

Mechanism of Photodynamic Therapy using 9-hydroxypheophorbide-alpha on HeLa Cell Lines

Jin-Chul Ahn[†]

Medical Laser and Device Research Center, Dankook University, Cheonan, Chungnam 330-714, Korea

Photodynamic therapy (PDT) is a treatment utilizing the generation of singlet oxygen and other reactive oxygen species (ROS), which selectively accumulate in target cells. The aim of present work is to investigate the photodynamic therapy mechanism of 9-HpbD-a-mediated PDT in HeLa cell lines. We studied the general reactive oxygen species (G-ROS) activation after 9-HpbD-a PDT using fluorescence stain with H₂DCF-DA. G-ROS activation observed after 9-HpbD-a PDT and higher activation condition was 1 hour after PDT at 0.5 µg/ml 9-HpbD-a concentration. Sodium azide and reduced glutathione (the singlet oxygen quencher) could protect HeLa cells from cell death induced by 9-HpbD-a PDT. But D-mannitol (the hydroxyl radical scavenger) could not protect cell death. Singlet oxygen played a decisive role in 9-HpbD-a PDT induced HeLa cell death. Type II reaction was the main type of ROS formation at 9-HpbD-a PDT.

Key Words: Photodynamic therapy, 9-hydroxypheophorbide-a (9-HpbD-a), Reactive species oxygen (ROS)

서 론

광역학치료 (photodynamic therapy; PDT)는 종양에 비교적 집중적으로 침착하는 광감작제 (photosensitizer)를 투여한 후, 광감작제에 흡수가 잘 되는 특정 파장의 빛으로 광감작제를 활성화시켜 종양을 파괴, 치명적인 손상을 유도하여 고사시키는 치료법으로 1970년대부터 활발히 연구되어 왔다 (Abdulla and Haeger-Aronson, 1971; Dougherty et al., 1998). 광역학치료가 항암효과를 나타내는 기전에는 광감작제에 흡수된 빛 에너지가 산소로 전이되어 세포에 손상을 일으키는 단일항 산소 및 유해 산소 등의 생성에 의한 암세포에 직접적인 손상 (Moan et al., 1979), 종양 공급 혈관의 파괴에 의한 이차적인 고사 (Nelson et al., 1987), 종양세포에 대한 면역계 (immune system)의 연계 등이 연구되어지고 있다 (Ana et al., 2006).

현재 많이 사용되고 있는 Hematoporphyrin derivatives (HPD)를 근간으로 하는 photofrin[®] 광감작제로 임상 허

가가 나와 실제 적용되고 있으며 이에 따라 그 사용범위가 점차 증가되고 있지만, 피부 광독성이 오래 지속되고 종양에 대한 선택성이 좋지 않은 단점 등이 있다 (Peng et al., 1997). 이에 따라 더 좋은 반응성과 체내에서 빠른 대사를 보이는 광감작제로 chlorophyll 유도체 (CpD)를 개발하여 이들에 대한 물리화학적 특성과 세포에 대한 작용 기전 등의 많은 연구가 이루어지고 있다 (Rosenthal, 1991). 현재 개발된 여러 종류의 CpD에서 CpD-a는 세포와 결합된 형태, 또는 단독으로도 광반응을 일으키고, 특히 세포와 결합된 상태에서는 다양한 파장의 빛에 대하여 형광 또는 활성 산소를 생성하여 광감작제로서 적합한 재료이다 (Lee et al., 1990).

광역학치료의 기전은 광감작제가 암세포 혹은 목표로 하는 조직에서 흡수가 된 후 선택적인 빛 조사를 하면 광감작제가 활성화 되고 이어서 산소 분자의 존재 하에서 빛의 조사는 Reactive oxygen sepsis (ROS)를 발생시킨다. ROS의 발생 기전은 두 가지 반응 방법이 있다. 광감작제가 전자전달계에 관여하여 free radical[®] 형성되는 Type I 반응이 있으며 산소와 에너지 전이로 반응하여 ROS를 생성시키는 Type II 반응으로 나누어 볼 수 있다. 이 때 생성되는 ROS 중 대표적인 것들로는 hydroxyl radical, singlet oxygen 등이 있다 (Oleinick and Evans, 1998; Dougherty, 2002).

*논문 접수: 2009년 5월 11일
수정재접수: 2009년 6월 2일

[†]교신저자: 안진철, (우) 330-714 충남 천안시 양서동 산 29번지,
단국대학교 의과대학 의학레이저 연구센터
Tel: 041-550-1786, Fax: 041-550-1788
e-mail: jcahn@dankook.ac.kr

본 연구에서는 인체 자궁경부암세포인 HeLa 세포 주에서 chlorophyll 유도체의 새로운 광감작제인 9-hydroxypheophorbide-a(9-HpbD-a)를 이용한 광역학치료시 ROS의 활성과 광역학치료의 ROS 생성 기전인 Type I 반응과 Type II 중 주요 ROS 생성 기전을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 광감작제 및 광원

광감작제는 금호 생명과학연구소에서 녹조류의 클로로필을 산화반응과 산처리를 통해 10-hydroxypheophytin a 유도체로 만든 다음 이를 유기용매로 이용하여 추출한 10-hydroxypheophytin과 10-hydroxypheophytin a 유도체의 유도체를 유기합성 후 안정된 구조 및 대량 수득이 가능한 9-hydroxypheophorbide-a(9-HpbD-a)를 이용하였다. 광원은 광감작제가 최대 광독성능을 나타내는 670 nm diode laser (Medical Laser Research Center, Korea)를 사용하였다.

