

MC-Transaction on Biotechnology, 2013, Vol. 5, No. 1, e3

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 藍光激發黃素單核苷酸產生的自由基抑制肝癌細胞之研究

邱啟銘、洪宇辰、梁致遠\*

銘傳大學 健康科技學院 生物科技學系(中華民國 台灣 桃園)

### 中文摘要

黃素單核苷酸對藍光敏感，經光照可產生各種不同型態的化合物。以黃素單核苷酸的光化學性質，探討黃素單核苷酸光分解及產生活性氧對肝癌細胞抑制的影響，發現黃素單核苷酸經光照反應後，能抑制 35-60%的肝癌細胞生長，黃素單核苷酸光化學技術應於光動力療法可滿足安全、低毒的要求，將是一項簡單且安全的技術。

關鍵字：黃素單核苷酸，活性氧自由基，藍光

通訊作者：梁致遠[[liang121@mail.mcu.edu.tw](mailto:liang121@mail.mcu.edu.tw)]

收稿：2013-10-19 接受：2013-10-29

### 緒 論

黃素單核苷酸(flavin mononucleotide, FMN)是核黃素側鏈的核糖醇磷酸化後產生。核黃素即維生素 B<sub>2</sub>，是酵素輔酶，功能廣泛。在生物體內核黃素主要以 FMN 及黃素腺嘌呤雙核苷酸(FAD)兩種輔酶的形式參與生物體的氧化還原過程，FMN 和 FAD 為體內輔酵素(coenzyme)和輔因子(cofactor)，與細胞呼吸、脂肪酸氧化、胺基酸及醣類分解有密不可分的關係<sup>[1]</sup>。

光動力療法(Photodynamic therapy; PDT)是透過光敏劑及光在細胞內產生活性氧分子(reactive oxygen species; ROS)，而導致腫瘤細胞凋亡或壞死的一種治療方法。Choe 等<sup>[2]</sup>指出核黃素為一種光敏劑。核黃素、FMN 及 FAD 在紫外光及 420-560 nm 波長的光源下，很容易降解<sup>[3]</sup>，核黃素經光激發可產生 ROS，其中包括超氧陰離子(superoxide anions)及單態氧 (single oxygen)<sup>[4, 5, 6, 7]</sup>。ROS 主要包括超氧自由基 (superoxide radical)、羥基自由基及有機過氧化物自由基等。超氧陰離子具毒性，能形成羥基自由基及過氧化氫化合物(hydroperoxide)，造成細胞受損、發炎、動脈粥狀硬化及老化<sup>[8, 9]</sup>。

硝基藍四氫唑(NBT)光照還原反應是測定超氧歧化酶活性常見的方法之一，利用核黃素在光照下產生超氧陰離子，能將硝基藍四氫唑還原為藍色的 Formazan 化合物，在 560 nm 波長有最大吸收<sup>[10]</sup>，因此利用 NBT 光照還原反應，是一項很好偵測超氧陰離子的方法。

目前以 UV 照射核黃素的光化學技術已趨於成熟，藉此使微生物失活已是有效安全的技術<sup>[11]</sup>，UV 照射進行氧化還原反應，使核苷酸中的鳥嘌呤斷裂，使微生物失活。Liang 等<sup>[12]</sup>以藍色 LED 燈照射核黃素後產生超氧陰離子，使大腸桿菌的超螺旋 DNA 結構破壞成開環狀或線狀，證明激發後的核黃素產生的超氧陰離子能抑制大腸桿菌的生長。Joe 等<sup>[13]</sup>指出核黃素對藍光的量子效率最高，很容易通過活性氧引起器官甚至細胞的損失。Ohara 等<sup>[14]</sup>以藍光作用核黃素研究，藉此抑制 B16 黑色素瘤細胞，指出不同波長的光源對核黃素的光反應有不同的表現。

核黃素溶解性較差，溶解度約 0.10-0.13 g L<sup>-1</sup>，FMN 是核黃素核糖醇磷酸化的產物，在水中的溶解度可高於核黃素 200 倍以上<sup>[15]</sup>，且保持光敏感的特性。生物體內核黃素主要以 FMN 及 FAD 兩種輔酶的形式參與生物體的氧化還原過程。FMN 對藍光敏感，可經光化學反應產生超氧陰離子<sup>[16]</sup>。本研究以藍色 LED 燈照射 FMN 產生超氧陰離子，以 NBT 光照還原法探討不同 pH 條件下產生的超氧陰離子能力，且討論以此方式產生的超氧陰離子抑制肝癌細胞株(Huh-7)的效果，探討使用 FMN 作為光動力療法治療的基礎。

