

行政院原子能委員會
委託研究計畫研究報告

開發奈米磁振造影與核醫雙功能造影劑
**Development of contrast agent encapsulating magnetic
nanoparticles and radioisotope**

計畫編號：992001INER076

受委託機關(構)：國立交通大學

計畫主持人：王雲銘

核研所聯絡人員：李德偉

聯絡電話：03-5712121 #56972

E-mail address：ymwang@mail.nctu.edu.tw

報告日期：99年12月15日

目 錄

目錄.....	i
中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
計畫緣起與目的.....	3
研究方法與過程.....	7
一、MnFe ₂ O ₄ 之合成製備.....	7
二、奈米氧化鐵粒子之表面修飾.....	8
三、奈米氧化鐵接上有功能性標定之抗體(Erbitux).....	9
四、MnFe ₂ O ₄ -Erbitux 之體外細胞實驗(In vitro).....	9
五、MnFe ₂ O ₄ -Erbitux 之體內動物實驗(In vivo).....	10
參、主要發現與結論.....	11
一、氧化鐵奈米材料之鑑定.....	11
(一) Energy-dispersive X-ray(EDX)鑑定.....	11
二、氧化鐵奈米粒子表面修飾之分析.....	12
(一) FT-IR 傅立葉鑑定其表面修飾之官能基.....	12
三、氧化鐵之表面修飾抗體之分析.....	13
(一)動態光散射儀(Dynamic Light Scattering, DLS)測定.....	14
(二)表面電位(Zeta potential)之測定.....	14
四、MnFe ₂ O ₄ -Erbitux 之體外細胞實驗(In vitro)測定.....	15
(一)流式細胞儀(Flow Cytometry)針對 A-431、SKBR-3、PC-3 及 Colo-205 之細胞株測試.....	15
(二) MnFe ₂ O ₄ -Erbitux 對細胞之毒性測試(MTT assay).....	15
(三) MnFe ₂ O ₄ -Erbitux 對細胞之磁振造影分析(MR imaging).....	16
(四)雷射共軛交顯微鏡(Confocal Microscope)之細胞影像分.....	17
五、MnFe ₂ O ₄ -Erbitux 之體內動物實驗(In vivo)測試.....	18
(一)裸鼠(Nude mouse)之體內靜脈注射用於 MRI 檢測.....	18
(二)裸鼠之體內非侵入性活體分子影像之光學分析.....	18
(三)活體器官(Ex vivo)之光學影像分析.....	19
肆、參考文獻.....	20

中文摘要

具有多功能的生物性標靶材料已經普遍用於核磁造影的醫學影像上，相較於磁振造影在活體影上的偵測極限與靈敏度，近年逐漸開發以紅外光的發光團在活體標靶上的研究，除了快速提供活體資訊外，也提高了影像的靈敏度與空間辨識度。因此，我們發展以高溫合成方式把錳離子參雜入氧化鐵核內而形成高遲緩率之奈米粒子，並在其奈米表面修飾上生物相容性聚合分子，用以鍵結近紅外光之發光團，且以此基礎應用在抗體(Erbix)標靶於上皮生長因子受器(EGFR)過度表現之腫瘤研究。其中的功能性氧化鐵奈米粒子已透過穿透式電子顯微鏡、傅立葉轉換紅外光光譜儀、動態光散射粒徑分析儀及表面電價分析儀之鑑定。然而在體內及體外之光學影像也證實我們設計出的功能性奈米粒子具有好的專一性及靈敏性。磁振造影的研究也證實光學影像在活體內的真實性。最後由老鼠體內取出的臟器之光學影像也說明了有 EGFR 高度表現的腫瘤具有較強的螢光訊號相較於沒有 EGFR 表現的腫瘤。

關鍵字：近紅外光發光團、上皮生長因子受器、核磁共振造影、抗體、奈米氧化鐵粒子

Abstract

A multimodal target specific probe consisting of a biocompatible magnetic nanoparticle capable of altering the MR signal intensity, a NIR fluorochrome and a biological moiety that possess lock-and-key interactions can provide consistent *in vivo* imaging information with high sensitivity and spatial resolution. We have synthesized magnesium doped iron oxide nanoparticle as MR enhancer by thermal decomposition method. Post-synthesis surface modification with PEG expose the amine group which have been used for bioconjugation of cetuximab bearing near-infrared (NIR) fluorophore which can specifically target *EGFR* expressing tumor cell. The nanoparticle was characterized by TEM, FT-IR, DLS, and zetapotential. *In vivo* optical imaging and *in vitro* and *in vivo* MR imaging studies demonstrate high specificity and sensitivity of these nanoparticles for EGFR. Furthermore, the biodistribution study also showed the high fluorescence signal in the EGFR positive tumor compared to the negative tumor.

Keyword : near-infrared (NIR) fluorophore 、 EGFR 、 MRI 、 Antibody 、
Iron oxide nanoparticle

壹、計畫緣起與目的

磁振造影 (Magnetic Resonance Imaging, MRI) 自發明以來，目前已經成為醫學臨床診斷上繼斷層掃描 (CT)、超音波及X-Ray 照相等影像診斷儀器以外，另一相當具代表性的影像醫學技術。磁振造影之成像原理，是根據核磁共振的基本原理 (故早期又稱作Nuclear Magnetic Resonance Imaging, NMRI)。依據給予的能量在激發原子核後所放出的電磁波訊號在體內衰變的速率，而衰變速率則隨著體內環境的不同會有所區別。如同內視鏡以外的其它影像診斷儀器，MRI具備不需侵入人體的優勢，而且所需照射能量低，不會產生游離輻射，所以對人體掃描不會造成任何副作用。MRI 在軟組織的成像上表現優秀，對於膀胱、直腸、子宮、陰道、骨、關節、肌肉等部位的檢查都較斷層掃描優秀。因此可診斷下列組織與器官如中樞神經系統、腦部、心臟、脊椎、腹部檢查，及骨骼肌肉系統。和斷層掃描相比，MRI 在影像擷取的部分除了可以自由選擇，更精確獲得所需的影像，最大優勢是在於它能夠任意觀察立體的影像，此一優勢為醫生提供一種更容易診斷病情，尋找病因的方式。目前MRI已經成為現代醫學不可或缺的影像診斷工具，許多相關的研究為了使得影像診斷可以更好、更靈敏、更準確而進行著，以求在醫學臨床的診斷、醫療及後續工作，能提供更完善的協助^[1-8]。

