

저출력레이저조사가 섬유아세포와 면역세포의 증식 및 유전자발현에 미치는 영향

전북대학교 치과대학 구강진단학·구강내과학 교실

임익준·신금백·최복

목 차

- I. 서 론
- II. 실험 재료 및 방법
- III. 결 과
- IV. 고 찰
- V. 결 론
- 참고문헌
- 영문초록

I. 서 론

치과영역에서 구강악안면부위 질환의 치료효과 차원에서 소염, 진통 및 창상치유촉진 등의 목적으로 저출력레이저가 응용되고 있으나 효과나 기전면에 관해서는 아직 논란의 여지가 많다. 대부분의 동물실험과 임상적 관찰에 의해 저출력레이저의 치주병소와 피부병소에 대한 창상치유촉진효과가 입증되고 있는 바, 이에 대한 세포수준의 생화학적 및 분자생물학적 차원에서의 정확한 분석이 요구되어 왔다. 최근의 문헌에 의하면 저출력레이저조사가 세포분열을 유도하고 (Clover와 Priestley, 1989; 안과 신, 1992), 모세혈관의 밀도를 변화시키며(Mester 등, 1978), 교원질의 유전자발현을 유발하고(Abergel 등, 1984), 섬유아세포의 증식을 촉진하며(안과 신, 1992; Hunter 등, 1984; Re와 Viterbo, 1985a; Re와

Viterbo, 1985b; Pourreau-Schneider 등, 1989), 치은섬유아세포내의 산화효소 및 RNA를 증가시키는 등(Chomette 등, 1987; 김과 신, 1994), 임상결과와 일치하는 시험관내실험들이 다수 보고되고 있다. 그러나 저출력레이저의 이러한 일관성 있는 창상치유촉진작용에 대한 작용기전으로는 여러가지로 추정되고 있을 뿐이며 확실한 실험결과는 매우 부족한 실정이다.

창상의 치유과정은 염증단계, 세포증식단계, 재조직화단계의 세단계를 거친다. 염증단계 및 세포증식단계에서는 증성과립구, 대식세포 등의 염증세포로부터 cytokine들이 유리되어 다양한 종류의 생물학적 활성들을 나타냄으로써 창상조직 특유의 조직변화를 야기하며, 이들 cytokine들은 섬유아세포의 증식 및 교원섬유 합성증진과 같은 활성의 변화를 일으키기도 한다. 염증세포 및 면역세포들이 유리하는 cytokine 및 growth factor들이 창상치유과정에 직접 어떠한 영향을 미치는 지에 관해서는 매우 상반된 결과들이 보고되었던 바(Lee 와 Lucas, 1977; Wahl 등, 1978; Neilson 등, 1980; Seppa 등, 1982; Narayanan 등, 1985; Leibovich와 Ross, 1976; Korm 등, 1980; Jimenez 등, 1979), 이는 단일세포의 분리방법이 실험적으로 불완전했던 까닭에 여러 종류의 세포에서 유리되는 cytokine 및 growth factor들이 복합적으로 작용하여 실험조건마다 서로 상반된 결과가 나온 때문으로 여겨진다. 그

러나 최근 완전한 세포분리방법과 생물학적 활성분석방법의 발달로 인하여, 창상치유과정에서 중성과립구 및 대식세포로부터 유리되는 basic fibroblast growth factor(BFGF), transforming growth factor-alpha(TGF- α), transforming growth factor-beta(TGF- β) 및 platelet-derived growth factor(PDGF)들이 fibrogenesis 및 angiogenesis에서 주도적 역할을 하는 것으로 밝혀졌다(Riches, 1988).

창상치유의 초기단계에 단핵세포들이 창상액에 다량으로 나타나는데, 이는 이들 세포로부터 유리되는 cytokine들이 창상치유의 주요 인자임을 간접적으로 입증하는 것이라 할 수 있다(Matsuoka와 Grotendorst, 1989). 한편 대식세포는 창상 혹은 세균감염이 있는지 상당기간이 지난 후 손상조직에 모여들어 활동을 나타냄으로써, 손상후의 육아조직 형성시기 및 섬유아세포의 증식과 활성화시기에 일치되게 작용한다. 또한 대식세포는 많은 종류의 cytokine 및 growth factor를 생산하여 대식세포, 임파구, 중성과립구 등에 autocrine 및 paracrine 기능을 나타냄으로써 면역반응을 조절할 뿐만 아니라, 섬유아세포의 세포증식과 기질성분생산 및 cytokine분비를 촉진시킴으로써 창상치유과정중 세포증식단계에서 총체적인 조절기능을 가진 세포로서 작용한다고 여겨져왔다(Parslow, 1994).

저출력레이저가 염증세포 및 면역세포에 미치는 영향은 곧 이들 세포가 유리하는 cytokine에 변화를 초래하여 결국 창상치유과정에도 영향을 미치리라고 여겨지지만, 아직까지 저출력레이저의 면역세포 및 면역세포의 기능변화에 관한 연구는 매우 미흡한 실정으로 저출력레이저가 임파구의 세포증식과 mixed-lymphocyte reaction (MLR)을 저하시켰다고 한 Ohta등(1987)의 보고 정도이다.

따라서 본 연구는 이점에 착안하여 창상치유과정의 각 단계에서 저출력레이저조사가 창상치유에 미치는 영향을 세포학적 및 분자생물학적 수준에서 밝히고자, 생검, 배양한 치은섬유아세포, 섬유아세포 line, 염증세포 line 및 면역세포 line에 저출력레이저를 조사하여 세포의 증식에

미치는 영향과 함께 세포활성화시 유도되는 유전자의 발현정도를 비교함으로써 저출력레이저 조사에 의하여 세포가 활성화되는 정도를 관찰, 분석, 평가한결과 다소의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 세포배양

실험대상세포로서의 치은섬유아세포는 건강한 치주조직에서 통상의 생검법에 의하여 채취된 치은조직으로부터 0.25% Trypsin/1mM EDTA(Sigma)로 세포를 분리한 후, Fungizone 2.5 μ g/ml(Gibco)가 포함된 배양액에서 하루동안 배양한 다음 penicillin 100U/ml, streptomycin 100 μ g/ml(Gibco) 및 fetal calf serum(FCS, Hyclone) 15%가 포함된 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, Gibco)에서 배양하였다. 실험에는 5-7 계대사이의 치은섬유아세포만을 사용하였다.

