대한정형외과연구학회지 제 7 권 제 2 호
J. of Korean Orthopaedic Research Society
Volume 7, Number 2, October, 2004

대퇴골두 무혈성괴사 동물모델에서 혈관내피성장인자의 발현

연세대학교 의과대학 정형외과학교실

양익환 · 김성훈 · 공선영 · 주선영 · 양규현 · 한수봉 · 박희완 · 김현우

= Abstract =

Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in an Animal Model of Avascular Necrosis of the Femoral Head

Ick Hwan Yang, Sung Hun Kim, Sun Young Kong, Sun Young Joo, Kyu Hyun Yang, Soo Bong Hahn, Hui Wan Park, Hyun Woo Kim

Department of Orthopedic Surgery, Severance Hospital Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: To evaluate the pathologic changes, apoptosis of chondrocytes, and expression pattern of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the growth plate of Spontaneouly Hypertensive Rats (SHR).

Materials and Methods: Sixty SHRs and thirty Wister Kyoto rats(control, WKYs) were sacrificed at the age of 6, 9, 12, 15 and 18 weeks. SHRs were divided into the groups of [SHR-n] and [SHR+n] according to the evidence of ischemic necrosis of the femoral head. TUNEL assay was done for the investigation of apoptotic changes in the growth plate. VEGF immunohistochemistry was performed to identify the expression of VEGF in the growth plate, epiphysis, and articular cartilage.

Results: Apoptosis of growth plate in the groups of SHR was more evident than that of WKY group. VEGF expression in the articular cartilage, epiphysis and growth plate was decreased in the course of normal ossification. VEGF expression in the epiphysis and growth plate was decreased in the groups of SHR, especially in the group of [SHR+n]. Normal expression was found in the articular cartilage of all three groups.

Conclusion: VEGF was expressed in the growth-dependent manner, and is an essential factor for the longitudinal growth of growth plate and normal ossification.

Key Words: VEGF, Apoptosis, Growth plate, Spontaneously Hypertensive Rats

※ **통신저자: 김 현 우**
서울특별시 서대문구 신촌동 134
연세대학교 의과대학 세브란스병원 정형외과학교실
TEL: 02) 361-5640 FAX: 02) 361-1139 E-mail: pedhkim@yumc.yonsei.ac.kr

* 본 연구는 2003년도 연세학술연구비로 이루어졌음.

서 론

Legg-Calve-Perthes씨 병은 소아 대퇴골두의 골화중심(ossification center)에 무혈성괴사가 발생하는 질환이다[2-4,26,28,30]. 성인의 대퇴골두에서 발생하는 무혈성괴사와는 달리 괴사 이후 혈관 유입이 이루어지면서 골두의 재생 과정을 거치게 되는데 이 과정 중 관절내 유치(containment)가 적절치 않은 경우 아탈구된 상태로 유지되어 결국 골두의 변형이 오게 된다. 또한, 비록 치료가 적절하였다 하더라도 장기추시 혹은 성장이 완료된 후 대퇴경부의 길이가 짧아지고 대전자부(greater trochanter)의 상대적인 과성장에 의한 파행이 유발되는 경우가 약 40%의 환아에서 발생한다[18,20,30]. 이는 Legg-Calve-Perthes씨 병의 경우 성장장애가 대퇴 골두의 골화중심 뿐만 아니라 골성장판에서도 일어난다는 사실을 의미한다.

Legg-Calve- Perthes씨 병에서 나타나는 무혈성괴사는 괴사 후 골두의 재생이 이루어지는 가역적인 질환이며 성인에서 보이는 비가역적인 괴사와는 다른 병태생리를 보인다[2,3,15,18,32,34]. 본 연구에서는 자발성 고혈압 흰쥐(Spontaneously Hypertensive Rats, SHR)를 동물모델로 이용하였는데 이는 Wister kyoto rats(WKY)에서 자연적으로 고혈압이 있는 쥐를 근친교배한 것으로, 성장과정 중 대퇴골두의 이차골화중심에 괴사가 나타나고 주령이 늘면서 골두의 재생을 보이는 조직병리학적인 특성을 나타냄으로써 Legg-Calve-Perthes씨 병의 유용한 동물실험모델이라 할 수 있다[13,14,16,24,27]. 골성장판의 분화 및 연골내 골화(endochondral ossification)에 있어서 혈관유입(angiogenesis)은 필수적인 요소라고 보고되고 있으며[9,25], 이들 혈관에 의해 영양분과 골형성 과정에 필요한 필수적인 여러 세포들이 유입된다. 이에는 여러 가지 성장인자가 관여하나 특히 혈관내피 성장인자가 가장 중요한 인자 중의 하나로 보고되었다[8,10,19,21].

본 연구에서는 자발성 고혈압 흰쥐에서 허혈성 변화 및 치유과정 중 일어나는 골성장판내 병적 변화를 관찰하고, 동시에 대퇴골두 무혈성괴사 과정 중 관절연골(articular cartilage), 이차골화중심(secondary ossification center) 및 골성장판(growth plate)에서의 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)의 발현을 조사함으로써 대퇴골두에서의 성장장애와의 상관관계를 규명하고자 한다.

