

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

磁場驅動微脂粒藥物釋放之研究(1/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2213-E-038-004-

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

執行單位：臺北醫學大學生物醫學材料研究所

計畫主持人：劉得任

計畫參與人員：曾麗萍 劉得任

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 5 月 29 日

行政院國科會研究計畫結案報告

磁場驅動微脂粒藥物釋放之研究

94-2213-E-038-004

執行時程：2005/8/1~ 2006/7/31

主持人 劉得任 博士

執行人 曾莉萍 劉得任

中文摘要

微脂粒是投藥時輸送藥物的良好奈米載體。但是微脂粒在藥物輸送時面臨專一釋放的問題。因此希望以物理方式驅動微脂粒藥物釋放，本研究以薄膜水合法與擠壓法製造單層微胞微脂粒(SUV)包覆水溶性藥物 5(6)-Carboxylfluorescein 的螢光指示劑經由磁場照射，以粒徑儀、界面電位儀與螢光儀發現微脂粒經由磁場照射後使得微脂粒形體改變，粒徑和帶電性明顯變化、螢光藥物釋放量增加。由結果顯示微脂粒經由磁場照射在第 1 和 3 小時的粒徑和界面電位均有改變，螢光液也大量滲漏，顯示磁場可驅動微脂粒藥物釋放。在微脂粒變形度方面，當微脂粒嵌入膽固醇後觀察其變形度較差，由 DSC 量測嵌入膽固醇的微脂粒其相轉移溫度升高，由變形度和相轉移溫度證實當微脂粒嵌入膽固醇使得微脂粒膜堅硬，將來也可用變形度推測微脂粒膜的硬度和物理穩定度。

一、簡介

微脂粒特殊的中空球體結構，因此許多科學家將微脂粒做為藥物載體之研究，認為在微脂粒的脂雙層的結構中可包覆疏水性 (hydrophobic) 藥物，在內部水相環境中則可包覆親水性 (hydrophilic) 藥物，並且微脂粒是由天然物質構成，與人體細胞間具有良好的生物相容性 (biocompatibility) 和生物降解性 (biodegradable)，因此自西元 1972 年開始被用來做為藥物載體[1]，提供藥物輸送的新劑型，目前被廣泛應用在藥物製劑及生物醫學的研究。而且使用微脂粒包覆藥物具有許多優點，可持續延長藥效時間，也可減輕藥物對組織細胞產生的毒性以及降低藥物對非目標組織器官產生副作用，並且可以有效的將包覆物質送到特定位置上釋放藥物，以達到最佳之療效。由以上敘述，微脂粒的應用與發展在生物醫學製藥上有著相當高的發展價值。然而微脂粒經由表面修飾或是增加微脂粒穩定度，使得微脂粒在體內 (in vivo) 藥物傳輸到目標位置如某特定癌症部位，微脂粒就算是被細胞吞進入細胞面臨釋放 (release) 的問題，因而使得微脂粒劑型藥物無法即時發揮藥效，因此，假若要更進一步地研究微脂粒應用與發展，有效的驅動 (trigger) 控制微脂粒的藥物釋放是目前發展微脂粒的重點，2004 年 Controlled Release Society 也在會中將驅動釋放做為一特別標題探討。

微脂粒的驅動釋放可分為三個方面討論：物理驅動釋放 (physical trigger release)、化學驅動釋放 (chemical trigger release) 和生物驅動釋放 (biological trigger release) 等。而物理驅動釋放以外加能量方式，如熱 (thermal)，使微脂粒包裹的藥物滲漏；化學驅動釋放則是以化學物質瓦解微脂粒，使藥物漏出；生物驅動釋放是微脂粒與細胞間的反應，使微脂粒膜不穩定，讓藥物釋出。科學家致力於研究使微脂粒在包裹藥物後，於體外儲存或體內血液循環時能夠穩定，同時又能有效的被驅動控制釋放藥物於目標位置，以增加藥物的生物可利用性 (bioavailability) [2]。

當微脂粒被靜脈注射進入血液後，面臨到關鍵問題：血管壁流場壓力擠壓或切割微脂粒，為提高脂雙層承受更大的剪應力並減緩包覆物滲漏，抑制磷脂質游離釋出以及減少微脂

粒融合現象因此在微脂粒脂雙層嵌入膽固醇 (cholesterol) [3]，期望微脂粒能順利到達控制釋放的目標位置。

本研究以薄膜水合法製備實驗所需的微脂粒，在微脂粒脂雙層的膜組成中添加膽固醇，以擠壓法 (extrusion) 製備實驗所需的微脂粒 (單層小微泡微脂粒, SUVs) 在內部水相區域包覆水溶性藥物 (5,6-carboxylfluorescein)，觀測此包藥微脂粒在磁場 (magnetic field) 照射的作用藥物驅動釋放，微脂粒的粒徑變化、螢光釋放量和界面電位之改變，探討以磁場驅動微脂粒藥物釋放的機制。

二、研究原理

2-1 微脂粒簡介

2-1-1 微脂粒之組成與構造

微脂粒是以脂質為主要成份而形成的中空球體，而磷脂質是具有表面活性的兩性物質 (amphiphiles)，其一端為親水的極性頭基，另一端則為疏水性的碳鏈，因此在水相介質中疏水性的碳鏈會彼此緊密聚集的排列成平面雙層平板結構 (polar bilayer sheet)，再自我封閉 (self-closing) 成一層或多層的磷脂質雙層膜 (phospholipid bilayer)，其雙層膜結構的模式類似細胞膜，磷脂質的疏水端相向排列，親水端裸露在外，這種雙層排列的型態，可以將疏水性 (hydrophobic) 的藥物嵌入相向的磷脂質疏水端區域，而親水性 (hydrophilic) 的藥物則可包覆在微脂粒內部的水相區域，因此微脂粒是既可包覆疏水性藥物和親水性藥物的藥物載體。

脂質的分類依照極性頭基 (head group) 及脊柱背骨 (back bone) 部分不同，可分為以下四大類：甘油磷脂質、甘油醣脂質、 抱合磷脂質、 抱合醣脂質。絕大多數的微脂粒是由甘油磷脂質所組成，三個碳的甘油 (glycerol) 做為背骨，背骨上的第一個碳和第二個

碳上分別鍵結了長鏈的脂肪酸，而第三個碳則是由磷酸根相接的極性頭基。

2-1-2 微脂粒的分類

微脂粒一般依照脂雙層結構的層數 (number of lamellae) 或是粒子大小 (size) 分類[4]。大致可以分為以下幾種：(1)多層微泡微脂粒 (Multilamellar vesicles, MLVs)：多層微泡微脂粒 (MLVs) 通常是由 5 個或更多的同心層所組成，其粒徑約為 100nm 以上，由於每個微脂粒有多層的脂雙層膜，所以包覆物質要釋放出來的阻力較大，具有持續釋放的功能，被包覆在外層的物质會先被釋放出來，包覆在內層的物质則被慢慢釋放出來。(2)單層大微泡微脂粒 (Large unilamellar vesicles, LUVs)：單層大微泡微脂粒 (LUVs) 通常是由 1 個脂雙層所包圍封閉而形成，粒徑約為 1000nm。(3)單層中微泡微脂粒 (Intermediate unilamellar vesicles, IUVs)：單層中微泡微脂粒由一層脂雙層構成的微脂粒，其粒徑約在 100nm 的數量級。(4)單層小微泡微脂粒 (Small unilamellar vesicles, SUVs)：單層小微泡微脂粒是由一個脂雙層所包圍封閉而成的微脂粒，其粒徑較 MLVs、LUVs 和 IUVs 小，粒徑約為 25-100nm。

2-2-3 微脂粒膜的性質

微脂粒的特殊脂雙層結構，與細胞膜相類似，因此，吸引許多生物物理學家和生物化學家自 1968 年起，將微脂粒模擬細胞膜或紅血球做研究，以研究脂雙層膜的特性，如脂雙層膜的結構排列，磷脂質的排列、相轉移溫度和嵌入膽固醇對微脂粒脂雙層的影響。生物物理學家和生物化學家希望藉由分子層面的探討，更進一步探討微脂粒的特性，並且脂肪酸鏈的長度 (fatty acyl chain length) 與親水性頭基 (polar head) 的種類會對微脂粒的特性如穩定性和滲漏性有影響。

2-2-4 膽固醇

膽固醇在哺乳動物的細胞膜是一個重要的組成份之一，其包括了一個 3- β 氫氧基 (3- β hydroxyl group) 和三個六環、一個五環所構成的堅硬平面結構 (rigid planar structure) 以及脂肪族的側鏈 (aliphatic planar chain) 這些全部都是膽固醇在膜中展現特徵行為的基本要件。膽固醇分子的結構具界面活性劑的特性，其本身也不會形成雙層結構，但是可以以各種濃度與磷脂質膜結合，膽固醇的氫氧基朝水相表面，脂肪族側鏈則在雙層結構中與磷脂質的醯鏈平行並排的在膜中，3- β 氫氧基與磷脂質 carboxyl group 的位置相等，且具有相當小的垂直移動自由度，堅硬的類固醇核心沿著脂肪酸鏈的前 10 個碳左右的位置並排著，這樣的排列使降低這些碳鏈的移動自由度。

當膽固醇與磷脂質整齊排列時，在液晶態 (liquid crystal state) 的微脂粒在加入膽固醇後，增加脂肪酸鏈排列的秩序 (order) 及排列的密度，因而增加了微脂粒膜的堅硬度 (rigidity)，膽固醇的添加也可以抑制相轉移溫度，由於膽固醇和脂肪酸鏈間的吸引力作用 (ie. Hydrophobic driven)，增加了微脂粒的凝聚向心力 (cohesivity) 及機械強度 (mechanical strength)，使脂雙層結構的排列更凝結 (condense) 也更有秩序 (order)。

