

X선에 의한 연골세포 분화 억제 작용경로

— The mechanism of chondrogenesis inhibition by X-irradiation —

경북대학교 사범대학 생물교육과 · 대구보건대학 방사선과*

하종렬 · 임영빈 · 이윤애 · 손종경 · 이준일*

— 국문요약 —

본 연구를 통해 X선에 의한 연골세포 분화 억제 작용경로를 조사하고자 하였다.

계배 limb bud 간충직세포를 배양하면서 여러 가지 선량(1-10Gy)의 X선을 조사하고 연골분화도를 조사한 결과, X선은 연골세포에 특이하게 발현되어 분화적으로 이용되는 typeII collagen의 발현과 proteoglycan의 축적을 저해하였다. 또한 세포내 신호전달 과정에서 중요한 매개자 역할을 하는 것으로 알려진 PKC동위효소중 PKCa의 발현을 저해 하였다. 그러나 PKC α (t), ϵ 등 다른 동위효소의 발현에는 별다른 영향을 미치지 못하였다. X선 조사에 의한 연골세포 분화 억제가 PKCa의 downstream으로 알려져 있는 Erk-1을 통하여 이루어지는 지 알아보기 위하여 Erk-1의 발현 및 인산화를 조사한 결과 X선은 그 발현에는 영향을 미치지 못했으나 인산화는 증가시켰다. 연골세포 분화 저해 효과가 Erk-1의 활성 변화에 의한 것인가를 확인하기 위하여 Erk-1을 인산화하는 MEK의 저해제인 PD98059를 처리하여 Erk-1의 인산화를 저제한 결과 X선 조사에 의한 연골분화 억제효과를 극복하는 것으로 나타났다. 또한 X선 조사가 분화 초기의 세포응집 과정에 어떤 영향을 미치는 지 알아보기 위하여 PNA 염색으로 조사한 결과 X선 조사는 세포응집을 저해하였다.

본 연구 결과를 종합하면 X선 조사는 분화 초기에 세포 응집을 억제하며 PKCa의 발현을 저해하고 Erk-1의 인산화를 촉진하여 연골세포 분화를 억제하는 것으로 사료된다.

I. 서 론

간충직세포는 연골세포나 섬유아세포, 근육세포로 분화될 수 있는 잠재력을 가지고 있는 중배엽성 세포로서 HH-stage 23/24 계배 limb bud 간충직 세포를 고밀도로 배양하면 세포가 모이게 되고 이어서 연골 특이 proteoglycan이나 type II collagen을 발현하는 nodule이 형성된다(Ahrens *et al.*, 1977).

X선은 조직 및 세포에 작용하여 세포를 사멸시키거나 압화를 유발한다. 또한 연골세포의 성숙에 관여하는데 그 효과는 연골세포의 성숙과정에 따라 다른 것으로 알려져 있다. 골 성장판의 미성숙 연골세포에 10 Gy의 X선을 조사하

면 연골세포의 비만화가 억제되고 alkaline phosphatase 유도가 억제되며 type-X collagen의 발현이 억제되나, 비만 세포에 10 Gy의 X선을 조사를 하면 그 효과가 감소하는 것으로 알려져 있다(Hiranuma *et al.*, 1996). 관절 연골세포에 1~10 Gy의 X선을 조사하면 type II collagen의 합성에는 영향을 받지 않으나, 분화정도에 따라 proteoglycan의 합성 속도는 그 효과가 다르다. 즉, 미성숙 연골세포에 같은 선량의 X선을 조사하면 proteoglycan의 합성이 억제되나, 성숙 세포의 경우에는 별로 영향을 받지 않는다(Jikko *et al.*, 1996).

