

저강도 음파 조사가 중간엽 줄기세포 증식에 미치는 영향

Effect of Low Intensity Sound Wave on UC-MSC(Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell) Growth

김성민^{1,✉}, 강승호¹, 정재훈¹, 박정극¹, 김수찬²
Sung Min Kim^{1,✉}, Seung Ho Kang¹, Jae Hoon Jeong¹, Jung Keug Park¹ and Soo Chan Kim²

1 동국대학교 의생명공학과 (College of Biosystem Department of Medical Bio Engineering, Dongguk Univ.)

2 한경대학교 생물정보통신전문대학원 IT 융합기술연구소(Graduate School of Bio & Information Technology, Hankyong National Univ.)

✉ Corresponding author: sungmin2009@gmail.com, Tel: 02-2260-3319

Manuscript received: 2010.10.5 / Revised: 2010.12.8 / Accepted: 2011.1.17

It is known that the low-intensity sound stimulation really affect to grow the cell. The cellular growth mechanism, however, does not been clearly identified even the effect on the low-intensity sound stimulation. The purpose of this study is to investigate the effect of low-intensity sound stimulation on the alveolar UC-MSC proliferation. Before the low-intensity sound stimulation is applied, the UC-MSC are cultured for 24 hours to facilitate their attachments. The cells are divided into two groups. And each was exposed to a medium with or without the low-intensity ultrasound stimulation at 71dB intensity level. The UC-MSC are again divided into three treatment groups of group 1, 2, and 3 and exposed to a frequency at 50Hz, 100Hz, and 1000Hz, respectively. In the results, it is investigated that the growth rates of UC-MSC for the stimulated groups were higher than those of control groups. In 1000Hz frequency, the number of UC-MSC cell is significantly higher than control groups ($p>0.05$). We would put the hypothesis that the cell growth could be enhanced by an appropriate low-intensity sound stimulation

Key Words: Sound Wave (음파), Stem Cell (줄기세포), Sound Effect (음파효과), Cell Growth (세포증식)

1. 서론

최근 음파의 영향에 대하여 다양한 연구가 진행되고 있다. 음파가 사람의 감성에 미치는 영향^{1,2}에 대한 연구가 있었고, 음파가 식물의 성장과 식물세포 증식능력 향상에 대한 연구,^{3,4} 동물의 생리 기능에 미치는 영향,^{5,6} 초음파에 의한 특정 인간세포 배양에 대한 연구^{7,8} 등 음파의 영향에 대한 연구는 지속적으로 진행되고 있다. 최근 생명공학의 발전으로 세포를 이용한 치료연구가 다방면에서 진행되고 있다. 줄기세포를 이용한 세포 치료제나 초음파를 통한 특정 세포의 증식을 유도하는 치료

법 등이 최근 연구되고 있다.^{7,8} 특히 광생체자극(Photobiostimulation)이 소개된 이후 의학적으로도 다양한 광원을 이용하여 상처를 치유하는 연구가 진행되고 있으며, 이는 상처부위를 저전위 레이저 치료(Low Level Laser (LLL) therapy)를 이용하여 상처부위의 세포 증식을 촉진시킴으로써 상처를 치유하는 방법이다.⁹

이러한 방법이 가능하게 된 것은 인체 조직을 구성하는 세포들은 각각의 위치에서 일정한 물리적 자극을 받고 있으며, 이러한 자극에 세포는 반응을 보이기 때문이다. 실제로 세포실험 시 실제와 유사한 환경을 제공하는 바이오리액터를 도입

하여 초음파를 이용한 골의 기계적 강도의 증가와 골유합 시간이 감소되는 골절치료 효능을 확인하는 연구나,¹⁰ 동물실험을 통한 골절치유 촉진효과¹¹ 등 초음파 효과연구에 사용되었다. 이러한 선행연구의 결과에는 직접적인 접촉, 매질에 의한 진동이 모티브가 되어 효과가 나타난 것으로 판단된다.¹² 결과적으로 순수한 음파를 이용한 연구는 선행 연구를 찾기 어려우며, 실제 음파가 인체의 세포 성장에 미치는 영향에 대한 연구가 미비하다.

따라서 본 연구에서는 음파의 여러 기전 중 물리적 진동에 의한 영향을 배제한 음파의 소리에너지에 대한 영향을 연구하였다. 이에 저 강도 음파 조사가 인체 줄기세포의 증식기능 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 71dB 강도의 50Hz, 100Hz, 1000Hz 의 정현파 자극을 세포에 조사하여 세포의 증식을 관찰하였다.

