

저강도 맥동성 초음파 적용이 관절연골세포에 미치는 영향

김은정 · 김계엽*

동신대학교 물리치료학과

Effect of Low Intensity Pulsed Ultrasound in Rat Chondrocyte

Eun Jung Kim, Gye Yeop Kim*

Department of Physical Therapy, Dongshin University

Low intensity pulsed ultrasound(LIPUS) is known to accelerate bone regeneration, but the precise cellular signaling mechanism is still unclear. The purpose of this study was to determine the effect of LIPUS on the signaling mechanism of rat chondrocyte. In the explant culture condition, there was inhibition effect of 1 W/cm² intensity LIPUS on chondrocytes proliferation but chondrocytes proliferation was increased at 0.25 W/cm² intensity. In addition, western blot analysis of MAPKs showed that LIPUS increased ERK1/2 activity from the 10 min treatment of LIPUS. Hydrogen peroxide(H₂O₂), resulted in a time- and dose-dependent cell proliferation, which was largely attributed to apoptosis. H₂O₂ treatment caused marked sustained nucleus condensation in Hoechst stain. LIPUS and H₂O₂ activates phosphorylation of p-ERK1/2 and PD 98059(10⁻⁵M) blocked the effect of LIPUS and H₂O₂. Moreover, the synergistic phosphorylation of p44/42 MAPK by H₂O₂, LIPUS was selectively inhibited by PD 98059, ERK1/2 inhibitor. In order to determine whether the increase in cell proliferation caused by H₂O₂ and LIPUS could be explained by changes in the level of the prostaglandin E₂. Our study demonstrated that LIPUS stimulate the cell proliferation via activated phosphorylation of ERK1/2 in chondrocyte. LIPUS has anabolic effects on rat cartilage in explant cultures, indicating a potential important method for the treatment of osteoarthritic cartilage.

Key words : chondrocyte, ERK1/2, Low Intensity Pulsed Ultrasound(LIPUS)

서 론

슬관절 내의 연골세포는 세포의 기질의 생성과 유지에 중요한 작용을 하며, 퇴행성 골관절염에서는 세포의 기질 및 세포성에 심한 변화를 가져오게 된다¹⁾. 따라서 성숙한 관절 연골 내에 조직손상을 회복하고, 세포의 형태나 정상적인 기능 유지가 관절염에 있어 중요한 역할을 하게 된다²⁾. 정상관절에서 관절연골의 유지는 단일세포인 연골세포(chondrocyte)와 세포외 기질의 이화작용(catabolism)과 합성(synthesis) 사이의 균형에 의해 이루어지는데³⁾, 노령화가 진행될수록 이러한 균형이 깨지면서 연령과 비례하여 관절염의 발생률도 증가하고 있는 추세이다⁴⁾.

세포고사는 조직의 항상성을 유지하기 위한 필수적인 부분이며, 매우 복잡하고 다양한 기전을 통해 조절되어지고 있다. 세포고사의 조절은 세포 내·외부의 자극 변화에 의해 조절되는데

이러한 능력이 소실되어, 비정상적인 세포고사가 유도되면 관절염을 야기하게 된다. 관절 연골은 혈관과 림프관, 통증 섬유, 신경이 분포 하지 않는 조직이며, 세포분열의 정지로 인해 대사가 능이 저하되어 있어 재생이 불가능한 조직이다. 최근의 연구들은 관절연골 세포의 세포고사 조절에 다른 여러 기전들을 제시하고 있으며^{5,6)}, 퇴행성 골관절염에서 관절연골의 세포고사와 세포괴사의 기전은 매우 중요한 요인으로 이와 관련된 연구를 통해 퇴행성 골관절염의 새로운 치료방법을 찾고자 노력하고 있다.

관절염 치료 분야에서 연골손상에 대한 치료 및 세포 재생을 위한 방법 중 약침과 탕제적용 외에도 외부에서 유압(shear stress), 인장력(strain), 초음파 등의 물리적 자극을 주는 방법이 이용되고 있다. 이는 뼈, 연골 등에 적용 시 조직 및 세포 내 물질대사를 변화시키며⁷⁾, 주로 세포 내 신호전달체계를 포함하여 Ca²⁺과 K⁺ ion channel에 따라 Ca²⁺의 농도 변화를 가져온다⁸⁾. 또한 기계적 수용기를 통해 들어간 세포 신호를 따라 단백질의 인산화를 촉진시켜 연골세포의 증식과 세포 염증반응을 조절하는 것으로 알려져 있으며, 이외 세포증식 촉진, 성장 과정의 분화와

* 교신저자 : 김계엽, 전남 나주시 대호동 252 동신대학교 보건복지대학

· E-mail : kykim@dsu.ac.kr, · Tel : 061-330-3391

· 접수 : 2008/09/05 · 수정 : 2008/09/24 · 채택 : 2008/10/08

유지에 관여한다고 알려져 있다⁹⁾. 따라서 정상적인 관절 연골에는 물리적인 자극이 연골의 유지에 필요한 요인이기도 하지만, 비정상적 관절 조직이거나 강한 물리적 자극이 가해지는 경우 조직 파괴를 가져 온다¹⁰⁾. 이러한 초음파 자극은 골절이나, 인대, 근육 등의 손상 후 치료 목적으로 사용하였을 때 효과적이며, Huang 등¹¹⁾에 의하면, papain으로 유도한 골관절염에서 관절염 초기에 초음파를 적용 시 효과가 있다고 보고하였다. 비온열 효과를 유도하는 단속형 초음파의 생체 조직 내 생리적 변화는 초음파장 내에서 매질의 흐름(streaming)에 의한 세포막의 투과도 변화에 의한 것으로 알려져 있다. 그러나 이러한 초음파의 비온열 효과에 의한 손상된 관절연골 내의 세포고사와 이와 관계되는 세포 내 신호전달 체계에 미치는 영향에 관해 조사한 연구는 거의 보고되지 않고 있다. 세포고사는 생화학적으로 DNA laddering, 염색체 응축, 세포 수축, 세포 고사체의 형성, 포식세포에 의한 포식작용 등의 형태학적인 특징을 보이며¹²⁾, 이는 세포와 스트레스 종류 및 강도 등에 의해 결정된다. 세포 자가고사를 유발시키는 요인으로는 허혈증(ischemia), 저산소증(hypoxia), 방사선조사(radiation), 화학물질(chemical agent), Fas/Fas ligand, 일산화질소(nitric oxide) 등이 있다¹³⁾.