## 材料與方法

### 材料

#### 1. 光化學系統：

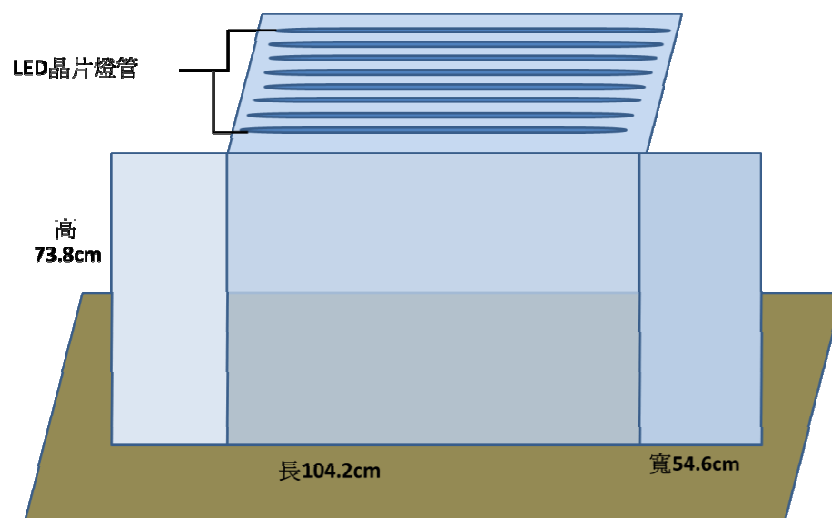
以長104.2公分，寬54.6公分，高73.8公分之壓克力板箱，外包覆遮光材質以防止光源外洩或外部光源影響。內部頂端架設8個燈座，備有LED燈管(3020LED燈，汎得光電，Taiwan；圖一)。調整照射高度控制輻射功率，以太陽功率計(Tenmars TM-207)偵測輻射強度。藍色LED燈的放射波長為462 nm。

#### 2. 藥品：

FMN、L-甲硫胺酸(L-methionine)、硝基藍四氫唑、碳酸氫鈉、磷酸氫一鉀及磷酸氫二鉀均為Sigma公司產品。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、DMEM medium (Dulbecco's modified Eagle medium)購自GIBCO<sup>TM</sup>。CellTiter96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay購於Promega公司。

### 3. 儀器：

ELISA reader (Molecular devices spectraMAX 190, Sunnyvale, USA)。



圖一、光化學系統的架設

## 實驗方法

### 1. 不同pH對FMN產生超氧陰離子的影響

以10  $\mu\text{M}$  FMN及120  $\mu\text{M}$  FMN溶液在不同的pH (pH 7.8、pH 7.4、pH 7.0)下接受2.0  $\text{mW}/\text{cm}^2$ 強度的藍色LED照射20及60分鐘，以NBT光照還原反應測定超氧陰離子。NBT光照還原法參考Beauchamp與Fridovich [17]的方法，經修飾而成，前製備分為A液及B液。

A液：精秤109.3 mg的L-methionin加入73.23 mL 100 mM的磷酸緩衝溶液(pH 7.8、pH 7.4、pH 7.0)，以超音波震盪機使其溶解。再精秤10 mg的NBT加入混勻後成A液。

B液：取3 mg FMN加入50 mL 100  $\mu\text{M}$ 的磷酸鉀緩衝溶液(pH 7.8、pH 7.4、pH 7.0)即成120  $\mu\text{M}$  FMN溶液；再以120  $\mu\text{M}$  FMN稀釋成10  $\mu\text{M}$  FMN溶液。

藥品皆新鮮配製。分析測定時，取1.53 mL的B液(120  $\mu\text{M}$ 或10  $\mu\text{M}$ )至A液中，以2.0  $\text{mW}/\text{cm}^2$ 強度的藍光LED照射20、60分鐘後，以吸光值560 nm進行偵測。每組實驗皆為三重複。實驗的過程皆避光，避免光照影響FMN及NBT。