2. 실험방법

2.1 Cell-line

세포는 탯줄 중간엽 줄기세포 (UC-MSC: Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell)로 특정한 조건에 따라 다양한 세포로 분화가 될 수 있는 세포를 사용하였다.¹¹ 본 세포를 사용한 이유는 성장속도가 빠르며, 현재 다양한 분야에서 세포치료제로써 연구가 진행되고 있기 때문이다.

측정결과

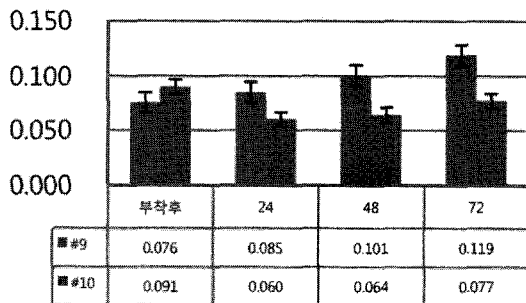


Fig. 1 The results of passage experiment(MTT)

실험에 사용한 세포는 동국대학교 생명공학연구원서 passage7 의 세포를 분양 받았으며, 사전 실험을 통하여 실험 가능한 passage 범위를 passage9 와 passage10 으로 설정하고 MTT assay 를 통한 예비실험 진행 결과 passage9 에서 더 우수한 증식량

을 보여 passage9 의 세포를 사용하였다. (Fig. 1)

2.2 음파발생장치

본 연구에서 사용한 음파 발생장치의 구성은 다음과 같다. 주파수를 발생시키는 함수발생기(FG-7002C, EG Digital Co., ltd)는 주파수 대역 0.02Hz-2MHz, 10Vp-p 의 출력을 가지고 있으며, 증폭기와 스피커(NA-818APR, NBN, China)는 차량용 우퍼 스피커를 변형하였고, 상세 스펙으로는 주파수응답 30Hz-20kHz, 유효출력 90W, 스피커 임피던스는 4Ω이다. 실험에 사용하는 주파수 범위에 맞추어 장비를 변형하였다. (Fig. 2)

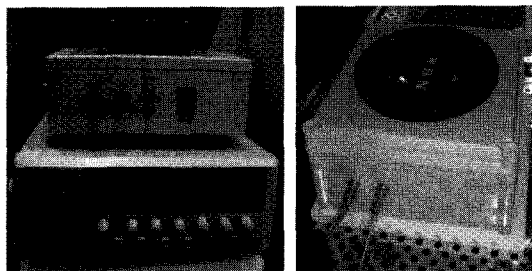


Fig. 2 Equipment of sound generator (a) Function Generator & AMP (b) Speaker

2.3 실험 환경

배양액 조성은 Low-DMEM(PAA, Austria)에 FBS(PAA, Austria) 10%, 항생제(Penicillin, PAA, Austria) 1%를 첨가하여 사용하였다. 비교실험을 위하여 두 대의 인큐베이터(SANYO water jacket MCO175, Japan)내부는 37℃, 습도 95%, CO₂ 5%의 조건을 유지하였고, 한 대의 인큐베이터에만 음파 발생 스피커를 설치했다. 세포는 6well 배양접시 2 개에 동일하게 파종하여 두 개 중 하나는 음파를 조사하여 72 시간 후 남은 한 개와 각각 MTT assay 를 실시하여 세포의 증식량을 비교하였다.

2.4 음파 조건

실험에 사용한 음파 조건은 71dB(TEs 1350A, TEs Electrical Electronic corp.) 강도의 정현파를 50, 100, 1000Hz 에서 72 시간 동안 조사하였다. 이는 Zhao 등⁴ 의 식물세포실험에서 1000Hz 대역에서 가장 높은 증식량을 확인하였다는 보고가 있었으나 1000Hz 이하에서의 실험이 없었기에 1000Hz 보다 낮은 주파수에서의 증식량을 확인하고자 하였다. 출력강도는 인큐베이터가 물리적으로 진동

하지 않는 가장 낮은 강도를 측정하여 71dB 로 하였다.

2.5 분석방법

세포의 증식량을 비교하기 위하여 MTT assay(Sigma-Aldrich Korea Ltd.)를 통한 MTT standard 를 작성하였다. 6well plate 에 1*10⁴, 5*10⁴, 1*10⁵씩 파종하여 12 시간 후 MTT assay 를 실시하여 MTT standard 를 작성하였다.(Fig. 3) 작성한 MTT standard 를 통하여 수식(1)을 유도하고 수식에 의하여 각 실험별 세포양을 유추하였으며,⁹ 비교군을 기준으로 음파조사군의 증식 정도를 판별하고 독립표본 T 검정으로 각 실험의 유의성을 확인하였다.

