

간헐적 정수압의 다양한 패턴에 따른 세포 부착력과 F-actin 및 vinculin 의 분포 변화 연구

김영직, 박수아, 신호준, 김인에, 이용재, 허수진, 황영미, 신정욱(인제대 의용공학과)

A Study on Changes of Cell Adhesive force and Distribution of F-actin and Vinculin under Various Intermittent Hydrostatic Pressure.

Young Jick Kim, Su-A Park, Ho Joon Shin, In Ae Kim, Yong Jae Lee, Su-Jin Heo, Young-Mi Hwang, Jung-Woog Shin(Dept. of Biomedical Eng. Inje Univ.)

ABSTRACT

Cell adhesion to any material surface is considered to be fundamental and important phenomenon in the fields of tissue engineering. Cell adhesion molecules, mechanism, and attachment force have been studied and described a lot. However, the effects of mechanical stimuli on the adhesive forces still have been left much to be investigated. In this study, to investigate the changes in cell adhesive force due to resting time period during the intermittent hydrostatic pressurizing (IHP), cells were cultured under the IHP with various resting times. Then the cell adhesive forces were measured quantitatively utilizing a cell detachment test system and immunofluorescent staining was performed using fluorescent microscopy. In the results, immediately after mechanical stimuli (150 minutes after seeding) and one hour later (210 minutes after seeding), the average adhesive force of experimental group 5 (resting time: 15min) compared with that of control group at same culture time was increased significantly ($p < 0.05$). The results indicated that IHP can contribute in improving cell adhesive force and some of time intervals were required for the expression of cell response.

Key Words: Cell adhesive force, CPAE cell, Intermittent hydrostatic pressure, Refractory period

1. 서론

세포의 기질에 대한 부착은 세포가 생리적 기능을 수행하는데 있어서 가장 기본적인 단계이며 조직재생이나 인공적인 조직 형성에 대한 연구에서도 중요한 과제로 알려져 있다.¹⁻³⁾ 국내, 외적으로 세포의 기질 부착에 대한 기전과 기능 그리고 부착력 향상을 위한 생화학적 인자들에 대한 많은 연구가 수행되어 왔으며 많은 관련인자들에 대한 연구들이 보고 되고 있다.^{4,5)} 하지만 세포의 부착력 조절을 위한 연구에 기계적인 자극을 이용한 사례는 거의 없었으며 기계적 자극에 대한 세포의 반응 양상을 역학적인 견지에서 연구한 사례도 거의 없으므로 많은 연구가 필요하다고 판단된다.

문헌상에 보고되고 있는 외부의 기계적 자극에 의한 조직형성 연구 등에서는, 간헐적 정수압에 의한 세포 배양 결과가 정적인 정수압이나 일반 세포

배양보다 조직 구성 면에서 좀더 생체에 가까웠으며 세포 외 기질의 형성도 뛰어난 것으로 보고 되고 있다.⁶⁻⁸⁾ 그러나 간헐적 정수압의 자극 패턴에 따라 결과가 다소 차이를 보이기도 했다.⁹⁻¹²⁾ 최근에 S.W. Donahue 등은¹³⁾ 간헐적으로 흐르는 액체에 의한 전단력 자극에 대한 세포 내 Ca^{2+} 농도 변화 측정 연구를 통해, 반복적인 기계적 자극에 대한 세포의 반응이 불응기를 가지며, 자극 간 시간 간격이 세포의 생리적 반응을 유발하는데 중요하다는 연구 결과를 보고 하였다. 불응기는 세포가 외부 자극에 의해 반응한 후 다시 새로운 자극에 반응할 수 있는 상태로 회복되기 전까지 외부 자극에 반응하지 않는 기간으로 세포의 불응기에 대한 정보는 조직 형성 연구를 비롯한 세포를 대상으로 한 많은 종류의 연구에서 기계적 자극의 빈도를 결정하는데 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 간헐적 정수압의 자극 간 휴지기

의 길이가 세포 부착력과 같은 기초적인 세포의 생리적 기능에 미치는 영향을 정량적으로 측정하였으며, 이를 통해 세포 부착력 향상을 위한 기계적 자극의 인자중의 하나로서 일정시간의 자극 간 휴식기가 필요함 보이고자 하였다.

