

# 科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

Gellan gum微粒合併化療藥物、microRNA作為標靶性肝癌動脈  
栓塞劑(第3年)

計畫類別：個別型計畫  
計畫編號：MOST 104-2314-B-040-003-MY3  
執行期間：106年08月01日至107年07月31日  
執行單位：中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系(所)

計畫主持人：李明偉  
共同主持人：田雨生  
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：鄭宏偉  
碩士班研究生-兼任助理：陳虹羽  
碩士班研究生-兼任助理：許銘芳  
碩士班研究生-兼任助理：黃奕鑾  
大專生-兼任助理：蔡涵宇  
大專生-兼任助理：王鐘誼  
大專生-兼任助理：簡欣第

報告附件：出席國際學術會議心得報告

中華民國 107 年 10 月 17 日

中文摘要：導管動脈化學栓塞療法是目前肝癌無法切除時的第一線治療，但目前市面上還沒有理想的肝動脈栓塞劑。本研究開發兩種肝癌栓塞劑：第一種是以結冷膠(gellan gum, GG)為基材，加上胺化石墨烯(graphene)和阿黴素(doxorubicin, DOX)，透過乳化法製備栓塞用微粒(GG/Gra/DOX)。此系統中結冷膠具備生物相容性且適合做成栓塞劑；胺化石墨烯可以吸附阿黴素和利用物理特性穿透細胞膜。奈米等級的胺化石墨烯是由氧化石墨烯改質而成。氧化石墨烯是透過Hummer's製備而成。使用雷射粒徑分析儀偵測胺化石墨烯和結冷膠-胺化石墨烯微粒大小，結果分別是1564奈米和200-400範圍之間。掃描電子顯微鏡觀察，發現微粒加入胺化石墨烯上表面從光滑變成網狀。在界面電位分析，證實胺化石墨烯的電位較氧化石墨烯具較高的正電性且胺化石墨烯和阿黴素的結合呈現一個穩定正電的狀態。傅立葉紅外線光譜分析，證實氧化石墨烯確實被胺化，且胺化石墨烯上的胺基可和阿黴素產生共價鍵結。HepG2細胞可以吞噬胺化石墨烯且隨著時間增長吞噬量也隨之增長。從藥物釋放數據中得到微粒的藥物釋放符合Higuchi模式。

第二種肝癌栓塞劑是將結冷膠(gellan gum, GG)微粒包覆透明質酸/聚乙烯亞胺-阿黴素的奈米顆粒(GG/HH / PH-DOX)。組氨酸分別與透明質酸、聚乙烯亞胺共軛形成HH、PH產物，<sup>1</sup>H NMR指出在8.064 ppm (-N = CH-)和6.979 ppm (-N-CH = C-)有新的尖端值出現，表透明質酸的“methenyl group”與組氨酸的咪唑環有起反應，兩者有成功共軛成功。而在待測物PH的<sup>1</sup>H NMR結果，發現了7.714 ppm (-N = CH-)和6.959 ppm (-N-CH = C-)新的尖端值出現，表明了有成功地獲得PH。從Zeta電位的變化，我們發現阿黴素可以成功地被承載於HH / PH-DOX奈米顆粒。透過W / O乳化法製備出包覆HH/PH-DOX的結冷膠微粒，平均粒徑300±100微米。從細胞攝取試驗結果得知，於24小時共同培養後，HH/PH-DOX可以藉由內吞作用進至HepG2細胞內。根據上述結果，本研究認為GG/Gra/DOX、GG/HH / PH-DOX具有潛力開發為化學藥物合併栓塞的肝癌治療試劑。

中文關鍵詞：結冷膠、導管動脈栓塞試劑、阿黴素、透明質酸、聚乙烯亞胺

英文摘要：Transarterial chemoembolization (TACE) is the first-line treatment at present when liver cancer can't be cut, but no have the ideal embolic agent currently. In this project we designed two embolic agent systems for TACE. First, we prepared the chemoembolization microsphere (GG/Gra/DOX) composed of gellan gum (GG), graphene (Gra) and anticancer drugs (doxorubicin, DOX) by the emulsification process. In this system, gellan gum with good biocompatibility and suitable as the embolic agent for TACE, graphene with the function to combine with DOX and physically penetrate the cell membrane. The nano amine-modified graphene is formed by the graphene-oxide which is made by the Hummer's method, mixing the ferric chloride, glycol, sodium acetate and ethylenediamine with the high temperature and pressure. The size of nano Gra was 1564nm by the Laser Diffraction

Particle Size Analyzer. The size of the microspheres (GG/Gra) were ranged from 200–400  $\mu\text{m}$  by the Laser Diffraction Particle Size Analyzer. The size of microspheres was affected by various gellan gum concentration. The scanning electron microscope found the surface of microsphere changed from smooth to reticular after adding the Gra. The delta-potential of Gra was positive electricity than GO and Gra mixed DOX was stable in the positive state. The cellular uptake test, found that nano Gra could be uptake into HepG2 cells by endocytosis after co-incubation for 1hr, 3hr, 6hr and 9hr.

Another system, the chemoembolization agent is based on gellan gum (GG) microspheres which contain hyaluronan/polyethylenimine-doxorubicin nanoparticles (HH/PH-DOX). Hyaluronan conjugated with histidine (HH) and Polyethylenimine conjugated with histidine (PH) were synthesized,  $^1\text{H}$  NMR spectrum showed that the peaks of HH were at 8.064 ppm ( $-\text{N}=\text{CH}-$ ) and 6.979 ppm ( $-\text{N}-\text{CH}=\text{C}-$ ) which were ascribed to the methenyl group located in imidazole group of Histidine. The newly appeared peaks at 7.714 ppm ( $-\text{N}=\text{CH}-$ ) and 6.959 ppm ( $-\text{N}-\text{CH}=\text{C}-$ ) revealed that PH was successfully obtained. From the change of zeta potential, we found the doxorubicin can encapsulate into HH/PH matrix successfully. The gellan gum microsphere contain HH/PH-DOX were fabricated using a W/O emulsion method, and the diameter of these microspheres was  $300 \pm 100 \mu\text{m}$ . The cellular uptake test, results showed that HH/PH-DOX could be into HepG2 cells by endocytosis after co-incubation for 24h. From these datas, the GG/Gra/DOX, GG/HH/PH-DOX microspheres have the potential as the chemoembolization agent in the future

英文關鍵詞：Gellan gum, Transarterial chemoembolization agent, doxorubicin、hyaluronan、polyethylenimine

科技部補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

(計畫名稱) Gellan gum 微粒合併化療藥物、microRNA 作為標靶性肝癌動脈栓塞劑

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：MOST 104-2314-B-040 -003 -MY3

執行期間：104 年 8 月 1 日至 107 年 7 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系

計畫主持人：李明偉

計畫參與人員：陳虹羽、簡宇辰、鄭宏偉、許銘芳  
蔡涵宇、簡欣弟、王鐘誼

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 完整報告

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國心得報告：

- 赴國外出差或研習心得報告
- 赴大陸地區出差或研習心得報告
- 出席國際學術會議心得報告
- 國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

- 涉及專利或其他智慧財產權，二年後可公開查詢

中 華 民 國 107 年 10 月 20 日

## 一、計畫成果摘要說明

本計畫獲科技部經費補助期間，就人才培育、研究產出、產業合作等面向簡述其成果。

### 1. 碩士生培育成果

計畫執行期間共培育四位碩士班學生，每月並給予 4000~6000 元研究津貼

- (1) 鄭宏偉：現職為交通大學材料科學研究所博士班學生  
碩士論文題目：結冷膠/阿黴素阿黴素/胺化石墨烯多功能性肝癌動脈栓塞微粒製備及效能評估
- (2) 許銘芳：現職為太暘生物科技股份有限公司產品專員  
碩士論文題目：結蘭膠微粒包覆承載 doxorubicin 的奈米顆粒作為肝癌治療栓塞劑的研究
- (3) 陳虹羽：現職為中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系職員  
碩士論文題目：結冷膠/氧化石墨烯/阿黴素微粒作為肝癌栓塞試劑之可行性評估
- (4) 簡宇辰：現職為 ESCO 生物科技股份有限公司維修工程師  
碩士論文題目：黃原膠/玻尿酸/石墨烯複合式薄膜作為傷口癒合敷料之研究

### 2. 大專生專題研究

計畫執行期間共培育五位大學部學生從事專題研究，並輔導進入研究所

- (1) 陳莉婷：後續就讀陽明大學醫學工程研究所碩士班
- (2) 鄭芷苓：後續就讀陽明大學醫學工程研究所碩士班
- (3) 蔡涵宇：後續就讀中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術研究所(學碩連讀學程)
- (4) 簡欣弟：後續就讀中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術研究所(學碩連讀學程)
- (5) 王鐘誼：後續就讀中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術研究所(學碩連讀學程)

### 3. 專利申請

計畫執行期間共申請專利 3 件，其中 1 件已獲准取得專利，另 2 件進入實體審查程序

- (1) 專利證書號 I624278，「貼片及其用於治療口腔癌之用途」
- (2) 申請案號 106140189，「栓塞微球及其製造方法」
- (3) 申請案號 107111074，「熱感式傷口敷料」

#### 4. 期刊論文發表

計畫執行期間已發表期刊論文 6 篇，尚有 3 篇撰寫中

- (1) Ming Fang Hsu, Yen Sheng Tyan, Yu Chen Chien, Ming Wei Lee. Hyaluronic acid-based nano-sized drug carrier-containing Gellan gum microspheres as potential multifunctional embolic agent. *Scientific Reports* 8, 731-740, 2018.
- (2) Wan Chi Tsai, Hui Fang Tsai, Yi Nuan Wong, Jui Yen Hong, Shwu Jen Chang, Ming Wei Lee. Preparation and characterization of gellan gum/glucosamine/clioquinol film as oral cancer treatment patch. *Materials Science and Engineering C*. 82, 317–322, 2018.
- (3) Yi-Nuan Wong, Ming-Wei Lee. Preparation and characterization of gellan gum film as a carrier of 5-Chloro-8-hydroxy-7-iodoquinoline for oral cancer therapy. *Chung Shan Medical Journal*. 29, 17-26, 2018.
- (4) Chiang CS, Chen JY, Chiang MY, Hou KT, Li WM, Chang SJ, Chen SY. Using the interplay of magnetic guidance and controlled TGF- $\beta$  release from protein-based nanocapsules to stimulate chondrogenesis. *International Journal of Nanomedicine*. 13, 3177-3188, 2018.
- (5) Wang L, Xu Y, Luo C, Sun J, Zhang J, Lee MW, Bai A, Chen G, Frenz CM, Li Z, Huang W. MAGEA10 gene expression in non-small cell lung cancer and A549 cells, and the affinity of epitopes with the complex of HLA-A(\*)0201 alleles. *Cell Immunol*. 297(1), 10-8, 2015.
- (6) Ton SS, Lee MW, Yang YH, Hoi SK, Cheng WC, Wang KS, Chang HH, Chang SH. Effects of Reductants on Phytoextraction of Chromium (VI) by *Ipomoea aquatica*. *Int J Phytoremediation*. 17 (1-6), 429-436, 2015.

#### 5. 產業合作面向

- (1) 中山醫學大學附設醫院放射腫瘤科(結蘭膠微粒作為肝癌栓塞劑動物實驗)
- (2) 上海交通大學附設新華醫院護理部(結蘭膠/石墨烯敷料熱療效應)
- (3) 鈞昊有限公司(玻尿酸/結蘭膠/ROOIBOS 機能性乳霜開發)

## 二、 實驗成果報告

### 1. 實驗方法

#### 1.1 藥品

10X trypsin-EDTA(Gibco: 9002-07-7)、10%FBS(Gibco: 10437-028)、二合一抗生素(Gibco: 15140122)、結冷膠(Sigma: 71010-52-1)、礦物油(Sigma: 8042-47-5)、sodium phosphate dibasic (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)(Sigma: 7558-79-4)、potassium phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)(Sigma: 7778-77-0)、氯化鈣(Sigma: 7048-04-6)、potassium chloride (KCl)(Sigma: 7447-40-7)、sodium chloride (NaCl)(Sigma: 7647-14-5)、MEM(Gibco:41500-034)、sodium bicarbonate(Sigma: 144-55-8)、sodium pyruvate(Sigma: 113-24-6)、95 % alcohol(鴻剛實業: 64-17-5)、丙酮(鴻剛實業: 67-64-1)、Span85(Fluka: 85549)、無水酒精(J.T. baker: 64-17-5)、阿黴素(Alfa Aesar: 25316-40-9)、石墨粉(中山醫公衛系提供)、硝酸鈉(林純藥工 190-02899)、硫酸(聯工化學)、過錳化鉀(島久藥品)、過氧化氫(林純藥工 080-00955)、氯化鐵(島久藥品)、乙二醇(Applichem panreac 603-027-00-1)、醋酸鈉(林純藥工 190-01345)乙二胺(ACROS 118420010)、Hyaluronic acid (Mw: 5300D, LIFECORE)、Branched polyethylenimine (Mw: 25 kDa, Sigma 408727)、L-histidine (His, Sigma H8000)、1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC)、N-hydroxysuccinimide (NHS, Sigma 56480)、Formamide (Riedel-deHaen 33272)、Triethylamine (TEA,Sigma)、MEM (Sigma)、Fetal bovine serum (FBS, gibco)、Penicillin-Streptomycin (PS, gibco)、Mineral oil (Sigma M3516)、Span85 (Fluka, 85549)、Glutaraldehyde solution、Xylazine (Sigma)、Zoletil 50 (Virbac)、DMSO (Sigma)。

#### 1.2 儀器設備

FTIR(Bruker Vertex 80v, Tensor 27)、Heating blocker (加熱板, Corning PC-420D)、pH meter (Mettler Toledo)、Spectrophotometer (Hitachi U-3000)、Vortex (Genie SI-2)、粒徑分析(Coulter LS230)、界面電位(Malvern, Zetasizer Nano)、掃描式電子顯微鏡(Jeol JSM-7800F Prime)、冷凍乾燥機(Heto FD4)、正立螢光顯微鏡(ZEISS AXioskop2)、超音波洗淨機(Sunnex)、均質機(G-100R)、離心機(細胞用,KN-70)、細胞培養箱(NUAIRE)、高壓釜、桌上型溫控離心機(5415R)、快速高壓消毒器(TM-328)、往復式震盪水浴器(B-211、SB301)、核磁共振光譜儀(Agilent

Technologies DD2)、正立螢光顯微鏡(ZEISS AXioskop2)、冷凍乾燥機(Lypholyzer: Heto FD4)、雷射粒徑分析儀(Laser Diffraction Particle Size Analyzer: Coulter LS230)、動態光散射粒徑分析儀及界面電位分析儀(Particle Size and Zeta Potential Analyzer: Malvern, Zetasizer Nano)、桌上型掃描式電子顯微鏡 (Hitachi TM-3000)。

### 1.3 氧化石墨烯製備

本研究使用 Hummer's 法來製備氧化石墨烯，將 4 克的石墨粉和 2 克的硝酸鈉和 92 毫升的硫酸放入燒杯中，將燒杯置於冰上攪拌 5 分鐘，於室溫下加入 12 克的過錳化鉀攪拌 5 分鐘，然後加熱到 35 度攪拌 30 分鐘，接著加入 184 毫升的二次水加熱到 165 度到 175 度之間攪拌 15 分鐘，再加入 160 毫升的 3%過氧化氫靜置 1 小時，接著將混合液離心，去除上清液加入二次水重複三次，將沉澱物溶於二次水中後使用超音波震盪 15 分鐘，到混合液倒入培養皿後放進烘箱 4-5 天。

### 1.4 胺化石墨烯製備

將 1 克的氯化鐵、20 毫升的乙二醇、3 克的醋酸鈉、10 毫升的乙二胺以及 0.5 的氧化石墨烯混合均勻，放置於高壓釜中 2 小時 200 度，取出乾燥物加入二次水，離心去除上清液 3 次，讓沉澱物溶於二次水中倒入培養皿中放入烘箱 1 天。

### 1.5 結冷膠微粒製備

將 0.12 克的結冷膠溶於 40 毫升的二次水中，隔水加熱至 85-90 度攪拌 15 分鐘，取 400 毫升礦物油放入燒杯中，預熱至 50 度後結冷膠溶液緩慢加入。利用乳化微粒製備法之原理，用均質機在 50 度 400 轉攪拌 10 分鐘，加入 1.25%氯化鈣 10 毫升和 Span85 1 毫升，在攪拌 1 小時後再加入 1.25%氯化鈣 10 毫升，在反應 10 分鐘，最後加入丙酮終止反應，使用 710、425、300、212 和 90 $\mu$ m 的篩網來分離產物，以二次水保存。

### 1.6 結冷膠/胺化石墨烯微粒製備

將 0.12 克的結冷膠溶於 40 毫升的二次水中，隔水加熱至 85-90 度攪拌 15 分鐘，取 0.04 克的胺化石墨烯，加入結冷膠溶液後超音波震盪 1 小時，取 400 毫升礦物油放入燒杯中，預熱至 50 度後結冷膠/胺化石墨烯溶液緩慢加入。利用乳化微



粒製備法之原理，用均質機在 50 度 400 轉攪拌 10 分鐘，加入 1.25%氯化鈣 10 毫升和 Span85 1 毫升，在攪拌 1 小時後再加入 1.25%氯化鈣 10 毫升，在反應 10 分鐘，最後加入丙酮終止反應，使用 710、425、300、212 和 90 $\mu$ m 的篩網來分離產物，以二次水保存。

#### 1.7 結冷膠/胺化石墨烯微粒體外釋放

將 710-425、425-300 和 212-90 微米的結冷膠/胺化石墨烯微粒用冷凍乾燥機將其水分抽乾，分別秤其重量並平均分為三等份，放入 15 毫升離心管中，再各加入 5 毫升的二次水，把 15 毫升離心管置於有震盪的 37 度水域槽中，每隔四天離心檢體後取 1 毫升的上清液，計數檢體在計數盤中的胺化石墨烯來計算檢體的濃度，並套入藥物釋放動力學的五種模式中，找出其最符合的釋放模式。

#### 1.8 胺化石墨烯顆粒數與濃度的標準曲線

將 1 毫克的胺化石墨烯溶於 8 毫升的二次水中，用超音波震盪器將胺化石墨烯溶液震 1 小時，再將其稀釋 128 倍，作為標準濃度的第一管，之後的用序列稀釋的方式得到第二、三、四和五管，每管做三重複。利用計數盤來計數胺化石墨烯在不同濃度下數得的數量來拉標準曲線，因胺化石墨烯本身的顆粒大小集中，所以採用此種方式來計算胺化石墨烯的濃度。

#### 1.9 結冷膠/胺化石墨烯/阿黴素微粒製備

將 0.04 克胺化石墨烯和 2 毫克的阿黴素溶於 10 毫升的二次水反應 72 小時，取 0.12 克的結冷膠溶於 30 毫升的二次水中，隔水加熱至 85-90 度攪拌 15 分鐘，將胺化石墨烯/阿黴素溶液加入結冷膠溶液中攪拌 15 分鐘，再將結冷膠/胺化石墨烯/阿黴素溶液用超音波震盪 1 小時，取 400 毫升礦物油放入燒杯中，預熱至 50 度後結冷膠-胺化石墨烯-阿黴素溶液緩慢加入。利用乳化微粒製備法之原理，用均質機在 50 度 400 轉攪拌 10 分鐘，加入 1.25%氯化鈣 10 毫升和 Span85 1 毫升，在攪拌 1 小時後再加入 1.25%氯化鈣 10 毫升，在反應 10 分鐘，最後加入丙酮終止反應，使用 710、425、300、212 和 90 $\mu$ m 的篩網來分離產物，以二次水保存。

#### 1.10 結冷膠不同濃度形成的微粒在特定範圍大小中所佔比例

製備 0.3%、0.4%和 0.5%的結冷膠微粒，依照特定範圍大小將其分開，將微粒

拿去冷乾，秤其微粒重量。以下列公式計算

$$\frac{\text{結冷膠微粒特定大小範圍的重量}}{\text{全部結冷膠微粒重量}} \times 100\% = \text{特定範圍大小結冷膠微粒所占比例}$$

#### 1.11 結冷膠/胺化石墨烯微粒包覆胺化石墨烯的比例

將所有微粒拿去冷凍乾燥，將乾燥後的微粒秤重，再以 6N 的氯化氫溶解，以 10000 轉離心後將上清液倒掉，把剩下的胺化石墨烯放於烘箱中烘乾，再將乾燥後的胺化石墨烯秤重，以下列的公式來計算微粒包覆胺化石墨烯的比例

$$\frac{\text{胺化石墨烯重量}}{\text{結冷膠 - 胺化石墨烯微粒重量}} \times 100\% = \text{胺化石墨烯包覆率}$$

#### 1.12 結冷膠/胺化石墨烯/阿黴素微粒藥物釋放

將不同大小的微粒進行冷凍乾燥，將冷凍乾燥後的微粒秤重平均分三等份，分別放置於 15 毫升的離心管中，加入 2 毫升的 PBS，將離心管放置於有震盪的 37 度水域槽中，每隔兩天將離心管以 2500 轉離心後取上清液 1 毫升，然後再加入 1 毫升的 PBS，將收取的上清液以吸光值 480nm 來測試藥物濃度。

#### 1.13 Hyaluronic acid / polyethylenimine-doxorubicin nanoparticles (HH/PH-DOX) 合成

本次合成實驗設計的概念是聚離子複合物(奈米等級)。在水溶液下透過靜電作用聚陰離子和聚陽離子自發性地形成聚離子複合物，形成後不會影響各自電解質本身的物化特性以及生化性質，承載的藥物亦是不受影響。在接下來的實驗，我們會將組胺酸分別與 HA 和 PEI 產生共軛形成聚陰離子/聚陽離子，因為組胺酸結構中的“咪唑環”在不同 pH 值環境下可以分別扮演接收和給予質子的角色，進而降低 PEI 的正電荷密度以及減輕其所帶來的細胞毒性。此外，藉由這個特性亦可讓聚離子複合物透過靜電作用或者疏水/親水相互作用的結合而產生，而抗癌藥物 Doxorubicin 亦可透過疏水/親水相互作用被包覆到聚離子複合物裏頭。

#### 1.14 HA 與 Histidine (組胺酸) 共軛合成產物 HH

取短鏈 HA (0.66g) 溶於 150ml 的二次水中，然後將 pH 值調至 5.5，此時將 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride; EDC (0.48048g) 和

N-hydroxysuccinimide; NHS (0.28842g) 加入進去反應 30 分鐘，30 分鐘後再將溶液 pH 值調至 7.4，並且加入 L-histidine (0.5181g)，接著於室溫下反應 24 小時。24 小時後，將反應溶液進行透析，使用 MWCO 3500Da 透析袋、二次水作為透析液。透析結束後將該溶液進行冷凍乾燥，最後收集冷凍乾燥好的產物，以  $^1\text{H}$  NMR 及介面電位分析鑑定。

#### 1.15 PEI 與 Histidine (組胺酸) 共軛合成產物 PH

取 L-histidine (1.32g)、EDC (2.452g) 和 NHS (1.472g) 溶於二次水 150ml 中，並將 pH 值調至 5.5 反應 30 分鐘，30 分鐘後加入 Branched polyethylenimine ; B-PEI (Mw25 kDa) 1ml，再將 pH 值調至 7.4 後，溶液於室溫下反應 24 小時。24 小時後，將反應溶液進行透析，使用 MWCO14k Da 透析膜、二次水作為透析液。透析結束後將該溶液進行冷凍乾燥，最後收集冷凍乾燥好的產物，以  $^1\text{H}$  NMR 及介面電位分析鑑定。

#### 1.16 Hyaluronic acid/polyethylenimine-doxorubicin nanoparticles (HH/PH-DOX) 合成

取 Doxorubicin hydrochloride; DOX·HCl (5mg) 和 TEA (1ml) 溶於 formamide (4ml) 中，避光反應 22 小時。22 小時後，加入 PH (20mg) 反應 2 小時，2 小時後進行透析，使用 MW3500Da 透析袋，PBS (pH7.4) 做透析液透析 2 天，並在第三天改換二次水做透析液透析一天。透析完後，得產物 PH-Doxorubicin (PH-DOX) 溶液，之後再取二次水稀釋該溶液至 20ml 並取些許樣品測介面電位。最後，將 PH-DOX 溶液和 HH(冷乾完 HH 以 mg/ml 溶於二次水)溶液以 1:4 比例混合，得 Hyaluronic acid / polyethylenimine-doxorubicin (HH/PH-DOX) nanoparticles 的水溶液，進行冷乾前先取少許樣品進行粒徑分析和介面電位分析，冷乾後得粉末狀的 HH/PH-DOX。

#### 1.17 HepG2 細胞攝取實驗

將 HepG2 人類肝癌細胞株培養在已滅過菌的載玻片上，又該載玻片置入於 10 公分 dish 內。待 HepG2 於載玻片上長至八分滿後，將舊的 medium 倒置廢液桶，並取 HH/PH-DOX 溶液 (1ml) (製備方法請看 2-3.3，並且先行使用超音波震盪 2 小時) 於載玻片上，之後再加入新鮮 medium (9ml) 於 dish 內共同培養。培養

24 小時後，用 PBS 將玻片來回洗乾淨並且取 glutaraldehyde solution 1ml 進行固定 15 分鐘。15 分鐘到了以後，一樣再用 PBS 來回洗乾淨，最後加以封片並使用正立螢光顯微鏡觀看細胞攝取現象。

### 1.18 純 Gellan gum 微粒製備

微粒製備的方法是採用油包水乳化法 (water-in-oil emulsion) 來進行，當中我們使用的油相為礦物油，而 gellan gum 水溶液則為水相，然後油相和水相以 10:1 的比例進行混和攪拌，並於中途適時的加入鈣離子  $\text{Ca}^+$  (氯化鈣  $\text{CaCl}_2$ ) 作為交聯固定劑，最後使 gellan gum 水膠形成大小不同的微粒狀。取 Gellan gum(0.12g) 加入 40ml 的二次水中，隔水加熱至完全溶解，隨後用 dropper 加入已預熱至  $50^\circ\text{C}$  的礦物油中 (400ml)，於 400rpm 下反應。10 分鐘後，加入第一次 1.25%(w/v) 的氯化鈣溶液 (10ml) 和 Span85 (1ml)，待全加完後持續攪拌 1 小時。1 小時到了以後，加入第二次 1.25%(w/v) 的氯化鈣溶液 (10ml)，加完後再持續攪拌 10 分鐘。10 分鐘後關掉攪拌機，並將含微粒的油溶液使用 25、40、50、70 和 170mesh 篩網進行過篩，並且使用丙酮和二次水來回 wash 將油去除，最後儲存於二次水中。每組 size 的微粒待測粒徑分析以及使用掃描式電子顯微鏡觀看其結構型態。

