

ALA 및 ALA-Methylester의 투여에 따른 종양조직 및 정상조직에의 분포양상에 대한 연구*

단국대학교 의과대학 이비인후과학교실, * 의학레이저연구센터**
정필상* · 정상운** · 안진철** · 이상준* · 윤준식*

= Abstract =

Distribution Patterns in the Tumor Tissue and Normal Tissue according to the Administration Methods of ALA and ALA-Methylester

Phil-Sang Chung, M.D.,* Sang Oun Jung, Ph.D.,** Jin Chul Ahn, M.S.,**
Sang Joon Lee, M.D.,* Jun Sik Yoon, M.D.*

Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery,* Medical Laser Reserch Center,**
Dankook University College of Medicine, Cheonan, Korea

Objectives : In this report, we confirmed the distributed pattern of ALA and ALA-methylester in normal and tumor-bearing region.

Materials and Methods : ALA and ALA-methylester were administered to nude mouse by intratumoral, subcutaneous and intravenous injection. After injection, the fluorescence in normal and tumor region was measured by LESA (laser electronic spectrum analyzer).

Results : The tumor-specificity of ALA and ALA-methylester was shown in the case of intratumoral injection. In all case, the fluorescence caused by ALA and ALA-methylester was maximally increased in 2 hours after injection. Then while the fluorescence level was rapidly decreased to control level in normal region, it was still remained in tumor region.

Conclusion : According to this result, The intratumoral injection was more efficient administration method for PDT/PDD than subcutaneous and intravenous injection.

KEY WORDS : 5-Aminolevulatic acid · Photosensitizers · Tumor specificity.

서 론

5-Aminolevulinic acid(ALA)는 조직 내에서 헴(heme) 생합성 경로를 통해 광감작제로 사용되는 protoporphyrin IX(PpIX)로 전환된다¹⁾. ALA가 나타내는 종양조직에 대한 선택성은 종양조직과 정상조직의 피부장벽(skin barrier) 차이에 의한 것으로 알려져 있으며²⁾ 과도한 양의 ALA는 세포내에서 PpIX의 축적을 유발하여 이를 진단 및 치료 목적

으로 이용하게 된다³⁾.

ALA 등과 같은 광감작제는 적당한 파장의 빛을 흡수하여 에너지 상태가 높은 여기상태로 전환되고 이어서 다시 원래의 에너지 상태로 돌아오게 되는데 이 과정에서 흡수된 빛 에너지는 형광으로 방출되거나, 산소로 전이되어 세포에 손상을 일으키는 단일항 산소및 유해산소등을 생성하게 된다. 따라서 현재에 암치료법으로 새롭게 인정받고 있는 광역학치료(Photodynamic therapy(PDT))는 광감작제의 이러한 특성을 이용하여 암세포에 손상을 일으켜 괴사시킴으로서 제거하는 치료방법이다⁴⁾. ALA에 의한 생성된 PpIX는 광역학치료(photodynamic therapy)시에 기존의 hematoporphyrin derivative(HpD)와 같은 광감작제보다 더 유용하다고 보고되어져 있는데, 특히 조직내에서의 배출시

*이 연구는 2002학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

교신저자 : 정필상, 330-715 충남 천안시 안서동 산 16-5

단국대학교 의과대학 이비인후과학교실

전화 : (041) 550-3975 · 전송 : (041) 556-1090

E-mail : pschung@dku.edu

간이 빨라서 광역학 치료시간의 단축 및 광독성을 최소화시켜 주며 또한 경구투여를 할 수 있어서 투여경로가 간편한 장점을 지니고 있다⁴⁾.

이와 더불어 관심이 집중되는 부분은 광감작제의 형광방출을 이용하여 생체내에서의 암조직을 진단하는 방법의 개발이다. 세포내에서 ALA로부터 PpIX의 합성은 mitochondria 내에서 이루어지는데, 생성된 PpIX는 600~730nm 사이의 전형적인 적색형광을 나타냄으로서 쉽게 검출되어진다⁵⁾. 따라서 본 연구에서는 ALA 및 ALA의 methylester form을 이용하여 암세포 내에서의 PpIX로의 전환 및 축적을 LESA 장비를 이용하여 시간별로 측정함으로써 이후 ALA를 이용한 암세포의 진단 및 PDT의 기준을 삼고자 하였다. 이를 위하여 nude mouse에 두경부 편평 암세포인 SNU-1041 세포주를 이식하여 종양을 만들고, 마우스의 각부위별로 ALA 및 ALA-methylester를 투여하고 종양 조직과 정상조직에서의 형광을 측정하여 비교하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 시약

