

플라즈마의 암 치료 응용

최근 플라즈마를 이용한 암 치료연구와 관련하여 많은 논문들이 발표되고 있으며 leukemia cell, 흑색종과 같은 암 세포 처리에 플라즈마를 조사했을 때, 암세포의 사멸효과가 높았다. 플라즈마는 암 세포 사멸과 박테리아 살균효과에 탁월한 효과를 가지고 있을 뿐만 아니라, 플라즈마에서 발생하는 다양한 radical은 혈액응고에도 효과가 있는 것으로 나타났다. 암 치료는 외과적 수술, 방사선 치료, 항암 약물치료 등의 방법으로 치료가 진행 되고 있으나, 현재로서는 수술이 가장 효과적인 치료법으로 받아지고 있다. 그러나 외과적 수술은 정상조직을 포함하여 넓은 부위의 암 조직을 절제해야 하며, 방사선 치료의 경우 면역력의 감소로 다른 합병증이 유발될 수 있으며, 항암제 치료의 경우 암 세포에 대한 비이성과 암 세포들의 항암제 내성으로 인해 치료에 있어 한계가 있다. 이렇듯 암 치료의 부작용을 최소화하기 위한 연구가 현재 활발히 진행되고 있으며, 최근 나노기술 및 바이오기술, 전기물리학 기술을 응용한 다양한 융합기술들이 대두되고 있다. 저온 상압 플라즈마는 열로서 암세포를 사멸 하는 것이 아니라 플라즈마의 다양한 활성종이 암세포의 괴사(necrosis)나 세포자멸사(apoptosis) 등을 유도하여 세포를 사멸시키게 된다. 플라즈마에서 발생하는 활성종은 세포의 부착(adhesion)에 중요한 기능을 하는 세포 부착 단백질들을 불활성화시켜 세포의 탈착 (detachment)을 유도하여 세포자멸을 유도한다. 세포의 부착능력 상실로 인해 나타나는 세포자멸의 양상(anoikis)은 암세포 사멸에 아주 중요한 역할을 한다. 다른 사멸 기작으로서 생쥐 흑색종 세포에 플라즈마를 처리 시, DNA의 손상과 사립체의 기능 장애를 통한 세포자멸사가 보고 되었다. 동물모델에서 Glioma cell을 주입한 생쥐에서 플라즈마를 조사했을 때, 암 조직의 크기가 대조군에 비해 30%의 감소되었음이 보고됐다. 그러나 플라즈마 또한 암 세포만을 구별해서 사멸시키는 암 특이적 죽음을 유도하진 못한다. 그리하여 선택적 암세포 사멸을 위해, 암세포에서 특이적으로 과잉 발현되는 단백질을 표적 단백질로 삼아, 이 단백질에 대한 항체를 금 나노입자에 부착을 시켰다. 이 중합체는 암세포만을 특이적으로 부착할 수 있으며, 금 나노입자는 플라즈마의 효과를 증폭시키기 때문에 정상세포가 영향을 받지 않는 세기의 플라즈마를 조사하게 되면, 정상세포에는 거의 영향을 미치지 않으면서, 중합체가 부착된 암세포에 강력한 플라즈마 효과를 집중시켜 암세포 특이적 세포사멸 기술이 소개되었다 (그림 1).

