

InGaAlP 레이저다이오드를 적용한 Rat의 창상 치유에서 면역조직화학적 연구

A Study on the Immunohistology in Injury Cure of Rat by using InGaAlP Laser Diode

유성미¹, 박용필², 천민우^{2,a}
(Seong-Mi Yu¹, Yong-Pil Park², and Min-Woo Cheon^{2,a})

Abstract

The apparatus has been fabricated using the laser diode and microprocessor unit. The apparatus used a InGaAlP laser diode for laser medical therapy and was designed for a pulse width modulation type to increase stimulation effects. To raise the stimulus effect of the human body, the optical irradiation frequency could be set up. The study has executed in-vivo experiment by employing our own developed laser diode irradiation system to investigate the effects of the InGaAlP laser diode irradiation on the wound healing as a preliminary study aimed at the application of InGaAlP laser diode to wound healing of human skin injury. The study cut out whole skin layers of Sprague-Dawley rat on the back part in 1 cm circle and observed developing effects after executing light irradiation for 9 days, and in result it is found that the light irradiation rat showed earlier wound healing than non-irradiation rat during the experimental period. In addition, there are some differences found regarding the healing process between laser diode irradiated rats and non-irradiated ones.

Key Words : InGaAlP laser diode, Low level laser therapy, Injury cure, Immunohistology test

1. 서론

현대는 의료소비자들의 건강회복에 대한 요구도가 점차 증가됨에 따라 많은 첨단 의료기술을 이용한 각종질병의 치료와 회복률이 증진되어 가고 있다. 최근 수술부위의 창상범위 최소화와 치유촉진을 위한 의료계의 노력에 따라 많은 다학제간의 연구가 이루어지고 있다. 피부에 물리적인 손상이 가해져서 정상적인 피부 구조물의 연속성이 파괴된 경우를 창상이라고 하며 이런 불연속성을 복구하는 과정이 창상치유이다[1]. 창상치유는 생물이 지니고 있는 필수적인 생명현상으로 조직의 파괴

에 따라 일어나는 역동적이고 복잡한 다단계과정이다[2].

한편 수술부위 절개, 창상치유 등과 같은 의료 분야에 최근 레이저 기술이 폭넓게 활용되어지고 있는데 이러한 레이저는 단일 파장의 빛으로 일반적인 광원과는 다르게 퍼지지 않는 연속된 빛을 의미한다. 1960년대 최초의 루비레이저가 개발[3]된 이후 고체, 액체, 기체, 반도체 등의 다양한 매질의 개발로 레이저는 급속한 발전을 하고 있으며 레이저의 단색성, 지향성 등의 특정 성질을 이용하여 다양한 산업 및 의료 분야에 사용되어 지고 있다. 레이저를 이용한 의료 기술은 크게 고출력 레이저와 저출력 레이저로 나눌 수 있다. 고출력 레이저는 열적효과를 이용한 수술부위의 절개, 혈액응고, 등의 외과적 치료[4-6]에 주로 사용된다. 저출력 레이저는 세포의 기능을 자극하여 활성화시킨다[7]는 사실이 밝혀지면서 각광 받기 시작하였

1. 광주보건대학 간호학과
2. 동신대학교 병원의료공학과
(전남 나주시 대호동 252)
a. Corresponding Author : ccuccu7@lycos.co.kr
접수일자 : 2009. 4. 10
심사완료 : 2009. 4. 15

다. 저출력 레이저 치료에 대한 효과나 안전성이 발표되고 유럽 레이저 학회에서 임상결과가 입증되면서 국제적으로 공인된 치료법으로 각광 받고 있다. 저출력 레이저는 연조직의 창상에 대한 자극 효과가 알려지면서 동유럽과 러시아에서 창상치유 [8] 및 통증억제[9]를 위해 많이 사용되어 지고 있다. 의료용 레이저는 레이저 빔의 조사에 따라 발생하는 스펙트럼 변화나 형광물질의 시간 변화에 따른 변이를 측정하여 사용하는 진단용, 고에너지 를 이용하여 수술에 사용함으로 절개부위의 출혈을 최소화하고 상처회복기간을 단축시킴으로서 감염을 예방하는데 기여할 수 있다.

