alanine, 99%

Alfa Aesar：

N-Boc-ethylenediamine, 98%

Fluka：

(3-aminopropyl)triethoxy silane(APTES), 98 %

N° -hydroxysuccinimide(NHS), 97 %

Mallinckrodt：

dichloromethane(DCM), 99 %

ethyl ether, 90 %

ethanol, 95 %

methanol, 99.7 %

toluene, 99.9 %

sodium chloride, 100 %

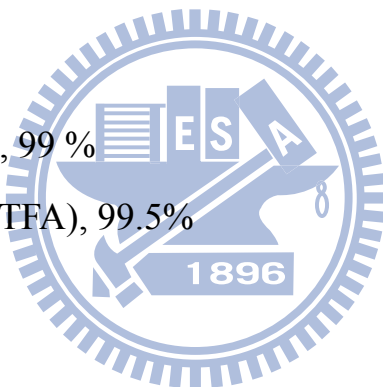
Pierce :

BCA protein assay reagent kit(bicinchoninic acid) , 包含 A 劑(contain sodium carbonate, sodium bicarbonate, BCA detection reagent 及 sodium tartrate in 0.1N sodium hydroxide) 、B 劑(alkaline medium)及測試用胎牛血清標準品 (bovine serum albumin, fraction V)

RDH :

triethylamine(TEA), 99 %

trifluoroacetic acid(TFA), 99.5%



TEDIA :

N,N-dimethylformamide(DMF)

Spectrum :

molecular porous membrane tubing(*Mn* : 12,000~14,000 及 *Mn* : 50,000)

四、實驗步驟及方法

4-1 超順磁氧化鐵奈米粒子參雜錳(MnMEIO)之製備與合成(5)

為了應用於磁振造影之影像追蹤，本研究需要製備超順磁奈米粒子，且有較高的磁緩率，因此奈米粒子設計合成參考自 2004 年由 Shouheng Sun^[81]團隊所合成設計的超順磁氧化鐵奈米粒子參雜錳離子的方式，其合成方法為將將 $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (4 mmol, 1.4g)、 $\text{Mn}(\text{acac})_2$ (2 mmol, 0.51g)、oleic acid (6 mmol, 1.7g)、oleylamine (6 mmol, 1.6g)、1,2-Hexadecandiol (10 mmol, 2.58g) 和 5 毫升的 benzyl ether 混合置於雙頸瓶中，並置入在高溫爐內。先加熱至 120°C 約等待 15 分鐘左右，此步驟為除去多餘的水氣，接著開啟冷凝系統並緩慢升溫至 200°C 後持續加熱二個小時使其融解並混合均勻，並加熱至 350°C ，到達指定溫度並持續加熱一小時後降溫至室溫。隨後產物加入過量的丙酮後以 13,000 rpm 離心，並利用丙酮清洗，移除多餘的界面活性劑，離心第二次之後將沉澱物溶於 20 毫升的己烷中，加以溶解並離心第三次 (3000 rpm)，此次離心目的為去除部分聚集而不能均勻擴散在己烷之氧化鐵粒子，收集上清液後，再次加入丙酮作最後一次離心(13,000 rpm)隨後的沉澱物即為 MnMEIO (MnFe_2O_4)，可溶於 chloroform、hexane 等溶劑保存。

反應藉由調整 benzyl ether 的量改變金屬前驅物的濃度，藉以控制粒子粒徑，並以穿透式電子顯微鏡觀察其粒徑及形狀。

4-2 mPEG-acrylate (mPEG-Ac)之合成(1)

將 mPEG-OH (M.W. = 2,000) (10 mmol, 20 g) 加熱至 90-100°C 抽真空以除去 mPEG 所包含的水份。抽真空 6 小時之後加入 dry dichloromethane (150 ml) 與 TEA (30 mmol, 4.2 mL)，並且在 4°C 下緩緩滴入 acryloyl chloride (30 mmol, 2.4 mL)，在室溫下反應 48 小時即完成反應。反應完成後加入碳酸鈉移除 acryloyl chloride 所產生的酸性副產物，抽氣過濾後隨後加熱抽真空以除去未反應的 TEA 與 acryloyl chloride，再用 tetrahydrofuran (THF) 析出鹽類，最後用己烷與乙醚以 1:1 的比例作不同相純化，沉澱物即可得 mPEG-Ac，利用 NMR 鑑定其結構(如圖四所示)。Yield: 76 % (15.2 mmol, 31.9 g)。
 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ): 3.37(s, 3H, $\text{CH}_3\text{-O}$), 3.63(m, 104H, PEG chain protons), 4.30(t, $J = 4.7$ Hz, 2H, $\text{C-CH}_2\text{-C=O}$), acryl group: 5.56 (1H), 6.15 (1H), 6.37 (1H).

4-3 *N*-acryl-(3-aminopropyl)triethoxy silane (APTES-Ac)之合成(2)

將 APTES (40 mmol, 9.33 mL) 溶解在 dry chloroform (DCM, 200 mL) 並且加入 TEA (80 mmol, 12.9 mL) 後 4°C 下加入 acryloyl chloride (50 mmol, 4.6 mL) 室溫下反應 6 小時，然後利用 silica-gel chromatography (eluent: hexane/ethyl acetate = 1/1) 純化即可得 APTES-Ac，利用 NMR 鑑定其結構(如圖五所示)。
yield: 71.71 % (28.7 mmol, 7.9 g)。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , δ): 0.66 (t, $J =$

7.1 Hz, 2H, C-CH₂-Si), 1.19(q, J = 8.1 Hz, 9H, CH₃-CH₂-O), 1.65(m, J = 7.5 Hz, 2H, C-CH₂-C), 3.32(t, J = 7.1 Hz, 2H, C-CH₂-N), 3.81(q, J = 8.4 Hz, 6H, C-CH₂-O), acryl group: 5.61 (1H), 6.11 (1H), 6.21 (1H).

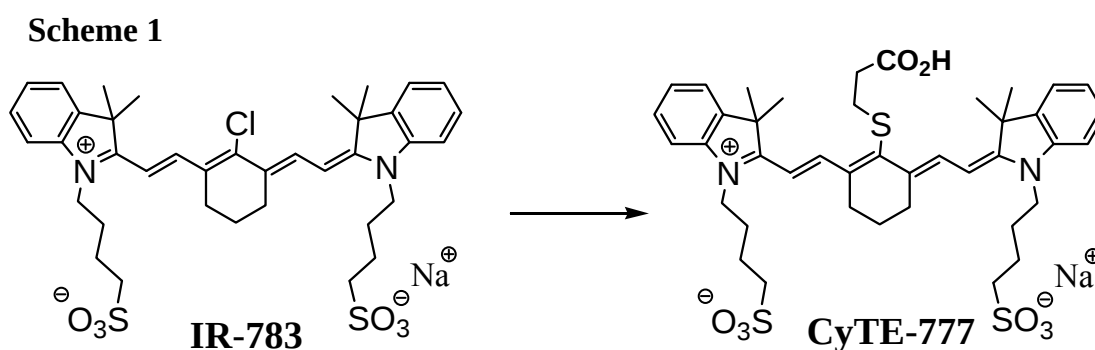
4-4 *N,N'*-APTES -N-Boc(ethylenediamine)-mPEG (mPEG-NBoc-silane)之合成 (3)

將 APTES-Ac (6.6 mmol, 1.8 g)、mPEG-Ac (6.6 mmol, 13.6 g) 與 N-Bocethylenediamine (7.0 mmol, 0.8 g) 置入雙頸瓶中並溶解在 dry dichloromethane (DCM) (20 mL) 之內，隨後加入 TEA (5mmol, 0.8 mL)，於 40~45°C 加熱迴流，在氮氣下反應 72 小時，即完成反應。反應完成後用減壓濃縮機移除多餘的 DCM，並加入 THF 析出反應中的 TEA 鹽類副產物，抽氣過濾收集澄清液，隨後正己烷析出 mPEG-NBoc-silane，利用 NMR 鑑定其結構(如圖六所示)。Yield: 39.4 % (1.9 mmol, 4.5 g)。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ): 0.76 (t, 2H, Si-CH₂-C, J = 4.2 Hz), 1.24(t, 9H, CH₂-CH₃, J = 2.4 Hz), 1.42(s, 9H, C-CH₃), 2.48-2.67 (m, 2H, -C-CH₂-(C=O)-N, 2H, -C-CH₂-(C=O)-O), 2.82-2.98(m, 2H, N-CH₂-C-(C=O)-O; 2H, N-CH₂-C-(C=O)-N, 2H, N-CH₂-C-N), 3.20(t, 2H, -C-CH₂-NH-(C=O)), 3.27(s, 3H, -O-CH₃), 3.54-3.70(m, ~190H, -(CH₂-O-CH₂)_n-), 4.18(t, 2H, C-CH₂-O-(C=O), J = 4.2 Hz).

4-5 *N,N'*-APTES -N-Boc(ethylenediamine)-mPEG(mPEG-NBoc-silane)的水解 (*N,N'*-APTES-ethylamine-mPEG) (4)

聚合物(3)的水解主要是為了移去胺基保護基，除此之外也會將silane上的ethoxy進行酸水解而形成醇基，以trifluoroacetic acid (TFA) 跟DCM (TFA/DCM = 1/1 20 mL) 並加入聚合物分子(3)，在氮氣下進行反應，六小時後即完成水解。最後以乙醚與正己烷 (ethyl ether / hexane=1/1) 移除TFA 並清洗數次，隨後收集沉澱物真空抽氣後可得mPEG-NH₂-silane，利用NMR鑑定其結構(如圖七所示)。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) : 2.54 (m, 2H, -C-CH₂-(C=O)-N-, 2H, -C-CH₂-(C=O)-O-), 2.67(m, 2H, N-CH₂-C-(C=O)-N-, 2H, N-CH₂-C-NH₂), 2.86(m, 2H, N-CH₂-C-(C=O)-O-, 2H, N-C-CH₂-NH₂), 3.13(q, 2H, -C-CH₂-NH-(C=O)), 3.32(s, 3H, -O-CH₃), 3.59-3.70(m, ~190H, -(CH₂-O-CH₂)_n-), 4.22(t, 2H, C-CH₂-O-(C=O), J = 7.8 Hz), 4.45(s, 3H, Si-OH).

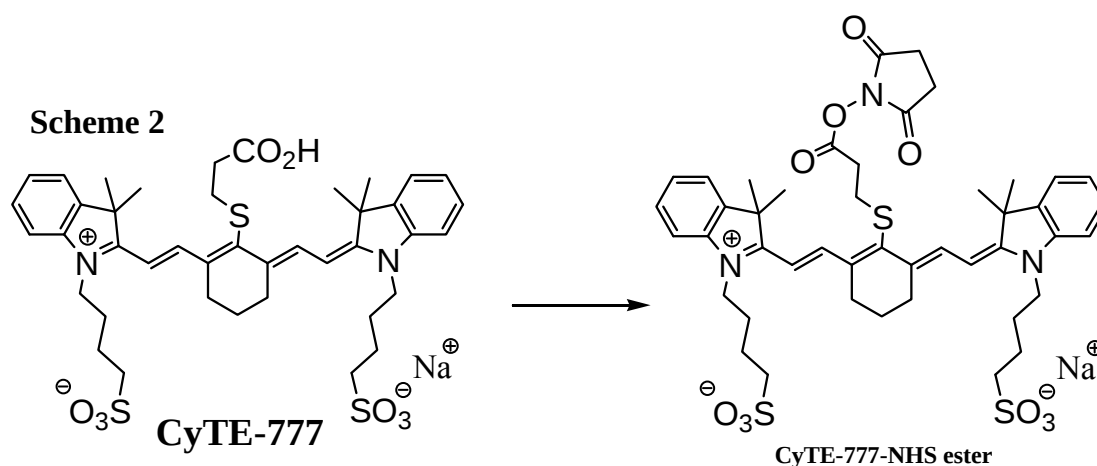
4-6 近紅外光螢光團 CyTE777 之合成(7)



此螢光團之設計合成主要在於可以利用近紅外光能穿透組織之特性用來對活體進行螢光之追蹤。取 3-mercaptopropionic acid(0.467 mmol, 40.7 μL)

和triethylamine (TEA) (0.467 mmol, 65.3 μ L) 溶於 DMF 10 mL 並置於圓底燒瓶中，在室溫下攪拌20分鐘。秤取 IR-783(0.33 mmol, 250 mg)溶於 6 mL 的DMF，使vial瓶中的IR-783完全溶解(成綠色溶液)，再將此溶液倒入圓底燒瓶中攪拌反應約21小時(不加熱)；利用HPLC判斷反應是否反應完全。待反應結束，在圓底燒瓶中加入冰乙醚，將綠色固體沉澱出來，以抽氣過濾收集固體，再以CH₃OH洗入另一濃縮瓶抽乾，以HPLC分離(條件：CH₃CN + 0.1 % TFA；水)，純化完將其凍乾，並放在低溫冷凍保存。得綠色棉絮狀固體0.14克，產率：91.45 %，利用NMR鑑定其結構。¹H NMR (300 MHz, CD₃OD, δ): 8.89 (d, 2H, J = 14.2 Hz), 7.49 (d, 2H, J = 7.4 Hz), 7.41 (t, 2H, J = 7.6 Hz), 7.34 (d, 2H, J = 7.8 Hz), 7.25 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 6.32 (d, 2H, J = 14.3 Hz), 4.19 (t, 4H, J = 6.7 Hz), 3.06 (t, 2H, J = 7.0 Hz), 2.90-2.87 (m, 4H), 2.70 (t, 4H, J = 5.9 Hz), 2.56 (t, 2H, J = 6.9 Hz) 2.00-1.92 (m, 10H), 1.76 (s, 12H). HRMS-ESI [M]⁻ m/z calcd for C₄₁H₅₁N₂O₈S₃ 795.2959, found 795.5.

