

行政院原子能委員會核能研究所

委託研究計畫期末研究報告

血清素運轉體奈米粒子之體外檢測應用

Characterization of serotonin transporter bioconjugated gold nanoparticles and its applications for screening in vitro

計畫編號：992001INER071

受委託機關(構)：國立臺灣大學化學系暨研究所

計畫主持人：張煥宗 教授

核研所聯絡人員：劉公典 博士、趙建華 博士

聯絡電話：02-3366-5393

E-mail address：changht@ntu.edu.tw

目 錄	I
作者及所屬單位	II
中文摘要	1
Abstract	2
壹、計畫緣起與目的	3
一、計畫緣起	3
二、計畫目的	4
貳、研究方法與過程	5
一、藥品	5
二、儀器	5
三、合成 13-nm 金奈米粒子(Au NPs)	5
四、修飾 MADAM 於 13-nm Au NPs 表面上	6
五、以 SALDI-MS 鑑定 MADAM-Au NPs	6
六、以 FT-IR 偵測 MADAM-Au NPs	6
七、以 SERS 偵測 MADAM-Au NPs	7
八、細胞培養與處理	7
九、MADAM-Au NPs 的細胞實驗	7
十、細胞活性實驗	8
參、主要發現與結論	9
一、以 SALDI-MS 質譜鑑定 MADAM-Au NPs	9
二、以 FT-IR 及 SERS 鑑定 MADAM-Au NPs	10
三、MADAM-Au NPs 與 LLC-PK1 的專一性結合	11
四、MADAM-Au NPs 與 MADAM 競爭反應	13
五、結論	14

肆、參考文獻.....15

附件

作者及所屬單位

張煥宗 教授

(國立臺灣大學化學系暨研究所)

李季霖 博士生

(國立臺灣大學化學研究所)

中文摘要

本計劃已成功將 2-((2-((Dimethylamino)methyl)-phenyl)thiol)-5-iodophenylamine (MADAM)以分子共價鍵方式鍵結於 13-nm 金奈米粒子(gold nanoparticles)上而合成出 MADAM-Au NPs 功能性奈米材料。透過 11-MUA(11-mercaptopundecanoic acid)、EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylamionpropyl)carbodiimide)及 Sulfo-NHS (sulfo-N-hydrosuccinimide)將 MADAM 分子上的一級胺與 11-MUA 上的羧基形成胜肽鍵而鍵結於 Au NPs 表面。根據紫外光/可見光(UV-Vis)吸收光譜的量測推估，每個 Au NP 粒子上約鍵結 650 個 MADAM 分子，並且於 4 °C 的條件下可穩定保存在磷酸鈉緩衝溶液 (5 mM; pH 7.4)中三個月以上。我們證明 MADAM-Au NPs 可藉由細胞膜上血清素轉運體 (serotonin transporters; SERT) 選擇性與 LLC-PK1(豬腎前曲小管上皮細胞)作用。另外，藉由加入 Alamar blue 測試後，發現 MADAM-Au NPs (1.5 nM)致細胞生長存活率約僅下降 6%，故其細胞毒性相當低。

關鍵字：金奈米粒子、血清素轉運體、血清素、豬腎前曲小管上皮細胞。

Abstract

We have prepared gold nanoparticles (Au NPs)-based functional nanomaterials for labeling of LLC-PK1 cells, renal epithelial cell line originally derived from porcine kidneys. Bioconjugation of 2-((2-((dimethyl-amino) methyl) phenyl) thiol) phenylamine (MADAM) on the Au NPs was through the formation of amide bond between MADAM and 11-mercaptoundecanoic acid (11-MUA)-modified Au NPs via N-sulfo-N-hydroxysuccinimide (sulfo-NHS) and 1-ethyl-3-(3-dimethylamion propyl) carbodiimide (EDC). About 650 MADAM molecules were bioconjugated on each Au NP based on the UV-vis absorption data. Our prepared MADAM-Au NPs were stabled in 5 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) at 4°C for at least three months. The MADAM-Au NPs were specific for LLC-PK1 cells through interaction of MADAM and serotonin transporters (SERTs) on the cell membrane. Using Alamar blue assay, we determine that the MADAM-Au NPs (1.5 nM) induced low cytotoxicity (about 6%) of LLC-PK1 cells.

Keywords: Au NPs 、 SERTs 、 Serotonin 、 LLC-PK1 cells 、 MADAM.

