

## 자발성 고혈압 흰쥐의 대퇴골두 골성장판내 세포역동학

연세대학교 의과대학 정형외과학교실

공선영 · 양익환 · 박건보 · 박희완 · 김현우

### - Abstract -

#### Cellular Kinetics in Growth Plate of the Femoral Head of the Spontaneously Hypertensive Rats

Sun Young Kong, Ick Hwan Yang, Kun Bo Park, Hui Wan Park, Hyun Woo Kim

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

**Purpose:** Although metaphyseal growth plates are assumed to be affected in the ischemic necrosis of the epiphysis in children's femoral head, little is known about the pathologic changes occurring within the growth plate. The present study was designed to investigate any histopathological changes in the growth plate using the spontaneously hypertensive rats (SHRs).

**Materials and Methods:** 60 SHRs and 30 Wister Kyoto rats (WKY) were sacrificed at each of 6, 9, 12, 15 and 18 weeks of age. SHRs were divided into two groups, [SHR-n] and [SHR+n], according to the existence of histopathological changes of ischemic necrosis of the secondary ossification center of the femoral head and WKY were used as control. 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) was injected and BrdU immunohistchemistry was performed for the cell kinetic analysis. TUNEL (transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labeling) assay was done for the investigation of any apoptotic changes in the growth plate. In both TUNEL and BrdU staining, the positive cells were counted in each zones of the growth plate. The length of each zone of growth plate - resting, proliferative, and hypertrophic zone was measured by histomorphometric analysis. All the data were analyzed by two-way ANOVA.

**Results:** Total length of growth plate was found to be decreased overtime. At earlier growth stages, the length of the growth plate of [SHR+n] group was shorter than those of the [SHR-n] and WKY group. As aging, hypertrophic zone of the growth plate in [SHR+n] was the mostly affected zone of the growth plate. The cell proliferation analysis of the growth plate of [SHR+n] showed lower activity than those of the [SHR-n] and WKY at earlier growth stages. Apoptosis occurring in the growth plate of [SHR+n] were observed mainly at earlier stages, and at the hypertrophic zone in later stages.

**Conclusion:** The metaphyseal growth plate in the femoral head of SHR was found to be affected by the disease process of ischemic necrosis of the epiphysis of the femoral head, and this would explain the reason why round femoral head is frequently associated with relative overgrowth of the greater trochanter in later stages of Legg-Perthes disease.

**Key Words:** Ischemic necrosis, Growth plate, Spontaneously hypertensive rats, Legg-Calvé-Perthes disease

책임저자: 김현우, 120-749 서울특별시 서대문구 신촌동 134, 연세대학교 의과대학 정형외과학교실  
Tel: (02) 361-5640, Fax: (02) 361-1139, e-mail: pedhkim@ymc.yonsei.ac.kr

## 서 론

Legg-Calvé-Perthes씨 병은 소아 대퇴골두의 골화 중심에 무혈성 괴사가 발생하는 질환으로써 대퇴골두의 아탈구 없이 적절한 치료가 이루어질 경우 골괴사가 있던 대퇴골두는 완전한 구형으로 복원될 수 있으나 약 반수의 환아에서는 대전자부가 과성장되고 대퇴경부가 굽어지며 하지길이가 단축되는 현상을 보인다<sup>1,2)</sup>. 이들 현상은 임상적으로 예측이 불가능하고 허혈성 괴사의 주요 침범부위가 대퇴골두의 골단(epiphysis) 뿐 아니라 골성장판(metaphyseal growth plate)이라는 사실을 의미하나 실제 골성장판에서 일어나는 병적 변화에 대한 연구는 진행된 바 없다.

Legg-Calvé-Perthes씨 병에서 나타나는 무혈성 괴사의 발병 기전에 관한 연구는 과거에도 많이 진행되어 왔으나 아직 정확한 원인은 밝혀지지 않았다<sup>3~5)</sup>. 과거의 연구는 주로 소수의 부검을 통한 조직 병리학적인 변화를 관찰한데 지나지 않았고, 동물 실험으로는 새끼돼지(piglet)의 고관절을 과도하게 외전시키거나 대퇴경부 혈관을 결찰하는 방법이 시도된 바 있다<sup>6)</sup>. 그러나 이는 인위적으로 대퇴골두로 가는 혈액공급을 차단시킴으로써 대퇴골두 전체에 장기간 동안의 심각한 허혈을 유발시킴으로써 불가역적인 변화를 일으키는 단점이 있으며 이는 Legg-Calvé-Perthes씨 병이 갖는 소위 "가역성"에 배치되는 문제점을 갖는다.