X선이 세포에 작용하는 신호경로로 PKC와 MAP kinase등이 보고되어 있다. HJ 세포주에 X선을 조사하

면 Jun 유전자의 발현이 증가하고 PMA로 장기처리 하여 PKC 활성을 억제하면 Jun 유전자의 전사 증가가 감소하며(Hallahan *et al.*, 1991), 배양한 사람 흑색종 세포에 X선을 조사하면 세포성장 조절인자로 알려진 WAF1이 축적되는데 PKC 저해제를 처리할 경우 X선 조사에 의해 유도된 WAF1 축적이 저해됨이 보고된 바 있다(Fujino *et al.*, 1999). 또한 X선을 감상선에 조사하면 암화되는데 그 신호과정에서 PKC 중 delta isoform과 MKK7, JNK 등이 활성화 된다는 것이 보고되었다(Mitsutake *et al.*, 2001). 이러한 결과들은 X선이 세포에 영향을 미치는데 있어서 PKC가 중간 경로 역할을 함을 보여준다. 그러나 X선이 연골세포에 미치는 신호 경로에 대한 연구는 아직 잘 알려져 있지 않아, 본 연구에서는 미분화 상태의 간충직세포로부터 연골세포로 분화되는 과정에 X선을 조사하여 X선이 세포 내에서 어떤 신호경로를 거쳐 연골세포 분화를 저해하는지에 대해 알아보려고 하였다. 실험결과 의미 있는 결과를 얻었기에 그 기초자료를 제공하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

실험에 사용된 계배의 간충직 세포는 White Leghorn 종의 수정란(에텐농원, 밀양, 경상남도)을 37°C, 상대 습도 60%의 조건에서 Hamburger-Hamilton stage(HH) 23/24로 배양한 후, limb bud의 말단 부위로 부터 분리하여 사용하였다(Park *et al.*, 1990).

2. 방법

1) 세포 배양

세포 배양은 Ahrens 등(1977)의 방법에 준하여 실시하였다. 간충직 세포를 HH-stage 23/24의 계배 wing bud 말단으로부터 절취한 후 0.1% trypsin-collagenase를 37°C에서 10분간 처리하였다. 분리된 세포들을 12,000×g에서 10분간 원심 분리하여 모은 후 배양액에 재현탁하고, 2장의 #20 Nytex에 통과시켜 세포 현탁액을 거르고 세포 수를 산정하였다. 세포 농도를 2×10^7 cells/ml로 맞춘 후 10 μ l의 세포 현탁액을 35 mm 플라스틱 배양조에 심고 37°C의 CO₂ 배양기에서 1시간 동안 배양하여 세포들을 배양조 바닥에 붙도록 하였다. 이후 F-12/10% FCS

배양액을 1.5 ml 가하고 X선을 조사하였다. 배양액은 매 24시간마다 갈아 주었다.

2) X선 조사

X선 조사는 6-MV X-Ray Machine(Mevatron MD67, Siemens, GFR)을 이용하여, 최대선량점을 1.5 cm, field size를 가로 3 cm 세로 3 cm의 크기로 조정하였다.

선원과 세포와의 거리를 1 m로 고정시킨 후 300 cGy/min의 선량율로 실험조건에 따라 각각 1 Gy, 5 Gy, 10 Gy 순으로 상온에서 조사하였다.

3) 분화도 검정

연골세포의 분화도 검정은 Lev와 Spicer(1964)의 방법에 의한 cartilage nodule의 관찰과 nodule에 결합된 Alcian blue 염색액을 추출한 후 이를 정량하는 Paulsen과 Solursh(1988) 방법으로 수행하였다. 즉, 배양된 세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 2회 수세하고, Kahle's fixative solution으로 10분간 고정시킨 후, 여기에 0.5% Alcian blue(pH 1.0) 염색액을 가하고 12시간 동안 염색하였다. 분화도를 정량하기 위해서 세포를 2% glacial acetic acid in ethanol로 30분 동안 고정하고, 95%-70% ethanol로 재수화 시켰다. 고정된 세포에 0.5% Alcian blue(pH 1.0) 염색액을 가하여 12시간 동안 염색한 후 4M guanidinium HCl을 가하고 12시간 뒤에 염색액을 추출하고, 추출된 염색액의 흡광도를 microplate reader (BIO-RAD, Hercules, CA, USA)를 사용하여 595 nm 파장에서 측정하였다.

