



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](#)

2021년 2월

박사학위 논문

대장암 마우스모델에서 포토론 이용  
광역동치료에 미치는 구리이온의 영향

조선대학교 대학원

의 과 학 과

신 근 수

# 대장암 마우스모델에서 포토론이용 광역동치료에 미치는 구리이온의 영향

Effects of copper ion on Photolon-induced photodynamic  
therapy in colon cancer mouse model

2021년 2월 25일

조선대학교 대학원

의 과학 과

신 근 수

# 대장암 마우스모델에서 포토론이용 광역동치료에 미치는 구리이온의 영향

지도교수 이 병 래

이 논문을 이학박사 학위신청 논문으로 제출함

2020년 10월

조선대학교 대학원

의 과 학 과

신 근 수

## 신근수의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 김태형 (인)

위원 건국대학교 교수 오재욱 (인)

위원 조선대학교 교수 전제열 (인)

위원 조선대학교 교수 송희상 (인)

위원 조선대학교 교수 이병래 (인)

2020년 12 월

조선대학교 대학원

## 목차(Contents)

### ABSTRACT

1. 서론(Introduction) .....	1
1) 대장암(Colon cancer) .....	1
2) 광역동 요법(photodynamic therapy) .....	1
3) 광민감제(Photosensitizers) .....	4
4) 광원(Light) .....	5
5) 산소(Oxygen) .....	6
6) 구리(copper) .....	7
7) 실험목적(Objective) .....	8
2. 재료 및 방법(Meterials and Methods) .....	9
1) 실험재료(Meterials) .....	9
2) 실험동물(Experimental animal) .....	9
3) 세포배양(Cell culture) .....	9
4) 생쥐 대장암 모델(Colon cancer bearing mouse model)	
.....	9
5) 광역동 치료 (Photodynamic therapy) .....	10

6) 지질과산화물량 측정(Lipid peroxide assay) .....	11
7) RNA-seq 측정(RNA-Seq assay) .....	11
8) 통계처리(Statistics) .....	12
3. 결과(Results).....	13
1) 생쥐 대장암 모델에서 광역동치료 후 종양 용적의 변화(Changes in tumor volume after photodynamic therapy in a mouse colon cancer model) .....	13
2) 광역동치료 후 종양 조직 TBARS 량의 변화(Changes in TBARS contents in tumor tissue after photodynamic therapy) .....	13
3) 광역동치료 후 암조직 기저측부 원형질막 구성 요소 관련 유전자 발현의 변화 (Changes in expression of genes related to basolateral plasma membrane components in tumor tissue after photodynamic therapy) .....	14
4) 구리이온이 광역동치료에 의한 종양조직 기저측부 원형질막 구성 요소 관련 유전자 발현에 미치는 영향 (Effect of copper ion on the expression of genes related to the basolateral plasma membrane	

components of cancer tissues by photodynamic therapy) .....	15
5) 레이조균과 레이저+구리균의 광역동 치료에 의한 기저측부 원형질막 구성 요소 관련 유전자 발현의 차이 분석 (Differentially expressed gene analysis related to basolateral plasma membrane components in tumor tissues of lazer versus lazer+copper groups) .....	16
6) 광역동치료가 암조직 정단부 원형질막 구성 요소 관련 유전자 발현에 미치는 영향 (Changes in expression of genes related to apical plasma membrane components in tumor tissue after photodynamic therapy) .....	17
7) 구리이온이 광역동치료에 의한 종양조직 정단부 원형질막 구성 요소 관련 유전자 발현에 미치는 영향 (Effect of copper ion on the expression of genes related to the apical plasma membrane components of cancer tissues by photodynamic therapy) .....	17
8) 레이조균과 레이저+구리균의 광역동 치료에 의한 정단부 원형질막 구성 요소 관련 유전자 발현의 차이 분석 (Differentially expressed gene analysis	



related to apical plasma membrane components in tumor tissues of lazer versus lazer+copper groups) .....	18
9) 광역동치료가 암조직 세포 용해 관련 유전자 발현에 미치는 영향(Changes in expression of genes related to the cytolysis in tumor tissue after photodynamic therapy) .....	19
10) 구리이온이 광역동치료에 의한 종양조직 세포 용해 관련 유전자 발현에 미치는 영향 (Effect of copper ion on the expression of genes related to the cytolysis of cancer tissues by photodynamic therapy) .....	20
11) 레이조균과 레이저+구리균의 광역동 치료에 의한 세포 용해 관련 유전자 발현의 차이 분석(Differentially expressed gene analysis related to the cytolysis in tumor tissues of lazer versus lazer+copper groups) .....	20
4. 고찰(Discussion) .....	22
5. 요약(Summary) .....	32
6. 참고문헌(Reference) .....	35

## 표 목차(Table contents)

Table 1. Effects of photodynamic therapy(PDT) on tumor growth in CT26 cancer bearing mice .....	45
Table 2. Analysis of differentially expressed genes of basolateral plasma membrane components-related genes in cancer tissues after PDT in CT26 cancer bearing mice .....	48
Table 3. Analysis of differentially expressed genes of basolateral plasma membrane components-related genes in cancer tissues after PDT in copper-treated CT26 cancer bearing mice .....	49
Table 4. Differentially expressed gene analysis related to basolateral plasma membrane components in tumor tissues of lazer versus lazer+copper treated CT26 cancer bearing mice .....	50
Table 5. Analysis of differentially expressed genes of apical plasma membrane components-related genes in cancer tissues after PDT in CT26 cancer bearing mice .....	51

Table 6. Analysis of differentially expressed genes of apical plasma membrane components-related genes in cancer tissues after PDT in copper-treated CT26 cancer bearing mice .....	52
Table 7. Differentially expressed gene analysis related to apical plasma membrane components in tumor tissues of lazer versus lazer+copper treated CT26 cancer bearing mice .....	53
Table 8. Analysis of differentially expressed genes of cytolysis-related genes in cancer tissues after PDT in CT26 cancer bearing mice .....	54
Table 9. Analysis of differentially expressed genes of cytolysis-related genes in cancer tissues after PDT in copper-treated CT26 cancer bearing mice .....	55
Table 10. Differentially expressed gene analysis related to cytolysis in tumor tissues of lazer versus lazer+copper treated CT26 cancer bearing mice .....	56

## 도 목차(Figure contents)

Fig. 1. Examples of atoms in singlet, doublet, and triplet states .....	2
Fig. 2. Type I and Type II photochemical reaction .....	2
Fig. 3. Chemical structure of the photosensitizer Photolon .....	5
Fig. 4. Copper catalyzed Fenton reaction .....	7
Fig. 5. Diode laser irradiation with a 660 nm red light .....	10
Fig. 6. Photograph of CT26 cancer bearing Balb/c mice after laser irradiation(660 nm, 80 J/Cm <sup>2</sup> ) .....	44
Fig. 7. Effects of copper and PDT on tumor growth in CT26 cancer bearing mice .....	46
Fig. 8. The effects of copper and PDT on thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) content in tumor tissue of CT26 cancer bearing mice .....	47

## ABSTRACT

### Effects of copper ion on Photolon-induced photodynamic therapy in colon cancer mouse model

Shin Kun-soo

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

Department of Medicine,

Graduate School of Chosun University

**Background:** Colon cancer is the third highest incidence cancer in Koreans. The treatment methods for colon cancer include surgery, radiation therapy, chemotherapy and immunotherapy. However, because the survival rate of cancer patients is not high, it is necessary to develop new treatment methods. Photodynamic therapy is an anticancer therapy that is performed using photosensitizers and light. Compared to chemotherapy or radiation therapy, this method has very few side effects, can be operated regardless of stage, and is a non-invasive therapy. However, since the anticancer effect by photodynamic therapy is limited, it is necessary to develop a method or agent to enhance the anticancer effect.

**Objective:** The purpose of this study is to observe the effect of copper on the increase of anticancer effect of photodynamic therapy using a colon cancer mouse model.

**Methods:** Colon cancer was induced by subcutaneous injection of cultured mouse colon cancer cells (CT26 cells) in Balb/c mice. A mouse tumor size of 300 to 400 mm<sup>3</sup> was used in the experiment as a mouse colon cancer model. The experimental group was divided into 4 groups: a control group, a copper group, a laser group, and a copper+laser group. Photolon (2.5 mg/kg BW) was injected into the abdominal cavity to the laser group and the copper+laser group. In the copper group and the copper+laser group, copper (2.5 mg/kg BW) was injected intraperitoneally 30 minutes after photolon injection. 2 hours after photolon injection, a laser (660nm, 80J/Cm<sup>2</sup>) was irradiated onto the tumor. After 24 hours of laser irradiation, the experimental animals were sacrificed and RNA-seq and lipid peroxide were measured in the tumor tissue. The TBARS level was measured using the OxiSelect™ TBARS Assay Kit. The size of the tumor was measured and observed up to 12 days after laser irradiation.

**Results:** On the 12th day after laser irradiation, the tumor volume increased by 420% in the control group, 154% in the laser group, and 53% in the copper+laser group. The tumor volume was significantly decreased in the copper+laser group compared to the laser group. After 24 hours of laser irradiation, the level of TBARS in the tumor tissue was increased by 190% in the laser group compared to the control group, and 68% in the copper+laser group than in the laser group. After 24 hours of laser irradiation, changes in the gene expression levels of the basolateral plasma membrane proteins Atp2b4, Hspa1a, Ddr1, Prom2, Nkd2, Slc38a3, Slc4a1, Slc14a1, St14, Tgfa and Cldn4 in the laser group and the copper+laser group were observed. In the laser group, tumor tissue Hspa1a, Nkd2, St14 and Tgfa gene expression levels were increased, and in the copper+laser group, tumor tissue Atp2b4, Ddr1, Nkd2, Prom2, Slc4a1,

Slc14a1, St14 and Tgfa gene expression levels were increased. In the copper+laser group, the expression levels of Cldn4, Ddr1, Prom2, Slc4a1 and Tgfa genes in tumor tissue were increased, and the expression of Slc14a1 gene was decreased compared to the copper group. After 24 hours of laser irradiation, the expression levels of the apical plasma membrane Dsg1a, Dsg2, Patj, Slc6a19, Slc34a2, Slc9a3r1 and Tnik genes were changed in the laser group and the copper+laser group. In the laser group, tumor tissue Dsg1a, Patj, and Slc34a2 gene expression levels were increased. In the copper+laser group, tumor tissue Dsg1a, Dsg2, Patj, Slc6a19, Slc9a3r1, Slc34a2 and Tnik gene expression levels were increased, and the increase rate was higher than that of the laser group. The expression levels of granzyme, Gzmc, Gzmd, Gzme, Gzmf and Gzmg genes in the tumor tissue of the copper+laser group were increased compared to that of the laser group. As a result of these experiments, when copper is used in combination with photodynamic therapy in a cancer mouse model, the tumor volume decrease, the lipid peroxide level increases, and the expression of cell membrane protein genes related to cancer induction, growth and metastasis are changed, and granzyme gene expression increased, and these results are thought to be correlated with the increased anticancer effect.

Conclusion: The enhanced anticancer effect by the combination of photodynamic therapy and copper is believed to be related to the increase in oxidative cell damage, as the amount of lipid peroxide in the cell membrane is increased.

Copper acts on reactive oxygen species to increase the production of highly reactive hydroxy radicals by the Fenton reaction, and granzyme secreted from immune cells is considered to have a combined effect with anticancer effects.

The synergistic effect of the combination of anticancer photodynamic therapy and copper is a very impressive effect that can be used for cancer treatment, and further studies are needed to use it clinically.



# 1. 서론(Introduction)

## 1) 대장암(Colon cancer)

대장암은 소화기관인 대장의 상피세포에서 발생하는 암으로, 세계보건기구(World Health Organization)에 따르면 2018년에 180만 명의 환자가 발생했고, 대장암으로 사망한 사람은 862,000명으로 발표되어 있다(1). 2018년 우리나라의 국가 암등록 통계에 의하면 2016년 우리나라의 총 암 유병자는 174만명이었고 2016년 한 해 동안 새로 발생한 암환자 수는 22만9180명(남 12만68명, 여 10만9112명)이었는데, 남성의 암 발생 순위는 1위 위암, 2위 폐암, 3위 대장암 4위 전립선암 이었고, 여성의 암 발생 순위는 1위 유방암, 2위 갑상선암, 3위 대장암, 4위 위암으로 대장암은 우리나라의 남성과 여성에서 모두 3번째로 발생률이 높은 암이다(2,3). 대장암은 수술요법, 방사선 요법, 화학요법 및 면역요법 등으로 치료하고 있다(4). 수술요법은 암조직을 절제하여 제거하는 방법으로 전이가 되지 않은 암은 완치 될 수 있는 방법으로 치료법중 가장 우선적으로 시도하는 방법이다(4). 전이가 일어난 경우는 수술요법과 화학요법이나 방사선요법을 병행하여 치료하고 있으나, 전이의 정도에 따라서 치료율은 많은 차이가 있다(4). 따라서 암 치료의 효과를 증대시키기 위하여 여러가지 치료법을 병행하여 시행하는 복합적 치료요법이 시행되고 있으나 환자 생존율의 증가는 높지 않기 때문에 새로운 치료방법의 개발이 필요하다(5).

## 2) 광역동 요법(photodynamic therapy)

광역동 요법은 빛에 반응하는 물질인 광민감제(photosensitizer)에 빛을 조사하여 활성화시켜 치료효과가 나타나는 치료법으로 화학요법이나 방사선요법에 비하여 부작용이 매우 적고, 치료과정에서 환자에게 주는 스트레스가 거의 없는 비침윤적 요법이기 때문에 암치료분야에서 대안적인 치료법으로서 관심을 받고 있다(6). 광민감제는 광선에 의해서 활성화되고, 활성화 광민감제는 산소를 활성화시켜서 치료효과가 나타나기 때문에

광민감제, 광선 및 산소를 광역동치료의 3대 요소라 할 수 있다(7).

특정파장의 빛을 광과민제에 조사하면 광과민제는 기저상태 (ground state) 에서 활성화 상태(excitation state)인 삼중항 활성화 상태(triplet excited states)로 되는데, 이를 광감작 반응(photosensitizing reaction)이라 한다(8)(fig.1).

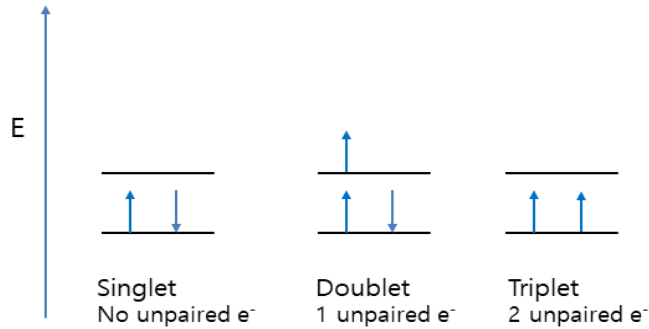


Fig. 1. Examples of atoms in singlet, doublet, and triplet states.

