

國立台灣大學 電機工程學研究所

碩士論文

指導教授：李百祺教授

超音波穴蝕效應於基因傳遞效率之研究

**A Study on Acoustic Cavitation Assisted  
Gene Delivery**

研究生：賴俊延

中華民國九十四年六月



# 致謝

短短兩年的碩士班生涯已經進入尾聲，看著自己寫出的厚厚一疊論文，再想想今年 4 月仍為做不出結果而焦頭爛額的我——現在終於是能鬆一口氣的時候了！回想這兩年來的研究，挫折的日子總是多過喜悅的時刻，幸好有許多的支持，才能讓我一路走到今天。首先先謝謝老師教導，不斷地為我尋找各種可用的資源，讓我能在實驗的規畫上無後顧之憂；老師處事的嚴謹與細心，也使我獲益良多，即使是小細節，也要盡自己所能做到最好。接著是黃聖文學長，不但常常提供與實驗相關的建議，在實驗初期更是風雨無阻地每週幫我載 7、80 公斤的儀器到台大醫院實驗。若沒有學長的鼎力相助，我恐怕早因不堪負荷而放棄了吧！實驗初始的訓練要感謝小咪，你幫我建立了不少觀念，甚至熬夜只為了教我探頭的校正，真是辛苦了！師大的佳璇學姐也是能夠生出這篇論文的一大功臣，學姐不僅教我許多細胞實驗的方法，在我幾乎做不出任何實驗結果的那一段日子還熱心幫我尋求解決的方向。雖然我自認為在生物領域的訓練還不差，但我從佳璇學姐那裡學到了更多。其他還有葉秩光學長、夢麟學長、葉醫師與超康學長，你們都曾提供我不少寶貴的建議，使我面對困難時不至於束手無策。另外，303 實驗室的各位學長學姐同學與學弟妹，你們讓我覺得進超音波實驗室果然是正確的選擇。最後，要謝謝始終支持著我與擔心我是否太累的爸爸媽媽，大學加碩士班的這六年來，辛苦你們了！

再一次向所有幫助過我、關心我的人致上最誠摯的謝意，我會繼續加油的！



# 中文摘要

基因治療是目前極具潛力的治療模式，其定義為”修復可能致病基因的技術”。基因治療的關鍵為基因傳遞（又稱為基因轉殖），可藉由許多方法達成，本研究使用之方法為利用超音波與超音波對比劑誘發穴蝕效應，以達成基因傳遞。穴蝕效應為微氣泡於聲場中受到壓力變化而脹縮與破裂的過程，由超音波產生的穴蝕效應在非熱治療領域上之優點如下：由於超音波具有非侵入性及深處聚焦之能力，因此應用於治療較安全可靠；且其亦為發展完善的造影方法，故可將治療與影像結合。雖然以超音波穴蝕效應進行基因傳遞已有許多成功的案例，且其機制目前認為是穴蝕效應導致細胞膜通透性增加，但對於穴蝕效應與基因傳遞間的量化關係仍然不清楚，故本研究的目的即是量化基因傳遞效率/細胞存活率與穴蝕效應之關係。本研究使用 1MHz 超音波探頭與商用對比劑Levovist<sup>®</sup>來誘發穴蝕效應，並以HeLa（子宮頸癌）細胞與標訂FITC染劑的DNA進行基因傳遞實驗。研究中使用超音波發射聲壓、對比劑濃度、超音波發射週數作為改變的參數，先有效地誘發與偵測穴蝕效應，並以慣性穴蝕劑量定量微氣泡破裂的程度，再進行基因傳遞實驗，於螢光顯微鏡下計數基因傳遞率與細胞存活率，最後以基因傳遞結果為縱軸，慣性穴蝕劑量為橫軸，將兩者的間之量化關係畫出，並比較不同超音波參數的結果之相關性。實驗結果發現，穴蝕效應（微氣泡破裂）的趨勢會隨發射聲壓增強、微氣泡濃度提高、發射週數增加而明顯升高，表示本研究已可有效地誘發與偵測穴蝕效應。基因傳遞實驗方面，單一變因下的基因傳遞率/細胞存活率對於慣性穴蝕劑量具高度相關性。若結合由不同超音波參數得到的基因傳遞率/細胞存活率對於慣性穴蝕劑量圖，其相關係數 $R^2$ 亦達 0.95 與 0.84，代表基因傳遞結果與慣性穴蝕劑量密切相關。此結果表示同一架構下不論改變的超音波參數為何，穴蝕效應與基因傳遞結果間存在一固定的函數關係，即有可能運用穴蝕效應的實驗結果來預測基因傳遞效率與細胞存活率。

關鍵詞：超音波、微氣泡、穴蝕效應、基因傳遞、慣性穴蝕劑量

# Abstract

Gene therapy is a promising therapeutic technique, and it is defined as correcting defective genes responsible for disease development. The key of gene therapy is gene delivery (also known as transfection). In this research, ultrasound and ultrasound contrast agents are used to induce cavitation, and gene delivery is assisted with cavitation effect. Cavitation is the process of microbubble formation, resonance, and destruction. When microbubbles experience time-varying acoustic field, cavitation may occur. Cavitation effects induced by ultrasound have been found beneficial in the non-thermal treatment, and the advantages of ultrasound are non-invasiveness, focusing and real-time imaging capacities. Although quantitative success of acoustic cavitation assisted gene delivery has been reported in the literature, the relations between gene delivery rate and cavitation effect are still unknown. In this research, methods for effective induction of acoustic cavitation are first established. Then, the quantitatively relations of gene delivery and cavitation dose are analyzed. A 1MHz ultrasound transducer and the commercial ultrasound contrast agent Levovist<sup>®</sup> are used for cavitation induction. HeLa cells and FITC labeled short sequence DNA are used in the gene delivery experiments. The parameters under investigation are acoustic pressure, microbubble concentration and ultrasound pulse length. The effect of cavitation (microbubble destruction) is quantitatively analyzed using the inertial cavitation dose (ICD) method. After gene delivery experiments, the gene delivery rate and cell viability are calculated under the fluorescent microscope. The curves of gene delivery rate (and cell viability) versus ICD are plotted, and the relations between gene delivery rate/viability and cavitation are examined. The results show that ICD increases with the acoustic pressure, microbubble concentration and pulse

length. In the gene delivery experiments, there are high correlations between gene delivery rate (or cell viability) and ICD. Combining the results of gene delivery rate (or cell viability rate) versus ICD of the three parameters, high correlations also exist between gene delivery results and ICD, indicating that gene delivery results may be potentially predicted using cavitation measurements before gene delivery experiments.

Key words: ultrasound, microbubbles, cavitation, transfection, gene delivery, inertial cavitation dose



# 目錄

第一章 緒論.....	1
1.1 基因治療.....	1
1.2 超音波治療之演進.....	4
1.3 穴蝕效應.....	6
1.4 超音波於基因傳遞之應用.....	8
1.5 研究動機與目標.....	10
1.6 論文架構.....	12
第二章 實驗材料與方法.....	13
2.1 穴蝕效應實驗—誘發與偵測.....	13
2.1.1 超音波對比劑.....	13
2.1.2 實驗系統架構.....	15
2.1.3 穴蝕效應之誘發.....	17
2.1.3.1 發射聲場強度.....	17
2.1.3.2 微氣泡濃度.....	17
2.1.3.3 發射週數.....	18
2.1.4 穴蝕效應之偵測.....	19
2.1.4.1 B-mode 影像觀察法.....	19
2.1.4.2 穴蝕效應之定量表示—Inertial Cavitation Dose.....	19
2.2 基因傳遞實驗.....	22
2.2.1 細胞株.....	22
2.2.2 DNA.....	23
2.2.3 系統架構與實驗流程.....	24
2.2.3.1 基因傳遞率量測法.....	24
2.2.3.2 細胞存活率量測法.....	24
2.2.4 實驗參數.....	26
2.2.5 基因傳遞率/細胞存活率與穴蝕效應關聯之建立.....	28

第三章 實驗結果.....	29
3.1 穴蝕效應實驗結果.....	29
3.1.1 B-mode 影像觀察法.....	29
3.1.2 發射聲壓 vs. 穴蝕效應.....	30
3.1.3 微氣泡濃度 vs. 穴蝕效應.....	34
3.1.4 發射週數 vs. 穴蝕效應.....	38
3.2 基因傳遞實驗結果.....	40
3.2.1 螢光顯微鏡與共軛焦顯微鏡觀察結果.....	40
3.2.2 發射聲壓 vs. 基因傳遞率與細胞存活率.....	43
3.2.3 微氣泡濃度 vs. 基因傳遞率與細胞存活率.....	46
3.2.4 發射週數 vs. 基因傳遞率與細胞存活率.....	49
3.3 穴蝕效應 vs. 基因傳遞率與細胞存活率.....	50
第四章 分析與討論.....	52
4.1 穴蝕效應之測與定量.....	52
4.2 基因傳遞實驗結果分析.....	57
4.3 穴蝕效應與基因傳遞率、細胞存活率之關聯.....	59
4.4 本研究之應用.....	61
第五章 結論與未來工作.....	62
第六章 參考文獻.....	67

# 第一章 緒論

## 1.1 基因治療

隨著生物技術的發展，基因治療在近幾年來已逐漸成為一種新的治療模式[1-3]。基因是遺傳上的基本功能單位，它為一段特定的序列，經過轉錄（transcription）與轉譯（translation）的過程後合成特定的蛋白質以表現其機能[4]。一旦基因受到影響（或改變）使其合成的蛋白質無法表現正常的功能，便稱為基因失調（genetic disorders）[5]，根本的解決之道即是仰賴基因治療。基因治療不但可將治療範圍縮小至局部或是某一特定功能，其與傳統醫療的不同之處在於直接影響人體內的遺傳信息，改變細胞或組織的表現使其功能回復正常，即基因治療的最終目標是「修復致病因子」而非「治療病狀」[1]。若應用於腫瘤治療，可使用基因療法抑制腫瘤生長，甚至將其導向自我毀滅的機制[6]；若目標是遺傳疾病，則可植入正常的基因或修復缺陷基因使患者的身體機能恢復正常[7]。綜上所述，基因治療即是修復可能致病基因的技術。基因的「修復」方式大致可分為下列四種[8]—

- 插入法（insertion）：在染色體中插入一段能發揮正常功能的基因，使其表現能取代現有的缺陷基因，如圖 1-1(a)。
- 置換法（swap），運用同源重組（homologous recombination）的方式，使帶有正常基因的染色體與原本有缺陷基因的染色體互換，讓正常基因可適當表現，如圖 1-1(b)。
- 修復法（repair），運用放射線或藥物讓缺陷基因產生逆向突變（reverse mutation），使其功能恢復正常，如圖 1-1(c)。
- 改變法（alter），直接將缺陷基因的功能凍結（blocking）或是改變其調節（regulation），並藉由其他基因功能的互補來導正體內的機能，如圖 1-1(d)。

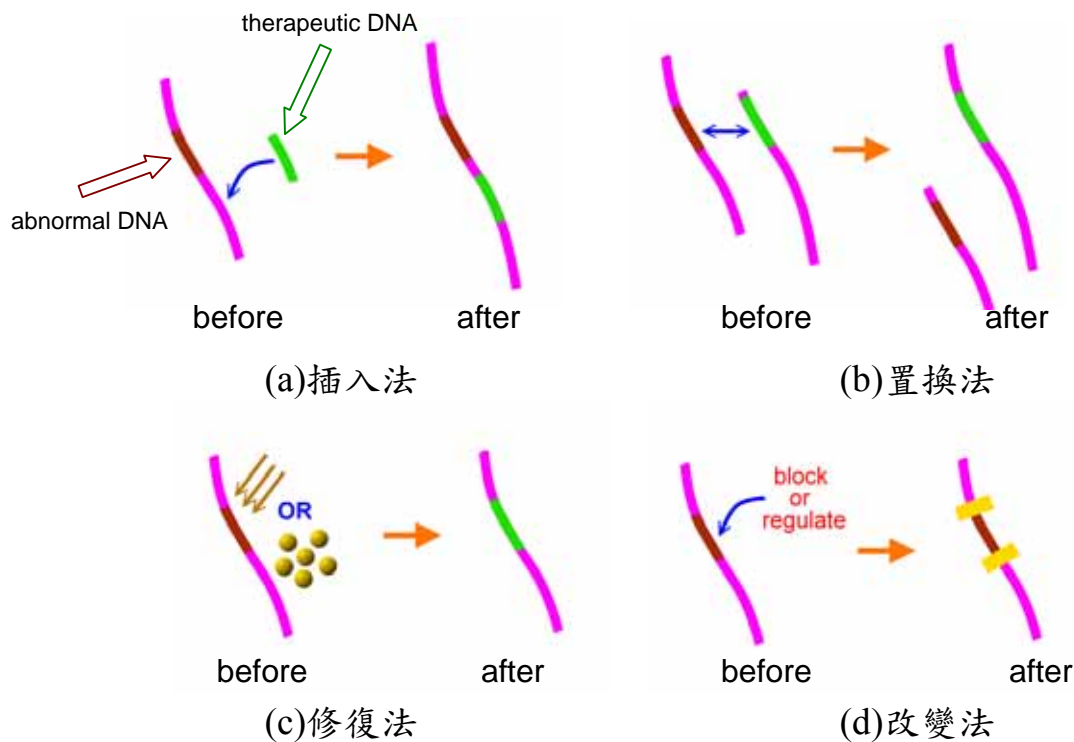


圖 1-1：基因治療方法示意圖。

基因治療的核心技術為基因傳遞 (gene delivery)，又稱為基因轉殖 (transfection)，是將基因從細胞外送入細胞內的過程。基因傳遞的環境可分為三種，第一種是 *in vitro*，即在實驗室模仿活體內的環境以進行基因傳遞。基因治療的研究都是從 *in vitro* 的方式開始，待有顯著成效後才可評估移至活體內的可行性。第二種方式是 *in vivo*，即應用於活體內。目前應用於活體內的基因療法例子有將血管新生的基因以腺病毒帶入病患體內，以治療冠狀動脈疾病[9]。第三種方式是 *ex vivo*，將體內特定細胞取出後進行基因傳遞，待細胞傳遞成功且正常表現後再植回患者體內。例如可從血友病患者體內取出骨髓細胞（已無法製造血液蛋白質），以基因工程技術處理過後，選出可生產血液蛋白質的細胞再植回患者體內，此後患者便不需要常常靠施打血液蛋白質以止血[10]。

基因傳遞可分為以病毒為媒介的傳遞系統 (virus-mediated gene delivery systems) [11]與非病毒式的傳遞系統 (non-viral gene delivery systems) [12]。病毒為傳送基因的優良載體 (vector)，因其可感染細

胞，將自身攜帶的基因送進宿主體內，因此為最廣為研究的基因傳遞方式。目前常用於基因傳遞實驗的病毒有腺病毒（adenoviruses, AdV）、腺病毒相關病毒（adeno-associated viruses, AAV）與反轉錄病毒（retroviruses, RV）。使用病毒作為基因傳遞媒介的好處是基因傳遞率高，臨床已有應用[13-15]，其毒性也已去除大部分。短效性的 AdV 可用於癌症的治療，長效性的 AAV 與 RV 未來可應用在遺傳疾病的治療。但病毒的缺點是仍有突變與致病性的風險，且對於 RV 而言，其攜帶的基因插入活體內並無專一性，若因此破壞正常基因反而會造成細胞的癌化現象。另外，病毒也會造成生物體的免疫反應（immune response）與發炎反應（inflammation），免疫反應太嚴重時甚至會造成生物體的死亡[16]。另外，病毒也有一項共同的特徵—攜帶的基因長度有限，這也限制了病毒的使用範圍。相較於病毒為媒介之傳遞系統，非病毒式的基因傳遞系統較偏重於物理與化學特性，如直接注射 DNA 至目的細胞周圍[17]；電穿孔法（electroporation）—以高電壓脈衝迫使細胞膜穿孔，基因得以進入細胞[18]；微注射法（microinjection）是以微小的細管直接將 DNA 注入細胞內[19]；基因槍（gene gun）為將基因附著於微小的奈米金粒子，再以類似發射子彈方式將金粒子打入細胞[20]；微脂體融合法（liposome fusion）則是運用微脂體殼層與細胞膜相近的特性，以融合的方式（或是胞飲作用，endocytosis）將攜帶的基因帶入細胞內[21]；以及使用磷酸鈣沉澱法（Calcium phosphate precipitation），運用鈣離子能增進細胞膜通透性的性質，將附著鈣離子的 DNA 送入細胞等等[22]。非病毒式的方法不會造成細胞毒性與免疫反應，容易製造、儲存與操作，攜帶的基因無長度限制，但最大的缺點是基因傳遞效率較差。綜上所述，病毒法面臨的最大挑戰是生物體的接受度；非病毒法的當務之急為增加基因傳遞的效率。

有鑑於非病毒的傳遞方式在活體的接受度與穩定性較占優勢，近年來不斷地有新的非病毒式傳遞方法被提出。將超音波運用在基因治療的基因傳遞方法即是其中之一，以下章節將針對超音波治療法與如何將超音波應用於基因傳遞加以介紹。

## 1.2 超音波治療之演進

超音波治療可分為熱治療與非熱治療的模式。超音波適於將高能量的聲波傳達至深部組織以達成療效主要依據兩項特徵：(a)低頻時波束具有良好的穿透深度，波長介於毫米（mm）等級，因此不但能作深處聚焦，能量在組織間的分布也可有效規範，可造成特定區域的組織損傷、組織加熱或是非熱性的治療。(b)探頭製作技術具有彈性，可針對特定部位做出合適的大小與形狀的探頭[23]。

於 1940 與 1950 年代時，「超音波手術」即以非侵入式的方法將體內深部聚焦處的組織加以燒灼，其原理為組織吸收超音波能量而產生溫度上升，此溫度上升量能讓蛋白質於幾分之一秒內凝固，而此方法亦發展成精密的腦部手術法 [24-26]。

1970 年代時，超音波高熱療法（hyperthermia）已被廣泛運用於臨床上，治療過程中組織會被加熱至 42-45°C 間，持續 30-60 分鐘。這種熱療法能使細胞對於放射線療法與化學療法具較高的敏感性，即當高熱療法與放射線療法結合在一起時，腫瘤生長的控制效果較佳 [27-28]。

1940 年代使用的超音波即是高能量聚焦超音波 [29]（High-Intensity Focused Ultrasound, HIFU），而高能量聚焦超音波的大量研究興起於 1990 年代左右 [30]。因探頭面積大、幾何聚焦特性較佳，故可發射較強之能量（ $I_{SATA}$  數百至數千  $W/cm^2$ ，強度約診斷用超音波 1000-10000 倍左右 [31]）之超音波以燒灼定點組織，其優點是精確度高，不會造成聚焦區周圍組織的傷害。對於大體積的治療，也可運用矩陣式的燒灼法達成 [32]。相較於輻射治療，同一位置能多次以高能量聚焦超音波進行治療而不會產生累加性的劑量傷害。近年來，高能量聚焦超音波已運用於許多領域，包括泌尿科、眼科與腫瘤治療 [29]，前列腺癌 [33] 與肝腫瘤 [30] 的治療也具臨床治療的可能性，並且此法也可運用於其他癌症的診治 [34]。除了治療腫瘤，超音波聚焦所產生之瞬間高熱亦可做內出血之處理。在動物中之大血管如肝動脈破

裂後，利用非侵入式之高能量聚焦超音波，可在數秒內燒結血管以達到止血的目的[35-36]。另外，高能量聚焦超音波也擁有精確造影的功能，在對組織作損傷性治療時，亦能一邊觀看聚焦區的影像 [29]。

除了熱效應，超音波造成細胞組織損害的機制還有另一大類—穴蝕效應[37-39]，其為微氣泡（microbubble）於聲場中脹縮的一連串過程，通常也伴隨微氣泡的破裂。已有研究顯示，當超音波的聲壓超過個閾值（threshold）時，就會產生微氣泡[23]。微氣泡會於聲場下振盪、生長與急劇破裂，釋放大量能量並造成震波（shock wave）與導致高溫，引起自由基（free radicals）的生成與機械性的組織傷害[40]。近年來，無論是在培養皿進行之體外實驗[41-42]，或是在老鼠的腎臟或兔子腦部等動物之體內實驗[43-48]，穴蝕效應皆可對癌細胞進行破壞；穴蝕效應亦可活化某些抗癌藥物，達到輔助治療的目的[41]。頻率約為 200kHz 的高強度超音波（又稱為震波），除可用於體外震波碎石機外，它在軟組織所引起的聲學穴蝕效應（acoustic cavitation）也已被運用於腫瘤治療[49-51]，其機制是穴蝕效應能引發組織的機械性傷害，產生細胞分解與出血效應，腫瘤生長便受到阻滯[52]。

穴蝕效應除了造成細胞組織損害外，近年來亦有研究發現穴蝕效應可增加細胞外的分子進入細胞的機會，此分子包括蛋白質與 DNA[32,53-60]。此外，DNA 於穴蝕效應的影響下不但可進入細胞，還能正常表現出特定蛋白質，對於基因治療的應用具有非常大的助益。以下章節將針對穴蝕效應加以介紹。

## 1.3 穴蝕效應

穴蝕效應的定義為液體中微氣泡生成、脹縮的一連串過程[37]，它常伴隨微氣泡的破裂（destruction）。故以穴蝕效應為主之超音波治療法即是將穴蝕效應產生的能量運用於損害組織或是基因傳遞。穴蝕效應產生的機制可分為三類：分裂（fragmentation）、穩定擴散（static diffusion）與聲學驅動擴散（acoustically driven diffusion）[61]。分裂的情形發生於微氣泡受到負聲壓脹大但卻變得不穩定之時，最後會分解成數個小碎片。當微氣泡為球狀對稱時是最穩定的時候，而此對稱狀態若受到擾動即會變得不穩定。Plesset與Mitchell已定義出微氣泡不穩定的閥值 $R_{Threshold}$  [62]—若微氣泡的半徑縮小至其最大半徑的十分之一倍時，微氣泡即可能因不穩定而破裂：

$$R_{Threshold} \cong \frac{R_{max}}{10}$$

其中， $R_{max}$ 為半徑的最大值。微氣泡的分裂又稱為瞬變穴蝕（transient cavitation），它包含劇烈地脹大與強烈地破裂現象，能量大量釋放的結果會使溫度急速上升與釋放自由基（free radicals）[55,63-64]，溫度甚至高達 20000K，稱為聲光效應（sonoluminescence）[65]。當微氣泡無分裂現象時，擴散即是造成微氣泡破裂的主要原因。穩定擴散是微氣泡內氣體擴散至氣泡外的過程，但不包含對流的效應在內。擴散速率與微氣泡分解速度反比於微氣泡的半徑與氣體密度。相較之下，聲學驅動擴散為超音波照射下的氣體擴散作用，擴散速率易受到隨時間改變的聲場強度或是氣液交界的移動而影響。微氣泡的完整擴散方程式如下：

$$\frac{\partial C}{\partial t} + v \frac{\partial C}{\partial R} = \kappa \nabla^2 C$$

其中， $C$ 為氣體濃度， $t$ 為時間， $v$ 為微氣泡壁的速度， $R$ 為微氣泡半徑， $\kappa$ 為氣體在液體中的擴散係數。

若將超音波應用於穴蝕效應，可將一具有強大負壓的壓力波施於一液體中，則該液體將會以其內的微小雜質作為穴蝕核（cavitation



nuclei)，由該點向外擴張形成小氣泡。由於超音波為一隨時間改變強度的縱波，當交替的正壓與負壓作用於微氣泡時，微氣泡即會發生振盪，正壓力時使氣泡縮小，負壓力時會使氣泡擴張。若脹縮的過程中殼層速度與超音波的壓縮及舒張速度不同步，經過幾個循環後微氣泡就會破裂，稱為慣性穴蝕效應 (inertial cavitation)。慣性的穴蝕效應是超音波用於基因治療的主軸，在足夠強的聲壓下 (~1MPa) 微氣泡可產生強烈地破裂現象，目前推測其能量可讓細胞膜的脂質層產生暫時性的擾動，細胞膜通透性因而增加，基因傳遞也得以發生 [54-55,63,66]。