當在微脂粒膜中添加膽固醇，能增加穩定度、降低分子可動性 (mobility)，並減少它的滲透性 (permeability)，並且膽固醇對微脂粒膜中的主轉移溫度 (T_c) 的影響有特殊的效果，隨著膽固醇的濃度增加，主轉移的溫度會增加，膽固醇會完全抑制相轉移溫度的產生，在 50mol% (mole ratio=1:1) 的膽固醇含量，會將相改變的焓 (enthalpy) 降到零，以降低膜的流動性。

以往文獻中大部分為探討微脂粒的物理穩定度和脂雙層的堅硬度時，多數以微觀的方式：例如 DSC 或 NMR 量測微脂粒脂雙層膜的相轉移溫度，以說明當脂雙層相轉移溫度升高時，代表微脂粒的穩定度增加，代表微脂粒在此配方的脂雙層膜較堅硬，能抵抗外來的物理變化，如溫度和壓力。目前本實驗室以直接觀測微脂粒巨觀之變形度的方式，探討微脂粒脂雙層在受外加壓力時，微脂粒的形變程度，以說明當微脂粒的形變能力愈差時，其微脂粒膜

的彈性較佳膜也較堅硬，微脂粒可承受之機械強度增加，表示微脂粒脂雙層結構較堅硬。

2-3 驅動微脂粒藥物釋放

微脂粒與細胞膜的結構相似，且由磷脂質組成，具有良好的生物相容性與生物降解性，適合做為藥物傳輸的載體，並且微脂粒可說是萬能的載體，可以在微脂粒的親水區域包覆水溶性藥物，在微脂粒的疏水區域包覆油溶性藥物，微脂粒的粒徑大小（size）也是可以控制在 100nm 之下，增加小顆微脂粒在血液循環的時間也增加微脂粒穿透細胞膜進入細胞的機率，並且利用微脂粒包覆癌症藥物時，可以保護藥物避免被快速代謝，同時也可降低藥物對正常細胞的毒性，如著名的例子，微脂粒包覆「小紅莓」 doxorubicin，以治療愛滋病（AIDS）的卡波西氏瘤（Kaposi's sarcoma），doxorubicin 在體內作用時會對心肌細胞造成毒害，為了使 doxorubicin 能在體內照常運作又不傷害正常的細胞，因此將其用微脂粒包裹起來，再控制釋放是為降低毒性提高藥效的好方法之一[5]；微脂粒也可以包覆其他各式各樣的物質，例如抗癌藥物（anti-cancer drug）[6]、抗黴菌藥（anti-fungal）[7]、遺傳物質（gene materials）[8]、蛋白質（protein）、血紅素（hemoglobin）[9]和疫苗（vaccine）[10]等。

微脂粒自 1968 年發展至今，科學家們致力於研究微脂粒的穩定性，給予微脂粒改良多次，從傳統式（conventional）微脂粒的發現，到正電荷（cationic）微脂粒的發明，再進步到隱藏式（stealth）微脂粒，於微脂粒表面接上親水性材料 PEG，預期能夠使微脂粒在體內是非常穩定的，在血液循環時不被血漿[11]攻擊脂雙層造成藥物滲漏，避免紅血球或是其他蛋白質的吸附造成聚集的現象，並且一直穩定地在體內循環。

科學家們近幾年才對於微脂粒的可控制性（controllable）進行探討，微脂粒的可控制性分為兩部分：目標導向（target）和驅動釋放（trigger release）[12]。目前有部分科學家著手研究微脂粒目標導向（target），在微脂粒外層加上特定目標之抗體（antibody）形成免疫微脂粒（immunoliposome）就能鎖定目標細胞，期望能像導彈飛彈一樣百分之百準確地投向目

標。另外，控制釋放的目的是使藥物能夠被程式性 (programmable) 的釋放出來，以增加藥物的生物吸收率 (bioavailability) 以提高藥效，驅動微脂粒藥物釋放分為物理驅動釋放 (physical trigger release)、化學驅動釋放 (chemical trigger release) 和生物驅動釋放 (biological trigger release)。

2-3-1 物理驅動藥物釋放

微脂粒在包裹藥物後，如能使微脂粒的穩定度增加的同時，則藥物釋放量減少，使得藥物吸收率也相對的降低，因此利用熱、微波、雷射、超音波、電場、光動力、血管剪應力和磁場等物理方式給予微脂粒能量，使藥物漏出：(1)熱：[13] 微脂粒脂雙層的磷脂質都有相轉移溫度 (Tc)，當溫度達到相轉移溫度附近時，藥物就能大量地釋放出來，並且配合高溫熱治療 (hyperthermia) 的方式，使局部的溫度升高到 42°C，文獻指出癌細胞對熱的耐受性較差，以損害癌細胞的同時，微脂粒脂雙層膜的結構變得鬆散，藥物得以從脂雙層滲漏 (leakage)。DPPC的相轉移溫度約為 41°C，DSPC的相轉移溫度約為 54°C，因此以DPPC：DSPC=3：1 混合時，其相轉移溫度介於 41°C~54°C之間，因此設計高溫熱治療的溫度在 41°C~54°C之間，可以獲得局部藥物的大量釋放。(2)微波 (Microwave)：微脂粒包覆水溶性的化學藥物，予以 2450MHz的微波能量驅動藥物從脂雙層釋放[14]。微脂粒包覆磁性粒子 (magnetic particles)，再予以微波照射，磁性材料吸收大量能量後，使微脂粒溫度上升，因而大量漏出藥物[15]。(3)雷射 (Laser)：[16]利用熱敏感性微脂粒 (temperature-sensitive liposome) 包覆藥物，再以 488/514nm和 577nm波長的雷射光激發微脂粒，使藥物從脂雙層滲漏。(4)超音波動 (Ultrasonication)：[17]以超音波能量給予微脂粒，包覆的藥物會從微脂粒脂雙層的漏出，可以局部大量釋放藥物。(5)電場 (Electrical field)：[18]微脂粒包覆螢光標的物質在 80V的電場照射下，微脂粒因為電刺激而使得藥物滲漏。(6)光動力 (Photodynamic)：[19] 微脂粒或是特殊材質如bis-SorbPC脂質做成載體，予以特定波長的光

照射，微脂粒因為能量使得脂雙層膜不穩定或是使bis-SorbPC類脂質形成架橋，使部分脂質空間縮小，脂雙層空隙變大而使藥物漏出。(7)剪應力 (Shear force)：[20]利用壓力使微脂粒產生形變，在形體變化的同時釋放出藥物，例如微脂粒包裹藥物後經靜脈注射進入血液循環，經由血管壁給予微脂粒之壓力為血管壁的剪應力，使微脂粒變形釋放出藥物。(8)磁場、電磁場 (Magnetic field, electromagnetic field)：[21]外加磁場的物理方式使微脂粒藥物滲漏，將微脂粒模擬為細胞膜，細胞膜上的磷脂質經磁場照射後頭基的方向會改變，則微脂粒經過磁照射後，亦可使微脂粒的結構改變以釋放出藥物，磁場照射微脂粒分為動磁場 (dynamic magnetic field) 和靜磁場 (static magnetic field) 的照射方式；有些包覆微米至奈米級的磁鐵粉末 (Fe_3O_4)，瞬間照射磁場有些並配合高溫熱治療 (hyperthermia) 使藥物因為磁鐵粉末瞬間加熱的同時，使得微脂粒及附近溫度升高，脂雙層因此不穩定使藥物和奈米鐵衝出微脂粒的瞬間大量釋放藥物。

2-3-2 化學驅動藥物釋放

化學方式驅動微脂粒藥物釋放，以體外 (in vitro) 模擬的方式，通常在微脂粒懸浮液中加入界面活性劑的物質如 Triton X-100 和 SDS (sodium dodecyl sulfate)，使微脂粒的脂雙層結構因為過量的界面活性劑嵌入進而使微脂粒脂雙層瓦解 (collapse) 而使藥物大量漏出；在體內 (in vivo) 情況，以口服微脂粒藥物為例，酸鹼值敏感 (pH sensitive) [22] 的微脂粒使藥物安全地經過胃酸的洗鍊再經由膽鹽 (bile salt) [39] 的瓦解使藥物在腸胃道被大量吸收；另外，當微脂粒完整地進入細胞內時也因酸鹼值敏感 (pH sensitive) 的材質在接觸到核內體 (endosome) 時瓦解使藥物在細胞內釋放[23]。

2-3-3 生物驅動藥物釋放

微脂粒最常從靜脈注射 (Intravenous injection, IV) 給藥，也有經由肌肉注射 (Intramuscular

injection, IM)、皮下注射 (Subcutaneous Injection, SC) 和腹腔注射 (Intraperitoneal injection, IP) 給予。但是不論是從肌肉、皮下或是腹腔給予微脂粒，最後都會透過淋巴液進入血管系統。在血管系統中主要產生兩種反應：(1) 與血液中的脂蛋白 (lipoprotein) 或是紅血球作用；(2) 調理作用 (opsonization)。第一種反應是微脂粒與脂蛋白或紅血球的脂質成份發生交換，導致微脂粒的脂雙層結構的不完整，包覆在微脂粒中的物資被釋放於血液中。第二種的調理作用則是微脂粒與血液中的血漿蛋白，如免疫球蛋白 (immunoglobulins)，因為吸附或是電荷的交互作用而結合。這些血漿蛋白上有接受器可被巨噬細胞 (macrophage) 所辨識，進而把微脂粒吞噬，導致微脂粒從血液中被清除。假設微脂粒在血液循環中未被清除，那麼特殊材質的微脂粒流經癌症細胞的部位，被癌症細胞分泌的酵素 PLA_2 給切斷脂質，使藥物大量釋放[25]。微脂粒包覆藥物後與細胞間直接作用被有效吸收的藥物為最常見，其作法方式有(1)膜與膜之間的交換 (intermembrane transfer) 適用於脂溶性藥物。(2)接觸釋放 (contact release) 可在細胞膜附近釋放大量的水溶性包覆物質。(3) 吸附作用 (adsorption)。(4) 膜與膜的融合 (fusion)。(5) 細胞吞噬與胞飲作用 (phagocytosis/endocytosis)。

