

GaAlAs 레이저 조사가 근타박상이 유발된 흰쥐 골격근내 혈관내피성장인자 발현에 미치는 영향

대구대학교 대학원 재활과학과 물리치료전공

김석범

대구대학교 재활과학대학 물리치료학과

김진상

The Effect of GaAlAs Laser Irradiation on VEGF Expression in Muscle Contusion of Rats

Kim, Souk-Boum, P.T., M.S.

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

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

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

Abstract

Skeletal muscle regeneration is a vital process for various muscle myopathies and muscular adaptation to physiological overload. Angiogenesis is the key event in the process of muscle regeneration, and vascular endothelial growth factor(VEGF) plays an important role in it. The purpose of this study was to evaluate the effect of GaAlAs(830nm) laser and immunoreactivity of VEGF on angiogenesis after muscle contusion injury. Muscle contusion injury was induced in the triceps surae muscle by dropping a metal bead(31.4g). GaAlAs laser irradiation(power 20 mW, frequency 2000 Hz, treatment time 15 min) was applied directly to the skin of injured muscle daily for seven days. The experimental group I was irradiated immediately by laser after injury, whereas the experimental group II was irradiated after 1 day of injury. The control group was non-irradiated.

The results of this study were as follows.

1. In morphological observation, there were no significant changes in experimental and control groups for 7 days. At 3 days, however, the splitted muscle fibers were observed in experimental groups, and the muscle atrophy and granular tissue viewed at 7 days in control group.
2. The VEGF was expressed in muscle fiber that located in the interspace between gastrocnemius and soleus muscles. As the time coursed, the immunoreactivity of VEGF also seemed to be strong in the individual muscle fibers.
3. The experimental group I & II showed higher immunoreactivity of VEGF than control group($p<0.05$). Then, the experimental group I showed higher than group II

especially($p<0.05$).

These data suggest GaAlAs semiconduct diode laser irradiation(830nm) enhanced angiogenesis in the skeletal muscle induced contusion injury, and immediate laser irradiation after injury promoted the angiogenesis greatly than after 1 day of injury.

I. 서 론

근육손상은 스포츠손상뿐만 아니라 일상생활에서도 빈번하게 일어나는 질환으로, 손상이 가해지는 방법에 따라 근열상(laceration)과 근타박상(contusion)을 포함하는 직접적인 손상과 좌상(strain), 허혈, 신경학적 기능이상 및 강렬한 운동에 의해 발생하는 지연성 근손상(delayed-onset muscle injury)과 같은 간접적인 손상으로 구분되어진다(Kami 등, 1999; Kasemkijwattana 등, 1998; Rantanen 등, 1999). 이 중 근타박상은 사지에 직접적으로 타격이 가해졌을 때 보여지는 근육손상 중 가장 일반적인 형태로, 근타박상의 증상은 종창, 구축, 압통(tenderness), 통증, 기능적·구조적 손실 등 비특이적으로 나타나고, 현미경적 수준에서는 근섬유와 모세혈관 파열, 혈액 침착, 혈종 형성, 손상받은 근섬유 주변에 공간형성, 부종 등이 관찰된다(Beiner와 Jokl, 2001).

근육 손상 후 재생과정과 관련하여 Mauro(1961)가 출생 후 골격근섬유의 가장자리에 분포하는 위성세포(satellite cell)의 존재를 보고한 이래 골격근의 재생과정에 대한 이해가 폭넓게 이루어져 왔다. 위성세포는 배아기의 근모세포(myoblast)와 같이 종식하고 새로운 근관(myotube)을 형성하는 능력을 지녀 성인의 근육에 존재하는 줄기세포(stem cell)의 역할을 하는 세포로써, 종식, 분화 및 융합(fusion)을 반복함으로써 근육재생과정에서 중요한 역할을 수행한다. 성인의 경우, 위성세포는 탈신경, 신장(stretch), 운동, 냉적용 및 압박과 같은 광범위한 근육손상에 반응하여 정지기 상태에서 활성화된다(Chambers와 McDermott, 1996). 그러나 손상 후 위성세포가 활성화되기까지는 몇 가지 단계가 선행되어지는데, 그 중 새로운 근섬유 형성을 성공적으로 수행하기 위하여 요구되어지는 중요한 과정중의 하나가 혈관신생(angiogenesis 또는 neovascularization)이다(Grounds, 1991).

혈관신생은 정확한 조절을 통해 짧은 기간에 일어나는 생리적(Reher 등, 1999)·병리적(Shizukuda 등, 1999) 현상으로, 두 가지 다른 기전 즉, 혈관내피세포전구체인 혈관모세포의 이주와 분화를 통해 단단한 내피다발(solid endothelial cord)을 형성하는 혈관형성(vasculogenesis)(Conway 등, 2001)과 이전에 존재하는 혈관에서 새로운 모세혈관의 발아(sprouting)를 유발하는 과정인 혈관신생(Brooks, 1996)에 의해서 이루어진다. 이러한 혈관신생 과정은 배아발생(Adams 등, 2001), 자궁내막재생, 상처치유과정(Reher 등, 1999) 등과 같은 생리적인 혈관신생과 암세포 성장(Harris 등, 2002), 류마토이드 관절염(Ferrara, 1996), 당뇨병성 망막병증(diabetic retinopathy)(Petrova 등, 1999) 등과 같이 비정상적으로 항진된 혈관신생 반응에서 관찰되어진다.

혈관신생과정은 성장인자, 사이토카인(cytokine), 세포의 기질 구성요소(extracellular

matrix component), 그리고 세포내 상호작용(intracellular interaction)의 네 가지 카테고리에 의해서 강하게 영향을 받는다(Reher 등, 1999). 이 중 혈관신생 과정을 촉진시키는 성장인자에는 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), 섬유모세포성장인자(basic fibroblast growth factor, bFGF), 혈소판유래성장인자(platelet derived growth factor, PDGF), 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF) 등이 있으며, 가장 대표적인 것이 혈관내피성장인자이다(Carmeliet과 Jain, 2000; Conway 등, 2001; Risau, 1997; Singer와 Clark, 1999).

상처치유, 골절, 류마티스 관절염, 근좌상 등과 같이 염증단계를 동반하는 손상들에 대해 운동, 초음파, 레이저, 전기자극 등과 같은 일반적인 물리치료 적용은 보통 손상 후 1일에서 2일 후 적용을 원칙으로 한다. 이전 연구에서 Amaral 등(2001b)은 혈관신생을 억제하는 물질인 captopril 또는 losartan을 물에 녹여서 일주일간 섭취한 수컷 흰쥐를 3일간 트레이드밀 훈련을 한 후 전경골근과 장지신근의 Western blot analysis를 실시한 결과 VEGF mRNA와 angiotensin II mRNA가 나타남을 보고하면서 짧은 기간의 운동도 혈관내피성장인자와 angiotensin II의 발현을 유도할 수 있다고 주장하였고, Gavin과 Wagner(2001)는 5일간의 운동 프로그램을 통하여 흰쥐의 비복근에서 혈관내피성장인자와 TGF- β 1 mRNA의 발현증가를 보고하였다. Hang 등(1995)은 허혈 손상을 입은 전경골근과 장지신근에 비복신경 전기자극(10Hz, 300 μ s pulses)을 실시한 결과 대조군에 비하여 VEGF mRNA가 높게 발현됨을 보고하였다. Reher 등(1999)은 배양한 단핵구(monocyte), 골아세포(osteoblast), 섬유아세포(fibroblast)에 두 종류의 초음파(1MHz와 45kHz)를 적용한 결과 모든 세포에서 혈관내피성장인자 발현의 증가를 관찰하였다. 이와 같은 연구결과들은 물리치료 영역에서 사용되고 있는 운동, 전기자극, 초음파가 근육손상 후 일어나는 여러 가지 단계 중 비교적 초기단계인 혈관신생과정에도 영향을 주어 근육재생과정을 촉진시킬 수 있다는 가능성을 제시해 주고 있다.

본 연구에서는 최근에 의학분야와 생물학분야, 그리고 물리치료학 분야에서 널리 이용되고, 연구되어지고 있는 치료 도구인 저강도 레이저를 사용하여 실험을 실시하였다. 저강도 레이저(파장 300~1,100nm)란 직접적 조사시 온도변화를 거의 일으키지 않으면서 생물학적 변화를 일으키는 낮은 에너지 밀도를 생성할 수 있는 기구로서, 이 때 온도변화는 0.1~0.5°C 미만으로 제한된다(Babapour, 1995; Snyder 등, 2002).

레이저란 Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation의 약자로(Mulcahy 등, 1995), 1917년에 발표된 광입자이론을 기초로 하여, 1960년 Maiman이 합성 루비 결정체로부터 단색의 적색광을 발생시킨 이래 레이저라는 용어가 체계적으로 확립되었고, 이후 루비 이외에도 반도체를 포함하는 고체상태의 물질, 아르곤과 같은 가스, 그리고 화학염료와 같은 액체 등을 이용한 다양한 레이저가 개발되어 현재까지 다양한 분야에서 사용되어져 오고 있다(Mantz, 1995). 레이저는 활성 매개물질(active medium)에 따라 명명되어지는데, 이

중 저강도 레이저에는 가스를 매개물질로 이용한 헬륨-네온(He-Ne, 파장 632.8nm) 레이저와 아르곤(Argon, 파장 488nm, 514.5nm) 레이저뿐만 아니라 고체물질을 이용한 루비(Ruby, 파장 694.3nm) 레이저, 그리고 반도체 다이오드(semiconductor diode)를 이용한 GaAs(Gallium-arsenide, 파장 904nm) 레이저와 GaAlAs (Gallium-aluminum-arsenide, 파장 820nm, 830nm, 870nm, 880nm) 레이저 등이 있다(Babapour, 1995; Mantz, 1995; Mulcahy 등, 1995).