4-7 近紅外光螢光團 CyTE777-NHS ester 之合成(8)



官能基為羧基酸的螢光基團對於合成氧化鐵需要縮合試劑進行反應，其過程較為複雜，為此把 CyTE777 修飾成 CyTE777-NHS 較易與奈米粒子上的胺基進行反應。取 CyTE-777 之羧基化合物溶入 500 μ l 除水過的 DMF，隨後加入 Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (1.1 mmol, 220.1 mg) 以及催化劑 4-(Dimethylamino)pyridine (DMAP) (1.1 mmol, 134.4 mg) 反應 12 小時，保持在避光且氮氣下攪拌。過程由 HPLC 觀測反應是否完全，反應後的產物由冰乙醚沉澱，隨後加入甲醇清洗後凍乾，產物不再用 HPLC 作純化。

4-8 NSMP (N-succinimidyl-3-maleimidopropionate) linker 之合成(10)

為了使氧化鐵奈米表面帶有 maleimide 的官能基，須先合成 NSMP (N-succinimidyl-3-maleimidopropionate) linker 之交聯化合物，此化合物能與超順磁氧化鐵表面胺基進行 SN2 離去基反應，使得氧化鐵表面能帶有 maleimide 官能基，此官能基能與抗體或是胜肽上的巯基作鍵結。取 maleic anhydride (10 mmol, 1g) 溶於無水的 DMF 中，隨後加入 β -Alanine (10 mmol, 0.91 g)，保持在氮氣的環境攪拌 1 小時，接著緩慢加入 DCC (20 mmol, 4.12 g) 反應 overnight，攪拌均勻直到 maleimide 官能基的形成，加入 N-hydroxysuccinimide (12.5 mmol, 1.4 g) 室溫下攪拌 4-6 小時，接著將溶液抽氣過濾，移除 DCU 等副產物，濾液加入 5 倍體積的二次水，並用 100 mL 之二氯甲烷個別萃取兩次，以無水硫酸鎂除水並過濾，減壓濃縮後可得黃白

色沉澱物，接著將產物溶到適量的DCM中，緩慢加入己烷作再結晶析出，所得白色粉末產物即為NSMP。利用NMR鑑定其結構(如圖八所示)。¹H NMR (300 MHz, CD₃OD, δ): 6.74 (s, 2H, -CH=CH-), 3.93 (t, 2H, -CH₂-), 2.96 (t, 2H, -CH₂-), 2.82(t, 4H, -CH₂-CH₂-). HRMS-ESI [M]⁺ *m/z* calcd for C₁₁H₁₀N₂O₆ 266.2, found 289.1 [Na]⁺.

4-9 超順磁氧化鐵-錳奈米粒子(MnMEIO)表面修飾 PEG 聚分子(6)

高溫裂解的磁性奈米粒子其反應為高沸點之有機溶劑，其核外為oleic acid 和 oleylamine 包覆之疏水性基團，此基團不能應用在生物實驗上，因此參考自Randy De Palma 所發表在Chemical Materials的方法，其原理為溶膠-凝膠聚合法(sol-gel reaction)。首先將溶在氯仿的超順磁氧化鐵-錳奈米粒子取1 mL，用真空抽氣移去氯仿，隨後加入20 mL 甲苯(toluene)，由超音波機震盪10分鐘，接著取聚合物分子(4)以重量比1：20 的方式加到甲苯裡與磁性奈米粒子進行配位子互換，此過程在60°C下反應，持續震盪8小時後，加入過量的己烷促使水溶性的磁性奈米粒子沉澱，接著用己烷清洗數次，再用真空抽氣移除多餘的己烷，加入適量的去離子水後，將水溶液的磁性奈米粒子通過0.22 μ m 的過濾膜，並用分子量為50,000透析膜以去離子水透析24小時，即可得到水溶性超順磁氧化鐵-錳奈米粒子。

4-10 水溶性超順磁氧化鐵-錳奈米粒子之表面胺基測定

為了能夠與CyTE777-NHS ester(8)、NSMP化合物(10)鍵結，首先須要了解磁性奈米粒子上有多少胺基數量，此胺基能與NSMP還有CyTE777上的NHS進行離去基取代反應，本研究利用OPA檢測法(spectrophotometric OPA assay method)，作為磁性奈米粒子表面胺基的檢測方法，o-phthaldialdehyde (OPA)會與一級胺反應，其反應快速、靈敏度高。其作用原理為利用磁性奈米粒子上其水溶性PEG內側之胺基官能基與o-phthaldialdehyde(OPA)反應，然後利用甘氨酸與未反應的OPA作用，利用UV/VIS在波長340 nm 定量未反應之OPA，並以OPA濃度檢量線標準樣品推測奈米粒子上胺基的濃度。

(1)OPA檢測配製：

試劑A - 將OPA溶於乙醇溶液中(0.25M)，以及β-mercaptoethanol溶於0.1 M的Na₂B₄O₇ (pH=9.5)使其濃度為 4 %。取300 μl的0.25 M之OPA乙醇水溶液與300μl之4 %的β-mercaptoethanol 之Na₂B₄O₇水溶液混合均勻，用去離子水稀釋至總體積為50 mL。(OPA濃度為 1.5×10^{-3} M)。

試劑B - 將glycine溶於0.1 M Na₂B₄O₇ 中，其濃度為0.06 M，以及β-mercaptoethanol溶於0.1 M的Na₂B₄O₇ (pH = 9.5)使其濃度為0.5 %。取500 μL之0.006 M 之glycine溶液與500 μL之0.5 % β-mercaptoethanol混合均勻後，用去離子水稀釋至30 mL。(glycine的濃度為 1.0×10^{-3} M)。

OPA標準溶液配製 - 在試管中分別加入2 ml之0.1 M Na₂B₄O₇和100 μL

之試劑B，再配製1.5 mM、1 mM、0.5 mM、0.1 mM、0 mM不同濃度的試劑A，取50 μ L 加入其中，混合均勻後，反應兩分鐘隨後以UV/Vis光譜儀測定340波長之吸收，得到OPA之濃度檢量線。

以OPA檢測表面胺基時，取2 mL 之試劑A於試管中，加入50 μ L的磁性奈米粒子混合均勻後，反應五分鐘，以高速離心機13,000 rpm離心20分鐘，取50 μ L 未反應之OPA上清液加入含有2 ml之0.1 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 和100 μ L 之試劑B的試管內，同時測量340波長處之吸光度，推算磁性奈米表面胺基數量。

4-11 近紅外光螢光基團鍵結至磁性奈米粒子上 MnMEIO(NH_2)-Cy777-mPEG 之合成(9)

由OPA檢測法可推知在10 mg/mL的磁性奈米粒子的水溶液中，其胺基的濃度為16 mM，以此為依據，將CyTE777-NHS ester (0.002 mmol, 2mg)溶入磁性奈米水溶液中，在4°C下反應overnight，接著將反應的溶液以分子量50,000的透析膜透析24小時，移除未反應之螢光團。

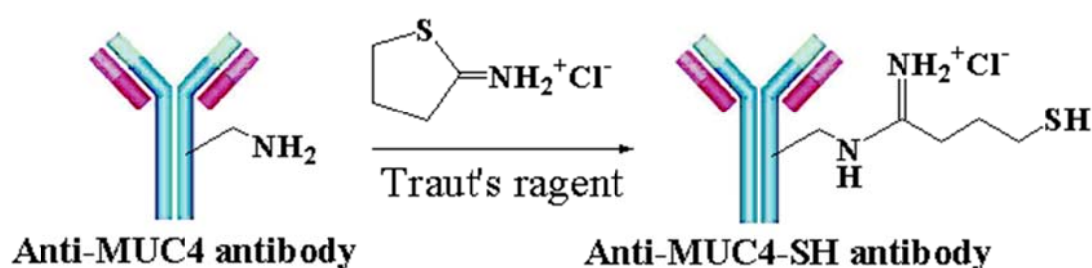
4-12 MnMEIO-linker-Cy777-mPEG 之合成(11)

取MnMEIO(NH_2)-Cy777-mPEG水溶液 9 mL ($-\text{NH}_2$, 16 mM)，加入

NSMP (0.1 mmol, 32 mg)反應，在4°C下反應overnight，同樣取反應溶液以分子量50,000的透析膜透析24小時，移除未反應之NSMP。

4-13 Anti-MUC4 抗體修飾巖基之合成

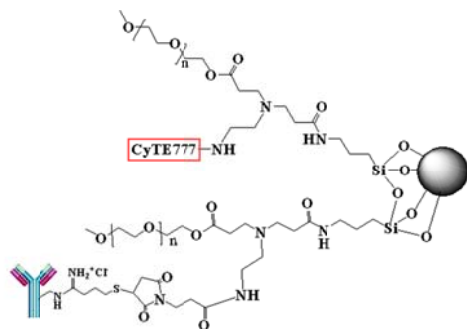
Scheme 3



抗體的修飾參考來自Stephen O'Brien^[82]團隊以及Martin W. Brechbiel^[83]團隊所發表的方法，利用Traut's agent與抗體反應生成巖端的方式可與磁性奈米粒子的maleimide上的巖鍵在水相進行加成反應，其反應為取400 μL 的抗體在Thiolation buffer (50 mM, 150mM NaCl, 10 mM EDTA, pH = 8.5)中透析，接著將Traut's agent配置成stock solution (1 mg/ml)，取1.8 μL 的stock solution加入至抗體溶液中，在室溫下反應45分鐘後以分子量12,000透析膜透析，移除未反應的Traut's agent，其反應半衰期為一個小時，故須在配製好stock solution後馬上與抗體反應，根據標準的反應過程，此抗體會修飾上1 - 2個巖基。

4-14 Anti-MUC4 抗體鍵結至超順磁氧化鐵-錳奈米粒子之合成

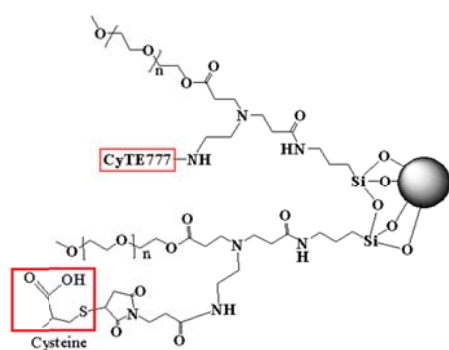
4-14.1 實驗組 MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG



Ab = Anti-MUC4 antibody

修飾上硫端的 Anti-MUC4 之抗體 (400 μ g) 加入到 2 mL 的磁性奈米粒子中，反應在4 $^{\circ}$ C下進行，其反應過程必須避光並快速搖動，經過 12 小時的反應，再加入cysteine去中和未反應之maleimide官能基，先用去離子水透析(透析膜分子量:50,000)，主要把EDTA給去除乾淨，否則殘餘的EDTA可能造成細胞無法貼附在培養皿上，換過 3 次去離子水後，隨即再用1 $\times$ PBS 透析，主要是將非共價性鍵結之螢光基團或是反應試劑去除，換過 4 次 1 $\times$ PBS後，將最後的磁性奈米粒子溶液以褐色瓶保存，並置放在4 $^{\circ}$ C並相以利於作後續研究。此實驗之控制組為maleimide修飾的磁性奈米粒子直接與足量的cysteine反應，未參與抗體之鍵結，因此磁性奈米粒子的專一性完全看抗體鍵結能力而定，隨後以1 $\times$ PBS 透析(透析膜:50,000)四次，保存在褐色瓶中避光。

4-14.2 對照組 MnMEIO-Cys-Cy777-mPEG



對照組主要是要跟實驗組MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG進行比較，藉此了解抗體的專一性是否會受到磁性奈米粒子的影響。加入過量的Cysteine與MnMEIO-linker-Cy777-mPEG反應，4 小時後以1 × PBS透析(透析膜：50,000)四次，保存在褐色瓶中避光。

4-15 穿透式電子顯微鏡(TEM)之鑑定

配製 0.2 ~ 0.5%(W/W)氧化鐵奈米粒子溶液，並利用毛細管將樣品點染於鍍碳銅網上，待其自然乾燥後以穿透式電子顯微鏡觀察。選取範圍內200~500 個鐵核計算其大小，並且求出其平均粒徑。

4-16 X 光能量分散光譜(Energy Dispersive Spectroscopy, EDS)之磁性奈米粒子內部元素鑑定

特性X光可以偵測表面材料以及元素鑑定，其原理為當原子內層電子收到外來能量(如：電子束、離子束或是光源)的激發而脫離原子時，原子的外

層電子很快的遷降至內層電子的空穴並釋放出兩能階差之能量。被釋放出的能量可以X光的形式釋出，不同原子特性的能量會以不同X光散出，因此此特性X光可以鑑定試片的各個組成元素。將有機相之磁性奈米粒子在丙酮的環境下震盪，去除高沸點之長碳鏈分子，獲得粉狀的磁性奈米粒子，將此粒子均勻的放置載體上以20 keV的電子伏特進行元素分析。

4-17 超導量子干涉磁量儀(SQUID)磁性之測定

其樣品配置與EDS相似，將磁性奈米粒子外層有機層利用丙酮沖洗後獲得粉末狀的磁性奈米晶體，把粉狀奈米粒子取1-2 mg 放入樣品管中，並置入在震盪桿下方，使樣品維持在兩磁場間，偵測由外加磁場-10 kOe到10 kOe之間的磁矩變化量，此資訊可提供所合成出的磁性奈米粒子之飽和磁化率，並可推測此奈米粒子是否為超順磁性質。

4-18 X 繞射光譜儀 (power X-ray diffraction, XRD)之晶體鑑定

X光進入晶體時，會被原子所組成的晶片反射，假設晶面距離為 d ，入射光與晶面夾角為 θ ，其為繞射角度，當入射光被相鄰的晶面反射時，兩反射光束會有一行差距為 $2 d \sin \theta$ ，若此行剛好等於光波波長 λ 之整數倍，會產生建設性干涉。滿足此條件可產生繞射，以此訂為布拉格定律。

$$\text{Bragg's law : } 2 d \sin \theta = n \lambda$$

將磁性奈米氧化鐵之乾燥後粉末放置在XRD的載體上，其掃描為每分鐘4度， 2θ 為20～80度。

4-19 核磁共振光譜儀(NMR)之鑑定

化學合成的 PEG 聚合物以及 silane 衍生物分子可藉由核磁共振光譜儀測定，其原理為偵測氫原子自旋方式在外加磁場下，其內的核磁距與磁場交互作用而吸收無線電波，因此氫原子核內自旋電子由滴能階要遷至高能階，此時不穩態的能量會以光或電磁波的方式再次釋放出去(即 relaxation)，因此針對氫原子在極性與非極性的原子團間之交互作用力可得到特定環境下的氫原子發散電磁波，經由傅立葉轉換得到化學位移 (chemical shift, δ) 由此化學位移判斷聚分子化合物或是小分子化合物上的氫數含量，藉此歸納出分子結構。

4-20 傅利葉轉換紅外線光譜儀(FT - IR)鑑定

FT - IR 是用來鑑定官能基的鍵結和位移，其原理為利用紅外光照射樣品後，其分子中的原子間產生震動和轉動模式時，吸收適當的能量，藉此得出在化合物分子在 $400\text{ nm}^{-1} \sim 4000\text{ nm}^{-1}$ 頻率間分子吸收與振動能量。由於含鐵之聚合物化學分子無法以 NMR 偵測表面之官能基，所以樣品經由乾燥取得粉末後，與 KBr 混合壓片測量。無法抽乾呈固狀粉末的非極性樣品

則利用鹽片(NaCl or KBr)測定。

4-21 動態光散射儀(Dynamic Light Scattering, DLS)測定

動態光散射儀的原理是利用使用單一波長的雷射光照射在分散在液相中的懸浮粒子表面，量測在幾個反射角的反射光強度，或者固定在某一角度量測反射光強度的衰變情形，再配合理論分析模式由溶液的吸光係數以及表面材質之折射率，便可以得到粒子的平均大小及分布。將高分子聚合物磁性奈米粒子水溶液樣品，配製成 1 mL 的水溶液裝在比色管內，利用 Nano- zetasizer 90 (ZS90) 之功能，量測粒子的水合直徑，可探討奈米粒子之穩定性。



