

## 정상 및 암 세포주에서의 5-Aminolevulinic Acid에 의해 유도된 Protoporphyrin IX의 형광 검출을 위한 In Vitro 연구

김 명 화 · <sup>1</sup>김 현 정 · <sup>1</sup>이 인 선 · <sup>2</sup>김 경 찬 · † 이 창 섭  
계명대학교 화학과, <sup>1</sup>전통미생물자원개발 및 산업화연구센터, <sup>2</sup>디지털물리학과  
(접수 : 2005. 12. 23., 게재승인 : 2006. 6. 20.)

### In Vitro Study of Fluorescence Detection for Protoporphyrin IX Induced from 5-Aminolevulinic Acid in Cancerous and Normal Cells

Myung-Hwa Kim, Hyun-Jeong Kim<sup>1</sup>, In-Seon Lee<sup>1</sup>, Kyung-Chan Kim<sup>2</sup>, and Chang-Seop Lee†  
Department of Chemistry, <sup>1</sup>The Center for Traditional Microorganism Resources,  
<sup>2</sup>Department of Digital Physics, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea  
(Received : 2005. 12. 23., Accepted : 2006. 6. 20.)

To clarify the usefulness of fluorescent diagnosis for cancer, We investigated the optimal method of administrating 5-aminolevulinic acid (5-ALA) by analyzing fluorescence signal of Protoporphyrin IX (PpIX) in the cultured normal and cancer cells. 5-ALA was injected as a photosensitizer to the cervico-uterine cancer cell line (HeLa) and in normal liver cells (Chang). Chang and HeLa cells were incubated with various concentrations of 5-ALA (0-800  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). The accumulation of PpIX induced by 5-ALA was in HeLa and Chang cells. The cell viability was measured by MTT assay. The optimal concentration of ALA that induced maximum levels of PpIX was 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in HeLa cell cultured for 24 hours after 5-ALA injection. Fluorescence of PpIX in HeLa cell was excited at a wavelength ( $\lambda=410 \text{ nm}$ ) and showed an emission spectrum at 602.3 nm, 659.9 nm which could be related to the PpIX generation induced by the applied 5-ALA. The experimental results showed that fluorescence signal of PpIX was proportional to the concentration of 5-ALA in cancer cells, but measured with low concentration in normal cells.

**Key Words** : 5-aminolevulinic acid, Protoporphyrin IX, Photosensitizer

### 서 론

최근에 각광받고 있는 5-aminolevulinic acid (ALA)는 heme의 생합성 경로내의 대사 전구물질로서 조직 내에서 heme의 전구물질인 광민감제 (Photosensitizer) protoporphyrin IX (PpIX)로 전환된다. ALA를 인체에 투여하면 내인성 광민감제인 PpIX를 형성하게 되고, 이는 짧은 시간동안 작용을 한 후 빠르게 대사된다. PpIX가 광민감제로 활성화되면 형광을 내고 세포 독성을 나타내는 특성이 있는데, 최근 이를 이용한 암의 광역학 진단과 치료를 위한 여러 가지 연구가 이루어지고 있다(1-5).

최근 들어 쥐의 대장암 세포 (CT-26) 및 대장암 세포를

mouse에 이식하여 만든 종양에 ALA를 이용한 광역학 치료에 관한 연구(6), nude mouse에 두경부 편평 암세포인 SNU-1041 세포주를 이식하여 종양을 만들고, 마우스의 각 부위별로 ALA 및 ALA-methylester를 투여하고 종양조직과 정상조직에서의 형광을 측정하여 비교 연구 등이 보고되었다(7). 또한 Zapata 등은 자궁경부암 세포주인 HeLa와 CaLo 및 정상 자궁상피세포인 NHCE에 ALA를 투여하여 정상세포에 비해 암세포에서 PpIX의 축적이 상승되어 강한 형광성을 나타냄을 확인하였다(8).

