

# 以奈米囊泡包覆蝦紅素對抗黑色素癌細胞癌

**一、摘要:** 近年發現，以腫瘤本身或分泌物作為藥物載體時，具有高度生物相容性、增強藥物遞送至特定細胞趨向性等優點。本研究旨在於研發腫瘤細胞膜分泌特性的奈米囊泡，以包覆目標物加強癌症治療效果。因前期研究發現：蝦紅素具有極高抗氧化及抗腫瘤性，故選擇蝦紅素作為抗癌藥物。蝦紅素奈米囊泡載體的製程方式是以黑色素癌及蝦紅素經適當比例混合，透過擠壓法，再去除癌細胞遺傳物質及發炎因子。在成果方面：蝦紅素奈米囊泡與黑色素癌細胞共同培養後證實，蝦紅素奈米囊泡抑制黑色素癌細胞生長及轉移的能力明顯優於等量蝦紅素，且對於人體正常細胞無顯著傷害性，顯示囊泡具有選擇性運送的傾向。我們的研究說明了蝦紅素奈米囊泡有成為抗癌藥物的潛力。

**二、探究題目與動機:** 黑色素癌在早期檢測非常困難，因為黑色素癌的初期型態與一般皮膚上的斑或痣沒什麼差別，然而黑色素癌隨著時間經過，擴張速度極快。患者身上會迅速出現大量凹凸不平的小圓包，惡化程度快再加上現存治療藥物的效果不佳，且治療的費用極高，使患者極容易輕忽它並放棄接受治療，導致它的死亡率占全部皮膚癌之中最高。根據衛生福利部統計，以 2015 年來說，黑色素癌佔了整體皮膚癌死亡率的 60%，是當今非常棘手的癌症。目前治療黑色素癌的方法有外科手術、化學療法、放射療法、免疫療法等，但這些治療方式往往都伴隨著強烈的副作用，且無法徹底根治黑色素癌，故我們查找了將抗癌藥物有效送入目標細胞中的其他方法。在奈米運輸科技中，研究人員會將目標藥物或促進腫瘤細胞死亡的蛋白質包覆於奈米藥物載體中進行治療。相關文獻顯示將腫瘤本身的細胞膜製成奈米等級大小的囊泡具有作為藥物載體的潛力，因為奈米囊泡具有類似細胞膜的結構（如蛋白質、脂質等），能表現出更好的生物相容性，其組成的蛋白質大多來自於原細胞本身。於是我們想要以黑色素癌細胞製成奈米囊泡，希望所製成的奈米囊泡可融合於黑色素癌細胞，以增強抗癌藥物的作用，將藥物有效且有目標性的送入癌細胞，並有效消滅癌細胞。因此經過討論後，決定以蝦紅素作為抑制黑色素癌的前趨藥物，以及利用黑色素癌細胞做為奈米運輸載體，希望可以達到有效治療黑色素癌的目的。

