

# NTacSam:SD 골수 세포의 증식에 100Hz PWM 저출력 광 조사가 미치는 효과

천만우, 김성환, 이호식\*, 박용필\*  
조선대학교, \*동신대학교

## Effect of the 100Hz PWM Low Power Light Irradiation in Proliferation of NTacSam:SD Bone-marrow Cell

Min-woo Cheon, Seong-hwan Kim, Ho-sic Lee\*, Yong-pil Park\*  
Chosun Univ. \*Dongshin Univ.

**Abstract :** We developed the equipment palpating cell proliferation using a high brightness LED. This equipment was fabricated using a micro-controller and a high brightness LED, and designed to enable us to control light irradiation time, intensity, frequency and so on. Especially, to control the light irradiation frequency, FPGA was used, and to control the change of output value, TLC5941 was used. Control stage is divided into 30 levels by program. Consequently, the current value could be controlled by the change of level in Continue Wave(CW) and Pulse Width Modulation(PWM), and the output of a high brightness LED could be controlled stage by stage. And then, each experiment was performed to irradiation group and non-irradiation group for bone marrow 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 bone marrow cells was verified in irradiation group as compared to non-irradiation group.

**Key Words :** Bone-marrow cell, Low power light irradiation, Pulsed width modulation

### 1. 서 론

빛(光)은 파장에 따라 자외선, 가시광선 및 적외선으로 크게 구분할 수 있다. 이러한 빛을 이용하여 질병 및 손상을 치료하는 것을 “Phototherapy” 혹은 “Light therapy”라 한다[1]. 인체는 구조적으로 조직, 기관 및 계통의 3 단계로 나눌 수 있으며, 생존하기 위해서 인체의 각 부분은 끊임없이 활동하여 내부 환경의 항상성을 유지시킨다. 이러한 항상성 유지를 위해 활동하는 구조적으로 기능을 수행하는 최소 단위가 바로 세포이며, 인체를 구성하고 있는 세포의 수는 약 100조 개 이상이다. 세포는 존재하는 영역에 따라 모양이나 크기가 다를 뿐 아니라 수명이나 기능에도 큰 차이가 있다. 세포와 조직의 기능을 복원시켜 각종 질병 및 질환뿐만 아니라 퇴행성 질환, 심장, 신장 및 암 등의 난치성 질환 치료[2]에 무한한 가능성을 지닌 세포 치료에 대한 관심이 높아지고 있다. 최근 저출력 레이저광의 조사가 세포 분열[3]을 유도하고 섬유아세포의 증식[4]을 촉진하는 것으로 연구되고 있어 세포치료제 대량 생산 가능성을 열어주고 있다. 이렇듯 좋은 효과가 있는 레이저의 경우 가격이 비싸고 발열의 문제가 있어 레이저와 비슷한 파장의 빛을 조사하는 LED를 사용하는 연구가 진행되고 있다. 하지만 각각의 연구마다 실험 조건이 조금씩 다르기 때문에 실험 변수를 줄이기 위하여 본 논문에서는 저출력 레이저와 같은 파장의 광을 방출하는 LED를 조사할 수 있는 PWM 광 조사를 개발하여 세포 증식에 적용하였다.

### 2. 실 험

#### 2.1. 100Hz PWM 저출력 광 조사기

LED는 활성층의 재료의 배합에 따라 파장이 결정되며, 본 실험에 사용된 LED 활성층의 재료는 AlGaInP(Aluminium, Gallium, Indium, Phosphide)의 4원소 계열로 화학적으로 안정되어 있으며 RED 계열의 빛을 발생한다. 사용된 LED의 전기적 특성은 20 mA가 흐를 때 LED에 2.2 ~ 2.4 V 전압(Vf)이 필요하고 같은 종류의 LED라도 소자의 재료 혼합비의 차이에 따라 전류·전압 특성이 조금씩 차이가 있다. 따라서 다수의 LED를 사용할 경우 직·병렬로 조합하여 전압과 전류의 변화를 고려하여 설계하여야 한다. LED는 전류 구동 소자이므로 본 실험에서 사용된 633 nm의 LED의 출력 특성을 확인하기 위해 DC Power supply를 사용하여 5 mA씩 전류 변화를 주면서 전력량과 광 출력을 비교 하였으며 그림 1에 나타내었다.

그림 1에서와 같이 전류의 증가에 따라 광출력 및 출력량이 비슷한 형태의 선형적 증가 곡선을 보였으며 이를 바탕으로 전류 조절에 의한 컨트롤이 가능한 것을 확인할 수 있었다. 광 조사기는 특정파장의 LED 광원을 인큐베이터 내부에 장착하고 외부에서 보다 손쉽게 광 조사를 하기 위해 컨트롤러와 광 모듈부를 탈부착이 가능하도록 구성하였다. 광 조사 시간(Timer), 강도(Intensity), 주기(Frequency)등의 기능은 외부의 컨트롤러를 이용하여 간단히 컨트롤이 가능하도록 구성하였다. 광조사기는 안정적으로 전원을 공급하는 전원, 광조사를 위한 변수 입력을 위한 Switch, 기기의 동작 상태를 표시해주는 Display,

u-controller와 FPGA로 구성된 제어부 그리고 다수의 LED가 매트릭스 형태로 구성된 광 모듈을 컨트롤하기 위한 LED Driver로 구성되어 있다.