레이저는 열효과와 비열효과 또는 생물학적 효과 모두를 가진다(Mulcahy 등, 1995). 일반적으로 열효과는 고강도 레이저의 치료개념으로 사용되어지는 데, 인체 조직에서 열효과를 나타내기 위해서는 레이저의 평균강도가 500mW 이상이 되어야 한다(Mulcahy 등, 1995). 물리치료 분야에서 주로 사용되어지는 저강도 레이저는 일반적으로 약 10~90mW 범위의 낮은 출력강도($1\sim4\text{J/cm}^2$ 이하의 낮은 에너지)와 파장이 300~1,100nm 범위에 속하는 레이저를 말하는데(Basford, 1995; Snyder 등, 2002), 이렇게 낮은 강도에서의 레이저 조사는 0.5~0.75°C 미만의 온도변화를 일으킴으로써, 물리치료에서 빈번하게 사용되어지는 초음파, 온습포, 또는 극초단파 등이 최소 3~5°C의 온도변화를 일으키는 것에 비해 매우 적은 온도변화를 일으킴을 알 수 있는데(Basford, 1993), 저강도 레이저를 low energy, low level, low intensity, low power 등 다양한 이름으로 묘사하는 것은 열효과가 아닌 비열효과를 강조하기 위함이다(Basford, 1995).

저강도 레이저의 여러 가지 종류의 레이저 중 반도체 다이오드 레이저가 나오기 전에는 He-Ne 레이저가 오랫동안 사용되었는데(Basford, 1993), 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 극대화 시킬 수 있는 장점이 있는 것으로 보고되고 있어(류종희와 여환호, 1993), 본 연구에서는 반도체 다이오드 레이저의 일종인 GaAlAs 레이저를 사용하였다.

본 실험에서 사용한 저강도 레이저 조사에 의한 세포수준에서의 변화들을 살펴보면 세포증식 및 분화 촉진(Ben-Dov 등, 1999; Van Breugel과 Bar, 1993), 세포 운동성 향상(Deckelbaum 등, 1993), 신경전달물질 분비 촉진(Navratil과 Dylevsky, 1997), ATP 합성 촉진(Karu, 1998; Oron 등, 2001), 프로스타글란딘 합성 촉진(Randjelovic과 Vukic, 1997) 등이 있다. 또한 통증 감소(Brosseau 등, 2000), 상처 치유 촉진(Stadler 등, 2001), 면역계 활성(Tadakuma, 1993), 신경재생촉진(Rochkind 등, 2001), 근육재생 촉진(Morrone 등, 1998) 등의 효과가 있다고 보고되고 있지만, 아직도 이러한 효과들과 반대되는 연구결과들이(Bouma 등, 1996; Cambier 등, 1996; Comelekoglu 등, 2002; Schuhfried 등, 2000) 발표되고 있어 논쟁의 여지가 충분히 남아있다.

사람이 피부는 3~4mm 이내에서 조사된 레이저 에너지의 80% 이상을 흡수해버리고, 일단 레이저가 피부를 통과했다고 할지라도 피부조직이 균일한 조직이 아니기 때문에 레이저의 특성 중 응집성을 잃어버리게 된다(Mulcahy 등, 1995). 그러나 이러한 피부에서의 레이저 흡수에도 불구하고, 저강도 레이저 조사가 피부에 비해 심부에 위치하는 근육세포에 있

어 세포의 생리학적 과정들을 조절하고 가속화시킴으로(Bibikova와 Oron, 1994), 근육손상 후 재생과정을 촉진시킨다는 연구들이 많이 이루어지고 있다(Amaral 등, 2001a; Bibikova 등, 1994; Morrone 등, 1998; Shefer 등, 2001).

이전 연구에서 Amaral 등(2001a)과 Oliveira 등(1999)은 저강도 레이저의 강도에 따라 골격근 재생에 영향을 주지 않을 수도 있다고 보고하였고, Bibikova와 Oron(1994)은 다중적인 레이저 조사는 새롭게 형성된 근육구조에 병리적인 변화를 초래할 수 있다고 하였다.

본 연구에서 사용한 GaAlAs 반도체 다이오드 레이저에 대하여, Kameya 등(1995)은 여러 가지 저강도 레이저 중 특히 GaAlAs 반도체 다이오드 레이저가 조작이 단순하고 쉬우며, 통증과 손상을 일으키지 않으면서 피부를 통과할 수 있다고 하였고, Morrone 등(1998, 2000)은 GaAlAs 반도체 다이오드 레이저가 세포손상을 일으키지 않으면서 생체자극(biostimulation)을 할 수 있다고 하였다. 그러나, 지금까지 연구되어 온 대부분의 연구는 He-Ne 레이저를 이용하여 저강도 레이저의 효과를 살펴본 논문들이 대부분이며, GaAlAs 반도체 다이오드 레이저를 이용한 연구들에 있어서도 근타박상 유발 후 근육재생과정을 살펴본 연구가 드물고, 또한 재생과정을 관찰하는 방법에 있어서도 성장인자의 발현을 관찰한 논문이 거의 없는 현실이다.

이에 본 연구는 근타박상 부위에 GaAlAs 반도체 다이오드 레이저를 조사하여 혈관신생의 지표로서 작용하는 혈관내피성장인자의 발현을 관찰함으로써 GaAlAs 반도체 다이오드 레이저 조사가 근타박상 이후 혈관신생과정에 영향을 주어 근육재생과정을 촉진시킬 수 있는지에 대한 과학적 증거를 제시하고자 한다. 그리고 근타박상 직후 즉, 급성기에 레이저 적용한 군과 1일 후 레이저 적용을 시작한 군의 혈관내피성장인자의 발현을 비교해 봄으로써 급성기에 레이저 적용이 어떠한 영향을 미치는지에 대해서도 알아보고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험동물

본 연구에서는 동일한 조건하에서 사육한 생후 8-10주, 체중 250-300g의 건강하고 성숙한 Sprague-Dawley계 흰쥐를 성별 구분 없이 36마리를 사용하였다. 실험동물은 손상 직후부터 레이저를 조사한 실험군1, 손상 1일 후부터 레이저를 조사한 실험군2, 그리고 레이저를 조사하지 않은 대조군으로 나누어 실시하였다. 실험군1은 다시 2, 4, 8시간, 1, 2, 3, 7일군으로, 실험군2는 1, 2, 3, 7일군의 하위그룹으로 각각 나누었으며, 대조군 또한 각각의 하위그룹에 맞추어 나누었다. 실험 기간 중 물과 먹이는 무제한 공급하였고, 사육실의 온도는 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $50\pm 2\%$ 로 최적의 상태를 유지하였으며, 사육장의 광주기와 암주기를 각각 12시간으로 조절하였다.

2. 실험방법

1) 예비실험

본 실험에서 사용될 근육조직은 혈종, 부종 등 일정한 근육손상 후 특징들이 나타나야하고, 일정한 기간동안 생존해야 하므로 100cm의 원통관을 이용하여 다양한 무게의 쇠구슬을 낙하시켜 봄으로써 적절한 쇠구슬의 무게를 채택하기 위하여 예비실험을 실시하였다.

예비실험에서 사용한 쇠구슬의 무게는 44.62g, 35.8g, 27g, 21.7g, 16.3g이었는데, 더 높은 무게의 쇠구슬의 경우 구슬의 지름이 너무 크므로 적절하지 않아 제외시켰다. 1회 낙하에 의해서는 생존률은 높으나 적절한 혈종형성이 이루어지지 않으므로, 쥐의 하퇴삼두근의 동일한 지점에 표시를 한 후 쇠구슬을 2회 낙하 시켰다. 44.62g의 경우 시술 후 1일 이내에 사망하였고, 27g의 경우는 혈종형성이 미약하여, 35.8g의 쇠구슬을 채택하여 근타박상 모델을 만들었다.

2) 실험전 처치

수술방법은 Kasemkijwattana 등(1998)의 방법을 변형하여 사용하였다. 요약하면, 염산케타민(Ketamine HCL, 유한양행)과 Xylazine hydrochloride(Rompun, 바이엘코리아)를 1:1 비율로 섞은 전신마취제를 복강내 주사(2ml/kg)하여 마취를 시킨 상태에서 오른쪽 다리의 하퇴 부위를 삭모하고, 슬관절 신전, 족관절 90°배측굴곡 시킨 상태로 고정하였다. 하퇴삼두근의 근건부에서 무릎방향으로 1~1.2cm 윗부분을 표시한 후, 표시한 지점이 100cm관(지름: 2.5 cm)의 중앙에 위치하도록 관을 위치시킨 후 31.4g의 쇠구슬을 2회 낙하시킴으로써 하퇴삼두근에 근타박상(muscle contusion)을 일으켰다. 근타박상 유발 후 표준플라스틱 케이지(290×430×180mm)에 2마리씩 넣어 생활하게 하였다.

3) 레이저 적용

본 실험에 사용한 레이저는 GaAlAs 반도체 다이오드 레이저로, 제품명은 LASER BIOSTIMULATION(HANIL M.E CO., LTD)를 사용하였다. 실험군1은 손상 직후에, 실험군2는 손상 1일 후에 Scan 레이저 조사 형식으로 파장 830nm, 강도 20mW, 주파수 2000Hz, 치료시간 15분, 1일 1회 치료를 원칙으로 실시하였다. 치료시 대조군 또한 치료시간 동안 마취를 시켜주어, 실험군과 최대한 동일한 조건을 주었다. 레이저 조사시 슬관절을 최대한 신전시키고, 족관절은 90도 배측굴곡시킨 상태에서 테이프로 고정시켜서 실시하였다. 레이저 치료는 손상이 유발된 하퇴삼두근의 근복 중앙을 중심으로 실시하였고, 레이저빔의 조사각도는 조사표면과 90도를 유지하였다.