그리고 섬유아세포 line인 COS, 대식세포 line인 RAW264.7 및 promyelocytic cell line인 HL-60는 penicillin 100U/ml, streptomycin 100 μ g/ml(Gibco) 및 FCS 10%가 포함된 DMEM에서 배양하였다.

한편 B cell line인 WR19n.1, 230, helper T cell line인 Jurkat, HuT78 및 cytolytic T cell line인 CTLL-R8은 위와 동일한 항생제조건 및 FCS 10%가 포함된 RPMI1640(Gibco)에서 배양하였으며, 모든 경우 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.

2. 저출력레이저조사

본 실험에서 사용한 저출력레이저장치는 파장 830nm, 레이저조사구출력 15mW의 GaAlAs반도체출력레이저장치인 SEMICON LASER MR-180[®](Sharp Corp., Japan)이었다. 저출력레이저조사를 위하여 실험대상세포들을 800rpm으로 5분간 원심분리한 후 상청액을 제거하고 배양액

내의 phenol red에 의한 레이저흡수를 방지하기 위해 Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS)으로 세척한 다음 microtube로 옮겼다. 200xg로 5분간 원심분리하여 상청액을 제거한 후 실험조건에 따라 적당시간 (2-10분) 저출력 레이저조사를 시행하였다. 치은섬유아세포와 COS는 저출력레이저조사를 위하여 배양접시에서 떼어낼때 0.25% Trypsin/1mM EDTA를 이용하였으며, RAW264.7은 rubber policeman을, 그리고 CTLL-R8은 1mM EDTA를 이용하였다.

3. 섬유아세포와 면역세포의 [³H]-thymidine incorporation test

3-1. 저출력레이저조사에 의한 치은섬유아세포의 증식속도 변화 관찰

치은섬유아세포를 저출력레이저로 2분 및 5분간 조사한 후 3000 cell/well이 되게 96-microwell plate에 plating하여 24시간 배양하고, [³H]-thymidine (NEN) 1μCi/well로 8시간 pulse하였다. 그 다음 cell harvester(Brandel, MD, USA)로 수확한 후, Liquid scintillation counter(Beckman, LS1801)로 세포내로 편입된 radioactivity를 count하였다. 모든 실험은 triplicate로 시행하였다.

3-2. 저출력레이저조사에 의한 면역세포의 증식속도 변화 관찰

RAW264.7, HL-60, WR19n.1, 230, Jurkat, HuT78, CTLL-R8의 면역세포 line에 저출력레이저를 4분 혹은 7분간 조사한 후, 96-microwell plate의 well에 세포들을 5x10⁵ cell/well되게 위치시키고 24시간 배양한 다음, [³H]-thymidine 1 μCi/well로 8시간 pulse하였다. 그 다음 치은섬유아세포에서와 동일한 방법으로 radioactivity를 count하였다.

4. 섬유아세포와 면역세포의 Northern blot 분석

치은섬유아세포는 대조군, 저출력레이저조사

군, lipopolysaccharide (LPS, *E. coli* 0127:B8, Sigma) 1μg/ml 전처리 후 저출력레이저조사군, interleukin-1β(IL-1β, Genzyme) 2ng/ml 전처리 후 저출력레이저조사군으로 나누어 실험하였으며, LPS 및 IL-1β의 전처리는 24시간동안 시행하였다. 저출력레이저조사는 4분간 시행하였으며, 저출력레이저조사후에는 12시간 동안 통상적 배양액에 배양한 후 수확하여 RNA추출에 사용하였다.

섬유아세포 line COS는 대조군, 저출력레이저 2분 또는 5분 조사군, LPS 전처리 후 저출력레이저조사군 및 IL-β 전처리 후 저출력레이저조사군 등으로 나누어 실험하였으며, LPS 및 IL-β의 전처리 조건 및 저출력레이저조사후의 처리과정은 치은섬유아세포에서와 동일하였다.

면역세포 line RAW264.7, HL-60 및 CTLL-R8는 저출력레이저로 5분간 조사하여 통상적인 배양액에 6시간 배양한 후 수확하여 RNA추출에 사용하였다.

4-1. RNA 추출

치은섬유아세포, COS, RAW 264.7, HL-60 및 CTLL-R8 세포를 각각 자극하지 않은 세포와 자극한 세포별로 10⁷ cell씩 모아 RNA추출에 이용하였다. RNA추출은 Chomczynski와 Sacchi(1987)의 guanidium thiocyanate 추출방법을 사용하였으며 RNA추출에 사용된 모든 용액은 diethylpyrocarbonate (DEPC)로 처리한 증류수로 준비하였다. Cell을 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 후 10⁶ cell당 1ml의 solution D(4M guanidium thiocyanate, 25mM sodium citrate pH 8.0, 0.5% sarcosyl, 0.1M 2-mercaptoethanol)를 첨가하였다. 50μl의 2M sodium acetate, pH 4.0, 500 μl의 phenol, 100 μl의 chloroform-isoamylalcohol 혼합물(49:1) 등을 연속적으로 첨가하여 혼합한 후 10초동안 강하게 진탕하고 15분동안 얼음에 놓아둔 후, 4°C에서 10,000xg로 20분간 원심분리하였다. 수용액층을 다른 microtube에 옮긴 후 500 μl의 isopropanol을 첨가하여 -20°C에서 1시간 이상 놓아둠으로써 RNA를 침전시켰다. 4°C에서 10,000xg

로 20분간 원심분리한 후 침전물을 300 μ l의 0.1U/ml RNasin이 포함된 증류수에 녹이고, 20 μ l의 3M sodium acetate, pH 5.2와 900 μ l의 100% ethanol을 첨가하여 -20 $^{\circ}$ C에서 하루동안 놓아두었다. 4 $^{\circ}$ C에서 10,000xg로 15분간 원심분리하여 얻어진 RNA 침전물을 70% ethanol로 1회 세척한 후 진공건조시켜 RNasin 0.1U/ml가 포함된 증류수 20 μ l에 용해시켰다.

4-2. RNA 전기영동 및 transfer blotting

RNA에 formaldehyde, formamide, MOPS를 혼합하여 55 $^{\circ}$ C에서 15분간 denature 시킨 다음, loading buffer를 혼합하여 1.4% agarose/formaldehyde gel에서 1xMOPS buffer(0.04M morpho-linopropanesulfonic acid, pH 7.0, 50 mM sodium acetate, 5mM EDTA, pH 8.0)를 사용하여 전기영동하였다. 이 gel을 증류수로 짧은 시간동안 세척한 후 20xSSC (3M NaCl, 0.3M sodium citrate, pH 7.0)에 30분간 soaking하여 Hybond N⁺ membrane(Amersham)에 capillary transfer blotting 한 다음 membrane을 2xSSC로 세척하여 공기중에 건조시켜 80 $^{\circ}$ C에서 2시간 구웠다.

