

行政院原子能委員會  
委託研究計畫研究報告

肝細胞二次離子質譜法與共焦點顯微分析法建立  
Analysis Methodology of Time of Flight-Secondary Ion Mass  
Spectrometer and Confocal Microscopy on HepG2 Liver Cell

計畫編號: 992001INER080

受委託機關(構): 台北醫學大學

計畫主持人: 麥富德

核研所聯絡人員: 分析組 趙建華

聯絡電話: (02)2736-1661ext.3950

E-mail address: fordmai@tmu.edu.tw

報告日期: 99 年 11 月

## 目 錄

目 錄.....	2
中文摘要.....	3
英文摘要.....	4
<b>壹、計畫緣起與目的.....</b>	<b>6</b>
<b>貳、研究方法與過程.....</b>	<b>13</b>
一、In-DTPA-hexa-lactosid 對於肝細胞 HepG2 生理影響檢測.....	13
(一) MTT 細胞生存能力分析試驗.....	13
(二) Lactic acid dehydrogenase (LDH)細胞毒性測試.....	113
(三) 顯微細胞型態觀察.....	15
二、HepG2 對 IDHL 吸收能力檢測.....	15
(一) 感應耦合電漿質譜儀觀察 HepG2 對 IDHL 吸收.....	15
(二) 以飛行式二次離子質譜儀觀察 HepG2 對 IDHL 吸收.....	18
三、細胞表面膜蛋白偵測.....	20
(一) 掃描式電化學顯微鏡.....	20
<b>參、主要發現與結論.....</b>	<b>21</b>
一、In-DTPA-hexa-lactosid 對於肝細胞 HepG2 生理影響檢測.....	21
(一) MTT 細胞生存能力分析試驗.....	21
(二) Lactic acid dehydrogenase (LDH)細胞毒性測試.....	22
(三) 顯微細胞型態觀察.....	23
二、HepG2 對 IDHL 吸收能力檢測.....	213
(一) 感應耦合電漿質譜儀觀察 HepG2 對 IDHL 吸收.....	213
(二) 以飛行式二次離子質譜儀觀察 HepG2 對 IDHL 吸收.....	25
三、細胞表面膜蛋白偵測.....	27
(一) 掃描式電化學顯微鏡.....	27
<b>肆、參考文獻.....</b>	<b>29</b>

肝細胞二次離子質譜法與共焦點顯微分析法建立  
Analysis Methodology of Time of Flight-Secondary Ion Mass  
Spectrometer and Confocal Microscopy on HepG2 Liver Cell

廖婉茹<sup>1</sup>，謝筱婷<sup>1</sup>，林韋誌<sup>1</sup>，羅翠勻<sup>2</sup>，麥富德<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> 台北醫學大學醫學科學研究所 <sup>2</sup> 台北醫學大學生化學科

### 中文摘要

肝臟病變在國人之十大死因中排行第六，為台灣之常見疾病之一，而慢性肝病所導致的肝纖維化也是導致肝炎及肝硬化之重要因素，本研究計畫著重於觀察帶有金屬銦之藥物 In-DTPA-hexa-lactoside (IDHL) 在人類肝細胞株 HepG2 中的吸收能力及其是否會所影響細胞增生、死亡...等正常生理情況改變。本研究利用 MTT 分析觀察肝細胞 HepG2 生存能力試驗，投予 50 $\mu$ M 的 IDHL 24 小時後檢測，發現對 HepG2 細胞存活、粒線體代謝能力並未有明顯的影響，以乳酸去氫酶分析試驗 (Lactate dehydrogenase assay ; LDH assay)，同樣投予 50 $\mu$ M 的 IDHL 24 小時後，檢測 IDHL 對 HepG2 細胞毒性測試，IDHL 對 HepG2 細胞也未有明顯的細胞毒理作用。本研究進一步觀察此藥物在 HepG2 有特殊的吸收作用，由於 IDHL 含有金屬銦(In)螯合，本研究以感應耦合電漿質譜儀(ICP-MS)檢測細胞內銦離子(In)含量來得知 HepG2 內 IDHL 含量，利用飛行式二次離子質譜儀(TOF-SIMS) 及掃描式電化學顯微鏡對 HepG2 分析檢測。飛行式二次離子質譜儀 (TOF-SIMS)產生 IDHL 二次離子的質譜訊號及影像，進一步確認藥物在細胞內外分佈。預期不同濃度之藥物在細胞實驗中對細胞

會產生造成不同的離子訊號強度差別，並進一步觀察 IDHL 對受損程度之不同是否也有肝糖的合成能力上之影響。在掃描式電化學顯微鏡結果中利用葡萄糖調節蛋白 78(Glucose regulator protein 78;GRP78)經由 IDHL 處理比較其對照組與實驗組可發現對照組的還原電流由-12 皮克安培增加至-16 皮克安培，表示經由 IDHL 的處理可以誘發葡萄糖調節蛋白 78 的表現。

關鍵字：含金屬銦之醣質藥物，銦，人類肝癌細胞株，感應耦合電漿質譜儀，飛行式二次離子質譜儀，掃描式電化學顯微鏡

### 英文摘要

The liver pathology is the 6th leading cause of death worldwide and also one of the most common diseases in Taiwan. Besides, the hepatic fibrosis caused by chronic liver disease is also involved in the pathogenesis of hepatitis and cirrhosis. In this study, the research project focused on how to observe the absorption and the affect cell proliferation, death and physiological metabolism of a synthetic drug “In-DTPA-hexa-lactoside(IDHL)” in human hepatoblastoma cell line (HepG2). At first, we used to MTT assay for detected the influence of 50 $\mu$ M IDHL in HepG2 cell survival and mitochondrial metabolism at 24hrs after treatment. We found that it is no significant impact on HepG2 cell. Lactate dehydrogenase method (Lactate dehydrogenase assay; LDH assay) is used to check the cytotoxicity of IDHL in HepG2. we tested for the same 50 $\mu$ M of IDHL 24 hours, and it without obvious cytotoxicity effect. Next, we investigated whether the IDHL in cells have specific absorption, as IDHL chelate with indium

(In), we planed to detect intracellular indium ion (In) content to quantitate the component of intracellular IDHL by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), In addition, we will use IDHL and analysis liver cell by TOF-SIMS and SECM. Time-of-flight-secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) has been applied mass signal and imaging to confirm the intracellular distribution of IDHL. We expect that ion Strength will change in different drug concentration and that IDHL is also the ability of glycogen synthesis effect on different degree of liver damage. In SECM application, we detect the glucose regulator protein 78 to be a model to detect the current change after drug treatment. To compare with two groups, the IDHL threaded group the current change until -12 pico-ampere to -16 pico-ampere. Indicate that the IDHL can induction the GRP78 expression.

