creative commons

COMMONS DEED

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

dCollection

[UCI]I804:24011-200000236460

2008년 8월

박사학위 논문

Chlorine e6 유도 광역학 치료에 의한 RK3E-ras 세포의 Apoptosis 유도

조선대학교 대학원

치의공학과

이 하 형

Chlorine e6 유도 광역학 치료에 의한 RK3E-ras 세포의 Apoptosis 유도

Apoptosis of RK3E-ras cells by Photodynamic Therapy with Chlorine e6

2008년 8월 일

조선대학교 대학원

치 의 공 학 과

이 하 형

Chlorine e6 유도 광역학 치료에 의한 RK3E-ras 세포의 Apoptosis 유도

지도교수 안 상 건

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로

제출함

2008년 5월 일

조선대학교 대학원

치 의 공 학 과

이 하 형

이하형의 박사학위 논문을 인준함

위원장　광주과기원 교수 김 재 일　인

위 원　조선대학교 교수 강 건 욱　인

위 원　조선대학교 교수 안 상 건　인

위 원　조선대학교 교수 윤 정 훈　인

위 원　광주과기원 교수 장 성 호　인

2008년　5월　일

조선대학교 대학원

목 차

목 차 ····· i
도목차 ····· ii
ABSTRACT ····· iii

Ⅰ. 서 론 ····· 1

Ⅱ. 재료 및 방법 ····· 3
1. 세포주 및 세포배양 ····· 3
2. 광민감제 및 레이저 ····· 3
3. 세포내 광민감제 흡수 (Cell Uptake) 실험 ····· 3
4. Reactive oxygen species 형성능 실험 ····· 4
5. MTT 분석 ····· 4
6. Apoptosis 측정을 위한 flow cytometry 분석 ····· 4
7. TUNEL 분석 ····· 4
8. Caspase-3 activity 측정 ····· 5
9. Western blot 분석 ····· 5

Ⅲ. 결과 ····· 7
1. 세포내 광민감제의 흡수 ····· 7
2. Reactive oxygen species 형성능 ····· 7
3. MTT 분석 ····· 8
4. Apoptosis 측정 ····· 9
5. Caspase-3 activity 측정 ····· 11
6. Western blot ····· 11

Ⅳ. 고찰 ····· 13

Ⅴ. 결론 ····· 15

Ⅵ. 참고 문헌 ····· 16

도목차

Fig. 1. Structure of chlorine e6 ····· 3

Fig. 2. Chlorine e6 uptake after treatment of chlorine e6 ····· 7

Fig. 3. Generation of ROS following PDT ····· 8

Fig. 4. MTT assay following PDT. ····· 9

Fig. 5. TUNEL assay and flow cytometric analysis following PDT ····· 10

Fig. 6. Caspase-3 activity following PDT ····· 11

Fig. 7. Western blot analysis of apoptosis-related protein following PDT ····· 12

Fig. 8. Schematics of PDT-induced effects upon apoptosis signal transduction pathways ····· 15

ABSTRACT

Apoptosis of RK3E-ras cells by Photodynamic Therapy with Chlorine e6

Lee Ha Hyoung
Advisor : Prof. Sang-Gun Ahn, PhD
Department of Dental Engineering,
Graduate School of Chosun University

Photodynamic therapy (PDT), a promising cancer treatment that employs a combination of a photosensitizing chemical, oxygen, and visible light, induces apoptosis in cancer cells. The mechanisms of its anticancer activity include generation of singlet oxygen and reactive oxygen species that directly damage cancer cells. Chlorine e6 is a newly introduced photosensitizer which is reduced forms of porphyrins for use in PDT. In the current study, the author evaluated the generation of reactive oxygen species and the mode of cell death of RK3E-ras cells induced by photosensitization with chlorine e6. RK3E-ras cells were incubated with chlorin e6 for twenty four hour. Chlorine e6-induced PDT was generated reactive oxygen species and led to significant RK3E-ras cell growth, as assessed by MTT assay. Apoptotic pattern was clearly demonstrated by TUNEL assay and flow cytometry. Subsequently, PDT with chlorine e6 induced activation of apoptosis related proteins such as caspase-3/-7, cytochrome c, and PARP. In contrast, cell survival factor Bcl-2 was reduced following PDT. These results demonstrate that chlorine e6-mediated PDT induces apoptosis through the generation of reactive oxygen species upon light activation. Chlorine e6 is a potent photosensitizer with the capacity to directly initiate apoptosis by acting upon mitochondria.

Ⅰ. 서 론

광역학 치료(photodynamic therapy: PDT)는 광민감제를 체내에 주사하고 질병 부위에 특별한 파장을 갖는 레이저 빛을 조사하여 종양을 치료하는 방법이다. 광역학 치료 효과에 대한 기전은 대개 세포 내에서 발생하는 singlet oxygen ($_1O^2$)에 의한 세포의 비활성화로 설명하고 있다[1-3]. 일반적으로 singlet oxygen은 세포 내 이동에 문제가 있으므로 주로 광민감제가 분포하는 미토콘드리아, 리소좀(lysosome) 혹은 세포벽에서 발생하여 광독성을 나타내는 것으로 알려져 있다[4-6]. 암세포 사멸과정은 독성의 활성산소가 암세포를 직접적으로 손상시키는 기전에 의하거나, 종양 주변의 미세 혈관에 손상을 주어 암조직에 저산소증을 초래하여 암세포를 사멸시키는 간접적인 효과도 있다. 또한 산화적 스트레스(oxidative stress)에 따른 2차 반응으로 apoptosis 또는 암조직을 공격하도록 면역시스템을 활성화시킬 수 있다[6]. 그러나 광역학 치료의 주된 효과는 세포괴사(cell necrosis)로 보고되고 있으나[7], 광역학 치료 후 30분 내에 apoptosis의 객관적인 증거의 하나인 DNA ladder가 확인된다는 보고도 있으나 일반적으로 apoptosis는 1~3일 후에 나타나며 대부분 저농도 혹은 저에너지의 경우에 관찰된다[8]. 또한 광역학 치료후에 숙주에서의 Interleukin-2 수용체가 감소하고 Interleukin-2 (IL-2)와 자연살해세포(natural killer cell, NK cell)의 증가가 보고되고 있어,[11] 광역학 치료에 의한 면역증강도 암세포 독성에 대해 일부분 기여하는 것으로 보인다[6-8].

