

간암 세포주에서 5-ALA 및 ALA-methyl ester에 의해 유도된 Protoporphyrin IX의 형광 검출

김 명 화 · 김 정 미 · ¹김 현 정 · ¹이 인 선 · ²김 경 찬 · † 이 창 섭
계명대학교 화학과, ¹전통미생물자원개발 및 산업화연구센터, ²디지털물리학과
(접수 : 2007. 2. 2., 게재승인 : 2007. 4. 20.)

Fluorescence Detection for Protoporphyrin IX Induced from 5-ALA and ALA-methyl ester in Incubated Liver Cancer Cells

Myung-Hwa Kim, Jung-Mi Kim, Hyun-Jeong Kim¹, In-Seon Lee¹, Kyung-Chan Kim², and Chang-Seop Lee[†]
Department of Chemistry, ¹The Center for Traditional Microorganism Resources,

²Department of Digital Physics, Keimyung University, 1000 Sindang-Dong, Dalseo-Gu, Daegu 704-701, Korea
(Received : 2007. 2. 2., Accepted : 2007. 4. 20.)

To clarify the usefulness of fluorescent diagnosis for cancer, we investigated the optimal method of administrating 5-aminolevulinic acid (5-ALA), 5-aminolevulinic acid methyl ester (ALA-methyl ester) by analyzing fluorescence signal of Protoporphyrin IX (PpIX) in the cultured normal and cancer cells. 5-ALA and ALA-methyl ester was injected as a photosensitizer to the cancer liver cells (HepG2) and normal liver cells (Chang). Chang and HepG2 cells were incubated with various concentrations of 5-ALA and ALA-methyl ester (0-800 µg/mL). The accumulation of PpIX induced by 5-ALA and ALA-methyl ester was in HepG2 and Chang. The cell viability was measured by MTT assay. Fluorescence of PpIX in HepG2 cell was excited at a wavelength ($\lambda = 410 \text{ nm}$) and showed an emission spectrum at 603.2 nm, 660.8 nm and 603.2 nm, 661.4 nm which could be related to the PpIX generation induced by the applied 5-ALA and ALA-methyl ester, respectively. The experimental results showed that fluorescence signal of PpIX was proportional to the concentration of 5-ALA and ALA-methyl ester in tumor cells, but measured with low concentration in normal cells. Another results showed that the PpIX formation rate induced by ALA-methyl ester is higher than that of 5-ALA.

Key Words : 5-aminolevulinic acid, 5-aminolevulinic acid methyl ester, protoporphyrin IX, photosensitizer

서 론

광민감제 (Photosensitizer)의 세포 내 분포는 sensitizer의 물리화학적 성질에 따라 다르다. HpD나 photofrin 및 photogem과 같은 친수성의 sensitizer와 5-aminolevulinic acid (5-ALA)에 의해 유도된 Protoporphyrin IX (PpIX)는 주로 미토콘드리아, 소포체, 세포질막, 핵막과 세포핵 주변에 축적되나, 리소좀과 세포핵에는 훨씬 적은 양이 분포한다. 반면에 좀 더 친수성의 sensitizer의 경우에는 리소좀에 주로 축적된다. 종양조직은 저밀도 지단백 수용체의 증가, 산성 pH 등이 특징적이며, 종양 기질은 새로운 결합조직

(porphyrin에 결합)의 합성, 지질의 증가 등이 특징적으로 정상조직과 구별되며 이러한 성질이 광민감제의 종양선택성에 관계한다. 종양조직의 저밀도 지단백 수용체와 결합한 광민감제는 내포작용 (endocytosis)에 의해 세포안으로 들어가 다시 세포 내 membraneous domain 즉 원형질, 미토콘드리아, 골지체, 소포체 등에 분포한다(1, 2).

최근 들어 각광받고 있는 5-ALA는 heme의 생합성 경로 중 광민감제인 PpIX로 전환된다. 이때 외부로부터 ALA가 많이 투여되면 인체 내 과량의 heme이 생성되어 PpIX를 heme으로 전환시키는 효소를 저해하여 세포 내에 PpIX가 많이 축적된다. 이 PpIX가 광민감제로 활성화되면 형광을 내고 세포독성을 나타내므로 ALA는 암의 광역학 진단과 치료에 사용되어왔다(3-12). 그러나 5-ALA는 친수성으로 세포막을 통한 투과율이 다소 낮아, ALA의 구조를 변형한 친수성 유도체들이 광민감제로의 가능성이 높다는 연구들이 보고되었다(13-16). 즉 친수성인 ALA는 피부로 적용할

† Corresponding Author : Department of chemistry, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Tel : +82-53-580-5945, Fax : +82-53-588-3408

E-mail : surfkm@kmu.ac.kr

때 효율성이 떨어지며 PpIX가 축적되지 않는 경우에는 사용이 불가능하여 모든 병변에 다 효과적이지 않다. 반면, 친유성의 ALA esters 유도체를 사용하면 세포막에 보다 침투가 용이하여 ALA의 단점을 개선할 수 있다.

최근에는 누드마우스에 인간의 비인강암 세포주 (NPC/CNE-2)를 이종이식하여 종양을 만들어 5-aminolevulinic acid (5-ALA)와 5-aminolevulinic acid methyl ester (ALA-methyl ester)에 의해 유도된 Protoporphyrin IX (PpIX)를 비교 실험한 결과 암 조직에서 형광이 높았으며(17), 또한 누드마우스에 두경부 편평 암세포인 SNU-1041 세포주를 이식하여 종양을 만든 다음, 마우스의 각 부위별로 ALA 및 ALA-methyl ester를 투여하고 종양조직과 정상조직에서의 형광을 측정하여 비교 연구 등이 보고되었다(18).

이에 본 연구에서는 5-ALA와 함께 ALA-methyl ester를 이용하여 간암 세포 내에서의 PpIX 축적을 형광 스펙트럼으로 비교 측정하여 암 진단의 기초자료로 이용하고자, 인간 유래의 간암 세포주인 HepG2와 정상 간세포주인 Chang에 대해 5-ALA 및 ALA-methyl ester의 농도를 달리하여 각각 처리한 후 세포독성 및 세포 내·외에서 유도되는 PpIX 생성을 형광 스펙트럼으로 측정하여 확인하였다.

재료 및 방법

세포주 및 세포배양

본 실험에 사용된 인간 유래의 간암 세포주인 HepG2와 정상 간세포인 Chang은 계명대 식품가공학과에서 제공받아 사용하였다. 이들 세포주는 minimum essential medium (MEM) 배지에 10% FBS (fetal bovine serum)와 1% antibiotics (penicillin/streptomycin)를 첨가하여 37°C의 5% CO₂ incubator (Forma Co., USA)에서 2~3일에 한번씩 계대배양하면서 사용하였다.