2. 재료 및 방법

전체 실험군은 간헐적 정수압의 압력 자극간의 휴식시간 길이에 따라 Table 1 과 같이 6 개의 실험군으로 나누었고, Fig. 1 에 간헐적 정수압 패턴의 한 예를 나타냈다. 대조군으로 설정된 실험군 (Group 1) 은 어떠한 물리적 자극도 주지 않은 상태로 배양하였다. 간헐적 정수압의 압력은 모두 게이지 압력으로 0.2 MPa 로 하였다.

본 연구에서는 Bovine pulmonary artery endothelial cells (CPAE cells, KCLB 10209, Korean Cell Line Bank, Korea)를 이용 하였으며, 10% fetal bovine serum (FBS)이 첨가된 RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) 배지로 5% CO₂ incubator 에서 배양 하였다.¹⁴⁾ CPAE cells 를 배양 중이던 dish 에서 trypsin 으로 분리한 후, gelatin (G1393, Sigma Chemical Co., St-Louis, MO, USA) 코팅된 coverslip 에 각각 5 x 10³cells/cm² 의 농도로 seeding 하였다. seeding 후 처음 30 분간은 세포들의 안착을 위하여 5% CO₂ incubator 에서 외부자극 없이 단순 배양하였다. 30 분 후 1 개의 dish 에서 세포가 부착된 coverslip 을 꺼내어 세포 부착력을 측정 하였으며 다른 두 개의 dish 들은 각 실험군에 부여한 간헐적 정수압 조건에 따라 bioreactor (TS-MBI 100, Taesan solutions, Korea) 내에서 2 시간 동안 배양하였다. 간헐적 정수압 조건은 본 실험에 이용된 bioreactor 를 이용하여 압력의 크기와 압력의 주기 그리고 압력 유지 시간 등을 프로그램화 하여 정확히 자동 조절되도록 하였다. 간헐적 정수압 조건에서의 배양이 끝난 직후 다시 하나의 dish 에 담긴 cover-glass 에 부착된 세포의 부착력을 측정 하였으며 나머지 하나의 dish 는 5% CO₂ incubator 에서 자극 없이 1 시간 더 배양한 후 세포 부착력을 측정하였다. 각 군의 부착력 측정 시점은 앞서 설명한 대로 실험군과 대조군 모두 세포 seeding 후 30 분, 150 분, 210 분 경과시점으로 하였으며, 부착력 측정에 소요된 시간은 각 시점에서 모두 20 분을 넘지 않도록 하였다.

세포의 부착력 측정 방법은 이전 연구에서 발표한 내용을 따랐다.¹⁵⁾ 간단히 세포 부착력 측정방법을 설명하면, 도립 현미경 (IX70, Olympus, Japan) 위에서 gelatin 이 도포된 cover-glass 에 부착된

CPAE 세포를 micropipette manipulator (ONE-99, Nareshige, Japan)로 조절되는 유리 micropipette 로 하나씩 떼어내고 이 과정을 모두 도립현미경에 연결된 CCD-camera (WV-CP450, Panasonic, Japan)와 VCR (SV-D955, Samsung, Korea)을 이용해 녹화하였다. 녹화된 비디오테이프를 VCR 로 재생하며 이미지 분석 프로그램(KanScopeKR, Fotec Co. Korea)으로 세포를 떼어낼 때의 micropipette 변형 과정을 Fig. 2 와 같이 정지화면으로 포착하였으며 micropipette 이 세포를 떼어낼 때 휘는 정도를 측정하였다. 측정된 값은 유한요소 프로그램 (Ansys. version 5.6, Swanson Analysis System Inc., Houston, PA, U.S.A.)에 입력하여 역 유한요소 방법으로 세포를 떼어낼 때 소요된 힘을 계산하였다. Micropipette 는 유리관 (외경 0.75mm, 내경 0.4mm, 길이 152.4mm, A-M System Inc., U.S.A.)을 micropipette puller (P-87, SUTTER Instrument Co. U.S.A.)로 끝 부분 직경이 1-2 μ m 정도 되게 제작하여 사용하였다. 유한요소모델은 digital 화상 분석에서 측정된 좌표 자료를 토대로 micropipette 의 굴곡 형상을 11,880 개의 육면체 형태의 요소들로 이루어진 3 차원 유한요소 모델로 구현하였으며 이때 micropipette 가 받는 반력을 계산함으로써 부착력을 계산하였다. 계산은 기하학적 비선형을 고려하여 대변형 이론을 이용하여 수행하였으며, 유리로 제작된 micropipette 의 물성치는 여러 문헌을 참고하여 E (Young's modulus) = 50GPa, Poisson's ratio = 0.3 으로 하였다.^{16,17)}