본 연구에서는 InGaAlP 레이저다이오드를 인체 치료 목적에 사용하기 위한 기초 실험으로써 성체의 Rat 피부 창상에 InGaAlP 레이저다이오드를 조사한 후, 면역조직화학염색법을 이용하여 PCNA의 발현을 관찰하고 창상의 감소를 형태학적으로 규명하여 창상치유에 InGaAlP 레이저다이오드의 효능을 확인하였다.

2. 실험

2.1 실험동물 모델

본 실험에서는 생후 8주된 250 ~ 300 g의 Rat 수컷 성체를 사용하였고 실험 기간 중 외상 여부와 질병 상태를 점검하고 환경의 변화를 줄여 스트레스 요인을 최소화하였다. 동물 사육실의 온도는 21 ~ 23 °C로 자동 조절되었고, 전용사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다. Rat의 창상을 만들기 위해 세보플루란(sevoflurane) 호흡마취제를 사용하여 마취한 후, 실험동물의 등 부위에 털을 제거하였다. 창상의 크기를 균일하게 하기 위해 집게 형태의 도구에 지름 1 cm의 원형 칼날과 칼집을 달아 창상을 만들 도구를 제작하였으며, 실험동물의 척추를 기준으로 좌우를 판별시켜 표피 및 진피 층을 제거하여 결손 창상을 유발하였다.

2.2 레이저다이오드 조사기

본 기기는 의료용으로 사용하는 부피가 크고 고가인 레이저를 대신하여 소형의 레이저다이오드를 창상 치유 및 피부미용, 혈액순환 개선 등의 다양한 치료에 적용할 목적으로 개발되었다[10].

그림 1에 개발한 기기의 시스템 구성도를 나타냈다. 기기의 전반적인 동작 제어에는 ATmel社의 8bit 마이크로컨트롤러인 ATmega 16을 사용했

다. ATmega16은 RISC 구조로 2.7~5.5 V에서 동작을 하며, 자체프로그램이 가능한 16K 바이트의 플래쉬 메모리와 전기적인 방법으로 프로그래밍이 가능한 512 바이트의 EEPROM, 1K 바이트의 데이터 저장용 SRAM, 32개의 프로그래밍이 가능한 I/O라인으로 구성되어 있다. 레이저의 조사 시간은 1~60 분까지 분 단위 조절이 가능하며 마이크로컨트롤러의 타이머 함수를 이용하여 1~10 Hz까지 점멸조사가 가능하도록 설계하였다. 기기는 휴대사용이 가능하도록 Battery를 사용하여 동작가능하게 설계하였다.

레이저다이오드의 빛은 cytochrome oxidase를 자극하여 mitochondria respiration을 증가시켜 세포 증식기에 영향을 준다. 따라서 적용할 조직 부위나 질병의 종류에 따라 사용하는 파장을 선택할 수 있도록 커넥터를 사용하여 Laser Diode의 모듈부가 탈부착이 가능하도록 설계하였다. 컨트롤러와 레이저다이오드는 케이블을 사용하여 연결하여 사용목적에 맞게 조사가 용의하도록 하였다.

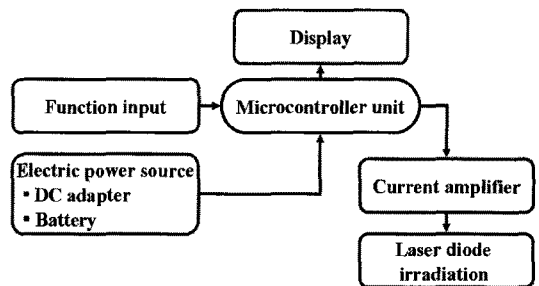


그림 1. 기기의 구성도.