### 2. 細胞活性分析(MTS assay)

以 CellTiter96<sup>®</sup> aqueous one solution cell proliferation assay 進行活性分析。MTS[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt]能受活細胞粒線體之去氫酶(dehydrogenase)代謝還原成水溶性之紅紫色產物 Formazan，其最大吸光值為波長 490 nm。將細胞培養至 96 孔盤內，隔天吸出培養液，加入不含胎牛血清及 PSA 抗生素的 DMEM (100  $\mu$ L/well)及 20  $\mu$ L/well CellTiter96<sup>®</sup> aqueous 置於 37 $^{\circ}$ C 的 CO<sub>2</sub> 培養箱 10 分鐘，以 ELISA reader 在波長 490 nm 偵測吸光值。

### 3. 不同pH的細胞培養基對hepato cell (Huh-7)細胞株生長的影響

以1 N NaOH或1 N HCL調配為pH 7.4及pH 7.8 DMEM 培養液(內含10%胎牛血清，及5% BSA)。將hepato cell (Huh-7)培養在DMEM培養液中，將細胞培養後收集，以血球計數器估算細胞數目，以每格約 $1 \times 10^4$ 濃度種至96孔盤。隔天分別將培養液區分為不同的pH值的DMEM培養液，再培養一天後以MTS assay進行細胞的測試。

### 4. FMN光化學反應對hepato cell (Huh-7)細胞株生長的影響

Hepato cell (Huh-7)培養在 DMEM 培養液中，將細胞培養後收集，以血球計數器估算細胞數目，以每格約  $1 \times 10^5$  濃度種至 96 孔盤培養並過夜，光照實驗前，以 pH 7.8 且含 10 $\mu$ M 或 20  $\mu$ M FMN 的 DMEM 培養液替換，以 2.0 mW/cm<sup>2</sup> 強度的 LED 藍光分別照射 20 或 60 分鐘。以 MTS assay，進行細胞的測試。Hepato cell (Huh-7)減少的百分率如下計算：

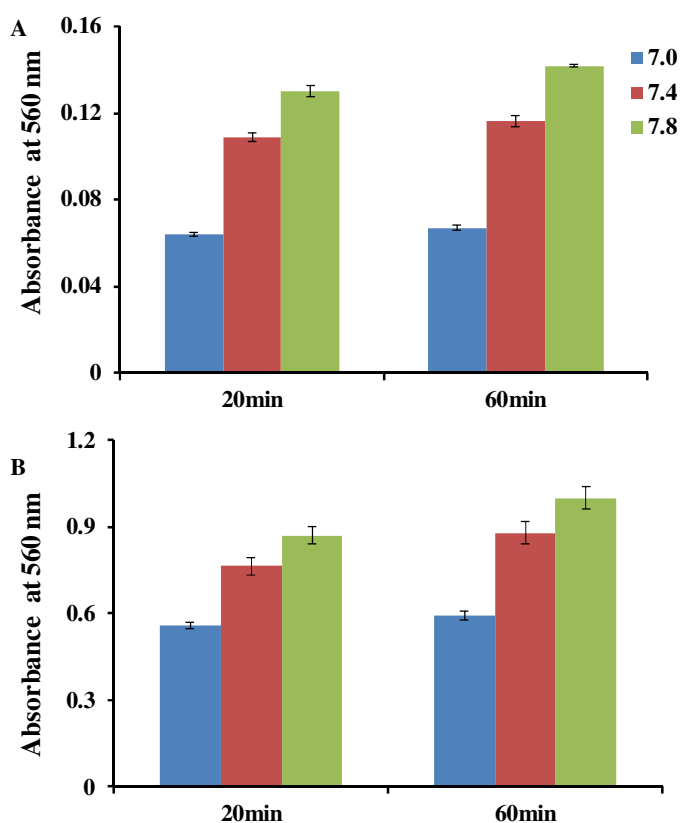
$$\text{細胞減少百分率} = - (1-I/D) \times 100\%$$

