Printed in the Republic of Korea
ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY
Vol. 27, No. 5, 223-227, 2014
http://dx.doi.org/10.5806/AST.2014.27.5.223

Analysis of the effects of δ-Aminolevulinic acid on the proliferation and apoptosis of mammalian cells

Yong-Woo Jun[1,†], Kun-Hyung Kim[1,†], Su-Yeon Jo[2], Jin-A Lee[3,★] and Deok-Jin Jang[1,★]

[1]*Department of Ecological Science, College of Ecology and Environment, Kyungpook National University, Kyungpook 742-711, Korea*
[2]*WEDEA Co, Science Park 305, Hannam University, Daejeon 305-811, Korea*
[3]*Department of Biotechnology, College of Life Science and Nano Technology, Hannam University, Daejeon 305-811, Korea*
(Received June 7, 2014; Revised August 6, 2014; Accepted August 8, 2014)

포유류 세포주에서 δ-Aminolevulinic acid (ALA)의 세포증식과 사멸에 미치는 영향분석

전용우[1,†] · 김건형[1,†] · 조수연[2] · 이진아[3,★] · 장덕진[1,★]

[1]경북대학교 생태환경대학 생태과학과, [2]㈜위디어,
[3]한남대학교 생명나노과학대학 시스템생명과학과
(2014. 6. 7. 접수, 2014. 8. 6. 수정, 2014. 8. 8. 승인)

Abstract: δ-Aminolevulinic acid (ALA) is a compound which is widely present in the biosphere and plays an important role in the living body as an intermediate of the tetrapyrrole compound biosynthesis pathway that leads to heme in mammals and chlorophyll in plants. ALA is of interest as a biodegradable mediator, a growth regulator, a precursor of heme proteins, and an effective agent used in therapy of cancer. It has been recently reported that ALA is commonly used in dermatology, due to good effects of skin therapy. Although for the last few decades a substantial amount of research has been focused on the elucidation of the mechanism of ALA and the improvement of its therapeutic activity, it's effect on the cell functions and growth was not cleared. Here, we identified that ALA treatment could attenuate cell proliferation of HEK293T and HaCaT cells. In addition, ALA treatement could induce apoptosis of HeLa cells. These results suggest that apoptosis induced by ALA treatment might be responsible for inhibition of cell proliferation. These results propose the possibility of the improved therapeutic strategy making ALA one of the effective drugs used in human cancers.

요 약: δ-Aminolevulinic acid (ALA)는 생물권내에 폭넓게 존재하는 화합물이고, 포유류에서 헴(heme)과 식물에서 엽록소 생성을 하게하는 경로에서 만들어진 테트라피롤의 중간물질로써 생체내 중요한 역할을 한다. ALA는 생분해성 매개자, 성장 조절자, 헴단백질의 전구체 그리고 암 치료에서 사용되는 효과적인 물질로써 관심이 있다. 최근에는 ALA가 피부 치료의 좋은 효과를 가지고 있어 피부과학에서 빈번히 사

★ Corresponding author
Phone : +82-(0)54-530-1213; +82-(0)42-629-8785 Fax : +82-(0)82-54-530-1218; +82-(0)42-629-8789
E-mail : jangdj@knu.ac.kr; leeja@hnu.kr
†이 저자들은 본 논문에 공동으로 기여했음

용된다고 보고되어 있는데, 하지만 지난 몇 십 년 동안, 많은 연구가 ALA 메커니즘의 설명과 치료적 활성 개선에 초점을 맞춰왔지만, 세포 기능과 세포생장에 대한 ALA의 효과는 아직 불분명하다. 본 연구에서는 ALA의 약물학적 효과가 HEK293T 뿐만 아니라, HaCaT와 HeLa 세포에서 세포분열을 억제하는 것으로 확인을 하였다. 또한, ALA가 처리된 세포에서는 세포예정사가 유도되는 것을 확인하였다. 이러한 결과들은 특정 세포에 ALA가 처리되면 세포증식을 억제하며, 특히 인간의 암세포의 죽임을 유발하는 효과적인 약물 중 하나로써 ALA를 개선된 치료 전략으로 가능성을 제시한다.