壹、計畫緣起與目的

一、計畫緣起

血清素(serotonin, 5-HT)是一種神經細胞之間相互通信的化學信號分子。科學家早期認為血清素具有幫助鎮定情緒與解除焦慮的功能，當腦中缺乏時，則可能會有憂鬱的現象產生。研究指出憂鬱患者的血清素轉運體(serotonin transporter, SERT)下降，可能不只侷限在大腦前額葉皮質；實驗發現在其他不同腦區以及腦幹等處的SERT皆會有下降的現象^[1,2]。人類的SERT基因主要位於第十七對染色體上，雖然血清胺轉運體基因的多型性變異與憂鬱症的相關性仍未有定論，但是相關的研究已經延伸到與自殺、暴力性格、衝動個性以及酗酒的探討。足見SERT不管在蛋白的表現、基因表現，甚至基因變異上均與情緒疾患有高度的關連性^[3]。

在利用正子造影，或是單光子斷層造影技術顯影技術上，放射性同位素¹²³I、¹¹C和¹⁸F標幟之多種藥物已經被用於SERT的相關研究；但這些化合物對於SERT的專一性通常較低。近年來有研究學者開發了新的單光子斷層掃描(Single Photon Emission Computed Tomography, SPECT)用SERT造影放藥物—¹²³I-MADAM，提高了對SERT的特異性，使得普及腦部SERT定量造影的可行性大為提高^[4]。

但由於腦組織切片的取得不易，科學家開始尋求較不具侵襲性的研究方式來偵測SERT的分佈與濃度。研究發現血小板(platelet)^[5]和豬腎前曲小管上皮細胞(LLC-PK1)^[6]膜上擁有與腦神經細胞同樣的SERT，故利用這些細胞可能取代血清素神經元細胞，用以研究SERT的變化與5-HT於細胞內濃度變化，因此將可增進對血清素作用機制的瞭解，以助於開發更好的抗焦慮及抗抑鬱等藥物。

金奈米粒子(gold nanoparticles; Au NPs)由於生物毒性較低，且具有極佳的光學、化學及催化等特性，目前已成功地應用於各種的生醫檢測。因此，將 MADAM 藥物修飾在 Au NPs 上，便可作為偵測與標定於細胞膜上的 SERT。於去年的研究計畫，我們已成功合成出 MADAM-Au NPs 功能性奈米材料。於本計畫我們利用合成的 MADAM-Au NPs 與豬腎前曲小管上皮細胞(LLC-PK1)進行專一性鍵結試驗，並由光學技術(例如：暗視野顯微鏡、相位差顯微鏡與吸收光譜儀)來探討 MADAM-Au NPs 與細胞作用情形。

二、計畫目的

血清素神經系統與大腦認知功能、焦慮、憂鬱及精神分裂症之病因有密切關係；因此，觀察血清素系統的作用情形，對於瞭解多種精神疾病具有極大助益。本計畫希望開發高靈敏度及專一性的奈米材料標記(MADAM-Au NPs)，用於 SERT 於細胞膜上的標記，並期待開發新穎奈米藥物功能。因此，本計畫希望透過光學顯影技術來開發一簡單快速的藥物與蛋白質作用篩選平台。

貳、研究方法與步驟

一、藥品

2-((2-((Dimethylamino)methyl)phenyl)thiol)-5-iodophenylamine (MADAM)、四氯金酸(HAuCl_4)、檸檬酸鈉、鹽酸、氫氧化鈉、磷酸、三羥甲基氨基甲烷(Tris)、11-巯基十一酸(11-Mercaptoundecanoic acid; 11-MUA)、1-ethyl-3-(3-dimethylamionpropyl) carbodiimide (EDC)、sulfo-N-hydroxysuccinimide (sulfo-NHS)、溴化鉀 (KBr)、聚乙烯吡咯酮 (polyvinylpyrrolidone, PVP)及聚氧化乙烯(olylethylene oxide, PEO)等化學藥品均購自友和貿易股份有限公司。二次水則由 Millipore 公司機器製造超純水 (Milli-Q)。