$$\text{cell No.} = (\text{MTT value} \times 286990) - 14997 \quad (1)$$

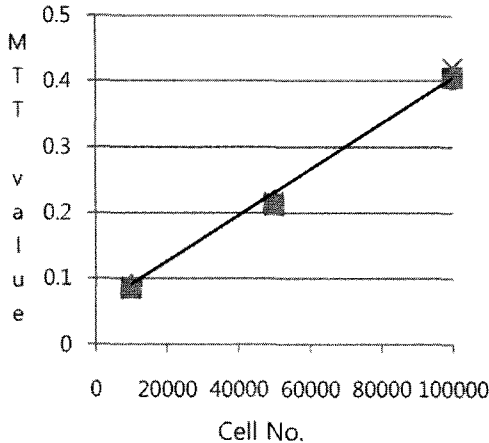


Fig. 3 MTT Standard graph

3. 결과

3.1 세포 형태

음파를 조사한 세포와 일반 인큐베이터에서 배양한 세포 모두 세포의 본래의 모양을 유지하였다. 이는 본 연구에서 사용한 음파의 강도와 주파수, 음파조사시간이 세포의 변형을 가져오지 않는 것으로 보여진다.(Fig. 4)

3.2 71dB, 정현파 50Hz

71dB 강도의 50Hz 정현파 자극은 세포성장에 있어서 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 독

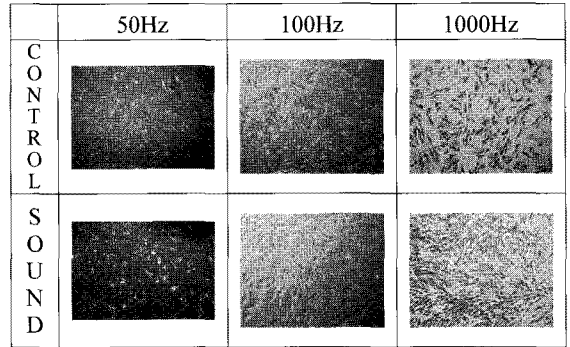


Fig 4 Cell shape of each experiment

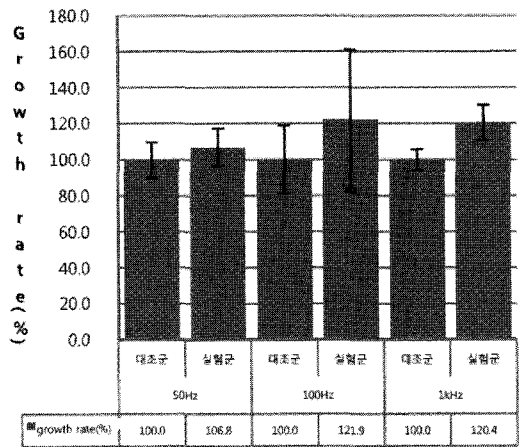


Fig 5 Cell growth rate of each frequency (50Hz n=24, 100 & 1000Hz n=12)

립표본 T 검정 결과 P value 0.028 (n=24)로 비교군과 실험군 사이에 통계적으로 증가(P<0.05)하였으나 그 차이는 10%미만으로 증가를 판단하는 것은 추가 실험을 통하여 확인하여야 할 것으로 사료된다.(Fig. 5)

3.3 71dB, 정현파 100Hz

100Hz 정현파 자극은 50Hz 정현파 자극보다 큰 증가량을 볼 수 있었다. 그러나 독립표본 T 검정 결과를 살펴볼 때 P value 0.097(n=12) 로 음파의 영향에 의한 증가로 판단하기 어렵다고 사료된다.(Fig. 5)

3.4 71dB, 정현파 1000Hz

1000Hz 정현파 자극에서는 확실한 변화를 볼 수 있었다. 실험군에서 대조군 보다 약 20%의 세포 증가를 확인하였고 P value 0.000036(n=12)으로

P value 0.01 이하의 매우 유의한 결과를 볼 수 있었다.(Fig. 5)

4. 결론

저강도 음파조사가 중간엽 줄기세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포에 3 가지 주파수의 음파를 조사하였다. 사전 연구에서는 1000Hz 보다 50Hz 의 음파가 세포의 증식 및 활성화에 긍정적인 영향을 준 것으로 나타났다.¹³ 그러나 본 연구에서는 반대로 1000Hz 에서 증식효과가 나타난 것을 확인할 수 있었다. 이는 출력 강도에 따른 결과로 판단된다. 사전 연구에서 사용한 음파발생장치는 출력을 조절할 수 없었다. 소형 차량용 스피커에 본 실험에 쓰인 함수발생기를 직접 연결하여 10V p-p 의 단일강도의 음파만 조사하였으나, 본 실험에서는 높은 출력을 감당할 수 있는 우퍼스피커와 출력을 조절할 수 있는 앰프를 통하여 출력강도에 따라 세포 증식의 영향을 볼 수 있도록 제작하였다. Xiujuan W 등³ 과 Zhao, H.C 등⁴ 의 연구에 의하면 국화속의 callus 에 500, 1000, 1500, 2000Hz 의 주파수의 정현파를 조사했을 때 1000Hz 의 주파수에서 성장률이 높았으며, 1000Hz 주파수 내에서도 98, 100, 102dB 로 강도에 변화를 주었을 때 특히 100dB 에서 증가하는 것을 보고하였다. 따라서 음파강도에 따라 세포가 증식되는 주파수가 달라진 것으로 사료된다.