現今醫用超音波在臨床上使用時皆有其安全規範，例如  $I_{SPPA}$  及  $I_{SPTA}$  值要小於  $190 \text{ W/cm}^2$  and  $720 \text{ mW/cm}^2$ ，MI值要低於 1.9 [67-69]，而使用超音波照射時也有所謂的ALARA(儘可能降低劑量；As Low As Reasonably Achievable)原則。這些規定是為了避免超音波使用的劑量太大而對生物組織造成傷害。前人研究指出超音波在安全規範邊緣下使用時，亦會對老鼠或兔子等小動物之肺臟或腎臟造成出血等損害 [38,43,70-73]，其機制之一即為穴蝕效應。由於人體中含有一些大小在 10 微米以下的氣泡，如前所述，壓力波會誘發穴蝕效應，產生不良的損傷，因此，在超音波成像的應用中，穴蝕效應為需要避免之現象 [37-39]。

然而，若能控制穴蝕發生區域於腫瘤細胞處，利用穴蝕釋放之能量造成惡性腫瘤之損傷；或是控制穴蝕的能量使基因傳遞達到最佳的效率但卻不損害細胞，便可達到超音波非侵入式治療的效果。因此，於安全規範下有效誘發穴蝕效應是基因治療時須特別注意的地方。除了損傷腫瘤外，大部分的基因治療環境下都希望儘可能地將基因傳遞進細胞而非損害細胞，故本研究中對於穴蝕效應的誘發都以不超過安全規範為準則 (即  $MI < 1.9$ )。由於穴蝕核在人體中的分布相當的不均，造成人體中穴蝕效應難以預測及控制，因此實際應用上會額外提供微氣泡作為穴蝕核。

## 1.4 超音波於基因傳遞之應用

以超音波進行穴蝕效應以達成基因傳遞，其優勢之一在於超音波對比劑即可直接作為微氣泡的來源。目前超音波成像使用的對比劑大小約數個微米 ( $\mu\text{m}$ )，故其共振頻率約在數個 MHz，正好是低頻超音波的範圍。由於超音波在造影上的使用率僅次於 X 光，具有非侵入性、穿透深度深(低頻下可達 20 多公分)、患者不會產生疼痛的特性，且架構已完整建立，因此在不需大量的研發成本之下，使用超音波將穴蝕效應與造影結合在一起便成為其最大的優勢。同時，超音波也具有聚焦的特性，因此可針對體內某一小範圍進行治療。使用超音波與穴蝕效應進行基因傳遞的流程如下：先注射入對比劑，待對比劑運送至欲治療的部位後，使用超音波誘發穴蝕效應，即可產生基因傳遞的效果[74]。若進入細胞的基因能正常表現，治療的目的即達成，流程如圖 1-2。

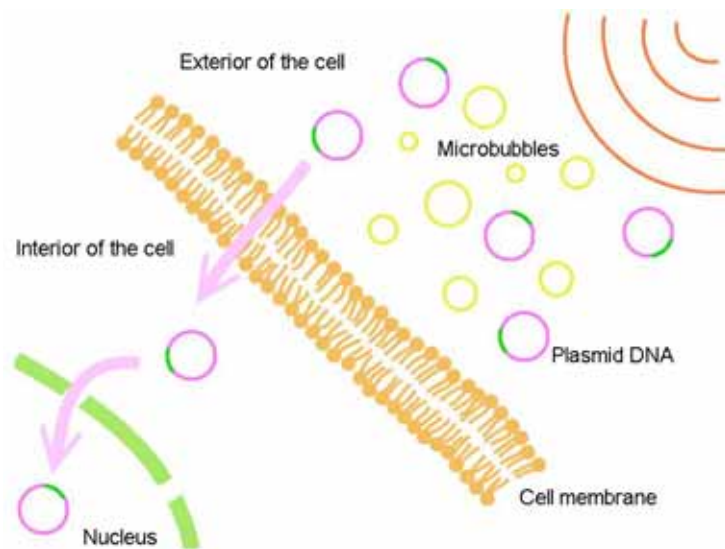


圖 1-2: 基因傳遞與治療流程圖。

目前已有許多團隊正進行基因傳遞的研究：Sandra Koch 團隊使用 2MHz 的脈衝都卜勒超音波 (pulsed Doppler ultrasound)、陽離子化的微脂體 (cationic liposomes) 與商用超音波對比劑 Levovist<sup>®</sup> 做惡性腦瘤的基因傳遞[54]；Douglas L. Miller 團隊使用高強度聚焦超音波產

生穴蝕效應，並在體內實驗中造成基因傳遞與抑制腫瘤生長[29]；Peter A. Frenkel團隊則是將基因附著在白蛋白（albumin）的微氣泡上，且在體外實驗中達成基因傳遞的效果[75]。目前對基因傳遞的確實機制並不清楚，但普遍認為是穴蝕效應導致細胞膜通透性增加，因此基因有機會藉此進入細胞中[54-55,63,66]。Claus-Dieter Ohl團隊更使用震波誘發穴蝕效應，發現穴蝕效應產生處會造成細胞的脫離，但周圍未脫離的細胞卻具通透性而攝取入螢光蛋白質[56]。此實驗一方面顯示傳遞對象並不只限於基因，另一方面也確認了穴蝕效應與傳遞發生的關聯性。

對於基因傳遞效率的評估，William J. Greenleaf團隊使用GFP基因、人類軟骨細胞與Albunex<sup>®</sup>微氣泡可達成 50%的傳遞率[55]；Sandra Koch團隊使用GFP基因、鼠腦瘤細胞、陽離子化的微脂體與Levovist<sup>®</sup>微氣泡，傳遞率可達 5.5%，但此時的細胞存活率為 39.3%[54]；Volker Oberle則認為因細胞種類而有 12~53%不等的傳遞率[76]；Wen-Shiang Chen團隊於 2004 年以GFP基因、人類子宮頸癌細胞（HeLa）與Definity<sup>®</sup>微氣泡得到 26%的傳遞率[77]；Douglas L. Miller團隊使用GFP基因、表皮細胞與Optison<sup>®</sup>微氣泡可達成 4%的傳遞率，而細胞存活率為 70%[78]。從上述結果可發現傳遞率可能因細胞而異，而傳遞率與細胞存活率似乎是一項妥協（trade off），即傳遞率愈高，細胞存活率可能愈低。目前已有研究顯示這種交換的現象[78]，原因可能為欲造成更高的基因傳遞效果，則需要更大的能量與穴蝕效應，但當穴蝕效應釋放的能量太多時，即會造成細胞的損傷。因此，如何在基因傳遞率與細胞存活率間取捨，是當前重要的課題。

## 1.5 研究動機與目標

雖然以超音波進行基因傳遞已有不錯的效果，其機制也普遍認為是穴蝕效應所造成 [29,54-55,57]，但穴蝕效應與基因傳遞率間的量化關係至今仍然不了解。若能得出基因傳遞率、細胞存活率與量化的穴蝕效應間的關係曲線，便能有效以穴蝕效應量預測基因傳遞率與細胞存活率，對於細胞實驗效率的提升將有莫大的助益。同時，也可對超音波輔助之基因傳遞機制有更進一步之認識。

本實驗室之前已進行穴蝕效應之有效誘發與偵測的相關研究 [79]，故本基因傳遞研究為其延伸。本研究目標之一為希望能建立起影響穴蝕效應之物理量（發射聲壓、對比劑濃度、發射週數等參數）與基因傳遞實驗結果間的相關性，並配合量化後的穴蝕效應結果作出物理量—穴蝕效應—基因傳遞效率/細胞存活率的三角關係圖（圖 1-3）：

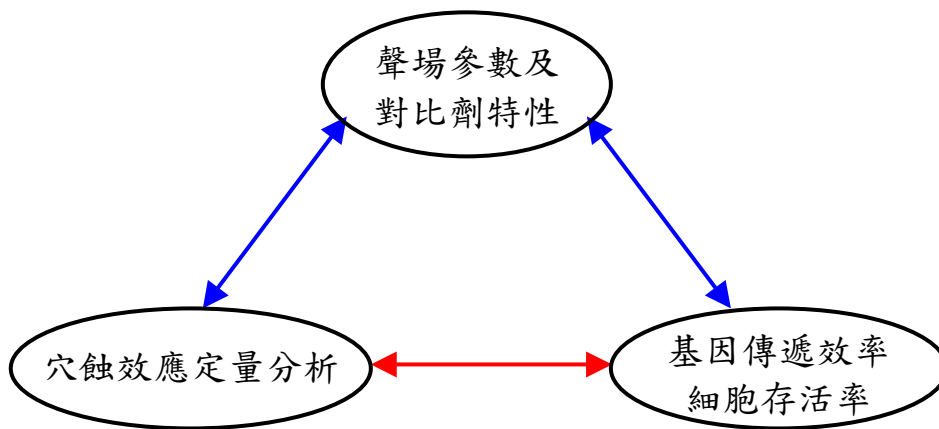


圖 1-3：物理量—穴蝕效應—基因傳遞效率/細胞存活率的三角關係圖。

若由各物理量得到的穴蝕效應—基因傳遞率/細胞存活率有一定的關係，則表示以穴蝕效應來預測基因傳遞的實驗結果應該是可行的，此方法便可用於細胞實驗前的評估參考。

於本研究中，雖然超音波的主要優勢在於活體實驗 (*in vivo*)，但體外 (*in vitro*) 基因傳遞實驗較簡化，且已有實際的應用，我們仍

先以體外實驗為主。本研究首先會先對各項參數下的穴蝕效應作有效地誘發與偵測，並量化微氣泡破裂的程度；接著設計一個適合基因傳遞的實驗架構，待得到基因傳遞率與細胞存活率後，求出基因傳遞率/細胞存活率對於量化之穴蝕效應的關係曲線，並比較不同超音波參數得到的關係曲線的趨勢。另外，在增加基因傳遞效率的同時，我們也將儘可能地降低細胞死亡率。

本研究使用的細胞為人類子宮頸癌細胞 (HeLa cells)，並以一段標訂 FITC 染劑的 DNA 作為欲傳遞的基因。若基因成功傳遞入細胞，則可從螢光顯微鏡下看到發綠螢光的細胞，並計算基因傳遞效率。細胞存活率之量測使用 Trypan Blue 染色法，藉由將死細胞染色以計算出單位面積下活細胞的比率。

## 1.6 論文架構

本論文第一章為概述基因治療的方式、超音波治療方式的演進與穴蝕效應的產生，並簡述如何運用超音波誘發穴蝕效應，並進而達成基因治療的效果。同時，對超音波進行基因傳遞的效率也做大略的介紹。第二章將描述穴蝕效應實驗架構的建立，以及誘發與偵測的方法。此章也包含穴蝕效應的定量分析法、基因傳遞架構的確立與傳遞率與細胞存活率的估算方式。第三章將介紹實驗結果與建立起圖 1-3 的關係。第四章對結果作分析，並評估與討論本研究是否達成預期的目標。第五章為結論與未來工作。

## 第二章 實驗材料與方法

### 2.1 穴蝕效應實驗—誘發與偵測

#### 2.1.1 超音波對比劑

本研究使用的對比劑為 Levovist<sup>®</sup> (Schering AG, Berlin, Germany)，其為目前台灣唯一臨床上核准可使用的超音波對比劑，殼層成分包含半乳糖 (galactose, 99.9%) 與棕櫚酸 (palmitic acid, 0.1%)，內部則是包覆空氣。棕櫚酸可穩定微氣泡，使其通過心臟與肺臟時不易溶於血液中。Levovist<sup>®</sup> 可用於靜脈注射，微氣泡的粒徑分布為 2-8 $\mu\text{m}$  (平均 3 $\mu\text{m}$ ) [80]，因此具有良好的超音波散射能力，在超音波影像上能增強心臟腔室與血管的影像亮度。圖 2-1(a) 為 Levovist<sup>®</sup> 微氣泡溶液在仿體中的超音波 B-mode 影像，紅框內的圓形區域即是裝填微氣泡溶液之處。相較於背景的斑點雜訊 (speckle background) 以及只裝填水的影像 (圖 2-1(b))，Levovist<sup>®</sup> 確實能有效增強微氣泡區域的影像亮度。

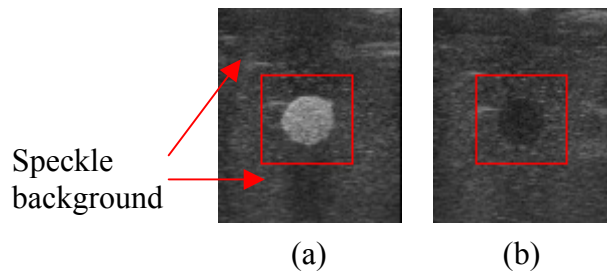


圖 2-1：仿體中有無 Levovist<sup>®</sup> 微氣泡時的 B-mode 影像。(a) 仿體洞內裝有微氣泡，可看到強烈的超音波散射信號 (白色圓形部分)；(b) 仿體洞內無微氣泡，故洞內散射強度很弱。

Levovist<sup>®</sup> 為白色粉末，其配製法如下：將粉末與生理食鹽水依所需比例混合後，利用手劇烈搖晃 15 秒，之後將混合均勻的溶液靜置 2 分鐘，讓搖晃過程中產生的非 Levovist<sup>®</sup> 微氣泡 (通常為空氣進入水中形成的暫時性空氣泡) 消失後即可使用，此時以顯微鏡觀察可看到

許多緻密的微小氣泡（圖 2-2）。Levovist<sup>®</sup>微氣泡溶液的穩定時間會隨配製濃度而異，在濃度為 200, 300, 400mg/mL時其穩定時間分別為 10, 25, 40 分鐘[81]。

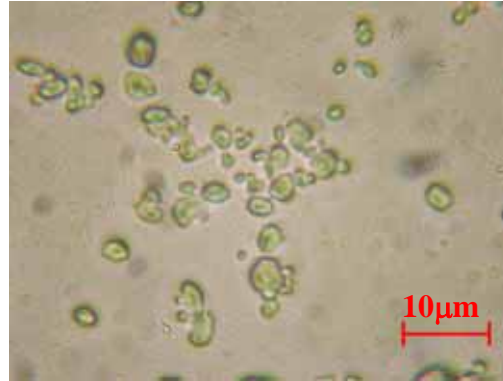


圖 2-2：顯微鏡下之Levovist<sup>®</sup>。

由於高濃度的Levovist<sup>®</sup>微氣泡不利於超音波信號的接收，因此實驗時我們儘量使用較低的濃度（此部分將在實驗結果 3.1.3 節「微氣泡濃度vs.穴蝕效應」中討論）。



## 2.1.2 實驗系統架構

穴蝕效應實驗是在一塊凝膠仿體 (agarose phantom) 中進行。仿體可模擬活體的軟組織，因此適於體外實驗的超音波成像。我們製作的仿體濃度為 2% (重量百分比)，其具有聲速與水相同、阻抗與水匹配、無散射干擾等優點，因此可看成是一塊常溫下的「固態水」，適於超音波信號的傳遞與接收。仿體製作方法如下：先取一定體積的二次水 (ddH<sub>2</sub>O)，秤取其 2% 重量的瓊脂粉末，將兩者混合攪拌均勻後加熱至瓊脂粉末完全溶解，冷卻後即製作完成。

仿體與穴蝕效應的實驗架構如圖 2-3。仿體的中央挖一個直徑 5mm、深度 2.5cm，體積約 0.5mL 的小洞，為微氣泡溶液的裝填處。仿體的右側為超音波發射源，為一 1MHz 的線聚焦探頭 (V303, Panametrics-NDT, Waltham, MA, USA)，聚焦體積 (focal volume, 參照圖 2-3) 約涵蓋仿體中間的洞。仿體的上側為超音波接收探頭，與發射探頭呈垂直角度，目的為儘量避免直接收到 1MHz 探頭的發射信號。接收探頭頻率為 10MHz (V312, Panametrics-NDT, Waltham, MA, USA)，其聚焦體積亦涵蓋仿體中間的洞。超音波的信號源來自電腦內的數位類比轉換卡 (digital-to-analog converter, CompuGen 1100, GaGe Applied Technologies, Lachine, QC, Canada)，可控制的參數為發射頻率、發射波形、發射波數目、脈衝重覆頻率 (pulse repetition frequency, PRF)、發射電壓與 duty cycle 等。完成的波形由數位類比轉換卡發出至功率放大器 (RF power amplifier, 250A250A, Amplifier Research, Souderton, Pennsylvania, USA)，電壓放大後再驅動探頭發射。信號經由 10MHz 探頭接收後，經前端放大器 (Pulser/Receiver 5072PR, Panametrics-NDT, Waltham, MA, USA) 放大，再由類比數位轉換卡 (analog-to-digital converter, CompuScope 12100, GaGe Applied Technologies, Lachine, QC, Canada) 接收，最後由 Matlab (Mathworks, Natick, MA, USA) 計算穴蝕效應的程度。

除了信號分析外，於仿體的左側我們亦用一商用超音波探頭與商

用超音波儀（10L and LOGIQ 500, GE Medical Systems, Milwaukee, Wisconsin, USA）直接從影像了解微氣泡破裂的時變過程。由於在夠強的發射聲壓下，單一微氣泡的破裂幾乎在數百奈秒（nano-second）內便可完成[82]，故即使仿體中為一整群微氣泡，我們也應能很快地以超音波影像觀察到微氣泡的破裂—當微氣泡未破時，可看到如圖 2-1(a)的強散射影像；微氣泡破裂結束後，仿體影像即如圖 2-1(b)。影像由影像擷取卡（frame grabber, UPG 401B, UPMOST Corp., Taipei, Taiwan）完成與分析。

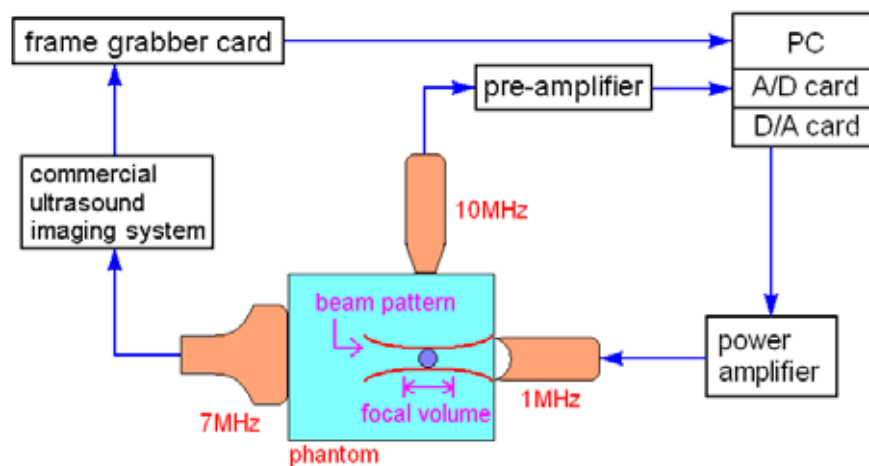


圖 2-3：穴蝕效應實驗架構圖。

完成後的架構實景如圖 2-4，仿體中央的紅色圈處即是裝填微氣泡溶液的洞。

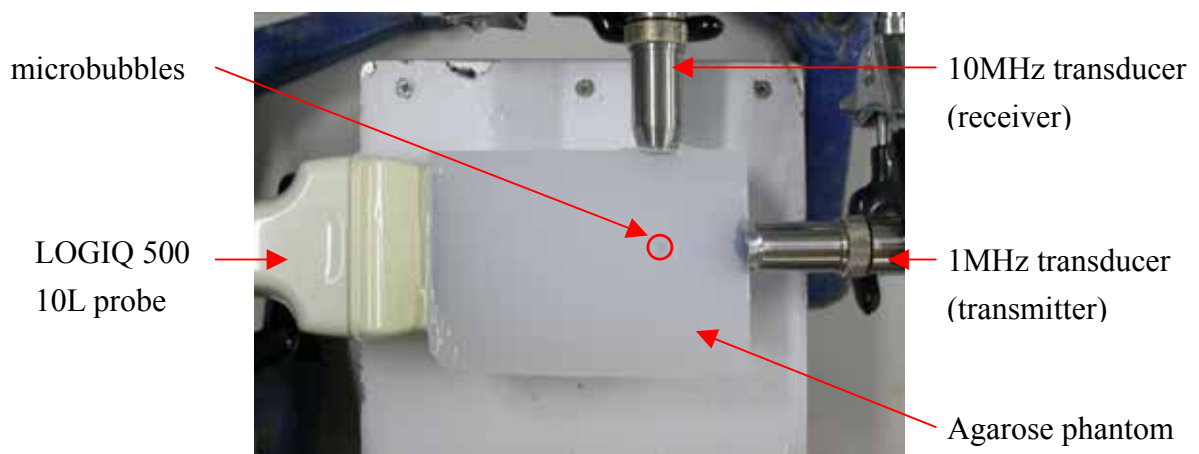


圖 2-4：穴蝕效應實驗架構實景。

### 2.1.3 穴蝕效應之誘發

穴蝕效應程度會隨超音波發射參數與微氣泡種類而改變 [58-59,79]。本研究為了簡化實驗的複雜度，只針對Levovist<sup>®</sup>微氣泡與發射聲場強度、發射週期數、微氣泡濃度 3 種變因作探討。實驗使用的波形為脈波 (pulsed wave)，針對探頭中心頻率 1MHz發射正弦波，PRF為 100Hz。

#### 2.1.3.1 發射聲場強度

發射聲場強度的控制是由數位類比轉換卡輸出電壓與功率放大器的輸出百分比來調整。已有研究顯示，穴蝕效應的效果會隨探頭發射的負峰值聲壓增強而增加[83]，因此我們主要考慮探頭的負聲壓效應。

探頭首先會以阻抗分析儀 (impedance analyzer, HP4194A, Hewlett-Packard Company, CA, USA) 進行阻抗值的量測，並以自製的補償電路補償探頭的電容效應，使其達到最佳發射效率。接著以輻射力微量天平 (radiation force balance, National Physical Laboratory, UK) 與水聽筒 (hydrophone, MHA150, FORCE Technology, Denmark) 作聲場強度的校正。經校正後，本研究使用的 1MHz 線聚焦探頭最大負聲壓值可達 1.32MPa。穴蝕效應實驗時，我們採用的聲壓分別為 0.09, 0.25, 0.48, 0.79, 1.09 與 1.32MPa，在不同聲壓下發射 5 個週期的脈波，調整微氣泡濃度為 40mg/mL，量測微氣泡破裂的效應。

#### 2.1.3.2 微氣泡濃度

本研究中微氣泡的濃度分別為 1, 5, 10, 20, 40, 100, 200, 300, 400mg/mL。200~400mg/mL的濃度為Levovist<sup>®</sup>於活體顯影時的注射濃度，穩定時間較長 (大於 10 分鐘)；而濃度小於 100mg/mL的溶液穩定度小於 10 分鐘。為了使每一組除了濃度以外的變因一致，我們預

先使用許多 2mL 的離心管分別裝好所需的粉末量，每筆數據的擷取都控制在搖晃完後 5 分鐘內完成。此實驗條件下的聲壓為 1.32MPa，發射週期數為 5 週。

### 2.1.3.3 發射週期數

發射週期數的定義為每次發射的脈波中所含的正弦波數目。發射週期數愈多，能量也愈強。已有研究顯示固定聲壓與 PRF 時，穴蝕效應的程度會隨發射週期數增加而增強[59-60]。本研究使用 1, 2, 5, 10 週作為發射參數，此實驗條件下的聲壓為 1.32MPa，微氣泡濃度為 40mg/mL。

## 2.1.4 穴蝕效應之偵測

偵測穴蝕效應可使用B-mode影像亮度與破裂信號分析兩種方式，前者較直觀，但較難以定量（易隨影像擷取像素的解析度而有差異）；後者雖無法觀看影像，但量化後的數值較具客觀性。因此我們將先以B-mode影像驗證我們使用的聲壓確實可打破Levovist<sup>®</sup>微氣泡，再以定量之方式分析穴蝕效應。

### 2.1.4.1 B-mode 影像觀察法

以 B-mode 影像觀察仿體中的微氣泡溶液時，需考慮商用超音波儀的探頭是否也會造成穴蝕效應而干擾實驗結果，因此實驗時須將商用探頭的發射功率調到最低。為了得到較適當的影像對比度，我們將動態範圍調到 60dB。

### 2.1.4.2 穴蝕效應之定量表示—Inertial Cavitation Dose

對於穴蝕效應的定量，之前已經有許多研究[74,76-78]。我們將穴蝕效應的劑量稱為 inertial cavitation dose (ICD)，它可運用時域或頻率域下的信號與使用者的定義來計算，因此會隨著系統設計的不同而改變，沒有絕對的基準。故對於不同的系統架構，我們無法比較「發生穴蝕效應的多寡」，但在同樣架構下的穴蝕效應的相對量是可比較的。當 ICD 值升高時，表示微氣泡破裂數/趨勢變多。而考慮 ICD 值時，通常會取沒有對比劑下的信號作基準值（即取樣體積內只裝水），並將有微氣泡時的 ICD 值減去基準值作為「完全由微氣泡提供的破裂效應」，稱 differential ICD[74]。

