

# 國立臺灣大學

National Taiwan University

## 醫學工程學系

Department of Biomedical Engineering



申請人姓名：康凱傑

申請系所別：醫學工程學系 碩士班丁組

就讀校／系：臺北醫學大學／生物醫學工程學系

# 有利審查之資料

## 目錄

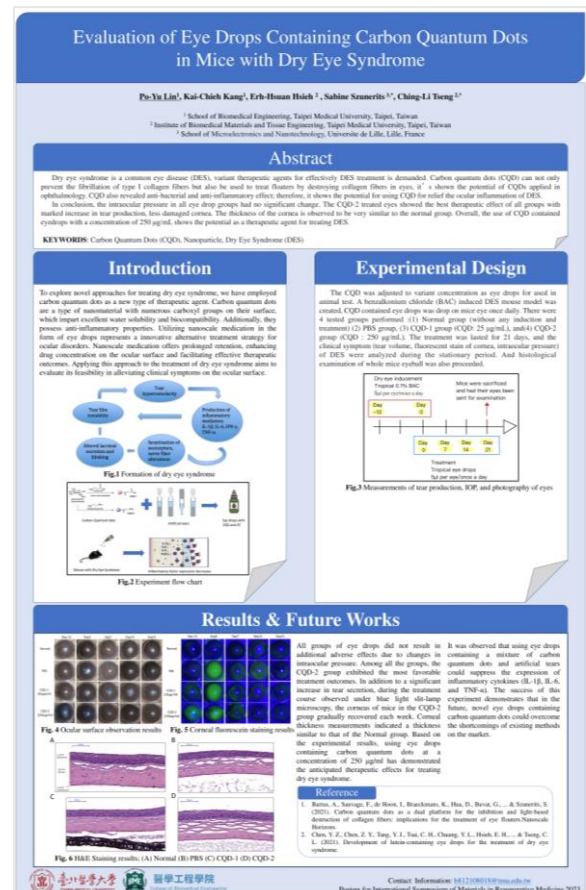
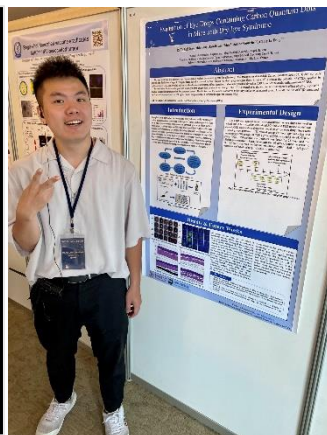
1. 學術活動與獲獎紀錄.....	3
2. 課程培訓與產業見習.....	4
3. 投稿國科會 112 學年度大專學生研究計畫.....	6
(一) 摘要.....	6
(二) 研究動機與研究問題.....	7
(三) 文獻回顧與探討.....	8
(四) 研究方法及步驟.....	10
(五) 預期結果.....	12
(六) 需要指導教授指導內容.....	12
(七) 參考文獻.....	12
4. 畢業專題研究.....	14
(一) 背景或文獻資料回顧.....	14
(二) 專題研究目的.....	15
(三) 實驗方法.....	15
(四) 結果與討論.....	17
(五) 結論.....	20
(六) 參考文獻.....	21

# 1. 學術活動與獲獎紀錄

## 參加 2021 國際研討會 "Biomedical Engineering Contributions to Precision Health and Patients Care"

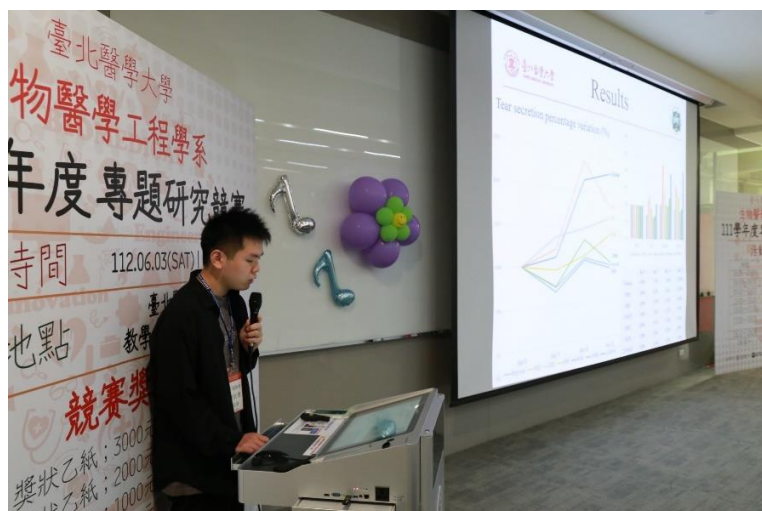


## 參加 2023 臺灣國際再生醫學材料應用研討會(ISOMRM)



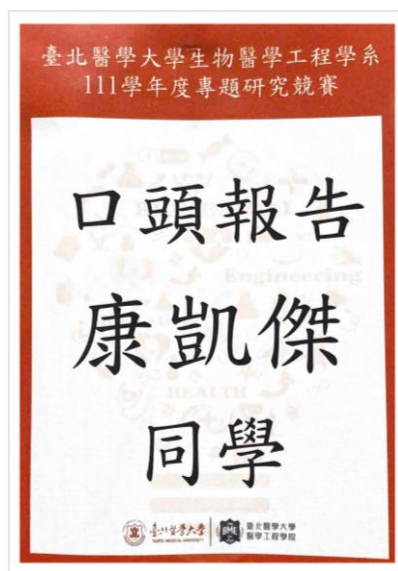


## 參加 2023 北醫醫工專題研究口說競賽，獲獎佳作



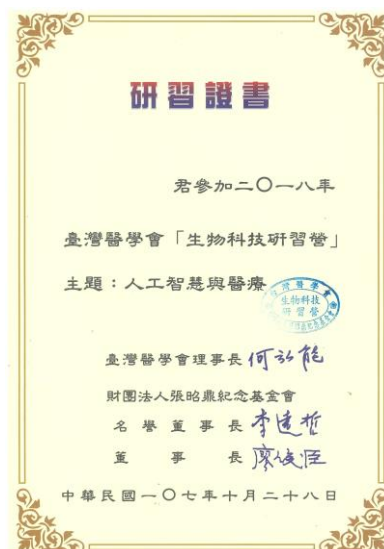
### Evaluating the Potential of Plasmon-Activated Water in Treating Dry Eye Syndrome (DES) in Mice

Speaker: 康凱傑  
Advisor: Chung-Li Tseng  
co-advisor: Yu-Chuan Liu



## 2. 課程培訓與產業見習

### 2018 臺灣醫學會 生物科技研習營



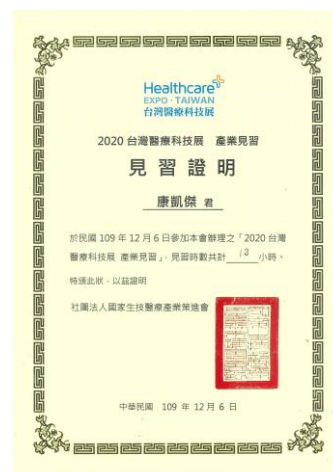
### 2020 Amazon Web Services 培訓課程認證



### 2021 臺灣醫療科技展產業見習



## 參加 2020 臺灣醫療科技展產業見習



## 參加 2021 北醫、東吳、大同三校聯合國際問題解決松 Problem Solving for Better Health(PSBH)



## 2023 年，於開放式學習平台取得 Google 非學分課程“Technical Support Fundamentals” 認證





## 2023 年，投入晁禾醫療科技進行業界實習



## 參加 2023 國際照護博覽會與臺灣醫療科技展



## 3. 投稿國科會 112 學年度大專學生研究計畫

### 題目：搭載山奈酚奈米藥物應用於結腸癌癌症小鼠治療評估

年度	條碼編號	計畫名稱	計畫狀態	繳交送出日期
112	112CFD2000239	搭載山奈酚奈米藥物應用於結腸癌癌症小鼠治療評估	繳交送出 (國家科學及技術委員會)	2023/2/17 下午 04:58