광감작제로서 사용된 ALA 및 ALA-methylester는 Sigma 제품을 사용하였으며, SNU1041 세포주의 배양을 위하여 10%의 FBS가 포함된 RPMI 1640 배지를 사용하였다. 실험에 사용된 마우스는 nude mouse이고 조직에서의 형광검출은 LESA (laser electronic spectrum analyser, BioSpec Co., Russia)를 사용하였다. 인체세포의 이종이식을 위해서 6주령의 누드마우스(Balb/C/nu/nu)를 사용하였고 자외선으로 멸균된 사료와 멸균수를 공급하여 사육하였다.

2. 세포배양 및 종양의 형성

SNU1041 세포주의 배양은 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지에서 배양하였으며 통상적으로 일주일에 2회 정도 계대배양 하였다. 종양의 형성은 성장 중인 세포주를 trypsin을 처리하여 떼어낸 다음, 세포수를 1×10^8 cells/ml로 조정하여 이중 100 μ l를 마우스의 등에 피하층으로 주사하였다. 종양의 형성과정은 7일 간격으로 확인하였으며 종양의 크기가 400mm³ 정도 되었을 경우 실험에 사용하였다.

3. 광감작제의 투여

마우스로의 광감작제의 투여는 종양의 크기가 약 400 mm³에 도달하였을 경우 ALA와 ALA-methylester를 PBS에 희석하여 100 μ l를 종양조직 내, 정맥내, 그리고 피하조직 내로 각각 투여하였다.

4. 광감작제의 검출

광감작제의 검출은 형광검출기인 LESA를 사용하였다. 광

감작제를 투여한 후 1시간째부터 11시간째까지 LESA기기의 형광 probe를 이용하여 각 측정부위별로 3회씩 측정하여 그 평균값을 비교하였다.

결 과

1. ALA의 종양 및 정상 세포에서의 분포 비교

ALA 및 ALA-methylester를 투여한 후 종양조직과 정상조직에서의 형광검출은 LESA 기기를 사용하여 측정하였다. 이러한 기기로부터 얻어진 결과를 살펴보면 632nm의 조직을 조사하는데 사용되는 형광(input fluorescence)과 이 파장의 레이저에 의해 조직으로부터 방출되는 형광(output fluorescence)이 측정되어진다. 측정된 형광 값들은 서로간의 비교를 위해 방출된 형광값을 조사한 형광값으로 나누어 결과를 비교하였다.

ALA의 분포는 종양세포 및 정상세포에서 2시간 이내에 거의 동시에 분포되는 것으로 확인되었으나 종양세포에 있어서는 좀더 오랜 기간 동안 잔존되는 특성을 나타내었다. Fig. 1에서 보는 것과 같이 ALA의 투여량을 8mg으로 조정하였을 경우 다른 투여방식과 마찬가지로 2시간 이내에 정상조직과 종양조직에 빠른 분포를 나타내었다. 그러나 5시간째 부터는 종양 세포에 더 높은 농도로 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 이와같은 결과는 2mg 그리고 4mg의 ALA를 종양내 투여방식에 의해 투여하였을 경우에도 동일하게 나타나는 결과였다.

그러나 피하주사나 정맥주사에 의한 투여방식의 결과는 좀 차이를 나타내었는데, 두가지 방식 모두 종양내 투여방식과 마찬가지로 2시간 이내에 종양조직과 정상조직에서 ALA가 검출되었으나 종양조직에서의 더 높은 농도로 잔존하는 현상은 거의 관찰되지 않았다. 8mg의 피하주사 의한 투여에 있어서는 종양내에 선택적인 잔존을 관찰할 수 있었으나 정맥내 주사에 의한 투여방식에 있어서는 그러한 현상이 관찰되지 않았다(Fig. 2).

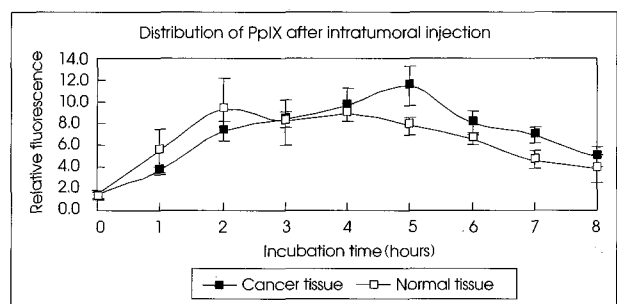


Fig. 1. The distribution of PpIX in tumor and normal cells according to their incubation time after intratumoral injection of 8 mg of ALA.

