

## 폐암 세포주에서 5-Aminolevulinic Acid에 의해 유도된 Protoporphyrin IX의 형광 진단을 위한 *In Vitro* 연구

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

### *In Vitro* Study of Fluorescence Detection for Protoporphyrin IX Induced from 5-Aminolevulinic Acid in Incubated Lung Cancer Cells

Myung-Hwa Kim, Hyun-Jeong Kim<sup>1</sup>, In-Seon Lee<sup>1</sup>, Kyung-Chan Kim<sup>2</sup>, and Chang-Seop Lee<sup>†</sup>  
Department of Chemistry, <sup>1</sup>The Center for Traditional Microorganism Resources,  
<sup>2</sup>Department of Digital Physics, Keimyung University, Sindang-Dong, Dalseo-Gu, Daegu 704-701, Korea  
(Received : 2007. 2. 2., Accepted : 2007. 4. 20.)

This study investigates the optimal method of administrating 5-aminolevulinic acid (5-ALA) in the context of fluorescence detection by analyzing protoporphyrin IX (PpIX) fluorescence in the cultured normal and cancer cells. 5-ALA was injected as a photosensitizer to the lung cancer cells (A549, NCI-H460) and normal lung cells (Hel299). Hel299, A549, and NCI-H460 cells were incubated with various concentrations of 5-ALA (0~800 µg/mL). The accumulation of PpIX induced by 5-ALA was observed in A549, NCI-H460 and Hel299 cells. The cell viability was estimated by means of the MTT assay. Formation of PpIX was measured by fluorescence spectroscopy. Especially, formation of PpIX in cancer cells was higher than normal cells. This study suggests that the difference of PpIX induced in normal and cancer cells treated with 5-ALA may use by means of fluorescence diagnosis for cancer.

**Key Words** : 5-aminolevulinic acid, protoporphyrin IX, photosensitizer

#### 서 론

광민감제 (Photosensitizer)를 이용한 형광 진단은 외부에서 광민감제를 투여한 후 특수 파장의 빛을 조사하여 형광을 측정하게 되면 암 병변 부위에서 강한 형광 스펙트럼 파장이 나오게 되는데, 이를 분광학적으로 측정 검출하여 암을 진단하는 방법이다. 특히 5-aminolevulinic acid (5-ALA)에 의해 유도된 protoporphyrin IX (PpIX)는 정상세포보다 암세포에서의 형광성이 높게 발현되어 암 진단을 위한 특수 파장의 광에 의해 활성화된다(1, 2).

5-ALA를 인체에 투여하면 내인성 광민감제인 PpIX를 형성하게 되고, 5-ALA는 투여 후 24시간 이내에 작용을 나타낸 다음 빠르게 대사된다(3). 즉 5-ALA는 heme의 생합성 경로내의 대사 전구물질로서 조직 내에서 heme의 전구

물질인 광민감제 PpIX로 전환된다(Fig. 1). Heme의 생합성은 먼저 글리신과 숙시닐 CoA로부터의 미토콘드리아내의 5-ALA synthase에 의한 5-ALA의 합성으로 시작하여, 다음에 porphobilinogen synthase의 작용으로 porphobilinogen (PBG)을 생성하고, 이어서 4분자의 PBG의 축합으로 테트라피롤인 uroporphyrinogen III형이 생성된다. protoporphyrin에 철이 효소를 매개로 하여 작용하면 protoheme이 생성된다. Heme의 생합성은 5-ALA syntase에 의해 조절되며, 체내의 헴이 과량 존재하면 억제된다. 이때 외부로부터 과량의 5-ALA를 투여하면 체내에 과량의 heme이 생성되어 PpIX를 heme으로 바꾸어 주는 효소인 ferrochelatase의 활성도를 저하시켜 세포 내에 PpIX이 다량 축적된다(3-5). 특히 PpIX가 광민감제로 활성화되면 형광을 내고 세포 독성을 나타내는 특성이 있어 이를 이용한 암의 광역학 진단과 치료를 위한 여러 가지 연구가 이루어지고 있다(6-12).

