

# 저강도 초음파 조사시 MC3T3-E1 세포의 활성화에 미치는 영향

최유성 · 이상철

경희대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

**Abstract**

## THE EFFECTS OF LOW INTENSITY-ULTRASOUND ON THE ACTIVITY OF MC3T3-E1 CELL IN VITRO

You-Sung Choi, Sang-Chull Lee

*Department of Oral & Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Kyung-Hee University*

This study was performed to observe the effect of ultrasound(1.0MHz, 0.75W/cm<sup>2</sup> and 1.0W/cm<sup>2</sup>) irradiation on cultured MC3T3-E1 cell, osteoblastic like cell with respect to the proliferation, protein synthesis, and alkaline phosphatase activity of the cells.

The results were as follows:

1. The proliferation of MC3T3-E1 cells was increased on ultrasound irradiated group compared with control group.
2. The protein synthesis was not apparently increased on ultrasound irradiated group compared with control group.
3. The alkaline phosphatase activity level was not apparently increased on ultrasound irradiated group compared with control group.

From the above results and other literatures, we could suggest that the ultrasound with the appropriate intensity and frequency may have important roles in stimulation of cell proliferation. Therefore the ultrasound may be used in the acceleration of the bone regeneration and bone fracture healing.

**Key words** : Ultrasound, MC3T3-E1 cell, Bone regeneration

## I. 서 론

골조직 재생은 구강악안면영역의 주요 관심분야로서 외상, 감염, 종양등으로 인하여 결손된 골을 재생시키기 위한 많은 연구가 진행되고 있으며, 최근에는 특히 인공매식치의 사용과 관계된 골조직 재생 및 조직의 치유에 국소적으로 관여하는 성장인자를 포함한 여러 매개물질들에 대한 연구등이 보고되고 있다. 골형성세포는 여러 성장인자, 골형성 단백질등의 생물학적 자극뿐만 아니라 물리적인 자극에도 민감한 것으로 알려지고 있다. 즉 낮은 전류, 저강도 초음파 에너지 영역, 그리고 특수한 파장의 전자장에 의해 골형성이 촉진될 수 있다고 한다<sup>1)</sup>.

초음파는 인간의 청각범위를 벗어난 주파수를 가진 에너지의 형태로서 조직에 기계적 에너지를 전달할 수 있다<sup>2)</sup>. 또한 초음파 신호의 주파수, 그리고 각 주파수에서의 조직내의 압축률과 밀

도분포에 의해 초음파 신호의 에너지가 흡수, 전파, 반사될 수 있다<sup>3)</sup>. 초음파는 치료시 사용되는 주파수, 강도 및 치료시간의 조절에 따라 다양한 결과를 보인다. 그 이유는 초음파가 다양한 흡수계수를 가진 조직들을 통과하면서 주로 조직내의 단백질과 세포막에 흡수되기 때문이다. 초음파가 생체조직에 미치는 영향은 발열작용, 기계적 작용, 미세균성 염증반응 억제작용, 근육경축의 감소, 조직 pH의 변화, 조직의 기체교환량의 변화, 막투과성의 증대 및 산소의 활성화 등의 효과를 예로 들 수 있다. 그러나 초음파가 생물학적인 효과가 있음에도 불구하고 초음파가 생체조직과 상호작용하는 물리적 과정이 고주파 음향자극에 대하여 조직이 복잡하게 반응하기 때문에 잘 알려져 있지 않다<sup>4)</sup>.

일반적으로 초음파는 주파수와 강도에 따라서 진단용, 세척용, 치료용으로 나눌 수 있는데, 진단용은 3-5MHz의 높은 주파수와 1-50mW/cm<sup>2</sup>의 낮은 강도로써 조직에 대한 열적 자극을 일으키지 않고 세척용은 20-60KHz의 주파수와 8W/cm<sup>2</sup> 이상의 높은 강도를 이용한다. 치료용 초음파는 1-3MHz의 주파수와 0.1-2.0W/cm<sup>2</sup>의 강도로써 열적 및 비열적(nonthermal) 기전에 의해 세포와 조직에 물리적 효과가 일어나도록 한다. 열적 효과는 급성 외상, 좌상, 동통완화 등의 치료를 위해 물리치료용으로 사용된다. 비열적 효과는 조직의 재생<sup>5,6)</sup>, 정맥류 궤양(varicose ulcer)

**최 유 성**

130-702 서울시 동대문구 회기동 1

경희대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

**You-Sung Choi**

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Kyunghee University

1. Hoegi-Dong, Dongdaemoon-Gu, Seoul, 130-702, Korea

Tel : 82-2-958-9441 Fax : 82-2-966-4572

E-mail : cysacsl@lycos.co.kr

의 치유<sup>7)</sup>, 욕창(pressure sore)의 치유<sup>8)</sup>, 만성적 허혈근육에서의 혈액흐름<sup>9)</sup>, 섬유모세포에서의 단백질 합성<sup>10-12)</sup>, 건치유<sup>13)</sup>를 촉진시킨다고 하였으며, Harris<sup>14)</sup>는 하악골의 방사선 골괴사에서 초음파의 비열적 치유 효과를 보고하였다.

초음파의 생물학적 효과는 여러문헌을 통해서 보고되어 왔으며, 이는 직접적인 열효과, 비열적 원인(nonthermal causes), 세포막 이동등과 관계가 있다고 하였다. 초음파의 생물학적 연구에 관하여 살펴보면, Xavier와 Duarte<sup>15)</sup>가 비유합 환자의 임상적 성과를 보고하였고, 다른 보고에 의하면 동물실험과 임상실험에서 골절치유시 저강도 초음파를 적용하면 가골의 기계적 강도를 증가시키고 골유합 시간을 감소시킨다고 하였다<sup>16-19)</sup>. 이는 골절가골의 세포가 초음파에 의해 전달된 기계적 에너지에 반응한다는 것을 의미한다. Duarte<sup>20)</sup>, Klug 등<sup>21)</sup>, Pilla 등<sup>22)</sup> 및 Wang 등<sup>23)</sup>은 동물 실험을 통해 골절치유를 촉진시키는 초음파의 효과를 보고하였으며, Chapman<sup>24)</sup>, Mortimer 등<sup>25)</sup>, Ryaby 등<sup>26-28)</sup>, Parvizi 등<sup>29)</sup>, Wu 등<sup>30)</sup>에 의해 시험관내 실험에서 세포막 이동변화가 보고되었다.

