

광역동 항암치료를 위한 광과민제 스크리닝 연구

¹김 소 영 · ¹유 귀 재 · ¹박 근 형 · ²임 병 락 · ³김 시 석 · ⁴염 행 철 · † ^{1,2}채 희 정
¹호서대학교 식품생물공학과 및 식품기능안전연구센터, ²(주)에이치앤비티코리아,
³CMS테크놀로지(주), ⁴호서대학교 생명과학과
(접수 : 2007. 4. 16., 게재승인 : 2007. 10. 16.)

Screening of Photosensitizer for Photodynamic Therapy

Soyoung Kim¹, Guijae Yoo¹, Keunhyoung Park¹, Byung Lak Lim², Shi Surk Kim³,
Heng Cherl Yom⁴, and Hee Jeong Chae^{1,2†}

¹Department of Food and Biotechnology, and Center for Food Function and Safety,
Hoseo University, Asan 336-795, Korea

²H&BT Korea Co., Ltd, Seoul 110-070, Korea

³CMS Technology Co., Ltd, Asan 336-795, Korea

⁴Department of Life Science, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

(Received : 2007. 4. 16., Accepted : 2007. 10. 16.)

Photodynamic therapy (PDT) is a targeted-tumor treatment system using a photosensitizer, light and oxygen to treat malignant tumor. We have investigated the cytotoxicity of 4 types of phthalocyanine derivative (silver phthalocyanine, iron (III) phthalocyanine, copper (II) phthalocyanine, nickel (II) phthalocyanine) against lung and breast cancers based on photodynamic therapy. As a result, phthalocyanine derivatives indicated a higher anticancer activity on a breast cancer cell line. Among the tested phthalocyanines, silver phthalocyanine (AgPc) showed a lower cytotoxicity against a normal cell line. In addition AgPc gave a good color characteristic when it is solubilized in water. Finally AgPc was selected as a potential antitumor agent for breast cancer.

Key Words : PDT (photodynamic therapy), Photosensitizer, Phthalocyanine

서 론

광역동요법 (photodynamic therapy, PDT)은 표적세포에 선택적으로 흡수되고, 600~1200 nm 파장에서 활성을 나타내는 광과민제 (photosensitizer)를 이용한 표적지향적인 항암치료법의 일종이다. 1904년 Von Tappeiner 등이 피부암 치료를 위해 광과민제 eosin을 사용한 것이 광역동요법의 시초이고(1), 1970년대 초에 Dougherty 등이 PDT가 동물과 인간의 종양에 광범위하게 효과가 있다고 밝혔다(2). 그 이후 1980년대 초에 처음으로 폐암 환자가 도쿄 의과대학에서 PDT로 치료를 받았다(1). 최근에는 PDT법이 식도암, 두경부암, 담관암, 피부암 등 여러 표재성 조직에 발생하는 종양 치료에 사용되고 있으며, 그 유효성이 인정되어 임상

영역에서 활발히 이용되고 있다(1, 3, 4). 조기 위암에 대한 광역동 치료 효과에 대한 일부 보고(5, 6)가 있으나, 아직까지는 대부분 진행성 종양에서의 일시적 억제 목적으로서의 광역동 치료 효과에 대한 연구가 대부분이다(3).

종양치료분야에서 PDT 사용의 이론적 근거는 산소 존재 하에서 광자극 후에 형광성을 띠고 세포독성을 유발하는 광과민제의 효능에 기초한다. PDT 치료 과정은 두 단계 과정으로 이루어진다. 첫 단계에서 암 조직에 광과민제로 감작시키는 것으로, 국소적 또는 전신적으로 광과민제를 주입하면 정상세포에 비해서 암조직에 광과민제가 고농도로 그리고 선택적으로 축적된다. 두 번째 단계에서는 감작된 조직을 chemical photosensitizer의 흡수도와 일치하는 파장의 빛 (laser)에 노출시킨다. 악성 조직 내에 축적된 광과민제는 특수한 파장 (630 nm, red light)에 의해 활성화되어 singlet oxygen을 생성하게 되는데 이에 의한 혈관 손상이 종양을 파괴시킨다. PDT에서 세포사멸 (cell death)의 기전은 singlet oxygen과 다른 세포독소가 방출되면서 직접적인 세포 손상과 혈관 손상 등의 여러 결과들을 초래한다(2, 7).