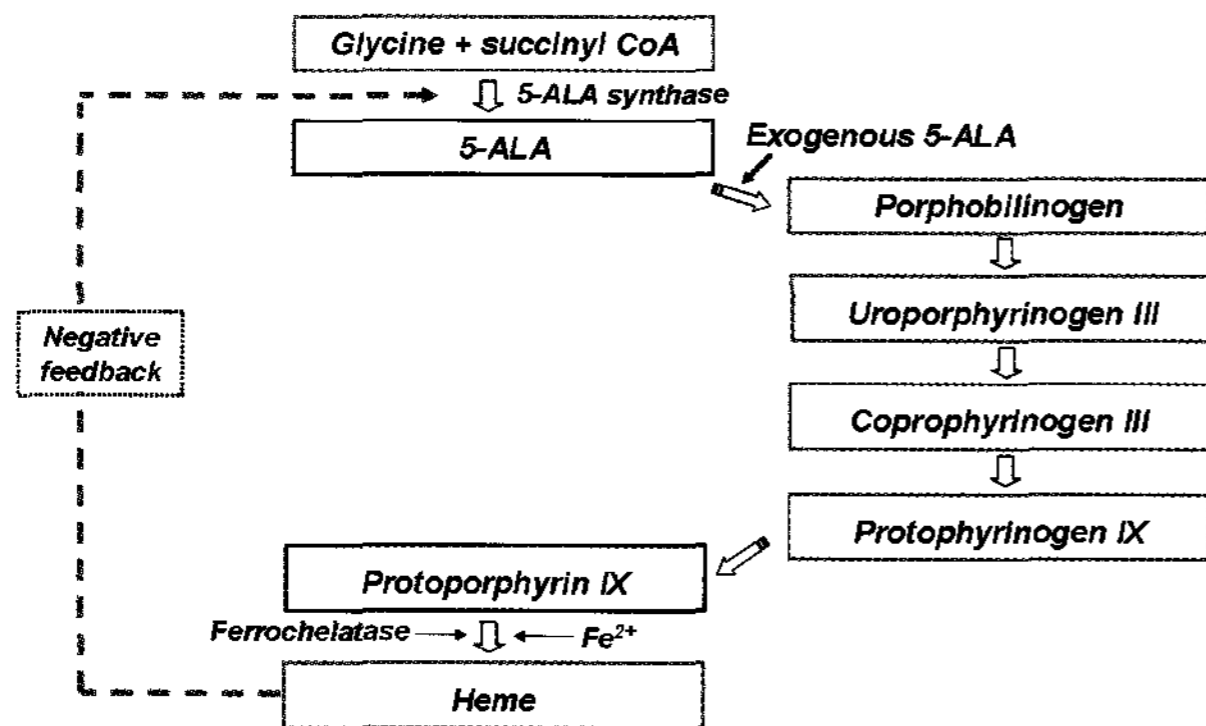
또한 ALA는 종양선택성이 있어 피부, 위장기관, 폐, 방광, 구강 등의 암 병변의 진단과 치료에 사용되고 있다(3, 13-16). 그 중 폐암 세포주인 A549에서 ALA와 632 nm Diode Laser를 이용한 광역학 치료에 관한 연구(17), 인간

† 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

의 기관지 상피조직에 네 가지의 폐암 세포주 (EPLC-M31, LCLC-103H, NCI-H125, NCI-H841)를 공동배양한 후 형광 현미경으로 관찰하여 5-ALA에 의해 유도된 PpIX의 형광의 동역학 효과에 관한 연구(18) 등 폐암세포에 대한 몇몇 연구가 이루어지고 있다.



**Figure 1.** Scheme of the intracellular pathway of the heme biosynthesis. 5-aminolevulinic acid (5-ALA) is converted to protoporphyrin IX (PpIX), the immediate precursor of heme. The heme biosynthetic pathway is regulated by 5-ALA synthase, which is inhibited by excess of heme.

이에 본 연구에서는 5-ALA의 처리에 의한 PpIX의 생성 차이를 인간 유래의 폐암 세포주 2종 (A549, NCI-H460)과 함께 정상 폐세포 (Hel299)에서 분석하였다. 먼저 폐암 세포주와 정상 폐세포에 5-ALA를 0~800 µg/mL 농도로 각각 처리하여 24시간 동안 배양한 다음, 세포독성 및 5-ALA에 의해 유도된 PpIX의 생성을 세포 내·외로 구분하여 형광 스펙트럼으로 비교분석하여 암 진단의 기초자료로 살펴보았다.

## 재료 및 방법

### 세포주 및 세포배양

본 실험에 사용된 인간 유래의 폐암 세포주인 A549와 NCI-H460 및 정상 폐세포주인 Hel299는 한국 세포주 은행으로부터 분양받아 사용하였다. 이들 세포주는 minimum essential medium (MEM) 배지에 10% FBS (fetal bovine serum)와 1% antibiotics (penicillin/streptomycin)를 첨가하여 37°C의 5% CO<sub>2</sub> incubator (Forma Co., USA)에서 2~3일에 한번씩 계대배양하면서 사용하였다.

### 5-ALA 용액의 제조 및 처리

5-Aminolevulinic acid hydrochloride (Merck Co., Darmstadt, Germany)는 phosphate buffer solution (PBS)에 녹여 5 mg/mL의 stock solution을 만들어 사용하였다. 5-ALA의 처리는 먼저 배양된 cell에 MEM 배지를 첨가하고 잘 혼합하여 세포수를  $1.5 \times 10^6$  cells/well로 조정된 다음, 6-well microtiter plate에 준비된 cell을 3 mL씩 첨가하고, 준비된 5-ALA를 0, 50, 100, 200, 400, 800 µg/mL씩의 농도로 첨가한 후 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 분위기에서 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 얻었다. 또한 형광광도계에서 측정된 5-ALA와 ALA-methyl ester에 의해 생성된 세포 내·외에서의 생성된 PpIX 형광 세기의 분석은 Mathematica 5 program을 이용하였다.

