

He-Ne 레이저 조사가 배양 섬유모세포의 활성화에 미치는 영향

원광보건전문대학 물리치료과
송인영 · 이재형

Effects of He-Ne Laser Irradiation on the Activity of the Cultured Fibroblast

Song, In-Young, Lee, Jae-Hyoung
Dept. of Physical Therapy, Wonkwang Health College

<Abstract>

The purpose of this study were to determined the effect of laser irradiation on the fibroblast activity. Cultures of 3T3 fibroblasts were subjected to Helium Neon laser(632.8 nm) irradiation of various energy density. On one, two and three consecutive days the fibroblast monolayers were irradiated for period from 0 to 32 minutes with 8 mW of average output power. The fibroblast activity was determined by the quantitative assay of MTT, SRB and NR after incubation of the fibroblasts for 24 hours. Results show that exposure duration from 2 min to 32 min could increase MTT at three consecutive days, whereas control and 1 min, one and two days irradiation had were not increased. The SRB and NR were increased at two and three consecutive days from 2 min to 32 min, whereas control and 1 min, and once radiation were not increased. These result demonstrate that energy density from 0.48 to 7.64 J/cm² could increase cellular protein contents and fibroblast activity at more than twice irradiation of laser, whereas low energy density (less than 0.24 J/cm²) and once irradiation of laser had no effect. The results suggest that the beneficial effect of the He-Ne laser with adequate dose on fibroblast activity in vitro.

Keywords : He-Ne laser, Low Level Laser Therapy, Fibroblast.

I. 서 론

1917년 Einstein이 광양자론을 발표하여 레이저의 물리적 원칙을 제시하고, 1960년 Theodoro H. Maiman이 파장 694 nm의 붉은 빛을 내는 루비 레이저를 개발하여, 1961년 신시내티대학의 레이저연구소에서 Leon Goldman 등이 레이저를 의료에 사용한 이래 오늘날 의학분야에서 여러 종류의 레이저를 다양한 목적으로 사용하고 있다. 오늘날 의료용으로 사용하고 있는 레이저는 출력을 기준으로 고출력 레이저와 저출력 레이저로 구분한다.

저출력 레이저는 출력이 1 W이하로 매우 낮아 열효과가 없으며 흔히 사용되고 있는 He-Ne(Helium-Neon) 레이저는 파장이 632.8nm로 표피층까지 침투되고, GaAlAs(Gallium-Aluminum-Arsenide) 레이저는 파장이 780-904nm로 3.5-5cm까지 침투되며, 주로 창상 치유 촉진(Enwemeka, 1988 ; Dyson과 Young, 1986)과 통증완화 (Ponnudurai 등, 1987 ; Ponnudurai 등, 1988 ; Snyder-Mackler 등, 1989, Walker, 1983 ; King, 1989, Kitchen과 Partridge, 1991 ; Beckerman, 1992) 및 레이저 침자극(Bischko, 1980 ; Brockhaus와 Elger, 1990 ; Choi 등, 1986 ; Kreczi와 Klingler, 1986 ; Kr

tlinger, 1980)을 비롯하여 여드름, 습진, 단순 포진 등의 피부 질환(Beckerman 등, 1992), 근골격계의 염증성 질환 및 손상(Olavi 등, 1989; Beckerman 등, 1992) 등의 치료 목적으로 사용되고 있으며 저준위 레이저치료 (low (reactive) level laser therapy, LLLT) 또는 저강도 레이저치료(low intensity laser therapy, LILT)라 부른다(Basford, 1986).

대체로 CO₂ 레이저와 같은 고출력 레이저는 선택적으로 콜라겐의 합성을 방해한다고 알려져 있고, He-Ne 레이저나 GaAs 레이저 등과 같은 저출력 레이저의 치료효과는 조직의 생물학적 과정을 촉진시키는 광자극 효과때문이라고 알려져 있다(Rigau, 1991).

Mester 등(1971)이 레이저를 사용하여 생쥐의 피부 창상 치유를 촉진시킨 이래 오늘날 DNA와 콜라겐 및 단백질 합성능 증가, SDH 및 APTase 등 효소 활성 증진, 육아조직 형성 촉진, 세포분열 및 상피화 촉진, 혈관신생, 혈류량 증진 등에 따라 창상치유가 촉진된다는 기전(Belkin과 Schwartz, 1989)을 근거로 레이저를 창상치유에 널리 사용하기 시작하였다.

