

編號：CCMP98-RD-008

黃連及鹽酸小檗鹼奈米微脂體的抗人類 肝癌細胞作用之分析與細胞凋亡機制之探討

溫曉薇

國立中興大學

摘 要

本計畫內容藉由細胞實驗與動物實驗評估微脂體包埋的黃連萃液或鹽酸小檗鹼水溶液是否可提高對人類肝癌的抑制能力。首先比較黃連萃液與鹽酸小檗鹼水溶液經微脂體包埋與未經包埋的藥物對 HepG2 的傷害效力，結果顯示藥物對 HepG2 的抑制力為鹽酸小檗鹼奈米微脂體> 黃連奈米微脂體> 黃連萃液> 鹽酸小檗鹼水溶液，因此選擇鹽酸小檗鹼奈米微脂體作為抗癌藥物。在藥物製備中發現鹽酸小檗鹼奈米微脂體以薄膜水合法配合擠壓過濾方式可得到較高的包覆率及較佳的粒徑分布。而所得鹽酸小檗鹼奈米微脂體在濃度為 5 $\mu\text{g/mL}$ 下，發現對正常肝細胞 Clone 9 無顯著傷害，但可使肝腫瘤 HepG2 細胞存活率下降至 50%。而以此鹽酸小檗鹼奈米微脂體加入 HepG2 細胞中會造成粒線體膜電位下降、caspase 3 活性表現增加，且細胞出現 Sub-G1 期，凋亡率隨鹽酸小檗鹼奈米微脂體的濃度增加而增加，由以上結果可推測鹽酸小檗鹼奈米微脂體是以 caspases mitochondria dependent pathway 促使 HepG2 細胞進入細胞凋亡。此外，接種 HepG2 細胞於裸鼠，在誘導產生腫瘤後將裸鼠分成鹽酸小檗鹼奈米微脂體組(0.15 和 0.6 mg/kg)及鹽酸小檗鹼水溶液組(0.6 mg/kg)，以腹腔注射方式給藥 7 天。裸鼠犧牲後，加藥組和控制組(有腫瘤未給藥)相比，鹽酸小檗鹼奈米微脂體與鹽酸小檗鹼溶液對腫瘤並無明顯抑制效果。但是在鹽酸小檗鹼水溶液組別中發現，犧牲後的裸鼠肝臟重量較輕且有較高的肝指數(AST 和 ALT)和腎指數(creatinin)。除此之外，在血漿中只有鹽酸小檗鹼奈米微脂體組別可偵測到鹽酸小檗鹼(0.06~0.08 $\mu\text{g/mL}$)的存在。由以上結果得知鹽酸小檗鹼微脂體對生物體較無副作用，且經包埋後可增加在體內的循環時間。為使療效增加，特將鹽酸小檗鹼奈米微脂體濃度提高到 4 mg/kg，並進行 21 天的毒性與療效的預試驗，結果顯示裸鼠體重量及生理表現並無差異，而腫瘤體積變化上，鹽酸小檗鹼奈米微脂體和控制組相比其腫瘤體積較小，其生長抑制效果為 47.1%，故在此濃度下鹽酸小檗鹼奈米微脂體對裸鼠生理功能並無傷害，並具有抑制肝腫瘤生長的能力。

關鍵詞：黃連、鹽酸小檗鹼、鹽酸小檗鹼微脂體、抗腫瘤、HepG2 細胞、細胞凋亡

Number: CCMP98-RD-008

Analysis of Anticancer Effects of Huang Lian and Berberine Liposomal Nanovesicles on Human Hepatocellular Carcinoma and Investigation of their Apoptotic Pathways

Hsiao-Wei Wen

National Chung Hsing University Department of Food Science and
Biotechnology

ABSTRACT

The objective of this study is to apply liposomal nanovesicles as the drug carrier to encapsulate berberine or huanglian extracts, in order to enhance its anticancer effects on HepG2 cells in vitro and in vivo. First, the MTT results show that the sequence of inhibition rates to HepG2 cells was berberine liposome > huanglian liposome > huanglian > berberine. Thus, berberine liposome was selected as the anticancer drug in this study. Moreover, to optimize the preparation of berberine liposomes, different methods were applied and the batch made by the thin-film hydration/extrusion method provided the highest encapsulation efficiency of berberine as well as the most narrow particle size distribution. When comparing the survival rates of treated HepG2 cells (50%) to treated Clone 9 cells (99.5%), 5 ug/mL berberine liposomes showed non-significant side effect to the normal cells. After the addition of berberine liposomes into HepG2 cells, the mitochondrial membrane potential decreased, caspase-3 activity increased, and the increase of sub-G1 phase and apoptotic rate were observed. Thus, berberine liposomes might induce apoptosis in HepG2 cells through the caspase/mitochondria dependent pathway. Furthermore, by using HepG2 cancer cells on a murine xenograft model, berberine liposome (0.15 and 0.6 mg/kg of body weight), and berberine (0.6 mg/kg of body weight) were i.p. injected daily for 7 days. Compared with the control group (tumor without treatment), berberine liposome and berberine had no significant inhibitory effect. However, the berberine group did have lighter liver and higher concentrations of AST, ALT, and creatinine. Additionally, plasma berberine could only be detected in berberine

liposome groups (0.06~0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$) but not in the berberine group. Therefore, these results showed that liposome could reduce the side effect of berberine as well as increase the retention time of berberine in plasma. In order to increase the therapeutic effect of berberine liposome, the concentration of berberine liposome was increased to 4 mg/kg in the second trail. In a 21-day preliminary toxicology study of 4 mg/kg of berberine, no significant changes of body weight and daily activities of treated mice were found. Moreover, compared to the control group, the tumor volume of berberine liposome group was smaller, and the inhibition rate was about 47.1%. At this high dose (4 mg/kg), berberine liposome inhibited hepatoma growth and had no significant side effects. Thus, it could be an anticancer medicine for treating liver cancer.

Keywords: Huanglian, Berberine, Berberine Liposome, Anticancer, HepG2 cell, Apoptosis

壹、前言

根據行政院衛生署的統計資料顯示，民國 75 至 97 年間癌症(惡性腫瘤)為臺灣地區十大死因之首，死亡人數與所佔比例亦逐年攀升，從 75 年的 16,559 人(佔總死亡人數 18%)至 97 年成長為 38,913 人(佔總死亡人數 27%)。而肝癌位居癌症死因的前兩名，約占癌症死亡人數的五分之一，對國人健康造成極大威脅。肝細胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)，亦稱為肝癌(hepatoma)，是臨床最常見的惡性腫瘤之一。肝癌可分為三種類型：(1)肝細胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)：為肝癌中最常見的一型，約占 80% 以上；(2)膽管細胞癌(cholangiocarcinoma)：占肝癌的 5%~20%；(3)混合型肝癌：由肝細胞癌及膽管細胞癌組成。肝癌在流行病學的調查發現除與地理環境有關，與飲食習慣也有關聯(如酗酒)，而病毒性肝炎患者更是罹患肝癌高風險群，主為 B 型肝炎(HBV)及 C 型肝炎(HCV)的患者(Key *et al.*, 2002)。臺灣成人肝癌病患者有 95% 以上與 B 型肝炎及 C 型肝炎有關，因肝癌其癒後不佳，故目前有效抗癌療法仍待開發中。肝癌在早期時不容易被診斷，故到晚期才發現，以致於延誤治療時機而使存活率低。目前，臨床上對於癌症治療的方法可分為手術切除法、血管栓塞法、局部治療、放射線療法、化學治療等。手術切除法為簡單且有效的方法，但因多數病人發現太晚，只有 15% 的病人可接受手術切除。其中化學治療為使用一種藥物或多種藥物之方法，目前已證明化學治療在癌症治療上具有極高的療效。而現今的抗癌藥物發展逐漸朝向從植物中萃取出具有抗惡性腫瘤細胞的天然物質(phytochemical)，以降低化學合成藥物對人體正常細胞的副作用(Liu *et al.*, 2004)。較為人所知的天然抗癌物質為紫杉醇(Taxol)，從 *Taxus brevifolia* 的樹皮所提煉出來，為臨床上已被廣泛應用的抗癌藥物(McGuire *et al.*, 1996)。另外，從中藥中尋找出有效的抗癌物質也為目前抗癌新藥研發重點研究之一，故本研究目的為利用奈米微脂體作為載體，包裹黃連萃取物或鹽酸小檗鹼，以誘導肝癌細胞凋亡，直接殺傷肝癌細胞。

黃連始載於『神農本草經』，為重要的傳統中藥之一，其性味苦寒，歸心、脾、胃、肝、膽及大腸經(舒華，2004)。黃連為毛茛科植物黃連(*Coptis chinensis* FRANCH)、家黃連(*Coptis teeta* WALLICH)及同屬近緣植物除去鬚根之乾燥根莖，外觀呈圓柱形或不規則形，表面暗黃色，有不規則結節狀隆起。黃連飲片為不規則圓形，徑 2~7 毫米，厚 0.5 毫米，斷面皮部棕褐色，木部金黃色，中央有空隙，無臭、味極苦，嚼之唾液呈黃色。其功效主要為清熱瀉火，另有抗菌、止瀉、抗消化性潰瘍及預防血管硬化等藥理作用(行政院衛生署中醫藥委員會-中草藥用藥安全-黃連，2009；Tang *et al.*, 2009)。黃連的主要成分包含多種生物鹼，包括小檗鹼(berberine)、黃連鹼

(coptisine)、甲基黃連鹼(worenine)、巴馬汀(palmatine)、藥根鹼(jatrorrhizine)和表小檗鹼(epiberberine)。而小檗鹼是黃連中主要的活性成分，外觀為黃色的結晶物，無臭、味苦，溶於熱水及熱乙醇，微溶於冷水、甲醇或乙醇，難溶於水(中華藥典，2006)。在現代藥理研究發現黃連與小檗鹼有抗菌、抗病毒、抗炎作用、抗潰瘍、抗氧化、解熱、降血壓、利膽、免疫調節、降血糖、擴張血管、抗血小板凝集、抗心律失常、促進組織癒合、鎮痛、鎮靜、降低眼內壓、降血脂、抗腹瀉和抗腫瘤等作用(呂霞，2003；崔學軍，2006；馮奕斌，2008)。

以黃連及其複方對人鼻咽癌細胞(HNE-1)的殺傷研究發現，黃連單用時作用最明顯，半抑制濃度為 1：729，具濃度依賴性；但黃連複方作用則稍減弱，半抑制濃度為 1：249，兼具濃度依賴性與時間依賴性(唐發清，1995)。另外，針對作用於 DNA 拓撲異構酶的抗癌物質研究發現，從日本產黃連中發現拓撲 II 抑制活性，而從中國產黃連(味連、雅連)中發現拓撲 I 與拓撲 II 兩方面的抑制活性，且黃連的拓撲阻礙活性為小檗鹼系生物鹼所致(賀玉琢，1995)。黃連主要活性成分以小檗鹼(berberine)最具代表性，小檗鹼具引發血癌細胞 HL-60 的細胞凋亡的抗癌作用(Kuo *et al.*, 1995)，而 Hwang 等人以小檗鹼處理人類肝癌細胞(HepG2) 24 小時後發現細胞存活率降低至 50% 以上，且出現細胞凋亡的各種現象；包含粒線體膜電位下降，caspase-8 和 caspase-3 活化、poly ADP ribose polymerase (PARP)斷裂、細胞 DNA 產生片斷化、cytochrome C 釋放、Bcl-XL 下降，推測小檗鹼促使細胞凋亡的路徑與 caspase 活化及粒線體膜電位下降(caspases mitochondria dependent pathway)有關(Hwang *et al.*, 2006)；Meeran 等人以小檗鹼處理前列腺癌細胞(human prostate cancer cells, PC3)也發現細胞會出現粒線體膜電位下降、凋亡蛋白 caspase 活化、PARP 斷裂及釋放 cytochrome C 等凋亡現象產生，並更進一步指出小檗鹼誘發的細胞凋亡與活性氧物質(reactive oxygen species, ROS)相關，當 ROS 被抑制後，所誘發的凋亡情形有下降的趨勢(Meeran *et al.*, 2008)。小檗鹼可誘導人類大腸直腸癌細胞(human colorectal cancer cells)產生 NAG-1 和 ATF3(促進凋亡蛋白)表現，使細胞凋亡(Piyanuch *et al.*, 2007)。Hsu 等人提出小檗鹼也可誘導 SW620 human colonic carcinoma cell 進行凋亡(Hsu *et al.*, 2007)。

另外，在先前的動物體內研究發現小檗鹼可能具有抑制體內腫瘤生長的功效，當小鼠體內種植人類 colon 26/clono 20 細胞再以 *Coptidis Rhizome* (CR)治療時，發現 IL-6 的 RNA 表現量與其蛋白質表現量在腫瘤組織及腎臟皆比未經治療的癌化小鼠顯著性地降低。因先前的體外細胞試驗結果顯示 CR 主成分小檗鹼能抑制 colon 26/clono 20 細胞 IL-6 的 RNA 表現量，且與其劑量成正相關，故推測 CR 可能經由小檗鹼來降低 IL-6 的產生，促使體

內大腸癌的生長受到抑制(Iizuka *et al.*, 2002)。另外，發現在種植人類舌癌 SCC-4 細胞於小鼠體內的前四周，先以每隔四天腹腔注射 berberine (10 mg/kg of body weight)，其結果顯示可以有效降低小鼠體內腫瘤生成的機率以及腫瘤的大小，故小檗鹼可能具有避免舌癌生成的作用(Ho *et al.*, 2009a)。而在 SCC-4 細胞的體外試驗也證實小檗鹼可以藉由增加細胞內鈣離子濃度以產生 reactive oxygen species (ROS)來抑制 SCC-4 細胞生長，並經由活化 caspase-8、-9 與-3 以及 endonuclease G 使 SCC-4 細胞執行細胞凋亡(Ho *et al.*, 2009b)。而在以 azoxymethane (AOM)引發的大鼠大腸癌動物模式發現，小檗鹼 (30 mg/kg of body weight)可以明顯的阻止脂質過氧化程度 (lipid oxidation)的增加，並提升細胞的抗氧化狀態，以避免細胞癌化轉型 (malignant morphology)，且具有引起細胞凋亡的能力(Thirupurasundari *et al.*, 2009)。由 WEHI-3 細胞所引起的體內血癌試驗，發現與未處理的對照組相較，經小檗鹼處理的小鼠其脾臟重量較小；此外小檗鹼可以使 Mac-3 與 CD11b 的濃度下降，顯示小檗鹼可以抑制巨噬細胞與顆粒細胞前驅物的分化，進而抑制血癌的產生(Yu *et al.*, 2007)。綜合以上研究結果可以發現，針對不同種體內癌症的產生，小檗鹼抑制癌細胞的生長、分化，或者以促進細胞凋亡的方式來抑制癌症的生成。

然而在醫療的使用上，除了口服味道極苦外，小檗鹼在體內的抗癌效果不如體外試驗明顯(黃林清，1997)，靜脈注射則會引起過敏、藥疹等副作用(張憲印，2003)。劉映麓等嘗試以 β -環糊精來包裹鹽酸小檗鹼，以期減少苦味、降低對腸道的刺激性，進一步增進療效。結果顯示， β -環糊精與鹽酸小檗鹼以 8:1 的比例進行包含 40 分鐘，可以顯著減輕鹽酸小檗鹼的苦味。為提升小檗鹼的生理活性，薛玉英等利用微脂體(liposome)來包裹小檗鹼，研製口服劑型的硫酸氫小檗鹼微脂體，並經老鼠腸道吸收實驗證實，硫酸氫小檗鹼微脂體可以增加腸道對藥物的吸收(薛玉英，1995)。此外，在動物實驗方面，小檗鹼微脂體在降低血糖的功效上與未經包覆的小檗鹼相比，有明顯增強的趨勢(劉衍興，1999)。故本研究特選奈米微脂體作為黃連及小檗鹼的載體，以研究其抗肝癌的效果。

一奈米(nanometer, nm)為 10 的負 9 次方公尺 (10^{-9} 公尺)，即為十億分之一公尺，大約是 10 個氫原子並列的寬度(Ratner *et al.*, 2002)。奈米科技在生物醫學與藥學領域已成為當今科技研究的焦點之一，目前國際上主要是以奈米技術改造某些難溶性藥物或保護某些特殊活性藥物，使之易被生物細胞所吸收，提高生物利用度，及控制藥物的釋放和延長藥物的作用時間等(Kayser *et al.*, 2005; Labhasetwar *et al.*, 2005)。現今中草藥正風行於全球，全球有八成之人口使用中草藥，中草藥製藥產業發展將是二十一世紀最具潛力的新興產業。將奈米科技融入中草藥製藥的研發，將會快速提昇

臺灣中藥產品的品質以增加國際競爭力。中國大陸於1998年由徐輝碧教授等率先提出「奈米中藥」的概念，奈米中藥是指運用奈米技術所製造之粒徑小於100 nm的中藥有效成分、有效部位、原藥或複方製劑(楊祥良, 2000; 李秀鳳, 2004)。徐輝碧教授的研究發現粒徑越小的礦物雄黃對S180腫瘤細胞、EC-304上皮細胞等的細胞毒性和誘導細胞凋亡作用越高(徐輝碧, 2000; 2001)。另外亦證實在血清中，奈米石決明的活性成分的含量顯著大於微米石決明(邊可君, 2003)。在比較三七之微米、細粉、粗粉之總皂苷釋出量時，發現粒徑越小溶出度越大(劉產明, 2003)。此外，爐甘石在奈米化後之抗菌活性明顯增加，推測可能是奈米化使其更容易被吸收，從而抑制細菌生長(柳娜, 2003)。目前奈米化研究多為礦物性中藥，若要將奈米化範圍推廣至其他中藥材，因其藥理較為複雜，則需要更為謹慎評估奈米化後安全性及有效性。

奈米中藥存在著優、劣點兩面性。其優點主要為：(1)增強組織靶向性，提高生物利用度(王金龍, 1999; 李泳雪, 2002)；(2)提高藥效，降低毒性(Lenaerts *et al.*, 1995; Moghimi, 1995)；(3)呈現新的藥效，拓寬原藥的適應症；(4)豐富中藥傳統給藥途徑和劑型選擇，使中藥製劑標準化、國際化；(5)降低中藥個體間差異；(6)減少用藥量，節省中藥資源等。而奈米中藥所面臨的問題是：(1)由於中藥的成分十分複雜，且作用機制多待研究，顯然顆粒越細，顆粒總表面積急增活性加大，提高了中草藥的藥性作用，但也可能提高藥物的毒性；(2)目前奈米顆粒的製備成本高於傳統劑型的製備；(3)由於奈米中藥的超細顆粒的表面效應可能使得藥物穩定性降低(王景璐, 2004; 張曉靜, 2003)。

微脂球或微脂體(liposome)是一種由具有自行密合特性的脂質雙層膜(lipid bilayer)包裹水溶液所組成的微小囊泡，囊泡中央可以包裹親水性(hydrophilic)物質，而其脂質雙層膜則可以夾帶厭水性(hydrophobic)物質(Bangham *et al.*, 1965)。從1960年代開始至今，微脂體已用來做為到達標的部位藥物載體(輸送藥物的系統)，並於臨床上廣泛使用。當藥物被包裹在微脂體中，控制藥物釋放速率，可以降低對正常細胞或組織的傷害進而減低藥物的不良副作用、增加藥物在血液中循環的時間、提高標靶性(藥物在目標細胞或組織中的濃度)，增加療效。微脂體的雙層膜是由磷脂質(phospholipids)與膽固醇(cholesterol)所組成，此結構與動物細胞的細胞膜(cell membrane)相似，故在生物體內能被分解、不具毒性，因此以微脂球為載體之藥物可多次投與給病患。此外，用於生物體內的微脂體特別需要在表面修飾聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)聚分子，被稱為長效型微脂體或隱蔽型微脂體，如圖1-1所示。聚乙二醇是親水性高且為非免疫性(Abuchowski *et al.*, 1977)、非毒性以及非抗原性的聚分子，更能降低血液中

調理素辨識微脂體的作用，進而降低免疫系統之辨認及清除，增加藥物在體內的半衰期。而微脂體的脂質組成(lipid compositions)、顆粒大小(partical size)、製備的方法有多種選擇性以夠符合各種不同的需求與應用(Senior, 1987)。因此微脂體技術在中藥微、奈化上可扮演舉足輕重角色，故本實驗將利用微脂體作為藥物的載體，並研究脂質組成與製備方法對微脂體藥物的粒徑大小、粒徑分布及鹽酸小檗鹼包裹率的影響。

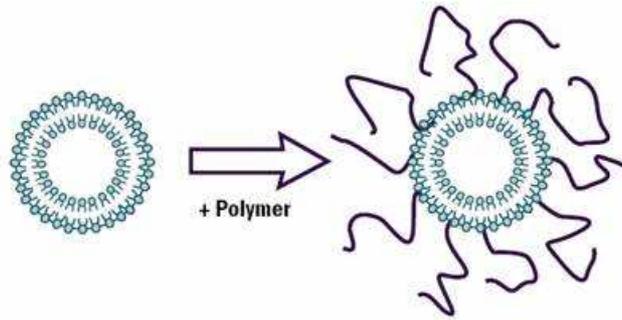


圖 1-1、長效型(隱蔽型)微脂體。

Figure 1-1. Long-circulating (stealth) liposomes.

採用微脂體作為藥物載體是目前國際醫療保健研究的焦點，中藥微脂體為將中藥包封於微脂體中而成的一種新型藥物載體機制(李海濤，2005)。另外，利用控制微脂體粒徑大小可以達到將中藥微、奈化的目的，而將微脂體做為中藥材有效成份的載體仍在初步研發的階段。目前使用此技術的中藥有黃芩前體脂質體、丹參多相脂質體等研究(靳琦，2002)。由於微脂體性質穩定、製作較為簡單、具有一定的藥物緩釋作用(張曉靜，2003)，可作為難溶性藥物或毒性較高藥物的包裹。將微脂體以靜脈注射或局部給藥可達到標靶定位及控釋作用(Jenning *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2000)。奈米藥物的釋放速度受到載體材料之生物降解速度的影響，載體材料的種類與配比不同時，釋藥速度也隨之而變(Westesena *et al.*, 1997)。

有以上文獻回顧可知小檗鹼具有抗多種癌細胞的功效，且相對副作用小，但因其吸收率較差，所以本計畫利用微脂體為載體以提高其吸收率。本研究主旨為探討鹽酸小檗鹼奈米微脂體在抑制肝癌細胞生長的機制，以及對小鼠皮下腫瘤治療效果的評估，此研究結果將提供黃連中藥材的新製作方法，且所得到之鹽酸小檗鹼奈米微脂體預期將具有緩釋的效果，可延長藥物在體內的半衰期以及降低藥物的用量，進而減緩對正常細胞可能產生的副作用。

貳、材料與方法

一、樣品採購與鑑定：

以市售之黃連做為原料。基源鑑定由共同主持人李威著教授進行。購買後的黃連樣品於分析後將置於密封容器(PE袋)中於4°C下貯存備用。

二、黃連水萃液與鹽酸小檗鹼水溶液製備及其小檗鹼含量分析

(一)黃連水萃液製備

片狀乾燥黃連研磨成粉末，稱取 20 g 黃連粉末溶於 1000 mL 逆滲透水(1:50)中，超音波萃取 1 小時，以 85°C 水浴濃縮至萃液滲透壓為 400 mmol/kg 左右，再以 8500 rpm 離心 10 分鐘，上清液過孔徑 0.22 μm 濾膜以去除顆粒，完成製備的萃液於 4°C 保存備用，作為微脂體包裹之黃連水萃液。

(二)鹽酸小檗鹼水溶液製備

取 15 mg 之小鹽酸小檗鹼溶於 10 mL 去離子水中，以作為微脂體包裹之鹽酸小檗鹼水溶液。

(三)黃連水萃液之指標成份小檗鹼分析

以高效能液相層析儀(High performance liquid chromatography; HPLC)分析，使用 C18 逆相層析管柱(PurospherR®STAR RP-18 endcapped 250-4, 5 μm)，偵測波長 265 nm，管柱溫度為 30°C，檢液注射量為 20 μL，流速為 1 mL/min。移動相條件是 0.1%磷酸(phosphoric acid)：乙腈(actonitrile) = 70%：30%，並以 0.45 μm 濾膜過濾後使用。

三、黃連與鹽酸小檗鹼奈米微脂體的製備與其物化性質分析

(一)黃連奈米微脂體的製備

取 1,2-distearoyl-3-sn-phosphatidylcholine (DSPC)、cholesterol 和 2000-(polyethylene glycol) distearoylphosphatidylethanolamine (DSPE-PEG2000)以% molar ratio 為 65：30：5 置於 50 mL 圓底燒瓶，加入 7 mL 氯仿溶解脂質，使用旋轉減壓乾燥機以 60°C 進行減壓乾燥，直至瓶內氯仿完全抽乾。加入黃連水萃液水合 30 分鐘，再以液態氮及 60°C 水浴反覆「冷凍-解凍作用」五次，使瓶壁上的脂質完全剝落。再以擠壓器在 60°C 下，以 PC 過濾膜反覆過濾，可以得到粒徑均勻的單層微脂粒(unilamellar vesicle)。最後，微脂體外的黃連水萃液以 Sephadex G-50 管柱的方式移除、收集純化的微脂體。

