

# 바이오이미징과 광열치료를 위한 폴리디아세틸렌 기반 나노입자

김준서<sup>1</sup>, 정윤경<sup>1</sup>

인제대학교 나노융합공학부<sup>1</sup>

## Polydiacetylene-based Nanoparticle for Specific Bioimaging and Photothermal Therapy

Jun Seo Kim<sup>1</sup>, Yun Kyung Jung<sup>1</sup>

Department of Nanoscience and Engineering, Inje University, Korea

\*ykjung9@inje.ac.kr

### Abstract

Polydiacetylene (PDA) is a polymer material that has unique colorimetric and fluorescent transition characteristic in response to external stimuli such as temperature, pH, and biological conjugation. In this study, PDA-based nanoparticle is developed by modifying both EpCAM-specific aptamer and polypyrrole nanoparticles (PPyNPs) to target and kill EpCAM overexpressed cancer cells specifically. We demonstrate bright fluorescence signal of PDA@PPyNPs on surface of HT-29 cells, and decrease in HT-29 cell viability after irradiating NIR laser. Moreover, PDA@PPyNPs developed in this study exhibits low cytotoxicity and good thermal stability.

### 1. 연구 배경

암은 복잡하고 치료가 매우 어려운 질병으로, 현재 암의 진단 및 치료에 대한 수요가 증가하고 있으며, 이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 현재 암 환자의 치료는 약물치료, 방사선 치료법 등이 시행되고 있으나 이러한 치료법들의 경우 정상세포나 면역계에 손상을 입히는 등의 부작용을 야기할 수 있다. [1]

Polypyrrole nanoparticles (PPyNPs)는 근적외선 영역의 빛을 흡수하여 열로 변환할 수 있는 나노입자로, 높은 안정성과 생체안정성을 가져 광열치료 (Photothermal therapy, PTT)에 사용되기 위해 주목받고 있는 물질이다. 그러나 생체 내에서 단일 PPyNPs의 위치를 파악하고 정상세포에 손상을 주지 않으며 암 세포만을 특이적으로 사멸시킬 수 있는 방법이 없어 PTT로의 적용에 제한이 있다. 이를 해결하기 위해 유기 형광염료와 같은 프로브 물질을 필요로 하나, 유기 형광염료의 경우 낮은 광안정성, 높은 세포독성 등과 같은 부작용을 초래할 수 있다. [1]

Polydiacetylene (PDA)는 온도, pH, 생물학적 결합 등과 같은 외부 자극에 의해 발생하는 독특한 비색 및 형광 전이 특성을 가진 고분자 물질로, 인지질로 이루어진 고분자 표면에 다양한 물질을 수식할 수 있어 다양한 분야에 적용 가능한 유망한 물질이다. PDA는 수용액 상에서 자가 조립된 디아세틸렌 (diacetylene) 단량체에 254 nm UV를 조사함으로써 합성이 가능하며, 청색을 띄는 PDA에 외부 자극이 가해질 경우 PDA의 polymer backbone의 구조적 변화가 발생하여 적색으로의 비색 전이가 일어나고 적색 형광을 발산한다. [2]

EpCAM 단백질은 유방암, 전립선암, 결장암 등의 암이 발생할 경우 암 세포 표면에 과발현되는 단백질으로, 암에 대해 특이적인 바이오마커로 주목받고 있다. 본 연구에서는 암 세포 표면에 과발현되는 EpCAM 단백질을 검출하고, 암 세포를 특이적으로 사멸시키기 위해 PDA 표면에 EpCAM 단백질과 특이적으로 결합하는 EpCAM-specific aptamer와 PPyNPs를 수식하여 PDA 기반의 바이오이미징 및 PTT시스템을 구축하였다. EpCAM 단백질이 과발현되는 모델 세포로서 결장암 세포주인 HT-29 세포를 표적 세포로 지정하였으며, HT-29 세포 배양 후 PDA 표면의 EpCAM-specific aptamer와 HT-29 세포 표면에 과발현된 EpCAM