초음파의 생물학적 효과에 관한 세포수준의 기전으로서 몇가지가 제시되었는데<sup>3)</sup>, 첫째로는 미세공기방울(microbubbles) 혹은 공동화(cavitation)가 생기면서 초음파에 의해 압박을 받으면 미세공기방울들이 진동운동과 음향흐름을 일으켜서 세포막의 침투성을 증가시킬 수 있다. 이온이나 단백질의 세포막 이동변화는 유전자 발현을 위한 세포내 신호를 변화시킬 수 있다<sup>25,26,31-33)</sup>. 두번째로는 세포표면에 기계적인 압박이 가해지면 Sachs<sup>34)</sup>에 의해 제안된 양이온통로에서 신장수용기를 활성화시킨다는 것이다. 이러한 양이온 농도의 변화로 인하여 유전자 발현을 조절하는 세포내 신호가 변화된다. 세번째로는 초음파에 의해 전달된 기계적 에너지가 세포외기질에 대한 세포내골격(cytoskeleton)의 부착의 변화를 활성화시킬 수 있다는 것이다. Wang등은 세포내골격에 대하여 기계적 힘을 적용시키면 세포대사와 유전자 발현에 영향을 미친다고 보고하였다<sup>35)</sup>. 이는 골모세포의 배양에서 기계적 스트레스가 IL-1의 합성을 증가시킨다고 보고한 Sandy에 의해 확인되었다<sup>36)</sup>. 네번째로는 초음파 에너지가 골에 가해지면 활동전류가 생길 수 있다는 것이다<sup>37,38)</sup>. 마지막으로 초음파에너지가 조직의 온도를 상승시키고, 그것에 의해 세포의 대사활동이 촉진되어 치유과정이 촉진된다는 것이다.

구강악안면외과 영역의 골결손시 일어나는 치유과정에서 골조직 재생에 관한 연구는 각종 성장인자, BMP에 관련된 내용이 많은데 비해, 초음파와 같은 물리적 자극에 관한 연구는 부족한 편이다. 골조직 재생을 촉진시키는 방법중 생물학적인 방법에 비하여 실제 임상에서 응용하기에 용이하고, 더욱 보존적인 방법인 초음파 조사를 구강악안면 영역의 골결손 부위에 적용하기 위하여 골조직의 재생에 관련된 세포수준의 생화학적 연구인 세포의 활성, 단백질 합성량, 알카리성 인산효소활성을 평가함으로써 구강악안면외과적 응용에 도움이 되고자 한다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 초음파 장치

본 실험에 사용한 초음파 장치는 주파수가 1.0MHz로 고정된 상태로 초음파 강도와 조사시간을 조절할 수 있도록 제작된 물리치료용 장치(wooshin, Korea)로써, 직경 50mm의 변환기(transducer)를 사용하였다.

#### 2) 세포배양

Kodama 등<sup>39)</sup>에 의해 신생쥐의 두개골에서 분리되어 계대배양된 골모세포양 세포주인 MC3T3-E1 세포를 이용하였는데, 이는 알카리성 인산효소 활성과 고원질 합성능이 있으며, 장기간 배양하면 골기질의 석회화 뿐 만 아니라 골모세포와 골세포로의 분화를 관찰할 수 있다.

### 2. 실험방법

#### 1) 초음파 조사방법

초음파와 세포사이의 매개물이 공기일 경우, 열이 발생하거나 초음파의 전달속도에 많은 변화를 야기할 수 있으므로 초음파의 전달속도, 흡수, 반사에 미치는 영향이 생체내 근육, 지방, 혈액 등과 유사한 증류수를 매개물로 이용하였다. 초음파 조사중 세포를 배양액에 유지시키기 위하여 5ml 플라스틱 시험관을 사용하였으며, 초음파가 세포로 원활하게 전달되도록 시험관의 하부에 5×10mm의 노출부를 형성하였고, 세포가 들어있는 배양액이 수조의 증류수와 섞이지 않도록 하기 위하여 노출부에 투명 접착테이프를 붙였으며, 시험관의 멸균처리를 위하여 Ethylene Oxide 개스를 이용하였다.

20×30cm 크기의 수조에 증류수를 채운후, 실험실용 쇠집게로 초음파 발생장치의 변환기를 수중에 고정하고 변환기와 시험관의 노출부 사이의 거리를 기준으로 100mm 떨어진 지점에 세포와 배양액을 넣은 시험관을 위치시켰으며 증류수의 온도는 37°C를 유지하였다.

초음파 조사방법은 강도 0.75W/cm<sup>2</sup>, 1.0W/cm<sup>2</sup>의 초음파를 5분간 조사하였으며, 대조군은 초음파를 조사하지 않고 동일한 세포를 동일한 조건으로 배양하여 동일한 항목을 관찰하였다.

#### 2) 세포활성

세포활성의 평가를 위하여 MTT 분석을 시행하였다. 먼저 각 세포를 96-well 배양판(culture plate, Falcon, USA)에 well당 1000개가 되도록 분주하고, 10% FBS-DMEM으로 24시간 배양하여 배양판 바닥에 세포가 부착하도록 하였다. 그후 초음파 조사를 시행하고 24시간과 48시간이 지난후 배양액을 제거하였으며 각 well에 배양액을 100μl 씩 첨가하고 0.01M phosphate buffered saline(PBS)에 5mg/ml의 농도로 녹인 MTT(Sigma) 용액을 필터로 여과하여 well당 10μl 씩 첨가하였다. MTT 용액을 첨가한 후 다시

동일한 배양조건에서 4시간 배양하였다. 그후 배양액을 제거하고 0.04N 염산이 포함된 isopropanol을 well당 100 $\mu$ l 씩 첨가한후 microplate reader(Model 550, Bio-Rad, USA)로 630nm 파장을 참고로 하여 570nm의 파장에서 측정하였다.

3) 단백질합성량

단백질합성량의 평가를 위하여 protein assay kit(Bio-Rad, USA)를 이용하여 배양액내의 총단백질량을 측정하였다. 먼저 각 세포를 24-well 배양판(Falcon, USA)에 well당  $2 \times 10^5$ 개가 되도록 분주하고 10% FBS-DMEM으로 세포가 well에 가득찰때까지 배양한 후 초음파 처치를 시행하였다. 초음파 처치후 24시간과 48시간동안 동일한 조건에서 배양한 후 각 well에서 10 $\mu$ l 씩을 취한 후 protein assay dye를 첨가하고 실온에서 20분간 방치하였다. 그후 microplate reader(Model 550, Bio-Rad, USA)로 595nm의 파장에서 측정하였다.