광역학치료의 역사는 1910년에 Hausman이 hematoporphyrin(Hp)을 마우스에 주입 후 빛에 노출시켰을 때 광과민 반응을 보인다는 것을 보고한 이후로 1960년대에 hematoporphyrin derivative(HpD)의 개발로 활성화 되었으며 1980년대 초부터 본격적인 연구와 함께 임상에서 사용되었고 1990년대에 이르러 새로운 암 치료방법으로 세계 여러나라에서 인정받게 되었으며 최근에 들어서는 항암 효율성에 있어 점자적으로 인정을 받게 이르렀다[9]. 광역학치료에 대한 반응은 사용된 광감작제, 레이저에 의한 빛의 조사조건, 조직의 산소포화 상태, 그리고 세포의 종류에 따라서 좌우되는 것으로 알려져 있다[8]. 현재 광역학 치료에 사용되고 있는 대부분의 광민감제들은 생체 내로 투여되었을 때 낮은 용해도 및 생체분자들과의 부적절한 상호작용, 광민감제들 간의 상호엉김 현상으로 암조직으로의 선택적 전달에 한계가 있고 낮은 광반응성을 보이고 있어 치료의 효과를 높이기 위해서는 적절한 전달시스템이 요구된다. 따라서 최근에는 난용성 광민감제들의 가용화와 더불어 암조직으로의 타겟팅(targeting) 성질을 보다 향상시키기 위한 많은 다양한 연구들이 진행되고 있다[1-4,7,8].

이 연구에서는 Sprague-Dawley rat에서 빠르게 악성종양을 유도할 수 있는 RK3E-ras 세포주를 이용하여 제2세대 광민감제인 chlorine e6와 diode laser를 이용한 광역학 치료에서 광민감제의 농도와 시간의 경과에 따른 세포독성의 변화와 세포사의 특징인 apoptosis의 확인과 그 기전을 규명하고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 세포주 및 세포배양

실험에 이용한 세포는 쥐의 신장 상피세포 RK3E를 k-ras로 형질 전환된 RK3E-ras 세포를 사용하였다. RK3E-ras세포를 37℃, 5% Co_2의 조건하에 10% fetal calf serum, 100μg/ml streptomycin이 포함된 Dulbeuo's Medified Eagle's Medium (DMEM)에서 배양하였다.

2. 광민감제 및 레이저

실험에 이용한 광민감제는 chlorin e6 (Ce6)로 LS-Pharm (Gwangju, Korea)으로부터 제공받아 사용하였다. Ce6의 구조는 Fig 1과 같으며, 10mM이 되게 멸균 생리식염수에 녹인 뒤 RK3E-ras 세포에 농도별로 처리하여 실험하였다.

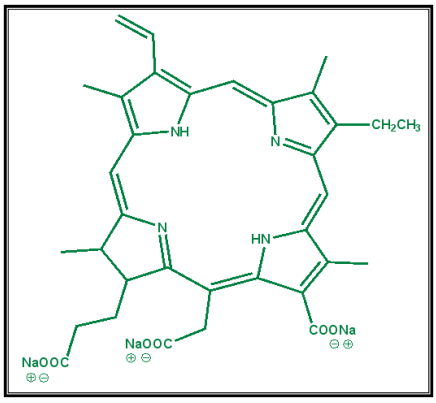

Fig. 1. Structure of chlorine e6.

광원은 diode laser (Diode pumped laser driver LD2030, Geumkwang Ltd., Daejeon, Korea)를 이용하였고, chlorin e6 처리 후 24시간 뒤에 660nm파장, 10J/cm^2로 12 well plate의 2cm내에 부착된 세포에 직접 조사하였다.

3. 세포내 광민감제 흡수 *(Cell Uptake)* 실험

RK3E-ras세포를 4-chamber slide에 2×10^3cell/well을 seeding한 후 chlorin e6 5μM을 시간별로 처리하고 confocal microscope(LSM 5 PASCAL, Carl Zeiss MicroImaging Inc.)로 세포내 흡수 정도를 관찰하였다.

4. Reactive oxygen species 형성능 실험

Chlorin e6 5μM과 Diode Laser 10J/cm^2이 처리된 후 RK3E-ras세포 1 x 10^6cell을 saline buffer에 10uM이 되게 용해한 뒤 H2DCFDA (Moleculat Probes, Invitrogen, USA)를 첨가한 후 37℃, 5% Co_2의 조건하에 30분에서 1시간동안 처리하였다. Reactive oxygen species (ROS) 형성은 형광현미경 (Olympus IX 71, Olympus America Inc., Melville, NY)로 관찰하였으며, SkanIt® Software를 이용하여 Thermo Scientific Varioskan® Flash spectral scanning multimode reader (Varioskan, Thermo Electron Co, Waltham. MA, USA)로 Wavelength : Excitation 450-495, Emission 517-527에서 측정하였다.

