

Hybrid Bioreactor를 이용한 물리적 자극에 대한 세포반응 연구

이창양^{1,2}, 최귀원¹, 홍대희²

¹한국과학기술연구원 의과학연구소, ²고려대학교 공과대학 기계공학과
(2004년 5월 31일 접수, 2004년 8월 9일 채택)

A Study on the Effect of Physical Stimuli on Bone Cell Differentiation Using a Hybrid Bioreactor

Changyang Lee^{1,2}, Kuiwon Choi¹, Daehie Hong²

¹Biomedical Research Center, Korea Institute of Science and Technology
²Department of Mechanical Engineering, College of Engineering, Korea University
(Received May 31, 2004. Accepted August 9, 2004)

요약 : 본 연구에서는 세포배양을 위해 개발된 복합생물반응기(Hybrid bioreactor)의 배양조건의 유효성을 평가하고, 3차원 키토산 지지체(Chitosan-Scaffold Sponge Type)에 배양된 세포에 Hybrid Bioreactor를 이용한 물리적 자극에 대한 반응을 실험하였다. Hybrid bioreactor는 압축변형과 전단변형을 동시에 가할 수 있도록 제작 되었다. 본 실험에서는 지지체 크기의 2.5% 변형으로 14일간 150회씩 0.5Hz 로 물리적 자극을 가하였다. 14일간 배양한 세포군은 일정 날짜에 샘플링 (sampling) 하였다 (Day 6, 8, 10, 12, 14). 세포 성장 정도를 알 수 있는 전체 단백질 양을 Lowey의 방법으로 분석하였으며, 분화의 시작을 알리는 표적단백질인 알카라인 포스파타제(Alkaline phosphatase)양을 ELISA로 측정하였다. Hybrid bioreactor를 이용하여 물리적 자극을 가한 군은 자극을 가하지 않은 군에 비하여 표적단백질의 형성을 촉진하였으며, 자극을 가한 군에서 자극을 가하지 않은 군에 비해 빠른 칼슘침착을 나타내었다.

Abstract : In this study, hybrid bioreactor was used to apply physical stimuli in cell culture. Effect of the applied physical stimuli on the growth and differentiation of MC3T3-E1 cell in a three-dimensional Chitosan scaffold were studied by using the hybrid bioreactor. The hybrid bioreactor for physical stimulus was specially designed to apply uniaxial cyclic compressive and shear strain. Physical stimulus was applied over a period of 14 days with 150 cycles per day at a frequency of 0.5Hz. Strain magnitude was 2.5% of the scaffold size. Control group and physically stimulated group of the MC3T3-E1 cell were incubated and harvested at the indicated times (Day 6, 8, 10, 12, 14). The total amount of protein, which obtained information of cell growth, was determined by Lowey method. Alkaline phosphatase activity was examined by ELISA. Physically stimulated group using the hybrid bioreactor was increased in alkaline phosphatase activity comparing with control group. The nodule formation and calcium deposit of the physical stimuli group which resulted in cell differentiation was faster than that of control group.

Key words : MC3T3-E1, Bioreactor, Physical stimuli, Proliferation, Differentiation, Alkaline phosphatase activity

서 론

뼈는 특수한 형태의 조직으로 뼈바탕질(Bone matrix), 뼈세포(Osteocyte), 뼈모세포(Osteoblast), 뼈파괴세포(Osteoclast) 로 구성되어있으며, 뼈바탕질은 대부분 아교섬유로 구성된 유기질 성분과 주로 칼슘으로 구성된 무기질 성분으로 이루어진다[1]

뼈는 인체에서 기계적 지지와 장기의 보호, 인체에 혈액과 무기질을 공급하는 기능을 하고 있다[2]. 이러한 기능에 미루어 여러가지 질병과 외상으로 인한 조직의 손상은 인체에 있어서 큰 기능장애를 일으킬 수 있으며, 손상된 조직은 자기 방어 기전에 의해 재생(regeneration)되는 과정을 거쳐 원래의 기능을 수행하게 된다.