조직채취를 위해 레이저 조사 1시간 경과 후 흉강을 열고 cannula를 좌심실을 통하여 오름대동맥에 삽입하고 관류수세기(MASTERFLEX, Cole-Parmer Instrument Co., USA)를 이용하여 0.9% NaCl로 관류수세하였고, 이어서 고정액(4% paraformaldehyde, Merck, Germany)을 이용하여 관류고정을 실시하였다. 하퇴삼두근의 근건접합부에서 근위부로 1.5cm 부위를 절취하여 면역조직화학검사를 위해 2시간 동안 고정액에 후고정을 하였으며,

수크로즈(25% sucrose)에 하루동안 냉장보관하였다.

4) 조직절편 제작

후고정 실시 후 하퇴삼두근은 알콜(alcohol)을 이용한 틸수(dehydration)과정과 자일렌(xylen)을 이용한 청명(clearing)과정을 실시한 후 파라핀 포매(paraffin embedding)를 하였다. 파라핀 블록(paraffin block)을 제작 후 미세절단기(BRIGHT 5040, Bright instrument company Ltd.)를 사용하여 10 μm 의 두께로 잘라서 슬라이드를 제작하였으며, 건조기(C-SL SLIDE WAMER, Chang Shin Scientific Co, Korea)에 24시간 동안 건조시켰다.

5) 혜마톡실린-에오진(Hematoxylin & Eosin) 염색

시간경과에 따른 근육조직내의 일반적인 조직형태를 관찰하기 위해 혜마톡실린-에오진 염색을 실시하였다. 탈파라핀(deparaffin)과 함수(hydration)과정을 실시한 후 3차 증류수에 10분간 수세하였다. 수세 후 혜마톡실린에 8분간 침수시키고 흐르는 물에 1분간 수세 후, 80% 알콜에 3분간 침수시켰다. 다시 에오진에 8분간 침수시킨 후 틸수와 청명의 과정을 거쳐 봉입하였다.

6) 면역조직화학법

제작된 근육절편은 자일렌을 이용한 탈파라핀(deparaffin)과 알콜을 이용한 함수(hydration)과정을 거친 후, 3차 증류수에 10분씩 3회 수세하였고, 내인성 과산화효소(endogenous peroxidase)를 억제시키기 위하여 100% methanol 200mL에 30% H₂O₂ 1mL를 첨가해 만든 용액에 30분간 침적시킨 후, 증류수와 0.1M PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)에 각각 10분씩 3회 세척하였다. 그리고 나서 조직이 마르는 것을 방지하기 위하여 습윤상자 내에 슬라이드를 배열하고 난 후, 조직내 비특이적인 면역반응을 차단하기 위해 normal horse serum으로 실온에서 1시간 동안 전처리를 시킨 후 ABC(avidin-biotin complex)법을 실시하였다. 요약하면, 1:50으로 희석된(희석용액: 0.1M PBS, 0.003% Triton X-100, 0.02% Normal goat serum) 1차 항체인 mouse anti-VEGF(rhVEGF₁₂₁, Oncogene Research Products, Boston, USA)를 사용하여 36°C에서 1시간 동안 반응시키고, 0.1M PBS로 10분씩 3회 세척하였다. 이후 2차 항체로 biotinylated anti-mouse IgG(Vector Lab., USA)으로 실온에서 1시간 반응시킨 후, 0.1M PBS로 10분씩 3회 세척하였다. 3차 항체로 Vectastatin Elite ABC Regent(Vector Lab., USA)로 실온에서 1시간 반응시킨 후, 0.1M PBS와 Tris-HCl buffer에 각각 10분씩 3회 수세하였다. DAB 용액(3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride containing 0.01% H₂O₂ in Tris-HCl buffer)으로 발색시킨 후, Mayer's hematoxylin staining으로 핵염색을 실시하였고, 틸수와 청명과정을 거친 후 마지막으로 PMM(permanent mounting media)인 clarion(Biomedica, USA)을 이용하여 cover glass로 봉입하였다.

7) 자료처리

육안적 관찰은 광학현미경(OLYMPUS BX50)을 사용하여 관찰하였고, 발현된 세포수의 비교는 Image-Pro Plus win 4.0β 프로그램을 사용하여 단위면적(40배율 : 1.19mm^2)당 반응을 나타낸 세포의 수를 측정하였다. 통계처리는 SPSS win 10.0을 이용하여 실시하였으며, 이원배치분산분석의 경우 시간경과와 그룹군간에 상호작용이 존재하기 때문에, 2시간, 4시간, 8시간군은 독립표본 T-검정을 실시하였고, 1일, 2일, 3일, 7일군은 일원배치분산분석을 실시하였으며, 유의수준 α 는 0.05로 하였다.

III. 결 과

1. 광학현미경적 관찰

근타박상 유발 후 근육조직의 재생과정이 일어나는지는 관찰하기 위하여 혈마톡실린-에 오진 염색을 실시하였다. 실험군1, 실험군2 및 대조군 사이의 형태학적인 조직의 재생과정은 1주일동안 그렇게 많은 차이를 보이지는 않았다. 일반적인 특징들을 살펴보면, 근타박상 유발 이후 손상 3일까지 혈종이 관찰되었고(Fig. 2-1), 비록 시간경과에 따라 면적이 감소되기는 했지만 쇠구슬이 떨어진 바로 아래 부위의 근육조직은 파열되어 근육조직의 형태를 유지하지 못하고 서로 뭉쳐져 있으며(Fig. 2-2), 근육조직이 뭉쳐져 있는 주변 부위의 근섬유 사이와 근다발막(epimysium) 사이간격이 혈액침착과 부종에 의하여 넓어져 있었다(Fig. 2-1, 2-2). 그리고 3일군과 7일군의 비교적 손상을 덜 받은 부위에서 분리된 섬유(splitted fibers)가 관찰되었고(Fig. 2-3), 7일군에서는 핵이 중앙부에 위치하는 근섬유(centronucleated muscle fiber)가 일부 관찰되었다(Fig. 2-5). 특히 7일째 대조군은 실험군에 비하여 근위축과 육아조직이 더 많이 나타났으며(Fig. 2-4), 7일군까지는 계속적으로 혈관주변과 간격이 넓어진 근섬유 사이에 부분적으로 염증세포가 관찰되었다(Fig. 2-6).

2. 혈관내피성장인자 면역조직화학 반응

대조군과 각 실험군의 조직절편들 중 무작위로 추출하여 혈관내피성장인자 면역조직화학 반응을 검사하였다. 대조군과 실험군 모두 직접적으로 손상받은 근섬유보다는 비교적 근섬유의 형태를 알아볼 수 있는 주변부위와 혈관주위에서 혈관내피성장인자 면역반응이 강하게 나타났다. 특히 손상 초기에는 내·외 비복근과 가자미근 사이의 주변에 위치한 근섬유에서 많은 발현이 관찰되었고, 손상 후기로 갈수록 각각의 근섬유 사이에서도 발현되기 시작하였다. 각 그룹별 혈관내피성장인자 면역반응 세포수를 <Table 1, 2>에 나타냈다.

손상직후 레이저를 조사한 실험군 I의 경우 시간경과에 따라 혈관내피성장인자 발현은 처음 2시간부터 2일까지 유의한 변화를 보였고($p<0.05$), 3일과 7일사이에 유의한 변화를 관찰

하였다(Fig. 1-1-1, Fig. 3-1, Fig. 4-1, Fig. 5-1, Fig. 6-1, Fig. 7-1, Fig. 8-1, Fig. 9-1). 그리고 대조군과 비교하여 2시간군을 제외하고 모두 유의한 차이를 보여($p<0.05$), 레이저가 혈관내피성장인자 발현에 영향을 미침을 알 수 있었다(Fig. 1-2A).

손상 1일 후 레이저를 조사한 실험군 II의 경우 1일과 2일 사이, 그리고 3일과 7일 사이에 유의한 변화를 보였고(Fig. 1-1-2, Fig. 10-1, Fig. 10-2, Fig. 10-3, Fig. 10-4), 대조군과의 비교에서는 2일, 3일, 7일에서 유의한 차이를 보였다($p<0.05$)(Fig. 1-2-2). 그리고 실험군 I과의 비교에서는 7일군을 제외한 나머지 그룹에서 모두 유의한 변화를 보여($p<0.05$)(Fig. 1-2-3), 손상 직후 레이저 조사가 손상 1일후 레이저 조사보다 혈관내피성장인자 발현에 더 효과적임을 보여주었다.

대조군의 경우 1일군과 2일군, 2일군과 3일군을 제외한 나머지 그룹에서 모두 유의한 변화를 보였다($p<0.05$)(Fig. 1-1-3, Fig. 3-2, Fig. 4-2, Fig. 5-2, Fig. 6-2, Fig. 7-2, Fig. 8-2, Fig. 9-2).