4-3. Hybridization

준비된 membrane을 sealable bag에 넣고 pre-hybridization용액 (5xSSPE, 5xDenhardt's solution, 0.5% SDS, 0.1mg/ml Salmon Sperm DNA)으로 65 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 반응시킨 후 Multiprimer DNA labelling kit(Amersham)와 [α -³²P]dCTP(Amersham)를 사용하여 만든 radioactive probe를 최종농도인 hybridization용액 ml당 4x10⁵cpm되는 양을 100 $^{\circ}$ C에서 5분간 denature시켰다. Denature시킨 probe를 hybridization solution에 첨가하여 65 $^{\circ}$ C에서 진탕하면서 16-24시간 반응시켰다. Bag에 든 용액을 제거한 후, membrane을 제조회사의 설명서에 따라 세척하여 -80 $^{\circ}$ C에서 X-Omat AR film(KODAK)에 7일 동안 감광시켰다.

4-4. DNA probe

Hybridization에 사용한 cDNA probe는 heat shock protein 70(Hsp70), IL-1 β , macrophage inflammatory protein(MIP)-1 α , β -actin 등이었다.

Table 1. Radioactivity incorporated into low level laser-irradiated or -unirradiated gingival fibroblasts

[³ H]-thymidine incorporation (cpm)			
	unirradiated control	irradiated (2min)	irradiated (5min)
	595	930	766
	595	907	795
	697	1007	819
	568	851	923
	592	710	736
	586	834	1011
Mean \pm SD	606 \pm 46	873 \pm 101 ^a	841 \pm 105 ^a

a : p<0.001 when compared with unirradiated control

III. 결 과

치은섬유아세포의 세포증식에 대하여 저출력 레이저조사가 미치는 영향을 관찰한 결과, 대조군 606 \pm 46 cpm에 비하여 2분 조사군 873 \pm 101cpm, 5분 조사군 841 \pm 105 cpm으로 각각 44%, 39%의 통계적으로 유의한 세포증식촉진결과를 나타내었으며, 조사기간의 변화에 의한 차이는 거의 없었다(Table 1). 또한 치은섬유아세포 및 섬유아세포 line COS에 저출력레이저를 조사하여, 세포증식과 관계있는 것으로 알려진 Hsp70 유전자의 발현정도를 상호비교한 결과(Fig. 1A~1B), 치은섬유아세포의 경우 저출력레이저를 조사하였을 때 Hsp70의 발현이 증가했지만, LPS 및 IL-1 β 의 전처치시 더 이상의 발현증가가 없었다(Fig. 1A). COS의 경우도 마찬가지로 양상을 보였으며, 저출력레이저조사시간에 따라 별다른 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 1B).

여러 면역세포 line에 저출력레이저를 조사하

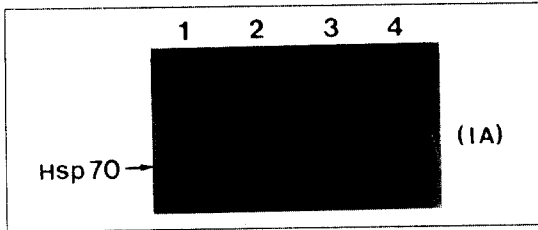


Fig. 1A. Effects of low level laser irradiation on the heat shock protein 70(Hsp70) gene expression of gingival fibroblasts

1. Control
2. 4 minutes irradiation
3. LPS pretreatment and 4 minutes irradiation
4. IL-1 β pretreatment and 4 minutes irradiation

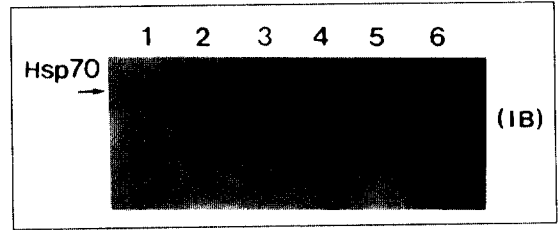


Fig. 1B. Effects of low level laser irradiation on the Hsp 70 gene expression of COS cells

1. Control
2. 2 minutes irradiation
3. LPS pretreatment and 2 minutes irradiation
4. IL-1 β pretreatment and 2 minutes irradiation
5. 5 minutes irradiation
6. LPS pretreatment and 5 minutes irradiation
7. IL-1 β pretreatment and 5 minutes irradiation

였을때 세포증식에 미치는 영향을 관찰한 결과 (Table 2, Fig.2), 대식세포 line인 RAW 264.7의 경우 약 3배의 증식촉진효과를 나타냈으며, promyelocytic cell line인 HL-60의 경우에는 약 7 배 이상의 증식촉진작용을 나타내어 모든 실험 대상세포 중 가장 현저한 증식촉진효과를 보였다. 그러나 B cell line인 WR 19n.1과 230, helper T cell line인 Junkat과 HuT 78, cytolytic T cell line인 CTLL-R8 등의 경우에는 모두 비조사군에 비하여 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

면역세포중 저출력레이저조사로 세포증식이 크게 증가되었던 RAW 264.7과 HL-60 그리고 별차이를 보이지 않았던 CTLL-R8에 대하여 세포활성화시에 흔히 발현유도되는 유전자들의 발현 정도를 관찰한 결과(Fig. 3), Hsp70유전자는 RAW 264.7과 HL-60에 저출력레이저조사를 한 경우 유전자발현이 증가하였다(Fig. 3A). MIP-1 α 는 대식세포 line인 RAW 264.7에서만 저출력 레이저조사시에 발현유도되었으며(Fig. 3B), IL-1 β 는 RAW 264.7의 저출력레이저조사시에 발현 유도가 크게 일어났으나 HL-60에서는 별 차이 없이 미약한 발현이 있었고, CTLL-R8에서는 발

