

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

光動力治療對生物膜防治之研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2320-B-002-079-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：國立臺灣大學生化科技學系

計畫主持人：黃慶瓌

計畫參與人員：涂雅屏、陳英琮

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 28 日

## 中文摘要

光動力治療 (Photodynamic therapy, PDT) 是一種使用特定波長之激發光將光感物質 (photosensitizer) 激發成高能量激發態，經由能量或電子傳遞，將細胞周圍氧分子轉變成有細胞毒性的單態氧 ( $^1\text{O}_2$ )，或與環境分子作用產生自由基，造成細胞死亡的方法，目前已應用於癌症治療及微生物防治 (Photodynamic inactivation, PDI)。研究顯示，將光動力治療應用在微生物防治上已有部分成效，而積極開發新光源及光感物質，使光動力治療能更有效發揮，為目前研究的新趨勢。藻藍素 (phycocyanin, PC) 為螺旋藻 (*Spirulina platensis*) 中的一種水溶性螢光蛋白，可吸收光能並進行能量及電子傳遞，具有光動力治療之潛力。本實驗由螺旋藻 *Spirulina platensis* 中萃取藻藍素作為光感物質，並以發光二極體 (Light emitting diodes, LED) 為光源，對革蘭氏陽性及陰性菌進行光動力抑制，並進一步探討菌體在懸浮狀態與生物膜狀態下，光動力殺菌效果是否不同。實驗結果顯示由螺旋藻中萃取並純化出藻藍素，回收率可達 56.1%，純度 ( $A_{620\text{nm}/280\text{nm}}$ ) 為 4.56，其品質與商品化之藻藍素相當。而以藻藍素進行光動力治療，在藻藍素濃度  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ，照光強度  $360 \text{ J cm}^{-2}$  之條件下，可將濃度  $10^7 \text{ CFU ml}^{-1}$  之革蘭氏陽性菌 *S. aureus* 及 *S. epidermis* 懸浮細胞完全抑制，但對革蘭氏陰性菌 *E. coli* 及 *P. aeruginosa* 之效果則不顯著；而以藻藍素對 *S. aureus* 及 *S. epidermis* 生物膜進行光動力抑制，在藻藍素濃度  $900 \mu\text{g ml}^{-1}$ ，照光強度  $360 \text{ J cm}^{-2}$  之條件下。亦可將  $10^8 \text{ CFU cm}^{-2}$  之生物膜菌體完全殺滅。此研究顯示由螺旋藻中萃取之天然光感物質藻藍素對革蘭氏陽性菌之懸浮菌體及生物膜細胞皆有良好之光動力抑制效果，在未來的應用上極具潛力。

關鍵詞：光動力抑制、螺旋藻、藻藍素、生物膜

## 英文摘要

Photodynamic inactivation (PDI) utilized photosensitizers and light with appropriate wave length to give a phototoxic response, normally via oxidative damage. Although PDI might be an effective approach in antimicrobial treatment, no photosensitizer is suitable for all possible applications. Therefore, the development of new photosensitizers became important to overcome the shortage of PDI. Phycocyanin (PC), a water-soluble non-toxic biliprotein, is one of the major constituents of *Spirulina platensis*. The photobiological properties of PC suggested its possibility to be a photosensitizer in photodynamic therapy. The goal of this study was to investigate the effect of the PC extracted from *Sp. platensis* on photodynamic inactivation against bacterial planktonic and biofilm cells. The extraction and purification of PC was accomplished by fractional precipitation with ammonium sulfate precipitation, following by ion-exchange chromatography on Macro-Prep DEAE Support system. The purity of PC was examined by absorbance and fluorescence spectrometry. Both Gram-positive and Gram-negative bacteria were tested for PC-PDI. Pure PC was finally obtained from *Sp. platensis* with purity ratio ( $A_{620\text{nm}/280\text{nm}}$ ) 4.56 and recovery rate 56.1%. After PC-PDI treatment, which carried with  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  of PC and irradiation light dose of  $360 \text{ J cm}^{-2}$ , no viable cell of the Gram-positive *Staphylococcus aureus* and *S. epidermis* planktonic cells

were detected. However, the Gram-negative *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* were resistant to the PC-PDI treatment. Experiments with PC-PDI against *S. aureus* and *S. epidermis* biofilms showed that both species of the tested biofilms were sensitive to the PC-PDI treatment, with a decrease of about 8-log of viable cells. This study showed that the PC from *Sp. platensis* was a potential photosensitizer to inactivated Gram-positive bacteria planktonic cells and biofilms.

