

乳癌細胞(MCF-7)於低溫冷凍存活率實驗之探討

*許藝菊¹、林彥廷²

南台科技大學機械工程學系

*¹ yichu@mail.stut.edu.tw, ² johydy@yahoo.com.tw

摘要

對於現今之冷凍治療大多是利用超低溫急速冷凍，使癌細胞凋亡或是壞死；而本實驗研究以非超低溫冷凍方法對乳癌細胞進行冷凍探討，並發現抑制癌細胞之存活率關鍵因素在於結凍，使其開始凋亡(apoptosis)或是壞死(necrosis)以有效抑制乳癌細胞。實驗數據發現，溫度越低，存活率相對降低；冷凍時間延長，則乳癌細胞存活率亦相對降低。以-30 °C、10 分鐘冷凍實驗，直接量測的存活率與放置三天的存活率相比較，無明顯之恢復情形。由於抑癌藥物具有強烈之副作用，例如：心悸、嘔吐、噁心等，為了降低藥物所帶來之副作用，故進一步將冷凍與抑癌藥物結合以降低用藥劑量，進而達到相同之抗癌效果。冷凍治療對於健康細胞組織會有周圍區域性之凍傷、血管淤塞造成組織壞死之可能性，本研究採用非超低溫冷凍，主要使健康細胞組織之傷害(如凍傷、壞死等)減至最小；以低溫下使乳癌細胞於冷凍手術中有效結凍所造成之影響及冷凍與藥物對癌細胞抑制之相關分析。

關鍵詞：冷凍治療、熱電致冷晶片、乳癌細胞、抗癌藥物

Investigation of survival rate of breast cancer cell (MCF-7) in the low temperature freezing

*Yi-Chu Hsu, Yan-Tin Lin

Department of Mechanical Engineering, Southern Taiwan University

Abstract

The cryosurgery treatment methods mostly use ultra-low temperature to rapidly freeze the treated cells to make the cancer cell apoptosis or necrosis. This experimental study carried on the freezing discussion by the non-ultralow temperature freezing method to the breast cancer cell, and discovered that suppressing the breast cancer survival percentage of the main factor is freezing to make it to start perishing apoptosis or necrosis by suppressing the breast cancer cell effectively. The data pointed out that the temperate is lower, and the survival percentage of breast cancer cell is lower; and furthermore the freezing times are longer, and the survival percentage is also lower. Under the -30 °C, 10 minutes freezing experiment, we compared with the direct and after three days survival percentage of breast cancer cell are not obvious restoration situation. The anticancer treatment medicine (doxorubicin) had intense side effect, such as palpitation, vomit, disgusting and so on. To combine freezing and medicine to reduce freezing time and medication dosage in order to reduce side effect of the medicine and hope to decrease medication dosage, then achieve the same effect of suppressing cancer cell. Using the ultra-low temperature cryotherapy method will damage, frostbite and necrosis the surrounding healthy cells and tissues. It is evident that non-ultra-low temperature freezing method could reduce the injury (i.e. frostbite, necrosis etc.) of the surrounding healthy cells and tissues. This research aims at the breast cancer cell under low temperate made the influence of freezes effectively in cryosurgery ,and the freezing and medicine suppress the cancer cell analysis of correlation.

Keywords: Cryosurgery, Thermoelectric Chip, Breast Cancer Cell, Anticancer Treatment Medicine(DOX)



壹、前言

冷凍療法(cryotherapy)，是一種應用冷凍之方法來消除組織患部之外科技術。其歷史從古埃及人利用冰塊以減輕傷口的疼痛與腫脹(西元前 2500 年)；英國人阿諾(James Arnold)利用冰和氯化鈉將溫度下降到攝氏零下 18~24 度以治療神經痛及癌腫瘤。而後在 1901 年懷特(Campbell White)改用液態氮治療口腔癌與皮膚癌；1930 年第一根冷凍探針問世，治療皮膚及婦科癌症；1961 年庫柏(I. Cooper)發展以氮為基礎的冷凍系統，並在 1963 年應用於治療癌症病患；1985 年歐尼克(Gary Onik)運用超音波診斷，更易於顯示身體內部結構，同時便於探針定位及進行監測，可達到更有效的定點治療。90 年代之後，冷凍療法逐漸為醫學界採用[1-9]，各種不同新設備與研究結果也開始慢慢的萌芽，為人類的健康奠定了一個新的里程碑。

參考相關文獻[1-9]，冷凍治療利用冷凍技術造成細胞的損壞，致細胞於死地，而達成醫療上的目的。而冷凍致死機制的關鍵因子包括：使細胞脫水、蛋白質變性、快速冷凍的溫度衝擊、冰的結晶造成細胞膜破裂、緩慢解凍使得電解質分配不均、回溫過程的低滲透壓環境、細胞缺氧及血流停滯等。一般而言，在癌細胞致死的溫度下，進行多次循環的冷凍及解凍程序可以達到最大療效，這種治療不會造成立即性的大出血或器官的崩壞，是其最被稱許的特點[1]。

本研究目的在探討乳癌細胞於低溫下冷凍手術之基礎分析及冷凍與抗癌藥物結合對乳癌細胞效應之探討，冷凍不僅可如同手術一樣，亦可激發機體免疫功能，消除腫瘤本身且具有手術不具備的免疫促進作用，並增加傷口之復元速度；除此之外，與醫界之抗癌藥物艾黴素(DOX-Doxorubicin)結合治療以更促進療效，提高癌症患者之存活率。

貳、實驗設備流程與實驗步驟

在本實驗主要應用低溫冷凍對乳癌細胞(MCF-7)所造成的影響之基礎分析，以及將低溫冷凍與抗癌藥物(Doxorubicin)結合，對乳癌細胞存活率變化之探討，並做比較。

