

관절연골세포에서 인테그린과 SMAD 신호경로 사이의 신호교차반응 규명

연세대학교 의과대학 정형외과학교실*, 연세대학교 BK-21 의과학사업단†

한수봉* · 박민성*† · 김윤희*† · 이진우*†

= Abstract =

Cross-talk between Integrin and SMAD Signal Pathway in Articular Chondrocyte

Soo Bong Hahn, M.D.*, Min Sung Park, M.S.*†, Yun Hee Kim, Ph.D.*†,
Jin Woo Lee, M.D., Ph.D.*†

Department of Orthopaedic Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, South Korea*
Brain Korea 21 Project for Medical Science, Yonsei University, Seoul, South Korea†

Purpose: Identifying the signal cross-talk between integrin signaling cascade and TGF- β 1 signaling cascade in articular chondrocytes.

Materials and Methods: To analyze integrin or TGF- β 1 mediated signaling pathways from extracellular stimuli, type II collagen was coated on the cell culture plate and TGF- β 1 was added to cell culture media. Chondrocytes were cultured in the conditioned media with each or both stimuli. Altered activation of signaling proteins detected with western blot technique.

Results: More rapid attachment of cells was observed in the type II collagen coated group than non-coated group. The phosphorylated SMAD 2 and 3 were expressed in the type II collagen coated group and synergistically up-regulated phosphorylation in the co-treated group. The phosphorylated FAK at tyrosine 925 was activated by TGF- β 1 treatment and synergistically up-regulated by both stimuli. But there was no meaningfully changed phosphorylation of extracellular signal regulated protein kinase (ERK) 1/2 and p38, as known downstream molecules of FAK cascade.

Conclusion: This result means that SMAD 2, SMAD 3 and tyrosine 925 of FAK are involved in this signal cross-talking in articular chondrocytes.

Key Words: Articular chondrocyte, Signal cross-talk, Type II collagen, TGF- β 1, FAK, SMAD 2/3

※ 통신저자: 이진우

서울특별시 서대문구 신촌동 134번지

연세대학교 의과대학 정형외과학교실

TEL: 02) 2228-2190 FAX: 02) 363-1139 E-mail: ljwos@yuhs.ac

* 본 연구는 연세대학교 의과대학 2004년도 교수연구비(과제번호: 6-2004-1097)에 의해 수행되었음.

서 론

제 2형 교원질은 관절연골의 가장 큰 비중을 차지하는 기질성분이다. 연골세포들은 연골의 분자적 성질과 물리적 특징들을 결정하는 세포의 기질을 끊임없이 생산하고 재구성하며, 세포와 교원질의 상호작용은 세포대사에 크게 영향을 준다^{8,18)}. 제 2형 교원질과 관절연골세포의 결합에 인테그린(integrin) $\beta 1$ 이 관여하며, 이는 제 2형 교원질과의 상호작용을 통해 관절연골세포의 증식, 분화와 생존 등에 관련된 세포외부 신호를 전달해 주는 역할을 한다^{1,11,13)}. 또한 tyrosine kinase의 일종인 focal adhesion kinase (FAK) 등과 같은 세포막 부위의 focal adhesion complex를 이루는 단백질은 인테그린으로부터 받는 세포증식, 분화, 생존을 조절하는 세포외부 신호를 전달한다^{5,7)}. 연골세포의 인테그린 $\beta 1$ 이 골아세포의 특이적 표현형인 제 1형 교원질과 결합하면 인테그린 $\beta 1$ 하위 tyrosine kinase를 활성화되고 관절연골의 기질분해효소인 matrix metalloproteinase-13 (MMP-13)의 발현이 증가되며²¹⁾, 또한 관절연골세포의 인테그린 $\alpha 2\beta 1$ 이 제 1형 교원질이 아닌 제 2형 교원질에 결합했을 때, 세포증식이 촉진되고 관절연골의 주요 기질성분인 제 2형 교원질과 단백다당의 합성이 증가한다^{11,18)}. 따라서 정상적인 관절연골세포와 관절연골의 유지 또는 재생을 위해 제 2형 교원질과 연골세포의 상호작용이 매우 중요하다는 것을 알 수 있다.

TGF- $\beta 1$ 은 관절연골세포의 기질형성을 촉진하는 대표적인 성장인자로 알려져 있다^{16,17,18)}. 세포외부에 존재하는 TGF- $\beta 1$ 은 TGF- β 수용체에 결합하여 SMAD 2와 3를 인산화함으로써 다양한 세포기능을 조절한다²⁸⁾. TGF- $\beta 1$ 은 관절연골세포의 성장과 분화를 조절하며, 세포의 기질생성을 촉진한다고 알려져 있다^{17,18,30)}.

수년전까지 다양한 신호전달경로는 수용체를 활성화시키는 분자에 의해 유전자의 전사를 조절하는 일차원적인 경로로써 생각되어 왔으나, 현재 다양한 신호경로 사이에서 복잡한 상호작용을 통해 신호교차반응(signal cross-talk)이 일어남이 알려졌다⁴⁾. 예를 들면, 제 2형 교원질에 부착된 연골세포의 인테그린 $\beta 1$ 신호전달경로와 insulin-

like growth factor-I (IGF-I) 사이에서 신호교차반응이 일어나며, 연골세포의 분화를 조절한다고 보고된 바 있다²⁶⁾. 연골세포의 증식 및 분화를 조절하는 대표적인 성장인자인 TGF- $\beta 1$ 과 다른 성장인자의 신호교차반응도 알려졌다. 연골세포에서 TGF- $\beta 1$ 이 transforming growth factor-beta-activated kinase-1 (TAK-1)를 통해 mitogen activated protein kinase (MAPK)를 활성화하여 제 2형 교원질의 합성이 증가된다는 보고와¹⁹⁾, TGF- $\beta 1$ 과 IGF binding protein-3 사이의 신호교차반응이 일어나며¹⁵⁾, SMAD 2 및 3와 MAPK 사이의 전사인자 수준에서 신호교차반응이 일어나며 aggrecan의 발현이 증가된다고 알려졌다³²⁾. 최근에는 TGF- $\beta 1$ 과 제 2형 교원질의 신호전달경로간의 교차반응이 일어나며, 이로 인한 제 2형 교원질의 발현에 대해 시너지 효과가 확인되었으나²⁴⁾, 이에 대한 자세한 신호교차반응기전은 알려지지 않았다.

