

인체 편평상피세포암세포주에서 9-Hydroxypheophorbide- α 와 660nm Diode 레이저를 이용한 광역학치료의 항암효과

단국대학교 의과대학 이비인후-두경부외과학교실

김 한 균

= Abstract =

Anticancer Effect of Photodynamic Therapy using 9-Hydroxypheophorbide- α and 660nm Diode Laser on Human Squamous Cell Carcinoma Cell Line

Han-Gyun Kim, M.D.

Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Dankook University, College of Medicine,
Cheonan, Korea

Objectives : New photosensitizer 9-hydroxypheophorbide- α (9-HpbD- α) was derived from chlorophyll in water with peak absorption at 660nm. 9-HpbD- α was tested with 660 nm diode laser for the anticancer effect of photodynamic therapy.

Materials and Methods : Human SNU 1041 cells were seeded into 96 well plate at a density of 10^4 cells/well for 24 hours. Cells were washed with media containing various concentration of 9-HpbD- α ranging from $0 \mu\text{g/ml}$ to $3.75 \mu\text{g/ml}$. Then, laser treatment was done with 660nm diode laser (10mW/cm^2) at various time setting (0, 30, 60, 90, 120 minutes) and with various time interval (0, 1, 4, 6, 18 hours). The treated cells were incubated 48 hours and MTT assay was done to measure the viability of cells.

Results : The viability of cells was more than 90% after laser treatment in control group. The viability of cells was decreased with increasing concentration of 9-HpbD- α and laser treatment time in experimental groups. The viability of cells was decreased significantly as the interval time between addition of 9-HpbD- α and laser irradiation was increased.

Conclusion : This study shows the anticancer effect of photodynamic therapy using 9-HpbD- α and 660nm Diode laser on carcinoma cell line. 9-HpbD- α is considered as one of new photosensitizers in the field of photodynamic therapy.

KEY WORDS : 9-HpbD- α · Diode laser · Photodynamic therapy.

서 론

광역학치료는 새로운 암치료 수단으로서 항암효율의 우월성이 점차 인정되고 있는 치료 방법이다¹⁾. 광역학치료의 원리는 체내의 풍부한 산소와 외부에서 공급되는 빛과 빛에 활성화되는 물질(photosensitizer)의 종합적인 화학반응으

로 인하여 파생되는 단일항 산소(singlet oxygen) 또는 자유 라디칼(free radical)이 각종 병변 부위나 암세포를 파괴하여 암을 치료하는 것으로 최적의 치료효능, 최소의 부작용을 갖는 저렴한 광감작제 개발이 광역학치료의 핵심이라고 할 수 있다²⁾.

최근에는 Hematophorphyrin derivatives(HPD)를 근간으로 하는 Photofrin이 광감작제로서 임상시험 허가가 나와 실제 임상에 쓰이고 있으며 그 적용범위를 점차 확대하여 완전관해, 부분관해의 효과를 보고하고 있다³⁾. 그러나 투약 후 5~6주간 체내에 누적되어 부작용을 일으킬 수 있으며 순수한 Photofrin 제조의 어려움, 광역학치료시 최적의

교신저자 : 김한균, 330-714 충남 천안시 안서동 산 29
단국대학교 의과대학 이비인후-두경부외과학교실
전화 : (041) 550-3973 · 전송 : (041) 556-1090
E-mail : hgkim99@chollian.net

조건으로 알려져 있는 650~850nm보다 낮은 630nm에서의 흡수로 인하여 수 mm밖에 침투시킬 수 없어 상대적으로 낮은 치료 효과 등의 요인에 의하여 더 나은 반응성을 가진 광감작제의 개발 필요성이 대두되고 있다⁴⁾⁵⁾.

차세대 광감작제로 알려진 화합물로는 포피린류(porphyrins), 클로린류(chlorins), 박테리오클로린류(bacteriochlorins), 포피센류(porphycenes) 등이 많이 연구되고 있다. 이 중에서도 식물에 많이 분포되어 있는 엽록소류(chlorophylls)의 금속이온을 제거한 피오파이틴류(pheophytins)는 Photofrin보다 장파장에서 흡수가 일어날 뿐 아니라 고순도로 분리 제조가 가능하여 차세대 광감작제로 많은 가능성을 보여주고 있다⁶⁾.

