

# New Conversing Technology; Plasma Medicine

Chul-Ho Kim

Department of Otolaryngology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

## 새로운 융합학문 플라즈마 의학; Plasma Medicine

김 철 호

아주대학교 의과대학 이비인후과교실

### Address for correspondence

Chul-Ho Kim, MD  
Department of Otolaryngology,  
Ajou University School of Medicine,  
San 5 Woncheon-dong,  
Yeongtong-gu, Suwon 443-721,  
Korea  
Tel +82-31-219-5269  
Fax +82-31-219-5264  
E-mail ostium@ajou.ac.kr

Plasma is generated by ionizing of neutral gas molecules, resulting in a mixture of energy particles, including electrons and ions. Recent progress in the understanding of non-thermal atmospheric plasma has led to applications in biomedicine. Studies investigating the interaction of plasma jets with living cells have shown eradication of pathogens, blood coagulation, and the ablation of cultured cancer cells. The effects of cold atmospheric plasma are thus not due to heat, but to active species, mainly oxygen/hydroxyl radicals and nitric oxide, generated in the plasma or in the tissue brought into contact with the plasma. Plasma treatment offers the possibility of modifying tissues at the cellular level and removing diseased sections without inflammation and damage, as well as suppressing infections. Our study showed that non-thermal atmospheric plasma induced growth inhibition and cell death in cancer cells. This study supports the hypothesis that non-thermal atmospheric plasma constitutes a new biologic tool with the potential for therapeutic applications that modulate cell structure and function. Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2010;53:593-602

**Key Words** Non-thermal atmospheric plasma · Plasma medicine · Apoptosis · Cancer.

## 서 론

영국의 철학자인 프랜시스 베이컨(Francis Bacon)이 학문의 발전을 위해서는 지식의 세분화와 전문화가 필요함을 역설한 이후 지식은 지속적으로 세분화되어 왔고, 학문의 세분화·전문화는 경이적인 학문의 발전과 사회적인 진보를 이루어왔다.<sup>1)</sup> 하지만 학문의 지나친 세분화는 다양한 학문적 결합을 방해하고, 창의적이고 새로운 학문의 발전을 저해할 수 있다는 우려가 제기됨에 따라 최근 들어서는 학제간 또는 다학제 간 학문융합 및 기술융합의 필요성이 강조되고 있다.<sup>1)</sup>

‘융합기술’이란 용어는 미국에서 1963년에 ‘Technological Convergence’로 나타났고, 1995년 일본에선 ‘Technology Fusion’이라는 형태로 등장했다. 현재는 이종기술 간의 화학적 결합이라는 협의의 개념인 ‘Fusion Technology’보다는 신기술 간 또는 이들과 타 분야와의 상승적 결

합을 통해 새로운 창조적 가치를 창출함으로써 미래 경제와 사회·문화의 변화를 주도하는 기술이라는 의미의 ‘Conversing Technology’로 정의된다.<sup>2)</sup> 즉, 서로 다른 기술이 하나의 기술로 합쳐지는 것이 아니라, 기존의 지식을 토대로 한 신선한 시각과 상상력을 통해 새로운 가치를 창출하는 방법이다. 최근의 과학의 큰 흐름 중의 하나가 바로 이 융합학문이라는 것이다. 기존의 고유의 학문영역을 넘어 서로 다른 학문이 어떤 한 지향점에서 만나 상호보완하면서 한 영역에서는 도출할 수 없었던 새로운 영역을 도출해내는 학문을 융합학문이라 할 수 있다. 과학과 과학의 융합, 과학과 문화의 융합, 다양한 과학기술분야들의 융합은 최근 연구의 두드러진 트렌드라고 할 수 있고 수많은 시도가 일어나고 있고 이를 위해 세계 각국이 엄청난 투자를 하고 있는 것이 현실이다.<sup>2)</sup>

이러한 융합학문의 하나로 최근 ‘플라즈마 의학(plasma medicine)’이라는 신조어가 생겼다.<sup>3)</sup> 지난 2004년 영국의 과

학전문지 네이처는 차세대 가속기로 연구 중인 레이저-플라즈마 가속기를 소개하면서 ‘꿈의 광선(dream beam)’을 발생할 수 있다고 예견하였다. 여기서 언급한 레이저-플라즈마 가속기는 극초단 고출력 레이저를 플라즈마에 쏘아 전자를 가속시키는 방식으로 물리학, 화학, 생물학 등의 기초 과학분야에는 물론이고, 나노기술(nano technolage), 바이오기술(biotechnology), 의료, 신소재 개발 등 광범위한 응용분야에서도 활용할 수 있다고 보고하였다.<sup>4)</sup> 바이오와 관련해서는 이러한 플라즈마를 통해 몸속의 세포 또는 원자, 분자 등 매우 작은 물체를 관찰하고 이를 조절하고 변형시키는 데 사용되는 X-선을 발생시킬 수 있다고 하였다.<sup>4)</sup>

최근에 발표되는 플라즈마 관련연구는 향후 이비인후과 영역에서 암치료, 감염 및 염증과 관련된 치료, 다양한 부위의 조직 환원, 정상 조직의 재생 촉진, 지혈 등의 다양한 부위에서 실용화될 것으로 예측되어 본 지를 통해 플라즈마의 의학관련 연구를 소개하고자 한다.<sup>3)</sup>

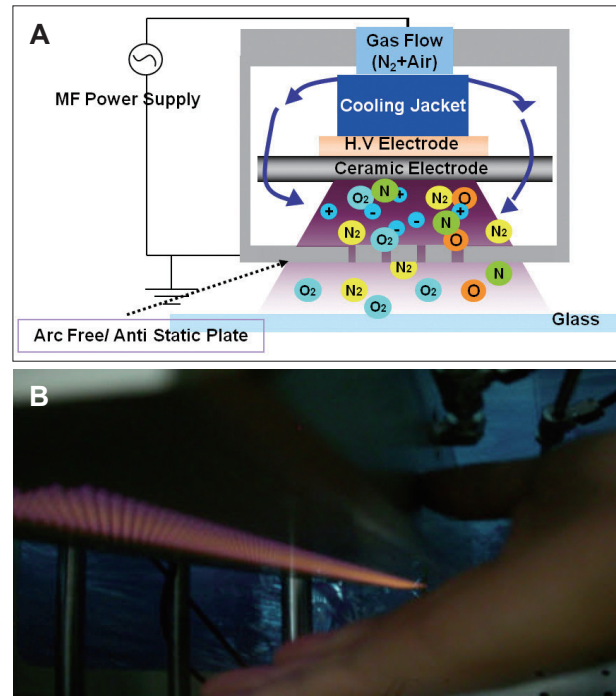
## 본 론

### 플라즈마의 정의

플라즈마란 용어는 그리스 언어로 ‘구조되어 만들어진 물건’이라는 뜻을 갖는데, 19세기경에 생물학이나 의학에서 먼저 통용되던 말이었다.<sup>3)</sup> 생물학에서는 단위형질이나 세포질을 플라즈마라 지칭하고 의학에서는 혈장이나 림프액을 지칭한다. 물리학에서는 1928년에 Langmuir와 Tonks<sup>5)</sup>가 전자와 이온이 분리된 상태로 균일하게 존재하는 물질을 플라즈마라고 지칭하였다.