Fig. 1. Block diagram of equipment.

2.3 동물 실험

레이저다이오드의 조사가 Rat의 창상 치유에 미치는 영향을 확인하기 위해 자체 개발한 레이저다이오드 조사기를 사용하였으며, InGaAlP 레이저다이오드를 조사하지 않은 Rat과 레이저다이오드를 조사한 Rat으로 나누어 실험을 진행하였다. 실험동물의 스트레스를 줄이기 위해 창상 유발 후 24 시간 동안 안정화시켰고 24 시간 후부터 레이저다이오드 조사군에 하루 10 분씩 9 일 동안 레이저다이오드를 조사하였다. 표 1에 InGaAlP 레이저다이오드 조사 Rat의 실험 조건을 나타냈다.

표 1. 광조사 그룹의 실험 조건.

Table 1. Experiment condition of light irradiation group.

Irradiated Rat	
Light source	InGaAlP Laser diode
Light intensity	3 mW/cm ²
Irradiation time	10 min/day for 9 days
Wave type	Continuous wave
Temperature	21~23 °C

3. 결과 및 고찰

관찰 대상이 된 조직들은 10 % 중성 포르말린에 충분히 고정된 다음, 파라핀 포매에 의해 4~5 μm 두께의 절편으로 제작하여 hematoxylin-eosin 이중 염색을 하였고, 면역 조직화학적으로 pan-Cytokeratin 및 PCNA에 대한 면역조직화학적 염색을 하였다. 그리고 결손부위의 조직재생 성상을 파악하기 위하여 Masson's trichrome 염색을 하였다. 면역 조직화학적 검사에 사용된 1차 항체는 Santa Cruz Biotechnology사(Santa Cruz, CA, USA)의 mouse monoclonal antibody pan-Cytokeratin (C-11)와 mouse monoclonal antibody PCNA (PC10)를 이용하였으며, 2 차 항체와 발색제는 각각 Dako사 (Glostrup, Denmark)의 LSAB Kit와 DAB (Diaminobenzoic acid) kit를 이용하였다. Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 시행하고, Research Genetics사 (Huntsville, AL, USA)의 universal mount 로 봉입하였다.

Hematoxylin-eosin 이중 염색을 하여 제작된 시료를 토대로 결손 부위를 컴퓨터 측정 프로그램을 이용하여 측정하였다. 증례에 따라 결손 부위에서의 재생 변연부가 명확하지 않아 구별이 어려운 경우는 pan-Cytokeratin에 대한 면역조직화학적 염색이 시행된 슬라이드를 이용하여 측정하였다. 측정방법은 우선 측정부위를 Magna Fire digital camera system (Optronics, Goleta, CA, USA)을 이용하여 촬영 후, 이 디지털 이미지를 바탕으로 Visus Image Analysis System (Image & Microscope Technology, Daejon, Korea)을 통하여 결손부위 장경을 측정하였다. 그림 2에 염색을 통한 결손 크기의 측정 방법을 간략히 나타냈다.

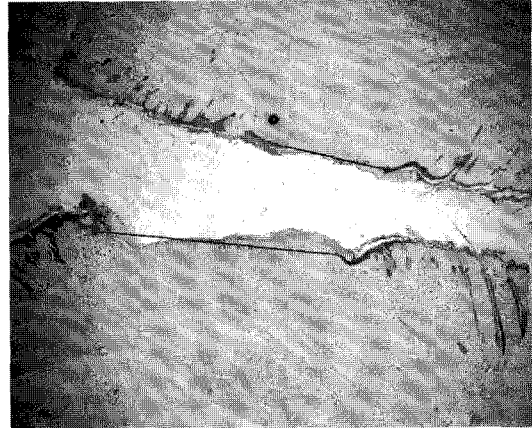


그림 2. 피부 창상의 결손 크기 측정.