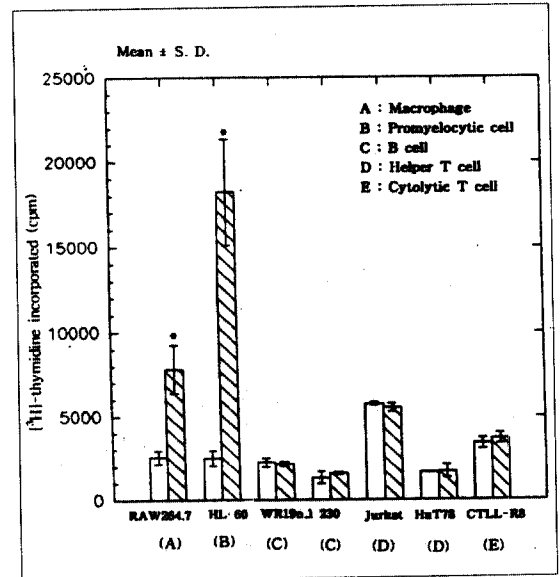


Fig. 2. Effects of low level laser irradiation on the proliferation rate of various immune cells

□ : unirradiated

▨ : irradiated

*: p<0.001 when compared with respective unirradiated control

Table 2. Radioactivity incorporated into low level laser-irradiated or -unirradiated various immune cells

Cell Type	Cell	^3H -thymidine incorporation(cpm)	
		irradiation	
		-	+
Macrophage	RAW264.7	2,557±400	7,825±1431 ^a
Promyelocytic	HL-60	2,496±438	18,240±3115 ^a
B cell	WR19n.1	2,236±247	2,148±126
	230	1,321±359	1,582±70
Helper T cell	Jurkat	5,726±87	5,507±245
	HuT78	1,647±23	1,712±388
Cytolytic T cell	CTLL-R8	3,383±316	3,681±314

(n=3) Mean ± SD

a : p<0.01 when compared with unirradiated control

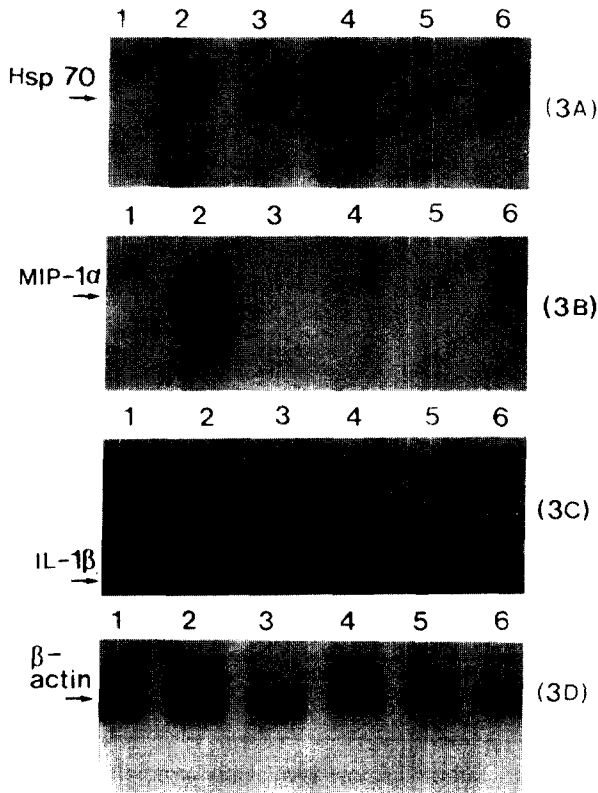


Fig. 3 A-D. Effects of low level laser irradiation on the Hsp 70 gene expression of various immune cells

1. unirradiated RAW 264.7 2. irradiated RAW 264.7
3. unirradiated HL-60 4. irradiated HL-60
5. unirradiated CTLL-R8 6. irradiated CTLL-R8

현되지 않았다(Fig. 3C). β -actin 유전자발현은 모든 경우 거의 유사하게 일어나 본 실험에 사용한 RNA의 양이 대개 일치하는것으로 관찰되었다(Fig. 3D).

IV. 고 찰

원래 레이저(LASER)란 “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation” 의 머릿글자에서 유래된 합성어로서 에너지의 유도방출에 의한 광증폭현상을 말한다. 레이저는 1917년 Einstein에 의해 그 이론적 근거가 제시된 이래 많은 학자들에 의해 이론적 측면에서 연구되어져 왔으며, 실제적으로는 1960년 처음으로 Maiman에 의해 루비결정을 이용한 레이저가 개발된 이후(Maiman, 1960) 현재 여러종류의 레이저가 개발, 활용되고 있다. 레이저의 의학적 응용 측면에서 개발초기에는 고출력레이저에 의한 임상응용이 주류였으나, 근래 soft laser라고 불리는 low level laser(Kert와 Rose, 1989), 즉 저출력레이저가 개발됨에 따라 새로운 응용분야가 열리고 있다. 일반적으로 고출력레이저는 주로 외과적 절제목적으로 사용되며, 저출력레이저는 주로 비외과적 생체자극목적으로 사용된다.

Mester와 Yaszagi-Nagy(1971)가 레이저조사가 물리적인 창상의 치유를 촉진시킨다고 보고한 이래, 저출력레이저의 생체조직에 대한 다양

한 생체자극효과(biostimulatory effect)가 실험적으로 혹은 임상적으로 입증되었다(Mester, 1973; Mester 등, 1978; Brunner 등, 1984; 한, 1985; Cho와 Cho, 1986; Tominaga 등, 1990). 이러한 사실로부터 구강점막창상치류수단으로 저출력레이저를 응용하고자 최근 치은섬유아세포를 대상으로 한 여러 실험적 연구가 있었다(김과 김, 1987; Pourceau-Schneider 등, 1989; Skinner 등, 1992; 안과 신, 1992; 김과 신, 1994). 대부분의 연구결과는 저출력레이저를 구강영역에서 응용함에 있어 긍정적인 해답을 주는 것이었으나, 작용기전에 대한 확실한 설명이 아직 가능하지 못한 상태이다. 본 실험의 결과에서 저출력레이저조사가 치은섬유아세포의 세포증식 촉진효과를 보였으며, 치은섬유아세포 및 COS 세포의 Hsp 70 유전자 발현에도 촉진효과를 보였다. 그러나, 조사시간의 장단이 큰 영향을 미치지 않았으며, 기염증성 cytokine인 IL-1 β 의 존재에 의하여도 별다른 차이를 나타내지 않았으므로 염증상태에 있는 조직과 정상조직에서 모두 동일한 치유 촉진작용을 저출력레이저가 나타낼 수 있을 것으로 추측되었으나 그외의 다양한 조건을 부여하였을 때도 동일한 결과가 나올지에 대해서는 아직 알 수 없다.