**Keyword:** Photodynamic Inactivation, *Spirulina platensis*, Phycocyanin, Biofilm

## 前言

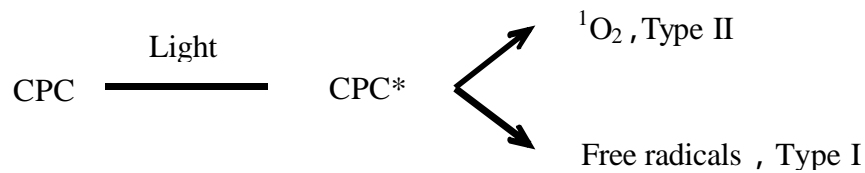
生物膜的生成會增加質量、熱量及動量輸送的阻力，影響整體系統的效率；會與吸附的表面起生物或化學反應，造成腐蝕的現象；也會感染醫療器材，危害人體的健康。一般對懸浮微生物極具療效的殺菌劑或抗生素對抑制生物膜生成的效果卻非常有限，通常須 500 至 1000 倍的濃度才能達到相同的殺菌效果，而這種高劑量在實際應用上卻不可行。同時，一旦停止使用殺菌劑或抗生素，未完全殺死的微生物又會重新生長並生成生物膜。此外，長期使用化學物質或抗生素會增加微生物誘導產生新的抗藥菌株的機會。光動力治療的基本原理是細胞中的光感物質在受到特定波長的光激發後，能將光能轉移給細胞內的其他物質如氧氣而發生光化學作用，進而產生對細胞有毒性的自由基，因此在光感物質所積聚的位置受到光照後會造成細胞的毒性。光感物質一般而言，分子量並不大，在生物膜結構中的傳輸相對容易，如此便有更多機會與細胞接觸，進而使菌體內累積大量具光感效應之物質。本計畫的假設為：光動力治療應用於生物膜防治與現有生物膜抗藥性機制無關，而取決於(1)細胞體內是否累積足夠的光感物質？(2)照設光壓是否足以激發光感物質？本計畫預定探討藻藍素 (phycocyanin)光動力治療對革蘭氏陽性及陰性菌生物膜防治的效果及其機制。

藻藍素普遍存在於螺旋藻中，為藻膽蛋白 (phycobiliprotein) 的一種，分為 C-藻藍素 (C-phycocyanin, CPC) 及異藻藍素 (allophycocyanin, APC)。在藻體中，藻藍素與葉綠體結合，成為光合作用中補光系統的一部分，能吸收可見光並進行能量傳遞。研究指出藻藍素具有抗氧化及抗發炎的功效(Romay et al, 1998)，且能保護肝臟酵素不受肝毒素的侵害(Vadiraja et al., 1998)，對於抑制癌細胞生長和促進人體細胞新生有重要的作用。藻藍素的螢光物質特性及高水溶性使其成為一種良好的螢光標定物質，並已廣泛應用於分子探針及電泳分析技術等。表 2 為 C-藻藍素 (CPC) 與異藻藍素 (APC) 之比較。

表 2. C-藻藍素 (CPC) 與異藻藍素 (APC) 之比較

Phycobiliprotein	C-phycocyanin	Allophycocyanin
Molecular Weight (kD)	232	104
Absorption Max (nm)	620	651
Emission Max (nm)	642	662

近年有研究指出，C-藻藍素經由可見光 (> 470 nm) 照射後，可產生單態氧 (singlet oxygen,  $^1\text{O}_2$ )，進行 Type II 路徑；或是生成自由基 (如  $\cdot\text{OH}$ )，進行 Type I 路徑，顯示藻藍素具有光動力治療之潛力(Zhang et al., 1999)。兩者關係如下：



但也有研究認為，藻藍素的光感性質是由結構內部之四比咯環提供，當其進行 Type II 路徑時，所產生的 singlet oxygen 會被外部的脫輔基蛋白 (apoprotein) 削弱(Romay et al, 1998)；雖然藻藍素之光動力治療機制仍不確定，但結合藻藍素及可見光照射，已確定可造成革蘭氏陽性菌死亡(Pádula et al., 1996)及 DNA 單股斷裂(Pádula and Bioteux, 1999)。

