

RF 플라즈마 및 전기장의 흑색종 (G361 melanoma) 세포에 대한 사멸 효과

論 文
56-11-15

The Effects of an RF Plasma and Electric Fields on the Death of G361 Melanoma Cells

孫采化[†] · 金奎千* · 李海準**
(Shon Chae-Hwa · Kim Gyoo-Cheon · Lee Hae June)

Abstract - Micro plasma has been recently studied to investigate the effects on various cells. We study a micro-plasma produced by a plasma needle that is operated with RF power and its effects on G361 melanoma cells. The micro plasma size ranges from sub-mm to several mm at a few watts of RF power. For the bio-medical treatment, low-temperature plasma is obtained and gas temperature is controlled within several tens of degrees (°C) in order not to disturb cell activities. Elementary spectroscopic studies to obtain plasma characteristics are presented for Ar and He plasma with different frequencies of RF power. Also the preliminary results of the micro plasma effects on G361 melanoma cells are presented. It was observed that the irradiation of micro plasma induces cell death through the deprivation of tyrosine phosphorylation in the G361 cells.

Key Words : micro plasma, low-temperature plasma, melanoma, apoptosis, plasma needle

1. 서 론

저온 플라즈마는 다양한 분야에서 사용되고 있는데 특히 반도체 가공이나 디스플레이 장치의 미소 가공에 많이 사용되고 있다. 최근에는 상압의 저온 플라즈마가 많이 연구되고 있는데 이는 기존의 저온 플라즈마를 발생시키기 위한 진공 장치 없이도 플라즈마의 발생이 가능하기 때문이다 [1-3]. 물론 청정한 환경을 요구하는 정밀 가공이나 오염이 문제가 되는 곳에는 사용하기 힘든 단점이 있지만 진공 장치라는 한계를 벗어날 수 있어서 향후 점점 다양한 응용분야가 생겨날 것으로 기대된다. 이러한 상압 플라즈마 장치에는 다양한 주파수의 전원을 사용하여 반도체 등의 가공에 쓰이는 ICP (Inductively Coupled Plasma) 타입이나 CCP (Capacitively Coupled Plasma) 타입을 비롯하여 최근 디스플레이 장치로 널리 사용되는 PDP (Plasma Display Panel) 와 DC micro-hollow cathode 및 DBD (Dielectric Barrier Discharge) 등이 있다.

상압 플라즈마 장치는 기존의 무기물질 가공에서 벗어나 유기물 가공에도 응용가능하다는 장점이 있고 나아가서는 생체에도 응용이 가능하다. 생체에 상압 플라즈마를 이용하기 위해서는 여러 가지 제약조건이 해결되어야 한다. 그 대표적인 예로서는 저온 플라즈마의 온도가 40°C 이하로 유지되어 생체에 일정 이상의 에너지가 전달되지 않아야 한다는

것이다. 또한 상압에서 동작해야 하고 생체에 전기적으로나 화학적으로 손상을 주지 않아야 하는 등의 까다로운 제약조건이 있다. 이처럼 많은 제약조건에도 불구하고 최근 바이오 분야에 대한 플라즈마 및 전자기장의 적용 연구가 활발하게 전개되고 있다 [4]. 전기적인 펄스를 이용하여 세포막에 가는 구멍을 내어 화학물질의 주입이나 DNA 가공에 응용하는 전기 천공법 (electroporation) 은 이미 많이 사용되고 있는 응용중의 하나이며 [5], 이외에도 플라즈마를 이용한 살균, 지혈 및 종양 제거등을 위한 수술장비 [6] 나 혹은 전기 펄스를 이용한 암세포의 자연사 (apoptosis) 유도 [7] 등 다양한 분야에 대한 연구들이 진행되고 있다. 세포 자연사를 이용한 암세포 치료나 창상, 화상으로 인하여 상처 입은 피부의 재생을 위한 처치 등에 대한 연구가 특히 많은 관심을 끌고 있으며 선진국에서는 많은 연구가 이루어지고 있는 실정이다.

본 연구에서는 플라즈마 및 전기장의 생체에 대한 영향을 연구하기 위하여 일차적으로 피부암 세포 (melanoma) 에 대한 플라즈마와 전기장의 영향을 조사하였다. 플라즈마 및 전기장의 발생은 13.56 MHz 의 RF 전원을 사용하였다. 먼저 적절한 파워 전달을 위하여 최적화된 인가 장치를 제작하여 세포에 인가되는 플라즈마 및 전기장이 최대가 되도록 시스템을 설계하였다. 플라즈마와 전기장의 영향을 기본적인 실험을 통해 확인하였고 전기장에 의한 세포의 사멸 작용과 함께 세포의 분리 및 인산화 작용에 대하여도 살펴보았다.

