

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

發展電化學法偵測癌細胞活性並應用於抗癌藥物之篩選

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：NSC 101-2113-M-040-001-
執行期間：101年08月01日至102年12月31日
執行單位：中山醫學大學應用化學系（所）

計畫主持人：蔡惠燕

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：蔡香素
碩士班研究生-兼任助理人員：張哲偉
碩士班研究生-兼任助理人員：蔡尚恆
大專生-兼任助理人員：吳柏宜

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：

1. 公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢
2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否
3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考：否

中華民國 103 年 03 月 17 日

中文摘要：本研究分三部分，第一部分以計時安培法結合網版印刷三電極之偵測，可克服細胞培養液中蛋白質對於電極吸附所產生的毒化現象，並成功地建立偵測 MDA-MB-231 乳癌細胞活性的最適化條件，利用特定電化學雙介質配方：10 μ M 的 Vit K3 及 5mM 赤血鹽，於特定培養基中與細胞共同培養 20 分鐘後，利用計時安培法結合網版印刷三電極，電位設定 0.4V(vs. pseudo-Ag 參考電極)，取 29~30 秒信號平均值可與細胞量呈現良好的線性關係，並將此方法使用於抗癌藥物及奈米磁性顆粒對細胞活性的測試並與傳統 MTT 比較，此方法替代 MTT 是可行的。

第二部分以阻抗測量，法拉第系統其總阻抗訊號變化主要來自 Rct 與 Cdl 改變，偵測靈敏度明顯優於非法拉第系統，但所添加之電化學介質於長時間培養對細胞產生傷害，不利於藥物活性檢測上的應用，若將此方法與其他菌種細胞或電化學介質做搭配，避免試劑對細胞的干擾，有機會能將法拉第阻抗系統應用於細胞的即時偵測；而非拉第系統雖亦可透過總阻抗值或 Cdl 之相對變化率對細胞數量進行定量，但其訊號變化較不明顯，若能克服電極再現性問題將可使阻抗量測方法臻致理想。

第三部分直接測量細胞葡萄糖的代謝量表示細胞活性的方法，初步以 HepG2 為雛形，所得結果顯示是可行的！

中文關鍵詞：細胞活性，雙介質電化學分析，計時安培法，葡萄糖檢測

英文摘要：This study investigates suitable electrochemical mediators and optimal mediator concentration for breast cancer cells, MDA-MB-231. The optimized mediators were 1 mM ferricyanide and 10 μ M menadione. The specifications for the chronoamperometric detection of ferrocyanide were a linear range of 0.02–0.36 mM, a slope of 1.90 μ A mM⁻¹, and R² 0.995. The detection limit (S/N=3) was 5.0 μ M and spike recovery was 95%–99% at a concentration range of 0.1–0.36 mM. The oxidation currents increased linearly with cultured cell density. Linearity was 0.9992 (R²) at a range of 0.2–1 \times 10⁵ cells/well and 0.9872 at a range of 0.2–4 \times 10⁵ cells/well. The detection limit was 6400 cells/well. Cell viabilities determined using electrochemical methods confirmed those determined by MTT assay. The chronoamperometric method can be used

as an alternative method for rapidly assessing the viability of cells.

We also measured the cell viability by directly measuring the consumption of glucose in cell cultured medium, the preliminary results obtained with HepG2 cells showed the method was feasible.

英文關鍵詞： Cell viability, chronoamperometric detection, double-mediator system, glucose determination

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告
(期中進度報告/期末報告)

發展電化學法偵測癌細胞活性並應用於抗癌藥物之篩選

Development of electrochemical methods for assessment of cell viability and anticancer drug screening

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 101-2113-M-040-001

執行期間：101 年 8 月 1 日至 102 年 12 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學應用化學系

計畫主持人：蔡惠燕

共同主持人：

計畫參與人員：蔡尚恆，蔡香素，吳柏宜，張哲偉

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 1_ 份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

期末報告處理方式：

1. 公開方式：

非列管計畫亦不具下列情形，立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否 是

3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考 否 是，_____（請列舉提供之單位；本會不經審議，依勾選逕予轉送）

中 華 民 國 103 年 3 月 10 日

一、前言

細胞實驗(cell-based assay) 是目前探討物質毒性或抗癌藥物篩選使用最廣泛的實驗模式(model)，細胞生長時需要利用呼吸作用將外界的氮源及碳源轉換成生長必須的醣類、胺基酸與 ATP，同時也會排出酸性廢物，代謝作用會受到生長環境及藥物的影響而產生代謝途徑的變化，所以細胞活性評估被用來作為藥物有效成分篩選及藥物毒性評估。在生化領域中，細胞活性偵測常用染劑與 adenosine-triphosphate(ATP)、Nicotiamide Adenine Dinucleotide(NADH)或粒腺體的脫氫酵素(dehydrogenase)作用將染劑轉換進而產生螢光或其它顯色，再以光譜儀偵測其特徵波長的吸收度，以推算其細胞存活性；或者以染劑對細胞的不同部位做顯色(或螢光)，如: trypan blue、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)、eosin 或 Propidium Iodide(PI)再利用顯微鏡計數。

細胞中的主要代謝途徑都涉及氧化還原反應，在代謝循環過程中氧化還原態間組成特定氧化還原對，這些代謝的產物濃度可藉由氧化還原對的流量調節間接測得。NADH 氧化酶控制眾多的生物過程，包括代謝、衰老、癌症和死亡，所以 NAD^+/NADH 的氧化還原狀態被認為是細胞新陳代謝的控制因子。電化學分析方法主要是透過雙介質系統(親油性和親水性介質)檢測細胞內的氧化還原活性。因為細胞膜為磷酸雙脂層，親水性的鐵氰化鉀(赤血鹽)無法自由進出，所以實驗中常用脂溶性的甲萘醌(menadione, 又稱維生素 K_3)當作介質，檢測細胞內的氧化還原活性，使用脂溶性維生素 K_3 來連接細胞內和細胞外氧化還原對(如圖 1-1 所示)。因此利用電化學介質間接測定細胞活性是在電極施加電位將被細胞代謝過程間接還原所生成的黃血鹽氧化，將所得電流信號推算細胞活性或藥物對細胞之毒性。

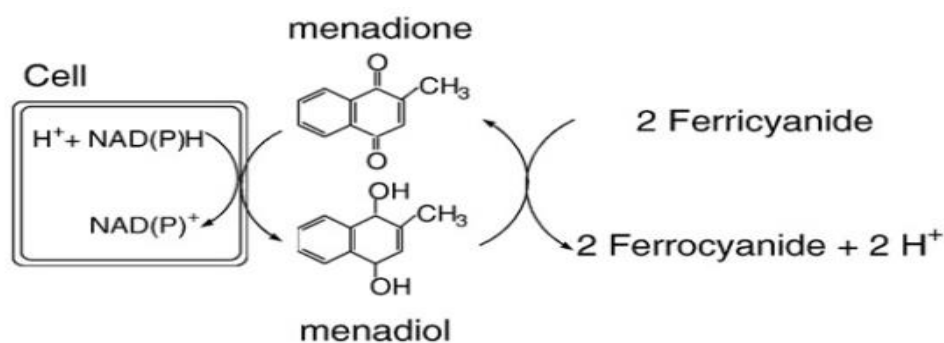


圖 1-1 細胞呼吸作用和電化學試劑的相關性

本研究團隊近年來成功開發雙介質(mediator)結時計時安培法(chronoamperometry)或安培法(amperometry)測定肝細胞及 MDA-MB-231 乳癌細胞之活性，不同種類的細胞所需的介質不同，如一般常用之維他命 K_3 對肝細胞之毒性大，不適合使用，所以在我們研究中改用丁二酸當介質，而丁二酸在 MDA-MB-231 乳癌細胞系統卻沒有功用(以上為本研究室進年來研究發現)。

根據 IUPAC 的定義，電化學可分為三大類：(1)既不涉及電雙層，也不涉及電極反應的，如電導分析；(2) 涉及電雙層，但不涉及電極反應的，例如藉表面張力或非法拉第阻抗測定濃度的分析方法；(3)涉及電極反應的，包含電位、電解及電量的分析法與極譜分析等，電化學分析方法具有快速、簡便、安全且環保的特性，而本研究著重在第二及第三類的範疇的分析工作，針對不同細胞活性偵測開發最適合的電化學偵測方法及探討最佳條件，建立具有非破壞性及即時監測細胞活動狀態之感測方法，減少生化染劑的使用量，達到對環境友善之綠色分析化學；並應用於篩選天然物之抗癌效果。

二、研究方法

本研究對於電化學偵測細胞活性的策略有二：

(一)是利用偵測氧化還原物質訊號來測定細胞存活率，本研究藉由可進入細胞膜的介質(丁二酸、維生素 K3 或其他介質)與 NADH 作用，形成還原態擴散出細胞外，再與細胞外的赤血鹽進行氧化還原將赤血轉換成還原態(黃血鹽)，示意圖如圖 1-1，但介質未必是 menadione，需視細胞而定。抽取培養液利用網版印刷電極(三電極，碳-碳-銀)進行電化學分析(linear sweep、chronoamperometry 或 amperometry)偵測黃血鹽濃度，藉此測定細胞活性；此方法無論是貼附性生長的動物細胞或是懸浮生長的植物細胞、酵母菌等均適用。

(二)是利用動物細胞貼附生長的特性，將金電極表面經過修飾後讓細胞貼附在電極上生長，由電路中阻抗物理量的變化來觀察細胞貼附情形。電化學阻抗圖譜 (electrochemical impedance spectroscopy, EIS)，以正弦波交流電施加一微小振幅的電位，測量電極間的電位、電流訊號的振幅，藉此計算出電路中的複合阻抗，再考慮電子在樣品中的動力學，推測出可能的等效電路模型，利用阻抗圖譜分析及參數模擬，獲得各元件(電阻、電容)得阻抗值，進而解釋測量樣品對等效電路所造成的訊號變化。EIS 技術不僅被用來偵測 glucose¹、protein² 或較小分子的抗體³ 的濃度偵測，目前已有文獻將 EIS 技術應用各種細胞的量測上，如內皮細胞^{4,5}、纖維母細胞⁶ 等，利用阻抗之變化探討細胞貼附於材料界面的效果，以評估生醫材料之生物相容性；Tirupathi 等人亦用阻抗探討內皮細胞(endothelial cell)型態的改變⁵，Manli et al.⁷ 利用 ITO 電極結合法拉第阻抗測量探討肝癌細胞的成長狀態，其裝置如下圖。

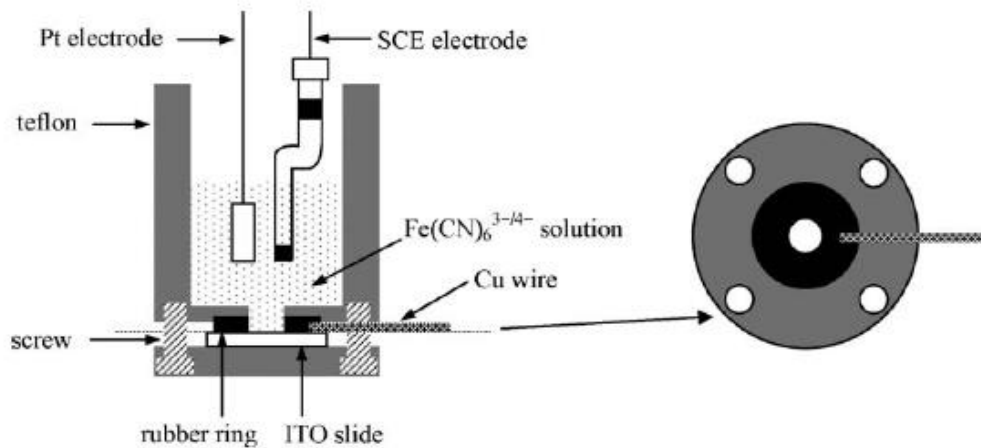


Fig. 1. Schematic diagram of the electrochemical detection cell.

