

GaAlAs 다이오드 레이저 조사가 장지신근 압좌손상 후 요수분절의 TGF- β 발현에 미치는 영향

대구대학교대학원 재활과학과 물리치료전공

김석범, 남기원, 구현모, 이선민

대구대학교 재활과학대학 물리치료학과

김진상

Effects of GaAlAs Diode Laser for the Expression of TGF- β on Lumbar Spinal Cord after Extensor Digitorum Muscle Crush Injury

Kim, Souk-Boum, P.T., Nam, Ki-Won, P.T., M.S.,

Koo, Hyun-Mo, P.T., M.S., Lee, Sun-Min, P.T.

Major in Physical Therapy, Dept. of Rehabilitation Science, Graduate School, Taegu University

Nam, Ki-Won, P. T.,

Kim, Jin-Sang, D.V.M., Ph.D.

Department of Physical Therapy, College of Rehabilitation Science, Taegu University

Abstract

Low intensity laser irradiation is potential physical agent that triggers the muscle regeneration by previous study. In muscle regeneration, a number of growth factors also promotes that is triggered in response to muscle damage. The transforming growth factor(TGF)- β is involved in the activation of cell proliferation and the inhibition of cell differentiation in muscle regeneration. This is secreted not only autocrine system but also paracrine and endocrine. Therefore, We investigated that effects of Gallium aluminum arsenide(GaAlAs) diode laser for the expression of TGF- β on lumbar spinal cord after extensor digitorum muscle crush injury. After laser irradiation, the immunoreactivity of TGF- β was increased bilaterally in gray mater of spinal cord. Especially, in 1 day, experimental group was higded than control, and in 3 day, lateral motor nucleus were storong immunoreactivv of TGF- β . Also, in 1 and 2 day, TGF- β was showed in white mater as well as gray mater, but in 3 day, only showed in gray mater. These data may suggests to the establishment of laser irradiation on spinal cord for skeletal muscle injury.

I. 서 론

손상 후 포유류의 근육재생 능력에 대해서는 많은 연구들이 이루어졌고, 그 과정 또한 잘 정립되어 있다(Grounds, 1991). 이러한 과정은 근섬유의 기저막과 근형질막 사이에 위치하는 위성세포(satellite cells)라고 불리우는 단핵 세포 집단이 손상에 반응하여 활성화되고, 증

식하고 분화하면서 이루어지게 되는데, 결과적으로 이러한 근원성 전구 세포들(myogenic precursor cells)은 뭇핵성(multinucleated) 근섬유로 합성된다. 이러한 일련의 과정에서 중요한 역할을 담당하는 것 중 하나가 근육-특이성 단백질(muscle specific protein)이다 (Lefaucheur과 Sebille, 1995; Zorzano 등, 2002). 근육-특이성 단백질 중 성장인자(growth factor)는 조인자(cofactor)와 영양성 인자(nutrients)와는 달리 정지기에 있는 세포의 유사분열을 개시할 수 있는 성질을 가지고 있다(Bennett와 Schultz, 1993). 이러한 성질 때문에 성장인자는 비교적 초기에 발현되며 또한 성장인자는 성장인자가 합성된 그 세포에만 작용하기도 하지만(autocrine stimulation), 주변세포(paracrine stimulation), 또는 멀리 떨어진 표적세포(endocrine stimulation)에도 작용한다(Bennett와 Schultz, 1993). 그러므로 손상된 근육 조직의 회복과정에서 성장인자가 반드시 손상부위에 국한되어 나타나는 것이 아니라 손상부위에서 멀리 떨어진 세포에서도 생성되어 손상부위로 이동됨을 알 수 있다.

