



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2017년 2월

박사학위 논문

시스플라틴이 CT26 cancer-bearing
nude mouse에서 포토론을
이용한 광역동 치료에 미치는 영향

조선대학교 대학원

의 학 과

양 훈

시스플라틴이 CT26 cancer-bearing
nude mouse에서 포토론을
이용한 광역동 치료에 미치는 영향

Effects of cisplatin on photolon mediated
photodynamic therapy
in CT26 cancer-bearing nude mouse

2017년 2월 24일

조선대학교 대학원

의 학 과

양 훈

시스플라틴이 CT26 cancer-bearing
nude mouse에서 포토론을
이용한 광역동 치료에 미치는 영향

지도교수 이 병 래

이 논문을 의학박사 학위신청 논문으로 제출함

2016년 10월

조선대학교 대학원

의 학 과

양 훈

양 훈의 박사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교 교수	<u>배 학 연 (인)</u>
위원	조선대학교 교수	<u>정 종 훈 (인)</u>
위원	건국대학교 교수	<u>오 재 욱 (인)</u>
위원	조선대학교 교수	<u>김 태 형 (인)</u>
위원	조선대학교 교수	<u>이 병 래 (인)</u>

2016년 12 월

조선대학교 대학원

목 차

ABSTRACT	xi
1. 서론	1
2. 재료 및 방법	6
A. 실험재료	6
B. 실험동물사육	6
C. 세포배양	6
D. CT26 cancer-bearing mouse model 확립	7
E. 광역동치료	7
F. 종양 조직 RNA-sequencing 및 분석	8
G. 조직검사	8
H. 통계처리	9
3. 결과	10
A. Tumor-bearing nude mice 에 PDT 시행 후 종양용적 변화	10

B. Tumor-bearing nude mice 에 PDT 시행 후 종양조직 소견	11
C. 대조군과 레이저 80 J/cm ² 조사군의 암조직 유전자 세트(Gene set) 발현 비교	11
D. 대조군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm ² 조사군의 암조직 유전자 세트 발현 비교	12
E. 레이저 80 J/cm ² 조사군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm ² 조사군의 암조직 유전자 세트 발현 비교	12
F. 레이저 80 J/cm ² 조사군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm ² 조사군의 암조직 화학주성(chemotaxis) 관련 유전자 발현 비교	13
G. 레이저 80 J/cm ² 조사군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm ² 조사군의 암조직 면역반응(immune response) 관련 유전자 발현 비교	13
H. 레이저 80 J/cm ² 조사군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm ² 조사군의 암조직 사이토카인 사이토카인 수용체 상호작용(cytokine-cytokine receptor interaction)관련 유전자 발현 비교	14

I. 레이저 80 J/cm ² 조사군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm ² 조사군의 사이토카인 활성(cytokine activity)관련 유전자 발현 비교	15
J. 레이저 80 J/cm ² 조사군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm ² 조사군의 케모카인 활성(chemokine activity)관련 유전자 발현 비교	15
K. 레이저 80 J/cm ² 조사군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm ² 조사군의 케모카인 신호전달경로(chemokine signal pathway)관련 유전자 발현 비교	16
L. 레이저 80 J/cm ² 조사군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm ² 조사군의 염증반응(inflammatory response) 관련 유전자 발현 비교	16
4. 고찰	17
5. 요약	24
6. 참고문헌	26

표 목 차

Table 1. Effects of PDT on growth of tumor in tumor-bearing mice	41
Table 2. Gene set analysis from the DEGs selected by $\log_2(\text{FC}) \geq 1$ & $P\text{-value} \leq 0.05$ & $q\text{-value} \leq 0.05$ in the comparison unit of control vs 80 j/cm ²	46
Table 3. Gene set analysis from the DEGs selected by $\log_2(\text{FC}) \geq 1$ & $P\text{-value} \leq 0.05$ & $q\text{-value} \leq 0.05$ in the comparison unit of control vs Cis+80 j/cm ²	47
Table 4. Gene set analysis from the DEGs selected by $\log_2(\text{FC}) \geq 1$ & $P\text{-value} \leq 0.05$ & $q\text{-value} \leq 0.05$ in the comparison unit of 80 j/cm ² vs Cis+80 j/cm ²	48
Table 5. Functional categories of differential expressed genes in tumor tissues from 80 J/cm ² vs Cis+80 J/cm ² mice	49

Table 6. Select tumor tissue transcripts in 80 J/cm ² vs Cis+80 J/cm ² mice related to chemotaxis	50
Table 7. Up-regulated genes related to immune response in tumor tissue of Cis+80 J/cm ² rats compared to 80 J/cm ² mice	51
Table 8. Down-regulated genes related to immune response in tumor tissue of Cis+80 J/cm ² rats compared to 80 J/cm ² mice	52
Table 9. Select tumor tissue transcripts in 80 J/cm ² vs Cis+80 J/cm ² rats related to cytokine -cytokine receptor interaction.....	53
Table 10. Select tumor tissue transcripts in 80 J/cm ² vs Cis+80 J/cm ² mice related to cytokine activity	54
Table 11. Select tumor tissue transcripts in 80 J/cm ² vs Cis+80 J/cm ² mice related to chemokine activity	55

Table 12. Select tumor tissue transcripts in
80 J/cm² vs Cis+80 J/cm² mice related to
chemokine signaling pathway 56

Table 13. Select tumor tissue transcripts in
80 J/cm² vs Cis+80 J/cm² mice related
to inflammatory response 57

도 목 차

Fig.1. Three elements of photodynamic therapy ...	34
Fig.2. Structure of photosensitizers	35
Fig.3. Platinum compounds	36
Fig.4. Laser irradiation with a 660 nm red light	37
Fig.5. Photography of tumor-bearing nude mice after photodynamic therapy with 80 J/cm ²	38
Fig.6. Photography of tumor-bearing nude mice after photodynamic therapy(80 J/cm ²) combine with cisplatin	39
Fig.7. Photography of tumor-bearing nude mice after photodynamic therapy with 140 J/cm ²	40
Fig.8. Photography of tumor-bearing nude mice 8 days after photodynamic therapy	42

Fig.9. Tumor volume of tumor-bearing mice	
8 days after PDT	43
Fig.10. Histologic findings of tumor tissues	
from mice with PDT	44
Fig.11. Histologic findings of tumor tissues of	
tumor-bearing mouse	45

ABSTRACT

Effects of cisplatin on photolon mediated photo-dynamic therapy in CT26 cancer-bearing nude mouse

Yang Hoon

Advisor : Prof. Lee Byoung-rai, Ph.D.

Department of Medicine,

Graduate School of Chosun University

Photodynamic therapy is a non-invasive cancer treatment method that can selectively laser irradiation on cancer tissue after the injection of photosensitizer. However, photodynamic therapy is necessary to develop a method that can enhance the cancer treatment efficiency due to limitation the light transmission and the anticancer activity of photosensitizer. This study was carried out to investigate the changes of anti-tumor effect of cisplatin on photodynamic therapy (PDT) with photolon in nude mouse tumor bearing model. The nude mouse tumor bearing model was prepared by injecting cultured colon cancer cells (CT26 cells, 1×10^5 cells/mouse) into the back of KSN/Slc nude mice. The experimental group was divided into the control group, the cisplatin group (3 mg/kg BW), 80 J/cm² group, cisplatin+80 J/cm² group and laser 140 J/cm² group. Cisplatin (3 mg/kg BW) and photolon (2.5 mg/kg BW) were injected into the abdominal cavity and after 2 hours, laser light(660 nm) was irradiated on the tumor mass and the volume of tumor

mass was measured with time. After 24 hours of laser irradiation, RNA was isolated from tumor tissues and gene expression changes were observed by mRNA sequencing analysis. The tumor volume of the control group was increased by 133% at day 8 compared to day 0, and 118% by the cisplatin treated group. The tumor volume in the 80 J/cm² group increased by 68% on day 8 compared to day 0, and increased by 7% on day 8 compared to day 0 in the Cis+80 J/cm² group. Tumor volume of 140 J/cm² group was reduced by 27% on day 8. After 1 day of PDT, the tumor tissues were excised, fixed into 10% paraformaldehyde, stained with hematoxylin-eosine(HE) and observed under a light microscope. Necrotic cells were not observed in the tumor tissue of the control group and cisplatin groups. In the 80 J/cm² group, necrosis was partially observed in the tumor tissue, and in the Cis+80 J/cm² group, necrotic cells were extensively observed in the tumor tissue. After 1 day of PDT, mRNA-seq analysis of the expression of the genes involved in the immune response in the control and 80 J/cm² groups showed no difference. In Cis+80 J/cm² group, expression of genes involved in immune response was increased compared to 80 J/cm² group. After 1 day of PDT, the expression of chemotaxis-related 12 genes and immune response-related 18 genes were different in cancer tissues of 80 J/cm² group and Cis+80 J/cm² group. The combination of cisplatin and photolon-PDT significantly reduced tumor size and increased the expression of immune response-related genes in tumor tissues. These results suggest that the combination of cisplatin and PDT may be an effective method for enhancing cancer treatment.

Key words: Photodynamic therapy, cisplatin, photolon, CT26 cells.

1. 서 론

광역동 치료(photodynamic therapy)는 비 침윤적 암치료법으로 암 조직에 선택적으로 빛을 조사하여 암을 치료하는 매우 유용한 치료법이다(1). 광역동 치료는 가시광선이나 적외선을 조사하여 활성화된 광민감제(photosensitizer)가 직접 또는 산소유리기를 생산하여 세포나 조직에 작용하여 치료효과를 나타낼 수 있다(2). 광역동 치료는 악성종양의 치료뿐만 아니라 심장질환, 비뇨기질환, 피부질환의 치료나 미용 분야에 광범위하게 이용되고 있다(3). 또한 광역동반응은 항균작용과 항바이러스 작용이 있는 것으로 알려져 있어서 항균제 내성균 감염, 바이러스 감염, 진균류 감염의 치료에 이용되고, 물의 살균이나 표면 살균등에도 이용되고 있다(4,5). 암치료를 위한 광역동 반응에 감광제, 빛 및 산소가 필요하며 이들을 광역동 치료 삼요소라 할 수 있다(Fig.1). 광민감제는 빛에너지인 광자를 흡수하는 물질로서 세포내부에서 만들어진 내인성 광민감제와 세포외부에서 유입된 외인성 광민감제로 나눌 수 있다(5). 내인성 광민감제는 포르피린, 빌리루빈 또는 엽록소등으로 세포내에 정상적으로 존재하는 물질로서, 이들은 농도가 너무 낮거나, 세포내에서 물질이 격리되어 있기 때문에 광감작반응이 일어나지 않거나, 일어나더라도 세포가 손상될 정도로 강력하지 않다. 외인성 광민감제는 염료나 천연물 유래의 물질로서 여러 가지 종류가 있으며, 의료나 농업 또는 다른 다양한 용도로 생산되어 사용되고 있다(4,5). 광민감제가 광자를 흡수하여 화학적으로 변화된 상태 즉 광민감제 활성화(excitation)형으로 전환되는 과정을 광감작 반응(photosensitizing reaction)이라 한다(4,6). 기저상태의 광민감제가 광감작반응으로 활성화되면 주위의 여러 가지 광감작반응에 예민한 수용체나 기질을 변화시키고 다시 기저상태로 돌아간다(3,6). 따라서 광민감제는 광감작반응이 일어나더라도 소모되지 않기 때문에 반응이

계속해서 일어날 수 있다. 광감작반응은 type I과 type II 반응 등 2 가지가 있다(6). Type I 반응은 광감작에 의해서 활성화된 광민감제가 기질에 직접 작용하여 나타나는 반응이고, type II 반응은 활성화된 광민감제가 산소와 반응하여 singlet oxygen(O_2^*)을 생산하여 이에 의해서 반응이 일어나는 것이다(3,6). Type I 반응결과 생성물도 산소와 반응하여 산화가 일어나므로 광민감제, 빛 및 산소를 광역동 치료의 삼요소라고 할 수 있다(6,7). Singlet oxygen 은 단백질, 지질 및 핵산과 반응할 수 있는데, 단백질의 트립토판, 티로신, 히스티딘, 시스테인 및 메치오닌등과 반응하고, 지질의 불포화지방산이나 콜레스테롤과 반응하며, 핵산의 구아닌과 반응하여 산화를 일으킬 수 있다(7). 따라서 광역동 치료는 광민감제가 광감작반응 후 singlet oxygen을 생성하여 이에 의한 세포나 조직의 단백질, 지질 및 핵산의 산화로 인하여 세포손상이 유발되어 치료 효과가 나타난다고 할 수 있다(8). 현재 광역동 치료에 사용되는 광민감제는 폴피린(porphyrin)과 이의 유도체, 클로린(chlorins) 및 이의 유도체, bacteriochlorins 및 phthalocyanines 등 알려져 있다(Fig.2)(9). 헤마토폴피린(hematoporphyrin) 유도체는 1960년 Lipson 에 의해서 처음 개발되어 주로 암 진단에 이용되었고, 이 후 포토프린(Photofrin)이라는 이름으로 이용되고 있는 광민감제이다(9). 1970년대 후반 기부터 Thomas Dougherty 등의 여러 연구팀에서 포토프린을 이용한 악성종양 치료를 시도하였으며, 1993년 캐나다에서 방광암 치료에 광민감제로 처음 사용되었으며, 이후 미국과 일본 및 유럽등지에서 식도암과 폐암의 치료에 사용되었다(9, 10). 포토프린은 세포분열이 왕성한 세포에서 더 잘 흡수되어 축적되므로 포토프린을 주사하면 암세포에 더 많은 량의 포토프린이 축적된다(11,12). 파장 652 nm 적색 레이저광선을 조사하면 포토프린이 활성화(excitation)되어 포토프린 유리기(radicals)로 전환되고, 포토프린 유리기가 주위의 산소를 반응성 산소로 전환시켜서 세포손상을 유발하여 항암효과

