

## Anti-effects of Photodynamic Therapy in Peroxiredoxin IV-induced AMC-HN3 Cell Lines

Jin-Chul Ahn<sup>1†</sup>, Jung-Wook Kang<sup>1</sup>, Daesik Kim<sup>2</sup> and Seong No Hong<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Medical Laser and Device Research Center, Dankook University, Cheonan, Chungnam 330-714, Korea.

<sup>2</sup>Department of Clinical Laboratory Science, Dongnam Health College, Suwon 440-714, Korea

Photodynamic therapy (PDT) is a treatment utilizing the generation of singlet oxygen and other reactive oxygen species (ROS), which selectively accumulate in target cells. Peroxiredoxin (prx) plays an important role in eliminating peroxides generated during metabolism. Prx exert protective antioxidant role in cells through peroxidase activity. The aim of present work is to investigate the cytotoxicity of photofrin-mediated PDT in prx IV-transfectant AMC-HN3 cell lines. We confirmed that PDT has an effect on ROS generation in prx IV-induced cell lines. Treatment of PDT in prx IV-HN3 cell lines inhibits cytotoxic effects. Prx IV-induced HN3 cell lines resists in cell death during PDT. Also, prx IV-HN3 cell lines treated PDT inhibited ROS generation in contrast with vector control. We indicated that prx IV-induced AMC-HN3 cell lines have a function as inhibitors during PDT.

**Key Words:** Photodynamic therapy, Peroxiredoxin IV (prx IV), Reactive species oxygen (ROS)

### 서 론

광역학 치료 (photodynamic therapy)는 광감작제 (photosensitizer)가 빛과 산소에 의해 화학적 반응을 일으킴으로써 단일항 산소 (singlet oxygen)와 이에 의해 유발되는 자유라디칼 (free radical)이 암세포만 선택적으로 파괴하는 치료 방법이다 (Dougherty et al., 1987). 이 과정에서 광감작제가 종양 세포에 선택적으로 흡수한 후, 광감작제에 민감한 흡수과장을 가진 레이저광을 조사하면 광감작제가 빛을 받아 광 에너지를 종양 세포의 산소에게 전달하게 되고, 화학 반응성이 뛰어난 활성 산소나 라디칼 상태의 산소가 발생하여 주변 세포성분을 화학적으로 파괴하기 시작하여 세포고사 (apoptosis)와 세포괴사 (necrosis) 등의 세포사멸 (cytotoxic effect)을 일으킨다 (Jheon, 2007).

Peroxiredoxin (Prx)는 촉매적 cysteine 잔기가 포함된 작은 항산화 단백질로 과산화물을 제거하고 활성 산소종에 대한 세포의 반응에 관여한다. 또한 peroxidase 활성 ( $\text{ROOH} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$ )을 통해 세포의 항산화제

역할을 가지고 Thioredoxin (Trx)로부터 전자를 제공받아  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 제거한다. Prx는 peroxides를 줄이기 위한 redox-active cysteines를 이용하고 크게 1-cys, 2-cys prx로 나뉘어 진다 (Wood et al., 2003). NIH 3T3 세포에 prx를 과발현시킬 경우 peroxidase로서 작용하여  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 제거하는 활성이 나타났다 Kang et al (1998). Prx는 포유류 세포에서 여러 종류의 isoform으로 존재하며, prx I-VI로 명명되고 있다 (Lyu et al., 1999; Netto et al., 1996). 대부분의 prx isoform들은 세포질에 존재하고 있으며, 종류별로 mitochondria, chloroplast, peroxisomes 등에서 확인된다 (Hofmann et al., 2002). 최근 Lee 등의 연구에서는 파킨슨병을 유도하는 신경 세포에 prx I의 영향을 받으면 ROS를 유도하면서 세포고사를 일으킨다고 보고하였다 (Lee et al., 2008). 또한, 자궁경부암 세포에서도 prx III에 의해 세포성장을 억제하는 것으로 나타났다 (Choi and Kang, 2003). 그러나 prx의 발현을 조절하는 기작에 대해서는 아직 밝혀지지 않은 상태이다 (Kim et al., 2000).