Yu 등(1997)은 생쥐의 당뇨병성 창상에 레이저를 조사한 결과 콜라겐합성 증진, 육아조직 형성 및 상피화가 촉진되어 창상치유에 효과가 있었다고 보고하였고, Braverman 등(1989)은 토끼의 피부에 전충 창상을 유발시키고 He-Ne 레이저 조사와 He-Ne 레이저 및 반도체 레이저를 혼합 조사한 결과 창상 장력이 증가하고 치유가 촉진되었으며 이는 혈액순환 증가와 관련이 있다 하였으며, Lyons 등(1987)은 생쥐의 창상에 He-Ne 레이저를 조사한 결과 섬유모세포 활성의 증가로 콜라겐합성이 증진되어 창상 치유가 촉진된다 하였고, Saperia 등(1986)은 돼지의 등에 전충 창상을 유발시키고 He-Ne 레이저를 조사한 결과 창상 치유가 촉진되었으며 이는 섬유모세포에서 type I 및 III procollagen의 mRNA가 현저하게 증가하여 레이저가 procollagen의 유전자 발현을 자극했기 때문이라 하였고, Kana 등(1981)은 흰쥐의 창상에 레이저를 조사한 결과 콜라겐 합성율이 유의하게 증가하여 치유가 촉진되었다고 보고하는 등 *in vivo*에서 레이저가 섬유모세포의 활성을 증가시켜 창상치유를 촉진시키고 있음은 잘 알려져 있다.

그러나 Vacca 등(1993), van Breugel과 Bar(1992), Lubart(1992), Pourreau-Schneider 등(1990), Karu (1989), 김과 김(1987) 등은 배양 섬유모세포에 He-Ne

레이저 및 저출력 레이저를 조사한 결과 섬유모세포의 활성이 증가 하고 DNA와 콜라겐 및 단백질 합성능이 증가되었다고 보고하였으나 Haas 등(1990), Colver와 Priestley(1989), Hallman 등(1988), Castro 등(1983)은 He-Ne 레이저 조사가 섬유모세포의 세포 증식, 콜라겐 및 단백질 합성능에 영향을 주지 않았다고 보고하여 *in vitro*에서의 레이저효과에 대해서는 다양한 보고가 제시되고 있다. 이와 같이 배양 섬유모세포를 대상으로 한 실험에서의 상반된 견해는 레이저의 효과가 에너지 밀도에 의존하고 있기 때문이라고 본다.

따라서 본 연구에서는 He-Ne 레이저 조사가 배양 섬유모세포의 세포단백량 및 세포활성에 미치는 영향을 규명하기 위해서 3T3 섬유모세포에 7가지 에너지 밀도별로 He-Ne 레이저를 조사하고 MTT, SRB 및 NR 정량분석하였다.

II. 방 법

1. 실험재료

실험대상은 원광대학교 치과대학 구강해부학교실에서 구한 흰쥐 3T3 섬유모세포를 사용하였다.

2. 세포배양

흰쥐 3T3 섬유모세포를 배양용기(25 cm² flask, Nunc, USA)에서 stock culture한 후 3-4회 계대배양하였다. 배양액은 Eagle's minimum essential medium (EMEM, Gibco, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA)과 penicillin G(25 unit/ml), streptomycin (25µg/ml) 및 fungizone (0.25µg/ml)을 혼합하여 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂로 조성된 항온기(Shel-Lab, USA) 내에서 배양하였으며 배양액은 3일마다 교환하였다. 각 well 당 세포수는 2×10⁴개가 되도록 하였으며, 세포수는 trypsin-EDTA로 세포를 부유시킨 후 0.2% trypan blue로 염색하여 hemocytometer로 산정하였다. 24 well plate를 이용하여 1회, 2회 및 3회 조사군으로 나누었고 각 군 당 에너지밀도에 따라 7가지로 세분하여 well에 배양하였으며, 한 가지 조건 당 각각 3개씩의 well을 사용하였다.

3. 레이저조사

레이저는 파장 632.8nm의 적색빔이 연속파로 방출

되는 He-Ne 레이저 (Helium-Neon Cold Laser Stimulator, Model PDT, 泉工醫科工業株式會社, Mera, Tokyo, Japan)를 사용하였다. 최대 정점출력이 30 mW, 평균출력 8.5mW, 출력밀도 27W/cm²가 출력되는 Class IIIB의 저출력 레이저기였으며, 직경 1.6cm인 probe를 well에 접촉하여 레이저를 조사하였다. 1회 조사군은 well에 레이저를 1회만 조사하였고, 2회 조사군은 레이저 조사 24시간 후 다시 well에 레이저를 조사했으며, 3회 조사군은 24시간 간격으로 3회 레이저를 조사하였다. 레이저의 평균출력과 조사면적을 고정하고 조사시간을 조절하여 각 군의 well에 7가지의 에너지 밀도별로 각각 레이저를 조사하였다. 에너지 밀도 0.00 J/cm²를 대조군으로 하였으며, 1분 조사의 에너지 밀도는 0.24 J/cm², 2분 조사의 에너지 밀도는 0.48 J/cm², 4분 조사의 에너지 밀도는 0.96 J/cm², 8분 조사의 에너지 밀도는 1.91 J/cm², 16분 조사의 에너지 밀도는 3.82 J/cm², 32분 조사의 에너지 밀도는 7.64 J/cm²였다. 에너지 밀도는 다음과 같은 공식 [1]을 사용하여 산출, 추정하였다.