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。早在核磁共振發展的初期，Bolch等人^[9]在1964年指出，若在水中加入順磁性的物質(paramagnetic materials)可提高水中質子的弛緩速率。1955年，Solomon^[10]也曾描述在溶液中加入過渡金屬離子(transition metal ions)，可以縮短氫質子的弛緩時間。到1973年，Lauterbur^[11]才將順磁離子加入組織液中，進而縮短氫離子的弛緩時間。而利用釷金屬離子錯合物{gadolinium-diethylenetri-aminepentaacetic acid, [Gd(DTPA)]²⁻}作為MRI的對比劑，則是在1980年後才開始的。若是根據顯影劑的特性分類，可以分成正相顯影劑(positive contrast agent)和反相顯影劑(negative contrast agent)兩種，正相顯影劑是以減少縱向弛緩時間(spin-lattice relaxation time, T_1)為主的磁振造影對比劑，也稱為 T_1 對比劑，其功能是用來增加組織訊號，使得影像比正常狀態下更為明亮。釷金屬離子錯合物即為其中一種，但釷金屬離子離子本身具有高毒性，因此必需合成無毒性之釷金屬離子錯化合物對比劑。另外由於釷金屬離子錯化合物對比劑市場價格高昂，因此近年來，一直不斷嘗試發展新的對比劑，其中尤以超順磁性的反相對比劑發展最為突出，此類是以減少橫向弛緩時間

(spin-spin relaxation time, T_2) 的對比劑，也稱為 T_2 對比劑，其目的是用以減少組織訊號，使得影像轉為較灰暗或黑色。此即超順磁氧化鐵奈米粒子 (superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIO)。

超順磁氧化鐵奈米粒子生物毒性較小但需增加其水溶性以及生物相容性。原因在於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，而生物相容也極為重要性，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)^[12]。常見的高分子有二氧化矽 (silica)、聚乙二醇 (PEG)、聚醚醯亞胺 (PEI)、聚離氨酸 (poly-lysine)、葡萄

聚醣 (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^[13-18]。因此本研究目的在於合成出功能性的氧化鐵奈米粒子應用於 *in vitro* 和 *in vivo* 之實驗設計，並應用於對組織有目標化的專一性。

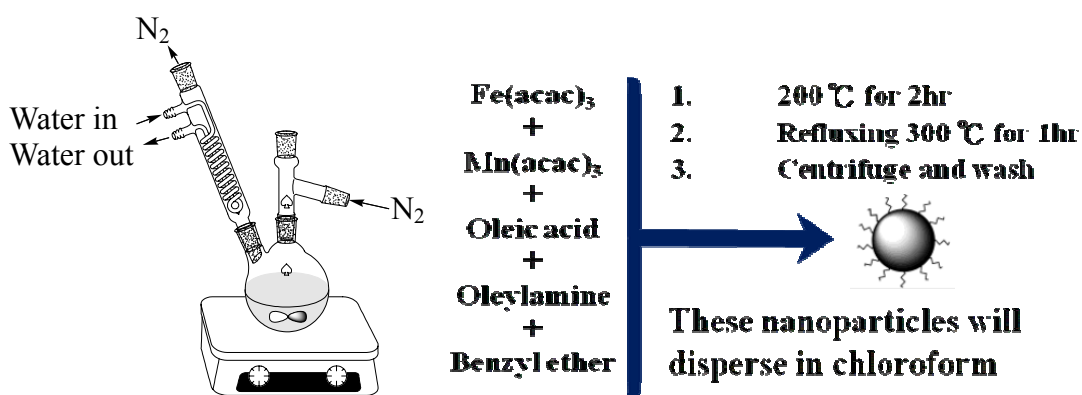
貳、研究方法與過程

本計畫的前期，已成功利用高溫裂解的方式合成出具有高遲緩率的超順磁氧化鐵奈米粒子^[19]，其物理性質與化學特性透過穿透式電子顯微鏡(TEM)顯示其粒徑約為 8.8 nm，超導量子干涉儀(SQUID)對其保有磁化現象之研究顯示，在室溫下的殘磁頑性(coercivity, Hc)約為~15 Oe，幾乎無磁滯現象以此證明 MnFe₂O₄ 具超順磁性^[20]。動態光散射儀(DLS)也顯示無論在任何 pH 值下的粒子半徑大小均不受影響，此結果表示粒子在溶液中能保持較長時間的穩定性，並在表面修飾後的水溶性奈米粒子能有效的包存於室溫下(或是 4°C)而不會造成聚集，此研究的成果證實經 PEG 包覆的氧化鐵奈米粒子能方便且有效的應用在生物物的影像實驗上。計畫的後半期，除了針對超順磁氧化鐵的表面修飾及其內核元素之分析外，也將抗體鍵結至氧化鐵奈米表面上，針對有高度表現生長因子受器(EGFR)的腫瘤細胞及動物活體進行相關實驗，除此之外，本研究也鍵結上近紅外光之發光團探討其體內螢光標定之腫瘤分析，其研究成果將作完整的探討與討論。

一、MnFe₂O₄ 之合成製備

將 Iron acetylacetonate、Manganese chloride、Oleic acid、Oleylamine 和 Benzyl ether 混合置於高溫爐(如圖一所示)。緩慢升溫至 200°C 後持續加熱二小時使其融解並混合均勻，並加熱至 300°C，到達指定溫度並持續加熱一小時後降溫至室溫。產物加

入丙酮後以 12000rpm 離心，並利用丙酮清洗，移除多餘的界面活性劑，離心後之沉澱物即為油酸包覆之 $MnFe_2O_4$ 奈米粒子，可溶於 chloroform 保存。可藉由調整 benzyl ether 的量改變金屬前驅物的濃度，藉以控制奈米粒徑，其穿透式電子顯微鏡之粒徑分析為 8.8 nm。除此之外，本研究也針對奈米粒子之組成成分與晶體結構進行 Energy-dispersive X-ray(EDX)與 X-ray 之分析。