† Corresponding Author : Department of Life Science, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

Tel : +82-41-540-5642, Fax : +82-2-6280-6346

E-mail : hjchae@hoseo.edu

흔히 임상에서 사용되고 있는 광과민제는 hematoporphyrin derivative (HpD)이고, 정제된 HpD의 변형품인 photofrin (porfimer sodium)이 세계적으로 인정을 받아 사용되고 있는 광과민제이다. 현재 photofrin은 모든 종양에서 널리 사용하는 광과민제로 630 nm의 빛에서 활성화된다. Meta-tetrahydroxy phenylchlorine (Foscan 혹은 Temoporfin)도 폐암에서 PDT 시술에 사용되고 있다. 이 약품은 652 nm의 레이저광에서 활성화되고 photofrin보다 적색파장을 더 띈다. Prodrug인 5-amino leuvalinic acid (ALA)는 광과민제는 아니지만 protoporphyrin IX의 대사전 물질이며 내인성 광과민반응을 형성한다. 이 약품은 피부종양에서 널리 사용되며 국소적으로 도포한다(1). 새로운 광과민제가 계속 개발되고 있지만 아직 소수의 광과민제만이 임상적으로 사용되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 PDT에 적용할 수 있는 phthalocyanine계 광과민제 4종을 이용하여 폐암과 유방암 세포주에 대한 항암활성 테스트를 수행하였으며 PDT 적용 약물의 개발 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

실험에 사용한 phthalocyanine계 photosensitizer (silver phthalocyanine, AgPc $C_{32}H_{16}AgN_8$; iron (III) phthalocyanine, FePc, $C_{32}H_{15}FeN_8O_{14}Na \cdot xH_2O$; copper (II) phthalocyanine, CuPc, $C_{32}H_{12}CuN_8Na_4O_{12}S_4$; nickel (II) phthalocyanine, NiPc, $C_{32}H_{12}NiN_8Na_4O_{12}S_4$)는 CMS테크놀로지(주)(아산, 한국)에서 제공받았고, 대조군으로 사용한 hematoporphyrin 유도체 (HpD)인 포토겜 (Photogem, Timtec Co., USA)은 화일약품(주)(서울, 한국)으로부터 제공받아 실험에 사용하였다. 인체 폐암 세포주 (A549), 인체 유방암 세포주 (MCF7), 정상세포주 (MDCK, dog kidney)는 한국세포주은행에서 분양받았고, 세포독성 실험에 사용된 dimethylsulfoxide (DMSO)와 3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)는 Sigma Chemical Co. (MO, USA)에서 구입하였다.

PDT 방법

PDT 치료를 위한 광원은 단국대학교 의학레이저연구센터에서 보유한 632 nm diode laser (Biolitec, Germany, 0.4 W)를 사용하였다. 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 RPMI-1640 배지에서 각각 배양된 폐암 (A549), 유방암 (MCF7), 정상세포 (MDCK)를 1×10^4 cell/ml의 농도가 되도록 96 well plate에 각각 180 μ l씩 넣고, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 측정하고자 하는 시료를 PBS에 녹인 후 농도별 (최종 농도 2, 4, 6, 8, 10 μ g/ml)로 20 μ l씩 각 well에 첨가하여 5% CO₂ 배양기에서 2시간 배양한 후, 새로운 배지로 교환해 주었다. 96 well plate를 0°C에서 썰과 15 cm 거리를 두고 900 sec 동안 632 nm diode laser를 조사한 후, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하여 MTT assay를 수행하였다.

세포독성 실험 (MTT assay)

세포독성 실험은 Denizot 등의 방법(8)에 따라 수행하였다. PDT를 수행한 96 well plate의 각 well에 5 mg/ml의 3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)를 10 μ l씩 첨가한 후 4시간 동안 암 상태 (dark condition)로 배양하였다. 푸른색의 MTT formazan이 생성되면 dimethylsulfoxide (DMSO) 100 μ l로 용해시켜 microplate reader (VERSAmax, Molecular Device, Sunnyvale, USA)를 이용하여 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 결과 값은 세포에 대한 증식 저해율 (inhibition rate, %)로 나타냈으며, 다음과 같이 산출하였다.

$$\text{Inhibition rate(\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}}\right) \times 100$$

여기서, A_{sample} : 시료 첨가 well의 흡광도 (570 nm)

A_{blank} : PBS 완충용액 첨가 well의 흡광도 (570 nm)