공식 [1]

$$\text{Energy Density (J/cm}^2\text{)} = \frac{\text{Average Power (W)} \times \text{Time (s)}}{\text{Area of Irradiation (cm}^2\text{)}}$$

4. 분 석

1) MTT 정량분석

Mosmann(1983)의 방법에 따라 well당 세포수를 2×10^4 cells/ml이 되도록 조절하여 1ml씩 well plate에 분주하고 24시간 배양한 후 레이저를 조사하고 24시간 동안 배양한 다음 MTT(3-4, 5dimethyl thiazol-2-YL-2,5-diphenyl tetrazolium bromide 1mg/ml, Sigma, Saint Louis, USA) 50 μ g/ml가 포함된 배양액을 well당 1ml씩 넣어 3시간 배양하였다. 배양후 배양액을 버리고 DMSO (Dimethyl sulfoxide)를 2ml/well씩 넣어 5분간 실온 방치 후 형성된 MTT formazan을 용해하여 분광 광도계(550nm)로 흡광도를 측정하였다.

2) SRB 정량분석

Well plate를 0.9% NaCl용액 1 ml로 씻은 후, 4 $^{\circ}$ C의 15% TCA(trichloroacetic acid)를 1ml 넣어 냉장실(4 $^{\circ}$ C)에서 1시간 동안 방치하여 세포를 부착시켰다. 1시간 후, TCA를 버리고 흐르는 물로 5회 수세하였다. 이를 잘 말린 후 1% 초산에 녹인 0.4% sulforhodamine

B를 200ml 취하여 각각의 well에 넣고 1시간 동안 방치하였다. 1시간 경과 후 1% 초산으로 다섯번 잘 씻어낸다. 물기를 제거한 후 말리고 적당량의 10mM Tris시약을 넣어 녹여낸 후 520nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) NR 정량분석

Borenfreund 와 Puerner(1985)의 방법에 따라 세포를 well당 2×10^4 cells/ml이 되도록 조절하여 1 ml씩 well plate에 분주하고 24시간 배양한 후 레이저를 조사하고 24시간 동안 배양한 다음 50 μ g/ml의 neutral red(Sigma, Saint Louis, USA)를 포함한 배양액을 온도 37 $^{\circ}$ C의 암소에서 overnight시킨 후 well당 1ml씩 첨가하여 3시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 배양액을 버리고 phosphate buffered saline(PBS)으로 2-3회 세척하고 1% formaldehyde-1% CaCl₂ 0.5ml/well을 넣어 세포를 고정한 후 1% glacial acetic acid-50% ethanol을 well당 2ml씩 넣어 15분간 실온에 방치하여 3시간 동안 용해소체내에 축적된 neutral red를 용출하였다. 용출된 neutral red의 흡광도는 분광 광도계(540nm)로 측정하였다.

5. 자료분석

He-Ne 레이저 조사가 배양 섬유모세포의 활성화에 미치는 영향을 파악하기 위해서 레이저의 에너지밀도에 따라 조사 횟수에 따른 MTT, SRB 및 NR치를 각각 일원 분산분석하고 Duncan 다중순위검정으로 사후검정하였으며 유의수준은 0.05로 하였다. 모든 통계분석은 SPSS/PC로 하였다.

III. 결 과

1. 1회 조사 결과

7가지의 에너지 밀도별로 레이저를 1회 조사하고 24시간 경과한 다음 측정된 MTT, SRB 및 NR의 흡광도는 Table 1 및 Fig. 1과 같았다. 레이저의 에너지 밀도에 따른 MTT, SRB 및 NR의 흡광도가 차이가 있는지를 규명하기 위해 이를 각각 일원분산분석한 결과 MTT, SRB 및 NR의 흡광도는 모두 유의한 차이가 없었다 (Table 2).

Table 1. Means and Standard Deviations of Optical Density (2×10^6 cells/ml) of MTT, SRB, and NR Assay with Various Energy Density at Once Irradiation of Laser

Energy Density (J/cm ²)	MTT	SRB	NR
0	1.58 ± 0.04	1.83 ± 0.02	1.66 ± 0.04
0.24	1.60 ± 0.03	1.85 ± 0.04	1.70 ± 0.14
0.48	1.61 ± 0.09	1.87 ± 0.01	1.74 ± 0.05
0.96	1.61 ± 0.09	1.89 ± 0.02	1.77 ± 0.08
1.91	1.57 ± 0.14	1.87 ± 0.05	1.80 ± 0.02
3.82	1.62 ± 0.04	1.80 ± 0.05	1.70 ± 0.03
7.64	1.63 ± 0.06	1.85 ± 0.05	1.71 ± 0.02

Table 2. One-way Analysis of Variance of Optical Density of MTT, SRB and NR with Various Energy Density at Once Irradiation of Laser

Source	D.F.	SS	MS	F	p
MTT	6	.0096	.0016	2.667	.9435
SRB	6	.0147	.0025	2.3295	.0902
NR	6	.0380	.0063	1.4296	.2715

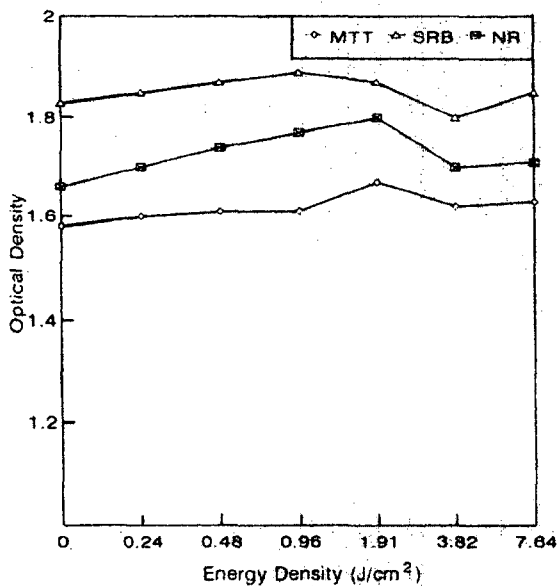


Fig. 1. Difference of Optical Density of MTT, SRB, and NR assay With Various Energy Density at Once Irradiation of Laser.