외부의 산화적 스트레스 자극은 세포내 여러 신호 전달 경로를 활성화시킴으로서 세포 신호전달을 유도하는데 이 경로중 하나가 serine/threonine kinase인 MAPKs(mitogen- activated protein kinases) 경로이다¹⁴⁾. 이는 세포 외부환경 변화 자극을 인지하여, 세포 성장, 분화, 세포고사 등의 조절에 관여하는 신호를 세포질 내부로 전달하는 신호전달계이다¹⁵⁾. MAPK의 아형으로는 extracellular signal regulated kinase-p44/42 MAPK(ERK1/2), p38-MAP kinase(p38), c-Jun N-terminal kinase (JNK)로 구성된다¹⁶⁾. 전세포고사(proapoptotic) 또는 항세포고사(anti-apoptotic), 생물학적 과정에 의해 MAPK 활성화는 자극되며, 매우 발산력이 강하며, 세포 형태에 매우 의존적인 경향을 보인다¹⁴⁾. 특히 ERK1/2 경로는 보통 성장인자의 활성화와 세포 분화, 증식, 생존과 관련된 신호경로이나 관절연골세포에서의 proteoglycan 합성과 단백질 합성에 억제적으로 작용한다고 보고된바 있다¹⁷⁾.

특히 본 연구에서는 임상분야에서 관절염 치료에 적용하는 초음파가 실제 어떠한 세포 기전에 의해 효과를 발휘하는지 세포 수준에서의 연구가 매우 미진한 실정이기에, 세포 배양된 연골세포에서의 초음파 치료 효과에 관해 세포내 작용 기작에 대한 근거를 제시하는데 목적이 있다.

재료 및 방법

1. 관절연골세포의 분리 및 배양

관절연골세포 배양을 위해 실험동물로는 무게 280~300 g의 Sprague-Dawley rat를 사용하여 연골 채취를 하였다. 각 실험을 위한 백서들은 경주탈골한 후 우측 슬관절 부위를 베타딘과 알코올(70%)로 소독하고 피부절개 후 관절 연골을 채취하였다. 채취한 연골 조직은 4℃ PBS(phosphate buffer saline, pH 7.4) 용

액에 보관하였다. 채취한 연골은 크기가 2~3 mm로 잘게 잘랐으며, 37℃에서 30분 동안 10 ml, 0.1% EDTA-CMFT(calcium magnesium free tyrode) 용액에 넣어 0.15% trypsin(GIBCO, 840-7072IL, NY)에 1시간, 2 mg/ml collagenase I (Sigma, C0130, USA)에 반응시키며 세포 부유액을 얻었다. 이 부유액은 나일론 여과지(pore size, 120 μm)로 여과한 후 1,500 rpm으로 5분간 원심분리 하여 원심분리 된 세포를 Hank's balanced salt solution(GIBCO, 450-1200EA, NY)으로 세척한 후 연골세포를 얻었다. 얻어진 세포는 10% FCS(fetal calf serum, GIBCO, 26140-038, NY)와 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium: GIBCO 213000-025, NY)에 항생제를 첨가하여 35 mm 배양 접시에 각 well 당 5×10^4 cells/cm² 밀도로 분주하였으며, 37℃, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. 2~3일 간격으로 배지를 교환 해주었고, 배양접시가 완전히 차면 모든 세포는 1회 계대 배양 후 사용하였다. 1회 계대배양 할 때 배양접시에 3×10^4 cells/cm² 농도로 용도에 따라 각각 동일하게 심어 배양한 후 사용하였다.

2. 초음파 적용

치료용 초음파는 Sonopuls 590[®] therapeutic ultrasound device (Enraf Nonius, 2600 AV, Delft, the Netherland)를 사용하였고, 초음파의 transducer head의 직경은 3 cm이고, 70% 에탄올로 소독하여 사용하였다. transducer head는 37℃에서 세포배양이 된 35 mm 배양 접시(culture dish) 내 배지와 head가 공기가 접하지 않도록 잘 밀착되도록 한 후 연골세포에 자극을 주었다. 매일 동일 시간에 처리하였으며, 출력은 0.25 W/cm², 1 W/cm²를 각각 주파수가 1 MHz, 맥동비(duty cycle)가 1:4인 맥동초음파로 설정하고, 0, 1, 2, 5, 10분간 조사하였다.

3. 관절연골세포의 증식 측정

관절연골세포의 증식과 생존율을 측정하기 위하여 XTT(sodium 3'-[1-(phenylamino- carbonyl)-3, 4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate) 분석 방법을 이용하였다. 이는 mitochondria의 succinate-tetrazolium 환원효소에 의해서 formazan 염색으로 살아있는 세포에서만 분해되어 나타나며, 수용성 대사산물이다. XTT 시약은 페놀 레드가 들어 있지 않은 배지에 XTT를 1 mg/ml로 용해시킨 XTT 용액(ab7963, abcam, cambridge, UK) 5 ml과 PBS 1.25 mM로 용해시킨 N-methyl dibenzo-pyrazine methyl sulfate (PMS) 용액 0.1 ml을 전자 공유 시약으로 사용 직전에 제조하였다. 관절연골세포를 PBS로 2회 세척한 후 35 mm 배양 접시에 각 well 마다 초음파를 처리하여 세포배양기(37℃, 5% CO₂)에서 세포배양하고, 배양이 끝난 후 XTT를 1 mg/ml로 용해시키고 PBS에 1.25 mM로 용해시킨 PMS 용액에 100 μl를 사용 직전에 혼합하여 배양접시당 첨가하고 배양기에서 5시간 반응시킨다. 반응이 끝나면 ELISA reader(Bio-Rad, Hercules, Calif)로 500 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

4. 세포사멸 측정

배양 용기에 배양한 관절연골 세포를 PBS로 2회 세척한 후 배양된 세포를 DNA와 결합하는 형광 색소인 Hoechst 33342(Invitrogen, USA) 시약을 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 첨가된 PBS와 암실에서 10분간 반응시킨 후, 자외선 필터를 이용하여 형광현미경(Olympus Optical Co., Tokyo, Japan)으로 핵의 형태를 관찰하였다. 최소한 300개 이상의 세포를 관찰하였으며, 핵 내 염색질(chromatic)이 응축(condensation) 된 사멸체(apoptotic body)가 존재하는 세포를 세포사멸이 일어난 세포로 간주하였다.