一、細胞培養

本研究使用低溫冷凍下對癌細胞存活率之探討，而實驗中所使用之癌細胞則為人類乳腺癌細胞(MCF-7)，所使用之培養液為 90 % MEM (Modified Eagle Medium) +10 % 胎牛血清(FBS)，並添加 1.0 mM sodium pyruvate + 10 mM Insulin。MEM 中含有許多胺基酸、鹽類、維生素等物質。其中還添加酸鹼指示劑(酚紅)，可以顯示酸鹼度。將 MCF-7 細胞株放置於 5%CO₂、37°C 培養箱中培養 24 小時。

(一) 解凍細胞：

1. 將細胞於-196 °C 液態氮中取出，置於 37°C 水浴槽回溫，待細胞懸浮液呈現半解凍狀態。
2. 將細胞至於 25T (flask area) 培養皿中培養。
3. 將此培養皿放入 37°C + 5% CO₂ 培養箱中進行培養，持續培養 5 ~ 7 天便可將細胞繼代培養(passage) 以進行之後的實驗。

(二) 細胞繼代培養：

1. 去除舊的培養液。
2. 加入 PBS 清洗細胞。
3. 去除 PBS，並加入 trypsin-EDTA 溶液，使細胞不再附著於培養皿上，再加入新的培養液中和，以停止 trypsin 的作用。
4. 留下適量的細胞培養液，再補足 flask 所需要的培養液。



5. 置入 37°C + 5% CO₂ 培養箱中培養。

(三) 細胞計數、種 96-well plate :

1. 去除舊的培養液。
2. 加入 PBS 清洗細胞。
3. 去除 PBS，並加入 trypsin-EDTA 溶液，使細胞懸浮。
4. 離心並去除上清液，加入新的培養液中和，以停止 trypsin 的作用。
5. 取 10 μL 細胞懸浮液與 10μL trypan blue 充分混和。
6. 以血球計數器(hemocytometer)於顯微鏡下計數細胞數後，計算出細胞濃度。
7. 最後以 5000 顆/well，種入 96-well plate。
8. 放入 37°C + 5% CO₂ 培養箱中培養。

二、細胞冷凍實驗架構

本研究所使用之儀器設備及材料包括：1.恒溫水槽(Refrigerater Thermostats, AR-15S)、2.水冷散熱(銅塊)器(Thermaltake,CL-W0082)、3.熱電致冷晶片(Thermoelectric Chip,TEC-12706)、4.電源供應器(GWINSTEK GPR-3510HD)、5.數位式溫度計(TES-1310)與 6.乳癌細胞(MCF-7)，下圖 1 為實驗架設示意圖。本實驗主要流程從乳癌細胞的培養，再進行低溫冷凍及低溫冷凍結合抗癌藥物，實驗完成後，將 96 孔盤置於培養箱中使其解凍，再進行細胞存活率測試。

三、熱傳導方式

本實驗發現結凍為主要抑制癌細胞存活率之關鍵，為使孔洞結凍，低溫是一個重要的因子，故考慮致冷晶片的散熱方式，及結晶核的影響。

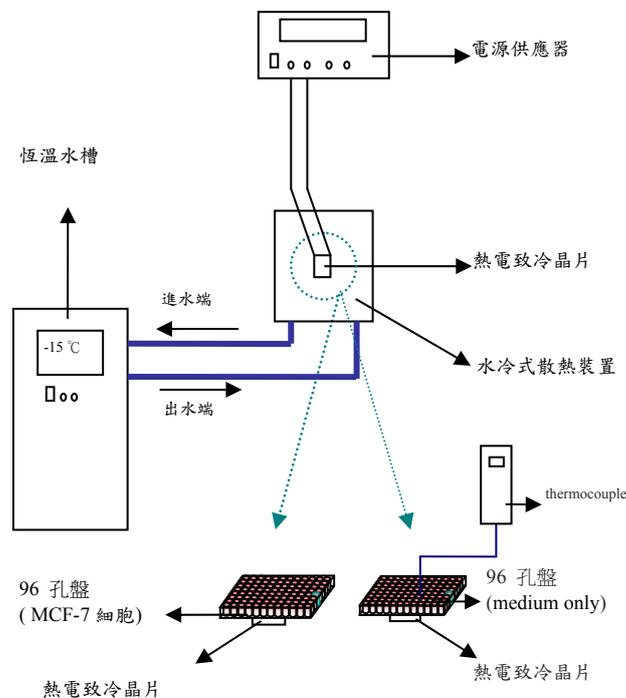


圖 1. 實驗架設示意圖



(一)散熱方式

本實驗主要使用元件為熱電致冷晶片作為冷凍實驗的致冷源，熱電致冷晶片的致冷力除了取決於電流大小之外，其散熱方式也會影響冷面的致冷力。由於熱電致冷晶片所產生之熱量，電流越大，其溫差也就越大，故當熱面無較好的散熱方式時，可能導致冷面溫度不夠低，甚至造成回溫之現象。

實驗初期，採用散熱鰭片搭配風扇作為熱電致冷晶片散熱系統，但由於風扇帶走之熱量有限，冷卻效果不甚理想；而在實驗間，也嘗試將風扇之散熱裝置置於冷藏環境中，試著使熱電致冷晶片冷面溫度降至更低，由於散熱系統熱管散熱面積有限，導致無法適時的帶走熱量，故效果亦不佳。使用一段時間過後，風扇所帶走的熱量不足以帶走致冷晶片所產生的熱量而產生回溫的現象，故在進行乳癌細胞冷凍實驗時，無法達到抑制癌細胞的目的；而後改採用水冷式散熱銅塊搭配水浴循環機來幫助散熱，因而達到我們所要求之低溫，且使用水冷式散熱，使致冷晶片冷面溫度更穩定，不至於產生回溫的現象。