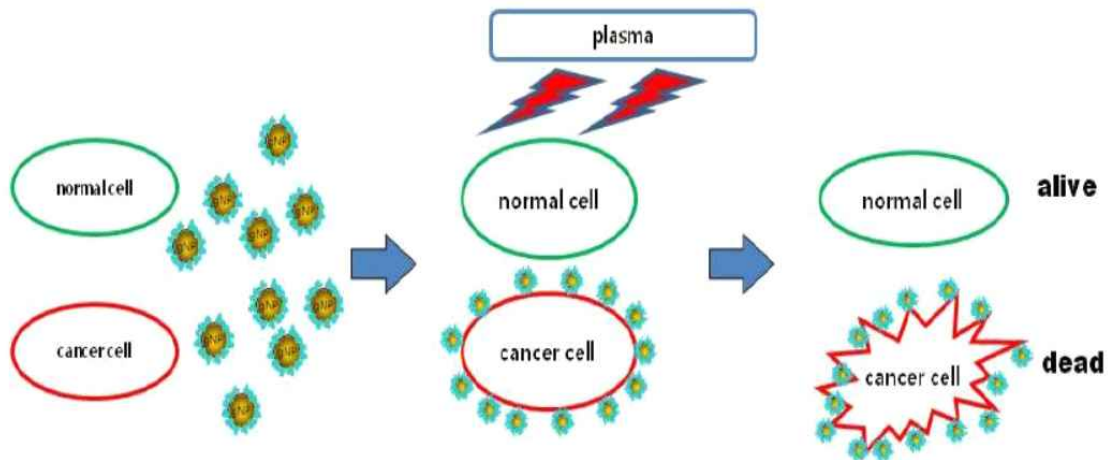


그림 1. The schematic picture of selectively killing cancer cells using gold nanoparticle (gNP) and plasma. Cancer cell specific antibodies are conjugated to the gNP that can be stimulated by plasma, thereby the stimulated gNP and plasma kill the cancer cells selectively.

흑색종 세포인 G361 세포주는 focal adhesion kinase (FAK)를 과잉 발현하고 있어서, FAK에 대한 항체를 금 나노입자에 부착시켰다. 사용된 플라즈마는 사용전력 22 kHz의 DBD type의 공기 플라즈마(air plasma) 형태였다. 흑색종 세포에 금 나노입자와 FAK를 부착시킨 중합체를 처리한 후 플라즈마를 적용시킨 결과 대조군들에 비해 중합체와 플라즈마를 처리한 실험군에서 흑색종 세포의 사멸률은 5배 이상 높았다. 이러한 결과는 흑색종 세포뿐만 아니라 oral squamous cell carcinoma (OSCC)에서도 유사한 결과를 보였다. OSCC에서는 epidermal growth factor receptor (EGFR) 단백질이 과잉 발현되었으며, EGFR을 표적 단백질로 이용하여 금 나노입자와 플라즈마를 함께 조사했을 경우, 매우 높은 암 선택적 사멸률을 관찰할 수 있었다. 위의 결과를 바탕으로 저온 상압 플라즈마를 이용하여 암세포에서 과잉 발현되는 단백질을 표적으로 정상세포와 구별하여 암세포의 전이, 침윤, 증식을 억제 할 수 있을 것이다. 그러나 비록 플라즈마가 암세포 제거에 높은 선택적 사멸률을 보이지만 향후 더 많은 연구가 진행될 것으로 기대된다. 암 치료에 사용되는 상온 상압 플라즈마(nonthermal atmospheric pressure plasma)의 효과는 열에 의한 것이 아니고, 플라즈마 에서 나오는 다양한 활성 분자(active species; oxygen/ hydroxyl radicals, nitric oxide etc)에 의해 나타난다. 이러한 암 연구와 관련해서 최근에 많이 발표되고 있는 부분이 플라즈마에 의한 세포의 부착능(adhesion property)의 변화와 세포사멸(apoptosis) 유도이다. 세포의 부착능과 관련해서 플라즈마의 활성 산소유리기 등이 세포 내 의 부착과 관련된 물질을 파괴하

면서 세포가 바닥에서 떨어지는 현상이 발생한다. 이러한 현상에는 세포 내의 다양한 세포골격구조(cytoskeletal structures)의 변화가 동반 되며, 가역적인 현상으로 알려져 있다. 암 연구에 있어 플라즈마의 주된 기전은 세포사멸의 유도이다. 플라즈마에 의해 세포가 죽게 되는 경우 세포는 핵의 응축, 핵의 분절 등 세포사멸 시 나타나는 특징적인 형태학적 변화를 보이게 된다. 그러나 아직까지 상온 상압 플라즈마의 기전에 대해서는 연구가 많이 부족한 상태이다. 암세포에서 플라즈마에 의해 유도되는 세포사멸현상과 이와 관련된 세포사멸기전 등에 대한 연구에 상압, 상온 플라즈마는 ‘torch with spray type’으로 사용하며 전력 최소 2 kV이고, 최고는 13 kV를 사용하도록 되어 있고, 발생되는 플라즈마의 온도는 대략 30°C로 측정되어, 열에 의한 효과는 배제할 수 있다 (그림 2).