이러한 광민감제를 이용한 형광 진단은 외부에서 광민감제를 투여한 후 특수 파장의 광을 비추게 되면 종양조직 내에서 광민감제가 활성화되어 형광이 높게 발현되는데, 이 부위에 형광을 이용한 분광학적 측정을 하는 것은 암을 진단하는 편리한 방법이라 할 수 있다. 특히 5-ALA에 의해 유도된 PpIX의 생성은 정상세포보다 암세포에 특이적으로 축적되어 특수 파장의 광으로 활성화시키면 형광이 높게 발현되어 암 진단의 사용에 용이하다(9).

† Corresponding Author : Department of chemistry, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Tel : +82-53-580-5945, Fax : +82-53-588-3408

E-mail : surfkm@kmu.ac.kr

따라서 본 연구에서는 ALA를 이용한 암 진단의 기초자료로 활용하고자, 인간 유래의 암세포주인 HeLa와 정상 간세포주인 Chang에 대해 각각 ALA를 다른 농도로 처리한 후 세포독성, ALA에 의해 유도된 PpIX의 생성을 세포 내·외로 구분하여 형광 스펙트럼으로 측정하여 검출하였다.

## 재료 및 방법

### 세포주 및 세포배양

본 실험에 사용된 암세포주는 인간유래의 자궁경부암(cervical carcinoma) 세포주인 HeLa를 한국 세포주 은행으로부터 분양받았고, 인간의 정상 간세포인 Chang은 영남대학교에서 분양받아 사용하였다. 이들 세포주는 minimum essential medium (MEM) 배지에 10% FBS (fetal bovine serum)와 1% antibiotics (penicillin/streptomycin)를 첨가하여 37°C의 5% CO<sub>2</sub> incubator (Forma Co., USA)에서 2~3일에 한 번씩 계대배양 하면서 사용하였다.

### ALA 용액의 제조 및 처리

5-Aminolevulinic acid hydrochloride (Merck Co., Darmstadt, Germany)는 phosphate buffer solution (PBS)에 녹여 5 mg/mL의 stock solution을 만들어 사용하였다. ALA의 처리는 먼저 배양된 cell에 MEM 배지를 첨가하고 잘 혼합하여 세포수를 1.5 × 10<sup>6</sup> cells/well로 조정된 다음, 6-well microtiter plate에 준비된 cell을 3 mL씩 첨가하고, 준비된 ALA를 0, 50, 100, 200, 400, 800 µg/mL씩의 농도로 첨가한 후 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 분위기에서 배양하였다.

### PpIX의 Standard curve 측정

Protoporphyrin IX (Sigma Chemicals Co., St. Louis, USA)는 methanol과 0.9 M perchloric acid가 1 : 1 혼합된 용액과 trypsin/EDTA 용액을 같은 부피로 첨가하여 용해시켰다. 그리고 PpIX의 용액을 0-1.4 µg/mL 농도로 만들어 Fluorolog 3-11 형광광도계 (Instruments S.A., Inc., New Jersey, USA)로 측정하여 PpIX의 Standard curve를 얻었다.

### 세포 내·외의 PpIX 생성 검출

인간 유래의 암세포주인 HeLa와 정상 간세포주인 Chang에 ALA를 처리하여 세포 내·외에서 생성된 PpIX의 검출은 다음과 같이 수행하였다. 먼저 세포 외에서 측정된 PpIX는 세포에 ALA를 처리하여 24시간 동안 배양한 후 각 well의 상등액인 배지를 모아 tube로 옮기고 이를 형광광도계로 측정하여 세포 외에서 측정된 PpIX를 관찰하였다.

세포 내에 측정된 PpIX는 배지를 제거하고 남은 세포에 대하여 PBS로 2~3차례 세척한 다음, 각 well에 trypsin/EDTA를 2 mL씩 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 방치하였다. 세포가 완전히 깨어지면 methanol과 0.9 M perchloric acid가 1 : 1 혼합된 용액을 2 mL 첨가하였다. 이 용액을 모아 2,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 취하고 세포 내 형광 세기를 관찰하여 PpIX의 농도를 측정하였다(10).