고체 상태의 물질에 에너지를 가하면 액체 상태를 거쳐 기체 상태가 되는데, 이러한 기체 상태의 물질에 에너지를 더 가해주면 전자가 원자나 분자에서 떨어져 나와 전자와 양이온들이 독립적으로 존재하는 플라즈마 상태가 된다. 플라즈마는 전자와 양이온들이 독립적으로 존재하는 상태이지만 플라즈마 전체를 보면 전기적으로 중성상태를 유지하며 또한 플라즈마 전체가 집단적으로 행동하는 특성이 있다.<sup>3)</sup> 한편 플라즈마 내에는 양이온, 음이온, 전자 및 중성입자들이 동시에 존재하는 것이 일반적이다(Fig. 1).<sup>3)</sup>

우리가 흔히 이야기하는 고체, 액체, 기체의 세 가지 상태 다음으로 플라즈마를 제4의 물질상태로 이야기하고 있다.<sup>3)</sup> 플라즈마는 기체의 특별한 상태로 볼 수도 있으므로 네 가지의 물질 상태 중에서 질량이 가장 적을 것이라고 생각하기 쉬우나, 실상은 정 반대이다. 태양계 총 질량의 99% 이상을 차지하는 태양이 플라즈마로 구성되어 있을 뿐만 아니라, 우주 전체를 놓고 보면 우리에게 익숙한 기체, 액체, 고



**Fig. 1.** Schematic view of the plasma system. Plasma may permit a flux of various active uncharged species of atoms and molecules. These active uncharged species generated in plasma will typically include ozone ( $O_3$ ), NO, OH radicals, etc (A). Nonthermal atmospheric pressure plasma (B).

체 상태는 모두 합쳐도 0.01%도 되지 않는 셈이다. 플라즈마는 온갖 미래 첨단기술의 원천을 제공할 것으로 기대되고 있다. 대표적인 예가 미래의 에너지로서의 이용 가능성인데, 점점 고갈되어 가는 화석에너지를 대체할 가장 유력한 수단으로 떠오르는 핵융합 발전은 수소 원자핵 등으로 켜서 1억도 이상의 초고온 플라즈마를 만들면 성공할 수 있을 것으로 이야기되고 있다.<sup>4)</sup>

### 생활과 환경 속의 다양한 플라즈마

플라즈마는 직 간접적으로 우리 생활에 많이 이용되고 있다. 우리가 매일 받고 있는 햇빛이 플라즈마 상태인 태양으로부터 나온 가시광선이며 현대 산업의 쌀이라 불리는 반도체 가공의 많은 부분에 플라즈마가 이용되고 있다. 텔레비전에 널리 쓰이고 있는 플라즈마 표시 장치인 PDP 역시 플라즈마를 발생하여 그 곳에서 나오는 빛을 이용하고 있다. 형광등과 네온 사인은 플라즈마 상태에서 방출되는 가시광선을 이용하고 있으며 우리가 입고 있는 많은 옷들이 플라즈마를 이용한 표면처리를 거쳐 제작되고 있다. 우리가 살고 있는 건물은 플라즈마 절단, 용접, 표면 처리를 거쳐 지어졌으며 실내에서 이용하고 있는 공기 청정기나 살균기 등도 플라즈마를 이용한 제품이 많다. 우리 생활에서 사용되는 플라즈마는 상당부분 직류 방전을 이용해서

**Table 1.** Various plasma sources of atmospheric pressure plasma

Plasma type		Features	Use
Corona discharge		Weak ionization Difficult control	Air purification Ozon generation Surface processing
Dielectric barrier discharge (DBD)	Streamer discharge	Simple structure Non-uniform	Light (zenon, neon sign)
	Atmospheric pressure glow discharge (APGD)	Uniform plasma High efficiency Difficult control	
	Ferroelectric bed discharge (FBD)	Surface discharge	
	Capillary discharge	Complicated structure High efficiency Non-uniform	
Microhollow cathode discharge (MHCD)		Small plasma volume	
Atmospheric pressure plasma jet (APPJ)		3D plasma High efficiency High cost (RF, He)	

만들어져 있다. 물론, 라디오 주파수 방전이나 마이크로파 방전 등도 있지만 이들은 전원 공급 장치가 비싸고 발생 방식이 복잡하여 아직까지는 주변에서 쉽게 볼 수 없다. 직류 방전은 양극과 음극 두 판을 만들고 이 사이에 전압을 가해 주어 방전을 일으켜 플라스마를 발생하는 방식인데, 전류-전압 관계에 따라 암방전(어두운 방전), 글로우 방전(밝은 방전) 아크(arc) 방전으로 나누어진다(Table 1).

암방전은 전류의 양은 낮은 대신 전극의 전압은 아주 높은 것이 특징이며 대부분의 경우 발광 현상이 미약하다. 암방전 중에서 상대적으로 전류가 높은 영역을 코로나 방전이라 부르는데, 이 영역의 플라스마가 우리 주변 생활에 많이 이용된다. 이러한 예로는, 공기 정화기 내부의 집진 장치를 들 수 있는데, 공기가 코로나 방전 영역을 통과하면서 공기에 포함된 미세 입자들이 전하를 띄게 되고 이렇게 하전된 입자가 방전 판에 부착되어 공기를 정화하게 된다. 또한, 살균 장치의 오존 발생 장치의 경우 많은 경우가 코로나 방전을 이용, 산소를 분해하여 오존을 발생시키고 이러한 오존을 이용하여 살균을 한다. 이 외에도 산업적 재료 표면의 친수성, 접착성, 염색성 등의 향상을 위해서도 코로나 방전이 널리 이용되며 정전기 제거 장치 등에도 이용되고 있다.<sup>3)</sup>

글로우 방전은 빛을 내기 때문에 조명으로 많이 이용되고 있다. 형광등, 네온 싸인, 제논 램프 등이 이에 해당한다. 이러한 방전에서는 기체를 봉입한 유리관의 양끝에 전극이 삽입되어 있고 이들 전극간에 전압을 인가하면 방전이 일어난다. 아크 방전은 빛과 함께 많은 열을 내기 때문에 조명뿐 아니라 절단, 용접, 용융 등의 처리에도 이용될 수 있다.

자연적으로 존재하는 플라스마를 우리 주변에서 찾아보기는 어렵지만 사실 우주의 99.9% 이상이 플라스마 상태로 존재하고 있다. 지구 주변에서 찾아 볼 수 있는 플라스마 상태

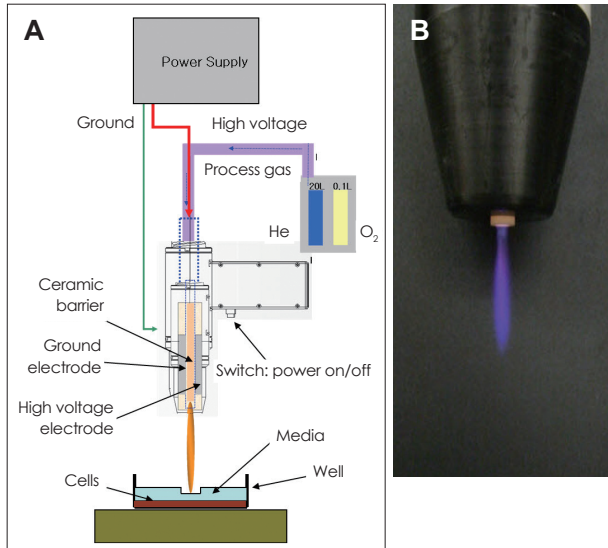
인 것은 번개, 오로라, 전리층, 밴앨런대 등을 들 수가 있다.