圖一、超順磁氧化鐵之製備流程圖

二、奈米氧化鐵粒子之表面修飾^[21]

由於油酸包覆之氧化鐵奈米粒子無法應用於生物實驗上，因此在本計畫之前期已經合成出具有胺基之聚合物分子，並且成功的修飾到氧化鐵奈米表面，其中裸露出的胺基能與抗體鍵結，或是鍵結其他應用於生物體內之發光團。其修飾的方式是將油酸包覆之氧化鐵奈米粒子(30mg/ml)溶於 20ml 的甲苯(Toluene)中，加入 1.5 倍當量之 mPEG-modified 粉末聚合物分子，經超音波震盪 8 小時，高濃度的 mPEG-modified 粉末聚合物分子會與油酸進行互換^[21]，隨後

形成具有胺基修飾的水溶性氧化鐵奈米粒子，其粒徑經由動態光散射儀測出其平均粒徑為 35.1 nm，而之後將會探討表面電位(Zeta potential)之分析結果，對於表面修飾之官能基也會以傅立葉轉換紅外光光譜儀作為鑑定。

三、奈米氧化鐵接上有功能性標定之抗體(Erbitux)

本實驗室在 2009 年發表了以 SPIO 為基礎鍵結上 Herceptin 抗體之抗癌藥物(CLIO-Herceptin)^[22]，其抗癌藥物是針對具有 HER2/Neu 受器過度表現之腫瘤進行標靶與診斷，因此，本計畫的目的也是針對具有生長因子受器(EGFR)之過度表現的腫瘤進行的標靶與診斷，其鍵結方式參照 CLIO-Herceptin 的方式，將氧化鐵水溶性奈米粒子(50mg/ml)融入水溶液中並加入 10%之 DMSO，隨後加入 PyBOT 和 HOBt 當作縮合催化試劑(condensation)攪拌半小時後，再加入 500 μ L 的抗體 5mg/ml(Erbitux)，將反應瓶放置 4°C 冰箱反應隔夜，接著拿透析膜過濾多餘的試劑與抗體，將透析完後的溶液保存到 4°C 冰箱供實驗使用。

四、MnFe₂O₄-Erbitux 之體外細胞實驗(*In vitro*)

合成好的 MnFe₂O₄-Erbitux 修飾上 FITC 發光團，作為流氏細胞儀之偵測基團，其發光團以 N=C=S 官能基與奈米粒子表面多餘的胺基進行鍵結，其反應 pH 值須調至 10 以上才能有效的反應，最後以 MW. 1000 之透析膜過濾多餘的發光團。準備有 EGFR 表現之腫瘤細胞(A-431、SKBR-3、PC-3)以及低表現之腫瘤細胞(Colo-205)進行對照。將 5*10⁵ 之細胞總數轉移到 2ml 的微量離心管中，經由 PBS buffer 清洗三次

後，加入 MnFe₂O₄-Erbtux-FITC 奈米粒子(0.3mM)在冰中培養 1 小時，其目的在測試細胞對奈米粒子吞噬的情形，隨後以 PBS buffer 再清洗三次後即可以流氏細胞儀進行觀察。接著在 96 孔盤上植入 3*10³/孔之細胞數量，培養 12 個小時後加入不同濃度之 MnFe₂O₄-Erbtux 奈米粒子培養 1 小時，隨後以 PBS buffer 清洗三次，再加入 MTT 試劑反應 2 小時，接著以 ELISA reader 偵測其吸光值並計算細胞之死亡率。

五、MnFe₂O₄-Erbtux 之體內動物實驗(*In vivo*)

將準備好的腫瘤細胞打入裸鼠皮下組織，兩個禮拜後腫瘤將會長至 5mm，利用尾巴靜脈注射方式可讓藥物快速循環至全身，接著把老鼠麻醉後放置 3T 的 MRI 磁振造影，影像條件以 TE/TR 為 90/3000 設定參數進行掃描，其中的影像訊號值以下列方程式(1)作為計算公式^[22]，並針對影像訊號作探討。

$$\text{Enhancement (\%)} = \frac{SI_{\text{post}} - SI_{\text{pre}}}{SI_{\text{pre}}} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

除此之外，MnFe₂O₄-Erbtux 也另外修飾上近紅外光之發光團，其目的為希望在光學影像上能帶來更便捷的影像訊號，原因在於 MRI 的靈敏度不如螢光或是冷光發光團，利用發光團與磁性奈米粒子的相互搭配已成為多功能性醫學材料之流行趨勢。因此 MnFe₂O₄-Erbtux-NIR 的光學影像上也可以提供豐富的活體資訊，將 MnFe₂O₄-Erbtux-NIR 以靜脈注射打入裸鼠體內，可探討其奈米螢光團在體內分布情形，並在適當