2. 2회 조사 결과

7가지의 에너지 밀도별로 24시간 간격으로 레이저를 2회 조사하고 24시간 경과한 후 측정된 MTT, SRB 및 NR의 흡광도는 Table 3 및 Fig. 2와 같았다. 이를 일원 분산분석한 결과는 MTT 흡광도는 유의한 차이가 없었으나 SRB 흡광도는 에너지 밀도에 따라 유의한 차이를 보였고($p < .01$), NR 흡광도도 에너지 밀도에 따라 유의한 차이를 보였다($p < .001$) (Table 4). 이를 Duncan 다중 범위검정한 결과 SRB 흡광도는 에너지 밀도 0.48 J/cm², 0.96 J/cm², 1.91 J/cm²에서 대조군보다 유의하게 증가하였고($p < .05$), NR 흡광도는 0.48 J/cm², 0.96 J/cm², 1.91 J/cm², 3.82 J/cm² 및 7.64 J/cm²의 에너지 밀도에서 대조군보다 유의하게 증가하였다($p < .05$).

Table 3. Means and Standard Deviations of Optical Density (2×10^6 cells/ml) of MTT, SRB, and NR Assay with Various Energy Density at Twice Irradiation of Laser

Energy Density (J/cm ²)	MTT	SRB	NR
0	1.58 ± 0.04	1.87 ± 0.03	1.63 ± 0.01
0.24	1.67 ± 0.09	1.86 ± 0.04	1.71 ± 0.05
0.48	1.69 ± 0.03	1.97 ± 0.01*	1.88 ± 0.03*
0.96	1.63 ± 0.04	1.93 ± 0.04*	1.90 ± 0.02*
1.91	1.61 ± 0.08	1.95 ± 0.01*	1.95 ± 0.04*
3.82	1.60 ± 0.08	1.89 ± 0.03	1.82 ± 0.04*
7.64	1.58 ± 0.06	1.89 ± 0.04	1.82 ± 0.09*

* : Significantly increased than control group ($p < .05$).

Table 4. One-way Analysis of Variance of Optical Density of MTT, SRB and NR with Various Energy Density at Twice Irradiation of Laser

Source	D.F.	SS	MS	F	p
MTT	6	.0341	.0057	1.4312	.2709
SRB	6	.0329	.0055	5.0852	.0058
NR	6	.2191	.0365	17.3457	.0000

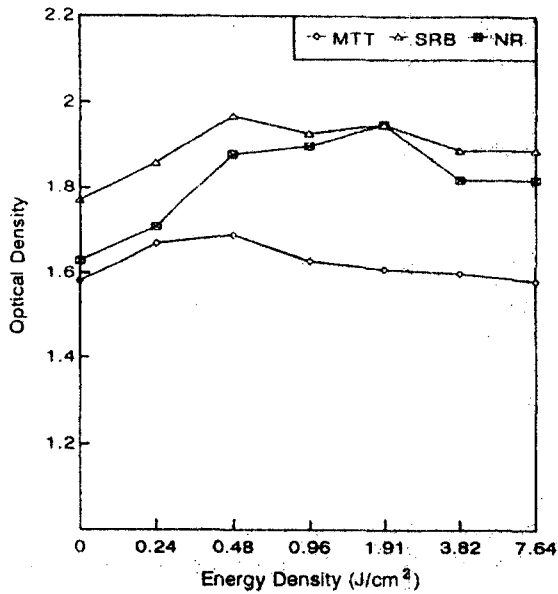


Fig. 2. Difference of Optical Density of MTT, SRB, and NR assay With Various Energy Density at Twice Irradiation of Laser.

3. 3회 조사 결과

7가지의 에너지 밀도별로 24시간 간격으로 레이저를 3회 조사하고 24시간 경과한 후 MTT, SRB 및 NR의 흡광도를 측정된 결과는 Table 5 및 Fig. 3과 같았다. 이를 일원 분산분석한 결과는 MTT 흡광도($p < .001$), SRB 흡광도($p < .01$), NR 흡광도($p < .001$) 모두 에너지 밀도에 따라 유의한 차이를 보였다(Table 6). 이를 Duncan 다중범위검정한 결과 MTT 흡광도는 에너지 밀도 0.48 J/cm² 및 1.91 J/cm²에서 대조군보다 유의하게 증가하였고($p < .05$), SRB는 에너지 밀도 1.91 J/cm²에서의 흡광도가 다른 에너지 밀도보다 유의하게 증가하였으며($p < .05$), NR 흡광도는 에너지 밀도 0.48 J/cm², 0.96 J/cm², 1.91 J/cm², 3.82 J/cm² 및 7.64 J/cm²에서 대조군보다 유의하게 증가하였다($p < .05$).

