

피부 섬유아세포에서 광자극의 효과

김 미 나[†] · 광 택 종 · 강 내 규 · 이 상 화 · 박 선 규 · 이 천 구

(주)LG생활건강 기술연구원

(2015년 12월 1일 접수, 2015년 12월 22일 수정, 2015년 12월 23일 채택)

The Effect of Photomodulation in Human Dermal Fibroblasts

Mi Na Kim[†], Taek Jong Kwak, Nae Gyu Kang, Sang Hwa Lee, Sun Gyoo Park, and Cheon Koo Lee

R&D Center, LG Household & Healthcare Ltd., 175 Gajeong-ro, Yuseong-gu, Daejeon 305-343, Korea

(Received December 1, 2015; Revised December 22, 2015; Accepted December 23, 2015)

요약: 피부는 낮 동안 태양빛과 인공 빛에 끊임없이 노출되어 있으며, 그중 5%는 UV 영역, 50%는 가시광선, 나머지 45%는 적외선 영역으로 구성되어 있다. 이중 자외선의 피부에 대한 영향은 많은 연구가 되어 왔으나, 나머지 영역에 대한 연구는 미진한 실정이다. 이에, 가시광선에서 적외선 사이의 파장이 피부 섬유아세포에 어떤 영향을 미치는지 연구하고자 하였다. 광처리에 의한 효과는 광파장, 처리 시간, 광세기, 광조합 등 다양한 파라미터들의 조합에 의해 그 효능이 결정되므로, 본 연구에서는 섬유아세포의 성장 및 콜라겐 합성과 관련된 기능을 촉진시킬 수 있는 광처리 조건을 찾아내고자 하였다. 가시광선과 적외선 영역 사이의 6개의 파장을 처리한 결과, 레드(630 nm)와 그린(520 nm) 파장에 의해 섬유아세포의 증식이 증가함을 확인하였다. 광처리 시간은 콜라겐 합성량 증가를 위해서는 10 min의 광처리가 30 min의 광처리 보다 적합한 조건이었다. 광세기는 0.05 ~ 0.75 mW/cm²에서 6개의 광세기로 분할하여 실험한 결과, 레드 0.3 mW/cm²와 그린파장 0.15, 0.3 mW/cm² 세기가 type I collagen의 mRNA의 양을 증가시킬 수 있었다. 마지막으로 두 개 파장을 순차적으로 조합 처리하였을 때의 효과를 확인한 결과, 레드와 그린파장의 조합 조건은 섬유아세포의 수적증가를 목적으로 할 때 효율적인 방법이며, 콜라겐 합성에는 레드 단독처리가 보다 효과적인 방법이었다. 따라서 본 연구에서 제시하는 광처리 조건을 이용시 피부 세포의 성장이나 콜라겐 합성에 긍정적 영향을 유도할 수 있으며, 재생 및 피부 미용 등에 활용할 수 있는 가능성이 클 것으로 기대된다.

Abstract: Skin is exposed to sunlight or artificial indoor light on a daily. The reached solar light on the earth surface consist of 50% visible light and 45% infrared (IR) except for ultra violet (UV). The negative effects of UV including UVB and UVA have been steadily investigated within the last decades. However, little is known about the effects of visible or IR light. In this study, we irradiated human dermal fibroblasts using light emitting diode (LED) to investigate the optimal parameter for enhancing cell growth and collagen synthesis. We found that red of 630 nm and green of 520 nm enhance the cell proliferation, but irradiation with purple and blue light exerts toxic effects. To examine the response of irradiation time and light intensity on the fibroblasts, cells were exposed to red or green light with intensities from 0.05 to 0.75 mW/cm². Procollagen secretion was increased of 1.4 fold by 10 min irradiation, while 30 min treatment decreased the collagen synthesis of dermal fibroblasts. Treatment with red of 0.3 mW/cm² and green of 0.15 and 0.3 mW/cm² resulted in enhancement of collagen mRNA. Lastly, we investigated the combinatorial effect of red and green light on dermal fibroblasts. The sequential irradiation of red and green light is an efficient way for the purpose

