

# 國立交通大學

## 奈米科技研究所

### 碩士論文

渥曼青黴素降低氧化鋅奈米粒子之細胞毒性與細胞外  
形之影響

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

研究生：邱士紋

學 號：9352514

指導教授：黃國華 副教授

中華民國九十五年六月

渥曼青黴素降低氧化鋅奈米粒子之細胞毒性與細胞外形之  
影響

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

研究生：邱士紋

Student: Shi-Wen Chiu

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

## 中文摘要

奈米材料因其優越的電子、發光及催化特性而備受歡迎，但是奈米級大小的金屬、陶瓷及有機材料似乎也展現出奈米尺度特有的毒性，奈米級的粒子甚至可能污染環境或是危害人類生命。

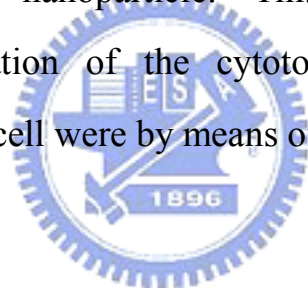
本文藉由觀察不同尺寸氧化鋅(ZnO)奈米微粒對於小鼠胚胎纖維母細胞(NIH-3T3)細胞的死亡率與對細胞 morphology 影響得知氧化鋅微粒的尺寸與毒性關聯性，並希望在藉由 Wortmannin 作用下，能夠降低氧化鋅毒性，更進一步希望能使細胞 morphology 恢復正常。



## 英文摘要

Nano-sized materials are often greeted 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 Wortmannin.



## 誌 謝

一路走來遇到很多貴人相助成就現在的我，雖然沒有什麼了不起的成就，但也要從交大領到碩士學位的證書了。我常有感慨，總覺得時間在來不及意識到之前即溜走，尤其是在交大這兩年快樂的研究生生活，首先先感謝我的指導老師 黃國華 教授，這兩年在實驗想法、簡報技巧及閱讀 paper 上給予很大的幫助及指導，更要感謝師母 洪孟燕 小姐，幾乎是作為我這兩年精神上的導師，不論在待人接物、人情世故及私人生活上，將她豐富的人生閱歷及精闢的人生見地毫不藏私的與我分享，使我懂得人必須具備道德勇氣，更使我了解做人處事的奧秘。當然最重要的不能忘了每個星期師母親手掌廚的愛心下午茶，師母的手藝不是好吃兩個字可以形容，因為佈滿其中的愛，每個星期不厭其煩的從竹南趕來，即每次不同的精挑特選素材，才是更讓人感動的。

這兩年是我求學生涯中最多與同儕接觸的一段時光，包含耀楠學長、凱明學長、孟德學長、文宏學長、佳慧學姊、維揚、老李、阿虎、Mouse、大勳、嘉偉、志杰、永昌、禮閣及柯博實驗室的大家，其中最感謝像小天使一般的耀楠學長，簡直是天上掉下來的禮物，大方提供無塵室及耗材給我們使用，以及在實驗設計與方法給予深具建設性的建議，並總在實驗瓶頸時適時給予援助，就有如水滸傳裡的宋濤一

般，總是扮演著及時雨的角色。而凱明學長總是駕駛著他的名貴坐駕不辭辛勞地載著我們到處玩透透及享受美食，並且總在我失落時分享逆向且正面的想法見解，總讓我耳目一新且精神振奮。孟德學長則是在電腦問題及購買 3C 產品時給予很大的幫助。

再來就是我實驗上的夥伴陳維揚，這兩年拖著微恙的身軀在實驗、生活及精神上給予我最大的幫助，感謝他總是容忍我的任性及壞脾氣，維揚可謂我的星海羅盤，一輩子的朋友。老李、阿虎及 Mouse 在實驗上也給予我們不少的幫助，大勳及柯博實驗室的各位則是在生活及娛樂上充實了我這兩年的研究生活，希望大家畢業後可以繼續保持聯絡。碩一的學弟們，尤其是嘉偉，在實驗上也幫了我們不少，畢業就在不遠的前方，學弟們，加油！

最後一定要感謝的就是我的家人及我的好友溢芸，感謝我的爸媽、大姐及二姐在我的求學生涯一直資助我做為我的後盾，使我可以專心讀書及金錢上不虞匱乏！也要感謝我的超級好朋友溢芸，認識妳真好，讓我的人生超美妙！

其實要感激的人多到族繁不及備載，沒辦法一一娓娓道來，總之我是個受上天眷顧的人，遇到的每個人都是我的貴人，感恩的心永遠存在我心中，凡走過必留下痕跡，大家不是我生命中的過客，在我心裡皆留下一道刻痕，久久不散，最後希望大家都能幸福快樂。

# 目 錄

中文摘要		i
英文摘要		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	4
2.1	奈米毒理學	4
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	7
2.2.3	NP 進入生物體肺部對組織影響的研究	8
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	9
三、	材料與方法	10
3.1	實驗材料	10
3.1.1	癌細胞株	10
3.1.2	耗材	11
3.1.3	三種氧化鋅粒子	11
3.1.4	氧化鋁、氧化鈦	12
3.2	實驗藥品	12
3.3	實驗儀器	12
3.4	實驗方法	13
3.4.1	纖維母細胞 (NIH 3T3) 之培養與繼代	13
3.4.2	細胞計數與存活測試	14
3.4.3	透析(dialysis)	16
3.4.4	MTT assay 實驗流程	17
3.4.5	SEM 試片之固定	18
3.5	NIH-3T3 細胞攝入氧化鋅奈米粒子試驗	19
3.5.1	氧化鋅奈米粒子在不同濃度下之 MTT assay 細胞活性測試	19
3.5.2	三管半致死濃度氧化鋅奈米粒子細胞培養液之配製	20

3.5.3	NIH-3T3 攝入三種氧化鋅奈米粒子之 SEM 膠片觀察	21
3.6	Wortmannin 對攝入氧化鋅奈米粒子細胞之實驗	22
3.6.1	Wortmannin 對正常細胞的 SEM 膠片觀察	22
3.6.2	Wortmannin 對改善攝入氧化鋅奈米粒子細胞之 MTT assay	23
3.6.3	Wortmannin 對攝入氧化鋅奈米粒子之 SEM 膠片觀察	24
四、	理論	26
4.1	細胞記數	26
4.2	MTT assay 原理	26
4.3	透析原理	28
4.4	Wortmannin 原理	29
五、	實驗結果	31
5.1	粒徑分析	31
5.2	NIH-3T3 細胞生長週期	34
5.3	攝入氧化鋅奈米粒子 MTT assay 細胞活性測試	35
5.4	Wortmannin 對攝入氧化鋅奈米粒子細胞毒性之影響	38
5.5	Wortmannin 的 SEM	40
六、	結論與未來展望	48
七、	參考文獻	49





## 圖目錄

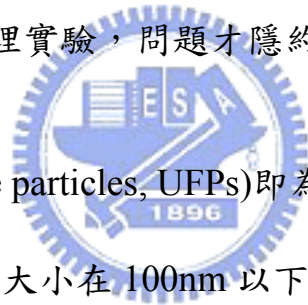
圖 2-1 富勒烯分子	5
圖 3-1 200 倍顯微鏡下的小鼠胚胎纖維母細胞	10
圖 3-2 200 倍 SEM 下的小鼠胚胎纖維母細胞	11
圖 3-3 ZnO 三種尺寸奈米粒子 SEM 圖	11
圖 3-4 Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·TiO <sub>2</sub> 的 SEM	12
圖 4-1 MTT 化學結構式	27
圖 4-2 細胞生長曲線	28
圖 4-3 細胞骨架	29
圖 4-4 Wortmannin 化學結構式	30
圖 5-1 透析圖	31
圖 5-2 細胞生長曲線	34
圖 5-3 MTT 細胞存活曲線	36
圖 5-4 Wortmannin MTT assay	38
圖 5-5.1 24 小時不同條件下之 SEM	40
圖 5-5.2 24 小時不同條件下之 SEM	41
圖 5-6.1 48 小時不同條件下之 SEM	42
圖 5-6.2 48 小時不同條件下之 SEM	43
圖 5-7.1 72 小時不同條件下之 SEM	44
圖 5-7.2 72 小時不同條件下之 SEM	45
圖 5-8 細胞局部放大圖	46

# 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(mesoscopic)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。

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。

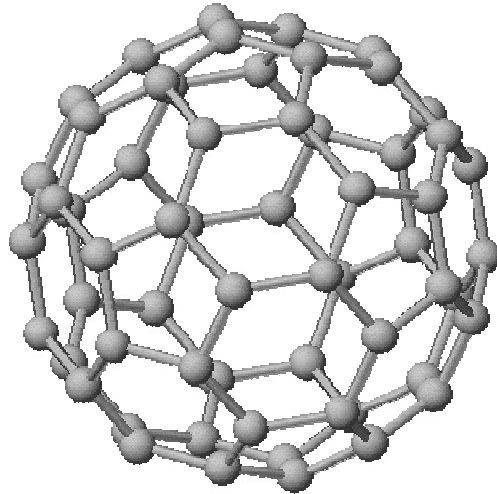


圖 2-1 富勒烯分子

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  $C_{60}(\text{OH})_{24}$ ，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  $C_{3}$ 、 $\text{Na}^{+}_{2-3}[\text{C}_{60}\text{O}_{7-9}(\text{OH})_{12-15}]^{(2-3)-}$ 、 $C_{60}(\text{OH})_{24}$ ，這個數字分別是 10,000ppb、40,000ppb 和 >5,000,000ppb。 (Thomas J Webster et. al.2004)