따라서 본 연구는 관절연골세포에서 제 2형 교원질에 의해 활성화된 인테그린 $\beta 1$ 경로가 TGF- $\beta 1$ 경로를 활성화한다는 가설하에, 두 신호경로의 활성을 분석함으로써, 제 2형 교원질 매개 인테그린 $\beta 1$ 과 TGF- $\beta 1$ 신호경로의 교차반응기전에 관여하는 신호전달인자를 밝히고자 하였다.

대상 및 방법

1. 관절연골세포의 분리

돼지의 슬관절로부터 연골을 채취한 후, 1% antibiotic-antimycotic 용액이 첨가된 4℃의 Dulbecco's modified eagle's medium-high glucose (DMEM-HG, GIBCO-BRL, Grand Island, NY, U.S.A.)로 세척하고 연골조직을 효소용액(DMEM-HG 9.3 ml/연골 1 g, collagenase II 10 mg/연골 1 g, hyaluronidase 6 mg/연골 1 g, 102 mM CaCl₂ 0.098 ml/연골 1 g)에 넣고 12시간 동안 녹였다. 연골조직이 녹아있는 용액을 원심분리하고 10% DMEM-HG로 세척한 후, 기본 배양액(10% 우태아 혈청과 1% antibiotic-antimycotic 용액이 첨가된 DMEM-HG)에서 7일간 배양하였다.

2. 세포의 배양

분리된 관절연골세포는 기본 배양액(10% 우태아 혈청과 1% antibiotic-antimycotic 용액이 첨가된 DMEM-HG)을 첨가하여 7일간 배양하였다. 각 세포는 실험 전 12시간 동안 serum starvation을 실시한 후, 실험에 사용하였고, 0.5% 우태아 혈청과 1X insulin-transferrin-selenium (ITS, GIBCO-BRL), 1% antibiotic-antimycotic 용액이 첨가된 DMEM-HG에 배양하며 실험을 수행하였다.

3. 제 2형 교원질의 코팅

세포배양용기에 PBS (GIBCO-BRL)에 1 µg/ml의 농도로 희석한 제 2형 교원질 용액(Chondrex, Redmond, WA, U.S.A.)을 넣고 4°C에서 3일간 코팅하고 제 2형 교원질 용액을 제거하고 차가운 PBS로 한번 세척한 후 30분간 건조하여 실험에 사용하였다.

4. 실험군의 분류

실험조건에 따라 연골세포를 세포배양용기에서 배양한 군(Group A), 제 2형 교원질(1 µg/ml)이 코팅된 세포배양용기에서 배양한 군(Group B), 세포배양용기의 배양액에 TGF-β1 (10 ng/ml, R&D Systems, Inc., Minneapolis, U.S.A.)처럼 처리한 군(Group C), 제 2형 교원질(1 µg/ml)이 코팅된 세포배양용기에 TGF-β1 (10 ng/ml)을 처리하여 배양한 군(Group D)으로 분류하였다.

5. 단백질 추출

세포배양용기에 부착된 세포를 PBS로 2회 세척하고 passive lysis buffer (Promega, Madison, WI, U.S.A.), 500X protease inhibitor (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.), 100X phosphatase inhibitor I와 II (Sigma)를 세포배양용기에 첨가하여 cell scraper를 이용하여 세포를 모은 후 단백질을 추출하였다. 단백질 추출액을 원심분리한 후, 상층

액만 취해서 -70°C에 보관하였다. 추출된 단백질의 정량은 Bradford 방법에 따라 실시하였다.

6. Western Blot 분석

세포추출액은 SDS-PAGE를 이용하여 단백질을 분리한 후, western blotter (Bio-RAD)를 이용하여 PVDF membrane (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, U.S.A.)으로 옮겼다. Membrane을 5%의 무지방 우유가 함유된 1X TBST (100 mM Tris (pH7.5), 1.5 M NaCl, 0.5% tween-20) 용액으로 blocking하고, 1X TBST로 세척한 후, 일차 항체를 1% 무지방 우유를 포함한 용액에서 부착시켰다. 일차 항체반응 후, membrane을 1X TBST를 이용하여 세척하고, 이차 항체를 반응시킨 후, 1X TBST를 이용하여 세척하고 ECL western blotting detection kit (Amersham Pharmacia)을 사용하여 발광을 유도한 후, ECL hyper film (Amersham Pharmacia)을 사용하여 현상하였다. Western blot에 사용된 일차 항체는 phospho-SMAD 2, SMAD 2, phospho-SMAD 3, SMAD 3, phospho-FAK_{Y397}, phospho-FAK_{Y925}, FAK, phospho-ERK1/2, ERK1/2, phospho-p38, p38, GAPDH (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, U.S.A.)이며, Western blot analysis를 통해 얻은 결과는 TINA pixel analyzer version 2.10 (Raytest Isotopenme gerate GmbH, Straubenhardt, Germany)을 이용하여 정량화하였고, 각 단백질의 발현 정도는 GAPDH로 표준화하였다.

