대한임상전기생리학회 제3권 제1호
Journal of the Korean Academy of Clinical Electrophysiology
Vol. 3, No. 1, 2005.

초음파가 닭의 관절연골에 미치는 영향

최 보 경
(현대의원 물리치료실)
이 재 형
(원광보건대학 물리치료과)
박 장 성
(서남대학교 물리치료학과)

Effects of Ultrasound on Cell Proliferation from Chicken Articular Cartilage Explants Culture

Choi Bo-Kyung,
(Dept. of Physical Therapy, Hundai Clinic)
Lee Jae-Hyoung
(Dept. of Physical Therapy, Wonkwang Health Science College)
Park Jang-Sung
(Dept. of Physical Therapy, Seonam University)

This study was performed to examine the effects of therapeutic doses of ultrasound on cell migration distance and proliferation of biopsies from articular cartilage. Articular cartilage biopsies were isolated from proximal part of the tibial of chicken, and cultured. Cartilage explants were exposed for a single 5 min to ultrasound with 0.1~1.6 W/㎠ (spatial average-temporal average) at a frequency of 1 ㎒. A control group was treated with the ultrasound generator switched off. The cell migration distance and cell

proliferation analysis were performed on day 6 after stimulation of ultrasound. The results revealed that ultrasound influenced cell migration distance and cell proliferation in intensity-dependent manner. It was found that ultrasounds at 0.2 W/㎠, 0.4 W/㎠, and 0.8 W/㎠ were significantly increase respectively both cell migration distance and cell proliferation ($p<0.05$). However, cell migration distance and cell proliferation were not affected by exposure ultrasound at 0.1 W/㎠ and 1.6 W/㎠ compared with control group. These results suggest that low-intensity ultrasounds at 0.2 W/㎠, 0.4 W/㎠, and 0.8 W/㎠ may stimulate cell proliferation of the chondroblasts, and reflect a potential role in cartilage repair.

Ⅰ. 서 론

관절염은 모든 연령과 인종 군들에게 영향을 주는 여러 질환들이 하나로 결합된 형태이다(Shah 등, 2005). 통증, 강직, 관절가동범위 제한이 관절염의 주요 증상으로 나타나며(Najm 등, 2004), 기능적, 사회적 활동 및 상호관계, 사회경제적 상태, 신체 이미지, 감정적인 안녕을 포함하여 일상생활에서 장애를 초래하는 주요한 원인 중의 하나이다(Carr, 1999; Shah 등, 2004). 여러 나라에서 노인인구 수가 증가함에 따라 관절염의 이환율은 급격히 증가될 것으로 보고 있으며, 미국의 경우 1997년에 4천 3백만에서 2020년에 6천만으로, 캐나다에서는 1991년과 2031년 사이에 2천 9백만에서 6천 5백만으로 증가될 것으로 예상하고 있다(Dominick 등, 2004).

퇴행성관절염은 특히 나이가 들어감에 따라 증가되는 가장 흔한 만성질환 중 하나로(Najm 등, 2004), 주로 슬관절과 고관절에 침범되고 손, 발, 척추 역시 많은 영향을 받으며(Thomas 등, 2004), 우리나라의 경우 60세 이상의 노인에서 약 80% 정도의 유병율을 보인다(우정임, 2003). 이러한 퇴행성관절염은 그 동안의 많은 연구에도 불구하고 그 원인은 잘 알려져 있지 않았고 단지 여러 가지 요인이 복합적으로 작용할 것이라는 것에 일반적으로 같은 견해를 보이며(Mansell과 Bailey, 1998) 유전적, 발달적, 대사적, 그리고 외상적인 요인들을 포함하는 여러 요인들이 퇴행성관절염을 유발할 수 있다는 것이 보통 가정되고 있다(Reginato와 Olsen, 2002). 그러나 병리적 요인에 관계없이 퇴행성관절염은 관절연골의 중점적인 퇴행과 새로운 골 형성으로 특징되고(Sipe, 1995), 연골의 손상, 연골하 뼈의 변화, 관절 주변에 골 증식체가 형성되는 활막관절의 질환으로 나타난다(Thomas 등, 2004). 또한, 이차적인 골 변화를 동반하는 관절공간의 협소와 함께 관절연골의 손실이 있다고 제시됨으로써 퇴행성관절염에 대한 주 연구는 관절연골에 초점을 두었으며, 관절연골의 손실은 관절을 파괴하고 통증을

유발하며 장애에 대한 초기반응으로 나타난다고 알려져 있다(Mansell과 Bailey, 1998).

퇴행성관절염에 대한 병리학적인 기전이 정확하게 규명 되지 않고 있기 때문에 치료방법 또한 명확하게 개발되어 있지는 않다. 현재까지 사용되고 있는 퇴행성관절염의 치료방법으로는 체중감소, 근력강화 운동을 포함한 물리치료, 작업치료(James와 Uhi, 2001; Miyaguchi 등, 2003; Huang 등, 2003), 침, 맛사지, 자석치료, 식이요법(Najm 등, 2004), 통증의 완화를 목적으로 하는 진통성의 약제(Moreland, 2003), 관절내 주사(Arroll와 Goodyear-Smith, 2004), 염증을 감소시키는 약물치료(Bookman 등, 2004)가 있다. 또한 관절 재정렬 같은 수술적인 과정들은 수세월 동안 환자의 통증완화를 목적으로 적용되었고 결국 고관절, 슬관절 같은 주요 체중부하관절에서 손상 부위가 큰 경우 인공관절로 대치해주는 인공관절 전치환술(Archer와 Francis-West, 2003)과 관절연골의 재생을 위한 미세천공술(Jakob 등, 2001)이 사용되어 왔다. 또한 관절연골의 자체 치유능력이 부족함을 고려하여 연골 조직에의 레이저자극(Guerino 등, 2000)과 세포를 이용한 자가연골세포이식술(Zarins와 Parsons, 1997), 체외에서 공학 제작된 연골이식술(Barbero 등, 2004)을 관절연골 치유방법으로 제시하고 있으며, 퇴행성 관절질환들의 연골치유를 촉진하기 위한 유전자적 치료 접근도 제안되고 있다(Venkatesan 등, 2004).