Keywords: In-DTPA-hexa-lactoside(IDHL), In, HepG2, ICP-MS, TOF-SIMS, SECM

## 壹、計畫緣起與目的

肝臟病變在國人之十大死因中排行第六，為台灣之常見疾病之一。在全球 60 億人口中大約有 3 億 6 千萬的 B 型肝炎帶原者[1]以及約 1 億 7 千萬的 C 型肝炎帶原者[2]，其中，B、C 型肝炎為亞洲人主要的疾病。基於宿主或種族或不明原因，台灣現行狀況確實是盛行率高的國家。估計 250 至 300 萬成年人口，亦即大約 15%至 20%是 B 型肝炎帶原者，會有 2%至 3%的人罹患慢性 C 型肝炎，以上統計顯示，C 肝帶原者約有三十萬人至六十萬人。更甚至，患有 B 型或 C 型肝炎的人進而罹患肝癌的比率為一般人的二、三倍。根據衛生署的統計，國人十大死亡原因中，慢性肝病、肝硬化為第六位，而肝癌更是國內十大癌症死亡原因的第一位，所以慢性肝炎、肝硬化、肝癌合稱『肝病三部曲』，但這些重大疾病的前兆—肝纖維化並未得到重視。

肝纖維化 (hepatic fibrosis) 是指肝臟內瀰漫性細胞外基質 (特別是膠原) 的過度沉積，為肝硬化的初期變化。由於肝臟纖維化不是一個獨立性的疾病，而是許多慢性肝病的共同病理過程。近年研究表明：病理證實的輕度慢性肝炎中 62.6%有肝纖維化，中度、重度慢性肝炎及肝硬化則 100%有肝纖維化，因而針對肝纖維化的治療原則應當貫穿於整個慢性肝炎的全部過程中。在肝臟內有一種名叫肝臟星狀細胞(hepatic stellate cell, HSC)是肝臟纖維化時細胞外基

質(extracellular matrix, ECM)過多產生和沉積的主要細胞來源。在肝臟損傷過程中，肝臟星狀細胞被刺激而活化，進而轉化為纖維細胞，此可產生大量細胞外基質，主要為膠原纖維，進而促進肝纖維化的形成。

幾乎各種慢性肝臟疾病均可引起肝纖維化，其病因大致可分為感染性，先天性代謝缺陷及化學毒物性及自身免疫性肝炎、原發性膽汁性肝硬化和原發性硬化性膽管炎等。根據最近的調查結果：肝纖維化所產生的影響在全世界對於超過數十以百萬計的人們而且可能最終導致肝硬化、肝功能衰竭和死亡。最近的流行病學的資料指出由於 C 型肝炎感染，而肝纖維化的影響方式在往後的 10-15 年期間被預期到三倍擴大[3]。

肝纖維化初期，尚有一定的可逆性，即在病因刺激停止後，增生的膠原纖維可以逐漸被重吸收，使肝臟結構部分恢復正常。另一方面，如病因刺激持續的存在，則肝纖維化將加重，使肝臟的正常結構遭到破壞，而代以廣泛的纖維增生及結節樣的假小葉，此時膠原纖維不易重吸收，即成為不可逆的肝硬化，後期常會併發門靜脈高血壓、肝衰竭、肝昏迷，甚至肝癌。

由於肝臟並無太多痛覺神經的存在，因此一但肝臟功能發生異常其所影響的層面是非常大的，在一般的血液常規檢查中多半以血中之 GPT、GOT 來做為肝臟發炎之觀測指數，而之 GPT、GOT 是

儲存於肝細胞中，肝發炎時，肝細胞會壞死才釋放至血液中，因而之 GPT、GOT 會上升，通常藉此來判定是否有肝炎。目前臨床所用肝穿刺檢查法，準確度與再現性皆不佳，且病患接受度低，若要於治療期間頻繁肝穿刺，病人意願會更低。很多民眾接受腹部超音波檢查後，除了「正常」或「肝硬化」兩種診斷外，也會聽到醫師診斷為「肝實質病變」，也有的說是「瀰漫性肝病變」。「肝實質病變」一般就是指肝纖維化，但是超音波無法像病理切片一樣再細分等級。而「瀰漫性肝病變」這個名詞除了可以指肝纖維化外，有時還用來指一些全面性病變，如脂肪肝，或某些浸潤性的炎症或惡性癌。一般來說，正常肝臟在超音波下的回音亮點，其亮度、大小比較均勻，表面看起來也是平的；如果是有肝纖維化（肝實質病變），肝臟回音亮點的亮度、大小可能會有不均勻的情形，這時醫師會跟你說肝臟「稍微粗粗」。肝硬化時，此種不均勻的情況更明顯，也就是「肝臟粗粗」，而且肝臟表面也可能凹凸不平。但是「粗粗」絕不是只有表面而已，而是內外都「粗」。用超音波診斷是否有肝纖維化，會遇到一些不易區分或診斷的情形，也就是說要判斷正常、肝實質病變或肝硬化，有時是需要依靠檢查者的經驗，當然跟檢查儀器也有相關。所以在診斷是否有肝纖維化、肝硬化甚至是硬化的程度時，還需要配合其他檢查（如切片檢查、同位素檢查、抽血檢查等），由醫師作綜合判讀。



慢性肝炎對肝臟纖維化有極大的關連，早期肝纖維化診斷，有助完全痊癒。目前市面肝纖維化治療藥很多，特別是中草藥的開發相當興盛，號稱有抗發炎抗纖維化之療效，由於肝纖維化並非十分緊急的疾病，因此我們傾向開發血清即可檢驗的醣質藥物來驗證其抗纖維化效果。

本計畫之目標發展抗肝纖維化藥物療效追蹤用之檢驗工具，我們採用 lysine based 之 nitrilo triacetic acid 結構做為聚合醣鏈之骨架，將 3 分子的半乳胺醣鏈或乳醣鏈抓在一起的小分子，發展高通量肝功能定量技術，殘餘肝功能越少的病患，血清測到醣質藥物濃度將會越高，選擇半乳醣胺醣聚合醣鏈或乳醣聚合醣鏈是因為它和肝細胞有十分高專一結合特性，可作為肝儲備功能檢測工具，且可增加造影靈敏度以及準確度，有利肝臟功能造影與區辨肝纖維化有無獲得治療。

在放射性同位素的標誌上，傾向開發 In-111 標誌聚合醣鏈，事實上它是目前最常用於胜肽類標誌的核種，也適合凍晶劑型，例如已上市的 IN-111 DTPA-pentetreotide。該核種由核研所自製，取材方便，沒有供貨來源不便的問題，它的半衰期 2.8 天，使用於胜肽類或氨基酸類的標誌，穩定性高，適合運輸遠端使用。另外由於聚合醣鏈有極佳的肝標靶特性，輻射劑量幾乎全集中於肝臟，所以可以極低的劑量來做造影。

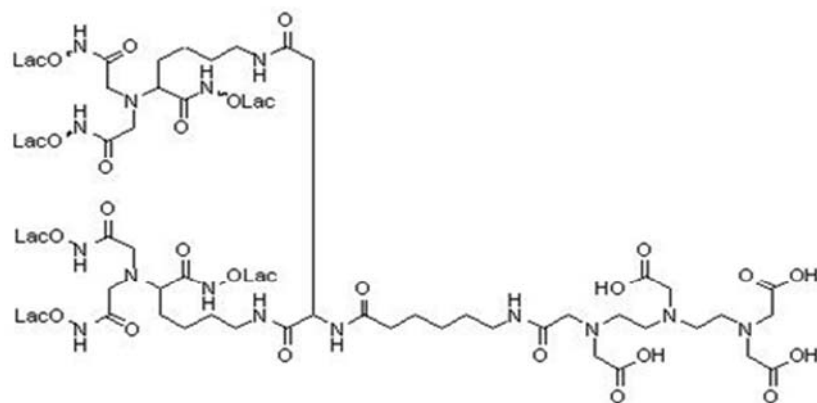
本次研究計畫著重於觀察 In-111 之乳糖聚合醣鏈(IDHL) (未含放射線) 在肝癌細胞的吸收能力以及其對於肝癌細胞所造成之影響，由於肝臟對於醣類代謝之角色中扮演一個十分重要的地位，當肝臟有初步病變產生纖維化現象時期對於糖類合成為肝醣儲存能力會下降，在研究中利用一種表面分析技術儀器飛行式二次離子質譜儀(TOF-SIMS)，來觀察肝癌細胞對 IDHL 吸收能力，其原理為帶能量之一次離子入射而撞擊樣品表面，而激發出二次離子，測此二次離子之荷質比值，鑑定其為何種物質，提供質譜訊號以及將訊號以影像呈現來觀察目標分子的分布位置，深具觀察細胞內部藥物吸收含量以及其分佈位置的潛力[4-9]。

因此，藉由 IDHL 帶有 In 可以被飛行式二次離子質譜儀(TOF-SIMS)所偵測到，對於 IDHL 於細胞內之分佈作一研究，以及藥物對於糖類合成時被利用之多寡作一檢測及判斷肝細胞合成肝醣能力之標準，另外應用 SECM 對於肝細胞中對於藥物所引起的蛋白質改變。