### 세포증식률

ALA에 의한 자궁경부암 세포 및 정상세포에 대한 세포증식에 미치는 영향은 MTT assay(11)로 측정하였다. 배양된 cell에 MEM 배지를 첨가한 후 잘 혼합하여 cell수를 1.5 × 10<sup>6</sup> cells/well로 조정된 다음 6-well plate에 3 mL씩 첨가하고, ALA 농도를 50, 100, 200, 400, 800 µg/mL씩 되도록 첨가하여 37 °C의 5% CO<sub>2</sub> 분위기에서 24시간 배양하였다. 배양 후 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 시약 (5 mg/mL) 200 µL를 각 well에 첨가한 후 다시 4시간 더 배양한 다음, 생성된 formazan 결정을 DMSO (dimethyl sulfoxide)로 용해시켜 cell plate reader (Bio-Rad Co., USA)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. ALA의 세포증식률은 다음 식과 같이 계산하였다.

$$\text{Cell viability} = \frac{\text{ALA 처리군의 흡광도}}{\text{대조군 (ALA 무처리군)의 흡광도}} \times 100$$

## 결과 및 고찰

### ALA의 세포증식률

MTT assay는 살아있는 세포가 미토콘드리아의 탈수소효소를 이용하여 노란색의 MTT를 환원시켜 분광광도법으로 측정이 가능한 보라색의 formazan 결정을 형성하는 특성을 이용하는 방법으로 암 기초연구에 널리 이용되는 방법이다. ALA 처리에 의한 정상 및 자궁경부암 세포의 세포증식률을 조사한 결과를 Table 1에 나타내었다. ALA의 농도에 따른 HeLa의 세포생존율은 50 µg/mL에서 800 µg/mL 범위의 ALA의 농도 증가에 대해서 96.5%에서 64.6%까지 생존율이 감소하는 변화를 나타내었다. 이는 ALA를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 볼 때, ALA의 농도가 증가함에 따라 세포 생존율은 감소함을 확인할 수 있었다. 또한 정상 세포인 경우도 자궁경부암 세포주와 유사하게 ALA의 농도가 증가함에 따라 세포생존율은 감소함을 확인하였다.

Table 1. Viability of cells exposed 5-aminolevulinic acid during 24 h

ALA Conc. (µg/mL)	Viability of Chang cells	Viability of HeLa cells
0	100	100
50	97.4	96.5
100	96.7	94.2
200	95.4	91.8
400	85.4	84.3
800	70.3	64.6

### ALA에 의해 유도된 세포 내·외에서 PpIX의 측정

Fig. 1은 ALA 농도를 달리하여 처리한 후 24시간 동안 배양한 정상세포인 Chang에서 ALA에 의해 유도된 PpIX의 생성 정도를 형광 스펙트럼으로 측정한 결과이다. PpIX의 형광 (emission) 스펙트럼은 여기 파장이 410 nm일 때 세포 외에서는 614.3 nm과 676.7 nm, 세포 내에서는 602.6

nm 및 659.2 nm에서 형광 봉우리가 관찰되었다.

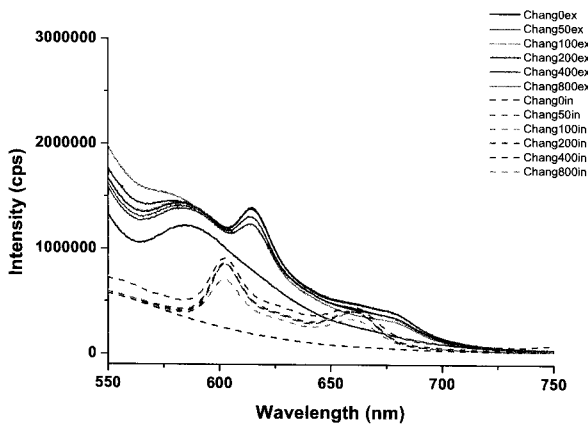


Figure 1. Fluorescence spectrum of 5-ALA induced PpIX in Chang cell.