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化有較為敏感的功能，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-Riviera 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 的多壁奈米碳管 (MWCNT) 中 1, 2, 4, 8, 12, 24 48 小時後，使用 transmission electron microscopy 觀察 HEK，可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-Riviera 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  $\text{TiO}_2$  時要進行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，其直徑通常只有人類頭髮的幾千分之一。

研究中黑鱸魚所接觸的  $\text{C}_{60}$  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  $\text{C}_{60}$  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  $\text{C}_{60}$  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。為了瞭解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

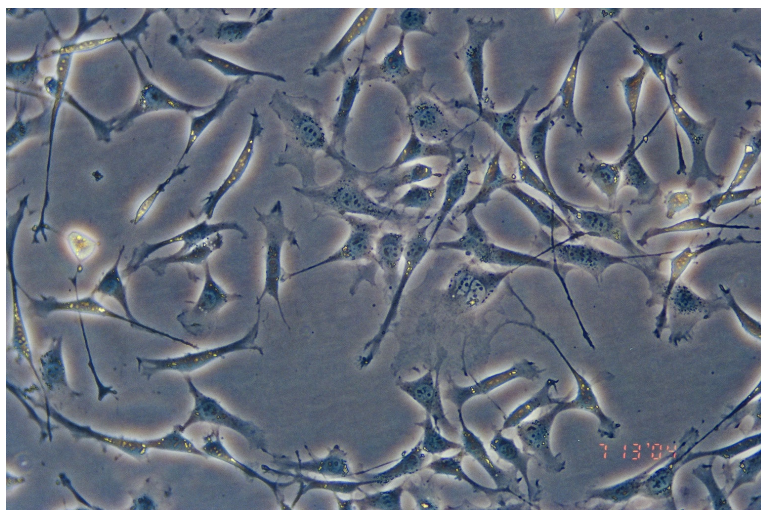


圖3-1 200倍顯微鏡下的小鼠胚胎纖維母細胞(新竹食品工業研究所)

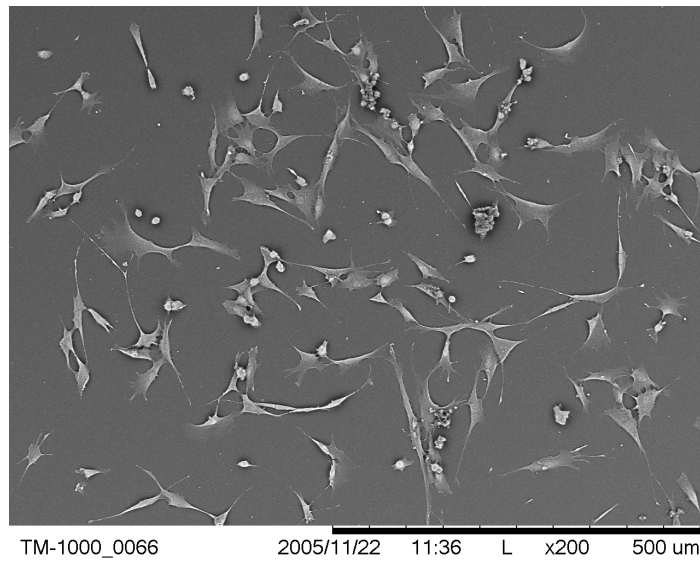


圖3-2 200倍SEM下的小鼠胚胎纖維母細胞

### 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、1×PBS、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

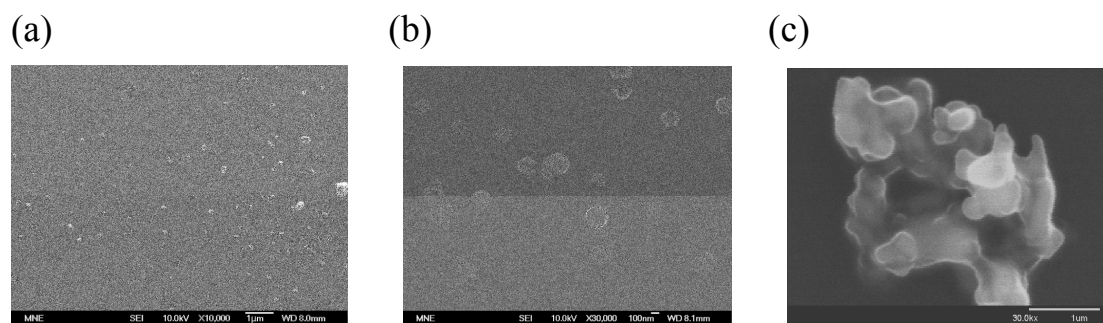
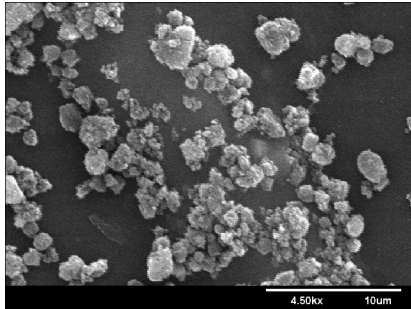


圖3-3 (a) 20nm (b) 150nm (c) 700nm ZnO之SEM

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

(a)



(b)

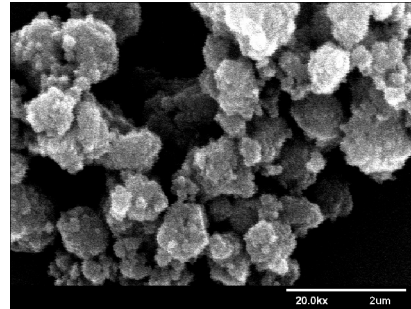


圖3-4 (a) Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (b) TiO<sub>2</sub>的SEM

### 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

#### 3.4.1 纖維母細胞 (NIH-3T3) 之培養與繼代：

##### NIH-3T3 細胞培養液配製

1. 配製原則為：

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

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

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繼代分盤。

##### 細胞繼代

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 70% 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

血球計數盤一般有兩個 chambers，每個 chamber 中細刻九個 1mm<sup>2</sup> 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 0.1mm。當 chamber 上方蓋上蓋玻片後，每個大正方形之體積為 1mm<sup>2</sup> x 0.1mm = 1.0 x 10<sup>-4</sup> 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<sup>4</sup>，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 1.5cm×5cm
2. 以 pipette 吸取各 10 $\mu$ 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  $10^{-3}$ g/mL。

#### 3.4.4 MTT assay 實驗流程

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200 $\mu$ 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。
5. 再將 well 中藍紫色 DMSO 混合液抽到另一盤 96-well culture plate 中。

6.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 NIH-3T3細胞攝入氧化鋅奈米粒子之實驗

#### 3.5.1 三種氧化鋅奈米粒子在不同濃度下之MTT assay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24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原液中抽取固定的12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8重覆，取樣時間皆為12、24、48及72小時。

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，之後將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。

### 3.5.2 三管半致死濃度氧化鋅奈米粒子細胞培養液之配製

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。

### 3.5.3 NIH-3T3 攝入三種氧化鋅奈米粒子之 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24小時。
4. 因取樣時間為24、48及72小時，故24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24、48及72小時後，做SEM膠片取樣做細胞固定。

### 3.6 Wortmannin對攝入氧化鋅奈米粒子細胞之實驗

#### Wortmannin的配製

將1mg的Wortmannin白色粉末溶在40 $\mu$ L DMSO溶液中，形成濃度為 $2.5\times 10^{-2}$ g/mL的原液，用錫箔紙包起來避光並保存在-20 $^{\circ}$ C。

#### 3.6.1 Wortmannin對正常細胞的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 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養24小時。
3. 抽取Wortmannin原液用DMEM溶液稀釋成 $3\times 10^{-8}$ g/mL的細胞培養液以待備用(需避光)。
4. 24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 $3\times 10^{-8}$ g/mL的Wortmannin之細胞培養液1mL。
- 5.分別依取樣時間於24、48及72小時後，做SEM膠片取樣之細胞固定。

### 3.6.2 Wortmannin對改善攝入氧化鋅奈米粒子細胞之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200 $\mu$ L培養24小時。

3. 抽取Wortmannin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 $3 \times 10^{-8}$ g/mL之Wortmannin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. 24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Wortmannin細胞培養液。

5. 30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 $3 \times 10^{-8}$ g/mL之Wortmannin和三種奈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12重覆，取樣時間皆為12、24、48及72小時。

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4小時，之後將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。

### 3.6.3 Wortmannin 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°C、5% CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 24 小時。
3. 抽取 Wortmannin 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  $3 \times 10^{-8}$  g/mL 之 Wortmannin 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. 24 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 Wortmannin 細胞培養液。
5. 30 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 $3 \times 10^{-8}$  g/mL之Wortmannin和三種耐米粒子的半致死劑量濃度的三管細胞培養液1mL。