[檢視內容](#)

申請案狀態：

→ ☒ 系所主管 確認完成 → ☒ 指導教授 確認完成 → ☒ 彙整人員 確認完成 → ☒ 已繳交至國科會  
(指導教授任職機關)

#### (一) 摘要

本研究欲探討將山奈酚(Kaempferol, 3, 4', 5, 7-tetrahydroxyflavone, KA)包覆於生物高分子-明膠(gelatin)中，形成奈米藥物後，應用於癌症治療的可行性。山奈酚是一種天然的黃酮類化合物，常見

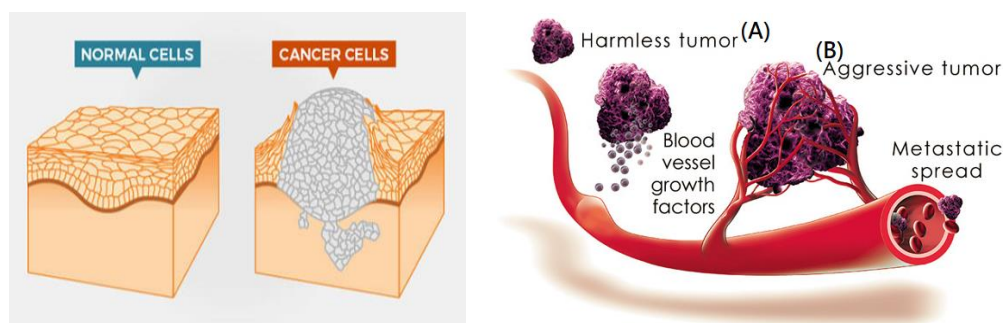
於茶葉、洋蔥、大蒜等植物，研究顯示其具有抗發炎、抗氧化與抗癌等功效。選用天然生物高分子,明膠,作為載體，乃因其具有良好的生物相容性與生物可降解性，有助於穩定其包覆/搭載藥物之活性;藥物本身經明膠包覆處理，而癌症組織有較高血管通透性，可使奈米藥物累積於腫瘤部位：使癌細胞有較高的被吸收性，且藉由緩慢釋放藥物的傳輸效果，延長藥物在目標組織的滯留時間，達到殺死癌細胞，治療癌症的效果。綜合以上特性，希望以搭載山奈酚之明膠奈米顆粒作為新的抗癌藥物製型，將其應用於癌症治療，藉由觀察小鼠背部腫瘤變化之動物模式與藥物給予，評估其作為抑癌用藥的能力。

## (二) 研究動機與研究問題

### 研究動機

根據世界衛生組織(WHO)報告指出[1]，癌症在 2020 年導致近 1000 萬人的死亡，即每六個人過世，就有一個是癌症所導致的。而臺灣方面，癌症多年來蟬聯十大死因之首，據同年衛生福利部統計[2]，2020 年共計 50161 人死於癌症，占比當年度總死亡人數的 29.0%。綜合上述數據顯示，為了挽救更多生命，抗癌相關的研究至關重要。

癌症是一種身體某些細胞不受控制地生長並擴散到身體其他部位的疾病。與正常細胞不同，癌細胞會忽略生物體中命令細胞停止分裂或凋亡的信號，在生物體內恣意繁殖，形成腫瘤(如圖(1))，惡性的腫瘤甚至會釋放血管生長因子，促進血管向腫瘤組織生長，提供其養分使其進一步增長(如圖(2))。由於這種不受控制的增長，癌細胞擅於侵入附近組織並擴散至生物體其他部位而產生轉移。



圖(1) 正常細胞(左)、癌細胞(右) 圖(2) (A)良性腫瘤 (B)惡性腫瘤

### 研究問題

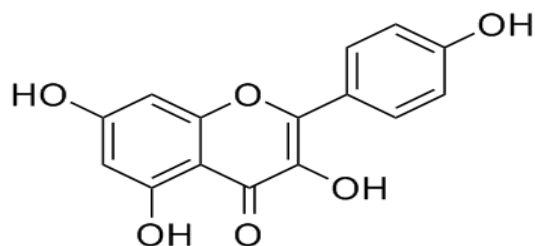
癌細胞本源自於生物體中的正常細胞，對於生物體免疫系統而言，癌細胞與正常細胞並無差異，無法透過自體免疫的途徑攻克癌細胞，需要人為介入進行治療。現階段主流的癌症治療手段包含手術治療、放射治療與化學治療等，前兩者針對腫瘤及周圍部分直接進行局部切除或治療，希望能完全去除腫瘤細胞達成治療效果。可怕的是，要在治療中發覺微小的癌細胞病灶實屬困難，要做到完全切除並不容易。除此之外，稍早有提到癌細胞具有轉移的特性，若癌細胞發生轉移，治療效果就會有所限制，須併用其他治療手段。

近年來，許多以化學手段治療癌症的研究持續發展，市面上也出現許多抗癌藥物，如 bevacizumab(Avastin®)、Sunitinib(Sutent®)、Lapatinib(Tykerb®)等。由於藥物作用於全身，相對於手術與放射治療只針對局部做改善，即使癌細胞轉移至其他部位，化學治療也能繼續進行。然而，正因為其作用於全身，上述藥物多具有一定的副作用，如噁心、嘔吐、食慾不振與紅疹等。雖目前亦持續開發止吐劑等副作用抑制劑，依舊治標不治本。因此，發展出一種可同時抑制癌症、抗發炎且副作用低的藥物可謂大勢所趨。

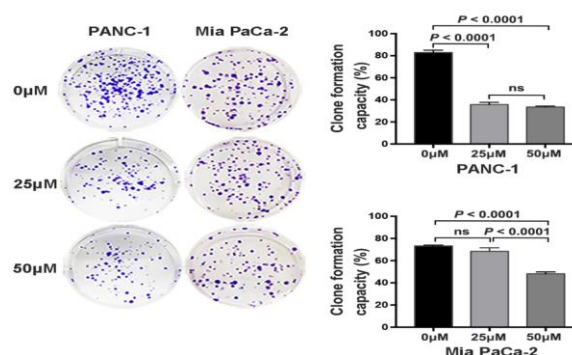
山奈酚是一種天然的黃酮類化合物(圖(3))，在先前的研究中已顯示其具有抗發炎、抗氧化與抗癌等功效[3]。眾多實驗證明，山奈酚可透過降低血管內皮生長因子(vascular endothelial growth



factor, VEGF)的表現[4]或促進癌細胞細胞凋亡[5][6]抑制腫瘤生長、增殖與血管生成[7]，如圖(4)。



圖(3) 山奈酚(Kaempferol)的化學結構



圖(4) 在菌落形成試驗中可見，增加山奈酚的劑量，將使菌落的形成受到抑制，其中 PANC-1 與 Mia PaCa-2 皆屬人類胰臟癌細胞系

將山奈酚作為抗癌藥物，儼然是一種不錯的治療手段，但由於其疏水的特性，難以被人體所吸收，造成其生物利用度較差，舉同樣為黃酮類化合物的兒茶素(Catechin)為例，其在大鼠體內的口服生物利用度僅 5%[8]。有鑑於此，本專題研究期望透過以生物高分子-明膠作為載體搭載山奈酚藥物，近一步改善藥物溶解度差的問題，作為一種具有良好生物利用度的藥品，並探究其應用於癌症治療的功效與可行性。