결 과

1. 제 2형 교원질에 부착된 연골세포형태 관찰

세포부착 1시간째 세포형태를 현미경상으로 관찰한 결과, 제 2형 교원질에서 배양된 군(Group B, D)이 코팅되지 않은 군(Group A, C)에 비해 빠른 세포부착과 넓게 퍼진 세포형태를 관찰하였으며, 이러한 연골세포부착은 성장인자보다 세포외 기질 즉, 제 2형 교원질에 의해 영향을 받는

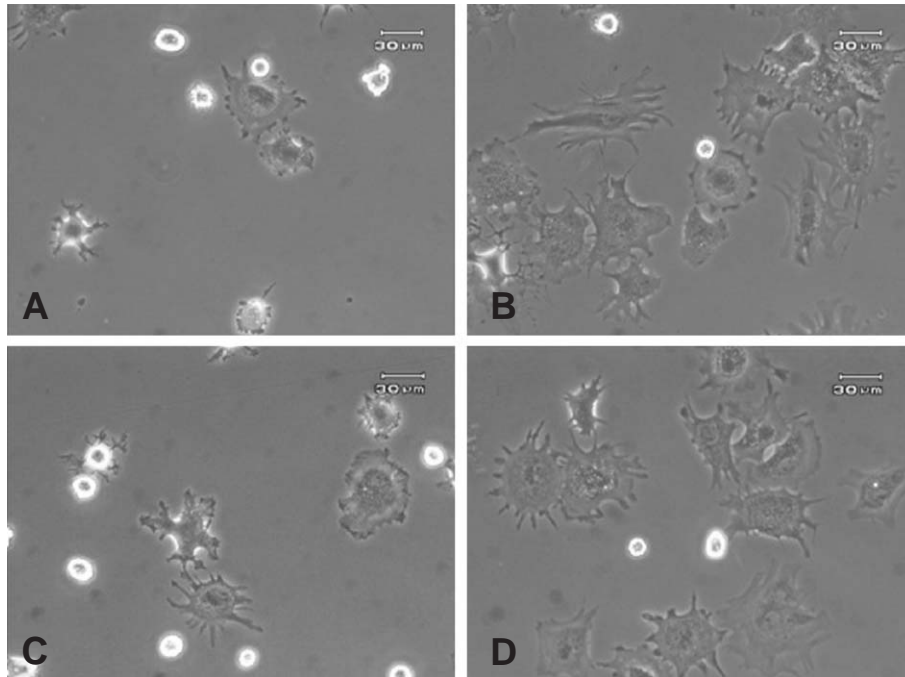


Fig. 1. Microscopic morphological features of attached articular chondrocytes. Articular chondrocytes were seeded on type II collagen (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) coated or non-coated plates after serum starvation for 12 hours and 1 hour later, we observed with an optical microscopy ($\times 200$). (A) Non-treated group, (B) Type II collagen coated group, (C) TGF- $\beta 1$ treated group, (D) Type II collagen and TGF- $\beta 1$ co-treated group.

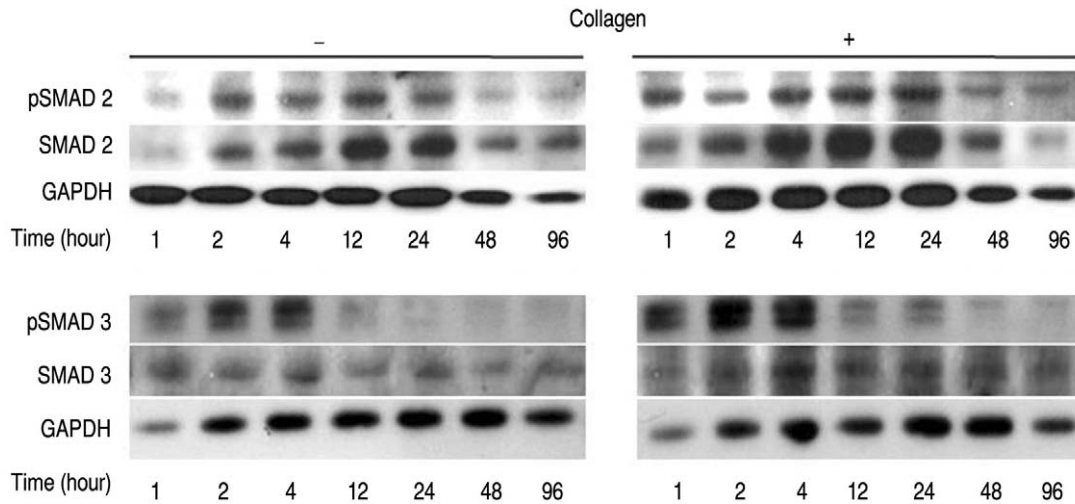


Fig. 2. SMAD 2 and SMAD 3 phosphorylation by the type II collagen. The whole cell lysates were obtained at 1, 2, 4, 12, 24, 48, 96 hours after stimulation and detected by western blot. SMAD 2 and 3 were phosphorylated by type II collagen (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Right) more quickly and stronger than non-coated group (Left) were detected with western blot analysis.

것으로 확인되었다(Fig. 1).

2. 제 2형 교원질에 의한 SMAD 2 및 SMAD 3의 인산화 분석

SMAD 2의 인산화가 부착 후 24시간까지 꾸준히 증가하였으나, 48시간 이후에 감소되었다. 특히, 대조군에 비해 제 2형 교원질에서 배양된 세포에서 세포부착 후 1시간부터 빠르게 증가하였다. SMAD 3의 인산화는 제 2군에서 1시간부터 4시간까지 확연히 증가하였으며, 12시간 이후 급격하게 감소하였다. 따라서 세포부착 초기에 있어서 SMAD 2와 SMAD 3이 서로 다르게 관여하는 것으로 보이며, 또한 제 2형 교원질에 의해 TGF- β 1 신호전달물질인 SMAD 2 및 SMAD 3이 활성화됨을 확인하였다(Fig. 2).

