

Effects of the Low Power He-Ne IR Laser Treatment on the Liver Damage Induced with CCl₄ in Rats

Min-Hee Rho and Jai-Young Kim[†]

Department of Physical Therapy, *Department of Clinical Laboratory Science, College of Health Science, Catholic University of Pusan, Busan 609-757, Korea

This study was investigated the effects of the lower power He-Ne IR laser treatment on the changes of blood biochemical components in the rat liver damaged by the carbon tetrachloride (CCl₄). The twenty one Sprague-Dawley adult male rats weights (260±18.6 g) were designed to the three groups: one control group and two experimental groups, the experimental groups were divided into the CCl₄-treated groups and the laser therapy group (CCl₄ + Laser). The experimental groups were injected twice with CCl₄ (1.0 ml/kg body weight) intraperitoneal for two days. Each group was sacrificed after two weeks irradiated with the lower power He-Ne IR laser for ten minutes per every day. The activity of alanine aminotransferase (ALT), lactic dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (ALP) and the concentration of serum glucose treated with He-Ne IR laser groups was significantly decreased to the control (treated with carbon CCl₄) group. The activity of aspartate aminotransferase (AST) was decreased in the laser group but not significantly, the concentration of the serum cholesterol in the laser group was significantly increased comparing with the control and case control groups. In conclusion, the effect of the lower power He-Ne IR laser treatment is believed to be a possible protective effects for CCl₄ induced acute hepatotoxicity in rats.

Key Words: Carbon tetrachloride (CCl₄), He-Ne IR laser, Hepatotoxicity

서 론

레이저 사용은 Maiman (1960)이 694 nm 루비레이저를 처음 개발한 이래 Towines (1962)가 의학과 생물학 분야에서 레이저를 사용하였으며, 1970년에 이르러 레이저 효과에 관한 동물실험을 통한 연구가 시작되었고 (Rho & Yong, 2000; Karu 1984) 등은 레이저가 세포내 ATP 합성을, Lee와 Han (1989) 그리고 Pallikans (1993) 등은 토끼의 상처치유 효과에 대한 임상실험, Basford (1986) 등과 Revani (1992) 등은 돼지의 피부 상처에 대한 치료효과, Kotan (1992) 등과 Nussbaum (1994) 등은 레이저가 흰쥐의 상처치유에 효과가 있었다고 보고하였다.

사염화탄소 (carbon tetrachloride; CCl₄)는 간독성을 유발하는 산업장 유해물질의 일종으로 간장 독성작용 기전은 확실하게 규명되어 있지 않지만, 생체막 내의 무과립 내형질세망 (smo-

oth endoplasmic reticulum)의 복합 산화기구에 의하여 반응성 대사물질 reactive metabolites인 trichloromethyl free radical ($\cdot\text{CCl}_3$)로 대사되거나 혹은 $\cdot\text{CCl}_3$ 가 O₂와 반응하여 생성된 tri-chloromethyl-peroxy free radical (Cl₃COO \cdot)로 산화되어 세포막의 polyunsaturated fatty acid를 과산화시킴으로써 막의 구조와 기능이 파괴된다고 하였다 (Na et al., 1996). 일반적으로 생체 조직세포의 손상은 생체막 구성성분인 polyunsaturated fatty acid의 과산화가 하나의 요인으로 지적되고 있다 (Curtis et al., 1984; Heimberg, 1965; Recknagel & Glende, 1967).

Mester (1985) 등은 He-Ne 레이저를 인체에 조사하여 소염작용이 있다는 것을 보고하였고, 개방상처에 He-Ne Gas 레이저를 조사하여 혈청내 β -endolphine의 변화에 대한 연구 (Kana et al., 1981), 만성 괴사성 피부 변병에 저출력 레이저의 치료효과 (Lam et al., 1986; Recknagel, 1959), 신경재생 촉진효과 (Rochking et al., 1986; Rochkind et al., 1987)에 대한 연구가 보고되고 있다. Berr (2000) 등은 수술할 수 없는 담관 종양이나 간 종양 등을 저 에너지 레이저를 이용하는 광역학적 치료가 대부분 성공적으로 담도를 정상으로 회복시켰다고 보고하였다. 이처럼 레이저를 이용하여 혈관이나 담도, 간과 같은 선조직내 PDT치료는 고 출력 레이저 보다 저 출력 레이저를 이용하여 비정상 조직을 선택적으로 괴사 제거하는 치료방