섬유아세포는 창상치유에서 가장 중요한 역할을 하는 세포로서, 이 세포의 교원섬유발현, arrangement 및 remodelling 등이 창상조직의 생화학적 및 조직학적 현상과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되었다(Dunphy, 1963). 섬유아세포는 교원섬유 type I과 III, fibronectin, proteoglycan과 glycosaminoglycan, tenascin, elastin 및 구성교원섬유들을 포함한 기질성분을 만들어 낸다. 또한 섬유아세포는 BFGF, keratinocyte growth factor, PDGF 및 IL-1 등 여러 종류의 수용성 인자들을 생산하는 effector cell로도 작용한다(Baird와 Walicke, 1989). 섬유아세포가 내는 cytokine은 주변의 다른 섬유아세포와 대식세포 및 모세혈관의 endothelium에 영향을 주며 그외에도 plasminogen activator, plasminogen, pro-collagenase 등을 발현하여 주변 기질을 파괴시키는 작용을 한다. 섬유아세포들에 의한 기질의

발현은 세포주위의 환경 및 cytokine들에 의하여 조절된다. 창상조직에서 새로운 기질이 축적되려면, 기질형성세포, 즉 섬유아세포의 증가가 있거나, 세포당 기질의 생산이 증가하거나 혹은 기질의 파괴가 감소하여야 한다. BFGF는 기질보다는 세포수의 증가를 일으키며, 반면에 TGF- β 는 창상조직에서 기질의 양을 증가시키는 것으로 보고되었다(Broudley, 1989). TGF- β 는 초기에는 chemoattractant로서 작용하지만(Groten-dorst 등, 1989; Brandes 등, 1991), 후에는 기질의 축적, 즉 fibronectin, 교원섬유, elastin, decorin 등의 생산을 섬유아세포에서 촉진하는 것으로 보고되었다(Roberts와 Sporn, 1987).

창상치유의 염증단계 및 세포증식단계에서 활성화된 면역세포가 다양한 cytokine 및 growth factor를 내어, 이들이 섬유아세포의 활동 및 증식속도에 자극효과를 나타내는데, 저출력레이저 조사의 섬유아세포에 대한 직접적 자극효과로 생각되어지는 증식촉진 및 유전자발현유도 이외에도, 면역세포활성화를 통한 간접적 섬유아세포 활성화작용도 무시할 수 없다. 그러나 면역세포활성에 관한 저출력레이저조사의 영향에 관하여는 거의 알려진 바 없다.

창상치유는 염증세포, 면역세포, 간엽(mesenchymal)세포 및 상피세포 사이에 positive 또는 negative한 신호들이 유통됨으로써 여러 생물학적 활성들이 서로 중첩되어 연속해서 일어나는 일련의 과정이다. 대부분의 신호계는 세포막의 수용체를 매개로 하여 그 신호가 세포내로 전달됨으로써 표적세포에서의 대사와 transcription 활성에 변화를 유도하는 것으로 알려져 있다. 이러한 신호전달의 기전으로는 생물학적 활성물질 혹은 면역매개체가 존재하거나, 국소적 유전자 발현이 있는 것에 기인한다고 알려져 있다. Cytokine들은 표적세포에 작용하여 또한 cytokine의 발현을 조절하기도 함으로써 신호체계가 매우 복잡한 양상을 띠게 된다(Davidson, 1992).

조직에 손상이 있게되면 손상된 조직에서 혈장액이 혈관밖으로 빠져나와 intrinsic 및 extrinsic 혈관응고기전과 complement cascades가 시작되게 되며, 창상치유에 필요한 주요 initiator

들이 유리되어 나온다(Grotendorst, 1992). 즉, 초기단계에서 혈소판은 TGF- α , PDGF, platelet-derived endothelial cell growth factor 및 mitogen들을 매우 빠르게 유리시킨다. 이 인자들은 섬유아세포와 같은 세포의 수용체와 특이적으로 작용하여 세포분열 및 세포의 이동을 유발시킨다. 염증단계가 진행됨에 따라 중성과립구와 대식세포가 BFGF, TGF- β , PDGF 및 TGF- α 등을 포함한 mitogen 및 angiogenic factor들을 생산해낸다(Riches, 1988). 창상치유의 초기단계에 단핵세포들이 창상액으로부터 다량 검출된다는 것으로부터 이 세포들이 유리하는 PDGF, TGF- β , TGF- α 를 포함한 cytokine의 활성이 창상치유과정에 중요한 역할을 하리라는 것을 유추할 수 있다(Matsuoka와 Grotendorst, 1989). 또한 염증단계에서는 주위 결합조직의 파괴와 재생이 일어나는데, 기질이 파괴되면서 sequester 형태로 기질의 proteoglycan에 강하게 결합되어 있던 BFGF와 TGF- β 의 유리가 일어난다(Ruoslahti와 Yamaguchi, 1991). 또한 섬유아세포도 BFGF와 FGF homologue, keratinocyte growth factor, TGF- β 및 PDGF를 생산하며, endothelial cell은 PDGF와 TGF- β 를 생산하고, 두 세포들간의 상호작용으로 이들 factor들의 발현이 조절된다. 창상치유의 신호단계는 다중성(multiplicity)을 나타내며, BFGF(Broadly 등, 1989)와 TGF- β (Shah 등, 1992)가 창상치유의 초기단계에서 특히 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. 또한 창상치유에 관계하는 cytokine들 사이에는 뚜렷한 중복성(redundancy)을 나타내어, 매우 다양한 종류의 수용체를 매개로 한 자극들이 섬유아세포증식 및 모세혈관 증식과 같이 중요한 사건을 유발하는 신호전달체계를 동일하게 활성화 시킬 수 있다.

감염이나 이물질과 같은 만성적인 자극이 없으면 중성 과립구는 창상조직에서 사라지고 점차 대식세포가 조직재건과정을 진행하게 된다(Riches, 1988). 이 세포들은 기질파괴산물 및 TGF- β 와 같이 이미 존재하는 인자들에 의하여 창상조직으로 모여드는데, 창상치유에 있어서 대식세포는 rate-limiting effector cell의 역할을

하는 것으로 알려져 있다(Leibovich와 Ross, 1975). 반면에 중성 과립구를 실험적으로 제거하여도 창상치유의 속도에는 별다른 변화가 없으며, 대식세포는 BFGF, TGF- β 및 PDGF-like molecules를 포함한 growth factor와 cytokine들의 가장 중요한 source로 알려져 있으며(Wahl 등, 1987; Wahl 등, 1989), 이 인자들은 fibroplasia와 angiogenesis가 활성화되는데 없어서는 안되는 인자로 작용한다. 대식세포는 중성 과립구보다 창상조직에 오래 남아있으면서 섬유아세포, 임파구 및 중성 과립구들과 조화된 상호작용을 이루는 것으로 보인다.