여러 종류의 세포들로 구성된 골조직은 기계적인 자극에 대해 가장 활발하게 반응하는 생물학적인 구조물이다. 골절로 손상된 뼈는 뼈모세포(osteoblast)와 뼈파괴세포(osteoclast)에 의해 골형성과 골흡수 과정으로 정교하게 조절되어 치유 된다[1,2,3].

치유된 뼈조직과 골격이 연속성을 유지하고 기계적으로 신체를 지지할 수 있는 치료가 필요하며, 현재 골 재생 또는 대체하는 치료들이 많이 수행되고 있지만 많은 한계점들이 존재하므로 많은 연구자들이 근본적인 치료방법을 연구하고 있다[4,5].

최근에 골 재생 분야의 연구가 활발히 진행되고 있는데 이에 조직공학 분야에서 3차원 지지체(scaffold)에 근원 세포를 배양함으로써 조직 대체물을 만들어 내는 연구를 시도하였다[5,8]. 이러한 조직공학 기법은 골세포를 배양하여 인공 가골을 만들어 손상된 조직에 이식하여 골 재생이 가능하도록 하고 있다. 이러한 연구와 더불어 골 세포에 직접적인 물리적 자극을 주어 이것의 영향을 보고자 하는 연

구도 활발히 진행되고 있다. 평면배지에서 키운 쥐의 골 세포에 13kPa의 반복 압축력을 18분 주기로 48시간 동안 가한 경우 alkaline phosphatase activity는 48%증가를 보였고, osteopontin은 1.4배의 증가가 있었다고 한다[6,8]. 기계적인 압축력은 alkaline phosphatase활성도 뿐만 아니라 osteopontin같은 골-특징적인 유전자의 발현을 촉진시킨다는 것도 보고된 바 있다[3,4].

이처럼 물리적인 자극이 골 세포의 성장과 유지에 중요한 역할을 하고 있다는 사실을 기반으로 하여 이를 조직공학에 응용해 보고자 한다.

조직재생공학은 노령화사회의 필수적인 의료기술이며 세포의 자극을 유도하여 활성화 시키는 기술은 장기 및 조직재생의 기술로 활용 가능하다. 조직 재생분야의 성패는 효율적인 대량생산 기술의 확보에 좌우될 것이다. 이러한 기술의 확보에 있어서 생물반응기(Bioreactor)의 역할이 지대하며, 유전공학 및 인체 치료용 단백질 기능 규명을 위한 단백질 생산 공정의 수요 증대에 부응하여, 신의약품 개발에 응용, 동물 세포 배양 기술을 이용한 인공치아, 인공 피부 등 인공 장기의 개발은 신의료 기술의 개발, 사회 복지 및 삶의 질 향상에 기여 등의 장점을 나타낸다.

따라서 본 연구에서는 보다 효과적으로 세포들을 분화 및 성장시키기 위하여 도움이 되는 요소들 가운데 물리적 자극에 해당되는 압축 변형 및 전단 변형을 가할 수 있는 복합생물반응기(hybrid bioreactor)를 이용하여 3차원 키토산 지지체에 골모세포와 유사한 성질을 가지고 있는 MC3T3-E1세포를 배양하여 물리적 자극이 골 세포의 성장과 분화에 어떠한 영향을 미치는지 특정단백질의 분비 정도와 분비되는 시기를 통하여 알아보고, 영상을 통하여 검증하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에서는 단층으로 점착하여 자라며 섬유 아세포의 형태를 가지고 있는 MC3T3-E1 cell line을 3차원 키토산 지지체(Chitosan-Scaffold Sponge Type)에 배양하여 Hybrid Bioreactor를 이용한 물리적 자극에 대한 세포반응을 실험할 것이다.