간헐적 정수압에 의한 세포내부의 변화를 연구하기 위해, 면역형광염색법으로 각 실험군별로 세포 내 F-actin 과 vinculin 을 염색한 후 형광현미경 (Axioskop2 Plus, Karl Zeiss, Germany)으로 관찰하였다. F-actin 의 염색은 Rhodamine phalloidin (Molecular Probe, OR)을 사용하였으며 vinculin 의 염색은 mouse anti-vinculin monoclonal antibody (Chemicon, CA)와 Alexa Fluor[®] 488 (Molecular Probe, OR) 을 사용하였다. 염색방법은 각 제품의 사용설명서와 문헌상의 방법을 참조하였다.

모든 통계분석은 범용 통계 프로그램인 SPSS (version 10.0K, SPSS Inc. USA)를 이용하여 one way ANOVA test 로 실시하였으며 다중분산비교는 Tukey HSD 방식을 취하였다.

Table 1 Classification of experimental groups based on the patterns of intermittent hydrostatic pressure(IHP). Total incubation time under IHP was 120min (from 30min to 150min after cell seeding) and the level of pressure was 0.2MPa (gauge pressure). Patterns of

IHP indicate pressurizing time (min)/ resting time (min).

Experimental groups	Patterns of IHP	Total stimulation time (min)
Group1 (Control)	0/120	0
Group 2	120/0	120(30-150)
Group 3	2/5	120(30-150)
Group 4	2/10	120(30-150)
Group 5	2/15	120(30-150)
Group 6	2/20	120(30-150)

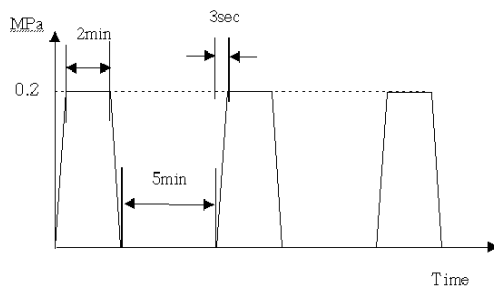


Fig. 1 Example of pattern of IHP (Group 3).

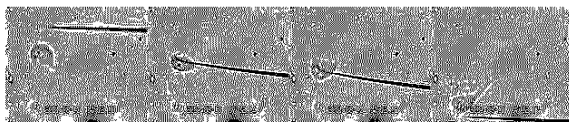


Fig. 2 Sequential images during the detachment test.

3. 결과 및 고찰

각 군의 세포 부착력을 측정한 결과는 Figure 3-a 에 나타난 그래프와 같이 정수압을 휴식기간 없이 계속 가해준 실험군 2 와 간헐적 정수압을 주어도 휴식기간이 상대적으로 길었던 실험군 6 에서는 대조군보다 부착력이 약하게 나타났으며 ($p < 0.05$) 휴식기간을 5 분, 10 분씩 주며 간헐적 정수압을 가한 실험군 3 와 실험군 4 에서는 대조군과 세포 부착력 값이 유의한 차이를 보이지 않았다 ($p > 0.05$). 그러나 실험군 5 에서는 세포 seeding 후 150 분에 측정한 세포 부착력과 210 분에 측정한 세포 부착력이 모두 대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났다 ($p < 0.05$). 또한 각 군은 세포 부착력이 시간이 지남에 따라 증가하다 안정화 경향을 보였으나 실험군 5 에서는 부착력 측정 시간 내에서 계속 증가하는 경향을 보였다.