本計畫由螺旋藻中萃取出具有光感性質的藻藍素，並探討以藻藍素進行光動力抑制對細菌的懸浮細胞及生物膜的影響。實驗目標如下：

- ❖ 測試藻藍素萃取與純化條件，並進行定性與定量分析
- ❖ 以藻藍素結合光動力抑制，分別測試其對革蘭氏陽性菌及陰性菌的抑制效果
- ❖ 以藻藍素結合光動力抑制，測試其對革蘭氏陽性菌生物膜之抑制效果
- ❖ 探討不同光動力條件對抑制效果之影響

## 結果與討論

### 1. 藻藍素對懸浮菌體之光動力抑制作用

#### (1) 革蘭氏陽性菌

本實驗中選用兩種葡萄球菌 *S. aureus* 及 *S. epidermis*，皆是常見的病源菌，常造成表皮感染，甚至引發全身性敗血症。將不同濃度之藻藍素與  $10^7$  CFU  $\text{ml}^{-1}$  之菌液在黑暗中作用 30 分鐘後，以強度 100 mW 之紅色 LED 照射 0-60 分鐘 (照光能量 0-360  $\text{J cm}^{-2}$ )，發現光動力抑制效果隨藻藍素濃度與照光時間增加；藻藍素標準品之光動力抑制效果如圖一及圖二所示。

兩種葡萄球菌之光動力抑制結果相當類似；在照光強度 90  $\text{J cm}^{-2}$  內，菌數變化不大，顯示藻藍素本身對菌體並不會造成傷害，而在照光強度 180  $\text{J cm}^{-2}$ ，藻藍素濃度為 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  時，並無明顯殺菌效果，但將濃度提升至 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  時，則可造成菌數下降，當濃度到達 300  $\mu\text{g ml}^{-1}$  時，則可將 *S. epidermis* 完全抑制；若將照光強度提高至 360  $\text{J cm}^{-2}$ ，則在藻藍素濃度 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  時即可將菌體全部殺滅。

以本實驗中純化所得之藻藍素對此兩種革蘭氏陽性菌進行光動力抑制，其效果與標

準品之效果相當，顯示藻藍素的確具有光動力抑制之潛力，且本實驗之純化方法所得之藻藍素品質與商品化之藻藍素不相上下；結果見圖三及圖四。

## (2)革蘭氏陰性菌

在革蘭氏陰性菌方面，選用綠膿桿菌 *P. aeruginosa* 及大腸桿菌 *E. coli* 進行光動力抑制實驗；此兩種菌亦是常見之病原菌。以藻藍素進行光動力抑制之結果發現光動力對兩種革蘭氏陰性菌之抑制效果皆不明顯，對 *P. aeruginosa* 及 *E. coli* 沒有明顯之殺菌效果。