(二)鹽酸小檗鹼奈米微脂體的製備

1. 薄膜水合法

取 1,2-distearoyl-3-sn-phosphatidylcholine (DSPC) 或 hydrogenated soy phosphatidylcholine (HSPC)、cholesterol 和 2000-(polyethylene glycol) distearoylphosphatidylethanolamine (DSPE-PEG2000)以% molar ratio為65：30：5置於50 mL圓底燒瓶，加入7 mL氯仿溶解脂質，使用旋轉減壓乾燥機以60°C進行減壓乾燥，直至瓶內氯仿完全抽乾。加入鹽酸小檗鹼水溶液水合30分鐘，再以液態氮及60°C水浴反覆「冷凍-解凍作用」五次，使瓶壁上的脂質完全剝落。

2. 溶劑注射法

取 DSPC 或 HSPC、cholesterol 和 DSPE-PEG2000 (% molar ratio = 65：30：5)於試管中，加入1 mL乙醇溶解脂質，使用針筒於60°C下注射至含有鹽酸小檗鹼水溶液的50 mL圓底燒瓶內，再以液態氮及60°C水浴反覆「冷凍-解凍作用」五次。

3. 高壓均質法

經薄膜水合法或溶劑注射法所製備出的微脂體溶液，以高壓均質機在25000 psi下均質1~10分鐘以降低粒徑。未包裹在微脂體內的鹽酸小檗鹼水溶液以Sephadex G-50膠體管柱或透析方式移除。

4. 過濾擠壓法

經薄膜水合法或溶劑注射法所製備出的微脂體溶液，以擠壓器在60°C下，以PC過濾膜反覆過濾，可以得到粒徑均勻的單層微脂粒(unilamellar vesicle)。可利用不同孔徑的PC過濾膜(0.4、0.2及0.1 μm)製備出不同粒徑大小的鹽酸小檗鹼奈米微脂體。最後，微脂體外的鹽酸小檗鹼水溶液以Sephadex G-50管柱或透析方式移除，收集純化的微脂體。

(三)黃連與鹽酸小檗鹼奈米微脂體的物化性質分析

使用粒徑分析儀分析微脂體的粒徑，此儀器是利用雷射散射法為原理，測定微脂體粒徑分佈。在雷射光照射下，藉由儀器偵測到從微脂體反射回來的散射光，再予以轉換成數值資料，所獲得的資料經電腦運算之後，即可得知微脂體粒徑分佈及粒徑平均值。再以 Bartlett's method 測黃連與鹽酸小檗鹼奈米微脂體的磷濃度，並用高效液相層析儀(HPLC)分析黃連與鹽酸小檗鹼奈米微脂體所包裹的小檗鹼含量，在後續細胞及動物實驗的樣品中小檗鹼濃度均以 HPLC 定量後之小檗鹼濃度表示之。

四、鹽酸小檗鹼水溶液及其奈米微脂體之細胞試驗

(一) HepG2與Clone9 cell line之培養

HepG2採用90% minimum essential medium，加入抗生素(100 U/mL penicillin、100 μ g/mL streptomycin及0.25 μ g/mL amphotericin B)、2 mM L-glutamine、0.1 mM non-essential amino acids、1.0 mM sodium pyruvate及3 g/L碳酸氫鈉。而Clone9採用90% F-12K，加入抗生素(100 U/mL penicillin、100 μ g/mL streptomycin及0.25 μ g/mL amphotericin B)、2 mM L-glutamine及1.5 g/L碳酸氫鈉。將medium混合均勻並調整酸鹼度至pH 7.2，加入以56 $^{\circ}$ C加熱30分鐘去活性之無菌胎牛血清(10% fetal bovine serum)，以0.2 μ m孔徑之濾膜過濾除菌，即為完全培養基。細胞加入培養基後，移至培養瓶中於含5% CO₂及95%相對濕度之37 $^{\circ}$ C恆溫培養箱中培養。每隔二天更換新鮮的培養基，約3~5天後細胞可長至90%滿度之單層細胞。細胞之繼代培養是以tryple處理細胞，使成懸浮狀離心後收集細胞，再取5 \times 10⁵細胞種植於T-25培養瓶中，供實驗用。

(二) 細胞毒性MTT分析

以MTT法測定黃連水萃液與鹽酸小檗鹼水溶液及其奈米微脂體對兩株細胞之毒性。MTT法是一種快速呈色法，由於細胞還原MTT的能力，代表了細胞粒腺體的活性，因此可做為細胞存活率的一個指標。將HepG2與Clone9細胞經24小時培養後，將不同濃度黃連水萃液、鹽酸小檗鹼水溶液及其奈米微脂體添加於細胞中。經適當時間培養後，以PBS清洗細胞二次，加入0.4 mL培養基及100 μ L新鮮配置之MTT溶液(5 mg/mL)，置於含5% CO₂，37 $^{\circ}$ C恆溫培養箱中4小時後，吸去上清液，加入DMSO (0.8 mL/well)，置於振盪器上振盪，至顆粒溶解為止，再用ELISA reader檢測波長570 nm的吸光值。

五、HepG2 細胞凋亡分析

(一) 粒腺體膜電位變化之分析

粒腺體膜功能不良常伴隨早期細胞凋亡發生，粒腺體膜電位的變化增加細胞膜的通透性，膜內蛋白如cytochrome c釋出到細胞質中，與Apaf-1結合活化凋亡小體，使caspase-3活化導致一連串凋亡反應。經樣品處理的HepG2細胞，吸出培養基以PBS沖洗後以tryple作用1~2分鐘，在2000 rpm離心5分鐘後，去除上清液，收集下來的細胞加入100 μ L的stain buffer均勻打散置於37 $^{\circ}$ C培養箱培養20分鐘，取出加入1 mL assay buffer以同樣地方式去除上清液，最後加

入200 μ L assay buffer 將細胞打散後，利用螢光光度計以激發/散射波長為485/528 nm偵測壞死細胞，另外以激發/散射波長為540/590 nm偵測正常細胞。以控制組的正常細胞/壞死細胞之螢光比值定為100%，進行相對值之換算。

(二) PI染色分析

PI (Propidium Iodide) 染劑能與細胞內核酸結合，但不能通過活細胞膜，只能染死細胞，故由PI染色可以看出細胞凋亡主要所在的細胞的週期。HepG2細胞經由不同樣品反應後，將medium吸出以PBS清洗，然後與tryple作用1~2分鐘，加入培養基終止反應，收集細胞懸浮液並以2000 rpm離心5分鐘，收集沉澱之細胞，用2 mL PBS清洗兩次，以2000 rpm離心5分鐘，去除PBS。邊震盪邊緩慢加入3 mL的95%酒精於沉澱之細胞中，使細胞均勻混合，便於PI染劑染色。以2000 rpm離心5分鐘除去上清液，以PBS清洗兩次，加入10 μ L RNase (20 mg/mL) 與1 mL的PI染劑(40 μ g/mL)進行PI染色，混合均勻後於暗室37°C反應15分鐘，最後以流式細胞儀進行分析。

(三) Annexin V-FITC/PI雙染色分析

正常細胞的細胞膜為不對稱性，磷脂絲胺酸(phosphatidyl serine, PS)只存在細胞膜內層，細胞在凋亡早期細胞膜維持完整但PS外翻到膜外，Annexin V-FITC染劑對PS具有高度親合性，可用來檢測暴露於細胞膜外的PS，但是細胞膜PS外翻在細胞壞死也會發生，所以結合PI染劑，因為細胞壞死在早期時細胞膜就已破裂，而細胞膜完整的細胞可以將PI染劑排除在外，藉此區分細胞凋亡與細胞壞死。HepG2細胞經由不同樣品反應後，和tryple作用，收集細胞並以PBS清洗兩次，加入0.5 mL binding buffer (10 mM HEPES、140 mM NaCl和2.5 mM CaCl₂)混合均勻，並加入Annexin V-FITC及PI染劑，於暗室37°C下反應10分鐘，最後以流式細胞儀進行分析。最終結果分四個象限，FITC-/PI-、FITC+/PI-、FITC-/PI+及FITC+/PI+的細胞，各代表正常、早期凋亡、壞死與晚期凋亡之細胞。

(四) Caspase 3蛋白質表現之分析

此分析方法是使用Caspase-3/ CPP32 Colorimetric Assay Kit (BioVision, CA, USA)進行分析。HepG2細胞經由不同處理後離心(2000 rpm, 5分鐘)以收集其細胞，加入100 μ L lysis buffer於冰上反應10分鐘，經過10,000 \times g離心1分鐘後收集上清液即為後續分析之樣品。以Bio-Rad protein dye進行檢測，以分光光度計在570 nm下測定其吸光值，並以不同濃度之bovine serum albumin (BSA)做出標

準曲線，即可計算蛋白質之含量，換算後調整到相同之蛋白質濃度(50~200 $\mu\text{g protein}/50 \mu\text{L lysis buffer}$)，取50 μL 的待測樣品加入50 μL 的2X reaction buffer (含10 mM DTT)及5 μL DEVD-pNA substrate，置於暗室37°C反應1-2小時，最後偵測405 nm下的吸光值，以控制組之吸光值定為100%，進行相對值之換算。

六、抑制肝腫瘤之動物實驗

(一)裸鼠品系與飼養條件

本動物實驗經國立中興大學動物實驗管理小組審核通過(動物實驗申請表寄同意書編號：97-81)。本研究採用5周齡之NU-Fox1 (nu/nu)公裸鼠進行實驗，裸鼠購自樂斯科生物科技公司(Taipei, Taiwan)。裸鼠飼養於具頂蓋濾紙過濾空氣設計之無菌飼育盒，放置於無菌培養環境，室溫維持於 $25\pm 2^\circ\text{C}$ ，空氣濕度為50~70%及12小時光/12小時暗之光照週期，裸鼠墊料、飲用水與飼料均需經過高壓殺菌釜滅菌處理。在動物飼育室觀察一周後，進行試驗。裸鼠實驗處理過程及安樂死程序均依照國立中興大學動物實驗管理小組規範之人道管理指南辦理。

(二)裸鼠肝癌腫瘤模式

將 1×10^8 HepG2 cells由培養基中以trypsin去除附著性後，將其懸浮於1 mL不含血清的新鮮培養液中，注射前將細胞保存在冰上備用；每隻裸鼠以24號針頭在皮下注射0.1 mL細胞液(細胞數約 1×10^7 cells)。肝癌細胞接種後，等到長成一定大小時，開始以腹腔注射方式給予藥物。

(三)裸鼠分組與實驗設計

為評估微脂體包覆藥物對肝癌腫瘤生長的抑制功效，採用腹腔注射對皮下接種肝癌細胞之實驗裸鼠給予已用奈米微脂體包覆之鹽酸小檗鹼溶液，與未用奈米微脂體包覆之鹽酸小檗鹼溶液進行試驗。裸鼠隨機分成5組，包含高劑量鹽酸小檗鹼奈米微脂體(0.6 mg/kg b.w., n=4)、低劑量鹽酸小檗鹼奈米微脂體(0.15 mg/kg b.w., n=4)、高劑量鹽酸小檗鹼(0.6 mg/kg b.w., n=2)、控制組(Control、皮下接種肝癌細胞並腹腔注射給予等體積之PBS, n=2)、正常組(Normal、未接種肝癌細胞並腹腔注射給予等體積之PBS, n=4)。在裸鼠腹腔注射給藥前先秤取每隻裸鼠之實驗前體重(initial body weight)並紀錄，之後每日注射一次，共7天。

高劑量實驗組方面：18隻裸鼠隨機分成3組，每組6隻，包含鹽酸小檗鹼奈米微脂體(4mg/kg b.w., n=6)、傳統化療藥物Doxorubicin

組(4 mg/kg b.w., n=6)、控制組(Control、皮下接種肝癌細胞並腹腔注射給予等體積之PBS, n=6)。在裸鼠腹腔注射給藥前先秤取每隻裸鼠之實驗前體重(initial body weight)並紀錄，之後每3天注射一次，共8次。

(四)抑制肝癌細胞生長試驗

在皮下接種肝癌細胞後，每2~3天觀察有無腫瘤形成，待發現已有腫瘤形成後，開始以游標尺(caliper)每2~3天測定一次裸鼠腫瘤體積大小，紀錄腫瘤長與寬並依下列公式換算成腫瘤體積：腫瘤體積(mm³) = 長(mm) × 寬²(mm²)/2。而裸鼠皮下肝癌細胞生長的抑制效率(%)為：(1-實驗組裸鼠腫瘤平均體積/控制組裸鼠腫瘤平均體積)×100%。

(五)血液學檢查

實驗裸鼠以isoflurane氣體麻醉後，以心臟採血方式抽取血液，取0.5 mL全血置入ependorf中，以3000 rpm離心5分鐘取出血清，置於ependorf中委請中興大學家畜動物醫院檢測血中 aspartate aminotransferase (AST)、alanine aminotransferase (ALT)、blood urea nitro (BUN) 及Creatinine等四種酵素；另外，再取0.5 mL全血置入含有EDTA抗凝血瓶中，進行血液學 complete blood count檢查，再以3000 rpm離心5分鐘取出血漿，儲存於-20°C冰箱以備進行後續分析。

(六)血漿中鹽酸小檗鹼含量分析

取血液加入1%不同濃度之鹽酸小檗鹼標準品，20°C下以3000 rpm離心10分鐘，取60 μL血漿加入甲醇(1:3, v/v)去蛋白，之後取上清液160 μL，65°C乾浴後用90 μL甲醇回溶，超音波震盪20分鐘後經孔徑0.22 μm syringe filter過濾，注入高效液相層析儀(HPLC)中進行樣品之鹽酸小檗鹼含量分析。HPLC分析方法如下：分析管柱為PurospherR[®] STAR RP-18 endcapped 250-4 (5 μm)；保護管柱為LiChroCARTR 4-4 (5 μm)；高壓輸送幫浦為L-2130 (HITACHI)；偵測器為Diode Array Detector L-2455 (HITACHI)；流速為1 mL/min；偵測波長為345 nm；管柱溫度為30°C；檢液注射量為20 μL；移動相A (0.1%磷酸)：B (乙腈)= 70%：30%。實驗裸鼠以isoflurane氣體麻醉後進行犧牲，其血液依上述方法製備以及偵測其鹽酸小檗鹼含量。

(七)組織臟器中鹽酸小檗鹼含量分析

取0.1 g組織加入甲醇與水的混合液(1:2, v/v) 2 mL後，用研鉢將組織研磨成組織均漿，加入不同濃度之鹽酸小檗鹼標準品，4°C下以10000 rpm離心5分鐘，取1 mL上清液，加入0.01 M NaOH 200 μ L、甲醇100 μ L及乙酸乙酯 6 mL，震盪2分鐘後，於4°C下以10000 rpm離心5分鐘，之後取上清液2 mL，65°C乾浴後用100 μ L甲醇回溶，震盪2分鐘後經孔徑0.22 μ m syringe filter過濾，注入高效液相層析儀(HPLC)中進行樣品之成分分析，HPLC的分析方法如上所述(方法六之六)。而實驗裸鼠以isoflurane氣體麻醉後進行犧牲，取其肝臟及腫瘤組織，依上述之組織臟器中鹽酸小檗鹼含量標準曲線製備過程進行萃取及偵測。

(八)臟器重量、肉眼及組織病理學檢查

裸鼠經isoflurane氣體麻醉後進行犧牲解剖，秤取心、肝、脾、腎及腫瘤組織等重量(g)。上述臟器經10%福馬林浸泡固定24小時後，經粗修、脫水與石蠟包埋後，以組織石蠟塊製成4~6 μ m厚之組織切片，以Hematoxylin & Eosin (H&E)染色後觀察各個組織臟器及腫瘤之病理變化。

七、統計分析

實驗數據以SAS[®]中之Student's t-test進行分析，結果之實驗數據以Mean \pm SD表示， $p < 0.05$ 即具有顯著差異。

參、結果

一、鹽酸小檗鹼微脂體製備條件之最適化與其物化特性分析

(一)鹽酸小檗鹼水溶液與黃連萃液對 HepG2 細胞生長之影響

為比較鹽酸小檗鹼或黃連在經奈米微脂體包埋後是否藥效有所提升，首先研究純鹽酸小檗鹼水溶液與黃連萃液抑制 HepG2 細胞生長效果。將兩溶液中的小檗鹼濃度調至相同，再以 0~112 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的小檗鹼濃度對 HepG2 細胞進行生長抑制分析，其結果如圖 3-1 所示。HepG2 細胞生長的抑制程度皆與鹽酸小檗鹼水溶液或黃連萃液中的小檗鹼含量成正相關(dose-dependent)。且在相同小檗鹼濃度下，相較於鹽酸小檗鹼水溶液，黃連萃液對 HepG2 細胞具有較高的傷害力。由圖 3-1 可得知鹽酸小檗鹼水溶液對 HepG2 細胞的 IC_{50} 約為 52 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的小檗鹼，而黃連萃液對 HepG2 細胞的 IC_{50} 則下降為 29 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的小檗鹼，故黃連萃液對 HepG2 細胞的傷害力優於鹽酸小檗鹼水溶液。

(二)鹽酸小檗鹼與黃連奈米微脂體對 HepG2 細胞生長之影響

為提升鹽酸小檗鹼水溶液或黃連萃液對 HepG2 細胞生長之抑制效果，分別將兩種水溶液包裹於奈米微脂體中，經管柱層析法或透析法移除未被包裹的鹽酸小檗鹼水溶液或黃連萃液後，再由 HPLC 測定出所包裹的小檗鹼濃度，經序列稀釋後再加入 HepG2 細胞中處理 24 小時後，以 MTT 試驗分析 HepG2 細胞之存活率(圖 3-2)。鹽酸小檗鹼奈米微脂體以 0~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的小檗鹼濃度對 HepG2 細胞作用；而黃連奈米微脂體則以 0~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的小檗鹼濃度作用。由圖 3-2 可以推算出鹽酸小檗鹼奈米微脂體對 HepG2 細胞生長之 IC_{50} 為 4.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的小檗鹼，而黃連奈米微脂體的 IC_{50} 則為 18.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的小檗鹼，故鹽酸小檗鹼奈米微脂體對 HepG2 細胞的傷害力高於黃連奈米微脂體，且其 IC_{50} 為純小鹽酸小檗鹼水溶液 IC_{50} 值的 8%，故證明經奈米微脂體包裹後可大幅提升小檗鹼抑制 HepG2 細胞生長的能力。綜合以上，鹽酸小檗鹼水溶液與黃連萃液以及其所製成之奈米微脂體對 HepG2 細胞生長影響，可以發現四種藥物的抑制肝癌生長能力為鹽酸小檗鹼奈米微脂體 > 黃連奈米微脂體 > 黃連萃液 > 鹽酸小檗鹼水溶液，因此在本計畫接下來的實驗將以鹽酸小檗鹼奈米微脂體為藥物，探討其製程的最佳化、引起 HepG2 細胞凋亡的可能機制，以及其抑制小鼠皮下肝癌生長的療效。

(三)鹽酸小檗鹼微脂體製備條件之最適化

1. PEG 含量對鹽酸小檗鹼奈米微脂體的粒徑與鹽酸小檗鹼包覆率

的影響

PEG 為 polyethylene glycol 的縮寫，當微脂體表面接上 PEG 後則成為長效型微脂體(long-circulating liposomes)或隱蔽型微脂體(stealth liposomes)。利用此種表面修飾方式，可以提升微脂體在動物體內的穩定性，進而提升其療效。故在鹽酸小檗鹼奈米微脂體製備條件最適化的第一步，先針對 PEG 的含量(0 mol% 與 5 mol%)對小鹽酸小檗鹼奈米微脂體做粒徑大小以及粒徑分布之分析，並評估其對鹽酸小檗鹼包覆率的影響。此外，膜的脂質組成也會影響微脂體的物化性質，故選擇兩種常用來做為藥物載體的磷脂質：distearoyl phosphatidylcholine (DSPC) 與 hydrogenated soybean phosphatidylcholine (HSPC) 來進行研究。

首先製作出四種鹽酸小檗鹼奈米微脂體，分別為由 DSPC 組成不含有 PEG (DSPC Peg 0%)、DSPC 組成含有 5 mol% 的 PEG (DSPC Peg 5%)、由 HSPC 組成不含有 PEG (HSPC Peg 0%)、HSPC 組成含有 5 mol% 的 PEG (HSPC Peg 5%)。圖 3-3 為此四批鹽酸小檗鹼奈米微脂體的粒徑大小以及粒徑分布的結果，可以發現四種奈米微脂體的大小皆在 120~130 nm，其粒徑分布皆非常集中，因其用來敘述粒徑分布(particle size distribution)的 PDI 值皆小於 0.05，故此四批鹽酸小檗鹼奈米微脂體的在粒徑大小以及粒徑分布皆無顯著性的差異。

而在鹽酸小檗鹼包覆率的分析方面(圖 3-4)卻發現無論是由 DSPC 或 HSPC 所製成的鹽酸小檗鹼奈米微脂體，含有 5 mol% 的 PEG 組(Peg 5%)的包覆率遠高於不含有 PEG 組(Peg 0%)。DSPC 所製成的鹽酸小檗鹼奈米微脂體其包覆率可由 4.2% (Peg 0%)上升至 14.0% (Peg 5%)；而由 HSPC 所製成的鹽酸小檗鹼奈米微脂體其包覆率則可由 2.2% (Peg 0%)上升至 14.1% (Peg 5%)。由以上得結果可以得知 5 mol% 的 PEG 修飾於鹽酸小檗鹼奈米微脂體表面可以有效得提升鹽酸小檗鹼包覆率 3.5~6.4 倍，但 DSPC 與 HSPC 所製成的鹽酸小檗鹼奈米微脂體，在含有相同 5 mol% 的 PEG 下，其鹽酸小檗鹼包覆率並無顯著性差異，故在接下來的實驗將會針對由 DSPC 與 HSPC 所製成含有 5 mol% 的 PEG 的兩種鹽酸小檗鹼奈米微脂體(DSPC-P5 與 HSPC-P5)製程做最適化的調整，以期提高鹽酸小檗鹼包覆率的同時，也可以簡化小檗鹼奈米微脂體的製程。

2. 高壓均質法之均質時間對鹽酸小檗鹼微脂體粒徑大小的影響

高壓均質法為製備微脂體的常用步驟，利用高壓均質時產

生之剪切力製作成 100 nm 大小的鹽酸小檗鹼奈米微脂體。與其他方法相較，此法較為簡便，且可製備較為大量的鹽酸小檗鹼奈米微脂體，但使用此法時會有高溫產生，對於熱敏感物質較不適用。圖 3-5 為 DSPC-P5 與 HSPC-P5 在高壓均質過程中其微脂體的粒徑變化圖，由此圖可以發現經過 6 分鐘的研磨後，鹽酸小檗鹼奈米微脂體的粒徑維持一定，兩組的粒徑在 10 分鐘研磨後皆在 90 nm 附近。圖 3-5-A 與-B 分別為研磨過程中 DSPC-P5 組與 HSPC-P 組之粒徑變化圖，由上而下分別為經研磨 0、2、4、6、8、10 分鐘的樣品。可以發現兩組在未研磨前主要由兩種粒徑大小的微脂體所組成，DSPC-P5 組為 323 nm 與 2972 nm 的 peaks 所形成，而 HSPC-P5 組則由 245 nm 與 1894 nm 的 peaks 所形成，但在經 4 分鐘研磨後，2 組皆轉換成只有由 100-110 nm 大小的一個 peak 組成，繼續研磨至 6 分鐘以後，粒徑皆小於 100 nm，且兩組之間的粒徑大小並無顯著性差異。

3. 過濾擠壓法之擠壓次數對鹽酸小檗鹼微脂體粒徑大小的影響

過濾擠壓法為製備微脂體的另一常用步驟，利用 PC 膜上孔徑的大小製備成所需的粒徑大小的微脂體。在本計畫選用孔徑為 200 nm 與 100 nm 的 PC 膜以進行過濾擠壓，使最終鹽酸小檗鹼奈米微脂體的粒徑在 100 nm 左右。圖 3-6 為 DSPC-P5 與 HSPC-P5 在藉由孔徑為 200 nm 的 PC 膜擠壓過程中鹽酸小檗鹼微脂體的粒徑變化圖，其結果顯示經過 20 次的擠壓後，鹽酸小檗鹼微脂體的粒徑維持一定，DSPC-P5 組粒徑維持在 170 nm 附近，而 HSPC-P5 組粒徑則維持在 160 nm 附近。另外，圖 3-6-A 與-B 分別為擠壓過程中 DSPC-P5 組與 HSPC-P5 組之粒徑變化圖，由上而下分別為經推膜 0、5、10、15、20、25 與 30 次的樣品之粒徑分布圖。經由圖 3-6-A 與-B 的觀察，可以得知在推膜過 5 次後，兩組的粒徑皆在 200 nm 附近，且隨推膜次數的增加，peak 的寬度變窄，粒徑分布趨向集中，而經 15 次推膜後兩組的粒徑皆在 170 nm 左右。

在推過 200 nm 孔徑的 PC 膜以後，再藉由推過 100 nm 孔徑的 PC 膜使鹽酸小檗鹼微脂體粒徑下降至 100 nm 左右。圖 3-7 為 DSPC-P5 與 HSPC-P5 藉由孔徑為 100 nm 的 PC 膜擠壓過程中鹽酸小檗鹼奈米微脂體的粒徑變化圖，兩組奈米微脂體在經 20 次推膜後其粒徑維持在 135~140 nm 附近。而圖 3-7-A 與-B 分別為擠壓過程中兩組奈米微脂體之粒徑變化圖，由上而下分別為經推膜 0、2、6、10、20 與 30 次的樣品之粒徑分布圖。隨