在 SECM 的第一個生物的應用程式中，是使用獲得金屬性碳絲的即時影像和 *Ligustrum sinensis* 樹葉和測量 *Elodea* 的氧的製造在光合作用期間。最近已經變為調查即時現象的一個重要的工具在其他活的生物系統中。舉例來說，Matsue 調查在光合作用 and respiration 期間的細胞外的氧中改變[10]。在一最近系列研究中，

Mirkin 使用了 SECM 測量 redox 活動、以酸為基礎的反應度和在不同細胞中[10-12] 細胞內的反應不外乎離子交換、訊號傳遞與各蛋白質的表現，而這些反應的產生都會有些微的電流產生，特別是位於細胞膜表面的各種膜蛋白質如圖五，由於這些細胞膜表面的蛋白質藉由與外界接觸來傳遞訊號分子使其活化後續路徑，或是經由細胞內各訊息路徑所調控而轉移至細胞膜表面的蛋白質，由於掃描式電化學顯微鏡為一非破壞性的檢測儀器，對於細胞表面的蛋白質可以提供一個分析的方向，與傳統方式相比較下雖然也是利用抗體的專一性去做辨認的方式，但是由於其不須有對於細胞產生的外力傷害如胰蛋白酶的作用、或是螢光的干擾以及訊號過低無法偵測等限制，與傳統方式比較下仍有其優勢存在。近年來利用 SECM 對於細胞蛋白質的偵測除了位於細胞膜上的之外也有利用基因轉殖的方式使其所想要觀察的蛋白分泌到細胞外[13]，由 Tatsuya Murata[14]的實驗結果得知與利用螢光分析的方式相比較可發現利用 SECM 偵測的靈敏度高於螢光分析方式，也證實了利用 SECM 的對於偵測上的高靈敏度，除此之外對於細胞內所反映的情況不同也可藉由利用 SECM 所反映出的電流不同作一判斷[15]，此外 SECM 對於細胞表面上的膜蛋白也有良好的分析能力，以往對於單一細胞的蛋白質分析可能需要利用到流式細胞儀，但其所分析出的也是屬於大量收集後所獲得的百分比，但經由 William S. Roberts 在 2007 的研究結果

中[16],SECM 不只是針對一群細胞可以藉由電流量化分析其蛋白表現量，對於單一細胞的偵測也十分的靈敏。



In-DTPA-HL

圖一: In-DTPA-hexa-lactoside(IDHL)結構圖；分子量 3906.76

## 貳、研究方法與過程

### 細胞培養

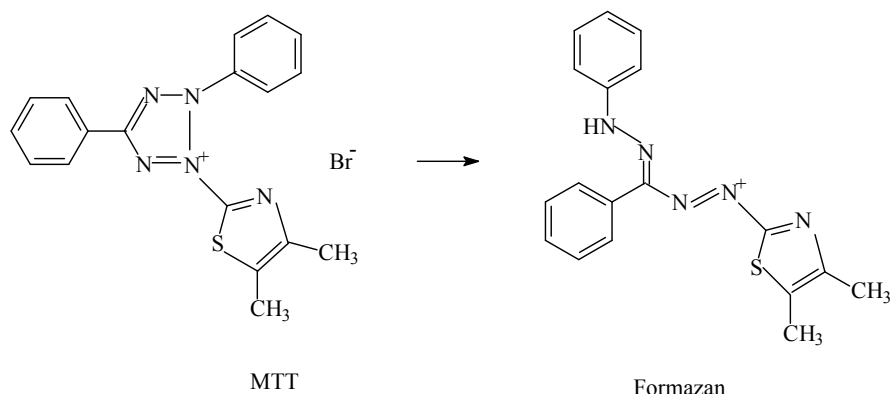
本實驗使用人類肝癌細胞株 (HepG2)，購買自食品工業研究所，HepG2 培養於含 10% (v/v) 胎牛血清與 90% (v/v) Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ F-12 (DMEM/F-12) 混合成的培養液中，每 1~2 天更換一次培養液，待細胞長至 9 分滿後，以 0.25% trypsin-EDTA 將細胞打下作繼代培養，細胞培養於 37°C、5%CO<sub>2</sub>、95%N<sub>2</sub> 的細胞培養箱中，定期以顯微鏡觀察生長情況及細胞型態[17-18]。

### 一、IDHL 對於肝細胞 HepG2 生理影響檢測

觀察 IDHL)是否會所造成人類肝癌細胞株 HepG2 細胞增生、死亡...等正常生理情況改變，故檢測不同濃度 IDHL 暴露下，HepG2 的正常生理狀態、代謝能力是否受到影響以及對 HepG2 致毒性測試。

#### (一) MTT 細胞生存能力分析試驗

本實驗是利 MTT(3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)此一黃色水溶性物質來測定細胞的存活率。MTT assay 是一種活細胞染色法，其原理是利用細胞內粒線體中的 dehydrogenase 將 MTT 代謝成藍紫色結晶 Formazan，將此結晶溶於 DMSO (Dimethyl Sulfoxide)中，以 OD 570nm 的吸光值來量化，形成的顏色深淺與存活的細胞數目成正比。其反應如下：



## 1. 實驗方法

將培養的肝臟細胞 HepG2 利用胰蛋白酶收取下來，種入 96 孔盤，每一孔內的細胞密度為  $1 \times 10^4 / 100 \mu\text{L}$ ，培養箱內培養 24 小時，加入含不同濃度的 IDHL 的培養液，持續培養 24 小時後，於 96 孔盤孔洞中加入  $10 \mu\text{L}$  MTT ( $5 \text{mg/ml}$ )，於  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  培養箱中與細胞共同培養 3 小時，等待活細胞線粒體中琥珀酸脫氫酶能代謝還原 MTT，形成 Formazan 藍紫色結晶，去除上清液，加入 DMSO  $100 \mu\text{l}$  溶解藍紫色結晶，讀取在  $570 \text{nm}$  吸收波長數值 (OD 值)，由於 Formazan 結晶生成數量與活細胞數目或代謝能力成正比，因此可藉讀取 OD 值推測出活細胞的數目增加或減少，來評估細胞生存能力 [19-21]。

## (二) Lactic acid dehydrogenase (LDH) 細胞毒性測試

本實驗主要是利用 LDH Cytotoxicity Assay，當細胞受到損害而導致細胞膜破裂時，內部的物質會釋放出來，其中包含一種穩定存在細胞質中的酵素：Lactic acid dehydrogenase (LDH)，因此，藉由檢測細胞是放到培養液中 LDH 的含量，推測細胞受到毒性損傷、死亡的程度。

## 1. 實驗方法

將培養的 HepG2 細胞利用胰蛋白酶收取下來，種入於 96 孔盤，每一孔內的細胞密度為  $1 \times 10^4 / 100 \mu\text{L}$ ，培養 24 小時，準備不同濃度之 IDHL 培養液，24 小時後加入  $10 \mu\text{L}$  Lysis buffer 於 High control 作用 1 小時，取出孔盤後離心，取上清液  $10 \mu\text{L}/\text{well}$  移至新孔盤中檢測 OD 450nm 吸光值 [21-23]。

### (三) 顯微細胞型態觀察

#### 1. 實驗方法

將細胞種在 6 孔盤中 ( $2.5 \times 10^6$  HepG2 / well)，培養三天使其生長情況穩定，投予  $50 \mu\text{M}$  IDHL 生長 24 小時後，放置於到立顯微鏡下觀察細胞型態。