Table 5. Means and Standard Deviations of Optical Density (2×10^4 cells/ml) of MTT, SRB, and NR Assay with Various Energy Density at Three Times Irradiation of Laser

Energy Density (J/cm ²)	MTT	SRB	NR
0	1.58 ± 0.04	1.83 ± 0.04	1.65 ± 0.05
0.24	1.74 ± 0.01	1.85 ± 0.04	1.81 ± 0.06
0.48	1.82 ± 0.03	1.88 ± 0.04*	1.92 ± 0.01*
0.96	1.80 ± 0.04	1.88 ± 0.02*	1.95 ± 0.02*
1.91	1.81 ± 0.07	1.97 ± 0.01*	1.98 ± 0.07*
3.82	1.71 ± 0.07	1.88 ± 0.01	1.83 ± 0.02*
7.64	1.72 ± 0.06	1.87 ± 0.04	1.88 ± 0.06*

* : Significantly increased than control group($p < .05$).

Table 6. One-way Analysis of Variance of Optical Density of MTT, SRB and NR with Various Energy Density at Twice Irradiation of Laser

Source	D.F.	SS	MS	F	p
MMT	6	.01257	.0210	8.0688	.0007
SRB	6	.0378	.0063	6.3557	.0021
NR	6	.2188	.0365	17.6206	.0000

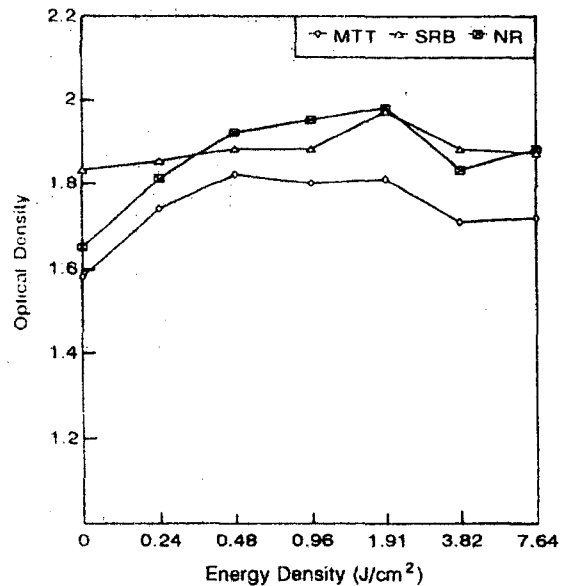


Fig. 3. Difference of Optical Density of MTT, SRB, and NR assay With Various Energy Density at Three Times Irradiation of Laser.

IV. 고 찰

MTT정량분석은 세포의 증식과 활성을 측정할 수 있는 예민한 방법으로 정량적 측정이 가능하다. 이 방법은 생존 세포내 미토콘드리아의 호박산탈수효소(succinyl dehydrogenase, SDH)에 의하여 노란색의 용해성 MTT가 청색의 불용성 MTT formazan으로 환원되는 기전에 기초하고 있으며 형성되는 formazan의 양은 생존 세포의 수에 비례한다. 따라서 MTT분석 formazan을 많이 형성하여 흡광도가 클수록 세포의 활성도가 우수하다고 할 수 있다(Mosmann, 1983). SRB정량분석법은 단층 또는 다층 배양시 모두 효율적인 방법이며 이 방법은 일반적으로 MTT분석보다 정확한 방법으로 소개되고 있으며 MTT분석과 비교하여 보면 SRB염색이 훨씬 안정적이다. 또한 사용한 plate를 수주에서 수개월까지 보관할 수 있으므로 결과가 의심스러운 경우 반복실험을 할 수 있다. 그러나 단백질을 이용한 분석이므로 처리과정이 복잡하고 여러 단계를 거치므로 과정 중에 정확한 결과를 방해할 여지가 존재하는 것이다(Keepers 등, 1991; Skehan 등, 1990). NR정량분석법은 용해소체를 이용하여 세포의 가수분해효소와 관련된 단백질량을 측정하는 것으로서, 세포단백질은 0.1 M sodium hydroxide 용액에 의하여 용해되며, 단백질의 양을 결정 할 수 있다. 세포수나 활성과 연관된 전체 단백질 양을 측정하는데는 이 방법이 간단하며 단층 배양시 특히 유리하다(Borefeund와 Puerner, 1985). 따라서 본 실험에서 He-Ne 레이저 조사가 섬유모세포의 활성에 미치는 영향을 파악하기 위해 MTT, SRB 및 NR 정량분석을 시행하였다.