5. Western blotting

각 조건에 따라 초음파 처리된 연골세포는 4°C PBS로 세척하고 수확한 후, 4°C 용해 버퍼(300 mM NaCl, 50 mM Tris - Cl (pH 7.6)), 0.5% Triton X-100, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 $\mu\text{l}/\text{ml}$ aprotinin, 2 $\mu\text{l}/\text{ml}$ leupeptin을 넣은 후, 4°C에서 30분 동안 반응시켰다. 이후 4°C, 14,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 상층액을 추출하였다. 용해된 세포의 단백질 농도는 단백질을 정량화를 통해 계산하였고, 추출된 단백질은 동일한 양을 7.5~12% sodium dodecyl sulfate(SDS) polyacrylamide gel의 각 lane에 로딩한 후 전기 영동하였다. 이후, 겔을 polyvinylidene difluoride membrane (Amersham, 0.2 μm pore size, USA)에 붙였다(DiFiglia et al., 1995). Membrane은 TBS(PBS containing 0.01% (v/v) Tween 20)에 5% nonfat dried milk로 4°C에서 1시간 반응시키고, TBS로 다시 세척한 후, rabbit anti-phospho p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) polyclonal antibody, rabbit anti-p44/42 MAP kinase polyclonal antibody (Cell Signaling technology, 1:100, Herts, UK)를 4°C에서 24시간 반응시킨 후, enhanced chemical luminescence kit (RPN 2106, Amersham Life Science, Inc., USA)를 이용하여, 방사선 필름에 감광시켜서 단백질 발현을 확인하였다.

6. Prostaglandin E₂의 측정

배지에서 PGE₂의 측정은 Model 680(BIO-RAD Inc., Japan)의 기기에 PGE₂ assay kit(R & D System Inc., Minneapolis, USA)를 사용하여 정량하였다. Calibrator Diluent RD5-39를 비특이적 결합(nonspecific binding, NSB)을 한 well에 150 μl 첨가하고, Calibrator Diluent RD5-3950를 100 μl 첨가하여 zero standard(B0) well을 만들었다. 다음으로 microplate well에 sample과 100 μl 의 표준 용액을 첨가하였다. 또한 blank와 NSB well을 제외한 나머지 well에 50 μl 의 1차 항체 용액을 첨가하고, blank를 제외한 나머지 well에 50 μl 의 PGE₂ Conjugate를 첨가하였다. 마지막으로 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후 수세 용액(400 μl)으로 4번 깨끗이 세척한 후 암실에서 기질 용액을 각각의 well에 200 μl 첨가하여 30분간 반응시킨다. 마지막으로 50 μl 의 정지 용액을 첨가하여 30분간 반응시킨 후 microplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. 통계처리

본 연구의 통계학적 분석은 SPSS ver. 12.0 windows를 사용

하였다. 각 실험결과들은 평균 \pm 표준오차로 나타내었고, 통계검정은 independent t-test를 실시하였다. 모든 통계학적 유의 수준은 $p < 0.05$ 수준에서 채택하였다.

결 과

1. 저강도 맥동성 초음파가 관절연골세포의 증식에 미치는 영향

초음파를 1 W/cm²와 0.25 W/cm²의 강도로 0, 1, 2, 5, 10 분간 처리하여 24시간과 72시간 후에 연골세포의 증식률을 관찰하였다. 초음파 처리를 하지 않았을 때 24시간 후 98.22 \pm 14.52%, 1 W/cm²으로 1분 처리 시 80.28 \pm 15.51% ($p < 0.01$), 2분 처리 시 60.65 \pm 13.37% ($p < 0.001$), 5분 처리 시 28.67 \pm 8.34% ($p < 0.001$), 10분 처리 시 20.21 \pm 8.62% ($p < 0.001$)로 오히려 세포증식이 억제되는 효과를 보였다(Fig. 1A). 72시간 후에는 0분 일 때 104.55 \pm 13.21%, 1분 처리 시 60.51 \pm 13.36% ($p < 0.001$), 2분 처리 시 30.93 \pm 7.87% ($p < 0.001$), 5분 처리 시 15.33 \pm 7.61% ($p < 0.001$), 10분 처리 시 10.51 \pm 4.61% ($p < 0.001$)로 역시 24시간대에서와 같이 세포증식이 억제되었다(Fig. 1A). 초음파를 처리하지 않았을 때 24시간 후 97.54 \pm 13.67%, 0.25 W/cm² 1분 처리 시 98.64 \pm 12.55%, 2분 처리 시 105.66 \pm 15.96%, 5분 처리 시 102.35 \pm 13.67%, 10분 처리 시 108.76 \pm 11.88%로 약간의 증식은 보였으나 유의하지 않았다(Fig. 1B). 초음파를 처리하지 않았을 때 72시간 후 105.79 \pm 11.87%, 0.25 W/cm² 저강도 초음파 1분 처리 시 107.66 \pm 11.37%, 2분 처리 시 120.36 \pm 17.48% ($p < 0.05$), 5분 처리 시 128.68 \pm 14.56% ($P < 0.01$), 10분 처리 시 120.59 \pm 11.48% ($p < 0.01$)로 유의한 세포증식 효과를 보였다(Fig. 1B). 상기의 실험결과에 따르면 1 W/cm²보다 0.25 W/cm² 초음파 처리 시 배양된 관절연골세포의 세포 분열 증식이 높다는 것을 관찰하였다.