ALA와 ALA-methyl ester 용액의 제조 및 처리

5-Aminolevulinic acid hydrochloride (Merck Co., Darmstadt, Germany)와 5-aminolevulinic acid methyl ester (Sigma Chemicals Co., St. Louis, USA)는 phosphate buffer solution (PBS)에 녹여 5 mg/mL의 stock solution을 만들어 사용하였다. ALA의 처리는 먼저 배양된 cell에 MEM 배지를 첨가하고 잘 혼합하여 세포수를 1.5×10^6 cells/well로 조정한다. 다음, 6-well microtiter plate에 준비된 cell을 3 mL씩 첨가하고, 준비된 ALA와 ALA-methyl ester를 0, 50, 100, 200, 400, 800 µg/mL씩의 농도로 첨가한 후 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다.

PpIX의 standard curve 측정

Protoporphyrin IX (Sigma Chemicals Co., St. Louis, USA)는 methanol과 0.9 M perchloric acid가 1 : 1 혼합된 용액과 trypsin/EDTA 용액을 같은 부피로 첨가하여 용해시켰다. 그리고 PpIX의 용액을 0~1.4 µg/mL 농도로 만들어 Fluorolog 3-11 형광광도계 (Instruments S. A., Inc., New Jersey, USA)로 측정하여 PpIX의 standard curve를 얻었으며,

Mathematica 5 program을 이용하여 PpIX 형광 세기를 분석하였다.

세포 내·외의 PpIX 생성 검출

간암 세포주인 HepG2와 정상 간세포주인 Chang에 5-ALA와 ALA-methyl ester를 처리하여 세포 내·외에서 생성된 PpIX의 검출은 다음과 같이 수행하였다. 먼저 세포 외에서 축적된 PpIX는 세포에 5-ALA와 ALA-methyl ester를 처리하여 24시간 동안 배양한 후 각 well의 상등액인 배지를 모아 tube로 옮기고 이를 형광광도계로 측정하여 세포 외에서 축적된 PpIX를 관찰하였다.

세포 내에 축적된 PpIX는 배지를 제거하고 남은 세포에 대하여 PBS로 2~3차례 세척한 다음, 각 well에 trypsin/EDTA를 2 mL씩 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 방치하였다. 세포가 완전히 깨어지면 methanol과 0.9 M perchloric acid가 1 : 1 혼합된 용액을 2 mL 첨가하였다. 이 용액을 모아 2,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 취하고 세포 내 형광 세기를 관찰하여 PpIX의 농도를 측정하였다(19). 또한 형광광도계에서 측정된 5-ALA와 ALA-methyl ester에 의해 생성된 세포 내·외에서의 PpIX 생성 형광 세기의 분석은 Mathematica 5 program을 이용하였다.

세포독성 검사

5-ALA와 ALA-methyl ester에 의한 간암 세포 및 정상 간세포에 대한 세포 증식에 미치는 영향은 MTT assay(20)로 측정하였다. 배양된 cell에 MEM 배지를 첨가한 후 잘 혼합하여 cell수를 1.5×10^6 cells/well로 조정한다. 다음 96-well plate에 3 mL씩 첨가하고, 5-ALA와 ALA-methyl ester 농도를 50, 100, 200, 400, 800 µg/mL씩 되도록 첨가하여 37°C의 5% CO₂ 분위기에서 24시간 배양하였다. 배양 후 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 시약 (5 mg/mL) 200 µL를 각 well에 첨가한 후 다시 4시간 더 배양한 다음, 생성된 formazan 결정을 DMSO (dimethyl sulfoxide)로 용해시켜 cell plate reader (Bio-Rad Co., USA)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 5-ALA와 ALA-methyl ester의 세포 증식률은 다음 식과 같이 계산하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{ALA 처리군의 흡광도}}{\text{대조군(ALA 무처리군)의 흡광도}} \times 100$$

결과 및 고찰

5-ALA와 ALA-methyl ester의 세포증식률

정상 간세포 및 간암 세포에 대한 5-ALA와 ALA-methyl ester 처리에 의한 세포증식에 미치는 영향을 조사하였다. Table 1과 같이 간암세포인 HepG2에 대한 5-ALA의 농도에 따른 세포생존율은 50 µg/mL에서 96.3%, 100 µg/mL에서 93.6%, 200 µg/mL에서 92.2%, 400 µg/mL에서 81.7%, 800 µg/mL에서 78.3%로 5-ALA를 처리하지 않은 대조군과 비교해 볼 때, 5-ALA의 농도가 증가함에 따라 농도 의존

적으로 세포의 생존율이 감소됨을 확인할 수 있었다. HepG2에 대한 ALA-methyl ester의 처리 시 Table 2와 같이, 50 µg/mL에서 91.7%, 100 µg/mL에서 91.0%, 200 µg/mL에서 92.4%, 400 µg/mL에서 88.4%, 800 µg/mL 82.4%의 세포 생존율을 나타내었다.

또한 정상 간세포인 Chang에 5-ALA 및 ALA-methyl ester를 처리했을 경우 최고 농도인 800 µg/mL를 처리한 경우를 제외한 50~400 µg/mL 농도에서는 간암세포보다 정상세포에서 5-ALA 및 ALA-methyl ester의 세포독성이 더 적음을 알 수 있었다.

특히 정상 간세포 및 간암 세포주에 광민감제인 5-ALA와 ALA-methyl ester를 농도별로 투여하여 세포생존율을 비교해보면, 5-ALA보다 ALA-methyl ester의 세포의 생존율이 높게 나타나 ALA-methyl ester의 사용이 생체에 더 긍정적인 영향을 미칠 것으로 예상되었다.

Table 1. Viability of cells exposed 5-aminolevulinic acid during 24 h

5-ALA (µg/mL)	Viability of Chang	Viability of HepG2
0	100	100
50	97.4	96.3
100	96.7	93.6
200	95.4	92.2
400	85.4	81.7
800	70.3	78.3

Table 2. Viability of cells exposed 5-aminolevulinic acid methyl ester during 24 h

ALA-methyl ester (µg/mL)	Viability of Chang	Viability of HepG2
0	100	100
50	98.3	91.7
100	97.8	91.0
200	95.5	92.4
400	89.8	88.4
800	72.2	82.4

5-ALA에 의해 유도된 세포 내·외에서 PpIX의 측정

5-ALA 농도를 달리하여 처리한 후 24시간 동안 배양한 정상 간세포인 Chang에서 5-ALA에 의해 유도된 PpIX의 생성 정도를 형광 스펙트럼으로 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. PpIX의 형광 (emission) 스펙트럼은 여기 파장이 410 nm일 때 세포 외에서는 614.3 nm와 676.7 nm, 세포 내에서는 602.6 nm 및 659.3 nm에서 형광 봉우리가 관찰되었다.