가 나타낸다(4, 13). 포토프린은 세포내에서 수 주 동안 파괴되지 않고 남아 있기 때문에 치료 후 다른 조직의 손상을 막기 위해서는 주사한 후 30 일 정도 빛에 노출을 피하기 위하여 피부를 가리고, 선글라스를 착용해야하며, 썬 크림 등을 발라서 햇빛을 차단해야 한다(14). 포토프린을 이용한 광역동 치료는 수 주 동안 빛에 대한 노출을 제한해야하기 때문에 치료받는 사람의 생활에 불편하여 이러한 문제점을 해소시키기 위해서 2세대 광민감제가 개발되었다. 클로린 유도체인 포토론(photolon)은 체내에서 빠르게 제거 되도록 개발된 2세대 광민감제다. 클로린 유도체인 클로린 e6(Ce6)는 1994년 Kostenich등이 암치료에 처음으로 사용하였고(15), 이후 polyvinyl-pyrrolidone(PVP)과 중합하여 수용성으로 만들어 Ce6-PVP를 포토론이라 하였다(16). 포토론은 정맥주사 후 1시간 정도 경과하면 암 세포에 축적이 일어나고 12시간이 지나면 체내의 포토론은 대부분 배설 되므로, 광역동 치료 후 다른 장기의 손상을 일어날 가능성이 줄어들기 때문에 환자는 빠른 시간 안에 일상에 복귀 할 수 있다(17). 광민감제를 활성화시키는 광원으로 레이저가 많이 이용되고 있다. 레이저는 출력에 따라 3,000-10,000 mW의 고출력 레이저와 1-500 mW의 저출력 레이저로 구분한다(18). 의료분야에서 고출력 레이저는 접촉부에 고열을 발생시켜서 조직을 태우기 때문에 외과적인 조직 절개에 사용되며, 저출력 레이저는 열이 발생하지 않기 때문에 광 에너지를 이용하는데 이용된다(18). 고출력의 레이저는 대부분 에너지가 열을 발생시켜서 세포의 수분을 증발시킴으로써 세포를 태워내는 효과를 나타낸다(19). 반면 저출력 레이저는 열을 발생하지 않고 피부 표면을 투과하여 광 에너지만을 신체 내부로 전달한다(19). 광역동 치료에 이용되는 레이저는 저출력 레이저로서 argon-pumped dye lasers, potassium titanyl phosphate (KTP)-pumped dye lasers 또는 gold vapor-pumped dye lasers 등이 이용되었으나 이들은 고가의 장비이므로 현재는 값이 저렴하고 다루기 쉬운 반도체

레이저(diode laser)가 많이 사용되고 있다(20,21). 광역동 치료에 이용되는 레이저의 파장은 630 nm-1200 nm 이며, 폴피린이나 클로린계 광민감제는 적색광선 파장인 600 nm-700 nm 에서 활성화가 일어난다(21,22). 광선의 파장에 따라서 빛 투과력에 차이가 나는데, 파장 630 nm 빛의 피부 침투력은 0.5 cm, 파장 700 nm 빛의 피부 침투력은 1.5 cm 로 파장이 길수록 투과력은 증가하며, 침투력이 클수록 광역동 치료에 더 효과적이라 할 수 있다(22,23). 시스플라틴(Cisplatin)은 cisplatinum 또는 cis-diamminedichloro-platinum(II)으로 알려져 있는 광범위 항암제로서 암치료에 많이 사용되는 항암화학요법제다(24). 시스플라틴은 DNA의 퓨린염기 사이에 끼어들어 가교결합(cross-linking)을 함으로서 DNA가 손상될 경우 이를 보수(repair)하는 작용이 억제되어 세포사멸이 초래됨으로서 항암작용이 나타나는 것으로 알려져 있다(25). 시스플라틴은 1844년 Peyrone에 의해서 처음 합성되었고, 1893년 Alfred Werner에 의해서 구조가 밝혀졌으나 1960년대에 Rosenberg에 의해서 세포성장 억제작용이 처음 알려졌으며 1978년 FDA에서 처음으로 백금을 함유하는 항암제로 인정받았다(26,27). 시스플라틴은 암종, 육종 및 배아종 등 여러 가지 암세포에 치료효과를 나타내는 것으로 알려져 두경부암, 유방암, 폐암, 대장암, 방광암, 생식기암 등 다양한 암 치료에 널리 이용되고 있다(28-30). 그러나 시스플라틴에 내성을 가진 암세포가 나타나고(31), 시스플라틴을 투여할 경우 신장손상, 감염, 면역억제, 위장장애, 출혈, 청신경손상 등 여러 가지 부작용이 동반되어 이의 사용이 제한되고 있다(32,33). 시스플라틴의 부작용을 감소시키고 항암력을 증가시키기 위하여 시스플라틴 유도체를 개발하거나 다른 항암요법제와 병합하는 등의 방법들이 시도되고 있다(34). 현재까지 많은 종류의 시스플라틴 유도체가 알려져 있는데 이들 중에서 카보플라틴(carboplatin)이 가장 많이 사용되고 있다(Fig.3)(35). 카보플라틴의 장점은 체내에서 작용시간이 시스플라틴 보다 더 길어서 투여 간

격을 늘려도 되고, 신장독성이 현저히 더 적은 것으로 알려져 있다(36). 그러나 카보플라틴의 항암력이 암세포의 종류에 따라서 다르지만 일반적으로 시스플라틴보다 더 낮아서, 시스플라틴과 같은 정도의 항암력을 위해서 카보플라틴을 4 배 정도 고용량으로 투여해야 하는 것으로 알려져 있다(37). 따라서 아직까지도 플라틴계열의 항암제는 시스플라틴이 가장 많이 사용되고 있다. 시스플라틴의 부작용이나 내성세포의 출현으로 시스플라틴 단독요법으로 치료가 어려운 경우 암치료를 위하여 다른 항암화학 요법제와 병합하거나 광역동 치료법과 병합치료하는 시도가 이루어지고 있다(34,37). 시스플라틴은 난소암, 유방암, 폐암 및 두경부암 치료에 시스플라틴과 파크리탁셀(Paclitaxel)을 병합하여 사용하면 치료효과가 증가한다고 하였고(38), 위암 치료에 5-FU와 Paclitaxel 을 삼중 병합치료에 이용하였고(39), 담도암 치료에 Gemcitabine 과 병용하여 사용하기도 하였다(40). 시스플라틴과 광역동 치료를 병합하는 치료도 시도되고 있는데, Ali 등(41)은 근육종암 세포주 실험에서 시스플라틴과 aluminum phthalocyanine tetrasulfonate chloride (AIS4Pc-Cl)를 이용한 광역동치료에서 항암작용을 증가시켰고, Wei 등(42)은 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포에서 시스플라틴과 ALA (5-aminolevulinic acid)를 병합하면 항암력이 증가한다고 하여 배양세포를 이용한 실험결과가 보고되어 있다. 그러나 암 조직에서 포토론을 이용한 광역동치료에 시스플라틴을 병용하여 치료효과를 관찰한 결과는 아직까지 보고되어 있지 않다. 본 연구는 광역동치료에 대한 시스플라틴의 효과를 생체실험을 통하여 관찰하기 위한 실험으로, 대장암세포(CT26 cells)를 Nude 생쥐에 주사하여 tumor-bearing nude mouse를 만들어서 시스플라틴을 투여하고 photolon을 이용한 광역동치료를 실시하여 암종의 크기와 암 조직의 유전자 발현을 mRNA sequencing 법으로 측정하여 시스플라틴과 광역동 치료의 영향을 관찰하였다.

2. 재료 및 방법

A. 실험재료

본 실험에 사용된 cisplatin 은 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서, 10% 태우혈청, 스트렙토마이신, 페니실린, DMEM 배지 등은 Gibco BRL(NY, USA)에서 구매하여 사용하였다. 실험동물은 KSN/Slc 종 nude mouse 6 주령 수컷으로 중앙 실험동물(주)(Seoul, KOREA)에서 구매하여 사용하였고, 대장암세포주는 CT26 cell 로서 미국표준균주 배양수록 보존소(ATCC)에서 구매하였고, 광민감제는 포토론(photolon)을 Belmedpreparaty(Minsk, Belarus)사에서 구매하여 사용하였다.

B. 실험동물사육

본 실험에서 사용한 실험동물은 Nude mouse (KSN/Slc) 종으로 1984년 일본의 도쿄대학에서 Balb/c nu/nu 종을 DDD/1 mouse 와 교배하여 발생된 변종으로 xenograft transplantation 실험에서 숙주(host)로 이용되는 nude mouse 종이다. KSN/Slc 종 nude mouse는 6주령 수컷을 중앙 실험동물(주)(Seoul, KOREA)에서 구매하여 12시간 명암주기, 온도 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 상대습도 $60 \pm 5\%$ 의 환경에서 사육하였고, 동물실험은 조선대학교 동물실험 윤리 위원회 승인(승인번호: CIACUC 2015-A0034)을 받아 윤리규정에 따라서 실험을 실시하였다.

C. 세포배양

생쥐 대장암세포(CT26 cell)는 미국표준균주 배양수록 보존소(ATCC)에서 구매하여 실험에 사용하였다. 대장암세포는 10% 태우혈청, 스트렙토마이신 (100 U/mL) 및 페니실린(100 U/mL)을 함유한 DMEM 배지(Gibco BRL, NY, USA)를 사용하여, 37°C 로 유지되는 CO_2 배양기에서 배양하였다.

D. Colon cancer bearing mouse model 확립

KSN/S1c종 nude mouse 를 1주일간 사육하여 환경에 적응시킨 후 암종 유도 동물로 이용하였다. 배양한 생쥐 대장암 세포(CT26 cell)를 trypsin 처리하여 수집한 후 대장암세포(CT26 cells : 1×10^5 cells/mouse)를 PBS 0.2 ml 에 부유하여 nude mouse의 등에 피하 주사하였다. 생쥐 대장암세포 주사 후 시간 경과에 따라서 관찰하고 암종의 크기를 digital caliper 로 측정하였으며, 10일 경과 시 9 mm 정도의 크기로 암종이 형성된 것을 tumor-bearing mouse model 로 실험에 사용하였다.

E. 광역동 치료 (PDT)

실험동물에 형성된 암종의 크기가 9 mm 이상인 tumor-bearing mouse 8마리씩을 한 실험군으로 모두 5 실험군으로 나누었다. 실험군은 레이저를 조사하지 않은 대조군과 시스플라틴군(3 mg/kg BW), 레이저 80 J/cm² 조사군, 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군 및 레이저 140 J/cm² 조사군으로 나누었다. 실험에 사용하는 광민감제는 포토론(Photolon)으로 Belmedpreparaty(Minsk, Belarus)사에서 구매하여 사용하였다. 시스플라틴은 생리식염수에 용해시켜서 포토론 주사 1시간 전에 생쥐 체중 kg 당 3 mg(3 mg/kg BW)를 생쥐 복강에 주사하였다. 포토론은 생리식염수에 용해시켜서 체중 kg 당 2.5 mg(2.5 mg/kg BW)를 생쥐 복강에 주사하고 2시간 경과한 후 반도체 레이저 수술기(CERALAS™ Diode Laser 632 System, biolitec, Germany)를 이용하여 레이저(파장 660 nm)를 조사하였다(Fig.4). 암종에 레이저를 조사하고 24시간 경과 후 각 실험군당 3마리씩 경추 탈골하여 희생시킨 후 암종을 절제하여 일부는 TRIzol 용액에 보관하여 RNA-seq 검사를 위한 시료로 사용하고, 일부는 10% paraformaldehyde 고정시켜서 조직소견관찰 시료로 사용하였다. 각 실험군당 5 마리씩은 레이저 조사전과 조사 후 시간 경과에 따라서 8일까지 암종

(tumor mass)의 크기를 측정하고 사진을 촬영하였다. 암종의 크기는 digital caliper 로 측정하여 다음 식에 의해서 계산하였다.

$$\text{Tumor volume(mm}^3\text{)} = (\text{width}^2 \times \text{length})/2$$

F. 종양 조직 RNA-seq 방법

절제한 종양조직에서 TRIzol® RNA Isolation Reagents (Life technologies, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 분리 하였고, Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 사용하고 BioAnalyzer 2100 automated electrophoresis system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 RNA 안정성을 분석하였다. 분리된 RNA는 TruSeq stranded mRNA sample preparation kit (illumina, San Diego, CA, USA) 을 이용하여 제조사의 방법에 따라서 mRNA sequencing library를 준비하였다. mRNA library는 Agilent DNA High sensitivity Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA) 를 이용하여 BioAnalyzer 2100로 분석하고, CFX96 real time system (BioRad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 정량분석 하였다. 각각의 mRNA library sequencing은 Illumina HiSeq 2500를 이용하여 분석하였고, cDNA libraries의 clusters는 TruSeq flow cell을 이용하여 만든 다음 TruSeq 200 cycle SBS kit (Illumina, San Diego, CA, USA) 를 이용하여 100bp-end read 로서 염기서열을 분석하였다. Illumina HiSeq 2500에서 수집된 염기서열 정보는 FASTQ format에 저장된 정보와 비교하여 분석하였다. Gene set의 분석은 DAVID Bioinformatics Resources 6.7, NIH(43)에서 Functional Annotation Tool을 이용 하였다. 실험군 간의 유전자 발현 차이는 reads per kilobase per million mapped reads (RPKM) 값을 이용하여 fold-change false discovery rate (FDR)을 측정하고, p<0.05 인 것을 유의한 것으로 하였다.