### 세포 내·외의 PpIX 생성 검출

폐암 세포주인 A549와 NCI-H460 및 정상 폐세포주인 Hel299에 5-ALA를 처리하여 세포 내·외에서 생성된 PpIX의 검출은 다음과 같이 수행하였다. 먼저 세포 외에서 축적된 PpIX는 세포에 5-ALA를 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).

### 5-ALA의 세포에 대한 성장 저해효과

5-ALA가 폐암세포 및 정상 폐세포의 성장에 미치는 영향을 MTT assay(20)로 측정하였다. 배양된 cell에 MEM 배지를 첨가한 후 잘 혼합하여 cell수를  $1.5 \times 10^6$  cells/well로 조정된 다음 96-well plate에 3 mL씩 첨가하고, 5-ALA 농도를 50, 100, 200, 400, 800 µg/mL씩 되도록 첨가하여 37°C의 5% CO<sub>2</sub> 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-ALA에 의한 세포의 성장 저해효과는 다음 식과 같이 계산하였다.

$$\text{Inhibition rate(\%)} = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 처리군의 흡광도}}{\text{대조군(5-ALA 무처리군)의 흡광도}} \times 100$$

## 결과 및 고찰

### 5-ALA에 대한 세포의 성장 저해효과

MTT assay는 살아있는 세포에서는 미토콘드리아의 succinyl 탈수소효소에 의해 비수용성인 보라색의 formazan

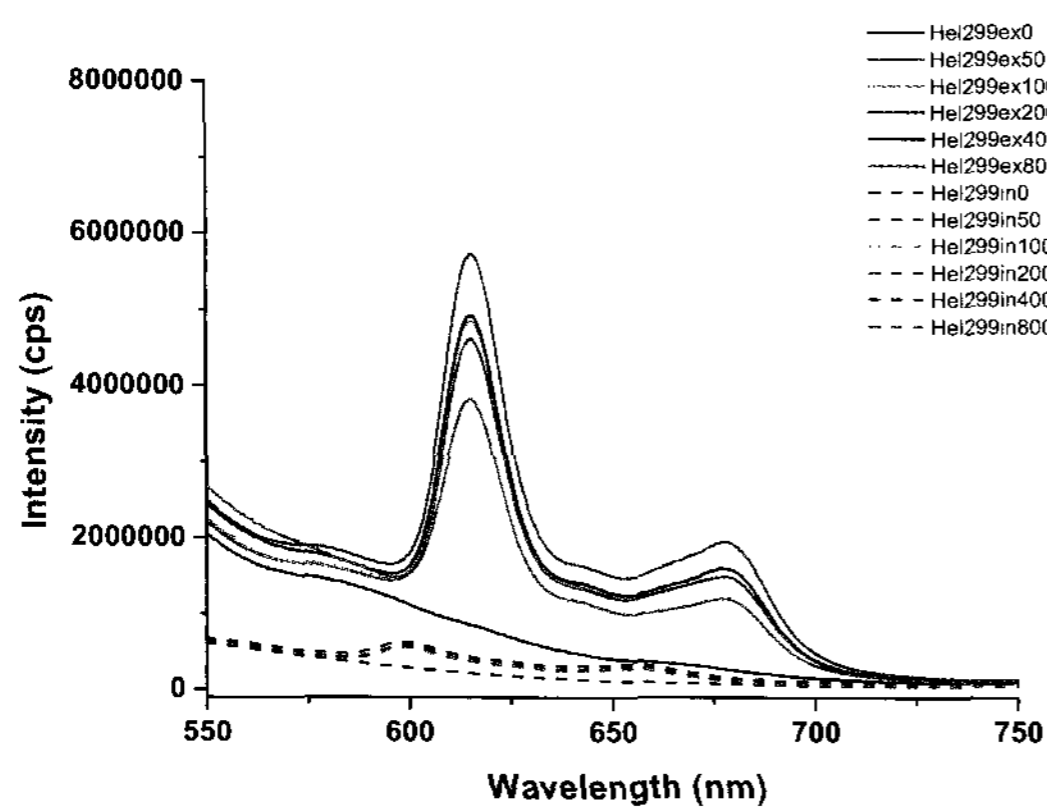
으로 환원된다. 이 formazan의 발색정도를 spectrophotometer로 측정하여 세포에 미치는 독성의 정도를 알아내는 방법으로 최근 암 기초연구에 널리 이용되는 방법이다. 결국 세포가 많이 살아있을수록 formazan의 양이 증가하기 때문에 550 nm에서의 흡광도가 증가하게 되는 것이다.