중성 과립구와 대식세포는 모두 숙주방어기전에서 중요 탐식세포로서 작용하지만, 그 기능에 있어서는 큰 차이를 보인다. 즉, 중성 과립구는 염증단계의 초기인 1-2일 사이에 창상부위 혹은 염증부위에 모여들어 격렬한 탐식반응과 탐식물의 소화작용을 일으키는 반면, cytokine을 유리하여 염증반응을 다양화시키는 작용은 매우 미흡하여, 염증단계의 초기에만 단순하고 격렬한 조직변화를 일으킬 뿐이다. 이와 달리 대식세포는 손상부위에 최대로 모여드는 시기가 7-10일 정도로서 손상후의 육아조직형성시기 및 섬유아세포의 증식과 활성화 시기에 일치하며, 또한 IL-1 β , MIP-1 α , MIP-1 β , TNF- α , IL-6를 비롯한 기염증성 cytokine 이외에도 TGF- β , PDGF, FGF와 같은 growth factor를 내어 임파구, 섬유아세포를 비롯한 손상주위의 세포들에 지대한 영향을 줌으로써, 매우 다양하게 염증 및 창상치유의 현상을 조절하는 기능을 갖는다(Parslow, 1994).

본 실험에서 저출력레이저조사로 가장 큰 세포증식촉진효과를 나타내었던 면역세포는 RAW 264.7과 HL-60 이었다. HL-60은 미분화된 promyelocytic cell line으로서 과립구나 대식세포로 될 전구세포인 셈이며 RAW 264.7은 대식세포 line이다. 유전자발현유도정도도 대식세포에서 가장 저출력레이저조사에 의한 영향을 크게 받는 것으로 나타났다. 창상치유과정에서 가장 영향력있게 작용하는 면역세포들에 저출력레이저 조사의 효과가 가장 컸다는 것은 매우 시사하는

바가 크다. 그러나 면역세포의 증식촉진 자체보다도 면역세포가 활성화되어 어떠한 종류의 cytokine을 유리하고 그들이 섬유아세포의 활성화 및 증식에 어떠한 영향을 미치는가가 더 중요한 문제이다. 따라서 이들 두 종류의 세포에 저출력레이저를 조사하여 유리되는 cytokine 종류를 알아내는 일이 다음에 시행해야 할 과제이다. 창상치유과정은 생물학적으로 매우 다양한 분야에서 흥미를 갖고 접근할 수 있는 현상으로서 지난 50년간 결체조직의 생화학적 반응과 세포증식 및 분화를 조절하는 기전에 대한 지식이 점차 증가하면서, 이 과정을 좀더 효율적으로 다루기 위하여 많은 노력이 기울어져 왔다. 최근에는 염증매개체, cytokines, attachment factors 및 세포 수용체들을 통한 신호전달 등에 대한 지식이 확장되어(Clark와 Henson, 1988; Cohen등, 1991; Hunt등, 1988; Goss, 1980) 복잡하고 임상적으로 큰 의미를 지닌 이 생물학적 현상을 분석하고 치료에 더 효율적으로 응용할 수 있는 기회가 올 것으로 기대된다. 본 실험 결과로서 추정할 수 있는 사실은 저출력레이저조사가 면역세포, 특히 대식세포를 활성화시켜 섬유아세포의 세포증식 및 기질생산능력효과를 유발시키는데 기여함으로써 창상치유촉진효과를 나타내며, 섬유아세포에 대한 직접적 자극효과와 더불어 면역세포 활성화를 통한 간접적 자극효과가 부가적으로 작용할 것이라는 점이다. 그러나 창상치유촉진작용에서 직접효과와 간접효과가 각각 어느 정도의 지분으로 영향력을 발휘하는가를 밝혀내어, 창상치유 촉진을 위해 더 효율적으로 응용할 수 있는 특이한 방법을 찾아내는 일이 본 실험의 결과를 이용하여 앞으로 추진해 나가야 할 연구과제일 것으로 사료된다.

V. 결 론

저자는 저출력레이저의 창상치유촉진작용기전을 세포학적 및 분자생물학적 수준에서 규명하기 위하여, 저출력레이저(GaAlAs, 830nm, 15mW)를 생검, 배양한 치은섬유아세포, 섬유아세포 line, 염증세포 line 및 면역세포 line에 조사하

여 세포활성에 미치는 영향을 관찰, 분석, 평가한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 저출력레이저 조사시 치은섬유아세포의 증식속도가 약 40% 증가하였다. 그러나, 조사시간(2분, 5분)에 따른 차이는 없었다.
2. 저출력레이저조사시 치은섬유아세포의 Hsp 70 유전자발현이 증가하였다. 그러나, LPS 및 IL-1 β 전처치시 더 이상의 발현증가는 없었다.
3. 저출력레이저조사시 섬유아세포 line인 COS 세포의 Hsp70 유전자발현이 증가하였다. 그러나, LPS 및 IL-1 β 전처치시 더 이상의 발현증가는 없었으며, 조사시간(2분, 5분)에 따른 차이도 없었다.
4. 저출력레이저조사에 의해 통계적으로 유의한 세포증식촉진효과를 보인 면역세포는 대식세포 line인 RAW 264.7과 promyelocytic cell line인 HL-60와 이었다. 그러나, B cell line인 WR19n.1 및 230, helper T cell line인 Jurkat 및 HuT 78, cytolytic T cell인 CTLL-R8 등은 변화가 없었다.
5. 저출력레이저조사시 Hsp70유전자발현은 RAW 264.7과 HL-60에서 증가되었으나 CTLL-R8에서는 발현되지 않았다. IL-1 β 와 MIP-1 α 유전자는 RAW 264.7에서만 발현유도 되었다.

이상의 결과로부터 저출력레이저조사의 면역세포, 특히 대식세포에 대한 활성화효과가 창상치유촉진작용에 기여하는 것으로 추정된다.