ICD 的原理如圖 2-5，由於微氣泡破裂的激突信號（spike）在時域上非常短暫 [82]（圖 2-5(a)），通常為數百奈秒等級，因此作頻譜分析後是一段寬頻的信號增強（broadband noise,圖 2-5(b)），其頻寬甚至可到達 30-40MHz[84]。故為了避開低頻的諧波信號（harmonic

signals) 造成的干擾，我們以較高頻的探頭擷取微氣泡破裂時釋放的寬頻信號，將探頭中心頻率處的強度上升量定義為微氣泡破裂的「劑量」。使用 10MHz 探頭作接收的優點即在於此。當微氣泡僅振動而未破裂時，由水的非線性特性產生的諧波信號 (harmonic signals) 在 10MHz 附近的強度已非常微弱，因此若 10MHz 探頭收到較強的信號，則幾乎可視為完全由微氣泡破裂而增強的寬頻效應。我們取 10MHz 探頭前後 0.5MHz 範圍的方均根值 (root mean square, RMS) 作為該筆接收信號的寬頻上升量，並將每一次 1MHz 探頭髮射後收到的信號的 RMS 值依時間畫出，則可得到如圖 2-5(c) 的藍色曲線。圖 2-5(c) 中，峰值產生處即表示該時間點接收信號的 RMS 值較大，換言之，此時的信號包含微氣泡破裂效應。將圖 2-5(c) 曲線下的面積積分，得到的值便是某段時間內微氣泡破裂的整體效應，即上述的 ICD。由於我們仿體的洞中裝有許多微氣泡，因此完全破裂完畢的時間可能較長，以此方法可調整信號的擷取時間 (圖 2-5(c) 的橫軸)，待 RMS amplitude 不再有峰值上升後，才對整段曲線作積分以評估微氣泡破裂的整體效應，完整性較佳。若對於水在同樣時間內亦積分得一個 ICD 值 (圖 2-5(c) 紅線部分)，則將微氣泡的 ICD 減去水的 ICD，可得到 differential ICD，此為真正用以量化穴蝕效應的指標。

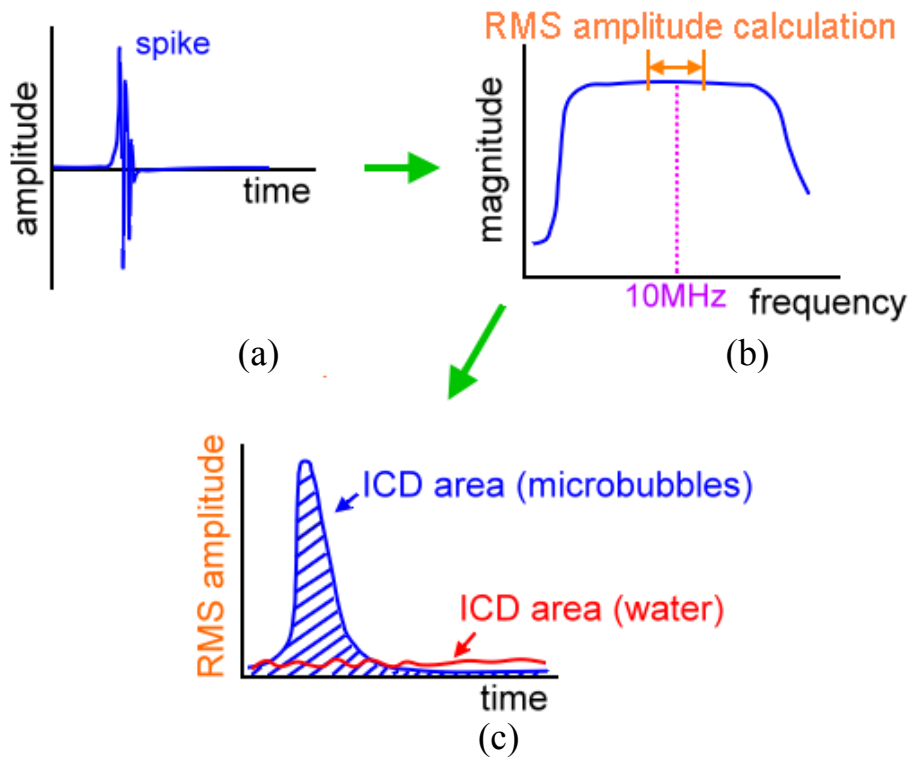


圖 2-5：ICD 原理。

## 2.2 基因傳遞實驗

### 2.2.1 細胞株

本實驗使用的細胞株HeLa是人類的子宮頸癌細胞（Cervical cancer cells, 圖 2-6），購自美國組織細胞庫（ATCC, American Type Culture Collection, VA. USA）。細胞先於直徑 10 公分的平底盤上培養成單層的貼覆細胞，培養液成分為DMEM( Dulbecco's Modified Eagle's Medium GIBCO, Grand Island, NY, USA)、10%的胎牛血清（fetal bovine serum, GIBCO）與 1%的抗生素（penicillin），培養環境為含 5% CO<sub>2</sub>的 37°C 培養箱。實驗前先將細胞以 1x胰蛋白酶（trypsin）洗下，離心收集後使用血球計數器（haematocytometer）計數，最後分裝成各為 0.5mL的細胞懸浮液，每管內含 10<sup>5</sup>個HeLa細胞。另外，DNA（20μg）與鈣離子（濃度 2.5 mole/L, 5 μL）預先混合均勻後亦加入各管細胞溶液中。由於鈣離子可穩定DNA結構，且本身帶正電，因此有助於拉近DNA與細胞膜的距離，使基因傳遞較易成功。但過多的鈣離子會造成細胞膜的不穩定，使細胞容易破裂，故本實驗經細胞測試後選定每管 5 μL的劑量。

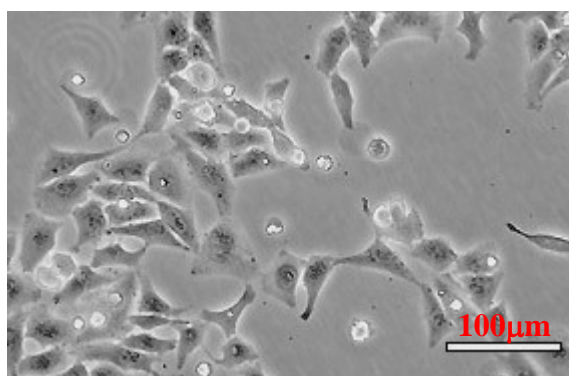


圖 2-6：HeLa cells（取自 ATCC）。



## 2.2.2 DNA

為了直接有效地觀察螢光，我們使用一段標訂FITC (fluorescein 5'-isothiocyanate) 的任意短序列DNA (MDBio Inc., Taipei, Taiwan) 作為我們的基因傳遞分子，DNA長度為10個鹼基 (5'<TACATCATGG>3')。FITC於450-490nm的激發光源下可放出波長為515nm的綠光，因此若FITC-DNA有進入細胞，基因傳遞實驗完成後於螢光顯微鏡下即可看到細胞發出綠色螢光。使用FITC染劑的優點為可立即得知欲傳遞分子有無進入細胞膜內，前人的研究中也有類似的用法[56]。實驗時的FITC-DNA濃度為40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，即將20 $\mu\text{g}$ 的DNA加入至0.5mL含有 $10^5$ 個HeLa細胞的培養液中，再進行超音波的照射。

## 2.2.3 系統架構與實驗流程

基因傳遞實驗的架構與穴蝕效應實驗相同，實驗前仿體與各項將接觸細胞的器具會先以紫外光滅菌半小時，以避免細胞受感染。實驗時先將HeLa細胞、FITC-DNA與鈣離子的混合溶液加入Levovist<sup>®</sup>粉末後用力搖晃 15 秒，靜置 2 分鐘後將溶液注入仿體洞內以進行超音波的照射。每筆樣品實驗完後抽至直徑 6 公分平底盤中，加入DMEM至總體積為 2mL並使細胞均勻散布，培養 24 小時讓細胞充分地貼於平底盤上。觀察結果前吸出DMEM培養液，並以 1x PBS (Phosphate Buffered Saline) 緩緩沖洗三次，洗去未進入細胞的FITC-DNA與死亡或被分解的細胞碎片後，以螢光顯微鏡 (TCS SP2, Leica Camera AG, Solms, Germany) 觀察。為了驗證FITC-DNA是否確實有進入細胞，我們另以共軛焦顯微鏡 (TCS SP2, Leica Camera AG, Solms, Germany) 作細胞的切片觀察。

### 2.2.3.1 基因傳遞率量測法

基因傳遞率於 200 倍 (物鏡 20x, 目鏡 10x) 放大倍率的螢光顯微鏡下進行觀測，方法為在每一盤細胞中任意圈出 5 塊 ROI (region of interest)，計算每一 ROI 中細胞總數與發出綠色螢光的細胞數，得出細胞發光比率後將 5 塊 ROI 的數值進行平均，作為此條件下單位面積的細胞發光率，即基因傳遞率。由於每一變因的每一組均做三次重複，故每一組均可算出平均值與標準差。

### 2.2.3.2 細胞存活率量測法

細胞存活率的估計是使用 Trypan Blue Staining，其原理為依據細胞膜的完整度對細胞選擇性染色。當細胞死亡時，細胞膜會被破壞使得通透性增加，trypan blue 染劑便進入細胞使細胞呈現藍色。活細胞因細胞膜完整，故染料無法進入細胞內部。依此方法，計數顯微鏡下未呈現藍色細胞的數目，相較於未加入 DNA 也未照射超音波的對照組即可估計細胞的相對存活率。計數法亦為在每一盤細胞中任意圈出

5 塊 ROI，計算每一 ROI 中活細胞總數，加總後平均得到每一 ROI 中的細胞數，作為此條件下單位面積的活細胞數目。將實驗組的單位面積活細胞數與對照組的活細胞數相除，即可得此條下的細胞存活率。每一變因的每一組均做三次重複，故每一組均可算出平均值與標準差。

由於 HeLa 細胞的二倍增生期 (doubling time) 為 48 小時[56]，且根據實驗經驗，懸浮的 HeLa 細胞完整附著於平底盤的時間需 5 小時以上，細胞平貼於平底盤前細胞分裂的過程非常不明顯。因此選擇在基因傳遞實驗 24 小時後進行觀察並不會有細胞大量複製導致的基因傳遞率不準或是細胞存活率增加的問題。

## 2.2.4 實驗參數

基因傳遞實驗中，改變的變因亦為超音波的發射聲壓、微氣泡濃度與發射週數，如表 2-1~2-3。表 2-1~2-3 中對每種超音波變因各做 6 組實驗，其中第 1 與第 2 組為對照組，第 1 組用於對照只有純細胞的情形下產生螢光的比率（作為背景干擾值）與作為細胞存活率的基準；第 2 組可對照出有細胞與 DNA 存在，完全不照射超音波的情形下自發性基因傳遞的機率；3-6 組為真正改變的參數。以發射聲壓為變因時，採用的聲壓為 0.48, 0.79, 1.09 與 1.32MPa，微氣泡濃度 40mg/mL，發射週數 5 週；以微氣泡濃度為變因時，使用的濃度為 10, 20, 40, 100mg/mL，發射聲壓 1.32MPa，發射週數 5 週；以發射週數為變因時，採用的週數為 1, 2, 5 與 10 週，發射聲壓 1.32MPa，微氣泡濃度 40mg/mL。關於參數範圍的選擇，於本論文第四章「分析與討論」中將有較詳盡的說明。三種變因下的超音波照射時間均為 60 秒，PRF 均為 100Hz，每一組各做三次重複，用於計算基因傳遞率與細胞存活率的平均值與標準差。

組別	1	2	3	4	5	6
HeLa (1×10 <sup>5</sup> /0.5mL)	V	V	V	V	V	V
DNA (20μg/0.5mL)		V	V	V	V	V
Ca <sup>2+</sup> (5μL/0.5mL)	V	V	V	V	V	V
Ultrasound (sec)			60			
Microbubble (mg/mL)			40			
Acoustic pressure(MPa)			0.48	0.79	1.09	1.32
Sine wave cycles			5			

表 2-1：以超音波發射聲壓為變因。

組別	1	2	3	4	5	6
HeLa ( $1 \times 10^5 / 0.5\text{mL}$ )	V	V	V	V	V	V
DNA ( $20\mu\text{g} / 0.5\text{mL}$ )		V	V	V	V	V
Ca <sup>2+</sup> ( $5\mu\text{L} / 0.5\text{mL}$ )	V	V	V	V	V	V
Ultrasound ( sec )			60			
Microbubble ( mg/mL )			10	20	40	100
Acoustic pressure(MPa)			1.32			
Sine wave cycles			5			

表 2-2：以微氣泡濃度為變因。

組別	1	2	3	4	5	6
HeLa ( $1 \times 10^5 / 0.5\text{mL}$ )	V	V	V	V	V	V
DNA ( $20\mu\text{g} / 0.5\text{mL}$ )		V	V	V	V	V
Ca <sup>2+</sup> ( $5\mu\text{L} / 0.5\text{mL}$ )	V	V	V	V	V	V
Ultrasound ( sec )			60			
Microbubble ( mg/mL )			40			
Acoustic pressure(MPa)			1.32			
Sine wave cycles			1	2	5	10

表 2-3：以超音波發射週期數為變因。

## 2.2.5 基因傳遞率/細胞存活率與穴蝕效應關聯之建立

得到不同超音波參數下的量化穴蝕效應 (differential ICD)、基因傳遞率與細胞存活率結果後，以 SigmaPlot (Systat Software, Inc., CA, USA) 軟體繪出以基因傳遞率或細胞存活率為縱軸、differential ICD 為橫軸的趨勢圖，並比較不同超音波聲參數產生的結果是否具有關聯性。

## 第三章 實驗結果

### 3.1 穴蝕效應實驗結果

#### 3.1.1 B-mode 影像觀察法

為了驗證本研究之方法可否有效打破微氣泡，本實驗針對剛注入微氣泡、開啟超音波至完全打破微氣泡各個時間點分別擷取 B-mode 影像以觀察，實驗結果如圖 3-1。

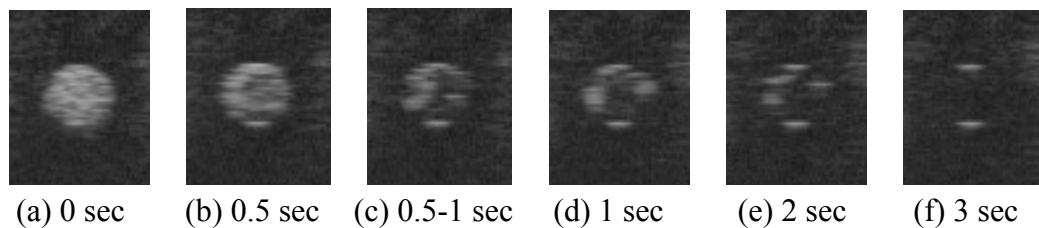
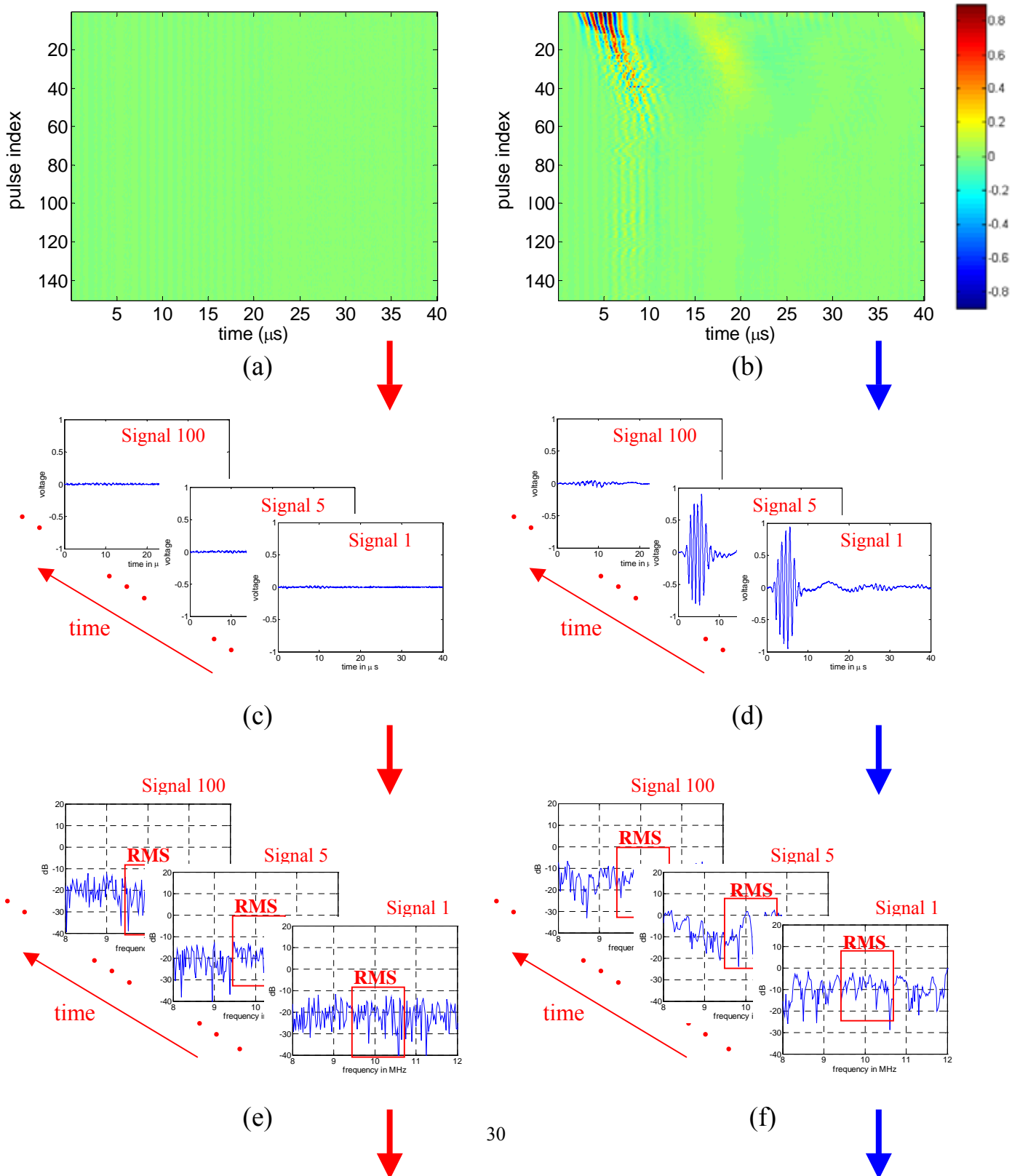


圖 3-1：以 B-mode 影像觀察微氣泡破裂情形。  
(聲壓：1.32MPa, 微氣泡濃度：40mg/mL)

圖 3-1(a)為剛注入微氣泡、尚未開啟超音波的情形，可看出微氣泡均勻地分布於仿體的洞中。圖 3-1(b)為剛開啟超音波，微氣泡受到擾動且開始變少；圖 3-1(c)、(d)、(e)、(f)分別是第 0.5-1、1、2、3 秒時的情形，隨時照射時間增加，影像亮度也愈來愈弱，最後微氣泡幾乎完全消失（圖 3-1(f)）。由於 1MHz 發射探頭的 -3dB 聚焦截面積幾乎涵蓋仿體的洞截面積（圖 2-3），因此微氣泡所在區域都會受到強聲場的影響，不太可能被擠到聲場範圍太弱的地區而未破裂。由影像觀察的結果可知，我們使用的聲場強度確實可以有效打破 Levovist<sup>®</sup> 微氣泡，因此接下來即以 ICD 法量化穴蝕效應。

### 3.1.2 發射聲壓 vs. 穴蝕效應

對於穴蝕效應的信號擷取，每筆信號的擷取長度為  $40\mu\text{s}$ ，並由第一筆收到微氣泡的信號起算，取 150 筆接收信號 (pulse index) 作 ICD 分析。由於 PRF 為  $100\text{Hz}$ ，因此 150 筆接收信號的總時間為 1.5 秒。ICD 的分析流程如圖 3-2。





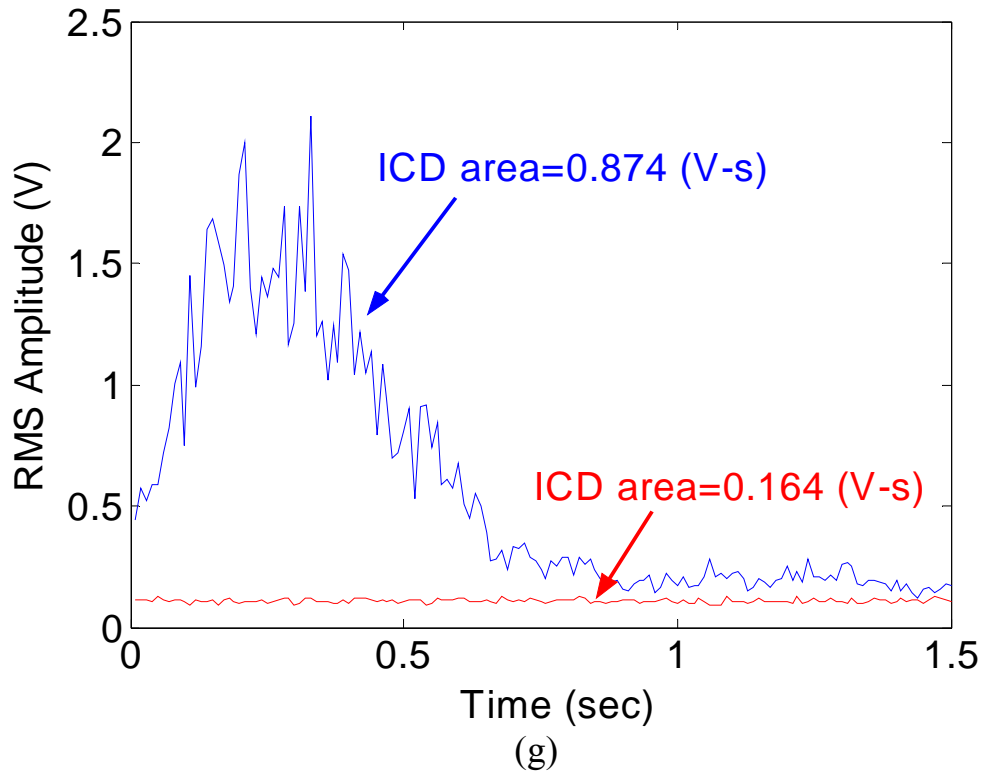


圖 3-2：ICD 分析流程圖。(a)仿體洞中只裝水時的 M-mode 接收信號；(b)仿體洞中有微氣泡時的 M-mode 接收信號；(c)由(a)圖取出的時域信號；(d)由(b)圖取出的時域信號；(e)將(c)圖中的每筆時域信號作頻譜分析，並取 9.5-10.5MHz 間的值作 RMS 運算；(f)將(d)圖中的每筆時域信號作頻譜分析與 RMS 運算；(g)將所有的 RMS 值沿時間軸畫出，並計算 RMS amplitude 曲線下面積，可得到 1.5 秒內微氣泡破裂的整體效應，即 ICD 值。(聲壓：1.32MPa, 微氣泡濃度：40mg/mL, 發射週數：5 週)

圖 3-2(a)與(b)分別為某一次實驗取得的數據，其中(a)為仿體洞中只裝水時得到的信號；(b)為仿體洞中裝入濃度為 40mg/mL Levovist<sup>®</sup> 時的接收信號，發射聲壓為 1.32MPa。(a)與(b)圖中的縱軸刻度為接收次數，共 150 次，橫軸為每筆資料的接收長度，為 40 $\mu$ s，此種圖形稱為 M-mode 圖，可觀察超音波探頭固定不動時 ROI 內部隨時間的變化，於本架構中即微氣泡隨時間受到擾動與破裂的情形。從(b)圖可看出前 15 筆信號 (0-0.15 秒) 有強烈的反射現象，表示微氣泡可能尚未破裂，而信號的橫向位移表示微氣泡有受到推動。第 16 至約第 60 筆信號 (0.16-0.6 秒) 則可觀察到信號開始變亂與逐漸消失，此即微氣泡破裂的證據；之後 M-mode 圖不再看到明顯的反射信號 (0.61-1.5