단백질과의 결합에 의해 발생하는 PDA의 형광을 평가하고, 이에 근적외선을 조사하여 HT-29 세포의 특이적인 사멸을 확인하였다. [3]

### 2. 연구 방법

실험에 사용된 PDA는 10, 12-pentacosadiynoic acid (PCDA), 1,2-ditetradecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC), TCDA-NHS, PCDA-EDEA로 구성되었으며, TCDA-NHS, PCDA-EDEA는 각각 TCDA, PCDA 단량체의 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) (EDC)/N-hydroxysuccinimide (NHS) 반응을 의한 유기 합성 과정을 통해 제작하였다. 이후 TCDA-NHS 단량체에 EpCAM-specific aptamer를 수식한 후 각 단량체의 몰 비를 PCDA : DMPC : TCDA-NHS : PCDA-EDEA = 48 : 32 : 10 : 10으로 하여 수용액 상에서의 자가 조립 후 254 nm UV 조사에 의한 중합을 통해 PDA를 합성하였다. 제작된 PDA와 PPyNPs는 EDC/NHS coupling 반응을 통해 합성되었다 (그림 1).

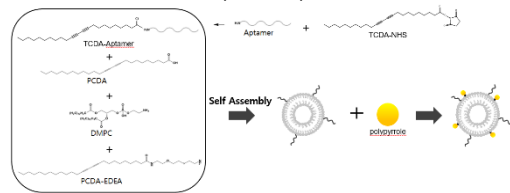


그림 1 PDA@PPyNPs의 합성 과정

HT-29 세포에 대한 PDA@PPyNPs의 형광 추적 이미지는 PDA@PPyNPs 용액으로 처리된 HT-29 세포의 공초점 현미경을 통한 세포 형광 이미지를 통해 관찰하였다.

PDA@PPyNPs를 사용한 PTT에 의한 HT-29 세포 및 정상 세포 WI-38 세포의 사멸율은 PDA@PPyNPs 용액으로 처리된 HT-29 세포에 808 nm 레이저를 조사하여 Calcein-AM/PI costaining을 통해 확인하였다 (그림 2).

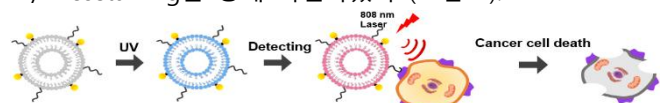
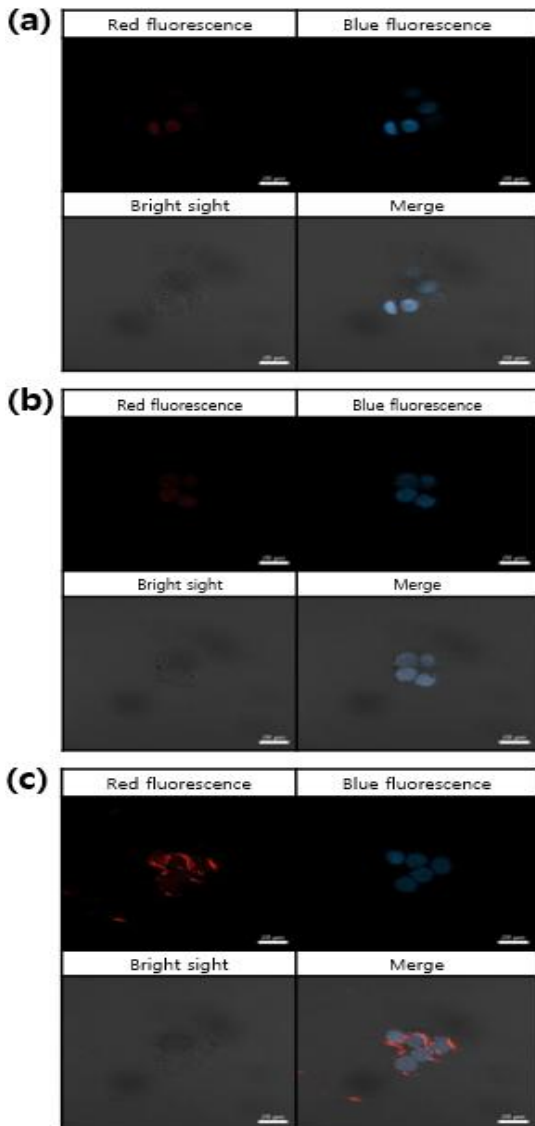