我在大二時，便已投入實驗室進行研究，曾參與明膠奈米顆粒應用於乾眼症小鼠動物實驗的相關研究。在製備明膠奈米顆粒，與分析顆粒的粒徑、電位以及動物實驗相關處置上有一定的能力與認識，但是對於細胞培養與癌症方面相關實驗比較缺乏經驗，期望也能藉由此次的大專生計畫的機會，豐富我的實驗技能。

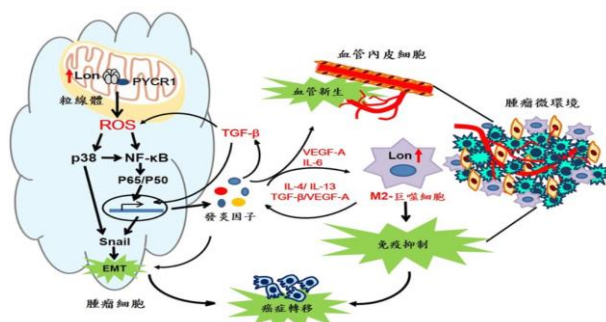
### (三) 文獻回顧與探討

細胞是構成生物體的基本單位，其透過生長與分裂以產生新的細胞。一般情況下，當細胞變得太老或受損時，會啟動細胞凋亡(Apoptosis)的程序，藉由巨噬細胞(Macrophages)淘汰異常細胞，並由新分裂的細胞取而代之。然而，當遺傳變異干擾這項程序時，癌症就開始了。異常或受損的細胞會忽略上述淘汰機制，恣意地生長與繁殖，且由於這些細胞起初本就是生物體的自體細胞，通常不會因此引發免疫反應，導致其不受限的擴大及繁殖，形成腫瘤。這些腫瘤對於生物體可能是良性或惡性的，較常見的良性腫瘤如皮膚疣等，易切除且不易復發，危險性較小。值得注意的是，良性腫瘤若發生在某些部位且不斷增生擴大，可能會導致組織器官的功能受影響，如腸阻塞或子宮肌瘤等，一旦長在腦部或心臟等難以切除的部位，也有極高的致命風險；惡性腫瘤會釋放血管生長因子，促使腫瘤組織周遭的血管新生，以供其進一步生長與繁殖。增生之餘，惡性腫瘤還會入侵周邊組織，經由血液或淋巴系統持續擴散，稱為遠端轉移(Metastasis)。

針對惡性腫瘤，我們期望能抑制其癌細胞的生長與轉移。在腫瘤環境中，由於快速的代謝以及組織缺氧，癌細胞處於一個慢性發炎的狀態，活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)的濃度也較一般正常細胞高，刺激了許多生長信號的傳導，導致腫瘤的惡化與轉移。研究發現，癌細胞內的粒線體伴護蛋白 Lon 可以透過結合粒線體中的 PYCR1 酵素(pyrraline-5-carboxylate reductase 1) 提升 ROS 的濃度，進而啟動 p38 蛋白激酶與 NF- $\kappa$ B(nuclear factor kappa-light-chain-



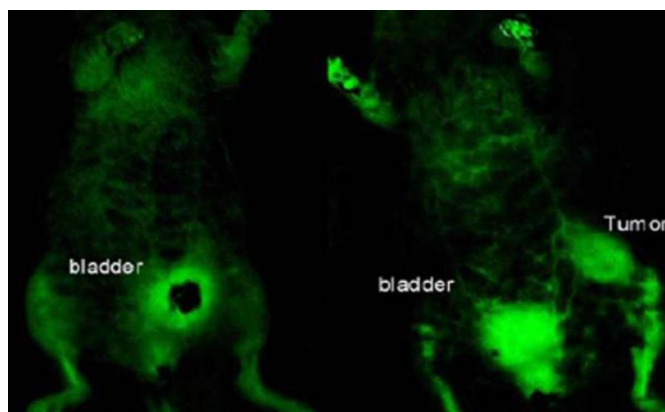
enhancer of activated B cells)分泌發炎因子的程序，這些發炎因子如 TGF- $\beta$ (transforming growth factor Beta)、介白素 4 (interleukin 4, IL-4)、血管內皮生長因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等，皆與誘導癌細胞轉移與血管新生有關[9]，如圖(5)說明。



圖(5) 細胞內的粒線體伴護蛋白 Lon，可以提升活性氧自由基 (ROS) 的濃度。高濃度的活性氧促使腫瘤細胞分泌許多發炎因子，可強化癌細胞的轉移能力、增加血管內皮細胞增生、影響巨噬細胞活性及抑制免疫反應。而活化的巨噬細胞可分泌更多的發炎因子到腫瘤環境中，持續產生活性氧，營造一個有助於癌細胞慢性發炎環境，導致其持續地發展與惡化。

基於以上致病機轉，推測山奈酚藥物用於抗癌治療或許可行。研究顯示，山奈酚能夠抑制發炎因子介白素 4(interleukin 4, IL-4)誘發信號傳導，有效地破壞炎症蛋白並影響發炎因子所導致的細胞增殖[10];也能夠透過降低血管內皮生長因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表現[4]，抑制腫瘤血管新生;也可活化抗氧化酶，誘導人類子宮頸癌 HeLa 細胞進行細胞凋亡[5]。亦可藉由停滯細胞週期中 G2/M 期，來達到抑制癌細胞增殖的效果[6]。以上結果皆顯示了山奈酚作為抗癌藥物的潛力。

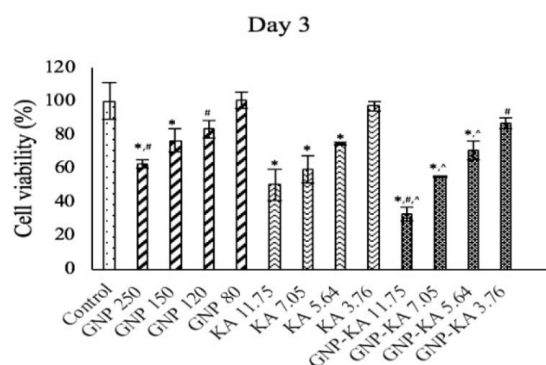
然而，山奈酚作為黃酮類化合物，因其為疏水性藥物，直接使用其生物利用度有待改善提升[8][11]。因此，透過將其包覆於奈米顆粒中，增加藥物的親水性，可望改善上述山奈酚作為抗癌藥物的不足之處。過去有研究表明，將納他黴素(Natamycin, NTM)包覆於奈米顆粒中進行體外及動物實驗，研究結果顯示，奈米顆粒包覆 NTM 的組別相對於 NTM 溶液組，其藥物釋放較為緩慢、藥物含量較高且滯留時間較長[12]。另有研究指出，透過奈米顆粒對抗癌藥物阿黴素(doxorubicin, DOX)的封裝，有助於提升藥物的靶向遞送，能更好地針對腫瘤部位進行給藥，如圖(6)說明[13]。



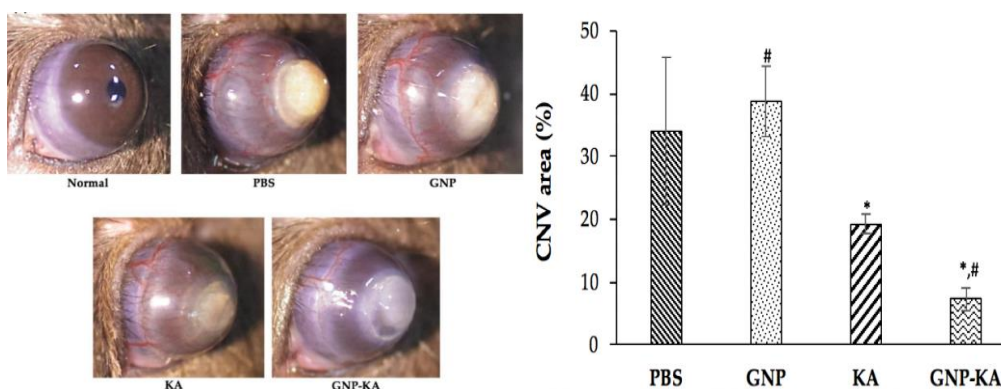
圖(6) 利用 DOX 的螢光特性監測小鼠動物模式體內奈米粒子的分布  
(左)無癌小鼠注射 DOX 奈米顆粒 / (右)乳腺癌小鼠注射 DOX 奈米顆粒