## 三、探究目的與假設

本次研究的假設為包覆蝦紅素的奈米囊泡能有效的抑制癌細胞的遷移及轉移。我們將本研究之假設分為下方所條列之四點，以利逐步驗證：

1. 檢測蝦紅素是否有抑制、消滅黑色素癌的效果。
2. 利用囊泡擠壓器製作以黑色素癌細胞自身為外包膜的奈米囊泡，並確

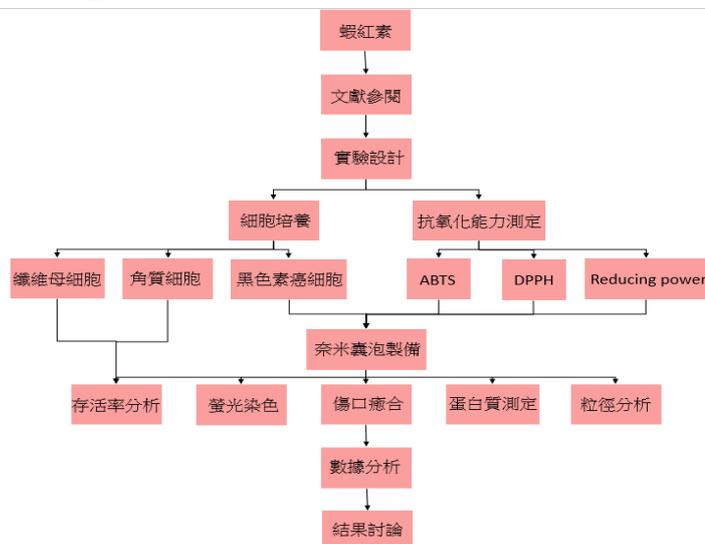
認其抑制、殺死黑色素癌的效果。

3. 觀察黑色素癌是否能專一性接收蝦紅素奈米囊泡。
4. 比較蝦紅素奈米囊泡與等量純蝦紅素對抗黑色素癌的效果。

#### 四、探究方法與驗證步驟

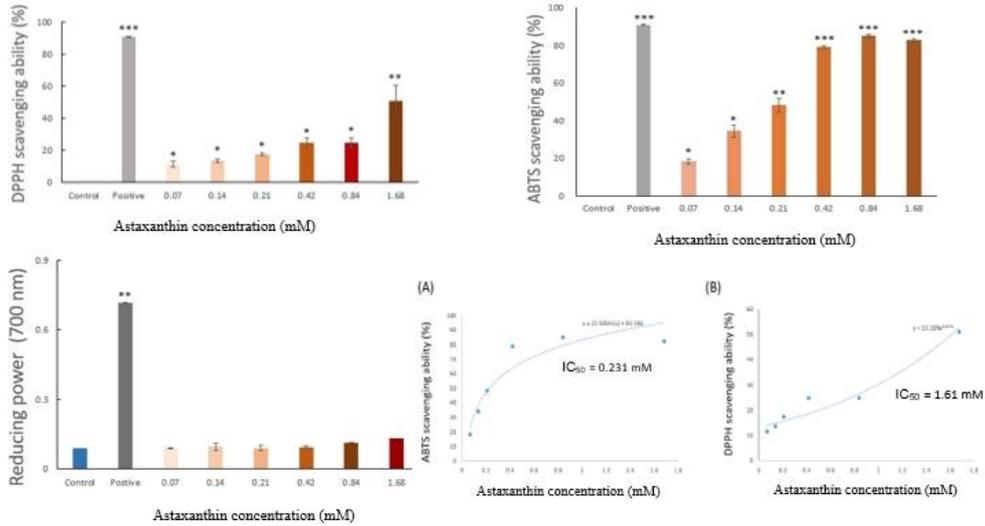
本次研究，分為四階段：

1. 首先檢測我們所使用的蝦紅素是否有強抗氧化能力，設計三種不同的實驗來驗證，分別是 DPPH、ABTS、Reducing power 清除率測試。
2. 接著我們選用黑色素癌細胞，作為奈米囊泡的載體，首先降培養皿上的細胞刮除後，將微量離心管放入離心機中進行 1200 rpm，10 分鐘，讓黑色素癌細胞沉澱於離心管的底部。接著進行細胞計數，以控制加入蝦紅素的量及細胞數目，再將蝦紅素與細胞進行 30 分鐘的超音波震盪，因超音波有頻率高、波長短、穿透力強的特性，能使萃取蝦紅素與細胞達到充分混合接觸，在 30 分鐘後每 10 分鐘混合 (pipette) 一次，一共進行 90 分鐘。再將蝦紅素與黑色素癌細胞的混合液從離心管移到培養基中，放入照射 UVB 照射的儀器，進行 2 分鐘的 UVB 光照射破壞黑色素癌細胞的 DNA。再將蝦紅素與黑色素癌細胞的混合液放入奈米擠壓器，進行來回擠壓 5 次，所使用的是 10  $\mu\text{m}$  及 5  $\mu\text{m}$  聚碳酸酯(PC)膜，最後，進行超高速離心，進行 25,000 rpm、4  $^{\circ}\text{C}$ 、2 小時。
3. 離心完後，接著進行蛋白質定量及 DLS 粒徑分析，確認我們的藥物是奈米級的囊泡。
4. 最後，設計三項實驗來驗證包覆蝦紅素的奈米囊泡能否有效的抑制黑色素癌細胞，分別是細胞存活率分析、細胞遷移率分析和細胞螢光染色。