### 1.19 Gellan gum 微粒包覆 HH/PH-DOX 奈米顆粒製備

將 Gellan gum(0.12g) 溶於 40ml 的二次水中，並隨後加入 HH/PH-DOX(0.04g)，隔水加熱至完全溶解。溶解後用 dropper 陸續滴入已預熱至  $50^\circ\text{C}$  的礦物油(400ml) 中，加完後於 400rpm 下反應 10 分鐘。10 分鐘後，加入第一次 2% 的氯化鈣溶液 (10ml) 以及 Span85 (1ml)，之後再攪拌 1 小時。1 小時到後，加入第二次 2% 氯化鈣溶液 (10ml)，之後再繼續攪拌 2 小時。2 小時到後關掉攪拌機，並且將含微粒的油溶液分別以 25、40、50、70 還有 170mesh 的篩網進行過篩，使用丙酮和二次水來回 wash 去油，最後儲存於二次水中。每組 size 的微粒待測粒徑分析以及使用掃描式電子顯微鏡觀看其結構型態。

### 1.20 Gellan gum 微粒包覆 HH/PH-DOX 進行體外藥物釋放模擬

將包覆 HH/PH-DOX 奈米顆粒的 gellan gum 微粒分成五組 size 後 (實驗方法 2-6)，進行冷凍乾燥並秤重。每組依照克數平均分成三等份 (三重複)，再依次加入 2ml 的 PBS (pH7.4)，置於  $37^\circ\text{C}$  的震盪水浴槽中 (100rpm) 進行藥物釋放，

每兩天收取一次，共為期 46 天。收取作業如下：將藥物釋放 15 管從震盪水浴槽裡拿出並 vortex 些許次，使其混和一番，之後離心 15 分鐘 (4000rpm)，吸取上清液 1ml 置入 eppendorf 中，待測 O.D 值。原先的 15 管中再各自加入新鮮的 PBS (1ml) 進去，使每一管總體積依舊維持在 2ml，最後換算出 Doxorubicin 的累計量。

### 1.21 胺化石墨烯進入肝癌細胞試驗

將肝癌細胞養於玻片上，確認細胞生長至 7-8 分滿後，將 0.001 克胺化石墨烯加入至 10 毫升的細胞培養液中，用超音波震盪 1 小時後用此溶液培養細胞，分別在 1、3、6、9 小時收取細胞，透過顯微鏡觀察細胞吞噬胺化石墨烯的情況。

將肝癌細胞(HepG2)養於 10 公分培養盤上，培養至適量後，將 0.001 克胺化石墨烯溶於 10 毫升的細胞培養液中，用超音波震盪 1 小時，用此溶液培養細胞，分別在 3、9、12、24 小時用 0.05 %的胰蛋白酶將細胞打下，用培養液中和反應、混合均勻，取其中一毫升放入 1.5 毫升微量離心瓶(Eppendorf)待上顯微鏡觀察，而剩下的細胞溶液離心並丟棄上清液，用 1 毫升的 PBS 緩衝液與沉澱物混合均勻，過濾蓋、上流式細胞儀(Flow cytometry, FLOW)。此實驗是透過流式細胞儀和顯微鏡觀察肝癌細胞吞噬胺化石墨烯的情況。

### 1.22 肝癌細胞存活率試驗

將 HepG2 養至 96 孔盤中，每一個孔種  $3 \times 10^4$  個細胞(體積為 80 微升)，加入 27.2 (425-300 微米微粒的胺化石墨烯釋放累積濃度)、55.2 (小於 212 微米微粒的胺化石墨烯釋放累積濃度)和  $74.9 \mu\text{g/ml}$  (710-425 微米微粒的胺化石墨烯釋放累積濃度)的胺化石墨烯溶液(10 毫升)，分別在 1 和 2 天時加入 10 微升的 PrestoBlue 試劑，在 37 度培養 2 小時後，再測波長 570 奈米的吸光值。

### 1.23 肝癌細胞凋亡試驗

將細胞種於六孔盤，每孔種  $4 \times 10^5$  的細胞，培養 1 天後加入藥物，配製  $3.17 \mu\text{M}$  (425-300 微米微粒的阿黴素累積釋放濃度)、 $2.35 \mu\text{M}$  (小於 212 微米微粒的阿黴素累積釋放濃度)和  $1.57 \mu\text{M}$  (710-425 微米微粒的阿黴素累積釋放濃度)的阿黴素溶液，還有 27.2 (425-300 微米微粒的胺化石墨烯釋放累積濃度)、55.2 (小於 212 微米微粒的胺化石墨烯釋放累積濃度)和  $74.9 \mu\text{g/ml}$  (710-425 微米微粒的

胺化石墨烯釋放累積濃度)的胺化石墨烯溶液作為實驗組，加入藥物 24 小時後將細胞用胰蛋白酶作用，並離心、倒掉上清液，加入適量的緩衝液混合均勻，取其中 100 微升至 1.5 毫升的微量離心瓶，加入 5 微升的 Annexin V-FITC 和 PI 染色，避光反應 15 分鐘後，經濾蓋過濾後即可上流式細胞儀，染色後要 1 小時內上完流式細胞儀。

Annexin V 對細胞膜成分中的磷脂酰絲氨酸(Phosphatidylserine, PS)具有高親和力，一般細胞的 PS 是位於內層細胞膜，當在進行細胞凋亡早期時，細胞膜會外翻，所以用流式細胞儀可以偵測到有接螢光的 Annexin V；而 PI 是會結合在 DNA 上，也有的使用方式是只用 PI 染色來看細胞週期和 sub G1 期(代表細胞凋亡)。

#### 1.24 動物模型的栓塞建立

選用公的紐西蘭大白兔，訂購於行政院農委會新化畜產試驗所，出生於 2016/02/22，2016/04/14 開始養在中山醫學大學實驗動物中心，並於 2016/05/25 進行手術（手術時約 14 週大），體重 2.6 公斤重。栓塞劑調配前置作業（步驟 1 至 2）：

- (1) 將 70~170mesh 範圍的微粒冷凍乾燥好後秤重並取 20mg，之後加入 1.5ml 的 PBS，使微粒從粉末狀膨潤回微粒狀
- (2) 用 12000rpm 離心 10 分鐘，將上清液取置廢液桶，再取 1ml 甘油與之混合在一塊（20mg/ml）
- (3) 於左後腿施打 Zoletil 50（620 $\mu$ l）加 Xylazine（780 $\mu$ l）混合型注射麻醉劑，待兔子進入麻醉狀態
- (4) 使用 22 大小的針頭緩慢地將含微粒的甘油注射至兔子耳朵，從近端主動脈至遠端的分枝血管（0.15ml/右耳），過程中宜確保沒有空氣
- (5) 確認注射完畢後，將傷口處理好
- (6) 依照 0、4、8、12 天觀察兔子耳朵栓塞壞死的情形

## 2. 結果與討論

### 2.1 胺化石墨烯製備之粒徑分析

本研究選用石墨烯的原因是石墨烯大小在 0.5-25 微米之間可以利用物理特性穿透細胞膜，因此本研究要確認使用的石墨烯大小落在這特定的區間。從圖 1 中所見，胺化石墨烯的大小主要落在 1.564 微米，根據這個結果可以得到使用的胺化石墨烯可以穿透細胞膜，因為 Yinfeng Li 等人的研究證實單層片狀石墨烯與人類肺上皮細胞或老鼠巨噬細胞表面接觸的橫向尺寸介於 0.5-25 微米。

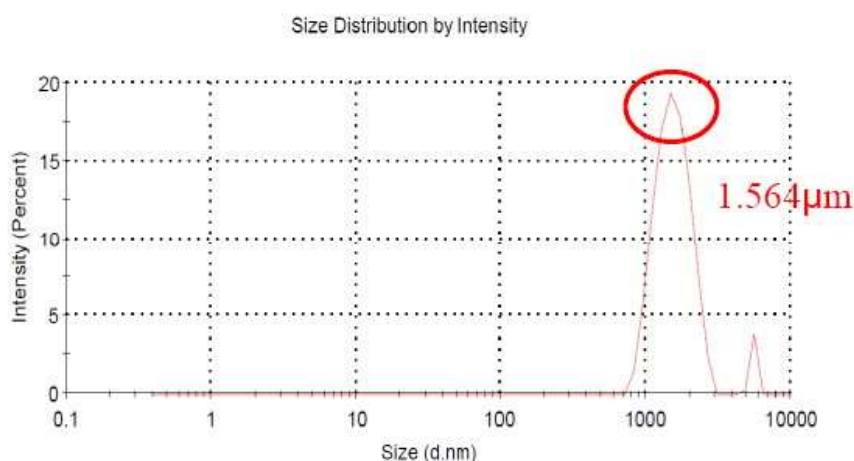


圖 1、胺化石墨烯的粒徑分析。

本研究使用的胺化石墨烯是由氧化石墨烯改質而成，所以需要確認胺化的改質成功，因此用元素分析來看石墨烯是否含有胺基(-NH<sub>2</sub>)。根據圖 2 顯示，可以看到氮(Nitrogen, N)在石墨烯中佔的比例為 6.57%，代表氧化石墨烯有改質成胺化石墨烯。



Spectrum Label	Spectrum 4
C	82.64
N	6.57
O	10.79
Total	100.00

圖 2、胺化石墨烯的元素分析。胺化石墨烯中碳、氮、氧元素佔的比例分別為 82.64、6.57 和 10.79 %。

## 2.2 胺化石墨烯在水溶液的狀態

根據粒徑分析的結果胺化石墨烯的大小約在 1500nm，從圖 3 中可以得知奈米等級胺化石墨烯的粉末是聚集在一起的，而在圖 4 中看到胺化石墨烯均勻分散在水溶液中，因此胺化石墨烯在水溶液的分散性佳不會形成聚集。



圖 3、胺化石墨烯粉末。



圖 4、水溶液中的胺化石墨烯。

## 2.3 不同濃度的結冷膠在微粒各大小的分佈

製備微粒會受到許多因素的影響，本研究控制結冷膠的濃度其他條件固定，來觀察微粒的大小，依照不同濃度在各大小中所分佈的比例來看，符合需求微粒的大小在哪個結冷膠濃度所佔的比例較多。從表 1 可以明顯看到，在 0.5%和 0.4%的結冷膠所做出的微粒在 425 $\mu\text{m}$  以上所佔的比例較高，在 212 $\mu\text{m}$  以下微粒中基本上是沒有的，而 0.3%的結冷膠是做出最多 212 $\mu\text{m}$  以下的微粒，因此本研究選用 0.3%的結冷膠。

表 1、不同濃度的結冷膠在不同大小中所佔的比例

	<25 mesh	25-40mesh	40-50mesh	50-70mesh	70-170mesh
0.5%GG	66.73%	16.76%	2.05%	2.56%	11.9%
0.4%GG	51.82%	15.6%	7.89%	5.46%	19.24%
0.3%GG	35.56%	15.5%	9.22%	10.7%	29.01%



## 2.4 結冷膠/胺化石墨烯微粒的石墨烯包覆率

利用胺化石墨烯攜帶藥物且透過物理特性穿透細胞膜，首先要確認在製備微粒的過程在微粒中石墨烯的含量多少，因此在冷乾後的微粒秤得重量為 0.0906 克，在將結冷膠溶解後，秤得胺化石墨烯重量為 0.0235 克，套用方法中所述的公式可得到微粒中含有 25.9%的胺化石墨烯。

## 2.5 結冷膠微粒和結冷膠/胺化石墨烯微粒的 SEM

本研究想要知道透過乳化法製備成微粒的表面結構、外在形狀和內部結構，以及添加的胺化石墨烯是否會改變外在形狀和胺化石墨烯被位於微粒的表面還是內層。圖 5 (A)是結冷膠微粒，從圖中可以看到呈現橢圓形狀，而表面光滑緊密，在圖 6(A)是結冷膠微粒的內部結構，可以清楚的看到纖維狀，結構偏向緊密且空洞小；圖 5 (B)是結冷膠/胺化石墨烯微粒，從圖中可以看到呈現圓球狀，而表面看起來是網狀結構，在圖 6 (B)是結冷膠/胺化石墨烯微粒的內部結構，可以清楚看到纖維狀但是結構部分鬆散且空洞大也有非常緊密沒有太多空洞，因此認為緊密的部分可能是包覆著胺化石墨烯，因為石墨烯是片狀結構；可以明確知道在表面上的結構在有胺化石墨烯之下從光滑表面變成了網狀表面且在內部可以看到包覆的胺化石墨烯以及受到胺化石墨烯的影響使結構比單純的結冷膠微粒來的鬆散。

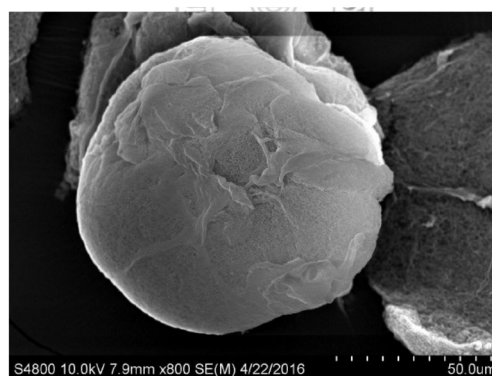
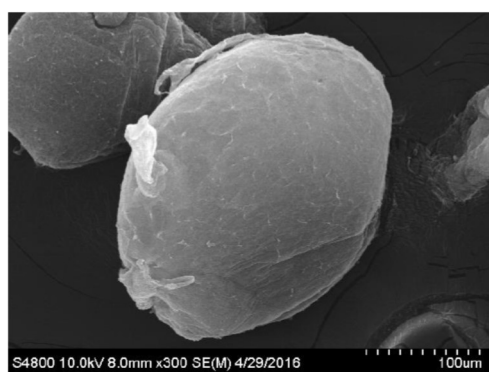


圖 5 (A)、結冷膠微粒(170-70 mesh)。 (B)、結冷膠/胺化石墨烯微粒(170-70 mesh)。

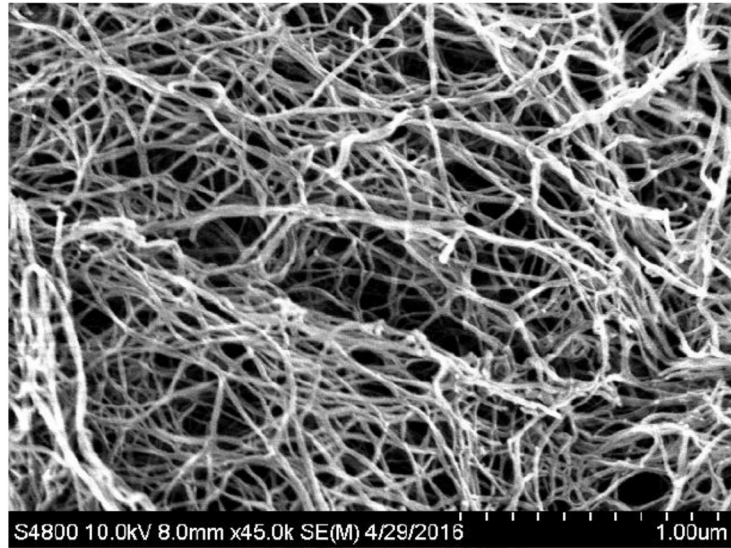


圖 6 (A)、結冷膠微粒內部結構(70-50 mesh)。

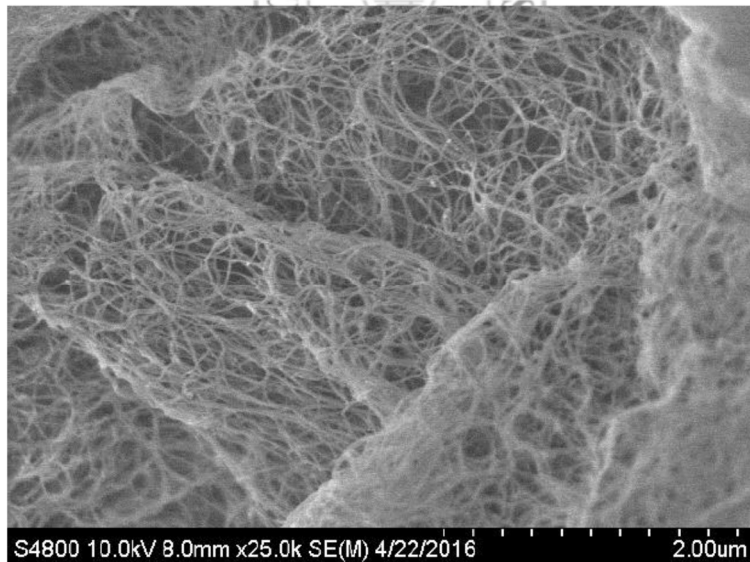


圖 6 (B)、結冷膠/胺化石墨烯內部結構(170-70 mesh)。

## 2.6 胺化石墨烯數量對濃度的標準曲線

由於大部分的研究在計算胺化石墨烯的數量是透過分光光度計的方式，但是因為本研究所使用的胺化石墨烯不溶於水，所以本研究是透過顯微鏡的方式來計數顆粒的數量來推算濃度。根據圖 7 顯示此標準曲線的 R 值在 0.99，確定本研究的計數透過這條標準曲線的換算可以得到可信的數值。

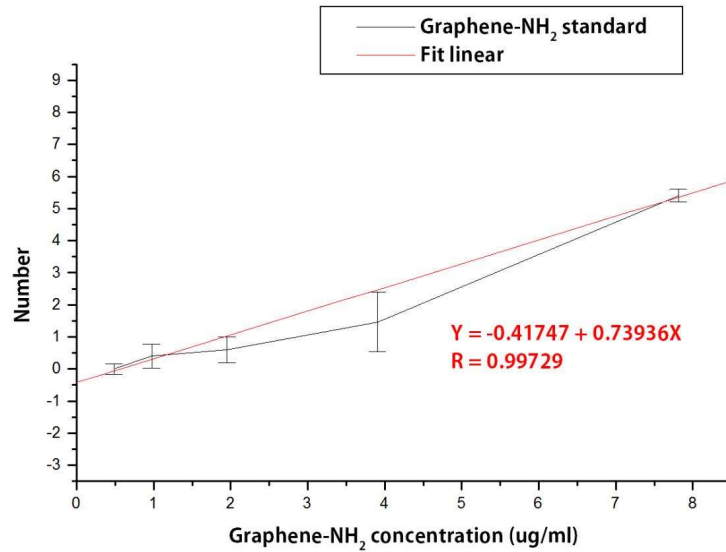


圖 7、胺化石墨烯數量對濃度的標準曲線。R 值為 0.99729。

## 2.7 胺化石墨烯的體外釋放

本研究是期望由胺化石墨烯攜帶阿黴素到達目標位，藉此來改善阿黴素進入癌細胞的效率，因此需要知道被包覆在三種微粒大小內的胺化石墨烯離開微粒的效率。根據圖 8(A)中顯示，三種大小的微粒都會釋放出胺化石墨烯，710-425 微米、425-300 微米和小於 212 微米的微粒分別累積釋放出的濃度為 74.94、27.15 和 55.2  $\mu\text{g/ml}$ 。本研究中用五種藥物釋放模式來觀察小於 212 微米微粒釋放胺化石墨烯的方式，分別是零級(Zero)、一級(First)、Higuchi、Hixson-crowell、Korsmeyer-peppas 模式，根據圖 8(B)-(F)各個模式所得到的 R 值，發現最佳的 R 值為零級模式的 0.9988，以及最佳的 Higuchi 模式 R 值為 0.9856。符合 Zero 模式是表示載體本身沒有發生降解，在每個時間段都是緩慢穩定的釋放，代表載體是個鋼性球；而 Higuchi 模式則是代表載體是個會隨著時間增加而降解，導致載體結構的孔洞變大而使被包覆的胺化石墨烯會愈容易釋放出來，基本上此兩種代表的載體狀態是不一樣的，不過，因為本研究使用的結冷膠本身就是一個會被緩慢降解的基材，所以符合 Higuchi 模式；而因為本研究的載體成分並非只有結冷膠，還混了胺化石墨烯，可能導致結冷膠微粒的結構更加穩固，形成鋼性球的狀態，所以也符合零級模式。這個結果符合本研究設計的概念，微粒在釋放過程中

大致為鋼性球，避免胺化石墨烯所攜帶的阿黴素短時間內大量釋放，達到微粒栓塞和阿黴素化療的同時進行，另外，因為仍然是會緩慢降解，所以此栓塞劑不是屬於永久的栓塞劑。

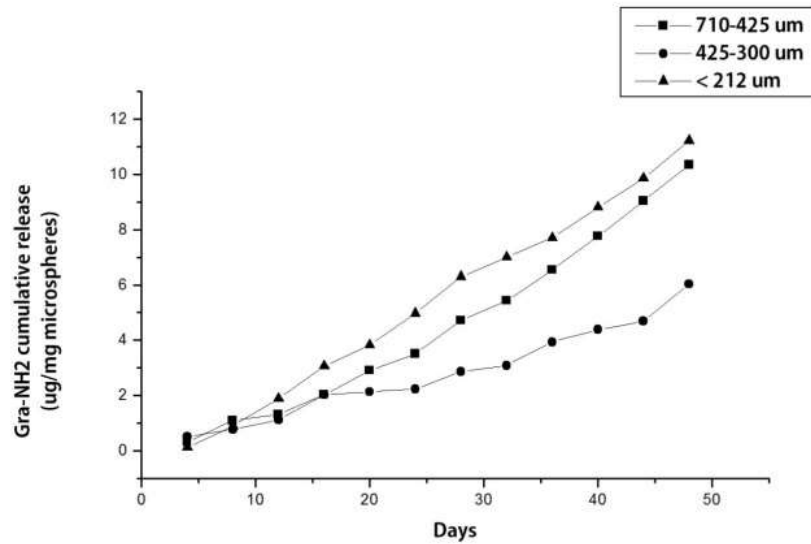


圖 8(A)、三種大小微粒的胺化石墨烯體外釋放。710-425 微米、425-300 微米和小於 212 微米微粒釋放胺化石墨烯的累積濃度分別為 74.94、27.15 和 55.2  $\mu$  m/ml。

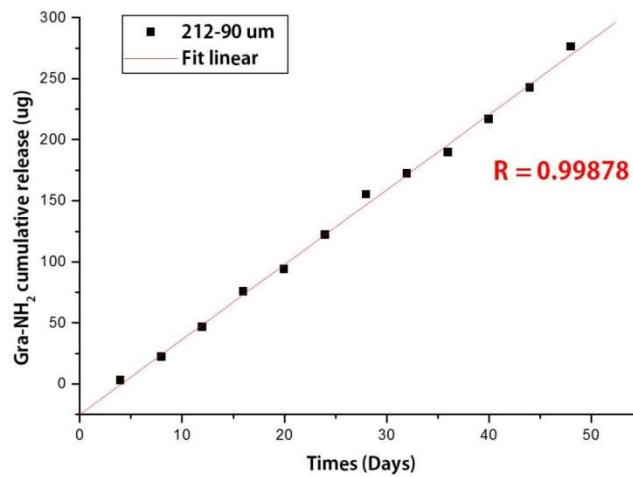


圖 8(B)、胺化石墨烯釋放的 Zero 模式。

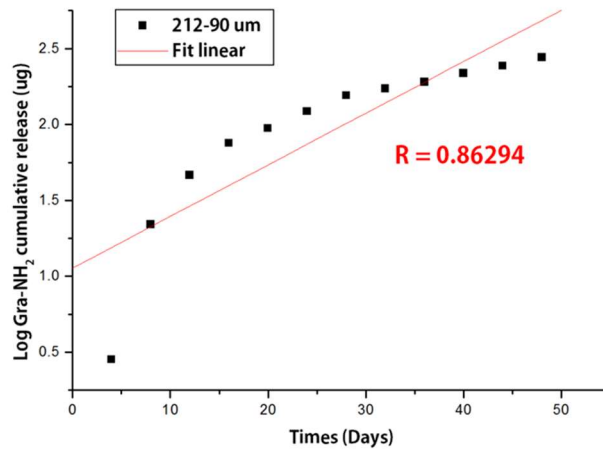


圖 8(C)、胺化石墨烯釋放的 First 模式。

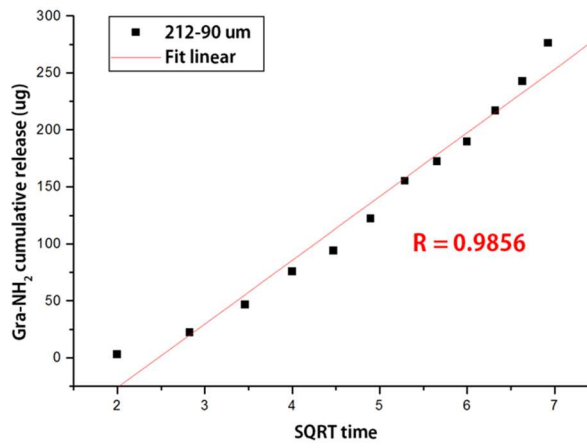


圖 8(D)、胺化石墨烯釋放的 Higuchi 模式。

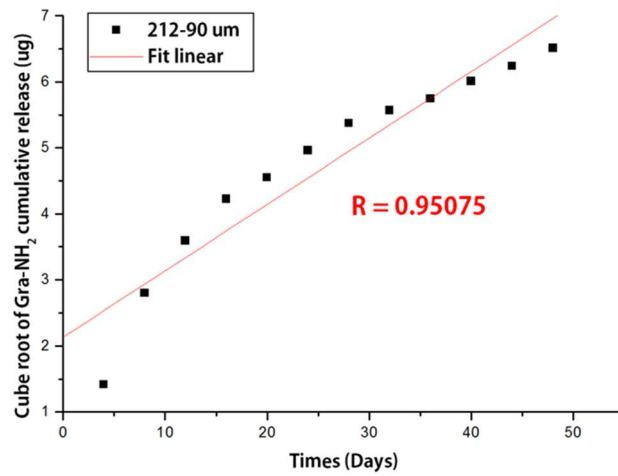


圖 8(E)、胺化石墨烯釋放的 Hixson 模式。

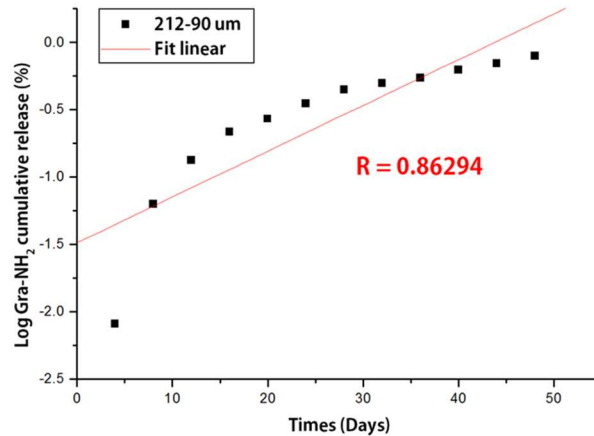


圖 8(F)、胺化石墨烯釋放的 Korsmeyer-peppas 模式。

## 2.8 胺化石墨烯和胺化石墨烯/阿黴素的界面電位

除了石墨烯本身結構來吸附藥物，本研究想利用胺化石墨烯上胺基本身帶正電的性質來吸附帶負電的阿黴素。從圖 9(A)中可以得知氧化石墨烯的電性是 -25.4mV，圖 9(B)中可以發現胺化石墨烯本身的電性是 -11.5mV，在添加胺基後電性還是位於負電，根據 Fang Fang 等人研究顯示胺化石墨烯在不同 pH 值會有不同電性的表現，在 pH 值 4 以下的時候會帶正電而在 4 以上的時候會帶負電 [Fang et al.,2014]，因此本研究的胺化石墨烯是溶於二次水中，pH 值位於 6.63，根據這結果可以證實氧化石墨烯已被胺基化。從圖 9(C)中所見，使用的阿黴素的電位是 -10.9mV。而在圖 9(D)中發現到當胺化石墨烯和阿黴素反應後的電位是 +36.2mV，因為阿黴素上的胺基和石墨烯上的碳氧雙鍵產生反應，使得胺化石墨烯上的帶負電的部分被消耗掉，因此測得電性為正電。