[†] 주 저자 (e-mail: mnkim@lgcare.com)
call: 042)860-8086

of the increase in the number of fibroblasts than single light treatment. On the other hand, the exposure of red light alone was more effective method for enhancing of collagen secretion. Our study showed that specific light parameters accelerated cell proliferation, gene expression and collagen secretion on human dermal fibroblasts. In conclusion, we demonstrate that light exposure with specific parameter has beneficial effects on the function of dermal fibroblasts, and suggests the possibility of its cosmetically and clinical application.

Keywords: light therapy, dermal fibroblast, collagen, cell growth

1. 서 론

피부는 다양한 광, 물리, 화학적 환경에 노출되어 있으며 자극에 따라 성장률, 세포외기질의 구성, 성장 인자들의 활성 변화가 유발되고, 항상성이 유지되지 못하는 현상이 반복되게 되면 손상을 입거나 노화 과정이 진행된다[1,2]. 여러 환경 중, 특히 피부는 태양광에 항상 노출되어 있으며, 그중 UV 영역은 광노화 현상과 밀접하게 관련이 있다. 태양광에서의 UV 영역에 의해 피부 표피줄기세포의 사멸이 유도되거나 멜라노사이트의 노화로 색소침착이 유도되기도 하며, 진피층의 섬유아세포의 주름이나 탄력과 관련된 인자들을 변화시키는 등 주로 부정적 영향에 대해 알려져 있었다[3,4]. 그러나 특정 질환들에 한해 1890년대 Niels Finsen에 의해 UV대역을 이용한 피부 질환 살균 및 치료요법이 시작되었고, 1980년대 들어 치료를 위한 상업적 UVB램프가 소개되면서 다양한 피부질환에 광원을 활용하기 시작했다[5]. 2000년대 들어 광치료요법에 대한 관심이 커지면서, UV를 이용한 치료에서의 부작용 가능성과 효능의 다양성 추구를 이유로 UV 외 다양한 파장대에 대한 연구가 진행되고 있다. 주로 IR 영역의 파장대를 이용하여 레이저, 형광등, 아크램프 등 다양한 광원으로 손상된 피부를 치료하거나 조직의 재생을 돕는데에 활용되고 있다. 최근 고출력 레이저와 달리 저출력의 광원인 light emitting diode (LED)를 이용하여 조직의 손상 없이 질환치료 및 노화된 피부의 재생을 유도하고자 하는 목적으로 다양한 파장대의 LED를 이용한 방법이 대두되고 있으나, 효과적인 활용을 위한 광처리 조건에 대한 연구가 부족한 실정이다. LED 광원은 파장의 bandwidth가 좁아 불필요한 광원의 방출이 적은 것이 특징으로 가시광선과 근적외선 영역의 LED를 이용한 치료를 사람에게 사용할 수 있도록 미국 FDA에서 허가하고 있다[6].

