

Enhanced Susceptibility of Human Squamous Cell Carcinoma to Photodynamic Therapy Combined with Administration of Cisplatin

Jin-Chul Ahn^{1,2,†}, Pil-Sang Chung^{1,2} and Byung Kuhn Park³

¹Medical Laser and Device Research Center, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea.

²Departemnt of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea.

³Departemnt of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Konyang University, Daejeon 302-718, Korea

We have compared the antitumor effect of photodynamic therapy (PDT), using 5-aminolevulinic acid (ALA) as the photosensitizer, combined with cisplatin (CDDP) on AMC-HN3 human squamous cell carcinoma. AMC-HN3 cells were cultured and then incubated with various concentrations of CDDP and ALA. 632 nm diode laser was given at 6.0 J/cm² followed by incubation for 24 hours. The evaluation of cell viability was done by MTT assay. *In vivo* CDDP was injected intraperitoneally 24 hours prior to PDT. The anti-tumor effects of each treatment were measured by tumor volume change. Cell viability were 44.29% for the cisplatin-mediated chemotherapy group (6.25 µg/ml), 77.22% for ALA-PDT group, and 15.06% for the Combination therapy group. *In vivo*, the antitumor effect of photodynamic therapy was enhanced by combination of Cisplatin-mediated chemotherapy. Photodynamic therapy combined with administration of Cisplatin appears to enhance antitumor effect and to be a useful treatment modality.

Key Words: Photodynamic therapy (PDT), 5-aminolevulinic acid (ALA), Cisplatin (CDDP), AMC-HN3 cell, Carcinoma

서 론

광역학치료 (photodynamic therapy; PDT)는 종양에 비교적 집중적으로 침착하는 광감작제를 투여하고 광감작제에 흡수가 잘 되는 특정 파장의 빛으로 광감작제를 활성화시켜 종양을 파괴하여 암을 치료하는 방법으로 1970년대부터 활발히 연구되어 왔다 (Abdulla and Haeger-Aronson, 1971; Dougherty et al., 1998). 광역학치료가 항암 효과를 나타내는 기전에는 광감작제에 흡수된 빛 에너지가 형광으로 방출되거나, 산소로 전이되어 세포에 손상을 일으키는 단일항 산소 및 유해산소 등의 생성에 의한 암세포에 직접적인 손상 (Moan et al., 1979), 종양 공급 혈관의 혀탈에 의한 이차적인 피사 (Nelson et al., 1987), 항종양세포 면역반응 (Krosl et al., 1995; de Vree et al., 1996; Korbelik et al., 1996) 등이 관여한다. 현재 많이 사용되고 있는 Hematoporphyrin 계통의 광감작제를 이용한 광역학치료는 피부 광독성이 오래 지속되고 종양에 대한 선택

성이 좋지 않은 단점이 있다 (Peng et al., 1997).

최근 들어 각광받고 있는 aminolevulinic acid (ALA)는 헴 (heme)의 생합성 경로 중 광감작제인 protoporphyrin IX (PpIX)으로 전환된다. 이 때 외부에서 ALA가 많이 투여되면 체내에 과량의 헴이 생성되어 PpIX을 헴으로 바꾸어 주는 효소인 ferrochelatase의 활성도를 저하시켜 세포 내에 PpIX이 많이 축적된다 (Nseyo et al., 1998). 이 PpIX은 강력한 광감작제로 활성화 되었을 때 형광을 내고 세포 독성을 나타내므로 ALA는 암의 광역학진단과 치료에 도입되었다 (Kennedy and Pottier, 1992). 또한 ALA는 전신 투여 뒤 24시간에서 48시간 내에 대사되어 장기간의 피부 광독성 위험을 줄일 수 있고 종양 선택성이 있어 피부, 위장기관, 폐, 방광, 구강 등의 암 병변을 치료하는데 사용되고 있다 (Ma et al., 1999). 그러나 ALA는 모든 병변에 다 효과가 있지는 않다. 친수성이라 피부로 적용할 때는 효율성이 떨어지며 PpIX이 축적되지 않는 경우에는 사용이 불가능하여 이러한 단점을 개선하고 효과적인 광역학치료를 하기 위해 여러 연구가 시행 중이다. 항암제인 cisplatin은 두경부 악성종양 및 비뇨생식기 계 종양 치료에 우수한 효과를 나타내어 단독 또는 병용 요법으로 널리 이용되고 있다. 그러나 cisplatin은 이독성, 신독성, 골수 억제 등의 심한 부작용을 가지고 있어 투

*논문 접수: 2008년 6월 11일

수정재접수: 2008년 6월 21일

†교신저자: 안진철, (우) 330-714 충남 천안시 암서동 산 29번지,
단국대학교 의과대학 329호 (단국대학교 의학레이저연구센터)
Tel: 041-550-1786, e-mail: jcahn@dankook.ac.kr

여에 한계점을 지닌다. 따라서 이러한 부작용과 그의 예방법에 대한 여러 연구가 있어 왔다. 최근 보고에 따르면 CDDP와 광감작제를 병행하여 광역학치료를 하였을 때, 훨씬 높은 세포 독성능을 볼 수 있다고 한다 (Nahadedian et al., 1988; Canti et al., 1998).

본 연구에서는 인체 두경부 종양세포인 AMC-HN3 cell에 ALA와 CDDP를 병행하여 투여한 뒤 광역학치료를 하여 그에 따른 세포 독성능을 확인하고, ALA만을 이용하여 광역학치료를 한 실험군과 비교하여 증진효과를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 광감각제와 항암제 및 레이저

광감각제는 ALA (5-Aminolevulinic acid, Sigma-Aldrich, Korea)를 사용하였고, 항암제는 Cisplatin (CDDP: cis-diamino-dichloro-platin, United Pharm. Korea)을 사용하였다. 광원은 632 nm diode LASER (Biolitec, Germany)를 사용하였으며 *in vitro*에서는 1 cm diffuser fiber tip (Biolitec, Germany)을, *in vivo*에서는 bare fiber tip (Biolitec, Germany)을 사용하였다.

2. 세포배양

두경부 종양세포인 AMC-HN3 세포주를 DMEM 배양액 500 ml에 우태혈청 50 ml와 antibiotic-antimycotic solution 5.5 ml 섞은 세포배양액으로 세포배양 플라스크 (Nunc, Denmark)를 이용하여 5%의 탄산가스와 95%의 공기가 공급되고 적절한 습도와 37°C의 온도가 유지되는 배양기 (Thermo Forma, USA)에서 배양하였으며 세포의 모양을 inverted microscope (Olympus-CK40, Japan)을 통하여 관찰하였다. 세포들은 플라스크 바닥에 부착하여 자랐으며 트립신 (GibcoBRL, USA)처리 후 계대배양 하였다.

3. 세포 독성능 측정

1) 세포 내에서의 광감작제의 축적 관찰

지수 성장시기의 AMC-HN3 세포를 10^5 cells/ml이 되게 배지로 희석한 뒤 6 well plate에 well당 2.8 ml를 분주하고 24시간을 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 1 mM의 ALA를 포함한 혈청이 없는 배지로 교환하고 0시간, 3시간, 6시간, 9시간까지 빛을 차단하고 배양하였으며 confocal laser scanning microscope에서 세포 내 PpIX의 형성을 형광의 세기로 비교하였다.

2) 광감각제 및 항암제를 이용한 광역학치료

지수성장기의 세포주를 배양배지를 이용하여 10^5 cells/ml의 농도로 희석한 후 96 well plate에 100 μl씩 분주하여 37°C가 유지되는 5% CO₂ 항온 향습기에서 monolayer를 이루도록 24시간 동안 배양하였다.