(本圖節錄自⁷)

本研究將結合網版印刷金電極組裝細胞培養微槽 (如圖 2-1)，減少實驗細胞及培養液的使用量，觀察電極上不同細胞密度對非法拉第阻抗的影響，此裝置細胞將同時貼附在工作電極、參考電極、及輔助電極上，其等效電路模型與 Manli 之裝置不同，本研究將透過模擬提出合理的等效電路模型。透過的阻抗測量可以了解電極表面的差異，即可了解細胞貼附情形，藥物若對癌細胞有抑制生長或毒殺效果時，細胞的貼附性會變差甚至完全飄浮起來(即 apoptosis process)或破損(necrosis process)，由阻抗的變化可即時觀測。

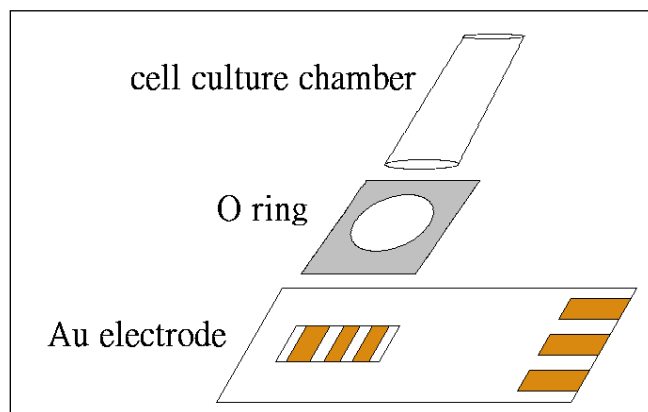


圖 2-1 細胞培養電極組裝示意圖。將微量離心管去除底部及上蓋，留下中段部份作為細胞培養槽，將 O 環先以矽利康固定於網版印刷三電極(金)上，再將離心管倒立以夾子固定電極及離心管形成細胞培養槽。組裝完成之電極以 70% 酒精清洗及 UV 殺菌。

進行步驟如下：

第一年

- (1) 細胞代謝基質氧化還原測定條件最適化

- 不同密度之細胞培養於 24 well 微盤中，貼壁 24hr。
- 將原培養液抽出。
- 加入 0.5ml 含有赤血鹽及親脂性介質之培養基或 PBS buffer (視細胞種類而定)
- 於 37°C、5% CO₂ 培養箱反應數分鐘。
- 抽出培養基質。
- 進行分析。
- 電極為網版印刷三電極，工作電極-碳、參考電極-銀、輔助電極-碳。
- 最適化條件：赤血鹽濃度、親脂性介質種類與濃度、反應時間等

(2)細胞阻抗測定 (electrochemical impedance spectroscopy)

- 組裝完成後之電極，經清洗滅菌。
- 加入細胞培養液 0.5 ml 及電極預處物質(如 BSA, collagen or chitosan)以利細胞貼附。
- 於培養箱 37°C 及 CO₂ 5 % 環境培養一天，並監測其阻抗訊號，觀察蛋白質吸附於電極之阻抗變化。
- 加入細胞，監測不同時間內之阻抗變化。
- 測量後電極以顯微鏡觀察其貼附情形。

儀器參數設定: 頻率範圍 0.1~10⁵ HZ；電位 0.0 V；電位振幅 5mV。

建立細胞貼附密度與阻抗變化之關係曲線及等效電路模型。為了確認電化學信號的準確性，相關信號將與傳統染劑法做對照。

(3)細胞活性試驗(MTT assay)

MTT assay 在 1983 年由 Mosroann 提出，最初運用在免疫方面的領域上，後來才用來測定細胞存活率的方法之一，其是藉由活細胞中粒線體的琥珀酸脫氫酶，將 MTT 中黃色的 tetrazolium 的環開裂，形成藍色結晶的 formazan，再用二甲基亞砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解，測其吸收值，此數值與 formazan 量呈正比關係，而 formazan 結晶生成量與活細胞數目呈正比關係，因死細胞的琥珀酸脫氫酶已消失，而無法將 MTT 還原成 formazan，故利用所測得的吸收值可知細胞之活性，如圖 2-2 所示，透過快速簡便的顏色反應來檢測細胞存活度。

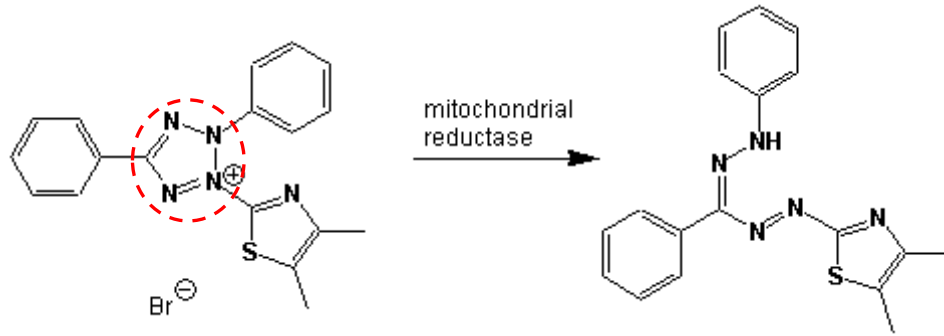


圖 2-2 MTT assay 示意圖。⁸

(4) 細胞螢光 DAPI 染色

DAPI，即 2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamidine dihydrochloride，也稱 DAPI dihydrochloride，分子式為 $C_{16}H_{15}N_5 \cdot 2HCl$ ，分子量為 350.25。結構如圖 2-3。DAPI 是一種可以穿透完整的細胞膜的藍色螢光染料。可用於活細胞和固定細胞的染色，也常用於細胞凋亡檢測，染色後用螢光顯微鏡觀察或流式細胞儀檢測。和 DNA 結合後可以產生比 DAPI 自身強 20 多倍的螢光。DAPI 的最大激發波長為 340nm，最大發射波長為 488nm；DAPI 與 DNA 結合後，最大激發波長為 364nm，最大發射波長為 454nm。

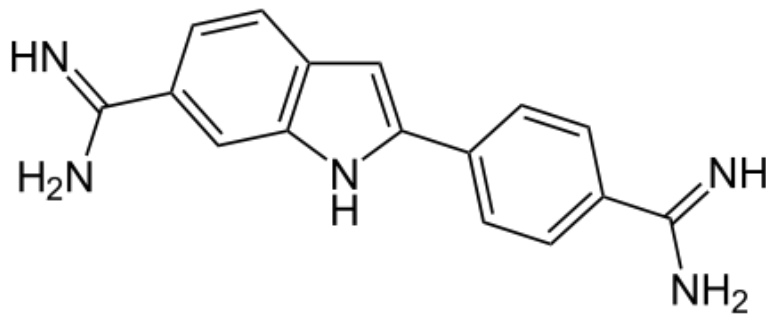


圖 2-3 DAPI 分子結構。⁹

- 將貼附細胞之金電極以 PBS 清洗，加入 4% 甲醛做固定化 10min。
- 移除甲醛溶液，以 PBS 清洗金電極，再加入含有 DAPI 試劑(5 ug/ml) 的 PBS，進行染色，10min。
- 以 PBS 清洗金電極，以正立螢光顯微鏡觀察細胞貼附密度與阻抗測量結果做相關係數分析(Pearson correlation)。

原先規劃第二年要以第一年建立之方法篩選天然物之抗癌效果，根據中國醫藥大學中西醫結合醫學林鉅超醫師的臨床經驗(著有抗癌日知錄)所提供中草藥，透過我們的實驗找科學證據。但計畫只核給一年，因此篩選天然物之抗癌效果部分尚未全面進行。

三、結果與討論:

本計畫分三部分，第一部分為開發 double mediators 作為癌細胞活性之電化學偵測，此部分已整理發表於 *electroanalysis* 期刊

(**Electroanalysis 2013 April, 25, 1005-1009**)，因此直接附上期刊內容。第

二部分為利用阻抗測量。在我們參加國際研討會與其他學者交流時，有其他學者提出”為何不直接測細胞代謝產物?”而癌細胞對葡萄糖的代謝與正常細胞有顯著的差異，所以我們延長計畫在原有經費下探索直接利用電化學測葡萄糖代謝量與細胞活性的關聯可行性。以下分三部分敘述結果與討論:

第一部分為開發 double mediators 作為癌細胞活性之電化學偵測，

1. Introduction

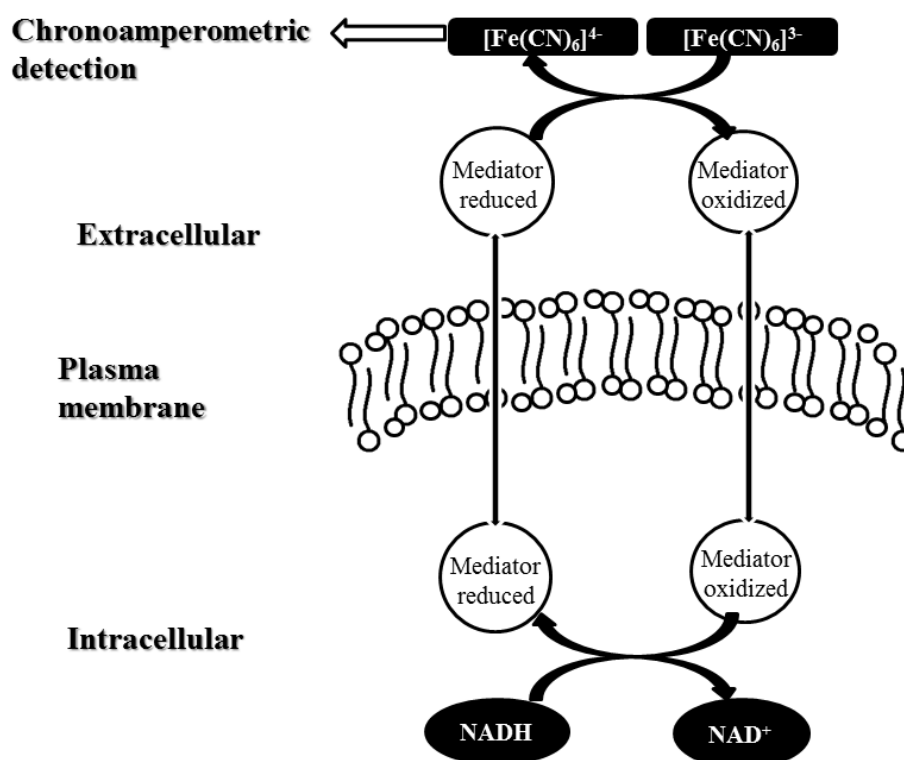
Cancers are listed for the leading causes of death in high-income countries [1], but no cure for this disease exists. Therefore, many researchers are devoted to developing anticancer drugs. In vitro cancer cell tests are the first step for screening potential anticancer chemicals. Researchers incubate cancer cells with the chemicals to be tested and then assess cell viability to identify potential drugs for further study. Current techniques for monitoring cell viability include spectrophotometric methods, fluorescent microscopy, and flow cytometry [2]. These methods have advantages and disadvantages. Because fluorescent microscopy and flow cytometry instruments are expensive, spectrophotometric methods are most commonly used. The colorimetric reagent for assessing the viability or survival of cultured cells after drug treatment is MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) [3, 4]. The MTT assay measures the activity of mitochondrial succinate

dehydrogenase, which reduces MTT to purple formazan in living cells. Because MTT reduction can only occur in metabolically active cells, MTT assay allows the assessment of cell viability and proliferation. The quantity of formazan formed is directly proportional to cell viability, but the formazan-forming process in living cells is time consuming; cells must be raised with MTT for 3 to 4 h. Cells are then solubilized with an organic solvent (usually DMSO or isopropyl alcohol). These organic solvents are harmful to the environment. Thus, the need to improve analytical measurement and develop rapid methods for cell viability detection is increasing.

Electrochemical measurements of respiratory chain activity are currently used to evaluate cell viability and to study chemical cytotoxicity [3-10]. Mediated electrochemistry based on a single- or double-mediator system has been used to study the redox activity of bacteria [5, 6], *Saccharomyces cerevisiae* cells (yeasts) [7-11], and cancer cells such as Hep G2 [12, 13] and HL-60 cells [14]. Mediators can improve electrochemical detection by acting as an electron shuttle between intracellular reducing centers and an external electrode [11]. Cell plasma membranes regulate the movement of chemicals in and out of the cell with proteins embedded in the phospholipid bilayer. The regulating proteins and suitable mediators are different for various types of cells [11]. MDA-MB-231 is a breast cancer cell line obtained from a patient in 1973 at the M.D. Anderson Cancer Center. Breast cancer is one of the ten most leading causes of death in high-income countries [1]. Electrochemical detections have not been used to assess the viability of MDA-MB-231 cells. This study aims to develop a simple and rapid electrochemical method for assessing cell viability for the rapid screening of anticancer drugs. This study examined the feasibility of electrochemical assessment of MDA-MB-231 viability using a chronoamperometric method based on the double-mediator system, which consists of

lipophilic and hydrophilic mediators. The lipophilic mediator functions as an electron shuttle between intracellular reducing centers and external hydrophilic mediators. Scheme 1 shows the reasonable reaction mechanism of the double-mediator system [15]. The lipophilic mediator diffuses inside cells and is reduced by NAD(P)H. The reduced lipophilic mediator then diffuses out of the membrane into the extracellular matrix and reacts with ferricyanide, recovering the oxidized form of the lipophilic mediator to complete the cycle. The amount of ferrocyanide produced in this cycle reaction is proportional to respiratory chain activity and the number of viable cells.

This study investigates suitable electrochemical mediators, optimal mediator concentration, and chronoamperometric potential. Electrochemically determined cell viabilities were compared with those determined by MTT assay.



Scheme 1. The reasonable reaction mechanism of the double-mediator system.

