

# 國立交通大學

## 奈米科技研究所

### 碩士論文

Cytochalasin D 降低氧化鋅奈米粒子之細胞毒性與細胞外形之影響

Cytochalasin D ameliorates Zinc oxide nanoparticles-induced cytotoxicity and morphological abnormality in NIH-3T3 cell

研究生：陳維揚

學 號：9352503

指導教授：黃國華 副教授

中華民國九十五年六月

Cytochalasin-D 降低氧化鋅奈米粒子之細胞毒性與細胞外形  
之影響

Cytochalasin-D ameliorates Zinc oxide nanoparticles-induced  
cytotoxicity and morphological abnormality in NIH-3T3 cell

研究生：陳維揚

Student: Wei-Yang Chen

指導教授：黃國華 副教授

Advisor : Guewha Steven Huang

國 立 交 通 大 學  
奈 米 科 技 研 究 所  
碩 士 論 文

A Thesis

Submitted to Institute of Nanotechnology

College of Engineering

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master

in

Institute of Nanotechnology

June 2006

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十五年六月

## 論文摘要

隨著科技的發展，科學家無不絞盡心智進行各式奈米材料的研發與應用，以造福人群，但是奈米科技的背後卻隱藏著一些不為人知的危機與危險。

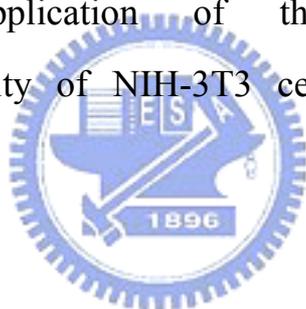
本文藉由觀察不同尺寸氧化鋅(ZnO)奈米微粒對於小鼠胚胎纖維母細胞(NIH-3T3)細胞的死亡率與對細胞 morphology 影響得知氧化鋅微粒的尺寸與毒性關聯性，並藉由 Cytochalasin D 藥物分別作用下，以期能夠降低氧化鋅毒性，更進一步也希望能使細胞 morphology 恢復正常。



## Abstract

Nano-sized materials are often hailed for their extraordinary electronic, light-emitting, and catalytic properties. But their unique physical characteristics raise concerns that nanometer scale of metals, ceramics, and organics could prove uniquely toxic as well. Nano-sized particles could be environmental pollution or even the loss of human life.

In this study, we investigated the cytotoxicity among different size of Zinc Oxide Nanoparticles in Mouse fibroblast cell (NIH-3T3). We found that the viability and morphology of NIH-3T3 cell were affected by incorporation of ZnO nanoparticle. This effect was size and dose-dependent. Application of the cytotoxicity and morphological abnormality of NIH-3T3 cell were by means of Cytochalasin D.



## 誌 謝

時光飛逝不知不覺的研究所兩年的時光一下子就過去了，這兩年來我在這個實驗室成長了許多這些首先要感謝我的指導老師 黃國華教授，黃老師讓我在實驗精神與技術方面有很大的進步，而另一位讓我終生感激的就是師母了，師母和老師對於我的照顧真的是無話可說，他們因為我身體不好而時常關心我也讓我養成了游泳的好習慣，使得我的體力比以前好多了，這都得感謝師母與老師的照料。

而實驗室的耀楠學長、凱明學長和孟德學長對我也是百般照顧耀楠學長就如同他的綽號小天使一般，只要我實驗上有啥需要他都能幫我”變”出來這真是讓我對他佩服的五體投地，更得感激他提供無塵室與許多耗材給我們使用使我們在實驗設備上無須煩惱；而大好人凱明學長更是常常載我們出去解解悶，讓無聊的研究生生活變的更有趣味；孟德學長對於我電腦問題上的幫助也是很大。

而毛博實驗室的張威、阿亮學長真的得感謝你們對我的指導，謝謝你們讓我對生物技術有初步的瞭解，而已經畢業的文宏學長和佳慧學姐也謝謝你們對我的照顧與指導，恩我有句話要對文宏學長說：「別讓我學姐（你女友）等太久喔，我等著喝你們的喜酒。」

謝謝另一個一定要感謝的就是我的好伙伴 邱士紋大美女，感謝你

的幫忙讓我們的實驗能完成，還有呀你真的是一个好女孩只是喔步調放慢些，個性別那麼急你一定能找到如意郎君的，還有呀以後你可是台積電大主管小弟我靠你摟，其他如昇成、英儒、和昱勳和柯博實驗室的各位同學也都是我這兩年來生活上的好伙伴，希望你們畢業後都有各自美好前程。

實驗室的學弟嘉偉、志杰、永昌和禮閣好好加油囉，時間很快就過去了好好把握學習的時間，嘉偉、志杰實驗要做性命也要顧呀！別待太晚了，保重身體。寫了這麼多當然最後不能不感謝的當然就是我的家人摟，謝謝爸媽及大阿姨和小阿姨對我的照顧以及支持，等我把身體養好了出去賺錢我會好好照顧你們的，還有呀老哥你去那啥巴布亞紐自己要小心喔，阿那邊錢若沒地方花你老弟我很樂意代勞的，哈！開玩笑的，總之自己保重囉。

研究所兩年累歸累但是在老師、師母和學長學弟的陪伴下心裡過得很快樂，也很感謝老天讓我能遇到這麼一群有趣的人，讓我這兩年過得這麼充實與豐富，但天下沒有不散的宴席也希望我們的情誼能永遠保持下去，彼此都能在對方心中留下一段美好的回憶。

# 目 錄

論文摘要		i
Abstract		ii
致謝		iii
目錄		v
圖目錄		vii
一、	緒論	1
1.1	前言	1
1.2	研究動機與目的	2
二、	文獻回顧	3
2.1	奈米毒理學	3
2.2	現行奈米粒子的研究	6
2.2.1.	皮膚對 NP 的吸附和對皮膚的毒性	6
2.2.2	NP 進入飲用水的後果	6
2.2.3	NP 進入生物體肺部對組織影響的研究	7
2.2.4	NP 對環境的影響	8
2.2.5	NP 對心血管、腦神經、呼吸、免疫系統等的研究	8
三、	材料與方法	9
3.1	實驗材料	9
3.1.1	癌細胞株	9
3.1.2	耗材	10
3.1.3	三種氧化鋅粒子	11
3.1.4	氧化鋁、氧化鈦	11
3.2	實驗藥品	12
3.3	實驗儀器	12
3.4	實驗方法	12
3.4.1	纖維母細胞 (NIH 3T3) 之培養	13
3.4.2	細胞計數與存活測試	14
3.4.3	透析(dialysis)	15
3.4.4	MTT assay 細胞活性測試	16
3.5	SEM 試片之固定	17
3.6	NIH-3T3 攝入氧化鋅奈米粒子試驗	19
3.7	NIH-3T3 攝入氧化鋅奈米粒子之 SEM 膠片觀察	20
四、	理論	25

4.1	細胞記數	25
4.2	MTT assay 原理	25
4.3	透析原理	27
4.4	Cytochalasin D 原理	28
五、	實驗結果	30
5.1	粒徑分析	30
5.2	NIH-3T3 細胞生長週期	33
5.3	MTT assay 細胞活性測試	34
5.4	Cytochalasin D 對於氧化鋅奈米粒子毒性之影響	37
5.5	Cytochalasin D 對於奈米粒子於細胞毒性之測試	38
5.6	Cytochalasin D 的 SEM	40
六、	結論與未來展望	51
七、	參考文獻	52



## 圖目錄

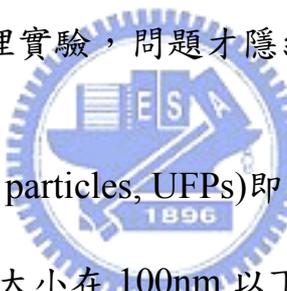
圖 2-1 富勒烯分子	4
圖 3-1 200 倍顯微鏡下的小鼠胚胎纖維母細胞	10
圖 3-2 200 倍 SEM 下的小鼠胚胎纖維母細胞	10
圖 3-3 ZnO 三種尺寸奈米粒子 SEM 圖	11
圖 3-4 Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·TiO <sub>2</sub> 的 SEM	11
圖 4-1 MTT 化學結構式	26
圖 4-2 細胞生長曲線	27
圖 4-3 細胞骨架	28
圖 4-4 Cytochalasin D 化學結構式	30
圖 5-1 透析圖	32
圖 5-2 細胞生長曲線	34
圖 5-3 MTT 細胞存活圖	37
圖 5-4 Cytochalasin D 化學結構式	38
圖 5-5 Cytochalasin D MTT 測試圖	39
圖 5-6.1 20nm 24hr 細胞 SEM	40
圖 5-6.2 20nm 48hr 細胞 SEM	41
圖 5-6.3 20nm 72hr 細胞 SEM	42
圖 5-7.1 150nm 24hr 細胞 SEM	43
圖 5-7.2 150nm 48hr 細胞 SEM	44
圖 5-7.3 150nm 72hr 細胞 SEM	45
圖 5-8.1 700nm 24hr 細胞 SEM	46
圖 5-8.2 700nm 48hr 細胞 SEM	47
圖 5-8.3 700nm 72hr 細胞 SEM	48
圖 5-9 細胞局部放大圖	49

# 第一章 序論

## 1.1 前言

奈米科技是一種多元運用的新興科技，它的觸角廣及化學、光學、紡織、藥妝、食品等領域，帶來極大商機與利益，因而引起各國政府、研究人員及企業的熱情參與；不過，它的負面影響亦不容小覷。

目前國內對奈米科學的應用科技寄予相當大的信心，卻鮮少注意到其背後所潛藏的可能危機。直到近幾年科學家開始從事自然界及人合成的奈米超微粒子之毒理實驗，問題才隱約顯現出來。



超微粒子(Ultrafine particles, UFPs)即為奈米粒子(Nanosized particles, NSPs)，指尺度大小在 100nm 以下任何形狀的粒子，並不以化學性質來分類。奈米粒子可分為自然產生與人為製造。自然產生在分散相中呈現不同的粒子大小；人為奈米粒子在分散相則大小均勻，後者將因現今奈米科技快速成長而大量增加，如 2003 年三菱公司(Mitsubishi)在日本設置第一家富勒烯 (fullerene)工廠，目標量產數以噸計的富勒烯，作為產業與科學方面應用。奈米產品的上市與相關應用的推廣，將使奈米粒子逐步與人類接觸，如具特殊光學活性的奈米二氧化鈦，已被利用於清潔消毒劑與皮膚防曬原料。

根據最新科學研究顯示：當物質縮小到奈米級尺寸，表面積增大，暴露於表面及界面的原子數增多，表面位能急速提高，粒子表面的活性大幅改變，許多新奇獨特的介觀特性(mesosopic)因而出現，甚至可能具有毒性；倘這些粒子進入人體，將可能對健康造成損害。

不過，我們應該明辨：絕大多數奈米科技對於健康並沒有新危害。因為當奈米粒子被固定或蝕刻於大型物體時，不會瀰漫在環境對人體造成損害；換言之，真正對人體及環境將造成威脅，而有必立即加以管制者，僅包括少數會自由活動(free)，飄散或移動於環境中，經由呼吸或直接穿透皮膚進入人體的奈米粒子而已。



## 1.2 研究動機與目的

由於近年來奈米科技發展迅速，許多奈米材料問世，但這些材對於人體細胞影響始終沒有被明確探討，因此希望藉由本實驗能探討於奈米粒子是否對人體細胞有所傷害以使得從事奈米材料製造的人能有所預防，另一方面探討對於人體內癌症細胞是否有所影響，以期能將奈米材料運用於癌症的治療以造福人群。

目前各國對 nanoparticle 的研究都著重在於對生物體細胞毒性影響機制,而無討論到對於 morphology 的改變，因此這使得我們對於

細胞 morphology 是否因奈米粒子的毒性或作用而有所改變產生濃厚的興趣，為了了解這個現象因此我們利用掃描式電子顯微鏡(scanning electron microscope, SEM) 來當做我們觀察的工具，以期能觀察出細胞表面微小的變化。而當細胞的 morphology 因奈米粒子毒性而有所變化或進而產生細胞死亡現象時，我們是否可以利用某種藥物使得細胞死亡減緩以及使細胞 morphology 恢復正常，這些是我們在這實驗所想要探討與了解的。

## 第二章 文獻回顧

### 2.1 奈米毒理學



奈米毒理學(nanotoxicology)是一門因應而起的新興領域，在國內，奈米物質以及奈米技術的安全性，對健康的影響等已受到廣泛重視。它涵蓋了生物技術，奈米技術，化學和物理的學科，既是國際科學前沿，也是與人類健康和生活環境密切相關的重要社會問題，但目前大家對奈米技術對健康和環境的影響還了解的很少。圍繞奈米技術的生物安全性，已開發國家皆已積極展開研究。

1. 在 2004 年，美國 Rice 大學和喬治亞理工學院的研究人員發現巴克球對人類細胞的毒性與巴克球表面是否黏有其他分子有密切的關係。這是第一次對巴克球對單個人類細胞的毒性進行研究。研

究的結果可以幫助科學家在實際應用中利用這種材料的毒性。這項研究涉及奈米  $C_{60}$  及由  $C_{60}$  分子組成的奈米級聚合體（通常在水中形成）的富勒烯分子。（Thomas J Webster *et. al.*2004）

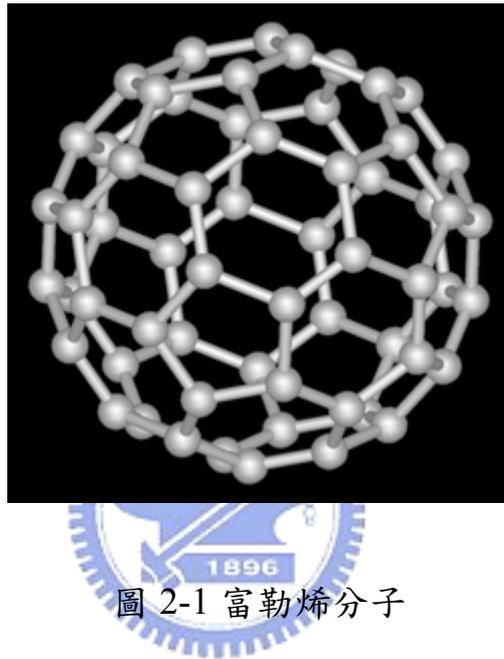


圖 2-1 富勒烯分子

研究人員測試了這兩種材料對兩種人類細胞，肝癌細胞和真皮纖維原細胞的毒性。結果發現奈米  $C_{60}$  對人類真皮細胞的毒性遠大於  $C_{60}(OH)_{24}$ ，而且表面修飾度越高的分子，毒性越低。研究人員推測富勒烯分子能殺死細胞是因為它能產生氧化劑氧化細胞膜。他們相信，表面修飾度較高的  $C_{60}$  的毒性較低是因為它們產生氧化劑的能力被降低。使半數真皮細胞死亡所需的奈米  $C_{60}$  的濃度是 20ppb (parts per billion)。而對  $C_{3}$ 、 $Na^{+}_{2-3}[C_{60}O_{7-9}(OH)_{12-15}]^{(2-3)-}$ 、 $C$