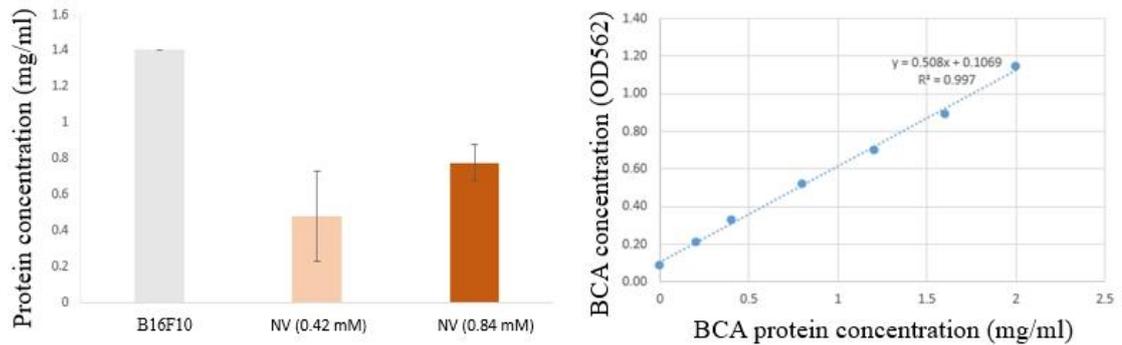


圖一：  
此為本實驗之研究架構圖

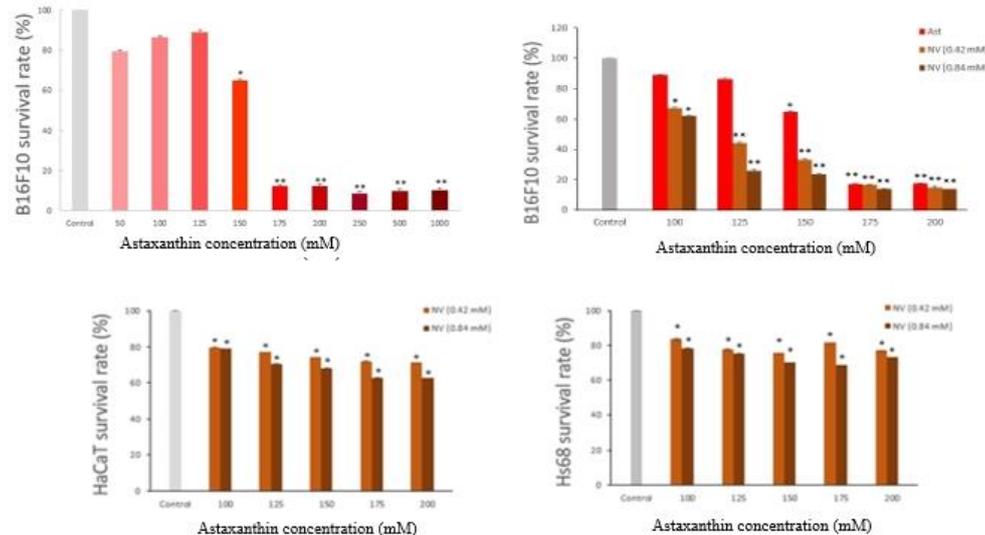
抗氧化能力測定



圖二:此為抗氧化能力測定，分別是 DPPH、ABTS、Reducing power 清除率測試，而圖(A)及(B)為 DPPH、ABTS 之自由基清除率的 IC50。DPPH 之控制組(control)為二次水；正控制組(positive)為 100 μm 維生素。ABTS 之控制組(control)為二次水；正控制組(positive)為 EDTA。Reducing power 之控制組(control)為二次水；正控制組(positive)為 BHA。樣品與 control 相比：\* P < 0.05；\*\* P < 0.01；\*\*\* P < 0.005。