奈米顆粒種類繁多，如微脂體、奈米金顆粒、氧化鐵、高分子奈米顆粒如聚乳酸、幾丁聚醣與明膠等。其中，生醫高分子，明膠(gelatin)，是一種膠原蛋白水解而成的衍生物，本身為一種兩性物質，可以隨著外在環境 pH 值的改變而產生不同的正負電特性，藉由自身帶有電荷的特性，可吸附生物分子或藥物，製備出各種以明膠載體作為載體的奈米藥物相關研究。奈米劑型藥物的優點包含標靶性的持續藥物給予，進而降低給藥頻率。且若奈米顆粒的電荷與欲作用位置的細胞電荷正負相反，則更能延長藥物在目標的滯留時間，以提升治療效果。

在曾靖嬋教授實驗室先前的研究中已證實，以明膠為載體的山奈酚奈米顆粒可以有效抑制血管新生[14]，如圖(7a)所示;其中 GNP 為明膠奈米顆粒、KA 為山奈酚溶液、GNP-KA 為包覆山奈酚的明膠奈米顆粒。圖(7b)中明顯可看到用 GNP-KA 治療的小鼠角膜並未有明顯角膜血管增生情形，再次證實了上述回顧山奈酚抑制血管新生的能力，同時也應證了:藉由明膠的配合，奈米劑型藥物的優勢與潛力相當值得關注。



圖(7a) 細胞活性試驗中顯示，KA 可以有效降低人類臍帶血管細胞(HUVEC)之細胞活力，且 GNP-KA 的抑制效果較 KA 更佳



圖(7b) 經化學燒灼後，以不同藥物治療的角膜血管增生情形，並量化計算眼表血管面積在總角膜中的比例(corneal neovascularization volume, CNV)

#### (四) 研究方法及步驟

研究方法大致可分為體外與體內試驗。體外試驗透過分析山奈酚明膠奈米顆粒(GNP-KA)的各項特性，評估藥物在癌症治療的能力;體內試驗方面，透過實際建立癌症小鼠動物模型，投藥治療並定期觀察癌細胞與藥物在動物體的作用情形，研究藥物的抗癌成效。

##### A. 山奈酚明膠奈米顆粒(GNP-KA)的製備與分析



#### ◆ GNP-KA 製備與保存

以過量丙酮對 A 型明膠(bloom 175)進行去溶劑化，並將沉澱後的明膠重新溶解於水中(1% w/v)，滴定至適當 pH 值後完成明膠純化。隨後加入山奈酚溶液(10 mg/mL in DMSO)與戊二醛(glutaraldehyde, 0.4% w/v)進行 3 小時的交聯[14]。交聯完成後，使用旋轉蒸發器去除多餘的有機溶劑，並將所得的 GNP-KA 藥品儲存於 4°C 冰箱保存，以待進一步觀察與分析。

#### ◆ 奈米顆粒藥物性質分析

使用動態光散射儀(Dynamic Light Scattering, DLS)測量藥物顆粒的粒徑與界面電位(Zeta potential)。並透過穿透式電子顯微鏡(Transmission electron microscope, TEM)進行藥物顆粒型態觀察。最後利用高效液相層析儀(High performance liquid chromatography, HPLC)量化山奈酚藥物濃度，並透過相關公式計算藥物包覆率與載藥率。

#### ◆ 山奈酚明膠奈米顆粒對細胞活性的檢驗

細胞實驗部分，使用小鼠結腸癌細胞 (colon cancer cells, CT-26)，並在含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培養基中進行培養。透過 CCK-8 測定法，利用 WST-8 試劑成色，並透過分光光度計量化活細胞百分比，檢測奈米顆粒對細胞活性的影響，以此避免藥物造成細胞毒性傷害[15][16]。

### B. 癌症動物實驗模型建立與評估

#### ◆ 實驗動物來源

向國家實驗動物中心(National Laboratory Animal Center, NLAC)訂購小鼠，選用 NOD/SCID 小鼠進行動物實驗。

#### ◆ 體內抗癌功效評估

透過將 CT-26 癌細胞懸浮液皮下注射至小鼠背部，讓腫瘤生長到面積約 80 mm<sup>2</sup> 的大小，期間不給予任何治療，完成癌症動物模型的建立。治療開始前，對所有小鼠進行編號與分組，測量並記錄它們的初始體重與初始腫瘤體積。治療過程中，根據不同組別，利用 24g 注射器針頭注射不同藥物至腫瘤組織區域，定時觀察腫瘤組織生長情形與小鼠體重與存活率[16][18]，如圖(8)所示。觀察期結束後，將小鼠犧牲，取出腫瘤組織，及內部臟器，進行組織切片，以觀察癌細胞於腫瘤部位之變化，及是否有遠端轉移到其他臟器的情形。



圖(8) 利用游標卡尺計算小鼠背部腫瘤的長度與寬度，並使用以下公式計算腫瘤體積：

$$\text{Tumor volume}(V)=\text{Length}*\text{Width}*\text{Width}/2$$

## ◆ 動物模式分組說明

根據給予注射不同藥物進行治療，將實驗動物拆分成以下三組:Normal(注射 PBS)、KA(注射山奈酚溶液)、GNP-KA(注射山奈酚明膠奈米顆粒)。

## (五) 預期結果

利用搭載山奈酚之高分子明膠奈米顆粒，可以有效抑制癌細胞生長，結合山奈酚與明膠的各項特性與優點，此複合藥物預期可進一步產生更良好的治療效果。期望藉由這次執行研究計畫的機會，更加熟練奈米藥物的製程，並且精進動物實驗、細胞實驗等技術，最終對開發新型抗癌藥物做出貢獻，在癌症研究領域注入一股新血，造福廣大癌症病患。

## (六) 需要指導教授指導內容

1. 指導山奈酚明膠奈米顆粒的製備流程
2. 指導奈米顆粒性質分析的各種儀器及其原理：
  - 動態光散射儀(Dynamic Light Scattering, DLS)
  - 穿透式電子顯微鏡(Transmission electron microscope, TEM)
  - 高效液相層析儀(High performance liquid chromatography, HPLC)
3. 指導細胞實驗相關流程
  - 指導細胞培養技術
  - 指導細胞活性測試流程
4. 指導癌症動物實驗模型的建立與藥效的評估方式
  - 指導小鼠腹腔麻醉方法
  - 指導小鼠背部皮下注射方法
  - 指導腫瘤細胞觀察與測量方法
5. 指導數據統計分析及研究報告撰寫

## (七) 參考文獻

[1] World Health Organization – Cancer.

Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

[2] 衛生福利部統計處-109 年死因統計結果

Available online: <https://dep.mohw.gov.tw/DOS/cp-5069-61847-113.html>

[3] Muhammad Imran, Bahare Salehi, Javad Sharifi-Rad, Tanweer Aslam Gondal, Farhan Saeed, Ali Imran, Muhammad Shahbaz, Patrick Valere Tsouh Fokou, Muhammad Umair Arshad, Haroon Khan, Susana G. Guerreiro, Natália Martins, and Leticia M. Estevinho. Kaempferol: A Key Emphasis to Its Anticancer Potential. *Molecules*. June 2019

[4] Luo H., Rankin G.O., Liu L., Daddysman M.K., Jiang B.H., Chen Y.C. Kaempferol inhibits angiogenesis and VEGF expression through both HIF dependent and independent pathways in human ovarian cancer cells. *Nutrition & Cancer*. 2009.