6.分別依取樣時間於24、48及72小時後，做SEM膠片取樣之細胞固定。



## 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。

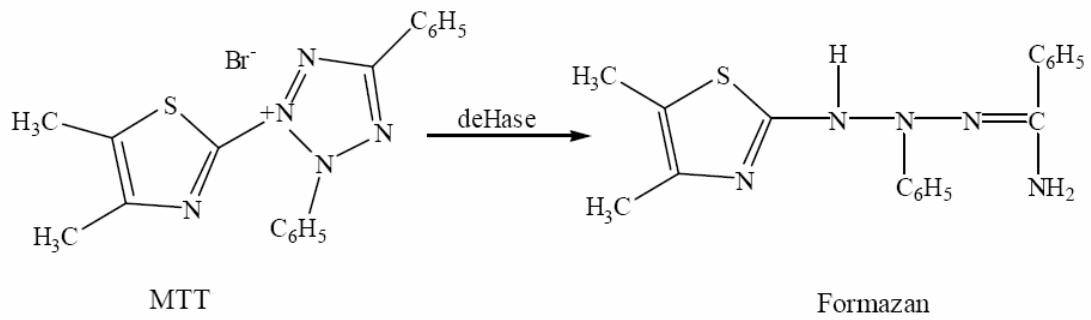


圖4-1 MTT化學結構式

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>)

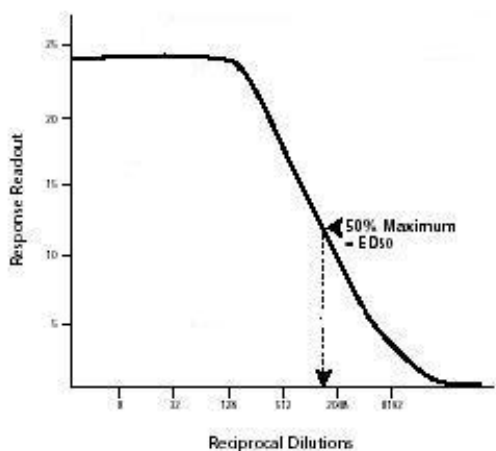


圖 4-2 細胞生長曲線

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 Wortmannin 原理

細胞中含有細胞骨架，這是由由三種纖維構成，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）

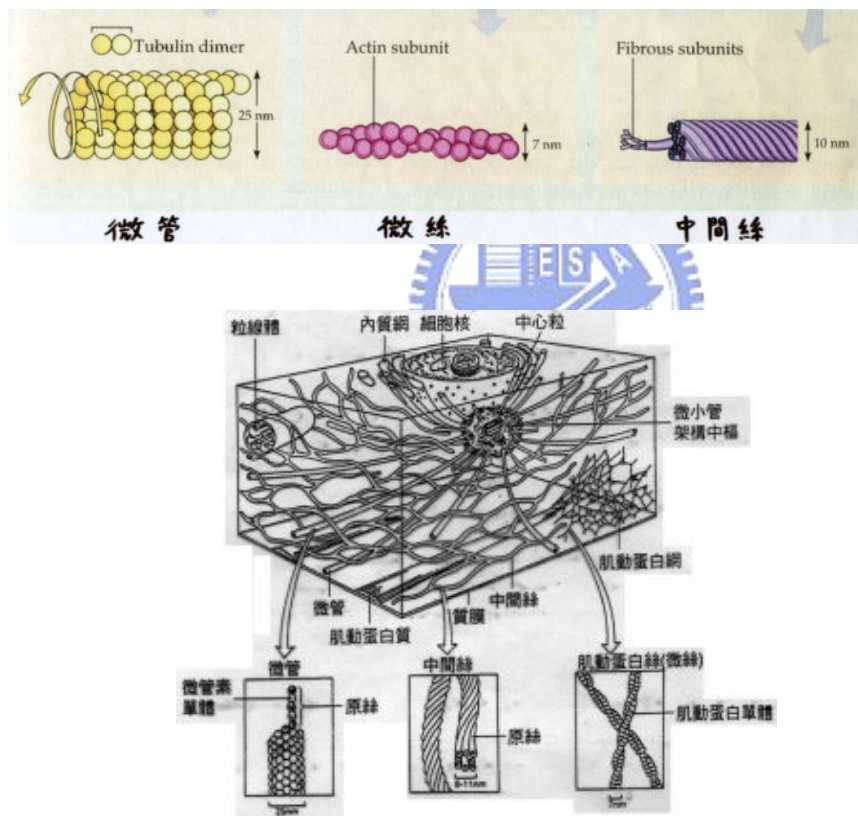


圖 4-3 細胞骨架

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：胞器會延細胞骨架所提供的軌道，移動到目的地。

Wortmannin 是一種真菌的代謝物，它具有穿透細胞的能力，並且對 PI3 kinase 是一種不可逆的抑制劑。PI3 kinase 是細胞內與脂質訊息傳遞有關的酵素，它參與許多和細胞生成、轉形、分化、存活及胰島素作用有關的調控。他阻擋了 PI3 kinase 的催化活性，並且不會影響到上游信號，例如：胰島素受器的 tyrosin kinase 的活性。Wortmannin 也具備抑制 myosin light chain kinase 以及 PI4 kinase 活性的能力。此狀況下 Wortmannin 的濃度約需一百倍於抑制 PI3 kinase 所需的濃度。  
(Edward H. Walker *et. al.* 2000)

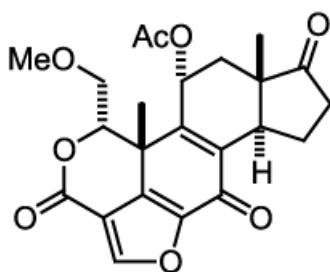
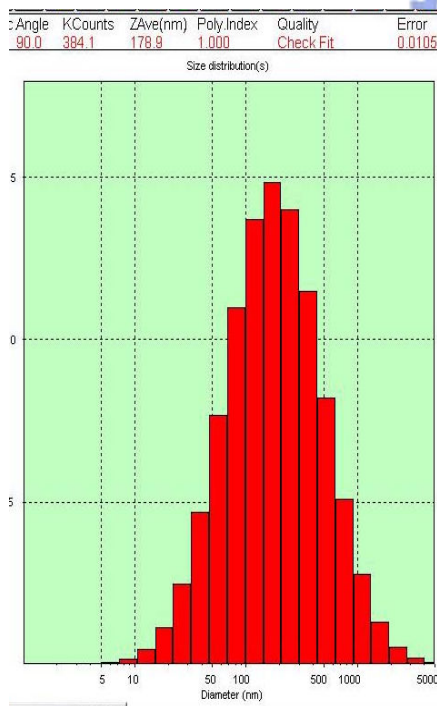


圖 4-4 Wortmannin 分子式：C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>O<sub>8</sub>，分子量 428.4。