광감작반응으로 활성화된 광과민제는 목표물질(target molecules)에 작용하여 화학반응이 일어나는데 이를 광화학반응(photochemical reactions)이라 하며, 광화학반응은 type I과 type II 반응 등 2가지가 있다(9).

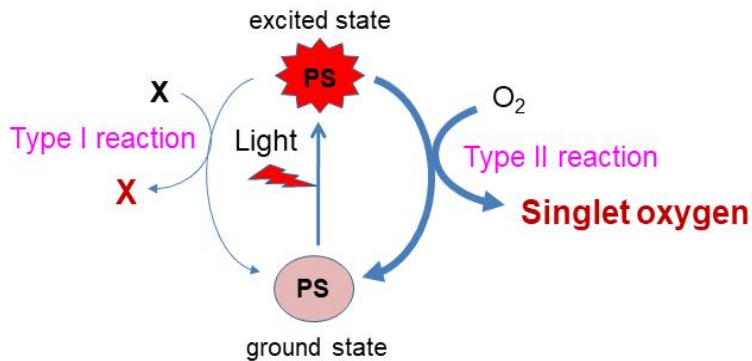


Fig. 2. Type I and Type II photochemical reaction.

PS : photosensitizer, X : target molecule.

Type I 반응은 활성화 광민감제가 목표물질에 직접 작용하여 목표물질을 변화시키는 반응이고, type II 반응은 활성화 광민감제가 산소를 일중항 산소(singlet oxygen)로 전환시키는 반응이며, 광역동 치료 시에 나타나는 치료 효과는 대부분 type II 반응에 의해서 생성된 반응성 산소종에 의한 효과로 알려져 있다(9)(fig.2).

반응성 산소종(reactive oxygen species)은 반응성이 매우 강하여 주위의 물질들을 산화시킬 수 있는데, 암세포내에서 생성된 반응성 산소종은 단백질, 지질 및 핵산등을 산화시켜 이들의 생리기능을 저하시킴으로서 일어나는 세포에 대한 독성작용으로 인하여 항암효과가 나타난다(10). 반응성 산소종은 단백질 구성 아미노산 중에서 트립토판, 티로신, 히스티딘, 시스테인 및 메치오닌 등에 산화반응을 유발하고, 세포막 지질인 불포화지방산에 작용하여 지질 과산화물을 생성하며 세포막의 기능을 저하시키며, 핵산을 구성하는 구아닌 염기를 산화시킴으로서 핵산의 기능이 저하될 수 있다(11).

광화학반응에 의해서 생성된 반응성 산소의 수명은 10 ~ 320 ns 정도로 매우 짧기 때문에 암세포의 단백질, 지질 및 핵산에 대한 산화적 손상은 세포내에서 광과민제가 존재하는 부위의 주변에서 주로 일어나는 것으로 알려져 있다(11). 광민감제는 종류에 따라서 위치하는 목표(target)를 미토콘드리아, 리소좀, 소포체 및 원형질막 등으로 하는 제제가 있다. Meso-tetrahydroxyphenyl chlorin 은 핵막(11), 5-Amino-laevulinic acid 는 미토콘드리아(12), methylene blue 는 리소좀(lysosomes)(13)를 목표(target)로 한다.

세포는 반응성 산소종으로 인한 산화적 손상을 받으면 세포사멸(cell death)이 일어날 수 있는데, 세포사멸이 일어나는 3가지 기전, 즉 세포 자멸사(apoptosis), 괴사(necrosis) 및 자가 포식(autophage) 중 광역동 치료에 의해서 암세포는 세포 괴사와 자멸사에 의해서 세포사멸이 초래되는 것으로 알려져 있다(14).

### 3) 광민감제(Photosensitizers)

광민감제는 빛에너지인 광자를 흡수하여 활성화되는 물질로서, 광역동 치료에 핵심이 되는 물질이로서, 광역동 치료효과는 광민감제가 암세포에 선택적 축적이 일어나고 활성화율이 높을수록 치료 효과도 높아진다(9). 광민감제는 빛에 의한 활성화율이 높고(high extinction coefficient), 빛을 조사하지 않았을 때 독성이 낮고(Low dark toxicity), 암세포에 축적이 잘되고(target tissue), 투여하기 쉽고 몸에서 쉽게 배출(rapid clearance)되는 제제가 이상적인 조건이라고 할 수 있다(9, 15).

항암치료에는 테트라피롤 골격(tetrapyrrole backbones)을 가진 광민감제가 주로 이용되고 있는데(fig.3), 여기에는 포르피린(porphyrin)계, 엽록소(chlorophyll)계 및 프탈로시아닌(Phthalocyanines)계가 포함된다(16). 포르피린은 적혈구의 헤모글로빈(hemoglobin)의 구성물질인 헴(hem)에 존재하는 물질로서 항암치료용 광민감제 중 처음으로 개발된 광민감제이다(17).

포토프린(photofrin)은 1960년도에 헤마토포르피린(hematoporphyrin)에서 처음 개발되어 캐나다(캐나다 BC 주 밴쿠버 소재의 Quadra Logic Technologies, Inc의 라이선스 하에 캐롤라이나 주 Lederle Parenterals에 의해 제조)에서 제조되어 암의 진단과 치료에 이용된 1세대 광민감제로서 파장 652 nm 광선 조사로 활성화된다(17). 포토프린은 주사 후 종양 조직에 최적의 농도에 도달하는데 48시간이 소요되고, 체내에 수주 동안 남아있어서 피부 손상이 6주일 동안 지속될 수 있다(18).

식물, 박테리아 및 조류(algae)의 세포에서 광합성이 일어나는 세포내 소기관인 엽록체(chloroplast)에서 발견되는 색소인 엽록소(chlorophyll)는 광합성반응에 관여하는 색소로서 폴피린과 유사한구조로 되어 있는데, 엽록소에서 유래한 클로린(chlorine) 유도체인 포토론(photolon)은 암세포에 흡수가 빠르고 체내에서 쉽게 배설되는 2세대 광민감제이다(19). 클로린 e6(Ce6)는 1994년 클로로필 유도체로부터 개발되어 암치료에 사용한 지용성 물질로서(20), 물에 대한 용해도가 매우 낮아서 정맥주사가 어렵기 때문에 수용성 물질인 polyvinylpyrrolidone(PVP)과 중합시켜서 Ce6-PVP을 만들었다(21).

포토론은 수용성 클로린 e6(Ce6-PVP)로서 정맥주사가 용이하고 주사후 2시이면 암조직에 최고 농도에 도달하며 파장 650~700nm의 광선조사로 활성화(excitation)되며 주사 후 12시간이 지나면 대부분 체외로 배출되기 때문에, 환자는 광역동 치료 후 일상복귀 시간을 단축시킬 수 있다(21).

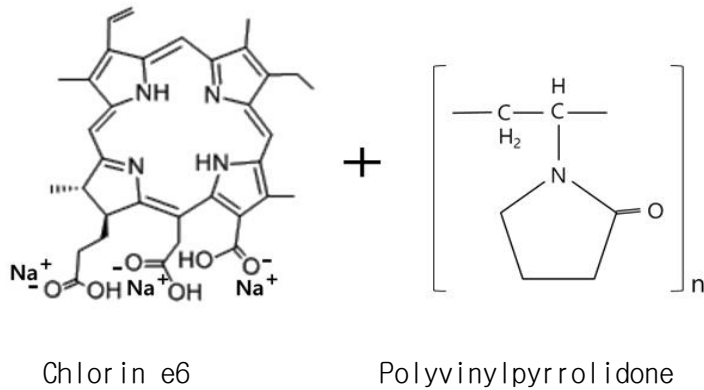


Fig. 3. Chemical structure of the Photolon.

박테리오 클로린은 광합성이 일어나는 세균의 bacteriochlorophyll로부터 유래한 물질로서 식물의 클로로필 유래 클로린에 비하여 안정성은 낮으나 활성화되는 빛의 파장이 700 ~ 800nm으로 식물유래 클로린의 활성화 파장 650 ~ 700nm 에 비하여 길기 때문에 광선의 침투력이 높아서 클로린보다 더 깊은 암의 치료에 이용될 수 있다(22).

프탈로시아닌(Phthalocyanine)은 합성 색소의 일종으로 포르피린의 테트라피롤(tetrapyrrole)과 유사한 구조를 가지고 있으며 활성화 파장이 670nm의 근처이기 때문에 포르피린의 활성화 파장 652nm 보다 길어서 심부의 암의 치료에 이용된다(23).

#### 4) 광원(Light)

빛은 광역동 치료를 구성하는 3대 요소 중 하나로서 광민감제를 활성화시키는 역할을 한다. 광민감제는 종류에 따라서 활성화되는 파장이 다르며, 최대 흡광계수를 나타내는

빛의 파장에서 활성화가 가장 잘 일어나며, 대부분의 광민감제는 적색-근적외선 영역(600-850nm)의 흡광계수를 가지고 있다(24). 광민감제 투여 후 암조직에 광민감제가 축적되면 암조직에 빛을 조사하여 광역동 치료를 실시하는데, 이때 조사한 빛의 조직 침투력은 빛의 파장과 비례하기 때문에 빛의 파장이 길수록 침투력도 증가한다(17).

광역동치료에 처음 사용된 빛은 사용된 광민감제인 포르피린의 흡수 스펙트럼에 기초하여 조사하였는데, 포르피린의 흡수 스펙트럼은 400 nm 근처와 650 nm 근처에서 나타나는데, 400 nm 는 파장이 짧아서 조직 침투력이 거의 없기 때문에 적색인 650 nm 근처 파장을 광역동 치료에 이용하였다(16, 17). 광역동 치료의 광원으로는 저출력의 간단한 반도체 레이저(diode laser)가 많이 이용되며, 폴피린이나 클로린계 광민감제는 적색광선 파장인 600nm-700 nm에서 활성화가 일어난다(25, 26). 광역동치료의 종류와 목적에 따라서 사용되는 광민감제의 종류도 다르며 이를 활성화시키기 위한 빛의 파장이나 조사 방법도 다르기 때문에 이에 적합한 전신 및 국소 광역동 치료를 위한 광원에 대한 연구가 광범위하게 이루어지고 있다(26).

암치료를 위한 PDT 시행 시 암조직에 조사되는 빛의 양을 증가시키기 위하여 수술이나 내시경을 이용한 장기내로 빛을 전달시키는 장치를 통하여 광역동 치료의 치료효율을 증가시키는 방법들이 시도되고 있다(27, 28).

## 5) 산소(Oxygen)

산소는 광역동 치료를 구성하는 3대 요소 중 하나로서 활성화된 광민감제는 산소를 반응성 산소로 전환시킨다. 광민감제가 광전자를 받으면 삼중항(triplet) 상태로 되어 주위의 산소분자를 일중항 산소(singlet oxygen)로 전환시킨다. 일중항 산소는 슈퍼옥사이드(superoxide) 및 히드록실 라디칼(hydroxyl radicals)를 형성하여 이들에 의한 세포 독성에 의해서 광역동 치료 효과를 나타낸다(29). 반응성 산소종(ROS)은 화학적으로 반응성이 강한 산소를 함유한 물질로서, 퍼옥시드( Peroxide), 슈퍼 옥시드, 히드록실 라디칼(hydroxyl radicals), 일중항 산소 및 알파-산소(alpha-oxygen)가 포함된다(10).

반응성 산소종은 호기성 세포의 미토콘드리아에서 정상적으로 생성되는 물질인데, 자외선이나 방사선조사, 중금속 및 약물등에 의해서 생성이 증가 될 수 있으며, 증가된 반응성 산소종은 지질, DNA, RNA 및 단백질을 손상을 유발하여 세포손상을 유발한다(29, 30).

## 6) 구리(Copper)

금속이온(metal ion)은 인체에 필요한 필수영양소로서 세포에서 일어나는 대사과정에 보조인자로서 세포 증식, 혈관 신생 및 운동성(mobility)과 같은 생체의 중요한 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다. 구리의 농도가 암조직에서 증가되어 있고, 구리가 혈관의 신생에 관여하는 것으로 알려지면서 구리는 암세포의 성장에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(31). 구리는 산화 환원반응 활성 금속(Redox-active metals)으로서 산화 환원 순환반응(oxydo-reduction cycle)를 통하여 반응성 산소종을 생산할 수 있기 때문에 세포내에 구리이온의 농도가 증가하면 산화적 손상(oxydative damage)에 의한 세포독성이 나타날 수 있다(32). 구리는 과산화수소의 존재하에서 펜턴반응(Fenton reaction)을 유도하여 반응성 산소종 중에서 반응성이 가장 강한 히드록실라디칼을 생성하는데(fig.7), 조직에서 생성된 히드록실 라디칼은 단백질, 막지질 및 핵산과 직접 반응하여 세포독성이 나타날 수 있기 때문에(33), 반응성 산소종이 증가된 상태에서 구리는 산화적 세포손상을 증가시키는 작용을 나타낼 수 있다.



Fig. 4. Copper catalyzed Fenton reaction

## 7) 실험목적(Objective)

암치료분야에서 광역동 치료법은 환자에게 시술의 스트레스가 매우 적은 비침윤적 방법이기 때문에 대안적 암치료법으로 개발되고 있다(25). 그러나 광역동 요법은 치료효과가 미흡하여 아직까지는 보편적인 치료법으로 이용되지 못하고 있다. 광역동 암치료는 광민감제를 주사한 후 암조직에 레이저를 조사하여 광민감제를 활성화시키는데, 빛의 조직 침투력이 제한적이어서 외부에서 조사한 빛이 내부 장기의 암조직까지 도달하는 빛의 양이 충분치 않다. 최근에 내시경이나 복강경등 기구와 광섬유를 이용해서 빛을 내부장기의 암조직까지 전달하여 치료 효과가 증가되었다는 보고가 있다. 또한 광역동치료의 치료효율 증가를 위해서 항암요법제 등 다른 항암요법과 병행 치료를 시도하였다(34, 35). 광역동 암치료법은 광역동 반응에 의해서 활성화된 광민감제에 의해서 생성되는 반응성산소가 작용하여 암치료효과가 나타나는데, 반응성 산소종 중 히드록실 라디칼이 반응성이 가장 강하다. 반응성 산소종이 생성되는 조건에서 구리는 팬턴 반응에 의해서 히드록실 라디칼 생성을 증가시킬 수 있다. 암치료를 위한 광역동 요법을 시행할 때 구리를 투여하면 암조직에 구리농도가 증가되어 광민감제에 의해서 생성된 반응성 산소종이 구리에 의해서 히드록실 라디칼로 전환되어 암세포에 대한 세포독성이 증가되어 항암치료 효과가 증가될 수 있을 것으로 예상된다. 본 연구의 목적은 암치료를 위한 광역동요법의 효과를 증가시키는 방법을 개발하기 위한 연구의 일환으로 구리가 광역동 요법의 치료 효과에 미치는 영향을 관찰하고자 한다. 광역동 치료의 항효과에 미치는 구리의 효과를 암세포를 생쥐에 주사하여 생쥐 암모델(tumor bearing mouse model)을 만들어서 실험 관찰하였다. 생쥐 암모델은 대장암 세포주(CT26 cells)를 생쥐(Balb/C mouse)에 주사하여 암종이 생성된 생쥐를 생쥐 암 모델로 이용하였고, 광역동 치료를 실시한 후 암종의 크기와 암 조직의 조직검사 및 유전자 발현검사(RNA-seq)를 실시하여 광역동 치료에 미치는 구리의 영향을 관찰하였다.