推膜次數的增加，兩組的 peak 皆往左移動，故粒徑變小，且 peak 寬度變窄，其粒徑分布趨向集中。兩組之間在相同推膜次數的結果以 HSPC-P5 組的粒徑大於 DSPC-P5 組的粒徑，但統計上無顯著性差異，此現象可能因 HSPC 的 T_m 值(52°C)略低於 DSPC 的 T_m 值(55°C)有關， T_m 值小則膜的流動性大，相對應粒徑可能會提升。

4. 高壓均質法與過濾擠壓法對鹽酸小檗鹼微脂體粒徑大小、粒徑分布及鹽酸小檗鹼包覆率的影響

DSPC-P5 與 HSPC-P5 兩組在經由高壓均質法與過濾擠壓法所製成的鹽酸小檗鹼奈米微脂體粒徑變化上，由圖 3-5 到圖 3-7 的結果可以看 HSPC-P5 組的粒徑略高於 DSPC-P5 組，但兩組間無顯著性差異。圖 3-8 為此兩種組成(DSPC-P5 與 HSPC-P5)經由兩種製程(高壓均質法與過濾擠壓法)所產生的四種鹽酸小檗鹼微脂體的粒徑大小及粒徑分布情形，由高壓均質法所製成的奈米微脂體相較於由過濾擠壓法的奈米微脂體粒徑較小(~ 100 nm)，但其粒徑分布較廣，其 PdI 值在 0.175~0.182 之間；而由過濾擠壓法所製成的鹽酸小檗鹼奈米微脂體粒徑較大($120\sim 140$ nm)，但其 PdI 值在卻只有 0.02~0.07，故相對而言此法所製成的鹽酸小檗鹼奈米微脂體粒徑分布較窄，可由圖 3-8-A 與-B 的結果觀察得到。另外，在分析此四種鹽酸小檗鹼奈米微脂體的鹽酸小檗鹼包覆率(圖 3-9)可以發現由過濾擠壓法所製成的鹽酸小檗鹼奈米微脂體具有較高的包覆率，無論是由 DSPC 或 HSPC 所組成的微脂體其包覆率皆在 14% 上下。而經由高壓均質法所製成奈米微脂體的鹽酸小檗鹼包覆率只有 5.8~7.5%，故在接下來的研究將使用過濾擠壓法製作鹽酸小檗鹼奈米微脂體。

5. 溶劑注射法與薄膜水合法對鹽酸小檗鹼微脂體粒徑分布及鹽酸小檗鹼包覆率的影響

當利用薄膜水合法製備初步的微脂體時需耗較多的時間與人力，考量於為動物實驗時所需製備大量的鹽酸小檗鹼奈米微脂體，嘗試用相對簡便的溶劑注射法取代薄膜水合法製備初步的微脂體，再用過濾擠壓法將其粒徑下降至 100 nm，此種製程可在較短時間內製備出大量的鹽酸小檗鹼奈米微脂體。因此，為確定此種製程組合的可行性，對此組合製出的鹽酸小檗鹼奈米微脂體分析其鹽酸小檗鹼包覆率與粒徑分布。如圖 3-10 所示溶劑注射法併過濾擠壓法(SI-E-D)製備出的奈米微脂體之鹽酸小檗鹼包覆率只有 7.42%，而經由薄膜水合法併過濾擠壓法

(TH-E-G) 製備出的奈米微脂體之鹽酸小檗鹼包覆率卻已上升至 13.9%，為前者的 1.9 倍；而此兩製法所得的奈米微脂體之 PdI 值相差不大，皆在 0.1 以下，顯示奈米微脂體的粒徑分布集中。然而溶劑注射法併過濾擠壓法的鹽酸小檗鹼包覆率明顯低於薄膜水合法併過濾擠壓法，使製程效率下降，所以接下來的研究所使用的鹽酸小檗鹼奈米微脂體皆由薄膜水合法併過濾擠壓法所製成。因由 DSPC 或 HSPC 所組成的鹽酸小檗鹼奈米微脂體其物化性質在統計學上無顯著性差異，而 DSPC 含有較高的 T_m ，故相對應而言 DSPC 的穩定度較佳，所以在接下來的實驗中皆以 DSPC 為主要組成，以薄膜水合法併過濾擠壓法製成鹽酸小檗鹼奈米微脂體。

(四) 鹽酸小檗鹼微脂體對 HepG2 及 Clone 9 細胞生長之影響

為評估所製出的鹽酸小檗鹼奈米微脂體對肝癌細胞(HepG2 cells)與正常細胞(Clone 9 cells)生長的影響，將含有 0~25 $\mu\text{g/mL}$ 的鹽酸小檗鹼濃度的鹽酸小檗鹼奈米微脂體加入 HepG2 細胞或 Clone 9 細胞中處理 24 小時後，以 MTT 試驗分析細胞之存活率(圖 3-11)。圖中顯示即使鹽酸小檗鹼濃度上升至 5 $\mu\text{g/mL}$ ，仍對 Clone 9 細胞無抑制作用產生，而在此濃度下，HepG2 細胞生長的抑制率已超過 50%，故由此結果可以得知鹽酸小檗鹼奈米微脂體對肝癌細胞的殺傷力高於正常肝細胞，故在臨床上有其開發價值。而且鹽酸小檗鹼奈米微脂體針對 HepG2 細胞的 IC_{50} 為單純鹽酸小檗鹼水溶液的 IC_{50} 的 1/11 倍，故經由奈米微脂體的包裹可顯著提升鹽酸小檗鹼抑制肝癌細胞生長的療效，因此在接下來的細胞凋亡路徑探討與抑制小鼠 HepG2 腫瘤生長之療效評估，即以鹽酸小檗鹼奈米微脂體來進行。

二、鹽酸小檗鹼微脂體引起 HepG2 細胞進行細胞凋亡機制之探討

(一) 粒線體膜電位變化之分析

圖 3-12 顯示 HepG2 細胞經過 4 小時的處理後，在鹽酸小檗鹼濃度 1.25、2.5 及 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 的鹽酸小檗鹼奈米微脂體的處理組中粒線體膜電位分別下降至 83%、80% 及 75%，統計結果顯示與未處理組有顯著差異，顯示細胞經鹽酸小檗鹼奈米微脂體處理後粒線體膜電位產生變化。另外，比較被微脂體包裹的小檗鹼(鹽酸小檗鹼奈米微脂體)與鹽酸小檗鹼水溶液在相同的鹽酸小檗鹼濃度(5 $\mu\text{g/mL}$)處理下(圖 3-13)，鹽酸小檗鹼水溶液處理組之膜電位(96%)與控制組(未經藥物處理)相較並無顯著的變化，表示細胞依然正常，未出現凋亡的現象。而以鹽酸小檗鹼奈米微脂體(1.25~5.0 $\mu\text{g/mL}$)處理

之細胞，經過 4 小時之後其粒線體膜電位已有顯著的下降至 75%，顯示鹽酸小檗鹼奈米微脂體有比鹽酸小檗鹼水溶液對 HepG2 細胞更強的誘導細胞凋亡之能力。

(二) Caspase 3 蛋白質表現量之分析

除了粒線體膜電位下降，另外亦觀察到 HepG2 細胞經不同濃度的鹽酸小檗鹼奈米微脂體處理 4 小時後凋亡蛋白 caspase 3 的活性表現與控制組相比有明顯的上升(圖 3-14)，並且隨著處理濃度上升 caspase 3 的活性表現分別上升至 135% (1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、144% (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及 157% (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，表示鹽酸小檗鹼奈米微脂體誘使凋亡蛋白 caspase 3 的表現增加走向細胞凋亡，而 caspase 3 隨鹽酸小檗鹼奈米微脂體濃度上升而上升，具有濃度依賴性。另有研究以 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的小檗鹼處理人類血癌細胞(human promonocytic U937 cells) 4 小時後，其 caspase 3 活性表現也有明顯的上升(Meeran *et al.*, 2008)，綜合圖 3-12 至 3-14 的實驗結果，表示鹽酸小檗鹼奈米微脂體也會依循鹽酸小檗鹼誘使細胞凋亡的路徑(caspases mitochondria dependent pathway)來表現，但是具有更強力的誘導能力。

(三)細胞週期變化之分析

為了解 HepG2 細胞經鹽酸小檗鹼奈米微脂體處理後，其細胞週期的狀況，利用流式細胞儀評估不同濃度(1.25 和 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的鹽酸小檗鹼奈米微脂體對 HepG2 細胞處理 24 小時後細胞週期中 Sub-G1 的變化。結果如圖 3-15 的 A 顯示，不同濃度的鹽酸小檗鹼奈米微脂體對細胞週期影響在 24 小時給藥後，可看到控制組中 Sub-G1 無明顯 peak，而隨著濃度增加 peak 的積分面積會上升，在濃度 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 有一明顯 SubG1 peak。從圖 3-15 的 B，可看到明顯的趨勢，Sub-G1 程度隨鹽酸小檗鹼奈米微脂體濃度上升而增加，在控制組、濃度 1.25 及 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，其 Sub-G1 分別 0.42%、0.63%及 0.93%，1.25 及 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 與控制組相比分別增加 1.5 及 2.2 倍。代表鹽酸小檗鹼奈米微脂體可誘導 HepG2 細胞行細胞凋亡且與其劑量呈正相關。

(四)細胞凋亡程度之分析

HepG2 細胞由不同濃度(1.25 和 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)處理 24 小時後，以流式細胞儀評估其早期凋亡與晚期凋亡之變化，四個格子右半部屬於細胞凋亡，下面為早期凋亡與上面為晚期凋亡。結果如圖 3-16 的 A 所示，當鹽酸小檗鹼奈米微脂體藥量增加，早期凋亡與晚期凋亡也隨之增加。控制組、濃度 1.25 及 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，其早期凋亡依序為 7.27%、8.72%和 16.22%，1.25 及 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 其早期凋亡分別

增加 1.2 及 2.2 倍。而晚期凋亡為 1.41%、2.32% 和 5.60%，1.25 及 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 其晚期凋亡個別增加 1.6 倍 4.0 倍。由圖 3-16 的 B 圖為早期與晚期凋亡的總加，可明顯看出鹽酸小檗鹼奈米微脂體的濃度上升則細胞凋亡率明顯增加，在 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的凋亡率(21.81%)和控制組(8.68%)相比約增加 2.5 倍，由此結果可證實鹽酸小檗鹼奈米微脂體的確可以引發 HepG2 細胞的細胞凋亡的產生，以抑制肝癌細胞的生長。

三、鹽酸小檗鹼微脂體抑制小鼠 HepG2 腫瘤生長之療效評估

(一)鹽酸小檗鹼微脂體對裸鼠皮下肝癌腫瘤生長之影響

在確定鹽酸小檗鹼奈米微脂體可引起 HepG2 細胞進行細胞凋亡反應後，接下來的研究目的為測定鹽酸小檗鹼奈米微脂體對裸鼠皮下肝癌腫瘤生長抑制效應，第一次的實驗流程設計如圖 3-17 所示。裸鼠(NUFox1^{nu})在購置後適應環境一週，將 5×10^6 HepG2 細胞數接種至每隻裸鼠皮下，經 28 天後腫瘤長至 $528 \pm 218 \text{ mm}^3$ 大小時開始進行治療，療程(period of treatment)為 7 天，每天以皮下方式給藥，而在療程的第 8 天犧牲並取出臟器與腫瘤做分析。實驗共分 5 組，包含(1)低劑量鹽酸小檗鹼奈米微脂體組(Liop-Ber 0.15 mg/kg, n=4)、(2)高劑量鹽酸小檗鹼奈米微脂體組(Liop-Ber 0.6 mg/kg, n=4)、(3)高劑量鹽酸小檗鹼水溶液組(Ber 0.6 mg/kg, n=2)、(4)控制組裸鼠(接種肝癌細胞但未腹腔注射藥物, n=2)以及(5)正常組(未接種肝癌細胞且未腹腔注射藥物, n=4)。

而在療程開始前(Day 0)與裸鼠犧牲前(Day 8)，分別秤取每隻裸鼠之體重，計算各組平均體重變化量(total body weight gain)，作為判定療程過程中裸鼠生理狀況發生改變之初步依據。表 3-1 結果顯示，療程開始前各組裸鼠體重皆約在 26.5~30.0 g 之間，療程結束後各組裸鼠體重則出現下降趨勢，平均體重約在 23.5~28.5 g 之間；而各組別間情形分別為：低劑量鹽酸小檗鹼奈米微脂體組：27.71 \pm 3.87 g、高劑量鹽酸小檗鹼奈米微脂體組：26.29 \pm 4.79 g、高劑量鹽酸小檗鹼水溶液組：24.50 \pm 0.71 g、控制組裸鼠：23.50 \pm 0.71 g 及正常組：28.25 \pm 1.50 g。而在體重下降率方面，則低劑量鹽酸小檗鹼奈米微脂體組：6.12%、高劑量鹽酸小檗鹼奈米微脂體組：6.05%、高劑量鹽酸小檗鹼水溶液組：7.55%、控制組裸鼠：21.67% 及正常組：11.02%。控制組裸鼠(Control)、正常組(Normal)及實驗組裸鼠的體重變化方面在統計學上雖無顯著差異，但可以發現與其他組別相較，控制組裸鼠(接種肝癌細胞但未腹腔注射藥物)的體重下降趨勢略為顯著。除此之外，實驗期間每 1~2 天以游標尺測量腫

瘤之長與寬，並以公式換算為腫瘤體積。各組裸鼠每次所測量之腫瘤體積增長情形，如圖 3-18 所示。在實驗組中，裸鼠腫瘤體積與成長速率從給藥第五天開始，其低劑量鹽酸小檗鹼奈米微脂體組之腫瘤體積為 576 mm^3 與高劑量鹽酸小檗鹼奈米微脂體組之腫瘤體積為 583 mm^3 ，與控制組之腫瘤體積(954 mm^3)相比，有所差異；而單純給予鹽酸小檗鹼水溶液組，其腫瘤體積為 998 mm^3 ，則與控制組相近，在後期(第五天之後)生長率甚至較控制組還快，如第 6 天時控制組與鹽酸小檗鹼水溶液組的腫瘤體積分別為 1059 mm^3 及 1188 mm^3 。待將各組裸鼠犧牲後，取出之腫瘤重量加以記錄，並將犧牲前一天所測得之腫瘤體積各自換算為鹽酸小檗鹼微脂體對裸鼠肝癌細胞生長抑制效率(%)，結果如表 3-2 所示。鹽酸小檗鹼實驗組中，沒有使用微脂體包覆之單純藥物，其抑制率為-24.91%，無抑制效果產生。而有使用微脂體包覆之藥物，與控制組相比，高劑量與低劑量其抑制率分別為 10.26%與 50.98%，顯示有抑制效果，但低劑量鹽酸小檗鹼奈米微脂體組的抑制效果較佳。圖 3-19 及圖 3-20 則為各組別在裸鼠犧牲時腫瘤之生長情形，各組別間腫瘤大小並沒有明顯性差異，但與控制組之腫瘤重量($0.044 \pm 0.014 \text{ g}$)比較之下，低劑量鹽酸小檗鹼奈米微脂體組的腫瘤重量為 $0.018 \pm 0.014 \text{ g}$ ，而高劑量組則為 $0.046 \pm 0.025 \text{ g}$ ，可見低劑量組之腫瘤較高劑量組小，此結果與上述腫瘤抑制效應相符。另外，犧牲後摘取每隻裸鼠之腫瘤組織，進行組織切片與染色，置於光學顯微鏡下觀察並擷取影像，結果如圖 3-21。在 200 倍的放大倍率下，可觀察到控制組與實驗組之腫瘤組織細胞核受染劑著色而成藍紫色，且細胞有群聚生長之現象。並觀察到細胞受到擠壓而變小，而細胞核形狀呈現不規則且核質比增加，故細胞核內的染色質染色程度增加(濃染)，細胞核的面積也較一般細胞大，由以上可知控制組與實驗組皮下生長的腫塊確實為癌細胞。另外，圖 3-22 為將各組別之腫瘤組織切片以 2 倍的放大倍率下觀察，可見控制組及高劑量鹽酸小檗鹼水溶液組，其切片下面積較大，且可見到壞死區域(箭頭處)，推測此壞死區域主要是由於腫瘤組織體積過大且生長速度過快，導致中央區域缺少血液及養分供應而造成壞死。

(二)鹽酸小檗鹼奈米微脂體對裸鼠生理之影響

為了解鹽酸小檗鹼奈米微脂體對裸鼠生理之影響，在療程期滿後將裸鼠犧牲並秤取每隻裸鼠各個臟器(心、脾、腎及肝)的重量，以作為治療藥物是否對體內臟器造成影響病理依據，並將腫瘤取出稱重，如圖 3-23 所示。在統計學上各個臟器的重量或腫瘤重，

不論各實驗組間或是實驗組與正常組及控制組間相比皆無顯著差異，但可以發現高劑量鹽酸小檗鹼水溶液組的肝臟重量較輕(1.06 ± 0.002 g)，而其腫瘤重量重(1.28 ± 0.91 g)。為準確得知在療程期間裸鼠體重變化，故將犧牲後裸鼠體重扣除其腫瘤重量後，即可得到其淨體重(圖 3-24)。與正常組(28.25 ± 1.50 g)相比，控制組(22.48 ± 1.00 g)與僅單純給予高劑量鹽酸小檗鹼水溶液組(23.22 ± 1.62 g)的體重較輕，而低劑量(27.02 ± 4.01 g)與高劑量鹽酸小檗鹼奈米微脂體組(26.47 ± 5.15 g)的體重則與控制組相似，但統計學上各組之間的淨體重並沒有顯著性差異。此外，並將裸鼠犧牲之後所採集得到的血液進行各種血球計數及血清生化學檢查，由圖 3-25 的血球計數值可以發現各組間沒有顯著差異，故在目前給藥情形之下並未影響到裸鼠的血液中白血球數(white blood cell count, WBC)、紅血球數(red blood cell count, RBC)、血紅素(hemoglobin, Hb)及血球容積比值(packed-cell volume, PCV)的數值。而在血清生化學檢查方面，由圖 3-26 的結果經統計學上分析所得結果為各組間無顯著性差異，但仍可以發覺高劑量鹽酸小檗鹼水溶液組的肝指數(AST 為 546.6 U/L, ALT 為 282.7 U/L)以及腎指數(BUN 為 35.6 mg/dL, creatinine 為 0.6 mg/dL)與正常組(AST 為 126.1 U/L, ALT 為 39.1 U/L, BUN 為 20.7 mg/dL, creatinine 為 0.3 mg/dL)相比相對較高，AST, ALT, BUN, 與 creatinine 之上升率分別為 333.47%，623.02%，71.98%，與 100.00%；此肝指數的提升可能與此組裸鼠肝臟重量較輕有關。而為確定給予較高劑量鹽酸小檗鹼奈米微脂體不會影響臟器的正常生長，待裸鼠犧牲後，將給予較高劑量鹽酸小檗鹼微脂體組別之裸鼠肝臟及肺臟取下製成組織切片(圖 3-27)，皆沒有見到明顯之壞死病變，故顯示不論是接種腫瘤或是給予較高劑量的鹽酸小檗鹼微脂體，對裸鼠的器官組織皆不會造成可觀察到的傷害。

(三)鹽酸小檗鹼在體內之分布情形

圖 3-28 為鹽酸小檗鹼在血漿中之標準曲線，可見在濃度 $0.065\text{-}2$ $\mu\text{g/mL}$ 間，有良好的線性關係；而圖 3-29 則為鹽酸小檗鹼在組織中之標準曲線，可見在濃度 $5\text{-}20$ $\mu\text{g/g tissue}$ 間，有良好的線性關係。為了解有無使用微脂體包覆與被包覆藥物鹽酸小檗鹼在體內循環及分布情形，在裸鼠犧牲之後採集血漿、腫瘤及肝臟樣本進行偵測分析，並與鹽酸小檗鹼在血漿中及組織中之標準曲線相比，得到僅有在使用微脂體包覆組別中的血液，才可偵測到微量之鹽酸小檗鹼，在給予 0.6 mg/kg 及 0.15 mg/kg 之之組別，其濃度換算後

分別為約 0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。而未使用微脂體包覆之組別，則無法偵測到鹽酸小檗鹼，顯示若沒有微脂體包覆，24 小時後無法偵測到 berberine 可能是其吸收或是代謝的問題所造成。詳細原因須待進一步的研究。另外，對所有實驗組及控制組而言，在腫瘤組織及肝臟中皆無法偵測到有鹽酸小檗鹼的存在，可能因經腹腔注射所給予的鹽酸小檗鹼濃度過低。

(四)高濃度藥物毒性試驗

因為初期所得到之結果與控制組相較並沒有顯著的差異，其原因可能為包覆之鹽酸小檗鹼濃度太低，以至於抑制肝癌細胞生長的效果並不顯著，故製備較高濃度之鹽酸小檗鹼奈米微脂體以進行第二次的體內試驗。第二次高濃度實驗流程設計如圖 3-30，但為確保在此高濃度情形下，對正常裸鼠並不會造成影響，先進行初步的毒性試驗：先分為高濃度鹽酸小檗鹼奈米微脂體組，Doxorubicin 組，及控制組，共三組，每組三隻。實驗組的每隻裸鼠每隔 3 天以腹腔注射鹽酸小檗鹼濃度為 4 mg/kg 的鹽酸小檗鹼奈米微脂體，共注射 8 次，並以常用抗癌藥物 Doxorubicin 作為陽性對照。在給藥期間每天觀察其活動情形及每三天測量一次體重，第 21 天時高濃度鹽酸小檗鹼奈米微脂體組體重為 30.50 ± 3.54 g，Doxorubicin 組體重為 32.33 ± 3.06 g，及控制組體重為 29.67 ± 2.31 g，其結果如圖 3-31 所示，各組間體重並沒有顯著改變。就活動情形與體重變化上，給予 4 mg/kg 之高濃度鹽酸小檗鹼微脂體，對正常裸鼠並不會造成明顯的副作用。而在實驗結束犧牲後，採其臟器觀察外觀及秤取重量，並同時採集血液進行血液學及血清生化學檢查，結果分別如圖 3-32、圖 3-33 及圖 3-34 所示，皆無顯著差異。而採集高濃度鹽酸小檗鹼奈米微脂體組之裸鼠肝臟及腎臟進行組織切片觀察(圖 3-35)，結果亦無見到明顯異常，顯示給予高濃度鹽酸小檗鹼奈米微脂體並不會對實驗裸鼠造成明顯副作用。

(五)高濃度藥物抑制肝癌細胞生長之預試驗

將製備好的高濃度鹽酸小檗鹼奈米微脂體給予已有腫瘤生長之裸鼠，先分為高濃度鹽酸小檗鹼奈米微脂體組，Doxorubicin 組，及控制組，共三組，每組一隻，每三天觀察其腫瘤體積變化，第 21 天時高濃度鹽酸小檗鹼奈米微脂體組之腫瘤體積為 631.75 mm^3 ，Doxorubicin 組之腫瘤體積為 1152.00 mm^3 ，及控制組之腫瘤體積為 2943.50 mm^3 ，如圖 3-36 所示。而高濃度鹽酸小檗鹼奈米微脂體組之腫瘤體積變化量則為 186.5%，Doxorubicin 組為 77.2%，控制組則為 411.0% (圖 3-37)，與控制組相比，在給予 Lipo-Ber 4

mg/kg 與 Doxorubicin 之組別，腫瘤體積增加較為緩慢。且在給藥後 12 天，控制組的腫瘤體積較給藥組別(Lipo-Ber 組及 Doxo 組)的腫瘤體積明顯增大，顯示 4 mg/kg 的 Lipo-Ber 對腫瘤生長具有抑制效果。圖 3-38 與圖 3-39 分別為實驗結束裸鼠犧牲後採集其各個臟器及腫瘤組織之重量與扣除腫瘤重量隻裸鼠淨體重；可得到高濃度鹽酸小檗鹼奈米微脂體組之腫瘤重量為 0.376 g，Doxorubicin 組之腫瘤重量為 1.223 g，控制組則為 3.072 g，可見與腫瘤生長體積變化相符合；而各組別之臟器重無顯著差異。圖 3-40 則為實驗結束裸鼠犧牲後採集其腫瘤組織進行組織切片觀察之情形。在相同放大倍率下，給予 Lipo-Ber 之腫瘤切片(圖 3-40 B)下面積較小，且腫瘤細胞壞死區域範圍較小；且沒有觀察到有壞死區域。

在高劑量組的預試驗中發現 4 mg/kg 的 Lipo-Ber 對腫瘤生長具有抑制效果，並不會對裸鼠生理功能造成顯著的副作用。故緊接針對高劑量試驗分成高濃度鹽酸小檗鹼奈米微脂體組，Doxorubicin 組，及控制組，共三組，每組 6 隻，進行試驗。圖 3-41 與圖 3-42 分別為到目前為止的腫瘤生長情形與腫瘤增加速率之變化情形。第 21 天時給予高劑量鹽酸小檗鹼奈米微脂體組與 Doxorubicin 組之腫瘤體積分別為 $1198.53 \pm 256.80 \text{ mm}^3$ 與 $873.46 \pm 853.32 \text{ mm}^3$ 皆較控制組之 $2090.20 \pm 1033.59 \text{ mm}^3$ 小，其中又以 Doxorubicin 組之抑制生長效果(74.5 %)較高劑量鹽酸小檗鹼奈米微脂體之效果(47.1 %)好，顯示高劑量鹽酸小檗鹼奈米微脂體對腫瘤生長具有抑制效果。