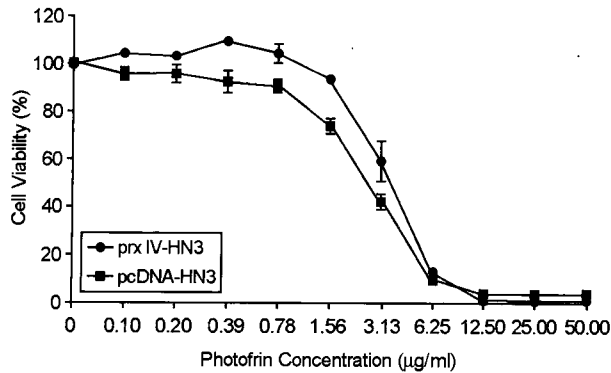
본 연구에서는 prx IV이 형질 도입된 인체 두경부 암세포주를 이용해 광역학 치료를 하였을 때 나타나는 세포 독성능에 대해 알아보고, 광역학 치료에 의해 증가하는 ROS가 prx IV-HN3 세포주에서 감소되는지 알아보았다.

\*논문 접수: 2008년 11월 24일

수정재접수: 2008년 12월 3일

†교신저자: 안진철, (우) 330-714 충남 천안시 안서동 산 29, 단국대학교 의과대학 의학레이저 연구센터

Tel: 041-550-1786, e-mail: jcahn@dankook.ac.kr



**Fig. 1.** Anti-cytotoxicity effects of photofrin-mediated PDT in prx IV-transfectant AMC-HN3 cells. Cells were treated various concentrations of photofrin (0~50 µg/ml) for 24 hr. After treatment, cells were irradiated at 630 nm diode laser (0.83 mW/cm<sup>2</sup>) for 15 min, and then determined by MTT assay.

## 재료 및 방법

### 1. 광감작제 및 광원

광감작제로 사용한 photofrin (Axcan Pharma Inc., Canada) 은 멸균된 증류수에 녹여서 1 mg/ml의 용액으로 제조한 후 -20°C의 냉동실에서 보관하였다. 광원은 광감작제가 최대 광독성능을 나타내는 630 nm diode laser (Biolitec, Germany)를 사용하였다. 1 cm cylindrical diffuser fiber을 메탈박스 안에 설치하여 단위면적 당 에너지 세기를 0.83 mW/cm<sup>2</sup>이 되도록 조절하여 15분간 총 7.47 J/cm<sup>2</sup>의 에너지를 조사하였다.

### 2. 세포 배양

본 실험에서는 인체 두경부 암세포주에 prx IV가 형질 도입된 세포주로 AMC-HN3 (Human Head and Neck cell line-3)를 사용하였다 (Kim et al., 1997). 대조군으로는 pcDNA vector만 형질 도입된 세포를 사용하였으며 이들은 서울 아산 병원에서 분양 받았다. 또한 실험에 사용된 세포들을 RPMI-1640 (Hyclone, USA)에 10% fetal bovine serum (Hyclone, USA)와 100 units/ml의 penicillin 및 100 µg/ml의 streptomycin (Hyclone, USA)이 포함된 성장배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 배양기 (Thermo Forma, USA)에서 배양하였다.

### 3. 세포 독성능

형질 도입된 인체 두경부 암세포에 광역학 치료를 이용해 의한 세포 독성능을 확인하기 위해 MTT assay 방법으로 알아보았다. 지수 성장시기의 세포를 10<sup>4</sup> cells/well

이 되게 96 well plate에 분주하고 24시간 동안 배양한 후 genistein을 25, 50, 100, 200 µM의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이에 100 µl의 광감작제 (100 µg/ml)를 첨가한 후 2배 희석법으로 처리하여 6시간 동안 배양하고 새로운 배지로 교환 후 630 nm diode laser로 조사하였다. 24시간 배양 후 pH 7.3의 DPBS에 녹인 MTT (Sigma Chemical Co., USA)용액 (2 mg/ml)을 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 dimethylsulfoxide (DMSO, Kanto, Japan)를 첨가하여 formazan을 잘 용해시키고 microplate reader (Bio-Rad 550, Bio-Rad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 4. General reactive oxygen species 측정

H<sub>2</sub>DCF-DA (Molecular Probes Inc., USA) 형광시약을 사용하여 세포 내에 존재하는 general reactive oxygen species (G-ROS)를 확인하였다. H<sub>2</sub>DCF-DA는 acetylation에 의해 변한 DCF 자체로는 형광이 없지만 세포 내의 ROS와 만나게 되면 형광을 가지는 특성을 가지고 있다. 광역학 치료 후 두경부 암세포를 DPBS로 두세 번 씻어내고, 10 µM의 H<sub>2</sub>DCF-DA를 첨가하여 30분 동안 배양 후 flow cytometer (BD Biosciences, USA)로 측정하였다.