2. 시스템 구성

플라즈마 및 전기장의 발생을 위하여 구성된 실험 장치는 그림 1에 보인 것처럼 구성되어 있다. RF 파워가 파형발생기에서 발생하여 증폭기를 거쳐 증폭된 다음 매칭 회로를 거쳐 플라즈마 발생부로 전달된다. 증폭기와 매칭 회로 사이

[†] 교신저자, 正會員 : 한국전기연구원 전기물리연구그룹
선임연구원

E-mail : chshon@keri.re.kr

* 非 會 員 : 부산대학교 치의학과 조교수

** 正 會 員 : 부산대학교 전자전기통신공학부 조교수

接受日字 : 2007年 8月 2日

最終完了 : 2007年 8月 21日

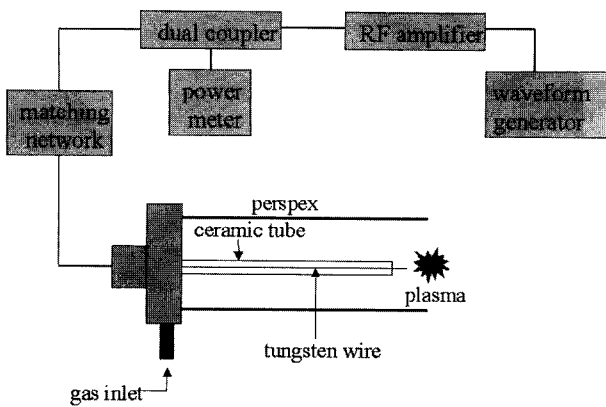


그림 1 실험 장치 개략도
Fig. 1 The schematic of experiment system

에는 파워 측정을 위한 파워미터가 들어가게 된다. 플라즈마 발생에 쓰이는 가스는 플라즈마 발생부의 아래쪽 가스 유입구로 따로 들어가게 되어 있다. 주로 쓰이는 가스는 불활성 8족 원소인 아르곤이나 헬륨이다. 유입되는 가스의 양은 가스 컨트롤러를 이용하여 조절한다. 본 연구에서는 2000 sccm 으로 가스 유량을 고정하였다. RF 전원의 주파수는 13.56MHz 로 고정하였다. 증폭기는 파형발생기에서 발생된 사인파를 10와트의 전력까지 증폭이 가능한 장치이다.

마이크로 플라즈마를 발생시키기 위해서는 플라즈마 발생부의 구조가 중요하다. 다양한 형태의 플라즈마 발생장치가 그림 2에 나타나 있다. 본 연구진은 네델란드 아인트호벤 대학의 플라즈마 니들 (plasma needle) [7] 과 비슷한 구조의 장치를 만들어서 실험을 수행하였다 (그림 2의 네 번째 형태). 파워의 매칭이 적절히 이루어지도록 구조를 설계하였고 내부의 니들의 끝을 가능한 한 가늘게 하여 전기장의 세기를 극대화하도록 하였다. 이렇게 하여 적은 파워로도 전기장의 세기를 키우고 플라즈마 발생이 용이하게 된다. 발생된 플라즈마가 생체에 사용되기 위한 첫 번째 조건은 플라즈마 혹은 가스의 온도이다. 본 연구에서는 파워를 적절하게 조절하여 플라즈마의 온도가 40도 이하가 되도록 하였다. 이는 열적인 손상에 의한 세포의 피사를 막기 위해서이다.

