

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

Gellan gum 水膠做為3D腫瘤球體基質與口腔癌治療貼片之研究 (第3年)

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 101-2221-E-040-003-MY3
執行期間：103年08月01日至104年10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：蔡婉琪
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：陳翊民
碩士班研究生-兼任助理人員：高安琪
碩士班研究生-兼任助理人員：劉品君
碩士班研究生-兼任助理人員：洪睿延
碩士班研究生-兼任助理人員：許銘芳
碩士班研究生-兼任助理人員：鄭宏偉
碩士班研究生-兼任助理人員：簡宇辰

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 105 年 01 月 27 日

中文摘要：以3D方式培養腫瘤細胞被認為具有腫瘤活體組織的特點，例如細胞緊密排列、延續性低氧細胞群、異質性以及功能性腫瘤增長特性等優點。本計畫為建立3D腫瘤球體 (3D tumor spheroids)的研究平台，選擇以微生物多醣體Gellan gum為基質與癌細胞共同培養形成類腫瘤組織。本研究採用類似AB膠的凝膠原理，開發Gellan-ADH/Gellan-CDI、Gellan-ADH/PEG-diNHS兩種膠體系統。此凝膠不但具有可調控的機械性質，並且可藉由添加致癌因子或藥物做為致癌機轉或治療策略之研究平台。為開發快速且具有生物安全性的凝膠系統，本研究在Gellan gum的酸基修飾Adipic dihydrazide (以GG-ADH表示)。另外，也製備Gellan-CDI (1,1'-Carbonyldiimidazole) 或 PEG-diNHS。Gellan-ADH和Gellan-CDI (或PEG-diNHS)在溫和的反應條件下，可藉由amide bond的鍵結產生凝膠。而Gellan gum水膠的機械模數 (Young's modulus) 則可利用Gellan-ADH/Gellan-CDI的相對莫耳數，或是利用PEG的分子量進行調控。本研究開發之凝膠系統不但能應用於癌症機轉之體外研究，並可應用於癌症治療之體外模擬。本研究進一步利用Gellan gum 3D腫瘤球體，探討機械性質與口腔鱗狀上皮細胞癌化以及對口腔癌細胞惡化之關係。為了解機械性質引起之訊息傳遞機制，本研究選擇以RhoA/ROCK、calcineurin/NFATc pathway做為研究對象，探討和口腔癌之關係。另外，為改善clioquinol在治療口腔癌之投藥方式，本計畫以Gellan gum膠體做為clioquinol(CQ)的傳輸載體，研究clioquinol的釋放動力學。並且製備Gellan gum-clioquinol口腔癌治療貼片，期望此貼片可應用在口腔癌患者腫瘤組織切除後傷口的保護，以及應用在口腔癌初期口腔黏膜白化病灶處癌細胞的局部毒殺。本計畫將生醫材料研發和癌症研究結合是一種創新的構想，同時也兼具基礎研究和應用開發的價值。

中文關鍵詞：Gellan gum、訊息傳遞、口腔癌、Clioquinol (CQ)

英文摘要：3D culturing of tumor cells is thought to have all the characteristics of living tumor tissue, such as cells that are closely arranged, hypoxic cell fractions, heterogeneity and tumor proliferation. To establish the cancer research platform, we chose Gellan gum (microorganism polysaccharide) as the substrate and co-culture with cancer cell to form 3D tumor spheroids. Gellan-ADH/Gellan-CDI and Gellan-ADH/PEG-diNHS hydrogels are developed with the principle analogous to that of AB glue. This hydrogel forming system not only has mechanical properties that can be regulated, but can also merger carcinogenic factors or drugs for studying the molecular mechanisms or treatment policy of cancer. To develop a faster, nontoxic and covalent cross-linking method for constructing 3D Gellan gum hydrogels. Gellan gum will graft with adipic acid dihydrazide (Gellan-ADH) and another polymer chain as like Gellan-CDI (1,1'-Carbonyldiimidazole) or PEG-diNHS also be synthesized by a

variety of methods. Gellan-CDI or PEG-diNHS can interact with primary amines of Gellan-ADH to form amide bond resulting in the formation of hydrogels. Gellan gum-based hydrogels with different Young's modulus can be controlled by adjusting the Gellan-ADH/Gellan-CDI mole ratios or the molecular weight of PEG. Further study, we evaluated the effects of hydrogel Young's modulus on RhoA/ROCK and calcineurin/NFATc signaling during oral carcinogenesis and progression.

Additionally, to change clioquinol delivery method for improved oral cancer treatment, we use Gellan gum as drug carrier for clioquinol and study its release kinetics in vitro. We also prepare Gellan gum-clioquinol therapeutic patches for oral cancer. The patches are anticipated to protect the wounds caused by tumor excision and terminate cancer cells reproduction in oral cancer patients. The combination of biomedical material development and cancer research described in this project is a novel concept, and is valuable in both basic research and applied research.

英文關鍵詞：Gellan gum, signal transduction, oral cancer

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 水膠做為 3D 腫瘤球體基質與口腔癌治療貼片之研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 101-2221-E-040-003-MY3

執行期間：101 年 8 月 1 日至 104 年 10 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：陳翊民、劉品君、高安琪、陳俐婷、洪睿延、簡宇辰、黃奕鑾、
鄭宏偉、許銘芳

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 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 105 年 1 月 27 日

一、中、英文摘要及關鍵詞(keywords)

Abstract

3D culturing of tumor cells is thought to have all the characteristics of living tumor tissue, such as cells that are closely arranged, hypoxic cell fractions, heterogeneity and tumor proliferation. To establish the cancer research platform, we chose Gellan gum (microorganism polysaccharide) as the substrate and co-culture with cancer cell to form 3D tumor spheroids. Gellan-ADH/Gellan-CDI and Gellan-ADH/PEG-diNHS hydrogels are developed with the principle analogous to that of AB glue. This hydrogel forming system not only has mechanical properties that can be regulated, but can also merger carcinogenic factors or drugs for studying the molecular mechanisms or treatment policy of cancer.

To develop a faster, nontoxic and covalent cross-linking method for constructing 3D Gellan gum hydrogels. Gellan gum will graft with adipic acid dihydrazide (Gellan-ADH) and another polymer chain as like Gellan-CDI (1,1'-Carbonyldiimidazole) or PEG-diNHS also be synthesized by a variety of methods. Gellan-CDI or PEG-diNHS can interact with primary amines of Gellan-ADH to form amide bond resulting in the formation of hydrogels. Gellan gum-based hydrogels with different Young's modulus can be controled by adjusting the Gellan-ADH/Gellan-CDI mole ratios or the molecular weight of PEG. Further study, we evaluated the effects of hydrogel Young's modulus on RhoA/ROCK and calcineurin/NFATc signaling during oral carcinogenesis and progression.

Additionally, to chang clioquinol delivery method for improved oral cancer treatment, we use Gellan gum as drug carrier for clioquinol and study its release kinetics in vitro. We also prepare Gellan gum-clioquinol therapeutic patche for oral cancer. The patche is anticipated to protect the wounds caused by tumor excision and terminate cancer cells reproduction in oral cancer patients. The combination of biomedical material development and cancer research described in this project is a novel concept, and is valuable in both basic research and applied research.

Key words: Gellan gum, signal transduction, oral cancer

中文摘要

以 3D 方式培養腫瘤細胞被認為具有腫瘤活體組織的特點，例如細胞緊密排列、延續性低氧細胞群、異質性以及功能性腫瘤增長特性等優點。本計畫為建立 3D 腫瘤球體 (3D tumor spheroids) 的研究平台，選擇以微生物多醣體 Gellan gum 為基質與癌細胞共同培養形成類腫瘤組織。本研究採用類似 AB 膠的凝膠原理，開發 Gellan-ADH/Gellan-CDI、Gellan-ADH/PEG-diNHS 兩種膠體系統。此凝膠不但具有可調控的機械性質，並且可藉由添加致癌因子或藥物做為致癌機轉或治療策略之研究平台

為開發快速且具有生物安全性的凝膠系統，本研究在 Gellan gum 的酸基修飾 Adipic dihydrazide (以 GG-ADH 表示)。另外，也製備 Gellan-CDI (1,1'-Carbonyldiimidazole) 或 PEG-diNHS。Gellan-ADH 和 Gellan-CDI (或 PEG-diNHS) 在溫和的反應條件下，可藉由 amide bond 的鍵結產生凝膠。而 Gellan gum 水膠的機械模數 (Young's modulus) 則可利用 Gellan-ADH/Gellan-CDI 的相對莫耳數，或是利用 PEG 的分子量進行調控。本研究開發之凝膠系統不但能應用於癌症機轉之體外研究，並可應用於癌症治療之體外模擬。本研究進一步利用 Gellan gum 3D 腫瘤球體，探討機械性質與口腔鱗狀上皮細胞癌化以

及對口腔癌細胞惡化之關係。為了解機械性質引起之訊息傳遞機制，本研究選擇以 RhoA/ROCK、calcineurin/NFATc pathway 做為研究對象，探討和口腔癌之關係。

另外，為改善 clioquinol 在治療口腔癌之投藥方式，本計畫以 Gellan gum 膠體做為 clioquinol(CQ)的傳輸載體，研究 clioquinol 的釋放動力學。並且製備 Gellan gum-clioquinol 口腔癌治療貼片，期望此貼片可應用在口腔癌患者腫瘤組織切除後傷口的保護，以及應用在口腔癌初期口腔黏膜白化病灶處癌細胞的局部毒殺。本計畫將生醫材料研發和癌症研究結合是一種創新的構想，同時也兼具基礎研究和應用開發的價值。

關鍵字:Gellam gum、訊息傳遞、口腔癌、Clioquinol (CQ)

二、研究背景及目的:

由國民健康局的癌症登記年度報告可以得知，近年來男性得口腔癌的發生率與死亡率高居第四名，此外口腔癌亦為前十大癌症死亡率。近10年發生率和死亡率已分別增加了85%和56%，目前每年分別有5千多人罹患和2千多人死於口腔癌。而口腔癌平均死亡年齡為54歲，較其他癌症早10-20年，為青壯年男性最容易發生的癌症。口腔癌發生於口腔黏膜長期受到外在與內在的刺激而產生的細胞病變。由於許多國人有嚼食檳榔的習慣，更大大的增加其罹癌的風險。而治療癌症最佳的方法就是進行外科手術將其病灶區移除，當面對較大的腫瘤時，可能會切除部分上顎、舌頭或下巴，切除後將連帶影響病患的外觀和其咀嚼、吞嚥和說話的能力。在手術後，將會給與化學藥物治療，但目前抗癌藥物無法準確判斷正常細胞與癌細胞，使藥物無法直接消滅癌細胞。故希望藉由gellan gum製成的薄膜來包覆藥物，直接將藥物貼於病灶區治療。此實驗是為了找出最適合的Gellan gum-sHA水膠機械強度來製成薄膜來包覆與慢慢釋放藥物，並探討其不同機械強度之Gellan gum-sHA水膠對口腔上皮傳遞訊號是否影響。在此實驗中將評估對不同機械強度之Gellan gum-sHA水膠對口腔癌細胞惡化之影響。

三、研究方法與實驗結果

本計畫之研究成果分為五個部分進行撰寫：

第一部分：Clioquinol(CQ)藥物對人類口腔癌細胞OC-2 和 HSC-3 之毒殺效應。

第二部分：3D Matrigel培養SCC-15研究口腔癌惡化之機轉。

第三部分：以Gellan gum水膠為基質建構3D腫瘤球體作為癌症研究之平台。

第四部份：以Gellan gum為基材傳輸口腔癌治療藥物之動力學研究及動物實驗評估

(第一~第三部分已於期中報告呈現，與此將以精簡版方式呈現)

(某些部分之研究方法與結果，因已投稿或準備投稿之故，將以英文方式呈現不再翻譯為中文)

第一部分：Clioquinol(CQ)藥物對人類口腔癌細胞OC-2 和 HSC-3 之毒殺效應(已獲23rd Biennial EACR Congress接受)。

1-1：研究方法與結果

Cell viability was determined via MTT assay. Cell apoptosis, caspase-3 activation, mitochondria membrane potential change and ROS production were analyzed by flow cytometer and analyzed by WinMDI analysis software. Protein expression was detected by western blot.

結果：We found that CQ with copper could enhance the cytotoxicity of CQ in two kinds of oral cancer cells, OC-2 and HSC-3 cells. Further, CQ with copper would induce cell apoptosis, decrease mitochondria membrane potential and increase ROS production in OSCC cells. Moreover, we also found the effect of CQ with copper caused aberrant expression of apoptosis-related protein in intrinsic cell apoptosis pathway. CQ with copper could enhance the cytotoxicity of CQ in oral cancer cells compared to CQ alone. CQ with copper could also induce ROS production, mitochondria disruption, and trigger cell apoptosis via intrinsic (mitochondrial) cell apoptosis pathway in OSCC cells. Our results supported that CQ would act as a potential selective anti-cancer drug due to the accumulation of copper in tumor part but not normal tissue, and induce OSCC cells apoptosis by intrinsic apoptosis pathway.

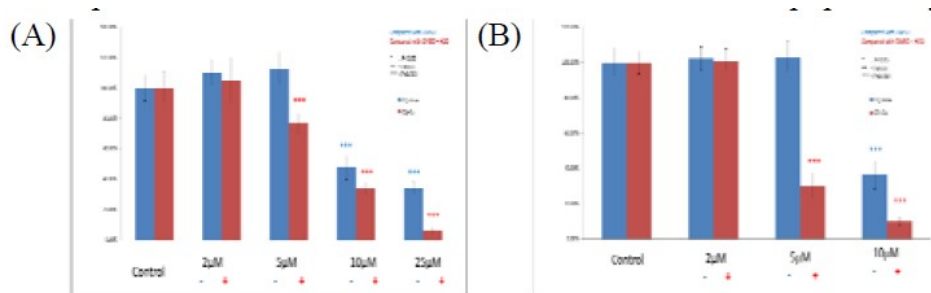


Figure 1. CQ with copper could enhance the cytotoxicity of CQ in oral cancer cells. Cell viability was determined via MTT assay.(A)HSC-3 cells (B)OC-2 cells were treated with CQ alone (blue line) or copper 10µM with CQ 2, 5, 10, 25µM (red line).

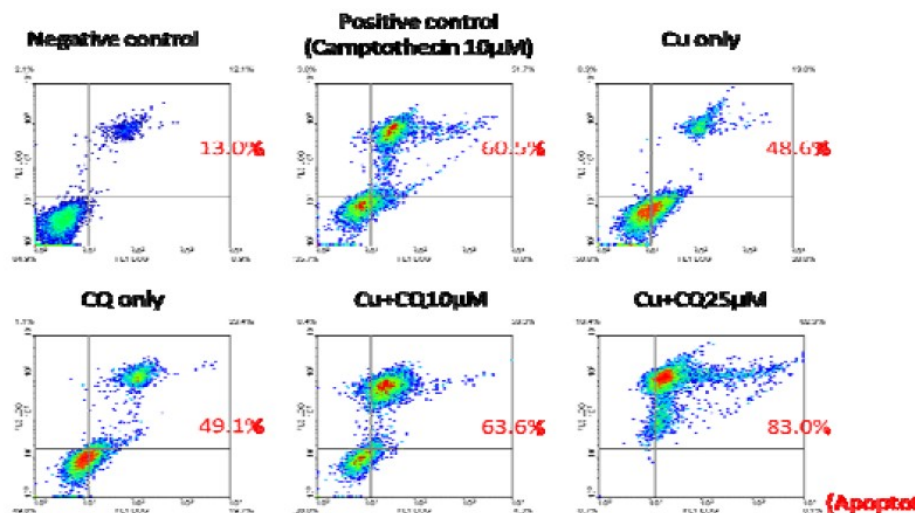


Figure 2. CQ with copper induced cell apoptosis in a dose-dependent manner, and the effect of CQ plus copper is more than CQ alone or copper alone treatment. Cell apoptosis with Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Invitrogen) by Coulter Epics XL Flow Cytometer. Apoptotic cells are annexin V –FITC (FL1) positive, with or without PI (FL3) positivity as shown in the right hand quadrant.

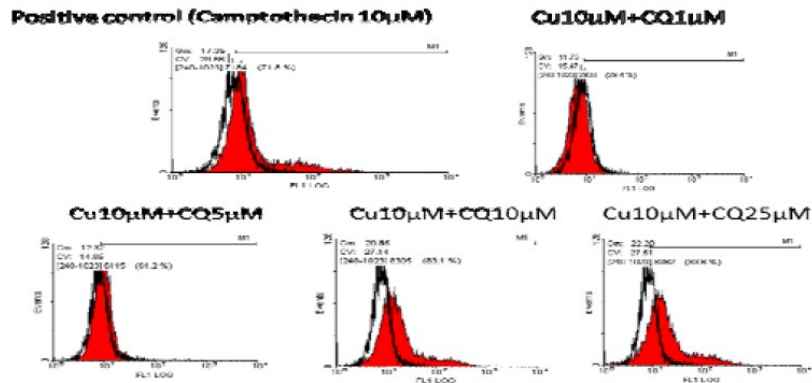


Figure 3. CQ with copper treatment increased the caspase-3 activity of OC-2 cells in a dose-dependent manner. Caspase-3 activation with BD active caspase-3 apoptosis kit were determined by Coulter Epics XL Flow Cytometer. OC-2 cells were treated with Copper 10 μ M plus CQ1, 5, 10, 25 μ M (the red peak) compared with negative control (the hollow peak)

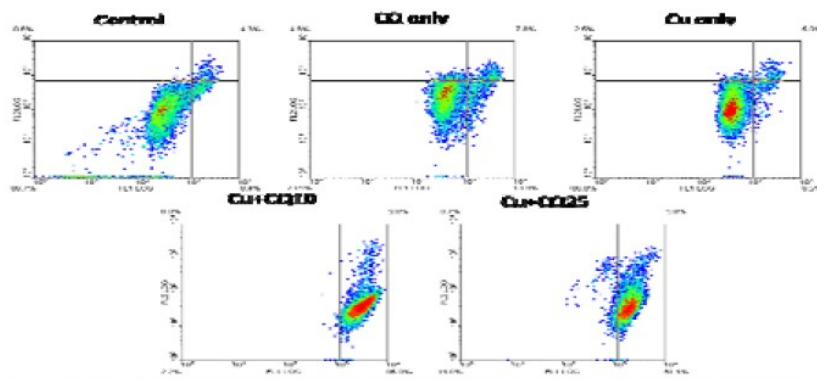


Figure 4. CQ with copper treatment decreased mitochondria membrane potential of OC-2 cells. Measurement of mitochondrial membrane potential (MMP) was performed with the JC-1 stain (Invitrogen), showing red fluorescent JC-1 aggregates (FL2) at higher MMP. When MMP decreases, JC-1 aggregates depart from mitochondria and change to green fluorescent JC-1 monomers (FL1).

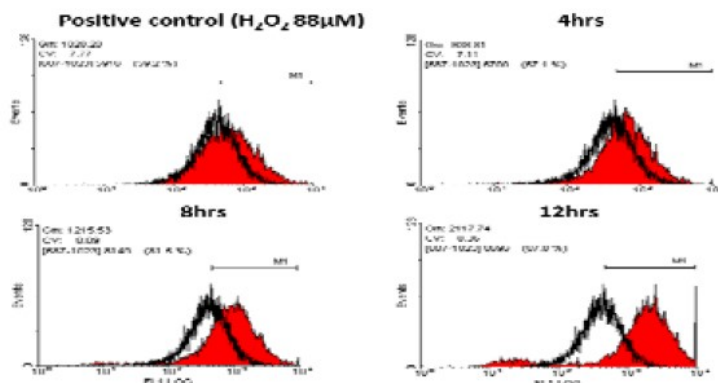


Figure 5. CQ with copper increased ROS production of HSC-3 cells in a time-dependent manner. Flow cytometric analysis of reactive oxygen Species (ROS) production with DCF-DA (Sigma-Aldrich) in HSC-3 cells after treatment with 10 μ M copper plus 10 μ M CQ in a time-dependent manner.

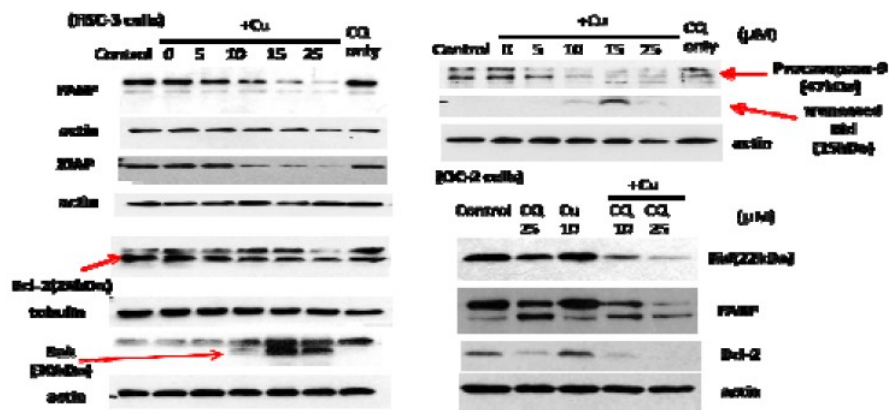


Figure 6. CQ with copper treatment caused aberrant expression of apoptosis-related protein in intrinsic cell apoptosis pathway in OSCC cells. CQ with copper (10 μ M) increased the level of pro-apoptotic protein Bak, truncated Bid, and decreased the level of anti-apoptotic protein XIAP, Bcl-2, procaspase-9 in intrinsic cell apoptosis pathway. Moreover, the effect of CQ with copper treatment induced PARP cleavage which contributed to OSCC cell apoptosis.