*논문 접수: 2004년 7월 20일

수정재접수: 2004년 9월 17일

[†]Corresponding author: Jai-Young Kim, Department of Clinical Laboratory Science, Catholic University of Pusan, Busan, Korea 609-757
Tel: 051-510-0560, Fax: 051-510-0568
e-mail: jykim@cup.ac.kr

법들이 소개되고 있다 (Berr et al., 2000). 그러나 급성간염이나 간 독성에 대한 치료는 대부분 약물치료에 의존하고 있다. 따라서 본 저자들은 사염화탄소에 의한 급성 간 손상을 일으켜 상기 저 출력 레이저의 생물학적 및 광역학적 치료 효과 등을 고려하여 저 출력 레이저를 외부 피부에서 간 조직까지 미치는 파장으로 조사하여 손상된 조직 재생에 생화학적 성분 변화를 추정하여 레이저 치료의 효과를 알아보기 위해 본 실험을 시도하였다.

재료 및 방법

실험동물은 부산가톨릭대학교 실험동물 사육실에서 직접 계대한 평균체중이 260 ± 18.6 g 되는 Spraque-Dawley계 수컷 21마리를 각 군당 7마리씩 3군으로 체중이 비슷한 것끼리 배정하였다. 실험군은 대조군, 급성 간 손상군 (이하, 간 손상군이라 한다), 급성 간 손상군 + 레이저 치료군 (이하 레이저 치료군이라 한다)으로 구분하였다. 사육실 온도는 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도는 50~60%를 항상 유지시켰으며, 명암은 12시간 (08:00~20:00)주기로 조절하였고, 식이와 물은 자유 급식하였다.

급성 간 손상은 50% 사염화탄소 (올리브유과 동량혼합액)를 체중 kg 당 1.0 ml씩 1일 간격으로 2회 복강 내로 투여하여 유발시켰으며, 대조군은 동량의 oliva oil을 동일한 방법으로 투여하였다.

레이저 치료는 저 출력 He-Ne IR laser (LASOTRONIC MED. 100, LASOTRONIC A.G Switzerland)로 그 재원은 He-Ne laser 주파수는 632.8 nm, 출력은 20 mw, IR은 주파수를 830 nm, 출력은 20 mw \times 4이다. 상기 기기를 사용하여 급성 간 손상이 유발된 실험동물을 복와자세로 고정하고 매일 10분씩 2주간 조사하였다.

시료채취 및 분석은 레이저 치료가 끝난 즉시 16시간 절식시킨 후 ethyl ether로 전신 마취하여 심장에서 직접 혈액을 채혈하였다. 채혈된 혈액은 실온에서 30분간 방치한 다음 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리한 즉시 각 성분분석에 사용하였다. 혈액의 생화학적 성분분석은 혈액생화학 자동분석기 (OLYMPUS, A, U. 5200, Japan)를 사용하여 분석하였다.

본 연구에 실험결과 자료는 평균치와 표준편차로 나타내었고, 통계적 유의성 검증은 $P < 0.05$ 유의수준에서 t-test를 이용하여 상호 비교하였다.

