

2013년 2월

博士學位論文

# 660 nm 광 조사가 치은섬유모세포 (HGF) 및 조골모세포(MC3T3-E1)에 미치는 영향

조선대학교 대학원

치의학과

박 찬 호

# 660 nm 광 조사가 치은섬유모세포 (HGF) 및 조골모세포(MC3T3-E1)에 미치는 영향

Effects of 660 nm radiation on human gingival fibroblast (HGF)  
and MC3T3-E1 cells

2013年 2月 25日

조선대학교 대학원

치의학과

박 찬 호

# 660 nm 광 조사가 치은섬유모세포 (HGF) 및 조골모세포(MC3T3-E1)에 미치는 영향

지도교수 고 영 무

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2012年 10月

조선대학교 대학원

치 의 학 과

박 찬 호

# 박찬호의 박사학위 논문을 인준함

위원장 경북대학교 교수 김 교 한 印

위 원 전북대학교 교수 이 민 호 印

위 원 조선대학교 교수 최 한 철 印

위 원 조선대학교 교수 김 병 훈 印

위 원 조선대학교 교수 고 영 무 印

2012年 12月

조선대학교 대학원

# 목 차

ABSTRACT .....	vi
제 1장 서론 .....	1
제 2장 실험재료 및 방법 .....	3
제 1절 광조사장치 .....	3
제 2절 조골모 세포(MC3T3-E1) 및 치은섬유모세포(HGF) 배양 .....	5
제 3절 광 조사 실험 .....	6
제 4절 조골모세포 증식평가 .....	7
제 5절 조골모세포 분화평가 .....	8
제 6절 2-dimensional migration assay .....	9
제 7절 3-dimensional transwell migration assay .....	10
제 8절 Rhodamine-phalloidin 과 DAPI 면역형광염색법 .....	11
제 3장 실험결과 .....	12
제 1절 광 조사에 의한 MC3T3-E1세포의 증식 및 분화 .....	12
제 2절 광 조사에 의한 MC3T3-E1세포의 형태변화 관찰 .....	15
제 3절 광 조사에 의한 세포의 이동 관찰 .....	17
제 4장 고찰 .....	20

제 5장 결론	.....	22
참 고 문 헌	.....	23

## LIST OF FIGURES

- Fig. 1. Experimental setup for LED illumination system. ... 4
- Fig. 2. Red LED module with power LED array. .... 4
- Fig. 3. Growth of preosteoblast (MC3T3-E1) cell as determined by the MTT assay after their exposure to 660nm red light LED. .... 13
- Fig. 4. Changes in the ALP activity of preosteoblast (MC3T3-E1) after their exposure to 660nm red light LED. 14
- Fig. 5. Fluorescence images of MC3T3-E1 cells immunostained with phalloidin-rhodamine (red, F-actin) and DAPI(blue, nuclei) on different LED irradiation time at 1 day (a) control, (b) 5 min (c) 10 min (d) 20 min (X 100 Fluorescent Microscope). .... 16
- Fig. 6. Fluorescence images of MC3T3-E1 cells immunostained with phalloidin-rhodamine (red, F-actin) and DAPI(blue, nuclei) on different LED irradiation time at 1 day (a) control, (b) 5 min (c) 10 min (d) 20 min (X 200 Fluorescent Microscope). .... 16
- Fig. 7. Effect of LED in human gingival fibroblast (HGF) for three-dimensional migration assays with precoated transwell chamber (a) control (b) 5 min (c) 10 min (d) 20 min. .... 18

Fig. 8. Effect of LED in gingival fibroblast (HGF) for two -dimensional migration assays conducted with a wound healing assay for 5 min LED irradiation. .... 19

Fig. 9. Mechanism of photobiomodulation by 630 - 900 nm light.  
..... 22

## ABSTRACT

### Effects of 660 nm radiation on human gingival fibroblast (HGF) and MC3T3-E1 cells

Chan-Ho Park, D.D.S, M.S.D

Director : Prof. Yeong-Mu Ko, D.D.S.,Ph.D.

Department of Dental Science

Graduate School of Chosun University

Photobiomodulation by light in the red to near infrared range (630-1000 nm) using light-emitting diode (LED) arrays has been shown to accelerate wound healing, improve recovery from ischemic injury in the heart and attenuate degeneration in the injured optic nerve.

In this study, we have fabricated the 660 nm red LED illumination controller and LED array module and evaluated the proliferation and differentiation of preosteoblast MC3T3-E1 cells and cell migration of human gingival fibroblast (HGF) cells under different light intensity and illumination time.

To investigate the 660 nm LED effects on MC3T3-E1 and HGF cells, cells were exposed to LED irradiation at illumination time of 5, 10, 15, 20 min and light intensity of 8.5 mW/cm<sup>2</sup>. The proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells were evaluated by MTT assay and Alkaline phosphatase (ALP) activity, respectively. In addition, cell migration of HGF cells was investigated by two-dimensional migration assay and three-dimensional transwell migration assay.

According to the 660 nm LED irradiation experiment results are as follows.

1) Exposure to LED light intensity of  $8.5 \text{ mW/cm}^2$  and illumination time of 5 min significantly increased MC3T3-E1 cells proliferation and cell differentiation, suggesting that 660 nm LED stimulates cell in a time-dependent.

2) The number of migrated HGF cells showed the largest increase in experimental group under LED light intensity of  $8.5 \text{ mW/cm}^2$  and illumination time of 5 min.

3) The migration rate of HGF cells showed the fastest in experimental group for culturing time of 12 hr after LED light intensity of  $8.5 \text{ mW/cm}^2$  and illumination time of 5 min.

These data that suggest 660 nm red light exposure may be helpful in postoperative wound repair of HGF cells and proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells.

## 제 1 장 서 론

광을 파장대별로 분류하면 자외선 (100-400 nm), 가시광선 (400-750 nm), 적외선 (750-10,000 nm)로 분류할 수 있고, 가시광선 영역을 세분하면 단파장대 (파란색), 중간파장대 (초록색) 그리고 장파장대 (적색)로 구별할 수 있다. 이러한 광은 파장대 별로 광 치료에 다양하게 사용되고 있다.