[5] Kashafi E., Moradzadeh M., Mohamadkhani A., Erfanian S. Kaempferol increases apoptosis in human cervical cancer HeLa cells via PI3K/AKT and telomerase pathways. *biomedicine and pharmacotherapy*. 2017.



- [6] Yi X., Zuo J., Tan C., Xian S., Luo C., Chen S., Yu L., Luo Y. Kaempferol, a flavonoid compound from *Gynura medica* induced apoptosis and growth inhibition in mcf-7 breast cancer cell. *African Journal of Traditional*. 2016.
- [7] Fengjiao Wang, Lai Wang, Chao Qu, Lianyu Chen, Yawen Geng, Chienshan Cheng, Shulin Yu, Dan Wang, Lina Yang, Zhiqiang Meng, and Zhen Chen. Kaempferol induces ROS-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells via TGM2-mediated Akt/mTOR signaling. *BMC Cancer*. 2021.
- [8] Ezzat, H. M., Elnaggar, Y. S. R., and Abdallah, O. Y. Improved oral bioavailability of the anticancer drug catechin using chitosomes: Design, in-vitro appraisal and in-vivo studies. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019.
- [9] Cheng-Liang Kuo, Han-Yu Chou, Yi-Chieh Chiu, An Ning Cheng, Chi-Chen Fan, Yu-Ning Chang, Chung-Hsing Chen, Shih Sheng Jiang, Nien-Jung Chen, Alan Yueh-Luen Lee. Mitochondrial oxidative stress by Lon-PYCR1 maintains an immunosuppressive tumor microenvironment that promotes cancer progression and metastasis. *Cancer Letters*. 2020.
- [10] Cortes JR, Perez-G M, Rivas MD, Zamorano J. Kaempferol inhibits IL-4-induced STAT6 activation by specifically targeting JAK3. *The Journal of Immunology*. 2007.
- [11] Hu M. Commentary: bioavailability of flavonoids and polyphenols: call to arms. *Molecular Pharmaceutics*. 2007.
- [12] Bhatta R, Chandasana H, Chhonker Y, Rath C, Kumar D, Mitra K, Shukla P. Mucoadhesive nanoparticles for prolonged ocular delivery of natamycin: in vitro and pharmacokinetics studies. *International journal of pharmaceutics* 2012.
- [13] Gulsim K. Kulsharova, Matthew B. Lee, Felice Cheng, Munima Haque, Hyungsoo Choi, Kyekyoon Kim, William D. O'Brien, Jr, and G. Logan Liu. In Vitro and In Vivo Imaging of Peptide-Encapsulated Polymer Nanoparticles for Cancer Biomarker Activated Drug Delivery. *Journal of Controlled Release*. 2013.
- [14] Yu-Lun Chuang, Hsu-Wei Fang, Aditya Ajitsaria, Ko-Hua Chen, Chen-Ying Su, Guei-Sheung Liu and Ching-Li Tseng. Development of Kaempferol-Loaded Gelatin Nanoparticles for the Treatment of Corneal Neovascularization in Mice. *Pharmaceutics*. 2019.
- [15] Yin Ju Chen, Zhi Weng Wang, Tung Ling Lu, Clinton B. Gomez, Hsu Wei Fang, Yang Wei, Ching Li Tseng. The Synergistic Anticancer Effect of Dual Drug- (Cisplatin/Epigallocatechin Gallate) Loaded Gelatin Nanoparticles for Lung Cancer Treatment. *Journal of Nanomaterials*. 2020.
- [16] Ching-Li Tseng, Wen-Yun Su, Ko-Chung Yen, Kai-Chiang Yang, and Feng-Huei Lin. The use of biotinylated-EGF-modified gelatin nanoparticle carrier to enhance cisplatin accumulation in cancerous lungs via inhalation. *Biomaterials*, Volume 30, Issue 20, July 2009.
- [17] Ching-Li Tseng, Ko-Hua Chen, Wen-Yu Su, Yen-Hsien Lee, Chi-Chang Wu, and Fen-Huei Lin. Cationic gelatin nanoparticles for drug delivery to the ocular surface: in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Nanomaterials*, Volume 2013, January 2013.
- [18] Steven Yueh-Hsiu Wu, Kai-Chiang Yang, Ching-Li Tseng, Jung-Chih Chen and Feng-Huei Lin. Silica-modified Fe-doped calcium sulfide nanoparticles for in vitro and in vivo cancer hyperthermia. *Journal of Nanoparticle Research*, volume 13, 2011.

#### 4. 畢業專題研究

### Topic: Evaluating the Potential of Plasmon-Activated Water in Treating Dry Eye Syndrome in Mice

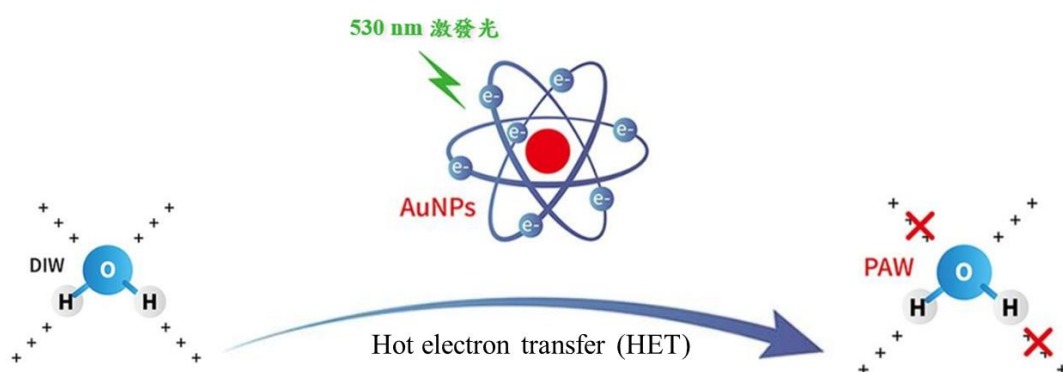
姓名：康凱傑

學號：b812109009

專題指導教授：曾靖嬋

#### (一) 背景或文獻資料回顧

電漿活化水是一種藉由奈米金顆粒在波長為 530 奈米之激發光照射下，產生的表面電漿共振 (surface plasmon resonance, SPR) 產生的熱電子轉移 (Hot electron transfer, HET)，使普通的去離子水 (deionized water, DIW) 轉換成氫鍵強度、自由基顯著下降的電漿活化水 (Plasmon-Activated Water, PAW)，如圖(A)所示。研究指出，相較去離子水，其氫鍵強度顯著下降，並證明其清除自由基與抗發炎的能力。

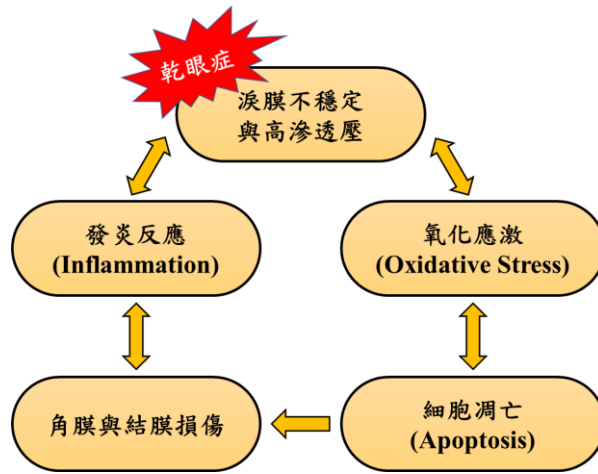


圖(A) 電漿活化水形成示意圖

乾眼症是一種臨床上常見眼科疾病，隨著 3C 產品的普及以及人們生活習慣的改變，如長時間身處於冷氣房中、長時間配戴隱形眼鏡等，種種因素都可能導致眼部的乾澀與缺氧，進一步誘發慢性發炎引起不適。常見的乾眼症症狀包含眼表乾澀、角膜受損、畏光等，嚴重者可能產生眼部疼痛甚至失明等問題。

