

전단력이 연골세포에 미치는 영향에 관한 연구

김신엽 · 김성곤* · 최제용** · 남동석

서울대학교 치과대학 치과교정학교실, 한림대학교 성심병원 구강악안면외과*,
경북대학교 의과대학 생화학학교실**

Abstract

THE SHEAR STRESS PROTEOME OF CHONDROCYTES

Shin-Yeop Kim, Seong-Gon Kim*, Je-Yong Choi**, Dong-Seok Nahm

*Department of Orthodontics, School of Dentistry, Seoul National University,
Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Sacred Heart Hospital, Hallym University*,
Department of Biochemistry, School of Medicine, Kyungpook National University***

The objective of this study is screening the shear stress related proteins in chondrocytes using two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF. C-28/I2 cell line were grown. The fluid-induced shear stress (FISS) was applied using a cone viscometer at a rotational velocity of 80rpm for periods of 12 hours. Control cultures were tested under identical conditions without mechanical load application. Collected samples were used for the two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF. The identified proteins were cal-cyclin, RPE-spondin, interleukin-2, extracellular signal regulated kinase (ERK), lamin B2, porA protein, and RET-ELE1 protein. All of them showed a decreased expression. In conclusion, seven proteins were identified as a shear stress related proteins in chondrocytes. As the destruction of articular cartilage is one of main pathogenesis of TMJ internal derangement, this study will give useful information for the understanding of the molecular aspect of TMJ disease.

Key words : Chondrocyte, MALDI-TOF, FISS

I. 서 론

악관절의 연골은 연골세포와 세포외 기질로 구성되어 있다. 연골세포는 조골세포와는 다른 특징을 가지고 있는 세포로 연골과 연관된 세포외 기질 단백질을 합성하며 이들 단백질은 인장강도에 저항하면서 기계적인 부하에 생체가 적응하게끔 하여 준다. 이러한 단백질의 발현은 유전자와 주변 환경인자와의 상호작용에 의하여 조절되는 데, 단백질의 발현에 관여하는 것으로 알려진 환경인자로는 세포외 기질 성분과 같은 용해성 중간자도 있고 기계적인 요소도 있다¹⁾. 악관절에 대한 해로운 자극은 연골세포에도 좋지 않는

영향을 주게됨으로 이는 악관절의 병적인 상태를 야기할 수 있다.²⁾ 그러므로 이러한 단백질의 발현 양상을 조사하는 것은 악관절의 병리를 이해하는 데 중요하다고 하겠다.

최근에 2형 교원섬유를 발현하는 사람에서 얻어진 몇 개의 연골세포주가 개발된 바 있다³⁾. 이들은 연골세포의 다양한 기능을 연구하는 데 이용되어 왔다⁴⁻⁶⁾. 연골세포의 기계적인 자극에 대한 반응은 관절연골의 세포외 기질 항상성을 유지하는 데 필수적인 것으로 인식되어왔다. 전단력이나 수압과 같은 기계적인 힘은 정상 관절의 부하운동 중에 일어나는 것으로 세포 반응에 영향을 미치고 결과적으로 연골 대사에 영향을 미치게 된다.

연골세포의 전단력에 대한 반응은 자극의 형태, 지속 시간, 강도에 영향을 받게 된다. 비록 전단력이 연골세포의 대사활동을 어떻게 바꾸는 지에 대한 명확한 결론은 아직 없는 상태이지만 동물세포에서 수행한 실험에서는 유체역학으로 유도된 전단력이 연골 형성에 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다.⁷⁾ 높은 전단력이 가해지는 부위에서는 연골의 변성과 관절의 기능 상실을 가져오게 된다. 전단력은 기계적인 부하의 양상이나 강도가 변한 경우 악관절과 같은 diarthroidal joint의 파괴를 가져오는 주된 원인으로 보고된 바 있다⁸⁾.