현재 의학 및 치의학 분야에서 상처 치유와 기능 장애 치료에 저준위 레이저 치료(Low Level Laser Therapy; LLLT)가 빈번하게 사용되고 있다.<sup>1-4</sup> 근적외선 (630-1000 nm) 적색 광은 photobiomodulation에 의하여 상처를 치유하는 효과가 있다고 알려져 있으며, 저준위 레이저 치료(LLLT)는 통증감소, 염증 및 상처치유 등을 포함한 다양한 효과를 보이고 있다.<sup>5,6</sup>

최근에 발광다이오드 (light emitting diode: LED)를 광원으로 하는 광 치료요법이 생체조절효과에 대한 생물학적인 메커니즘이 전체적으로 밝혀지지 않았지만, 저준위 레이저치료는 다양한 실험적 그리고 임상적 연구에서 세포 대사조절 기능을 통하여 생물학적으로 생체조직의 재생능력을 증가시켰다고 보고되고 있다.<sup>7,8</sup> LED 광은 생체자극(biostimulation)을 통해 세포 내의 환경들을 변화시킬 수 있는 특징이 있어 다양한 근골격계 질환과 신경계 질환 치료에 적용된바 있다.<sup>9-11</sup> 특히 의료분야에서 특정파장대의 광을 환자의 치료에 이용하는 치료시스템을 광 치료요법(photo therapy)이라고 정의할 수 있으며 이 치료요법의 원리는 세포를 광자극하면 상처의 혈관을 재생하는 치유를 하여 각종 염증을 제거하고 섬유질의 조직을 감소시키고 흉터 형성을 억제시키고 신경에 광자극하면 고통을 경감시키는 효과가 있으며 침을 놓는 효과가 있다. LED 레이저를 이용한 광선치료는 기존의 레이저와 비슷한 치료 효과를 보이는 반면 레이저 보다 깊은 피부 6 mm 깊이까지 침투가 가능하며, 치료 시 피부조직의 파열과 반흔의 위험이 없고 파장의 크기를 다양하게 이용할 수 있어 넓은 부위의 치료도 가능하다고 보고되고 있다.<sup>12-16</sup> 저준위 에너지 레이저나 LED 어레이를 이용한 근적외선(630nm-1000nm) 저출력 광 조사는 동물모델과 세포배양에서 다양한 생리적 과정을 조절하는 것으로 알려져 있다.<sup>17,18</sup>

최근에 미우주항공국(NASA)에서는 670 nm 파장을 갖는 광이 상처치유에 어떤 생물학적 효과를 나타내는가에 대하여 연구하기 위해 광원을 발광다이오드로 사용하고 있다.<sup>19</sup> 발광다이오드 광원은 레이저광에 비하여 발열이 거의 없으며, 에너지를 덜 소모하고, 넓은 면적을 조사할 수 있고, 저비용으로 우수한 장점을 보유하고 있다.<sup>20</sup> 일부 상처를 완화시키는데 있어서 발광다이오드 광원의 효용성은 고효율 670 nm LED 광이 망막에서 메탄올의 독성효과를 억제할 수 있다는 최근 연구결과는 보여주었다.<sup>21</sup> 다른 연구에서는 670-, 726-, 혹은 880 nm 적색 LED 광이 쥐의 만성 허혈성 궤양의 치유시간을 단축시킨다는 결과를 보여주었다.<sup>22</sup> 또한 이 연구결과에서는 670 nm 광 조사는 환자가 화학요법을 받을 때 유발되는 점막염의 치유에 도움을 준다는 것을 보여주었다.<sup>20</sup> 이러한 연구결과들을 토대로 생각해보면 670 nm LED가 창상치유에 어떤 도움을 주는 것은 분명한 사실로 다가온다. 그러나 670 nm 광이 아직까지 조골모세포나 치은섬유모세포에 미치는 생물학적 영향평가에 대한 연구결과는 발표되지 않았다. 치과 임상에 이러한 LED 광 치료를 응용하기 위해서는 광 파장의 종류, 세기 및 시간 그리고 조사형태에 대한 세포적 관점에서의 기초연구자료가 우선적으로 필요하다.

따라서 본 연구에서는 670 nm 와 비슷한 파장대인 660 nm의 적색 LED를 광원으로 하는 LED 광을 치은섬유모세포(human gingival fibroblast; HGF)에 조사하여 창상치유에 대한 효과를 관찰하고, 마우스 유래 조골모세포(preosteoblast MC3T3-E1)의 증식 및 분화에 미치는 영향을 조사하였다.

## 제 2 장 실험재료 및 방법

### 제 1 절. 광 조사 장치

광 조사 실험 장치 (Fig. 1)는 광 조사 제어기와 광 조사 모듈로 구성되어 있다. 660 nm LED는 시판용 LED를 구입하여 광 조사 모듈을 직접 설계하여 제작하였다.

광 조사 제어기는 광 조사세기 및 시간을 독립적으로 12개 까지 조절 가능하도록 설계하였다. 광 조사기 제어기와 광 조사 모듈은 6핀 케이블로 연결하여 탈부착이 가능하도록 제작하였다.

광 조사 모듈의 재질은 LED 광원에서 발열되는 열을 방열하기 위하여 알루미늄 블록을 가공하여 제작하였고, 모듈의 크기는 세포배양 실험에 사용되는 6 well plate와 12 well plate크기와 동일하게 제작하였다. Fig. 2는 광 조사 모듈의 실물사진을 나타내었다.

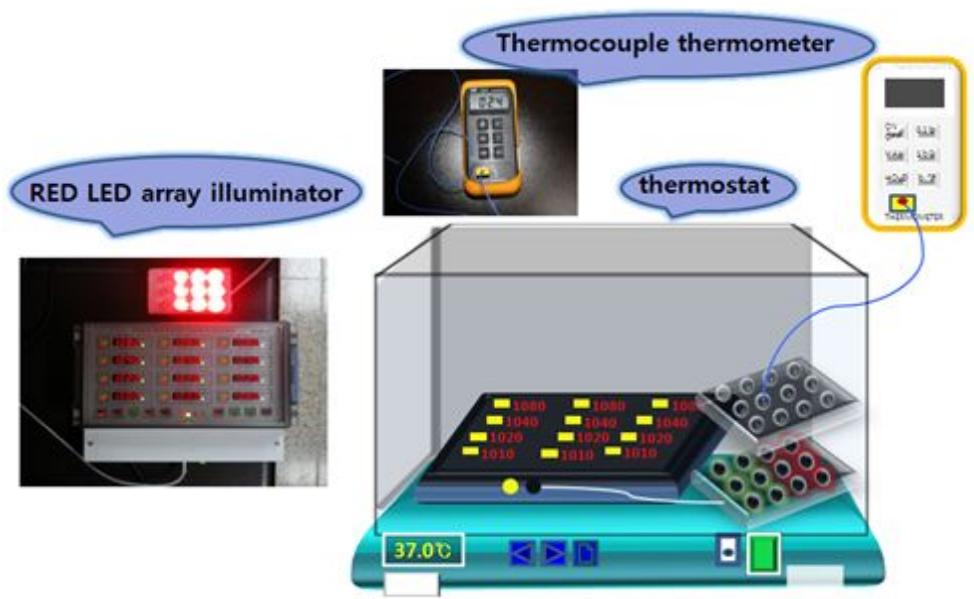


Fig. 1. Experimental setup for LED illumination system.