2-5 螢光指示劑

微脂粒的發現，讓生物物理學家和生物化學家研究討論生物膜與膜蛋白間的作用，為了更瞭解微脂粒在生理與膜蛋白間、細胞間的作用機制及微脂粒的穩定度，因此，Weinstein 首先建立“螢光自我驟冷法” (fluorescein self-quenching method, FSQ method) 研究微脂粒與膜蛋白 (lipoproteins)、細胞間的作用，由微脂粒的膜滲透性 (permeability) 直接反應微脂粒脂雙層結構的物理狀態，利用螢光自我驟冷法觀察微脂粒穩定性是個相當具有可信度的方法。Carboxylfluorescein 的結構較 fluorescein 在 5 或 6 的位置上多一個 carboxyl group，Carboxylfluorescein 較 fluorescein 更為親水，因此，利用微脂粒包覆 Carboxylfluorescein 偵測膜的物理性質時，較 fluorescein 可提高包覆量及加長量測時間[26]。

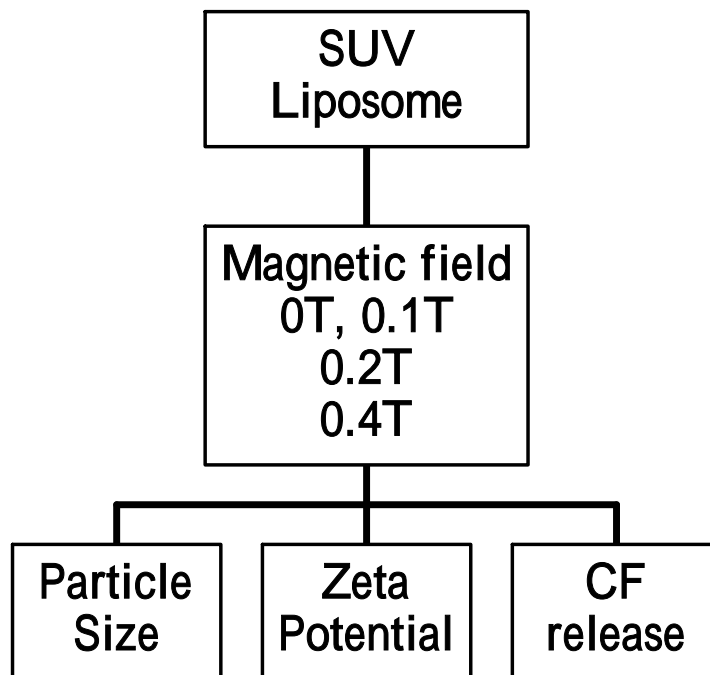
由於Carboxylfluorescein的優點，使“螢光自我驟冷法”技術已被廣泛用於觀察微脂粒在體外（in vitro）或在體內（in vivo）的滲透穩定性，因為Carboxylfluorescein具有自我驟冷（self-quenching）的特性，在高濃度時，Carboxylfluorescein的螢光強度會逐漸驟減，隨著濃度的稀釋，約到 3×10^{-5} M以下時，螢光強度則與Carboxylfluorescein的稀釋濃度呈線性關係[27]，因此利用這樣的特性將高濃度的Carboxylfluorescein包覆在微脂粒內，再將外在的水環境稀釋，即可精確測得外在水環境螢光強度變化，進而瞭解微脂粒的滲透情形。

三、研究動機與實驗目的

微脂粒結構類似細胞膜，曾經有科學家觀察細胞在磁場下的變化，例如鎌狀紅血球在磁場下會變形[29]，正常的紅血球在高磁場強度下變形也有科學家研究過[30]。磁場驅動藥物釋放期望以非侵入式的醫療方式，驅動微脂粒的藥物釋放出來，因此本實驗在微脂粒脂雙層嵌入（incorporate）不同濃度的膽固醇，探討微脂粒的相轉移溫度、微脂粒變形度和磁場驅動微脂粒藥物釋放後觀察微脂粒的粒徑變化、界面電位和螢光物質的滲漏量。

在本研究中以微脂粒分兩大主軸探討微脂粒的特性：單層微泡微脂粒（SUVs），做為包裹藥物之載體，以磁場照射微脂粒驅動藥物由微脂粒脂雙層漏出，探討在脂質與不同濃度膽固醇製成的微脂粒，經由不同量級磁場照射後，以瞭解微脂粒被磁場驅動藥物釋放的機制。（如流程圖）

實驗流程圖



四、結果與討論

本實驗選用的脂質有 60%純度之 Egg PC 和純度 99%之 DPPC，在微脂粒脂雙層嵌入 (incorporate) 不同濃度的膽固醇，探討微脂粒在磁場驅動微脂粒藥物釋放的變化情形。

磁場驅動微脂粒藥物釋放實驗

微脂粒做為包覆藥物之載體，由於微脂粒與細胞膜結構相似，由文獻得知細胞膜在磁場照射時，會引起細胞膜結構的改變，因此本實驗為希望以磁場照射微脂粒，驅動藥物由脂雙層釋放，觀察微脂粒的粒徑改變、界面電位的變化以及螢光液滲漏的量，以說明利用磁場驅動微脂粒藥物釋放的機制。並且本實驗採用 DPPC(Dipalmitoyl-L- α -Phosphatidylcholine)純的

磷脂質目的為避免其他雜質在磁場照射時干擾界面電位和粒徑變化。

微脂粒的粒徑分析

為了瞭解在本實驗的製備程序下微脂粒粒徑的分佈及添加膽固醇於微脂粒系統中，對於微脂粒粒徑隨磁場和時間之藥物滲漏的影響。所以分兩部分來討論，分別為初始粒徑分析與粒徑隨時間變化分析。

在本實驗中，微脂粒的製備是採用微脂粒擠壓器(extruder)，並採用 $0.2\mu\text{m}$ 的過濾膜，恆溫 50°C 的條件下進行製備，重複擠壓 3 次。給予此外力的原因是由於形成小粒徑的微脂粒在熱力學上並不是自發性的反應，所以必須藉由外界給予相當的能量，才可形成較小粒徑的微脂粒，也因此微脂粒在熱力學上被認為是介穩(metastable)狀態。

(1)初始粒徑分析

圖(1)為添加不同含量的膽固醇對微脂粒粒徑的變化，首先我們發現在傳統型微脂粒粒徑會大於擠壓時所使用的 $0.2\mu\text{m}$ 過濾膜，根據 Frisken et al. [31]的研究文獻，可能微脂粒具有順應性，在本實驗也有類似結果，推測可能是因為擠壓次數不足及脂質濃度過高，使微脂粒粒徑比 $0.2\mu\text{m}$ 過濾膜的粒徑還大。

(2)粒徑隨磁場、時間變化分析

微脂粒儲存於 37°C 之下，在外加磁場 0.1Tesla 、 0.2Tesla 和 0.4Tesla ，觀察微脂粒的粒徑變化。圖(2)表示組成 DPPC : Cholesterol = 4 : 0 時的微脂粒於磁場照射的粒徑變化，磁場愈強照射時間愈長則粒徑因為磁場照射形成粒徑愈大，此結果與[32]的結果相同。圖(3)表示組成 DPPC : Cholesterol = 4 : 0.5 時的微脂粒於磁場照射的粒徑變化，其趨勢也和圖(4)相似，圖(5)為磁場照射下微脂粒粒徑的變化；可以由此推論，磁場會造成微脂粒的粒徑

改變，有可能是因為微脂粒的磷脂質受磁場照射改變其結構排列，使微脂粒增加聚集、融合的發生，進而融合成較大顆之微脂粒。當組成微脂粒的成份當中嵌入愈多膽固醇時，照射磁場也會造成粒徑改變，但是變化程度比未嵌入膽固醇的粒徑變化程度小，表示膽固醇會抑制微脂粒粒徑變化。由 Liu et al. [33]文獻中指出微脂粒(組成中無添加膽固醇)在剪應流場下，無法承受剪應力的壓力，使微脂粒容易破裂形成碎屑並且使大量藥物漏出，因此文獻指出微脂粒在磷脂質比膽固醇為 4：1 時的微脂粒組成，屬穩定性較佳的微脂粒，能提升脂雙層脂質分子間的結構穩定度，降低膜的流動性，增加膜的硬度[34]，並且由以本實驗中得知在 DPPC：Cholesterol=4：1，仍可被磁場驅動使微脂粒粒徑變化，表示若將來應用靜脈注射之微脂粒藥物可承受血管剪切率也可以被磁場驅動藥物釋放。

微脂粒的界面電位

微脂粒粒子與細胞膜相似，細胞膜因磁場改變脂雙層形態也可能改變微脂粒的電荷分佈，因此微脂粒脂雙層的表面電位(荷)扮演著非常重要的角色，然而，一般說來，在微脂粒懸浮液系統中，微脂粒的表面往往會吸附著緩衝液中之異性離子，因此微脂粒之表面電位是無法真正的量測到。所以，針對微脂粒粒子間因為磁場照射引起脂雙層結構電性變化大都採用界面電位表示，由界面電位可以推測粒子表面電荷密度及電性大小，進而瞭解粒子在磁場照射時的電荷分佈情形。