근육손상시 근육재생과정을 조절하는 성장인자 중 IGF(insulin like growth factor), FGF(fibroblast growth factor), HGF(hepatocyte growth factor), TGF(transforming growth factor), LIF(leukemia inhibitor factor) 및 PDGF(platelet-derived growth factor)는 위성세포의 증식과정(proliferation)을 촉진시키는 반면에 분화과정(differentiation)은 주로 IGF에 의해서 조절되어진다(Zorano 등, 2002). 이 중 TGF- β 는 여러 세포에서 분비되는 조절 단백질로서, 세포의 성장, 분화, 세포 화학주성, 혈관신생, 면역기능, 세포외 기질 형성, 이동, 조직화 및 세포사, 그리고 손상 후의 조절 및 재모델화(remodeling)에 이르기까지 다양한 기능을 갖는 cytokine으로 작용하며, 그 조절 작용은 세포 종류에 따라 다르다(박준식, 1998; Gumienny와 Padgett, 2002; Husmann 등, 1996). 현재까지 TGF- β 와 그 수용체를 통한 세포내 신호전달계에 대해서는 거의 밝혀진 바 없었으나, 최근에 drosophila 및 C. elegans에서 처음 밝혀진 Smad 단백질이 TGF- β 수용체와 상호작용하여 인산화된 후 핵으로 이동, 축적되며 DNA에 binding하여 downstream target gene의 전사를 유도하는 것으로 보고되고 있다(Ana 등, 1997; Heldin 등, 1997). 면역조직화학 연구들은 이러한 TGF가 발달기에 있는 쥐와 닭의 CNS에 넓게 분포하고 있다는 것을 보여주었고(Flanders 등, 1991; Pelton 등, 1991; Unsicker 등, 1996), 특히 TGF- β 1은 rat의 척수의 운동신경원의 survival을 촉진시키지만, 오직 별아교세포(astrocyte)에서만 발현된다고 하였다(Martinou 등, 1990).

근육재생과정의 촉진을 위해서 최근 물리치료에서 사용되어지는 여러 가지 물리적 인자 중 저강도 레이저는 직접적인 레이저 조사로 조직내 생물학적 변화를 유도하기 위해 개발, 발전된 의료용 치료도구로써, 저강도 레이저 조사시 다양한 생체자극의 효과를 확인하기 위한 연구로 상처치유(Stadler 등, 2001), 신경재생(Rochkind 등, 2001), 혈관신생촉진 유전자(Khanna 등, 1999), 골절치유(Nagasaki 등, 1991) 등의 광범위한 여러 임상 연구가 진행되어 왔다. 지금까지 골격근 재생과 관련하여 치료적용 후 또는 치료적용 없이 시간경과에 따른 TGF- β 의 발현을 관찰한 연구들은 손상근육에 국한되어서 관찰되어져 왔다(Gavirn과 Wagner, 2001; Lefaucheur과 Sebille, 1995). 이에 본 연구에서는 근육손상을 유발시켜 저강도 레이저의 일종인 레이저 조사한 후 근육재생과정에 있어 중요한 영향을 미치는 TGF- β 가 손상부위와 관련된 척수분절에서 어떠한 변화가 나타나는지를 면역조직화학법을 이용하여 관찰하고자 한다.

II. 연구 방법

본 연구에서 사용한 실험동물은 동일한 조건에서 사육한 생후 8-10주, 체중 250-300g의 건강하고 신경학적으로 이상이 없는 성숙한 Sprague-Dawley계 흰쥐를 성별 구분 없이 12마리를 사용하였다. 실험동물은 레이저를 조사한 실험군과 레이저를 조사하지 않은 대조군으로 나누어 사용하였고, 다시 실험군과 대조군 각각 1일군, 2일군, 3일군으로 세분하였다. 실험기간 중 물과 먹이는 무제한 공급하였고, 사육실의 온도는 $23\pm2^{\circ}\text{C}$, 습도 $50\pm2\%$ 로 최적의 상태를 유지하였으며, 사육장의 광주기와 암주기를 각각 12시간으로 조절하였다.

장지신근의 압좌손상을 유발시키기 위해서 염산케타민(Ketamine HCL, 유한양행)과 Xylazine hydrochloride(바이엘코리아)를 1:1 비율로 섞은 전신마취제를 복강내 주사(2ml/kg)하여 마취를 시킨 상태에서 오른쪽 하퇴의 외측면을 착모한 후 피부와 근막을 절개하였다. 전경골과 장비골근 사이의 장지신근을 노출시킨 후, 지혈겸자를 이용하여 장지신근의 중간 부위를 수평하게 10초간 압좌하였다. 손상부위의 피부를 다시 봉합하였다.

