

Histologic Evaluation of Collagen Generation in Mouse Subcutaneous Tissue Using 880 nm & 630 nm LED

Jin-Chul Ahn^{1,2,†}, Phil-Sang Chung^{1,2}, So-Young Chang¹, Heejun Hwang¹,
Jang-In Shin¹ and Chung-Ku Rhee^{1,2}

¹Medical Laser and Device Research Center, ²Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery,
Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

We compared the clinical efficacy of LED therapy using 880 nm and 630 nm LED to test collagen accumulations in subcutaneous tissue of mouse after LED irradiation by measuring the quantity of collagen. 880 nm and 630 nm LED was irradiated on the back of ICR mouse given at 10.8 J/cm² followed for 30 minutes everyday for 5 weeks. Histological observation was performed by Hematoxylin & Eosin staining and Masson's Trichrome collagen staining. We also used Sircol soluble collagen assay kit for measuring the amounts of collagen in the mouse skin tissue after 1, 3, and 5 weeks post LED irradiation, respectively. Collagen generation was found at subcutaneous tissue, and the quantity of collagen in 880 nm LED group had grown more than that of 630 nm LED group at 5 weeks follow-up later. About 75% more efficacies for collagen generation were found in the group of 5th week of 880 nm LED irradiation. The efficacy of 880 nm LED could be more useful than 630 nm LED for synthesizing collagens in mouse subcutaneous tissue as time followed.

Key Words: Phototherapy, LED (880 nm & 630 nm), Collagen

서 론

LED (light emitting diode)는 반도체의 p-n 접합에 순방향 전류를 흘리면 빛을 내는 소자로서 1962년 최초 개발되어 오늘날까지 여러 분야에 사용이 되며 현재 사용되는 전구와 형광등을 대체할 광원으로 많은 연구가 이루어지고 있다. LED의 의학적, 광생물학적 이용은 1990년대 미국항공우주국에서 우주정거장이나 우주선 내에서 승무원에게 식량을 공급하기 위한 식물재배에 필요한 광합성의 광원으로 사용하기 위하여 연구되어 왔으며, 이 광선은 세포에 흡수되어 조직회복을 촉진시킨다는 것을 발견하였다 (Whelan et al., 2003). Macrophage와 Fibroblasts들은 LED에 의해 활성이 되며, 콜리젠과 엘라스틴을 생성하고, Cytokines을 배출해 혈관 확장에 관여하는 bradykinin과 혈관 수축을 일으키는 serotonin을 조직 내에서 생성한다. LED는 마우스의 fibroblast와 osteoblast, skeletal

muscle cells의 성장을 약 140~200% 증가시키며, 인간의 상피세포에서는 약 155~171%의 세포 성장 촉진을 일으키는 것으로 보고하였다 (Whelan et al., 2001). 또한 세포의 분자 수준의 단계에 대한 연구 역시 활발히 이루어지고 있는데, 최근의 한 연구에서는 조직의 성장에 필요한 여러 가지 요소들의 mRNA 수준에서의 실험을 실시하여 이에 따라 발생하는 조직학적 소견들을 근거로 LED가 조직 재형성에 관여한다는 사실을 증명하였다 (Lee et al., 2007). 현재 임상에서 조직 재생성과 골세포의 형성 촉진에 근본 요소로 쓰이고 있는 콜리젠은 고등 동물 세포 물질을 이루며 조직의 구성물로서의 역할을 하고 있으며, 엘라스틴과 더불어 혈관을 지닌 조직 내에 골교류 분포하며 주로 피부의 긴장 상태를 유지시켜 주기에 의학적 응용가치가 매우 큰 요소들이다 (Pugliese et al., 2003).

높은 영역대의 파장이 조직에 대한 투과력이 더 강하다는 연구들에 기초하여 본 연구에서는 880 nm와 630 nm 파장을 지닌 LED를 각각 사용하여 파장에 대한 일정 에너지를 마우스 스킨에 조사한 이후 일어나는 콜리젠의 증가와 분포 위치를 조직, 세포 수준에서 관찰하였고, 조직 분쇄 후 정량 기법을 통하여 두 LED 파장에 의한 콜리젠의 증가를 서로 비교 확인하였다.