한편 자발성 고혈압 흰쥐(Spontaneously Hypertensive Rats, SHR)는 Wister Kyoto Rats(WKY)에서 자연적으로 고혈압이 있는 쥐를 근친 교배한 종으로 수축기 혈압이 평균 200 mmHg 이상 이르는 등 원래 사람의 특발성 고혈압(essential hypertension)을 위한 실험동물 모델로서 이용되어 왔다. WKY 흰쥐는 발달과정 중 정상적인 골화(ossification)를 나타내는데 반해, 자발성 고혈압 흰쥐의 경우 골성숙 과정 중 일부 대퇴골두에 허혈성 변화 및 이차 골화중심의 괴사가 나타나고 주령이 늘어나면서 자연적으로 치유가 되는 특징을 지님으로 인해 Legg-Calvé-Perthes씨 병의 좋은 실험동물 모델로서 제시된 바 있다<sup>7~11)</sup>. 본 연구에서는 자발성 고혈압 흰쥐

에서 허혈성 변화 후 속발되는 치유과정 중 일어나는 골성장판내 병적 변화를 세포역동학적(cellular kinetics) 방법을 통해 규명하고자 하며, 이를 통해 전술한 골성장판내 성장장애로 인한 임상적 문제에 대한 병인을 유추하고 임상적으로 활용 가능한 기초자료로 삼고자 하였다.

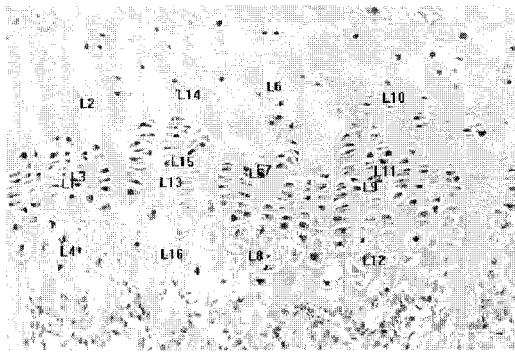
## 연구 대상 및 방법

### 1. 실험동물 및 분류

각각 6, 9, 12, 15, 18주령의 자발성 고혈압 흰쥐 12마리씩 총 60마리를 실험군으로, 동일 주령의 WKY 흰쥐 각각 6마리씩 총 30마리를 대조군으로 하였다. Ether 흡입 마취하에 실험동물을 희생시키고 Smith-Peterson 도달법으로 조심스럽게 대퇴골두를 노출시킨 후 대퇴경부에서 절골술을 가하여 골두를 적출하였다. 적출된 조직을 4% paraformaldehyde로 고정하고 2주간 10% ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) 용액에서 탈화한 후 통상적인 방법으로 파라핀 포매하였다. 대퇴골두의 원형연대(ligamentum teres) 부착 부위를 중심으로 관상면(coronal plane)에서 4 μm 두께로 자른 후 silane coating slide(MUTO PURE CHEMICALS CO., Japan)를 사용하여 고정하였으며, hematoxylin과 eosin으로 염색하여 광학현미경 하에서 관찰하였다. SHR의 모든 개체에서 대퇴골두 골화중심에 괴사가 나타나지 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. 골성장판내 조직형태학적 계측

골성장판 전체의 길이와 정지대(resting zone), 증식대(proliferation zone) 및 과성장대(hypertrophic zone) 각각의 길이를 Imagepro® program을 이용하여 측정하였다. 모든 조직학적인 관찰은 골단에 괴사가 관찰된 부위의 성장판과 동일한 위치에서 임의로 네 부분을 선정하여서 수직으로 전체 길이를 측정하고 전체 길이에서 각 부위별 측정을 수행하였다(Figure 1).



**Figure 1.** Measurement of length of the growth plate using image analyzer ( $\times 100$ ).

L1, L5, L9, L13 - total length  
L2, L6, L10, L14 - resting zone  
L3, L7, L9, L15 - proliferation zone  
L4, L8, L12, L16 - hypertrophic zone