세포 부착력은 세포 부착력 측정 당시의 세포의 상태나 환경에 영향을 받을 수 있으므로 각 군의 세포 seeding 후 30 분의 세포 부착력을 기준으로 150 분과 210 분의 부착력 향상 정도를 상대적으로

나타내었을 때 Figure 3-b 와 같이 나타났으며, 이 결과에서도 실험군 5 의 세포 seeding 후 210 분에 측정된 세포 부착력 증가량이 타 군에 비해 월등히 높게 나타났다.

세포 내 F-actin 과 vinculin 에 대한 관찰 결과에서도 Fig. 4 와 같이 실험군 5 에서 다른 군에 비해 잘 발달되어 있다는 것을 확인할 수 있었으며 각 군의 F-actin 과 vinculin 의 발달 정도가 세포의 부착력 크기와 대동소이 하다는 것을 알 수 있었다.

이러한 결과들은 간헐적 정수압이 세포의 부착 과정에서 focal contacts 의 형성과 세포 내 stress fiber 의 형성에 영향을 미치고 있고 이러한 세포 내 변화가 세포의 부착력 변화에도 관여하고 있다고 판단할 수 있는 하나의 근거를 제시하고 있으며, 간헐적 정수압의 여러 가지 조건 중 자극간 휴지기의 길이가 중요하다는 것을 보여주는 결과라 할 수 있다.

최근까지 다양한 세포들을 대상으로 외부의 물리적 자극에 의한 조직형성이나 세포 외 물질 형성 또는 세포 증식과 분화 등에 대한 여러 연구가 있어 왔다. 자극의 형태는 간헐적 정수압 또는 일정한 정수압,⁶⁻¹²⁾ 세포가 부착된 재료의 변형에 의한 세포 모양 변형,¹⁸⁾ 세포에 직접 자극,¹⁹⁾ 배지의 흐름에 의한 shear stress,^{13, 14, 20, 21)} 초음파를 이용한 자극,²²⁾ 전류를 이용한 자극²³⁻²⁵⁾ 등의 매우 다양한 형태로 연구 되었다. 문헌상의 대부분의 연구가 앞서 설명한 여러 가지 방법에 의한 세포 성장과 분화 그리고 대사 등에 대한 생화학적 분석, 현미경 이미지의 분석, 생성된 물질의 양적인 분석에 중점을 두고 있다면, 본 연구는 이러한 세포 성장과 대사 그리고 세포의 정보전달 통로 연결 등에 가장 기본적인 과정으로 알려진 세포의 기질부착에 기계적 자극이 미치는 영향을 역학적인 견지에서 연구하였다.

본 연구에서는 간헐적 정수압의 다양한 자극 패턴을 이용해서 외부 자극에 대한 세포의 생리적 반응에 관여하는 한 가지 인자로서 간헐적 정수압의 자극 간 휴지기 길이가 세포의 부착력에 영향을 미칠 수 있다는 결과를 얻을 수 있었다. 세포의 부착력 증가가 본 연구의 결과와 같이 자극 간 휴식기간의 차이에 영향을 받는다는 것은 세포의 자극에 대한 반응이 불응기와 관련이 있다고 판단된다. 신경전달세포나 근육세포 등에서 보이는 전기적인 탈분극 현상에 나타나는 세포 활동전압의 불응기와 비슷한 결과가 일반세포의 생리적인 활동에 관여하는 기계적 자극에 대한 세포의 반응 양상에서 나타나고 있다는 것을 본 연구 결과로부터 유추 해 볼 수 있었다. Donahue¹³⁾ 등은 세포 내 2 차 정보전달