$C_{60}(OH)_{24}$ ，這個數字分別是 10,000ppb、40,000ppb 和 >5,000,000 ppb。

同年相同一批人又發現水溶性富勒烯細胞毒性在表面的衍生物有較為敏感的功能，依照兩種不同的細胞路線，從致死劑量下分幾個、等級的劑量，一種  $C_{60}$  的聚集物-四種物質的最後衍生物，比一些高水溶性的衍生物還來的毒 ( $C_3$ 、 $Na^+_{2-3} [C_{60}O_{7-9}(OH)_{12-15}]^{(2-3)-}C_{60}(OH)_{24}$ )，細胞暴露在富勒烯後都產生細胞膜上的氧化傷害，導致細胞死亡。他們也發現在含有水溶性富勒烯的四週環境中，可以產生環氧類的陰離子，也證實含氧自由基會造成細胞膜損害，最後會導致細胞死亡。這份研究是針對一些需要提高富勒烯毒性的應用，像是殺菌劑、治療癌症等等，也可以作為原始富勒烯所產生不當的生物反應作補救。(Christie M Sayes et. al. 2004)

2005 年 Nancy A. Monteiro-Riviere 利用 microwave plasma enhanced chemical vapor deposition system 製成奈米碳管薄膜。之後將人類表皮角質細胞 (HEK) 個別暴露在 0.1, 0.2, 0.4 mg/ml 的複壁奈米碳管 (MWCNT) 中 1, 2, 4, 8, 12, 24 48 小時後，使用 transmission electron microscopy 觀察 HEK，得知在所有的時間點下 MWCNT 均存在於 HEK 的細胞質的液泡中，並引起了 HEKs 釋放出會引起發炎反應的細胞分裂素白細胞介素 8 ( proinflammatory cytokine interleukin 8 )。這些結果明顯指出奈米碳管尚未能有效地發展應用在生物學上，而在奈米碳管製造過程中的職業暴露下，MWCNT 有能力存在於人類表皮細胞中並引起發炎反應。(Nancy A. Monteiro-Riviere et. al. 2005)

## 2.2 現行奈米粒子的研究

### 2.2.1. 皮膚對 NP 的吸附和對皮膚的毒性

奈米微粒可能會透過皮膚吸收而進入人體，主要是奈米化妝品、奈米防曬乳、隔離霜與塗抹藥物。對於奈米微粒是否會經由皮膚吸收進入人體，增加產生氫氧自由基 (hydroxyl radicals) 的風險，進而導致氧化與破壞 DNA 的問題，目前仍具爭議。依據歐盟所屬化妝品與非食品科學委員會 (SCCNFP) 對奈米防曬乳所使用之  $\text{TiO}_2$  的說明是，以目前工業界所使用的大小、包覆或沒包覆、防水或親水性的  $\text{TiO}_2$  是安全的，不過要求在工業界使用奈米級的  $\text{TiO}_2$  時要從事額外的試驗以便規範它的安全問題。 (ETC Group 2003)

### 2.2.2 NP 進入飲用水的後果

2004年，南方衛理公會大學也首次找到奈米微粒可能給水生物種造成毒副作用的證據，他們在研究中將九條年幼的黑鱸魚放入容量十公升的魚缸內，讓其接觸水溶性  $\text{C}_{60}$ 。 $\text{C}_{60}$  是由 60 個碳原子組成的碳同素異形體，呈現為類似微型足球的籠狀結構，這種結構又稱 buckyball，其直徑通常只有人頭髮絲的幾千分之一。

研究中黑鱸魚所接觸的 C<sub>60</sub> 濃度為 0.5 PPM (1 PPM 為百萬分之一)。四十八小時後對這些魚腦組織樣本的分析發現，它們腦部所受損傷比處於不含 C<sub>60</sub> 的清水中的黑鱸魚要嚴重十七倍。損傷主要表現為脂質的過氧化反應，它能導致脂質分解，削弱細胞膜正常功能。研究中還發現，接觸 C<sub>60</sub> 布基球會改變黑鱸魚肝臟部位一些基因的表達。發現奈米碳巴基球會對魚腦產生大範圍破壞，並會改變黑鱸魚幼苗肝臟細胞的基因。這是人類首次找到奈米微粒可能給水生物種造成毒性副作用的證據，在美挑起新一波奈米技術利弊之爭。(Eva Oberdörster 2004)



### 2.2.3 NP 進入生物體肺部對組織影響的研究

奈米製程使用大量的奈米微粒，可能造成人體健康的負面影響，報告中指出研究人員使用多種不同的奈米微粒進行動物毒理實驗，結果顯示這些奈米微粒對造成肺部紅腫的程度從普通刺激反應到非常嚴重，甚至會造成心臟血管系統的危害皆有可能。而造成紅腫反應的程度主要與單位質量的微粒表面積大小成正相關，特別是小於 50 nm 的奈米微粒。同時這麼小的微粒(10~50 nm)也可能從呼吸道滲出到其它器官，造成嚴重的傷害。然而還有很多的問題，尚未得到解答，包括奈米微粒如何對這些器官造成傷害，所以更多的研究須要再進行，才能了解其中的機制。(Gunter Oberdorster *et. al.* 2003)

#### 2.2.4 NP 對環境的影響

隨著奈米材料製程的發展，奈米微粒的排放與可能的健康危害，必須加以探討，未來管制的標準應該以數目濃度為單位。大氣中的微粒分佈常是三峰分佈，奈米微粒的直徑在 18 nm 附近，32~67%由有機物組成。未來奈米材料製程排放的奈米微粒可能對人體健康造成危害，特別是剛生成的奈米微粒，主要在於高表面積與反應性。可行的控制技術為奈米纖維過濾技術，帶電纖維過濾技術及加強帶電功能的靜電除塵器。（*Chein H. and Chen D. 2002*）

#### 2.2.5 NP 對心血管.腦神經.呼吸.免疫系統等的研究

超細微粒 ( $<0.1\mu\text{m}$ ) 在大氣中無所不在而且具有特別的物理化學性質，因此對人體健康造成潛在危害。為了幫助釐清超細微粒的潛在健康風險，我們進行了健康成人的超細微粒 (0.04, 0.06, 0.08 and 0.10  $\mu\text{m}$ ) 呼吸劑量研究，在正常的呼吸狀況下 (置換體積 500 mL 以及呼吸量 250 mL/s)，呼吸管道以每 50 ml 為一間隔，總體積 50~500 mL，量測所吸入超細微粒的沉積量。結果發現，呼吸管道的沉積區域變化相當大，沉積量最高的區域在於離口腔 150~200 mL 的區域，最高的區域隨著粒徑減小而往口腔靠近。單位面積的沉積量在肺部前端達到最高，越深入肺部單位面積的沉積量越低，最高值大約為平均值的

5~7 倍（女性），這個結果顯示，局部區域的高沉積劑量將會是人體健康危害的關鍵角色。（Kim, C.S. and Jaques, P.A. 2000）

### 第三章 材料與方法

#### 3.1 實驗材料

3.1.1. 癌細胞株:小鼠胚胎纖維母細胞 資料表(新竹食品工業研究所)

Cell Name	NIH/3T3
Cell Type	Mouse NIH/Swiss embryo, contact-inhibited
Species	Mus musculus (mouse)
Cell Morphology	Fibroblast
Growth property	Adherent
Culture Medium	90% Dulbecco's modified Eagle's medium with 4 mM L-glutamine adjusted to contain 1.5 g/L sodium bicarbonate and 4.5 g/L glucose + 10% calf serum
SubCulture Procedure	trypsin-EDTA; NOTE: Do not allow the cells to become confluent, subculture once per week.
Freezed Medium	93% culture medium + 7% DMSO

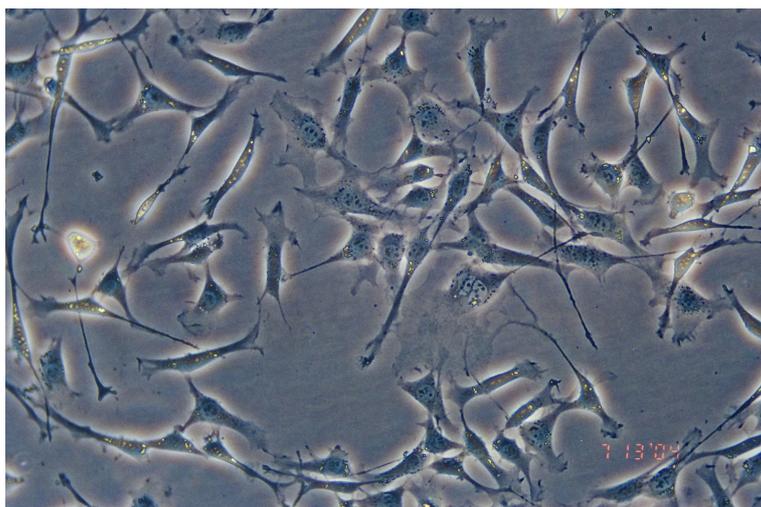


圖3-1 200倍顯微鏡下的小鼠胚胎纖維母細胞

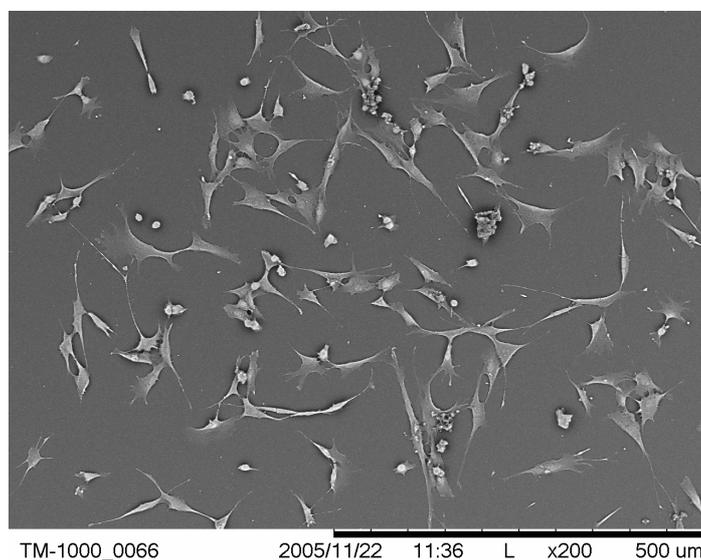
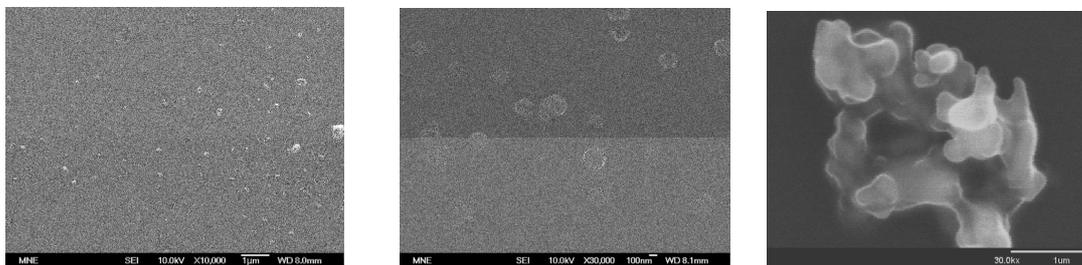


圖3-2 200倍SEM下的小鼠胚胎纖維母細胞

### 3.1.2 耗材

培養皿、DMEM、胎牛血清(Fetal calf serum)、抗生素(penicillin)、  
trypsin-EDTA、L -glutamine、Trypan blue、1XPBS、去離子水  
(Deionized water)、酒精(alcohol)95%

### 3.1.3 三種尺寸之ZnO奈米粒子:20nm、150nm、700nm

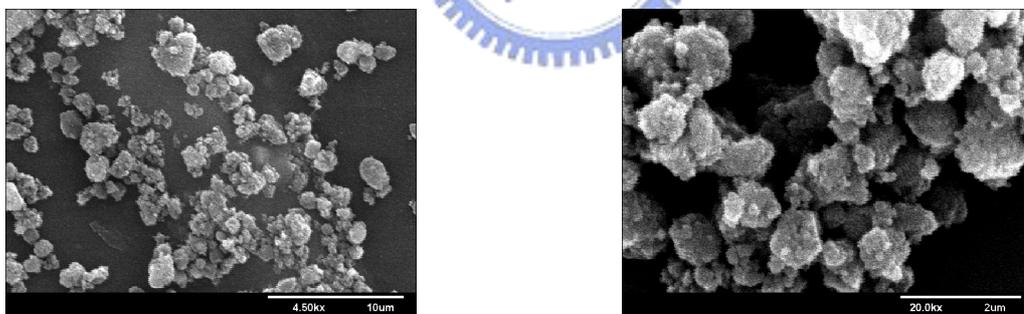


(a) 20nm SEM圖片 (b) 150nm SEM圖片 (c) 700nm SEM圖片

圖3-3 (a) 20nm SEM圖片 (b) 150nm SEM圖片

(c) 700nm SEM圖片

### 3.1.4 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、TiO<sub>2</sub>



(a) Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>的SEM

(b) TiO<sub>2</sub>的SEM

圖3-4 (a) Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>的SEM (b) TiO<sub>2</sub>的SEM

### 3.2 實驗藥品

戊二醛(Glutaraldehyde) 、細胞軟骨劑( Cytochalasin D)、細胞軟骨劑(Wortmannin)、 MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-y]-2,5-dihenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) 、DMSO、 OsO<sub>4</sub>

### 3.3 實驗儀器

高溫滅菌鍋 (Autoclave) 、二氧化碳培養箱(CO<sub>2</sub> incubator)、無菌無塵操作台(Laminar flow) 、桌上型高速離心機、SEM、ELISA reader、粒徑分佈儀

