

630nm LED 광원이 세포 증식에 미치는 효과

김태곤, 천민우*, 박용필, 김성환*, 송창훈*, 김영수**
 동신대학교, *조선대학교, **(주)바이오테코

Effects of 630nm LED light source to the cell proliferation.

Tae-gon Kim, Min-woo Cheon, Yong-pil Park, Seong-hwan Kim, Chang-hun Song*, Young-su Kim
 Dongshin Univ. *Chosun Univ. **Bioateco INC.

Abstract : In this module, RED Light Emitting Diode was employed to replace for Low level He-Ne laser for medical applications. Each experiment was performed to irradiation group and non-irradiation group for both Dog bone marrow and Rat tissue cells. MTT assay method was chosen to verify the cell increase of two groups and the effect of irradiation on cell proliferation was examined by measuring 590nm transmittance of ELISA reader. As a result, the cell increase of 37% on Dog bone marrow, 23% on Rat tissue cells was verified in irradiation group as compared to non-irradiation group. The fact that specific wavelength irradiation has an effect on cell vitality and proliferation is known through this study.

Key Words : Light Emitting Diode, Low Level Laser Therapy, MTT Assay

1. 서론

저출력 레이저 치료는 세포의 활성화 및 재생 촉진, 세포의 호르몬 분비를 촉진하여 고유 기능을 향상 시키며 항염증 효과, 항 부종 효과, 섬유조직 형성억제, 세포 분열을 촉진시키는 효과[1]등의 생화학적 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

이러한 저출력 레이저와 LED(Light Emitting Diode)는 같은 파장의 빛을 사용하여 서로 유사한 생화학적인 효과를 가지고 있을 것으로 생각된다. 현재 치료에 사용되고 있는 저출력 레이저는 열에 의한 손상이나 직접적인 조직 손상 현상을 발생 시킬 위험성을 가지고 있는 반면, LED는 열에 의한 손상이나 파괴현상이 없어[2] 안전하고, 근육이나 피부에 높은 투과성을 가지고 있으며 저출력 레이저 보다 경제적인 장점을 가지고 있다.

이러한 저출력 레이저와 비슷한 생화학적 성질을 가지며 보다 안전한 LED 광원은 세포의 성장 및 분열 촉진에도 효과가 있을 것이라 추측 되지만 이에 대한 연구는 많지 않은 상태이다.

따라서 본 논문은 저출력 레이저인 He-Ne 레이저(632.8nm)와 비슷한 파장을 가진 RED 계열의 LED(630nm)를 사용하여 균일하게 빛의 조사가 가능한 모듈을 제작한 후, 630nm의 LED 광이 세포 증식에 미치는 영향을 연구하였다.

2. 실험

세포 증식에 미치는 영향으로서는 광원의 세기(mW/cm^2), 광조사 시간(min), 광조사 주기(Hz)가 있으며, 스위치 입력 부의 설정에 의해 조절이 가능하도록 설계를 하였다. 광원의 세기는 Power 스위치 입력을 통해 출력 Level을 1~30까지 단계별로 조절이 가능하며 Mode를 통해

CW(continuous wave)와 PWM (Pulsed with modulation) 방식 중 파형의 선택이 가능하며, PWM 방식에서는 Frequency의 선택을 통해 4가지 주파수의 설정할 수 있으며 광조사 시간은 Timer를 이용하여 0 ~ 999시간 까지 설정이 가능하도록 설계되었으며 본 실험에서 사용된 시스템상의 실험 조건은 다음 표 1과 같다.

표 1. 하드웨어 실험 조건

	Dog bone marrow	Rat Tissue cell
wavelength	630nm	630nm
Light intensity	5.68mW/cm ²	5.68mW/cm ²
Irradiation time	5min	5min
Wave type	continuous wave	continuous wave

세포의 배양은 Dog의 골수(bone marrow)와 임신한 Rat의 태아의 조직(tissue)에서 추출하였으며, FBS(Fetal Bovine Serum) (GibcoBRL,UK)과 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GibcoBRL,UK), L-Glutamin (GibcoBRL,UK)을 혼합하여 배지로 사용하였으며, 37°C, 95%의 습도, 5% CO₂의 조건이 항상 유지되는 Incubator에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 배지를 교환해 주었다.

사용된 Dog의 골수 세포는 Passage 4의 세포를 사용하였고, Rat의 조직 세포는 Passage 5의 세포를 사용하였으며, 세포의 분배는 Trypsin-EDTA를 사용하여 세포를 부유시켜 세포를 획득한 후 획득한 세포를 원심분리 하여 Hemocytometer 및 Trypan blue를 사용하여 세포의 개수 및 생존율을 측정 하였다.

Dog의 골수세포는 well 당 3×10^3 개의 세포를 Rat의 조직 세포는 well 당 5×10^3 개의 세포를 파이펫을 이용해 각각 분배해 주었다. 이렇게 분배된 세포는 안정화를 위해 3일간 배양하였으며, 배지 교환 후 세포의 미치는 영향을 줄이기 위해 CO₂ Incubator 내부에서 광 조사를 24시간 간격으로 2회 실시 하였다.