5-ALA 처리에 의한 정상 및 폐암세포에 대한 저해효과를 조사한 결과를 Table 1에 나타내었다. 5-ALA의 농도에 따른 정상 폐세포인 Hel299에 대한 성장 저해효과는 50~800 µg/mL 범위에서 5-ALA의 농도 증가에 대해서 3.8~23.7%로 세포의 저해 효과가 증가하는 것으로 나타났다. 즉 5-ALA를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 볼 때, 5-ALA의 농도가 증가함에 따라 세포에 대한 저해효과가 증가함을 확인할 수 있었다.

한편 폐암세포인 A549에 대한 성장 저해효과는 50~800 µg/mL 범위에서 5.0~25.9%까지로 저해율이 증가하고, 5-ALA를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 볼 때 5-ALA의 농도가 증가함에 따라 세포에 대한 저해효과가 증가함을 확인할 수 있었다. 반면 NCI-H460의 경우에는 5-ALA의 농도가 증가하여도 세포에 대한 성장 저해효과가 없는 것으로 확인되었다. 이는 폐암 세포주라 하더라도 암세포주의 종에 따른 저해율의 차이를 보이는 것으로 생각되었다.

**Table 1.** Inhibition effect of normal lung (Hel299) and lung cancer (A549, NCI-H460) cells exposed 5-aminolevulinic acid during 24 h

5-ALA (µg/mL)	Hel299 Inhibition rate (%)	A549 Inhibition rate (%)	NCI-H460 Inhibition rate (%)
0	-	-	-
50	3.8	5.0	-
100	4.9	6.2	-
200	12.3	10.0	-
400	13.2	14.9	-
800	23.7	25.9	-



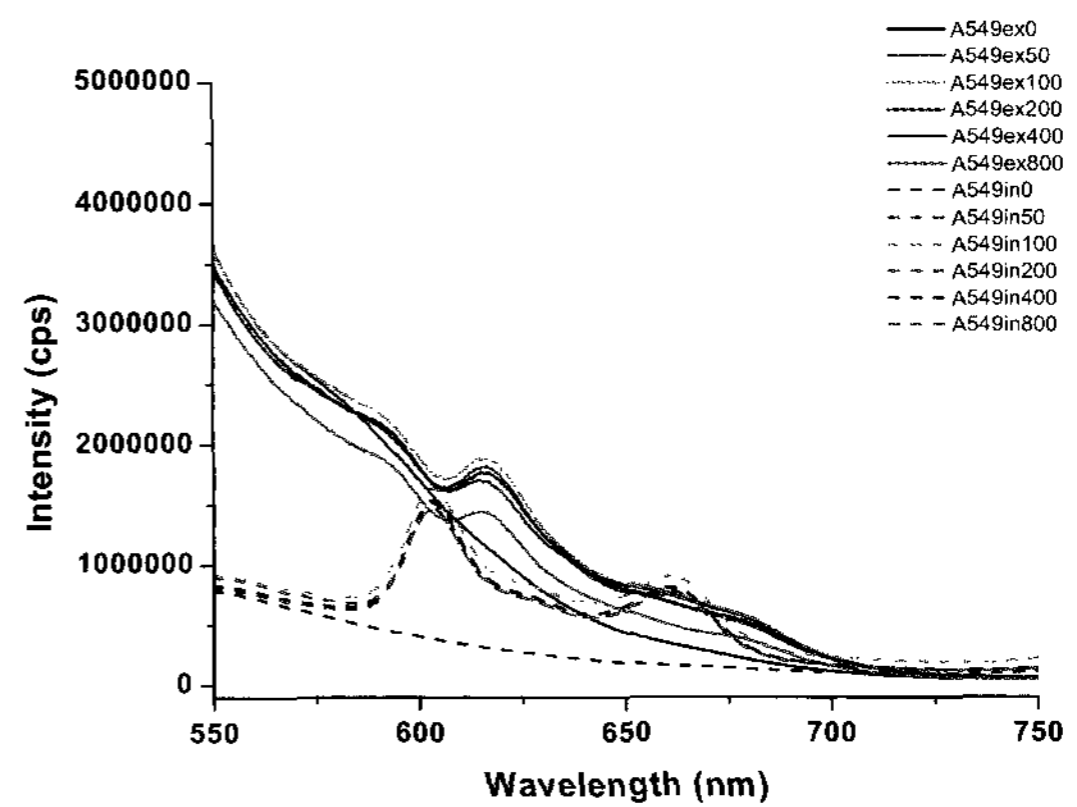
**Figure 2.** Fluorescence spectrum of 5-ALA induced PPIX in normal lung Hel299 cells.