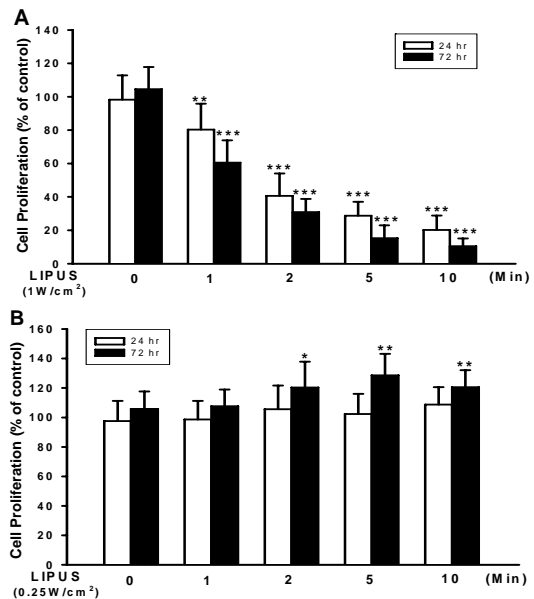


Fig. 1. Time-dependent effects of LIPUS in chondrocyte proliferation. Values are means \pm S.E. of three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. LIPUS 0 min. The autoradiographs are representative of two independent experiments.

2. 저강도 맥동성 초음파가 ERK1/2 신호전달 활성화에 미치는 영향

일정기간 동안 배양한 연골세포에서 초음파를 0.25 W/cm²를 5분간 처리한 후 p-ERK1/2, p38 MAPK, JNK 등의 MAPK 아형 중 어느 kinase가 활성화되는지 알아보았다. 저강도 초음파 처리 10분 후 p-ERK1/2가 발현되었고 시간 경과에 따라 점차 증가되어, 60분에 최대로 발현된 후 90분에서 감소하였다(Fig. 2). p38 MAPK, JNK는 발현되지 않았다. MAPK 아형 중 저강도 맥동성 초음파로 인하여 관절 연골 세포의 p-ERK1/2가 활성화됨을 알 수 있었다.

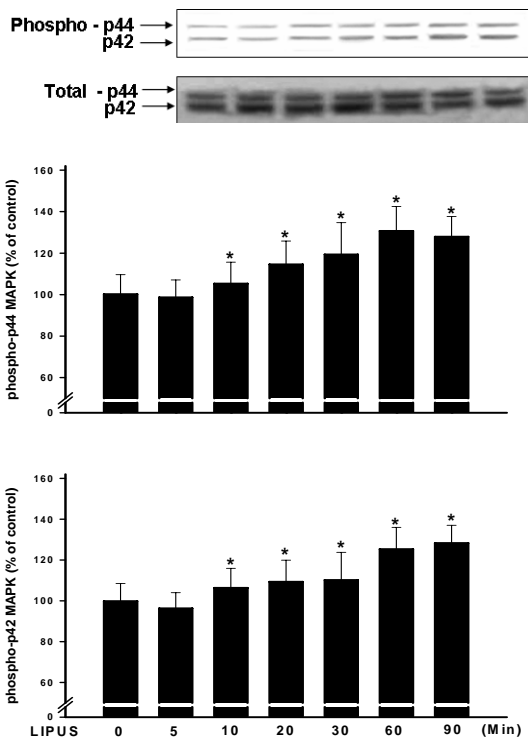


Fig. 2. The phosphorylation of p-ERK1/2 in rat chondrocyte after LIPUS treatment. Values are means±S.E. of three independent experiments. *P < 0.05 vs. LIPUS 0 min. The autoradiographs are representative of two independent experiments.

3. 관절연골세포의 세포 고사 시 세포 형태학적 변화

퇴행성 골관절염과 같은 상태를 인위적으로 유도하기 위하여 세포 증식에 영향을 주는 여러 물질 중 과산화수소수를 50 μM, 24 시간 처리하여 관절연골세포의 세포고사를 유도하였다. 배양 현미경 소견 상 정상관절 연골세포에 비해(Fig. 3A) 산화적 스트레스로 인한 세포고사 유도 시 연골세포의 세포질의 위축 및 세포 수가 감소함을 나타내었다(Fig. 3B). Hoechst 염색을 통하여 핵 내 염색질 응축(condensation)을 형광 현미경을 통해 관찰한 결과 정상관절 연골세포(Fig. 3C)에 비하여 산화적 스트레스로 인한 세포고사 유도 시 핵 응축과 세포 수가 많이 감소했음이 관찰되었다(Fig. 3D).

4. 저강도 맥동성 초음파와 세포 고사가 MAPK 활성화에 미치는 영향

연골세포에서 과산화수소수 50 μM과 저강도 맥동성 초음파를 처리한 후 p-ERK 1/2의 활성화에 미치는 영향을 알아보았다. 과산화수소수 50 μM과 저강도 맥동성 초음파 0.25W/cm² 처리 후 60분 후에 p-ERK가 발현되었고, 두 가지를 병합 시에도 발현이 활성화됨을 보였으나 병합 처리 시 더욱 인산화가 증폭되지는 않았다. ERK 선택적 억제제인 PD 98059를 10⁻⁸ M과 10⁻⁵ M을 60분 전 처리 시 과산화수소수와 저강도 맥동성 초음파에 의하여 증가되는 p-ERK 1/2 활성화를 10⁻⁵ M에서 유의하게 억제하였다(Fig. 4).

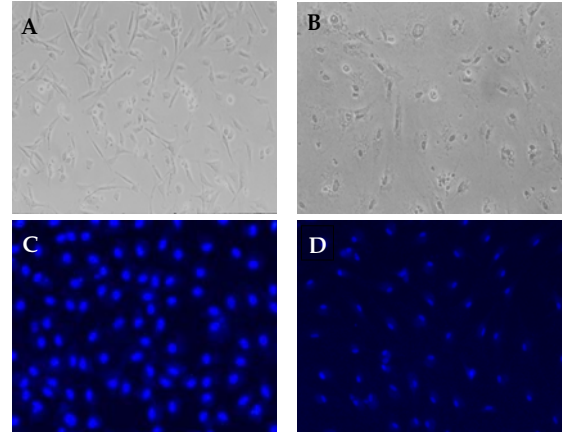


Fig. 3. The microscopical morphology changes(A, B) and assessment of nuclear morphology(C, D) of H₂O₂(50 μM, 24hr) treated chondrocyte (Hoechst stain, × 200).