(1) CDDP 단독치료

CDDP 단독치료시의 세포 독성능을 확인하기 위하여 0.2 μm 주사기 필터 (Gelman, USA)로 멀균한 100 μg/ml CDDP 100 μl을 세포배양 배지로 희석하여 첨가하고 pH 7.3의 DPBS (Hyclone, USA)용액으로 2 fold-dilution을 통하여 CDDP의 농도를 줄여나갔다. CDDP 투여 뒤 3시간, 6시간, 9시간, 24시간 뒤 세포 독성능 검사를 시행하였다.

(2) ALA-PDT 단독치료

혈청이 없는 배지의 96 well plate에 200 μg/ml부터 0.391 μg/ml까지 2배수 간격으로 희석된 다양한 농도의 ALA를 투여하였다 24시간 배양 후 6.0 J/cm²로 반사판을 이용하여 plate 상방 10 cm에서 diffuser tip을 이용하여 레이저를 조사한 후, 48시간 동안 다시 동일조건에서 배양하였다.

(3) CDDP + ALA-PDT 병행치료

혈청이 없는 배지에 CDDP는 6.25 μg/ml, ALA는 25 μg/ml, 50 μg/ml을 투여하고 24시간 배양하고 24시간 후 6.0 J/cm²로 반사판을 이용하여 plate 상방 10 cm에서 diffuser tip을 이용하여 레이저를 조사한 후, 48시간 동안 다시 동일조건에서 배양하였다.

3) 세포 독성능 검사

(1) 광학현미경 관찰

광역학치료군과 CDDP + PDT 병행 치료군에서의 세포의 모양을 inverted microscope (Olympus-CK40, Japan)을 통하여 관찰하고 치료 전의 모습과 비교하였다.

(2) MTT assay

광감작제와 레이저 조사가 세포에 미치는 독성능을 알아보기 위해 MTT assay 방법을 이용하였다. 각 well에 50 μl의 PBS에 녹인 MTT 용액을 50 μl씩 첨가하고, 4시간 동안 배양하였다. Formazan이 형성되면 각 well의 배지를 모두 제거하고 150 μl의 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 첨가한 후 micromixer로 잘 흔들어 주었으며, ELISA reader로 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였고, 측정한 흡광도는 살아있는 세포의 수와 직접 비례하는데 대조군과 비교하여 다음의식을 이용하여 세포 생존률 (cell viability)을 계산하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{Mean optical density in test well}}{\text{Mean optical density in control well}} \times 100$$

4. 종양의 광역학치료

1) 세포주의 이종이식

37°C 가 유지되는 5% CO_2 항온-항습기에서 단층(monolayer)을 이루도록 배양된 AMC-HN3 세포주를 트립신으로 처리하여 세포를 분리하고 세포의 농도를 10^8 cells/ml개로 만들었다. 그리고 30 gauge(G) 인슐린 주사기로 6주령의 BALB/C/nu/nu (Charles River, Osaka, Japan) 암컷 실험 쥐의 등에 0.1 ml씩 피하로 주입하고 종양의 형성 유무를 관찰하여 1주일에 1번씩 4주간 종양의 크기를 관찰하였다.

2) 종양의 광역학치료

실험 쥐 ($n=60$)에 이종이식된 종양의 크기가 약 100~300 mm³에 도달하였을 때 총 5개의 실험군으로 나누어 실험을 실시하였다. 제 1 군 ($n=10$)은 레이저만 조사한 군 (L군)으로 종양의 주변 네 방향에서 632 nm 다이오드 레이저를 (132 J/cm², 400 mW) 조사하였다. 제 2 군 ($n=10$)은 ALA만 투여한 군 (A군)이고, 제 3 군 ($n=10$)은 2 mg/kg 농도의 CDDP만 투여한 군 (C군), 제 4군 ($n=15$)은 ALA-광역학치료군 (P군)으로 실험 쥐에 375 mg/kg

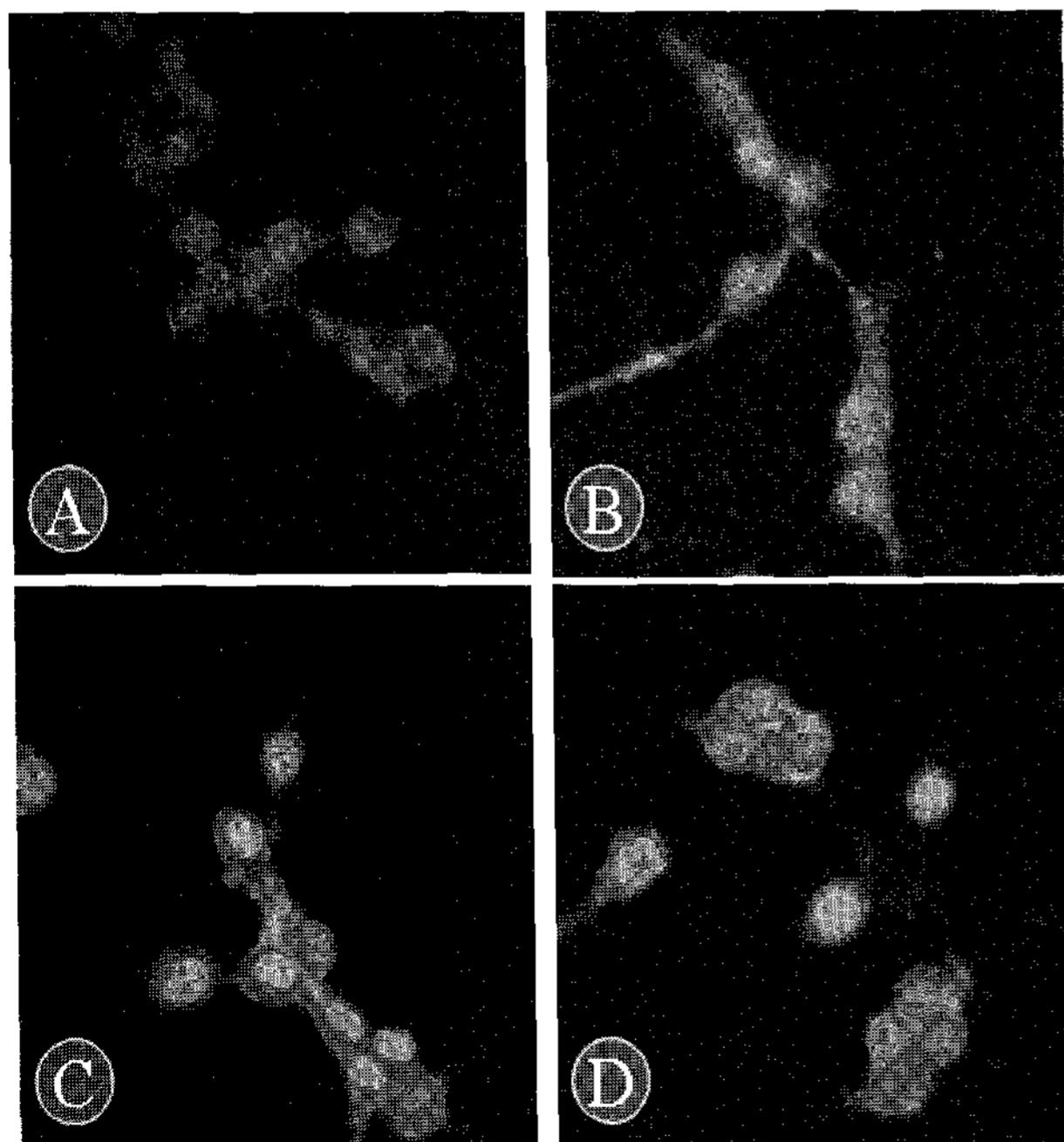


Fig. 1. The intracellular accumulation of PpIX according to incubation time with ALA. A: 0 hr, B: 3 hr, C: 6 hr, D: 9 hr after ALA application. The fluorescence of PpIX was saturated at 6 hour after the ALA application to AMC-HN3 cell.