5. MTT 분석

광역학 치료에 대한 RK3E-ras세포의 생존율을 조사하기 위하여 12 well plate에 2×10^4 cells/well 세포를 seeding 하고 24시간 동안 chlorin e6를 농도별(1μM, 2.5μM, 5μM)로 처리한 후 10J/cm2의 diode laser를 조사하였다. Laser 조사 후 0, 12, 24, 48시간 뒤에 각 well을 PBS로 두 번씩 세척하고 세포배양액 0.5ml과 MTT용액 50㎕(5mg/ml in PBS)를 가하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenylte-trazolium bromide (MTT) dye uptake방법으로 확인하였다. 3시간 후 배양액을 제거하고 acid-isopropanol(0.04M HCL in isopropanol) 250㎕를 가하고 250㎕의 DW에 혼합하였다. 96well plate에 상기한 suspention 100㎕와 DW 100㎕를 혼합 후 Microplate Autoreader ELISA(Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT)를 사용하여 595nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Apoptosis 측정을 위한 *flow cytometry* 분석

Chlorin e6 5μM을 24시간 동안 처리하고 Diode Laser 10J/cm2로 조사한 후 24 뒤에 total 1×10^6 cell은 Annexin V-FLUOS Staining(Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN)를 이용하여 Annexin V-FITC 와 Propidium iododide(PI)로 표지하였다. Flow cytometry분석은 Cell Quest software를 이용하여 FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)로 측정하였다.

7. TUNEL 분석

RK3E-ras세포에 Chlorin e6 5μM과 Diode Laser 10J/cm^2 이 처리된 세포를 terminal

deoxynucledtidyl transferase (TdT)-mediated dUTPdigoxigenin nick end-labeling (TUNEL)을 원리로 하는 ApopTag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Intergen, Purchase, NY)를 사용하여 TUNEL 염색을 시행하였다. 실험 방법은 먼저 12well plate에 2×10^4cell/well의 RK3E-ras세포를 PBS에 1%로 용해한 paraformaldehyde(PH 7.4)에 10분 고정한 후 PBS로 세척하였다. PBS에 과산화효소를 3%로 희석하여 5분 incubation 한 후 equilibration buffer와 TdT Enzyme을 70:30으로 혼합하여 첨가 후 37℃에서 1시간 incubation하였다. 다음 stop/wash buffer로 15초간 shaking하고 10분간 incubation 하였다. 발색이 완료된 후 PBS로 세척한 후 anti-digoxygenin peroxidase conjugate를 65㎕/5cm^2 으로 첨가 후 30분간 camber에서 incubation 하였다. PBS로 세척 후 peroxidase substrate(DAB) 75㎕/5cm^{2}으로 처리하여 3분간 발색 염색한 후 DW로 세척하여 methyl green으로 counter stain하였다. TUNEL 양성인 세포의 수를 × 400 시야에서 가장 많은 5 부위의 평균을 구하였다.

8. Caspase-3 activity 측정

RK3E-ras세포의 Caspase-3 activity는 ApoAlertTM Caspase-3 Colorimetric Assay Kit (Clontech Laboratories, Mountain View, CA)를 이용하여 측정하였다. RK3E-ras세포를 12 well plate에 2×10^4 cells/well 세포를 seeding 하여 chlorin e6 5μM을 24시간 동안 처리하고 Diode Laser 10J/cm^{2}로 조사한 후 24시간 뒤에 PBS로 두 번 세척하여 cell lysis buffer를 이용하여 용해하였다. DTT와 2× reaction buffer를 혼합한 용액에 1mM caspase 3 substrate (DEVD)를 가한 후 37℃ water bath에서 1~3시간 처리한 후 96well plate에서 Microplate Autoreader ELISA(Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT)를 사용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

9. Western blot 분석

12 well plate에 RK3E-ras세포 2×10^4 cells/well을 seeding 하고 chlorin e6 5μM에 24시간동안 처리하고, Diode Laser 10J/cm^2 조사한 후 24시간 뒤에 PBS로 두 번 세척하고, Reporter lysis buffer(5x)와 DW를 1x로 희석한 1x lysis buffer로 용해하였다. Room temperature에서 10분간 shaking한 후 15초 동안 vortexing하였다. 13000rpm에서 2분간 4℃ centrifuge하고 상층액만 모아 -20℃에서 보관하여 사용하였다. Immunoblotting을 위해 단백질 40㎍/lane은 12% SDS-Polyacrylamide gel 상에서 전기영동하고, membrane은 4℃조건하에 5% milk에서 overnight shaking 하였다. 1차 항체

anti-cytochrom c (DAKO, Glostrup, Denmark), anti-caspase3/7 antibody (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), anti- PARP (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), anti-actin (Santa Cruz Biotechnology, Santa CS), anti-BCL2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa CS) antibody를 5% milk/Tris Buffered saline에 1:1000 비율로 2시간 처리하였으며, Tris Buffered saline-Tween 20에 wash 후 2차 항체 anti-goat, anti-rabbit 또는 anti-mouse antibody (Amersham Biociences, UK)는 1:5000 비율로 1시간 처리한 후 immunoblotting 하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 세포내 광민감제의 흡수

RK3E-ras세포에 chlorin e6 5μM을 각각 6, 24, 36, 48시간 동안 처리한 후 confocal microscope로 관찰한 결과 6시간부터 세포내에 흡수하기 시작하여, 24시간에 가장 높은 세포내 흡수가 관찰되었다. 또한 36시간부터는 흡수도가 감소되었다 (Fig 2). 이러한 결과는 chlorin e6가 세포에 침착되기 위한 시간으로 24시간의 처리가 가장 적합함을 보여주고 있다.

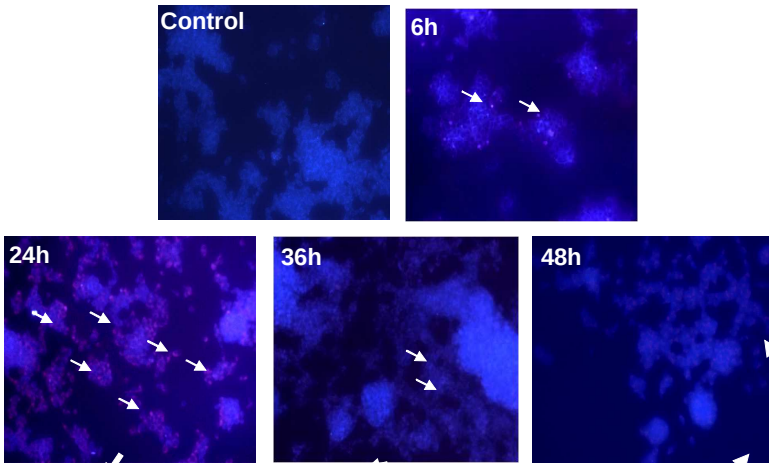

Fig 2. Chlorine e6 uptake after treatment of chlorine e6.