2. Experiment

2.1. Reagents and apparatus

Dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), phosphate buffered saline (PBS), potassium ferricyanide $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (BioUltra), potassium ferrocyanide $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (BioUltra), 2-methoxyestradiol (2-ME), menadione, and sodium succinate dibasic hexahydrate were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) and used without further purification. Gibco[®] Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), antibiotics mixture (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of penicillin, 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of streptomycin, and 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of neomycin), glutamine, and non-essential amino acids (NEAA) were purchased from Invitrogen[™] Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Biological Industries Ltd. (Kibbutz Beit Haemek, Israel). Culture dishes and microplates were obtained from Nunc (Roskilde, Denmark).

Electrochemical measurements were performed in screen-printed electrodes (SPE) consisting of 3 electrodes: a carbon working electrode, a carbon counter electrode, and a pseudo-silver reference electrode. They were purchased from Zensor R&D Co. (Taichung, Taiwan). Chronoamperometric measurements were conducted using a potentiostat (EmStat) and data acquisition was performed using PStace software (PALM instruments BV, Houten, Netherlands). A FlexStation3 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) was used for measuring MTT assay absorbance.

2.2 Cell viability assessments by the electrochemical method

MDA-MB-231 cancer cells from ATCCTM were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% antibiotic mixture at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ and 95% air. Cells were incubated in 24-well culture plates at densities of 0.2-5 x 10⁵ cells/well for 12 h. After the cells adhered overnight, the culture supernatants were removed, and then a fresh medium was supplemented with electrochemical mediators. After a period of time, 50 µl of the medium was withdrawn and applied to the surface of the screen-printed electrode where the ferrocyanide oxidation current was measured. Based on a previous study [16], the optimal chronoamperometric potential was determined to be 0.4 V [see Figure 1 (a)] for a pseudo-silver reference electrode, and the oxidation currents were taken during 39-40 s and averaged for optimizing mediator. A disposable SPE was used for each cultured sample, minimizing protein adsorption and cross-contamination.

This study selected 2-ME as the drug to assess whether the developed chronoamperometric method is suitable for anticancer drug screening. MDA-MB-231 cells were incubated in 24-well plates at a density of 1 x 10⁵ cells/well for 24 h and then treated with various concentrations of 2-ME or fresh medium for 48 h. The cultured medium was withdrawn and the cultured cells were washed with PBS. The cells were then incubated with a fresh medium supplemented with electrochemical mediators.

The relative viability from electrochemical measurement was calculated using Equation (1).

$$\text{viability \%} = \frac{i_{test} - i_{blank}}{i_{control} - i_{blank}} \times 100\% \quad (1)$$

where i_{blank} is the oxidation current of the medium only; i_{control} is the oxidation current of the normally cultured cells (no chemical added); and i_{test} is the oxidation current of the cultured cells treated with the drug.

2.3 Cell viability assessments by MTT assay

After incubating with 2-ME, the cultured medium was withdrawn and the cultured cells were washed with PBS. The cells were then incubated with a fresh medium supplemented with MTT (0.5 mg ml^{-1}) at $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 4 h. After removing the MTT medium, DMSO was added to dissolve the formazan crystals. The absorbance of formazan was measured at 560 nm. The relative viability from MTT assay was calculated using Equation (2).

$$\text{viability \%} = \frac{A_{\text{test}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}} \times 100\% \quad (2)$$

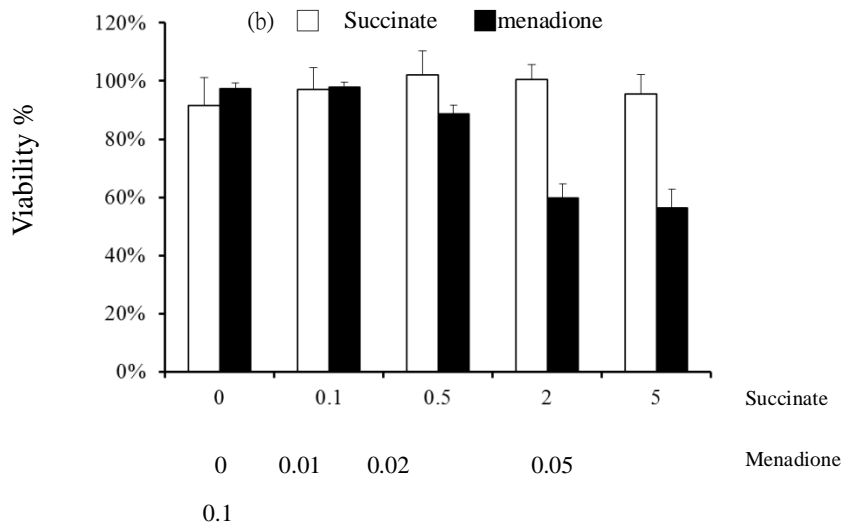
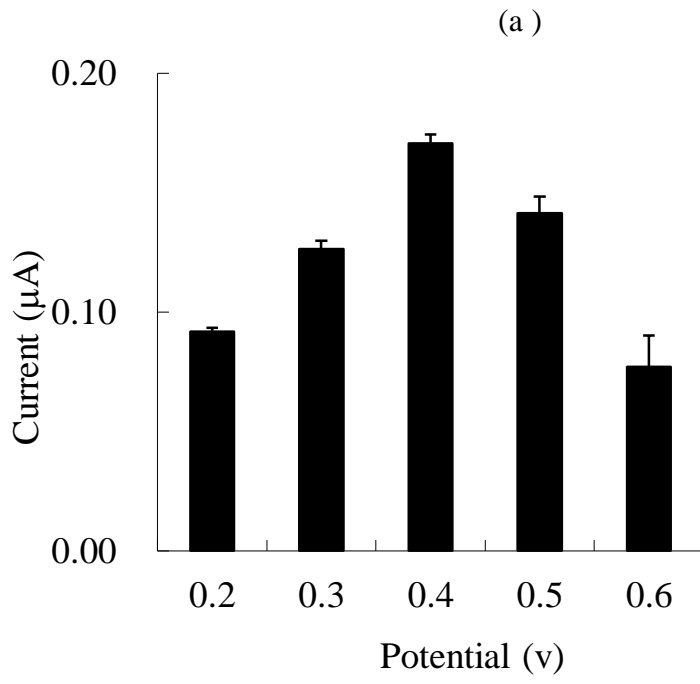
where A_{blank} is the absorbance of the cultured well containing the medium only; A_{control} is the absorbance of normally cultured cells; and A_{test} is the absorbance of the cells cultured with the drug.

3. Results and discussion

3.1 Optimization of electrochemical mediators and potential

This study investigated 2 lipophilic mediators, menadione and succinate, which were the most commonly used electrochemical mediators in the literature. MTT assay was used to examine the effects of lipophilic mediators on cell viability and chronoamperometry was used to examine the electron shuttle effect. Figure 1 (a)

shows the current response of ferrocyanide in DMEM cell culture medium. The optimal potential was at 0.4 V versus a pseudo-silver reference electrode, which produced higher signal than other potentials. Figure 1(b) shows cell viability affected by lipophilic mediators measured with MTT assay. Cell viability was unaffected by succinate at concentrations between 0.1 and 5 mM, but decreased when menadione concentration increased. Figure 1(c) shows electrochemical sensitivity with menadione as a mediator. There is no significant oxidation current with succinate as a mediator. This indicates that menadione is a favorable electron shuttle between the cell respiratory chain and ferricyanide. Menadione generates reactive oxygen species (ROS) through redox cycling. Low levels of ROS can function as redox-active signaling messengers, whereas high levels of ROS induce cellular damage and trigger cell death [17]. Succinate was an unsuitable mediator for MDA-MB-231 cells, although it was an excellent electron shuttle for rat liver cells (our another study, manuscript in preparation). Because a high menadione concentration caused cell apoptosis or necrosis, 10 μM of menadione was selected as the optimal lipophilic mediator concentration.



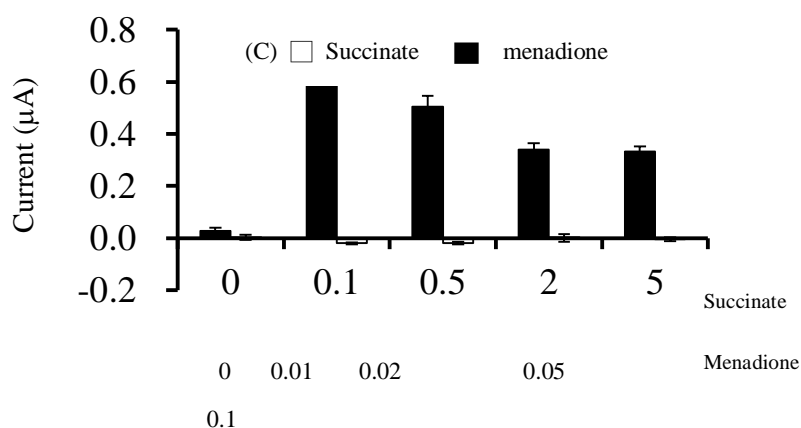


Fig 1. (a) The current response of 0.1 mM ferrocyanide in DMEM cell culture medium (b) MDA-MB-231 cell viability after incubating with a medium supplemented with 5 mM ferricyanide and various concentrations of lipophilic mediators. The cell viability was assessed by MTT assay and relative viability was calculated using Equation (2). (c) ferrocyanide oxidation currents formed in the cell respiratory cycle. .

Figure 2 shows the reaction time and concentration effects of the hydrophilic mediator, ferricyanide, on the sensitivity of electrochemical detection. The hydrophilic mediator was assessed using 10 µM menadione and various ferricyanide concentrations. The electrochemical signals increased as reaction time of mediator and cells increased. The effects of ferricyanide concentration were not significantly different when reaction time was less than 20 min. The signal limitation was cell activity under these conditions. Studies have found that a low potassium ferricyanide concentration (<0.03 mM) can stimulate cell growth, but a high potassium ferricyanide concentration can injure cells [18-20]. A measurable amount of

ferrocyanide was produced when the cultured medium was supplemented with 1 mM ferricyanide and 10 μ M menadione. Therefore, based on signal sensitivity, mediator toxicity, and experiment time considerations, later experiments used a medium supplemented with 1 mM ferricyanide and 10 μ M menadione with 20 min reaction time. The specifications for the chronoamperometric detection of ferrocyanide were a linear range of 0.02-0.36 mM, a slope of 1.90 μ A mM⁻¹, and R² >0.995. The detection limit (S/N=3) was 5.0 μ M and spiked recovery was 95%-99% at a concentration range of 0.1-0.36 mM.

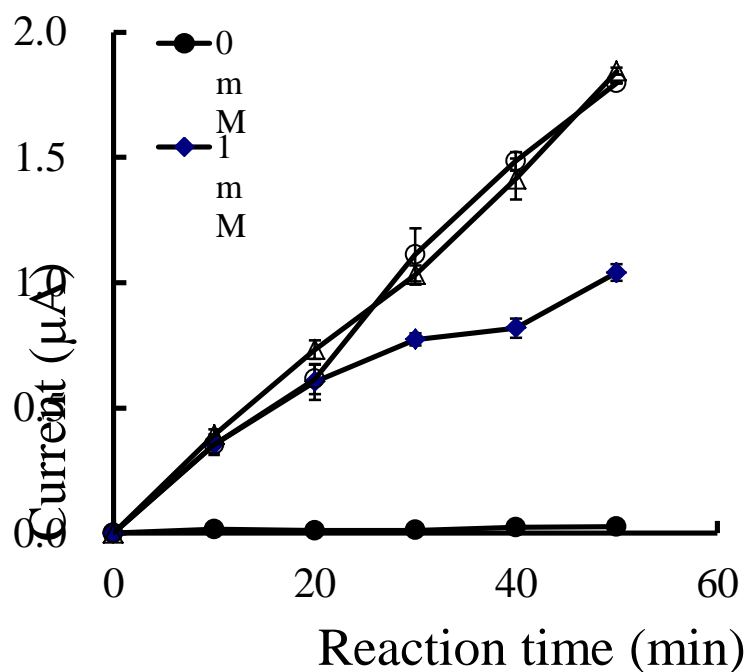


Fig 2. The reaction time and concentration effects of the hydrophilic mediator on electrochemical detection

3.2 Cell counts assessed by respiratory activity

Figure 3 shows the current response versus cultured densities of MDA-MB-231 cells. The oxidation currents increase linearly with cultured cell densities of 0.2-4 x 10⁵

cells/well ($R^2=0.9872$). Linearity is more apparent ($R^2=0.9992$) at lower densities ($0.2-1 \times 10^5$ cells/well). The detection limit is 6400 cells/well.