2. 세포배양

한국 세포주 은행에서 분양 받은 사람의 자궁경부암세포주인 HeLa 세포 (KCLB #100026)를 DMEM (GibcoBRL, USA) 배양액 500 ml에 우태혈청 (GibcoBRL, USA) 50 ml 와 antibiotic-antimycotic solution (Gibco, BRL) 5.5 ml를 섞은 세포배양액으로 세포배양 플라스크 (Nunc, Denmark)를 이용하여 5%의 탄산가스와 95% 공기가 공급되고 적절한 습도와 37°C의 온도가 유지되는 배양기 (Thermo Forma, USA)에서 배양하였으며 세포의 모양을 inverted microscope (Olympus CK40, Japan)을 통하여 관찰하였다. 세포들은 플라스크 바닥에 부착하여 자랐으며 트립신 (GibcoBRL, USA) 처리 후 계대배양 하였다.

3. 광역학치료 후 ROS 활성

광역학치료에 의한 세포 내 G-ROS (general reactive oxygen species)를 확인하기 위하여 세포 내 G-ROS와 반응하여 형광을 보이는 H₂DCF-DA (Molecular Probes, Inc, Eugene, Oregon, USA) 형광시약을 사용하였다. H₂DCF-DA는 세포 내로 자유롭게 들어갈 수 있는 형태이나 세포 내로 들어간 H₂DCF-DA는 deacetylation에 의하여 DCF로 변하게 되고 이러한 형태는 세포 밖으로 나가지 못한다. DCF 자체로는 형광이 없지만 세포 내의 자유 ROS와 만나게 되면 형광을 가지는 특성을 가지고 있다. 지수 성장

시기의 세포를 10⁵ cells/ml이 되게 배지로 희석한 후 지름이 35 mm로 바닥이 0.17 mm 두께의 유리로 된 세포배양 용기에 2 ml 분주하고 24시간을 5% CO₂가 유지되는 세포배양기에서 배양하였다. 그 다음 여기에 다양한 농도의 광감작제 (0.5 µg/ml, 1.1 µg/ml, 2.3 µg/ml, 4.6 µg/ml)를 세포배양 배지로 희석하여 첨가하고 6시간을 5% CO₂가 유지되는 세포배양기에서 배양하고 670 nm 다이오드레이저 (1.7 mW/cm², 1.6 mJ/cm²)를 조사하였다. 레이저 조사를 마치고 30분, 1시간, 3시간, 6시간, 12시간, 24시간 후 각각의 well에 DMEM 배양액에 녹인 H₂DCF-DA용액 (1 µM)을 첨가하고 30분 동안 37°C가 유지되는 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다. 그리고 새로운 배양액으로 교환 후 바로 confocal microscope (Zeiss, 510 Meta, Germany)을 이용하여 excitation 488 nm에서 세포 내 녹색의 G-ROS 형광을 관찰하였다. 그리고 9-HpbD-a의 자체형광은 excitation 633 nm에서 붉은색의 형광을 관찰하였고 동일한 위치에서 G-ROS와 9-HpbD-a의 형광을 multi-track scan 방식을 이용하여 촬영하였다. 모든 사진의 촬영은 동일한 조건에서 시행하여 상대적인 형광의 세기를 비교하였다.

4. 광역학치료 기전

9-HpbD-a를 이용한 광역학치료 기전을 알아보기 위하여 대표적인 singlet oxygen quencher인 sodium azide, reduced glutathione (GSH)와 hydroxyl radical scavenger인 D-mannitol을 처리하여 광역학치료 후 세포생존율의 변화를 알아보기 위해 MTT assay 방법을 이용하였다. 지수 성장시기의 세포를 10⁵ cells/ml이 되게 배지로 희석한 후 96 well plate에 well당 100 µl 분주하고 24시간 동안 5% CO₂가 유지되는 세포배양기에서 배양하였다. 그 다음 여기에 광감작제 (18.75 µg/ml) 100 µl를 세포배양 배지로 희석하여 첨가하고 2 fold-dilution을 통하여 광감작제의 농도를 줄여나갔으며 각각의 실험군에 D-mannitol (Sigma, USA) 40 mM, 80 mM, sodium azide (Sigma, USA) 20 mM, 40 mM 그리고 GSH (Sigma, USA) 5 mM, 10 mM을 첨가하였다. 6시간 동안 5% CO₂가 유지되는 세포배양기에서 배양하고 새로운 배지로 교환 후 670 nm 다이오드레이저 (1.7 mW/cm², 1.6 mJ/cm²)를 조사하였다. 대조군으로 광감작제와 D-mannitol, sodium azide 그리고 GSH만을 세포배양 배지에 첨가하여 배양한 실험군으로 하였다. 레이저 조사 혹은 새로운 배지 교환 24시간 후 각각의 well에 50 µl씩 pH 7.3의 DPBS에 녹인 MTT[3-(4,5-