乾眼症的致病機制主要與淚液高滲透壓和眼表發炎有關。過度表達的炎症細胞激素，如 IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-17、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$ ，將導致負責分泌黏液的杯狀細胞喪失，進而引起淚膜不穩定和淚液高滲透性。淚膜的不穩定性會誘發角膜上皮細胞凋亡，促使眼表炎症細胞激素表達進一步增加，形成惡性循環，如圖(B)所示。





圖(B) 乾眼症惡化循環關係圖

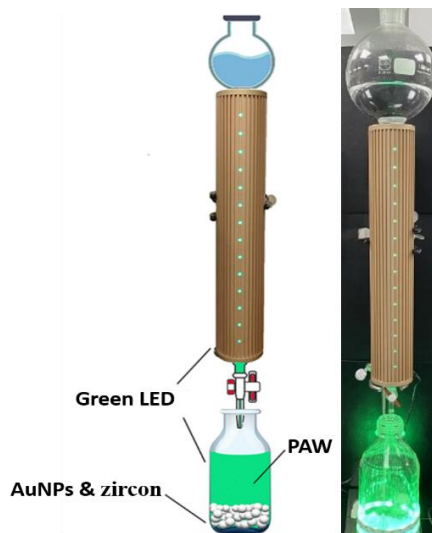
## (二) 專題研究目的

本研究旨在評估並探討將電漿活化水的抗氧化、抗發炎以及有效去除體內自由基等特性應用於治療乾眼症小鼠的潛力與可行性。

## (三) 實驗方法

### (i) 電漿活化水之製備

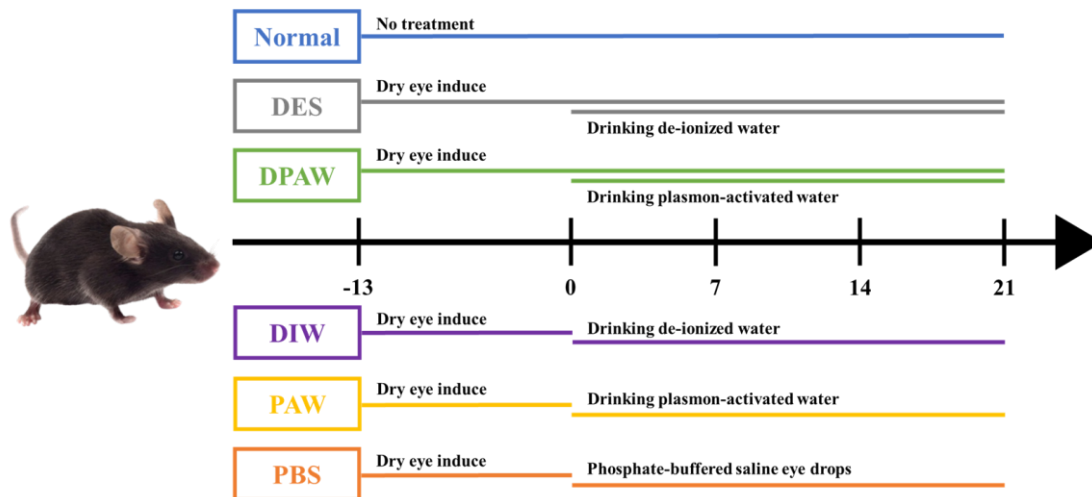
在波長 530 奈米的激發光照射下，利用奈米金顆粒與鋯石，將去離子水進行激發活化並加以過濾，形成電漿活化水，如下圖(C)所示。



圖(C) 電漿活化水製備設備

### (ii) 乾眼症小鼠模型的建立

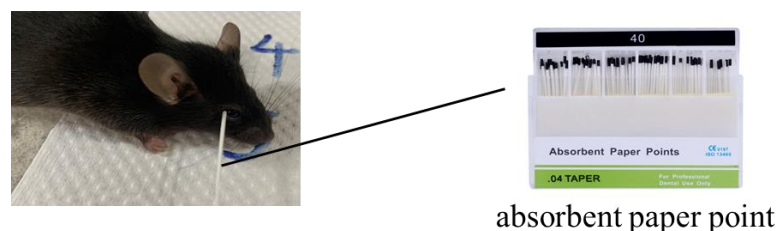
選擇 6-8 周齡的 C57BL/6 小鼠，將 benzalkonium chloride (BAC, 0.1%) 進行雙眼點藥，每天兩次，持續 14 天，完成乾眼症誘導，並在誘導完成後，分別以不同治療手段進行 21 天的持續治療，探討各組別間的療效差異，評估治療手段的可行性，詳細組別資訊如下圖(D)所示。



圖(D) 六組小鼠處置手段 Normal (no treatment)、DES (induction + drinking water)、DPAW (induction + drinking PAW)、PBS (induction then drop phosphate-buffered saline)、DIW (induction then drinking water)、PAW (induction then drinking PAW)

### (iii) 淚液分泌量測

使用 absorbent paper points，插入小鼠下眼窩處約 20 秒，以游標卡尺紀錄所吸收的淚液量如下圖(E)所示。



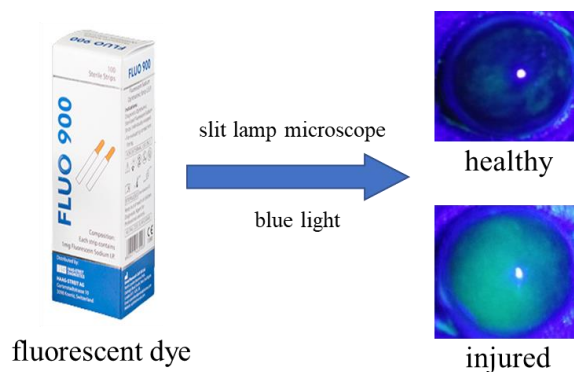
圖(E) 小鼠淚液測量圖示說明

### (iv) 眼壓量測

利用手持式眼壓儀測量小鼠眼壓情形，透過探針垂直輕觸小鼠右眼眼表，每次測量三組數據後紀錄。

### (v) 角膜螢光素染色與定量分析

使用顯微裂隙燈進行拍攝，在白光光源與藍光光源下觀察小鼠眼表受損或恢復情形。透過螢光染劑對小鼠眼表進行染色，若有角膜受損情形，在藍光光源下可以看出螢光素的累積與沉澱，如圖(F)所示。



圖(F) 健康狀態與受損狀態下螢光素的不同沉澱情形

針對眼表沉澱之螢光素，我使用 MATLAB 撰寫影像處理程式，分離出綠色螢光訊號並計算小鼠眼表的平均螢光強度(mean fluorescence intensity, MFI)，進行定量分析。

#### (vi) 角膜上皮層厚度量測

二十一天療程結束後，針對各組別小鼠右眼眼球進行手術提取，並透過石蠟包埋、組織切片以及蘇木精-伊紅染色法 (hematoxylin and eosin stain, H&E stain) 進行組織切片。隨後在顯微鏡下觀察小鼠眼球組織切片並計算中央角膜上皮層厚度 (central corneal epithelial thickness)，評估各組別之眼表最終受損或恢復情形，如圖(G)所示。