時間將臟器取出，並用非侵入性分子光學影像系統分析各臟器殘餘藥物的情形。

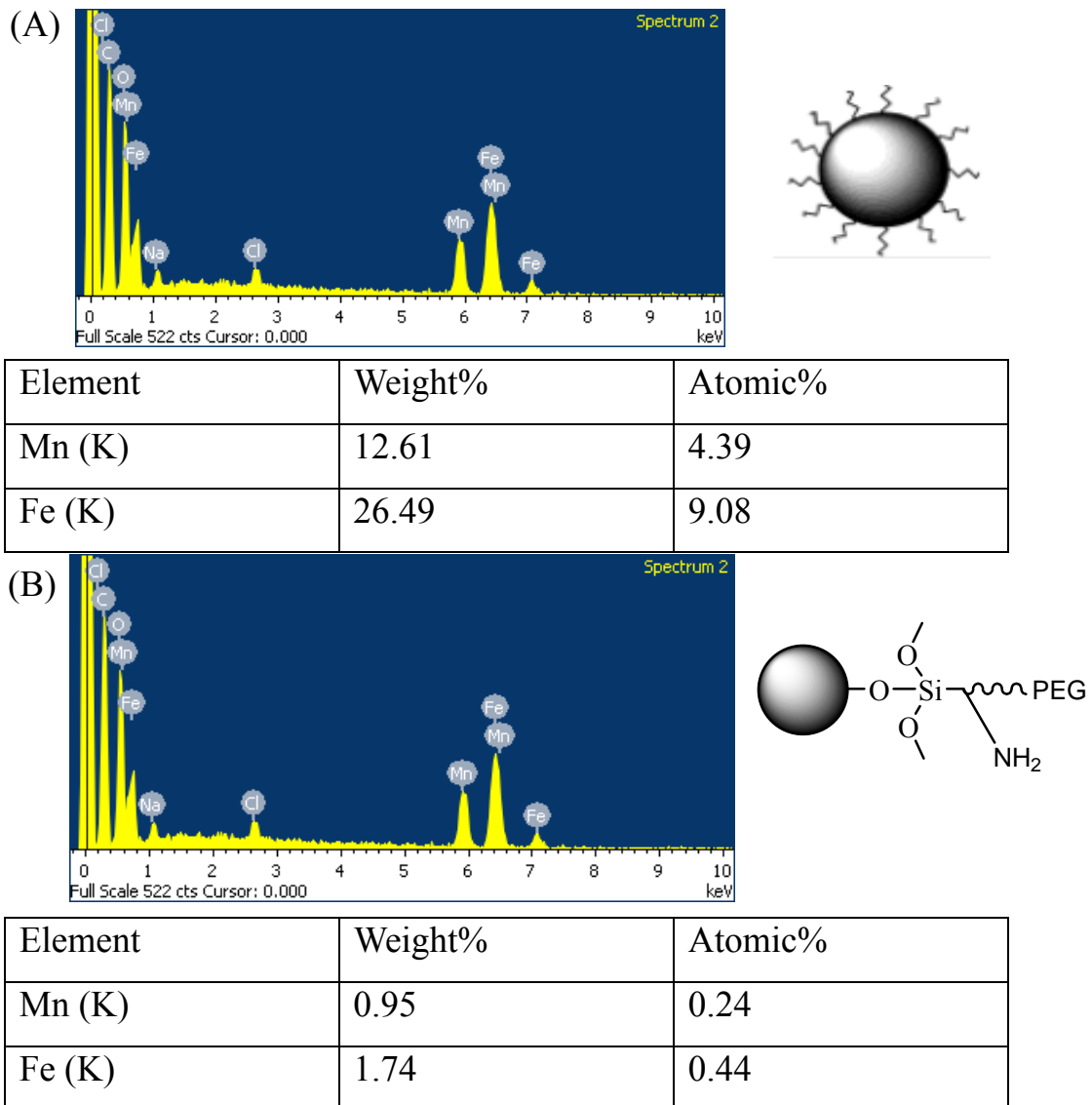
參、主要發現與結論

此研究已經成功合成出多功能性的氧化鐵奈米粒子，並應用於細胞與活體之相關研究，其抗體標定於腫瘤之研究結果顯示，抗體擁有較佳的鍵結能力，可以快速並準確的辨識腫瘤中過度表現的蛋白質，並針對其細胞生長機制加以抑制，所以針對抗體在醫學上的應用可說是非常廣泛，本實驗室致力於研究能標定腫瘤之多功能性磁振造影材料，並預期能達到早期診斷、早期治療之目的，因此，此計畫之研究重點在於增加奈米材料在光學或是磁振造影的雙功能性之腫瘤初期診斷之目標。

一、氧化鐵奈米材料之鑑定

(一) Energy-dispersive X-ray(EDX)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 X-ray(EDX)之掃描結果如圖二所示，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(圖二、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，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。



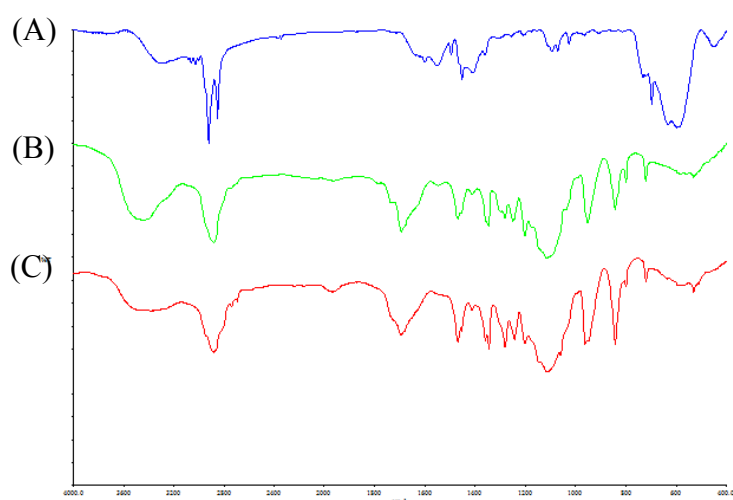
圖二、(A)油酸包覆之氧化鐵奈米鐵核鑑定(B)表面修飾後之氧化鐵奈米鐵核之鑑定。

二、氧化鐵奈米粒子表面修飾之分析

(一)FTIR (Fouries Tranform Infrared ; FTIR)^[21]

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容性之 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 巨分子確實接到奈米粒子上。由圖三、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} ，而修飾完的氧化鐵奈米粒子，可看出 MPEG-NH₂-Sliane(green) 的聚合物分子已成功包覆於氧化鐵核外 MPEG-NH₂-Sliane- MnFe₂O₄(red)，最明顯的吸收峰出現在 2924 cm^{-1} 之 $(-\text{CH}_2-)$ 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 $1114\&1070\&1055\text{ cm}^{-1}$ 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。