經由界面電位的量測，DPPC：Cholesterol 的組成在 4：0，4：0.5，4：1 和 4：2 時，被磁場照射在第 1、3 和 24 小時的界面電位呈現相似的變化趨勢，如圖(6)到(9)。

微脂粒經磁場驅動藥物滲漏變化

微脂粒包覆之 5(6) - Carboxylfluorescein 在磁場照射時，螢光液從微脂粒脂雙層滲漏的

趨勢與粒徑變化相似，由圖（10）到（13）得知微脂粒經由磁場照射實驗結果發現，其中溫度對其滲漏率確有明顯的差異，這種結果與溫度對粒徑的變化非常相似(微脂粒的粒徑分析)，推測可能原因為當儲存溫度提高時，對微脂粒來說，除了碰撞頻率升高，再加上脂雙層結構變得較為流動態或較柔軟(flexible)，在碰撞時容易變形而增加粒子間的接觸面積，使得每次碰撞形成聚集發生的機率提升，並且碰撞也會影響脂雙層中排列缺陷的出現，而加速了藥物的釋放；另一推測為微脂粒因為磁場照射使微脂粒脂雙層結構改變，使微脂粒磁感融合（magnetofusion）成大顆微脂粒，在微脂粒融合的過程時螢光液從微脂粒的脂雙層隙縫滲漏出。

微脂粒經由磁場照射後，微脂粒的型態和帶電性都有改變，在型態改變的部分：微脂粒經由不同量級的磁場照射後，微脂粒的粒徑明顯增大，尤其是經 0.4Tesla 的磁場照射後，使得微脂粒的粒徑由原本的 200nm 增大為 5000nm 的巨型微脂粒(圖 14)，並且界面電位由 -32mV 改變為 -38mV(圖 15)，螢光物釋放情形如(圖 16)顯示，呈現大量(massive)釋放模式，推測可能是由於形成微脂粒的磷脂質受磁場照射後，在頭基和背骨的部位產生磁感作用（magnetoresponse），使得原本處於非等向性（anisotropy）的磷脂質經由磁場照射後，磁化率（susceptibility）增加，改變磷脂質的頭基定位（orientation），使脂雙層的磷脂質排列一致，並且使得磷脂雙層的磷脂質垂直於磁場方向，經由磁場照射及溫度效應產生的布朗運動，微脂粒漸漸碰撞並且融合為愈來愈大顆的微脂粒，其形狀經由文獻得知微脂粒在磁場作用後其形狀由圓形（spherical）改變為橢圓形（ellipsoidal）。在帶電性改變部分：磁化的改變使微脂粒的頭基部位電荷改變，因為微脂粒的型態結構的改變，微脂粒可能因磁場照射改變其 Stern layer 的厚度，使磁感融合後的微脂粒的帶電性更明顯，在以 DPPC 形成的微脂粒而言，呈現帶電性愈強，界面電位呈現更負的狀態[35]- [40]。

五、結論

1. 微脂粒經由 0.1Tesla、0.2Tesla 和 0.4Tesla 磁場照射驅動微脂粒藥物釋放的實驗中，在第 1 和 3 小時的微脂粒粒徑改變以 DPPC : Cholesterol=4 : 0，DPPC : Cholesterol=4 : 0.5 時的粒徑變化最明顯。
2. 微脂粒的界面電位也因磁場照射改變，帶電性增加呈現更負的情形，表示磁場確實能夠改變微脂粒的表面結構和帶電性。
3. 由於微脂粒穩定組成比以 DPPC : Cholesterol=4 : 1 的微脂粒為最穩定，利用 0.4Tesla，使微脂粒的粒徑變大又能夠驅動藥物由脂雙層釋放，為兼顧能夠承受流場剪應力的壓力又可被磁場驅動藥物釋放因此由本實驗知微脂粒在 DPPC : Cholesterol=4 : 1 時，也適用於磁場驅動藥物釋放。