**5-ALA에 의해 유도된 세포 내·외에서 PpIX의 축적**

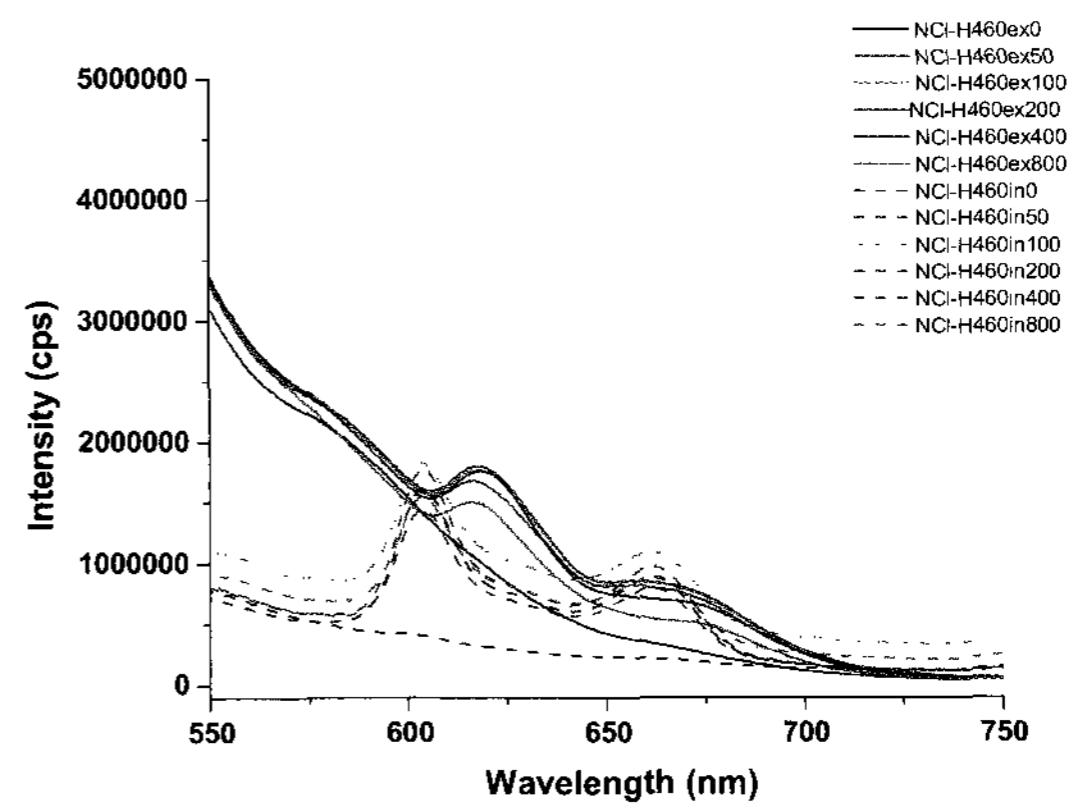
인간 폐암 세포주인 A549와 NCI-H460 및 정상 폐세포주인 Hel299의 각 세포수를  $1.5 \times 10^6$  cells/well로 하고 5-ALA를 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 5-ALA의 처리에 의한 세포 내·외에서 생성된 PpIX를 형

광 스펙트럼을 측정하여 검출하였다.

Fig. 2와 같이, 5-ALA 농도를 달리하여 처리한 후 24시간 동안 배양한 정상 폐세포인 Hel299에서 5-ALA에 의해 유도된 PpIX의 생성 정도를 형광 스펙트럼으로 측정하면 PpIX의 형광 (emission) 스펙트럼은 여기 파장이 410 nm일 때 세포 외에서는 614.9 nm와 676.1 nm, 세포 내에서는 599.6 nm 및 653.3 nm에서 형광 봉우리가 관찰되었다.



**Figure 3.** Fluorescence spectrum of 5-ALA induced PpIX in lung cancer A549 cells.



**Figure 4.** Fluorescence spectrum of 5-ALA induced PpIX in lung cancer NCI-H460 cells.

한편 인간 유래의 폐암 세포주인 A549와 NCI-H460에 5-ALA를 처리하여 형광 스펙트럼으로 측정된 결과는 Fig. 3 및 Fig. 4와 같다. 먼저 A549의 경우에는 형광 방출스펙트럼은 여기 파장이 410 nm일 때 세포 외에서는 615.8 nm와 660.8 nm, 세포 내에서는 603.2 nm 및 661.4 nm에서 형광 봉우리가 관찰되었고, NCI-H460의 경우에는 형광 방출스펙트럼은 여기 파장이 410 nm일 때 세포 외에서는 616.7 nm, 660.2 nm와 세포 내에서는 603.5 nm, 661.4 nm에서 각각 형광 봉우리가 관찰되었다. 이 결과는 Fig. 5에서 나타낸 표준 PpIX의 형광 봉우리의 위치와 잘 일치하였다.