*논문 접수: 2008년 7월 28일

수정재접수: 2008년 9월 17일

†교신저자: 안진철, (우) 330-714 충남 천안시 안서동 산 29번지, 단국대학교 의학레이저 의료기기 연구센터 (의과대학 329호)

Tel: 041-550-1786, e-mail: jcahn@dankook.ac.kr

재료 및 방법

1. 실험동물

4주령의 건강한 ICR mouse 마취시킨 후 제모 크림으로 척추후방의 털을 제거하고, LED 조사를 위한 일정 부위를 표시한 후, 880 nm와 630 nm LED를 조사하였다.

2. 880 nm, 630 nm LED

880 nm LED (Photron Co., PI-3A521)와 630 nm LED (Ujin LED Co., ULP-H5R1101 A) 판넬을 제작하여 가로 160 mm × 세로 113 mm로, 총 150 (가로 10 × 세로 15)개의 LED를 장착하였다. 두 광원 모두 6.0 mW/cm²의 출력으로 매일 30분씩 10.8 J/cm²를 조사하였다. 5주 연속 조사를 실시하였으며 처음 조사 이후 1, 3, 5 주일 후 조직학적 관찰과 콜라겐 정량을 위한 조직을 채취하였다.

3. Histology & Collagen assay

1) Histology

실험동물의 LED 조사에 의한 조직학적 변화를 살펴보기 위하여 1, 3, 5주 LED 조사를 실시한 후 절개하여 만들어진 paraffin block sample을 조직 절단기 (Leica, HI-1210, GER)를 사용하여 두께 5 µm의 section slides를 제작하였다. 제작된 샘플의 파라핀을 제거하고 bouin 용액에 1시간 담근 뒤에 weigert hematoxyline 용액, biebrich scarlet acid fuchsin 용액, aniline blue 용액을 이용하여 콜리젠, 세포질, 케라틴, 섬유조직 등과 핵을 염색하는 Masson's Trichrome collagen staining (MT stain) 염색을 실시하여 각각의 LED 조사에 따른 조직학적 변화를 비교하였다.

2) Collagen assay

실험동물의 LED 조사에 의한 변화양상을 정량적으로 분석하기 위해서 1, 3, 5주 LED 조사를 실시한 후 절개한 조직의 무게를 미량저울 (OHAUS, EPG214, USA)로