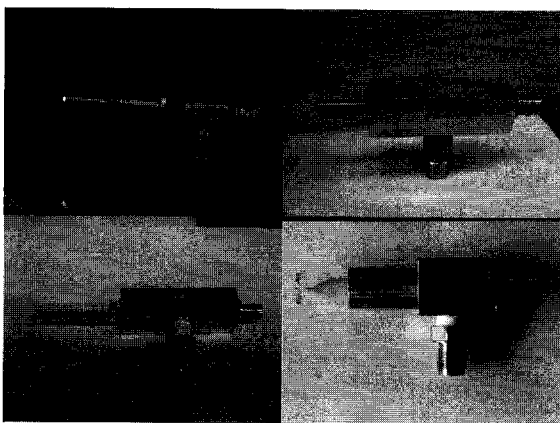
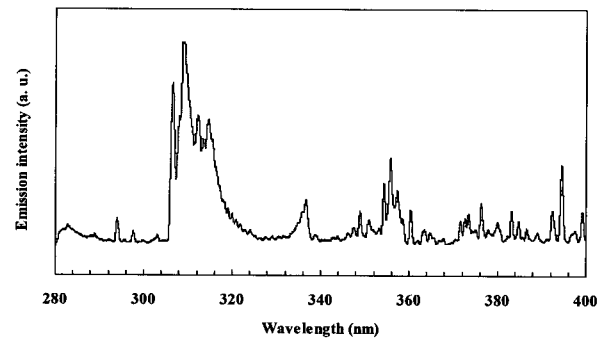
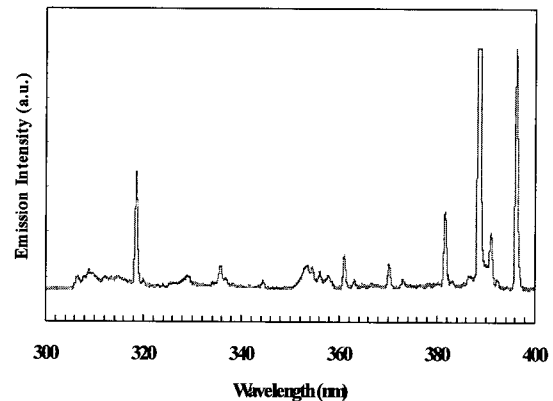


그림 2 다양한 플라즈마 발생 팁
Fig. 2 Various plasma tips tested in the experiment

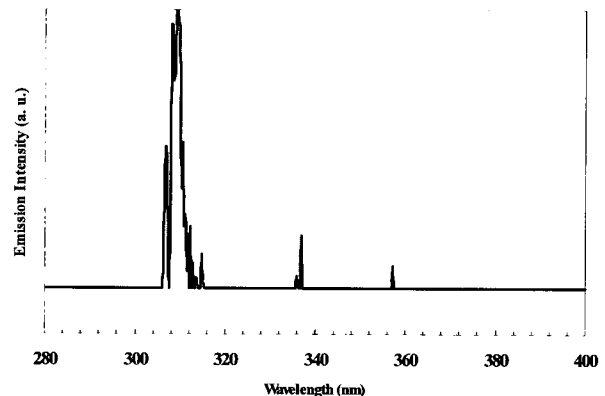
플라즈마의 정상적인 발생과 플라즈마 내부의 입자들을 살펴보기 위하여 분광 실험을 수행하였다. 분광 실험은 아르곤 플라즈마와 헬륨 플라즈마를 이용하였다. 그림 3에 그 결과를 나타내었다. 그림 3(a)와 그림 3(b)는 각각 진공에서의 아르곤과 헬륨 플라즈마의 분광, 그리고 그림 3(c)와 그림 3(d)는 각각 상압에서의 아르곤과 헬륨의 분광 결과이다. 분광 실험에서 보인 바와 같이 각각의 가스에 대해서 비슷한 파장 영역에서 피크 값들이 발견되는 것을 알 수 있다. 또한 상압에서의 결과는 공기 입자의 밀도가 높아서 많은 충돌로 인해 세부 피크들이 잘 나타나지 않는다는 사실도 알 수 있다. 하지만 주로 나타나는 피크들이 확인되는 것으로 보아서 플라즈마의 특성이나 내부 입자들의 종류에는 큰 차이가 없을 것으로 예상된다.



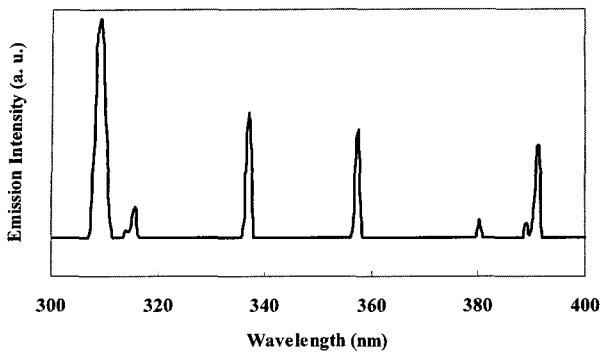
(a)



(b)



(c)



(d)

그림 3 분광에 의한 플라즈마 내의 입자 분석 결과: (a) 진공 중의 아르곤 플라즈마 (b) 진공중의 헬륨 플라즈마 (c) 상압 아르곤 플라즈마, (d) 상압 헬륨 플라즈마

Fig. 3 Spectroscopic analysis of plasma: (a) Ar and (b) He plasma at low-pressure (2Torr), (c) Ar and (b) He plasma at atmospheric pressure conditions.