레이저 조사는 손상직후, 1일 후, 2일 후, 3일후에 각각 오른쪽 장지신근에 실시하였는데, 본 실험에서는 GaAlAs 반도체 다이오드 레이저(830nm , HANIL M.E CO., LTD)를 사용하여 2000mW 의 강도와 2000Hz 의 주파수로 10분간 실시했다. 대조군은 레이저 조사를 실시하지 않았고, 치료시간 동안 마취를 시켜주어, 실험군과 최대한 동일한 조건을 주었다.

실험군은 레이저 조사 30분 후 각각 희생하였으며, 0.9% NaCl를 이용한 심장관류와, 8% paraformaldehyde(Sigma)를 이용한 전고정을 실시하였다. 요수부를 적출한 후 다시 8% paraformaldehyde에 2시간 동안 후고정 시킨 후, sucrose(25% , Sigma)에 담궈 24시간 냉장 보관하였다. Sucrose에 보관된 조직을 영하 40 도로 냉각시킨 후 $30\mu\text{m}$ 의 두께로 자른 후 일차항체(anti-mouse TGF, 1:100, Sigma)에 담궈 4°C 에서 24시간 동안 냉장보관하였다. 0.01M PB(phosphate buffer)에 3회 수세한 후 일반적인 ABC(avidine-biotin peroxidase complex)법으로 면역조직화학법을 실시하였다. 처리된 조직들을 다시 수세하고 DAB를 이용하여 발색을 실시하였고, 수세 및 탈수과정을 거친 후 커버슬라이드로 봉입하였다. 면역반응 관찰은 광학현미경(OLYMPUS BX50)을 통해서 실시하였고 근육압좌손상 후 3일의 대조군을 기준으로 하여 실험군의 척수분절에서의 TGF- β 발현양상을 매우 높음 +++, 높음 ++, 보통 +, 거의없음 ± 으로 표시하였다.

III. 결 과

장지신근을 압좌시킨 후 저강도 레이저인 GaAlAs 반도체 다이오드 레이저를 손상부위에 직접적으로 조사한 결과, 척수분절과 관련된 척수분절에서의 TGF- β 의 발현을 살펴본 결과 레이저를 조사한 1일군과 조사하지 않은 대조군 사이에 많은 차이가 관찰되었고, 2일군과 3일군에서는 거의 비슷한 면역반응이 관찰되었다(Table 1). 그리고 손상을 입힌 쪽과 동측의 척수분절에서 반대측보다는 더 많은 발현이 관찰되었다. 또한 레이저를 조사한 1, 2일군에서는 척수 회백질을 중심으로 전체적으로 발현이 관찰되었고(Fig. 1-E), 3일군에서는 렉스드총판 I, II, III, IV와 IX를 중심으로 양측성으로 관찰되었다(Fig. 1-A, B, C, D). 이러한 척수분절의 발현은 근육의 치유과정에서 척수분절 내 TGF- β 의 조절이 양측성으로 이루어지고 있음을 알 수 있다. 특히 3일군에서 렉스드총판 IX의 외측운동신경핵(lateral motor nucleus)에서 양측성으로 강한 면역반응을 보였고(Fig. 1-A, B), 1일군과 2일군에서는 척수회백질뿐만 아니라 백색질에서도 면역반응이 관찰되었으며(Fig. 1-F), 3일군에서는 백색질에서의 면

역반응이 거의 나타나지 않았다.

Table 1. The Changes of TGF- β Expression in 1, 2, 3 Days

		1 day	2 day	3 day
TGF- β expression	experimental group	++	++	+++
	control group	±	++	+++

IV. 고 칠

본 실험의 결과 손상된 근육과 관련있는 척수레벨에서 레이저를 조사한 실험군에서 손상 후 1일에 특히 TGF- β 의 발현이 대조군에 비해서 더 많이 발현되는 것으로 보아, 저강도 레이저 조사가 근육손상 후 후기 염증기와 근육증식과정의 초기과정에서 손상된 근육을 지배하는 중추신경계에 변화를 유발시킨다는 것을 알 수 있다. 또한 손상 후 초기에는 관련 척수레벨의 감각신경원과 운동신경원 모두에서 TGF- β 의 발현에 영향을 주지만 시간경과에 따라 운동신경원에서의 TGF- β 발현에 더 많은 영향을 주는 것으로 보아 TGF- β 가 손상 후 운동기능의 회복과 관련됨을 추정할 수 있었다.