IC₅₀ (50% inhibitory concentration)값의 산출

세포주에 대한 IC₅₀은 각 테스트 시료의 항암활성 비교를 위한 지표로서, 그 값은 암세포의 증식 억제 정도가 50%일 때의 시료의 투여량이다. 따라서 특정약물의 특정 세포주에 대한 IC₅₀값이 낮을수록 특정암세포에 대한 증식 저해활성이 높다고 할 수 있다. IC₅₀값은 시료투여량에 따른 저해율을 조사하여 SPSS 12.0 프로그램 (SPSS Science, USA)을 이용한 probit 분석법에 의하여 산출하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 기존의 항암제의 부작용을 최소화시킬 수 있는 암세포 국소전달형 레이저 시스템과 광과민성 항암제 (photosensitizer)를 이용하여 암세포를 괴사시킬 수 있는 암치료 방법을 확립하였다. 레이저시스템은 632 nm diode laser를 사용하였고, 레이저는 900 sec 동안 조사했으며, 에너지 조사량은 0.4 W를 사용하였다. PDT 방법은 96 well plate에 세포를 분주한 후, 일정량 (최종 농도 2, 4, 6, 8, 10 μ g/ml)의 광과민제를 투여한 후, 96 well plate를 암소에 설치하여 632 nm diode laser (0.4 W, 900 sec)로 조사하였다. 또한 *in vitro* 상에서 암세포에 부착된 광과민제의 활성만을 분석하기 위해 레이저 조사전에 암세포에 부착되지 않은 광과민제를 제거한 후 실험을 진행하였다.

Photosensitizer는 약물 단독으로는 암치료 효과가 없으나 암조직에 고농도로 축적되는 성질을 지니고 있고 레이저 광선을 쏘게 되면 암조직만 골라서 괴사시키는 추적성을 갖는 물질이다. 광과민제가 표적으로 암조직에 고농도로 축적될 수 있는 것은 암세포가 정상세포보다 지단백질 (lipoprotein) 수용체가 많이 존재하고, 광과민제 물질이 혈중 지단백질에 결합하여 순환하다가, 암세포 지단백질 수용체에 강하게 결합하게 되므로 정상세포에서는 빨리 배설되는 반면 암세포에서는 오래 남아 있기 때문이다.

본 연구에서는 4종의 phthalocyanine계 photosensitizer인 CuPc, FePc, NiPc, AgPc과 양성 대조군으로 hematoporphyrin 유도체인 포토겔 (Timtec사 제품)을 *in vitro* PDT에 적용하여 폐암, 유방암, 신장 정상세포에 대한 저해활성을 알아보았다. Fig. 1과 2에서 보는 바와 같이 phthalocyanine계 시료들은 폐암세포주에 대해서는 2 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서도 저해활성을 보이기 시작하였으며, 4종의 phthalocyanine계 시료들은 모두 대조군인 포토겔과 비슷한 항암활성을 보였다. 한편 유방암에 대해서는 6 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 세포독성을 나타내기 시작했으며 그 이하의 농도에서는 대조군인 포토겔에 비해 매우 낮은 항암활성을 보였다(Fig. 2). Fig. 3에서 보는 바와 같이 CuPc와 NiPc는 8 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 정상세포에도 높은 세포독성을 보이는 것을 알 수 있었다.