2. Reactive oxygen species 형성능

RK3E-ras 세포에서 ROS 생성 여부를 형광현미경으로 관찰한 결과 PDT 처리 즉시 대조군에 비해 형광 발현이 강하게 나타남을 확인하였다 (Fig 3A). 2′,7′-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA)를 이용하여 ROS 양을 측정한 결과 PDT를 시행한 즉시 대조군에 비하여 60%이상 증가함을 보였으며 30분, 1시간 이후 시간 의존적으로 점차 증가하는 양상을 보였다 (Fig 3B).

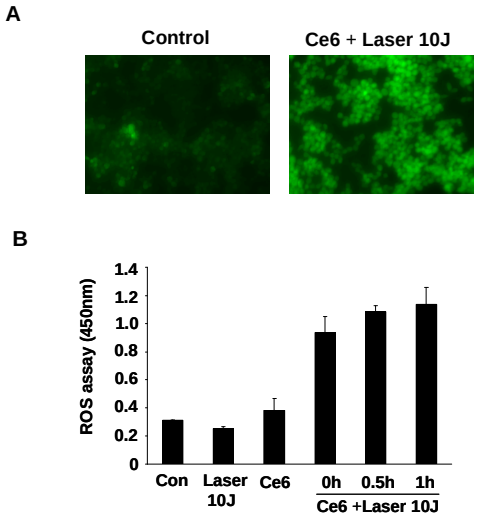

Fig 3. Generation of ROS following PDT.

3. MTT 분석

Chlorin e6 매개 PDT의 세포증식 억제 효과를 조사하기 위해 MTT assay를 이용하여 세포의 생존율을 조사하였다. 먼저 chlorin e6 5μM과 laser 10J/cm^{2}을 처리하고 0, 12, 24, 48시간 후 MTT assay를 한 결과 PDT를 처리한 세포의 성장이 24시간에 가장 저해되었으며 48시간에 다시 증가하였으나, 대조군 세포들에 비해 90%이상 감소된 수치를 보였다. 그러나 chlorin e6만 처리하거나 laser만 처리한 세포에서의 성장 저해는 관찰되지 않았다 (Fig 4A). 또한 광민감제 농도에 따른 효과를 보면 RK3E-ras 세포에 chlorin e6 1, 2.5, 5μM과 laser 10J/cm^{2}을 처리하였을 때 chlorin e6 1, 2.5μM를 처리한 세포에 비해 5μM을 처리한 세포에서 성장이 급격히 저해되는 것을 관찰하였다 (Fig 4B). 이 결과는 chlorin e6만 처리하거나 laser만 처리하는 것은 세포에 영향을 주지 않지만 PDT 처리에 의해 세포의 성장을 저해하는 것을 보여주고 있다.

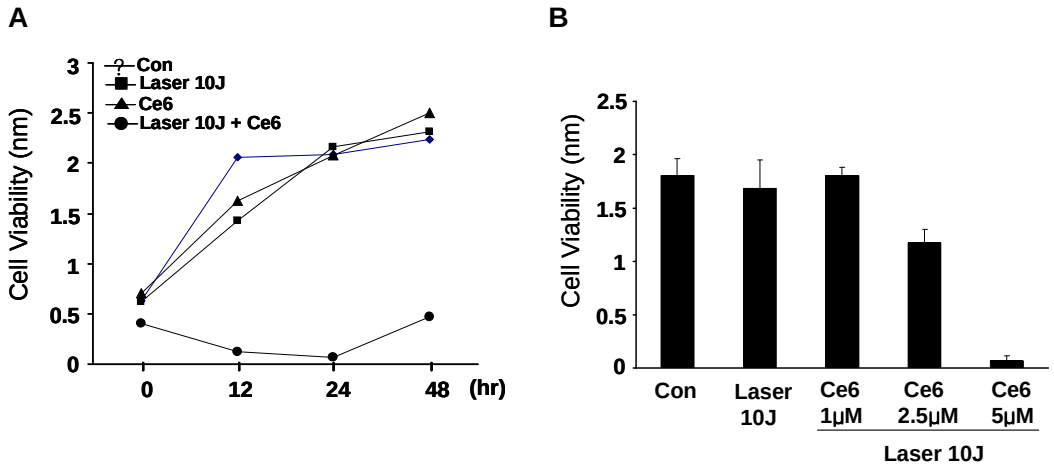

Fig 4. MTT assay following PDT.

4. Apoptosis 측정

RK3E-ras 세포에서 chlorin e6 매개 PDT가 apoptosis를 유도하는지 알아보기 위해 chlorin e6 5μM과 laser 10J/cm^{2}을 처리하고 24시간 후 flow cytometry로 분석하였다. 그 결과 PDT처리한 세포에서 apoptosis된 세포가 48.4%였으며 apoptosis와 necrosis가 함께 나타난 세포가 51.6%로 대조군에 비해 세포사된 수가 크게 증가하는 것을 관찰하였다 (Fig 5A, B). 즉 chlorin e6 매개 PDT는 RK3E-ras 세포에 세포사를 유발하며, 주로 apoptosis가 유도됨을 보였다. In vitro에서 apoptosis가 유도된 세포를 확인하기 위하여 TUNEL assay를 수행하였다. TUNEL에 양성인 세포의 비율은 PDT를 시행한 세포에서 대조군에 비하여 현저하게 증가되었다 (Fig 5C).