광에 의한 인체 생리학적 효과를 유도하기 위해서

는 파장뿐만 아니라 처리시간, output 광세기, 광의 조합 등 복잡한 파라미터들의 조합에 대한 고려가 필요하다. 그러나 여러 연구들에서 광의 세기를 피부에 직접 쬐여지는 에너지가 아닌 기구적 장치에 input되는 에너지로 혼용하여 사용하는 경우가 많다. 이로 인해 세포 수준에서의 연구 결과들이 상충되는 경우도 있으며, 같은 효과를 내더라도 에너지 단위가 10배 이상 차이 나는 경우의 결과들이 있다[7,8]. 또한, 광처리로 생물학적 활성 효능을 유도하기 위해서 빛은 표피와 진피를 뚫고 진피 내 세포까지 도달해야 하는데 이 과정에서 광은 주변 조직에 흡수되거나 반사되어 실제 진피세포에 도달하는 광세기는 줄어들게 되므로 광이 피부를 뚫고 실제 세포수준에 도달하게 되는 광세기에 대한 고려도 필요하다. 최근 들어 피부질환 치료에 이용되는 기술이 피부노화 개선 방안으로도 적용할 수 있고 있는 추세인 만큼, 피부세포 활성을 촉진시킬 수 있는 광 파라미터들의 조건을 찾아내는 연구는 매우 중요한 의미를 가지고 있다 할 수 있겠다. 피부 노화를 야기시키는 주요 원인 중에는 진피층에 존재하는 콜라겐의 양적 감소와 분해가 있으며, 이로 인해 진피층의 구조 파괴가 일어나고 탄력의 감소와 주름의 유발까지 이어진다[9]. 이에 본 연구에서는, 다양한 광파라미터들을 조절하여 피부 섬유아세포의 성장과 콜라겐 합성에 관련된 기능들을 조절할 수 있는지 확인하고 적합한 광조건을 찾고자 하였다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1. 광처리 장비

본 실험에 사용된 광처리 장비는 LED 소스부, 광세기와 시간을 조절할 수 있는 컨트롤패드와 독립적 광처리를 위한 프로텍터의 구성으로 주문 제작(Live cell instrument. Ltd, Korea)하였다(Figure 1A). 광파장은 narrowband LED를 이용하여 405 nm에서 830 nm 내에

서 6개의 과장을 처리할 수 있으며, diode는 96 well format으로 동일 간격으로 배치되어 있어 well format 뿐만 아니라 dish에 키운 세포에도 광처리 가능한 형태이다. 다른 과장으로부터의 간섭현상을 최소화하기 위해 well plate는 형광실험에 사용되는 black well을 사용하였고, 디쉬 사용 시에는 자체 제작한 검은색 차폐막을 사용하였다. 광을 이용한 연구에서 광과장과 더불어 광세기는 세포의 반응을 유도하거나 억제시키는 데에 중요한 요소이지만 기존연구에서는 input light intensity와 실측한 output light intensity를 혼용하여 사용하고 있는 경우가 있어왔다. 본 연구에서는 스펙트로포토미터(Stellarnet, USA)를 이용하여 output intensity를 측정하였다(Figure 1B). 광소스로부터 세포배양 바닥면까지의 거리를 2 cm 거리로 놓았을 때의 output light intensity가 0.05 ~ 0.75 mW/cm²인 범위를 이용하여 연구에 활용하였다. 광세기의 범위는 광이 피부부를 투과하는 정도를 측정한 논문을 참고하여, 상용화되고 있는 피부케어용 LED 기기의 광세기를 역으로 피부투과율로 계산하였을 때 진피세포에 닿게 되는 값을 계산하였다[10]. 이를 통해 광처리 실험을 위한 최소 intensity로 설정하고, 최대 intensity는 피부 상처치유에 대한 효과를 검증한 논문을 참고하여 0.05 ~ 0.75 mW/cm² 사이로 실험하였다[11].

2.2. 세포배양

본 실험에 사용된 사람 피부 유래 정상 섬유아세포(normal human dermal fibroblasts)는 ATCC (USA, PCS-201-010)에서 구입하였다. 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco-BRL, USA)에 우태아 혈청(fetal bovine serum) 10%와 penicillin/streptomycin solution 1%가 첨가된 배양액 조건에서 계대 배양하였다. 콜라겐 합성에 대한 컨트롤로 처리한 transforming growth factor-beta1 (TGF-β1, Peprotech Inc, USA)은 10 ng/mL의 농도로 광처리 미디어와 동일한 미디어를 이용하여 48 h 처리하였다.