MC3T3-E1 세포는 Mouse 두개골 아래쪽 턱에서 유래되었으며, 염기성 인산분해효소인 알카라인 포스파타제(ALP)활성과 교원질 합성능이 있다. 장기간 배양시 골기질의 축적, 석회화, 성장인자의 효과로 인한 형태와 물질대사의 변화를 관찰할 수 있다[9,11].

MC3T3-E1는 골분화 과정 동안 뼈와 관련된 단백질 발현 패턴을 좀더 폭넓게 이해할 수 있어 실험에 적합한 세포주이다[9].

본 논문에서는 실험에 사용된 키토산 지지체를 그림 1에 나타내었다. 외형은 길이가 8 x 8 x 4mm의 직육면체이며, 그림 1에서처럼 다공성 기공을 가진 해면체 구조로 제작되었다.

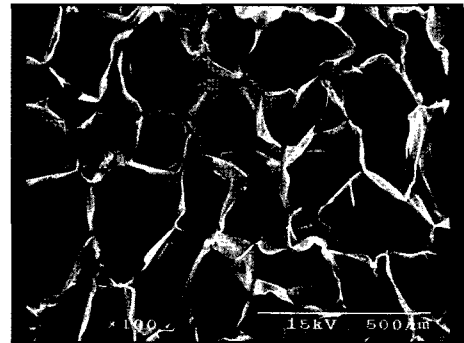


그림 1. 3차원 키토산 지지체

Fig. 1. Three-dimension porous chitosan scaffold

2. 세포배양

MC3T3-E1 세포 배양에는 100mm 배양 접시에서 alpha-minimum essential medium (α -MEM, Gibco BRL)에 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco BRL)으로 구성된 배양액을 사용하여, 37°C, 5% CO₂ 농

도로 배양기에서 배양하였다. 2차 배양시에는 trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 분리 1:6 또는 1:8 계대 배양하였다[14].

세포들을 키토산 지지체(Chitosan scaffold)에서 배양하기 위하여 지지체(scaffold)를 70% 에탄올을 이용하여 24시간 자외선(UV) 아래에서 소독 후 에탄올을 제거하기 위해 멸균된 PBS로 세척한 후, 세포를 배양하기 위해서 배양액 alpha-minimum essential medium (α -MEM, Gibco BRL)에 2시간 정도 담궈 둔 후에 배양액을 제거한 후, 배양한 세포를 Sigma사의 세포카운터를 이용하여 세포수를 세어 1 × 10⁵ 개/ml scaffold를 지지체 위에 떨어뜨려 배양하였다.

지지체의 배양에서 물리적 자극을 가한군은 복합생물반응기(Hybrid bioreactor)를 이용하여 배양용기의 회전으로 전단력을 가해주면서 배양 하였다. 대조군은 지지체 내부로 Rocker(CR95, FINPCR)를 이용하여 배양액의 원활한 공급을 되도록 배양하였다.

3. Hybrid bioreactor 기계구성

그림 2는 본 연구에서 사용된 Hybrid bioreactor의 외형을 나타낸 것이다. 본 장치는 습도가 있는 인큐베이터 내에서 구동이 가능하도록 Engineering Plastic을 이용하여 가공하였고, 구동 모터는 Empire Magnetics(WP-U22,21)사의 수중모터를 이용하여 제작하였다(그림 3.). 또한, 회전을 요하는 부위에는 세라믹으로 코팅된 베어링을 사용하여 회전시에 마찰과 마모를 최소화하였고, 클램프형식을 채택하여 배양용기의 착탈을 용이하게 하였다.

지지체를 배양하기 위한 배양 용기는 CO₂ 교환을 하기 위한 상단에 membrane을 부착하고(그림 4), 물리적 자극시 오염방지를 위해 뚜껑에 고무링을 장착하였다(그림 4).