G. 조직학적 검사

생쥐로부터 절제한 암조직을 10% paraformaldehyde 용액에서 고정시킨 후 탈수과정을 거쳐서 파라핀에 포매(embedding)한 후 6 μ m의 절편으로 잘라 슬라이드 글라스 위에 붙여 파라핀을 제거하는 과정(xylene I, II, III \rightarrow 100% EtOH I, II \rightarrow 95% EtOH I, II \rightarrow 90% EtOH \rightarrow 80% EtOH \rightarrow 70% EtOH, 각 10분씩)을 진행하였다. H&E 염색 후 조직학적 소견을 광학 현미경으로 관찰하였다.

H. 통계처리

RNA-seq를 제외한 모든 측정 결과는 평균 \pm 표준편차(mean \pm SD)로 표시하였고, 실험결과는 SPSS (Statistical Package for the Social Science, Ver. 12.0. SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 이용하여 분산분석(ANOVA)을 실시하였고, 시료 간 유의성은 Duncan's multiple range test에 의해서 $P < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

3. 결 과

A. Tumor-bearing nude mice 에 PDT 시행 후 종양 용적 변화

PDT가 종양의 성장에 미치는 영향을 PDT 직전(0 일), 2 일, 4 일 및 8 일 에 각각 종양의 크기를 측정하여 관찰한 결과는 Table 1, Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9 및 Fig. 10 과 같다. PDT를 시행하지 않은 대조군에 서 종양의 크기는 실험시작 0 일, 2 일, 4 일 및 8 일에 421 ± 112 , 512 ± 121 , 696 ± 139 및 $983 \pm 128 \text{ mm}^3$ 를 각각 나타내서 실험 시작 할 때에 비하여 2 일, 4 일 및 8 일 경과 시에 종양의 크기가 21%, 65% 및 133%가 각각 증가 되어 시간이 경과 될수록 종양의 크기가 증가됨을 알 수 있다. 시스플라틴을 투여하고 PDT를 시행하지 않은 시스플라틴군에서 종양의 크기는 실험시작 0 일, 2 일, 4 일 및 8 일에 429 ± 124 , 493 ± 131 , 672 ± 133 및 $995 \pm 142 \text{ mm}^3$ 를 각각 나타내서 종양의 크기가 실험 시작 할 때에 비하여 2 일, 4 일 및 8 일 경과 시에 14%, 56% 및 131%가 각각 증가되어 시간이 경과 될수록 종양의 크기가 증가됨을 알 수 있다. 레이저 80 J/cm^2 조사군의 종양크기는 레이저 조사 직전(0 일)과 조사 후 2 일, 4 일 및 8 일에 389 ± 80 , 479 ± 101 , 572 ± 113 및 $657 \pm 107 \text{ mm}^3$ 를 각각 나타내서 종양의 크기가 레이저 조사 직 전에 비하여 레이저 조사 후 2 일, 4 일 및 8 일 경과 시에 27%, 47% 및 68% 가 각각 증가되어 시간이 경과 될수록 종양의 크기가 증가되나, PDT를 시행 하지 않은 대조군에 비하여 종양의 크기 증가 속도가 감소됨을 알 수 있다 (Fig.5). 시스플라틴+레이저 80 J/cm^2 조사군의 종양크기는 레이저 조사 직 전(0 일)과 조사 후 2 일, 4 일 및 8 일에 412 ± 98 , 491 ± 93 , 452 ± 101 및 $443 \pm 117 \text{ mm}^3$ 를 각각 나타내서 레이저 조사 직전에 비하여 레이저 조사 후 2 일, 4 일 및 8 일 경과 시에 종양의 크기가 각각 19%, 9% 및 7%가 증가되어 시간이 경과 될수록 종양의 크기가 증가되나, 시스플라틴군이나 레이저 80

J/cm^2 조사군에 비하여 종양의 크기가 감소됨을 알 수 있다(Fig.6). 레이저 $140 J/cm^2$ 조사군의 종양크기는 레이저 조사 직전(0 일)과 조사 후 2 일, 4 일 및 8 일에 418 ± 103 , 558 ± 110 , 412 ± 107 및 $304 \pm 82 mm^3$ 를 각각 나타내서 레이저 조사 직전에 비하여 레이저 조사 후 2 일, 4 일 및 8 일 경과 시 종양의 크기가 각각 33%, -1% 및 -27%가 증가되어 2 일에는 종양의 크기가 증가되나, 2 일과 8 일에는 종양의 크기가 실험시작 때 보다 더 감소됨을 알 수 있다(Fig.7).

B. Tumor-bearing nude mice 에 PDT 시행 후 종양 조직학적 소견

PDT가 종양에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 PDT 시행 1 일 후 생쥐를 희생시켜 종양조직을 절제하여 고정시킨 후 H&E 염색하여 광학현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 11 및 Fig. 12와 같다. PDT를 시행하지 않은 대조군과 시스플라틴 군의 암조직을 관찰한 결과 세포는 무질서하고, 모양이 불규칙하였으며, 세포들이 핵이 진하고 크며, 핵의 크기가 일정치 않고, 세포 분열(mitotic cell)이 보였으나 세포괴사는 나타나지 않았다. 레이저 $80 J/cm^2$ 조사군의 암조직을 관찰한 결과 세포핵이 진하고 크며, 핵의 크기가 일정치 않은 무질서하고 불규칙한 모양의 세포가 보였고, 세포핵이 사라진 형태의 세포가 나타났다. 시스플라틴+레이저 $80 J/cm^2$ 조사군의 암조직을 관찰한 결과 세포핵이 사라진 세포가 많이 나타났다.

C. 대조군과 레이저 $80 J/cm^2$ 조사군의 암조직 유전자 세트(Gene set) 발현 비교

PDT가 종양의 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 레이저 $80 J/cm^2$ 조사 1 일 후 생쥐를 희생시켜 종양조직을 절제해서 RNA를 분리하여 mRNA-sequencing 법으로 유전자 발현량을 측정하여, 대조군과 레이저 80

J/cm^2 조사군의 유전자 발현량의 차이를 비교한 결과 $\log_2(FC)$ 값이 1 이상이고 p 값이 0.05 이하인 유전자 세트는 Table 2와 같다. 아미노산 막이동 활성(Amino acid transmembrane transporter activity) 관련 유전자 5개는 p 값이 0.05 이하면서 q 값이 0.05 이하였다. 그러나 아민 막 이동 활성(amine transmembrane transporter activity) 관련 유전자 5개, 분비억제조절(negative regulation of secretion) 관련 유전자 4개, 창상반응(response to wounding) 관련 유전자 8개, 유기산 운반(organic acid transport) 관련 유전자 5개, 세포성장 조절(regulation of cell proliferation) 관련 유전자 9개 및 인산화 조절(regulation of phosphorylation) 관련 유전자 7개는 p 값이 0.05 이하이었으나, q 값이 0.05 이상 이었다.

D. 대조군과 시스플라틴+레이저 $80 J/cm^2$ 조사군의 암조직 유전자 세트 발현 비교

PDT가 종양의 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 PDT 시행 1일 후 생쥐를 희생시켜 종양조직을 절제해서 RNA를 분리하여 mRNA-sequencing 법으로 유전자 발현량을 측정하여, 대조군과 시스플라틴+레이저 $80 J/cm^2$ 조사군의 유전자 발현량의 차이를 비교한 결과 $\log_2(FC)$ 값이 1 이상이고 p 값이 0.05 이하인 유전자 세트는 Table 3과 같다. 면역반응(Immune response) 관련 유전자 17개, 후천성 면역(Adaptive immune response) 관련 유전자 8개, 창상반응(response to wounding) 관련 유전자 13개, 항체매개 면역반응(Immunoglobulin mediated immune response) 관련 유전자 5개, Antigen processing and presentation 관련 유전자 5개 및 B 세포 매개 면역(B cell mediated immunity) 관련 유전자 7개는 p 값과 q 값이 모두 0.05 이하였다.

E. 레이저 80 J/cm² 조사군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직 유전자 세트 발현 비교

시스플라틴이 PDT에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 레이저 80 J/cm² 조사군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군에 PDT 시행 1 일 경과 후 생쥐를 희생시켜 종양조직의 RNA를 분리하여 mRNA-sequencing 법으로 유전자 발현량의 차이를 비교한 결과 log₂(FC) 값이 1 이상이고 p 값이 0.05 이하인 유전자 세트는 Table 4, 5와 같다. 화학주성(chemotaxis)관련 유전자 12개, 면역반응(Immune response)관련 유전자 18개, 사이토카인-사이토카인 수용체 상호작용(cytokine-cytokine receptor interaction) 관련 유전자 13개, 케모카인(chemokine) 관련 유전자 7개, 케모카인 수용체 결합(chemokine receptor binding)관련 유전자 7개 및 사이토카인 활성화(cytokine activity) 관련 유전자 10개는 *p* 값과 *q* 값이 모두 0.05 이하였다. 레이저 80 J/cm² 조사군에 비하여 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군 에서 화학주성(chemotaxis)관련 유전자 12개의 발현량은 18.023 배 증가되었고, 면역반응(Immune response)관련 유전자 18개의 발현량은 6.256 배, 사이토카인-사이토카인 수용체 상호작용(cytokine-cytokine receptor interaction) 관련 유전자 13개의 발현량은 7.278 배, 케모카인 활성화(chemokine activity) 관련 유전자 7개의 발현량은 32.637 배, 사이토카인 활성화(cytokine activity) 관련 유전자 10개의 발현량은 9.842 배 및 염증반응(inflammatory response) 관련 유전자 10개의 발현량은 7.276 배 가 각각 증가되었다.

F. 레이저 80 J/cm² 조사군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직 화학주성(chemotaxis)관련 유전자 발현 비교

시스플라틴이 PDT에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 레이저 80 J/cm² 조사군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직 화학주성(chemotaxis)관련 유전자 발현량을 mRNA-sequencing 법으로 측정하여 비교한 결과 log₂(FC) 값이 1 이상이고 *p* 값과 *q* 값이 0.05 이하인 유전자는 Table 6과 같다. 레이저 80 J/cm² 조사군에 비하여 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직 화학주성 관련 chemokine ligand 2, S100 calcium binding protein A9 및 interleukin 8 receptor(beta) 유전자는 log₂(FC) 값이 4 이상이었으며, chemokine ligand 5 유전자는 log₂(FC) 값이 3.56 이었으며, S100 calcium binding protein A8 와 colony stimulating factor 3 receptor 유전자의 log₂(FC) 값이 2.96 와 2.31 이었으며, chemokine ligand 2, 7, 10, 12 및 interleukin 1 beta 유전자는 log₂(FC) 값이 1 이상 2 이하였다.

G. 레이저 80 J/cm² 조사군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직 면역반응(immune response)관련 유전자 발현 비교

레이저 80 J/cm² 조사군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직 면역반응(immune response)관련 유전자 발현량을 mRNA-sequencing 법으로 측정하여 비교한 결과 log₂(FC) 값이 1 이상이고 *p* 값과 *q* 값이 0.05 이하인 유전자는 Table 7,8과 같다.

레이저 80 J/cm² 조사군에 비하여 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직 면역관련 유전자 chemokine (C-X-C motif) ligand 2 의 log₂(FC) 값은 4.71 이었고, chemokine (C-X-C motif) ligand 1, chemokine (C-X-C motif) ligand 5 및 growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma 유전자의 log₂(FC) 값은 2에서 3사이였으며, interleukin 6, chemokine (C-C motif)

ligand 2, radical S-adenosyl methionine domain containing 2, chemokine (C-C motif) ligand 7, chemokine (C-X-C motif) ligand 10, chemokine (C-C motif) ligand 12, serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3G, interleukin 1 beta, guanylate binding protein 3, 및 guanylate binding protein 2 유전자는 $\log_2(FC)$ 값이 1 이상 2 이하였다.

또한 histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1, CD74 antigen, histocompatibility 2, class II antigen E beta 및 histocompatibility 2, class II antigen A, alpha 유전자의 발현량은 레이저 80 J/cm² 조사군에 비하여 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군에서 감소되었고, $\log_2(FC)$ 값은 -2 이상 -1 이하였다.

H. 레이저 80 J/cm² 조사군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직 사이토카인 사이토카인수용체 상호반응(cytokine-cytokine receptor interaction)관련 유전자 발현 비교

레이저 80 J/cm² 조사군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직 사이토카인 사이토카인수용체 상호반응(cytokine-cytokine receptor interaction)관련 유전자 발현량을 mRNA-sequencing 법으로 측정하여 비교한 결과 $\log_2(FC)$ 값이 1 이상이고 p 값과 q 값이 0.05 이하인 유전자는 Table 9와 같다. 레이저 80 J/cm² 조사군에 비하여 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직 사이토카인 사이토카인 수용체 상호반응 관련 유전자 chemokine (C-X-C motif) ligand 2와 interleukin 8 receptor, beta 유전자의 $\log_2(FC)$ 값은 4.71 과 4.02 이었고, chemokine (C-X-C motif) ligand 5, colony stimulating factor 1 receptor 및 chemokine (C-X-C motif) ligand 1 유전자의 $\log_2(FC)$ 값은 3.56, 2.94 및 2.31 이었으며, chemokine (C-C motif) ligand 12, interleukin 6, chemokine (C-C motif) ligand 2,

chemokine (C-C motif) ligand 7, colony stimulating factor 1 receptor 및 chemokine (C-X-C motif) ligand 10 유전자의 $\log_2(FC)$ 값은 1 이상 2 이하였다.