### 3.4 實驗方法

NIH-3T3 細胞培養液



#### 1. 配製原則為:

90%DMEM + 10%Calf serum + 1.5 g/L L-glutamine +0.1% penicillin

#### 2. 首先先用 70%酒精清理無菌操作台，再將所需配置的藥品置於操作台裡

#### 3. 取一個已經過高壓滅菌鍋滅菌乾淨的 500mL 血清瓶作為培養液的存取瓶

#### 4. 先用電動真空抽取器抽 450mL DMEM 至血清瓶中

#### 5. 再依序加入 50mL Calf serum、10mL L-glutamine 及 5mL penicillin 至血清瓶中

6. 以上即完成所需的細胞培養液，並將血清瓶保存在 4°C 下

## 細胞培養

### 3.4.1 纖維母細胞 (NIH-3T3) 之培養：

1 將纖維母細胞養於 T-25 flask 中，加入 15mL 細胞培養液，置入 37°C ， 5 % CO<sub>2</sub> 培養箱 (incubator) 中培養，以倒立式顯微鏡觀察其生長情形，每隔三天換一次培養基。若發現細胞太滿的時候就要繼代，以免細胞死亡。

當細胞生長量達八成時即可分盤

1. 準備 trypsin-EDTA 及 culture medium
2. 利用電動吸取器將 T-25 flask 中的舊 medium 吸起丟棄，再於 flask 中加入 2c.c. trypsin-EDTA
3. 置入 37°C ， 5 % CO<sub>2</sub> 培養箱 ( incubator ) 中等五分鐘
4. 當細胞都脫落成圓形時再加入大約 5mL medium 的量到 flask 中沖一沖，再吸到 15 c.c. 離心管中，再放入離心機中用 1000rpm 旋轉 5 分鐘，須注意細胞是否全部沉澱。若離心不夠，可以再離心一次。
5. 將 15c.c. 離心管取出，噴酒精再放入無菌操作檯中，將上清液完全吸乾，不可吸到細胞。
6. 吸取 3-5c.c. culture medium 加入離心管，再利用 pipette 將細胞均勻打散

7.把所得細胞適量的分到數個新 flask 繼續培養

### 3.4.2 細胞計數與存活測試

血球計數盤一般有二個 chambers，每個 chamber 中細刻九個  $1\text{mm}^2$  大正方形，其中四個角落之正方形再細刻十六個小格，深度均為  $0.1\text{mm}$ 。當 chamber 上方蓋上蓋玻片後，每個大正方形之體積為  $1\text{mm}^2 \times 0.1\text{mm} = 1.0 \times 10^{-4}\text{mL}$ 。使用時，計數每個大正方形內之細胞數目，乘以稀釋倍數，再乘以  $10^4$ ，即為每 mL 中之細胞數目。

材料：

1. 0.4% w/v trypan blue (GibcoBRL 15250-061)
2. 血球計數盤及蓋玻片 (Hemocytometer and coverslip)
3. 計數器 (counter)
4. 低倍倒立顯微鏡
5. 血球計數盤 (counting chamber)

步驟：

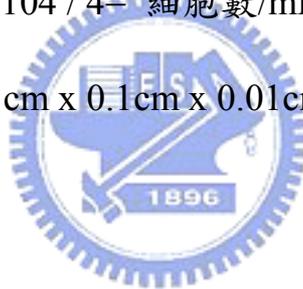
1. 剪一小片 parafilm，約  $1.5\text{cm} \times 5\text{cm}$
2. 以 pipette 吸取各  $10\mu\text{L}$  細胞懸浮液及 0.4 % trypan blue，並分別

滴於 parafilm 上面，以 pipetting 方式將其均勻混合。

3. 取 10 $\mu$ L 混合液自血球計數盤 chamber 上方凹槽加入，蓋上蓋玻片，於一百倍倒立顯微鏡下觀察，活細胞不染色，死細胞則為藍色。
4. 計數四個大方格之細胞總數，再除 4，乘以稀釋倍數（至少乘以 2，因與 trypan blue 等體積混合），最後乘以 10<sup>4</sup>，即為每 mL 中細胞懸浮液之細胞數。若細胞位於線上，只計上線與右線之細胞（或計下線與左線之細胞）。

四大格\*細胞總數 x 2 x 10<sup>4</sup> / 4 = 細胞數/mL

\*每一大格的體積 = 0.1cm x 0.1cm x 0.01cm = 10<sup>-4</sup> mL



### 3.4.3 透析(dialysis)

#### 實驗藥品

EDTA、NaHCO<sub>3</sub>、DMEM、三種尺寸的 ZnO 奈米粒子

#### 實驗材料

1. 透析膜、透析夾、去離子水(Deionized water)、燒杯、磁石、夾子、剪刀、pipette

#### 實驗儀器

Water bath、Hot plate、電子天秤

#### 實驗步驟

1. 用電子天秤秤量所需的 EDTA 及 NaHCO<sub>3</sub> 重量溶於去離子水中
2. 將燒杯中 含有藥品 EDTA 1mM 及 NaHCO<sub>3</sub> 2%(w/w) 的去離子水放

在 hot plate 上，放入磁石調整轉數指標為五，使兩種藥品加速均勻溶解在水中

3. 剪一段實驗所需的透析膜長度，用夾子將其置於已均勻溶解 EDTA 1mM 及 NaHCO<sub>3</sub> 2%(w/w)的去離子水燒杯中
4. 將燒杯置於設定溫度為 60°C 的 Water bath 中四小時
5. 取出透析膜置於另一個裝了乾淨去離子水的燒杯中，用 hot plate 將其煮沸 2~3 分鐘
6. 用剪刀將透析膜均分三份，每份都先用透析夾夾緊一端開口，再將溶有 ZnO 奈米粒子的 DMEM 注入其中後，再用夾子夾緊另一端開口
7. 將夾有 ZnO 奈米粒子 DMEM 溶液的透析膜置於體積比為 1:200 的純 DMEM 溶液的燒杯中四小時，此動作重複兩次
8. 最後將夾有三種 ZnO 奈米粒子 DMEM 溶液的透析膜用 pipette 吸出分別排至於三管 50c.c 離心管中，即完成透析
9. 最後我們完成的三管 ZnO 奈米粒子原液濃度皆為 10<sup>-3</sup>g/mL

#### 3.4.4 MTT assay 實驗方法

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)配製

將MTT(Sigma M5655)100mg黃色粉末溶在20c.c.的去離子水中，形成

5mg/c.c.的MTT淡黃色透明溶液以待備用，避光並保存於4°C

1.於96-well culture plate中加入含 $1 \times 10^6$ /well細胞數的細胞培養液2

00 $\mu$ L

2.培養24hr之後除了control組之外其餘well中的medium改為

含奈米粒子之培養液。

3. 當取樣時間到時，於每 well 加入 5vol% 的 MTT 即 20 $\mu$ L  
(時間未到者不用加)
4. 再放入培養箱等待四小時，將 well 中所有液體抽乾，於每 well 中  
再加入 200 $\mu$ L DMSO，與 well 中的藍紫色沉澱物用 pipette 吸排將其  
混合均勻呈透明藍紫色混合液
6. 再將 well 中藍紫色 DMSO 混合液抽到另一盤 96-well culture plate  
中
7. 將含這些混合液的 96-well culture plate 在 570nm 下以 ELISA Reader  
讀取 OD 吸光值



#### 3.4.5 SEM 試片之固定 (Ajay Kumar Gupta *et. al.* 2003)

1. 將細胞長在置有 SEM 觀測膠片 (13mm glass coverslips) 的 24- well  
culture plate 上
2. 自培養箱取出 24- well culture plate，放入無菌操作檯中，將預觀測  
的 SEM 膠片用鑷子 transfer 至另一個全新的 24- well culture plate。
3. 加入含有 1.5% glutaraldehyde 的前固定液中固定三十分鐘
4. 經過三十分鐘固定後將前固定液 suction 乾淨，用 PBS wash 三次，每  
次五分鐘。

- 5.加入含有2% OsO<sub>4</sub>的後固定液中固定三十分鐘
6. 同上step 4
- 7.依序以不同酒精濃度20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%至100%的無水酒精來進行脫水動作，每次五分鐘。
- 8.將100%的無水酒精suction掉後，加入hexamethyldisilazane (HMDS)  
  
放置於通風櫥進行最後一道脫水反應，使其自然乾燥  
  
Note:以上任一步驟務必使液體蓋滿整個膠片
- 9.乾燥完後貼在載台上，進行鍍白金。
- 10.利用掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察sample。



### 3.5 MTT assay細胞活性測試

三種氧化鋅奈米粒子在不同濃度下之細胞活性測試

1. 先以trypsin-EDTA作用收集細胞液，待離心後吸乾上清液，將沉澱的細胞與細胞培養液混合均勻，以trypan blue及血球計數盤計算細胞數目
2. 在96-well culture plate中加入含 $1 \times 10^6$ /well細胞數的細胞培養液  
  
200 $\mu$ L培養二十四小時
3. 二十四小時後，除了控制組的細胞培養液之外，從三種氧化鋅奈米粒子之1000ppm原液中抽取相同的十二個濃度為實驗組，其濃度順序為:5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60及70ppm，控制

組及實驗組皆為八重覆，取樣時間皆為12hr、24hr、48hr及72hr

4. 到達取樣時間時，於每 well 加入 20 $\mu$ L 的 MTT，再放入培養箱等待四小時，將 well 中所有液體抽乾，於每 well 中再加入 200 $\mu$ L DMSO，與 well 中的藍紫色沉澱物用 pipette 吸排將其混合均勻呈透明藍紫色混合液
5. 再將 well 中藍紫色 DMSO 混合液抽到另一盤 96-well culture plate 中，將含這些混合液的 96-well culture plate 在 570nm 下以 ELISA Reader 讀取 OD 吸光值



### 3.6 NIH-3T3 攝入氧化鋅奈米粒子試驗

含有氧化鋅奈米粒子的細胞培養液配製

1. 首先先由 MTT assay 細胞活性測試中分別找出添加三種氧化鋅奈米粒子後細胞的半致死劑量濃度，半致死劑量濃度各為:20nm 氧化鋅奈米粒子為 9ppm，150nm 的為 12ppm，700nm 的為 16ppm。
2. 先將無菌操作台用 70%酒精清理乾淨，再放入細胞培養液及三管新的 50c.c.離心管及三管奈米粒子濃度皆為 1000ppm 的原液
3. 用電動真空抽取器先抽一些細胞培養液至一 50c.c.離心管中
4. 再從 20nm 的氧化鋅奈米粒子原液抽取 45 $\mu$ L 至離心管，再補細胞

培養液使總體積為 50c.c.，即完成含有 20nm 氧化鋅奈米粒子之半致死劑量濃度的細胞培養液

5. 用相同方法，從 150nm 的氧化鋅奈米粒子原液抽取 60 $\mu$ L 至離心管，再補細胞培養液使總體積為 50c.c.，即完成含有 150nm 氧化鋅奈米粒子之半致死劑量濃度的細胞培養液

6. 用相同方法，從 700nm 的氧化鋅奈米粒子原液抽取 80 $\mu$ L 至離心管，再補細胞培養液使總體積為 50c.c.，即完成含有 700nm 氧化鋅奈米粒子之半致死劑量濃度的細胞培養液



### 3.7 NIH-3T3 攝入氧化鋅奈米粒子之 SEM 膠片觀察

1. 取出八分滿盤之細胞，吸除培養液，加入 1mL trypsin-EDTA 37°C 下作用五分鐘，收集細胞液，當細胞都脫落成圓形時再加入大約 5mL medium 的量到 flask 中沖一沖，再吸到 15 c.c. 離心管中，再放入離心機中用 1000rpm 旋轉五分鐘(須注意細胞是否全部沉澱。若離心不夠，可以再離心一次)。

2. 取出 15 c.c. 離心管，稀釋倍數並利用 trypan blue 及血球計數盤計算細胞數目。

3. 放置 SEM 膠片 (13mm glass coverslips) 於欲觀察的 24-well culture

plate上，依照 $5 \times 10^5$ /well 濃度將所收集的細胞液分至24-well culture plate，加入NIH-3T3細胞培養液1mL(含10% calf serum)，先置於37°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養二十四小時。

- 4.因取樣時間為24Hr、48hr及72hr，故二十四小時後，除留下一組控制組之外，將其餘well中的培養液全部吸除掉，分別置換上含有三種氧化鋅奈米粒子的半致死劑量濃度的細胞培養液1mL，即20nm的氧化鋅奈米粒子濃度為9ppm，150nm的為12ppm，700nm的為16ppm
- 5.分別依取樣時間於24Hr、48hr及72hr後，做SEM膠片取樣做細胞固

定添加Cytochalasin D後對細胞的影響

Cytochalasin D的配製



將1mg的Cytochalasin D白色粉末溶在500μL DMSO溶液中，形成濃度為 $2 \times 10^{-3}$ g/mL的原液，用錫箔紙包起來避光並保存在-20°C

MTT assay 測試

1. 先以trypsin-EDTA作用收集細胞液，待離心後吸乾上清液，將沉澱的細胞與細胞培養液混合均勻，以trypan blue及血球計數盤計算細胞數目
2. 在96-well culture plate中加入含 $1 \times 10^6$ /well細胞數的細胞培養液200μL培養二十四小時
3. 抽取Cytochalasin D原液用DMEM溶液稀釋成 $3 \times 10^{-8}$ g/mL的細胞培

養液，及分別含有 $5 \times 10^{-7}$  g/mL之Cytochalasin D和三種奈米粒子的半致死劑量濃度的三管細胞培養液以待備用(以上四管皆需避光)

(Anke Di *et. al.* 2003)

- 4.二十四小時後，除了控制組的細胞培養液之外，將所有實驗組well的細胞培養液抽乾，皆添加200 $\mu$ L的Cytochalasin D細胞培養液
- 5.三十分鐘後，除了控制組的細胞培養液之外，將所有實驗組well的細胞培養液抽乾，分別添加含有 $5 \times 10^{-8}$  g/mL之Cytochalasin D和三種耐米粒子的半致死劑量濃度的三管細胞培養液200 $\mu$ L，控制組及實驗組皆為十二重覆，取樣時間皆為12hr、24hr、48hr及72hr
6. 到達取樣時間時，於每 well 加入 20 $\mu$ L 的 MTT，再放入培養箱等待四小時，將 well 中所有液體抽乾，於每 well 中再加入 200 $\mu$ L DMSO，與 well 中的藍紫色沉澱物用 pipette 吸排將其混合均勻呈透明藍紫色混合液
7. 再將 well 中藍紫色 DMSO 混合液抽到另一盤 96-well culture plate 中，將含這些混合液的 96-well culture plate 在 570nm 下以 ELISA Reader 讀取 OD 吸光值