4) 알카리성 인산효소 활성

단백질합성량 평가와 동일하게 세포를 분주하고 배양한 후 초음파 처치를 시행하였다. 초음파 처치후 24시간과 48시간동안 동일한 조건에서 배양한 후 배양액을 제거하고 세포층을 PBS로 2회 수세하였다. 그후 각 well의 생리식염수에 0.1%의 농도로 희석한 Triton X-100 (Polyscience)을 첨가하고 실온에서 30분간 방치하였다. 0.1M glycine-NaOH 완충액(pH 10.4)에 100mM 농도로 용해

시킨 p-nitrophenyl phosphate를 각 well에 첨가한 후 37°C에서 10분간 배양하였다. 그후 microplate reader(Model 550, Bio-Rad, USA)로 405nm의 파장에서 측정하였다.

III. 실험성적

1. 세포활성

0.75W/cm<sup>2</sup> 강도의 초음파 조사군은 초음파 처치 24시간후 세포활성이 미약하게 감소하였으나 유의성은 없었으며, 48시간후 대조군에 비해 150% 증가된 양상을 보였다. 1.0W/cm<sup>2</sup> 강도의 조사군은 초음파 조사 24시간후 대조군에 비해 120% 증가되었으며, 48시간후 231.5% 증가로 가장 큰 세포활성을 보였다(Table 1, Fig. 1).

2. 단백질합성량

0.75W/cm<sup>2</sup> 조사군의 경우, 초음파 처치 24시간후 단백질 합성량이 감소하였으나, 48시간 후에는 회복되어 대조군과 유사할 정도의 단백질 합성량을 보였다. 1.0W/cm<sup>2</sup> 조사군의 경우, 초음파 조사 24시간후 단백질 합성량이 대조군과 유사하였고, 48시간 후에는 대조군에 비해 102%로 약간 증가하였으나 유의성은 없었다(Table 2, Fig. 2).

**Table 1.** The Changes of the Cell Activity of MC3T3-E1 Cells after Ultrasound Irradiation with the Intensity of 0.75W/cm<sup>2</sup> and 1.0W/cm<sup>2</sup>

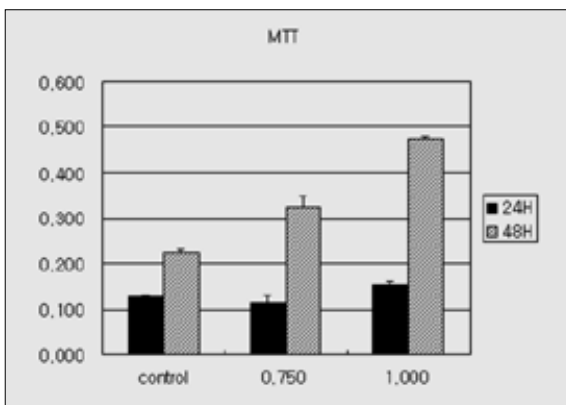
Intensity		control	0.75W/cm <sup>2</sup>	1.0W/cm <sup>2</sup>
24H	AVE	0.128	0.114	0.153 *
	SD	0.002	0.027	0.009
48H	AVE	0.222	0.324 *	0.474 *
	SD	0.009	0.024	0.006

AVE : Average (\* : P<0.05)  
SD : Standard Deviation  
H : Hour

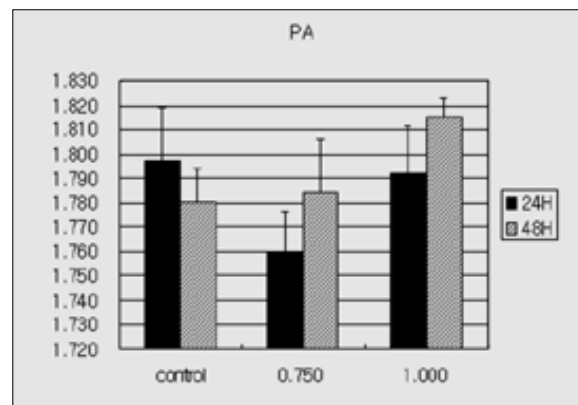
**Table 2.** The Amount of the Total Protein in the Media after Ultrasound Irradiation with the Intensity of 0.75W/cm<sup>2</sup> and 1.0W/cm<sup>2</sup>

Intensity		control	0.75W/cm <sup>2</sup>	1.0W/cm <sup>2</sup>
24H	AVE	1.797	1.760	1.792
	SD	0.022	0.016	0.019
48H	AVE	1.780	1.785	0.008
	SD	0.014	0.022	1.815

AVE : Average  
SD : Standard Deviation  
H : Hour



**Fig. 1.** The changes of the cell activity of MC3T3 -E1 cells after ultrasound irradiation with the intensity of 0.75W/cm<sup>2</sup> and 1.0W/cm<sup>2</sup>.



**Fig. 2.** The amount of the total protein in the media after ultrasound irradiation with the intensity of 0.75W/cm<sup>2</sup> and 1.0W/cm<sup>2</sup>.

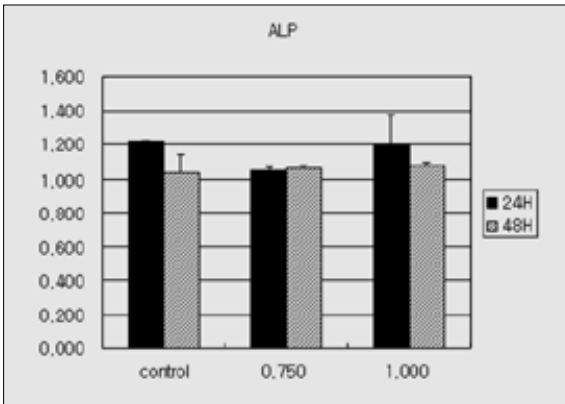
**Table 3.** The Changes of the ALP Activity of MC3T3-E1 Cells after Ultrasound Irradiation with the Intensity of 0.75W/cm<sup>2</sup> and 1.0W/cm<sup>2</sup>

Intensity		control	0.75W/cm <sup>2</sup>	1.0W/cm <sup>2</sup>
Hour				
24H	AVE	1.121	1.049	1.195
	SD	0.013	0.019	0.178
48H	AVE	1.041	1.064	1.074
	SD	0.094	0.010	0.023

AVE : Average

SD : Standard Deviation

H : Hour



**Fig 3.** The changes of the ALP activity of MC3T3-E1 cells after ultrasound irradiation with the intensity of 0.75W/cm<sup>2</sup> and 1.0W/cm<sup>2</sup>.