초음파는 인간의 가청 범위인 20 ㎑ 보다 훨씬 높은 주기의 음파장으로 1927년 Wood와 Loomis가 처음으로 초음파의 치료적 적용에 대해 보고한 이래 물리치료, 치과, 정형외과적 수술, 암치료, 진단영역에서 사용되고 있다(Leung 등, 2004; ter Haar, 1999). 물리치료 분야에서 초음파는 가장 많이 사용되는 전기 물리적 치료방법인 동시에(Warden과 McMeeken, 2002) 인대 및 근육, 뼈, 관절의 치료목적으로도 사용되며, 주로 사용되는 주파수는 0.5~5 ㎒이다(Leung 등, 2004). 초음파는 조직에 열 효과와 기계적 효과를 일으켜 국소적인 대사와 순환증진, 결합조직의 신장성을 증가시키고 조직의 재생을 촉진시킨다(Van der Windt 등, 1999). 치료용 초음파의 강도는 전통적으로 0.125~3 W/㎠의 저강도와 5 W/㎠ 이상의 고강도로 분류되고 있으며(ter Haar, 1999), 각 강도와 자극방법에 따라 인체에 대한 열효과와 비열효과를 가진다.

초음파의 조직에 대한 열 효과는 궁극적으로 세포들의 활성을 촉진시켜 조직의 치유와 기능증진을 목적으로 물리치료에서 주로 사용되고 있으나 생체학적으로 조직과 상호작용하는 초음파의 치료적 범위는 비열효과에 의해서이다(Reher 등, 2002). 저강도의 초음파자극으로 생성되는 비열효과는 조직재생의 자극(Yang 등 1996; Barnett 등, 1997), 항염증 반응의 가속(ter Haar, 1999), 혈관신생(Young과 Dyson, 1990), 만성적인 허혈성 근육에서의 혈류(Hogan 등, 1982; Fabrizio 등, 1996), 궤양 치유(Nussbarm 등, 2003), 허혈성-정맥류성 궤양의 치유(Dyson 등, 1976), 섬유모세포 증식 및 단백합성 증가(Harvey 등, 1975), 건 치유(Cunha 등, 2001) 등의 연부조직에 적용해 왔다.

뼈에서의 초음파 효과는 1965년에 Knoch

와 Klug이 최초로 저강도 초음파를 사용하여 동물모델에서의 골절치유에 응용하였으며, 초음파가 골절면에 부딪힐 때 골표면의 압전위를 변화시켜 가골 형성을 촉진시킨다는 것이 발견되었다(김종만, 2000). 그 후 여러 연구들에서 골형성과 골절치유에서의 저강도 초음파치료의 긍정적인 효과를 증명하였고, 사람에 있어서 저강도 초음파는 이 중맹검법의 임상적 연구에서 경골 골절과, 요골 골절의 치유속도를 가속시켰다(Cook 등, 1997; Heckman 등, 1994; Kristiansen 등, 1997).

초음파의 효과에 대한 연구는 관절연골에서도 보고되었는데, Huang 등(1997, 1999)은 실험적인 퇴행성관절염의 연골 재건에 초음파의 효율성을 보고 하였고, Cook 등(2001)은 연골 결손의 토끼에게 초음파를 적용하여 관절 연골치유가 증진된 것을 보고하며 연골손상의 관리에 대한 치료방법의 하나로 제안하였다. 또한 몇몇 연구들은 세포수준에서의 연골에 대한 저강도 초음파의 효과를 보고하였다. Yang 등(1996)은 쥐의 대퇴 골절면에 0.5 ㎒의 주파수와 0.05 W/㎠와 0.1 W/㎠(SATA)의 강도로 초음파를 자극하여 가골에서 연골세포에 의한 aggrecan 유전자 발현이 증가되었음을 보고하였고, Parvizi 등(1999)은 신생쥐의 대퇴과에서 연골세포를 배양하여 1.0 ㎒의 주파수와 0.05 W/㎠와 0.1 W/㎠(SATA)의 강도로 초음파를 자극한 결과 연골세포의 증식은 관찰되지 않았으나 연골세포에 의한 aggrecan 유전자 발현이 증가되었다고 보고하여 저강도 초음파가 연골세포의 활성을 자극하여 골화를 촉진한다고 하였다. 그러나 이 두 연구에서 이용된 연골세포는 석회화 쪽으로 발달시켜졌기 때문에 이들 연구들은 연골내 골화에는 특별한 관련성이 있겠지만 석회화 되지 않는 관절연골의 연골세포에는 관련성이 적다. 더구나 배양에서 연골세포에 대한 초음파 연구들은 연골세포가 섬유모세포로 역분화하는 경향이 있는 단층배양에서 수행되었거나, 비교적 고강도의 초음파를 사용하였고(Zhang 등, 2003), 배양에서 골형성을 자극한 저강도 초음파는 높은 강도에서의 초음파로 같은 반응을 나타내지 못했다(Reher 등, 1997). 배양된 인간피부섬유모세포를 이용한 Harvey 등(1975)은 교원질과 비교원질의 단백질합성의 증가를 알아냈고 이것은 강도에 의존하며, 저강도 연속 초음파(0.5 W/㎠)로 적용한 섬유모세포는 콜라겐 분비 증가를 20% 보였고, 저강도 맥동 초음파 [0.5 W/㎠(SATA)] 에서는 30% 증가됨을 보였다(Reher, 1997). Zhang 등(2002)은 배양에서 저강도 초음파로 연골세포들을 자극한 결과, 연골세포의 비대 증가로 골형성을 자극하고, 초자연골에서는 연골세포의 비대를 유도하지 않고 증가된 기질 합성이 연골치유에 잠재적 역할을 한다고 하였다. 또한 동물실험 결과 초음파에 의해 활성화된 연골세포에서 골형성 유전자의 발현보다는 단백당이나 제2형 교원질의 발현을 상승시켜 연골의 구조를 유지하고 있는 교원질망을 보호함으로써 연골의 파괴나 분해를 방지하는 효과가 있다고 하였다(우정임, 2003).

연골치유에 대한 저강도 초음파 효과들의 기초가 되는 기전을 밝혀내는데 어려운 요인들 중의 하나는 목표세포들에 궁극적으로 전달되는 초음파 에너지를 결정하는 것이다

(Hadjiargyrou 등, 1998). 임상에서 성공적으로 관절연골의 재생 및 치유를 촉진시킬 수 있는 여러 가지 치료적 요인들을 규명하기 위해 많은 연구자들이 노력하고 있다. 그러나 인간의 관절연골조직 표본을 채취하는데 관계된 윤리적인 고려사항들 때문에 활발한 연구가 제한된다. 이러한 이유로 슬관절 퇴행성관절염의 특징을 가장 근접하게 설명할 수 있는 동물들의 관절을 표본으로 한 연구가 진행되어 왔다(Anderson-MacKensie 등, 2005).