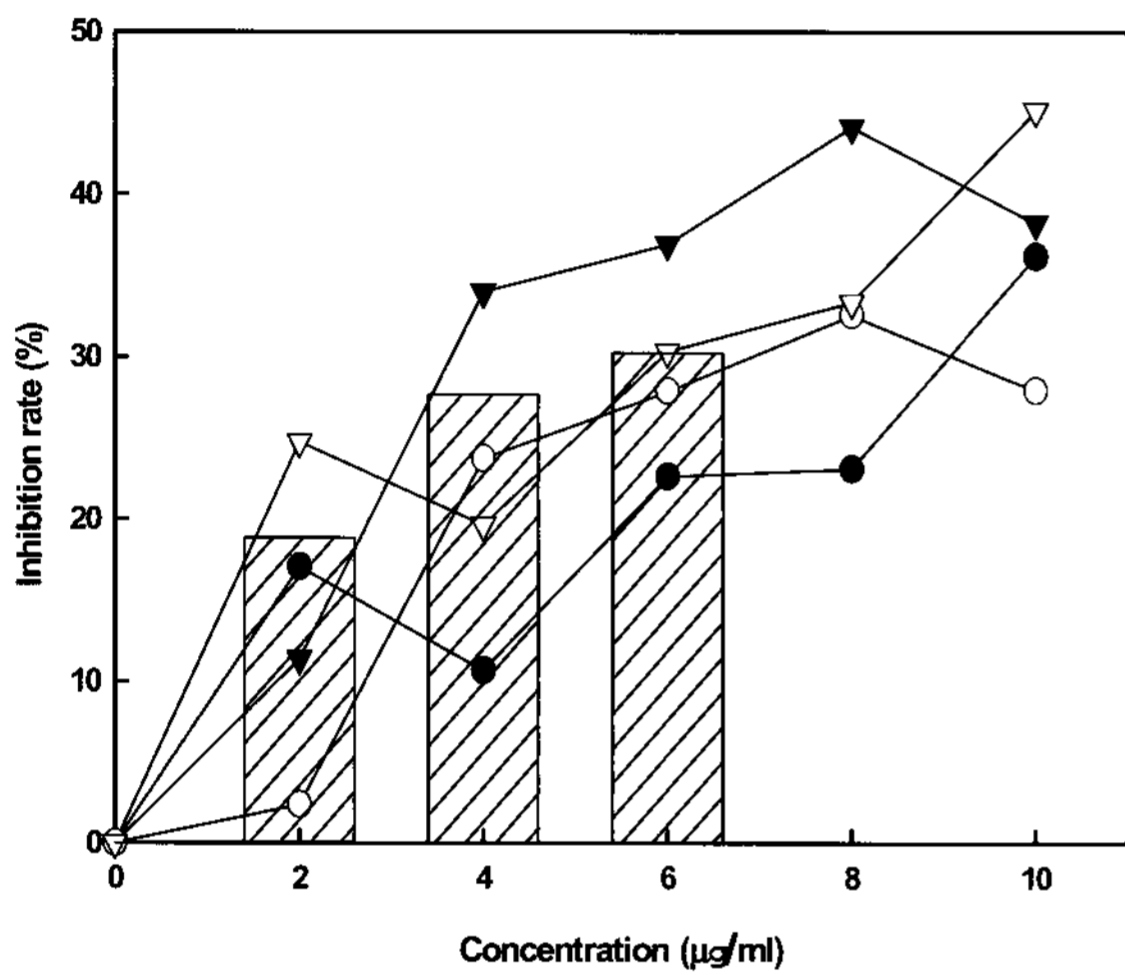


Figure 1. Inhibitory effects of phthalocyanines on the growth of lung cancer cell determined by MTT assay (-●- : CuPc, -○- : FePc, -▽- : AgPc, -▼- : NiPc, ▨ : photogem (control)).