### 3. 알카리성 인산효소 활성의 평가

0.75W/cm<sup>2</sup> 조사군의 경우, 초음파 조사 24시간후 알카리성 인산효소 활성이 대조군에 비해 87%로 감소하였고, 48시간후에는 대조군에 비해 102%로 약간 증가하였으나 유의성은 없었다. 1.0W/cm<sup>2</sup> 조사군의 경우, 초음파 처치 24시간후 알카리성 인산효소 활성이 대조군에 비해 99%로 거의 변화하지 않았으며, 48시간후 대조군에 비해 103%로 약간 증가하였으나 유의성은 없었다(Table 3, Fig. 3).

## IV. 총괄 및 고안

구강악안면 부위의 골재생을 촉진시키기 위한 연구중 골조직 치유과정에 관여하는 성장인자에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 최근에는 이들이 세포성장기에 국소적으로 작용하고 소실되는 초기 조절자로서, 골세포는 다양한 성장인자를 합성하고 골기질은 이들의 풍부한 자원이 되는 것으로 알려져 있다<sup>40,41</sup>.

골조직은 흡수와 형성이 함께 일어나는 복합조직으로써 손상 후 치유와 재생이 일어날 때 여러성장인자, 골형성단백질등의 생물학적 자극뿐 만 아니라 5~20 $\mu$ A의 낮은 전류, 30~50mW/cm<sup>2</sup>의 낮은 에너지 영역의 초음파, 특수한 파장의 전자장, 그리고 아직은 밝혀지지 않은 많은 요소들이 관여하는 것으로 알려져 있

다<sup>42</sup>.

초음파에너지는 진행방향에 신축하는 파동으로 전파하는 소리의 진동중에 인간의 귀에 들리지 않는 고주파를 가진 에너지의 형태라고 정의된다. 인간이 들을 수 있는 주파수의 범위는 대개 16~1,7000Hz이며, 의료를 목적으로 한 초음파의 주파수는 20~1,000KHz로서 주로 0.8~1.5MHz가 사용된다. 초음파의 진행속도는 어떤 매질속에서는 빠르고 어떤 매질속에서는 느리며, 이는 생물학적 물질에 따른 개개의 전파속도와 음향임피던스에 따라 나타난다. 음향임피던스는 초음파가 전파하는 매질의 비중과 음속과의 곱으로서 건강한 근육 조직내를 대개 1,500msec로 전한다. 조직내에서의 에너지 전달은 주로 조직간의 공간에서 초음파가 얼마나 흡수, 반사되는가에 달려있다<sup>43</sup>.

골절치유의 관여요소로서의 초음파의 역할에 관하여 Xavier와 Duarte<sup>15</sup>는 초기 보고에서 골절의 비유합 환자에게 저강도 초음파를 하루 20분동안 비유합 부위에 적용시켜서 해로운 영향없이 70%가량의 증례에서 치유되었다고 하였다. 다른 임상연구를 살펴보면, Heckman 등<sup>17</sup>은 저강도 초음파 처치시 경골골절의 치유 촉진을 보고하였고, Cook 등<sup>18</sup>과 Kristiansen 등<sup>19</sup>은 경골과 요골의 원심부 골절시 치유기간을 감소시키 $\infty$  지연유합의 발생률을 감소시켰다고 하였다. Duarte<sup>20</sup>는 토끼 비골 골절단의 치유와 대퇴골의 피질골 결손부 충전에서 저강도 초음파가 촉진시킨다는 사실을 조직학적인 방법과 방사선학적인 방법으로 보여주었다. 즉 수술후 13일에 초음파를 조사한 군에서 가골형성의 증가를 보였는데, 골절단의 가골부위에서 200%, 피질골결손부에서 170% 증가되었다고 하였다. 그리고 곧이어 Klug 등<sup>21</sup>은 고강도 초음파 처치시 토끼 경골 골절 모델에서의 조영활성도가 유의성있게 높게 나타남으로써 치유속도를 증가시킨다고 하였다. Pilla 등<sup>22</sup>은 골절된 골의 비틀림 강도의 회복촉진을 보고하였고, Wang 등<sup>23</sup>은 백서의 대퇴골 골절 모델에서 저강도 초음파를 처치한 후, 실제로 골강도가 증가되었다고 하였다. Ito 등<sup>44</sup>과 Jinguishi 등<sup>45</sup>은 초음파 신호의 특이성분에 대한 조직선택성을 강조하였는데, 그 결과로 200 $\mu$ s와 1KHz 주파수가 골절치유에 적합함을 보여주었다. Wu 등<sup>46</sup>은 초음파 에너지가 조직의 밀도에 비례하여 흡수된다고 하였다. 이러한 차별화된 흡수는 골절간격에 대한 초음파의 표적에서 중요한 역할을 한다고 하였다.

초음파의 골형성과 골절치유의 촉진에 관한 생물학적 기전에 관한 연구중 시험관내 연구의 첫번째 시도는 초음파가 백서의 홍선세포에서 칼슘이온의 세포막 이동속도에 변화를 일으킨다는 것을 보고한 Chapman에 의해서이다<sup>24</sup>. Ryaby 등<sup>26,28</sup>은 저강도 초음파가 분화된 연골과 골세포의 칼슘흡수를 증가시킨다고 하였다. Parvizi 등<sup>29</sup>은 Mayo clinic에서 백서의 연골세포에 대한 초음파의 효과를 조절하는 2차 전달자의 경로에 관하여 실험적으로 보여주었다. 이들 연구에 의하면 50mW/cm<sup>2</sup>과 그 이상의 강도를 가진 초음파가 칼슘의 세포내 수준을 즉시 증가시킨다고 하였다. 이들 연구는 세포 활성도에 초음파가 영향을 줄 수 있다는 사실을 보여주었으나, 초음파가 치유속도에 영향을 준다면 치유과정에 관여하는 특이 유전자의 발현에 영향을 주어야만 한다. 최근에 Wu 등<sup>30</sup>은 연골세포에 저강도 초음파를 노출시켰을때