I. 레이저 80 J/cm² 조사군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직 사이토카인 활성(cytokine activity)관련 유전자 발현 비교

레이저 80 J/cm² 조사군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직 사이토카인 활성(cytokine activity)관련 유전자 발현량을 mRNA-sequencing 방법으로 측정하여 비교한 결과 $\log_2(FC)$ 값이 1 이상이고 p 값과 q 값이 0.05 이하인 유전자는 Table 10과 같다. 레이저 80 J/cm² 조사군에 비하여 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직 사이토카인 활성 관련 유전자 chemokine (C-X-C motif) ligand 2, chemokine (C-X-C motif) ligand 5 및 chemokine (C-X-C motif) ligand 1 유전자의 $\log_2(FC)$ 값은 4.71, 3.56 및 2.94 였고, chemokine (C-C motif) ligand 12, interleukin 6, chemokine (C-C motif) ligand 2 및 chemokine (C-C motif) ligand 7 유전자의 $\log_2(FC)$ 값은 1 이상 2 이하로 유전자 발현량이 증가하였다. 반면에 레이저 80 J/cm² 조사군에 비하여 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직 사이토카인 활성 관련 유전자 secreted phosphoprotein 1 유전자 $\log_2(FC)$ 값은 -1.29로 유전자 발현량이 감소되었다.

J. 레이저 80 J/cm² 조사군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직 케모카인 활성(chemokine activity)관련 유전자 발현 비교

레이저 80 J/cm² 조사군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직 케모카인 활성(chemokine activity)관련 유전자 발현량을 mRNA-sequencing 방법으로 측정하여 비교한 결과 $\log_2(FC)$ 값이 1 이상이고 p 값과 q 값이 0.05 이하인 유전자는 Table 11과 같다.

레이저 80 J/cm² 조사군에 비하여 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직 케모카인인 활성 관련 유전자 chemokine (C-X-C motif) ligand 2, chemokine (C-X-C motif) ligand 5 및 chemokine (C-X-C motif) ligand 1 유전자의 log₂(FC) 값은 4.71, 3.56 및 2.94 였고, chemokine (C-C motif) ligand 12, chemokine (C-C motif) ligand 2, chemokine (C-C motif) ligand 7 및 chemokine (C-X-C motif) ligand 10 유전자의 log₂(FC) 값은 1 이상 2 이하로 유전자 발현량이 증가하였다.

K. 레이저 80 J/cm² 조사군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직 케모카인 신호전달 경로(chemokine signaling pathway)관련 유전자 발현 비교

레이저 80 J/cm² 조사군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직 케모카인 신호전달경로(chemokine signaling pathway)관련 유전자 발현량을 mRNA-sequencing 법으로 측정하여 비교한 결과 log₂(FC) 값이 1 이상이고 *p* 값과 *q* 값이 0.05 이하인 유전자는 Table 12와 같다. 레이저 80 J/cm² 조사군에 비하여 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직 케모카인 신호전달 경로 관련 유전자 chemokine (C-X-C motif) ligand 2 와 interleukin 8 receptor, beta 유전자의 log₂(FC) 값은 4.71 과 4.02 였고, guanine nucleotide binding protein (G protein) gamma 8, chemokine (C-C motif) ligand 12, chemokine (C-C motif) ligand 2, chemokine (C-C motif) ligand 7 및 chemokine (C-X-C motif) ligand 10 유전자의 log₂(FC) 값은 1 이상 2 이하로 유전자 발현량이 증가하였다.

L. 레이저 80 J/cm² 조사군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직 염증반응(inflammatory response)관련 유전자 발현 비교

레이저 80 J/cm² 조사군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직 염증반응(inflammatory response)관련 유전자 발현량을 mRNA-sequencing 방법으로 측정하여 비교한 결과 log₂(FC) 값이 1 이상이고 *p* 값과 *q* 값이 0.05 이하인 유전자는 Table 13과 같다. 레이저 80 J/cm² 조사군에 비하여 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직 염증반응 관련 유전자 chemokine (C-X-C motif) ligand 2, chemokine (C-X-C motif) ligand 5 및 chemokine (C-X-C motif) ligand 1 유전자의 log₂(FC) 값은 4.71, 3.56 및 2.94 였고, chemokine (C-C motif) ligand 12, interleukin 6, chemokine (C-C motif) ligand 2, interleukin 1 beta, chemokine (C-C motif) ligand 7 및 chemokine (C-X-C motif) ligand 10 유전자의 log₂(FC) 값은 1 이상 2 이하로 유전자 발현량이 증가하였다. 그러나 레이저 80 J/cm² 조사군에 비하여 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직 염증반응 관련 유전자 fibronectin 1 유전자 log₂(FC) 값은 -1.05로 유전자 발현량이 감소되었다.

4. 고 찰

본 연구는 포토론을 이용한 광역동 치료에 시스플라틴의 병합투여 효과를 관찰하기 위하여 생쥐 대장암세포(CT26 cells)를 Nude 생쥐에 주사하여 암종이 유발된 tumor-bearing nude mouse model을 이용하여 시스플라틴과 photolon을 투여하고 반도체 레이저를 이용하여 파장 660nm 빛을 조사한 후 암종의 크기를 측정하고, 암 조직의 유전자 발현 변화를 조사하였다. 광역동 치료를 시행하지 않은 실험군에서 실험시작 0 일, 2 일, 4 일 및 8 일에 종양의 크기를 측정한 결과 대조군은 0 일에 비하여 2 일, 4 일 및 8 일에 종양의 크기가 21%, 65% 및 133%가 각각 증가되었고, 시스플라틴군은 0 일에 비하여 2 일, 4 일 및 8 일에 종양의 크기가 14%, 56% 및 131%가 각각 증가되어 대조군과 시스플라틴군에서 모두 시간 경과에 따라서 종양의 크기가 증가되었고, 대조군과 시스플라틴군 사이에 암종의 크기 증가율의 차이도 없어서 시스플라틴 3 mg/kg BW 투여로는 인한 암종의 성장 억제 효과는 없는 것으로 생각된다. CT26 세포는 1975년 Griswold 등이 Balb/C mouse 에서 N-nitroso-N-methylurethane 으로 유발시킨 대장암에서 수립한 암 세포주로서 항암제 개발을 위한 전임상 실험을 위한 tumor-bearing animal model 에 많이 이용되고 있는 암세포주다(44,45). 본 실험에서 KSN/S1c 종 마우스에 CT26 세포를 주사하여 생성된 암종이 실험 8 일까지 계속 성장하는 것을 보여주고 있어서 KSN/S1c 종 마우스는 CT26 암세포가 암종을 형성하고 성장하는 환경조건이 적절한 것으로 생각된다. 레이저 80 J/cm² 조사군의 종양크기는 0 일에 비하여 2 일, 4 일 및 8 일 경과 시에 27%, 47% 및 68%가 각각 증가되어, 대조군에 비하여 종양의 성장속도가 감소되어 포토론 주사 후 레이저 조사로 인하여 암종의 성장이 억제된 것으로 생각된다. 또한 레이저 140 J/cm² 조사군의 종양크기는 0 일에 비하여 2 일에는 33%가 증가하였으나, 4

일 과 8 일에는 1% 와 27%가 각각 감소되어 레이저 80 J/cm² 조사군에 비하여 종양의 크기가 현저히 감소하여 레이저 조사량이 증가되면 암종의 성장 억제효과가 더 증가하는 것으로 추측된다. 광역동 치료는 빛에너지를 이용하여 광과민 물질을 활성화시켜서 치료 효과가 나타나게 하는 치료법으로 암치료에 사용되는 광과민 물질은 1세대와 2세대가 있다. 1세대 광과민제로서 폴피린(porphyrin)계로써 포토젬(Photogem, Russia), 포토프린(Photofrin, Canada) 및 포토산(Photosan, Germany)이 상품화 되어 사용되었다(46-48). 그러나 이들 폴피린계 광과민 물질은 투여 후 1-2 일이 지나야 암조직 세포에서 최고농도에 도달하고 체내에 2-3주 동안이나 남아있으며, 파장 630 nm 빛에 의해서 활성화가 일어난다. 빛의 파장은 빛의 피부 침투력과 연관이 있는데, 파장이 증가되면 빛의 침투력도 증가되는 것으로 알려져 있다. 지속시간이 짧고 더 긴 파장의 빛에서 활성화가 일어나는 제 2세대 광과민 물질로서 chlorin 유도체가 개발되었다(16,17). 포토론은 지용성인 클로린(e6)에 polyvinylpyrrolidone 을 중합시켜 수용성으로 전환시킨 물질로서 정맥주사 후 1시간 정도 경과하면 암 세포에 축적이 일어나는 것으로 알려져 있기 때문에 본 실험에서는 포토론을 복강주사하고 2시간 경과 후 파장 660 nm 레이저를 조사하여 포토론이 암종에 침투하여 축적될 수 있는 충분한 시간이 경과 되도록 하였다. 본 실험결과 레이저 80 J/cm² 조사군의 종양크기는 0 일에 비하여 2 일, 4 일 및 8 일 경과 시에 27%, 47% 및 68%가 각각 증가되었고, 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 종양크기는 0 일에 비하여 2 일, 4 일 및 8 일 경과 시에 각각 19%, 9% 및 7%가 증가되어 시간이 경과 될수록 종양의 크기가 증가되나, 레이저 80 J/cm² 조사군에 비하여 종양의 크기가 감소되어 시스플라틴 주사로 종양의 크기가 유의하게 감소되는 것을 보여주고 있다. 시스플라틴을 nude mouse 에 복강주사하면 대부분의 조직에 15분 이내에 최고 농도에 도달하고, 30 분에서 4 시간 동안 지속되는 것으로 알려

저 있어서(49), 본 실험에서 시스플라틴 주사 후 레이저 조사까지 3시간이 경과되어 레이저 조사 시에 조직 시스플라틴 농도가 최고점에 있었을 것으로 생각된다. 시스플라틴의 생쥐 치사량(lethal dose)은 20 mg/kg 이상으로 알려져 있는데(49,50) 본 실험에서는 시스플라틴을 3 mg/kg 주사하여 일반적으로 사용하는 용량인 5 mg/kg 보다 더 낮은 농도로 사용하였다. 시스플라틴 단독 사용군에서 암종의 크기는 대조군과 차이를 나타내지 않았으나, 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 군에서 시스플라틴군이나 레이저 80 J/cm² 군에 비하여 암종의 크기가 유의하게 감소된 것은 시스플라틴과 활성화된 포토론의 상호작용에 의한 암종 성장억제 효과에 의한 결과로 생각된다. Ali 등(41)은 근육종세포주에 저용량 시스플라틴과 phthalocyanine 계 광민감제를 이용한 광역동 실험에서 항암작용이 증가되었다고 하였고, Ge 등(50)은 CT26 세포를 이용한 실험에서 시스플라틴과 광민감제로서 포토젠을 이용한 실험에서 항암력이 증가된다고 하였는데, 본 실험에서 tumor-bearing mouse model을 이용한 실험에서도 3 mg/kg 정도의 낮은 용량의 시스플라틴 투여로 포토론에 의한 광역동 치료 효과가 증가되어 저용량 시스플라틴이 포토론에 의한 광역동치료 효과를 증가시키는 것으로 생각된다. PDT 시행 1 일 후 생쥐를 희생시켜 종양조직을 절제하여 고정시킨 후 H&E 염색하여 광학현미경으로 관찰한 결과 PDT를 시행하지 않은 대조군과 시스플라틴 군의 암조직은 무질서하고, 모양이 불규칙하며, 세포핵이 진하고, 크기가 일정치 않은 세포들이 나타났으며, 세포괴사는 나타나지 않았다. 레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직은 암세포들 사이에, 세포핵이 사라진 형태의 세포가 몇 개 나타나고, 임파구로 추정되는 세포가 일부분에서 관찰되어, 세포괴사가 부분적으로 조금씩 일어나는 소견을 나타냈다. 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직을 관찰한 결과 세포핵이 사라진 세포가 현미경시야에서 전반적으로 관찰되어 암조직 전체적으로 괴사가 일어나고 있고, 임파구로 추정되는 세포가 매우 많이 관찰되어