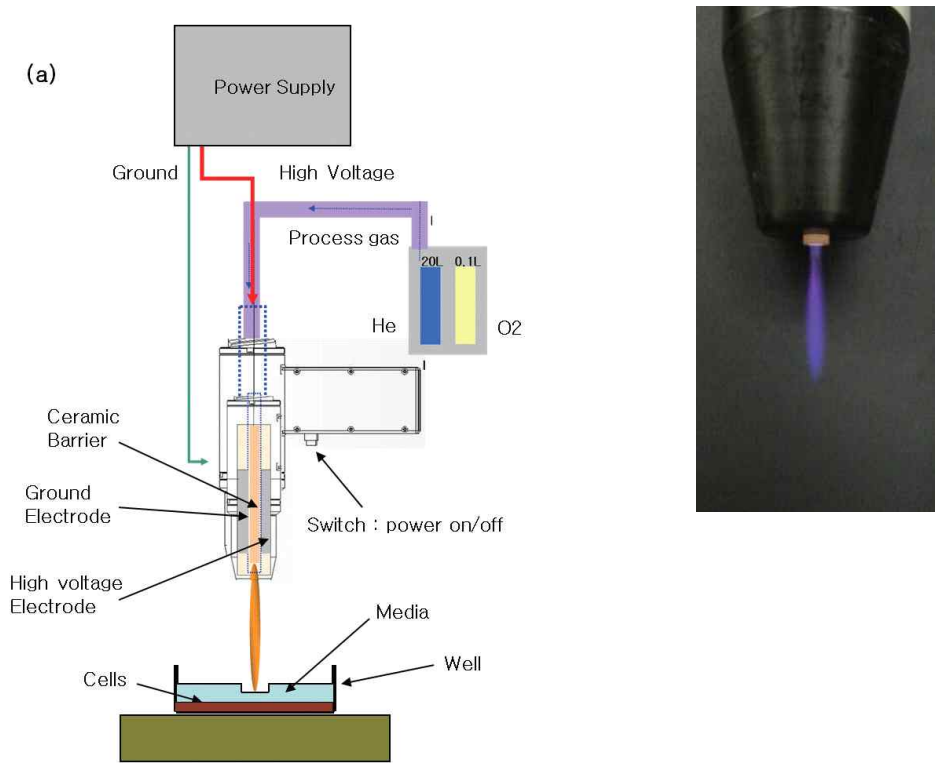


그림 2. Schematic view of the plasma torch(a) and plasma jet(b).

사용된 플라즈마에 대해 optical emission spectroscopy로 측정한 결과 헬륨가스 (He)를 사용 시에 다양한 emission peak(O I, O II, He I, He II, N I, C I, N V; I-neutral, II-singly ionized, V-quadruply ionized atoms)이 발생하고 여기에 산소(O2)를 더하면 활성화된 산소유리기가 더 많이 발생하는 것을 알 수 있다(그림 3) He와 O2를 함께 사용하였을 때 singly ionized O II ($O_2 \rightarrow O_2^{++} + e^-$ or $O \rightarrow O^{++} + e^-$)가 488.5 nm, 507.8 nm, 539.4 nm wavelengths에서 He 단독으로 사