## 결 과

### 1. prx IV-HN3 세포주에서 광역학 치료 시 나타나는 세포 독성능 억제

Prx IV가 형질 도입된 AMC-HN3 세포에서 광역학 치료 후 세포 독성능을 관찰한 결과, vector control과 비교하여 prx IV 유전자가 형질 도입된 AMC-HN3에서 세포사멸이 억제되었다 (Fig. 1). 즉, photofrin의 농도가 약 1.56 µg/ml일 때에 vector control은 약 93%의 세포 독성능을 나타냈고, prx IV 유전자가 형질 도입된 세포에서는 약 73%로 나타났다. 두 세포간의 약 20% 정도의 세포 독성능의 차이가 발생하였다. 세포의 형태학적 관찰을 하였을 때, prx IV-HN3 세포가 pcDNA-HN3 세포보다 세포 응축 등의 변화가 적은 것으로 나타났다 (Fig. 2). 결국 prx IV가 형질 도입된 AMC-HN3 세포주에서 광역학 치료 시 세포 독성능이 억제되는 것으로 확인하였다.

### 2. Prx IV-HN3 세포주가 광역학 치료 시 형성하는 ROS 생성 억제

Antioxidant 역할을 하는 prx IV가 광역학 치료 시 발생

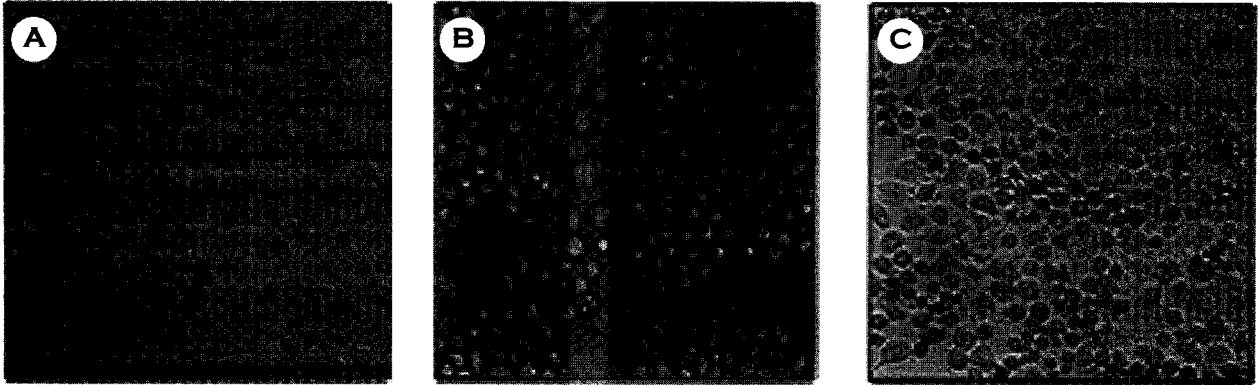


Fig. 2. Morphological change of cells treated photofrin-mediated PDT in prxIV-transfectant AMC-HN3 cells. Cells were adjusted with PDT, and then observed by light microscopy. (A; control, B; prx IV-HN3, C; pcDNA-HN3)

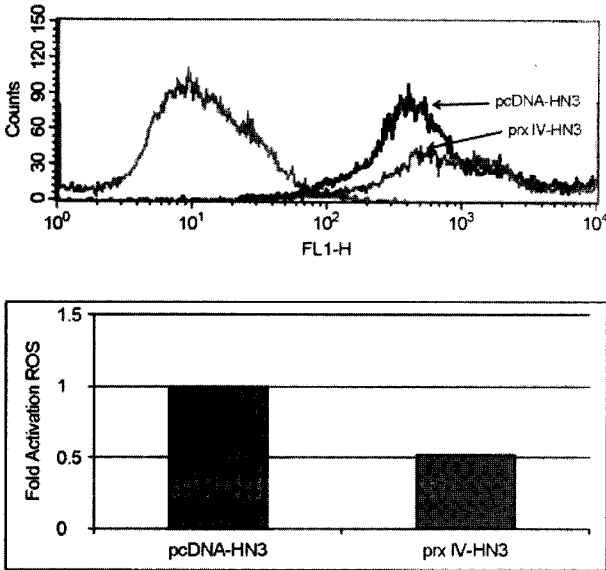


Fig. 3. Antioxidant effects of PDT mediated photofrin in prx IV-HN3 cells. Each treated cells were washed by DPBS and incubated with  $H_2DCF\text{-}DA$  ( $10 \mu M$ ) for 30 min at  $37^\circ C$ . The ROS of cells were analyzed using a flow cytometer.