附錄 (一) 圖

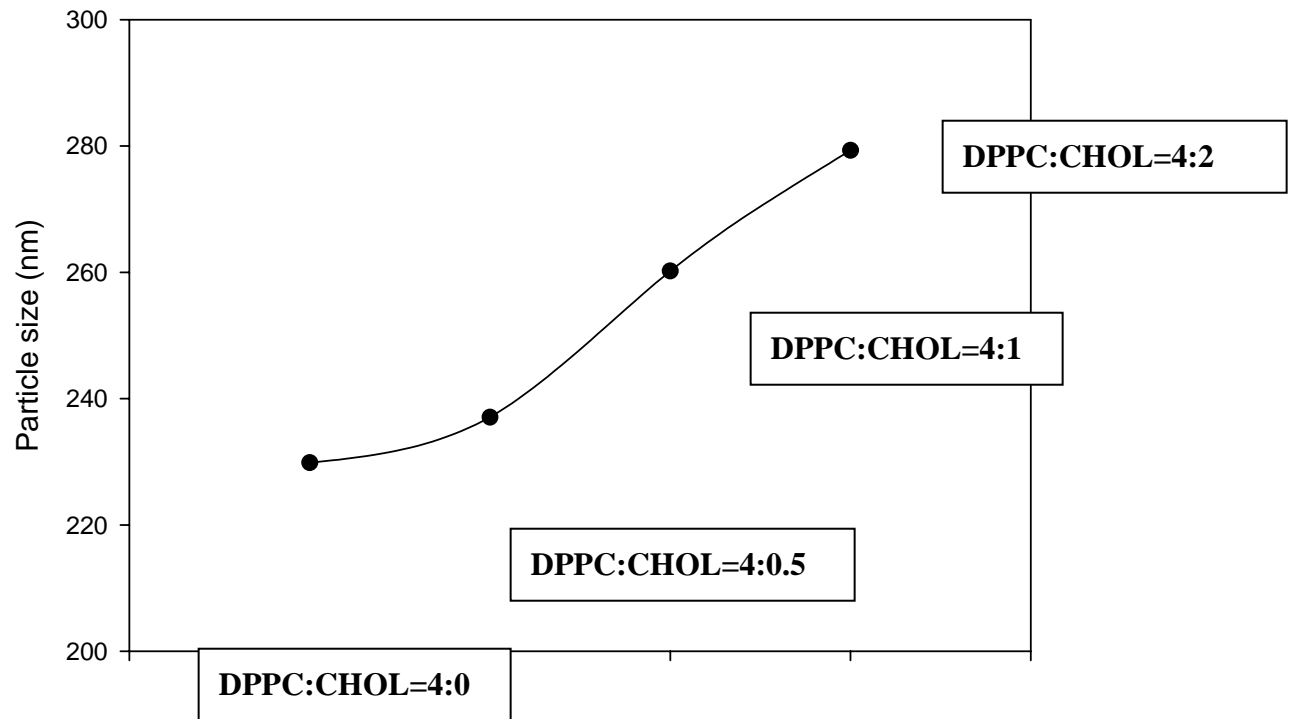


圖 1 初始粒徑

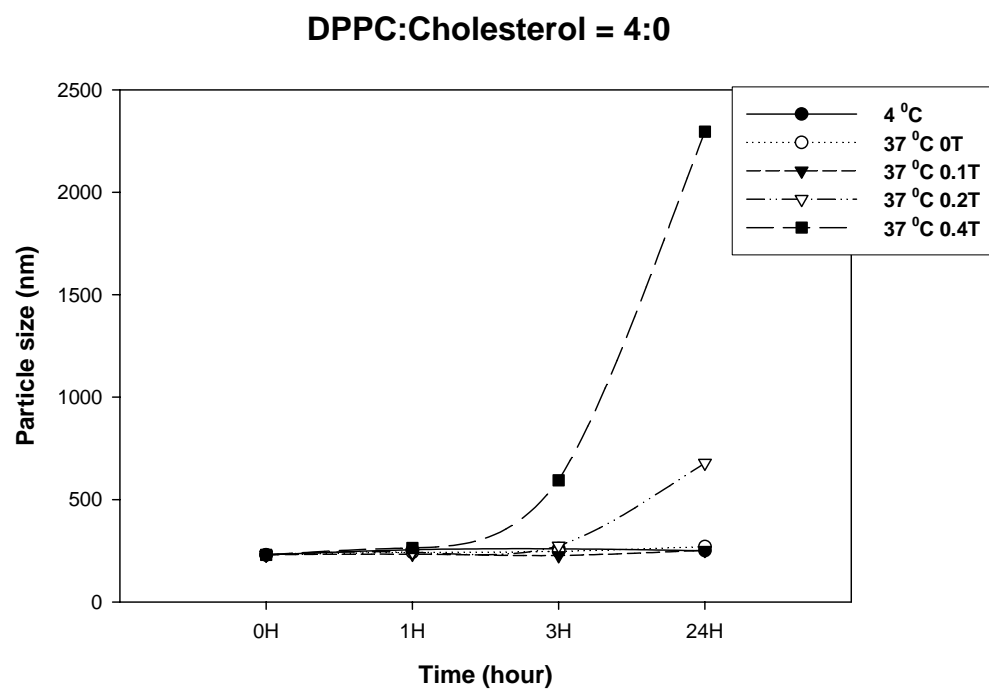


圖 2 粒徑變化 DPPC:Cholesterol=4:0

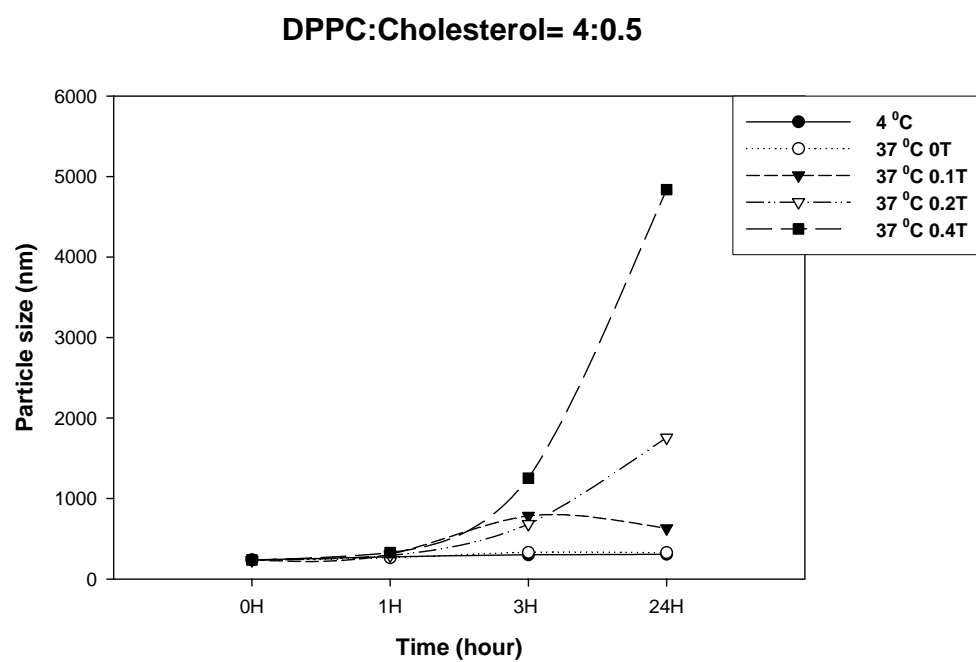


圖 3 粒徑變化 DPPC:Cholesterol=4:0.5

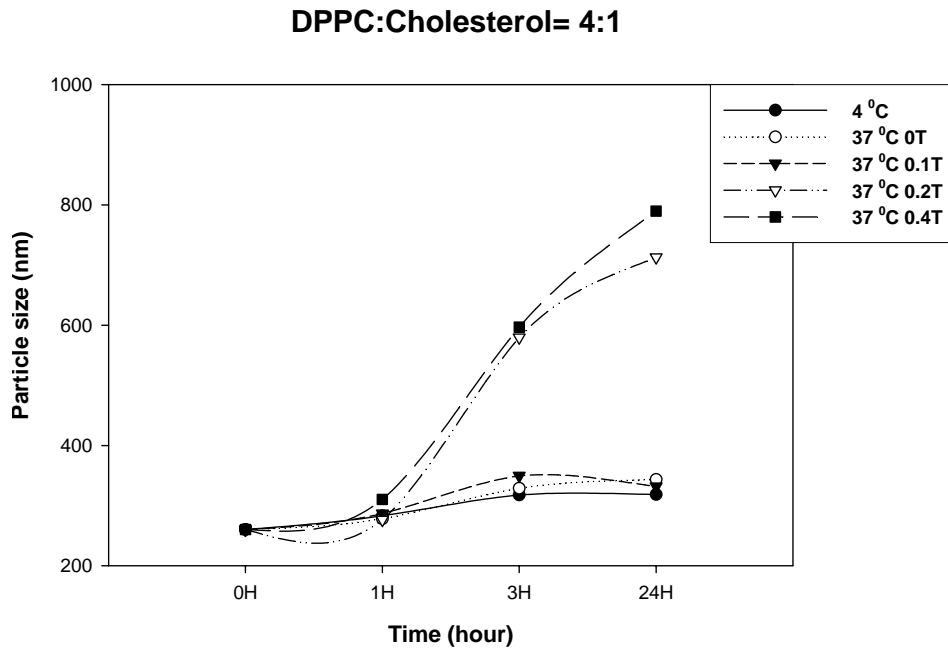


圖 4 粒徑變化 DPPC:Cholesterol=4:1

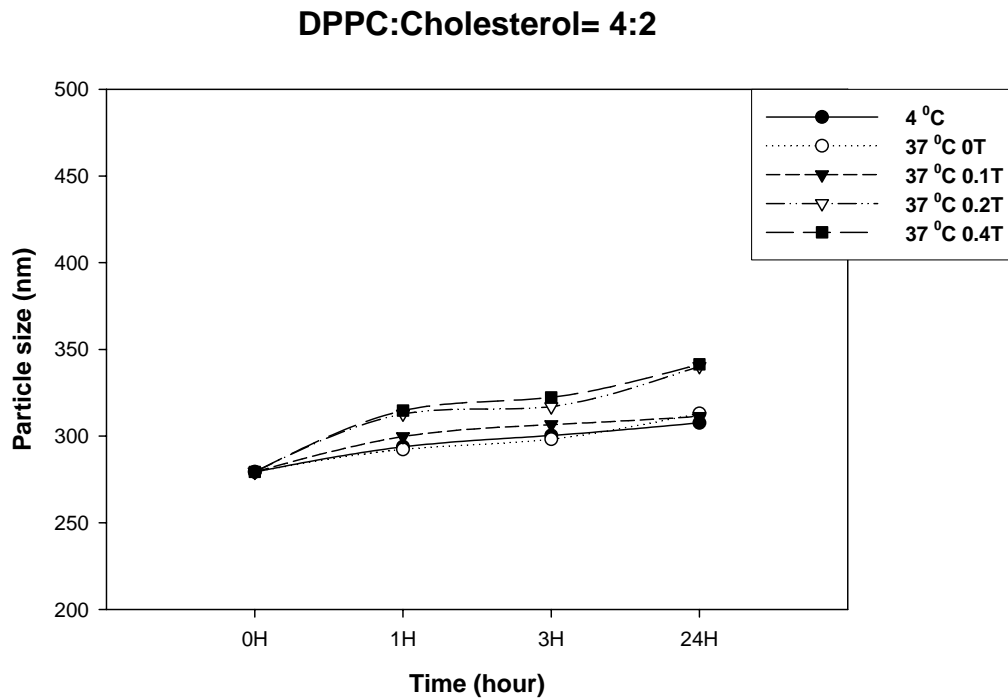


圖 5 粒徑變化 DPPC:Cholesterol=4:2

DPPC:Cholesterol= 4:0

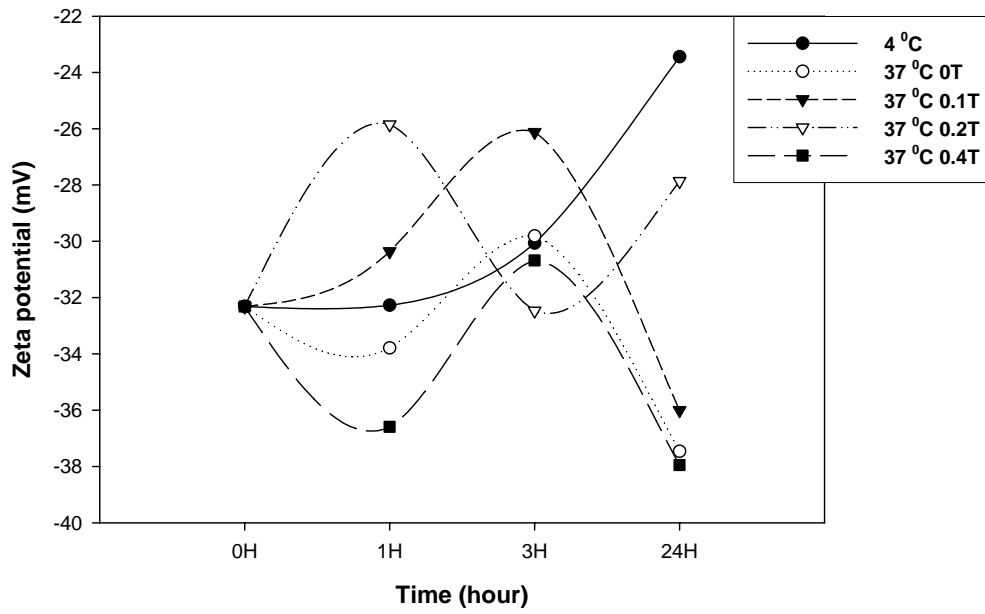


圖 6 界面電位變化 DPPC:Cholesterol=4:0

DPPC:Cholesterol= 4:0.5

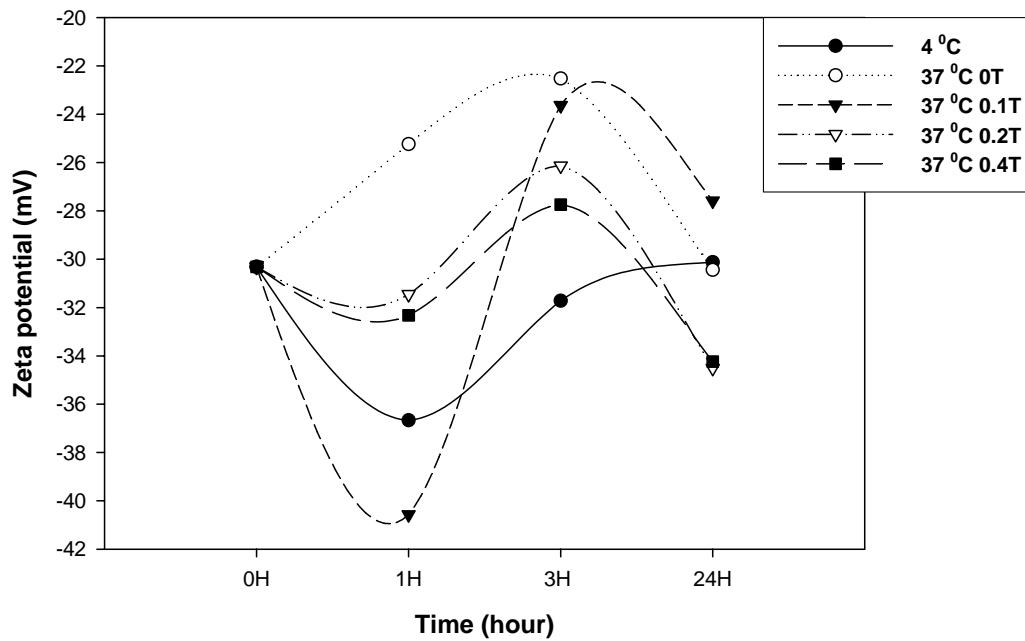


圖 7 界面電位變化 DPPC:Cholesterol=4:0.5

DPPC:Cholesterol= 4:1

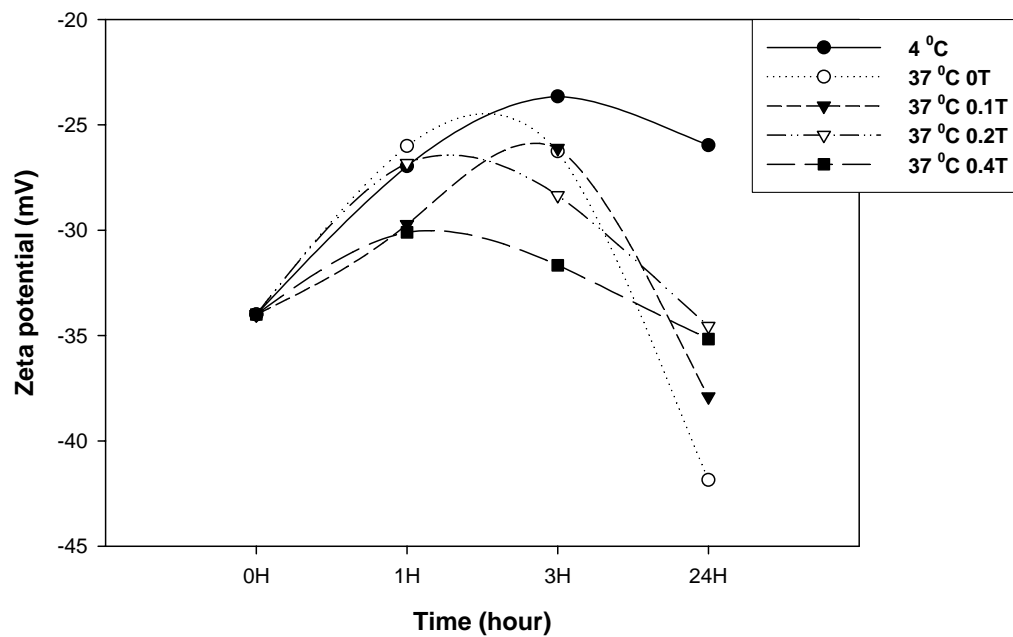


圖 8 界面電位變化 DPPC:Cholesterol=4:1

DPPC:Cholesterol= 4:2

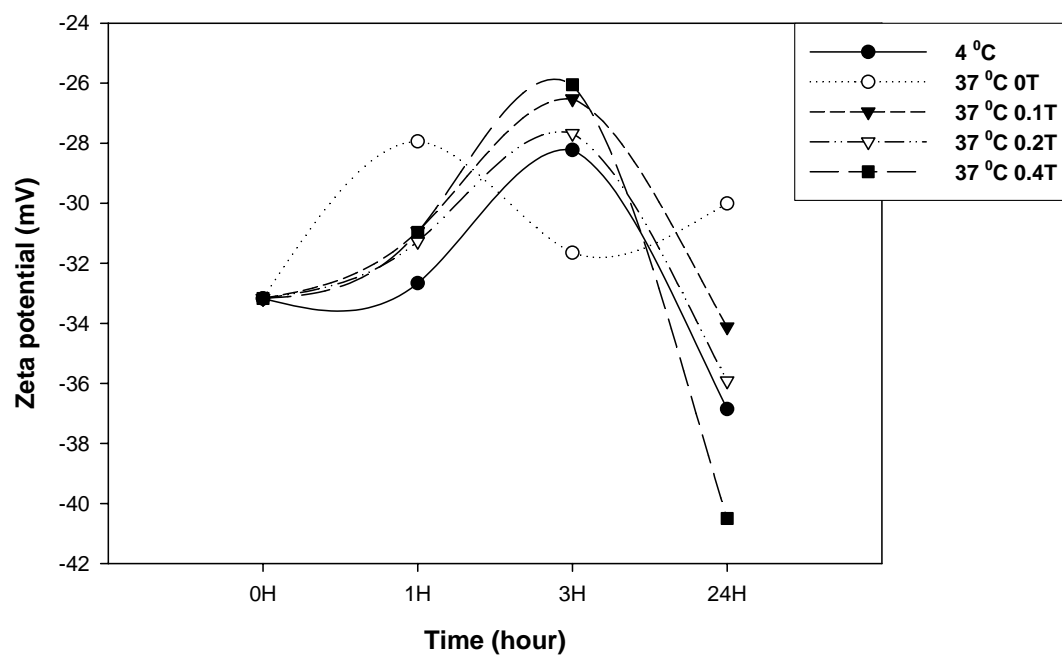


圖 9 界面電位變化 DPPC:Cholesterol=4:2

DPPC:Cholesterol= 4:0

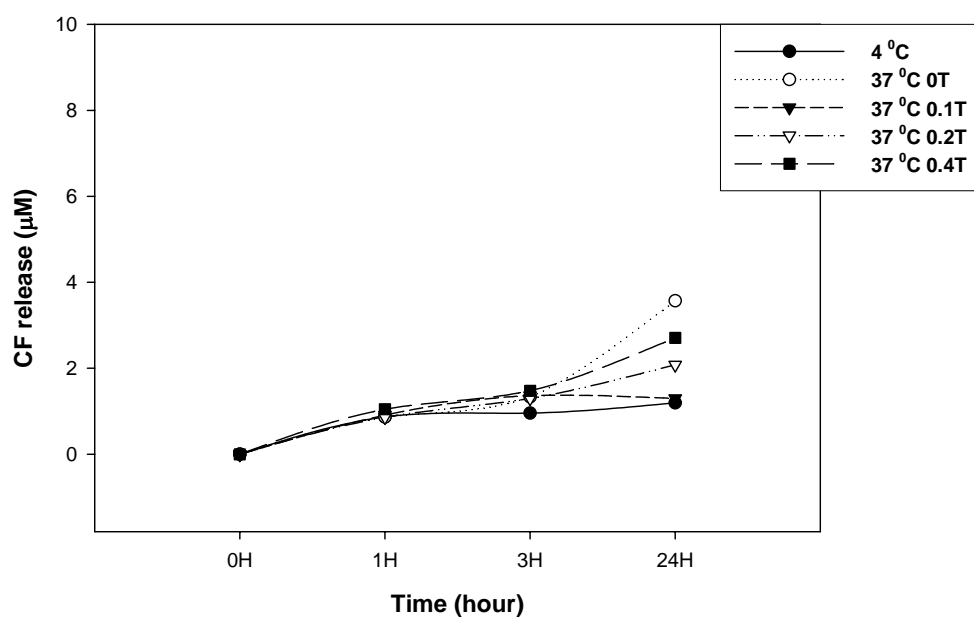


圖 10 螢光滲漏濃度 DPPC:Cholesterol=4:0

DPPC:Cholesterol= 4:0.5

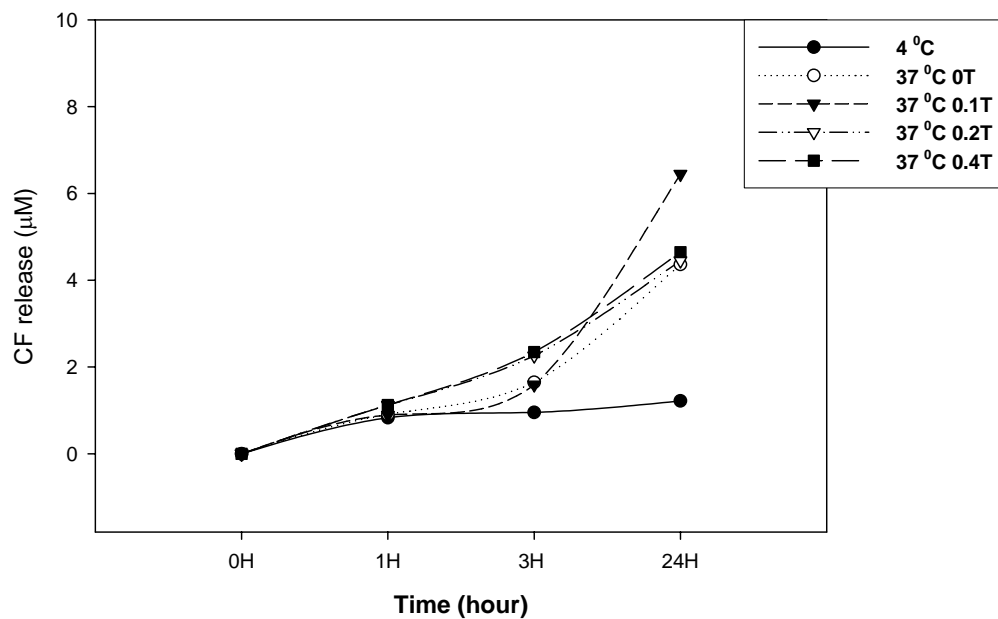


圖 11 螢光滲漏濃度 DPPC:Cholesterol=4:0.5

DPPC:Cholesterol= 4:1

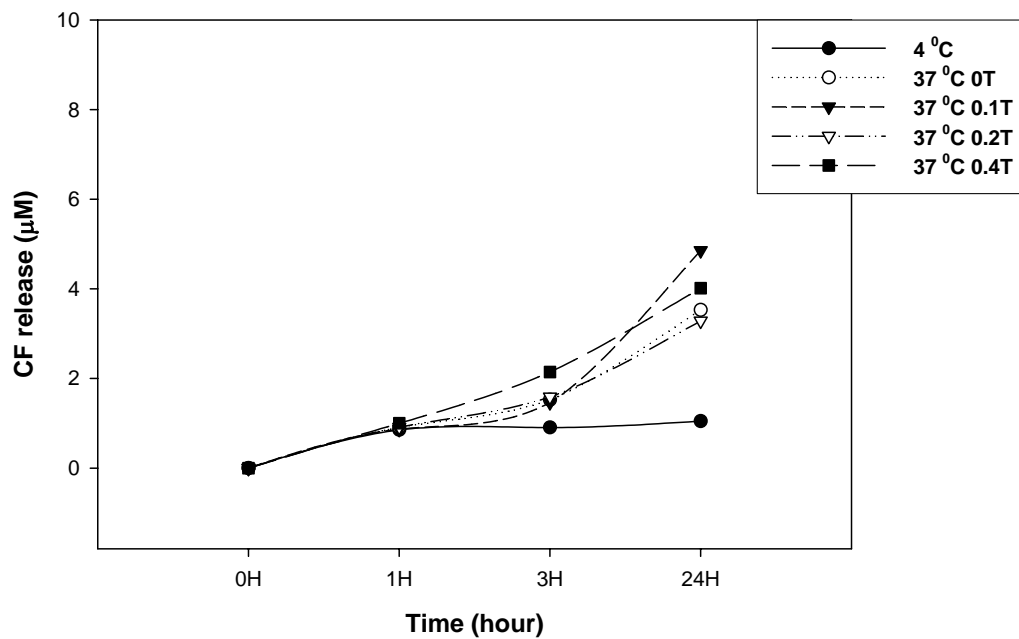


圖 12 螢光滲漏濃度 DPPC:Cholesterol=4:1

DPPC:Cholesterol= 4:2

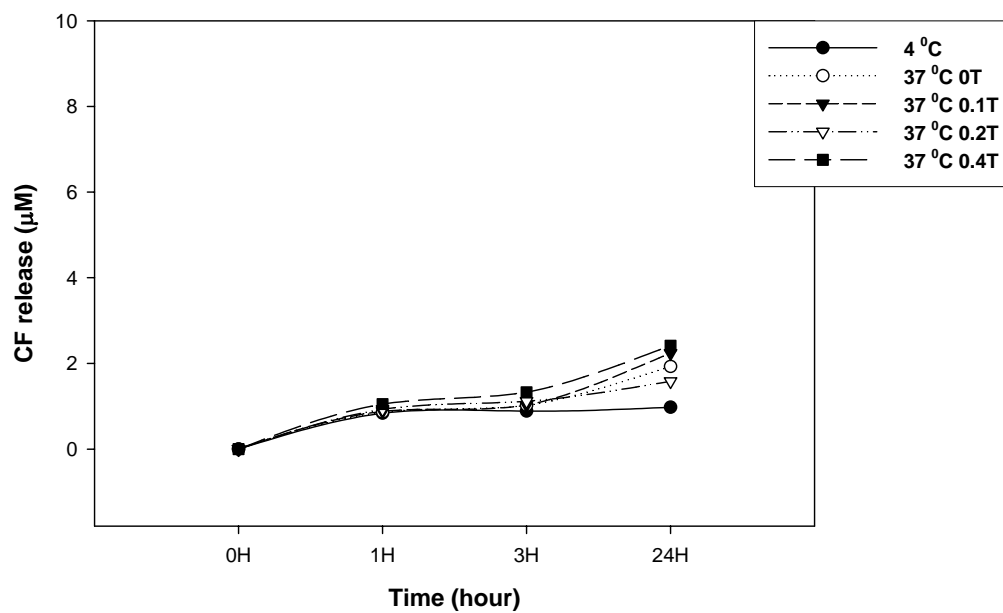


圖 13 螢光滲漏濃度 DPPC:Cholesterol=4:2

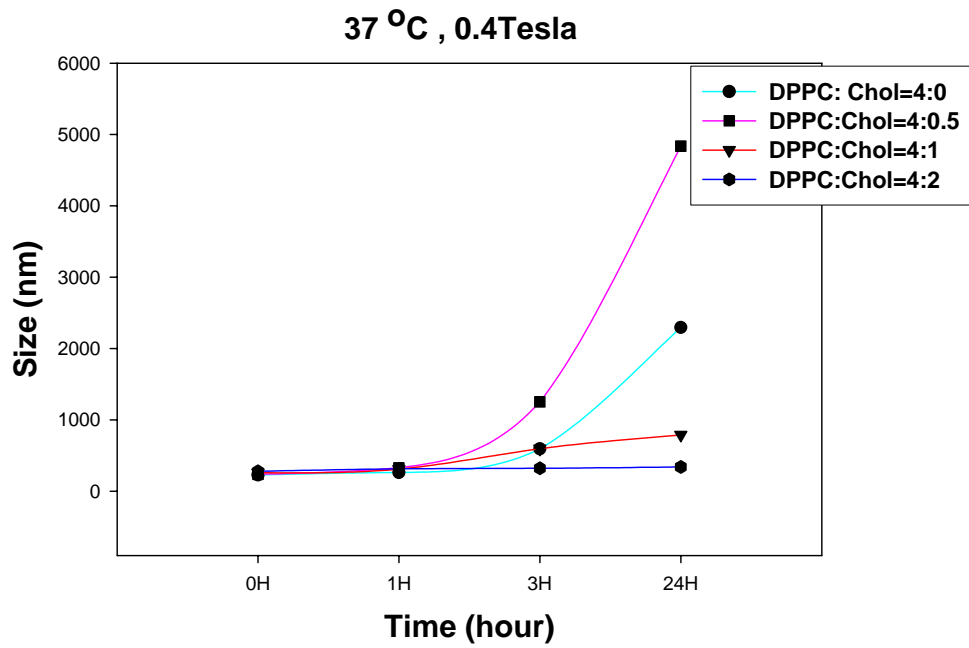


圖 14 0.4Tesla 磁場微脂粒之粒徑變化

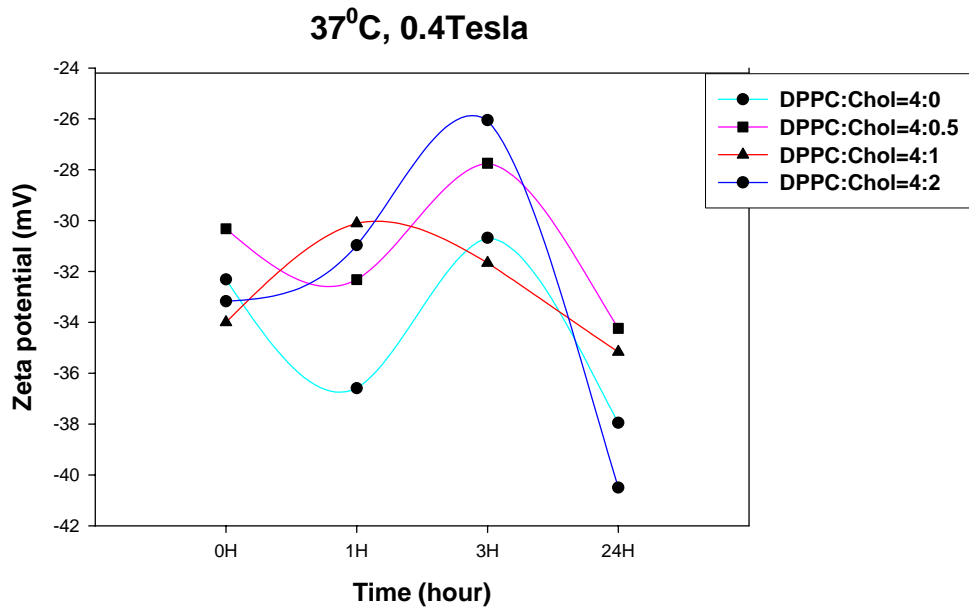


圖 15 0.4Tesla 磁場微脂粒界面電位之變化

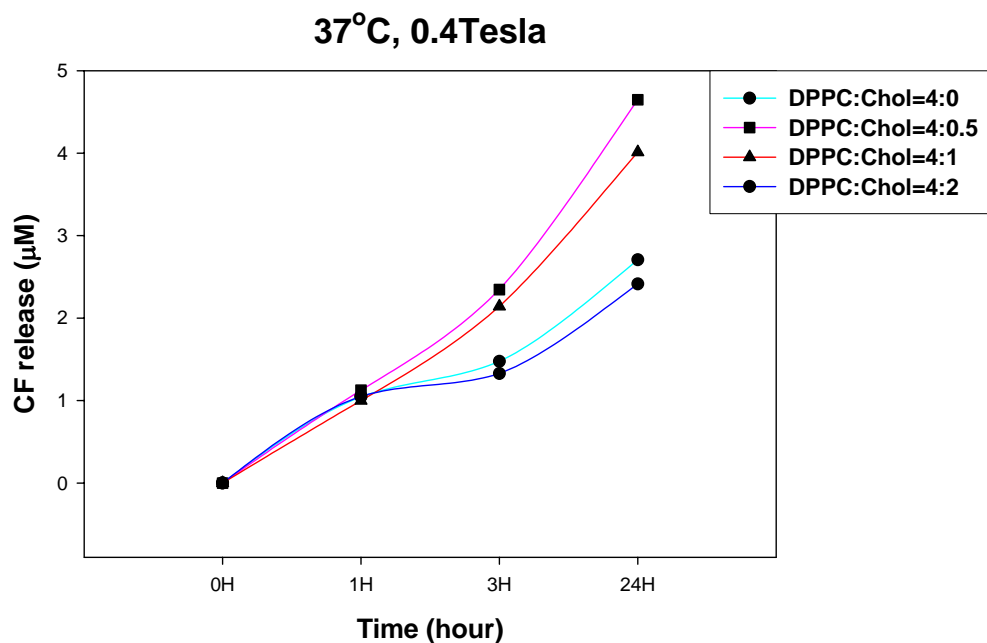


圖 16 0.4Tesla 磁場微脂粒包覆物釋放之變化

參考文獻

1. J. N. Weinstein and L. D. Leserman, "Liposomes as drug carriers in cancer chemotherapy", *Pharmacology & Therapeutics*, 24,207-223(1984)
2. S. Raffy and J. Teissie, "Control of Lipid Membrane Stability by Cholesterol Content", *Biophysical Journal*, 76,2072-2080(1999)
3. D. Z. Liu, W. Y. Chen, L. M. Tasi and S. P. Yang, "The Effects of Cholesterol on the Release of Free Lipids and Physical Stability of Lecithin Liposomes", *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 31,269-276(2000)
4. New, R. R. C., in *Liposome : a practical approach*, edited by New, R. R. C., IRL press, New York, 1990 (1981)
5. M. C. Woodle and G. Storm, *Long Circulating Liposomes: Old drugs, New Therapeutics*, Springer-Verlag, 1998