이에 본 연구에서는 저강도 초음파자극이 관절연골 조직에 미치는 영향을 알아보기 위하여 닭의 슬관절 연골조직에 초음파를 자극하여 배양 관절연골에서의 세포이동 거리와 관절연골 조직에서 연골세포의 증식 정도를 비교함으로써 초음파의 자극 강도가 관절연골 조직의 세포증식에 미치는 영향을 알아보았다.

II. 재료 및 방법

1. 연구 재료

본 연구는 익산 미림 축사에서 사육중인 Loss계 닭을 대상으로 이루어졌으며, 닭의 체중은 약 1.6~1.7 ㎏이었다. 본 연구에 사용된 닭은 건강 상태가 양호할 뿐만 아니라 사육장에서 고형사료와 물로 사육하였으며, 명암주기는 12시간을 주기로 조절하였다.

2. 연구방법

1) 관절연골 조직의 적출 및 배양

본 연구에서 사용한 관절연골 조직은 닭의 슬관절의 경골 상부에서 적출하였다. 관절연골 조직을 적출하기 위하여 깃털과 이물질을 제거한 후 깨끗하게 수세한 후 다시 알코올로 닦았다. 각각의 슬관절에서 연골조직 전층을 모두 포함하도록 연골하골에 인접한 면까지 적출하여 2×2 ㎜(30~35 ㎎)의 크기로 2~3 개씩 생검 하였다. 생검한 연골 절편은 24 well polystyrene 조직배양 접시(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)의 각 well 에 5 조각씩 넣고 관절연골 조직이 충분히 잠길 정도로 5% fetal bovine serum(FBS)(TerraCell, USA)과 penicillin-streptomycin (PS)(Gibco BRL, USA)이 첨가된 M199 배양액을 첨가하여 항온배양기(Model 2210, Queue Systems, USA)에 온도 37℃, CO_2 5%/O_2 95% 조건에서 1시간 방치하였다. 그 후 각각의 well에 새로운 배양액을 채우고 다시 항온배양기에 24 시간 배양하였다.

초음파 적용 24시간 후에 관절연골 생검편을 24 well polystyrene 조직배양접시에 옮기고 생검편의 위에 2 ㎎/㎖ bovine thrombin 용액(Sigma, Prod. No. T4648, USA) 5 ㎕을 첨가한 후 4 ㎎/㎖ bovine fibrinogen 용액(Sigma, Prod. No. F8630, USA) 50 ㎕를 첨가하여 포매한 다음 M199 배양액 1 ㎖를 첨가하여 1 주일 동안 항온배양기에서 배양하였다. 배양기간 동안 날마다 배양액을 교환해 주었다. 실험에서 사용된 배양액은 10% FBS와 50 ㎍/㎖ streptomycin, 50 units/㎖ penicillin이 함유된 antibacterial-antifungal

solution(Gibco, Grand Island, NY)을 첨가한 M199(Sigma, Prod. No. M-5017, USA)를 사용하였고 37℃의 온도를 유지하면서 CO_2 5%/O_2 95%를 공급하여 배양하였다.

2) 초음파 자극

초음파 자극을 위해 6 well polystyrene 조직배양접시(Cellstar, Greiner Labortechnik Ltd, Gloucestershire, UK)에 배양액 5 ㎖를 첨가한 후 각기 다른 관절에서 얻은 생검편을 well에 각각 1 개씩의 생검편을 넣었다. 초음파 자극은 0~1.6 W/㎠ 범위의 각기 다른 강도에서 각각의 well에 5 분 동안 자극하였고, 초음파 자극이 적용된 생검편들은 새로운 24 well 조직배양접시에 배양액 1 ㎖를 첨가하여 각 well에 1개의 생검편을 넣어서 배양하였다. 본 연구에서 초음파 자극기는 변환기의 효과방출면적(ERA)이 0.8 ㎠ 인 Sonopuls 434(Enraf Nonius, P.O. Box 810 2600 AV Delft, The Netherland)를 사용하였다. 초음파의 자극 주파수는 1 ㎒ 이었고, 자극 강도는 대조군에 0 W/㎠, 실험군은 0.1 W/㎠, 0.2 W/㎠, 0.4 W/㎠, 0.8 W/㎠, 1.6 W/㎠를 각각 적용하였다. 관절연골 생검편들에 초음파 적용을 위하여 37℃가 유지되는 수조에 물을 채우고, 바닥면과 네 방향면에 5 ㎜ 두께의 고무판을 부착시켰으며 바닥면에서 5 ㎝ 높이에 초음파를 조사할 때 조직배양접시가 움직이지 않도록 고정시킬 수 있는 틀을 제작하였다. 관절연골 조직의 생검편들에 초음파의 자극은 조직배양접시의 위에서 직접 초음파 변환기를 접촉하여 자극하였고 대조군은 실험군과 동일한 방법으로 자극하였으나 초음파 전원을 작동시키지 않았다.

3) 연골세포 이동 거리 측정

세포이동거리는 위상차도립현미경(Olympus, Tokyo, Japan)의 대안렌즈에 micrometer를 삽입하여 연골 생검편 가장자리에서부터 연골모세포가 최대로 이동한 거리를 네 부위에서 측정하여 평균이동거리(㎜)를 산출하였다.

4) 연골세포의 증식 측정

연골세포의 증식은 MTS[3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] colorimetric assay 방법을 사용하였다. 배양시작 후 7일째에 24 well에서 연골조직을 제거하고 각 well에 Cell Titer96®(Promega, Prod No. G3580, USA) 150 ㎕를 처리하고 배양기에서 2 시간 동안 배양하여 발색을 유도하였다. 그 후 24 well 조직배양접시에서 배양액의 100 ㎕를 96 well 조직배양접시에 옮겨 담은 다음 MTS가 formazan으로 분해되는 양을 enzyme linked imino sorbant analyser(ELISA) reader(EIA 2552, Bio-Rad Laboratories, USA)를 이용하여 490 ㎚에서의 흡광도(optical density, OD)를 측정하였다. 각각의 처리군은 10 well씩 60 well을 준비하여 실험하였고 초음파 자극 강도에 따른 연골 세포의 증식 효과는 60 well 각각에서 얻어진 값을 취하였다.