秒)，代表微氣泡已大量消失，因此接收探頭收到的強度與水類似。相較於(b)圖，(a)圖信號的強度非常小，此因仿體洞中幾乎無可散射超音波的大分子所致，可作為(b)圖的對照組。將接收信號依時間順序畫出即如圖 3-2(c)與(d)，每筆時域信號經頻分析後可得到 3-2(e)與(f)，並取 9.5-10.5MHz間的資料點作RMS平均：

$$RMS = \sqrt{\frac{\sum_{9.5MHz}^{10.5MHz} x_i^2}{n}}$$

其中， $x_i$ 為頻譜分析後每個頻率點的數值， $n$ 為 9.5-10.5MHz間的總點數。最後，將(e)與(f)各 150 個RMS值沿時間軸畫出，如圖 3-2(g)，稱為時間-強度曲線 (time-amplitude curve)。相較於水的曲線，微氣泡的時間-強度曲線上每一個遠大於水的值都代表微氣泡破裂造成的效應，故從圖 3-2(g)可知Levovist<sup>®</sup>微氣泡破裂的主要時間都集中在約前 0.7 秒，此結果與由(b)圖M-mode推論的結果大致相符。為了考慮微氣泡破裂的整體效應，將(g)圖的曲線對時間作積分，即可得到 1.5 秒內微氣泡的穴蝕效應量化值(Inertial Cavitation Dose, ICD值)與水的ICD值，兩者相減後為真正由微氣泡貢獻的穴蝕效應能量，稱differential ICD，於本結果為 0.71V-s。

因此，以超音波發射聲場強度為橫軸，differential ICD 為縱軸可得圖 3-3 的結果，可觀察到隨著發射聲壓增加，微氣泡破裂的程度也增加。

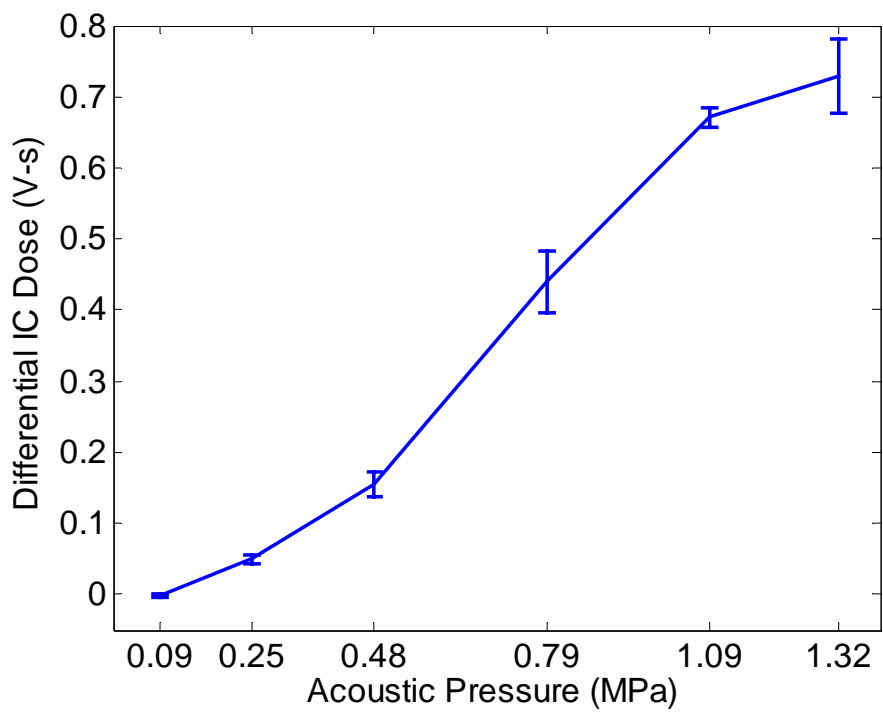


圖 3-3：以發射聲壓為變因之穴蝕效應結果。  
(微氣泡濃度：40mg/mL，發射週數：5 週)

### 3.1.3 微氣泡濃度 vs. 穴蝕效應

若以微氣泡濃度為橫軸，differential ICD 為縱軸可得到圖 3-4 的結果。隨著微氣泡濃度上升，微氣泡破裂的程度也增加，但此處有個特別的情形是微氣泡的濃度並不能永無止境地增加。從圖 3-4 的結果可發現，當微氣泡濃度高於 100mg/mL 時，differential ICD 值不增反減。我們認為這應非表示「微氣泡破裂的趨勢降低」（因為發射聲壓與週期都未變），較合理的解釋應是因微氣泡濃度太濃產生遮蔽效應 [85]，使得微氣泡破裂信號可能被其他未破的氣泡阻擋，而無法有效傳遞至接收探頭。

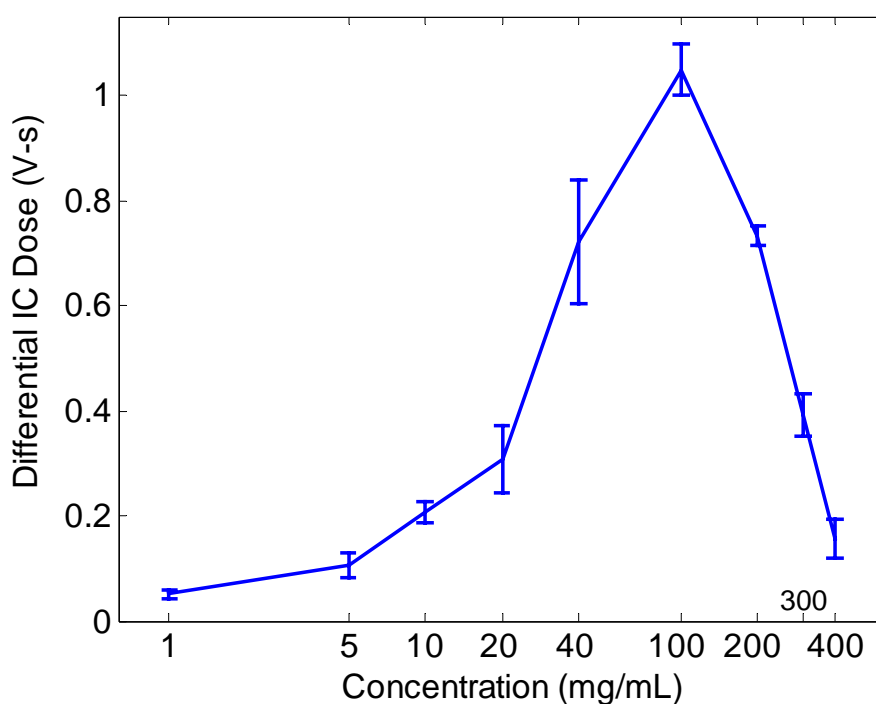
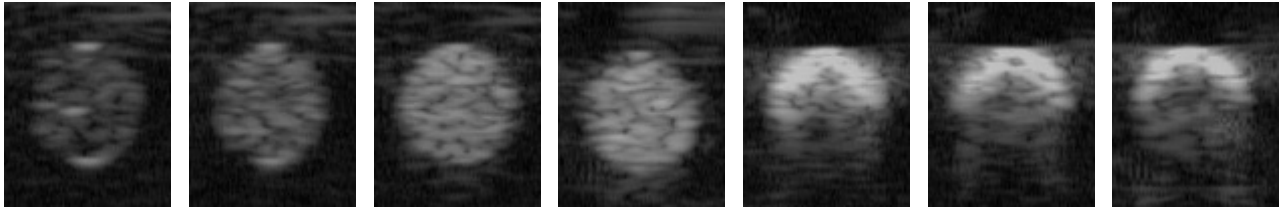


圖 3-4：以微氣泡濃度為變因之穴蝕效應結果。  
(發射聲壓：1.32MPa，發射週數：5 週，橫軸取指數座標)

為了驗證上述解釋（濃度太高產生遮蔽效應）是否正確，我們使用 LOGIQ 500 商用超音波儀分別再對濃度為 10, 20, 40, 100, 200, 300, 400mg/mL 的 Levovist<sup>®</sup> 微氣泡溶液作 B-mode 成像，結果如圖 3-5。



(a)10mg/mL (b)20mg/mL (c)40mg/mL (d)100mg/mL (e)200mg/mL (f)300mg/mL (g)400mg/mL

圖 3-5：以B-mode影像觀察Levovist<sup>®</sup>微氣泡的遮蔽效應。

由圖 3-5 的結果可明確看出當 Levovist<sup>®</sup> 微氣泡濃度超過 100mg/mL 時 ((e)-(g))，嚴重的遮蔽效應使得仿體洞下半部的影像開始不明顯，只有上半圓上緣的微氣泡能有效地被探頭偵測到。若將微氣泡所在區域區分為上半區 (圖 3-6, top half region)、下半區 (bottom half region)、頂部小區 (top small region) 與底部小區 (bottom small region)，計算該些區域的平均亮度並以微氣泡濃度為橫軸作圖，可得圖 3-7 的結果。

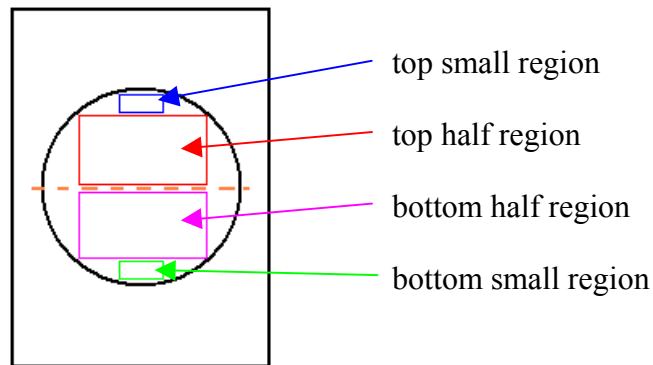


圖 3-6：計算平均亮度分區示意圖。

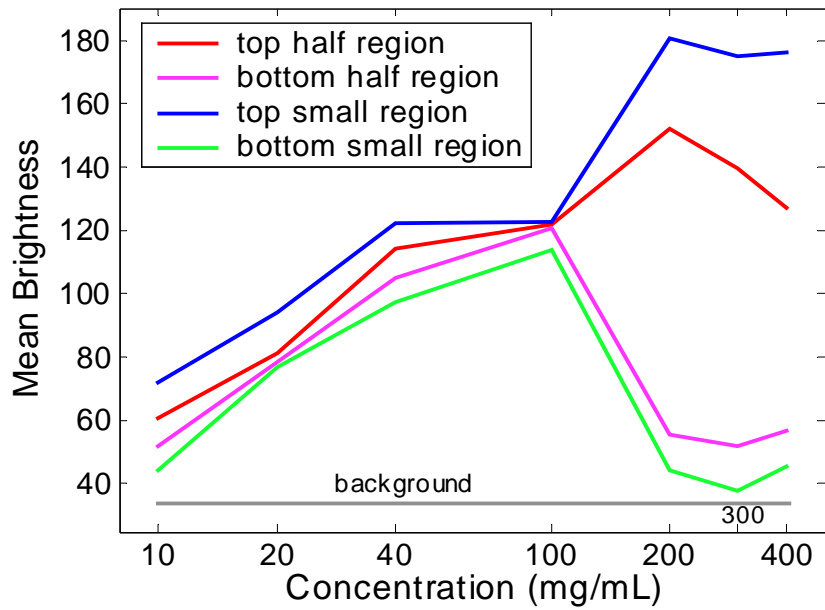


圖 3-7: 分區平均亮度 vs. 微氣泡濃度圖 (橫軸取指數座標)。

比較圖 3-7 中上半區與下半區的結果，當微氣泡濃度小於 100mg/mL 時，上下半區的平均亮度均隨濃度升高而增加；微氣泡濃度超過 100mg/mL 時，下半區的平均亮度幾乎相同，上半區平均亮度則隨濃度升高而降低。若再比較圖 3-7 頂部小區與底部小區的平均亮度，結果顯示濃度小於 100mg/mL 時上下小區的亮度亦與濃度成正比，而濃度超過 100mg/mL 時，上半小區平均亮度值即接近飽和狀態，下半小區的平均亮度也變化不大，接近背景雜訊的平均亮度。

由「濃度超過 100mg/mL 時，上半區的平均亮度隨濃度升高而降低、上半小區的平均亮度卻接近飽和」的結果可得知，當微氣泡濃度太高時，聲波幾乎完全被接近探頭端的微氣泡散射，強散射區的下方反而因聲波無法有效抵達而變暗，且濃度愈高此效應愈明顯，因此才會造成濃度 400mg/mL 時上半區的平均亮度反而比 300mg/mL 小的結果。而上半小區的擷取範圍就在仿體洞前端，即強散射區，因此濃度到達一定量後，上半小區的平均亮度即不會再增加。由圖 3-5 的 B-mode 影像中濃度 200、300 與 400mg/mL 時上半圓上緣的微氣泡亮度均差不多，也可以印證此推論。當濃度小於 100mg/mL 時，不論何

區的亮度都會隨濃度升高而增加，顯示在沒有高濃度微氣泡的遮蔽效應下，聲波能完全穿過仿體裝填微氣泡的洞，形成圖 3-5(a)-(d)的均勻影像。

由以上分析結果驗證了微氣泡濃度太高時不利於超音波傳遞的推論。這也是為什麼於 2.1.1 節中提到「實驗時儘量使用較低的濃度」的原因，因為在無遮蔽效應的情形下穴蝕效應才能均勻地發生於仿體洞內，接收探頭也才可收到完整的微氣泡破裂信號。

### 3.1.4 發射週數 vs. 穴蝕效應

若再以超音波發射週數為橫軸，differential ICD 為縱軸可得到圖 3-8 的結果。結果顯示微氣泡破裂的程度亦會隨著發射週數增加而升高。此圖中 differential ICD 隨著發射週期之增加而增加，此可能因發射週數太少使探頭的波形無法有充裕的時間抵達穩態 (steady-state)。5 週的波形是抵達穩態的最少所需週數 (圖 3-9)。

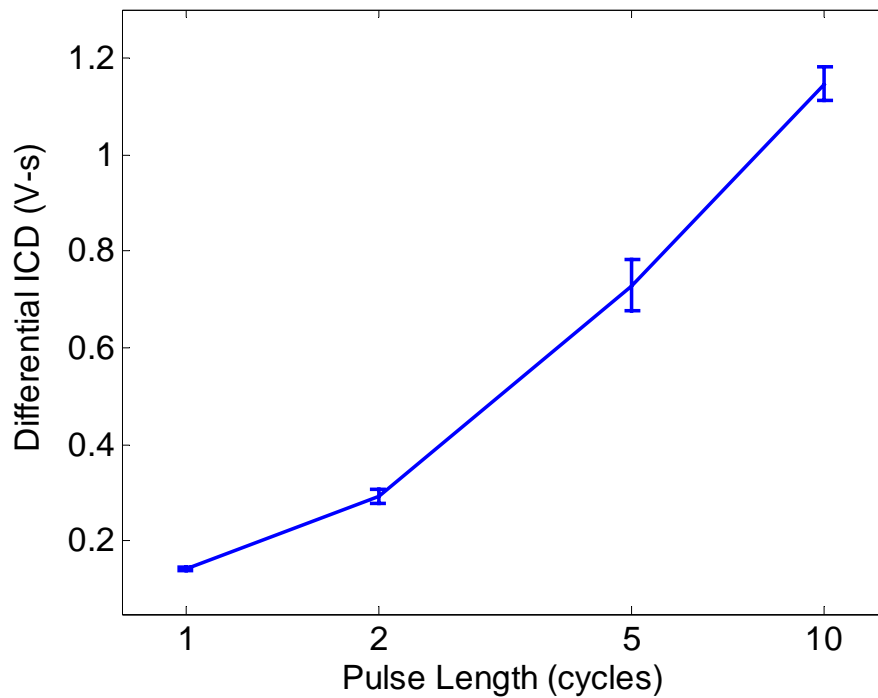


圖 3-8：以發射週數為變因之穴蝕效應結果。  
(微氣泡濃度：40mg/mL，發射聲壓：1.32MPa，橫軸取指數座標)

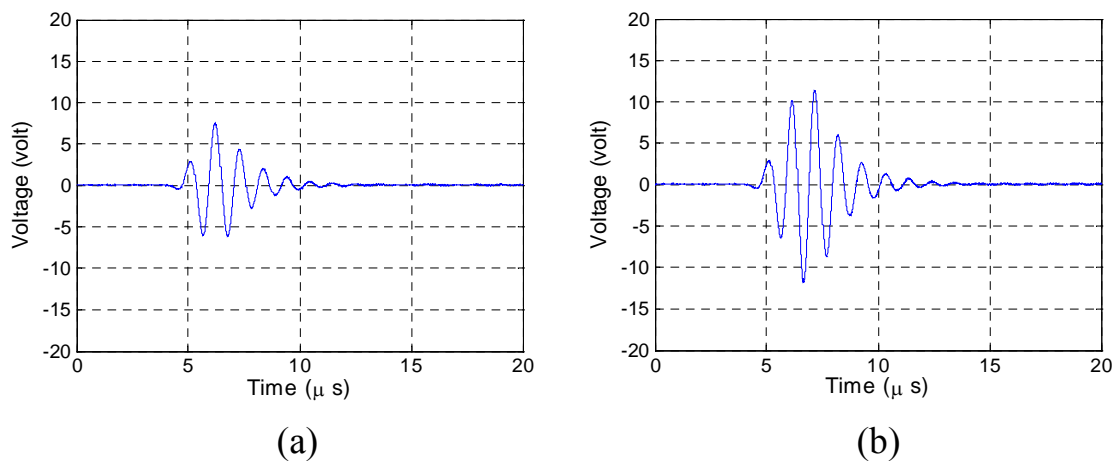
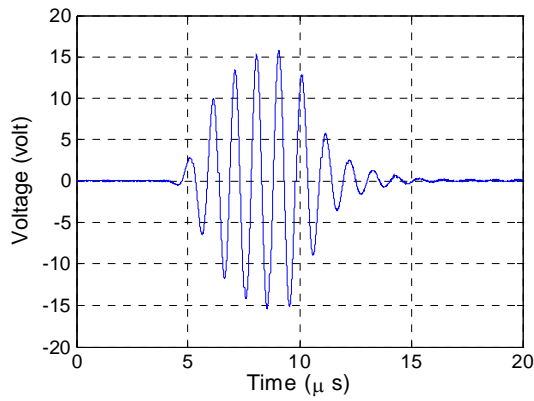
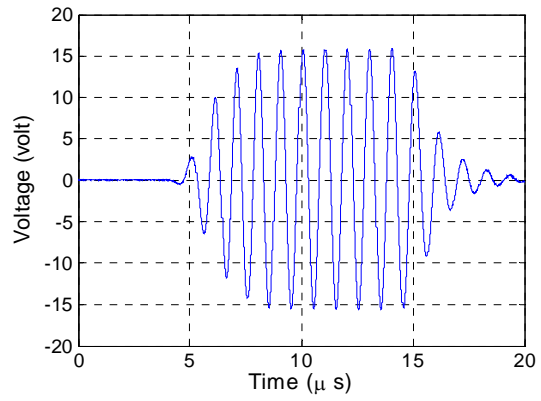


圖 3-9





(c)



(d)

圖 3-9：以發射週數為變因 4 種週數的波形示意圖。(a)1 週；(b)2 週；(c)5 週；(d)10 週。發射週數大於 5 週時，發射電壓開始接近穩態。

至此，我們已經建立一套可有效誘發與偵測穴蝕效應的系統，並將穴蝕效應以 ICD 的觀念定量化。同時，我們的方法也可有效對一整群的微氣泡進行穴蝕效應的定量分析。

## 3.2 基因傳遞實驗結果

### 3.2.1 螢光顯微鏡與共軛焦顯微鏡觀察結果

圖 3-10 為螢光顯微鏡下的 HeLa 細胞，於基因傳遞實驗 24 小時後拍攝，綠色的螢光即是 FITC-DNA 的所在位置。由於我們的實驗架構為先將細胞以胰蛋白酶洗下，再對懸浮於培養液中的細胞進行基因傳遞，因此較難發生大量 FITC-DNA 同時進入某些細胞，使該區域的細胞完全充滿綠色螢光的情形（該情形較可能發生於對平貼於平底盤上的細胞進行傳遞的實驗，若細胞為懸浮態，在照射超音波時可能因輻射力（radiation force）而飄動，故 DNA 進入細胞的難度較高）。因此，實驗結果看到傳遞成功的細胞大部分如圖 3-10(a)，即 FITC-DNA 在細胞內呈亮點分布；欲找到如圖 3-10(b)整顆細胞都發光的機會不多。

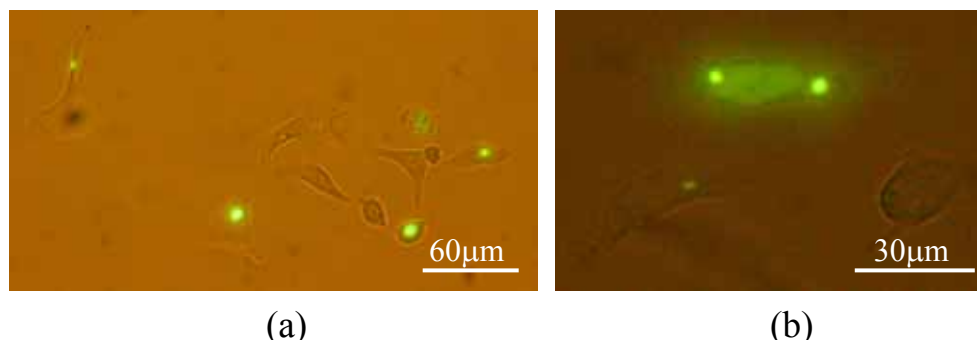


圖 3-10：螢光顯微鏡觀察結果。

（微氣泡濃度：40mg/mL，發射聲壓：1.32MPa，發射週數：5 週）

由於大部分的 FITC-DNA 在細胞內呈點狀分布，為了再次確認該 DNA 有進入細胞（而不是只是黏附在細胞膜上），我們使用共軛焦顯微鏡對細胞進行更細微的觀察，結果如圖 3-11、3-12 與 3-13。

圖 3-11 為細胞橫切面的結果，可分成 3 部分：(a)圖為螢光下的圖像，紅色箭頭部分為有進細胞的螢光 DNA；(b)圖為可見光下圖像；(c)圖為螢光與可見光的疊加圖。由本結果即可證明 DNA 可經我們的基因傳遞實驗模式進入細胞。另外，(a)圖細胞外圍較亮的部分為自體