3. 제 2형 교원질 및 TGF- β 1에 의한 SMAD 2 및 SMAD 3의 인산화 분석

TGF- β 1 또는 제 2형 교원질의 각 자극에 의해 SMAD 2의 활성이 시간이 지남에 따라 감소하였으나, 두 자극을 함께 가한 군(Group D)에서 48시간부터 96시간까지 지속되는 것으로 나타났다(Fig. 3A). SMAD 2와 유사하게, Group B와 Group C에서 SMAD 3의 활성이 시간이 지남에 따라 감소하였으나, Group D에서 48시간부터 96시간까지 지속되는 활성을 확인하였다(Fig. 3B). 따라서 제 2형 교원질과 TGF- β 1을 동시에 처리하였을 경우, 일어나는 신호교차반응에 SMAD 2와 SMAD 3이 관여하는 것으로 보인다.

4. FAK의 인산화 분석

인테그린의 하위 신호전달단백인 FAK의

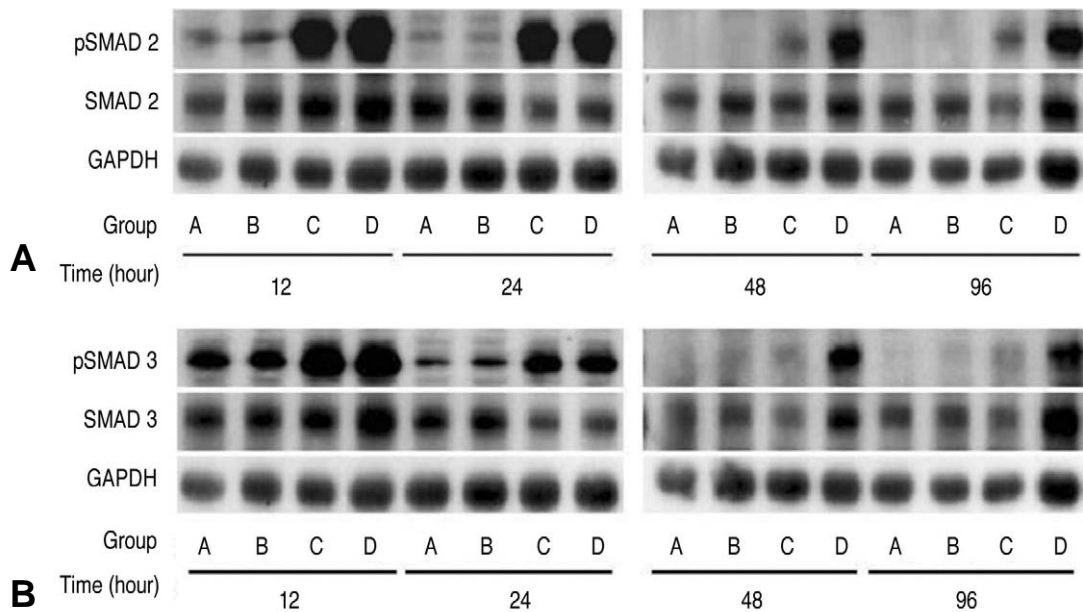


Fig. 3. Synergic effect on phosphorylation of SMAD 2 and 3 by combination of type II collagen and TGF- β 1. After stimulation, unattached cells were washed out with PBS and attached cells were lysed directly with lysis buffer at 12, 24, 48, 96 hours. Phospho-SMAD 2 (A) and phospho-SMAD 3 (B) were detected using western blotting. Phosphorylation of these two molecules in type II collagen (Group B) or TGF- β 1 (Group C) stimulated group was time dependently decreased after 24 hours. Until 96 hours, however, phosphorylation of those was maintained by co-stimulation (Group D). This means that there was synergic effect by signal cross-talk between integrin and TGF- β 1 pathways.

tyrosine 397번(FAK_{Y397}) 잔기의 인산화를 분석한 결과, 모든 군에서 시간이 지남에 따라 FAK_{Y397}의 인산화가 증가하였으나, 두 자극을 모두 가했을 때에 인산화 양상에 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 4A). 그러나, FAK의 인산화

부위인 tyrosine 925번(FAK_{Y925})을 확인한 결과, 대조군에 비해 제 2형 교원질과 TGF- β 1을 가한 군 그리고 두 자극을 함께 가한 군에서 FAK_{Y925}의 활성이 증가되었으며, 또한 두 자극을 함께 가했을 때 활성이 96시간까지 지속되는 것