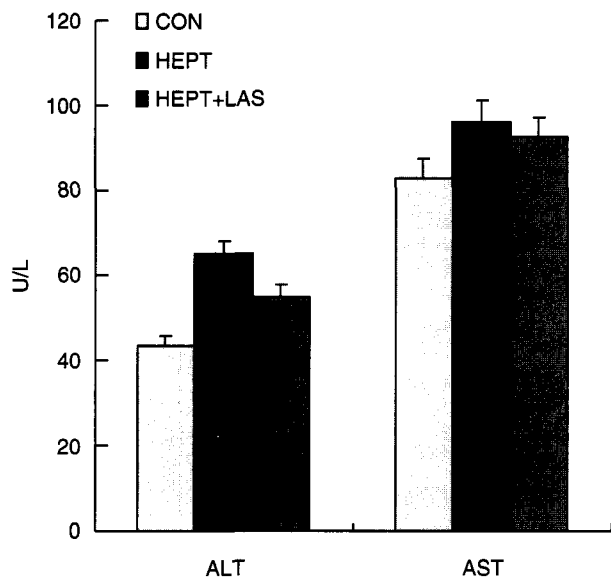


Fig. 1. The changes of the serum ALT, AST

결과

사염화탄소에 의한 급성 간 손상 쥐의 혈청내 생화학적 물질의 활성을 알아보기 위해 21마리의 SD 수컷을 대조군과 간 손상군 및 간 손상군에 He-Ne IR laser를 매일 10분씩 14일간 조사하여 간 손상 치유과정에서 변화되는 혈청내 생화학적 물질들의 농도 변화를 조사한 결과는 Table 1, 2와 Fig 1, 2, 3같다.

1. ALT 및 AST 활성변화

사염화탄소에 의한 급성 간 독성 손상을 일으킨 후 14일간 레이저 치료한 결과 alanine aminotransferase 활성변화는 대조군에 비해 간 손상군과 레이저 치료군이 각각 49.3%, 26.5%로 유의하게 증가하였으나 간 손상군에 비해 레이저 치료군에서는 15.3%로 유의하게 감소되었다. aspartate aminotransferase의 혈청내 활성 변화는 대조군에 비해 간 손상군

Table 1. The alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactic dehydrogenase (LDH) and alkaline phosphatase (ALP) activities in serum injured rats liver by the carbon tetrachloride (IU/L)

Groups	ALT	AST	LDH	ALP
con	43.47 ± 3.21 ^a	83.06 ± 2.48 ^a	270.00 ± 45.35 ^a	569.70 ± 10.05 ^a
Hept	64.91 ± 3.80 ^b	96.14 ± 3.42 ^b	616.05 ± 11.34 ^b	549.38 ± 8.37 ^a
Hept+ las	55.00 ± 1.56 ^c	92.76 ± 2.18 ^b	497.49 ± 9.80 ^c	421.06 ± 8.04 ^c