aggrecan 유전자 발현을 상승시킨다고 하였다. 연골화 과정에서 이들 chondroitin sulfate 분자는 hyaluronan, decorin, biglycan 등과 함께 골절부의 가골 형성에 중요한 구성요소인 제2형 아교질을 위하여 proteoglycan 형성요소를 생산한다고 하였다. Yang 등<sup>2)</sup>은 시험관 연구로부터 생체연구로 옮겨서 백서의 양측성 대퇴골 골절 모델에서 다음과 같은 가설을 증명하였다. 즉 50~100mW/cm<sup>2</sup>의 저강도 초음파는 외상치유의 악조건에서 aggrecan 유전자 발현을 증가시킨다는 사실과 생역학적 수준의 연관성을 살펴보기 위한 실험에서 뒤틀림 강도가 초음파 처치군에서 증가한다는 사실을 함께 증명하였다. Doan 등<sup>4)</sup>은 방사선 골괴사에서 나타날 수 있는 저산소증, 저혈관증, 저세포증을 방지하거나 환원시킬 수 있는 초음파의 실험적 효과를 평가한 결과, 치은섬유모세포와 하악골세포에서 세포증식과 단백질 합성이 증가되었다고 하였다.

50년대 혹은 60년대의 문헌에서는 골절부위에 초음파를 적용하는 것이 골의 유합에 해롭다는 연구가 많았으나 80년대와 90년대의 문헌에서는 골절부위에 초음파를 적용할 경우에 골절치유 효과가 있을 것이라고 보고되고 있다. 이러한 이유는 초음파 치료기구의 발달로 인하여 초음파의 주파수나 강도, 그리고 전달양식(mode)을 다양하게 변화시킬 수 있기 때문일 것으로 사료된다.

본 연구에서 사용한 초음파 장치는 주파수가 1.0MHz로 고정되어 있고, 초음파 강도와 처치시간을 조절할 수 있도록 되어 있다. 초음파는 강도와 주파수, 전달양식에 따라 조직에서 흡수, 반사, 전파, 그리고 분포가 달라지므로 동물이나 인체에 미치는 영향에 대하여 다양한 주파수와 강도, 그리고 전달방법을 바꾸어 생리적 효과를 검증해 볼 필요가 있다. Mortimer 등<sup>25)</sup>은 섬유모세포의 칼슘흡수에 대한 초음파의 효과를 연구하기 위하여 0.25W/cm<sup>2</sup>부터 1.5W/cm<sup>2</sup>의 강도로 1~20분간 조사한 결과, 5분간 조사시 0.5W/cm<sup>2</sup>, 0.75W/cm<sup>2</sup>, 1.0W/cm<sup>2</sup>에서 칼슘흡수가 증가하였다고 보고하였다. 이에 본 실험에서는 강도는 0.5W/cm<sup>2</sup>, 0.75W/cm<sup>2</sup>, 1.0W/cm<sup>2</sup>, 1.5W/cm<sup>2</sup>, 조사시간은 5분과 10분간, 변환기와 세포와의 거리는 50mm와 100mm를 구분하여 예비실험을 시행하여 세포 활성화에 변화를 보였던 0.75W/cm<sup>2</sup>와 1.0W/cm<sup>2</sup>의 강도와 조사시간 5분, 변환기와 세포와의 거리 100mm를 설정하여 실험하였다.

치료적 맥관형성(therapeutic angiogenesis)이라는 용어는 국소적 저혈관상태인 병적임상상태를 치료 또는 예방하기 위하여 신생혈관화(neovascularization)와 신생세포화(neocellularization) 과정을 유도하거나 자극하는 것을 말한다. 치유와 조직재생은 치료적 맥관형성에 의해 증가되거나 촉진될 수 있다<sup>46)</sup>. 치료적 맥관형성을 위한 고전적인 외과적 방법은 가까운 미래에 맥관적 요소의 국소적 적용과 생체외에서 배양된 자가모세혈관 내피세포의 식립에 의해 대체될 것이다. 몇몇 임상자료들 뿐만 아니라 실험자료들은 치료적 맥관형성을 위한 맥관형성요소들의 유용성을 뒷받침하고 있다. 초음파 치료는 치료적 맥관형성을 생성하는 가장 간단한 방법중의 하나로서, Young와 Dyson<sup>49)</sup>은 백서 피부병소에서 초음파의 맥관형성 유도를 보고하였고, 이를 뒷받

침해주는 많은 문헌이 보고되었다<sup>2,5,14)</sup>.

조직의 재생과정에서 골모세포는 세포증식, 세포외기질 성숙, 석회화의 과정을 통하여 분화된다. 이때 세포의 증식을 나타내는 MTT분석, 결합조직을 재생시키는데 필요한 단백질 분비량, 석회화가 시작되는 시기에 증가되는 알칼리성 인산효소 활성을 조사함으로써 초음파 조사가 골모세포의 분화과정에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

본 연구에서 세포활성의 평가는 덜 융합된(subconfluent) 상태로 분주된 세포에 0.75W/cm<sup>2</sup>, 1.0W/cm<sup>2</sup>의 강도로 5분간 초음파 조사후, MTT assay를 통해 시행하였다. 0.75W/cm<sup>2</sup> 강도의 초음파 조사군은 초음파 조사 24시간후 세포활성이 미약하게 감소하였으나, 48시간후 대조군에 비해 150% 증가된 양상을 보였다. 1.0W/cm<sup>2</sup> 강도로 조사한 군은 초음파 조사 24시간후 대조군에 비해 120% 증가되었으며, 48시간후 231.5% 증가로 가장 큰 세포활성을 보였다.