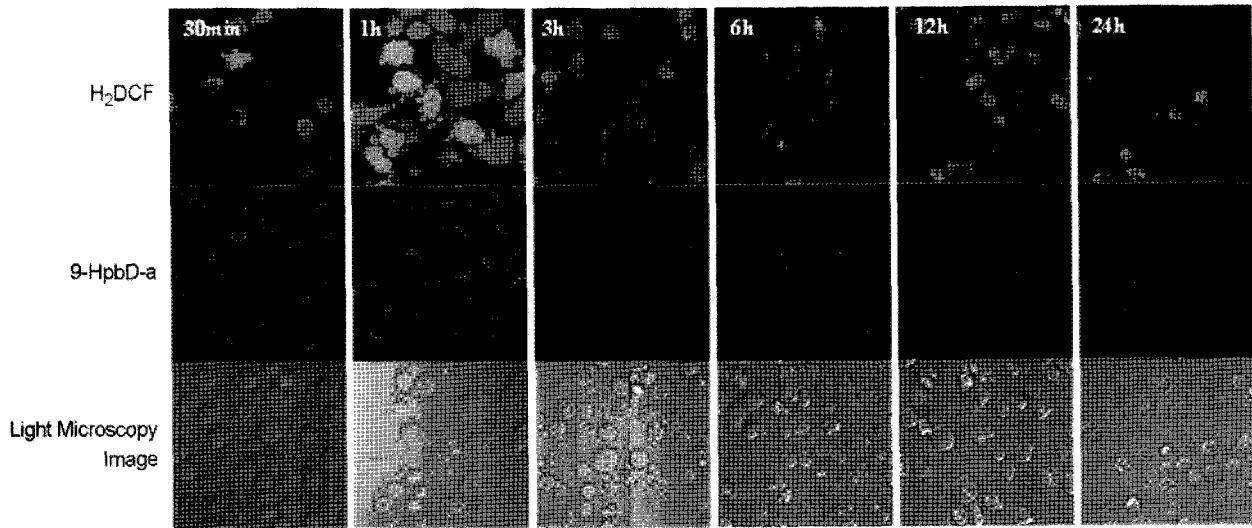


Fig. 1. Time course image of G-ROS activity after PDT with 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 9-HpbD-a sensitized cells. The photosensitized cells were irradiated by 670 nm diode laser ($1.7 \text{ mW}/\text{cm}^2$, $1.6 \text{ mJ}/\text{cm}^2$). Various time (30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h) after laser irradiation, PDT treated cells were stained with 1 μM H₂DCF-DA for 30 min. Stained cells were observed with confocal microscopy at same configuration.

dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 용액 (2 mg/ml, Sigma)을 첨가하고 4시간 동안 37°C가 유지되는 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다. 배양 후 각 well의 배지를 모두 제거하고 여기에 150 μl 의 dimethylsulfoxide (DMSO: KANTO, Japan)를 첨가한 후 formazan을 잘 용해시키기 위해 microplate mixer (Amersham, UK)로 10~20분간 흔들어 주었으며 microplate reader (BIO-RAD 550, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. Singlet oxygen 생성

9-HpbD-a의 광역학치료 반응 동안 singlet oxygen 생성을 확인하기 위하여 imidazole-RNO method를 이용하였다. Imidazole (Sigma, USA)과 singlet oxygen의 반응에 의하여 생성된 산물은 RNO (N,N-dimethyl-4-nitrosoaniline)의 탈색을 유도하는데 440 nm에서 흡광도의 감소를 측정하여 singlet oxygen의 생성을 측정하는 방법이다. 흡광도 측정용 큐벳에 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 9-HpbD-a와 8 mM의 imidazole 그리고 5 μM 의 RNO를 첨가하여 55분 동안 670 nm 레이저를 조사하면서 5분 간격으로 440 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 흡광도 측정시 blank로 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 9-HpbD-a와 8 mM의 imidazole을 희석용액으로 하여 RNO의 흡광도 변화를 확인하였다.

결 과

1. 광역학치료 후 ROS 활성

9-HpbD-a 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 G-ROS의 활성을 확인할 수 있었는데 광역학치료 30분 후부터 G-ROS의 활성이 증가하여 1시간 후 매우 강한 활성을 확인할 수 있었고 그 이후 24시간 까지 G-ROS의 활성은 감소하였다. 9-HpbD-a 1.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 광역학치료 1시간 후의 G-ROS 활성을 비교해보면 9-HpbD-a 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 더 높은 G-ROS의 활성을 확인할 수 있었다. 그리고 9-HpbD-a 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 암세포의 형태학적 관찰은 광역학치료 24시간 까지 붙어있던 세포가 떨어지면서 apoptotic body가 생성되어 세포고사로 추정되는 암세포 형태를 관찰할 수 있었다 (Fig. 1). 9-HpbD-a 1.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서도 광역학치료 후 G-ROS의 활성을 확인할 수 있었는데 G-ROS의 발현 양상은 9-HpbD-a 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도와 같이 광역학치료 1시간 후에 아주 강한 활성을 확인할 수 있었다.

그 후 24시간 까지 G-ROS 활성은 점차 감소하는 양상을 확인하였다. 또한 동일한 9-HpbD-a의 농도에서 암세포의 형태학적 관찰은 광역학치료 24시간 까지 시간이 지남에 따라 점차 암세포의 크기 작아지고 세포배양 플라스크 바닥에서 떨어지는 세포를 관찰할 수 있었다 (Fig. 2). 9-HpbD-a 2.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 광역학치료 30분 이후