본 연구에서는 인체 두경부 영역의 편평상피세포암세포주에서 Chlorophyll로부터 추출하여 만든 새로운 광감작제 9-Hydroxypheophorbide- α (9-HpbD- α)와 660nm의 Diode 레이저를 이용한 광역학치료의 항암효과를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구의 재료

1) 광감작제 및 레이저

광감작제로는 금호 생명과학연구소에서 녹조류에 혼한 chlorophyll을 산으로 처리하여 피오파이틴 α (pheophytin

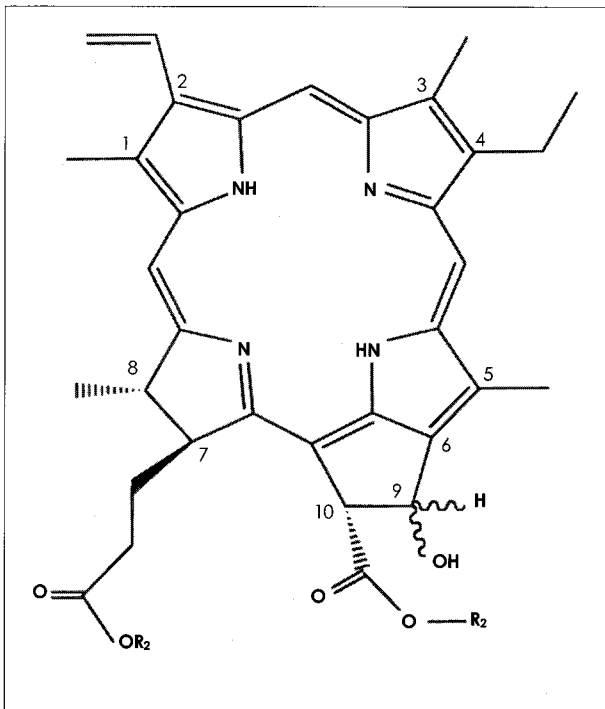


Fig. 1. Chemical structure of 9-Hydroxypheophorbide- α (9HpbD- α)

a)를 만든 후 화학구조변형을 하여 개발한 9-Hydroxypheophorbide- α (9HpbD- α)를 사용하였고 레이저는 주식회사 금광에서 개발한 660nm 반도체 Diode 레이저를 사용하였다. 9HpbD- α 는 chlorophyll의 금속 이온을 제거한 피오파이틴 a에서 9번 탄소의 카르보닐(carbonyl)기를 환원하여 하이드록시(hydroxy)기로 전환 시키고, 에스터(ester)기를 가수 분해하여 제조 하였으며 다른 기존의 다른 chlorophyll 추출물보다 친수성이 증가되고, 광역학 치료의 성능이 증가 된 새로운 광감작제이다(Fig. 1).

2) 세포배양

후두암환자로부터 수립한 편평상피세포암세포주(SNU-1041)⁷⁾를 culture flask(Nunc,USA)에서 RPMI-1041(Gibco BRL, USA) 배양액 500ml에 우태혈청(Gibco BRL) 50ml와 antibiotic-antimycotics(Gibco BRL) 5ml를 섞은 세포배양액으로 CO₂ 배양기내에서 배양하였다.

2. 실험방법

1) 레이저 조사시간(lasering time)에 따른 9HpbD- α 의 항암효과

Tetrazolium-based colorimetric(MTT) 검색법⁸⁾을 이용하여 9HpbD- α 농도 및 레이저조사시간에 따른 세포 생존율의 차이를 조사하였다. 초대배양이나 계대배양하여 세포가 배양용기의 바닥에 포화(confluence)되면, 세포를 10⁵/ml개씩 되게 배양액을 이용하여 희석한 후 flat bottom 96 well plate에 각 well당 100 μ l씩(10⁴개/well) 분주하여 24시간을 5% CO₂가 유지되는 항온항습기에서 배양하고 3.75 μ g/ml부터 0.007 μ g/ml까지 단계별로 희석된 9HpbD- α 를 포함한 배지로 갈아주었다. 대조군의 배지에는 9HpbD- α 를 녹일때 사용한 용매(에탄올)와 pH 7.3의 PBS를 같은 농도로 사용하였다. 각 농도의 9HpbD- α 를 포함한 배지로 갈아주고 바로 무균상태에서 Diode 레이저를 (10mW/cm²) 0분, 30분, 60분, 90분, 120분 동안 microplate 상방 10cm에서 diffuser tip을 이용하여 조사한 후, 각 well에 50 μ l pH 7.3의 PBS에 녹인 MTT용액(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)을 50 μ l씩 첨가하고 37 $^{\circ}$ C CO₂ 배양기에서 48시간동안 배양하였다. Formazan이 형성되면 각 well의 배지를 모두 제거하고 150 μ l의 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 첨가한 후 microplate mixer로 잘 흔들어 주었으며 ELISA reader(BIO_RED 450, USA)로 540nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 살아있는 세포의 수와 직접 비례하는데 9HpbD- α 를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 세포 생존율(cell viability)을 아래와 같은 공식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{Mean optical density in test well}}{\text{Mean optical density in control well}} \times 100$$