3. 결과 및 검토

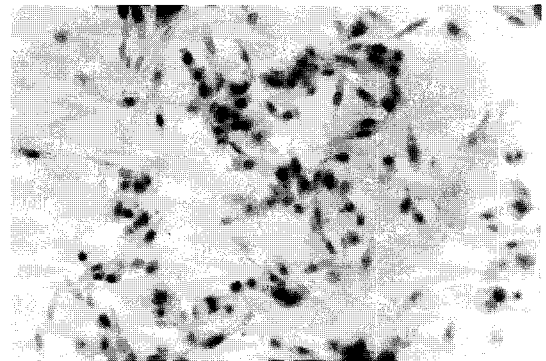
플라즈마의 정상적인 발생과 플라즈마 내부의 입자들을 살펴보기 위하여 분광 실험을 수행하였다. 분광 실험은 아르곤 플라즈마와 헬륨 플라즈마를 이용하였다. 그림 3에 그 결과를 나타내었다. 그림 3(a)와 그림 3(b)는 각각 진공에서의 아르곤과 헬륨 플라즈마의 분광, 그리고 그림 3(c)와 그림 3(d)는 각각 상압에서의 아르곤과 헬륨의 분광 결과이다. 분광 실험에서 보인 바와 같이 각각의 가스에 대해서 비슷한 파장 영역에서 피크 값들이 발견되는 것을 알 수 있다. 또한 상압에서의 결과는 공기 입자의 밀도가 높아서 많은 충돌로 인해 세부 피크들이 잘 나타나지 않는다는 사실도 알 수 있다. 하지만 주로 나타나는 피크들이 확인되는 것으로 보아서 플라즈마의 특성이나 내부 입자들의 종류에는 큰 차이가 없을 것으로 예상된다.

본 연구에서는 플라즈마와 전기장의 효과를 확인하기 위하여 1차적으로 배양된 피부암 세포 (melanoma)에 대하여 몇 가지 실험을 수행하였다. 플라즈마 (case 1과 case 4)와 전기장 (case 2) 그리고 헬륨 가스 (case 3)의 영향 중 어느 것에 의해 세포가 영향을 받는지를 알아보기 위해 표 1과 같은 조건으로 나누어 세포 실험을 수행하였다. 전원을 공급하지 않고 헬륨 가스만 흘린 경우 (case 3)에는 세포에 아무런 영향을 미치지 않았다. 그러나 6W의 전력으로 전기장만 가한 경우와 플라즈마를 가한 경우에는 모두 세포사멸을 일으켰다. 전력을 3W까지 낮추었을 때는 전기장은 세포에 거의 영향을 미치지 않았으며 헬륨 가스를 공급하여 플라즈마를 발생시켜 세포에 적용하면 세포 사멸이 유발되었다. 이러한 결과에 대한 세포 사진이 그림 4에 제시되어 있다. 그림 4(a)는 헬륨 가스만 흘린 경우로 세포가 살아 있으며 그림 4(b)는 6W의 전기장만을 가한 결과로서 세포들이 죽어 있다. 세포의 사멸은 검게 염색된 부분으로 확인이 가능하다.

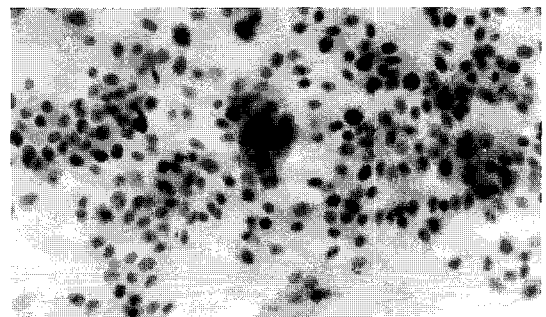
다. 그림 4(c)에서는 3W의 플라즈마를 가한 결과로서 죽은 세포들이 명확하게 구분되고 사망한 세포의 모양도 그림 4(b)의 경우와 달라짐을 알 수 있다. 이 경우에 흑색종 세포의 생존률의 시간에 따른 변화는 표 2에 명시된 바와 같다.