농도의 ALA를 복강 내 주입한 후 6시간 뒤에 레이저로 광역학치료를 하였다. 제 5 군 ($n=15$)은 ALA-광역학치료와 CDDP 병합치료한 군 (C+P군)이었다.

5. 항암효과의 판정

각 군에서 치료 후 일주일에 2번씩의 종양의 부피를 측정하여 항암효과를 판정하였다. 부피의 계산은 다음의 공식을 이용하였다.

$$V = (4/3 \times A \times B \times C) \times 1/2$$

(V : 부피, A : 장축, B : 단축, C : 높이)

병합치료군에서의 조직괴사를 보기 위해 치료 전과 병용치료 24시간, 48시간 후에 종괴를 Hematoxylin-eosin 염색을 하여 관찰하였다.

6. 통계처리

통계처리는 ANOVA test를 사용하였으며 P -value는 0.05 미만을 유의한 수준으로 채택하였다.

결 과

1. 세포 독성능 측정

1) 세포 내에서의 광감작제의 축적 관찰

0시간, 3시간 뒤 형광검출은 저명하지 않았으나 6시간 이후에는 PpIX이 거의 포화된 수준에 이르러 9시간까지 plateau를 형성하였다 (Fig. 1).

2) CDDP 농도에 따른 따른 세포 독성능

CDDP 투여 뒤 배양시간에 따른 세포 생존률의 차이를 보면 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 CDDP 투여 후 3, 6, 9, 24 시간 배양한 군의 세포 생존률은 각각 $38.04 \pm 1.54\%$, $23.08 \pm 1.36\%$, $20.41 \pm 1.72\%$, $5.50 \pm 0.34\%$ 를 보였다. 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농

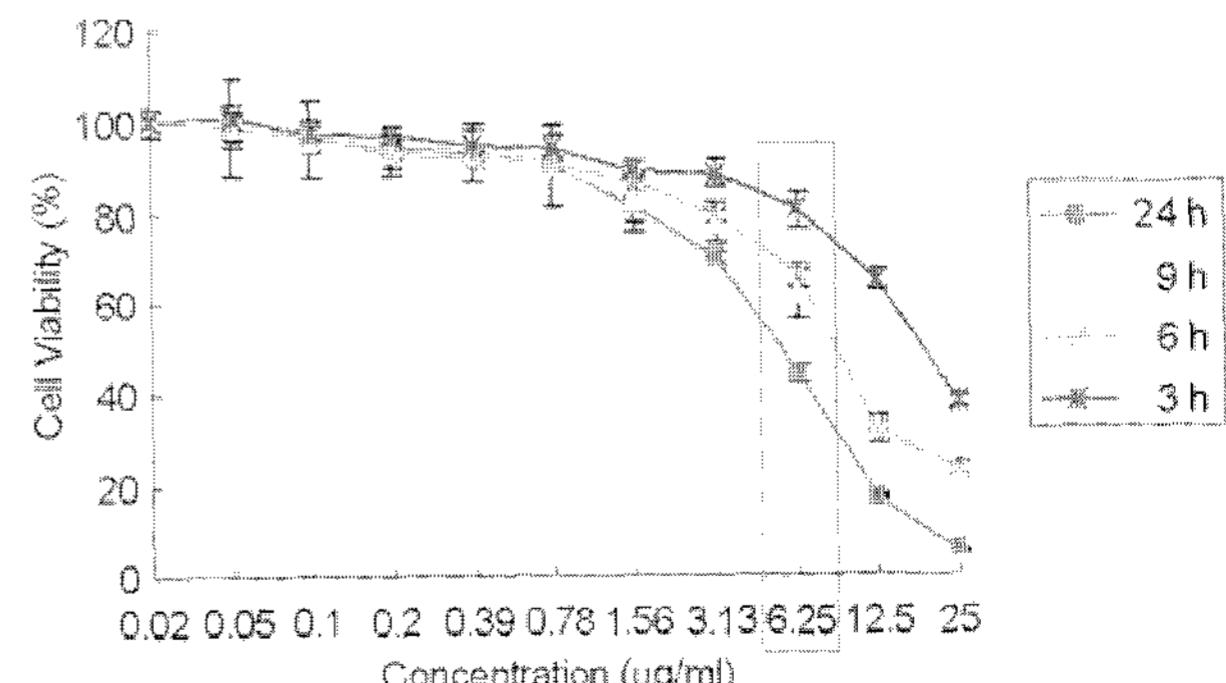


Fig. 2. Cell viability of AMC-HN3 cell by incubation time with various concentrations of cisplatin

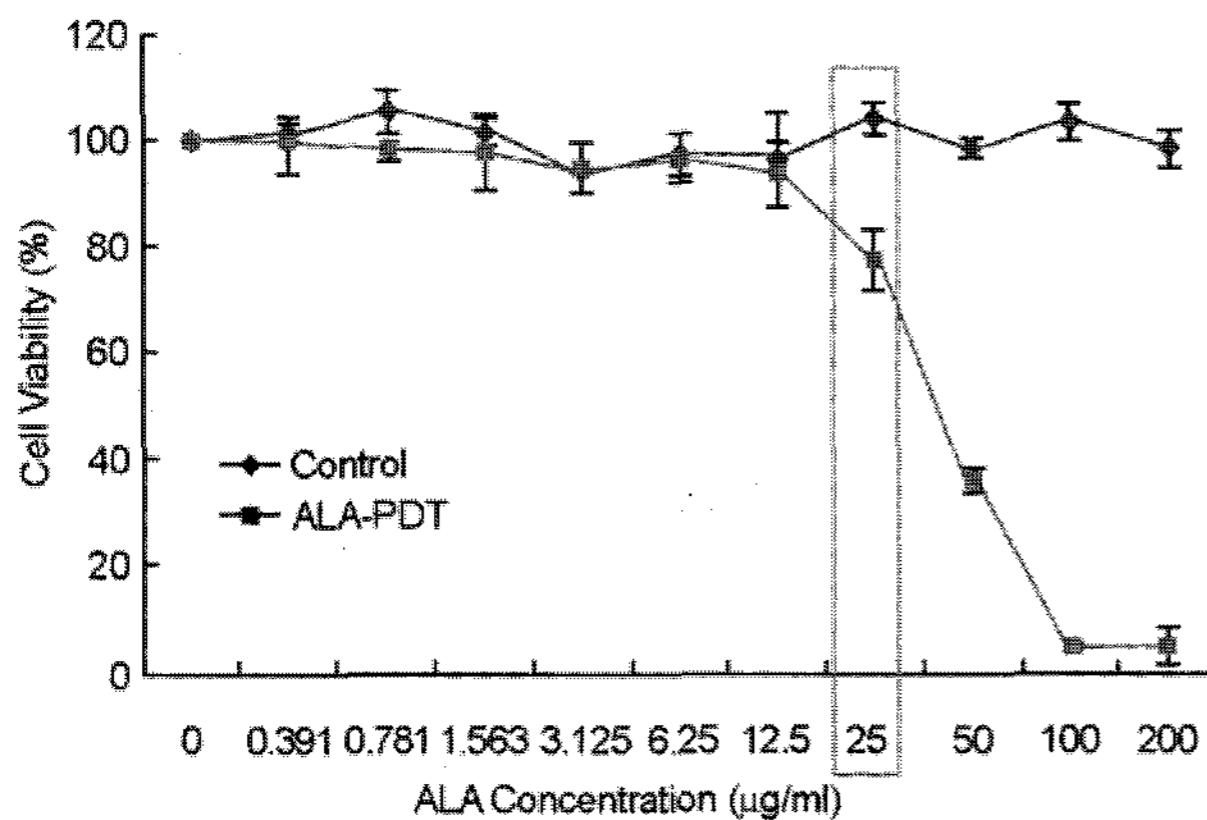


Fig. 3. Effect of various concentration of ALA based PDT on AMC-HN3 cell viability.