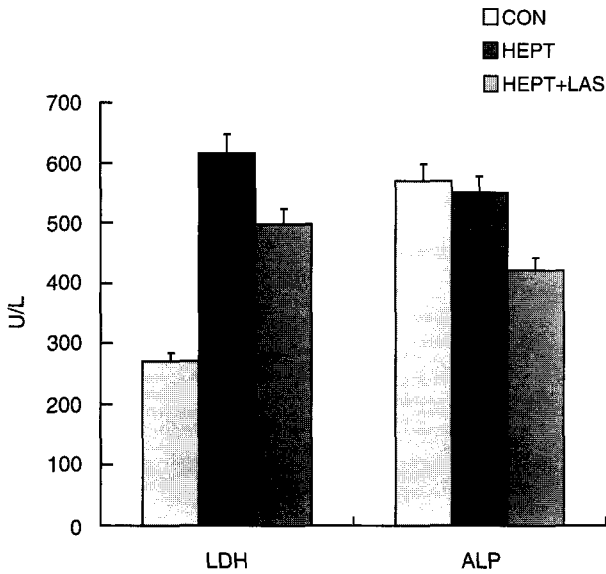


Fig. 2. The changes of the serum LDH, ALP

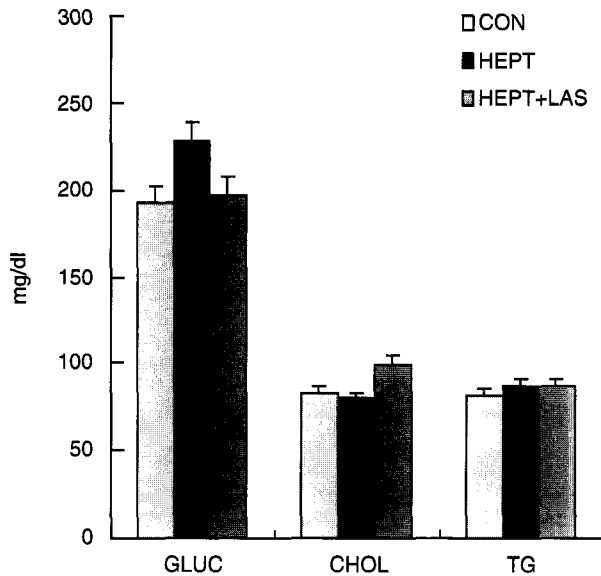


Fig. 3. The changes of the serum CHOL, TG, GLUCO

과 레이저 치료군에서 각각 15.7%, 11.7%로 유의하게 증가되었으며, 간 손상군에 비해 레이저 치료군은 약간 감소되었으나 유의성은 나타나지 않았다 (Table 1, Fig. 1).

2. LDH 및 ALP 활성 변화

Lactic dehydrogenase 혈청내 활성 변화는 대조군에 비해 간 손상군과 레이저 치료군에서 각각 128%, 84.2%로 유의하게 증가되었다. 그러나 간 손상군에 비해 레이저 치료군에는 19.3%로 유의하게 감소되었다. alkaline phosphatase의 혈청내 활성변화는 대조군에 비해 간 손상군에서는 유의적인

Table 2. The glucose, total cholesterol and triglyceride concentrations in serum injured rats liver by the carbon tetrachloride (mg/dl)

Groups	Glucose	Total cholesterol	Triglyceride
con	192.72±3.37 ^a	83.03±2.39 ^a	80.84±4.87 ^a
Hept	227.43±9.22 ^b	79.43±1.79 ^a	86.71±1.23 ^{ab}
Hept+ las	197.19±3.28 ^{ac}	99.66±2.34 ^b	87.17±1.46 ^b

All values are Mean±SD (n=7)

^{a,b,c} Values within a column with different superscripts are significantly different at $P<0.05$

Con; control group, Hept; injured liver by the carbon tetrachloride group

Hept + las; hept + treated He-Ne IR laser group

ALT; alanine aminotransferase, AST; Aspartate aminotransferase
LDH; lactate dehydrogenase, ALP; alkaline phosphatase

차이는 없었으나 간 손상군에 비해 레이저 치료군이 19.3%로 유의성 있는 낮은 활성치를 나타내었다 (Table 1, Fig. 2).

3. Cholesterol, triglyceride 및 glucose 농도의 변화

Cholesterol의 혈청내 농도 변화는 대조군에 비해 간 손상군은 감소되었으나 유의성은 없었고 레이저 치료군은 오히려 20.0%로 유의하게 증가되었고, 간 손상군에 비해 레이저 치료군이 25.4%로 유의하게 증가되었다.

Triglyceride의 혈청내 농도 변화는 정상 대조군에 비해 간 손상군이 증가되었으나 유의성은 없었고, 레이저 치료군은 7.8%로 유의하게 증가되었다, 그러나 간 손상군에 비해 레이저 치료군에서는 유의성 있는 변화가 없었다. Glucose의 혈청내 농도 변화는 정상 대조군에 비해 간 손상군이 18.0%로 유의하게 증가되었으나, 레이저 치료군은 거의 변화가 없었다. 간 손상군에 비해 레이저 치료군은 오히려 정상 대조군치와 비슷하게 13.3%로 유의성 있게 감소되었다 (Table 2, Fig. 3).