4-22 表面電位(zeta potential)測定

表面電位在膠體化學中，是指膠體粒子上累積的離子所引發的靜電壓；膠體粒子由雙層電子構成，包含固定層和擴散層。一個粒子可以藉由亨利公式(Henry's function)導出電泳的移動率，進而求出其表面電位的值。

$$U_e = \frac{2\varepsilon\zeta f(ka)}{3\eta} \quad (\text{Henry's function})$$

表面電位的測試需要以水溶液的形式量測，離子性之水溶液會影響磁性奈米粒子在水溶液中真實的表面帶電性，其粒子濃度須要大於或等於 1

mg/mL 才可以量測準確，因此，測定表面電價時先將高分子聚合物磁性奈米粒子溶入去離子水中，取 1 mL 的奈米粒子 1 mg/mL 溶液置入含有電極板之測量槽內，以固定電壓計算出電泳之移動率，藉此得到表面電位 (mV)。

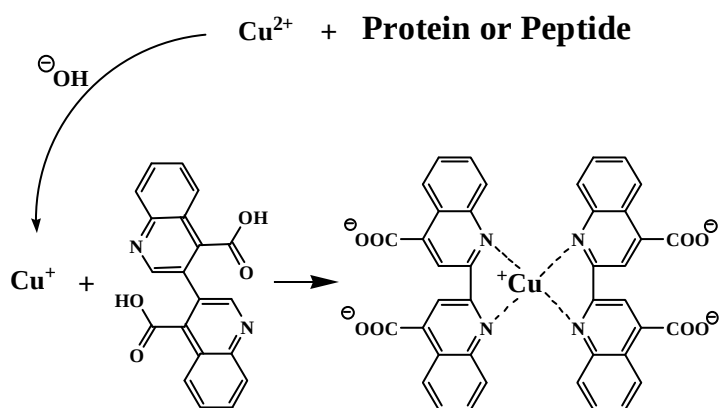
4-23 縱向弛緩率(r_1)及橫向弛緩率(r_2)之測定

將高分子磁性奈米粒子水溶液樣品分別配製成五個不同濃度，再利用 20 MHz relaxometer 測量樣品在 37.0 ± 0.1 °C 的縱向弛緩時間(T_1)及橫向弛緩時間(T_2)。

4-24 蛋白質定量檢測 (BSA assay)

BSA assay 為一般常用於測量蛋白質濃度的基本方法，其原理為 Bicinchoninic acid 為水溶性鈉鹽，可與一價銅離子產生特異性的螯合作用，所以把待測蛋白質加入至二價銅離子的環境中，蛋白質會將二價銅離子還原成一價銅離子，而形成 Cu^+ - BCA complex 之錯合物，顏色也會變成深紫色，利用此特性進行蛋白質定量，以 UV/Vis 測定 562 nm 波長之吸光值並描繪出標準蛋白質之檢量線即可偵測出待測抗體濃度。

反應如下：



4-25 細胞培養

實驗中選用 Panc 1、HPAC 以及 BxPC-3 之細胞株，其培養基分別為 DMEM、F12/DMEM 以及 RPMI 1640，Panc 1 為 MUC4 低表現之細胞株，其餘 HPAC 及 BxPC-3 為 MUC4 表現較高之細胞株，分別培養在 37°C 下培養箱中。

4-26 流式細胞儀(Flow cytometry)測定

此儀器能偵測細胞表面抗原以及細胞體積和型態複雜程度，其原理為利用雷射光照射入流體細胞上其偵測器分為 FSC 以及 SSC，FSC 與細胞體積及大小有關，而 SSC 則與細胞內部複雜度有關，藉此利用免疫螢光染色的方式，可測得螢光訊號被偵測的強度。利用 Versen buffer (0.2 % EDTA) 將細胞(Panc 1、HPAC、BxPC-3)從培養皿上脫落，清洗 3 次 PBS buffer，取細胞數目為 3×10^5 各別裝入 3 個微量離心管內，其實驗組分成 Cell alone、

Cell + nanoparticles、cell + Anti-MUC4-nanoparticles，隨後加入 43 μL 的磁性奈米粒子溶液使其總體積稀釋至 200 μL (其抗體修飾之磁性奈米粒子上之抗體濃度為 0.323 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)，控制組為單純的磁性奈米粒子與細胞培養在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下，反應 2 小時，用 PBS buffer 再清洗三次，加入 Anti-mouse antibody-FITC (稀釋 500 倍)使反應總體積為 200 μL ，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下反應 1 小時，隨之再以 PBS buffer 清洗 3 次，最後以 1 mL 的 PBS 回溶經過濾膜打散後，隨即上機操作。

4-27 體外(In vitro) MRI 細胞造影

準備 6 well 的培養皿，分三個實驗組 cell alone、cell + MnMEIO-Cys-Cy777-mPEG、cell + MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG，計算細胞個數為 3×10^5 加入至培養皿中，使細胞生長 24 小時開始與磁性奈米粒子反應，實驗組的三株細胞(Panc 1、HPAC、BPC-3)與 50 μL (抗體濃度為 0.323 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) Anti-MUC4-nanoparticles 總反應體積為 500 μL ，反應兩小時，對照組則為把未修飾抗體的奈米粒子，取 50 μL 與細胞反應使其總體積為 500 μL ，時間也為兩個小時，另一組對照組則為沒有加任何奈米粒子之細胞株，總反應 2 個小時後以 PBS buffer 清洗 3 次，隨後將細胞刮下後放入 PCR tube 中，隨即上機觀測。MRI 核磁共振造影設備其為 7 T 之外加磁場，利用 MSME (multislice multiecho) sequence 為計算模組，TE 為 22.5 ms，TR 為

3000 ms，在 3000 ms 內取 30 張影像訊號，並獲得 R.O.I.值。



五、結果與討論

5-1 磁性奈米粒子內部結構與其物、化性探討

5-1.1 Energy-dispersive spectrometer (EDS)鑑定

本實驗所合成設計之氧化鐵摻雜錳金屬之磁性奈米粒子，透過 Energy-dispersive spectrometer (EDS)之掃描結果如圖十所示，其中在油酸包覆的 MnFe_2O_4 中可看出鐵和錳的比率接近 2：1(圖十一、A)，此結果說明在高溫合成下的奈米粒子，其晶格排列符合本實驗當初設計之預期結果，即使經過水溶性聚合分子修飾後的氧化鐵奈米粒子，也可看出鐵和錳的比率還是接近 2：1(圖十一、B)，因此，在高溫合成的結果顯示其奈米粒子具有良好的晶形結構且不會聚集而影響奈米之實用性。

5-1.2 超順磁氧化鐵-錳奈米粒子之晶體結構

氧化鐵晶體其單元晶格為 Fe_3O_4 尖晶石構形，其特徵峰為(220)、(311)、(400)、(422)、(511)和(440)，其中的 220 為四氧化三鐵之特性吸收峰(如圖十二所示)，比照本研究合成的超順磁氧化鐵-錳奈米粒子，其化學式已由 EDS 鑑定出為 MnFe_2O_4 ，其結構與 Fe_3O_4 尖晶石構形相似，主要原因為錳和鐵的價電荷數相同，其原子半徑相似，除了錳離子具有半滿的 d 軌域之外，其原子組態與鐵相近，由於錳可有較高的磁矩，因此將晶格中的原本是 Fe^{2+} 的位子置換成錳離子將有助於弛緩率的提升。

5-1.3 TEM 之奈米粒子大小測定

在鍍碳銅網上的膜可吸附磁性奈米粒子，由 TEM 可看出平均粒子大小為 $8.8 \pm 0.8 \text{ nm}$ (如圖九所示)，其形狀完整規則，符合預期高溫裂解方式比共沉澱法所合成的奈米粒子結構更完整。

5-1.4 超導量子干涉儀(SQUID)之磁性分析

利用 SQUID 鑑定磁性奈米粒子之磁性，圖可看出在室溫下的飽和磁化強度 M_s 為 101 emu/g ，矯頑磁力 H_c 約為 10 Oe (如圖十所示)，可說明在室溫下的磁滯現象並不明顯，這表示高溫裂解之磁性奈米粒子本身具有超順磁性。

5-1.5 FTIR (Fourier transform infrared, FTIR)分析磁性奈米氧化鐵表面特定官能基之吸收振動頻率分析

FTIR 是用來鑑定官能基的鍵結和化學位移，最常用的方法為壓錠法也就是將樣品與 KBr 粉末進行壓片。為了使磁性奈米粒子表面修飾上具有生物相溶性之 polymer，利用 ligand exchange 的方式將 polymer 修飾到粒子表面上，並將樣品與 KBr 壓片，藉由 Perkin Elmer System 2000 FT-IR 測量其修飾前以及修飾後的吸收波長，並證明水溶性的 polymer 聚分子確實接到奈米粒子上。由圖十三、A (blue)可看出在 $2955\text{-}2870 \text{ cm}^{-1}$ 有 $(-\text{CH}_2-)$ 之非對稱及對稱性吸收，而 (COO^-) 則出現在 1534 和 1407 cm^{-1} 的位置， (Fe-O) 之吸收峰則出現在 591 cm^{-1} ，而修飾完的磁性奈米粒子，可看出 mPEG-NH₂-silane

(green)的聚合物分子已成功包覆於氧化鐵核外 MnMEIO(NH₂)-mPEG (red)，最明顯的吸收峰出現在 2924 cm⁻¹ 之(-CH₂-)官能基呈現渾圓且修長的對稱吸收，此吸收為聚合物分子(mPEG)之獨特吸收，然而 1114&1070&1055 cm⁻¹ 也可看出(Si-O-Si)之官能基吸收，說明氧化鐵表面修飾的情形，其他吸收峰之振動頻率顯示在表一中。

5-1.6 縱向弛緩率(r_1)及橫向弛緩率(r_2)之分析

弛緩率代表著水分子受到磁性奈米粒子影響後的弛緩時間，磁性奈米粒子弛緩率越大則影響周圍水分子之自旋的弛緩速率也越大，這造成與周圍環境的對比度上升，因此在測量縱向與橫向的弛緩時間，會是造成 MRI 影像訊號上的基礎依據。由表二所示，經修飾聚乙二醇的磁性奈米粒子具有較高的弛緩率 239.66 mM⁻¹s⁻¹，原因在於水合直徑較小，接上螢光團與 NSMP 後水合直徑由 39.3 nm 增大至 41.59 nm，其弛緩率由 239.7 mM⁻¹s⁻¹ 下降至 209.5 mM⁻¹s⁻¹，由於水合直徑增大因此與水接觸的距離較遠，弛緩率有稍微的下降，當接上抗體與半胱胺酸後，接抗體後的奈米粒子大小上升為 55.9 nm，弛緩率上升至 216.1 mM⁻¹s⁻¹，弛緩率上升的原因推測為抗體為胺基酸單體組成，因此胺基與羧酸會與水分子產生氫鍵，其餘的 maleimide 基團也由半胱胺酸反應完全，因此磁性奈米粒子表面由正負基團所組成，含有大量的胺基與羧酸，因此與水產生較大的吸引力，即使水合直徑變大，

但弛緩率還是有上升的傾向。對照組則相較於實驗組而言其弛緩率 $210.01 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ 並沒有太大的差異。

5-1.7 超順磁氧化鐵-錳奈米粒子表面電價與 pH 變化之分析

奈米粒子的表面電價由胺基與羧酸的含量多寡所調控，在之前的研究中，我們利用聚乙二醇的立體阻礙，使胺基藏於性奈米粒子內側，也就是 MnMEIO(NH₂)-mPEG 的結構，此修飾方式有很好的優點，其為表面電價雖然為正值，但反應端胺基因外層聚乙二醇的修飾則不易裸露於外側，會減少與細胞表面接觸的機會，進而降低非專一性的吸附或是吞噬，由於腫瘤為酸性環境 pH 約為 4~5，因此針對磁性奈米粒子對於酸鹼的表面電位測定有助於了解奈米粒子在酸鹼環境中的電荷狀態。由圖十四所示，MnMEIO(NH₂)-mPEG 在 pH 為 7 時帶有 +17.3 mV 的價電荷，而經修飾的 MnMEIO-linker-Cy777-mPEG 在 pH 為 7 時則下降至 -8.72 mV，此負電價來自於螢光團上 SO₃⁻ 所產生，胺基完全被 NSMP 所反應，所以表面電價比 MnMEIO(NH₂)-mPEG 在水溶液中更接近於電中性，因此本實驗也測得修飾完抗體與半胱胺酸的實驗組與對照組之磁性奈米粒子，其 MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG 為 -4.38 mV，而 MnMEIO-Cys-Cy777 為 -3.93 mV，此兩個組別都接近於電中性，之所以會修飾半胱胺酸的原因在於希望能在表面電價上使得奈米粒子不會因為帶電性的關係造成對細胞的非專一

性鍵結，當然也能模擬奈米粒子在體內真實粒子流動的情形。

5-1.8 pH 值對超順磁氧化鐵-錳奈米粒子穩定性的探討

由於合成的 mPEG-NH₂-silane 具有酯鍵，因此容易在鹼性環境下被水解成酸與醇，此反應會造成奈米粒子的水溶性下降甚至造成沉澱，由圖十四所示，奈米粒子在 pH 值為 4~7 時粒子大小幾乎沒有什麼變化維持在 36~39 nm，從 pH 值 8~9 可看出奈米粒子開始下降至 27.2 nm，放置數小時之後可看見微小的沉澱產生，此結果說明奈米粒子在酸性至中性的環境可以保存一段時間，但往後反應的過程不得有鹼性催化劑的參與，否則將會導致鹼性的水解，但此水解特性並不會影響奈米粒子在體內的穩定性，原因在於體內的 pH 為恆定 7.4，血液皆為等張溶液，因此 pH 對於奈米粒子的損壞可以減低至最小。

5-2.1 流式細胞儀對磁性奈米粒子上的抗體其專一性功能進行分析

奈米粒子上的抗體會受到修飾的過程中產生降解，造成抗體的不穩定或是結構的破壞，因此本實驗選用 Traut's agent 對抗體進行修飾，最後在 buffer 中進行磁性奈米粒子與抗體之鍵結，此過程都在無菌的狀態下完成，盡量減少對抗體的傷害。所以在流式細胞儀的測定下，如圖十六所示，可以看見實驗組的細胞(HPAC、BxPC-3)有些許的位移，而對照組的細胞(Panc 1)則無明顯的位移，但是實驗組的位移情形並不能代表本實驗所設計合成的

MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG 具有標並細胞表面蛋白的能力，推測原因為本實驗中 MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG 其抗體位子在內側，外層有 PEG 聚合分子所形成的立體阻礙，因此二抗無法辨識在一抗的位置，造成螢光訊號的下降。