대상 및 방법

1. 실험동물 및 분류

각각 6, 9, 12, 15, 18주령의 자발성 고혈압 흰쥐 12마리씩 총 60마리를 실험군으로, 동일 주령의 WKY흰쥐 각각 6마리씩 총 30마리를 대조군으로 하였다. Ether 흡입 마취 하에 실험동물을 희생시키고 Smith-Peterson 도달법으로 조심스럽게 대퇴골두를 노출시킨 후 대퇴경부에서 절골술을 가하여 골두를 적출하였다. 적출된 조직을 4% paraformaldehyde로 고정하고 2주간 10% ethylenediaminetetracetic acid(EDTA) 용액에서 탈회한 후 통상적인 방법으로 파라핀 포매하였다. 대퇴골두의 원형인대(ligamentum teres) 부착 부위를 중심으로 관상면(coronal plane)에서 4 μm 두께로 자른 후 silane coating slide (MUTO PURE CHEMICALS CO., LTD, Japan)를 사용하여 고정하였으며, hematoxylin과 eosin으로 염색하여 광학현미경하에서 관찰하였다. SHR의 모든 개체에서 대퇴골두 골화중심에 괴사가 나타나지는 않으므로 조직학적 검사 상 자발성 고혈압 흰쥐의 골단에서 성장장애 및 괴사 소견이 관찰된 경우를 [SHR+n] 군으로, 정상적인 골화현상을 보였던 경우를 [SHR-n] 군으로 정의하였다.

2. 연구방법

1) 골성장판내 세포고사의 관찰 (biotin nick end labeling TUNEL assay)

각 조직슬라이드를 Tris-HCl 용액(pH 8.0)에서 10분 동안 전처리 하고 20분간 proteinase K(SIGMA, St. Louis, MO, USA)로 처리하였다. PBS 용액으로 수세한 뒤 3% H_2O_2로 조직에 있는 peroxidase를 불활성 시킨 후 PBS로 다

시 수세하였다. 면역조직화학적 관찰을 위한 양성대조군에 대해 DNA buffer로 10분간 전처리하고 DNaseI (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland)으로 20분간 반응시켜 인위적으로 DNA를 단편화시켰다. Transferase-mediated deoxyuridin triphosphated (TdT, SIGMA, St. Louis, MO, USA) buffer에서 15분간 전처리한 후 terminaldeoxytransferase와 Biotin-16-2'-deoxy-uridine-5'-triphosphate(dUTP, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland)로 37℃에서 2시간30분 동안 반응시켜 dUTP를 표지 하였다. 음성대조군에서는 terminaldeoxytransferase 효소를 처리하지 않았다.

TB buffer에서 10분간 담가서 반응을 중지시킨 후에 2% Bovine serum albumin(BSA, SIGMA, St. Louis, MO, USA)로 15분간 blocking 하였고 PBS로 수세 후 streptavidin-peroxidase(SIGMA, St. Louis, MO, USA)로 30분간 반응시켜 DAB로 발색시켰다. 대조염색은 nuclear fast red를 이용하였으며 다시 70, 90, 100% 에틸알코올로 탈수하여 봉입하였다. TUNEL assay에 양성인 세포는 각 슬라이드에서 임의로 세 부분을 지정하여 150 μm×250 μm 크기의 사각형내의 전체 세포 수와 염색된 세포의 수를 측정하고 전체세포에서의 양성인 세포의 비율로 골성장판 내 양성세포율을 계산하였다.

2) 혈관내피성장인자 면역조직화학염색법 (VEGF Immunohistochemistry)

혈관내피성장인자 항체(VEGF DAKO)를 사용하여 면역조직화학법을 수행하였다. 60℃ oven에서 1시간 동안 paraffin을 녹인 뒤 xylene에서 10분씩 3번을 담근 후 함수(hydration)를 위해서 100, 90, 70% Ethanol에 차례대로 담근 뒤 증류수에서 수세(rinse)하였다. 3% H_2O_2로 조직에 있는 Peroxidase를 불활성화 시킨 후 PBS rinse하고 5:1로 희석한 Goat serum으로 차단하고 혈관내피성장인자 일차 항체(VEGF primary Antibody)로 밤새 반응시켰다. PBS로 수세하여 Avidin-Biotin 반응시킨 후 DAB로 발색하여 hematoxylin으로 대조염색을 하고 다시 70, 90, 100% Ethanol에서 탈수(dehydration)후 xylene에서 histomounting solution으로 봉입(mounting)하여 관찰하였다. VEGF에 양성인 세포는 각 슬라이드에서 임의로 세 부분을 지정하여 150 μm×250 μm 크기의 사각형내의 전체 면적과 염색된 부분의 면적을 측정하여 전체면적에서의 양성인 면적의 비율로 골성장판 내 양성세포율을 계산하였다.

3) 결과처리

WKY군, 괴사를 보이지 않았던 SHR-n군 및 괴사를 보였던 SHR+n군에서 세포고사 비율을 측정하였다. 세포고사 비율은 골성장판내 전체 세포수에서 세포고사를 보인 양성세포 수를 측정하여 계산하였으며, 혈관내피성장인자는 골성장판, 골단, 관절연골에서의 발현된 정도를 전체 면적분의 발현한 면적의 비율로계산하여 비교하였다. 주령과 군의 유의성은 two-way ANOVA를 이용하여 검증하였으며, P=0.01에서 통계학적 유의성을 결정하였다.