그림 2 PDA@PPyNPs의 암 세포 탐지 및 PTT의 계략도

PDA@PPyNPs의 HY-29 세포에 대한 세포 독성 테스트 (CCK-8 assay)는 배양된 HT-29 세포에 PDA@PPyNPs를 첨가한 후 Microplate reader로 450 nm에서의 각 샘플의 흡광도를 기록하여 상대 세포 생존률을 확인하였다.

### 3. 연구 결과

PDA@PPyNPs에 의한 HT-29 세포의 형광 추적은 공초점 현미경을 통한 형광 이미지를 통해 관찰하였다. 그 결과, EpCAM-specific aptamer가 수식된 PDA@PPyNPs (EpCAM Apt@PDA@PPyNPs)의 경우 HT-29 세포의 세포막 주변에서 PDA의 강한 적색 형광을 나타내었으며, EpCAM에 비특이적인 Random DNA를 수식한 PDA@PPyNPs (Random DNA@PDA@PPyNPs) 및 aptamer/DNA를 수식하지 않는 PDA@PPyNPs (Control PDA@PPyNPs)의 경우 세포막에서 적색 형광을 나타내지 않았다. 이는 EpCAM Apt@PDA@PPyNPs가 HT-29 세포 표면의 EpCAM 단백질과 결합하여 암 세포의 형광 이미징이 가능함을 의미한다 (그림 3).



PDA@PPyNPs의 PTT에 의한 HT-29 세포 및 WI-38 세포의 사멸율은 Calcein-AM/PI costaining을 통해 확인하였다. HT-29 세포 및 WI-38 세포에 EpCAM Apt@PDA@PPyNPs 용액을 처리한 후 808 nm 레이저를 조사하여 Calcein-

AM/PI costaining을 진행한 결과, WI-38 세포의 경우 808 nm 레이저 조사 후에도 세포 사멸이 거의 일어나지 않은 반면 HT-29 세포의 경우 처리한 EpCAM Apt@PDA@PPyNPs의 농도가 증가함에 따라 세포의 사멸율이 증가함을 확인하였다. 이를 통해 본 연구에서 제작한 PDA@PPyNPs가 암 세포에 대해 특이적인 PTT 특성을 나타냄을 입증하였다.

제작된 PDA@PPyNPs의 세포 독성은 CCK-8 분석을 통해 확인하였다. HT-29에 고농도의 PDA@PPyNPs를 처리하였음에도 HT-29 세포가 높은 생존률을 보였다. 이를 통해 본 연구에서 제작한 PDA@PPyNPs가 높은 생체 안정성을 기반으로 암 세포의 바이오 이미징과 PTT를 위한 나노 프로브로 사용될 수 있음을 입증하였다.

### 4. 참고 문헌

[1] Kim, Tae Eun, et al. "Folic acid functionalized carbon dot/nolovnrrole nanoparticles for specific bioimaging and photothermal therapy." *ACS Applied Bio Materials* 4.4 (2021): 3453-3461.  
 [2] YK Jung, TW Kim, J Kim, and JM Kim. "Universal colorimetric detection of nucleic acids based on nolvdiaacetylene (PDA) liposomes." *Advanced Functional Materials*, Vol 18, No 5, p701-708, 2008  
 [3] Jung, Yun Kyung, et al. "Antamer-based cell imaging reagents capable of fluorescence switching." *Chemical Communications* 50.82 (2014): 12329-12332.

그림 3 (a) Control PDA@PPyNPs, (b) Random DNA@PPyNPs, (c) EpCAM Apt@PDA@PPyNPs로 처리된 HT-29 세포의 공초점 현미경 이미지