本實驗溫度於零下 30 °C，為了使熱電致冷晶片達到良好之效能，本實驗採用水冷式散熱銅塊降低熱電致冷晶片熱面溫度，並於熱電致冷晶片與散熱銅塊間以散熱膏填補，以減少空隙來達到散熱效果，並將水冷式散熱器連接至恆溫水槽，利用水浴循環來幫助散熱；將電源供應器連接至熱電致冷晶片，提供適當之電流，以達到實驗所需溫度。

當實驗進行時，透過電源供應器輸入熱電致冷晶片電流，一般設定熱電致冷晶片作用最有效之工作電流為最大電流之 75 % ~ 80 %；於室溫 26 °C 下使用數位式溫度計(熱電偶)量測熱電致冷晶片之溫度，其所能達到之最低溫度約 -40.5 °C (± 0.5 °C)；在量測空的 96 孔盤底部的溫度時，由於致冷晶片冷面處於零下溫度，與空氣接觸後不久，周圍水汽遇冷形成冰晶付在晶片上，而使得表面產生霜，使得量測溫度變為 0 °C，故量測空的 96 孔盤底部之溫度時，在熱電致冷晶片冷面塗上散熱膏，利用散熱膏填補 96 孔盤底部與熱電致冷晶片冷面間之空隙，使其緊密貼附於熱電致冷晶片上，避免周遭水氣的影響，並增加冷面能量之傳遞；量測空的 96 孔盤底部之溫度約 10 分鐘，所能達到溫度約為 -33 °C (± 0.5 °C)，下圖 2 為空的 96 孔盤底部溫度曲線圖。

藉由量測 96 孔盤底部溫度，可以了解乳癌細胞(MCF-7)於冷凍實驗下所作用之溫度。並將 96 孔盤培養好之乳癌細胞分成四小區塊(左上、右上、左下及右下)分別置於熱電致冷晶片上進行實驗(圖 3)，並分別施行冷凍時間為 2.5 分鐘、5 分鐘、7.5 分鐘及 10 分鐘，並紀錄其產生之變化。圖 3 為 96 孔盤五個區塊示意圖，左邊的區塊為未進行冷凍實驗的部份，作為整體實驗的對照組；而右側四個區塊分別施以冷凍進行實驗；實驗完成後，經細胞存活率測定之吸光值，最外圍部份的數值則不採用。

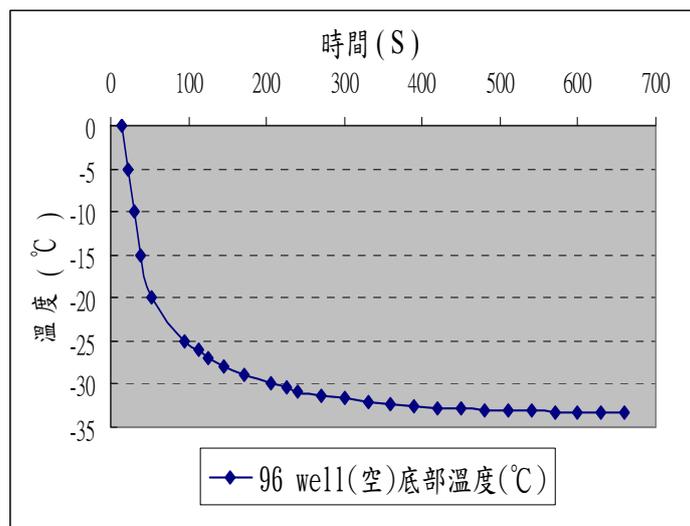


圖 2. 96 孔盤(medium only)底部溫度曲線圖



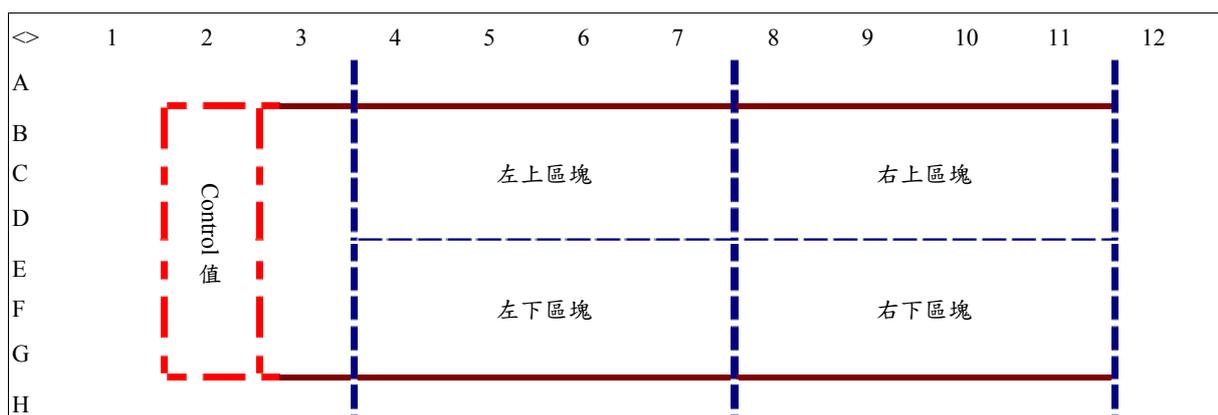


圖 3. 96 孔盤冷凍與未冷凍區塊對照示意圖

(二)溫度量測

本實驗以 40 mm × 40 mm × 4.0 mm 單層熱電致冷晶片作為致冷源，而溫度是本實驗重要的關鍵，最初以熱像儀量測冷面各處的平均值，致冷晶片冷面中間之溫度值最低，而四個角落之溫度較高於中間溫度 0.5 °C 左右，雖然使用熱像儀能清楚的量測溫度值，但由於熱像儀所能測得的溫度僅 -15 °C，由於實驗所用的溫度低於 -15 °C 而無法以熱像儀測得，故採用熱電偶來量測 96 孔盤中心的底部溫度；但以探針量測亦有其缺點，會受到週遭環境影響而使得量測上造成誤差，與熱像儀所量測溫度相比，越低溫下，其誤差也相對增加；於 0 °C 與 -5 °C，其誤差為 0.5 °C 左右，而於 -10 °C 與 -15 °C 下，其誤差為 1 °C ~ 1.5 °C 左右，故以熱電偶量測溫度是有其誤差性，所以對於溫度量測時以泡棉隔絕外部影響，儘量減少溫度量測上的誤差。