6. J. A. O'Shaughnessy "Pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer. ", *Clinical Breast Cancer*. 4(5),318-28(2003)
7. J. Tollemar, L. Klingspor, O. Ringden, "Liposomal amphotericin B (AmBisome) for fungal

- infections in immunocompromised adults and children. ” *Clinical Microbiology & Infection*. 7 Suppl 2:68-79(2001).
8. H. Kikuchi, N. Suzuki, K. Ebihara, H. Morita, Y. Ishii, A. Kikuchi, S. Sugaya, T. Serikawa and K. Tanaka, “Gene Delivery Using Liposome Technology”, *Journal of Controlled Release*, 62,269-277(1999)
 9. T. W. Chung and I. H. Peng, “An Engineering Model to Characterize Oxygen Transfer Rates for Liposome Encapsulated Hemoglobin (LEH)”, *Artificial Cell, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology*, 26,389-398(1998)
 10. M. M. Batenjany, L. T. Boni, Y. Guo, M. E. Neville, S. Bansal, R.J. Robb , M.C. Popescu, “The effect of cholesterol in a liposomal Muc1 vaccine. ” *Biochimica et Biophysica Acta*. 1514(2),280-90, 2001
 11. G. Gregoriadis and A. Trouet, Target of Drugs, Plenum Press, New York,1981
 12. D. H. Thompson., *Advanced Drug Delivery Reviews* 53,245(2001)
 13. M. B. Yatvin, J. N. Weinstein,. W. H. Dennis, R.Blumenthal., “Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia. ” *Science*. 202(4374):1290-3(1978)
 14. R. P. Liburdy, R. L. Mafin., “Microwave-stimulated drug release from liposomes. ” *Radiation Research* 103(2),266-275(1985)
 15. M. Shinkai, M. Suzuki, S. Iijima, T. Kobayashi., “Antibody-conjugated magnetoliposomes for targeting cancer cells and their application in hyperthermia. ” *Biotechnology & Applied Biochemistry*. 21, 21125-37(1995)
 16. B. Khoobehi, C. A. Char, G. A. Peyman., “Assessment of laser-induced release of drugs from liposomes: an in vitro study. ” *Lasers in Surgery & Medicine*. 10(1),60-5(1990)
 17. S. P. Vyas, R. Singh, R. K. Asati., “ Liposomally encapsulated diclofenac for sonophoresis induced systemic delivery. ” *Journal of Microencapsulation*. 12(2),149-54(1995)