2.3. 광처리

세포 배양용 플레이트에 섬유아세포를 분주하고 24 h 뒤, CO₂ 배양기에서 1, 30 min 간 광처리를 하였다. 이때 세포배양액이 가지는 붉은색으로 인한 광 간섭요인을 최소화하기 위하여 phenol red-free DMEM

(Gibco-BRL, USA)으로 미디어를 교체하였고, 혈청 없는 미디어 상태로 실험이 진행되었다. 광소스로부터 2 cm 떨어진 거리에 세포를 놓고 광처리 실험을 진행하고, 이후 48 h 동안 세포 내 반응이 일어나도록 배양시간을 부여한 뒤, 세포나 미디어를 모아 세포 증식률, 콜라겐합성량, 유전자양의 변화를 측정하기 위한 실험을 진행하였다.

2.4. 세포 성장률 측정

세포의 성장률은 cell counting kit-8 (CCK-8, Dojindo, Japan)을 이용하여 제공된 프로토콜에 따라 측정하였다. 96 black well에 키운 세포에 광처리를 하고, 48 h 동안의 배양이 끝난 후, 각 well 당 CCK-8 용액을 10 μL씩 첨가하고 37 °C, 5% CO₂가 공여되는 환경에서 3 h 동안 반응시켰다. ELISA reader (Epoch, Bio-tech Instruments Inc, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. Procollagen Type I 생합성 측정

섬유아세포 2.5 × 10³개를 96 black well plate에 well 마다 접종한 후 24 h 뒤 10, 30 min 간 광처리를 하고 48 h 뒤, 세포의 배양액을 모아 실험에 사용하였다. Procollagen type I C-peptide (PIP) EIA kit (Takara Bio, Japan)을 각 well에 첨가하여 3 h 반응시킨 뒤, 사용법에 따라 450 nm에서 흡광도를 측정하여 procollagen type I의 양을 측정하였다.

2.6. Real Time PCR

60 mm 배양용 플레이트에 5 × 10⁵개의 섬유아세포를 접종하여 24 h 키운 뒤, 10 min 간 광처리를 하였다. 48 h 동안 반응시간을 준 뒤, 모은 세포를 easy-BlueTM total RNA extraction kit (iNtRON Inc, Korea)를 이용하여 RNA를 분리 및 정량하고, 0.8 mg의 RNA를 ReverTra Ace qPCR RT master mix kit (Toyobo, Japan)를 이용하여 역전사(reverse transcription)하였다. 역전사 반응은 Mycycler[®] PCR (Biorad, USA)을 이용하여 수행하였다. 합성된 cDNA를 Taqman universal master mix (Applied biosystems, USA)와 특정 유전자 특이적인 프라이머를 이용하여 real-time PCR system (Applied biosystems, USA)으로 발현을 측정하였다. Real-time PCR에 사용된 프라이머