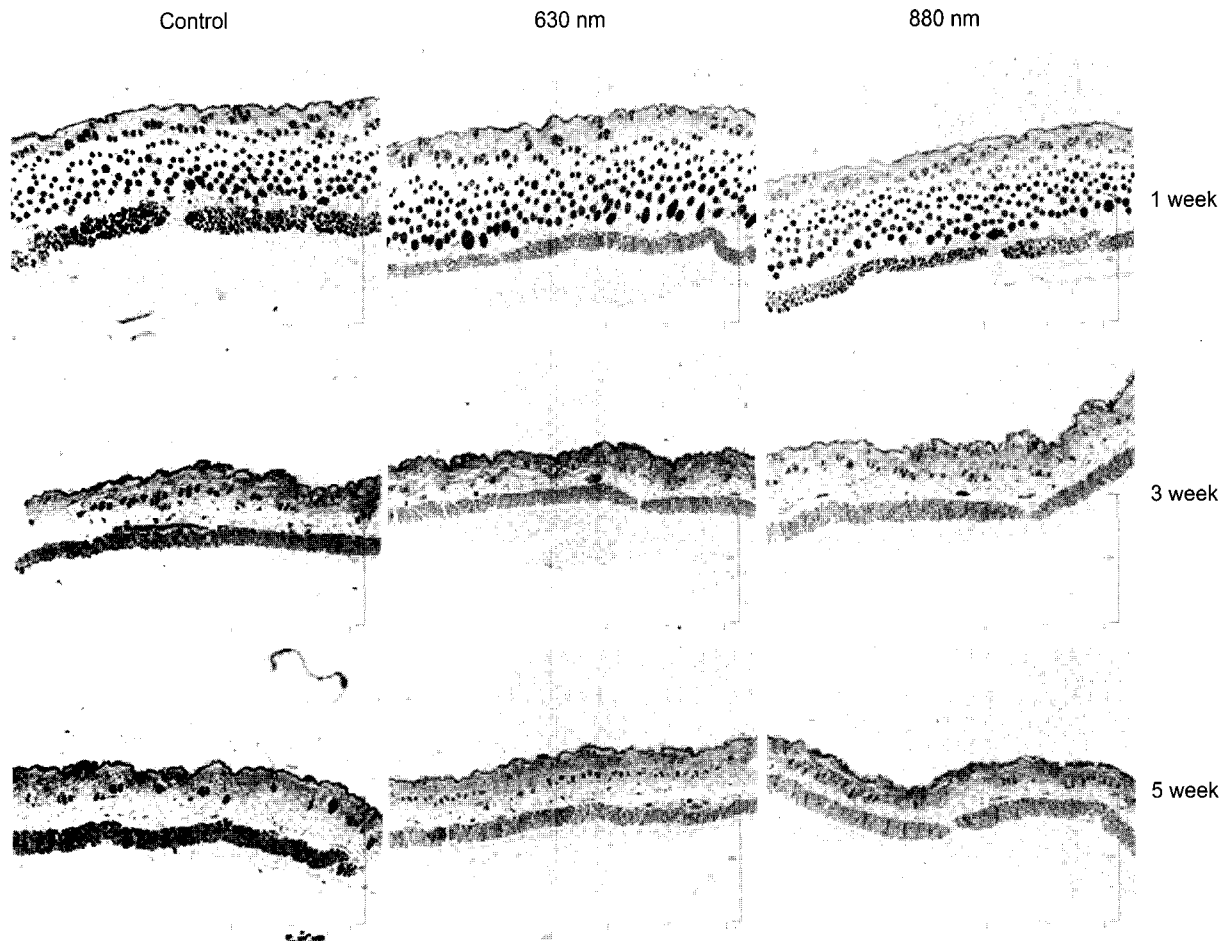


Fig. 1. Collagen accumulation in subcutaneous tissue of mouse after 630 nm and 880 nm LED irradiation (10.8 J/cm²). Collagen is stained blue, and accumulated at subcutaneous region evenly. Scale bar = 1 mm (Masson's Trichrome collagen staining).

정확한 무게를 측정하였다. 측정된 조직의 10배 양의 0.5 M acetic acid 용액을 넣고 0~5℃에서 16~18시간 동안 교반한 다음 15,000 g에서 60분 동안 원심분리하여 상층액을 취한 후 collagen standard 용액과 샘플들의 부피가 총 100 µl가 되게 준비하였다. 준비한 collagen standard와 샘플 tube에 1 ml의 sircol dye reagent를 첨가한 후 30분 동안 믹스한 다음 10,000 g에서 10분 동안 원심분리 후 상층액을 제거하였다. 남겨진 collagen-dye complex pellet에 1 ml의 alkali reagent를 첨가하여 5~10분 동안 고루 섞고 콜리젠과 결합되어 있는 dye를 녹인 후에 540 nm에서 흡광도를 측정하여 콜리젠을 정량하는 Biocolor사의 Sircol™ soluble collagen assay kit을 이용하여 각 조직 내의 collagen의 양을 비교하였다.

결 과

880 nm와 630 nm LED를 조사한 실험군과 대조군 모두 콜리젠은 마우스의 표피 부위에 주로 집중 분포를 하고 있으며 진피 부위 역시 산발적인 고른 분포를 나타내었다. LED 조사 후 1주부터 2주 간격으로 관찰한 조직 결과, 마우스 피하조직에서의 콜리젠의 분포양상은 바뀌지 않았다 (Fig. 1). 880 nm LED 조사 후 기간 별 관찰 결과, 3주와 5주차 조직에서 점점 증가하는 콜리젠 염색 강도를 관찰하였고, 주로 표피 부위의 콜리젠에서 더욱 강한 분포를 확인하였다. 630 nm LED 조사 실험군에서는 3주차 조직에서 짙은 콜리젠 염색 정도를 나타내었고 5주차 관찰 후 역시 3주차 콜리젠의 발현과 비슷한 분포를 보였다. 880 nm LED 조사군의 5주차 콜리젠의 양은 630 nm 조사군의 콜리젠 양보다 더 짙은 염색 강도를 보였다 (Fig. 1).