(a)



(b)



(c)

그림 4 헬륨가스, 전기장 및 플라즈마 조사에 의한 G361 흑색종세포의 변화 (a) 헬륨가스만 조사한 경우, (b) 6와트 전력의 전기장만 조사한 경우, (c) 3와트의 플라즈마를 조사한 경우

Fig. 4 Results from exposure of Helium gas, electric field and plasma to G361 melanoma cells. Effects of (a) Helium gas only, (b) electric fields with 6 watts power, (c) plasma with 3watts power

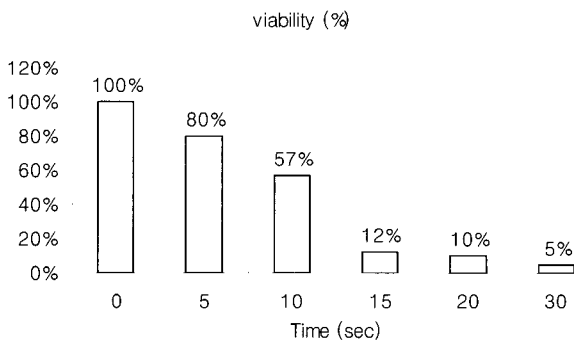
표 1 바이오 실험에서 사용된 플라즈마 및 전기장의 실험 조건

Table 1 The conditions of biological experiments

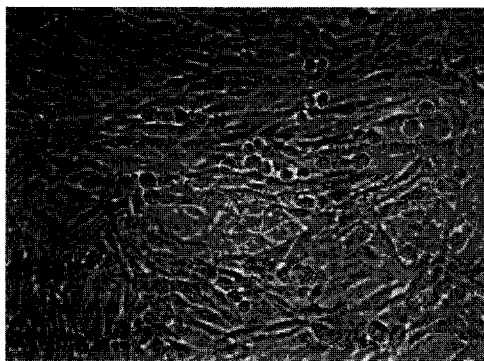
| | Power(W) | Gas | Time | Plasma |
|--------|----------|-----|------|--------|
| Case 1 | 6 | ○ | 15 | ○ |
| Case 2 | 6 | X | 15 | X |
| Case 3 | 0 | ○ | 15 | X |
| Case 4 | 3 | ○ | 15 | ○ |

표 2 플라즈마가 조사된 G361 흑색종 세포 생존율의 시간에 따른 변화

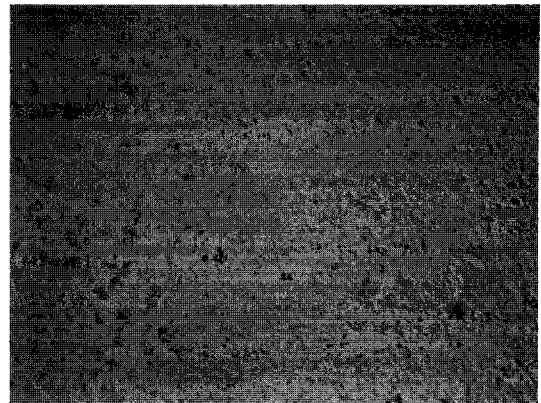
Table 2 The effect of plasma on viability of G361 melanoma cells



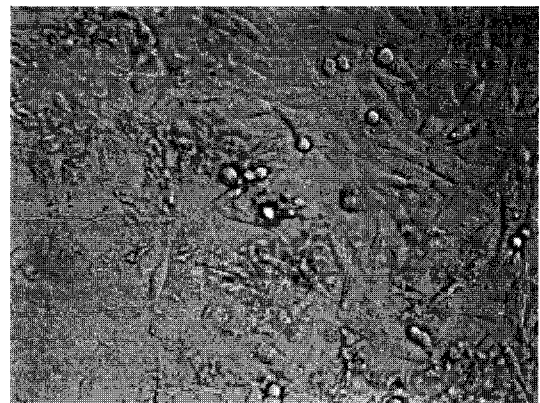
플라즈마의 효과를 자세히 살펴보기 위하여 현미경으로 확대하여 얻은 사진이 그림 5에 나와 있다. 그림 5(a)는 살아있는 흑색종 세포를 찍은 사진으로 세포는 방추형의 모양을 하고 있으며 원형의 세포는 세포분열이 이루어지고 있는 상태이다. 그림 5(b)는 플라즈마의 영향으로 죽은 세포들의 영역을 찍은 사진으로 세포들이 손상을 입어서 원래의 형태를 잃고 죽은 상태임을 알 수 있다. 한편 그림 5(c)는 플라즈마의 영향이 미치는 경계 부근에서 찍은 사진으로 세포의 일부는 살아 있고 일부는 원래의 형태를 잃고 죽은 것을 볼 수 있다. 이와 같은 결과로 볼 때 5와트 미만의 낮은 전력에서도 플라즈마의 효과에 의해 암세포가 죽는 것을 확인할 수 있었다. 이후의 계속된 실험에서 파워를 낮출수록 죽는 세포의 면적이 줄어들고 전기장의 세기를 최적화하여 극소적인 부분의 세포만을 죽이는 것도 가능하였다.