모든 실험은 9HpbD- α 각 농도마다 4개 well씩 평균 흡광도를 계산하여 세포 생존율을 구하였다.

2) 레이저 조사시기(interval time)에 따른 9HpbD- α 의 항암효과

세포를 10^5 /ml개씩 되게 배양액을 이용하여 희석한 후 flat bottom 96well plate에 각 well 당 $100 \mu\text{l}$ 씩 분주하여 24시간을 5% CO_2 가 유지되는 항온항습기에서 배양한다음 $3.75 \mu\text{g/ml}$ 부터 $0.007 \mu\text{g/ml}$ 까지 단계별로 희석된 9HpbD- α 를 포함한 배지로 갈아주고 0, 1, 4, 6, 18시간 후에 Diode 레이저(10mW/cm^2)를 60분동안 조사한 실험군과 9HpbD- α 를 첨가하지 않고 9HpbD- α 를 녹일 때 사용한 용매(에탄올)와 pH 7.3의 PBS를 같은 농도로 사용한 배지를 첨가한 대조군을 대상으로 MTT검사를 시행하여 9HpbD- α 를 첨가하고 레이저를 조사하기까지의 시간간격에 따른 흡광도와 세포 생존율의 변화를 알아보았다.

3. 통계처리

SAS 통계프로그램을 이용하여 각 농도에서의 레이저조사 시간 및 조사시기에 따른 9HpbD- α 의 항암효과의 차이를 two-way ANOVA test로 분석하였고 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 로 검증하였다.

결 과

1. 레이저 조사시간에 따른 흡광도 및 세포생존율

9HpbD- α 를 투여한 후 레이저 조사시간을 변화시킨 실험군이 9HpbD- α 를 투여하지 않은 대조군의 흡광도 (1.249 ± 0.042)보다 전체적으로 낮았다. $0.117 \mu\text{g/ml}$ 의 9 HpbD- α 농도에서 실험군의 흡광도는 레이저를 조사하지 않은 군(LT 0)에서 1.061 ± 0.080 , 30분간 조사한 군(LT 30)에서 1.014 ± 0.046 , 1시간 조사한 군(LT 60)에서 0.636 ± 0.031 , 90분간 조사한 군(LT 90)에서는 0.074 ± 0.021 이었고 2시간 조사한 군(LT 120)에서는 0.025 ± 0.004 로서 레이저 조사시간이 길어질수록 의미있는 흡광도의 감소를 보였다(Table 1).

9HpbD- α 농도증가 및 레이저 조사시간이 길어질수록 세포생존율의 감소를 확인할 수 있었고 살아있는 암세포의 농도를 9HpbD- α 비처리군(대조군)에 비해 50%로 줄일 수 있는 농도를 IC_{50} (Initial Concentration)으로 정의하면 레이저를 1시간 조사한 경우 대략 $0.117 \mu\text{g/ml}$ 정도로 추정할 수 있는데 이농도에서 각 실험군의 세포생존율은 LT 0군에서 $92.1 \pm 7.0\%$ 이고 LT 30군에서 $88.0 \pm 4.0\%$, LT

60군에서 $55.2 \pm 2.7\%$, LT 90군에서는 $6.4 \pm 1.8\%$ 로 급격한 감소를 보였고 LT 120군에서도 $2.2 \pm 0.4\%$ 로 매우 낮은 세포생존율을 보였다(Fig. 2).