Fig. 2. Red LED module with power LED array.

## 제 2 절. 조골모 세포(MC3T3-E1) 및 치은섬유모세포(HGF) 배양

본 연구에 사용된 MC3T3-E1 조골모세포는 쥐 두개골에서 유래된 세포주로서 American Type Culture Collection (ATCC, CRL-2594)에서 구입하였다. 세포배양은  $\alpha$ -MEM(Alpha Minimum Essential Medium with ribonucleosides, deoxyribonucleosides, 2 mM L-glutamine and 1 mM sodium pyruvate, but without ascorbic acid/GIBCO, Custom Product, Catalog No. A1049001)배지에 growth factor를 제공하는 10% (w/v) fetal bovine serum (FBS, PAA Laboratoris.inc A15-751)과 항생제인 amphotericin (Lonza walkersville MD USA 0719)을 혼합하여 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간 배양하였다. 그리고 계대배양을 통해서 얻어진 4세대 세포를 incubator에서 1일 동안 배양하여 실험에 사용하였다.

치은섬유모세포 HGF(CRL-2014)는 사람에서 치은조직에서 유래된 세포주로 DMEM(Dulbecco's Modified e Eagle Medium)에 10% (w/v) FBS와 항생제인 amphotericin을 혼합하여 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 48시간 배양하였다. 그리고 계대배양을 통해서 얻어진 4세대 세포를 incubator에서 1일 동안 배양하여 실험에 사용하였다.

### 제 3 절. 광 조사 실험

광 조사 실험은 37℃에서 수행하였고, 광에 의한 세포의 생물학적 평가는 광 조사 세기 8.5 mW/cm<sup>2</sup>에서 5, 10, 15, 20분을 광 조사하여 조골모세포의 증식은 MTT assay로 평가하였고, 세포분화는 alkaline phosphatase활성을 측정하여 평가하였다. 치은섬유모세포의 창상치유에 광이 미치는 영향을 평가하기 위하여 세포의 이동거리를 관찰하였다. 치은섬유모세포의 이동거리 평가 방법은 3-dimensional transwell migration assay와 2-dimensional migration assay (wound healing assay)로 조사하였다.

#### 제 4 절. 조골모세포 증식평가(MTT assay)

배양된 세포는 배지를 모두 제거한 후 PBS (phosphate buffered saline, Sigma, USA) 를 이용하여 세척하였으며 trypsin/EDTA를 소량 첨가하여 배양 접시로부터 분리시켰다. 분리된 세포에 FBS가 포함된 배지를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 원심분리기를 이용하여 세포를 수집하였다. 세포에 배지를 첨가하여 다시 부유 시킨 후 준비된 샘플이 첨가된 12-well plate에 각각  $1 \times 10^5$  cells/well을 파종하였다. 세포는 37°C에서 5, 10, 15, 20분을 광 조사를 한 후 MTT를 첨가하여 청자색의 결정이 생성되는 것을 확인한 후 이소프로필알콜(Isopropyl alcohol, Sigma, USA)을 이용하여 용해하였다. 흡광도를 측정하기 위해 반응액을 96-well plate에 각각 200  $\mu$ l씩 분주한 후 ELISA reader (Thermal Fisher SCIENTIFIC, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 대조군(광 조사를 하지 않은 세포군)의 생세포수를 100%로 했을 때 실험군(광 조사를 한 세포군) 에서 생존한 세포의 비율로 계산하였다.

## 제 5 절. 조골모세포 분화 평가(ALP assay)

MC3T3-E1 세포배양 24시간 후 분화배지로 교체하고 2일마다 분화배지를 교체하였다. 일주일 후 well plate에 넣어 cell media를 제거하고 PBS로 2회 세척한 후, 세포 lysis buffer를 well당 150  $\mu$ l씩 넣어서 200 분간 wise mix를 이용하여 shaking 하였다. 스크래퍼를 이용하여 well내에 존재하는 세포를 추출하여 microtube에 담근 후, 4 $^{\circ}$ C, 2500 rpm에서 10분 동안 원심분리하고 상층액을 새로운 microtube에 옮겨주고 ice에 보관하였다. 30분 동안 37 $^{\circ}$ C에서 튜브를 배양한 후, 1.2 N NaOH 600  $\mu$ l씩 첨가하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 ALP활성을 계산하였다. 단백질 정량은 1 mg/ml BSA를 사용하여 표준용액을 제조한 후 592 nm에서 흡광도를 측정하였고, 표준정량곡선으로부터 단백질 농도를 결정하였다.

## 제 6 절. 2- dimensional migration assay (wound healing assay)

12 well plate의 1  $\mu$ l에  $2 \times 10^5$ 개의 세포수가 되도록 HGF 세포를 파종한 후 48시간이 지나면 멸균된 200  $\mu$ l yellow tip을 이용하여 일직선의 상처를 주었다. 상처를 준 후 HGF 배양배지인 DMEM을 이용하여 3회 세척하였다. 세척 후  $8.5 \text{ mW/cm}^2$  세기로 660 nm 적색 LED 광을 5, 10, 15, 20분 동안 조사하여 준 후 위상차 현미경을 이용하여 하나의 조건에서 5개 영역을 무작위로 선정하여 사진을 찍어 주었고 다시  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  농도의 인큐베이터에서 12시간을 배양한 후 동일한 방법으로 5 부분의 사진을 찍어주고 다시 인큐베이터에서 배양을 하였다. 광 조사 후 24시간이 지나면 다시 한 번 사진을 찍어 주고 세포 이주율을 계산하였다. 사진을 출력하여 wound area를 재서 평균을 내어 주고 (oh에서 wound area- 12h 또는 24h 이 지난 후 wound area/2/12h 또는 24h)의 공식을 이용하여 HGF 세포의 이주율을 계산하였다.