결 과

1. 세포고사율 측정

골성장판내 전체 세포 수에 대한 세포고사의 비율은 주령이 늘어날수록 높아지는 것을 관찰하였으며 12주 이후부터는 전체 세포의 20% 이상에서 세포고사가 관찰되었다(Table 1, Fig. 1, 2). 6주 때 세포고사율의 경우 SHR-n군이 가장 높은 고사율을 보였으며 세 군에서 15 내지 24%의 세포고사율을 보였으나, 18주 때 전체 세포고사율의 세 군간 비교 시 WKY군이 23.7%, SHR-n군이 34.7%, SHR+n군이 42.9%로서 괴사가 일어난 군에서 WKY군 보다 약 2배 높은 세포고사율을 나타내었다. WKY군에서는 주령이 늘어남에도 불구하고 과성장대의 세포고사율이 6주때의 15.4%, 18주의 23.7%로 20% 전후의 낮은 비율을 유지하였다. 반면 SHR+n군에서는 6주 때 19%였던 세포고사율이 18주 때 47%로 증가하였다. 6주 때 정지대의 세 군간 비교에서 WKY군의 세포고사율이 9.9%인 반면 SHR-n군은

30.7%, SHR+n은 36.1%로서 SHR 두 군이 WKY군에 비해 높은 세포고사율을 보였다. 증식대에서는 SHR-n군이 26%의 가장 높은 비율을 보였으며 과성장대에서는 14 내지 18%의 차이를 보였다.

2. 혈관내피성장인자의 발현

1) 골성장판(Growth Plate)

정상 대조군인 WKY군의 골성장판에서 주령이 증가하여도 연골세포들은 전형적인 종배열 구조(columnar pattern)을 보였으며 혈관내피성장인자는 하부과성장대(lower hypertrophic zone) 및 석회화대(mineralized zone)에서 주로 발현되었고 정지대(resting zone) 및 증식대(proliferative zone)에서는 약하게 발현되었다. 주령이 증가함에 따라서 혈관내피성장인자의 각 세포대(zone)에서의 발현 정도는 점차적으로 감소하였다(Fig. 3, 4). 괴사가 없는 SHR-n군에서도 성장판의 고유한 층배열(columnar pat-

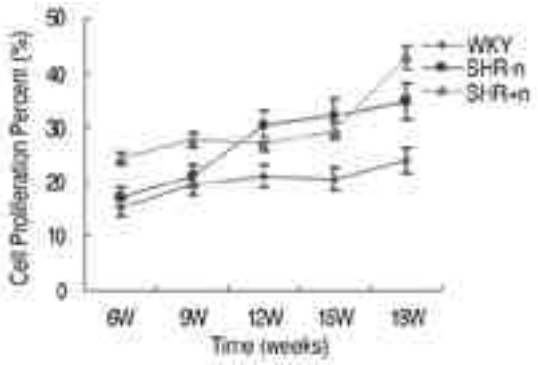

Fig. 1. Percentage of Apoptotic cells in the Growth Plate with Aging. (*p<0.001)

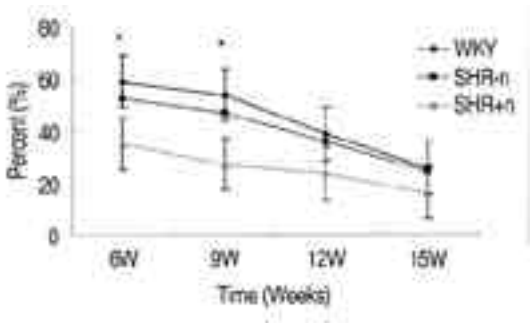

Fig. 3. Percentage of VEGF Expression in the Growth Plate with Aging. (*p<0.001)

Table 1. Percentage of Apoptotic cells in the Growth Plate with Aging (Scale: %, *p<0.001)

		total length	resting zone	proliferation zone	hypertrophic zone
6weeks	WKY	15.37±3.85	9.92±5.90	17.37±4.78	14.3±4.61
	SHR-n	17.18±6.32	13.72±9.08	16.02±6.40	18.23±5.94
	SHR+n	24.24±7.53	16.1±14.69*	20.97±9.10	28.27±8.94
9weeks	WKY	19.44±4.83	28.49±4.96	5.81±2.43	24.1±7.3
	SHR-n	20.89±6.07	26.09±7.11	22.08±9.97	16.48±3.72
	SHR+n	26.66±6.2	44.34±11.74	22.32±8.69*	28.15±9.26
12weeks	WKY	20.92±5.17	23.92±12.04	24.61±5.49	19.08±8.68
	SHR-n	30.26±5.97	33.15±12.06	25.39±5.21	33.71±5.84
	SHR+n	21.01±6.57	47.72±10.3	33.03±4.34	25.11±7.75
15weeks	WKY	20.44±3.98	29.84±8.43	6.39±9.56	26.27±4.91
	SHR-n	32.11±5.87	43.24±9.82	25.71±8.4	29.5±10.72
	SHR+n	29.25±7.7	31.32±11.64	33.88±16.89	31.59±8.37
18weeks	WKY	23.76±4.74	42.23±8.94	12.03±5.77	26.45±6.58
	SHR-n	34.69±8.87	45.42±4.62	14.51±6.73	44.58±12.25
	SHR+n	42.9±7.74	49.6±7.75	31.19±11.74	47.75±20.91

tern)을 유지하였으나 WKY군에 비해 혈관내피성장인자의 발현은 어린 주령에서 유의하게 감소되었다. 괴사가 있는 SHR+n군에서는 연골세포들이 종배열 대신에 섬모양 배열(island pattern)을 보였고 혈관내피성장인자의 발현도 거의 되지 않았다(Fig. 5). 12주, 15주로 주령이 증가함에 따라 혈관내피성장인자의 발현은 더욱 감소하였다(Table 2, Fig. 4).