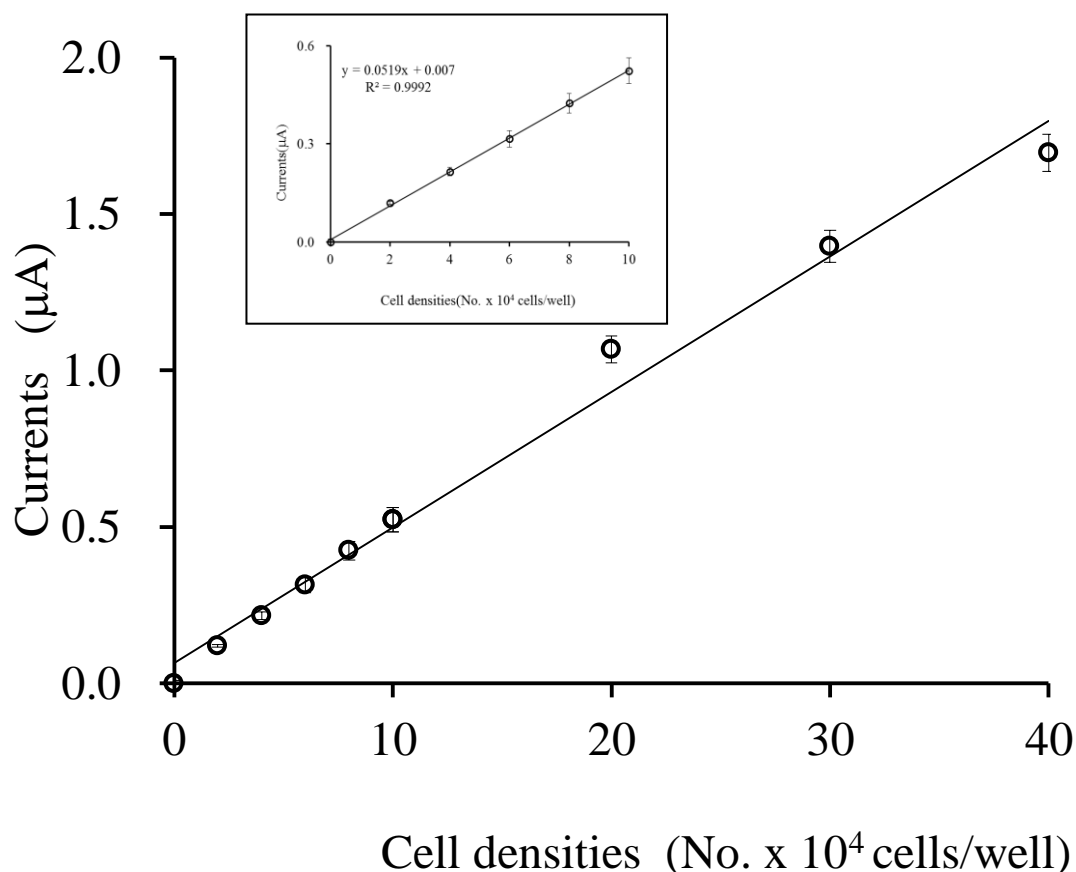


Fig 3. Current response versus MDA-MB-231 cell densities. The error bar represents a standard deviation of $n=4$. The in-set graph is the current response at low MDA-MB-231 cell densities.

3.3 Anti-cancer efficacy of 2-Methoxyestradiol (2-ME) assessed by electrochemical detection and MTT assay

The chronoamperometric method and MTT assay were used to evaluate the anticancer efficacy of 2-ME based on the viability changes of MDA-MB-231 cells. Figure 4a

shows the chronoamperograms of blank, control and test for reference. Figure 4b shows the viability of cells cultured with 2-ME at a concentration between 0 and 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Chronoamperometry and MTT assay were used to determine cell viabilities. The results were compared using a paired t test on Microsoft Excel[®]. The statistical results showed no significant difference between the 2 methods.

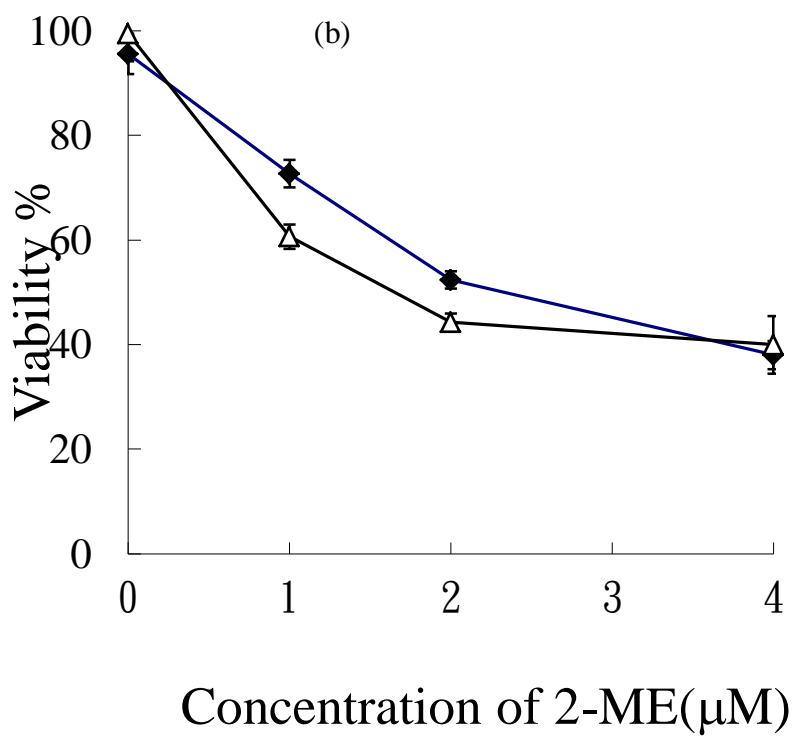
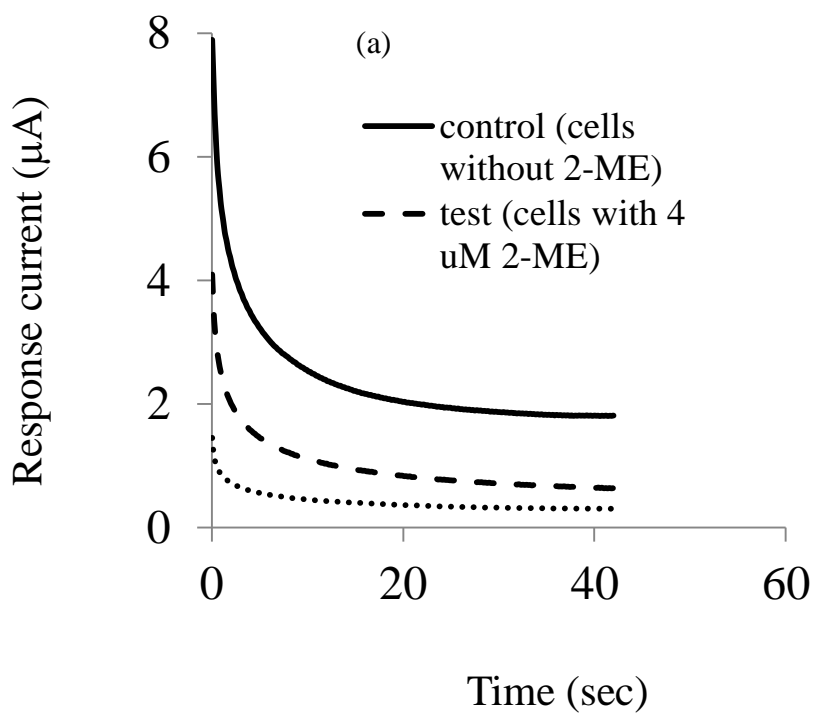


Fig 4. (a) The chronoamperograms of blank, control and test (b) The anticancer efficacy of 2-ME based on the viability changes of MDA-MB-231 cells.

3.4 Respiratory effect of Fe₃O₄@SiO₂ magnetic nanoparticles on MDA-MB-231 cells

To confirm the feasibility of the method developed in this study, the respiratory effect of Fe₃O₄@SiO₂ magnetic nanoparticles (10/20 nm) on MDA-MB-231 cells was evaluated. The preliminary results, as shown in Figure 5, indicate that magnetic nanoparticles slightly inhibit cell respiration. The mechanism of the biological effect of Fe₃O₄@SiO₂ magnetic nanoparticles is beyond the scope of this study. The results of the paired *t* test analysis indicate that chronoamperometric method assessments are comparable to those of the MTT viability assay.

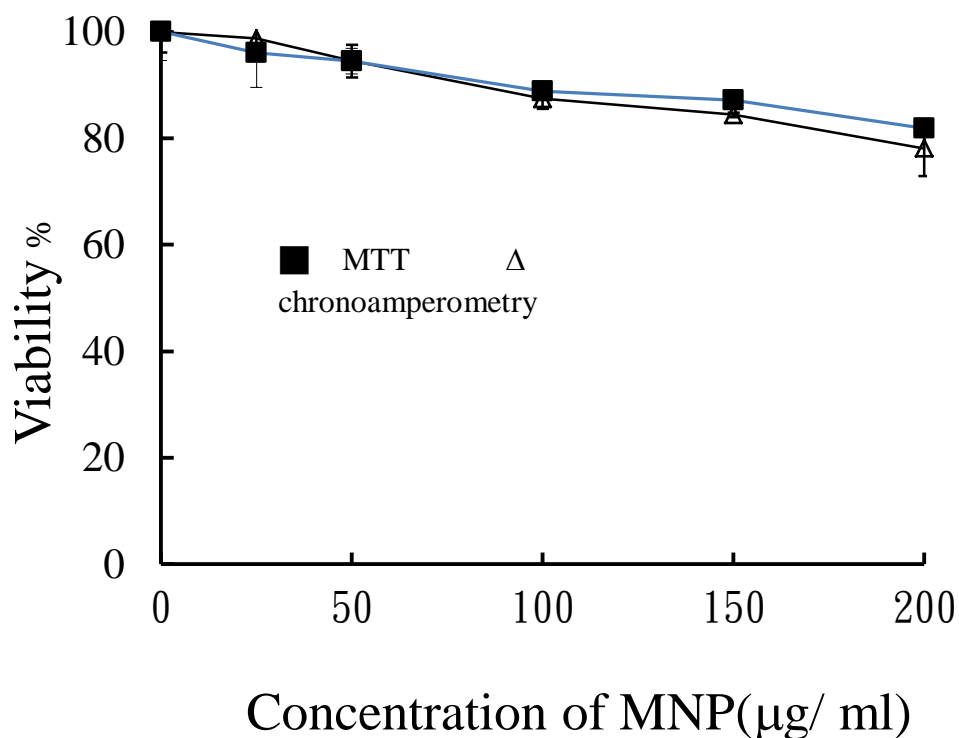


Fig. 5. The respiratory effect of Fe₃O₄@SiO₂ magnetic nanoparticles (MNP) on MDA-MB-231 cells.

4. Conclusion

The chronoamperometric method based on the double-mediator system can be used as an alternative method to assess respiratory activity of MDA-MB-231 cells. The optimized mediators were 1 mM ferricyanide and 10 μ M menadione. We compared the viability of cells treated with the same amounts of 2-ME or nanoparticles measured by chronoamperometry and MTT assay. The statistic results showed no significant difference between the 2 methods. Chronoamperometric detection using screen-printed electrodes requires less reagent for measurement, using less cell-culture medium and reducing experiment costs. This method is suitable for assessing chemical toxicity and respiratory effect of magnetic nanoparticles in MDA-MB-231 cell cultures. These results were obtained within 30 min.