 18. V. Neytchev, N. Terezova, H. Matsumura, T. Tomov., “Membrane electropermeabilization effects of frequency and membrane surface order on liposome leakage. ” *Histology & Histopathology*,17(2),649-656(2002)
 19. P. Shum, J.M. Kim and D.H. Thompson., “Phototriggering of liposomal drug delivery systems.” *Advanced Drug Delivery Reviews*. 53,273-284(2001)
 20. C. Mader, S. Kupcu, M. Sara, U. B. Sleytr., “Stabilizing effect of an S-layer on liposomes towards thermal or mechanical stress. ”*Biochimica et Biophysica Acta*, 1418(1),106-116(1999)

21. M. Shinkai, M. Yanase, H. Honda, T. Wakabayashi, J. Yoshida and T. Kobayashi.,
“Intracellular Hyperthermia for Cancer Using Magnetite Cationic Liposomes: In vitro Study.”
Japan Journal of Cancer Research.87,1179-1183(1996)
22. P. Venugopalan, S. Jain, S. Sankar, P. Singh, A. Rawat, S.P. Vyas., “pH-sensitive liposomes:
mechanism of triggered release to drug and gene delivery prospects. ” *Pharmazie*.
57(10),659-71(2002)
23. N. Aihara, S. Tazuma, G. Kajiyama., “Hydrophilic bile salts and liposomes inhibit hydrophobic
bile salt-induced release of glycoprotein by guinea-pig gall-bladder. ” *Journal of
Gastroenterology & Hepatology*. 10(1),42-6(1995)
24. R. Tachibana, S. Futaki, H. Harashima, H. Kiwada., “pH-sensitive liposomes in nuclear
targeting of macromolecules. ” *Methods in Enzymology*. 372,349-61(2003)
25. J. Davidsen, K. Jørgensen, L.T. Andresen, O.G. Mouritsen., “Secreted phospholipase A₂ as a
new enzymatic trigger mechanism for localised liposomal drug release and absorption in
diseased tissue.” *Biochimica et Biophysica Acta*. 1609,95–101(2003)
26. A. Kim, E.H. Lee, S. H. Choi, C. K. Kim, “In vitro and in vivo transfection efficiency of a
novel ultradeformable cationic liposome.” *Biomaterials*, 25,305-313(2004)
26. J. N. Weinstein, R. Blumenthal, R. D. Klausner., “Carboxyfluorescein Leakage Assay for
Lipoprotein-liposome Interaction. ” *Methods of Enzymology*.128,657-668(1980)
28. J. C. Domingo, F. Rosell, M. Mora and De M.A. Madariaga., “Importance of Purification of
5-(6)-Carboxyfluorescein on the Stability and Permeability Properties of