Hybrid bioreactor는 압축 변형 및 전단 변형을 가할 수 있도록 제작 되었으며, 한번에 20개의 시편을 배양, 물리적 자극을 가할 수 있는 구조를 가지고 있다. 세포를 배양한

3차원 지지체를 배양하며 물리적 자극을 주기 위하여 전체 시스템은 그림 3. 과 같이 구성 되어 있으며, 모터 구동 및 제어는 Motor controller (Parker Hann. corp. 6K series 6K2), Motor driver(Parker Hann. corp. E-AC Microstepper driver)를 사용하여 Parker Model RP240 control panel을 이용하여 시스템을 구동하였다.

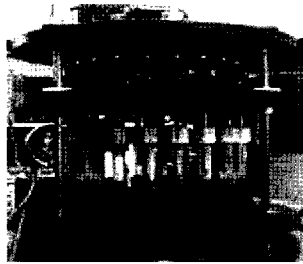


그림 2. 복합 생물반응기
Fig. 2. Hybrid bioreactor

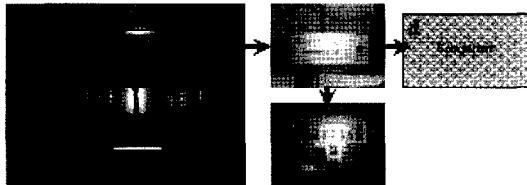


그림 3. 물리적 자극을 위한 생물반응기 시스템
(a) Incubator and hybrid bioreactor
(b) Motor controller and driver
(c) Control panel
(d) Monitoring computer
Fig. 3. Hybrid bioreactor system for physical stimuli
(a) Incubator and hybrid bioreactor
(b) Motor controller and driver
(c) Control panel
(d) Monitoring computer

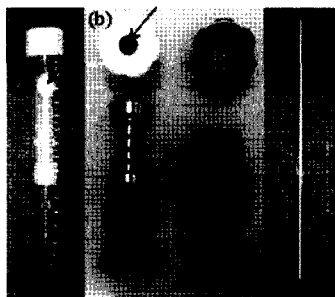


그림 4. 배양용기 구성
(a) 배양용기, 화살표-membrane
(b) 배양용기 뚜껑, 화살표-고무링
(c) 물리적 자극을 위한 봉
Fig. 4. Composition of culture bottle
(a) culture bottle
(b) culture bottle cap
(c) rod for physical stimuli

4. 물리적 자극조건 및 실험

세포수준에서 실험한 연구보고들이 많은데, 이들이 주장하는 변형의 크기의 범위가 연구자들마다 달라서 명확한 수치를 제공하지 못하고 있다. 실제 골의 표면에서 받는 물리적 자극은 0.04 ~ 0.3%이지만 많은 연구에 의해서 화학적 반응을 일으키기 위해 세포막에 가해지는 변형률의 크기는 1~10%라고 알려져 있다[6,10,15]. 본 연구에서는 선행 연구들을 물리적 자극을 참고하여 2.5%의 크기로 자극을 가하였다 (그림 5).

자극 주파수는 인간의 보행 사이클을 따라서 0.5Hz로 할 것이다. 그리하여, 힘을 가하는 시간(During times)은 약 0.5초로 하여 시편길이의 약 2.5%정도의 변형을 150회 가할 것이다. 또한 배양용기의 회전으로 전단력을 가하면서 배양하였다 (그림 6).