第二部分 為利用阻抗測量，(以下為指導碩士生蔡尚恆的碩士論文資料，碩士生論文乃指導教授多次修訂而成)

1. 細胞阻抗測量

以計時安培法對癌細胞及肝細胞進行活性偵測時，須考慮所添加之電化學介質(Vit K3、丁二酸)對於細胞傷害的程度，欲探討之藥物在黃血鹽偵測電位下是否具有氧化還原訊號；以及與電化學介質是否產生自發性反應，而干擾檢測結果。因此希望藉由阻抗測量的方式，避免其他藥物或試劑對於細胞的干擾，減少外部變因，也可簡化檢測步驟，對細胞活性偵測做更有效率的監測，使檢測結果更為準確。本研究的阻抗分析分別以法拉第系統及非法拉第系統對細胞活性偵測進行探討。

2. 法拉第阻抗系統

(1) 總阻抗值對細胞濃度關係探討

將細胞培養液中加入電化學介質(0.5mM 黃血鹽及赤血鹽)觀察其各頻率總阻抗相對變化率與細胞密度之校正曲線關係。表 2 以細胞培養 24 小時的數據顯示，高頻率($\log f = 4.5$)偵測下其總阻抗與細胞密度沒有明顯變化，推測是細胞在電極表面形成似電容之構造，在高頻率時電容進行較快速的充、放電過程使總阻抗值為一定值，故細胞密度對於總阻抗變化不大；另外在低頻率($\log f =$

-0.5~1)偵測時，所測得的總阻抗為電極表面蛋白質吸附及細胞貼附所形成的電阻及電容，所涉及的變因較多，故線性較差。而在中等頻率($\log f = 2\sim 3$)時的偵測靈敏度及線性較佳，顯示在特定頻率下以總阻抗相對變化率可對電極上之細胞密度進行定量。

表 1 細胞培養第 24 小時各頻率之總阻抗相對變化率之校正曲線。

組抗測量交流平 率, Hz ($\log f$)	Slope ($\Delta Z_t\% / \log \text{cells}$)	R^2
0.3 (-0.5)	0.028	0.9265
10(1.0)	0.012	0.8718
100 (2)	0.016	0.9713
1000 (3)	0.019	0.9583
31623 (4.5)	0.0011	0.4493

以 1000Hz 總阻抗相對變化率觀察細胞培養 48 小時之細胞狀態，由圖 3-1 顯示細胞密度 80000cells/well 培養至 36 小時後，細胞生長逐漸達到飽和，生長速度逐漸趨緩，細胞密度在 40000cells/well 以下的細胞在 48 小時仍繼續生長。由表 3 可看出其線性斜率在第 12 小時後，24、36、48*小時都有明顯的增加。

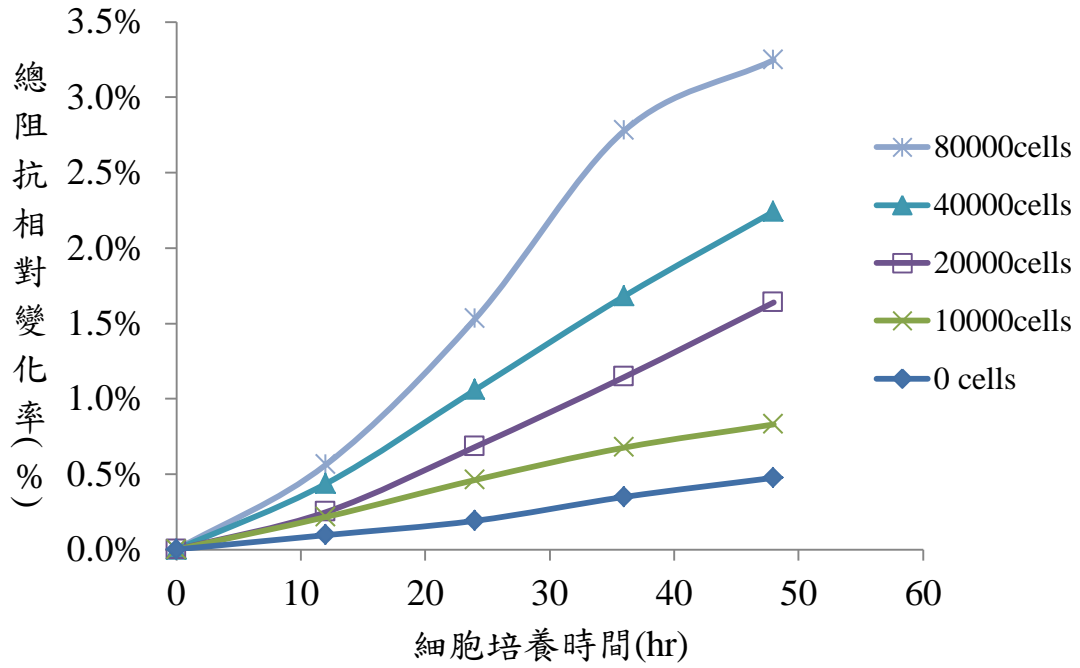


圖 3-1 各細胞密度培養 48 小時之生長曲線。

表 2 1000Hz 之總阻抗相對變化率校正曲線。

細胞培養時間 (hr)	Slope ($\Delta Z_t\%$ / log cells)	R ²
12	0.0041	0.9428
24	0.012	0.9756
36	0.023	0.9547
48	0.024	0.9927

48*:不採計細胞密度 80000cells/well 第 48 小時之數據。

(2) 擬合等效電路元件對細胞濃度關係探討

在法拉第系統中細胞貼附於電極表面會形成電荷轉移電阻(Charge Transfer Resistance, R_{ct})、電雙層電容(Double Layer Capacitance, C_{dl})及溶液電阻(Solution Resistance, R_s)及電化學介質所形成的擴散(Warburg Diffusion, W)等構造，以串聯或並聯形式組成的等效電路(圖 3-2)。經電化學阻抗儀軟體擬合出各元件所貢獻的阻抗值，誤差為 0.08~0.12，換算其各元件的相對變化率，發現擬合元件 R_s 的變化不大， W 與細胞密度無明顯的相關性，而 R_{ct} 及 C_{dl} 與細胞密度具由線性關係(圖 3-3)，顯示細胞貼附於電極表面形成似電容或似電阻層，阻礙了電荷的傳遞，其訊號變化率與細胞密度有正相關，具對細胞進行定量的潛力。由表 4 可知 R_{ct} 與 C_{dl} 訊號皆可用於細胞定量，且細胞對 R_{ct} 所造成的變化率大於 C_{dl} ，比較電阻變化率(R_{ct})與電容變化率(C_{dl})在各時間點之校正曲線， R_{ct} 之偵測靈敏度較 C_{dl} 佳，但 C_{dl} 線性較佳。

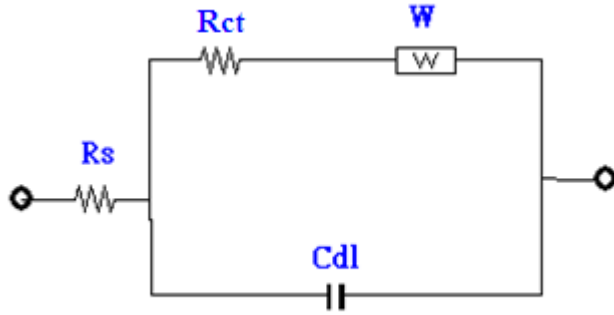


圖 3-2 法拉第系統之擬合等效電路模型。

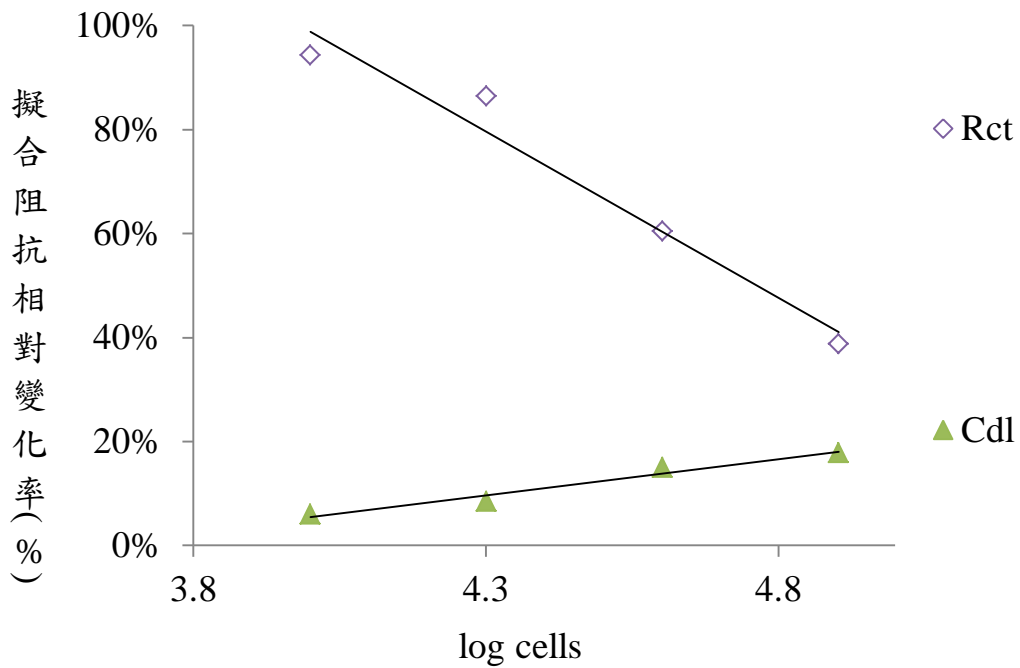


圖 3-3 細胞培養第 24 小時擬合阻抗元件之校正曲線。

表 3 擬合元件各 R_{ct} 及 C_{dl} 時間點之擬合元件校正曲線。

細胞培養 時間(hr)	R_{ct} Slope ($\Delta S_t\% / \log \text{ cells}$)	C_{dl} Slope ($\Delta S_t\% / \log \text{ cells}$)	$R^2 (R_{ct})$	$R^2 (C_{dl})$
12	-0.11	0.051	0.6591	0.9327
24	-0.64	0.14	0.9625	0.9672
36	-1.1	0.21	0.8978	0.9831
48	-4.2	0.26	0.9499	0.9869

(3) 電化學介質對於細胞型態影響

將阻抗測量後的細胞以 4% 甲醛固定化，於顯微鏡(X100)底下觀察細胞貼附

於金電極之形態。圖 3-4 左為正常細胞培養 48 小時(不含電化學介質)，右為加入電化學介質，由圖可明顯看出細胞在加入電化學介質後雖有部分細胞貼附於電極，但大部分細胞型態已產生變化，以 MTT 試驗觀察細胞長時間培養於電化學介質中的存活率變化(圖 3-5)，發現細胞在含有電化學介質的環境中 60 小時內細胞存活率約為 78 ~ 60%，顯示即使黃血鹽及赤血鹽在低濃度(0.5mM)下，長時間培養仍會對細胞產生傷害。加入電化學介質雖可以增強 R_{ct} 之偵測靈敏度，但對細胞活性的干擾甚大，因此在細胞藥物活性試驗中並不適合加入電化學介質進行阻抗系統長時間監測。若不加入電化學介質細胞生長及貼壁較完整有機會從其他阻抗參數中進行細胞定量，並進一步進行藥物試驗。