5-2.2 體外(In vitro) MRI 造影實驗之探討

細胞實驗開始前，先將配置的標準溶液作 MRI 影像之鑑定，如圖所示，與市售的 ResovistTM 進行比較，其中各取鐵離子濃度為 0.5 mM、0.25 mM、0.125 mM、0.0625 mM 作為標準濃度樣品，由圖十七可以看出本實驗設計的 MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG 與對照組 MnMEIO-Cys-Cy777-mPEG 顏色對比度都比 ResovistTM 來得強烈，這表示參雜錳離子的磁性奈米粒子確實有提高對比效果，換算成 R.O.I. 訊號值後，由圖十八所示，可看到實驗組與對照組 MRI 訊號有明顯下降的趨勢，這表示在影像上會偏向黑色，因此本實驗設計的磁性奈米粒子確實有達到預期的效果。細胞實驗的結果也顯示，具有 MUC4 表現的細胞株其顏色訊號較為黑，如圖十九所示，而對照低表現之 Panc 1 細胞株則影像訊號則沒有太大差異相較於 cell alone，由圖二十分析的結果也指出，MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG 能有效且專一性的鍵結上具有 MUC4 的細胞株，其訊號質有明顯的下降，此結果顯示本實驗所設計的磁性奈米粒子具有較佳的影像對比訊號，且在偵測細胞的表面蛋白上具有良

好的專一性鍵結。



六、 結論

本文研究已經成功的合成高溫裂解的超順磁氧化鐵-錳奈米粒子，由EDS與XRD分析都顯示其晶體結構為完整的 MnFe_2O_4 尖晶石構形，元素分析也指出鐵錳比為2：1，其飽和磁化率與矯磁頑力為101 emu/g以及10.1 Oe代表著超順磁性的特徵，進一步修飾上 $\text{MnMEIO}(\text{NH}_2)\text{-mPEG}$ 其弛緩率為 $239.7 \pm 15.9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ，其表面修飾已經透過紅外光傅立葉轉換進行鑑定，此水溶性超順磁氧化鐵-錳奈米粒子在前期的研究中已經成功的應用於表面生長受體的鍵結，並且降低了非專一性的吸附。而得到良好的MRI影像訊號。在本文，又將利用此磁性奈米粒子表面胺基特性，進一步的修飾抗體與交聯化合物(linker)與胺基進行專一性的反應，並且以半胱胺酸中和表面電價，得到實驗組 $\text{MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG}$ 與對照組 $\text{MnMEIO-Cys-Cy777-mPEG}$ 兩組MRI對比劑，對照組目的為觀測此磁性奈米粒子是否會與細胞進行非共價性的吸附或鍵結，由流式細胞儀的觀測雖然螢光位移的情形不多，但可看出實驗組與對照組之間的差異性，推測其二抗螢光蛋白無法辨識在內側的一抗，導致螢光訊號微弱。由體外MRI造影實驗可以看出有表現MUC4蛋白之細胞株有明顯的變黑趨勢，而對照組以及低表現之細胞株則沒有明顯訊號的下降，證實本實驗所合成能偵測胰臟癌的磁性奈米探針，確實可在MRI影像訊號上獲得資訊，此結果也顯示磁性奈米探針具有良好的生物相容性，更有良好的專一性鍵結，可作為未來活體實驗之參考依據。

七、 參考文獻

- (1) Iniewski, K.; John Wiley & Sons: Hoboken, N.J.; *Medical Imaging* **2009**.
- (2) Cho, Z. H.; Jones, J. P.; Singh, M.; John Wiley & Sons: New York, *Foundations of Medical Imaging*. **1993**.
- (3) Krestel, E. Aktiengesellschaft: Berlin, *Imaging Systems for Medical Diagnostics*; Siemens. **1990**.
- (4) Cherry, S. R.; Sorenson, J. A.; Phelps, M. E.; Elsevier Science: Philadelphia, *Physics in Nuclear Medicine*. **2003**.
- (5) Wernick, M. N.; Aarsvold, J. N.; Elsevier, Academic Press: Amsterdam, Boston, *Emission Tomography, The Fundamentals of PET and SPECT*. **2004**.
- (6) Tsien, R. Y. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 86-89.
- (7) Piwnica-Worms, D. R. *J. Am. Col. Radiol.* **2004**, *1*, 2-3.
- (8) Schroeder, T. *Nature* **2008**, *453*, 345-351.
- (9) Leach, M. O. *NMR Biomed.* **2009**, *22*, 17-27.
- (10) Sinha, S.; Sinha, U. *NMR Biomed.* **2009**, *22*, 3-16.
- (11) Logothetis, N. K. *Nature* **2008**, *453*, 869-878.
- (12) Duong, T. Q.; Pardue, M. T.; Thule, P. M.; Olson, D. E.; Cheng, H.; Nair, G.; Li, Y.; Kim, M.; Zhang, X.; Shen, Q. *NMR Biomed.* **2008**, *21*, 978-996.
- (13) Ogawa, S.; Lee, T. M.; Kay, A. R.; Tank, D. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*, 9868-9872.
- (14) Lauterbur, P. C. *Nature* **1973**, *242*, 190-191.
- (15) Lauterbur, P. C. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1989**, *244*, 3-6.
- (16) Nelson, F.; Poonawalla, A.; Hou, P.; Wolinsky, J. S.; Narayana, P. A. *Mult. Scler.* **2008**, *14*, 1214-1219.
- (17) Le Bihan, D. *Magn. Reson. Med.* **1988**, *7*, 346-351.
- (18) Le Bihan, D. *Radiology* **2008**, *249*, 748-752.
- (19) Le Bihan, D.; Breton, E.; Lallemand, D. *Radiology* **1986**, *161*, 401-407.
- (20) Le Bihan, D.; Breton, E.; Lallemand, D.; Aubin, M. L.; Vignaud, J.; Laval-Jeantet, M. *Radiology* **1988**, *168*, 497-505.
- (21) Le Bihan, D.; Turner, R. *Magn. Reson. Med.* **1992**, *27*, 171-178.
- (22) Turner, R.; Le Bihan, D.; Maier, J.; Vavrek, R.; Hedges, L. K.; Pekar, J. *Radiology* **1990**, *177*, 407-414.
- (23) Gerlach, W.; Stern, O. *Z. Phys.* **1921**, *8*, 110-115.
- (24) Rabi, I. I.; Zacharias, J. R.; Millman, S.; Kusch, P. *Phys. Rev.* **1938**, *53*, 318-323.
- (25) Purcell, E. M.; Torrey, H. C.; Pound, R. V. *Phys. Rev.* **1946**, *69*, 37-43.

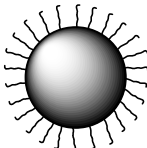
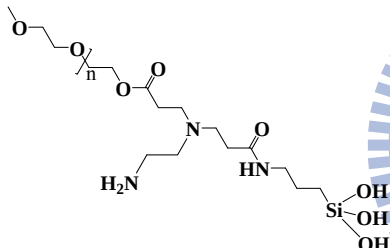
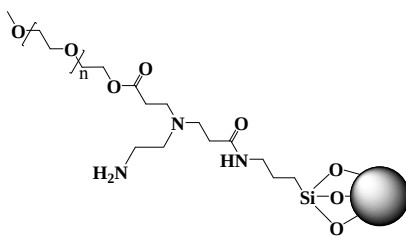
- (26) Bloch, F.; Hansen, W. W.; Packard, M. *Phys. Rev.* **1946**, *69*, 127-132.
- (27) Damadian, R. *Science* **1974**, *4*, 1471-1474.
- (28) Mansfield, P. J. *Phys. C: Solid State Phys.* **1977**, *10*, 55-61.
- (29) Mansfield, P.; Grannell, P. K. J. *Phys. C: Solid State Phys.* **1973**, *6*, 422-429.
- (30) Josephson, L.; Kircher, M. F.; Mahmood, U.; Tang, Y.; Weissleder, R. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 554-560.
- (31) Askenasy, N.; Farkas, D. L. *Stem Cells* **2002**, *20*, 501-513.
- (32) Modo, M.; Hoehn, M.; Bulte, J. W. M. *Mol. Imaging* **2005**, *4*, 143-164.
- (33) Tearney, G. J.; Brezinski, M. E.; Boppart, S. A.; Bouma, B. E.; Weissman, N.; Southern, J. F.; Swanson, E. A.; Fujimoto, J. G. *Circulation* **1996**, *94*, 3013-3020.
- (34) Moniaux N, Varshney G. C.; Chauhan S. C.; Copin M. C.; Jain M.; Wittel U. A.; Andrianifahanana M.; Aubert J. P.; Batra S. K.; *J Histochem Cytochem.* **2004**, *52*, 253-61.
- (35) Gellermann, J.; Faehling, H.; Mielec, M.; Cho, C. H.; Budach, V.; Wust, P. *Int. J. Hyperthermia* **2008**, *24*, 327-335.
- (36) Wyatt, C.; Soher, B.; MacCarini, P.; Charles, H. C.; Stauffer, P.; MacFall, J. *Int. J. Hyperthermia* **2009**, *25*, 422-433.
- (37) Chapon, C.; Jackson, J. S.; Aboagye, E. O.; Herlihy, A. H.; Jones, W. A.; Bhakoo, K. K. *Mol. Imaging Biol.* **2009**, *11*, 31-38.
- (38) Loebinger, M. R.; Kyrtatos, P. G.; Turmaine, M.; Price, A. N.; Pankhurst, Q.; Lythgoe, M. F.; Janes, S. M. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 8862-8867.
- (39) Thu, M. S.; Najbauer, J.; Kendall, S. E.; Harutyunyan, I.; Sangalang, N.; Gutova, M.; Metz, M. Z.; Garcia, E.; Frank, R. T.; Kim, S. U.; Moats, R. A.; Aboody, K. S. *PLoS One* **2009**, *4*, 1-12.
- (40) Jiang, Y.; Chen, L.; Tang, Y.; Ma, G.; Shen, C.; Qi, C.; Zhu, Q.; Yao, Y.; Liu, N. *Basic Res. Cardiol.* **2009**, *1*, 692-695.
- (41) Klose, A. D.; Beattie, B. J.; Dehghani, H.; Vider, L.; Le, C.; Ponomarev, V.; Blasberg, R. *Med. Phys.* **2010**, *37*, 329-338.
- (42) Wang, K.; Shen, B.; Huang, T.; Sun, X.; Li, W.; Jin, G.; Li, L.; Bu, L.; Li, R.; Wang, D.; Chen, X. *Mol. Imaging Biol.* **2009**, *12*, 520-529.
- (43) Hermus, L.; van Dam, G. M.; Zeebregts, C. J. *Eur. J. Vasc. EndoVasc.* **2009**, *39*, 125-133.
- (44) Minowa, T.; Kawano, K.; Kuribayashi, H.; Shiraishi, K.; Sugino, T.; Hattori, Y.; Yokoyama, M.; Maitani, Y. *Br. J. Cancer* **2009**, *101*, 1884-1890.
- (45) Murukesh, N.; Dive, C.; Jayson, G. C. *Br. J. Cancer* **2010**, *102*, 8-18.
- (46) Zhou, Y.; Wang, S.; Yu, Z.; Hoyt, R. F., Jr.; Sachdev, V.; Vincent, P.; Arai, A.

- E.; Kwak, M.; Burkett, S. S.; Horvath, K. A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *390*, 902-907.
- (47) Bartusik, D.; Tomanek, B. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51*, 894-900.
- (48) Giesel, F. L.; Mehndiratta, A.; Locklin, J.; McAuliffe, M. J.; White, S.; Choyke, P. L.; Knopp, M. V.; Wood, B. J.; Haberkorn, U.; Von Tengg-Kobligk, H. *Exp. Oncol.* **2009**, *31*, 106-114.
- (49) Tsai, C. S.; Lai, C. H.; Chang, T. C.; Yen, T. C.; Ng, K. K.; Hsueh, S.; Lee, S. P.; Hong, J. H. *Int. J. Radiat. Oncol., Biol., Phys.* **2009**, *76*, 477-484.
- (50) Lodygensky, G. A.; West, T.; Stump, M.; Holtzman, D. M.; Inder, T. E.; Neil, J. J. *Brain, Behav., Immun.* **2009**, *24*, 759-769.
- (51) Yadav, A.; Chaudhary, C.; Keshavan, A. H.; Agarwal, A.; Verma, S.; Prasad, K. N.; Rathore, R. K. S.; Trivedi, R.; Gupta, R. K. *Acad. Radiol.* **2010**, *17*, 194-200.
- (52) Yang, Y.; Yanasak, N.; Schumacher, A.; Hu, T. C. C. *Magn. Reson. Med.* **2010**, *63*, 33-44.
- (53) Blankenberg, F. G. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2009**, *9*, 944-951.
- (54) Burtea, C.; Laurent, S.; Lancelot, E.; Ballet, S.; Murariu, O.; Rousseaux, O.; Port, M.; Vander Elst, L.; Corot, C.; Muller, R. N. *Mol. Pharmaceutics* **2009**, *6*, 1903-1919.
- (55) Sosnovik, D. E.; Garanger, E.; Aikawa, E.; Nahrendorf, M.; Figuiere, J. L.; Dai, G.; Reynolds, F.; Rosenzweig, A.; Weissleder, R.; Josephson, L. *Circ. CardioVasc. Imaging* **2009**, *2*, 460-467.
- (56) Hayashi, K.; Mani, V.; Nemade, A.; Silvera, S.; Fayad, Z. A. *Int. J. CardioVasc. Imaging* **2010**, *26*, 309-321.
- (57) Volcik, K. A.; Campbell, S.; Chambless, L. E.; Coresh, J.; Folsom, A. R.; Mosley, T. H.; Ni, H.; Wagenknecht, L. E.; Wasserman, B. A.; Boerwinkle, E. *Atherosclerosis* **2010**, *210*, 188-193.
- (58) Miller, M. M.; Prinz, G. A.; Cheng, S. F.; Bounnak, S. *Appl. Phys. Lett.* **2002**, *81*, 2211-2230.
- (59) Jain, T. K.; Morales, M. A.; Sahoo, S. K.; Leslie-Pelecky, D. L.; Labhasetwar, V. *Mol. Pharm.* **2005**, *2*, 194-205.
- (60) Chourpa, I.; Douziech-Eyrolles, L.; Ngaboni-Okassa, L.; Fouquenot, J. F.; Cohen-Jonathan, S.; Souce, M.; Marchais, H.; Dubois, P. *Analyst* **2005**, *130*, 1395-1403.
- (61) Gupta, A. K.; Gupta, M. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3995-4021.
- (62) Chastellain, M.; Petri, A.; Gupta, A.; Rao, K. V.; Hofmann, H. *Adv. Eng. Mater.* **2004**, *6*, 353-360.
- (63) Nikhil R. J.; Yongfen, C.; Peng, X. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 3931-3935.