### 플라스마의 의학적 응용

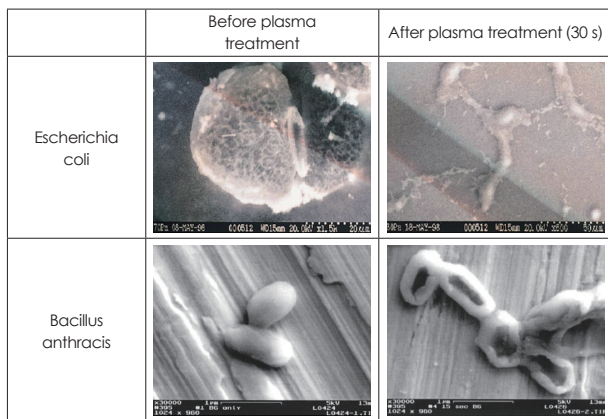
최근에 플라스마를 이용한 응용기술 중 가장 주목을 받고 있으며 가장 활발하게 연구되고 있는 부분은 소위 ‘플라즈마 의학’이라고 하는 의료관련 연구이다.<sup>3)</sup> 초기 의료용 플라스마 기술의 연구는 미국방성 소속의 연구소(Defense Advanced Research Project Agency)가 미 육군이 전염성 미생물을 살균하기 위해 사용하는 살균용 약품과 살균용 화학물질을 대체하기 위한 연구를 지원하면서 시작되었다.<sup>3)</sup> 이 플라스마 장치는 미 육군이 멀리 떨어진 해외 지역으로 병참용 보급품을 필수적으로 공급해야 하는데, 이때 방해가 되는 전염성 미생물을 살균하고, 마찬가지로 전쟁터에서 평화를 지키며, 작전을 안전하게 수행하는 장비로 사용하기 위해 개발되었다. 참여했던 연구원들이 찾아낸 이 저온 플라스마는 원인과 결과에 관계없이 살아있는 세포상에 기생하는 박테리아를 최단 시간 내에(탄저균에 의한 탄저병, 대장균, 연쇄구균과 포도상구균을 포함해서) 살균한다.<sup>6-8)</sup> Fig. 2는 PSM이라는 plasma 기기회사에서 제공받아 연구를 시행했던 저온 상압(nonthermal atmospheric pressure) 플라스마 기기의 모식도와 플라스마 발생 시를 보여주는 그림이다.<sup>9)</sup> 이 기기를 이용하여 대장균과 탄저균에 플라스마 처리를 한 경우 30초 이내에 대부분이 살균되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 효과는 이비인후과 영역의 다양한 감염성 질환에 이용할 수 있을 것이라는 예측이 이미 보고되었다(Fig. 3).<sup>3)</sup>

이러한 살균효과와 더불어 플라스마에 사용하는 gas의 종류에 따라 다른 플라스마의 효과를 기대할 수 있는데, 질소가스를 이용한 경우 상처치유를 촉진할 수 있다는 연구



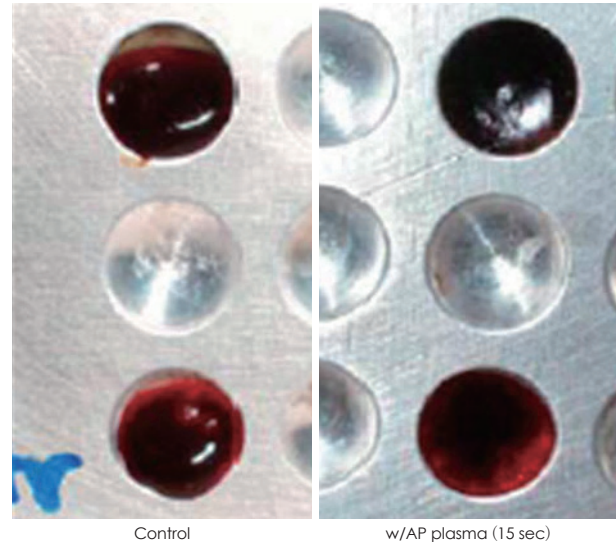


**Fig. 2.** Schematic view of the plasma torch (A) and photograph of plasma jet used in this study (B).<sup>9)</sup>



**Fig. 3.** Bacterial sterilization results of plasma. Plasma sterilization leads roughly to a 6-log reduction in bacterial load in 30 s of the treatment.

결과가 보고되었다.<sup>3)</sup> 질소가스가 상처치유를 촉진하고 살균 작용과 염증작용을 조절한다는 효과를 통해 다양한 임상환자에 실제 적용하고 있는 상황이다. 이러한 작용에는 질소가스에 의해 만들어지는 NO가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 질소가스에 의한 플라즈마가 형성되면서 NO가 O<sub>2</sub>-와 결합하여 peroxynitrite를 형성하여 직접적인 항균작용을 나타내고 대식세포(macrophage, neutrophil)의 기능을 강화하고, 병원균에 치명적인 산소유리기(free oxygen radicals)가 유도되는 것으로 보고되고 있다.<sup>3)</sup> 상처 치유 측면에서도 질소가스에서 형성되는 플라즈마가 상처부위의 미세혈액순환(microcirculation)을 촉진하고, 상처부위의 면역기능을 강화하고, 상처치유에 도움이 되는 각종 cytokine의 분비를 유도하고, 섬유아세포(fibroblast)와 각질세포(keratinocyte)의 증식과 콜라겐의 생성을 촉진하



**Fig. 4.** Blood coagulation of plasma. Blood drop treated by plasma: control (nontreated, left) and 15 s of plasma (right); photo was taken 1 min after the drops were placed on brushed stainless steel substrate; blood was treated immediately after it was placed on metal. Plasma was experimentally confirmed to significantly hasten blood coagulation *in vitro*. Visually, a drop of blood drawn from a healthy donor and left on a stainless steel surface coagulates on its own in about 15 min, while a similar drop treated for 15 s by plasma coagulates in under 1 min.

여 상처치유를 유도한다고 보고되었다.<sup>3)</sup>

또한 저온 상압 플라즈마는 지혈작용에 매우 유용한 것으로 다양한 검사에서 확인이 되었다. 지혈작용과 관련된 연구에서 보면 큰 상처 부위에서 출혈이 일어나면 멈추는데, 10~20분이 걸리는 데 반해 플라즈마에 노출시키면 단지 15초 만에 출혈이 멈추며, *in vivo* 실험에서는 피부의 상처에 대해서도 플라즈마가 신속한 상처치유에도 도움을 주는 것으로 나타났다.<sup>10-12)</sup> 이에 대한 본 연구진에도 동일한 실험을 진행하여 *in vitro*상에서 유사한 결과를 확인하였다(Fig. 4). 아직까지는 이러한 지혈작용에 대한 정확한 기전은 확인되지 않은 상태이나 플라즈마가 지혈작용에 영향을 주는 칼슘의 분비와 혈중 pH의 변화를 유도하고 지혈작용에 관여하는 혈액응고인자의 농도를 높이는 것으로 확인되었으며, 플라즈마가 혈소판의 활성화와 피브린(fibrin) 형성을 촉진시키는 것으로 나타났다.<sup>11)</sup> 이러한 작용은 항응고제가 포함된 혈액에서도 효과가 있는 것으로 나타났다.<sup>11)</sup>

아직은 좀 더 많은 연구와 인체에 적용하기 위한 다양한 선행연구가 필요하고 사용이 용이하도록 고안된 기기가 개발되어야겠지만 현재의 진행되는 연구내용과 속도로 볼 때 멀지 않는 장래에 사람의 외과적 수술 과정과 위장관 내 궤양 및 비강의 출혈을 멈추게 하는 데 사용할 날이 올 것으로 보인다.