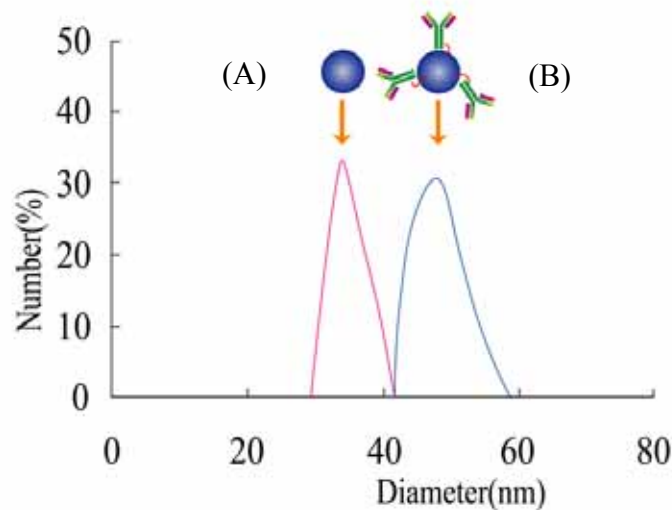


圖三、FT-IR 之光譜圖。(A)Oleic acid-MnFe₂O₄(blue)、
(B)MPEG-NH₂-Sliane(green)、(C)MPEG-NH₂-Sliane- MnFe₂O₄(red)。

三、氧化鐵之表面修飾抗體之分析

(一)動態光散射儀(Dynamic Light Scattering, DLS)測定

DLS 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，或者固定在某一個角度量測反射光強度的衰變情形，再配合理論分析模式，便可以得到粒子的平均大小及分布。反應後的抗體鍵結氧化鐵奈米粒子經 DLS 測量可發現粒徑由 35.1 nm 增加至 48.2 nm 表示抗體會增加大約~13 nm 的平均粒徑，如圖四所示。

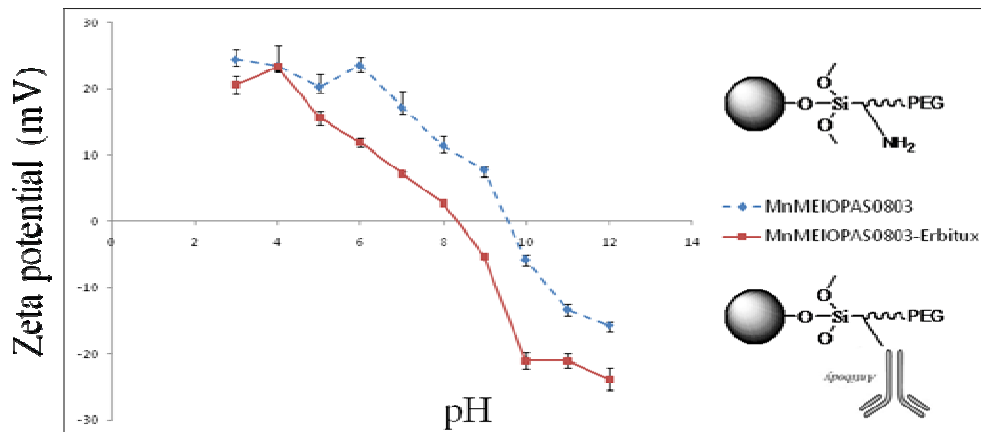


圖四、平均粒徑之氧化鐵奈米粒子鍵結抗體(A)氧化鐵奈米粒子(B)鍵結抗體後之奈米粒子。

(二)表面電位(Zeta potential)之測定

表面電位的測定可以了解粒子在溶液中的外層電荷分布的情形，通常大於+20 mV 或是小於-20 mV 都可以說明粒子在溶液中的排斥性極佳，相對的粒子比較不會產生沉澱或聚集的現象，由圖五所示，尚未鍵結抗體前的水溶性氧化鐵奈米粒子為+19.2 mV，而接上抗體後的氧化鐵奈米粒子其表面電價會下降至+7.5 mV，此結果說明抗體本身的縮酸官能基會影響奈米粒子

表面電價之分佈，即便如此，奈米粒子還是能穩定的存在溶液中，其次的原因為奈米粒子表面的 mPEG 聚合物分子為中性水溶性物質，奈米間會形成立體阻礙而不至於聚集，且能維持較長的時間。

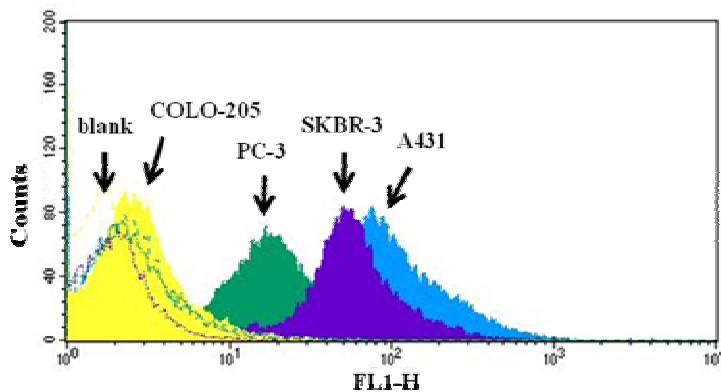


圖五、氧化鐵奈米粒子表面修飾抗體之表面電價分析。

四、 $MnFe_2O_4$ -Erbibitux 之體外細胞實驗(*In vitro*)測定

(一)流式細胞儀(Flow Cytometry)針對 A-431、SKBR-3、PC-3 及 Colo-205 之細胞株測試

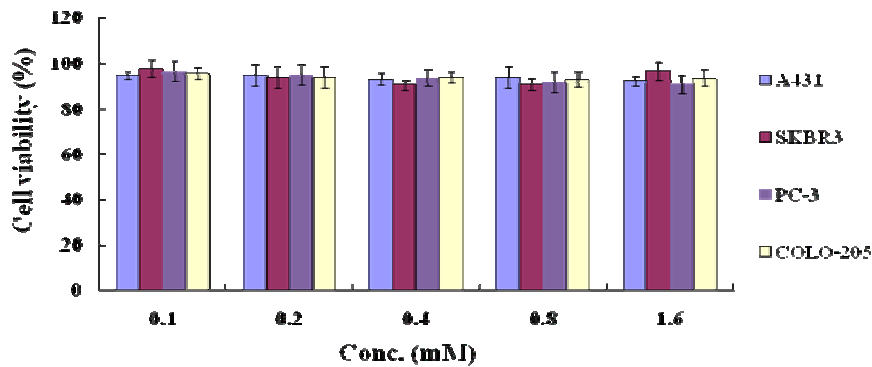
流式細胞儀可針對細胞對藥物的吞噬或是接收的能力而進行探討及研究，也可針對細胞凋亡的情形解釋其藥物對細胞之影響為何?將 $MnFe_2O_4$ -Erbibitux-FITC 與細胞培養後，由圖六可看出，A-431 的 EGFR 表現量較高相對其他細胞，因此此實驗可以初步說明 $MnFe_2O_4$ -Erbibitux-FITC 具有標定腫瘤細胞的能力。