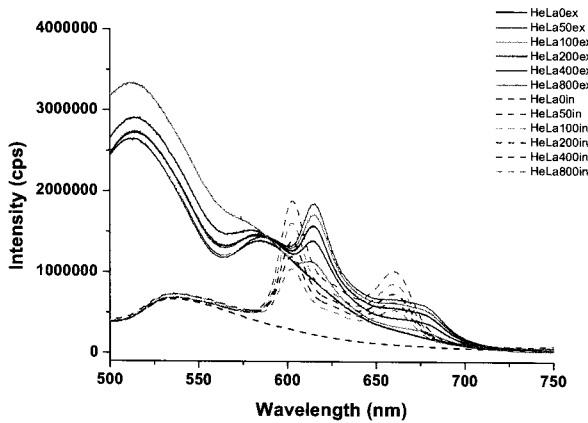


Figure 2. Fluorescence spectrum of 5-ALA induced PpIX in HeLa cell.

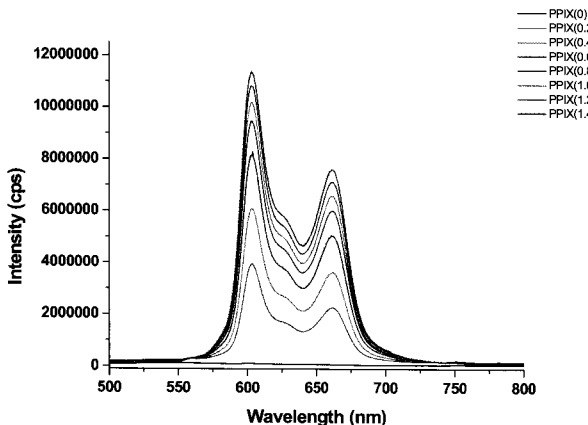


Figure 3. Fluorescence spectrum of standard protoporphyrin IX in isotonic saline.

한편 암세포인 HeLa에 ALA를 처리하여 형광 스펙트럼을 측정할 경우에는 형광 방출스펙트럼은 여기 파장이 410 nm일 때 세포 외에서는 614.9 nm과 673.4 nm, 세포 내에서는 602.3 nm 및 660.9 nm에서 형광 봉우리가 관찰되었으며 이를 Fig. 2에 나타내었다. 이는 Fig. 3에서 나타난 표준 PpIX의 형광 봉우리의 위치와 잘 일치하였다.

세포주에 ALA를 주입하고 배양함으로써 생성되는 PpIX의 양은 PpIX 형광강도의 측정을 통해서 알 수 있었다. Fig. 2의 결과로부터 알 수 있듯이, HeLa의 세포 내·외에서 ALA의 농도에 따른 PpIX의 형광강도는 ALA 농도가 50 µg/mL에서 최고치를 나타내었고, 그 이상의 농도에서는 감소하여 PpIX의 최고 형광강도를 나타내는 ALA 최적 농도가 존재하였다. 형광 봉우리가 뚜렷한 최적의 ALA 농도에서는 PpIX의 생성이 가장 높았으나 역치 농도에서는 PpIX의 생성이 오히려 감소하는 것으로 알려져 있다(2).

인간 유래의 암세포주인 HeLa와 정상 간세포주인 Chang에 ALA의 처리에 의한 세포 내·외에서 생성된 PpIX는 세포수를  $1.5 \times 10^6$  cells/well로 하고 ALA를 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 형광 스펙트럼을 측정하여 검출하였으며, 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Chang과 HeLa 모두 ALA에 의한 PpIX의 생성은 세포 외에서보다 세포 내에서 더 많이 측정되었다.