<Table 1> The changes of VEGF expression at 2, 4, and 8 hours.

	unit : pixels		
	2hour	4 hour	8 hour
Exp. I	57.50±4.20	98.25±4.78	126.25±4.78
Control	55.25±4.92	85.00±2.16	107.50±5.19

(Mean ± SD)

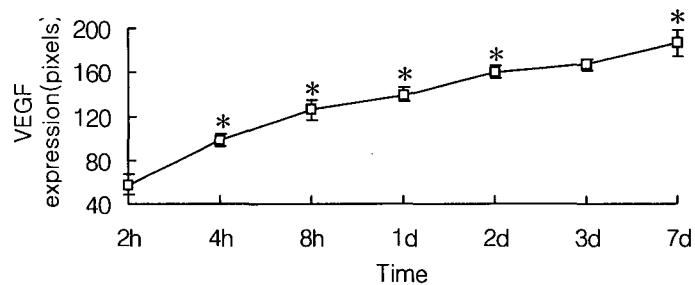
<Table 2> The changes of VEGF expression at 1, 2, 3, and 7 days.

	unit : pixels			
	1 day	2 day	3 day	7 day
Exp. I	139.75±4.03	160.25±3.30	167.00±2.94	186.75±3.59
Exp. II	126.25±3.59	143.50±3.87	149.75±1.07	178.50±3.87
Control	123.50±2.88	130.25±1.70	136.25±0.95	152.50±8.06

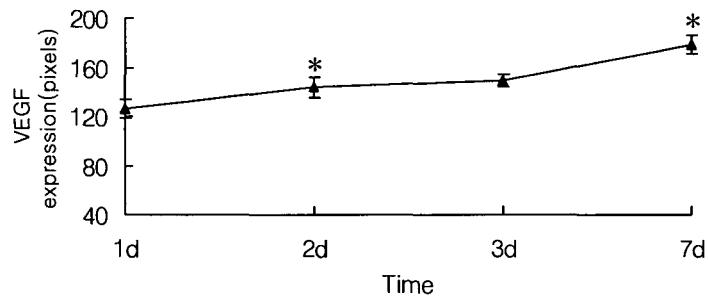
(Mean ± SD)

<Fig. 1-1> The changes of average numbers of VEGF expressed pixels in the each groups with the course of times(* : p<0.05).

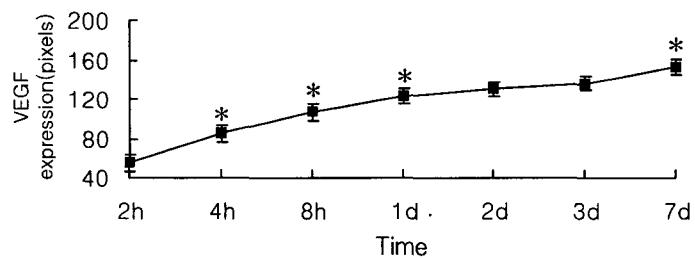
1) Experimental group I



2) Experimental group II

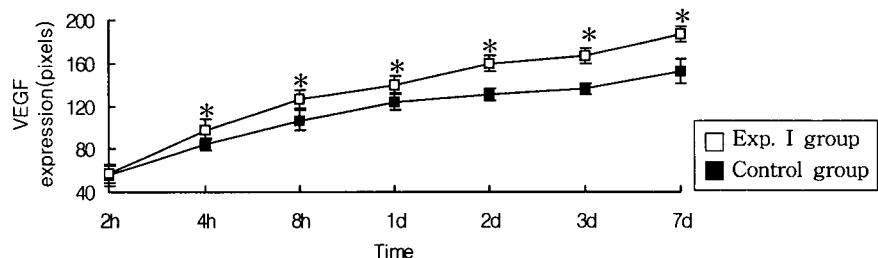


3) Control group

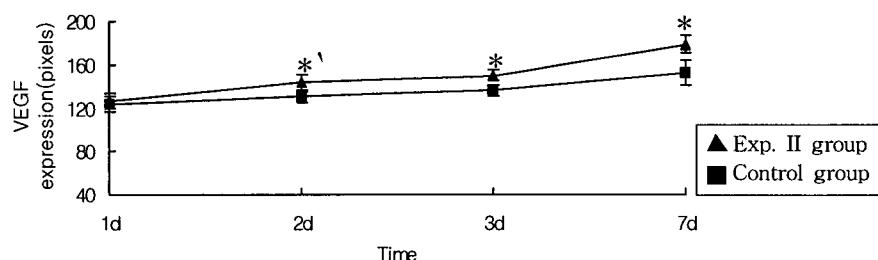


<Fig. 1-2> The comparison with VEGF expression between groups (* : p<0.05)

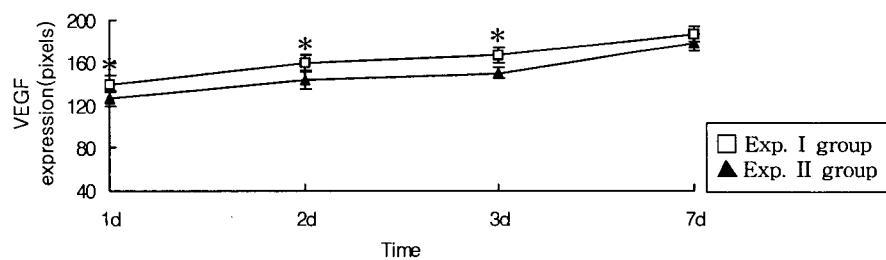
1) Experimental group I and control group



2) Experimental group II and control group



3) Experimental group I and experimental group II



IV. 고 칠

근육손상 후 일어나는 재생과정은 복잡한 단계를 거치는 생리학적인 과정으로, 손상된 근섬유는 위성세포(satellite cell)에 의해서 새로이 대치됨으로써 재생과정이 이루어지게 된다. 이러한 위성세포는 성숙한 근섬유의 근섬유막(sarcolemma)과 기저막(external lamina)사이에 위치하는 단핵세포로, 새로운 근섬유의 전구세포일 뿐만아니라 재생되어지는 근섬유에 새로운 근핵을 추가하는데 이용되기도 한다(Husmann 등, 1996). 성인의 경우, 위성세포는 탈신경, 신장(stretch), 운동, 냉(cold), 그리고 압박과 같은 근육손상에 반응하여 정지기 상태에서 활성화된다(Chambers와 McDermott, 1996). 이러한 위성세포의 증식과 분화과정은 괴사조직의 탐식작용과 혈관신생과정이 끝난 후 일어나는데, 혈관신생과정이 선행적으로 일어나야 하는 이유는 신체조직의 기능유지 및 발휘를 위해서는 필수적으로 계속적인 산소와 영양공급이 필요한데, 산소의 제한적인 확산거리 때문에 신체조직은 혈관에서 100-200 μm 이내에 위치해야하기 때문이다(Carmeliet와 Jain, 2000). 그러므로 혈관신생과정에서 중추적인 역할을 담당하는 성장인자인 혈관내피성장인자의 발현을 관찰하는 것으로 근육재생과정의 촉진을 설명할 수 있다.

비록 근섬유의 재생과정에 대해서는 많은 연구가 이루어져 왔지만, 근섬유의 재생과정을 촉진시키는데 자주 사용되어지는 많은 물리적 인자(physical agents)의 효과에 대해서는 아직도 많은 의문점들이 존재한다(Amaral 등, 2001a; Oliveira 등, 1999). 현재 물리치료 영역에서 근육손상 후 적용되는 물리적 인자에는 전기자극, 초음파, 저강도 레이저 등이 있는데, 특히 저강도 레이저의 경우는 근타박상과 같이 피부조직이 손상받지 않는 상황에서는 잘 시행되지 않는 것이 보통이다(Oliveira 등, 1999). 그러므로 저강도 레이저가 근육손상 후 근육재생과정을 촉진시킬 수 있다는 연구결과들에 주의를 기울일 필요가 있다.

저강도 레이저 조사에 의한 생리적 효과는 광원(light source)의 특성과 피부구조에 따라 특징지워진다. 즉, 광원에 따라 발생되는 레이저의 파장, 에너지, 맥동기간, 주파수 등에 따라서도 생리학적 효과가 달라질 수 있다(Morrone 등, 1998). Basford(1993, 1995)는 레이저의 경우 짧은 파장은 수 밀리미터의 깊이만을 투과하는 반면, 긴 파장인 경우 짧은 파장보다 더 깊이 침투한다. 그러므로, He-Ne 레이저인 경우는 천부조직 손상에 더 효과적이고, 적외선 레이저인 경우는 심부조직 손상에 더 효과적이라고 하였다. Amaral 등(2001a)은 전경골근에 ACL myotoxin을 투여한 후 다양한 강도(2.6, 8.4, 그리고 25J/cm²)로 5일간 He-Ne 레이저를 조사한 결과 오직 2.6 J/cm²에서만 근육재생을 촉진시키는 것을 발견하고, He-Ne 레이저가 강도-의존성으로 생물학적 효과를 발휘한다고 하였다. 이러한 결과에서도 알 수 있듯이 저강도 레이저는 특별한 파장과 강도 등에 따라 피부를 통한 레이저의 전달량에 차이가 있을 것이라고 충분히 예상할 수 있다. 본 연구에서는 He-Ne 레이저에 비해 조직 투과율이 더 좋은 것으로 알려진 GaAlAs 반도체 다이오드 레이저(830nm)를 사용하였고, 주파수와 강도는 일반적으로 포유류의 골격근 손상시 적용시키는 강도를 채택하였다.