Key words: δ-Aminolevulinic acid, Apoptosis, cell proliferation, cell growth

1. 서 론

δ-Aminolevulinic acid (ALA)는 세포의 미토콘드리아에서 에너지 생산을 위한 구연산 회로의 작동시 부산물로 생기는 물질로서, 헴(heme)의 전구물질인 protoporphyrin IX (PpIX)의 생성을 촉진하는 물질이다. 특히 ALA는 최근 여드름 치료나 피부암, 아토피 치료에 사용되는 광역동 치료(photodynamic therapy, PDT)에서 빛에 의한 활성화를 높이는 광민감제(photosensitizer)로 많이 사용되고 있다.[1] 또한, ALA는 수분의 보습에 필수불가결한 에너지 대사를 돕는 기능도 있고, 체내에 불필요한 세포를 제거하거나 면역력을 증가시켜 건강보조식품이나 암치료[2]와 같은 의약 분야에도 효과적인 기능이 있어 활발한 연구가 진행 중이다.

모든 세포에는 햄합성에 관여하는 효소를 발현하고 있지만, 정상세포와 비교해 암세포에서는 뚜렷이 구별되는 활성을 갖고 있어, 암세포에서 높은 수준의 PpIX가 축적되어 있다.[3] 또한, PpIX가 축적되면 세포사멸을 유발한다고 보고되었다.[4] 따라서, 이러한 헴합성 경로에 관여하는 ALA는 암세포를 사멸시키는 가능성이 제기되고 있다. 흥미롭게도 ALA는 금속촉매성 호기성 산화를 통해 활성산소를 만들어 단백질, 지질 또는 세포내 구조를 파괴할 수 있다고 보고되었다.[5] 최근에 ALA의 처리가 사람의 hepatocarcinoma 세포주의 세포예정사(apoptosis)를 유발하는 것을 발견하였다.[6] 또한, 빛에 의해 활성화된 ALA는 침샘의 adenocarcinoma 세포에서 세포 죽음을 유발하거나 세포증식을 억제한다고 보고하였고,[7] 이러한 세포 증식의 억제 효과는 다른 세포에서도 적용될 수 있는 가능성을 보였다.

따라서, 본 연구에서는 인간의 특정 암세포주에서 ALA의 세포증식 억제 및 세포죽음에 대한 영향을 알아보고자 하였다. 이를 위해 사람의 배아 신장 세포에서 ALA의 농도 별 처리 후 세포 죽음 및 증식에 미치는 영향을 조사한 결과 고농도의 ALA를 처리하게 되면 암세포의 세포증식을 억제하는 결과를 보였다. 또한 사람의 피부의 표피층을 이루는 각질세포(keratinocyte)에서 유래된 HaCaT 세포에서도 마찬가지로 고농도의 ALA의 처리가 세포의 죽음을 유도하고 증식을 억제하는 것으로 나타났다. 또한, 세포의 죽음과 증식 억제는 세포예정사(apoptosis)와 관련되어 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들은 ALA가 타깃세포의 증식을 억제하거나 세포의 죽음을 유도시킴으로써 세포사멸을 유발하는 약물로 활용될 수 있는 단서를 제공할 것이다.

2. 재료 및 실험 방법

2.1. 세포배양 및 약물처리

HEK293T와 HaCaT 세포는 10% FBS + penicillin/streptomycin + DMEM 배양액에서 37 ºC (w/ 5% CO_2) 세포 배양기를 이용해 배양하였다. 약물 처리를 하기 위해 HEK293T와 HaCaT cell을 6 well plate에 하나의 well 당 7×10^5개의 세포가 들어가도록 하고 37 ºC에서 24 시간 배양시켰다. ALA를 세포에 처리하기 위해 배양액에 ALA를 녹이고 0.22 μm 필터를 이용하여 여과 시킨후 각각 다른 농도 별로 처리하였다. 일정 시간이 지남에 따라 나타나는 모델세포의 모양변화를 CCD (charge-coupled device) 카메라를 이용하여 촬영하였다. 세포의 수는 트립신을 처리한 후 hematocytometer를 이용해 측정하였다. ALA는 ㈜위디어에서 공급받았다.