### 3. 골성장판내 연골세포의 증식능

-20°C에서 보관된 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, SIGMA, St. Louis, MO, USA)을 phosphated buffered saline (PBS)에 녹여 실험동물 희생 각각 25시간 전과 1시간 전 2회씩 복강 내 주사 (100 mg/kg)하였다. 통상적인 방법으로 슬라이드를 제작하여 60°C oven에서 1시간 동안 파라핀을 녹인 후 다시 xylen으로 10분씩 3번 처리하였으며, 함수를 위하여 100, 90, 70% ethanol 및 이차증류수로 수세하였다. 3% hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )로 조직 내 내인성 peroxidase를 불활성시킨 후 0.4% pepsin으로 20분간 반응시켜 조직을 반응하였다. 2 N HCl로 30분간 DNA 변성 후, 5:1로 희석된 goat serum (SIGMA, St. Louis, MO, USA)과 반응시켰으며 BrdU 일차항체 (SIGMA, St. Louis, MO, USA)로 실온에서 12시간 반응시켰다. Avidin-biotin (mouse IgG, extra avidin; SIGMA, St. Louis, MO, USA) 방법을 이용하여 면역조직화학염색법을 수행하였으며, goat serum에서 일차항체 단계를 제외한 각 단계에서 PBS 용액으로 수세하였다. 3, 3'-diaminobenzidine (DAB, Vector laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA)으로 발색하고 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 수행하였다. 70, 90, 100% 에틸알코올에서 탈수하고 봉입 (mounting)하여 광학현미경 하에서 관찰하였다. BrdU 면역조직화학염색법에 양성인 세포는 각 슬라이드에서 임의

로 세 부분을 지정하여  $150 \mu\text{m} \times 250 \mu\text{m}$  크기의 사각형 내의 전체 세포 수와 염색된 세포의 수를 측정하고 전체 세포에서의 양성인 세포에서 성장판의 각 위치별 세포의 양성세포율을 계산하였다.

### 4. 골성장판내 세포고사

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%  $H_2O_2$ 로 조직에 있는 peroxidase를 불활성시킨 후 PBS로 다시 수세하였고, 면역조직화학적 관찰을 위한 양성대조군에 대해 DNA buffer로 10분간 전처리하고 DNase I (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland)으로 20분간 반응시켜 인위적으로 DNA를 단편화시켰다. Transferase-mediated deoxyuridyl triphosphate (TdT, SIGMA, St. Louis, MO, USA) buffer에서 15분간 전 처리한 후 terminaldeoxytransferase와 Biotin-16-2'-deoxy-uridine-5'-triphosphate (dUTP, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland)로 37°C에서 2시간 30분 동안 반응시켜 dUTP를 표지하였다. 음성대조군에서는 terminaldeoxytransferase 효소를 처리하지 않았다. TB buffer에서 10분간 담가서 반응을 중지시킨 후에 2% Bovine serum albumin (BSA, SIGMA, St. Louis, MO, USA)로 15분간 blocking하였고, 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  $150 \mu\text{m} \times 250 \mu\text{m}$  크기의 사각형 내의 전체 세포 수와 염색된 세포의 수를 측정하였고 전체 세포에서의 양성인 세포에서 성장판의 각 위치별 세포의 양성세포율을 계산하였다.

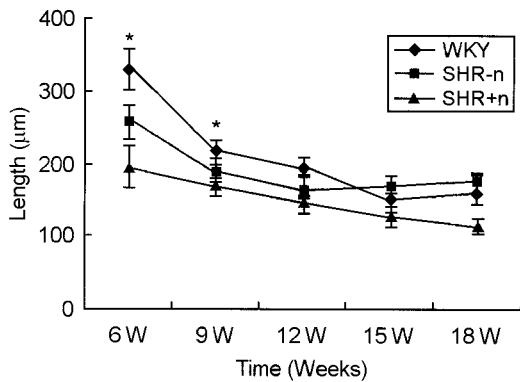
### 5. 통계처리

WKY군, 괴사를 보이지 않았던 SHR-n군 및 괴사를 보였던 SHR+n군에 대한 골성장판의 전체 길이, 정지대, 증식대 및 과성장대의 길이, 세포고사의 비율, BrdU 비율에 관한 결과에 대해 주령과 군 사이의 유의성을 two-way ANOVA를 이용하여 검

증하였으며,  $p=0.01$ 에서 통계학적 유의성을 결정하였다.

## 결과

### 1. 주령에 따른 골성장판 및 각 부위별 길이



**Figure 2.** Measurement of length of the growth plate according to age (\* $p<0.001$ ).

WKY: Wister-Kyoto rat

SHR-n: SHR without evidence of ischemic necrosis of epiphysis

SHR+n: SHR with evidence of ischemic necrosis of epiphysis

골성장판의 길이를 6주에서 18주까지 관찰한 결과 주령 (age)이 증가할수록 골성장판 전체의 길이가 감소함을 관찰하였다 (Figure 2, Table 1). 성장 초기인 6, 9주에서 WKY군 및 SHR-n군과 SHR+n군 사이에 유의한 골성장판의 길이차이가 있음을 관찰하였고, 특히 주령 6주 골성장판 전체 길이의 경우 SHR+n군의 길이가 WKY군 및 SHR-n군에 비해 유의성 있게 감소하여 WKY군의 63% 정도에 불과하였다. 그러나 골성장이 진행됨에 따라 세 군 모두에서 골성장판 길이의 감소를 보여 세 군 간의 길이차이는 어린 주령 때에 비해 감소하였다.