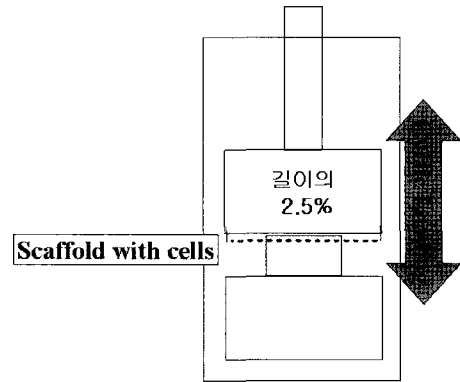


그림 5. 물리적 자극 모델
Fig. 5. The model of physical stimuli

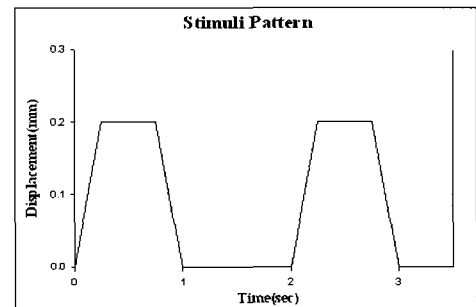


그림 6. 물리적 자극 패턴
Fig. 6. The graph of physical stimuli pattern

5. Protein 및 ALP 활성화도 측정

물리적 자극을 가한 후 지지체(Scaffold)를 배양 용기에서 건져내어 PBS 및 3M paper 이용하여 media를 제거한 후 1.5ml 튜브에 담고, 50mM Tris-cl 100 μ l를 넣어준 후에 -70 $^{\circ}$ C에서 보관한다.

보관한 sample의 단백질 함량과 알카라인 포스파타제의 활성화도 측정을 위해서 냉동과 해동을 반복하여 세포들을 터트려 내부의 물질들이 밖으로 나오도록 하여 샘플(lysate)을 얻는다.

단백질 함량은 Bovine Serum Albumin(sigma)를 표준 용액으로 사용하여 Lowey의 방법으로 정량화 하였다[13].

단백질 정량 시약(Bio-Rad사)을 1/5로 희석하여 라이세이트(cell lysate)10 μ l 와 Reagent(시약) 200 μ l를 섞은 것과 표준용액인 BSA 10 μ l 과 Reagent(시약) 200 μ l를 섞은 것을 10개의 WELL에 순차적으로 1/2로 희석하여 표준용액을 이용하여 표준 그래프를 형성시킨 후 세포의 단백질양을 측정하였다.

알카라인 포스파타아제 양의 측정은 두 가지의 시약을 사용하는데 이를 편의상 Reagent(시약) A와 Reagent(시약) B라고 하면 우선 Reagent(시약) A를 라이세이트(lysate)와 반응시키고, 그 다음 Reagent(시약) B와 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 30 min 반응시켰다.

반응종료액인 1N NaOH를 50 μ l넣고,405nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

6. 실험영상

실험영상은 inverted microscope (Diaphot 200, Nikon)에 CCD카메라(TK-1280U, JVC)를 장착하여 영상보드를 통하여 영상을 획득하였다

결 과

생물반응기를 이용한 실험 이전에 30일간 세포배양을 하여 고안된 생물 반응기의 배양 조건을 검증하였다. 배양 용기내 지지체를 현미경을 통한 CCD 카메라를 통해 세포 배양을 10일 간격으로 확인하였다(그림 7). 30일간의 추이 관찰로 안정된 배양조건을 확인할 수 있었다.



그림 7. 배양용기내 세포관찰
Fig. 7. The image of culture bottle

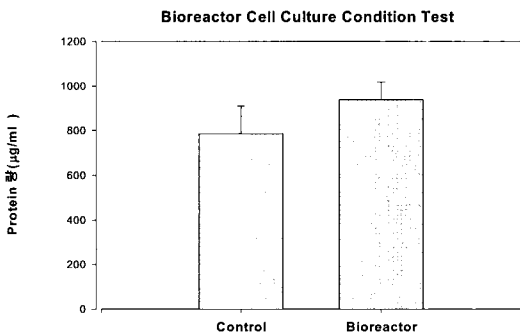


그림 8. 단백질 량 (N=5)
Fig. 8. The amount of total protein (N=5)

30일 후 전체 단백질 량 측정으로 기존의 배양 조건과의 비교에서 유사한 측정치를 나타내고 있다 (그림 8). 세포지지체 배양 조건이 실험 실시하기에 적당함을 알 수 있다.