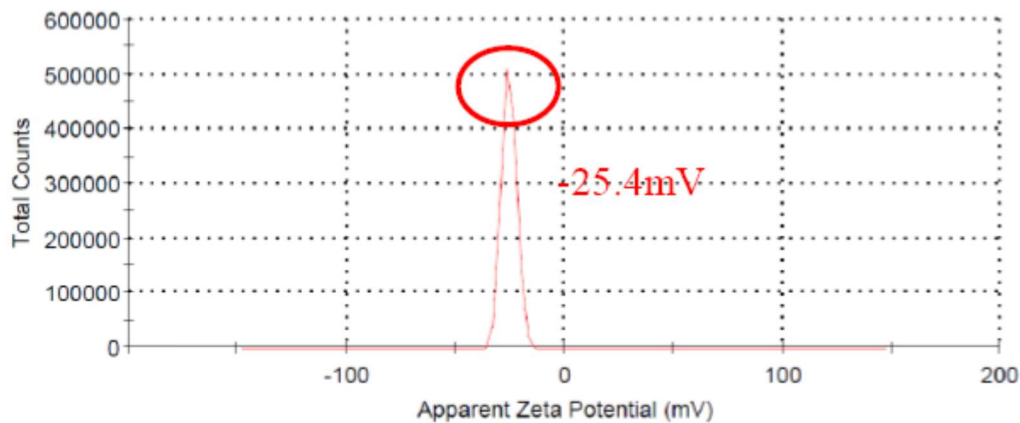


圖 9 (A)、氧化石墨烯的界面電位分析。

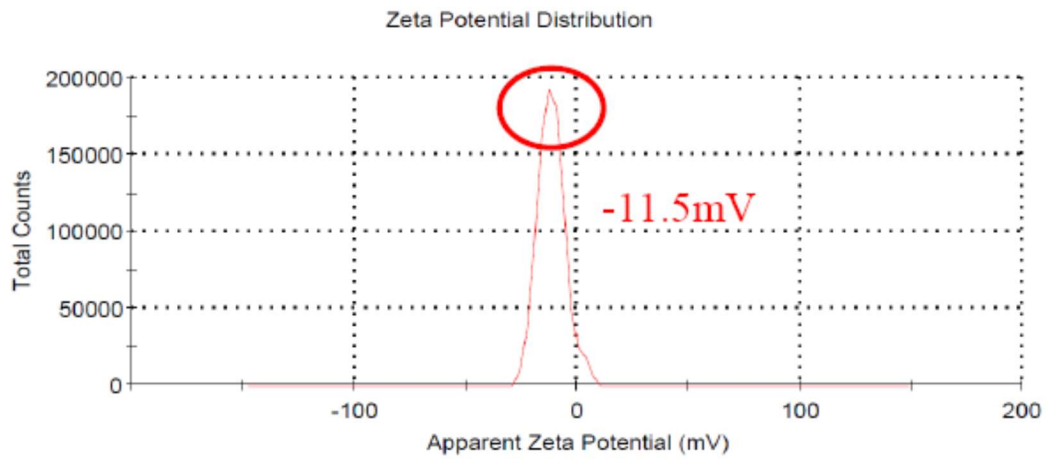


圖 9 (B)、胺化石墨烯的界面電位分析。

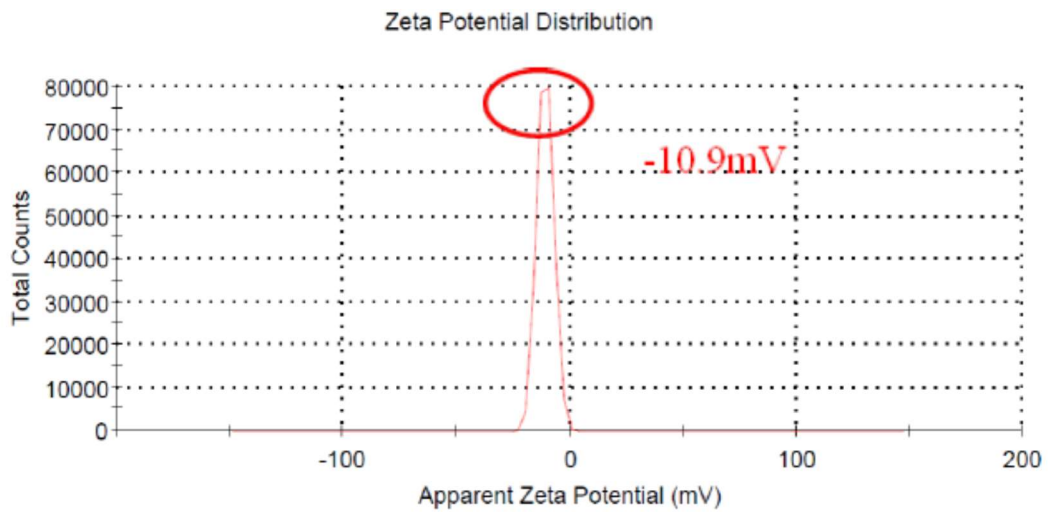


圖 9 (C)、阿黴素的界面電位分析。

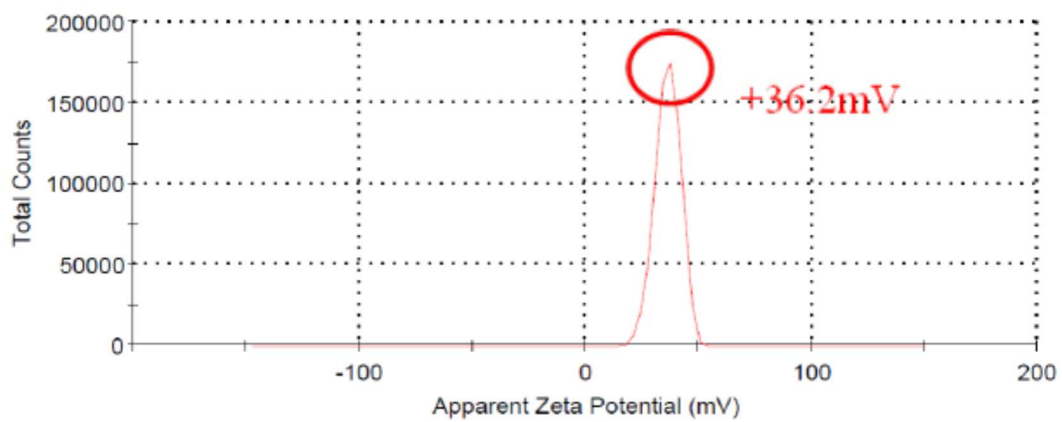


圖 9 (D)、胺化石墨烯/阿黴素的界面電位分析。

## 2.9 氧化石墨烯、胺化石墨烯和胺化石墨烯/阿黴素的傅立葉紅外線光譜(FTIR)

本研究透過傅立葉紅外線光譜來確認石墨烯胺基化和胺化石墨烯與阿黴素反應後的結構變化。根據 H. J. Chen 的研究結果，從圖 10 中判斷  $1712\text{cm}^{-1}$  的波消失，代表氧化石墨烯上的 -OH 基和胺基反應， $1163\text{ cm}^{-1}$  的波出現代表產生 -C-N 鍵結， $667\text{ cm}^{-1}$  的波出現代表結構上有胺基的存在，[H. J. Chen et al.,2013]。從圖 11 得知而  $667\text{ cm}^{-1}$  的波消失,在其他的波沒有明顯的變化，因此本研究認為胺化石墨烯沒有和阿黴素產生化學鍵結。

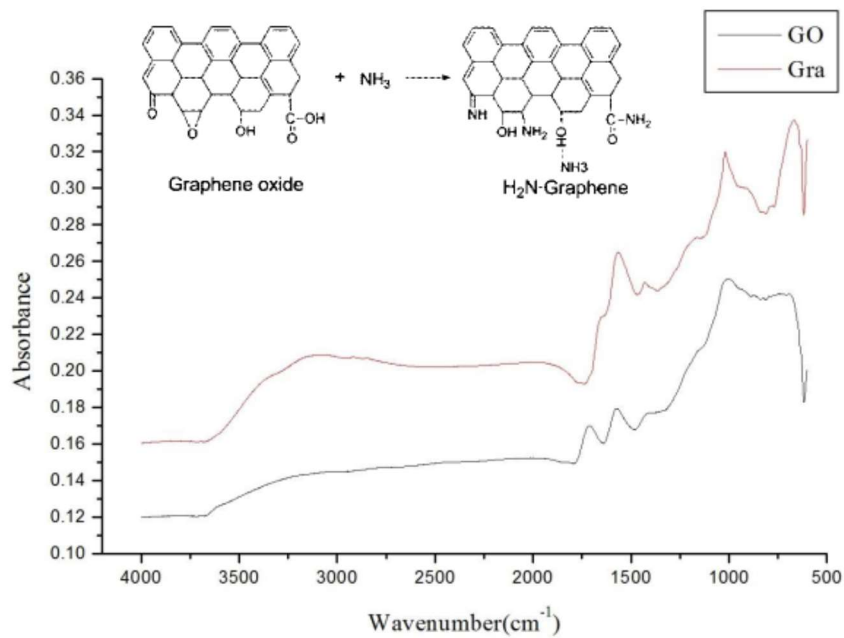


圖 10、氧化石墨烯和胺化石墨烯的 FTIR。



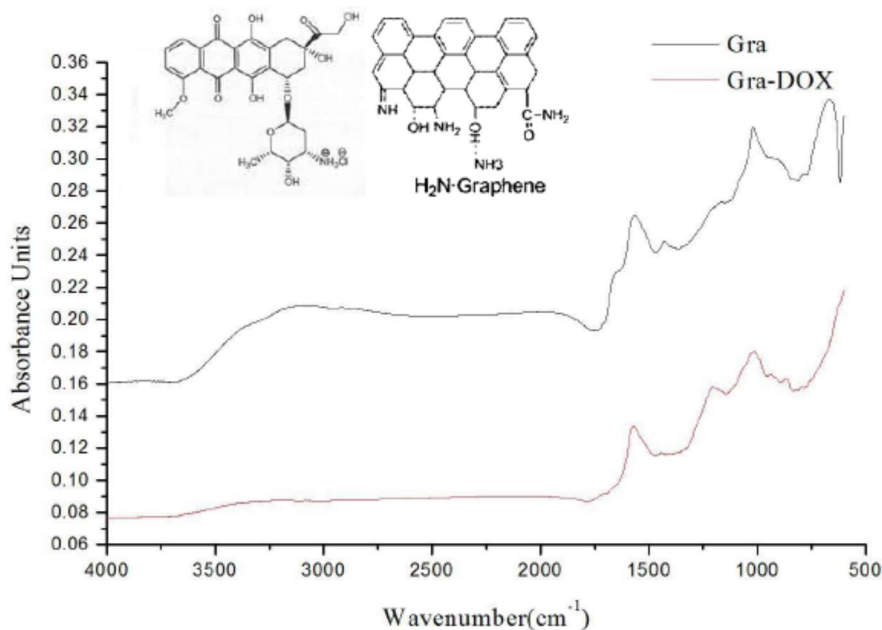


圖 11、胺化石墨烯和胺化石墨烯/阿黴素的 FTIR。

## 2.10 結冷膠/胺化石墨烯/阿黴素微粒的粒徑分析

進行肝癌動脈栓塞療法試劑中的微粒必須要依照栓塞的血管大小來選擇，本研究透過篩網篩出的微粒只能知道大約在哪個大小之間，因此需要透過粒徑分析來確認其大小。一開始本研究要先確認結冷膠的微粒粒徑經過過篩會落在哪些區域，從圖 12(A)中得知在 170 到 70 mesh 篩出來的微粒平均是  $250.2 \pm 84.61 \mu\text{m}$ ，圖中明確看到占有比例最高的兩個落在 200-300 $\mu\text{m}$  之間；從圖 12(B)中得知 70 到 50 mesh 篩出來的微粒平均是  $371.2 \pm 101.7 \mu\text{m}$ ，和圖 12(A)比較可以看到整個圖向右偏移而比例最高落在接近 400 $\mu\text{m}$  的地方；從圖 12(C)得知在 50 到 40 mesh 篩出來的微粒平均是  $485.4 \pm 143.5 \mu\text{m}$ ，和圖 12(B)比較可以看到比例最高的落在大於 400 小於 500 之間；從圖 12(D)得到在 40 到 25 mesh 篩出來的微粒平均是  $6205. \pm 224.5 \mu\text{m}$ ，和其他張圖比較可以發現他的粒徑分布來的廣泛，這代表在大尺寸的微粒上面會吸附小尺寸微粒或是在過篩的時候擋住了小尺寸微粒；從這四張圖中可以確定本研究可以利用篩網將微粒依照大小分離，只是在偏大尺寸微粒的過篩需要提高微粒之間的分散性，使微粒的分布可以縮小來確保大小分離的準確性。在結冷膠微粒中添加胺化石墨烯，胺化石墨烯是片狀物體，本研究想要了解結冷膠在包覆胺化石墨烯的過程中是否會對微粒的大小產生影響，從圖 13(A)中得知在 170 到 70 mesh 篩出來的微粒平均是  $226.2 \pm 75.57 \mu\text{m}$ ，而從圖中可以明確看到主要的微粒座落在略大於 200 $\mu\text{m}$ ；在圖 13(B)得知在 70 到 50 mesh 篩出來的微

粒平均是  $359.4 \pm 95.13 \mu\text{m}$ ，而從圖中可以看到主要的微粒座落在 300 到 400 之間；在圖 13(C)得知在 50 到 40 mesh 篩出來的微粒平均是  $498.8 \pm 125.3 \mu\text{m}$ ，不過從圖中可以發現主要的微粒是座落在 400 到 500 之間，這可能是因為大尺寸的微粒拉高了平均值。最後在圖 13(D)得知在 40 到 25 mesh 篩出來的微粒平均  $674.8 \pm 218.4 \mu\text{m}$ ，而從圖中可以明顯看出他的微粒分布相較於其他圖來的廣泛，這裡造成的原因應該是跟結冷膠微粒一樣。從結冷膠微粒和結冷膠/胺化石墨烯微粒兩者的粒徑分析來看，在經過同樣篩網的微粒大小沒有太大的差距，因此可以確定結冷膠在包覆胺化石墨烯的過程中並不會影響到原來的微粒大小；在這個粒徑分析中確認了微粒大小。

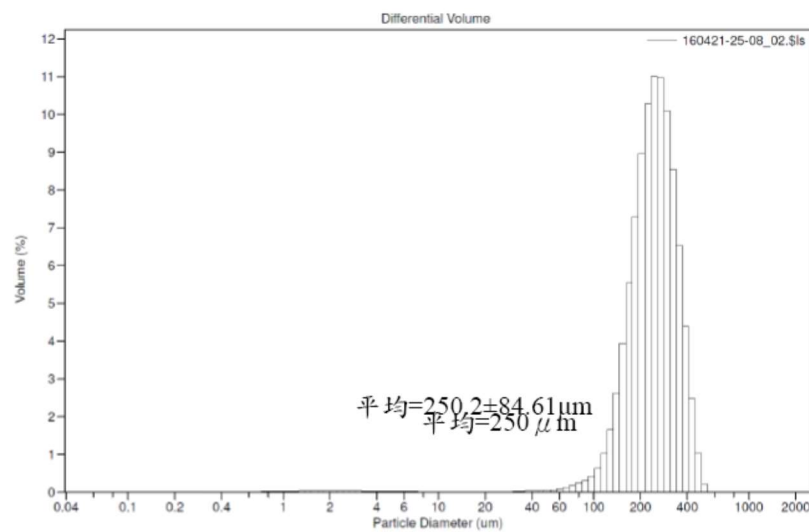


圖 12 (A)、結冷膠微粒在 170-70 mesh 過篩。

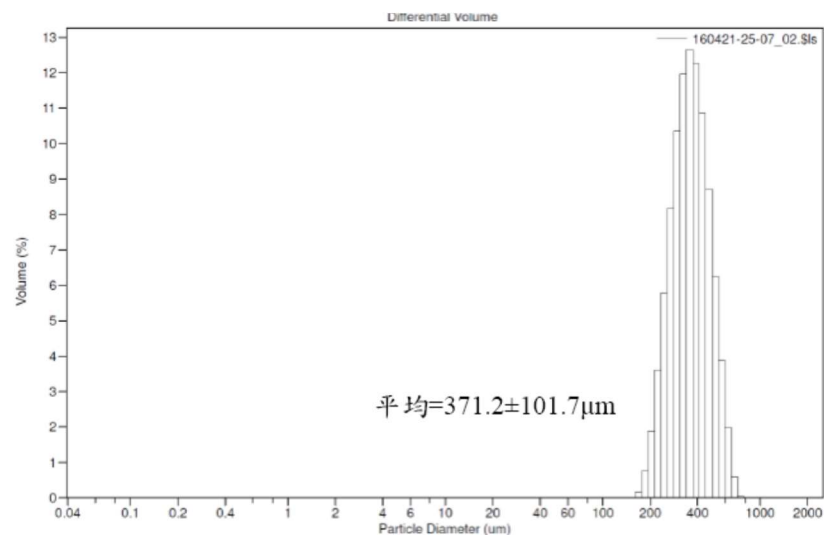


圖 12 (B)、結冷膠微粒在 70-50 mesh 過篩。

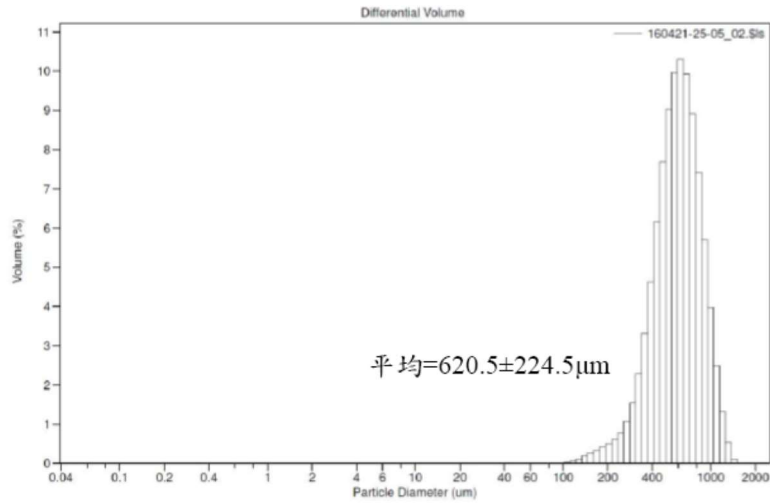


圖 12 (C)、結冷膠微粒在 50-40 mesh 過篩。

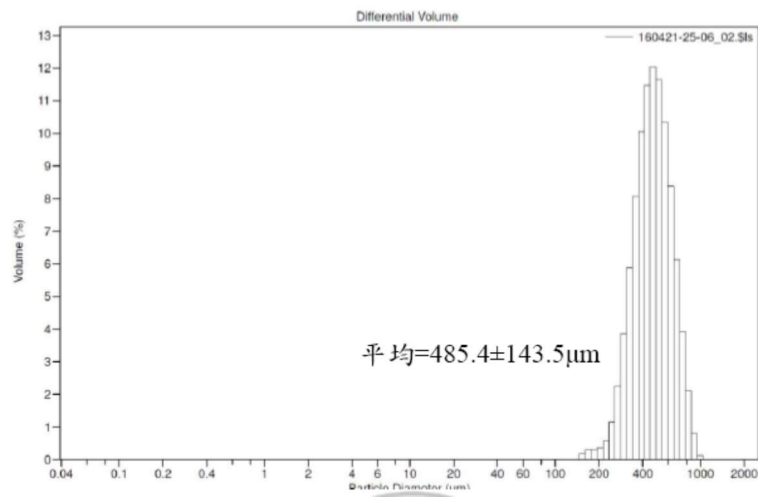


圖 12 (D)、結冷膠微粒在 40-25 mesh 過篩。

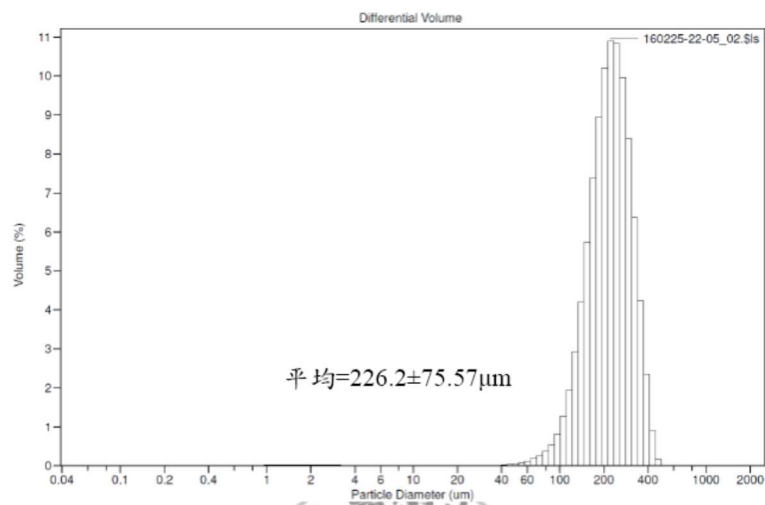


圖 13 (A)、結冷膠/胺化石墨烯微粒在 170-70 mesh 過篩。

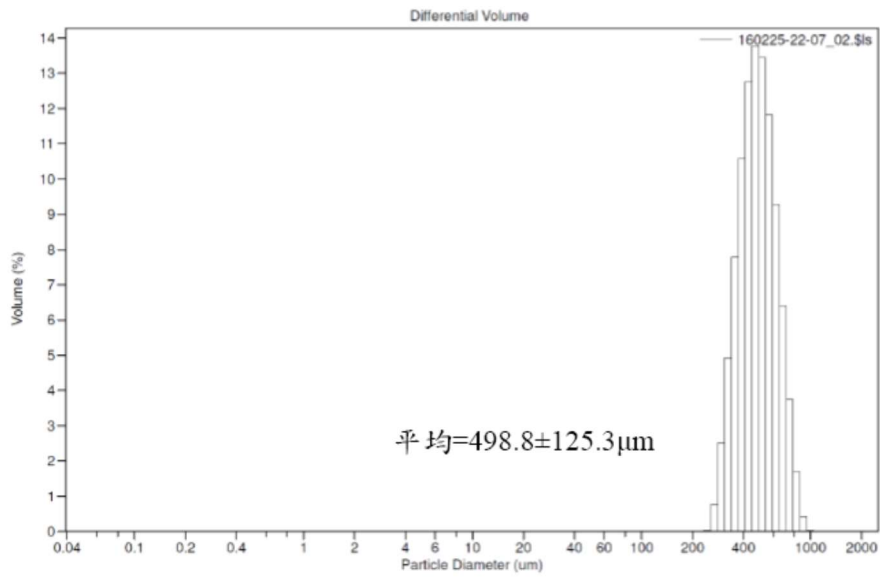


圖 13 (B)、結冷膠/胺化石墨烯 70-50 mesh 過篩。

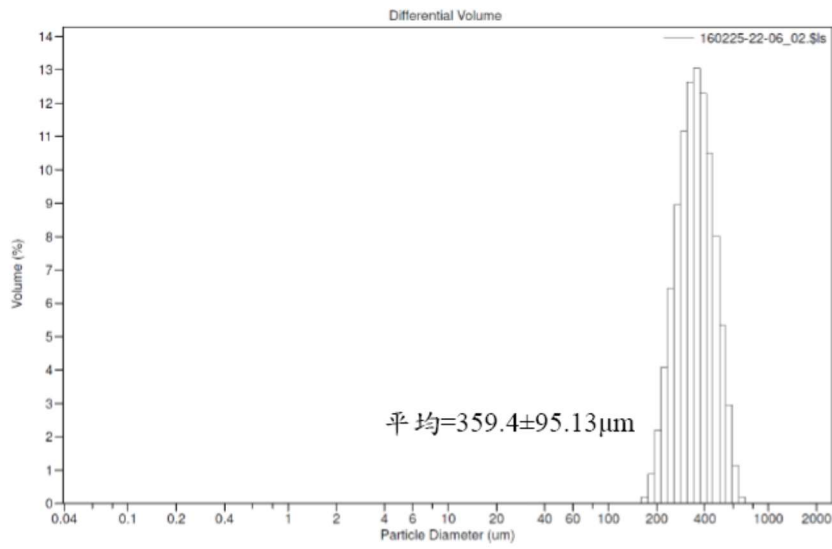


圖 13 (C)、結冷膠/胺化石墨烯 50-40 mesh 過篩。

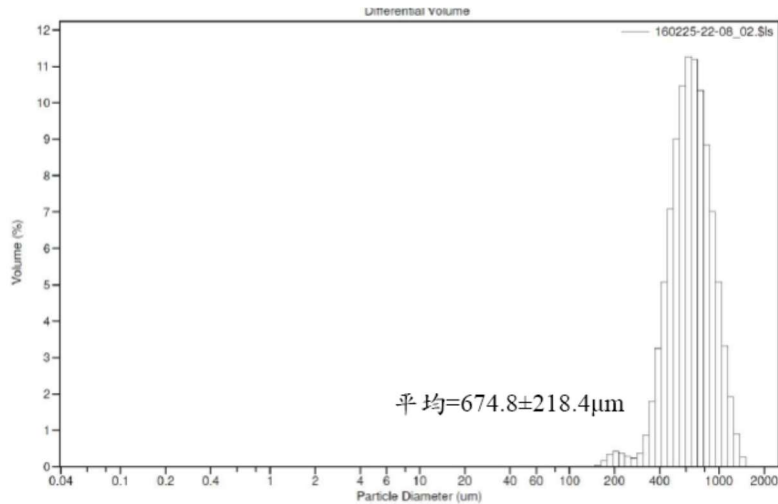
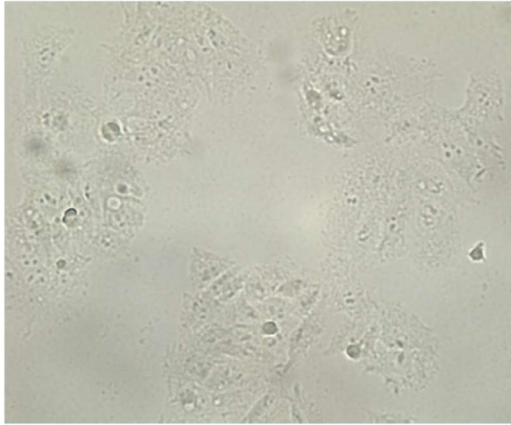