한편 간암세포인 HepG2에 5-ALA를 처리하여 형광 스펙트럼을 측정된 경우에는 형광 방출스펙트럼은 여기 파장이 410 nm일 때 622.1 nm와 676.1 nm, 세포 내에서는 603.2 nm 및 660.8 nm에서 형광 피크가 관찰되었으며 이를 Fig. 2에 나타내었다. 이는 Fig. 5에서 나타낸 표준 PpIX의 형광 봉우리의 위치와 잘 일치하였다. HepG2 세포에 5-ALA를 주입하고 배양함으로써 생성되는 PpIX의 양은 PpIX 형광강도의 측정을 통해서 알 수 있었다. HepG2의 세포 내·외에서 5-ALA의 농도에 따른 PpIX의 형광강도는 5-ALA 농도가 400 µg/mL에서 최고치를 나타내었고, 그 이상의 농도에서는 감소하여 PpIX의 최고 형광강도를

나타내는 5-ALA 최적 농도가 존재하였다. 형광 봉우리가 뚜렷한 최적의 5-ALA 농도에서는 PpIX의 생성이 가장 높았으나 역치 농도에서는 PpIX의 생성이 오히려 감소하는 것으로 알려져 있다(2).

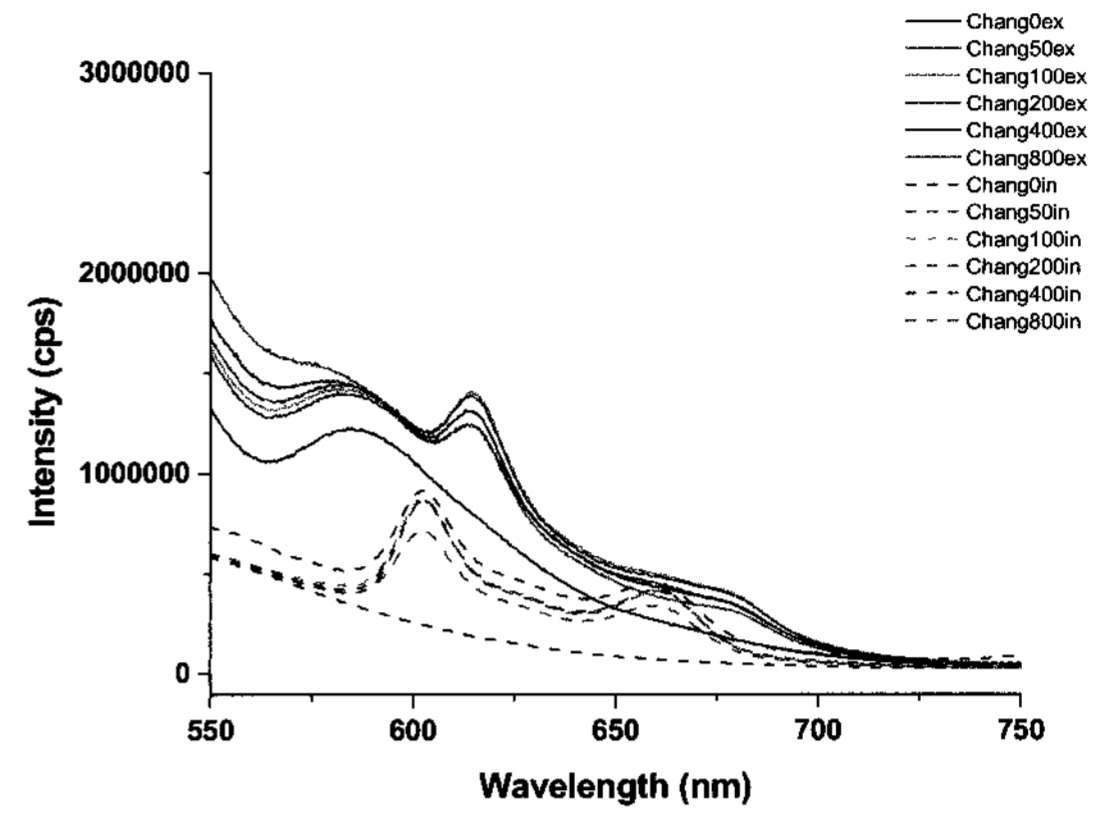


Figure 1. Fluorescence spectrum of ALA induced PpIX in Chang cells.

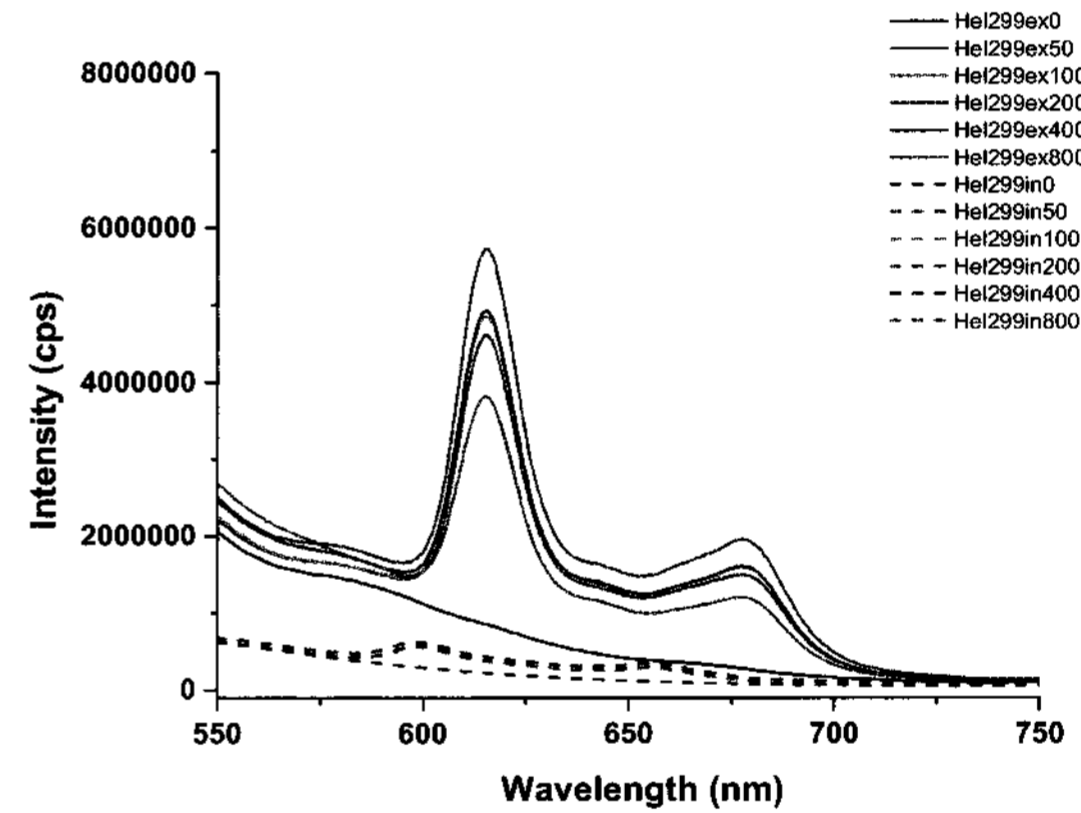


Figure 2. Fluorescence spectrum of 5-ALA induced PpIX in HepG2 cells.