자료 알려진 칼슘이온의 세포 내 농도 변화가 유체에 의한 shear stress 형태의 자극을 간헐적으로 주었을 때 휴지기의 길이에 영향을 받고 있다고 하였다. 그리고 이러한 결과가 외부자극에 대한 세포의 불응기가 원인이라고 보고하였다. 또한 본 연구의 실험군 5 과 같은 15 분의 자극 간 휴지기를 가진 세포들의 경우, 반복되는 외부 자극에 세포 내 Ca^{2+} 이온 농도가 최초 자극 때와 같은 증가량을 계속 유지함을 보여주었고 15 분 이하의 휴지기를 가진 경우 반복된 외부 자극에서 세포 내 Ca^{2+} 이온의 농도의 증가량이 줄어드는 결과를 보고하고 있다. Hung²⁶⁾ 등의 연구에서도 10 분에서 15 분 사이의 휴지기를 가지는 경우 첫 번째 유체 흐름에 의한 자극에 비해 두 번째 자극에 반응하는 (세포 내 Ca^{2+} 농도 증가) 세포의 수가 줄어드는 현상을 보고하였다. Jacobs²⁷⁾ 등의 연구에서는 배지의 흐름을 이용한 shear stress 를 자극으로 하여 세포 내 Ca^{2+} 이온의 농도 측정 결과 세포 내 반응 양상이 자극의 빈도가 높을수록 낮게 나타났고, 일정한 배지 흐름에 대해서는 처음 배지가 흐르기 시작한 시점에서만 높게 나타나고 차츰 낮아져서 일정한 시간이 흐른 뒤에는 배지 흐름에 대한 반응이 거의 없어지는 양상을 보였다. 그 외 대부분의 외부자극에 의한 세포반응 연구에서도 자극의 빈도에 따라 연구결과가 다르게 나오는 경우가 많이 보고되었다. 이러한 문헌상의 결과들은 자극의 주기와 세포 반응이 서로 연관되어 있다는 것을 보여주고 있으며 따라서 자극 간 휴지기의 길이가 세포의 외부 자극에 대한 반응에 중요한 인자가 될 수 있다고 판단된다.

여러 문헌상의 연구 및 본 연구를 통해 반복된 자극에 대한 세포의 불응기가 존재하며 다양한 형태의 생리적 반응에도 영향을 미치고 있다는 것을 유추할 수 있었으며 이에 대한 좀 더 많은 연구가 있어야 할 것으로 사료된다. 또한 본 연구는 앞으로의 연구에서 자극의 형태에 따라 세포 내 신호전달물질들의 세포 내 농도 변화를 측정하고, 세포 내 세포골격과 세포 부착에 관련된 분자들의 정량적 변화를 측정하여 좀 더 보완해 나갈 예정이다.

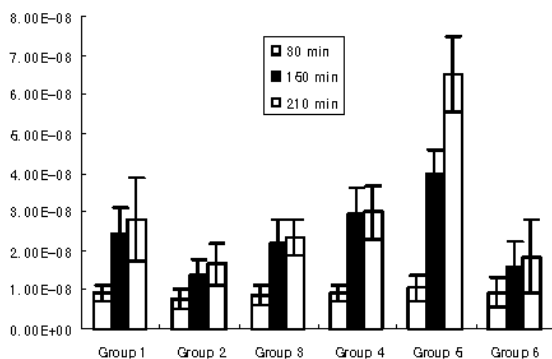


Fig. 3 Attachment forces (N) of CPAE cells to cover glasses coated with gelatin. Number of cells measured: Group 1 (30,30,30), Group 2 (15,15,15), Group 3 (15,15,15), Group 4 (15,15,15), Group 5 (15,15,15), Group 6 (15,15,15). (*: Compared with control group, $p < 0.05$)