(六)高濃度藥物在體內之分布情形

在預實驗組的裸鼠犧牲後，採集其血漿、肝臟，及腫瘤進行鹽酸小檗鹼含量偵測，結果顯示，在未接種腫瘤之裸鼠血漿中測得之濃度為 0.66 $\mu\text{g/mL}$ ，而有接種腫瘤之裸鼠血漿中濃度則為 3.7 $\mu\text{g/mL}$ 。在臟器方面，僅有腫瘤組織中可測得鹽酸小檗鹼含量為 1.05 $\mu\text{g/g tissue}$ ，而無論有無接種腫瘤，其肝臟中皆無法偵測到鹽酸小檗鹼。

肆、討論

表 3-3 為本實驗所用微脂體製法對其所生成鹽酸小檗鹼奈米微脂體的物化性質綜合分析結果。在影響鹽酸小檗鹼包覆率的因素方面，可以注意到微脂體表面是否含有 PEG 為主要影響因素，因無 PEG 存在的鹽酸小檗鹼奈米微脂體其鹽酸小檗鹼包覆率皆小於 4%。而對含有 PEG 存在的鹽酸小檗鹼奈米微脂體的組別，以薄膜水合法併過濾擠壓法(TF-E-G)所得的鹽酸小檗鹼包覆率最高(E.E = 13.9%~14.3%)，其次為溶劑注射法併過濾擠壓法(SI-E-D; E.E = 7.4%)，最後為薄膜水合法併高壓均質法(TF-H-G; E.E = 5.8%~7.5%)。當評估微脂體粒徑大小時發現薄膜水合法併過濾擠壓法所得的粒徑最大(140-120 nm)，其次為溶劑注射法併過濾擠壓法(112 nm)，而最小為薄膜水合法併高壓均質法(95-103 nm)。而在粒徑分布上，以過濾擠壓法所得的 PdI 值皆小於 0.07，但以高壓均質法得的 PdI 值則大於 0.175，故過濾擠壓法可以得到粒徑較為集中的鹽酸小檗鹼奈米微脂體。而在脂質的選擇方面，DSPC 組與 HSPC 組在相同製程條件下，兩者所製出的鹽酸小檗鹼奈米微脂體的物化性質並無顯著性差異，但 DSPC 的 Tm 值(55°C)略高於 HSPC (52°C)，具有較高的穩定性(Drummond *et al.*, 1999)。故綜合以上結果，為得到高的鹽酸小檗鹼包覆率，以及粒徑均一且集中的鹽酸小檗鹼奈米微脂體，並希望鹽酸小檗鹼奈米微脂體在生物體內能有較佳的穩定及緩釋效果，本計畫選用以 DSPC 為主要的脂質組成，並在其微脂體表面修飾 5 mol% 的 PEG，而脂質先以薄膜水合法製成初步的微脂體，再經由過濾擠壓法製成粒徑約為 100 nm 的鹽酸小檗鹼奈米微脂體。

比較鹽酸小檗鹼水溶液、黃連萃液、鹽酸小檗鹼奈米微脂體、黃連奈米微脂體四種樣品對抑制 HepG2 細胞生長效果時發現此四種藥物對 HepG2 細胞均有抑制效果，且與其所含的鹽酸小檗鹼濃度成正相關(dose-dependent)。抑制肝癌細胞生長能力為鹽酸小檗鹼奈米微脂體 > 黃連奈米微脂體 > 黃連萃液 > 鹽酸小檗鹼水溶液，表示經過奈米微脂體包埋後不論是鹽酸小檗鹼水溶液或是黃連萃液的藥效都有明顯的提升，其中又以鹽酸小檗鹼奈米微脂體最為顯著，其 IC₅₀ 降為鹽酸小檗鹼水溶液 IC₅₀ 值的 9%。此外，將鹽酸小檗鹼奈米微脂體處理正常肝細胞(Clone 9 cells)，結果顯示同樣以 5 μg/mL 的鹽酸小檗鹼奈米微脂體處理後，HepG2 細胞存活率降至 50%，而 Clone 9 細胞存活率仍維持在 99.5%，顯示鹽酸小檗鹼奈米微脂體在抑制肝癌細胞的同時，對正常肝細胞所產生的傷害相對較小，故鹽酸小檗鹼奈米微脂體具有做為抗癌藥物的潛力。

文獻指出小檗鹼具有誘導 HepG2 細胞凋亡的能力(Hwang *et al.*,

2006)，而本實驗結果也發現經鹽酸小檗鹼微脂體處理之 HepG2 細胞其粒線體膜電位有明顯的下降。而參考其它研究文獻發現，物質經過微脂體包埋後可提升其細胞毒性，Shabbits 等人的研究指出將 ceramide lipids 此誘導細胞凋亡物質以微脂體進行包埋運輸可使 ceramide lipids 更容易進入細胞，藉此提高 ceramide lipids 對細胞毒性之表現(Shabbits *et al.*, 2003)。在本實驗結果中，鹽酸小檗鹼奈米微脂體與鹽酸小檗鹼水溶液兩處理組相比，於相同的鹽酸小檗鹼濃度(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)下，微脂體處理組膜電位顯著下降 25%，但是水溶液組則無顯著變化，故鹽酸小檗鹼奈米微脂體比鹽酸小檗鹼水溶液具有更強的誘導細胞凋亡之能力。另外亦觀察到鹽酸小檗鹼奈米微脂體處理組的 caspase 3 活性表現有顯著的上升，且由 PI 染色實驗(圖 3-15)發現加藥組(1.25 和 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和控制組相比，有 Sub-G1 期出現，顯示 HepG2 細胞有凋亡現象產生。而在 Annexin V-FITC/PI 雙染色分析的(圖 3-16)結果顯示 HepG2 細胞早期凋亡與晚期凋亡的凋亡率與控制組相較皆有增加趨勢。此現象與以 30 μM 的鹽酸小檗鹼溶液處理 HepG2 人類肝癌細胞兩小時後發現細胞凋亡率為 29%的結果相似 (Hur *et al.*, 2009)，由以上結果可推測鹽酸小檗鹼奈米微脂體以 caspases mitochondria dependent pathway 促使 HepG2 細胞進入細胞凋亡。

為確認鹽酸小檗鹼奈米微脂體對裸鼠的影響，因此選用幾種臨床上常用來評估肝功能的相關酵素如 aspartate aminotransferase (AST)及 alanine aminotransferase (ALT)，與腎功能指數如 blood urea nitro (BUN)及 Creatinine 等四種酵素進行檢測。在一些研究報告中指出，AST 及 ALT 兩種酵素大量的存在於肝細胞當中，故當肝細胞受損時，此兩種酵素會由細胞內釋放至血液中。故當血清中此兩項酵素上升時，即表示肝細胞有受到傷害，因此血清中的 AST 及 ALT 活性變化常被用來作為評估生物體內細胞的完整性及疾病症狀的指標。其中 ALT 較具有專一性，因為 AST 除了存在於肝細胞之外，心臟、骨骼肌與腦細胞也具有 AST。腎臟也是臨床上常被用來評估藥物毒性的器官，而 BUN 及 Creatinine 則是最具代表性也最常被檢測的指標，其中 BUN 較易受到外在的環境，如脫水等因素影響，此外，BUN 也會受到肝臟製造含氮廢物功能的影響，也是一個可以間接觀察肝臟功能的指標。而在本次實驗中，於犧牲時採集血液檢測上述四種酵素濃度，其中僅未有使用微脂體包覆的組別其指數有上升情形，但觀察期各組活動情形及體重變化，並未有任何明顯的異常。此外，由表 3-1 可見有給予微脂體包覆藥物的組別，其淨體重與正常組別較接近，而沒有使用微脂體包覆藥物的組別及控制組其體重有較輕的情形，推測可能是由於腫瘤生長的不舒適感所造成。

病理切片檢驗對於腫瘤的診斷是最準確的方法之一。腫瘤在病理切片下的分級標準可分為數個主要特徵，包含細胞有絲分裂情形、細胞核的大小、細胞核質比、核外觀形狀的不規則性、核的濃染程度、細胞間細胞核的大小差異顯著集合的紋理等。細胞核和細胞質的比例會因為腫瘤的增生，導致細胞密度增加，細胞因擠壓變小，而細胞核增大，使細胞核和細胞質的比例增加。細胞核的形狀在越惡性的肝癌細胞就越不規則。正常細胞核之染色質不會有過染的情形，但肝炎腫瘤細胞核內的染色質則會隨著腫瘤細胞惡化情形等級升高而增加染色的程度。細胞核的面積越大，越惡性的機率就越大。而上述之辨識標準大多都是與細胞核有相關的，所以可以說細胞核含有肝癌細胞主要的辨識特徵。H&E 染色法主要是以蘇木紫(Hemotoxylin)鹼性染料，經氧化作用將細胞核染成藍色，並以伊紅(Eosin)酸性染料將細胞質染成淡紅色或紅色，可因此觀察細胞的整體型態與細胞核的狀態，可作為辨定肝癌細胞發生與惡性程度之初步依據。本研究以 H&E 染色觀察到腫瘤組織之病理切片具有以上所描述之主要辨識特徵(圖 3-21)。且由圖 3-22 可以觀察到沒有使用微脂體組及控制組其腫瘤組織切片在相同放大倍率下相對較大，且可看到有壞死的情形，推測可能是由於腫瘤生長過大，速度過快所造成中央部份有缺少養分的情形所致。

而鹽酸小檗鹼在裸鼠體內之分布情形則是僅有在使用微脂體包覆組別中，才可偵測到微量之鹽酸小檗鹼，在給予 0.6 mg/kg 及 0.15 mg/kg 之組別，其濃度換算後分別為約 0.08 $\mu\text{g/mL}$ 及 0.06 $\mu\text{g/mL}$ ，而未使用微脂體包覆之組別，則無法偵測到鹽酸小檗鹼，顯示若沒有微脂體包覆，24 小時後鹽酸小檗鹼則會被代謝掉，而無法偵測到。另外，在腫瘤組織及鹽酸小檗鹼主要的代謝器官肝臟中，亦無法偵測到有鹽酸小檗鹼的存在。顯示本次我們所給予的鹽酸小檗鹼濃度太低，以至於無法偵測到；由結果可知，在給予 0.6 mg/kg 之鹽酸小檗鹼，不論有無使用微脂體包覆，與控制組相比，在腫瘤生長速度，生長體積，腫瘤重量等，皆無法看到有很顯著的抑制作用。而本次實驗在腫瘤體積上雖然有輕微的抑制生長的作用，但並不具有顯著差異，推測主要有兩個原因：一為腫瘤於開始給予藥物時的起始體積過大 ($>500 \text{ mm}^3$)，已無法達到預期治療的效果；二為我們所給予的鹽酸小檗鹼奈米微脂體中鹽酸小檗鹼劑量太低，無法達到有效的治療劑量，以致於沒有明顯的抑制效果。針對以上兩點，重新製備並濃縮至原本藥物濃度約六倍的藥物，但為避免因高劑量所產生的副作用，先進行藥物毒性試驗，就體重變化、活動情形、切片型態與肝腎功能指數來看，給予 4 mg/kg 的鹽酸小檗鹼奈米微脂體並不會對裸鼠有任何明顯的副作用。而在第二次動物試驗將鹽酸小檗鹼奈米微脂體的鹽酸小檗鹼濃度向上調升至 4 mg/kg，並加

入陽性對照組給予 Doxorubicin，同時與控制組比較，得到的初步結果顯示高劑量的鹽酸小檗鹼奈米微脂體與傳統化療藥物 Doxorubicin 對於肝臟腫瘤細胞有延緩腫瘤增長的效果。此外，在給予 4 mg/kg 的鹽酸小檗鹼奈米微脂體時，裸鼠血漿與肝臟中皆可偵測到鹽酸小檗鹼含量，顯示高劑量的鹽酸小檗鹼奈米微脂體可使鹽酸小檗鹼在體內的停留時間延長，濃度增加，因此對腫瘤的生長抑制效果更好。

綜合以上結果，使用奈米微脂體將鹽酸小檗鹼包覆，可以加強對於肝癌腫瘤生長的抑制能力，未來可望能發展成副作用較少的抗腫瘤生長藥物。

伍、結論與建議

本計畫內容為探討微脂體包裹的黃連萃取液與鹽酸小檗鹼水溶液對人類肝癌的抑制能力，並評估其物性、化性、細胞毒性、細胞凋亡機制及微脂體在免疫不全裸鼠模式中對肝癌的生長抑制功效。在黃連萃液與鹽酸小檗鹼溶液與其微脂體對 HepG2 的傷害效力的結果顯示以鹽酸小檗鹼奈米微脂體最佳，且在同濃度下對正常肝細胞並無抑制效果。因為微脂體之脂質組成與藥物的形式可能會影響藥物之包覆率與釋放率，而是否因小檗鹼的形式(鹽類或自由態)而造成對小檗鹼奈米微脂體的療效有所影響，在未來值得研究。此外，從化學結構來看，berberine 為 protoberberine alkaloids 的一種，而其相關的結構衍生物研究指出在 protoberberine alkaloids 四個環上的官能基不同時，會提高、降低或是改變其作用能力與目標 (Grycová *et al.*, 2007)。Berberrubin 與小檗鹼結構上僅 9 號碳上的官能基不同(前者為-OH；後者為-OCH₃)，而研究指出 Berberrubin 可抑制 topoisomerase II 的活性，而小檗鹼則不具此活性 (Kim *et al.*, 1998)。另外已有利用化學修飾出小檗鹼的衍生物 piperidino-berberine 以提高與 DNA 之間的親和力，加強抑制細胞生長的能力 (Franceschin *et al.*, 2006)。小檗鹼衍生物可能具有多種抑制細胞生長的作用途徑，當合併使用時是否能對癌細胞有更強的殺傷力，當可作為後續的延伸探討。而在製備方面，則以薄膜水合法並以擠壓過濾方式製備的鹽酸小檗鹼奈米微脂體可得到最高的包覆率。再以此鹽酸小檗鹼奈米微脂體加入 HepG2 細胞中會造成粒線體膜電位下降、caspase 3 活性上升及 Sub-G1 期的出現，故推測其是以 caspases mitochondria dependent pathway 促使凋亡的產生。另外，動物實驗結果發現給予 0.6 mg/kg 鹽酸小檗鹼奈米微脂體組與鹽酸小檗鹼溶液組的腫瘤體積變化跟控制組相近。但發現只有鹽酸小檗鹼溶液會造成肝腎指數的上升，顯示鹽酸小檗鹼奈米微脂體不會對裸鼠的生理造成傷害。為增加療效，將鹽酸小檗鹼奈米微脂體濃度提高到 4 mg/kg，毒性與療效的預實驗發現此濃度對裸鼠並無傷害；且鹽酸小檗鹼奈米微脂體組的腫瘤體積和控制組相比較小，故在此濃度下其具有抑制腫瘤生長的功效。目前結果顯示以奈米微脂體包覆鹽酸小檗鹼可以加強對於肝腫瘤體內生長的抑制，並可減輕鹽酸小檗鹼水溶液對正常組織的傷害，未來可望能發展成副作用較少的抗腫瘤生長藥物。此外，未來將做藥物動力學的研究以將加強了解對小檗鹼在血液中劑量的變化，以便接下來的劑量及動物實驗做更準確的設計，並將離體細胞與活體動物實驗之成果將投稿至 SCI 的期刊。而針對 berberine 衍生物是否更有抗肝癌藥效之研究，依目前 berberine 低吸收率的問題，或許當其衍生物可增加其吸收率時，即可增加其肝癌藥效。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會計畫編號 CCMP98-RD-008 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

1. Abuchowski A, McCoy JR, Palczuk NC, van Es T, and Davis FF: Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *J Biol Chem.* 1977; 252(11): 3582-3586.
2. Bangham AD, Standish MM, and Watkins JC: Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 1965; 13: 238-525.
3. Drummond CD, Meyer O, Hong K, Kirpotin BD, and Papahadjopoulos D: Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol Rev.* 1999; 51(4): 691-743.
4. Franceschin M, Rossetti L, D'Ambrosio A, Schirripa S, Bianco A, Ortaggi G, Savino M, Schultesf C, Neidlef S. Natural and synthetic G-quadruplex interactive berberine derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006. 16: 1707-1711.
5. Grycová L, Dostál J, Marek R: Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry.* 2007; 68: 150-75.
6. Ho YT, Lu CC, Yang JS, Chiang JH, Li TC, Ip SW, Hsia TC, Liao CL, Lin JG, Wood WG, and Chung JG: Berberine induced apoptosis via promoting the expression of caspase-8, -9 and -3, apoptosis-inducing factor and endonuclease G in SCC-4 human tongue squamous carcinoma cancer cells. *Anticancer Res.* 2009b; 29(10): 4063-4070.
7. Ho YT, Yang JS, Lu CC, Chiang JH, Li TC, Lin JJ, Lai KC, Liao CL, Lin JG, and Chung JG: Berberine inhibits human tongue squamous carcinoma cancer tumor growth in a murine xenograft model. *Phytomedicine.* 2009a; 16(9): 887-890.
8. Hsu WH, Hsieh YS, Kuo HC, Teng CY, Huang HI, Wang CJ, Yang SF, Liou YS, and Kuo WH: Berberine induces apoptosis in SW620 human colonic carcinoma cells through generation of reactive oxygen species and

- activation of JNK/p38 MAPK and FasL. *Arch Toxicol.* 2007; 81(10): 719-728.
9. Hur JM, Hyun MS, Lim SY, Lee WY, and Kim D: The combination of berberine and irradiation enhances anti-cancer effects via activation of p38 MAPK pathway and ROS generation in human hepatoma cells. *J Cell Biochem.* 2009; 107: 955-964.
 10. Hwang JM, Kuo HC, Tseng TH, Liu JY, and Chu CY: Berberine induces apoptosis through a mitochondria/caspases pathway in human hepatoma cells. *Arch Toxicol.* 2006; 80(2): 62-73.
 11. Iizuka N, Hazama S, Yoshimura K, Yoshino S, Tangoku A, Miyamoto K, Okita K, and Oka M: Anticachectic effects of the natural herb *Coptidis rhizoma* and berberine on mice bearing colon 26/clone 20 adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 2002; 99(2): 286-291.
 12. Jennings V, and Gohla SH: Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN). *J Microencapsul* 2001; 18: 149-158.
 13. Kayser O, Lemle A, and Hernandez-Trejo N: The impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems. *Curr Pharmaceut Biotechnol* 2005; 6(1): 3-5.
 14. Key TJ, Allen NE, Spencer EA, and Travis RC: The effect of diet on risk of cancer. *Lancet.* 2002; 360: 861-868.
 15. Kim SA, Kwon Y, Kim JH, Muller MT, Chung IK: Induction of Topoisomerase II-Mediated DNA Cleavage by a Protoberberine Alkaloid, Berberrubine. *Biochemistry.* 1998;37: 16316-16324.
 16. Kuo LC, Chou CC, and Yung Y.-M. B: Berberine complexes with DNA in the berberine-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *Cancer Lett.* 1995; 93(2): 193-200.
 17. Labhasetwar V: Nanotechnology for drug and gene therapy: the importance of understanding molecular mechanisms of delivery. *Curr Opin Biotechnol* 2005; 16(6): 674-680.
 18. Lenaerts V, Labib A, Chouinard F, Rousseau J, Hasrat Ali and Vanlier J: Nanocapsules with a reduced liver uptake: targeting of phthalocyanines to EMT-6 mouse mammary tumor *in vivo*. *Eur J Pharm Biopharm* 1995; 41(1): 38-43.
 19. Liu RH: Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr.* 2004; 134: 3479-3485.

20. McGuire WP, Hoskins WJ, and Brady MF: A randomized trial of cyclophosphamide/cisplatin versus Paclitaxel/cisplatin in suboptimal stage III and IV ovarian cancer: a gynecologic oncology group study. *N Engl J Med.* 1996; 334: 1-6.
21. Meeran SM, Katiyar S, and Katiyar SK: Berberine-induced apoptosis in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species generation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008; 229(1): 33-43.
22. Moghimi SM: Mechanisms regulating body distribution of nanospheres conditioned with pluronic and tetronic block co-polymers. *Adv Drug Deliv Rev.* 1995; 16: 183-193.
23. Muller RH, Mader K, and Gohla S: Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000; 50: 161-177.
24. Piyanuch R, Sukhthankar M, Wandee G, and Baek SJ: Berberine, a natural isoquinoline alkaloid, induces NAG-1 and ATF3 expression in human colorectal cancer cells. *Cancer Lett.* 2007; 258(2): 230-240.
25. Ratner MA, and Ratner D: Nanotechnology: A gentle introduction to the next big idea. Prentice Hall PTR, Indianapolis, IN, 2002.
26. Senior JH: Fate and behavior of liposomes in vivo: a review of controlling factors. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1987; 3(2): 123-193.
27. Shabbits AJ, and Mayer DL: Intracellular delivery of ceramide lipids via liposomes enhances apoptosis in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2003; 1612: 98-106.
28. Tang J, Feng Y, Tsao S, Wang N, Curtain R, and Wang Y: Berberine and *Coptidis Rhizoma* as novel antineoplastic agents: A review of traditional use and biomedical investigations. *J Ethnopharmacol.* 2009; 126: 5-17.
29. Thirupurasundari CJ, Padmini R, and Devaraj SN: Effect of berberine on the antioxidant status, ultrastructural modifications and protein bound carbohydrates in azoxymethane-induced colon cancer in rats. *Chem Biol Interact.* 2009; 177(3): 190-195.
30. Westesena K, Bunjesa H, and Kochb MHJ. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. *J Control Release.* 1997; 48: 223-236.
31. Yu FS, Yang JS, Lin HJ, Yu CS, Tan TW, Lin YT, Lin CC, Lu HF, and

- Chung JG: Berberine inhibits WEHI-3 leukemia cells *in vivo*. *In Vivo*. 2007; 21(2): 407-412.
32. 王金龍，姚魯也：鈣製劑的進展。中國醫院藥學雜誌 1999; 6: 359-361。
 33. 王景璐，于慧敏：納米中藥與中藥複方現代化的探討。中華實用中西醫雜誌 2004; 4(17): 3326-3327。
 34. 行政院衛生署中華藥典編修委員會：中華藥典。2006; 第六版: 192-193。
 35. 行政院衛生署中醫藥委員會-中草藥用藥安全網。2009/11/12。
http://tcam.ccmp.gov.tw/meun_know_1_content.asp?aaa=106
 36. 呂霞，王晶，蔣文強，張鴻雁：黃連的研究進展。山東醫藥工業 2003; 22(6): 33-35。
 37. 李秀鳳，殷輝安，唐明林，安連英：納米中藥研究進展。中醫藥通報 2004; 3(5): 53-56。
 38. 李冰雪，王春龍，李傑：納米技術在現代中藥製劑中的應用。中草藥 2002; 33(8): 673-675。
 39. 李海濤，孫靚：脂質體技術在中藥方面應用的概況。江蘇中醫藥 2005; 26(5): 57-58。
 40. 柳娜，楊祥良：奈米爐甘石體外抗菌作用的研究。中成藥 2005; 27(9): 1083-1084。
 41. 唐發清：黃連及其複方對人鼻咽癌細胞殺傷動力學研究。湖南中醫學院學報 1995; 15(4): 41-44。
 42. 徐輝碧，楊祥良，黃開勳：雄黃抑制小鼠肉瘤 S₁₈₀ 的尺寸效應的初步研究。武漢大學學報(自然科學報) 2000; 特刊 1: 288-289。
 43. 徐輝碧，楊祥良，謝長生：納米技術在中藥研究中的應用。中國藥科科學學報 2001; 32(3): 161-165。
 44. 崔學軍：黃連及其有效成分的藥理研究進展。中國藥師 2006; 9(5): 469-470。
 45. 張憲印，安麗華，邵智：黃連及其制品的不良反應和治療。時珍國醫國藥 2003; 14(11): 714。
 46. 張曉靜：中藥納米化的作用及存在的問題。江蘇中醫藥 2003; 24(3): 40-44。
 47. 舒華，向麗華：黃連藥理作用及臨床應用。甘肅中醫 2004; 12: 5-6。
 48. 馮奕斌，羅偉權，朱世清：從黃連及其複方古今臨床應用，發掘現代臨床新應用。中國中藥雜誌。中國中藥雜誌 2008; 33(10): 1221-1225。
 49. 黃林清，徐傳福，周世文，張詩平，姚丹凡：小檗鹼抗腫瘤作用實驗研究。中國藥理學通報 1997; 13(2): 189。

50. 楊祥良，徐輝碧，謝長生：基於納米技術的中藥問題研究。華中理工大學學報2000; 28(12): 104-106。
51. 靳琦，胡定邦，王子炎：論中藥現代化研究的基本思路。中國醫藥學報 2002; 15(2): 57-60。
52. 劉映麓，羅曉燕，尹春南：鹽酸黃連素的苦味包合研究。廣東藥學 1999; 93(24): 24-25。
53. 劉衍興，郭輝：小檗鹼及其脂質體降血糖作用實驗研究。基層中藥雜誌 1999; 13(1): 18-19。
54. 劉產明，楊洪元：不同粉碎度三七體外溶出試驗。中成藥 1998; 20(2): 17-19。
55. 薛玉英，翁幗英，何俊峰，徐斌：口服硫酸氫黃連素脂質體的研制。中國中藥雜誌 1995; 20(12): 730-731。
56. 邊可君，楊詳良等：納米石決明的研究。中成藥 2003; 25(4): 296。

柒、圖、表

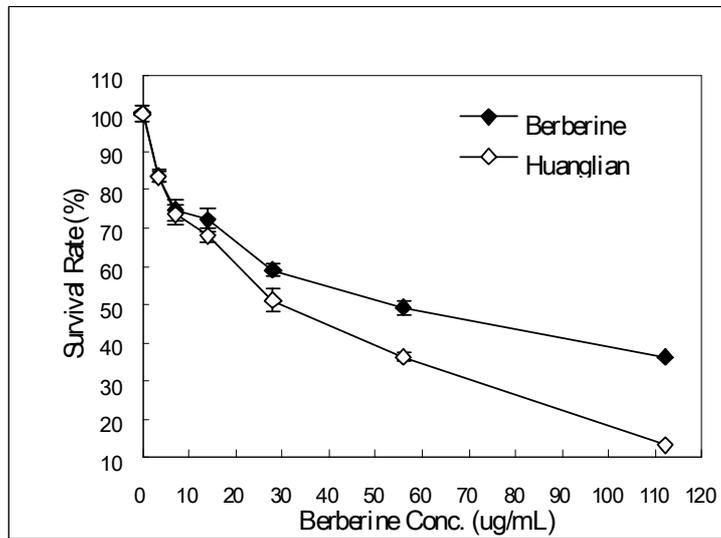


圖 3-1、鹽酸小檗鹼水溶液與黃連水萃液對 HepG2 細胞生長的影響
Figure 3-1. Effect of berberine solution and huanglian extract on the growth of HepG2 cells. Results are means \pm SD, n=3.