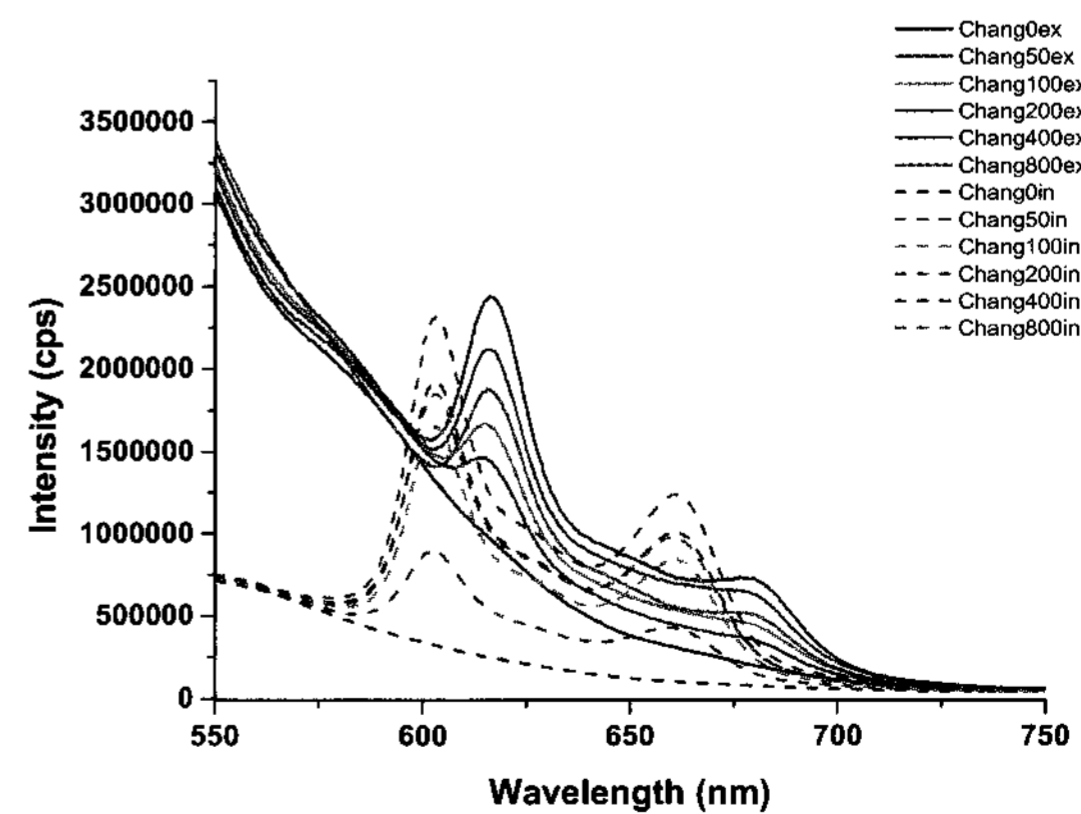


Figure 3. Fluorescence spectrum of ALA-methyl ester induced PpIX in Chang cells.

ALA-methyl ester에 의해 유도된 세포 내·외에서 PpIX의 축적

Fig. 3에서는 정상 간세포인 Chang에 ALA-methyl ester 농도를 달리하여 처리한 후 24시간 동안 배양하여 ALA-methyl ester에 의해 유도된 PpIX의 생성을 형광 스펙트럼으로 측정된 결과를 나타내었다. Fig. 3에서 볼 수 있듯이, ALA-methyl ester에서의 형광 스펙트럼은 여기 파장이 410 nm일 때 세포 외에서는 616.1 nm 및 678.2 nm, 세포 내에서는 603.2 nm 및 660.5 nm에서 형광 피크가 관찰되었다.

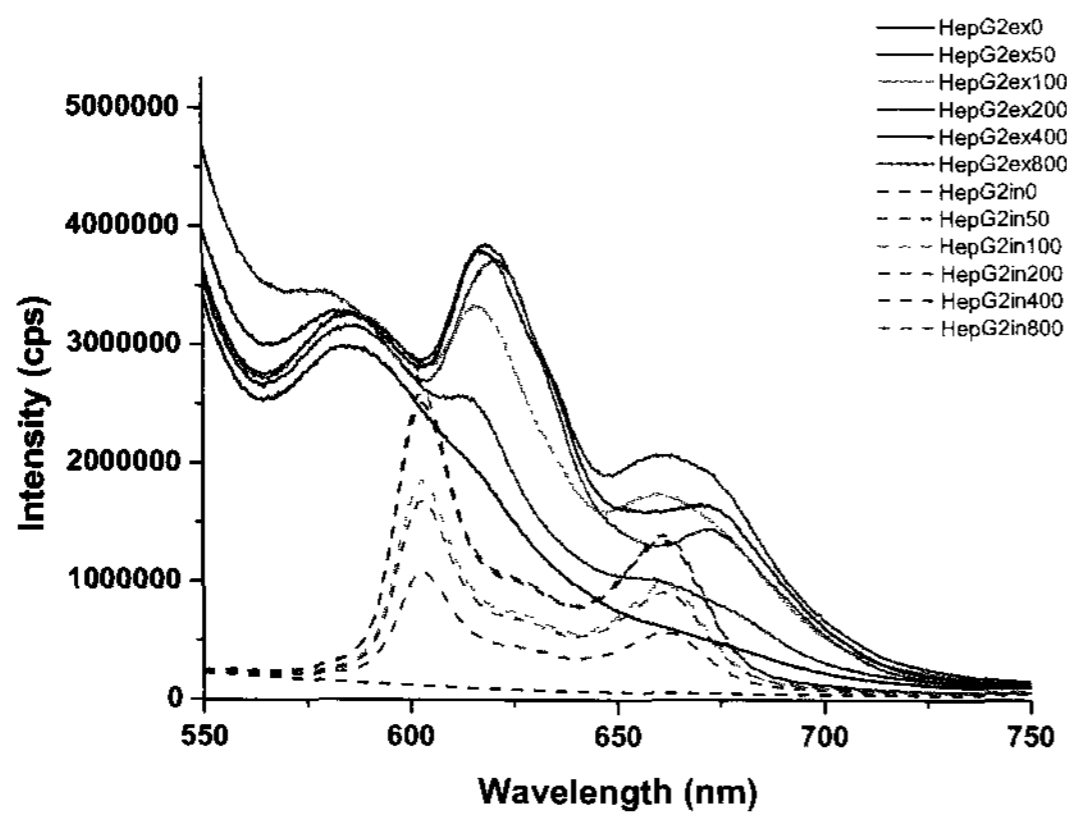


Figure 4. Fluorescence spectrum of ALA-methyl ester induced PpIX in HepG2 cells.