第二部分：3D Matrigel培養SCC-15研究口腔癌惡化之機轉

2-1：Matrigel-Gellan gum 凝膠製備

目的：確認在何種比例下 Matrigel 可順利凝膠

材料：Matrigel, gellan gum, medium

組別：1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9

結果：1:2~1:6 皆可順利凝膠，但凝膠強度有待後續實驗

1:7~1:9 幾乎不凝膠

且因 matrigel 與 gellan gum 的凝膠與溫度有關，故室溫下會漸漸溶膠



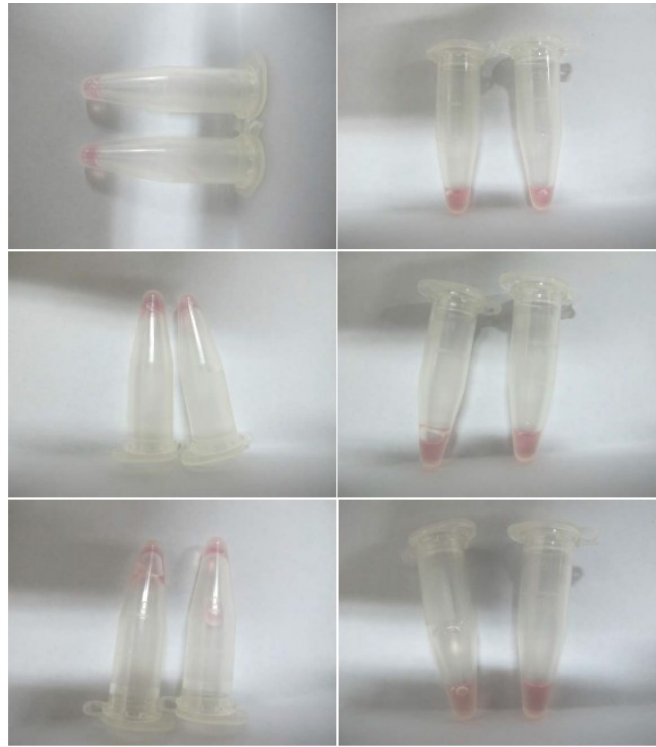
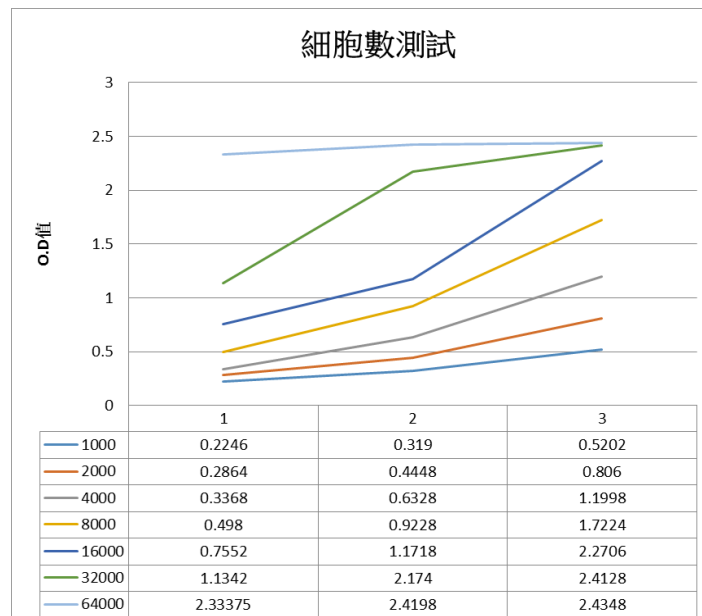


圖 1:不同比例 Matrigel 與 gellan gum 混合之凝膠情形，a~f(由上而下)混合比例分別為 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7。

2-2：觀察以 48well 養適合的 SCC15 細胞培養濃度

材料：Matrigel, gellan gum, SCC15 cell line, 48 well plate

步驟：分別在 well 中加入 1×10^3 、 2×10^3 、 4×10^3 、 8×10^3 、 1.6×10^4 、 3.2×10^4 及 6.4×10^4 ，並收集三天的數據做圖(天數 VS 細胞量)。



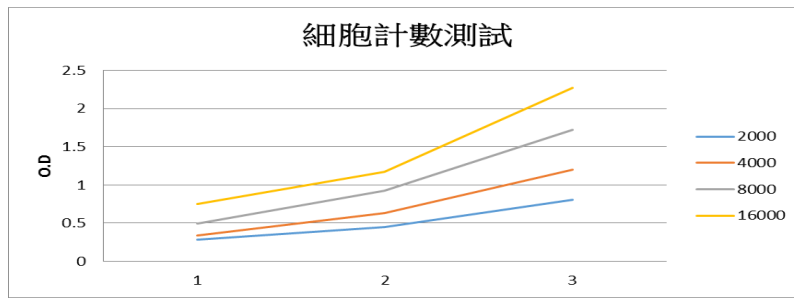


圖 2:細胞濃度與培養天數之關係。

2-3 : Matrigel 與 SCC15 細胞共同培養之生長狀況

材料 : Matrigel, gellan gum, SCC15 cell line, 48 well plate

步驟 :

Day1	Day2	Day3
不處理，直接取 400ul 的細胞，使用 12well	不處理，直接取 400ul 的細胞，使用 12well	不處理，直接取 400ul 的細胞，使用 12well
Matrigel:50ul GG:150ul 乾燥後 coating 共 400ul 的細胞，使用 12well	Matrigel:50ul GG:150ul 乾燥後 coating 共 400ul 的細胞，使用 12well	Matrigel:50ul GG:150ul 乾燥後 coating 共 400ul 的細胞，使用 12well
1:4 做 14 個 well M:G:C=100:50:250 M:G:C=100:250:50 各七個 well，五個做 WST， 兩個做 GA	1:4 做 14 個 well M:G:C=100:50:250 M:G:C=100:250:50 各七個 well，五個做 WST， 兩個做 GA	1:4 做 14 個 well M:G:C=100:50:250 M:G:C=100:250:50 各七個 well，五個做 WST， 兩個做 GA

細胞數: 1×10^5 。一天收三盤，先拍照(一次四張，三天共十二張)，再各取 5well 做 WST(96well, 10ul/well, 波長取 420nm~480nm(450nm))，其中各 2well 做 GA，先冷凍起來要切片時取用。

結果 :

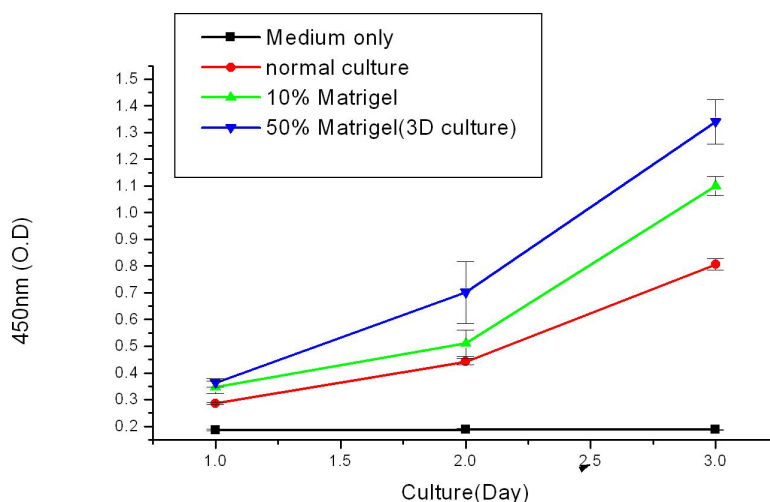


圖 3: SCC15 在 3D Matrigel 培養時之 MTT test。

2-4：3D 細胞團之石蠟切片觀察

上述製備之 3D Matrigel-SCC15 細胞團，以戊二醛固定後，以石蠟包埋進行組織切片觀察。

結果：HE stain 拍照的結果，大部份都是切到組織塊，有些片子幾乎沒有細胞出現，檢討後改變材料與細胞混合時的條件及步驟，並自行製備冷凍切片與 HE stain 及 IHC 染色片。實驗持續進行中。

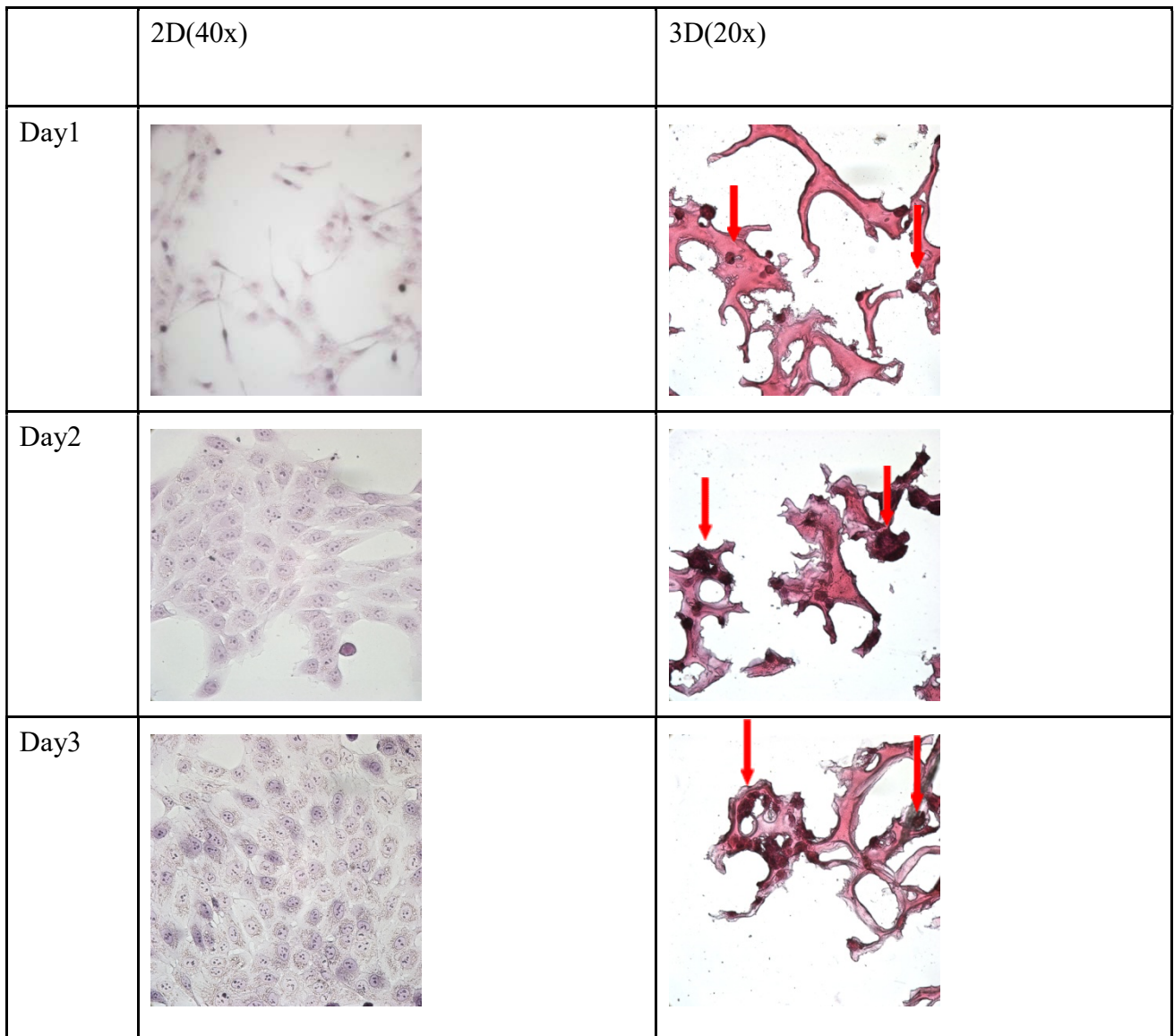


圖 4：3D 細胞團之石蠟切片觀察。

2-5: 3D 細胞團之 SEM 觀察

將 Matrigel 與細胞培養液 1:1 混合後養在 24well 中，培養三天後加 Glutaraldehyde 固定 O/N，隔天以序列酒精脫水，將 sample 以臨界點乾燥脫水後拍攝 SEM 照片。

結果：

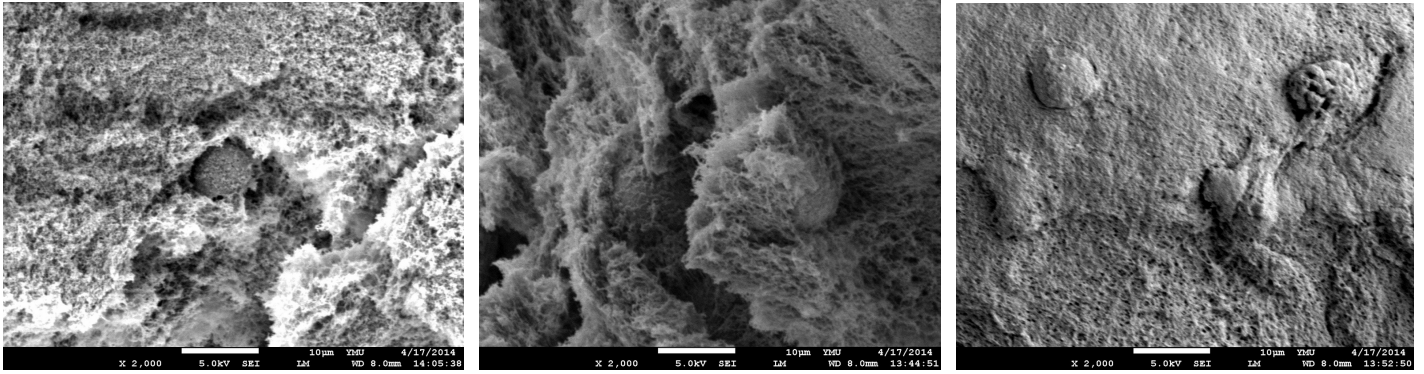


圖 5：3D 細胞團之 SEM 觀察。

2-6：以 2D 和 3D 培養 SCC-15 對訊息傳遞之影響

本實驗將 SCC-15 培養在 2D culture dish 以及 3D 的 Matrigel 中，於培養 24, 48, 72 小時之後，抽取 mRNA，利用 RT-PCR 分析不同培養環境下 GADPH、Ras、ERK、MEK、MMP2、P53 等基因之表現。

(1) RNA 純化：加 1 ml 的 Trizol(cell lysis)至 cell pellet(細胞數 10^6 - 10^7)，vortex 後 25°C 下放置 5 min，transfer to eppendroff，每 1ml 的 lysis solvent 加 0.2 ml 的 chloroform，劇烈 vortex 後， 25°C 下放置 2 min，12000 g， 4°C 下離心 15 min，分層後最上層透明為 RNA 層，取 上層(不要取到白色物)至新的 eppendroff (約 0.51 ml)再加入等量的 isopropanol，vortex 均勻後室溫下放置 10 min。12000 g， 4°C 下離心 10 min，可得白色沉澱物 (RNA)，Air dry on ice (可先用棉花棒將 eppendroff 管壁周圍酒精吸乾，pellet 乾燥過程中隨時注意不要完全乾，否則 RNA 不好溶解)，將 RNA 溶再 20 μl 的 DEPC 水中， -70°C 保存。

(2) RT (合成 cDNA)：將保存在 -70°C 的 RNA 在冰上解凍，取 1 λ 的 sample 加到 399 λ 的水中(稀釋 400 倍)，測 260/280 之 OD，計算 RNA 濃度：

$$1 \text{ OD} = 40\mu\text{g/ml} \times 400 = 16000\mu\text{g/ml} = 16\mu\text{g}/\mu\text{l}$$

若所測之 OD 為 0.141 則 RNA 濃度為 $0.141 \times 16 = 2.267\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

取 RNA 的量為 5 μg (體積須由計算得到) 在加 DEPC- H_2O 使最終體積為 11 λ ，加 1 λ 的 oligo dT (若不溶可加熱至 70°C)，on ice，5-10 分鐘。每個 sample 加 mixture solvent 7 λ (10X RT buffer 2 λ ，DTT 2 λ ，DNTP 10mM 1 λ ，DEPC- H_2O 2 λ)。 42°C ，2-4 分鐘後，加 1 λ 的 stration script 1 λ ， 42°C ，50 分鐘 (或更長)， 70°C ，10 分鐘， -20°C 保存。

(3) PCR：

配製

d H_2O (一般水)	17.5 λ
buffer	2.5 λ
dNTP	2.5 λ
cDNA	1 λ
primer(F)	0.5 λ
primer(R)	0.5 λ
Taq	0.5 λ (最後加)

上 PCR 機器，之後以 agarose 電泳分析。電泳膠配製：3.2 g 的 agarose 溶在 160 ml 的 TAE 水 (配膠時加入 EtBr，130 ml 加 8 λ)。取 Sample 10 λ PCR 產物 + 2 λ dye，電壓 120V，35min。

結果: 當細胞表面的 EGF 受體活化 ras 蛋白, 觸發蛋白質激酶訊息的梯瀑效應(Raf, MEK,MAPK)。導致細胞核內 c-myc 分泌量增加, 刺激 cyclin D 的轉錄作用, 再刺激 cyclin-dependent kinase (CDK)活化。被活化的 CDK 催化視網膜細胞瘤腫瘤抑制蛋白(pRb)磷酸化, 磷酸化 Rb 會刺激細胞通過細胞週期控制點導致細胞分裂。另外 p53 抑癌基因也可以透過 p21、Bax 和 Bcl2 等基因來控制細胞的生長。細胞功能正常狀況下, p16 蛋白會透過競爭性機制與 CDK 結合, 進而抑制 Rb 磷酸化, 防止細胞過度分裂, 但口腔癌患者常見 p16 基因甲基化或突變而導致功能喪失。另外相關研究指出 41%口腔癌病例中有 cyclin D 過度表現、54%有 p53 累積。本研究經由以上的學理證實, 以 3D 系統培養 SCC-15 細胞 Ras(圖 6)、MEK(圖 7)、P53(圖 8)基因之表現明顯受到抑制, 藉由半定量分析也觀察受抑制的基因表現量只有 2D 培養的 30~50%左右。另外 MMP-2、ERK 基因之表現(圖 9-10), 以 2D、3D 培養至 72 小時則無明顯差異。

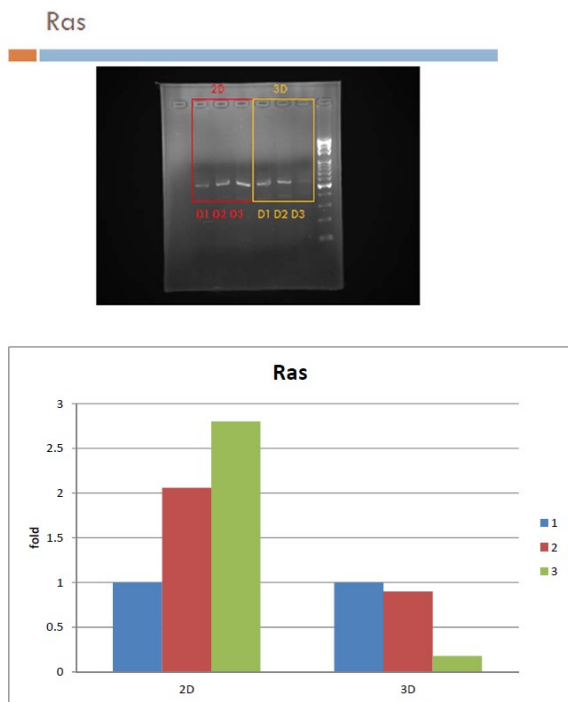


圖 6：2D 和 3D 培養之 Ras 基因表現。

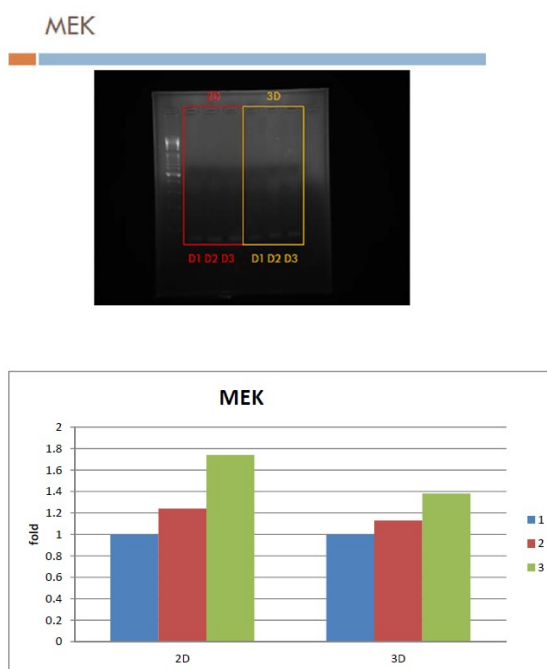


圖 7：2D 和 3D 培養之 MEK 基因表現。

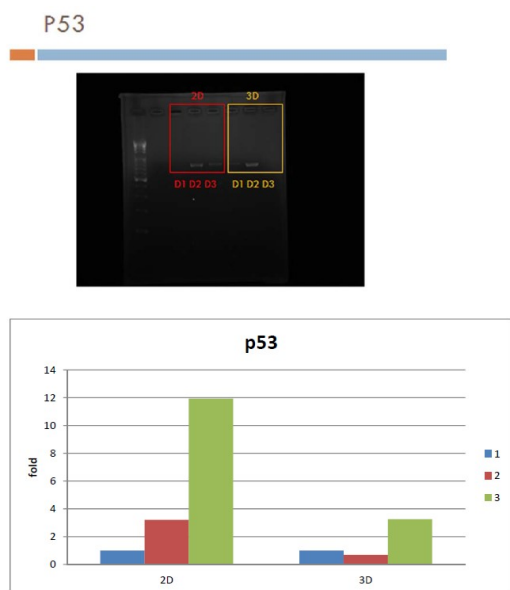
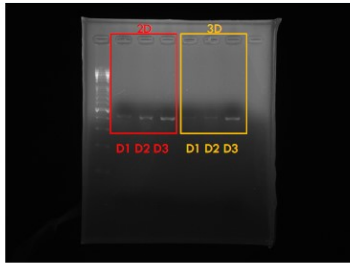