본 연구에서 레이저를 조사한 실험군과 레이저를 조사하지 않은 대조군의 경우 대부분 통

계학적으로 유의한 차이를 보였다. 이러한 유의한 차이가 특히 2일과 3일에서 많은 차이를 나타내며 관찰되어지는 것으로 보아 저강도 레이저가 신생혈관의 형성 중 특히 증식과정에 많이 관여함을 알 수 있다. 왜냐하면 3일이라는 시간은 대개 증식이 최고조에 이르는 시간이기 때문이다(Chambers와 McDermott, 1996). 지금까지 연구에서도 저강도 레이저가 혈관내피성장인자 발현을 향상시킬 수 있다는 연구들이 보고되고 있는데, Kipshidze 등(2001)은 관상혈관으로부터 추출한 사람의 내피세포를 배양하여 He-Ne 레이저(632nm)를 조사한 결과 레이저 조사 20분까지는 온도변화가 거의 없었고, 섬유아세포와 평활근세포에서 모두 10-20분 조사시 혈관내피성장인자 발현이 가장 많았으며, 섬유아세포에 비해 평활근세포가 특히 저강도 레이저 조사에 민감하게 반응하여 혈관내피성장인자를 더 많이 분비함을 보고하였다, Khanna 등(1999)은 배양한 태아심근세포(fetal cardiomyocyte)에 저강도 레이저 (5mW, 632nm, He-Ne)를 조사한 결과 VEGF mRNA가 증가됨을 보고하였다. 혈관내피성장인자뿐만 아니라 혈관재생과 골격근 재생에 있어 중요한 역할을 담당하는 TGF- β 와 PDGF(Yu 등, 1994)와 같은 성장인자 또한 저강도 레이저 조사에 의해서 발현이 증가됨을 보고한 연구들이 다수 존재한다. 이와 같은 연구결과들은 저강도 레이저 조사가 성장인자의 자가생성을 증가시키는것과 관련있다고 사료되어지고, 본 연구에서 사용한 저강도 레이저인 GaAlAs 레이저 또한 성장인자의 발현을 증가시킨다는 점에서 부합되어진다.

Bibikova 등(1994)은 toad의 비복근에 손상을 일으킨 후 손상 2일 후 저강도 레이저 (He-Ne) 조사(632.8nm, 6mW, 2min)를 실시하여 조직형태학적 방법으로 신생모세혈관의 용적 밀도(column density)와 표면 밀도(surface density)를 살펴본 결과 9일째 대조군에 비해 더 높았고 14일째는 더 낮음을 보고하면서, 초기 저강도 레이저 조사가 신생혈관의 형성을 촉진하고 성숙과정을 촉진시킨다고 주장하였다. Weiss와 Oron(1992)은 비복근에 부분적 근육절개를 한 후 He-Ne 레이저(6.0mW)를 5일간 조사한 후 조직학적 형태측정 방법으로 손상면적을 계측한 결과, 3일째부터 대조군과 유의한 변화를 관찰하였다. 본 연구에서는 실험군과 대조군사이의 육안적인 형태는 별다른 차이가 없었고, 7일째 대조군에서 근위축소견 및 육아조직(granular tissue)이 실험군에 비해서 더 많이 나타났는데, 이러한 현상은 손상유발 부위의 통증 등으로 인해 사용이 제한적으로 이뤄지면서 나타나는 현상으로 사료된다. Beiner와 Jokl(2001)은 이러한 현상이 신경신호입력의 손상, 혈관의 미성장, 콜라겐 교차결합 증가, 그리고 재생되어지는 근모세포의 과도한 침착 등의 원인에 의한 것이라고 하였다. 또한 7일군에서 핵이 중앙부에 위치하는 근섬유와 관찰되었는데, 이러한 현상은 골격근의 재생과정이 이루어지고 있다는 증거가 된다. Kasemkijwattana 등(1998)은 하퇴삼두근에 근타박상을 유발하여 치유과정을 관찰한 실험에서, 2일까지 큰 혈종이 관찰되었고, 7일에는 핵이 중앙에 위치하는 근섬유를 관찰하였고, Amaral 등(2001a)과 Oliveira 등(1999)은 ACL myotoxin을 전경골근에 투입후 HeNe 레이저를 조사한 실험에서 핵이 중앙에 위치하는 근섬유들이 21일에서도 관찰됨을 보고하였다. 핵이 중앙부에 위치하는 근섬유의 출현은 새롭게 재생된 근관과 근섬유들의 증거인데, 근육이 재생과정에 있어 이러한 현상들은 손상 후 기저막과 세포막 사이에 위치하는 위성세포가 기저막 손상으로 인해 분비되면서 다행히 근

관을 형성하고 결과적으로 근섬유의 형태를 취하면서 손상회복을 이루는 과정 중 하나이다 (Kasemkijwattana 등, 1998). 그리고 본 연구에서 7일까지 골격근의 재생과정이 완전히 이루어지지 않는 것으로 보아, 본 실험에서 사용한 실험모델이 기저막 손상을 유발시킬 수 있음을 알 수 있다. 왜냐하면, 일반적으로 기저막이 손상받지 않았을 때 완벽한 재생은 7일까지 이루어지나, 좀 더 심한 파괴가 있을 시, 7일부터 결합조직이 손상부위를 채우게 되고, 21일까지 손상부위를 재생된 근섬유들이 불완전하게 치유되기 때문이다(Chambers와 McDermott, 1996).

본 실험결과에서 관찰된 분리된 섬유(splited fibers)는 근육손상 부위에서 가늘게 또는 불완전하게 나누어진 근섬유의 특징으로, 신경근지배와 관련있는 것으로 알려져 있고(Amaral 등, 2001a), 이러한 특징은 불완전한 근섬유재생이 보이는 곳에서 나타나며, 근육손상 후 운동단위(motor unit)의 재정렬의 증거가 된다고 보고되고 있다(Oliveira 등, 1999). 이미 존재하는 근섬유에서 기원하는 분리된 섬유와 재생과정에서 나타나는 작은 근섬유를 구분하는 기준은 분리된 섬유의 경우 모섬유가 차지하는 공간을 벗어나지 않으면서 모섬유와 하나의 그룹을 이루고 있으나, 재생과정에서 나타나는 작은 근섬유의 경우는 각각의 섬유들이 서로 일정한 거리를 두고 존재하는 것으로 구분되어진다고 판단된다(Stauber와 Smith, 1998).

일반적으로 급성기에는 휴식, 얼음, 압박, 그리고 거상과 같은 치료가 일반적으로 이루어져 왔고(Worrell, 1994), 이후에 물리치료가 적용되어져 왔다. 일반적으로 급성기에는 계속적인 출혈과 부종감소 등의 목적으로 치료에 접근하기 때문에 위와같은 치료들이 주로 이루어지는데(Beiner와 Jokl, 2001), 저강도 레이저의 경우 열효과(thermal effects)가 아닌 직접적인 조사에 의한 조직내 생물학적 변화를 일으키는 것이므로(Karu, 1991, 1998), 본 실험에서 손상직후 레이저 조사군(실험군1)과 손상 1일 후 레이저 조사군(실험군2)으로 나누어 실험을 실시한 결과 손상 후 초기 3일까지 실험군1에서 더 많은 혈관내피성장인자 발현을 관찰한 연구결과는 손상 후 급성기 치료에 있어 저강도 레이저 적용을 위한 기초자료로서 사용될 수 있으리라 사료된다.

그러나 본 연구의 결과처럼 저강도 레이저의 효과들에 대해 긍정적인 결과들만이 존재하는 것은 아니다. Oliveira 등(1999)은 ACL myotoxin을 전경골근에 투여한 후 GaAs 레이저(904nm)를 5일간 조사하여 21일 후 전경골근의 무게와 근섬유의 형태학적인 변화를 관찰한 결과 유의한 변화를 나타내지 않았다고 보고하였는데, 이와같이 저강도 레이저 조사가 골격근 재생과정을 촉진시키지 않는다는 연구결과들도 일부 발표되고 있다. 비록 저강도 레이저의 효과에 대한 완전한 이해는 이루어지지 않고 있지만, 본 실험결과의 기전적 설명에 영향을 줄 수 있는 기초적인 기전들이 몇몇 연구들에 의해서 제시되고 있다. Kreisler 등(2002)은 세포에 대한 레이저 효과는 주파수와 강도 등에 의존적으로 나타나므로, 세포는 일부 레이저 주파수와 파장에 대하여 "window-specificity"를 가진다고 하였다. 이렇게 세포를 통과한 광선들은 세포내에 위치하면서 가시광선 또는 근적외선과 같은 광선흡수에 있어 중요한 역할을 담당하는 porphyrins과 같은 내인성 감광기(sensitizer), 광수용기(photoacceptors) 또는 chromophores, cytochromes, 그리고 미토콘드리아 효소인 chromoxidase에 의해서 흡수

가 이루어진다(Rochkind 등, 2001; Snyder 등, 2002). Karu(1998)와 Oron 등(2001)은 저강도 레이저 자극이 미토콘드리아에서 세포질로의 Ca^{2+} 분비를 증가시키고, 미토콘드리아 내 호흡사슬(respiratory or cytochrome chain)을 단기간 활성시켜 ATP 생성을 증가시킨다고 하였고, 이러한 ATP의 생성증가는 적-간접적으로 세포활성을 증가시킴으로써, 화학적 조성과 효소분비를 변화시켜 주변세포에도 영향을 준다고 보고되고 있다(Greco 등, 2001; Rochkind 등, 2001). Schwartz 등(2002)은 1~2일된 어린 쥐의 골격근 세포를 배양하여 저강도 레이저(He-Ne)를 조사한 결과 조사직후부터 세포내 Ca^{2+} 농도($[\text{Ca}^{2+}]_i$)가 증가하고, 신경성장인자(nerve growth factor, NGF)의 분비가 증가함을 보고하면서, 저강도 레이저 조사가 세포내 Ca^{2+} 농도를 증가시키고, 그러한 농도증가에 의해서 성장인자와 신경영양성인자의 발현이 증가됨을 보고하였고, Ben-Dov 등(1999)은 세포내 Ca^{2+} 농도 증가는 또한 Ca^{2+} -의존성 PKC 또는 MAPK 연쇄증폭반응과 같은 신호전달로를 활성화 시킴으로써 골격근의 위성세포의 증식과정을 촉진시킨다고 보고하였다. 이와같은 연구결과들과 본 연구의 결과에 의해서 유추해 볼 때, 골격근 손상 후 GaAlAs 반도체 다이오드 레이저(830nm, 20mW, 2000Hz) 조사에 의한 근육재생촉진에 있어 성장인자의 발현 촉진을 과학적 증거로 제시할 수 있다.