- (64) Sun, S.; Zeng, H.; Robinson, D. B.; Raoux, S.; Rice, P. M.; Wang, S. X.; Li, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 273-279.
- (65) Xie, J.; Sun, S. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 5401-5403.
- (66) Xie, J.; Peng, S.; Brower, N.; Pourmand, N.; Wang, S. X.; Sun, S. *Pure Appl. Chem.* **2006**, *78*, 1003-1014.
- (67) Insin, N.; Tracy, J. B.; Lee, H.; Zimmer, J. P.; Westervelt, R. M.; Bawendi, M. G. *ACS Nano* **2008**, *2*, 197-202.
- (68) Huang, X.; Bronstein, L. M.; Retrum, J.; Dufort, C.; Tsvetkova, I.; Aniahyei, S.; Stein, B.; Stucky, G.; McKenna, B.; Remmes, N.; Baxter, D.; Kao, C. C.; Dragnea, B. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 2407-2416.
- (69) Bronstein, L. M.; Huang, X.; Retrum, J.; Schmucker, A.; Pink, M.; Stein, B. D.; Dragnea, B. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 3624-3632.
- (70) Hyeon, T. *Chem. Commun.* **2003**, 927-934.
- (71) Lee, H.; Yu, M. K.; Park, S.; Moon, S.; Min, J. J.; Jeong, Y. Y.; Kang, H.-W.; Jon, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12739-12745.
- (72) Bhattacharya, S.; Eckert, F.; Boyko, V.; Pich, A. *small* **2007**, *3*, 650-657.
- (73) Petri-Fink, A.; Chastellain, M.; Juillerat-Jeanneret, L.; Ferrari, A.; Hofmann, H. *Biomaterials* **2005**, *26*, 2685-2694.
- (74) Jana, N. R.; Chen, Y.; Peng, X. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 3931-3935.
- (75) Kwon, S. G.; Piao, Y.; Park, J.; Angappane, S.; Jo, Y.; Hwang, N.-M.; Park, J.-G.; Hyeon, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12571-12584.
- (76) Park, J.; An, K.; Hwang, Y.; Park, J. G.; Noh, H.-J.; Kim, J. Y.; Park, J.-H.; Hwang, N.-M.; Hyeon, T. *Nat. Mater.* **2004**, *3*, 891-895.
- (77) Sun, S.; Zeng, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8204-8205.
- (78) Sun, S.; Zeng, H.; Robinson, D. B.; Raoux, S.; Rice, P. M.; Wang, S. X.; Li, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 273-279.
- (79) Shukoor, M. I.; Natalio, F.; Therese, H. A.; Tahir, M. N.; Ksenofontov, V.; Panthöfer, M.; Eberhardt, M.; Theato, P.; Schröder, H. C.; Müller, W. E. G.; Tremel, W. *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 3567-3573.
- (80) Bronstein, L. M.; Huang, X.; Retrum, J.; Schmucker, A.; Pink, M.; Stein, B. D.; Dragnea, B. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 3624-3632.
- (81) Sun S.; Zeng H.; Robinson D. B.; Raoux S.; Rice P. M.; Wang S. X.; Li G. *J Am Chem Soc.* **2004**, *126*, 273-9.
- (82) Xu H, Baidoo K, Gunn A. J.; Boswell C. A.; Milenic D. E.; Choyke P. L.; Brechbiel M. W. *J Med Chem.* **2007**, *50*, 4759-4765.
- (83) Hultman K. L.; Raffo A. J.; Grzenda A. L.; Harris P. E.; Brown T. R.; O'Brien S. *ACS Nano.* **2008**, *2*, 477-84.

表目錄

表一、傅立葉轉換紅外光光譜儀分析 MnMEIO/oleic acid/oleylamine(5), mPEG-NH₂-silane(4), and MnMEIO(NH₂)-mPEG(6)。

Sample	Characteristic vibrations ^a (cm ⁻¹)
MnMEIO/oleic acid/oleylamine(5) 	3100-3600 (ν OH), 3058 (ν_a CH=), 3019 (ν_s CH=), 2924 (ν_a CH ₂), 2851 (s CH ₂), 1678(ν C=C), 1600 (δ N-H), 1552 (ν_a COO ⁻), 1454 (sh) (CH ₂), 1404 (ν_s COO ⁻ and CH ₂ -COO ⁻), 1097 (ν_s C-N), 593 (ν Fe-O)
mPEG-NH ₂ -silane(4) 	3100-3700 (ν OH & ν NH ₂), 2885 (ν_s EG CH ₂), 2823 (sh) (ν_s CH ₃), 2739 (sh) (comb.), 1695 (ν C=O), 1633 (δ H ₂ O), 1466 (δ CH ₂), 1409 (δ CH ₂ -COO ⁻), 1342 (ω_{gauche} EG CH ₂), 1300 (sh) (ω_{trans} EG CH ₂), 1281 (τ EG CH ₂), 1247 (τ EG CH ₂ & ν Si-C), 1200 (ρ OCH ₃), 1177 (ν C-N), 1170-1000 (ν Si-O-R), 1110 (ν C-O-C), 1034 (ν C-O-C), 948 (ρ EG CH ₂), 840 (ν_s EG CH ₂), 797&718 (ω NH ₂)
MnMEIO(NH ₂)-mPEG(6) 	3100-3700 (ν OH & ν NH ₂), 2884 (ν_s EG CH ₂), 2820 (sh) (ν_s CH ₃), 2739 (sh) (comb.), 1693 (ν C=O), 1633 (δ H ₂ O), 1465 (CH ₂), 1410 (δ CH ₂ -COO ⁻), 1342 (ω_{gauche} EG CH ₂), 1301 (sh) (ω_{trans} EG CH ₂), 1282 (τ EG CH ₂), 1247 (τ EG CH ₂ & ν Si-C), 1202 (ρ OCH ₃), 1177 (ν C-N), 1170-1000 (ν Si-O-R), 1110 (ν C-O-C), 1034 (ν C-O-C), 948 (ρ EG CH ₂), 795&715 (ω NH ₂), 592 (ν Fe-O)

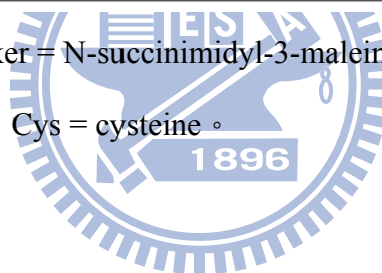
^a sh = shoulder; EG = ethylene glycol; R=H, C, Si; ν_a = asymmetric stretching; ν_s = symmetric stretching; δ = scissoring; ω = wagging; τ = twisting; ρ = rocking。

表二、MnMEIO(NH₂)-mPEG、MnMEIO-linker-Cy777-mPEG、
MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG、MnMEIO-Cys-Cy777-mPEG 之水合直徑與弛
緩率之分析。

Sample ^a	Size (nm)	r_1 (mM ⁻¹ s ⁻¹)	r_2 (mM ⁻¹ s ⁻¹)	r_2/r_1
MnMEIO(NH ₂)-mPEG	39.3 ± 2.2	30.1 ± 1.3	239.7 ± 15.9	7.9
MnMEIO-linker-Cy777-mPEG	41.6 ± 8.2	33.5 ± 0.6	209.5 ± 7.8	6.3
MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG	55.9 ± 5.6	35.7 ± 1.5	216.1 ± 4.4	5.7
MnMEIO-Cys-Cy777-mPEG	42.7 ± 4.3	34.3 ± 0.8	210.0 ± 5.4	6.1

^aMnMEIO = MnFe₂O₄ ; linker = N-succinimidyl-3-maleimidopropionate (NSMP) ;

Ab = Anti-MUC4 antibody ; Cys = cysteine 。



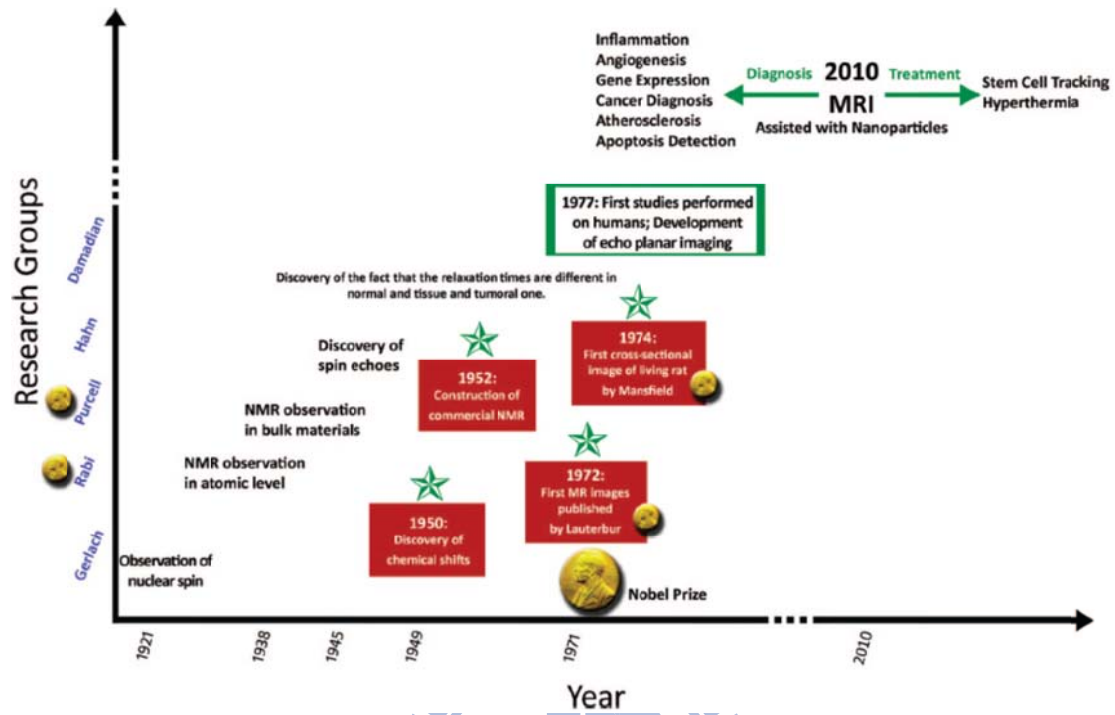
表三、表面電位對 MnMEIO(NH₂)-mPEG、MnMEIO-linker-Cy777-mPEG、MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG、MnMEIO-Cys-Cy777-mPEG 之測定，其偵測濃度控制在 25.0 ± 0.1 °C 下，樣品濃度為 1 mg/mL。

Sample ^a	MnMEIO(NH ₂)-mPEG	MnMEIO-linker-Cy777-mPEG	MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG	MnMEIO-Cys-Cy777-mPEG
Conc. amine (mM)	16	0	-	-
Zeta (mV)	+17.3 ± 2.3	-8.72 ± 1.7	-4.38 ± 0.5	-3.93 ± 0.8