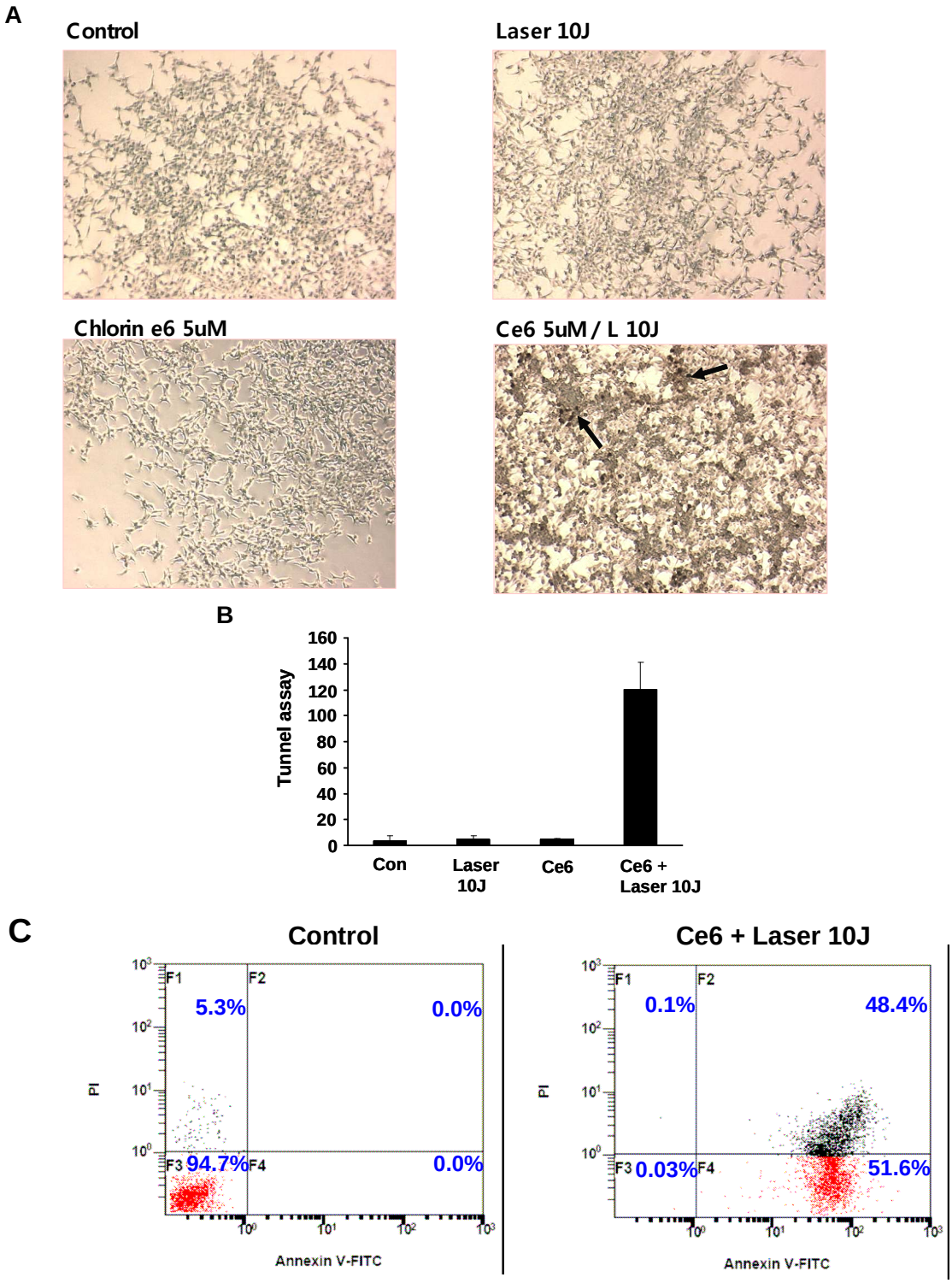

Fig 5. TUNEL assay and flow cytometric analysis following PDT.

5. Caspase-3 activity 측정

Chlorin e6 매개 PDT에 의해 유도되는 apoptosis가 caspase-3 경로에 의한 것인지를 확인하기 위해 caspase-3 activity assay를 이용하여 측정하였다. 실험 결과 PDT를 처리한 세포에서 12시간에 활성도가 최대로 증가하며, 24시간에는 약간의 감소를 보였으나 대조군 에 비하여 높은 수치를 나타냈다 (Fig 6). 이러한 결과는 chlorin e6 매개 PDT는 caspase 3의 활성화를 통해 apoptosis를 유도한다는 것을 보여주고 있다.

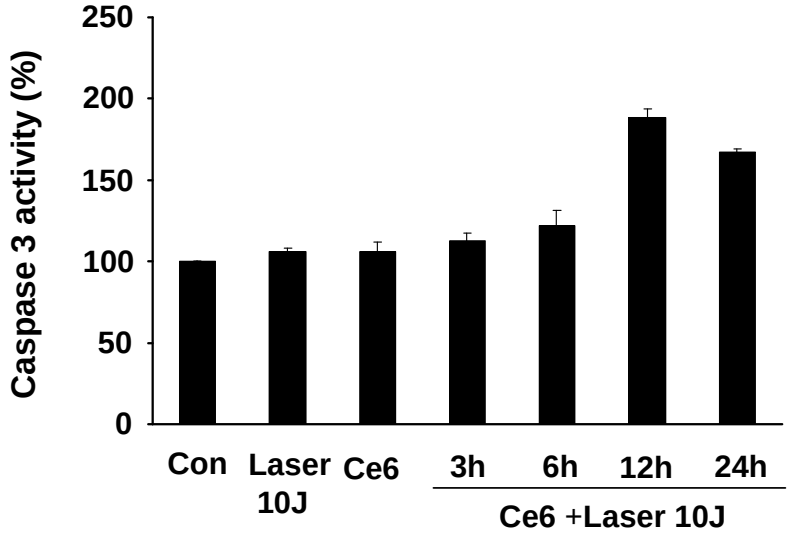

Fig 6. Caspase-3 activity following PDT.