二、儀器

在本實驗中利用 microplate reader (μ -Quant Biotek Instruments; Winooski; USA)來進行紫外光/可見光(UV-Vis)吸收及螢光的量測；利用倒立顯微鏡 (OLYMPUS IX71; Tokyo; Japan)來觀測細胞及 Au NPs 的分佈；利用感應耦合電漿質譜分析儀(ICP-MS; ELAN 6000; Waltham; USA)來定量吸附於細胞的 Au NPs 濃度；基質輔助雷射脫附游離法-質譜儀(MALDI-MS; Bruker Daltonics, Bremen, Germany)。

三、合成 13 nm 金奈米粒子(Au NPs)

本研究以 50 mL (4 mM)檸檬酸鈉($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)為還原劑將 0.5 mL (0.1 M)四氯金酸(HAuCl_4)還原成金奈米粒子。此反應於沸騰的溶液中進行，反應 8 分鐘後立即冰浴，即可合成 13 nm 金奈米粒子，濃度約為 15 nM。最後經穿透式電子顯微鏡量測得知，Au NPs 粒徑約為 13 ± 2 nm。

四、修飾 MADAM 於 13 nm Au NPs 表面上

取出 1 mL 之 13-nm Au NPs (15 nM)，離心後移除上層液，再以 950 μ L 去離子水回溶，依序再修飾適當量之 11-MUA、EDC (配製於 0.1M，pH 4.7 MES 緩衝液)、Sulfo-NHS 及 MADAM 等試劑，最後再以離心方式將上層液取出，以 UV-Vis 吸收值確認 MADAM 修飾在金奈米粒子表面的數量，修飾過程如圖 1 所示。

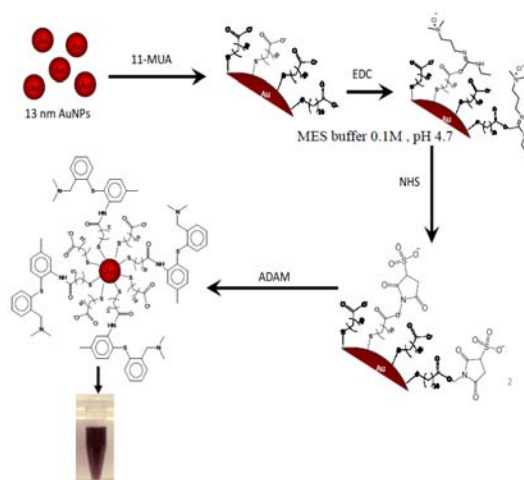


圖 1. MADAM 修飾於金奈米粒子示意圖

五、以 SALDI-MS 鑑定 MADAM-Au NPs

利用 Au NPs 作為 surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (SALDI-MS) 的無機基質材料可直接鑑定 MADAM 與 Au NPs 鍵結情形，我們分別利用正電壓模式與負電壓模式的條件來鑑定 MADAM 與 11-MUA 於 Au NPs 上修飾的情形。

六、以 FT-IR 偵測 MADAM-Au NPs

除了利用 SALDI-MS 來鑑定 MADAM 是否鍵結與 Au NPs 表面外，我們亦利用傅立葉轉換紅外線光譜儀 (FT-IR; Varian Company, Cary 5000, USA) 進行鑑定。將 20 μ L 待測樣品滴於 CaF₂ 鹽片上，置於陰涼處待乾後，再進行偵

測。

七、以 SERS 偵測 MADAM-Au NPs

表面增強拉曼散射光譜(Surface Enhanced Raman Scattering, SERS)可探測表層所吸附的分子可藉由吸附，如由 Ag、Au 及 Cu 等金屬奈米表面而觀察到訊號。而 MADAM 具有共軛芳香環結構，因此可藉由 SERS 的效應而觀察到其分子振動訊號。我們取適當體積的待測樣品($\sim 50 \mu\text{L}$)，以 1:1 之比例與銀奈粒子互混，滴於矽晶片上，置於陰涼處待乾後，再以 SERS 進行偵測。

八、細胞之培養與處理

將豬腎前曲小管上皮細胞(LLC-PK1)，人類肝癌細胞(Huh7)與人類乳癌細胞(MCF-7)三株細胞濃度各控制在 10^6 cell/mL 以培養在 sodium bicarbonate (26 mM)、HEPES (3.574 g/L)、DMEM (3.5 g/L)、penicillin G (10 U/mL)、streptomycin (10 mg/mL)及 10% 胎牛血清之培養皿中，再置於 5% CO_2 、 37°C 之恆溫箱培養。48 小時後，將培養液取出，再以 3 mL 磷酸(PBS, pH 7.4)緩衝液清洗兩次，最後以 1 mL 0.5% trypsin-EDTA 將培養皿上之細胞均勻打散，再分裝至新的培養皿中，以完成繼代培養。