2.2. 초기 세포예정사 마커인 Annexin V 염색

세포예정사를 측정하기 위해 Invitrogen사에서 제공하는 세포예정사 측정 kit를 이용하였다. 6 well plate에 ALA가 6일 동안 처리된 세포와 처리되지 않은 세포를 1× PBS (4 ºC)로 씻어준 후, 1 well 당 annexin V 12.5 μL + PI working solution (1 × Annexin-binding

buffer:PI=9:1) 2.5 μL에 1×annexin-binding buffer을 넣어 총 1 mL이 되도록 buffer를 만들어 15 분간 상온에 대기하였다가 plate well에 처리하였다. 그 후 발광을 내는 세포를 촬영하기 위해 CCD (charge-coupled device) 카메라를 이용하여 촬영하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. HEK293T세포에서 ALA가 세포에 미치는 영향

ALA가 세포에 미치는 영향을 연구하기 위해 HEK293T 세포를 이용하여 지속적인 ALA의 처리가 세포의 모양과 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위해 배양접시에 일반모델세포인 HEK293T 세포를 배양하고, 다양한 농도(0 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM)의 ALA를 처리한 후, 2일, 4일, 6일 간격으로 세포의 모양을 직접 관찰하여 촬영하였다. *Fig.* 1에서 보여지듯이 ALA를 농도별로 처리하여 시간이 지남에 따라, 고농도인 20 mM과 30 mM을 처리한 그룹에서 처리 2-4일 후에는 세포가 더 이상 성장하지 않고, 세포의 모양이 쪼그라들며, 배양접시에서 떨어지는 것을 관찰하였다. 또한, 5 mM, 10 mM의 ALA를 처리한 그룹도 처리 6일 후, vehicle을 처리한 0 mM 대조군과 비교하면, 세포의 모양이 일부 변하고, 세포의 밀도가 적은 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 사실은 ALA 처리가 세포증식에 영향을 미침을 알 수 있었다.

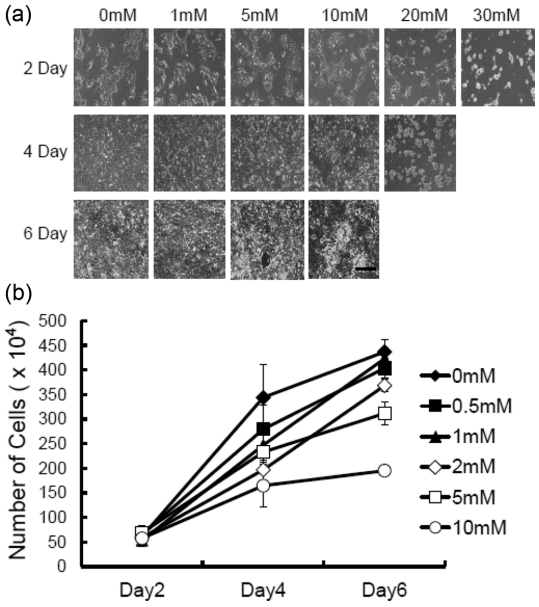

Fig. 1. Effects of ALA treatment on cell morphology and proliferation of HEK293T cells. (a) Morphological changes induced by various concentrations (0, 1, 5, 10, 20 and 30 mM) of dALA in HEK239T cells. Scale bar, 400 μm. (b) Cell proliferation assay. The graph shows the number of cells with various ALA treatments. The graph illustrates that high concentration groups (especially 5 and 10 mM) can inhibit cell proliferation in HEK293T cell.

다음으로, ALA를 처리하면 암세포의 세포증식을 억제하는데 효과가 있는지 정량적으로 확인하기 위해, 다양한 농도별 ALA를 처리하여 2일, 4일, 6일, 8일의 간격으로 세포의 수를 직접 측정하였다(*Fig.* 1b). 그 결과, ALA의 처리농도가 증가함에 따라 ALA를 처리한 그룹에서 대조군과 비교했을 때, 세포의 수가 감소함을 알게 되었다. ALA처리에 의한 EC50을 계산해 본 결과 약 7 mM임을 일 수 있었다. 이를 통해 고농도의 ALA를 처리하면 암세포의 세포증식을 억제하는데 영향을 미치는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 ALA가 암세포인 HEK293T 세포의 증식 및 억제에 관여함을 알 수가 있었다.

3.2. 각질세포에서 유래된 세포에서 ALA가 세포에 미치는 영향

HEK293T세포에서의 선행 연구결과를 바탕으로, 사람의 표피층을 이루는 각질세포에서 유래된 세포주인 HaCaT 세포를 배양하여 ALA가 세포에 미치는 영향을 조사하였다. ALA가 HaCaT세포의 모양과 성장에 미치는 영향을 보기 위해, HEK293T세포와 마찬가지로 배양 접시에 HaCaT세포를 배양하고, 다양한 농도(0 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM)의 ALA를 처리한 후, 1일, 2일, 3일, 4일 간격으로 세포의 모양을 직접 관찰하여 촬영하였다(*Fig.* 2a). ALA처리 후 시간이 지남에 따라 고농도인 20 mM, 30 mM에서는 세포가 성장하지 않고 죽는 것을 관찰하였다. 이 보다 낮은 농도에서는 농도에 비례해 세포의 밀도가 감소함을 확인할 수 있었다.