고 찰

간에는 중간대사의 효소들이 들어 있다. 간은 소화관 및 전신에서 보내온 영양소, 대사 중간물질의 처리, 저장, 수송, 해독작용 등의 기능을 갖고 있기 때문에 간염 등으로 간 기능이 저하되면 심한 식욕부진을 일으키게 된다. 또한 혈당, 담즙생성 및 분비, albumin, α , β -globulin, 응고인자 및 주요 지단백질 등을 공급하여 내적 환경을 유지한다. 그러나 간 질환이 생기면 이 혈청 성분들의 양이 저하된다. 특히 간은 탄수화물, 지방, 아미노산 대사에 매우 중요한 작용을 할뿐만 아니라, 혈액의 생화학적 성분을 조절하고 여러 가지 혈장단백질을 합성한다.

사염화탄소는 간 독성을 유발하는 산업장 유해물질의 일종

으로 간장 독성작용의 기전은 확실히 규명되어 있지 않으나 생체막 내의 무과립 내형질세망 (smooth endoplasmic reticulum)의 복합 산화기구에 의하여 반응대사물인 trichloromethyl free radical ($\cdot\text{CCl}_3$)로 대사되거나, 혹은 CCl_3 가 O_2 와 반응하여 생성된 trichloromethylperoxy free radical ($\text{Cl}_3\text{COO}\cdot$)로 산화되어 세포막이 polyunsaturated fatty acid를 과산화시킴으로써 막의 구조와 기능을 파괴한다고 보고되어 있다 (Na et al., 1996).

레이저는 Maiman (1960)이 루비레이저를 처음 소개한 이래 오늘날 의학 분야에서 여러 종류의 레이저가 개발되어 다양한 목적으로 사용되고 있다. 중 출력, 및 저 출력 레이저는 출력이 0.1 mw로 낮고 열 효과, 또는 조직파괴 작용이 없기 때문에 흔히 냉 레이저 (cold laser) 또는 연 레이저 (soft laser)라 부른다. He-Ne 레이저와 반도체 레이저가 대표적인 저 출력 레이저로 분류 된다. 특히 저 출력 레이저는 최근 물리치료 임상분야에서 널리 이용되어 주목받고 있으나 그 효과와 작용기전에 관한 연구는 많지 않다 (Rho & Yong, 2000).

Mester (1985) 등은 He-Ne 레이저를 인체에 조사하여 소염작용을 보고하였고, 개방상처 (Kana et al., 1981) 등, He-Ne Gas 레이저의 β -endorphin의 변화연구, 호흡생리의 변화와 관련된 cytochrome-oxidase의 활성 (Henrik & Dorthe, 1994), 만성 피사성 피부병변에 저 출력 레이저 치료 (Lam et al., 1986), 신경재생 촉진효과 (Rochkind et al., 1986; Rochkind et al., 1987) 등을 보고하고 있다. 또한 레이저는 생체 내에서 histamine, serotonin, acetylcholine 등의 분비를 조절하여 만성통증을 감소시키고, 미토콘드리아 내의 ATP 생성을 증가시키며, 세포 분열을 촉진하고, 세포막의 전위를 안정시킨다. 특히 세포막을 통한 물질의 투과성을 변화시켜 세포의 활동을 저상하고 평형을 유지하는 효과 등의 있다고 보고하였다 (Rochkind et al., 1989).

간조직 손상의 지표로 이용되고 있는 AST, ALT의 활성 (Wroblewski & La, 1956; Zimmerman, 1981)이 사염화탄소를 투여했을 때 상승된 것은 사염화탄소의 독성작용이 급성 간 손상 때문에 그 활성도가 혈청 중에서 증가한다는 Na (1996) 등의 보고와 본 연구 결과와 일치하였다. 저 출력 레이저 치료군이 급성 간염 대조군 보다 AST, ALT의 활성도가 정상 대조군에 가깝게 접근된 것은 간 손상 치유과정에 레이저 치료의 생물학적 효과가 있다고 사료된다.