#### Cytochalasin D對正常細胞的SEM圖觀察

1. 先以trypsin-EDTA作用收集細胞液，待離心後吸乾上清液，將沉澱的細胞與細胞培養液混合均勻，以trypan blue及血球計數盤計算細胞數目

2. 放置SEM膠片(13mm glass coverslips)於欲觀察的24-well culture plate上，依照 $5 \times 10^5$ /well 細胞數濃度將所收集的細胞液分至24-well culture plate，加入NIH-3T3細胞培養液1mL(含10% calf serum)，先置於 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培養箱中培養二十四小時。

3. 抽取Cytochalasin D原液用DMEM溶液稀釋成 $5 \times 10^{-8}$ g/mL的細胞培養液以待備用(需避光)

4. 二十四小時後，除控制組之外，將其餘well中的培養液全部吸除掉，全置換上含有 $5 \times 10^{-8}$ g/mL的Cytochalasin D之細胞培養液1mL

5. 分別依取樣時間於24Hr、48hr及72hr後，做SEM膠片取樣做細胞固定



Cytochalasin D 對攝入氧化鋅奈米粒子之 SEM 膠片觀察

1. 先以trypsin-EDTA作用收集細胞液，待離心後吸乾上清液，將沉澱的細胞與細胞培養液混合均勻，以trypan blue及血球計數盤計算細胞數目

2. 放置SEM膠片(13mm glass coverslips)於欲觀察的24-well culture plate上，依照 $5 \times 10^5$ /well 細胞數濃度將所收集的細胞液分至24-well culture plate，加入NIH-3T3細胞培養液1mL(含10% calf serum)，先置於 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培養箱中培養二十四小時。

3. 抽取Cytochalasin D原液用DMEM溶液稀釋成 $5 \times 10^{-8}$ g/mL的細胞培養液，及分別含有 $5 \times 10^{-8}$ g/mL之Cytochalasin D和三種耐米粒子的半致死劑量濃度的三管細胞培養液以待備用(以上四管皆需避光)
- 4.二十四小時後，除了控制組的細胞培養液之外，將所有實驗組well的細胞培養液抽乾，皆添加1mL的Cytochalasin D細胞培養液
- 4.三十分鐘後，除控制組之外，將其餘well中的培養液全部吸除掉，分別置換成含有 $5 \times 10^{-8}$ g/mL之Cytochalasin D和三種耐米粒子的半致死劑量濃度的三管細胞培養液1mL
- 5.分別依取樣時間於24Hr、48hr及72hr後，做SEM膠片取樣做細胞固定



## 第四章 理論

### 4.1 細胞記數

目的：利用血球計數盤，測量培養中的活細胞數目。

原理：

Trypan Blue 是一種常被使用於細胞染色的染料。Trypan Blue 無法穿透活細胞的細胞膜，但是當細胞受傷或死亡，細胞膜破損時，Trypan Blue 則可以滲入細胞膜進入細胞內，使細胞染成藍色。利用此一特點，配合血球計數盤的使用，則可以在顯微鏡底下，分辨出細胞樣本中的活細胞與死細胞，以方便細胞計數。

### 4.2 MTT assay 原理

四唑鹽比色試驗(MTT)是一種檢測細胞存活和生長的方法。這種方法靈敏度高、重複性好、無放射性污染等，所以常用於細胞活力的檢測。此法的主要原理是：MTT 為黃色化合物，是一種接受氫離子的染料由於活細胞線粒體中的脫氫酵素(dehydrogenase) 將 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 之

tetrazolium環切斷，藍色沉澱物formazan 形成，顏色由淡黃色轉為難溶的深藍紫色結晶物，並沈積在細胞中，而死細胞粒腺體不含脫氫酵素，所以MTT 顏色並不會產生變化，仍為淡黃色。

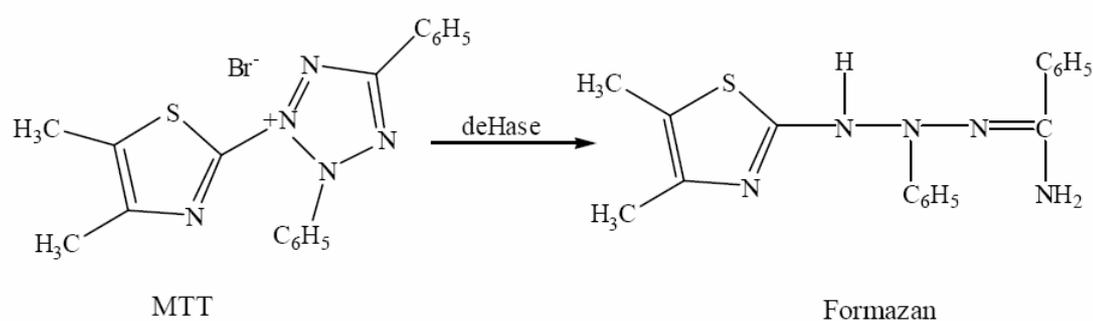


圖4-1 MTT化學結構式

去培養液後二甲基亞(DMSO)能溶解細胞中的紫色結晶物，並用聯免疫檢測，以multiscan reader(ELISA) 讀取波長570 nm 之吸收值，可間接反映活細胞數量。在一定細胞數範圍內，MTT結晶物形成的量與細胞數成正比。此法已廣泛用於一些生物活性因子的活性檢測、抗腫瘤藥物的篩選、細胞毒性試驗和腫瘤放射敏感性的測定等。用此法測細胞活力，為保證結果的準確性，最好在試驗前測定每種細胞的貼壁率、倍增時間以及不同接種細胞數條件下的生長曲線，再確定每孔細胞接種數和培養時間，以保證培養終止時不至過滿。另外，試驗時應設空白對照，比色時，以空白孔調零。MTT測定所得數據在扣除背景值後，結果可繪製成圖表，下方圖X軸為樣品的稀釋倍數由低到高排列，即樣品濃度由高到低。Y軸則為細胞生理活性效應，一般為吸光

值。圖例為典型的細胞增生或抗病毒化合物劑量反應曲線，呈下降型曲線。相反地，如果是測定抑制細胞增生、或是細胞殺傷效應，則反應曲線為上昇型。從此一量效依賴曲線研究人員可定出50%有效劑量（ED<sub>50</sub>）

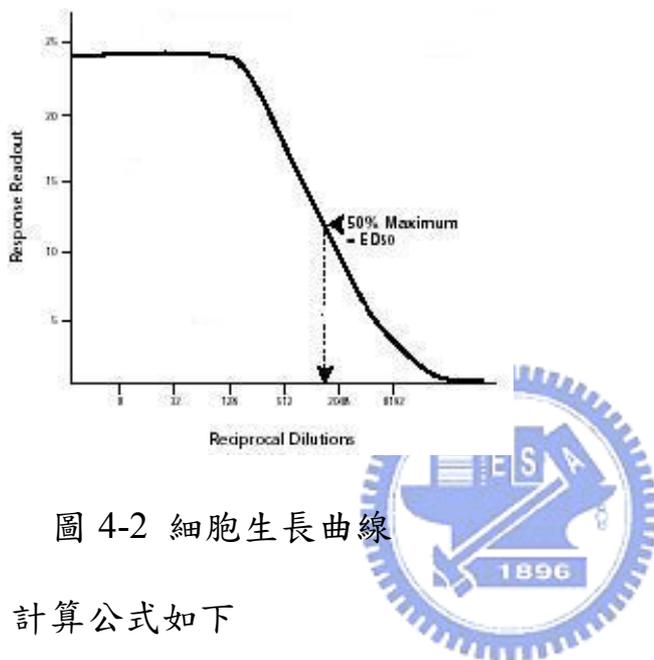


圖 4-2 細胞生長曲線

計算公式如下

$$\text{細胞存活率} = \frac{(\text{實驗組A值} - \text{空白組A值})}{(\text{對照組A值} - \text{空白組A值})} \times 100\%$$

### 4.3 透析原理

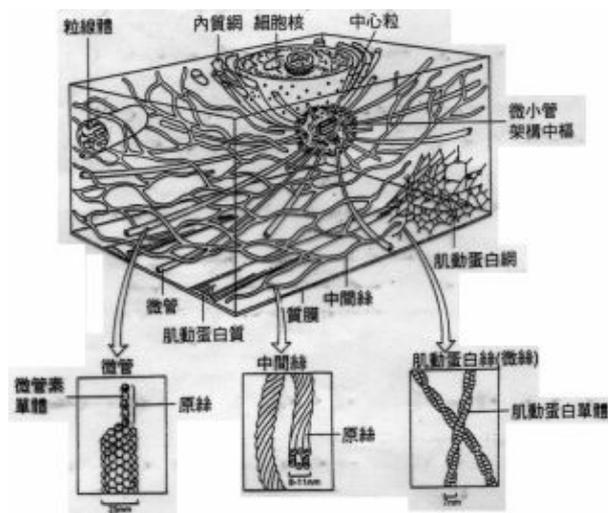
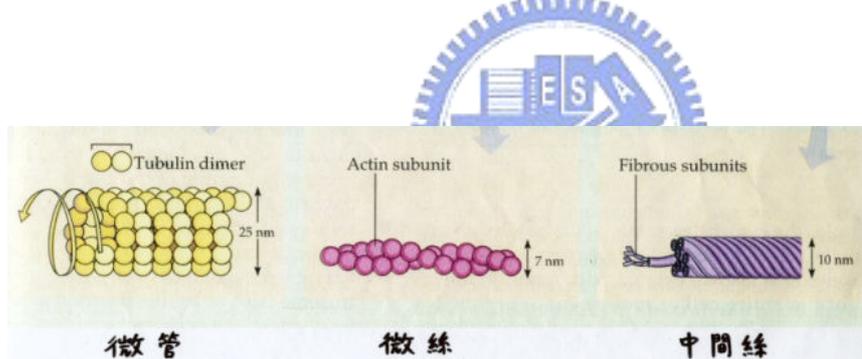
透析是指溶質從半透膜的一側透過膜至另一側的過程，任何天然的(如腹膜)或人造的半透膜，只要該膜含有使一定大小的溶質透過的孔徑，那這些溶質就可以透過彌散和對流從膜的一側移動到膜的另一側。例如腹膜透析是指人體內的“毒物”包括代謝產物、藥物、外源性毒物，只要其原子量或分子量大小適當，就能夠透過透析清除出體

外。其基本原理是彌散和對流。彌散就是半透膜兩側液體各自所含溶質濃度梯度及它所形成的不同滲透濃度，溶質從濃度高的一側透過半透膜向濃度低的一側移動。對流也稱超濾，是指溶質和溶劑因透析膜兩側的靜水壓和滲透壓梯度的不同而跨膜轉運的過程。

#### 4.4 Cytochalasin D 原理

細胞中含有細胞骨架，這是由三種纖維構成，其粗細不同。

最粗的為微管（Microtubule）直徑介於兩者之間的是中間絲（intermediate filament）最細的為微絲（Microfilament）



### 圖 4-3 細胞骨架

細胞骨架的功能如下：

1. 維持細胞形狀：如紅血球和神經細胞的特殊形狀。
2. 改變細胞形狀：由於組成細胞骨架的蛋白質分子可以重新組合，因此可以改變細胞形狀。
3. 使細胞具運動能力：組成鞭毛、纖毛，並可延伸至偽足內。
4. 使胞器能在細胞質內移動：胞器會沿細胞骨架所提供的軌道，移動到目的地。



Cytochalasin D 細胞鬆弛素是真菌的一類代謝產物，可抑制 G 肌動蛋白添加到集結部位，從而干擾肌動蛋白絲的聚合，常用的有細胞鬆弛素 B 和細胞鬆弛素 D，而我們這個實驗選用的是 Cytochalasin D 它的效率是 Cytochalasin B 的 10 倍，而我們選用 Cytochalasin D 的原因是因為它可以干擾肌動蛋白絲的聚合進而改變細胞的形狀，我們猜測是否藉由這個機制可以使得原本奈米粒子對細胞外觀的改變可已有所恢復，甚至是使奈米粒子對細胞的毒性有所改善。

(HASSAN JIJAKLI *et. al.* 2002 )

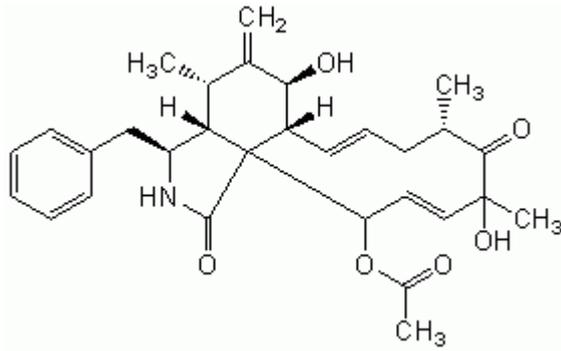


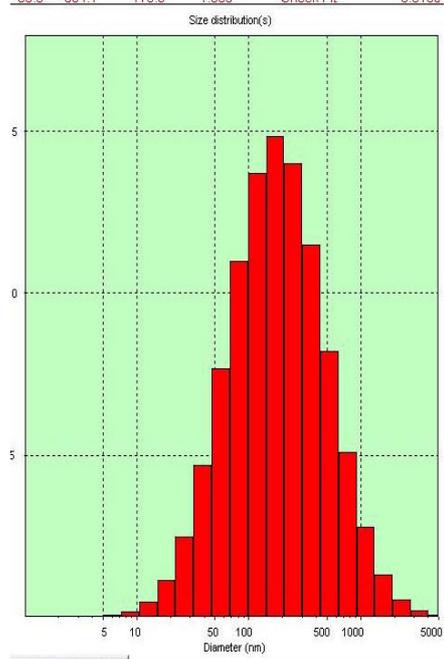
圖 4-4 Cytochalasin D 化學結構式

## 第五章 實驗結果

### 5.1 粒徑分析

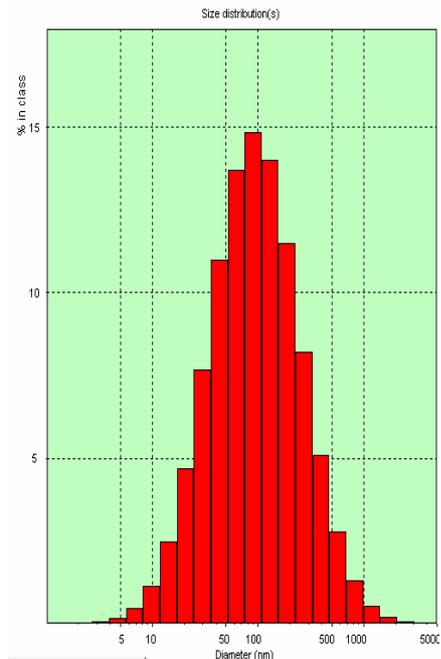
奈米粒子在培養液內間彼此會互相聚集因此粒徑會遠大於理論值，又因為合成的奈米粒子表面會有許多不必要化學成分，因此藉由透析可以使得附著於奈米粒子表面不必要的成分藉由透析而析出因此透析前後奈米粒子尺寸會有不同，由圖可知透析前 20nm 粒徑約 180nm 左右而透析後降為 90nm 左右；透析前 150nm 粒徑約 500nm 左右而透析後降為 190nm 左右；同樣的 700nm 透析前約 2500nm 而透析後約 2000nm