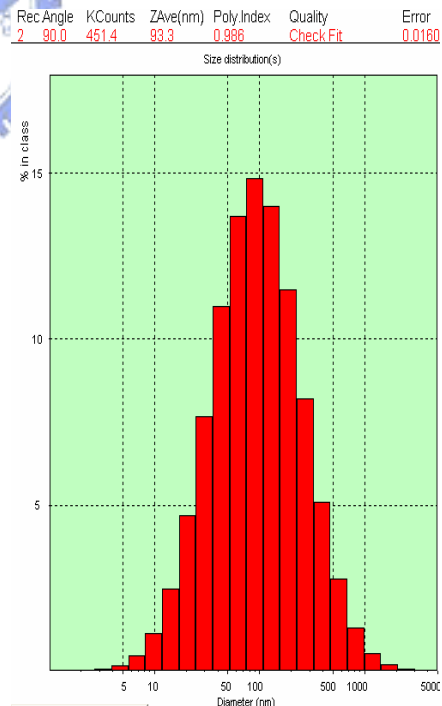
## 第五章 實驗結果

### 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。

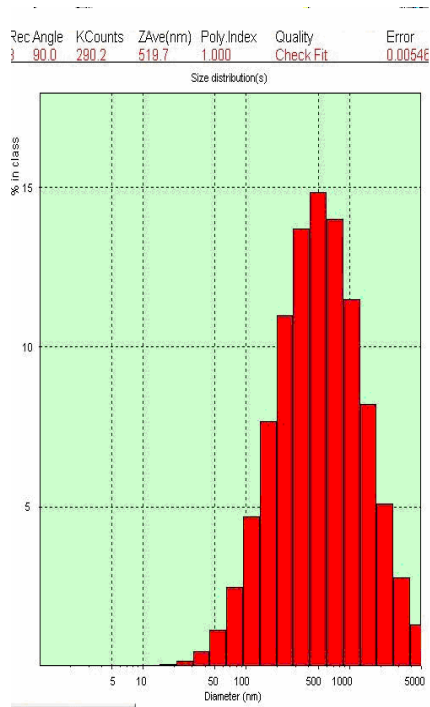


(a) 20nm 透析前

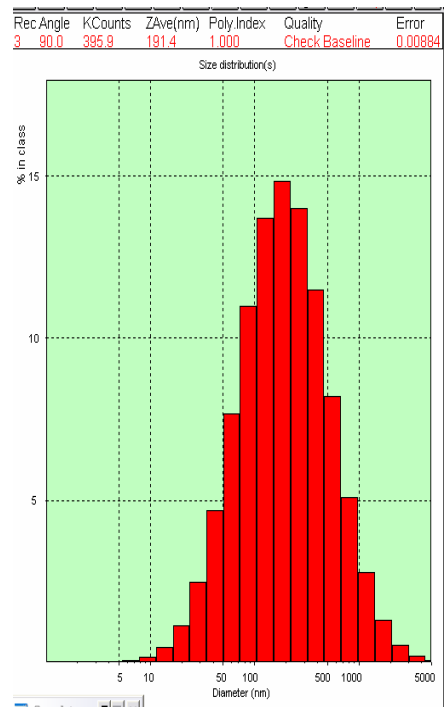


(b) 20nm 透析後

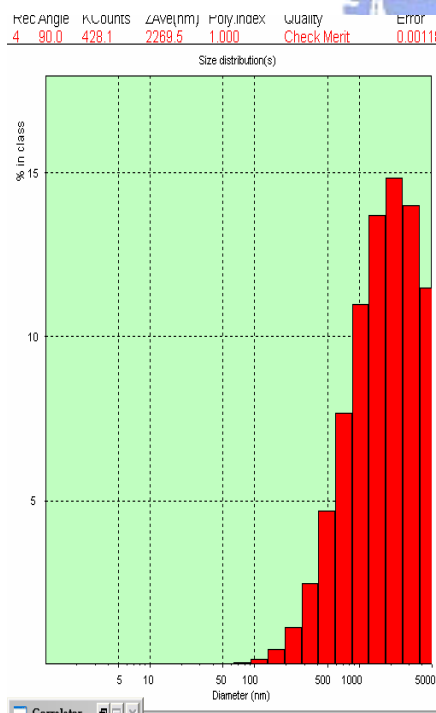




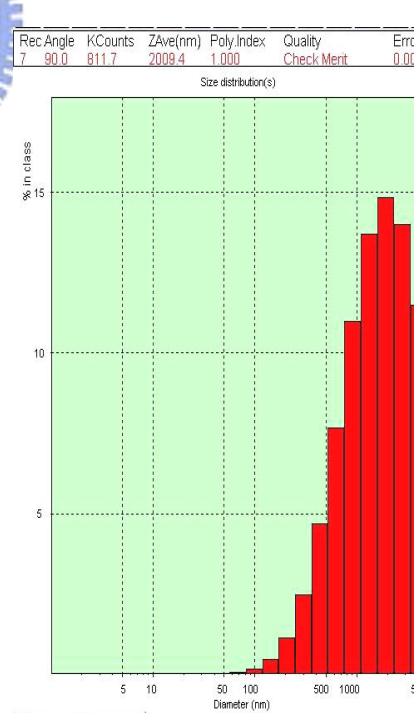
(c) 150nm 透析前



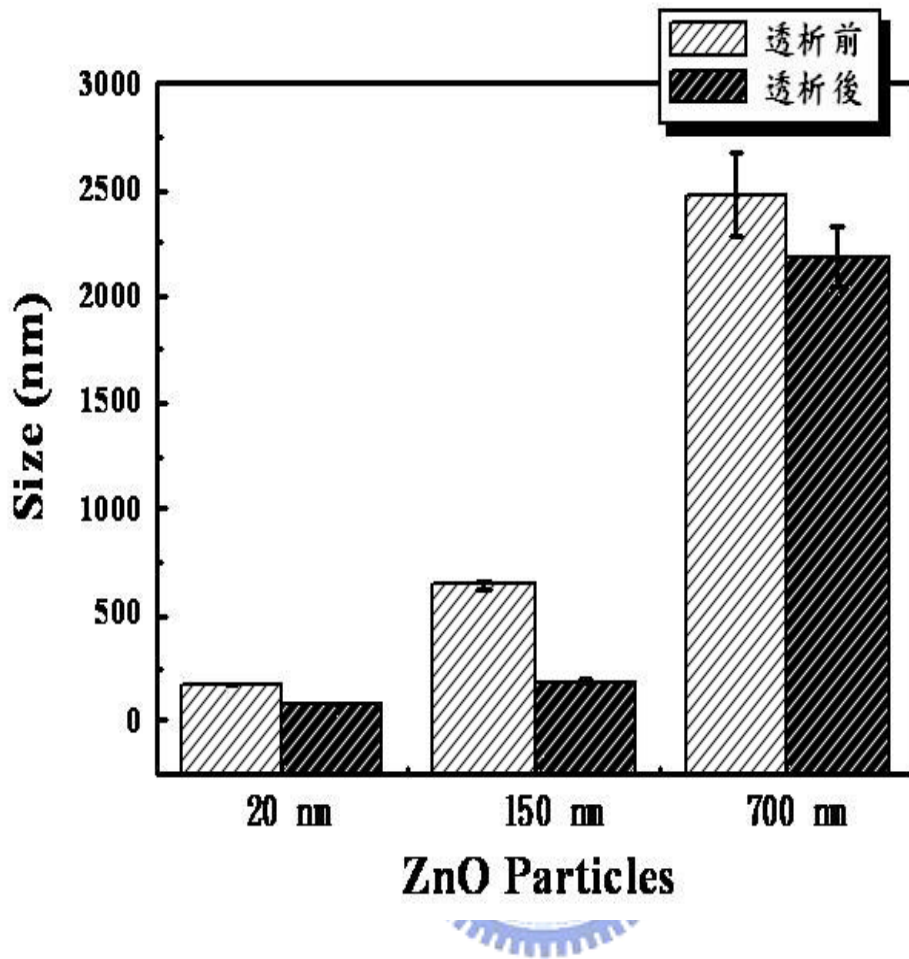
(d) 150nm 透析後



(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

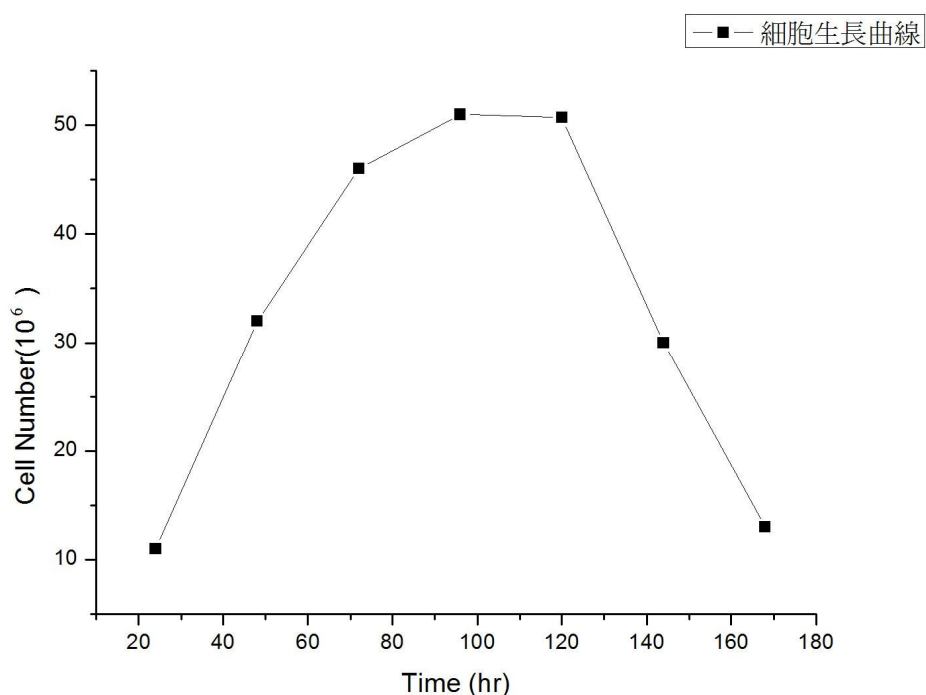


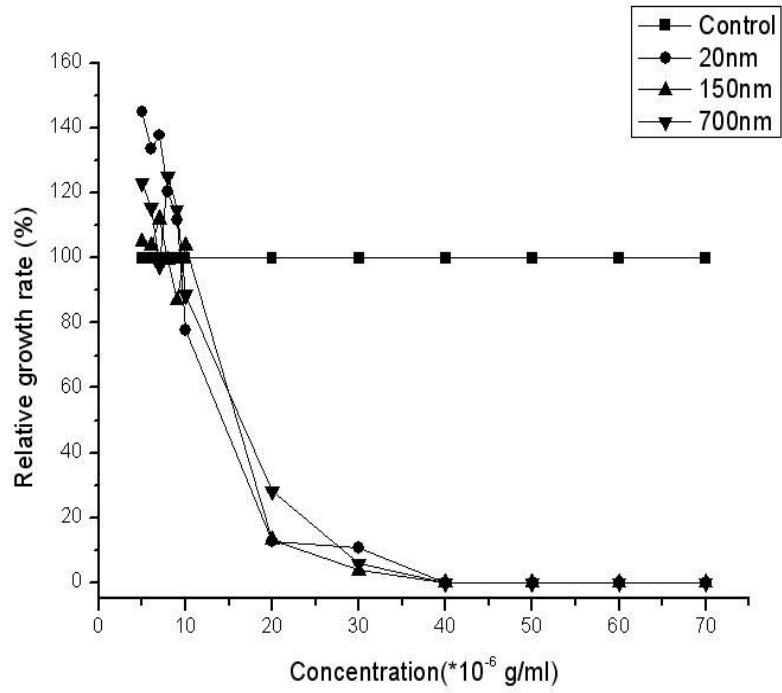
圖 5-2 細胞存活曲線

由細胞生長曲線我們可以發現正常細胞於 96 小時時達生長頂峰，當 96 小時以後細胞慢慢地逐漸凋亡，是因為細胞培養液的顏色由原來的深粉紅色慢慢變成黃橘色，表示培養液養份已經逐漸消耗完畢，而細胞產生過量代謝產物累積對細胞體產生毒害作用，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。