2) 이차골화중심 (secondary ossification center, epiphysis)

WKY군에서는 이차골화중심 즉 골단에서 정상적인 골화 과정을 보였으며 혈관내피성장인자가 연골세포 및 세포기질에서 풍부하게 발현된 것을 관찰하였다. 12주에서는 골화가 진행 중이었으며 WKY군에서는 유골조직 속의 골세포에서도 지속적으로 혈관내피성장인자의 발현을 관찰하였다.

괴사가 없는 SHR-n군에서는 연골세포의 크기

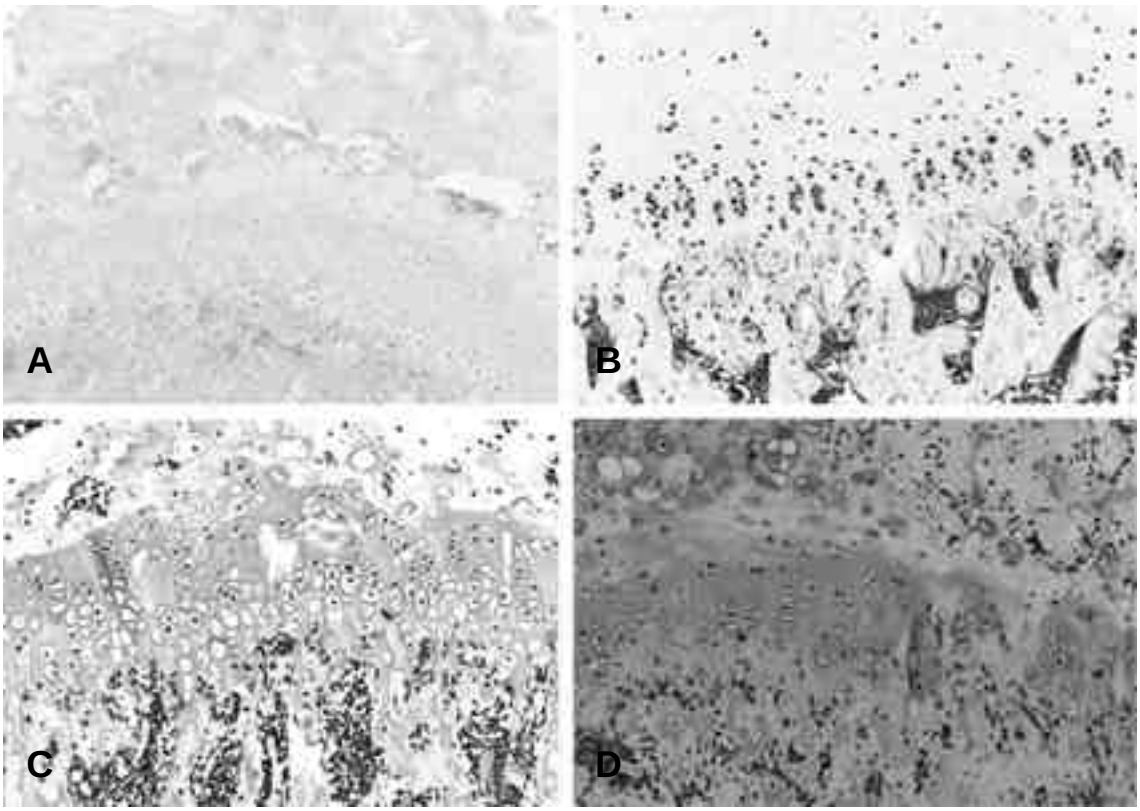

Fig. 2. TUNEL assay in the growth plate. (×40 A, B; ×100 C, D, *p<0.001) (**A**) negative control (**B**) positive control (**C**) 12wks WKY (**D**) 12wks SHR+n

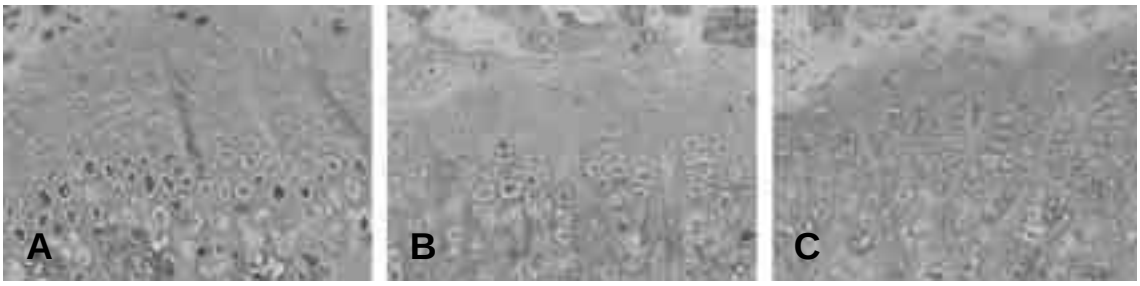

Fig. 4. VEGF expression in the growth plate of WKY. (×200) (**A**) 9 wks (**B**) 12 wks (**C**) 15wks