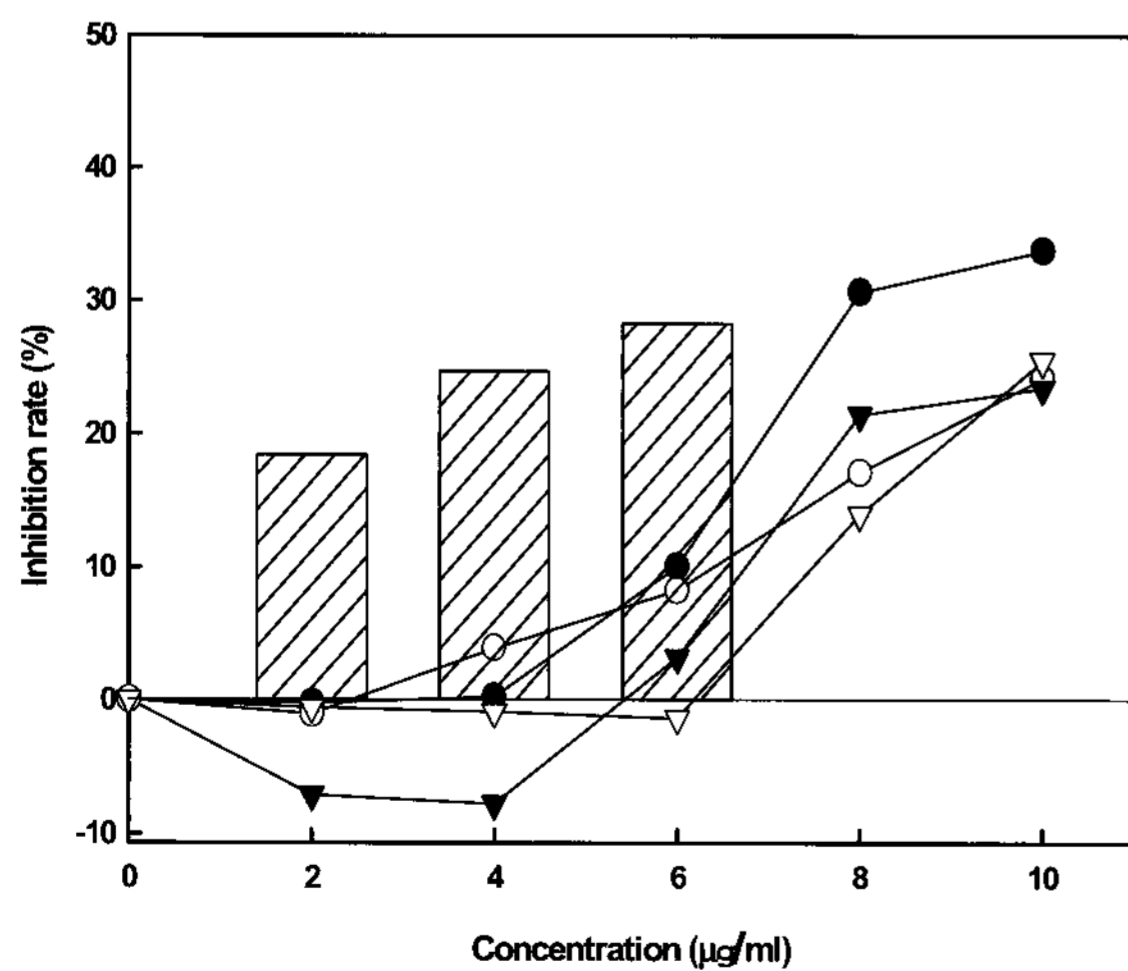


Figure 2. Inhibitory effects of phthalocyanines on the growth of breast cancer cell determined by MTT assay (-●- : CuPc, -○- : FePc, -▽- : AgPc, -▼- : NiPc, ▨ : photogem (control)).

Table 1. IC₅₀ values of tested phthalocyanines and photogem against various cell lines

	A549 (lung cancer cell line)	MCF-7 (breast cancer cell line)	MDCK (normal cell line)
CuPc	41.44	11.37	27.79
FePc	16.91	17.89	11.35
NiPc	12.21	13.67	10.72
AgPc	23.15	12.06	22.39
Photogem	25.61	42.12	20.37