圖 8：2D 和 3D 培養之 p53 基因表現。

ERK



MMP2

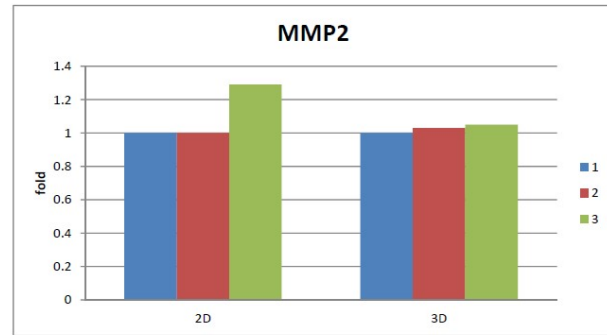
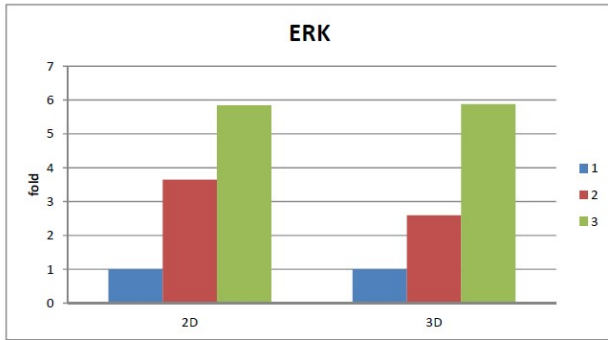
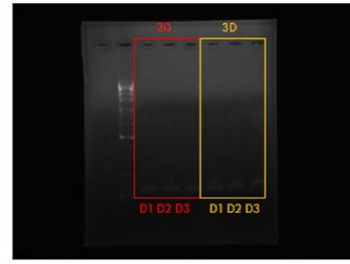


圖 9：2D 和 3D 培養之 ERK 基因表現。

圖 10：2D 和 3D 培養之 MMP2 基因表現。

第三部分：以 Gellan gum 水膠為基質建構 3D 腫瘤球體作為癌症研究之平台

3-1：Gellan gum 水膠之製備

分別配製 0.6%、0.8%、1.0% 之 GG 溶液及 0.5% 之 CaCl₂ 溶液，以鈣交聯方式成膠，各濃度膠體之 GG 加 CaCl₂ 的總體積為 1 mL，比例如下表：

GG/CaCl ₂ 配比 基材(GG)	交聯劑 (CaCl ₂) 0.5% CaCl ₂ (μL)	1.0% CaCl ₂ (μL)
0.6% GG(μL)	960/40, 950/50, 940/60	970/30, 960/40, 950/50, 940/60
0.8% GG(μL)	960/40, 950/50, 940/60	980/20, 970/30, 960/40, 950/50
1.0% GG(μL)	970/30, 960/40, 950/50, 940/60	980/20, 970/30, 960/40, 950/50

※以上其他比例為不成膠或無法成形，故僅列出上述比例比較之

將上述不同濃度、比例之 GG 及 CaCl₂ 分別加至於所訂製之 1 cm × 1 cm 的鐵氟龍模具中(容積為 1 mL) 成膠(完全成膠時間為 24 小時)。

3-2：水膠之機械強度測試

將前述各濃度、比例之膠體從模具中取出後浸潤於二次水中(使膠體保持濕潤)，2. 將膠體拭乾後，於壓縮機上以 10 mm/min 的速度壓縮，壓縮至破裂為止，得膠體之最大荷重(抗拉強度，gf)。

3-3：口腔癌細胞株 SCC15 之培養

由 Rheinwald 和 Beckett 於 1981 年所建立之口腔鱗狀上皮細胞癌細胞株。取自一位 70 歲高加索男性之舌癌檢體，在免疫缺失小鼠體內，有致癌的能力。

培養液之配製：

Serum free DMEM/F12 培養液 / 2L-

- DMEM/F12 powder(含 HEPES、sodium pyruvate) 一包
- sodium bicarbonate(1.2 g/L) 2.4 g
- hydrocortisone(400 ng/ml) 0.8 mg

添加 1200 mL 之 ddH₂O，將 pH 值調至 7.2 後再補 ddH₂O 至 2 L，至操作台以 0.22 μm 之 filter 過濾完後分裝(過

程均需過火)，從中取3 mL之medium作medium test。

DMEM/F12 growth medium-

➤ Serum free DMEM/F12	88 %
➤ FBS	10 %
➤ PSN	1 %
➤ L-Glu	1 %

※試藥快回溫，慢降溫，避免產生冰晶傷害細胞

PBS 緩衝溶液/ 1L-

➤ NaCl	8.0 g
➤ KCl	0.2 g
➤ KH ₂ PO ₄	0.24 g
➤ Na ₂ HPO ₄	1.44 g

添加 dd H₂O 至 1L，分裝完後滅菌

FBS之分裝-

將保存於-20 °C之FBS(500 mL)放至4 °C冰箱中回溶，待隔天於水浴槽中，56°C，30分鐘去補體(每15分鐘搖晃一次)，至操作台分裝完後保存於-20 °C冰箱中。

1.0 % Trypsin solution / 50 mL-

於操作台中取10 mL之0.5 % Trypsin-EDTA solution(10 x)加PBS至50 mL

繼代培養：

當細胞長至八分滿時，將培養液吸除後，以2 mL PBS沖洗細胞碎片，將PBS吸除後，以2 mL 1.0 % trypsin將細胞打下(切細胞和dish間的鍵結)，若細胞不易切下可放置incubator數分鐘後使細胞較易落下，拍打盤壁使細胞懸浮呈沙狀掉落，以4 mL medium(trypsin : medium = 1 : 2)中和trypsin，均勻suspending完後(小心勿打散中央細胞貼附區)吸至離心管中以1200 rpm離心5分鐘。倒除上清液，拍散細胞 pellet，以3 mL medium resuspending之。從cell suspension中取適量細胞均勻種於新的10公分dish中，培養於37°C，含5 %二氧化碳飽和濕度的培養箱中作繼代培養。

3-4：3D 培養模式

利用3D 培養模式以不同楊氏模數的膠體培養口腔癌細胞株 SCC15，藉此分析觀察癌細胞是否有惡化之情形。若最終需 6×10^4 cells/mL，而此次一盤七分滿細胞計數為 6×10^4 cells，以 trypsin 打下再以 medium 中和後有 6 mL，所以離下來的細胞 pellet 有 3.6×10^5 cells(6×10^4 cells \times 6 mL)。稀釋： 3.6×10^5

cells/X=6 × 10⁴ cells/mL, X=6 (mL), 以 6 mL 新的 medium resuspending 細胞 pellet 後即可得 6 × 10⁴ cells/mL 之細胞懸浮液以下為以 48-well 培養之設計：

3D 培養-

- 0.6 % GG-(150 μL GG + 40 μL medium) + 10 μL 0.5 % CaCl₂ × 8 wells
- 0.8 % GG-(150 μL GG + 40 μL medium) + 10 μL 0.5 % CaCl₂ × 8 wells

對照組之 2D 培養(成膠後將 cell suspension load 於其上)-

- 0.6 % GG-(150 μL GG + 10 μL 0.5 % CaCl₂) + 40 μL medium × 8 wells
- 0.8 % GG-(150 μL GG + 10 μL 0.5 % CaCl₂) + 40 μL medium × 8 wells

確認各 well 膠體均成膠後，每 well 均補加新的 medium 200 μL 於其 well 中，每天觀察視情況更換 medium(medium 會被細胞所利用，觀察澄清度可辨是否有汙染)

3-5：水膠之型態(SEM)

經掃描影像觀察膠體之內部構造及孔隙度大小，用以評估材料是否適合包覆細胞及細胞之生存。脫水，將sample浸泡於PBS buffer → 70% alcohol → 80% alcohol → 85% alcohol → 90% alcohol → 90% alcohol → 95% alcohol → 95% alcohol → 99% alcohol → 99% alcohol，各10分鐘。臨界點乾燥(去除水分)。鍍金，90秒(由於水膠本身非導體，於觀測時會產生電荷累積現象而造成亮點，故可鍍上白金改善之)。

3-6：WST-1 細胞增生試驗

用以檢測癌細胞於 3D 培養 24 hrs、48 hrs、72 hrs 後細胞的增殖情形。最終需 3 × 10⁴ cells/mL，而此次一盤七分滿細胞計數為 6 × 10⁴ cells，以 trypsin 打下再以 medium 中和後有 6 mL，所以離下來的細胞 pellet 有 3.6 × 10⁵ cells(6 × 10⁴ cells × 6 mL)。稀釋：3.6 × 10⁵ cells/X=3 × 10⁴ cells/mL, X=12 (mL)，以 12 mL 新的 medium resuspending 細胞 pellet 後即可得 3 × 10⁴ cells/mL 之細胞懸浮液，以下為以 48-well 培養之設計：

3D 培養-

- 0.6 % GG-(150 μL GG + 40 μL medium) + 10 μL 0.5 % CaCl₂ × 5 wells
- 0.8 % GG-(150 μL GG + 40 μL medium) + 10 μL 0.5 % CaCl₂ × 5 wells

2D 培養(成膠後將 cell suspension load 於其上)-

- 0.6 % GG-(150 μL GG + 10 μL 0.5 % CaCl₂) + 40 μL medium × 5 wells

- 0.8 % GG-(150 μ L GG + 10 μ L 0.5 % CaCl_2) + 40 μ L medium \times 5 wells

對照組-

- 對照組①(正常細胞生長曲線)-

40 μ L medium(加新的 medium 至 200 μ L) \times 5 wells

- 對照組②(0.5 % CaCl_2 之影響) -

40 μ L medium + 10 μ L 0.5 % CaCl_2 (加新的 medium 至 200 μ L) \times 5 wells

確認各 well 膠體均成膠後，每 well 加新的 medium 200 μ L 於其膠上(對照組則加新的 medium 至 200 μ L)。測定在培養 24 hrs(一天)、48 hrs(兩天)、72 hrs(三天)後細胞的增殖狀況，每一天在同一時間點加入 WST-1 solution，每 well 加入培養基總體積 10 % 之 WST-1 solution(如培養基體積為 200 μ L，則加入 20 μ L 之 WST-1 solution)。於 incubator 培育 3 hrs。在電子耦合試劑存在的情況下，可被線粒體內的一些脫氫酶還原生成橙黃色的 formazan(水溶性)，細胞增殖越多越快，則顏色越深；細胞毒性越大，則顏色越淺。每 well 分別取 100 μ L 至 96-well 中以 ELISA reader 測定 450 nm 處之吸光值。

3-7：HE 染色

用以觀察癌細胞於膠體中的型態及其分佈情形，以前述 3D 培養製備完 sample 後，分別於培養 24 hrs(一天)、48hrs(兩天)、72 hrs(三天)後之 well 中吸除殘餘的 medium，加入 2.5 % 之 glutaraldehyde 存放於 4 $^{\circ}$ C 至隔天(500 μ L/well，以完全浸潤膠體為主)固定之。分別將不同天數、組別之膠體取出，以 5 % sucrose 浸泡於 4 $^{\circ}$ C 下 mix 10 分鐘 \rightarrow 10 % sucrose 浸泡於 4 $^{\circ}$ C 下 mix 10 分鐘 \rightarrow 20 % sucrose 浸泡於 4 $^{\circ}$ C 下 mix 待隔天利用高滲吸收組織中的水分，減少組織含水量，可防止或減少冰晶的形成。取適量的冷凍包埋劑(OCT)包覆 sample，至 4 $^{\circ}$ C \rightarrow -20 $^{\circ}$ C 下待凝固，成形後做冷凍切片。HE 染色前以冰醋酸：甲醇(95：5)之溶液浸潤 15 秒固定組織(材料)。

3-8：IHC stain

玻片前處理：以 12M HCl 酸洗玻片 O/N(使玻片較好 coating sample，並可避免後續 非特異性之結合)。以二次水 wash 玻片至中性(pH 7，以石蕊試紙檢測之)。將玻片於烘箱中烘乾(45 $^{\circ}$ C \sim 60 $^{\circ}$ C)。

sample 之製備：2D-以 2% gellan 溶液 coating 玻片，於 4 $^{\circ}$ C 下放置 O/N。將玻片於烘箱中烘乾(45 $^{\circ}$ C \sim 60 $^{\circ}$ C)。將玻片浸至 80%酒精 O/N。玻片以 UV 照射殺菌 O/N。將處理過之玻片置於 10 公分 plate 中進行細胞培養(勿過密，培養至隔天約六分滿即可)，一組為普通培養；另一組為含有 0.5% CaCl_2 之培養，

分別培養至 24 hrs、48 hrs、72 hrs 後做防腐固定之。3D-：以 0.6%及 0.8% GG 進行 3D 培養 SCC15 細胞珠，分別培養至 24 hrs、48 hrs、72 hrs 後，以 2.5% glutaraldehyde 做防腐固定之(O/N)。將 sample 浸泡於 5% sucrose 於 4°C 下 mix 10 分鐘 → 10% sucrose 於 4°C 下 mix 10 分鐘 → 20% sucrose 於 4°C 下 mix O/N(脫水)。將 sample 進行冷凍切片。

將 sample 浸於 0.3% H₂O₂ (diluted in ddH₂O，去除內生性的氧化還原酶，因氧化還原酶會釋放出離子進而影響 Ab 之結合，亦會使 sample 的背景變深而干擾實驗結果)作用三十分鐘。將 slide 過 1x PBS(pH=7.4)，再用 Pap pen(厭水且非油性筆，具有 1.聚水 2.保濕 3.維持 buffer 離子濃度之功能)圈起來。加入 blocking buffer(去除非特異性結合)，1% Normal serum:1x PBS=1:100，室溫下作用 30 分鐘後再用 dropper 吸掉。加一抗(找尋標的抗原，以 PBS 稀釋，不同抗體有不同的稀釋倍數)，於潮濕的環境作用一小時/overnight。以 Wash buffer(PBS，將非專一性的結合沖洗掉)rinse slide 三次，每次五分鐘加二抗(聯結一抗與 Streptavidin HRP)，Biotinylated anti-mouse IgG : PBS=1:50，作用三十分鐘以 Wash buffer(PBS)rinse slide 三次，每次五分鐘加入 Streptavidin HRP(聯結 streptavidin/HRP 與 linking antibody 上標定之 biotin)，Solution A : Solution B:PBS=1:1:38，作用三十分鐘(需在使用前三十分先配好)，用 Wash buffer(PBS)rinse slide 三次，每次五分鐘以 DAB buffer : liquid DAB=320:7(Development solution)，作用 5~30 分(依呈色狀況做調整)。將 sample 浸入自來水中(把多餘的 substrate 清洗乾淨)，Counter stain，以 Hematoxylin(染胞核，藍色)染 5~10 秒(依染劑之染色狀態調整時間)，Dehydrate : 70%-80%-90%-95%100%-100%各三分鐘以 Xylene 處理兩次，各十分鐘 Mounting slide，一小時/overnight。※剩餘的 development solution 可加兩滴 detoxification solution 減毒後倒除

第三部分實驗結果

3-1 水膠之機械強度測試

為了藉由不同機械強度之膠體來進行 3D 腫瘤球體基質之培養(圖 6)，以分析其口腔癌細胞是否有惡化的情形，實驗以最大抗壓(縮)強度測定各配比水膠的機械性質及機械強度。利用萬能試驗機以定速 10 mm/min 壓縮水膠，並紀錄各配比膠體之最大抗壓強度(克力，gf)。

圖 1 為以固定 1% CaCl₂，利用不同配成交聯 0.6%、0.8%及 1% GG 之結果，結果顯示 CaCl₂ 所交聯的量及 GG 之濃度和最大抗壓強度呈正相關，意即 CaCl₂ 所交聯的量越高及 GG 之濃度越高，膠體所能承受的最大抗壓強度有越大的趨勢。圖 2 為以固定 0.5% CaCl₂，利用不同配成交聯 0.6%、0.8%及 1% GG 之結果，結果顯示 CaCl₂ 所交聯的量及 GG 之濃度和最大抗壓強度亦呈正相關，意即 CaCl₂ 所交聯的量

越高及 GG 之濃度越高，膠體所能承受的最大抗壓強度有越大的趨勢。圖 3-7 為固定 CaCl_2 所交聯的量，經由不同濃度之 CaCl_2 及 GG 所交聯的結果，結果顯示 CaCl_2 及 GG 之濃度和最大抗壓強度呈正相關，意即 CaCl_2 及 GG 的濃度越高，膠體所能承受的最大抗壓強度也有越大的趨勢。

由於有些配比的水膠過軟，結構過於鬆散，故所測出來的最大抗壓強度極小不列入考慮(結果未顯示)，或最大抗壓強度以 0 表示。而作為後續 3D 培養的水膠之機械強度也並非越高越好，因為膠體越硬其膠體的脆性也會增加，因此我們依據(1)鈣離子濃度挑選較低的，較不會影響口腔癌細胞惡化之生化途徑(2) CaCl_2 所交聯的量以最大抗壓強度開始顯著上升的量為後續 3D 腫瘤球體培養之配比。故我們最終選用 950 μL 之 0.6% 及 0.8% GG 與 50 μL 之 0.5% CaCl_2 作交聯，此配比用於後續所有 3D 腫瘤球體培養中。

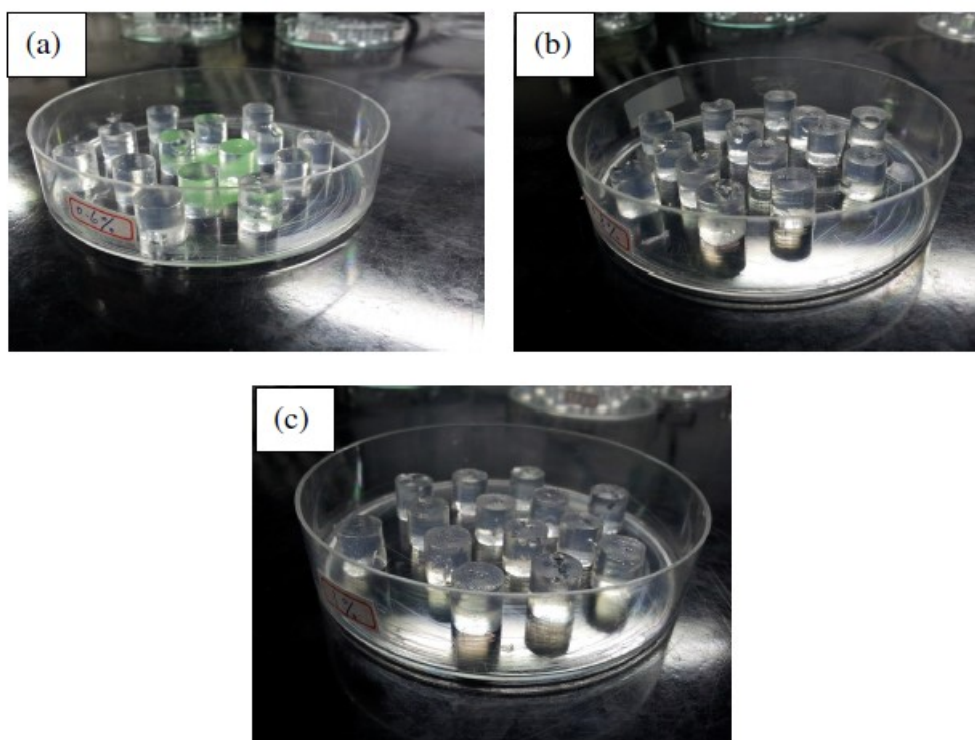


圖 1：直徑 10 mm；厚度 10 mm 之(a) 0.6% (b) 0.8% (c) 1% 膠體(交聯配比為最終之配比)。

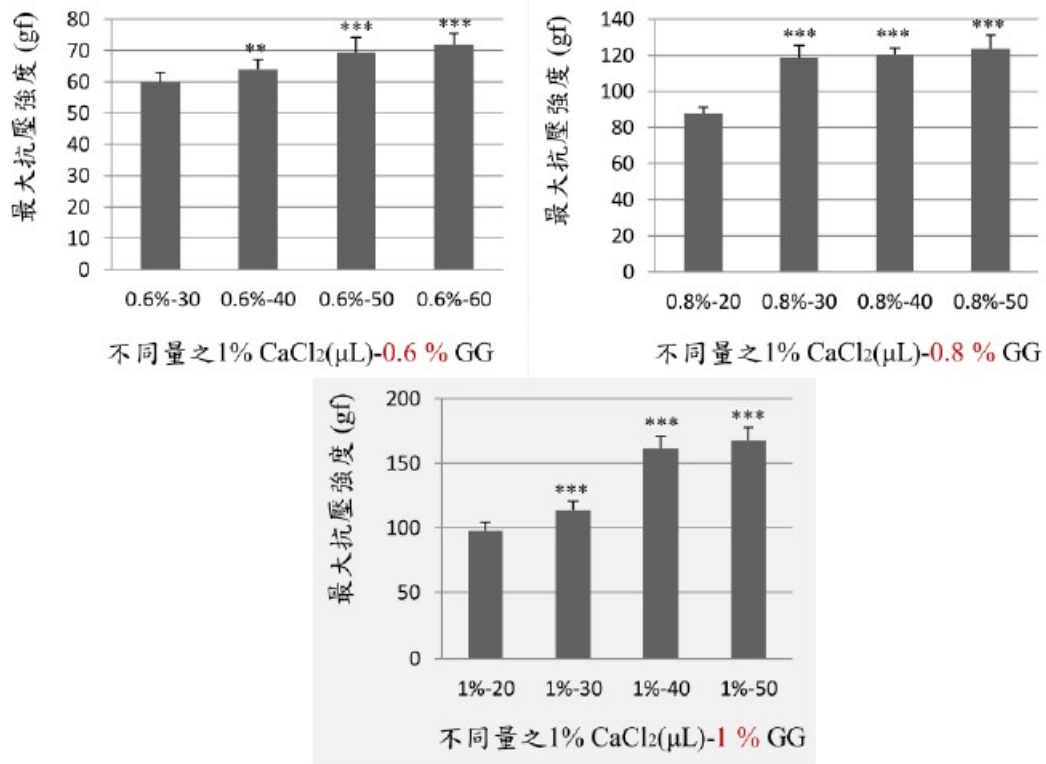


圖 2：固定 1% CaCl₂，利用不同配比如交聯 0.6%、0.8% 及 1% GG，最大抗壓強度越強代表膠體的機械強度越高，n=50，*， $p < 0.05$ ；**， $p < 0.01$ ；***， $p < 0.001$ 。