주령 6주 및 9주의 초기 성장기 증식대의 경우, SHR+n군에서 각각 WKY군 및 SHR-n군에 비해 유의하게 감소되었음을 관찰하였다 (Figure 3). 주령 12주 때의 골성장판 전체 길이의 경우 SHR+n군이

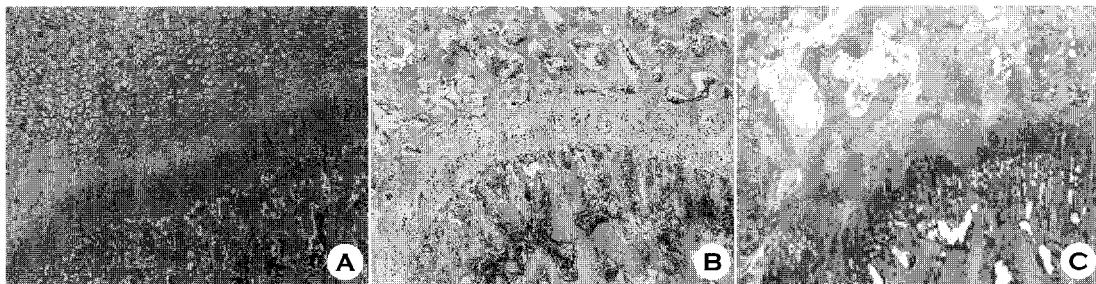
**Table 1.** Measurement of length of the growth plate according to age (unit; μm, \* $p<0.001$ )

		Total length	Resting zone	Proliferation zone	Hypertrophic zone
6 weeks	WKY	329.34±27.39	75.62±13.49	130.32±19.75	106.03±12.97
	SHR-n	256.68±22.97	71.87±12.38	102.71±15.10	83.42±12.13
	SHR+n	195.31±29.51	56.26±10.17	64.04±13.49*	61.96±13.94
9 weeks	WKY	215.17±15.81	67.71±12.12	77.59±8.24	75.71±11.04
	SHR-n	189.80±18.13	51.37±9.39	73.20±13.66	68.17±12.3
	SHR+n	172.36±16.23	35.25±6.89*	62.79±12.21	64.74±9.91
12 weeks	WKY	194.03±11.22	45.74±7.08	71.73±9.40	69.16±13.17
	SHR-n	164.48±19.96	31.67±5.71	62.56±8.99	65.14±13.57
	SHR+n	146.69±15.76	29.32±4.4	58.33±9.17	56.71±11.29
15 weeks	WKY	149.72±20.05	28.76±8.29	54.79±11.14	76.09±11.38
	SHR-n	168.87±14.53	25.31±5.81	66.86±9.16	77.99±10.04
	SHR+n	126.71±14.89	17.04±3.24	41.39±9.12	56.02±12.65
18 weeks	WKY	160.22±16.18	27.05±5.38	52.03±9.59	79.97±11.96
	SHR-n	167.27±9.73	21.6±4.06	50.6±7.67	100.41±12.24
	SHR+n	113.60±10.68	18.24±3.77	33.35±5.86	62.98±10.71