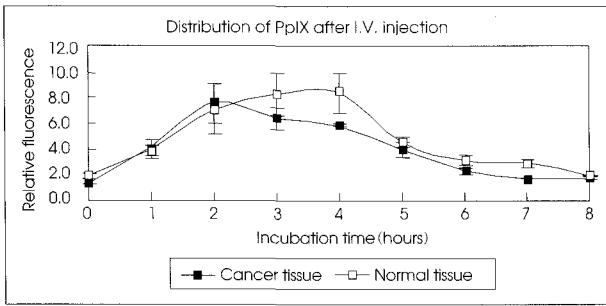


Fig. 2. The distribution of PpIX in tumor and normal cells according to their incubation time after intravenous injection of 8 mg of ALA.

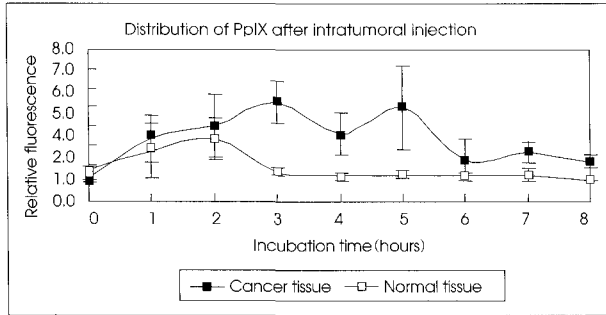


Fig. 3. The distribution of ALA-methylester in tumor and normal cells according to their incubation time after injection of 8mg of ALA-methylester.

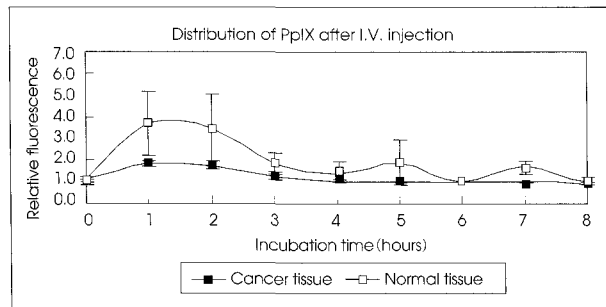


Fig. 4. The distribution of ALA-methylester in tumor and normal cells according to their incubation time after intravenous injection of 8mg of ALA-methylester.

2. ALA-methylester의 종양 및 정상세포의 분포 비교

ALA-methylester의 분포 역시 ALA와 비슷한 양상으로 나타났는데, 각 부분에 투여했을 경우 거의 2시간내에 가장 높은 농도로 분포하였으며 그 이후에 빠르게 감소하였다. 또한 종양조직에 대한 선택성은 종양내 투여시의 경우 2mg, 4mg, 8mg 모두에 있어서 종양조직에 대한 더 높은 선택성을 확인 할 수 있었으나 다른 투여방법에 있어서는 종양에서의 더 높은 선택성을 확인 할 수 없었다. 또한 Fig. 3에서 보여지는 것과 같이 ALA-methylester는 종양내 주사에 의한 투여시 정상조직과 종양조직의 분포 차이가 ALA에서의 결과보다 더 큰 것을 확인할 수 있었으나 정맥주사로 투여하였을 경우에는 ALA와 마찬가지로 종양조직에 대한 선택성을 나타내지 않았다(Fig. 4).

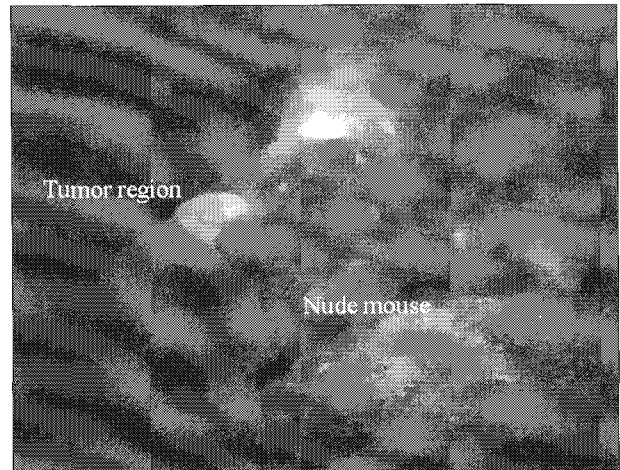


Fig. 5. The distribution of ALA into tumor region in nude mouse bearing tumor. ALA was injected by intratumoral injection. After incubation for 6 hours, 532 nm of DPSS-laser was irradiated for fluorescence detection (PDT : photodynamic therapy, PDD : Photodynamic diagnostic).