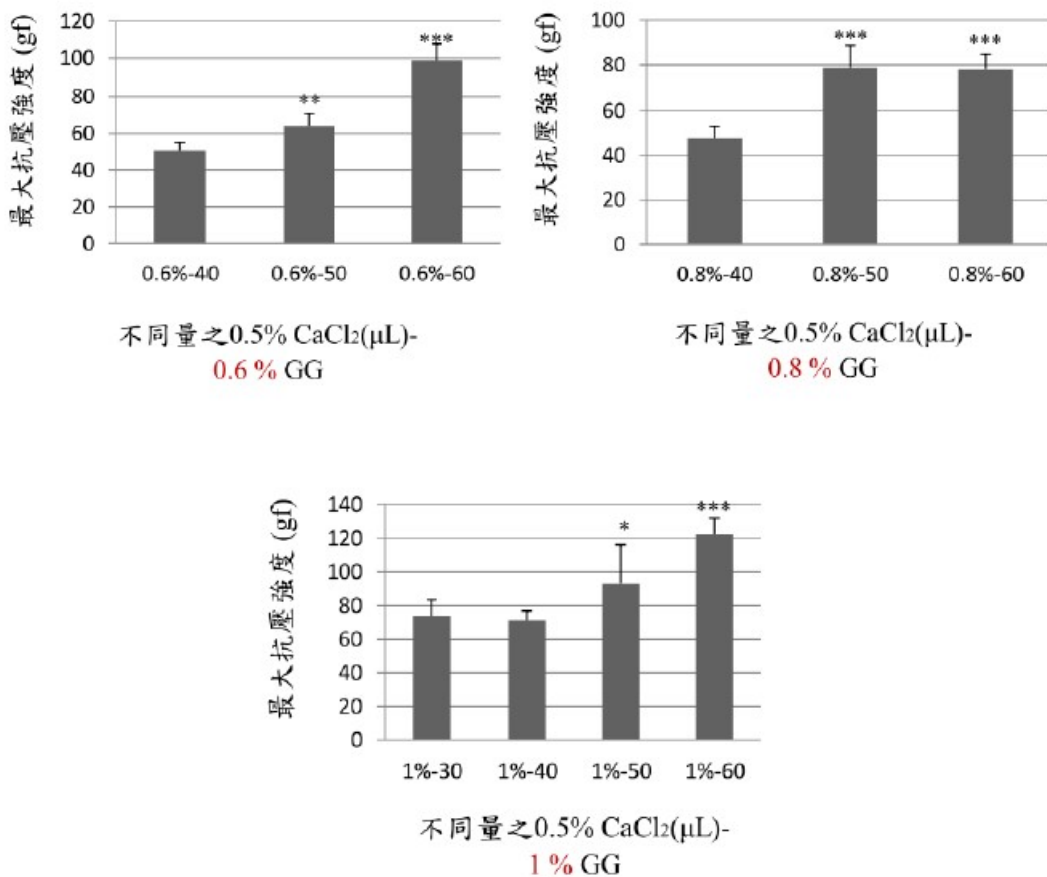
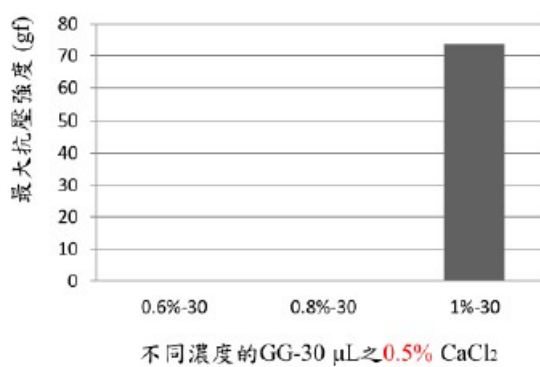
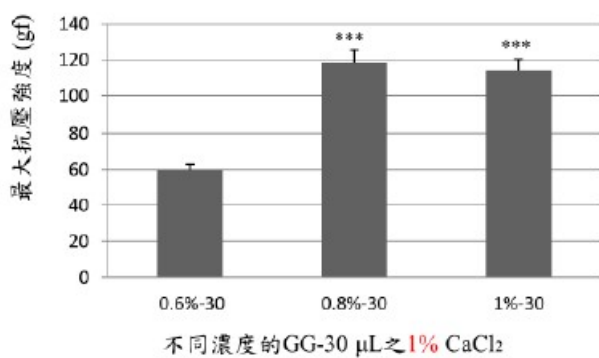
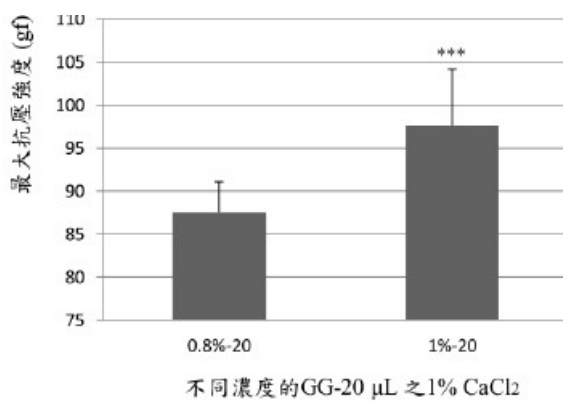


圖 3：固定 0.5% CaCl₂，利用不同配比如交聯 0.6%、0.8% 及 1% GG，最大抗壓強度越強代表膠體的機械

強度越高， $n=50$ ， $*$, $p < 0.05$; $**$, $p < 0.01$; $***$, $p < 0.001$ 。



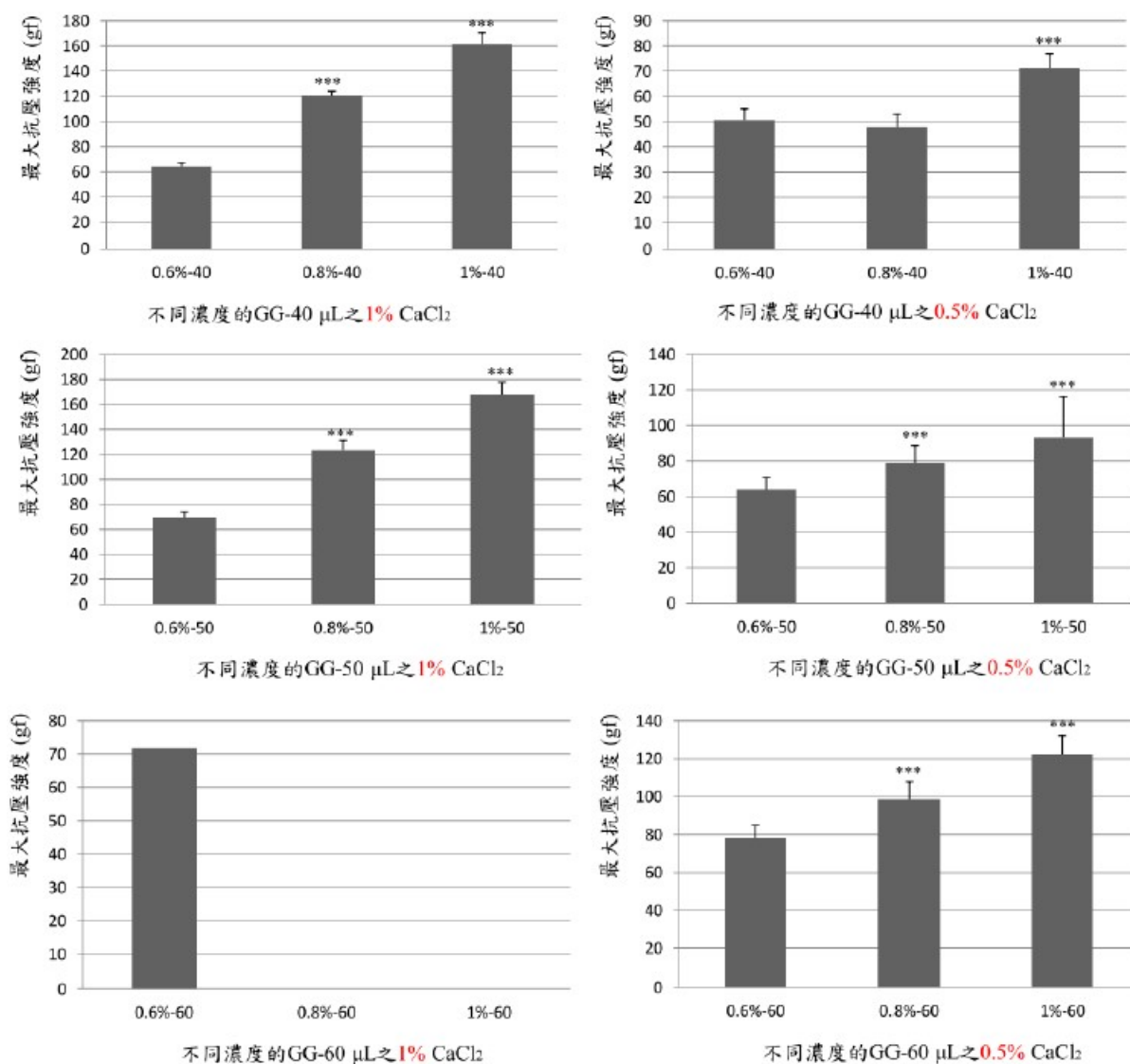




圖 3-7：固定 CaCl₂ 所交聯的量，經由不同濃度之 CaCl₂ 及 GG 所交聯，最大抗壓強度越強代表膠體的機械強度越高，n=50，*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ 。


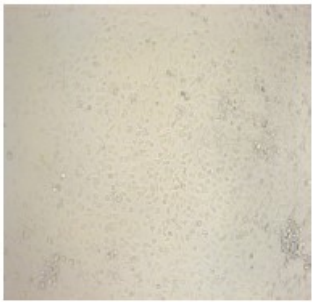
3-2：3D 培養模式

在建立 3D 腫瘤培養系統後，於培養 24 hrs、48 hrs、72 hrs 之後以光學顯微鏡觀察其口腔癌細胞的生長型態。表 1 為培養 24 hrs、48 hrs、72 hrs 後之光學影像，不同於 2D 培養，3D 培養可見圓形亮球狀的細胞均勻分散在不同的凝膠層面上，隨著培養時間的延長，細胞數目有些微增加的情況。圖 8 為培養至第七天的光學影像，細胞狀態良好，邊緣折光性強，口腔癌細胞均勻分散在膠體中，形成多個生長層面。而當培養至第十天時，表 3 可見有細胞聚集的現象出現，此說明了膠體之機械壓力可能會造成腫瘤團塊的形成，所以接下來會進一步研究癌細胞惡化之可能性，由上述結果顯示此系統可以提供一個自然的三維生長空間，而不僅僅侷限在一個平面內。

光學(10x)	0.6% GG(2D)	0.6% GG(3D)
Day1		

Day2		
Day3		

表 2

光學(10x)	0.8% GG(2D)	0.8% GG(3D)
Day1		




Day2		
Day3		

表 3

光學(10x)	0.6% GG(3D)	0.8% GG(3D)
Day7		

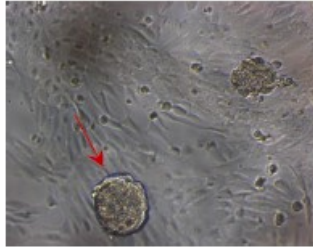
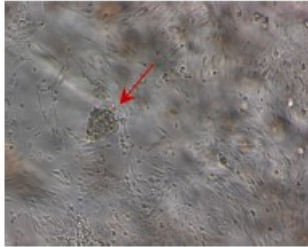
Day10		
-------	---	--

圖8：3D細胞培養型態。

3-3：水膠之型態(SEM)

觀察乾燥水膠的截斷面型態，可見水膠內皆為孔洞結構，有利於細胞之附著及鑲嵌，由圖 9 直接觀測可得知孔洞大小約為 0.1~0.5 μm 。

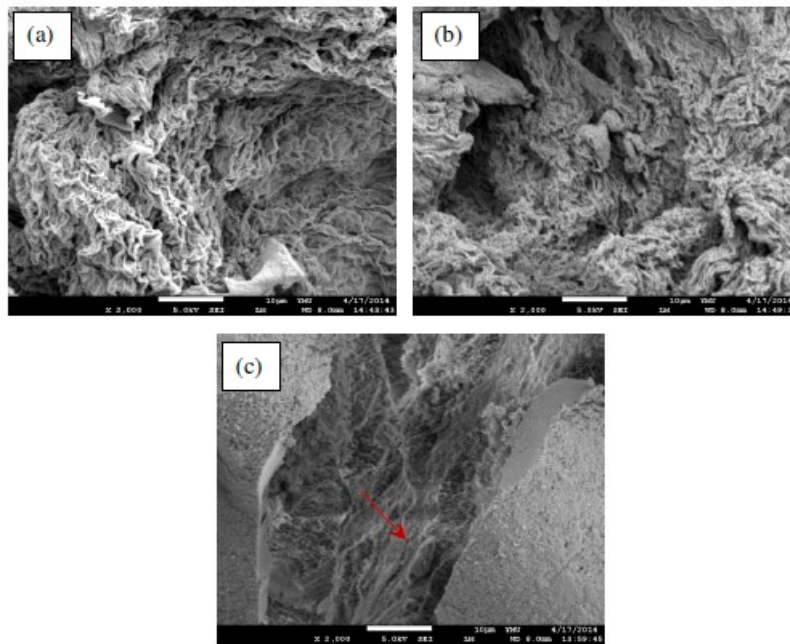


圖 9：GG-CaCl₂ 交聯水膠結構之 SEM 圖(a) 0.6% GG (b) 0.8% GG (c) 3D 培養之 0.6% GG，箭頭所指為口腔癌細胞。

3-4：WST-1 細胞增生試驗

為了了解口腔癌細胞於 3D 培養中是否有細胞增生之惡化表現，所以在分別培養 24 hrs、48 hrs、72 hrs 後，加入 WST-1 試劑檢測其細胞增殖率。圖 10 結果顯示以 0.6%及 0.8%膠體作 3D 培養相較於 2D 培養或對照組而言，在分別培養 24 hrs、48 hrs、72 hrs 後均無顯著差異，且以 0.6%及 0.8%膠體作 3D 培養，在分別培養 24 hrs、48 hrs、72 hrs 後，兩者濃度在培養至第三天時細胞並無明顯增生的情況出現，但也無死亡的趨勢，因此後續將以其他惡化途徑來進行評估。

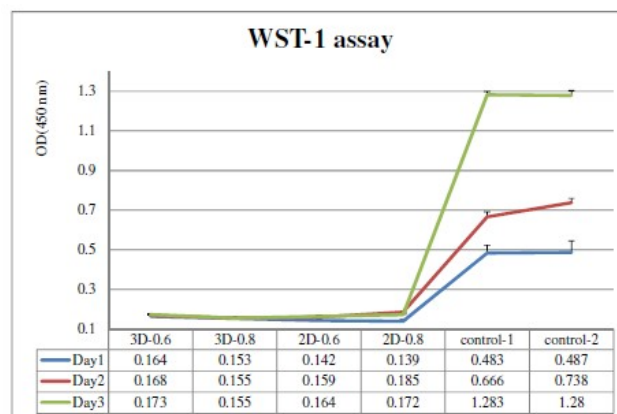


圖 10：口腔癌細胞於 3D 培養 24 hrs、48 hrs、72 hrs 後之細胞增生曲線。

3-5：HE 染色

以 HE 染色觀察口腔癌細胞於 3D 培養中之分布及型態，由圖 11 結果顯示於不同濃度之 0.6% 或 0.8% 的膠體中，細胞均呈圓球形鑲嵌在不同層面之膠體中，且亦可見有些細胞會沿著支架貼壁生長。

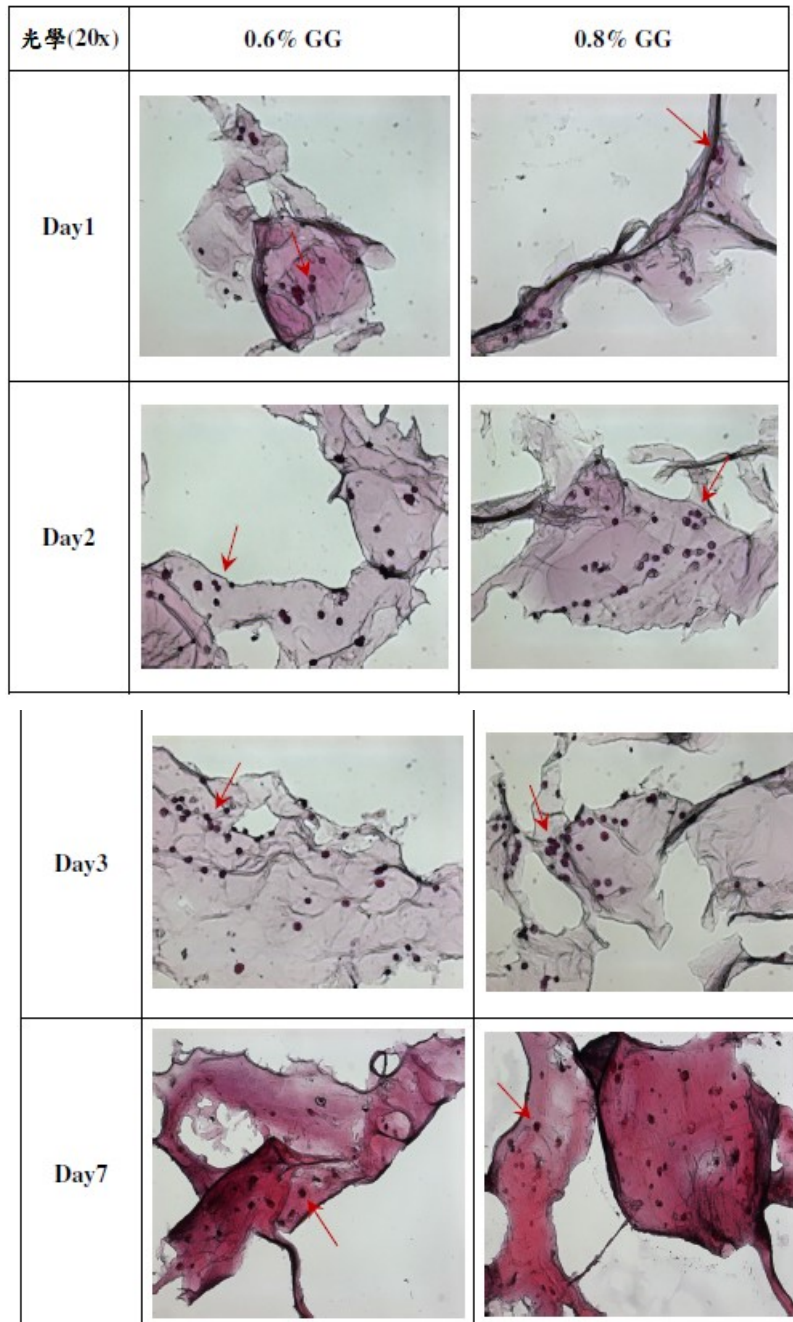


圖 11：細胞型態觀察。

第四部份：以Gellan gum為基材傳輸口腔癌治療藥物之動力學研究及動物實驗評估

4.1. 試劑配置

3T3-L1 細胞培養液 (Cell Culture Medium) 製備：

先將 FBS 置於 37 °C 水浴槽中加熱 30 分鐘，使補體去活化備用。取 DMEM 外加 HEPES、sodium bicarbonate，加入已滅菌 ddH₂O 至 1 L，攪拌均勻，並測量其 PH 值為 7.2；以 0.22 μm 孔徑濾膜過濾除菌，分裝至兩罐 500 mL 血清瓶中，為 serum free DMEM medium。將一罐 serum free medium 取出 50 mL medium，並加入 50 mL FBS 以及 5 ml Antibiotic 於上述 serum free medium 中，充分攪拌均勻後即為 10% FBS DMEM medium，將培養液置於 4 °C 冰箱儲存備用。

1X 磷酸緩衝液 (Phosphate Buffered Saline) 製備：

取 potassium phosphate (KH₂PO₄)、potassium chloride (KCl)、sodium chloride (NaCl)、sodium phosphate, dibase heptahydrate (Na₂HPO₄·7H₂O) 加入 ddH₂O 至 1000 mL，攪拌均勻，待完全溶解後，以高溫高壓滅菌 60 分鐘，完畢置於 4 °C 冰箱中備用。

0.1%(v/v)Tween80 磷酸緩衝液 (Phosphate Buffered Saline) 製備：

取 potassium phosphate (KH₂PO₄)、potassium chloride (KCl)、sodium chloride (NaCl)、sodium phosphate, dibase heptahydrate (Na₂HPO₄·7H₂O) 加入 ddH₂O 至 1000 mL，並加入 0.1% Tween80，攪拌均勻，待完全溶解後，以高溫高壓滅菌 60 分鐘，完畢置於 4 °C 冰箱中備用。

4.2. Gellan gum-CM 薄膜及藥物包覆製備

先秤取 0.05 g 的 CM 加入含有 10 mL 的 95% alcohol 在 15 mL 離心管內，隔水加熱至完全溶解。將 0.35 g (1%) 及 0.28 g 的結冷膠粉末分別溶於 35 mL 的二次水中攪拌，隔水加熱 85 °C - 90 °C，直到均勻溶解。再加入 0.07 g 的 glucosamine 至 0.28 g 結冷膠溶液中，濃度一樣是 0.35 g (1%)，溶解完畢後，將先前製備好的 CM 溶液分別倒入均勻溶解的結冷膠溶液後，再倒入 dish (10 cm²) 中，放置 45 °C 烘箱 18 到 24 小時，完全乾燥後即可使用手術刀或刀片將薄膜從 dish 取出。