다음으로, ALA를 처리하면 암세포의 세포증식을 억제하는데 효과가 있는지 정량적으로 확인하기 위해, ALA를 농도별로 처리한 후 HaCaT세포의 세포 수를 직접 조사 하였다. 그 결과 ALA처리 농도에 의존적으로 세포증식 억제 효과를 나타냈다(*Fig.* 2b). EC50을 계산해본 결과, 약 0.7 mM임을 알 수 있었다. 이 같은 실험 결과는 ALA가 HEK293T세포보다 각질세포에서 유래된 HaCaT 세포에서 보다 효과적으로 증

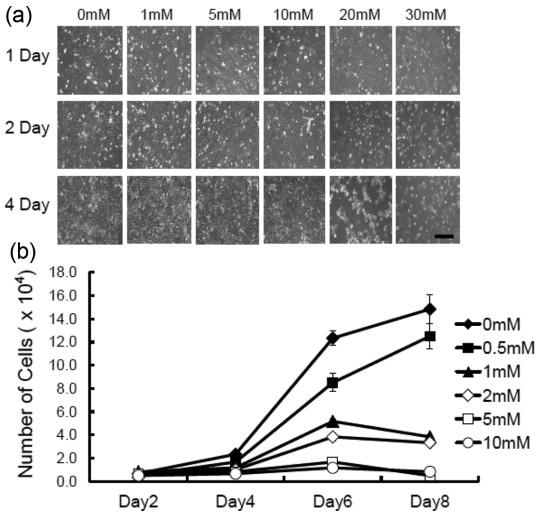

Fig. 2. Effects of ALA treatment on cell morphology and proliferation of HaCaT cells. (a) Morphological changes induced by various ALA treatment concentrations (0, 1, 5, 10, 20 and 30 mM) in HaCaT cells. Scale bar, 400 μm. (b) Cell proliferation assay. The graph shows the number of cells with various ALA treatments. The graph illustrates that high concentration groups (1, 2, 5 and 10 mM) could inhibit cell proliferation in HaCaT cell.

식을 억제함을 확인할 수 있었다. 따라서, 이러한 연구결과를 활용하여 ALA가 사람의 표피층의 각종 피부염에 세포증식을 억제할 수 있는 치료제로써 응용될 수 있는 가능성을 확인하였다.

3.3. ALA의 농도별 처리가 HeLa세포의 증식과 세포예정사에 미치는 영향 연구

다음으로 또 다른 세포주인 HeLa세포를 이용해 ALA가 세포증식에 미치는 영향을 확인하였다. *Fig.* 3(a)에서 보여주듯이, HeLa세포의 경우도 HEK29T세포와 HaCaT세포와 마찬가지로 농도의존적으로 세포의 모양이 변하고, 세포의 밀도가 감소됨을 확인할 수 있었다.

이러한 ALA의 세포증식 억제 작용이 세포예정사의 유도에 의해서 일어나는 것인지 확인하기 위해, 2일과 6일동안 농도별로 ALA를 처리한 세포를 이용해 초기 세포예정사 마커인 annexin V staining 방법을 사용하여 염색하였다. *Fig.* 3(b)에서 보여지듯이 5 mM ALA를 처리한 세포에서 보다 많은 annexin V에 염색됨을 확인 할 수 있었다. 이를 정량화해본 결과 ALA처리 2일 후에는 큰 변화가 없었으나 처리 6일째는 처리농