배양된 세포에서 수행되는 실험에서는 기계적인 자극이 세포 내 신호전달 체계나 유전자 발현, 성장, 분화 및 세포 사멸에 어떠한 영향을 미치는 지를 알아낼 수 있다. 따라서 본 연구의 목적은 연골세포에서 전단력과 연관된 단백질 발현을 2차원 전기영동법과 matrix assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF)를 이용하여 밝히는 데 있다.

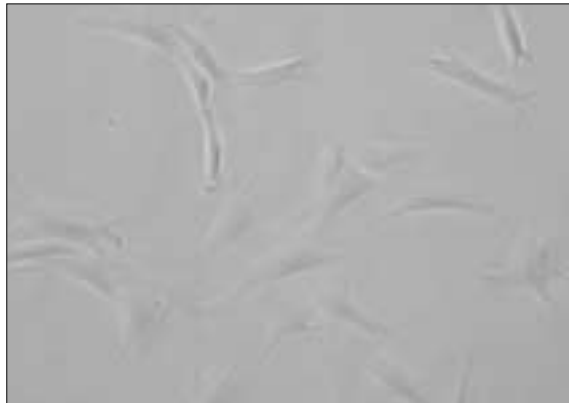


Fig. 1. Cultured chondrocytes.

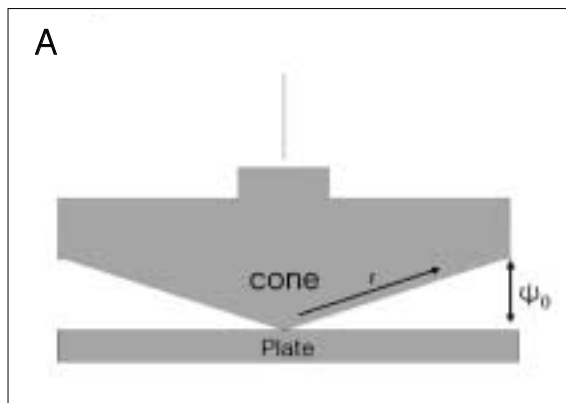


Fig. 2. A. Diagram of the apparatus (r : radius, ψ_0 : angle). B. The apparatus of shear stress generator.

II. 재료 및 방법

세포 배양 및 유체역학 유도 전단력의 적용

C-28/I2 cell line (Immortalized human juvenile costal chondrocyte, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Institute of Medicine, USA)을 이용하여 실험을 수행하였다 (Fig. 1). 상기 세포주를 Ham's F12/Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, BRL, Gaithersburg, MD)에서 키워졌고 배양액에는 1% penicillin/streptomycin, bFGF (100 μ g/ml), 그리고 10% fetal bovine serum (FBS)를 함유하고 있었다. 배양된 세포는 전단력을 가하기 24시간 전에 PBS로 세 차례 세척을 시행하였고 10ml의 혈장이 포함되어 있지않는 배양액을 넣었다. 전단력은 cone viscometer를 이용하여 가하였으며 회전 속도는 80rpm이었으며 힘을 가한 시간은 12시간이었다 (Fig. 2). 대조군은 같은 조건에서 전단력을 가하지 않은 상태에서 배양하였다. 시편은 24시간 후에 얻었으며 영하 70도에서 다음 실험 전까지 보관하였다.

2차원 전기영동법

2차원 전기 영동법은 이전에 발표된 논문의 방법대로 수행하였다.⁸⁾ 배양된 세포 시편을 500 μ l의 buffer I (0.3% SDS, 200 mM DTT, 28 mM Tris-HCl,)에 녹여서 부유