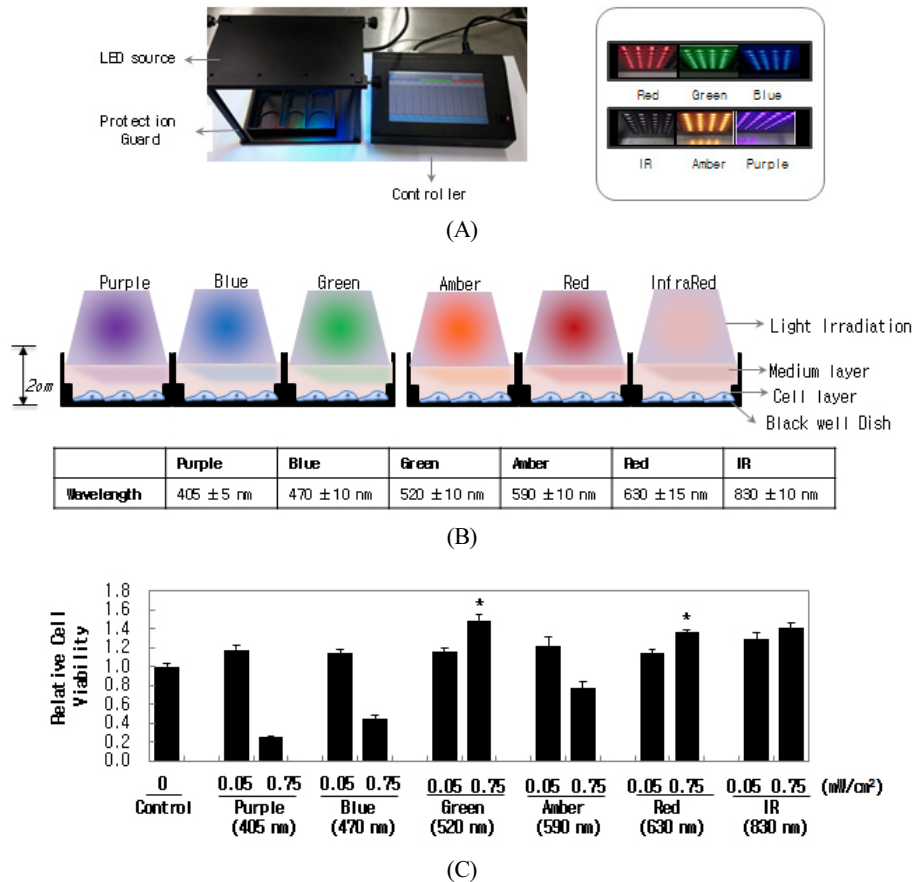


Figure 1. Light emitting diode (LED) irradiation device for *in vitro* experiment. (A) Light device including six different wavelengths. (B) Detection data of light output intensity and wavelength. (C) Schematic of cell experiment for light irradiation.

는 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), collagen type I alpha, elastin, matrix metalloproteinases 1 (MMP1)이다.

2.5. 통계적 분석

실험 결과는 3개의 같은 군의 평균값과 표준편차로 나타내었고, student's *t*-test법을 이용하여 *p*-value가 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 광처리 시스템 셋업 및 무독성 광파장 선정

가시광선과 적외선을 포함한 6개의 각기 다른 파장을 각 파장별로 독립적으로 처리할 수 있는 광처리 시스템을 Figure 1A, B와 같이 구축하였으며, 광처리 시

간동안 주변 빛으로부터의 영향을 최소화할 수 있도록 불투명아크릴을 이용하여 가림막을 사용하였다. LED를 세포에 10 min 간 처리한 후, 세포 증식률 측정을 통해 비독성 광파장을 선정하였다. Purple과 blue 파장은 세포 증식이 억제되고 세포 형태에 변형을 유도하였으며, green과 red light는 세포 증식을 촉진시킴을 확인하였으며, 그 외 파장은 유의미한 반응은 나타나지 않았다(Figure 1C).

3.2. 광처리 시간에 따른 섬유아세포에의 영향

광조사를 통해 세포 및 조직에 효과를 내기 위해서는 파장 뿐만 아니라 처리 시간 또한 중요한 요소이며, 과도한 처리시간은 오히려 세포 활성을 억제시킬 수 있다. 이에, 처리 시간을 10, 20, 30 min으로 달리하여 그린과 레드파장을 처리하였을 때 세포 증식률과 콜라겐 합성량의 변화를 측정하였다. 세포 증식률의

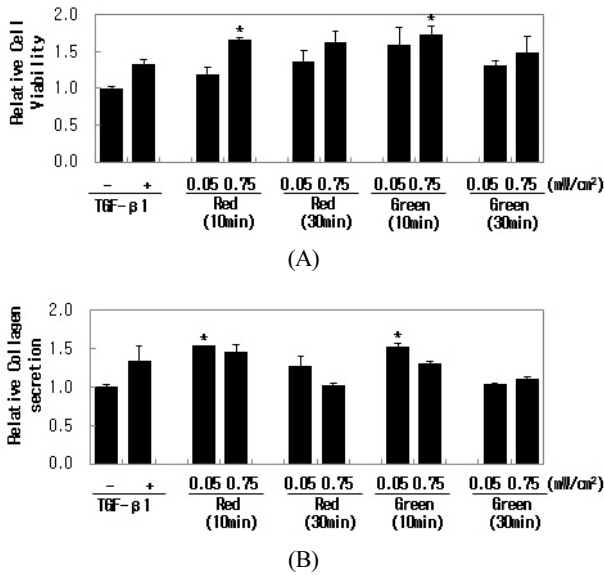


Figure 2. Irradiation for 10 min induced both the proliferation and collagen synthesis in human dermal fibroblasts. (A) Irradiation of 10 min with red and green light increased the cell proliferation. (B) Treatment for 30 min inhibited the collagen secretion.