## 二、HepG2 對 IDHL 吸收能力檢測

IDHL 含有 In 離子，利用觀察細胞內 In 離子來檢測 IDHL 含量。

### (一) 感應耦合電漿質譜儀觀察 HepG2 對 IDHL 吸收

感應耦合電漿質譜儀(ICP-MS)的基本原理乃是藉霧化器將待測樣品溶液霧化後，輸送至電漿中，在高溫下將樣品破壞，使吸入之樣品使產生原子態之離子，或與基質結合之離子，因此，準備不同濃度之 IDHL 培養液培養 24 小時後，將細胞、medium 及 wash buffer 收下，並進一步打破細胞，收細胞內物質進一步消化、上機，由於 IDHL 含有 In 離子，

利用觀察細胞內 In 離子來檢測 HepG2 內 IDHL 含量，以及 IDHL 對於糖類合成時被利用之多寡作一檢測及判斷肝細胞合成肝醣能力之標準[18, 24]。

## 1. 實驗方法

### (1)種細胞

種  $2.5 \times 10^6$  HepG2 / well 於 6 well 中，培養三天待細胞貼附生長後下藥，下藥後 24 小時 (第四天)每孔盤收  $2.5 \times 10^6$  HepG2 細胞。

### (2)下藥

配製 IDHL Stock: 1mM IDHL 500 $\mu$ l，取 1mM 100 $\mu$ l 加 medium 1,900 $\mu$ l 為 50 $\mu$ M IDHL 2ml。配製 Stock1:50 mM InCl<sub>3</sub> 1,000 $\mu$ l；Stock2: Stock1 200 $\mu$ l medium 800 $\mu$ l 為 5mM 1,000 $\mu$ l。取 Stock2 分別配置 100  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 10  $\mu$ M InCl<sub>3</sub> 於 2ml medium。將孔盤內 medium 去除，加入 2ml medium 於 Control，其他樣品分別加入 50 $\mu$ M IDHL, 100  $\mu$ M InCl<sub>3</sub>, 50  $\mu$ M InCl<sub>3</sub>, 10  $\mu$ M InCl<sub>3</sub> 溶液。

### (3)收樣品

本實驗收 A, B, C 三組上機，A 組(Cell lysate): A1(control);A 2(10  $\mu$ M InCl<sub>3</sub>);A 3(50 $\mu$ M IDHL);A 4(50  $\mu$ M InCl<sub>3</sub>); A5(100 $\mu$ M InCl<sub>3</sub>) 共五個樣品。B 組(medium): B1(control);B 2(10  $\mu$ M InCl<sub>3</sub>); B3(50 $\mu$ M IDHL); B4(50  $\mu$ M InCl<sub>3</sub>); B5(100 $\mu$ M InCl<sub>3</sub>) 共五個樣品。C 組(wash buffer):



C1(control); C2(10  $\mu$ M InCl<sub>3</sub>); C3(50 $\mu$ M IDHL); C4(50  $\mu$ M InCl<sub>3</sub>); C5(100 $\mu$ M InCl<sub>3</sub>) 共五個樣品。

	Cell lysate	Medium	Wash buffer
Control	A1	B1	C1
10 $\mu$ M InCl <sub>3</sub>	A2	B2	C2
50 $\mu$ M IDHL	A3	B3	C3
50 $\mu$ M InCl <sub>3</sub>	A4	B4	C4
100 $\mu$ M InCl <sub>3</sub>	A5	B5	C5

先分別將孔盤中 medium 2ml 收到 tube 為 B 組，加 PBS 500 $\mu$ l wash 後收到 tube C 組，加 trypsin 200 $\mu$ l 與 PBS 800  $\mu$ l 使細胞懸浮，收到離心管 4 $^{\circ}$ C 離心 2,300rpm，抽取上清液到 C 組，加 cold PBS 500  $\mu$ l wash 4 $^{\circ}$ C 離心 2,300rpm，抽取上清液到 C 組，加 cold PBS 150  $\mu$ l 將細胞穩合均勻，於 -20 $^{\circ}$ C 保存。

#### (4) 蛋白定量

標準品配置:

2mg/mLBSA 分別取 1, 2, 3, 4, 5 $\mu$ l 加 ddH<sub>2</sub>O 200 $\mu$ l 加 Bradford ford 800 $\mu$ l 定量。

樣品配製:

Lysis buffer 49  $\mu$ l 加 protease inhibitor 0.5 $\mu$ L (votex 一次/5min)加 A 組每個樣品取 1  $\mu$ l cell lyaste 為 50  $\mu$ lProtein solution 。取 1  $\mu$ L Protein solution 加 ddH<sub>2</sub>O 200 $\mu$ l 加 Bradford 800 $\mu$ l 做蛋白定量。

## (5)上機消化

樣品配製:

取 A(cell lyaste) 130 $\mu$ l, B(Medium) 1,500 $\mu$ l, C(Wash buffer) 1,500 $\mu$ l 以及一管 ddH<sub>2</sub>O 分別加濃硝酸，將樣品移到消化管消化，將有機物消化掉，樣品由消化管移到 15c.c tube，RO 水清洗消化管壁再移到 tube 補至 5ml 後上機檢測。

溶液配製:

In 標準品配製濃度為 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 30, 50ppb 標準品各 10ml 於 15c.c tube，Quality control 含 In, Y 各 5ppb(以 2%HNO<sub>3</sub>), blank。

## (二) 以飛行式二次離子質譜儀觀察 HepG2 對 IDHL 吸收

藉由 IDHL 帶有 In 可以被飛行式二次離子質譜儀所偵測到，藉由此儀器對於細胞內外 IDHL 分佈之趨勢作一研究，以及 IDHL 對於糖類合成時被利用之多寡作一檢測及判斷肝細胞合成肝醣能力之標準。

### 1.實驗方法

#### (1)種細胞

矽晶片滅菌後放入孔盤中(每格孔盤放一個)，種  $1 \times 10^5$  HepG2 /孔盤，使細胞生長在矽晶片上，定期以顯微鏡觀察晶片週圍細胞生長情形，待其貼附完整且細胞量適中。

## (2)下藥

配製 10 $\mu$ M IDHL( 1mM 10 $\mu$ l 加 medium 900 $\mu$ l 為 10 $\mu$ M IDHL 1ml)於 1.5ml 離心管，將孔盤中 medium 去除，Control 孔盤內加 1ml medium，實驗組則加入配製的 10 $\mu$ M IDHL 容易到孔盤中。

## (3)樣品前處理

下藥後 24 小時收樣品，用夾子輕輕將矽晶片取出，以 PBS 清洗掉矽晶片上細胞外的 medium，取另一上層矽晶片蓋上，放入液態氮中迅速冷凍，待冷凍乾燥前將兩片細江片上下垂直撥開(冷凍脆裂)，送入冷凍乾燥機真空乾燥，36 小時後，取出樣品上機檢測。

## (4)上機檢測

將乾燥之矽晶片樣品固定於裝置後送入 TOF-SIMS 中，機器設定條件為 ION-TOF GmbH, Germany；一級離子槍: 25 keV Ga<sup>+</sup>；typical current :0.5–1 pA；pulse width: 20–100 ns。

## 三、細胞表面膜蛋白偵測

細胞內的反應不外乎離子交換、訊號傳遞與各蛋白質的表現，而這些反應的產生都會有些微的電流產生，特別是位於細胞膜表面的各種不同的膜蛋白，由於這些細胞膜表面的蛋白質藉由與外界接觸來傳遞訊號分子使其活化後續路徑，或是經由

細胞內各訊息路徑所調控而轉移至細胞膜表面的蛋白，其表現量或是表現與否都與細胞息息相關。為此藉由偵測細胞膜上的葡萄糖調節蛋白-78( glucose regulator protein ;GRP78 )來判斷細胞對於 IDHL 所產生的反應