3. 통계분석

초음파 자극이 배양 연골조직의 증식에

미치는 영향을 규명하기 위해 0.1 W/㎠, 0.2 W/㎠, 0.4 W/㎠, 0.8 W/㎠, 1.6 W/㎠ 강도의 초음파 자극군과 대조군의 연골세포의 이동거리와 흡광도를 일원분산분석(analysis of variance, ANOVA) 하였으며, 유의한 차이가 있는 경우 Duncan 다중순위검정으로 사후 검정하였고, 유의수준은 0.05 이하로 하였다. 모든 통계분석은 SPSS/WIN 10.0을 사용하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 초음파 자극에 따른 연골세포의 이동거리

적출 관절연골 배양 7일째에 위상차도립현미경으로 연골 생검편 가장자리에서 부터 연골세포가 최대로 이동한 거리를 측정한 결과 0.0 W/㎠에서 1.06 ㎜, 0.1 W/㎠는 1.04 ㎜, 0.2 W/㎠는 1.28 ㎜, 0.4 W/㎠는 1.21 ㎜, 0.8 W/㎠는 1.24 ㎜, 1.6 W/㎠는 1.03 ㎜ 이동하였다(표 1). 이들 측정값들을 일원분산분석한 결과 0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 W/㎠의 강도에 따라 세포이동거리가 유의한 차이를 보였으며, Duncan 다중순위검정으로 사후 검정한 결과 0.2, 0.4, 0.8 W/㎠ 강도의 초음파 자극군이 대조군과 0.1, 1.6 W/㎠ 강도의 초음파 자극군보다 유의하게 증가되었다($p<0.05$)(그림 1).

Table 1. Distance(㎜) of migration by ultrasound exposure in articular cartilage of tibia explants from Loss chicken

Intensity(W/㎠)	n	Mean	SD	95% Confidence Interval for Mean	
				Lower Bound	Upper Bound
0.0	10	1.06	0.12	0.97	1.14
0.1	10	1.04	0.17	0.92	1.16
0.2	10	1.28	0.21	1.13	1.43
0.4	10	1.21	0.16	1.10	1.32
0.8	10	1.24	0.20	1.09	1.38
1.6	10	1.03	0.15	0.92	1.14

The results were calculated the mean ± SD for 6 experiments

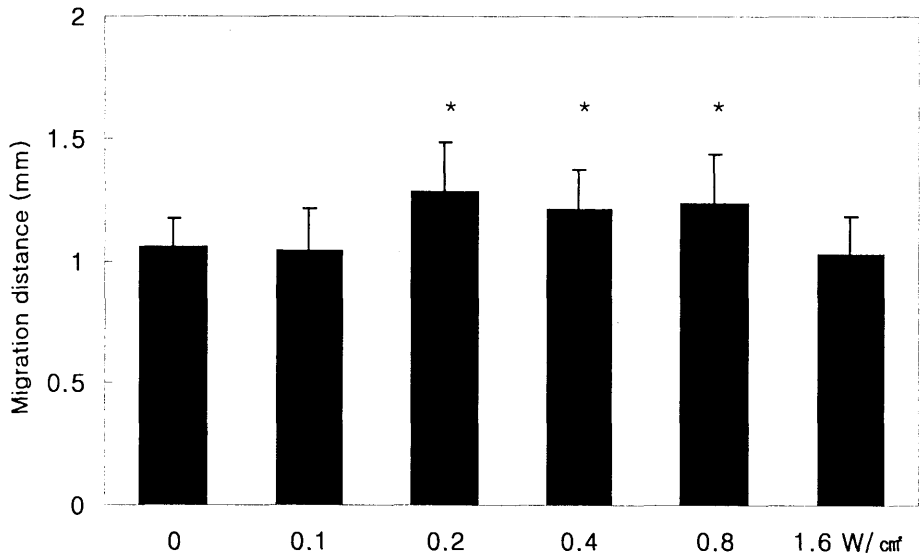

Fig 1. A comparison of the effect of shame and ultrasound with various intensities on migration distance of cells from articular cartilage biopsies. Migration distances were measured on 7 days after explants culture. Ultrasound at 0.2, 0.4, and 0.8 W/㎠ had significantly increased migration of chondroblasts from articular cartilage biopsies.

Values are the mean±SD(n=10).

Asterisk(*) denotes a significant difference($p<0.05$).

2. 초음파 자극에 따른 세포증식 측정

적출 관절연골 배양 시작 7일째에 490 ㎚에서 흡광도를 측정한 결과 초음파 자극 강도에 따른 대조군과 실험군에서 평균 흡광도는 대조군이 0.58, 0.1 W/㎠는 0.57, 0.2 W/㎠는 0.64, 0.4 W/㎠는 0.67, 0.8 W/㎠는 0.67, 1.6 W/㎠는 0.57 이었다(표 2). 초음파 강도에 따른 흡광도를 일원분산분석한 결과 0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 W/㎠의 강도에 따라 유의한 차이를 보였으며, 이를 Duncan 다중순위검정으로 사후 검정한 결과 0.2, 0.4, 0.8 W/㎠ 강도의 초음파 자극군이 대조군과 0.1, 1.6 W/㎠ 강도의 초음파 자극군보다 유의하게 증가되었다($p<0.05$) (그림 2).

Table 2. Optical density by MTS assay in articular cartilage of tibia explants from Loss chicken after ultrasound exposure

Intensity(W/㎠)	n	Mean	SD	95% Confidence Interval for Mean	
				Lower Bound	Upper Bound
0.0	10	0.58	0.06	0.54	0.63
0.1	10	0.57	0.10	0.50	0.64
0.2	10	0.64	0.10	0.56	0.71
0.4	10	0.67	0.08	0.61	0.73
0.8	10	0.67	0.09	0.61	0.74
1.6	10	0.57	0.08	0.51	0.62