LDH 활성도가 대조군에 비해 사염화탄소 투여군에서 증가된 것은 사염화탄소에 의한 간 조직의 손상으로 인한 결과로 사료됨은 Lee (1998) 등이 간 경변과 만성간염 등의 진단지표로 증가된다는 내용과 일치된다. 특히 레이저 치료군에서 감소는 사염화탄소에 의한 간 손상 치유과정에 레이저 치유효과를 암시하고 있다. ALP는 신체 각 조직에 존재하며 주로 유기산 monophosphate ester를 가수분해하는 효소이다. 막을 통한 인산수송에 관여하고, 골질환이나 간이나 담도 질

환 등에서 혈중에 증가하며, 특히 ALP는 γ -GTP, LAP와 더불어 폐쇄성 황달이나 간내 담즙울체의 지표로 사용하며, 간내 점거성, 침윤성 병변을 시사하는 효소로 간담도 질환의 지표가 된다 (Lee et al., 1998). 본 실험의 연구결과 레이저 치료군에서 유의한 감소 등 기준치 이하의 실험결과는 만성 신염, 괴혈병 등에서 저하된다는 Lee (1998) 등의 진단지표로 생각되나, 본 실험은 단기간에 급성간염을 일으켜 레이저 치료효과를 측정할 결과이기 때문에, 단순히 신장염과 괴혈병 등 부작용으로 단정하기는 곤란하다 그러나 앞으로 이런 문제 등을 지속적으로 원인을 규명하는 연구가 필요하다고 생각된다.

Cholesterol의 혈청 중 감소는 간 경변이나 급성 간염이나 폐쇄성 황달 등에서 진단 지표로 이용된다. 본 연구 결과 사염화탄소 투여군에서 cholesterol 농도의 감소는 간독성으로 인한 결과로 사료되며, 레이저 치료군에서 유의성 있는 증가는 간독성 회복의 증후라고 사료된다. 사염화탄소 투여군에서 T, G 농도 증가는 lipoprotein lipase 결핍 시 증가된다고 하였으며 (Lee et al., 1998), 특히 폐쇄성 황달이나 지방간, 고지혈증 등에서 증가된다고 하였다. 본 실험에서 약간씩 증가는 사염화탄소의 독성에 의한 간 손상으로 인해 나타난 2차적인 기능장애로 생각되며, 또한 간 지질 대사장애로 혈중상승된 것이라 생각된다.

혈중 glucoses는 급성 독성 간염으로 인한 간 조직 손상으로 간내 당원질 형성 장애로 인한 혈중에 고농도로 나타난 것으로 생각되고, 레이저 치료군에서 정상대조군에 비슷한 결과는 간독성의 치유 과정에 레이저의 효과가 있는 것으로 사료된다.

이상의 실험결과에서 사염화탄소 투여로 혈청 중 각종 간염지표 효소의 활성도 감소와 지질농도의 증가는 사염화탄소가 간 중의 효소계 및 간세포의 microsome을 심하게 손상시켰음을 알 수 있으며, 레이저 치료로 인해 간세포의 피사와 효소의 유출을 저해하고 간의 저항력 및 간 기능을 유지함으로써 간 보호 작용을 할 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Basford JR, Hallman PM, Sheffield CG, Mackey GL. Comparison of cold-quartz ultraviolet, low-energy laser, and occlusion in wound healing in a swine model. Arch Phys Med Rehabi. 1986. 67: 151-154.
- Berr F, Wiedmann M, Tannapfel A. Photodynamic Therapy for Advanced Bile Duct Cancer: Evidence for Improved Palliation and Extended Survival. Hepatology. 2000. 31: 291-298.
- Calvert DN, Brody TM. Role of sympathetic nervous system in CCL₄ hepatotoxicity. Am J Physiol. 1960. 198: 669-675.