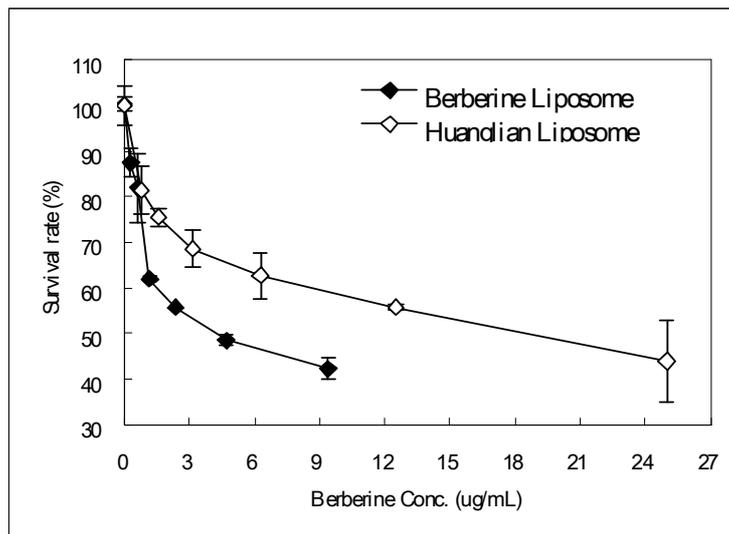


圖 3-2、鹽酸小檗鹼奈米微脂體與黃連奈米微脂體對 HepG2 細胞生長的影響
Figure 3-2. Effect of berberine liposomes and huanglian liposomes on the growth of HepG2 cells. Results are means \pm SD, n=3.

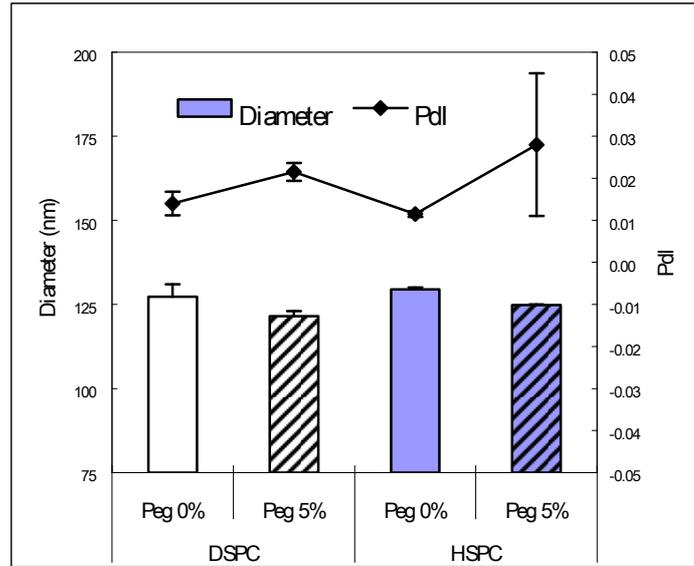


圖 3-3、鹽酸小檗鹼奈米微脂體之脂質組成對微脂體的粒徑大小以及粒徑分布的影響

(PEG: polyethylene glycol、DSPC: distearoyl phosphatidylcholine、HSPC: hydrogenated soybean phosphatidylcholine)

Figure 3-3. Effect of lipid compositions of berberine liposomes on the diameter and particle distribution of berberine liposomes.

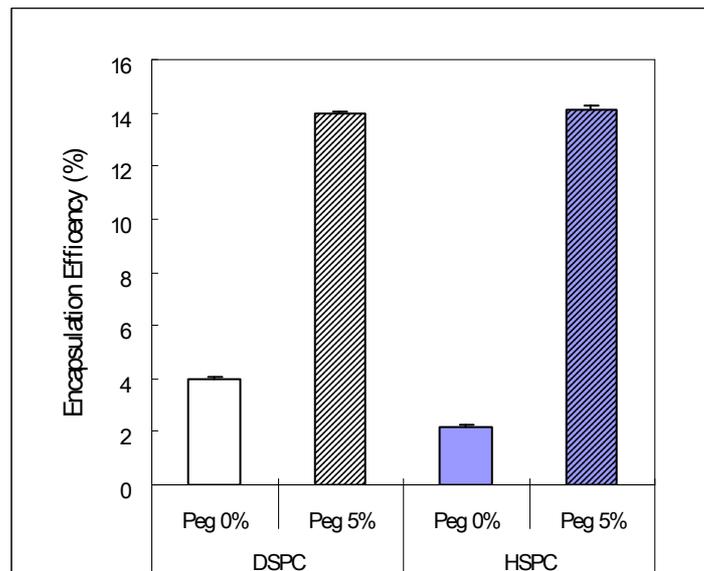


圖 3-4、鹽酸小檗鹼奈米微脂體之脂質組成對鹽酸小檗鹼包覆率的影響

Figure 3-4. Effect of lipid compositions of berberine liposomes on the encapsulation efficiency of berberine.

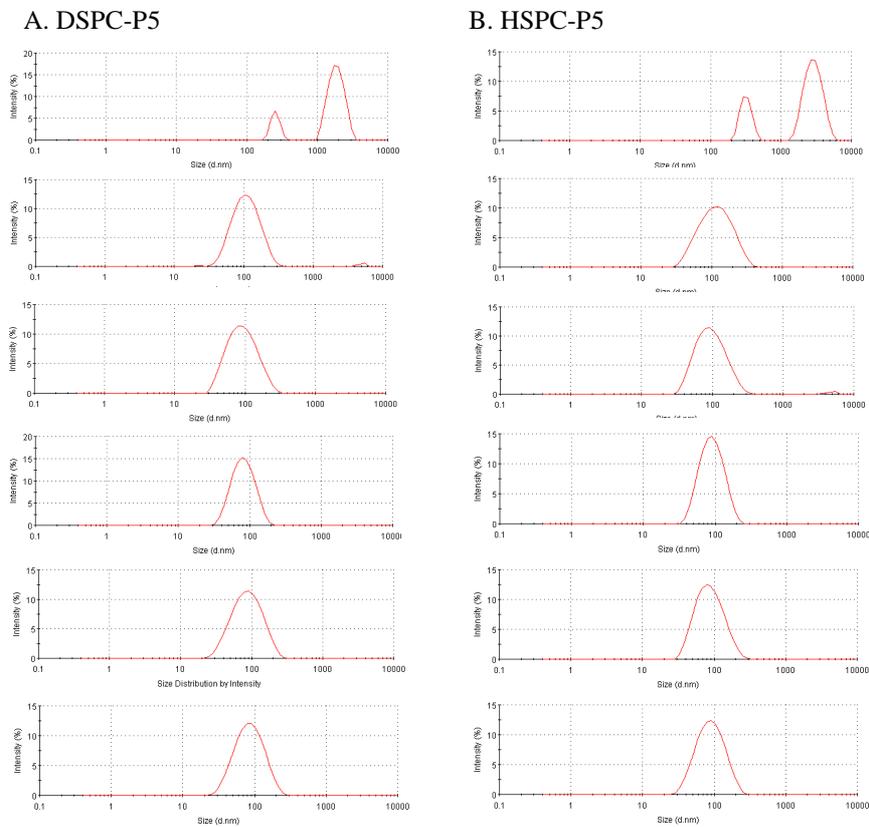
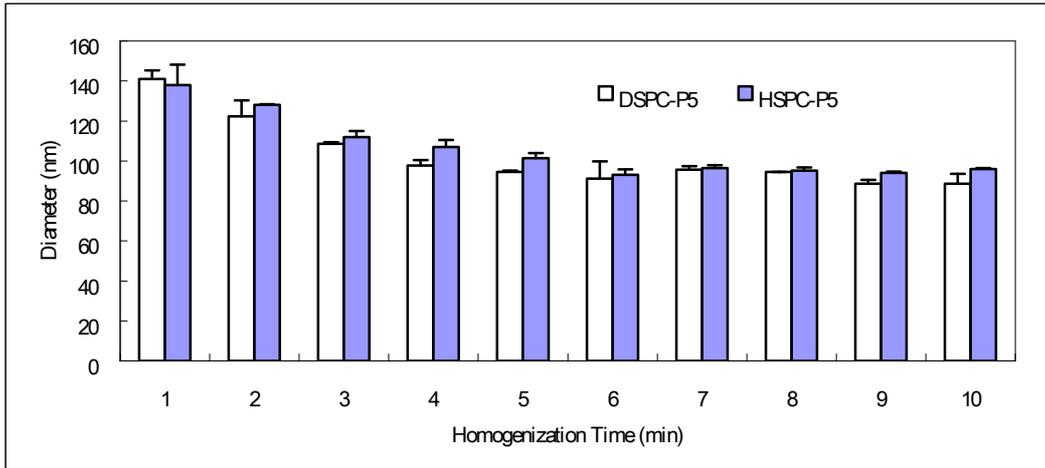


圖 3-5、鹽酸小檗鹼奈米微脂體以 25000 psi 均質 0~10 分鐘的粒徑變化圖。
 A 與 B 小圖分別為 DSPC-P5 組與 HSPC-P5 組之粒徑分析圖
 Figure 3-5. The particle sizes of berberine liposomes which were homogenized at 25000 psi for 0~10 mins. (A) DSPC-P5 and (B) HSPC-P5 particle size distribution of berberine liposomes.

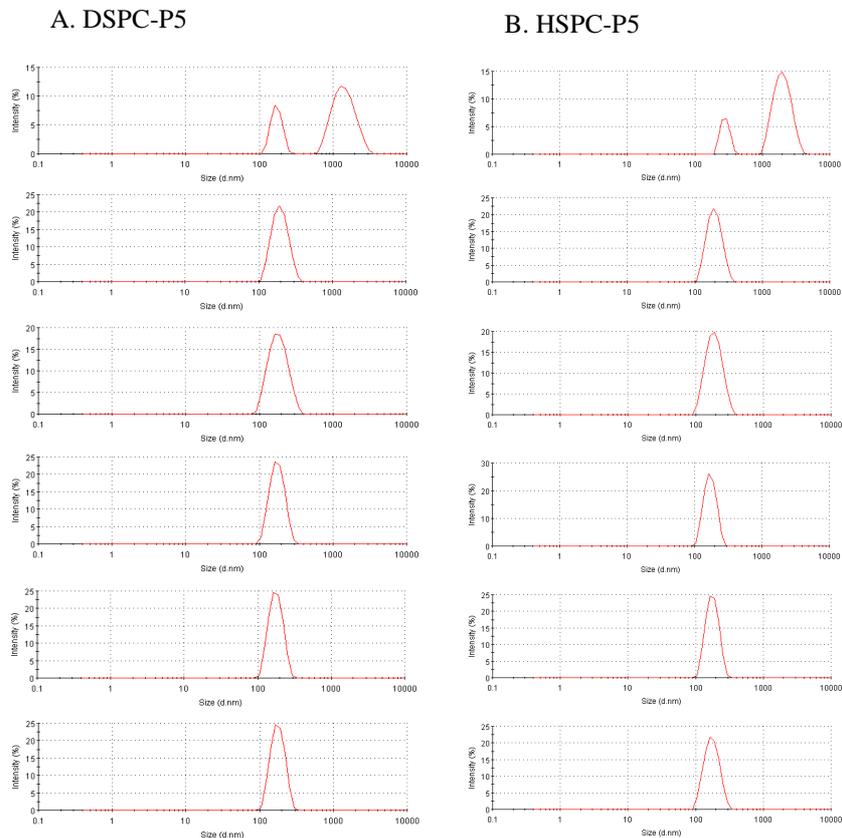
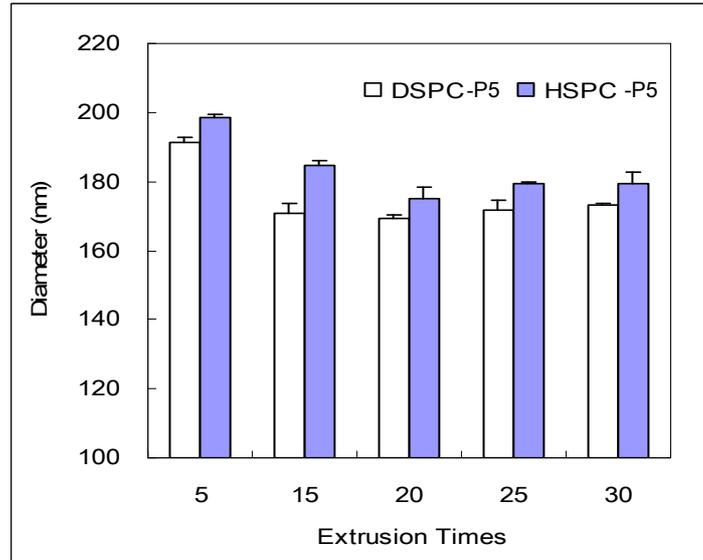


圖 3-6、鹽酸小檗鹼奈米微脂體以孔徑為 200 nm 的 PC 膜擠壓過程中的粒徑變化圖。A 與 B 小圖分別為 DSPC-P5 組與 HSPC-P5 組之粒徑分析圖。

Figure 3-6. The particle sizes of berberine liposomes which were extruded through 200 nm pore size PC membrane. (A) DSPC-P5 and (B) HSPC-P5 particle size distribution of berberine liposomes.

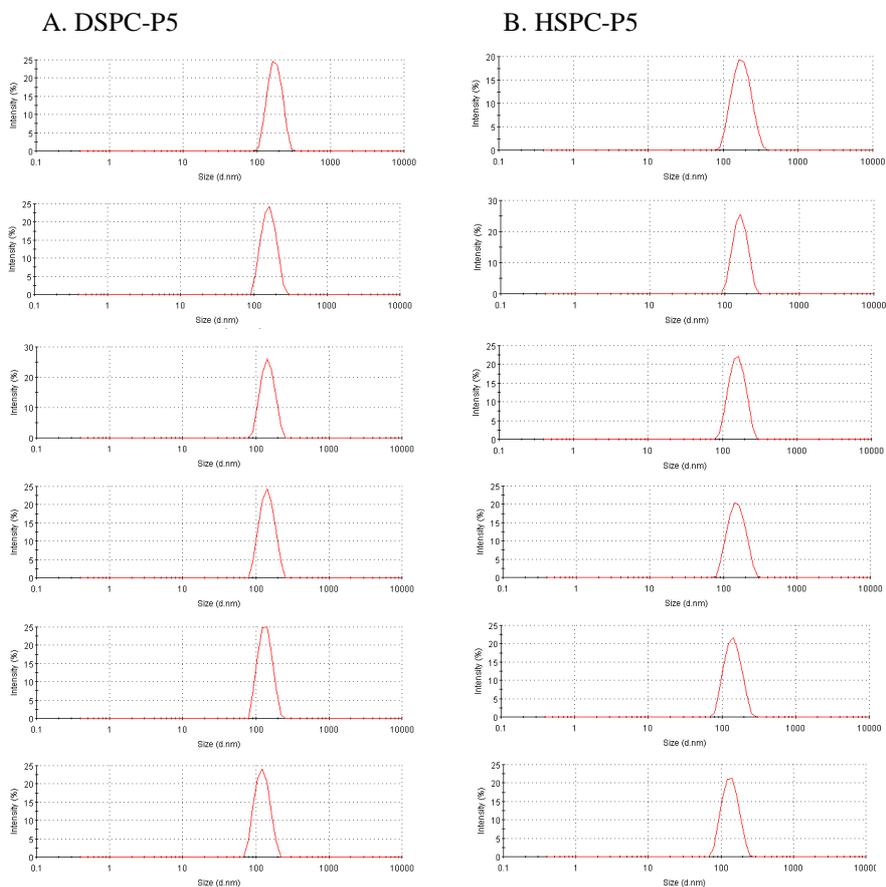
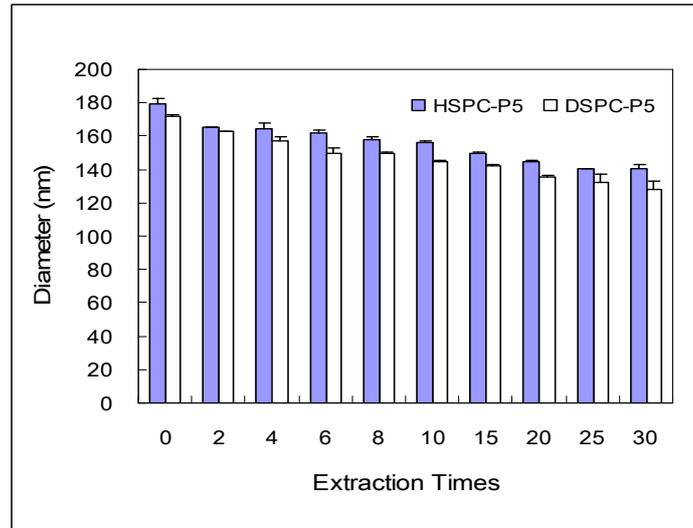
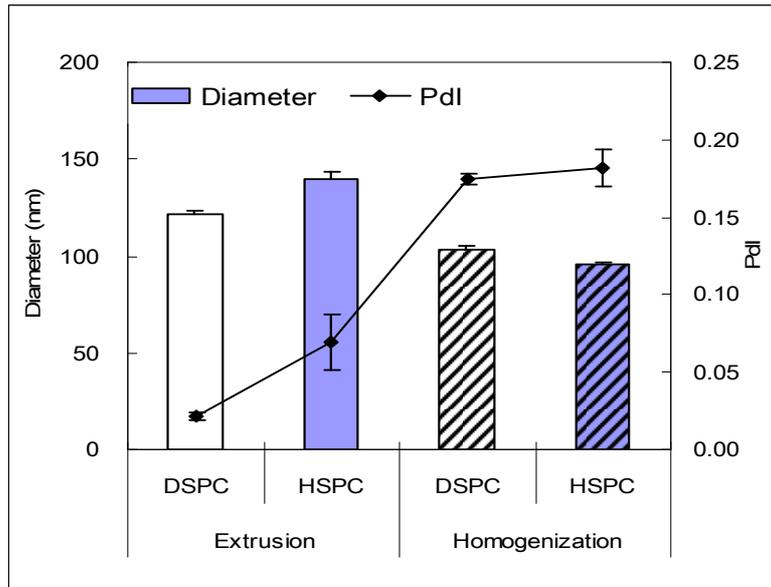
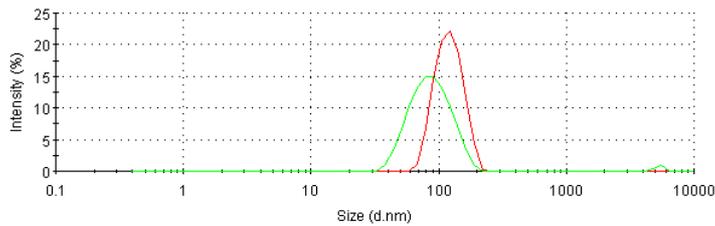


圖 3-7、鹽酸小檗鹼奈米微脂體以孔徑為 100 nm 的 PC 膜擠壓過程中的粒徑變化圖。A 與 B 小圖分別為 DSPC-P5 組與 HSPC-P5 組之粒徑分析圖。

Figure 3-7. The particle sizes of berberine liposomes which were extruded through 100 nm pore size PC membrane. (A) DSPC-P5 and (B) HSPC-P5 particle size distribution of berberine liposomes.



A. DSPC



B. HSPC

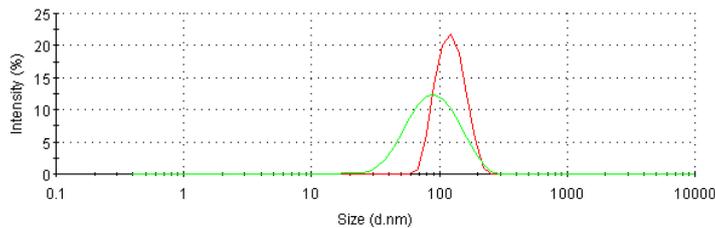


圖 3-8、鹽酸小檗鹼微奈米脂體之製備方法與脂質組成對微脂體的粒徑大小以及粒徑分布的影響。A 與 B 小圖分別為 DSPC-P5 組與 HSPC-P5 組之粒徑分析圖。綠色線為高壓均質法之粒徑分布，而紅色線為過濾擠壓法之粒徑分布。

Figure 3-8. Effect of lipid compositions and preparation methods on the diameter and particle distribution of berberine liposomes. (A) DSPC-P5 and (B) HSPC-P5 particle size distribution of berberine liposomes. Green line is the sample prepared by homogenization method and red line is the one prepared by extrusion method.

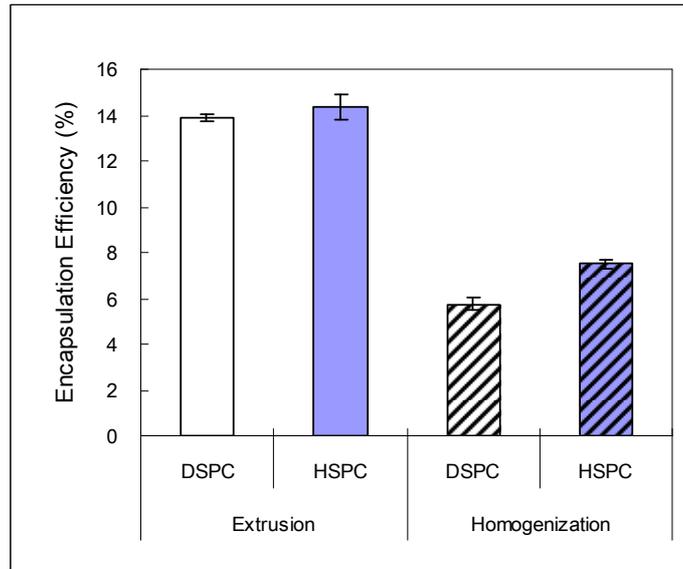


圖 3-9、鹽酸小檗鹼奈米微脂體之製備方法與脂質組成對鹽酸小檗鹼包覆率的影響

Figure 3-9. Effect of lipid compositions and preparation methods of berberine liposomes on the encapsulation efficiency of berberine.

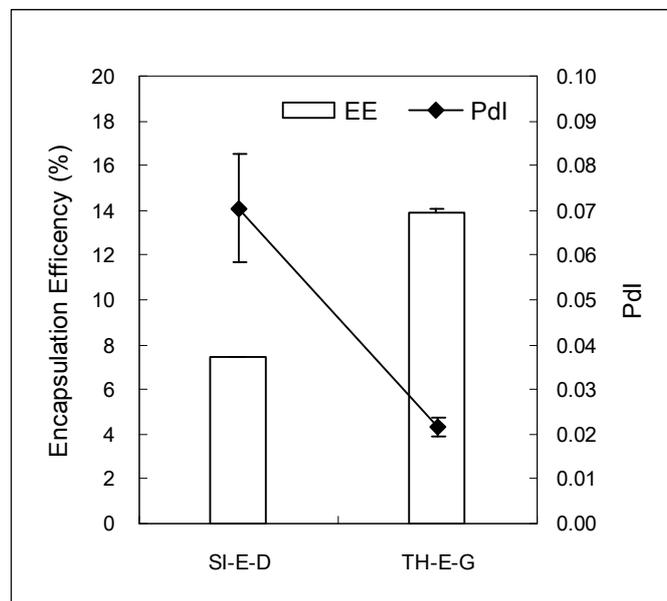


圖 3-10、鹽酸小檗鹼奈米微脂體製備方法對對微脂體的粒徑分布與鹽酸小檗鹼包覆率的影響。

Figure 3-10. Effect of preparation methods of berberine liposomes on the particle distribution and the encapsulation efficiency of berberine.