추후 에너지 강도와 파형의 변화 음파조사시간 등의 변수를 추가하여 중간엽 줄기세포의 증식에 최적화된 음파에너지에 대한 연구와 음파의 영향이 줄기세포의 분화에 어떠한 영향을 보이는가에 대한 추가연구가 필요할 것으로 사료된다.

후 기

본 연구는 한국연구재단을 통해 교육과학기술부의 미래융합융합기술 파이오니어사업으로부터 지원받아 수행되었습니다.(2009-0082947)

참고문헌

1. Jeon, Y. W. and Cho, A., "Effect of 1/f Fluctuation sound on Comfort Sensibility," Journal of the Ergonomics Society of Korea, Vol. 25, No. 4, pp. 9-22, 2006.

2. Kim, D. W. and Park, S. K., "A Study on the catecholamine change in human urine due to low frequency noise exposure," Proceedings of the Korean Society for Noise and Vibration Engineering Spring Conference, pp. 616-620, 2002.

3. Xiujuan, W., "Effect of sound stimulation on cell cycle of chrysanthemum (Gerbera jamesonii)," Colloids and Surfaces B : Biointerfaces, Vol. 29, No. 2-3, pp. 103-107, 2003.

4. Zhao, H. C., Wu, J., Zheng, L., Zhu, T., Xi, B. S., Wang, B., Cai, S. and Younian, W., "Effect of sound stimulation on Dendranthema morifolium callus growth," Colloids and Surfaces B : Biointerfaces, Vol. 29, No. 2-3, pp. 143-147, 2003.

5. Lee, Y. J. and Song, Y. H., "Effects of Sound Stimulation on Growth Performance, Feeding Behaviour and Egg Production in Egg-type Chickens," Journal of Livestock Housing and Environment, Vol. 6, No. 2, pp. 91-96, 2000.

6. Park, H. S. and Kim, J. S., "The Effects of Low Intensity of Ultrasound on Monosodium Iodoacetate (MIA) Induced Arthritis in Rats," The Korean Journal of Sports Medicine, Vol. 27, No. 1, pp. 27-32, 2009.

7. Lee, E. T., Lim, K. T., Kim, J. H., Im, A. L., Son, H. M., Cho, C. S., Choung P. H. and Chung J. H., "Effects of Low Intensity Ultrasound Stimulation on the Proliferation of Alveolar Bone Marrow Stem Cell," Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Vol. 5, No.4-6, pp. 572-580, 2008.

8. Sung, J. H., Ryu, J. D., Kim, W. Y., Han, C. H., Shin, S. Y., Choi, E. S. and Kim, J. Y., "In Vitro Effects of Therapeutic Low Energy Ultrasound on Cultured Human Articular Chondrocyte," The Journal of the Korean Orthopaedic Association, Vol. 34, No. 3, pp. 617-624, 1999.

9. Vinck, E. M., Cagnie, B. J., Cornelissen, M. J., Declercq, H. A. and Cambier, D. C., "Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation," Lasers Med. Sci., Vol. 18, No. 2, pp. 95-99, 2003.

10. Kristiansen, T. K., Ryaby, J. P., McCabe, J., Frey, J. J. and Roe, L. R., "Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study," J. Bone Joint

- Surg. Am., Vol. 79, No. 7, pp. 961-973, 1997.
11. Duarte, L. R., "The stimulation of bone growth by ultrasound," Arch. Orthop. Trauma. Surg., Vol. 101, No. 3, pp. 153-159, 1983.
 12. Kubarev, S., Shigaev, A., Ponomarev, V., Ponomarev, O. and Susak, I., "Simulation of sound vibrations effect on radical pair recombination probability," Chemical Physics Letters, Vol. 423, No. 4-6, pp. 401-406, 2006.
 13. Kim, S. M., Kang, S. H., Jeong, J. H., Seo, Y. G. and Kim, S. C., "The Study of Low Intensity Sound Wave Affect to Human Physiological Function Activation," Proceedings of the Korean Society for Precision Engineering Spring Conference, pp. 1399-1400, 2010.