

원 저

연골세포의 탈분화 및 세포고사 억제를 위한 기전연구

허정은¹⁾, 조은미¹⁾, 양하루¹⁾, 김대성¹⁾, 백용현, 이재동, 최도영, 박동석

경희대학교 부속한방병원 침구학교실
경희대학교 골관절질환 한방연구센터¹⁾

Regulation of Interleukin-1 β -induced Dedifferentiation and Apoptosis via p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway in Articular Chondrocytes

Jeong-Eun Huh¹⁾, Eun-Mi Cho¹⁾, Ha-Ru Yang¹⁾, Dae-Sung Kim¹⁾,
Yong-Hyeon Baek, Jae-Dong Lee, Do-Young Choi, Dong-Suk Park

Department of Acupuncture & Moxibustion, Oriental Medical Hospital, Kyung-Hee University
Oriental Medicine Research Center for Bone & Joint Disease¹⁾

Objectives : Interleukin-1 (IL-1) β in articular chondrocytes regulates differentiation, apoptosis, and inflammatory responses. It is still controversial. So, we investigated IL-1 β induces chondrocytes dedifferentiation and death. Also, we studied the role of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) subtypes on IL-1 β -induced dedifferentiation and apoptosis.

Methods : To evaluation of dedifferentiation by chemokines of chondrocytes, we assessed such as proteoglycan, collagen, MMP-3 and MMP-13 by RT-PCR analysis. Also, to assess of apoptosis effect by chemokines, we measured annexin V/Propidium iodode (PI) and sub G1 cells in chondrocytes by flowcytometric analysis.

Results : IL-1 β treatment did not affect activation of ERK-1/2, but stimulation of p38 kinase. Inhibition of phospho ERK-1/2 with PD98059 enhanced IL-1 β -induced dedifferentiation, and apoptosis up to 13.5%, whereas inhibition of phospho p38 kinase with SB203580 inhibited dedifferentiation, and apoptosis.

Conclusions : Our results indicate that SB203580, p38 kinase inhibitor, inhibits IL-1 β -induced dedifferentiation, and apoptosis by the inhibition of type II collagen expression and proteoglycan synthesis of rabbit articular chondrocytes.

Key Words: Interleukin-1 (IL-1) β , chondrocytes, dedifferentiation, mitogen-activated protein kinase (MAPK), apoptosis.

서 론

- 접수 : 2006년 2월 8일 · 논문심사 : 2006년 2월 18일
- 채택 : 2006년 2월 22일
- 교신저자 : 박동석, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 부속한방병원 침구학교실 (Tel:02-958-9206, E-mail: dspark@yahoo.co.kr)
- 본 논문은 보건복지부 특정센터연구의 지원에 의하여 연구되었음 (사업명 : 한방치료기술 연구개발사업, 고유번호 : B030008).

연골조직의 퇴행은 점진적이고 비가역적으로 일어나는 반응으로 퇴행성관절염의 가장 직접적인 원인이며 70세 이상에서는 거의 전인구가 퇴행성관절염을 나타내고 이 중 약 25% 정도가 임상증세를 나타낸다^{1,2)}. 지난 수십 년 동안 퇴행성관절염을

