

Enhancement of Anticancer Effect through Photodynamic Therapy with High Oxygen Concentration

Yun-Ho Kim¹, Phil-Sang Chung¹, Sang Joon Lee¹, Jang-In Shin²,
Heejun Hwang² and Jin-Chul Ahn^{2,†}

¹Department of Otolaryngology-Head & Neck Surgery,

²Medical Laser and Device Research Center, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

In photodynamic therapy (PDT), oxygen plays important role. Because of singlet oxygen which is produced by activated photosensitizer after laser irradiation of specific wavelength. The aim of this study is to find how oxygen concentration affects anticancer effect in PDT. Groups were divided into PDT with oxygen applied group and only PDT applied group. PDT with oxygen applied group supplied oxygen for 15 minute before laser irradiation. In vitro, CT-26 cell was incubated with various concentration of photofrin (50.0~0.05 µg/ml) and was irradiated with 632 nm diode laser 6 hr after application of photofrin. The cell viability of two groups was assessed by MTT assay. In vivo, CT-26 cell line was transplanted into the subcutaneous tissue of BALB/c mouse. The anticancer effect of two groups was measured by tumor volume change. In vitro study, the cell viability was significantly decreased at 1.56~3.13 µg/ml in PDT with oxygen applied group. In vivo study, the PDT with oxygen applied group significantly higher reduction rate of tumor volume 7 days after PDT compared to PDT only group. The high oxygen concentration might enhance the anticancer effect of the photodynamic therapy.

Key Words: Oxygen, Photodynamic therapy, Photosensitizer

서 론

광역학치료의 개념은 1900년 Raab (van Hillebergersberg et al., 1994)이 아크리딘 염색약 (acridine dye)에 노출된 짚신벌레에서 광독성이 확인되면서 시작되었으며, 1960년 Lipson (Ripson et al., 1961) 등이 광감작제 (photosensitizer) 로 헤마토포르피린 (hematoporphyrin)을 사용하여 수술 중 종양부위에서 형광을 확인함으로써 임상적으로 종양의 진단이 가능함을 확인하였다. 그 후 1976년 Kelly (Kelly and Snell, 1976) 등이 방광암 환자의 치료에 광역학치료를 이용하여 암치료에 적용하였으며, 1993년 이후 캐나다, 네덜란드, 일본, 미국 등에서 진행성 폐, 소화기, 비뇨기계 암환자에 대한 치료로 승인을 받아 활발히 시행되고 있다. 현재 우리나라에서도 접근이 비교적 용이한 식도, 폐, 후두 등의 고형 종양이 치료에 중요한 방법

으로 자리매김 하고 있으며, 그 치료효과와 증대를 위해 많은 연구가 진행되고 있다.

광역학치료는 광감작제를 암세포 혹은 목표로 하는 조직에 흡수시킨 후 특정파장의 빛을 조사하면 광감작제가 활성화되고 활성화된 광감작제에 의해 조직 내에 존재하는 산소분자가 Type II 반응을 통하여 활성산소 (singlet oxygen)로 변환된다 (Dougherty et al., 2002). 이렇게 생성된 활성산소를 통하여 생화학적, 생물리학적 반응을 일으켜 직, 간접적으로 종양세포의 파괴를 일으켜 치료효과를 나타낸다 (Hampton and Selman, 1992).

본 연구에서는 쥐의 대장암 세포주 (CT-26)를 이용한 광역학치료의 과정에서 고농도의 산소가 미치는 영향에 대하여 알아보고, 이를 통해 향후 광역학치료의 시행에서 고농도의 산소가 항암효과를 증진시킬 수 있는지를 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 광감작제 및 레이저

광감작제는 임상사용 허가가 나와 실제 임상에 널리

*논문 접수: 2009년 3월 10일
수정재접수: 2009년 3월 20일

†교신저자: 안진철, (우) 330-714 충남 천안시 안서동 산 29번지,
단국대학교 의과대학 의학레이저 연구센터
Tel: 041-550-1786, Fax: 041-550-1788
e-mail: jcahn@dankook.ac.kr

쓰이고 있는 photofrin을 광감작제로서 사용하였고 광원은 632 nm 다이오드 레이저 (Biolitec, GER)를 사용하였다.