## 2.藻藍素對生物膜之光動力抑制作用

### (1)金黃色葡萄球菌生物膜

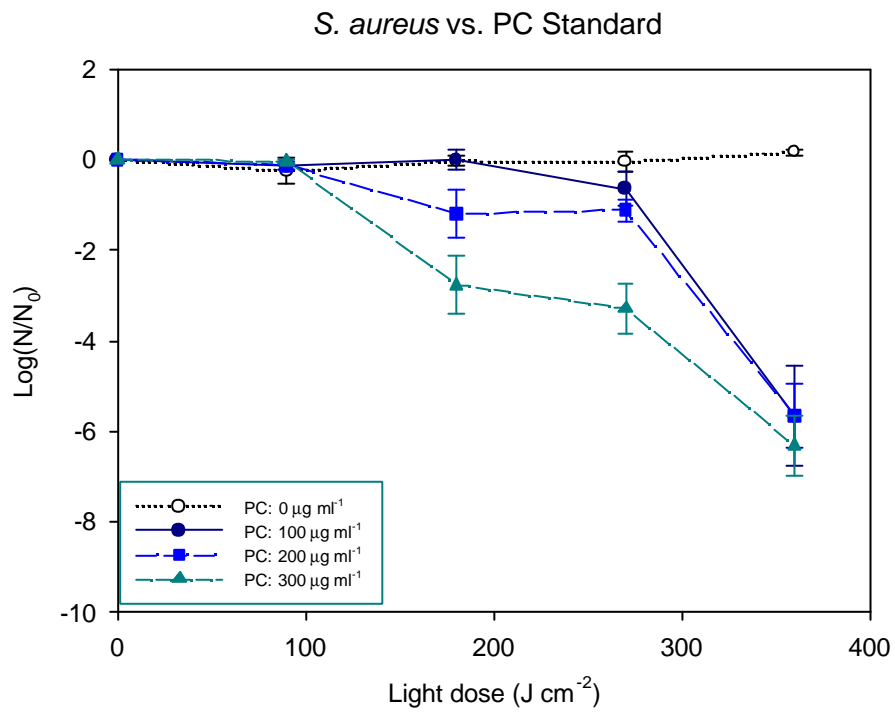
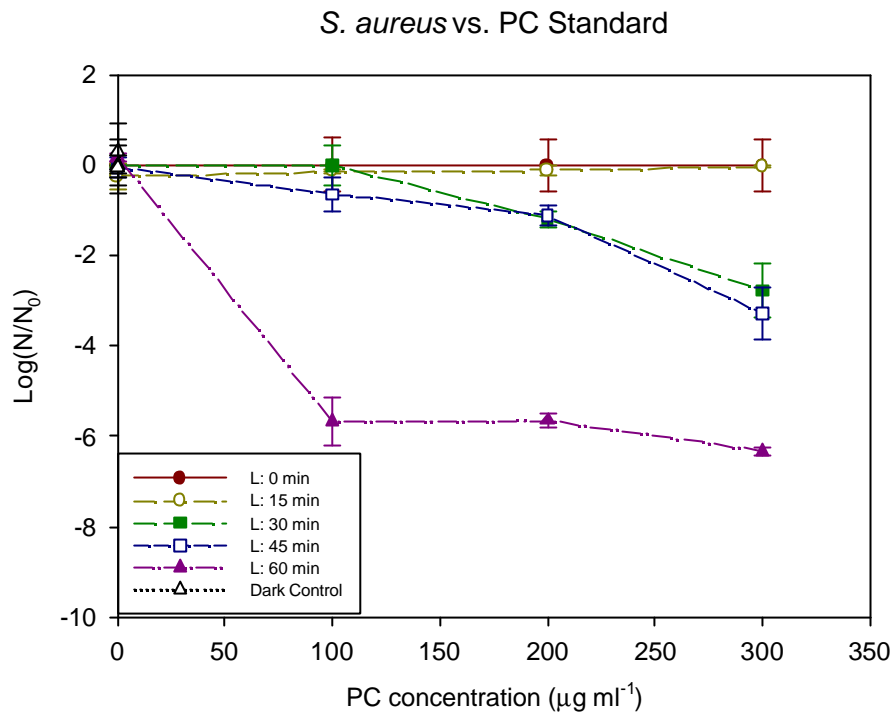
以不同藻藍素濃度及不同作用時間對 *S. aureus* 生物膜進行光動力抑制，可發現抑制效果隨藻藍素濃度提高而增加，與懸浮狀態之實驗結果吻合，當藻藍素濃度增加到  $900 \mu\text{g ml}^{-1}$  時，可達到完全抑制的效果；而作用時間對光動力抑制效果影響不明顯，亦與懸浮狀態實驗結果類似，但當藻藍素與菌體未在黑暗中作用，而直接進行照光時，實驗之標準偏差極大。實驗結果見圖五。

