

Chlorin e6의 농도별 Photodynamic therapy을 통한 자궁경부암 세포의 사멸도 측정

이언진 · 최세운*

국립금오공과대학교

Photodynamic therapy with chlorin e6-induced cervical cancer cell death

Eonjin Lee · Se-woon Choe*

Kumoh National Institute of Technology

E-mail : eonjin@kumoh.ac.kr / sewoon@kumoh.ac.kr

요 약

본 연구에서는 Chlorin e6 (Ce6)를 입힌 자궁경부암세포를 사멸시키기 위해 레이저 또는 LED를 인가한 PDT (photodynamic therapy)을 실시하고, Ce6 농도와 투여 시간별 사멸도의 변화를 실험하였다. 이를 위해 자궁경부암세포에 광자극을 인가한 후 영상의 처리 및 CCK-8을 이용한 정량적인 평가를 진행하였다. 실험 결과, Ce6은 일정 농도가 높아질수록 많은 양의 세포가 사멸되었고, Ce6를 이용한 PDT 실험군에서 사멸도가 높은 것을 확인하였다. LED와 레이저를 비교하였을 때 레이저는 국소적 위치만 세포의 사멸이 가능하고 LED는 비교적 넓은 범위의 사멸에 효과적인 결과를 확인하였다. 또한 레이저와 같이 국소적 위치를 조사하는 경우 세포 생존도 측정 시 해당 위치의 이미지를 획득한 후 영상처리를 통한 정량분석을 시행하는 방법이 효과적임을 확인하였다.

ABSTRACT

In this paper, after administration of Chlorin e6 to kill cervical cancer cells, PDT (photodynamic therapy) using laser or LED was studied for Ce6 concentration and apoptosis by administration time. After photostimulation was applied to cervical cancer cells, qualitative and quantitative evaluation through imaging and quantitative evaluation using CCK-8 were performed. As a result of the experiment, as the concentration of Ce6 increased, a large amount of cells were killed, and it was confirmed that the Ce6+PDT test group killed more. When comparing the LED and the laser, the laser was able to kill cells only at a local location, and the LED showed the result that it was possible to kill the cells in a wide range. In addition, when irradiating a local location, such as a laser, when measuring the cell viability, it is judged to be accurate to image processing the location.

키워드

Cervical cancer cell, Chlorin e6, Photodynamic Therapy (PDT), Light-emitting diode, laser, Image processing

1. 서 론

항암제를 이용한 암 치료 방법은 정상세포의 손상률이 높고 약물의 내성이 생기면 더 많은 약물을 투여해주어야 하므로, 효과적인 항암치료를 위

해 대체 치료 방법이 필요하다 [1]. Photo Dynamic Therapy (PDT)는 특정 파장대의 광원을 Photosensitizer (PS)에 조사해 PS가 에너지 흡수 후 다시 주변으로 에너지를 발산하면 세포내의 이중 산소를 ROS (활성산소종)로 전환시켜 세포사멸을 일으키는 방법이다 [2-3]. 연구에 많이 사용되는 PS로는 Chlorin e6 (Ce6), AIPcS4, Purpurin 18,

* corresponding author

m-THPC, ALA 등이 있다[4-5]. 이들은 각각 다른 파장대에 에너지를 흡수하고 발산한다. 본 논문에서는 그중 낮은 독성과 높은 ROS 생성률을 보이는 Ce6를 이용하여 자궁경부암 세포에 인가하여 레이저와 LED를 이용하여 세포 사멸도를 확인하고자 한다[6]. 또한 각 광원의 특징과 두 가지 정량적 검출방식을 이용하여 이를 비교하고자 한다.

II. 실험 방법

2.1 세포 배양

실험에는 자궁 경부 암세포 HeLa (한국 세포주 은행, 대한민국)를 사용하였고, 배지는 DDM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Capricorn Scientific GmbH)과 10%의 FBS (Fetal Bovine Serum, pH 7.4, Capricorn Scientific GmbH), 1%의 Penicillin Streptomycin으로 구성해 사용하였다. 37°C와 5%의 이산화탄소를 포함한 환경인 incubator에서 증식시켰다.

2.2 Ce6 처리

Ce6 (chlorin e6, SC-263067, Santa Cruz Biotechnology)은 HeLa cell을 96 well plate에 7×10^5 cells/well로 분주하고, 세포의 안정화를 위해 배양 후 48시간이 지나고 실험을 진행하였다. 0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2.5, 5, 7.5, $10 \mu M$ 농도로 DMEM을 이용해 희석해 이용하였으며 투여 시간은 3h, 6h으로 두 가지 시간으로 나누어 실험을 진행하였다.