제어하기 위한 연구와 노력이 있어 왔음에도 불구하고 아직 병리적인 원인이나 근본적 해결책은 강구되지 않았다. 그러나 최근 새로이 시도되고 있는 생체 외 배양 연골세포에서 유래된 세포를 연골세포로 분화시켜 세포 및 조직을 이식하거나 유전자 도입에 연골재생을 유도하는 방법 등은 매우 희망적인 예측을 가능케 한다⁵⁴. 실제 분화된 연골세포를 적절한 조건으로 생체 외에서 배양하면 연골 특이적 기질을 합성하고, 실험적 및 임상적 시험에서 적어도 80%의 환자에서 효과를 나타냄이 밝혀졌다⁵⁶. 그런데 이러한 방법을 사용할 수 있기 위해서는 연골세포에서 퇴행성 반응의 분자적 조절 메커니즘을 규명하여 연골세포 및 연골조직의 퇴행 제어 기술을 탐색하는 연구⁷⁹가 선행되어야 하며, 그러기 위해서는 chondroprogenitor 세포 및 다량의 건강한 연골세포를 획득하여 세포주기에 수반되는 연골세포의 탈분화(dedifferentiation)의 억제와 효율적인 재분화(redifferentiation)를 유도하는 기술등의 연구가 수반되어야 한다. 이에 본 연구팀은 세포주기의 증식, 분화, 성장, 형질전환, 고사 (proliferation, differentiation, development, transformation, and apoptosis) 등의 과정에 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway가 매우 중요하게 작용하는 것에 착안하여 연구하였다¹⁰⁻¹³. 이 중에서도 extracellular signal-regulated kinase (ERK), Jun kinase (JNK/SAPK), 그리고 p38 MAPK (p38)의 세 가지는 매우 특징적이다. MAPK는 성장인자 등이 세포막에 위치한 수용체를 활성화하면 이 신호를 세포막으로부터 핵으로 전달함으로써 세포의 성장과 분화를 조절하는 주요 신호전달계이다¹⁴⁻¹⁶. 포유동물에서 MAPK의 신호전달체계는 지금까지 3가지 (ERK, JNK/SAPK, p38) 이상이 발견되어 이들이 MAPK family를 이루고 있다. MAPK는 MAPKKK → MAPKK → MAPK로 연결된 protein kinase cascade를 통하여 활성화된 후, 여러 가지의 표적 유전자의 발현을 조절함으로써 세포 반응을 유발한다. 성장 인자는 주로 ERK 경로를 활성화하고 자외선 등의 stress, 그리고 TNF 등의 염증성

cytokine은 주로 JNK와 p38의 경로를 활성화한다¹⁴⁻¹⁶. 그러나 이 경로들은 완전히 독립된 것이 아니어서, 자극이나 세포의 종류에 따라서 여러 가지의 MAPK가 서로 다른 정도로 활성화되고, 이에 따라서 다른 기질을 서로 다른 정도로 인산화함으로써, 다양한 신호에 따르는 세포 반응의 특이성을 나타내는 것으로 추정한다.

이를 바탕으로 MAP kinase inhibitor를 적절히 이용한다면 연골세포의 탈분화와 재분화를 조절할 수 있다는 예측을 할 수 있다. 본 실험에서는 분화된 연골세포의 탈분화 및 탈분화된 연골세포의 재분화를 연구하기 위한 모델로 관절연골세포의 배양과 interleukin-1(IL-1)을 처리하여 탈분화를 유도한 뒤 MAPK 신호전달과정에 미치는 영향을 확인하였고, MAP kinase inhibitor가 세포고사, glycosaminoglycan 및 collagen 분해 억제에 미치는 영향에 대해 실험한 결과, 이러한 과정이 연골세포의 탈분화 및 세포고사를 억제함으로써 탈분화 억제 및 재분화의 방향으로 전환시킬 수 있는 가능성을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 연골세포 배양

1) 세포분리

(1) 2주령의 New Zealand White 토끼의 무릎관절의 연골을 얇게 저며서 분리한다. PBS로 세척 후 0.2% type II collagenase를 넣고, 37 °C shaker에서 90 rpm으로 반응시켰다. 30분 후 분리된 세포를 모으고, 효소의 활성을 불활성화 시키기 위하여 fetal bovine serum (FBS)을 최종 2%로 첨가하였다. 이 과정을 5회 반복하여 분리된 단일세포만을 모두 모았다.

(2) 완전배지(DMEM + 20% FBS)로 세포 현탁액을 만든다. 세포를 0.5×10^5 cells/cm² 세포밀도가 되도록 넣어준 뒤, 37 °C CO₂ incubator에 넣어 배양한다.