2. 최대산소 도달시간과 농도의 측정

In vitro에서는 배양액 (RPMI-1041, Hyclone, USA)에 3 l/min의 농도로 직접 산소를 관류시키면서, 용존산소측정기 (DO meter, EcoScan DO, Protronics intertrade)을 이용하여 측정하였다. 산소 관류 전, 그리고 산소 관류 후 5분, 10분, 15분 그리고 20분의 용존산소를 측정하였으며, 이를 통해 최대산소 농도 도달시간과 농도를 측정하였다. In vivo에서는 5주령의 BALB/c 실험 쥐에 3 l/min의 농도로 동물 산소마취기를 이용하여 직접 산소를 흡입시켰으며, 흡입 전, 흡입 후 5분 (n=7), 10분 (n=8), 15분 (n=5) 그리고 20분 (n=5)으로 나누어 동맥혈을 채취하여 산소 분압이 (Radiometer, ABL-830, USA)를 이용 측정하였다.

3. 세포배양

쥐의 대장암 세포주인 CT-26 cell을 culture flask (Nunc, USA)에서 DMEM (Gibco BRL, USA) 배양액 500 ml에 우태혈청 (Gibco, BRL) 50 ml와 antibiotic-antimycotic (Gibco, BRL) 5.5 ml를 섞은 세포배양액으로 5% CO₂ 배양기 내에서 배양하였다.

4. 세포독성능 측정

10⁵ cells/ml의 지수성장기 쥐의 대장암세포인 CT-26 세포를 96 well plate에 well당 100 µl 분주하고 24시간 동안 배양기에서 배양한 후, photofrin을 0.05 µg/ml부터 50.0 µg/ml까지 2배수 간격으로 희석하여 세포에 투여하였다. Photofrin 투여 6시간이 지난 후 632 nm 다이오드 레이저를 15분 (360 J)간 microplate의 상방 10 cm에서 조사하였다. 대조군도 6시간 후 레이저 조사를 시행하였으며, 다른 한 군에서는 조사 15분 전 산소를 배양액에 직접관류시킨 후 고동도 산소 농도 상태에서 well에 직접 적용하였다. 세 가지 군 모두에서 24시간 동안 배양기에서 배양하여 각각의 well에 50 µl씩 pH 7.3의 DPBS에 녹인 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 용액 (2 mg/ml, Sigma)을 첨가하고 4시간 동안 incubator에서 배양하였다. 배양 후 각 well의 배지를 모두 제거하고 여기에 150 µl의 DMSO (Dimethylsulfoxide: KANTO, Japan)를 첨가한 후 microplate mixer (Amersham, UK)로 10 흔들여주었으며 microplate reader (BIO-RAD 550, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생존율 (cell viability)은 다

음의 식을 이용하여 측정하였다.

Cell viability = (Mean optical density in test well / Mean optical density in control well) × 100

5. 세포주의 이종이식

배양기에서 배양된 CT-26 세포주를 트립신으로 처리하여 세포를 분리하고 세포의 농도를 10⁸ cells/ml로 만들어 30 gauge 인슐린 주사기로 5주령의 BALB/c 암컷 실험 쥐의 등에 0.1 ml씩 피하로 주입하고 종양의 형성 여부를 관찰하여 3일에 1번씩 종양의 부피를 측정하였다.

6. 종양의 광역학치료

실험 쥐 (n=26)에 이종이식된 종양의 크기가 약 100~250 mm³에 도달하였을 때 총 2개의 실험군으로 나누어 실험을 실시하였다. 제 1군은 (n=13) 대조군으로 실험 쥐에 최소농도인 1 mg/kg 농도 (Peng et al., 2001)의 photofrin을 혈관 내 주입 후 6시간 뒤에 종양의 상방 10 cm에서 주변 다섯 방향에 각 3분씩 15분간 632 nm 다이오드 레이저로 500 J/cm²의 조사하였다. 제 2 군 (n=13)은 제 1 군과 같은 방법으로 광역학치료를 시행하였으며 레이저 조사 전 15분간 동물용 산소 흡입이기를 이용하여 3 l/min의 농도로 직접 흡입시켰다.

7. 항암효과의 판정

광역학치료 시행 후 3일에 1번씩의 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)

8. 통계처리

SPSS 통계프로그램을 이용하여 항암효과의 차이는 T-test로 5% 유의수준에서 검증하였다.