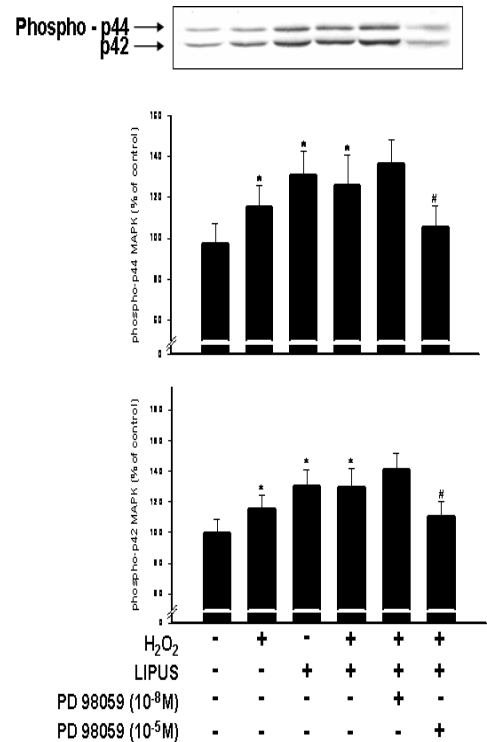


Fig. 4. Effects of PD 98059 on hydrogen peroxidase and LIPUS induced phosphorylation of p44/42 MAPKs. Chondrocyte were treated with PD 98059 for 60 min prior to the treatment of LIPUS 0.25W/cm². Values are means±S.E. of three independent experiments. *P < 0.05, vs. control, #P < 0.05, vs. H₂O₂ and LIPUS. The autoradiographs are representative of two independent experiments.

5. 저강도 맥동성 초음파가 Prostaglandin E₂(PGE₂)에 미치는 영향
저강도 초음파가 염증에 관여하는 PGE₂에 미치는 영향을 알아보기 위해 ELISA를 이용하여 PGE₂ 농도 변화를 관찰하였다(Fig. 5). PGE₂ 농도 변화는 산화적 스트레스를 주지 않았을 때 0.30±0.04 ng/ml, 과산화수소 50 μM 처리 후 4시간 후에 0.83±0.03 ng/ml로 유의하게 증가되었다(P<0.05). 저강도 초음파만 시간별(0, 1, 5, 10분)로 처리하고, 1분일 때 0.28±0.02 ng/ml, 5분일 때 0.26±0.05 ng/ml, 10분일 때 0.34±0.06 ng/ml로 정상관절 연골 세포에서 LIPUS만 처리 시에는 PGE₂의 농도 변화에 큰 영향을 미치지 않았다. 산화적 스트레스로 세포고사를 유도 후 저강도 초음파 처리 결과는 다음과 같다. 초음파 1분일 때 0.80±0.03 ng/ml, 2분일 때 0.64±0.01 ng/ml, 90초일 때 0.7±0.04 ng/ml로 저강도 초음파 5분과 10분에서 유의한 PGE₂의 농도의 감소를 보였다(P<0.05)(Fig. 5).

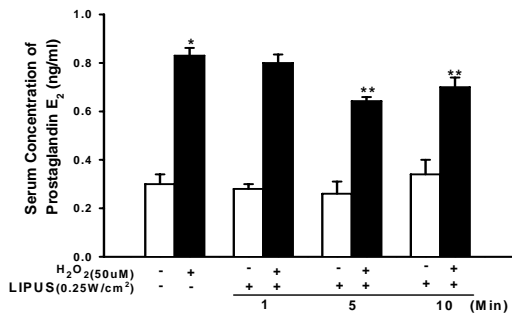


Fig. 5. The change of prostaglandin E₂ concentration in LIPUS treatment after chondrocyte apoptotic cell death. Values are means±S.E. of three independent experiments. *P < 0.05, vs. non-treated, **P < 0.05, vs. H₂O₂ alone treated.

고찰

저강도 맥동성 초음파는 50년 동안 물리적 그리고 생물학적 방법으로 골절치유¹⁸⁾와 골형성 동안에 뼈의 성장을 가속화 하는데 널리 사용되어져왔으며, 기계적 에너지의 형태로 음파를 생체 조직 내로 전달시켜, 진단적 그리고 치료적 기법으로 많이 사용되고 있다¹⁹⁾. 세포배양을 통한 *in vitro* 연구와 실험적 골절을 유발한 동물 모델에서 저강도 초음파의 적용은 세포 내에서 유의한 사이토카인의 활동성을 증가시켜 생물학적 효과를 자극하여 골절치유를 촉진한다고 하였으며²⁰⁾, 동물모델에서 저강도 초음파의 적용 시 시간의존적으로 여러 유전자 발현 증가나, aggrecan, proteoglycan 등의 세포의 기질 생성을 보인다고 하였다²¹⁾. Rubin 등²²⁾의 연구보고에 의하면 저강도 초음파는 골절 치유과정에서 골에 많은 수의 유전자 발현을 증가시켜 세포생리에 직접적인 영향을 준다고 하였다. 또한 혈소판에서 저강도 초음파 적용 시 세포막을 따라 K⁺의 유입이 증가된다고 하였으며²⁰⁾, 골아 세포주에서도 세포 내 TGF-β와 adenyle cyclase의 활동성을 조절한다²³⁾.