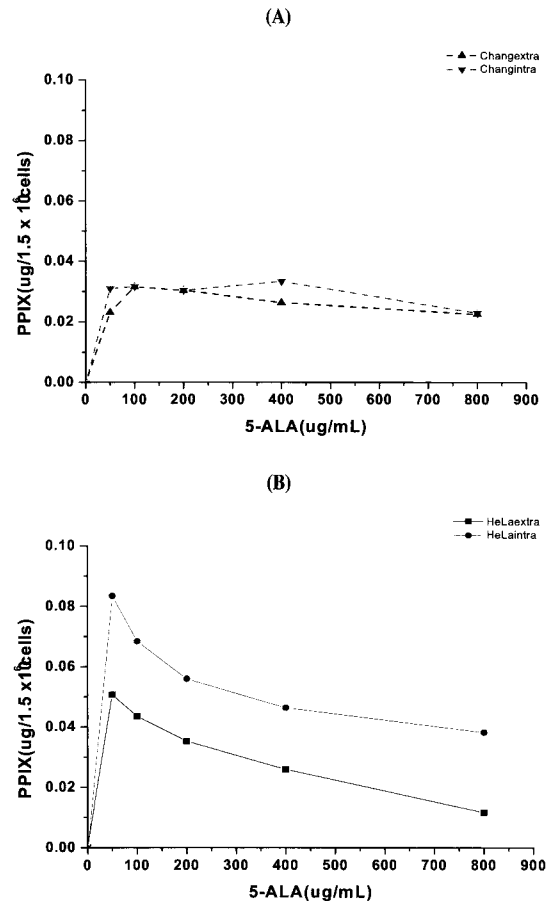


Figure 4. (A) Concentration of PpIX in Chang cells exposed to ALA for 24 h. (B) Concentration of PpIX in HeLa cells exposed to ALA for 24 h.

Fig. 5에는 정상세포인 Chang과 암세포인 HeLa에 ALA 농도를 달리하여 처리한 후 24시간 동안 배양하여 ALA에 의해 유도된 PpIX의 생성을 형광 스펙트럼으로 측정된 결과를 나타내었다. Chang과 HeLa에 대한 세포 내·외의 PpIX의 생성비는 각각 1 : 2.19, 1 : 2.68로 나타났으며, 이는 세포주의 차이에 기인하는 것으로 생각된다. 또한 Chang에 비해 HeLa에서 형광 세기가 더 큰 것으로 나타나 ALA에 의해 유도된 PpIX의 생성은 정상세포보다는 암세포에서 더 높은 농도로 축적되는 것을 알 수 있었다. Zapata 등에 의하면, 자궁경부암 세포주 (HeLa와 CaLo) 및 정상 세포주 (NHCE)의 세포수를  $1.8 \times 10^6$  cells/well로 하여 ALA를 투여한 후 유도된 PpIX의 생성을 암세포에서 더 많은 PpIX가 축적되는 것으로 보고하였는데(8), 본 실험의 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

따라서 본 연구결과는 자궁경부암 세포주인 HeLa라는 단일 세포주에서 확인된 것으로 암 진단을 위한 형광 반응이 세포의 종류에 따라 다를 수 있음을 고려하면 다른 세포주를 대상으로 한 연구가 필요하며, 향후 연구에서는 형광을 이용한 암 진단에서 효과적인 광민감제의 사용과 향상된 종양 선택성, 잔존성 그리고 효율적인 광원의 조사에 대한 연구가 필요하다.

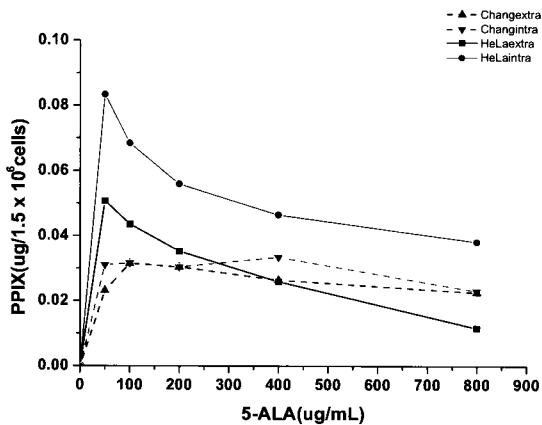


Figure 5. Protoporphyrin IX in the culture medium of cells exposed to different ALA concentration for 24 h.