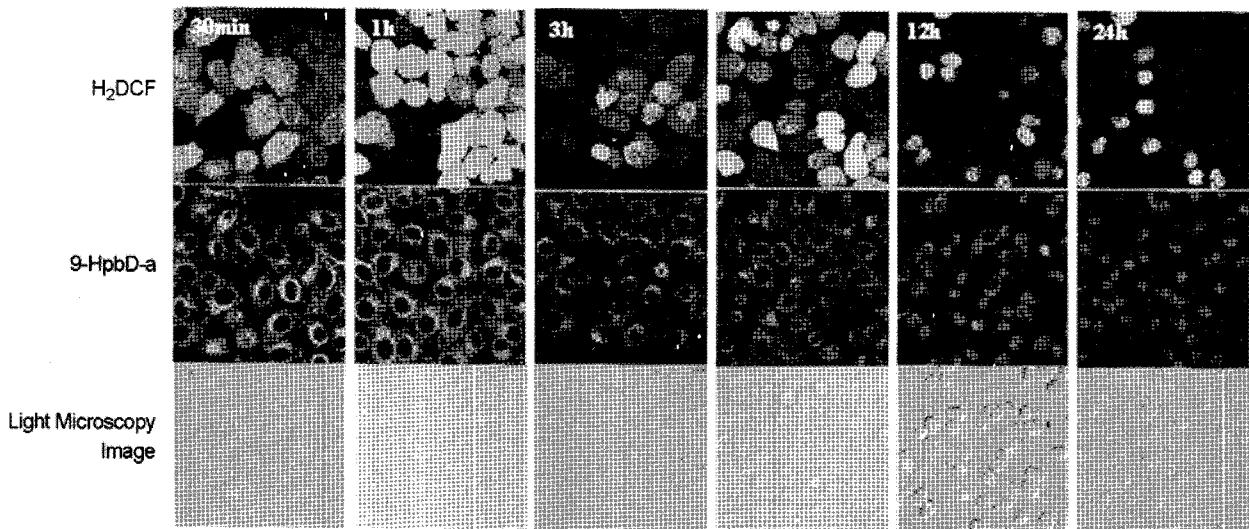


Fig. 2. Time course image of G-ROS activity after PDT with $1.1 \mu\text{g/ml}$ 9-HpbD-a sensitized cells. The photosensitized cells were irradiated by 670 nm diode laser (1.7 mW/cm^2 , 1.6 mJ/cm^2). Various time (30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h) after laser irradiation, PDT treated cells were stained with $1 \mu\text{M}$ H₂DCF_DA for 30 min. Stained cells were observed with confocal microscopy at same configuration.

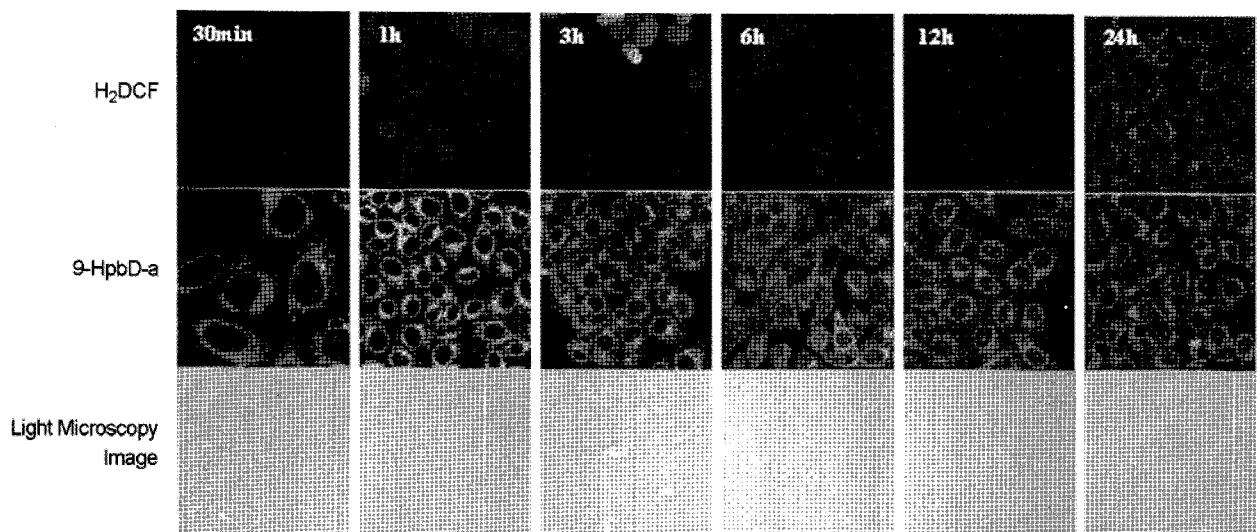


Fig. 3. Time course image of G-ROS activity after PDT with $2.3 \mu\text{g/ml}$ 9-HpbD-a sensitized cells. The photosensitized cells were irradiated by 670 nm diode laser (1.7 mW/cm^2 , 1.6 mJ/cm^2). Various time (30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h) after laser irradiation, PDT treated cells were stained with $1 \mu\text{M}$ H₂DCF_DA for 30 min. Stained cells were observed with confocal microscopy at same configuration.

부터 24시간 까지 G-ROS의 활성을 확인할 수 없었으나 광역학치료 1시간부터 3시간 까지 아주 약한 G-ROS의 활성을 확인할 수 있었다. 세포의 형태학상 관찰에서는 광역학치료 24시간 까지 모든 암세포가 세포배양 플라스크 바닥에 붙은 채로 세포막이 손상되어 정상 암세포의 형태가 아닌 세포파괴의 형태를 보이는 암세포를 관찰하였다 (Fig. 3). 9-HpbD-a $4.6 \mu\text{g/ml}$ 농도에서도 9-HpbD-a $2.3 \mu\text{g/ml}$ 농도와 마찬가지로 광역학치료 30분 후부터 24시간 까지 G-ROS의 활성을 확인할 수 없었고 암세포

의 형태학적 관찰에서도 9-HpbD-a $2.3 \mu\text{g/ml}$ 농도와 같은 양상을 확인하였다 (Fig. 4). 광감작제의 세포 내 확인은 붉은색의 9-HpbD-a 형광으로 확인하였는데 전반적으로 9-HpbD-a의 농도가 높은 실험군에서 세포 내 많은 9-HpbD-a의 축적을 확인할 수 있었다. 그리고 9-HpbD-a $2.3 \mu\text{g/ml}$, 9-HpbD-a $1.1 \mu\text{g/ml}$, 9-HpbD-a $0.5 \mu\text{g/ml}$ 농도에서는 광역학치료 후 24시간 까지 세포 내 9-HpbD-a의 축적이 감소함을 확인하였다. 암세포에 아무런 치치를 하지 않은 실험군에서는 G-ROS의 활성이 없었고, 암세포에

