

GaAlAs 저출력 레이저 자극이 흰쥐의 피부 전층결손 절제 창상의 치유시 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 발현에 대한 면역조직화학법적 분석

안산대학 물리치료과

김순자 · 구희서

Immunohistochemical analysis of the effect of low power GaAlAs laser treatment on the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in full-thickness excisional wound of rat skin

Kim, soon - ja, Koo hee- seo.

Dept. of Physical Therapy, Ansan Collage

-ABSTRACT-

We evaluated the effect of low power GaAsAl laser on re-epithelization in full-thickness excisional wound of rat skin. Two full-thickness excisions were made on the back of the experimental animals. Low power laser applications with 10mW intensity were treated experimental animals twice a day for 7 days. On the seventh postoperative day the quantitative analysis of re-epithelization was performed using immunohistochemical staining for proliferating cell nuclear antigen (PCNA).

The majority of PCNA immunoreactive cells was observed at epithelial cells in the margin of full thickness excisional wound. The low power laser treatments significantly increased the number of PCNA immunoreactive cell as compared to that of non treated animal group ($p < 0.01$). The shape of PCNA immunoreactive cell appeared as small dark, round to ovoid structures. Most PCNA immunoreactive cells exhibited a high intensity of staining that contrasted sharply with the surrounding background.

In conclusion, these findings suggest that GaAlAs laser treatments effectively enhance the epithelial wound healing by the stimulating cell proliferation. Furthermore, the majority of cell proliferation occurred in the margin of full thickness excisional wound.

Key words: GaAlAs laser; Wound healing, proliferating cell nuclear antigen, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry, Image analysis.

I. 서 론

He-Ne 레이저와 같은 저출력 레이저는 현재 임상에서 급성 및 만성 창상의 치료 (Kana et al., 1981; Kitchen and Partridge, 1991; Bisht et al., 1994)를 위해 사용되고 있으며, 다양한 종류의 괴양치료 (Kovacs and Tisza, 1981) 및 염증으로 인한 부종의 억제 (Baxter, 1994)를 위해서도 사용된다. 창상치료에 대한 레이저의 조사의 영향에 대한 실험에서 저출력 레이저의 조사는 창상이 치유되는 과정에서 결합조직간의 장력을 증가시킴으로써 파열에 대한 저항성이 증가시키는 것으로 밝혀져 있다 (Surinckh et al., 1983).

이러한 창상 치유는 재생피화, 수축, 육아조직형성 및 교원질 합성 등을 포함하는 복잡한 과정을 통하여 이루어진다 (Peacock and Winkle, 1976; Buckley et al., 2000; Hasan et al., 2000). 특히 창면 면적의 감소는 재생피화와 수축이라는 서로 다른 특성을 가지는 상이한 치유 기전에 의해 동시에 유도되는 현상으로 알려져 있으며, 이러한 이유로 창상의 치유 효능을 분석함에 있어서 창상면적의 감소속도만을 분석하는 것만으로는 창상 치유에 대한 효능을 명확하게 평가할 수 없다 (Cass et al., 1997; Estes et al., 1994; Manxi et al., 1999; Bernadete et al., 1998)..

창상면적이 감소하는데는 피부 손상 후 정상 표피 세포가 유사 분열하여 기저 세포를 대체해 주고, 대체된 기저 세포는 피부 결손부를 향해 이동하게 된다. 이 기저세포는 섬유소 그물을 따라 창상 경계면에서부터 창상 중심부로 이동하며 창상면 양쪽에서 이동해오던 기저세포가 서로 만나게 되면 이동을 멈추고 표피의 두께가 정상일 때 까지 유사분열을 계속하여 표피세포의 밀도를 증가시킴으로써 상피화가 이루어지게 된다. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)은 분열중인 세포의 핵내에서 발현되는 단백질로서 상피화 및 육아조직 형성에 대한 지표로서 사용되어 왔다 (Benrath et al., 1995; Hall et al., 1990; Frank et al., 1992).