가 전반적으로 커져 있었으며 WKY군에 비하여 골화 과정이 더디고 혈관내피성장인자의 발현도 WKY군과 비교 시 감소하였다. 괴사가 있는 SHR+n군에서는 대퇴골두의 전외측(anterolateral portion)에 주로 괴사가 발생하였으며 괴사 부위의 연골세포는 크기가 크며 정상적인 골화과정이 15주 이후에서도 전혀 진행되지 않았고 혈관내피 성장인자의 발현도 거의 되지 않았다(Fig. 6, 7).

3) 관절연골(articular cartilage)

관절연골에서의 혈관내피성장인자의 발현은 WKY군, SHR-n군 및 SHR+n군 세 군간에 차이를 보이지 않았으며 세 군 모두에서 정상적으로 발현되었다.

고 찰

Legg-Calve-Perthes씨 병은 소아 대퇴골두를 이환하는 자기한정성(self limiting) 고관절 질환으로 골두의 무혈성괴사 이후 혈관이 다시 유입되는 과정에서 골두의 변형 및 성장장애가 발생하는 질환이다[2,3,15,18,26,28,30,32,34]. Legg-Calve-Perthes씨 병에 대한 다양한 유전학적(genetic), 역학적

Table 2. Percentage of VEGF Expression in the Growth Plate with Aging (Scale: %,*p<0.001)

	VEGF Expression	
6wk	WKY	58.90±11.07
	SHR-n	52.55±11.5
	SHR+n	35.15±8.66*
9wk	WKY	53.91±12.51
	SHR-n	47.07±12.84
	SHR+n	27.16±10.97
12wk	WKY	38.95±13.22
	SHR-n	35.91±10.60
	SHR+n	23.71±11.04
15wk	WKY	25.95±12.11
	SHR-n	24.64±12.27
	SHR+n	16.27±4.17

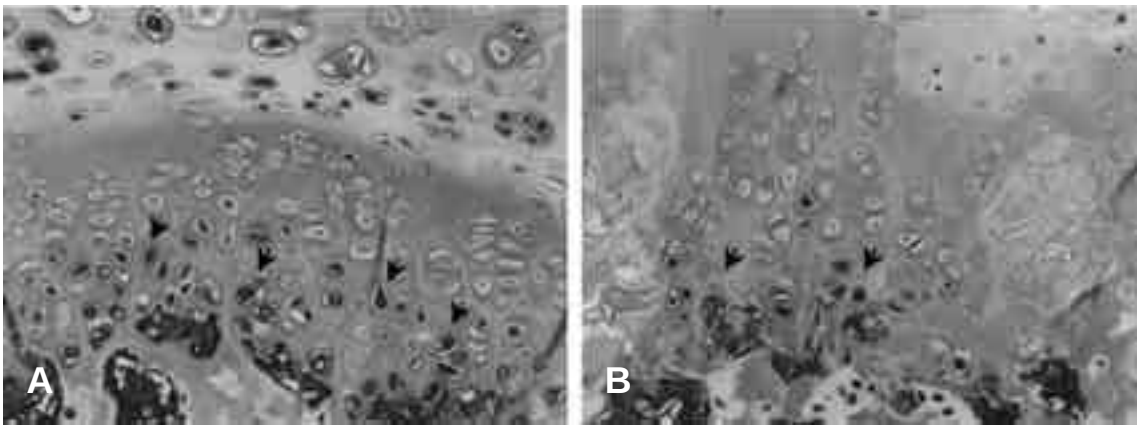

Fig. 5. VEGF expression in the growth plate of 15 weeks old rats. (×200) (**A**) SHR-n (**B**) SHR+n

(epidemiological), 생화학적(biochemical) 및 조직병리학적(histopathological) 연구가 이루어졌지만 혈류장애(vascular disturbance)에 대한 병인에 대해서는 아직 밝혀진 바 없다. 현재까지 진행된 연구로 부검을 통한 조직병리학적인 변화 관찰, piglet의 고관절을 과도하게 외전 시키거나 대퇴경부 혈관을 결찰하는 동물실험이 시도된 바 있다[2,17]. 그러나 이들은 인위적으로 대퇴골두로 가는 혈액공급을 차단시키고 대퇴골두 전체에 장기간 동안의 심각한 허혈을 유발시킴으로써 불가역적인 변화를 일으키는 단점이 있으며 이는 Legg-Calve-Perthes씨 병이 갖는 소위 "가역성"에 배치되는 문제점을 갖는다. 본 연구에서는 괴사의 가역성의 문제와 골성장판에서의 일어나는 괴사를 충족시키는 동물모델로 자발성 고혈압 흰쥐를 이용하였다. 자발성 고혈압 흰쥐(Spontaneously Hypertensive Rats, SHR)는 Wister Kyoto Rats에서 자연적으로 고혈압이 있는 쥐를 근친교배한 종으로 수축기 혈압이 평균 200 mmHg 이상 이르는 등 원래 사람의 특발성 고혈압(essential hypertension)을 위한 실험동물 모델로서 이용되어 왔다. WKY흰쥐는 발달과정 중 정상적인 골화(ossification)를 나타내는데 반해 자발성 고혈압 흰쥐의 경우 골성숙 과정 중 일부 대퇴골두에 허혈성 변화 및 이차골화중심의 괴사가 나타나고 주령이 늘어나면서 자연적으로 치유가 되는 특징을 지님으로 인해 Legg-Calve-Perthes씨 병의 좋은 실험동물 모델로서 제시된 바 있으며[13,14,16,24,27], Kong 등은 자발성 고혈압 흰쥐로 대퇴골두 내 이차골화 중심에서의 괴사로 인한 골성장판의 길이 변화 및 세포증식도에 관한 연구가 있었다[18].