## 2. 재료 및 방법(Meterials and Methods)

### 1) 실험재료(Materials)

본 실험에 사용된 구리(Copper chloride dihydrate :  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), Antimycotic Solution (100×)과 Trypsin-EDTA Solution (10X)은 시그마알드리치코리아(서울, 한국)에서 구매하였고, 10% 태우혈청, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지 등은 Gibco BRL(NY, USA)에서 구매하여 실험에 사용하였다. 광민감제 포토론(photolon)은 동성제약 연구부에서 기증받아 실험에 사용하였다.

### 2) 실험동물(Experimental animals)

실험동물은 Balb/c 종 생쥐(6주령, 수컷)로서 중앙 실험동물(주)(Seoul, KOREA)에서 구매하여 사용하였다. 실험동물은 명암주기 12시간, 온도  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  상대습도  $60 \pm 5\%$  의 조건이 유지되는 사육환경에서 사육시키면서 실험을 진행하였고, 실험은 조선대학교 동물실험 윤리 위원회 승인(승인번호: CIACUC 2019-A0034)을 받아 동물실험 윤리규정을 준수하여 실험을 실시하였다.

### 3) 세포배양(Cell culture)

생쥐 대장암 세포주(CT26 cell)는 한국 American Type Culture Collection(ATCC)(서울, 한국)에서 분양받아 실험에 사용하였다. 생쥐 대장암세포는 10% 우태혈청 과 Antimycotic solution 을 함유한 DMEM 배지를 사용하여,  $37^\circ\text{C}$ 로 유지되는  $\text{CO}_2$  배양기에서 배양하여 사용하였다.

### 4) 생쥐 대장암 모델(Colon cancer bearing mouse model)

Balb/c mouse 를 구매하여 1주일간 사육하여 환경에 적응시킨 후 암종을 유도하기 위한 동물로 사용하였다. 생쥐대장암 세포(CT26 cell)를 배양한 후 trypsin-EDTA로 처리

하여 수집한 후 암세포(CT26 cells :  $2 \times 10^5$  cells/mouse)을 인산염 완충액(phosphate buffered saline; PBS) 0.2 ml에 부유하여 생쥐의 등쪽 털을 제모한 후 피하에 주사하였다. 암세포 주사 후 시간 경과에 따라서 관찰하고 암종의 크기를 디지털 캘리퍼(digital caliper, EDC 150, EX-power, 경북, Korea)로 측정하여 암종의 크기가 300-400 mm<sup>3</sup> 인 것을 생쥐 대장암 모델로 실험에 사용하였다. 암종의 용적(tumor volume)은 디지털 캘리퍼로 크기를 측정하여 다음 식에 의해서 계산하였다.

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

### 5) 광역동 치료(Photodynamic therapy)

대장암 모델(암종의 크기 300-400 mm<sup>3</sup>) 생쥐 8마리씩을 한 실험군으로 하였고, 실험군은 레이저를 조사하지 않은 대조군, 구리군, 레이저 조사한 레이저군 및 구리+레이저군 등 4군으로 나누어 실험을 실시 하였다. 레이저군과 구리+레이저군에는 광민감제 포토론을 생리식염수에 용해시켜서 포토론 용액을 만들어서 체중 kg 당 2.5 mg(2.5 mg/kg BW) 용량의 포토론 용액을 생쥐 복강에 주사하였다. 구리군과 구리+레이저군에는 구리(Copper chloride dihydrate)는 식염수에 용해시켜서 구리용액을 만들어서 포토론 주사 30분 후에 체중 kg 당 2.5 mg(2.5 mg/kg BW)의 구리용액을 생쥐 복강에 주사하였다.



Fig. 5. Diode laser irradiation with a 660 nm red light

포토론 주사 2시간 경과 후에 실험동물을 4% isoflurane을 사용하여 마취시킨 후 반도체 레이저 기기(LuxR)를 이용하여 레이저 광선(파장 660nm, 조사량 80J/Cm<sup>2</sup>)을 종양의 표면에 조사하였다(Fig. 8). 종양에 레이저를 조사하고 24시간 경과 후 각 실험군 당 3마리씩 경추탈골하여 희생시킨 후 종양을 절제하여 종양조직 일부는 TRIzol 용액에 보관하여 RNA-seq 검사를 위한 시료로 사용하였고, 조직 일부는 지질과산화물량 측정을 위한 시료로 사용하였다. 각 실험군당 5마리씩은 레이저 조사 후 시간 경과에 따라서 12일까지 디지털 캘리퍼를 이용하여 암종(tumor mass)의 크기를 측정하고 암종의 형태를 사진을 촬영하였다.

### 6) 지질과산화물량 측정(Lipid peroxide assay)

종양조직의 지질과산화 산물량은 thiobarbituric acid reactive substance(TBARS) 량으로 측정하였다. 종양조직을 일부 절제하여 조직중량 10배(W/V)의 0.1M phosphate buffer(pH 7.4)를 첨가하여 균질화 기기(polytron PT-21000, 써모 피셔 사이언티픽 코리아, 서울, Korea)를 사용하여 균질화시킨 후 TBARS 량 측정을 위한 시료로 이용하였다. TBARS 량은 OxiSelect™TBARS Assay Kit(고마바이오텍(주), 서울, Korea)을 이용하여 제조사의 측정 방법에 따라서 측정하였다.

### 7) RNA-seq 측정(RNA-seq assay)

절제한 종양조직에서 TRIzol® RNA Isolation Reagents (Life technologies, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하고, BioAnalyzer 2100 automated electrophoresis system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 RNA 안정성을 분석하여 안전성을 확인한 후 시료 RNA로 이용하였다. 시료 RNA는 TruSeq stranded mRNA sample preparation kit (illumina, San Diego, CA, USA) 을 이용하여 mRNA sequencing library를 만들었다. mRNA library는 Agilent DNA High sensitivity Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA) 를 이용하여 BioAnalyzer 2100과 CFX96 real time system (BioRad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 분석하였다.

각각의 mRNA library sequencing은 Illumina HiSeq 2500을 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. 염기서열 정보는 FASTQ format의 정보와 비교하여 분석하였고, gene set의 분석은 DAVID Bioinformatics Resources 6.7, NIH(36)에서 Functional Annotation Tool을 이용하였다. 실험군간의 유전자 발현 차이는 reads per kilobase per million mapped reads (RPKM) 값을 이용하여 fold-change false discovery rate (FDR) 을 측정하고,  $|\log_2(FC)| \geq 1$  & P-value  $\leq 0.05$  인것을 유의한 것으로 하였다.

## 8) 통계처리(Statistics)

RNA-seq를 제외한 모든 측정 결과는 평균± 표준편차(mean± 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. 결과(Results)

#### 1) 생쥐 대장암 모델에서 광역동치료 후 종양 용적의 변화(Changes in tumor volume after photodynamic therapy in a mouse colon cancer model)

광역동치료가 종양에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 대장암 모델 생쥐에 반도체 레이저 기기를 이용하여 레이저 광선(파장 660nm, 용량 80J/Cm<sup>2</sup>)을 종양의 표면에 조사하여 광역동 치료 시행 후 12일까지 관찰한 결과는 Table 1, Fig. 6 및 Fig. 7과 같다. 광역동 치료를 시행하지 않은 대조군에서 종양의 용적은 0일, 4일 7일 및 12일에 194±47, 282±181, 566±141 및 994±189 mm<sup>3</sup> 를 각각 나타내서 7일 과 12일 경과 시 종양 용적은 실험 시작할 때와 비교하면 196% 및 420%가 각각 증가 되어 시간이 경과에 따라서 종양의 용적이 증가 됨을 보여주고 있다. 구리군의 종양 용적은 7일 과 12일 경과시에 종양 용적은 실험 시작할 때와 비교하면 205% 및 431%가 각각 증가되어 시간 경과에 따른 종양 용적 증가율이 대조군과 차이를 나타내지 않아서 구리 2.5 mg/kg BW 을 1회 투여하였을 때 종양의 성장에 미치는 영향은 적은 것으로 추측된다. 레이저군의 종양 용적은 레이저 조사 전인 0일과 조사 후 12일에 각각 203±51과 517±121 mm<sup>3</sup> 을 각각 나타내서 종양의 용적이 실험 시작할 때와 비교하여 12일경과시에 154%가 증가되어 광역동치료를 시행하지 않은 대조군의 420% 증가에 비하여 종양 용적 증가율이 더 감소 됨을 알 수 있다. 구리+레이저군의 종양 용적은 레이저 조사 전인 0일과 조사 후 12일에 각각 207±53과 97±43 mm<sup>3</sup> 을 각각 나타내서 종양 용적이 실험 시작할 때와 비교하여 12일 경과시에 53%가 감소되어 광역동 치료를 시행하지 않은 대조군의 420% 증가나, 레이저군의 154% 증가에 비하여 종양의 용적이 현저히 감소됨을 알 수 있다.

#### 2) 광역동치료 후 종양 조직 TBARS 량의 변화(Changes in TBARS cotents in tumor tissue after photodynamic therapy)

CT26 tumor bearing mouse에 광역동치료를 시행하고 24시간 경과 후 종양 조직에서 TBARS 량을 측정 한 결과는 Fig. 8과 같다.

종양 조직 TBARS 함량은 대조군과 구리군 사이에 유의한 차이가 없어서 구리 2.5 mg/kg BW 을 1회 투여하였을 때 종양 조직의 지질 과산화물량에 미치는 영향은 적은 것으로 추측된다. 레이저군의 종양 조직 TBARS 량은  $244 \pm 24 \mu\text{M/gm tissue}$  로 대조군의 종양 조직 TBARS 량  $84 \pm 11 \mu\text{M/gm tissue}$  에 비하여 190 %가 증가되어, 광역동치료 시행으로 종양 조직에 산화적 손상이 증가되었음을 보여주고 있다. 구리+레이저군의 종양 조직 TBARS 량은  $412 \pm 52 \mu\text{M/gm tissue}$  로 레이저군보다 68%가 증가되어, 구리를 투여하고 광역동 치료를 시행하면 산화적 손상이 더 증가됨을 보여주고 있다.

### **3) 광역동치료 후 암조직 기저측부 원형질막 구성 요소 관련 유전자 발현의 변화 (Changes in expression of genes related to basolateral plasma membrane components in tumor tissue after photodynamic therapy)**

CT26 tumor bearing mouse에 광역동치료를 시행하고 24시간 경과 후 종양 조직에서 RNA를 분리하여 mRNA-sequencing 법으로 기저측부 원형질막 구성요소 관련 유전자 7가지의 발현량 차이를 비교한 결과는 Table 2와 같다. ATPase, Ca<sup>++</sup> transporting, plasma membrane 4(Atp2b4) 유전자는 RPKM 값이 대조군 3.81, 레이저군 12.54로 레이저군에서 값이 증가되었으나 log<sub>2</sub>(FC) 값이 1.71로 유의성이 없었다. Heat shock protein 1A(Hspa1a)는 RPKM 값이 대조군 2.00, 레이저군 160.99로 레이저군에서 증가 되었으며, log<sub>2</sub>(FC) 값은 6.32로 유의하게 증가되어 레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다. Naked cuticle 2(Nkd2)는 RPKM 값이 대조군 0.95, 레이저군 13.56으로 레이저군에서 증가되었으며, log<sub>2</sub>(FC) 값은 3.83으로 유의하게 증가되어 레이저군에서 유전자 발현량이 증가되었다. Solute carrier family 38, member 3(Slc38a3)는 RPKM 값이 대조군 0.14, 레이저군 4.89으로 레이저군에서 증가 되었으며, log<sub>2</sub>(FC) 값은 5.11 로 유의하게 증가되어 레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다. Suppression of tumorigenicity 14 (colon carcinoma)(St14)는 RPKM 값이 대조군 1.68, 레이저군 25.93으로 레이저군에서 증가되었으며, log<sub>2</sub>(FC) 값은 3.94로 유의하게 증가되어 레이

저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다. Transforming growth factor alpha(Tgfa)는 RPKM 값이 대조군 3.20, 레이저군 16.24로 레이저군에서 증가되었으며,  $\log_2(FC)$  값은 2.34로 유의하게 증가되어 레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다.

**4) 구리이온이 광역동치료에 의한 종양조직 기저측부 원형질막 구성 요소 관련 유전자 발현에 미치는 영향 (Effect of copper ion on the expression of genes related to the basolateral plasma membrane components of cancer tissues by photodynamic therapy)**

CT26 tumor bearing mouse에 구리를 투여하고 광역동치료 시행 24시간 경과 후 종양 조직에서 RNA를 분리하여 mRNA-sequencing 법으로 기저측부 원형질막 구성요소 관련 유전자 9가지의 발현량 차이를 비교한 결과는 Table 3와 같다. Atp2b4 유전자는 RPKM 값이 대조군 3.81, 구리+레이저군 29.35로 구리+레이저군에서 증가되었으며,  $\log_2(FC)$  값은 2.94로 유의하게 증가되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다. Discoidin domain receptor family, member 1(Ddr1)은 RPKM 값이 대조군 3.83, 구리+레이저군 33.93으로 구리+레이저군에서 증가되었으며,  $\log_2(FC)$  값은 3.14로 증가되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다. Naked cuticle 2(Nkd2)는 RPKM 값이 대조군 0.95, 구리+레이저군 40.90으로 구리+레이저군에서 증가되었으며,  $\log_2(FC)$  값은 5.42로 유의하게 증가되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다. Prominin 2(Prom2)는 RPKM 값이 대조군 1.55, 구리+레이저군 64.44로 구리+레이저군에서 증가되었으며,  $\log_2(FC)$  값은 5.36으로 유의하게 증가되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다. Solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1(Slc4a1)는 RPKM 값이 대조군 0.22, 구리+레이저군 6.38로 구리+레이저군에서 증가되었으며,  $\log_2(FC)$  값은 4.81로 유의하게 증가되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다. Solute carrier family 14 (urea transporter), member 1(Slc14a1)는 RPKM 값이 대조군 94.99, 구리+레이저군 13.81로 구리+레이저군에서 감소되었으며,  $\log_2(FC)$  값은 -2.78로 유의하게 감소되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 감소 되었다.

St14는 RPKM 값이 대조군 1.68, 구리+레이저군 86.48으로 구리+레이저군에서 증가되었으며,  $\log_2(FC)$  값은 5.67로 유의하게 증가되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다. Tgfa는 RPKM 값이 대조군 3.20, 구리+레이저군 77.05로 구리+레이저군에서 증가되었으며,  $\log_2(FC)$  값은 4.58로 유의하게 증가되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다.