본 실험 결과 레이저를 1회 조사한 경우에는 배양 섬유모세포의 활성에 영향을 주지 않았으나 레이저를 2회 조사했을 때 SRB의 흡광도가 에너지 밀도 0.48~1.95 J/cm²에서 유의하게 증가되어 세포활성이 증가하였고, 0.48~7.64 J/cm²의 에너지 밀도에서 NR 흡광도가 유의하게 증가하여 세포단백의 양이 증가되었다. 레이저를 3회 조사했을 때 에너지 밀도 0.48 및 1.95 J/cm²에서 MTT 흡광도가 유의하게 증가하고 1.95 J/cm²에서 SRB 흡광도가 유의하게 증가되어 0.48~1.95 J/cm²에 이르는 에너지 밀도에서 세포증식이 유발되었으며, 0.48~7.64 J/cm²의 에너지 밀도에서 NR 흡광도가 유의하게 증가하여 세포단백의 양이 증가되었다. 0.48~7.64 J/cm²에 이르는 에너지 밀도 특히 0.48~1.91 J/cm²의 에너지 밀

도로 2회 이상 He-Ne 레이저를 조사했을때 배양 섬유모세포의 수 및 미토콘드리아의 SDH 활성이 증가되고 세포단백량이 증가되어 3T3 배양 섬유모세포의 활성은 레이저의 에너지 밀도와 조사 빈도에 영향을 받고 있었다.

이러한 결과는 출력 12mW의 연속 He-Ne 레이저를 사용하여 5 J/cm²의 에너지 밀도로 조사한 결과 미토콘드리아의 DNA합성능이 50~60% 증가되었다는 Vacca 등(1993)의 보고, 섬유모세포에 0.55mW에서 5.98mW에 이르는 출력밀도와 30초에서 10분에 이르는 다양한 조건으로 He-Ne 레이저를 조사한 결과 2.91mW 이하의 출력밀도와 조사시간 30초 및 2분의 조건에서 섬유모세포의 증식이 유발되었다는 van Breugel과 Bar (1992)의 보고, He-Ne 레이저 조사로 세포호흡이 증가하여 세포활성이 증진되었다는 Lubart(1992)와 Karu(1989)의 보고, 섬유모세포에 1.2 J/cm² (10mW, 10분)로 He-Ne 레이저를 조사한 결과 섬유모세포의 활성이 증가하였으며 특히 4회 조사 후 현저하게 세포분열이 촉진되었다는 Soudry 등(1988)의 보고, 섬유모세포에 1.2 J/cm²로 He-Ne 레이저를 조사하고 24시간 후 섬유모세포의 활성을 대조군과 비교한 결과 현저하게 증가했다는 Pourreau-Schneider 등(1990)의 보고, 배양 치은 섬유모세포에 He-Ne 레이저 및 GaAs 레이저를 조사한 결과 레이저 조사시간이 증가함에 따라 세포의 활성이 증가하는 경향을 보였다는 양 등(1993)의 보고와 대체로 일치하고 있다.

한편 양 등(1993)은 배양 치은 섬유모세포에 여러 가지 주파수의 He-Ne 레이저 및 GaAs 레이저를 조사한 결과 레이저 조사시간이 증가함에 따라 세포의 활성이 증가하는 경향을 보였으나 세포의 수에 따라 차이가 있어 일관된 결과를 얻지 못했다고 보고하였고, Haas 등(1990)은 사람 각질세포를 배양하여 He-Ne 레이저를 조사한 결과 세포의 증식이 일어나지 않았다고 보고하였으며, Colver와 Priestley(1989)는 사람의 피부 섬유모세포에 He-Ne 레이저를 1일 3회 3일간 조사한 결과 레이저 조사가 콜라겐 합성, 글리코사미노글리칸(GAG) 합성 등에 영향을 미치지 못했다고 보고한 바 있고, Hallman 등(1988)은 0.9mW의 낮은 출력의 He-Ne 레이저가 섬유모세포의 활성에 영향을 주지 못했다고 보고했고, Castro 등(1983)은 사람 피부의 섬유모세포를 배양하여 레이저로 자극한 결과 단백질합성능이 감소하였다 보고하여 본 실험의 결과와 상반된 견해를

보이고 있다. 이와 같은 상반된 견해는 레이저의 자극 효과가 레이저 기기의 특성 및 파장에 의존(Beckerman 등, 1992; England, 1988)하고 또한 주파수, 출력밀도, 조사시간 즉 에너지 밀도와 조사횟수에 의존(Continezza 등, 1993)하고 있으며, 플라젠 합성율이 레이저의 에너지 밀도에 의존(Kana 등, 1981)하고 있음을 비추어 볼 때 이들이 사용한 레이저의 특성 및 에너지 밀도가 본 실험에서 사용한 조건과 다르고 또한 대상 세포가 달랐기 때문으로 생각된다.

배양 섬유모세포를 대상으로한 본 실험에서 레이저의 에너지 밀도와 조사 빈도에 따라 배양 섬유모세포의 활성이 영향을 받았다. 0.48 J/cm²에서부터 7.64 J/cm²에 이르는 에너지 밀도로 2회 이상 He-Ne 레이저를 조사한 결과 배양 섬유모세포의 세포수와 효소활성 및 단백질을 증가시켜 섬유모세포의 활성을 촉진시키는 자극 효과가 있음을 알 수 있었다.