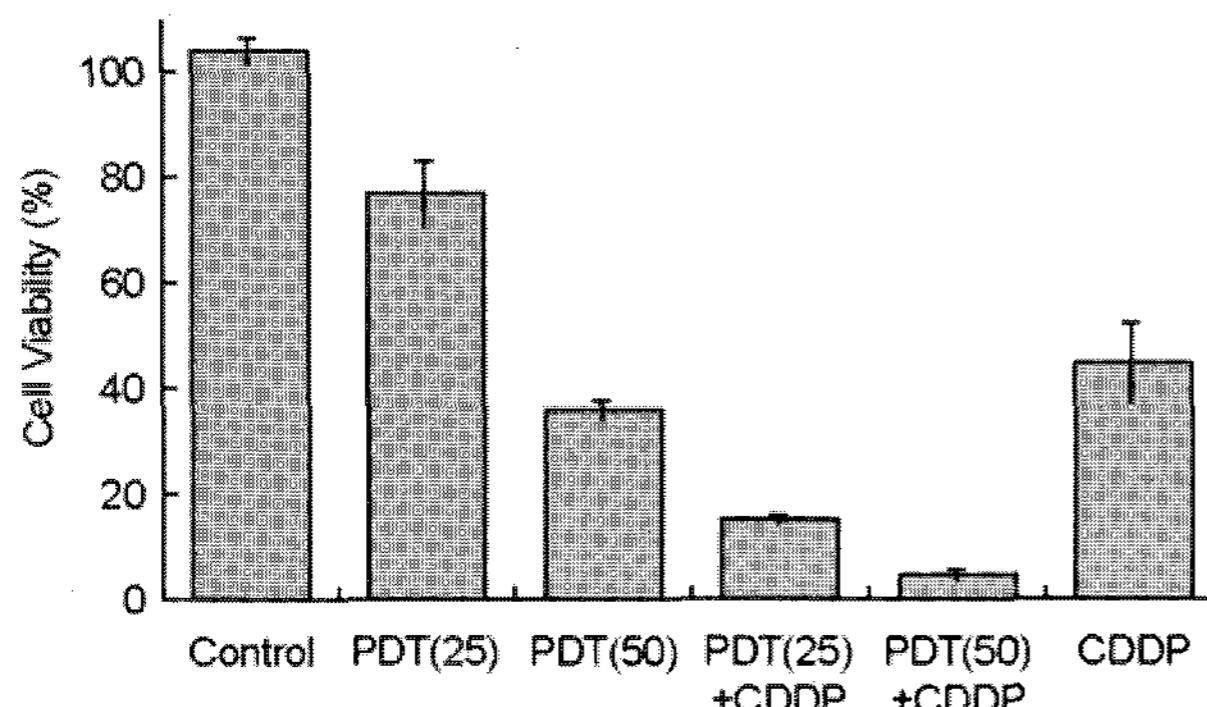


Fig. 4. Effect of PDT + CDDP combination therapy. PDT(25): ALA 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, PDT(50): ALA 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, CDDP 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

도의 CDDP 투여 후 배양한 군에서의 세포 생존률은 각각 $80.16 \pm 3.77\%$, $66.09 \pm 2.61\%$, $61.84 \pm 5.04\%$, $44.29 \pm 2.26\%$ 였다. 1.563 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 CDDP 투여 후 배양한 군에서의 세포 생존률은 각각 $89.05 \pm 1.75\%$, $86.52 \pm 1.72\%$, $82.37 \pm 4.61\%$, $81.15 \pm 5.46\%$ 였다. CDDP의 농도는 1.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상부터 세포 생존률이 전체적으로 유의하게 낮았고, 0.781 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이하 농도의 CDDP 투여 후 배양한 군에서는 배양시간에 따른 세포 생존률간의 통계학적 유의성은 없었다 (Fig. 2).

3) ALA 농도에 따른 따른 세포 독성능

ALA가 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도부터 대조군과 유의한 세포 생존률의 차이를 보이기 시작하였으며, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 $77 \pm 5.7\%$ 의 세포 생존률을 보였고, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 $36 \pm 2.1\%$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 $4.7 \pm 5.3\%$ 의 세포 생존률을 보여 농도가 높아질수록 세포 생존률도 감소됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