* predicted by 95% confidence limits

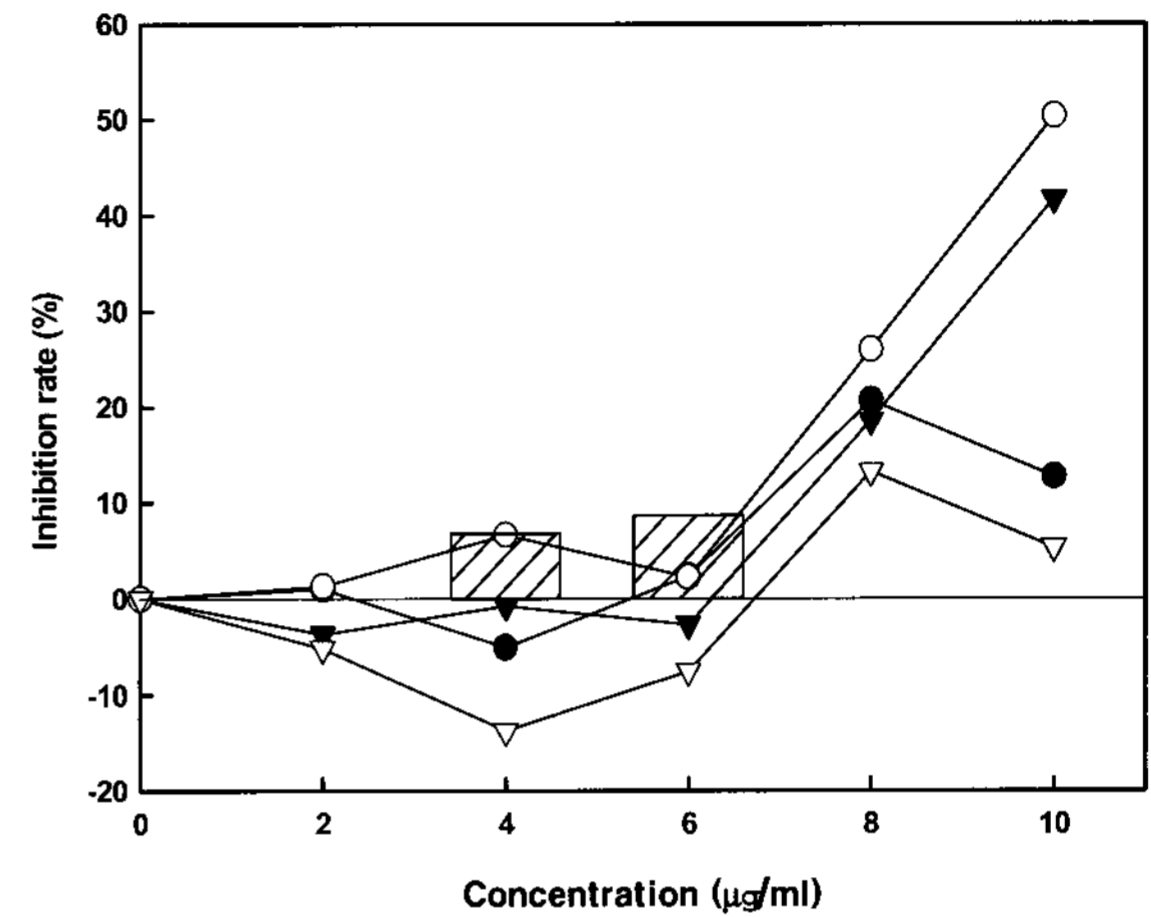


Figure 3. Inhibitory effects of phthalocyanines on the growth of kidney normal cell determined by MTT assay (-●- : CuPc, -○- : FePc, -▽- : AgPc, -▼- : NiPc, ▨ : photogem (control)).

테스트 시료의 항암활성을 비교하기 위해 통계프로그램인 SPSS를 이용하여 probit 분석법에 의해 테스트 시료와 대조군의 암세포에 대한 IC₅₀ 값을 추정하였다. Table 1에 정리된 바와 같이 통계처리에 의해 산출된 IC₅₀ 값을 검토해 보면, phthalocyanine계 시료들은 대조군으로 사용된 포토겔과 비교하여 유방암과 폐암세포에 대하여 높은 저해활성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 대조군인 포토겔은 광역동 치료가 폐암 치료에 활용되고 있다는 이전의 보고와 같이 유방암보다는 폐암에 높은 활성을 나타냈고, phthalocyanine계 시료들은 폐암보다는 유방암에 높은 항암활성을 나타냈다. 이것은 phthalocyanine계 시료를 이용한 광역동 치료법이 유방암에 대한 적용가능성을 제시하는 새로운 결과이다. NiPc의 IC₅₀ 값이 폐암과 유방암에 각각 12.21 $\mu\text{g/ml}$ 과 13.67 $\mu\text{g/ml}$ 로 가장 높은 활성을 보였으나, 정상세포에 대한 비교적 낮은 IC₅₀ 값 (10.72 $\mu\text{g/ml}$)을 보였고, 이러한 결과는 NiPc는 정상세포에 대한 독성 부작용을 나타낼 수 있음을 시사하는 결과이다. CuPc는 정상세포에는 낮은 세포독성을 보이고, 유방암에도 높은 저해활성을 보이지만 폐암에는 낮은 저해활성을 나타냈다. FePc는 암세포보다 정상세포에 높은 독성을 나타냈다. 또한, CuPc, FePc 및 NiPc는 물에 녹였을 때 짙은 청색을 나타냈는데, PDT 항암치료시 정맥주사를 통해 약물이 주입되기 때문에 피부에 청색증을 유발할 가능성이 있어 항암제로 사용하기에는 부적합한 약물이라고 판단되었다. 실제 phthalocyanine계 광과민제들이 피부 청색증을 유발하는 부작용 때문에 임상 적용에 한계가 있는