### (一) 掃描式電化學顯微鏡

掃描式電化學顯微鏡或稱電化學掃描顯微鏡 ( Scanning Electrochemical Microscopy; SECM )，是一種掃描表面高解析度電化學資料的集合物件的探針技術 [16] 基於其電化學原理工作，可測量微區內物質氧化或還原時所給出的電化學電流。在肝臟細胞中其糖類代謝占有十分重要之地位，當肝臟在有初步病變產生纖維化的現象時其對於糖類代謝合成等都會有所影響。在糖類的代謝過程中，當乳糖在進入人體後可以分解成葡萄糖及半乳糖，來供給身體吸收應用，而過多的糖類則會以肝糖的形式儲存於肝臟中，目的藉由偵測與糖類的代謝相關的蛋白來反應細胞吸收代謝的情形。

#### 1. 實驗方法

將  $5 \times 10^4$  的 HepG2 細胞培養於 3.5 公分培養皿中 24 小時。待細胞貼附後將培養液置換為含有  $10 \mu\text{m}$  的 IDHL 培養液，繼續培養 24 小時。隔天將培養液置換為含有 Goat-GRP78 抗體(1.5mg/mL)的培養液，放回  $37^\circ\text{C}$  培養箱 2 小時。以 2mL 培養液將多餘未結合的 Goat-GRP78 抗體洗掉，並重複此步驟三次。再將培養液置換為含有 anti-Goat 抗體(1.5mg/mL)的培養液，放回  $37^\circ\text{C}$  培養箱 2 小時。以 2mL 培養液將多餘

未結合的 anti-Goat 抗體洗掉，並重複此步驟三次。將培養液置換為含有 4.7mM 的 p-aminophenylphosphate monosodium salt (PAPP) 及 10% 胎牛血清的 pH 9.5 HEPES-based saline 溶液 (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 4.2 mM KCl, and 11.2 mM glucose)。以 0.3 伏特電壓，每點 0.2 秒的條件進行掃描[25]。

### 參、主要發現與結論

投予最高濃度 50  $\mu$ M IDHL 24 小時後，對肝細胞 HepG2 並無明顯毒理作用，且未造成細胞生理情況改變。

#### 一、細胞生存能力試驗

暴露 IDHL 50 $\mu$ M 24hrs 後的 HepG2，細胞生長促進或抑制增生、存活、代謝能力未有明顯的影響，也未有明顯細胞毒理作用，其型態學觀察也與正常細胞相同。

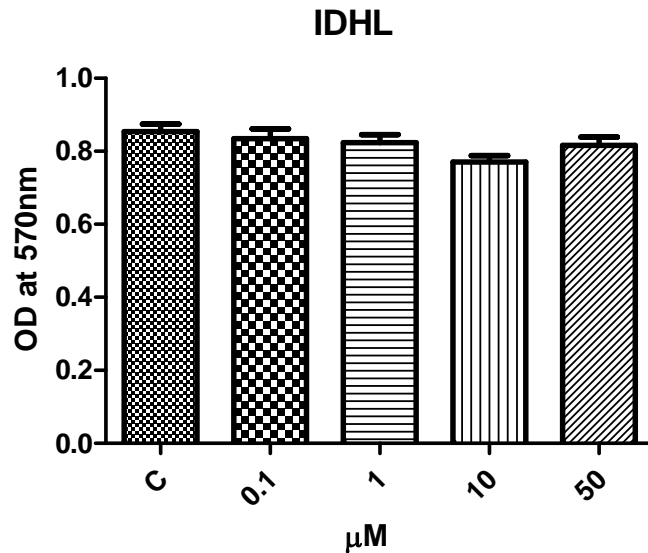
#### (一) MTT 細胞生存能力分析試驗

暴露 IDHL 50 $\mu$ M 24hrs 後的 HepG2，其細胞生長情如：促進或抑制增生、存活、代謝能力未有明顯的影響。

#### 1. 實驗結果與結論

由初步結果可知，選擇加入 0.1,1,10,50 $\mu$ M 的 IDHL 後 24 小時的細胞，來進行細胞生存能力測驗。以 Control(C) 代表細胞正常環境下生長與代謝能力為 100%，觀察暴露 IDHL 50 $\mu$ M 24hrs 後的 HepG2，其細胞生長情如：促進或抑制增生、存活、代謝能力未有明顯的影響 [圖二]。

暴露於 IDHL 是否影響其細胞型態及影響 HepG2 毒性，尚不清楚，將在之後實驗進一步觀察。



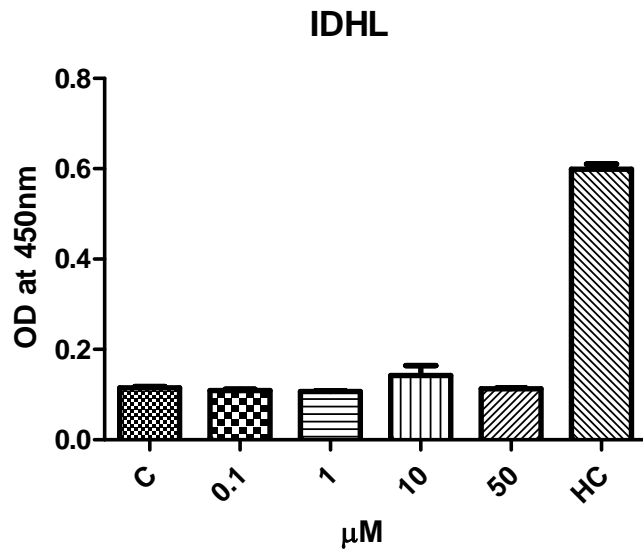
圖二:以 MTT 分析試驗檢測 HepG2 細胞生存能力。HepG2 培養於未加與加入 0.1,1,10,50μM 的 IDHL 的培養液中培養 24 小時，顯示 OD570nm 吸光值。

## (二) Lactic acid dehydrogenase (LDH)細胞毒性測試

IDHL 50μM 24hrs 後的 HepG2 ，並未有明顯的毒性作用發生。

### 1. 實驗結果與結論

選擇 0.1,1,10,50μM 的 IDHL 後 24 小時的細胞，來進行細胞毒性測驗。以 Control(C)代表細胞正常環境下細胞死亡率為 0，觀察暴露 IDHL 50μM 24hrs 後的 HepG2 ，其細胞未有明顯的致死性損傷 [圖三]。



圖三:以乳酸脫氫酶分析試驗檢測 HepG2 細胞毒性。HepG2 培養於未加與加入 0.1,1,10,50 $\mu$ M 的 IDHL 的培養液中培養 24 小時,取 10 $\mu$ L 上清液檢測 OD450nm 吸光值。

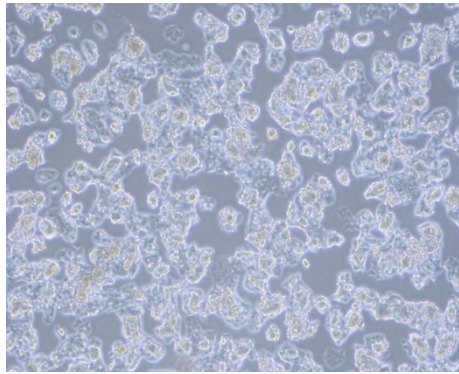
### (三)顯微細胞型態觀察

於顯微鏡下觀察投予 IDHL 50 $\mu$ M 24hrs 後, HepG2 細胞生長情形及型態。

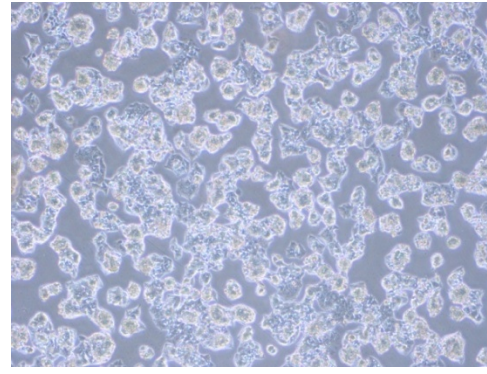
#### 1.實驗結果與結論

觀察暴露 50 $\mu$ M IDHL 24hrs 後的 HepG2,其細胞生長情形和 Control 相同,細胞均正常貼附、生長密度相當[圖四 A],細胞完整展開且型態為正常的多角型狀[圖四 B],顯示投予 50 $\mu$ M IDHL 對 HepG2 細胞生長及細胞型態未有明顯的影響 [圖四]。