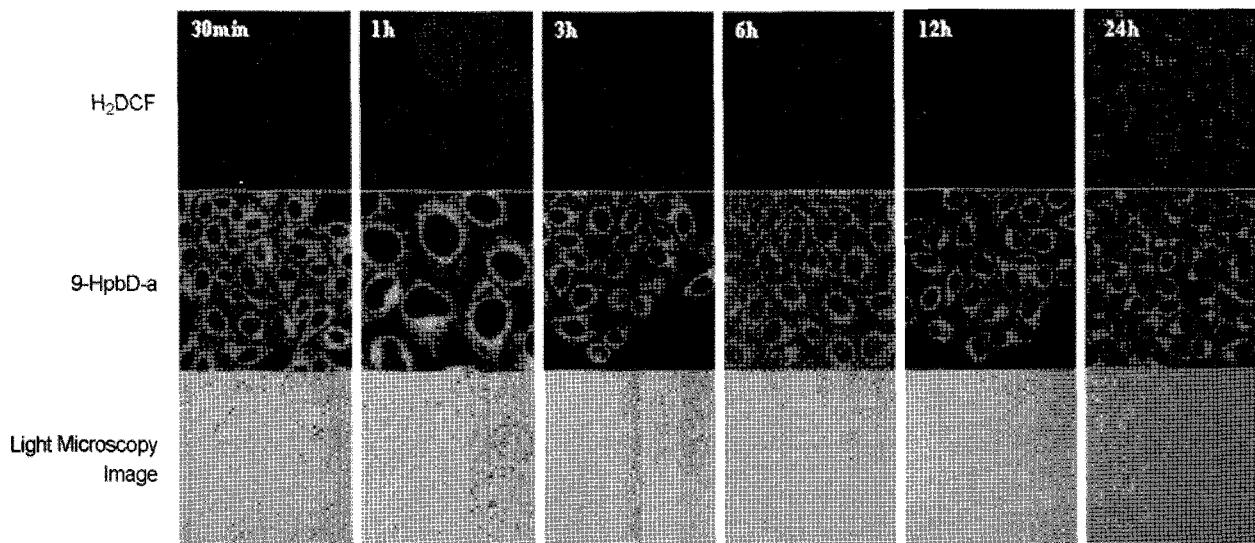


Fig. 4. Time course image of G-ROS activity after PDT with 4.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 9-HpbD-a sensitized cells. The photosensitized cells were irradiated by 670 nm diode laser ($1.7 \text{ mW}/\text{cm}^2$, $1.6 \text{ mJ}/\text{cm}^2$). Various time (30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h) after laser irradiation, PDT treated cells were stained with 1 μM H₂DCF-DA for 30 min. Stained cells were observed with confocal microscopy at same configuration.

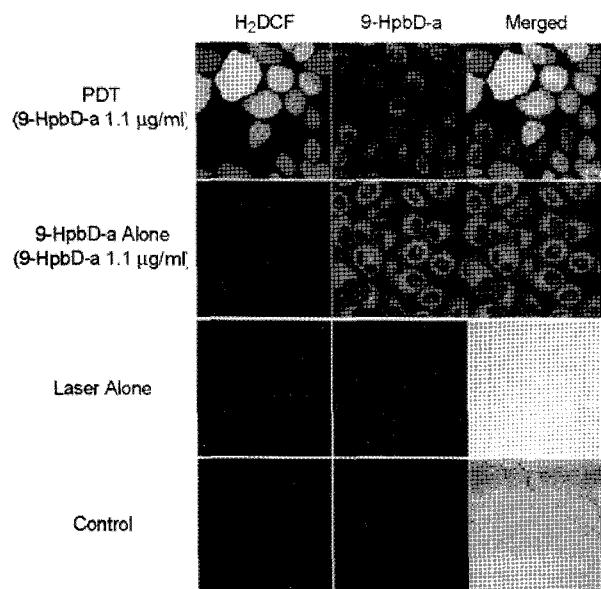


Fig. 5. Images of HeLa cells stained with 1 μM H₂DCF-DA by various groups (PDT, 9-HpbD-a alone, laser alone and untreated control). Fluorescence intensity of PDT group was highly increased.

레이저만을 조사한 실험군에서도 암세포에 아무런 처치를 하지 않은 실험군과 마찬가지로 G-ROS의 활성을 확인할 수 없었다. 암세포에 9-HpbD-a만을 처리한 실험군에서는 레이저만을 조사한 실험군과 아무런 처치를 하지 않은 실험군보다는 아주 약한 G-ROS의 활성을 확인할 수 있었으나 광역학치료를 시행한 실험군에 비해서는 G-ROS의 활성이 현저히 떨어짐을 확인하였다. 다른

실험군에 비하여 광역학치료 실험군에서는 매우 강한 G-ROS의 활성을 확인하였다 (Fig. 5).