#### 5) 레이저군과 레이저+구리군의 광역동 치료에 의한 기저측부 원형질막 구성 요소 관련 유전자 발현의 차이 분석(Differentially expressed gene analysis related to basolateral plasma membrane components in tumor tissues of lazer versus lazer+copper groups)

CT26 tumor bearing mouse에서 구리가 광역동치료에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 시행 24시간 경과 후 종양 조직에서 RNA를 분리하여 mRNA-sequencing 법으로 기저측부 원형질막 구성요소 관련 유전자 8가지의 발현량을 측정하여 레이저군과 구리+레이저군을 비교한 결과는 Table 4와 같다. Claudin 4(Cldn4) 유전자는 RPKM 값이 레이저군 21.19, 구리+레이저군 162.53으로 구리+레이저군에서 증가되었으며,  $\log_2(FC)$  값은 2.93로 유의하게 증가되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다. Ddr1은 RPKM 값이 레이저군 9.17, 구리+레이저군 33.93으로 구리+레이저군에서 증가되었으며,  $\log_2(FC)$  값은 1.88로 증가되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가되었다. Prom2는 RPKM 값이 레이저군 13.74, 구리+레이저군 64.44로 구리+레이저군에서 증가되었으며,  $\log_2(FC)$  값은 2.22로 유의하게 증가되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다. Slc4a1은 RPKM 값이 레이저군 1.36, 구리+레이저군 6.38로 구리+레이저군에서 증가되었으며,  $\log_2(FC)$  값은 2.22로 증가되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가되었다. Slc14a1은 RPKM 값이 레이저군 54.45, 구리+레이저군 13.81로 구리+레이저군에서 감소되었으며,  $\log_2(FC)$  값은 -1.97로 감소되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 감소되었다. Tgfa는 RPKM 값이 레이저군 19.24, 구리+레이저군 77.05로 구리+레이저군에서 증가되었으며,  $\log_2(FC)$  값은 2.24로 유의하게 증가되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다.



**6) 광역동치료가 암조직 정단부 원형질막 구성 요소 관련 유전자 발현에 미치는 영향 (Changes in expression of genes related to apical plasma membrane components in tumor tissue after photodynamic therapy)**

CT26 tumor bearing mouse에 광역동치료를 시행하고 24시간 경과 후 종양 조직에서 RNA를 분리하여 mRNA-sequencing 법으로 정단부 원형질막 구성요소 관련 유전자 6가지의 발현량 차이를 비교한 결과는 Table 5와 같다. Desmoglein 1 alpha(Dsg1a) 유전자는 RPKM 값이 대조군 5.87, 레이저군 37.42로 레이저군에서 값이 증가되고, log2(FC) 값이 2.67로 유의하게 증가되어 레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다. Desmoglein 2(Dsg2)는 RPKM 값이 대조군 0.70, 레이저군 2.56으로 레이저군에서 증가되었으나 log2(FC) 값은 1.87로 유의성이 없었다. PATJ, crumbs cell polarity complex component(Patj)는 RPKM 값이 대조군 0.92, 레이저군 7.52으로 레이저군에서 증가되었으며, log2(FC) 값은 3.02로 유의하게 증가되어 레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다. Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 19(Slc6a19)는 RPKM 값이 대조군 0.27, 레이저군 2.65으로 레이저군에서 증가되었으며, log2(FC) 값은 3.28 로 증가되었으나 유의성이 없었다. Solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2(Slc34a2)는 RPKM 값이 대조군 0.34, 레이저군 3.13로 레이저군에서 값이 증가 되었으며, log2(FC) 값은 3.18로 유의하게 증가되어 레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다.

**7) 구리이온이 광역동치료에 의한 종양조직 정단부 원형질막 구성 요소 관련 유전자 발현에 미치는 영향 (Effect of copper ion on the expression of genes related to the apical plasma membrane components of cancer tissues by photodynamic therapy)**

CT26 tumor bearing mouse에 구리를 투여하고 광역동치료 시행 24시간 경과 후 종양 조직에서 RNA를 분리하여 mRNA-sequencing 법으로 정단부 원형질막 구성요소 관련 유전자 8가지의 발현량 차이를 비교한 결과는 Table 6과 같다. Dsg1a 유전자는 RPKM 값이 대

조군 5.87, 구리+레이저군 116.46으로 구리+레이저군에서 값이 증가되고,  $\log_2(FC)$  값이 4.30으로 유의하게 증가되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다. Dsg2는 RPKM 값이 대조군 0.70, 구리+레이저군 10.42로 구리+레이저군에서 유의하게 증가되었고,  $\log_2(FC)$  값이 3.89으로 유의하게 증가되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다. Patj는 RPKM 값이 대조군 0.92, 구리+레이저군 30.93으로 구리+레이저군에서 증가되었으며,  $\log_2(FC)$  값은 5.06으로 유의하게 증가되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다. Slc6a19는 RPKM 값은 대조군 0.27, 구리+레이저군 11.82로 구리+레이저군에서 증가되었으며,  $\log_2(FC)$  값은 5.44로 유의하게 증가되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다. Solute carrier family 9(sodium/hydrogen exchanger), member 3 regulator 1(Slc9a3r1)은 RPKM 값은 대조군 5.58, 구리+레이저군 38.97로 구리+레이저군에서 증가되었으며,  $\log_2(FC)$  값은 2.80으로 유의하게 증가되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다. Slc34a2는 RPKM 값은 대조군 0.34, 구리+레이저군 28.43으로 구리+레이저군에서 값이 증가 되었으며,  $\log_2(FC)$  값은 6.36으로 유의하게 증가되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다. TRAF2 and NCK interacting kinase(Tnik)는 RPKM 값이 대조군 4.27, 구리+레이저군 57.30으로 구리+레이저군에서 값이 증가 되었으며,  $\log_2(FC)$  값은 3.74로 유의하게 증가되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다.

**8) 레이저조군과 레이저+구리군의 광역동 치료에 의한 정단부 원형질막 구성 요소 관련 유전자 발현의 차이 분석(Differentially expressed gene analysis related to apical plasma membrane components in tumor tissues of lazer versus lazer+copper groups)**

CT26 tumor bearing mouse에서 구리가 광역동치료에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 시행 24시간 경과 후 종양 조직에서 RNA를 분리하여 mRNA-sequencing 법으로 정단부 원형질막 구성요소 관련 유전자 7가지의 발현량을 측정하여 레이저군과 구리+레이저군을 비교한 결과는 Table 7과 같다. Dsg1a 유전자의 RPKM 값은 레이저군 37.42, 구리+레이저군 116.46으로 구리+레이저군에서 값이 증가되었으나  $\log_2(FC)$  값이 1.63으로 유의성이 없었다.

Desmoglein 1 beta(Dsg1b) 유전자의 RPKM 값은 레이저군 10.11, 구리+레이저군 38.66  
 으로 구리+레이저군에서 값이 증가되었으나  $\log_2(FC)$  값이 1.93으로 유의성이 없었다.  
 Dsg2는 RPKM 값이 레이저군 2.56, 구리+레이저군 10.42로 구리+레이저군에서 증가되었  
 고,  $\log_2(FC)$  값이 2.02 이었으나 유의성이 없었다. Slc6a19는 RPKM 값이 레이저군  
 2.65, 구리+레이저군 11.82로 구리+레이저군에서 증가되었으며,  $\log_2(FC)$  값은 2.15  
 이었으나 유의성이 없었다. Slc9a3r1은 RPKM 값이 레이저군 6.68, 구리+레이저군  
 38.97로 구리+레이저군에서 증가되었으며,  $\log_2(FC)$  값은 2.54으로 유의하게 증가되어  
 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다. Tnik는 RPKM 값이 레이저군 10.81,  
 구리+레이저군 57.30으로 구리+레이저군에서 값이 증가 되었으며,  $\log_2(FC)$  값은 2.40로  
 유의하게 증가되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다.

### **9) 광역동치료가 암조직 세포 용해 관련 유전자 발현에 미치는 영향(Changes in expression of genes related to the cytolysis in tumor tissue after photodynamic therapy)**

CT26 tumor bearing mouse에 광역동치료를 시행하고 24시간 경과 후 종양 조직에서  
 RNA를 분리하여 mRNA-sequencing 법으로 세포 용해 관련 유전자 5가지의 발현량 차이  
 를 비교한 결과는 Table 8과 같다. Granzyme C(Gzmc) 유전자는 RPKM 값이 대조군  
 0.91, 레이저군 0.61로 레이저군에서 값이 감소 되었으나,  $\log_2(FC)$  값이 -0.56 으로  
 유의성은 없었다. Granzyme D(Gzmd)는 RPKM 값이 대조군 0.12, 레이저군 0.08로 레이저  
 군에서 값이 감소되었으나  $\log_2(FC)$  값이 -0.53 으로 유의성은 없었다. Granzyme  
 E(Gzme)는 RPKM 값이 대조군 0.13, 레이저군 0으로 레이저군에서 값이 감소되었rh,  
 $\log_2(FC)$  값은  $-\ln f$  로 나타났으나 유의성은 없었다. Granzyme F(Gzmf)는 RPKM 값이 대  
 조군 0.69, 레이저군 0으로 레이저군에서 값이 감소되었고,  $\log_2(FC)$  값이  $-\ln f$  로 나  
 타났으나 유의성은 없었다. Granzyme G(Gzmg)는 RPKM 값이 대조군 0, 레이저군 0 으로  
 대조군과 레이저군의 유전자 발현량 차이가 없었다.

**10) 구리이온이 광역동치료에 의한 종양조직 세포 용해 관련 유전자 발현에 미치는 영향 (Effect of copper ion on the expression of genes related to the cytolysis of cancer tissues by photodynamic therapy)**

CT26 tumor bearing mouse에 구리를 투여하고 광역동치료 시행 24시간 경과 후 종양 조직에서 RNA를 분리하여 mRNA-sequencing 법으로 세포 용해 관련 유전자 5가지의 발현량 차이를 비교한 결과는 Table 9과 같다. Gzmc 유전자는 RPKM 값이 대조군 0.91, 구리+레이저군 8.29로 구리+레이저군에서 RPKM 값이 증가 되었고,  $\log_2(FC)$  값이 3.18로 증가되었으나 유의성은 없었다. Gzmd는 RPKM 값이 대조군 0.12, 구리+레이저군 13.27로 구리+레이저군에서 RPKM 값이 증가 되었고  $\log_2(FC)$  값은 6.71로 유의하게 증가되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가되었다.

Gzme는 RPKM 값이 대조군 0.13, 구리+레이저군 5.17로 구리+레이저군에서 RPKM 값이 증가 되었고  $\log_2(FC)$  값은 5.28로 유의하게 증가되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가되었다. Gzmf는 RPKM 값이 대조군 0.69, 구리+레이저군 5.17로 구리+레이저군에서 RPKM 값이 증가되었고,  $\log_2(FC)$  값이 5.28 로 유의하게 증가되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다. Gzmg는 RPKM 값이 대조군 0, 구리+레이저군 13.70으로 구리+레이저군에서 유의하게 증가되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다.

**11) 레이저군과 레이저+구리군의 광역동 치료에 의한 세포 용해 관련 유전자 발현의 차이 분석 (Differentially expressed gene analysis related to the cytolysis in tumor tissues of lazer versus lazer+copper groups)**

CT26 tumor bearing mouse에서 구리가 광역동치료에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 시행 24시간 경과 후 종양 조직에서 RNA를 분리하여 mRNA-sequencing 법으로 세포 용해 관련 유전자 5가지의 발현량을 측정하여 레이저군과 구리+레이저군을 비교한 결과는 Table 10과 같다.

Gzmc 유전자는 RPKM 값이 레이저군 0.61, 구리+레이저군 8.29로 구리+레이저군에서 RPKM 값이 증가 되었고,  $\log_2(FC)$  값이 3.74로 유의하게 증가되어 구리+ 레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다. Gzmd는 RPKM 값이 레이저군 0.08, 구리+레이저군 13.27로 구리+레이저군에서 RPKM 값이 증가 되었고  $\log_2(FC)$  값은 7.24로 유의하게 증가되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다. Gzme는 RPKM 값이 레이저군 0, 구리+레이저군 5.17로 구리+레이저군에서 RPKM 값과  $\log_2(FC)$  값이 유의하게 증가 되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다. Gzmf는 RPKM 값이 레이저군 0, 구리+레이저군 17.44로 구리+레이저군에서 RPKM 값과  $\log_2(FC)$  값이 유의하게 증가되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되었다. Gzmg는 RPKM 값이 레이저군 0, 구리+레이저군 13.70으로 구리+레이저군에서 RPKM 값과  $\log_2(FC)$  값이 유의하게 증가되어 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가되었다.

## 4. 고찰(Discussion)

본 연구는 구리이온이 광역동 치료에 미치는 영향을 알기 위하여 생쥐 대장암 모델 (CT26 cancer bearing mouse model)을 이용하여 실험을 실행한 결과 구리이온이 광역동 치료에 의한 항암효과를 증가시키는 것으로 나타났다. CT26 세포는 Balb/C mouse에서 발암물질(N-nitroso-N-methylurethane)에 의하여 유발된 대장암 조직에서 확립된 생쥐 대장암 세포주로서 대장암 모델 실험에 많이 이용되고 있다(37,38). 본 실험에서 배양한 CT26 세포를 Balb/c 종 생쥐의 피하에 주사하여 암종이 생성되어 지속적으로 성장함을 확인하였고, 적절한 크기의 암종을 가진 생쥐를 생쥐 대장암 모델로 사용하였다.

광역동 치료효과를 알아보기 위해서 대장암 모델 생쥐에 포토론(2.5 mg/kg BW)을 주사하고 2시간 후 레이저(660nm, 80J/Cm<sup>2</sup>)를 조사한 레이저군의 종양용적은 실험 시작할 때와 비교하면 12일 경과 시 154% 가 증가되어 광역동 치료를 시행하지 않은 대조군의 종양용적 증가율 420% 에 비하여 레이저군의 종양용적 증가율이 더 적어서 광역동 치료에 의해서 종양의 성장이 억제됨을 알 수 있다. 그러나 레이저군의 종양용적이 광역동 치료 후 12일에 154% 가 증가되어 본 실험에서 실시한 조건의 광역동 치료는 항암 치료 효과가 충분하다고 할 수는 없다. 광역동 치료는 광민감제에 광선을 조사하면 광에너지에 의해서 광민감제가 활성화되고, 활성화된 광민감제는 주로 산소분자를 활성산소로 활성화시켜 활성산소에 의해서 효과가 나타나기 때문에 광역동 치료에서 광민감제, 광원 및 산소가 매우 중요한 요소라 할 수 있다. 암치료에 사용되는 광민감제는 적혈구의 헴(heme)을 구성하는 폴피린에서 유도된 폴피린(porphyrin)계 물질이 1세대 광민감제로 개발되었는데, 러시아에서 상품명 포토젠(Photogem)으로 개발되었고(37), 캐나다에서 상품명 포토프린(Photofrin)으로 개발되었으며(38), 독일에서는 상품명 포토산(Photosan)으로 개발 되었다(17, 18). 1세대 폴피린계 광민감제는 파장 600nm 대역의 광선에 의해서 활성화되는데, 광역동 치료 시 광선은 조직의 표면에 조사하기 때문에 암조직 내부까지

광선이 도달하려면 광선의 조직 침투력이 높아야 하는데, 광선은 파장이 길수록 광선의 조직 침투력은 증가하므로, 암 치료를 위한 광역동 치료에는 파장이 긴 광선이 더 유리하다(17). 또한 1세대 폴피린계 광민감제는 배출되는 시간이 길어서 2-3주 동안 체내에 남아있기 때문에 빛에 노출되면 노출부위에 광손상에 의한 부작용이 나타날 가능성이 있어서, 체내에서 완전히 배출될 때까지 빛으로부터 완전 격리시켜야 하기 때문에 생활이 매우 불편이 매우 크다(17). 1세대 폴피린계 광민감제의 단점을 보강하기 위하여 2세대 광과민 물질이 클로로필(chlorophyll)로부터 개발된 클로린(chlorine) 유도체인데 이들 2세대 광과민제는 투여 후 체외 배출이 빠르고, 더 긴 파장의 광선으로 활성화된다(39).