현재 임상에서는 저강도 레이저 조사가 다방면의 치료에 이용되고 있는 현실이다. 그러나 이러한 저강도 레이저의 생물학적 자극효과(biostimulation effect)에 대해서는 아직까지 논쟁중에 있는 것 또한 사실이다. 저강도레이저 조사가 혈관내피성장인자의 발현을 촉진시켜 골격근의 재생을 촉진시킨다는 본 연구의 결과가 레이저 사용에 있어 과학적 근거로서 사용되기 위해서는 앞으로도 계속적인 생체내 실험이 이루어져야 할 것이며, 저강도 레이저의 치료적용에 있어서도 단독적인 사용뿐만 아니라 초음파치료, 전기치료 등과 같은 다른 형태의 물리치료 기구와 복합적으로 사용하여 치료에 응용함으로써 더 큰 치료효과가 기대될 것으로 사료된다.

V. 결 론

근육손상 후 저강도 레이저의 일종인 GaAlAs 반도체 다이오드 레이저의 효과를 정량적으로 알아보기 위하여 본 실험에서는 실험동물로 흰쥐를 이용하여 쇠구슬을 낙하시켜 근타박상을 유발시킨 후, 레이저를 손상된 근육에 조사하여 혈관내피성장인자를 이용하여 면역조직화학법을 실시하였다. 실험동물은 레이저를 조사하지 않은 대조군, 손상 직후 레이저를 조사한 실험군 I, 그리고 손상 1일 후 레이저를 조사한 실험군 II로 나누었다. 시간경과에 따른 변화를 관찰하기 위하여 실험군은 다시 2시간, 4시간, 8시간, 1일, 2일, 3일, 그리고 7일군으로 나누어 관찰하였다. 실험결과는 다음과 같다.

1. 형태학적인 관찰에서 7일까지 실험군과 대조군사이의 큰 차이는 발견되지 않았지만, 3일째부터 실험군에서 분리된 섬유가 관찰되었고, 7일째 대조군에서 실험군에 비해 근위축소견과 육아조직이 더 많이 관찰되었다. 그리고 부분적으로 핵이 중앙에 위치한 근섬유가

관찰되었다.

2. 혈관내피성장인자의 발현부위는 실험군과 대조군 모두 손상초기에는 내·외 비복근과 가자미근 사이에 위치한 근섬유에서 주로 관찰되었고, 시간경과에 따라 점차 각각의 근육의 근섬유 사이에서도 관찰되었다.

3. 각 그룹의 혈관내피성장인자의 발현은 보통 2일과 3일을 제외하고는 대부분 유의한 차이를 보였다($p<0.05$).

4. 레이저를 조사한 그룹에서 대조군에 비하여 혈관내피성장인자 면역반응성이 더 높았고, 특히 손상 1일 후 레이저를 조사한 군에 비해 손상직후 레이저를 조사한 군이 손상 후 3일 까지 즉, 손상초기에 혈관내피성장인자 발현이 높게 나타났다.

이상의 결과에서 근타박상 유발 후 근섬유의 재생과정에 있어 저강도 레이저의 일종인 GaAlAs 반도체 다이오드 레이저 조사가 손상초기 혈관신생과정을 촉진시키고, 급성기 저강도 레이저 조사가 손상 1일 후 레이저 조사에 비해 혈관신생과정에 더 효과적임을 알 수 있었다.

참고문헌

- 류종희, 여환호 : Ga-As 레이저조사가 가토의 콴골신경재생에 미치는 영향에 관한 실험적 연구, *Oral Biology Research*, 17(2), 553-563, 1993.
- Adams RH, Diella F, Hennig S, et al : The cytoplasmic domain of the ligand ephrinB2 is required for vascular morphogenesis but not cranial neural crest migration, *Cell*, 104, 57-69, 2001.
- Amaral AC, Parizotto NA, Salvini TF : Dose-dependency of low-energy HeNe laser effect in regeneration of skeletal muscle in mice, *Lasers in Medical Science*, 16(1), 44-51, 2001a.
- Amaral SL, Papanek PE, Greene AS : Angiotensin II and VEGF are involved in angiogenesis induced by short-term exercise training, *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 281(3), 1163-1169, 2001b.
- Babapour R : Low-energy laser systems, *Clinics in dermatology*, 13, 87-90, 1995.
- Basford JR : Laser therapy: scientific basis and clinical role, *Orthopedics*, 16(5), 541-547, 1993.
- Basford JR : Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool, *Lasers in Surgery and Medicine*, 16(4), 331-342, 1995.
- Beiner JM, Jokl P : Muscle contusion injuries: current treatment options, *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 9(4), 227-237, 2001.
- Ben-Dov N, Shefer G, Irinitchev A, et al : Low-energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1448, 32-380, 1999.
- Bibikova A, Oron U : Attenuation of the process of muscle regeneration in the toad gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation, *Lasers in Surgery and Medicine*, 14(4), 355-361, 1994.
- Bibikova A, Belkin V, Oron U : Enhancement of angiogenesis in regeneration gastrocnemius muscle of the toad (*bufo viridis*) by low-energy laser irradiation, *Anatomy and Embryology*, 193(6), 597-602, 1994.
- Bouma MG, Buurman WA, van den Wildenberg FA : Low energy laser irradiation fails to modulate the inflammatory function of human monocytes and endothelial cells, *Lasers in Surgery and Medicine*, 19(2), 207-215, 1996.
- Brooks PC : Role of integrins in angiogenesis, *European Journal of Cancer*, 32A(14), 2423-2429, 1996.
- Brosseau I, Welch V, Wells G, et al : Low level laser therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a metaanalysis, *The Journal of Rheumatology*, 27(8),

- 1961-1969, 2000.
- Cambier DC, Vanderstraeten GG, Mussen MJ, et al : Low-power laser and healing of burns: a preliminary assay, Plastic and Reconstructive Surgery, 97(3), 555-558, 1996.
- Carmeliet P, Jain RK : Angiogenesis in cancer and other diseases, Nature, 407, 249-257, 2000.
- Chambers RL, McDermott JC : Molecular basis of skeletal muscle regeneration The Canadian Journal of Applied Physiology, 21(3), 155-184, 1996.
- Comelekoglu U, Balis S, Buyukakilli B, et al : Acute electrophysiological effect of pulsed gallium-Arsenide low-energy laser irradiation on isolated frog sciatic nerve, Lasers in Medical Science, 17, 62-67, 2002.
- Conway EM, Collen D, Carmeliet P : Molecular mechanisms of blood vessel growth, Cardiovascular Research, 49, 507-521, 2001.
- Deckelbaum LI, Scott JJ, Stetz ML, et al : Photoinhibition of smooth muscle cell migration: potential therapy for restenosis, Lasers in Surgery and Medicine, 13(1), 4-11, 1993.
- Ferrara N : Vascular endothelial growth factor, European Journal of Cancer, 32(14), 2413-2422, 1996.
- Gavin TP, Wagner PD : Effect of short-term exercise training on angiogenic growth factor gene responses in rats, Journal of Applied Physiology(Bethesda, Md.: 1985), 90(4), 1219-1226, 2001.
- Greco M, Vacca RA, Moro L, et al : Helium-neon laser irradiation of hepatocytes can trigger increase of the mitochondrial membrane potential and can stimulate c-fos expression in a Ca^{2+} -dependent manner, Lasers in Surgery an Medicine, 29(5), 433-441, 2001.
- Grounds MD : Towards understanding skeletal muscle regeneration, Pathology, Research and Practice, 187(1), 1-22, 1991.
- Hang J, Kong L, Gu JW, et al : VEGF gene expression is upregulated in electrically stimulated rat skeletal muscle, The American Journal of Physiology, 269(5), 1827-1831, 1995.
- Harris SR, Schoeffner DJ, Yoshiji H, et al : Tumor growth enhancing effects of vascular endothelial growth factor are associated with increased nitric oxide synthase activity and inhibition of apoptosis in human breast carcinoma xenografts, Cancer Letters, 179, 95-101, 2002.
- Husmann I, Soulet L, Gautron J, et al : Growth factors in skeletal muscle regeneration, Cytokine & Growth Factor Reviews, 7(3), 249-258, 1996.
- Kameya T, Ide S, Acorda JA, et al : Effect of different wavelengths of low level laser

- therapy on wound healing in mice, *Laser Therapy*, 7, 33-36, 1995
- Kami K, Morikawa Y, Kawai Y, et al : Leukemia inhibitory factor, glial cell line-derived neurotrophic factor, and their receptor expressions following muscle crush injury, *Muscle & Nerve*, 22, 1576-1589, 1999.
- Karu TI : Stimulation of metabolic processes by low-intensity visible light a science basis for biostimulation. In Myron L. W. *Laser Application in Medical and Biology*, New York: Plenum Press, 1991.
- Karu TI : The science of low-power laser therapy, Netherlands: Gordon and Breach Science Publishers, 1998.
- Kasemkijwattana C, Menetrey J, Somogy G, et al : Development of approaches to improve the healing following muscle contusion, *Cell Transplantation*, 7(6), 585-598, 1998.
- 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.
- Kipshidze N, Nikolaychik V, Keelan MH, et al : Low-power helium:neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro, *Lasers in Surgery and medicine*, 28(4), 355-364, 2001.
- Kreisler M, Christoffers AB, Al-Haj H, et al : Low level 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts, *Lasers in Surgery and Medicine*, 30, 365-369, 2002.
- Maiman TH : Stimulated optical radiation in ruby, *Nature*, 187, 493-494, 1960.
- Mantz AW : A review of spectroscopic applications of tunable semiconductor lasers, *Spectrochimica Acta Part A*, 51(13), 2211-2236, 1995.
- Mauro A : Satellite cells of skeletal muscle fibers, *Journal of Biophysiology, Biochemistry and Cytology*, 9, 493-495, 1961.
- Morrone G, Guzzardella GA, Orienti L, et al : Muscular trauma treated with Ga-Al-As diode laser: in vivo experimental study, *Lasers in Medical Science*, 13(4), 293-298, 1998.
- Morrone G, Guzzardella GA, Tigani D, et al : Biostimulation of human chondrocytes with Ga-Al-As diode laser: 'in vitro' research, *Artificial Cells, Blood Substitutes, And Immobilization Biotechnology*, 28(2), 1037-1199, 2000.
- Mulcahy D, McCormack D, McElwain J, et al : Low level laser therapy: a prospective double blind trial of its use in an orthopaedic population, *Injury*, 26(5), 315-317, 1995.