레이저(Laser)는 1917년 아인슈타인이 발표한 광입자론을 기본으로 하여, 1971년부터 그 개념이 발전되어 1960년대 Maiman의 Ruby Laser 실험 성공으로 Laser라는 용어가 체계적으로 확립되었고, 이후 Helium-Neon Laser, Argon Laser, Carbon Dioxide Laser 등의 개발과 더불어 의료용 치료기구로 그 적용이 점차적으로 확장되었다(계영철, 1996; 김식현과 전진석, 2000). 저강도 레이저란 조사시 조직내 온도 상승이 0.1-0.5°C 미만으로, 저강도 레이저 조사로 인한 조직내 생물학적 변화는 열효과(thermal effects)에 의한 것이 아니라 직접적인 조사 효과(direct irradiation effects)에 의한 것이다(Babapour, 1995). 반도체 레이저가 나오기 전에는 He-Ne 기체를 이용한 저강도 레이저 방법이 오랫동안 사용되었는데, He-Ne 레이저는 5mm 정도의 침투효과를 가지고 있는 반면에 반도체 레이저는 약 35-40mm의 침투효과를 나타내어 피부표면으로부터 깊은 부위, 즉, 내부 깊숙이 자리잡고 있는 부위에 대한 생물학적 효과를 나타낼 수 있는 장점이 있으며, 본 실험에서는 반도체 레이저의 일종인 GaAlAs 레이저를 사용하였다(류종희와 여환호, 1993).

Shefer 등(2002)은 분리된 위성세포를 배양하여 저강도 레이저를 조사한 결과 위성세포 자체의 생존뿐만 아니라 주변세포의 생존 또한 촉진시킴을 관찰하였고, 이와 더불어 세포사를 억제하는 물질인 Bcl-2의 증가와 세포사를 증가시키는 BAX가 감소됨을 관찰하였다. Ben-Don 등(1999)은 저강도 레이저 조사에 의해서 근육위성세포의 증식과 분화를 촉진시킨다고 하였고, Bibikova와 Oron(1995)은 toads의 비복근을 탈신경 시킨지 7일후에 He-Ne laser(6.0mW, 31.2J/cm²)로 조사한 결과 14일째 정상근육에과 비교했을 때 비슷한 조직학적 구조를 보였다고 보고하였다. Schwartz 등(2002)은 배양한 골격근에 He-Ne 레이저(633nm)를 조사한 후 칼슘의 양의 증가와 함께, NGFmRNA의 증가를 관찰하였다. 이러한 이전 연구들에 기초하여 저강도 레이저 조사가 손상 후 근육재생과정에 영향을 준다는 것을 알 수 있다.