4.3. Gellan gum-CQ 薄膜及藥物包覆製備

先秤取 0.05 g 的 CQ 加入含有 2 mL DMSO 的 15 mL 離心管內，隔水加熱至完全溶解。將 0.35 g (1%) 及 0.28 g 的結冷膠粉末分別溶於 35 mL 的二次水中攪拌，隔水加熱 85 °C - 90 °C，直到均勻溶解。再加入 0.07 g 的 glucosamine 至 0.28 g 結冷膠溶液中，濃度一樣是 0.35 g (1%)，溶解完畢後，將先前製備好的 CQ 溶液分別倒入均勻溶解的結冷膠溶液後，再倒入 dish (10 cm²) 中，放置 45 °C 烘箱 18 到 24 小時，完全乾燥後即可使用手術刀或刀片將薄膜從 dish 取出。

4.4. Gellan gum-CM/CQ 薄膜交聯作用

將 0.0862 g (15mM) 的 EDC 交聯劑粉末溶於 30 ml 的去離子水中攪拌，直到交聯劑均勻溶解在去離子水後，把交聯劑倒在製備好的薄膜上，放在室溫進行 24 小時進行交聯作用。將已交聯 24 小時的薄膜用去離子水做 3 到 5 次的清洗 (每次 1 小時)，最後放置烘箱將水分烘乾。而結冷膠 -CM/CQ 的交聯結構，可用 FTIR 分析。

4.5. 水膠含水率 (water content)

將交聯後的薄膜裁剪成長寬 1.5 cm 大小的正方形，放置 eppendorf 秤重 (W1)，在室溫浸泡於 1 ml 的去離子水 24 小時，之後將浸潤後的薄膜從 eppendorf 取出放在兩片濾紙中擦去多餘的水分，然後再秤重 (Ws)，再將同一薄膜放置 45 °C 烘箱中烘乾水份 24 小時，然後秤第三次的重量 (W2)。使用下列公式計算水膠含水率：

$$\text{Water content (\%)} = [(W_s - W_2) / W_s] \times 100\%$$

4.6. 水膠含膠率 (water content)

將交聯後的薄膜裁剪成長寬 1.5 cm 大小的正方形，放置 eppendorf 秤重 (W1)，在室溫浸泡於 1 ml 的去離子水 24 小時，之後將浸潤後的薄膜直接放置 45 °C 烘箱中烘乾水份 24 小時，秤第二次的重量 (W2)，使用以下的公式計算水膠含膠率：

$$\text{Gel content (\%)} = (W_2/W_1) \times 100\%$$

4.7. 薄膜拉伸試驗

將薄膜裁成 1x5 cm 長條狀測試樣品 (n=10)，利用桌上型材料試驗機，以每分鐘 5 mm 接近速度進行測試，利用 Tinius Olsen 軟體繪製拉伸試驗之應力應變圖，比較差異性。

4.8. Gellan gum-CM/CQ 薄膜體外降解試驗

將交聯後的薄膜裁剪成長寬 1.5 cm 大小的正方形，放置 eppendorf 秤重 (W1)，在室溫浸泡於 1 ml 的去離子水，並置於 37 °C 恆溫震盪水浴中進行體外分解試驗，於 3、7、14、21、28 天分批取出，將水吸出倒掉，再將薄膜放置 45 °C 烘箱中烘乾 (W2)，使用以下的公式計算薄膜降解率：

$$\text{Degradation test} = [(W_2 - W_1) / W_s] \times 100\%$$

4.9. 製作Curcumin (CM) 之標準曲線

將 0.01 g 的 Curcumin 溶解於 100 mL 的 0.1 % tween 80 PBS 溶液，序列稀釋，利用已知 6 個濃度，吸收光與濃度關係之曲線，利用線性迴歸以求出一條直線，以備藥物釋放代回標準曲線求得實際濃度。

4.10. 製作Clioquinol(CQ)之標準曲線

同Curcumin製作標準曲線方法。

4.11. 體外藥物釋放試驗

將製備好的薄膜裁切成直徑 1 cm 大小的圓，並測量其厚度，將薄膜置於 1 ml 之 0.1% tween 80 PBS 溶液 (pH ~ 7.2) 中，於 37 °C 恆溫震盪水浴中進行體外藥物釋放試驗。於 24 小時將浸潤過 0.1 % tween 80 PBS 溶液的薄膜取出，並在加入乾淨的 1 ml 之 0.1 % tween 80 的 PBS 溶液 (pH ~ 7.2) 繼續進行釋放，將各時間點取出之 PBS 測定在 CM 430 nm、CQ 255 nm 波長下之吸收值。樣品測定之吸光值再代回標準曲線中回推實際釋放的濃度。

4.12. 細胞培養 (Cell culture)

3-1. 3T3-L1 細胞培養 (3T3-L1 cell culture)

(1) 3T3-L1 細胞解凍

先將含 10% FBS 之新鮮細胞培養液放置於 37 °C 水域槽中回溫 30 分鐘。自液態氮筒中取出一管含有 3T3-L1 老鼠纖維母細胞株的抗凍管，且取出後立即放入 37 °C 水域槽中，快速解凍直至完全溶解後，取出抗凍管中含 3T3-L1 細胞株的冷凍培養液至 15 mL 離心管中，再額外加入 5 mL 已回溫之新鮮細胞培養液並以使細胞均勻混合，離心 1000 rpm，5 分鐘，除去含抗凍劑 DMSO 之上清液，輕拍離心管底部之細胞沉澱，再加入 10 mL 新鮮細胞培養液於離心管中，將細胞打散均勻後注入 10 公分細胞培養皿中，靜置於 37 °C 含 5% CO₂ 的細胞培養箱中，隔夜使細胞貼附後觀察細胞形態及生長情形。

(2) 3T3-L1 細胞繼代培養

先將含 10 % FBS 之新鮮細胞培養、1×PBS 液放置於 37 °C 水域槽中回溫 30 分鐘。吸去欲繼代、長滿 3T3-L1 細胞之 10 公分細胞培養皿中舊的細胞培養液，再以加入 5 mL 的 1×PBS 清洗細胞後吸去 1×PBS，反覆 2 次後，加入 1 mL 的 1×胰蛋白酶 (trypsin-EDTA)，來回搖晃使其均勻覆蓋細胞表面，靜置於 37 °C 細胞培養箱中 3 分鐘，打斷細胞與培養皿間的鍵結，取出培養皿再加入 5 mL 新鮮細胞培養液以中止 trypsin-EDTA 之作用，並來回吸取以沖洗細胞使其完全脫落後，將細胞懸浮液吸至 15 mL 離心管中，離心 1000 rpm，5 分鐘，除去含 trypsin-EDTA 之上清液，輕拍離心管底部之細胞沉澱，再加入 10 mL 新鮮細胞培養液於離心管中，將細胞均勻打散。在新的 10 公分細胞培養皿中加入 9 mL 新鮮培養液，取出混合均勻之細胞懸浮液 1 mL 注入其中，重新混合均勻後，靜置於 37 °C 含 5 % CO₂ 的細胞培養箱中，隔夜使細胞貼附後觀察細胞形態及生長情形，當細胞生長到 9 至 10 分滿時則需再次重複上述步驟，繼代培養。

(3) 3T3-L1 細胞冷凍

等細胞生長至培養皿 9 至 10 分滿時，即可存於液態氮桶中冷凍保存。先將含 10 % FBS 之新鮮細胞培養、1×PBS 液放置於 37 °C 水域槽中回溫 30 分鐘。吸去欲冷凍、長滿 3T3-L1 細胞之 10 公分細胞培養皿中舊的細胞培養液，再以加入 5 mL 的 1×PBS 清洗細胞後吸去 1×PBS，反覆 2 次後，加入 1 mL 的 1×胰蛋白酶 (trypsin-EDTA)，來回搖晃使其均勻覆蓋細胞表面，靜置於 37 °C 細胞培養箱中 3 分鐘，打斷細胞與培養皿間的鍵結，取出培養皿再加入 5 mL 新鮮細胞培養液以中止 trypsin-EDTA 之作用，並來回吸取以沖洗細胞使其完全脫落後，將細胞懸浮液吸至 15 mL 離心管中，離心 1000 rpm，5 分鐘，除去含 trypsin-EDTA 之上清液，輕拍離心管底部之細胞沉澱，加入 1 mL 細胞冷凍液 (含 DMSO 的細胞培養液，DMSO : Medium=1 : 9)，混合均勻，每管抗凍管加入 1 mL 細胞懸浮液，以 paraffin 封好，至於 4°C 冰箱中，30 分鐘，再移至 -20 °C 冰箱中靜置 1 小時，之後再放入 -80 °C 冰箱中約 16 小時 (over night)，最後放入液態氮桶中長期保存。

4.13. 建立動物模型 (Animal model)

(1). DMBA 誘導倉鼠口腔癌模式

敘利亞黃金倉鼠 (Golden Syrian hamster, *Mesocricetus auratus*)，其口腔上皮細胞腫瘤的體內模式與人類的口腔癌模式相似。文獻中指出此動物模式系統是最適合研究人類口腔組織病變研究之動物模式。利用其頰囊進行誘導黏膜組織癌化。以 100 μL 0.5 % 致癌物質 DMBA (0.5 % in mineral oil) 塗抹倉鼠左側頰囊袋，每週三次，共 13 週。

(2). 實驗動物飼養與分組

使用動物為 Syrian 系雄性倉鼠 (Golden Syrian hamster, *Mesocricetus auratus*)，購自行政院國家科學委員會實驗動物中心，四週齡。飲用水為逆滲透水；每 3 天換墊料一次；飼料須保持充足。倉鼠進行一週的適應期後，6 隻皆為 DMBA 誘導組。

(3). 樣品採集

禁食 12 小時後，以二氧化碳窒息犧牲老鼠。從口腔連著外皮沿著耳下剪開至腰部，撐開頰囊口，將整個頰囊剪下，將頰囊迅速泡入 10% 福馬林固定，以進行日後分析。

第四部份 結果與討論

1. Gellan gum-CM / CQ 薄膜巨觀圖

將製備好的薄膜至烘箱取出，經裁剪 1×1 cm 之正方形其外觀如下 (A) 結冷膠薄膜 (GG film) 呈現為透明狀薄膜，其厚度為 0.08 ± 0.01 mm (B) 結冷膠—薑黃素薄膜 (GG-CM)，薑黃素均勻溶解在薄膜中，其厚度為 0.08 ± 0.01 mm (C) 結冷膠—薑黃素薄膜 (GG-CM)，添加 glucosamine 作為藥物釋放基質，薄膜比未添加 glucosamine 之薄膜來的薄，其厚度為 0.05 ± 0.01 mm (D) 結冷膠—Clioquinol 薄膜 (GG-CQ)，CQ 均勻溶解在薄膜中，其厚度為 0.08 ± 0.01 mm (E) 結冷膠—Clioquinol 薄膜 (GG-CQ)，添加 glucosamine 作為藥物釋放基質，薄膜比未添加 glucosamine 之薄膜來的薄，其厚度為 0.05 ± 0.01 mm。

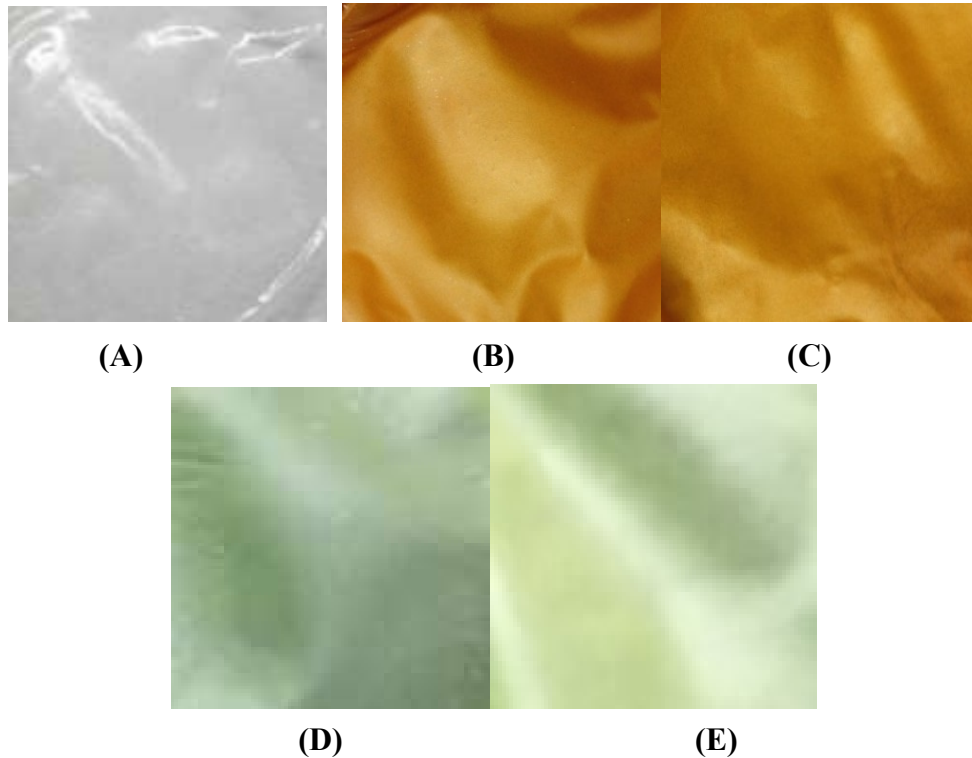
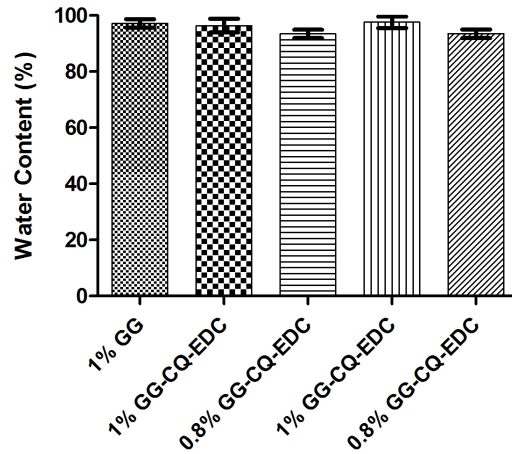
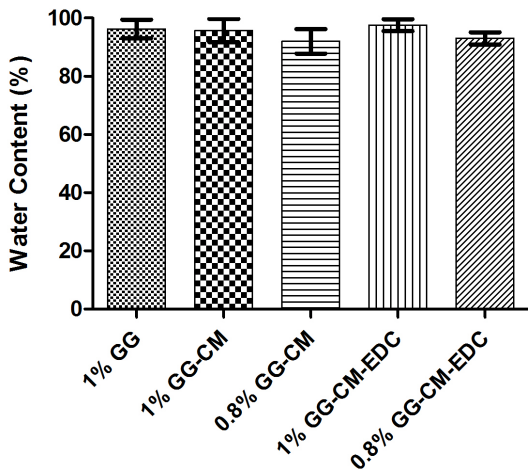


圖1. (A)–(E)結冷膠—薑黃素及Clioquinol薄膜之巨觀圖。

2. Gellan gum—Curcumin/Clioquinol 薄膜的含水量

所有的薄膜浸泡在二次水內24小時，實驗結果顯示 (A) 未添加交聯劑的 GG 薄膜，在經過 24 小時二次水的浸泡後，薄膜的含水量平均已經高達96.3%。而未添加交聯劑的GG-CM薄膜及加入 glucosamine 的 GG-CM 薄膜各別平均達到 95.7 % 及 92 %，而添加交聯劑的GG-CM 薄膜及加入 glucosamine 的 GG-CM 薄膜各別平均達到97.6 % 及 93%。(B) 未添加交聯劑的 GG 薄膜，在經過 24 小時二次水的浸泡後，薄膜的含水量平均已經高達 97.2 %。而未添加交聯劑的GG-CM 薄膜及加入 glucosamine 的 GG-CM 薄膜各別平均達到96.4 % 及 91.8 %，而添加交聯劑的 GG-CM 薄膜及加入 glucosamine 的GG-CM 薄膜各別平均達到 97.6 % 及 93.5 %。其結果顯示在 GG-CM 及 GG-CQ 薄膜並不受到交聯作用的影響，並無明顯的差異 ($p > 0.05$)。證明本實驗的薄膜皆會提供傷口高保濕的環境。其結果是與未添加藥物之 GG 薄膜對照組做比較，每個實驗至少 6 重複，結果數據以 % 表示。



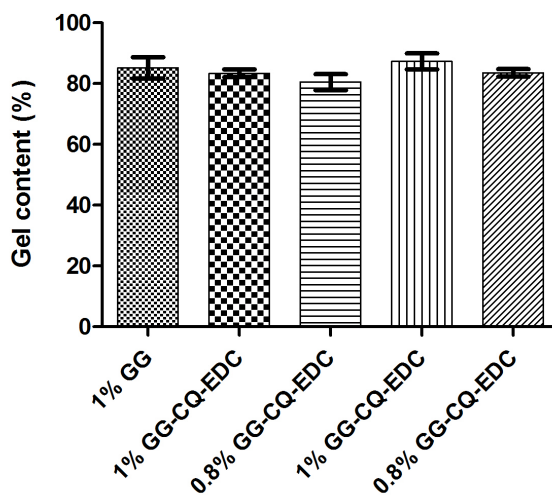
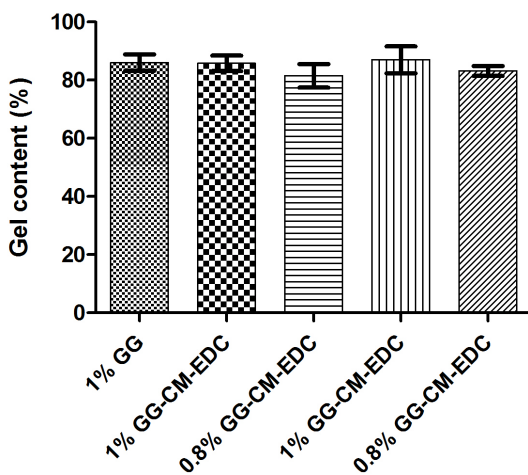
(A)Curcumin

(B)Clioquinol

圖2. A、B. 結冷膠包覆蓋黃素及 Clioquinol 薄膜含水量的影響結果。

3. Gellan gum—Curcumin/Clioquinol 薄膜的含膠量

EDC 為最常見的化學交聯劑，為了解決結冷膠在水中出現降解的情形，因此將 EDC 溶解於二次水做為反應溶劑。實驗結果顯示 (A) 為結冷膠包覆蓋黃素的薄膜在 15 mM 的 EDC 溶液混合於二次水內 24 小時交聯反應，經過二次水浸泡後的含膠量測定結果。在控制組 (未經交聯處理的結冷膠薄膜)，有 86.2 % 的含膠量。而未添加交聯劑的 GG-CM 薄膜及加入 glucosamine 的 GG-CM 薄膜各別平均達到 85.8 % 及 81.5 %，而添加交聯劑的 GG-CM 薄膜及加入 glucosamine 的 GG-CM 薄膜各別平均達到 87 % 及 83.2 %。(B) 在控制組 (未經交聯處理的結冷膠薄膜)，有 85.2 % 的含膠量。而未添加交聯劑的 GG-CQ 薄膜及加入 glucosamine 的 GG-CQ 薄膜各別平均達到 83.4 % 及 80.5 %，而添加交聯劑的 GG-CQ 薄膜及加入 glucosamine 的 GG-CQ 薄膜各別平均達到 87.3 % 及 83.5 %。上述實驗結果顯示，以 EDC 交聯劑交聯處理的生物組織材料的含膠率，並無明顯的差異 ($p > 0.05$)。但交聯過後的薄膜含膠率比未交聯之前來得高，顯示交聯作用成功。其結果是與未添加藥物之 GG 薄膜對照組做比較，每個實驗至少 6 重複，結果數據以 % 表示。



(A)Curcumin

(B)Clioquinol

圖3. A、B. 結冷膠包覆蓋黃素及 Clioquinol 薄膜含膠量的影響結果。

4. Gellan gum-CM/CQ 薄膜拉伸試驗

拉伸試驗目的是為了瞭解材料在受到拉力時，材料在彈性範圍內及塑性範圍內，抵抗伸長變形的能力及斷裂的特性。本實驗主要是比較材料受到每分鐘 5 mm 接近速度時，最大的受力程度。結果顯示 (A) 未經過交聯的 1% GG 薄膜及加入 Glucosamine 的 0.8% GG 薄膜最大受力分別為 1471 gf 及 1195 gf；1% GG-CM 薄膜及 0.8% GG-CM 薄膜最大受力分別為 1426 gf 及 1100 gf；經過交聯反應的 1% GG-EDC 薄膜及 0.8% GG-EDC 薄膜最大受力分別為 1349 gf 及 1080 gf；1% GG-CM-EDC 薄膜及 0.8% GG-CM-EDC 薄膜最大受力分別為 1178 gf 及 1028 gf。(B) 未經過交聯的 1% GG 薄膜及加入 Glucosamine 的 0.8% GG 薄膜最大受力分別為 1471 gf 及 1195 gf；1% GG-CQ 薄膜及 0.8% GG-CQ 薄膜最大受力分別為 1316 gf 及 1111 gf；經過交聯反應的 1% GG-EDC 薄膜及 0.8% GG-EDC 薄膜最大受力分別為 1349 gf 及 1080 gf；1% GG-CQ-EDC 薄膜及 0.8% GG-CQ-EDC 薄膜最大受力分別為 1286 gf 及 1043 gf。上述實驗結果顯示，交聯前後及是否加入藥物皆不影響拉伸試驗的結果，主要差異是加入 Glucosamine 且降低 Gellan gum 的量，薄膜最大受力程度比未加入 Glucosamine 前來得低。