- Navratil L, Dylevsky I : Mechanisms of the analgesic effect of therapeutic lasers in vivo, *Laser Therapy*, 9, 33-40, 1997.
- Oliveira NML, Parizzotto NA, Salvini TF : GaAs(904-nm) laser radiation does not affect muscle regeneration in mouse skeletal muscle, *Lasers in Surgery and Medicine*, 25, 13-21, 1999.
- Oron U, Yaakobi T, Oron A, et al : Attenuation of infarct size in rats and dogs after myocardial infarction by low-energy laser irradiation, *Lasers in Surgery and Medicine*, 28, 204-211, 2001.
- Petrova TV, Makinen T, Alitalo K : Signaling via vascular endothelial growth factor receptors, *Experimental Cell Research*, 253, 117-130, 1999.
- Randjelovic V, Vukic D : Laser induced neuronal regeneration. *Journal of the Neurological Sciences*, 150, Supplement 1, S326, 1997.
- Rantanen J, Thorsson O, Wollmer P, et al : Effects of therapeutic ultrasound on the regeneration of skeletal myofibers after muscle injury, *The American Journal of Sports Medicine*, 27(1), 54-59, 1999.
- Reher P, Doan N, Bradnock B, et al : Effect of ultrasound on the production of IL-8, basic FGF and VEGF, *Cytokine*, 11(6), 416-423, 1999.
- Risau W : Mechanisms of angiogenesis, *Nature*, 386(17), 671-674, 1997.
- 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, 2001.
- Schuhfried O, Korpan M, Flalka-Moser V : Helium-neon laser irradiation: effect on the experimental pain threshold, *Lasers in Medical Science*, 15(3), 169-173, 2000.
- Schwartz F, Brodie C, Appel E, et al : Effect of helium/neon laser irradiation on nerve growth factor synthesis and secretion in skeletal muscle cultures, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 66, 195-200, 2002.
- Shefer G, Oron U, Irintchev A, et al : Skeletal muscle cell activation by low-energy laser irradiation: a role for the MAPK/ERK pathway, *Journal of Cellular Physiology*, 187(1), 73-80, 2001.
- Shizukuda Y, Tang S, Yokota R, et al : Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase C[delta] activity, *Circulation Research*, 85(3), 247-256, 1999.
- Snyder SK, Byrnes KR, Borke BC, et al : Quantitation of calcitonin gene-related peptide mRNA and neuronal cell death in facial motor nuclei following axotomy and 633nm low power laser treatment, *Lasers in Surgery and Medicine*, 31,

216-222, 2002.

Singer AJ, Clark RAF : Mechanisms of disease: cutaneous wound healing, *The New England Journal of Medicine*, 341(10), 738-746, 1999.

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.

Stauber WT, Smith C : Cellular responses in exertion-induced skeletal muscle injury, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 179, 189-196, 1998.

Tadakuma T : Possible application of the laser in immunology, *The Keio Journal of Medicine*, 42(4), 180-182, 1993.

Van Breugel HH, Bar PR : He-Ne laser irradiation affects proliferation of cultured rat schwann cells in a dose-dependent manner, *Journal of Neurocytology*, 22(3), 185-190, 1993.

Worrell TW : Factor associated with hamstring injuries. An approach to treatment and preventative measures, *Sports Medicine(Auckland, N.Z.)*, 17(5), 338-345, 1994.

Yu M, Naim JO, Lanzafame RJ : The effects of photoirradiation on the secretion of TGF and PDGF from fibroblasts in vitro, *Lasers in Surgery and Medicine*, Supplement 6, 8, 1994.

Legends for Figures

<Fig. 2-1> Hematoxylin & eosin stain at 1 day in group II($\times 40$; bar = $200\mu\text{m}$).

Large hematoma were observed. H : hematoma

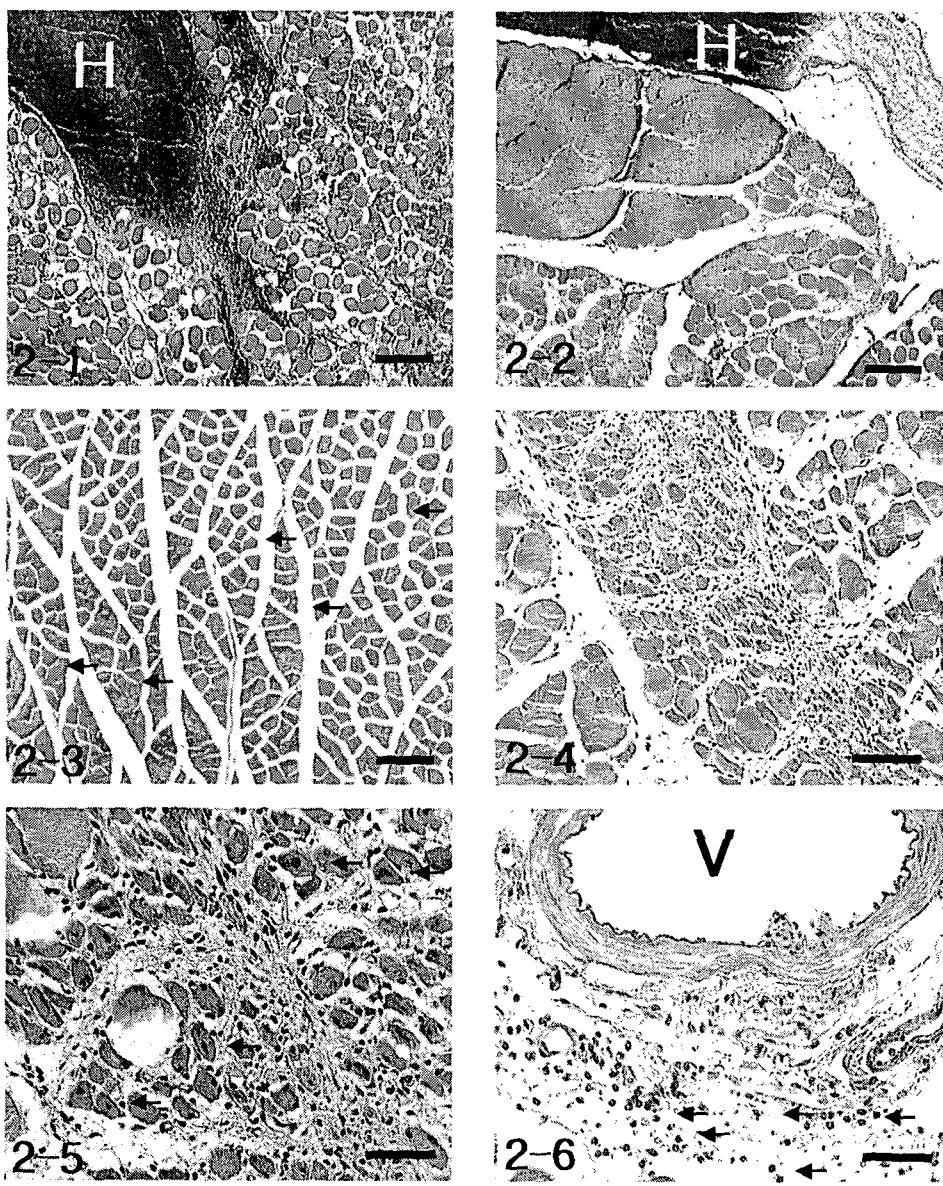
<Fig. 2-2> Hematoxylin & eosin stain at 8 hours in control group($\times 40$; bar = $200\mu\text{m}$). The lower part contacted with metal bead was collapsed muscle fiber, and interspace of epimysium and muscle fiber was increased. H : hematoma

<Fig. 2-3> Hematoxylin & eosin stain at 3 days in group II($\times 40$; bar = $200\mu\text{m}$). Splited fibers(arrow) were observed among the muscle fibers.

<Fig. 2-4> Hematoxylin & eosin stain at 7 days in control group($\times 100$; bar = $100\mu\text{m}$). Muscle atrophy and fibrosis were observed.

<Fig. 2-5> Hematoxylin & eosin stain at 7 days of control group($\times 200$; bar = $50\mu\text{m}$). Centronucleated muscle fibers(arrow) were observed.

<Fig. 2-6> Hematoxylin & eosin stain at 7 days of control group($\times 200$; bar = $50\mu\text{m}$). Inflammatory cells(arrow) were observed around the blood vessel. V : blood vessel



<Fig. 3-1> Immunoreactivity(arrow) with the VEGF antibody at 2 hours in group I($\times 100$; bar = $100\mu\text{m}$).