2. 레이저 조사시기에 따른 흡광도 및 세포생존율

9HpbD- α 를 투여한 후 레이저 조사를 시행한 실험군이 대조군의 흡광도(1.538 ± 0.077)보다 전체적으로 낮았다. $0.117 \mu\text{g/ml}$ 의 9HpbD- α 농도에서 레이저를 바로 조사한 군(IT 0)의 흡광도는 1.248 ± 0.043 , 레이저를 1시간 후에 조사한 군(IT 1)의 흡광도는 1.242 ± 0.036 , 레이저를 4시간 후에 조사한 군(IT 4)의 흡광도는 0.770 ± 0.083 , 레이저를 6시간 후에 조사한 군(IT 6)의 흡광도는 0.398 ± 0.044 이였으며 18시간후(IT 18)에는 0.331 ± 0.102 로서 9HpbD- α 를 투여한 후 레이저를 조사한 시간 차이가 6시간까지는 의미있게 흡광도가 감소하였다.

IC_{50} 부근으로 추정되는 $0.117 \mu\text{g/ml}$ 에서 세포생존율은 IT 0군에서 $80.7 \pm 2.8\%$, IT 1군에서는 $80.7 \pm 2.3\%$, IT 4군에서는 $50.1 \pm 5.4\%$ 이고 IT 6군과 IT 18군의 세포생존율은 $25.9 \pm 2.8\%$ 과 $21.5 \pm 6.6\%$ 이었다(Fig. 3).

Table 1. Optical density of experimental groups with various lasering time

Group	Concentration of 9-HpbD- α		
	$0.015 \mu\text{g/ml}$	$0.117 \mu\text{g/ml}$	$0.938 \mu\text{g/ml}$
LT 0 *	1.129 ± 0.050	1.061 ± 0.080	0.728 ± 0.124
LT 30 †	1.098 ± 0.030	1.014 ± 0.046	0.092 ± 0.042
LT 60 ‡	1.012 ± 0.056	0.636 ± 0.031	0.022 ± 0.001
LT 90 §	0.969 ± 0.042	0.074 ± 0.021	0.019 ± 0.003
LT 120	0.926 ± 0.016	0.025 ± 0.004	0.018 ± 0.005

Optical density of control group : 1.249 ± 0.042

Values are mean \pm SD at 0.015, 0.117 and $0.938 \mu\text{g/ml}$ of 9-HpbD- α

Difference between means assessed by two-way ANOVA test $p < 0.05$

* : LT 0 vs LT 30, 60, 90, 120 † : LT 30 vs LT 0, 60, 90, 120

‡ : LT 60 vs LT 0, 30, 90, 120 § : LT 90 vs LT 0, 30, 60, 120

|| : LT120 vs LT 0, 30, 60, 90

LT 0 : Group without lasering

LT 30 : Group with lasering for 30 minutes

LT 60 : Group with lasering for 60 minutes

LT 90 : Group with lasering for 90 minutes

LT120 : Group with lasering for 120 minutes

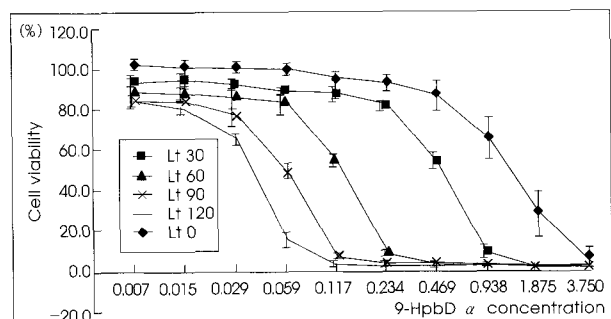


Fig. 2. Cell viability change by concentration of 9-HpbD- α and lasering time

Table 2. Optical density of experimental groups with various incubation time

Group	Concentration of 9-HpbD- α		
	0.015 $\mu\text{g/ml}$	0.117 $\mu\text{g/ml}$	0.938 $\mu\text{g/ml}$
IT 0*	1.375 \pm 0.039	1.248 \pm 0.043	0.722 \pm 0.052
IT 1 [†]	1.360 \pm 0.071	1.242 \pm 0.036	0.315 \pm 0.021
IT 4 [‡]	1.321 \pm 0.056	0.770 \pm 0.083	0.207 \pm 0.003
IT 6 [§]	1.188 \pm 0.087	0.398 \pm 0.044	0.163 \pm 0.055
IT 18	1.107 \pm 0.130	0.331 \pm 0.102	0.157 \pm 0.030