참 고 문 헌

1. Abergel, R.P., Lam, T.S. and Meeker, C.A., et. al. : Biostimulation of procollagen production by low energy lasers in human skin fibroblast culture, Clin. Res., 32 : 567, 1984.
2. Baird, A. and Walicke, P.A. : Fibroblast growth factors, Br. Med. Bull., 45 : 438, 1989.
3. Banda, M.J., Knighton, D.R., Hunt, T.K. and Werb, Z. : Isolation of a non-mitogenic angiogenesis factor from wound fluid, Proc. Natl. Acad. Sci., 79

- : 7773, 1982.
4. Brandes, M.E., Mai, U.E., Ohura, K. and Wahl, S.M. : Type I transforming growth factor-beta receptors on neutrophils mediate chemotaxis to transforming growth factor-beta, *J. Immunol.*, 147 : 1600, 1991.
 5. Broadley, K.N., Aquino, A.M. and Woodward, S.C., et. al. : Monospecific antibodies implicate basic fibroblast growth factor in normal wound repair, *Lab. Invest.*, 61 : 571, 1989.
 6. Broudeley, K.N., Aquino, A.M. and Hicks, B., et. al. : The diabetic rat as an impaired wound healing model ; Stimulatory effects of transforming growth factor-beta and basic fibroblast growth factor, *Biotech. The.*, 1 : 55, 1989.
 7. Brunner, R., Haina, D., Landhaler, M., Waidelech, W. and Braun Falco, O. : Applications of laser light of low powers density-Experimental and clinical investigations, *Chir. Probl. Derm.*, 15 :111, 1984.
 8. Cho, B.Y. and Cho, J.O. : Experimental study on the effect of the laser irradiation in treating oral soft tissue wound, *J. Dent. Res.*, 65 : 600, 1986.
 9. Chomczynski, P. and Sacchi, N. : Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal. Biochem.*, 162 : 156, 1987.
 10. Chomette, G., Auriol, R.M. and Zeitoun, R., et al. : Effect du soft laser sur le tissu conjonctif gingival. I. Effect sur les fibroblastes, Etude histoenzymologique et de microscopie electronique, *J. Biol. Buccale.*, 15 : 45, 1987.
 11. Clark, R.A.F. and Henson, P.M., eds, *The molecular and cellular biology of wound repair*, Plenum Press, New York, 1988.
 12. Clover, G.B. and Priestley, G.C. : Failure of a helium-neon laser to affect components of wound healing in vitro, *Brit. J. Dermatol.*, 121 : 179, 1989.
 13. Cohen, I.K., Lindblad, W.J. and Diegelmann, R.F., eds, *Wound repair : biomedical and clinical aspects*, 4th ed., Saunders, Orlando, 1991.
 14. Davidson, J.M. : Wound repair. In : *Inflammation basic principles and clinical correlates*, Gallin, J.I., Goldstein, I.M. and Snyderman, R., eds, Raven Press, New York, 809-820, 1992.
 15. Dunphy, J.E. : The fibroblast - A ubiquitous ally for the surgeon, *J. Engl. J. Med.*, 268 : 1367, 1963.
 16. Goss, R.J. : Prospects of regeneration in man, *Clin. Orthop.*, 151 : 270, 1980.
 17. Grotendorst, G.R., Grotendorst, C.A. and Gilman, T. : Production of growth factors (PDGF & TGF) at the site of tissue repair. In : *Biological and clinical aspects of tissue repair*, vol. 266, Hunt, T.K., Pines, E., Barbul, A., eds, Alan R Liss, New York, 47, 1988.
 18. Grotendorst, G.R. : Chemoattractants and growth factors In : *Wound healing : Biochemical and clinical aspects*, Cohen, I.K., Diegelmann, R.F. and Lindblad, W.J., eds, WB Saunders, Philadelphia, 237-246, 1992.
 19. Hunt, T.K., Pines, E. and Barbul, A., eds, *Biological and clinical aspects of tissue repair : Progress in clinical and biological research*, vol. 266, Alan R Liss, New York, 1988.
 20. Hunt, T.K. : Vascular factors govern healing in chronic wounds, *Prog. Clin. Biol. Res.*, 365:1,1991a.
 21. Hunt, T.K. : Wound fluid : The growth environment. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 365 : 223, 1991b.
 22. Hunter, J., Leonard, L. and Wilson, R., et al. : Effects of low energy laser on wound healing in a porcine model, *Laser Surg. Med.*, 3 : 285, 1984.
 23. Jimenez, S.A., McArthur, W. and Rosenbloom, J. : Inhibition of collagen synthesis by mononuclear cell supernates, *J. Exp. Med.*, 150 : 1421, 1979.
 24. Kert, J. and Rose, L. : Clinical laser therapy-Low level laser therapy, *Scandinavian Medical Laser Technology*, Copenhagen, 1989.
 25. Knighton, D.R. and Fiegel, V.D. : Macrophage-derived growth factors in wound healing : Regulation of growth factor production by the oxygen microenvironment, *Am. Rev. Respir. Dis.*, 140 : 1108, 1989.
 26. Korm, J.H., Halushka, P.V. and LeRoy, E.C. : Mononuclear cell modulation of connective tissue function, Suppression of fibroblast growth by stimulation of endogenous prostaglandin production , *J. Clin. Invest.*, 65 : 543, 1980.
 27. Lee, S.C. and Lucas, Z.J. : Regulatory factors produced by lymphocytes. II. Inhibition of cellular DNA synthesis associated with a factor inhibiting DNA polymerase α activity, *J. Immunol.*, 118 : 88, 1977.
 28. Leibovich, S.J. and Ross, R. : A macrophage-dependent factor that stimulates the proliferation of