폐암세포 및 정상 폐세포에 5-ALA를 주입하고 배양함으로써 생성되는 PpIX의 양을 PpIX 형광강도의 측정으로 알 수 있었다. 폐암 세포주인 A549와 NCI-H460의 경우 세포

내·외에서 5-ALA의 농도에 따른 PpIX의 형광강도는 5-ALA 농도가 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 최고치를 나타내었고, 그 이상의 농도에서는 감소하여 PpIX의 최고 형광강도를 나타내는 5-ALA 최적 농도가 존재하였다(Fig. 6). 일반적으로

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

또한 폐암 세포주인 A549 및 NCI-H460에서 5-ALA에 의

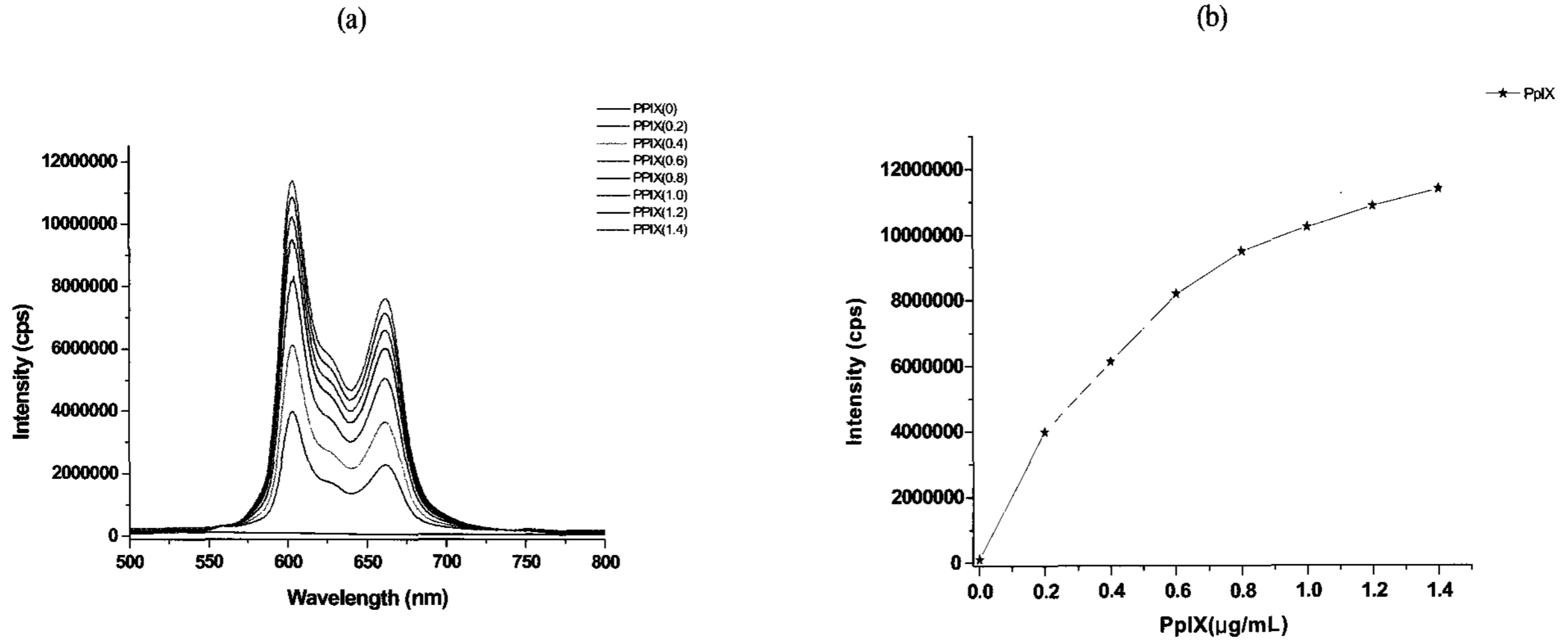


Figure 5. Fluorescence spectrum of standard protoporphyrin IX in isotonic saline.