Angle	KCounts	ZAve(nm)	Poly.Index	Quality	Error
90.0	384.1	178.9	1.000	Check Fit	0.0105



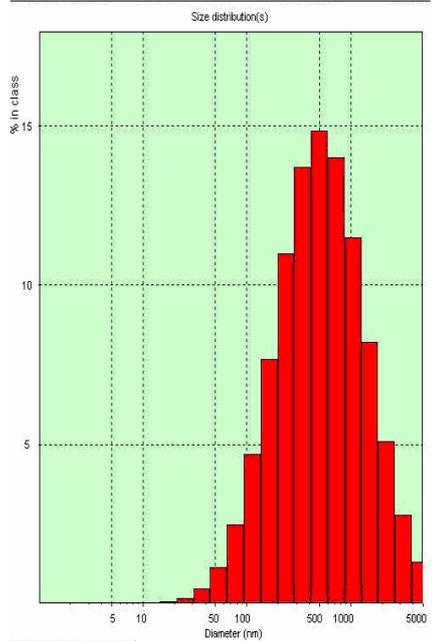
(a) 20nm 透析前

Rec Angle	KCounts	ZAve(nm)	Poly.Index	Quality	Error
2 90.0	451.4	93.3	0.986	Check Fit	0.0160



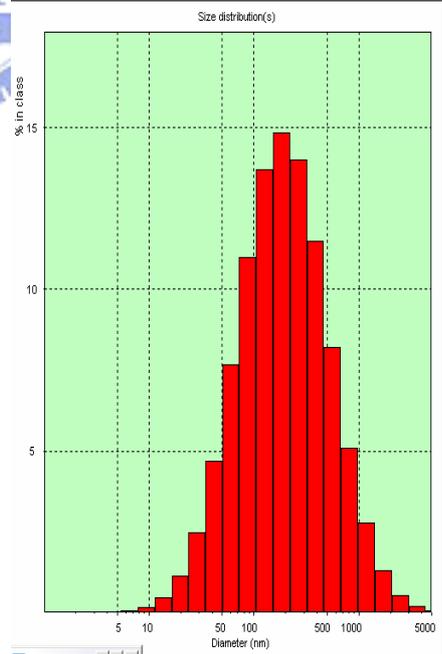
(b) 20nm 透析後

Rec Angle	KCounts	ZAve(nm)	Poly.Index	Quality	Error
3 90.0	290.2	518.7	1.000	Check Fit	0.00546



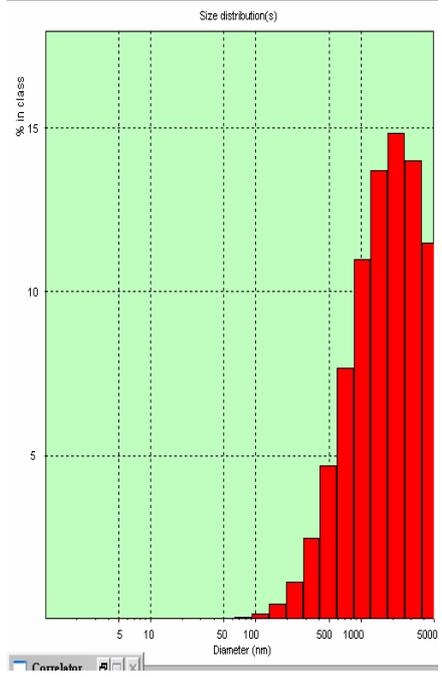
(c) 150nm 透析前

Rec Angle	KCounts	ZAve(nm)	Poly.Index	Quality	Error
3 90.0	395.9	191.4	1.000	Check Baseline	0.00884



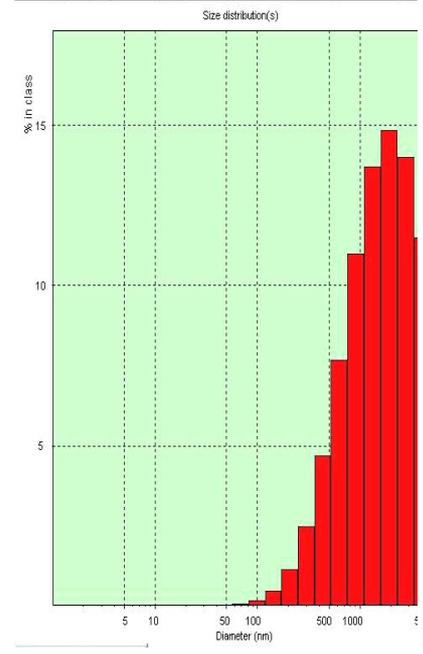
(d) 150nm 透析後

Rec.Angle	KCounts	ZAve(nm)	Poly.index	Quality	Error	
4	90.0	428.1	2269.5	1.000	Check Merit	0.0011



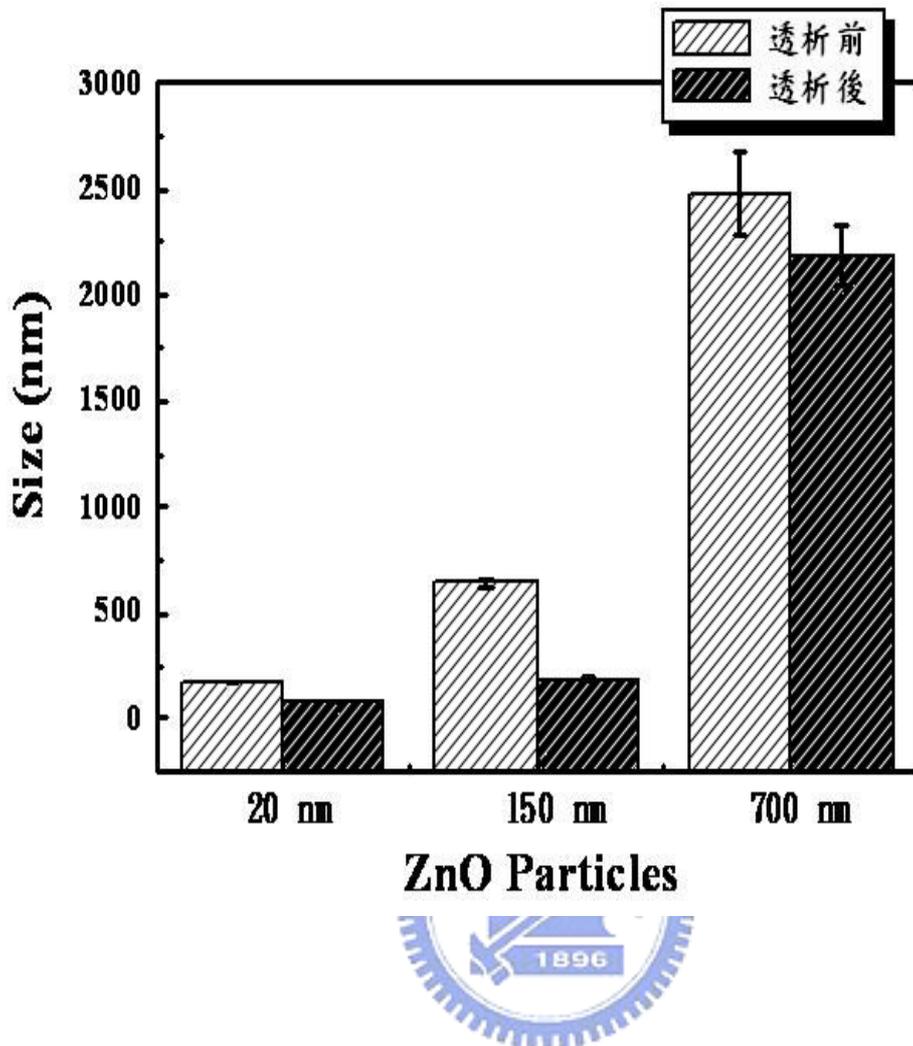
(e) 700nm 透析前

Rec.Angle	KCounts	ZAve(nm)	Poly.index	Quality	Error	
7	90.0	811.7	2009.4	1.000	Check Merit	0.0011



(f) 700nm 透析後





(g) 透析前與透析後粒徑比較

圖 5-1 (a) 20nm 透析前 (b) 20nm 透析後 (c) 150nm 透析前

(d) 150nm 透析後 (e) 700nm 透析前 (f) 700nm 透析後

(g) 透析前與透析後比較

## 5.2 NIH-3T3 細胞生長週期

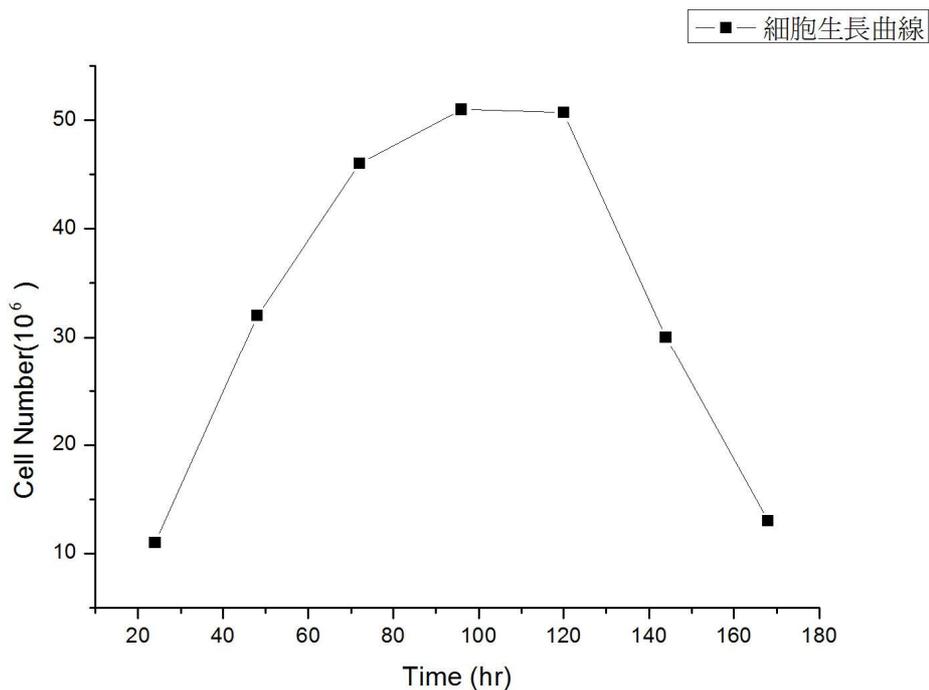


圖 5-2 細胞存活曲線

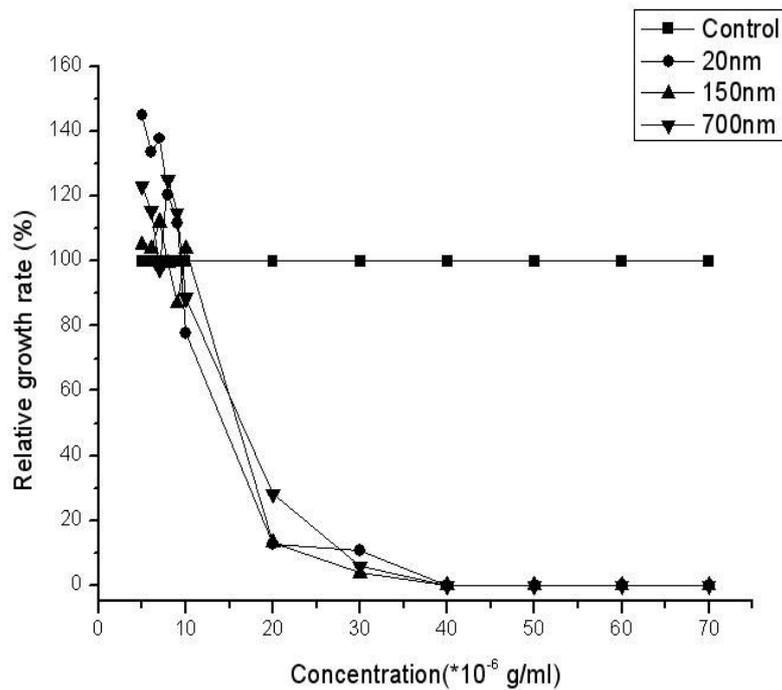
由細胞生長曲線我們可以發現正常細胞於九十六小時時達生長頂峰，當九十六小時以後慢慢的細胞逐漸凋亡，這是由於細胞培養液內的養份已經逐漸消耗完畢接著培養液內細胞所產生的有毒代謝物濃度亦逐漸提高使得細胞凋亡速度加快，所以一般細胞培養通常在第三天也就是 72 小時左右就必須重新分盤加入新的培養液，使得細胞有足夠生長空間與充足的養分來成長。