螢光，是細胞膜所在，可區分細胞的內外。

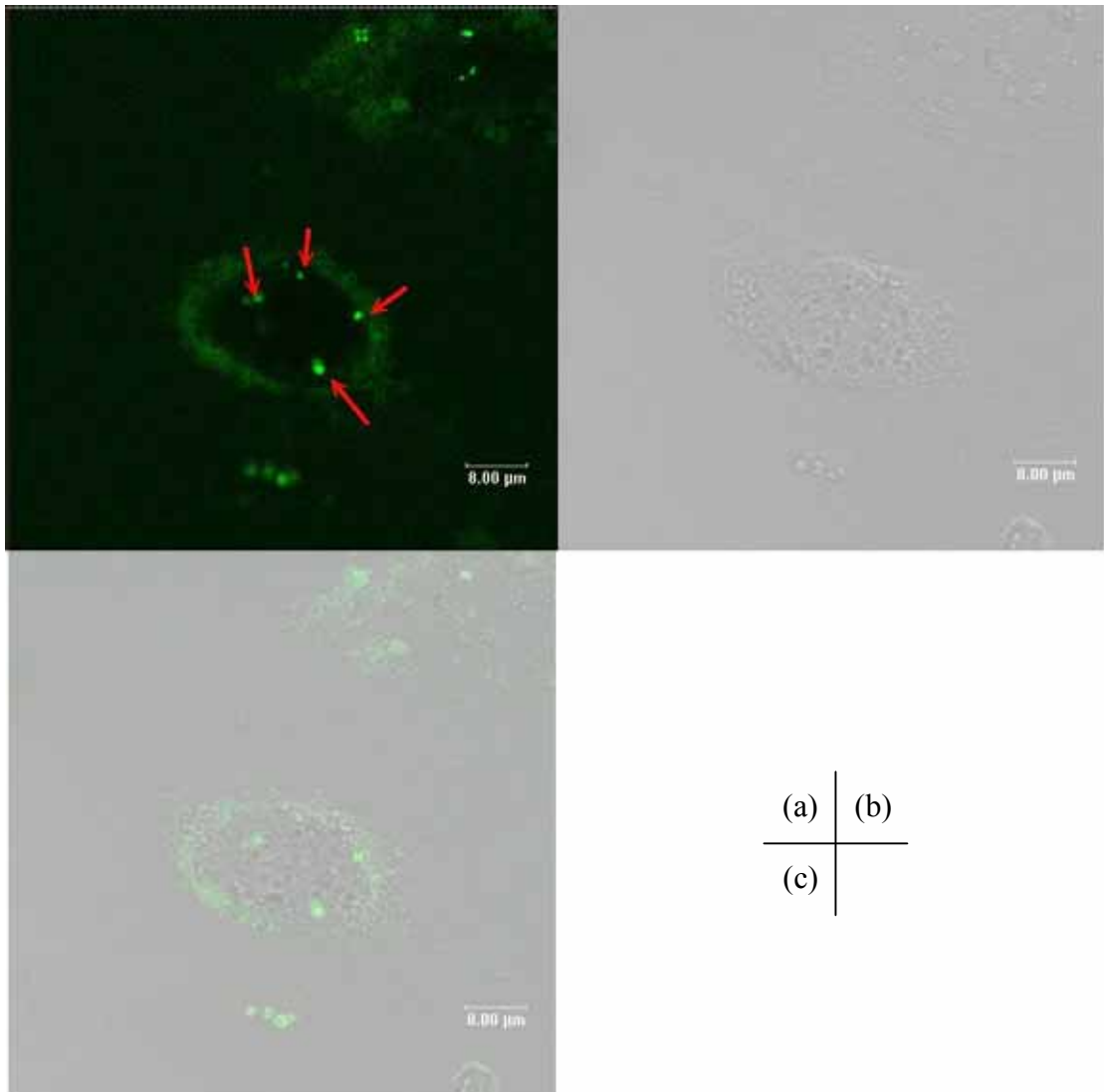


圖 3-11：共軛焦顯微鏡觀察結果。

(微氣泡濃度：40mg/mL，發射聲壓：1.32MPa，發射週數：5 週)

圖 3-12 為共軛焦顯微鏡的切片結果。先定出細胞的上緣與下緣，作 30 等分的切片，並對一顆有興趣的 DNA (紅色箭頭部分) 觀察細胞縱切後其所在位置 (b) 圖) 與橫切後的所在位置 ((c) 圖)。從縱切與橫切的結果顯示 DNA 的位置為上緣與下緣的細胞膜間。(a) 圖的影像長寬各為 71.81 $\mu$ m，細胞高度為 12.98 $\mu$ m，切片間隔為 0.43 $\mu$ m。圖 3-13 類似圖 3-12，但選定另一顆 DNA 作觀察，切片厚度與圖 3-12 相同。

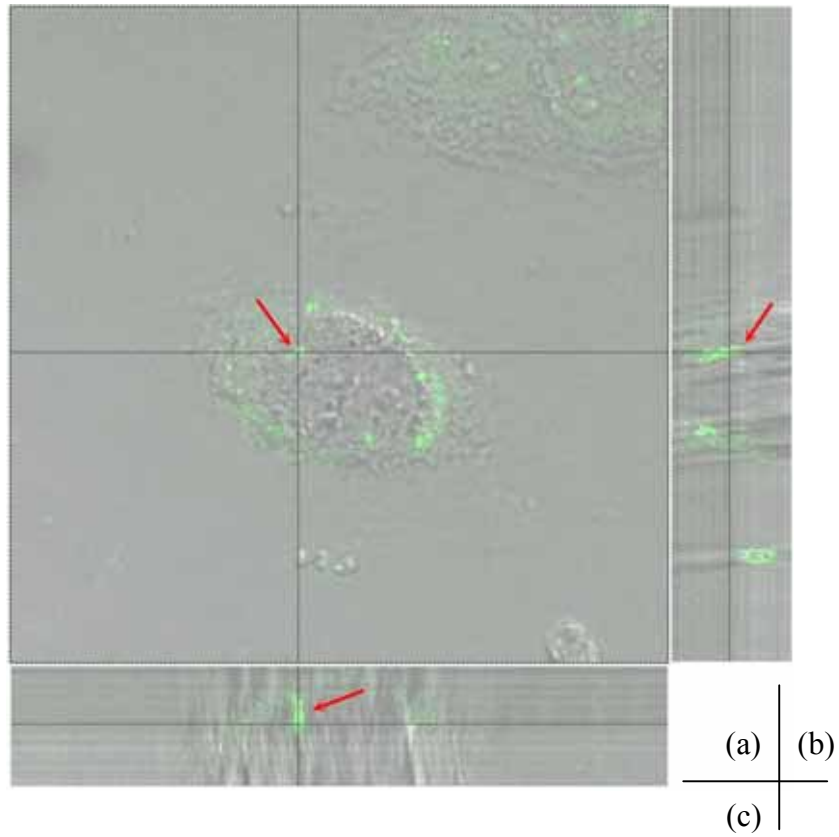


圖 3-12：共軛焦顯微鏡觀察結果。  
 (微氣泡濃度：40mg/mL，發射聲壓：1.32MPa，發射週數：5 週)

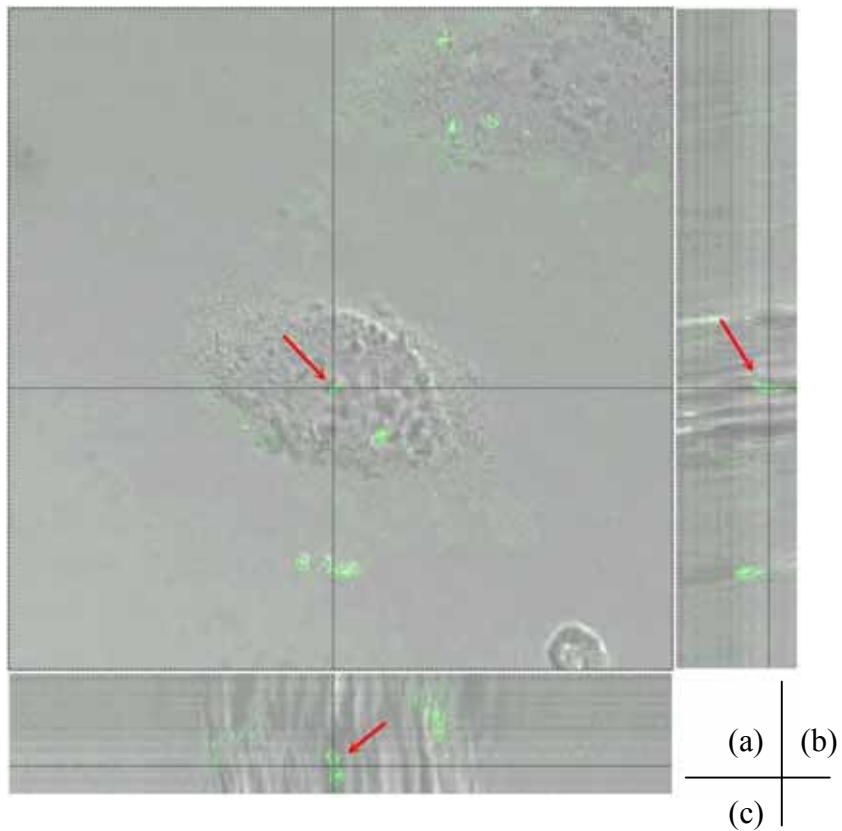


圖 3-13：共軛焦顯微鏡觀察結果。  
 (微氣泡濃度：40mg/mL，發射聲壓：1.32MPa，發射週數：5 週)

### 3.2.2 發射聲壓 vs. 基因傳遞率與細胞存活率

若以發射聲壓為變因，微氣泡濃度 40mg/mL、發射週期 5 週、超音波照射 60 秒下，基因傳遞率與細胞存活率的結果如圖 3-14。

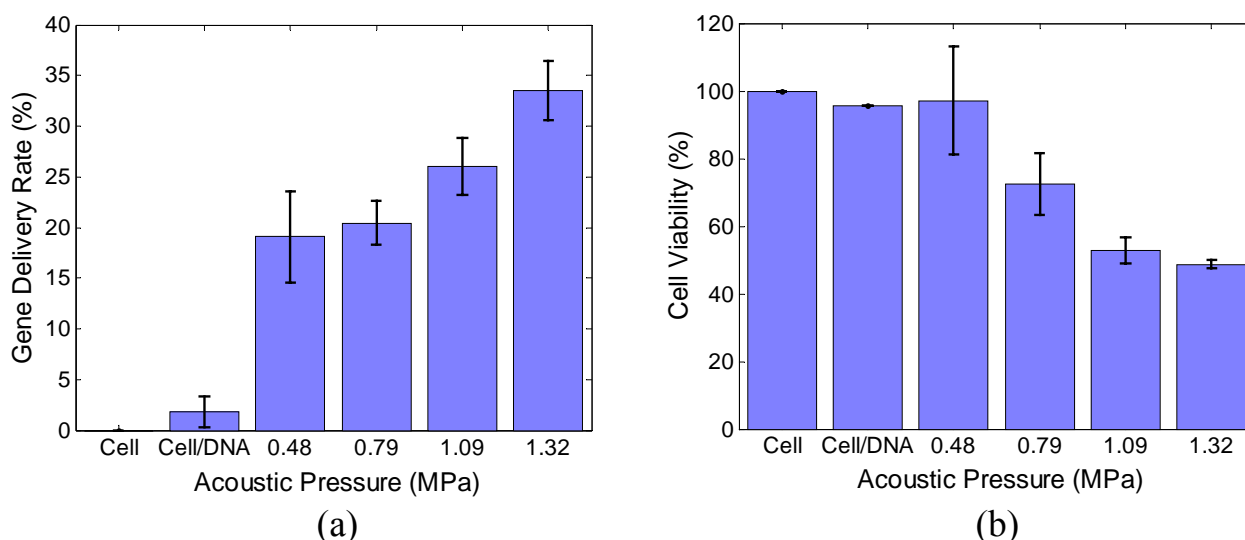


圖 3-14：發射聲壓 vs. 基因傳遞率(a)與細胞存活率(b)。

圖中標示「Cell」的組為溶液中只含HeLa細胞與鈣離子，標示「Cell/DNA」的組為溶液中含HeLa細胞、鈣離子與DNA，此二組為空白實驗，供有打超音波的組作比較。實驗結果發現基因傳遞率隨發射聲壓增強而提高，但相對地細胞存活率也下降。於發射聲壓 1.32MPa時，基因傳遞率可達 33.48%，此時的細胞存活率為 48.65%；發射聲壓降至 0.48MPa時，基因傳遞率只有 19.11%，但細胞存活率達 97.06%；未照超音波而自發性傳遞成功的比率僅有 1.57%。由於本實驗結果是於照射超音波後 24 小時觀察，為了釐清自發性的胞飲作用是否對基因傳遞造成影響，以及單純超音波照射下是否也會誘發基因傳遞，我們另外做了兩組空白實驗—將含有HeLa細胞、鈣離子與DNA的溶液作「僅加入Levovist<sup>®</sup>微氣泡、不打超音波」與「僅打超音波，但不加入Levovist<sup>®</sup>微氣泡」兩組實驗。實驗結果發現，此二組於實驗後 24 小時進行觀察亦未發現任何螢光現象，因此可證明基因的傳遞確實需要在超音波與微氣泡的共同組合下才能達成，亦即需要穴蝕效應的輔助。另外，穴蝕效應為機械性作用，因此理論上本實驗若於超音波照射後立即觀察應也可看到基因傳遞的結果(只是懸浮態的細胞

較難觀察)。我們將剛進行完基因傳遞實驗的懸浮態細胞於 100 倍螢光顯微鏡下進行觀測 (圖 3-15)，結果顯示基因的傳遞確實立即發生於超音波照射之後。

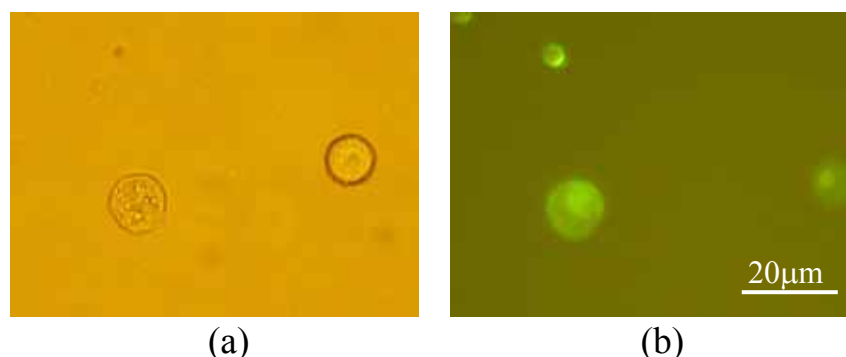


圖 3-15：基因傳遞實驗後立即以螢光顯微鏡觀察之結果，此時細胞尚未平貼於平底盤上，故呈圓球狀。(a)可見光下觀察結果；(b)螢光下之結果。

由上述的空白實驗結果可知，本研究中基因的傳遞是由超音波與微氣泡合作產生的穴蝕效應達成，於照射超音波後 24 小時的培養過程中，由於已無超音波照射，因此不會再繼續產生基因傳遞的現象，故可排除自發性胞飲作用可能造成的誤判。若以圖 3-3 量化的穴蝕效應值 (differential ICD) 作橫軸、圖 3-14 的基因傳遞率與細胞存活率作縱軸，可得圖 3-16 的結果。

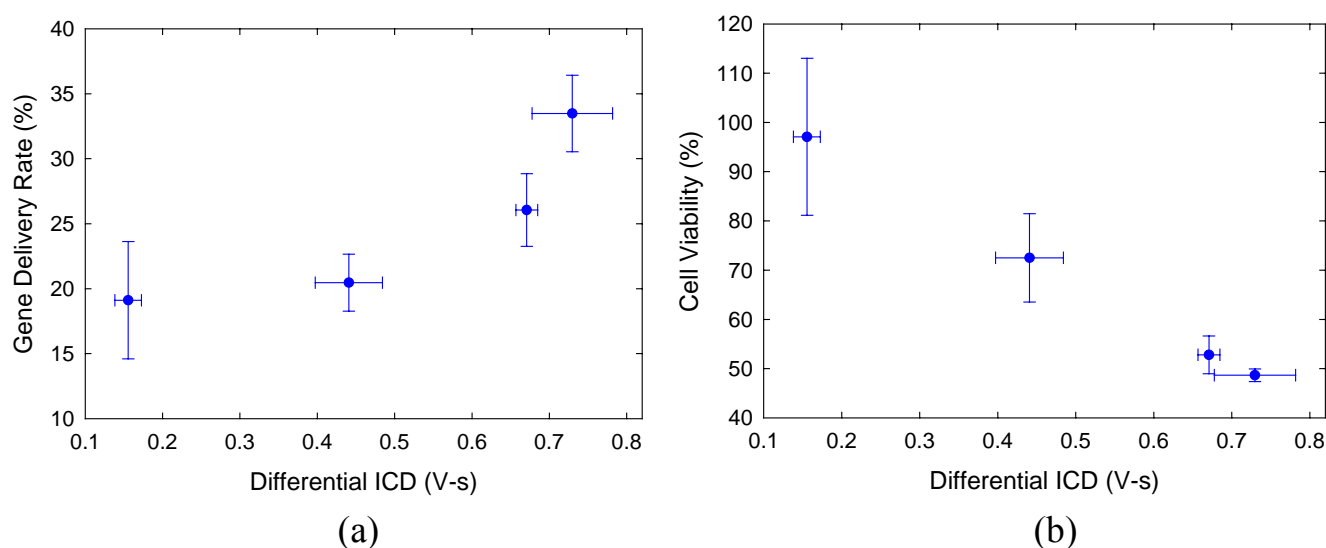


圖 3-16：將圖 3-14 以 differential ICD 為橫軸作圖。  
(a)基因傳遞率 vs. differential ICD；(b)細胞存活率 vs. differential ICD

圖 3-16 中已抽離超音波參數，僅比較基因傳遞率/細胞存活率與穴蝕效應之關聯。若以線性回歸曲線分析，可得趨勢如表 3-1：

	線性回歸方程式	相關係數 ( $R^2$ )
基因傳遞率, 3-16(a)	$y=21.67x+13.96$	0.75
細胞存活率, 3-16(b)	$y=-84.85x+110.1$	0.99

表 3-1：以發射聲壓為變因所得結果之線性回歸分析。  
 (其中，y 為縱軸；x 為橫軸，之後提到的方程式表示法皆同)

表 3-1 顯示基因傳遞率與細胞存活率對於 differential ICD 都具有高度相關性。

### 3.2.3 微氣泡濃度 vs. 基因傳遞率與細胞存活率

若改變微氣泡濃度，固定發射聲壓為 1.32MPa、發射週期 5 週、超音波照射 60 秒，基因傳遞率與細胞存活率的結果如圖 3-17。

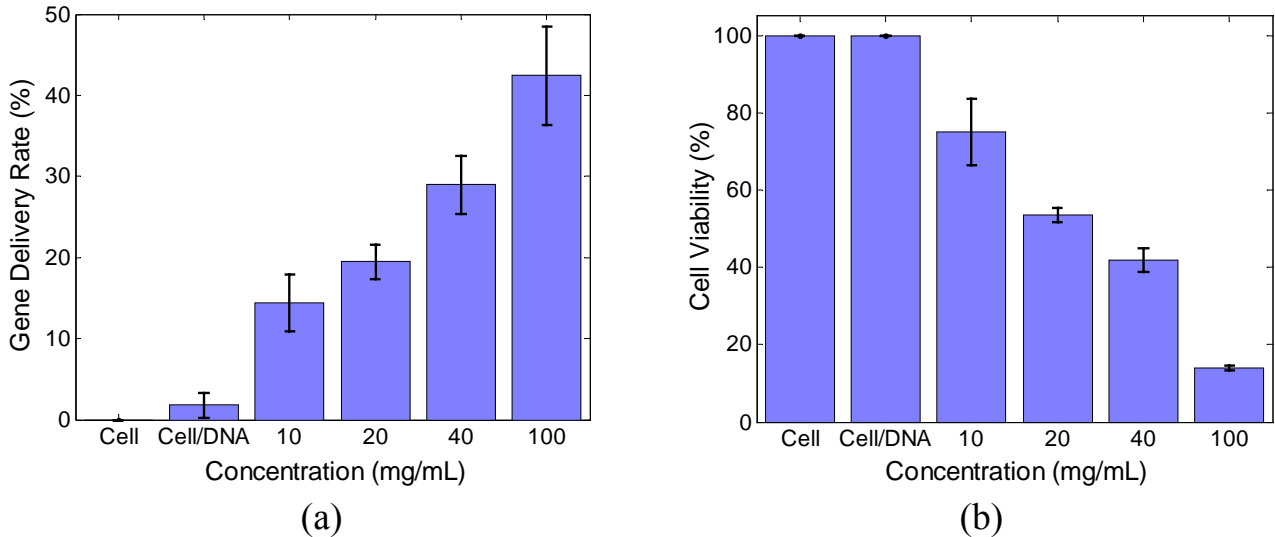


圖 3-17：微氣泡濃度 vs. 基因傳遞率(a)與細胞存活率(b)。

由圖中可觀察出當微氣泡濃度為 100mg/mL 時，基因傳遞率達 42.4%，此時的細胞存活率為 14.0%；當微氣泡濃度為 10mg/mL 時，基因傳遞率為 14.37%，而細胞存活率增為 75.01%；未照超音波而自發性傳遞成功的比率僅有 1.8%。若以圖 3-4 量化的穴蝕效應值作橫軸、圖 3-17 的基因傳遞率與細胞存活率作縱軸，可得圖 3-18 的結果。

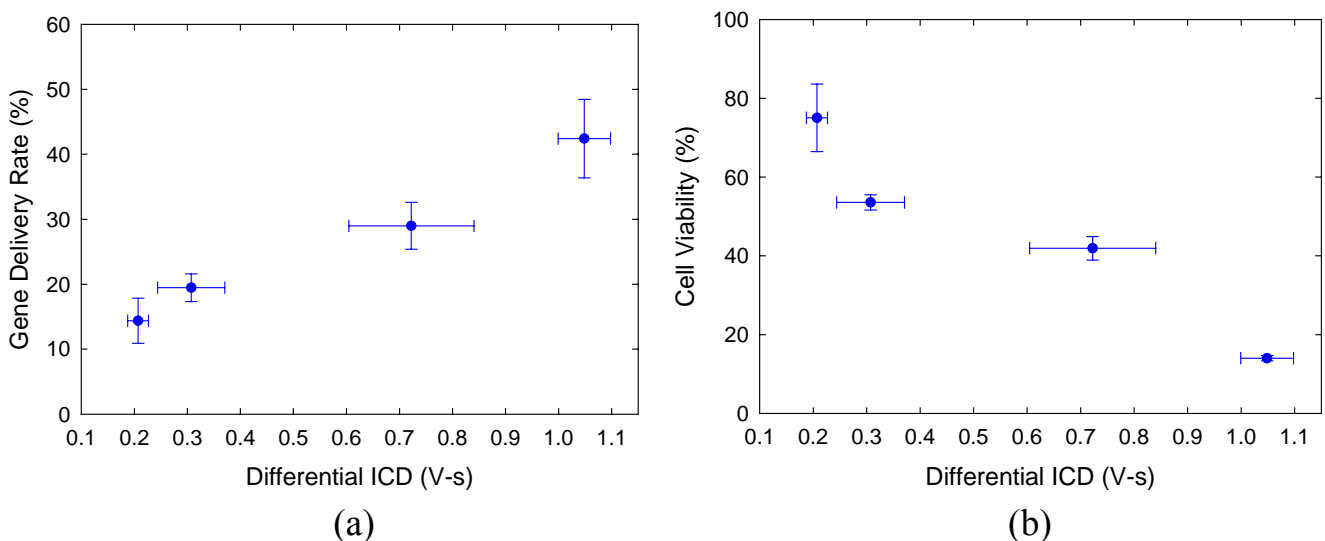


圖 3-18：將圖 3-17 以 differential ICD 為橫軸作圖  
(a)基因傳遞率 vs. differential ICD；(b)細胞存活率 vs. differential ICD。



以線性回歸曲線分析圖 3-18 中基因傳遞率/細胞存活率與穴蝕效應之關聯，可得趨勢如表 3-2：

	線性回歸方程式	相關係數 ( $R^2$ )
基因傳遞率, 3-18(a)	$y=31.44x+8.35$	0.98
細胞存活率, 3-18(b)	$y=-62.84x+82.01$	0.92