레이저의 기계적 특성이 다양하기 때문에 앞으로 여러 종류의 레이저를 사용한 실험이 수행되어 섬유모세포 및 배양 섬유모세포의 활성을 촉진시키는 정확한 용량을 규명하는 실험이 이루어져 레이저의 임상치유 용량이 제시되기를 바란다.

V. 결 론

He-Ne 레이저 조사가 배양 섬유모세포의 활성에 미치는 영향을 규명하기 위해 배양 3T3 섬유모세포에 7가지의 에너지 밀도에 따라 연속과형의 He-Ne 레이저(632.8nm)를 각각 1회, 24시간 간격으로 2회 및 3회 조사하고 24시간 경과한 후 MTT, SRB 및 NR를 정량분석한 결과 1회 조사에서는 레이저가 섬유모세포의 MTT, SRB 및 NR의 흡광도에 영향을 주지 않았으나, 24시간 간격으로 2회 조사했을 때에는 SRB의 흡광도가 0.48 J/cm²~1.91 J/cm²에서, NR의 흡광도는 0.48 J/cm²에서부터 7.64 J/cm²에 이르는 에너지 밀도에서 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며 (p<.05), 24시간 간격으로 3회 조사한 경우에는 MTT의 흡광도가 0.48 J/cm² 및 1.91 J/cm²에서, SRB의 흡광도는 1.91 J/cm²에서, NR의 흡광도가 0.48 J/cm²에서부터 7.64 J/cm²에 이르는 에너지 밀도에서 대조군에 비해 유의하게 증가하였다 (p<.05). 이러한 결과는 2회이상 자극한 경우에 0.48 J/cm²~1.91 J/cm²의 에너지 밀도에서 섬유모세포의 수 및 미토콘드리아 SDH활성이 증가하고 0.48 J/cm²에서부터 7.64 J/cm²에 걸친 에너지 밀도에서 세포단백량이 증가하여 He-Ne 레이저가 배양 섬유모세포의 활성을 촉진시켰다는 결론을 얻었다.

참 고 문 헌

- 김기석, 김생곤: 치은 섬유아세포에 대한 저출력 레이저 광의 효과에 대한 실험 적 연구. 대한구강외과 학회지 12: 17-25, 1987.
- 양근영, 한경수, 신민: 저출력 레이저조사가 배양 섬유아세포의 생존력에 끼치는 영향에 관한 실험적 연구. 원광치의학잡지 3: 235-243, 1993.
- Basford, J.R.: Low-energy laser treatment of pain and wounds. Mayo Clin Proc 61: 671-675, 1986.
- Beckerman, H., de Bie, R.A., Bouter, L.M., De Cuyper, H.J., & Oostendrop, R.A.B.: The efficacy of laser therapy for musculoskeletal and skin disorders: A criteria-based meta-analysis of randomized clinical trials. Phys Ther 72: 483-491, 1992.
- Belkin, M., & Schwartz, M.: New biological phenomena associated with laser radiation. Health Phys 56: 687-690, 1989.
- Bischko, J.: Use of laser in acupuncture. Acupunct Electrother Res Int J 5: 29-40, 1980.
- Borenfreund, E., & Puerner, J.A.: Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicol Lett 24: 119-124, 1985.
- Braverman, B., McCarthy, R.J., Ivankovich, A.D., Forde, D.E., Overfield, M., & Bapna, M.S.: Effect of helium-neon and infrared laser irradiation on wound healing in rabbits. Lasers in Surg Med 9: 50-8, 1989.
- Brockhaus, A. & Elger, C.E.: Hypalgesic efficacy of acupuncture on experimental pain in man. Comparison of laser acupuncture and needle acupuncture. Pain 43: 181-185, 1990.
- Castro, D.J., Abergel, R.P., Meeker, C., Dwyer, R.M., Lesavoy, M.A., & Uitto, J.: Effects of the Nd:YAG laser on DNA synthesis and collagen production in human skin fibroblast cultures. Ann Plast Surg 11: 214-222, 1983.
- Choi, J.J., Srikantha, K., & Wu, W.H.: A comparison of electro-acupuncture, tanscutaneous electrical nerve stimulation and laser photo-biostimulation on pain relief and glucocorticoid excretion. Acupunct Electrother Res 11: 45-51, 1986.
- Colver, G.B. & Priestley, G.C.: Failure of a helium-neon laser to affect components of wound healing in vitro. Br J Dermatol 121: 179-186, 1989.