본 연구는 복합생물반응기(Hybrid bioreactor)를 이용한 물리적 자극을 가한 세포군과 가하지 않은 세포군의 단백질 양을 측정하여 성장의 효과를 알 수 있고, alkaline phosphatase activity 을 측정하여 분화의 여부를 측정할 수 있었으며, 석회화의 여부는 칼슘의 침착 정도를 영상을 통하여 확인할 수 있었다. 물리적인 자극을 가한 결과 단백질 양은 자극을 가한 군의 경우에는 자극을 가하지 않은 군과 비교하여 성장을 하다가 감소하는 형태를 보이지만, 자극을 가하지 않은 군은 지속적인 증가양상을 나타냄을 확인할 수 있다(Fig. 9). 이는 물리적 자극을 받은 골세포가 서서히 성장에서 분화로 상태를 옮겨가 석회화되면서 전체 단백질 양이 완전히 분화의 상태로 되면서 단백질 양이 감소하는 현상이 나타난 것으로 판단된다.

이에 대한 근거를 제시하기 위해서 분화의 표적 단백질인 alkaline phosphatase를 측정한 결과 타당한 결과를 얻었다. 물리적 자극을 가하지 않은 군에서는 초기 수준에서 점차 증가하는 양상을 보이며 14일째 가장활성화 되었으며, 물리적 자극을 가한 군에서는 alkaline phosphatase의 활성도가 시작일 부터 10일까지 일정수준을 유지하다가 12일 최대치를 나타낸 후 감소하는 형태를 보였다. 이처럼 복합생물반응기(Hybrid bioreactor)를 이용한 물리적 자극을 가한 군에서는 자극을 가하지 않은 군과 비교하여 alkaline phosphatase의 최대 활성시점이 앞당겨진 것을 볼 수 있다(Fig. 10). 골세포에서 alkaline phosphatase의 활성도가 최대치가 나타나는 시점이 분화가 가장 활성화 되어 있는 시점이라고 알려져 있으므로, 본 연구에서의 단백질 양과 alkaline phosphatase의 활성도로 2개의 군을 비교해 볼 때 물리적 자극을 가한 세포군은 12일전에 분화가 시작되지만, 자극을 가하지 않은 군에서는 성장의 상태에 머물러 있다고 할 수 있다.

또한, 물리적 자극이 분화의 시기를 앞당긴다는 것을 특성단백질 실험을 통하여 확인할 수 있었지만 이에 대한 보다 명확한 근거를 제시하기 위해 칼슘 침착 정도를 영상을 통하여 관찰하였다. 골세포가 분화를 시작하면서 일반적으로 검은 덩어리들이 생성되는데, 이는 분화가 진행되면서 칼슘침착이 일어나고 이후에 결절을 형성한다. 이는 2차원 배지에서 배양했을 때에도 관찰되는 것이며 이는 칼슘 침착에 의한 것이다.

3차원배지에서 복합생물반응기(Hybrid bioreactor)를 이용해 물리적 자극을 가한 군은 8일째 부터 칼슘침착이 보이기 시작하다가 12일째부터 다량의 칼슘침착을 보이지만, 자극을 가하지 않은 군에서는 성장을 계속하여 덩어리진 세포군들이 많이 보이며 14일째부터 칼슘 침착이 나타나고 있다(Fig.11).

고찰

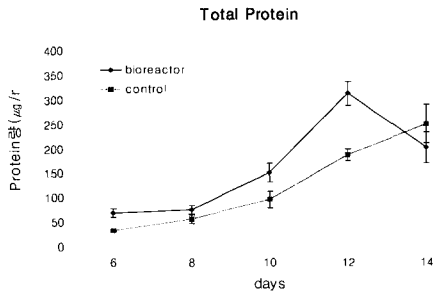


그림 9. 단백질 량 [day 6, 8, 10, 12, 14] (N=3)
Fig. 9. Total Protein [day 6, 8, 10, 12, 14] (N=3)