(三)傳熱方式

由實驗中已發現，對於抑制乳癌細胞存活率關鍵在於使癌細胞結凍，實驗初期除考慮散熱方式外，對於部分孔洞產生結凍而部分卻未受影響，但由於結凍為主要因素，所以找尋相關文獻[10-12]及其他相關資料，如何幫助結凍及其相關機制，對於結凍主要發生相關條件，除了溫度夠低外，還需要飽和之濕度、溶質之影響及結晶核之產生等因素；為了達到實驗中之每個區塊的孔洞皆發生結凍，找尋不同材料置入 96 孔盤中作為結晶核來進行試驗，例如：銅、不鏽鋼、碳鋼、聚苯乙烯(polystyrene, PS)等，雖然聚苯乙烯不會對細胞造成影響，但其粒徑很小，對結凍影響不大；而銅、不鏽鋼和碳鋼採用 0.8 mm ~ 1.0 mm 之粒徑，雖然對孔洞能夠有效的產生結凍並簡短其結凍的時間(約 6 ~ 8 分鐘)，但相對的，這三種材料經過細胞存活率測定之後，發現其對生物體是有害的，因此對於置入一些相容性材料不採用。

參、結果與討論

本研究主要使用熱電致冷晶片作為致冷源，實驗溫度於零下，使用非超低溫對乳癌細胞進行冷凍實驗分析，其目的在於不使用超低溫冷凍(如液態氮等)對癌細胞之破壞及抑制。

一、乳癌細胞冷凍實驗

對於使用水冷式散熱方式，一開始使用恆溫水槽(4°C)作為致冷晶片散熱方式，且經過量測 96 孔盤底部溫度，溫度較穩定，且不會產生回溫的問題，以此條件下進行乳癌細胞冷凍實驗，再經由 MTT assay 四小時作用後，發現某些孔洞的數值較低，而這些較低數值的孔洞是由於結凍所造成的，發生結凍之乳癌細胞存活率僅存 15% ~ 30%，經過多次實驗發現，96 孔盤中發生結凍是主要抑制乳癌細胞存活率之關鍵因素。表 1 則為以 4°C 的恆溫水槽作為致冷晶片散熱系統所得的數據。



表 1. 未冷凍與冷凍後乳癌細胞之吸光值(4°C 恆溫水槽)

◇	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.1229	1.6432	1.6138	1.7357	1.175	1.855	1.5555	1.3694	1.275	0.8066	1.3855	1.8315
B	1.3934	1.3612	1.402	1.5429	1.4162	1.2553	1.4339	1.0777	1.1615	1.2265	1.1569	2.2808
C	1.61	1.1629	1.3011	1.322	1.3797	1.3449	1.5217	1.7439	1.2556	0.94	1.3418	2.2604
D	1.7577	1.0248	1.3933	1.405	1.4444	1.4611	1.5959	0.9143	1.3123	1.4509	1.3979	2.1643
E	1.5865	1.1616	0.9809	0.6683	1.3466	1.4459	1.688	0.4863	1.3907	0.4571	0.4082	1.8313
F	1.6769	1.2928	1.1175	1.3622	1.2425	1.2008	1.5238	1.2174	0.5415	0.4256	1.637	1.6476
G	1.6197	1.5777	1.3678	0.4215	1.2917	1.2291	1.2651	1.1857	0.5892	1.2509	1.6303	1.9132
H	2.2014	1.323	1.8074	1.3277	1.3661	1.4563	1.6372	1.4095	1.4068	1.6638	1.4599	1.8748

為使每個孔洞皆能達成結凍，而考慮使恆溫水槽降至-15°C 並搭配散熱銅塊，使致冷晶片的散熱效果更好，並能使得 96 孔盤 底部溫度達到-30°C 以下，且使得溫度更趨於穩定。從實驗數據(表 2)中可以看出於-30°C 溫度對乳癌細胞施以冷凍 10 分鐘，於冷凍實驗結束後，再經由 MTT assay 四小時作用後的結果；左側的部份作為整體實驗之 control 值。

從實驗中發現，結凍為抑制乳癌細胞的關鍵因素；對於乳癌細胞經於-30°C、10 分鐘冷凍實驗後，結凍孔洞的數值明顯的降低，存活率僅存 15% ~ 30%左右。除此之外，本研究對癌細胞的復發情況做更進一步的實驗，圖 4 則為乳癌細胞進行冷凍實驗後，直接進行細胞存活率量測與冷凍實驗後置入 37°C 培養箱放置三天，再進行細胞存活率量測的數據比較圖。

表 2. 未冷凍與冷凍後乳癌細胞之吸光值(-15°C 恆溫水槽)