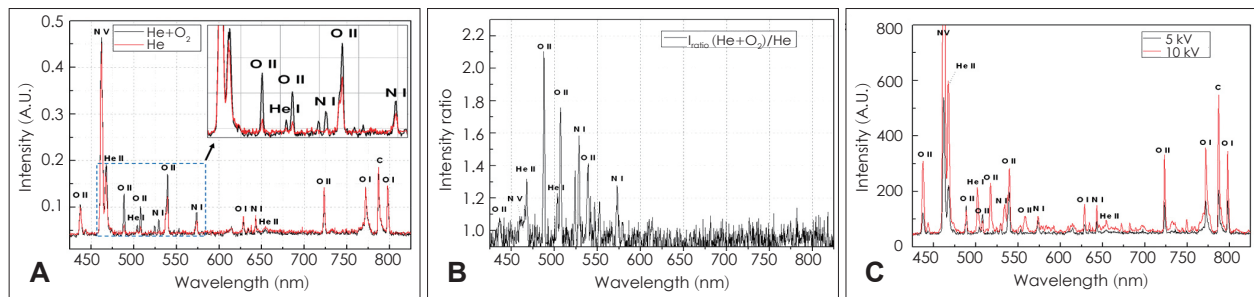
또 하나 플라즈마의 흥미로운 임상적용의 예로서 치과영

역과 피부과를 들 수 있는데, 치과의 경우 치아미백 치료에 많이 이용되어 왔다.<sup>13)</sup> 피부과의 경우 가장 활발하고 일찍 플라즈마의 임상적용을 시도하여 이미 개원가에게까지 다양한 플라즈마 기기가 사용되고 있는 상황이다. 주된 사용법 위는 플라즈마를 통해 피부의 주름과 색소질환을 치료하고자 하는 것이다. 주로 40~60대 중장년층의 노화로 인한 주름 및 검버섯, 잡티 등 난치성 색소질환 치료에 이용된다.<sup>3)</sup> 주름과 광선 각화증, 얼굴의 양성 피부 병변 치료 부분에 FDA 승인을 받아 활용되고 있다. 플라즈마 기체를 기계적인 방법으로 피부 속 진피 조직에 전달해 새로운 피부가 재생되도록 만드는 방식이다.<sup>3)</sup> 에너지 조절이 쉬운 질소 가스에 고주파 에너지를 통과시켜 고에너지의 플라즈마 가스를 형성한 뒤 기체를 통해 피부 속으로 분사해 피부 속에 직접적인 열에너지를 전달하는 방식으로 진피 부위에 새로운 콜라겐 재생을 유도한다.<sup>3)</sup>

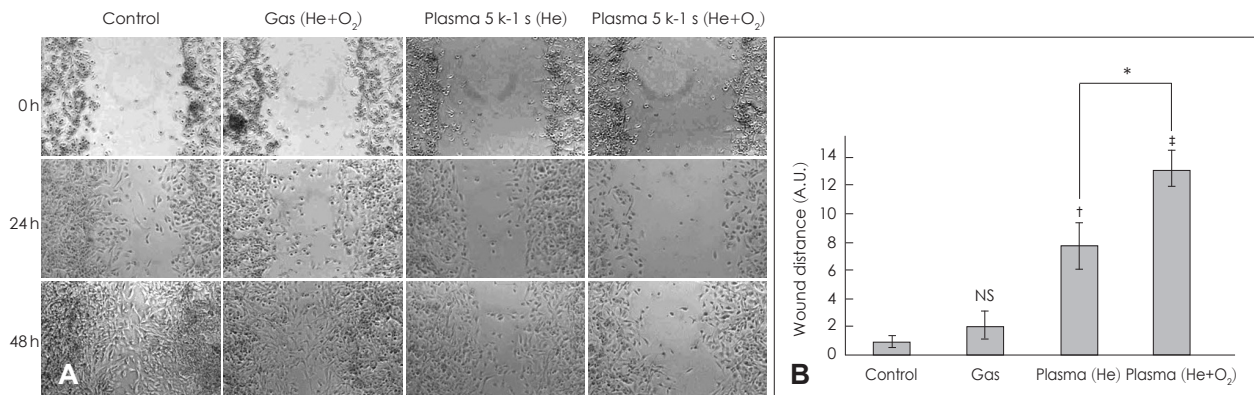
### 플라즈마를 이용한 암치료

최근에 플라즈마의 임상적용으로 가장 주목을 받는 영역은 암치료 부분이다. 최근 많은 연구자들에 의해 암과 관련하여 우수한 연구가 계속 발표되고 있다. 이러한 연구에 사용되는 상온 상압 플라즈마(nonthermal atmospheric pressure plasma)의 효과는 열에 의한 것이 아니고, 플라즈마에서 나오는 다양한 활성 분자(active species; oxygen/hydroxyl radicals, nitric oxide etc)에 의해 나타난다.<sup>14)</sup>

이러한 암연구와 관련해서 최근에 많이 발표되고 있는 부분이 플라즈마에 의한 세포의 부착능(adhesion property)의 변화와 세포사멸(apoptosis) 유도이다.<sup>6,15-17)</sup> 세포의 부착능과 관련해서 플라즈마의 활성 산소유리기 등이 세포 내의 부착과 관련된 물질을 파괴하면서 세포가 바닥에서 떨어지는 현상이 발생한다.<sup>6,18)</sup> 이러한 현상에는 세포 내의 다양한 세포골격구조(cytoskeletal structures)의 변화가 동반되며, 가역적인 현상으로 알려져 있다.<sup>6,19)</sup> 암연구에 있어 플



**Fig. 5.** Plasma emission spectra with different gases.<sup>9)</sup> Comparison of He vs. He+O<sub>2</sub> gases. All emission peaks have O I, O II, He I, He II, N I, C I, N V, meaning the spectral lines of neutral (I), singly ionized (II), and quadruply ionized (V) atoms, over the measured wavelength range, in which the peaks include signatures from air molecules, i.e., nitrogen, oxygen and even carbon. In particular, different intensities appear in the range of 475 nm to 575 nm (A). Plot of peak ratio vs. wavelength [ $I_{ratio}, (He+O_2)/He$ ] at 5 kV. To better illustrate the spectral differences, the plasma emission spectra ratio  $[(He+O_2)/He]$  is shown Fig. 2B. There were three particularly large peak changes with O II ( $O_2 \rightarrow O_2^+ + e^-$  or  $O \rightarrow O^+ + e^-$ ) at 488.5 nm, 507.8 nm, and 539.4 nm wavelengths, showing 110% increase at 488.5 nm for the (He+O<sub>2</sub>) as compared with only He gas. On the other hand, between 625 nm and 800 nm, the oxygen peaks, and even the nitrogen and carbon peaks have the same ratio, indicating that the most of gas peaks between 625 nm and 800 nm are associated with contributions from the air ambient (B). Comparison of atmospheric pressure plasma emission spectrum of He+O<sub>2</sub> gases with different voltages at 5 and 10 kV (C).