경우, 처리 시간의 변화에 영향을 받지 않았다(Figure 2A). 반면, 콜라겐 합성량의 경우 20, 30 min 처리에 비해 10 min 처리의 경우 콜라겐 합성량이 높음을 확인할 수 있었다(Figure 2B). 20 min 처리의 경우 30 min 처리와 유사한 경향성을 나타내었다(data not shown). 이를 통해 섬유아세포의 증식과 콜라겐 합성을 촉진시키기 위해서는 10 min의 처리시간이 적합함을 확인하였다.

3.3. 광세기에 따른 세포 증식과 콜라겐 유전자의 변화

광과 세포간의 상호작용에 있어 중요한 요소 중 하나가 광의 세기로, 최근 여러 논문에서 input power intensity와 output light intensity를 혼용하여 사용하고 있다. 이에 피부섬유아세포의 활성화에 중요한 extracellular matrix (ECM) 관련 유전자에 긍정적 변화를 유도할 수 있는 output light intensity를 찾고자 하였다. 섬유아세포에 레드와 그린 파장을 0.05 ~ 0.75 mW/cm² 사이의 세기로 10 min 간 처리하였다. 먼저, 광세기에 따른 증식률을 확인하였으나 광세기의 변화는 섬유아세포 증식에 유의미한 영향을 주지 않았다(Figure 3A). 반면, 유전자 발현양의 변화를 관찰한 결과 0.3 mW/cm²의 레

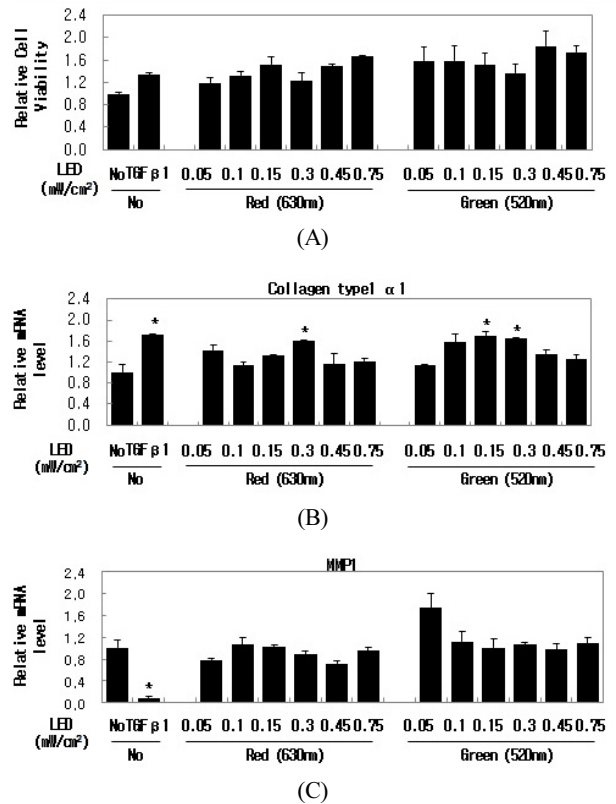


Figure 3. The specific output light intensity enhanced the expression of collagen type 1 alpha. (A) Effect of light intensity for cell growth. (B), (C) Effect of light intensity for ECM related genes expression (collagen type I, MMP1).