(3) 배양 후 하루가 지나면 세포가 증식하기 시작

하고 약 5일 정도 지나면 confluent 상태에 도달한다. 계대 배양하는 경우 각 passage 당 0.3×10^5 cells/cm²로 계대배양하였고 5 계대까지 배양된 세포로 실험한다.

(4) 90% confluent하게 자란 세포를 DMEM +1% FBS 배지로 교환하고, 각 well에 다음과 같은 약제 (retinoic acid(ReA) 5 μ M, IL-1b 10 ng/ml, PD98059 (PD)20 μ M, SB203580(SB) 20 μ M)를 처리하여 24시간 배양하였다.

| | ReA | IL-1b | PD | SB |
|---|-----|-------|----|----|
| 1 | - | - | - | - |
| 2 | + | - | - | - |
| 3 | - | + | - | - |
| 4 | + | + | - | - |
| 5 | + | + | + | - |
| 6 | + | + | - | + |

2. RNA추출

약제처리된 세포를 PBS용액으로 세척한 후

Trizol 500 μ l 넣고 세포를 scraper로 긁어내어 1.5ml tube에 옮기고, 100 μ l씩 chloroform을 첨가한다. 12,000rpm에서 10분 동안 원심분리를 하여 RNA 층을 거두어 새로운 튜브에 옮긴 후 isopropylalcohol을 250 μ l 넣고 -20 $^{\circ}$ C에 하루 밤 방치한다. 원심분리 후 70% alcohol로 세척한 후 건조시키고, 멸균한 증류수 20 μ l에 녹이고 Spectrophotometry (absorbance A₂₆₀/A₂₈₀ nm)에서 RNA량을 정량한다.

3. RT-PCR analysis

1) Reverse transcription

| | |
|----------------------------------|-------------|
| total RNA | 1~5 μ g |
| Oligo dT(15 mer) | 1 μ l |
| 10x reverse transcriptase buffer | 2 μ l |
| 10mM DTT | 4 μ l |
| 10mM dNTP | 1 μ l |

Reverse transcriptase(250 units/ μ l) 1 μ l

DEPC water to 20 μ l

95 $^{\circ}$ C 5분 : RNA denaturation

42 $^{\circ}$ C 60분 : Reverse transcriptase reaction

70 $^{\circ}$ C 5분 : Enzyme killing

2) PCR

cDNA 5 μ l

10x PCR buffer 2 μ l

Taq DNA polymerase(5 units/ μ l) 1 μ l

5' primer 1 μ l

3' primer 1 μ l

H₂O 10 μ l

20 μ l

1단계: 95 $^{\circ}$ C, 5분, 1 cycle

2단계: 30 cycle

95 $^{\circ}$ C 30초 : denaturation

58 $^{\circ}$ C 60초 : annealing

72 $^{\circ}$ C 30초 : polymerization

3단계: 72 $^{\circ}$ C, 5분, 1 cycle

4. Protein 추출

약제처리된 세포를 PBS로 세척하고, lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1mM EDTA, supplemented with protease inhibitors(10 g/ml leupeptin, 10 g/ml aprotinin, 10 g/ml pepstatin A, and 1mM of 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride) and phosphatase inhibitors (1 mM NaF and 1mM Na₃VO₄)를 300 μ l 넣고 scraper로 긁어내어 1.5ml tube에 옮긴다. 12,000 rpm에 10분간 원심분리하고, 부유액을 새 튜브에 옮긴 후 Bradford 용액으로 단백질을 정량한다.