LED 조사 이후 조직을 적출하여 콜리젠 정량을 실시한 결과, 880 nm LED 조사 실험군에서는 조사 1주 후 대조군과 차이가 없었으며, 5주차 샘플에서 0.79 mg/ml의 정량을 나타내어 대조군에 비해 약 75%의 콜리젠 증가를 나타내었다. 630 nm LED 조사 실험군에서는 3주와 5주차에서 0.38 mg/ml과 0.51 mg/ml의 일정한 콜리젠 증가를 보였으며 5주차에서는 대조군에 비해 약 13%가 증가한 것으로 확인하였다. 880 nm LED 조사군의 콜리젠 양은 3주에서 5주차에 유의성있게 증가하였다 (Fig. 2).

630 nm와 880 nm LED 조사 이후 5주차 샘플에서 콜리젠 축적 위치에 대한 비교 염색 실험 결과, 두 실험군 모두 대조군에 비해 강한 콜리젠 염색 정도를 보여 활

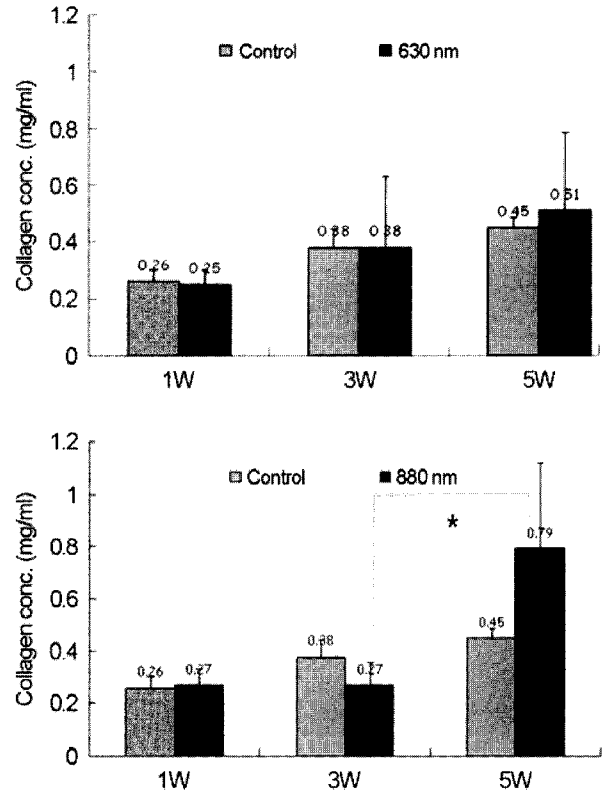


Fig. 2. Quantitative analysis of collagen in subcutaneous tissue of mouse after 630 nm and 880 nm LED irradiation (10.8 J/cm²). Collagen synthesis was increasing as time followed. At 5 weeks, the amount of collagen in 880nm group was significantly higher than that of 630 nm group ($P < 0.05$).

발한 콜리젠 생성을 피하에서 일으키는 것을 관찰하였으며, 880 nm LED 조사군에서 조금 더 기저부 (basal membrane)에 근접한 깊은 콜리젠 생성을 보였다 (Fig. 3).

고 찰

레이저와 LED, 형광 램프 등의 광에너지 (photo energy) 이용한 광치료 (Light therapy)는 임상에서의 실용 가능성에 대해 많은 보고와 연구가 이루어지고 있다 (Satoshi et al., 2007; Lee et al., 2007). 차세대 광원의 하나로 여겨지는 LED는 광원을 만들기 위한 장치가 작고 얇으며 가볍다는 장점을 가지며, 또한 전력소모가 적고 수명이 길며 열손실이 거의 없으며 공해가 전혀 없어 임상에서의 응용에 있어 그 효율성이 매우 크다고 할 수 있다. 1960년대 말 저출력 레이저 (low level laser)의 상처치료 효과에 대하여 보고된 이후 (Mester et al., 1971) 빛을 광원으로 이용하여 의학적 치료용으로 사용하고자 하는 노력들이 많이 이루어졌으며 그 중 LED는 과학의 발전과 더불어 가장 최근의 산물로써 이에 대한 연구와 임상적 시도

