

골육종세포에 미치는 레이저 조사의 광독성 효과

손장호*¹, 조영철³, 류성호¹, 김규천², 성일용¹, 박봉수²

울산대학교 의과대학 울산대학교병원 치과/구강악안면외과¹

부산대학교 치과대학 치의학과 해부학교실²

울산동강병원 치과/구강악안면외과³

Phototoxic Effects of Low Level Laser Irradiation on Human Osteosarcoma Cells

Jang-Ho Son*¹, Young-chul Cho³, Sung-HO Ryu¹, Gyoo-Cheon Kim², Iel-Yong Sung¹, Bong-Soo Park²

Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, Medical College of Ulsan University¹

Dept. of Oral Anatomy, College of Dentistry, Pusan National University²

Dept. of Oral & Maxillofacial Surgery, Ulsan Dong Kang Hospital³

손장호

682-714 울산광역시 동구 전하동 290-3 울산대학교병원
울산대학교 의과대학 울산대학교병원 치과/ 구강악안면외과학교실

Jang-Ho Son

Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Ulsan University Hospital
College of Medicine, Ulsan University
290-3 Jeonha-Dong, Dong-Gu, Ulsan 682-714, KOREA
Tel:052-250-7230, Fax:052-250-7236

Abstract

Photodynamic therapy(PDT) has advanced to clinical trials for the treatment of a variety of solid tumors and presents an alternative treatment option for tumors resistant to chemo-and/or radio-therapy. PDT is based on the combination of laser light of appropriate wavelength and energy to activate a systemically or locally applied photosensitizer that concentrates preferentially in malignant tissues. In this study, phototoxicity of laser EIT 21 was analysed in human osteosarcoma cell(HOS) and the second objective of this study was to determine the ability of laser EIT 21 to induce apoptosis

This study demonstrated that laser EIT 21 had a phototoxicity to HOS cells. In order to examine whether cell death was induced by necrosis or apoptosis, variety of techniques which assess apoptosis were used. TUNEL assay showed only a few the positive reaction on condensed nuclei. It is hard to find condensed or fragmented nuclei on HOS cells irradiated with laser EIT 21 in Hemastat and AO/EB stain. By DNA electrophoresis, cells also did not show DNA degradation

characteristic of apoptosis with a ladder pattern of DNA fragments. Apoptosis-related factors were analyzed by western blotting. The expression of p53 was constant and cells irradiated with laser did not show the caspase-3 and PARP degradation, therefore we suggest that p53 and caspase-3 are not involved in laser-induced cell death.

key words: PDT, laser light, apoptosis

I. 서론

종양세포의 성장과 생존에 관여하는 유전적 결함이 여러 항암제에 대한 내성에도 관여한다는 것이 점차 확실해 지고 있다^{1,2)} 따라서 세포고사(apoptosis)와 관련된 분자 차원의 과정에 대한 이해와 종양세포를 선택적으로 세포고사 시킬 수 있는 치료 요법의 개발에 연구가 집중되어져 왔다.

광역동치료(PDT)는 갖가지 고형 종양의 치료를 위한 임상적 시도로 시작되어³⁾ 화학요법 및 방사선 요법에 내성이 있는 종양의 대체 치료법의 하나로 제시되고 있다^{4,5)}. PDT는 적절한 파장의 레이저광과 국소적 또는 전신적으로 투여되어 악성 종양세포에 우선적으로 침착되는 광증감제의 조합에 기초를 두고 있다. 즉 레이저 조사에 의한 광화학 반응이 반응성 산소기를 만들고 악성 종양세포를 선택적으로 감소시킨다^{6,7)}. 이런 반응이 세포고사에 의한 것인지⁸⁾ 세포괴사(necrosis)에 의한 것인지는⁹⁾ 광증감제의 종류와 사용된 광량 및 세포종류에 따라 다르게 나타난다¹⁰⁾.

세포괴사가 이온 펌프의 파손에 의해 나타나는 세포 팽창에 기초한 수동적, 외상적 형태의 세포사멸에 반해서, 세포고사는 고도로 통제되며, 조직 발달, 퇴화 및 항상성 조절을 위한 필수적인 생리적 과정이다. 종종 “programed cell death”라고 일컬어지는 세포고사는 정상 및 병적 과정 모두에서 조직 교체, 크기 및 형태 유지를 위해 필수적인 세포사로, 형태학상 뚜렷이 구분되는 세포사 과정이다. 세포고사는 핵 응축과 원형질막의 수포화(blebbing)를 수반하는 세포 수축과 같은 독특한 형태학적 특징을 지닌다. 세포고사 과정 동안에 엔도뉴클라아제(endonuclease)의 활성화는 염색질(chromatin)을 올리고뉴클레오솜(oligonucleosomal)의 단편 또는 180-200 bp^{11,12)} 의 집합체로 분할하게 된다. 이 핵의 절편들은 고사체(apoptotic body)라고 불리는 난형 또는 원형의 세포질 절편에서 발견되는데, 이것은 배지에 남아서 결국 secondary necrosis라 불리는 세포기관의 파괴, 막의 파열과 같은 퇴행적인 변화를 겪는다⁹⁾.