5. Western blot analysis

4-12% SDS-polyacrylamide gel에 20 μ g의 단백질을 120V에서 90분간 전기영동한다. Transfer system (300 mA, 2 h)을 이용하여 gel에 있는 단백질을

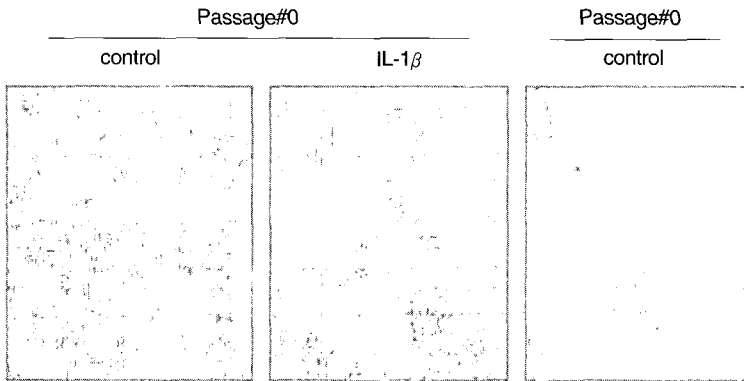


Fig. 1. Dedifferentiation induced by IL-1 β and serial passage in primary culture of articular chondrocytes.

Hybond-C nitrocellulose membranes에 옮긴다. 5% nonfat dry milk로 실온에서 90분간 반응시킨다. 일차항체 (mouse anti-pERK, ERK, pp38, p38)를 1:1,000 희석하여 5 ml 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 shaking하면서 overnight으로 반응시킨다. 1 \times TBST 용액으로 10분간 3회 세척한다. 이차항체 (horseradish peroxidase-conjugated IgG) 1:2,000 희석하여 5 ml 넣고 shaking하면서 실온에서 2시간 반응시킨다. 다시 1 \times TBST 용액으로 10분간 3회 세척한 후 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액으로 감광시킨 후 현상한다.

약제 처리된 세포를 PBS로 세척하고 TE를 1 ml 넣어 1분간 방치한다. 완전배지를 첨가한 후 15 ml tube에 각각 담은 후 원심분리한다. PBS를 6 ml 넣은 후 세포를 세척한 후, 차가운 70% EtOH를 5 ml 넣으면서 동시에 vortex로 mixing 한 후 -20 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨다. 세포를 세척 후 0.1% RNase A로 10분 동안 반응시키고 propidium iodide 50 μ g/ml을 1 ml 넣어 염색한 후 Flow cytometry로 분석한다.

6. Flow cytometry (FACS) analysis

7. 통계처리

SPSS에서 Paired *t*-test와 One way ANOVA를 이용하여 통계처리 하였다.

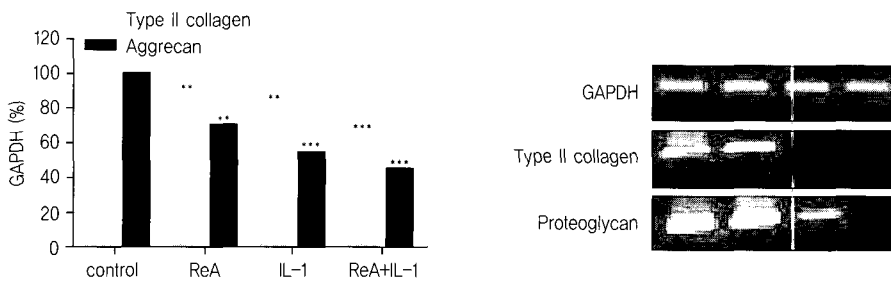


Fig. 2. Gene expression of type II collagen and proteoglycan by ReA, and IL-1 β on dedifferentiated chondrocytes. Chondrocytes were treated with ReA, and IL-1 β 24 h. The expression of type II collagen and proteoglycan expression were determined by RT-PCR, and quantified by densitometric analysis. GAPDH indicates that same amount of RNA extracts were used each treated group. Data represent the percentage values with standard deviation.