유사분열은 세포의 활성을 나타내는 증식에 기본적인 역할을 하며, 중간기에 염색체의 주성분인 DNA의 복제가 일어난다. 이러한 중간기는 유사분열에 의해 반으로 줄어든 세포용적이 RNA에 의한 단백질 합성을 통해서 정상크기로 회복되는 G<sub>1</sub>기, DNA와 중심체가 복제되는 S기, 유사분열에 필요한 에너지가 축적되며 미세소관으로 조립될 투블린이 합성되는 G<sub>2</sub>기 및 세포주기가 일시적 또는 영구적으로 중단된 상태인 G<sub>0</sub>기가 존재하는데, 초음파 처치후 이들 세포의 세포증식율이 증가된 것은 세포분열주기상 G<sub>0</sub>기의 세포들이 G<sub>1</sub>기로 진입하였거나 혹은 세포분열주기가 감소되었기 때문으로 사료된다<sup>51-53)</sup>. 이러한 결과는 대부분의 세포에 있어 세포주기의 장단이 G<sub>0</sub>기의 길이의 차이에서 비롯되고<sup>54,55)</sup>, 특히 G<sub>0</sub>기의 유지 여부는 해당세포와 외적환경과의 관계에서 결정된다는 점에서 더욱 그렇다<sup>56,57)</sup>. 또한 초음파 조사에 의하여 세포의 수가 증가된 것은 적어도 부분적으로는 세포분열주기를 이탈하여 활동이 중지된 세포들이 초음파의 자극으로 세포분열주기로 재진입한 결과로 세포증식이 촉진된 것으로 사료된다<sup>58,59)</sup>.

본 연구의 단백질 합성량의 평가는 융합된(confluent) 상태로 분주된 세포에 0.75W/cm<sup>2</sup>, 1.0W/cm<sup>2</sup>의 강도로 5분간 초음파 조사후, protein assay를 통해 시행하였다. 0.75W/cm<sup>2</sup> 조사군은 초음파 조사 24시간후 단백질 합성량이 감소하였으나, 48시간 후에는 회복되어 대조군과 유사할 정도의 단백질 합성량을 보였다. 1.0W/cm<sup>2</sup> 조사군은 초음파 조사 24시간후 단백질 합성량이 대조군과 유사하였으나, 48시간후 대조군에 비해 102%로 약간 증가하였다.

일반적으로 치유 및 재생과정에서는 결합조직의 여러 세포들이 모여들고 증식하게 되며, 이러한 과정에서 필요한 여러 가지 물질들을 분비한다<sup>60)</sup>. 이 부위로 이동하여 증식한 세포들중 세포들은 결합조직을 치유, 재생시키는데 필요한 단백질을 분비한다. 이들 단백질의 분비는 크게 두 단계로 나누어 이루어지게 되는데, 먼저 무정형의 기질이 분비되고 그 이후에 아교질과 같은 섬유성분이 분비, 침착하게 된다<sup>60)</sup>. Sodek 등<sup>60)</sup>은 섬유모세포가 활성화되면 높은 아교질 합성능력을 가지며 새로 형성된 아교질

분자의 가장 효과적인 결합능력이 있다고 하였다. 아교질의 합성 및 분비과정은 세포내의 폴리솜 부위에서 개개의 아미노산이 연결되어 기다란 폴리펩티드 사슬을 형성하여 프로콜라겐의 고분자를 형성함으로써 이루어진다. 이 프로콜라겐은 조면형질내 세망을 거쳐 세포의 골지복합체 부위로간다. 거기서 당화라고 알려진 과정을 통해 탄수화물 성분이 고분자에 첨가된다. 일단 당화된 프로콜라겐은 소포형태로 세포표면으로 옮겨져 분비된다<sup>61)</sup>.

본 연구에서는 배양액내에 존재하는 총 단백질의 양을 측정하는 것이었으므로 실험기간중 합성된 단백질이 아니더라도 배양액내에 존재하는 단백질이 모두 검출되었다. 즉 세포가 손상되어 세포활성이 크게 감소한 경우에도 세포막의 손상으로 인하여 세포내에 존재하던 여러 단백질이 세포외로 유출되어 배양액내에 존재할 수 있으나, 세포활성이 증가되었으므로 세포의 손상으로 인한 변화는 아닐 것으로 사료된다.

골화가 일어나는 부위에서 칼슘인산염의 침착을 조절하는 인자를 알아내기 위한 연구중 *Junqueria* 등<sup>62)</sup>에 의한 연구에 의하면 골조직에서 인산염 이온의 농도가 뼈모세포에 많이 함유되어 알칼리성 인산효소의 활성에 의해 국소적으로 증가한다고 보고되었다.

본 연구에서 알칼리성 인산효소 활성을 평가한 결과, 0.75W/cm<sup>2</sup> 조사군과 1.0W/cm<sup>2</sup> 조사군 모두 24시간후에는 약간 감소하였고, 48시간후에는 약간 증가하였으나 유의성은 없었다.

골모세포의 성장단계는 세포증식, 세포외기질 성숙 및 석회화로 이어지는 세가지 중요한 시기와 두가지 제한 시점인 세포증식이 감소되고 기질성숙과 관련된 유전자 발현이 시작하는 시점 그리고 석회화가 시작되는 시점으로 나뉘어진다. 이 단계에 따라 세포분열기에는 세포주기조절 유전자인 H4 histone, 세포성장 조절 유전자인 c-myc과 c-fos 등이 기질성숙기에는 세포기질관련 유전자인 교원질, 당단백 등이 그리고 골모세포의 분화에 따라 골모세포 표현형 marker gene인 인산가수 분해효소가 발현된다. 특히 골모세포의 증식이 감소하고 세포외기질 성숙이 시작되는 시기에 인산가수분해효소 유전자가 발현되고, 또 석회화가 시작하는 시기에 유전자의 발현과 칼슘의 침착이 증가하게 되며, 이들 유전자들은 복잡한 신호기전에 의해 골모세포의 분화를 조절하게 된다<sup>63)</sup>.

한편 Tjandrawinata 등은 MC3T3-E1 세포에 대하여 우주왕복선이 발사되는 동안 발생하는 진동힘을 가한 후 8개의 유전자 발현을 위한 mRNA 수준을 조사하였다. 그결과 진동힘을 가한지 30분 후 골모세포의 증식과 관련된 c-fos와 c-myc의 mRNA는 각각 4배와 2배가량 증가하였고, 3시간후에는 기질성숙과 관련된 TGF-β1과 무기질화 과정과 관련된 osteocalcin이 각각 1.5배 감소하였다. 이는 진동힘이 세포의 증식을 활성화하고 분화를 억제한다는 결과라고 주장하였다<sup>64)</sup>.

초음파의 생물학적 기전중 초음파에 의한 공동화(cavitation)로 인하여 진동운동과 음향흐름을 일으키는 것이 Tjandrawinata 등<sup>64)</sup>의 진동힘과 유사한 작용을 하는 것이라면, 본 연구에서와 같이 세포활성의 증가와 함께 단백질 합성이나 알칼리성 인산효소의

활성이 거의 영향을 받지 않는 것을 설명할 수 있을 것으로 사료된다.