저강도 초음파에 관한 이러한 많은 연구들은 결국 세포 활성에 저강도 초음파가 영향을 준다는 사실들을 보여주고 있으며, 초음파가 세포 활성도에 영향을 준다면 이에 관여하는 유전자

발현 및 단백질 발현에도 영향을 주는 것임을 시사하는 것이다. 그러나 아직까지 랫트 관절연골세포에 저강도 맥동성 초음파 적용 시 세포신호전달기전에 관한 연구 보고는 거의 보고되지 않고 있어, 본 연구에서는 연골세포 내의 신호전달기전을 밝힘으로써 저강도 맥동성 초음파의 관절염 치료에 대한 기초 근거를 제시하고자 하였다.

저강도 맥동성 초음파의 강도를 달리하여 1 W/cm²와 0.25 W/cm²를 적용하여 세포의 증식을 확인한 결과 1 W/cm²를 적용했을 때는 오히려 세포의 증식이 24시간과 72 시간 배양 시 현저히 떨어지는 것을 관찰 할 수 있었으며, 0.25 W/cm² 적용 시에는 세포 증식이 유의하게 증가하였다(p<0.05). 이는 1 W/cm²로 사용 시 연골세포의 손상을 가져와 세포 증식을 오히려 억제하는 것으로 보여지며, 0.25 W/cm²의 경우 처리 시간이 증가 할수록 세포 증식이 증가되는 것은 각기 동일한 강도의 저강도 초음파라도 처리 시간이 길어질수록 시간에 비례하여 세포증식에 다른 영향을 주는 것이라 생각되어진다. Yang 등²⁴⁾은 1 MHz, 0.5 W/cm²의 이상의 강도로 초음파를 골절부위에 조사 시 가골 형성이 증가한다고 하였으나, *in vitro* 상에서 0.5 W/cm²의 이상의 경우는 오히려 세포증식을 억제하는 용량으로 보여 진다 하였다. 생체 내에서 신장(stretch)과 유압(shear stress)과 같은 기계적 스트레스는 특정 세포형태 내 DNA 합성을 유도하고, 기계적 스트레스는 세포의 신호조절에 관여하는 ERK1/2를 활성화 시킨다²⁵⁾. 본 연구결과에서 관절연골세포에서 0.25 W/cm²의 저강도 맥동성 초음파 처리 시 10분에서부터 유의한 p-ERK1/2의 증가가 관찰되었다. 다른 세포시스템 내에서 ERK1/2 활성화는 세포의 신장과 같은 직접적인 기계적 자극이 세포의 증식을 유도하며, 기계적 스트레스를 간접적으로 적용 시 비생리학적 기계적 에너지의 형태가 관여하는 것으로 보인다²⁶⁾. 이러한 p-ERK1/2의 증가는 결국 관절연골세포내의 DNA 합성을 촉진 하는 것으로 보여진다. Zhou 등²⁷⁾의 연구에서 사람의 피부섬유아세포에 1.5 MHz의 0.3 W/cm², 1:4의 맥동비로 세포에 처리 한 결과 integrin 수용기를 경유하여 ERK1/2 경로를 활성화 하였다고 하였다. 저강도 맥동성 초음파는 조직에 간접적인 기계적 자극을 줌으로써 다른 세포들 내에서 DNA 합성과 세포내 칼슘 유입, 단백질 합성과 골 생성 등을 증진시킨다고 보고되고 있다^{23,28)}, Choi 등²⁹⁾의 결과에서 C-28/I2 사람의 연골세포주 세포에서 0.2 W/cm²의 강도로 세포 주를 자극했을 때 Jun N-terminal kinase(JNK)와 extracellular signal-regulated kinase (ERK)를 경유하여 type II collagen과 aggrecan의 합성을 촉진시킨다고 하였다. 본 연구결과에서도 세포의 기질 물질의 증가는 검사하지 않았지만 0.25 W/cm²에서 p-ERK1/2의 활성화를 촉진하여 세포 증식에 영향을 주는 것으로 사료된다. 본 연구에서 사람의 퇴행성 골관절염과 같은 상황을 유도하기 위해 세포에 세포고사를 유도하는 물질로서 사용한 H₂O₂(hydrogen peroxide)는 높은 산화적 물질이며, 자유피라디칼의 하나로 단백질, 지질, 핵산의 산화 과정을 통해 세포고사를 유도하여, 세포 기능 손상과 세포 고사를 유도하게 된다. 세포 고사 유도 후 관절연골세포의 형태학적인 변화는 핵 내 분열이나 응축 등 전형적인 세포고사의 특징을 보였다. 관절연골

세포에 과산화수소수 50 μM 을 24시간 처리 후에 Hoechst 염색으로 관찰한 결과 연골세포의 핵 내 응축 현상이 현저히 일어났다. DiPietrantonio 등³⁰⁾에 의하면 H_2O_2 는 세포고사를 유도한다고 하였고, 이외 반응성 산소종(ROS), 일산화질소 등은 관절염, 세포노화, 암, 허혈성 손상 등의 다양한 질환을 유발하며 세포 내에서 많이 생성되어지는 물질로 알려져 있다. 본 연구에서는 과산화수소수로 유도한 세포고사에서 p-ERK1/2 활성화와 저강도 맥동성 초음파가 자극한 p-ERK1/2의 인산화는 PD 98059 (10^{-5}M)에서 유의한 차단 효과를 보였다. 따라서 관절연골세포에서 저강도 맥동성 초음파에 의한 ERK 경로를 통해 증식에 영향을 주는 것으로 보여진다. Xia 등³¹⁾에 의하면 JNK와 p-ERK는 anti-apoptosis kinase로서 일반적으로 세포내에서 발생되어지며, 세포 내 ERK1/2는 산화적 스트레스, TNF- α , 성장인자 결핍, 세포고사 유도제 등에 의한 세포고사 유발에 대응하여 세포를 보호하는 기능을 하는 세포신호전달자로 알려져 있다³²⁾. 이러한 것은 Fas와 관계된 세포고사 유도 시 ERK1/2의 세포고사전 역할에 대해 일부 보고된 바가 있다. Asada 등³³⁾의 연구에서 Bovine 관절연골세포에서 과산화수소수는 연골세포의 자가 고사를 유도하였으며, 이는 Ca^{2+} 신호전달과 p-ERK의 활성화를 통해 세포의 자가 고사를 유도한다고 하였다. 본 연구에서 염증성 사이토카인과 관련하여 저강도 초음파가 PGE₂의 농도에 미치는 영향을 관찰한 결과 저강도 초음파와 적용 시 산화적 스트레스로 인해 증가되었던 PGE₂가 유의하게 감소되었다. H_2O_2 로 인한 세포 내 염증성 물질인 PGE₂의 증가는 세포의 산화적 스트레스로 인한 물질로 생각되어지며, Reyes-Martin 등³⁴⁾의 연구에서 신장의 원위세뇨관 내 Madin-Darby cells (MDCK)에서 H_2O_2 를 이용하여 급성 신부전증을 유도 시에 S-ketoprofen은 cyclooxygenases (COX-1 and COX-2), PGE₂ 생성과 caspase 의존성 세포고사를 억제한다고 보고한바가 있다. Takahashi 등³⁵⁾에서는 퇴행성 골관절염 환자의 관절연골에서 NO와 관련하여 세포고사가 유도되었고 이러한 세포고사는 p38과 p44/42 MAPK신호전달계를 경유하여, 세포고사와 관련되는 PGE₂ 생성과 관련된다고 하였다.