- fibroblast in vitro, *Am. J. Pathol.*, 84 : 501, 1976.
29. Leibovitch, S.J. and Ross, R. : The role of the macrophage in wound repair : A study with hydrocortisone and antimacrophage serum, *Am. J. Pathol.*, 78 : 71, 1975.
 30. Maiman, T.H. : Stimulated optical radiation in ruby, *Nature*, 187 : 493, 1960.
 31. Matsuoka, J. and Grotendorst, G.R. : Two peptides related to platelet-derived growth factor are present in human wound fluid, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86 : 4416, 1989.
 32. Mester, E. and Yaszagi-Nagy, E. : The effect of laser radiation on healing and collagen synthesis, *Studia. Biophysica.*, 35 : 227, 1971.
 33. Mester, E., Nagylucskay, E., Tisza, S. and Mester, A. : Stimulation of wound healing by means of laser rays—Investigation of the effect of immune competent cells, *Acta. Chir. Acad. Sci.*, 19 : 163, 1978.
 34. Mester, E. : Stimulation of wound healing by means of laser rays (Clinical and EM study), *Acta. Chir. Acad. Sci.*, 14 : 347, 1973.
 35. Narayanan, A.S., Voss, T. and Page, R.C. : Transcriptional regulation of fibroblast collagen synthesis by activated mononuclear cell supernatants, *Biochem. Biophys. Comm.*, 131 : 1028, 1985.
 36. Neilson, E.G., Jimenez, S.A. and Phillips, S.M. : Cell-mediated immunity in intestinal nephritis III. T lymphocyte-mediated fibroblast proliferation and collagen synthesis : an immune mechanism for renal fibrogenesis, *J. Immunol.*, 125 : 1708, 1980.
 37. Ohta, A., et al. : Inhibition of lymphocyte proliferation with low level laser, *Lasers in Surg. Med.*, 7 : 199, 1987.
 38. Parslow, T.G. : The phagocytes : Neutrophils & macrophages. In : *Basic & Clinical Immunology*, Stites, D.P., Terr, A.I., and Parslow, T.G., eds, Lange Medical Book, Connecticut, 9-21, 1994.
 39. Pierce, G.F., Vande Berg, J.S., Rudolph, R., Tarpley, J. and Mustoe, T.A. : Platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor beta selectively modulate glycosaminoglycans, collagen, and myofibroblasts in excisional wounds, *Am. J. Pathol.*, 138 : 629, 1991.
 40. Pourreau-Schneider, N. Soudry, M., Remusat, M., Franquin, J.C. and Martin, P.M. : Modifications of growth dynamics and ultrastructure after helium-neon laser treatment of human gingival fibroblasts, *Quintessence* 20 : 887, 1989.
 41. Re, F. and Viterbo, S. : Amalisi delo degli effetti biologici dei soft laser, *Menerva Stomatol.*, 34 : 357, 1985.
 42. Re, F. and Viterbo, S. : Indicazionki selluso della soft lase terapia in odonostomatologia, *Menerva Stomatol.*, 34 : 563, 1985.
 43. Riches, D.W.F. : The multiple roles of macrophages in wound healing. In : *The molecular and cellular biology of wound repair*, Clark, R.A.F., Henson, P.M., eds, Plenum Press, New York, 213-242, 1988.
 44. Roberts, A.B. and Sporn, M.B. : Transforming growth factor-beta : Potential common mechanisms mediating its effects on embryogenesis, inflammation-repair, and carcinogenesis, *Int. J. Radiat. Appl. Instrum[B]*, 14 : 435, 1987.
 45. Ruoslahti, E. and Yamaguchi, Y. : Proteoglycans as modulators of growth factor activities, *Cell*, 64 : 867, 1991.
 46. Seppa, H., Grotendorst, G., Seppa, S., Schiffmann, E. and Martin, G.R. : Platelet-derived growth factor is chemotactic for fibroblasts, *J. Cell Biol.*, 92 : 584, 1982.
 47. Shah, M., Foreman, D.M. and Fergysonm M.W. : Control of scanning in adult wounds by neutralizing antibody to transforming growth factor beta, *Lancet*, 339 : 213, 1992.
 48. Skinner, S.M., Gage, J.P., Wilce, P.A. and Shaw, R.M. : Effect of laser radiation on collagen metabolism in cell culture, *J. Dent. Res.*, 71 : 981, 1992.
 49. Tominaga, R., Kuroda, T. and Yamamoto, H.I. : Effect of He-Ne laser on cultured fibroblases of palatal wounds, *J. Dent. Res.*, 69 : 1055, 1990.
 50. Wahl, S.M., Hunt, D.A. and Wakefield, L.M., et al. : Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84 : 5788, 1987.
 51. Wahl, S.M., Wahl, L.M. and McCarthy, J.B. : Lymphocyte-mediated activation of fibroblast proliferation and collagen production, *J. immunol.* 121 : 942, 1978.
 52. Wahl, S.M., Wong, H. and McCartney, F.N. : Role of growth factors in inflammation and repair.
 53. 김기석, 김생관 : 치은섬유아세포 (gingival fibroblast

-
-)에 대한 저출력레이저광의 효과에 관한 실험적 연구, 대한구강내과학회지 12(1) : 17, 1987.
54. 김정민, 신금백 : 저출력레이저조사와 염증성 자극물질이 치은섬유아세포의 유전자 발현에 미치는 영향에 관한 실험적 연구, 대한구강내과학회지, 19(2) : 57, 1994.
55. 안낙현, 신금백 : 저출력레이저가 성인의 치은섬유아세포의 성장양상과 미세구조에 미치는 영향에 관한 실험적 연구, 대한구강내과학회지 17(2) : 129, 1992.
56. 한응렬 : 레이저 조사가 구강연조직 창상치유에 미치는 영향에 관한 시험적 연구, 조선대학교, 1985.

ABSTRACT

Effects of Low Level Laser on the Proliferation and Gene Expression of Fibroblasts and Immune Cells

Ik-Jun Lim, D.D.S., M.S.D., **Keum-Back Shin**, D.D.S., M.S.D., Ph.D.,
Bok Choi, D.D.S., M.S.D.

Department of Oral Medicine, College of Dentistry, Chonbuk National University

The growth and synthetic activities of fibroblasts are regulated by cytokines and growth factors derived from activated inflammatory cells. Stimulatory effect of low level laser (LLL) radiation on wound healing seems to be in part due to direct stimulatory action on cell proliferation and synthetic activities of fibroblasts. Also indirect stimulatory effect on the fibroblast function through inflammatory or immune cells is another possible mechanism of biostimulatory action of LLL. This study was performed to determine the growth rate of human gingival fibroblasts obtained biopsy and culture, fibroblast cell line, and immune cell line by using [³H]-thymidine incorporation test. And gene expression pattern was also analyzed by using the DNA probe such as Hsp70, IL-1 β , MIP-1 α and actin cDNA. Proliferation rate of gingival fibroblast was increased by LLL irradiation, but no more effect was added by LPS or IL-1 β pretreatment. Enhanced Hsp70 gene expression was found from gingival fibroblasts and fibroblast cell line COS by LLL irradiation, which was not more increased by LPS or IL-1 β pretreatment. LLL-irradiated promyelocytic cell line HL-60 and macrophage cell line RAW264.7 showed significant stimulatory effect of proliferation rate when compared with respective control. However there were no changes in growth rate of other immune cells tested in this study, such as B cell line WR19n.1 and 230, helper T cell line Jurkat and HuT78, cytolytic T cell line CTLL-R8. By LLL-irradiation Hsp70 gene expression was increased in RAW264.7 and HL-60, not in CTLL-R8. And IL-1 β and MIP-1 α gene expression were induced only from LLL-irradiated RAW264.7. These results led us to presume that LLL radiation may affect to the immune cells, especially to macrophage, through which it might promote wound healing process.