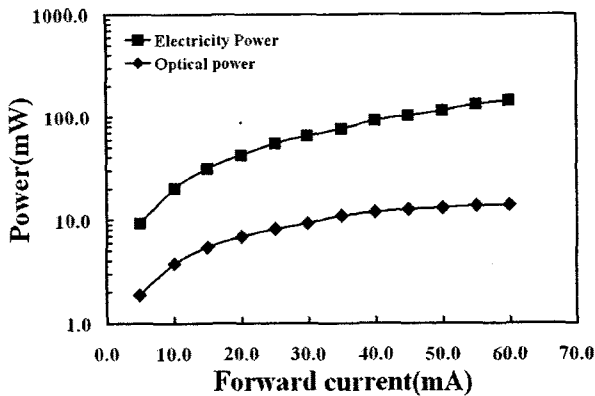


그림 1. 고휘도 LED의 전류 변화에 따른 출력 특성.

### 2.2. NTacSam:SD 골수 세포의 증식 실험

실제 세포에 100Hz 저출력 광을 조사하였을 경우 세포의 증식이 일어나는지 확인하기 위하여 NTacSam:SD의 골수 세포를 사용하여 in vitro 실험을 시행하였다. 실험에 사용된 골수 세포는 8주령 된 NTacSam:SD 수컷의 골수를 이용하여 Primary culture를 통하여 얻었다. 각각의 cell은 FBS(Fetal Bovine Serum, GibcoBRL, UK), DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, GibcoBRL, UK) 및 L-Glutamin(GibcoBRL, UK) 등을 혼합한 배지를 사용하여 배양하였으며, CO<sub>2</sub> 인큐베이터를 이용해 항상 37 °C, 5 %의 CO<sub>2</sub>로 조건을 일정하게 해 주었으며 배지는 3~4일에 한 번씩 교환해 주었다. 광 조사에 사용된 골수 세포는 passage는 3번으로 0.05% Trypsin-EDTA(GibcoBRL, UK)를 사용하여 계대배양 해주었으며, 표 1에 실험 사용된 조건표를 나타냈다.

표 1. 실험 조건표.

Wave type	PWM 100 Hz	Control
Wavelength	633 nm	
Light intensity	7.64mW/cm <sup>2</sup> ± 2%	none
Irradiation time	5min / Days for 2days	
Cell round number	Passage 3	

### 3. 결과 및 검토

사용된 633nm LED 광 모듈을 기기의 최대 출력인 30 step에서 광을 조사하였으며 조사 강도는 7.64 mW/cm<sup>2</sup>였다. 골수 세포를 100 Hz 저출력 광으로 24시간 간격으로 5분씩 조사하였으며, 광을 조사하지 않은 Control을 두어

광을 조사하였을 때와 조사하지 않았을 때를 비교 하였으며 정확한 증식률을 확인하기 위해 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl -2H-tetrazolium bromide] Assay[5]를 이용해 측정하였다. MTT Assay는 노란색 수용성 MTT Teteazolium이 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의해 비수용성의 자주색을 띄는 MTT formazan으로 환원되어진다. 이 환원된 MTT formazan 용액을 ELISA reader(Multiwell microplate reader)을 이용해 흡광도를 측정할 수 있으며 측정된 흡광도는 대사 활성이 있는 세포의 수와는 직선상의 상관관계를 반영하게 되게 된다.

실험에서 사용된 plate는 cell control이 용의 하도록 6well plate를 사용하였으며 1개 well에 1×10<sup>5</sup> 개의 세포를 배양하였다. 세포의 안정화를 위해 24시간 인큐베이션을 행하였으며, 세포가 plate에 안정적으로 붙은 것을 확인 후 1차와 2차 광 조사를 24시간 간격으로 실시하였다. 이렇게 2차 광 조사 후 MTT ASSAY방법을 사용하였으며, 각각의 Well당 PBS(pH 7.2 : GibcoBRL, UK) ml당 5 mg의 MTT(Thiazolyl Blue Terazolium Bromide, approx. 98 % : SIGMA-ALDRICH, Inc) 분말을 용해시킨 MTT 수용액을 400 µl씩 넣어 골고루 희석시켜 주었다. 4.5 시간 인큐베이션 후 1M HCL에 10 % SDS (Sodium Dodecyl Sulfate : Fluka, Inc)가 녹아 있는 수용액을 2ml 씩 넣어 12시간 인큐베이션 후 96Well plate에 옮겨 ELISA Leader 590 nm 파장을 이용하여 흡광도를 측정하였다.

### 4. 결론

LED를 사용하여 PWM LED 광조사가 세포에 미치는 영향을 확인하기 위해 PWM 저출력 광조사기를 개발하여 633 nm의 파장에서 100 Hz PWM 저출력 광 조사가 골수 세포의 증식에 미치는 영향을 MTT assay로 확인하였다.

MTT 환원분석결과로 흡광도를 비교하여 100 Hz PWM 633 nm의 LED 광조사가 골수 세포의 증식에 미치는 영향을 확인한 결과, 광을 조사한 세포가 조사하지 않은 세포인 control 보다 더 높은 증식률을 보임을 확인하였다. 결론적으로 633 nm의 파장의 100 Hz PWM 저출력 광 조사도 저출력 레이저 조사와 같이 세포의 성장 및 증식에 영향을 미칠 수 있음을 확인하였다.

### 참고 문헌

- [1] R. Krulan (Physical Medicine and Rehabilitation, W. B. Saunders Co), 1942
- [2] Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz., M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. And Jones., J. M. Science 282, 1145, 1998
- [3] Clover, G.B. and Priestley, G.C. Brit. J. Dermatol., 121 179, 1989
- [4] Hunter, J., Leonard, L. and Wilson, R., Et. al, Laser surg. Med., 3, 285, 1984,
- [5] H. Tada, O. Shiho, K. I. Kuroshima, M. Koyama and K. Tsukamoto, J. Immu. Methods. 93, 157, 1986