## 제 7 절. 3-dimensional transwell migration assay

실험 전에  $\varnothing 100$  배양 접시에 세포가 90% 채워지도록 배양하여 주었고 trypsin을 이용하여 배양 접시로부터 세포를 분리한 후 4°C 1000rpm에서 3분 동안 원심 분리하여 세포 pellet를 준비하였다. trans well(Corning #3401) 6개 chamber를 준비한 후 음성대조군에는 1% BSA, 나머지 5개의 well은 DMEM 배지를 이용하여 37°C에서 1시간동안 코팅하였다. 1시간이 지나면 6개의 well에 모두 DMEM을 넣어주고 양성대조군에는 추가로 PDGF(세포이주 촉진제)를 8  $\mu$ l 넣어주었으며 모든 well의 1 ml 속에  $2 \times 10^5$ 의 세포수가 포함되도록 수를 세어 파종했다. 8.5 mW/cm<sup>2</sup> 세기의 660 nm red LED를 5분, 10분, 15분, 20분 조사하여 준 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 농도의 incubator에서 8시간 동안 배양한 후 transwell filter의 세포를 고정하고 염색하여 주었다.(HEMA 3 staining kit: Fisher # 122-911) 처음 1분 동안 세포를 고정하여 주고 각각 10초 동안 핵과 세포전체를 염색하여 준 후 증류수에 transwell chamber를 두 번 헹구어 염색시약들을 제거하였다. 면봉의 머리 부분을 잘라서 평평하게 만들어서 transwell chamber내 filter에 남아있는 염색시약도 조심스럽게 깨끗이 닦아 준 후 위상차 현미경을 이용하여 5 영역을 무작위로 지정하여 사진을 찍어준 후 세포의 수를 세어 영역 당 세포의 수를 계산하였다.

## 제 8 절. Rhodamine-phalloidin 과 DAPI 면역형광염색법

12 well plate에 현미경용  $\varnothing 15\text{mm}$  cover slip를 넣어준 후 3세대 배양된 MC3T3-E1 세포를 1ml 속에  $2 \times 10^5$ 의 세포수가 포함되도록 수를 세어 파종하였다. 24시간이 지난 후  $8.5 \text{ mW/cm}^2$  세기의 660 nm red LED를 5분, 10분, 15분, 20분 동안 조사하여 준 후  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  농도의 incubator에서 30분 동안 배양하였다. 30분이 지나면 12 well plate에 담겨진 배양배지를 제거하여 주고 D-PBS(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, pH 7.3)를 이용하여 세척하였다. 4%의 paraformaldehyde를 이용하여 15분 동안 세포를 고정하여 주고 D-PBS내에 5분간 유지시켜 세척하여 준 후 0.1% Triton X-100 과 1% BSA에 담귀 5분 동안 유지시켜 형광 염색시약이 세포에 침투할 수 있는 상태로 만들어 주었다. PBS를 용매로 하여 100배 희석된 Rhodamine-phalloidin(Invitrogen, R415) 시약을 넣고 15분 동안 F-actin을 염색하였고 D-PBS를 이용하여 매회 5분 동안 3회 세척하여 준 후  $76 \times 26 \times 1\text{mm}$  크기의 cover glass 위에 핵을 염색해 주는 DAPI시약인 Fluorescence mounting media(Vector Labs, H-1200)와 함께 Rhodamine-phalloidin 염색 후 세척된 cover slip을 올려 주었다. 형광현미경을 이용하여 100X, 200X의 배율로 빨간색으로 염색된 F-actin filament와 푸른색으로 염색된 핵의 이미지를 각각 관찰한 후 합성하였다.

## 제 3 장 실험결과

### 제 1절. 광 조사에 의한 MC3T3-E1세포의 증식 및 분화

적색 LED 광이 MC3T3-E1 세포 증식률에 미치는 영향을 평가하기 위하여 MTT 분석법을 이용하여 관찰하였다. MTT분석법은 세포의 미토콘드리아 활성과 직접연관이 있는 방법으로 세포의 생존율을 측정할 때 일반적으로 널리 사용되는 방법이다. 이 실험에서 대조군으로 광을 조사하지 않은 세포군을 사용하였고, 8.5 mW/cm<sup>2</sup> 세기에서 5, 10, 15, 20분간 광 조사를 하였다. 생존율(%)계산은 대조군의 생세포수를 100%로 했을 때 실험군의 생세포수를 비율로 나타낸 것이다 (Fig. 3). 5분간 광 조사를 했을 때가 가장 증식률이 우수함을 알 수 있었다. 광 조사 시간이 증가할수록 증식률은 감소하였다.

Fig. 4는 광 조사 시간에 따른 ALP활성을 조사한 결과를 표시하였다. 광을 세포에 8.5 mW/cm<sup>2</sup> 세기에서 5분 동안 조사하였을 때 대조군에 비하여 가장 높은 활성을 보여주었다. 그 후 광 조사시간이 증가하면서 대조군과 비슷한 ALP활성을 나타냈다.

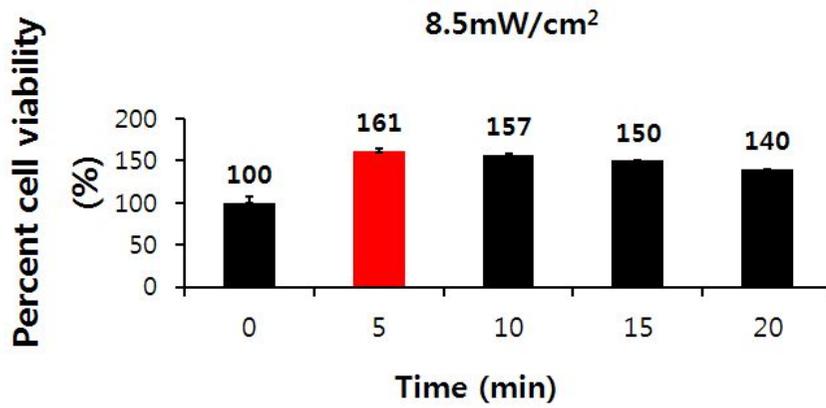


Fig. 3 Growth of preosteoblast (MC3T3-E1) cell as determined by the MTT assay after their exposure to 660nm red light LED.