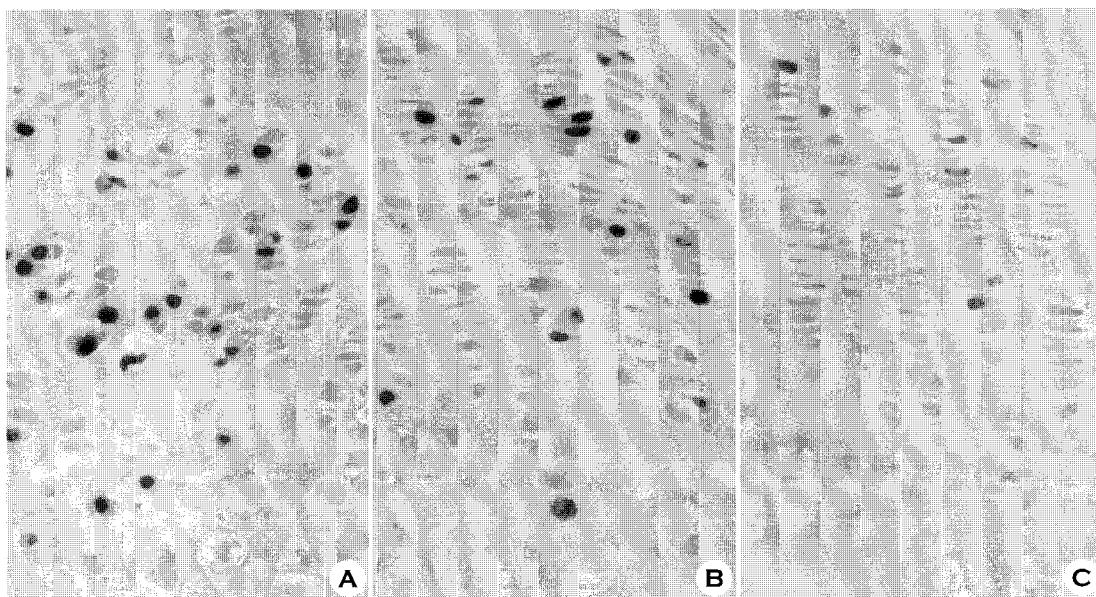
WKY: Wister-Kyoto rat

SHR-n: SHR without evidence of ischemic necrosis of epiphysis

SHR+n: SHR with evidence of ischemic necrosis of epiphysis



**Figure 3.** Femoral head of 9 weeks old rat ( $\times 40$ , Hematoxylin and Eosin) (A) 9 weeks WKY, (B) 9 weeks SHR-n, (C) 9 weeks SHR+n



**Figure 4.** Findings of BrdU immunohistochemistry ( $\times 100$ ). (A) 9 weeks WKY, (B) 9 weeks SHR-n, (C) 9 weeks SHR+n

WKY군 보다 골성장판의 길이가 짧았고, 각 부위별 관찰시 정지대의 경우 SHR-n군 및 SHR+n군이 WKY군에서 보다 현저하게 길이가 감소하였으며 증식대 및 과성장대에서는 각 군 간의 큰 차이를 관찰할 수 없었다. 성장 후반인 15주, 18주의 골성장판 길이의 경우 SHR+n군에서 가장 짧았고 SHR-n군의 길이가 WKY군 보다 긴 것을 관찰하였다.

## 2. 세포증식능 측정

BrdU 양성 세포는 세포증식에 관여하는 증식대에서 관찰되었는데 (Figure 4, Table 2), 성장 초기인 6주 및 9주의 WKY군에서 가장 높은 세포증식률을

보였으며 SHR+n군에서 가장 낮은 세포증식도가 측정되었다. 주령이 늘어나면서 세포증식률은 세 군 모두에서 낮아지면서 18주째 세 군 간의 차이는 9~12%로 큰 차이를 보이지 않았다.

## 3. 세포고사를 측정

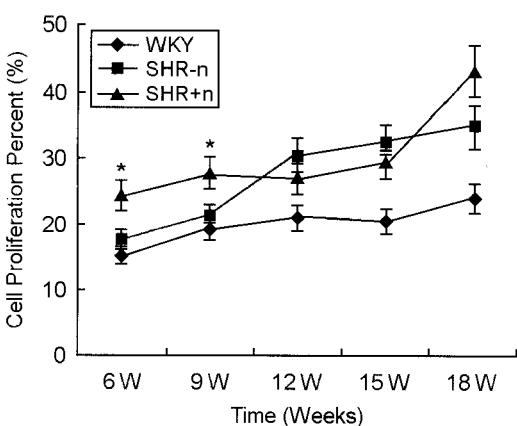
골성장판내 전체 세포 수에 대한 고사된 세포의 비율은 주령이 늘어날수록 높아졌으며 12주 이후부터는 전체 세포의 20% 이상에서 세포고사가 관찰되었다 (Table 3, Figure 5 and 6). 6주 때 세포고사를 의 경우 SHR+n군에서 가장 높은 고사율을 보였으며, 18주째 세 군 간 비교에서 각각 WKY군이

**Table 2.** Comparison of cellular proliferation between groups (unit: %, \*p<0.001)

		6 weeks	9 weeks	12 weeks	15 weeks	18 weeks
Proliferation zone	WKY	23.2±4.8	19.9±2.4	15.2±5.5	12.6±9.6	12.0±5.8
	SHR-n	20.7±6.4	19.0±7.9	15.3±5.2	11.7±8.4	11.5±6.7
	SHR+n	16.8±7.1*	13.4±5.7*	10.1±4.3	8.8±4.9	9.1±10.7

**Table 3.** Comparison of apoptosis between groups (unit: %, \*p<0.001)

		Total length	Resting zone	Proliferation zone	Hypertrophic zone
6 weeks	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
9 weeks	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
12 weeks	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
15 weeks	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
18 weeks	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