D是細胞在黑暗中(不照光)以MTT assay偵測的細胞活性；I是細胞經藍色LED燈照光後的細胞活性。

## 結 果

### pH 值對 FMN 產生超氧陰離子的影響

圖二是比較不同的 pH 對 FMN 經光照還原反應後吸光值的影響。不論是低濃度(10  $\mu$ M)或是高濃度(120  $\mu$ M)的 FMN，在 pH 7.8 時經光照還原反應後吸光值達最高，而 pH 7.0 的條件最低。高濃度的 FMN (120  $\mu$ M)經光照反應後比低濃度的 FMN (10  $\mu$ M)平均可提高近 7.6 倍的吸光值。



圖二、(A) 10  $\mu\text{M}$  FMN 在不同的 pH 溶液，以 2.0  $\text{mW}/\text{cm}^2$  強度的藍色 LED 照射，NBT 光照還原反應的吸光值 (B) 120  $\mu\text{M}$  FMN 在不同的 pH 溶液，以 2.0  $\text{mW}/\text{cm}^2$  強度的藍色 LED 照射，NBT 光照還原反應的吸光值。

### pH 對 hepato cell (Huh-7) 細胞株生長的影響

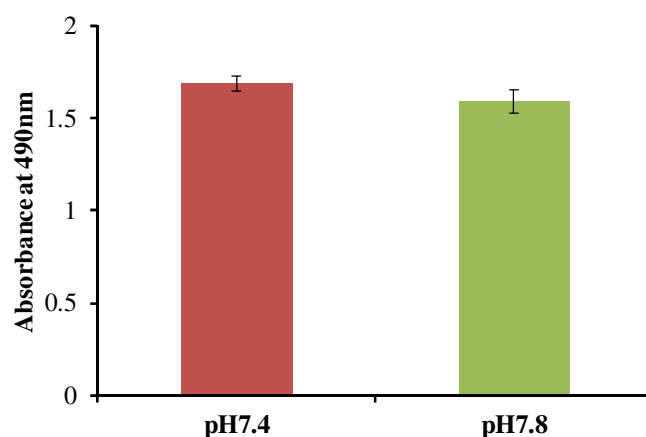
圖三是比較 hepato cell (Huh-7) 細胞株在 pH 7.4 及 pH 7.8 的培養基生長的情況，以 MTS assay 進行細胞的測試。Hepato cell 在 pH 7.8 的生長是 pH 7.4 的 94%，pH 的影響不明顯。

綜合圖二及圖三，FMN 在鹼性溶液中較不穩定，在偏鹼性的環境下，光照容易分解及產生超氧陰離子，在 pH 7.8 條件培養 hepato cell (Huh-7) 細胞株和 pH 7.4 相似，因此選擇 pH 7.8 的培養條件及光照條件，進行以 FMN 光照產生超氧陰離子抑制肝癌細胞株(Huh-7)的實驗。

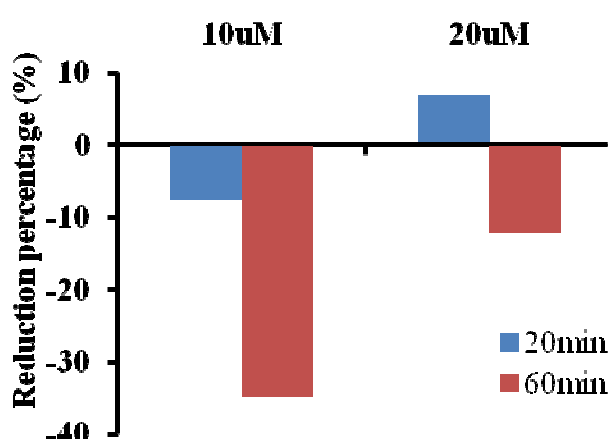
### FMN 的光化反應對 hepato cell (Huh-7) 細胞株抑制的效果

圖四是以不同的 FMN 濃度的培養基經光照還原反應後的 hepato cell (Huh-7) 細胞株抑制的情況。由圖四，在同樣濃度的 FMN 的培養基，hepato cell (Huh-7) 細胞株，隨著光照時間的增加，能產生相對高的細胞抑制效果。10  $\mu\text{M}$  FMN 的處理，經 2.0  $\text{mW}/\text{cm}^2$  強度的藍色 LED 照射一小時後可抑制近 35% hepato cell (Huh-7) 細

胞株。當 FMN 濃度增至 20  $\mu\text{M}$ ，抑制效果反而減少，推測培養基含 20  $\mu\text{M}$  FMN，可能因滲透壓的問題，造成細胞生長不好，導致抑制效果不明顯。