하는 ROS를 억제 시키는지 알아보기 위해 광역학 치료 후 flow cytometer로 ROS를 측정해 보았다. Photofrin의 농도를 약  $1.56 \mu g/ml$ 로 처리하여 광역학 치료를 하여 비교한 결과, vector control에 비해 ROS의 형성이 약 50% 정도 감소한 것으로 나타났다 (Fig. 3). 즉, vector control에서 광역학 치료 후 증가했던 ROS가 prx IV-HN3 세포주에서 antioxidant 역할을 하는 prx IV의 영향으로 ROS 생성을 억제시킨 것으로 보여진다.

## 고 찰

현재 암세포 치료는 수술, 항암화학요법 및 방사선 치료 등 3가지 주요 치료수단 뿐만 아니라 면역 치료, 유전자 치료 등과 함께 광역학 치료도 암 치료의 다른 방법으로 발전하고 있다 (Jheon, 2007). 이 중, 광역학 치료가 기존의 암 치료법인 수술이나 약물요법 등의 치료 이후의 후유증 문제를 해결할 수 있는 장점으로 인해 많은 관심을 얻고 있다 (Choi et al., 2008). 광역학 치료는 세포 내의 반응으로 세포 내에 축적된 광감작제가 외부의 빛 에너지와 산소가 반응하여 ROS 또는 활성 산소를 ( $O_2$ ) 생성시키거나 (Type II 반응), 감작제가 전자 전달계에 관여하는 경우 자유라디칼이 형성되어 (Type I 반응) 세포 파괴가 일어난다 (Foote, 1991; Moan and Berg, 1991). 표피 세포암종에서 광역학 치료 시에 세포고사를 유도하면서 세포사멸이 나타난다는 보고가 있고 (Lam et al., 2001), 임상에서도 두경부 암세포가 광역학 치료에 증진 효과가 나타났으며 특히 초기단계에서 높은 효율이 나타났다 (Bie, 2006).

6개의 isoform으로 존재하는 prx 중에서 prx IV와 같은 분류에 속하는 prx I은 유방암 세포에서 세포사멸을 억제시킨다고 보고되었고 (Ahn et al., 2003), 최근 Chol 등의 연구에서는 cochlear hair cell에 항암제를 투여하여 세포고사가 일어나는 것에 대해 prx III가 보호하는 것으로 나타났다 (Choi et al., 2008). Prx IV는 세포 내에 축적되는 위치 및 정확한 기작이 알려져 있지 않고 있다 (Wood et al., 2003). 본 연구에서 prx IV가 형질 도입된 인체 두경부 암세포를 이용해 광역학 치료를 하여 세포 독성능을 알아본 결과, photofrin의 농도가  $1.56 \mu g/ml$ 일 때에 prx IV-

HN3에서 세포사멸이 약 20%가 억제되었다 (Fig. 1).

세포의 물질대사 과정 중 발생하는 ROS는 세포 내 물질의 산화변성 및 절단을 유발하기 때문에 일반적으로 세포에 유독한 물질로 알려져 있다. 수많은 질병에 관여하는 산화적 스트레스 (oxidative stress)는 세포에서 산화제 생산과 항산화제 능력 사이에서 불균형을 초래한다 (Gomer et al., 1996). Porphyrin에 매개되어 유도된 산화적 스트레스는 세포 내의 스트레스 단백질뿐만 아니라 초기 반응하는 유전자의 발현을 증가시킨다 (Luna et al., 1993). Prx II을 이용하여 녹조류 중 하나인 *Chlamydomonas reinhardtii*을 통한 연구에서 prx group 중 prx II가 ROS 형성을 억제하는 역할을 한다고 보고하였다 (Dayer et al., 2008). 본 연구에서 광역학 치료 초기에 발생하는 ROS를 분석한 결과, prx IV-HN3가 vector control보다 약 50% 정도 ROS가 감소된 것으로 나타났다 (Fig. 3). Antioxidant 역할을 하는 prx IV에 의해 광역학 치료 시 형성하는 ROS를 억제한 것으로 나타났다.