4) ALA와 CDDP를 병행한 광역학치료의 세포 독성능

병용치료의 증진효과를 관찰하기 위하여 고정된 농

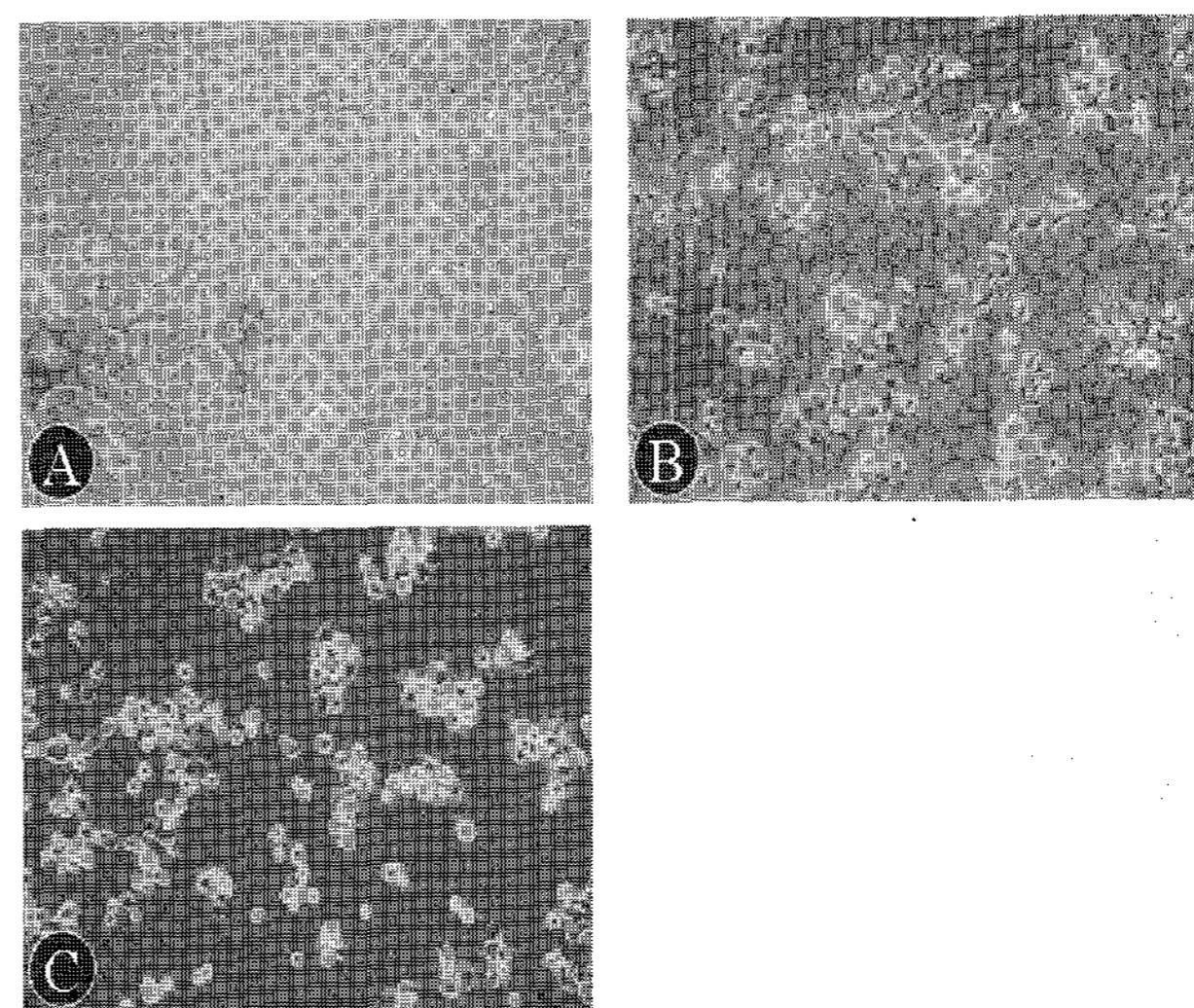


Fig. 5. Microscopic findings of culture flask ($\times 200$) A: Control group, B: PDT only group, C: CDDP + PDT combination group.

도의 CDDP와 ALA에서의 세포 생존률을 비교하였다. CDDP 단독치료시 6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 $44.29 \pm 2.26\%$ 세포 생존률을 보였으며, PDT (ALA: 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 시 세포 생존률은 $77.22 \pm 5.70\%$ 보였으나 병용치료시 $15.06 \pm 0.76\%$ 의 생존율을 보였고 PDT (ALA: 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 시 세포 생존률은 $36.15 \pm 2.11\%$ 보였으나 병용치료시 $5.06 \pm 0.68\%$ 의 생존률을 보였다 (Fig. 4).

5) 광학현미경 관찰

광역학치료군과 CDDP + PDT 병행치료군에서의 세포의 모양을 inverted microscope를 통하여 관찰하고 대조군과 비교하였다. 대조군에서는 대부분의 세포배양 플라스크의 바닥에 부착되어 자라는 모습을 보였고, 광역학치료로 단독군에서는 일부의 세포들이 세포배양 플라스크의 바닥에서 탈락되는 것이 관찰되었으며, CDDP와 광역학치료 병행군에서는 많은 수의 세포들이 세포배양 플라스크의 바닥에서 탈락되는 것이 관찰되었다 (Fig. 5).

2. 이종이식된 종양의 광역학치료

치료 4주 뒤 L군, A군, C군에서는 모든 예에서 종양의 크기가 증가되는 소견을 보였다. P군에서는 치유가 되지 않은 종양이 3예 (20%), 완치가 8예 (53%), 재발을 보인 종양이 4예 (27%)였으며, C + Prns에서는 치유가 되지 않은 종양이 2예 (13%), 완치가 12예 (80%), 재발을 보인 종양이 1예 (7%)였다 (Fig. 6, 7).

광역학치료를 시행하기 전부터 치료 후 28일 간 종양의 크기를 비교해 보면 레이저 조사만을 시행한 L군은 군으로 종양의 크기가 치료 전 $532 \pm 51 \text{ mm}^3$ 에서 2주 뒤

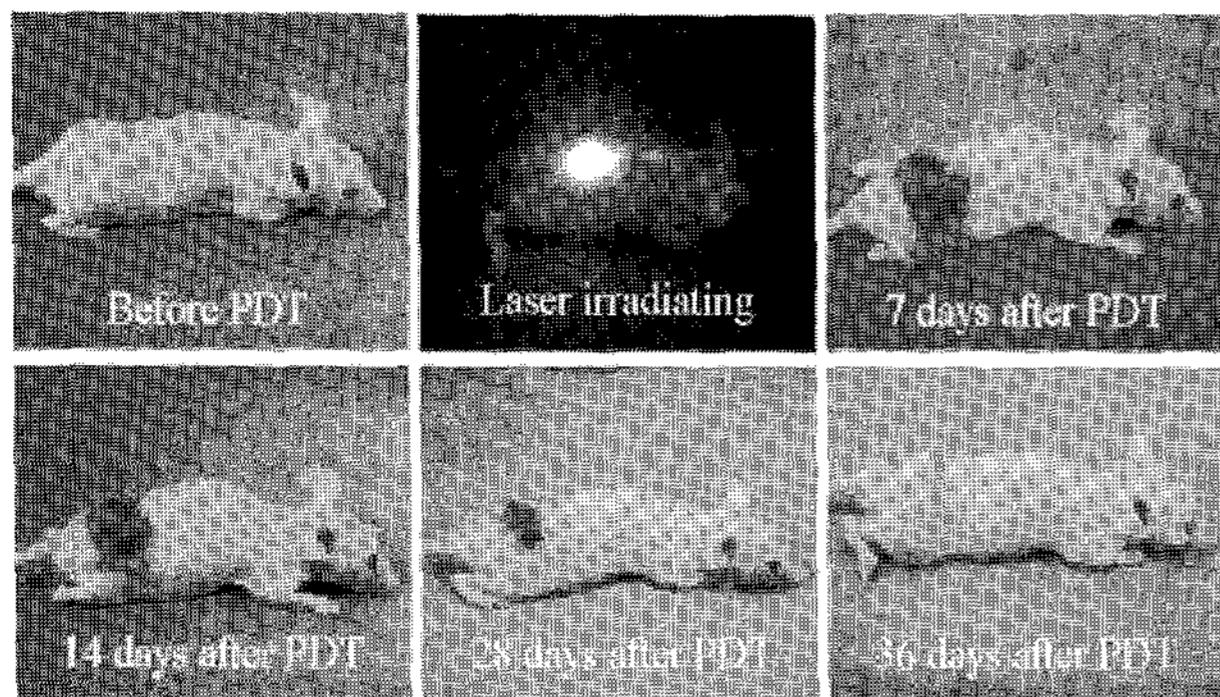


Fig. 6. Complete Tumor remission after ALA-PDT + CDDP.