**Fig. 6.** Cell migration of colorectal cancer cells.<sup>9)</sup> Photographs of the SW480 cells at 24 and 48 h after treatment. 100× magnification (A). Quantification of cell migration assay from three independent experiments. \* $p < 0.05$ , † $p < 0.01$ , and ‡ $p < 0.001$  by student t-test compared to control (B). NS: no significant, AU: arbitrary unit.



라즈마의 주된 기전은 세포사멸의 유도이다.<sup>17,18,20,21</sup> 플라즈마에 의해 세포가 죽게 되는 경우 세포는 핵의 응축, 핵의 분절 등 세포사멸 시 나타나는 특징적인 형태학적 변화를 보이게 된다.<sup>6</sup> 그러나 아직까지 상온 상압 플라즈마의 기전에 대해서는 연구가 많이 부족한 상태이다. 따라서 본 연구자는 암세포에서 플라즈마에 의해 유도되는 세포사멸현상과 이와 관련된 세포사멸기전 등에 대한 연구를 진행하였다.

본 연구자가 사용한 상압, 상온 플라즈마는 'torch with spray type'으로 사용되는 전력 최소 2 kV이고, 최고는 13 kV를 사용하도록 되어 있고, 발생하는 플라즈마의 온도는 대략 30℃로 측정되어, 열에 의한 효과는 배제할 수 있었다 (Fig. 2).<sup>9,22</sup>

본 연구자가 사용한 플라즈마에 대해 optical emission spectroscopy로 측정한 결과 헬륨가스(He)를 사용시에 다양한 emission peak(O I, O II, He I, He II, N I, C I, N V; I-neutral, II-singly ionized, V-quadruply ionized atoms)이 발생하고 여기에 산소(O<sub>2</sub>)를 더하면 활성화된 산소유리기가 더 많이 발생하는 것을 알 수 있다(Fig. 5A).<sup>9</sup> 사용되는 gas에 따른 차이를 잘 보이게 하기 위해 Fig. 5B에서 spectra ratio[(He+O<sub>2</sub>)/He]를 측정하였다.<sup>9</sup> 이 결과 상 He와 O<sub>2</sub>를 함께 사용하였을 때 singly ionized O II (O<sub>2</sub>→O<sub>2</sub><sup>+</sup>+e<sup>-</sup> or O→O<sup>+</sup>+e<sup>-</sup>)가 488.5 nm, 507.8 nm, 539.4 nm wavelengths에서 He 단독으로 사용하였을 때에 비해 산소유리기가 유의하게 증가되는 것을 볼 수 있었다.<sup>9</sup> 사용

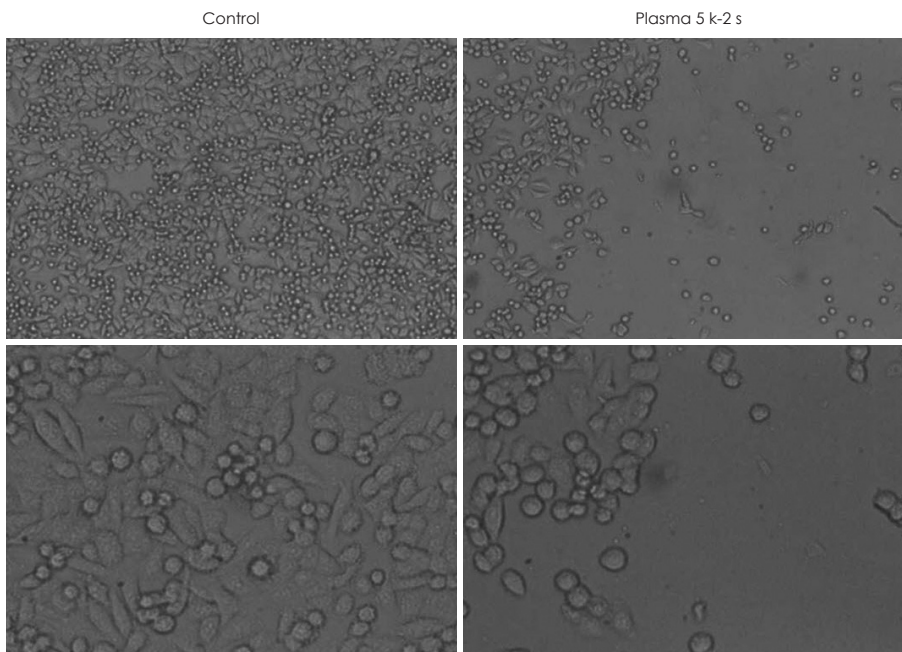
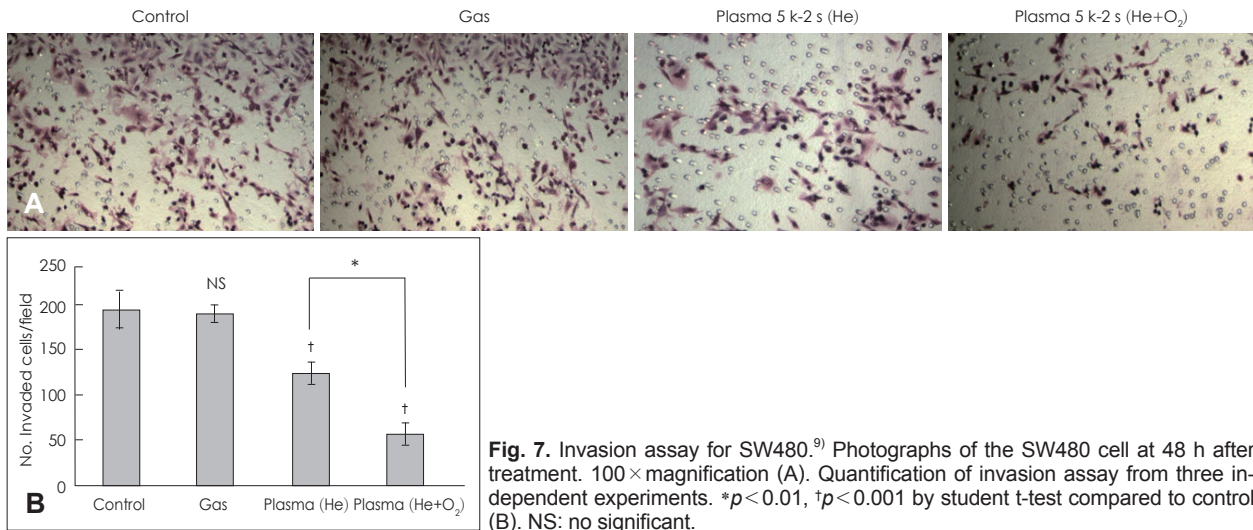