결 과

1. 최대산소 농도와 도달시간

배양액에 산소를 직접 관류시키며 용존산소량을 측정된 결과 실내공기 (24±1.4) 상태와 산소 관류 후 5분 (90.4±0.8) 그리고 산소 관류 후 5분과 10분 (98.4±1) 사이의 용존산소량의 변화는 의미 있는 차이를 보였으나

15분 이후 (98.2±0.7)로는 고원을 형성하였으며, 이는 실내공기 상태에 비하여 약 400%로 증가한 소견을 관찰할 수 있었다 (Table 1). 또한 실험 쥐에 직접 산소를 흡입시키며 측정된 동맥혈 산소 분압은 실내공기 (75±9.6)에서 산소 흡입 후 5분 (101±2.65) 그리고 산소 관류 후 5분과 10분 (110±8.8) 사이의 동맥혈 산소 분압의 변화는 의미 있는 차이를 보였으나 15분 이후 (107±8.3)로는 고원을 형성하였으며 실내공기 상태보다 126%로 증가되어 있었다 (Table 2).

2. 산소 농도에 따른 세포독성능의 차이

산소를 관류한 배양액을 적용한 배지와 적용하지 않은 배지로 구분하여 광역학치료를 시행하였다. 대조군과 산소를 관류시킨 배양액을 사용하여 광역학치료를 시행한 실험군에서 광감각제 용량에 따른 세포생존율 곡선에서

Table 1. Oxygen concentration of media according to oxygen perfusion time

O ₂ perfusion time	DO (%)	
Room air	24.0±1.4	*
5 min.	90.4±0.8	*
10 min.	98.4±1.0	
15 min.	98.2±0.7	
20 min.	98.3±1.2	

The dissolved oxygen (DO) concentration between room air and 5 min, 5 min and 10 min after oxygen perfusion has statistically significantly different. After 10 min oxygen is saturated regardless of oxygen perfusion time (**P*<0.05)

Table 2. Arterial blood oxygen concentration of mouse according to oxygen inhalation time

O ₂ inhalation time	pO ₂	
Room air	75.0±7.0	*
5 min.	90.6±1.6	*
10 min.	101.6±2.7	
15 min.	110.0±6.0	
20 min.	107.0±6.8	

The arterial blood oxygen saturation between room air and 5 min, 5 min and 10 min has statistically significantly different. There is no statistically significantly difference after 10 min (**P*<0.05)

Table 3. The result of In vivo study at 14 days after PDT

	CR	PR	NR
PDT only group	0	8	5
PDT + O ₂ group	3	5	5

The response rate was similar but CR was found only in PDT + O₂ group. CR: complete remission, PR: partial remission, NR: no response

세포의 생존율은 저농도 및 고농도의 광감각제 용량에서는 차이를 보이지 않았다. 그러나 photofrin의 용량 1.56, 3.13 µg/ml에서는 대조군에 비하여 실험군에서의 생존율이 유의하게 감소된 소견을 보였다 (Fig. 1).

3. 산소 농도에 따른 종양의 광역학치료 결과

대조군에서는 13예 중 완전 관해는 없었으며, 부분 관해가 8예, 반응 없음이 5례였고, 실험군에서는 완전 관해는 3례, 부분 관해는 5례, 반응 없음이 5례로 광역학치료를 반응이 보이는 경우는 같았으나 실험군에서는 3례에서 완전 관해를 보였다 (Table 3). 또한 광역학치료를 반응이 있었던 실험 쥐의 종양크기 변화양상을 보면 대조군은 115.2±55.8 mm³에서 4일째 78.8±62.8 mm³, 7일째 70.5±48.38 mm³, 14일째 235±68.6 mm³이었으며, 실험군은 104.7±50.9 mm³에서 4일째 41.2±30.3 mm³, 7일째 25.1

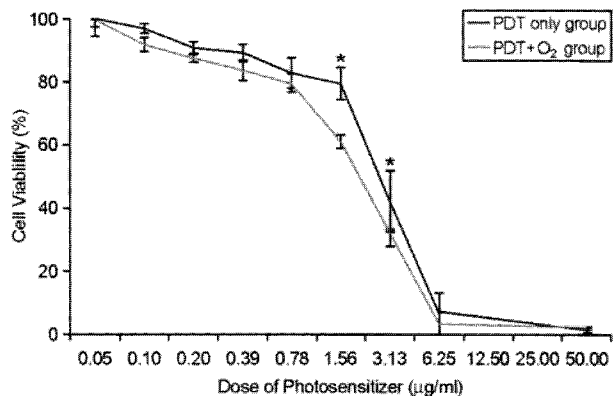


Fig. 1. Comparison of PDT effect according to oxygen perfusion and photofrin concentration in CT-26 cell. The cell viability of PDT + O₂ group declined significantly compared to PDT only group at 1.56~3.13 µg/ml concentration of photofrin (**P*<0.05).