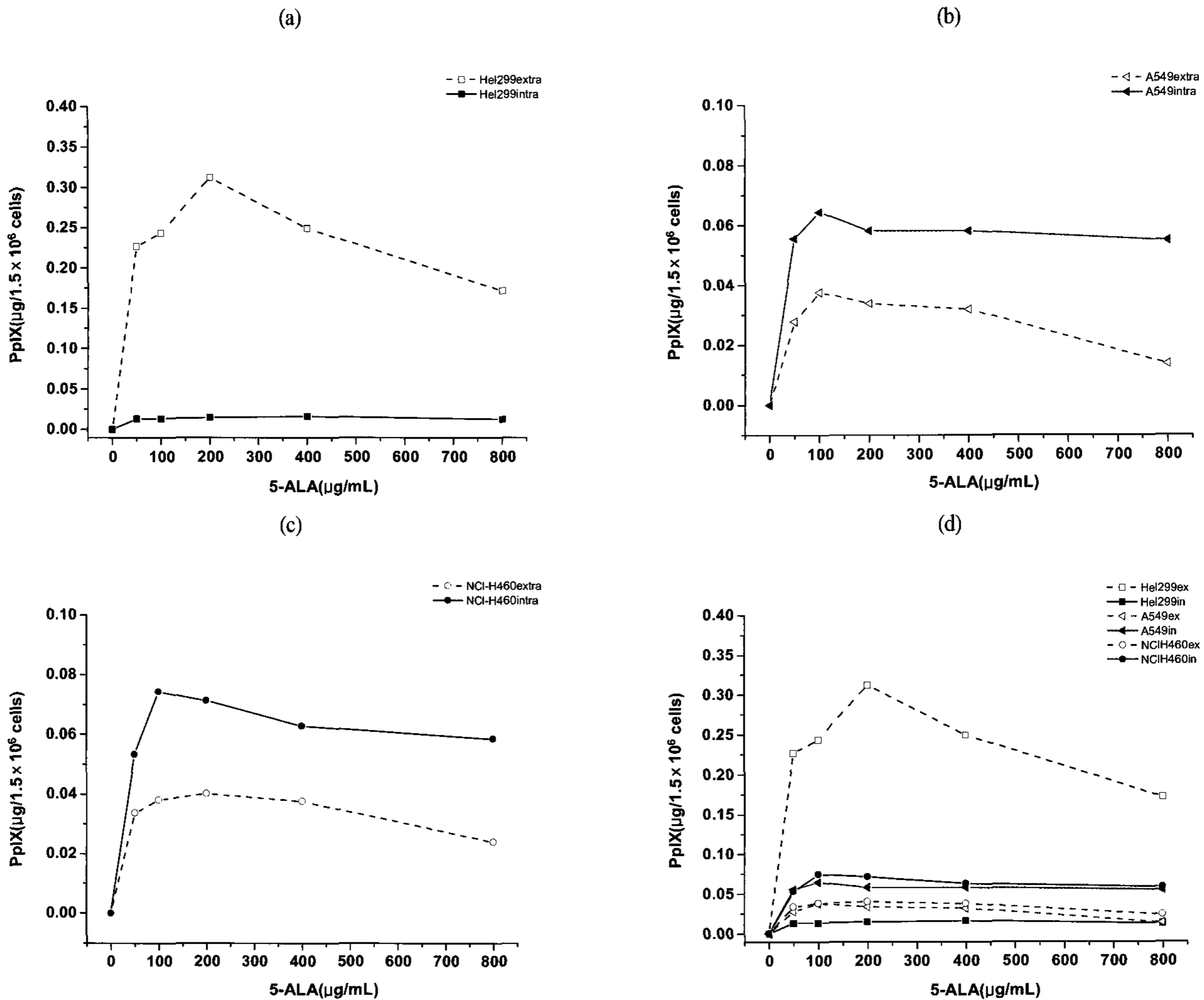


Figure 6. Concentration PpIX in normal lung(a) and lung cancer(b, c) cells exposed to 5-ALA for 24 h ((a) Hel299 cells (b) A549 cells (c) NCI-H460 cells (d) mixed in normal and cancer cells).

한 PpIX의 생성은 세포 외에서보다 세포 내에서 더 많이 축적되었다. 그러나 정상 폐세포인 Hel299에서 5-ALA에 의한 PpIX의 생성은 세포 내에서보다 세포 외에서 더 많이 축적되었다. 즉 폐암세포인 경우에는 세포 내에서 PpIX 생성이 증가됨을 확인했으나 정상 폐세포에서는 세포 내에서 PpIX가 생성되지 않고 거의 다 세포 외로 배출됨을 알 수 있었다.

그리고 Hel299과 A549에 대한 세포 내·외의 PpIX의 생성비는 1 : 4.81, 1 : 0.11으로 나타났으며, Hel299과 NCI-H460에 대한 세포 내·외의 PpIX의 생성비는 1 : 5.54, 1 : 0.13으로 확인되었는데, 이는 세포주의 차이에 기인하는 것으로 생각되었다.

또한 세포 내의 PpIX의 생성 정도를 살펴보면 정상세포인 Hel299에 비해 암세포인 A549와 NCI-H460에서 형광 세기가 더 큰 것으로 나타나는데, 이것으로 5-ALA에 의해 유도된 PpIX의 생성이 정상세포보다는 암세포에서 더 높은 농도로 축적되는 것을 알 수 있었다. 자궁경부암 세포주 (HeLa) 및 정상 세포주 (Chang)에 5-ALA를 투여한 후 유도된 PpIX의 생성을 관찰한 결과 암세포에서 더 많은 PpIX가 축적되는 것으로 보고하였는데(2), 본 실험의 결과와도 유사한 경향이였다.

따라서 폐암 세포주인 A549와 NCI-H460를 대상으로 5-ALA를 투여한 후 유도된 PpIX의 생성이 정상세포보다는 암세포에서 더 높은 농도로 축적됨을 확인하여, 5-ALA가 폐암 진단에 대한 광민감제로 이용될 수 있다고 생각된다. 그러나 향후 형광을 이용한 암 진단에 있어서 5-ALA에 의한 PpIX가 효과적인 광민감제로서 사용되기 위해서는 종양조직내의 선택적인 축적 및 잔존성 그리고 효율적인 광원의 조사에 대한 연구가 더 필요하고, 또한 5-ALA외에 다른 광민감제에 대한 연구도 필요할 것으로 생각된다.