3. ALA와 ALA-methylester의 분포 양상 비교

ALA-methylester는 ALA와 비교하여 조직내에 축적되는 농도가 적은 것으로 보여진다. 실험에서 사용한 2mg, 4mg, 8mg의 모든 농도에서 조직에서 검출되는 양은 대부분이 ALA를 투여 하였을때 검출되는 양의 1/2 이하인 것으로 확인 되었다.

고 찰

ALA(5-aminolevulinic acid)는 세포내에 들어갔을 경우 정상적인 대사과정을 거쳐 PDT 과정에 사용되는 protoporphyrin IX의 형태로 전환되어지는 prodrug이다⁶⁾. ALA의 대사가 일어나는 곳은 세포내 mitochondria로 알려져 있으며 투여된 ALA의 분포는 정상세포보다는 종양세포에 더 특이성을 가진다¹⁾. 또한 PpIX로의 전환 역시 정상세포 보다는 종양세포 내에서 더 활발하게 이루어지는 것으로 알려져 있다. 이러한 이유로서 ALA는 PDT를 이용한 암치료 뿐만이 아니라 암조직의 조기발견을 위한 암 진단 분야에까지 그 적용범위가 확대되어 연구가 이루어지고 있다⁷⁾. 본 실험에 있어서도 투여된 ALA가 nude마우스에 형성된 종양부분에 위치하는 것을 532nm의 laser 빛을 조사함으로써 확인하였다(Fig. 5).

ALA 혹은 ALA 유도체들은 기존의 1세대 광감작제인 haematoporphyrin 계열에 비해서 많은 장점을 가지고 있는데 우선 ALA의 체외로의 배출속도가 빠르다는 점이다. Haematoporphyrin 계열의 대표적인 광감작제인 photofrin의 경우는 투여 후 피부에 잔존하는 기간이 2달 동안으로 환자에 있어서 많은 불편을 초래하지만 ALA의 경우는 24시간 이내로 빠르게 배출되어 불필요한 광독성을 유발

하지 않는다. 본 실험에 있어서도 투여된 ALA 및 ALA-methylester는 투여 후 2시간째에 높은 농도로 존재하는 것이 확인되었고 이후에 빠르게 감소하여 6시간 혹은 8시간째에는 정상적인 수치로 낮아지는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1, 3).

ALA의 또다른 장점은 부작용이 적은 것인데, 다른 광감작제들의 경우 체내에 투여되었을 경우 위(Gastrointestine)에 많이 분포하게 되는데 이로 인한 협착(stenosis) 및 perforation 등을 유발하게 된다. 하지만 ALA의 경우는 위의 점막부분에 주로 분포하므로 이러한 부작용의 위험성이 상대적으로 적다. 그리고 종양조직에 대한 선택성 및 경구투여가 가능하다는 점들도 다른 광감작제들에 비해 ALA 만이 갖는 장점이다.