^aConc. amine = concentration of amine group

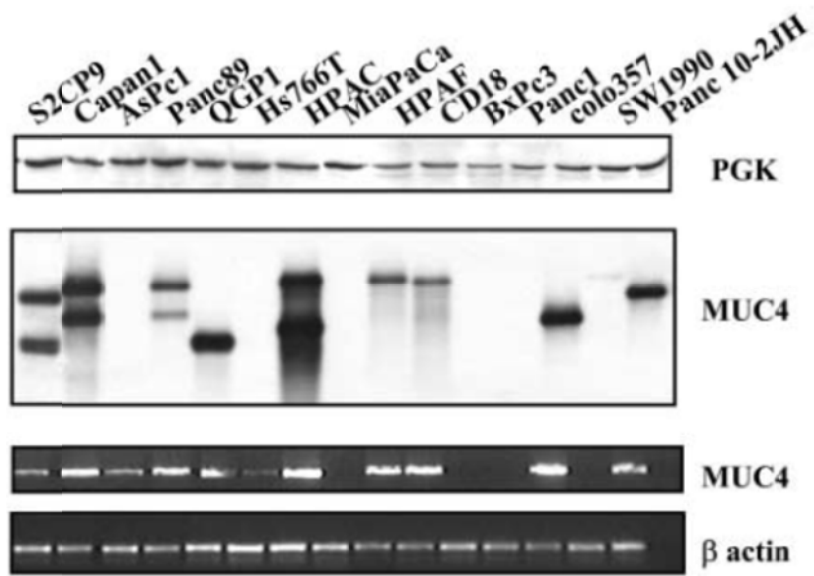


圖目錄

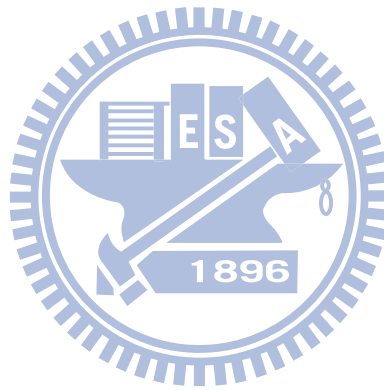


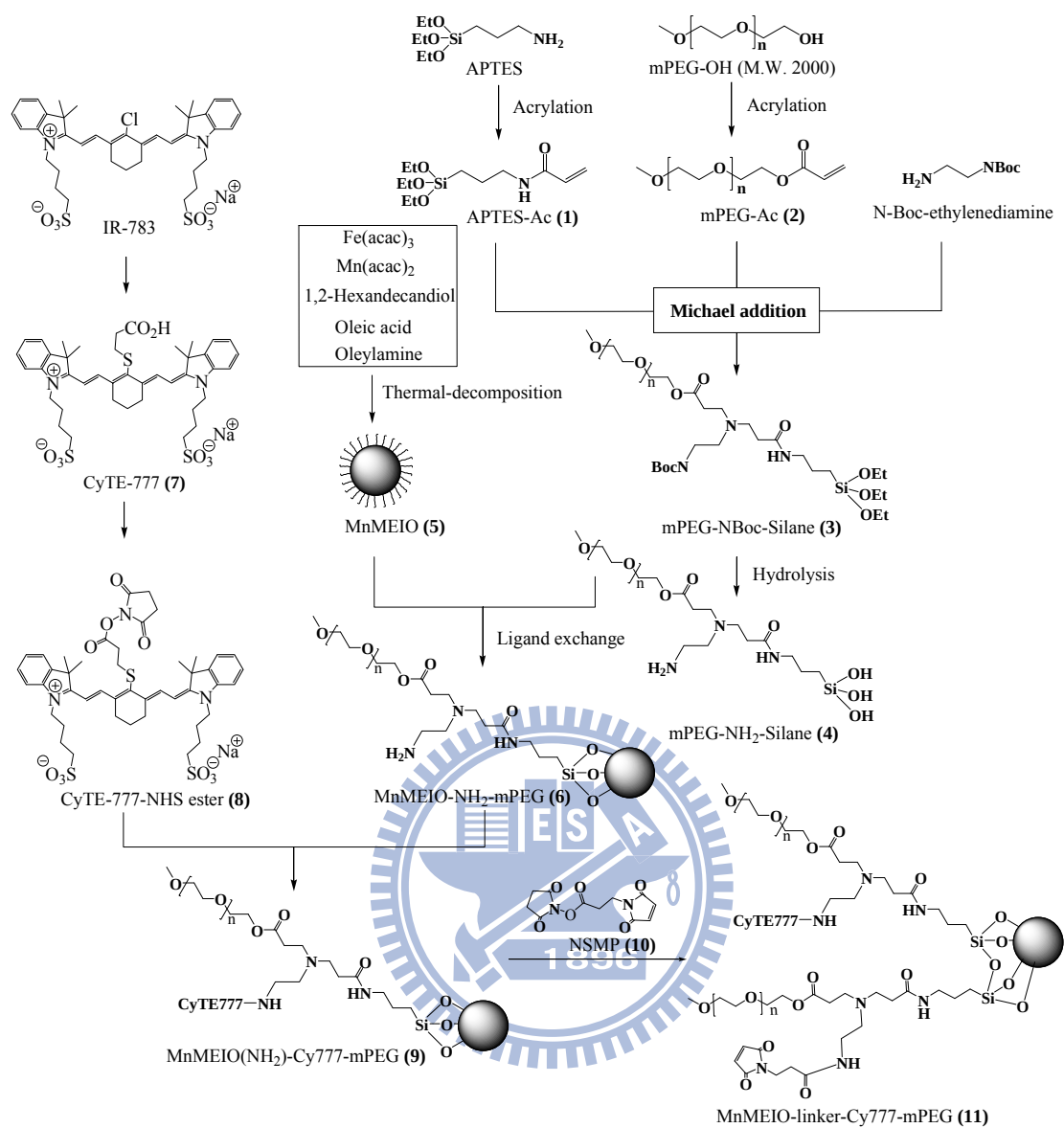
圖一、核磁共振造影之技術演進。



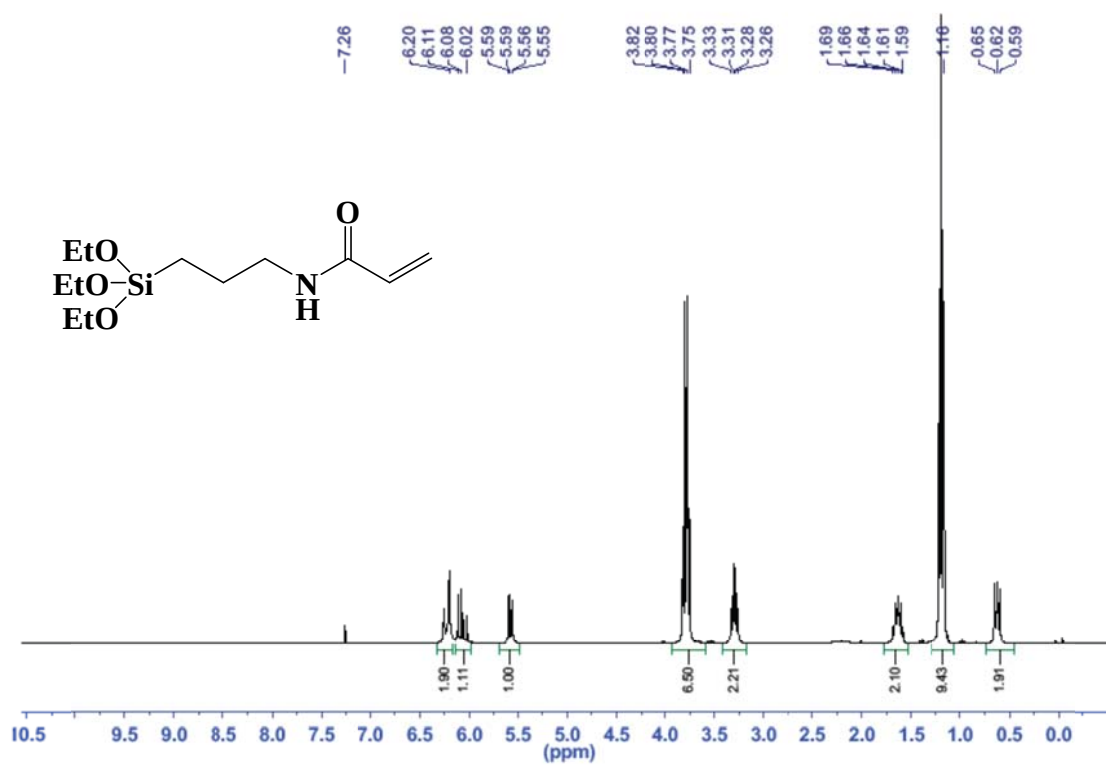


圖二、針對不同的胰臟癌細胞，利用西方點墨法判別不同程度的 MUC4 表現量。



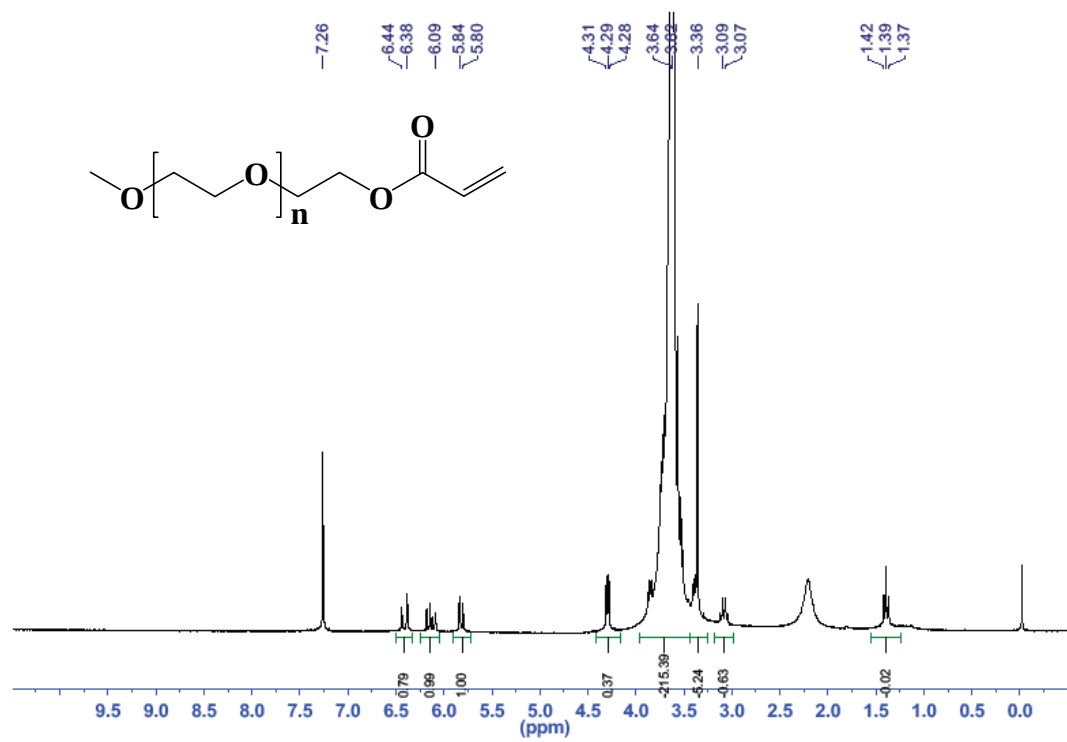


圖三、MnMEIO-linker-Cy777-mPEG 合成流程圖。



圖四、APTES-Ac 之 ^1H -NMR 光譜圖。

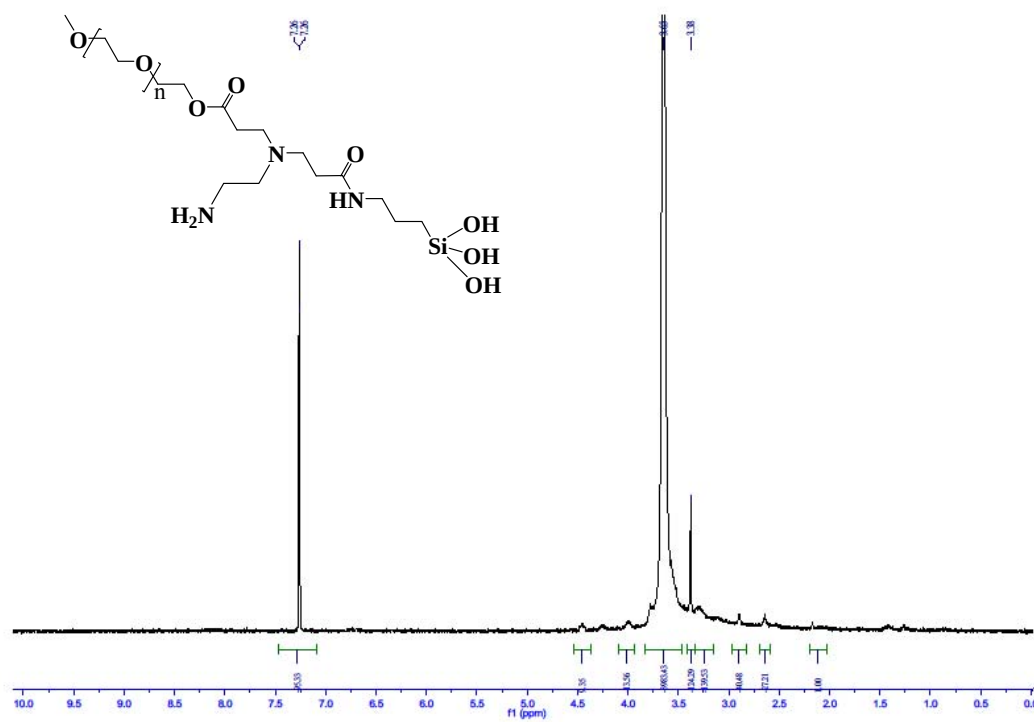




圖五、mPEG-Ac 之 ^1H -NMR 光譜圖。

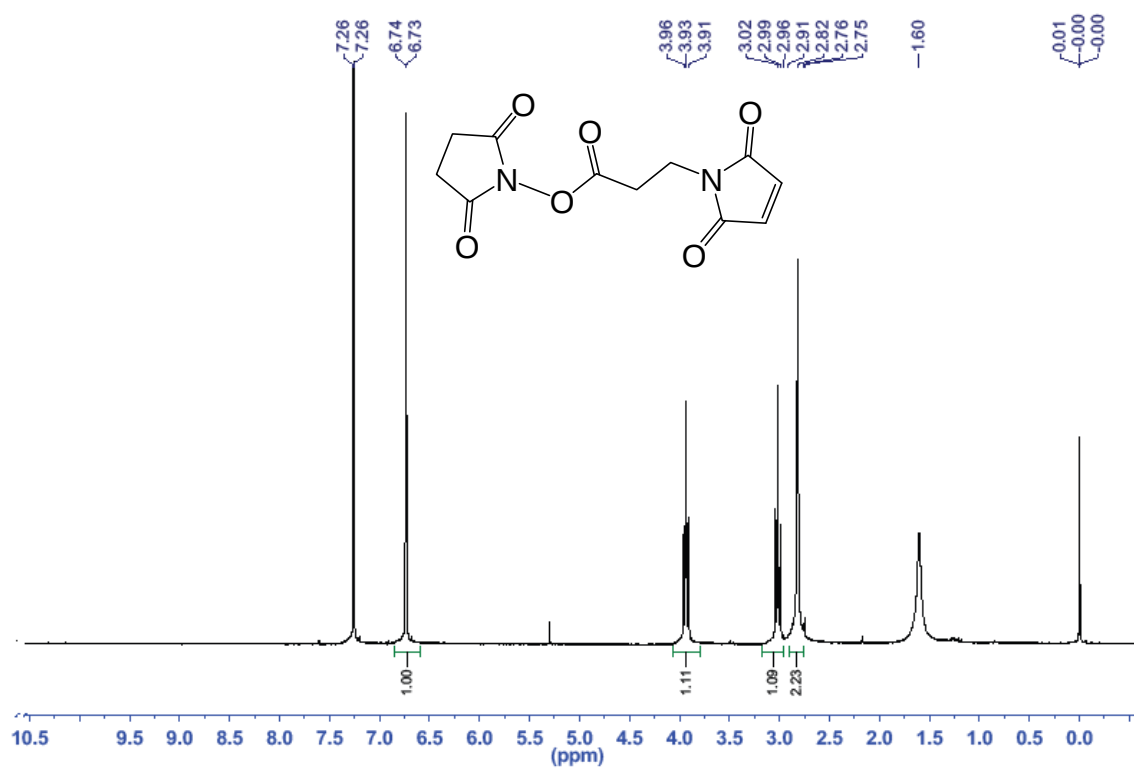






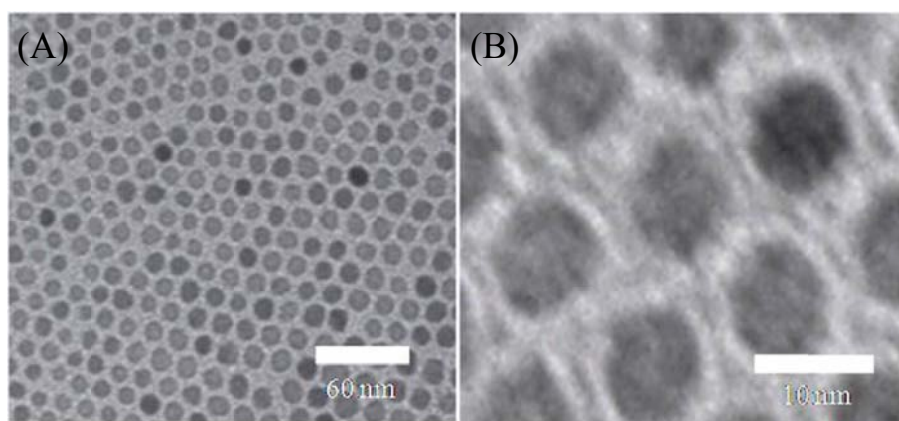
圖七、mPEG-NH₂-silane 之 ¹H-NMR 光譜圖。



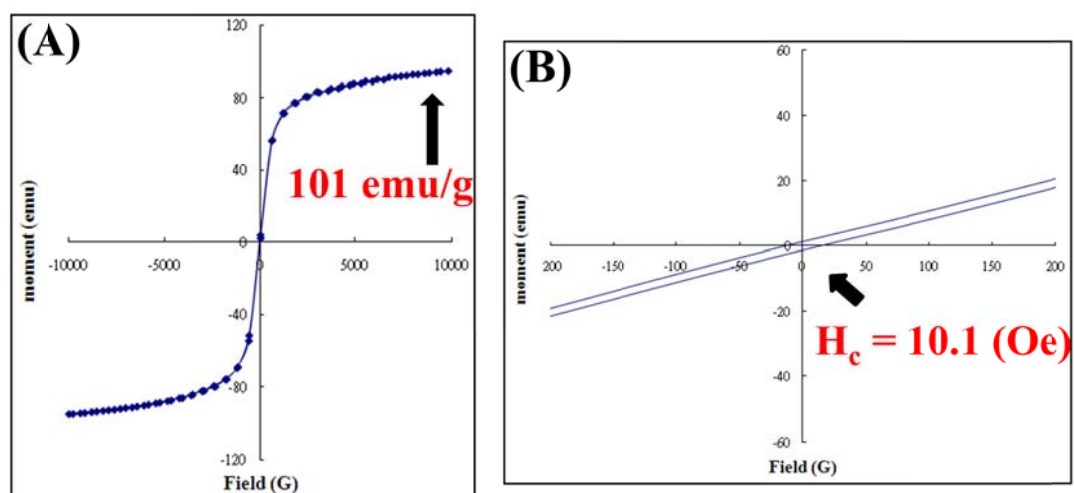


圖八、NSMP 之 ^1H -NMR 光譜圖。

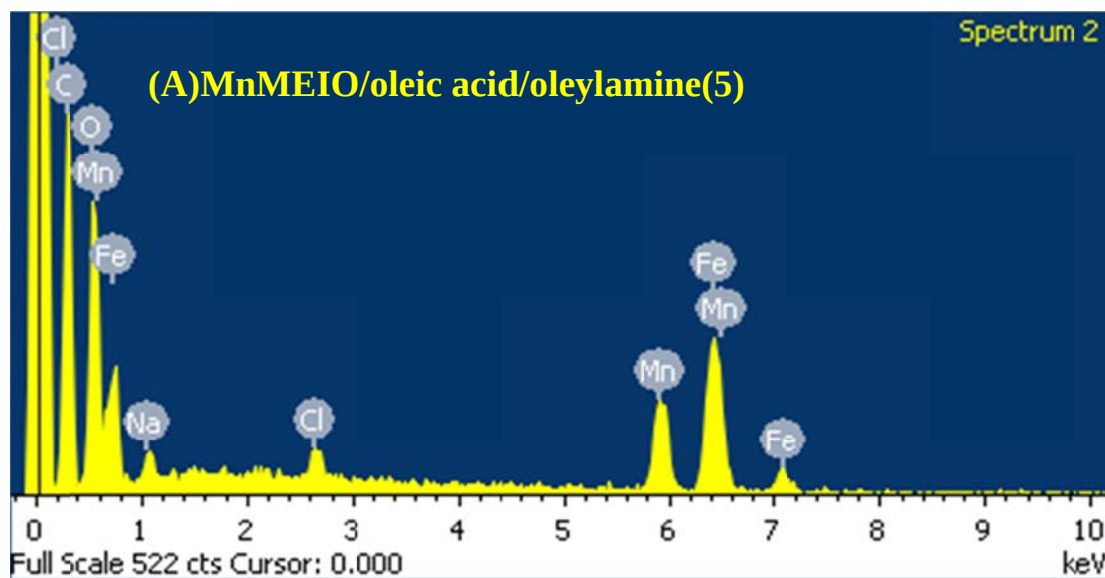