염증반응이 증가된 것으로 추정된다. 세포가 사멸하는 과정은 세포고사 (apoptosis)와 세포괴사(necrosis)가 있는데, 세포고사는 세포자연사라고도 하며 세포가 정상적인 삶의 과정을 마친 뒤에 죽는 것이고, 세포괴사는 정상적인 삶의 과정을 끝마치지 못하고 물리적인 손상이나 산소공급 부족 또는 독성물질에 노출되어 죽는 것이다(51). 광역동 치료에서 광과민 물질이 세포에서 용해소체(lysosome)나 미토콘드리아 내에 축적되는데, 이때 레이저 조사(irradiation)가 이루어지면 용해소체 가수분해효소(lysosomal hydrolase)가 세포질(cytoplasm)로 흘러나와서 세포괴사가 일어나게 된다(52). 또한 광역동 치료를 시행하면 혈관 내피세포(endothelial cell)가 손상되고 혈관이 수축되며, 혈전이 형성되어 혈관의 폐쇄가 일어나 이차적으로 종양 괴사가 유도될 수도 있다(53,54). 본 실험에서 레이저 80 J/cm² 조사군 보다 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직에서 세포괴사가 증가된 것으로 나타나서 포토론 사용에 의한 광역동 치료에 시스플라틴이 암세포의 괴사를 증가시키는 작용이 있는 것으로 추정된다. 포토론이 파장 660 nm 레이저에 의해서 광감작반응이 일어나면 반응성 산소종 (ROS: reactive oxygen species)이 발생하여 이에 의해서 반응이 일어나는데, ROS 중에서 세포에 반응성이 가장 강한 것은 hydroxy radicals(OH[·])이다(13,55). Hydroxy radicals는 superoxide로부터 금속이온(Cu⁺⁺ or Fe⁺⁺)의 촉매로 생성될 수 있는데(56), 시스플라틴이 ROS 생성을 증가시킬 수 있는 것으로 알려져 있어서(57), 시스플라틴을 병합투여하면 ROS에 의한 독성이 더 증가 될 수 있을 것으로 추측된다. ROS는 단백질, 지질 및 핵산과 반응하여 이들의 생리기능을 억제하기 때문에 광역동 치료에 시스플라틴을 병합하면 치료효과가 증가되는 것은 ROS에 의한 요인도 작용될 것으로 추측된다. PDT가 종양의 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 PDT 시행 1 일 후 생쥐를 희생시켜 종양조직을 절제해서 RNA를 분리하여 mRNA-sequencing 법으로 유전자 발현량을 측정하

여, 대조군, 레이저 80 J/cm² 조사군 및 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군을 서로 비교한 결과 대조군과 레이저 80 J/cm² 조사군을 비교하여 log₂(FC) 값이 1 이상이고 p 값과 q 값이 모두 0.05 이하인 유전자 세트는 아미노산 막이동 활성(Amino acid transmembrane transporter activity) 관련 유전자 5 개였다. 또한 대조군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 유전자 발현량의 차이를 비교하여 log₂(FC) 값이 1 이상이고 p 값과 q 값이 모두 0.05 이하인 유전자 세트는 면역반응(Immune response) 관련 유전자 17 개, 후천성 면역(Adaptive immune response) 관련 유전자 8개, 창상반응(response to wounding) 관련 유전자 13 개, 항체매개 면역반응(Immunoglobulin mediated immune response) 관련 유전자 5 개, Antigen processing and presentation 관련 유전자 5 개 및 B 세포매개 면역(B cell mediated immunity) 관련 유전자 7개였다. 이러한 실험결과로서 포토론을 이용한 광역동 치료 후 1 일에 암조직에서 면역반응 관련 유전자의 발현은 큰 차이가 없는 것으로 생각된다. 그러나 시스플라틴을 투여하고 난 후 포토론을 이용하여 광역동 치료를 시행하면 시행 1 일 후에 암조직에 면역반응 관련 유전자의 발현이 증가되는 것으로 나타나서 저용량 시스플라틴이 광역동 치료에 의한 면역반응을 증가시킬 수 있을 것으로 추측된다. 시스플라틴은 면역세포에 독성을 나타내는 것으로 알려져 있는데, 본 실험에서는 저용량의 시스플라틴을 사용하여 면역세포에 대한 억제작용은 거의 없는 것으로 추측된다. 80 J/cm² 조사군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 종양조직 유전자 발현량의 차이를 비교하여 log₂(FC) 값이 1 이상이고 p 값과 q 값이 0.05 이하인 유전자는 화학주성(chemotaxis) 관련 유전자 12 개, 면역반응(Immune response) 관련 유전자 18 개, 사이토카인-사이토카인 수용체 상호작용(cytokine-cytokine receptor interaction) 관련 유전자 13 개, 케모카인(chemokine) 관련 유전자 7개, 케모카인 수용체 결합(chemokine receptor binding) 관련 유전자 7개 및 사이토

카인 활성(cytokine activity) 관련 유전자 10개 등 면역반응 관련 유전자의 발현 차이가 큰 것으로 나타났다. 광역동치료에 의해서 암세포에 대한 면역반응이 증가된다는 보고가 있다(58). 광역동 치료에 의해서 암세포에 대한 세포면역을 나타내는 세포독성 티세포(CD8⁺ T cells)가 증가하고, 자연살해세포(NK cells)가 증가되어 항암작용이 나타난다는 보고도 있다(59). 본 실험에서 레이저 80 J/cm² 조사군과 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군의 암조직 유전자 발현량을 비교하여 log₂(FC) 값이 1 이상이고 *p* 값과 *q* 값이 0.05 이하인 면역반응(immune response)관련 유전자는 chemokine (C-X-C motif) ligand 2, chemokine (C-X-C motif) ligand 1, chemokine (C-X-C motif) ligand 5, growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma, interleukin 6, chemokine (C-C motif) ligand 2, radical S-adenosyl methionine domain containing 2, chemokine (C-C motif) ligand 7, chemokine (C-X-C motif) ligand 10, chemokine (C-C motif) ligand 12, serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3G, interleukin 1 beta, guanylate binding protein 3, 및 guanylate binding protein 2 유전자였다. Chemokine (C-X-C motif) ligand 1은 대식구(macrophage)와 호중구(neutrophil)에서 발현되는 chemokine으로 호중구에 대한 화학주성을 나타내고(60), chemokine (C-X-C motif) ligand 2 는 단핵구(monocyte)와 대식구에서 분비되며 다형핵구(polymorphonuclear leukocyte)에 대한 강력한 화학주성을 나타내며(61,62), chemokine (C-X-C motif) ligand 5 는 급성 염증반응이 일어나면 내피세포(endothelial cell)나 호중구에서 분비되어 호중구를 활성화(activation)시키는 역할을 하며(63), chemokine (C-X-C motif) ligand 10 는 단핵구나 내피세포에서 분비되어 단핵구, 대식세포, T cell, NK cell에 대한 강력한 화학주성을 나타내며(64,65), chemokine (C-X-C motif) ligand 12 는 여러 조직에서 합성되며 임파구에 대한 강력한 화학주성을 나타내는

것으로 알려져 있다(66). Interleukin 6 는 활성화된 대식구(activated macrophages)에서 분비되어 염증반응을 유발하는 역할을 하며 T cells 과 대식구에 작용하여 면역반응을 증가시키는 작용을 한다(67). chemokine (C-C motif) ligand 7 는 대식세포에서 분비되며 단핵구에 대한 화학주성을 나타내며(68), chemokine (C-C motif) ligand 12 는 대식세포에서 분비되며 단핵구, 호산구, 임파구에 대한 화학주성을 나타낸다(69). 따라서 시스플라틴을 투여하고 레이저 80 J/cm² 를 조사하면 단핵구, 호산구, 임파구 등 면역세포들이 모여들고 이들의 활성화가 일어나서 면역반응이 증가될 것으로 생각된다. Sun 등(70)은 생쥐 SCCVII tumor 를 이용한 광역동 치료에서 호중구가 증가되어 면역반응을 증가 시킨다고 하였는데, 본 실험에서는 암조직에서 호중구뿐만 아니라 단핵구, 대식세포, T cell, NK cell에 대한 화학주성을 나타내는 chemokine과 cytokine 이 증가되어 암세포에 대한 면역반응이 증가될 것으로 추측된다. 또한 histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1, CD74 antigen, histocompatibility 2, class II antigen E beta 및 histocompatibility 2, class II antigen A, alpha 유전자의 발현량은 레이저 80 J/cm² 조사군에 비하여 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군에서 감소되었고, log₂(FC) 값은 -2 이상 -1 이하였다. 면역반응에서 MHC class II antigen 은 antigen presenting cell 에서 합성되어 antigen의 processing 에 관여하는데(71), 본 실험에서 histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1, CD74 antigen, histocompatibility 2, class II antigen E beta 및 histocompatibility 2, class II antigen A, alpha 등이 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군에서 감소되어 시스플라틴을 투여하고 레이저 80 J/cm² 를 조사하면 식세포들의 antigen processing 과정이 억제 될 것으로 생각된다. 이상의 실험으로 CT26 tumor bearing nude mouse model에서 포토론을 이용한

광역동 치료에 저용량 시스플라틴을 병용하면 암세포의 괴사가 증가되고, 암 조직에 면역반응이 증가되는 것으로 나타나서 시스플라틴과 광역동 치료를 병행하면 암치료에 상승효과가 있을 것으로 추측되며, 이에 대한 지속적인 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

요 약

광역동치료(photodynamic therapy; PDT)는 암조직이나 암세포에 선택적으로 빛을 조사하여 치료하는 비침윤성 암치료 방법이다. PDT는 빛을 조사할 수 있는 암의 치료에 이용할 수 있는데, 빛의 투과에 한계와 광민감제의 항암효과 제한으로 암치료 효과를 증강시킬 수 있는 방법의 개발이 절실하다. 본 연구는 PDT와 저용량 시스플라틴을 병합하여 저용량 시스플라틴이 PDT에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시하였다. 실험군은 레이저를 조사하지 않은 대조군과 시스플라틴군(3 mg/kg BW), 레이저 80 J/cm² 조사군, 시스플라틴+레이저 80 J/cm² 조사군 및 레이저 140 J/cm² 조사군으로 나누었다. 배양 대장암세포(CT26 cells)를 Nude 생쥐에 주사하여 암종을 유발하여 CT26 tumor-bearing mouse model을 만들어 시스플라틴(3 mg/kg BW)을 투여하고 photolon(2.5 mg/kg BW)을 이용한 광역동치료를 실시한 후 암종의 크기를 측정하여 비교하고, 광역동치료 1일 후 암조직에서 RNA를 분리하여 mRNA sequencing을 실시하여 유전자 발현의 변화를 측정하였다. Tumor volume을 관찰한 결과 대조군은 PDT 시행일에 비하여 8 일째에 133%가 증가되었고, 시스플라틴 투여군은 118%가 증가되었다. 80 J/cm² 군은 PDT 직전에 비하여 PDT 8 일 후 68%가 증가되었고, Cis+80 J/cm² 군은 PDT 직전에 비하여 PDT 8 일 후 7%가 증가되었다. 140 J/cm² 군은 PDT 직전에 비하여 PDT 8 일 후 27%가 감소되었다. PDT 1일 후 암조직을 절제하여 10% paraformaldehyde에 고정시킨 후 HE 염색하여 관찰한 결과 대조군과 시스플라틴 투여군은 괴사세포가 관찰되지 않았고, 80 J/cm² 군은 암조직에 부분적으로 세포괴사가 관찰되었으며, Cis+80 J/cm² 군은 암조직에서 광범위하게 괴사세포가 관찰되었다. PDT 1 일 후 암조직을 절제하여 mRNA-seq 분석결과 대조군과 80 J/cm² 군을 비교한 결과 면역반응관련 유전자의 발현차이가 없었다. 80 J/cm² 군과 Cis+80 J/cm² 군을 비교한 결과 Cis+80 J/cm² 군에서 면역반응에 관여하는

유전자의 발현이 증가되었다. PDT 1 일 후 암조직을 절제하여 mRNA-seq 분석 결과 80 J/cm² 군 과 Cis+80 J/cm² 군을 비교한 결과 면역반응에 관여하는 유전자중 Chemotaxis 관련 12 유전자의 발현차이가 있었고, Immun response 관련 18 유전자의 발현차이가 있었다. Chemokine activity 관련 7 유전자의 발현차이가 있었고, Cytokine activity 관련 10 유전자의 발현차이가 있었으며, Inflammatory response 관련 10 유전자의 발현차이가 있었다. Chemokine signaling pathway 관련 9 유전자의 발현차이가 있었다. CT26 tumor-bearing nude mouse 를 이용하여 시스플라틴과 포토론을 이용한 PDT를 시행한 결과 tumor volume이 현저히 감소되었고, 암조직에서 면역반응관련 유전자의 발현이 증가되어 저용량 시스플라틴 과 PDT 병합요법은 암치료 효과를 증강시킬 수 있는 효과적인 치료법이 될 가능성이 있는 것으로 추측된다.

참 고 문 헌

1. Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2003; 3:380-387.
2. Wang SS, Chen J, Keltner L, Christophersen J, Zheng F, Krouse M, Singhal A. New technology for deep light distribution in tissue for phototherapy. *Cancer J*. 2002; 8:154-163.
3. Silva JN, Filipe P, Morliere P, Maziere JC, Freitas JP, JL Cirne de Castro, Santus R. Photodynamic therapies: principles and present medical applications. *Biomed Mater Eng*. 2006; 16:S147-S154.
4. Dougherty TJ. An update on photodynamic therapy applications. *J Clin Laser Med Surg*. 2002; 20:3-7
5. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin*. 2011; 4:250-281.
6. Huang L, Xuan Y, Koide Y, Zhiyentayev T, Tanaka M, Hamblin MR. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria. *Lasers Surg Med*. 2012; 44:490-499.
7. Kochevar IE, Redmond RW. Photosensitized production of singlet oxygen. *Methods Enzymol*. 2000; 319:20-28.
8. Price M, Reiners JJ, Santiago AM, Kessel D. Monitoring singlet oxygen and hydroxyl radical formation with fluorescent probes during photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 2009; 85:1177-1181.
9. Dougherty TJ, Henderson BW, Schwartz S, Winkelman JW, Lipson RL. Historical perspective, In: Henderson BW, Dougherty TJ, editors. *Photodynamic Therapy: Basic Principles and Clinical Applications*. New York. Dekker M. 1992; 1-15.