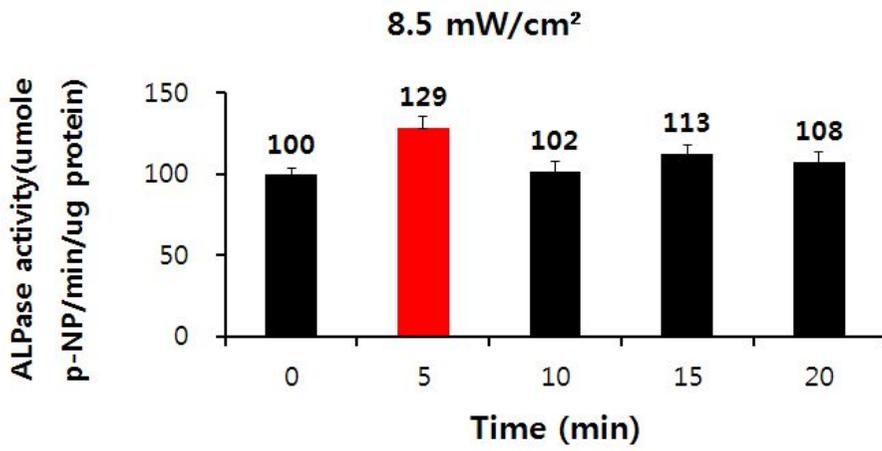


Fig. 4 Changes in the ALP activity of preosteoblast(MC3T3-E1) after their exposure to 660nm red light LED.

## 제 2절. 광 조사에 의한 MC3T3-E1세포의 형태변화 관찰

광 조사에 의한 MC3T3-E1세포의 형태변화를 관찰하기 위하여 Rhodamine-phalloidin 과 DAPI 면역형광염색법을 사용하였다. Rhodamine-phalloidin염색은 세포골격의 F-actin 단백질을 염색하여 세포형태의 변화를 관찰하는 일반적인 방법이다. 또한 DAPI염색은 세포의 핵을 염색하는 것으로 세포가 살아있을 경우에만 푸른색으로 염색이 되는 특징을 가지고 있다. Fig. 5와 6은 MC3T3-E1세포에 광 조사 후 하루 동안 배양하여 Rhodamine-phalloidin과 DAPI 면역형광염색을 한 형광현미경 사진을 나타내었다. Rhodamine-phalloidin에 의해서 세포골격은 적색의 형광을 보여주고 있고, 세포핵은 DAPI염색에 의해 푸른색을 띄고 있다. Fig. 5는 100 배율로 관찰한 사진이고, Fig. 6은 200 배율로 관찰한 사진이다. 광 조사시간 5분에서 가장 많은 생세포수를 보여주고 있고(Fig. 5), 세포의 골격 즉 형태가 가장 잘 발달된 것을 알 수 있었다. (Fig. 6)

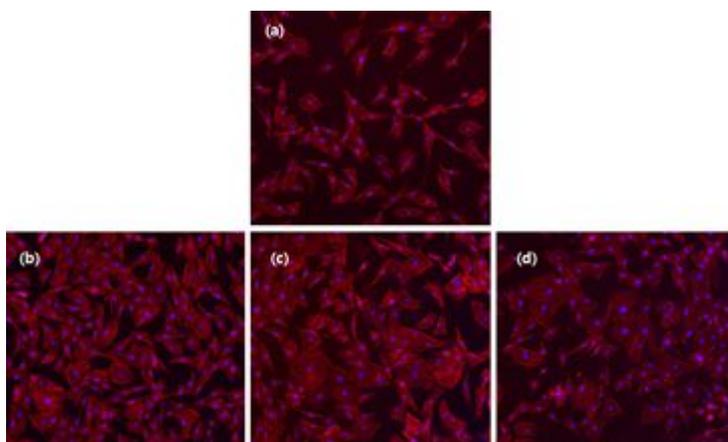


Fig. 5 Fluorescence images of MC3T3-E1 cells immunostained with phalloidin-rhodamine (red, F-actin) and DAPI(blue, nuclei) on different LED irradiation time at 1 day (a) control, (b) 5 min (c) 10 min (d) 20 min (X 100 Fluorescent Microscope).

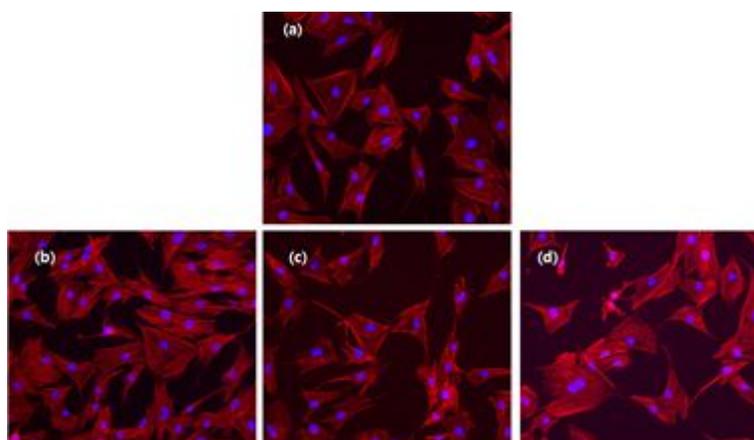


Fig. 6 Fluorescence images of MC3T3-E1 cells immunostained with phalloidin-rhodamine (red, F-actin) and DAPI(blue, nuclei) on different LED irradiation time at 1 day (a) control, (b) 5 min (c) 10 min (d) 20 min (X 200 Fluorescent Microscope).

### 제 3 절. 광 조사에 의한 세포의 이동 관찰

치은섬유모세포 (HGF)가 외부자극에 의해 손상을 입었을 때 광에 의해서 회복되는 정도를 평가하기 위하여 3-dimensional transwell migration 평가와 wound healing assay 평가를 수행하였다. Fig. 7은 HGF세포의 3-dimensional transwell migration 결과를 나타낸 것이다. 8.5 mW/cm<sup>2</sup> 광 세기로 5분 동안 조사하였을 때 가장 많은 세포가 이동한 것을 알 수 있었다. 그 후 광 조사시간이 증가할수록 이동한 세포수는 감소하였다. 이동한 세포수가 많을수록 세포손상의 회복이 빠르다는 것을 의미하고, 상처치유에 광을 5분 동안 조사하였을 때가 가장 회복이 빠르다는 것을 의미한다.