하지만 ALA는 친수성 물질이기 때문에 세포막을 통과하여 투과되는데 있어서 효율성의 문제를 가지고 있다. 따라서 ALA의 친수성을 줄이기 친유성을 높여 세포내로의 투과율을 높이기 위한 여러가지의 유도체들이 개발되었는데 그중의 하나가 ALA의 ester 유도체이다⁸⁾. 이미 기존의 보고에 의하면 ALA-ester의 경우 ALA보다 더 효율적으로 세포내에서 PpIX를 생성한다고 알려져 있다. 그러나 이러한 ALA 유도체들의 체내분포 등에 대한 연구는 아직 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 실험에 있어서도 ALA 뿐만 아니라 ALA의 methyl ester 형태의 유도체를 사용하여 서로의 분포양상을 비교해 본 결과 ALA-methylester가 정맥투여 및 피하주사에 의한 투여 있어서 ALA보다는 낮은 형광수치를 나타냈으나 종양조직내의 선택적인 축적 및 잔존성에 있어서는 ALA보다 좋은 효과를 나타내었다(Fig. 1, 3). 이미 기존의 보고에 있어서도 ALA-methylester의 경우는 ALA와 비교하여 보았을 때 약간은 비효율적으로 PpIX를 생성한다고 되어 있다³⁾⁹⁾. 따라서 본 실험에서도 ALA와 비교하여 낮은 형광수치는 이러한 이유인 것으로 추정되어진다. 그러나 ALA-methylester의 경우는 국소적인 투여시에 ALA에 비해 더 많이 조직내로 침투한다고 보고되어지고 있고 또한 정상조직과 종양조직상의 특이성이 더 높은 것으로 보고되어져 있다. 본 실험에 있어서도 ALA-methylester는 비록 낮은 형광수치를 나타냈으나 종양조직에 대한 선택성에 있어서는 ALA보다 우수하다는 것을 확인 할 수 있었다.

결 론

본 연구는 ALA 및 ALA-methylester를 종양조직이 있는 누드 마우스에 종양내 주사, 피하주사, 정맥내 주사의 3가지 경로를 통해 투여한 후, 정상조직과 종양조직 사이의 선택적인 분포양상을 확인한 것이다. 3가지 투여 방식에 대

한 결과를 보면 종양조직내의 직접적인 투여에 있어서 정상세포보다는 오랜기간 종양조직에 더 잔존하는 것을 확인할 수 있었으나 정맥 주사에 의한 투여방식이나 피하주사에 의한 투여방식에서는 확인할 수 없었다. 따라서 ALA를 이용한 치료에 있어서는 종양내 직접 투여에 의한 방식이 더 효과적인 것으로 확인되었으며 투여 후 2시간 이후에 빛을 조사할 경우 주변 정상세포에 대한 손상을 최소화 할수 있는 것으로 확인되었다. 또한 진단으로의 이용에 있어서도 정맥주사 및 피하주사에 의한 투여 방식 보다는 종양의 의심부위에 대한 국소적 투여방식을 검토하여 사용하고 투여 후 2시간 이후부터 8시간 이내에 검사하는 것이 효과적일 것으로 추정된다.

중심 단어 : 5-아미노레블리산 · 광감작제 · 종양특이성.

References

- 1) Ades IZ : Heme production in animal tissue : the regulation of biosynthesis of δ -aminolevulinic acid synthase. *Int J Biochem.* 1992 ; 14 : 275-299
- 2) van der Veen N, Hebeda KM, de Bruijn HS, Star WM : Photodynamic effectiveness and vasoconstriction in hairless mouse skin after topical 5-aminolevulinic acid and single- or two-fold illumination. *Photochem Photobiol.* 1999 ; 70 : 921-929
- 3) Peng Q, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Nesland JM : 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy : principles and experimental research. *Photochem Photobiol.* 1997 ; 65 : 235-251
- 4) Sharman WM, Allen CM, van Lier JE : Photodynamic therapeutics : basic principles and clinical applications. *DDT.* 1999 ; 4 : 507-517
- 5) Zheng W, Olivo M, Sivanandan R, et al : Endoscopy imaging of 5-ALA-induced PPIX fluorescence for detecting early neoplasm in oral cavity. *SPIE.* 2001 ; 4597 : 128-132
- 6) Yee KKL, Soo KC, Bay BH, Olivo M : A comparison of protoporphyrin IX and protoporphyrin IX dimethyl ester as a photosensitizer in poorly differentiated human nasopharyngeal carcinoma cells. *Photochem Photobiol.* 2002 ; 76 : 678-682
- 7) Finlay JC, Conover DL, Hull EL, Foster TH : Porphyrin bleaching and PDT-induced spectral changes are irradiance dependent in ALA-sensitized normal rat skin in vivo. *Photochem Photobiol.* 2001 ; 73 : 54-63
- 8) Brunner H, Hausmann F, Krieg RC, et al : The effects of 5-aminolevulinic acid esters on protoporphyrin IX production in human adenocarcinoma cell lines. *Photochem Photobiol.* 2001 ; 74 : 721-725
- 9) Gederaas OA, Holroyd A, Brown SB, et al : 5-aminolaevulinic acid methyl ester transport on amino acid carriers in a human colon adenocarcinoma cell line. *Photochem Photobiol.* 2001 ; 73 : 164-169