◇	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.7545	1.1081	1.1799	0.1996	0.223	0.2129	0.2082	0.182	0.1569	0.1311	0.1351	0.7488
B	0.772	0.9154	0.8246	0.1819	0.1932	0.1859	0.1742	0.1539	0.1703	0.1107	0.1185	0.6404
C	0.8521	0.9552	1.1333	0.2014	0.1906	0.1709	0.1728	0.1507	0.161	0.1133	0.1129	0.5895
D	0.0173	1.0448	1.0476	0.1956	0.1836	0.1591	0.1502	0.1708	0.1781	0.1093	0.138	0.7339
E	0.9666	0.9763	1.2281	0.1635	0.1595	0.154	0.1248	0.1403	0.1505	0.1055	0.1278	0.6124
F	0.9302	1.0133	1.1964	0.1681	0.1583	0.1526	0.1426	0.1523	0.1115	0.1069	0.1319	0.6518
G	0.9716	0.9528	0.9419	0.1724	0.1515	0.1597	0.1387	0.1496	0.1315	0.1085	0.1168	0.6976
H	0.7598	0.7536	0.9957	0.1405	0.2052	0.1646	0.1686	0.1783	0.1327	0.1386	0.1221	0.617

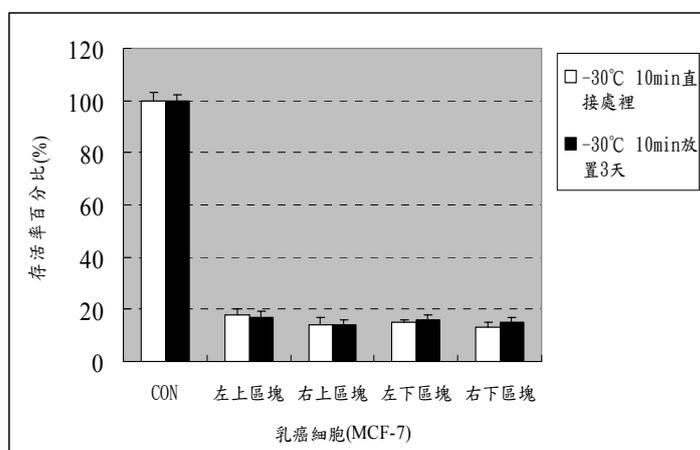


圖 4. 乳癌細胞於-30°C、10 分鐘直接處理與放置三天後存活率數據比較圖



圖 4 對於乳癌細胞於冷凍實驗後，受到結凍之影響而有效抑制癌細胞存活，並且對於乳癌細胞經過冷凍實驗放置三天後之細胞恢復情形進行測試，經過多次實驗後，可以發現乳癌細胞之存活率無明顯之恢復情況，由此可以推測的可能原因是結凍所造成的影響。

進一步經由控制熱電致冷晶片之電流大小，將乳癌細胞於-30°C、-25°C、-20°C、-15°C 及-10°C 五種溫度條件下進行冷凍實驗，分別於 96 孔盤四個區塊(左上、右上、左下及右下)各進行 2.5 分鐘、5 分鐘、7.5 分鐘及 10 分鐘的冷凍實驗，並於細胞存活率測定後，所得之數據加以比較，各組實驗條件皆進行 10 次實驗並經統計後所呈現之數據，圖 5 為乳癌細胞(MCF-7)於不同條件溫度下之冷凍數據圖。由圖中的實驗數據發現，除了結凍能有效的抑制乳癌細胞，並且對於所使用的溫度越低，對於乳癌細胞的存活率相對降低；而將冷凍時間延長，則乳癌細胞存活率亦相對降低。由於不同冷凍條件下，96 孔盤之結凍個數不均勻而導致各區塊變異數過大，例如：以-30°C 而言，雖然溫度較低，但冷凍時間於 2.5 分鐘時，96 孔盤並非全面結凍，雖然平均存活率相對降低，但由於結凍不平均，故造成變異數過大；而對於冷凍時間 10 分鐘區塊而言，其整體區塊皆結凍，故其變異數相對較小。故溫度越低，對抑制癌細胞效果越好；冷凍時間延長，抑制癌細胞之效果也相對較好。

二、冷凍實驗與藥物結合

Doxorubicin(DOX)為目前常使用的抗癌藥物，主要作用機制是透過共價結合插入(intercalate)DNA 和烷化(alkylate)DNA 造成 DNA 交互鍵結而抑制 DNA 的合成。並且抑制拓樸異構酶(topoisomerases)，它可以干擾 DNA 雙股的分離和螺旋的活性，導致自由基的形成和脂質的過氧化反應，藉由這些作用來毒殺細胞。

雖然 DOX 對癌症有良好的療效，但卻會帶來嚴重的副作用，例如：嘔吐、噁心、黏膜組織發炎和脫髮等副作用外，由於心肌對氫氧自由基的傷害特別敏感，使 Doxorubicin 容易對心臟產生累積性的傷害，通常是不可逆的反應，且死亡率亦會增加，這些副作用將帶給癌症患者莫大的傷害，嚴重者則會發生心臟衰竭而死亡，因而限制了 Doxorubicin 的多次使用。而一般常使用的劑量，從 20 nM ~ 100 nM，而劑量愈重，其副作用也愈大。

從文獻中參考若將冷凍治療與藥物治療結合，更可以促進療效，提高癌症病患的存活率。因此本研究更進一步對於利用冷凍治療結合抗癌藥物，使癌細胞受到冷凍傷害其機制並誘導藥物作用以抑制癌細胞使其凋亡；而考慮到一般癌症的藥物治療會對換者造成莫大的傷害，所以選擇低劑量 20 nM(可有效抑制癌細胞 15% 的存活率)結合冷凍治療以抑制癌細胞的存活率。對於結合低溫冷凍與抗癌藥物對乳癌細胞存活率之變化，由於使用熱電致冷晶片做為冷凍的致冷源，而無法有效精準的控制各區塊孔洞的結凍數量，由於結凍數量的多寡，也會影響乳癌細胞存活率之平均值，故對於乳癌細胞應用低溫冷凍與藥物結合之實驗所結凍孔洞的個數比照先前乳癌細胞各區塊只施以冷凍實驗之個數所作之數據圖，而以此數據圖與乳癌細胞(MCF-7)只單獨施以不同溫度條件下的低溫冷凍實驗數據圖相比較，圖六為低溫冷凍與低溫冷凍+DOX 的數據比較圖，表 3 則為乳癌細胞於低溫冷凍與低溫冷凍結合抗癌藥物數值比較。