본 연구에서는 임상분야에서 관절염 치료에 사용하는 초음파 치료에 대한 세포수준에 미치는 메카니즘을 연구하였다. 저강도 맥동성 초음파는 세포내 특정 신호전달체계인 ERK1/2를 거쳐 세포 증식에 변화에 영향을 미치고 있음을 관찰하였다. 이러한 결과를 바탕으로 좀더 다양한 변수의 초음파를 적용하여 초음파가 세포내 어떠한 수용기와 다른 신호전달체계에도 어떤 경로를 거쳐 작용을 하는지 구체적인 연구들이 다각적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 단층 배양한 관절 연골세포에서 저강도 맥동성 초음파(low-intensity pulsed ultrasound)의 비 열적 효과와 관련하여 세포신호전달 기전에 대해 알아보고자 하였다. 연골세포에서 초음파를 1 W/ cm^2 와 0.25 W/ cm^2 의 강도로 0, 1, 2, 5, 10분간 처리하여 24시간과 72시간 후에 연골세포의 생존율을 관찰한

결과 1W/ cm^2 로 처리한 후 24시간과 72시간 후 변화는 0분일 때보다 시간 의존적으로 세포 증식이 유의한 세포증식의 억제효과를 보였으며($p<0.001$), 0.25 W/ cm^2 의 강도에서는 0분일 때보다 시간 의존적으로 유의한 세포증식의 효과를 보였다($p<0.001$). 저강도 맥동성초음파 0.25 W/ cm^2 를 5분 동안 처리한 후 10분 후부터 p-ERK가 발현되기 시작하여 시간이 증가함에 따라 점차 증가되어 60분에 최대로 발현된 후 90분부터 감소하였다. 과산화수소수, 저강도 초음파는 p-ERK의 활성화를 증가시켰으며 이러한 ERK 증가는 PD 98059(10^{-5}M)에 의해 유의한 활성화 억제 반응을 보였다($P<0.05$). 또한 세포질 내 PGE₂의 농도감소에도 유의한 영향을 미쳤다. 결론적으로, 본 연구에서 관절연골세포에서 저강도 맥동성 초음파는 ERK를 매개로 관절연골세포의 증식과 ERK 발현 및 PGE₂ 농도변화에 영향을 미쳐 세포 증식 관련 신호전달에 관여하는 것으로 보인다. 본 연구 결과를 바탕으로 하여 저강도 맥동성 초음파와 관절연골세포의 신호전달기전에 있어 ERK1/2가 중요한 영향을 미칠 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술재단의 지역혁신인력양성사업으로 수행된 연구결과이며, 참여기업인 화순전남생약협동조합에 감사드립니다.

참고문헌

- Mitrovic, D., Quintero M., Stankovic, A., Ryckewaert, A. Cell density of adult human femoral condylar articular cartilage. Joints with normal and fibrillated surfaces. Lab Invest 49(3):309-316, 1983.
- Gardner, D.L. Problems and paradigms in joint pathology. J Anat. 184: 1749-1755, 1994.
- Hannan, M.T., Anderson, J.J., Zhang, Y., Levy, D., Felson, D.T. Bone mineral density and knee osteoarthritis in elderly men and women. The Framingham Study. Arthritis Rheum 36(12):1671-1680, 1993.
- Felson, D.T., Lawrence, R.C., Hochberg, M.C., McAlindon, T., Dieppe, P.A., Minor, M.A., Blair, S.N., Berman B.M., Fries J.F., Weinberger M., Lorig K.R., Jacobs J.J., Goldberg V. Osteoarthritis: new insights. Part 2: treatment approaches. Ann Intern Med. 133: 726-737, 2000.
- Lee, S.W., Lee, H.J., Chung, W.T., Choi, S.M., Rhyu, S.H., Kim, D.K., Kim, K.T., Kim J.Y., Kim, J.M., Yoo Y.H. TRAIL induces apoptosis of chondrocytes and influences the pathogenesis of experimentally induced rat osteoarthritis. Arthritis Rheum. 50(2):534-542, 2004.
- Hashimoto, S., Setareh, M., Ochs, R.L., Lotz, M. Fas/Fas ligand expression and induction of apoptosis in chondrocytes. Arthritis Rheum. 40(10):1749-1755, 1997.