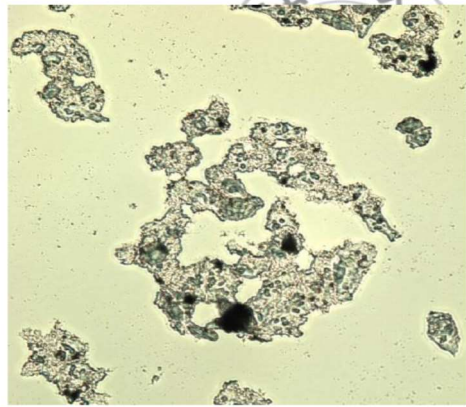
圖 13 (D)、結冷膠/胺化石墨烯 40-25 mesh 過篩。

### 2.11 胺化石墨烯進入肝癌細胞分析

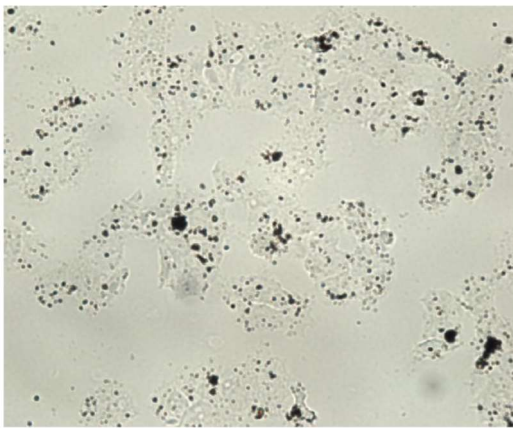
在胺化石墨烯粒徑分析中已經確定石墨烯的大小可以穿透細胞膜，在這個實驗中除了確認胺化石墨烯穿透細胞膜還要看 HepG2 細胞吸收胺化石墨烯的時間性和吸收後細胞型態上的改變。圖 14(A)是沒有加入胺化石墨烯的 HepG2 細胞，圖 14(B)(C)(D)(E)分別是加入 1、3、6、9 小時的 HepG2 細胞。經過 1 小時發現有部分胺化石墨烯已經進入到細胞內但是量並不多；到 3 小時從圖中看到 HepG2 細胞明顯吞噬胺化石墨烯，胺化石墨烯主要分布於細胞內部的內圈的位置；到 6 小時看到胺化石墨烯分布於細胞內部，已經不在內圈的位置；到 9 小時看到胺化石墨烯已經占據細胞大部分的位置，這表示胺化石墨烯有進入細胞的能力且從圖中可以發現隨著時間的增長，在 HepG2 細胞內的胺化石墨烯聚集的程度上升，這代表當培養時間的增長在細胞內堆疊的石墨烯會隨之增加。



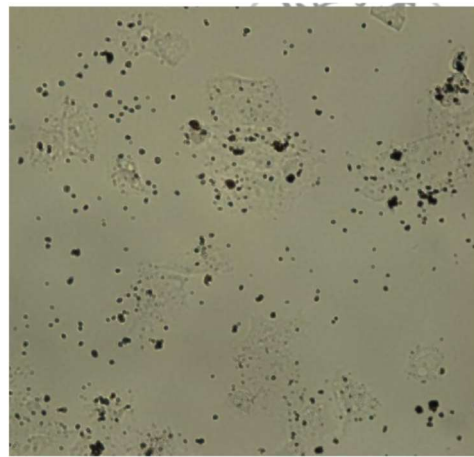
(A)



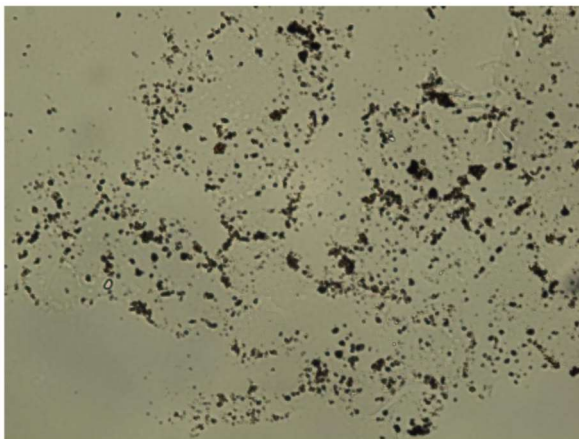
(B)



(C)



(D)



(E)

圖 14(A)、HepG2 細胞未加入胺化石墨烯(400x)。(B)、HepG2 細胞加入胺化石墨烯 1 小時(400x)。(C)、HepG2 細胞加入胺化石墨烯 3 小時 (400x)。(D)、HepG2 細胞加入胺化石墨烯 6 小時(400x)。(E)、HepG2 細胞加入胺化石墨烯 9 小時 (400x)。

## 2.12 結冷膠/胺化石墨烯/阿黴素的藥物釋放

因為製備的微粒有包覆藥物，所以要在體外模擬藥物釋放模式，以利於之後的體內試驗。本研究先將阿黴素溶於 PBS 中，掃描全波長發現最大吸收峰位於 480nm 的位置，所以本研究就用 480nm 來偵測藥物濃度。將 0.075mg 的阿黴素溶於 1ml PBS 中，序列稀釋，利用已知的 6 個濃度( $75\times 10^{-6}$ 、 $37.5\times 10^{-6}$ 、 $18.75\times 10^{-6}$ 、 $9.375\times 10^{-6}$ 、 $4.6875\times 10^{-6}$ 、 $2.34375\times 10^{-6}$ )利用線性回歸做出標準曲線(如圖 15)，將藥物釋放所測得吸光值代入標準曲線中求得實際濃度(如圖 16)，發現  $226.2\pm 75.57$  和  $498.8\pm 125.3\mu\text{m}$  藥物釋放結果沒有差異，而  $674.8\pm 218.4\mu\text{m}$  釋放比較慢，可能是小尺寸的表面積大且厚度較薄所以釋放較快，反之大尺寸的表面積小且厚度較厚所以釋放較慢。將所求得數值分別帶入 Zero(如圖 17)、First(如圖 18)、Higuchi(如圖 19)、Hixson(如圖 20)和 Korsmeyer(如圖 21)模式中，從斜率得知藥物釋放結果符合 Higuchi 模式，Higuchi 模式特點有三個，第一是釋放方式是透過擴散，第二是各種的幾何形狀或是基質特性，包含多孔結構，第三是藥物釋放速率和基材厚度相關[Nokhodchi et al. 2012, Ramteke et al. 2014]，這說明了本研究微粒的藥物釋放方式是從球的表層開始釋放，再慢慢的從內層釋放到表層，代表此微粒可以透過不斷的擴散將藥慢慢的釋放出來達到延長藥物釋放時間。

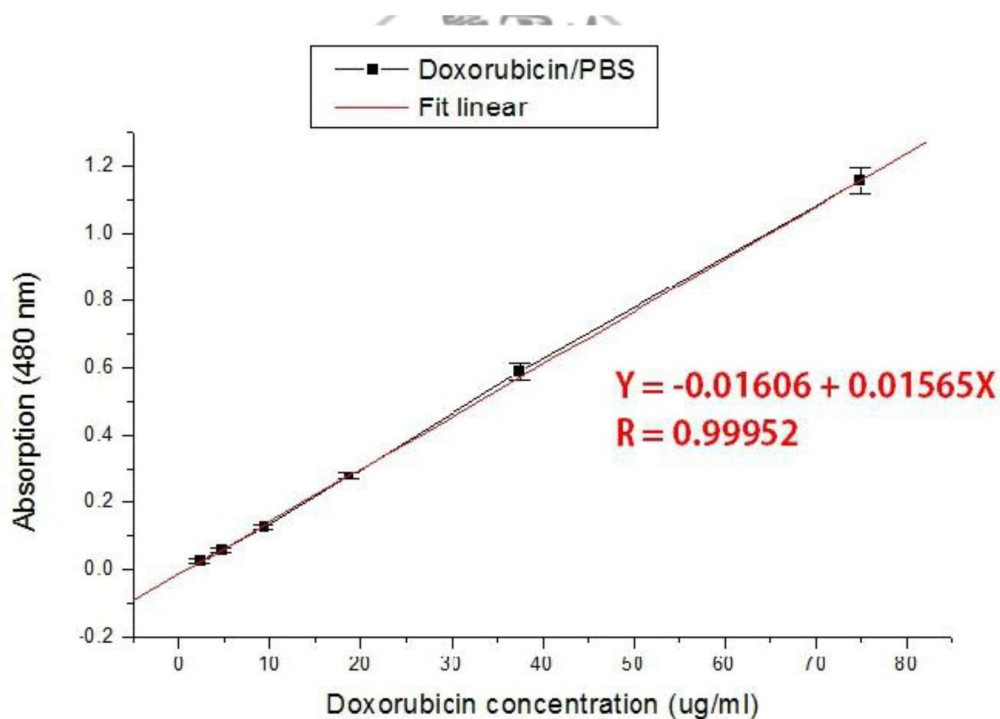


圖 15、DOX 溶於 PBS 的標準曲線。

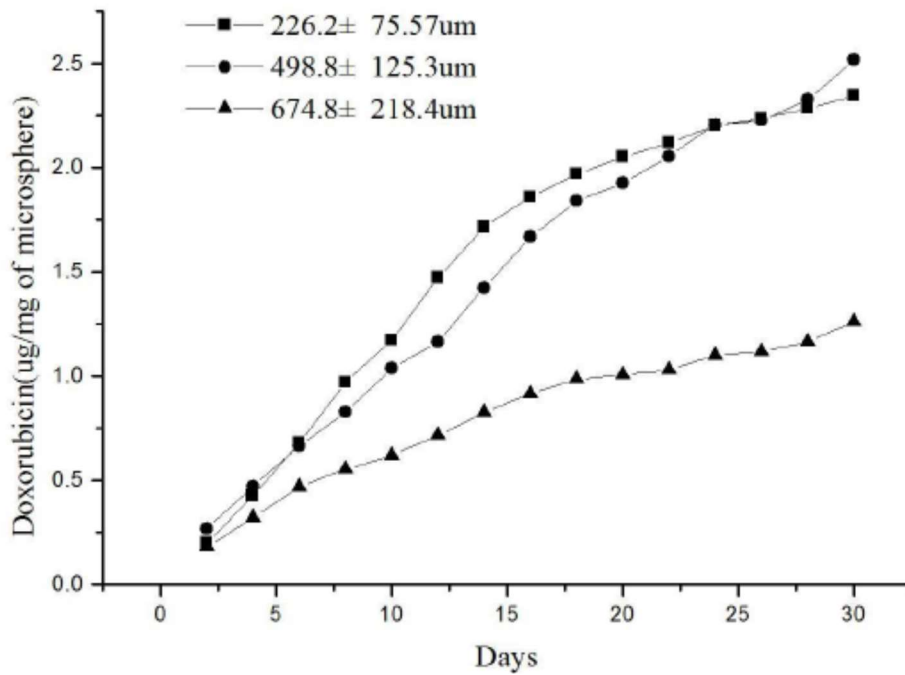


圖 16、結冷膠/胺化石墨烯/阿黴素各大小微粒的藥物釋放。

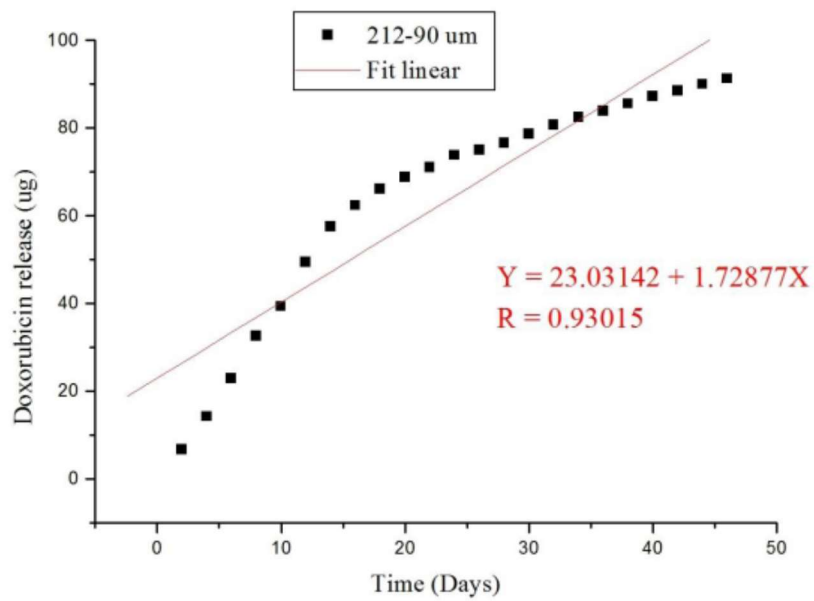


圖 17、結冷膠/胺化石墨烯/阿黴素微粒的 Zero 模式。



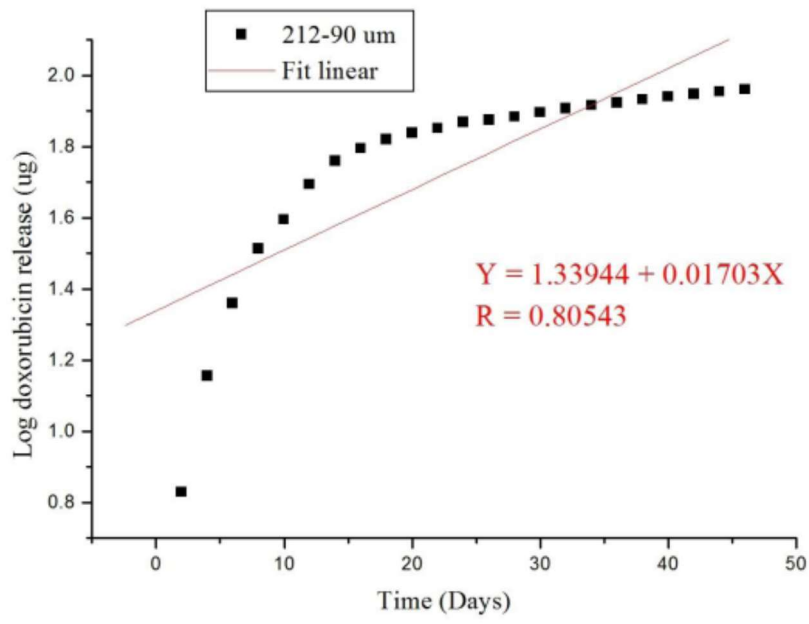


圖 18、結冷膠/胺化石墨烯/阿黴素微粒的 First 模式。

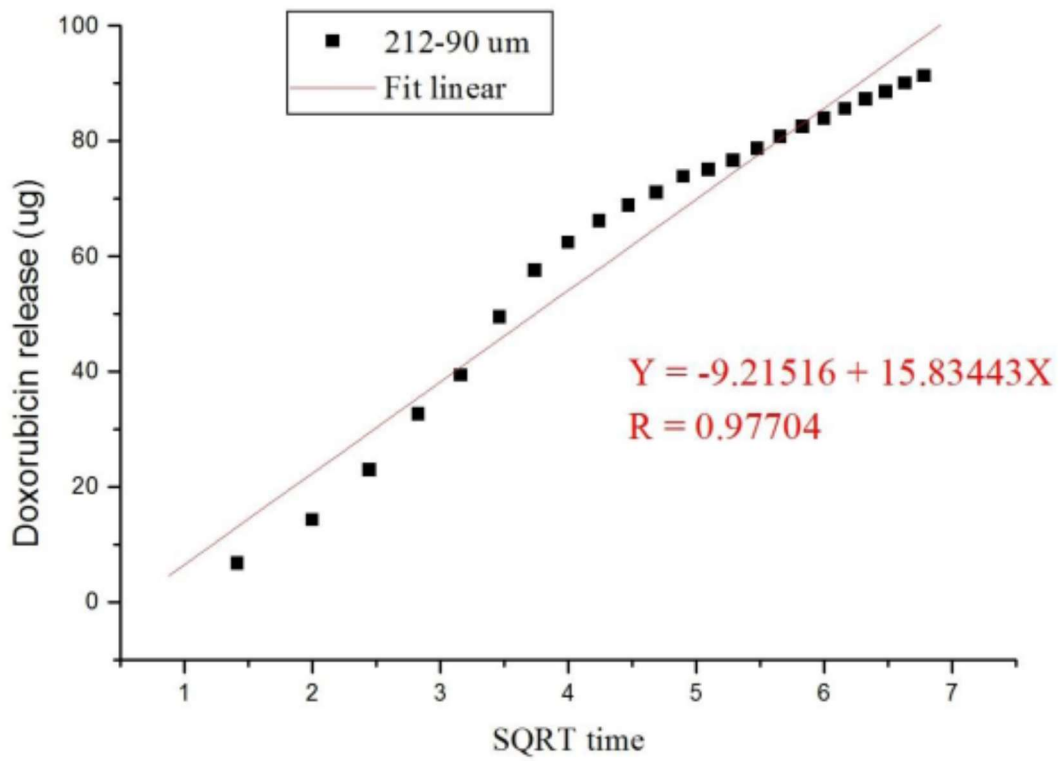


圖 19、結冷膠/胺化石墨烯/阿黴素微粒的 Higuchi 模式。

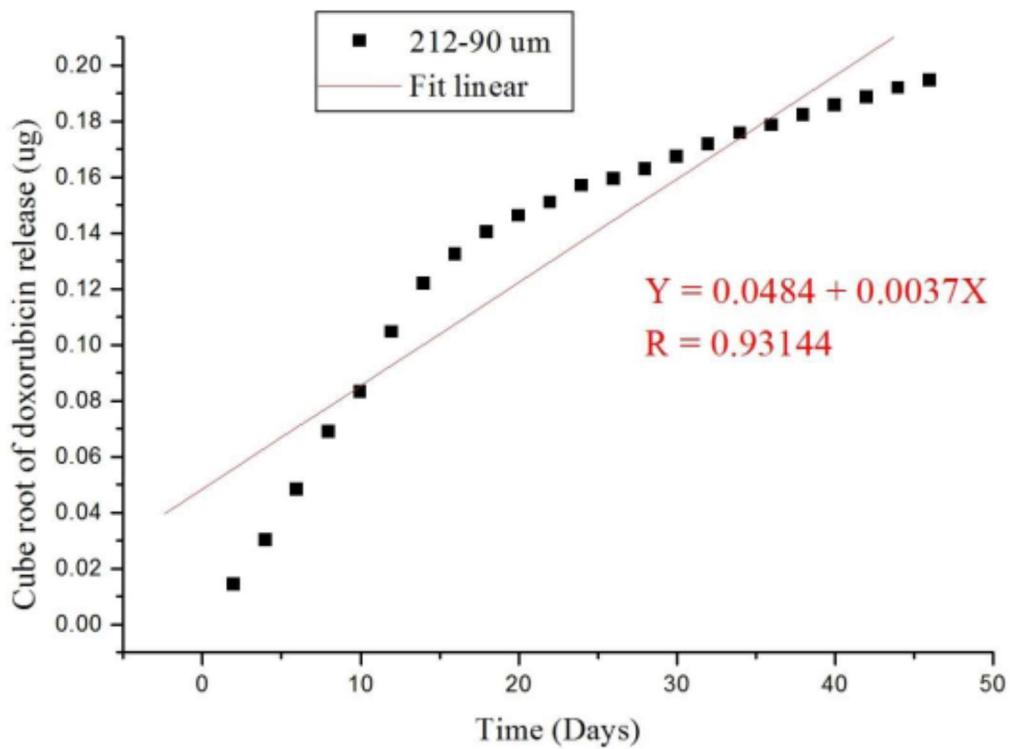


圖 20、結冷膠/胺化石墨烯/阿黴素微粒的 Hixson 模式。

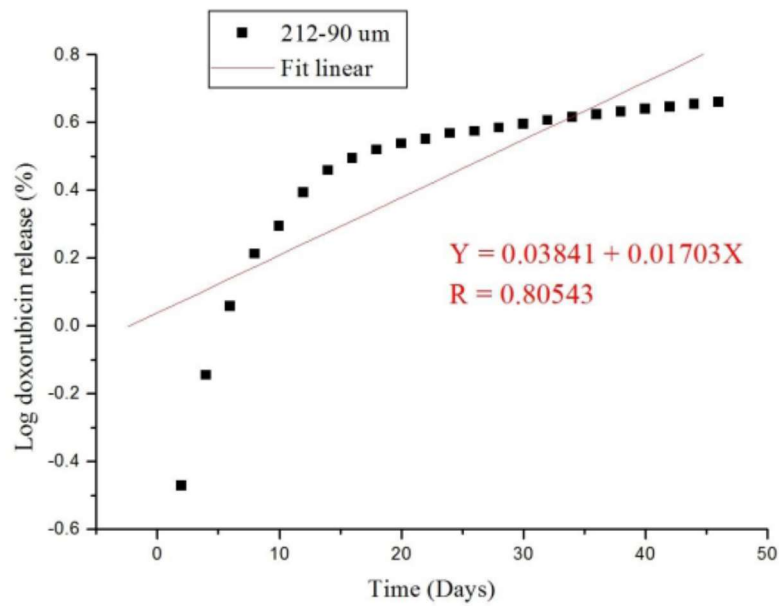


圖 21、結冷膠/胺化石墨烯/阿黴素微粒的 Korsmeyer-peppas 模式。

### 2.13 HH 之 NMR 結果分析

利用氫原子核磁共振光譜儀( $^1\text{H}$  NMR)來看透明質酸(HA)與組胺酸(Histidine)共軛後形成的 HH 待測物，並將該待測物溶解於  $\text{D}_2\text{O}$  中，然後透過分子中的氫元素之化學位移來分析化學結構上出現的特徵改變。在 8.064ppm(-N=CH-)以及 6.979ppm(-N-CH=C-)出現特有的質子 (proton) 尖端值，說明了透明質酸的 methenyl 基團與組胺酸的咪唑環(imidazole)產生了反應，兩者有成功結合上(圖 22)。

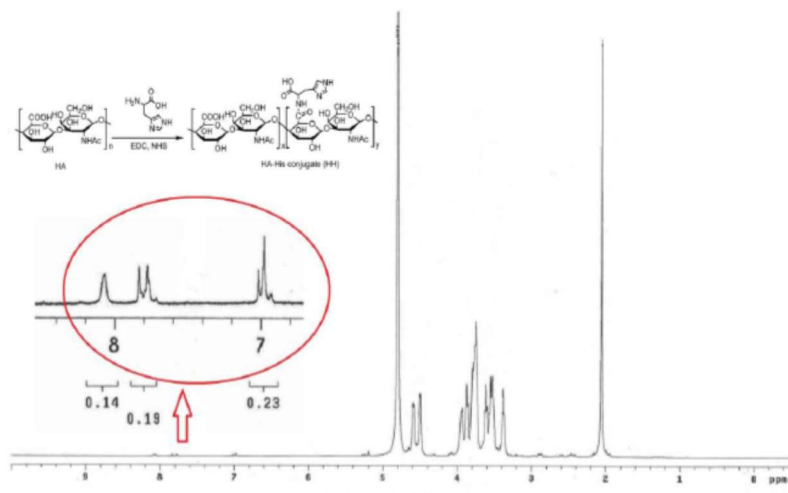


圖 22. HH 合成之 NMR 圖。

## 2.14 PH 之 NMR 結果分析

利用氫原子核磁共振光譜儀( $^1\text{H}$  NMR)看聚乙炔亞胺(PEI)與組胺酸(Histidine)結合後，是否有共軛形成 PH 產物，因此將 PH 產物溶於  $\text{D}_2\text{O}$ ，進而分析結構上的特徵改變。在 7.714ppm(-N=CH-)以及 6.959ppm(-N-CH=C-)發現新的質子 (proton) 尖端值，說明了聚乙炔亞胺 (PEI) 和組胺酸 (Histidine) 產生了反應，成功地得到 PH (圖 23)。