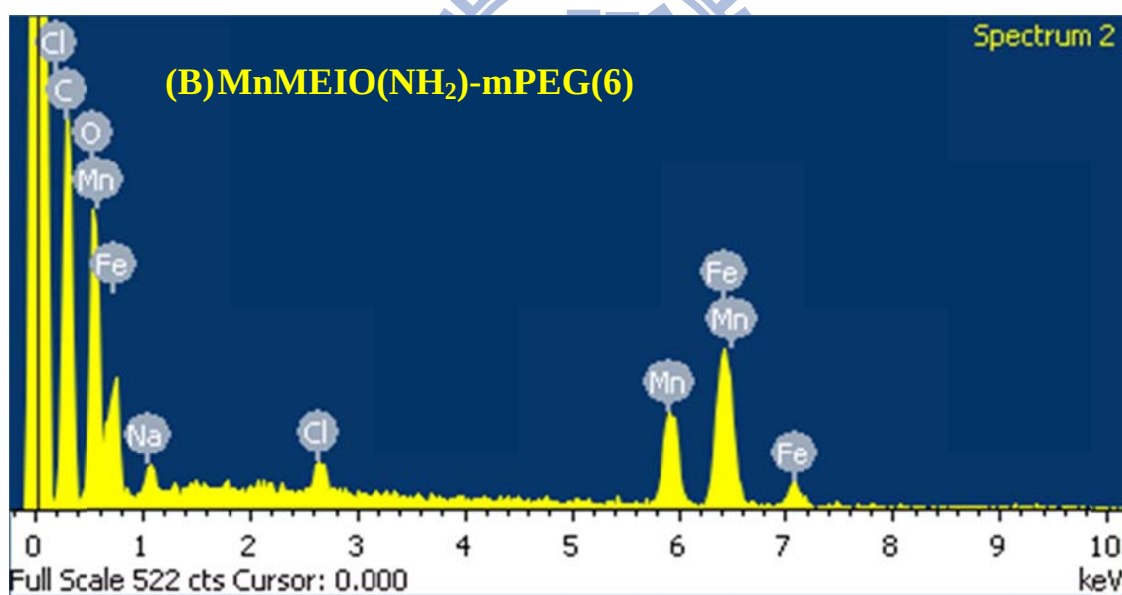
圖九、超順磁氧化鐵-錳奈米粒子之 TEM 影像，平均粒徑為 $8.8 \pm 0.8 \text{ nm}$ ，
 焦距(A) 200,000 倍率；(B)500,000 倍率。



圖十、室溫下超順磁氧化鐵-錳奈米粒子之磁性分佈圖(A)飽和磁化率 = 101
 emu/g；(B)矯頑磁力 $\sim 10.1 \text{ Oe}$ 。

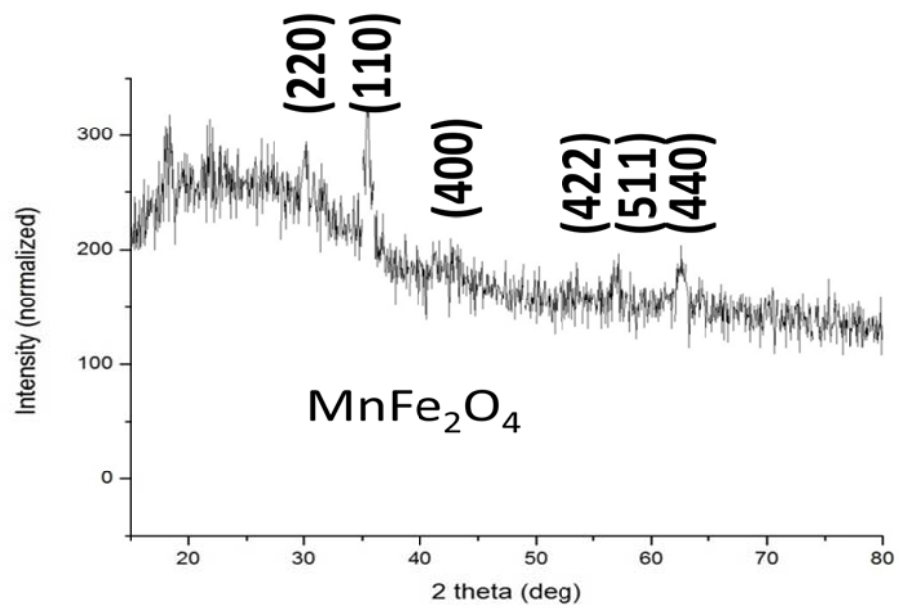


Element	Weight%	Atomic%
Mn (K)	12.61	4.39
Fe (K)	26.49	9.08



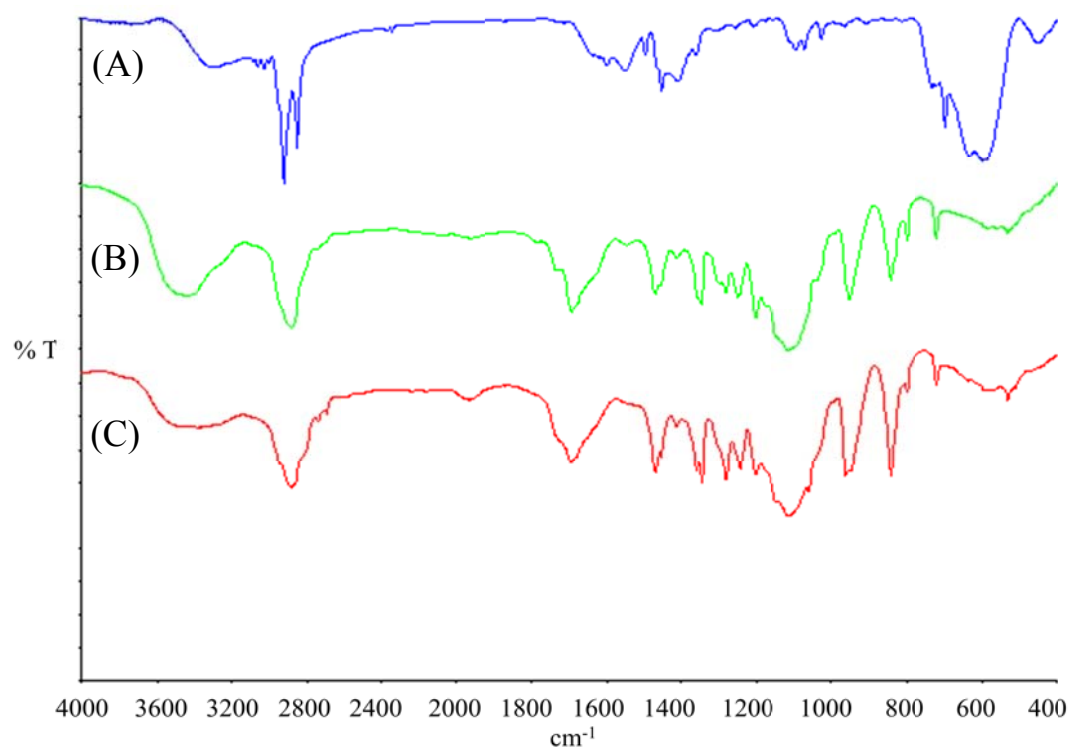
Element	Weight%	Atomic%
Mn (K)	0.95	0.24
Fe (K)	1.74	0.44

圖十一、超順磁氧化鐵-錳之 EDS 元素分析，(A)疏水性超順磁裸核氧化鐵-錳奈米粒子；(B)親水性超順磁氧化鐵-錳奈米粒子。

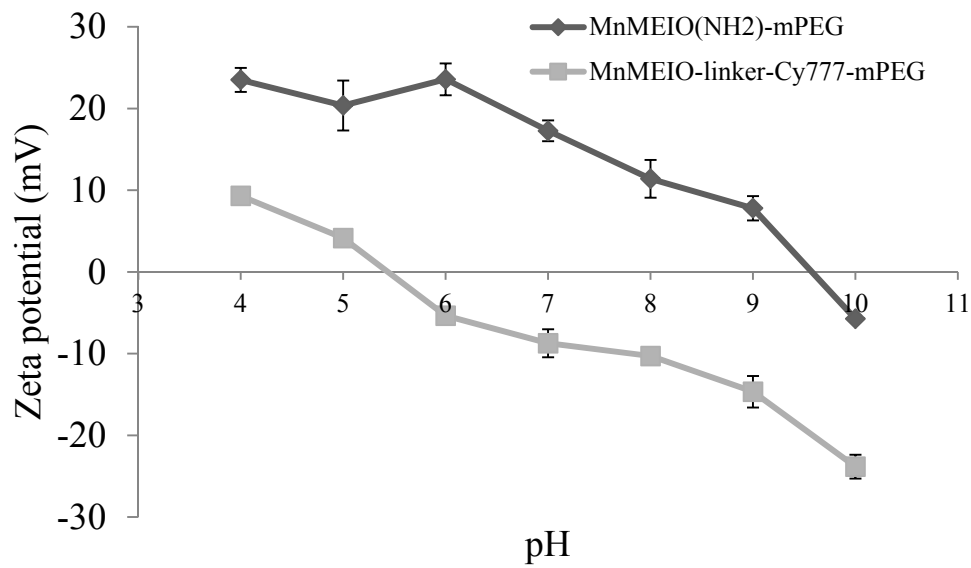


圖十二、超順磁氧化鐵-錳奈米粒子之 XRD 繞射分析。



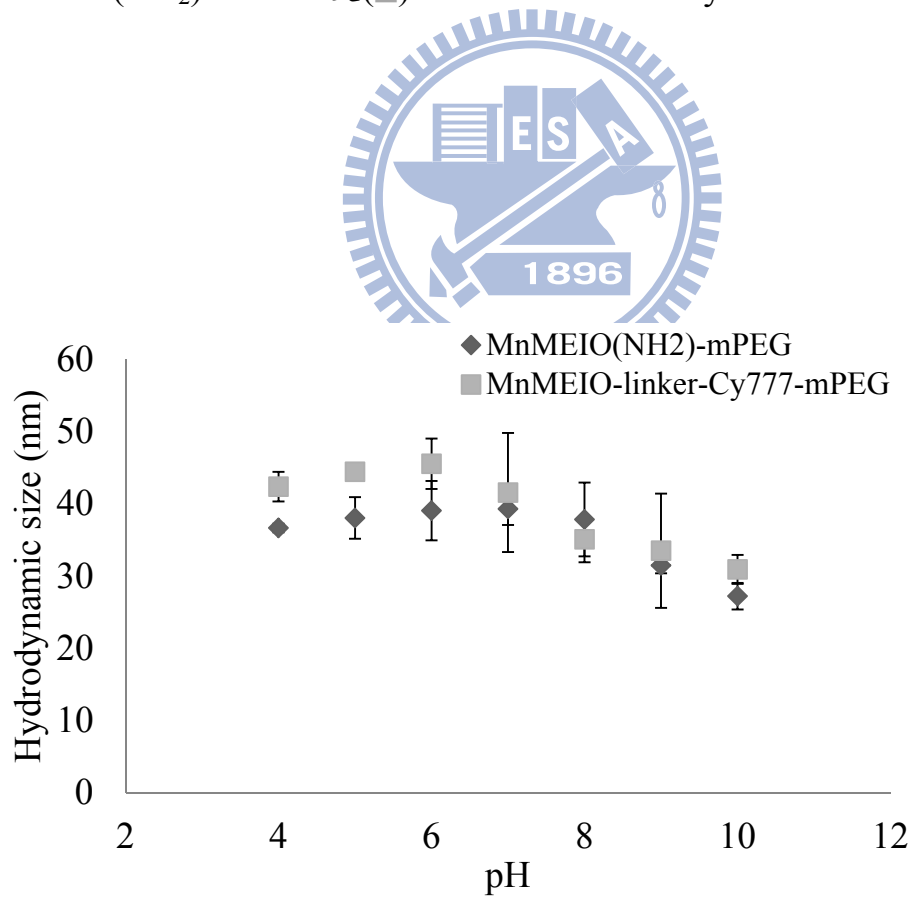


圖十三、FT-IR 光譜分析 (A) MnMEIO/oleic acid/oleylamine ; (B) mPEG-NH₂-silane ; (C) MnMEIO(NH₂)-mPEG。