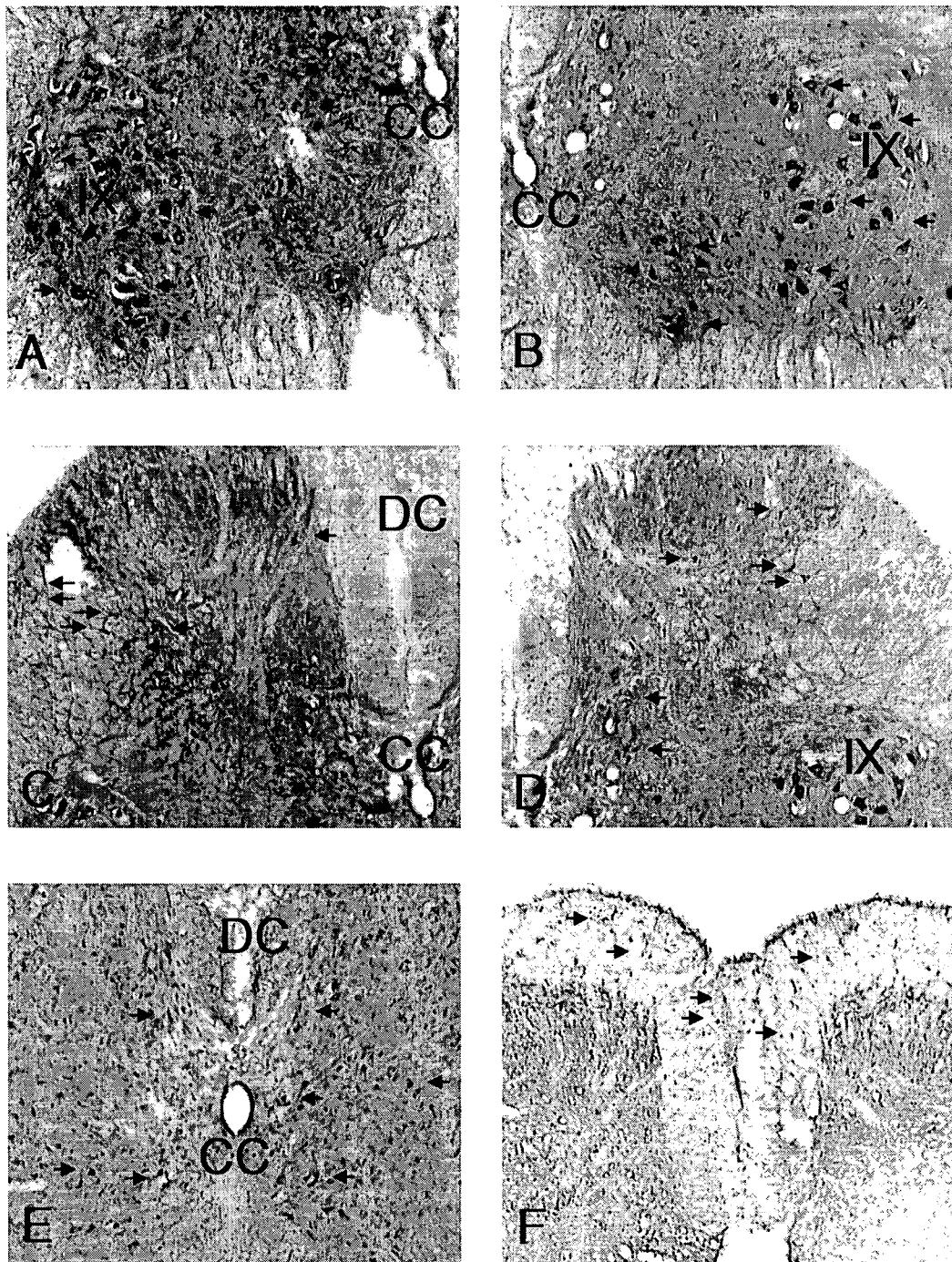


Fig. 1. The expression of TGF- β (black & white arrow) in spinal cord by irradiated laser directly on extensor digitorum longus muscle induced crushe muscle injury. A, B, C, D: experimental group with 3 day of injury($\times 40$), E: experimental group with 1 days of injury($\times 40$), F: control group with 2 days of injury($\times 40$). DC=dorsal column, CC=central canal of spinal cord, IX=IX of Rexed lamination.