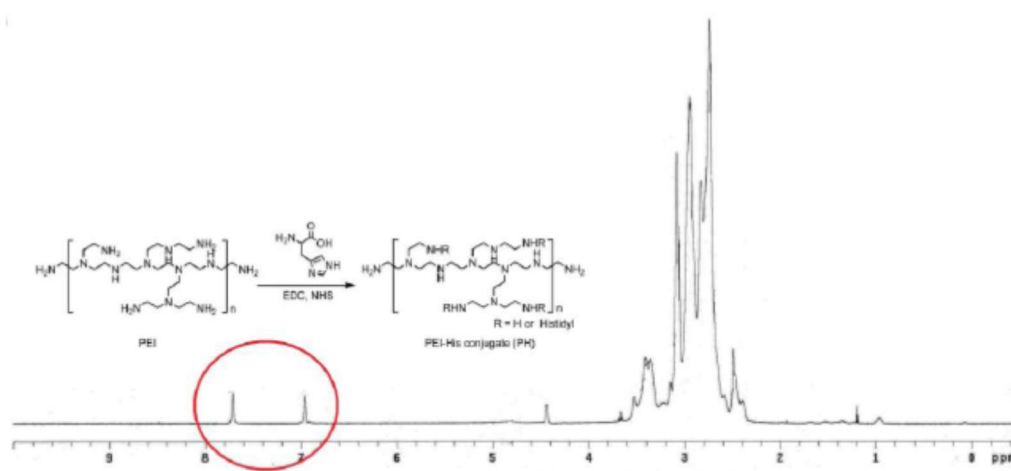


圖 23. PH 合成之 NMR 圖。

## 2.15 介面電位

介面電位的意義主要是看待測物的穩定性、表面吸附和表面等電點，介面電位量測值的絕對值 $\Rightarrow$ 大於 30：待測物系統穩定，粒子分散；小於 30 $\Rightarrow$ 待測物系統不穩定，粒子易聚集；等於零 $\Rightarrow$ 為等電位點，IEP 點。本研究想透過介面電位分析值來得知每一階段的合成是否有成功發生改變，表 2 為 Doxorubicin、PH、PH-DOX、HH、HH/PH-DOX 三重複所得的平均值和其 S.D 值。從圖 24A 中可以發現阿黴素本身的介面電位是 -10.2mV，而 PH 合成的介面電位為 45.1mV (圖 24B)，將兩者添加在一起反應後，產物 PH-DOX 的介面電位變為 35.6mV (圖 24C)，依舊帶正電荷。圖 24D 為 HH 合成的分析結果，可得知其介面電位值為 -42.2mV。經由 HH 和 PH-DOX 以 4 比 1 的比例混和得到 HH/PH-DOX 奈米顆粒，介面電位分析值為 -25.4mV (圖 24E)，帶負電的原因估計是因為混和的比例問題，HH 占了五分之四的比重，因而影響最後奈米顆粒所帶的電荷。

表 2. Doxorubicin (DOX)、HH 合成、PH 合成、PH-DOX 合成、HH/PH-DOX 五個介面電位三重複數值以及對應之平均值和標準差。

	DOX	PH	PH-DOX	HH	HH/PH-DOX
Run1	-9.29	43.4	33.6	-43.5	-25.5
Run2	-10.5	47.8	35	-42.7	-25.8
Run3	-10.9	44	38.3	-40.4	-24.9
Mean±S.D	"-10.2±0.8"	"45.1±2.4"	35.6±2.4	"-42.2±1.6"	"-25.4±0.5"

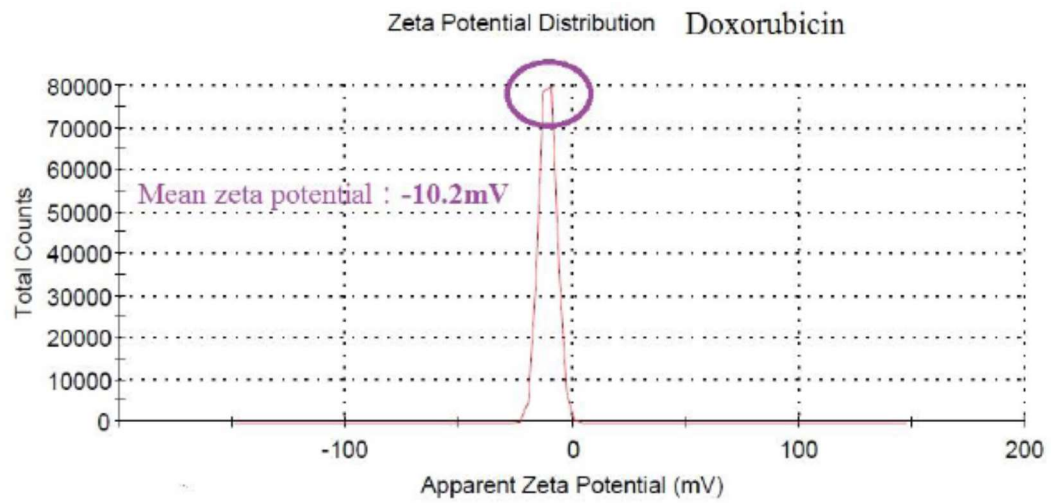


圖 24A. Doxorubicin 介面電位分析圖。

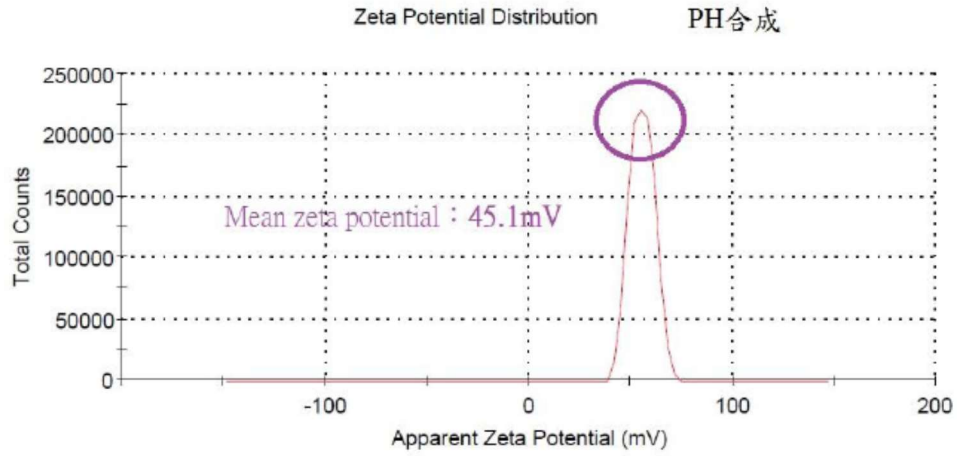


圖 24B. PH 合成介面電位分析圖。

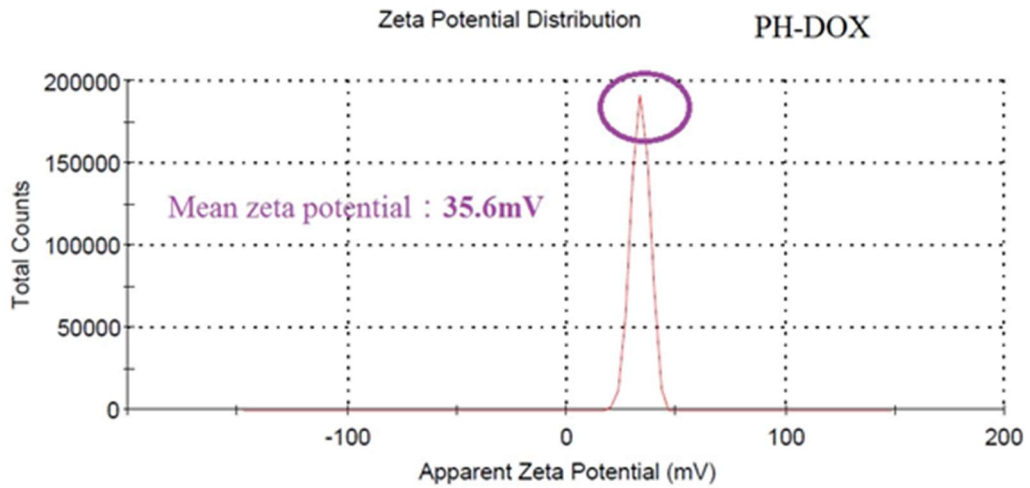


圖 24C. PH-Doxrubucun(DOX)合成介面電位分析圖。

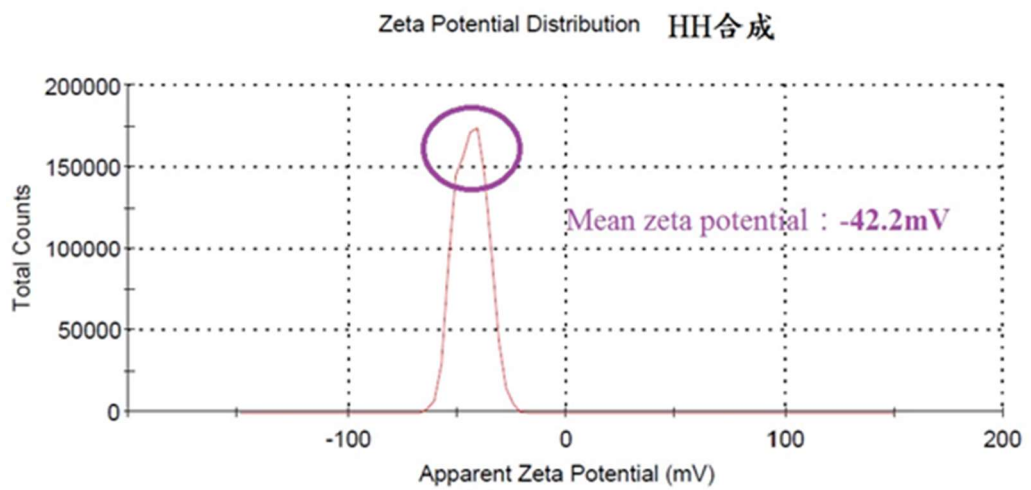


圖 24D. HH 合成介面電位分析圖。

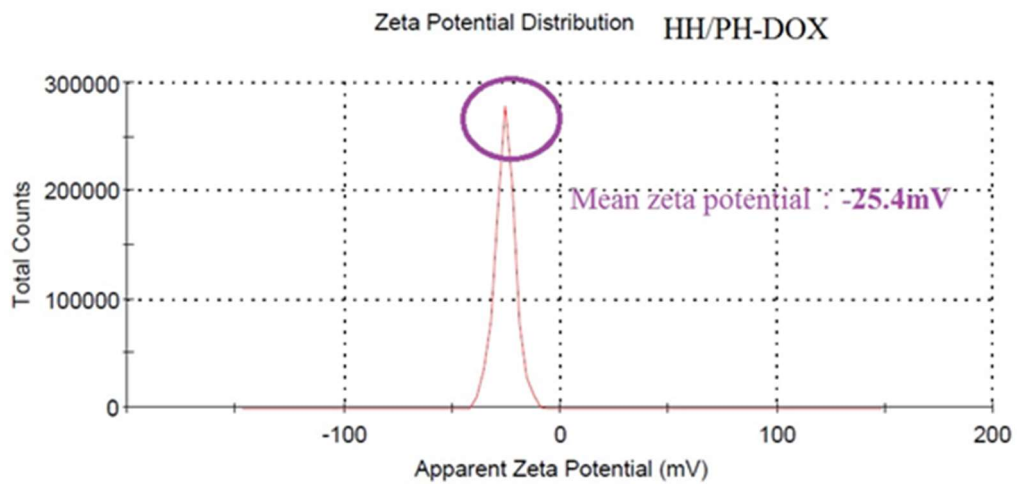


圖 24E. HH/PH-DOX 合成介面電位分析圖。

### 2.16 HH/PH-DOX 粒徑分析

將 HH 和 PH-DOX 合成分別以 4(80ml)比 1(20ml)的比例混合得 HH/PH-DOX 奈米顆粒溶液，並且經由粒徑分析得三重複數值分別為 140.5 d.nm、139 d.nm、140.1 d.nm，平均值約為  $140 \pm 0.8$  d.nm，而多分散指數 (polydispersity index ; PDI) 為 0.099，又低多分散指數象徵了 HH/PH-DOX 奈米顆粒粒徑的單一性分布 (圖 25) (C. Senthil Kumar., 2015)。

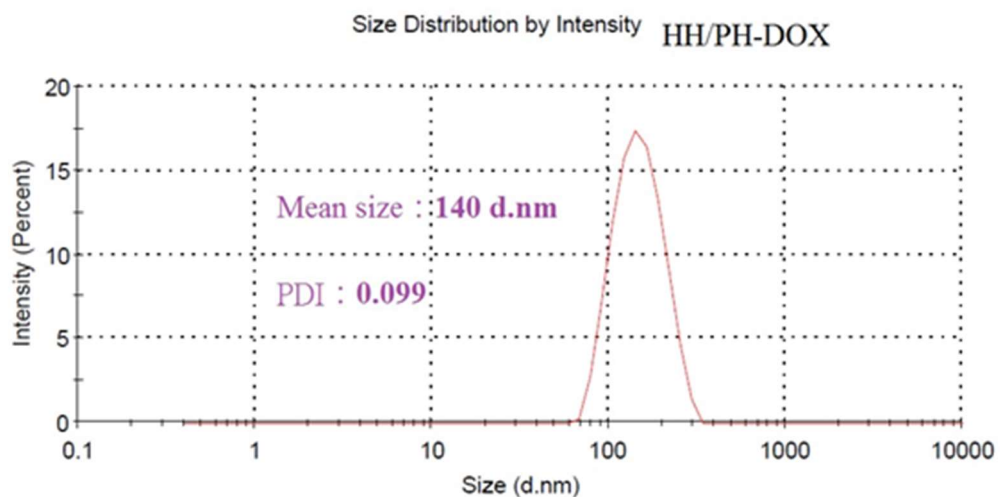


圖 25. HH/PH-DOX 奈米顆粒於水溶液下的粒徑分析。

### 2.17 螢光顯微鏡下 HepG2 攝取 HH/PH-DOX 奈米顆粒的情形

本細胞攝取實驗為定性實驗，目的是要看攜帶化療藥物 doxorubicin 的奈米顆粒會不會經由吞噬作用進到 HepG2 細胞裏頭。圖 26A 為控制組，與圖 26B 實驗組是同樣代數的 HepG2 細胞株，差別在於控制組的部分沒有加入 1ml 的奈米顆粒溶液，10ml 全是給予養分的 medium；而圖 26B 實驗組則是有加入 1ml 的奈米顆粒溶液和 9ml 的 medium。控制組和實驗組於培養箱放置 24 小時後，於螢光顯微鏡 400 倍視野下，發現實驗組有看到控制組沒有的多數粒狀物質，這些粒狀物質大小平均分布於細胞中，我們認為這些即是 HH/PH-DOX 奈米顆粒。此結果說明了 HepG2 細胞於 HH/PH-DOX 奈米顆粒與 medium 共同培養 24 小時後，奈米顆粒可透過吞噬作用進至 HepG2 細胞中。此結果即是當初設計時所希望得到的，透過 HH/PH-DOX 承載化療藥物 doxorubicin 藉由吞噬作用進入至 HepG2 細胞，如此期盼達到扼殺癌細胞的功效，使癌細胞無法繼續增殖下去。

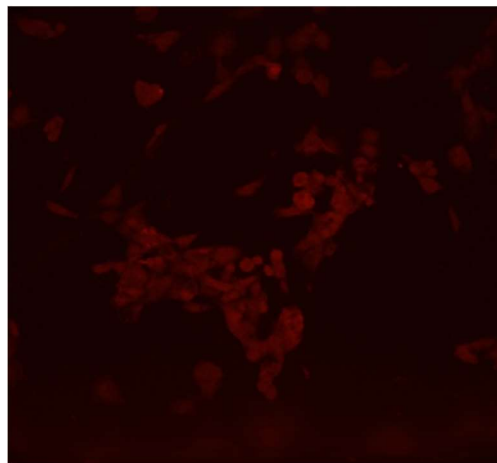


圖 26A. 螢光顯微鏡下，HepG2 照（控制組 400X）。

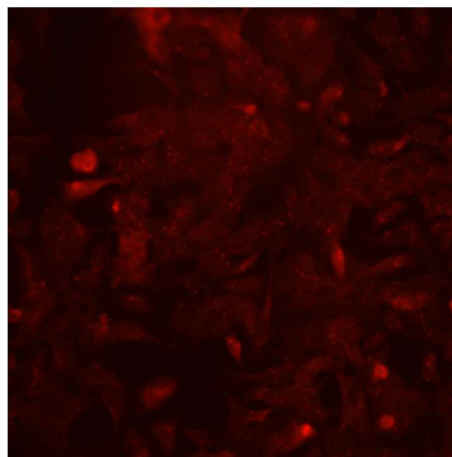


圖 26B. 螢光顯微鏡下，HepG2 照（實驗組 400X）。



## 2.18 gellan gum 微粒巨觀圖

依照實驗方法 2-5 使用 0.3% 的 gellan gum 溶液於 400rpm 下攪拌 1 小時又 20 分鐘，並且前後加入兩次 1% 的氯化鈣溶液，並透過帶正二價的陽離子幫助 gellan gum 多醣體形成微粒狀，之後再將含微粒的油溶液依序用 25、40、50、70、170 由大到小 mesh 值的篩網進行過篩。儘管大於 25mesh 的微粒不再細分，但透過巨觀圖可發現微粒的顆粒大小依舊呈現均勻分布（圖 27）。因此本研究可以初步得到利用乳化法製備 gellan gum 微粒是可行的，至於其他小於 25mesh 的微粒，分別為 25~40mesh、40~50mesh、50~70mesh、70~170mesh 共四組範圍，則進一步經由粒徑分析得知每一範圍的平均尺寸，以及 SEM 下的外觀型態和表面結構。

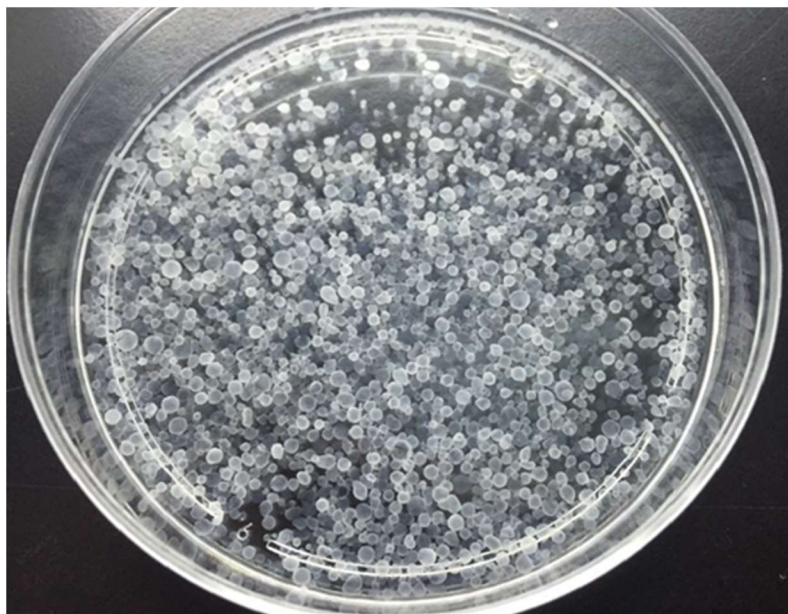


圖 27. 大於 25mesh 以上的純 gellan gum 微粒巨觀圖。

## 4.19 gellan gum 微粒掃描式電子顯微鏡下的外觀型態及表面結構

圖 28A 和 28C 為純 gellan gum 微粒於掃描式電子顯微鏡下的外觀型態，圖 28A 為 250 倍率，且透過 scale bar 粗略得知粒徑約為 200-300um；圖 28C 為 700 倍率，粒徑約為 100-200um。透過圖 28B 和 29D 可得知純 gellan gum 微粒的表面結構，無論是在 35.1k 倍還是 45k 倍皆呈現纖維狀，並且相互交織的纖維產生了大小不一的孔洞。

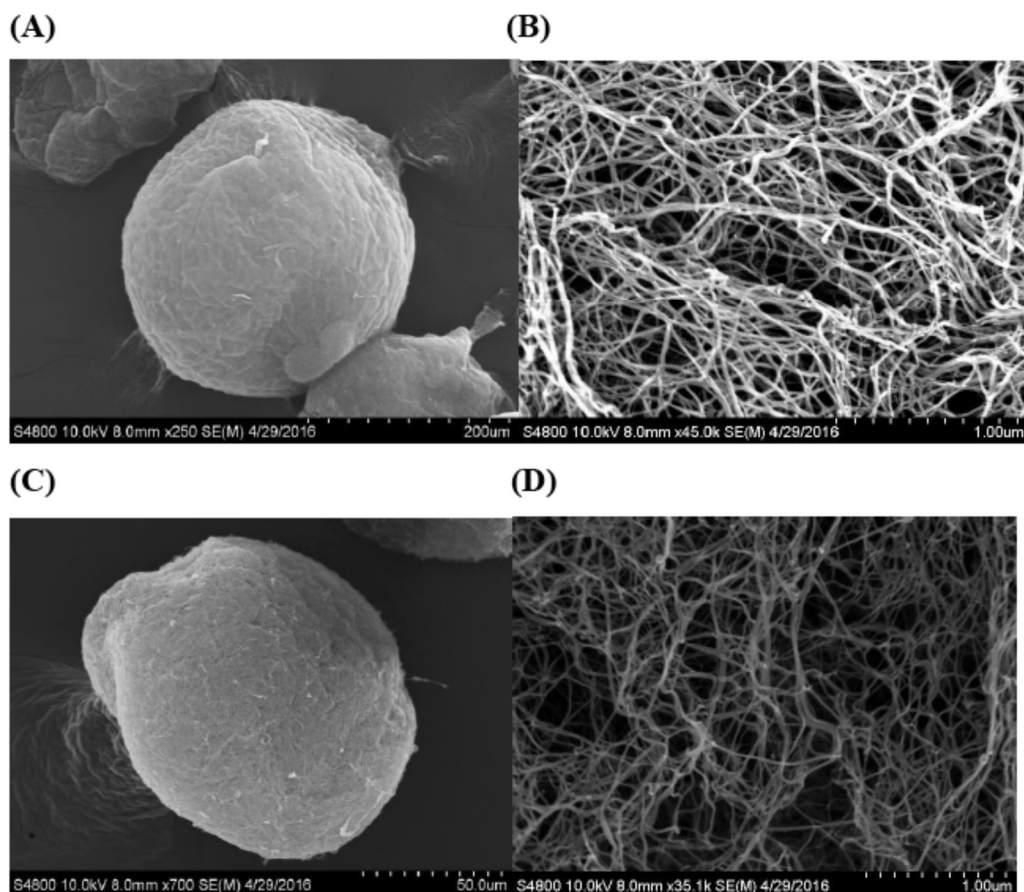


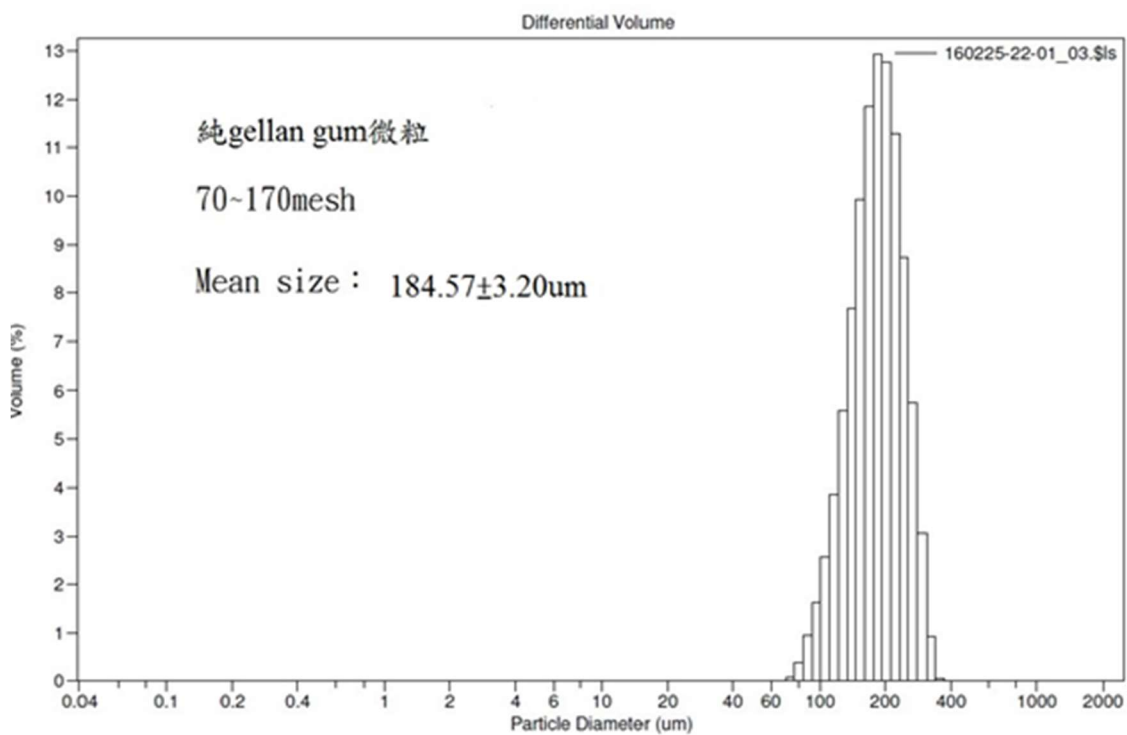
圖 28A-D. 純 gellan gum 微粒於 SEM 下的外觀型態和表面結構。

#### 4.20 gellan gum 微粒粒徑分析圖

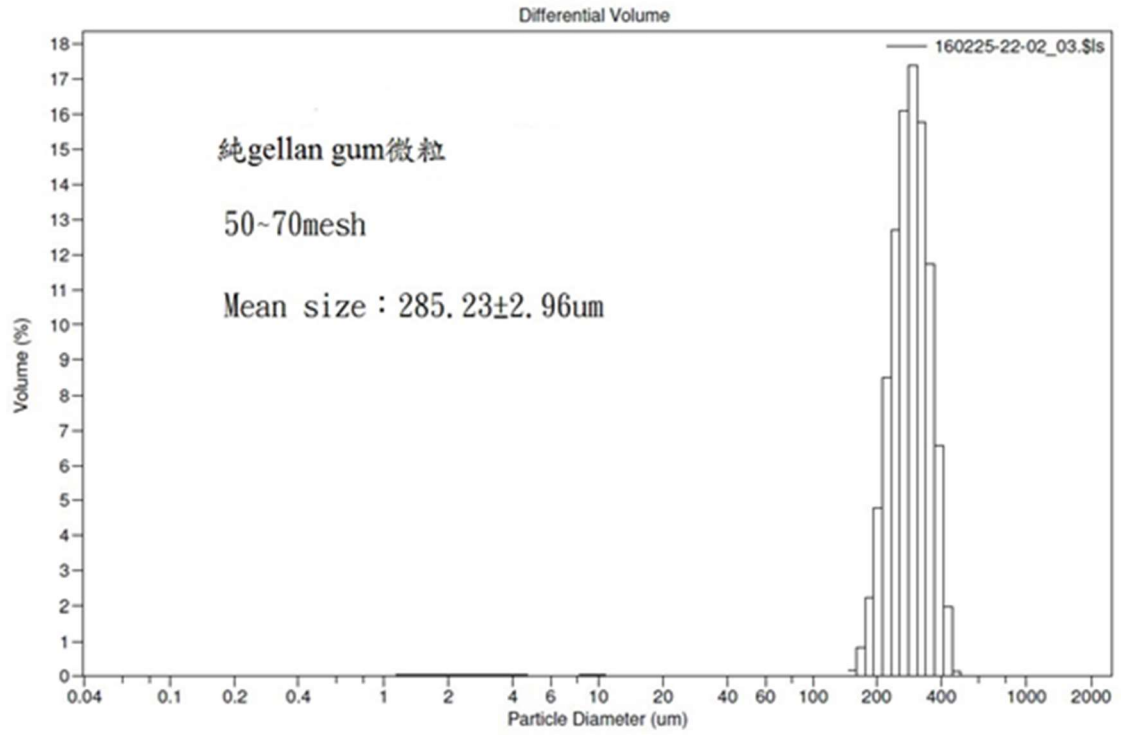
將 0.3% 的 gellan gum 溶液於 400rpm 下攪拌 1 小時又 20 分鐘，之後再透過五種不同 mesh 值的篩網依序為 25、40、50、70、170 由大到小來進行過篩，再將過篩好的四組樣品送至台灣大學化工系粉粒體實驗室進行分析。每個 mesh 範圍均有三重複的測量值，平均過後即可知道在不同 mesh 範圍下所代表的尺寸大小，如此即可選取欲進行栓塞的微粒尺寸（如表 3）。圖 29A 為 70~170mesh 範圍，將三重複所得的值平均後得  $184.57 \pm 3.20 \mu\text{m}$ ；圖 29B 為 50~70mesh 範圍，將三重複所得的值平均後得  $285.23 \pm 2.96 \mu\text{m}$ ；圖 29C 為 40~50mesh 範圍，將三重複所得的值平均後得  $388.80 \pm 1.56 \mu\text{m}$ ；圖 29D 則為 25~40mesh 範圍，將三重複所得的值平均後得  $481.57 \pm 22.40 \mu\text{m}$ ，平均每個範圍的粒徑大小均差  $100 \mu\text{m}$ ，且粒徑分析所測得的值和四個不同 mesh 篩網範圍亦有相對應。