(a)



(b)



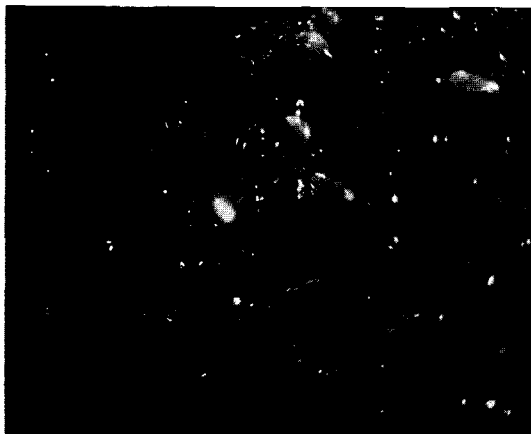
(c)

그림 5 3와트 전력의 플라즈마를 조사한 G361 흑색종세포의 생존에 미치는 효과 (a) 살아 있는 세포, (b) 플라즈마에 의해 죽은 세포, (c) 플라즈마 영향이 미치지 않은 곳과 미치지 않은 곳의 세포 (경계 부근)

Fig. 5 The morphology of G361 melanoma cells exposed by plasma with 3 watts power

세포외기질(extracellular matrix, ECM)에 대한 세포의 부착은 배자발생 [8], 암세포의 침윤과 전이 [9]와 같은 생물학적 과정에 있어서 매우 중요한 기능을 한다. 세포가 ECM에 부착할 때, 세포 표면에 있는 다양한 부착단백질들이 관여하며, 이중 integrin이 가장 잘 알려진 부착단백질로 알려져 있다. Integrin은 ECM과 부착부위에서 focal adhesion 이라 불리는 특별한 접촉부위를 형성하게 되는데, 이곳은 액틴 세포 뼈대를 형성하는 밀집된 부위로서 세포의 부착, 펼침 (spreading), 그리고 세포 신호 전달이 시작된다. 이러한 과정에서 세포 표면 단백질의 tyrosine 잔기에서 일어나는 인산화는 매우 중요한 기능을 한다 [10]. 즉, tyrosine 인산화는 세포와 ECM의 상호작용을 통해 생성되는 세포내 신호 전달경로의 중요한 과정인 것이다. 부착단백질을 이용하여 ECM에 부착하는 것이 흑색종 세포의 생존과 성장에 있어서 필수적이다. 흑색종 세포에서 대표적인 tyrosine 인산화 단백질 중의 하나인 focal adhesion kinase 단백질의 인산화를 억제했을 때, 흑색종 세포는 세포자멸사가 유도되어 세포 성장이 강력하게 억제되었다는 보고가 있다 [11].

그러므로 흑색종 치료를 위해서는 흑색종 세포의 부착성을 잃게 하는 것이 중요한 방법이 될 수 있다. 본 실험에서는 플라즈마의 조사로 인해 G361 흑색종세포의 세포사멸이 유도되었고 세포의 인산화가 현격히 줄어들어 현상이 관찰되었다. 그림 6(a)에서 보이는 바와 같이 플라즈마를 조사하지 않은 세포는 방추형 모양의 끝부분 세포막 부위에서 가시와 같은 형상의 강한 tyrosine 인산화 현상을 나타내지만, 플라즈마 조사를 받은 세포는 그림 6(b)에서 보이는 바와 같이 방추형의 모양을 잃어버리고 인산화 현상도 사라졌다. 이것은 G361세포의 생존에 필수적인 부착성을 잃게 함으로써 세포 자연사를 유도할 수 있음을 의미한다. 그러므로 플라즈마는 흑색종 치료에 있어서 잠재력이 있는 치료도구가 될 수 있을 것으로 보인다.