이에 본 실험에서는 인위적으로 실험동물에 전층결손 절제 창상을 유발시킨 후 앞서 창상 치유를 촉진시키는 것으로 관찰된 10mW 강도의 저출력 레이저를 창상부위에 조사함으로써 창상 경계면내의 피부 창상치유와 관련된 재생피화와 수축에 미치는 영향을 평가하고자 하고자 하였다. 이를 위해 α -SMA와 PCNA에 대한 면역조직화학법 및 컴퓨터와 연계된 영상분석기법을 이용하여 정성 및 정량 분석하여 수축과 상피화 정도를 관찰하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에서는 250-300g인 Sprague Dawley종 수컷 백서 (바이오 제노믹스)를 사용하였다. 실험 기간 중 스트레스 및 환경의 변화를 최소화하였으며, 실험전후에 동물의 상태를 점검하여 외상의 여부와 질병상태를 검사하고, 이를 바탕으로 정상 실험동물을 선별하여 실험에 사용하였다. 동물실은 온도 $24 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 로 조절되었으며 명암은 12시간 주기로 자동 조절되었다. 또한 사료와 물은 자유롭게 섭취토록 하였으며, 모든 실험동물은 1주이상 실험환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2. 레이저 자극방법

GaAlAs type 의 endolaser 476 레이저조사기 (최대 파장 780nm, Asah Medico, Denmark)를 사용하였으며, 최대 10mW(6J/10min)의 강도로 레이저를 조사하였다. 레이저 자극시 흡입마취로 가볍게 마취한 후 실험동물을 플라스틱으로 제작한 고정틀(Ugo Basile)을 사용하여 고정하였으며, 창상부위에 12시간 간격으로 일일 2회 10분간 직접 조사하였다.

3. 전층결손 절제 창상의 유발

실험 군과 대조군에서 8% chloral hydrate(0.5 ml/100 g)를 복강 주사하여 마취한 후 백서의 등 부위에 있는 털을 제거하였다. 백서의 등 두 군데에 직경 2cm의 크기로 원을 작도한 후 소독된 가위를 사용하여 표피 및 진피 층을 제거하여 결손창상을 유발하였다.

4. 실험군

창상 경계면내의 피부 창상치유와 관련된 재상피화와 수축에 미치는 영향을 평가하고자 레이저 처치군 (n=10)으로는 본 실험에 사용한 레이저 조사기의 최대강도인 10mW의 강도로 일일 2회 각 10분간 창상에 레이저를 조사한 실험 군과 대조군으로는 레이저 조사 군에서 실시한 보정과 마취는 시행하되 레이저 조사를 생략한 무 처치 대조군 (n=10)으로 나누어 실험을 실시하였다.

5. PCNA 면역조직 화학염색

PCNA에 대한 면역조직화학반응을 유도하기 위해 조직절편을 xylene 을 이용하여 파라핀을 제거하고 100, 90, 80, 70% 알코올과 증류수로 10분간 함수 시킨 후 최종적으로 phosphated buffered solution (PBS)으로 세척하였다. 함수 과정과 PBS세척을 마친 조직을 3% 과산화수소에 30분간 반응시킨 다음 PBS로 10분씩 3회 세척하였다. 또한 단백질 결합을 억제하기 위하여 조직 절편을 실온에서 10% 표준혈청을 사용하여 1시간동안 처리하였다. 일차 항체 (PCNA,1:100; Dako)의 처리는 4°C에서 12시간 이상 반응을 유도하였으며, 반응 후 PBS로10분씩 3회 세척하였다. 2차 항체에 대한 처리는 biotin이 표지된 anti- mouse Ig G (1:200, Vector)를 이용하였으며, 3차 항체에 대한 반응은 2차 항체와 특이적 결합을 하는 avidin-biotin-peroxidase complex (ABC kit; Vector)를 사용하여 각각 반응을 유도하였으며, 반응이 끝난 조직은 세척과정을 거친 후, 0.05%

diaminobenzidine tetrahydro-chloride(DAB)-0.03% H2O2로 발색시켰다. 발색과정이 완결된 조직은 PBS로 세척하였으며, 70, 80, 90, 100% 알코올 및 xylene을 이용하여 탈수한 후 Permount (Fisher)로 봉입하였다.