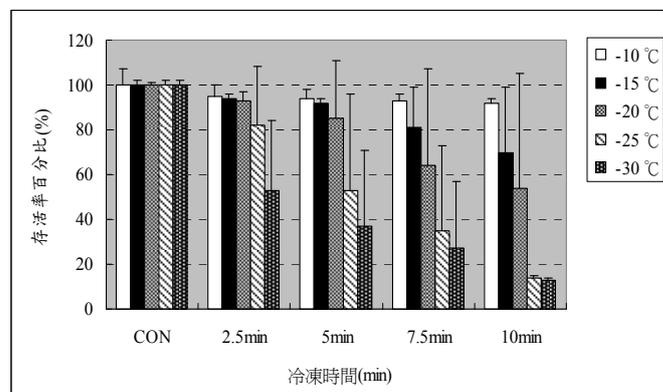


圖 5. 乳癌細胞(MCF-7)於不同條件溫度下之冷凍數據圖



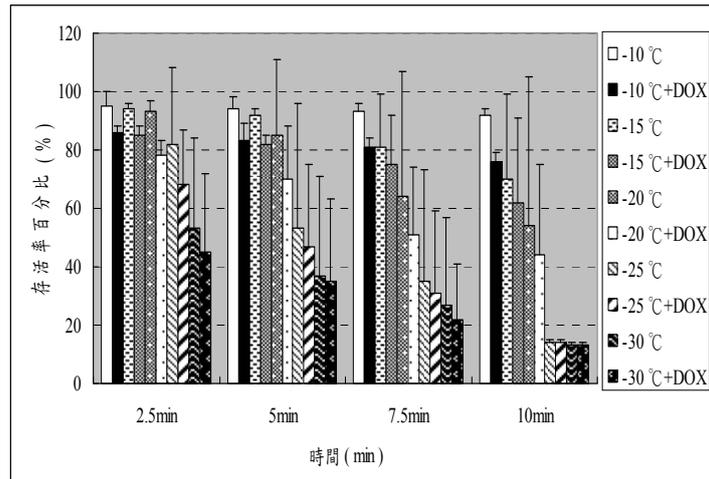


圖 6. 乳癌細胞(MCF-7)低溫冷凍與低溫冷凍+DOX 數據比較圖

由圖 6 中可以看出，對於乳癌細胞於不同溫度條件下使用低溫冷凍結合藥物的存活率，比單獨使用冷凍條件以抑制乳癌細胞存活率有良好的效果。並從圖 6 及表 3 之數值可以看出，乳癌細胞於不同溫度條件(-30 °C、-25 °C、-20 °C、-15 °C 及 -10 °C)下，對於冷凍時間 2.5 分鐘、5 分鐘及 7.5 分鐘的區塊，以低溫冷凍結合抗癌藥物所得的存活率數值皆比單獨施以低溫冷凍所得的存活率數值低，以-20 °C 而言，於冷凍時間 2.5 分鐘、5 分鐘及 7.5 分鐘的存活率百分比數值為 93 %、85 %及 64 %，而-20 °C+DOX 存活率百分比數值為 78 %、70 %及 51 %，對於其他溫度所呈現之數值而言，低溫冷凍與抗癌藥物結合皆有呈現出這樣的趨勢。

而對於乳癌細胞於-30 °C 及-25 °C，冷凍時間 10 分鐘的區塊而言，此區塊的孔洞皆產生結凍，故其存活率的數值相對較低，故再添加 DOX 所得到的存活率，與未添加抗癌藥物的存活率數值相當，其存活率百分比皆分別為 13 %及 14 %，可能是由於結凍的效果已經有效的破壞癌細胞之機制，且使用 20 nM 的 DOX 所能抑制癌細胞存活率 15 %，故 DOX 的作用並不明顯；並且以冷凍實驗與不同濃度之抗癌藥物對乳癌細胞存活率之數值做比較，我們可以發現冷凍治療有相對較好的結果。

找尋與本研究相關文獻並比較，較少有與本研究相關所呈現之數據文獻，目前僅 John G. Baust 團隊所發表的文獻[7]與本研究有相關探討。圖 7 為 John G. Baust 團隊以 PC-3、Caco-2 及 HT-29 此三種癌細胞

表 3. 乳癌細胞於冷凍與冷凍+DOX 存活率百分比(%)數值

	2.5 分鐘	5 分鐘	7.5 分鐘	10 分鐘
-10 °C	95 %	94 %	93 %	92 %
-10 °C + DOX	86 %	83 %	81 %	78 %
-15 °C	94 %	92 %	81 %	70 %
-15 °C + DOX	85 %	82 %	75 %	62 %
-20 °C	93 %	85 %	64 %	54 %
-20 °C + DOX	78 %	70 %	51 %	44 %
-25 °C	82 %	53 %	35 %	14 %
-25 °C + DOX	68 %	47 %	31 %	14 %
-30 °C	53 %	37 %	27 %	13 %
-30 °C + DOX	45 %	35 %	22 %	13 %