圖六、奈米粒子 $MnFe_2O_4$ -Erbibitux-FITC 針對不同表現 EGFR 的腫瘤細胞之比較圖。

(二) MnFe₂O₄-Erbix 對細胞之毒性測試(MTT assay)

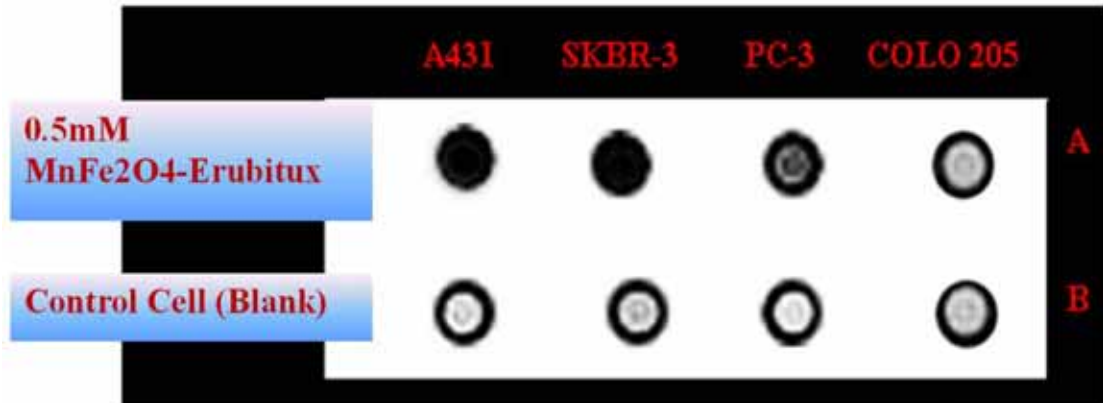
MTT 細胞毒性測試結果如圖七所示，即便是氧化鐵奈米濃度提高至 1.6 mM 也可看出細胞平均存活率都大於 90%，這說明了 MnFe₂O₄-Erbix 對細胞的立即性毒性很小，這對於正常細胞的傷害較小，可適用於醫學診斷之研究



圖七、個別細胞株對於 MnFe₂O₄-Erbix 之 MTT 毒性測試

(三) MnFe₂O₄-Erbix 對細胞之磁振造影分析(MR imaging)

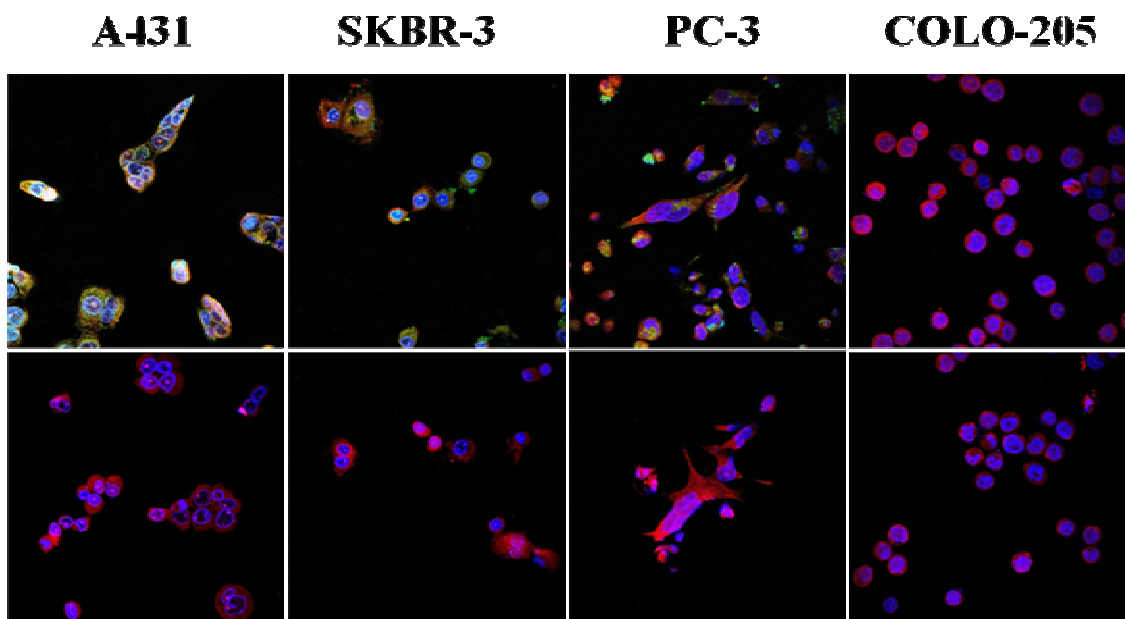
為了應用於醫學診斷之研究，在體外實驗利用四株細胞株，對照組細胞為 COLO-205，及 EGFR 有表現之實驗組細胞 SKBR-3、PC-3 及 A431，分別與 MnFe₂O₄-Erbix 培養，再利用 3.0 T MRI 進行造影，如圖八所示，MnFe₂O₄-mPEG-Erbix 會目標化到過度表現 EGFR 的細胞 (SKBR-3、PC-3 及 A431)，由磁性奈米粒子培養前後，訊號值有明顯差異，經磁性奈米粒子培養後的細胞影像變黑，訊號值下降；而不表現 EGFR 的細胞 (COLO-205) 磁性奈米粒子培養前後的影像則無明顯變化。



圖八、表現 EGFR 細胞與對照組細胞之 MRI 顯影分析(3.0 T)(A)有與磁性氧化鐵奈米粒子培養之實驗組(B)無任何藥物之對照組。

(四)雷射共軛交顯微鏡(Confocal Microscope)之細胞影像分析

將細胞植入 6 well 孔盤中培養 12 小時候，加入 4%固定液 (paraformaldehyde solution)後，細胞會貼附在蓋玻片上，隨後用 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, blue) 以及 HiLyte Fluor™ 594 acid (red)各別染細胞質及細胞核，如圖九所示。有將 $MnFe_2O_4$ -Erbitux-FITC 吞噬的細胞株可以看出與 DAPI 混合成的黃色光團，相較於對照組則沒有黃色光團顯示。