3-dimensional transwell migration 결과 (Fig. 7)로부터 5분이 최적의 광 조사시간으로 생각하고, 광조사세기와 시간을 각각 8.5 mW/cm<sup>2</sup>와 5분으로 고정하여 2-dimensional migration assay (wound healing assay)를 수행하였다. 세포에 인위적으로 상처를 낸 후 광을 조사하고 12시간, 24시간 후에 세포의 이동거리를 시간으로 나누어 이동속도를 구한 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 광 조사 후 12시간 후에 가장 빠른 이동속도를 보여주었고, 24시간 후에는 이동속도가 감소함을 알 수 있었다. 이 결과로부터 광 조사 후 12시간 이내에 상처치유 효과가 잘 이루어지는 것을 알 수 있었다.

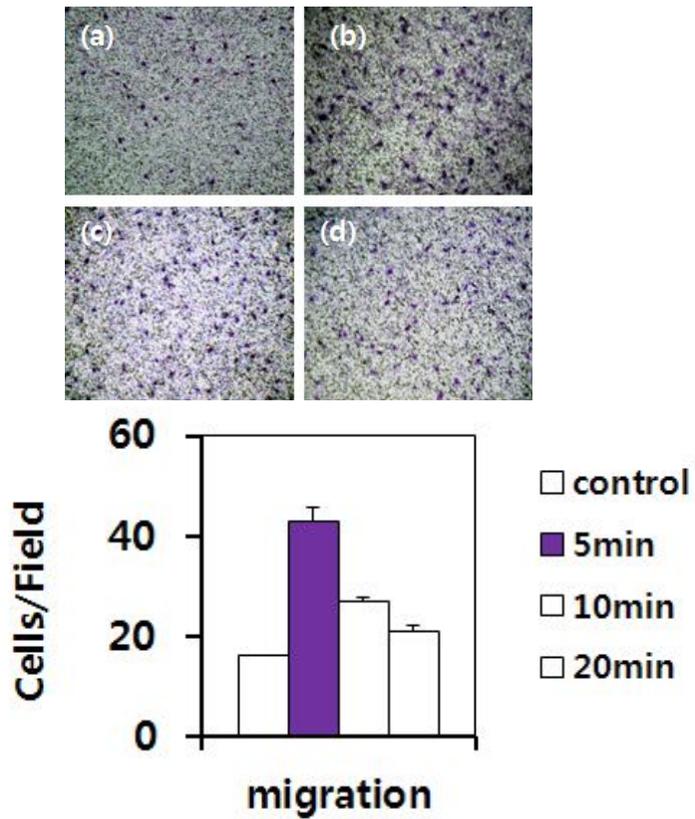


Fig. 7 Effect of LED in human gingival fibroblast (HGF) for three-dimensional migration assays with precoated transwell chamber (a) control (b) 5 min (c) 10 min (d) 20 min.

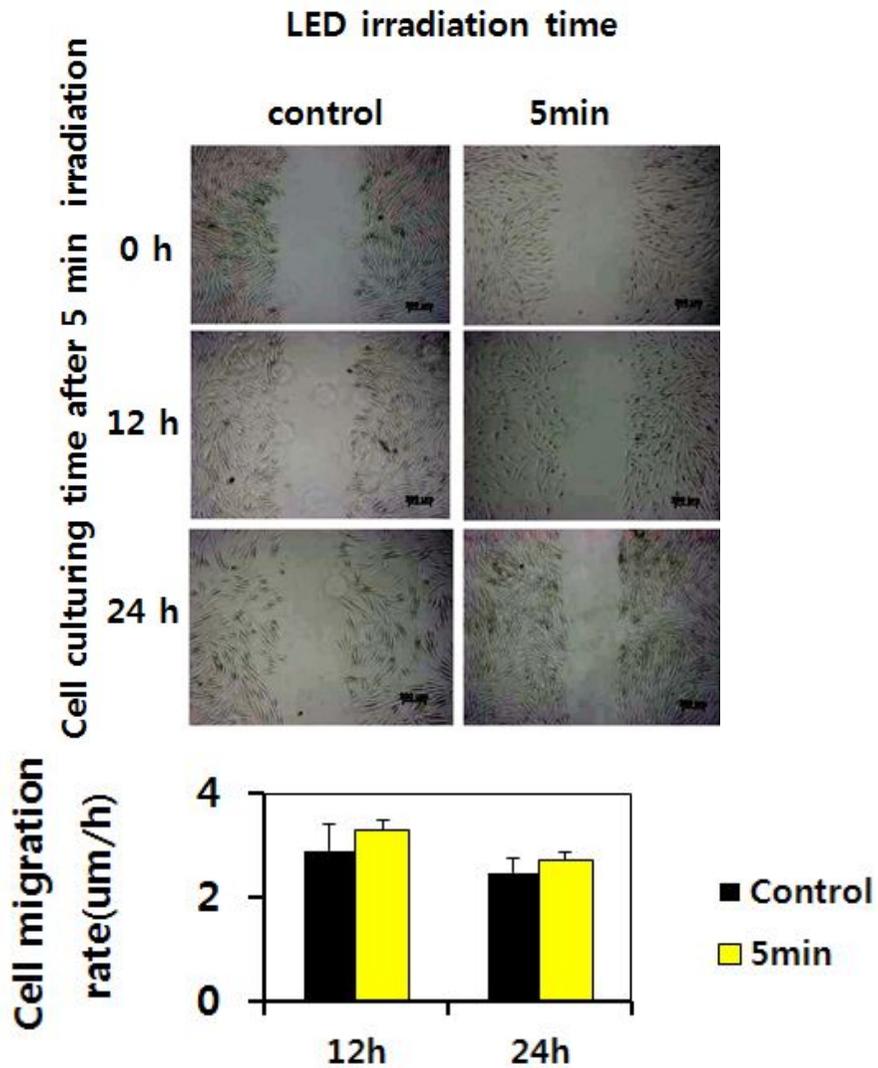


Fig. 8 Effect of LED in human gingival fibroblast (HGF) for two-dimensional migration assays conducted with a wound healing assay after 5 min LED irradiation.