6. Western blot

Chlorin e6 매개 PDT의 세포성장 억제 및 세포사가 apoptosis에 의한 것인가를 조사하기 위해 apoptosis와 관련된 단백질에 대한 western blot을 시행하였다. PDT 처리에 의해 caspase 3를 활성화시키는 up-stream의 cytochrome c의 발현이 증가하였다. 또한 직, 간접으로 미토콘드리아로부터 cytochrome C를 포함한 여러 단백질의 배출을 막는 Bcl-2의 발현은 PDT를 처리한 세포에서 감소되는 것을 관찰하였다. Apoptosis signal pathway에 관여하는 중요한 effector enzyme인 pro-caspase 3/7의 활성도를 조사한 결과, PDT처리 이후 감소됨을 확인하였다. Caspase 7의 down-stream의 pro-PARP(poly(ADP)-ribose polymerase)는 감소되었으나, 활성형인 cleaved PARP의 발현은 PDT를 처리한 세포에서 증가하였다 (Fig 7). 이와 같은 결과는 chlorin e6 매개 PDT가 mitochondria에서 cytochrome c를 유리하고 caspase 3/7와 PARP의 활성화를

통해 apoptosis를 유도한다는 사실을 보여주고 있다.

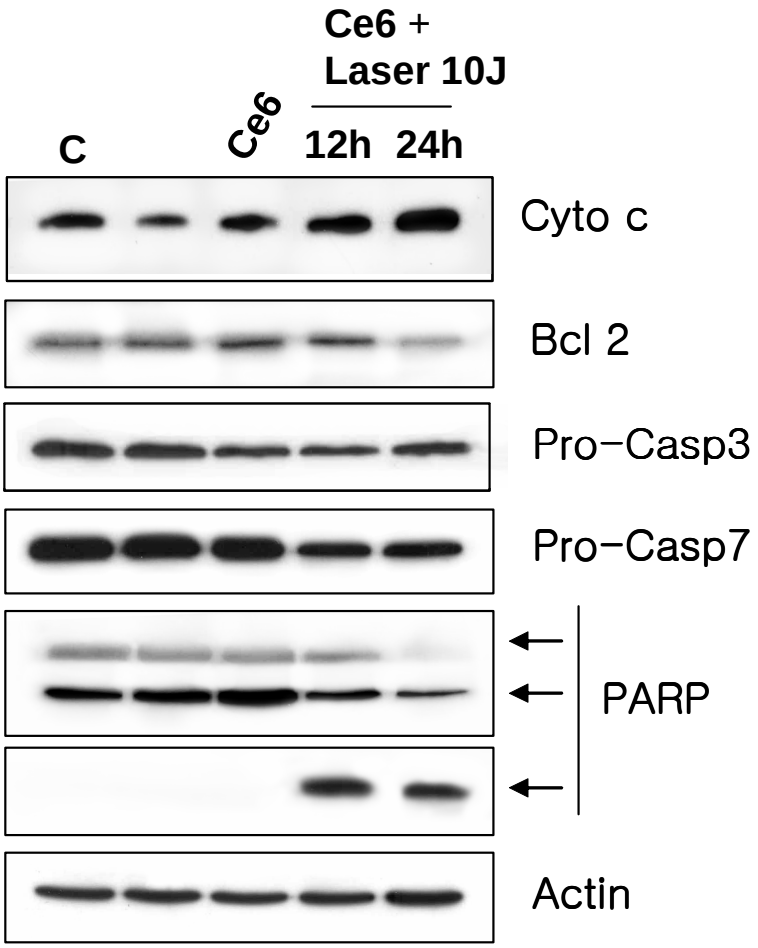

Fig 7. Western blot analysis of apoptosis-related protein following PDT.

Ⅳ. 고 찰

현재 사용되고 있는 광민감제는 1세대인 aminolaevulinic acid (ALA), porfimer sodium (Photofrin®), 헤마토포르피린 유도체(Hpd, Photohem®) 등이 있으며 이들은 대부분 630 nm의 파장에서 에너지 흡수가 극대화되는 특징을 가지고 있다[1,4,10]. 그러나 이들은 체내에서 약 한 달 이상 피부에 남아 햇빛에 노출될 경우 피부화상의 위험이 있으며 광독성의 깊이가 3~15 mm에 불과하여 커다란 종양에서는 치료효과가 적다는 단점이 있다[10]. 반면 2세대 광민감제는 이 연구에 사용한 Chlorin e6, sulphonated aluminum phtlaocyanine (Photosense®)를 비롯해서, m-THPC (5,10,15,20-Tetra (m-hydroxyphenyl)chlorin, Foscan®), bacteriochlorin A 등4,16이 있으며 이들은 모두 최소 650nm 이상의 파장을 가진 광에너지를 흡수하는 특징이 있어, 광독성이 1세대인 Photohem®보다 거의 두 배에 달하는 것으로 알려져 있다[3,10].

광원으로는 광민감제에 맞는 정확한 파장의 광원으로 레이저를 사용하는데 임상적으로 이용할 때에는 약 50~500 J/cm2의 에너지를 전달하게 되나 mTHPC와 같은 2세대의 광민감제같이 효율이 높은 경우 10J/cm2로도 충분한 효과가 있는 것으로 알려져 있다[10,11]. 세포주에 대한 실험에서는 일반적으로 20~40 J/cm^2 정도 혹은 300 W의 일반광원에 단지 필터만 장착해서 필요한 파장만 통과시켜도 충분한 세포독성을 확인할 수 있으며 결과는 큰 차이가 없는 것으로 보고되고 있으며[11], 이 연구에서 사용한 광원은 diode laser (Diode pumped laser driver LD2030, Geumkwang Ltd., Daejeon, Korea)를 이용하였고, chlorin e6 처리 후 24시간 뒤에 660nm파장, 10J/cm^{2}로 세포에 직접 조사하여 세포독성의 효과를 관찰하였다.