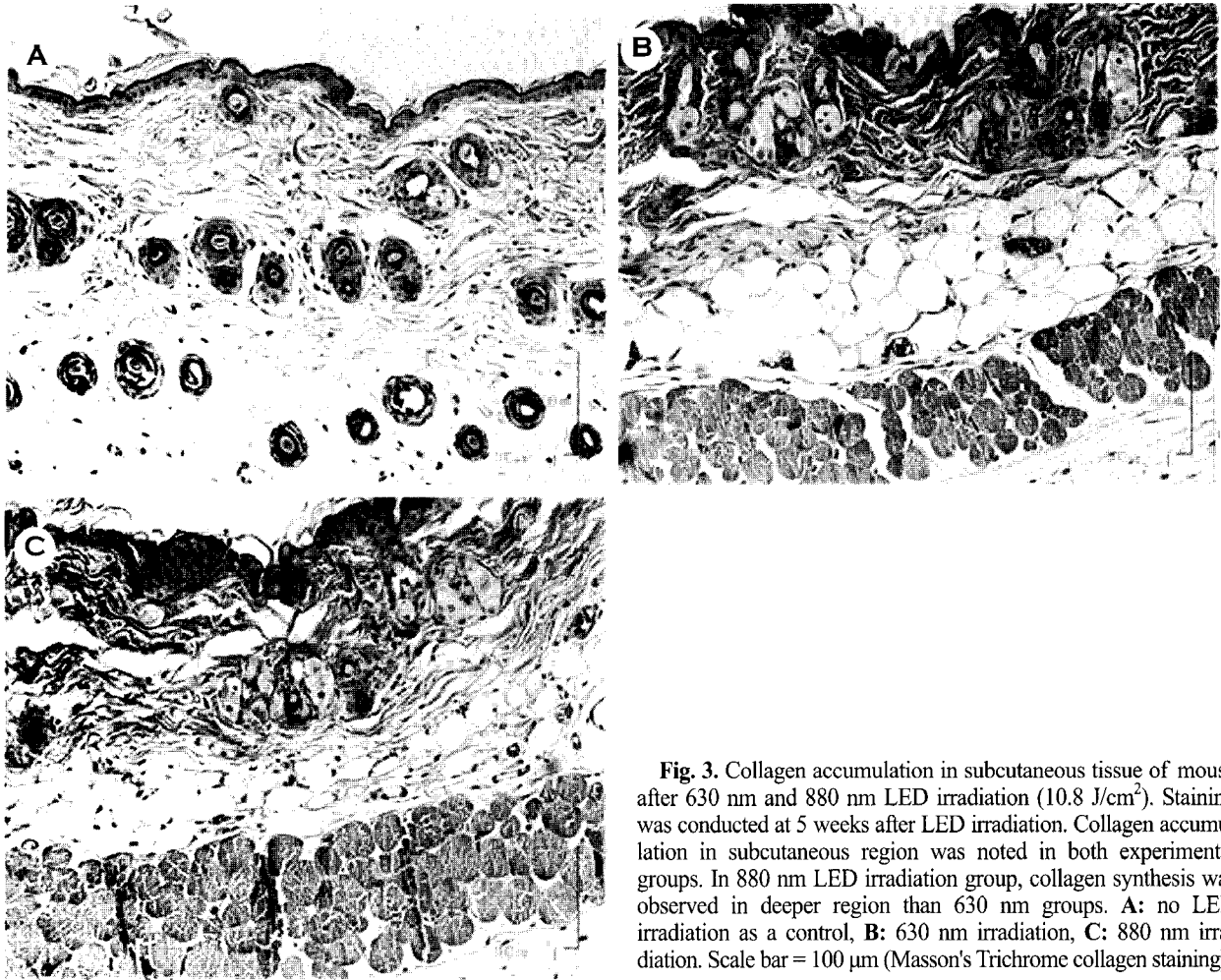


Fig. 3. Collagen accumulation in subcutaneous tissue of mouse after 630 nm and 880 nm LED irradiation (10.8 J/cm^2). Staining was conducted at 5 weeks after LED irradiation. Collagen accumulation in subcutaneous region was noted in both experimental groups. In 880 nm LED irradiation group, collagen synthesis was observed in deeper region than 630 nm groups. **A:** no LED irradiation as a control, **B:** 630 nm irradiation, **C:** 880 nm irradiation. Scale bar = $100 \mu\text{m}$ (Masson's Trichrome collagen staining).