6. 영상분석

PCNA에 대한 면역성을 분석하기 위하여 광학현미경과 형광현미경 (Zeiss Axioscope, Germany)을 이용하여 창상 경계면을 현미경 시야하에서 cooled CCD camera (Micromax Kodak 1317, Princeton instrument,USA)를 이용하여 100배율인 영상을 수집하고, 화상 분석 장치(Image Analysis System, Metamorph,USA)를 이용하여 회색단계(Gray level)의 평균값이 70% 이상의 강도에서 PCNA에 대해 양성 면역반응을 나타내는 세포 수를 측정하였다.

9. 통계학적 처리

Metamorph와 Optimas에 의해 자동으로 측정된 값을 이용하여 통계처리하였으며, 실험결과로 얻은 수치는 평균 표준편차로 표시하였다. 통계학적 유의성은 paired t-test로 검정하였다. 유의 수준은 5% 미만에 두었다.

III. 결 과

1. PCNA에 대한 조직학적 분석

그림1.에서 나타난 바와 같이 PCNA에 대한 양성 면역반응을 나타내는 세포(arrows)는 무처치 대조군 (A)에서 관찰되는 것에 비해 저출력 레이저를 조사한 실험군(B)에서 면역반응의 강도 및 양성 세포의 수가 현저히 증가되어 관찰되었다. 이러한 PCNA에 대한 양성 반응 세포는 대부분 창상 경계면의 신생 상피와 기저 세포층을 중심으로 관찰되었으며, 면역

성은 원형이나 타원형의 형태로 세포핵내에 존재하는 것으로 관찰되었다. 레이저를 처치한 실험군에서는 면역성은 주변조직에 비해 현저히 증가하는 양상을 보였으며, 무처치 대조군에서 관찰되는 면역성에 비해 현저히 증가되어 관찰되었다.

Each data represented as mean±SEM.

** P<0.01 Compared with Non-treat.

2. PCNA 양성 세포의 수적변화에 대한 영상분석

PCNA에 대해 양성 면역반응을 나타내는 세포의 수는 저출력 레이저를 처치한 실험군에서 무처치 대조군에 비하여 유의성 있게 증가되어 관찰되었다 (표 1 및 그림 2: p<0.01). 저출력 레이저 조사군에서 측정된 PCNA에 대한 양성 면역 반응을 나타내는 세포의 수는 453.8±21.3개로 무처치 대조군의 388.1±29.3개와 비교할 때 현저히 증가는 것으로 관찰되었다 (표 1, p<0.01).



그림1)(A)저출력 레이저 무 처치군 PCNA의 증식상태.
(B)저출력 레이저 처치군 PCNA 증식상태.

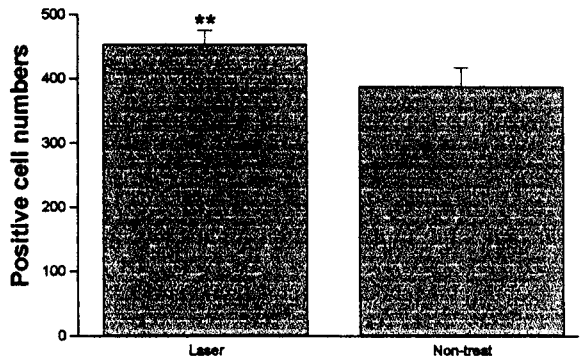


그림2) PCNA 양성 세포의 수적변화에 대한 영상 분석 비교

표 1. 처치군과 무 처치군의 PCNA 증식 수

	No. of PCNA positive cells
Laser treat	453.8±21.3**
Non-treat	388.1±29.3

IV.고 찰

현재까지 피부의 창상 치유를 촉진시키는데 직접 관여하는 요인에는 창상내 피부에 함유되어 있는 섬유아세포와 각질세포의 유사분열을 촉진시키는 표피 성장 인자, 전이 성장 인자 (TGF)- α 등이 밝혀져 있다 (Coffey et al.,1987; Nanney et al., 1984; Reinwald and Green, 1977). 뿐만 아니라 이들 표피 성장인자, Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)

및 전이 성장 인자 (TGF)- β 와 같이 창상 주위세포에 의해 분비되는 여러 가지 성장 인자들이 섬유아세포의 분열과 성장에 영향을 주어 창상 수축에 관여함으로써 창상치유가 촉진되는 것으로 알려져 있다 (Cass et al., 1997; Estes et al., 1994; Schmitt et al., 1994; Gabbiani, 1996).