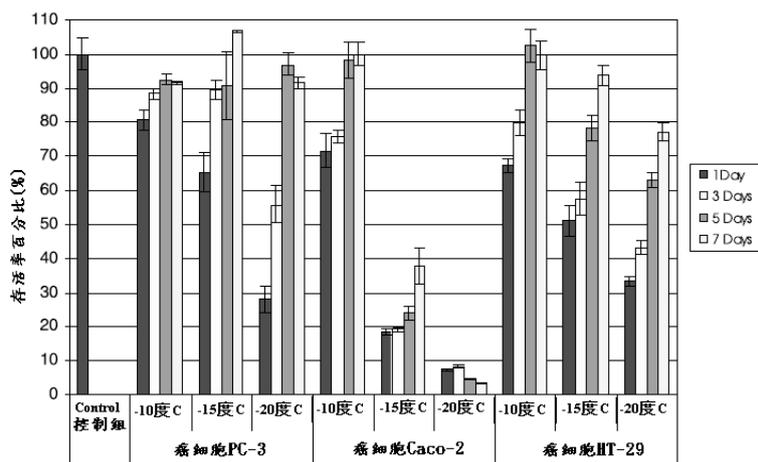


圖 7. 以 PC-3、Caco-2 及 HT-29 於不同溫度條件下的存活率數據圖

於不同溫度下所做的存活率數據圖，而本實驗所使用的癌細胞為 MCF-7，與此篇文獻比較，其冷凍時間為 20 分鐘，細胞於不同溫度下所做的存活率數據圖，而本實驗所使用的癌細胞為 MCF-7，與此篇文獻比較，其冷凍時間為 20 分鐘，本實驗冷凍時間為 10 分鐘；由圖 7 與表 3 比較，以 -15 °C 而言，本研究 MCF-7 之存活率為 70%，而 PC-3、Caco-2 及 HT-29 存活率分別為 64%、18%及 52%，由此可看出，對於使用不同癌細胞，其對冷凍之敏感性也不同。

進一步比較利用低溫冷凍結合抗癌藥物對癌細胞之影響，本研究主要使用之抗癌藥物為 DOX，而 John G. Baust 團隊所使用的抗癌藥物主要有 5-FU(flourouracil)、Cisplatin(順鉑—順—雙氨雙氮鉑)及 Folinic Acid(亞葉酸)，下圖 8 及圖 9 為 PC-3、Caco-2 及 HT-29 分別以冷凍(-15 °C)結合抗癌藥物後的存活率數據圖，以 PC-3 而言，以 -15 °C 結合 5-FU、Cisplatin 及 Folinic Acid 所得的存活率分別為 36 %、22 %及 58 %，故以相同癌細胞而言，冷凍條件相同，對於不同藥物之影響，其對藥物的敏感性亦不同；以本研究(表 3)與其相比較，於 -15 °C 條件下，本研究結合 20 nM 的 DOX 所得 MCF-7 之存活率為 62 %，而 John G. Baust 團隊結合 25 μM 的 Cisplatin 所得 PC-3、Caco-2 及 HT-29 存活率分別為 22%、16%及 35%。

雖然本研究以低溫冷凍結合抗癌藥物所得之結果與文獻相比並未有較好之結果，但由文獻中比較發現，對於不同癌細胞其對冷凍條件之敏感性不同，並且結合不同抗癌藥物其敏感性也不同，並證實以冷凍結合抗癌藥物以抑制癌細胞存活率是可行的。而對於文獻中，並無指出其實驗結果是否發生結凍，並提出結凍對癌細胞所造成之影響，而本研究發現結凍為主要抑制癌細胞存活率之關鍵因素，使其結凍破壞癌細胞之機制以達到抑制癌細胞的效果。