2. 광역학치료 기전: Type I 반응

광역학치료의 기전은 크게 Type I 반응과 Type II 반응이 존재한다. Type I 반응은 활성화된 광감작제와 기질 사이의 수소 원자의 추출반응 또는 전자이동 반응에 의하여 자유 라디칼 또는 라디칼 이온을 생성하는 반응으로 대표적인 라디칼로는 하이드록실 라디칼과 superoxide anions이 존재한다. D-mannitol은 대표적인 하이드록실 라디칼 스캐빈저로 알려져 있다. 광역학치료 후 세포독성을 MTT assay 방법을 통하여 D-mannitol을 처리한 실험군과 비처리 실험군과 비교하여 알아본 결과 광역학치료만을 시행한 실험군의 세포생존율은 $12.8 \pm 0.06\%$, 40 mM의 D-mannitol을 첨가 후 광역학치료를 시행한 실험군에서는 $12.6 \pm 0.5\%$ 의 세포생존율을 확인하였다. 그리고 80 mM의 D-mannitol을 첨가 후 광역학치료를 시행한 실험군에서는 $12.3 \pm 0.5\%$ 의 세포생존율을 확인하였다 (Fig. 6). 광역학치료만을 시행한 실험군과 D-mannitol을 처리한 실험군에서의 세포생존율을 비교하였을 때 결과에서 보듯이 D-mannitol이 광역학치료시 세포생존율에 영향을 주지 못한 것을 확인하였다. 이는 9-HpbD-a를 이용한 광역학치료 기전으로 하이드록실 라디칼이 세포독성능에는 작용하지 않음을 의미하고 Type I 반응은 9-HpbD-a의 광역학치료에 영향을 주지 않음을 확인하였다.

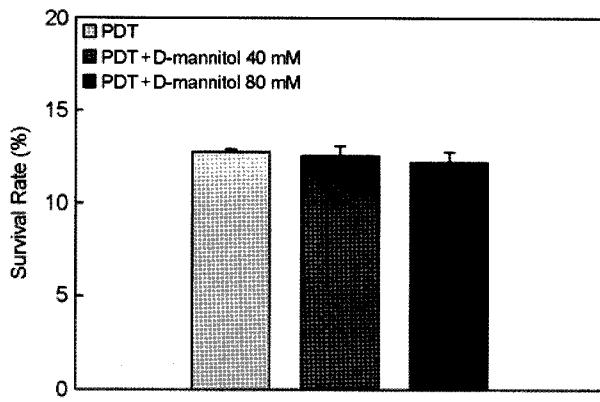


Fig. 6. Effects of D-mannitol on cell survival induced by PDT. 40 mM and 80 mM of D-mannitol were added to the cells at the same time of 9-HpbD-a (0.5 µg/ml) addition. After 4 hours incubation, cells were changed with fresh media. Then laser treatment was performed using 670 nm diode laser (1.7 mW/cm^2 , 1.6 mJ/cm^2). The treated cells were incubated for 24 hours and MTT assay was carried out to measure the viability of cells.

3. 광역학치료 기전: Type II 반응

광역학치료의 기전 중 Type II 반응은 활성화된 광감작제와 산소 분자사이의 에너지 전달에 의하여 singlet oxygen이 생성되는 반응이다. Sodium azide와 reduced glutathione (GSH)는 singlet oxygen quencher로 singlet oxygen에 대하여 생물체를 보호하는 antioxidants이다. 광역학치료 후 세포독성을 MTT assay 방법을 통하여 sodium azide와 GSH를 처리한 실험군과 비처리 실험군과 비교하여 광역학치료시 생성되는 singlet oxygen의 생성을 간접적으로 확인해본 결과 sodium azide를 처리한 실험에서 광역학치료만을 시행한 실험군의 세포생존율은 $15.4 \pm 0.12\%$, 20 mM의 sodium azide를 첨가 후 광역학치료를 시행한 실험군에서는 $18.1 \pm 0.87\%$ 의 세포생존율을 확인하였다. 그리고 40 mM의 sodium azide를 첨가 후 광역학치료를 시행한 실험군에서는 $26.1 \pm 0.06\%$ 의 세포생존율을 확인하였다. 대조군인 광역학치료만 시행한 실험군과 20 mM의 sodium azide를 처리한 실험군에서의 세포생존율을 비교해보면 약 3%의 세포생존율이 증가함을 확인하였고, 40 mM의 sodium azide를 처리한 실험군에서의 세포생존율을 비교해 보면 약 11%의 세포생존율이 유의성 있게 증가함을 확인하였다 ($P < 0.05$). Sodium azide의 처리에 의하여 9-HpbD-a를 이용한 광역학치료시 생성된 singlet oxygen으로부터 세포사멸이 감소되었음을 확인하였다 (Fig. 7). GSH를 처리한 실험에서는 광역학치료만을 시행한 실험군의 세포생존율은 $16.2 \pm 6.4\%$, 5 mM의 GSH를 첨가 후 광역학치료를 시행한 실험군에서는 $54.4 \pm 1.83\%$ 의 세포생

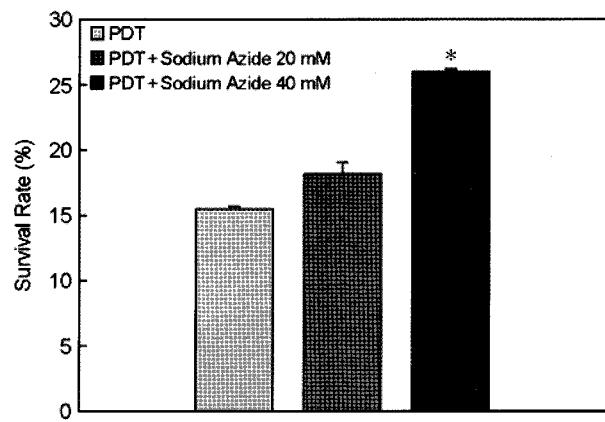


Fig. 7. Effects of sodium azide on cell survival induced by PDT. 20 mM and 40 mM of sodium azide were added to the cells at the same time of 9-HpbD-a (0.5 µg/ml) addition. After 4 hours incubation, cells were changed with fresh media. Then laser treatment was performed using 670 nm diode laser (1.7 mW/cm^2 , 1.6 mJ/cm^2). The treated cells were incubated for 24 hours and MTT assay was carried out to measure the viability of cells (* $P < 0.01$ vs PDT by two-way ANOVA test).