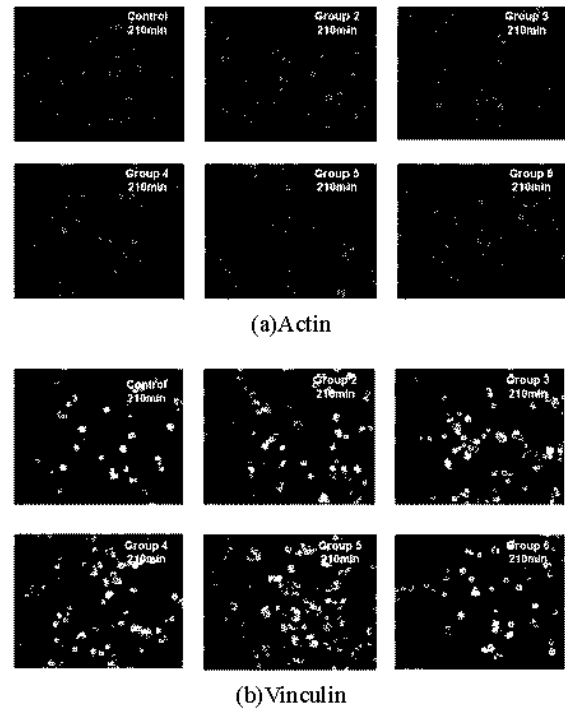


Fig. 4. Immunofluorescent staining images.

4. 결론

본 연구를 통해 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다. 세포는 외부자극의 형태에 따라 반응을 달리 할 수 있다. 그리고 세포의 부착력에 영향을 미치는 하나의 인자로 간헐적 정수압에서 자극 간 휴지기의 길이가 중요하다는 것을 확인 할 수 있었으며 이는 세포의 불응기와 연관되어 있는 것으로 사료된다

참고문헌

1. A. Yamamoto, S. Mishima, N. Maruyama and M. Sumita, "A new technique for direct measurement of the shear force necessary to detach a cell from a material," *Biomaterials*, **19**, 871-879 (1998)
2. K.A. Athanasiou, B.S. Thoma, D.R. Lancot, D. Shin, C.M. Agrawal and R.G. LeBaron, "Development of