현재 임상에서 저출력 레이저는 동증, 괴양치료, 급성 및 만성 창상의 치료, 그리고 부종의 감소 및 억제 효능을 위해 이용되고 있다 (Baxter, 1994; Kitchen and Partridge, 1991; Kovacs and Tisza, 1981). 특히 He-Ne 레이저를 이용한 동물실험에서 저출력 레이저의 조사는 창상의 치유속도를 증가시키는 것으로 알려져 있다 (Kana et al., 1981; Bisht et al., 1994). 뿐만 아니라 창상에 대한 레이저의 조사는 창상이 치유되는 과정에서 결합조직간의 장력을 증가시켜 파열에 대한 저항성이 증가하는 것으로 밝혀져 있다 (Surinchak et al., 1983). 이러한 실험적 근거를 바탕으로 본 실험에서는 앞서 저출력레이저의 출력을 달리하여 실험한 결과, 10mW 강도인 저출력 레이저를 조사한 경우 전층결손 창상에서 탁월한 창상 치유 증진효과를 관찰하였으며, 특히 조직학적으로 창상치유면에서 신생상피 및 섬유아세포의 생성이 증가하고, 육아조직의 신생축진을 통한 교원질의 합성을 증가되었으며, 창상조직내의 신생혈관의 생성이 증가함을 관찰할 수 있어 종래에 발표된 연구논문들의 결과와 일치함을 알 수 있었다.

저출력 레이저가 가지는 창상치유효능에 관련된 기전을 밝히기 위해 다양한 세포배양기술을 이용한 실험에서 섬유아세포의 활성증가 및 교원질 합성이 보고되었으나 (Atabay et al., 1995; Conlan et al., 1996; Lyons et al., 1987), 실제 실험동물을 이용한 창상치유과정에서 이들 섬유아세포의 유사분열 및 수축에 관여하는 근 섬유아 세포(myofibroblast)의 활성의 변화에 관한 연구는 미약한 실정이다.

일반적으로 세포의 증식능력을 측정 하는데 이용될 수 있는 생물학적 지표인자에는 여러 가지가 알려져 있지만 그중 PCNA는 세포 주기 중 성장1단계

말기에 증가하기 시작하여 S기에 최대가 되고 성장2단계 M기에 다시 감소하는 특성이 있어 세포의 증식 능력을 판정하는 데 좋은 지표인자로 알려져 있다. 즉 PCNA는 분열중인 핵 내에서 발현되는 단백질로서 PCNA에 대한 면역염색은 특정 조직의 분열 정도의 지표가 될 수 있으며 육아조직의 형성 및 상피화 정도를 평가할 수 있는 좋은 지표로 알려져 있다 (Benrath et al., 1995; Hall et al., 1990; Frank et al., 1992). PCNA는 증식되는 상피와 진피의 땀샘, 모낭 등에서 핵이 증식되는 형태로 나타나고 창상 치유가 진행됨에 따라 감소한다. 표피화는 피부 손상 후 정상 표피 세포가 유사 분열하여 기저 세포를 대체해 주고, 기저 세포는 피부 결손부를 향해 이동함으로써 유도되며, 이러한 과정 중에서 표피 성장 인자는 세포의 증식을 자극함으로써 표피화를 촉진하는 것으로 알려져 있다 (Brown et al., 1991; Murata et al., 1989; Wenczak et al., 1992). 본 실험에서 PCNA에 대한 면역조직 화학적 분석결과에서 저출력 레이저 조사군에서 PCNA에 대해 양성면역반응을 나타내는 세포의 수가 창상 경계면의 신생 상피 세포와 기저 세포층에서 유의성 있게 증가하는 것으로 관찰되었으며, 창상면적 감소율에서 창상 치유 속도가 현저히 촉진되는 것과 Masson's Trichrome에서 신생상피 및 육아조직 형성의 증가의 관계를 생각해 볼 때 이는 표피성장인자가 상피의 증식만을 촉진시키는 것뿐만 아니라 세포의 이동에도 관여한다는 보고와 동일한 결과를 관찰할 수 있었다 (Grant et al., 1992).