九、ADAM-Au NPs 的細胞實驗

在開始新的繼代細胞培養時，為了比較 MADAM-Au NPs 在有無 SERT 細胞膜表面吸附之差異，我們分別將 MADAM-Au NPs 加入 LLC-PK1 (實驗組)、Hep-G2 (對照組 1)及 MCF-7 (對照組 2)三株細胞中，待 12 小時後，取出培養液，並以 3 mL 磷酸(PBS, pH 7.4)緩衝液清洗兩次，再利用倒立式顯微鏡觀察其影像。最後，以 1 mL 0.5% trypsin-EDTA 將培養皿上之細胞均勻打散，細胞總數計數後，利用 ICP-MS 定量平均吸附於每個細胞表面的 Au NPs 粒子數。

十、細胞活性實驗

為了探討加入 11-MUA-AuNPs, MADAM-AuNPs 和 AuNPs 藥物及其濃度對於細胞的活性影響。利用 96 孔盤來培養細胞，將每一個 well 的細胞數固定(2000 cells/well)，經 24 小時的培養後，將細胞培養液移除，再加入實驗所使用的藥物。經過 24 小時後，將藥物吸除並以 200 μ L 磷酸(PBS, pH 7.4)緩衝液清洗 2 次，最後再加入 250 μ L 0.1x Alamar blue (Alamar blue 與培養液= 1:9 互混)，4 小時後利用螢光儀測定並換算細胞的活性。

參、實驗結果與討論

一、以 SALDI-MS 質譜鑑定 MADAM-Au NPs

為觀察 MADAM 與 Au NPs 鍵結情形，我們利用 Au NPs 直接作為 Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (SALDI-MS) 的無機基質材料。於負電壓模式下，由質譜圖分別在 m/z 196.99 及 217.14 觀察到 $[\text{Au NP}]^-$ 及 $[\text{11-MUA-H}]^-$ 的訊號；於正電壓模式下，可觀察到 $[\text{ADAM+H}]^+$ (m/z 346.84) 的訊號(圖 2)。因此由 SALDI-MS 證明結果 MADAM 鍵結在 Au NPs 表面。

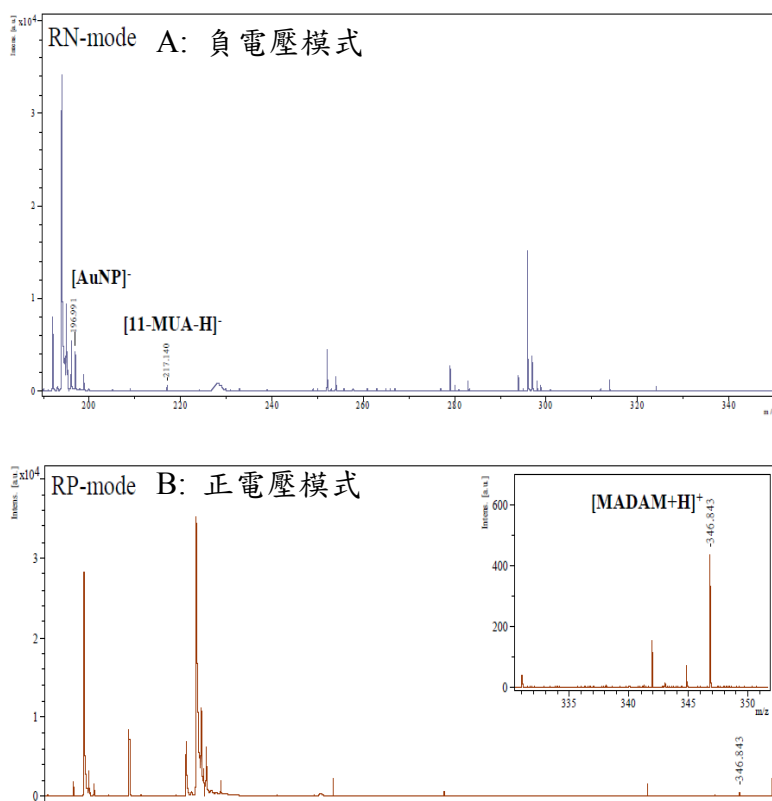


圖 2. 藉由 SALDI-MS 來鑑定 MADAM-Au NP。

二、以 FT-IR 及 SERS 鑑定 MADAM-Au NPs

我們亦利用 FT-IR 及 SERS 鑑定 MADAM 與 Au NPs 的鍵結。由 FT-IR(圖 3)測得 MADAM-Au NPs 有苯環-C=C 的訊號與-C=O 及-CH 的訊號，表示 MADAM 已成功地修飾在 Au NPs 表面。