드파장과 0.15, 0.3 mW/cm²의 그린파장이 type I collagen의 유전자 발현양을 증가시킴이 확인되었고(Figure 3B), 그 외 MMP1에는 영향을 미치지 않았다(Figure 3C). 그 외 유전자로 elastin의 변화를 관찰하였으나 본 실험 조건 내에서 유의미한 변화는 관찰되지 않았다(data not shown). 이를 통해 피부섬유아세포의 활성화에 중요한 콜라겐 유전자 증가를 위해서는 레드와 그린 파장 모두 0.3 mW/cm²를 넘지 않는 광세기가 적합함을 알 수 있었다.

3.4. 순차적 광조합 처리가 세포증식과 콜라겐 합성에 미치는 영향

앞선 확인된 0.3 mW/cm²를 넘지 않는 광세기가 콜라겐 유전자 촉진에 적합한 조건이라는 사실을 바탕으로, 총광량을 0.3 mW/cm²로 고정시킨 뒤, 레드와 그린 두 개 파장의 조합 순서와 비율을 달리하여 세포

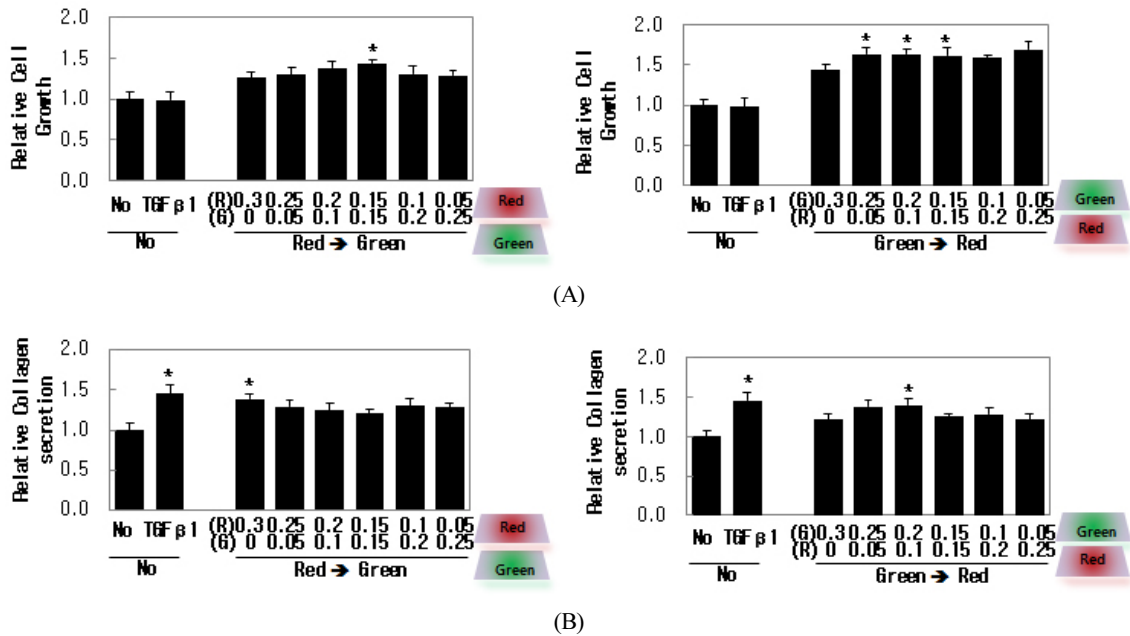


Figure 4. Sequential irradiation of red and green light enhanced cell growth and collagen secretion. (A) Irradiation condition for cell proliferation. (B) Irradiation condition for collagen secretion.