액 형태로 만들었다. 이는 유리구슬을 이용하여 혼합기에서 4분간 흔들어 줌으로서 균일화하였다. 이어서 원심분리를 13,000rpm에서 15분 4도에서 실시하였을 때 수용성 분획과 불수용성 분획으로 나누어진다. 이 중에서 수용성 분획을 금변 실험에 사용하였다. 이어서 100도에서 5분간 노출시킨 후 얼음에서 식혔다. 그리고 24 μ l의 buffer II (24 mM Tris, 476 mM Tris-HCl, 50 mM $MgCl_2$, 1mg/mL Dnase I (Gibco BRL, Grand Island, NY), 0.25 mg/ml RNase A (Sigma Chemical, St. Louis, MO))를 첨가하였다. 반응은 4도에서 15분간 진행시켰으며 전체 부피의 4 배의 차가운 acetone을 가하여 반응을 중지시켰다. 얼음에서 20분간 두게 되면 단백질 침적이 생기게 된다. 단백질을 12000 rpm에서 10분간 원심분리하여 모았으며 15 μ l의 buffer pH 4-8 (540 mg/ml urea, 10 mg/ml DTT, 2% v/v Ampholyte 4-8 (Millipore, Bedford, MA), 0.52% v/v Triton X-100)에 용해시켰다. 고해상도 2차원 전기영동법은 Lopez 등¹⁰⁾에 의하여 기술된 변형된 방법을 이용하여 수행하였다. Bio-Rad Protein IEF Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)을 이용하여 1차 분리하였고, Millipore Investigator system (Millipore)을 이용하여 2차분리하였다. 건조된 gels를 storage phosphor screen (Packard Instrument Company, Downers Grove, IL)에 48시간 노출시켰으며 각 spot의 정량적 분석은 OptiQuant Image Analysis Software (Packard Instrument Company)를 이용하여 수행되었다.

MALDI-TOF

MALDI-TOF는 이전에 보고된 논문을 참조하여 수행하였다.¹¹⁾ Trypsin을 시편에 첨가한 후 혼합물은 37도에서 5

시간 배양하였다. 이어서 5 μ l의 10% trifluoroacetic acid (TFA)를 첨가하여 단백질을 분해를 중단시켰다. 부가적으로 chymotrypsin 처리한 TLCK (1-chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanone-HCl) treated (2 μ l of 2mg/ml)도 사용하였다. MALDI-TOF는 Bruker Ultraflex TOF (Bruker Daltonics Inc., Germany)를 이용하여 수행되었으며 이는 직선형 질량분석기로 N₂ laser를 이용한 양이온 작동모드형 질량분석기이다. 레이저의 강도는 신호를 얻어 지기에 충분한 정도로 가하였으며 가속전압은 28kV로 정하였다. 장비는 본 실험에 들어가기에 앞서서 알려진 단백질/펩타이드 시편으로 시험하였다. 분석에 사용된 시편은 0.1% TFA에 50pmol/ μ l의 농도로 용해시킨 것을 사용하였다.

III. 실험 결과

본 실험에서는 전단력을 연골세포에 가한 경우 그 발현이 현저히 변하는 단백질을 모두 7개 찾아내었다 (Table 1). 전체적인 단백질의 발현 양상은 전단력을 가한 경우가 대조군과 비교하여 상당히 다르게 나타남을 알 수 있었다 (Fig. 3). Calcyclin은 전단력을 가한 경우 연골세포에서 그 발현이 현저히 저하되어 거의 관찰되지 않았다 (Fig. 4A, B). RPE-spondin과 interleukin 2는 분자량과 pI 값이 유사하여 같은 spot에서 나왔는데, 이 역시 발현이 현저히 감소하여 실험군에서는 spot이 거의 관찰되지 않았다 (Fig. 4C, D). 이 이외에도 extracellular regulated kinase (ERK), PorA protein (Fig. 4E, F), lamin B2 (Fig. 4G, H), 및 RET-ELE1 protein (Fig. 4I, J)은 실험군에서 발현은 관찰되나 현저히 감소되는 단백질로 분석되었다.