### 5.3 MTT assay 細胞活性測試

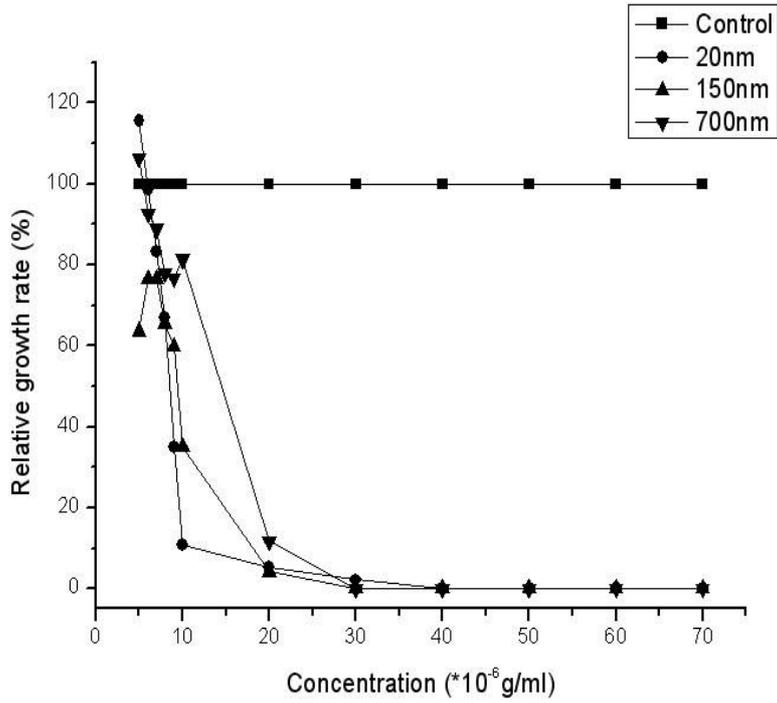
#### 三種氧化鋅奈米粒子在不同濃度下之細胞活性測試

在本實驗中，我們分別對三種尺寸的奈米粒子做不同時間及不同濃度下對細胞活性的影響，由下圖的結果可知，低濃度劑量( $\sim < 9\text{ppm}$ )

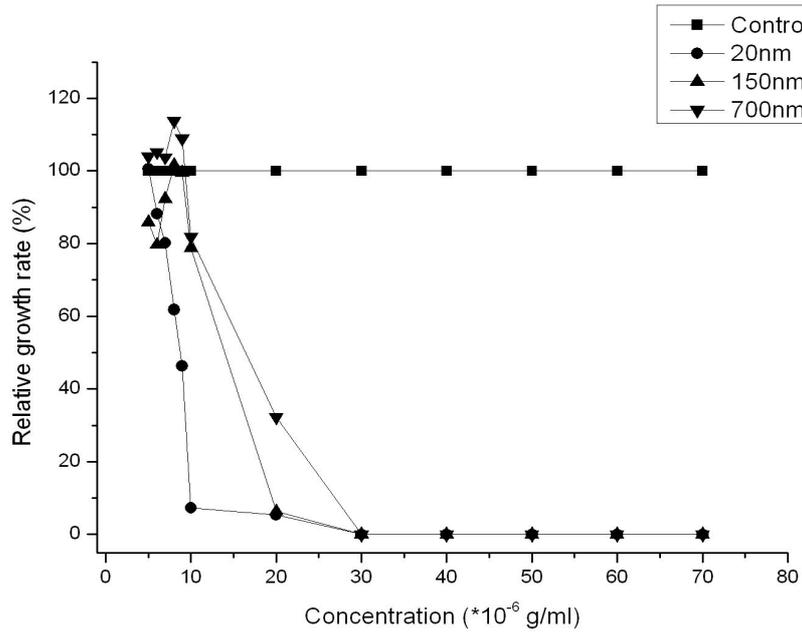
的奈米粒子對細胞活性沒有產生任何毒性而使細胞凋亡，而半致死劑量濃度(LC50)在四個實驗時間點皆介於9~18ppm之間，超過半致死劑量濃度(20ppm)則幾乎全部因奈米粒子的毒性而凋亡。我們也發現隨著奈米粒子作用時間的增加，半致死劑量有往左位移的趨勢，即細胞數量隨著粒子作用時間的增加逐漸凋亡減少，因此僅需較小的粒子濃度即可達到半致死劑量。此外我們也發現奈米粒子的尺寸越小，對細胞的毒性越大。



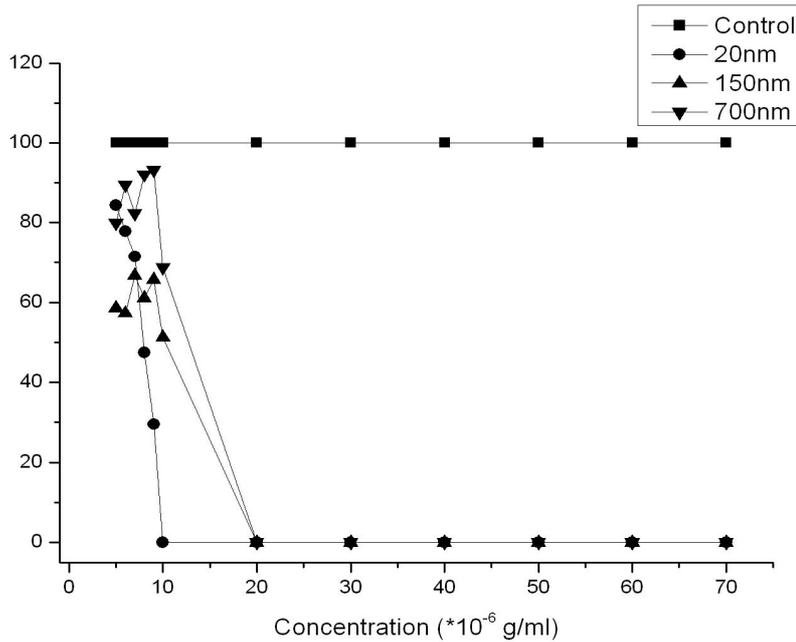
(a) 12hr



(b) 24hr



(c) 48hr



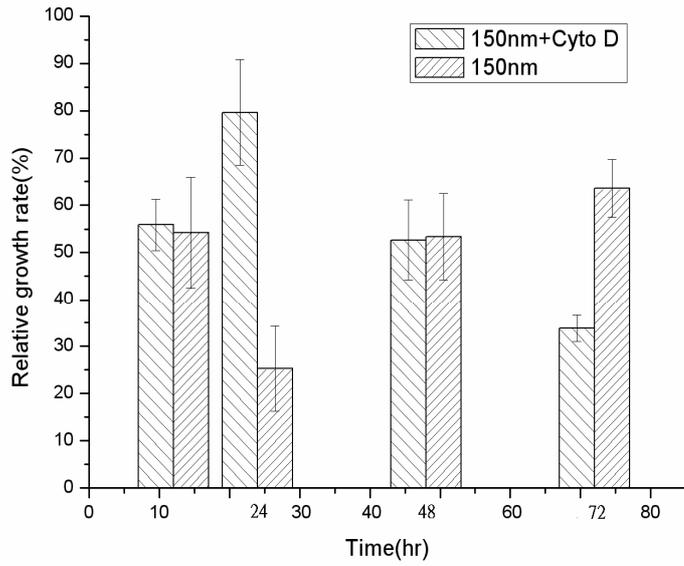
(d) 72hr

圖 5-3 (a) 12hr MTT 細胞存活曲線 (b) 24hr MTT 細胞存活曲線 (c) 48hr MTT 細胞存活曲線 (d) 72hr MTT 細胞存活曲線

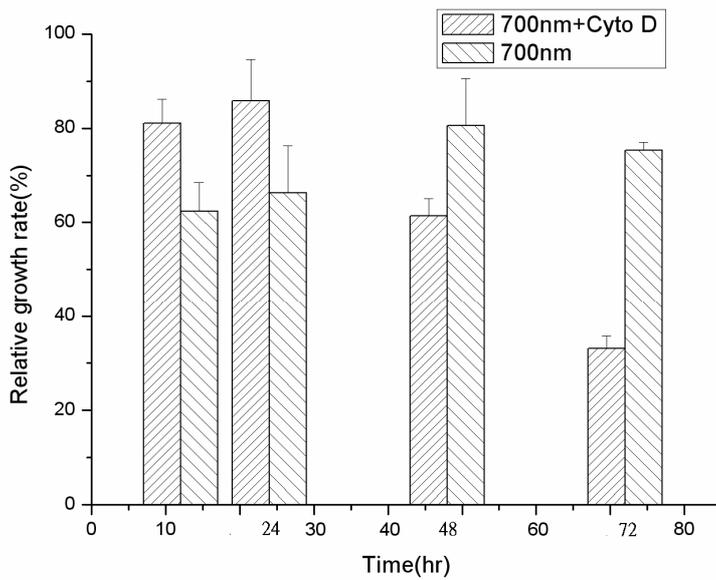
#### 5.4 Cytochalasin D 對於氧化鋅奈米粒子毒性之影響

- Cytochalasin D is a cell-permeable fungal toxin which binds to the barbed end of actin filaments inhibiting both the association and dissociation of subunits.
- Molecular Formula: C<sub>30</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>6</sub>





(b) 150nm



(c) 700nm

圖 5-5 Cytochalasin D MTT 測試圖 (a) 20nm (b) 150nm

(c) 700nm

由 Cytochalasin D 的 MTT 測試我們可以發現在 24 小時內，  
Cytochalasin D 對於三種尺寸的奈米粒子對細胞所造成的毒性皆有

一定的減緩作用，由圖 5-5 (a)、(b)、(c) 可以發現於 24 小時內有加入 Cytochalasin D 的細胞存活率很明顯的高於只有 ZnO 奈米粒子，當 48 小時以後可以發現加入 Cytochalasin D 的細胞存活率反而低於單純只加奈米粒子的存活率，對於這種情形我們推測有可能是於 24 小時內 Cytochalasin D 已經被細胞吸收完了所以療效減低並且由於 Cytochalasin D 本身亦有一定的細胞毒性，在此時因為療效已消失且 Cytochalasin D 的毒性亦顯現出來，再加上奈米粒子的毒性雙重作用下使的細胞存活率比只有奈米粒子的還要低。

## 5.6 Cytochalasin D 的 SEM

- ZnO : 20nm (24hr)

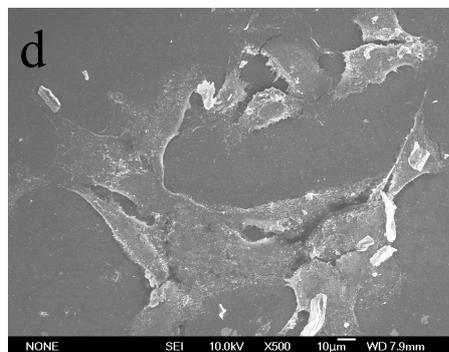
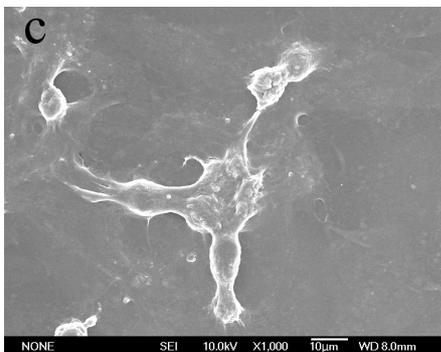
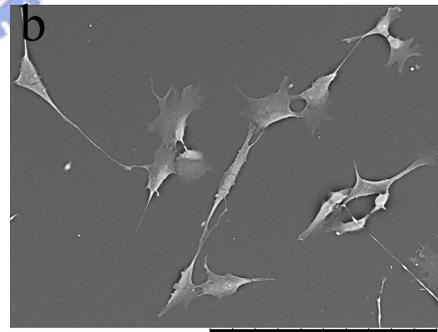
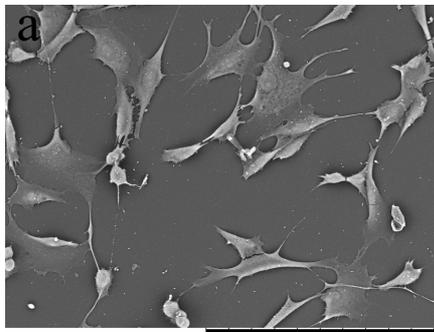


圖 5-6.1 (a) 24hr 時正常細胞 (b) 加 20nm ZnO 的細胞於 24hr 時  
 (c) 加 Cytochalasin D 於 20nmZnO 的細胞於 24hr (d) 24h 時單獨  
 只加 Cytochalasin D 的細胞

- ZnO:20nm (48hr)

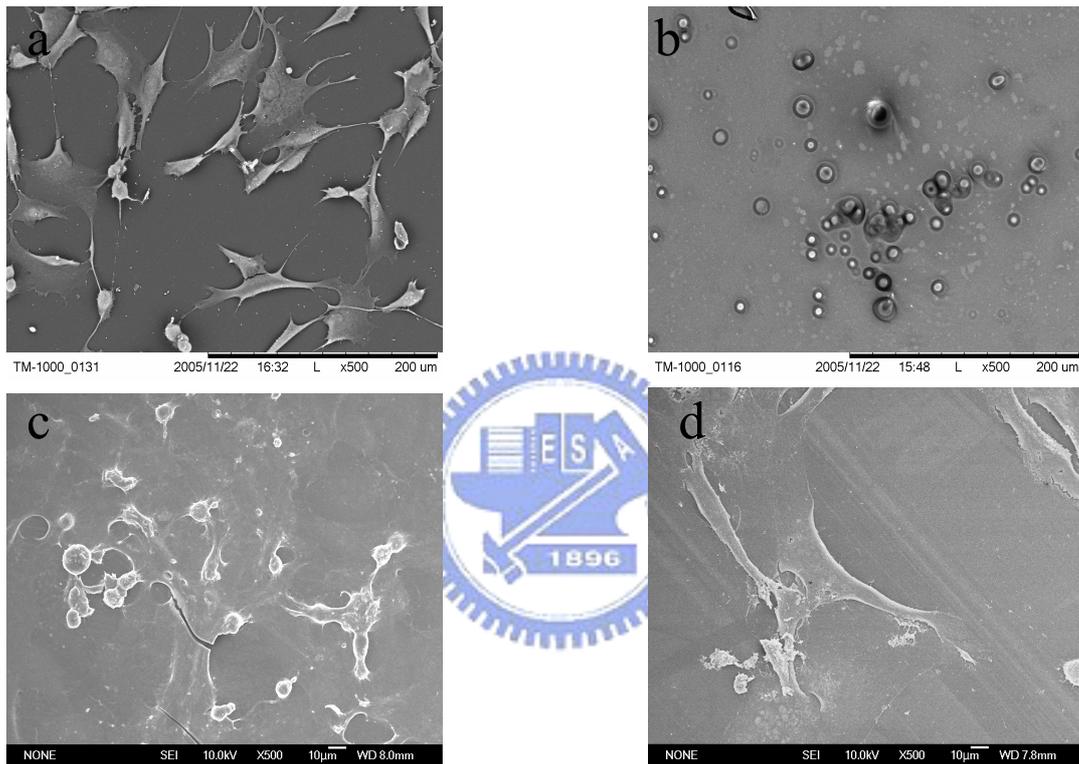


圖 5-6.2 (a) 48hr 時正常細胞 (b) 加 20nm ZnO 的細胞於 48hr 時  
 (c) 加 Cytochalasin D 於 20nmZnO 的細胞於 48hr (d) 48hr 時單獨  
 只加 Cytochalasin D 的細胞