10. Pandey RK, Zheng G. Porphyrins as photosensitizers in photodynamic therapy. In: Kadish KM, Smith KM, Guillard R, editors. *The Porphyrin Handbook*. Boston. Academic Press. 2000; 157-230.
11. Sobolev AS, Jans DA, Rosenkranz AA. Targeted intracellular delivery of photosensitizers. *Prog Biophys Mol Biol*. 2000; 73:51-90.
12. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part three: photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2005; 2:91-106.
13. Chekulayeva LV1, Shevchuk IN, Chekulayev VA, Ilmarinen K. Hydrogen peroxide, superoxide, and hydroxyl radicals are involved in the phototoxic action of hematoporphyrin derivative against tumor cells. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2006; 25:51-77.
14. O' Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol*. 2009; 85:1053-1074.
15. Kostenich GA, Zhuravkin IN, Zhavrid EA. Experimental grounds for using chlorin e6 in the photodynamic therapy of malignant tumors. *J Photochem Photobiol B*. 1994; 22:211-217.
16. Chin WW, Lau WK, Heng PW, Bhuvaneshwari R, Olivo M. Fluorescence imaging and phototoxicity effects of new formulation of chlorin e6-polyvinylpyrrolidone. *J Photochem Photobiol B*. 2006; 84:103-110.
17. Petrov PT, Trukhacheva T, Isakov GA, Turyn MCV, Kravchenko E. Photolon™ an agent for photodynamic diagnosis and therapy: non-clinical and clinical experience. *Acta Biooptic Inform Med*. 2004; 10:6-7.

- 18.Zhang W, Yao J, Zhao YS. Organic Micro/Nanoscale Lasers. *Acc Chem Res.* 2016; 49:1691-1700.
- 19.Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg.* 2005; 31:334-340.
- 20.Lim HS. Development and optimization of a diode laser for photodynamic therapy. *Laser Ther.* 2011; 20:195-203.
- 21.Brancaleon L, Moseley H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2002; 17:173-186.
- 22.Beyer W. Systems for light application and dosimetry in photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 1996; 36:153-156.
- 23.Wilson BC, Patterson MS. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol.* 2008; 53:R61-69.
- 24.Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7:573-584.
- 25.Crul M, van Waardenburg RCA, Beijnen JH, Schellens JHM. DNA-based drug interactions of cisplatin. *Cancer Treat Rev.* 2002; 28:291-303.
- 26.Rosenberg B, Van Camp L, Grimley EB, Thomson AJ. The inhibition of growth or cell division in Escherichia coli by different ionic species of platinum(IV) complexes. *J Biol Chem.* 1967; 242:1347-1352.
- 27.Hill JM, Speer RJ. Organo-platinum complexes as antitumor agents (review). *Anticancer Res.* 1982; 2:173-186.
- 28.Peddi P, Shi R, Nair B, Ampil F, Mills GM, Jafri SH. Cisplatin, cetuximab, and radiation in locally advanced head and neck squamous cell cancer: a retrospective review. *Clin Med Insights Oncol.* 2015; 9:1-7.

29. de Biasi AR, Villena-Vargas J, Adusumilli PS. Cisplatin-induced antitumor immunomodulation: a review of preclinical and clinical evidence. *Clin Cancer Res*. 2014; 20:5384-5391.
30. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014; 740:364-378.
31. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, Castedo M, Kroemer G. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*. 2012; 31:1869-1883.
32. Hartmann JT, Lipp HP. Toxicity of platinum compounds. *Expert Opin Pharmacother*. 2003; 4:889-901.
33. Ruggiero A, Trombatore G, Triarico S, Arena R, Ferrara P, Scalzone M, Pierri F, Riccardi R. Platinum compounds in children with cancer: toxicity and clinical management. *Anticancer Drugs*. 2013; 24:1007-1019.
34. Dowdy SC, Boardman CH, Wilson TO, Podratz KC, Hartmann LC, Long HJ. Multimodal therapy including neoadjuvant methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin (MVAC) for stage IIB to IV cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol*. 2002; 186:1167-1173.
35. Kelland LR. New platinum antitumor complexes. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1993; 15:191-219.
36. Ho GY, Woodward N, Coward JI. Cisplatin versus carboplatin: comparative review of therapeutic management in solid malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016; 102:37-46.
37. Stathopoulos GP. Cisplatin: process and future. *J BUON*. 2013; 18:564-569.

38. Tang HR, Ma HF, An SM, Badakhshi H, Deng JY, Zhang JH, Chen Y, Zhang Z, Guo XM, Jiang GL, Zhao KL. A phase II study of concurrent chemoradiotherapy with paclitaxel and cisplatin for inoperable esophageal squamous cell carcinoma. *Am J Clin Oncol*. 2016; 39:350–354.
39. Kang GH, Kim GS, Lee HR, Yuh YJ, Kim SR. A phase II trial of paclitaxel, 5-fluorouracil (5-FU) and cisplatin in patients with metastatic or recurrent gastric cancer. *Cancer Res Treat*. 2008; 40:106–110.
40. Lee KJ, Yi SW, Cha J, Seong J, Bang S, Song SY, Kim HM, Park SW. A pilot study of concurrent chemoradiotherapy with gemcitabine and cisplatin in patients with locally advanced biliary tract cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016; 78:841–846.
41. Ali S, Khurshid A, Maqsood M, Rafi M, Khan JA, Zaidi SSZ, Mohammad A, Ikram M. Study of low doses cisplatin synergistic effect on photodynamic outcome of aluminum phythalocyanine on soft tissue sarcoma (RD) cell line. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2015; 12:146–149.
42. Wei XQ, Ma HQ, Liu AH, Zhang YZ. Synergistic anticancer activity of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in combination with low-dose cisplatin on Hela cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013; 14:3023–3028.
43. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*. 2008; 4:44–57.

44. Griswold DP, Corbett TH. A colon tumor model for anticancer agent evaluation. *Cancer*. 1975; 36:2441-2444.
45. Castle JC, Loewer M, Boegel S, de Graaf J, Bender C, Tadmor AD, Boisguerin V, Bukur T, Sorn P, Paret C, Diken M, Kreiter S, Türeci Ö, Sahin U. Immunomic, genomic and transcriptomic characterization of CT26 colorectal carcinoma. *BMC Genomics*. 2014; 15:1471-2164.
46. Melo CA, Kurachi C, Grecco C, Sibata CH, Castro-e-Silva O, Bagnato VS. Pharmacokinetics of Photogem using fluorescence monitoring in Wistar rats. *J Photochem Photobiol B*. 2004; 73:183-188.
47. Korbelik M, Krosi G. Photofrin accumulation in malignant and host cell populations of various tumours. *Br J Cancer*. 1996; 73:506-513.
48. Radakovic-Fijan S, Rappersberger K, Tanew A, Hönigsmann H, Ortel B. Ultrastructural changes in PAM cells after photodynamic treatment with delta-aminolevulinic acid-induced porphyrins or photosan. *J Invest Dermatol*. 1999; 112:264-270.
49. Johnsson A, Olsson C, Nygren O, Nilsson M, Seiving B, Cavallin-Stahl E. Pharmacokinetics and tissue distribution of cisplatin in nude mice: platinum levels and cisplatin-DNA adducts. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1995; 37:23-31.
50. Ge R, Ahn JC, Shin JI, Bahk CW, He P, Chung PS. An in vitro and in vivo study of combination therapy with Photogem®-mediated photodynamic therapy and cisplatin on mouse cancer cells (CT-26). *Photomed Laser Surg*. 2011; 29:155-160.
51. Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1776:86-107.

52. Berg K, Moan J. Lysosomes as photochemical targets. *Int J Cancer*. 1994; 59:814-22.
53. Chen B, Pogue BW, Luna JM, Hardman RL, Hoopes PJ, Hasan T. Tumor vascular permeabilization by vascular-targeting photosensitization: effects, mechanism, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res*. 2006; 12:917-923.
54. Fingar VH, Wieman TJ, Wiehle SA, Cerrito PB. The role of microvascular damage in photodynamic therapy: the effect of treatment on vessel constriction, permeability, and leukocyte adhesion. *Cancer Res*. 1992; 52:4914-4921.
55. Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, Choi AM. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9:49-89.
56. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006; 160:1-40.
57. Brozovic A, Ambriovic-Ristov A, Osmak M. The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Crit Rev Toxicol*. 2010; 40:347-359.
58. Gollnick SO, Brackett cm. Enhancement of anti-tumor immunity by photodynamic therapy. *Immunol Res*. 2010; 46:216-226.
59. Kabingu E, Vaughan L, Owczarczak B, Ramsey KD, Gollnick SO. CD8+ T cell-mediated control of distant tumours following local photodynamic therapy is independent of CD4+ T cells and dependent on natural killer cells. *Br J Cancer*. 2007; 96:1839-1848.

60. Becker S, Quay J, Koren HS, Haskill JS. Constitutive and stimulated MCP-1, GRO alpha, beta, and gamma expression in human airway epithelium and bronchoalveolar macrophages. *Am J Physiol.* 1994; 266:L278-286.
61. Wolpe SD, Sherry B, Juers D, Davatelis G, Yurt RW, Cerami A. Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. *Proc Natl Acad Sci.* 1989; 86:612-616.
62. Devalaraja RM, Nanney LB, Du J, Qian Q, Yu Y, Devalaraja MN, Richmond A. Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. *J Invest Dermatol.* 2000; 115:234-244.
63. Persson T, Monsef N, Andersson P, Bjartell A, Malm J, Calafat J, Egesten A. Expression of the neutrophil-activating CXC chemokine ENA-78/CXCL5 by human eosinophils. *Clin Exp Allergy.* 2003; 33:531-537.
64. Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV. Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature.* 1985; 315:672-676.
65. Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol* 2002; 168:3195-3204.
66. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med.* 1996; 184:1101-1109.

67. Anestakis D, Petanidis S, Kalyvas S, Nday cm, Tsave O, Kioseoglou E, Salifoglou A. Mechanisms and applications of interleukins in cancer immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 2015; 16:1691–1710.
68. Opdenakker G, Froyen G, Fiten P, Proost P, Van Damme J. Human monocyte chemotactic protein-3 (MCP-3): molecular cloning of the cDNA and comparison with other chemokines. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 191: 535–542.
69. Jia G, Gonzalo J, Lloyd C, Kremer L, Lu L, Martinez-A C, Wershil B, Gutierrez-Ramos J. Distinct expression and function of the novel mouse chemokine monocyte chemotactic protein-5 in lung allergic inflammation. *J Exp Med.* 1996; 184:1939–1951.
70. Sun J, Cecic I, Parkins CS, Korbelyik M. Neutrophils as inflammatory and immune effectors in photodynamic therapy-treated mouse SCCVII tumours. *Photochem Photobiol Sci.* 2002; 1:690–695.
71. Cresswell P. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol.* 1994; 12:259–293.

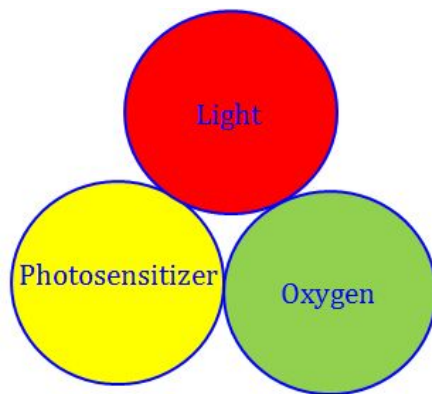


Fig. 1. Three elements of photodynamic therapy

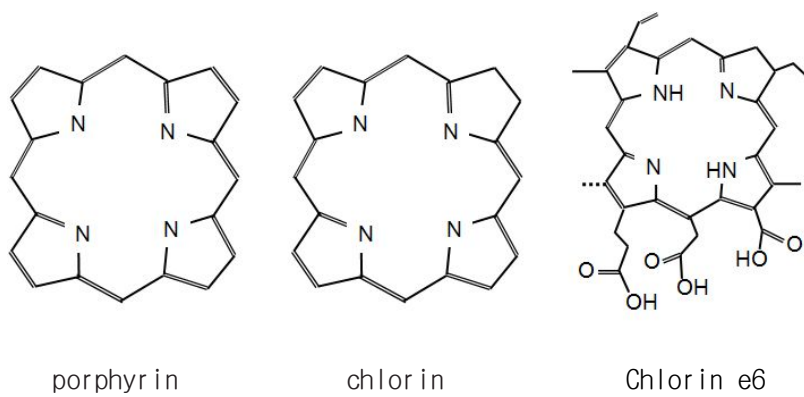


Fig. 2. Structure of photosensitizers

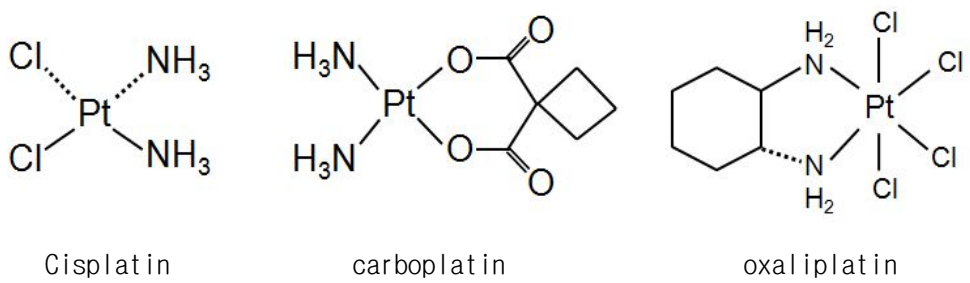


Fig. 3. Platinum compounds



Fig. 4. Laser irradiation with a 660 nm red light



Fig. 5. Photography of tumor-bearing nude mice after photodynamic therapy with 80 J/cm^2 .