가 다양하게 연구되어 학계에 발표되고 있다 (Paul et al., 2007). 열을 발생하지 않고 어떠한 다른 손상 없이 피부의 표면을 투과하여 광 에너지만을 신체 내부로 전달한다는 점에서 사용 목적은 같지만, 저출력 레이저의 경우 광 에너지를 사용하기 위한 기계적 장치의 부피가 상대적으로 LED와 비교해 크고 무거우며 전력 소모가 많은 점이 있다. 이러한 단점을 보완하는 기능을 갖는 LED는 다양한 영역의 파장을 조정하기가 쉽고, 이에 따라 보다 간편하고 안정적인 임상 응용에 쓰일 수 있는 장점을 갖는다.

포유류의 결합조직 구성성분으로써 근간을 이루고 있는 콜리젠은 긴 섬유성 단백질로써 공업용과 임상용 등의 분야에 널리 쓰이고 있다. 인체를 비롯한 동물의 피부에서는 강도와 신장력을 담당하고 있으며, 콜리젠의 결핍과 파괴는 피부의 노화를 수반하는 주름살을 생성하게 된다. 피부조직 내에서 콜리젠의 합성과 특정 부위에 대한 축적은 일반적으로 조직의 재생성을 의미하며, 콜리젠 합성의 촉진에 대한 다양한 연구가 이루어지고 있

다 (Pinheiro et al., 2005). 피부의 조직 재생성에 관여하는 콜리젠은 본 실험의 결과에서 진피 부위에 널리 분포하고 있으며 주로 표피 이하에 집중되어 있는 것을 확인하였다 (Fig. 1).

Elke et al은 (Elke et al., 2003) LED와 저출력 레이저에 의한 콜리젠 합성의 촉진에 대하여 연구 발표하였는데 이 둘 사이에는 유의한 차이가 없었으며, 단지 저출력 레이저 보다는 LED쪽이 파장의 변화를 쉽게 바꿀 수 있다는 것과 이로 인해 인체 피부의 응용 범위가 더 넓을 수 있다는 것을 제시하였다. 하지만 아직 LED에 의한 치료 기전과 콜리젠 합성 촉진의 기전이 확실히 밝혀지지 않아 이에 대한 연구가 더 필요하다고 기술하고 있다. 이후 최근에는 LED가 콜리젠의 모체인 fibroblast의 생성을 자극해 콜리젠의 합성을 촉진한다는 연구 보고가 있어 *in vitro* 실험에서의 분자생물학적 증명이 이루어지고 있다 (Huang et al., 2007).

본 실험 역시 이들 제시의 일환으로 880 nm와 630 nm LED의 파장을 사용하여 콜리젠의 생성의 차이를 조직학

적, 정량적으로 분석하여 대조군에 비해 LED 조사 실험군에서 모두 콜리젠의 증가를 관찰하였다 (Fig. 1, 2). 파장별로 비교한 실험에서는 630 nm 조사 실험군보다 880 nm 조사 실험군에게서 콜리젠의 유의성있는 증가가 이루어졌으며, 630과 880 nm 조사군 모두 LED 조사 이후 3주에서 5주 동안 피하조직에서 콜리젠의 분포가 증가하는 것으로 나타났다. 하지만 630 nm LED의 경우 조사 이후 3주차에서 콜리젠의 정량이 880 nm의 것보다 높았지만, 5주 실험 후에는 880 nm 조사 실험군의 증가율이 630 nm 조사군보다 더 높은 것을 확인하였다. 이는 좀 더 높은 영역의 파장인 880 nm가 피하조직 내의 침투율이 630 nm 보다 더 좋아 상대적으로 LED를 많이 조사 받는 조직에서 더 고르게 콜리젠이 생성되는 것으로 여겨진다 (Fig. 3). 또한 LED가 갖는 장점 중에 하나인 기계 장치의 편의성을 이용하여, 임상에서 사용시 부작용이 없는 범위 내에서 각각의 LED 파장을 동시에 조사하는 것 등의 응용 범위를 넓힐 수 있을 것으로 생각된다. Russell et al은 (Russell et al., 2005) 실제로 633 nm와 830 nm LED를 병용하여 피부의 재생성을 높일 수 있다는 보고를 하였으며, Goldberg et al은 (Goldberg et al., 2006) 이 둘 LED의 파장이 photoaging skin을 치료하는데 도움이 된다고 발표하였다. 즉 LED는 여러 가지 파장을 동시에 사용하는 것이 가능하며 또한 그 효율을 더 올릴 수 있다는 장점을 갖게 되며, 최근 연구가 활발한 Photodynamic therapy (광역학 치료, PDT)과의 연계 사용이 효율적이라는 보고 (Meic et al., 1999)와 함께 다양한 범위에서의 응용이 가능하리라 생각된다.