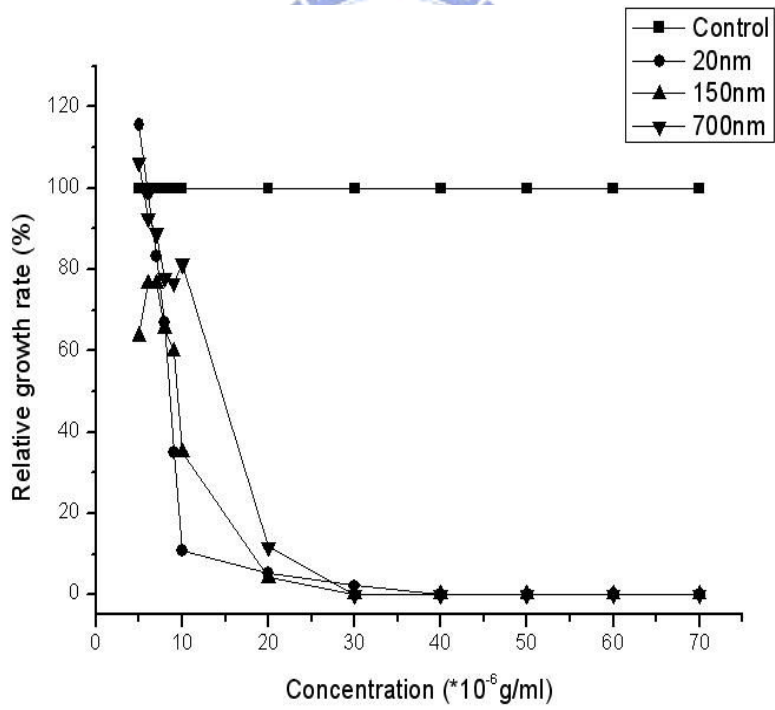
### 5.3 攝入氧化鋅奈米粒子MTT assay細胞活性測試

#### 三種氧化鋅奈米粒子在不同濃度下之細胞活性測試

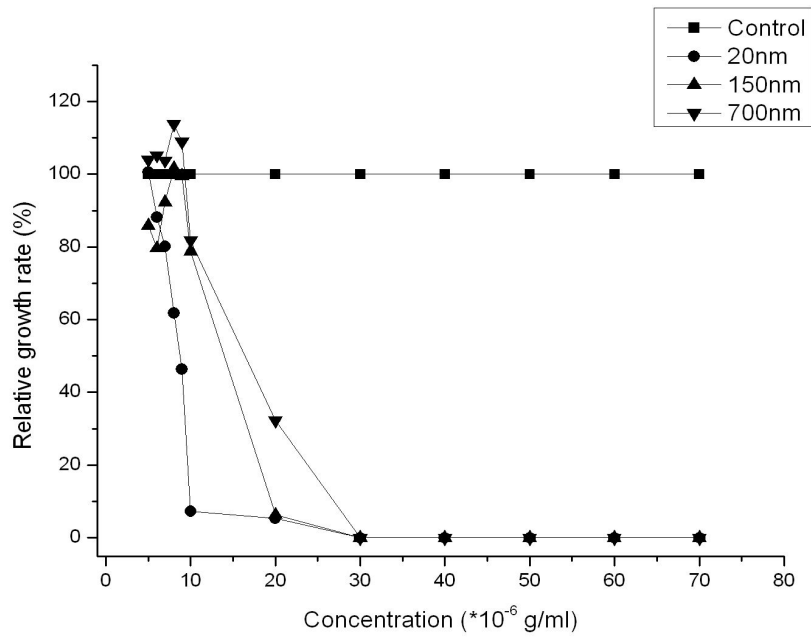
在本實驗中，我們分別對三種尺寸的奈米粒子做不同時間及不同濃度下對細胞活性的影響，由下圖的結果可知，低濃度劑量( $\sim < 9\text{ppm}$ )的奈米粒子對細胞活性沒有產生任何毒性而使細胞凋亡，而半致死劑量濃度(LC50)在四個實驗時間點皆介於 $9\sim 18\text{ppm}$ 之間，超過半致死劑量濃度( $20\text{ppm}$ )則幾乎全部因奈米粒子的毒性而凋亡。我們也發現隨著奈米粒子作用時間的增加，半致死劑量有往左位移的趨勢，即細胞數量隨著粒子作用時間的增加逐漸凋亡減少，因此僅需較小的粒子濃度即可達到半致死劑量。此外我們也發現奈米粒子的尺寸越小，對細胞的毒性越大，應該是因為粒子越小，表面活性越大的關係所導致。



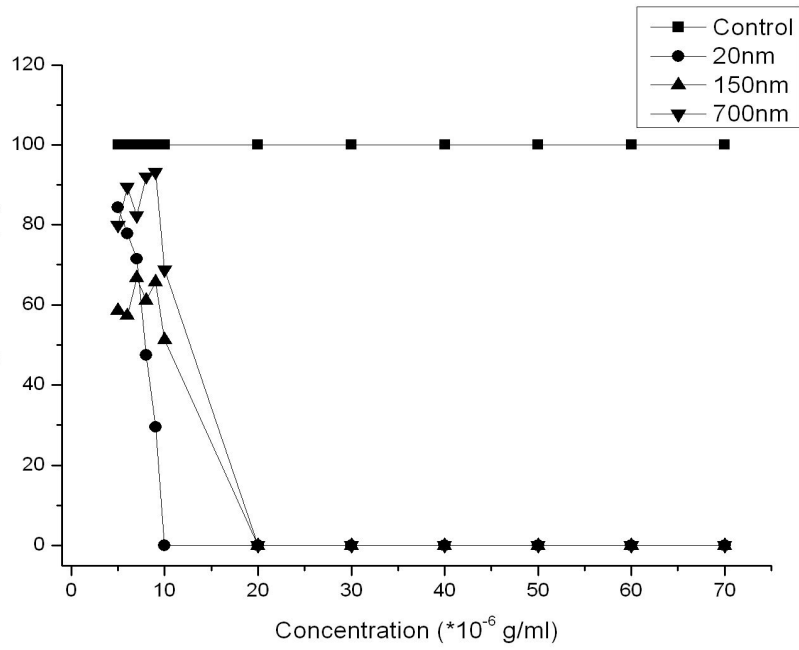
(a) 12 小時



(b) 24 小時



(c) 48 小時

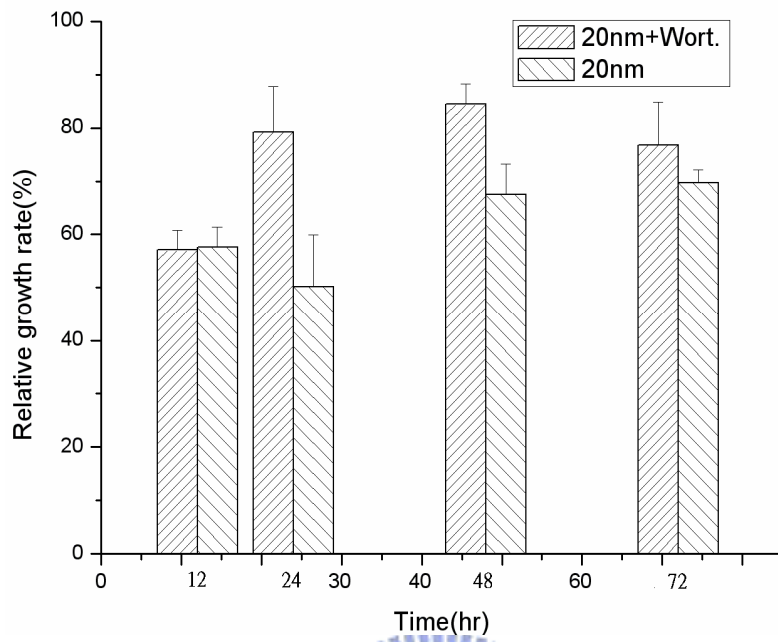


(d) 72 小時

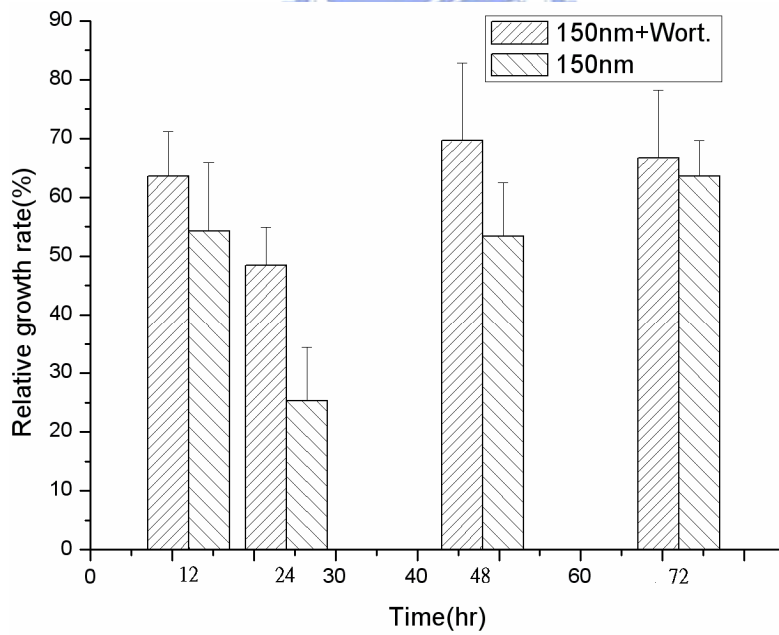
圖 5-3 (a) 12 小時 (b) 24 小時 (c) 48 小時 (d) 72