세포괴사의 독특한 형태적 특징은 세포 팽창과 파열, 염색질의 유실, 그리고 작고 어둡게 염색되는 핵이다. 세포괴사는 병적형태의 세포손상에서 나타나는데, 이는 특징적으로 조직 수준에서 염증성 반응을 야기한다⁸⁾.

특정한 종양억제유전자와 발암유전자의 발현이 세포의 생존이나 세포고사를 결정하는데 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 유전자 가운데 종양억제유전자 p53은 세포고사를 일으키는 자극에 의해 유발되는데, 이는 세포고사 기전의 조절에 있어 중추적인 역할을 한다. DNA 손상이나 여타의 자극 하에서, p53의 수준은 세포내에서 급격히 증가하는데 이렇게 증가된 p53 수치가 지놈(genom)의 안내자로서 역할을 하는데 필수적이다^{13,14)}. DNA 손상에 의해 핵 내에서 p53이 축적되고, 이것이 특정한 DNA 서열에 결합하여 p21, bax, mda-2, gadd45, cyclin G 같은 세포 주기와 세포고사에 영향을 주는 인자들을 포함한 몇 가지 표적 유전자들의 상호작용을 촉진한다¹⁵⁾.

현재 세포고사를 조절하는 몇몇 유전자가 밝혀졌다. caspase의 활성화에 의해 세포고사가 일어날 수 있다는 것이 다방면에서 확인된다¹⁶⁾. caspase들 중 caspase-3 은 가장 집중적으로 연구되었는데, 이는 세포가 세포고사를 일으키는 신호를 받았을 때 단백질분해에 의해 활성화된다¹⁷⁾. polyadenosine biphosphate ribose polymerase(PARP)를 포함한 caspase-3의 몇 가지 기질이 밝혀졌으나 기질의 분열이 세포고사에서 어떠한 인과관계를 갖는지 아닌지는 아직 밝혀지지 않았다.

대부분의 문헌에서는 여러 가지 세포계에서 광증감제에 대한 PDT의 효능에 대해 보고하

고 있다. 이 연구에서는, 인체 골육종 세포(HOS)에 미치는 레이저 EIT 21의 광독성 효과에 대해 알아보았으며, 그런 광독성 효과가 세포고사를 유발하는가를 규명하였다. .

II. 연구재료 및 방법

레이저 광원

광원으로 laser EIT 21 (ANAMEDICO Ltd, KOREA)을 사용하였다. 레이저 빔은 두 종류의 파장으로 구성되는데, 하나는 830nm(GaAlAs)이고 다른 하나는 660nm(HeNe)의 파장이다. EIT 21은 하나의 arm에 central probe($\lambda=830\text{nm}$)와 5개의 peripheral probe($\lambda=660\text{nm}$)로 이루어져있다. GaAlAs 레이저는 830nm의 파장, continuous type, 200mW의 최대출력으로, HeNe 레이저는 660nm의 파장, continuous type, 50mW의 최대출력으로 맞추어졌다. 레이저 probe를 10mm의 거리에서 수직으로 놓고 각 에너지 밀도에서 60초 동안 조사하였다. 10mm의 거리에서 조사한 레이저 에너지 감소율은 10% 이다.

세포배양

HOS 세포를 25mM HEPES, 100 $\mu\text{g/ml}$ penicillin/streptomycin, 4mM L-glutamine를 첨가한 DMEM에 10% fetal bovine serum을 첨가하고 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 환경의 incubator에서 배양했다.

약제(Agents)

Dimethyl sulfoxide(DMSO), RNase A, proteinase K, leupeptin, aprotinin, propidium iodide, phenyl-methylsulfonyl fluoride(PMSF), 3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium-bromide(MTT), Acridine orange solution은 Sigma(St Louis, MO)로부터 구입했다. Ethidium bromide stock solution은 Amresco로부터 구입했다. 세포사 탐지 키트 fluorescein은 인디애나폴리스 Roche 진단 법인(In USA)것을 사용하였다.

혈액 도말을 염색하는 Hemacolor은 Merck로부터 구입했다.

세포 생존력 분석(Cell viability assay)

배양된 세포의 생존 능력은 MTT assay로 평가하였다. MTT assay에서 세포를 96-well plate에서 24시간 동안 배양하였다. 그런 후 세포를 21J/cm², 42J/cm², 84J/cm², 126J/cm², 168 J/cm², 210J/cm²로 레이저 조사한 후 세포를 성장 배지에서 MTT 1mg/ml로 처리하고 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 에서 4시간 동안 배양하였다. 세포의 생존 능력은 multiwell reader(Quant, Bio-Tek, Highland Park, USA)를 이용하여 파란 색의 강도(OD at 570nm)를 측정하여 대조군(100%로 처리된 배양군)과 비교한 것으로 평가하였다.

Hemacolor 염색

세포 현탁액(cell suspension)을 cytopsin chamber에 채우고 2분 동안 500rpm으로 원심 분리하여 세포를 Hemacolor 고정액에 고정하였다. Hemacolor red 시약에 10초 동안 슬라이드를 담근 후 hemacolor blue 시약에 10초 동안 담금으로써 대조염색 하였다. 세포고사를 정량화하기 위해 표본을 40배 배율로 검사하였는데, 주위 세포 수가 100개 이상인 최소 3 곳을 분석하여 세포고사의 백분율과 세포괴사의 백분율을 구하였다..

Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) 염색

세포 현탁액 25 μ l를 1 μ l의 AO/EB 용액과 함께 배양했다. 세포 현탁액을 현미경 슬라이드 위에 놓고 형광필터(fluorescein filter)를 사용하는 형광 현미경에서 400개의 세포를 검사하였다.

Hoechst 33258을 이용한 핵 염색

세포를 차가운 PBS로 씻은 후 DNA에 결합하는 형광 염료인 hoechst 33258 4 μ g/ml와 함께 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 배양하였다. 그런 후에 10분 동안 4%의 paraformaldehyde에서 고정하였다. 형광 현미경(ECLIPSE E800, Nikon, Tokyo, Japan)을 이용하여 세포고사의 형태학적 특징을 관찰하였는데 부서지거나 응축된 핵을 가진 세포가 세포고사를 일으키는 세포로 분류하였다.

TUNEL assay

DNA 붕괴를 발견하기 위해, TUNEL 반응 혼합 키트(Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 TUNEL assay 하였다. 레이저 조사 후에 세포를 PBS로 두 번 씻고 30분 동안 4% paraformaldehyde로 고정하였다. 4 $^{\circ}$ C에서 2분간 투과성(permeabilisation)용액을 가한 후 다시 PBS로 씻어내고 형광 현미경 하에서 세포고사를 일으키는 세포를 관찰하였다.

III. 결과

세포의 생존력에 대한 레이저 광의 광독성 효과

레이저 조사량 및 조사 빈도가 증가함에 따라 HOS 세포의 생존률이 감소하였다.(Fig. 1 and 2). 21 J/cm 2 , 42 J/cm 2 , 84 J/cm 2 , 126 J/cm 2 , 168 J/cm 2 그리고 210J/cm 2 로 레이저 조사한 실험군에서 HOS 세포는 각각 78%, 63%, 56%, 47%, 39% 그리고 32%의 생존 비율을 보여주었다. 21 J/cm 2 로 조사 빈도를 각각 1회, 2회, 3회, 4회, 시행하였을 때 HOS 세포는 74%, 55%, 48% 그리고 45%의 생존율을 보였다.

형태학적 변화

HOS 세포를 레이저 조사에 따른 형태변화를 알아보기 위해 위상차 현미경으로 관찰하였다. 레이저를 조사한 몇몇 세포에서 세포 수축과 세포막의 수포현상(blebbing)이 관찰되었다.(Fig. 3)

레이저 조사가 HOS 세포에서 세포고사를 일으키는지를 알아보기 위해 여러 가지 형태학적인 방법을 시행하였다. 광학 현미경으로 세포고사를 확인 하는 방법은 일차적으로 핵 변화의 발견과 고사체의 형성을 관찰하는 것이다.

레이저 조사 후 Hemacolor staining은 세포괴사를 겪는 다수의 세포(N) 가운데 남아있는 생존 세포(L) 소수와 세포고사를 일으키는 극소수의 세포(A)를 보여주었다.(Fig. 4)

AO/EB stain은 세포괴사를 겪는 대다수의 세포 중에서 소수의 세포들만이 세포고사적 형태를 나타낸다는 것을 보여주었다.(Fig. 5)

TUNEL stain은 레이저에 조사된 세포에서 극소수의 세포만이 응축된 핵에 양성 반응으로 염색되는 것을 보여주었다.(Fig. 6)

DNA 분절 (DNA fragmentation)

세포고사의 중요한 생화학적 특징은 절편 또는 약 200bp의 복합체로 쪼개어지는 염색체 DNA의 분절이다. HOS 세포에 21J/cm² 레이저 조사 후 전기 영동 실험에서 DNA 분절의 전형적인 특징인 사다리형 절편 형태(ladder fragmentation pattern)가 나타나지 않았다.(Fig. 7)

Western blotting

다양한 분자적 변화와 세포 주기 혹은 세포고사 경로 사이의 관계를 정립하기 위해 종양 억제 유전자 p53과 caspase3, PARP를 western blot을 시행하였다. HOS 세포에서, p53 단백질의 발현은 21J/cm² 레이저로 한번, 두 번, 세 번, 네 번 조사한 세포내에서 변화되지 않았다.(Fig. 8)

다음으로, caspase와 PARP의 활성화를 분석하였다. Western blot 분석은 레이저 조사가 caspase3과 PARP의 분열을 유발하지 못한다는 것을 보여주었다.(Fig. 9).

IV. 토의 및 고찰

세포 외적 또는 내인적 계기에 의한 갖가지의 자극으로 세포가 죽는 몇 가지 유형이 보고되었다. 세포죽음은 세포고사와 세포괴사 외에도, 세포고사적인 것과 세포괴사적인 특징을 공유하는 혼합형이 기술되고 있다^{18,19}. PDT에 의해서도 복잡한 형태의 세포 죽음이 나타나는데 이런 복잡성은 광증감제의 특성, 레이저 조사 량 그리고 세포 유형에 의해 영향을 받는다^{20,21,22,23,24}.