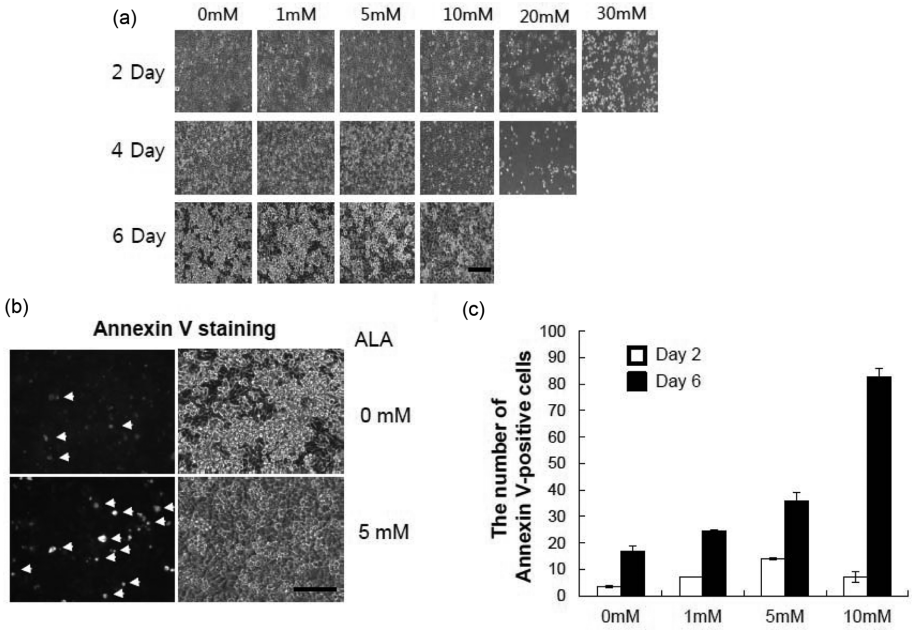

Fig. 3. Effects of ALA treatment on cell morphology and cell death of HeLa cells. (a) Morphological changes induced by various concentrations (0, 1, 5, 10, 20 and 30 mM) of ALA in HeLa cells. Scale bar, 400 μm. (b) Cells were treated with or without 0 and 5 mM ALA for 6 days. The pictures show annexin V staining cells treated for 6 days. (c) Apoptosis assay using annexin V staining. The graph was analyzed from cells treated with 0, 1, 5, 10 mM ALA for 2 or 6 days. Annexin V staining analysis revealed that cells treated with ALA induced a greater degree of apoptosis compared to the untreated cells in concentration-dependent manners.

도에 비례해 증가함을 확인 할 수 있었다. 이러한 실험 결과는 암 세포의 경우에는 ALA 농도가 높아지면 세포예정사가 유도되고, 이로 인해 세포 증식이 억제됨을 확인하였다.

4. 결 론

본 연구를 통해, ALA 처리에 의해 암세포의 일종인 HEK293T세포와 HaCaT세포와 HeLa세포에서 농도의존적으로 세포의 증식을 직접적으로 억제할 수 있음을 확인하였다. 또한, HeLa세포의 경우는 ALA의 처리 농도에 비례해서 세포예정사를 유도해 세포의 증식을 억제함을 확인하였다. 이와 같은 결과들은 ALA의 기능이 사람의 특정 세포에 대하여 세포예정사를 유도하여 세포증식을 억제하는 메커니즘을 가지고 있으며, 이는 각종 피부염 발생의 주요 원인이 되는 세포에 직접 처리함으로써 세포사멸로 유도하는 효과적인 약물로 ALA가 사용될 가능성을 제시한다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 지역특화사업(R0002816)과 2011년도 경북대학교 학술연구비에 의하여 수행된 연구결과입니다.

Reference

1. M. Wakui, Y. Yokoyama, H. Wang, T. Shigeto, M. Futagami and H. Mizunuma, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.,* **136**(8), 1143-1150 (2010).
2. M. Wachowska, A. Muchowicz, M. Firczuk, M. Gabrysiak, M. Winiarska, M. Wañczyk, K. Bojarczuk and J. Golab, *Molecules,* **16**(12), 4140-4164 (2011).
3. S. Collaud, A. Juzeniene, J. Moan and N. Lange, *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents,* **4**(3), 301-316 (2004).
4. E. J. Fratz, G. A. Hunter and G. C. Ferreira, *PLoS One,* **9**(4), e93078 (2014).
5. J. Onuki, M. H. Medeiros, E. J. Bechara and P. D. Mascio, *Biochim Biophys Acta,* **1225**(3), 259-263 (1994).
6. A. De Siervi, E. S. Vazquez, C. Rezaval, M. V. Rossetti and A. M. del Batlle, *BMC Cancer,* **2**, 6 (2002).
7. B. B. Noodt, K. Berg, T. Stokke, Q. Peng and J. M. Nesland, *Br. J. Cancer,* **74**(1), 22-29 (1996).