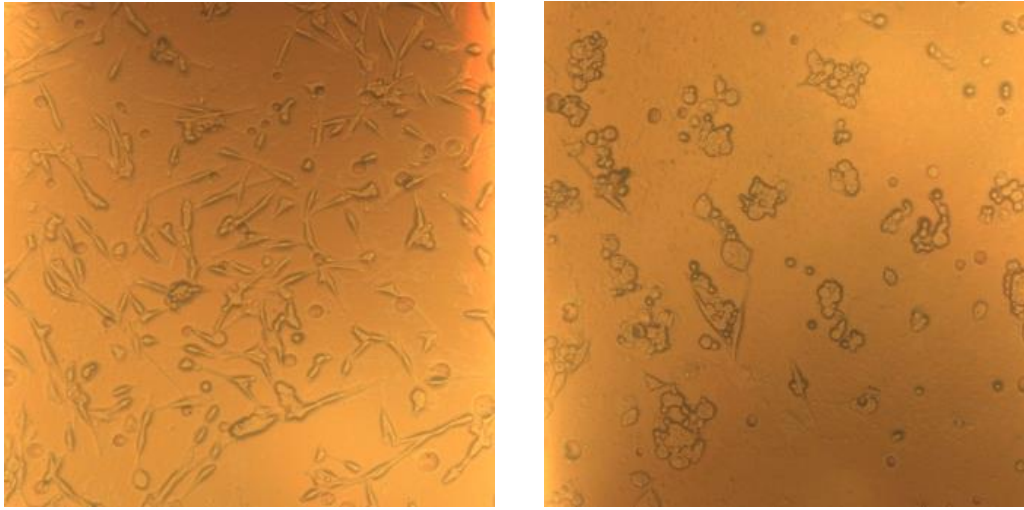


圖 3-4 顯微鏡觀察細胞培養 48 小時貼附於金電極表面之型態。左圖為正常培養，右圖培養液中含 0.5mM 黃血鹽及赤血鹽。

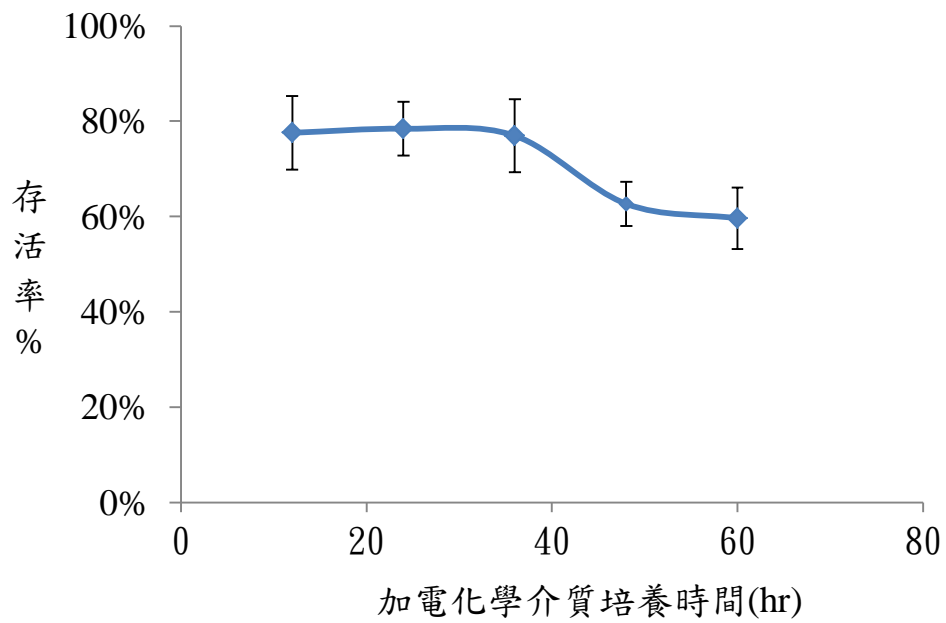


圖 3-5 MTT 試驗細胞培養液中含電化學介質之 60 小時內存活率變化。

(4)非法拉第阻抗系統

因電化學介質(赤血鹽)在長期培養下對細胞型態有所影響，所以我們改用非法拉第阻抗方式測量。

● 總阻抗值對細胞濃度關係探討

在細胞培養液不加入電化學介質的情況下，觀察其各頻率總阻抗相對變化率與細胞密度之關係，以細胞培養 24 小時的數據顯示(表 5)，高頻率($\log f = 4$ 以上)偵測下的結果與(表 2)法拉第系統相似，其總阻抗相對變化率與細胞密度沒有明顯變化；另外在低頻率($\log f = 2$ 以下)偵測時，所測得的總阻抗為電極表面蛋白質吸附及細胞貼附所形成的電阻及電容，而在非法拉第系統 R_{ct} 變化較不明顯，故低頻率時其總阻抗變化可能主要來自電容(C_{dl})。由表 5 顯示除了在高頻率的線性及靈敏度較差，而在 $\log f = 1\sim 3$ 時線性較佳， R^2 均在 0.9800 以上。結果顯示在不加入電化學介質的情況下，仍可在特定頻率下以總阻抗相對變化率對電極上之細胞密度($\log \text{cells}$)進行定量。

以 100Hz 總阻抗相對變化率觀察細胞培養 72 小時之細胞狀態，由圖 3-6 顯示細胞培養至 12 小時後，細胞繼續生長且電極表面的貼附也逐漸達到飽和。且其總阻抗相對變化率與細胞密度變化率具有一致性，各濃度之細胞經長時間培養，在 12 小時貼壁完成後，其阻抗變化率曲線呈現平行。由表 6 可看出在正常培養的條件下，其線性斜率在各時間點並沒有明顯差異，若細胞生長受到藥物影響改變其生長速率，觀察其總阻抗變化率可即時篩選出具有活性之藥物，進一步進行細胞藥物活性試驗。

表 4 細胞培養第 24 小時各頻率之總阻抗相對變化率校正曲線。

$\log f$	Slope ($\Delta Z_t\% / \log \text{cells}$)	R^2
1	0.065	0.9800
2	0.081	0.9819
3	0.074	0.9833
4	0.009	0.3014

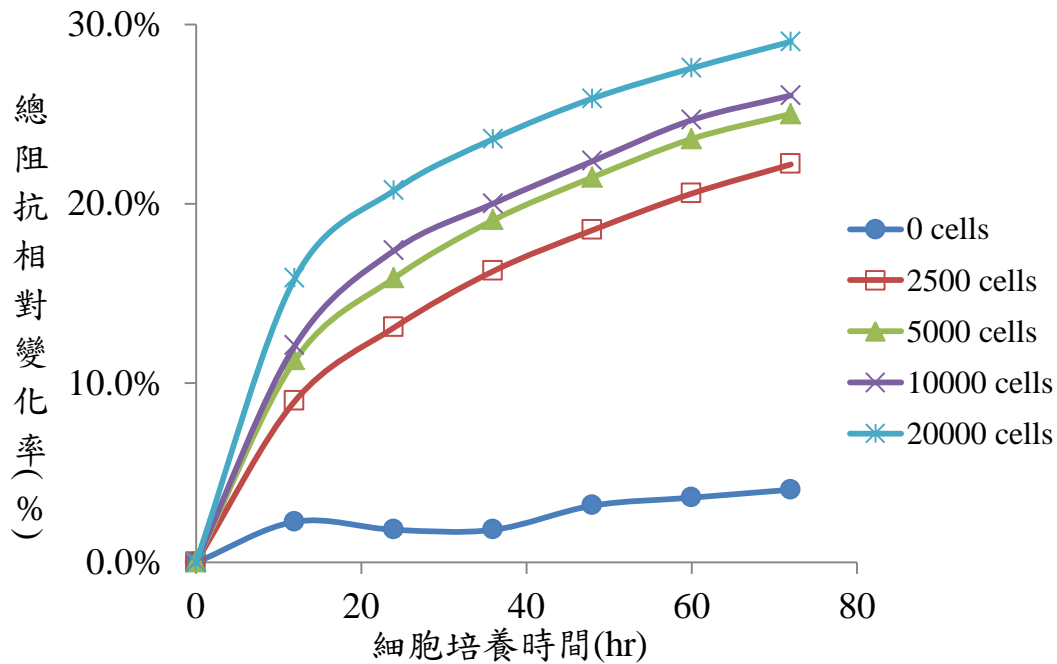


圖 3-6 各細胞密度培養 72 小時之阻抗變化率。

表 5 100Hz 各時間點之總阻抗相對變化率校正曲線。

細胞培養時間(hr)	Slope ($\Delta Z_t\%$ /log cells)	R^2
12	0.07	0.9373
24	0.081	0.9819
36	0.08	0.9568
48	0.08	0.9580
60	0.073	0.9702
72	0.072	0.9702

● 擬合等效電路元件對細胞濃度關係探討

在非法拉第系統中細胞貼附於電極表面會形成電荷轉移電阻(Charge Transfer Resistance, R_{ct})、電雙層電容(Double Layer Capacitance, C_{dl})及溶液電阻(Solution Resistance, R_s)等構造，以串聯或並聯形式組成等效電路(圖 3-7)。經電化學阻抗儀軟體擬合出各元件所貢獻的阻抗值，誤差為 0.12~0.15，換算其各元件的相對變化率，由圖 3-8 發現擬合元件 R_s 及 R_{ct} 與細胞密度之相關性不大，而 C_{dl} 與細胞密度具由線性關係(Slope=0.12, $R^2=0.9695$)，在非法拉第系統細胞貼附較完整，對電極表面形成似電容或似電阻層，在不添加電化學介質的情況下 R_{ct} 的變化與細胞密度關係較不明顯，而 C_{dl} 訊號相對變化率與細胞密度有正相關，且其偵測靈敏度較總阻抗相對變化率高，證明細胞密度所造成的阻抗變化主要來自細胞貼壁所形成的 C_{dl} 構造，而線性略遜於總阻抗相對變化率所做的校正曲線，這說明電化學阻抗分析軟體將總阻抗透過運算擬合出各元件的

阻抗值，其計算並無法完全符合現實的溶液樣品，仍會有部分軟體定義上的誤差，故以總阻抗觀察整個阻抗試驗槽之阻抗變化其線性較理想，但所包含之變因較複雜，所呈現之總阻抗訊號為 R_{ct} 、 C_{dl} 、 R_s 及 W 等元件的綜合表現；而透過擬合元件的參數可藉由特定元件性質推測細胞及蛋白質貼附於電極表面的情況，且變因較單純，惟需考慮軟體運算誤差。

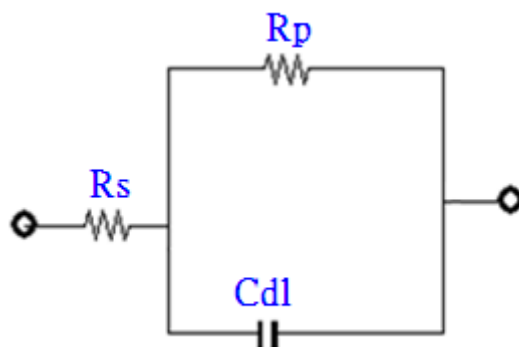


圖 3-7 非法拉第系統之擬合等效電路模型。

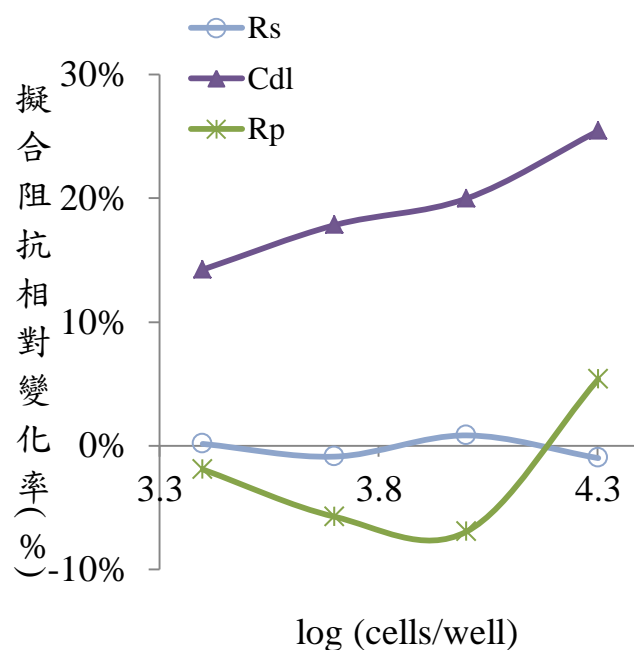


圖 3-8 細胞培養第 24 小時非法拉第系統擬合阻抗元件值與細胞數量關係圖。

圖 3-9 電容變化率(C_{dl})在各細胞密度之時間變化與總阻抗相對變化率(圖 3-6)具有相似的趨勢，顯示 C_{dl} 變化率在總阻抗的變化率中佔有較大的比重。觀察不同時間的 C_{dl} 校正曲線斜率發現隨著時間增加其斜率有微小的增加，而此結果與總阻抗相對變化率(表 6)並不相同，以 C_{dl} 可觀察出隨著細胞的增生線性斜率增加(表 7)，有機會利用 C_{dl} 監測細胞生長變化量，進一步應用於細胞藥物活性偵測。

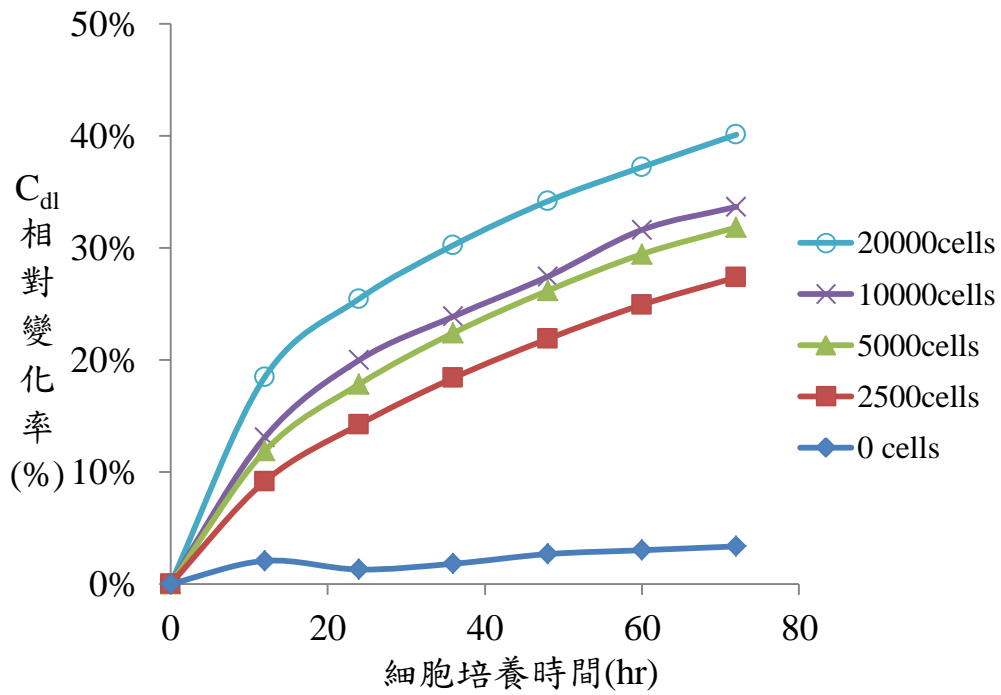


圖 3-9 各細胞密度培養 72 小時之 C_{dl} 變化率。

表 6 各時間點 C_{dl} 擬合元件校正曲線。

細胞培養時間(hr)	Slope($\Delta S_t\%$ /log cells)	R^2
12	0.10	0.9256
24	0.12	0.9695
36	0.12	0.9428
48	0.13	0.9346
60	0.13	0.9714
72	0.13	0.9573