圖三、Hepato cell (Huh-7)細胞株在不同 pH 培養基的生長率比較



圖四、Hepato cell (Huh-7)細胞株在含 10  $\mu\text{M}$  及 20  $\mu\text{M}$  FMN 的 DMEM 培養液，以 2.0  $\text{mW}/\text{cm}^2$  強度的藍色 LED 照射後的影響。

## 討 論

FMN 對光敏感，在不同的 pH 時對光反應不同。鄭等<sup>[18]</sup>以核黃素比較不同 pH 時各種光照度反應後的吸光值，亦有類似情形，pH 7.8 條件下的核黃素光分解，吸光值平均增加速率都較 pH 7.0 為高。由圖二，FMN 在 pH 7.4 光照還原反應後的吸光值是 pH 7.8 的 85%，但 pH 7.0 只有 55%。核黃酸在酸性或中性條件下，光照會使核黃素失去側鏈形成光色素(lumichrome)，而在鹼性條件下則形成光黃

素(lumiflavin)<sub>[19]</sub>，FMN 是核黃素側鏈上的核糖醇磷酸化後所產生，化學性質和核黃素相似，表示 FMN 在鹼性溶液中較不穩定，光照容易分解及產生超氧陰離子，在中性溶液中相對穩定。

在不加 FMN 的條件下，以 2.0 mW/cm<sup>2</sup> 藍光照射 hepato cell (Huh-7)細胞株，經一小時後以 MTT assay 偵測細胞活性，與黑暗(不照光組)比較，細胞活性影響不大，照光並不影響 hepato cell (Huh-7)細胞株的生長。以添加 10 μM FMN 且光照藍燈一小時後的細胞活性與黑暗且不添加 FMN 的細胞株比較，經 2.0 mW/cm<sup>2</sup> 強度的藍光照射一小時後可抑制近 60% hepato cell (Huh-7)細胞株。

以 2.0 mW/cm<sup>2</sup> 藍光照射 FMN，經 20 分鐘及 60 分鐘產生超氧陰離子以抑制 hepato cell 細胞株，光化學法輻射能量可由輻射照度及時間算出，如以下公式：

輻射能量(radiant energy) (J/cm<sup>2</sup>)=輻射照度(irradiance) (W/cm<sup>2</sup>)×時間(time) (sec)

如圖四，以 462 nm 的藍光並固定光強度為 2.0 mW/cm<sup>2</sup>，經照射 20 分鐘及 60 鐘後其輻射能量分別為 2.4 及 7.2 J/cm<sup>2</sup>。FMN 對光敏感，是一光敏劑，受光產生超氧陰離子，接受輻射能量高的處理，hepato cell (Huh-7)抑制率較高。

由圖二，不論是低濃度(10 μM)或是高濃度(120 μM)的 FMN，在 pH 7.8 時經藍色 LED 光照還原反應 20 分鐘或 60 分鐘後，NBT 光照還原法偵測的吸光值隨著光照時間增加，略有增加，但不明顯，差距小於 10%。FMN 的濃度在 10 μM，經 2.0 mW/cm<sup>2</sup> 強度的藍色 LED 照射 60 分鐘後可抑制近 35% hepato cell (Huh-7)細胞株，但在光照 20 鐘的條件下僅 8%，差距近 7 倍，表示 FMN 經光反應產生的超氧陰離子在短時間對 hepato cell (Huh-7)細胞株影響不大，其抑制作用與光照時間成正比。Liang 等<sub>[12]</sub>以 120 μM 核黃素的光化學反應破壞質體的 DNA 的研究也同樣類似結果，光反應產生的超氧陰離子經 40 分鐘後才能破壞大腸桿菌中的質體 DNA。因此若要使 FMN 的光化學反應對細胞的抑制率達到更高的效果，照光時間的反應可再提高。

核黃素是人類膳食所必須的一種維生素，為人體不可缺少的物質，生成的 FMN 及 FAD 也是人體中重要的輔酶，以 FMN 的光化學反應對腫瘤細胞的抑制，是一項簡單、安全且具潛力的光動力療法。

## 參考文獻

[1] 簡宏霖、鄭建璋、陳良宇、梁致遠：核黃素光化學研究。生技學報(MC-TB)

2011 , v3e3 。

[2] Choe E, Huang R, Min D: Chemical reactions and stability of riboflavin in foods. *J Food Sci* 2005, 70: R28-R36.

