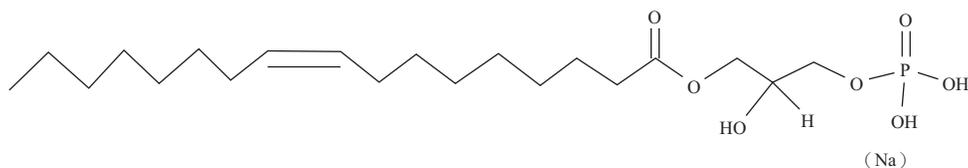


壹、前言

溶血磷脂酸 (lysophosphatidic acid, LPA) 是一個結構簡單的磷脂類化合物。其結構包含一個磷酸、甘油與脂肪鏈，結構如圖 1 所示。LPA 可當作生物體中許多病理與生理條件的生物指標，其生理上的調控包含細胞的增殖、凋亡與細胞骨架的重組 (Sengupta, Wang, Tipps, & Xu, 2004)。生物體中，LPA 主要的產生途徑為溶血磷脂醯膽鹼 (lysophosphatidylcholine, LPC) 經過水解磷酸酯合成酶 (Autotaxin, ATX) 的作用後，脫去一個膽鹼基所產生。ATX 產生的 LPA 在刺激溶血磷脂酸受體 (LPA receptor, LPAR) 後會影響不同的病理過程，包含血管發育、肝、腎的纖維化和腫瘤的生長 (Aoki, Inoue, & Okudaira, 2008)。生物體中許多疾病的形成會影響 LPA 的多寡，所以定量 LPA 的方法就顯得非常重要。



實驗式： $C_{21}H_{41}O_7P \cdot xNa^+$

分子量：436.52

圖 1 溶血磷脂酸結構與基本資料

目前有許多分析 LPA 的方法，包含核磁共振儀 (nuclear magnetic resonance, NMR) (Kuliszkiewicz-Janus, Tuz, & Baczyński, 2005)、氣相層析儀 (gas chromatography, GC) (Xu et al., 1998)、液相層析電噴灑串聯質譜儀 (liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry, LC/ESI/MS/MS) (Yoon, Kim, & Cho, 2003)，其中以質譜儀在定量上最為準確，因為質譜儀 (mass spectroscopy) 具有高靈敏度與特異性的特點；而液相層析 (liquid chromatography, LC) 則有優越的分離能力，使液相層析串聯質譜儀 (LC-MS/MS) 在分析生物樣品中成為一個很好的選擇。

在以質譜儀分析前使用液相層析當作溶血磷脂類之分離 (Zhao & Xu, 2009)，可以有效避免部分的干擾，尤其是 LPC 的干擾，LPC 為 LPA 的前驅化合物，在質譜儀進行碎裂時會有相同的子離子片段；此外亦可以添加內標 [$^{13}C_{16}$] 16:0 LPA (Shan, Jaffe, Li, & Davis, 2008) 或 LPA17:0 使定量更為準確；在萃

取 LPA 的前處理上，除了使用氯仿亦有人嘗試使用甲醇 (Zhao & Xu, 2010)、乙醇 (Lee, Raboune, Walker, & Bradshaw, 2010) 及正丁醇 (Bathena et al., 2011; Kosanam et al., 2010)，主要目的為減少氯仿的使用或期望直接取代氯仿，讓實驗過程可以更加的環保，符合現代社會對實驗工作的期待。

LPA 存在於生物體的細胞中，其中大腦中的腦幹、中腦及丘腦中發現有較高含量的 LPA，所以 LPA 在特定的大腦區域可能具有生物意義 (Lee et al., 2010)；Bathena 等人 (2011) 之研究發現，在牙周炎疾病患者的 LPA 含量相較於正常人約高 5 ~ 10 倍；此外，LPA 和肝炎及肝纖維化有相關，像是和 LPA 有相似結構的生物活性脂質調節體 (Sphingosine 1-phosphate, S1P)，在患有 C 型肝炎患者身體中，其含量顯著低於正常人 (Ikeda et al., 2010)；然而在經由阻斷 LPA 受體 LPAR_{1/3} 後，發現可以改善經由輻射所誘發之肺纖維化 (Gan et al., 2011)。另外，十八烷基硫代磷酸酯 (octadecyl thiophosphate, OTP) 為 LPA 的合成相似物，也具有顯著降低小鼠全身曝露於輻射下的致死率，因而嘗試應用於猴子身上進行藥物代謝動力學之測試，發現容易被吸收並相對有較長的半衰期 7.66 小時，未來可以發展臨床前在猴子身上當作輻射防護劑的測試 (Kosanam et al., 2010)。

當 LPA 含量增加會使前列腺癌細胞 (PC-3) 產生的血管內皮生長因子 (vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C) 增加，VEGF-C 是一個能促使淋巴管深入癌細胞的誘導因子並供給癌細胞養分，此兩者含量成正比關係，且 LPA 的生成與 ATX 和 LPA_{1/3} 有關，其所形成的自體循環機制如圖 2 所示，並已證實有相關性 (Lin et al., 2012)。但目前的實驗數據尚未有實際定量培養 PC-3 細胞中培養基的 LPA 含量，無法確認培養基中的 LPA 對 PC-3 細胞的確切影響與 PC-3 細胞對培養基中 LPA 的利用率，因此本研究希望開發檢測培養基中 LPA 含量的方法，期進一步證實 PC-3 細胞的自體循環機制。

過去多數以生物體液為樣品的檢測方法多使用氯仿進行萃取 (Shan et al., 2008; Zhao & Xu, 2009)，氯仿在環境中不易被分解，且對心臟及血管有抑制作用，因此以較為綠色且環保之有機溶劑進行萃取並取代氯仿是非常必要的。文獻中並無直接量測細胞培養基之分析方法，因此本研究希望開發較環保要求的有機溶劑進行培養基中 LPA 含量的萃取分析方法，期望瞭解細胞培養過程中，LPA 添加量對細胞之影響與細胞對培養基中 LPA 之利用率，並期望此方法能應用在其他更複雜基質下的 LPA 含量測量。