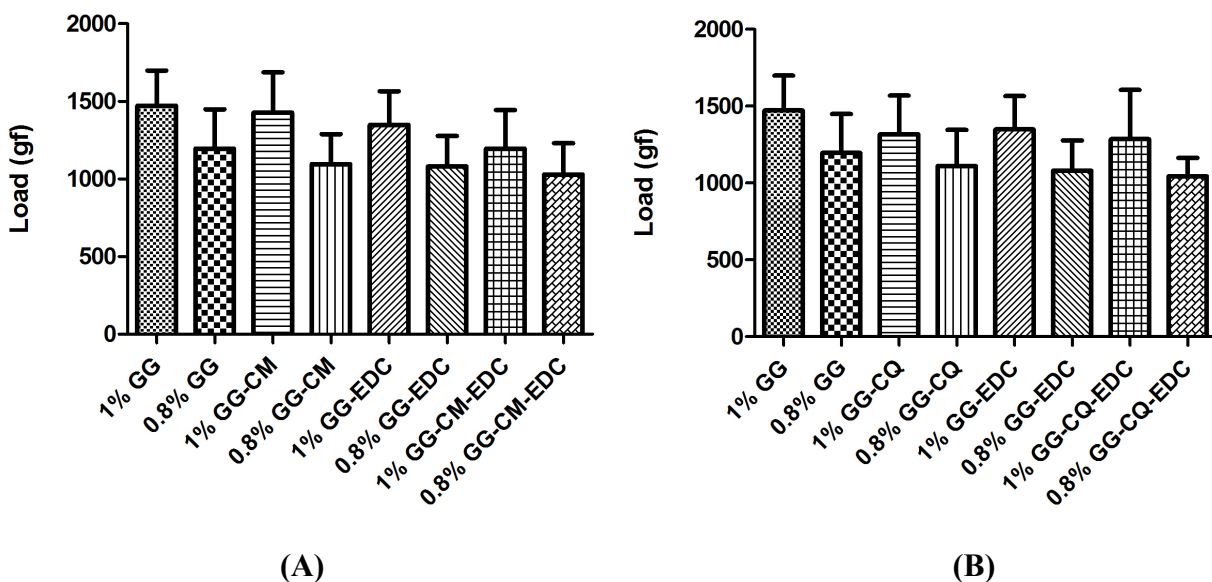
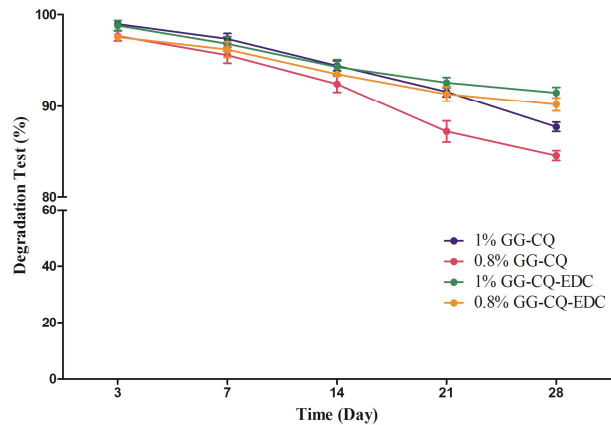
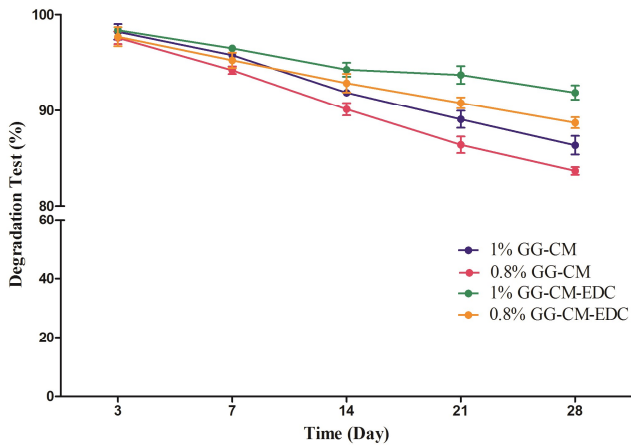


圖4. A、B. 結冷膠包覆薑黃素及 Clioquinol 薄膜拉伸試驗結果。

5. Gellan gum-CM/CQ 薄膜體外降解試驗

降解試驗目的是為了瞭解材料在模擬體內環境中，降解速度對藥物釋放的影響，假設材料在體內迅速被降解，則藥物就無法達到長效的釋放就崩解完畢，則基材無法達成效用。結果顯示 (A) 在 37 °C 恆溫震盪水浴中進行體外分解試驗，於 3、7、14、21、28 天分批取出並測定降解率。未經過交聯的 GG-CM 薄膜及添加 glucosamine 薄膜降解率分別是 86.6% 及 83.6%，而添加交聯劑的 GG-CM 薄膜及添加 glucosamine 薄膜降解率分別是 91.8% 及 88.6%。(B) 在 37 °C 恆溫震盪水浴中進行體外分解試驗，於 3、7、14、21、28 天分批取出並測定降解率。未經過交聯的 GG-CQ 薄膜及添加 glucosamine 薄膜降解率分別是 87.7% 及 84.5%，而添加交聯劑的 GG-CQ 薄膜及添加 glucosamine 薄膜降解率分別是 91.4% 及 90.1%。上述結果顯示經由交聯後的薄膜比未添加交聯劑的薄膜，降解速度來得慢，代表交聯作用成功，以及藥物能夠在體內達到長效的釋放作用。



(A)

(B)

圖5. A、B. 結冷膠包覆薑黃素及 Clioquinol 薄膜降解試驗結果。

6. 交聯前後 GG-CM/CQ 的 FTIR 分析結果

結冷膠-EDC 交聯的凝膠反應示意圖，葡萄糖醛酸的羧基會和 EDC 上 C=N-CH₃ 的雙鍵，而形成 ester bond (圖A)。未經過交聯的 1% GG-CM 薄膜 (紅色)，在 3337 cm⁻¹ 的峰值是結冷膠的 -OH 鍵被拉伸所致；2917 cm⁻¹ 的峰值是結冷膠的 -CH₂ 鍵震動所拉伸；而 1025 cm⁻¹ 是醚類和煙基的 C-O 分子拉伸的吸收帶；1603 和 1406 cm⁻¹ 的峰值代表羧酸的吸收帶；805 cm⁻¹ 代表 C-H 鍵的震動 (圖7)。未經過交聯的 0.8% GG-CM 薄膜 (紅色)，773 和 912 cm⁻¹ 的峰值代表 Glucosamine C=C bending；3033 和 3093 cm⁻¹ 的峰值代表 Glucosamine 羧酸的 O-H 拉伸 (圖8)。未經過交聯的 GG-CQ 薄膜 (紅色)，在 3325 cm⁻¹ 的峰值是結冷膠的 -OH 鍵被拉伸所致；2920 cm⁻¹ 的峰值是結冷膠的 -CH₂ 鍵震動所拉伸；而 1014 cm⁻¹ 是醚類和煙基的 C-O 分子拉伸的吸收帶；1605 和 1489 cm⁻¹ 的峰值代表羧酸的吸收帶；876 cm⁻¹ 代表 C-H 鍵的震動，1% GG-CQ 薄膜經過交聯處理後 (藍色)，顯示一個新的峰值落在 1563 cm⁻¹，是在未交聯的薄膜上沒有觀察到的峰值，代表結冷膠的羧酸鍵在 β-D-葡萄糖醛酸的羧基會和 EDC 上 C=N-CH₃ 的雙鍵，而形成 ester bond。新的峰值出現可做為交聯成功的依據 (圖9)。未經過交聯的 0.8% GG-CQ 薄膜 (紅色)，836 和 890 cm⁻¹ 的峰值代表 Glucosamine C=C bending (圖10)。

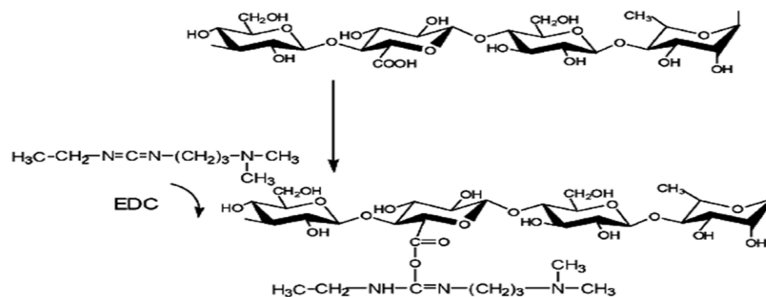


圖6. 結冷膠-EDC 交聯的凝膠反應示意圖

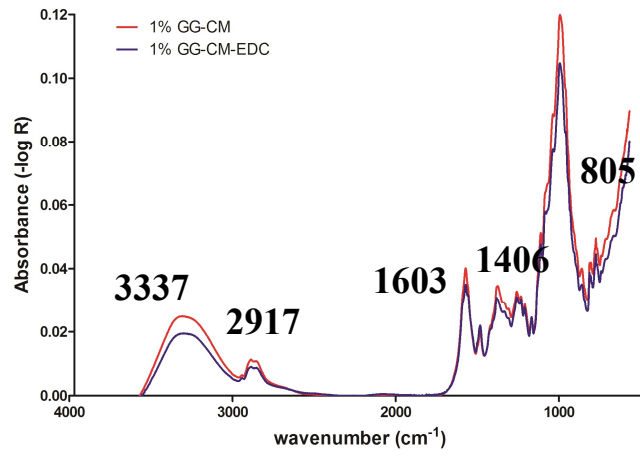


圖7. 1%結冷膠包覆薑黃素薄膜交聯前後 FTIR 分析結果。

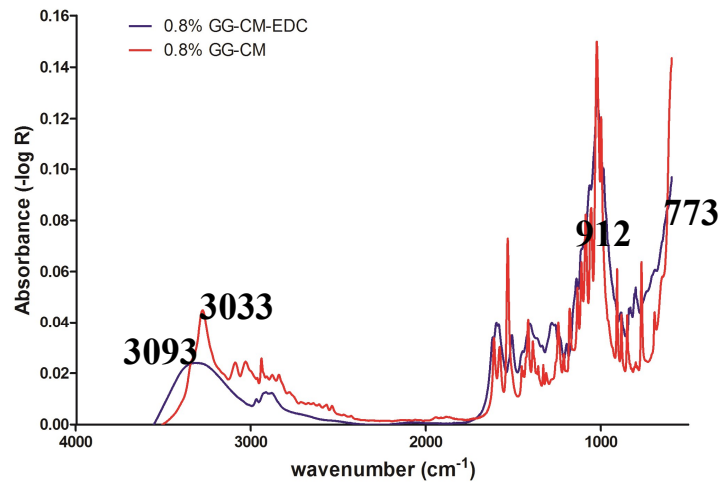


圖8. 0.8% 結冷膠包覆薑黃素薄膜交聯前後 FTIR 分析結果。

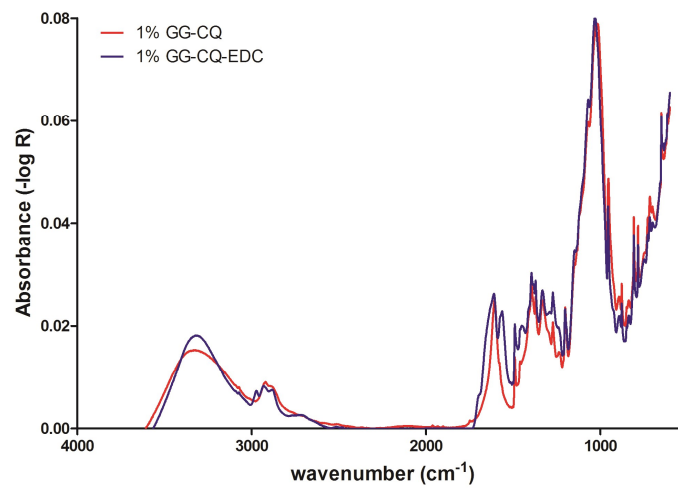


圖9. 1% 結冷膠包覆 Clioquinol 薄膜 FTIR 分析結果。

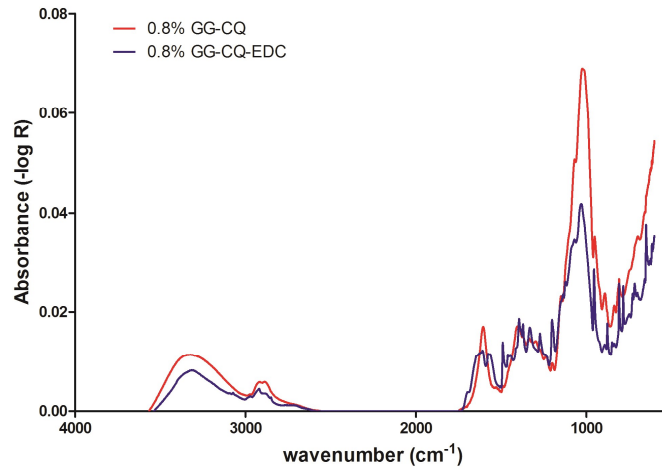
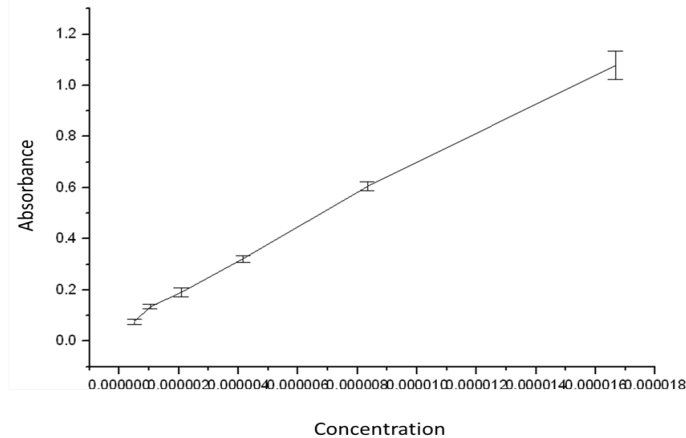


圖10. 0.8% 結冷膠包覆 Clioquinol 薄膜交聯前後 FTIR 分析結果。

7. 繪製 Curcumin 及 Clioquinol 之標準曲線

將 0.01 g 的 Curcumin 溶解於 100 mL 的 0.1% tween 80 PBS 溶液，序列稀釋，利用已知 6 個濃度 (1.667×10^{-5} 、 8.333×10^{-6} 、 4.167×10^{-6} 、 2.083×10^{-6} 、 1.042×10^{-6} 、 5.209×10^{-7})，吸收光與濃度關係之曲線，利用線性迴歸以求出一條直線，以備藥物釋放代回標準曲線求得實際濃度。圖11

將 0.01 g 的 Clioquinol 溶解於 100 mL 的 0.1% tween 80 PBS 溶液，序列稀釋，利用已知 6 個濃度 (1.667×10^{-5} 、 8.333×10^{-6} 、 4.167×10^{-6} 、 2.083×10^{-6} 、 1.042×10^{-6} 、 5.209×10^{-7})，吸收光與濃度關係之曲線，利用線性迴歸以求出一條直線，以備藥物釋放代回標準曲線求得實際濃度。圖12



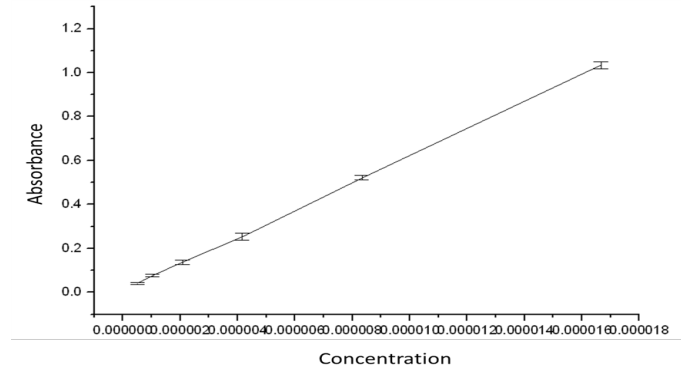
$$Y = A + B * X$$

Parameter	Value	Error
A	0.06394	0.01046
B	61704.72633	1331.48682

R	SD	N	P
0.99907	0.0184	6	<0.0001

(A)

圖11. Curcumin (CM) 之標準曲線。



$$Y = A + B * X$$

Parameter	Value	Error
A	0.00711	0.00346
B	61548.63076	439.89385

R	SD	N	P
0.9999	0.00608	6	<0.0001

(B)

圖12. Clioquinol (CQ) 之標準曲線。

8. 體外藥物釋放試驗 (Drug delivery system)

於各時間點將浸泡於1 ml 之0.1% tween 80 PBS溶液的GG-CM薄膜從恆溫震盪水浴槽取出，將各時間點取出之PBS 測定在 CM 430 nm 波長下之吸收值。樣品測定之吸光值再代入標準曲線中回推實際釋放的濃度。結果顯示未經交聯的 GG-CM 薄膜及添加glucosamine 的 GG-CM 薄膜在30天左右就完全釋放結束，釋放率分別是 93.5 % 及 92.8 % ；而添加交聯劑的GG-CM薄膜及添加 glucosamine的 GG-CM薄膜則釋放到45天左右，釋放率分別是 89.6 % 及 86.5 % 。（圖13）

於各時間點將浸泡於1 ml 之0.1 % tween 80 PBS 溶液的GG-CQ薄膜從恆溫震盪水浴槽取出，將各時間點取出之PBS 測定在 CM 430 nm波長下之吸收值。樣品測定之吸光值再代入標準曲線中回推實際釋放的濃度。結果顯示未經交聯的GG-CQ薄膜及添加glucosamine的GG-CQ薄膜在接近30天左右就完全釋放結束，釋放率分別是95.1%及92.3%；而添加交聯劑的GG-CM薄膜及添加 glucosamine的GG-CM薄膜則釋放超過 40 天，釋放率分別是86.8 % 及82.4 % 。（圖14）

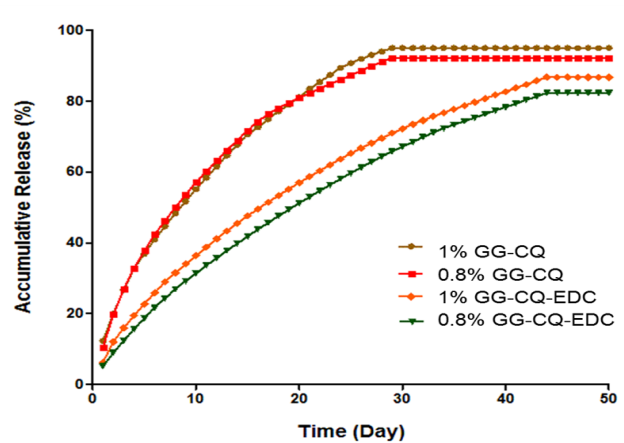
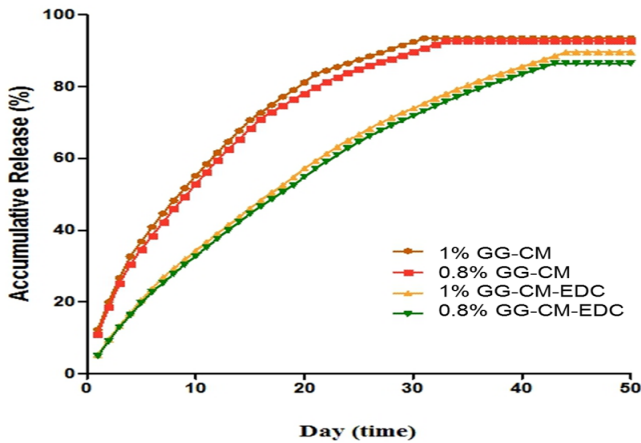
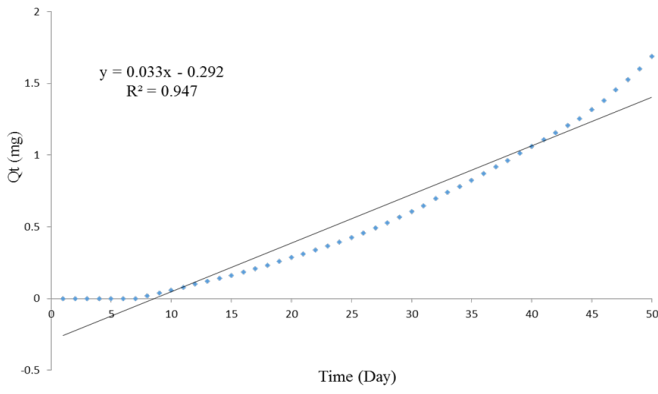
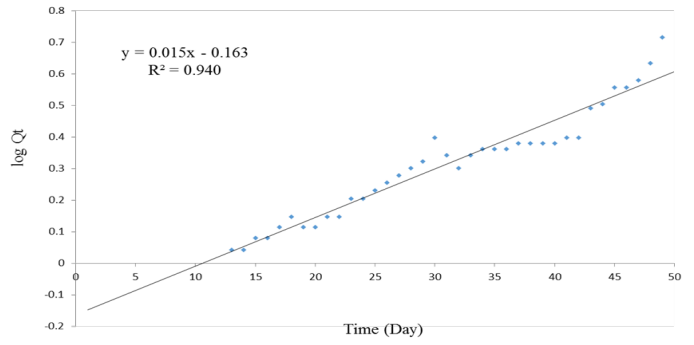


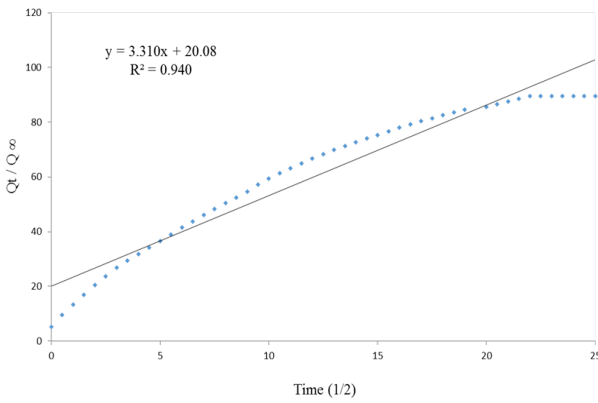
圖 13.結冷膠包覆薑黃素薄膜之藥物累積釋放圖。 圖 14.結冷膠包覆 Clioquinol 薄膜之藥物累積釋放圖。



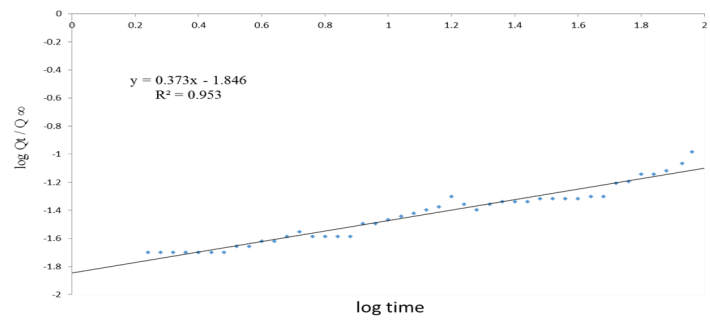
(A)



(B)

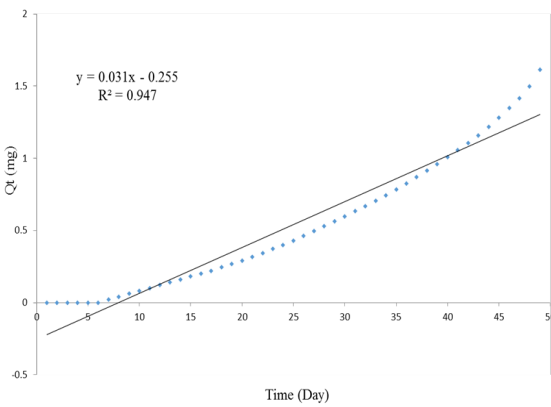


(C)

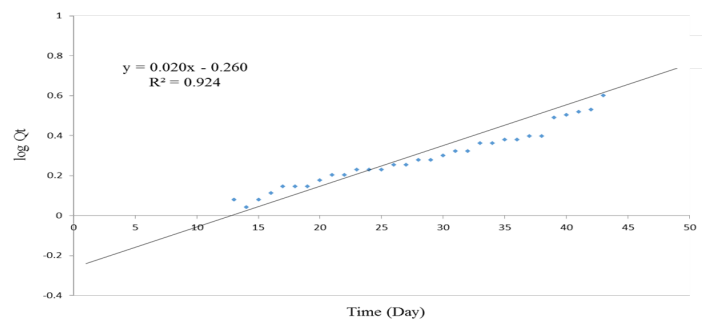


(D)

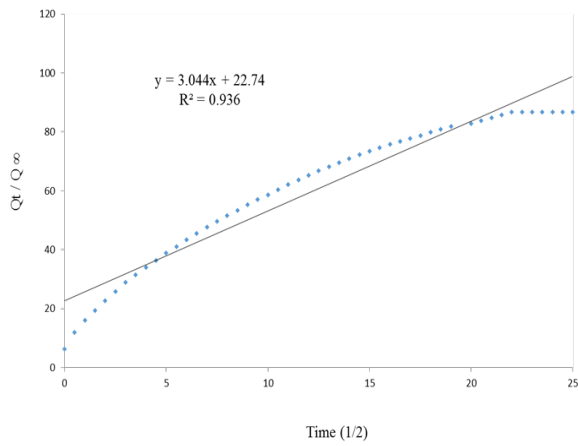
圖 15. (A)–(D).動力學模型應用到 Curcumin 薄膜藥物釋放：(A) zero order, (B) first order, (C) Higuchi, (D) Korsmeyer–Peppas.