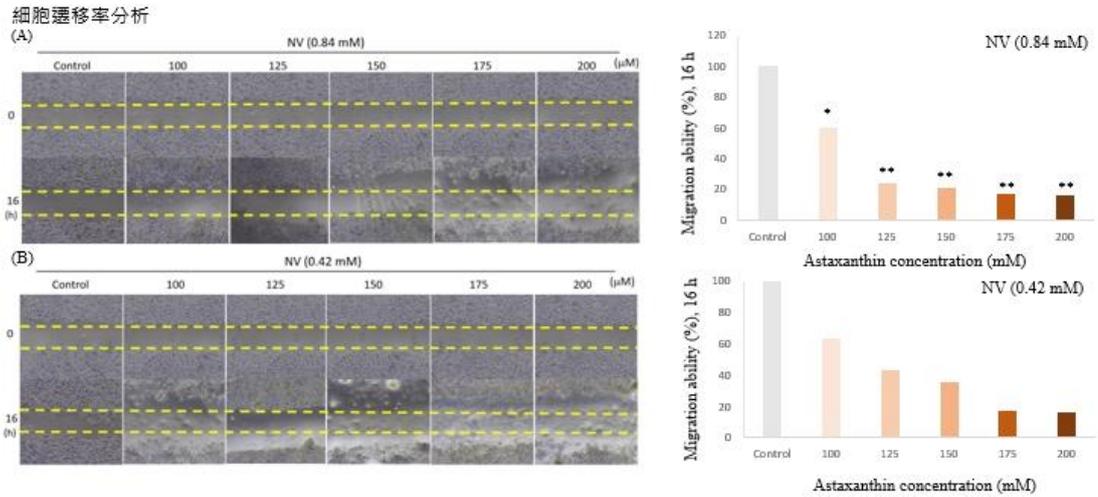


圖三:此為 BCA 蛋白質定量分析  
細胞毒殺率分析

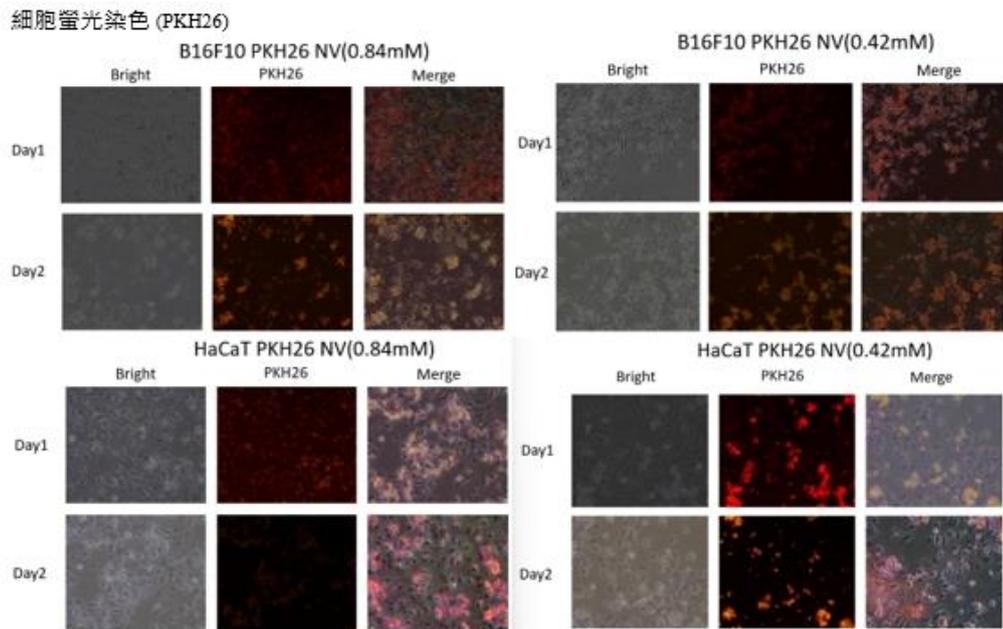


圖四:此為細胞存活率分析，分別為純蝦紅素毒殺黑色素癌細胞、蝦紅素奈米囊泡毒殺黑

色素癌細胞、角質細胞(HaCaT)、纖維母細胞(Hs68)。蝦紅素奈米囊泡濃度分別為 NV(0.84mM)、NV(0.42mM)。樣品與 control 相比：\* P < 0.05；\*\* P < 0.01；\*\*\* P < 0.005。



圖五:此為細胞遷移率分析，圖(A)及(B)分別是蝦紅素奈米囊泡於 NV (0.84mM)及 NV (0.42 mM)濃度下，與黑色素癌細胞與培養 16 小時的細胞型態。右圖兩張分別為細胞遷移率的柱狀圖表。樣品與 control 相比：\* P < 0.05；\*\* P < 0.01；\*\*\* P < 0.005。



圖六:此為細胞螢光染色之照片，將蝦紅素奈米囊泡預染 PKH26 後，與黑色素癌細胞及角質細胞共培養 24 小時的結果。

## 五、結論與生活應用

1. 首先，在抗氧化能力實驗，我們做了三項實驗來證明蝦紅素具有優良的抗氧化能力，分別為 DPPH、ABTS、Reducing power，由 DPPH、ABTS 的實驗數據顯示出，當蝦紅素濃度越高時，其清除自由基的能力也越好，證明了蝦紅素具有強抗氧化能力。查找文獻後發現蝦紅素能使細胞內自由基與