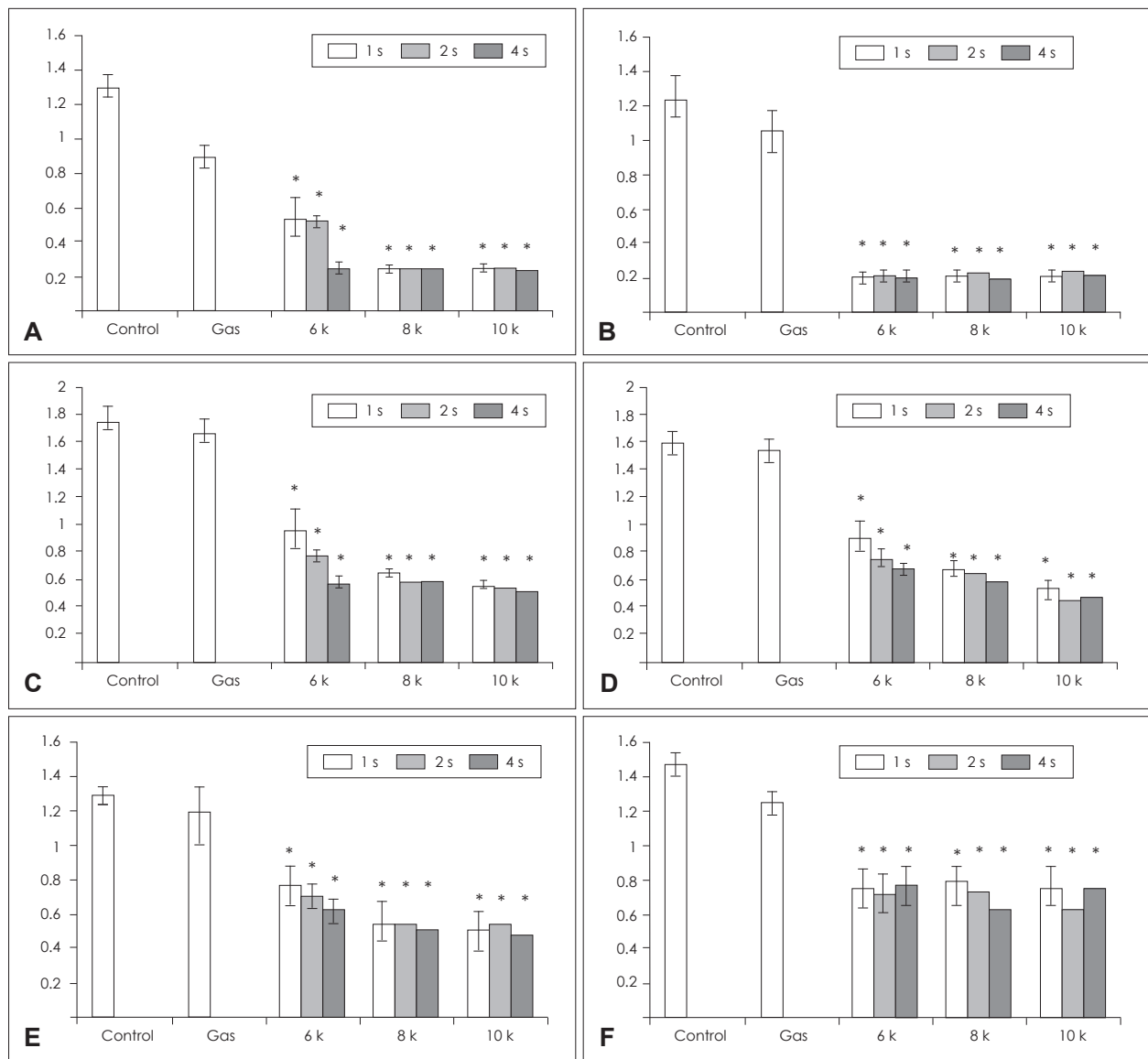
Fig. 8. A void created in a cell culture, grown on a Petri dish. Treatment with plasma allowed focal localized cell detachment and cells typically displayed a void that was completely free of cells.

되는 gas에 따른 차이뿐 아니라, 동일한 gas를 사용하더라도 플라즈마 형성 시 제공되는 전압의 크기를 증가시키면 발생하는 플라즈마의 양도 차이가 나는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5C).<sup>9)</sup>

사용된 산소유리기가 암세포에는 어떠한 영향을 주는 지를 측정하였다. Fig. 6은 암세포의 증식과 이동을 측정할 수 있는 wound healing assay로 He를 단독으로 사용한 것보다는 He과 O<sub>2</sub>를 동시에 사용한 군에서 통계적으로 유의하게 세포의 증식과 이동을 억제하는 것으로 나타났다.<sup>9)</sup> 또한 Fig. 7의 Transwell chamber에서 Matrigel을 이용

한 invasion assay결과도 He 단독보다는 He과 O<sub>2</sub>를 함께 사용하였을 때 효과적으로 세포의 침습을 억제하는 것을 볼 수 있었다.<sup>9)</sup> 이러한 결과는 사용하는 gas에 따라 암세포의 증식, 이동, 침습에 영향을 줄 수 있다는 중요한 결과이고, 향후 플라즈마를 이용한 치료 시에 충분히 고려해야 하는 조건이라고 할 수 있다.

이러한 세포의 이동과 침습에는 세포 간의 유리(detachment)가 초기단계에서 매우 중요한 과정이다. 세포 간의 부착에는 다양한 접착물질(adhesion molecules)이 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 세포의 이동이나 침습에서

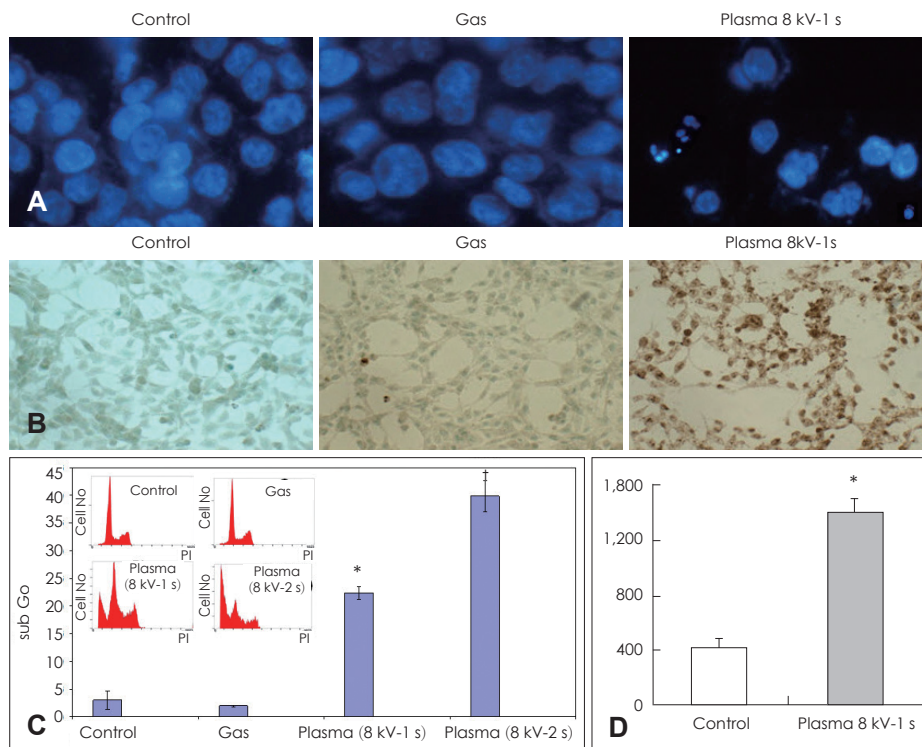


**Fig. 9.** Effect of non-thermal atmospheric plasma on growth of HCT-116.<sup>22)</sup> (A and B), LoVo (C and D), and SW480 (E and F) cells. The cells were seeded at a concentration of 20,000 cells/well in 96-well tissue culture plates in five replicates. Cells were exposed to 6, 8 and 10 kV for 1, 2 and 4 second (s) in the presence of thin media. At 2 h (A, C and E) or 24 h (B, D and F) after treatment, 20  $\mu$ L of CellTiter 96 aqueous one solution was added to each well, and the plate was incubated for 1 h at 37°C. \* $p$  < 0.001 by student t-test compared to gas alone. Y-axis represents optical density at 490 nm.