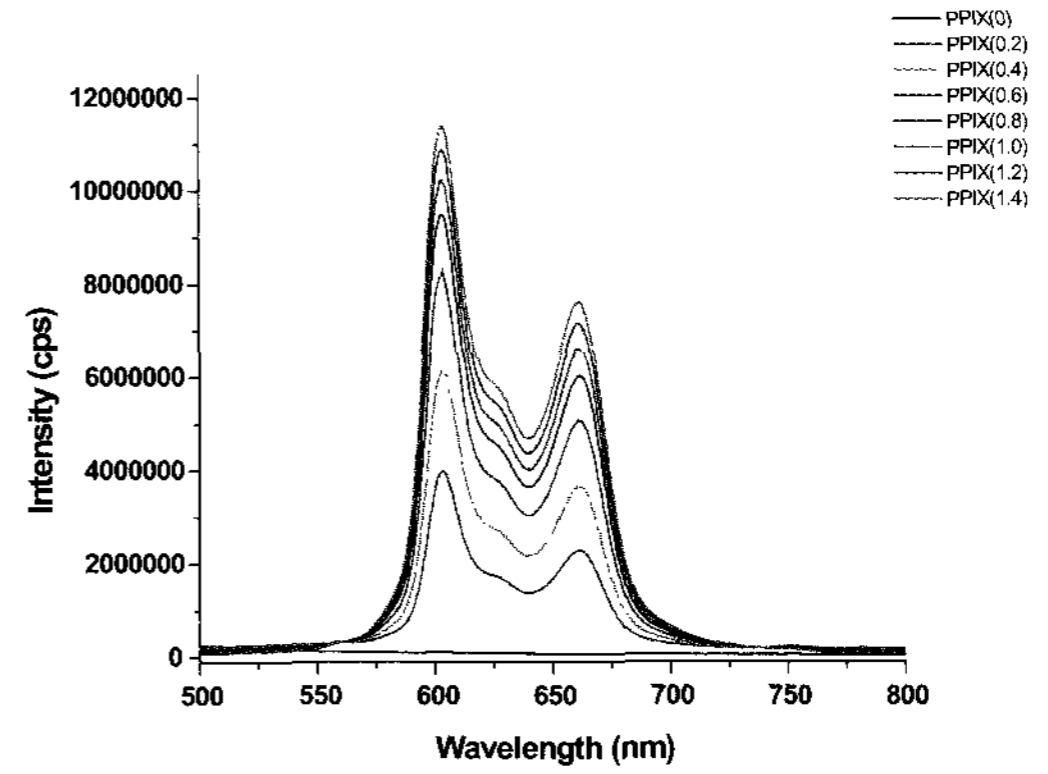
간암 세포인 HepG2에 ALA-methyl ester의 농도를 달리하여 처리한 후 24시간 동안 배양한 다음 유도되는 PpIX의 생성을 형광 스펙트럼으로 측정하였다. Fig. 4와 같이 ALA-methyl ester에서의 형광 (emission) 스펙트럼의 여기 파장이 410 nm일 때 세포 외에서는 618.8 nm 및 670.1 nm, 세포 내에서는 603.2 nm 및 661.4 nm에서 형광 피크가 관찰되었다. 이는 Fig. 5의 표준 PpIX의 형광 봉우리의 위치와 일치하였다.

5-ALA 및 ALA-methyl ester에 의해 유도된 세포 내·외에서 PpIX의 축적 비교

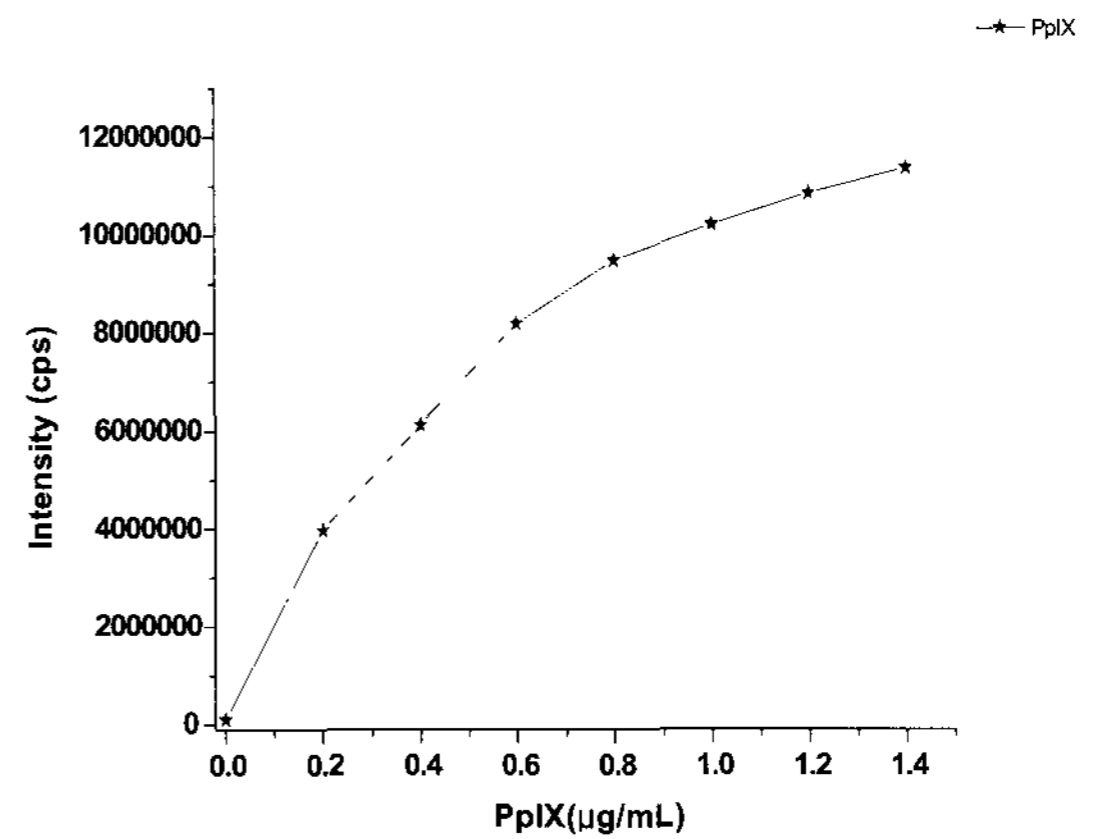
HepG2와 Chang 세포주에 5-ALA 및 ALA-methyl ester의 처리에 의한 세포 내·외에서 생성된 PpIX의 형광 스펙트럼을 측정된 결과, Fig. 6과 Fig. 7에서 보듯이 Chang과 HepG2 모두 5-ALA와 ALA-methyl ester에 의한 PpIX의 생성은 세포 외에서보다 세포 내에서 더 많이 축적되었다.