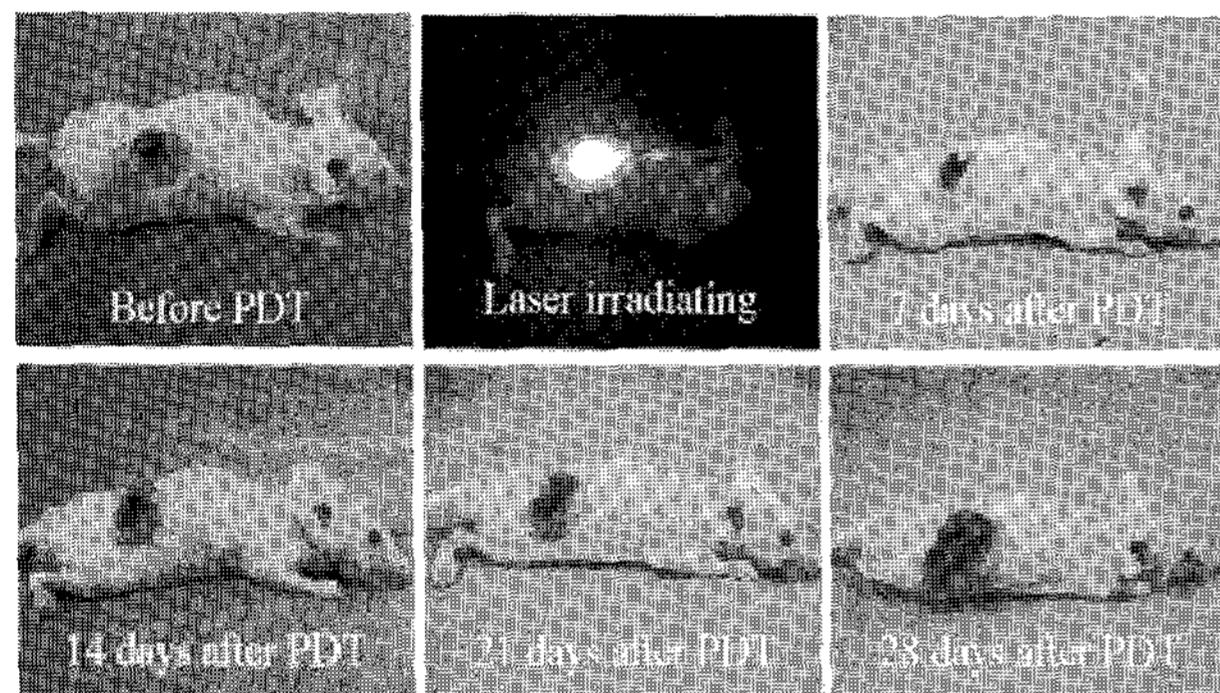


Fig. 7. No Tumor remission after ALA-PDT + CDDP.

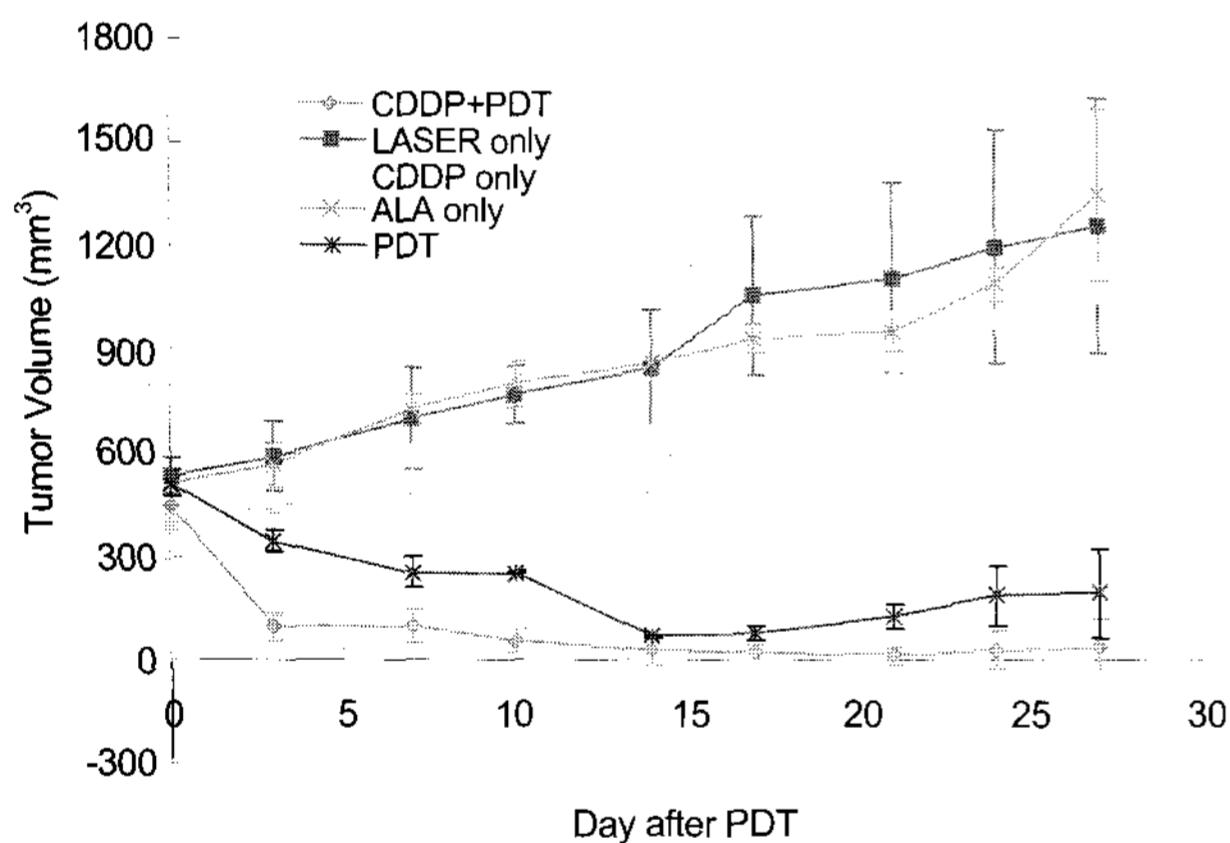


Fig. 8. Tumor volume change of transplanted AMC-HN3 cell for each treatment group.

$842 \pm 167 \text{ mm}^3$, 4주 뒤 $1258 \pm 370 \text{ mm}^3$ 로 꾸준히 증가함을 관찰하였다. ALA만을 투여한 A군은 종양의 크기가 치료 전 $510 \pm 12 \text{ mm}^3$ 에서 2주 뒤 $860 \pm 8.5 \text{ mm}^3$, 4주 뒤 $1344 \pm 252 \text{ mm}^3$ 로 꾸준히 증가함을 관찰하였다. CDDP만을 투여한 C군은 종양의 크기가 치료 전 $396 \pm 102 \text{ mm}^3$ 에서 2주 뒤 $574 \pm 104 \text{ mm}^3$, 4주 뒤 $1125 \pm 94 \text{ mm}^3$ 로 꾸준히 증가함을 관찰하였다. ALA-광역학치료를 시행한 P군은 종양의 크기가 치료 전 $512 \pm 38 \text{ mm}^3$ 에서 2주 뒤 68 mm^3