4) 면역조직화학법

분화된 연골세포에서 합성되는 type II collagen에 특이적인 항체를 이용하여 연골세포의 분화정도를 검증하였다. 배양된 세포를 PBS로 3회 수세한 후, 4% paraformaldehyde로 20분간 고정시키고, 다시 PBS로 3회 수세하였다. 5% normal horse serum으로 30분간 blocking시킨 후, type II collagen에 대한 항체를 가하여 1시간 동안 반응시키고 PBS로 수세한 후 biotinylated anti-mouse IgG로 30분간 반응시켰다. VECTASTAIN ABC 용액으로 30분간 반응시킨 후, diaminobenzidine tetrahydrochloride substrate solution kit으로 발색시키고 (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA), Crystal mount(Biomedex, CA, USA)로 mount 하였다.

5) PNA 염색법

배양된 세포를 PBS로 3회 수세한 후, 4% paraformaldehyde로 20분간 고정시키고, 다시 PBS로 3회 수세하였다. 5% normal horse serum으로 30분간 blocking시킨 후, biotinylated peanut agglutinin을 가하여 1시간동안 반응시켰다. PBS로 수세하고 VECTASTAIN ABC 용액으로 30분간 반응시킨 후, diaminobenzidine tetrahydrochloride substrate solution kit으로 발색시키고, Crystal mount로 mount 하였다.

6) Western blot 법

배양 연골세포를 배양 시기별로 수확하여 lysis 완충용액 (50 mM Tris, pH 7.4, containing 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, 1 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 0.25% sodium deoxycholate, 1% NP-40)을 가하여 세포를 용해시켰다. 세포 용해물을 원침하여 세포 파편을 제거하고 상층액의 단백질 농도를 측정하였다. 단백질을 7.5% SDS-PAGE로 분리하고 nitrocellulose(NC) membrane으로 전이시켰다. NC membrane을 3% non-fat 분유로 1시간 blocking하고 1차 항체(PKCα, ε, type II collagen, Erk)로 4°C에서 밤새 반응시켰다. TBS로 막을 수세한 후 horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG로 1시간 반응시키고 면역 반응을 보이는 band를 enhanced chemiluminescence(Amersham, UK)로 확인하였다.

III. 결 과

연골세포의 분화 과정에서 X선의 역할을 알아보기 위하여, 계배 limb bud 간충직 세포를 배양조에 심은 후 1-10 Gy의 X선을 조사하고 F12 배양액에서 3일간 배양한 세포를 4% paraformaldehyde로 고정시키고 type II collagen에 대한 항체를 가하여 그 발현정도를 면역조직화학법으로 조사하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 X선 조사는 연골세포에 특이하게 발현되어 분화적으로 사용되는 type II collagen의 발현을 감소 시켰다. 또한 대조군 세포와 X선을 조사한 세포의 단백질 추출물로 type II collagen에 대한 western blot법을 실시한 결과에서도 X선을 조사한 세포의 type II collagen 발현은 선량이 증가할수록 감소하였다(Fig. 2). 이와 같은 결과들은 X선

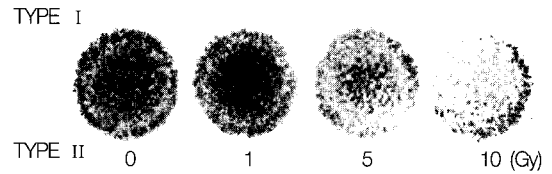


Fig. 1. Effect of X-irradiation on the chondrogenic differentiation.

In the beginning of culture, cells were exposed to various dose of X-ray, and cultured for 3 days, fixed and immunostained with anti-type II collagen antibody.