5-ALA와 ALA-methyl ester에 의한 PpIX의 생성을 세포 주별로 비교해 보면 Fig. 8과 같이, ALA-methyl ester의 처리시 5-ALA 처리보다 더 효율적으로 세포 내에서 PpIX가 생성되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 5-ALA가 친수성 물질이기 때문에 세포막을 통해 침투하는데 있어서 효율성의 문제를 가지고 있었으나, ALA의 구조에 methyl ester 형태의 유도체를 사용하여 친유성을 높여 세포막으로의 침투가 보다 용이한 것으로 생각되었다. 또한 Uehlinger 등 (15)은 인간의 폐나 방광에서 유래된 세포주 (A549, T24,

J82)에 ALA 대신에 ALA ester를 사용하여 임상에 적용했을 때 PpIX의 생성이 증가된다고 보고하였는데, 본 실험 결과와도 유사한 경향을 나타내어 ALA-methyl ester의 임상 적용에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 예상된다.



(a)



(b)

Figure 5. Fluorescence spectrum of standard protoporphyrin IX in isotonic saline.

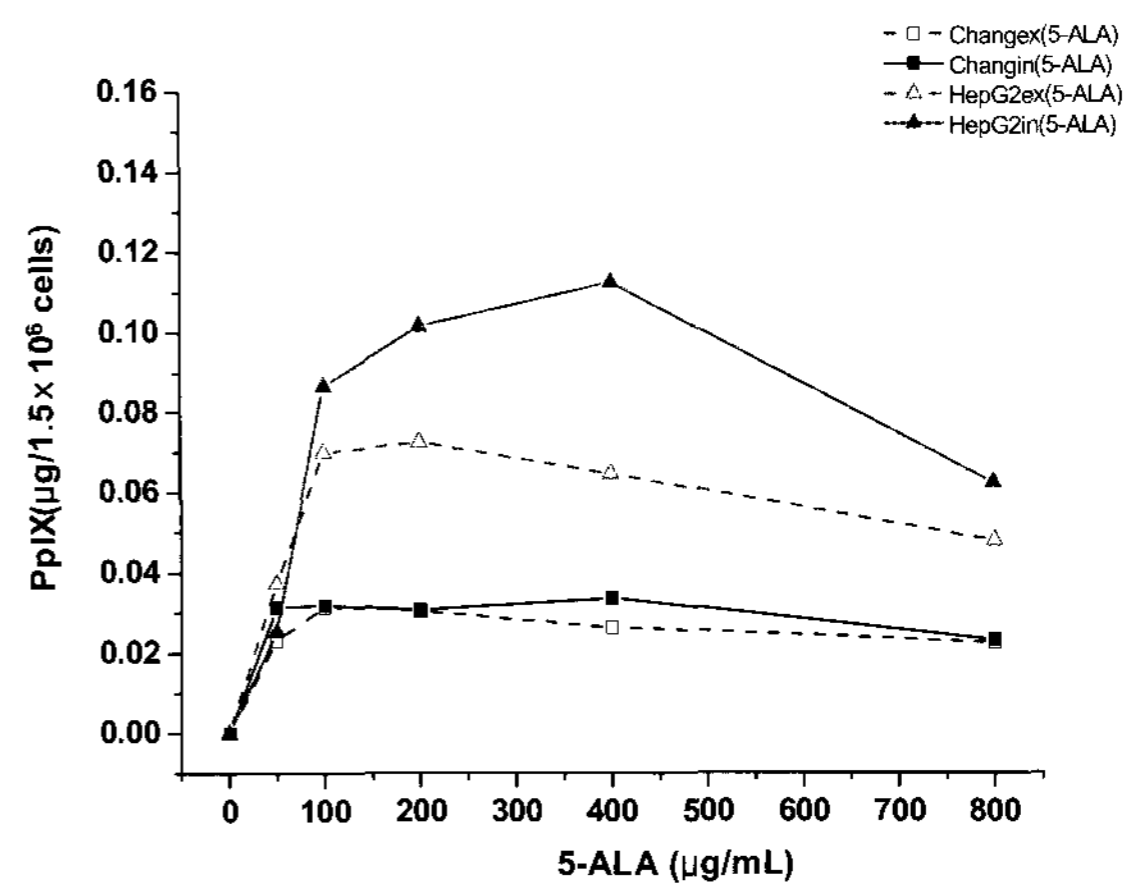


Figure 6. Concentration PpIX in normal liver Chang cells and liver cancer HepG2 cells exposed to 5-ALA for 24 h.

5-ALA에 대한 세포 내·외의 PpIX의 생성비는 Chang 및 HepG2에서 각각 1 : 2.39, 1 : 3.35으로 나타났고, ALA-methyl ester에 대한 세포 내·외의 PpIX의 생성비는 1 : 1.20, 1 : 1.25으로 나타났다. 특히 Chang에 비해 HepG2에서 형광 세기가 더 큰 것으로 나타나 ALA에 의해 유도된 PpIX의 생성은 정상세포보다는 암세포에서 더 높은 농도로 축적되는 것을 알 수 있었다. 이는 자궁경부암 세포주 (HeLa) 및 정상 세포주 (Chang)에 5-ALA를 투여한 후 유도된 PpIX의 생성을 관찰한 결과 암세포에서 더 많은 PpIX가 축적되었다는 보고(7)와 유사한 경향으로 나타났다.