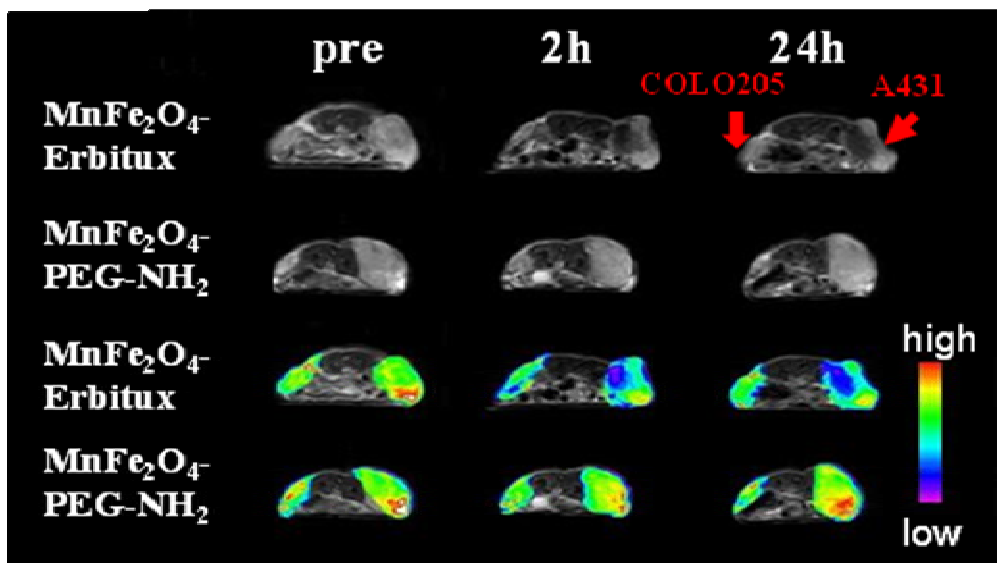
圖九、各別細胞株 EGFR 表現會影響其 $MnFe_2O_4$ -Erbitux-FITC 到細

胞質內吞噬的情形。

五、 $MnFe_2O_4$ -Erbitux 之體內動物實驗(*In vivo*)測試

(一)裸鼠(Nude mouse)之體內靜脈注射用於 MRI 檢測

挑選兩株細胞株，其中 A-431 的表面 EGFR 的表現較佳，本實驗選擇 A-431 當作活體實驗組以及 Colo-205 當作對照組，使用儀器為高雄醫學大學放射腫瘤科之 MRI 設備，磁場強度為 3.0T。由圖十所示，A-431 有看到明顯的影像變黑的情形相較於 Colo-205，由此推斷氧化鐵奈米粒子可以有效的標定腫瘤位置，且經過 24hr 後其訊號值還在，因此除了診斷之外，也可用於腫瘤之有效追蹤。

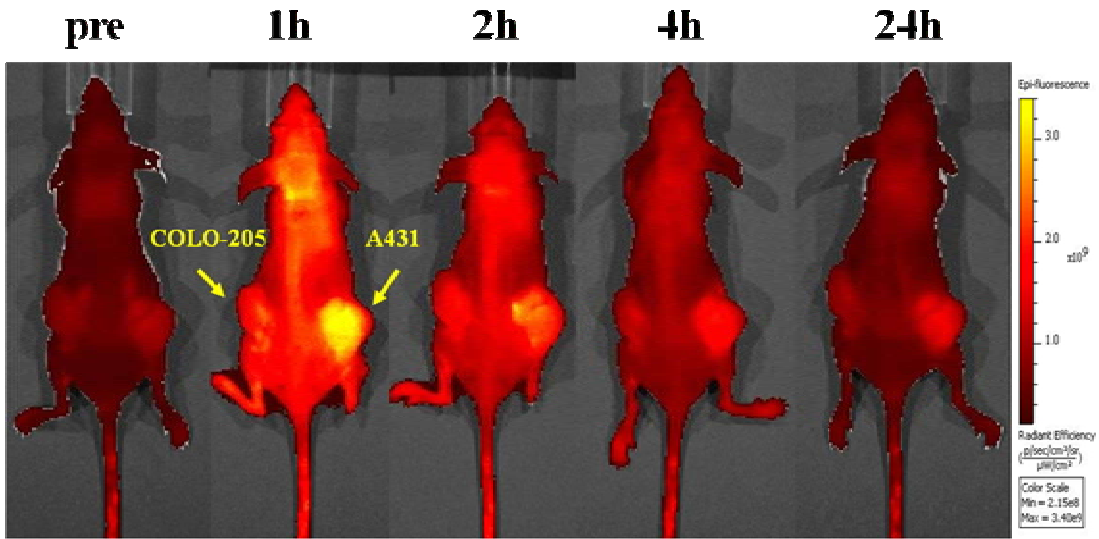


圖十、裸鼠左右各植入 Colo-205 及 A-431 腫瘤細胞，其 MRI 影像對時間之診斷結果顯示，A-431 具有較高的顯影效果。

(二)裸鼠之體內非侵入性活體分子影像之光學分析

隨後本研究也將 NIR(Near Infrared)發光團結合到氧化鐵奈米表面，並針對體內光學性質進行研究。將已種植好腫瘤之裸鼠打入 $MnFe_2O_4$ -Erbitux-Cy-TE777 之近紅外光光團之氧化鐵奈米