表 3. Gellan gum 微粒+HH/PH-DOX 奈米顆粒五組尺寸範圍對應的三重複數值及其平均值±S.D 值。

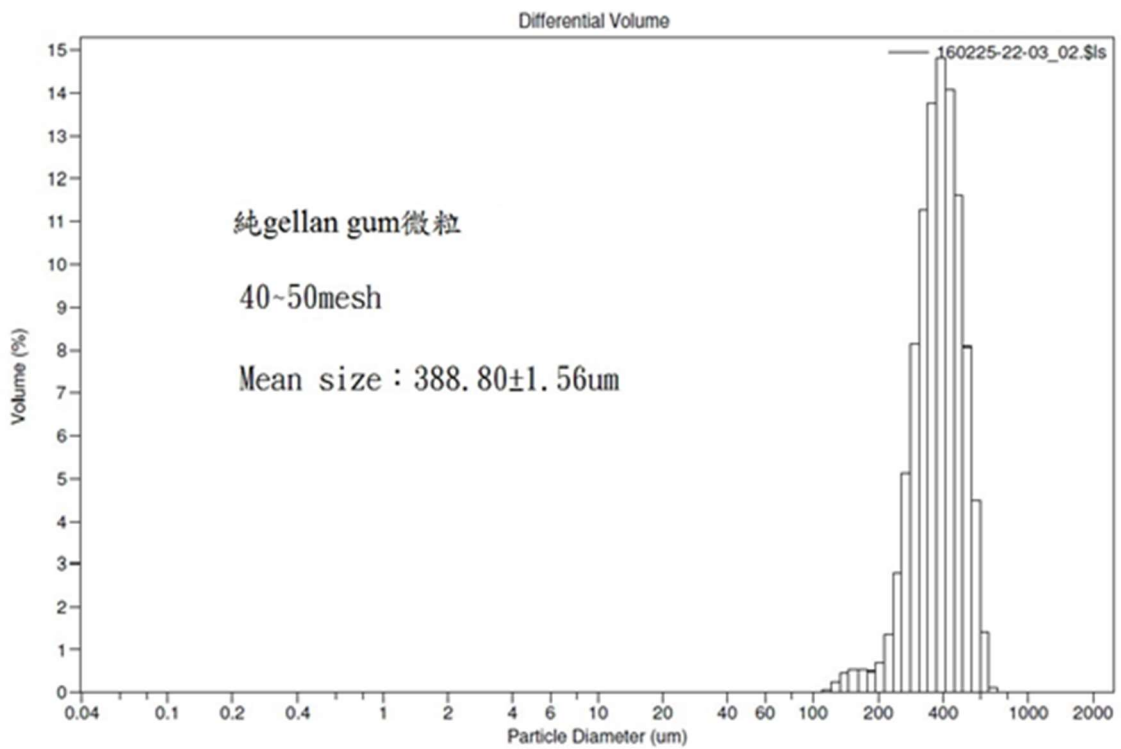
/um	70~170mesh	50~70mesh	40~50mesh	25~40mesh
run1	244.3	364	464.1	454.7
run2	246	367.5	498.5	641.8
run3	238.4	358.1	424.9	356.9
Mean±S.D	242.9±4.0	363.2±4.8	462.5±36.8	484.5±144.8



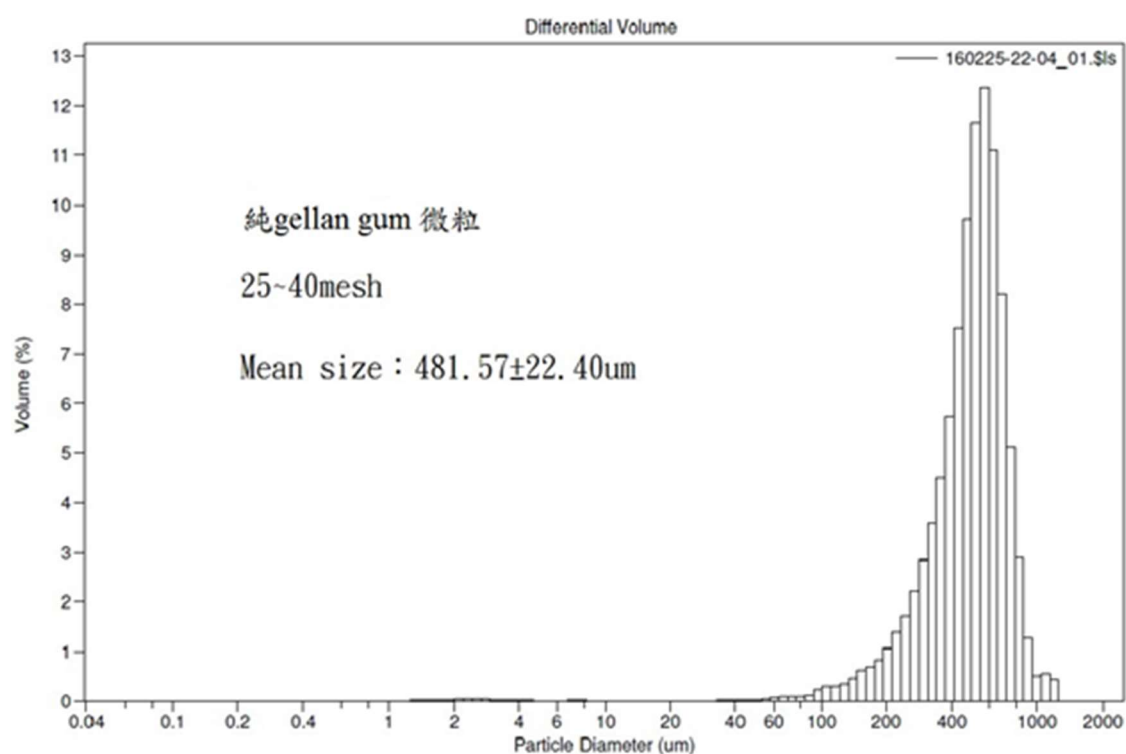
(A)



(B)



(C)



(D)

圖 29A-D. 純 gellan gum 微粒粒徑分布圖。

#### 4.21. Gellan gum 微粒包覆 HH/PH-DOX 奈米顆粒之掃描式電子顯微鏡下的外觀型態和表面結構

將 0.3% 的 gellan gum 溶液加入 0.04g 的 HH/PH-DOX 奈米顆粒粉末，於 400rpm 下攪拌 3 小時又 10 分鐘，並前後加入兩次 2% 氯化鈣溶液，透過帶正二價陽離子的幫助，使 gellan gum 多醣體固定形成微粒狀。圖 30A 和 30C 為包覆 HH/PH-DOX 的 gellan gum 微粒於掃描式電子顯微鏡下的外觀型態，圖 30A 和圖 30C 皆為 110 倍下的視野，且透過 scale bar 粗略得知粒徑約為 700-750 $\mu$ m 和 500 $\mu$ m 左右。圖 30B 和 30D 呈現包覆 HH/PH-DOX 的 gellan gum 微粒之表面結構，無論是在 20k 倍還是 40k 倍皆呈現纖維狀，並且相互交織的纖維產生了大小不一的孔洞。如此可以得知 HH/PH-DOX 奈米顆粒的加入，不會影響 gellan gum 微粒表面的纖維狀結構。

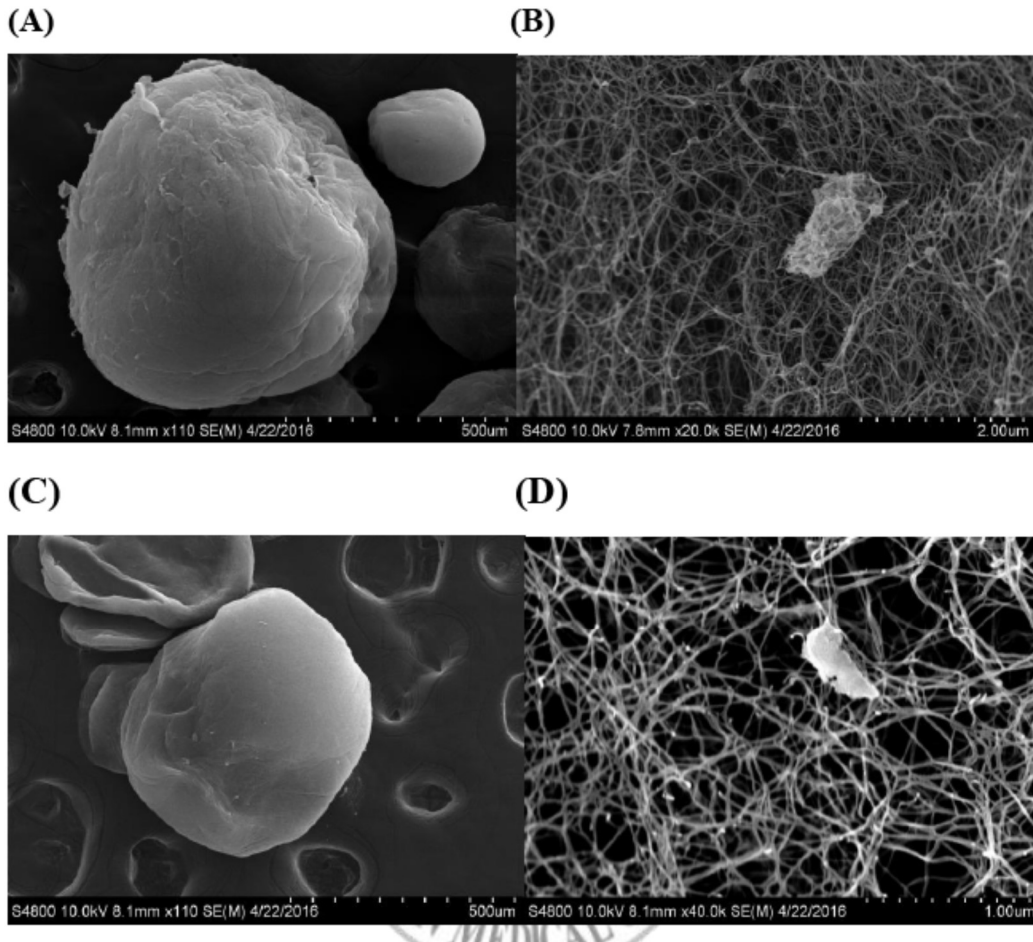
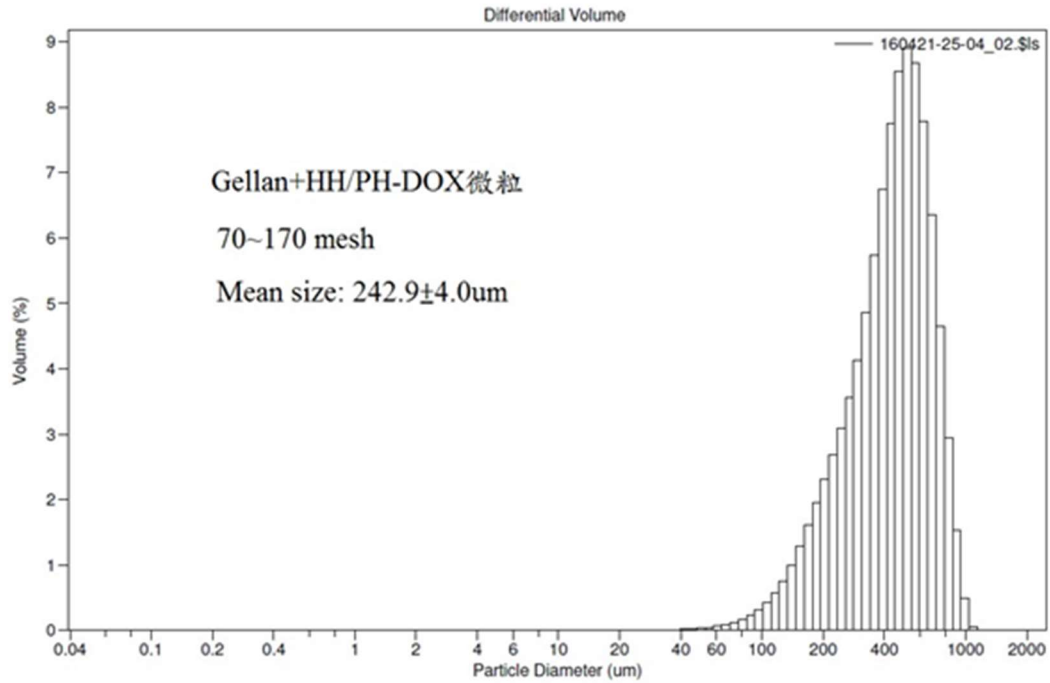


圖 30 A-D. 包覆 HH/PH-DOX 奈米顆粒的 gellan gum 微粒於 SEM 下的外部型態和表面結構。

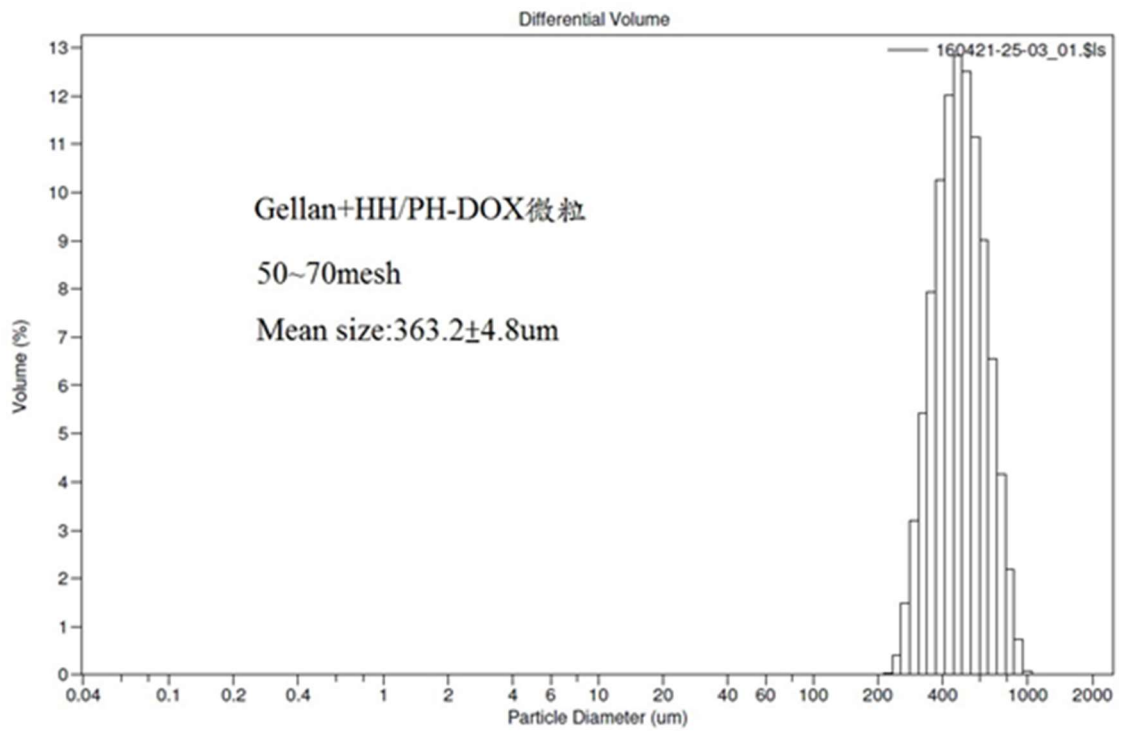
#### 4.22 粒徑分析

將 0.3% 的 gellan gum 溶液加入 0.04g 的 HH/PH-DOX 奈米顆粒粉末，於 400rpm 下攪拌 3 小時又 10 分鐘，並前後加入兩次 2% 氯化鈣溶液，透過帶正二價陽離子的幫助，使 gellan gum 多醣體固定形成微粒狀。之後再透過五種不同 mesh 值的篩網依序為 25、40、50、70、170 由大到小來進行過篩，再將過篩好的四組樣品送至台灣大學化工系粉粒體實驗室進行分析。每個 mesh 範圍均有三重複的測量值，平均過後即可知道在不同 mesh 範圍下所代表的尺寸大小，如此即可選取欲進行栓塞的微粒尺寸（如表 3）。圖 31A 為 70~170mesh 範圍，將三重複所得的值平均後得  $242.9 \pm 4.0 \mu\text{m}$ ；圖 31B 為 50~70mesh 範圍，將三重複所得的值平均後得  $363.2 \pm 4.8 \mu\text{m}$ ；圖 31C 為 40~50mesh 範圍，將三重複所得的值平均後得  $462.5 \pm 36.8 \mu\text{m}$ ；圖 31D 則為 25~40mesh 範圍，將三重複所得的值平均後得

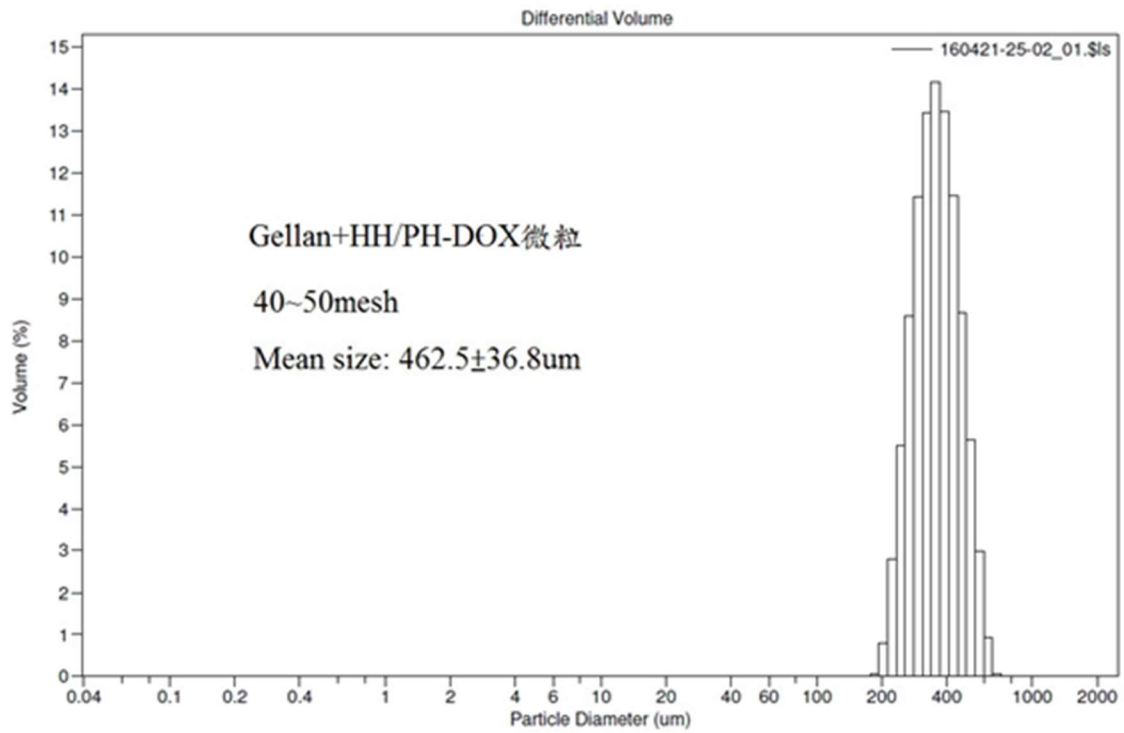
484.5±144.8μm，平均每個範圍的粒徑大小均差 100μm，且粒徑分析所測得的值和四個不同 mesh 篩網範圍亦有相對應。



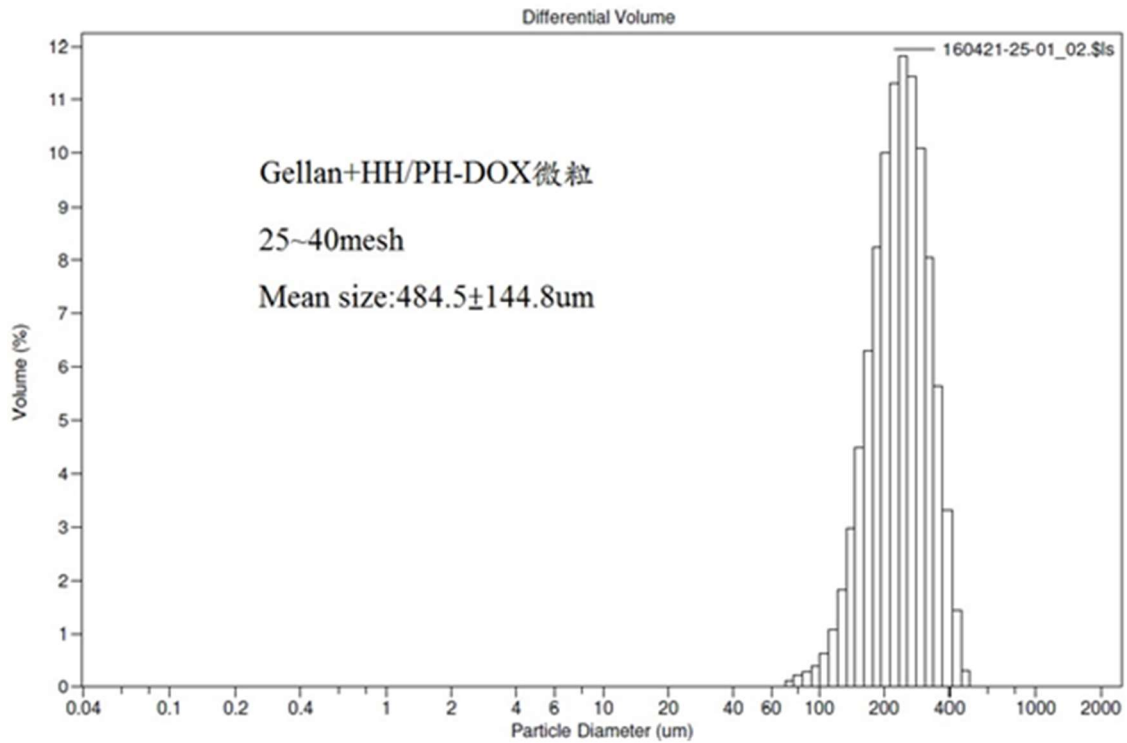
(A)



(B)



(C)



(D)

圖 31 A-D. 包覆 HH/PH-DOX 奈米顆粒的 gellan gum 微粒粒徑分布圖。



#### 4.23 Gellan gum 微粒包覆 HH/PH-DOX 體外藥物釋放模擬

##### 繪製 Doxorubicin 的標準曲線

本研究將 0.075mg 的阿黴素使用 PBS 序列稀釋，透過 451nm 波長將已知的 6 個濃度( $75\times 10^{-6}$ 、 $37.5\times 10^{-6}$ 、 $18.75\times 10^{-6}$ 、 $9.375\times 10^{-6}$ 、 $4.6875\times 10^{-6}$ 、 $2.34375\times 10^{-6}$ ) 測出吸光值，然後再利用線性回歸做出標準曲線（如圖 32），待藥物釋放所測得的吸光值代入求得實際 Doxorubicin 釋放量。

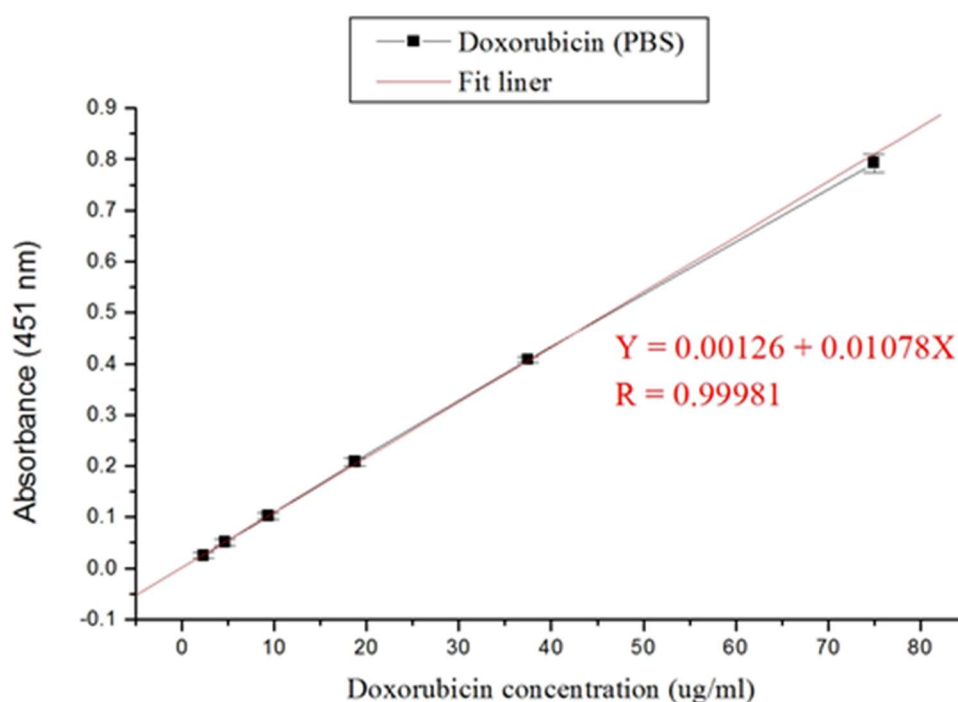


圖 32. Doxorubicin (451nm) 之標準曲線圖。

#### 4.24 體外藥物釋放曲線圖

如圖 33 所示，藍色曲線為平均 242um 大小的微粒（屬 70~170mesh 範圍）；紅色曲線為平均 363um 大小的微粒（屬 50~70mesh 範圍）；綠色曲線為平均 462um 大小的微粒（屬 40~50mesh 範圍）。由於三組尺寸的微粒總克數各不相同，因此將 Doxorubicin 的累計釋放量進行標準化後，依序算出值為 7.3 $\mu$ g、2.7 $\mu$ g、1.7 $\mu$ g，得到了（1）相同重量的 gellan gum 微粒，粒徑越小，表面積越大，因此造成 Doxorubicin 的釋放速率越快（2）gellan gum 微粒粒徑越小，吸水後膨潤效應越明顯，造成 Doxorubicin 的釋放速率越高。此外，在實驗方法 2-8（動物模型栓