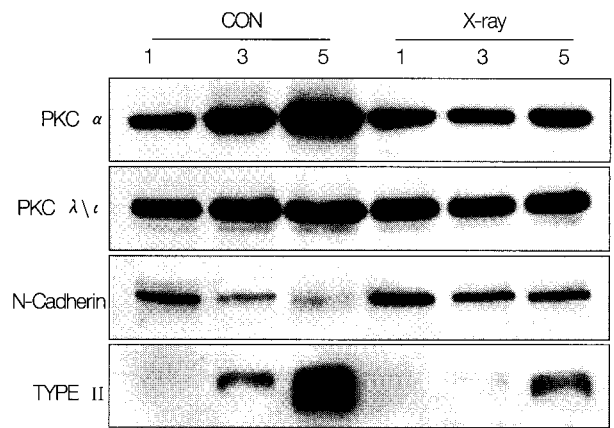


Fig. 2. Effect of X-irradiation on the PKC, N-cadherin and type II collagen expression during chondrogenesis. In the beginning of culture, cells were exposed to 10 Gy of X-ray and cultured for indicated periods. The expression of PKCα, λ/ε, N-cadherin and type II collagen was examined by Western blot as described in "Materials and Methods".

조사가 연골분화를 억제함을 보여주는 것이다.

X선 조사가 연골세포 분화를 억제하는 과정을 조사하기 위하여 X선 조사가 PKC 발현에 미치는 영향을 Western blot 법으로 분석하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 대조군 세포에서 PKCα는 연골세포 분화가 진행됨에 따라 그 발현이 점차 증가하였으나 X선을 조사한 세포의 경우 PKCα의 발현이 초기에는 비슷하였으나 증가하지 않고 초기 수준을 유지하였다. 다른 PKC 동위효소인 PKCλ/ε는 대조군 세포에서 연골세포 분화가 진행됨에 따라 변화가 없었는데 X선을 조사한 세포에서도 발현에는 영향을 미치지 않았다.

연골세포 분화 과정 중 세포간의 상호작용에 관여하는 것으로 알려진 N-cadherin의 발현에 미치는 X선의 영향

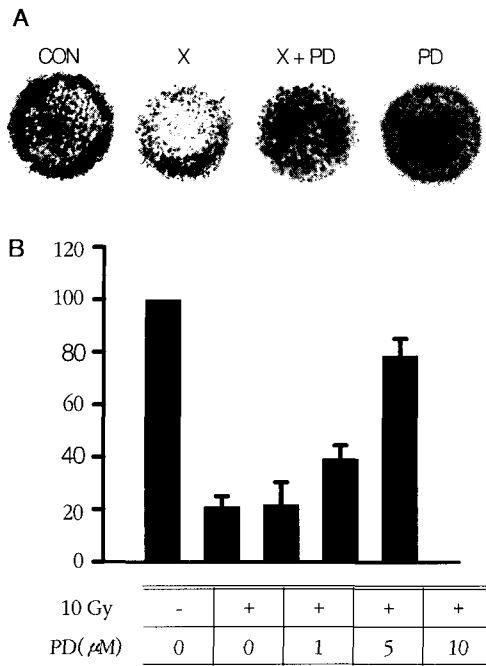


Fig. 3. PD98059 recovers the inhibitory effect of X-irradiation on chondrogenic differentiation.

A, Cells were cultured in the absence(CON, X) or presence of PD98059(X+PD, PD) for 3 days and stained with alcian blue. In the beginning of culture, some cells were exposed to 10 Gy of X-ray(X, X+PD).

B, In the beginning of culture, cells were exposed to 10 Gy of X-ray and treated with various concentrations of PD98059 for 3 days. Cells were stained with alcian blue and bound dye was extracted with 4 M guanidium HCl and optical density was measured at 595 nm. Data represent means \pm S.D.(n = 3).

을 조사하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 대조군 세포에서 N-cadherin의 발현은 배양시기가 지남에 따라 점차 감소하였으나 X선을 조사한 세포에서는 N-cadherin의 발현이 많은 상태를 유지하였다.