창상치유에 있어 재상피화와 더불어 중요한 역할을 담당하는 것이 창상수축이다. 이러한 창상수축은 근 섬유아 세포(myofibroblast)의 수축력에 의해 매개되는 것으로 알려져 있다 (Cass et al., 1997; Estes et al., 1994; Manxi et al., 1999; Bernadete et al., 1998). 근 섬유아 세포myofibroblast는 정상 피부의 섬유모 세포로부터 유래하며 (Schmitt et al., 1994; Gabbiani, 1996) 섬유모 세포는 PDGF와 EGF 및 TGF- β 와 같이 창상 주위 세포에 의해 분비되는 성

장 인자들에 의해 영향을 받으며 (Montesano and Orci, 1988; Park et al., 2000; Hasan et al., 2000), 저출력 레이저조사에 의해서도 섬유아세포의 증식이 촉진되는 것으로 알려져 있다. 따라서 앞으로 저출력 레이저 조사에 의한 창상치유능력을 규명함에 있어 저출력 레이저의 조사가 창상수축에 미치는 영향에 대한 평가가 병행되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

실험동물을 이용하여 전층 결손 절제 창상을 유발시킨 후 인공적으로 10mW의 저출력 레이저를 국소적으로 처치하였을 때 나타나는 창상부위의 재생피화에 미치는 영향에 대해 분석하고자 면역조직화학법과 영상분석기법을 이용하여 실험을 수행하였다.

본 실험에서는 실험동물의 등에 두 개의 전층 결손 절제 창상을 유발한 후, 10mW의 저출력 레이저를 7일동안 하루에 두 번씩 10분간 처치하였다. 창상 유발 후 7일째에 레이저의 처치가 재생피화에 미치는 영향을 평가하기 위해 proliferating cell nuclear antigen (PCNA)의 발현을 면역 조직 화학법 및 영상분석기법을 이용하여 정성 및 정량분석 하였다.

저출력 레이저를 창상유발후 처치한 실험군에서 PCNA에 대해 양성 면역반응을 나타내는 세포가 창상경계면의 신생상피조직과 기저세포층을 중심으로 관찰되었다. PCNA에 대해 양성 면역반응을 나타내는 세포는 원형에서 타원형인 염색성을 나타내었으며, 주변의 조직과 확연히 구분되어 관찰되었다. 뿐만 아니라 이러한 PCNA에 대해 양성 면역반응을 나타내는 세포의 수를 영상분석장치를 이용하여 정량 분석한 결과, 무처치 대조군에 비해 저출력 레이저를 처치한 실험군에서 현저히 증가되었다 ($p < 0.01$).

이상의 결과에서 저출력 레이저 자극은 창상의 치유과정중에서 세포 증식을 효과적으로 자극하여 재생피화를 촉진시켰으며, 또한 저출력 레이저자극에 의해 촉진된 재생피화는 창상의 경계면을 중심으로 일어나는 것으로 관찰되었다.

참 고 문 헌

- Atabey A, Karademir S, Atabey N, Barutcu A. The effects of the helium neon laser on wound healing in rabbits and on human skin fibroblasts in vitro. *Eur J Plast Surg* 1995; 18: 99-102
- Baxter GD. *Therapeutic Lasers: Theory and Practice*. London: Churchill Livingstone 1994: 89-138
- Bernadete N, Dodd CM, Scott PG, Ghahary A, Tredget EE. Effect of interferon- $\alpha 2\beta$ on guinea pig wound closure and the expression of cytoskeletal proteins in vivo. *Wound Rep Reg* 1998; 6: 202-212
- Benrath J, Zimmermann M, Gillardon F. Substance P and nitric oxide mediate wound healing of ultraviolet photodamaged rat skin. *Neuroscience Letters* 1995; 200: 17-20
- Bisht D, Gupta SC, Misra V, Mital VP, Sharma P. Effect on low intensity laser radiation on healing on open skin wounds in rats. *Indian J Med Res* 1994; 100: 43-46
- Brown GL, Curtisinger L, Jurkiewicz MZ, Nahai F, Schultz G. Stimulation of healing of chronic wounds by epidermal growth factors. *Plast Reconstr Surg* 1991; 88: 189-194
- Buckley A, Davidson JM, Kamerath CD, Wolt TB, Woodward SC. Sustained release of epidermal growth factor accelerates wound repair. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 82: 7340-7344
- Cass DL, Sylvester KG, Yang EY, Crombleholme TM, Adzick NS. Myofibroblast persistence in fetal sheep wounds is associated with scar formation. *J Pediatr Surg* 1997; 32: 1017-1021
- Coffey RJ, Drynek R, Wilcox JN, Bringman TS, Goustin AS, Moses HL, Pittelkow MR. Production and auto-induction of transforming growth factor