塞建立) 中，我們使用粒徑約 242 $\mu\text{m}$  尺寸的微粒進行栓塞，因此藥物釋放 model 即取 242、363、462 $\mu\text{m}$ ，相近的尺寸進行分析。

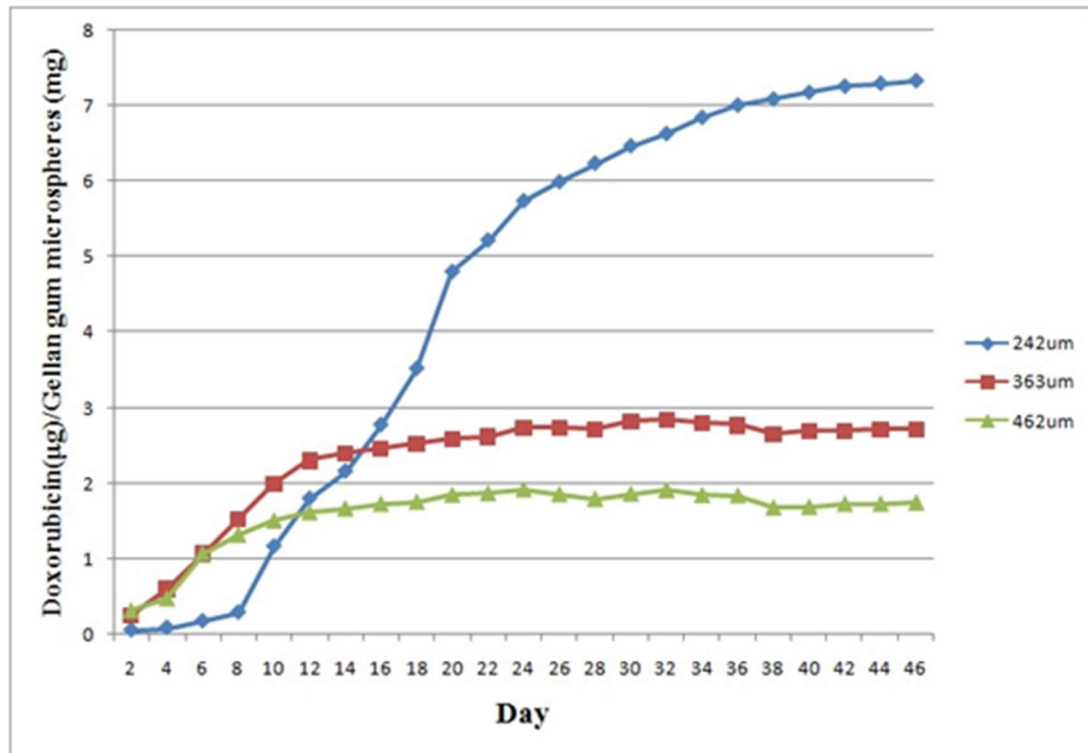


圖 33 三種大小的 gellan+HH/PH-DOX 微粒藥物釋放曲線圖。

#### 4.25 藥物對肝癌細胞的存活率

檢測三種大小微粒體外釋放的胺化石墨烯積濃度對細胞毒殺能力。根據圖 34 的結果可以得知，55.2  $\mu\text{g/ml}$  的胺化石墨烯在第一、二天都和控制組有非常顯著的差異；27.15  $\mu\text{g/ml}$  的胺化石墨烯在第二天時有非常顯著的差異；74.94  $\mu\text{g/ml}$  的胺化石墨烯在第一、二天有非常顯著的差異。27.15  $\mu\text{g/ml}$  的胺化石墨烯在第一天是沒有差異，第二天有差異，代表低劑量的濃度需要時間的累積，根據 C. S. Park 等人的研究，他們使用 A549 做氧化石墨烯、十二烷氧化石墨烯、還原型氧化石墨烯和十二烷基硫酸鈉石墨烯氧化物的濃度依賴性細胞毒性，顯示濃度 3-25  $\mu\text{g/ml}$  會產生溫和的細胞毒性，而 50-400  $\mu\text{g/ml}$  則是產生劇烈的細胞毒性 (Park et al., 2015)，本實驗使用的 27.15  $\mu\text{g/ml}$  介於其溫和和劇烈細胞毒性的濃度，而 55.2  $\mu\text{g/ml}$  和 74.94  $\mu\text{g/ml}$  濃度位於其劇烈細胞毒性的濃度，雖然使用的細胞株和石墨烯的修飾不相同，但做出來的結果與本實驗相似。

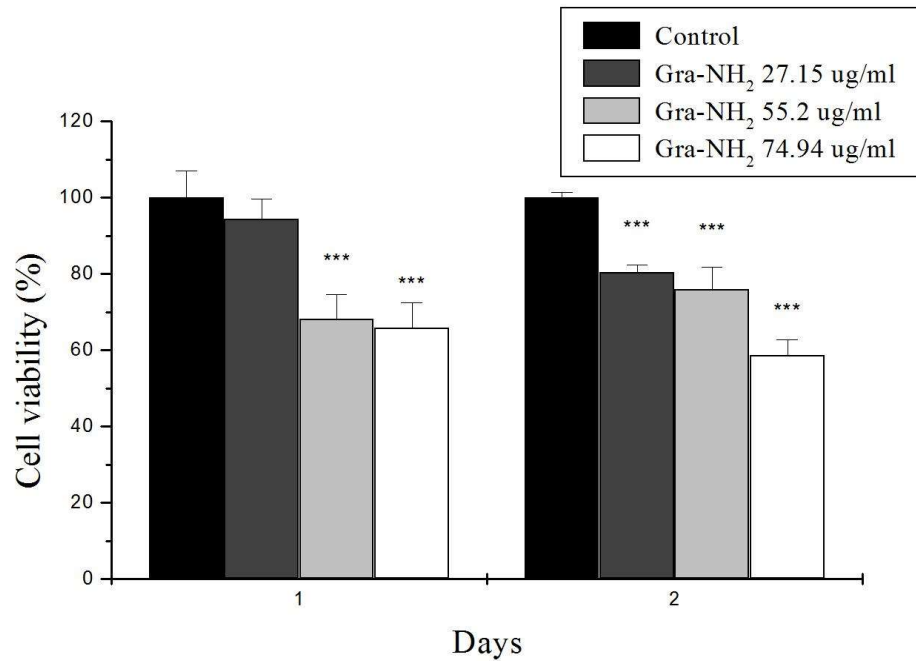


圖 34、胺化石墨烯對肝癌細胞的存活率。使用 t-test 將控制組和實驗組做比較，\*\*\*表示非常顯著差異(p<0.001)。

#### 4.26 流式細胞儀對肝癌細胞的細胞凋亡

使用流式細胞儀的 Annexin V/PI 來評估體外釋放累積濃度的阿黴素和胺化石墨烯誘導肝癌細胞的細胞凋亡。這邊選用三種大小的微粒釋放量來做比較，圖 35(A)展現用流式細胞儀看阿黴素和胺化石墨烯對肝癌細胞的細胞凋亡狀態，根據圖 35(B)顯示，1.57  $\mu\text{M}$  的阿黴素和控制組有顯著差異，而 2.35  $\mu\text{M}$  和 3.17  $\mu\text{M}$  的阿黴素則有非常顯著差異，根據圖 35(C)顯示 55.2  $\mu\text{g/ml}$  和 74.94  $\mu\text{g/ml}$  的胺化石墨烯和控制組有顯著差異，根據此結果顯示，從微粒中體外釋放出的阿黴素和胺化石墨烯累積濃度中，三種阿黴素和 55.2  $\mu\text{g/ml}$  和 74.94  $\mu\text{g/ml}$  的胺化石墨烯會促進肝癌細胞走向細胞凋亡。

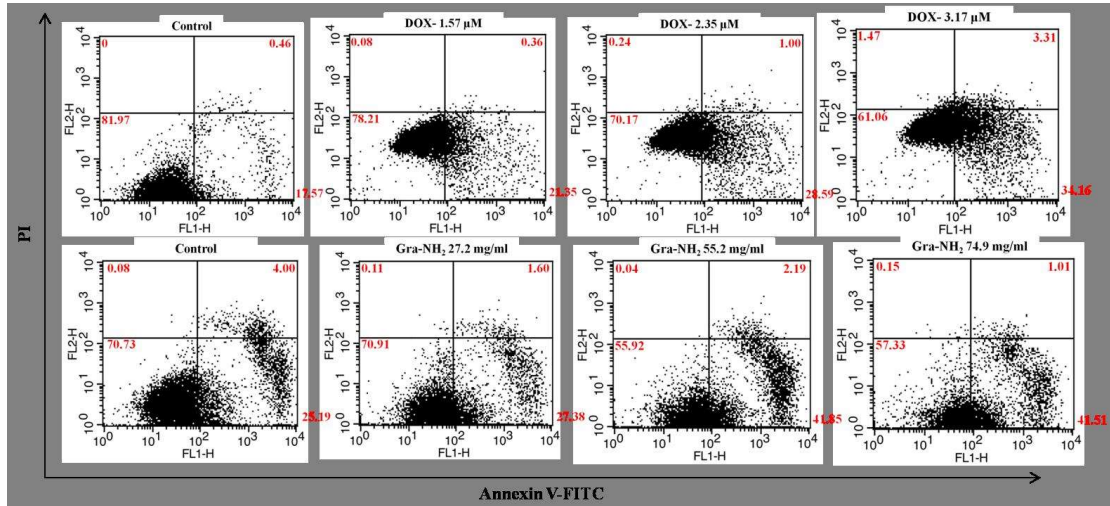


圖 35(A)、阿黴素和胺化石墨烯對肝癌細胞凋亡的流式細胞儀圖。使用 Annexin V 和 PI 來看細胞凋亡狀態，上排為三種阿黴素給予肝癌細胞一天後的原始結果，下排為三種胺化石墨烯給予肝癌細胞一天後的原始結果。

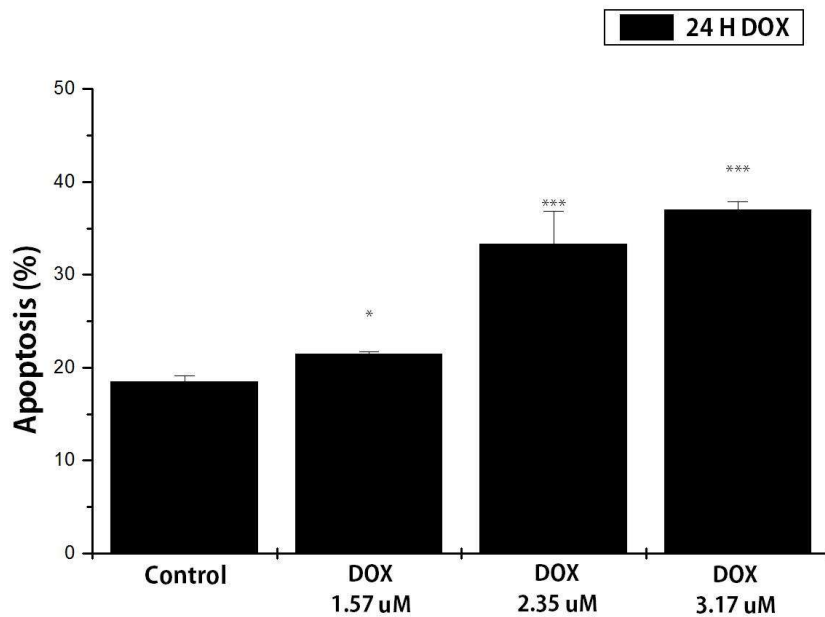


圖 35(B)、阿黴素對肝癌細胞細胞凋亡的流式細胞儀長條圖。用三種不同濃度的阿黴素，給予肝癌細胞一天後上流式細胞儀的長條圖。使用 t-test 將控制組和實驗組做比較，\*表示顯著差異( $p < 0.05$ )，\*\*\*表示非常顯著差異( $p < 0.001$ )。

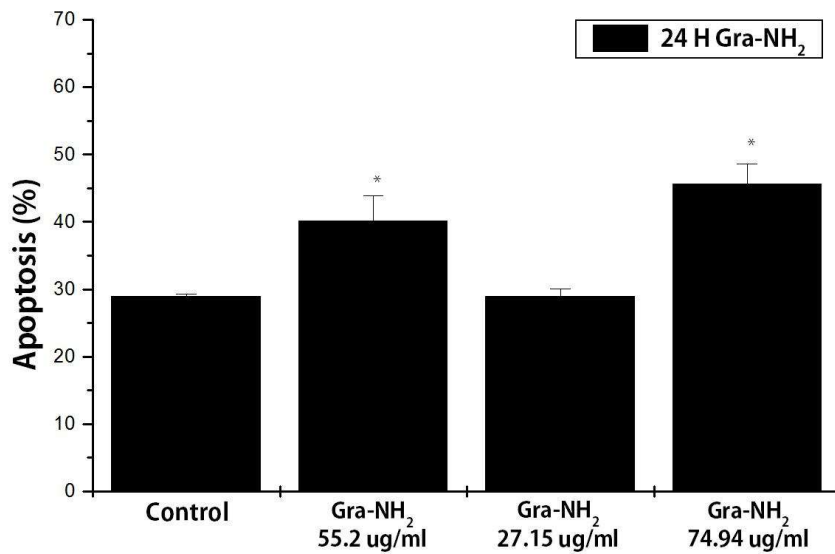


圖 35(C)、胺化石墨烯對肝癌細胞細胞凋亡的流式細胞儀長條圖。用三種不同濃度的胺化石墨烯，給予肝癌細胞一天後上流式細胞儀的長條圖。使用 t-test 將控制組和實驗組做比較，\*表示顯著差異( $p < 0.05$ )。

#### 4.27 動物模型栓塞情況分析

為了方便研究結蘭膠微粒在體內的栓塞功效，本研究使用兔耳作為栓塞模式來評估此材料，結果如圖 36。從圖 36A 可以看到主動脈施打栓塞劑之處，遠端微血管正常且被毛覆蓋 (Day0)。但是，栓塞後第 4 天可以發現，相較於左耳右耳末端血流已發生阻塞，不復可見 (圖 36B)。由於觀看第 4 天結果時，兔毛遮蓋住微血管的部分，讓控制組 (左耳) 和實驗組 (右耳) 的差異性連帶受到影響，因此第八天將毛剃除後，右耳可明顯看到有缺血性壞死、黑端的現象；而左耳無論是主動脈血管還是末端微血管，都相當清楚 (圖 36C)。來到第 12 天，發現右耳的黑端處已明顯萎縮，左耳的微血管依舊清晰細微且尾端可以伸展開來，任意凹折 (圖 36D)。因此本栓塞結果表明，結蘭膠多醣體製備出的微粒可以實現栓塞的功效，可作為潛在的栓塞劑。

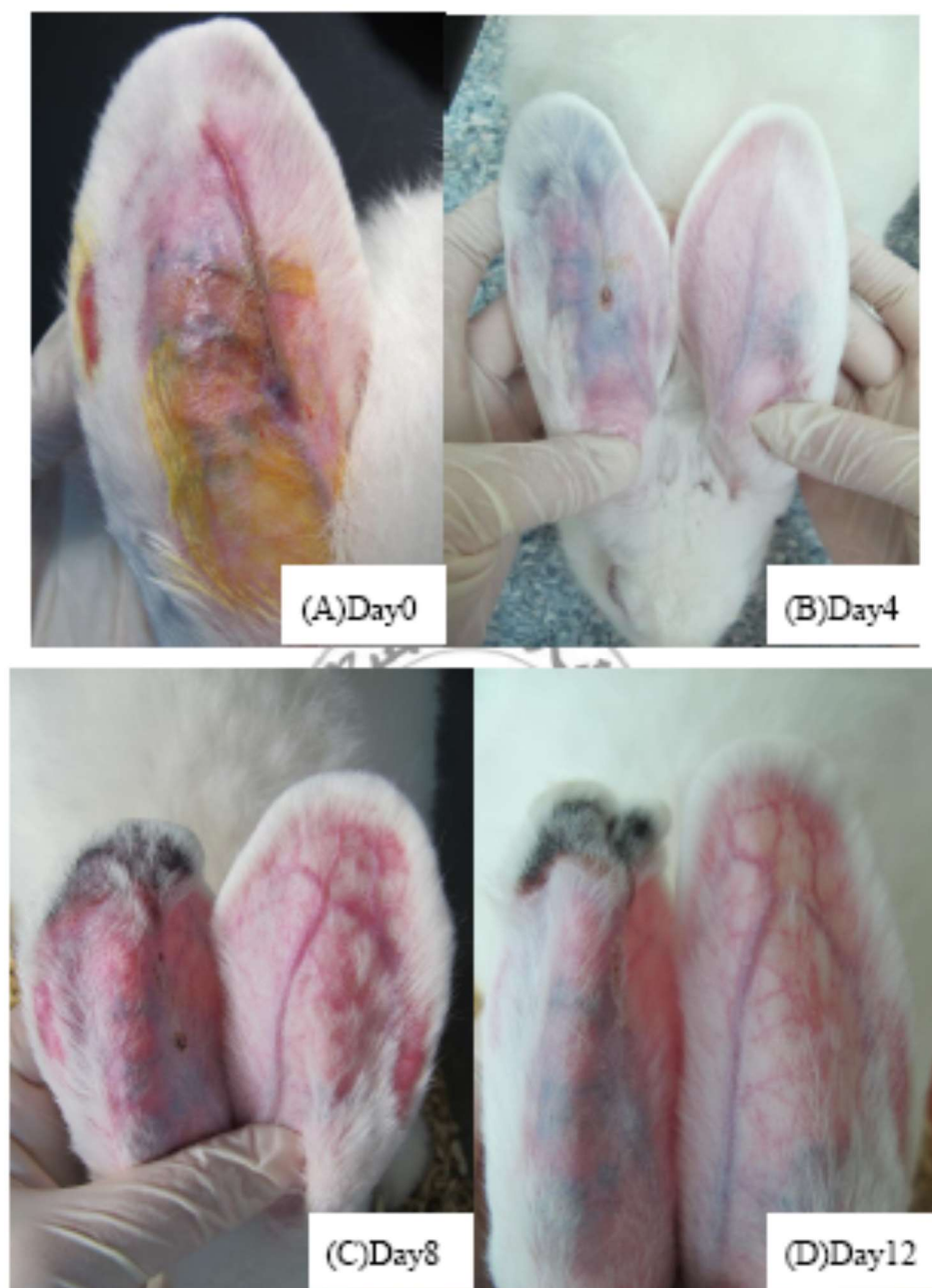


圖 36A-D. 兔耳栓塞之 A)0、B)4、C)8、D)12 天的情形，右耳為控制組；左耳為施打 0.5ml 甘油（含 3.0mg 的  $242.9 \pm 4.0 \mu\text{m}$  純 gellan 微粒）。

## 五、參考文獻

1. 劉鐘軒，蔡正中，陳海雄，肝癌的診斷及治療最新發展，內科學誌第24期，2013年，頁85-94。
2. 姜厚任，Novel gene delivery vectors based on diblock copolymers of poly(2-ethyl-2-oxazoline) and linear polyethylenimine，<https://ir.nctu.edu.tw/handle/11536/76838> (2004)
3. 陳雨儂，Development of targeted nanodelivery multiple recognition system for enhancement endocytosis and programmable intracellular retention time，<http://ir.ncnu.edu.tw/handle/310010000/3475> (2013)
4. 楊國明，藥物釋放之親疏水性乙基纖維素/羥丙基纖維素摻合微粒的製備與其藥物釋放之研究，(2006)。
5. 薛敬和，生命科學與工程《第二版》，新竹，百晴文化科技出版股份有限公司，頁375-385，2012。
6. A.Aguayo, Y.Z. Patt.Nonsurgical treatment of hepatocellular carcinoma. Semin Onco 128:503-513,2001.
7. A.A. Patel, J.A. Solomon, M.C. Soulen. Pharmaceuticals for intra-arterial therapy. Semin Intervent Radiol 22:130-138,2005.
8. Anatoly N. Lukyanov, Tamer A. Elbayoumi, Ananthsrinivas R. Chakilam, Vladimir P.Torchilin.Tumor-targeted liposomes: doxorubicin-loaded long-circulating liposomes modified with anti-cancer antibody. Journal of Controlled Release 100:135-144,2004.
9. Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C., Seed, B. Cell 61:1303–1313,1990.
10. Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, Spalla C. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. Biotechnol Bioeng. 11:1101-10,1969.
11. A. Kogan, N. Garti, Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. Adv. Colloid Interface 2006; 369-385.
12. A. Nokhodchi, S. Raja, P. Patel et al., The Role of Oral Controlled Release Matrix Tablets in Drug Delivery Systems. BioImpacts, 2012; 175-187.
13. B. Brime, M. Moreno, G. Frutos et al. Amphotericin B in oil-water lecithin-based

- microemulsions: formulation and toxicity evaluation. *J. Pharma.* 2002; 1178-1185.
14. B.P. Shashi, S. Hanish. Role of transcatheter intra-arterial therapies in hepatocellular carcinoma. *J Clin Exp Hepatol* 2014; 1–10.
  15. Behzad Behnam, Wayne T. Shier, Azadeh Hashem Nia, Khalil Abnous, Mohammad Ramezani. Non-covalent functionalization of single-walled carbon nanotubes with modified polyethyleneimines for efficient gene delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 454:204-215, 2013.
  16. C. Oerlemans, P.R. Seevinck, G.H. Maat, et al. Alginate–lanthanide microspheres for MRI-guided embolotherapy. *Acta Biomater* 2013; 4681–4687.
  17. C. Solans, R. Pons, H. Kunieda, Overview of basic aspects of microemulsions. *Industrial Applications of Microemulsions*, 1997; 1-19.
  18. C. Solans, P. Izquierde, J. Nolla et al. Nanoemulsions. *Curr Opin. Colloid Interface* 2005; 102-110.
  19. C.-C. Chiu, J.-J. Wang, Y.-S. Chen, *et al.* Trends and predictors of outcomes after surgery for hepatocellular carcinoma: A nation wide population-based study in Taiwan. *EJSO* 41:1170-1178, 2015.
  20. Carlos Rodríguez de Lope, Silvia Tremosini, Alejandro Forner, María Reig, Jordi Bruix. Management of HCC. *Journal of Hepatology* S75–S87, 2012.
  21. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 348:1625–1638, 2003.
  22. Charlotte Tan MD, Hideko Tasaka MD, Kou-Ping Yu MD, M. Lois, Murphy MD, David A. Karnofsky MD. Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer* 20:333-353, 1967.
  23. C. Senthil Kumara, M.D. Rajac, D. Sathish Sundar, M. Gover Antoniraj, K. Ruckmani. Hyaluronic acid co-functionalized gold nanoparticle complex for the targeted delivery of metformin in the treatment of liver cancer (HepG2 cells). *Carbohydrate Polymers* 128:63-74, 2015.
  24. Costa, P., & Sousa Lobo, J. M. Modeling and comparison of dissolution



- profiles. *Eur J Pharm Sci* 13:123-133,2001.
25. D.C. Cui, W.L. Lu, E.A. Sa, et al. Poly(acrylic acid) microspheres loaded with lidocaine: preparation and characterization for arterial embolization. *Int J Clin Pharm* 2012; 527– 535.
  26. D.J. McClements, Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*.2011; 2297-2316.
  27. E. Bouyer, G. Mekhloufi, V. Rosilio et al. Protein, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? *International Journal of Pharmaceutics* 2012; 359-378.
  28. E. U. Kathryn, M. C. Scott, S. L. Robert et al. Polymeric Systems for Controlled Drug Release. *Chem*. 1999; 3181-3198.
  29. Eliaz, R.E., Szoka F.C., Jr. Liposome-encapsulated doxorubicin targeted to CD44: A strategy to kill CD44-overexpressing tumor cells. *CancerResearch* 61:2592-2601,2001.
  30. El-Serag HB, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of chronic liverdisease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;126:460–468.
  31. F. A. Fornari, J. K. Randolph, J. C. Yalowich, et al. Interference by Doxorubicin with DNA Unwinding in MCF-7 Breast Tumor Cells. *MOLECULAR PHARMACOLOGY* 1994; 649-656.
  32. F. Fang, L. Kong, J. Huang et al. Removal of cobalt ions from aqueous solution by an aminationgraphene oxide nanocomposite. *Journal of Hazardous Materials*, 2014; 1-10.
  33. F.D. Battistini, J. Flores-Martin, M.E. Olivera, S. Genti-Raimondi, R.H. Manzo. Hyaluronan as drug carrier. The in vitro efficacy and selectivity of Hyaluronan–Doxorubicin complexes to affect the viability of overexpressing CD44 receptor cells. *European Journal ofPharmaceutical* 65:122–129, 2014.
  34. Forrest, E. K., Heidelberger, M., Dawson, M. H. *J Biol Chem*118: 61–69, 1937.
  35. Guy Zuber, Emmanuel Dauty, Marc Nothisen, Pascale Belguise, Jean-Paul Behr. Towards synthetic viruses. *Advanced Drug Delivery Reviews* 52:245-253,2001.