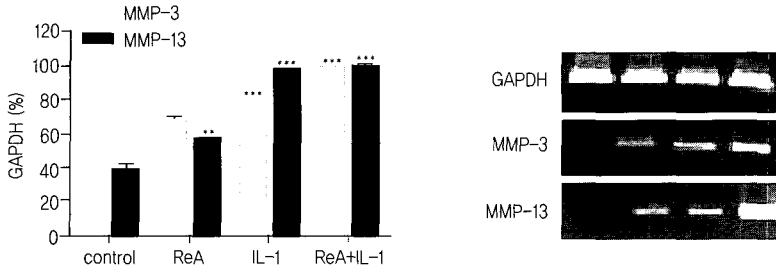


Fig. 3. Gene expression of MMP-3 and MMP-13 by ReA, and IL-1 β on de-differentiated chondrocytes. Chondrocytes were treated with ReA, and IL-1 β 24 h. The expression of MMP-3 and MMP-13 expression were determined by RT-PCR and quantified by densitometric analysis.

결 과

1. 세포의 형태관찰

연골세포를 일차배양 한 후 계대별 세포의 탈분화 정도를 관찰하였다. Chondrocyte는 lacunae의 내부에 위치하며 세포간 기질은 type II collagen이 주성분으로 구성되어 있다. 계대를 하지 않은 연골세포의 경우 (passage #0) 약재를 처리하지 않은 정상세포는 lacunae와 chondrocyte 및 미세한 collagen층으로 세포들이 선명하게 보인 반면, IL-1 β 를 처리하였을 경우와 계대배양을 하여 보았을 때 (passage #4) lacunae가 선명하게 보이지 않았고, collagen fiber의 노화로 탄력을 잃어 세포가 커져 보였다 (Fig. 1).

h2. 연골세포에서 IL-1 β 에 의한 유전자 발현의 변화

정상 연골세포에 ReA, IL-1 β , ReA+IL-1 β 를 각각 처리하여 연골세포에서의 유전자 발현 변화량을 RT-PCR로 측정하였다. 실험결과 ReA 및 IL-1 β 를 처리하였을 경우, 음성대조군에 비하여 type II collagen 발현이 각각 8.5%, 11% 감소되었으며 aggrecan 발현은 각각 29%, 47% 감소되었으며, ReA+IL-1 β 를 동시 처리하였을 때 synergistic 효과가 유발되어 type II collagen은 32.5%, aggrecan은 49%로 감소하였다(Fig. 2). 또한 연골세포에 ReA, IL-1 β , ReA+IL-1 β 를 각각 처리하여 matrix metalloproteinase (MMP)-3 과 -13을 각각 RT-PCR하여 측정하였다. 실험결과, ReA를 처리하였을 때 보다 IL-1 β 에 의하

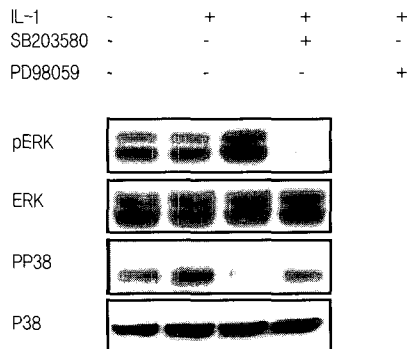


Fig. 4. MAP kinase inhibitors regulates IL-1 β induced dedifferentiation of chondrocytes. Chondrocytes were treated with IL-1 β 24 h. The expression of phospho ERK and phospho p38 expression were determined by western blot analysis. ERK and p38 expression indicates that same amount of protein extracts were used each treated group.

여 MMP-3 및 MMP-13의 활성이 증가하였고, ReA+IL-1 β 에 의하여 가장 많은 MMPs 활성이 증가 되는 것을 확인하였다 (Fig. 3).

3. 연골세포에서 MAP kinase inhibitor에 따른 유전자 발현의 변화

정상 연골세포에 IL-1 β 10 ng/ml 처리 후 pERK inhibitor인 PD98059, pp38 inhibitor인 SB203580을 각각 동시 처리하여 연골세포의 탈분화를 억제시키는데 대하여 실험하였다. 실험결과, IL-1 β 에 pERK와 p38을 활성화 시켰고, PD98059는 pERK, pp38 및 type II collagen의 발현 모두를 감소시켰다. 그러나, SB203580은 pERK의 발현은 증가시켰으며, pp38의 발현은 감소시켰고, type II collagen의 발현은 증가시켰다 (Fig. 4).