表 3-2：以微氣泡濃度為變因所得結果之線性回歸分析。

由表 3-2 亦可觀察出以微氣泡濃度為變因的實驗結果顯示基因傳遞率與細胞存活率對於 differential ICD 都具有高度相關性。

### 3.2.4 發射週數 vs. 基因傳遞率與細胞存活率

若以發射週數為變因，固定發射聲壓為 1.32MPa、微氣泡濃度 40mg/mL、超音波照射 60 秒，基因傳遞率與細胞存活率的結果如圖 3-19。

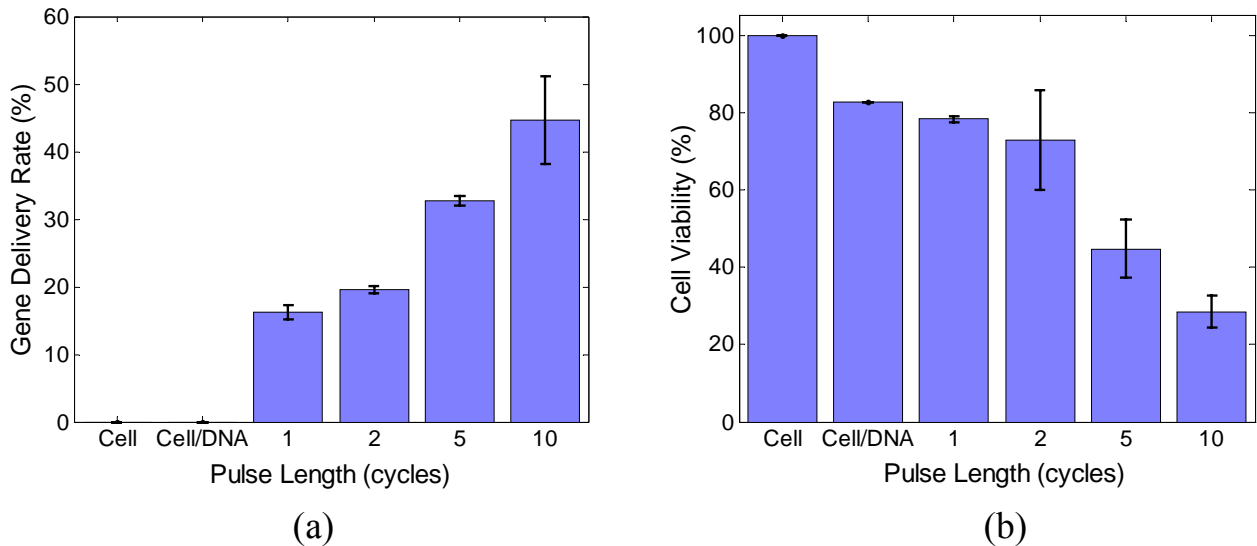


圖 3-19：發射週數 vs. 基因傳遞率(a)與細胞存活率(b)。

結果顯示當發射週數為 10 週時，基因傳遞率達 44.68%，此時的細胞存活率為 28.44%；當週數為 1 週時，基因傳遞率為 16.23%，而細胞存活率增為 78.34%；未照超音波而自發性傳遞成功的比率幾乎為 0。若以圖 3-6 量化的穴蝕效應值作橫軸、圖 3-19 的基因傳遞率與細胞存活率作縱軸，可得圖 3-20 的結果。

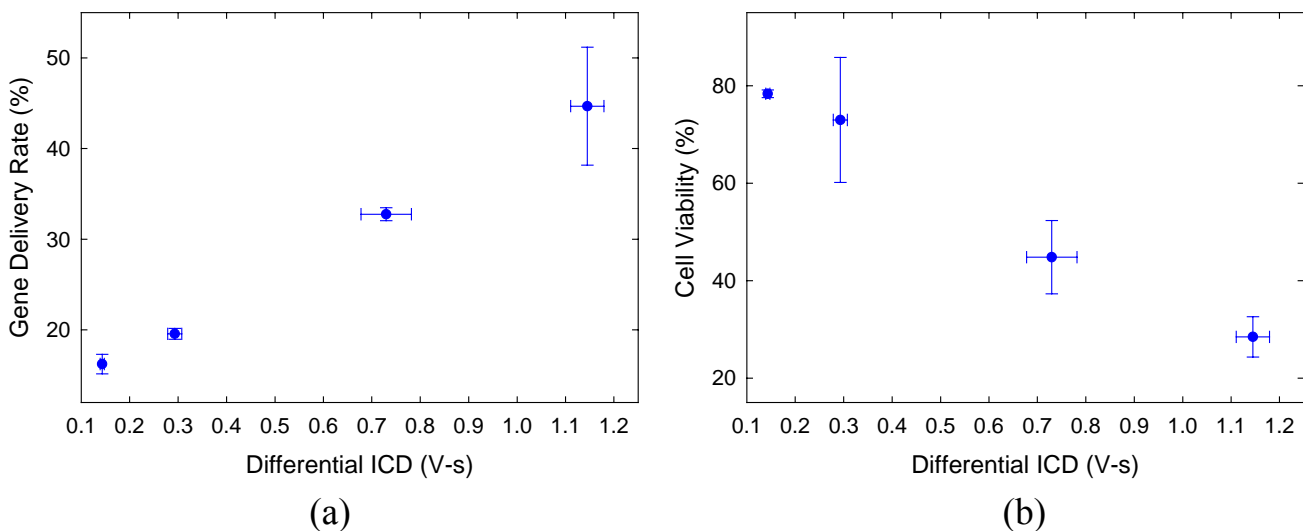


圖 3-20：將圖 3-19 以 differential ICD 為橫軸作圖。

(a) 基因傳遞率 vs. differential ICD；(b) 細胞存活率 vs. differential ICD

以線性回歸曲線分析圖 3-20 中基因傳遞率/細胞存活率與穴蝕效應之關聯，可得趨勢如表 3-3：

	線性回歸方程式	相關係數 ( $R^2$ )
基因傳遞率, 3-20(a)	$y=28.8x+11.67$	0.99
細胞存活率, 3-20(b)	$y=-51.84x+86.08$	0.99

表 3-3：以發射週數為變因所得結果之線性回歸分析。

由表 3-3 可觀察出以發射週數為變因的實驗結果顯示基因傳遞率與細胞存活率對於 differential ICD 都具有高度相關性。

### 3.3 穴蝕效應 vs. 基因傳遞率與細胞存活率

由改變單一參數（發射聲壓、微氣泡濃度與發射週數）的實驗結果可發現基因傳遞率、細胞存活率與量化後的穴蝕效應都有很高的線性相關性。若將三個參數得到的基因傳遞率圖形合併，可得 3-21 的基因傳遞率 vs. differential ICD 圖形；同理，將三者得到的細胞存活率圖形合併，可得到圖 3-22。由此二圖可發現不論使用何種超音波參數進行基因傳遞實驗，基因傳遞率與細胞存活率對於 differential ICD 都有很高的相關性，其線性回歸曲線方程式如表 3-4 所示。

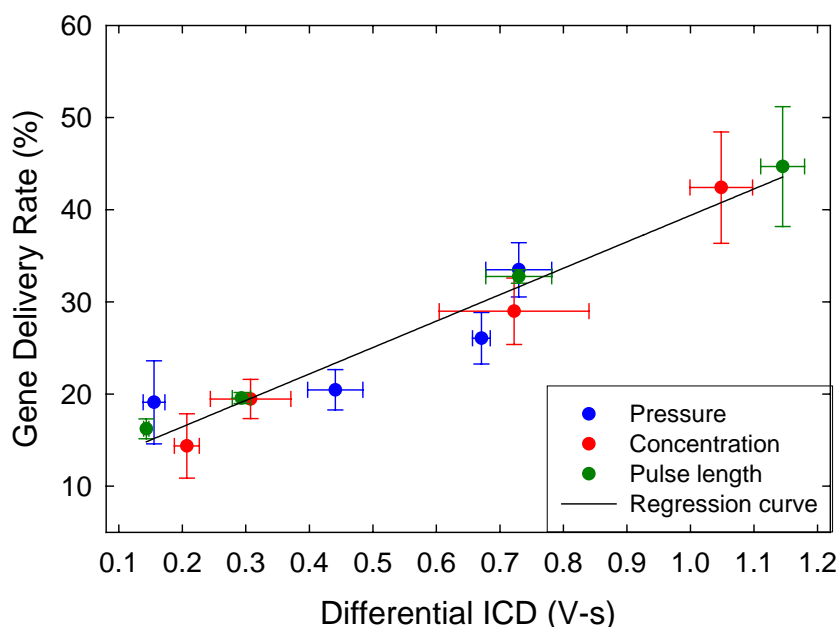


圖 3-21：將發射聲壓、微氣泡濃度與發射週數的基因傳遞率 vs. differential ICD 結果畫在一起。

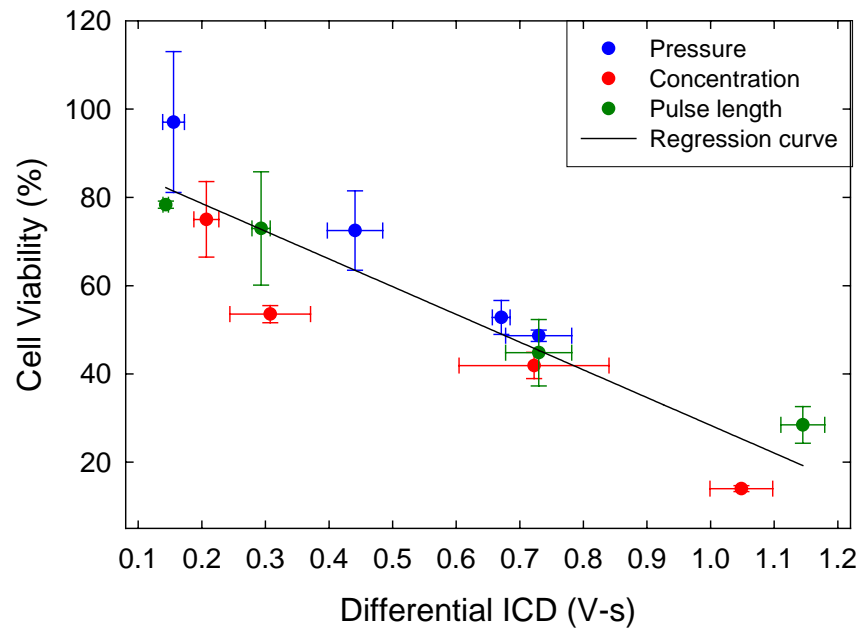


圖 3-22：將發射聲壓、微氣泡濃度與發射週數的細胞存活率 vs. differential ICD 結果畫在一起。

	線性回歸方程式	相關係數 ( $R^2$ )
基因傳遞率, 3-21	$y=28.67x+10.71$	0.95
細胞存活率, 3-22	$y=-62.83x+91.18$	0.84

表 3-4：基因傳遞實驗結果之線性回歸分析。

## 第四章 分析與討論

### 4.1 穴蝕效應之偵測與定量

由於微氣泡的破裂過程中會釋放大量能量，其溫度甚至可達數千 K (絕對溫度)，因此除了瞬間產生的強聲壓外，亦會造成自由基 (free radicals) 的生成 [65,86-92]，故有研究顯示可由自由基的產生量以量化穴蝕效應 [92-93]。另一種量化穴蝕效應的方式為定量微氣泡破裂時產生的寬頻雜訊強度 [59,94-96]，此法與微氣泡破裂時的激突信號直接相關，故本研究採用此法評估微氣泡破裂釋放的能量。激突信號的產生位置通常在正聲壓信號結束時 [84]，其示意圖如圖 4-1；但本研究實際測得的接收信號並無明顯的激突信號出現 (圖 4-2)，原因可能為 Levovist<sup>®</sup> 包覆的氣體為空氣，微氣泡破裂時空氣易迅速溶於水中，無法再產生強大的回波信號所致。相較於常用於穴蝕效應的商用對比劑 Definity<sup>®</sup> (Bristol-Myers-Squibb, New York, USA) 與 Optison<sup>®</sup> (Molecular Biosystems, San Diego, CA, USA)，其包覆氣體為八氟丙烷 (perfluoropropane, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>)，對水的溶解度遠小於空氣 [93,97]，因此微氣泡破裂後氣體仍會在水中存留一小段時間，於超音波訊號照射下有機會產生更強的回波散射，較易看到激突信號。雖然本研究因微氣泡氣體種類不同而無法有效偵測激突訊號，但從頻譜分析可知微氣泡破裂時仍有一寬頻的訊號產生 (圖 4-3 紅框處)，故亦可由寬頻訊號強度增加量偵測穴蝕效應之程度。圖 4-3 將同樣超音波條件下的 Levovist<sup>®</sup> 信號、鐵針信號 (將仿體洞中放置一根細鐵針量得的信號) 與純水信號的頻譜圖一起比較。鐵針可完全反射超音波，故其頻譜於 1MHz 處強度甚強，比較 1MHz 處的強度可發現 Levovist<sup>®</sup> 也有強反射現象，表示未破裂的 Levovist<sup>®</sup> 微氣泡亦會造成強烈的超音波回波現象—此可能因所有的微氣泡不可能在同一次發射脈衝中同時破裂完畢，因此接收信號中還是會有未破裂氣泡的信號。相較之下，水在 1MHz 處的信號強度比鐵針與 Levovist<sup>®</sup> 微氣泡少約 20dB (即 10 倍)，

此因仿體洞中無強反射體與散射體，接收探頭只能收到洞中多次來回反射而碰巧抵達該探頭的超音波信號。而鐵針與水無法產生激突信號（因無穴蝕核），故頻譜分析在 10MHz 附近只剩下 1MHz 造成的多階諧波信號（2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup>, ...）成分。由於此處的諧波強度都小於 Levovist<sup>®</sup> 信號，顯示 Levovist<sup>®</sup> 產生的寬頻上升非由 1MHz 的多階諧波造成，而是激突信號所影響。

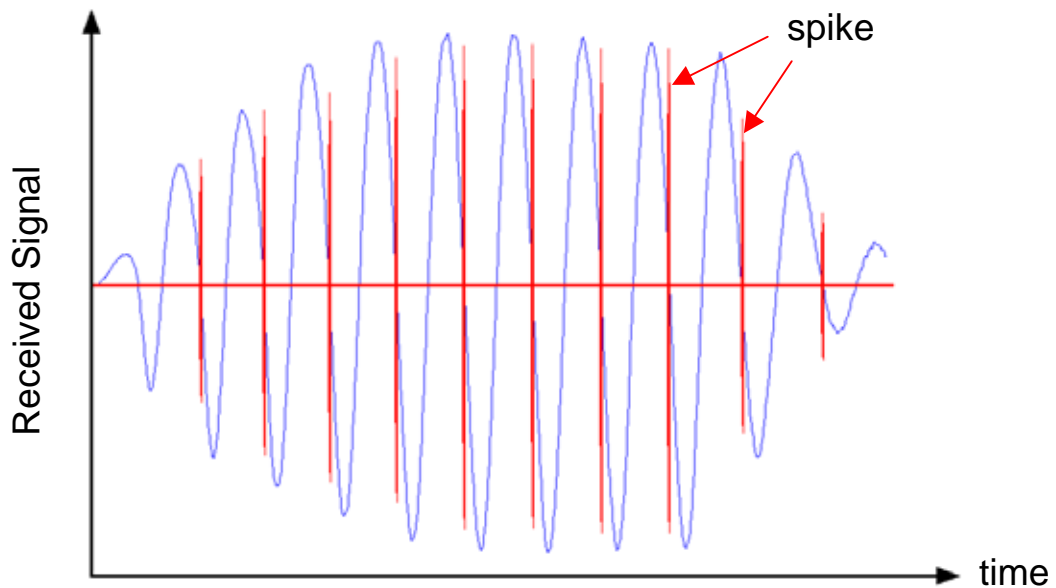


圖 4-1：激突信號產生時間點示意圖。藍色為聲壓信號，紅色為激突信號，兩者相對強度大小已調整過，故本圖所示非實際強度。

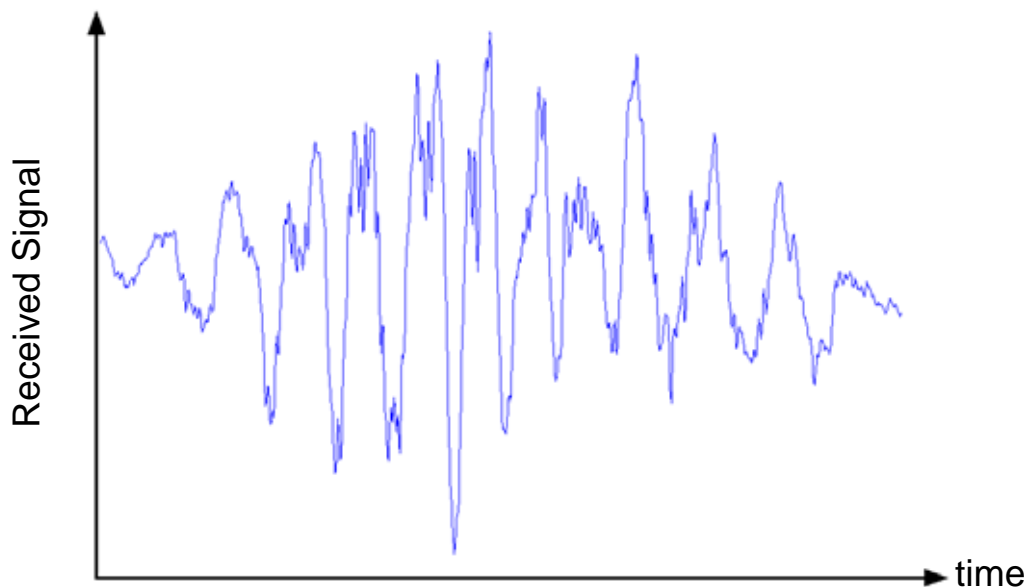


圖 4-2：實際接收的回波信號，並未看到明顯的激突信號。

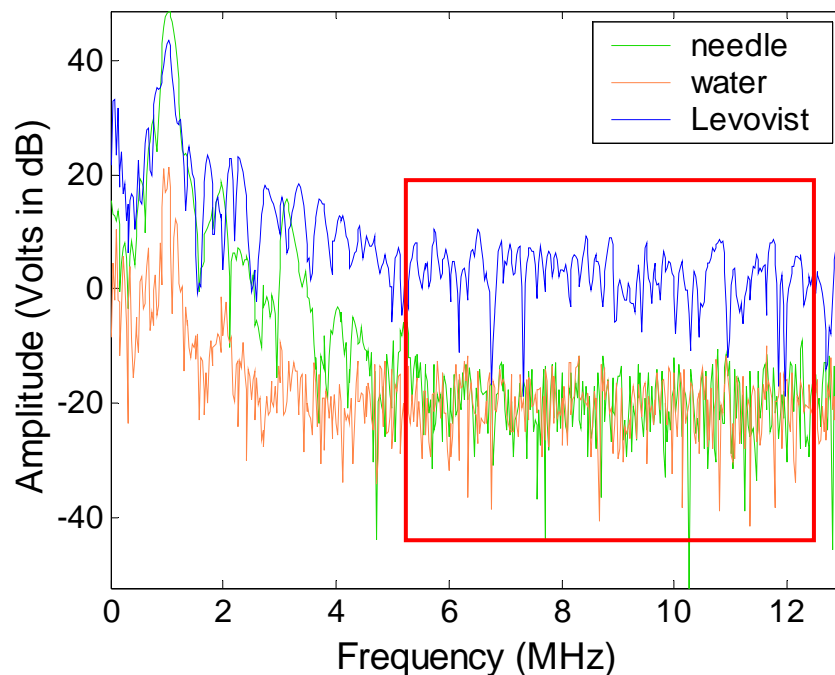


圖 4-3：將Levovist<sup>®</sup>信號、鐵針信號與純水得到的信號做頻譜分析與比較，圖中紅框處顯示Levovist<sup>®</sup>微氣泡溶液在高頻處可產生寬頻上升（相較於鐵針與水）。

由於穴蝕效應的定量會因實驗系統架構而相異[59]，因此沒有一定的標準比較不同微氣泡或架構間穴蝕效應的相對量。本研究是以水作基準，將量得的ICD數值減去水的效應以作為穴蝕效應的「淨量」。對於Levovist<sup>®</sup>微氣泡破裂時的閾值（threshold）判斷，則是由 10MHz 探頭接收信號的M-mode圖形（即圖 3-2(b)的型式）決定。

對於穴蝕效應的量化結果，由圖 3-3、3-4 與 3-8 的 differential ICD vs. 聲壓、濃度與週數圖可發現各組參數得到的 differential ICD 值均具有上升趨勢。當變因為發射聲壓時，differential ICD 於 0.48MPa 後開始明顯上升，並於 1.09MPa 之後出現類似飽和的趨勢，此變因下的標準差幾乎不互相重疊，故統計上可推得「隨著發射聲壓增強，微氣泡破裂趨勢增加」的結論。

當變因為Levovist<sup>®</sup>微氣泡濃度時，differential ICD於 5mg/mL後開



始明顯上升，並於 100mg/mL後出現下降的趨勢。Differential ICD下降的原因已於之前討論過，可能為遮蔽效應的問題；但此處還可發現標準差小於 100mg/mL時並不穩定，此可能因Levovist<sup>®</sup>設計使用的濃度為 200、300 與 400mg/mL，於這些濃度下的穩定時間分別為 10、25 與 40 分鐘[81]，若依此趨勢推估濃度小於 100mg/mL時的穩定時間，可能小於 5 分鐘（圖 4-4）。而本次實驗於變因為發射聲壓與發射週數時濃度均使用 40mg/mL，因此數據的標準差來源有一部分應為 Levovist<sup>®</sup>不甚穩定所致。雖然以微氣泡濃度為變因的標準差較大，但因標準差亦幾乎不互相重疊，故統計上可推得「隨著Levovist<sup>®</sup>濃度增加，微氣泡破裂趨勢增加」的結論。

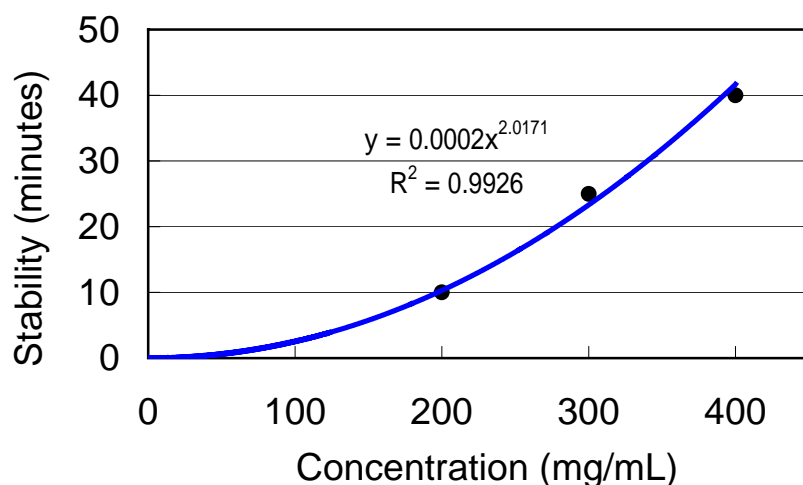


圖 4-4：Levovist<sup>®</sup>濃度與穩定度相關關係圖，藍色曲線為以乘冪為基礎之回歸曲線。

當變因為發射週數時，differential ICD 於 2 週後開始明顯上升。由於標準差幾乎不互相重疊，故統計上可推得「隨著發週數增加，微氣泡破裂趨勢增加」的結論。

對於Levovist<sup>®</sup>微氣泡破裂閾值的探討，由圖 4-5 的M-mode實驗結果顯示約在 0.25-0.48MPa間微氣泡即會大量破裂（因微氣泡的強散射信號在 150 筆接收時間內即消失），大於 0.48MPa時M-mode圖上的微氣泡軌跡會在開啟超音波後 0.5 秒（接收第 50 筆處）內迅速消失，