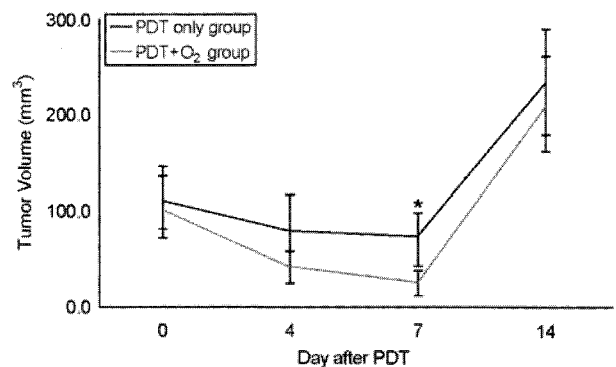


Fig. 2. Tumor volume change of transplanted CT-26 cell for each treatment group. The tumor volume was significant decreased in PDT + O₂ group compared to PDT only group at 7 days after PDT (**P*<0.05).

$\pm 25.0 \text{ mm}^3$, 14일째 $212 \pm 38.4 \text{ mm}^3$ 이었다. 종양크기의 감소 정도는 대조군에서는 4일째 종양의 크기는 PDT전보다 68%로 감소하였으며, 7일째에는 59%로 감소하였다. 실험군에서는 4일째에 43%, 7일째 23%로 감소하였다. 이 실험결과 대조군에 비하여 고농도의 산소를 적용한 실험군에서 치료 7일째까지의 종양의 감소 정도가 유의하게 높은 것으로 나왔다 (Fig. 2).

고 찰

광역학치료의 주된 효과는 세포괴사 (cell necrosis)로 보고되고 있으나 (Lavie et al., 1999) 세포고사 (apoptosis)도 같이 작용하는 것으로 알려져 있으며 (Ball et al., 1998) 이런 반응을 통해서 치료효과를 나타내게 되는데, 일반적으로 광감작제의 종류, 빛의 조사 환경, 조직의 산소화 정도와 세포의 종류 등등에 의해 결정된다 (Kessel, 1997; Wyld, 2001). 또한 광역학치료는 두 가지 반응으로 진행되는데, Type I 반응은 주로 저산소 환경 (hypoxic condition) 이나 극성 (Polar)배지 환경으로 일어나고, Type II 반응은 친지질성의 산소 분압이 높은 환경에서 주로 발생하며 광역학치료에서는 주로 Type II 반응이 주도적인 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 (Foote, 1987; Chung et al., 2006; Weishaupt et al., 1976), 국소적 저산소증이 유발된 상황에서는 Type II 반응에서 Type I 반응으로 작용기전이 변할 수 있다 (Ochsner, 1997). Type II 반응으로 발생하는 최종 생산물인 활성산소는 일반적으로 세포 내 이동에 문제가 있으므로 (Moan and Berg, 1991) 주로 광감작제가 분포하는 미토콘드리아 (mitochondria), 리소좀 (lysosome) 혹은 세포벽에서 발생하여 광독성을 나타내는 것으로 이해되고 있다 (Malham et al., 1996). 이는 활성산소가 많이 만들어지는 환경인 체내산소의 농도를 높일 수 있다면, Type II 반응이 활성화 되어 활성산소의 생성이 증가해 광역학치료의 효과를 증진할 수 있을 것이라는 것을 예측할 수 있다 (Foote, 1987; Tromberg et al., 1990). 또한 실험체의 주위에 산소를 공급하는 경우, 호흡기로 산소가 모세혈관에 공급이 증가되게 되고 이는 광역학치료 시 사용되는 체내산소의 농도가 증가될 수 있다 (Fuchs and Thiele, 1998; Vaupel et al., 1991).

본 연구에서는 광역학치료를 시작하며 항암치료의 주된 반응인 Type II 반응을 통해 활성산소를 발생시켜 세포의 괴사를 유도하는 과정 중 산소 환경의 변화가 일컫는 치료효과의 변화를 알아보려고 실험을 진행하였다.