## 제 4 장 고찰

LED 치료요법은 부작용이 없고, 열이 나지 않는 광 치료요법으로 보고되고 있고, 상피세포, 골격 근육세포, 조골세포, 섬유아세포와 같은 다양한 세포 주의 성장을 증진시킬 뿐만이 아니라 화상치료의 가능성을 보여주고 있다.<sup>23,24</sup> 또한 제 1형 프로콜라겐의 증가도 보여주고 있다.<sup>23</sup> 연골세포에 관한 LED 치료요법의 특이적 효과는 아직까지 조사되지 않았으나, 제 2형 콜라겐 합성을 상승 시킨다는 연구결과가 보고되었다.<sup>25</sup> 사이클로옥시제나제(cyclooxygenase)효소의 저해작용과 프로스타글랜딘(prostaglandin) E2 합성의 억제제는 LED 치료요법의 항염증작용의 가능성을 시사한다.<sup>26</sup> 또한 MMPs의 감소작용에 대해서 보고되고 있다.<sup>27</sup>

세포수준에서 적색에서 근적외선(near infrared light, NIR)광에 의한 photobiomodulation의 기전은 미토콘드리아 호흡의 연쇄성분의 활성화로 언급되어왔고, 그 결과 세포증식과 세포보호를 증진시키는 단계적 신호작용을 개시하게 된다. Cytochrome oxidase는 적색에서 근적외선 스펙트럼 범위에서 중요한 광-수용체 역할을 한다. 또한 Cytochrome oxidase는 4개의 레독스 활성금속을 함유하는 integral 막 단백질과 적색에서 근적외선사이의 광에 대하여 강한 흡수력을 가지고 있다. 더욱이 660-680 nm 조사영역은 정제된 cytochrome oxidase에서 전자전달을 증가시키는 동시에 미토콘드리아 호흡과 ATP 합성을 증가시킨다. Fig. 9는 630-900 nm 파장대의 광에 의해 유도되는 포토바이오모듈레이션(photobiomodulation) 기전의 모식도를 나타낸 것이다.<sup>33</sup> LED 치료요법은 특히 피부 임상적 실험에 적용되어 왔다. 이 치료요법이 성공하기 위해서는 적절한 파장, 조사량, 세기, 시간 그리고 연속적 조사, 혹은 펄스 조사를 결정하는 것이 매우 중요하다. De Morias 등은 무릎 관절의 관절염에 대한 LED 치료요법과 저 준위 레이저요법 (low-level laser therapy; LLLT)의 항염증효과를 조사하였다.<sup>28</sup> 그들은 저 준위 레이저요법이 LED 치료요법보다 더욱 효과적으로 염증을 감소시킨다는 결과를 보였으나, 많은 변수들이 있는 LED 치료요법의 효용성을 평가하기 위해서는 새로운 연구를 수행해야 한다는 결론을 내놓았다. 각각의 파장은 다양한 색조를 보이고, 생체조직에 다양한 영향을 미친다. 일반적으로, 장파장 LED는 생체조직

깊숙이 침투한다. 또한 적색광은 단파장보다 깊숙이 있는 목표물에 더욱 효과적으로 영향을 미친다는 것을 보여주었다.<sup>29-31</sup> LED 치료요법에서 사용되는 적색 또는 적외선 파장들은 토끼의 무릎관절조직 (즉 연골과 관절액 조직)에 적합하다.

LED 광 조사방법에서 펄스 파형과 연속 파형 중 어느 것이 세포반응에 많은 영향을 미치는가에 대해서 아직 조사되지 않았다. 왜냐하면 펄스 파형은 콜라겐 생성에는 연속 파형보다는 효과적이라고 생각되어, 이러한 펄스 파형이 적용되고 있다.<sup>32</sup> 이것은 아마도 제 2형 콜라겐의 발현을 증가시키는 것에 기인한 것으로 생각된다. 만약에 조사세기가 충분하지 않다면, 이것은 광 자극효과를 보여주지 못할 것이며, 심지어 조사시간을 연장시켜도 마찬가지 일 것이다.<sup>32</sup> 치료법의 결과들은 최적 LED 파장과 조사조건(조사세기, 조사시간)을 찾는 데 필요한 변수들에 달려있다. 치료를 받은 실험군은 적용된 광세기 및 파장에 강하게 반응을 보일 것이며, 반면에 대조군(치료를 받지 않은 그룹)은 각각의 다른 결과들을 보일 것이다.

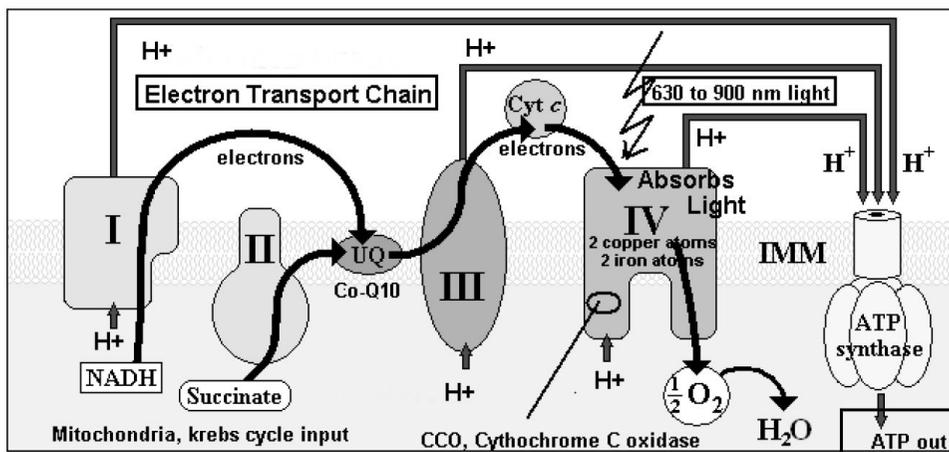


Fig. 9 Mechanism of photobiomodulation by 630 - 900 nm light.

## 제 5 장 결론

조골모세포 (MC3T3-E1)와 치은섬유모세포(HGF)에 660 nm 파장대의 적색LED 광을  $8.5 \text{ mW/cm}^2$  세기로 하여 광 조사 시간을 변화하였을 때 다음과 같은 세포의 반응을 관찰할 수 있었다.

- 1) 광세기  $8.5 \text{ mW/cm}^2$  그리고 광 조사 시간 5분 일 때, 조골모세포의 증식 및 분화가 가장 우수하였고, 세포의 형태가 가장 발달된 상태임을 확인하였다.
- 2) 광세기  $8.5 \text{ mW/cm}^2$  그리고 광 조사 시간 5분 일 때, 치은섬유모세포의 세포이동수가 가장 많았고, 이동속도가 가장 빨랐다.