The results were calculated the mean±SD for 6 experiments

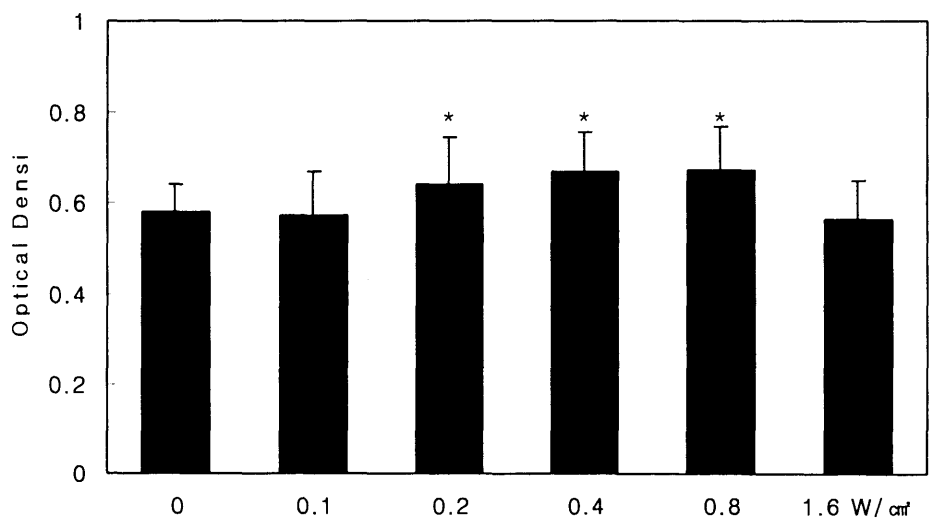

Fig 2. A comparison of the effect of shame and ultrasound with various intensities on optical densities of cells from articular cartilage biopsies. Optical densities were measured on 7 days after explants culture. Ultrasound at 0.2, 0.4, and 0.8 W/㎠ had significantly increased migration distance of chondroblasts from articular cartilage biopsies.

Values are the mean±SD(n=10).

Asterisk(*) denotes a significant difference($p<0.05$).

Table 3. ANOVA of mean migration distance of tissue biopsies from articular cartilage

	SS	df	Mean Square	F	p
Between Groups	0.637	5	0.127	4.435	0.002
Within Groups	1.551	54	2.87202		
Total	2.188	59			

Table 4. ANOVA of mean optical density of tissue biopsies from articular cartilage

	SS	df	Mean Square	F	p
Between Groups	0.122	5	2.44902	3.175	0.014
Within Groups	0.416	54	7.71303		
Total	0.539	59			

Ⅳ. 고 찰

본 연구에서는 저강도 초음파 자극이 관절연골조직 생검편의 연골모세포의 세포이동과 증식을 촉진하는 것으로 나타났다. 세포이동거리와 세포증식을 측정한 결과 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 W/㎠의 자극군과 대조군 사이에 유의한 차이가 있었으며, 0.2, 0.4, 0.8 W/㎠ 강도로 조사된 초음파 자극군이 대조군과 0.1, 1.6 W/㎠ 강도로 조사된 자극군에 비해 세포이동거리와 세포의 증식율이 유의하게 증가되었음을 보였다. 연골세포의 증식에 유효한 저강도 초음파 자극강도는 0.002~0.03 W/㎠(Cook 등, 2001), 맥동강도 0.1~0.77 W/㎠, 0.1 W/㎠와 0.5 W/㎠(Wiltink 등, 1995), 0.05~0.12 W/㎠(Parvizi 등, 1999), 0.04~0.7 W/㎠(우정임, 2003), 0.25~1 W/㎠(성진형 등, 1999)로 연구자에 따라 다양한 범위를 제시하고 있다. 따라서 본 연구에서 효과적인 초음파 강도를 알아내기 위하여 0.1 W/㎠, 0.2 W/㎠, 0.4 W/㎠, 0.8 W/㎠, 1.6 W/㎠의 강도들 간에 연골세포 증식율의 효과를 비교한 결과, 0.2, 0.4, 0.8 W/㎠군이 대조군과 0.1, 1.6 W/㎠보다 유의한 증가를 보였고, 연골세포의 이동거리를 비교한 결과에서도 같은 효과를 보였다.

Zhang 등(2002)은 배아상태의 16일 된 닭에서 원위부 흉골의 초자성 연골조직과 근위부 흉골의 골화성 연골조직을 배양하여 분화단계에서 연골세포의 기질합성에 대한 저강도 초음파(1.5 ㎒, 0.03 W/㎠)의 영향을 보고하였는데, 골화성 연골조직에 대한 초음파의 효과는 연골세포의 비대를 증가시켜 골 형성을 자극하고, 초자성 연골조직에의 연골세포는 비대를 유도하지 않고 기질의 합성을 증가시킨다고 보고하였다. Zhang 등(2003)은 또한 배아상태의 16일 된 닭에서 원위부 흉골의 초자성 연골세포를 배양

하여 세포증식에 대한 초음파(1.5 ㎒, 0.002 W/㎠와 0.03 W/㎠)의 영향을 배양기간 1, 3, 5, 7 일에 관찰하였는데, 초음파 자극 3 일에 0.002 W/㎠는 연골세포의 증식이 현저했지만 일시적이었고, 0.03 W/㎠은 배양기간 모두 대조군과 0.002 W/㎠보다 증식이 감소됨을 보여 0.002 W/㎠이 0.03 W/㎠보다 연골세포의 증식을 자극하는데 더 효과적이라고 하였다. 초음파에 대한 이와 같은 미미한 연골세포의 증식은 비록 연골세포가 비대하지 않는 기전이 현재 잘 알려지지 않았지만 초자성 연골인 관절연골에서의 연골세포는 비대이전 상태를 유지하기 때문일 것이다(Pacifici 등, 2000). 따라서 초자성 관절연골의 연골세포에 비대성 분화를 유도하지 않는 저강도 초음파 자극은 연골치유에 효과적이라고 할 수 있다(Zhang 등, 2003).

Wiltink 등(1995)은 제태 기간 16일과 17일된 쥐에서 발달 상태에 있는 중족골의 장골을 배양하여 연골세포의 증식에 대한 치료적 초음파 [1 ㎒, 0.1~0.77 W/㎠(SATP)와 0.1 W/㎠, 0.5 W/㎠(SATA)] 의 효과적인 자극강도를 배양기간 1, 3, 5, 7 일에 증명하였는데, 자극 7일 후 0.77 W/㎠(SATP)로 자극한 16일된 조직의 연골세포에서 유의하게 증가됨을 보였고 17일된 조직에서는 증가되지 않았으며, 0.5 W/㎠(SATA)로 자극했을 때는 17일된 조직에서 자극 3일 후 에서만 유의하게 증가되었음을 보고하였다. 이러한 결과는 연골세포의 증식이 초음파의 강도와 연골세포의 발달상태가 서로 관계된다는 것을 의미하고(Zhang 등, 2003), 본 연구에서 사용한 관절연골의 0.4 W/㎠와 0.8 W/㎠ 자극군에서 현저한 세포증식을 보였던 결과와 상응할 것이다. 또한 임상적인 적용에 있어서 성장 중에 있는 관절연골에 초음파 자극을 고려해야하는 이유 중의 하나라고 사료된다.