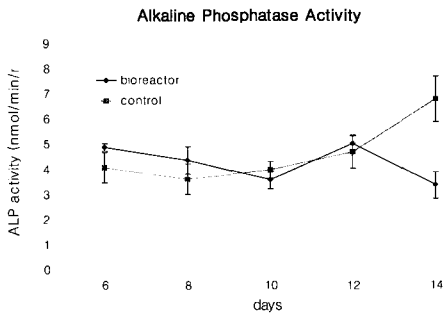


그림 10. 알카라인 포스파타제 활성도 [day 6, 8, 10, 12, 14] (N=3)
Fig. 10. Alkaline Phosphatase Activity [day 6, 8, 10, 12, 14] (N=3)

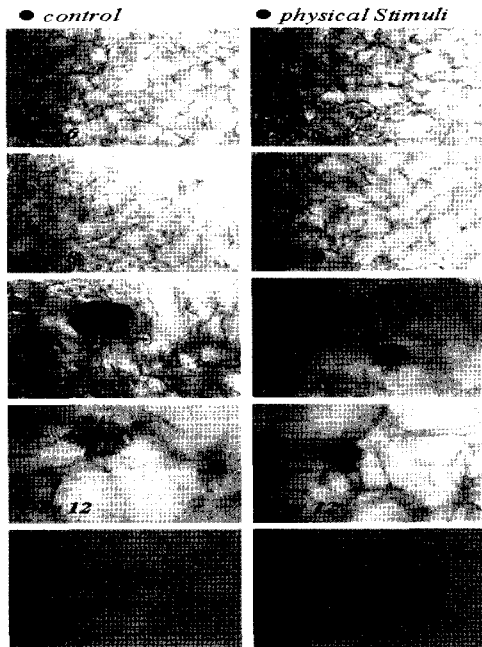


그림 11. 칼슘침착 과정
Fig. 11. The image of the processing calcification for 14 days

뼈모세포(Osteoblast)의 성장 및 분화의 과정은 성장 (proliferation), 골 기질 형성(matrix formation), 석회화 (calcification)시기를 거치는데 성장의 시기에는 단백질의 양이 지속적으로 늘어남을 볼 수 있으며 단백질 정량의 결과의 추세로 볼 때 자극을 가하지 않은 군은 14일 이후에도 세포의 성장의 패턴을 유지할 것으로 보인다[2,3,12].

그리고, alkaline phosphatase 활성도는 분화가 활발히 이루어져 석회화되는 시기에 최대값을 나타내며, 이 시기에 특정단백질인 osteocalcin의 분비가 시작 된다고 알려져 있다. 그리하여, 이를 분화의 상태를 알리는 표적물질로 많이 활용되고 있다. 본 연구에서 물리적 자극을 가한 군은 9~13일 사이에 alkaline phosphatase 활성도가 최고치에 도달하였으나, 자극을 가하지 않은 군에서는 최고활성 시점이 나타나고 있지 않다[7,9]. 14일 이후에 alkaline phosphatase 활성도가 감소할 것이라 예상된다.

그러므로, 그래프의 패턴으로 볼 때 물리적 자극이 분화촉진 호르몬과 유사하게 세포의 분화를 촉진한다고 볼 수 있다. 골세포의 성장 상태와 분화의 시점을 보다 명확하게 규명하기 위해서 뼈모세포의 성장 시에 발현되는 Type I collagen의 양과 골 분화의 시작점에서 발현되는 osteopontin의 양에 대한 연구가 필요할 것이다[3,15].

또한, 일반적으로 골 세포를 자극하는 물리적 성분은 압축 및 인장 변형 그리고 유체의 흐름으로 가해지는 전단력인데 이전의 연구 보고들에 의하면 골세포의 자극 시 초기 성장에는 전단력의 영향이 크고, 이후 분화의 시기에서는 물리적 압축 변형에 의한 효과가 더 크게 나타난다고 한다[8,15].

물리적 자극을 가하지 않은 군은 전단력을 가하지 않고, 복합생물반응기(Hybrid bioreactor)를 이용하여 물리적 자극을 가한 군은 배양용기 회전으로 전단력을 가한 결과 초기6일째부터 가하지 않은 군보다 더 높은 성장을 하고 있음을 볼 수 있다.