세포고사에 의한 세포 죽음은 불필요한 세포를 제거하는 매우 깔끔한 방법으로 흔적이 남지 않고 결코 세포 내용물을 세포 밖으로 쏟아내어 놓거나 면역계에 영향을 주지 않는다. 따라서 세포고사는 염증이 야기되지 않는다. 이것은 세포괴사에 의한 죽음과 대조적이다. 세포괴사의 상황에서는, 세포는 부풀어 오르며, 막의 긴밀성(integrity)이 손상 받으면 세포는 풍선처럼 붕괴되어 내용물이 세포 밖으로 흘러나온다. 이는 염증성 반응을 초래한다. 세포고사 과정의 깔끔한 특성 때문에, 세포고사 경로를 효과적으로 활성화하는 방법을 밝혀내는 연구가 진행된다. 새로운 치료 방법인 광역동치료(PDT)는 빛을 흡수하는 화합물과 광조사자 결합한 것을 기본으로 한다. 광증감제의 PDT 효과에 대한 최신 지견은, 광증감제의 성공 요인으로 암세포에서 세포고사를 유발 하는 가 이다²⁵.

PDT의 원리는 다음과 같다. 가시 광에 노출되었을 때, 종양 조직에 침착된 광증감제가 빛 에너지를 흡수하여 여기 상태(excited state)로 전환된다. 여기 상태에서 기저 상태로 되돌아오는 동안 방출되는 에너지가 세포내호흡(intracellular respiration)을 손상시켜, 종양 세포의 변성과 세포괴사를 야기 시킨다^{26,27}. 여러 연구자들은 PDT와 관련된 종양 세포 죽음의 기전이 확실하진 않지만 혈액의 정상적인 흐름을 방해함으로써 혈관 내피 세포가 손상되거나 또는 혈전 형성으로 세포 괴사가 야기 된다고 보고있다^{26,28}.

쥐의 림프종 세포를 사용한 실험에서 Agarwal²⁹은 세포고사가 PDT 후 30분에서 2시간 사이에 유발된다고 하였다. Matsumoto³⁰는 배양한 사람의 편평상피세포 암세포에서 PDT 2시간 후 세포고사 생성물이 나타났다고 보고했으며, Tajiri은 배양된 췌장 암 세포에서도 PDT에 의해 세포고사가 야기된다고 보고하였는데 이런 초기 세포고사의 유발은 PDT의 전형적인 특징이라고 생각했다.

본 연구는 레이저 EIT 21이 HOS 세포에 대해 광독성을 가진다는 것을 증명했다. 세포 죽음이 세포괴사에 의해 유발되는지 아니면 세포고사에 의해 유발되는지를 알아보기 위해 세포 고사를 평가 하는 여러 실험 기법을 이용하였다. 세포고사는 핵 DNA 분절 여부에 따라 주로 평가되는데, 이것은 일반적으로 세포고사 과정의 핵심적 표지로 여겨진다. 본 연구에서, TUNEL 분석은 극소수만이 응축된 핵의 양성반응을 보여주었다. Hemacolor와 AO/EB 염색 또한 대부분의 세포가 괴사로 죽는 것을 보여주었다. 레이저 EIT로 조사된 HOS 세포에서 응축되거나 분절된 핵을 발견하는 것은 어려웠다. DNA 전기영동에서, 세포고사에서 보여지는 DNA 분절의 전형적인 특징인 사다리형 절편 형태(ladder fragmentation pattern)가 나타나지 않았다.

p53은 세포고사적인 세포 죽음에서 중심적인 역할을 하며, p53 종양 억제 유전자 생성물의 발현은 세포고사에서 증가한다. p53은 DNA 손상이나 세포의 스트레스에 대한 반응으로 세포 조절을 결정한다^{31,32}. DNA 손상과 광범위한 유형의 다른 자극 하에서, p53의 수준은 세포내에서 급격히 증가하고 이렇게 증가된 p53 수치가 지놈(genom)의 안내자로서 p53이 역할을 하는데 필수적이다. 본 연구에서 p53의 발현은 일정했는데, 이로 보아 레이저 유도 세포 죽음(laser-induced cell death)은 p53과는 관련이 없는 것 같다.

세포고사는 여러 가지 신호에 의해 유발된다. 세포고사에서 일관되게 나타나는 한 기전은 caspase라는 cytosolic protease의 연속적인 활성화이다. caspase는 세포고사가 진행되는 세포내에서 자가 단백질분해(self-proteolytic) 과정을 겪는 불활성 효소전구체로 합성되는데, 이것이 PARP나 DNA fragmentation factor같은 DNA 수복과 지놈(genom)의 유지에 관여하는 효소기질의 분열과 활성화를 가능하게 한다³³. 이 연구에서, 레이저로 조사된 세포는 caspase-3 과 PARP의 분열을 보이지 않았다.

V. 요약

광역동치료(PDT)는 갖가지 고형 종양의 치료를 위한 임상적 시도로 시작되어 화학요법 및 방사선 요법에 내성이 있는 종양의 대체 치료법의 하나로 제시되고 있다. PDT는 전신적 또는 국소적으로 투여하여 유해한 조직에 선택적으로 농축되도록 한 광증감제와 이를 활성화 하는 적절한 파장과 에너지를 가진 레이저광의 조합에 기초한다. 이 연구에서는, 인체 골육종 세포(HOS)에 미치는 레이저 EIT 21의 광독성 효과에 대해 알아보았으며, 그런 광독성 효과가 세포고사를 유발하는가를 규명하고자 하였다. .