### (2)白色表皮葡萄球菌生物膜

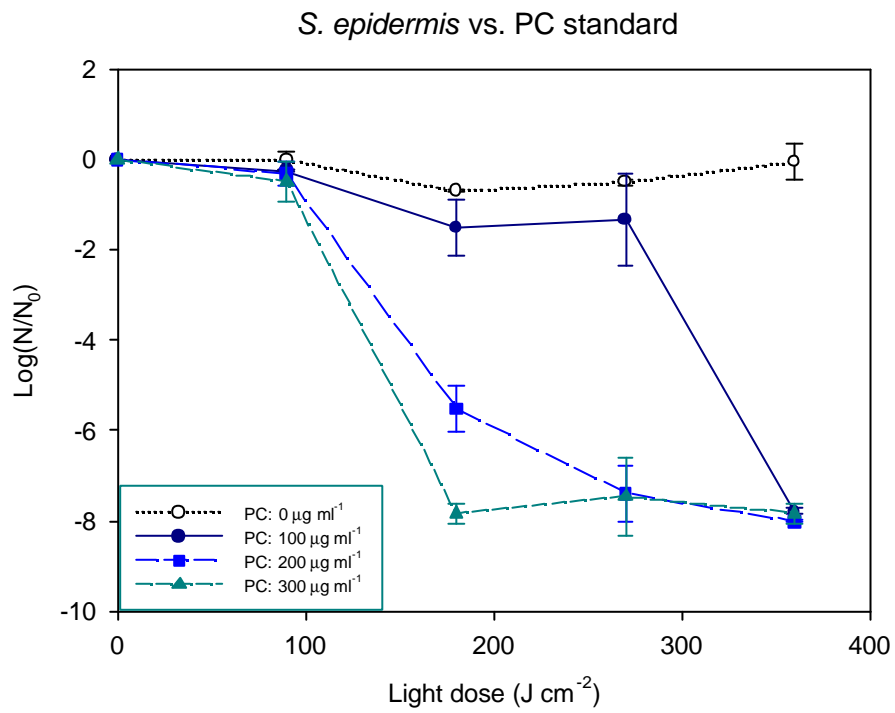
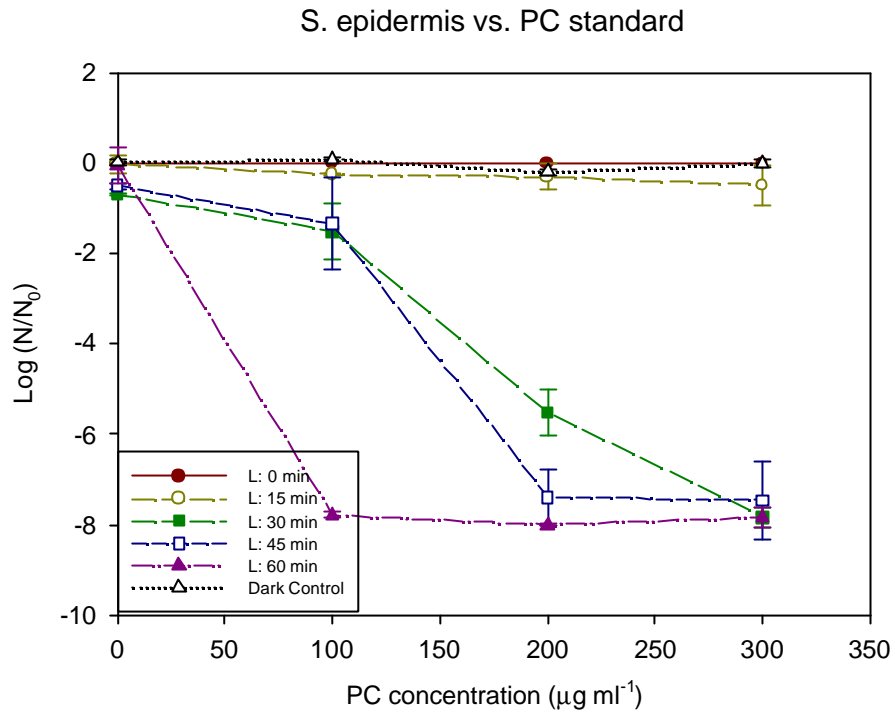
以不同藻藍素濃度及不同作用時間對 *S. epidermis* 生物膜進行光動力抑制，可發現抑制效果與 *S. aureus* 生物膜之結果類似，並與懸浮狀態之實驗結果吻合，當藻藍素濃度增加到  $900 \mu\text{g ml}^{-1}$  時，可達到完全抑制的效果；而作用時間對光動力抑制效果影響不明顯，亦與懸浮狀態實驗結果類似，但當藻藍素與菌體未在黑暗中作用，而直接進行照光時，實驗之標準偏差亦很大。實驗結果見圖六。