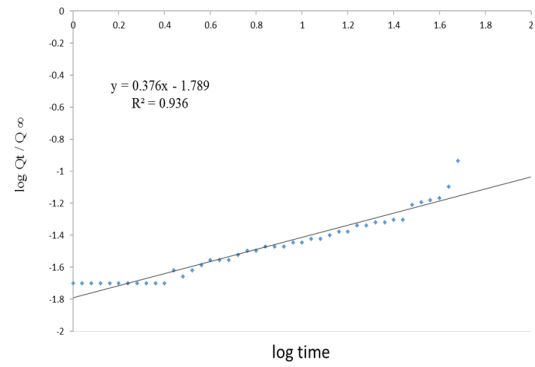
(A)



(B)



(C)



(D)

圖 16. 動力學模型應用到 Clioquinol 薄膜藥物釋放：(A) zero order, (B) first order, (C) Higuchi, (D) Korsmeyer–Peppas.

9. 動物模型的建立 (animal model)

利用其頰囊進行誘導黏膜組織癌化。以 100 μL 0.5 % 致癌物質 DMBA (0.5 % in mineral oil) 塗抹倉鼠左側口頰囊袋，每週三次，共 13 週。結果顯示頰囊外觀具有明顯的表皮變異，有出血、脫毛及腫塊的現象 (圖 17 A–D)。而不經塗抹誘導藥物的右側頰囊外觀良好。



(A)



(B)



(C)



(D)

圖 17. (A)–(D). DMBA 誘導倉鼠口腔癌模式。

本實驗在 FTIR 的結果中，GG-CM 薄膜經過 EDC 交聯後，會產生 Ester bond 在 1701 cm^{-1} 的吸收峰上，GG-CQ 薄膜經過 EDC 交聯後，會產生 Ester bond 在 1563 cm^{-1} 的吸收峰上。這些數據指出新的峰值的出現，並非是因為 EDC 交聯劑的殘留所致，因為 EDC 已經透過洗滌浸泡的方式被二次水所洗淨，所以才會出現 GG 交聯過程出現成功的峰值。而 GG 混合 CM 或是 CQ 的薄膜，在經過 EDC 交聯後，所呈現的曲線和 GG 交聯後皆為重疊，會出現交聯成功的吸收峰，落值在 1701 cm^{-1} 以

及 1563 cm^{-1} ，由上述的分析結果可確定，GG 混合 CM 及 CQ 的薄膜交聯反應生成的峰值和 GG 薄膜交聯處理完後的結果為一致，並不受到 CM 及 CQ 加入的影響。在 Water content 試驗中，GG-CM 及 GG-CQ 薄膜經過交聯反應後，羧鍵和 OH 鍵會產生一個 Ester bond，而這個 Ester bond 會把 H_2O 抓住，因此讓含水量下降，造成分子與分子間的空隙變小，而使水分變得較不易進入，交聯程度越高，可填充於結構內的水也會隨著降低，而含水量也代表了是否應用於組織中，可以吸收組織液的關鍵，本次實驗中，含水量並未有下降，代表薄膜可以使傷口呈現在高保濕的環境中，而本身 Gellan gum 及 glucosamine 都具親水性且吸水能力強，故含水率高。在 Gel content 試驗中，以 EDC 交聯劑交聯處理的 GG-CM 及 GG-CQ 薄膜的含膠率，並無明顯的差異 ($p > 0.05$)。造成這種現象的原因，可能是生物組織在經交聯劑交聯處理後產生組織收縮，使得生物組織內的自由體積 (free volume) 縮小，以致於其內原先所含的水分子部分被排擠出來，因此造成了生物組織在交聯後膠體量的降低。另一個原因則是 glucosamine 為易溶於水及親水性有機溶劑中，導致整體膠體量降低，但整體含膠率還是良好的，並沒有因為加入 CM 及 CQ 導致含膠量明顯下降。若要將薄膜應用於口腔中，用於治療藥物的載體，就必須具備良好的膨潤度，在薄膜降解試驗 28 天的結果顯示，交聯後的薄膜皆比交聯前的薄膜較不易降解，原因推測是交聯前的薄膜本身親水性高，在吸取模擬體液達到飽和後，結冷膠支架在各時間點經過水分子破壞結構慢慢被水解，在模擬體液環境中較迅速的崩解，交聯後的薄膜水分子較不易進入導致產生的降解現象，所以在模擬體內的環境中降解速度相對的比較緩慢，證明交聯後的薄膜能在體內達到較長時間的作用。傳統藥物釋放速率難以控制，而控制藥物釋放可延長藥物釋放且有較佳之釋放速率。GG-CM 及 GG-CQ 薄膜交聯前後在藥物釋放 50 天的比較結果顯示，交聯前的薄膜有突釋現象，且在接近 30 天左右就不再釋放，交聯後的薄膜較能穩定的釋放至 40 天以上，雖然交聯前的釋放率較交聯後高，推測是前面幾天產生的突釋現象，有些藥物未完全包覆在薄膜內層，而是散布在薄膜表面，造成薄膜遇到 PBS 時，表面的藥物先行釋出導致藥物量比起交聯後的薄膜更快釋放完畢。在第五天開始有較穩定的釋放速率，推測是高分子孔洞開始浸滿水分，高分子也開始產生降解使薄膜構造較鬆散，促進內部包埋藥物釋出，整體看來，交聯後的薄膜能夠穩定的將每個單位時間的釋放量控制好，雖然到了 40 天左右，釋放累積曲線趨於平緩，表層藥物已在前期釋放殆盡，薄膜內部較深層的地方仍然有殘留的藥物，但先前溶蝕產生的孔道，緩緩地透過擴散作用將藥物運送到薄膜外。因 CM 及 CQ 的藥物釋放趨勢相近，所以利用交聯後的 CM 及 CQ 薄膜套用藥物動力學模型內，分別套用於 zero order、first order、Higuchi 以及 Korsmeyer–Peppas 四種模型內，發現薄膜藥物釋放曲線的趨勢，最接近 Korsmeyer–Peppas model，口腔的癌前病變本身並非口腔癌，但長期置之不理或刺激源一直存在時，有極高之可能性發展成口腔癌。建立動物模型能夠模擬人類口腔環境。實驗結果顯示，DMBA 誘導後，可見頰囊外觀具有明顯的表皮變異，除外觀可見到局部脫毛，且有出血、潰瘍及紅斑病變現象，亦可見到顆腫瘤生成，由此可知頰囊嚴重癌化並侵襲到外部表皮，而不經塗抹誘導藥物的右側頰囊外觀良好。後續實驗可將 GG-CM 及 GG-CQ 薄膜應用於動物模型上，能夠評估此口腔癌貼片的完整性。

四、結論

本研究第一年主要在研究以 3D 方式培養口腔癌細胞 (SCC15)，以研究腫瘤細胞在 3D 機械性刺激下惡化之機轉。目前透過 2 種 3D 水膠平台進行此實驗。分別是 3D Matrigel gel 以及 Gellan gum gel。經由第一年的研究，已成功製備 3D 腫瘤球體水膠。而第二年的研究結果則是證實口腔上皮癌細胞 SCC15 以 3D 方式培養，癌細胞增生速度較快，此結果已證實機械性刺激的確是細胞癌化的影響參數。本研究第三年則是在開發以 Gellan gum 為基材傳輸口腔癌治療藥物之動力學研究及動物實驗評估。本計畫執行期限雖然已於 2015 年 10 月結束，但在最後的數據整理中，發現仍有許多研究數據並需再進一步確認，因此後續相關的研究仍會持續。我們認為開發一個醫療產品，三年的時間似乎太短。不過，非常感謝科技部給予經

費上的支持，使得本研究構想得以實現。另外本研究室在2013年也發表1篇SCI期刊、4篇國際研討會論文，目前也著手SCI期刊的發表。

五、參考文獻:

1. 財團法人台灣癌症基金會

(<http://www.canceraway.org.tw/cancerpageshow.asp?IDno=423>)

行政院衛生福利部 (http://www.mohw.gov.tw/cht/DOS/Statistic.aspx?f_list_no=312)

2. 曾莉婷，Clioquinol 與銅離子合併治療口腔癌引發 Caspase 非依賴性細胞凋亡和細胞生長停滯，碩士論文，醫學檢驗生物技術學研究所，高雄醫學大學，中華民國一百零二年。
3. 林宜美，幾丁質摻盒具乳酸酯微粒於藥物釋放系統之研究，碩士論文，化學工程與材料工程研究所，國立中央大學，中華民國九十一年六月
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，碩士論文，化學工程學系，國立成功大學，民國九十五年三月二十四日。
5. 魏宗平，PLGA微球包覆Rapamycin與蠶絲蛋白/明膠形成複合薄膜之藥物釋放探討，碩士論文，化學工程與材料工程研究所，國立台北科技大學，中華民國一百零一年六月。
6. Adlard, P. A., & Bush, A. I. (2012). Metal chaperones: a holistic approach to the treatment of Alzheimer's disease. *Front Psychiatry*, 3, 15.
7. Aggarwal, B. B., Kumar, A., & Bharti, A. C. (2003). Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res*, 23(1a), 363-398.
8. Ambrose, J. A., & Barua, R. S. (2004). The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol*, 43(10), 1731-1737.
9. Bartsch, H., Rojas, M., Nair, U., Nair, J., & Alexandrov, K. (1999). Genetic cancer susceptibility and DNA adducts: studies in smokers, tobacco chewers, and coke oven workers. *Cancer Detect Prev*, 23(6), 445-453.
10. Ben-Jacob, E., Garik, P., Mueller, T., & Grier, D. (1988). Characterization of morphology transitions in diffusion-controlled systems. *Phys Rev A*, 38(3), 1370-1380.
11. Bose, C., Zhang, H., Udupa, K. B., & Chowdhury, P. (2005). Activation of p-ERK1/2 by nicotine in pancreatic tumor cell line AR42J: effects on proliferation and secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 289(5), G926-934.

12. Bouquot, J. E., & Whitaker, S. B. (1994). Oral leukoplakia--rationale for diagnosis and prognosis of its clinical subtypes or "phases". *Quintessence Int*, 25(2), 133-140.
13. Califano, J., van der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., et al. (1996). Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res*, 56(11), 2488-2492.
14. Chang, M. C., Wu, H. L., Lee, J. J., Lee, P. H., Chang, H. H., Hahn, L. J., et al. (2004). The induction of prostaglandin E2 production, interleukin-6 production, cell cycle arrest, and cytotoxicity in primary oral keratinocytes and KB cancer cells by areca nut ingredients is differentially regulated by MEK/ERK activation. *J Biol Chem*, 279(49), 50676-50683.
15. Chen, H., Wilkins, L. M., Aziz, N., Cannings, C., Wyllie, D. H., Bingle, C., et al. (2006). Single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-1B gene affect transcription according to haplotype context. *Hum Mol Genet*, 15(4), 519-529.
16. Choi, S., & Myers, J. N. (2008). Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *J Dent Res*, 87(1), 14-32.
17. Chung, C. H., Yang, Y. H., Wang, T. Y., Shieh, T. Y., & Warnakulasuriya, S. (2005). Oral precancerous disorders associated with areca quid chewing, smoking, and alcohol drinking in southern Taiwan. *J Oral Pathol Med*, 34(8), 460-466.
18. Costa, P., & Sousa Lobo, J. M. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci*, 13(2), 123-133.
19. Crolle, G., & D'Este, E. (1980). Glucosamine sulphate for the management of arthrosis: a controlled clinical investigation. *Curr Med Res Opin*, 7(2), 104-109.
20. Dabhi, M. R., Nagori, S. A., Gohel, M. C., Parikh, R. K., & Sheth, N. R. (2010). Formulation development of smart gel periodontal drug delivery system for local delivery of chemotherapeutic agents with application of experimental design. *Drug Deliv*, 17(7), 520-531.
21. Daniel, K. G., Chen, D., Orlu, S., Cui, Q. C., Miller, F. R., & Dou, Q. P. (2005). Clioquinol and pyrrolidine dithiocarbamate complex with copper to form proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res*, 7(6), R897-908.
22. Dodd, C. E. (2001). HACCP in the meat industry, edited by Martyn Brown. Woodhead Publishing Ltd,

Cambridge (pound95/US\$157) ISBN 1855734486. *Meat Sci*, 59(3), 339.

23. Du, X., Squier, C. A., Kremer, M. J., & Wertz, P. W. (2000). Penetration of N-nitrosornicotine (NNN) across oral mucosa in the presence of ethanol and nicotine. *J Oral Pathol Med*, 29(2), 80-85.
24. Eyer, L., & Hruska, K. (2013). Antiviral agents targeting the influenza virus: a review and publication analysis. *Veterinarni Medicina*, 58(3), 113–185.
25. Geiser, J., De Lisle, R. C., Finkelstein, D., Adlard, P. A., Bush, A. I., & Andrews, G. K. (2013). Clioquinol synergistically augments rescue by zinc supplementation in a mouse model of acrodermatitis enteropathica. *PLoS One*, 8(8), e72543.
26. Gupta, R., Sharma, S. C., & Das, S. N. (2008). Association of TNF-alpha and TNFR1 promoters and 3' UTR region of TNFR2 gene polymorphisms with genetic susceptibility to tobacco-related oral carcinoma in Asian Indians. *Oral Oncol*, 44(5), 455-463.
27. Hamcerencu, M., Desbrieres, J., Popa, M., & Riess, G. (2012). Original stimuli-sensitive polysaccharide derivatives/N-isopropylacrylamide hydrogels. Role of polysaccharide backbone. *Carbohydr Polym*, 89(2), 438-447.
28. Hoffman, A. (1998). Pharmacodynamic aspects of sustained release preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 33(3), 185-199.
29. Hoffmann, E., Dittrich-Breiholz, O., Holtmann, H., & Kracht, M. (2002). Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol*, 72(5), 847-855.
30. Hua, J., Sakamoto, K., & Nagaoka, I. (2002). Inhibitory actions of glucosamine, a therapeutic agent for osteoarthritis, on the functions of neutrophils. *J Leukoc Biol*, 71(4), 632-640.
31. Jeng, J. H., Ho, Y. S., Chan, C. P., Wang, Y. J., Hahn, L. J., Lei, D., et al. (2000). Areca nut extract up-regulates prostaglandin production, cyclooxygenase-2 mRNA and protein expression of human oral keratinocytes. *Carcinogenesis*, 21(7), 1365-1370.
32. Jeng, J. H., Kuo, M. L., Hahn, L. J., & Kuo, M. Y. (1994). Genotoxic and non-genotoxic effects of betel quid ingredients on oral mucosal fibroblasts in vitro. *J Dent Res*, 73(5), 1043-1049.
33. Jeng, J. H., Wang, Y. J., Chiang, B. L., Lee, P. H., Chan, C. P., Ho, Y. S., et al. (2003). Roles of keratinocyte inflammation in oral cancer: regulating the prostaglandin E2, interleukin-6 and TNF-alpha production of oral epithelial cells by areca nut extract and arecoline. *Carcinogenesis*, 24(8), 1301-1315.

34. Johnson, J. J., & Mukhtar, H. (2007). Curcumin for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Lett*, 255(2), 170-181.
35. Kim, D. G., You, K. R., Liu, M. J., Choi, Y. K., & Won, Y. S. (2002). GADD153-mediated anticancer effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide on human hepatoma cells. *J Biol Chem*, 277(41), 38930-38938.
36. Kshirsagar, N. A., Gokhale, P. C., & Pandya, S. K. (1995). Liposomes as drug delivery system in leishmaniasis. *J Assoc Physicians India*, 43(1), 46-48.
37. Kwon, Y., Malik, M., & Magnuson, B. A. (2004). Inhibition of colonic aberrant crypt foci by curcumin in rats is affected by age. *Nutr Cancer*, 48(1), 37-43.
38. Lauta, V. M. (2001). Interleukin-6 and the network of several cytokines in multiple myeloma: an overview of clinical and experimental data. *Cytokine*, 16(3), 79-86.
39. Lee, E. J., Lee, H., Huang, T. N., Chung, C., Shin, W., Kim, K., et al. (2015). Trans-synaptic zinc mobilization improves social interaction in two mouse models of autism through NMDAR activation. *Nat Commun*, 6, 7168.
40. Lee, M. W., Tsai, H. F., Wen, S. M., & Huang, C. H. (2012). Photocrosslinkable gellan gum film as an anti-adhesion barrier. *Carbohydr Polym*, 90(2), 1132-1138.
41. Lev-Ari, S., Strier, L., Kazanov, D., Madar-Shapiro, L., Dvory-Sobol, H., Pinchuk, I., et al. (2005). Celecoxib and curcumin synergistically inhibit the growth of colorectal cancer cells. *Clin Cancer Res*, 11(18), 6738-6744.
42. Li, J., Kamath, K., & Dwivedi, C. (2001). Gellan film as an implant for insulin delivery. *J Biomater Appl*, 15(4), 321-343.
43. Li, N., Chen, X., Han, C., & Chen, J. (2002). [Chemopreventive effect of tea and curcumin on DMBA-induced oral carcinogenesis in hamsters]. *Wei Sheng Yan Jiu*, 31(5), 354-357.
44. Lin, J. K., & Lin-Shiau, S. Y. (2001). Mechanisms of cancer chemoprevention by curcumin. *Proc Natl Sci Counc Repub China B*, 25(2), 59-66.
45. Mahdi, M. H., Conway, B. R., & Smith, A. M. (2014). Evaluation of gellan gum fluid gels as modified release oral liquids. *Int J Pharm*, 475(1-2), 335-343.
46. Mandal, T. K. (2000). Swelling-controlled release system for the vaginal delivery of miconazole. *Eur J Pharm Biopharm*, 50(3), 337-343.

47. Mehrotra, R., Singh, M., Kumar, D., Pandey, A. N., Gupta, R. K., & Sinha, U. S. (2003). Age specific incidence rate and pathological spectrum of oral cancer in Allahabad. *Indian J Med Sci*, 57(9), 400-404.
48. Mio, T., Romberger, D. J., Thompson, A. B., Robbins, R. A., Heires, A., & Rennard, S. I. (1997). Cigarette smoke induces interleukin-8 release from human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med*, 155(5), 1770-1776.
49. Misra, A., Pal, R., Majumdar, S. S., Talwar, G. P., & Singh, O. (1997). Biphasic testosterone delivery profile observed with two different transdermal formulations. *Pharm Res*, 14(9), 1264-1268.
50. Mithani, S. K., Mydlarz, W. K., Grumbine, F. L., Smith, I. M., & Califano, J. A. (2007). Molecular genetics of premalignant oral lesions. *Oral Dis*, 13(2), 126-133.
51. Miyazaki, S., Aoyama, H., Kawasaki, N., Kubo, W., & Attwood, D. (1999). In situ-gelling gellan formulations as vehicles for oral drug delivery. *J Control Release*, 60(2-3), 287-295.
52. Mundargi, R. C., Shelke, N. B., Babu, V. R., Patel, P., Rangaswamy, V., & Aminabhavi, T. M. (2010). Novel thermo-responsive semi-interpenetrating network microspheres of gellan gum-poly (N-isopropylacrylamide) for controlled release of atenolol. *Journal of applied polymer science*, 116(3), 1832-1841.
53. Murti, P. R., Bhonsle, R. B., Pindborg, J. J., Daftary, D. K., Gupta, P. C., & Mehta, F. S. (1985). Malignant transformation rate in oral submucous fibrosis over a 17-year period. *Community Dent Oral Epidemiol*, 13(6), 340-341.
54. Purohit, V., Khalsa, J., & Serrano, J. (2005). Mechanisms of alcohol-associated cancers: introduction and summary of the symposium. *Alcohol*, 35(3), 155-160.
55. Rao, C. V. (2007). Regulation of COX and LOX by curcumin. *Adv Exp Med Biol*, 595, 213-226.
56. Rhodus, N. L., Ho, V., Miller, C. S., Myers, S., & Ondrey, F. (2005). NF-kappaB dependent cytokine levels in saliva of patients with oral preneoplastic lesions and oral squamous cell carcinoma. *Cancer Detect Prev*, 29(1), 42-45.
57. Roy, M., Chakraborty, S., Siddiqi, M., & Bhattacharya, R. K. (2002). Induction of Apoptosis in Tumor Cells by Natural Phenolic Compounds. *Asian Pac J Cancer Prev*, 3(1), 61-67.
58. Sharma, C., Kaur, J., Shishodia, S., Aggarwal, B. B., & Ralhan, R. (2006). Curcumin down regulates smokeless tobacco-induced NF-kappaB activation and COX-2 expression in human oral premalignant

and cancer cells. *Toxicology*, 228(1), 1-15.