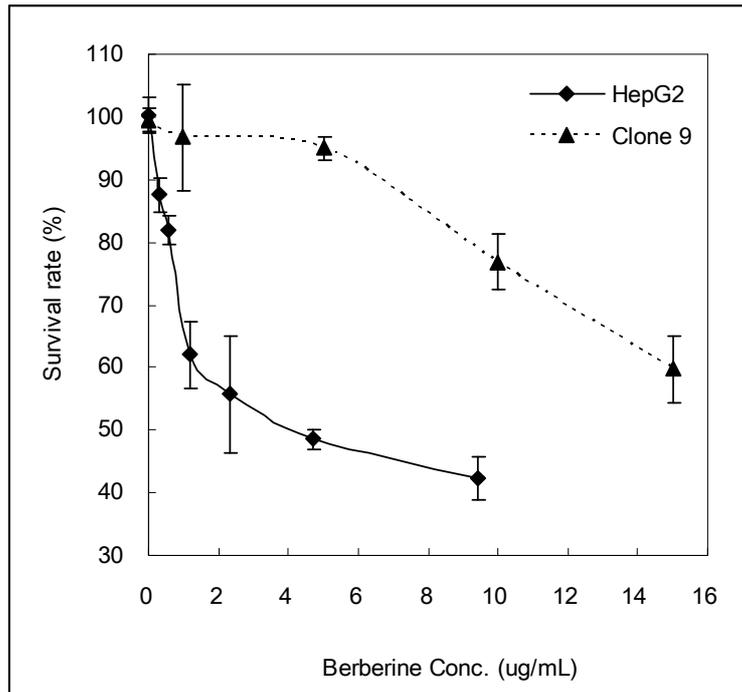


圖 3-11、鹽酸小檗鹼奈米微脂體對 Clone 9 細胞與 HepG2 細胞生長的影响。
 Figure 3-11. Effect of berberine liposomes on the growth of Clone 9 cells and HepG2 cells. Results are means \pm SD, n=3.

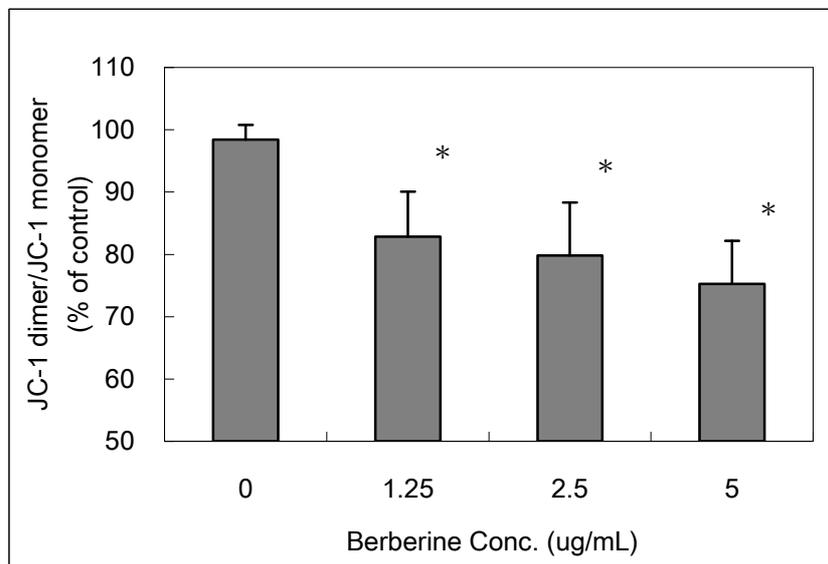


圖 3-12、不同濃度的鹽酸小檗鹼奈米微脂體對 HepG2 細胞的粒線體膜電位影响。

Figure 3-12. The effect of berberine concentrations of berberine liposomes on the mitochondrial membrane potential of HepG2 cells. Results are means \pm SD, n=2.

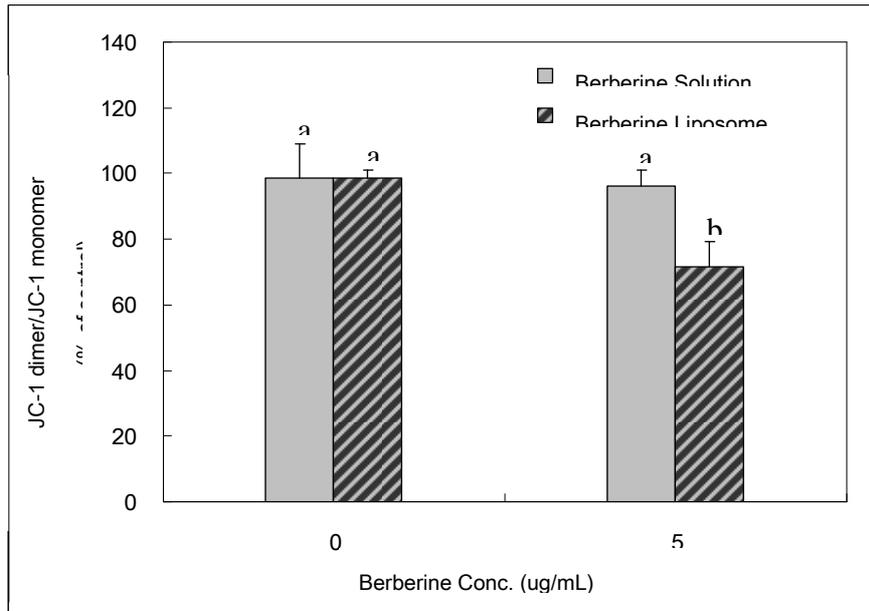


圖 3-13、鹽酸小檗鹼奈米微脂體及小檗鹼水溶液對 HepG2 細胞的粒線體膜電位影響。

Figure 3-13. The effect of berberine solution and berberine liposomes on the mitochondrial membrane potential of HepG2 cells. Results are means \pm SD, n=2.

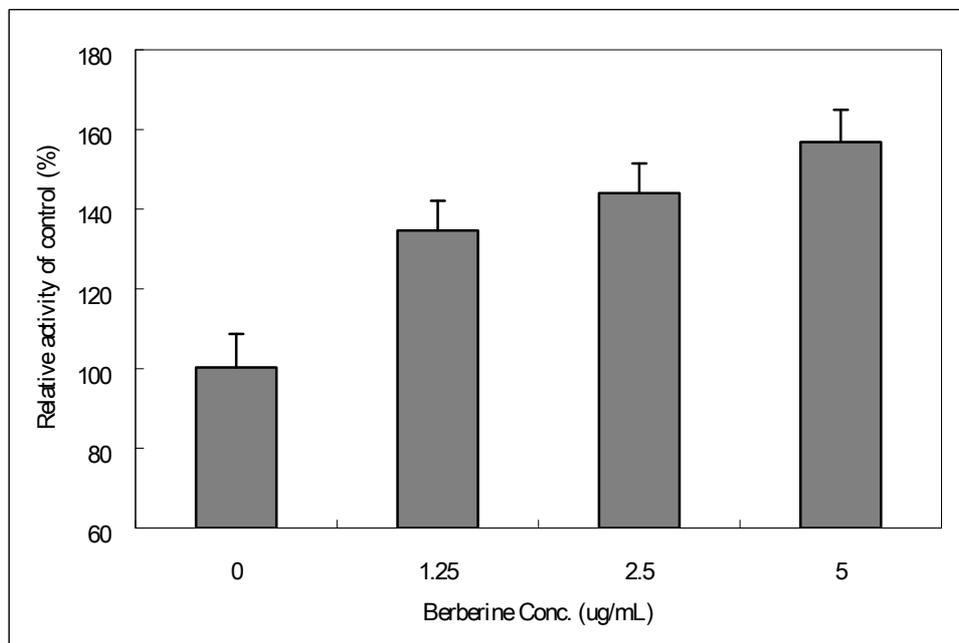


圖 3-14、不同濃度的鹽酸小檗鹼奈米微脂體對 HepG2 細胞中 Caspase 3 活性影響。

Figure 3-14. The effect of berberine concentrations of berberine liposomes on the activity of caspase 3 in HepG2 cells. Results are means \pm SD, n=2.

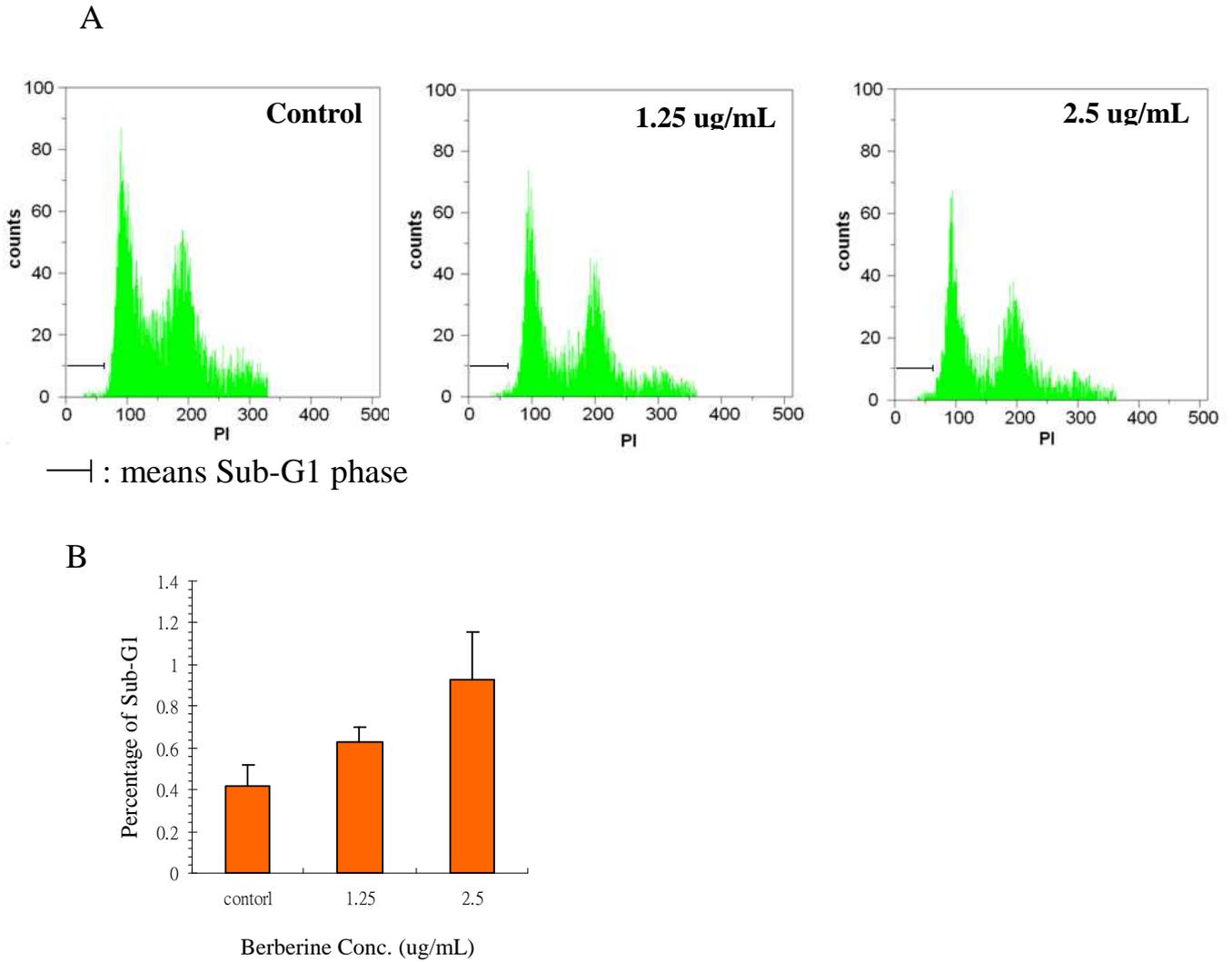


圖 3-15、鹽酸小檗鹼奈米微脂體對 HepG2 細胞週期的影響。A 小圖為流式細胞儀所偵測出的細胞週期之結果；B 小圖為 sub-G1 細胞含量分析結果。

Figure 3-15. Effect of berberine liposome on the cell cycle of HepG2 cells. A: Assessment of cell death by flow cytometry. B: The ratio of Sub-G1 cells. Results are means \pm SD, n=2.

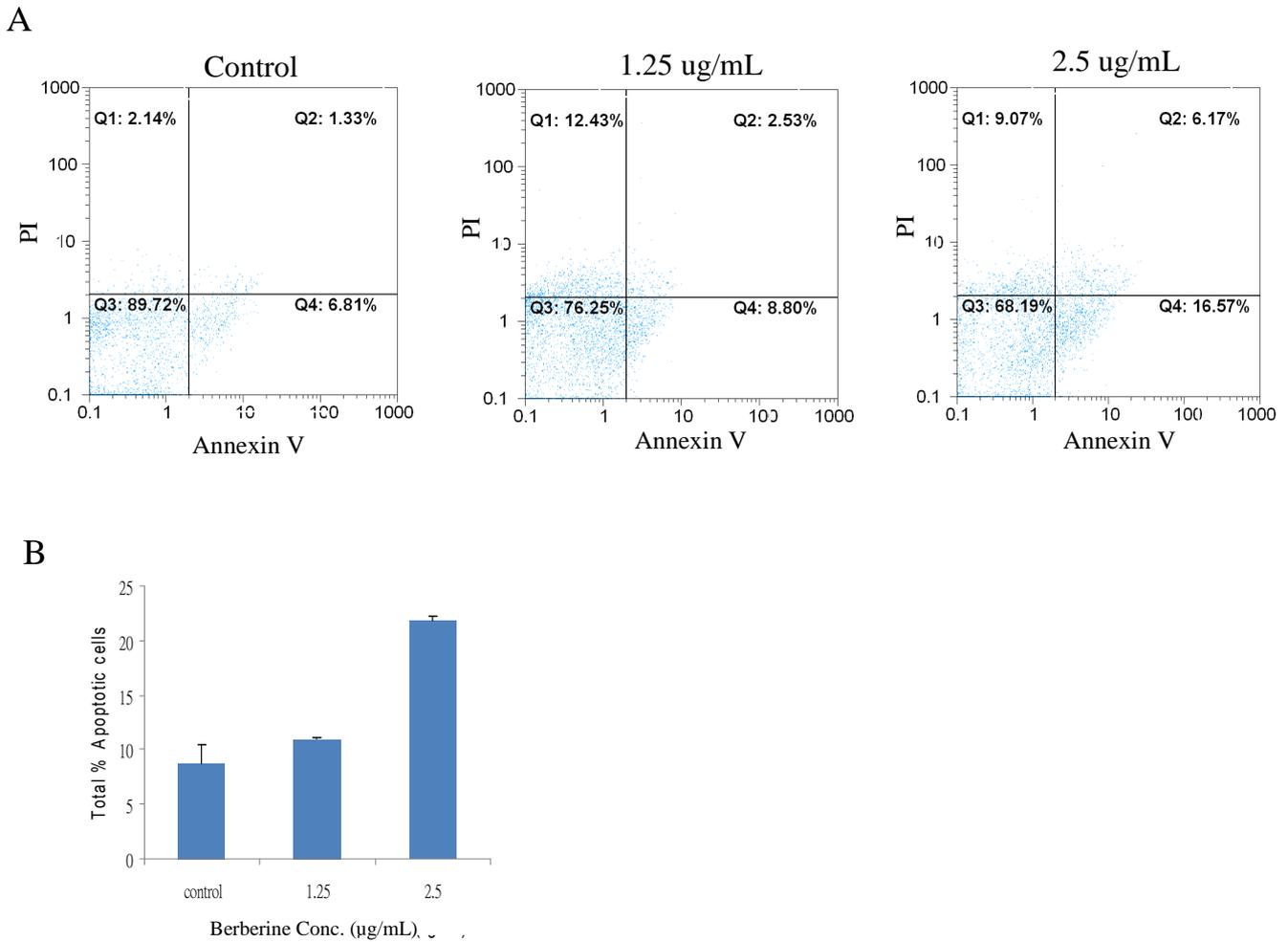


圖 3-16、鹽酸小檗鹼奈米微脂體對 HepG2 細胞凋亡的影響。A 小圖為流式細胞儀所偵測出的細胞週期之結果；B 小圖為總凋亡細胞含量分析結果。

Figure 3-16. Effect of berberine liposome on the apoptosis of HepG2 cells. A: Assessment of cell death by flow cytometry. Lower right quadrant: early apoptotic cells (annexin V-FITC-positive/PI-negative cells); upper right quadrant: late-apoptotic cells (annexin V-FITC-positive/PI-positive cells). B: The ratio of total apoptotic cells (early-apoptotic cells and late-apoptotic cells) was showed. Results are means \pm SD, n=2.

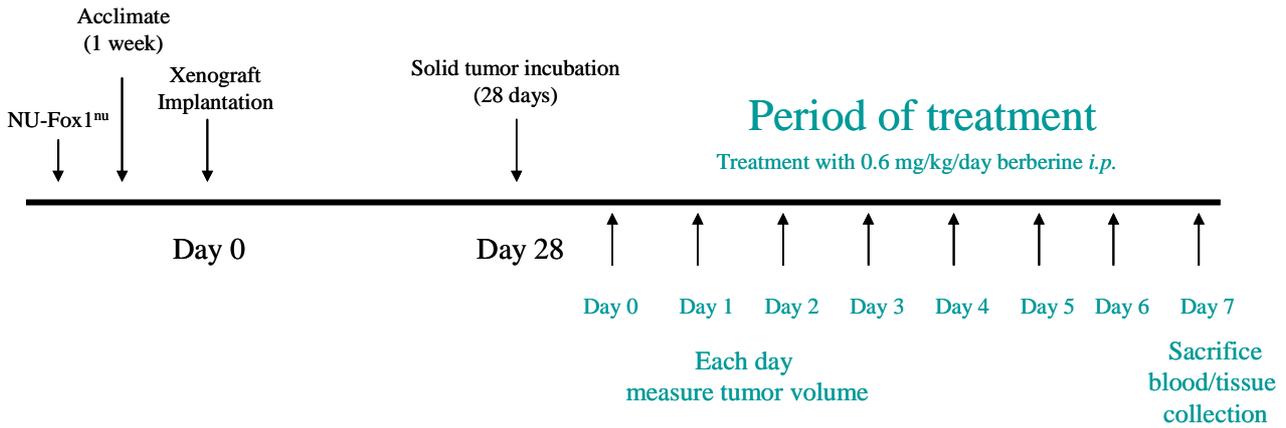


圖 3-17、腹腔注射鹽酸小檗鹼奈米微脂體對裸鼠皮下肝癌生長之影響實驗設計與期程。

Figure 3-17. The experimental design and schedule of berberine liposome inhibitory effect on growth of HepG2 injected subcutaneously into nude mice.

表 3-1、腹腔注射鹽酸小檗鹼奈米微脂體群組實驗前後裸鼠平均體重之變化
Table 3-1. Initial body weight, final body weight and total body weight gain of HepG2 injected nude mice with or without treatment.

Groups	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Total body weight gain (g)
Lipo-Ber 0.15 mg/kg ^a	29.5±2.9	27.7±3.9	-2.0±6.4
Lipo-Ber 0.6 mg/kg ^a	28.3±5.4	26.3±4.8	-2.0±0.8
Ber 0.6 mg/kg ^b	26.5±0.7	24.5±0.7	-2.0±0.7
Control ^b	30.0±4.2	23.5±0.7	-6.5±0.7
Normal ^a	30.0±3.3	28.5±1.5	-3.5±1.7

^aResults are mean±SD, n=4.

^bResults are mean±SD, n=2.

Control was HepG2 injected nude mice without treatment.

Normal was nude mice without treatment.

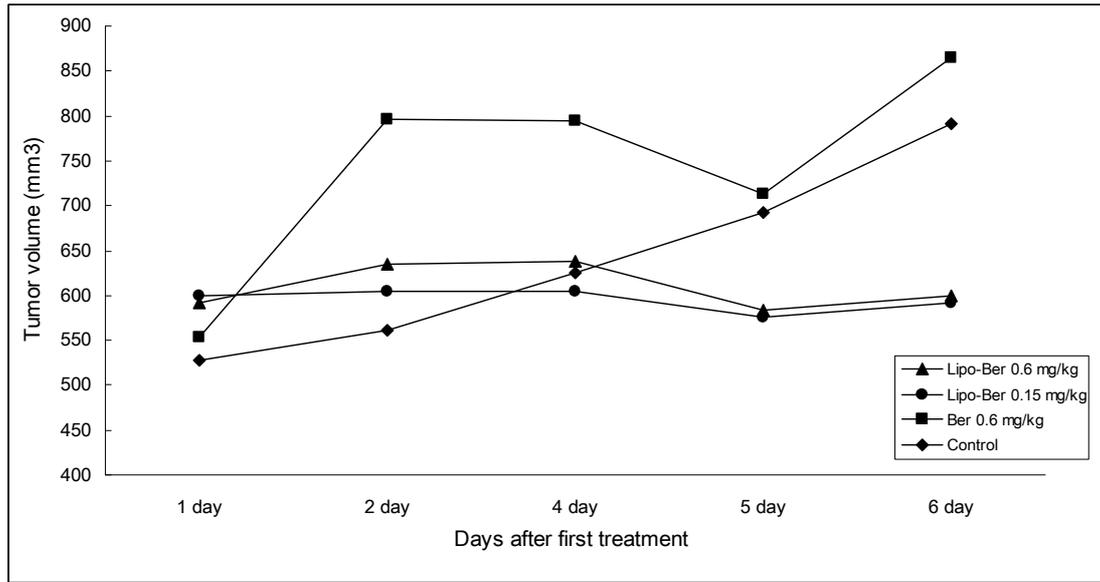


圖 3-18、裸鼠在給藥期間之腫瘤體積變化。

Figure 3-18. Tumor volume in the treatment period of nude mice. Results are means, n=2.

表 3-2、腹腔注射鹽酸小檗鹼奈米微脂體對裸鼠皮下肝癌腫瘤生長體積與重量之抑制效應。

Table 3-2. Inhibitory effect of Lipo-Ber on growth of HepG2 tumor enografts in nude mice.

Group	Tumor volume (mm ³)	Inhibition (%)	Tumor weight (mg)	Inhibition (%)
Lipo-Ber 0.15 mg/kg ^b	529±529.15	33.12	502±377.3	50.98
Lipo-Ber 0.6 mg/kg b.w ^b	600±13.86	24.15	919±503.9	10.26
Ber 0.6 mg/kg b.w ^a	866±51.91	-9.48	1279±910.0	-24.91
Control ^a	791±213.90	0	1024±294.9	0

^a Results are mean±SD, n=4.

^b Results are mean±SD, n=2

Control was HepG2 injected nude mice without treatment.

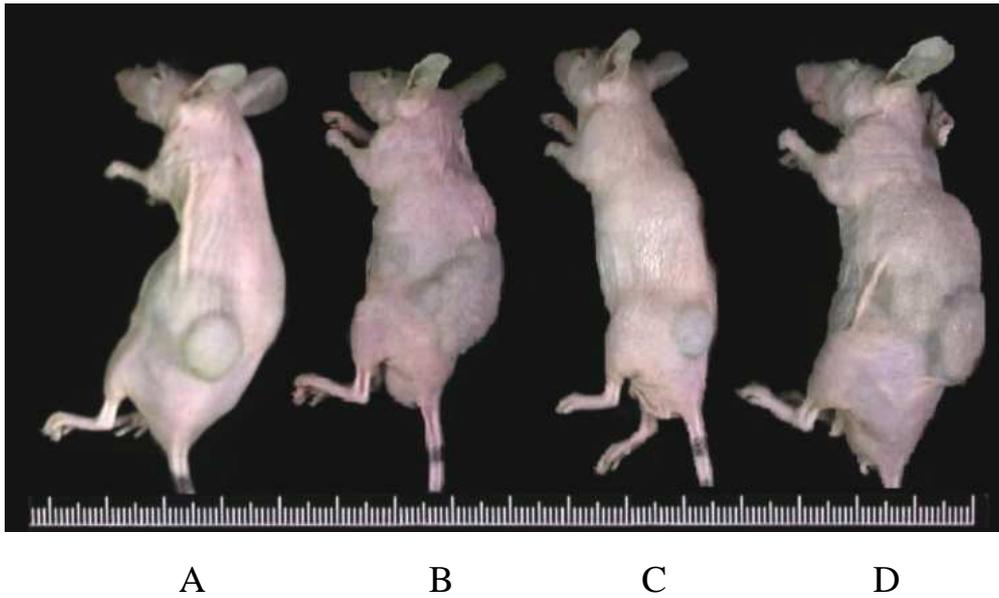


圖 3-19、裸鼠犧牲時各組別未取下之腫瘤情形
Figure 3-19. Tumor condition at sacrificed. A: Control, B: Lipo-Ber 0.6 mg/kg,
C: Lipo-Ber 0.15 mg/kg, D: Ber 0.6 mg/kg.