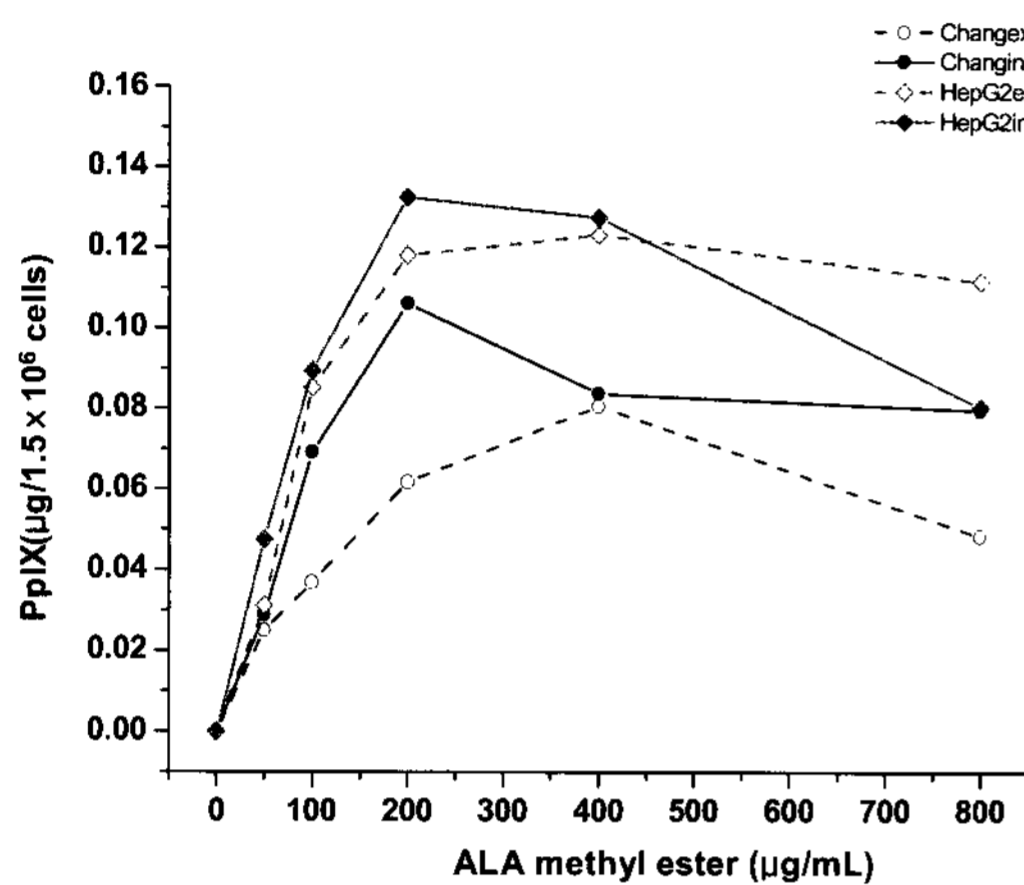


Figure 7. Concentration PpIX in normal liver Chang cells and liver cancer HepG2 cells exposed to ALA-methyl ester for 24 h.

요 약

형광을 이용한 암 진단을 위해 배양된 정상 및 암세포주에 광민감제인 5-ALA, ALA-methyl ester를 투여하고 세포 내·외에서 생성된 Protoporphyrin IX (PpIX)의 형광을 측정하여 5-ALA, ALA-methyl ester 투여의 최적 농도를 조사하였다. 정상 간세포주 (Chang) 및 간암 세포주 (HepG2)

에 5-ALA와 ALA-methyl ester를 농도별로 투여하여 5-ALA와 ALA-methyl ester에 의해 유도된 PpIX의 생성을 확인하고, MTT assay로 세포생존율을 측정하였다. 배양된 cell에 5-ALA와 ALA-methyl ester를 투여한 후 24시간 동안 배양함으로써 생성되는 PpIX의 양은 형광의 강도로 측정하였다. 이 때의 형광 (emission) 스펙트럼은 여기 파장이 410 nm일 때 603.2 nm, 660.5 nm와 603.2 nm 및 661.4에서 형광 봉우리가 관찰되었다. PpIX의 형광 강도를 측정된 결과, PpIX는 정상세포에서는 낮은 농도로 축적이 되는 반면에 암세포에서 더 높은 농도로 축적되었으며, 세포 외보다는 세포 내에서 더 높은 농도로 축적됨을 알 수 있었다. 또한 5-ALA 및 ALA-methyl ester에 의한 PpIX의 생성에 대한 형광 강도는 ALA-methyl ester가 5-ALA보다 더 큰 것으로 관찰되었다.

감 사

본 연구는 산업자원부 지방기술혁신사업 (RTI04-01-01)의 지원에 의해 수행되었기에 이에 감사를 드립니다.

REFERENCES

1. Youn-Seup Kim, Jae-Seuk Park, Young-Koo Jee, and Kye-Young Lee (2004), Photodynamic Therapy induced Cell Death using 5-ALA and 632 nm Diode Laser in A549 Lung Cancer Cells, *Tuberculosis and Respiratory Diseases* 56(2), 178-186.
2. Kelty C. J., N. J. Brown, M. W. Reed, and R. Ackroyd (2002), The use of 5-aminolevulinic acid as a photosensitizer in photodynamic therapy and photodiagnostics, *Photochem. Photobiol. Sci.* 1, 158-168.
3. Kennedy, J. C. and R. H. Pottier (1992), Endogenous protoporphyrin IX, a clinical useful photosensitizer for photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol. B* 14, 275-92.
4. Krammer, B. and K. Ueberrigler (1996), In vitro investigation of ALA-induced protoporphyrin IX, *Journal of Photochemistry and*