(A)

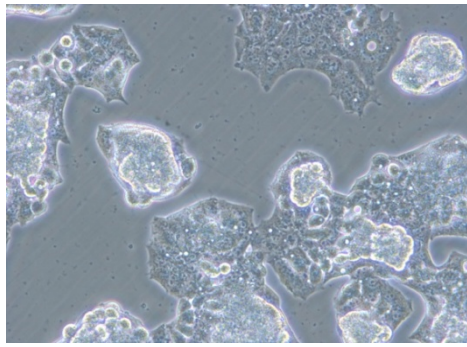


Control 40X

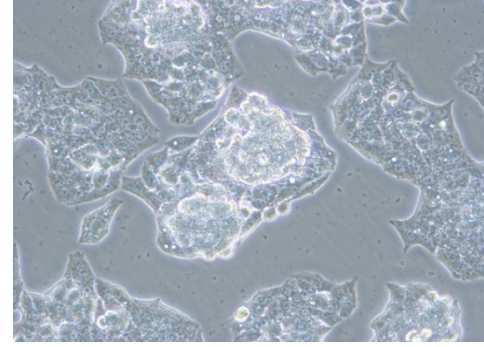


50  $\mu$ M IDHL 40X

(B)



Control 200X



50  $\mu$ M IDHL 200X

圖四：以顯微鏡觀察 HepG2 生長情形與細胞型態。(A)左：正常環境，40X；右：50  $\mu$ M IDHL，40X。(B)左：正常環境，200X；右：50  $\mu$ M IDHL，200X。

## 二、細胞對 IDHL 吸收能力檢測

### (一)感應耦合電漿質譜儀觀察 HepG2 對 IDHL 吸收

IDHL 50 $\mu$ M 24hrs 後的 HepG2 細胞對 IDHL 吸收能力。

#### 1. 實驗結果與結論

將 ICP-MS 上機檢測到的訊號值，帶入 standard curve 得到各樣品之濃度單位 ppb，經過計算回推 In 在細胞內外的



含量，評估 IDHL 被細胞吸收 (cell lysate) 與在細胞外 (medium+wash beffer) 的含量，結果顯示為 In 被細胞吸收及在細胞外濃度 [圖五]，比較 control 與投予 50 $\mu$ M IDHL 24 小時後 In 的總含量，可以發現 IDHL 確實含有 In，然而和投予 50 $\mu$ M InCl<sub>3</sub> 24 小時後 In 的總含量比較，發現同樣濃度下，IDHL 所含 In 含量明顯低於同濃度的 InCl<sub>3</sub>，推測 IDHL 合成過程中，DHL 接上 In 的機率較低，不過，在比較 control 與投予 50 $\mu$ M IDHL 24 小時後 HepG2 細胞內 (cell uptake) In 量，發現，50 $\mu$ M IDHL 下 HepG2 細胞對 In 吸收量為 1.384ppb，較 Control 的細胞多 1.19ppb，因此推測有部分 IDHL 會被細胞吸收。

	Cell uptake	Medium	Wash buffer	Total
Control	<b>0.192</b>	<b>0.650</b>	<b>0.020</b>	<b>0.862</b>
50 $\mu$ M IDHL	<b>1.384</b>	<b>0.506</b>	<b>0.057</b>	<b>1.947</b>
50 $\mu$ M InCl <sub>3</sub>	<b>928.85</b>	<b>6160</b>	<b>262</b>	<b>7350.85</b>

單位:ppb

圖五: HepG2 細胞在 control、投予 50 $\mu$ M IDHL 和 50 $\mu$ M InCl<sub>3</sub> 24 小時後，細胞吸收及在細胞外 In 濃度。

(二) 飛行式二次離子質譜儀 (TOF-SIMS) 觀察 HepG2 對 IDHL 吸收

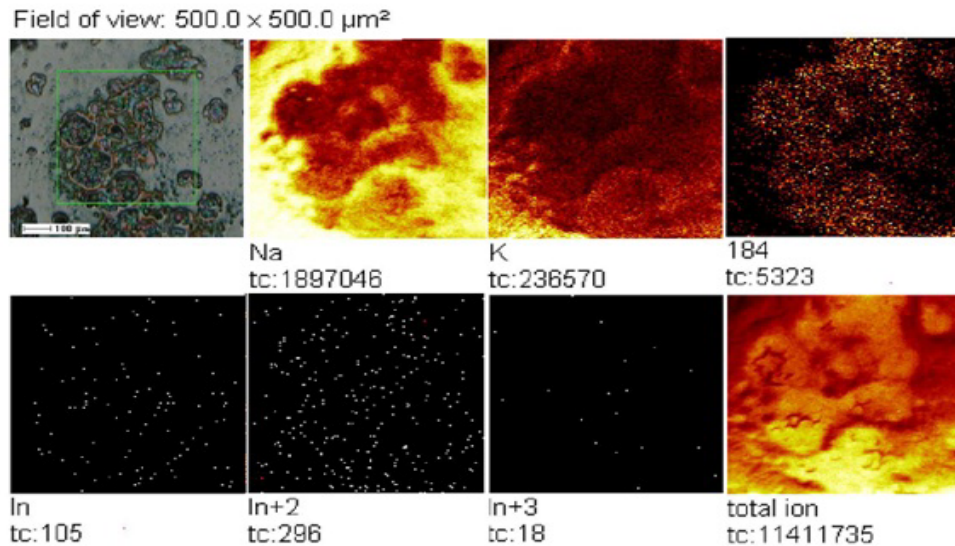
觀察投予 IDHL 10 $\mu$ M 24hrs 後的 HepG2 細胞內外 In 訊

號分佈來進一步推測 HepG2 對 IDHL 吸收能力。

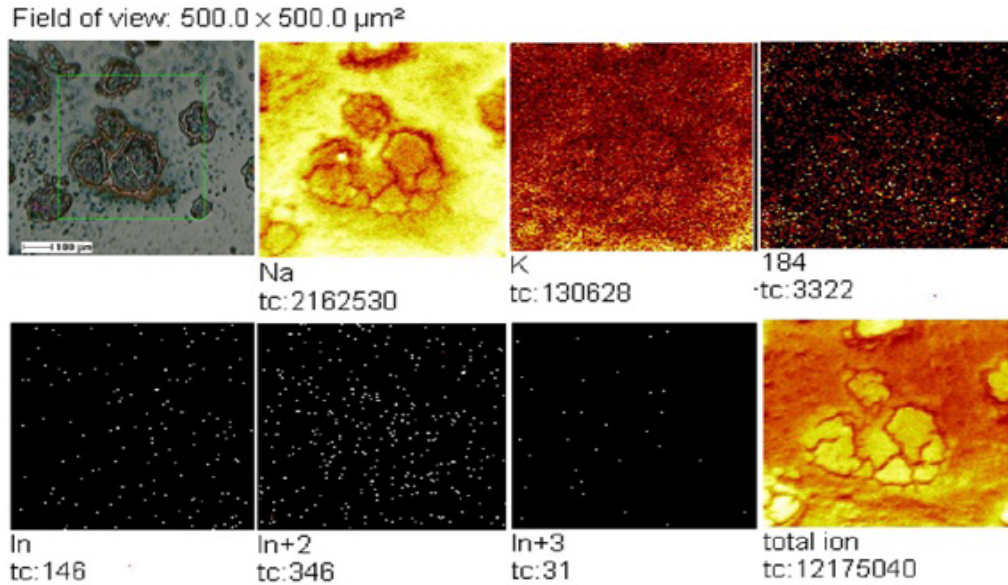
### 1. 實驗結果與結論

利用 TOF-SIMS 影像檢測 Control 與投予 10 $\mu$ M IDHL 24 小時後的細胞內 In 含量，綠色框框為偵測範圍，control 收集到的 total In count(In<sup>+</sup>, In<sup>2+</sup>, In<sup>3+</sup>總合)為 419，而 10 $\mu$ M IDHL 的樣品的 total In count 為 523，顯示投予 10 $\mu$ M IDHL 的樣品可測到 In 訊號，然而進一步觀察投予 10 $\mu$ M IDHL 的 HepG2，細胞內外沒有明顯的 In<sup>+</sup>、In<sup>2+</sup>、In<sup>3+</sup>差異[圖六 B]，推測可能因偵測到 In 含量略少，較難比較出細胞內外明顯訊號差異，若要明顯觀察含 In 的 IDHL 在細胞內外分佈，則可能要大大提高 IDHL 濃度。