**Figure 5.** Comparison of apoptosis between groups ( $\times 100$ ) (\*p<0.001)

23.7%, SHR-n군이 34.7%, SHR+n군이 42.9%로서 폐사가 일어난 군에서 그렇지 않은 군 보다 2배 가까운 높은 세포고사율이 측정되었다. WKY군의 경우 주령이 늘어남에도 불구하고 과성장대의 세포고사율이 6주 때의 15.4%에서 18주의 23.7%로 증가는 있었으나 유의한 차이는 없었고, SHR+n군에서는 6주째 24%에서 18째 47%로 증가하였다. 한편 9주 째의 경우 WKY군, SHR-n군이 각각 19.4%, 20.9%, SHR+n군에서는 26.7%의 세포고사율을 보여 초기 6 내지 9주에 각 군 간의 유의한 길이차이를 보였다. 12주 이후의 성장 후반기 세 군 간의 비교 시 초기보다 차이가 뚜렷하지는 않았으나 18주령의 WKY군이 23.7%, SHR-n군이 34.7%로서 SHR+n군의 42.9%와 유의한 차이를 보였다.

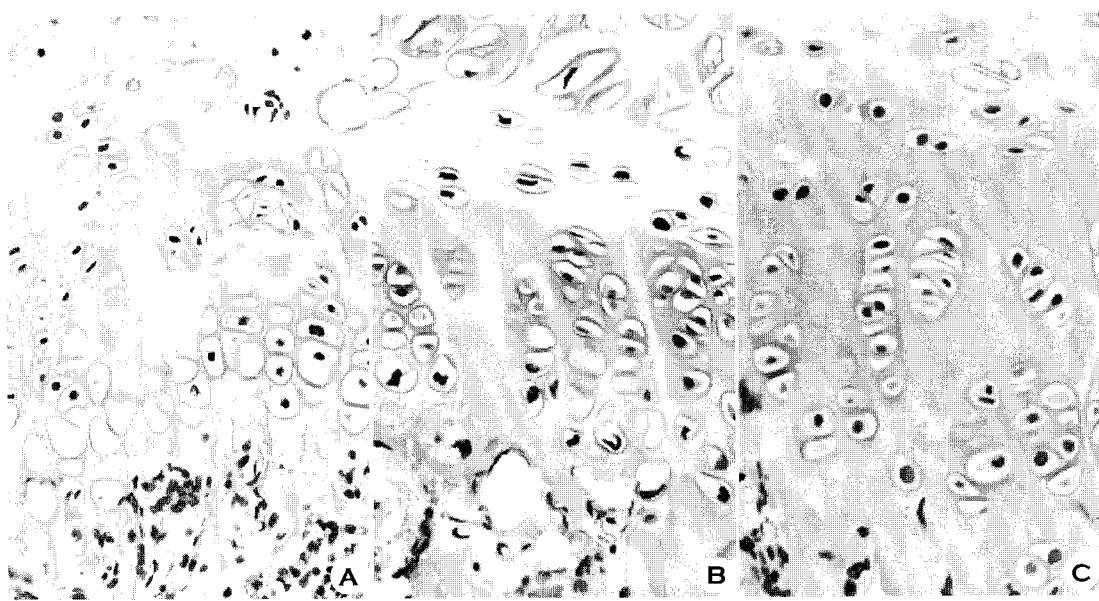


Figure 6. Findings of apoptosis ( $\times 100$ , TUNEL assay). (A) 9 weeks WKY, (B) 9 weeks SHR-n, (C) 9 weeks SHR+n

## 고 찰

골성장판은 크게 정지대 (resting zone), 증식대 (proliferation zone), 과성장대 (hypertrophic zone) 및 석회화대 (mineralizing zone)로 나뉜다<sup>12)</sup>. 정지대에서의 연골세포는 비 활성화된 납작한 형태의 연골 세포로서 증식을 위한 새로운 세포를 공급하며 증식대의 세포는 세포분열을 반복하고 둥근 형태로 성숙되면서 세포질의 부피를 증가시켜 성장판 내에서 수직적인 공간을 만드는 한편 세포와 기질을 생산하여 세포간의 거리가 멀어지면서 과성장대로 진행된다. 과성장대에서는 연골세포내 칼슘의 축적 및 방출, 기질의 석회화, 골간단부로부터의 신생혈관이 침투하면서 골화근원세포 (osteogenic precursor cells)의 유입과 더불어 세포고사를 거치고 골로 전환이 되어 길이성장을 한다. 골성장판은 이와 같은 전반적인 과정을 거치면서 연골세포의 증식, 과성장과 사멸에서 세포역동성을 나타낸다<sup>13~15)</sup>.