4. Flowcytometry를 이용한 연골세포의 세포고사 확인

정상 연골세포에 IL-1 β 와 함께 pERK inhibitor인 PD98059, pp38 inhibitor인 SB203580을 각각 처리하여 연골세포의 세포고사를 억제하는데 대하여

실험하였다. 실험결과, 음성대조군에 비하여 IL-1 β 처리 시 세포고사가 5.5% 증가하였고, PD98059에 의하여 13.5% 증가하였으며, SB203580에 의해서 세포고사가 감소하였다 (Fig. 5).

고찰 및 결론

퇴행성관절염의 해결방법 중 하나로 생체 외에서 연골세포를 배양하여 연골재생을 유도할 수 있는데 이를 위해서는 연골세포에서 퇴행성 반응의 분자적 조절 메커니즘을 규명하여 연골세포 및 연골조직의 퇴행제어 기술을 탐색해야 한다. 골관절염의 역학적 특성으로 가장 뚜렷한 것은 그 유병율이 나이와 밀접한 연관을 보인다는 점이다. 연골조직 검사소견에서 노령으로 갈수록 연골의 퇴행성 변화가 나타나는 비율이 높아지는 것을 관찰할 수 있는데, 이러한 연령에 따른 골관절염의 발병을 '연골 세포 노화 (chondrocyte senescence)'의 개념으로 접근하여 실험을 시도하였다.

연골세포는 염증성 cytokine에 의해 활성화되며, 이는 연골을 파괴하는 metalloproteinase 합성 증가

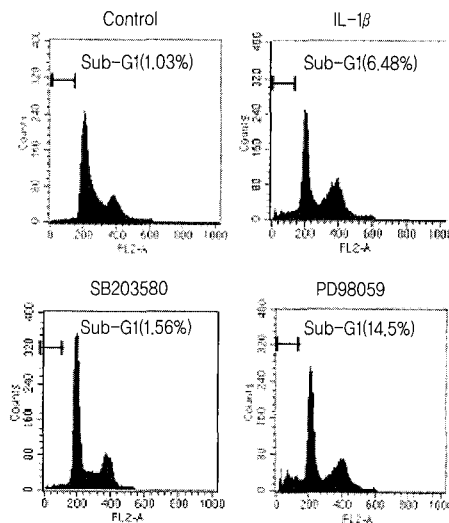


Fig. 5. MAP kinase inhibitors regulates IL-1 β induced dedifferentiation of chondrocytes. Chondrocytes were treated with IL-1 β for 24 h. Apoptotic cells were stained with propidium iodide and quantified using flowcytometric analysis.

와 기질 파괴의 발현을 유도하고 nitric oxide와 같은 염증성 매개물을 생성하며, extracellular matrix의 분해를 가속화하는 한편 proteoglycan이나 type II collagen의 발현을 억제한다. Articular chondrocyte에 NO 공여체인 sodium nitroprusside (SNP)를 처리하면 분화된 연골세포의 주요 표지인자인 type II collagen과 proteoglycan의 발현을 저해해 탈분화를 유도한다는 것은 이미 여러 논문에서 보고된 바 있다¹⁶⁻²¹⁾.

본 연구팀은 연골세포의 탈분화 및 사멸에 대한 분자적 조절 메카니즘에 대해 알아보기 위하여 탈분화를 유도하는 방법으로 IL-1 β 를 처리하는 것을 택하였고 이러한 과정이 MAPK 신호전달과정에서 미치는 영향을 확인하였다.