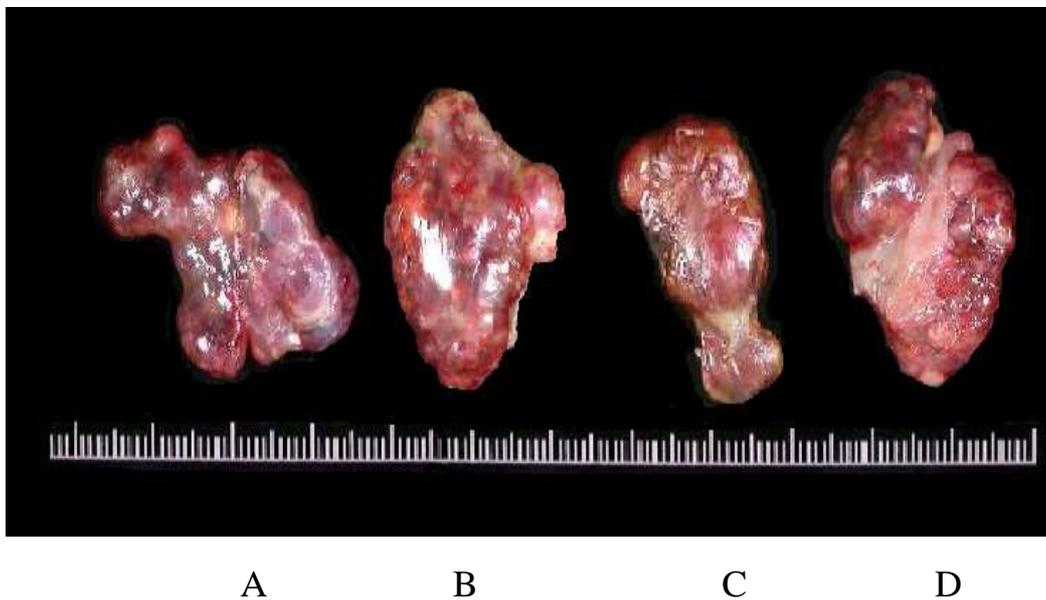


圖 3-20、裸鼠犧牲時各組別已取下之腫瘤情形
Figure 3-20. Tumor condition at sacrificed. A: Control, B: Lipo-Ber 0.6 mg/kg,
C: Lipo-Ber 0.15 mg/kg, D: Ber 0.6 mg/kg.

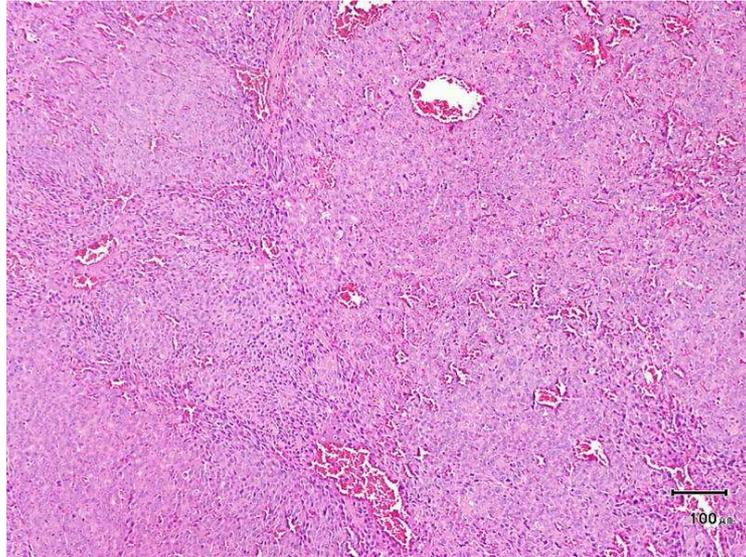


圖 3-21、裸鼠皮下腫瘤組織切片之影像

Figure 3-21. Image of histological characteristics of tumor tissue. (Hematoxylin/Eosin staining, 200x)

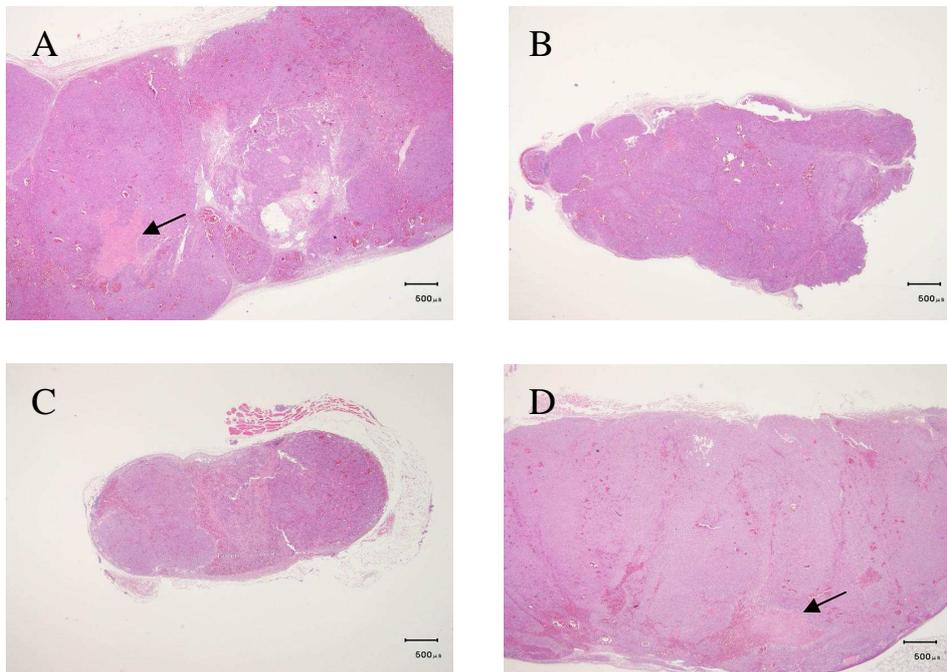


圖 3-22、實驗中各組別腫瘤組織切片之影像

Figure 3-22. Images of histological characteristics in different groups of tumor tissue. (Hematoxylin/Eosin staining, 2x), A: Control, B: Lipo-Ber 0.6 mg/kg, C: Lipo-Ber 0.15 mg/kg, D: Ber 0.6 mg/kg. Arrow: Apoptosis part.

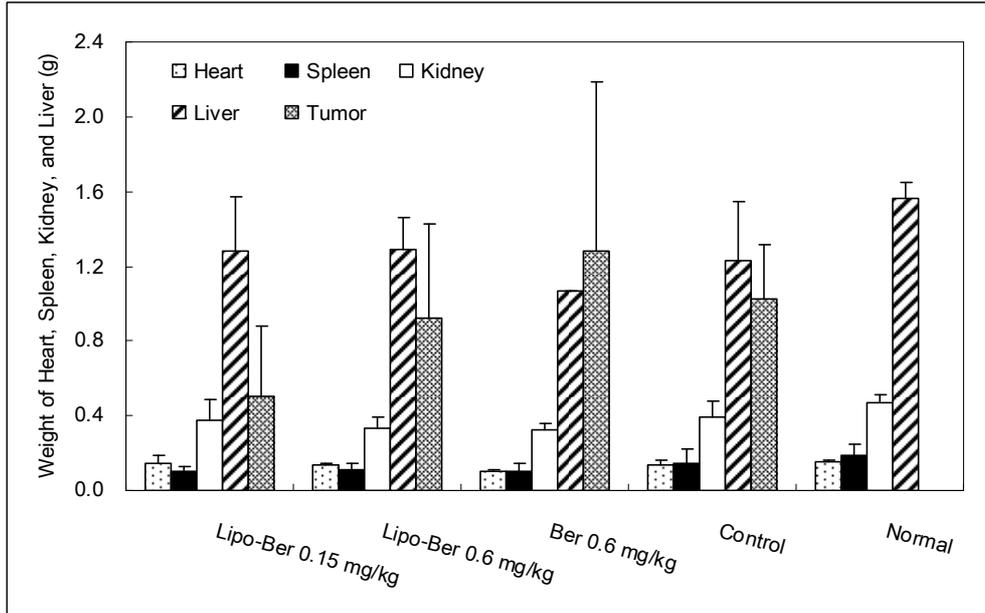


圖 3-23、裸鼠犧牲時各臟器(心、脾、腎及肝)及腫瘤重量

Figure 3-23. Weight of heart, spleen, kidney, liver, and tumor measured after sacrificed.

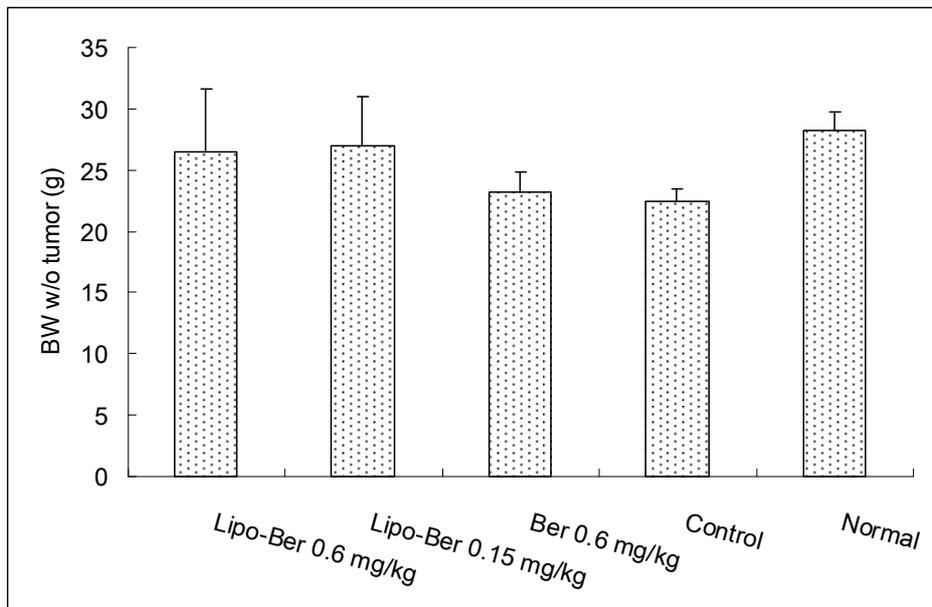


圖 3-24、裸鼠犧牲之淨體重

Figure 3-24. Body weight without tumor measured after sacrificed.

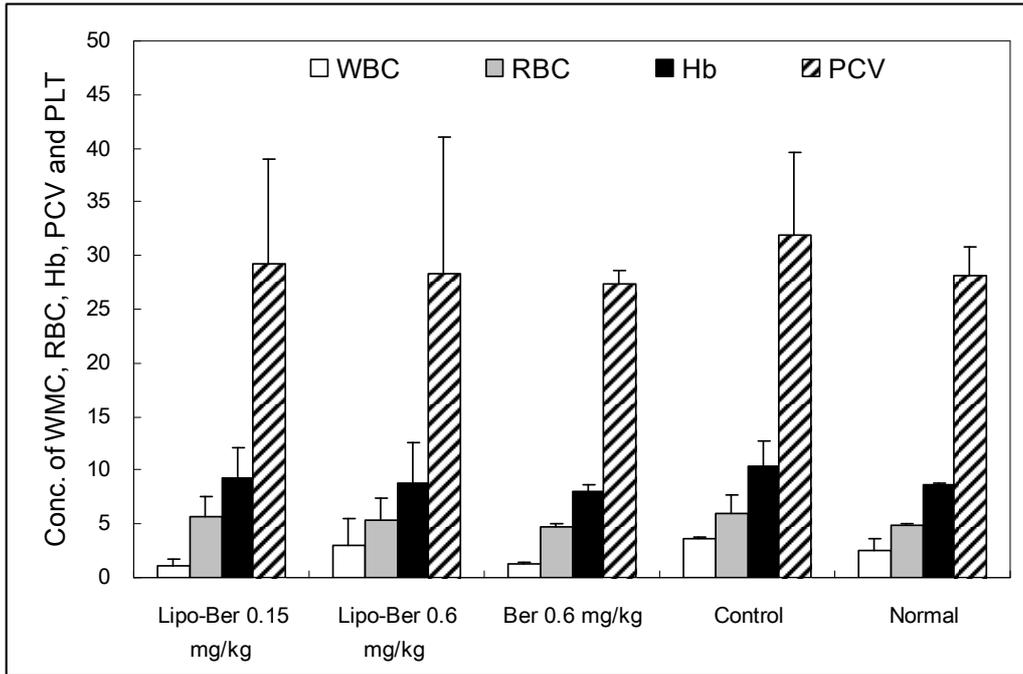


圖 3-25、裸鼠之各項血球計數值

Figure 3-25. Complete blood cell counts of nude mice.

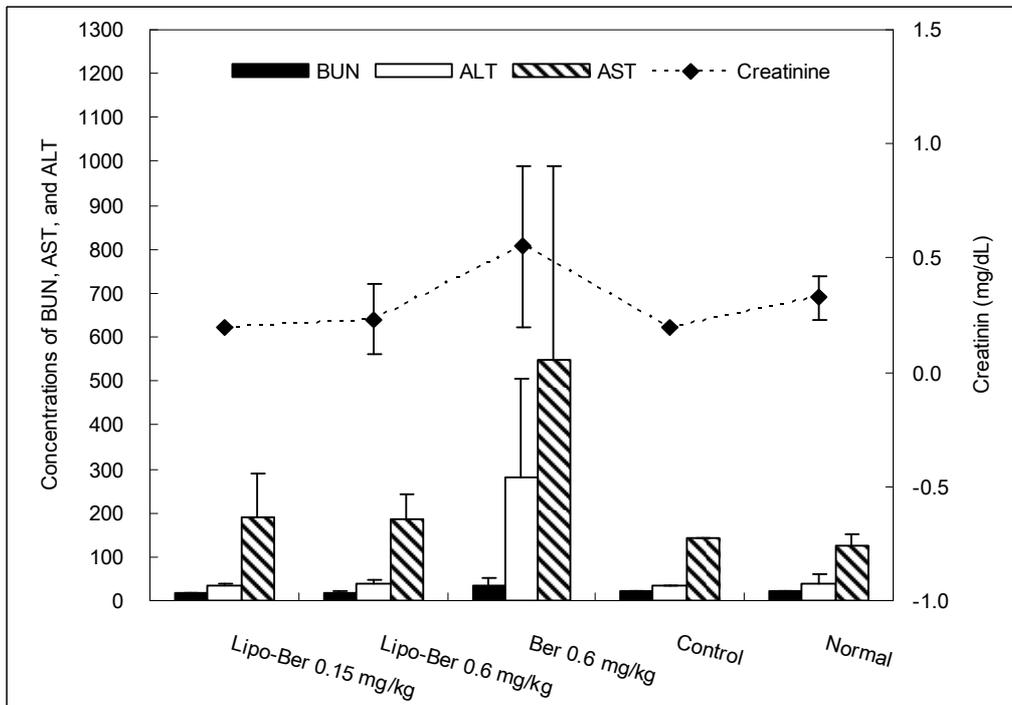


圖 3-26、裸鼠之各項血清生化數值

Figure 3-26. Blood chemistry of nude mice.

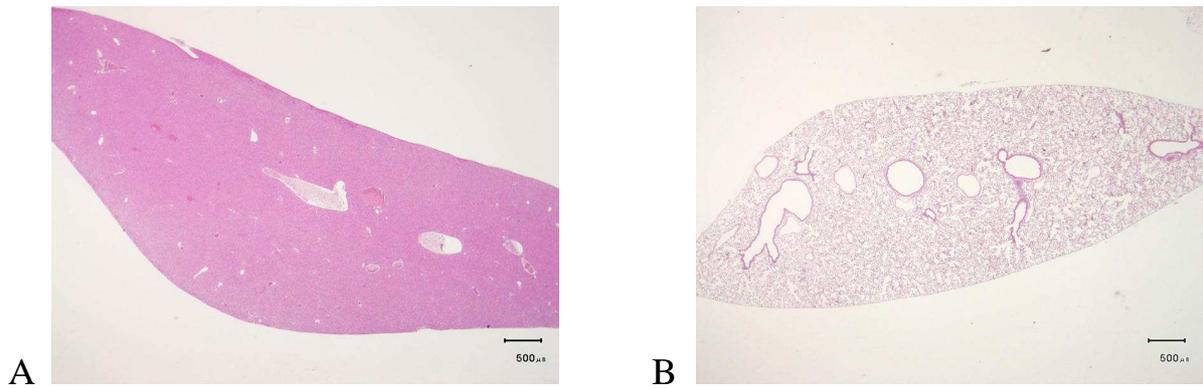


圖 3-27、給予 Lipo-Ber 0.6 mg/kg 組別之裸鼠臟器切片 A：肝 B：肺。
Figure 3-27. Images of organs' histological characteristics in Lipo-Ber 0.6 mg/kg group. (Hematoxylin/Eosin staining, 2x). A: Liver; B: Lung.

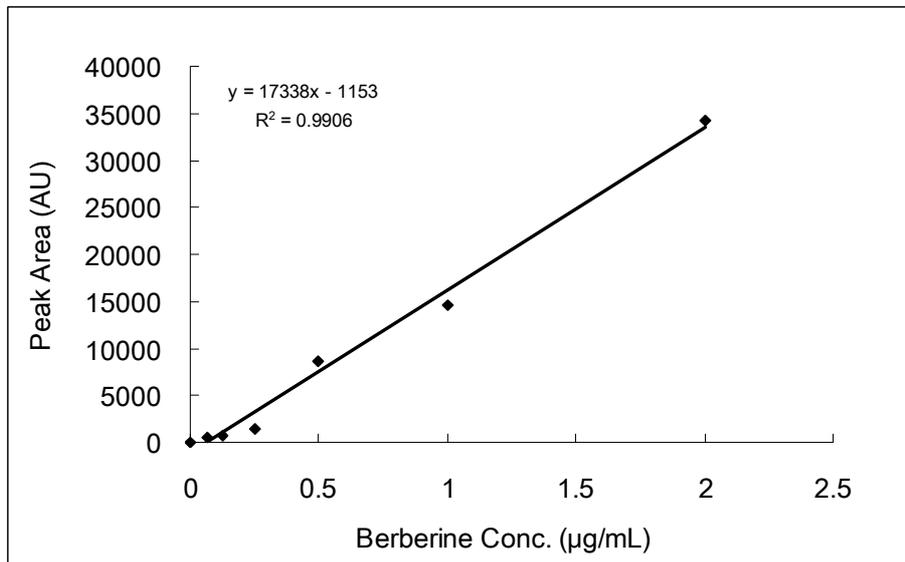


圖 3-28、鹽酸小檗鹼在血液中之標準曲線
Figure 3-28. Standard curve of berberine concentration in blood.

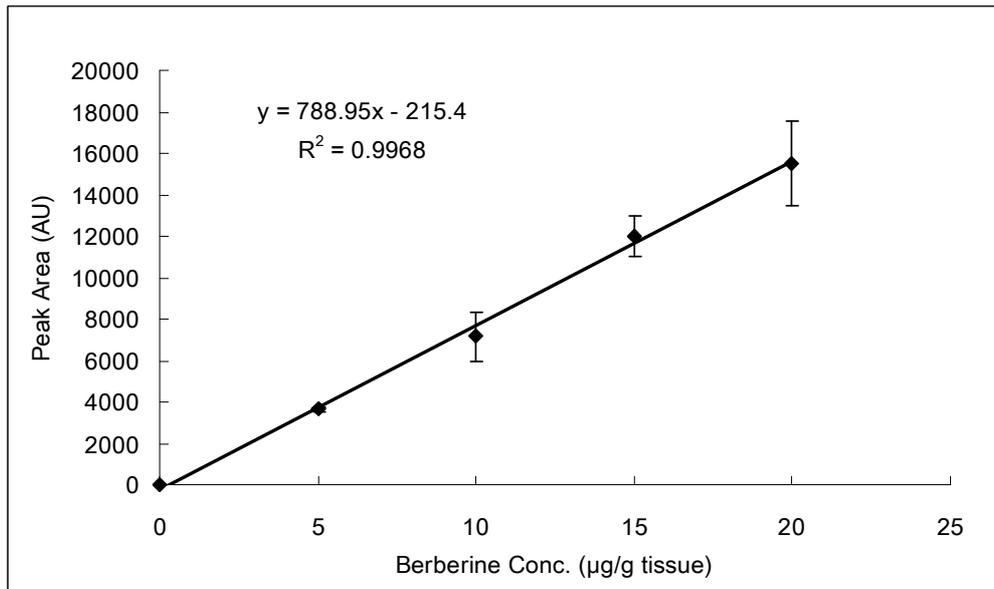


圖 3-29、鹽酸小檗鹼在組織中之標準曲線

Figure 3-29. Standard curve of concentration of berberine in tissue.

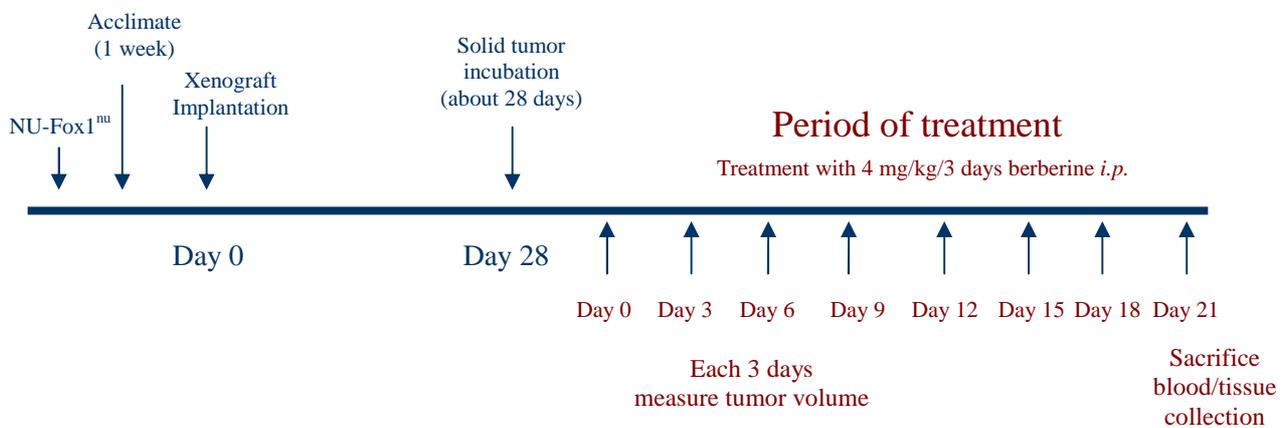


圖 3-30、腹腔注射高劑量鹽酸小檗鹼奈米微脂體對裸鼠皮下肝癌生長之影響實驗設計與期程

Figure 3-30. The experimental design and schedule of high-dose berberine liposome inhibitory effect on growth of HepG2 injected subcutaneously into nude mice.

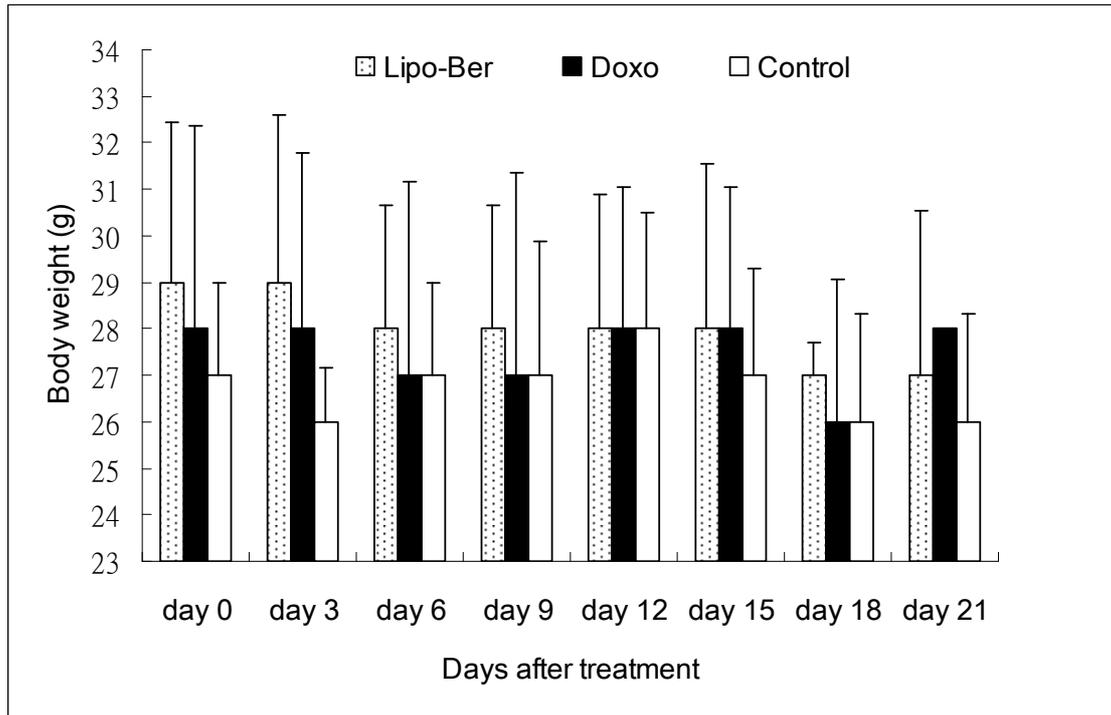


圖 3-31、藥物對未接種腫瘤裸鼠之體重變化情形

Figure 3-31. Drug effects to body weight of nontumor-bearing nude mice.