세포의 증식률을 측정하기 위해 광 조사 후 24시간 경과된 시점에서 Tada[3]의 MTT Assay 법을 사용하였으며, MTT(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide : GibcoBRL,UK) 수용액은 첨가 후 4.5시간 CO₂ Incubator 내부에서 Incubation 하였으며 SDS(Sodium dodecyl sulfate :Fluka) 혼합 용액을 100 μ L 넣어 다시 12시간 Incubation 시켜 주었다. Incubation 후 모든 well은 ELISA leader기의 590nm의 파장을 이용하여 흡광도를 측정 하였다.

그림 1에 본 연구의 실험 모식도를 나타내었다.

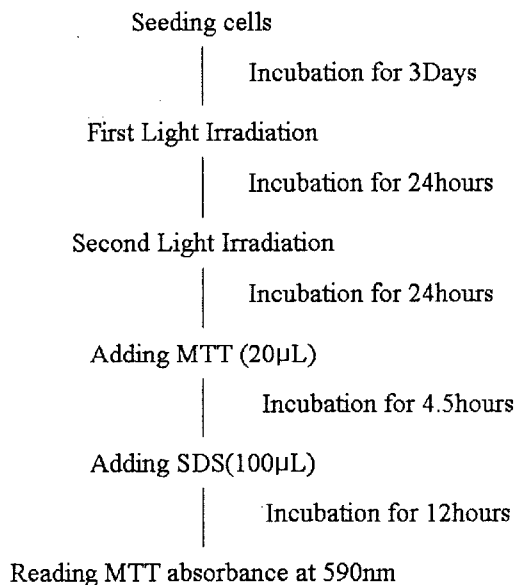


그림 1. MTT Assay 모식도

3. 결과 및 검토

MTT Assay는 탈수소 효소 작용에 의하여 노락색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띠는 비수용성 MTT foemazan으로 환원 시키는 미토콘드리아의 능력을 이용한 검사법으로 630nm의 LED광을 24시간 간격으로 5분간 2회 조사 하였을 때 MTT assay을 이용하여 성장률을 ELISA leader의 590nm파장에서 흡광도를 이용하여 측정하였으며 결과는 다음 그림 2와 같다.

그림에서와 같이 광을 조사 하지 않은 비조사군(control)에 비해 630nm광을 조사한 광조사군인 Dog의 골수 세포에서는 37%와 Rat의 조직세포에서는 23%정도 비조사군에 비해 증가 한 것을 알 수 있다.

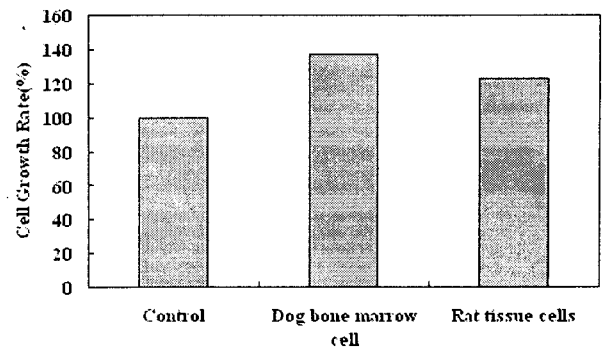


그림 2. ELISA leader를 이용한 증식률

4. 결론

본 연구에서는 현재 의료용으로 많이 사용되고 있는 저출력 레이저인 He-Ne 레이저를 대신 할 목적으로 비슷한 파장을 가지는 630nm Red 계열의 LED를 조사할 수 있는 모듈을 제작하고 세포 증식에 미치는 영향을 조사하였다.

광조사에 따른 성장량의 변화를 알아보기 위하여 세포 배양 시 광조사군과 비조사군으로 나눈 후, 광조사군에는 일정량의 광을 일정 시간 조사하였고, 광조사군과 비조사군의 성장량을 MTT assay 법으로 측정한 결과 광을 조사한 광조사군이 조사하지 않은 비조사군에 비하여 Dog의 골수세포에서는 37%, Rat의 조직세포에서는 23%의 증가율을 보이는 것을 확인 하였다.

이를 통하여 특정 파장의 광 조사가 세포 활성이나 증식에 영향을 미칠 수 있음을 확인 할 수 있었다.

참고 문헌

- [1] Jan Tuner, Lars Hode, Low level laser therapy. Sweden:Prima books, p. 59, 1999.
- [2] H. T. Whelan, R. L. J. Smiths, E. V. Buchman, N. T. Whelan, S. G. Turner, D. A. Margolis, V. Cevenini, H. Stinson, R. Ignatius, T. Martin, J. Cwiklinski, A. F. Philippi, W. R. Graf, B. G. L. Hodgson, M. Kane, G. Chen, J. Clin Laser Med Surg. Vol. 19, p. 305, 2001.
- [3] H. Tada, O. Shiho, K. I. Kuroshima, M. Koyama and K. Tsukamoto, J. Immu. Methods, Vol. 93, No. 2, p. 157, 1986.