- alpha in human keratinocytes. *Nature* 1987; 328: 817-820
- Conlan MJ, Rapley JW, Cobb CM. Biostimulation of wound healing by low energy laser irradiation: A review. *J Clin Periodontol* 1996; 23: 492-496
- Estes JM, Vande-Berg JS, Adzick NS, Mac-Gillivray TE, Desmouliere A, Gabbiani G. Phenotypic and functional features of myofibroblasts in sheep fetal wounds. *Differentiation* 1994; 56: 173-181
- Frank FI, Marina F, Elaine Y. Proliferating cell nuclear antigen(PCNA): a marker for cell proliferation in autopsy tissue. *Arch Pathol Lab Med* 1992; 16: 1142-1146
- Gabbiani G. The cellular derivation and the life span of the myofibroblast. *Pathol Res Pract* 1996; 192: 708-711
- Grant MB, Khaw PT, Schultz GS, Asams JL, Shimizu RW. Effects of EGF, FGF, and TGF- β on corneal cell chemotaxis. *Invest Ophthalmol Vis sci* 1992; 33: 3292-3301
- Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA. PCNA immunolocalization in paraffin sections. *J Pathol* 1990; 162: 285-294
- Hasan W, Zhang R, Liu M, Warn JD, Smith PG. Coordinate expression of NGF and α -smooth muscle actin mRNA and protein in cutaneous wound tissue of developing and adults rats. *Cell Tissue Res* 2000; 300: 97-109
- Kana JS, Hutschenreiter G, Haina D, Waidelich W. Effect of low power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. *Arch Surg* 1981; 116: 293-296
- Kitchen SS, Partridge CJ. A review of low level laser therapy. *Physiotherapy* 1991; 77: 161-170
- Kovacs L, Tisza S. Treatment of ectropium with low output He-Ne laser. *Neoplasma* 1981; 28: 351-354
- Lyons RF, Abergel RP, White RA, Dwyer RM, Castel JC, Uitto J. Biostimulation of wound healing in vivo by a Helium-Neon Laser. *Ann Plast Surg* 1987; 18: 47-50
- Manxi L, Donald JW, Qin F, Peter GS. Relationships between nerves and myofibroblasts during cutaneous wound healing in the developing rat. *Cell Tissue Res* 1999; 297: 423-433
- Montesano R, Orci L. Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85(13): 4894-4897
- Murata T, Ishibashi T, Inomata H. Location of epidermal growth factor receptor and proliferating cell nuclear antigen during corneal wound healing. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1989; 231: 104-108
- Nanney LB, Magid M, Stoscheck CM, King LE. Comparison of epidermal growth factor binding and receptor distribution in normal human epidermis and epidermal appendage. *J Invest Dermatol* 1984; 83: 385-393
- Park JS, Kim JY, Cho JY, Kang JS, Yu YH. Epidermal growth factor (EGF) antagonizes transforming growth factor (TGF)- β 1-induced collagen lattice contraction by human skin fibroblasts. *Biol Pharm Bull* 2000; 23(12): 1517-1520
- Peacock EF, Winkle VW. *Wound Repair* 2nd ed. Philadelphia: 1976. p22-53
- Reinwald JG, Green H. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature(Lond)* 1977; 265: 421-424
- Schmitt GA, Desmouliere A, Gabbiani G.

Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features:an
example of fibroblastic cell plasticity. Virchows Arch,
1994; 425: 3-24

Surinchak JS, Alago ML, Bellamy RF, Stuck BE,
Belkin M. Effects of low level energy lasers on
the healing of full thickness skin defects. Lasers
Surg Med 1983; 2: 267-274

Wenczak BA, Lynch JB, Nanney LB. Epidermal
growth factor receptor ditribution in burn
wounds. J Cli Invest. 1992; 90(6): 2392-2401