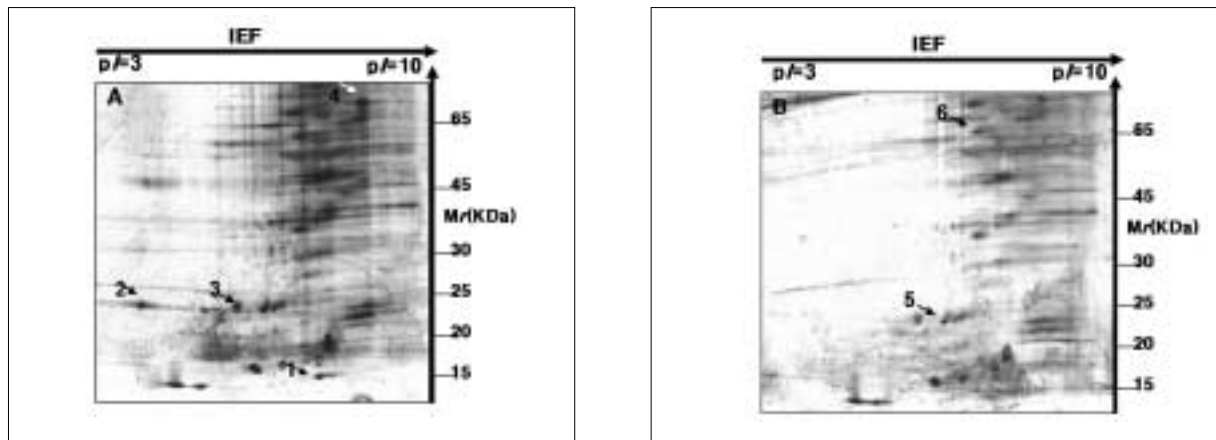


Fig. 3. Silver-stained 2-DE analytical gels of proteins of derived from compared control and experiment of **A:** CONTROL **B:** EXPERIMENT (SHEAR STRESS). The numbered spots are listed in Table 1.