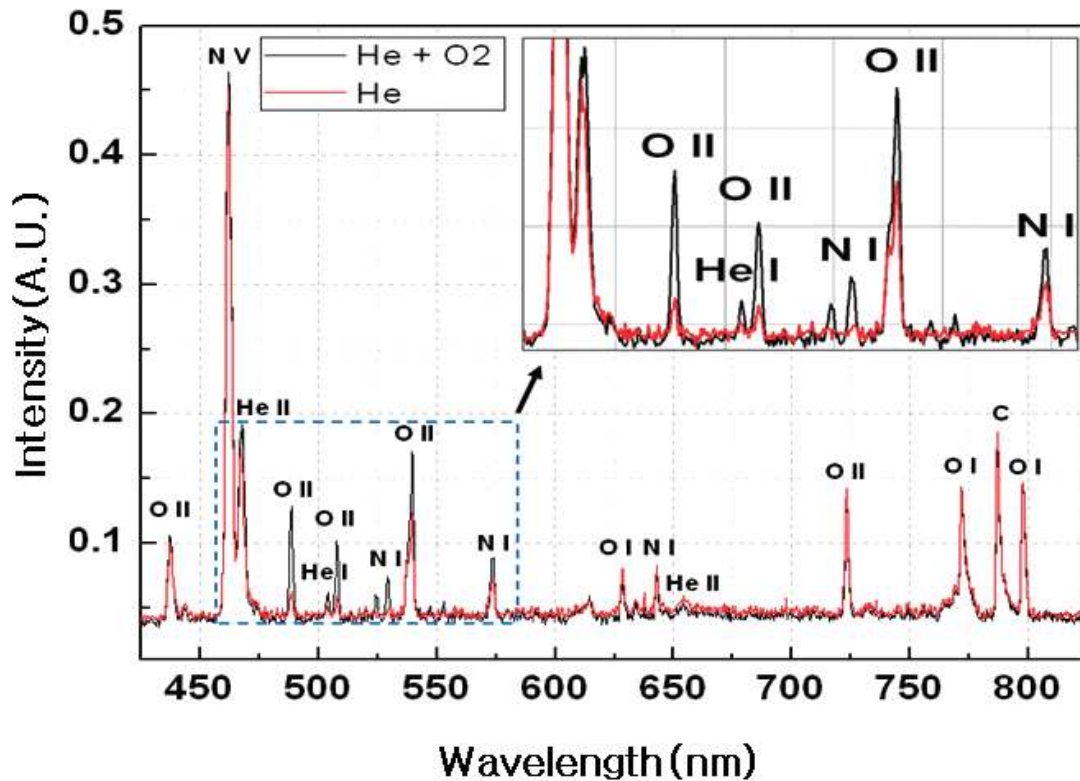


그림 3. Plasma emission spectra with different gases.⁹⁾ Comparison of He vs. He+O₂ gases. All emission peaks have O I, O II, He I, He II, N I, C I, N V, meaning the spectral lines of neutral (I), singly ionized (II), and quadruply ionized (V) atoms, over the measured wavelength range, in which the peaks include signatures from air molecules, i.e., nitrogen, oxygen and even carbon. In particular, different intensities appear in the range of 475 nm to 575 nm

용하였을 때에 비해 산소유리기가 증가되는 것을 볼 수 있다. 그림 4는 암세포의 증식과 이동을 측정할 수 있는 wound healing assay로 He를 단독으로 사용한 것보다는 He과 O₂를 동시에 사용한 군에서 통계적으로 유의하게 세포의 증식과 이동을 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 사용하는 가스에 따라 암세포의 증식, 이동, 침습에 영향을 줄 수 있다는 중요한 결과이고, 향후 플라즈마를 이용한 치료 시에 충분히 고려해야 하는 조건이라고 할 수 있다. 이러한 세포의 이동과 침습에는 세포 간의 유리(detachment)가 초기단계에서 매우 중요한 과정이다. 세포 간의 부착에는 다양한 접착물질(adhesion molecules)이 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 세포의 이동이나 침습에서 가장 중요한 현상은 액틴의 형성이 특정부위에서 일어나 방향성을 지닌 pseudopodia가 돌출하는 것으로 pseudopodia의 형성은 실험