본 연구는 레이저 EIT 21이 HOS 세포에 대해 광독성을 효과를 가진다는 것을 증명했다. 세포 죽음이 세포괴사에 의해 유발되는지 아니면 세포고사에 의해 유발되는지를 알아보기 위해 세포 고사를 평가 하는 여러 실험 기법을 이용하였다. TUNEL 분석은 극소수만이 응축된 핵의 양성반응을 보여주었다. Hemacolor와 AO/EB 염색 또한 대부분의 세포가 괴사로 죽는 것을 보여주었다. 레이저 EIT로 조사된 HOS 세포에서 응축되거나 분절된 핵을 발견하는 것은 어려웠다. DNA 전기영동에서, 세포고사에서 보여지는 DNA 분절의 전형적인 특징인 사다리형 절편 형태(ladder fragmentation pattern)가 나타나지 않았다. Western blotting에 의한 분석에서 p53의 발현은 일정하게 나타났고 레이저로 조사된 세포는 caspase-3과 PARP의 분열을 나타내지 않는 것으로 보아 레이저 유도 세포 죽음(laser-induced cell death)은 p53과는 관련이 없는 것 같다.

VI. 참고문헌

1. Granville DJ, Carthy CM, Hunt DW and McManus BM : Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest* 78(8):893-913, 1998.
2. Decaudin D, Marzo I, Brenner C and Kroemer G : Mitochondria in chemotherapy-induced apoptosis: a prospective novel target of cancer therapy. *Int J Oncol* 12(1):141-152, 1998.
3. Fisher AM, Murphree AL and Gomer CJ. Clinical and preclinical photodynamic therapy. *Lasers Surg Med* 17(1):2-31, 1995.
4. Canti G, Lattuada D, Morelli S, Nicolini A, Cubeddu R, Taroni P and Valentini G : Efficacy of photodynamic therapy against doxorubicin-resistant murine tumors. *Cancer Lett* 93(2):255-259, 1995.
5. Schwarz VA, Hornung R, Fedier A, Fehr MK, Walt H, Haller U and Fink D : Photodynamic therapy of DNA mismatch repair-deficient and -proficient tumour cells. *Br J Cancer* 86(7):1130-1135, 2002.
6. Dougherty TJ, Grindey GB, Fiel R, Weishaupt KR and Boyle DG : Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J Natl Cancer Inst* 55(1):115-121, 1975.
7. Henderson BW and Dougherty TJ : How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol* 55(1):145-157, 1992.
8. Moan J and Berg K : Photochemotherapy of cancer: experimental research. *Photochem Photobiol* 55(6):931-948, 1992.
9. Luo Y, Chang CK and Kessel D : Rapid initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 63(4):528-534, 1996.

10. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, Moan J and Peng Q : Photodynamic therapy J Natl Cancer Inst 90(12):889-905, 1998.
11. Williams GT : Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. Cell 65:1097-1098, 1991.
12. Wyllie AH, Kerr JFR and Currie AR : Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol 68:251-305, 1980.
13. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B and Craig RW : Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. Cancer Res 51:6304-6311, 1991.
14. Fritsche M, Haessler C and Brandner G : Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. Oncogene 8:307-318, 1993.
15. Verhaegh GW, Richard MJ and Hainaut P : Regulation of p53 by metal ions and by antioxidants: dithiocarbamate down-regulates p53 DNA-binding activity by increasing the intracellular level of copper. Mol Cell Biol 17:5699-5706, 1997.
16. Thornberry NA, Rosen A and Nicholson DW : Control of apoptosis by proteases, in Apoptosis (Kaufmann SH eds). Adv Pharmacol 44:155-177, 1997.
17. Yuan J : Evolutionary conservation of a genetic pathway of programmed cell death. J Cell Biochem 60:4-11, 1996.
18. Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S and Orlandini SZ : Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. Cell Physiol 182(1):41-49, 2000.

19. Denecker G, Vercammen D, Declercq W and Vandenameele P : Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell Mol Life Sci* 58(3):356-370, 2001.
20. Dellinger M : Apoptosis or necrosis following Photofrin photosensitization: influence of the incubation protocol. *Photochem Photobiol* 64(1):182-187, 1996.
21. Chan WH, Yu JS and Yang SD : Apoptotic signalling cascade in photosensitized human epidermal carcinoma A431 cells: involvement of singlet oxygen, c-Jun N-terminal kinase, caspase-3 and p21-activated kinase 2. *Biochem J* 351(Pt 1):221-232, 2000.
22. Eleouet S, Rousset N, Carre J, Bourre L, Vonarx V, Lajat Y, Beijersbergen van Henegouwen GM and Patrice T : In vitro fluorescence, toxicity and phototoxicity induced by delta-aminolevulinic acid (ALA) or ALA-esters. *Photochem Photobiol* 71(4):447-454, 2000.
23. Fabris C, Valduga G, Miotto G, Borsetto L, Jori G, Garbisa S and Reddi E : Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Cancer Res.* 61(20):7495-7500, 2001.
24. Wyld L, Reed MW and Brown NJ : Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type. *Br J Cancer* 84(10):1384-1386, 2001.
25. Ali SM and Olivo M : Mechanisms of action of phenanthroperylenequinones in photodynamic therapy. *Int J Oncol* 22(6):1187-1191, 2003.
26. Pass HI : Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *J Natl Cancer Inst* 17;85(6):443-456, 1993.
27. Ochsner M : Photophysical and photobiological processes in the

- photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B* 39(1):1-18, 1997.
28. Agarwal ML, Clay ME, Harvey EJ, Evans HH, Antunez AR and Oleinick NL : Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Res* 51(21):5993-5996, 1991.
 29. Matsumoto Y, Muro Y, Banno S, Ohashi M and Tamada Y : Differential apoptotic pattern induced by photodynamic therapy and cisplatin in human squamous cell carcinoma cell line. *Arch Dermatol Res* 289(1):52-54, 1996.
 30. Hartwell LH and Kastan MB : Cell cycle control and cancer. *Science* 266(5192):1821-1828, 1994.
 31. Harris CC : Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst* 88(20):1442-1455, 1996.
 32. Gross A, McDonnell JM and Korsmeyer SJ : Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13:1899-1911, 1999.
 33. Porter AG: Protein translocation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 9:394-401, 1999.

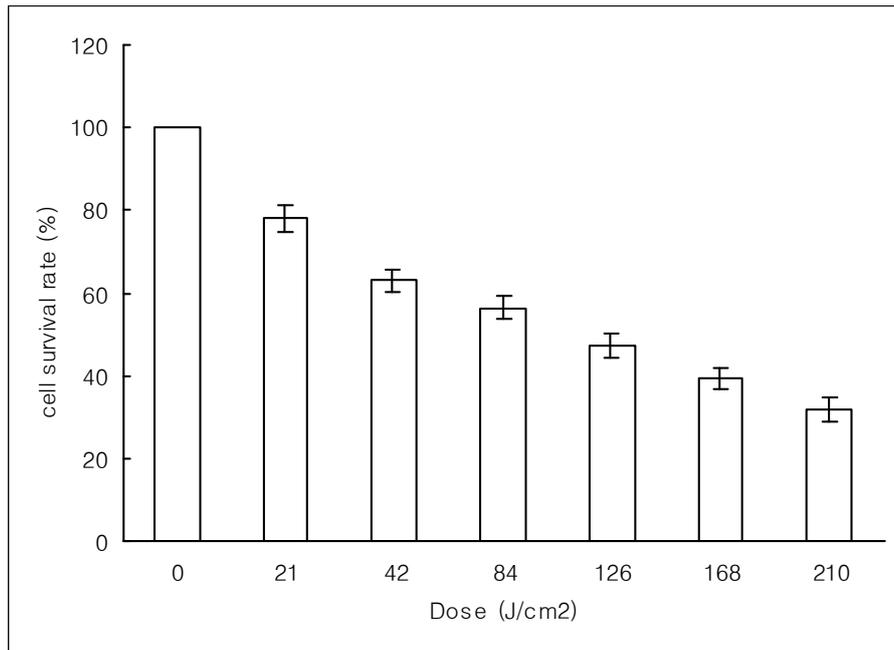


Fig 1. Phototoxicity of HOS cells measured by MTT assay. HOS cells were irradiated with various dose of laser light.

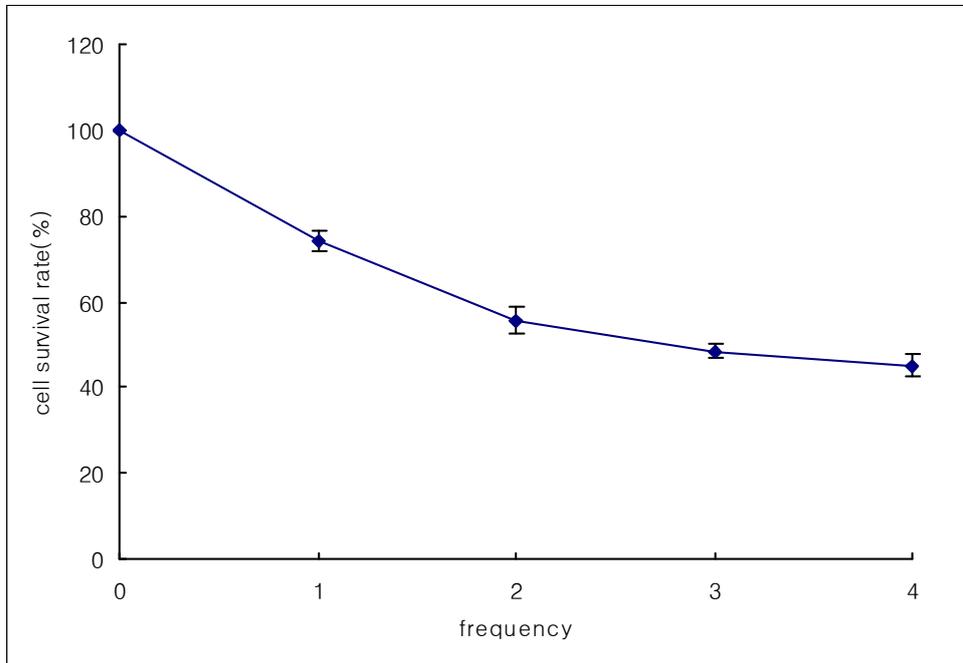


Fig 2. Phototoxic effect of 21 J/cm^2 laser light on HOS cells. HOS cells were irradiated at intervals of 2 hours.