클로린 유도체인 클로린 e6 는 파장 660nm 빛에 의해서 활성화되는 광과민제로서 광역동 치료나 진단에 많이 이용되고 있다(39). Kostenich GA 등(1994)(40)은 클로린 e6의 복강 주사에 의한 LD50 은 생쥐(C3H mice)에서  $189 \pm 9$  mg/kg BW, 흰쥐(Wistar white rats)에서  $113 \pm 18$  mg/kg BW 이며, 광역동 치료에 사용하는 용량은 1-10 mg/kg BW 라고 하였다. 클로린 e6는 지용성 물질로서 체내에 투여 시 배출시간이 길기 때문에, 클로린 e6에 수용성물질 폴리비닐 피롤리돈(polyvinylpyrrolidone)과 중합시켜 배출이 잘되는 포토론(chlorin e6-polyvinylpyrrolidone)을 만들었다. 포토론은 파장 660nm 레이저 조사로 활성화되고, 수용성 특징을 가지고 있어서 투여 후 24시간이면 대부분 배출된다(41). Ramaswamy 등(2005)(42)은 사람 비인두암(nasopharyngeal carcinoma) 세포주를 이용한 이종이식(xenograft) 생쥐 실험에서 포토론이 암조직에서 높은 농도로 측정된다고 하였고, Chin 등(2007)(43)은 사람의 폐암 세포주를 이용한 이종이식(xenograft) 생쥐에 포토론을 이용한 광역동 치료 실험에서 레이저 조사 48 시간 후 암 조직에 괴사가 나타나서 포토론을 이용한 광역동 치료가 암 치료 효과가 있다고 하였는데, 본 실험에서는 레이저군의 종양용적이 광역동 치료 후 12일에 15% 가 증가되어 대조군의 종양용적 증가율 420% 에 비하여 더 적었고, 광역동 치료 후 12일에 종양 용적

은 레이저군  $517 \pm 121 \text{ mm}^3$ , 대조군  $952 \pm 201 \text{ mm}^3$  로 레이저군의 종양 용적은 대조군의 54% 로 감소되어 포토론에 의한 광역동 치료에 의해서 항암 효과가 나타남을 알 수 있다. Ali-Seyed M 등(2011)(44)은 CT26 암세포를 배양하고 배양액에 포토론을 첨가하면 암세포의 사립체(mitochondria), 용소체(lysosome) 및 골지체(golgi app)에서 검출되고 핵(nucleus)에서는 거의 발견되지 않는다고 하여, 포토론에 의한 광역동 치료 효과도 사립체나 용소체의 손상에 의한 세포손상에 의해서 나타난다고 알려져 있다(44).

포토론에 의한 광역동 치료 효과는 주로 활성화된 포토론에 의해서 생성된 반응성 산소종에 의해서 나타나는 것으로 알려져 있는데, 반응성 산소종 중 반응성이 가장 강한 것은 히드록실 라디칼(hydroxy radicals)이다(45). 히드록실 라디칼은 과산화수소나 superoxide 로 부터 Harver-Wise 반응이나, 펜턴 반응에 의해서 생성될 수 있는데, 펜턴 반응은 과산화수소로부터 히드록실 라디칼이 생성되는 반응으로 구리나 철과 같은 금속이온의 촉매로 일어난다(46). Kuo 등(2002)(47)은 사람의 대장암, 폐암 및 유방암에서 구리의 농도가 더 높다고 하였는데, 구리의 농도가 높은 암세포에 반응성 산소의 생성량을 증가시키면 구리의 촉매에 의한 드록실 라디칼 생성량도 증가 될 것으로 생각된다. 본 실험에서 구리이온을 주사한 후 광역동 치료를 실시하고 종양의 용적 변화를 측정 한 결과 레이저 조사 12일째에 종양의 용적은 대조군 420 % 증가, 레이저군 154% 증가, 구리+레이저군 53% 감소로 나타나서, 레이저군에 비하여 구리+레이저군의 종양 용적이 현저히 감소되어 구리 투여로 광역동 치료에 의한 항암 치료 효과가 증가됨을 알 수 있었다. 구리는 혈관신생(angiogenesis)에 관여하며 혈관신생은 암조직의 성장이나 암 전이에 필수적인 것으로 알려져 있어서 구리의 작용을 억제하면 암 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있는데(48), Pan Q 등(2002)(48)은 유방암 이종이식 모델 생쥐(breast cancer xenograft in nude mice)에서 4-티오 몰리브덴 산(tetrathiomolybdate)를 투여하여 구리를 결핍시키면 암의 성장이 억제된다고 하였다. Weng YQ 등(2007)(49)은 폴피린계 광민감제를 구리와 결합시킨 구리-광민감제(copper-photosensitizer)를 만들었고, Al-Omar i S와 Al-Noaimi M(2010)(50)은 구리-광민감제가 암세포에서 더 잘 감지된



다고 하였으며, Al-Omari S(2013)(51)는 구리-광민감제를 사용하여 광역동 치료를 시행하면 항암효과가 증가 된다고 하였다. 본 실험에서는 포토론 복강주사 30 분 후 구리를 투여하고 광역동치료를 실시한 구리+레이저군에서 구리를 투여하지 않은 레이저군에 비하여 종양용적 감소 효과가 증가되어 구리이온 투여가 광역동 치료 효과를 증가시키는 것으로 나타났다. 암세포에 구리의 농도가 증가된 상태에서 광역동 치료를 실시하면 광민감제에 의해서 생성된 반응성 산소가 구리의 촉매작용으로 히드록실 라디칼로 전환될 것으로 생각된다. 히드록실 라디칼은 반응성 산소종 중에서 반응성이 가장 강하며, 핵산, 단백질 및 지질의 산화를 유발 할 수 있는 것으로 알려져 있는데, 본 실험에서 레이저 조사 24시간 후 종양조직의 TBARS량은 대조군에 비하여 레이저군에서 190 %가 증가되어, 광역동 치료에 의해서 종양조직에서 지질과산화물이 증가 됨을 보여주고 있다. 지질과산화물은 불포화지방산이 산화되어 일어나는 지질과산화 반응산물로서 세포에서 불포화지방산은 막지질 구성성분으로서 세포에서 지질과산화물의 증가는 세포의 손상과 밀접한 연관이 있다(52). 지질 과산화반응은 반응성 산소종에 의해서 일어나는 세포막 손상 반응으로서 세포막 지질이 과산화되면 세포막 기능이 저하되어 세포사멸이 일어날 수 있기 때문에 광역동 치료에 의한 종양조직 지질과산화물량의 증가는 암세포 사멸과 밀접한 연관이 있으며 광역동 치료에 의한 항암효과와도 직접적인 연관이 있을 것으로 생각된다. 또한 구리+레이저군의 종양 조직 TBARS 량은 레이저군보다 68%가 더 증가되었는데, 암세포에서 지질과산화물이 증가되면 암세포의 사멸도 증가 될것으로 추측되기 때문에 구리이온은 광역동 치료에 의한 항암치료 효과를 증가시키는 작용을 하는 것으로 추측된다. 구리는 팬턴반응에 의해서 과산화수소나 슈퍼옥사이드 (superoxide) 등으로부터 반응성 산소종 중에서 반응성이 가장 강한 히드록실 라디칼 생성을 촉진시키며, 암조직에 구리의 농도가 더 높은 것으로 알려져 있기 때문에, 구리이온 투여 후 광역동 치료를 시행하면 광역동 반응으로 광민감제로 부터 생산된 반응성 산소종이 증가된 구리에 의해서 히드록실 라디칼 생성량이 더 증가되어 세포막 지질의 과산화반응을 유발할 것으로 추측된다. 이러한 실험 결과로서 구리이온은 지질과산화물을

증가시키는 것으로 나타났는데, 지질과산화 반응은 불포화 지방산에서 일어나는 반응이며, 불포화지방산은 세포 막을 구성하는 막지질이므로 세포 지질과산화물의 증가는 세포막 기능의 저하를 초래 할 수 있다 (52). 세포막은 세포내부와 외부를 차단하는 지질과 세포의 기능 유지를 위해서는 물질의 이동과 정보를 감지하는 단백질로 구성되어 있는데, 세포막 지질이나 단백질의 기능이 저하되거나 세포는 세포사멸(cell death)이 초래될 수 있다(53).

상피세포(epithelial cell)는 세포막은 세포와 세포사이의 밀착 접합부(tight junction)를 기준으로 정단 부위(apical domain)와 기저측 부위(basolateral domain)로 나눌 수 있으며 이들 부위를 구성하는 단백질이 서로 다르다(54). 본 실험에서 광역동 치료가 세포막 구성 단백질의 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 종양 조직에서 RNA를 분리해서 mRNA-sequencing 법으로 비교한 결과, 기저측부 원형질막 구성단백질 중 암의 발생이나 성장 및 전이에 관여하는 Atp2b4, Hspa1a, Ddr1, Prom2, Nkd2, Slc38a3, Slc4a1, Slc14a1, St14, Tgfa 및 Cldn4 유전자의 발현량 차이가 나타났다.

Atp2b4 단백질은 세포막에서 칼슘을 배출시켜서 세포내 칼슘량 조절에 관여하는 단백질인데, 대장암에서 유전자 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다(55). 본 실험에서 Atp2b4 RNA-seq 분석 결과 RPKM 값이 대조군 3.81, 레이저군 12.54, 구리+레이저군 29.35로 레이저군에서 값이 증가되었으나 유의성이 없었고, 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되어 구리가 광역동 치료에 의한 Atp2b4 유전자 발현을 촉진하는 것으로 나타났다. Hspa1a는 heat shock protein 70 family로서 암세포의 성장과 전이에 관여하는 것으로 알려져 있는데(56), 본 실험에서 레이저군에서 유전자 발현이 증가되었으나, 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가되지 않아서, 구리이온이 광역동 치료에 의한 Hspa1a 유전자 발현을 억제하는 것으로 나타났다. Ddr1 단백질은 암세포의 성장에 관여하며, 암세포와 주위 환경과의 정보교환에 관여하는 것으로 알려져 있는데 (57), RNA-seq 분석 결과 RPKM 값이 대조군 3.83, 레이저군 11.75, 구리+레이저군 33.93으로 레이저군에서 값이 증가되었으나 유의성이 없었고, 구리+레이저군에서 유전

자 발현량이 증가되어, 구리이온이 광역동 치료에 의한 Ddr1 유전자 발현을 촉진하는 것으로 나타났다.

Prom2 유전자는 상피세포 암에서 발현이 증가되는 것으로 알려진 줄기세포 관련 유전자로 (58), 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가 되어, 구리이온이 광역동 치료에 의한 Prom2 유전자 발현을 촉진하는 것으로 나타났다. Nkd2는 암세포 증식에 관여하며, Yang 등(2016)(59)은 대장암에서 Nkd2 유전자 발현을 억제하면 암의 성장이 증가된다고 하였는데, 본 실험에서 RNA-seq 분석 결과 RPKM 값이 대조군 0.95, 레이저군 13.56으로 레이저군에서 유전자 발현이 증가되었고, 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가되지 않아, 구리이온이 광역동 치료에 의한 Nkd2 유전자 발현을 억제하는 것으로 나타났다.

Slc38a3는 글루타민(L-glutamine) 세포막 이동 통로로서 작용하는 단백질로서 폐암세포의 전이를 촉진하는 작용을 하는 것으로 알려져 있는데(60), 본 실험에서 RNA-seq 분석 결과 RPKM 값이 대조군 0.14, 레이저군 4.89으로 레이저군에서 유전자 발현이 증가되었고, 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가되지 않아, 구리이온이 광역동 치료에 의한 Slc38a3 유전자 발현을 억제하는 것으로 나타났다. Slc4a1은 염화물/중탄산염 음이온 교환기(chloride/bicarbonate anion exchanger)로서 작용하는 단백질로서 유방암발생을 촉진하는 작용을 하는 것으로 알려져 있는데(61), 본 실험에서 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가되어, 구리이온이 광역동 치료에 의한 Slc4a1 유전자 발현을 촉진하는 것으로 나타났다.

Slc14a1은 요소(urea)의 세포막 이동에 관여하는 단백질로서 비뇨기 암 발생에 작용을 하는 것으로 알려져 있는데(62), 본 실험에서 레이저군에서 유전자 발현량의 변화가 없었고, 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 감소되어, 구리이온은 광역동 치료에 의한 Slc14a1 유전자 발현을 억제하는 것으로 나타났다. St14는 장 상피세포 장벽(intestinal epithelial barrier)기능 강화에 관여하는 matriptase 유전자로서 대장암 발생에 관여하는 것으로 알려져 있는데(63), 본 실험에서 RNA-seq 분석 결과 RPKM 값이 대조군 1.68, 레이저군 25.93, 구리+레이저군 86.48 로, 레이저군과 구리+레이저군

에서 모두 유전자 발현량이 증가되었으나, 구리+레이저군에서 유전자 발현량 증가가 더 커서, 구리이온은 광역동 치료에 의한 St14 유전자 발현을 촉진하는 것으로 생각된다. Tgfa는 암 유발에 관여하는 것으로 알려져 있는데(64), 본 실험에서 RNA-seq 분석 결과 RPKM 값이 대조군 3.20, 레이저군 16.24, 구리+레이저군 77.05로, 레이저군과 구리+레이저군에서 모두 유전자 발현량이 증가되었으나, 구리+레이저군에서 유전자 발현량 증가가 더 커서 구리이온은 광역동 치료에 의한 Tgfa 유전자 발현을 촉진하는 것으로 생각된다. Cldn4는 암세포에서 발현이 증가되는 것으로 알려져 있는데(65), 본 실험에서 RNA-seq 분석 결과 레이저군에서 유전자 발현량의 차이는 없었으나, 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 유의하게 증가되어 구리이온이 광역동 치료에 의한 Cldn4 유전자 발현을 촉진하는 것으로 생각된다. 본 실험결과 광역동 치료는 기저측부 원형질막 구성 단백질의 유전자 발현에 영향을 미치는 것으로 나타났는데, 레이저군에서 Hspa1a, Nkd2, St14 및 Tgfa 유전자 발현량이 증가되었고, 구리+레이저군에서 Atp2b4, Ddr1, Nkd2, Prom2, Slc4a1, Slc14a1, St14 및 Tgfa 유전자 발현량이 증가되었으며, 구리+레이저군은 구리군에 비하여 Cldn4, Ddr1, Prom2, Slc4a1 및 Tgfa 유전자 발현량이 증가되었고, Slc14a1 유전자는 발현이 감소되어 구리이온이 광역동치료에 의한 원형질막 구성단백질의 유전자 발현 영향을 미치는 것으로 추측된다. Atp2b4, Hspa1a, Ddr1, Prom2, Nkd2, Slc38a3, Slc4a1, Slc14a1, St14, Tgfa 및 Cldn4 유전자는 암의 발생이나 성장 및 전이에 관여하는 것으로 알려져 있기 때문에 광역동 치료시 구리이온에 의해서 이들 유전자 발현의 변화가 더 크기 때문에 암세포에 구리이온이 더 큰 영향을 준다고 할 수 있다. 구리이온이 광역동 치료에 의한 종양의 크기를 감소시켰기 때문에 구리이온은 광역동 치료의 치료 효과를 증가시키는 작용을 하는 것으로 생각되는데, 구리의 광역동 치료의 치료 효과를 증가작용과 기저측부 원형질막 구성단백질의 유전자 발현 변화의 상관 관계는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 실험에서 광역동치료가 세포막 구성 단백질의 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 종양 조직에서 RNA를 분리해서 mRNA-sequencing 법으로 비교한 결과 정단부 원형질막 구성단백질 중 Dsg1a, Dsg2, Patj, Slc6a19, Slc34a2, Slc9a3r1 및 Tnik 유전자의 발현량 차이가 나타났다.