2.3 광 자극 인가

광 자극 시스템은 PDT를 이용하기 위해 Ce6의 자극 파장대인 623nm LED와 625nm 레이저를 이용하였다. 실험에 사용된 두 개의 광원을 레이저파워미터 (US/PM100D, Thorlabs)로 측정된 결과 LED는 조사 위치에 따라 5mW, 15mW, 100mW로 측정되었으며 레이저는 8mW로 확인되었다. 또한, well의 중앙에 LED가 조사될 수 있도록 3D 프린터를 사용하여 광 자극 실험용 지지대를 맞춤 제작하였다. Ce6를 투여한 후에 세포에 바인딩 되지 않은 Ce6를 제거하고 PBS로 세척 후에 새 배지를 주입 후에 각 well에 0, 2.5, 5, 7.5, 10분 동안 광 자극을 인가해 주었다.

2.4 세포 생존도 분석

세포 생존율의 정량적인 분석을 위해 CCK-8(cell counting kit 8/WST-8, abcam)를 이용해 Microplate Reader (Synergy HT, BioTek)로 흡광도 측정을 진행

하였다. 생존도의 측정은 광자극을 인가하고 24시간 후에 새로 배지를 교체한 후 CCK-8을 주입해 2시간 동안 incubator 후에 460nm에서 흡광도를 측정하였다. 그림 1과 같이 well에 살아있는 세포 수의 양을 알기 위해서 세포 수별 흡광도를 측정하여 실험 결과와 비교하였다.

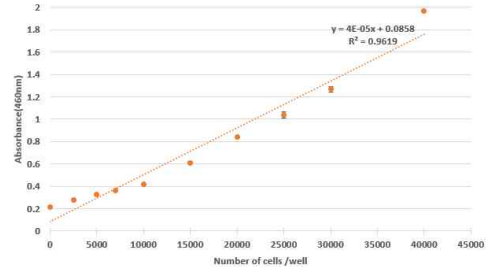


그림 1 HeLa cell 개수 별 흡광도

2.5 Calcein AM 형광 영상처리 및 정량분석

세포 이미지는 실험 전과 후에 역상 광학 현미경(Inverted fluorescent microscope, IX73, Olympus, Japan)을 이용하여 촬영하였다. 또한, 살아있는 세포 수를 확인하기 위해서 살아있는 세포에만 염색이 되는 형광염료 Calcein AM (invitrogen, USA)을 이용하였다. 광 자극을 조사하고 24시간 후에 well에 Calcein AM을 넣어 30분간 staining 한 후 PBS로 세척 후 새 배지를 넣어 형광 이미지를 관측하였다. 추가로 현미경으로 획득한 형광 이미지들은 MATLAB (MathWorks, Natick, MA, USA)을 이용하여 촬영 위치에 대한 세포 생존도를 분석하였다.

III. 실험 결과

세포의 사멸 실험을 위해 실험군은 6개의 그룹(대조군, LED 인가 그룹, Laser 인가 그룹, 다양한 농도의 Ce6 그룹, Ce6+LED 그룹, Ce6+레이저 그룹)으로 나누어 실험을 진행하였으며, 광 자극만 인가한 그룹의 경우 LED는 100mW의 높은 전력에도 사멸이 되지 않은 것을 확인할 수 있다. 하지만 Ce6만 인가한 그룹에도 $2.5 \mu M$ 초과에서는 세포 생존율이 줄어든 것으로 볼 수 있다. Ce6의 농도가 높아질수록 광 자극을 인가해 주었을 때는 Ce6 단독인가 보다 생존율이 많이 감소한 결과를 보였다. 두 광원 중 LED로 광 자극을 인가한 경우 $2.5 \mu M$ 이상에서는 거의 모든 세포가 사멸한 것을 볼 수 있었다. 레이저 자극을 인가한 경우에는 레이저 위치로 원형의 경계가 생겨 레이저의 조사 위치를 확인할 수 있어 광자극에 의한 세포의 사멸인 것을 정확하게 확인할 수 있었다. 또한 CCK-8은 well의 전체의 세포생존도를 분석할 수 있는 데 반해 Matlab을 이용하여 세포 생존도를 분석할 때는

해당 부위만 촬영된 이미지를 이용했기 때문에 자극의 크기가 well의 크기보다 작은 레이저인 경우에 더 정확한 값을 얻을 수 있었다.