배양 연골세포의 분화과정에서 PKC는 MAP kinases 중 하나인 Erk-1의 인산화를 조절하여 연골세포 분화를 통제하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 X선의 연골세포 분화 저해 효과가 Erk-1의 활성 변화에 의한 것인가를 확인하기 위하여 Erk-1을 인산화하는 MEK의 저해제인 PD98059를 X선을 조사한 세포에 처리하고 alcian blue로 염색하여 관찰하였다(Fig. 3A). 그 결과 PD98059를 대조군 세포에 처리하였을 때 연골세포 분화도는 크게 증가하였다. 또한 PD98059를 X선을 조사한 세포에 처리하였을 때 X선 조사에 의한 연골세포 분화 억제효과가 완화됨을 알 수 있었다. X선을 배양세포

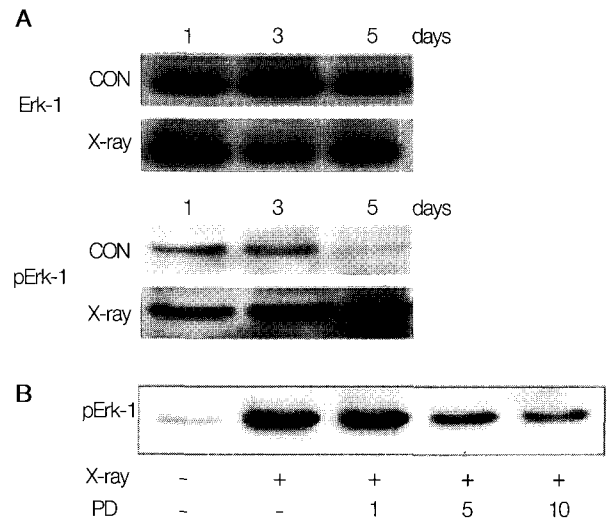


Fig. 4. Erk is involved in the pathway by which X-irradiation inhibits chondrogenic differentiation.

A, After exposure to 10 Gy of X-ray in the beginning of culture, cells were further cultured for indicated periods and expression of Erk-1 or pErk-1 was examined by Western blot.

B, After exposure to 10 Gy of X-ray in the beginning of culture, cells were cultured in the presence of various concentrations of PD98059 for 3 days and expression of pErk-1 was examined by Western blot.

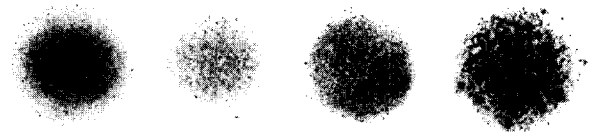


Fig. 5. Effect of X-irradiation on the cellular aggregation.

Cells were exposed to 10 Gy of X-ray in the beginning of culture and cultured in the absence or presence of PD98059 for 2 days and stained with PNA as described in 'Materials and Methods'.

에 조사하고 여러 가지 농도의 PD98059를 처리한 후 alcian blue로 염색하고 연골세포의 분화도를 양적으로 분석한 결과에서도 PD98059는 농도 의존적으로 연골세포 분화를 극복하는 것으로 나타났다(Fig. 3B).

X선 조사에 의해 연골세포 분화가 저해되는 과정에 Erk-1이 관련되어 있는지를 조사하기 위하여 Erk-1의 발현 및 인산화 정도를 Western blot 법으로 분석하였다. Fig. 4A에서 보는 바와 같이 Erk-1의 발현은 대조군 세포나 X선을 조사한 세포에서 변화가 없었다. 대조군 세포에서 Erk-1의 인산화는 배양 3일째에 증가하였

으나 그 이후에는 감소하였다. X선을 조사한 세포에서는 Erk-1의 인산화가 배양 1일째부터 증가하여 3일째에 최대 인산화를 보였고 5일째에는 약간 감소하였으나 지속적으로 많은 인산화가 일어났다. PD98059에 의한 X선 조사의 효과 완화가 Erk-1의 인산화를 통한 것임을 알아보기 위하여 X선을 조사한 세포에 여러 가지 농도의 PD98059를 처리하고 Erk-1의 인산화를 phospho-Erk-1 항체를 이용한 Western blot 법으로 조사하였다. 그 결과 X선을 조사한 세포에 처리한 PD98059의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 Erk-1의 인산화가 저해되는 것으로 나타났다(Fig. 4B).