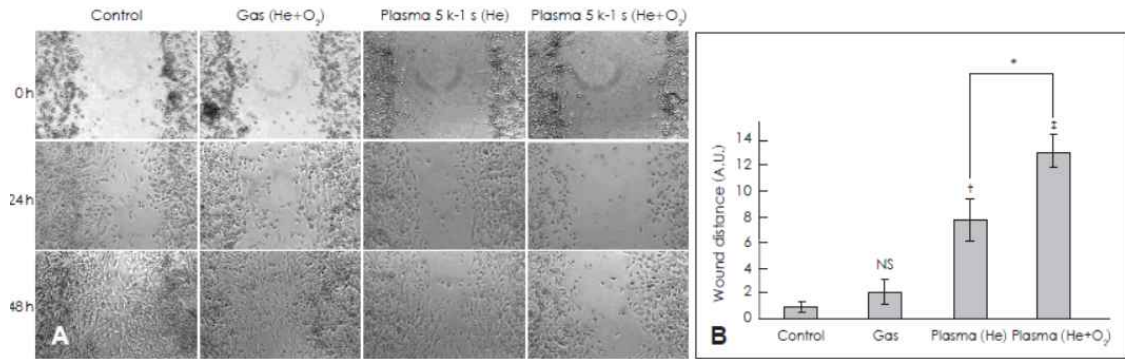


그림 4. Cell migration of colorectal cancer cells.⁹⁾ Photographs of the SW480 cells at 24 and 48 h after treatment. 100×magnification (A). Quantification of cell migration assay from three independent experiments. * $p < 0.05$, † $p < 0.01$, and ‡ $p < 0.001$ by student t-test compared to control (B). NS: no significant, AU: arbitrary unit.

적으로 세포의 이동과 관련이 있음이 확인되었고 체내에서 종양세포의 이동과 관련이 있다고 알려져 있다. 플라즈마를 처리한 경우 이러한 세포의 이동에 중요한 pseudopodia와 lamellipodia가 소실되는 것을 확인할 수 있고 이러한 현상에 의한 세포의 detachment 현상이 발생한다. 또한 이러한 형태학적인 변화에 영향을 주는 다양한 부착관련 물질(adhesion molecules; integrins, cadherins, and focal adhesion kinase 등)이 변화하는 것을 확인할 수 있다. 또한 세포가 종양이 침습과 전이를 일으키려면 기저막을 파괴한 후 주변 기질을 녹이는 작용을 하게 되는 현상은 일반적으로 종양세포와 주변의 간질세포에서 분비되는 heparinase, serine proteinase, cathepsin, matrix metalloproteinase (MMP) 등에 의해 일어나며 이 중 MMP와 serine protease가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데 플라즈마가 이러한 변화를 초래하는 것으로 확인되었다. 플라즈마의 세포사멸(apoptosis)에 의한 현상인지를 확인하고, 세포사멸과 관련된 기전에 대한 초기연구 결과로 그림 5는 대장암 세 가지 세포주에서 2시간과 24시간에 시행한 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole(MTT) assay 결과이다. 플라즈마가 가스를 사용하여 만들어지기 때문에, He+O₂만 사용한 경우를 gas only로 해서 비교하였다. 대장암뿐만 아니라 두경부암을 포함한 다양한 암세포주에서 1초, 2초, 4초의 아주 짧은 노출시간에도 세포사멸이 효과적으로 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 세포사멸 여부를 확인하기 위하여 시행한 4'-6-diamidino-2-phenylindole(DAPI) staining과 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)mediated dUTP-biotin nick end labeling(TUNEL) staining에서 가스만 사용하였을 때는 세포사멸이 거의 없다가 플

라즈마 8 kV, 1초간 노출되었을 때 대부분의 세포에서 세포사멸이 나타나는 것을 확인할 수 있다. 그림 5(c)는 세포사멸을 나타내는 subG0가 플라즈마 조사 시에 증가하는 결과를 보여주고 있다. 대조군(subG0: 1.9%)과 가스처리군(subG0: 2.1%)에 비해 플라즈마 1초를 조사한 경우 subG0가 22.5%로 증가하여 통계적 유의성이 있었고($p=0.0019$), 2초를 조사한 경우 43.1%로 엄청나게 증가하는 것을 확인할 수 있었다($p=0.0008$).²²⁾ 또한 S기와 G2/M기도 처리시간에 비례하게 감소하는 것을 알 수 있어, 플라즈마 조사가 세포사멸과 세포주기를 억제하는 것을 보여준다.