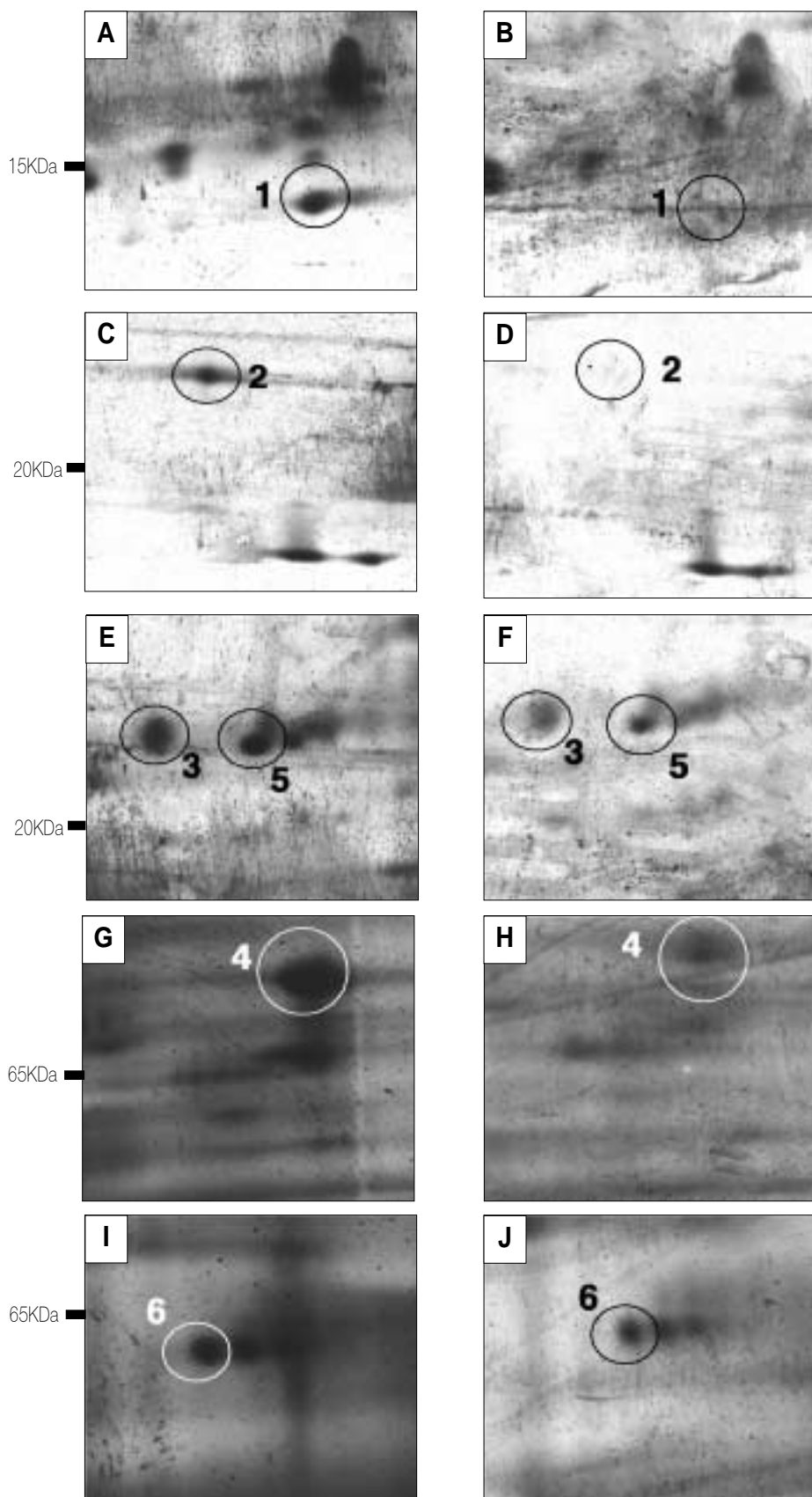


Fig. 4. Sections of 2-D separation of labeled proteins from control (A, C, E, G, and I) and stressed cells (B, D, F, H, and J). The identification numbers are those used in Table 1 and correspond as follows: 1 (calcyclin), 2(RPE-spondin, interleukin-2), 3(extracellular signal regulated kinase), 4(lamin B2), 5(porA protein), and 6(RET-ELE1 protein).

Table 1. Proteins identified in each spot by peptide mass fingerprinting using MALDI-TOF.

Spot No.	Candidate Protein	Accession number	Sequenced peptides	Modification	Sequence coverage
1	Calcyclin	BCHUY	⁵⁶ LMEDLDR ⁶² ¹⁰⁵ SPEGGGGAGARGGAWP ¹¹⁵	Oxidaton(M)	14.0%
2	RPE-Spondin	Q96J64	⁶⁷ DPACFARGWR ⁷⁶ ³⁷ TLWMALCALSR ⁴⁷	Oxidaton(M)	7.0%
2	Interleukin-2 Extracellular	Q8NFA4	¹⁸ MLTFKFYMPK ²⁷ ²⁹¹ MLVLDACIR ²⁹⁹	Oxidation(M)	7.0%
3	signal regulated kinase	JC6138	¹³⁰ IQFLVYQMMK ¹³⁹ ²⁶⁰ NYMKGLPELEK ²⁷⁰ ²²⁸ GSDHLDQLKEIMK ²⁴⁰	Oxidation(M) Oxidation(M) Oxidation(M)	3.2%
4	Lamin B2	A45023	¹ RVLDETAR ²⁸ ³⁹⁰ DQSLGNWR ³⁹⁷ ⁵⁰⁷ TTSRGCYVM ⁵¹⁵ ⁵⁵ SEVELAAALSDK ⁶⁶		9.1%
5	PorA protein	Q9ZEQ6	SAYKPAYVDENKMVHAADV		95%
6	RET-ELE1 protein	Q9UM84	PISSAEMTFR		92.3%