## 요 약

형광을 이용한 암 진단을 위해 배양된 정상 폐세포 및 폐암 세포주에 광민감제인 5-ALA를 투여하고 세포 내·외에서 생성된 protoporphyrin IX (PpIX)의 형광을 측정하여 5-ALA 투여의 최적 농도를 조사하였다. 정상 폐세포주 (Hel299) 및 폐암 세포주 (A549, NCI-H460)에 5-ALA를 0~800 µg/mL 농도별로 투여하여 24시간 동안 배양한 다음 MTT assay로 세포증식 저해율 및 이때 생성되는 PpIX의 양을 형광의 강도로 측정하였다. 그 결과 Hel299 및 A549에서는 5-ALA의 처리농도가 증가할수록 세포 증식의 저해율이 증가하였으나 NCI-H460에서는 세포 증식이 저해되지 않았다. 그리고 폐암세포인 A549와 NCI-H460에 대한 5-ALA의 최적농도는 100 µg/mL이며, 이때의 형광 (emission) 스펙트럼은 여기 파장이 410 nm일 때 세포 외에서는 615.8 nm와 660.8 nm, 616.7 nm와 660.2 nm, 세포 내에서는 603.2 nm와 661.4 nm, 603.5 nm와 661.4 nm에서 각각 형광 봉우리가 관찰되었다. 또한 PpIX를 형광 강도로 측정하면, PpIX는 정상세포에서는 낮은 농도로 축적이 되

는 반면에 암세포에서 높은 농도로 축적되었으며, 세포 외보다는 세포 내에서 더 높은 농도로 축적됨을 알 수 있었다.

## 감 사

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

## REFERENCES

- 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  $\delta$ -Aminolevulinic Acid in Normal and Cancerous Cells of the Human Cervix, *Archives of Medical Research* **30**, 163-170.
- 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.
- 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.
- Dietze, A. and B. Kristian (2005), ALA-induced porphyrin formation and fluorescence in synovitis tissue In-vitro and in vivo studies, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2**, 299-307.
- Ji-Sun Kim, Phil-Sang Chung, Sang-Joon Lee, Chung-Hun Oh, Sang-Yong Chung, Ji-Yeon Park, and Young-Saeng Kim (2005), The Photodynamic Therapy using 5-Aminolevulinic Acid(5-ALA) : The Study of the Anti-Tumor Effect on *in vitro* and *in vivo* Experiments, *Korean J. Otolaryngol.* **48**, 234-40.
- 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.
- Kennedy, J. C. and R. H. Pottier (1992), Endogenous protoporphyrin IX, a clinical useful photosensitizer for photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol. B* **14**, 275-92.
- Krammer, B. and K. Ueberrigler (1996), In vitro investigation of ALA-induced protoporphyrin IX, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **36**, 121-126.
- Wyld, L., J. L. Burn, J. L. Reed, and N. J. Brown (1997), Factors affecting aminolaevulinic acid-induced generation of protoporphyrin IX, *British Journal of Cancer* **76**, 705-712.
- 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.
- Ohgari Y., Y. Nakayasu, S. Kitajima, M. Sawamoto, H. Mori, O. Shimokawa, H. Matsui and S. Taketani (2005), Mechanisms involves in  $\delta$ -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.
- 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.

13. 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.
14. Ogaswara T., N. Miyoshi, M. Fukuda, T. Yamada, T. Ogawa, H. Maegawa, Y. Kitagawa and K. Sano (2003), Fluorescent analysis of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in mouse transplanted tumor tissues, *International Congress Series*, **1248**, 405-408.
15. Leunig A., M. Mehlmann, C. Betz, H. Stepp, S. Arbogast, G. Grevers, and R. Baumgartner (2001), Fluorescence staining of oral cancer using a topical application of 5-aminolevulinic acid: fluorescence microscopic studies, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **60**, 44-49.
16. Sharwani A., W. Jerjes, V. Salih, A. J. MacRobert, M. E. Maaytah, H. S. M. Khalil, and C. Hopper (2006), Fluorescence spectroscopy combined with 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in detecting oral premalignancy, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **83**, 27-33.
17. Youn-Seup Kim, Jae-Seuk Park, Young-Koo Jee and Kye-Young Lee (2004), Photodynamic Therapy induced Cell Death using 5-ALA and 632nm Diode Laser in A549 Lung Cancer Cells, *Tuberculosis and Respiratory Diseases* **56(2)**, 178-186.
18. Gamarra F., P. Lingk, A. Marmarova, M. Edelmann, H. Hautmann, H. Stepp, R. Baumgartner, and R. M. Huber (2004), 5-Aminolevulinic acid fluorescence in bronchial tumours : dependency on the patterns of tumour invasion, *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology* **73**, 35-42.
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. of Immunological Methods* **70**, 257-263.