Fig. 2. Measurement of defect size of skin injury.

결손부위 조직재생의 성상을 알아보기 위하여 Masson's trichrome 염색과 Actin에 대한 면역조직화학적 염색을 평가하였다. 교원질은 Masson's trichrome 염색에 양성(청색)을 보이나 Actin에 음성이므로 재생조직의 기원 및 분화를 식별할 수 있다. 재생조직 중 섬유모세포(fibroblast) 뿐만 아니라 근섬유모세포(myofibroblast)가 나타날 수 있는데 이는 Masson's trichrome 염색에 양성(청색)을 보이며 Actin에도 부분적으로 양성소견을 보이므로 유용한 사용이 가능하며, 조직재생속도를 평가하기 위하여 수복 중인 결손부를 중심으로 증식세포의 핵에 염색반응을 나타내는 PCNA에 대한 면역조직화학적 염색을 시행한 후 판정하였다.

Pan-Cytokeratin은 세포질에 갈색 염색을 보이는 경우 양성으로 PCNA는 핵 염색을 양성으로 판정하였다. PCNA는 염색이 가장 강한 곳을 임의로 4 ~ 5 곳 선정하여 관찰되는 총 세포 중 양성 염색이 이루어진 세포의 백분율을 구하여 비교하였다. 창상 결손부의 재생세포 성상을 파악하고, 교원질의 경우는 관찰되는 교원질의 양에 따라 반정량적으로 점수화하였다. 즉, 교원질이 전혀 관찰되지 않는 경우 0, 교원질 가닥이 미세하게 관찰되면 1+, 교원질이 작은 다발을 형성하면 2+, 교원질이 크고 작은 다발을 형성하면 3+, 교원질이 일부라도 juicy matrix를 형성하면 4+로 정하였다.

표 2에 실험 후의 교원질의 형성, PCNA 및 창상 수복 검사 결과를 나타냈다.

표 2. 검사 결과.

Table 2. Results of examination.

	Irradiated	None-irradiated
	Rat	Rat
PCNA	71	65
Collagen	4+	2+
Defect Size	786 μm	3,605 μm

조직재생 속도를 평가하기 위하여 수복 중인 결손부를 중심으로 증식세포의 핵에 염색반응을 나타내는 Proliferating Cell Nuclear Antigen(PCNA) 발현에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하여 분석하였다. PCNA는 DNA 합성 단계의 세포에서 발현되는 핵단백질이므로 세포 증식 시 매우 유용한 지표로 사용된다. PCNA는 핵 염색을 양성으로 판정하였으며 전체 세포 중 양성 염색된 세포의 백분율을 구하여 비교하였다. 그 결과 InGaAIP 레이저다이오드 조사 Rat은 71 %로 비 조사 Rat의 65 % 보다 더 빠르게 세포 분열이 일어나 빠른 창상 수복율을 보임을 확인하였다. 특히, 세포의 분열은 창상인접부를 중심으로 시작됨을 그림 3를 통하여 알 수 있었다. 이미지상의 좌측은 창상이 아닌 조직이므로 PCNA 발현이 없으나 우측의 경우 창상의 수복이 일어나므로 PCNA 발현이 일어남을 확인 할 수 있었다. PCNA 발현은 창상 부위에서 세포증식 속도에 매우 큰 영향을 미치며 교원질의 형성과도 밀접한 관계가 있다.

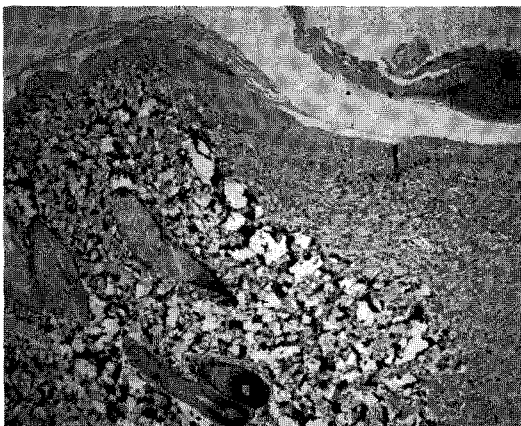


그림 3. 창상 인접부 이미지.
Fig. 3. Image of neighboring injury area.