골성장판내 연골세포의 증식 및 과성장, 고사로의 전환에 대한 세포역동성을 인지하기 위한 여러 실험방법 중에서<sup>16)</sup> 본 연구에서는 세포증식을 측정하기 위한 BrdU 면역조직화학염색법과 세포고사를

관찰하기 위한 TUNEL assay를 수행하였다. 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU)은 세포분열과정 중 S phase에서 DNA 복제 시 thymidin에 치환되어 세포분열과정을 거쳐 표지되는 원리로 세포증식도의 측정에 이용되며, 본 연구에서는 쥐의 골성장판에서 세포주기가 24시간인 것을 참고로 하여<sup>17)</sup> 24시간 간격으로 2회 표지 하였으며 anti-BrdU를 이용한 면역조직화학적 검사로써 표지된 BrdU를 인지하여 증식된 세포를 측정하였다. 골성장판에서의 세포고사는 하부과성장대 (lower hypertrophic chondrocytes)에서 석회화 과정을 거치면서 골로 전환되는 과정 중 생리적으로 일어나는 세포 변화로써<sup>18,19)</sup> 골로 대치되는 정도를 인지할 수 있으며<sup>20)</sup>, 본 연구에서는 골화중심 내의 피사와 연관이 있을 수 있는 골성장판 내에서의 세포고사 정도를 알아보고자 하였다.

본 연구에서 WKY군과 SHR-n군에 비하여 SHR+n군에서의 골성장판의 길이는 유의하게 감소하였으며, 이러한 성장장애는 특히 성장 초기의 어린 주령인 6주의 증식대와 9주의 정지대에서 뚜렷하였다. 15, 18주에서는 6, 9, 12주에서와 동일하게 SHR+n군의 전체 골성장판 길이가 가장 짧으나 초반 6주, 9주에서보다 길이차이가 작은 것을 관찰하였으며 이는 성장과정에서 초반의 피사에 의한 골성장

판의 손상이 자연적으로 회복되어 가는 것으로 사료되었다. 또한 SHR-n군의 전체 골성장판 길이가 WKY군 보다 긴 것을 관찰할 수 있었으며 이는 과성장대의 길이의 증가에 의한 것으로 관찰되었다. WKY군에서도 역시 15주째부터 과성장대의 길이 증가를 보였으나, WKY군 보다 SHR-n군에서의 과성장대의 길이 증가가 뚜렷하였다. 과성장대의 길이가 골성장판의 성장률과 비례한다는 보고도 있었으나 본 연구의 경우 골간단부로부터의 신생혈관생성과 혈액공급의 지연으로 인해 골화유도물질 및 골화근원세포의 유입이 결여되어 연골세포가 골로 대치되지 못하고 적체되어 길이가 증가 되는 것으로 추정되었다. 또한 WKY군과 SHR-n군의 경우 15주째부터 과성장대의 길이 증가를 보이는데 반해 SHR+n군에서는 18주째부터 길이증가를 보였으며 이는 성장초기의 허혈성 변화에 기인하였던 것으로 생각된다.

BrdU 면역조직화학염색법으로 관찰한 세포증식도 측정의 경우, SHR군에서 WKY군 보다 낮은 세포증식율을 보여 SHR군에서 WKY군에서 보다 성장이 지연됨을 관찰하였으며, 초반 6, 9주령에서 SHR+n군이 SHR-n 및 WKY군에 비해 낮은 세포증식도를 보여 골단 괴사가 초기 골성장판의 세포증식에도 영향을 미침을 시사 하였다. TUNEL assay는 세포고사에 의한 DNA절편 이외에도 다른 요인에 대한 DNA 손상 역시 인지하여 세포고사만을 정량하기에는 부정확한 결과를 얻을 가능성이 있는 단점에도 불구하고 세포고사를 표지하는 최적의 방법으로 이용되고 있다. 세포고사가 골성장판에서 일어나는 비율을 관찰한 결과, 6주 및 9주째의 SHR+n군에서 WKY군 및 SHR-n군에서 보다 빈번한 세포고사가 일어남을 관찰하였고, 성장 후기인 18주령 SHR+n군의 세포고사율이 47.8%로 측정되어 23.7%인 WKY군에서 보다 두 배에 가까운 높은 세포고사율을 나타내었다. 이는 골성장판의 하부과성장대에서 골로 대치되는 과정 중 특이적으로 발생하는 경상적인 세포고사가 골단 혹은 이차골화중심의 괴사에 의한 과정에 의해서도 비정상적으로 발생할 수 있음을 시사 한다고 할 수 있으며, 세포고사와 골성장판의 길이 사이에는 서로 반비례하는 단순 상관관계가 아니라 보다 많은 다른 요인에 의해 변

화할 수 있음을 의미한다.