그러나 본 연구는 시험관내의 골모세포의 활성화에 대한 실험으로써 향후 구강악안면 영역의 생체내 실험 및 임상에 적용시 골조직 상부의 조직의 종류 및 두께에 따른 적절한 강도와 주파수를 위한 실험이 계속되어야 하며, 골모세포의 활성화와 분화과정에 각각 어떻게 영향을 미치는 가에 대하여도 계속된 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

구강악안면 영역의 골조직 재생에 대한 초음파의 효과를 조사하기 위해서 골모세포양 세포주인 MC3T3-E1 세포에 초음파를 조사하여, 세포의 활성, 단백질 합성량, 알칼리성 인산효소 활성을 평가하여 초음파 응용의 기초적 지식을 제공하고자 하였다. 즉 주파수 1MHz, 강도 0.75W/cm<sup>2</sup>과 1.0W/cm<sup>2</sup>의 초음파를 초음파 변환기와 세포와의 거리 100mm의 조건으로 5분간 처치하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 골모세포는 초음파 조사에 의해 0.75W/cm<sup>2</sup>군은 48시간후 세포활성이 증가하였고, 1.0W/cm<sup>2</sup>군은 24시간후와 48시간후 모두 대조군에 비해 세포활성이 증가하였으며 특히 48시간후 큰 증가를 보였다.
2. 골모세포는 초음파 조사에 의해 1.0W/cm<sup>2</sup>군의 경우 48시간후 대조군에 비해 단백질 합성량이 약간 증가하였으나 유의성은 없었다.
3. 골모세포는 초음파 조사에 의해 0.75W/cm<sup>2</sup>군과 1.0W/cm<sup>2</sup>군 모두 대조군에 비해 알칼리성 인산효소의 활성이 약간 증가하였으나 유의성은 없었다.

이상의 결과로 초음파 조사에 의해 단백질 합성과 알칼리성 인산효소의 활성에는 큰 영향이 없었으나, 세포증식이 활성화되었으며, 특히 1.0W/cm<sup>2</sup>의 강도로 100mm 거리에서 5분간 조사후 세포증식이 큰 영향을 받았으므로 향후 각각의 조건에 따라 주파수와 강도를 변화시킨다면 골모세포의 세포활성 과정에 영향이 있어 골조직 재생에 영향을 미칠 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 양규현: 초음파를 이용한 골절치유촉진. 대한의사협회지 39(6):771-776, 1996.
2. Yang KH, Parvizi J, Wang SJ, et al: Exposure to low density ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model. J Orthop Res 14:802-809, 1996.
3. Suslick KS[ed]: Ultrasound: Its chemical, physical, and biological effects. New York, VCH Publishers, 1988.
4. Hadjiargyrou M, McLeod K, Ryaby J, et al: Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. Clin Orthop Res 355S:S216-S229, 1998.
5. Dyson M, Pond JB, Joseph J: The stimulation of tissue regeneration by means of ultrasound. Clin Sci 35:273, 1968.
6. Dyson M: Role of ultrasound in wound healing, in Kloth LC,