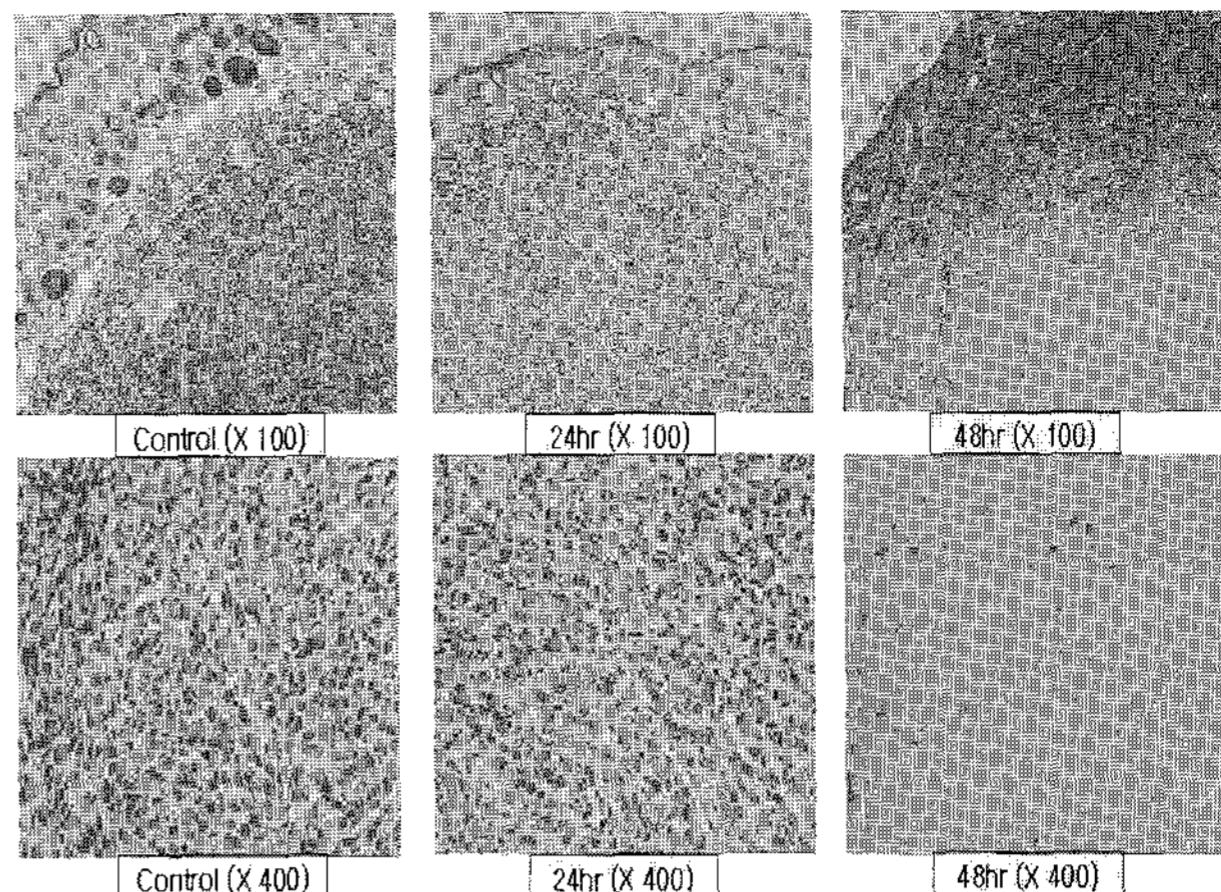


Fig. 9. Histologic findings of xenografted tumor after ALA PDT + CDDP combination therapy. After 24 hour, there was focal tumor necrosis and lymphocytic infiltration. After 48 hours, there was extensive coagulative tumor necrosis.

$\pm 2.5 \text{ mm}^3$ 감소하였다가, 4주 뒤 $195 \pm 129 \text{ mm}^3$ 로 약간 증가함을 관찰하였다.

ALA-광역학치료와 CDDP 병합치료를 시행한 C + P군은 종양의 크기가 치료 전 $445 \pm 29 \text{ mm}^3$ 에서 2주 뒤 $27 \pm 40 \text{ mm}^3$, 4주 뒤 $32 \pm 85 \text{ mm}^3$ 로 꾸준히 감소함을 관찰하였다 (Fig. 8). 치료효과 확인을 위해 병용치료군에서 이종이식된 종양을 치료 전, 치료 24시간, 48시간 후 Hematoxylin-eosin 염색을 통하여 관찰하였으며 치료 24시간 후 종양의 초점성 괴사와 림파구 침윤이 관찰되었으며, 48시간 후 종양의 광범위한 응고성 괴사소견이 관찰되었다 (Fig. 9).

고 칠

ALA의 장점 중 하나는 다른 광감작제에 비하여 부작용이 적은 것인데, 다른 광감작제들의 경우 체내의 투여되었을 때 위에 많이 분포하게 되는데 이로 인한 협착 및 perforation 등을 유발하게 된다. 하지만, ALA의 경우는 위의 점막부분에 주로 분포하므로 이러한 부작용의 위험성이 상대적으로 적다. 그리고 종양조직에 대한 선택성 및 경구 투여가 가능하다는 점들도 다른 광감작제들에 비해 ALA만이 갖는 장점이다 (Sharman et al., 1999).

세포주에 ALA를 주입하고 배양함으로써 생성되는 PpIX의 양은 PpIX의 형광 관찰로 알 수 있다. Regula 등은 ALA 투여 뒤 PpIX 형광의 최대치가 되는 시간이 서로 다른 조직에서 1시간에서 6시간 사이라고 하였으며 (Regula et al., 1995) Chung 등은 SNU1041 세포주에서

ALA 투여 2시간에서 5시간 사이에 형광이 최대치가 되는 것을 관찰하였다 (Chung et al., 2003). 본 연구에서는 혈청이 없는 배지에 1 mM로 희석한 ALA를 투여한 뒤 confocal laser scanning microscope을 이용하여 세포 내 PpIX의 형광검출을 관찰하였다. 이 때 3시간 후에 약한 분포를, 6시간 이후에는 PpIX이 거의 포화된 수준을 보여 3시간에서 6시간 사이에 세포에 PpIX의 축적이 일어나 포화되는 것을 알 수 있었다. 다른 연구에서 간암 (hepatoma cell)세포, 섬유모세포종양 (neuroblastoma)세포에서의 PpIX의 축적은 12시간까지 꾸준히 증가하였고 신경모세포종양 (neuroblastoma)세포는 8시간 정도부터 포화상태를 나타내었다는 결과 등이 있으며 이로써 세포의 종류에 따라 차이가 있음을 알 수 있다 (Wu et al., 2003).

혈청이 여러 세포주에서 PpIX의 방출을 일으키는 것으로 보인다는 보고가 있으며 (Iinuma et al., 1994), 혈청을 뺀 배지와 포함한 배지에서 광역학치료를 한 결과 혈청이 첨가된 실험군에서 광독성이 감소하였다는 (Riesenbergs et al., 1996; Kim et al., 2005) 보고에 의거하여 본 실험에서 *in vitro* ALA-광역학치료시 혈청을 뺀 배지를 사용하였다.

ALA와 CDDP (cisplatin)을 병행하여 광역학치료를 한 것은 종양세포를 사멸시킬 시에 발생하는 정상세포의 부작용을 최소화하기 위함이었기 때문에 (Nonaka et al., 2002) 본 연구에서는 많은 광감작제 중 ALA를 선택하였으며, 항암제는 가장 보편화되어 있는 cisplatin을 사용하였다. 병용치료시 CDDP의 농도는 IC₅₀값에 가까운 세포 생존률을 보이는 값 중 가장 낮은 농도인 6.25 µg/ml CDDP 24시간 배양치료군을 선택하였다. 병용치료시의 ALA의 농도는 12.5 µg/ml 이하의 농도에서는 세포 생존률이 93.20% 이상으로 대조군과 큰 차이를 보이지 않고, 100 µg/ml 이상의 농도에서는 4.71% 이하 세포 생존률을 보여 병행치료효과 관찰이 어려울 것으로 판단되어 25 µg/ml와 50 µg/ml의 ALA-PDT 군을 선택하였다.

CDDP 단독치료시 6.25 µg/ml에서 44.29±7.80% 세포 생존률을 보였으며, PDT (ALA: 25 µg/ml) 시 세포 생존률은 77.22±5.70% 보였으나 병용치료시 15.06±0.76%의 생존률을 보였고 PDT (ALA: 50 µg/ml) 시 세포 생존률은 36.15±2.11% 보였으나 병용치료시 5.06±0.68%의 생존률을 보였다.