배양 간충직세포는 분화 초기에 세포 응집현상이 일어난다. X선 조사에 의한 연골세포 분화 억제가 세포 응집을 저해하여 일어나는지를 알아보기 위하여 배양 간충직 세포에 X선을 조사하고 세포의 응집정도를 PNA로 염색하여 관찰하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 X선을 조사하였을 때 세포의 응집되는 정도가 많이 감소함을 알 수 있었다. Erk-1의 인산화 저해가 X선에 의한 세포 응집 억제를 극복할 수 있는 지 알아보기 위하여 X선을 조사한 세포에 PD98059를 처리하여 Erk-1의 인산화를 억제시키고 세포 응집 정도를 조사한 결과 어느 정도 세포 응집이 회복됨을 알 수 있었다.

IV. 고 찰

X선 조사가 연골세포의 분화 단계에 따라 다양한 효과를 보이는 것으로 알려져 있으므로(Hiranuma *et al.*, 1996), 본 연구에서는 X선이 세포 내에서 어떤 신호 경로를 거쳐 연골세포 분화를 저해하는지에 대해서 알아보 고자 하였다. 먼저 Fig. 1에서 보는 바와 같이 X선 조사는 type II collagen의 축적을 저해하여 연골세포 분화를 억제하였다. 이 결과는 관절 연골세포는 미성숙세포이든 성숙세포이든 X선 조사에 의해 type II collagen의 합성에 영향을 받지 않았다는 결과(Jikko *et al.*, 1996)와는 다른 것이다. 그런데 미성숙 연골세포의 경우 X선 조사에 의해 proteoglycan의 합성이 저해된 반면 성숙 연골 세포는 그 영향이 미약하다는 결과는(Jikko *et al.*, 1996) 분화가 이루어지지 않은 세포일수록 X선 조사의 영향을 크게 받음을 의미한다. 따라서 X선 조사에 의해 배양 중인 간충직 세포의 type II collagen 축적이 감소한다는 본 연구의 결과는 어린 분화단계의 세포일수록 X선 조사에 민감함을 보여준다.

방사선이 세포내 PKC 활성 수준을 높이고(Hallahan *et al.*, 1991; Haimovitz-Friedman *et al.*, 1994), PKC가 X선 조사에 의해 유도되는 신호전달 경로에 관여한다는 보고들이 있다. 즉, HL-60 세포에서 X선 조사에 의한 tumour necrosis factor 유전자 발현의 유도과정에서 PKC를 통한 신호전달이 필요하며(Hallahan *et al.*, 1991), HJ 세포주에서 X선 조사에 의해 유도된 c-jun 유전자의 발현이 PKC에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다(Datta *et al.*, 1992). 또한 PKC가 murine T-lymphoma 세포에서 X선 조사에 의해 유도된 세포사에 관련이 있음이 보고되어 있다(Palayoor *et al.*, 1995). 간충직 세포가 연골세포로 분화되는 과정에서 PKC가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으므로(Choi *et al.*, 1995, Lee *et al.*, 1998), 본 연구에서는 X선 조사의 연골분화 억제과정에 PKC가 관여하는지를 알아보기 위하여 X선을 조사한 배양 간충직 세포의 분화단계 별 PKC 동위효소의 발현 변화를 조사하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 PKCa의 발현이 대조군 세포에서는 점차 증가한 반면 X선을 조사한 세포에서는 배양 초기의 수준에 머물러 있는데 이는 X선 조사가 PKCa의 발현을 억제함으로써 연골세포 분화를 저해함을 보여주는 것이다. 이러한 결과는 PKC를 저해하거나 활성화시켜 연골세포 분화를 억제하거나 촉진한다는 결과들(Lee *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998)과 비교하였을 때 PKC의 활성이 연골세포 분화를 조절한다는 사실에 일치한다 하겠다.