表示微氣泡迅速破裂完畢，故Levovist<sup>®</sup>破裂的閾值約為 0.48MPa。

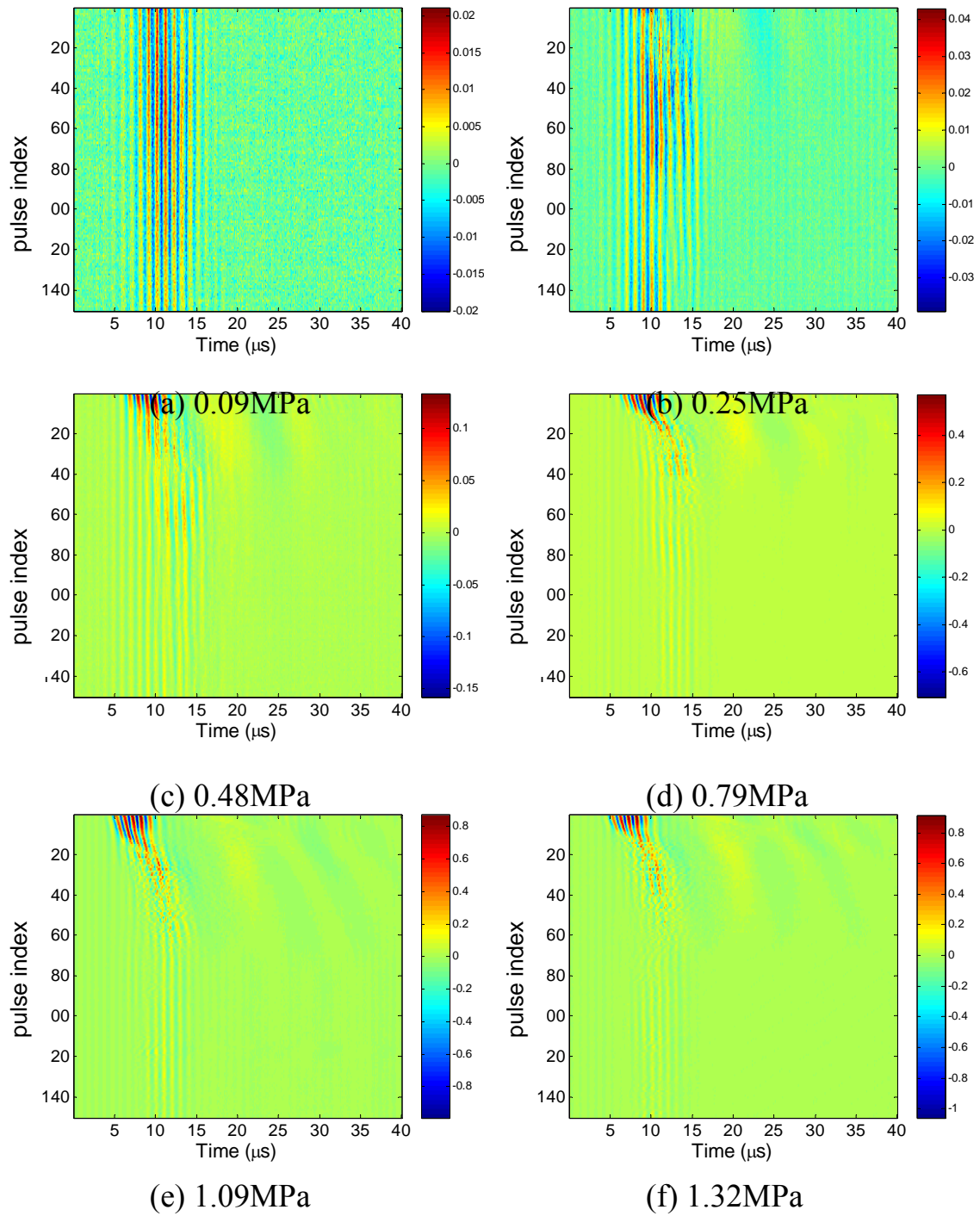


圖 4-5：不同聲壓下的 M-mode 結果，顯示微氣泡破裂的閾值約為 0.48MPa。

## 4.2 基因傳遞實驗結果分析

本實驗架構下的基因傳遞率與細胞存活率整理如表 4-1。

變因	範圍	基因傳遞率	細胞存活率
發射聲壓	0.48-1.32MPa	19.11-33.48%	97.06-48.65%
Levovist <sup>®</sup> 濃度	10-100mg/mL	14.37-42.4%	75.01-14%
發射週數	1-10 cycles	16.23-44.68%	78.34-28.44%

表 4-1：基因傳遞率與細胞存活率結果。

當變因為發射聲壓時，由圖 3-3 differential ICD vs.發射聲壓結果知穴蝕效應的急速上升約於 0.48MPa開始，故此變因下的基因傳遞實驗便以 0.48, 0.79, 1.09 與 1.32MPa四種聲壓進行實驗。實驗結果發現，基因傳遞率於 0.48 與 0.79MPa時分不出差異，但 1.09 與 1.32MPa時則有明顯上升，傳遞率最高可達 33.48%。若以穴蝕效應實驗得到的differential ICD為橫軸，基因傳遞率為縱軸，可發現其類似於指數趨勢。但由於前兩組的標準差互相涵蓋，在統計上無法分出差異，因此我們仍以線性回歸曲線作分析。分析結果顯示相關係數 $R^2=0.75$ ，具高度線性相關度 ( $R^2>0.5$ )，表示此聲壓範圍內的基因傳遞率可由穴蝕效應的量化結果進行線性預測。同樣變因下的細胞存活率分布由 97.06-48.65%，細胞存活率vs. differential ICD圖形的線性回歸曲線所得之關係數 $R^2$ 高達 0.99，表示存活率與穴蝕效應的量化結果亦具高度線性相關性，此聲壓範圍內的細胞存活率可由穴蝕效應結果進行線性預測。

若以Levovist<sup>®</sup>微氣泡濃度為變因，由圖 3-4 differential ICD vs.微氣泡濃度結果知穴蝕效應約於 5mg/mL後急速上升，故此變因下的基因傳遞實驗以 10, 20, 40 與 100mg/mL四種濃度進行實驗。高於 100mg/mL的濃度由於有遮蔽效應的問題，量化的穴蝕效應數值無法正確反映出真實的微氣泡破裂總能量，因此不予採用。實驗結果顯

示，隨著濃度提高，基因傳遞率與細胞存活率的趨勢亦有明顯上升與下降，其標準差幾乎不互相涵蓋，故於統計上是可分辨的。分析結果顯示基因傳遞率曲線vs. differential ICD的相關係數 $R^2=0.98$ ，細胞存活率曲線vs. differential ICD的相關係數 $R^2=0.92$ ，具高度線性相關度，表示此濃度範圍內的基因傳遞率與細胞存活率可由穴蝕效應的量化結果進行線性預測。

若以超音波發射週數為變因，由圖 3-8 differential ICD vs.發射週數結果知穴蝕效應約於 2 週後急速上升，但我們仍以 1, 2, 5 與 10 週四種週數進行實驗。實驗結果顯示，1 與 2 週的基因傳遞率與細胞存活率差不多，此與穴蝕效應的量化結果相符，應是由於週數不足以讓探頭的波形達到穩態所致。週數大於 5 週後傳遞率也迅速升高，於 10 週時達到本次實驗三種變因中可達到的最高傳遞率 44.68%。分析基因傳遞率曲線與細胞存活率曲線vs. differential ICD的線性相關度，可得相關係數各為 $R^2=0.99$  與 $R^2=0.99$  的高相關度，表示此週數範圍內的基因傳遞率與細胞存活率可由穴蝕效應的量化結果進行線性預測。

相較於前人同樣以Levovist<sup>®</sup>微氣泡得到的實驗結果，Sandra Koch 團隊以J3T犬腦瘤細胞、GFP (green fluorescent protein) DNA與 2MHz 脈衝超音波 ( $I_{SATA}=0.5W/cm^2$ ) 進行實驗，在商用陽離子化微脂體 (cationic liposomes, LipofectAmine, Life Technologies, Karlsruhe, Germany) 的輔助下，於Levovist<sup>®</sup>濃度 200mg/mL時得到 5.5%的基因傳遞率與 39.3%的細胞存活率[54]；Tieli Li團隊於 10mg/mL的 Levovist<sup>®</sup>濃度下以中國田鼠卵巢細胞 (Chinese hamster ovary cells) 與GFP DNA進行實驗，使用 1MHz超音波與  $0.5W/cm^2$ 能量照射 20 秒，實驗結果顯示細胞存活率達 60.7%，基因傳遞率約 5%[98]。本研究中基因傳遞率最低仍有 14.37%，此時的細胞存活率為 75.01%，較前人結果為佳，可能因實驗架構不同與細胞不同所致。

### 4.3 穴蝕效應與基因傳遞率、細胞存活率之關聯

將三種超音波參數得到的基因傳遞率圖形重疊後對differential ICD作圖，可得 3-21 的基因傳遞率vs. differential ICD圖形。由圖中可觀察出在以發射聲壓、微氣泡濃度與發射週數可得的differential ICD範圍內（發射聲壓可得的differential ICD：0.16-0.73V-s；微氣泡濃度可得：0.21-1.05V-s；發射週數可得：0.14-1.15V-s），基因傳遞率與differential ICD呈現高度線性相關性，相關係數 $R^2=0.95$ 。此結果反映出不論超音波參數為何，基因傳遞率主要取決於differential ICD值的大小，即微氣泡破裂的整體能量。雖然不同超音波參數造成的微氣泡破裂過程可能有差異（例如：高聲壓造成的高differential ICD是以強度來直接迫使微氣泡破裂；高濃度造成的高differential ICD是因大量的氣泡在短暫時間內破裂；高發射週數造成的高differential ICD是因單一脈衝波內有較多的週期數，使微氣泡更易在較長的脹縮過程中產生慣性穴蝕效應而破裂），但基因傳遞率不會受到不同的微氣泡破裂方式影響，而直接由破裂能量的總強度反應。因此，不論超音波參數為何，只要能有效提高穴蝕效應強度的方法，應都能增強基因傳遞的效果。

對於圖 3-22 的細胞存活率vs. differential ICD圖形，由於兩者亦呈現高度線性相關性（相關係數 $R^2=0.84$ ），表示細胞存活率不會受到不同的微氣泡破裂方式影響，而直接由破裂能量的總強度反應。因此，不論超音波參數為何，只要有效提高穴蝕效應強度，細胞存活率也會以線性趨勢遞減，並可由相對應的線性關係預測出。

基因傳遞率、細胞存活率對於量化穴蝕效應的高度線性相關性是本研究的一大發現，但本研究也驗證前人提出的「基因傳遞率與細胞存活率是一項取捨」的論點[78]。以目前實驗結果而言，高基因傳遞率意味必需加強穴蝕效應釋放的能量（例如：聲壓變大或發射週數更多等等），因此細胞存活率也會愈低。由於基因傳遞的效果會因不同的細胞、微氣泡種類而異[76,97]，因此若能找到適合對某種細胞進行

基因傳遞實驗的微氣泡，有效提高圖 3-21 傳遞率曲線的斜率，並控制圖 3-22 存活率的斜率於可接受範圍內，便能克服「高傳遞率勢必伴隨低存活率」的問題。

## 4.4 本研究之應用

雖然基因傳遞實驗的結果可能隨不同細胞株、不同微氣泡或是不同架構而異，但本研究發現在同一架構下針對HeLa細胞與Levovist<sup>®</sup>微氣泡，基因傳遞率與細胞存活率具有高度的線性相關性。此方法可提供未來細胞實驗前的預測途徑，只要先以某一變因建立基因傳遞率與細胞存活率相對於量化穴蝕效應的關係，之後改變超音波參數時即可以穴蝕效應結果預測此情形下可能的基因傳遞結果。由於調整不同的超音波參數可能有效增加穴蝕效應的效果，除了本研究使用的發射聲壓、微氣泡濃度與發射週數外，共振頻串接（cascade）、重疊（superimposition）二階諧波（second-harmonic）或是次諧波（sub-harmonic）也能有效誘發穴蝕效應[79,99-100]，因此若能先以量化的穴蝕效應結果以預測可能的基因傳遞結果，或是縮小細胞實驗時必須調整的參數範圍，活體或細胞實驗將能更有效率地進行。

## 第五章 結論及未來工作

為研究基因傳遞效率、細胞存活率與量化穴蝕效應間的關聯，本研究建立一套能進行穴蝕效應與基因傳遞實驗的系統，並使用 Levovist<sup>®</sup> 微氣泡、標訂 FITC 染劑的 DNA 與 HeLa 細胞進行實驗，最後提出穴蝕效應可對基因傳遞實驗結果進行預測的理論模式。

在穴蝕效應實驗方面，本研究使用發射聲壓、微氣泡濃度與發射週數三種變因對樣本空間 (sample volume) 內的一整群微氣泡誘發穴蝕效應，微氣泡破裂信號由較高頻的接收探頭接收並對其作頻譜分析，採用 ICD 法以量化穴蝕效應於高頻處產生的寬頻雜訊強度。實驗結果顯示於三種變因下均能有效誘發穴蝕效應，由於標準差幾乎不互相重疊，因此可得到隨發射聲壓升高、微氣泡濃度增加或發射週數增加，微氣泡破裂趨勢增加的結論。

在基因傳遞實驗方面，使用的三種變因與穴蝕效應相同，但取具有較佳穴蝕效應的參數範圍進行實驗。實驗結果先經共軛焦顯微鏡作基因成功進入細胞的確認，接著於螢光顯微鏡計算基因傳遞效率，並以 Trypan Blue Assay 法計算細胞存活率。實驗結果顯示，三種變因下均能得到大於三成的傳遞率 (此時細胞存活率由 14-49% 不等)；若以存活率為主要考量，則於七成以上存活率的情形下，傳遞率也有一成至二成。

若以基因傳遞率或細胞存活率為縱軸，量化後的穴蝕效應為橫軸，於單一變因下可發現基因傳遞率/細胞存活率對於穴蝕效應量具有高度線性相關性，顯示在本研究能達到的超音波能量範圍內，基因傳遞率/細胞存活率可由穴蝕效應量來預測。若將三種變因的基因傳遞率/細胞存活率結果合併，可觀察到抽離超音波參數後，基因傳遞率/細胞存活率對於量化的穴蝕效應值亦具有高度線性相關的特性，此結果顯示不論超音波參數為何，基因傳遞實驗的結果主要取決於微氣泡破裂的整體能量的大小，故只要能有效提高穴蝕效應強度的方



法，應都能增強基因傳遞的效果。此結果也顯示以量化的穴蝕效應結果預測基因傳遞率/細胞存活率是可行的，對於活體細胞實驗而言，能有效地預測基因傳遞實驗結果以提供細胞實驗時的參數調整範圍，對於提高實驗的整體效率具有很大的助益。

未來工作方面，首先將以不同的細胞株進行實驗，驗證基因傳遞率/細胞存活率對於量化穴蝕效應的趨勢在不同細胞株中是否亦具有高度線性相關性。若此關係存在，則表示對於不同種類的細胞，以量化的穴蝕效應對基因傳遞實驗結果進行預測是可行的方法。另外，本研究觀察的「基因傳遞」現象僅止於「DNA 由細胞外部進到細胞內部」的過程，此過程僅為 DNA 進入細胞，但 DNA 進細胞並表現出所需的蛋白質才是基因治療最終的目的，因此未來工作也將使用 GFP DNA 作為欲轉殖的基因，以最後表現綠色螢光蛋白質的細胞比率作為基因轉殖（傳遞）率的依據，再檢驗其與量化的穴蝕效應之關聯。

未來工作還有設計超音波波形以有效誘發穴蝕效應，並以共振頻、次諧波與二階諧波之串接或重疊法為主。不同的微氣泡特性亦可能為影響穴蝕效應與基因傳遞的因素之一，其原因就在於殼層性質與內部包覆的氣體不同。目前本實驗室已能自製包覆空氣的微脂體與包覆全氟碳化物（perfluorocarbon, PFC）氣體的微氣泡，並將其粒徑控制在數微米的大小。包覆空氣的微脂體殼層成分為 PE（1,2, distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine）、PC（L- $\alpha$ -phosphatidylcholine）、PG（L- $\alpha$ -phosphatidyl-DL-glycerol）與 CH（cholesterol），其製作流程如圖 5-1：

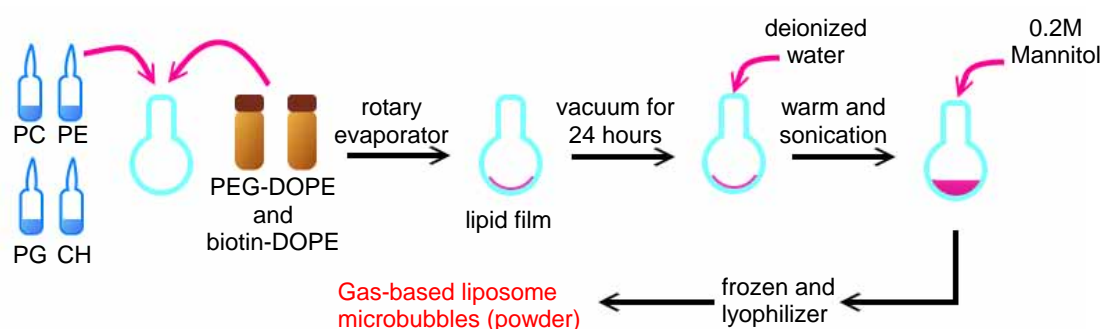


圖 5-1：微脂體製作流程圖。

包覆PFC氣體的微氣泡使用人類血清白蛋白（human serum albumin, HSA）作為殼層成分，內部氣體成分為PFP（perfluoropentane,  $C_5F_{12}$ ）。由於 $C_5F_{12}$ 的沸點為  $29^{\circ}C$ ，因此製作方法為先將去離子水、HSA與 $C_5F_{12}$ 的混合液以超音波震碎機震成乳白狀液（emulsion, 此時溶液中為HSA包覆 $C_5F_{12}$ 液滴的結構），再於  $37^{\circ}C$  恆溫環境中使微氣泡氣體充分形成，製備流程圖如圖 5-2。

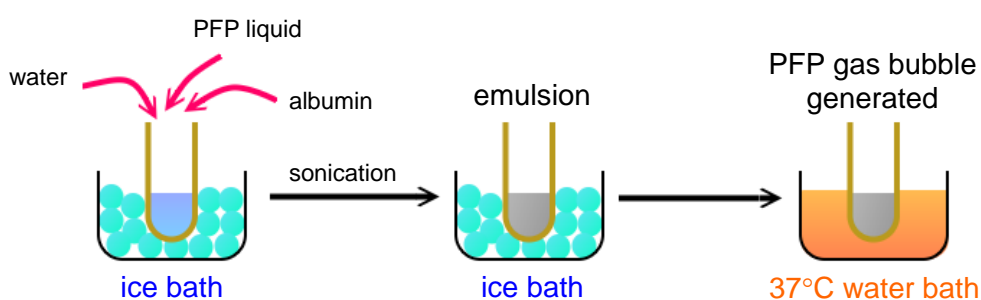


圖 5-2：PFP 微氣泡製作流程圖。

目前本實驗室已可做出初步的微脂體微氣泡與 PFP 微氣泡，其外觀如圖 5-3 與圖 5-4，粒徑約控制於  $10\mu m$  內，但穩定度仍需再改善。

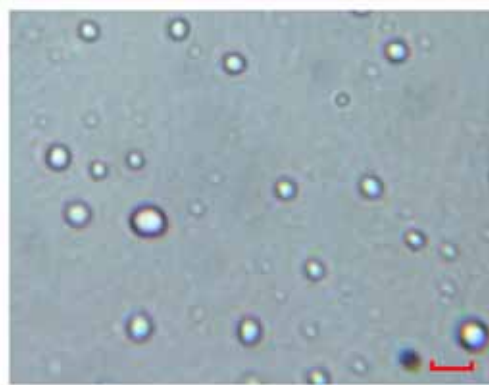


圖 5-3：微脂體微氣泡外觀，紅色尺規的長度為  $5\mu m$ 。

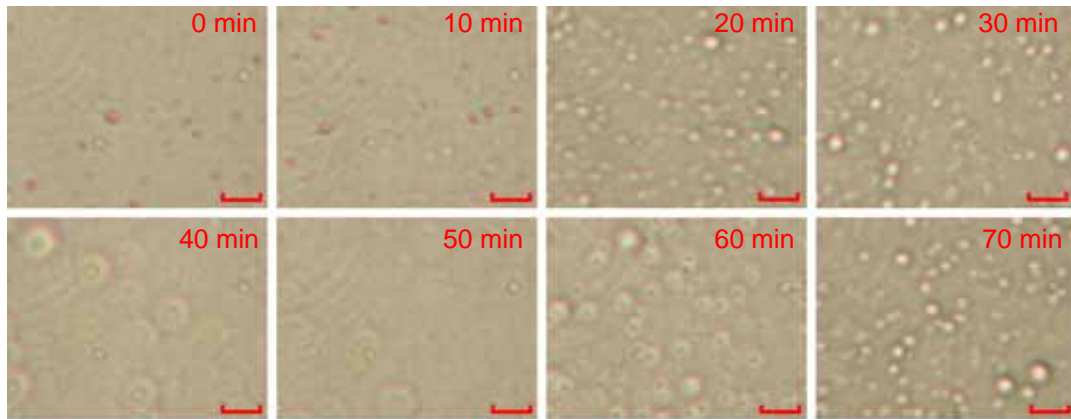


圖 5-4：PFP 微氣泡外觀，圖片右上角數字為 37°C 溫水浴時間。紅色尺規的長度為 5 $\mu$ m。

另外，微氣泡的靶向功能（targeting）亦能提升基因治療或藥物傳遞的效率。製作微脂體時使用的 biotin-DOPE（圖 5-1）即為銜接配位體（ligand）與微脂體間的分子。配位體為一種能與腫瘤細胞表面的腫瘤標記（tumor marker）相對應的蛋白質，若能針對特定的腫瘤細胞找出相對應的配位體，再將該配位體黏附於我們製作的微脂體上，則微脂體進入活體後便能大量聚集於腫瘤處，此時再進行穴蝕效應，即可達成具靶向性的基因治療，此亦為未來工作之一。靶向性的基因治療如圖 5-5。

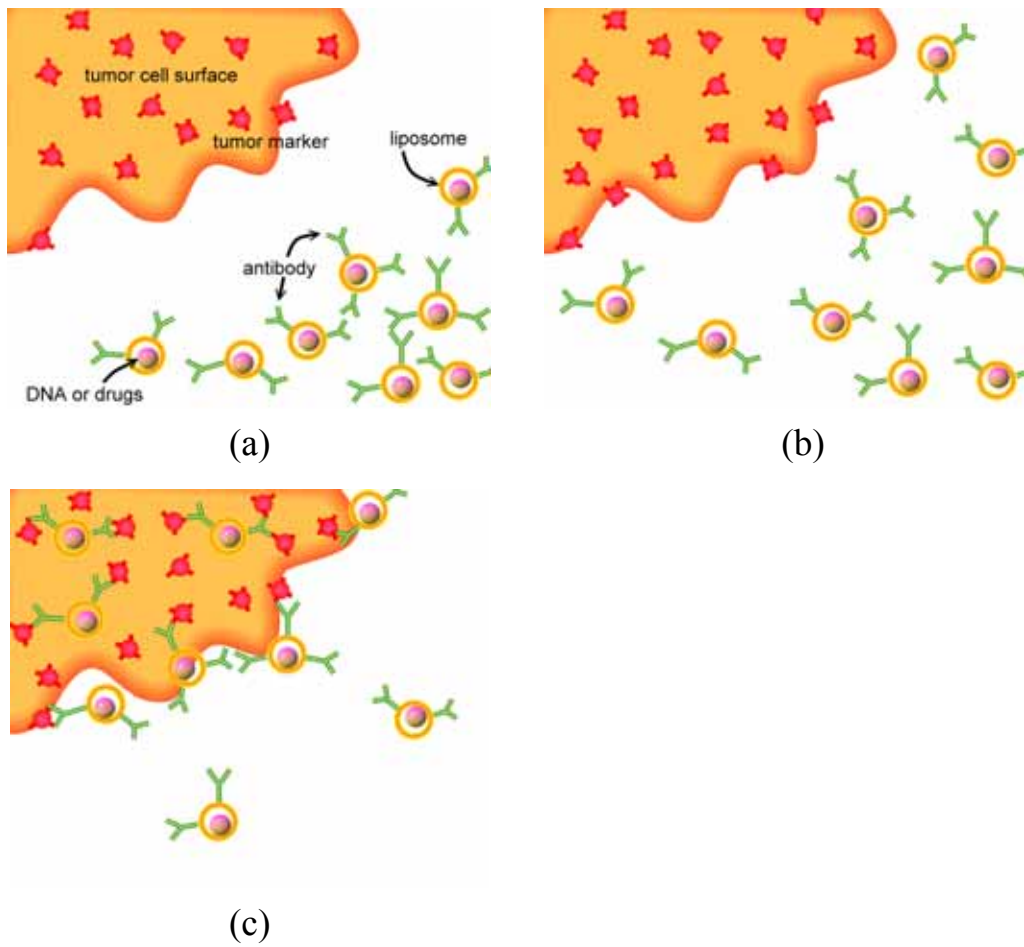


圖 5-5：以微氣泡靶向功能示意圖。(a)攜帶配位體的微氣泡散布於血液中；(b)微氣泡接近腫瘤細胞；(c)微氣泡上的配位體與腫瘤細胞表面的瘤標標記相結合，此時再施以能誘發穴蝕效應的能量，即可進行藥物或 DNA 的釋放，達到基因治療的效果。