小時 MTT 細胞存活曲線

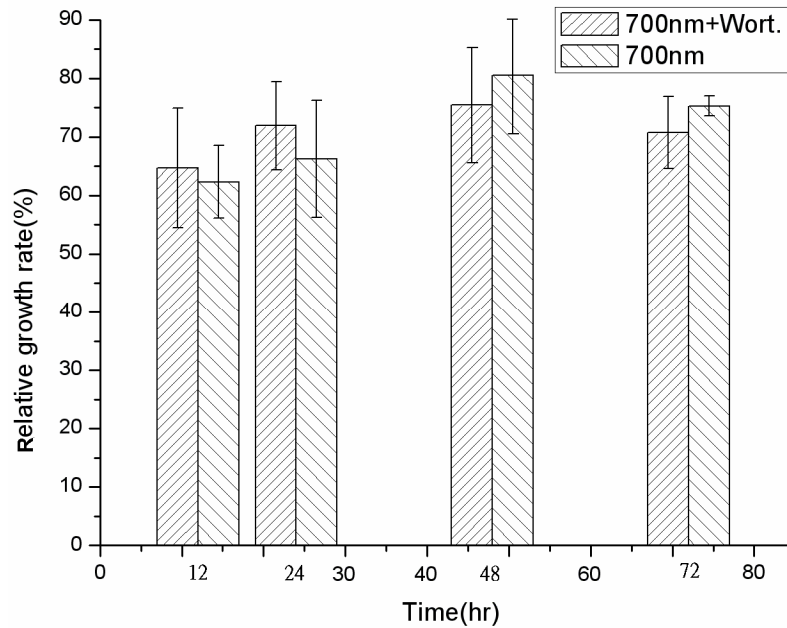
#### 5.4 Wortmannin 對攝入半致死濃度氧化鋅奈米粒子細胞毒性之影響



(a) 20nm



(b) 150nm



(c) 700nm

圖 5-4 Wortmannin MTT assay (a) 20nm (b) 150nm

(c) 700nm 氧化鋅奈米粒子

由 Wortmannin 的 MTT 測試我們可以發現在 24 小時內，Wortmannin 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 5-4 (a)、(b) 可以發現攝入 20nm 及 150nm 的奈米粒子在 72 小時的全程實驗時間中，有加入 Wortmannin 的細胞存活率很明顯的高於只有氧化鋅奈米粒子之細胞。而圖 5-4 (c) 則是在 24 小時內有較少的減緩作用，但是在 48 小時以後可以發現加入 Wortmannin 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 小時內攝入 700nm 的奈米粒子之 Wortmannin 已經被細胞吸收作用殆盡，所以



療效減低並且由於 Wortmannin 本身亦有一定的細胞毒性，在此時因為療效已消失且 Wortmannin 的毒性亦顯現出來，再加上奈米粒子的毒性雙重作用下使得細胞存活率比只有攝入奈米粒子的細胞還要低。

### 5. 5 Wortmannin 的 SEM

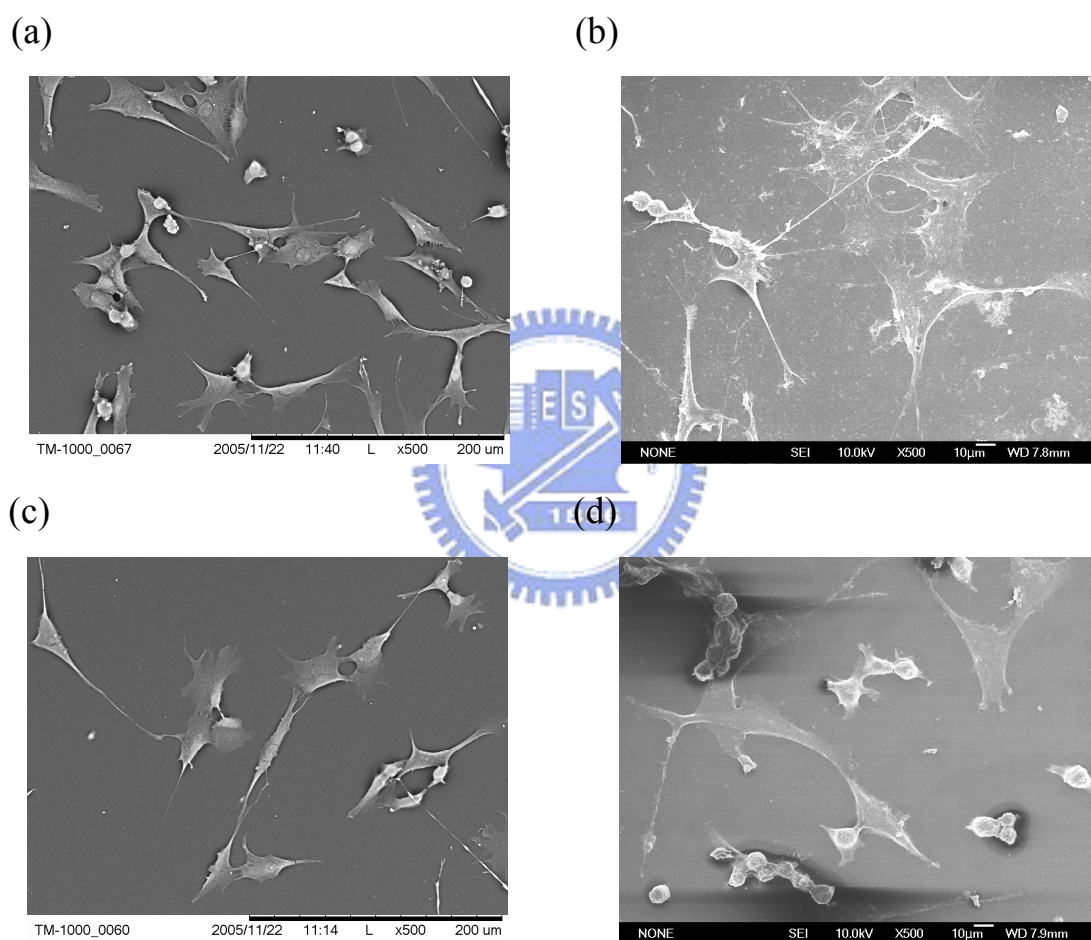
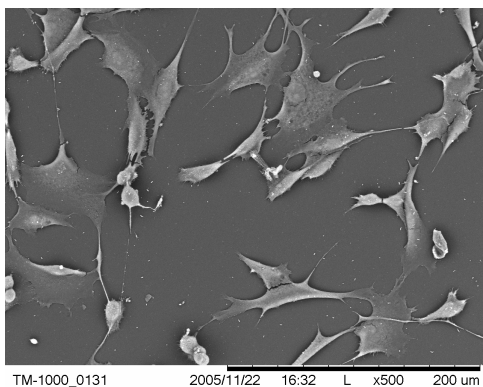
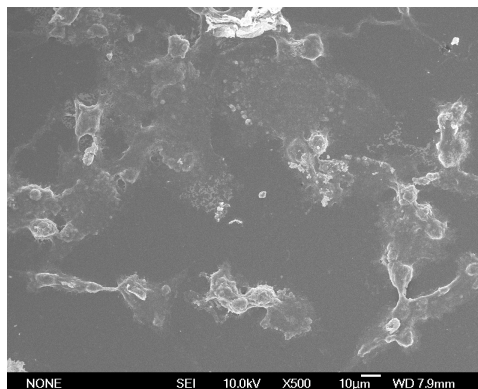


圖 5-5.1 24 小時之 SEM(a)正常 (b)只添加 Wortmannin(c) 、(d)分為攝入 20nm 氧化鋅及再添加 Wortmannin 的細胞

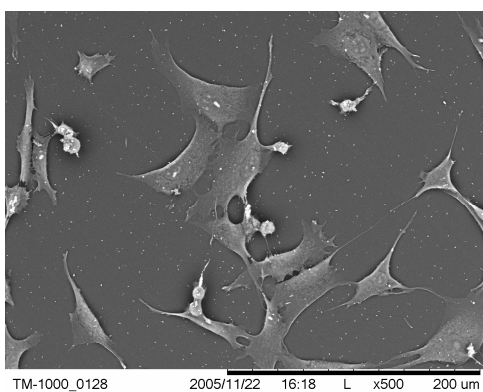
(a)