가장 중요한 현상은 액틴의 형성이 특정부위에서 일어나 방향성을 지닌 pseudopodia가 돌출하는 것으로 pseudopodia의 형성은 실험적으로 세포의 이동과 관련이 있음이 확인되었고 체내에서 종양세포의 이동과 관련이 있다고 알려져 있다.<sup>23)</sup> 플라즈마를 처리한 경우 이러한 세포의 이동에 중요한 pseudopodia와 lamellipodia가 소실되는 것을 확인할 수 있고 이러한 현상에 의한 세포의 detachment 현상이 발생한다(Fig. 8). 또한 이러한 형태학적인 변화에 영향을 주는 다양한 부착관련 물질(adhesion molecules; integrins, cadherins, and focal adhesion kinase 등)이 변화하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 세포가 종양이 침습과 전이를 일으키려면 기저막을 파괴한 후 주변 기질을 녹이는 작용을 하게 되는 현상은 일반적으로 종양세포와 주변의 간질세포에서 분비되는 heparinase, serine proteinase, cathepsin, matrix metalloproteinase(MMP) 등에 의해 일어나며 이 중 MMP와 serine protease가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, 본 연구진의 연구결과 플라즈마가 이러한 변화를 초래하는 것으로 확인되었다.

상온 상압 플라즈마에 의한 세포사멸에 대한 연구는 아

직까지 미진한 상태이고 많은 연구가 초기의 세포사멸 현상에 국한되어 있어, 보다 심도 있는 기전 등에 대해서는 연구가 되어 있지 않다. 본 저자는 플라즈마의 세포사가 세포사멸(apoptosis)에 의한 현상인지를 확인하고, 세포사멸과 관련된 기전에 대한 초기연구를 진행하였다. Fig. 9는 대장암 세 가지 세포주에서 2시간과 24시간에 시행한 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole(MTT) assay 결과이다.<sup>22)</sup> 플라즈마가 가스를 사용하여 만들어지기 때문에, He+O<sub>2</sub>만 사용한 경우를 gas only로 해서 비교하였다. 대장암뿐 아니라 두경부암을 포함한 다양한 암세포주에서 1초, 2초, 4초의 아주 짧은 노출시간에도 세포사멸이 효과적으로 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 세포사멸 여부를 확인하기 위하여 시행한 4'-6-diamidino-2-phenylindole(DAPI) staining과 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labeling(TUNEL) staining에서 가스만 사용하였을 때는 세포사멸이 거의 없다가 플라즈마 8 kV, 1초간 노출되었을 때 대부분의 세포에서 세포사멸이 나타나는 것을 확인할 수 있다(Fig. 10A and B).<sup>22)</sup>



**Fig. 10.** Effect of non-thermal atmospheric plasma on apoptosis and caspase-3 activity in HCT-116 cells.<sup>22)</sup> HCT-116 cells were exposed to 8 kV for 1 and 2 s in the presence of media. DAPI staining was performed and apoptotic cells were (magnification: 200×) visualized under a fluorescence microscope. Arrow indicates apoptotic cells (A). TUNEL assay. Cells were grown and treated with plasma at 8 kV for 1 s. TUNEL assay was performed using an *in situ* cell detection kit (magnification: 100×)(B). DNA content for the sub G<sub>0</sub> population was determined using PI staining followed by flow cytometry. Plasma treatment resulted in a significant enrichment in the number of cells in the sub G<sub>0</sub> phase, representing the apoptotic cells. \* $p < 0.01$ , † $p < 0.001$  by student t-test compared to gas alone (C). The Caspase-Glo 3/7 Assay kit was used to measure apoptosis in cells according to the manufacturer's protocol. Plasma increased caspase-3/7 activity in cells treated with plasma at 8 kV for 1 s ( $p = 0.0079$ ). \* $p < 0.01$  by student t-test compared to control (D).



Fig. 10C는 플라즈마가 세포주기에 미치는 영향을 확인하기 위해 시행한 실험으로 세포사멸을 나타내는 subG0가 플라즈마 조사 시에 증가하는 결과를 보여주고 있다. 대조군(subG0: 1.9%)과 가스처리군(subG0: 2.1%)에 비해 플라즈마 1초를 조사한 경우 subG0가 22.5%로 증가하여 통계적 유의성이 있었고( $p=0.0019$ ), 2초를 조사한 경우 43.1%로 엄청나게 증가하는 것을 확인할 수 있었다( $p=0.0008$ ).<sup>22)</sup> 또한 S기와 G2/M기도 처리시간에 비례하게 감소하는 것을 알 수 있어, 플라즈마 조사가 세포사멸과 세포주기를 억제하는 것을 알 수 있었다.<sup>22)</sup>

세포사멸이 caspase 의존적인지를 확인하고, caspase 3/7의 활성도를 측정하기 위해 시행한 실험에서 caspase activity가 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 10D).<sup>22)</sup>

플라즈마에 의한 암세포에서의 세포사멸 기전을 확인하고자 시행한 Western blot검사에서 플라즈마를 8 kV를 1초가 조사하고, 24시간 동안 시간별로 세포사멸과 세포주기와 관련된 분자를 확인한 결과 phospho-p38, phospho-c-Jun N-terminal kinases(JNK), phospho-extra-cellular signal-regulated kinases(ERK)는 초기시간인 1~2시간 사이에 활성이 되다가 24시간에 사라지는 것을 확인할 수 있었다.<sup>22)</sup> 또한 phosphorylated  $\beta$ -catenin은 플라즈마 처리 후 8시간에 증가되었다가 24시간 감소하였고 phosphorylated  $\beta$ -catenin의 증가와 동시에 cyclin D1은

감소하는 소견을 보여 플라즈마가 세포사멸과 관련된 유전자를 유도하고, 세포주기를 억제하여 세포성장을 조절하는 결과를 보여주었다(Fig. 11).<sup>22)</sup>

그러나 이러한 효과적인 암억제 효과가 현재로서는 제한점이 있어 보인다. 그 이유는 아직까지 플라즈마는 조직에 대한 투과력이 약한 것으로 알려져 있고, 본 저자들이 실험한 xenograft mouse model 실험에서 피부 아래에 발생한 종양에 대한 억제력이 *in vitro* 같지는 않았다. 즉, 표면에 노출되어 있거나 노출되었다고 하더라도 종양이 부피가 너무 크지 않은 표재성 병변에서 사용이 가능할 것 같다. 물론 플라즈마 기기도 계속 개발 중에 있고 이를 통해 암을 치료하고자 하는 연구기관과 기업이 많으므로 멀지 않아 극복될 수 있는 부분이라고 판단된다. 기존의 여러 가지 연구에 볼 때 레이저나 방사선치료에 비해 조직으로 손상이 적고, 치료시간이 짧으며 치료에 따른 통증 등의 부작용이 적어 향후 다양한 종양에서 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