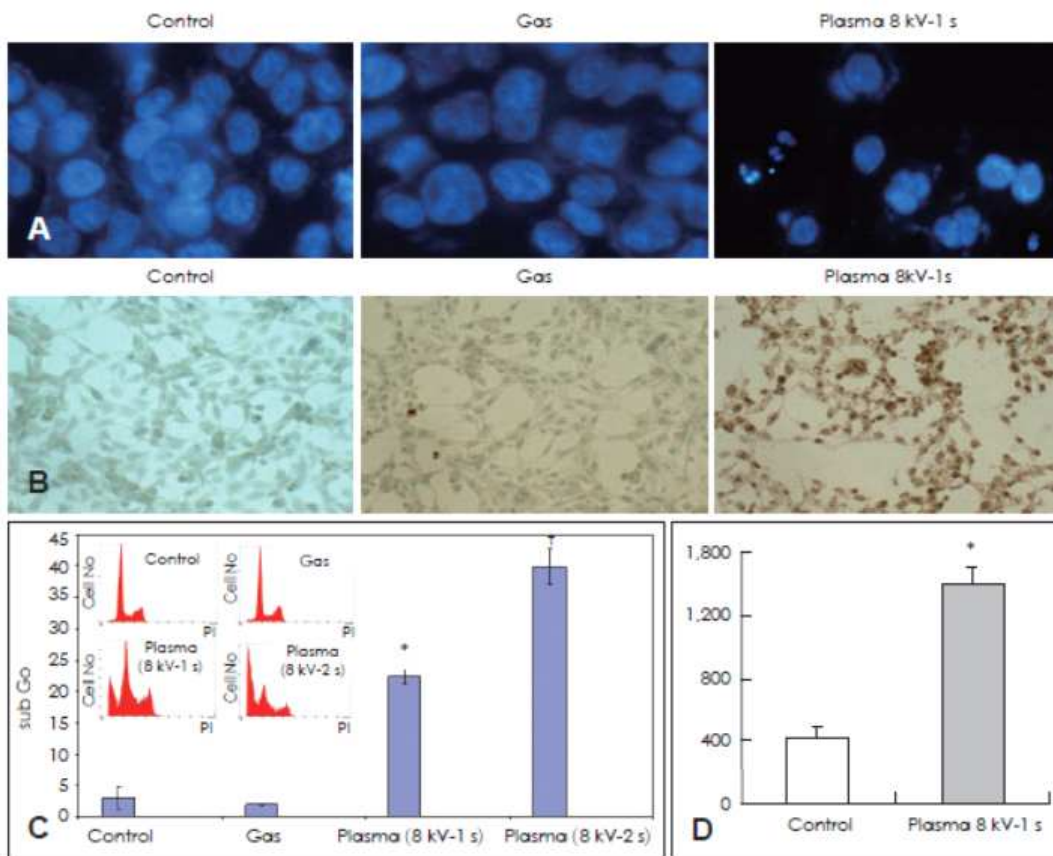


그림 5. Effect of non-thermal atmospheric plasma on apoptosis and caspase-3 activity in HCT-116 cells.

참고문헌: 1. Vacuum Magazine (2015) December, (2014) September
 2. Plasma Physics and Controlled Fusion 59 (2017) 014031
 3. Korean J. Otorhiolaryngol-Head Neck Surg. 53 (2010) 593
 4. Korea Chemical Engineering Research 49 (2011) 835