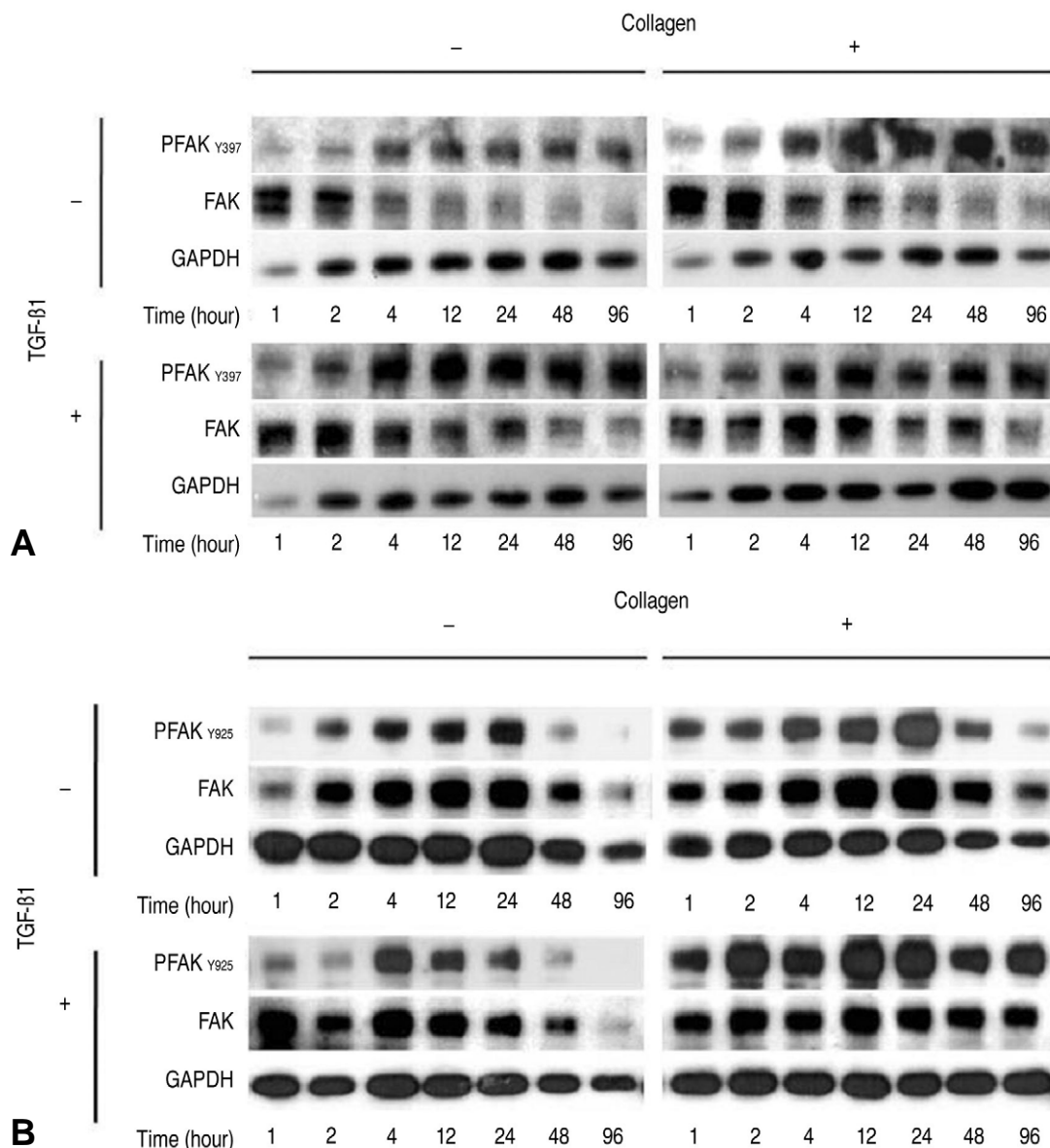


Fig. 4. Synergistically activated tyrosine 925 residue of FAK. Chondrocytes were seeded in coated or non-coated plates containing TGF- β 1 or not. Whole cell lysates were obtained at 1, 2, 4, 12, 24, 48, 96 hours after stimulation and western blotting was performed with phosphorylation site (tyrosine 397 (A) or 925 residue (B)) specific antibodies of FAK. There was synergic effect on phospho-FAK at tyrosine 925 residue.

을 확인하였다(Fig. 4B). 따라서 TGF- β 1과 제 2형 교원질에 의해 FAK의 tyrosine 397번이 아닌 tyrosine 925번 인산화에 시너지 효과를 보였으며, 이것이 SMAD 2와 3에서 보인 시너지 효과와 관련이 있을 것으로 추측된다.

5. MAPK의 인산화 분석

위에서 보인 시너지 효과가 FAK의 하위 경로인 MAPK에서도 일어나는지 살펴보았다. ERK1/2의 인산화를 확인한 결과, 모든 군에서 인산화 양상의 유의한 차이를 볼 수 없었으며 두

자극을 함께 가한 군에서 또한 증가되지 않았다(Fig. 5A). p38의 인산화를 확인한 결과, 각 군의 차이가 없었으며, 두 자극을 동시에 처리한 군에서도 유의한 변화양상을 확인할 수 없었다(Fig. 5B). 따라서 제 2형 교원질 및 TGF- β 1의 신호교차반응은 위의 MAPK보다 상위단계에서 일어날 것으로 사료된다.