- the cytodetachment technique to quantify mechanical adhesiveness of the single cell," *Biomaterials*, **20**, 2405-2415 (1999)
3. A. Yamamoto, S. Mishima, N. Maruyama and M. Sumita, "Quantitative evaluation of cell attachment to glass, polystyrene, and fibronectin- or collagen-coated polystyrene by measurement of cell adhesive shear force and cell detachment energy," *J. Biomed. Mater. Res.*, **50**, 114-124 (2000)
 4. J.T. Parsons, K.H. Martin, J.K. Slack, J.M. Tayler and S.A. Weed, "Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement," *Oncogene*, **19**, 5606-5613 (2000)
 5. A.J. Garcia and D. Boettiger, "Integrin- fibronectin interactions at the cell-material interface:initial integrin binding and signaling," *Biomaterials*, **20**, 2427-2433 (1999)
 6. J.J. Parkkinen and J. Ikonen, "Effects of cyclic hydrostatic pressure on proteoglycan synthesis in cultured chondrocytes and articular cartilage explants," *Arch. Biochem. & Biophys.*, **300**(1), 458-465 (1993)
 7. P. Angele, J.U. Yoo, C. Smith, J. Mansour, K.J. Jepsen, M. Nerlich, and B. Johnstone, "Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro," *J. Orthopaed. Res.*, **21**, 451-457 (2003)
 8. T. Murata, T. Ushida, S. Mizuno, and T. Tateishi, "Proteoglycan synthesis by chondrocytes cultured under hydrostatic pressure and perfusion" *Materials Science and Engineering, C* **6**, 297-300 (1998)
 9. A.C. HALL, "Differential Effects of Hydrostatic Pressure on Cation Transport Pathways of Isolated Articular Chondrocytes," *J. Cell. Physiol.*, **178**, 197-204 (1999)
 10. U. Hansen, M. Schunke, C. Domm, N. Ioannidis, J. Hassenpflug, T. Gehrke, and B. Kurz, "Combination of reduced oxygen tension and intermittent hydrostatic pressure: a useful tool in articular cartilage tissue engineering," *J. Biomech.*, **34**, 941-949 (2001)
 11. T. Toyoda, B.B. Seedhom, J.Q. Yao, J. Kirkham, S. Brookes, and W.A. Bonass, "Hydrostatic Pressure Modulates Proteoglycan Metabolism in Chondrocytes Seeded in Agarose," *ARTHRITIS & RHEUM.*, **48**(10), 2865-2872 (2003)
 12. T. Ikenoue, M.C.D. Trindade, M.S. Lee, E.Y. Lin, D.J. Schurman, S.B. Goodman, and R.L. Smith, "Mechanoregulation of human articular chondrocyte aggrecan and type II collagen expression by intermittent hydrostatic pressure in vitro," *J. Orthopaed. Res.*, **21**, 110-116 (2003)
 13. S.W. Donahue, H.J. Donahue and C.R. Jacobs, "Osteoblastic cells have refractory periods for fluid-flow-induced intracellular calcium oscillations for short bouts of flow and display multiple low-magnitude oscillations during long-term flow," *J. Biomech.*, **36**, 35-43 (2003)
 14. J.H. Lee, S.J. Lee, G. Khang, and H.B. Lee "The Effect of Fluid Shear Stress on Endothelial Cell Adhesiveness to Polymer Surfaces with Wettability Gradient," *J. Colloid & Interf. Sci.*, **230**(1), 84-90 (2000)
 15. Y.J. Kim, J.W. Shin, K.D. Park, J.W. Lee, N. Yui, S.A. Park, K.S. Jee and J.K. Kim, "A study of compatibility between cells and biopolymeric surfaces through quantitative measurements of adhesive forces," *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, **14**(12), 1311-1321 (2003)
 16. R.R. Craig Jr., "Mechanics of materials," John Wiley & Sons Inc.(2001)
 17. S.H. Crandall, N.C. Dahl, and T.J. Lardner, "An introduction to the mechanics of solids," McGraw-Hill, Inc., (1978)
 18. T. Yamada, K. Naruse, and M. Sokabe, "Stretch-induced morphological changes of human endothelial cells depend on the intracellular level of Ca²⁺ rather than of cAMP," *Life Sciences*, **67**, 2605-2613 (2000)
 19. T. Adachi, K. Sato, and Y. Tomita, "Directional dependence of osteoblastic calcium response to mechanical stimuli," *Biomechan Model Mechanobiol.*, **2**, 73-82 (2003)
 20. P.P. Hsu, S. Li, Y.S. Li, S. Usami, A. Ratcliffe, X. Wang, and S. Chien, "Effects of Flow Patterns on Endothelial Cell Migration into a Zone of Mechanical Denudation" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **285**, 751-759 (2001)
 21. J.J. Chiu, C.N. Chen, P.L. Lee, C.T. Yang, H.S. Chuang, S. Chien, and S. Usami, "Analysis of the effect of disturbed flow on monocytic adhesion to endothelial cells," *J. Biomech.*, **36**, 1883-1895 (2003)
 22. J. Parvizi, V. Parpura, J.F. Greenleaf, and M.E. Bolander, "Calcium signaling is required for ultrasound-stimulated aggrecan synthesis by rat chondrocytes," *J. Orthopaed. Res.*, **20**, 51-57 (2002)
 23. H.P. Wiesmann, M. Hartig, U. Stratmann, U. Meyer, and U. Joos, "Electrical stimulation influences mineral formation of osteoblast-like cells in vitro,"

- Biochimica et Biophysica Acta, **1538**, 28-37 (2001)
24. M. Hartig, U. Joos, and H.P. Wiesmann, "Capacitively coupled electric fields accelerate proliferation of osteoblast-like primary cells and increase bone extracellular matrix formation in vitro," *Eur. Biophys. J.*, **29**, 499-506 (2000)
 25. H. Zhuang, W. Wang, R.M. Seldes, A.D. Tahernia, H. Fan, and C.T. Brighton, "Electrical Stimulation Induces the Level of TGF- β 1 mRNA in Osteoblastic Cells by a Mechanism Involving Calcium/Calmodulin Pathway," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **237**, 225-229 (1997)
 26. C.T. Hung, S.R. Pollack, T.M. Reilly, and C.T. Brighton, "Real-time calcium response of cultured bone cells to fluid flow," *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **313**, 256-269 (1995)
 27. C.R. Jacobs, C.E. Yellowley, B.R. Davis, Z. Zhou, J.M. Cimbala, H.J. Donahue, "Differential effect of steady versus oscillating flow on bone cells," *J. Biomech.*, **31**, 969-976 (1998)