## 參考文獻

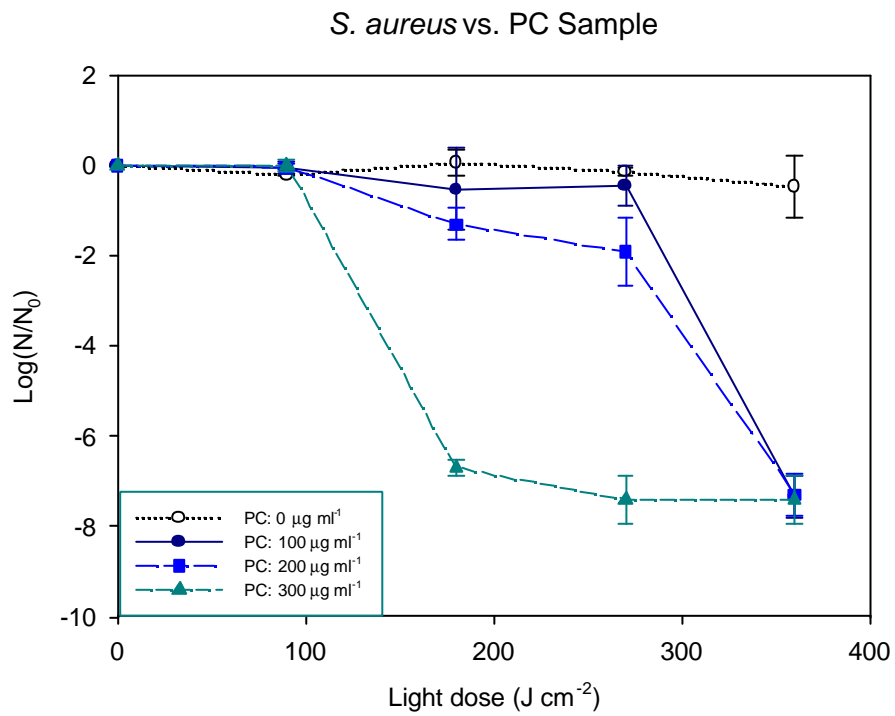
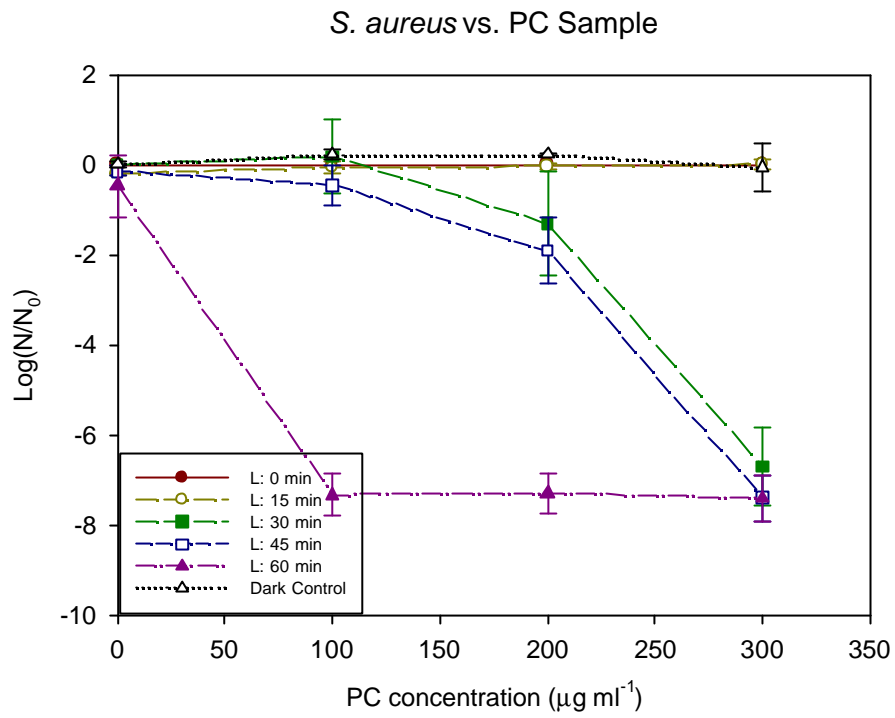
1. Padula M., S. Boiteux, I. Felzenszwalb, and S. Menezes. 1996. Photodynamic action of phycocyanin: damage and repair. *J Photochem Photobiol B* 32: 19-26.
2. Padula M. and S. Boiteux. 1999. Photodynamic DNA damage induced by phycocyanin and its repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Braz J Med Biol Res* 32: 1063-1071.
3. Romay C., N. Ledon, and R. Gonzalez. 1998. Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation. *Inflamm Res* 47: 334-338.
4. Vadiraja B. B., N. W. Gaikwad, and K. M. Madyastha. 1998. Hepatoprotective effect of C-phycocyanin: protection for carbon tetrachloride and R-(+)-pulegone-mediated hepatotoxicity in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 249: 428-431.