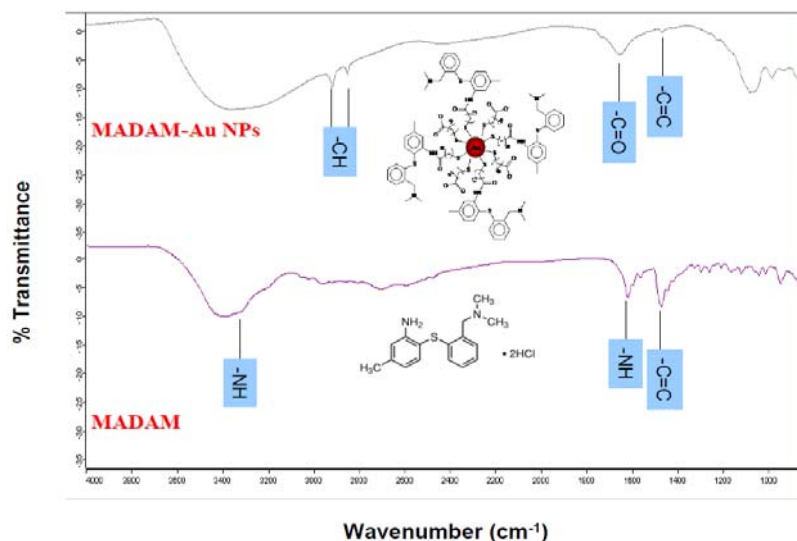


圖 3. MADAM 與 MADAM-Au NPs 之 FT-IR 光譜圖。

分子振動或轉動的拉曼(Raman)可藉由吸附 Ag、Au 及 Cu 等金屬奈米粒子增強其效應。MADAM 分子具有的共軛芳香環的結構，對於分子振動訊號的觀察較為容易。將 13-nm 銀奈米粒子(3.3 nM) 與 15 nM MADAM-Au NPs 以體積 1:1 互混，由 MADAM 分子振動的訊號(圖 4)進一步證明 MADAM 鍵結於 Au NPs。

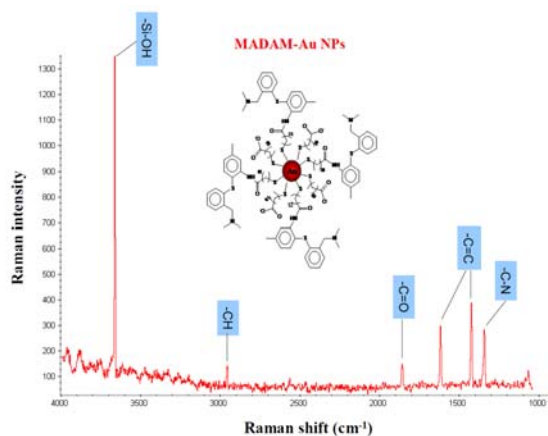


圖 4. MADAM-Au NPs 之 SERS 光譜圖。

三、MADAM-Au NPs 與 LLC-PK1 的專一性結合

為比較有無 MADAM 修飾之 Au NPs 與目標細胞 LLC-PK1 的作用能力，我們將同濃度(1.5 nM) 之 MADAM-Au NPs、11-MUA-Au NPs 與未修飾的 Au NPs 分別加入 LLC-PK1 細胞培養 48 hr。由圖 5 相位差顯微鏡觀察得知，加入 11-MUA-Au NPs 於 LLC-PK1 細胞中，僅有少量的金奈米粒子會吸附於細胞膜上，此外亦有不少未分化完全的球形細胞產生。加入 MADAM-Au NPs 於 LLC-PK1(10^6 cell/well)細胞中，其細胞的外觀可見 MADAM-Au NPs 的結合明顯提升，由細胞活性測試發現其活性僅下降 5.7%，故 MADAM-Au NPs 細胞毒性相當低。經由 ICP-MS 定量得知其結合約為 4.35×10^5 Au NPs/cell。此外，未修飾的 Au NPs 對於 LLC-PK1 會產生細胞內吞噬的作用，而產生胞內聚集的情形，亦可發現有一些未分化完全的球形細胞產生，最後經由 ICP-MS 定量得知其結合約為 4.19×10^5 Au NPs/cell。