## 결론

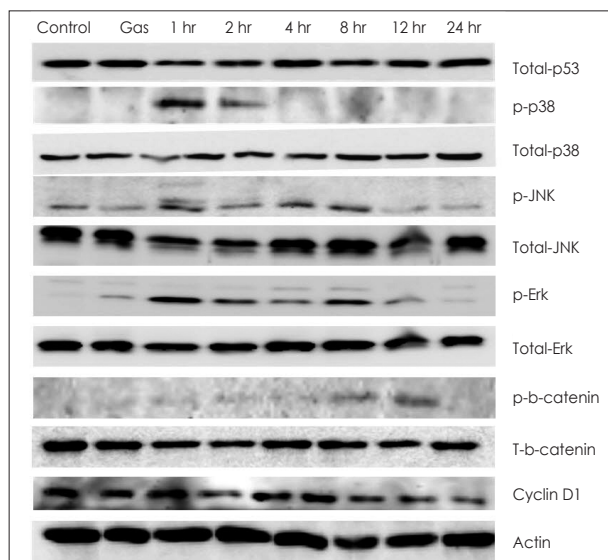
융합학문의 하나인 플라즈마 의학은 플라즈마와 관련된 공학적인 부분의 비약적인 발전을 통해 매우 급속하게 변화되고, 다양한 임상적용에 대한 시도가 폭발적으로 늘어나고 있다. 현재 멸균, 조직재생, 각종 피부질환, 지혈과 치과 질환 등에는 이미 사용되고 있고, 현재 가장 활발하게 연구되고 있는 암치료 부분에서도 멀지않아 의미 있는 결과물이 도출될 것으로 예측된다. 레이저, 방사선 등의 다른 치료법에 비해 조직의 손상을 최소화한다는 점, 짧은 치료시간, 세포 내 다양한 분자의 변화와 신호전달체계의 변화를 통해 세포사멸을 억제한다는 점은 플라즈마치료의 가장 유용한 부분이라고 할 수 있다. 또한 기존의 다양한 치료와 병합할 수 있는 가능성도 있어 가까운 미래에 다양한 임상치료에 있어 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

## Acknowledgments

This research was supported by the 'GRRC' project of Gyeonggi provincial government, Republic of Korea (GRRC Ajou University 2009-A03).

## REFERENCES

- 1) Nelson R, Phelps E. Investment in Humans, Technological Diffusion, and Economic Growth. *American Economic Review* 1966;56: 69-75.
- 2) Bernard A, Jones C. Technology and Convergence. *Economic Journal* 1996;106:1037-44.
- 3) Fridman G, Friedman G, Gutsol A, Shekhter AB, Vasilets VN, Fridman A. *Applied Plasma Medicine. Plasma Processes and Polymers* 2008;5:503-33.
- 4) Faure J, Glinec Y, Pukhov A, Kiselev S, Gordienko S, Lefebvre E,



**Fig. 11.** Effects of non-thermal atmospheric plasma on apoptosis and cell cycle related genes.<sup>22)</sup> HCT 116 cells were treated with plasma at 8 kV for 1 s and cell lysates were prepared at indicated times for up to 24 h and then analyzed for protein expression of p53, p38, JNK, Erk, cyclin D1 and  $\beta$ -catenin. The data are representative from two independent experiments.

- et al. A laser-plasma accelerator producing monoenergetic electron beams. *Nature* 2004;431(7008):541-4.
- 5) Langmuir I, Tonks L. Oscillations in an ionized gas. *Science* 1928; 68:598.
- 6) Stoffels E, Kieft IE, Sladek REJ, van den Bedem LJM, van der Laan EP, Steinbuch M. Plasma needle for in vivo medical treatment: recent developments and perspectives. *Plasma Source Sci Technol* 2006;15(4):S169-80.
- 7) Kolb JF, Mohamed AAH, Price RO, Swanson RJ, Bowman A, Chiavarini RL, et al. Cold atmospheric pressure air plasma jet for medical applications. *Appl Phys Lett* 2008;92:241501-3.
- 8) Bin L, Goree J, Drake D, Stoffels E. Killing of *S. mutans* bacteria using a plasma needle at atmospheric pressure. *IEEE Trans Plasma Sci* 2006;34(4):1317-24.
- 9) Kim CH, Kwon S, Bahn JH, Lee K, Jun SI, Rack PD, et al. Effects of atmospheric nonthermal plasma on invasion of colorectal cancer cells. *Appl Phys Lett* 2010;96(24):243701.
- 10) Fridman G, Peddinghaus M, Balasubramanian M, Ayan H, Fridman A, Gutsol A, et al. Blood coagulation and living tissue sterilization by floating-electrode dielectric barrier discharge in air. *Plasma Chem Plasma Process* 2006;26(4):425-42.
- 11) Kalghatgi SU, Fridman G, Cooper M, Nagaraj G, Peddinghaus M, Balasubramanian M, et al. Mechanism of blood coagulation by nonthermal atmospheric pressure dielectric barrier discharge plasma. *IEEE Trans Plasma Sci* 2007;35(5):1559-66.
- 12) Kieft IE, Darios D, Roks AJM, Stoffels E. Plasma treatment of mammalian vascular cells: a quantitative description. *IEEE Trans Plasma Sci* 2005;33:771-5.
- 13) Lee YW, Nam SH, Mohamed AAH, Kim GC, Lee JK. Atmospheric Pressure Plasma Jet Composed of Three Electrodes: Application to Tooth Bleaching *Plasma Process Polym*:2009 ePub.
- 14) Chen Y, Miao ZH, Zhao WM, Ding J. The p53 pathway is synergized by p38 MAPK signaling to mediate 11,11'-dideoxyverticillin-induced G2/M arrest. *FEBS Lett* 2005;579(17):3683-90.
- 15) Kim D, Gweon B, Kim DB, Choe W, Shin JH. A feasibility study for the cancer therapy using cold plasma. *IFMBE Proceedings* 2008;23:355-7.
- 16) Kim GC, Lee HJ, Shon H. The effects of a micro plasma on melanoma (G361) cancer cells. *J Korean Phys Soc* 2009;54:628-32.
- 17) Zhang X, Li M, Zhou R, Feng K, Yang S. Ablation of liver cancer cells in vitro by a plasma needle. *Appl Phys Lett* 2008;93:021502-021504.
- 18) Shashurin A, Keidar M, Bronnikov S, Jurjus RA, Stepp MA. Living tissue under treatment of cold plasma atmospheric jet. *Appl Phys Lett* 2008;93:181501-3.
- 19) Kieft IE, Kurdi M, Stoffels E. Reattachment and Apoptosis After Plasma-Needle Treatment of Cultured Cells. *IEEE Trans Plasma Sci* 2006;34:1331-6.
- 20) Montie TC, Kelly-Wintenberg K, Roth JR. An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP) for sterilization of surfaces and materials. *IEEE Trans Plasma Sci* 2000;28:41-50.
- 21) Nuccitelli R, Chen X, Pakhomov AG, Baldwin WH, Sheikh S, Pomier JL, et al. A new pulsed electric field therapy for melanoma disrupts the tumor's blood supply and causes complete remission without recurrence. *Int J Cancer* 2009;125:438-45.
- 22) Kim CH, Bahn JH, Lee SH, Kim GY, Jun SI, Lee K, et al. Induction of cell growth arrest by atmospheric non-thermal plasma in colorectal cancer cells. *J Biotechnology* in press.
- 23) Vadnais J, Nault G, Daher Z, Amraei M, Dodier Y, Nabi IR, et al. Autocrine activation of the hepatocyte growth factor receptor/met tyrosine kinase induces tumor cell motility by regulating pseudopodial protrusion. *J Biol Chem* 2002;277:48342-50.