정상 연골세포에 ReA 및 IL-1 β 를 단독처리 처리하여 유전자 발현 변화량을 측정했을 때 type II collagen 발현이 감소되었으며 aggrecan 발현 또한 감소되었으며, ReA+IL-1 β 를 동시 처리하였을 경우, type II collagen과 aggrecan이 더욱 감소함을 알 수 있었다. 또한 본 실험의 결과, IL-1 β 에 의하여 MMP-3 및 MMP-13의 활성이 증가하였고, ReA+IL-1 β 에 의하여 MMPs 활성이 가장 크게 증가하는 것을 확인하였는데 이러한 결과를 통해 ReA와 IL-1 β 를 함께 처리하면 연골세포의 탈분화가 더 촉진된다는 것을 알 수 있다.

그러나 본 실험에서는 일차적으로 먼저 IL-1 β 에 의한 탈분화 및 세포고사가 MAPK signaling에 의하여 조절되는지에 대하여 초점을 맞추었다. ERK가 활성화되면 연골세포 분화가 억제되는데 PD98059를 처리하면 pERK와 pp38의 발현은 감소되었으며, SB203580은 pERK의 발현은 증가시켰으나 pp38의 발현은 감소시켰다는 것을 알 수 있었다. 또한 Flowcytometry로 측정한 결과 SB203580에 의해 세포고사가 감소하였고 PD98059에 의해 증가하여 본 실험에 대한 결과의 일치를 얻을 수 있었다.

결론적으로 활성화된 ERK는 연골세포의 탈분화를 유도하고 반대로 p38 kinase는 분화된 연골세포의 표현형 유지에 중요한 역할을 하므로 phospho

ERK inhibitor인 PD98059인 보다는 phospho p38 inhibitor인 SB203580을 이용하여 p38 kinase의 신호전달을 조절함으로써 연골세포의 탈분화를 효과적으로 억제하고, 세포고사를 억제함으로써 연골세포 보호 및 재분화를 유도하여, 연골세포를 이용한 관절염 환자의 치료에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. McAlindon TE, Wilson PW, Alibadi P, Weissman B, Felson DT. Level of physical activity and the risk of radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in the elderly: the Framingham study. *Am J Med.* 1999;106:151-157.
2. Felder DT, Naima A, Anderson J, Kazis L, Castelli W, Meenan RF. The prevalence of osteoarthritis in the elderly: Te Framingham study. *Arthritis Rheum.* 1987;30:914-918.
3. Barnewitz D, Endres M, Kruzer I, Becker A, Zimmermann J, Wilke I, Ringe J, Sttinger M, Kaps C. Treatment of articular cartilage defects in horses with polymer-based cartilage tissue engineering grafts. *Biomaterials.* 2006;27(14):2882-9.
4. MacHale MK, Setton LA, Chilkoti A. Synthesis and in vitro evaluation of enzymatically cross-linked elastin-like polypeptide gels for cartilaginous tissue repair. *Tissue Eng.* 2005;11(11-12):1768-79.
5. Kuo CK, Li WJ, Mauck RL, Tuan RS. Cartilage tissue engineering: its potential and uses. *Curr Opin Rheumatol.* 2006;18(1):64-73.
6. Marcacci M, Berruto M, ghinelli D, Gobbi A, Kon E, pederzini L, Rosa D, Sacchetti GL, Stefani G, Zanasi S. Articular cartilage engineering with Hyalograft C: 3-year clinical results. *Clin Orthop Relat Res.* 2005;435:96-105.
7. Cho SH, Oh CD, Kim SJ, Kim IC, Chun JS. Retinoic acid inhibits chondrogenesis of