Dsg1a 는 피부의 장벽기능에 중요한 역할을 하는 단백질로서 알려져 있는데(66), 본 실험에서 RNA-seq 분석 결과 RPKM 값이 대조군 5.87, 레이저군 37.42, 구리+레이저군 116.46로, 레이저군과 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 유의하게 증가되었으나, 구리+레이저군에서 유전자 발현량 증가가 더 커서 구리가 광역동 치료에 의한 Dsg1a 유전자 발현을 촉진하는 것으로 생각된다. Dsg2 는 피부의 장벽기능에 중요한 역할을 하는 단백질로 대장암세포의 성장을 촉진하는 것으로 알려져 있는데(67), 본 실험에서 RNA-seq 분석 결과 RPKM 값이 대조군 0.70, 레이저군 2.56, 구리+레이저군 10.47로, 레이저군에서 유전자 발현량의 변화가 없었으나, 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 유의하게 증가되어 구리이온은 광역동 치료에 의한 Dsg2 유전자 발현을 촉진하는 것으로 생각된다. Patj 는 피부의 장벽기능과 세포의 극성(polarity) 형성 조절에 중요한 역할을 하는 단백질로 알려져 있는데(68), 본 실험에서 RNA-seq 분석 결과 RPKM 값이 대조군 0.92, 레이저군 7.52, 구리+레이저군에서 30.93으로 레이저군과 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가되었으나, 구리+레이저군에서 유전자 발현량 증가가 더 커서 구리이온이 광역동 치료에 의한 Patj 유전자 발현을 촉진하는 것으로 생각된다. Slc6a19 는 중성아미노산 이동 통로 역할을 하는 단백질로 알려져 있는데(69), 본 실험에서 RNA-seq 분석 결과 RPKM 값이 대조군 0.27, 레이저군 2.65, 구리+레이저군 11.82로, 레이저군에서 유전자 발현량의 변화가 없었으나, 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가되어 구리이온이 광역동 치료에 의한 Slc6a19 유전자 발현을 촉진하는 것으로 생각된다. Slc34a2 는 인(phosphate) 이동 통로 역할을 하는 단백질로 암세포의 증식과 전이에 작용하는 것으로 알려져 있는데(70), 본 실험에서 RNA-seq 분석 결과 RPKM 값이 대조군 0.34, 레이저군 3.13, 구리+레이저군 28.43으로, 레이저군에서 유전자 발현량의 변화가 없었으나, 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가되어 구리이온이 광역동 치료에 의한 Slc6a19 유전자 발현을 촉진하는 것으로 생각된다. Slc9a3r1 는 암세포의 autophage를 조절하는 작용하는 것으로 알려져 있는데(71), 본 실험에서 RNA-seq 분석 결과 레이저군에서 유전자 발현량의 변화가 없었으나, 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가되어

구리이온이 광역동 치료에 의한 Slc9a3r1 유전자 발현을 촉진하는 것으로 생각된다. Tnik 는 대장암세포의 증식에 작용하는 것으로 알려져 있는데(72), 본 실험에서 RNA-seq 분석 결과 레이저군에서 유전자 발현량의 변화가 없었으나, 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가되어 구리이온이 광역동 치료에 의한 Tnik 유전자 발현을 촉진하는 것으로 생각된다. 본 실험결과 광역동치료는 정단부 원형질막 구성단백질 유전자중 Dsg1a, Pat j 및 Slc34a2 유전자 발현량이 레이저군에서 증가되었고, 구리+레이저군에서 Dsg1a, Dsg2, Pat j, Slc6a19, Slc9a3r1, Slc34a2 및 Tnik 유전자 발현량이 증가되어 구리+레이저군에서 발현이 증가되는 유전자가 더 많고, 증가되는 비율도 더 높았으며, 구리+레이저군은 구리군에 비하여 Dsg1a, Dsg2, Slc6a19, Slc9a3r1 및 Tnik 유전자 발현량이 증가되어 광역동치료시 구리이온은 원형질막 정단부 구성 단백질의 유전자 발현에 미치는 영향이 큰 것으로 생각된다. 이러한 원형질막 구성 단백질의 유전자 발현량 변화는 암세포의 성장이나 사멸과 연관이 있을 것으로 추측되기 때문에 광역동치료시 구리이온에 의한 원형질막 유전자 발현의 변화는 세포독성의 증가와 연관이 있을 것으로 추측되며 이의 기전규명을 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 그랜자임(granzyme)은 자연살해세포(natural killer cell) 이나 세포독성 티림파구(cytotoxic T cell)로부터 분비되어 세포사멸에 관여하는 serine protease 이다(73). 본 실험에서 광역동치료에 의한 그랜자임 유전자 발현에 미치는 구리이온의 영향을 관찰하기 위하여 종양 조직에서 RNA를 분리해서 mRNA-sequencing 법으로 비교한 결과 Gzmc, Gzmd, Gzme, Gzmf 및 TGzmg 유전자의 발현량 차이가 나타났다. Gzmc는 티림파구에서 분비되며 caspase 비의존성 세포사에 관여하는 것으로 알려져 있는데(74), 본 실험에서 레이저군에서 Gzmc 유전자 발현량의 변화가 없었으나, 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가되어 구리이온이 광역동 치료에 의한 Gzmc 유전자 발현을 촉진하는 것으로 생각된다. Gzmd는 비만세포(mast cell) 활성화에 관여하는 것으로 알려져 있는데(75), 본 실험에서 레이저군은 Gzmd 유전자 발현량의 변화가 없었으나, 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가되어 구리이온이 광역동 치료에 의한 Gzmd 유전자 발현을 촉진하는 것으로 생각된다.

Gzme는 티 임파구에서 분비되는 것으로 알려져 있는데(73), 본 실험에서 RNA-seq 분석 결과 레이저군은 Gzme 유전자 발현량의 변화가 없었으나, 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가되어 구리이온이 광역동 치료에 의한 Gzme 유전자 발현을 촉진하는 것으로 생각된다. Gzmf는 티 임파구에서 분비되는 것으로 알려져 있는데(76), 본 실험에서 레이저군은 Gzmf 유전자 발현량의 변화가 없었으나, 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가되어 구리이온이 광역동 치료에 의한 Gzmf 유전자 발현을 촉진하는 것으로 생각된다. Gzmg는 티 임파구에서 분비되는 것으로 알려져 있는데(76), 본 실험에서 레이저군은 Gzmg 유전자 발현량의 변화가 없었으나, 구리+레이저군에서 유전자 발현량이 증가되어 구리이온이 광역동 치료에 의한 Gzmg 유전자 발현을 촉진하는 것으로 생각된다.

그랜자임은 비루스에 감염된 세포나 암세포를 사멸시키기 위해서 면역세포에서 분비되는 단백질 분해 효소로서 방어기전에 중요한 작용을 하는데, 본 실험에서 광역동치료에 의해서 그랜자임의 유전자 발현에 변화가 없어서 광역동 치료가 그랜자임 유전자 발현에 미치는 영향은 크지 않은 것으로 생각된다. 그러나 구리이온 투여후 광역동 치료를 실시한 군에서 그랜자임의 유전자 발현이 증가되었는데, 이러한 그랜자임 유전자 발현의 증가는 암세포에 대한 사멸을 증가시킬 것으로 추측된다. 따라서 구리이온에 의한 그랜자임 유전자 발현의 증가는 암세포의 사멸을 증가시켜 항암력을 강화시키는 작용을 할 것으로 추정된다. 구리이온에 의한 그랜자임 유전자 발현의 증가는 암세포의 사멸을 초래할 것으로 생각되며, 이는 항암작용 증가와 연관이 있을 것으로 추정된다. 이상의 실험결과 암생쥐 모델(CT26 cell)에서 구리이온을 포토론을 이용한 광역동 치료에 병용하면 종양의 용적 감소가 더 증가하고, 지질과산화물이 증가하며, 암의 발생과 성장 및 전이 관련 세포막 단백질 유전자의 발현이 변화되며, 그랜자임 유전자 발현이 증가하여 항암효과가 증가하는 것으로 나타났다. 구리이온의 이러한 항암효과 증강 작용은 구리이온이 ROS의 생성을 증가시켜서 세포막 지질과산화 유발에 의한 세포손상을 증가시키는 작용과 암조직 주변에서 면역세포의 작용에 의한 세포사멸 작용으로 인하여 나타나는 작용이 암치료에 상승효과를 나타낸 것으로 생각된다. 광역동 치료에서 구리이온의 병용으로 인한 암치료 상승효과는 암치료분야에서 매우 유용하게 이용될 수 있기 때문에 이를 임상적으로 이용하기 위해서는 작용기전과 독성 등에 관한 지속적인 연구가 필요할 것으로 추측된다.

## 5. 요약(Summary)

**실험 배경** : 대장암은 대장의 상피세포에서 발생하는 암으로 우리나라 사람에서 발생하는 암중에서 3번째로 발병률이 높다. 대장암의 치료는 수술요법, 방사선 요법, 화학요법 및 면역요법 등으로 시행하고 있으며, 생존율을 높이기 위하여 몇 가지 치료법을 병행하여 시행하는 복합적 치료요법이 시행되고 있다. 대장암 치료 후 생존율의 증가는 크지 않기 때문에 새로운 치료방법의 개발이 계속적으로 시도되고 있다. 광역동 요법은 광민감제와 빛을 이용하는 항암 치료법으로 화학요법이나 방사선요법에 비하여 부작용이 매우 적고, 병기에 관계없이 시행이 가능하며, 치료과정에서 환자에게 스트레스가 매우 적은 비침윤적 요법이기 때문에 암치료분야에서 대안적인 새로운 치료법으로 관심을 받고 있다. 그러나 광역동 요법에 의한 항암효과가 제한적이기 때문에 항암효과를 증가시킬 수 있는 방법의 개발이 필요하다.

**실험 목적** : 본 연구는 구리이온이 광역동 치료의 항암효과 증가에 미치는 영향을 알기 위해서 대장암에 대한 광역동 치료 효과에 미치는 구리이온의 영향을 관찰하였다.

**실험 방법** : 생쥐 대장암 세포(CT26 cell)를 배양하여 Balb/c 생쥐의 피하에 주사하여 암을 유발시킨 후, 암종의 크기가 300~400mm<sup>3</sup> 인 것을 생쥐 대장암 모델로 사용하였다. 실험군은 대조군, 구리군, 레이저군 및 구리+레이저군 등 4군으로 나누었다. 레이저군과 구리+레이저군에 포토론(2.5 mg/kg BW)을 복강에 주사하였다. 구리군과 구리+레이저군에는 포토론 주사 30분 후에 구리(2.5 mg/kg BW)를 복강에 주사하였다. 포토론 주사 2시간 경과한 후 레이저 광선(파장 660nm, 조사량 80J/Cm<sup>2</sup>)을 종양의 표면에 조사하였다. 레이저 조사 24시간 경과 후 종양조직을 절제하여 RNA-seq 검사하고, 지질과산화물량을 측정하였다. TBARS 량은 OxiSelect™ TBARS Assay Kit 이용하여 측정하였다. 레이저 조사 후 시간 경과에 따라서 12일까지 암종의 크기를 측정하고 사진을 촬영하여 관찰하였다.



**실험 결과** : 종양 용적은 레이저 조사 후 12일째 대조군 420 % 증가, 레이저군 154% 증가, 구리+레이저군 53% 감소로 나타나서, 레이저군에 비하여 구리+레이저군의 종양 용적이 현저히 감소되었다. 레이저 조사 24시간 후 종양조직의 TBARS량은 대조군에 비하여 레이저군에서 190 %가 증가되었고, 구리+레이저군은 레이저군보다 68%가 더 증가되었다. 레이저군과 구리+레이저군에서 레이저 조사 24시간 후 종양조직의 기저측부 원형질막 구성단백질 중 암의 발생이나 성장 및 전이에 관여하는 Atp2b4, Hspa1a, Ddr1, Prom2, Nkd2, Slc38a3, Slc4a1, Slc14a1, St14, Tgfa 및 Cltn4 유전자의 발현량 차이가 나타났다. 레이저군에서 Hspa1a, Nkd2, St14 및 Tgfa 유전자 발현량이 증가되었고, 구리+레이저군에서 Atp2b4, Ddr1, Nkd2, Prom2, Slc4a1, Slc14a1, St14 및 Tgfa 유전자 발현량이 증가되었다. 구리+레이저군은 구리군에 비하여 Cltn4, Ddr1, Prom2, Slc4a1 및 Tgfa 유전자 발현량이 증가되었고, Slc14a1 유전자는 발현이 감소되었다. 레이저군과 구리+레이저군에서 레이저 조사 24시간 후 종양조직의 정단부 원형질막 구성단백질 중 Dsg1a, Dsg2, Patj, Slc6a19, Slc34a2, Slc9a3r1 및 Tnik 유전자의 발현량 차이가 나타났다. Dsg1a, Patj 및 Slc34a2 유전자 발현량이 레이저군에서 증가되었다. 구리+레이저군에서 Dsg1a, Dsg2, Patj, Slc6a19, Slc9a3r1, Slc34a2 및 Tnik 유전자 발현량이 증가되어 레이저군에 비하여 발현이 증가되는 유전자가 더 많고, 증가 비율도 더 높았다. 그랜자임은 바이러스에 감염된 세포나 암세포를 사멸시키기 위해서 면역세포에서 분비되는 단백질 분해 효소인데, 구리+레이저군 종양 조직 Gzmc, Gzmd, Gzme, Gzmf 및 Gzmg 유전자 발현이 증가되었다.