(b)



(c)



(d)

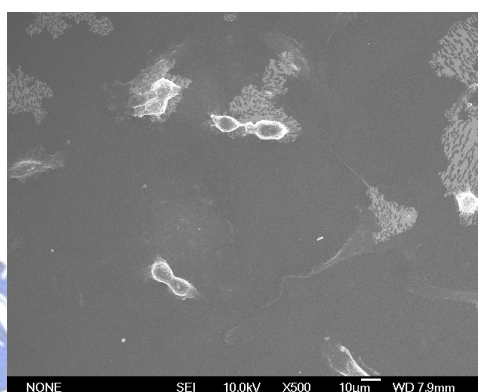
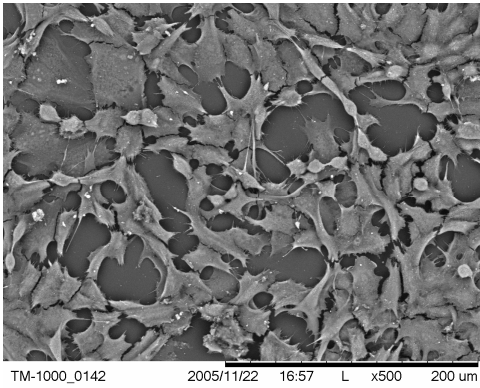


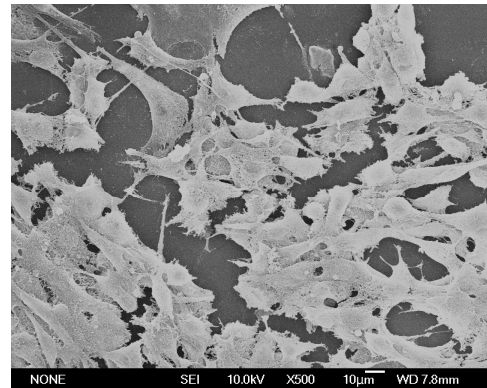
圖 5-5.2 24 小時之 SEM(a)、(c)分別攝入 150nm 及 700nm

(b)Wortmannin+150nm 、(d) Wortmannin+700nm 氧化鋅的細胞

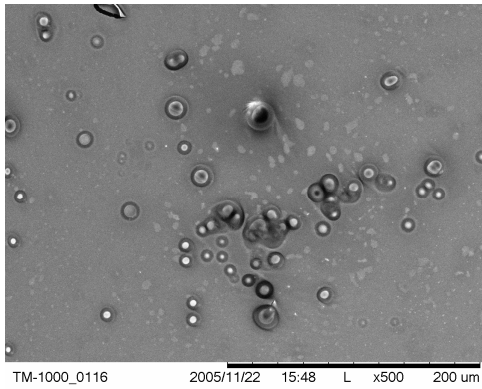
(a)



(b)



(c)



(d)

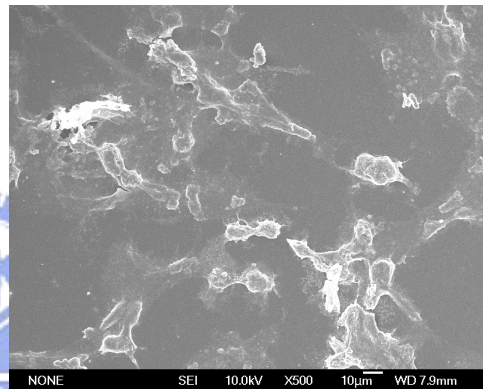
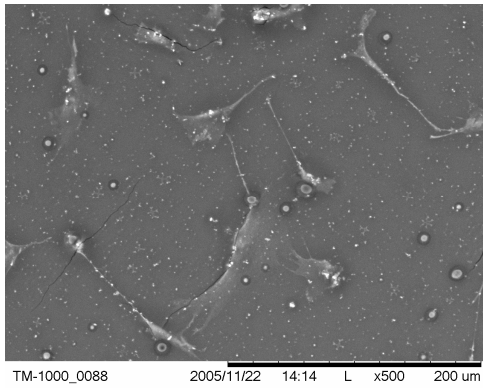
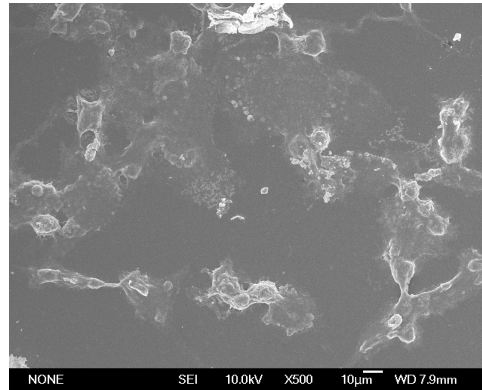


圖 5-6.1 48 小時之 SEM(a)正常 (b)只添加 Wortmannin(c) 、(d)分為攝入 20nm 氧化鋅及再添加 Wortmannin 的細胞

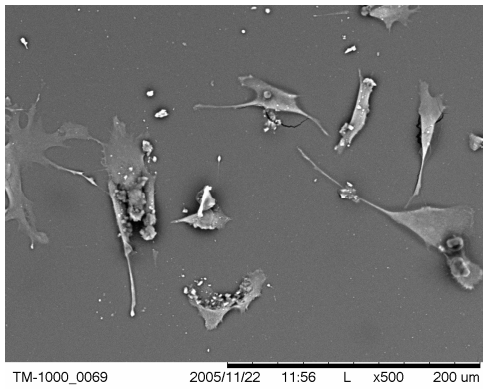
(a)



(b)



(c)



(d)

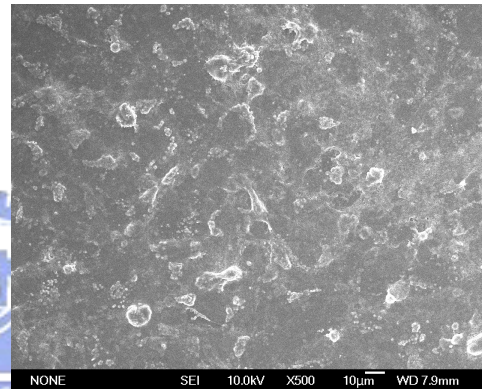
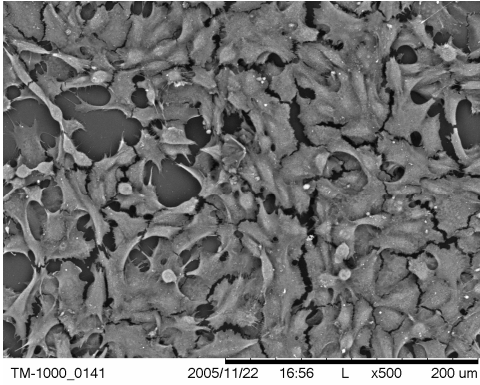


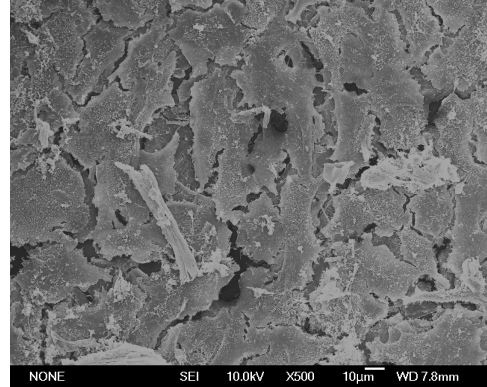
圖 5-6.2 48 小時之 SEM(a)、(c)分別攝入 150nm 及 700nm

(b)Wortmannin+150nm 、(d) Wortmannin+700nm 氧化鋅的細胞

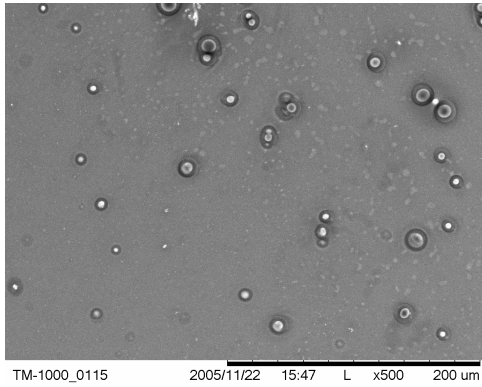
(a)



(b)



(c)



(d)