- McCulloch JM, Feedar JA(eds): Wound healing: Alternatives in management. Philadelphia, PA, Davis, 259-285, 1990.
7. Dyson M, Franks C, Suckling J: Stimulation of healing of varicose ulcers by ultrasound. *Ultrasonics* 14:232, 1976.
  8. Paul BJ, LaFratta CW, Dawson AR, et al: Use of ultrasound in the treatment of pressure sores in patients with spinal cord injuries. *Arch Phys Med Rehabil* 41:438-440, 1960.
  9. 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, 1982.
  10. Harvey W, Pond JB: The stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by therapeutic ultrasound. *Rheumatol Rehabil* 14:237, 1975.
  11. Reher P, Doan N, Bradnock B: The introduction of long wave ultrasound therapy for osteoradionecrosis. *Oral Dis* 3:S23, 1997(abstr)
  12. Webster DF, Pond JB, Dyson M: The role of cavitation in the in vitro stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 4:343, 1978.
  13. Enwemeka CS, Rodriguez O, Mendosa S: The biomechanical effects of low-intensity ultrasound on healing tendons. *Ultrasound Med Biol* 16:801-807, 1990.
  14. Harris M: The conservative management of osteoradionecrosis of the mandible with ultrasound therapy. *Br J Oral Maxillofac Surg* 30:313-318, 1992.
  15. Xavier CAM, Duarte LR: Estimulaci ultra-sonica de callo osseo: Applicaca clinica. *Rev Brasileira Orthop* 18:73-80, 1983.
  16. Dyson M, Brookes M: Stimulation of bone repair by ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 2(Suppl): 61-66, 1983.
  17. Heckman JD, Ryaby JP, McCabe J, et al: Acceleration of tibial fracture healing by non-invasive low intensity pulsed ultrasound. *J Bone Joint Surg* 76A:26-33, 1994.
  18. Cook SD, Ryaby JP, McCabe J, et al: Acceleration of tibia an distal radius fracture healing in patients who smoke. *Clin Orthop* 337:198-207, 1997.
  19. 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* 79A:961-973, 1997.
  20. Duarte LR: The stimulation of bone growth by ultrasound. *Arch Orthop Trauma Surg* 101:153-159, 1983.
  21. Klug W, Franke WG, Knoch HG: Scintigraphic control of bone-fracture healing under ultrasonic stimulation: An animal experimental study. *Eur J Nucl Med* 11:494-497, 1986.
  22. Pilla AA, Mont MA, Nasser PR, et al: Non-invasive low intensity pulsed ultrasound accelerates bone healing in the rabbit. *J Orthop Trauma* 4:246-253, 1990.
  23. Wang SJ, Lewallen DG, Bolander ME, et al: Low intensity ultrasound treatment increases strength in a rat femoral fracture model. *J Orthop Res* 12:40-47, 1994.
  24. Chapman I, MacNally NA, Tucker S: Ultrasound -induced changes in rates of influx and efflux of potassium ions in rat thymocytes in vitro. *Ultrasound Med Biol* 6:47-58, 1980.
  25. Mortimer AJ, Dyson M: The effect of therapeutic ultrasound on calcium uptake in fibroblasts. *Ultrasound Med Biol* 14:499-506, 1988.
  26. Ryaby JT, Bachner EJ, Bendo J, et al: Low intensity pulsed ultrasound increases calcium incorporation in both differentiating cartilage and bone cell cultures. *Trans Orthop Res Soc* 14:15, 1989.
  27. Ryaby JT, Matthew J, Duarte-Alves P: Low intensity pulsed ultrasound affects adenylate cyclase activity and TGF- $\beta$  synthesis in osteoblastic cells. *Trans Orthop Res Soc* 17:590, 1992.
  28. Ryaby JT, Matthew J, Pilla AA, et al: Low intensity pulsed ultrasound modulates adenylate cyclase activity and transforming growth factor beta synthesis. In Brighton CT, Pollack SR(eds). *Electromagnetics in biology and medicine*, San Francisco, Sanfrancisco Press 95-100, 1991.
  29. Parvizi J, Parpura V, Kinnick RP, et al: Low intensity ultrasound increases intracellular concentration of calcium in chondrocytes. *Trans Orthop Res Soc* 22:465, 1997.
  30. Wu C-C, Lewallen DG, Bolander ME, et al: Exposure to low intensity ultrasound stimulates aggrecan gene expression by cultured chondrocytes. *Trans Orthop Res Soc* 21:622, 1996.
  31. Dyson M: Non-thermal cellular effects of ultrasound. *Br J Cancer* 45:165-171, 1982.
  32. Hill CR: Ultrasonic exposure thresholds for changes in cells and tissues. *J Acoust Soc Am* 52:667-672, 1971.
  33. Webster DF, Pond JB, Dyson M, et al: The role of cavitation in the in vitro stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 4:343-351, 1978.
  34. Sachs F: Mechanical transduction by membrane ion channels : a mini review. *Mol Cell Biochem* 104:57-60, 1991.
  35. Wang N, Butler JP, Ingber DE: Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 260:1124-1127, 1993.
  36. Sandy JR: Hormonal and mechanical regulation of osteoblast function (PhD Thesis). University of London, England, 1988.
  37. Behari J, Singh S: Ultrasound propagation in "in vivo" bone. *Ultrasonics* 19:87-90, 1981.
  38. Duarte LR: The stimulation of bone growth by ultrasound. *Arch Orthop Trauma Surg* 101:153-159, 1983.
  39. Kodama H, Amagai Y, Sudo H, et al: Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria. *Jpn J Oral Biol* 23:899-901, 1981.
  40. Canalis E, McCathy T, Centrella M: Growth factors and the regulation of bone modeling. *J Clin Invest*. 81:277-281, 1988.
  41. Urist MR, Delange RJ, Finerman GA: Bone cell differentiation and growth factors. *Science* 220:680-686, 1993.
  42. Yasko AW, Lane JM, Fellingner EJ, et al: The healing of segmental bone defects, induced by recombinant bone morphogenic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biochemical study in rats. *J Bone Joint Surg*. 74A:659-670, 1992.
  43. 谷腰欣司 箸, 이종락 역: 초음파와 그 사용법, 도서출판세화, 1997, 11-52.
  44. Ito M, Azuma Y, Harada Y, et al: Low intensity pulsed ultrasound accelerates fracture healing in a rat femoral fracture model. *Trans Orthop Res Soc* 23:732, 1998.
  45. Jinguishi S, Azuma Y, Ito M, et al: Effects of non-invasive pulsed low-intensity ultrasound on rat femoral fracture. *Third World Congress of Biomechanics*. Sapporo, Japan, 1756, 1998.
  46. Wu J, Du G: Temperature elevation in tissues generated by finite-amplitude tone bursts of ultrasound. *J Acoust Soc Am* 88:1562-1577, 1990.
  47. Doan N, Reher P, Meghji S, et al: In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts, and monocytes. *J Oral Maxillofac Surg* 57:409-419, 1999.
  48. Hockel M, Schlenger K, Doctrow S, et al: Therapeutic angiogenesis [Review]. *Arch Surg* 128:423-429, 1993.
  49. Young SR, Dyson M: The effect of therapeutic ultrasound on angiogenesis. *Ultrasound Med Biol* 16:261-269, 1990.
  50. Tompach PC, Lew D, Stoll JL: Cell response to hyperbaric oxygen treatment. *Int J Oral Maxillofac Surg* 26:82, 1997.
  51. Pardee AB: A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 71:1286, 1974.
  52. Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, et al(ed): *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 11th ed., p432, McGraw-Hill Book Co., New York, 1987.
  53. Stein GS, Lian JB, Owen TA: Relationship of cell growth to the regulation of tissue specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J*. 4:3111-3123, 1990.
  54. Tolmach LJ, Lajtha LG, Smith CL, et al: Differential sensitivity of the cell life cycle. *J. Cell Comp. Physical.*, 62(suppl):141-156, 1963.
  55. Burns FJ, Tannock IF: On the existence of a G0 phase in the cell cycle. *Cell Tissue Kinet.*, 3:321, 1970.
  56. Baserga RL: Cell division and the cell cycle in Finch, CE, and Hayflick, L (eds): *Handbook of the Biology of Aging*. Van Nostrand Reinhold, New York, 1977.
  57. Mendelsohn ML: The growth fraction-A new concept applied to tumors. *Science*, 132:1496, 1960.

58. Ross R: The fibroblasts and wound repair. *Biol. Rev.*, 43:51-96, 1968.
59. Bentley JP: Rate of chondroitin sulfate formation in wound healing. *Ann. Surg.*, 165:186-191, 1966.
60. Sodek J, Berkman FA: Bone cell cultures. In: *Methods in Enzymology*, Vol. 145. Academic Press:303-324, 1987
61. Butler WT: Dentin matrix proteins and dentinogenesis. Proceedings of the Vth international conference on tooth morphogenesis and differentiation, May 4-8, 1994, Kerkrade, The Netherlands. Woltgens, JHM, Bronckers, ALJJ, Lyaruu, DM, editors. *Connect. Tissue Res.*, 32(1), 1995.
62. Junquera LC, Carneiro J, Kelly RO: *BASIC HISTOLOGY*, 8th ed. Appleton and Lange, East Norwalk, p143, 1995.
63. Lian JB, Stein GS: Concepts of osteoblast growth and differentiation: Basic for modulation of bone cell development and tissue formation. *Crit. Rev. Oral Biol Med* 3:269-305, 1992.
64. Tjandrawinata RR, Vincent VL, Hughes-Fulford M: Vibrational force alters mRNA expression in osteoblasts. *FASEB J* 11(6):493-497, 1997.