[3] Ottaway P B: Stability of vitamins in food. in *The technology of vitamins in food*, Chapman and Hall, London; 1993.

[4] Kumari MVR, Yoneda T, Hiramatsu M: Scavenging activity of  $\beta$ -catechin on reactive oxygen species generated by photosensitization of riboflavin. *Biochem Mol Biol Int* 1996, 38: 1163-1170.

[5] Grzelak A, Rychlik B, Bartosz G: Light-dependent generation of reactive oxygen species in cell culture media. *Free Rad Biol Med* 2001, 30: 1418-1425.

[6] Min DB, Boff JM: Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Comp Rev Food Sci Food Safety* 2002, 1: 58-72.

[7] Mahns A, Melchheier I, Suschek CV, Sies H, Klotz LO: Irradiation of cells with ultraviolet-A (320–400 nm) in the presence of cell culture medium elicits biological effects due to extracellular generation of hydrogen peroxide. *Free Rad Res* 2003, 37: 391-397.

[8] 黃政弘、陳惠婷、涂瑞澤：三種SOD 活性測定法之比較。大葉學報1999，8：101-109。

[9] Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D: Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987, 107:526-545.

[10] Donnelly JK, McLellan KM, Walker JL, Robinson DS: Superoxide dismutases in foods. A review. *Food Chem* 1989, 33: 243-270.

[11] Carbonare MD, Pathak MA: Skin photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging. *J Photochem Photobiol* 1992, B14: 105-124.



- [12] Liang JY, Yuann JMP, Cheng CW, Jian HL, Lin CC, Chen LY: Blue light induced free radicals from riboflavin on *E. coli* DNA damage J Photochem Photobiol 2013, B119: 60–64.
- [13] Jou MJ, Jou SB, Chen HM, Lin CH, Peng T: Critical oxygen species formation in visible laser irradiation- astrocytes (RBA-1). J Bio Sci 2002, 9: 507-516.
- [14] Ohara M, Fujikura T, Fujiwara H: Augmentation of the inhibitory effect of blue light on the growth of B<sub>16</sub> melanoma cells by riboflavin. Int J Oncol 2003, 22:1291-1295
- [15] Y. Lin, R.R. Eitenmiller , W.O. Landen, Riboflavin. in Vitamin analysis for the health and food sciences, second edition. CRC press (2008).
- [16]林志璋：黃素單核苷酸在藍光反應產生活性氧使大腸桿菌失活之可行性研究，銘傳大學碩士論文，2013。
- [17] Beauchamp C, Fridovich I: Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem 1971, 44: 276-287.
- [18]鄭建璋、簡宏霖、梁致遠：光照度對硝基藍四氫唑光照反應的影響。生技學報(MC-TB)，2010，v2e2。
- [19] Russell LF, Vandersilice JT: A comprehensive review of vitamin B2 analytical methodology. J Micronutri Anal 1990, 8: 257-310.

# Effects of Reactive Oxygen Species from Blue Light-Excited Flavin Mononucleotide on Inhibiting of Hepato Cell (Huh-7)

Chi-Ming Chiu, Yu-Chen Hung, and Ji-Yuan Liang\*

Department of Biotechnology, School of Health Technology, Ming-Chuan University, (Taoyuan, Taiwan, R.O.C.)

## Abstract

Flavin mononucleotide is sensitive to blue light. Various compounds may be derived from flavin mononucleotide after illumination. This study was working on the effects of reactive oxygen specie from light-excited flavin mononucleotide on the reduction percentage of hepato cell (Huh-7) growth. The 35-60% reduction percentage of hepato cell (Huh-7) was occurred by light-excited flavin mononucleotide reaction. Flavin mononucleotide photochemistry may be a simple and safe technology for photodynamic therapy.

Keyword: flavin mononucleotide, reactive oxygen species, blue light

Corresponding author: Ji-Yuan Liang [liang121@mail.mcu.edu.tw ]

Received 19 Oct 2013/Accepted 29 Oct 2013

---

MC-Transaction on Biotechnology, 2013, Vol. 5, No. 1, e3

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.