- ZnO : 20nm (72hr)

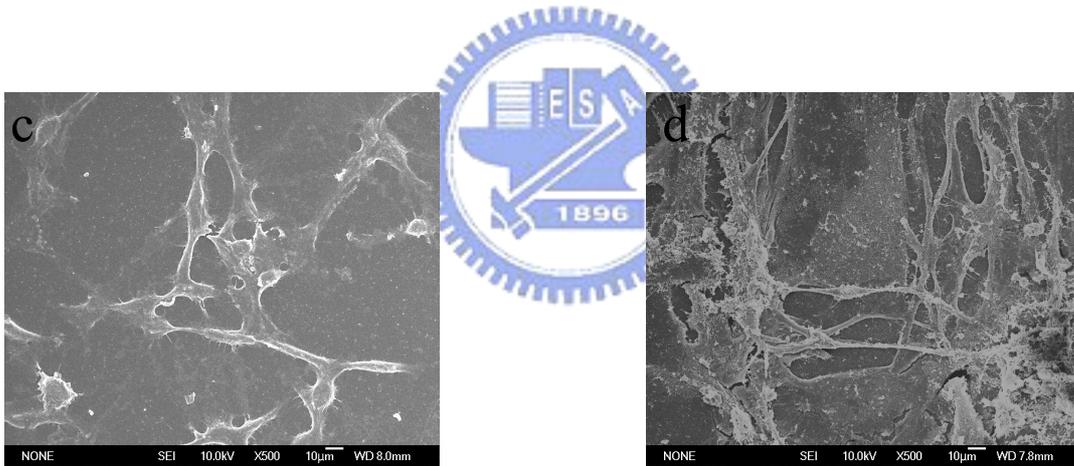
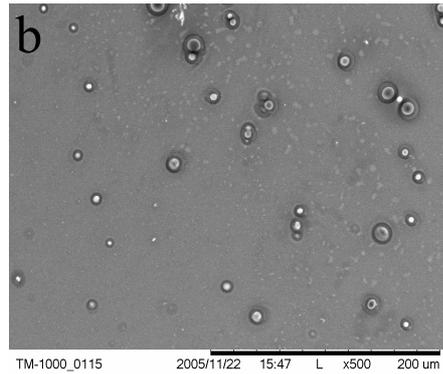
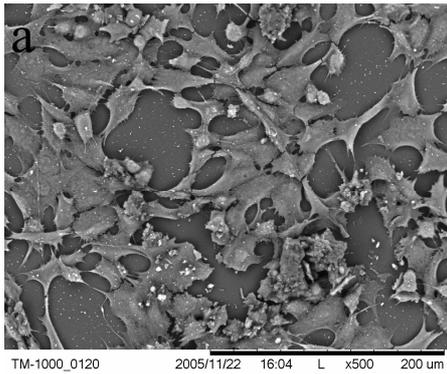


圖 5-6.3 (a) 72hr 時正常細胞 (b) 加 20nm ZnO 的細胞於 72hr 時  
 (c) 加 Cytochalasin D 於 20nmZnO 的細胞於 72hr (d) 72hr 時單獨  
 只加 Cytochalasin D 的細胞

- ZnO : 150nm (24hr)

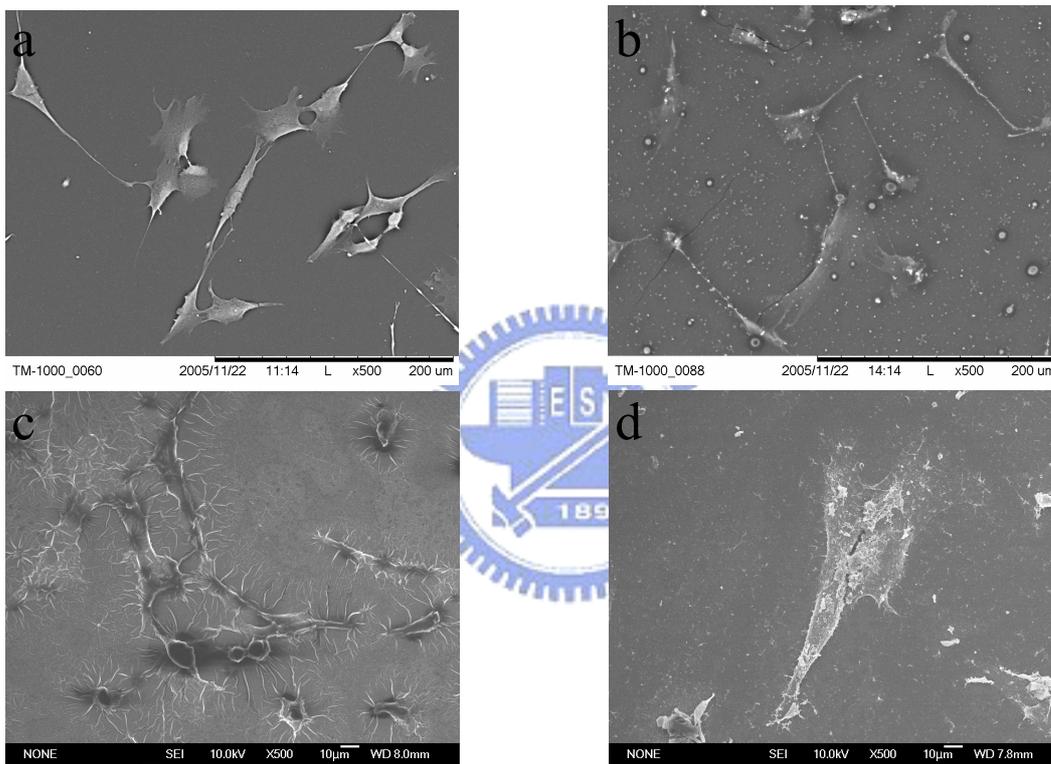


圖 5-7.1 (a) 24hr 時正常細胞 (b) 加 150nm ZnO 的細胞於 24hr 時  
(c) 加 Cytochalasin D 於 150nmZnO 的細胞於 24hr (d) 24hr 時單  
獨只加 Cytochalasin D 的細胞

- ZnO : 150nm (48hr)

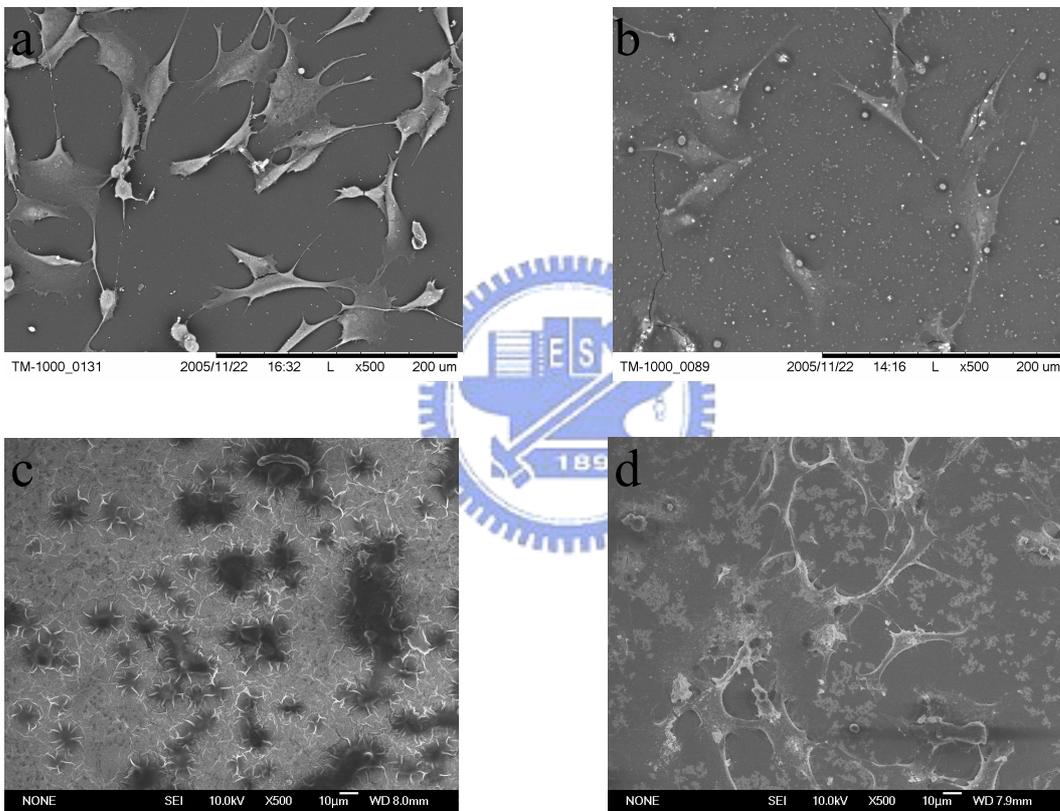


圖 5-7.2 (a) 48hr 時正常細胞 (b) 加 150nm ZnO 的細胞於 48hr 時  
 (c) 加 Cytochalasin D 於 150nmZnO 的細胞於 48hr (d) 48hr 時單  
 獨只加 Cytochalasin D 的細胞

- ZnO : 150nm ( 72hr )

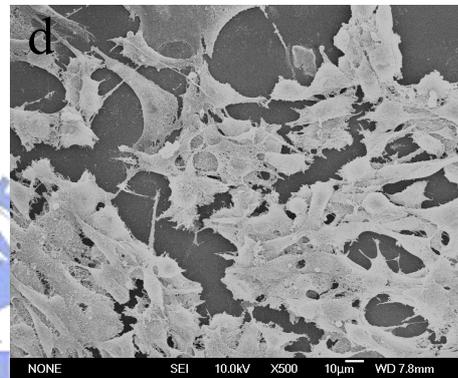
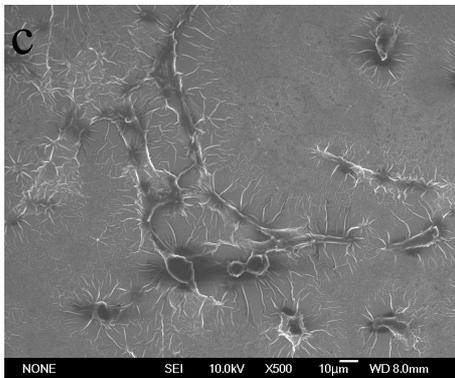
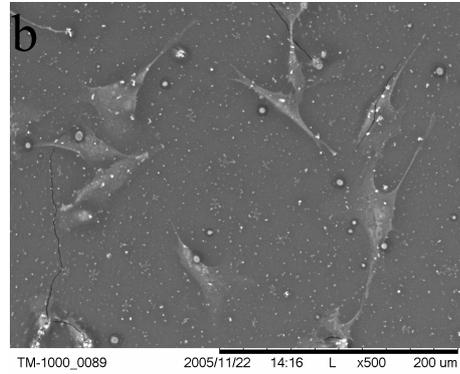
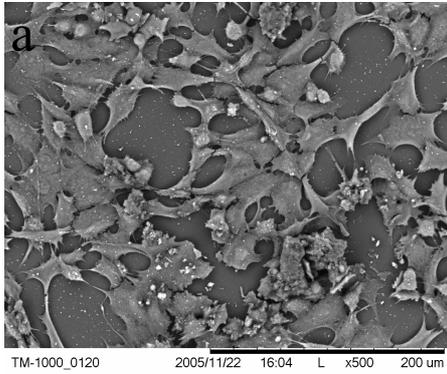


圖 5-7.3 (a) 72hr 時正常細胞 (b) 加 150nm ZnO 的細胞於 72hr 時  
 (c) 加 Cytochalasin D 於 150nmZnO 的細胞於 72hr (d) 72hr 時單  
 獨只加 Cytochalasin D 的細胞

- ZnO : 700nm (24hr)

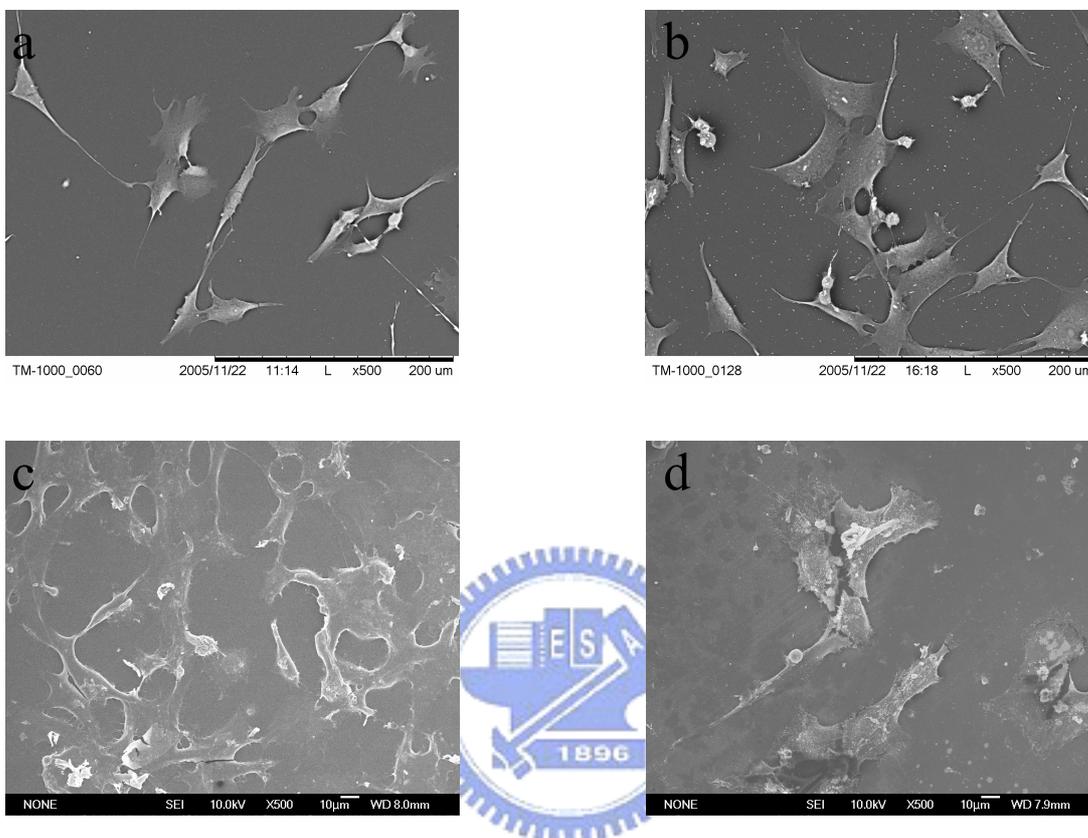


圖 5-8.1 (a) 24hr 時正常細胞 (b) 加 700nm ZnO 的細胞於 24hr 時  
 (c) 加 Cytochalasin D 於 700nmZnO 的細胞於 24hr (d) 24hr 時單  
 獨只加 Cytochalasin D 的細胞