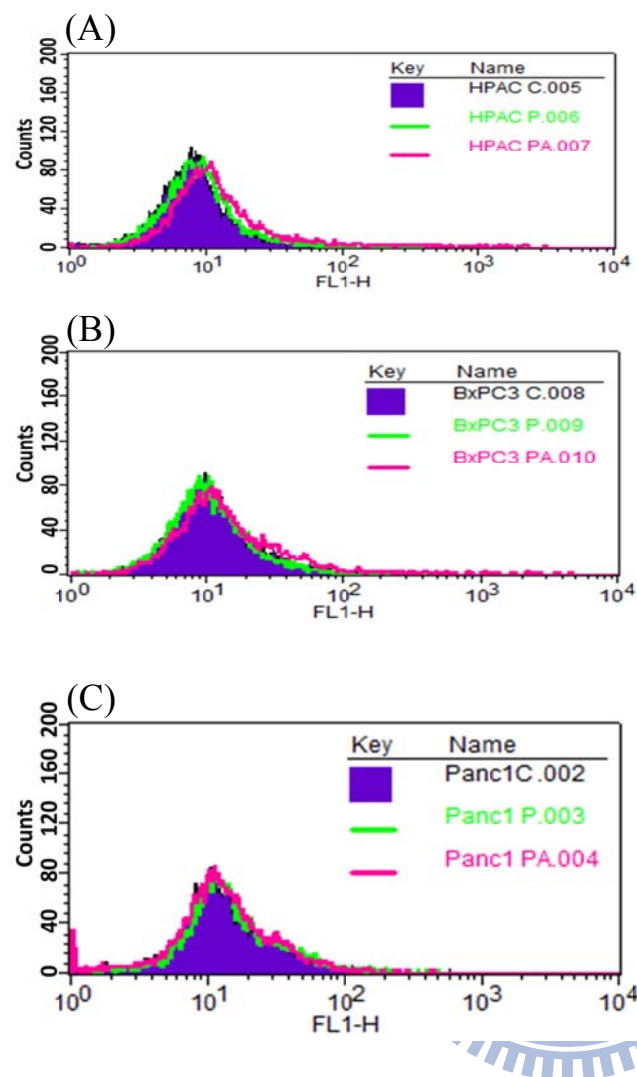
圖十四、超順磁氧化鐵-錳表面電價與 pH 變化之分析圖，(◆)

MnMEIO(NH₂)-mPEG 及(■) MnMEIO-linker-Cy777-mPEG。

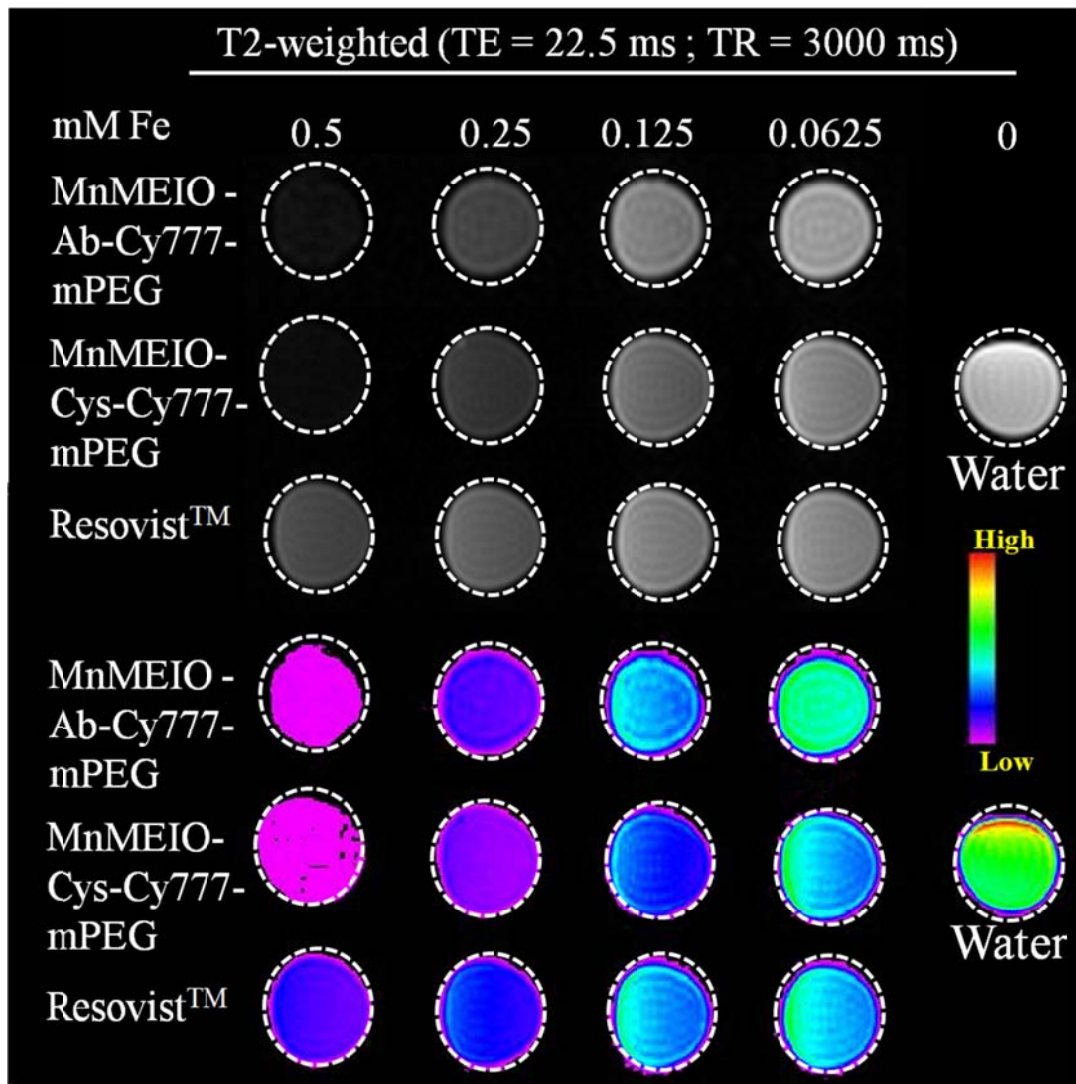


圖十五、pH 值對超順磁氧化鐵-錳奈米粒子(◆) MnMEIO(NH₂)-mPEG 及(■)

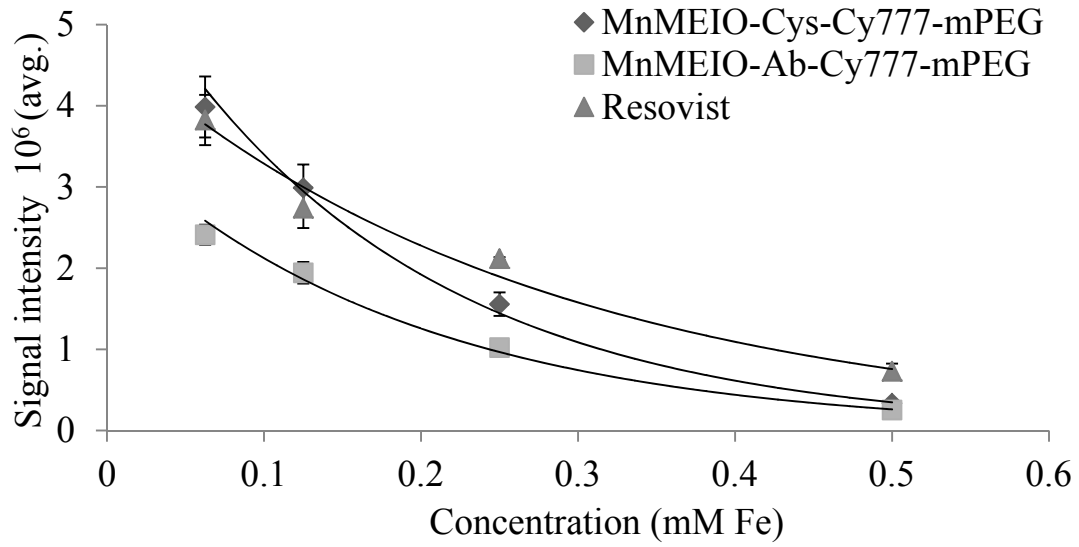
MnMEIO-linker-Cy777-mPEG 穩定性的探討。



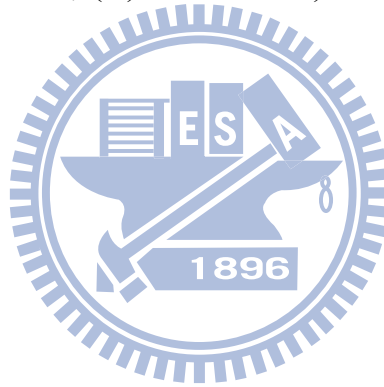
圖十六、超順磁氧化鐵-錳奈米粒子針對細胞株表面蛋白(MUC4)專一性作分析，(A) HPAC (positive); (B) BxPC-3 (positive) ; (C) Panc 1 (negative)。(C：control；P：MnMEIO-Cys-Cy777-mPEG；PA：MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG)。

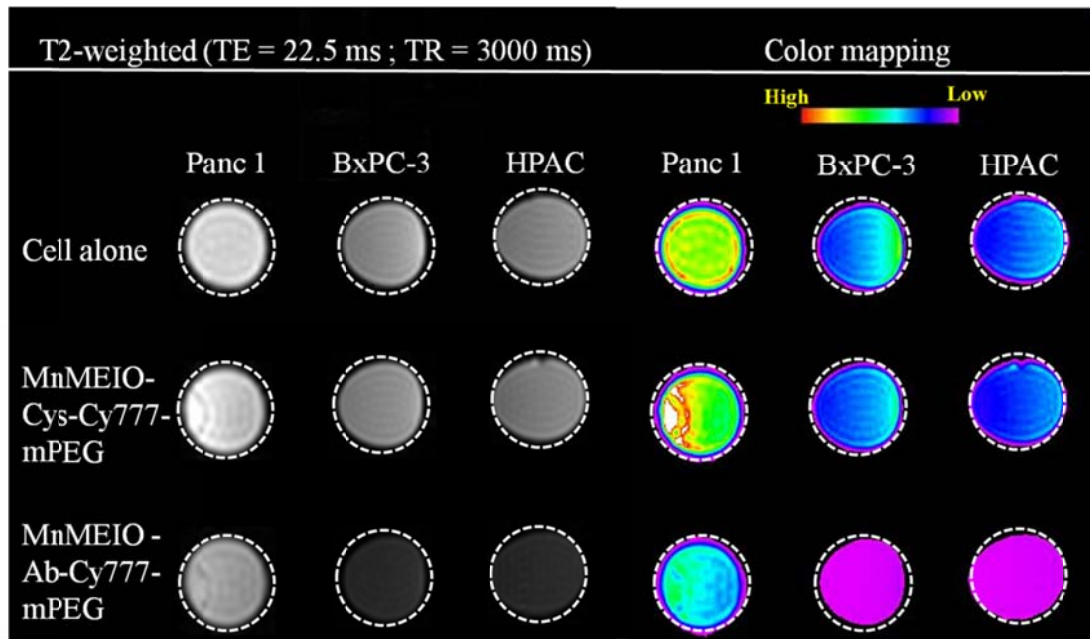


圖十七、磁性奈米粒子鐵離子濃度(MnMEIO-Cys-Cy777-mPEG、MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG 及 Resovist™)之磁振造影訊號圖。

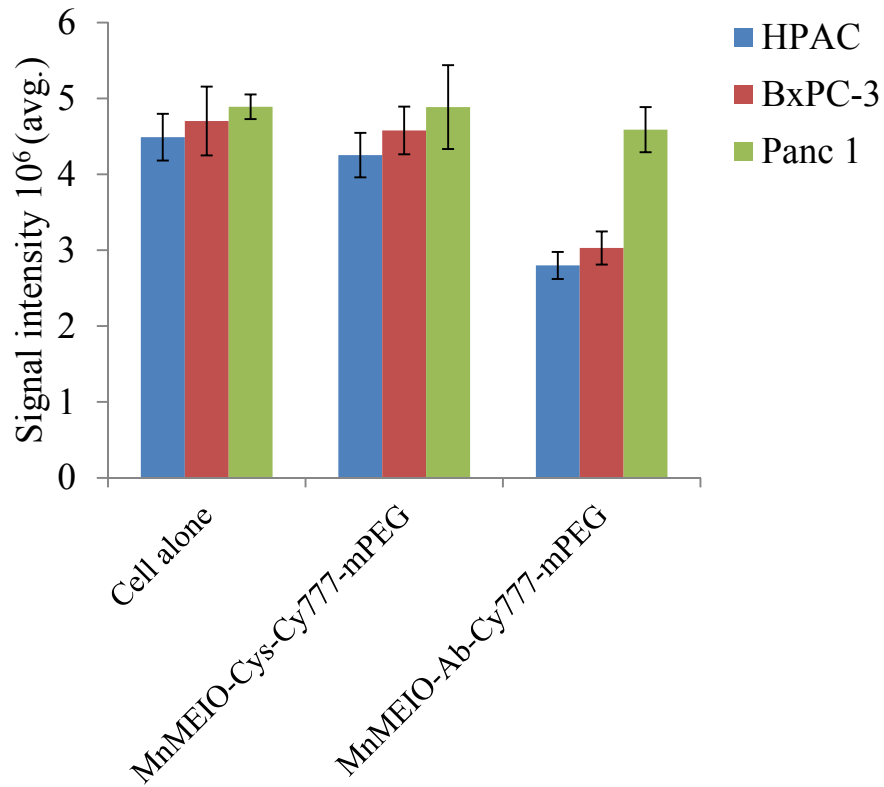


圖十八、磁性奈米粒子鐵離子濃度(◆) MnMEIO-Cys-Cy777-mPEG ; (■) MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG ; (▲) ResovistTM)之磁振造影訊號分析圖。





圖十九、MUC4 高表現之細胞株(HPAC、BxPC-3)與 MUC4 低表現之細胞株 (Panc 1)，由實驗組 MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG 與對照組 MnMEIO-Cys-Cy777-mPEG 反應之體外(In vitro) 磁振造影影像。



圖二十、MnMEIO-Ab-Cy777-mPEG、MnMEIO-Cys-Cy777-mPEG 體外(In vitro)磁振造影之影像訊號分析。