- Curtis MT, Gilfor D, Farber JL. Lipid peroxidation increased the molecular order of microsomal membranes. *Arch Biochem Biophys.* 1984. 235: 644-650.
- Doull J. Carbon tetrachloride, Casarett and Doull's Toxicology. 1984. pp 472-479. 2nd Ed. Macmillan Publishing Co. NY, USA.
- Heimberg M. Lipoprotein & lipid transport by livers from normal and CCl₄-poisoning animals. *Am J Physiol.* 1965. 209: 1053-1059.
- Henrik Loevschall, DDS, Dorthe Arenholt-Bindslev. Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro. *Laser Surg Med.* 1994. 14: 347-354.
- 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.
- Karu TI, Kalendo GS, Lobdo VV. Kinetics of tumor HeLa cells growth under subcutivation after irradiation by low intensity red light at the stationary growth phase. *Exp Oncol.* 1984. 61: 60-63.
- Kim KS, Lee MY. Effects of selengenis methanol extract on ethanol induced hepatotoxicity in rat liver. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 1996. 26(4): 581-587.
- Kotani HS, Kasai, Sawa M. Effects of low power laser stimulation on delayed wound healing in rats. 3rd world congress international society for low power laserapplication in medicine. Bologna Italy. 1992. 92: 9-12.
- Lam TS, Abergel RP, Meeker CA. Laser stimulation of collagen synthesis in human skin fibroblast cultures. *Laser Life Sci.* 1986. 1: 66-77.
- Lee DM, Han YK. Studies on wound healing effects of human plasma ultraviolet and lowenergy GaAlAs laser. *J Kor Acad Rehab Med.* 1989. 13: 110-115.
- Lee KN, Noon HR, Lee YH. Lab. test dictionary: Clinical pathology selection and interpretation. 1988. pp 28-235. Korea Medical Book Publisher Co. Seoul.
- Matsubara T, Mori S, Touchi A. Carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats, evidence for different susceptibilities of rat liver lobes. *Jpn J Pharmacol.* 1983. 33: 435-441.
- Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Laser Surg Med.* 1985. 5: 31-39.
- Na HS, Kim KS, Lee MY. Effect of jujube methanol extract on hepatotoxicity in CCl₄-treated rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 1996. 25(5): 839-845.
- Nussbaum EL, Biemann I, Mustard B. Comparison of ultrasound/ultraviolet-C and laser for treatment of pressure ulcers in patients with spinal cord injury. *Phys Thera.* 1994. 74: 812-825.
- Pallikaris IG, Tslimbaris MK, Liaki OE, Panagopoulos IS. Effectiveness of corneal neovascularization photothrombosis using photothalocyanin and a diode laser (675 nm). *Laser Surg Med.* 1993. 13: 197-203.
- Recknagel RO, Glende EA. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol Rev.* 1967. 19: 145-152.
- Recknagel RO. Biochemical changes in carbon tetrachloride fatty liver, Separation of fatty changes from mitochondrial degeneration. *J Biol Chem.* 1959. 234: 1052-1058.
- Revani M, Nissaan M, Hopewell JW. Prevention of X-ray-induced late dermalnecrosis in the pig by treatment with multi-wavelength light. *Laser Surg Med.* 1992. 12: 288-293.
- Rho MN, Yong JH. Effects of the low power wavelengths of helium-neon infrared laser on the change of the serum immunoglobulin concentration in bun rats. *J Korea Soc Physical Therapy.* 2000. 12(3): 287-292.
- Rochkind S, Nissan M, Razon N. Electro physiological effect of He-Ne laser on normal and injured sciatic nerve in the rat. *Acta Neuro Chir.* 1986. 83: 125-130.
- Rochkind S, Barnea L, Razon N. Stimulatory effect of He-Ne low dose laser on injured sciatic nerves of rats. *Neurosurgery.* 1987. 20: 843-847.
- Rochkind S, Rousso M, Villarel M. Systemic effect of low-power laser irradiation on the peripheral and central nervous system cutaneous wounds and burns. *Laser Surg Med.* 1989. 92: 174-182.
- Tappel AL. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed Proc.* 1973. 32: 1870-1878.
- Wroblewski F, La Due JS. Serum glutamicpyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease. *Proc Exp Biol Med.* 1956. 91: 569-575.
- Yeo JY, Lee YJ, Han JP. Effect of pine pollen proteins on rat liver injury induced CCl₄. *J Korean Soc Food Nutr.* 1996. 25(1): 34-38.
- Zimmerman HJ. Chemical hepatic injury and its detection. In "Toxicology of the liver" Plaa GI and Hewitt WR (eds). Raven Press. 1981. 22: 1-5.