In vitro에서는 고농도 산소환경의 생성을 위해 실험군에 사용되는 배양액 직접 산소를 관류시켰으며, 용존산소량이 약 4배 가량 증가하였으며, 이 상태에서 광역학치료를 진행하였다. 대조군에 비교하여 실험군에서의 생존율이 photofrin의 농도 $1.56 \sim 3.13 \mu\text{g/ml}$ 에서 유의하게 생존율이 낮아지는 것을 관찰할 수 있었다. In vivo에서는 고농도 산소 환경이 제공됨으로 인한 항암증진효과를 비교하기 위하여 photofrin을 최소 사용 농도로 사용하여 치료를 진행하였다. 그 결과 대조군에서는 완전 관해가 없었으나 실험군에서는 3례가 있었다. 또한 광역학치료의 초기라고 할 수 있는 치료 1주의 종양크기는 실험군에서 대조군보다 유의하게 감소하는 소견을 보였다. 이는 체내의 고농도의 산소가 활성산소의 생성을 유도하여 치료효과의 증강을 유도한 것이라 사료된다. 이 결과는 고농도의 산소 환경이 광역학치료효과를 증진시킬 수 있음을 확인하였고, 앞으로 임상 적용의 기본 자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 연구는 단국대학교 의학레이저 의료기기 연구센터의 지원에 의해서 이루어진 것임.

REFERENCES

- 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* 1998. 42: 159-163.
- Chung PS, Park ET, Lee KI, Ahn JC. ROS Formation and the mechanism of photodynamic therapy using 9-hydroxypheophorbide-a on AMC-HN3 human head and Neck carcinoma cell line. *Korea J Otolaryngol*. 2006. 49: 1194-2000.
- Dougherty TJ. An update on photodynamic therapy applications. *J Clin Laser Med Surg*. 2002. 20: 3-7.
- Foote CS. Type I and Type II mechanisms of photodynamic action. In: Heitz JR, Downum KR, editors. *Light-Activates Pesticides*. Washington D: Am Chem Soci. 1987. 22-38.
- Fuchs J, Thiele J. The role of oxygen in cutaneous photodynamic therapy. *Free Radic Biol Med*. 1998. 24: 835-847.
- Hampton JA, Selman SH. Mechanism of cell killing in photodynamic therapy using a novel in vivo drug/in vitro light culture system. *Photochem. Photobiol*. 1992. 56: 235-243.
- Kelly JF, Snell ME. Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. *J Urol*.

1976. 115: 150-151.
- Kessel D, Luo Y, Deng Y, Chang CK. The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 1997. 65: 422-426.
- Lavie G, Kaplinsky C, Toren A, Aizman I, Meruelo, D, Mazur Y, Mandel M. A photodynamic pathway to apoptosis and necrosis induced by dimethyl tetrahydroxyhelianthone and hypericin in leukaemic cells: possible relevance to photodynamic therapy. *Br J Cancer* 1999. 79: 423-432.
- Malham GM, Thomsen RJ, Finlay GJ, Baguley BC. Subcellular distribution and photocytotoxicity of aluminium phthalocyanines and haematoporphyrin derivative in cultured human meningioma cells. *Br J Neurosurg.* 1996. 10: 51-57.
- Moan J, Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol.* 1991. 53: 549-553.
- Ochsner M. New trends in photobiology. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors. *Photochem Photobiol.* 1997. 39: 1-18.
- Peng Q, Warloe T, Moan J, Godal A, Apricena F, Giercksky KE, Nesland JM. Antitumor effect of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy can be enhanced by the use of a low dose of photofrin in human tumor xenografts. *Cancer Res.* 2001. 61: 5824-5832.
- Ripson RL, Blades EJ, Olsen AM. The use of hematoporphyrin in tumor destruction. *J Natl Cancer Inst.* 1961. 26: 1-11.
- Tromberg BJ, Orenstein A, Kimel S, Barker SJ, Hyatt J, Nelson JS, Berns MW. In vivo tumor oxygen tension measurements for the evaluation of the efficiency of photodynamic therapy. *Photochem Photobiol.* 1990. 52: 375-385.
- Van Hillegersberg R, Kort WJ, Wilson JH. Current status of photodynamic therapy in oncology. *Drugs* 1994. 48: 510-527.
- Vaupel P, Schlenger K, Knoop C, Hockel M. Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res.* 1991. 51: 3316-3322.
- Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Res.* 1976. 36: 2326-2329.
- Wyld L, Reed MW, Brown NJ. Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type. *Br J Cancer* 2001. 84: 1384-1386.
-