골성장판에서의 세포고사는 하부과성장대(lower hypertrophic zone)에서 석회화 과정을 거치면서 골로 전환되는 과정 중 생리적으로 일어나는 세포변화로써[5,6,11,22,33] 골로 대치되는 정도를 인지할 수 있으며 이차골화중심의 괴사에 의한 골성장판 손상에 의해서도 세포고사가 발생할 수 있다[12,22,29,31,23]. TUNEL assay는 세포고사에 의한 DNA절편 이외에도 다른 요인에 대한 DNA 손

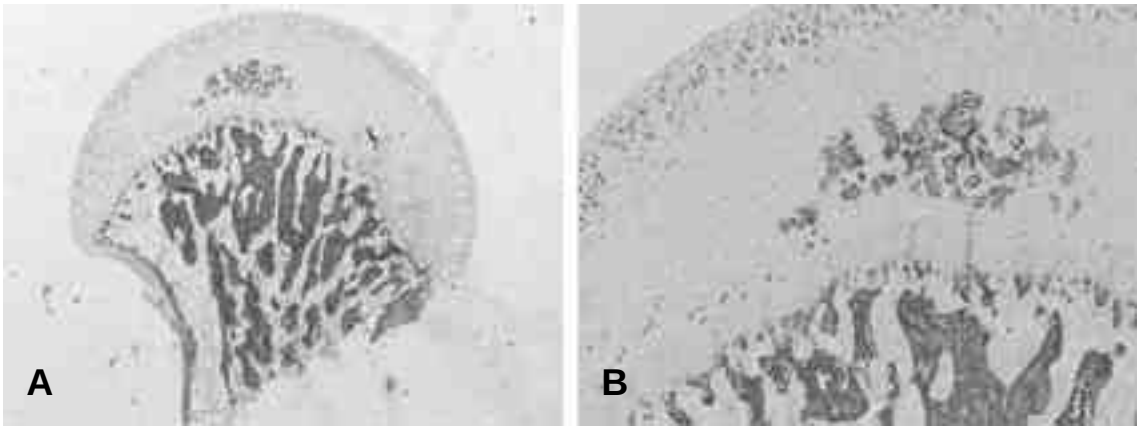

Fig. 6. VEGF expression in the epiphysis of SHR+n. (**A**)×40 (**B**) ×100

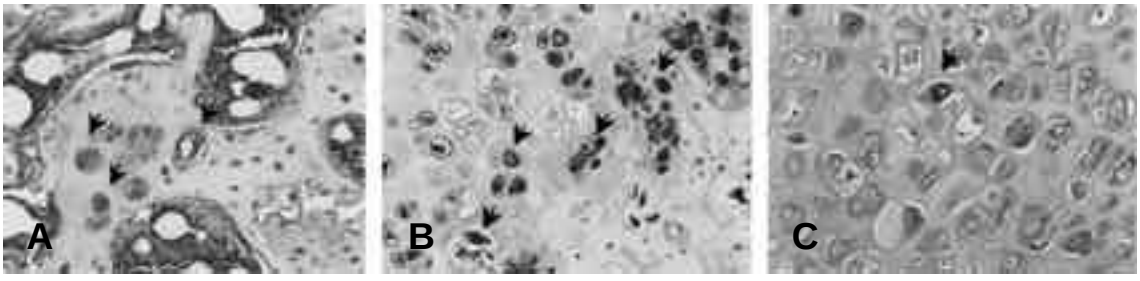

Fig. 7. VEGF expression in the epiphysis of 12weeks old rats. (×200) (**A**) WKY (**B**) SHR-n (**C**) SHR+n

상 역시 인지하여 부정확한 결과를 얻을 가능성이 있으나 이러한 단점에도 불구하고 세포고사를 표지하는 최적의 방법으로 이용되고 있다[1,7]. 골성장판내에서 세포고사가 일어나는 비율을 관찰한 결과 6주에서는 세 군이 15 내지 24%의 세포고사율을 보이며 각 군 간의 차이는 없었다. 그러나 부위에 따라 관찰한 결과 대퇴골두 내 괴사가 발병하는 시기인 성장 초기의 6주의 정지대, 9주의 증식대에서 두 실험군인 SHR-n군 및 SHR+n군과 대조군인 WKY군 사이에 유의한 차이가 있었으며 성장 말기인 18주 때 골성장판 전체에서의 세포고사율이 SHR+n군에서 47.8%로 23.7%인 WKY군 보다 두 배 가까운 세포고사율을 나타내었다. 이는 대퇴골두 내 무혈성괴사가 발생하는 성장초기에 실험군인 SHR군에서는 골성장판의 생장 및 성장에 관련된 정지대, 증식대에 문제가 있으나, 주령이 늘어남에 따라 SHR-n군에서는 정상적인 골성장에 근접하였다. SHR+n군의 경우 성장초기의 손상이 성장말기까지 계속 영향을 미치는 것으로 사료되었다. 이는 연골에서 골로 전환되는 과정 중 정상적인 세포고사뿐 아니라 다른 요인에 의한 DNA 손상 역시 인지된 결과를 의미한다.