광역학 치료의 항암 효과는 크게 4가지 기전에 의해서 일어나는 것으로 알려져 있다. 첫째, 활성산소의 직접 효과로 세포내 구성조직인 미토콘드리아, 세포막 등의 물리화학적인 손상을 유도함으로서 종양세포의 괴사를 일으킨다. 둘째, 혈관에 미치는 효과로 혈관에 손상을 일으킴으로서 혈류속도의 감소 및 혈행정지를 유발하여 종양세포의 산소결핍과 종양괴사를 유도한다. 셋째, 면역학적인 효과로 T-세포와 대식세포의 활성화를 유발하여 다양한 염증매개체의 분비와 종양세포의 직접적인 탐식작용을 일으켜서 종양의 퇴행에 기여한다. 넷째, apoptosis의 유도로 종양세포의 사멸을 일으킨다[6,12].

광역학 치료의 효과에 대한 기전은 일반적으로 세포 내에서 발생하는 singlet oxygen ($_1O^2$)에 의한 세포의 비활성화로 설명이 된다[1,6,8]. 일반적으로 singlet oxygen ($_1O^2$)은 세포 내 이동에 문제가 있으므로, 주로 광민감제가 분포하는 미토콘드리아, 리소좀 혹은 세포벽에서 발생하여 광독성을 나타내는 것으로 알려져 있다[1-3,6-9]. 광역학 치료에 의해 유도되는 세포사는 괴사와 apoptosis 두 가지 경로의 복합적인 과정을 거친다. 그러나 광역학 치료에 의한

세포사의 형태는 사용한 세포주나 광민감제 그리고 치료기기에 따라 다르게 나타나지만, 대부분의 광역학 치료후 세포사의 형태는 apoptosis이다[13,14]. 특히, 치료 조건이 직접적인 세포 괴사를 초래하는 경우보다 낮은 농도나 에너지에서 apoptosis가 발생한다. 광민감제가 주로 미토콘드리아, 리소좀에 주로 축적되어 mitochondrial-cascade 경로를 통해 apoptosis가 일어난다[15,16].

이 연구에서도 광역학 치료에 의한 RK3E-ras 세포에 대한 항암 활성도를 확인하기 위해 성장 억제 효과와 apoptosis의 유도에 대해 연구하였다. 실험결과 광역학 치료에 의한 RK3E-ras 세포의 증식을 억제하고 apoptosis를 유도하였다. 광역학 치료에 의한 RK3E-ras 세포가 apoptosis를 유도하는 전형적인 형태학적 양상은 TUNEL assay 소견과 flow cytometry 분석으로 확인하였다. 그 결과 광역학 치료한 세포에서 apoptosis된 세포가 48.4%였으며 apoptosis와 necrosis가 함께 나타난 세포가 51.6%로 대조군에 비해 세포사된 수가 크게 증가하는 것을 관찰하였다. *In vitro*에서 apoptosis가 유도된 세포를 확인하기 위하여 TUNEL assay를 수행하였다. TUNEL에 양성인 세포의 비율은 PDT를 시행한 세포에서 대조군에 비하여 현저하게 증가되었다. 이러한 결과는 chlorin e6 매개 PDT는 RK3E-ras 세포에 세포사를 유발하며, 주로 apoptosis가 유도됨을 보였다.

일반적으로 mitochondria-mediated cell death pathways는 미토콘드리아로부터 만들어지는 cytochrome c가 caspase cascade 과정을 통해 caspase 9을 활성화시키고 caspase 9은 caspase 3를 활성화 시킨다[17-19]. 세포사의 effect인자인 caspase 3는 활성화된 caspase 7과 함께 DNA 수복에 관여하는 Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP)를 억제한다[17]. 이 연구에서도 광역학 치료후 apoptosis 관련 단백질인 caspase-3/-7, cytochrome c, and PARP. caspase-3/-7/-9을 활성화 시키는지를 실험하였다. 그 결과 caspase 3를 활성화시키는 cytochrome c의 발현이 증가하였다. 또한 미토콘드리아로부터 cytochrome C 유리를 억제하는 bcl-2의 발현이 감소하였다. 아울러 apoptosis signal pathway에 관여하는 중요한 effector enzyme인 pro-caspase 3/7의 활성은 감소하였다. Caspase 7의 down-stream의 pro-PARP(poly(ADP)-ribose polymerase)는 감소되었으나, 활성형인 cleaved PARP의 발현은 광역학 처리한 세포에서 증가하였다. 이와 같은 결과는 chlorin e6 매개 PDT가 미토콘드리아에서 cytochrome c를 유리하고 caspase3/7와 PARP의 활성화를 통해 apoptosis를 유도한다는 사실을 확인하여, chlorine e6 매개 광역학 치료에 의해 유도되는 apoptosis는 mitochondria 매개 경로를 통해 일어남을 알 수 있었다.

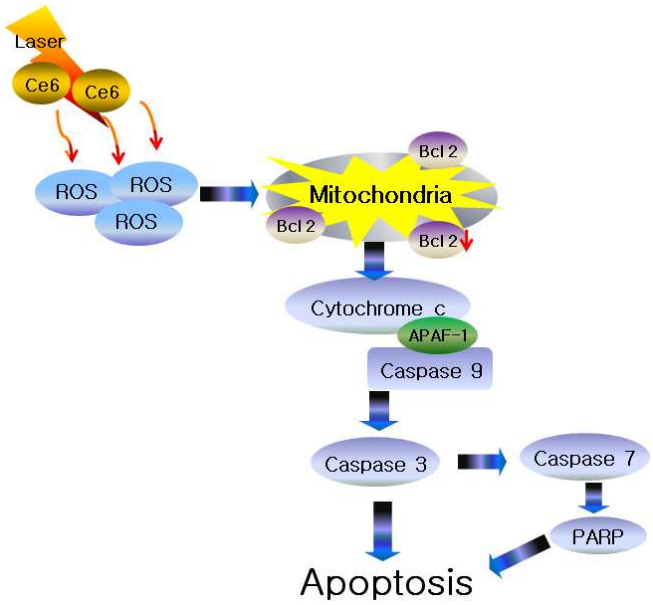

Fig 8. Schematics of PDT-induced effects upon apoptosis signal transduction pathways.