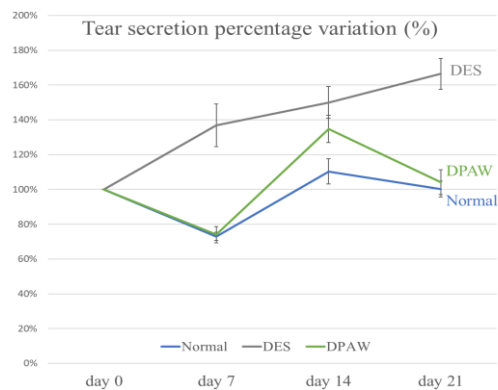
圖(G) 角膜上皮層厚度量測流程示意圖

#### (四) 結果與討論

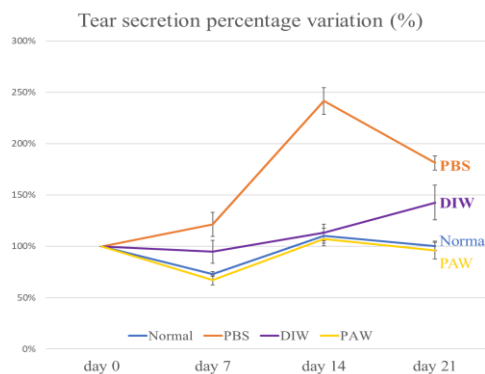
分別於乾眼症誘導前(day -13)、乾眼症誘導後(day 0)、療程開始後的第七天(day 7)、第十四天(day 14)、第二十天(day 21)進行上述(三-iii)~(三-v)數據的蒐集，並以 day 0 為比較基準點，計算百分比變化，進行療效的分析與評估，結果如下。



## (i) 淚液分泌情形



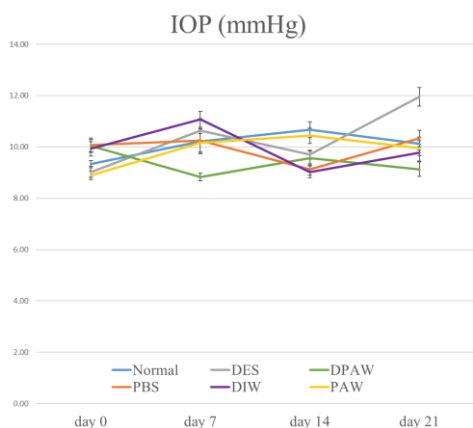
	day 0	day 7	day 14	day 21
Normal	100%	73±2.40%	110±7.20%	100±4.54%
DES	100%	137±12.31%	150±9.16%	166±8.94%
DPAW	100%	74±4.67%	135±7.80%	104±7.21%



	day 0	day 7	day 14	day 21
Normal	100%	73±2.40%	110±7.20%	100±4.54%
PBS	100%	122±11.72%	242±13.02%	181±6.90%
DIW	100%	95±10.97%	113±8.10%	143±16.95%
PAW	100%	67±4.82%	107±6.75%	96±8.10%

淚液數據顯示，DPAW 組別中，在持續進行乾眼症誘導下，於療程開始一周後出現淚液量恢復的情形;而在 PAW 組別中，則無明顯的淚液量恢復或驟減的情形發生。

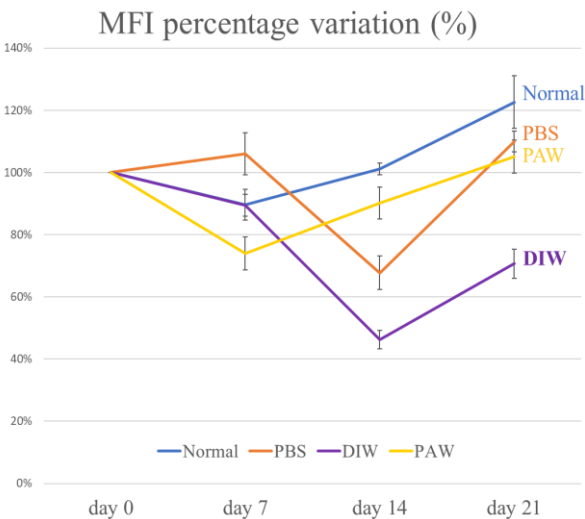
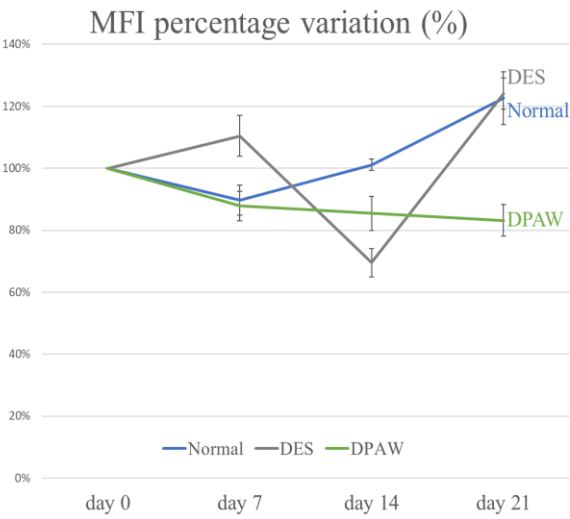
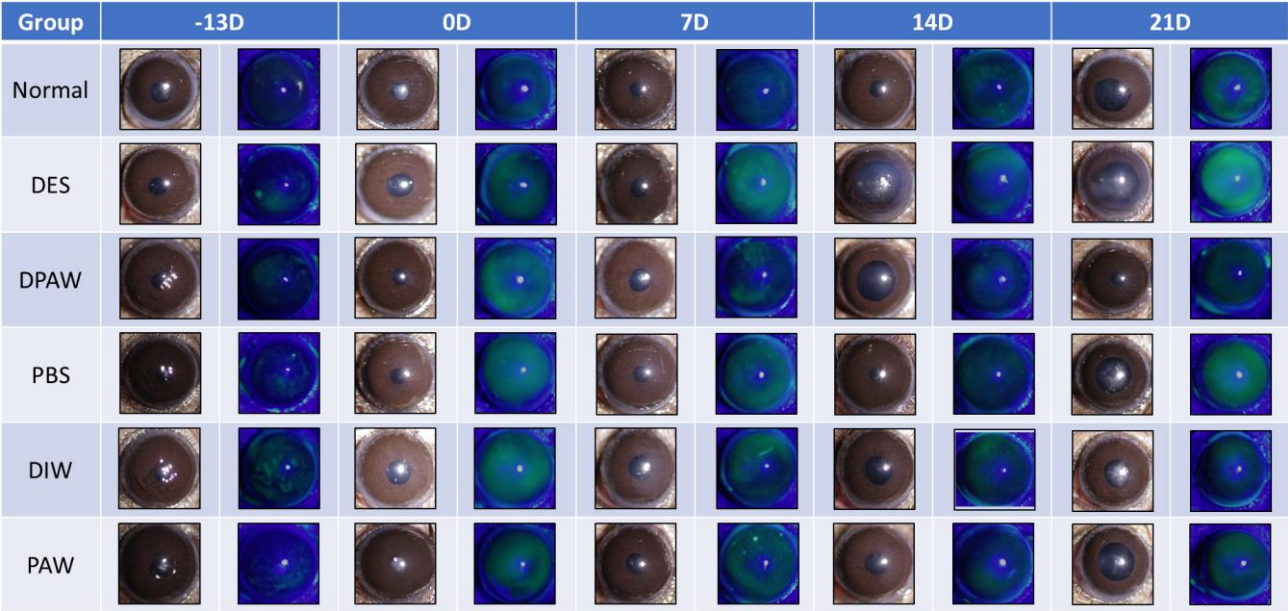
## (ii) 眼壓情形



IOP	day 0	day 7	day 14	day 21
Normal	9.33±0.14	10.21±0.48	10.67±0.31	10.13±0.26
DES	9.03±0.21	10.63±0.47	9.70±0.17	11.96±0.36
DPAW	10.04±0.25	8.83±0.15	9.56±0.27	9.13±0.28
PBS	10.08±0.26	10.25±0.46	9.12±0.22	10.33±0.32
DIW	9.93±0.28	11.08±0.31	9.03±0.22	9.78±0.32
PAW	8.90±0.17	10.17±0.36	10.44±0.30	9.96±0.29