● 藥物活性檢測

進一步將非法拉第系統應用於細胞藥物活性檢測上，發現阻抗量測並未能看出細胞加藥與不加藥之訊號差異，但以 MTT 及 DAPI 染色的結果可看出，MDA-MB-231 經過 4 μ M 2-ME 藥物處理之後，細胞的生長有明顯受到抑制(圖 3-10)，且細胞型態有明顯的改變(圖 3-11)，其型態變化為 2-ME 藥物促進細胞產生凋亡現象所形成的細胞皺縮、核裂解及凋亡小體。

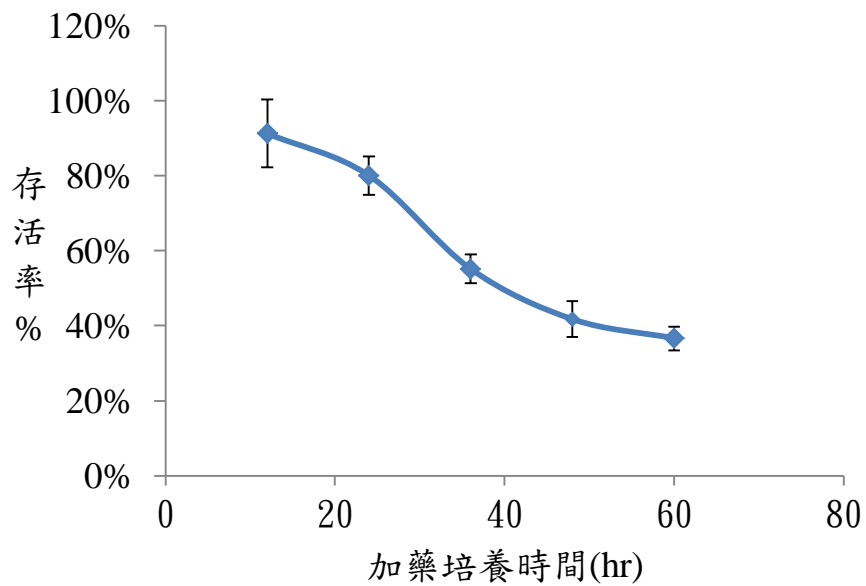


圖 3-10 MTT 檢測 2-ME 藥物對 MDA-MB-231 細胞之抑制現象。

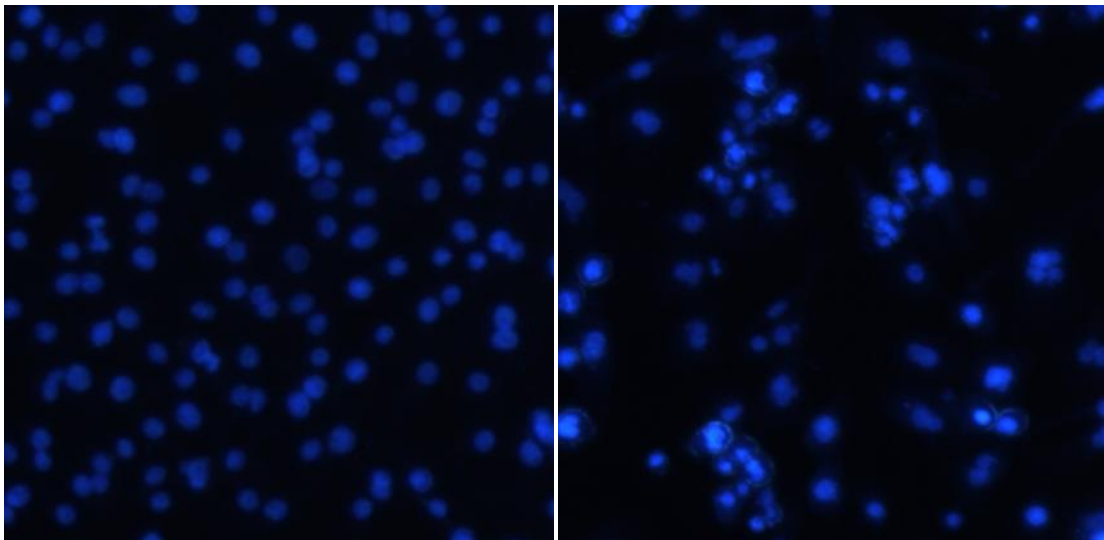


圖 3-11 細胞經藥物處理 60 小時後貼附於金電極表面之型態。左圖為正常培養，右圖為培養液中含 4 μ M 2-ME 藥物。

第三部分直接利用電化學式的血糖檢測儀測細胞培養時葡萄糖代謝量與細胞活性的關聯性

The Warburg Effect 說明癌細胞的生長速度遠大於正常細胞的原因來自於能量的來源差別，多數癌細胞會偏向使用醣解作用(glycolysis)取代一般正常細胞的有氧循環(phosphorylation)，所以癌細胞使用線粒體的方式與正常細胞就會有所不同，為了能更快篩檢抗癌細胞之藥物，使癌細胞的研究能更加迅速方便，我們利用商業的血糖檢測儀測培養細胞後的基質(medium)，並利用 MTT assay 測試癌細胞活性，藉以驗證葡萄糖的代謝是否與細胞活性有關。先以肝癌細胞 Hep-G2 做試驗，結果如圖 3-12，其 Person 相關係數為 0.985，表示二者為高度相關

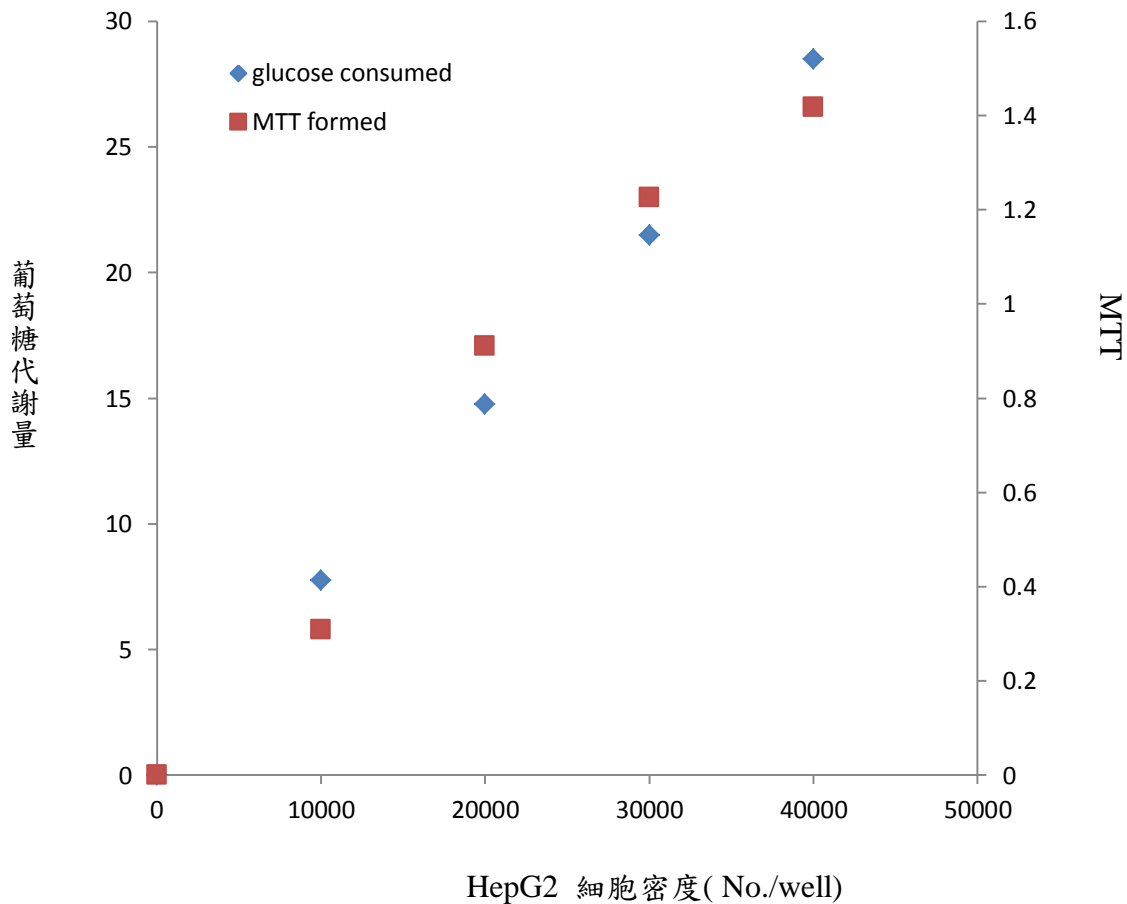


圖 3-12 HepG2 細胞培養消耗葡萄糖與細胞轉化 MTT 與細胞數之關係圖。

四、結論

本研究以計時安培法結合網版印刷三電極之偵測，可克服細胞培養液中蛋白質對於電極吸附所產生的毒化現象，並成功地建立偵測 MDA-MB-231 乳癌細胞活性的最適化條件，利用特定電化學雙介質配方：10 μ M 的 Vit K3 及 5mM 赤血鹽，於特定培養基中與細胞共同培養 20 分鐘後，利用計時安培法結合網版印刷三電極，電位設定 0.4V(vs. pseudo-Ag 參考電極)，取 29~30 秒信號平均值可與細胞量呈現良好的線性關係，並將此方法使用於抗癌藥物及奈米磁性顆粒對細胞活性的測試並與傳統 MTT 比較，此方法替代 MTT 是可行的。未來可進一步應用於生醫材料之毒性探討或其他細胞物種之電化學介質最適化探討，建立其細胞電化學介質資料庫，增加此偵測方法的適用範圍。相較生化常用之活性檢測方法 MTT 試驗，此方法可快速得到結果達到即時偵測的效果，且網版印刷三電極僅需數十微升(μ l)的樣品量即可偵測，可降低細胞培養量及實驗成本，此方法對於藥物篩選及細胞試驗的工作者提供一種新的檢測方法，可有效降低染劑及有機溶劑的使用量，減少對環境的危害。

在阻抗測量部分，法拉第系統其總阻抗訊號變化主要來自 R_{ct} 與 C_{dl} 改變，偵測靈敏度明顯優於非法拉第系統，但所添加之電化學介質於長時間培養對細胞產生傷害，不利於藥物活性檢測上的應用，若將此方法與其他菌種細胞或電化學介質做搭配，避免試劑對細胞的干擾，有機會能將法拉第阻抗系統應用於細胞的即時偵測；而非拉第系統雖亦可透過總阻抗值或 C_{dl} 之相對變化率對細胞數量進行定量，但其訊號變化較不明顯，若能克服電極再現性問題將可使阻抗量測方法臻致理想。

直接測量細胞葡萄糖的代謝的方法，初步以 HepG2 為雛形所得結果是可行的！

參考文獻

● 前言介紹引用之文獻

1. A. Tura, S. Sbrignadello, S. Barison, S. Conti and G. Pacini, *Biophys. Chem.* **129** (2-3), 235-241 (2007).
2. A. Bogomolova, E. Komarova, K. Reber, T. Gerasimov, O. Yavuz, S. Bhatt and M. Aldissi, *Anal. Chem.* **81** (10), 3944-3949 (2009).
3. A. C. Barton, S. D. Collyer, F. Davis, G.-Z. Garifallou, G. Tsekenis, E. Tully, R. O'Kennedy, T. Gibson, P. A. Millner and S. P. J. Higson, *Biosens. Bioelectron.* **24** (5), 1090-1095 (2009).
4. I. Giaever and C. R. Keese, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88** (17), 7896-7900

- (1991).
5. C. Tiruppathi, A. B. Malik, P. J. Del Vecchio, C. R. Keese and I. Giaever, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **89** (17), 7919-7923 (1992).
 6. C. Xiao and J. H. Luong, Toxicol. Appl. Pharmacol. **206** (2), 102-112 (2005).
 7. M. Guo, J. Chen, X. Yun, K. Chen, L. Nie and S. Yao, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1760** (3), 432-439 (2006).
 8. http://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay
 9. <http://zh.wikipedia.org/wiki/DAPI>

第一部分 計時安培法發表文獻所用之參考資料

- [1] The 10 leading causes of death. World Health organization, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>, **June 2011**.
- [2] R.P. Haugland, M.T.Z. Spence, I. Johnson, A. Basey, The handbook: A guide to fluorescent probes and labeling technologies, 10th ed., Invitrogen, life technologies, 2010.
- [3] P.R. Twentyman, M. Luscombe, *Br J Cancer*. **1987**, 56, 279-285.
- [4] A.M. Sieuwerts, J.G. Klijn, H.A. Peters, J.A. Foekens, *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. **1995**, 33, 813-823.
- [5] P. Ertl, E. Robello, F. Battaglini, S.R. Mikkelsen, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 4957-4964.
- [6] P. Ertl, B. Unterladstaetter, K. Bayer, S.R. Mikkelsen, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 4949-4956.
- [7] J. Zhao, Z. Wang, C. Fu, M. Wang, Q. He, *Electroanalysis* **2008**, 20, 1587-1592.
- [8] E.E. Krommenhoek, J.G.E. Gardeniers, J.G. Bomer, X. Li, M. Ottens, G.W.K. Van Dedem, M. Van Leeuwen, W.M. Van Gulik, L.A.M. Van Der Wielen, J.J. Heijnen, A. Van Den Berg, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 5567-5573.
- [9] J.L. Roustan, J.M. Sablayrolles, *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2003**, 96, 434-437.
- [10] J. Zhao, M. Wang, Z. Yang, Z. Yang, *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, 37, 246-253.
- [11] J. Zhao, M. Wang, Z. Yang, Z. Wang, H. Wang, Z. Yang, *Analytica Chimica Acta* **2007**, 597, 67-74.
- [12] H.Y. Ju, J.K. Park, *Anal. Biochem.* **2005**, 341, 308-315.
- [13] R.M. Pemberton, J. Xu, R. Pittson, N. Biddle, G.A. Drago, S.K. Jackson, J.P.