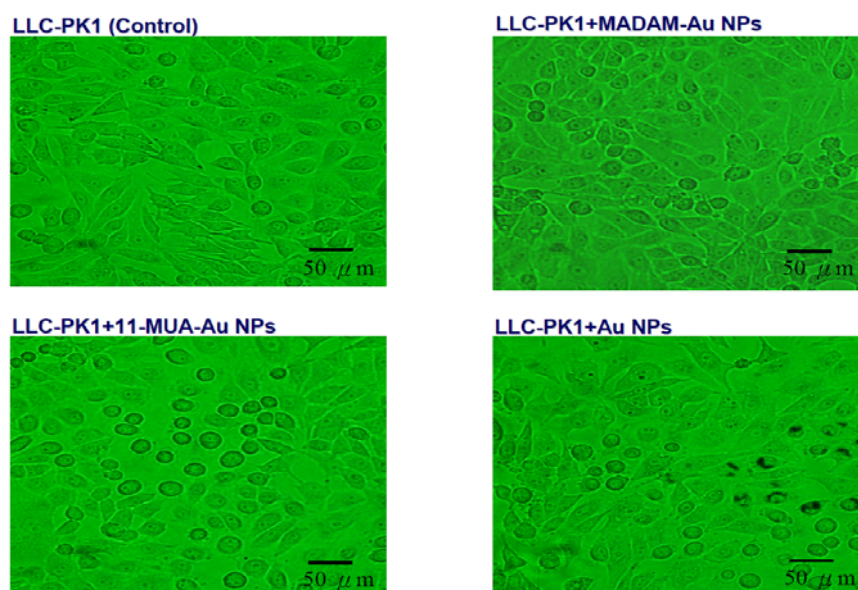


圖 5. ADAM-Au NPs、11-MUA-Au NPs 和未修飾的 Au NPs 與 LLC-PK1 細胞作用後之相位差顯微鏡影像。

為了比較 LLC-PK1 及其他細胞(如:MCF-7) 對於 MADAM-Au NPs 之結合情形，我們利用暗視野顯微鏡來進行細胞的觀察 (圖 6)。發現 1.5 nM MADAM-Au NPs 於 MCF-7 (10^6 cell/well)細胞中，經吞噬作用將 MADAM-Au NPs 吞噬於細胞內，而產生胞內聚集，故細胞內有明顯的散射光產生；而 LLC-PK1 主要與 SERT 有高的結合能力[binding affinity 0.33 nM]^[8]，因此在整個細胞的上可清楚的見到 MADAM-Au NPs 吸附在膜的表面而產生較強的散射光；因 MCF-7 細胞膜上與 SERT 結合能力小，所以 MADAM-Au NPs 大多不會和 MCF-7 細胞膜作用。