감사의 글

본 연구는 단국대학교 의학레이저 의료기기 연구 센터의 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

- Elke MV, Barbara JC, Maria JC, Heidi AD, Dirk CC. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers Med Sci*. 2003. 18: 95-99.
- Goldberg DJ, Amin S, Russell BA, Phelps R, Kellett N, Reilly LA. Combined 633-nm and 830-nm led treatment of photoaging skin. *J Drugs Dermatol*. 2006. 5: 748-753.
- Lee SY, Park KH, Choi JW, Kwon JK, Doo Rak Lee, Mi Sun Shin, Jee Sung Lee, You CE, Park MY. A prospective, randomized, placebo-controlled, double-blinded, and split-face clinical study on LED phototherapy for skin rejuvenation: Clinical, profilometric, histologic, ultrasutrcutural, and biochemical evaluations and comparison of three different treatment settings. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2007. 88: 51-67.
- Lee SY, You CE, Park MY. Blue and red light combination LED phototherapy for acne vulgaris in patients with skin phototype IV. *Lasers Surg Med*. 2007. 39: 180-188.
- Meic H Schmidt, Reichert KW, Ozker K, Meyer GA, Donohoe DL, Bajic DM, Whelan NT, Whelan HT. Preclinical evaluation of benzoporphyrin derivative combined with a light emitting diode array for photodynamic therapy of brain tumors. *Pediatr Neurosurg*. 1999. 30: 225-231.
- Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. Effect of lasers rays on wound healing. *Am J Surg*. 1971. 122: 532-535.
- Paul HD, Andrea JW, Erin EM, Edwin MT, Ybe M, Martine JR, Edward H, John T, Hani I, Diane BB, Raymond WL. A controlled trial of the litebook light emitting diode (LED) light therapy device for treatment of seasonal affective disorder (SAD). *BMC Psychiatry* 2007. 38: 1471-1478.
- Pei-Jane Huang, Huang YC, Su MF, Yang TY, Huang JR, Jiang CP. In vitro observations on the influence of copper peptide aids for the LED photoirradiation of fibroblast collagen synthesis. *Photomed Laser Surg*. 2007. 25: 183-190.
- Pinheiro AL, Pozza DH, Oliveira MG, Weissmann R, Ramalho LM. Polarized light (400~2,000 nm) and non-ablative laser (685 nm): a description of the wound healing process using immunohistochemical analysis. *Photomed Laser Surg*. 2005. 23: 485-492.
- Pugliese LS, Medrado AP, Reis SR, Andrade Zde A. The influence of low level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui Odontol Bras*. 2003. 17: 307-313.
- Russell BA, Kellett N, Reilly LR. A study to determine the efficacy of combination LED light therapy (633 nm and 830 nm) in facial skin rejuvenation. *J Cosmet Laser Ther*. 2005. 7: 196-200.
- Satoshi Hagiwara, Hideo Iwasaka, Kentaro Okuda, Takayuki Noguchi. GaAlAs (830 nm) low level laser enhances peripheral endogenous opioid analgesia in rats. *Lasers Surg Med*. 2007. 39: 797-802.
- Whelan HT, Buchmann EV, Dhokalia A, Kane MP, Whelan NT, Wong-Riley MT, Eells JT, Gould LJ, Hammamieh R, Das R, Jett M. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on molecular changes for wound healing in diabetic mice. *J Clin*

Laser Med Surg. 2003. 21: 67-74.
Whelan HT, Smits RL Jr, Buchman EV, Whelan NT, Turner SG,
Margolis DA, Cevenini V, Stinson H, Ignatius R, Martin T,
Cwiklinski J, Philippi AF, Graf WR, Hodgson B, Gould L,

Kane M, Chen G, Caviness J. Effect of NASA light-emitting
diode irradiation on wound healing. J Clin Laser Med Surg.
2001. 19: 305-314.