各組別在療程期間，眼壓數據皆落於 8-13mmHg 之正常值區間，變化起伏亦輕微，顯示各組別無嚴重的異常狀況產生。

眼表觀察與螢光素沉澱情形

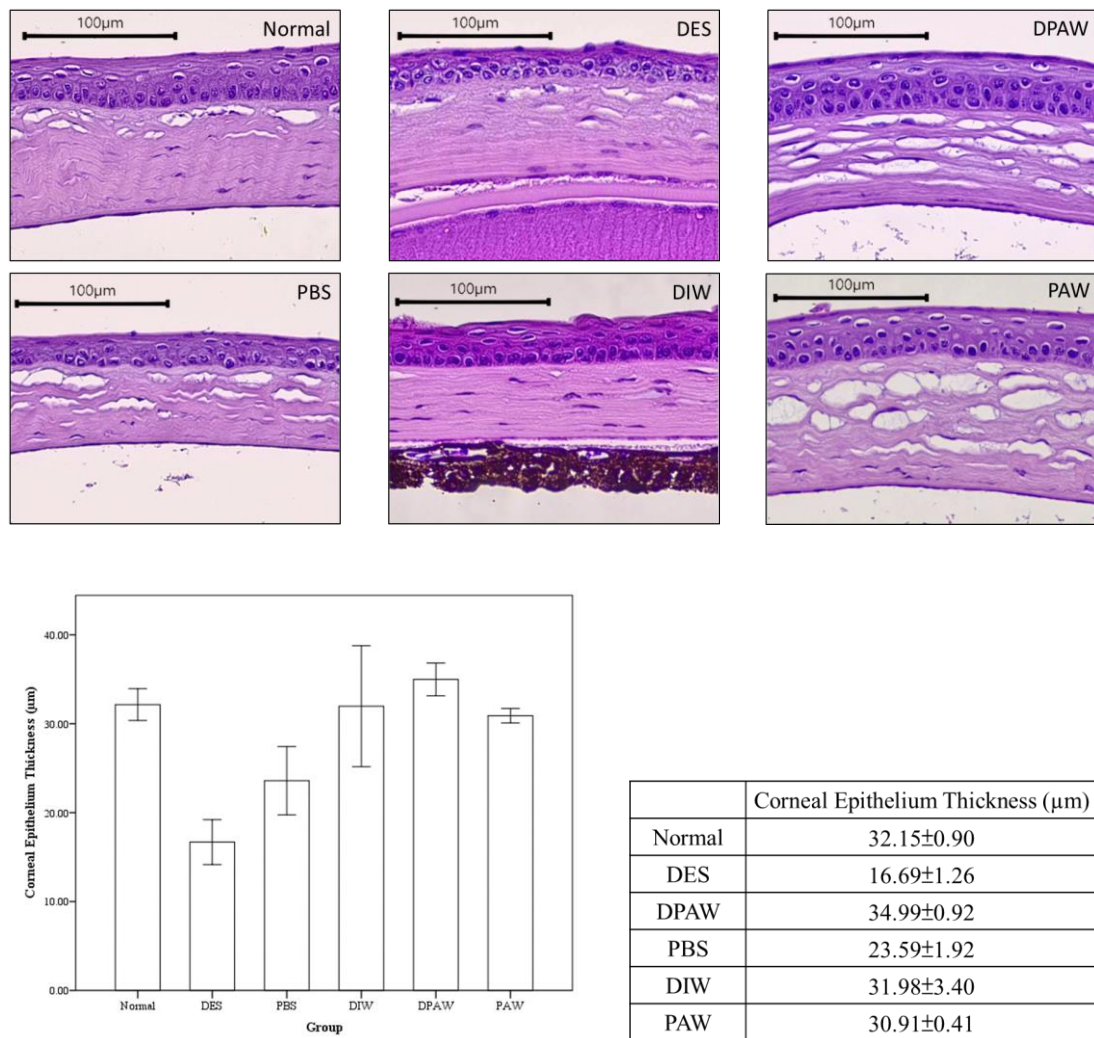


MFI	day 0	day 7	day 14	day 21
Normal	100%	90±4.93%	101±1.86%	123±8.46%
DES	100%	110±6.51%	69±4.60%	124±5.04%
DPAW	100%	88±4.72%	85±5.50%	83±5.13%

MFI	day 0	day 7	day 14	day 21
Normal	100%	90±4.93%	101±1.86%	123±8.46%
PBS	100%	106±6.82%	68±5.45%	110±3.35%
DIW	100%	89±3.54%	46±2.98%	71±4.76%
PAW	100%	74±5.25%	90±5.16%	105±5.23%

透過螢光素沉澱的觀察，可看出 day 0 時已具有肉眼可見的乾眼症成功誘導。而在療程結束後，可看出在 DPAW、DIW 組中，角膜受損程度下降，而 PAW 組則維持無持續惡化的情形

### (iii) 角膜上皮層厚度情形



透過觀察角膜上皮層厚度可知，DES 組與 DPAW 組間角膜上皮厚度呈顯著差異，推測在乾眼症持續的誘導下，電漿活化水可能具有抵抗眼表受損情形的潛力；PBS 組與 PAW 組間亦呈顯著差異，推測飲用電漿活化水的恢復情形應優於使用磷酸緩衝液濕潤眼表。

### (五) 結論

綜合以上數據分析，相較於同樣處於乾眼誘導狀態的 DES 組別，我們清楚地觀察到 DPAW 組別中的小鼠在持續乾眼誘導下展現出優越的數據表現。這表明，在特定條件下，飲用電漿活化水對小鼠乾眼症的發展可能具有積極的影響。

然而，在進行 PAW 組與 DIW 組的比較時，我們並未觀察到飲用電漿活化水相對於飲用去離子水有著顯著優勢的現象。這結果可能顯示出，在這一特定研究設計中，電漿活化水在治療乾眼症方面並未呈現出明顯的效果。

總結來看，雖然我們無法確定電漿活化水對乾眼症治療的確切功效，但幸運的是，我們也未能排除其在預防乾眼症惡化方面可能具有的潛在能力。這一發現為未來進一步深入研究提供了有價值的方向，以揭示電漿活化水在乾眼症管理中的真正作用。



## (六) 參考文獻

- (1) Chang, C.-C., et al. (2022). "Functional Plasmon-Activated Water Increases *Akkermansia muciniphila* Abundance in Gut Microbiota to Ameliorate Inflammatory Bowel Disease." *International Journal of Molecular Sciences* 23(19): 11422.
- (2) Chen, Yi-Zhou, et al. "Development of lutein-containing eye drops for the treatment of dry eye syndrome." *Pharmaceutics* 13.11 (2021): 1801.
- (3) Chen, H.-C., et al. (2014). "Active and stable liquid water innovatively prepared using resonantly illuminated gold nanoparticles." *ACS nano* 8(3): 2704-2713.
- (4) Cheng, C.-H., et al. (2019). "Plasmon-activated water reduces amyloid burden and improves memory in animals with alzheimer's disease." *Scientific Reports* 9(1): 13252.
- (5) Tsai, H.-Y., et al. (2015). "One-step fabrication of SERS-active substrates based on plasmon-induced activated water, with improved activity and excellent reproducibility." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 750: 27-35.
- (6) Yang, C.-P. and Y.-C. Liu (2018). "Therapeutics for inflammatory-related diseases based on plasmon-activated water: a review." *International Journal of Molecular Sciences* 19(6): 1589.
- (7) Chen, HC., Lin, HC., Chen, HH. et al. Innovative strategy with potential to increase hemodialysis efficiency and safety. *Sci Rep* 4, 4425 (2014).
- (8) Henriksson JT, McDermott AM, Bergmanson JP. Dimensions and morphology of the cornea in three strains of mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Aug;50(8):3648-54.