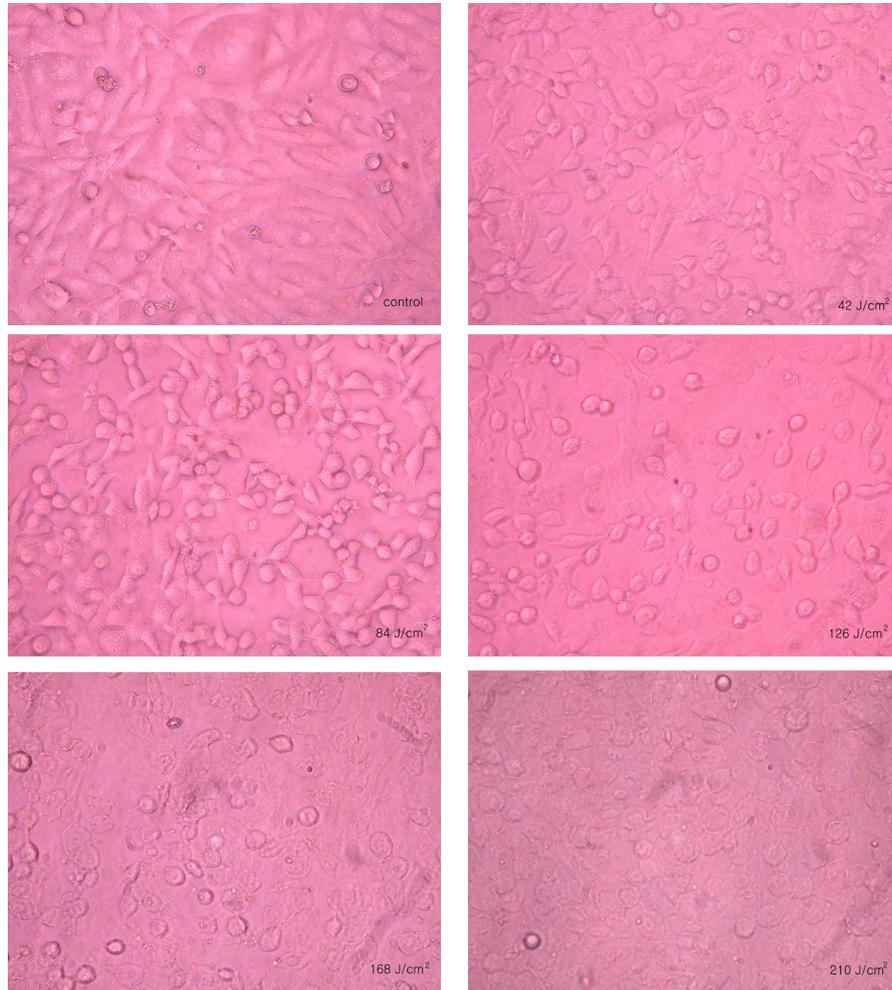


Fig. 3. Laser irradiation induces change of HOS cells morphology in dose-dependent manner.

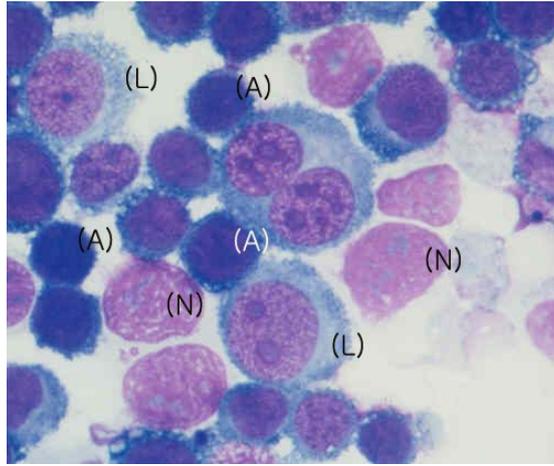


Fig. 4. Hemastat stainin of HOS cells irradiated with 84 J/cm^2 laser light. Picture shows remaining live cells (L), necrotic cells (N) and apoptotic cells (A).

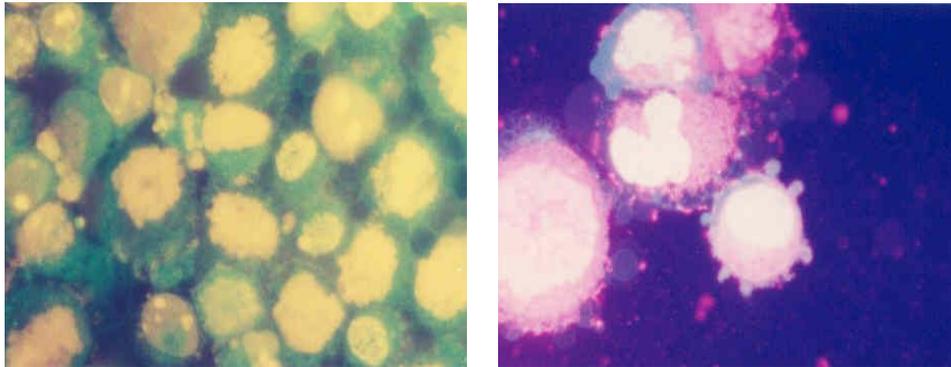


Fig. 5. AO/EB staining of HOS cells irradiated with 84 J/cm^2 laser light. Live cells still stain green (left panel) and a few cells apoptotic morphology which appear orange due to co-stain with ethidium bromide (right panel).