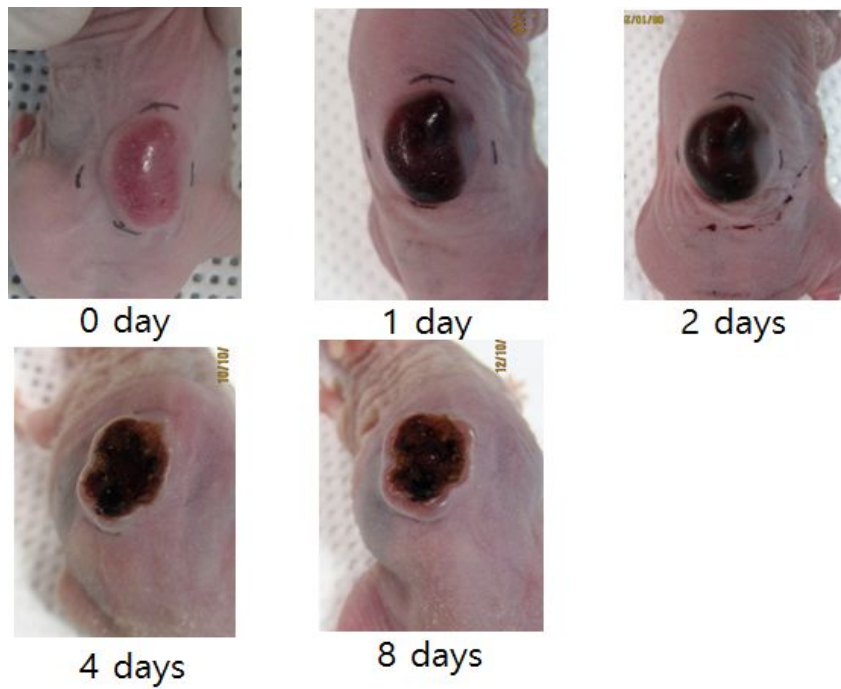


Fig. 6. Photography of tumor-bearing nude mice after photodynamic therapy(80 J/cm^2) combined with cisplatin.



Fig. 7. Photography of tumor-bearing nude mice after photodynamic therapy with 140 J/cm^2 .

Table 1. Effects of PDT on growth of tumor in mouse

Groups	Tumor volume(mm ³)			
	0 day	2 days	4 days	8 days
Control	421± 112	512± 21	696± 139	983± 128
Cisplatin	429± 124	493± 131	672± 133	995± 142
80 J/cm ²	389± 80	497± 101	572± 113	657± 107
Cis+80 J/cm ²	412± 98	491± 93	452± 101	443± 117
140 J/cm ²	418± 103	558± 110	412± 107	304± 82

CT26 tumor-bearing mice were irradiated with laser light at 2 hours after intra-peritoneal injection of photolon (2.5 mg/kg) and at 3 hours after intra-peritoneal injection of cisplatin (3 mg/kg). Tumors size was measured by digital caliper and tumor volume calculated using the following formula ;

$$\text{Tumor volume(mm}^3\text{)} = [(\text{width})^2 \times \text{length}]/2.$$

Values are mean± SD, n=5.

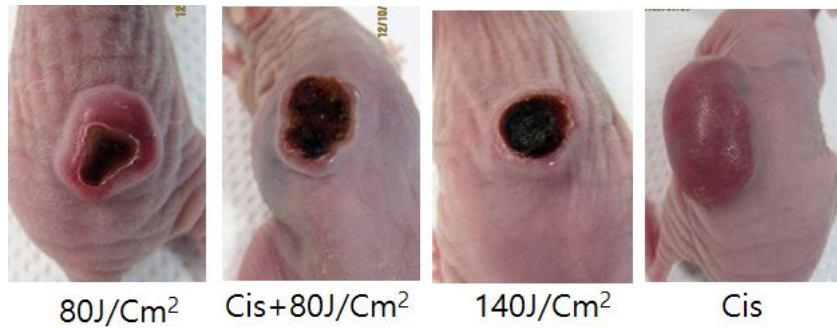


Fig. 8. Photography of tumor-bearing nude mice 8 days after photodynamic therapy.

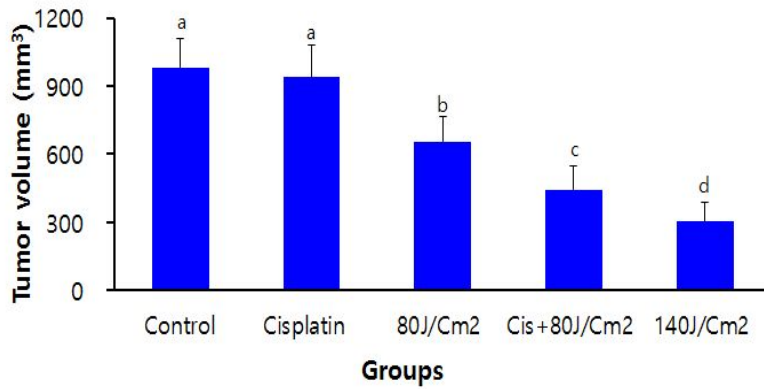


Fig. 9. Tumor volume of tumor-bearing mice 8 days after PDT. Values are mean \pm SD (n=5). Values with different superscripts are significantly different at the $p < 0.01$ by Duncan's multiple range test.

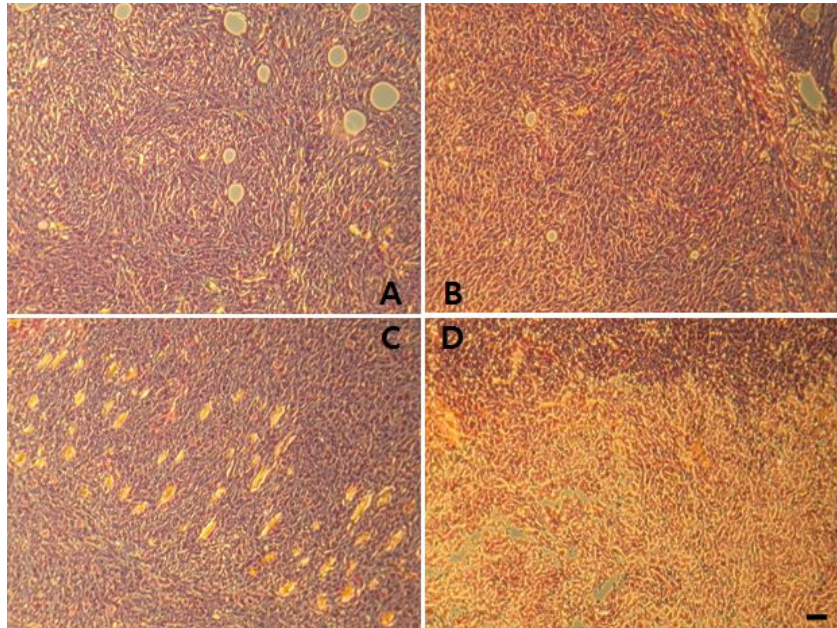


Fig. 10. Histologic findings of tumor tissues from mice with PDT.

A. Fourteen days after inoculation, the tumor tissue was dense with mitotic figures, and no infiltration of immune cells was observed. Hematoxylin eosin (HE) stain, original magnification $\times 100$. (bar 20 μm). B. 1 day after cisplatin injection, the tumor tissue was dense with mitotic figures, and necrotic area was not observed. C. 1 day after PDT, necrotic area was observed in tumor tissue. D. 1 day after Cis+PDT treatment, a large area of necrosis(N) was in visible, and infiltrating immune cells were present.

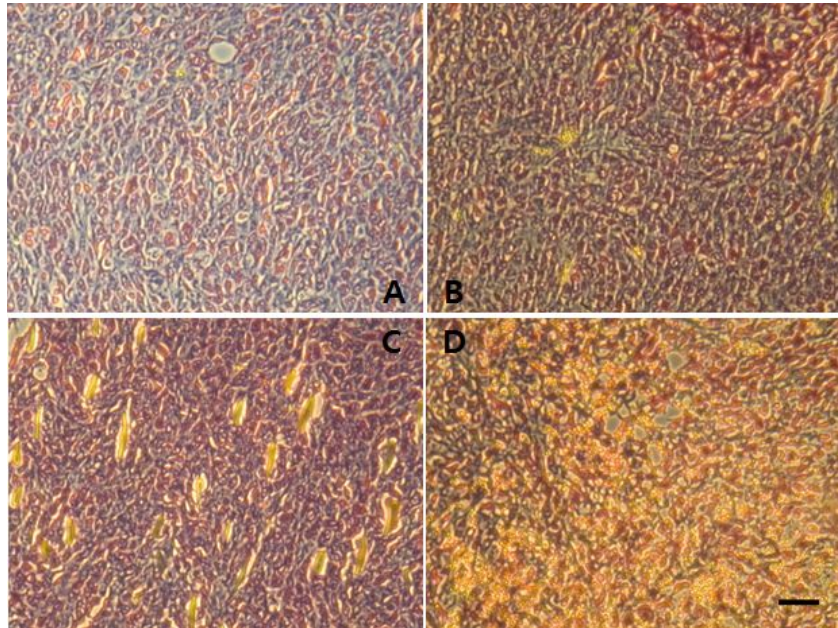


Fig. 11. Histologic findings of tumor tissues of tumor bearing mouse. A. Fourteen days after inoculation, the tumor tissue was dense with mitotic figures, and no infiltration of immune cells was observed. Hematoxylin eosin (HE) stain, original magnification $\times 200$. (bar 20 μm). B. 1 day after cisplatin injection, the tumor tissue was dense with mitotic figures, and necrotic area was not observed. C. 1 day after PDT, necrotic area was observed in tumor tissue. D. 1 day after Cis+PDT treatment, a large area of necrosis (N) was in visible, and infiltrating immune cells were present.

Table 2. Gene set analysis from the DEGs selected by $\log_2(\text{FC}) \geq 1$ & $P\text{-value} \leq 0.05$ & $q\text{-value} \leq 0.05$ in the comparison unit of control vs 80 j/cm²

Term	Count	P-value	Fold Enrichment	Bonferroni	FDR
Amino acid transmembrane transporter activity	5	2.576E-05	28.272	4.422.E-03	3.149.E-02
Amine transmembrane transporter activity	5	6.448E-05	22.438	1.103.E-02	7.879.E-02
Negative regulation of secretion	4	9.391E-05	43.762	5.524.E-02	1.388.E-01
Response to wounding	8	1.312E-04	6.810	7.630.E-02	1.938.E-01
Carboxylic acid transport	5	3.141E-04	14.919	1.731.E-01	4.635.E-01
Organic acid transport	5	3.264E-04	14.770	1.792.E-01	4.816.E-01
Regulation of cell proliferation	9	3.386E-04	4.941	1.853.E-01	4.995.E-01
Regulation of phosphorylation	7	3.630E-04	7.130	1.972.E-01	5.353.E-01

DEGs : differentially expressed genes

Fold Enrichment : The ratio of the two proportions.

Bonferroni, FDR (False Discovery Rate) are different 'standard' statistics for multiple comparison corrections.