증식과 콜라겐 합성량을 측정하였다. 두 개 파장간의 interval time의 영향을 비교하였을 때, interval time이 6, 24 h과 같이 긴 경우 콜라겐 합성량이 오히려 감소하는 영향이 나타났다(data not shown). 이에, 두 파장을 연이어 처리하는 조건으로 순차적 광조합이 세포 성장과 콜라겐 합성량에 미치는 영향을 확인하였다. 세포성장에는 그린파장을 먼저 처리하는 것이 적합한 조건이며, 레드광을 먼저 처리하는 경우에는 두 개 파장을 동일 광세기 비율로 처리하는 것이 성장률을 증가시켰다(Figure 4A). 세포 성장률과 달리, 콜라겐 합성을 촉진시키기 위해서는 0.3 mW/cm² 레드파장 단독 처리가 적합한 조건인 것으로 나타났다(Figure 4B).

4. 결 론

본 연구에서는 피부섬유아세포의 활성화에 다양한 광처리 조건이 미치는 영향을 *in vitro* 실험을 통해 확인하였다. 가시광선에서 적외선까지 6가지 파장을 독립적으로 다양한 세기로 처리할 수 있도록 구축한 광처리 시스템을 이용하여 피부 섬유아세포의 증식과 콜라겐 합성과 관련된 변화를 관찰하였다. 결과, 레드와 그린의 광처리 시간과 세기에 따라 섬유아세포의 활

성과 관련된 증식과 콜라겐 합성에 긍정적 효과를 줄 수 있는 조건을 확보할 수 있었다. 또한 두 개 파장을 순차적으로 처리하면서 광세기 비율을 조절함에 따라 세포 성장을 집중적으로 촉진시킬 수 있었으며, 콜라겐합성을 위해서는 레드 파장을 단독으로 처리하는 것이 효과적이었다. 따라서 본 연구에서 확인된 레드와 그린 파장을 이용한 특정 광 처리 조건은 향후 피부 섬유아세포의 성장과 콜라겐 합성을 촉진을 통한 피부 노화 개선 및 재생 유도 등에 이용이 가능할 것으로 기대된다.

Reference

1. V. W. Wong, S. Akaishi, M. T. Longaker, and G. C. Gurtner, Pushing back: wound mechanotransduction in repair and regeneration, *J. Invest. Dermatol.*, **131**(11), 2186 (2011).
2. M. Chiquet, L. Gelman, R. Lutz, and S. Maier, From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1793**(5), 911 (2009).
3. J. Varani, L. Schuger, M. K. Dame, C. Leonard, S.

- E. Fligiel, S. Kang, G. J. Fisher, and J. J. Voorhees, Reduced fibroblast interaction with intact collagen as a mechanism for depressed collagen synthesis in photodamaged skin, *J. Invest. Dermatol.*, **122**(6), 1471 (2004).
4. B. A. Gilchrest, Photoaging, *J. Invest. Dermatol.*, **133**, E2 (2013).
 5. H. Hönigsmann, Phototherapy, *J. Invest. Dermatol.*, **133**, E18 (2013).
 6. P. Avci, A. Gupta, M. Sadasivam, D. Vecchio, Z. Pam, N. Pam, and M. R. Hamblin, Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring, *Semin. Cutan. Med. Surg.*, **32**(1), 41 (2013).
 7. Y. Zhang, S. Song, C. C. Fong, C. H. Tsang, Z. Yang, and M. Yang, cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light, *J. Invest. Dermatol.*, **120**(5), 849 (2003).
 8. T. Niu, Y. Tian, Q. Ren, L. Wei, X. Li, and Q. Cai, Red light interferes in UVA-induced photoaging of human skin fibroblast cells, *Photochem. Photobiol.*, **90**(6), 1349 (2014).
 9. G. J. Fisher, J. Varani, and J. J. Voorhees, Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications, *Arch. Dermatol.*, **144**(5), 666 (2008).
 10. J. R. Jagdeo, L. E. Adams, N. I. Brody, and D. M. Siegel, Transcranial red and near infrared light transmission in a cadaveric model, *PLoS One*, **7**(10), e47460 (2012).
 11. N. S. Sadick, A study to determine the efficacy of a novel handheld light-emitting diode device in the treatment of photoaged skin, *J. Cosmet. Dermatol.*, **7**(4), 263 (2008).