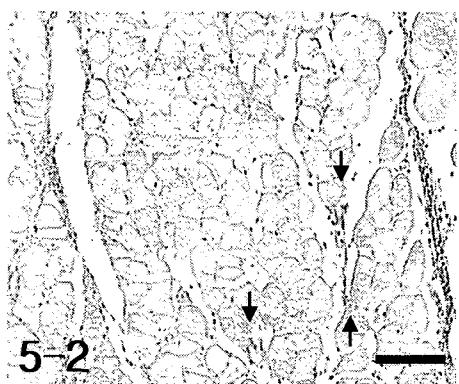
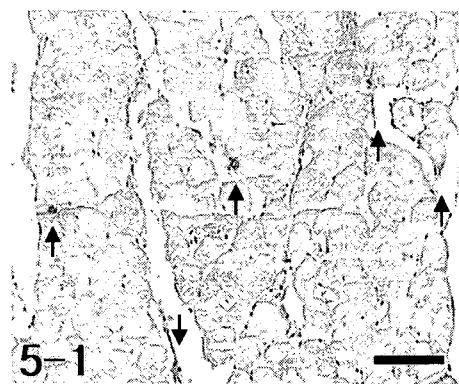
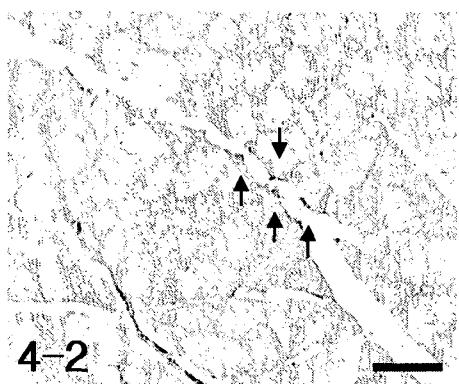
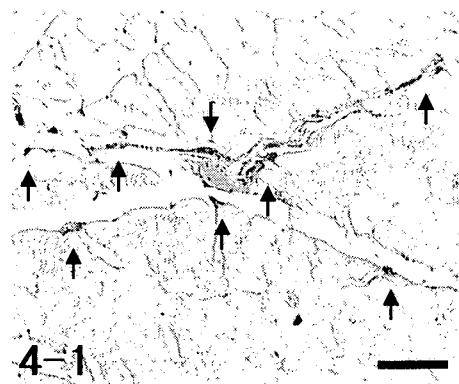
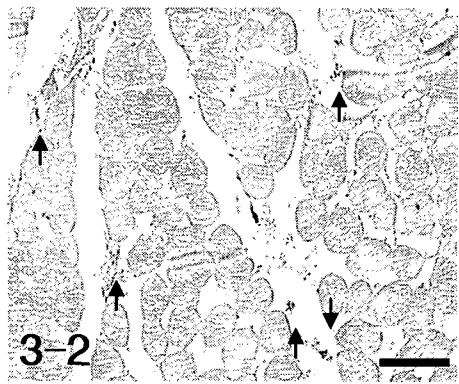
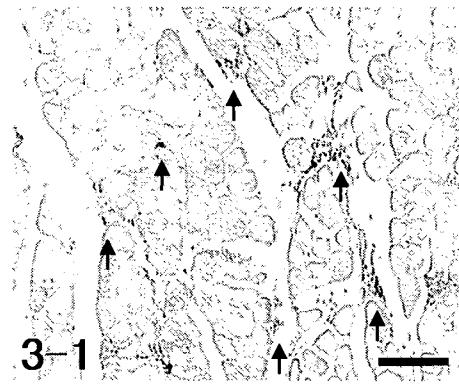
<Fig. 3-2> Immunoreactivity(arrow) with the VEGF antibody at 2 hours in control group($\times 100$; bar = $100\mu\text{m}$).

<Fig. 4-1> Immunoreactivity(arrow) with the VEGF antibody at 4 hours in group I($\times 100$; bar = $100\mu\text{m}$).

<Fig. 4-2> Immunoreactivity(arrow) with the VEGF antibody at 4 hours in control group($\times 100$; bar = $100\mu\text{m}$).

<Fig. 5-1> Immunoreactivity(arrow) with the VEGF antibody at 8 hours in group I($\times 100$; bar = $100\mu\text{m}$).

<Fig. 5-2> Immunoreactivity(arrow) with the VEGF antibody at 8 hours in control group($\times 100$; bar = $100\mu\text{m}$).



<Fig. 6-1> Immunoreactivity(arrow) with the VEGF antibody at 1 day in group I($\times 100$; bar = $100\mu\text{m}$).

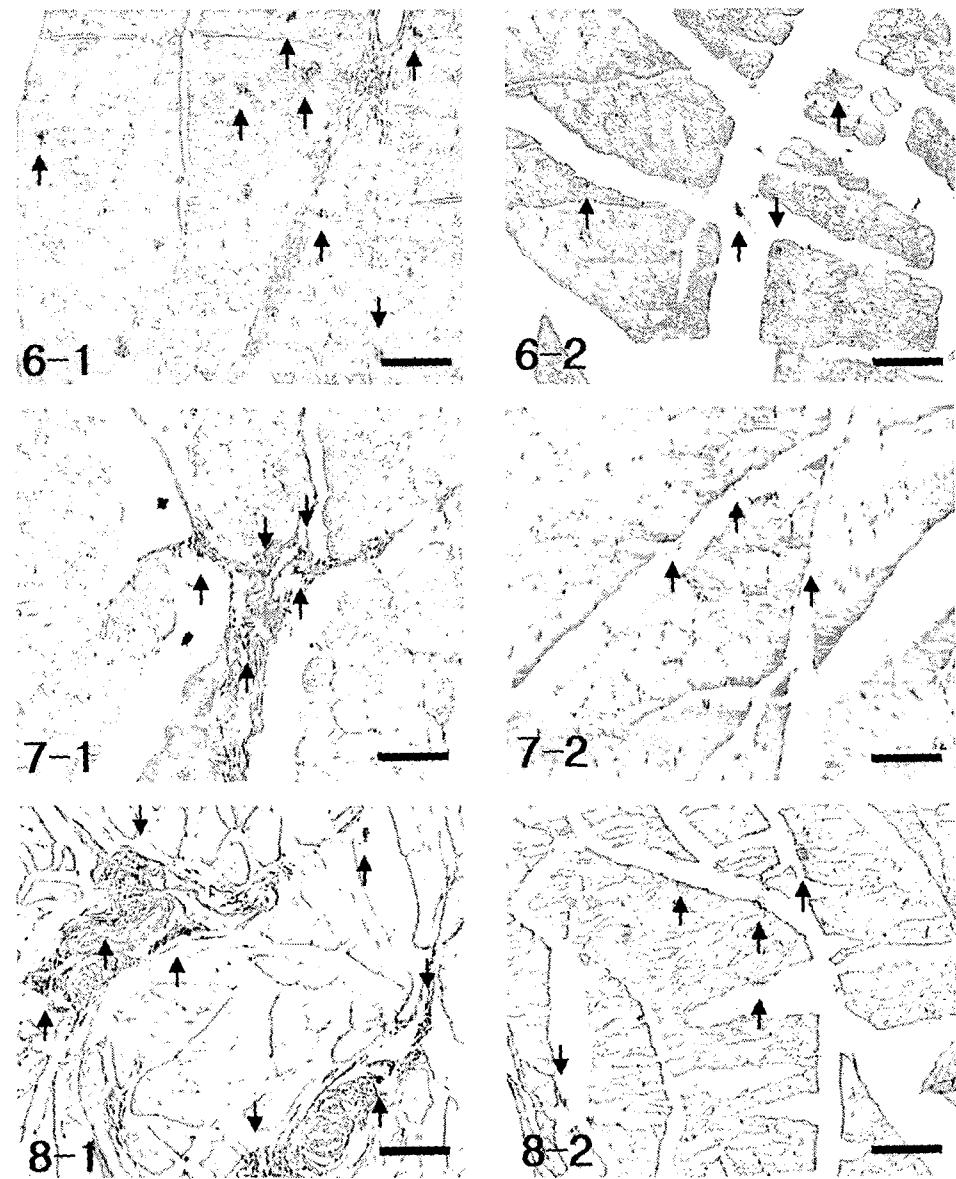
<Fig. 6-2> Immunoreactivity(arrow) with the VEGF antibody at 1 day in control group($\times 100$; bar = $100\mu\text{m}$).

<Fig. 7-1> Immunoreactivity(arrow) with the VEGF antibody at 2 days in group I($\times 100$; bar = $100\mu\text{m}$).

<Fig. 7-2> Immunoreactivity(arrow) with the VEGF antibody at 2 days in control group($\times 100$; bar = $100\mu\text{m}$).

<Fig. 8-1> Immunoreactivity(arrow) with the VEGF antibody at 3 days in group I($\times 100$; bar = $100\mu\text{m}$).

<Fig. 8-2> Immunoreactivity(arrow) with the VEGF antibody at 3 days in control group($\times 100$; bar = $100\mu\text{m}$).



<Fig. 9-1> Immunoreactivity(arrow) with the VEGF antibody at 7 days in group I($\times 100$; bar = $100\mu\text{m}$). V : blood vessel

<Fig. 9-2> Immunoreactivity(arrow) with the VEGF antibody at 7 days in control group($\times 100$; bar = $100\mu\text{m}$).

<Fig. 10-1> Immunoreactivity(arrow) with the VEGF antibody at 1 day in group II($\times 100$; bar = $100\mu\text{m}$).

<Fig. 10-2> Immunoreactivity(arrow) with the VEGF antibody at 2 days in group II($\times 100$; bar = $100\mu\text{m}$).

<Fig. 10-3> Immunoreactivity(arrow) with the VEGF antibody at 3 days in group II($\times 100$; bar = $100\mu\text{m}$).

<Fig. 10-4> Immunoreactivity(arrow) with the VEGF antibody at 7 days in group II($\times 100$; bar = $100\mu\text{m}$). V : blood vessel