Table 3. Gene set analysis from the DEGs selected by $\log_2(\text{FC}) \geq 1$ & $P\text{-value} \leq 0.05$ & $q\text{-value} \leq 0.05$ in the comparison unit of control vs Cis+80 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$

Term	Count	P-value	Fold Enrichment	Bonferroni	FDR
Immune response	17	9.723E-09	6.130	8.576.E-06	1.512.E-05
Adaptive immune response	8	5.418E-07	16.176	4.778.E-04	8.423.E-04
Response to wounding	13	7.004E-07	6.363	6.176.E-04	1.089.E-03
Immunoglobulin mediated immune response	7	1.663E-06	18.872	1.465.E-03	2.585.E-03
Antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class II	5	1.826E-06	53.078	1.610.E-03	2.840.E-03
B cell mediated immunity	7	2.003E-06	18.292	1.765.E-03	3.114.E-03

Table 4. Gene set analysis from the DEGs selected by $\log_2(\text{FC}) \geq 1$ & $P\text{-value} \leq 0.05$ & $q\text{-value} \leq 0.05$ in the comparison unit of 80 j/cm^2 vs Cis+80 j/cm^2

Term	Count	P-value	Fold Enrichment	Bonferroni	FDR
Chemotaxis	12	4.609E-11	18.023	4.291.E-08	7.215.E-08
Immune response	18	2.289E-09	6.256	2.131.E-06	3.584.E-06
Cytokine-cytokine receptor interaction	13	7.034E-08	7.279	3.658.E-06	6.834.E-05
Chemokine activity	7	5.818E-08	32.637	1.030.E-05	7.146.E-05
Chemokine receptor binding	7	6.845E-08	31.800	1.212.E-05	8.408.E-05
Cytokine activity	10	6.519E-07	9.843	1.154.E-04	8.008.E-04

Table 5. Functional categories of differential expressed genes in tumor tissues from 80 J/cm² vs Cis+80 J/cm² mice

Term	Genes	Fold Enrichment	p_value
Chemotaxis	CCL12, CCL2, CXCL5, S100A8, CXCL2, S100A9, IL1B, CSF3R, CXCR1, CXCR2, CCL7, CXCL10	18.023	4.609E-11
Immune response	CXCL1, IL6, CCL2, CXCL5, CXCL2, RSAD2, H2-AB1, CCL7, CD74, CXCL10, CCL12, SERPINA3G, H2-EB1, GADD45G, IL1B, H2-AA, GBP3, GBP2	6.256	2.289E-09
Cytokine-cytokine receptor interaction	CXCL1, CCL12, IL6, CCL2, CXCL5, CXCL2, IL1B, CSF3R, CXCR1, CXCR2, CCL7, CSF1R, CXCL10	7.278	7.034E-08
Chemokine activity	CXCL1, CCL12, CCL2, CXCL5, CXCL2, CCL7, CXCL10	32.637	5.818E-08
Cytokine activity	CXCL1, CCL12, IL6, CCL2, CXCL5, CXCL2, IL1B, CCL7, CXCL10, SPP1	9.842	6.519E-07
Inflammatory response	CXCL1, CCL12, IL6, CCL2, CXCL5, CXCL2, IL1B, CCL7, FN1, CXCL10	7.276	8.19E-06

Cxcl1 : chemokine (C-X-C motif) ligand 1, Il6 : interleukin 6, Ccl2 : chemokine (C-C motif) ligand 2, Cxcl5 : chemokine (C-X-C motif) ligand 5, Cxcl2 : chemokine (C-X-C motif) ligand 2, Rsad2 : radical S-adenosyl methionine domain containing 2, H2-Ab1 : histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1, Ccl7 : chemokine (C-C motif) ligand 7, Cd74 : CD74 antigen, Cxcl10 : chemokine (C-X-C motif) ligand 10, Ccl12 : chemokine (C-C motif) ligand 12, Serpina3g : serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3G, H2-Eb1 : histocompatibility 2, class II antigen E beta, Gadd45g : growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma, Il1b : interleukin 1 beta, H2-Aa : histocompatibility 2, class II antigen A, alpha, Gbp3 : guanylate binding protein 3, Gbp2 : guanylate binding protein 2.

Table 6. Select tumor tissue transcripts in 80 J/cm² vs Cis+80 J/cm² mice related to chemotaxis

Gene	80 J/cm ²	Cis+80 J/cm ²	log2(FC)	p_value	q_value
Ccl12	16.46	46.57	1.50	0.00015	0.025985
Ccl2	96.40	255.53	1.41	0.00005	0.010965
Cxcl5	5.64	66.38	3.56	0.00005	0.010965
S100a8	35.03	272.93	2.96	0.00005	0.010965
Cxcl2	0.52	13.59	4.71	0.00015	0.025985
S100a9	19.14	391.71	4.35	0.00005	0.010965
Il1b	21.55	47.76	1.15	0.00005	0.010965
Csf3r	1.38	6.82	2.31	0.00005	0.010965
Cxcr2	0.27	4.38	4.02	0.00015	0.025985
Ccl7	11.93	36.37	1.61	0.00005	0.010965
Cxcl10	5.05	17.01	1.75	0.00005	0.010965

Ccl12 : chemokine ligand 12, Ccl2 : chemokine ligand 2, Cxcl5 : chemokine (C-X-C motif) ligand 5, S100a8 : S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A), Cxcl2 : chemokine (C-X-C motif) ligand 2, S100a9 : S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B), Il1b : interleukin 1 beta, Csf3r : colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte), Cxcr2 : interleukin 8 receptor, beta, Ccl7 : chemokine (C-C motif) ligand 7, Cxcl10 : chemokine (C-X-C motif) ligand 10.

Table 7. Up-regulated genes related to immune response in tumor tissue of Cis+80 J/cm² mice compared to 80 J/cm² mice

Gene	80 J/cm ²	Cis+80 J/cm ²	log2(FC)	p_value	q_value
Cxcl1	2.97	22.78	2.94	0.00005	0.010965
Il6	16.50	48.31	1.55	0.00005	0.010965
Ccl2	96.40	255.53	1.41	0.00005	0.010965
Cxcl5	5.64	66.38	3.56	0.00005	0.010965
Cxcl2	0.52	13.59	4.71	0.00015	0.025985
Rsad2	1.17	3.83	1.71	0.00025	0.038652
Ccl7	11.93	36.37	1.61	0.00005	0.010965
Cxcl10	5.05	17.01	1.75	0.00005	0.010965
Ccl12	16.46	46.57	1.50	0.00015	0.025985
Serpina3g	9.92	29.86	1.59	0.00005	0.010965
Gadd45g	13.13	70.52	2.43	0.00005	0.010965
Il1b	21.55	47.76	1.15	0.00005	0.010965
Gbp3	1.75	6.27	1.84	0.00005	0.010965
Gbp2	2.66	9.31	1.81	0.00005	0.010965

Cxcl1 : chemokine (C-X-C motif) ligand 1, Il6 : interleukin 6, Ccl2 : chemokine (C-C motif) ligand 2, Cxcl5 : chemokine (C-X-C motif) ligand 5, Cxcl2 : chemokine ligand 2, Rsad2 : radical S-adenosyl methionine domain containing 2, Ccl7 : chemokine (C-C motif) ligand 7, Cxcl10 : chemokine (C-X-C motif) ligand 10, Ccl12 : chemokine (C-C motif) ligand 12, Serpina3g : serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3G, Gadd45g : growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma, Il1b : interleukin 1 beta, Gbp3 : guanylate binding protein 3, Gbp2 : guanylate binding protein 2.

Table 8. Down-regulated genes related to immune response in tumor tissue of Cis+80 J/cm² mice compared to 80 J/cm² mice

Gene	80 J/cm ²	Cis+80 J/cm ²	log2(FC)	<i>p</i> _value	<i>q</i> _value
H2-Ab1	18.61	6.13	-1.60	0.00005	0.010965
Cd74	70.47	22.11	-1.67	0.00005	0.010965
H2-Eb1	14.95	4.63	-1.69	0.00005	0.010965
H2-Aa	32.16	8.98	-1.84	0.00005	0.010965

H2-Ab1 : histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1, Cd74 : CD74 antigen, H2-Eb1 : histocompatibility 2, class II antigen E beta, H2-Aa : histocompatibility 2, class II antigen A alpha.

Table 9. Select tumor tissue transcripts in 80 J/cm² vs Cis+80 J/cm² mice related to cytokine-cytokine receptor interaction

Gene	80 J/cm ²	Cis+80 J/cm ²	log ₂ (FC)	p_value	q_value
Cxcl1	2.97	22.78	2.94	0.00005	0.010965
Ccl12	16.46	46.57	1.50	0.00015	0.025985
Il6	16.50	48.31	1.55	0.00005	0.010965
Ccl2	96.40	255.53	1.41	0.00005	0.010965
Cxcl5	5.64	66.38	3.56	0.00005	0.010965
Cxcl2	0.52	13.59	4.71	0.00015	0.025985
Il1b	21.55	47.76	1.15	0.00005	0.010965
Csf3r	1.38	6.82	2.31	0.00005	0.010965
Cxcr2	0.27	4.38	4.02	0.00015	0.025985
Ccl7	11.93	36.37	1.61	0.00005	0.010965
Csf1r	26.88	13.28	-1.02	0.00015	0.025985
Cxcl10	5.05	17.01	1.75	0.00005	0.010965

Cxcl1 : chemokine (C-X-C motif) ligand 1, Ccl12 : chemokine (C-C motif) ligand 12, Il6 : interleukin 6, Ccl2 : chemokine (C-C motif) ligand 2, Cxcl5 : chemokine (C-X-C motif) ligand 5, Cxcl2 : chemokine (C-X-C motif) ligand 2, Csf3r : colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte), Cxcr2 : interleukin 8 receptor, beta, Ccl7 : chemokine (C-C motif) ligand 7, Csf1r : colony stimulating factor 1 receptor, Cxcl10 : chemokine (C-X-C motif) ligand 10.

Table 10. Select tumor tissue transcripts in 80 J/cm² vs Cis+80 J/cm² mice related to cytokine activity

Gene	80 J/cm ²	Cis+80 J/cm ²	log2(FC)	p_value	q_value
Cxcl1	2.97	22.78	2.94	0.00005	0.010965
Ccl12	16.46	46.57	1.50	0.00015	0.025985
Il6	16.50	48.31	1.55	0.00005	0.010965
Ccl2	96.40	255.53	1.41	0.00005	0.010965
Cxcl5	5.64	66.38	3.56	0.00005	0.010965
Cxcl2	0.52	13.59	4.71	0.00015	0.025985
Ccl7	11.93	36.37	1.61	0.00005	0.010965
Cxcl10	5.05	17.01	1.75	0.00005	0.010965
Spp1	11285.80	4630.04	-1.29	0.00005	0.010965

Cxcl1 : chemokine (C-X-C motif) ligand 1, Ccl12 : chemokine (C-C motif) ligand 12, Il6 : interleukin 6, Ccl2 : chemokine (C-C motif) ligand 2, Cxcl5 : chemokine (C-X-C motif) ligand 5, Cxcl2 : chemokine (C-X-C motif) ligand 2, Ccl7 : chemokine (C-C motif) ligand 7, Cxcl10 : chemokine (C-X-C motif) ligand 10, Spp1 : secreted phosphoprotein 1.

Table 11. Select tumor tissue transcripts in 80 J/cm² vs Cis+80 J/cm² mice related to chemokine activity

Gene	80 J/cm ²	Cis+80 J/cm ²	log ₂ (FC)	p_value	q_value
Cxcl1	2.97	22.78	2.94	0.00005	0.010965
Ccl12	16.46	46.57	1.50	0.00015	0.025985
Ccl2	96.40	255.53	1.41	0.00005	0.010965
Cxcl5	5.64	66.38	3.56	0.00005	0.010965
Cxcl2	0.52	13.59	4.71	0.00015	0.025985
Ccl7	11.93	36.37	1.61	0.00005	0.010965
Cxcl10	5.05	17.01	1.75	0.00005	0.010965

Cxcl1 : chemokine (C-X-C motif) ligand 1, Ccl12 : chemokine (C-C motif) ligand 12, Ccl2 : chemokine (C-C motif) ligand 2, Cxcl5 : chemokine (C-X-C motif) ligand 5, Cxcl2 : chemokine (C-X-C motif) ligand 2, Ccl7 : chemokine (C-C motif) ligand 7, Cxcl10 : chemokine (C-X-C motif) ligand 10.

Table 12. Select tumor tissue transcripts in 80 J/cm² vs Cis+80 J/cm² mice related to chemokine signaling pathway

Gene	80 J/cm ²	Cis+80 J/cm ²	log2(FC)	p_value	q_value
Gng8	33.03	12.34	-1.42	0.0002	0.032721
Cxcl1	2.97	22.78	2.94	0.00005	0.010965
Ccl12	16.46	46.57	1.50	0.00015	0.025985
Ccl2	96.40	255.53	1.41	0.00005	0.010965
Cxcl5	5.64	66.38	3.56	0.00005	0.010965
Cxcl2	0.52	13.59	4.71	0.00015	0.025985
Cxcr2	0.27	4.38	4.02	0.00015	0.025985
Ccl7	11.93	36.37	1.61	0.00005	0.010965
Cxcl10	5.05	17.01	1.75	0.00005	0.010965

Gng8 : guanine nucleotide binding protein (G protein) gamma 8,
 Cxcl1 : chemokine (C-X-C motif) ligand 1, Ccl12 : chemokine (C-C motif) ligand 12, Ccl2 : chemokine (C-C motif) ligand 2, Cxcl5 : chemokine (C-X-C motif) ligand 5, Cxcl2 : chemokine (C-X-C motif) ligand 2, Cxcr2 : interleukin 8 receptor, beta, Ccl7 : chemokine (C-C motif) ligand 7, Cxcl10 : chemokine (C-X-C motif) ligand 10.

Table 13. Select tumor tissue transcripts in 80 J/cm² vs Cis+80 J/cm² mice related to inflammatory response

Gene	80 J/cm ²	Cis+80 J/cm ²	log2(FC)	p_value	q_value
Cxcl1	2.97	22.78	2.94	0.00005	0.010965
Ccl12	16.46	46.57	1.50	0.00015	0.025985
Il6	16.50	48.31	1.55	0.00005	0.010965
Ccl2	96.40	255.53	1.41	0.00005	0.010965
Cxcl5	5.64	66.38	3.56	0.00005	0.010965
Cxcl2	0.52	13.59	4.71	0.00015	0.025985
Il1b	21.55	47.76	1.15	0.00005	0.010965
Ccl7	11.93	36.37	1.61	0.00005	0.010965
Fn1	361.95	174.26	-1.05	0.00005	0.010965
Cxcl10	5.05	17.01	1.75	0.00005	0.010965

Cxcl1 : chemokine (C-X-C motif) ligand 1, Ccl12 : chemokine (C-C motif) ligand 12, Il6 : interleukin 6, Ccl2 : chemokine (C-C motif) ligand 2, Cxcl5 : chemokine (C-X-C motif) ligand 5, Cxcl2 : chemokine (C-X-C motif) ligand 2, Il1b : interleukin 1 beta, Ccl7 : chemokine (C-C motif) ligand 7, Fn1 : fibronectin 1, Cxcl10 : chemokine (C-X-C motif) ligand 10.