- Continenza, M.A., Ricciardi, G., & Franchitto, A. : Effects of low power 904nm radiation on rat fibroblasts explanted and in vitro cultured. *J Photochem Photobiol B* 19 : 231-234, 1993.
- Dyson, M., & Young, S. : The effect of laser therapy on wound contraction and cellularity in mice. *Lasers Med Sci* 1 : 125-130, 1986.
- England, S. : Introduction to mid laser therapy. *Physiother* 74 : 100-102, 1988.
- Enwemeka, C.S. : Laser biostimulation of healing wounds : Specific effects and mechanisms of action. *J Orthop Sports Phys Ther* 9 : 333-338, 1988.
- Haas, A.F., Isseroff, R.R., Wheeland, R.G., Rood, P.A., & Graves, P.J. : Low-energy helium-neon laser irradiation increase the motility of cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 94 : 822-826.
- Hallman, H.O., Basford, J.R., O'Brien, J.F., & Cumming, L.A. : Dose low-energy helium-neon laser irradiation alter in vitro replication of human fibroblasts? *Lasers Surg Med* 8 : 125-129, 1988.
- Kana, J. S., Hutschenreiter, G., Haina, D., & Waidelich, W. : Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. *Arch Surg* 116 : 293-296, 1981.
- Karu, T. : Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys* 56 : 691-704, 1989.
- Keepers, Y.P., Pizao, P.E., Peters, G.J., van Ark-Otte, J., Winograd, B., & Pinedo, H.M. : Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *Eur J Cancer* 27 : 897-900, 1991.
- King, P.R. : Low level laser therapy : a review. *Lasers Med Sci* 4 : 141-150, 1989.
- Kitchen, S., & Partridge, C. J. : A review of low level laser therapy. *Physiother* 77 : 161-168, 1991.
- Kreczi, T., & Klingler, D. : A comparison of laser acupuncture versus placebo in radicular and pseudoradicular pain syndromes as recorded by subjective responses of patients. *Acupunct Electrother Res Int J* 11 : 207-216, 1986.
- Krotlinger, M. : On the laser in acupuncture. *Acupunct Electrother Res Int J* 5 : 297-311, 1980.
- Lubart, R., Wollman, Y., Friedenmann, H., Rochkind, S., & Laulicht, I. : Effects of visible and near-infrared lasers on cell cultures. *J Photochem Photobiol B* 12 : 305-310, 1992.
- Lyons, R.F., Abergel, R.P., White, R.A., Dwyer, R.M., Castel, J.C., & Uitto, J. : Biostimulation of wound healing in vivo by a helium-neon laser. *Ann Plastic Surg* 18 : 47-50, 1987.
- Man, T.H. : Stimulated optical radiation in ruby. *Nature* 187 : 493-494, 1960.
- Mester, E., Spiry, T., Szende, B., & Tota, J. C. : Effects of laser rays on wound healing. *Am J Surg* 122 : 532-535, 1971.
- Mosmann, T. : Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival : application proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65 : 55-63, 1983.
- Olavi, A., Pekka, R., & Pertti, J. Jr. : Effects of the infrared laser therapy at treated and non-treated trigger points. *Acupunct Electrother Res Int J* 14 : 9-14, 1989.
- Ponnudurai, R.N., Zbuzek, V.K., Niu, H.L., & Wu, W.H. : Laser photobiostimulation-induced hypoaesthesia in rats is not naloxone reversible. *Acupunct Electrother Res Int J* 13 : 109-117, 1988.
- Ponnudurai, R.N., Zbuzek, V.K., & Wu, W.H. : Hypoalgesic effect of laser photobiostimulation shown by rat tail flick test. *Acupunct Electrother Res Int J* 12 : 93-100, 1987.
- Pourreau-Schneider, N., Ahmen, A., Soudry, M., Jacquemier, J., Kopp, F., Franquin, J.C., & Martin, P.M. : Helium-neon laser treatment transforms fibroblasts into myofibroblasts. *Am J Pathol* 137 : 171-178, 1990.
- Rigau, J. Trelles, M.A., Calderhead, R.G., & Mayayo, E. : Changes in fibroblasts proliferation and metabolism following in vitro helium-neon laser irradiation. *Laser Ther* 3 : 25-33, 1991.
- Saperia, D., Glassberg, E., Lyons, R.F., Abergel, R.P., Baneux, P., Castel, J.C., Dwyer, R.M., & Uitto, J. : Demonstration of elevated type I and type III procollagen mRNA levels in cutaneous wound treated with helium-neon laser. *Biochem Biophys Res Commun* 138 : 1123-1128, 1986.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., & Boyd, M.R. : New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82 : 1107-1112, 1990.
- Snyder-Mackler, L., Barry, A.J., Perkins, A.I., & Soucek, M.D. : Effects of Helium-Neon laser irradiation on skin resistance and pain in patients with trigger points in the neck or back. *Phys Ther* 69 : 336-341, 1989.
- Soudry, M., Franquin, J.C., Pourreau-Schneider, N., & Martin, P.M. : Effect of a helium-neon laser on cellular gingival fibroblasts. *J Biol Buccale* 16 : 129-135, 1988.
- Vacca, R.A., Marra, E., Quagliariello, E., & Greco, M. : Activation of mitochondrial DNA replication by He-Ne laser irradiation. *Biochem Biophys Res*

- Commun 195 : 704-709, 1993.
- vanBreugel, H.H., & Bar, P.R. : Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photo-biostimulation of human fibroblasts in vitro. Lasers Surg Med 12 : 528-537, 1992.
- Walker, J. : Relief from chronic pain from low-power laser irradiation. Neurosci Lett 43 : 339-344, 1983.
- Yu, W., Naim, J.O., & Lanzafame, R.J. : Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice. Lasers Surg Med 20 : 56-63, 1977.