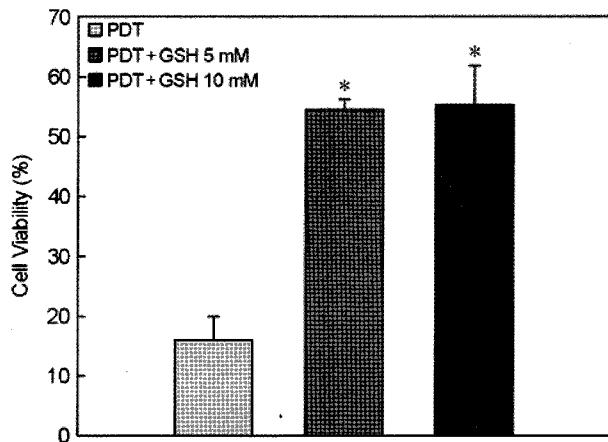


Fig. 8. Effects of GSH on cell survival induced by PDT. 5 mM and 10 mM of GSH were added to the cells at the same time of 9-HpbD-a (0.5 µg/ml) addition. After 4 hours incubation, cells were changed with fresh media. Then laser treatment was performed using 670 nm diode laser (1.7 mW/cm^2 , 1.6 mJ/cm^2). The treated cells were incubated for 24 hours and MTT assay was carried out to measure the viability of cells (* $P < 0.01$ vs PDT by two-way ANOVA test).

존율을 확인하였다. 그리고 10 mM의 GSH를 첨가 후 광역학치료를 시행한 실험군에서는 $55.4 \pm 3.79\%$ 의 세포생존율을 확인하였다. 대조군인 광역학치료만 시행한 실험군과 5 mM의 GSH를 처리한 실험군에서의 세포생존율을 비교해보면 약 38% 정도 증가함을 확인하였고 ($P < 0.05$), 10 mM의 GSH를 처리한 실험군에서의 세포생존율을 비교해보면 약 39% 정도 유의성 있게 증가함을 확인하였다 (Fig. 8, $P < 0.05$). GSH의 경우 sodium azide 처리와 같은

고 찰

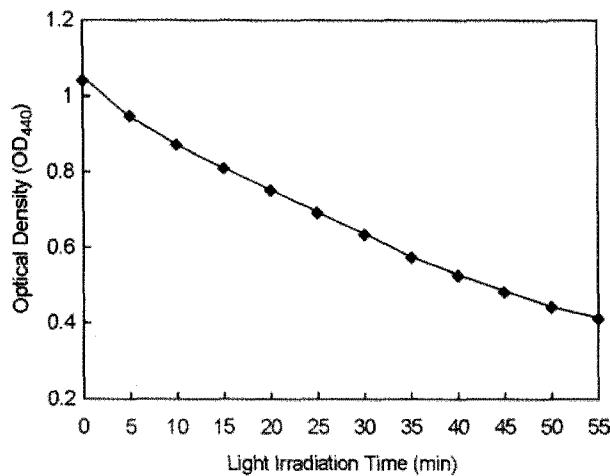


Fig. 9. Singlet oxygen formation by photoactivation of 9-HpbD-a. 9-HpbD-a solution (100 µg/ml) was added to imidazole (8 mM) plus RNO (5 µM) (for singlet oxygen detection) solution. This solution was measured the decrease of absorbance at 440 nm for detect the RNO bleaching during 670 nm diode laser irradiation.

양상으로 GSH에 의하여 9-HpbD-a를 이용한 광역학치료 시 생성된 singlet oxygen으로부터 세포사멸이 감소되었음을 확인하였다. 9-HpbD-a를 이용한 광역학치료시 singlet oxygen의 생성을 확인하였고 생성된 singlet oxygen은 세포독성능에 직접적으로 관여함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 광역학치료 기전으로 Type II 반응이 주된 세포사멸 기전으로 작용한다는 것을 시사한다.

4. Singlet oxygen 생성

9-HpbD-a의 광역학치료시 생성되는 singlet oxygen을 확인하기 위하여 imidazol-RNO (N,N-dimethyl-4-nitrosoaniline) 방법을 이용하여 측정하였다. 측정결과 9-HpbD-a와 imidazol-RNO 용액의 초기 OD (optical density)₄₄₀은 1.04±0.001로 측정하였고 이후 670 nm 라이저를 조사하면서 시간 별로 OD₄₄₀를 측정한 결과 670 nm 라이저 조사 10분 후에는 OD₄₄₀ 0.87±0.001, 20분 후에는 OD₄₄₀ 0.75±0.001, 30분 후에는 OD₄₄₀ 0.63±0.0005, 40분 후에는 OD₄₄₀ 0.53±0.001 그리고 50분 후에는 OD₄₄₀ 0.44±0.001로 670 nm 라이저 조사 시간이 증가 할수록 440 nm의 흡광도가 감소함을 확인할 수 있었다 (Fig. 9). 이러한 결과는 9-HpbD-a의 광역학치료시 singlet oxygen의 생성을 확인하였고 라이저 조사 시간이 증가 할수록 생성되는 singlet oxygen의 양도 증가함을 확인하였다.