이상의 결과들을 종합해볼 때, 660 nm파장을 갖는 적색 LED광이 MC3T3-E1세포와 HGF세포의 증식, 분화 그리고 창상치유에 좋은 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 따라서 이러한 연구결과들은 치과임상에서 광을 이용한 치료요법에 기초데이터로 활용가능성이 높을 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Donelan MB, Parrett BM, Sheridan RL. (2008) Pulsed dye laser therapy and z-plasty for facial burn scars: the alternative to excision. *Ann Plast Surg* 60: 480-486.
2. Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. (2001) Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats. *Wound Repair Regen* 9: 248-255.
3. Mester E, Mester AF, Mester A. (1985) The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med* 5:31-39.
4. Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. (1971) Effect of laser rays on wound healing. *Am J Surg* 122:532-535.
5. Gaida K, Koller R, Isler C, et al. (2004) Low level laser therapy—a conservative approach to the burn scar? *Burns* 30:362-367.
6. Herascu N, Velciu B, Calin M, et al. (2005) Low-level laser therapy (LLLT) efficacy in post-operative wounds. *Photomed Laser Surg* 23:70-73.
7. Klebanov GI, Shuraeva NI, Chichuk TV, et al.(2005) A comparative study of the effects of laser and light-emitting diode irradiation on the wound healing and functional activity of wound exudate leukocytes. *Biofizika* 50:1137-1144.
8. Carvalho PT, Mazzer N, dos Reis FA, et al.(2006) Analysis of the influence of low-power HeNe laser on the healing of skin wounds in diabetic and non-diabetic rats. *Acta Cir Bras* 21:177-183.
9. Weiss RA, McDaniel DH, Geronemus RG, et al.(2005) Clinical experience with lightemitting diode (LED) photomodulation. *Dermatol Surg* 31: 1199-1205.
10. Rochkind S, Nissan M, Alon M, Shamir M, Salame K (2001) Effects of laser irradiation on the spinal cord for the regeneration of crushed peripheral nerve in rat. *Lasers Surg Med* 28:216-219.

11. Shamir MH, Rochkind S, Sandbank J, Alon M. (2001) Double-blind randomized study evaluating regeneration of the rat transected sciatic nerve after suturing and postoperative low-energy laser treatment. *J Reconstr Microsurg* 17:133-137.
12. Hode L.(2005) The importance of the coherency. *Photomed Laser Surg* 23:431-434.
13. Trelles MA, Allones I, Levy JL, Calderhead RG, Moreno-Arias GA.(2004) Combined nonablative skin rejuvenation with the 595- and 1450-nm lasers. *Dermat Surg* 30:1292-1298.
14. Juzeniene A, Juzenas P, Ma LW, Iani V, Moan J.(2004) Effectiveness of different light sources for 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 19:139-149.
15. Brancalion L, Moseley H. (2002) Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 17:173-186.
16. Clark C, Bryden A, Dawe R, Moseley H, Ferguson J, Ibbotson SH. (2003) Topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for cutaneous lesions: outcome and comparison of light sources. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 19:134-141.
17. Dahiya R, Lam SM, Williams III EF. (2003) A systematic histologic analysis of nonablative laser therapy in a porcine model using the pulsed dye laser. *Arch Facial Plast Surg* 5:218-223.
18. Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P. (2001) The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen* 9:66-76.
19. Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM. (1996) Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A review. *J Clin Periodontol* 23:492-496.
20. Whelan HT, Smits RL Jr, Buchman EV, et al. (2001) Effect of NASA lightemitting diode irradiation on wound healing. *J Clin Laser Med Surg* 19:305-314.

21. Eells JT, Henry MM, Summerfelt P, et al. (2003) Therapeutic photobiomodulation for methanol-induced retinal toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3439-3444.
22. Reddy GK, Stehno-Bittel L, Enwemeka CS. (2001) Laser photostimulation accelerates wound healing in diabetic rats. *Wound Repair Regen* 9:248-255.
23. Barolet D, Roberge CJ, Auger FA, Boucher A, Germain L. (2009) Regulation of skin collagen metabolism in vitro using a pulsed 660 nm LED light source: clinical correlation with a single-blinded study. *J Invest Dermatol* 129:2751-2759.
24. Al-Watban FA, Andres BL. (2003) Polychromatic LED therapy in burn healing of nondiabetic and diabetic rats. *J Clin Laser Med Surg* 21:249-258.
25. Yasushi O, Richard DC, Neil MB, Robert MH, Toshikazu K, David A. (2011) Effect of light-emitting diode (LED) therapy on the development of osteoarthritis (OA) in a rabbit model. *Biomed Pharma* 65:224-229.
26. Lim W, Lee S, Kim I, Chung M, Kim M, Lim H, et al. (2007) The anti-inflammatory mechanism of 635 nm light-emitting-diode irradiation compared with existing COX inhibitors. *Lasers Surg Med* 39:614-621.
27. Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, et al. (2002) Mechanisms of photoaging and chronological skinaging. *Arch Dermatol* 138:1462-1470.
28. de Morais NC, Barbosa AM, Vale ML, Villaverde AB, de Lima CJ, Cogo JC, et al. (2010) Anti-inflammatory effect of low-level laser and light-emitting diode in zymosan-induced arthritis. *Photomed Laser Surg* 28:227-232.

29. Karu TI, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. (2005) Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers Surg Med* 36:307-314.
30. Kalka K, Merk H, Mukhtar H. (2000) Photodynamic therapy in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 42:389-413.
31. Simpson CR, Kohl M, Essenpreis M, Cope M. (2001) Near-infrared optical properties of ex vivo human skin and subcutaneous tissues measured using the Monte Carlo inversion technique. *Phys Med Biol* 1998;43(9):2465-2478 [Erratum in: *J Am Acad Dermatol* 2000;43(4)609; *J Am Acad Dermatol* 44(1):150].
32. Barolet D. (2008) Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. *Semin Cutan Med Surg* 27:227-238.
33. Fukuwatari T, Shibata K, Ishihara K, Fushiki T, Sugimoto E. (2001) Elevation of blood NAD level after moderate exercise in young women and mice. *J Nutr Sci Vitaminol* 47:177-179.