Optical density of control : 1.538 \pm 0.077

Values are mean \pm SD at 0.015, 0.117 and 0.938 $\mu\text{g/ml}$ of 9-HpbD- α

Difference between means assessed by two-way ANOVA test $p < 0.05$

* : IT 0 vs IT 1, 4, 6, 18 † : IT 1 vs IT 0, 4, 6, 18

‡ : IT 4 vs IT 0, 1, 6, 18 § : IT 6 vs IT 0, 1, 4 || : IT 18 vs IT 0, 1, 4

IT 0 : Group without incubation time

IT 1 : Group with incubation time of 1 hour

IT 4 : Group with incubation time of 4 hour

IT 6 : Group with incubation time of 6 hour

IT 18 : Group with incubation time of 18 hour

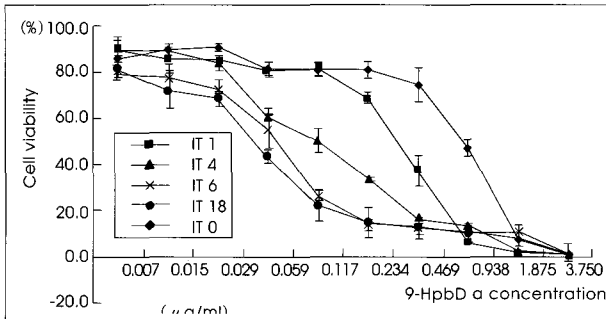


Fig. 3. Cell viability change by concentration of 9-HpbD-a and

incubation time. 이상의 결과는 각각의 요인(레이저 조사시간 및 시간간격) 사이에 통계적으로 유의한 흡광도의 차이를 나타내었고, 광감작제의 농도에 따라서도 유의적인($p < 0.05$) 차이를 보여주었다

고찰

우수한 광감작제는 높은 광반응성과 650nm 이상에서 상대적으로 높은 흡광도를 가지며, 암조직과 주변조직에 선별적으로 흡수되어야 하고 치료용량에서 인체에 독성이 없이 빠른 시간내에 대사되어 부작용이 없어야 한다. 또한 이상적인 광감작제는 상대적으로 낮은 제조비와 대량 생산성 및 고순도 등의 조건을 만족시켜야 한다⁵⁾.

이와 같은 조건을 만족시킬 수 있는 차세대 광감작제로는 클로린 구조를 가지며, 자연계에서 흔한 엽록소류를 기본으로 하는 유도체가 최근 주목을 받고 있다⁹⁾. 특히 chlorophyll에서 금속 이온을 제거한 피오포바이드 α 와 이의 파이틸(phytyl)기를 가수 분해 시킨 피오포바이드 α (pheophorbide)는 흡수 파장이 650nm 이상으로 Photofrin의 단

점을 보장 할 수 있고, 다른 클로린 구조를 갖는 광감작제가 체내에서 배설되는데 시간이 오래걸리는 단점을 줄여 체내 누적을 방지할 수 있는 분자 수준의 구조를 변형 시킬 수 있는 장점이 있다. 그러나 피오포바이드 α 는 상온에서 서서히 분해가 일어나 안정성이 떨어지는 단점이 있는데 이를 보완한 신규 피오포바이드 α , 9-Hydroxypheophorbide- α (9HpbD- α)를 국내에서 자체 개발하였고 본 연구에서는 이를 이용한 광역학치료의 항암효과를 알아보고자 하였다.