요약

형광을 이용한 암 진단을 위해 배양된 정상 및 암세포주에 광민감제인 5-ALA를 투여하고 세포 내·외에서 생성된 Protoporphyrin IX (PpIX)의 형광을 측정하여 5-ALA 투여의 최적농도를 조사하였다. 정상 간세포주 (Chang) 및 자궁경부암 세포주 (HeLa)에 5-ALA를 농도별로 투여하여 ALA에 의해 유도된 PpIX의 생성을 확인하고, MTT assay로 세포생존율을 측정하였다. 배양된 cell에 5-ALA를 투여한 후 24시간 동안 배양함으로써 생성되는 PpIX의 양은 형광의 강도로 측정하였다. HeLa 세포주에 대한 5-ALA의 최적농도는 50 ug/mL이며, 이 때의 형광 (emission) 스펙트럼은 여기 파장이 410 nm일 때 602.3 nm, 659.9 nm에서

형광 봉우리가 관찰되었다. PpIX의 형광 강도를 측정할 결과, PpIX는 정상세포에서는 낮은 농도로 축적이 되는 반면에 암세포에서 더 높은 농도로 축적되었으며, 세포 외보다는 세포 내에서 더 높은 농도로 축적됨을 알 수 있었다.

감사

본 연구는 산업자원부 지방기술혁신사업 (RTI04-01-01)과 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터 지원에 의해 수행되었기에 이에 감사를 드립니다.

REFERENCES

- Kennedy, J. C. and R. H. Pottier (1992), Endogenous protoporphyrin IX, a clinical useful photosensitizer for photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol. B*: **14**, 275-92.
- Uehlinger P., M. Zellweger, G. Wagnieres, L. J. Jeanneret, H. Bergh, and N. Lange (2000), 5-Aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **54**, 72-80.
- Krammer, B., and K. Ueberigler (1996), In vitro investigation of ALA-induced protoporphyrin IX, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **36**, 121-126.
- Wyld, L., J. L. Burn, J. L. Reed, and N. J. Brown (1997), Factors affecting aminolaevulinic acid-induced generation of protoporphyrin IX, *British J. Cancer* **76**, 705-712.
- Baumgartner, R., R. M. Huber, H. Schulz, H. Stepp, K. Rick, F. Gamarra, A. Leberig, and C. Roth (1996), Inhalation of 5-aminolevulinic acid: a new technique for fluorescence detection of early stage lung cancer, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **36**, 169-174.
- Ji-Sun Kim, Phil-Sang Chung, Sang-Joon Lee, Chung-Hun Oh, Sang-Yong Chung, Ji-Yeon Park, and Young-Saeng Kim (2005), 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.* **48**, 234-40.
- Phil-Sang Chung, Sang-Oun Jung, Jin-Chul Ahn, Sang-Joon Lee, and Jun-Sik Yoon (2003), Distribution Patterns in the Tumor Tissue and Normal Tissue according to the Administration Methods of ALA and ALA-Methylester, *Kor. J. Head & Neck Oncology* **19**(1), 21-24.
- Gallegos, E. R., I. D. Rodriguez, L. A. M. Guzman, and A. J. P. Zapata (1999), In Vitro Study of Biosynthesis of Protoporphyrin IX Induced By  $\delta$ -Aminolevulinic Acid in Normal and Cancerous Cells of the Human Cervix, *Archives of Medical Research* **30**, 163-170.
- Peng, Q., K. Berg, J. Moan, M. Kongshaug, and J. M. Nesland (1997), Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *DDT* **4**, 507-517.
- Ninomiya, Y., Y. Itoh, S. Tajima, and A. Ishibashi (2001), In vitro and In vivo expression of protoporphyrin IX induced by lipophilic 5-aminolevulinic acid derivatives, *J. Dermatological Science* **27**, 114-120.
- Green L. M., J. L. Reade, and C. F. Ware (1984), Rapid colorimetric assay for cell viability : Application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J. Immunological Methods* **70**, 257-263.