抗氧化物失去平衡，進一步給癌細胞更多的氧化壓力來抑制其生長。在製造奈米囊泡的過程中，為了確認奈米囊泡的性質，以 BCA 蛋白質測定及 DLS 粒徑分析作為實驗依據。在 BCA 蛋白質測定實驗中，我們肯定奈米囊泡上具有某些蛋白質是來自於原先黑色素癌細胞本身的，再經過測量後與原始的蛋白質含量(1.4 mg/ml)相比，NV (0.84 mM) 及 NV (0.42 mM) 分別為 60% 及 35%。在 DLS 粒徑分析實驗中證實自製的奈米囊泡確實屬於奈米等級的載體，大小約介於 400~1600 nm 之間，而造成 NV (0.84 mM) 及 NV (0.42 mM) 大小差異大的原因，推測應為蛋白質的相近物質產生群聚與黏附效應，導致 NV (0.84 mM) 大小為 NV (0.42 mM) 三倍左右。一般外泌體的大小介於 50 ~ 200 nm 之間，雖然製成的囊泡比外泌體體積大了約兩倍左右，但依舊為奈米等級大小，此一特點提供了更大的藥物與細胞接觸的表面積，使細胞對於囊泡內藥物的吸收度大幅提升。為了測試包覆蝦紅素的奈米囊泡是否會抑制黑色素癌細胞的生長。我們將不同濃度蝦紅素溶液與蝦紅素奈米囊泡進行細胞存活率測試。結果顯示，在有被奈米囊泡包覆的情況下，黑色素癌的死亡率較高。此實驗證明了，使用奈米囊泡作為藥物載體，可能具有加強藥物效果的潛力。此外，我們想知道囊泡包覆的蝦紅素對非黑色素癌細胞是否也具有抑制的特性，我們也對角質細胞(HaCaT) 與纖維母細胞(Hs68)進行存活率測試，在數據中證實 HaCaT 和 Hs68 對蝦紅素的接受度較小，細胞存活率幾乎都在 70% 以上。這項結果代表著蝦紅素奈米囊泡不會使其他細胞的存活率顯著下降殺死正常細胞，但對於黑色素癌細胞卻有極高的致死率，此項結果代表蝦紅素奈米囊泡具有一定程度的細胞專一性。再者，透過細胞遷移實驗，可以觀察到蝦紅素奈米囊泡，能在 16 到 18 小時內，抑制癌細胞的生長，並在 24 小時以後造成細胞的凋亡，證實了蝦紅素奈米囊泡能有效抑制癌細胞的轉移及遷移；而透過螢光染色可以觀察到螢光染劑進入到黑色素癌細胞，但是並未進入 HaCaT 細胞，代表著我們利用色素瘤細胞本身所製成奈米囊泡是可以與一般的黑色素癌細胞互相融合，把囊泡內所包覆的蝦紅素藥物直接送進黑色素癌細胞中，而從螢光染色的圖中也可以觀察到經螢光染色後的奈米囊泡完整的包覆於黑色素癌細胞周圍更證實了奈米藥物有著更佳吸收度。而其他細胞並未發生此種狀況。一些研究表明，細胞膜 (奈米囊泡膜) 上有某些細胞標誌 (CD 蛋白) 及整合素(integrin)是只有黑色素癌細胞特有。因此本實驗顯示出奈米囊泡藥物的運送具有專一性與此有關。

## 2. 未來與展望:

(1) 未來希望透過靜脈注射的方式，打入人體當中，透過人體體循環，讓囊

泡有效地進入皮膚的表皮層與毛囊中，進一步使蝦紅素藥物有效的抑制黑色素癌細胞的生長及擴散，如此一來患者也可以降低手術心理的傷害以及術後所服用的藥物副作用，此外患者所需支付的醫療費用及癌症治療的風險都會下降。

- (2) 奈米囊泡中可以包覆不同藥物(如化療藥，光敏劑，血管增生抑制劑、或小片段的 RNA)來達到治療的效果也可以嘗試以不同細胞融合一起擠壓成 nv，如與紅血球細胞一起擠壓，讓奈米囊泡可以在血液循環中待久一點，與巨噬細胞及殺手細胞一起擠壓，讓奈米囊泡帶有上面的 receptor 能藉以找到癌細胞，來增強奈米囊泡於癌細胞治療的功效改善奈米囊泡標靶性的問題後。

## 六、參考資料

1. 沈馨仙、郭旻奇、張思平、鍾佳玲、楊榮季(2010)抗氧化劑及常見之抗氧化活性評估。臺北長庚紀念醫院、林口長庚紀念醫院。
2. 汪徽五(2012)抗癌藥品的奈米給藥傳輸
3. 周鑫佑、吳聖馨、王惠民(2020)蝦紅素回顧：合成、萃取以及在皮膚醫藥上之應用。化工；67卷1期，P54-63。
4. Rastrelli, M., Tropea, S., Rossi C. R., Alaibac M. (2014). Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo*, 28(6), 1005-11.
5. Mishra, H., Mishra, P. K., Ekielski, A., Jaggi, M., Iqbal, Z., Talegaonkar, S. (2018). Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. *J Cancer Res Clin Oncol*, 144(12), 2283-2302, doi: 10.1007/s00432-018-2726-1.
6. Middleton, R. J., Grob, J., Aaronson, N., Fierlbeck, G., Tilgen, W., ..... Muller, M. (2000) Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol*, 18(1), 158-66. doi: 10.1200/JCO.2000.18.1.158