누에 분변(silkworm excreta)에서 분리한 클로로필 추출물(CpD)을 이용한 다른 연구에서는 세포내 광감작제의 농도가 광감작제 첨가 30분이내에는 시간에 비례해서 증가하고 그 이후에는 크게 변화가 없는 것으로 보고하였다⁴⁾. 본 연구에서는 9HpbD- α 의 농도변화에 따라서 레이저 조사시간이 길어질수록 세포 생존율이 지수적 감소 현상을 보였는데 이는 세포 독성효과가 단순한 광감작제의 세포내 농도증가에 비례하기 보다는 세포내에서 광감작제에 의한 새로운 신호전달 과정(signaling pathway)이 있고 계속해서 반응물질의 생산이 일어남을 시사하는 소견이다. 광물리학적으로 광역학치료에 의한 세포내 작용기전은 광물리 현상으로 이해되고 있는데 바닥상태(S_0)의 광감작제를 특정과장으로 활성화시키면 단일항 상태(singlet state, S_1)로 되고 매우 불안정한 단일항 상태는 바닥상태(ground state)로 환원되면서 에너지를 방출하는데 이때 나타나는 형광성(fluorescence)을 진단에 이용하거나 조직내 광감작물질의 분포를 조사하는데 사용할 수 있다. 단일항 상태의 시간은 불과 수 nano 초에 불과하기 때문에 주위에 반응을 일으키는 작용시간이 매우 적고 광역학치료에서 나타나는 독성효과는 주로 3중항 상태(triplet state, T_1)에서 바닥상태로 될 때 방출되는 에너지에 의해 나타나며 이때 반응시간은 micro에서 milli 초로서 반응을 유발하기에는 충분한 시간이다¹⁰⁾. 광감작제 첨가후 특정과장이 아닌 자연광에 폐광장치없이 노출시켰을 경우 세포생존은 평균 210분으로 광감작제 만으로도 세포독성이 있다는 보고가 있었고⁴⁾ 본 연구에서도 비슷한 결과를 확인 할 수 있었다. 특정 파장의 빛을 조사(illumination)하는 방법에는 연속적 또는 간헐적으로 조사하는 것을 생각할 수 있는데, 두 방법이 세포독성효과에는 특별한 영향은 주지 않는다는 보고¹¹⁾와 간헐적조사(on-off mode)가 유의한 세포독성효과를 보인다는 보고¹²⁾로 나뉘지만 본 연구에서는 빛을 연속적으로 조사하였다.

9HpbD- α 첨가 후 레이저를 조사하기 까지의 시간간격에 따른 세포생존율은 6시간까지는 감소율이 증가하다가 그 이후에는 완만해지고 1.875 $\mu\text{g/ml}$ 이후에는 모든 경우에서 10%미만의 세포생존율을 보여 세포내 9HpbD- α 가 포화농도에 이르면 짐작할 수 있었다. 또한 6시간까지 계속

되는 세포생존율의 감소는 9HpbD- α 가 지속적으로 세포 내 목표지점 (intracellular target area), 즉 반응을 일으키는 특정부위에 위치하고 있기 때문이며, 그 이후에 세포생존율 감소가 둔화되는 이유는 9HpbD- α 가 목표지점에서 떨어져 나와 불활성화 되거나, 9HpbD- α 간에 응집같은 이차적인 변화가 일어나서 효과가 떨어질 수 있는 가능성을 생각할 수 있고, 세포내 다른 목표지점으로 이동하여 다른 반응을 유발하는 재분산(redistribution)¹⁰⁾이 일어나는 경우에는 세포생존율의 감소가 지속될 가능성도 있을 것이다.

친지질성(lipophilic) 광감작제의 세포내 목표지점으로는 리소솜(lysosomes), 사립체(mitochondria), 소포체(endoplasmic reticulum)와 핵(nucleus) 등의 다양한 막으로 알려져 있고 특정장소에 고정되는 데 영향을 주는 인자에는 광감작제의 전하(charge)와 화학특성 등이 관여한다¹³⁾. 그리고 세포내 흡수되는 양에 영향을 주는 인자에는 배양 온도, 혈청의 존재 그리고 일광에 노출여부 등인데 37°C에서 0°C보다 높고 어두운 곳이 밝은 곳보다 흡수되는 양이 많고 혈청 단백질이나 알부민 지질단백 등이 많으면 이들과 결합하는 광감작제의 양이 많기 때문에 상대적으로 세포내 농도는 감소한다⁴⁾. 그러나 광역학치료의 효율성을 좌우하는 것은 단순한 세포내 광감작제의 총 농도가 아니라 세포내 광감작제의 분포로서 반응을 유발하는 장소, 목표지점에 있는 광감작제의 양이 중요한 관건이다¹¹⁾.