(a)



(b)

그림 6 3와트 플라즈마가 G361 흑색종세포의 tyrosine 인산화 단백질에 미치는 영향 (a) 플라즈마 조사를 받지 않은 세포 (b) 플라즈마를 조사한 세포

Fig. 6 The deprivation of phosphorylation in phosphotyrosine protein exposed by plasma, (a) control cells, (b) G361 melanoma cells exposed by plasma.

4. 결 론

본 연구에서는 마이크로 플라즈마 발생을 위한 RF 방전 시스템을 구축하고 발생된 마이크로 플라즈마를 이용하여 바이오 시스템에 조사함으로써 플라즈마의 바이오 시스템에 대한 영향을 살펴보았다. 특별히 피부암 세포에 대한 플라즈마 및 전계의 영향을 실험을 통하여 확인하였다. 발생된 마이크로 플라즈마는 세포의 열적인 변형을 일으키지 않는 온도 범위를 갖도록 조절되었다. 본 연구진은 플라즈마와 전기장에 의한 효과를 함께 실험하여 낮은 파워에서 피부암 세포의 사멸 원인은 플라즈마 효과인 것을 밝혀내었다. 플라즈마 조사는 G361 흑색종세포의 tyrosine 인산화단백질들의 인산화를 현격하게 고갈시킴으로써 세포사멸을 일으켰다. 이러한 기작을 이용하면 흑색종 치료에 대한 새로운 치료도구로서 플라즈마의 가능성을 제안할 수 있으리라 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (KRF- 2005-042-D00132).

참 고 문 헌

- [1] J. Park, I. Henins, H. W. Herrmann, G. S. Selwyn, and R. F. Hicks, *J. Appl. Phys.* 89 (2001) 20.
- [2] J. P. Boeuf, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36 (2003) R53.
- [3] M. Moselhy, W. Shi, R. H. Stark, and K. H. Schoenbach, *Appl. Phys. Lett.* 79 (2001) 1240.
- [4] "Special issue on nonthermal medical/biological applications using ionized gases and electromagnetic fields" ed. by J. F. Kolb, M. G. Kong, and P. E. Blackmore, *IEEE Trans. on Plasma Sci.* 34 (2006)
- [5] R. Nuccitelli, U. Pliquet, X. Chen, W. Ford, R. J. Swanson, S. J. Beebe, J. F. Kolb, and K. H. Schoenbach, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 343 (2006) 351.
- [6] <http://www.erbe-med.de/englisch/>
- [7] E. Stoffels, A. K. Flikweert, W. W. Stoffels, and G. M. W. Kroesen, *Plasma Sources Sci. Technol.* 11 (2002) 383.
- [8] J. P. Thiery, J. L. Duband, and G. C. Tucker, *Annu. Rev. Cell Biol.* 1 (1985) 91.
- [9] L. A. Liotta, *Cancer Res.* 46 (1986) 1.
- [10] M. W. Johansson, E. Larsson, B. Luning, E. B. Pasquale, and E. Ruoslahti, *J. Cell Biol.* 126 (1994) 1299.
- [11] Y. M. Fu, Z. X. Yu, B. A. Pelayo, V. J. Ferrans, and G. G. Meadow, *Cancer Res.* 59 (1999) 758.

저 자 소 개



손 채 화 (孫 采 化)

1967년 12월 15일생. 2001년 포항공대 물리학과 박사 졸업. 2003년 11월~현재 한국전기연구원 전기물리연구그룹 선임연구원.

Tel : (055) 280-1490

Fax : (055) 280-1419

E-mail : chshon@keri.re.kr



김 규 천 (金 奎 千)

1967년 3월 26일생. 2001년 부산대학교 자연과학대 생물학과 박사 졸업. 2004년 3월~현재 부산대학교 치의학과 조교수.

Tel : (051) 240-7970

Fax : (051) 244-7399

E-mail : ki91000m@pusan.ac.kr



이 해 준 (李 海 準)

1972년 2월 25일생. 1998년 포항공대 물리학과 박사 졸업. 2004년~현재 부산대학교 전자전기통신공학부 조교수

Tel : (051) 510 3516

Fax : (051) 513 0212

E-mail : haejune@pusan.ac.kr