혈관내피성장인자의 발현은 주령이 증가하면서 정상적인 골화과정에서도 감소하였다. 이는 혈관내피성장인자가 성장 단계에 의존적이며 성장이 완료된 시기에는 그 중요도가 성장초기보다 떨어진다는 것을 의미한다. 골성장판 및 골단에서 대조군인 WKY군보다 괴사가 없는 SHR-n군에서 발현 정도가 감소하였으며, 괴사가 있는 SHR+n군에서는 거의 발현되지 않았다. 이와 같이 동일한 SHR군이라도 괴사 유무에 따라서 혈관내피성장인자의 발현이 다르다는 점은 혈관내피성장인자의 발현이 유전적으로 결정되는 것이 아닌 다양한 요소들에 영향을 받는 것을 의미한다. 이차골화중심의 골화는 9주에서 시작하여 15주 정도까지 진행되는데 괴사가 없는 SHR-n군에서는 WKY군보다는 더디지만 골화가 가능하였으며, 특히 혈관내피성장인자가 발현이 되는 주변으로 하여 골화가 진행된 것으로 보아 혈관내피성장인자가 정상 골화과정에 있어서 필수적인 요소인 것으로 생각된다. 관절연골에 있어서는 세군 모두에서 정상적으로 발현되어 괴사에 의한 혈관내피성장인자의 발현에 차이를 보이지 않았다. 이상의 결과로 볼 때 혈관내피성장인자의 발현은 성장단계에 의존적이며 또한 조직 특이성을 가지고 있는 것으로 생각된다. 골성장판의 길이성장이나 이차골화중심의 골화에는 혈관유입(angiogenesis)이 필수적이어서 충분한 혈관내피성장인자의 발현이 필요하나 관절연골은 무혈성(avascular) 조직이므로 혈관내피 성장인자의 발현이 필수적이지 않다는 것으로 해석되었다.

혈관내피성장인자의 발현 및 과성장대에서의 세포고사율은 대조군인 WKY군에 비해 SHR군에서 증가되어있었다. 이는 혈관내피성장인자의 기능을 차단하면 세포고사가 억제된다는 이전의 연구와 대치되는 것으로, 정상이 아닌 병적 상태에 있는 SHR에서는 세포고사와 혈관내피성장인자의 발현 사이에 단순히 반비례 관계가 아닌 다른 요인에 의해서 영향을 받는 것으로 사료되었다. 이를 규명하기 위해서는 유전적인 요인인지 단순히 괴사에 의한 영향을 받은 것인지에 대한 보다 자세한 실험이 요구되며, 향후 혈관유입 정도와 혈관내피성장인자와의 상관관계를 비교하는 것이 필요하리라 사료된다.

결 론

혈관내피성장인자는 성장이 진행됨에 따라 발현이 감소하는 양상을 보이며, 대퇴골두 내 괴사가 발생한 골화중심 및 골성장판에서는 발현이 감소하나 관절연골에는 정상적으로 발현되는 조직 특이성을 가짐으로써 골성장판 성장 및 골화중심의 정상 골화에 있어 필수적인 요소로 사료되었다.

REFERENCES

1) **Aizawa T, Kokubun S and Tanaka Y**: Apoptosis and proliferation of growth plate chondrocytes in rabbits. *J Bone Joint Surg[Br]*, 79-B(3): 483-486, 1997.

2) **Catterall A, Pringle J, Byers P, Fulford G, Kemp H, Dolman C et al**: A review of the mor-

phology of perthes ' disease. *J Bone Joint Surg[Br]*, 64-B(3): 269-275, 1982.