배양한 간충직 세포의 연골세포 분화과정에서 PKC는 MAP kinase의 하나인 Erk-1을 통하여 작용하는 것으로 알려져 있다(Chang *et al.*, 1998). X선 조사에 의한 연골세포 분화 억제가 Erk-1을 통하여 이루어지는 지 여부를 알아보기 위하여 배양 간충직 세포에 X선을 조사하고 Erk-1의 발현 및 인산화를 조사하였다. X선 조사에 의해 Erk-1의 발현에는 변화가 없었으나 Erk-1의 인산화는 증가하였다. 이것은 Erk-1의 인산화 증가가 연골분화를 억제한다는 기존의 결과와 일치하는 것이다(Oh *et al.*, 2000). X선 조사에 의한 연골분화 억제과정에서 Erk-1 활성화의 역할을 알아보기 위하여 X선을 조사한 세포에 PD98059를 처리하고 연골분화도를 조사하였다. 그 결과 PD98059는 X선 조사에 의한 연골분화 억제를 약간 완화시켰다. 또한 PD98059를 X선을 조사한 세포에 처리하였을 때 Erk-1의 인산화가 많이 저해되었다. 이 결과는 X선 조사에 의한 연골세포 분화 억제는 Erk-1의 활성화를 통한 것임을 뒷받침하는 것이다. 그러나 PD98059에 의한 연골세포 분화 회복의 정도가 그다지 크지 않은

것으로 보아 X선 조사에 의한 연골세포 분화 억제에는 Erk-1 이외의 경로에도 작용함을 시사한다.

X선 조사가 연골세포 분화 과정 중 분화 초기인 세포 응집 과정에 어떤 영향을 미치는 지 알아보기 위하여 배양 간충직 세포에 X선을 조사하고 PNA 염색으로 관찰하였다. 그 결과 X선 조사는 세포응집을 저해하는 것으로 나타났다(Fig. 5). 따라서 X선 조사는 분화 초기인 세포 응집시기에 작용하여 연골세포 분화를 억제함을 알 수 있다.

본 연구 결과를 종합하면 X선 조사는 분화 초기에 세포 응집을 억제하며 PKCa의 발현을 저해하고 Erk-1의 인산화를 촉진하여 연골세포 분화를 억제함을 알 수 있다. 그러나 PD98059에 의한 연골분화 회복의 정도가 그다지 크지 않아 X선 조사에 의한 연골세포의 분화 억제는 Erk-1경로 이외의 것으로도 작용하는 것으로 사료되어 이에 대한 연구가 이어져야 할 것이다.

참 고 문 헌

- Ahrens, P. B., M. Solursh, and R. S. Reiter. Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture. *Dev. Biol.* **60** : pp.69-82, 1977.
- Chang, S.-H., C.-D. Oh, M.-S. Yang, S.-S. Kang, Y.-S. Lee, J.-K. Sonn, and J.-S. Chun. Protein kinase C regulates chondrogenesis of mesenchymal cells via mitogen-activated protein kinase signaling. *J. Biol. Chem.* **273** : pp.19213-19219, 1998.
- Choi, B., J. S. Chun, Y. S. Lee, J. K. Sonn, and S. S. Kang. Expression of protein kinase C isoenzymes that are required for chondrogenesis of chick limb bud mesenchymal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216** : pp.1034-1040(1995).
- Datta, R., D.E. Hallahan, S.M. Kharbanda. Involvement of reactive oxygen intermediates in the induction of c-jun gene transcription by ionizing radiation. *Biochemistry*, **31** : 8300, 1992.
- Fujino, M., K. Ohnishi, M. Asahi, X. Wang, A. Takahashi, T. Ohnishi. Effects of protein kinase inhibitors on radiation-induced WAF1 accumulation in human cultured melanoma cells. *Br. J. Dermatol.* **141** : 652-7, 1999.
- Hallahan, D.E., S. Virudachalam, M.L. Sherman. Tumor necrosis factor gene expression is mediated by protein kinase C following activation by ionizing radiation. *Cancer. Res.* **51** : 4565, 1991.
- Hallahan, D.E., V.P. Sukhatme, M. L. Sherman, S. Virudachalam, D. Kufe, R.R. Weichselbaum. Protein kinase C mediates x-ray inducibility of nuclear signal transducers EGR1 and JUN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88** : 2156-60, 1991.
- Hamburger, V. and H.W. Hamilton. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* **88** : pp.49-92, 1951.
- Hiranuma, H., A. Jikko, M. Iwamoto, H. Fuchihata. Effects of X-ray irradiation on terminal differentiation and cartilage matrix calcification of rabbit growth plate chondrocytes in culture. *Bone* **18** : 233-8, 1996.
- Jikko, A., H. Hiranuma, M. Iwamoto, Y. Kato, Y. Okada, H. Fuchihata. Effects of X irradiation on metabolism of proteoglycans. *Radiat. Res.* **146** : 93-9, 1996.
- Knudson, C. B., and B. P. Toole. Changes in the pericellular matrix during differentiation of limb bud mesoderm. *Dev. Biol.* **112** : pp.308-318, 1985.
- Lee, S. R., Y. S. Lee, J. S. Chun, J. K. Sonn, and S. S. Kang. Lysophosphatidylcholine enhances chondrogenesis by the modulation of protein kinase C isoform expression. *Korean J. Biol. Sci.* **2** : pp.229-232, 1998.
- Mitsutake, N., H. Namba, S. S. Shklyae, T. Tsukazaki, A. Ohtsuru, M. Ohba, T. Kuroki, H. Ayabe, S. Yamashita. PKC delta mediates ionizing radiation-induced activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase through MKK7 in human thyroid cells. *Oncogene* **20** : 989-96, 2001.
- Oh, C.D., S.H. Chang, Y.M. Yoon, S.J. Lee, Y.S. Lee, S.S. Kang, J.S. Chun. Opposing role of mitogen-activated protein kinase subtypes,