CDDP와 ALA 25 µg/ml 광역학치료군, ALA 50 µg/ml 광역학치료에서 단독치료시 각각 44.29%, 77.22%, 36.15%

의 세포 생존률을 보여 병용치료시 부가적인 효과만을 나타낸다면 약 34.20%, 16.01%가 기대되지만 본 연구에서는 각각 15.06%, 5.06%의 세포 생존률을 보여 부가적 효과 이상의 세포 독성능을 보인다는 것을 확인하였으며, 기존에 보고되어 있는 논문에 따르면, apoptosis 역시 더 높게 나타난다고 한다 (Agarwal et al., 1991; He et al., 1994).

PDT군과 CDDP+PDT 병행치료군, 대조군에서의 세포의 모양을 inverted microscope을 통하여 관찰하였을 때 대조군에서는 대부분의 세포배양 플라스크의 바닥에 부착되어 자라는 모습을 보였고, 광역학치료로 단독군에서는 일부의 세포들이 세포배양 플라스크의 바닥에서 탈락되는 것이 관찰되었으며, CDDP와 광역학치료 병행군에서는 많은 수의 세포들이 세포배양 플라스크의 바닥에서 탈락되는 것이 관찰되었다. 세포배양 플라스크에서 세포들이 탈락되는 정도의 차이 역시 세포 생존률의 차이를 간접적으로 시사하는 것으로 생각된다.

동물 실험에서 LASER 치료군, ALA 치료군, CDDP 치료군에서는 4주간의 관찰 동안 종양이 치유되지 않았으나, 광역학치료군과 병용치료군에서 다른 군과 의미있는 차이로 종양의 크기가 감소하는 것이 관찰되었다. 광역학치료군과 병용치료군 사이에서도 유의하게 병용치료군에서의 종양부피의 감소 정도가 나타났으며, 병용치료군에서 재발이 유의하게 낮았다.

병용치료군에서 이종이식된 종양을 치료 전, 치료 24시간, 48시간 후 Hematoxylin-eosin 염색을 통하여 관찰하였으며 치료 24시간 후 종양의 초점성 괴사와 림파구 침윤이 관찰되었으며, 48시간 후 종양의 광범위한 응고성 괴사소견이 관찰되었다.

두 가지 약을 병행함으로 해서 더 높은 세포 독성능을 보인다는 것은 좀 더 적은 농도의 약으로 광역학치료가 가능하다는 것이고, 그에 따른 부작용이 적어진다는 것을 의미한다. 이러한 결과들은 매우 획기적이고 흥미로운 결과이며, 그에 따른 apoptosis가 더 높게 나타나는 기전에 대한 연구가 필요하다.

감사의 글

본 연구는 단국대학교 의학레이저연구센터의 지원을 받아 이루어진 것임.

REFERENCES

- Abdulla M, Haeger-Aronson B. ALA-dehydratase activation by zinc. Enzyme 1971. 12: 708-710.
- Agarwal ML, Clay ME, Harvey EJ, Evans HH, Antunez AR, Oleinick NL. Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. Cancer Res. 1991. 51: 5993-5996.
- Canti G, Nicolin A, Cubeddu R, Taroni P, Bandieramonte G, Valentini G. Antitumor efficacy of the combination of photodynamic therapy and chemotherapy in murine tumor. Cancer Lett. 1998. 125: 39-44.
- Chung PS, Jung SO, Ahn JC, Lee SJ, Yoon JS. Distribution patterns in the tumor tissue and normal tissue according to the administration methods and ALA and ALA-methylester. Kor J Head Neck Oncol. 2003. 19: 21-24.
- de Vree WJ, Essers MC, de Brujin HS, et al. Evidence for an important role of neutrophils in the efficacy of photodynamic therapy *in vivo*. Cancer Res. 1996. 56: 2908-2911.
- Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, et al. Review. Photodynamic therapy. J Natl Cancer Inst. 1998. 90: 889-905.
- He XY, Sikes RAQ, Thomsen S, Chung LW, Jacques SL. Photodynamic therapy with photofrin II induces programmed cell death in carcinoma cell lines. Photochem Photobiol. 1994. 59: 468-473.
- Iinuma S, Farshi SS, Ortell B, Hasan T. A mechanistic study of cellular photodestruction with 5-aminolevulinic acid induced porphyrin. Br J Cancer 1994. 70: 21-28.
- Kennedy JC, Pottier RH. Endogenous protoporphyrin X, a clinical useful photosensitizer for photodynamic therapy. J Photochem Photobiol B. 1992. 14: 275-292.
- Kim JS, Chung PS, Lee SJ, Oh CH, Chung SY, Park JY, Kim YS. The photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid (ALA): The study of the anti-tumor effect on *in vitro* and *in vivo* experiments. Kor J Otolaryngol. 2005. 48: 234-240.
- Korbelik M. Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. J Clin Laser Med Surg. 1996. 14: 329-334.
- Krosol G, Korbelik M, Dougherty GJ. Induction of immune cell infiltration into murine SCCVII tumour by photofrin-based photodynamic therapy. Br J Cancer 1995. 71: 549-555.
- Ma G, Ikeda H, Inokuchi T, Sano K. Effect of photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid on 4-nitroquinolone-1-oxide-induced premalignant and malignant lesions of mouse tongue. Oral Oncology 1999. 35: 120-124.
- Moan J, Pettersen EO, Christensen T. The Mechanism of photodynamic inactivation of human cells in vitro in the presence of haematoporphyrin. Br J Cancer. 1979. 39: 398-407.
- Nahadadian MY, Chhen RA, Contino MF, Terem TM, Wright WH, Berns MW, Wile MW. Combination cytotoxic chemotherapy with cisplatin or doxorubicin and photodynamic therapy in murine tumor. J Natl Cancer Inst. 1988. 80: 739-743.
- Nelson JS, Liaw LH, Berns MW. Tumor destruction in photodynamic therapy. Photochem Photobiol. 1987. 46: 829-835.
- Nonaka M, Ukedo H, Inokuchi T. Effect of combined photodynamic and chemotherapeutic treatment on lymphoma cells *in vitro*. Cancer Lett. 2002. 84: 171-178.
- Nseyo UO, Shumaker B, Klein EA, Sutherland K. Photodynamic therapy using porfimer sodium as an alternative to cystectomy in patients with refractory transitional cell carcinoma *in situ* of the bladder. Bladder Photofrin Study Group J Urol. 1998. 160: 39-44.
- Peng Q, Warloe T, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Giercksky KE. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Principles and experimental research. J Photochem Photobiol B. 1997. 65: 235-251.
- Regula J, MacRobert AJ, Gorchein A, Buonaccorsi GA, Thorpe SM, Spencer GM, et al. Photosensitisation and photodynamic therapy of esophageal, duodenal, and colorectal tumors using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX-a pilot study. Gut 1995. 36: 67-75.
- Riesenber R, Fuchs C, Kriegmair M. Photodynamic effects of 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin on human bladder carcinoma cell *in vitro*. Eur J Cancer 1996. 32: 328-334.
- Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. DDT. 1999. 4: 507-517.
- Wu SM, Ren QG, Zhou MO, Wei Y, Chen JY. Photodynamic effects of 5-aminolevulinic acid and its hexylester on several cell lines. Acta Biochimica et Biophysica Sinica. 2003. 35: 655-660.