- Hart, *Anal. Biochem.* **2009**, 385, 334-341.
- [14] H.N. Li, Y.X. Ci, *Anal. Chim. Acta* **2000**, 416, 221-226.
- [15] A. Heiskanen, C. Spéjel, N. Kostesha, S. Lindahl, T. Ruzgas, J. Emnéus, *Anal. Biochem.* **2009**, 384, 11-19.
- [16] H.Y. Tsai, S.H. Tsai, H.W. Deng, C.B. Fuh, Proc. *2012 International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology*, Macau, **2012**.
- [17] G. Loor, J. Kondapalli, J. Schriewer, N. Chandel, H.T. Vanden, P. Schumacker, *Free Radic Biol Med.* **2010**, 49, 1925-1936.
- [18] K.A.O. Ellem, G.F. Kay, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1983**, 112, 183-190.
- [19] I.L. Sun, F.L. Crane, C. Grebing, H. Löw, *Exp. Cell Res.* **1985**, 156, 528-536.
- [20] P. Basset, Y. Quesneau, J. Zwiller, *Cancer Res.* **1986**, 46, 1644-1647.

第二部分 阻抗分析 為碩士生蔡尚恆碩士論文資料

國科會補助專題研究計畫出席國際學術會議心得報告

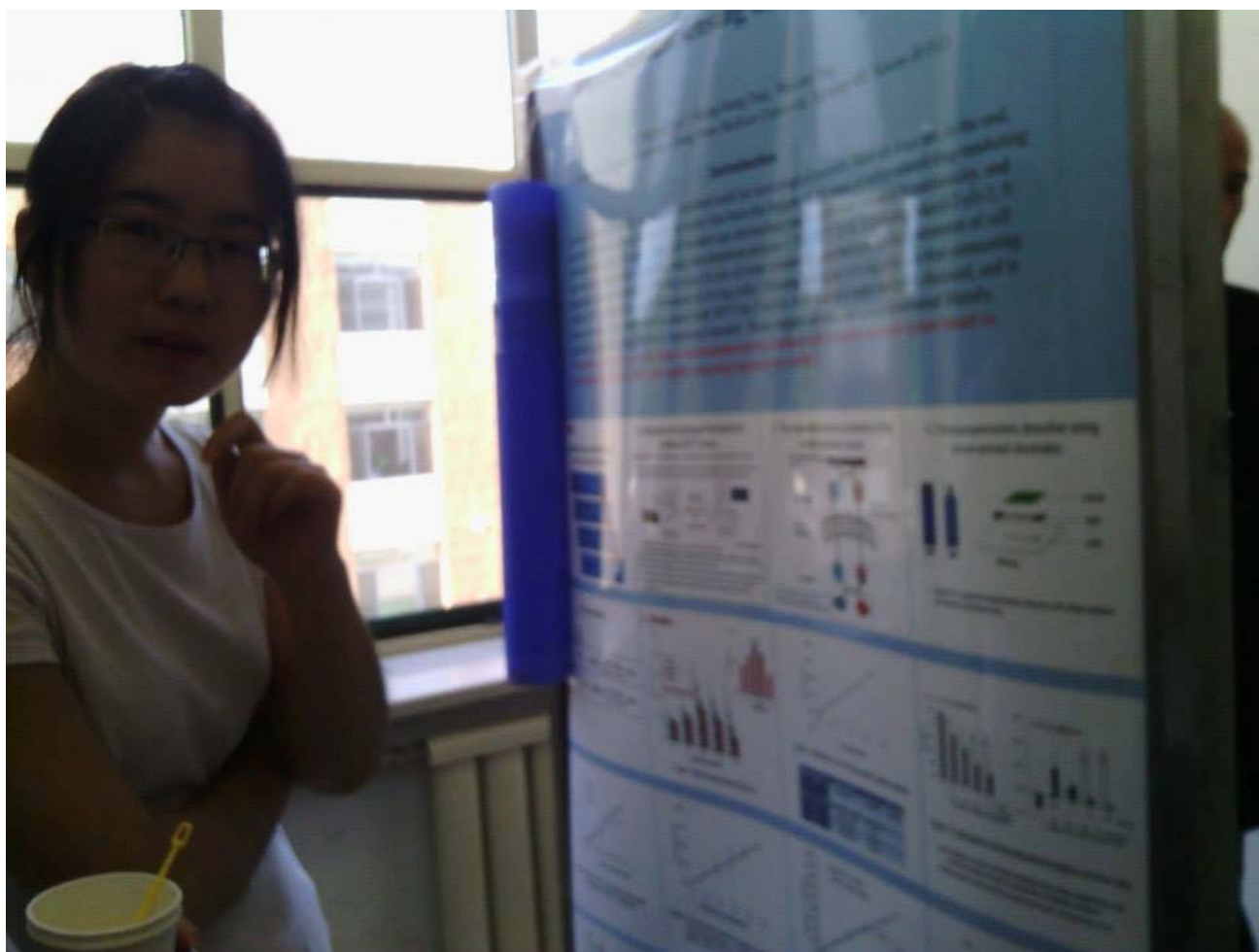
日期：102 年 10 月 2 日

計畫編號	NSC 101-2113-M-040-001-		
計畫名稱	發展電化學法偵測癌細胞活性並應用於抗癌藥物篩選		
出國人員姓名	蔡惠燕	服務機構及職稱	中山醫學大學 (教授)
會議時間	102 年 08 月 17 日 至 102 年 08 月 20 日	會議地點	中國 長春
會議名稱	(中文) 2013 第十四屆中國國際電分析化學研討會 (英文) The 14 th international symposium on electroanalytical chemistry (14th ISEAC)		
發表題目	(中文) 利用計時安培法評估肝細胞活性 (英文) assessment of hepatocyte viability via chronoampertric method based on screen-printed electrodes		

一、參加會議經過

八月十七由中正機場出發直飛長春，當天完成報到程序。八月十八日 8:00 am 由汪爾康 (EK Wang) 院士開幕 開始三天緊鑼密鼓的學術報告。適逢汪院士八十大壽，大會非常用心的安排 welcome party 並由長春化學所的同儕表演幫汪院士祝壽，場面非常溫馨。在研討會中本人做 poster presentation，大部分作的主題都偏材料分析，環境分析：我的主題較為特別--結合電化學及細胞生物學。有數位博士生表興趣，詢問未來是否有機會

到台灣來做 postdoc.





會後轉至日本福岡 Kyushu university 參加 The 12th Asian conference on analytical science. 除了一般學術研討之外，還安排了 education of analytical chemistry in Asian countries.

二、與會心得

第一次參加 focus 在電分析化學的研討會，了解到電化學在不同領域上的應用。在亞洲分析化學會中第一次聽到來自泰國、印尼、越南等不同國家在大學中的分析化學課程之安排，會中來自美的 Professor Thomas J. Wenzel 提出現在分析化學不教 classical analysis, 而巴基斯坦的 Nama Memon 公開徵求大家把舊儀器捐給他們，在教學上先進國家與落後國家其實有很大的

差異。

三、發表論文全文或摘要

Assessment of hepatocyte viability via chronoamperometric method based on screen-printed electrodes

Hweiyen Tsai*, Shang-heng Tsai, Wei J. Ting

Department of Applied Chemistry, Chung Shan Medical University, No.110, sec.1, Jianguo N. Rd., South Dist. Taichung 402, Taiwan

Email: annetsai@csmu.edu.tw

Cell-based assay is currently an important method used for toxicological research. Since all drugs are, in the end, metabolized in the liver, drug-induced liver injury has been the biggest single cause of safety-related drug-marketing withdrawals in the last 50 years¹. Liver-cell models are increasingly used to evaluate chemical hepatotoxicity, and these now play an important role in the drug-development process². The MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) assay is one of most commonly used methods for the assessment of cell viability. MTT is reduced to purple formazan in living cells³. Forming formazan in living cells is a time-consuming process, however, since cells must be raised with MTT for 3 to 4 h. Formazan is a water-insoluble chemical, and is generally solubilized using DMSO or isopropyl alcohol. These organic solvents are not environmental friendly.

The purpose of this study is to develop a chronoamperometric method with a double-mediator system based on screen-printed electrodes (SPE) for rapidly assessing hepatocyte viability. The chronoamperometric method based on SPE shows that the oxidation currents were proportional to the concentrations of ferrocyanide that were prepared in culture medium. The linearity was at a range of 0.02 ~ 0.36 mM ($R^2 = 0.9935$), and the detection limit ($S/N = 3$) was 8 μ M. A disposable SPE was used for each cultured sample, so protein-adsorbing and cross contamination problems were minimized. The oxidation currents were linearly increased with the cultured cell density at a range of 0 ~ 10^5 cells/well (Slope = 3.4 nA/ 10^4 cells, $R^2 = 0.9944$). The viability assessment can be done in 20 min. The cytotoxic effect of lipopolysaccharides was determined via both chronoamperometric method and MTT assay. There was no significant difference between the results measured by the two methods.

Chronoamperometry with double electrochemical mediators, succinate and ferricyanide, can be used as an alternative avenue for rapidly assessing hepatocyte viability. The chronoamperometric detection based on screen-printed electrodes required less reagent for measurement, and thus less culture medium and fewer cells were needed, and the experimental cost was reduced.

Acknowledgements

This work was supported by the National Science Council of Taiwan, and Chung Shan medical university.

References

- ¹ F. D. A. Center for Drug Evaluation and Research and Center for Biologics Evaluation and Research, USA, (2009).
- ² A. Guillouzo, Environmental Health Perspectives **106**, 511 (1998).
- ³ F. Denizot and R. Lang, Journal of Immunological Methods **89** (2), 271 (1986).

四、建議

一個好國際研討會的辦理，可增加國家的曝光度並建立國家形象，到不同國家也可了解不同的民族性。在長春，大會飯店就在長春化學所的對面，大會工作人員就引導與會人員橫跨車水馬龍的六線道公路，高知識份子都如此做，怪不得常見新聞媒體報導大陸交通如何亂與行人如何不遵守交通秩序。而在日本可看到人民對政府政策的配合度，政府希望大家節約用電，冷氣不要調太冷，甚至在地鐵站月台、飯店大廳與走道並不開冷氣，在大會會場大家汗流浹背，會議主持人請大家把西裝脫掉，穿輕便一點，並沒有因為開國際研討會而把冷氣開強。反觀台灣大家反核，卻把冷氣開到要穿外套。

五、攜回資料名稱及內容

1. Program and extended abstracts, 14th ISEAC

2. 根深葉茂—汪爾康先生八秩華誕 專輯

六、其他

無

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2013/10/17

國科會補助計畫	計畫名稱: 發展電化學法偵測癌細胞活性並應用於抗癌藥物之篩選
	計畫主持人: 蔡惠燕
	計畫編號: 101-2113-M-040-001- 學門領域: 電化學
無研發成果推廣資料	

101 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：蔡惠燕		計畫編號：101-2113-M-040-001-					
計畫名稱：發展電化學法偵測癌細胞活性並應用於抗癌藥物之篩選							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	1	1	100%		
		研討會論文	2	1	200%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	3	2	100%	人次	其中蔡尚恆同學未領取本計畫津貼
		博士生	0	0	100%		
博士後研究員		0	0	100%			
專任助理		0	0	100%			
國外	論文著作	期刊論文	2	1	200%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	2	1	200%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
博士後研究員		0	0	100%			
專任助理		0	0	100%			

<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>本計畫執行期間亦培育大學部學生從事研究之訓練，協助學生順利推甄上台大化學研究所。亦辦理 2013 分析化學小組春季交流研討會。</p>
--	--

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科教處計畫加填項目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

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：

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 100 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）

利用電化學方式偵測細胞活性，可即時取得相關實驗數據，增加藥物動力學探討的方便性，結合網版印刷電極製成微量細胞培養槽所需樣品量少，可減少研發的成本及減少實驗廢棄物，是對環境友善的研究發展。