고찰

관절연골은 한번 손상되면 재생되지 않는 단점이 있다¹⁷⁾. 통증, 활동의 제약, 체형변형 등을 유

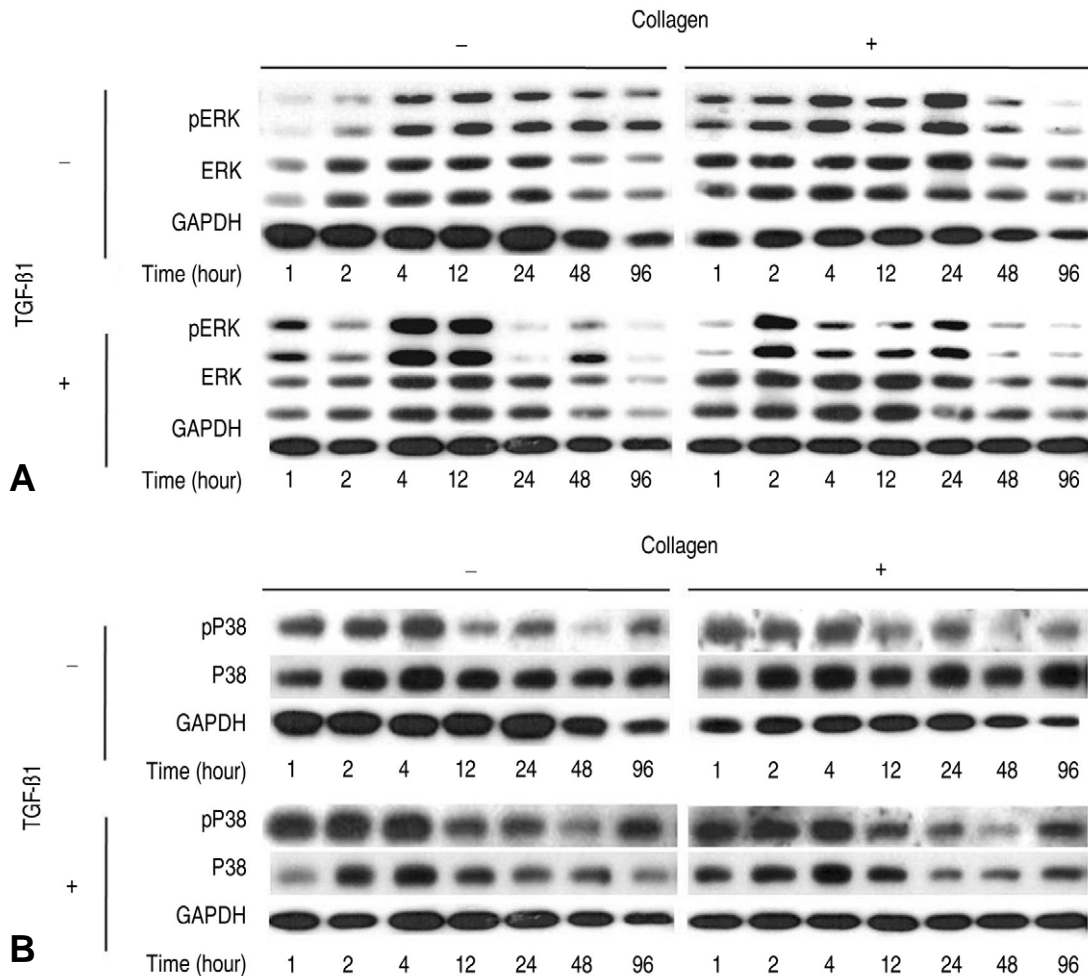


Fig. 5. Phosphorylation of ERK and p38. Cells were seeded in type II collagen coated or non-coated plates containing TGF- β 1 or not. Whole cell lysates were obtained at 1, 2, 4, 12, 24, 48, 96 hours after stimulation and western blot analysis was performed with phospho-specific ERK1/2 (A) and p38 (B) MAPKs.

발하는 가장 흔한 관절질환인 골관절염이 발생된 연골은 연골기능이 크게 손상된 상태로, 연골기질의 변성이 일어나고, matrix metalloproteinases (MMPs)가 분비되어 단백다당을 분해시키고 균열(fibrillation)이 발생하며, 결국에는 연골조직이 파괴된다^{2,3)}. 세포의 생물학적 기능은 세포내에서 발견되는 유전자의 발현을 조절하는 다양한 세포신호들의 복잡한 전달과정이 관여함으로써 조절된다⁴⁾. 따라서 정상연골의 기능을 유지하고 회복하기 위해서는 연골세포내 신호전달과정의 이해가 필수적이다. 세포부착단백의 일종인 인테그린은 세포외부로부터 연골세포내부로 성장, 생존, 분화, 이동 등의 관련된 신호를 전달하는 매개체의 역할을 한다^{1,6,9,22)}.

현재 TGF- β 1에 의한 연골세포의 제 2형 교원질의 발현이 증가한다는 보고와^{16,17,19,30)}, 발현된 제 2형 교원질 및 그 외의 기질성분들이 연골유지에 주요 역할을 한다고 알려져 있다^{5,8,11,18)}. 또한 연골세포에서 두 종류의 성장인자가 신호교차반응을 통해 연골세포의 대사를 촉진한다고 한다^{26,32)}.

따라서 본 연구는 관절에서 분리한 연골세포에 연골의 주요 구성성분인 제 2형 교원질과 대표적인 연골성장인자인 TGF- β 1의 자극을 가하였을 때 또는 두 가지 자극을 동시에 가했을 때 변화하는 세포내 신호전달단백의 활성을 살펴보았다.

TGF- β 1의 신호전달단백인 SMAD 2와 SMAD 3이 제 2형 교원질 자극이 가해진 군에서 빠르게 활성화되었음이 확인되었다. 즉, 제 2형 교원질로 인해 활성화된 인테그린 신호전달경로가 SMAD 2와 SMAD 3의 신호전달경로와 상호작용을 한다는 것을 의미한다. SMAD 2와 SMAD 3이 제 2형 교원질과 TGF- β 1에 의해 활성화되었으나 자극을 가한 후 48시간이 지나자 활성이 감소되었다. 하지만 두 가지 자극이 함께 가해졌을 때에 활성이 96시간까지 지속되었고, 약 4배 증가된 것으로 보아, 두 자극의 교차반응에 의한 시너지 효과가 있는 것을 확인하였다. 이 결과는 제 2형 교원질로부터 매개된 인테그린 하위 신호전달계와 TGF- β 1 하위 SMAD 2와 SMAD 3의 신호전달경로에서 신호교차반응이 일어난다는 것을 보여준다.