Ramirez 등(1997)은 신생 쥐의 아킬레스건에서 섬유모세포를 배양하여 교원질 합성과 세포증식에 대한 초음파(1 ㎒, 0.4 W/㎠)의 효과를 연구하여, 자극 3 일과 5 일 후에 세포증식이 증가되었고, 교원질 합성은 1, 3, 5 일에 50~67% 증가함을 증명하였다. 이것은 초음파가 건섬유모세포의 교원질 합성을 자극하고, 활발한 세포증식 기간 동안 세포의 분열을 자극한다는 것을 보여주었다. 이 연구의 결과는 본 연구에서 0.4 W/㎠의 자극군에서 현저한 연골모세포의 증식율을 보인 것과 같고, 0.4 W/㎠의 저강도 초음파가 세포의 증식에 효과적이라는 것을 나타낸다.

성진형 등(1999)은 사람의 관절연골에서 연골세포를 배양하여 세포분화와 증식 및 교원질의 합성에 미치는 초음파(1 ㎒, 1.0, 0.75, 0.25 W/㎠)의 효과를 관찰한 결과, 1.0 W/㎠와 0.75 W/㎠의 자극강도는 세포를 손상시키고 세포의 증식이 나타나지 않았고, 0.25 W/㎠의 자극강도에서는 세포의 분화 및 증식이 증가되었다고 보고하였다. 이러한 결과는 0.2 W/㎠ 자극군에서 현저한 세포의 증식율을 보였던 본 연구의 결과와 일치하며 0.2 W/㎠의 강도는 연골세포의 증식을 촉진하는데 효과적인 초음파 강도에 속한다고 볼 수 있다. 그러나 본 연구에서는 위의 결과와 다르게 0.8 W/㎠의 강도에서도 유의한 세포증식을 보였다. 이러

한 결과는 연골세포가 삼차원적인 환경에 적응되어 있고(우정임, 2003), 배양방법에 있어서 단층배양은 연골세포를 섬유모세포로 역 분화시키기 때문일 것으로 생각된다(Zhang 등, 2003).

Reher 등(1997)은 쥐의 두개골 조직을 배양하여 초음파의 자극강도[3 ㎒, 0.1 W/㎠, 1.0~2.0 W/㎠(SATA)] 가 골 형성에 미치는 영향에 대하여 알아본 결과 0.1 w/㎠의 자극강도에서 교원질과 비교원질의 단백질 합성이 증가되어 골형성을 촉진시켰고 온도의 변화가 없었으나, 1.0~2.0 W/㎠의 자극강도에서는 골형성이 현저하게 억제되었고 온도의 변화는 2.0 W/㎠ 강도에서 최고 1.8℃의 상승이 있었다고 보고하였다. 본 연구에서는 초음파의 자극효과에 대한 온도변화율을 측정하지 않았으나, 연골세포의 증식을 관찰할 수 없었던 1.6 W/㎠의 자극강도는 선행연구에서 뚜렷한 상승의 온도변화를 유도하고 교원질 및 비교원질의 단백질 합성을 촉진시키지 않았던 1.0~2.0 W/㎠의 자극강도에 포함되므로 조직에서의 치료적인 초음파 자극으로 1.6 W/㎠의 자극강도는 적합하지 않을 것으로 생각된다. 이전의 많은 연구에서 관절연골의 세포외기질은 수분, 제2형 교원질 및 기타 비교원질로 구성되어 있고(Buckwalter와 Mankin, 1998; Roughley, 2001), 연골세포에 의해 기질의 합성이 증가된다고 하였다(Sandell과 Aigner, 2001). 또한 세포외기질은 정상적인 관절연골 구조를 유지시키고 연골세포의 증식과 유전자 발현을 조절한다고 하여(Reginato와 Olsen, 2002) 연골세포와 세포외기질의 상호 의존적인 생화학적 특성을 밝혔고, Reboul 등(1996)의 보고에서는 제1형 교원질은 뼈, 피부, 건, 인대에 넓게 분포되어 있고 제2형 교원질은 초자성 연골에만 분포되어 있다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 이러한 관점에서 고찰하지 않았으나 이와 같은 여러 선행연구의 자료를 통해서 볼 때 조직을 구성하고 있는 교원질의 형태가 초음파의 자극효과에 영향을 미치는 것으로 보이며, 차후 저강도 초음파가 어떠한 교원질의 형태에 더 효과적인지를 결정하는 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

초음파는 높은 주기의 음파 압력 파장인 기계적 에너지의 한 형태로 생체조직과의 상호작용을 통해 미세한 기계적 긴장력을 생산하고(Li 등, 2003), 저강도에서의 기계적 효과들인 비열 효과와 고강도에서의 열 효과로 구분 된다. 저강도 초음파가 세포의 특성이나 단백질 합성에 미치는 기전에 대해서 밝혀진 연구들은 매우 제한적이지만(주석규와 김병직, 2002), 조직에서 치료적 변화들을 유발시킬 수 있는 저강도 초음파의 기계적 효과들은 세포외액의 음향흐름과 결합해서 안정공동을 형성하여 인접한 세포들의 세포막 투과성을 변화시키며 이러한 변화들은 세포막에서의 이온통로를 활성화시킬 것이다(Wiltink 등, 1995). 성진형 등(1999)에서는 초음파의 기계적 효과가 인접한 세포의 세포막 투과성을 변화시켜서, 세포 안으로 칼슘 이온을 유입시킴으로써, 세포 내에 칼슘농도를 증가시키고, 이러한 세포내의 변화는 세포의 움직임이나 성장요소 합성을 증가시켜 세포증식과 상처치유에 효과적일 것이라고 하였다. 대부분의 세포는 세포들 사이에 상호작용을 통하여 생존하지

만 연골세포는 생존을 위해 자가분비나 측분비 조절자들로 작용하는 생존-촉진 요인들을 생산하기 때문에(Lotz 등, 1999) 연골모세포의 증식을 유도한 저강도 초음파는 세포의 정상적인 기능을 촉진하는데 적합한 자극형태가 될 수 있다.