- erk-1/2 and p38, in the regulation of chondrogenesis of mesenchymes, *J. Biol. Chem.* **275** : pp.5613-5619, 2000.
15. Palayoor ST, Macklis RM, Bump EA, Coleman CN. Modulation of radiation-induced apoptosis and G2/M block in murine T-lymphoma cells. *Radiat Res.* **141(3)** : 235-43, 1995.
16. Park, T. K., J. K. Sonn, J. A. Yoo, B. J. Yoo, and S. S. Kang. Studies on the Differentiation of Chondrogenic Cells in Developing Chick Embryo I. Cellular Aggregation and Chondrogenesis. *Korean J. Zool.* **33** : pp.310-321, 1990.
17. Paulsen D.F., and M. Solursh. Microtiter microassay cultures of limb-bud mesenchymal cells. *In Vitro Cell Dev Biol.* **24** : 138-47, 1988.
18. Yang, M. S., S. H. Chang, J. K. Sonn, Y. S. Lee, S. S. Kang, T. K. Park, and J. S. Chun. Regulation of chondrogenic differentiation of mesenchymes by protein kinase C alpha. *Mol Cells.* **8** : pp.266-271, 1998.

• Abstract

The mechanism of chondrogenesis inhibition by X-Irradiation

Jong-Yeol Ha · Young-Bin Lim · Yoon-Ae Lee · Jong-Kyung Sonn · Joon-Il Lee*

Dept. of Biology Education, Kyungpook National University

*Dept. of Radiologic Technology, Taegu Health College**

The purpose of this study is to investigate the mechanism of inhibition of chondrogenic differentiation by X-irradiation. Cultures of chick limb bud mesenchymal cells were exposed to various dose of X-ray and chondrogenesis was examined. X-irradiation inhibited accumulation of proteoglycan based on the observation of alcian blue staining and expression of chondrocyte specific-type II collagen. X-irradiation also inhibited expression of protein kinase Ca while expression of PKC α (ι), ϵ was not altered. Expression of Erk-1 was not changed by X-irradiation but phosphorylation of Erk-1 was increased. In addition, inhibition of Erk-1 phosphorylation by PD98059 overcame inhibitory effect of X-irradiation on the chondrogenic differentiation. PNA staining data showed that X-irradiation inhibited cellular aggregation.

Taken together, these results suggest that X-irradiation inhibits chondrogenic differentiation by inhibiting cellular aggregation and suppressing expression of PKCa and promoting phosphorylation of Erk-1. In addition to above pathway, our results also suggest that X-irradiation may exerts its inhibitory effect by another signaling pathways.