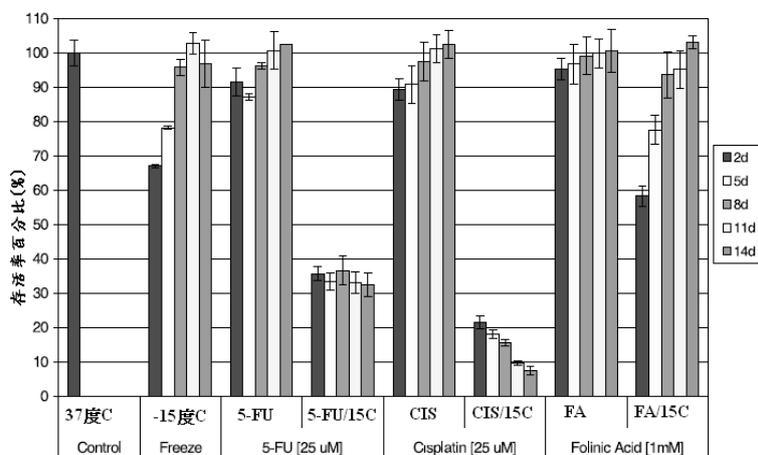


圖 8. PC-3 冷凍(-15 °C)結合抗癌藥物(5-FU、Cisplatin 及 Folinic Acid)之存活率數據圖



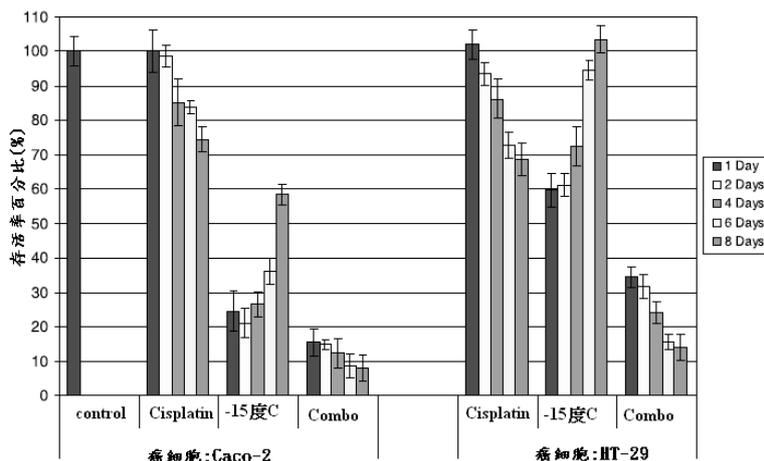


圖 9. Caco-2 及 HT-29 冷凍(-15 °C)結合抗癌藥物(Cisplatin)之存活率數據圖

肆、結論

本研究主要對於低溫冷凍結合抗癌藥物對乳癌細胞存活率之研究探討。對於一般冷凍手術均使用超低溫冷凍來進行手術，由於施行冷凍治療時間於 15 ~ 20 分鐘左右，而冷凍手術之整體療程時間約 1 小時左右，考慮冷凍手術的超低溫會對患者造成之影響，例如：患者健康之細胞組織造成區域性局部凍傷、血管淤塞造成組織壞死等影響，故研究如何於非超低溫或低溫(-30 °C ~ -25 °C)下進行多次冷凍解凍實驗以抑制癌細胞之生長，主要在於減少傷害健康之細胞組織，降低患者凍傷之可能性，並且節省消耗之能量。除此之外，將乳癌細胞採低溫冷凍並進一步與抗癌藥物結合，縮短冷凍時間，並且有效抑制癌細胞，達到提高癌症病患之存活率。

對於本研究以抑制乳癌細胞存活率之實驗，從最初低溫冷凍實驗至最後冷凍與抗癌藥物結合實驗中，可以獲得以下幾點結論：

1. 由實驗初步發現，對於結凍的乳癌細胞經過細胞存活率測定(MTT assay)後之數值相對較低，與 control 值相比，其存活率僅存 15% ~ 30%，因此結凍是主要造成抑制癌細胞生長之關鍵因素。
2. 乳癌細胞於不同溫度條件下(-30°C、-25°C、-20°C、-15°C 及-10°C)於各區塊分別施以不同時間(2.5 分鐘、5 分鐘、7.5 分鐘及 10 分鐘)，使用的溫度越低，對於乳癌細胞的存活率相對降低；而將冷凍時間延長，則乳癌細胞存活率亦相對降低。
3. 一般冷凍療法主要應用超低溫冷凍，由於溫度極低，能有效抑制癌細胞，但也相對傷害健康組織細胞；本研究經由多次實驗結果發現，以乳癌細胞而言，建議於-30°C、10 分鐘之冷凍，能使乳癌細胞均勻結凍以抑制乳癌細胞存活率；並由文獻比較，對於不同癌細胞，其對冷凍的敏感性也不同。
4. 乳癌細胞於-30°C、10 分鐘冷凍實驗後，結凍能有效抑制癌細胞，使癌細胞凋亡，並且比較乳癌細胞於冷凍實驗後並放置三天之復發情形，發現乳癌細胞之存活率無明顯之復發情況。可能是結凍使得癌細胞的分裂機制受到結凍的冰晶所造成嚴重的破壞，而無法如期的分裂，可能造成未死亡之癌細胞的分裂速度與凋亡速度相當，因此無明顯的復發情況。
5. 乳癌細胞於不同溫度條件下以低溫冷凍與抗癌藥物結合所測得之存活率，比單獨使用不同溫度條件的低溫冷凍抑制乳癌細胞存活率有良好的效果。
6. 乳癌細胞於冷凍實驗後(-30°C、10 分鐘)，每個孔洞均發生結凍，再添加抗癌藥物的作用所測得之存活率，與單以冷凍實驗後(-30 °C、10 分鐘) 存活率相比，無明顯的降低；可能是結凍的效果已經有效的破壞癌細胞之機制，且使用 20 nM 的 DOX 所能抑制癌細胞存活率 15%，故 DOX 的作用並不明顯。



【參考文獻】

- [1] 周更生、賴紹榮(2004)：膨脹與冷卻的應用。科學發展月刊，377，22-25。
- [2] B. H. Allen, DPM, L.M. Fallat, DPM, FACFAS, & S. M. Schwartz. (2007). Cryosurgery: An Innovative Technique for the Treatment of Plantar Fasciitis. *The Journal of Foot & Ankle Surgery*, 46(2):75–79.
- [3] J. F. Langenhuijsen , E. Broers , & H. Vergunst. (2008). Cryosurgery for Prostate Cancer: an Update on Clinical Results of Modern Cryotechnology. *Eur Urol*, doi:10.1016/j.eururo.2008.08.063.
- [4] A. A. Gage, & J. G. Baust. (2007). Cryosurgery for Tumors. *J Am Coll Surg*, Vol. 205, No. 2.
- [5] National Cancer Institute. Cryosurgery in Cancer Treatment: Q & A.
- [6] G. F. Graham. (2001). Cryosurgery in the Management of Cutaneous Malignancies. *Clinics in Dermatology*, 2001; 19:321–327.
- [7] J. G. Baust, A. A. Gage, D. Clarke, J. M. Baust, & R. V. Buskirk. (2004). Cryosurgery—a putative approach tomolecular-based optimization. *Cryobiology*, 48 (2004) 190–204.
- [8] A. A. Gage & J. G. Baust. (1998). Mechanisms of Tissue Injury in Cryosurgery. *Cryobiology*, 37, 171–186.
- [9] M. O. Maiw, J. M. Evans, & J. E. Beeson. (2004). The application of cryosurgery in the treatment of lung cancer. *Cryobiology*, 48 (2004) 55–61.
- [10] G. Vali. (1999). Ice Nucleation – Theory.
- [11] 林鴻明(不詳)：奈米材料合成技術(氣相法)。私立(台北市)大同大學材料工程學系。2010 年 3 月 1 日。
取自：http://nano.mse.ttu.edu.tw/html/doc/Class02_produ/2.pdf
- [12] 陳進成(2004)：雲、雨、霧的形成-談日常生活中的成核現象。科學發展月刊，377，26-33。