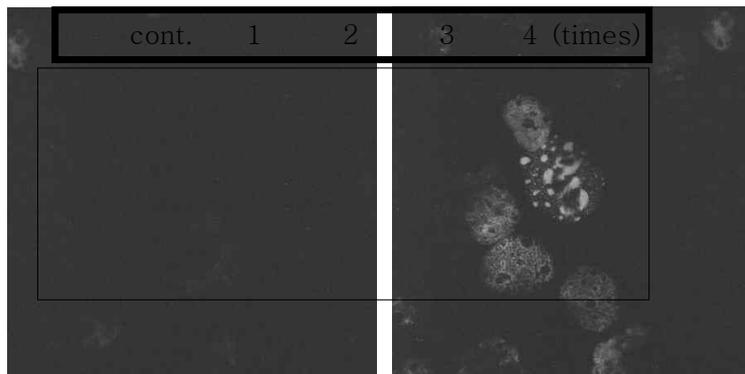


Fig. 6. TUNEL staining of HOS cells irradiated with 84 J/cm² laser light. Most cells show negative reaction (left) and a few cells show positive reaction (right panel).

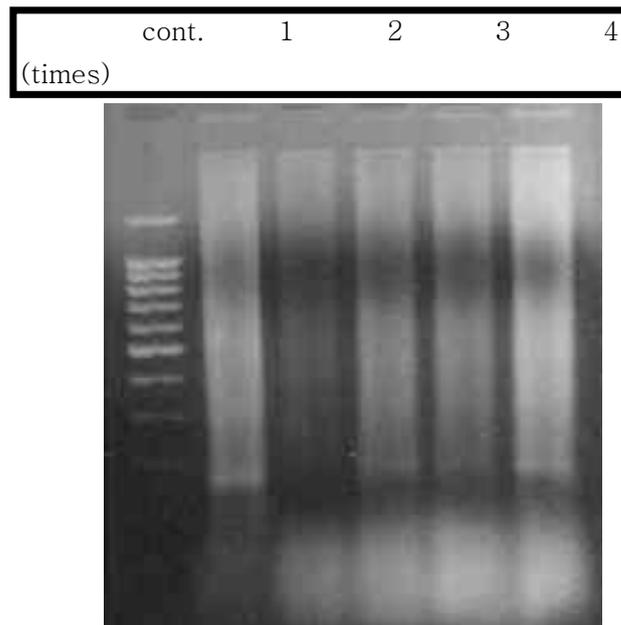


Fig. 7. DNA electrophoresis of HOS cells irradiated with 84 J/cm² laser light. Cells showed no DNA fragmentation.



Fig. 8. Western blotting analysis of p53 at intervals of 2 hours with 21 J/cm^2 laser light.

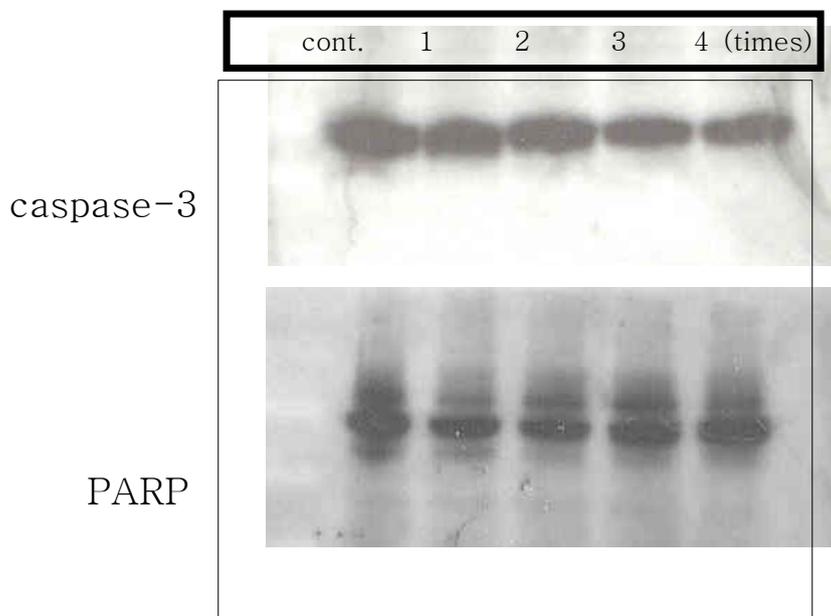


Fig. 9. Western blotting analysis of caspase-3 and PARP. Cells treated with 21 J/cm^2 laser light at one time, two times, three times and four times did not show caspase-3 and PARP degradation.