광역학치료에 사용되는 광감작제는 특정 파장의 빛에 활성을 일으켜 체내 산소와 결합하여 세포사멸을 유도하는데 본 연구에서 사용된 광감작제는 녹조류인 *Spirulina platensis*의 chlorophyll a로부터 금속이온을 제거한 피오파이틴 a와 이의 phytol기를 가수분해시킨 피오바이드 a로부터 개발한 9-hydroxypheophorbide-a (9-HpbD-a)는 기존의 hematophorphyrin derivative (HpD) 광감작제가 갖는 단점을 보완할 수 있는 광감작제로 체내에서 배설되는데 시간이 오래 걸리는 단점을 줄여 체내의 누적을 방지할 수 있는 장점이 있다. 또한 광감작제의 최대 흡수파장이 높아지면 이러한 광감작제에 적합한 레이저를 선택하여야 하는데 가시광선 영역에서 높은 파장의 레이저일수록 조직에 침투되는 깊이가 깊어져 광역학치료의 효과를 높일 수 있다. 기존의 HpD 광감작제가 630 nm 영역의 최대 활성을 보이는 반면 9-HpbD-a의 최대 흡수파장은 670 nm로 기존의 광감작제보다 높은 파장의 레이저를 사용할 수 있는 장점을 갖고 있다.

광역학치료 기전으로 빛에 의해 활성화된 광감작제 분자와 체내 산소 분자에 의해 ROS가 생성된다고 알려져 있다. 이러한 기전은 Type I 반응과 Type II 반응으로 나뉘는데 광감작제는 빛 에너지를 흡수하여 ground state (S0)에서 single state (S1)으로 활성화되고 triplet state (T1)으로 바뀌게 된다. Triplet state에서 두 종류의 반응으로 나뉘는데 Type I 반응은 활성화된 광감작제와 수소 원자의 추출작용 또는 전자전달반응으로 자유 라디칼 또는 라디칼 이온이 생성되는 반응으로 하이드록실 라디칼 또는 superoxide anions이 대표적이다. Type II 반응은 활성화된 광감작제와 산소 분자 사이의 에너지 전달반응으로 singlet oxygen이 생성되는 반응이다. 일반적으로 Type II 반응이 광역학치료 기전으로 많은 비중을 차지하고 있다고 보고되고 있고 Type I 반응은 저산소상태 또는 극성의 환경에서 우세하게 일어나는 것으로 알려져 있다 (Sharman et al., 1999; Foote, 1991). 본 연구에서도 9-HpbD-a를 이용한 광역학치료시 세포 내에 ROS의 활성을 확인하였고 또한 세포 내 광감작제가 축적된 곳에 더 많은 ROS 활성을 관찰할 수 있었다. 9-HpbD-a를 이용한 광역학치료시 선행의 연구에서 고농도의 9-HpbD-a에서는 세포괴사가, 저농도의 9-HpbD-a에서는 세포고사에 의한 세포사멸이 일어난다고 하였다 (Ahn, 2002). 세포 내 ROS

의 발현도 이러한 두 종류의 세포사멸에 관계가 있다고 생각하였고 실험결과 세포 내 ROS의 활성을 세포고사가 일어나는 조건에서 높은 활성을 확인하였지만 세포괴사가 일어나는 고농도의 9-HpbD-a에서는 활성을 확인할 수 없었다. 그리고 하이드록실 라디칼 스캐빈저인 D-mannitol은 9-HpbD-a를 이용한 광역학치료시 세포사멸에 영향을 주지 못했으나 singlet oxygen quencher인 sodium azide와 reduced glutathione (GSH)는 광역학치료시 세포사멸을 감소시켰고 광역학치료 후 생성되는 singlet oxygen을 확인하였다. 이러한 결과는 9-HpbD-a를 이용한 광역학치료시 주된 기전은 하이드록실 라디칼이 관여하는 Type I 반응 보다는 singlet oxygen이 관여하는 Type II 반응임을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 인체 자궁경부암세포주에서 새로운 광감작제인 9-HpbD-a를 이용한 광역학치료 후 ROS의 활성을 확인하였고 광역학치료 기전으로 singlet oxygen이 관여하는 Type II 반응임을 확인할 수 있었다.

REFERENCES

- Abdulla M, Haeger-Aronson B. ALA-dehydratase activation by zinc. Enzyme 1971. 12: 708-710.
- Ahn JC. The anticancer effect and mechanism of photodynamic therapy using 9-hydroxypheophorbide-a and 660 nm diode laser on human squamous carcinoma cell line. Dankook University 2002. 1-50.
- Ana PC, Hamblin PM, Michael R. Photodynamic therapy and anti-tumor immunity. Nature 2006. 535-545.
- Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, et al. Photodynamic therapy. J Natl Cancer Inst. 1998. 90: 889-905.
- Dougherty TJ. An update on photodynamic therapy applications. J Clin Laser Med Surg. 2002. 20: 3-7.
- Foote CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. Photochem Photobiol. 1991. 54: 659.
- 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 Med J. 1990. 31: 225-233.
- Moan J, Pettersen EO, Christensen T. The Mechanism of photodynamic inactivation of human cells in vitro in the presence of haematoporphyrin. Br J Cancer. 1979. 39: 398-407.
- Nelson JS, Liaw LH, Berns MW. Tumor destruction in photodynamic therapy. Photochem Photobiol. 1987. 46: 829-835.
- Oleinick NL, Evans HH. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. Rad Res. 1998. 150: S146-S156.
- Peng Q, Warloe T, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Giercksky KE, et al. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: Principles and experimental research. J Photochem Photobiol B. 1997. 65: 235-251.
- Rosenthal I. Phthalocyanines as photodynamic sensitizers. Photochem Photobiol. 1991. 53: 859-870.
- Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. Drug Discov Today 1999. 4: 507-517.