실정이다. 그에 반해 AgPc는 유방암에는 높은 활성 ($IC_{50} = 12.06 \mu\text{g/ml}$)을 보이면서 고농도에서도 정상세포에 대해서는 상대적으로 낮은 독성 ($IC_{50} = 22.39 \mu\text{g/ml}$)을 나타내었고, 시료색도 옅은 회색으로 항암제로 활용시 문제가 없을 것으로 판단되었다. AgPc는 기존의 광과민제로서 임상치료에 사용되고 있는 대조군인 포토젬과 비교해 폐암세포주와 유방암세포주에 대해 높은 항암활성을 나타냈고, 정상세포에 대한 독성은 더 적은 것으로 나타났다. 또한 기존의 보고된 photosensitizer (HpD, AlSPc, ZnSPc)의 IC_{50} 값 ($5\text{-}200 \mu\text{g/ml}$)과 비교해 보면(9), AgPc가 높은 항암활성을 보이는 물질임을 알 수 있었다. 그러나 AgPc는 물에 대한 용해도가 낮아 용해도 개선을 위한 분자적 수식 (molecular modification)이 필요하다고 판단되었다. 향후 AgPc의 용해도를 향상시키기 위한 지속적인 연구를 통하여 AgPc를 암치료에 효과적인 항암제로서 개발할 수 있을 것으로 전망된다.

요 약

광역동요법 (photodynamic therapy, PDT)은 악성종양을 치료하기 위해 광과민제와 레이저광을 이용하는 표적지향적 항암치료법이다. 본 연구에서는 PDT에 적용할 수 있는 새로운 광과민제를 스크리닝하기 위해 4종의 phthalocyanine계 광과민제 (silver phthalocyanine, iron (III) phthalocyanine, copper (II) phthalocyanine, nickel (II) phthalocyanine)을 이용하여 폐암과 유방암 세포주에 대한 항암활성 테스트를 수행하였다. 연구결과 phthalocyanine계 광과민제들은 폐암보다 유방암에 높은 활성을 나타냈으며, 그 중 silver phthalocyanine (AgPc)는 정상세포에 대해서는 세포독성이 낮으면서도 물에 용해할 경우 청색증을 유발하지 않아 유방암에 대한 항암제로서의 개발가능성을 확인하였다.

감 사

본 연구는 호서대학교의 벤처산학컨소시엄 연구비 지원 (2005년)에 의해 수행된 결과의 일부이며, 이에 깊이 감사드립니다.

REFERENCES

1. Song, K. H., C. W. Lee, and K. H. Kim (2003), Photodynamic treatment for precancerous disease, *Kor. J. Dermatol.* **41**(5), 609-616.
2. Kim, J. H. and M. K. Jung (2006), Interventional pulmonology: Photodynamic therapy (PDT) in lung cancer, *Proc. Korean National Tuberculosis and Respiratory Diseases Workshop 2006*, Seoul, pp3-11.
3. Cheon, Y. K., D. H. Han, I. S. Jung, C. B. Ryu, J. Y. Cho, Y. S. Kim, J. S. Lee, M. S. Lee, C. S. Shim, and B. S. Kim (2006), Photodynamic therapy for superficial gastrointestinal tumors, *Kor. J. Gastrointest. Endosc.* **32**(2), 81-86.
4. Lee, H. N., J. D. Lee, S. C. Baek, D. K. Byun, and D. Houh (1998), Clinical effects of photodynamic therapy on carcinoma in situ of the skin, *Kor. J. Dermatol.* **36**(3), 407-414.
5. Ell, C., L. Gossner, and A. May (1998), Photodynamic ablation of early cancers of the stomach by means of mTHPC and laserirradiation, *Gut* **43**, 345-349.
6. Karanov, S. (2002), Long-term results after photodynamic therapy (PDT) of TINOMO gastrointestinal (GI) tumors. *Hepatogastroenterology* **49**, 1579-1581.
7. Pass, H. I. (1993), Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *J. Natl. Cancer Inst.* **85**, 443-456.
8. Denizot, F. and H. Lanf (1986), Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J. Immun. Methods* **89**, 271-277.
9. Stylli, S. S., J. S. Hill, W. H. Sawyer, and A. H. Kaye (1995), Phthalocyanine photosensitizers for the treatment of brain tumours, *J. Clin. Neurosci.* **2**(1), 64-72.
10. Oh, Y. H., S. B. Kim, G. W. Lee, H. Y. Kim, M. J. Shim, H. S. Rho, H. S. Lee, M. W. Lee, U. Y. Lee, and T. S. Lee (2006), The immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *Tremella fuciformis*. *Kor. J. Mycol.* **34**(2), 105-111.