圖一、以藻藍素標準品對革蘭氏陽性菌 *S. aureus* 懸浮細胞進行光動力抑制。

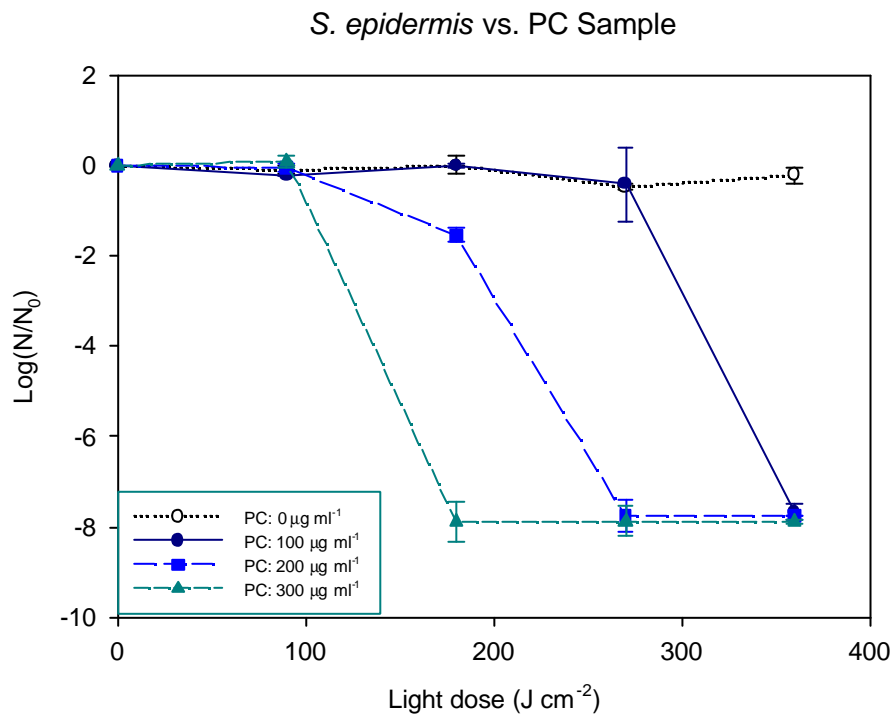
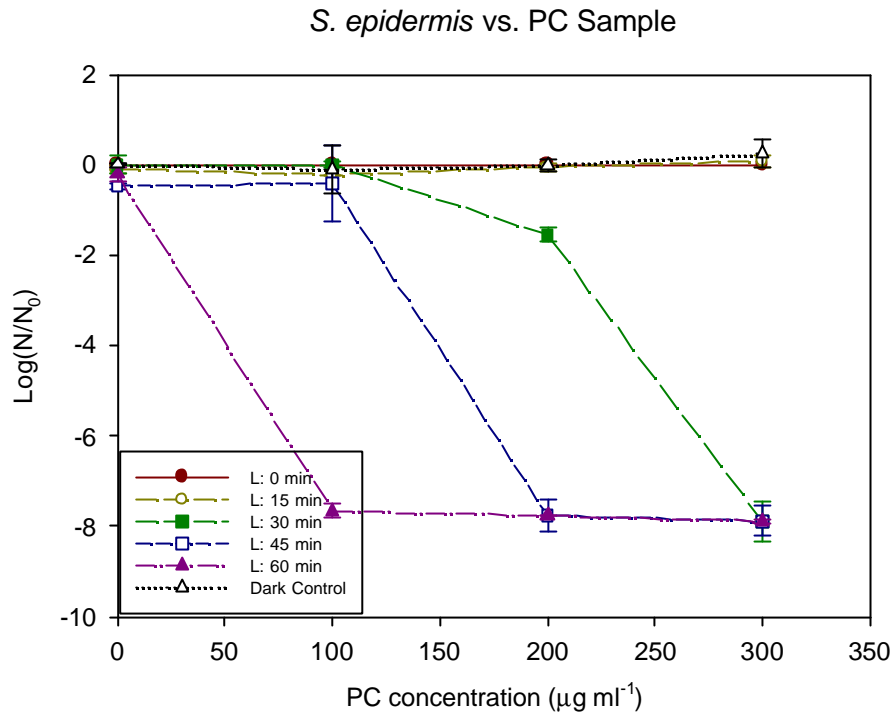