본 연구에서는 antioxidant 단백질로 알려진 prx IV를 이용하여 인체 두경부 암세포주에서 광역학 치료 기전을 알아보았다. Prx IV에 의해 광역학 치료 시 세포 독성능이 억제되고, 이 때 광역학 치료 시 증가하는 ROS의 생성이 억제 되는 것을 확인하였다. 결국, prx IV는 광역학 치료에 저항성 기질로서 역할을 하는 것으로 추정된다.

---

#### 감사의 글

본 연구는 2006년도 동남보건대학 연구비지원에 의하여 수행된 것임.

#### REFERENCES

- Ahn SJ, Bac JY, Lee RA, Han WS, Kim SW, Chae HZ, Noh DY. Protective role of prx (peroxiredoxin) I and II against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis of MCF7 cell lines. *J Kor Breast Cancer Soci.* 2003. 6: 68-74.
- Biel M. Advances in photodynamic therapy for the treatment of head and neck cancers. *Lasers Surg Med.* 2006. 38: 349-355.
- Choi HS, Park KJ, Hwang SC, Park H, Kim YS, Park KE. The role of peroxiredoxin III in the phototoxic drug-induced mitochondrial apoptosis of cochlear hair cell. *Acta Otolaryngol.* 2008. 10: 1-8.
- Choi SY, Kang SW. The effects of peroxiredoxin III on human hela cell proliferation. *Immune Network* 2003. 3: 276-280.
- Choi YC, Yoon SG, Chea MJ. Cancer imaging and photodynamic therapy using photosensitizers. *Polymer Sci Technol.* 2008. 19: 138-145.
- Dayer R, Fischer BB, Eggen RI, Lemaire SD. The peroxiredoxin and glutathione peroxidase families in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 2008. 179: 41-57.
- Dougherty T, Kaufman J, Goldfarb A, Weishaupt K, Boyle D. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res.* 1978. 38: 143-151.
- Foote CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol.* 1991. 54: 659.
- Gomer CJ, Ryter SW, Ferrario A, Rucker N, Wong S, Fisher AM. Photodynamic therapy-mediated oxidative stress can induce expression of heat shock proteins. *Cancer Res.* 1996. 15: 2355-2360.
- Hofmann B, Hecht HJ, Flohe L. Peroxiredoxins. *Biol Chem.* 2002. 383: 347-364.
- Jheon SH. Photodynamic therapy. *J Kor Med Assoc.* 2007. 50: 1119-1129.
- Kang SW, Baines IC, Rhee SG. Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. *J Biol Chem.* 1998. 273: 6303-6311.
- Kim H, Lee TH, Park ES, Suh JM, Park SJ, Chung HY, Kwon OY, Kim YK, Shong MH, Ro HK. Peroxiredoxin I and II are involved in hydrogen peroxide regulation in FRTL-5 thyroid cells. *J Kor Soc Endocrinol.* 2000. 15: 55-69.
- Kim SY, Chu KC, Lee HR, Lee KS, Carey TE. Establishment and characterization of nine new head and neck cancer cell lines. *Acta Otolaryngol.* 1997. 117: 775-784.
- Lam M, Oleinick NL, Nieminen AL. Photodynamic therapy-induced apoptosis in epidermoid carcinoma cells; reactive oxygen species and mitochondrial inner membrane permeabilization. *J Biol Chem.* 2001. 276: 47379-47386.
- Lee YM, Park SH, Shin DI, Hwang JY, Park B, Park YJ, Lee TH, Chae HZ, Jin BK, Oh TH, Oh YJ. Oxidative modification of peroxiredoxin is associated with drug-induced apoptotic signaling in experimental models of Parkinson disease. *J Biol Chem.* 2008. 11: 9986-9998.
- Luna MC, Wong S, Gomer CJ. Photodynamic therapy mediated induction of early response gene. *Cancer Res.* 1993. 53: 5897-5902.
- Lyu MS, Rhee SG, Chae HZ, Lee TH, Adamson MC, Kang SW, Jin DY, Jeang KT, Kozak CA. Genetic mapping of six mouse peroxiredoxin genes and fourteen peroxiredoxin related sequences. *Mamm Genome.* 1999. 10: 1017-1019.
- 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.

Netto LES, Chae HZ, Kang SW, Rhee SG, Stadtman ER. Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. TSA

possesses thiol peroxidase activity. *J Biol Chem.* 1996. 271: 15315-15321.

Wood ZA, Schroder E, Robin Harris J, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci.* 2003. 28: 32-40.

---