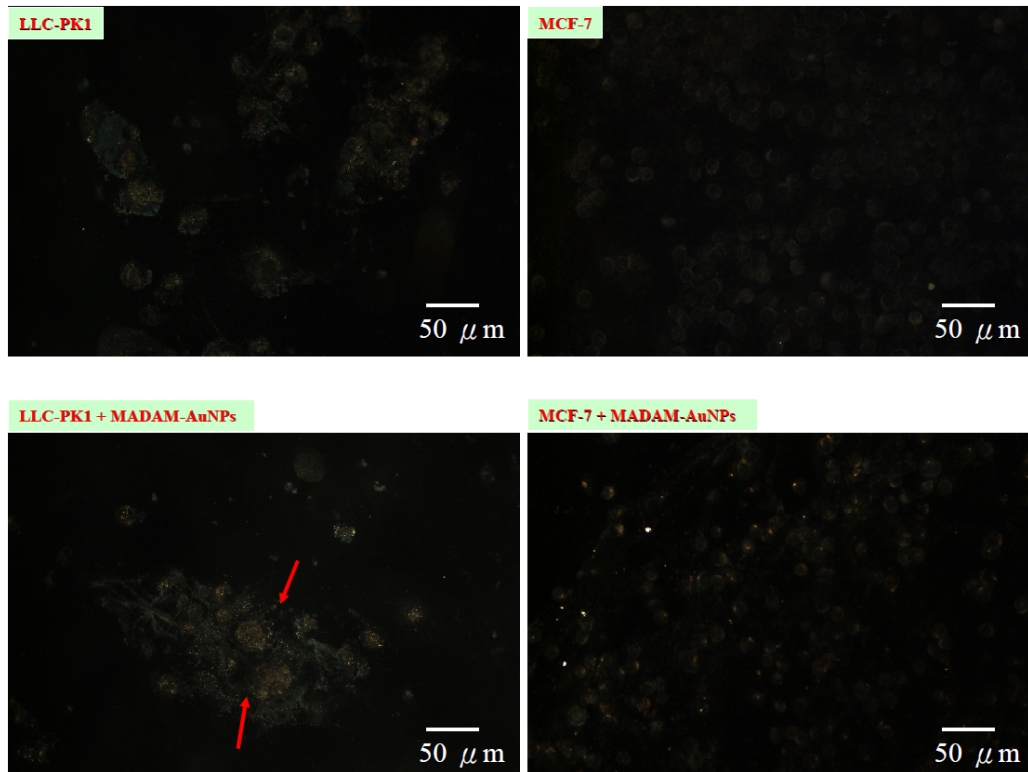


圖 6. MADAM-Au NPs 分別 LLC-PK1 與 MCF-7 細胞作用後之暗視野顯微鏡影像。

四、MADAM-Au NPs 與 MADAM 競爭反應

為探討添加 MADAM 後對 LLC-PK1 與 MADAM-Au NPs 結合之影響，分別加入 MADAM (0–16 μM) 來與 MADAM-Au NPs (1.5 μM) 競爭結合 LC-PK1 (10^6 cell/well)。由圖 7 得知當 MADAM 濃度依序增加時，MADAM-Au NPs 與 LLC-PK1 細胞表面的結合能力有逐漸下降趨勢(圖 7)。