- mesenchymal cells by sustaining expression of N-cadherin and its associated proteins. *J Cell Biochem.* 2000;389:837-47.
8. Cho YR, Lee SJ, Jeon HB, Park ZY, Chun JS, Yoo YJ. Under-sulfation by PAPS synthetase inhibition modulates the expression of ECM molecules during chondrogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;323:769-75.
 9. Goessler UR, Bugert P, Bieback K, deml M, Sadick H, Hormann K, Riedel F. In vitro analysis of the expression of TGF-beta superfamily members during chondrogenesis differentiation of mesenchymal stem cells and chondrocytes during dedifferentiation in cell culture. *Cell Mol Biol Lett.* 2005;10(12):345-62.
 10. Goessler UR, Bugert P, Bieback K, Sadick H, Verse T, Baisch A, Hormann K, Riedel F. In vitro analysis of matrix proteins and growth factors in dedifferentiating human chondrocytes for tissue-engineered cartilage. *Acta Otolaryngol.* 2005;125:647-53.
 11. Mazzetti I, Magagnoli G, Paoletti S, Ugucioni M, Olivotto E, Vitellozzi R, Cattini L, Facchini A, Borzi RM. A role for chemokines in the induction of chondrocyte phenotype modulation. *Arthritis Rheum.* 2004;50(1):112-22.
 12. Kim JH, Ryu KH, Jung KW, Han CK, Kwak WJ, Cho YB. SKI306X suppresses cartilage destruction and inhibits the production of matrix metalloproteinase in rabbit joint cartilage explant culture. *J Pharmacol Sci.* 2005;98:298-306.
 13. Kim SM, Kwon MS, Park CS, Choi KR, Chun JS, Ahn J, Song WK. Modulation of Thr phosphorylation of integrin beta1 during muscle differentiation. *J Biol Chem.* 2004;279:7082-90.
 14. Oh CD, Chun JS. Signaling mechanisms leading to the regulation of differentiation and apoptosis of articular chondrocytes by insulin-like growth-factor I *J Biol Chem.* 2003;278(38):36563-71.
 15. Chun JS. Expression, activity, and regulation of MAP kinases in cultured chondrocytes. *Methods Mol Med.* 2004;100:291-306
 16. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation on mammalian cells. *Cell research.* 2002; 12:9-18
 17. Kim SJ, Kim Ju JW, Oh CD, Yoon YM, Song WK, Kim JH, Yoo YJ, Bang OS, Kang SS, Chun JS. ERK-1/2 and p38 Kinase Oppositely Regulate Nitric Oxide-induced Apoptosis of Chondrocytes in Association with p53, Caspase-3, and Differentiation Status. *J Biol Chem.* 2001;277:1332-9.
 18. Kim SJ, Hwang SG, Kim IC, Chun JS. Actin cytoskeletal architecture regulates nitric oxide-induced apoptosis, dedifferentiation and cyclooxygenase-2 expression in articular chondrocytes via mitogen-activated protein kinase and protein kinase C pathways. *J Biol Chem.* 2003;278:42448-56
 19. Oh HM, Choi SC, Lee HS, Chun CH, Seo GS, Choi EY, Lee HJ, Lee MS, Yeom JJ, Choi SJ, Han WC, Oh JM, Chung YT, Chun JS, Lee KM, Jun CD. Combined action of extracellular signal-regulated kinase and p38 kinase rescues Molt-4 T cells from nitric oxide-induced apoptotic and necrotic cell death. *Free Radic Biol Med.* 2004;37:463-79.
 20. Panico AM, Vicini P, Massimo G, Cardile V, Gentile B, Avondo S, Vittorio F, Ronsisvalle G. Protective effects of benzisothiazolylamidines on IL-1 beta induced alterations in human articular chondrocyte metabolism. *Inflammation.* 2004;28:231-5.
 21. Sasaki A, Sasaki K, Kontinen YT, Santavirta S, Takahara M, Takei H, Ogino T, Takagi M. Hyaluronate inhibits the interleukin-1beta-

(228) 대한한의학회지 제27권 제1호(2006년 3월)

induced expression of matrix metalloproteinase
(MMP)-1 and MMP-3 in human synovial cells.

Tohoku J Exp Med. 2004;204:99-107