Ⅴ. 결 론

이 연구에서는 기존의 알려진 광민감보다 효능이 탁월한 물질을 개발하고 그 기전을 확인하기 위해 새로운 광민감제 chlorine e6를 이용한 광역학 치료 효과를 RK3E-ras 세포에서 연구하였다. Flow cytometry와 TUNEL assay 결과 chlorin e6 매개 PDT는 RK3E-ras 세포에 apoptosis를 유도하였다. 또한 광역학 치료후 apoptosis 관련 단백질에 대한 연구결과 caspase 3를 활성화시키는 cytochrome c의 발현이 증가하였고, cytochrome C 유리를 억제하는 Bcl-2의 발현이 감소하였다. 또한 pro-caspase 3/7의 감소와 cleaved PARP의 발현이 증가하였다. 이와 같은 결과는 chlorin e6 매개 PDT가 mitochondria에서 cytochrome c를 유리하고 caspase3/7와 PARP의 활성화를 통해 apoptosis를 유도한다는 사실을 확인하여, chlorine e6 매개 광역학 치료에 의해 유도되는 apoptosis는 mitochondria 매개 경로를 통해 일어남을 알 수 있었다.

Ⅵ. 참고문헌

1. Dolmans DEJGJ, Fukumura Dm Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. Nature Review Cancer 3;3:380-7, 2003.

2. Carl D. Update on photodynamic therapy. Curr Opin Opthalmol 2000;11:166-70.

3. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, et al. Photodynamic therapy. J Natl Cancer Inst 90:889-905, 1998.

4. Hampton JA, Selman SH. Mechanism of cell killing in photodynamic therapy using a novel in vivo /in vitro light culture system. Photochem Photobiol 56:235-43, 1992.

5. Oleinick NL, Evans HH. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. Radiat Res 150:S146-56, 1998.

6. Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? Photochem Photobiol 55:145-57, 1992.

7. Lavie G, Kaplinsky C, Toren A, Aizman I, Meruelo D, Mazur Y, et al. A photodynamic pathway to apoptosis and necrosis induced by dimethyltetrahydroxyhelianthrone and hypericin in leukaemic cells: possible relevance to photodynamic therapy. Br J Cancer 79:423-32, 1999.

8. Ball DJ, Luo Y, Kessel D, Griffiths J, Brown SB, Vernon DI. The induction of apoptosis by a positively charged methylene blue derivative. J Photochem Photobiol B 42:159-63, 1998.

9. Biel MA. Photodynamic therapy and the treatment of head and neck neoplasia. Laryngoscope 108:1259-68, 1998.

10. Stranadko EF, Skobelkin OK, Litvin GD, Astrakhankina TA. Photodynamic therapy of human malignant tumors: a comparative study between photohem and tetrasulfonated aluminum phthalocyanine. Proc SPIE 2625:440-8, 1996.

11. Baumgartner, R, Huber RM, Schulz HJ, Stepp H, Rick K, Gamarra F, Leberig A, Roth. Inhalation of 5-amonolevulinic acid: a new technique for fluorescence detection of early stage lung cancer. J Photochem Photobiol B 36:167-74, 1996.

12. Moan J, Berg K. Photochemotherapy of cancer: Exp Res 55:931-48, 1992.

13. Luo Y, Kessel D. Initiation of apoptosis versus necrosis by photodynamic

therapy with chloroaluminum phthalocyanine. Photochem Photobiol 66:479-83, 1997.

14. Lavie G, Kaplinsky C, Toren A, Aizman I, Meruelo D, Mazur Y, et al. A photodynamic pathway to apoptosis and necrosis induced by dimethyltetrahydroxyhelianthrone and hypericin in leukaemic cells: possible relevance to photodynamic therapy. Br J Cancer 79:423-32, 1999.

15. Kocanova S, Buytaert E, Matroule JY, Piette J, Golab J, de Witte P et al. Induction of heme-oxygenase 1 requires the p38MAPK and PI3K pathways and suppresses apoptotic cell death following hypericin-mediated photodynamic therapy. Apoptosis 12(4):731-41, 2007.

16. Hendrickx N, Volanti C, Moens U, Seternes OM, de Witte P, Vandenheede JR et al. Up-regulation of cyclooxygenase-2 and apoptosis resistance by p38 MAPK in hypericin-mediated photodynamic therapy of human cancer cells. J Biol Chem 26;278(52):52231-9, 2003.

17. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: Critical control points. Cell 116(2); 205-9, 2004.

18. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. Science 281;1309-12, 1998.

19. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. Curr Opin Cell Biol 15(6);725-31, 2003.

저작물 이용 허락서

학 과	치의공학과	학 번	20067615	과 정	박사
성 명	한글: 이 하 형 한문: 영문: Ha Hyung Lee				
주 소	강원도 춘천시 석사동 809-3 이하형치과의원				
연락처	033-264-2875 E-MAIL : hhl13369@yahoo.co.kr				
논문제목	한글: Chlorine e6 유도 광역학 치료에 의한 RK3E-ras 세포의 Apoptosis 유도 영문: Apoptosis of RK3E-ras cells by Photodynamic Therapy with Chlorine e6				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

2008년 6월 일

저작자: 이 하 형 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하