InGaAIP 레이저다이오드 조사 Rat과 비 조사 Rat의 교원질 형성을 검사하기 위해 Masson's trichrome 염색을 시행하여 분석하였다. 분석 결과 비 조사 Rat은 교원질이 작은 다발을 형성하였기 때문에 2+로 판정되었으나 레이저다이오드 조사 Rat은 교원질이 juicy matrix를 형성하여 4+로 판정하였다. 섬유아세포와 교원질의 형성은 인체가 외부의 물리·화학적 공격을 받은 후, 창상 부위가 수복될 때 매우 중요한 역할을 한다. 따라서 레이저다이오드를 조사한 Rat이 비 조사 Rat 보다 월등히 빠른 교원질 형성이 일어나 결과적으로 창상의 수복이 빠름을 확인 할 수 있었다.

Hematoxylin-eosin 이중 염색을 하여 제작된 시료를 토대로 결손 부위를 컴퓨터 측정 프로그램을 이용하여 측정하였으며 증례에 따라 결손 부위에서의 재생 변연부가 명확하지 않아 구별이 어려운 경우는 pan-Cytokeratin에 대한 면역조직화학적 염색이 시행된 슬라이드를 이용하여 측정하였다. 그림 4는 InGaAIP 레이저다이오드 조사 Rat과 비 조사 Rat의 조직 절편의 현미경 관찰을 통해 육아조직의 수복을 확인한 결과를 그래프로 나타낸 것이다. 결과값을 통하여 광을 조사하였을 때가 광을 조사하지 않았을 때보다 상처 수복이 빠르게 진행된 것을 확인할 수 있었다.

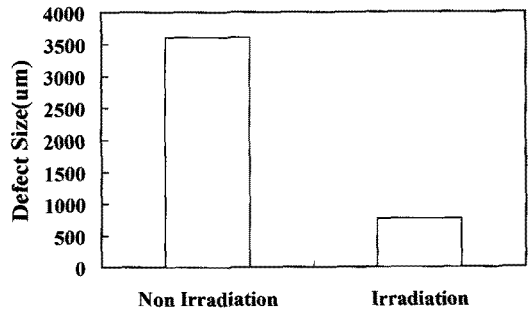


그림 4. 창상 수복 결과.
Fig. 4. Result of wound healing.

InGaAIP 레이저다이오드 조사 Rat과 비 조사 Rat의 조직 절편들을 현미경으로 관찰하여 육아조직의 수복을 통한 창상 치유를 확인 한 결과 레이저다이오드 조사 Rat의 조직 절편은 약 98 %의 조직 수복률을 보였으며 레이저다이오드를 조사하지 않은 Rat의 조직 절편은 약 64 %의 조직이 수복되었음을 확인 하였다. 즉, 레이조다이오드 조사

Rat의 조직이 비 조사 Rat의 조직보다 더 빠른 조직 수복을 보임을 알 수 있었다.