이상의 연구 결과를 볼 때, 저강도 초음파가 닭의 배양 관절연골조직에서 세포증식을 촉진시키는데 효과적이었다. 또한 0.2, 0.4, 0.8 W/㎠의 강도는 관절연골의 연골세포에 증식을 촉진시키는 유효한 초음파 영역임을 알 수 있었다.

V. 결 론

본 연구에서는 저강도 초음파가 닭의 배양 관절연골조직에서 자극강도(0.1 W/㎠, 0.2 W/㎠, 0.4 W/㎠, 0.8 W/㎠, 1.6 W/㎠)에 따라 세포증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 배양 관절연골에서의 세포이동거리와 관절연골조직에서 연골세포의 증식정도를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 관절연골 배양 시작 후 7 일째에 연골모세포가 최대로 이동한 거리는 대 조군과 실험군들 사이에 유의한 차이를 보였고($p<0.05$), 초음파 자극 강도에 따른 대조군과 실험군들에서의 세포이동거리는 0.2 W/㎠, 0.4 W/㎠, 0.8 W/㎠의 실험군이 대조군과 0.1 W/㎠, 1.6 W/㎠보다 유의하게 증가되었다($p<0.05$).

2. 관절연골배양 시작 후 7일째에 연골조직에서 세포의 증식율은 대조군과 실험군들 사이에 유의한 차이를 보였고($p<0.05$), 초음파 자극강도에 따른 대조군과 실험군들에서의 세포이동거리는 0.2 W/㎠, 0.4 W/㎠, 0.8 W/㎠의 실험군이 대조군과 0.1 W/㎠, 1.6 W/㎠보다 유의하게 증가되었다($p<0.05$).

이상의 결과로 볼 때, 저강도 초음파는 관절연골조직의 세포증식을 촉진시키는데 효과적이며, 0.2 W/㎠, 0.4 W/㎠ 및 0.8 W/㎠의 강도는 연골세포의 증식을 촉진시키는 유효한 초음파 영역임을 알 수 있었다. 따라서 저강도 초음파는 동물실험 및 임상시험 후 관절연골의 재생과 치유를 위해 적용 가능하다고 생각된다.

참고문헌

김종만 : 토끼모델에서 저강도 맥동초음파가 골절치유에 미치는 영향. 연세대학 교 대학원 박사학위논문. 2000.

성진형, 류재덕, 김원유 등 : 치료용 저 에너지 초음파가 배양중인 관절 연골 세포에 미치는 영향. 대한정형외과학회지. 34; 617-624, 1999.

우정임 : 저강도 초음파가 관절 연골세포의 증식 및 대사에 미치는 영향. 아주대학교 대학원 박사학위논문. 2003.

주석규, 김병직 : 저강도 초음파가 인체 골모세포(SaOS-2)와 인체내피세포(HUVEC) 공동배양에 미치는 영향. 대한정형외과연

구학회지. 5;140-150, 2002.

Anderson-MacKensie JM, Quasnichka HL, Starr RL, et al. Fundamental subchondral bone bone changes in spontaneous knee steoarthritis. Int J Biochemistry & Cell Biol. 37;224-236, 2005.

Archer CW and Philippa Francis-West. Cells in focus: The chondrocyte. Int J Biochemistry & Cell Biol. 35;401-404, 2003.

Arroll B and Goodyear-Smith F : Corticosteroid infections for osteoarthritis of the knee: meta-analysis. BMJ. 10;328 (7444) :869, 2004.

Barbero A, Grogan S, Schafer D, et al. : Age related changes in human articular chondrocyte yield, proloferation and post-expansion chondrogenic capacity. OsteoArthritis & Cartilage. 12;476-484, 2004.

Barnett SB, Rott HD, ter Haar GR, et al. : The sensitivity of biological tissue to ultrasound. Ultrasound Med Biol. 23;805-812, 1997.

Bookman AAM, Williams KSA, Shainhouse JZ : Effect of a topical diclofenac solution for relieving symptoms of primary osteoarthritis of the knee: a randomized controlled trial. CMAJ. 171;333-338, 2004.

Buckwalter JA. and Mankin HJ : Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. Instr Course Lect. 47;487-504, 1998.

Carr AJ : Beyond disability: measuring the social and personal consequences of osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage. 7;230-238, 1999.

Cook SD, Ryaby JP, McCabe J, et al. : Acceleration of tibia and distal radius fracture healing in patients who smoke. Clin Orthop Rel Res. 337;198-207, 1997.

Cook SD, Salkeld SL, Popich-Patron LS, et al. : Improved cartilage repair after treatment with low-intensity pulsed ultrasound. Clin Orthop. 391(S);S231-S243, 2001.

Cunha A, Parizotto NA, Campos Vidal B : The effect of therapietic ultrasound on repair of the achilles tendon(tendo calcaneus) of the rat. Ultrasound Med. & Biol. 27;1691-1696, 2001.

Dominick KL, Ahern FM, Gold CH, et al. : Health-related quality of life among older adults with arthritis. Health and Quality of Life Outcomes. 2;5, 2004.

Dyson M, Franks C, Suckling J : stimulation healing of varicose ulcers by ultrasound. Ultrasonics. 56;136-142, 1976.

Fabrizio PA, Schmidt JA, Clemente FR, et al. : Acute effects of therapeutic ultrasound delivered at varying parameters on the blood flow velocity in a muscular distribution artery. J Orthop Sports Phys Ther. 24;294-302, 1996.

Guerino MR, Baranaruskas V, Guerino AC, et al. : Laser treatment of experimentally induced chronic arthritis. Applied Surface Science. 154-155;561-564, 2000.

Hadjiargyrou M, McLeod K, Ryaby JP, et al. : Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. Clin Orthop. 355(S);S216-S229, 1998.

Havey W, Dyson M. Pond JB, et al. : The stimulation protein synthesis in human fibroblasts by therapeutic ultrasound. Rheumatol Rehab. 14;237-242, 1975.

Heckman JD, Ryaby JP, kcCabe J, et al. : Acceleration of tibial fracture healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound. J Bone Joint Surg. 76-A; 26-34, 1994.

Hogan RDB, Burke KM, Franklin TD : The effect of ultrasound on the microvascular hemo dynamics in skeletal muscle: Effects during ischemia. Microvasc Res. 23;370-379, 1982.