## 결 론

6, 9, 12, 15, 18주령의 자발성 고혈압 흰쥐를 광학현미경상 골단에 괴사가 있는 군 (SHR+n)과 괴사가 없는 군 (SHR-n)으로 나눈 뒤 대조군인 WKY 군과 비교한 결과, SHR+n군은 WKY군 및 SHR-n 군에서 보다 유의한 골성장판 길이의 감소, 낮은 세포증식도 및 높은 세포고사도를 보였으며 이는 대퇴골두 골단의 괴사에 동반하여 골성장판에서의 성장장애가 일어날 수 있음을 시사 하였다.

## 참 고 문 헌

- 1) Ponseti IV, Maynard JA, Weinstein SL, Ippolito EG, Pous JG. *Legg-Calvé-Perthes Disease. Histochemical and ultrastructural observations of the epiphyseal cartilage and physis.* J Bone Joint Surg Am 65: 797-807, 1983
- 2) Oda J, Hirano T, Iwasaki K, Majima R. *Vascular occlusion and cartilage disorders in osteonecrosis of the femoral head in rats.* Int Orthopaedics 20: 185-189, 1996
- 3) Kim HT, Wenger DR. "Functional retroversion" of the femoral head in Legg-Calvé-Perthes disease and epiphyseal dysplasia; analysis of head-neck deformity and its effect on limb position using three-dimensional computed tomography. J Pediatric Orthopaedics 17: 247-254, 1997
- 4) Wenger DR, Ezaki M. *Bilateral femoral head collapse in an adolescent with brachydactyly (multiple epiphyseal dysplasia tarda type Ic).* J Pediatr Orthop 1: 267-271, 1981
- 5) Catterall A, Pringle J, Byers PD, Fulford GE, Kemp HB, Dolman CR, et al. *A review of the morphology of Perthes' disease.* J Bone Joint Surg Br 64: 269-275, 1982
- 6) Kim HK, Su PH, Qiu YS. *Histopathologic changes in growth-plate cartilage following ischemic necrosis of the capital femoral epiphysis. An experimental*

- investigation in immature pigs. J Bone Joint Surg Am* 83: 688-697, 2001
- 7) Hirano T, Majima R, Yoshida G, Iwasaki K. *Characteristics of blood vessels feeding the femoral head liable to osteonecrosis in spontaneously hypertensive rats. Calcif Tissue Int* 58: 201-205, 1996
  - 8) 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
  - 9) Hirano T, Iwasaki K, Oda J, Kumashiro T. *Osteonecrosis of the femoral head in spontaneously hypertensive rats. Acta Orthop Scand* 63: 37-40, 1992
  - 10) Iwasaki K, Hirano T. *Osteonecrosis and ossification disturbance of the femoral head in spontaneously hypertensive rats. J Jpn Orthop Assoc* 62: 1003-1010, 1988
  - 11) 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
  - 12) Farnum C, Wilsman N. *Chondrocyte kinetics in the growth plate The growth plate, ISO press, Amsterdam Vol 54:* 245-257, 2002
  - 13) Gibson G. *Active role of chondrocyte Apoptosis in Endochondral ossification. Microscopy research and technique* 43: 191-204, 1998
  - 14) Roach HI, Clarke NM. "Cell paralysis" as an intermediate stage in the programmed cell death of epiphyseal chondrocytes during development. *J Bone Mineral Res* 14: 1367-1378, 1999
  - 15) Zenmyo M, Komiya S, Kawabata R, Sasaguri Y, Inoue A, Morimatsu M. *Morphological and biochemical evidence for apoptosis in the terminal hypertrophic chondrocytes of the growth plate. J Pathol* 180: 430-433, 1996
  - 16) Farnum CE, Wilsman NJ. *Determination of proliferative characteristics of growth plate chondrocyte by labeling with bromodeoxyuridine. Calcified Tissue Int* 52: 110-119, 1993
  - 17) Wilsman NJ, Farnum CE, Green EM, Lieberman EM, Clayton MK. *Cell cycle analysis of proliferative zone chondrocytes in growth plates elongating at different rates. J Orthopaedic Res* 14: 562-572, 1996
  - 18) Nagata S. *Apoptosis by death factor. Cell* 88: 355-365, 1997
  - 19) Farnum CE, Wilsman NJ. *Cellular turnover at the chondro-osseous junction of growth plate cartilage: analysis by serial sections at the light microscopical level. J Orthop Res* 7: 564-566, 1989
  - 20) Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. *VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. Nat Med* 5: 623-628, 1999