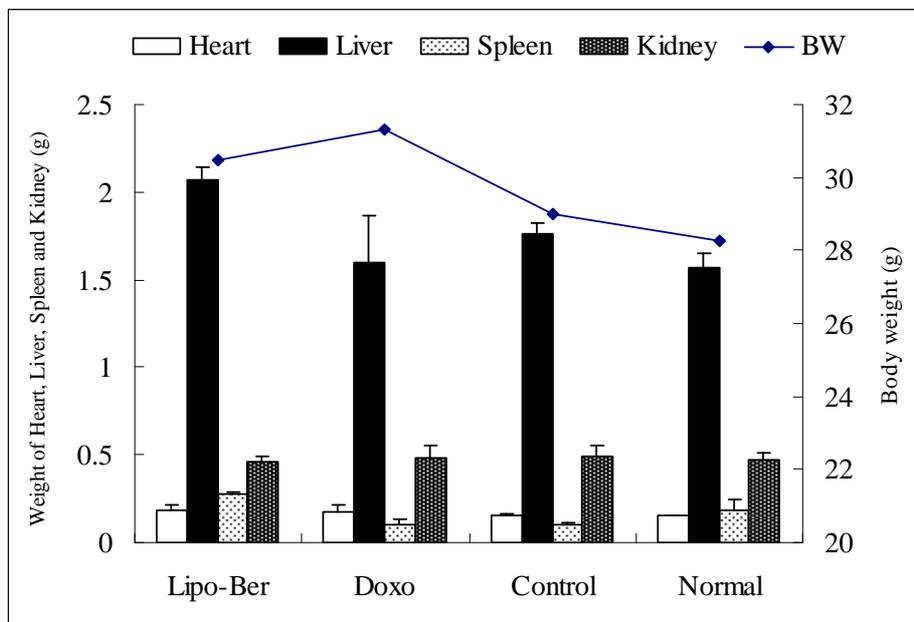


圖 3-32、給予高劑量鹽酸小檗鹼奈米微脂體裸鼠犧牲時各臟器(心、脾、腎及肝)重量

Figure 3-32. Weight of nontumor-bearing nude mice heart, spleen, kidney, and liver measured after sacrificed.

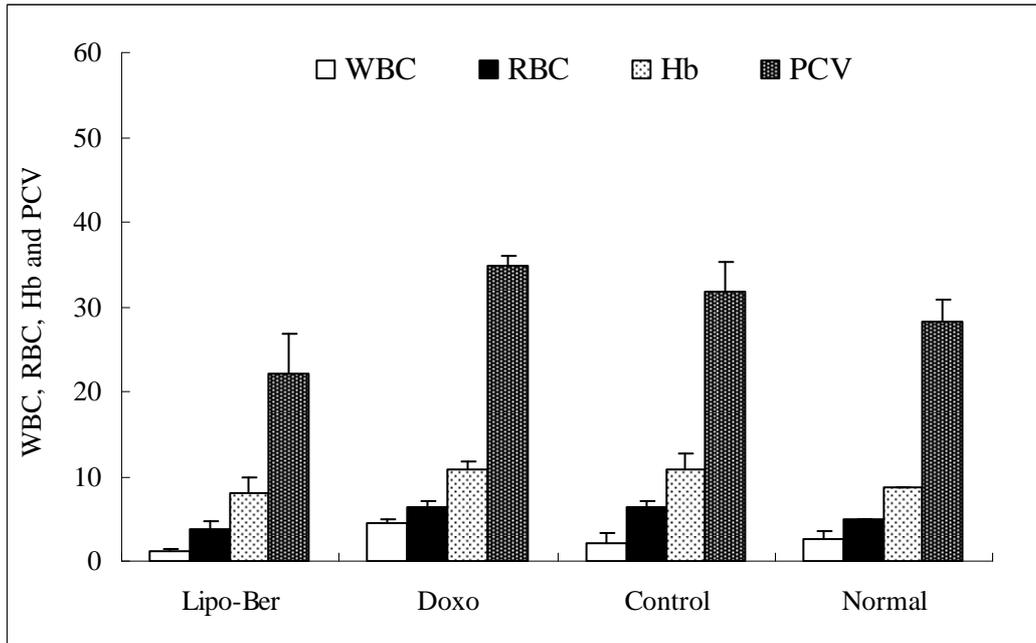


圖 3-33、高劑量鹽酸小檞鹼奈米微脂體注射裸鼠之各項血球計數值
Figure 3-33. Complete blood cell counts of nude mice in high-dose treatment.

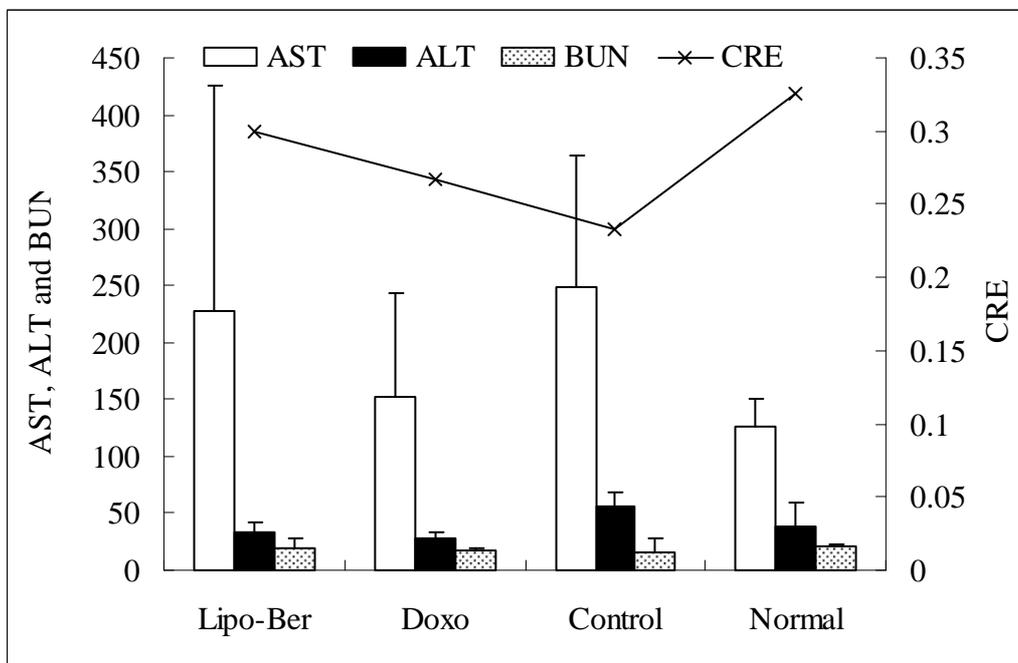


圖 3-34、高劑量鹽酸小檞鹼奈米微脂體注射裸鼠之各項血清生化數值
Figure 3-34. Blood chemistry of nude mice in high-dose treatment.

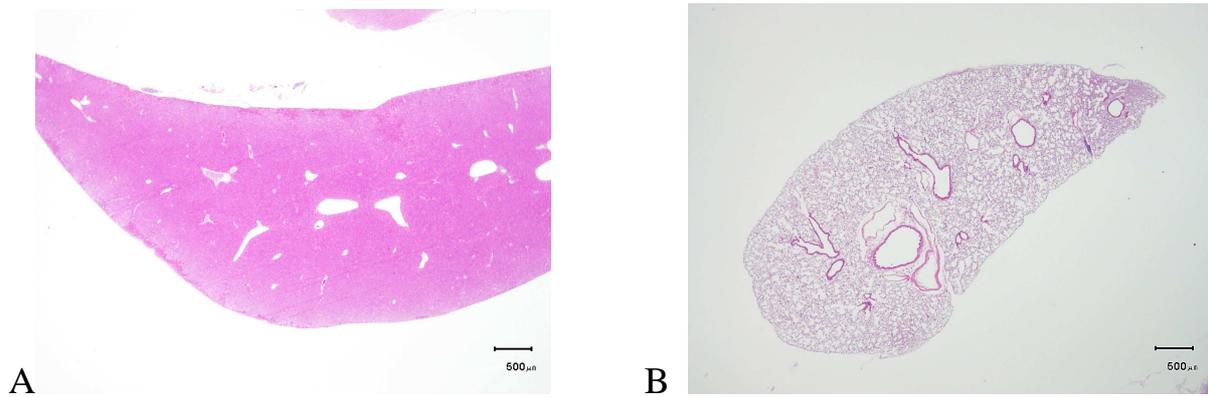


圖 3-35、給予 Lipo-Ber 4 mg/kg 組別之裸鼠臟器切片 A：肝 B：肺。

Figure 3-35. Images of organs' histological characteristics in Lipo-Ber 4 mg/kg group. (Hematoxylin/Eosin staining, 2x). A: Liver; B: Lung.

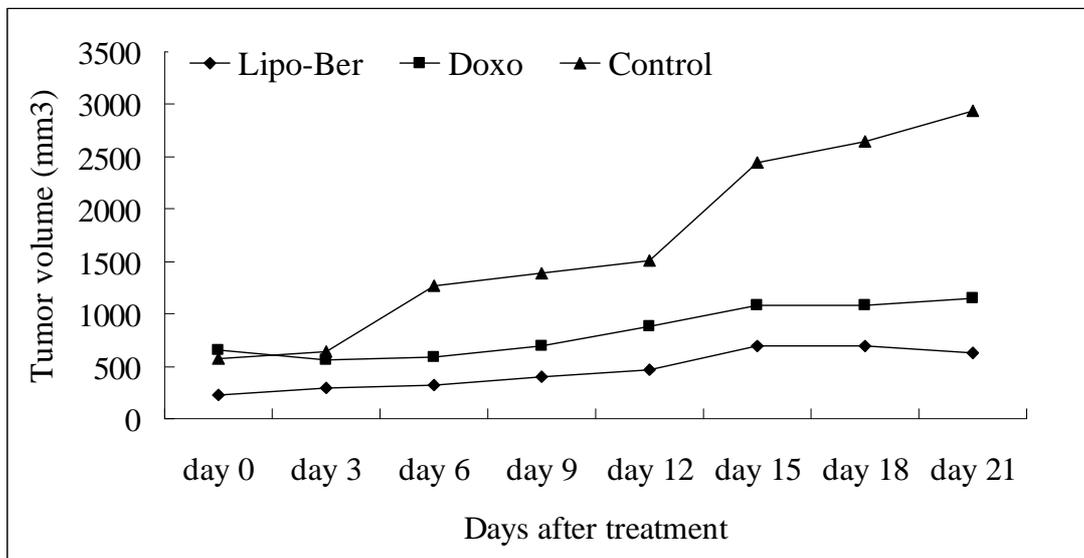


圖 3-36、給予高濃度藥物期間之腫瘤體積變化情形

Figure 3-36. Tumor volume in the high dose treatment period.

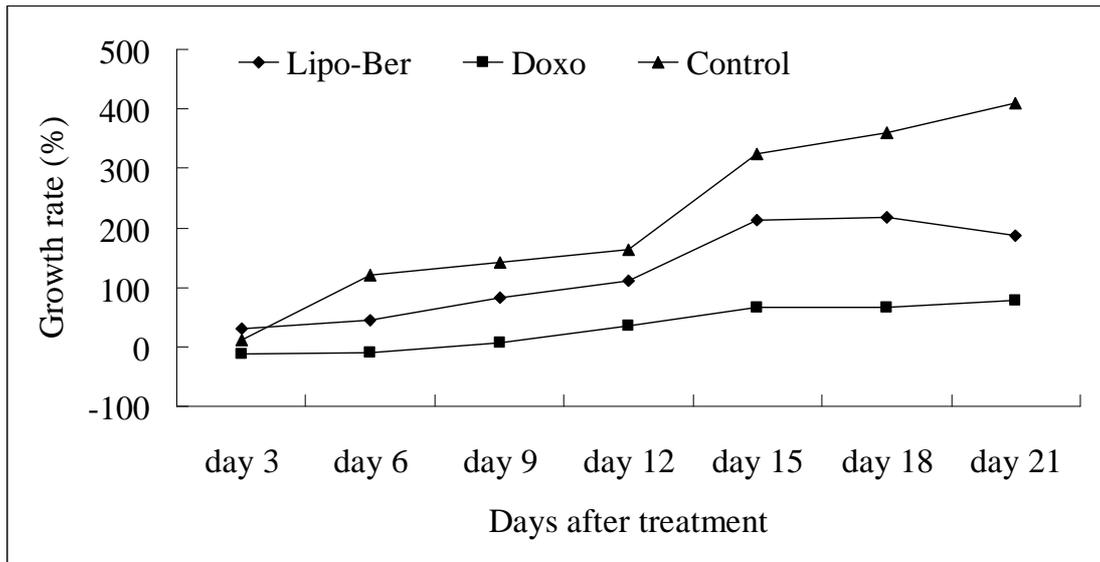


圖 3-37、給予高濃度藥物期間之腫瘤體積增加情形

Figure 3-37. Tumor growth rate in the high dose treatment period.

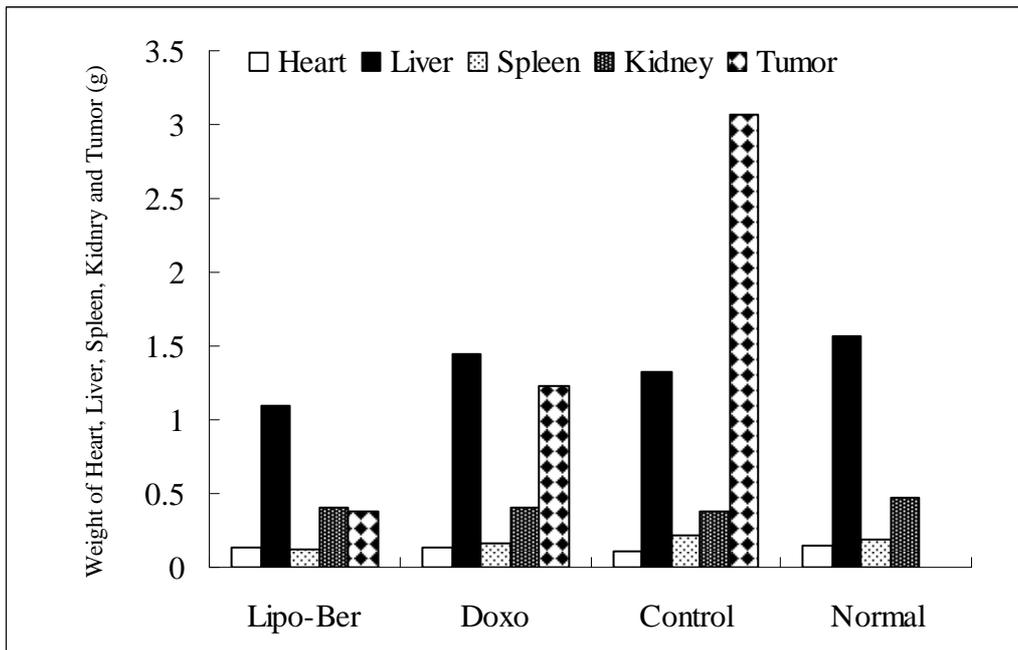


圖 3-38、高劑量組裸鼠犧牲時各臟器(心、肝、脾及腎)及腫瘤重量

Figure 3-38. High-dose treatment group of heart, spleen, kidney, liver, and tumor weight measured after sacrificed.

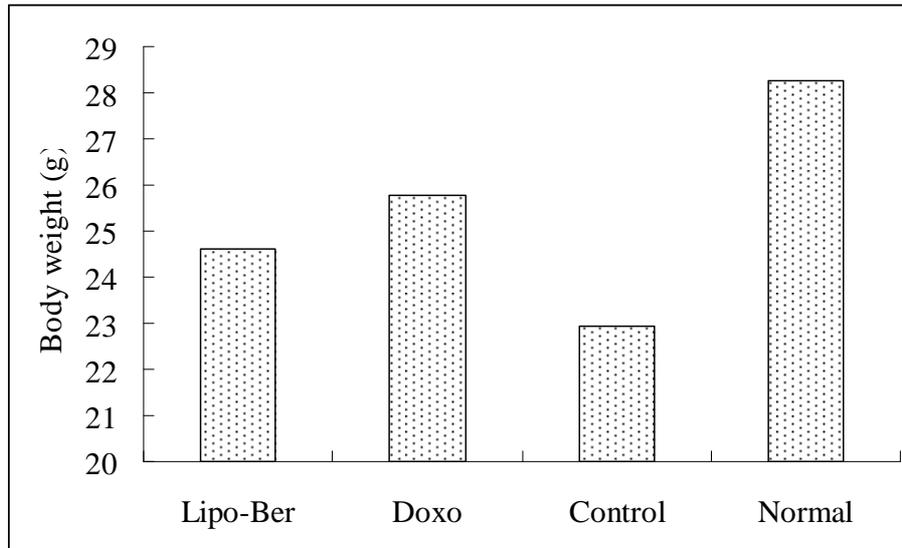


圖 3-39、高劑量組裸鼠犧牲之淨體重

Figure 3-39. High-dose treatment group body weight without tumor measured after sacrificed.

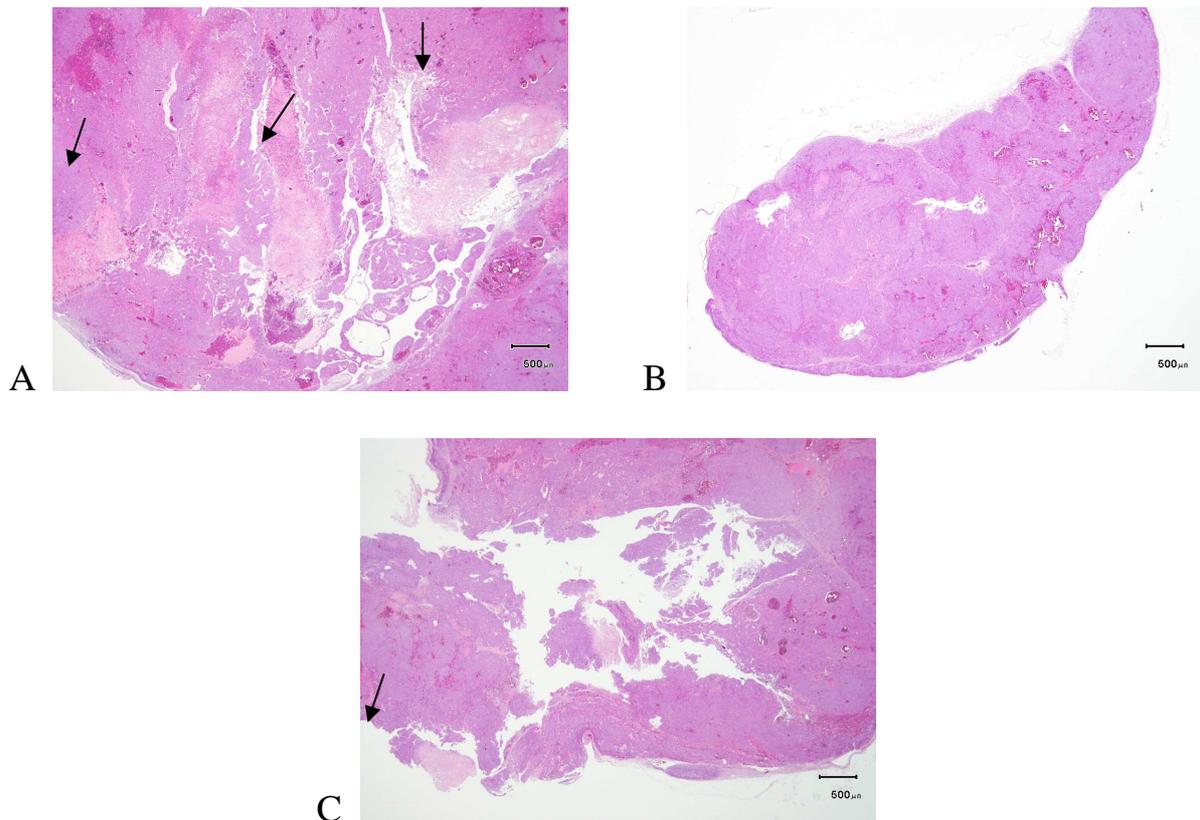


圖 3-40、實驗中各組別腫瘤組織切片之影像

Figure 3-40. Images of histological characteristics in different groups of tumor tissue. (Hematoxylin/Eosin staining, 2x), A: Control, B: Lipo-Ber 4 mg/kg, C: Doxorubicin 4 mg/kg. Arrow: Apoptosis part.

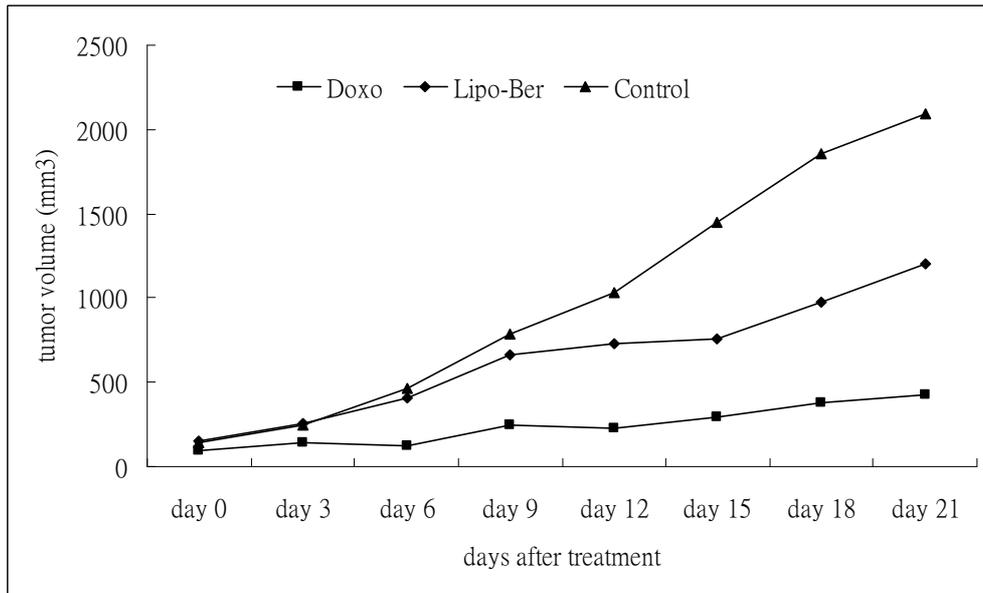


圖 3-41、給予高濃度藥物期間之腫瘤體積變化情形
Figure 3-41. Tumor volume in the high dose treatment period.

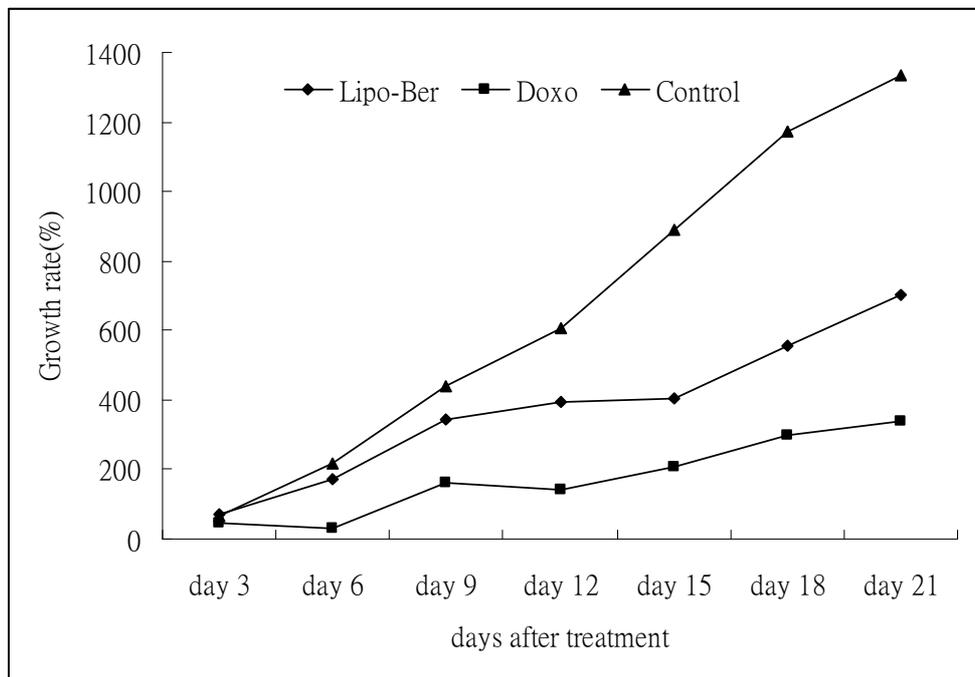


圖 3-42、給予高濃度藥物期間之腫瘤體積增加情形
Figure 3-42. Tumor growth rate in the high dose treatment period.

表 3-3、綜合比較各製法對鹽酸小檗鹼奈米微脂體粒徑大小、粒徑分布及鹽酸小檗鹼包覆率的影響

Table 3-3. Comparisons of the particle size, particle distribution and the encapsulation efficiency of berberine of berberine liposomes manufactured through different preparation methods.

Methods	Liposome	E.E.	Size	PdI
TF-E30-G				
	DSPC P0	4.00 ± 0.08	127.3 ± 3.7	0.014 ± 0.003
	DSPC P5	14.00 ± 0.12	121.6 ± 1.5	0.022 ± 0.002
	HSPC P0	2.20 ± 0.04	129.5 ± 0.6	0.012 ± 0.001
	HSPC P5	14.10 ± 0.21	124.9 ± 0.2	0.028 ± 0.017
TF-H-G				
	DSPC P5	5.80 ± 0.30	103.1 ± 2.1	0.175 ± 0.040
	HSPC P5	7.50 ± 0.21	95.9 ± 0.5	0.182 ± 0.012
TF-E20-G				
	DSPC P5	13.90 ± 0.15	121.6 ± 1.5	0.020 ± 0.020
	HSPC P5	14.30 ± 0.55	140.1 ± 3.3	0.070 ± 0.002
SI-E20-D				
	DSPC P5	7.42 ± 0.66	112.5 ± 3.5	0.070 ± 0.010

E.E: encapsulation efficiency of berberine

TF: thin film hydration

E30: extruded 30 times

E20: extruded 20 times

H: high pressure homogenization

SI: solvent injection

G: gel filtration

D: Dislysis