Ⅳ. 총괄 및 고찰

생체 내에는 수용성 물질로 다양한 효과를 내는 인자들이 많은데 이들은 염증성 cytokines, 성장인자나 호르몬들로 연골 내 대사 과정과 연관되어 기계적인 힘에 따라 그 발현이 변화될 가능성이 있으며 결과적으로 세포의 기질의 변화를 초래하게 된다. 각각의 분자들은 관절이 처해진 환경에 따라 그 발현이 증감되게 된다. 이론적인 모형에서는 전단력이 관절염에 영향을 미치는 것으로 밝혀져 있다^{12,13}. 수학적 모형과 동물실험에서의 결과는 악관절에서 변형된 부하와 관절염 상태에 밀접한 연관이 있음이 밝혀진 바 있다. 관절 연골의 손상과 연관이 있는 기계적인 부하는 역시 골관절염 발생의 위험 요소일 것이다. 실험실 연구에서 연골에 대한 위해성 기계적 압박이 강도에 비례하여 세포사멸을 증가시킨다는 보고가 있다¹³. 비록 MALDI-TOF를 통하여 전체 아미노산 서열을 분석할 수는 없으나 MALDI-TOF는 미지의 단백질을 확인하는 데 있어서 상당히 신뢰할 수 있는 방법이다. 이번 실험에서 모두 7개의 단백질이 전단력과 관련하여 발현이 감소되는 단백질로 확인되었다 (Table 1). 이들 중에서 calyclin, interleukin-2 및 ERK는 기계적인 스트레스와 연관이 있는 단백질로 보고된 바 있다.

Calcyclin는 칼슘과 결합하는 단백질로 분자량은 10-15 kDa이다¹⁴. 이 단백질의 기능은 세포질 내 칼슘 이온 농도의 조절과 연관이 있고¹⁵, exocytosis¹⁶, 단백질 분해¹⁷ 및 세포 주기 조절¹⁸을 담당하고 있다. 이 단백질은 다양한 종류의 세포에서 발현된다¹⁹. Calcyclin의 발현이 기계적인 힘에 반응하여 변한다는 것이 폐에서는 보고된 바 있다²⁰. 그리고 calyclin의 발현 증가는 가벼운 기계적 자극에서 상

피세포와 기질세포의 상호작용으로 세포증식이 일어나는 경우에 관찰할 수 있다²¹. 연골세포에서 calyclin의 발현이 어떠한 의미를 가지는 지에 대하여는 아직 보고된 바 없다. 이 단백질이 칼슘과 결합하는 단백질이고 세포 증식에 관여하는 것을 감안하면 이의 발현 감소는 과도한 기계적 자극에서 연골세포의 증식이 억제되는 것과 연관이 있을 수 있다.

임파구에 의하여 연골세포가 파괴되는 것은 류마티스성 관절염에서 면역체계가 관절의 파괴에 어떻게 기여하는지를 명확하게 보여준다. Interleukin 1 (IL-1)은 세포의 기질의 변환주기를 증가시키고 metalloprotease의 합성을 촉진함으로써 연골에 영향을 미친다. 이러한 효과는 세포 표면에 위치한 수용체 (IL-1R)를 통하여 일어난다. 특정 농도의 IL-2는 IL-1R의 발현을 감소시킨다²². 그러므로 IL-2는 수용체의 발현을 조절함으로써 연골에서 세포의 기질 대사를 조절할 수 있다. IL-2의 발현도 이번 실험에서는 감소됨을 보였다 (Fig. 4C, D).

격리된 연골세포에 cytokines²³, 성장인자²⁴, matrix adhesion²⁵, 혹은 기계적인 스트레스^{26,27}를 가하는 경우 각각의 자극은 ERK를 활성화시켜 이들 자극에 대하여 세포가 반응하고 조절할 수 있게 한다. ERK는 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)에 속하는 단백질로서 세포 밖에서 오는 자극을 핵으로 전달하는 역할을 함으로서 다양한 유전자의 발현 및 조절에 영향을 미치게 된다²⁸. 연골세포에서는 ERK에 의하여 조절되는 기능으로는 증식²⁴, 탈분화²⁹, 세포사멸²⁴ 그리고 세포의 기질 물질의 합성²⁶이 있다. 그리고 단백질 분해효소의 억제자로 작용한다³⁰. 이번 실험에서는 ERK의 발현이 감소된 것으로 나타났다 (Fig. 4E, F).