圖二、以藻藍素標準品對革蘭氏陽性菌 *S. epidermis* 懸浮細胞進行光動力抑制。

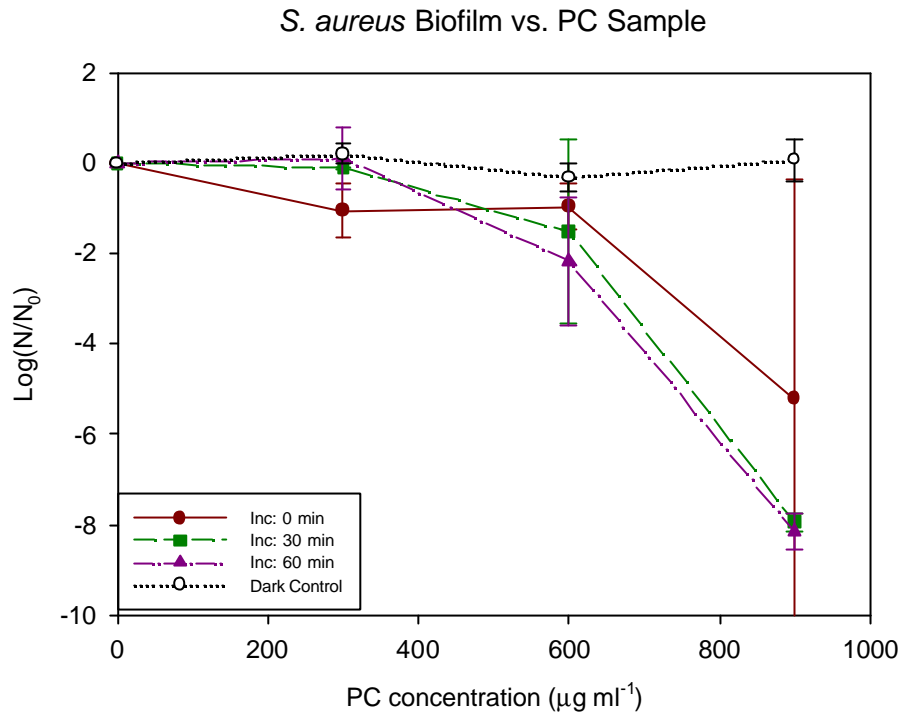


圖三、以藻藍素樣品對革蘭氏陽性菌 *S. aureus* 懸浮細胞進行光動力抑制。

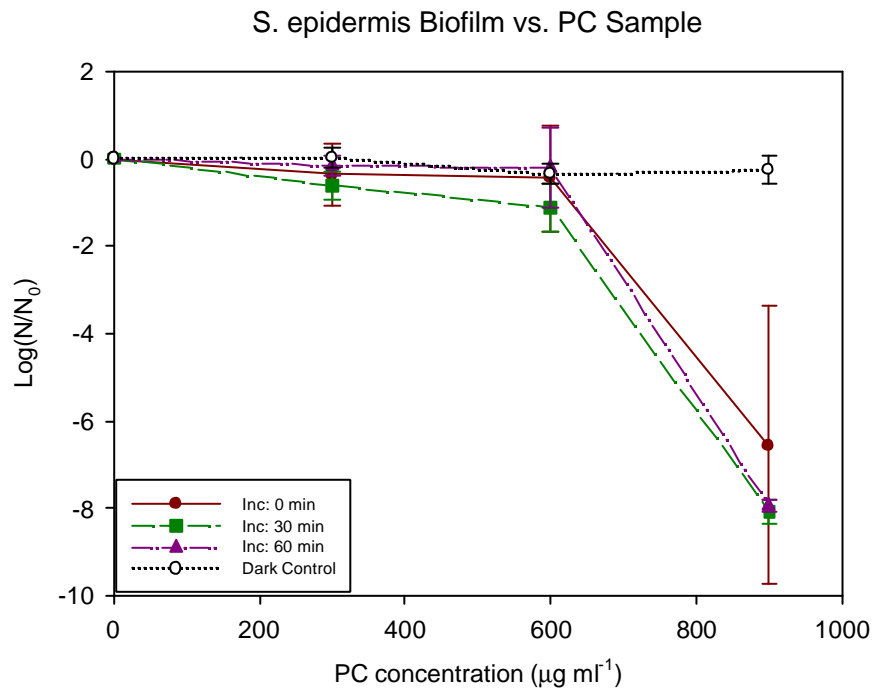




圖四、以藻藍素樣品對革蘭氏陽性菌 *S. epidermis* 懸浮細胞進行光動力抑制。



圖五、以藻藍素樣品對 *S. aureus* 生物膜進行光動力抑制。



圖六、以藻藍素樣品對 *S. epidermis* 生物膜進行光動力抑制。