인테그린 β 1의 세포내 부위에 부착하는 FAK는

인테그린의 신호전달과정의 중심적인 역할을 한다. 하지만 현재까지 연골세포 특성의 유지에 크게 영향을 주는 것으로 알려져 있는 TGF- β 1과 관련하여 인테그린과 FAK에 의해 전개되는 세포내 신호전달과정의 자세한 기전에 대해서 밝힌 연구는 매우 미흡한 상태이다^{7,12)}. 본 연구 결과에서, FAK의 tyrosine 397번째 잔기의 인산화는 시간이 지남에 따라 증가되는 것으로 나타났으나, 모든 군에서 차이가 없었으며, 시너지 효과 또한 확인할 수 없었다. 한편, FAK의 tyrosine 925번째 아미노산 잔기의 인산화가 제 2형 교원질에 의해서 빠르게 증가되었으며, TGF- β 1에 의해서도 활성을 보였다. 특히 두 자극을 함께 가한 군에서 빠르게 활성화되어 96시간까지 강한 활성이 지속되는 것으로 확인되었다. 따라서 TGF- β 1과 인테그린 β 1 신호교차반응에 FAK의 tyrosine 925번 부위가 관여할 것으로 사료된다. 관절연골세포에서 TGF- β 1과 제 2형 교원질의 공동작용에 의해 DNA의 합성과 aggrecan의 mRNA 발현 증가에 시너지 효과가 있다는 보고가 있다^{16,17)}. 따라서 본 연구에서 보인 TGF- β 1과 제 2형 교원질에 의한 FAK의 tyrosine 925 잔기 및 SMAD 2와 3의 활성에 대한 시너지 효과가 위의 보고와 관련하여 연골세포의 특성을 유지하고, 연골기질의 합성에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다.

세포와 교원질의 상호작용에 의해 인테그린으로 전달된 세포외부 자극은 인테그린 β 1의 cytoplasmic domain에 결합된 FAK와 Src, paxillin, talin, p130^{CAS}, cavaolin 등의 보조인자들을 통해 세포내로 신호전달이 이루어지고 증식, 분화, 생존 등과 관련된 세포대사가 조절된다. FAK tyrosine 397의 활성화는 FAK와 Src의 상호작용에 의해 tyrosine 576, tyrosine 577, tyrosine 861 그리고 tyrosine 925번째 잔기 등의 인산화로 이어진다. 특히 FAK의 tyrosine 925 잔기의 인산화가 일어나게 되면 FAK로 전달된 신호는 MAP kinase의 활성화에 영향을 준다고도 알려져 있다^{7,12,14,25)}. MAP kinase의 활성화기전은 Src, p130^{CAS}, Crk 등이 관여하는 FAK에 의존적인 신호경로와 Shc, Fyn, caveolin-1 등이 관여하는 FAK에 비의존적인 신호경로의 두 가지 경로를 통해 MAPK가 활성화되는 두 가지 경로

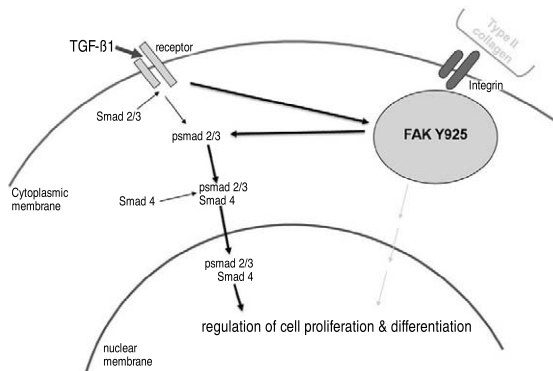


Fig. 6. A diagram of signal cross-talk between integrin and TGF- β 1 cascades. We suggested in this study that there was the signal cross-talk between type II collagen triggered integrin signal cascade and TGF- β 1 signal pathway. Also, the tyrosine 925 residue and SMAD 2 and SMAD 3 were related on this signal cross-talk.

로 나눌 수 있다^{10,23,31}). 최근 연구에 따르면, IGF와 fibroblast growth factor (FGF) 등의 성장인자들에 의해 MAP kinase가 활성화되고 연골세포의 대사가 조절된다고 한다^{20,27}). 한편, Starkman 등²⁹)은 연골세포에서 IGF에 의한 단백질 합성이 MAPK 활성화에 비 의존적으로 증가된다고 보고하였다. 본 연구에서는 MAPK의 일종인 p38과 ERK 1/2가 TGF- β 1 또는 제 2형 교원질에 의해 유의하게 활성이 증가되거나 두 자극에 의한 시너지 효과를 보이지 않았다. MAPK의 활성화에는 수많은 신호전달인자들이 관여하며, 세포증식, 분화 및 생존 등을 조절하는 신호전달 경로 또한 매우 복잡하게 구성되어 있다. 따라서 FAK의 하위 경로로써 p38과 ERK 1/2에 비 의존적인 경로가 관여할 것으로 추측된다.

본 연구에서 TGF- β 1에 의한 신호와 제 2형 교원질 자극에 의한 인테그린 신호가 FAK의 tyrosine 925와 SMAD 2 및 SMAD 3의 활성화에 대해 시너지 효과를 보였으며, 이 단백질들이 TGF- β 1과 제 2형 교원질의 신호교차반응에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다(Fig. 6).