스트레스에 의하여 발현이 증가되는 샤페론으로는 Hsp70과 Hsp25가 있으며 이들은 모두 핵으로 전달되는 신호를 조절하며 핵 내에 위치하게 된다³¹⁾. 이들 샤페론의 발현은 세포 내 기포 형성이나 lamin을 함유하고 있는 구조물의 파괴시에 나타난다³⁰⁾. Lamin B2의 발현이 본 연구에서는 강한 전단력을 가하는 경우 감소되는 것으로 나타났다 (Fig. 4G, H). 이는 아마도 스트레스와 연관되어 나타나는 현상으로 사료된다. 이번 연구에서 확인된 단백질로는 RPE-spondin, porA protein, RET-ELE1 protein이 있지만 (Fig. 3), 이들 단백질이 기계적인 자극과 연관되어 연구된 논문은 아직 없다. 따라서 이는 추후 연구를 통하여 밝혀져야 할 것으로 사료된다.

결론적으로 이번 연구에서는 전단력과 관련하여 연골세포에서 발현이 감소되는 단백질로 일곱개를 확인하였으며, 관절 연골의 파괴가 악관절 내장증의 주된 발병과정이기 때문에 이들 단백질의 확인은 추후 악관절 질환의 분자생물학적 연구에 기초 자료로 사용될 수 있으리라 사료된다.

Acknowledgement

The authors thank Mary B. Goldring (Massachusetts General Hospital, Charlestown, MA) for her giving cell line kindly.

참고문헌

1. Lee JH, Kisiday J, Grodzinsky AJ : Tissue-engineered versus native cartilage: linkage between cellular mechanotransduction and biomechanical properties. *Novartis Found Symp* 249 : 52, 2003.
2. Almaraz AJ, Athanasiou KA : Design characteristics for the tissue engineering of cartilaginous tissues. *Ann Biomed Eng* 32 : 2, 2004.
3. Goldring MB, Birkhead JR, Suen LF, et al : Interleukin-1 b-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin Invest* 94 : 2307, 1994.
4. Cawston TE, Curry VA, Summers CA, et al : The role of oncostatin M in animal and human connective tissue collagen turnover and its localization within the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum* 41 : 1760, 1998.
5. Kaarniranta K, Elo M, Sironen R, et al : Hsp70 accumulation in chondrocytic cells exposed to high continuous hydrostatic pressure coincides with mRNA stabilization rather than transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 : 2319, 1998.
6. Labelle Y, Bussières J, Courjal F, et al : The EWS/TEC fusion protein encoded by the t(9;22) chromosomal translocation in human chondrosarcomas is a highly potent transcriptional activator. *Oncogene* 18 : 3303, 1999.
7. Freed AN, Davis MS : Hyperventilation with dry air increases airway surface fluid osmolality in canine peripheral airways. *Am J Respir Crit Care Med* 159 : 1101, 1999.
8. Lee MS, Trindade MC, Ikenoue T et al : Intermittent hydrostatic pressure inhibits shear stress-induced nitric oxide release in human osteoarthritic chondrocytes in vitro. *J Rheumatol* 30 : 326, 2003.
9. Giard JC, Laplace JM, Rincé A, et al : The stress proteome of *Enterococcus faecalis*. *Electrophoresis* 22 : 2947, 2001.
10. Lopez MF, Melov S : Applied proteomics: mitochondrial proteins and effect in function. *Circ Res* 90 : 380, 2002.
11. Kim SG, Cho BO, Lee YC, et al : Ganglion cyst of the temporomandibular joint. *J Oral Pathol Med* 32 : 310, 2003.
12. Lee MS, Trindade MC, Ikenoue T, et al : Intermittent hydrostatic pressure inhibits shear stress-induced nitric oxide release in human osteoarthritic chondrocytes in vitro. *J Rheumatol* 30 : 326, 2003.
13. Bussolari SR, Dewey CF Jr, Gimbrone MA Jr : Apparatus for subjecting living cells to fluid shear stress. *Rev Sci Instrum* 53 : 1851, 1982.
14. Schäfer BW, Wicki R, Engelkamp D, et al : Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: Rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics* 25 : 638, 1993.
15. Courtois-Couty N, Le Moellie C, Boulkroun S, et al : Calyculin is an early vasopressin-induced gene in the renal collecting duct: Role in the long-term regulation of ion transport. *J Biol Chem* 277 : 25728, 2002.
16. Okazaki K, Niki I, Iino S, et al : A role of calyculin, a Ca(2⁺)-binding protein, on the Ca(2⁺)-dependent insulin release from the pancreatic beta cell. *J Biol Chem* 269 : 6149, 1994.
17. Filipek A, Jastrzebska B, Nowotny M, et al : CacyBP/SIP, a calyculin and Siah-1 interacting protein, binds EF-hand proteins of the S100 family. *J Biol Chem* 277 : 21103, 2002.
18. Calabretta B, Battini R, Kaczmarek L, et al : Molecular cloning of the cDNA for a growth factor-inducible gene with strong homology to S-100, a calcium-binding protein. *J Biol Chem* 261 : 12628, 1986.
19. Kuznicki J, Kordowska J, Puzianowska M, et al : Calyculin as a marker of human epithelial cells and fibroblasts. *Exp Cell Res* 200 : 425, 1992.
20. Breen EC, Fu Z, Normand H : Calyculin gene expression is increased by mechanical strain in fibroblasts and lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21 : 746, 1999.
21. Liu M, Post M : Invited review: Mechanochemical signal transduction in the fetal lung. *J Appl Physiol* 89 : 2078, 2000.
22. McCollum R, Martel-Pelletier J, DiBattista J, et al : Regulation of interleukin 1 receptors in human articular chondrocytes. *J Rheumatol Suppl.* 27 : 85, 1991.
23. Scherle PA, Pratta MA, Feeser WS, et al : The effects of IL-1 on mitogen-activated protein kinases in rabbit articular chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 230 : 573, 1997.
24. Hirota Y, Tsukazaki T, Yonekura A, et al : Activation of specific MEK-ERK cascade is necessary for TGF- β signaling and crosstalk with PKA and PKC pathways in cultured rat articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 8 : 241, 2000.
25. Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, de Souza P, et al : Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase induces apoptosis of human chondrocytes. *J Biol Chem* 276 : 13289, 2001.
26. Hung CT, Henshaw DR, Wang CC, et al : Mitogen-activated protein kinase signaling in bovine articular chondro-