이에 본 연구에서 가해진 물리적 자극은 지지체에 축 방향으로 2.5%의 변형을 가하였고, 이로 인한 순수한 물리적 압축변형이 세포의 분화 촉진에 큰 작용을 한 것으로 보인다.

앞으로 세포에 복합생물반응기(Hybrid bioreactor)를 이용하여 다양한 패턴의 물리적 자극 가하여 그 효과를 높여 볼 것이고, 세포가 받은 자극의 크기를 측정할 수 있는 방법을 모색하여 자극의 크기에 대한 자극의 효과와의 관계를 더 명확히 규명하여야 할 것이다.

그리하여 여전히 많은 논란이 되고 있는 자극의 패턴에 관한 문제를 해결하고, 골세포에 가해지는 최적의 물리적 자극 형태를 찾아낼 수 있을 것이다. 또한, 골화의 정도를 확인함에 있어서 시기별로 강성을 측정하여 석회화의 정도를 확인하는 연구도 필요할 것이다.

참고 문헌

1. Simon. Orthopaedic Basic Science. AAOA
2. Martin, Burr : Structure, Function and Adaption of

- Compact bone. Reven Press, pp. 18-20, 143-185, 1989
3. F. Lyall, A.J. EL Haj : Cell and Biomechanics Cambridge University Press, pp. 147-196, 1994
 4. Yaszemski, M.J., Payne, R.G., Hayes, W.C., "Evolution of bone transplantation : molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone", Biomaterial 17:175-185, 1996
 5. Lonnie D. Shea, Dian Wang, "Engineered bone development form a pre-Osteoblast cell line on three-dimensional scaffolds", Tissue Engineering, 6:605-617, 2000
 6. Frost HM., "From Wolff's Law to the Utah Paradigm : Insights About Physiology and Its Clinical Applications", Anat Rec 262:398-491, 2001
 7. Joha P. Bilezikian, Lawrence G. Raisz, Gideon A. Rodan Principles of Bone Biology. Academic Press. pp. 69-86, 1996
 8. Vassilios I. Sikavitsas, Johnna S. Temenoff, Antonios G. Mikos, "Biomaterial and bone mechano transduction", Biomaterials 22:2581-2593, 2001
 9. Je-Yong Choi, Byung-Heon Lee, In-San Kim, "Expression Patterns of Bone-Related Proteins During Osteoblastic Differentiation in Cells", Journal of Cellular Biochem. 61:609-618, 1996
 10. B. Fermor, R. Gundle, M. Evans, M. Emerton, A. Pocock "Primary Osteoblast Proliferation and Prostaglandin E2 Release in Response to Mechanical Strain In Vitro", Bone Vol.22 : 637-643, 1998
 11. H. Ozawa, K. Imamura, "Effect of a continuously applied compressive on Mouse Osteoblast-Like Cells (MC3T3-E1) In Vitro", Journal of Cellular Physiology. 142:177-180, 1990
 12. M. R. Forwood: "Mechanical Effects on the skeleton: Are there Clinical Implications?", Osteoporosis Int. 12:77-83, 2001
 13. Vaanane, K., Morris, D., Munoz, PA, Parvinen, EK, "Immunohistochemical of alkaline phosphatase in growth plate cartilage, bone and fetal calf chondrocytes using monoclonal antibodies", Acta histochem. 82:211-217, 1987
 14. Jenneke klein-nulend, Jan roelofsen, Cornelis M. Semeins, "Stimulation of Osteopontin mRNA Expression and Synthesis in Bone Cell Cultures", Journal of Cellular Physiology 170:174-181, 1997
 15. Lidan You, Stephen C. Cowin, Mitchell B. Schaffler, Sheldon Weinbaum, "A model for strain amplification in the actin cytoskeleton of osteocytes due to fluid drag on precellular matrix", journal of biomechanics Vol 34:1375-1386, 2001