59. Shigemasa, Y., & Minami, S. (1996). Applications of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 13, 383-420.
60. Shin, V. Y., Wu, W. K., Ye, Y. N., So, W. H., Koo, M. W., Liu, E. S., et al. (2004). Nicotine promotes gastric tumor growth and neovascularization by activating extracellular signal-regulated kinase and cyclooxygenase-2. *Carcinogenesis*, 25(12), 2487-2495.
61. Shiu, M. N., Chen, T. H., Chang, S. H., & Hahn, L. J. (2000). Risk factors for leukoplakia and malignant transformation to oral carcinoma: a leukoplakia cohort in Taiwan. *Br J Cancer*, 82(11), 1871-1874.
62. Sidransky, D. (1995). Molecular genetics of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol*, 7(3), 229-233.
63. Sikdar, N., Paul, R. R., & Roy, B. (2004). Glutathione S-transferase M3 (A/A) genotype as a risk factor for oral cancer and leukoplakia among Indian tobacco smokers. *Int J Cancer*, 109(1), 95-101.
64. Smith, A. M., Shelton, R. M., Perrie, Y., & Harris, J. J. (2007). An initial evaluation of gellan gum as a material for tissue engineering applications. *J Biomater Appl*, 22(3), 241-254.
65. Smith, W. L., DeWitt, D. L., & Garavito, R. M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*, 69, 145-182.
66. Soares, J. B. P. (2004). Macromolecular Reaction Engineering. *Macromolecular Materials and Engineering*, 289(1), 11-11.
67. Sturtevant, F. M. (1980). Zinc deficiency, acrodermatitis enteropathica, optic atrophy, subacute myelo-optic neuropathy, and 5,7-dihalo-8-quinolinols. *Pediatrics*, 65(3), 610-613.
68. Su, C. C., Chen, G. W., Lin, J. G., Wu, L. T., & Chung, J. G. (2006). Curcumin inhibits cell migration of human colon cancer colo 205 cells through the inhibition of nuclear factor kappa B /p65 and down-regulates cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-2 expressions. *Anticancer Res*, 26(2a), 1281-1288.
69. Sugerma, P. B., & Savage, N. W. (1999). Current concepts in oral cancer. *Aust Dent J*, 44(3), 147-156.
70. Thacharodi, D., & Rao, K. P. (1996). Rate-controlling biopolymer membranes as transdermal delivery systems for nifedipine: development and in vitro evaluations. *Biomaterials*, 17(13), 1307-1311.
71. Uhrich, K. E., Cannizzaro, S. M., Langer, R. S., & Shakesheff, K. M. (1999). Polymeric systems for controlled drug release. *Chem Rev*, 99(11), 3181-3198.

72. Valentine, J. A., Scott, J., West, C. R., & St Hill, C. A. (1985). A histological analysis of the early effects of alcohol and tobacco usage on human lingual epithelium. *J Oral Pathol*, 14(8), 654-665.
73. Wang, C., Gong, Y., Lin, Y., Shen, J., & Wang, D. A. (2008). A novel gellan gel-based microcarrier for anchorage-dependent cell delivery. *Acta Biomater*, 4(5), 1226-1234.
74. Wight, A. J., & Ogden, G. R. (1998). Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer--a review. *Oral Oncol*, 34(6), 441-447.

撰寫人: 李明偉 教授

單位: 中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系(所)

一、與會緣由與過程

本實驗室的研究主要有幾個方向:分別是生醫材料、生物感測以及藥物釋放。2010 年開始,本研究室為拓展研究的實用性,投入癌症方面的治療方式開發,特別是癌症的藥物傳輸。本次參與國際研討會的經費,則是來自科技部個人計畫“Gellan gum 水膠做為 3D 腫瘤球體基質與口腔癌治療貼片之研究”,計畫編號為 NSC 101-2221-E-040 -003 -MY3。由於本次會議的主題與我們的研究內容有密切的相關性,因此決定參與該研討會。希望藉由論文的發表能吸引與會學者給予我們研究上更多的建議,達到交流的目的。此次研討會中,我們的研究團隊發表之論文題目為“Cell cytotoxic effects of clioquinol and prepare of a gellam gum/glucosamine hydrogel carrier for oral cancer therapy”,會議摘要 ID 為 100293。

二、會議相關資訊

此次會議是由 Controlled Release Society(CRS)所舉辦,此藥物釋放學會是該研究領域最大的機構,各國也在此學會得認可下成立各地的分會,台灣亦不例外。台灣目前的 TCRS 主席則是清華大學宋信文教授。而本人也是 TCRS 的成員之一。該學會每年均會舉辦國際性年會,藉此鼓勵世界各地的傑出研究可透過交流將研究深度與應用性提升。本次研討會就是在這樣的背景下舉辦。

本次研討會於 2015 年 7 月 26-29 日於蘇格蘭愛丁堡舉辦。本此,台灣 CRS 成員成立台灣學術訪問團前往與會,參與研討會的團一行 12 人於 7 月 25 日搭乘荷蘭航空航班前往阿姆斯特丹,再由阿姆斯特丹轉機前往蘇格蘭愛丁堡。由於正值暑假旺季,航班機位訂位不易,再加上航班 delay,這一段航程充滿了憤怒與驚

奇。一行人抵達阿姆斯特丹之後，發現轉機機位超賣與航班誤點，所有人被迫更改行程，且整團必須搭乘不同的航班前往愛丁堡。而我被安排的航班則是由阿姆斯特丹轉機前往英國利物浦，再轉往曼徹斯特，再轉往愛丁堡。從台北出發一趟行程下來已超過36小時，抵達愛丁堡之後再搭5小時的巴士才到達下榻的飯店，此時已是午夜2點鐘。

三、研討會內容

本此會議分為3天進行，與會人員具主辦單位統計有1430位，來自52個國家，發表論文782篇，另外新加入的會員有416位。就演講的內容，會議第一天主要是以藥物劑型開發為主，第二天則是以蛋白質、核酸、胜肽類傳輸系統重點，第三天則以臨床應用為主題，特別是癌症方面的治療。詳細的內容可參閱表1-3。

表 1: 會議議程(Day 1)

Saturday, July 25		
7:30 a.m. – 5:00 p.m.	CRS Registration Open	Strathblane Hall
7:30 a.m. – 5:00 p.m.	Speaker Preparation Room Open	Conference Organiser's Room
8:00 a.m. – 5:00 p.m.	Exhibit Set-Up	Lennox Suite
8:00 a.m. – 5:00 p.m.	Premeeting Workshop: Ocular Drug Delivery – Challenges of Matching New Technologies with Drug Pharmacokinetics*	Moorfoot
8:00 a.m. – 5:00 p.m.	Young Scientist Workshop: The Rise, and Rise, of Precision Medicine	Sidlaw

表 2: 會議議程(Day 2)

Sunday, July 26		
7:30 a.m. – 5:00 p.m.	Speaker Preparation Room Open	Conference Organiser's Room
7:30 a.m. – 7:30 p.m.	CRS Registration Open	Strathblane Hall
8:00 a.m. – 12:00 p.m.	Young Scientist Workshop: Finding Your Career Edge	Sidlaw
8:00 a.m. – 12:10 p.m.	Premeeting Workshop: Delivery of Therapeutic Bioconjugates: From Polymer Conjugates to Antibody-Drug Conjugates*	Menteith
8:00 a.m. – 2:00 p.m.	Exhibit Set-Up	Lennox Suite
9:00 – 10:00 a.m.	Technology Forum: Evonik Industries AG	Carrick
9:00 – 10:00 a.m.	Technology Forum: Lucideon Limited	Harris 2
9:00 – 10:00 a.m.	Technology Forum: MedImmune	Harris 1
9:00 – 10:00 a.m.	Technology Forum: Wyatt Technology Corporation	Ochil
10:15 – 11:15 a.m.	Technology Forum: Agilent Technologies	Ochil
10:15 – 11:15 a.m.	Technology Forum: Evonik Industries AG	Carrick
10:15 – 11:15 a.m.	Technology Forum: MedPharm	Harris 1
11:30 a.m. – 12:30 p.m.	Technology Forum: Catalent Pharma Solutions & BASF Corp.	Carrick
11:30 a.m. – 12:30 p.m.	Technology Forum: Corbion Purac Biomaterials & Medincell	Harris 1
11:30 a.m. – 12:30 p.m.	Technology Forum: Powder Systems Limited	Ochil
12:00 – 2:00 p.m.	Leadership Forum (<i>by invitation</i>)	Sheraton, Edinburgh Suite 2 (offsite)
12:30 – 2:00 p.m.	Young Scientist Roundtable: Drug Delivery Technology and Clinical Development	Sidlaw
1:00 – 2:40 p.m.	Soapbox Sessions	Lomond Suite
1:00 – 4:00 p.m.	Poster Session I Set-Up	Cromdale Hall
2:00 – 3:00 p.m.	First Timers' Meeting	Lowther
3:00 – 3:50 p.m.	Plenary Session: Vincent H. L. Lee	Pentland
4:00 – 5:30 p.m.	Industry Roundtable – Drugs, Delivery, and Patients – How Will We Bring It All Together in the New World?	Lomond Suite
4:30 – 5:30 p.m.	Speed Mentoring Event	Lammermuir
5:30 – 7:30 p.m.	Exposition Grand Opening and Welcome Reception	Lennox Suite

表 3:會議議程(Day 3)

Monday, July 27		
7:00 – 8:00 a.m.	Get Up! Get Educated! Choosing the Best Animal Model for Your Drug Delivery Studies	Moorfoot
7:00 a.m. – 5:00 p.m.	Speaker Preparation Room Open	Conference Organiser's Room
7:00 a.m. – 5:00 p.m.	CRS Registration Open	Strathblane Hall
8:00 – 9:30 a.m.	CRS Opening Session	Pentland
9:30 – 10:30 a.m.	Poster Session I Authors Present – Group A	Cromdale Hall
9:30 – 10:30 a.m.	Exposition Hall Open	Lennox Suite
9:30 a.m. – 6:00 p.m.	Poster Session I Viewing Hours	Cromdale Hall
10:30 a.m. – 12:00 p.m.	Mini-Symposium: Modeling and Simulation of Oral Absorption – A Progress Report from the EU/IMI Project OrBiTo	Pentland
10:30 a.m. – 12:00 p.m.	Scientific Sessions	
	• Drug Delivery to the Brain	Sidlaw
	• Encapsulation for Industrial Applications	Tinto
	• Modulated and Responsive Delivery Systems	Fintry
	• Transdermal Delivery	Moorfoot
12:00 – 1:00 p.m.	Exposition Hall Open (lunch available for purchase)	Lennox Suite
1:00 – 2:45 p.m.	Plenary & Special Session: Cameron Alexander and Nicholas A. Peppas	Pentland
3:00 – 4:30 p.m.	Mini-Symposium: Therapeutic Cancer Nanomedicines	Pentland
3:00 – 4:30 p.m.	Scientific Sessions	
	• Delivery of Vaccines	Sidlaw
	• Manufacture, Characterization, Measurement, and Stability	Tinto
	• Oral Delivery for Food	Fintry
	• Respiratory Drug Delivery	Moorfoot
4:30 – 5:30 p.m.	Exposition Hall Happy Hour	Lennox Suite
5:00 – 6:00 p.m.	Poster Session I Authors Present – Group B	Cromdale Hall
5:30 – 6:30 p.m.	PSAH Networking Event*	Shakespeare (offsite)
6:00 – 6:30 p.m.	Poster Session I Take-Down	Cromdale Hall
9:00 – 10:30 p.m.	Young Scientist Networking Event*	The Scotch Whisky Experience (offsite)

表 4:會議議程(Day 4)

Tuesday, July 28		
7:00 – 8:00 a.m.	Get Up! Get Educated! Trends in Protein Delivery	Moorfoot
7:00 – 8:00 a.m.	Poster Session II Set-Up	Cromdale Hall
7:00 a.m. – 5:00 p.m.	Speaker Preparation Room Open	Conference Organiser's Room
7:00 a.m. – 5:00 p.m.	CRS Registration Open	Strathblane Hall
8:00 – 9:30 a.m.	Plenary Session: María José Alonso	Pentland
9:30 – 10:30 a.m.	Exposition Hall Open	Lennox Suite
9:30 – 10:30 a.m.	Poster Session II Authors Present – Group C	Cromdale Hall
9:30 a.m. – 4:30 p.m.	Poster Session II Viewing Hours	Cromdale Hall
10:30 – 11:30 a.m.	Chapter Chair Networking Break (by invitation)	Atrium Café
10:30 a.m. – 12:00 p.m.	Mini-Symposium: Next-Generation Vaccine Development and Delivery Technologies	Moorfoot
10:30 a.m. – 12:00 p.m.	Scientific Sessions	
	• <i>In Vivo</i> Nucleic Acid Delivery	Tinto
	• Nano-Sized Carriers for Small Molecule Oncology Drugs	Sidlaw
	• Ocular Drug Delivery	Fintry
	• Oral Drug Delivery	Pentland
12:00 – 1:00 p.m.	Lunch with the Luminaries*	Carrick
12:00 – 1:30 p.m.	Exposition Hall Open (lunch available for purchase)	Lennox Suite
12:00 – 1:30 p.m.	C&DP Luncheon*	Sheraton, Stirling Suite (offsite)
1:30 – 3:00 p.m.	Mini-Symposium: European Technology Platform on Nanomedicine: Translation of Nanomedicines	Moorfoot

本次會議吾人負責展示的論文題目是“Cell cytotoxic effects of clioquinol and prepare of a gellam gum/glucosamine hydrogel carrier for oral cancer therapy” 圖 1、圖 2 則是吾人於會議現場以及論文展示時的照片。

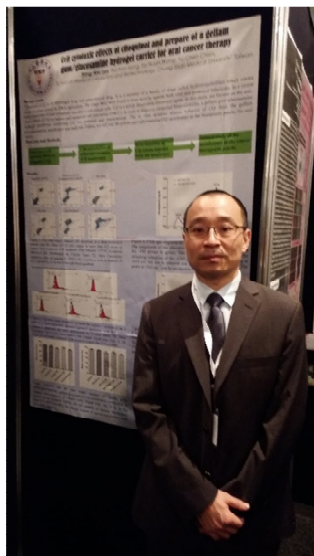


圖 1：會議現場。

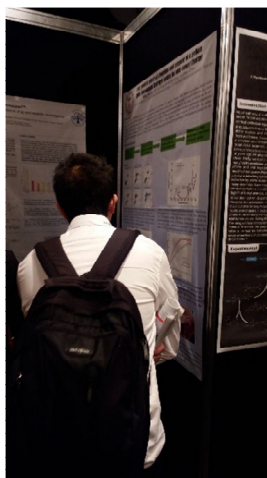


圖 2：論文展示。

四、此行會議心得

此次會議之所以能順利成行，非常感謝科技部在經費上的支持與協助。特別是參與的博士後班研究生，也都取得科技部提供的經費補助，顯示國家在人才培育方面的重視。多年來，面對對岸的崛起與野心，吾人一直認為台灣在很多外在環境不如能的情況下，唯有在人才培育方面下功夫，建立軟實力，才足以面對未來世界的快速變遷。與會的學生也表示，這是他們第一次參與國際性研討會，或許

在研究的內容上，都可由紙本期刊找到相關的研究設計與結果，但是透過親身體驗的學術交流，對於學生以及研究人員而言，更重要的是國際視野與國際交流的經驗。

藥物釋放系統，早在 60 年代即有相關的概念。發展至今，藥物釋放系統的市場每年高達 300 億美金的產值，預估未年十年也將以每年 10-15% 的成長率繼續擴展其市場價值及應用。藥物釋放其應用面，主要以基材開發、藥物篩選以及釋放動力學為三大主軸，其他部分還包括蛋白質及其他生物活性物質方面的傳輸開發和奈米粒子的傳輸理論。本此會議安排的講演主題也都是圍繞在上述的幾個重點中。對從事藥物傳輸研發的團隊而言，對這些主題其實都不陌生，但當中有幾份報告則是引起吾人的興趣：B Mead (USA) 利用奈米粒子做為傳輸基材，藉此穿透血腦障壁治療經退化，技術層次頗高但實用性極佳，與我們生醫感測的領域不同，但卻是一個我們一直想開發的系統，特別是台灣未來邁入高齡化社會，對於阿茲海默症的治療過於依賴外國進口的藥物，對台灣而言是一個警訊。中國的 L Li, Y 提出一些奈米級粒子，不但可以做為癌症偵測系統也可做為殺死癌細胞的工具，相關概念先前就有研究報告，不過我們感到好奇的是，此構想是否是一個難以達到的境界。經過這麼長的時間，我們一直期待的臨床人體試驗數據，卻沒有研究團隊提出，有的只是體外模擬測試或是動物實驗模式，不免讓我們質疑應用在人體的可行性。美國的 S Rosenbaum 提出 Novel V-Smart™ Nanovesicles 可做為神經退化性疾病的治療，像是帕金森氏症、阿茲海默症、手足舞蹈症 (Huntington's disease)，則是一個很符合台灣未來需求的一項研究，面臨即將進入高齡化的台灣社會，神經退化性疾病將會是未來需要耗費大量醫療資源的一個項目，但以我的認知，目前國內並未有相關研究室從事類似的研究，是一個值得注意的課題。德國的 T Lammers 提出具顯影功能的粒子為偵測癌症的工具，以前我們只知道 CT、MRI 是癌症檢測的兩大工具，顯影功能的粒子如果也可應用於癌症檢測，在醫療成本上是一個利基，不過我們也認為顯影功能的粒子應用於

癌症檢測，因體內障壁的影響需面對解析度不佳的情況。

五、結論

藥物釋放的研發是一個跨領域的研究，藥物開發也是一個具有地域性、群組性的考量。以台灣現階段而言，過去 30 年來藥物製造業一直是我們國家的強項，以這樣的思維做考量，藥物釋放基材是一項值得國家投入的產業。此外，台灣的生醫研究，特別是分子生物方面，於世界也占有一席之地。理論上，有上述兩項優勢為基礎，台灣是一個適合發展藥物釋放基材的國家。不過，藥物釋放基材必需結合材料科學與生物醫學，如何引導跨領域的結合，才是我們現今的問題。另外，藥物釋放基材的應用很廣，我們該選擇開發那一類疾病的藥物傳輸基材，也是決定台灣醫藥產業成敗的關鍵。舉例而言，同樣是肝癌和口腔癌，在台灣的罹患率遠超過歐、美等國，相關的藥物治療與傳輸系統建立對我們而言，不但具有需求也具有區域發展的特色。我們非常期望政府能藉由多方的考量，重點式的投入某些類別的藥物開發研究與產業支持，並提供人才整併的教育訓練，培養更多的跨領域人才。否則台灣又只是淪為專利過期藥的代工重鎮，這是一個值得政府與教育單位都必需慎重思考的問題。

此行，雖歷經舟車勞頓之苦，但對於吾人而言，能直接面對面和各國研究人員切磋，是一個非常難忘且有意義的經驗，也非常感謝科技部在經費上的補助。

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2016/01/25

科技部補助計畫	計畫名稱: Gellan gum 水膠做為3D腫瘤球體基質與口腔癌治療貼片之研究
	計畫主持人: 李明偉
	計畫編號: 101-2221-E-040-003-MY3 學門領域: 生醫材料
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：李明偉		計畫編號：101-2221-E-040-003-MY3				計畫名稱：Gellan gum 水膠做為3D腫瘤球體基質與口腔癌治療貼片之研究	
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	1	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	8	6	100%		
		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（本國籍）	碩士生	7	5	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%		
國外	論文著作	期刊論文	3	4	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	4	3	100%		
		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%		
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。）		1. 本研究與大陸地區溫州醫科大學生命科學院進行國際合作 2. 本研究與高雄醫學大學進行校際合作					

	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）

本計畫目前共發表4位碩士學位論文，國內外研討會論文8篇以上，目前進行數據整理與SCI期刊投稿，近日將投稿之標題為"Gellan gum/Glucosamine films carrying 5-Chloro-8-hydroxy-7-iodoquinoline as an oral cancer treatment patch"，本計畫執行期日雖已到期，但後續仍有數據需進一步證實，且研究可以再延續，因此仍會有一位博士班學生持續研究醫材在口腔癌治療之應用

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）

口腔癌在台灣地區屬於區域性高風險癌症，本研究利用gellan gum為基材發展口腔癌治療的醫療器材，對我國醫療發展是相當重要且必要。本研究最大的突破是開發口腔癌治療貼片，由於目前市面上並無此產品，因此我們相信此新的治療概念，可以大幅減緩口腔癌患者的病痛與預後。未來在期刊發表後，我們也希望能引起廠商的注意，達到技術轉移的目標，確實將本研究成果推廣至臨床。另一方面，本計畫雖然為期三年，不過針對研究成果，很多的實驗數據仍需進一步確認，以及研究深度可再加強，因此本實驗室於2016年繼續安排一位博士班持續進行口腔癌相關研究，並不因計畫結束而停頓我們的研究工作。