- cytes in response to fluid flow does not require calcium mobilization. *J Biomech* 33 : 73, 2000.
27. Fanning P, Emkey G, Smith R, et al : Response of cartilage to mechanical loading is correlated with sustained ERK1/2 activation. *Trans Orthop Res Soc* 26 : 172, 2001.
 28. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, et al : Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22: 153, 2001.
 29. Yoon YM, Kim SJ, Oh CD, et al : Maintenance of differentiated phenotype of articular chondrocytes by protein kinase C and extracellular signal-regulated protein kinase. *J Biol Chem* 277 : 8412, 2002.
 30. Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M : Oncostatin M-induced matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 genes expression in chondrocytes requires Janus kinase/STAT signaling pathway. *J Immunol* 166 : 3491, 2001.
 31. Chen TL, Wang PY, Luo W, et al : Aggrecan domains expected to traffic through the exocytic pathway are misdirected to the nucleus experimental cell research 263 : 224, 2001.

저자 연락처

우편번호 431-070
경기도 안양시 동안구 평촌동 896번지
한림대학교 성심병원 구강악안면외과
김 성 곤

원고 접수일 2004년 6월 5일
게재 확정일 2004년 10월 21일

Reprint Requests

Seong-Gon Kim

Department of OMFS, Sacred Heart Hospital, Hallym University
#896, Pyungchon-Dong, Dongan-Gu, Anyang-city, Kyungki-do,
431-070, Republic of Korea
Tel: +82-31-380-3870 Fax: +82-31-387-2475
E-mail: kimsg@hallym.or.kr

Paper received 5 June 2004
Paper accepted 21 October 2004