결 론

연골세포의 대사에 중요한 역할을 하는 TGF- β

1과 제 2형 교원질의 신호경로간에 일어나는 신호교차반응에 SMAD 2와 SMAD 3, 그리고 FAK tyrosine 925가 중요한 역할을 하며, 이 신호교차반응이 연골기질생성에 영향을 줄 것으로 보인다. 따라서 본 연구가 관절연골세포의 대사조절기전을 이해하는 데에 도움이 될 것으로 기대되며, 또한 외상 또는 관절염이 유발된 연골조직의 회복에 적용되어질 수 있는 기본적인 이론 및 기전에 관한 이해뿐만 아니라, 손상된 관절의 치료 및 재생, 조직공학 등에 관한 임상적 응용에 필요한 이론적인 이해에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1) **Albelda SM and Buck CA:** Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J*, 4: 2868-2880, 1990.
- 2) **Buckwalter JA:** Articular cartilage injuries. *Clin Orthop Relat Res*, 402: 21-37, 2002.
- 3) **Burrage PS, Mix KS and Brinckerhoff CE:** Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci*, 11: 529-543, 2006.
- 4) **Dumont JE, Pecasse F and Maenhaut C:** Crosstalk and specificity in signalling. Are we crosstalking our selves into general confusion? *Cell Signal*, 13: 457-463, 2001.
- 5) **Geiger B, Bershadsky A, Pankov R and Yamada KM:** Transmembrane crosstalk between the extra cellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 793-805, 2001.
- 6) **Giancotti FG and Ruoslahti E:** Integrin signaling. *Science*, 13, 285: 1028-1032, 1999.
- 7) **Guan JL:** Focal adhesion kinase in integrin signaling. *Matrix Biol*, 16: 195-200, 1997.
- 8) **Hynes RO:** Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*, 110: 673-687, 2002.
- 9) **Hynes RO:** Related Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69: 11-25, 1992.
- 10) **Lee JW and Juliano R:** Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-

- mediated pathways. *Mol Cells*, 17: 188-202, 2004.
- 11) **Lee JW, Qi WN and Scully SP:** The involvement of beta1 integrin in the modulation by collagen of chondrocyte-response to transforming growth factor-beta1. *J Orthop Res*, 20: 66-75, 2002.
 - 12) **Li W, Duzgun A, Sumpio BE and Basson MD:** Integrin and FAK-mediated MAPK activation is required for cyclic strain mitogenic effects in Caco-2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 280: G75-87, 2001.
 - 13) **Loeser RF:** Integrins and cell signaling in chondrocytes. *Biorheology*, 39: 119-124, 2002.
 - 14) **Mitra SK, Mikolon D, Molina JE, et al.:** Intrinsic FAK activity and Y925 phosphorylation facilitate an angiogenic switch in tumors. *Oncogene*, 28, 25: 5969-5984, 2006.
 - 15) **O'Rear L, Longobardi L, Torello M, et al.:** Signaling cross-talk between IGF-binding protein-3 and transforming growth factor- β in mesenchymal chondroprogenitor cell growth. *J Mol Endocrinol*, 34(3): 723-737, 2005.
 - 16) **Qi WN and Scully SP:** Effect of type II collagen in chondrocyte response to TGF-beta 1 regulation. *Exp Cell Res*, 25, 241: 142-150, 1998.
 - 17) **Qi WN and Scully SP:** Extracellular collagen modulates the regulation of chondrocytes by transforming growth factor-beta 1. *J Orthop Res*, 15: 483-490, 1997.
 - 18) **Qi WN and Scully SP:** Type II collagen modulates the composition of extracellular matrix synthesized by articular chondrocytes. *J Orthop Res*, 21: 282-289, 2003.
 - 19) **Qiao B, Padilla SR and Benya PD:** Transforming growth factor (TGF)-beta-activated kinase 1 mimics and mediates TGF-beta-induced stimulation of type II collagen synthesis in chondrocytes independent of Col2a1 transcription and Smad3 signaling. *J Biol Chem*, 280: 17562-17571, 2005.
 - 20) **Rauci A, Laplantine E, Mansukhani A and Basilico C:** Activation of the ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates fibroblast growth factor-induced growth arrest of chondrocytes. *J Biol Chem*, 279: 1747-1756, 2004.
 - 21) **Ronzière MC, Aubert-Foucher E, Gouttenoire J, et al.:** Integrin alpha1beta1 mediates collagen induction of MMP-13 expression in MC615 chondrocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1746: 55-64, 2005.
 - 22) **Salter DM, Hughes DE, Simpson R and Gardner DL:** Integrin expression by human articular chondrocytes. *Br J Rheumatol*, 31: 231-234, 1992.
 - 23) **Schlaepfer DD, Jones KC and Hunter T:** Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events. *Mol Cell Biol*, 18: 2571-2585, 1998.
 - 24) **Schneiderbauer MM, Dutton CM and Scully SP:** Signaling "cross-talk" between TGF- β 1 and ECM signals in chondrocytic cells. *Cell Signal*, 16: 1133-1140, 2004.
 - 25) **Schoenwaelder SM and Burridge K:** Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol*, 11: 274-286, 1999.
 - 26) **Shakibaei M, John T, De Souza P, Rahmanzadeh R and Merker HJ:** Signal transduction by beta1 integrin receptors in human chondrocytes in vitro: collaboration with the insulin-like growth factor-I receptor. *Biochem J*, 342: 615-623, 1999.
 - 27) **Shakibaei M, Seifarth C, John T, Rahmanzadeh M and Mobasheri A:** Igf-I extends the chondrogenic potential of human articular chondrocytes in vitro: Molecular association between Sox9 and Erk1/2. *Biochem Pharmacol*, 72: 1382-1395, 2006.
 - 28) **Shi Y and Massague J:** Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113: 685-700, 2003.

- 29) **Starkman BG, Cravero JD, Delcarlo M and Loeser RF:** IGF-I stimulation of proteoglycan synthesis by chondrocytes requires activation of the PI 3-kinase pathway but not ERK MAPK. *Biochem J*, 389: 723-729, 2005.
- 30) **Verrecchia F and Mauviel A:** Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J Invest Dermatol*, 118: 211-215, 2002.
- 31) **Wary KK, Mariotti A, Zurzolo C and Giancotti FG:** A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell*, 94: 625-634, 1998.
- 32) **Watanabe H, de Caestecker MP and Yamada Y:** Transcriptional cross-talk between Smad, ERK1/2, and p38 mitogen-activated protein kinase pathways regulates transforming growth factor-beta-induced aggrecan gene expression in chondrogenic ATDC5 cells. *J Biol Chem*, 276: 14466-14473, 2001.