#### (A) Control



(B) 10 $\mu$ M IDHL



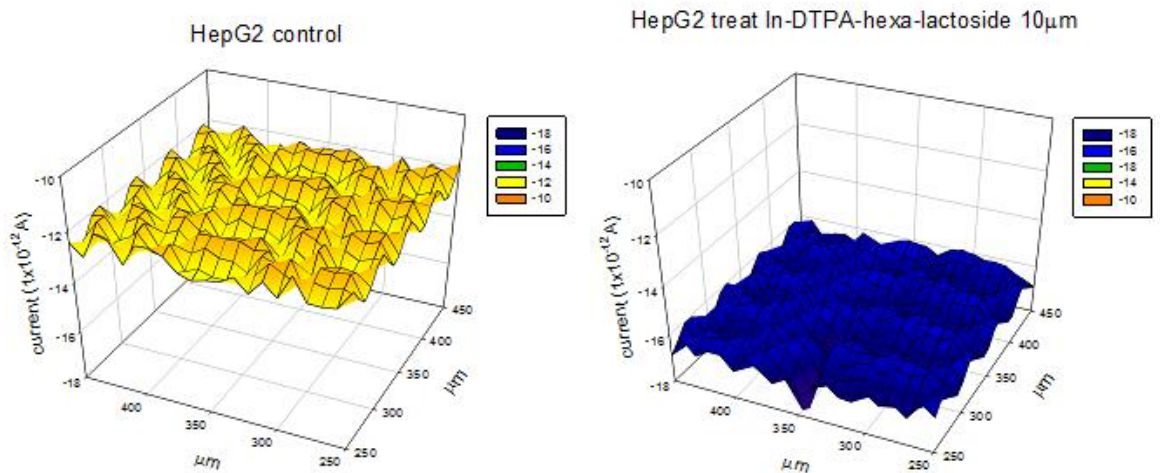
圖六: (A) Control (B) 投予 IDHL 10 $\mu$ M 24hrs 後的 HepG2 細胞內外 Na, K, 184(觀察的是細胞膜上的 phosphatidylcholine , 由此來分辨細胞位置),及 In(In<sup>+</sup>, In<sup>2+</sup>, In<sup>3+</sup>)離子分佈。

### 三、細胞表面膜蛋白偵測

由於本次研究中所使用之藥物為乳糖類藥物，在先前的研究中指出當 HepG2 細胞處在含有乳糖的環境中，因將乳糖分解成葡萄糖及半乳糖提供給細胞，使得細胞中的葡萄糖調節蛋白-78(GRP78)其啟動子活性會有上升的情形[26]，因此在本次研究中選擇此蛋白做為掃描式電化學顯微鏡偵測之標的蛋白，預期在含有 IDHL 的實驗組中會因藥物中的乳糖使得細胞因乳糖含量的增加使得代謝量不同而誘使 GRP78 的表現量改變，在本次研究中經由藥物處理後的組別在經由顯微鏡觀察其細胞型態並與對照組相比較後並無太大的差異，經由掃描式電化學顯微鏡掃描 [圖七] 可發現在對照組與實驗組比較中並無偵測到

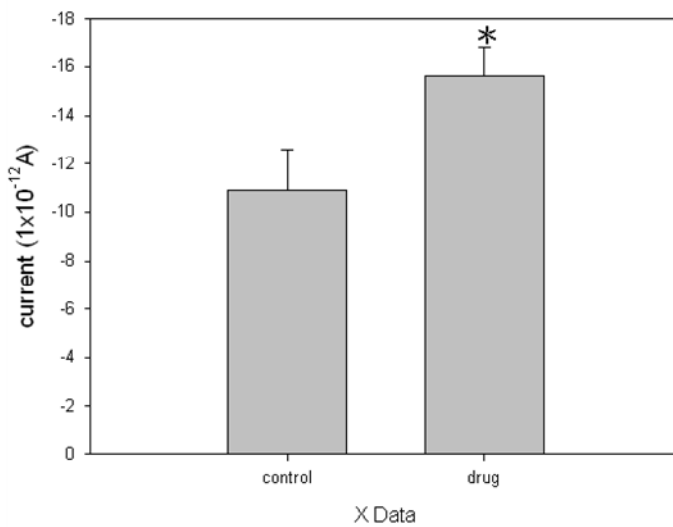
GRP78 抗體所代表的電流有十分明顯的變化產生，同時對照組中所偵測到的平均電流為-12 皮克安培(pA)而實驗組則為-16 皮克安培(pA)，而負值所表示其為還原電位。

雖然此兩組在經由掃描式電化學顯微鏡偵測上電流只有些微的改變但其微小的電流改變差異在統計上仍是有意義的[圖八]，由於使用同樣的實驗條件在感應耦合電漿質譜儀的結果中是有將藥物吸收至細胞內，因此在掃描式電化學顯微鏡的結果中無法偵測到十分明顯的 GRP78 表現，其推測的原因可能為藥物中的乳糖濃度與先前的研究相比較之下其含量過低其差異為 1000 倍而使得在本次實驗中無法大量誘發 GRP78 的表現增加進而使得掃描式電化學顯微鏡所偵測到的電流改變不明顯。