- ZnO : 700nm (48hr)

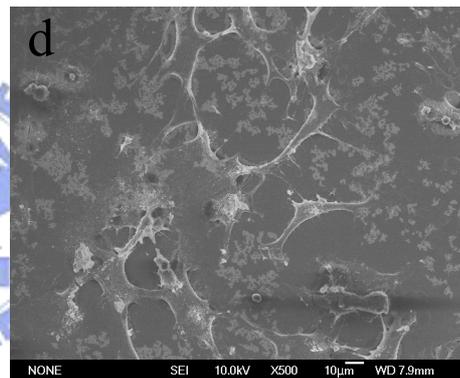
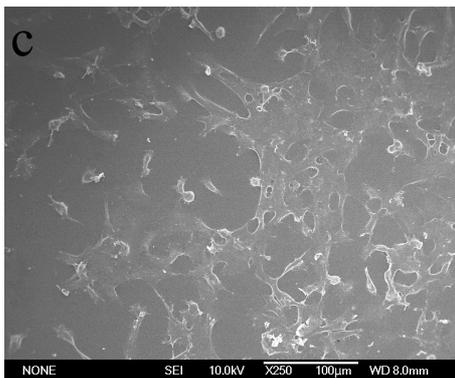
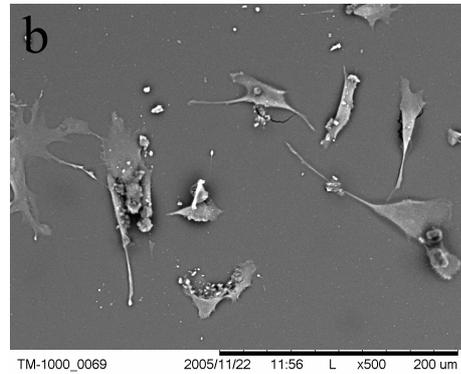
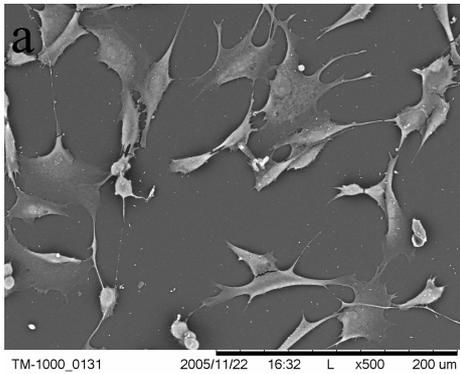


圖 5-8.2 (a) 48hr 時正常細胞 (b) 加 700nm ZnO 的細胞於 48hr 時  
(c) 加 Cytochalasin D 於 700nmZnO 的細胞於 48hr (d) 48hr 時單  
獨只加 Cytochalasin D 的細胞

- ZnO : 700nm ( 72hr )

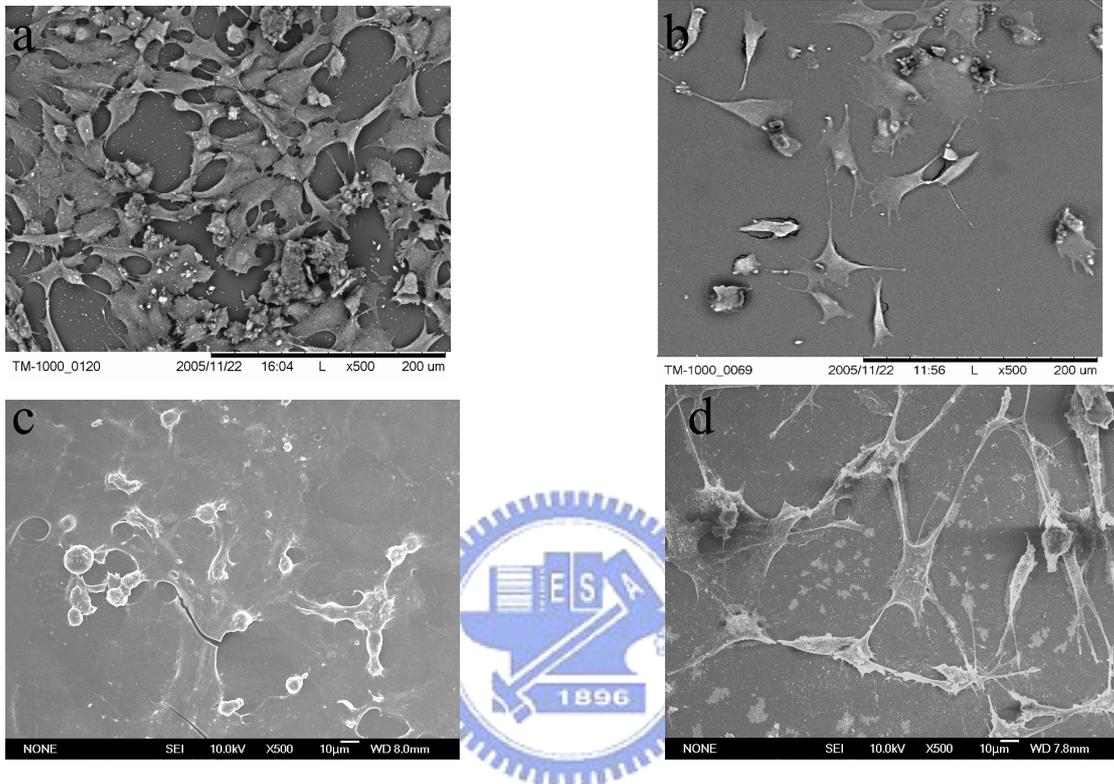


圖 5-8.3 (a) 72hr 時正常細胞 (b) 加 700nm ZnO 的細胞於 72hr 時  
 (c) 加 Cytochalasin D 於 700nmZnO 的細胞於 72hr (d) 72hr 時單  
 獨只加 Cytochalasin D 的細胞

藉由以上的細胞的 SEM 圖，我們可以明顯發現無論是 20nm、150nm 或是 700nm 的 ZnO 奈米粒子於均會使得細胞的 morphology 產生改變，由於四十八小時的 SEM 圖可以很明顯的看出細胞培養液中加入奈米粒子時，細胞會產生圓形的類似 Endocytosis 或是 Exocytosis 的現象

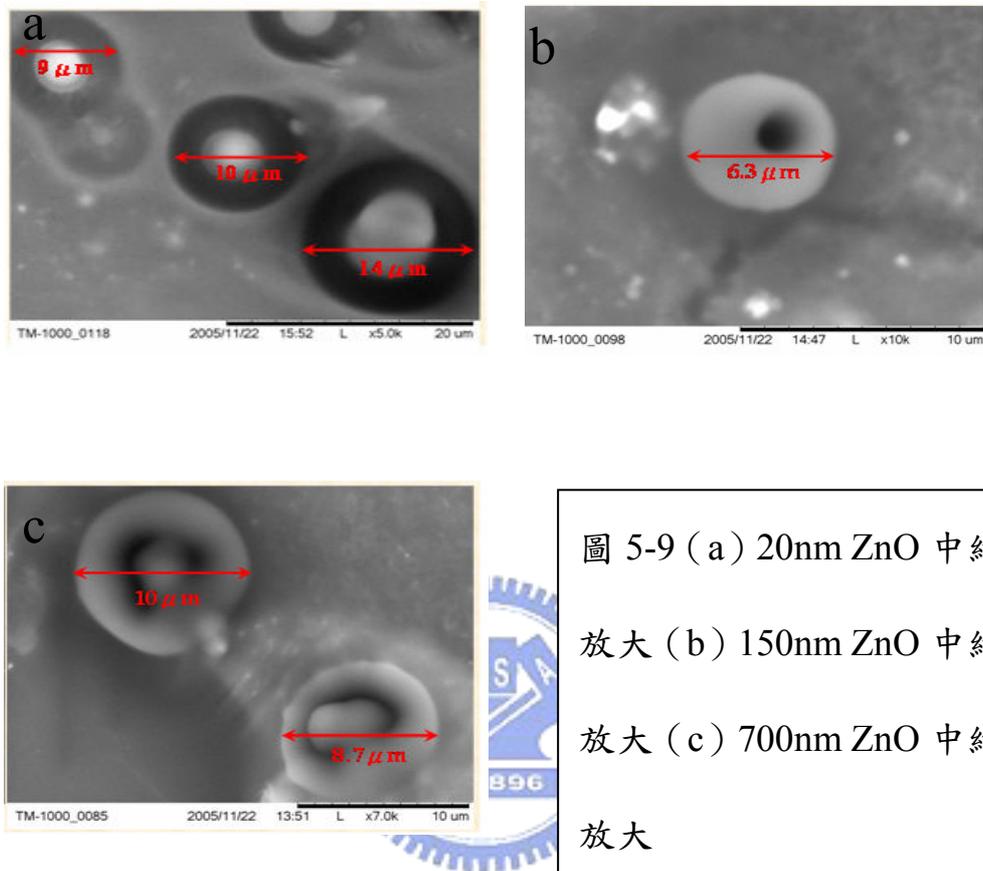


圖 5-9 (a) 20nm ZnO 中細胞局部放大 (b) 150nm ZnO 中細胞局部放大 (c) 700nm ZnO 中細胞局部放大

這些圓形的類似腫瘤的外型平均直徑大約數  $\mu\text{m}$ ，這個大小遠大於我們所使用的奈米粒子直徑，因此我們推論這個東西不是奈米粒子，而有可能是奈米粒子對於細胞造成的毒性而使 morphology 產生改變，亦有可能是細胞的 Endocytosis 或是 Exocytosis，但是因我們無法確認，所以這一部份是將來必須要加以確認的。

而由圖 6-4、6-5、6-6 均可發現當含奈米粒子的細胞培養液再加入 Cytochalasin D 時可以發現原先細胞表面的圓形 morphology 消失了

有些細胞甚至恢復了較接近原先正常的 morphology，由此我們可知 Cytochalasin D 對於奈米粒子毒性有減低的效果，這個現象的原理是以後所必須探討的，而若培養液中只有 Cytochalasin D 而無奈米粒子時，也可以發現細胞的 morphology 也是有相當程度的改變，這亦可證實我們之所說的 Cytochalasin D 也是有毒性的。



## 第六章 結論與未來展望

由奈米粒子的 MTT assay 可以推論在細胞培養液中加入 ZnO 奈米粒子時若奈米粒子越小，對於細胞的毒性就越大這有可能是與奈米粒子的表面能以及細胞所能吞吐的粒子大小有關；由 SEM 圖知 ZnO 奈米粒子會使細胞 morphology 產生特殊變化這種變化是我們所首度發現但是他到底是如何生成其生長機制是將來所必須再加以探討的，當培養液中再加入 Cytochalasin D 時，細胞的 morphology 可以有相當程度的恢復，而 Cytochalasin D 在二十四小時內對於粒子的毒性亦有減緩的作用使得細胞存活率提高。

目前這些對於 ZnO 奈米粒子的測試都只是初步開始，其他尚有許多我們目前無法解釋的機制，這些必須留待將來學弟再繼續去探討研究，除了 ZnO 奈米粒子外其他常見的奈米粒子例如氧化鋁、二氧化鈦…等等，他們的毒性都還未測試故無法確知是否和氧化鋅奈米粒子一般具有毒性，因此在這奈米科技當道的世代這些不確定因素都是有待我們去發覺與解決。

## 第七章 參考文獻

1. Thomas J Webster ,Michael C Waid “Nano-biotechnology : carbon nanofibres as improved neural and orthopaedic implants” ,Nanotechnology,15,pp. 48-54,2004.
2. Christie M Sayes, Joun D. Fortner, Wenh Guo, Delina Lyon, Adina M. Boyd, Kevin D. Ausman, Yizhi J, Tao Balaji Sitharaman, Lon J. Wilson, Joseph B. Hughes, Jennifer L. West, and Vicki L. Colvin,“The differential Cytotoxicity of Water-soluble Fullerenes ” ,Nano Letters, 4, pp. 1881-1887, 2004.
3. Nancy A. Monteiro-Riviere, Robert J. Nemanich, Alfred O. Inman , Yunyu Y. Wang , Jim E. Riviere ,“Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes” , Toxicology Letters, 155,pp. 377-384 , March 2005.
4. ETC Group,“No Small Matter II: The Case for a Global Moratorium:Size Matters!” , Occasional Paper Series, 7, pp. 1-14, April 2003.
5. Eva Oberdörster,“Manufactured Nanomaterials (Fullerenes, C60) Induce Oxidative Stressin the Brain of Juvenile Largemouth Bass” , Environmental Health Perspectives, 112 , pp. 1058-1062 , July 2004.
6. Gunter Oberdorster, “Effects and fate of inhaled ultrafine particles” , Nanotechnology and the Environment session, 225th ACS National Meeting, 22, pp. 23-27, March 2003.
7. Chein H. and Chen D. , “Nanoparticles: Health Risk and Control Technology” , International Symposium on “Nanoparticles: Technology and Sustainable Development ” , a Special Symposium of the International Aerosol Conference, 2002.
8. Kim, C.S. and Jaques, P.A., “Respiratory dose of inhaled ultrafine particles in healthy adults” , Phil. Trans. Royal. Soc. London A., 358 , pp. 2693-2705, 2000.

9. Ajay Kumar Gupta, Catherine Berry, Mona Gupta, and Adam Curtis, “Receptor-Mediated Targeting of Magnetic Nanoparticles Using Insulin as a Surface Ligand to Prevent Endocytosis” , NANOBIOSCIENCE, 2, pp. 255-261, DECEMBER 2003.
  
10. Anke Di, Deborah J. Nelson, Vytautas Bindokas, Mary E. Brown, Frances Libunao, and H. Clive Palfrey, “Dynamin Regulates Focal Exocytosis in Phagocytosing Macrophages” , Molecular Biology of the Cell , 14, pp. 2016-2028, May 2003.
  
11. HASSAN JIJAKLI, HAI-XIA ZHANG, ”Effects of cytochalasin B and D upon insulin release and pancreatic islet cell metabolism” , INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE, 9, pp. 165-172, 2002.