4. 결 론

InGaAlP 레이저다이오드의 조사가 피부 결손에 미치는 치유 효과를 확인하기 위해 동물 실험을 시행하여 면역조직화학 염색을 하여 PCNA 발현, 교원질 형성 및 조직 수복률을 확인하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. PCNA(Proliferating Cell Nuclear Antigen) 발현에 대한 면역조직화학적 염색을 시행하여 분석한 결과 주변의 조직과 창상 인접부를 중심으로 증식하고 있는 세포가 확연히 구분되어 관찰되었다. 또한, InGaAlP 레이저다이오드를 조사한 Rat의 조직 절편이 비 조사 Rat의 조직 절편보다도 세포의 증식 속도가 더 빠른 것을 확인하였다.
2. InGaAlP 레이저다이오드 조사 후 조직 슬라이드에 Masson's trichrome 염색을 시행하여 교원질 분석을 한 결과 InGaAlP 레이저다이오드를 조사한 Rat의 조직 슬라이드가 비 조사 Rat의 조직 슬라이드 보다 교원질의 형성이 더 많이 일어났다. 교원질 형성은 창상 수복과 매우 밀접한 관계가 있으므로 교원질 형성의 결과로도 InGaAlP 레이저다이오드 조사 Rat이 비 조사 Rat에 비하여 교원질 형성이 더 많이 일어나고 창상 치유 또한 더 빠른 것을 확인할 수 있었다.
3. 실험동물들의 창상 결손 크기를 측정하여 분석한 결과, 비 조사 Rat에 비하여 InGaAlP 레이저다이오드 조사 Rat의 결손 크기 감소가 더 빨라 창상 치유가 더 빠른 것을 확인 하였다.

이상의 결과에서 InGaAlP 레이저다이오드 조사는 창상 치유 과정 중에서 세포 증식을 유도하여 재생피화를 촉진시켰으며 창상 인접부를 중심으로 세포의 증식이 활발히 일어남을 관찰하였다. 창상에 InGaAlP 레이저다이오드의 광원 조사 시 수축, 상피화 형성 촉진 등 창상 치유에 유익한 것으로 추정되지만 창상의 치유는 창상의 부위, 정도, 종류에 따라 다르며, 같은 크기와 깊이의 창상이라도

감염 여부 등 외부 영향에 의해 결과가 상이해질 수 있어 보다 많은 연구가 필요할 것으로 예상된다.

참고 문헌

- [1] D. O. Han, G. H. Kim, Y. B. Choi, I. S. Shim, and H. J. Lee, "Healing effects of astragali radix extracts on experimental open wound in rat", *Oriental physiology & Pathology*, Vol. 19, p. 93, 2005.
- [2] J. Adam, M. D. Singer, A. F. Richard, and M. D. Clark, "Cutaneous wound healing", *N. Engl. J. Med.*, Vol. 341, p. 10, 1999.
- [3] T. H. Maiman, "Stimulated optical radiation in ruby", *Nature*, Vol. 187, p. 493, 1960.
- [4] F. Mullins, "The effects of high energy laser pulses on the primate liver", *Surg. Gynecol. Obste.*, Vol. 122, p. 727, 1966.
- [5] J. L. Fox, "The use of laser radiation as a surgical light knife", *Surg. Gynecol. obster.*, Vol. 9, p. 199, 1969.
- [6] J. E. Madden, "Studies in the management of the contaminated wound: IV. Resistance to infection of surgical wounds made by knife electrosurgery and laser", *Am. J. Surg.*, Vol. 119, p. 222, 1970.
- [7] T. Karu, "Photochemical effect upon the cornea, skin and other tissues: photobiology of low-power laser effects", *Health Phys.*, Vol. 56, p. 691, 1989.
- [8] M. W. Cheon, S. H. Kim, Y. P. Park, T. G. Kim, and S. M. Yu, "The effect of LED light irradiation on skin injury cure of rat", *J. of KIEEME(in Korean)*, Vol. 20, No. 12, p. 1087, 2007.
- [9] T. H. Lee, D. H. Sohn, B. I. Kim, S. K. Cho, and S. H. Lee, "Pain Relief and Accelerated Healing Processes of Wound by Low Level Laser Irradiation", *Korean J. Pain.*, Vol. 7, No. 1, p. 74, 1994.
- [10] M. W. Cheon, S. H. Kim, Y. P. Park, H. S. Lee, and T. G. Kim, "Development of multi-wavelength laser medical therapy apparatus", *J. of KIEEME(in Korean)*, Vol. 20, No. 8, p. 736, 2007.