圖七: 左圖為掃描式電化學顯微鏡在對照組所偵測到的電流表現，右圖為掃描式電化學顯微鏡在實驗組所偵測到的電流表現。

HepG2 treat with/without In-DTPA-hexa-lactoside 10 $\mu$ m



圖八：t-test 統計圖表

### 三、 參考文獻

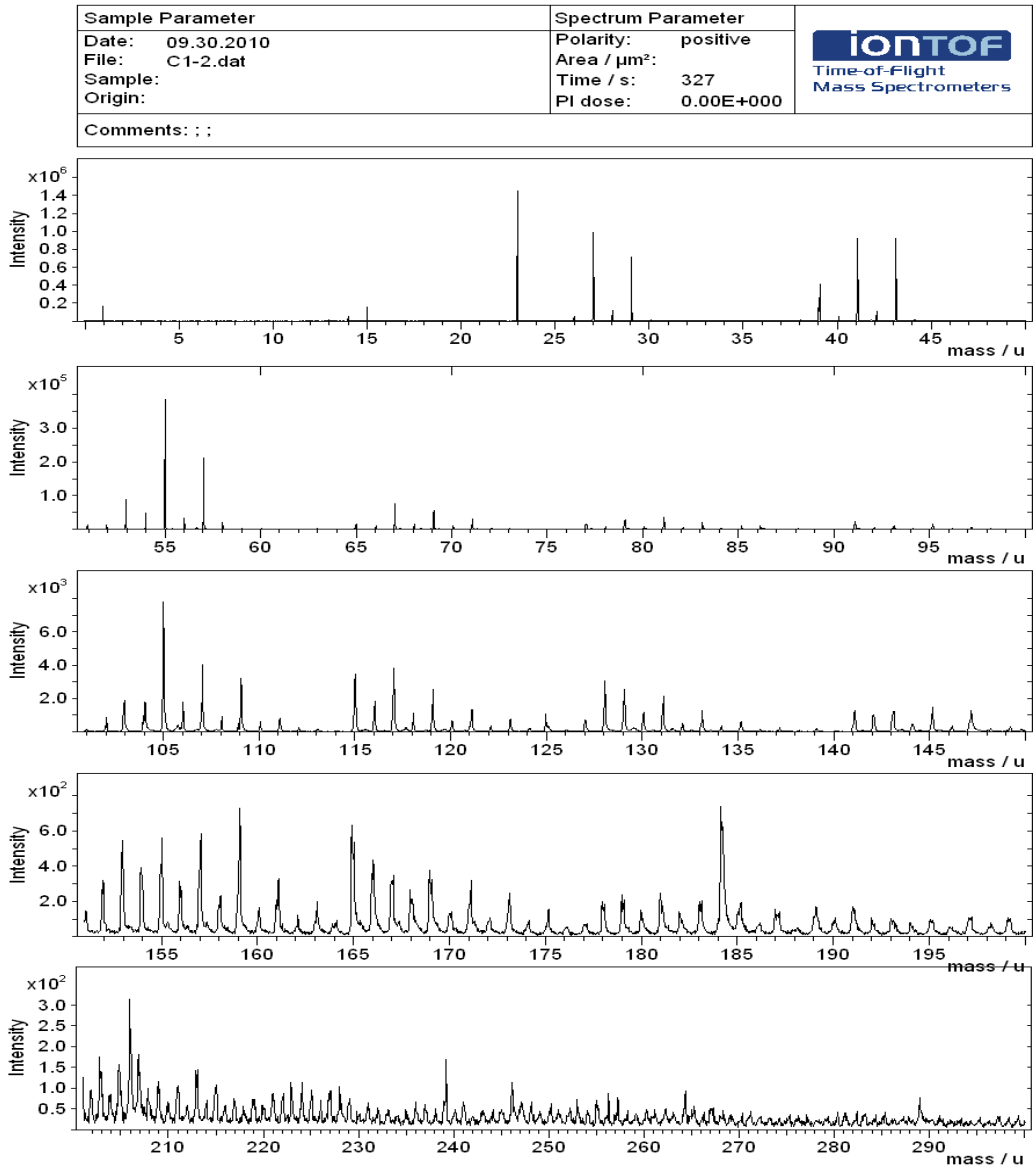
1. Plymoth, A., S. Viviani, and P. Hainaut, *Control of hepatocellular carcinoma through Hepatitis B vaccination in areas of high endemicity: Perspectives for global liver cancer prevention*. Cancer Letters, 2009. **286**(1): p. 15-21.
2. Thimme, R., et al., Adaptive immune responses to hepatitis C virus: From viral immunobiology to a vaccine. *Biological Chemistry*, 2008. **389**(5): p. 457-467.
3. Balsano, C., A. Alisi, and V. Nobili, Liver fibrosis and therapeutic strategies: The goal for improving metabolism. *Current Drug Targets*, 2009. **10**(6): p. 505-512.
4. Burns, S.A. and J.A. Gardella Jr, Quantitative ToF-SIMS studies of protein drug release from biodegradable polymer drug delivery membranes. *Applied Surface Science*, 2008. **255**(4): p. 1170-1173.
5. Grams, J. and I. Sobczak, Application of ToF-SIMS to the study of surfactant removal from AuNbMCM-41 and AuMCM-41 materials. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2010. **289**(2-3): p. 138-143.
6. Lockyer, N.P. and J.C. Vickerman, Progress in cellular analysis using ToF-SIMS. *Applied Surface Science*, 2004. **231-232**: p. 377-384.
7. Mahoney, C.M., et al., SIMS depth profiling of polymer blends with protein based drugs. *Applied Surface Science*, 2006. **252**(19): p. 6609-6614.
8. Mai, F.-D., et al., Imaging of single liver tumor cells intoxicated by

- heavy metals using ToF-SIMS. *Applied Surface Science*, 2006. 252(19): p. 6809-6812.
9. Szykowska, M.I., et al., ToF-SIMS application in the visualization and analysis of fingerprints after contact with amphetamine drugs. *Forensic Science International*, 2009. 184(1-3): p. e24-e26.
  10. Yasukawa, T., et al., Imaging of cellular activity of single cultured cells by scanning electrochemical microscopy. *Chemistry Letters*, 1998(8): p. 767-768.
  11. Liu, B., S.A. Rotenberg, and M.V. Mirkin, Scanning electrochemical microscopy of living cells: Different redox activities of nonmetastatic and metastatic human breast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000. 97(18): p. 9855-9860.
  12. Korchev, Y.E., et al., A conserved tryptophan in pneumolysin is a determinant of the characteristics of channels formed by pneumolysin in cells and planar lipid bilayers. *Biochemical Journal*, 1998. 329(3): p. 571-577.
  13. Liu, B., et al., Scanning electrochemical microscopy of living cells - Part 2. Imaging redox and acid/basic reactivities. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2001. 500(1-2): p. 590-597.
  14. Takahashi, Y., et al., Transfected single-cell imaging by scanning electrochemical optical microscopy with shear force feedback regulation. *Analytical Chemistry*, 2009. 81(23): p. 9674-9681.
  15. Mureşan, L., et al., Monitoring of glucose and glutamate using enzyme microstructures and scanning electrochemical microscopy. *Bioelectrochemistry*, 2009. 76(1-2): p. 81-86.
  16. Roberts, W.S., et al., Advances in the application of scanning electrochemical microscopy to bioanalytical systems. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007. 23(3): p. 301-318.
  17. Duncan, E.J., M.P. Thompson, and S.H. Phua, Zinc protection of HepG2 cells from sporidesmin toxicity does not require de novo gene transcription. *Toxicology Letters*, 2005. 159(2): p. 164-172.
  18. Urani, C., et al., Copper and zinc uptake and hsp70 expression in HepG2 cells. *Toxicology in Vitro*. 15(4-5): p. 497-502.
  19. Hong, H.-S., et al., Combining the rapid MTT formazan exocytosis assay and the MC65 protection assay led to the discovery of carbazole analogs as small molecule inhibitors of A[beta] oligomer-induced cytotoxicity. *Brain Research*, 2007. 1130: p. 223-234.
  20. Ngamwongsatit, P., et al., WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line. *Journal of Microbiological Methods*, 2008. 73(3): p. 211-215.
  21. Fotakis, G. and J.A. Timbrell, In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 2006. 160(2): p. 171-177.
  22. Jurisic, V., I. Spuzic, and G. Konjevic, A comparison of the NK cell

- cytotoxicity with effects of TNF-[alpha] against K-562 cells, determined by LDH release assay. *Cancer Letters*, 1999. 138(1-2): p. 67-72.
23. Saberi, M., A. Zaree, and A. Khoshbaten, The relation between LDH activity and glutathione level as criteria for degree of sulfur mustard-induced oxidative stress and cytotoxicity. *Toxicology Letters*, 2008. 180(Supplement 1): p. S114-S115.
  24. Ghezzi, A., et al., Uptake of antitumor platinum(II)-complexes by cancer cells, assayed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2004. 98(1): p. 73-78.
  25. Takahashi, Y., et al., Electrochemical detection of epidermal growth factor receptors on a single living cell surface by scanning electrochemical microscopy. *Analytical Chemistry*, 2009. 81(7): p. 2785-2790.
  26. Zeng, L., et al., ATF6 modulates SREBP2-mediated lipogenesis (*EMBO Journal* (2004) 23, 950-958 DOI:10.1038/sj.emboj.7600106). *EMBO Journal*, 2008. 27(21): p. 2941.


附件一：圖六 TOF-SIMS 值譜圖（綠色框框收集之值譜訊號）

(A)Control:





(B) 10  $\mu$  M IDHL:

Sample Parameter	Spectrum Parameter	
Date: 09.30.2010	Polarity: positive	
File: S1-1.dat	Area / $\mu\text{m}^2$ :	
Sample:	Time / s: 327	
Origin:	PI dose: 0.00E+000	
Comments: ; ;		