## 第六章 參考文獻

- [1] Mountain A., **“Gene therapy: the first decade,”** *Trends Biotechnol.*, Vol. 18, No. 3, pp. 119-128, 2000.
- [2] Gabi U. Dachs, Graeme J. Dougherty, Ian J. Stratford and Dai J. Chaplin, **“Targeting gene therapy to cancer: a review,”** *Oncology Research*, Vol. 9, pp. 313-325, 1997.
- [3] Anderson WF., **“Human gene therapy,”** *Science*, Vol. 256, No. 5058, pp. 808-813, 1992.
- [4] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts and Peter Walter, *Molecular Biology of the Cell, Fourth Edition*, Taylor & Francis Group Ltd.
- [5] Tom Strachan and Andrew P. Read, *Human Molecular Genetics*, BIOS Scientific Publishers, Ltd.
- [6] Nielsen LL., Maneval DC., **”P53 tumor suppressor gene therapy for cancer,”** *Cancer Gene Therapy*, Vol. 5, No. 1, pp. 52-63, 1998.
- [7] Fletcher JC., Anderson WF., **”Germ-line gene therapy: a new stage of debate,”** *Law Med Health Care*, Vol. 20, No. 1-2, pp. 26-39, 1992.
- [8] Human Genome Project Information Website  
[http://www.ornl.gov/TechResources/Human\\_Genome/home.html](http://www.ornl.gov/TechResources/Human_Genome/home.html)
- [9] Todd K. Rosengart, Leonard Y. Lee, Shailen R. Patel, Timothy A. Sanborn, Manish Parikh, Geoffrey W. Bergman, Rory Hachamovitch, Massimiliano Szulc, Paul D. Kligfield, Peter M. Okin, Rebecca T. Hahn, Richard B. Devereux, Martin R. Post, Neil R. Hackett, Taliba Foster, Tina M. Grasso, Martin L. Lesser, O. Wayne Isom and Ronald G. Crystal, **“Angiogenesis gene therapy (phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease),”** *Circulation*, Vol. 100, pp. 468-474, 1999.
- [10] J. N. Lozier and K. M. Brinkhous, **“Gene therapy and the hemophilias,”** *The Journal of the American Medical Association*, Vol. 271, No. 1, 1994.
- [11] Paul D. Robbins and Steven C. Ghivizzani, **“Viral vectors for gene therapy,”** *Pharmacol. Ther.*, Vol. 80, No. 1, pp. 35-47, 1998.
- [12] Schatzlein AG, **“Non-viral vectors in cancer gene therapy: principles and progress,”** *Anti-Cancer Drugs*, Vol. 12, No. 4, pp. 275-304, 2001.
- [13] Fubao Wang, Deepa K. Patel, Joseph M. Antonello, Michael W. Washabaugh, David C. Kaslow, John W. Shiver and Narendra Chirmule, **“Development of an adenovirus-shedding assay for the detection of adenoviral vector-based**

- vaccine and gene therapy products in clinical specimens,”** *Human Gene Therapy*, Vol. 14, No. 1, pp. 25-36, 2003.
- [14] Patricia M. Joseph, Brian P. O'Sullivan, Allen Lapey, Henry Dorkin, Joseph Oren, Rosemary Balfour, Michael A. Perricone, Mireille Rosenberg, Samuel C. Wadsworth, Alan E. Smith, Judith A. St. George and David P. Meeker, **“Aerosol and lobar administration of a recombinant adenovirus to individuals with cystic fibrosis. I. methods, safety, and clinical implications,”** *Human Gene Therapy*, Vol. 12, No. 11, pp. 1369-1382, 2001.
- [15] Hiroyuki Kubo, Thomas A. Gardner, Yoshitaka Wada, Kenneth S. Koeneman, Akinobu Gotoh, Ling Yang, Chinghai Kao, So Dug Lim, Mahul B. Amin, Hua Yang, Margaret E. Black, Shigeji Matsubara, Masayuki Nakagawa, Jay Y. Gillenwater, Haiyen E. Zhou and Leland W.K. Chung, **“Phase I dose escalation clinical trial of adenovirus vector carrying osteocalcin promoter-driven herpes simplex virus thymidine kinase in localized and metastatic hormone-refractory prostate cancer,”** *Human Gene Therapy*, Vol. 14, No. 3, pp. 227-241, 2003.
- [16] Eliot Marshall, **“Gene therapy death prompts review of adenovirus vector,”** *Science*, Vol. 286, Issue 5448, pp. 2244-2245, 1999.
- [17] Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M, Ashare AB, Lathi K and Isner JM, **“Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia,”** *Circulation*, Vol. 98, No. 25, pp. 2800-2804, 1998.
- [18] Yo-ichi Yamashita, Mitsuo Shimada, Hirofumi Hasegawa, Ryosuke Minagawa, Tatsuya Rikimaru, Takayuki Hamatsu, Shinji Tanaka, Ken Shirabe, Jun-ichi Miyazaki and Keizo Sugimachi, **“Electroporation-mediated interleukin-12 gene therapy for hepatocellular carcinoma in the mice model,”** *Cancer Researc.*, Vol. 61, pp. 1005-1012, 2001.
- [19] B. R. Davis, J. Yannariello-Brown, N. L. Prokopishyn, Z. Luo, M. R. Smith, J. Wang, N. D. V. Carsrud and D. B. Brown, **“Glass needle-mediated microinjection of macromolecules and transgenes into primary human blood stem/progenitor cells,”** *Blood*, Vol. 95, No. 2, pp. 437-444, 2000.
- [20] Rakhmilevich AL, Janssen K, Turner J, Culp J and Yang NS, **“Cytokine gene therapy of cancer using gene gun technology: superior antitumor activity of interleukin-12,”** *Human Gene Therapy*, Vol. 8, No. 11, pp. 1303-1311, 1997.
- [21] Lesoon-Wood LA, Kim WH, Kleinman HK, Weintraub BD and Mixson AJ, **“Systemic gene therapy with p53 reduces growth and metastases of a malignant human breast cancer in nude mice,”** *Human Gene Therapy*, Vol. 6,

No. 4, pp. 395-405, 1995.

- [22] Pengnian Lin, Jake A. Buxton, Ann Acheson, Czeslaw Radziejewski, Peter C. Maisonpierre, George D. Yancopoulos, Keith M. Channon, Laura P. Hale, Mark W. Dewhirst, Samuel E. George and Kevin G. Peters, **“Antiangiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2,”** *Proceedings of the National Academy of Science*, Vol. 95, No. 15, pp. 8829-8834, 1998.
- [23] Hynynen K., **“Review of ultrasound therapy,”** *Ultrasonics Symposium, 1997, Proceedings.*, Vol. 2, pp. 1305-1313, 1997.
- [24] W. J. Fry, J. W. Barnard, F. J. Fry, R. F. Kruminis and J. F. Brennan, **“Ultrasonic lesions in the mammalian central nervous system,”** *Science*, Vol. 122, pp. 517-518, 1955.
- [25] W. J. Fry and F. J. Fry, **“Fundamental neurological research and human neurosurgery using intense ultrasound,”** *IRE Trans. Med. Electron.*, Vol. ME-7, pp. 166-181, 1960.
- [26] G. R. ter Haar, **“Ultrasound focal beam surgery,”** *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol. 21, pp. 1089-1100, 1995.
- [27] Datta NR, Bose AK, Kapoor HK and Gupta S., **“Head and neck cancers: results of thermoradiotherapy versus radiotherapy,”** *Int J Hyperthermia*, Vol. 6, No. 3, pp. 479-486, 1990.
- [28] Overgaard J, Gonzalez Gonzalez D, Hulshof MC, Arcangeli G, Dahl O, Mella O and Bentzen SM., **“Hyperthermia as an adjuvant to radiation therapy of recurrent or metastatic malignant melanoma. A multicentre randomized trial by the European Society for Hyperthermic Oncology,”** *Int J Hyperthermia*, Vol. 12, No. 1, pp. 3-20, 1996.
- [29] G. R. ter Haar, **“High intensity focused ultrasound for the treatment of tumors,”** *Echocardiography*, Vol. 18, pp. 317-322, 2001.
- [30] ter Haar G, Sinnott D and Rivens I., **“High intensity focused ultrasound—a surgical technique for the treatment of discrete liver tumours,”** *Phys Med Biol.*, Vol. 34, No. 11, pp. 1743-1750, 1989.
- [31] Shahram Vaezy, Victor Y. Fujimoto, Cheryl Walker, Roy W. Martin, Emil Y. Chi and Lawrence A. Crum, **“Treatment of uterine fibroid tumors in a nude mouse model using high-intensity focused ultrasound,”** *Am J Obstet Gynecol*, Vol. 183, No. 1, pp. 6-11, 2000.
- [32] Douglas L. Miller and Jianming Song, **“Tumor growth reduction and DNA transfer by cavitation-enhanced high-intensity focused ultrasound *in vivo*,”** *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol. 29, No. 6, pp. 887-893, 2003.
- [33] Chaussy C and Thuroff S, **“Results and side effects of high-intensity focused**

- ultrasound in localized prostate cancer,”** *J Endourol.*, Vol. 15, pp. 437-440, 2001.
- [34] Wu F, Chen WZ, Bai J et al, **“Pathological changes in human malignant carcinoma treated with high-intensity focused ultrasound,”** *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol 27, pp. 1099-1106, 2001.
- [35] S. Vaezy, R. Martin, P. Mourad and L. Crum, **“Hemostasis using high intensity focused ultrasound,”** *European Journal of Ultrasound*, Vol. 9, No. 11, pp. 79-87, 1999.
- [36] S. Vaezy, R. Martin, U. Schmiedl, M. Caps, S. Taylor, K. Beach, S. Carter, P. Kaczkowski, M. Rice, R. Roy and L. Crum, **“Liver hemostasis using high-intensity focused ultrasound,”** *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol. 23, No. 9, pp. 1413-1420, 1997.
- [37] T. G. Leighton, *The acoustic bubble*, London: Academic Press, 1994.
- [38] S. Umemura, K. Kawabata and K. Sasaki, **”Enhancement of sonodynamic tissue damage production by second-harmonic superimposition: theoretical analysis of its mechanism,”** *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelect. Freq. Contr.*, Vol. 43, No. 6, pp. 1054-1062, 1996.
- [39] F. R. Young, *Cavitation*, UK: McGraw-Hill, 1989.
- [40] F. J. Fry, G. Kossoff, R. C. Eggleton and F. Dunn, **“Threshold ultrasound dosages for structural changes in the mammalian brain,”** *J. Acoust. Soc. Am.* Vol. 48, pp. 1413-1417, 1970.
- [41] A. Amararene, J. B. Fowlkes, J. Song and D. L. Miller **“Relationships between scattered signals from ultrasonically activated contrast agents and cell membrane damage *in vitro*,”** *2001 IEEE Ultrasonics Symposium*, pp. 1751-1754.
- [42] T. Feigl, B. Volklein, H. Iro, C. Ell and T. Schneider, **“Biophysical effects of high-energy pulsed ultrasound on human cells,”** *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol. 22, No. 9, pp. 1267-1275, 1996.
- [43] B. C. Tran, J. Seo, J. B. Fowlkes and C. A. Cain, **“Microbubble enhanced threshold reductions for tissue damage using high intensity ultrasound,”** *2001 IEEE Ultrasonics Symposium*, pp. 1389-1392.
- [44] H. Kullervo, **“Review of ultrasound therapy,”** *1997 IEEE Ultrasonics Symposium*, pp. 1305-1313.
- [45] N. I. Vykhodtseva, K. Hynynen and C. Damianou, **“The effect of pulse duration and peak intensity during focused ultrasound surgery: a theoretical and experimental study in rabbit brain *in vivo*,”** *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol. 20, No. 9, pp. 987-1000, 1994.
- [46] F. J. Fry, G. Kossoff, R. C. Eggleton and F. Dunn, **“Threshold ultrasound**



- dosages for structural changes in the mammalian brain,”** *J. Acoust. Soc. Am.*, Vol. 48, No. 6, pp. 1413-1417, 1999.
- [47] F. J. Fry, N. T. Sanghvi, R. S. Foster, R. Bihrlé and C. Hennige, **”Ultrasound and microbubble: their generation detection and potential utilization in tissue and organ therapy- experimental,”** *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol. 21, No. 9, pp. 1227-1237, 1995.
- [48] N. I. Vykhodtseva, K. Hynynen and C. Damianou, **”Histologic effects of high intensity pulsed ultrasound exposure with subharmonic emission in rabbit brain *in vivo*,”** *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol. 21, No. 7, pp. 969-979, 1995.
- [49] Randazzo RF, Chaussy CG, Fuchs GJ et al, **”The *in vitro* and *in vivo* effects of extracorporeal shock waves on malignant cells,”** *Urol Res*, Vol. 16, pp. 419-426, 1988.
- [50] Gamarra F, Spelsberg F, Dellian M and Goetz AE, **”Complete local tumor remission after therapy with extra-corporeally applied high-energy shock waves (HESW),”** *Int J Cancer*, Vol. 55, pp. 153-156, 1993.
- [51] Gamarra F, Spelsberg F, Kuhnle GE and Goetz AE, **”High-energy shock waves induce blood flow reduction in tumors,”** *Cancer Res.*, Vol. 53, pp. 1590-1595, 1993.
- [52] Jianming Song, Darrell Tata, Lang Li, Jeremy Taylor, Shiping Bao and Douglas L. Miller, **”Combined shock-wave and immunogene therapy of mouse melanoma and renal carcinoma tumors,”** *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol. 28, No. 7, pp. 957-964, 2002.
- [53] Gambihler S, Delius M and Ellwart JW, **”Permeabilization of the plasma membrane of L1210 mouse leukemia cells using lithotripter shock waves,”** *J Membrane Biol.*, Vol. 141, pp. 267-275, 1994.
- [54] Sandra Koch, Peter Pohl, Ulrich Cobet and Nikolai G. Rainov, **”Ultrasound enhancement of liposome-mediated cell transfection is caused by cavitation effects,”** *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol. 26, No. 5, pp. 897-903, 2000.
- [55] Greenleaf, William J.; Bolander, Mark E.; Sarkar, Gobinda; Goldring, Mary B and Greenleaf, James F., **”Artificial cavitation nuclei significantly enhance acoustically induced cell transfection,”** *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol. 24, No. 4, pp. 587-595, 1998.
- [56] Claus-Dieter Ohl and Bernhard Wolfrum, **”Detachment and sonoporation of adherent HeLa-cells by shock wave-induced cavitation,”** *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1624, pp. 131-138, 2003.
- [57] Douglas L. Miller and Jianming Song, **”Lithotripter shock waves with cavitation nucleation agents produce tumor growth reduction and gene transfer *in vivo*,”** *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol. 28, No. 10, pp. 1343-1348,

- 2002.
- [58] Wen-Shiang Chen, Thomas J. Matula, Andrew A. Brayman and Lawrence A. Crum, **“A comparison of the fragmentation thresholds and inertial cavitation doses of different ultrasound contrast agents,”** *J. Acoust. Soc. Am.* Vol. 113, No. 1, pp. 643-651, 2003.
- [59] Wen-Shiang Chen, Andrew A. Brayman, Thomas J. Matula and Lawrence A. Crum, **“Inertial cavitation dose and hemolysis produced *in vitro* with or without Optison,”** *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol. 29, No. 5, pp. 725-737, 2003.
- [60] Wen-Shiang Chen, Andrew A. Brayman, Thomas J. Matula, Lawrence A. Crum and Morton W. Miller, **“The pulse length-dependence of inertial cavitation dose and hemolysis,”** *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol. 29, No. 5, pp. 739-748, 2003.
- [61] James E. Chomas, Paul Dayton, John Allen, Karen Morgan and Katherine W. Ferrara, **“Mechanisms of contrast agent destruction,”** *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelect. Freq. Contr.*, Vol. 48, No. 1, pp. 232-248, 2001.
- [62] M.S. Plesset and T.P. Mitchell, **“On the stability of the spherical shape of a vapour cavity in a liquid,”** *Q. Appl. Math.*, Vol 13, No 11, pp. 419-430, 1956.
- [63] Wyber, J. A., Andrews, J. and D’Emanuele, A, **“The use of sonication for the efficient delivery of plasmid DNA into cells,”** *Pharm. Res.* Vol. 14, pp. 750-756, 1997.
- [64] Miller, M. W., Miller, D. L. and Brayman, A. A, **“A review of *in vitro* bioeffects of inertial ultrasonic cavitation from a mechanistic perspective,”** *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol. 22, pp. 1131-1154, 1996.
- [65] Peter Weiss, **“Shrimps spew bubbles as hot as the sun,”** *Science News*, Vol. 160, No. 14, p. 213, 2001.
- [66] Bao, S., Thrall, B. D., Gies, R. A. and Miller, D. L, **“*In vivo* transfection of melanoma cells by lithotripter shock waves,”** *Cancer Res.*, Vol. 58, pp. 219-221, 1998.
- [67] **“Standard for real-time display of thermal and mechanical indices on diagnostic ultrasound equipment 510(k),”** *American Institute of Ultrasound in Medicine*, Laurel, MD 20707.
- [68] **“Revised 510(k) diagnostic ultrasound guidance for 1993,”** *Center for Devices and Radiological Health, Food and Drug Admin., US Depart. Health Human Services*, Rockville, MD, 1993.
- [69] **“Use of mechanical index in place of spatial peak, pulse average intensity in determining substantial equivalence,”** *Center for Devices and Radiological Health, Food and Drug Admin., US Depart. Health Human Services*, Rockville,

MD, 1994.

- [70] W. B. O'Brien, D. G. Simpson, L. A. Frizzell and J. F. Zachary, "**Superthreshold behavior and threshold estimates of ultrasound-induced lung hemorrhage in adult rat: role of beamwidth,**" *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelect. Freq. Contr.*, Vol. 48, No. 6, pp. 1695-1705, 2001.
- [71] J. F. Zachary, J. M. Sempsrott, L. A. Frizzell and W. B. O'Brien, "**Superthreshold behavior and threshold estimation of ultrasound-induced lung hemorrhage in adult mice and rat,**" *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelect. Freq. Contr.*, Vol. 48, No. 2, pp. 581-592, 2001.
- [72] W. B. O'Brien, D. G. Simpson, M. H. Ho, R. J. Miller, L. A. Frizzell and J. F. Zachary, "**Superthreshold behavior and threshold estimation of ultrasound-induced lung hemorrhage in pigs: role of age dependency,**" *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelect. Freq. Contr.*, Vol. 50, No. 2, pp. 153-169, 2003.
- [73] D. Dalecki, C. H. Raeman, S. Z. Child and E. L. Carstensen, "**Intestinal hemorrhage from exposure to pulsed ultrasound,**" *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol. 21, No. 8, pp. 1067-1072, 1995.
- [74] Unger EC *et al.*, "**Gene delivery using ultrasound contrast agents,**" *Echocardiography*, Vol. 18, pp. 355-361, 2001.
- [75] Peter A. Frenkel, Shuyuan Chen, To Thai, Ralph V. Shohet and Paul A. Grayburn, "**DNA-loaded albumin microbubbles enhance ultrasound-mediated transfection in vitro,**" *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol 28, No. 6, pp. 817-822, 2002.
- [76] Volker Oberle, Gary de Jong, Jan I. Drayer and Dick Hoekstra, "**Efficient transfer of chromosome-based DNA constructs into mammalian cells,**" *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1676, pp. 223-230, 2004.
- [77] Wen-Shiang Chen, Xiaochun Lu, Yunbo Liu and Pei Zhonga, "**The effect of surface agitation on ultrasound-mediated gene transfer in vitro,**" *J. Acoust. Soc. Am.*, Vol. 116, No. 4, pp. 2440-2450, 2004.
- [78] Douglas L. Miller, Chunyan Dou and Jianming Song, "**DNA transfer and cell killing in epidermoid cells by diagnostic ultrasound activation of contrast agent gas bodies in vitro,**" *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol. 29, No. 4, pp. 601-607, 2003.
- [79] 賴寬裕, "以穴蝕效應為主之超音波治療, 誘發與偵測," 國立台灣大學電機工程學研究所碩士論文, 民國九十三年.
- [80] Ah Young Kim, Byung Ihn Choi, Tae Kyoung Kim, Kyoung Won Kim, Jae Young Lee and Joon Koo Han, "**Comparison of contrast-enhanced fundamental imaging, second-harmonic imaging, and pulse-inversion harmonic imaging,**" *Investigative Radiology*, Vol. 36, No 10, pp. 582-588,

2001.

- [81] Levovist Data Sheet, Schering AG.
- [82] J. E. Chomas, P. A. Dayton, D. May, J. Allen, A. Klibanov and K. Ferrara, **“Optical observation of contrast agent destruction,”** *Applied Physics Letters*, Vol. 77, No. 7, pp. 1056-1058, 2000.
- [83] Brayman A, Strickler P, Luan H, et al., **“Hemolysis of 40% hematocrit, Albunex-supplemented human erythrocytes by pulsed ultrasound: Frequency, acoustic pressure and pulse length dependence,”** *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol. 23, No. 8, pp. 1237-1250, 1997.
- [84] Kruse, D.E., Chih-Kuang Yeh and Ferrara, K.W., **“A new imaging strategy utilizing wideband transient response of ultrasound contrast agents,”** *2003 IEEE Ultrasonics Symposium*, Vol. 1, pp. 424-428, 2003.
- [85] Angelos G. Rigopoulos, Lothar Faber, Peer Ziemssen, Christodoulos I. Stefanadis, Pavlos K. Toutouzas and Hubert Seggewiss, **“Echocardiography-guided percutaneous septal ablation in patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy: one year follow-up,”** *Hellenic J Cardiol*, 44, pp. 171-179, 2003.
- [86] Michel Versluis, Barbara Schmitz, Anna von der Heydt and Detlef Lohse **“How Snapping Shrimp Snap: Through Cavitating Bubbles.”** *Science*, Vol. 289, pp. 2114-2117, 2000.
- [87] Suhr D, Brummer F and Hulser DF., **“Cavitation-generated free radicals during shock wave exposure: investigations with cell-free solutions and suspended cells,”** *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol. 17, No. 8, pp. 761-768, 1991.
- [88] Riesz P, Berdahl D and Christman CL., **“Free radical generation by ultrasound in aqueous and nonaqueous solutions,”** *Environ Health Perspect.*, Vol. 64, pp. 233-252, 1985.
- [89] Miller, M. W., Miller, D. L. and Brayman, A. A., **“A review of *in vitro* bioeffects of inertial ultrasonic cavitation from a mechanistic perspective,”** *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol. 22, pp. 1131-1154, 1996.
- [90] Wyber, J. A., Andrews, J. and D Emanuele, A., **“The use of sonication for the efficient delivery of plasmid DNA into cells,”** *Pharm. Res.* Vol. 14, pp. 750-756, 1997.
- [91] Apfel RE., **“Sonic effervescence: A tutorial on acoustic cavitation,”** *J. Acoust. Soc. Am.*, Vol. 101, pp. 1227-1237, 1997.
- [92] Allan Lawrie, Axel F. Brisken, Sheila E. Francis, David Wyllie, Endre Kiss-Toth, Eva E. Qwarnstrom, Stephen K. Dower, David C. Crossman and Christopher M. Newman, **“Ultrasound-enhanced transgene expression in vascular cells is not**

- dependent upon cavitation-induced free radicals,”** *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol. 29, No. 10, pp. 1453-1461, 2003.
- [93] Olsson B., **“Determination of hydrogen peroxide in a flow system with microperoxidase as a catalyst for the luminol chemi-luminescence reaction,”** *Anal Chim Acta*, Vol. 136, pp. 113-119, 1982.
- [94] Cramer E and Lauterborn W, **“Acoustic cavitation noise spectra,”** *Appl Sci Res*, Vol. 38, pp. 209-214, 1982.
- [95] Everbach EC, Makin IR, Azadniv M, Meltzer RS, **“Correlation of ultrasound-induced hemolysis with cavitation detector output *in vitro*,”** *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol. 23, No. 4, pp. 619-624, 1997.
- [96] Lauterborn W and Cramer E, **“On the dynamics of acoustic cavitation noise spectra,”** *Acustica*, Vol. 49, pp. 280-287, 1981.
- [97] 物質安全資料表, Material Safety Data Sheets, <http://www.iosh.gov.tw/msds.htm>
- [98] Tieli Li, Katsuro Tachibana, Motomu Kuroki and Masahide Kuroki, **“Gene Transfer with Echo-enhanced Contrast Agents: Comparison between Albunex, Optison, and Levovist in Mice—Initial Results,”** *Radiology*, Vol. 229, p. 423, 2003.
- [99] Shin-ichiro Umemura, Ken-ichi Kawabata and Kazuaki Sasaki, **“*In vitro* and *in vivo* enhancement of sonodynamically active cavitation by second-harmonic superimposition,”** *J. Acoust. Soc. Am.*, Vol. 101, No. 1, pp. 569-577, 1997.
- [100] Ken-ichi Kawabata and Shin-ichiro Umemura, **“Effect of periodic phase shift on acoustic cavitation induction with second-harmonic superimposition,”** *Japanese Journal of Applied Physics*, Vol. 42, No. 5B, pp. 3246-3250, 2003.