근육의 재생과정에 있어 성장인자는 염증기에 혈소판의 α -파립, 그리고 대식세포에서 분비가 이루어지고, 회복기에는 염증기에 분비된 성장인자 등에 의해 손상부위로 이주된 섬유모세포, 상피세포, 케라틴 세포 등에 의해서 합성 및 분비가 이루어진다(Bennett과 Schultz, 1993). 일반적으로 성장인자는 구조적·기능적 유사성을 기초로 하여 크게 다섯 개의 그룹들로 나뉘는데, EGF, PDGF, IGF-1, FGF, 그리고 TGF- β 가 그것이다. 이 중 TGF- β 는 기본구조가 똑같은 다섯 개의 동형(isoform)을 가지는데, TGF- β s1, 2, 3은 포유류에서 나타나고, TGF- β 4는 닭에서, 그리고 TGF- β 5는 제노푸스(xenopus)에서 발견되는데, 이때 TGF- β s4, 5는 TGF- β 1과 동형체(homologue)이다(Flanders 등, 1998). 이러한 TGF- β 는 처음에는 신장(kidney) 세포의 군락형성(colony formation)을 자극하는 단백질로서 알려졌지만, 세포의 형질전환(transformation)을 측정하는 전형적인 방법으로써 사용되었기 때문에, 그러한 일차적인 생리학적 기능에 따라 TGF β 라고 명명되었다(Flanders 등, 1998). 현재 TGF- β 는 다기능 성장인자의 기본형(prototype)으로, activins, inhibins, BMP(bone morphogenetic proteins), GDF(growth and differentiation factor) 그리고 GDNF(glial derived neurotropic factor)와 같은 약 25 종의 성장인자에 대한 superfamily의 기본형으로 인식되어지고 있다(Gumienny와 Padgett, 2002). Walsh 등(1987)은 근육 손상 후 TGF- β 는 손상 후 1일부터 계속 발현이 된다고 보고하였고, Ignotz와 Massague(1986)는 손상 후 발현된 TGF- β 는 fibronectin, 콜라겐, proteoglycan 및 새로운 기질 단백질의 합성을 증가시킨다고 보고하였다.

본 저자들은 이전 연구에서 2000mW, 2000Hz의 GaAlAs 반도체 다이오드를 이용해 본 실험과 동일한 조건하에서 EGF의 발현을 척수분절에서 관찰하였다. 이때에도 대조군과의 차이를 관찰하였지만, EGF의 발현이 동측 척수후각의 lamina I, II, III에 국한되서 나타남을 관찰하였다(김석범 등, 2002). TGF- β 의 경우 척수후각뿐만 아니라 척수의 회백질에 전체적으로 대조군에 비해 강한 면역반응을 나타냈는데, 이는 근육손상에 대한 TGF- β 의 조절기능이 양측성으로 이루어지고 있음을 알 수 있고, 손상시 이루어지는 TGF- β 의 활성이 EGF와 비교하여 더욱 강하게 이루어짐을 시사하고 있다. 또한 좌골신경 압좌손상 후 손상부위와 관련된 척수레벨에 레이저를 조사하는 것이 레이저를 조사하지 않은 대조군에 비하여 더 빠른 운동기능회복을 관찰하였는데(김석범 등, 2001), 이러한 연구결과들에서 유추하여 볼 때 TGF- β 가 손상 후 시간경과에 따라 운동신경원에 더 많이 관찰되는 것을 운동기능회복의 촉진과도 연관시켜 볼 수 있다고 사료된다. 지금까지의 연구결과들을 종합하여 볼 때, 근육손상 후 손상부위의 레이저 조사가 관련 척수분절에서의 성장인자의 발현을 증가시킴을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- 계영철 : 레이저치료의 임상적 적용, 가정의학회지, 17(4), 38-43, 1996.
김석범, 김동현, 남기원 등 : 저강도레이저 조사가 근육압좌손상 후 척수분절의 EGF 발현에 미치는 영향, 대한물리치료학회지, 14(2), 29-36, 2002.
김석범, 김동현, 송주민 등 : 훈련 좌골신경 압좌손상 후 척수분절의 저강도 레이저 조사가 운동기능 회복에 미치는 영향, 대한물리치료학회지, 13(3), 560-578, 2001.
김석현, 전진석 : 저강도 레이저 조사에 의한 가토 피부의 상처 치유에 관한 연구, 대한의생