이상의 실험결과 암생쥐 모델에서 구리이온을 포토론 이용 광역동 치료에 병용하면 종양의 용적감소가 더 증가하고, 지질과산화물이 증가하며, 암의 발생과 성장 및 전이 관련 세포막 단백질 유전자의 발현이 변화되며, 그랜자임 유전자 발현이 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 항암효과 증가와 관련이 있는 것으로 추측된다.

**결론** : 광역동 요법에서 구리이온의 항암효과 증강 작용은 세포막 지질과산화물량이 증가되는 것으로 미루어 산화적 세포손상의 증가와 관련이 있을 것으로 추측된다. 광역동 치료로 인하여 반응성 산소종이 발생하였을 때 구리이온이 팬텀반응에 의해서 반응성 산소종을 반응성이 가장 강한 히드록시 라디칼로 전환 시켜 세포손상을 증가시키고, 암조직 주변에서 면역세포의 작용에 의한 세포사멸 작용이 복합적으로 작용하여 암치료에 상승효과를 나타낸 것으로 생각된다. 광역동 치료에서 구리이온의 병용으로 인한 암치료 상승효과는 암치료분야에서 매우 유용하게 이용될 수 있기 때문에 이를 임상적으로 이용하기 위해서는 작용기전과 독성 등에 관한 지속적인 연구가 필요할 것으로 추측된다.

## 참고문헌(Reference)

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019; 144(8):1941-1953.
2. 암등록통계, 통계정보 보고서, 2018. 12. 보건복지부 pp 58-59
3. 보건복지부 암등록통계 - e-나라지표, [http://www.index.go.kr/potal/main/EachDtlPageDetail.do?idx\\_cd=2770/](http://www.index.go.kr/potal/main/EachDtlPageDetail.do?idx_cd=2770/) Date accessed: Sep 2, 2020
4. Bosman, Frank T. (2014). "Chapter 5.5: Colorectal Cancer". In Stewart, Bernard W.; Wild, Christopher P (eds.). *World Cancer Report*. the international agency for research on cancer, World Health Organization. pp. 392-402.
5. Colon Cancer Treatment (PDQ®)-Patient Version-National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/types/colorectal/patient/colon-treatment-pdq/> Date accessed: Sep 2, 2020.
6. Vrouenraets MB, Visser GW, Snow GB, van Dongen GA. Basic principles, applications in oncology and improved selectivity of photodynamic therapy. *Anticancer Research* 2003; 23(1B):505-522.
7. Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kędzierska E, Knap-Czop K, Kotlińska J, Michel O, Kotowski K, Kulbacka J. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother*. 2018; 106:1098-1107.
8. Skovsen E, Snyder JW, Lambert JD, Ogilby PR. Lifetime and diffusion of singlet oxygen in a cell. *J Phys Chem B*. 2005; 109(18):8570-8573.
9. Baptista MS, Cadet J, Di Mascio P, Ghogare AA, Greer A, Hamblin MR, Lorente C, Nunez SC, Ribeiro MS, Thomas AH, Vignoni M, Yoshimura TM. Type I and type II photosensitized oxidation reactions: Guidelines and mechanistic pathways. *Photochem Photobiol*. 2017; 93(4):912-919.

10. Tong L, Chuang CC, Wu S, Zuo L. Reactive oxygen species in redox cancer therapy. *Cancer Lett.* 2015; 367(1):18-25.
11. Sasnouski S, Pic E, Dumas D, Zorin V, D'Hallewin MA, Guillemin F, Bezdetnaya L. Influence of incubation time and sensitizer localization on meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC)-induced photoinactivation of cells. *Radiat Res.* 2007; 168(2):209-217.
12. Shimamura Y, Tamatani D, Kuniyasu S, Mizuki Y, Suzuki T, Katsura H, Yamada H, Endo Y, Osaki T, Ishizuka M, Tanaka T, Yamanaka N, Kurahashi T, Uto Y. 5-Aminolevulinic acid enhances ultrasound-mediated antitumor activity via mitochondrial oxidative damage in breast cancer. *Anticancer Res.* 2016; 36(7):3607-3612.
13. Mellish KJ, Cox RD, Vernon DI, Griffiths J, Brown SB. In vitro photodynamic activity of a series of methylene blue analogues. *Photochem Photobiol.* 2002; 75(4):392-397.
14. Wei MF, Chen MW, Chen KC, Lou PJ, Lin SY, Hung SC, Hsiao M, Yao CJ, Shieh MJ. Autophagy promotes resistance to photodynamic therapy-induced apoptosis selectively in colorectal cancer stem-like cells. *Autophagy.* 2014; 10:1179-1192.
15. Kochevar IE, Redmond RW. Photosensitized production of singlet oxygen. *Methods Enzymol.* 2000; 319:20-28.
16. Allison RR, Sibata CH. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2010; 7:61-75
17. 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.
18. Levy JG. Photosensitizers in photodynamic therapy. *Semin Oncol.* 1994; 21(6 Suppl 15):4-10.

19. Petrov PT, Trukhacheva T, Isakov GA, Turyn MCV, Kravchenko E. Photolon™ an agent for photodynamic diagnosis and therapy: non-clinical and clinical experience. *Acta Biooptica Inform Med.* 2004; 10:6-7.
20. 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.
21. 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.
22. Brandis AS, Salomon Y, Scherz A : Bacteriochlorophyll sensitizers in photodynamic therapy. in : Grimm B, Porra RJ, Rüdiger W, Scheer H (eds): Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: *Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications*, pp. 485-494. Springer. Dordrecht, Netherlands. 2006
23. Allen CM, Sharman WM, Van Lier JE. Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. *J Porphyrins Phthalocyanines.* 2001; 5:161-169
24. Dysart JS, Patterson MS. Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro. *Phys Med Biol.* 2005; 50:2597-2616.
25. Mang TS. Lasers and light sources for PDT, Past, present and future. *Photodiagn Photodyn Ther.* 2004; 1:43-48
26. Beyer W. Systems for light application and dosimetry in photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 1996; 36:153-156.
27. Yoon I, Li JZ, Shim YK. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clin Endosc.* 2013; 46:7-23.
28. Bansal A, Yang F, Xi T, Zhang Y, Ho JS. In vivo wireless photonic photodynamic therapy. *PNAS.* 2018; 115:1469-1474.

29. 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.
30. Hayyan M, Hashim MA, AlNashef IM. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chemical Reviews.* 2016; 116:3029-3085.
31. Gupte A, Mumper RJ. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treat Rev.* 2009; 35(1):32-46.
32. Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew BB, Beeregowda KN. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip Toxicol.* 2014; 7:60-72
33. Garza-Lombó C, Posadas Y, Quintanar L, Gonsebatt ME, Franco R. Neurotoxicity linked to dysfunctional metal ion homeostasis and xenobiotic metal exposure: redox signaling and oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2018; 28(18):1669-1703.
34. Lange C, Bednarski PJ. Evaluation for synergistic effects by combinations of photodynamic therapy (PDT) with Temoporfin (mTHPC) and Pt(II) complexes carboplatin, cisplatin or oxaliplatin in a set of five human cancer cell lines. *Int J Mol Sci.* 2018; 19:3183-3204.
35. Li X, Gao M, Xin K, Zhang L, Ding D, Kong D, Wang Z, Shi Y, Kiessling F, Lammers T, Cheng J, Zhao Y. Singlet oxygen-responsive micelles for enhanced photodynamic therapy. *J Control Release.* 2017; 260:12-21.
36. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols.* 2008; 4:44-57.
37. 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.

38. Korbely M, Krosz G. Photofrin accumulation in malignant and host cell populations of various tumours. *Br J Cancer*. 1996; 73:506-513.
39. Juzeniene A. Chlorin e6-based photosensitizers for photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2009; 6(2):94-96.
40. 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(3):211-217.
41. Shliakhtsin SV, Trukhachova TV, Isakau HA, Istomin YP. Pharmacokinetics and biodistribution of Photolon(Fotolon) in intact and tumor-bearing rats. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2009; 6(2):97-104.
42. Ramaswamy B, Manivasager V, Chin WW, Soo KC, Olivo M. Photodynamic diagnosis of a human nasopharyngeal carcinoma xenograft model using the novel Chlorin e6 photosensitizer Fotolon. *Int J Oncol*. 2005; 26(6):1501-1506.
43. Chin WW, Heng PW, Olivo M. Chlorin e6 - polyvinylpyrrolidone mediated photosensitization is effective against human non-small cell lung carcinoma compared to small cell lung carcinoma xenografts. *BMC Pharmacol*. 2007; 7:15-23.
44. Ali-Seyed M, Bhuvaneshwari R, Soo KC, Olivo M. Photolon™-photosensitization induces apoptosis via ROS-mediated cross-talk between mitochondria and lysosomes. *Int J Oncol*. 2011; 39(4):821-831
45. Bacellar IO, Tsubone TM, Pavani C, Baptista MS. Photodynamic efficiency: From molecular photochemistry to cell death. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(9):20523-20559.
46. Moriwaki H, Osborne MR, Phillips DH. Effects of mixing metal ions on oxidative DNA damage mediated by a Fenton-type reduction. *Toxicol In Vitro*. 2008; 22(1):36-44.

47. Kuo HW, Chen SF, Wu CC, Chen DR, Lee JH. Serum and tissue trace elements in patients with breast cancer in Taiwan. *Biol Trace Elem Res.* 2002; 89:1-11.
48. Pan Q, Kleer CG, van Golen KL, Irani J, Bottema KM, Bias C, De Carvalho M, Mesri EA, Robins DM, Dick RD, Brewer GJ, Merajver SD. Copper deficiency induced by tetrathiomolybdate suppresses tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res.* 2002; 62:4854-4859.
49. Weng YQ, Teng YL, Yue F, Zhong YR, Ye BH. A new selective fluorescent chemosensor for Cu(II) ion based on zinc porphyrin-dipyridylamino. *Inorg Chem Commun.* 2007; 10:443-444
50. Al-Omari S, Al-Noaimi M. Spectroscopic analysis of the binding interaction of cationic Cu<sup>2+</sup> with pyropheophorbide-a Me ester: targeting tumor in a copper-dependent manner. *Int Rev Phys.* 2010; 4:152-160.
51. Al-Omari S. Toward a molecular understanding of the photosensitizer-copper interaction for tumor destruction. *Biophys Rev.* 2013; 5(4):305-311.
52. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 482(3):419-425.
53. Zhang Y, Chen X, Gueydan C, Han J. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Res.* 2018; 28(1):9-21.
54. Yeaman C, Grindstaff KK, Nelson WJ. New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. *Physiol Rev.* 1999; 79(1):73-98.
55. Geyik E, Igci YZ, Pala E, et al. Investigation of the association between ATP2B4 and ATP5B genes with colorectal cancer. *Gene.* 2014; 540(2):178-182
56. Chen Q, Wu K, Qin X, Yu Y, Wang X, Wei K. LASP1 promotes proliferation, metastasis, invasion in head and neck squamous cell carcinoma and through direct interaction with HSPA1A. *J Cell Mol Med.* 2020; 24(2):1626-1639.



57. Zhong X, Zhang W, Sun T. DDR1 promotes breast tumor growth by suppressing antitumor immunity. *Oncol Rep.* 2019; 42(6):2844-2854.
58. Saha SK, Islam SMR, Kwak KS, Rahman MS, Cho SG. PROM1 and PROM2 expression differentially modulates clinical prognosis of cancer: a multiomics analysis. *Cancer Gene Ther.* 2020; 27(3-4):147-167
59. Yang XJ, Huang CQ, Peng CW, Hou JX, Liu JY. Long noncoding RNA HULC promotes colorectal carcinoma progression through epigenetically repressing NKD2 expression. *Gene.* 2016; 592(1):172-178.
60. Wang Y, Fu L, Cui M, Wang Y, Xu Y, Li M, Mi J. Amino acid transporter SLC38A3 promotes metastasis of non-small cell lung cancer cells by activating PDK1. *Cancer Lett.* 2017; 393:8-15.
61. Yi T, Zhou X, Sang K, Huang X, Zhou J, Ge L. Activation of lncRNA lnc-SLC4A1-1 induced by H3K27 acetylation promotes the development of breast cancer via activating CXCL8 and NF- $\kappa$ B pathway. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019; 47(1):3765-3773
62. Hou R, Kong X, Yang B, Xie Y, Chen G. SLC14A1: a novel target for human urothelial cancer. *Clin Transl Oncol.* 2017; 19(12):1438-1446.
63. Kosa P, Szabo R, Molinolo AA, Bugge TH. Suppression of Tumorigenicity-14, encoding matriptase, is a critical suppressor of colitis and colitis-associated colon carcinogenesis. *Oncogene.* 2012; 31(32):3679-3695.
64. Wu H, Liu Y, Shu XQ, Cai Q. MiR-374a suppresses lung adenocarcinoma cell proliferation and invasion by targeting TGFA gene expression. *Carcinogenesis.* 2016; 37(6):567-575.
65. Luo Y, Kishi S, Sasaki T, Ohmori H, Fujiwara-Tani R, Mori S, Goto K, Nishiguchi Y, Mori T, Kawahara I, Kondoh M, Kuniyasu H. Targeting claudin-4 enhances chemosensitivity in breast cancer. *Cancer Sci.* 2020; 111(5):1840-1850.

66. Amagai M. Autoimmune and infectious skin diseases that target desmogleins. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2010; 86(5):524-537.
67. Kamekura R, Kolegraff KN, Nava P, Hilgarth RS, Feng M, Parkos CA, Nusrat A. Loss of the desmosomal cadherin desmoglein-2 suppresses colon cancer cell proliferation through EGFR signaling. *Oncogene*. 2014; 33(36):4531-4536.
68. Shin K, Straight S, Margolis B. PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells. *J Cell Biol*. 2005; 168(5):705-711.
69. Javed K, Cheng Q, Carroll AJ, Truong TT, Bröer S. Development of biomarkers for inhibition of SLC6A19 (B<sup>0</sup>AT1)—A potential target to treat metabolic disorders. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(11):3597-3618.
70. Liu X, Zhou X, Xu H, He Z, Shi X, Wu S. SLC34A2 Regulates the Proliferation, Migration, and Invasion of Human Osteosarcoma Cells Through PTEN/PI3K/AKT Signaling. *DNA Cell Biol*. 2017 ;36(9):775-780.
71. Liu H, Ma Y, He HW, Wang JP, Jiang JD, Shao RG. SLC9A3R1 stimulates autophagy via BECN1 stabilization in breast cancer cells. *Autophagy*. 2015; 11(12):2323-2334.
72. Masuda M, Uno Y, Ohbayashi N, Ohata H, Mimata A, Kukimoto-Niino M, Moriyama H, Kashimoto S, Inoue T, Goto N, Okamoto K, Shirouzu M, Sawa M, Yamada T. TNIK inhibition abrogates colorectal cancer stemness. *Nat Commun*. 2016; 7:12586-12599.
73. Susanto O, Stewart SE, Voskoboinik I, Brasacchio D, Hagn M, Ellis S, Asquith S, Sedelies KA, Bird PI, Waterhouse NJ, Trapani JA. Mouse granzyme A induces a novel death with writhing morphology that is mechanistically distinct from granzyme B-induced apoptosis. *Cell Death Differ*. 2013; 20(9):1183-1193.
74. Johnson H, Scorrano L, Korsmeyer SJ, Ley TJ. Cell death induced by granzyme C. *Blood*. 2003; 101:3093-3101

75. Rönnerberg E, Calounova G, Guss B, Lundquist A, Pejler G. Granzyme D is a novel murine mast cell protease that is highly induced by multiple pathways of mast cell activation. *Infect Immun.* 2013; 81(6):2085–2094.
76. Bots M, Medema JP. Granzymes at a glance. *J Cell Sci.* 2006; 119(Pt 24):5011–5014.