IV. 결론

본 연구에서는 두 가지 광원을 이용한 Ce6의 농도별 자궁경부암세포 사멸도를 확인하였다. 세포의 사멸도는 Ce6의 농도가 높아질수록 강하게 나타났으며 농도가 높은 경우 PDT를 진행하지 않아도 세포사멸이 나타났다. 이는 실제 암 치료에 이용 시 Ce6 농도 조절의 필요성을 보인다. LED와 레이저 두 가지 광원은 각각 장단점이 보였다. 레이저는 국소적인 부분에만 광 자극을 인가 가능한 것을 Calcein AM 염색을 통한 현미경사진으로 명확하게 확인할 수 있었다. 반면, LED는 비교적 넓은 영역으로 광원이 발산되는 경향이 있으므로 광범위한 부분에 암세포가 퍼져있는 경우나 종양의 크기가 클 때 이용이 가능할 것으로 보이며 레이저보다 저렴한 가격에 제작이 가능할 것으로 보인다. 따라서 자궁 경부 암세포에는 소량의 Ce6를 이용하여 PDT 요법을 이용하면 높은 사멸을 일으킬 수 있다는 것을 볼 수 있다. 추가적으로 레이저를 이용하여 well의 일부분에 자극을 인가하는 실험인 경우, well 전체의 세포생존도를 보는 경우인 CCK-8보다 이미지를 이용한 생존도 분석이 더 정확하다고 볼 수 있다. 향후 다양한 광원의 인가 방법을 응용하거나, PDT와 추가적인 요법을 추가해 정상세포에 적은 독성을 가지면서 암세포의 높은 사멸도를 나타내도록 실험을 진행할 예정이다 [4-8].

Acknowledgement

본 논문은 4단계 BK21 사업(금오공과대학교 IT 융복합공학과)에 의하여 지원되었으며, 중소벤처기업부에서 지원하는 2022년도 산학연 플랫폼 협력 기술개발사업 (S3310765)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

References

- [1] K. R. Cho, and S. W. Choe, "Basic study on proliferation control of cancer cells using combined ultrasound and LED therapeutic module," *Journal of the Korea Institute of Information and Communication Engineering*, Vol. 22, No. 8, pp. 1107-1113, Aug. 2018.
- [2] J. H. Correia, J.A. Rodrigues, S. Pimenta, T. Dong, and Z. Yang, "Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions," *Pharmaceutics*, Vol. 13, No. 9, 1332, Aug. 2021.
- [3] A.I. Gavrina, M.V. Shirmanova, N.A. Aksenova, D.V. Yuzhakova, L.B. Snopova, A.B. Solovieva, P.S. Timashev, V.V. Dudenkova, and E.V. Zagaynova, "Photodynamic therapy of mouse tumor model using chlorin e6- polyvinyl alcohol complex," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Vol. 178, pp. 614-622, Jan. 2018.
- [4] Z. S. Shi, W. Ren, A. Gong, X. Zhao, Y. Zou, E. Brown, X. Chen, and A. Wu, "Stability enhanced polyelectrolyte-coated gold nanorod-photosensitizer complexes for high/low power density photodynamic therapy," *Biomaterials*, Vol 35, Issue 25, pp. 7058-7067, Aug. 2014.
- [5] Q. Duan, M. Yang, B. Zhang, Y. Li, Y. Zhang, X. Li, J. Wang, W. Zhang, and S. Sang, "Gold nanoclusters modified mesoporous silica coated gold nanorods: Enhanced photothermal properties and fluorescence imaging," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Vol. 215, Feb. 2021.
- [6] M. Luo, H. Li, D. Han, K. Yang, and L. Kang, "Inhibition of autophagy enhances apoptosis induced by Ce6-photodynamic therapy in human colon cancer cells," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, Vol. 36, Dec. 2021.
- [7] B. Jang, J. Y. Park, C. H. Tung, I. H. Kim, and Y. Choi, "Gold Nanorod-Photosensitizer Complex for Near-Infrared Fluorescence Imaging and Photodynamic/Photothermal Therapy In Vivo" *ACS Nano*, Vol. 5, No. 2, pp. 1086-1094, Jan. 2011.
- [8] H. Zhang, H. Li, H. Fan, J. Yan, D. Meng, S. Hou, Y. Ji, and X. Wu, "Formation of plasmon quenching dips greatly enhances OLSUP1₂ generation in a chlorin e6-gold nanorod coupled system". *Nano Research*. Vol. 11, pp. 1456-1469, Feb. 2018.