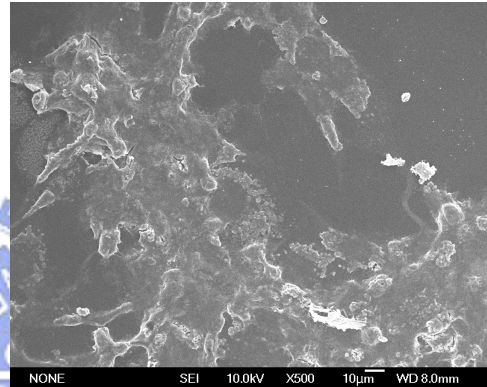
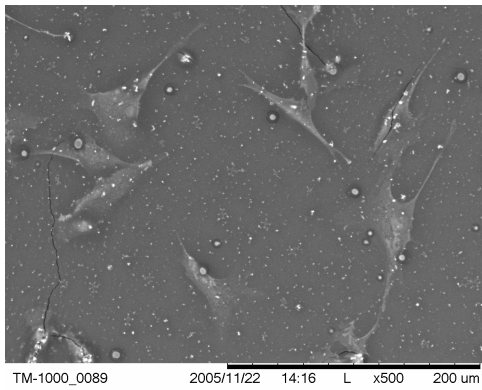
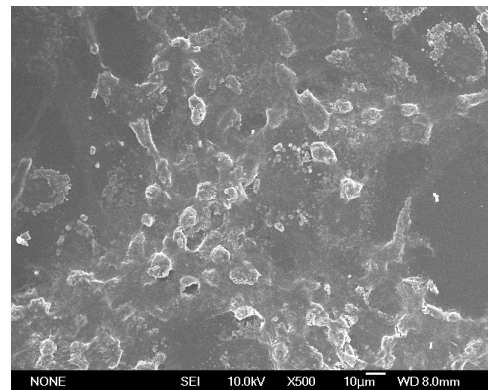


圖 5-7.1 72 小時之 SEM(a)正常 (b)只添加 Wortmannin(c) 、(d)分為攝入 20nm 氧化鋅及再添加 Wortmannin 的細胞

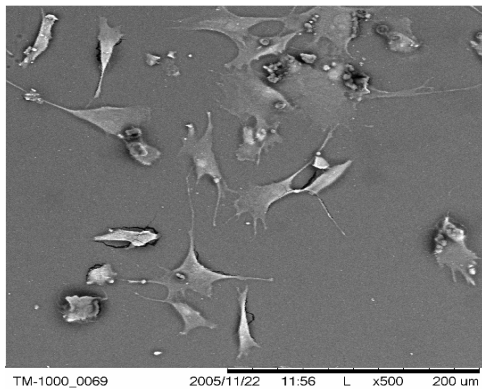
(a)



(b)



(c)



(d)

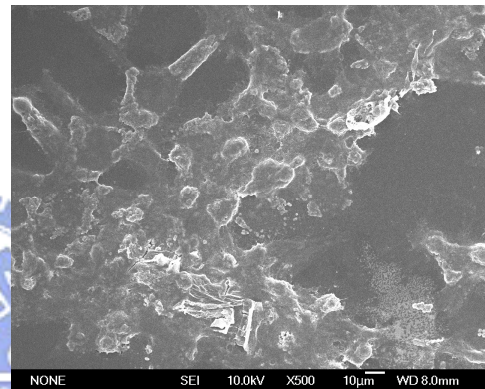
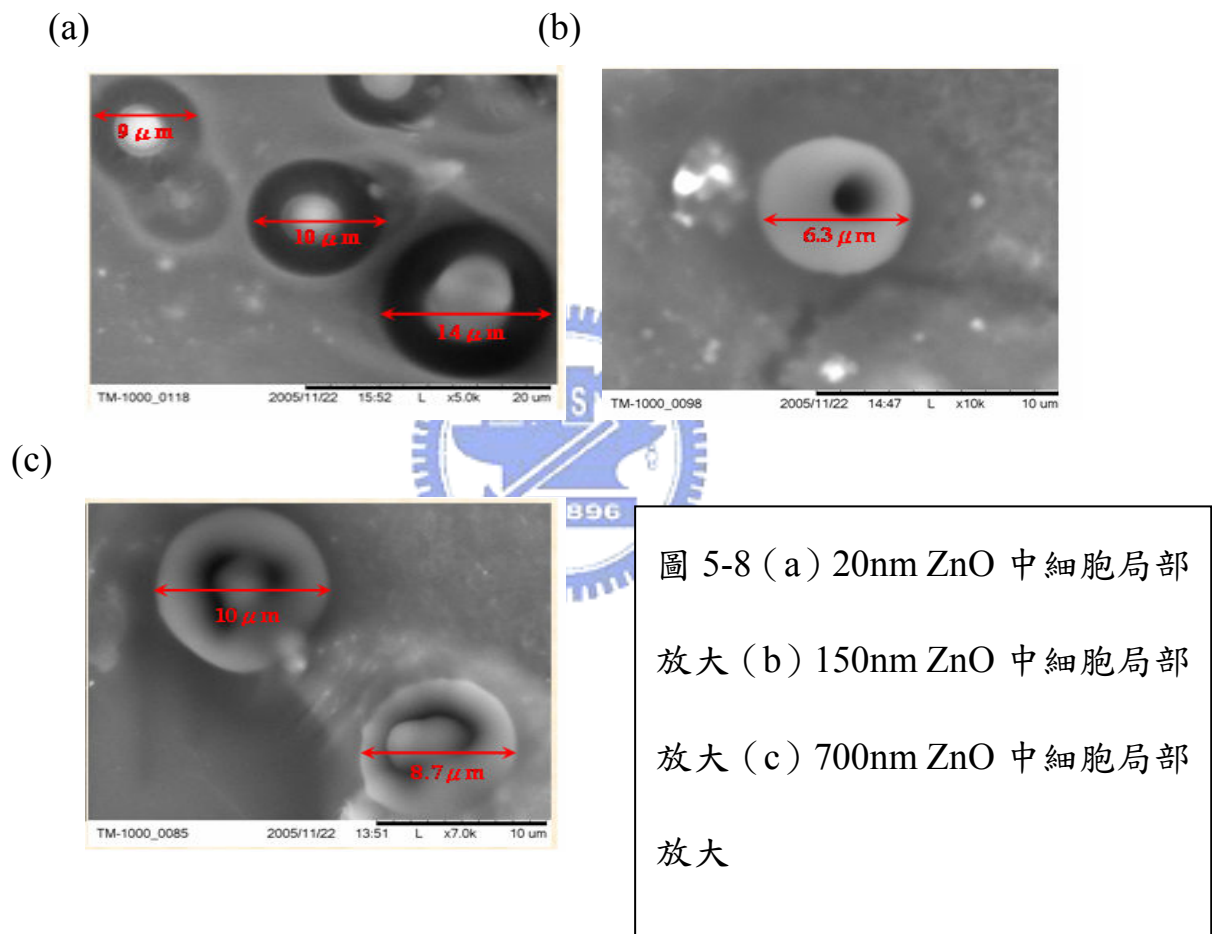


圖 5-7.2 72 小時之 SEM(a)、(c)分別攝入 150nm 及 700nm

(b)Wortmannin+150nm 、(d) Wortmannin+700nm 氧化鋅的細胞

藉由以上圖 5-5、圖 5-6 及圖 5-7 細胞的 SEM 圖，我們可以明顯發現無論是 20nm、150nm 或是 700nm 的氧化鋅奈米粒子均會使得細胞的 morphology 產生改變，尤其 48 小時的 SEM 圖 5-6.1(c)及圖 5-6.2(a)、(c)可以很明顯的看出細胞培養液中加入奈米粒子時(圖 5-8)，細胞會產生圓形的類似 Endocytosis 或是 Exocytosis 的現象。



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，但是目前我

們尚無法確認。而除了這種細胞上特殊形貌的發生之外，我們也發現細胞周圍的延伸觸角也消失了，細胞與細胞之間幾乎毫無空隙的緊密連接，細胞也變的較為扁平，幾乎可說是看不到細胞了，我們推測可能是添加了奈米粒子使細胞骨架產生改變，甚至是導致了細胞凋亡 (apoptosis) ，這與我們的 MTT assay 結果是相符的。

而由圖 5-5.1(d)、5-5.2(b) 、(d) 、圖 5-6.1(d) 、圖 5-6.2(b) 、(d) 、圖 5-7.1(d) 及圖 5-7.1(b) 、(d)均可發現當含奈米粒子的細胞培養液添加 Wortmannin 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 Wortmannin 對於奈米粒子毒性有改善的效果，這個現象的原理是以後所必須探討的，而若培養液中只有 Wortmannin 而無奈米粒子時，也可以發現細胞的 morphology 圖 5-5.1(b) 、圖 5-6.1(b) 及圖 5-7.1(b)也是有相當程度的改變，這亦可證實我們之前所說的 Wortmannin 也是有細胞毒性的。



## 第六章 結論與未來展望

### 結論

1. 同種奈米粒子,相同濃度下,尺寸越小,毒性越大。
2. 加入氧化鋅奈米粒子後,細胞形貌產生特殊的變化。
3. 渥曼青黴素在 24 小時內可改善氧化鋅奈米粒子的毒性解救細胞,且可使特殊的形貌消失。

### 未來展望

目前各界對於氧化鋅奈米粒子的研究大多著重於其光學特性,例如應用在光觸媒、太陽能電池及防曬隔離乳液上,較少討論其攝入至人體的一些毒化反應,而我們證實了氧化鋅奈米粒子具細胞毒性,且會改變細胞的形貌,但關於其對細胞的毒理分子機制作用了解甚少。

希望未來的學弟妹們可以解決我們尚未解開的謎團,不只是氧化鋅,甚至是其他的奈米粒子,建立一套奈米粒子對細胞作用的完整分子機制,成為實驗室重要的智慧財產。

## 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. Edward H. Walker, Michael E. Pacold, Olga Perisic, Len Stephens, Philip T. Hawkins, Matthias P. Wymann, and Roger L. Williams, “Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine ” , Molecular Cell, 6 , pp. 909-919, October 2000.