7. Mow, V.C., Wang, C.C. Some bioengineering considerations for tissue engineering of articular cartilage. *Clin Orthop Relat Res.* 367: 204-223, 1999.
8. Chang, W., Tu, C., Chen, T.H., Komuves, L., Oda, Y., Pratt, S.A., Miller S., Shoback D. Expression and signal transduction of calcium-sensing receptors in cartilage and bone. *Endocrinology* 140(12):5883-5893, 1999.
9. Doan, N., Reher, P., Meghji, S., Harris, M. In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts, and monocytes. *J. Oral Maxillofac Surg.* 57(4):409-419, 1999.
10. Setton, L.A., Mow, V.C., Muller, F.J., Pita, J.C., Howell, D.S. Mechanical behavior and biochemical composition of canine knee cartilage following periods of joint disuse and disuse with remobilization. *Osteoarthritis Cartilage* 5(1):1-16, 1997.
11. Huang, M.H., Ding, H.J., Chai, C.Y., Huang, Y.F., Yang R.C. Effects of sonication on articular cartilage in experimental osteoarthritis. *J. Rheumatol.* 24(10):1978-1984, 1997.
12. Que, F.G., Gores, G.J. Cell death by apoptosis: basic concepts and disease relevance for the gastroenterologist. *Gastroenterology.* 110(4):1238-1243, 1996.
13. Pelletier, J.P., Jovanovic, D.V., Lascau-Coman, V, Fernandes, J.C., Manning, P.T., Connor, J.R., Currie, M.G., Martel-Pelletier, J. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthesis reduces progression of experimental osteoarthritis in vivo. *Arthritis Rheum.* 43(6):1290-1299, 2000.
14. Raucci, A., Laplantine, E., Mansukhani, A., Basilico, C. Activation of the ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates fibroblast growth factor-induced growth arrest of chondrocytes. *J. Biol Chem.* 279(3):1747-1756, 2004.
15. Chang, L., Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410(6824):37-40, 2001.
16. Cano, E., Mahadevan, L.C. Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem Sci.* 20(3):117-122, 1995.
17. Wang, X., Martindale, J.L., Liu, Y., Holbrook, N.J. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem J.* 333: 291-300, 1998.
18. Schortinghuis, J., Bronckers, A.L., Stegenga, B., Raghoobar, G.M. de Bont, L.G. Ultrasound to stimulate early bone formation in a distraction gap: a double blind randomised clinical pilot trial in the edentulous mandible. *Arch Oral Biol.* 50(4):411-420, 2005.
19. Cook, S.D., Ryaby, J.P., McCabe, J., Frey, J.J., Heckman, J.D., Kristiansen T.K. Acceleration of tibia and distal radius fracture healing in patients who smoke. *Clin Orthop.* 337: 198-207, 1997.
20. Chapman, I.V., MacNally, N.A., Tucker, S. Ultrasound-induced changes in rates of influx and efflux of potassium ions in rat thymocytes in vitro. *Ultrasound Med Biol.* 6(1):47-58, 1980.
21. Parvizi, J., Wu, C.C., Lewallen, D.G., Greenleaf, J.F., Bolander, M.E. Low-intensity ultrasound stimulates proteoglycan synthesis in rat chondrocytes by increasing aggrecan gene expression. *J. Orthop Res.* 17(4):488-494, 1997.
22. Rubin, C., Bolander, M., Ryaby, J.P., Hadjiargyrou, M. The use of low-intensity ultrasound to accelerate the healing of fractures. *J. Bone Joint Surg Am.* 83A(9):259-270, 2001.
23. Naruse, K., Miyauchi, A., Itoman, M., Mikuni-Takagaki, Y. Distinct anabolic response of osteoblast to low-intensity pulsed ultrasound. *Bone Miner Res.* 18(2):360-369, 2003.
24. Yang, K.H., Choi, C.H., Cho, J.H. Stimulation of fracture healing by low intensity pulsing ultrasound. *The Journal of the Korean Society of Fracture* 11(2):247-253, 1998.
25. Kumar, A., Chaudhry, I., Reid, M.B., Boriak, A.M. Distinct signaling pathways are activated in response to mechanical stress applied axially and transversely to skeletal muscle fibers. *J. Biol Chem.* 277(48):46493-46503, 2002.
26. Pouyssegur, J., Volmat, V., Lenormand, P. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol.* 64(5-6):755-763, 2002.
27. Zhou, S., Schmelz, A., Seufferlein, T., Li, Y., Zhao, J., Bachem M.G. Molecular mechanisms of low intensity pulsed ultrasound in human skin fibroblasts. *J. Biol Chem.* 279(52):54463-54469, 2004.
28. Chen, Y.J., Wang, C.J., Yang, K.D., Chang, P.R., Huang, H.C., Huang, Y.T., Sun Y.C., Wang F.S. Pertussis toxin-sensitive Galphai protein and ERK-dependent pathways mediate ultrasound promotion of osteogenic transcription in human osteoblasts. *FEBS Lett.* 554(1-2):154-158, 2003.
29. Choi, B.H., Choi, M.H., Kwak, M.G., Min, B.H., Woo, Z.H., Park S.R. Mechanotransduction pathways of low-intensity ultrasound in C-28/I2 human chondrocyte cell line. *Proc Inst Mech Eng.* 221(5):527-535, 2007.
30. DiPietrantonio, A.M., Hsieh, T., Wu, J.M. Activation of caspase 3 in HL-60 cells exposed to hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 255(2):477-482, 1999.
31. Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J., Greenberg, M.E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270(5240):1326-1331, 1995.
32. Stadheim, T.A., Kucera, G.L. Extracellular signal-regulated

- kinase (ERK) activity is required for TPA-mediated inhibition of drug-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 245(1):266-271, 1998.
33. Asada, S., Fukuda, K., Nishisaka, F., Matsukawa, M., Hamanisi C. Hydrogen peroxide induces apoptosis of chondrocytes; involvement of calcium ion and extracellular signal-regulated protein kinase. *Inflamm Res.* 50(1):19-23, 2001.
34. Reyes-Martin, P., Alique, M., Parra, T., Hornedo, J.P., Lucio-Cazana J. Cyclooxygenase-independent inhibition of H₂O₂-induced cell death by S-ketoprofen in renal cells. *Pharmacol Res.* 55(4):295-302, 2007.
35. Takahashi T., Ogawa Y., Kitaoka K., Tani T., Uemura Y., Taguchi H., Kobayashi T., Seguchi H., Yamamoto H., Yoshida S. Selective COX-2 inhibitor regulates the MAP kinase signaling pathway in human osteoarthritic chondrocytes after induction of nitric oxide. *Int J. Mol Med.* 15(2):213-219, 2005.