Huang MH, Lin YS, Yang RC, et al. : A comparison of various therapeutic exercises on the functional status of patients with knee osteioarthritis. Simin Arthritis Rheum. 32;398-406, 2003.

Huang M, Ding H, Chai C, et al. : Effects of sonication on articular cartilage in experimental osteoarthritis. J Rheumatol. 24;1978-1984, 1997.

Huang M, Yang R, Ding H, et al. : Ultrasound effect on level of stress protein and arthritic histology in experimental arthritis. Arch Phys Med Rehab. 80;551-556, 1999.

Jakob RP, Varlet PM, Gautier E : Isolated articular cartilage lesion: repair or regeneration. Osteoarthritis Cartilage. 9(SA); S3-S5, 2001.

James CB, Uhi TL : A review of articular cartilage pathology and the use of glucosamine sulfate. J Athletic Training. 36(4);413-419, 2001.

Kristiansen TK, Ryaby JP, McCabe J, et al. : Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. J Bone Joint Surg. 79-A(7);961-973, 1997.

Leung MC, Ng GY, Yip KK : Effect of ultrasound on acute inflammation of transecte medial collateral ligaments. Arch Phys Med Rehabil. 85;963-966, 2004.

Li JK, Chang WH, Lin JC, et al. : Cytokine release from osteoblasts in response to ultrasound stimulation. Biomaterials. 24;2379-2385, 2003.

Lotz M, Hashimoto S, Kuhn K : Mechanisms of chondrocyte apoptosis. Osteoarthritis Cartilage. 7;389-391, 1999.

Mansell JP, Bailey AJ : Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis. J Clin Invest. 101;1596- 1603, 1998.

Miyaguchi M, Kobayashi A, Kadoya Y, et al. : Biochemical change in joint fluid after isometric quadriceps exercise for patients with osteoarthritis of the knee. Osteoarthritis Cartilage. 11;252-259, 2003.

Moreland LW : Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. Arthritis Res Ther. 5;54-67,

2003.

Najm WI, Reinsch S, Hoehler F, et al. :S-Adenosyl methionine(SAMe) versus celecoxib for the treatment of osteoarthritis symptoms: A double-blind cross-over trial. BMC Musculoskeletal Disord. 5:6, 2004.

Nussbarm EL, Biemann I, Mustard B : Comparison of ultrasound/ultraviolet-c and laser for treatment of pressure ulcers in patients with spinalcord injury. Phys Ther. 74;812-823, 1994.

Pacifici M, Koyama E, Iwamoto M, et al. : Development of articular cartilage: What do we know about it and how may it occur?. Connect Tissue Res. 41; 175-184, 2000.

Parvizi J, Wu C, Lewallen DG, et al. : Low-intensity ultrasound stimulates proteoglycan synthesis in rat chondrocytes by increasing aggrecan gene expression. J Orthop Res. 17;488-494, 1999.

Ramirez A, Schwane JA, McFarland D, et al. : The effect of ultrasound on collagen synthesis and fibroblast proliferation in vitro. Med Sci Sports Ecerc. 19;326-332, 1997.

Reboul P, Pelletier JP, Tardif G, et al. : The niw collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. J Clin Invest. 97;2011-2019, 1996.

Reginato AM. Olsen BR : The role of structural genes in the pathogenesis of osteoarthritic disorders. Arthritis Res. 4;337-345, 2002.

Reher P, Elbeshir El-NI, Harvey W, et al. : The stimulation of bone formation in vitro by therapeutic ultrasound. Ultrasound Med Biol. 23;1251-1258, 1997.

Reher P, Harris M, Whiteman M, et al. : Ultrasound stimulates nitric oxide and prostaglandin E_2 production by human osteoblasts. Bone. 31;236-241, 2002.

Roughley PJ : Articular cartilage and changes in arthritis: Noncollagenous proteins and proteoglycans in the extracellular matrix of cartilage. Arthritis Res. 3;342-347, 2001.

Sandell LJ and Aigner T : Articular cartilage and changes in arthritis: An introduction: Cell biology of osteoarthritis. Arthritis Res. 3;107-113, 2001.

Shah EN, Reddy NP, Rothschild BM : Fractal analysis of acceleration signals from patients with CPPD, rheumatoid arthritis, and spondyloarthroparthy of the finger joint. Comput Methods Programs Biomed. 77;233-239, 2005.

Sipe JD : Acute-phase proteins in osteoarthritis. Semin Arthritis Rheum. 25;75-86, 1995.

Thomas E, Wilkie R, Peat G, et al. : The North Staffordshire Osteoarthritis Project-NorStOP: Prospective, 3-year study of the epidemiology and management of clinical osteoarthritis in a general population of older adults. BMC Musculoskeletal Disord. 5;2, 2004.

ter Haar G : Therapeutic ultrasound. Eur J Ultrasound. 9;3-9, 1999.

Van der Windt DAWM, Ban der Heijden GJMG, Van den Berg SGM : Ultrasound therapy for musculoskeletal disorders: a systematic review. Pain. 81;257-271, 1999.

Venkatesan N, Barre L, Benani A, et al. : Stimulation of proteoglycan synthesis by glucuronosyltransferase-1 gene delivery: A strategy to promote cartilate repair. PNAS. 101;18087-18092, 2004.

Warden SJ and McMeeken JM : Ultrasound usage and dosage in sports physiotherapy. Ultrasound Med Biol. 28;1075-1080, 2002.

Wiltink A, Nijweide PJ, Oosterbaan WA, et al. : Effect of therapeutic ultrasound on endochondral ossification. Ultrasound Med Biol. 21;121-127, 1995.

Yang KH, Parvizi J, Wang SJ, et al. : Exposure to low-intensity ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model. J Orthop Res. 14;802-809, 1996.

Young SR and Dyson M : The effect of therapeutic ultrasound on angiogenesis. Ultrasound Med Biol. 16;261-269, 1990.

Zarins B and Parsons C : Chondral injuries: Clinical overview. Oper Techn Orthopaedics. 7;345-346, 1997.

Zhang Z, Huckle J, Francomano CA, et al. : The influence of pulsed low-intensity ultrasound on matrix production of chondrocytes at different stages of differentiation: An explant study. Ultrasound Med Biol. 28;1547-1553, 2002.

Zhang Z, Huckle J, Francomano CA, et al. : The effects of pulsed low-intensity ultrasound on chondrocyte viability, proliferation, gene expression and matrix production. Ultrasound Med Biol. 29; 1645-1651, 2003.