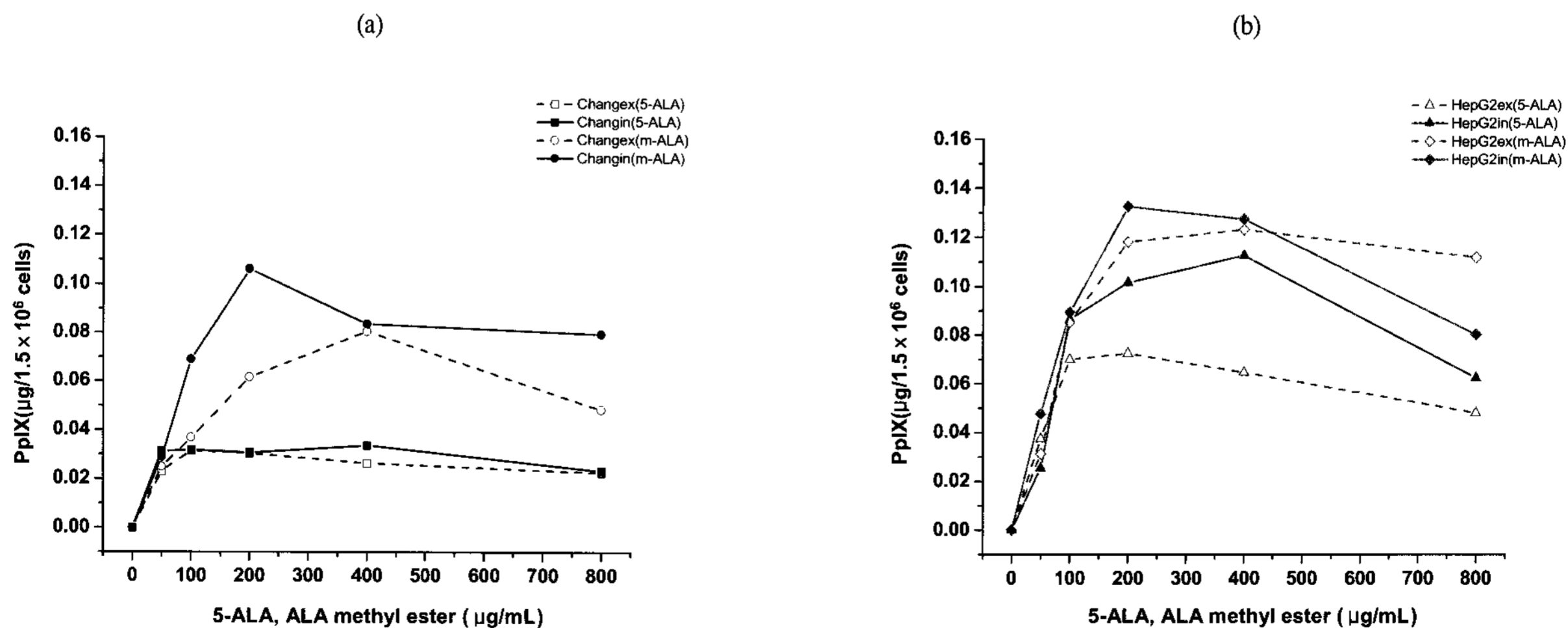


Figure 8. Protoporphyrin IX in the culture medium of Chang (a) and HepG2 (b) cells exposed to different 5-ALA and ALA-methyl ester concentration for 24 h.

- Photobiology B: Biology* **36**, 121-126.
5. Wyld, L., J. L. Burn, J. L. Reed, and N. J. Brown (1997), Factors affecting aminolevulinic acid-induced generation of protoporphyrin IX, *British Journal of Cancer* **76**, 705-712.
 6. Baumgartner, R., R. M. Huber, H. Schulz, H. Stepp, K. Rick, F. Gamarra, A. Leberig, and C. Roth (1996), Inhalation of 5-aminolevulinic acid: a new technique for fluorescence detection of early stage lung cancer, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **36**, 169-174.
 7. Gallegos, E. R., I. D. Rodriguez, L. A. M. Guzman, and A. J. P. Zapata (1999), In Vitro Study of Biosynthesis of Protoporphyrin IX Induced By δ -Aminolevulinic Acid in Normal and Cancerous Cells of the Human Cervix, *Archives of Medical Research* **30**, 163-170.
 8. Myung-Hwa Kim, Hyun-Jeong Kim, In-Seon Lee, Kyung-Chan Kim and Chang-Seop Lee (2006), In Vitro Study of Fluorescence Detection for Protoporphyrin IX Induced 5-Aminolevulinic Acid in Cancerous and Normal Cells, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **21**(3), 171-174.
 9. Liwei, M., S. Bagdonas, and J. Moan (2001), The photosensitizing effect of the photoproduct of protoporphyrin IX, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **60**, 108-113.
 10. Ohgari Y., Y. Nakayasu, S. Kitajima, M. Sawamoto, H. Mori, O. Shimokawa, H. Matsui, and S. Taketani (2005), Mechanisms involves in δ -aminolevulinic acid (ALA)-induced photosensitivity of tumor cells: Relation of ferrochelatase and uptake of ALA to the accumulation of protoporphyrin, *Biochemical Pharmacology* **71**, 42-49.
 11. Uzdensky A. B., A. Juzeniene, E. Kolpakova, G. O. Hjortland, P. Juzenas, and J. Moan (2004), Photosensitization with protoporphyrin IX inhibits attachment of cancer cells to a substratum, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **322**, 452-457.
 12. Coinsman V. V., M. T. Foulter, L. X. Brito, L. Morlet, A. Gouyette, and T. Patrice (1995), HepG2 human hepatocarcinoma cells: an experimental model for photosensitization by endogenous porphyrins, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **30**, 201-208.
 13. Endlicher E., P. Rummele, F. Hausmann, R. Krieg, R. Knuchel, H. C. Rath, J. Scholmerich, and H. Messmann (2001), Protoporphyrin IX distribution following local application of 5-aminolevulinic acid and its esterified derivatives in the tissue layers of the normal rat colon, *British Journal of Cancer* **85**(10), 1572-1576.
 14. Merclin N., T. Bramer, and K. Edsman (2004), Iontophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester using a carbopol gel as vehicle, *Journal of Controlled Release* **98**, 57-65.
 15. Uehlinger P., M. Zellweger, G. Wagnieres, L. J. Jeanneret, H. Bergh, and N. Lange (2000), 5-Aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **54**, 72-80.
 16. Merclin N., J. Bender, E. Sparr, R. H. Guy, H. Ehrsson, and S. Engstrom (2004), Transdermal delivery from a lipid sponge phase-iontophoretic and passive transport in vitro of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester, *Journal of Controlled Release* **100**, 191-198.
 17. Manivasager V., K. K. L. Yee, P. W. S. Heng, K. C. Soo, and M. Olivo (2006), A study comparing endogenous protoporphyrin IX induced by 5-ALA and ALA-methyl ester with exogenous PpIX and PpIX dimethyl ester in photodynamic diagnosis of human nasopharyngeal carcinoma xenografts, *International Journal of Oncology* **29**, 997-1002.
 18. Phil-Sang Chung, Sang-Oun Jung, Jin-Chul Ahn, Sang-Joon Lee, and Jun-Sik Yoon (2003), Distribution Patterns in the Tumor Tissue and Normal Tissue according to the Administration Methods of ALA and ALA-Methylester, *Korean J. Head & Neck Oncology* **19**(1), 21-24.
 19. Ninomiya, Y., Y. Itoh, S. Tajima, and A. Ishibashi (2001), In vitro and In vivo expression of protoporphyrin IX induced by lipophilic 5-aminolevulinic acid derivatives, *Journal of Dermatological Science* **27**, 114-120.
 20. Green L. M., J. L. Reade, and C. F. Ware (1984), Rapid colorimetric assay for cell viability: Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines, *J. Immunological Methods* **70**, 257-263.