- 명 과학회지, 6(2), 119-129, 2000.
- 류종희, 여환호 : Ga-As 레이저 조사가 가토의 좌골신경재생에 미치는 영향에 관한 실험적 연구, 구강생물학연구, 17(2), 553-563, 1993.
- 박준식 : TGF- β 수용체 신호전달계를 통한 종양 억제 조절 기작, 유전공학연구소보, 13, 195-217, 1998.
- Ana MG, Zhang L, Wang W, et al : Induction of p21waf1 expression and growth inhibition by transforming growth factor β involve the tumor suppressor gene DPC4 in human pancreatic adenocarcinoma cells, Cancer Research, 57, 3929-3933, 1997.
- Babapour R : Low-energy laser system, Clinics in dermatology, 13, 87-90, 1995.
- Ben-Don N, Shefer G, Irintchev A et al : Low-energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro, Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Molecular Cell Research, 1448(3), 372-380, 1999.
- Bennett NT, Schultz GS : Growth factor and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors, The American Journal of Surgery, 165(6), 728-737, 1993.
- Bibikova A, Oron U : Regeneration in denervated toad(*bufo viridis*) gastrocnemius muscle and the promotion of the process by low energy laser irradiation, Anatomical Record, 241(1), 123-128, 1995.
- Flanders KC, Ludecke G, Engels S, et al : Localizations and actions of transforming growth factor- β s in the embryonic nervous system, Development, 113, 183-191, 1991.
- Flanders KC, Pen RF, Lippa CF : Transforming growth factor- β s in neurodegenerative disease, Progress in Neurobiology, 54, 71-85, 1998.
- Grounds MD : Towards understanding skeletal muscle regeneration, Pathology, Research and Practice, 187(1), 1-22, 1991.
- Gumienny TL, Padgett RW : The other side of TGF- β superfamily signal regulation: thinking outside the cell, TRENDS in Endocrinology & Metabolism, 13(7), 295-298.
- Heldin CH, Miyazono K, Dijke P : TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins, Nature, 390, 465-471, 1997.
- Husmann I, Soulet L, Gautron J, et al : Growth factors in skeletal muscle regeneration, Cytokine & Growth Factor Reviews, 7(3), 249-258, 1996.
- Ignatz RA, Massague J. : Transforming growth factor β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix, Journal of Biology and Chemistry, 26, 4337-4345, 1986.
- Khanna A, Shankar LR, Keelan MH, et al : Augmentation of the expression of proangiogenic genes in cardiomyocytes with low dose laser irradiation in vitro, Cardiovascular Radiation Medicine, 1(3), 265-269, 1999.
- Lefaucheur JP, Sebille A : Muscle regeneration following injury can be modified in vivo by immune enurulation of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor β 1 or insulin-like growth factor I, Journal of Neuroimmunology, 57, 85-91, 1995.
- Nagasawa A, Kato K, Negishi A : Bone regeneration effect of low level lasers including argon laser, Laser Therapy, 3, 59-62, 1991.

- Pelton RW, Szxena B, Jones M, et al : Immunohistochemical localization of TGF β 1, TGF β 2 and TGF β 3 in the mouse embryo: expression patterns suggest multiple roles during development, *Journal of Cell Biology*, 115, 1091-1105, 1991.
- Rochkind S, Nissan M, Alon M, et al : Effects of laser irradiation on the spinal cord for the regeneration of crushed peripheral nerve in rats, *Lasers in Surgery and Medicine*, 28, 216-219.
- Schwartz F, Brodie C, Appel E et al : Effect of helium/neon laser irradiation on nerve growth factor synthesis and secretion in skeletal muscle culture, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 66(3), 195-200, 2002.
- Shefer G, Partridge TA, Heslop L, et al : Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells, *Journal of Cell Science*, 115(7), 1461-1469, 2002.
- Stadler I, Lanzafame RJ, Evans R, et al : 830-nm irradiation increases the wound tensile strength in a diabetic murine model, *Lasers in Surgery and Medicine*, 28(3), 220-226, 2001.
- Unsicker K : GDNF: a cytokine at the interface of TGF- β s and neurotrophins, *Cell Tissue Research*, 286, 175-178, 1996.
- Walsh SM, Hunt DA, Wakefield LM, et al : Transforming growth factor β (TGF β) induces monocyte chemotaxis and growth factor production, *Proc Natl Acad Sci USA*, 84, 5788-5792, 1987.
- Zorzano A, Kaliman P, Guma A, et al : Intracellular signals involved in the effects of insulin-like growth factors and neuregulins on myofibre formation, *Cellular Signalling*, 5619, in press, 2002.