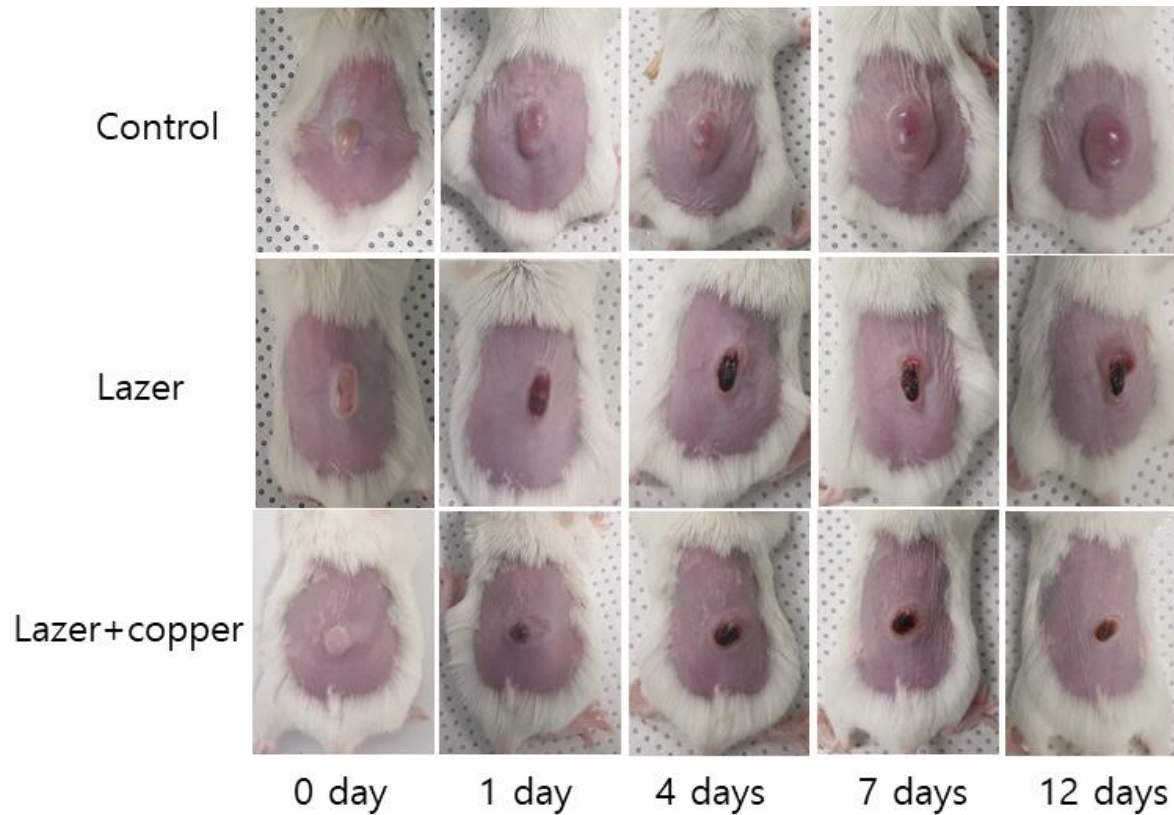


Fig. 6. Photograph of CT26 cancer bearing Balb/c mice after laser irradiation (660 nm, 80 J/Cm<sup>2</sup>).

Table 1. Effects of photodynamic therapy(PDT) on tumor growth in CT26 cancer bearing mice

Groups	Tumor volume(mm <sup>3</sup> )			
	0 day	4 days	7 days	12 days
Control	194±47	282±81	566±141	994±189
Copper	179±49	273±76	547±127	952±201
Lazer	203±51	461±102	485±101	517±121
Lazer+copper	207±53	407±97	217±63	92±43

Colon cancer bearing mice were irradiated with lazer light(660nm, 80 J/Cm<sup>2</sup>) 2 hours after intra-peritoneal injection of Photolon(2.5mg/kg BW). Copper (2.5mg/kg BW) was injected intraperitoneally into colon cancer braring mice 30 minutes after photolon injection. Values are mean±D, n=5.

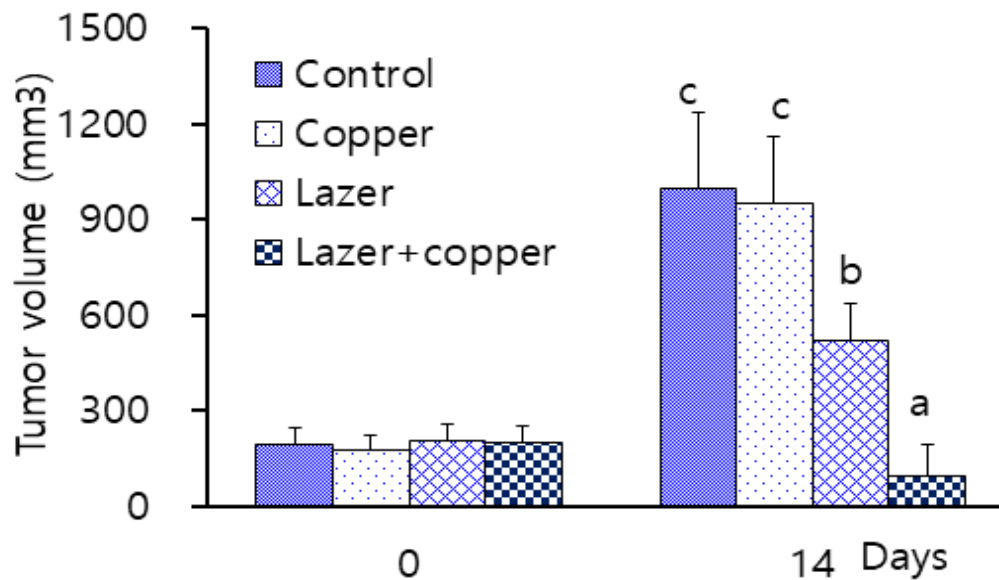


Fig. 7. Effects of copper and PDT on tumor growth in CT26 cancer bearing mice.  
 Values with different superscripts in the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ).

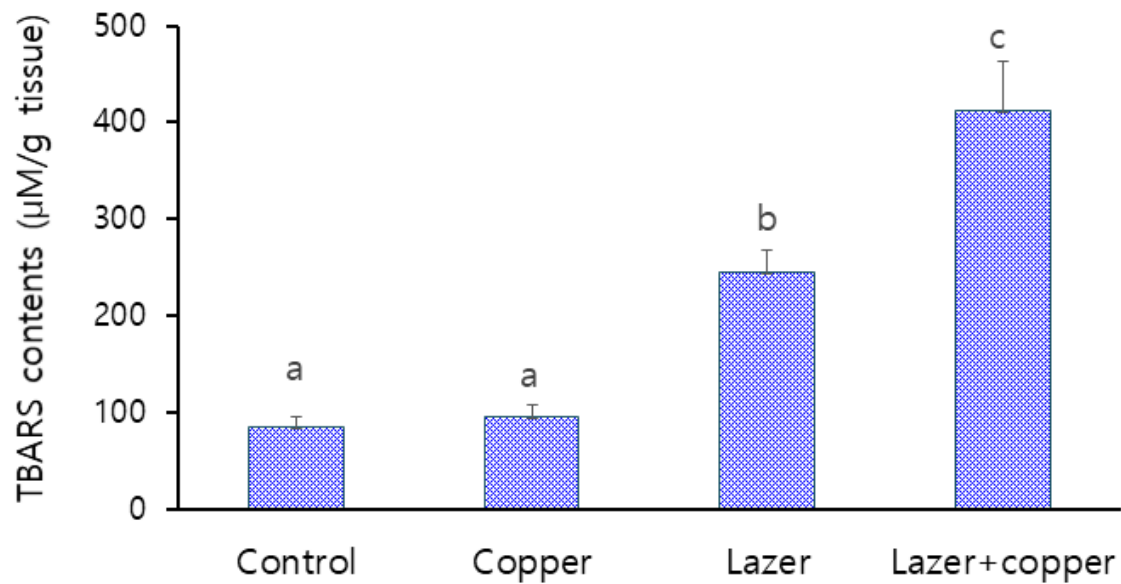


Fig. 8. The effects of copper and PDT on thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) content in tumor tissue of CT26 cancer bearing mice. Values with different superscripts are significantly different ( $p < 0.01$ ).

Table 2. Analysis of differentially expressed genes of basolateral plasma membrane components-related genes in cancer tissues after PDT in CT26 cancer bearing mice

Genes	RPKM		log2(FC)	p_value
	Control	Lazer		
Atp2b4	3.81	12.54	1.71	0.104
Hspa1a	2.00	160.99	6.32	0.016
Nkd2	0.95	13.56	3.83	0.012
Slc38a3	0.14	4.89	5.11	0.013
St14	1.68	25.93	3.94	0.007
Tgfa	3.20	16.24	2.34	0.033

RPKM : reads per kilobase per million mapped reads, Atp2b4 : ATPase, Ca<sup>++</sup> transporting, plasma membrane 4, Hspa1a : heat shock protein 1A , Nkd2 : naked cuticle 2, Slc38a3 : solute carrier family 38, member 3, St14 : suppression of tumorigenicity 14 (colon carcinoma), Tgfa : transforming growth factor alpha.



Table 3. Analysis of differentially expressed genes of basolateral plasma membrane components-related genes in cancer tissues after PDT in copper-treated CT26 cancer bearing mice

Genes	RPKM		log2(FC)	p_value
	Control	Lazer+copper		
Atp2b4	3.81	29.35	2.94	0.003
Ddr1	3.83	33.93	3.14	0.003
Nkd2	0.95	40.90	5.42	0.004
Prom2	1.55	64.44	5.36	0.012
Slc4a1	0.22	6.38	4.81	0.023
Slc14a1	94.99	13.81	-2.78	0.030
St14	1.68	86.48	5.67	0.001
Tgfa	3.20	77.05	4.58	0.001

Ddr1 : discoidin domain receptor family, member 1, Prom2 : prominin 2, Slc4a1 : solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1, Slc14a1 : solute carrier family 14 (urea transporter), member 1.

Table 4. Differentially expressed gene analysis related to basolateral plasma membrane components in tumor tissues of lazer versus lazer+copper treated CT26 cancer bearing mice

Genes	RPKM		log2(FC)	p_value
	Lazer	Lazer+copper		
Cldn4	21.19	162.53	2.93	0.010
Ddr1	9.17	33.93	1.88	0.038
Prom2	13.74	64.44	2.22	0.021
Slc4a1	1.36	6.38	2.22	0.159
Slc14a1	54.45	13.81	-1.97	0.112
Tgfa	16.24	77.05	2.24	0.026

Cldn4 : claudin 4.

Table 5. Analysis of differentially expressed genes of apical plasma membrane components-related genes in cancer tissues after PDT in CT26 cancer bearing mice

Genes	RPKM		log2(FC)	p_value
	Control	Lazer		
Dsg1a	5.87	37.42	2.67	0.049
Dsg2	0.70	2.56	1.87	0.251
Patj	0.92	7.52	3.02	0.018
Slc6a19	0.27	2.65	3.28	0.102
Slc34a2	0.34	3.13	3.18	0.040

Dsg1a : desmoglein 1 alpha, Dsg2 : desmoglein 2, Patj : PATJ, crumbs cell polarity complex component, Slc6a19 : solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 19, Slc34a2 : solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2.

Table 6. Analysis of differentially expressed genes of apical plasma membrane components-related genes in cancer tissues after PDT in copper-treated CT26 cancer bearing mice

Genes	RPKM		log2(FC)	p_value
	Control	Lazer+copper		
Dsg1a	5.87	116.46	4.30	0.003
Dsg2	0.70	10.42	3.89	0.020
Patj	0.92	30.93	5.06	0.001
Slc6a19	0.27	11.82	5.44	0.006
Slc9a3r1	5.58	38.97	2.80	0.032
Slc34a2	0.34	28.43	6.36	0.009
Tnik	4.27	57.30	3.74	0.001

Slc9a3r1 : solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 3 regulator 1, Tnik : TRAF2 and NCK interacting kinase.

Table 7. Differentially expressed gene analysis related to apical plasma membrane components in tumor tissues of lazer versus lazer+copper treated CT26 cancer bearing mice

Genes	RPKM		log2(FC)	p_value
	Lazer	Lazer+copper		
Dsg1a	37.42	116.46	1.63	0.134
Dsg1b	10.11	38.66	1.93	0.160
Dsg2	2.56	10.42	2.02	0.207
Slc6a19	2.65	11.82	2.15	0.181
Slc9a3r1	6.68	38.97	2.54	0.049
Tnik	10.81	57.30	2.40	0.026

Dsg1b : desmoglein 1 beta.

Table 8. Analysis of differentially expressed genes of cytolysis-related genes in cancer tissues after PDT in CT26 cancer bearing mice

Genes	RPKM		log2(FC)	p_value
	Control	Lazer		
Gzmc	0.91	0.61	-0.56	1
Gzmd	0.12	0.08	-0.53	1
Gzme	0.13	0	-Inf	1
Gzmf	0.69	0	-Inf	1
Gzmg	0	0	0	1

Gzmc : granzyme C, Gzmd : granzyme D, Gzme : granzyme E, Gzmf : granzyme F, Gzmg : granzyme G. Inf : infinity.

Table 9. Analysis of differentially expressed genes of cytolysis-related genes in cancer tissues after PDT in copper-treated CT26 cancer bearing mice

Genes	RPKM		log2(FC)	p_value
	Control	Lazer+copper		
Gzmc	0.91	8.29	3.18	0.053
Gzmd	0.12	13.27	6.71	0.026
Gzme	0.13	5.17	5.28	0.046
Gzmf	0.69	17.44	4.64	0.022
Gzmg	0	13.70	Inf	0.004

Table 10. Differentially expressed gene analysis related to cytolysis in tumor tissues of lazer versus lazer+copper treated CT26 cancer bearing mice

Genes	RPKM		log2(FC)	p_value
	Lazer	Lazer+copper		
Gzmc	0.61	8.29	3.74	0.043
Gzmd	0.08	13.27	7.24	0.024
Gzme	0	5.17	Inf	0.005
Gzmf	0	17.44	Inf	0.001
Gzmg	0	13.70	Inf	0.004