36. Ge Jiang, Kitae Park, Jiseok Kim *et al.* Hyaluronic Acid–Polyethyleneimine Conjugate for Target Specific Intracellular Delivery of siRNA. *Biopolymers* 89:635-642,2008.
37. H. J. Chen, Z. H. Zhang, R. Cai *et al.* Molecularly imprinted electrochemical sensor based on amine group modified graphene covalently linked electrode for 4-nonylphenol detection. *Talanta* 2013; 222–227
38. H. Kim, D. Lee, J. Kim, *et al.* Photothermally triggered cytosolic drug delivery via endosome disruption using a functionalized reduced graphene oxide. *ACSNANO* 2013; 6735-6746.
39. H. S. Mahajan, S. G. Gattani. Nasal administration of ondansetron using a novel microspheres delivery system Part II: *ex vivo* and *in vivo* studies. *Pharm Dev Technol.* 2010; 653-657
40. H. Yan, X. Tao, Z. Yang *et al.* Effects of the oxidation degree of graphene oxide on the adsorption of methylene blue. *Journal of Hazardous Materials*, 2014; 191-198.
41. I. Capek, Degradation of Kinetically-stable o/w emulsion. *Adv. Colloid Interface* 2004; 125-155.
42. J. Chen, A.Y. Sheu, W Li, *et al.* Poly(lactide-co-glycolide) microspheres for MRI-monitored transcatheter delivery of sorafenib to liver tumors. *J Control Release* 2014; 10–17.
43. J.C Nault. Hepatologist pathogenesis of hepatocellular carcinoma according to aetiology. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2014; 937–947.
44. J.L. Grossiord, M. Stambouli, Potentialities of W/O/W multiple emulsions in drug delivery and detoxification. *Multiple Emulsions Technology and Applications.* 2008 ; 209-234.
45. J. P. Ley, Masking bitter taste by molecules. *Chemosens.*2008; 58-77.
46. Jean-Marc Idéa, Boris Guiub. Use of Lipiodol as a drug-delivery system for transcatheter arterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma: A review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 88 : 530–549, 2013.
47. Jean-Charles Nault, MD, Hepatologist. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma according to aetiology. *Best Practice & Research Clinical*

Gastroenterology 28:937-947, 2014.

48. Jin Woo Choi, Ju-Hwan Park, Song Yi Baek, Dae-Duk Kim, Hyo-Cheol Kim, Hyun-Jong Cho. Doxorubicin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared using the solid-in-oil-in-water method for the transarterial chemoembolization of a liver tumor. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 132:305-312, 2015.
49. Jing-Xiao Chen, Min Wang, Hui-Hui Tian, Jing-Hua Chen. Hyaluronic acid and polyethylenimine self-assembled polyion complexes as pH-sensitive drug carrier for cancer therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 134:81-87, 2015.
50. K.H. Ramteke, P.A. Dighe, A.R. Kharat et al., Mathematical Models of Drug Dissolution: A Review. *Sch. Acad. J. Pharm.* 2014; 388-396
51. K. Y. Tam, K. C. Leung, Y. J. Wang. Chemoembolization agents for cancer treatment. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 44 2011; 1–10
52. Kin Y. Tam, Ken Cham-Fai Leung, Yi-Xiang J. Wang. Chemoembolization agents for cancer treatment. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 44:1-10, 2011.
53. Ki Young Choi, Hong Yeol Yoon, Jong-Ho Kim *et al.* Smart Nanocarrier Based on PEGylated Hyaluronic Acid for Cancer Therapy. *ACS nano* 5:8591-8599, 2011
54. L. Weng, H.C. Le, R. Talaie, J. Golzarian. Bioresorbable hydrogel microspheres for transcatheter embolization: preparation and in vitro evaluation. *J Vasc Interv Radiol* 2011; 1464-1470.
55. M. Ahearne, D. J. Kelly. A comparison of fibrin, agarose and gellan gum hydrogels as carriers of stem cells and growth factor delivery microspheres for cartilage regeneration. *Biomed Mater.* 2013.
56. M. Idéa, B. Guiu. Use of lipiodol as a drug-delivery system for transcatheter arterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma: A review. *Crit Rev Oncol/Hematol* 2013; 530–549.
57. M. Narkar, P. Sher, A. Pawar. Stomach-specific controlled release gellan beads of acid-soluble drug prepared by ionotropic gelation method. *AAPS PharmSci-Tech* 2010; 267–277.

58. M. Idéa, B. Guiu. Use of lipiodol as a drug-delivery system for transcatheter arterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma: A review. *Crit Rev Oncol/Hematol* 88:530–549, 2013.
59. M.R. Rekha, Chandra P. Sharma. Hemocompatible pullulan–polyethyleneimine conjugates for liver cell gene delivery: In vitro evaluation of cellular uptake, intracellular trafficking and transfection efficiency. *Acta Biomaterialia* 7 : 370-379, 2011.
60. N. A. Kshirsagar, P. C. Gokhale, S. K. Pandya, Liposomes as drug delivery system in leishmaniasis. *J Assoc Physicians India* 1995; 46-48.
61. O. Novac, G. Lisa, L. Profire, et al. Antibacterial quaternized gellan gum based particles for controlled release of ciprofloxacin with potential dermal applications. *Materials Science and Engineering C* 35 2014; 291–299.
62. Omar Mezghrani, Yue Tang, Xue Ke. Hepatocellular carcinoma dually-targeted nanoparticles for reduction triggered intracellular delivery of doxorubicin. *International Journal of Pharmaceutics* 478:553-568, 2015.
63. P. Costa, J. M. Sousa Lobo, Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm* 2001; 123-133.
64. Patel AA, Soulen MC. Agents for small vessel/tissue embolization and transcatheter tissue ablation: current status and the future. In: Baum SA, Pentecost MJ, eds. *Interventional Radiology*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 169–175, 2005.
65. R. Dhanasekaran, S. Bandoh, L. R. Roberts. Molecular aetiology of hepatocellular carcinoma and impact of therapeutic advances. *F1000Research (F1000 Faculty Rev)* 2016; 879.
66. S.J. Chang, S.M Kuo, W.T Liu, et al. Gellan Gum Films for Effective Guided Bone Regeneration. *J Med Bioeng* 2009; 99-103.
67. Sunil Mahor, Biraja C. Dash, Stephen O'Connor, Abhay Pandit. Mannosylated Polyethyleneimine-Hyaluronan Nanohybrids for Targeted Gene Delivery to Macrophage-Like Cell Lines. *Bioconjugate Chem* 23:1138–1148, 2012.
68. S. Rivankar An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J Can Res Ther* 2014; 853-858.

69. S. S. Bhattacharya, S. Banerjee, P. Chowdhury et al. Tranexamic acid loaded gellan gum-based polymeric microbeads for controlled release: In vitro and in vivo assessment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013; 483–491.
70. S. Zorawar. Applications and toxicity of graphene family nanomaterials and their composites. *Nanotechnology, Science and Applications* 2016; 15–28.
71. T.G. Mason, J.N. Wilking, K. Meleson, et al. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Condensed Matter*. 2006 ; 635-666.
72. T. J. Wooster, M. Golding, P. Sanguansri, Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability. *Langmuir* 2008; 12758-12765.
73. T. Luedde, N. Kaplowitz, R.F. Schwabe. Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance. *Gastroenterology* 2014; 765–783.
74. T. Osmałek, A. Froelich, S. Tasarek. Application of gellan gum in pharmacy and medicine. *International Journal of Pharmaceutics* 466 2014; 328–340.
75. T. W. Hansen, A. T. Delariva, S. R. Challa et al. Sintering of Catalytic Nanoparticles: Particle Migration or Ostwald Ripening? *ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH*, 2013; 1720–1730.
76. T. Zhou, X. Zhou, D. Xing. Controlled release of doxorubicin from graphene oxide based charge-reversal nanocarrier. *Biomaterials* 2014; 4185-4194.
77. Tomasz Osmałek, Anna Froelich, Sylwia Tasarek. Application of gellan gum in pharmacy and medicine. *International Journal of Pharmaceutics* 466:328-340, 2014.
78. W.T. Godbey, Kenneth K. Wu, Antonios G. Mikos. Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *Journal of Controlled Release* 60 : 149-160, 1999.
79. X. Zhou, M. Kong, X.J. Cheng, et al. In vitro and in vivo evaluation of chitosan microspheres with different deacetylation degree as potential embolic agent. *Carbohydr Polym* 2014; 304–313.
80. Xueyan Cao, Lei Tao, Shihui Wen, Wenxiu Hou, Xiangyang Shi. Hyaluronic acid-modified multiwalled carbon nanotubes for targeted delivery of doxorubicin into cancer cells. *Carbohydrate Research* 405:70-77, 2015.
81. Xuan Zhou, Ming Kong, Xiao Jie Chenga *et al.* In vitro and in vivo evaluation of

chitosan microspheres with different deacetylation degree as potential embolic agent. *Carbohydrate Polymers* 113:304-313, 2014.

82. Y. J. Wang, T. D. Baere, et al. Transcatheter embolization therapy in liver cancer: an update of clinical evidences *Chin J Cancer Res* 2015; 96-121.
83. Y. Li, H. Yuana, A. Busschec, et al. Graphene microsheets enter cells through spontaneous membrane penetration at edge asperities and corner sites. *PANS* 2013; 12295-12300.

## 出席國際會議心得報告

計畫編號	MOST 104-2314-B-040 -003 -MY3		
計畫名稱	Gellan gum 微粒合併化療藥物、microRNA 作為標靶性肝癌動脈栓塞劑		
出國人員姓名	李明偉	服務機構及職稱	中山醫學大學
會議時間	107 年 7 月 18 日至 107 年 7 月 20 日	會議地點	葡萄牙
會議名稱	ANM2018 1. 14th International conference on Advanced Nanomaterials 2. 7th International conference on Advanced Graphene materials 3. 7th International conference on Hydrogen Energy 4. 5th International conference on Advanced Magnetic and Spintronics materials 5. 3rd International conference on Advanced polymer materials and Nanocomposites 6. 2nd International conference on Advanced Nanoelectronics and Organic light emitting diodes		
發表題目	Gellan gum/ graphene/doxorubicin microspheres as potential multifunctional embolic agent		

### 一、大會相關資訊

2018 ANM 國際會議於 7 月 18-20 於葡萄牙舉行，這個國際會議開辦於 2007 年，當時主辦機構是印度孟買的 Indian Institute of Technology。從 2014 年以後，因為整合了 6 個主要的學會，參加人數較多之故，就固定在葡萄牙舉辦。因為本人研究是關於石墨烯 graphene 在癌症治療之應用，正符合 ANM 當中的 7th

International conference on Advanced Graphene materials 會議的主題，因此前往與會。

## 二、論文發表

本次發表論文一篇，研究內容則是與獲科技部經費補助的研究主題一致。會議當天論文呈現的內容如下：

**GELLAN GUM/GRAPHENE/DOXORUBICIN MICROSPHERES AS POTENTIAL MULTIFUNCTIONAL EMBOLIC AGENT**  
**MING-WEI LEE\*, HONG-WEI CHENG**  
 DEPARTMENT OF MEDICAL LABORATORY AND BIOTECHNOLOGY CHUNG SHAN MEDICAL UNIVERSITY, TAIWAN

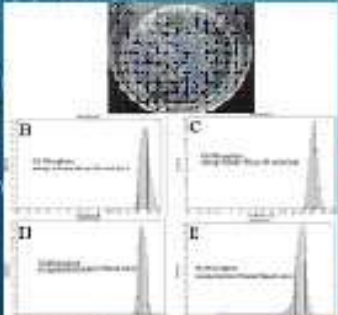
**Abstract**  
 Transcatheter chemoembolization (TACE) is the first-line treatment of present when liver cancer can't be cut, but no less the ideal embolic agent currently. In this study we prepared the chemoembolization microspheres (GG/Gra/DOX) composed of gellan gum (GG), graphene (Gra) and anticancer drugs (doxorubicin, DOX) by the emulsification process. In this system, gellan gum with good biocompatibility and suitable as the embolic agent for TACE, graphene with the function to combine with DOX and physically penetrate the cell membrane. The nano extra-modified graphene is formed by the graphene-oxide which is made by the Hummer's method, mixing the ferric chloride, glycol, sodium acetate and ethylenediamine with the high temperature and pressure. The size of nano Gra was 1564nm by the Laser Diffraction Particle Size Analyzer. The size of the microspheres (GG/Gra) were ranged from 200-400µm by the Laser Diffraction Particle Size Analyzer. The size of microspheres were affected by various gellan gum concentration. The scanning electron microscope found the surface of microspheres changed from smooth to reticular after adding the Gra. The delta-potential of Gra was positive electricity than GO and Gra mixed DOX was stable in the positive area. The cellular uptake test found that nano Gra could be uptake into HepG2 cells by endocytosis after co-incubation for 1h, 3hr, 6hr and 9hr. From these data, the GG/Gra/DOX microspheres have the potential as the chemoembolization agent in the future.

**Methods**  
 Gellan gum microspheres were made by an emulsification and coformulated crosslinking process. With the aim of controlling microspheres size through manipulation of process and formulation parameters, three different sets of experiments were conducted, within a single factor was varied while keeping the others constant. The aqueous gellan gum (0.34%, 0.44%, 0.54% w/v) solutions were prepared. Gellan gum microspheres were separated into different size fractions by sieving using 25-mesh (710µm), 40-mesh (425µm), 50-mesh (300µm) and 70-mesh (210µm) standard sieves.


The nano graphene (Gra) conjugated with anticancer drug doxorubicin (DOX) were synthesized. The gellan gum microspheres (GG) composed of Gra/DOX nanoparticles was fabricated by the emulsification process. The gellan gum microspheres based chemoembolization agent and Gra/DOX nanoparticles was characterized. Gra/DOX nanoparticles uptake by liver cancer cell (HepG2) was performed. The *in vivo* dynamic release behavior of DOX from the GG/Gra/DOX microspheres was analyzed.

**Result**  
 Preparation of gellan gum (GG) microspheres: The purpose of preparing gellan gum (GG) microspheres of varying sizes, the concentration of gellan gum was used as a parameter. Different concentrations of gellan gum (0.34%, 0.44%, 0.54% w/v) were mixed in 50 °C mineral oil (400ml) at 400 rpm for 10 min. Subsequently, 1.25% (w/v) calcium chloride solution (10 ml) and Span85 (1 ml) were added to the mixture and mixed for 1 h. Morphology and structure of the GG microspheres were shown in Fig 1 and Fig 2.

In this study we prepared the chemoembolization particles (GG/Gra/DOX) composed of gellan gum (GG), graphene and doxorubicin (DOX) by the emulsification. In this system, gellan gum with good biocompatibility and suitable as the embolic agent for TACE, graphene with the function to combine with DOX and physically penetrate the cell membrane. The nano extra-modified graphene (G-HH) is formed by the graphene-oxide (GO) which is made by the Hummer's method mixing the ferric chloride, glycol, sodium acetate and ethylenediamine with the high temperature and pressure. The size of nano G-HH was 1564nm by the Laser Diffraction Particle Size Analyzer (Fig 3). The size of the microspheres (GG/G-HH) were ranged from 200-400 µm by the Laser Diffraction Particle Size Analyzer. The size of microspheres were affected by various gellan gum concentrations. (Table 1) The delta-potential of Gra and DOX were -11.3 mV and -10.1 mV, respectively. The delta-potential of DOX-loaded Gra HH was 26.3 mV. The cellular uptake test found that nano Gra could be uptake into HepG2 cells by endocytosis after co-incubation for 1h, 3hr and 12h (Fig 4) From these data, the Gellan gum/gellan gum/graphene microspheres have the potential as the chemoembolization agent in the future.




**Fig. 1** Morphology of the GG microspheres: (A) 0.34% microspheres are distributed at size 25-mesh sieve (E); 40-mesh sieve (D); 50-mesh sieve (C); and 70-mesh sieve (A).



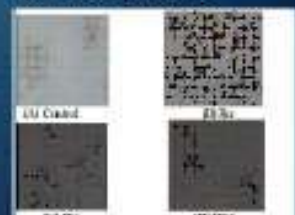
**Fig. 2** SEM images of surface morphology of Gellan gum microspheres: 0.34% (A) and 0.54% (C).

**Table 1** The preparation of different concentration of GG microspheres distribute in different size of the microspheres.

	0.34%	0.44%	0.54%	0.64%
0.34% GG	66.9%	74.9%	78.4%	81.4%
0.44% GG	61.6%	68.9%	74.6%	78.6%
0.54% GG	61.7%	65.6%	70.6%	74.6%



**Fig. 3** The size of G-HH



**Fig. 4** The image of HepG2 cells incubated with G-HH for 1, 3, 6 and 12h by microscope



### 三、與會心得

本次會議參與的人數相當多，會後的大合照如下圖：



本次大會將近有 400 位學者參與口頭報告或壁報展示，由於主題較多元，本人則是盡量選擇奈米、感測系統或石墨烯相關的主題聆聽和。當中有幾場演講特別引起我的興趣。7 月 18 號，講者 Victor LopezRichard，他們製備量子點作為晶體管，提升電感測器的靈敏度，對於檢驗方面的應用相當有前景。Evgeny Modin 則是製備奈米高分子，短鏈胜肽且利用胺基酸親疏水性基團以 self-assembly 的觀念建構奈米級的材料，因胺基酸的序列具有產生訊息傳遞的功能，因此藉由改變不同的胺基酸序列使得短鏈胜肽可有不同的用途，此類型的基材目前在組織工程上使用相當頻繁，像是促進血管增生、骨細胞增生，或是治療 Parkin's disease 等均有不錯的成果。不過，對於奈米高分子在細胞內引發的訊息傳遞機制並未有太多的解釋。其實這也是吾人目前的困擾，以工程的角度我們比較在乎的是生醫材料的可操控性和實用性，但對於材料和細胞間的交互作用，若以分子生物的觀點探究其作用機制，特別是材料影響基因表現的關係，仍有很多的研究需要持續進行。另外，Cristina Busuioc 團隊製備 Calcium Phosphate Ba-TiO<sub>3</sub> 作為硬骨的基質之一，Calcium Phosphate 用作骨組織工程的基材也已經行之多年，但藉由 Cristina Busuioc 等人的研究則是發現奈米化的 Calcium Phosphate 再修飾 Ba-TiO<sub>3</sub>，表面積放大效應對於骨細胞的活性有增強的效應，因此對骨組織工程的進展有很大的助益。Katerina Prouzova 團隊則是透過 top-down 的建構原理製備奈米有機粒子，他們的研究主要是在奈米粒子製程上的創新，大部分醫用奈米有機粒子較常使用 bottom-up 的方式，他們能製備有機奈米粒子其平均粒徑相當均質，是一項難度頗高的技術。

其實整個會議可發現到很多有趣的研究在世界各地進行，經過這一次的與會，各國研究者的努力成果相當令人雀躍和驚喜。奈米科技也因為有這些研究人員的加入，使得醫學科技和人類生活獲得更大的助益。不過，吾人在與會的這幾天也在思考，由於大陸的崛起，研究上的表現因為量大，研究素質較為參差不齊，相對影響華人在研究上的可信度。建議我們的科技部，應重視此問題並提出解決之道。

104年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：李明偉			計畫編號：104-2314-B-040-003-MY3			
計畫名稱：Gellan gum微粒合併化療藥物、microRNA作為標靶性肝癌動脈栓塞劑						
成果項目		量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)		
國內	學術性論文	期刊論文	1	篇	Yi-Nuan Wong, Ming-Wei Lee. Preparation and characterization of gellan gum film as a carrier of 5-Chloro-8- -hydroxy-7-iodoquinoline for oral cancer therapy. Chung Shan Medical Journal. 29, 17-26, 2018.	
		研討會論文	1		Effectiveness of endovascular embolization with a Gellan Gum-based embolic agent	
		專書	0	本		
		專書論文	0	章		
		技術報告	0	篇		
		其他	0	篇		
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	2	(1)申請案號106140189, 「栓塞微球及其製造方法」 (2)申請案號107111074, 「熱感式傷口敷料」
				已獲得		1
			新型/設計專利	0	件	
		商標權	0			
		營業秘密	0			
		積體電路電路布局權	0			
		著作權	0			
		品種權	0			
		其他	0			
技術移轉	件數	0	件			
	收入	0	千元			
國外	學術性論文	期刊論文	5	篇	計畫執行期間已發表期刊論文6篇, 尚有3篇撰寫中 (1)Ming Fang Hsu, Yen Sheng Tyan, Yu Chen Chien, Ming Wei Lee. Hyaluronic acid-based nano-sized drug carrier-containing Gellan gum microspheres as potential multifunctional embolic agent. Scientific Reports 8, 731-740,	

				<p>2018.</p> <p>(2)Wan Chi Tsai, Hui Fang Tsai, Yi Nuan Wong, Jui Yen Hong, Shwu Jen Chang, Ming Wei Lee. Preparation and characterization of gellan gum/glucosamine/clioquinol film as oral cancer treatment patch. Materials Science and Engineering C. 82, 317-322, 2018.</p> <p>(3)Yi-Nuan Wong, Ming-Wei Lee. Preparation and characterization of gellan gum film as a carrier of 5-Chloro-8- -hydroxy-7-iodoquinoline for oral cancer therapy. Chung Shan Medical Journal. 29, 17-26, 2018.</p> <p>(4)Chiang CS, Chen JY, Chiang MY, Hou KT, Li WM, Chang SJ, Chen SY. Using the interplay of magnetic guidance and controlled TGF-<math>\beta</math> release from protein-based nanocapsules to stimulate chondrogenesis. International Journal of Nanomedicine. 13, 3177-3188, 2018.</p> <p>(5)Wang L, Xu Y, Luo C, Sun J, Zhang J, Lee MW, Bai A, Chen G, Frenz CM, Li Z, Huang W. MAGEA10 gene expression in non-small cell lung cancer and A549 cells, and the affinity of epitopes with the complex of HLA-A(*)0201 alleles. Cell Immunol. 297(1), 10-8, 2015.</p> <p>(6)Ton SS, Lee MW, Yang YH, Hoi SK, Cheng WC, Wang KS, Chang HH, Chang SH. Effects of Reductants on Phytoextraction of Chromium (VI) by Ipomoea aquatic. Int J Phytoremediation. 17 (1-6), 429-436, 2015.</p>
		研討會論文	4	<p>1. Ming-Wei Lee, Hong-Wei Cheng. Gellan gum/ grapheme/doxorubicin microspheres as potential multifunctional embolic agent. ANM 2018 - Advanced Nano Materials Conference. June 18-20. Portugal.</p> <p>2. Lee Ming Wei. Gellan gum microsphere encapsulate the nanocarrier of doxorubicin as the chemoembolization agent of hepatoma therapy. EACR-AACR-SIC Special Conference 2017: The Challenges of Optimising Immuno and Targeted</p>

					Therapies. June 24-27. Florence, Italy. 3.Lee Ming Wei. Gellan gum/grapheme/doxorubicin preparation and performance assessment multifunctional arterial embolization microsphere for hepatoma therapy. EACR-AACR-SIC Special Conference 2017: The Challenges of Optimising Immuno and Targeted Therapies. June 24-27. Florence, Italy. 4.Ming-Fang Hsu, Ming-Wei Lee. Manufacturing of gellan gum microsphere encapsulate the nanocarrier of doxorubicin for hepatoma therapy. Materials Chain Conference 2016, May 30- June 1. Bochum University, Germany.
		專書		0	本
		專書論文		0	章
		技術報告		0	篇
		其他		0	篇
智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件
			已獲得	0	
		新型/設計專利	0		
	商標權		0		
	營業秘密		0		
	積體電路電路布局權		0		
	著作權		0		
	品種權		0		
	其他		0		
技術移轉	件數		0	件	
	收入		0	千元	
參與計畫人力 本國籍	大專生		5	人次	(1)陳莉婷：後續就讀陽明大學醫學工程研究所碩士班 (2)鄭芷苓：後續就讀陽明大學醫學工程研究所碩士班 (3)蔡涵宇：後續就讀中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術研究所(學碩連讀學程) (4)簡欣弟：後續就讀中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術研究所(學碩連讀學程) (5)王鐘誼：後續就讀中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術研究所(學碩連讀學程)
	碩士生		4		(1)鄭宏偉：現職為交通大學材料科學研究所博士班學生

				<p>碩士論文題目：結冷膠/阿黴素阿黴素/胺化石墨烯多功能性肝癌動脈栓塞微粒製備及效能評估</p> <p>(2)許銘芳：現職為太暘生物科技股份有限公司產品專員</p> <p>碩士論文題目：結蘭膠微粒包覆承載doxorubicin的奈米顆粒作為肝癌治療栓塞劑的研究</p> <p>(3)陳虹羽：現職為中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系職員</p> <p>碩士論文題目：結冷膠/氧化石墨烯/阿黴素微粒作為肝癌栓塞試劑之可行性評估</p> <p>(4)簡宇辰：現職為ESCO生物科技股份有限公司維修工程師</p> <p>碩士論文題目：黃原膠/玻尿酸/石墨烯複合式薄膜作為傷口癒合敷料之研究</p>
		博士生	0	
		博士後研究員	0	
		專任助理	0	
非本國籍		大專生	0	
		碩士生	0	
		博士生	0	
		博士後研究員	0	
		專任助理	0	
<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>			<p>5. 產業合作面向</p> <p>(1)中山醫學大學附設醫院放射腫瘤科(結蘭膠微粒作為肝癌栓塞劑動物實驗)</p> <p>(2)上海交通大學附設新華醫院護理部(結蘭膠/石墨烯敷料熱療效應)</p> <p>(3)鈞昊有限公司(玻尿酸/結蘭膠/ ROOIBOS機能性乳霜開發)</p>	

## 科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以200字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以500字為限）

栓塞療法是目前臨床上用以治療癌症的新趨勢，原因在於栓塞療法可減少化療藥物的使用劑量，避免造成全身性的不良反應。栓塞療法又以肝癌的治療效果最為顯著。不過，目前市售的癌症栓塞試劑產品種類僅1-2種。本研究室經過3年的時間，開發新的栓塞試劑，在研究成果上取得相當好的績效。不過在研究後期，面臨的就是臨床應用，因為癌症栓塞療法是一種侵入式治療，若要建立臨床試驗，須再投入研究經費和臨床的人力。另外，以3年的時間要從研究到建立商品其實是不可能。因此，我們一直在思考解決之道。我們的第一個策略就是盡速取得專利，專利申請也於2017年正式送件。另一方面，則是透過與本校附設醫院放射腫瘤科建立合作關係，再從經費和人力等問題進行評估，以決定是否自主進行臨床試驗。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值： 否  是，建議提供機關

（勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關）

本研究具影響公共利益之重大發現： 否  是

說明：（以150字為限）