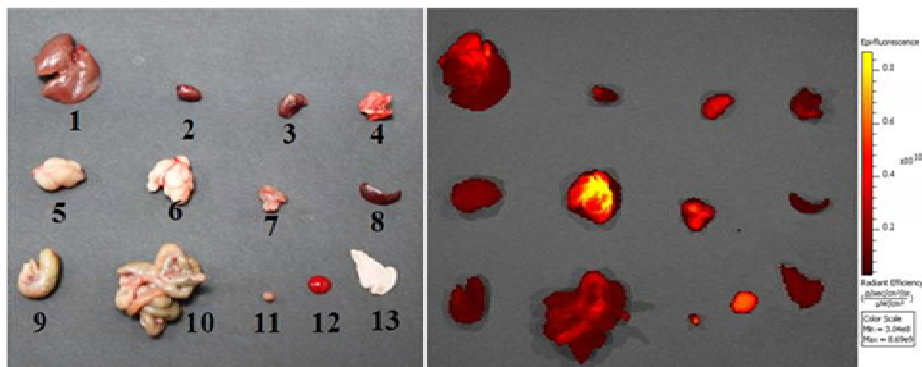
粒子，隨著時間得到螢光的發散病診斷體內奈米粒子分布的情形，可由圖十一所示。經過 24 小時後，依稀可看到殘餘的螢光訊號，雖然有機發光團會隨著時間降解，但其快速的偵測靈敏度可提供有效的活體資訊。



圖十一、靜脈注射 $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Erbtux-Cy-TE777}$ 至裸鼠體內，隨時間變化分析螢光光帶之殘餘情形。

(三)活體器官(*Ex vivo*)之光學影像分析

將老鼠犧牲後取出其臟器，可以看出在腫瘤的地方有明顯的螢光訊號，然而血液和肌肉組織也有殘餘的螢光訊號，但相較於對照組的腫瘤細胞，可看出無任何螢光訊號殘餘，可說明 $\text{MnFe}_2\text{O}_4\text{-Erbtux-Cy-TE777}$ 能有效的標定特定的腫瘤。



1. Liver, 2. Heart, 3. Kidney, 4. Lung, 5. COLO-205 tumor, 6. A431 tumor, 7. Muscle, 8. Spleen, 9. Stomach, 10. Intestines, 11. Bladder, 12. Blood, 13. Skin.

肆、參考文獻

1. Kidwell, C. S.; Chalela, J. A.; Saver, J. L.; Starkman, S.; Hill, M. D.; Demchuk, A. M.; Butman, J. A.; Patronas, N.; Alger, J. R.; Latour, L.L.; Marie L. Luby, M.; Baird, A. E.; Leary, M. C.; Tremwel, M.; Ovbiagele, B.; Fredieu, A.; Suzuki, S.; Villablanca, J. P.; Davis, S.; Dunn, B.; Todd, J. W.; Ezzeddine, M. A.; Haymore, J.; Lynch, J. K.; Davis, L.; Warach, S. *J. Am. Med. Assoc.* **2004**, *292*, 1823-1830.
2. Sun, C.; Veiseh, O.; Gunn, J.; Fang, C.; Hansen, S.; Lee, D.; Sze, R.; Ellenbogen, R. G.; Olson, J.; Zhang, M., *small* **2008**, *4*, 372-379.
3. Kang, Y. S.; Risbud, S.; Rabolt, J. F.; Stroeve, P., *Chem. Mater.* **1996**, *8*, 2209-2211.
4. Schellenberger, E.; Schnorr, J.; Reutelingsperger, C.; Ungeth, L.; Meyer, W.; Taupitz, M.; Hamm, B., *small* **2008**, *4*, 225-230.
5. Li, Z.; Tan, B.; Allix, M.; Cooper, A. I.; Rosseinsky, M. J., *small* **2008**, *4*, 231-239.
6. Kalambur, V. S.; Longmire, E. K.; Bischof, J. C., *Langmuir* **2007**, *23*, 12329-12336.
7. Zabow, G.; Dodd, S.; Moreland, J.; Koretsky, A., *Nature* **2008**, *453*, 1058-1064.
8. Gallagher, F. A.; Kettunen, M. I.; Day, S. E.; Hu, D. E.; Ardenkjær-Larsen, J. H.; Zandt, R. i. t.; Jensen, P. R.; Karlsson, M.; Golman, K.; Lerche, M. H.; Brindle, K. M., *Nature* **2008**, *453*, 940-944.
9. Bloch, F.; Hansen, W. W.; Packard, M., *Phys. Rev.* **1946**, *69*, 127-135.
10. Solomon, I., *Phys. Rev.* **1955**, *99*, 559-565.
11. Lauterbur, P. C., *Nature* **1973**, *242*, 190-201.
12. Lee, H.; Lee, E.; Kim, D. K.; Jang, N. K.; Jeong, Y. Y.; Jon, S., *J.*

- Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7383-7389.
13. Horák, D.; Babič, M.; Jendelová, P.; Herynek, V.; Trchova, M.; Pientka, Z.; Pollert, E.; Hájek, M.; Syková, E., *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 635-644.
 14. Wan, S.; Huang, J.; Guo, M.; Zhang, H.; Cao, Y.; Yan, H.; Liu, K., *J. Biomed. Mater. Res. A* **2006**, *80*, 946-954.
 15. Sun, B.; Ranganathan, B.; Feng, S. S., *Biomaterials* **2008**, *29*, 475-486.
 16. Zhang, Y.; Kohler, N.; Zhang, M., *Biomaterials* **2002**, *23*, 1553-1561.
 17. Kohler, N.; Fryxell, G. E.; Zhang, M., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7206-7211.
 18. Gupta, A. K.; Gupta, M., *Biomaterials* **2005**, *26*, 3995-4021.
 19. Shouheng Sun, Hao Zeng, David B. R., Simone R., Philip M. R., Shan X. W., and Guanxiong Li., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 273-279.
 20. Ma, M.; Wu, Y.; Zhou, J.; Sun, Y.; Zhang, Y.; Gu, N. *J. Magn. Magn. Mater.* **2004**, *268*, 33-39.
 21. Randy, D. P.; Sara P., Margriet J. V.-B., Heidi V.-d. R. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 1821-1831.
 22. T.-J. Chen, T.-H. Cheng, C.-Y. Chen, Sodio C. N. Hsu, T.-L. Cheng, G.-C. Liu, and Y.-M. Wang*, Targeted Herceptin-Dextran Iron Oxide Nanoparticles for Noninvasive Imaging of HER2/neu Receptors Using MRI, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2009**, *14*, 253-260.