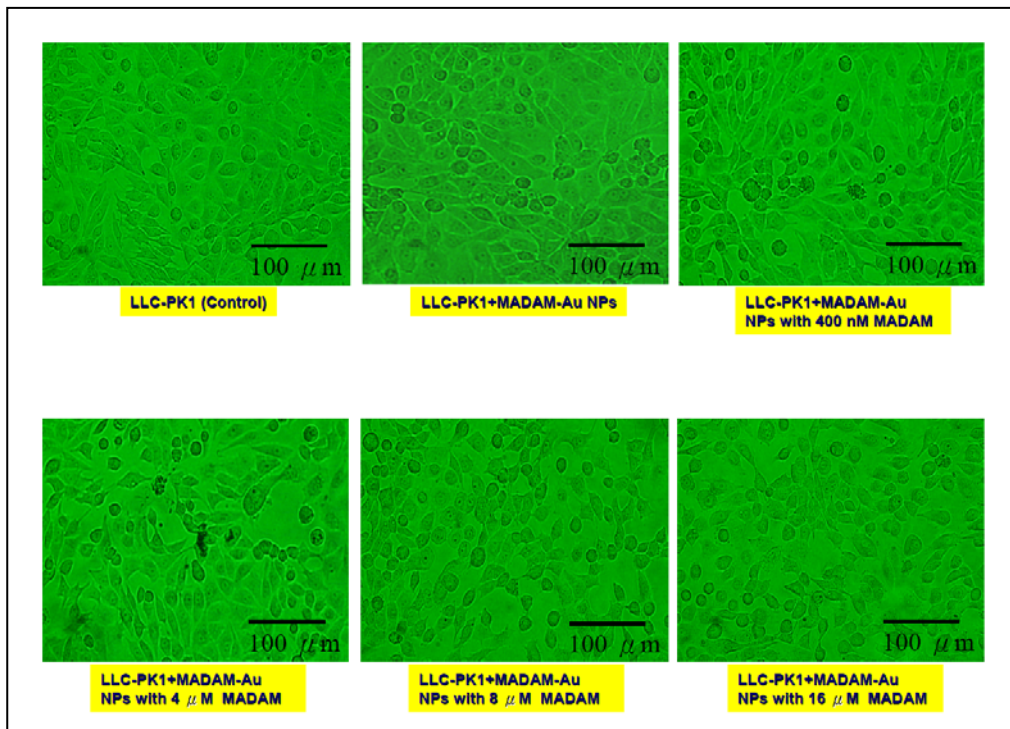


圖 7. MADAM-Au NPs 與 MADAM 競爭結合 LLC-PK1 細胞之相位差顯微鏡影像。

五、結論

由本研究結果，我們提出三點結論：

- (一) 藉由 SALDI-MS、FT-IR 與 SERS 光譜鑑定，證明 MADAM 藥物以共價鍵結合方式修飾於 13-nm Au NPs 表面。
- (二) 在 MADAM-Au NP 與 LLC-PK1 細胞的研究中發現，MADAM-Au NPs 能選擇性的吸附於 LLC-PK1 細胞膜上，推測具有辨識 LLC-PK1 細胞上 SERT 的能力；然而對於細胞膜上無 SERT 的 MCF-7 則以內吞噬的方式將 MADAM-Au NPs 吞噬進細胞中。
- (三) 由 MADAM-Au NPs 與 MADAM 藥物競爭反應可知 LLC-PK1 會隨著

MADAM 濃度的增加，將使得 MADAM-Au NPs 與 LLC-PK1 細胞表面的結合能力下降。

肆、參考文獻

1. Roy, A. *Neuropsychobiology* **1999**, 39, 71-75.
2. Owens, M. J.; Nemeroff, C. B. *Clin. Chem.* **1994**, 40, 288-295.
3. Mann, J. J.; Brent, D. A.; Arango, V. *Neuropsychopharmacology* **2001**, 24, 467-477.
4. Oya, S.; Choi, S. R.; Hou, C.; Mu, M.; Kung, M. P.; Acton, P. D. *et al. Nucl. Med. Biol.* **2000**, 27, 249-254.
5. Nemeroff, C. B.; Knight, D. L.; Krishnan, R. R.; Slotkin, T. A. *Psychiatry* **1988**, 45, 919-923.
6. Kung, M.P.; Hou, C.; Oya, S.; Mu, M.; Acton, P. D.; Kung, H. F. *Eur. J. Nucl. Med.* **1999**, 26, 844-853.
7. Kim, B. K.; Steiner, M.; Baldini, M. G. *Anal. Biochem.* **1980**, 106, 92-98.
8. Wang, J. L.; Parhi, A. K.; Oya, S.; Lieberman, B.; Kung, M. P.; Kung, H. F. *Nucl. Med. Biol.* **2008**, 35, 447-458.

附件：

在進行本年研究計畫中，我們亦和劉博士合作開發出檢測鉛離子之方法。檢測機制(如圖八)、研究成果及發表期刊資料如下：

[研究成果摘要]

一些富含鳥糞嘌呤(G-rich guanine)的oligonucleotides能與鉛離子形成穩定 G-tetrads 的構型(如：AGRO100)，使得 hemin 這類環狀平面的 metalloporphyrins 分子能藉由凡得瓦吸引力(van der Waals attraction)及堆疊(stacking)的方式緊靠在 G-tetrads 的末端(end)，進而產生類似過氧化酵素(oxidase-like)的 DNAzyme 活性；在 H_2O_2 之環境下即可去催化 Amplex[®] UltraRed (AUR)，產生具高放光產率之產物，故經由放光強度之量測即可測定 DNAzyme 催化活性。利用此方法，對溶液中鉛離子之偵測提供良好的偵測極限(約 0.4 nM)、線性範圍(0–1000 nM)及選擇性(>100 倍)，亦能實際應用在環境中真實樣品(如：泥土)之偵測，偵測極限約 1.0 nM。

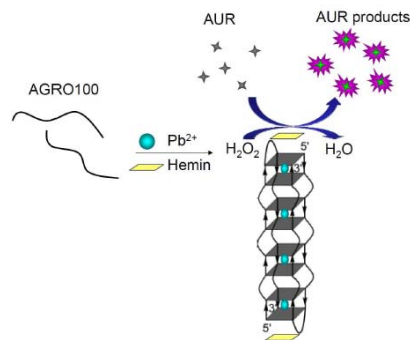


圖 8. 鉛離子之感測機制

[發表期刊]

Li, C.-L.; Liu, K.-T.; Lin, Y.-W.; Chang, H.-T. “Fluorescence Detection of Lead(II) Ions Through Their Induced Catalytic Activity of DNAzymes” *Anal. Chem.* **2010**, *Accepted*.