N-Acylphosphatidylethanolamine Liposomes. ” *Biochemical Society
Transactions*.17(6),997-999(1989)
29. M. Murayama., “Orientation of Sickled Erythrocytes in a Magnetic Field.” *Nature*,
206,420-422(1965)
30. T. Higashi, A. Yamagishi, T. Takeuchi and M. Date., “Effects of Static Magnetic Fields on
Erythrocyte Rheology.” *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*,36, 101-108(1995)
31. B. J. Frisken, C. Asman and P. J. Patty, “Studies of Vesicle Extrusion”, *Langmuir*,
16,928-933(2000)
32. M. D. Mitov, et al. *Advances in Supramolecular Chemistry* edited by G. W. Gokel ~JAI Press,
Greenwich, Vol. 2, pp. 93–139,1992

33. D. Z. Liu, W. Y. Chen, L. M. Tasi and S. P. Yang, "The Effects of Cholesterol on the Release of Free Lipids and Physical Stability of Lecithin Liposomes", *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 31,269-276(2000)
34. S. Raffy and J. Teissie, "Control of Lipid Membrane Stability by Cholesterol Content", *Biophysical Journal*, 76,2072-2080(1999)
35. R. P. Liburdy, T. S. Tenforde., "Magnetic Field-Induced Drug Permeability in Liposome Vesicles", *Radiation Research* 108, 102-111(1986)
36. S. Ozeki, H. Kurashima and H. Abe., "High-Magnetic-Field Effects on Liposomes and Black Membranes of Dipalmitoylphosphatidylcholin: Magnetoresponse in Membrane Potential and Magnetofusion." *The Journal of Physical Chemistry B*,104(24)5657-5660(2000)
37. C. Rosenbalatt, P. Yager and P. E. Schoen., "Orientation of Lipid Tubules by a Magnetic Field." *Biophysical Journal*, 52,295-301(1987)
38. H. R. Khan, S. Ozeki., "Estimation of Effective Fixed Charged Density of a Black Lipid Membrane of Didodecyl Phosphite from Membrane Potential and Its Application to Static Magnetic Field Effect on Ion Transport. " *Journal of Colloid and Surface Science*, 177,628-632(1996)
39. H. Kurashima, H. Abe and S. Ozeki., "Magnetic-field-induced Deformation of Lipid Membranes. " *MolecularPhysics*,100(9),1445-1450(2002)
40. E. Boroske and W. Helfrich., "Magnetic Anistropy of Egg Lecithin Membranes. " *Biophysical Journal*, 24,863-868(1978)