3) **Chung S**. Hip disorders in infants and children: Philadelphia: *Lea & Febiger*, 19-28, 235-253, 1981.
4) **Farnum C and Wilsman N**: Chondrocyte kinetics in the growth plate. In: Sapiro IM, Boyan B, Anderson HC, editors. The growth plate. Vol 54. Amsterdam: *ISO press*, 245-257, 2002.
5) **Farnum C and Wilsman N**: Determination of proliferative characteristics of growth plate chondrocyte by labeling with bromodeoxyuridine. *Calcified tissue int*, 52: 110-119, 1993.
6) **Galotto M, Campanile G, Robino G, Cancedda F, Bianco P and Cancedda R**: Hypertrophic chondrocytes undergo further differentiation to osteoblast-like cells and participate in the initial bone formation in developing chick embryo. *J Bone Mineral Res*, 9(8): 1239-1249, 1994.
7) **Gavrieli Y, ShermanY and Bensasson S**: Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biolo*, 119: 493-501, 1992
8) **Gerber H and Ferrara N**: Angiogenesis and bone growth. *TrendsCardiovasc Med*, 10(5): 223-227, 2000.
9) **Gerber H, Vu T, Ryan A, Kowalski J, Werb Z and Ferrara N**: VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation, 5(6): 623-628, 1999.
10) **Gerber H et al**: VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development*, 126: 1149-1159, 1999.
11) **Gibson G**: Active role of chondrocyte Apoptosis in Endochonral ossification. *Microscopy research and technique*, 43: 191-204, 1998.
12) **Hatori M, Klatte K, Yeixeira C and Sapiro I**: End labelling studies of fragmented DNA in Avian growth plate: evidence of apoptosis in terminal differentiation chondrocytes. *J Bone Min Res.* 10: 1960-1968, 1995.
13) **Hirano T, Iwasaki K. Oda J and Kumashiro T**: Osteonecrosis of the femoral head in spontaneously hypertensive rats. *Acta Orthop Scand*, 63(1): 37-40, 1992.
14) **Hirano T, Iwasaki K. and Yamane Y**: Osteonecrosis of the femoral head of growing, spontaneously hypertensive rats. *Acta Othop Scand*, 59: 530-5, 1988.
15) **Hirano T, Majima R, Yoshida G and Iwasaki K**: Characteristics of blood vessels feeding the femoral head liable to osteonecrosis in spontaneously hypertensive rats. *Calcif Tissue Int*, 58: 201-205, 1996.
16) **Iwasaki K and Hirano T**: Osteonecrosis and ossification disturbance of the femoral head in spontaneously hypertensive rats. *J Jpn Orthop Assoc*, 62: 1003-1010, 1988.
17) **Kim H, Su R and Qiu Y**: Histopathologic changes in growth plate cartilage following ischemic necrosis of the capital femoral epiphysis. JBJS[Am], 83-A(5): 688-697, 2001.
18) **Kong S, Yang I, Park K, Park H and Kim H**: Cellular kinetics in growth plate of the femoral head of the spontaneously hypertensive rats. *Korean Journal of Bone Metabolism*, 11: 137-145, 2004.
19) **Klagsbrun M, D 'Amore P**: Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 7: 259-270, 1996.
20) **Lovell and Winter**: Pediatric orthopaedics. 5th edition. *Legg-Calve-Perthes syndrome*, 957-998, 2001.
21) **Maes C, Carmeliet P, Moermans K, Stockmans I, Smets N, Clooen D et al**: Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF and VEGF. *Mechanisms of development*, 111: 61-73, 2002.
22) **Matsuno T, Ishida O, Arihiro K, Sunagawa T, Mori T and Ikuta Y**: Cell proliferation and death of growth plate chondrocyte caused by ischemia and reperfusion. *Microsurgery*, 21(1):

30-36, 2001.

23) **Nagata S**: Apoptosis by death factor. *Cell* 88: 355-365, 1997.

24) **Naito S, Ito M, Sekine I et al**: Femoral head necrosis and osteopenia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats(SHRSPs). *Bone*, 14: 745-753, 1993.

25) **Norman D, Reis D, Zinman C, Misselevich I and Boss JH**: Vascular deprivation-induced necrosis of the femoral head of the rats. An experimental model of avascular osteonecrosis in the skeletally immature individual or Legg-Perthes disease. *Int. J Exp Path*, 79: 173-181, 1998.

26) **Oda J, Hirano T, Iwasaki K. and Majima R**: Vascular occlusion and cartilage disorders in osteonecrosis of the femoral head in rats. Int. *Orthopaedics*, 20: 185-189, 1996.

27) **Ohtubo Y**: Avascular necrosis in the femoral heads of the spontaneously hypertensive rats. A study on deffering incidence between the sexes. *J Jpn Orthop Assoc*, 66: 83-91, 1992.

28) **Ponseti I, maynard J, Weinstein S, Ippolito E and Pous J**: Legg-Calve-Perthes Disease. *J Bone Joint Surg[Am]*, 65-A(6): 797-807, 1983.

29) **Roach H, Erenpreisa J and Aigner T**: Osteogenic differentiation of hypertrophic chondrocytes involes asymmetric cell divisions and apoptosis. *J. cell biology* 131(2): 483-494, 1995.

30) **Schoenecker P**: Legg-Calve-Perthes Disease. *orthopaedic review*, 9: 561-574, 1986.

31) **Streeter G**: Developmental horizons in human embryos. A review of the histogenesis of cartilage and bone. *Carnegie Inst Wash*, 583(33): 151-167, 1949.

32) **Tomita M, Shimokawa I, Maeda H, Higami Y, Kawahara T, Ikeda T, et al**: Dietary restriction reduces the prevalence of osteonecrosis of the caput femoris in spontaneously hypertensive rats. *Calcif Tissue Int*, 64: 259-262, 1999.

33) **Vanky P, Brockstedt U, Hjerpe A and Wikstrom**: Kinetic studies on epiphyseal growth cartilage in the normal mouse., 22(4): 331-339, 1998.

34) **Wenger D and Ezaki M**: Bilateral femoral head collapse in an adolescent with brachydactyly (multiple epiphyseal dysplasia tarda type Ic). *J Pediatr orthop*, 1: 267-271, 1981.