광역학치료후에 나타나는 세포반응은 세포내 광감작제의 위치, 세포주의 종류, 레이저 용량 등에 따라서 apoptosis나 괴사과정을 통한 세포파괴 과정을 밟거나 스트레스 호르몬의 변화에 의한 세포의 회복과정으로 크게 나뉘는데 최근 이들의 정보전달과정에 대한 많은 연구¹⁰⁾들이 진행 중이다. 본 연구에서 세포독성효과의 판정은 MTT 분석을 통해 시행하였는데 이는 사립체의 기능에 국한된 검사로서 apoptosis와 전반적인 세포파괴기전의 관계를 확인하기에는 부족하다. 클론형성(clonogenic) 분석을 이용하면 광역학치료의 DNA에 대한 돌연변이 유발력(mutagenicity)¹⁴⁾ 등 다른 기전의 세포파괴 효과를 확인 할 수 있고 정확한 세포의 생존능력을 평가할 수 있을 것이다.

결 론

본 연구의 결과 in vitro에서 9HpbD- α 를 이용한 광역학치료는 유의한 항암효과를 나타냈고 그 효과로 볼 때 새로운 광감작제로서 in vivo 실험을 거쳐 두경부 영역의 새로운 광감작제로 이용될 것으로 기대된다.

References

- 1) Carl D. Regillo : *Update on photodynamic therapy* : *Curr Opin Ophthalmol.* 2000 ; 11 : 166-170
- 2) Chung PS : *Photodynamic therapy.* In : Kim CS, Min YG, Kim KH. *Seoul symposium 5 (2).* Seoul National University. 1995 : 193-215
- 3) TJ Dougherty, JE Kaufman, A Goldfarb, KR Weishaupt, D Boyle : *Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors* : *Cancer Res.* 1978 ; 38 : 1978
- 4) Lee WY, Park JH, Kim BS, Han MJ, Hahn BS : *Chlorophyll derivatives (CpD) extracted from silk worm excreta are specifically cytotoxic to tumor cells in vitro* : *Yonsei Medical Journal.* 1990 ; 31 (3) : 225-233
- 5) R Allman, P Cowburn, M Mason : *Effect of photodynamic therapy in combination with ionizing radiation on human squamous cell carcinoma cell lines of head and neck* : *Br J Cancer.* 2000 ; 83 (5) : 655-661
- 6) R Dai, R Shoemaker, D Farrens, Han MJ, Kim CS, Song PS : *Characterization of silkworm chlorophyll metabolites as an active photosensitizer for photodynamic therapy.* *J Nat Products.* 1992 ; 55 (9) : 1241-1251
- 7) Kim KH, Chung PS, Park JG : *A study of establishment of SNU cell line in the head and neck.* *Korean J Head and Neck Oncol.* 1996 ; 12 : 181-187
- 8) Yang YM : MTT assay. In : Koo JR, Kim WH, Park JG et al. *The 1st Korean cell line reserch workshop.* 1998 : 34-46
- 9) Park YJ, Lee WY, Hahn BS, Han MJ, Yang WI : *Chlorophyll derivatives-a new photosensitizer for photodynamic therapy of cancer in mice.* *Yonsei Medical Journal.* 1989 ; 30 (3) : 212-218
- 10) Anne C.E. Moor : *Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy* : *Phototochem Photobiol.* 2000 ; 57 : 1-13
- 11) Jin He, Min-Fen Horng, J. Thom Deahl, Nancy L. Oleinick : *Variation in photodynamic efficacy during the cellular uptake of two phthalocyanine photosensitizers* : *Photochem Photobiol.* 1998 ; 67 (6) : 720-728
- 12) Muller S, Walt H, Hallr U, Fiedler D : *Enhanced photodynamic effects using fractionated laser light.* *J Photochem Photobiol.* 1998 ; 42 (1) : 67-70
- 13) Moan J, Berg EK, Western A, Malik Z : *Intracellular localization of photosensitizers.* In : G Bock, S harnett. *Photosensitizing Compounds, their chemistry, biology and chemical use.* CIBA foundation symposium, 1989 : 95-111
- 14) A Ketabchi, A Macrobert, PM Speight, JH Bennet : *Induction of apoptotic cell death by photodynamic therapy in human keratinocytes.* *Arc Oral Biol.* 1998 : 143-149