대한정형외과연구학회지 제 6 권 제 2 호
J. of Korean Orthopaedic Research Society
Volume 6, Number 2, October, 2003

두부 손상이 골절 치유 촉진 시 동물 모델 및 유전자 발현 분석

연세대학교 BK 의과학대학원, 연세대학교 의과대학 정형외과학교실*

김경희 · 김학선* · 문성환* · 김 향 · 권언혜 · 이환모* · 박희완* · 한수봉* · 문은수*

= Abstract =

Animal Model and Gene Expression Analysis During the Accelerated Fracture Healing in Traumatic Brain Injury

Kyung-Hee Kim, MSc, Hak-Sun Kim, M.D.*, Sung-Hwan Moon, M.D.*, Hyang Kim, MSc, Uhn-Hae Kwon, MBc, Hwan-Mo Lee, M.D.*, Hui-Wan Park, M.D.*, Soo-Bong Hahn, M.D.*, and Eun-Su Moon, M.D.*

*BK21 Graduate School of Medicine, Yonsei University, Department of Orthopaedics Surgery, School of Medicine, Yonsei University**

Purpose: This study was performed to create a traumatic brain injury (TBI) animal model of up-regulated bone formation, and to show the possibility of comprehensive analysis of early gene expression from the hard tissue by cDNA microarray technique.

Materials and Methods: Thirty Sprague-Dawley rats underwent either a severe brain injury operation procedure using the water pump with femur fracture (Group I, N=15), or femur frecture only (group II, N=15). The femur was nailed with a 20-gauge needle and fractured. The rats were euthanized at the day 1, 3, 8, 14, and 28 day. The volume of callus was calculated using GE PACS®. The total RNA was isolated from the 3rd day's callus and the gene expression was compared using microarray chips.

Results: The average time until union was 28 days for control group and 14 days for TBI group, which was significantly shorter. The volume of the callus (27.4±8.5 mm^2) in the TBI animals was clearly greater than that of the control group (13.0±6.3 mm^2). The mRNA was successfully extracted from the callus and analysed using the c-DNA microarray, and. 312 genes were significantly increased and 227 genes were decreased in the TBI group.

Conclusion: This study successfully made a model for a accelerated fracture healing in traumatic brain

※ **통신저자: 김 학 선**
서울시 강남구 도곡동 146-92
영동세브란스병원 정형외과교실
TEL: 02) 3497-3411 FAX: 02) 573-5393 E-mail: haksunkim@yumc.yonsei.ac.kr

* 이 연구는 연세대학교 장기해외 연수 교수 연구비 지원을 받았음.

injury. We showed that cDNA microarray technique can be used to compare the expression of the mRNA in fracture callus. This method will be helpful in analysing the mechanism of accelerated fracture healing after brain injury.

Key Words: Traumatic brain injury, Fracture healing, cDNA microarray

서 론

외상성 손상의 기질 대사 작용 변화는 호르몬의 분비, 순환과 호흡작용, 면역반응[15] 등의 많은 생리적 변화를 초래하나, 복잡한 반응 매개체들은 아직 완벽히 보고되지 않았다. 장골 혹은 관절의 골절 등과 동반된 외상성 두부 손상 (traumatic brain injury, TBI)에서는 특히 항진된 골화의 특별한 현상을 자주 나타낸다고 보고되었다[3].

두부 손상이 있는 환자들은 그렇지 않은 환자보다 골절 치료 속도가 빠르고 과도한 가골 을 형성한다고 보고되고 있다[7,14,17,18]. 이렇게 빠른 치료 속도의 원인으로는 신경학적 원인과 두부 손상 시 분비되는 체액성 원인이라는 이론이 있다. 실제 두부손상이 있는 환자의 혈장이 백서의 골아 세포의 증식을 촉진한다는 보고도 있다[9,12,13]. 이는 두부 손상 시 골절 치유 능력의 증가에 미지의 요소가 어떠한 형태로든 존재함을 시사한다. 현재까지 이와 연관된 많은 노력과 연구가 있었으나, 아직 분자 생물학적 수준에서 증명되어진 바는 없다. 이제는 거의 모든 유전자가 밝혀진 post-genome 시대이며 이렇게 알려진 유전자 지도를 이용하여 유전자를 검색할 수 있는 보상 디옥시리보핵산 검색법 (complementary DNA microarray: cDNA microarray)이란 기술이 개발되어 분자 생물학계에 큰 영향을 미치고 있으므로, 이 방법을 이용하여 상기한 외상성 뇌 손상 시 골절 촉진 인자를 찾는데 사용하면 효과적일 것으로 사료된다. 그러나, 보상 디옥시리보핵산 검색법을 사용하기 위해서는 먼저 인간에게 일어나는 것과 동일한 동물 모델을 만들어야하고 이 동물 모델에서 인간과 같은 현상, 즉 외상성 두부 손상이 골절 치유를 촉진시킴이 일어남을 증명해야 하나 아직 보고된 동물 모델은 없다. 그 동안 골절의 치유를 연구하기 위해, 많은 동물 모델들이 제시되어 왔으며, Bonnarens 과 Einhorn은[2,6] 백서의 대퇴골에 금속 핀을 삽입후 일정한 높이에서 금속 추를 떨어뜨리는 기계를 고안 후 이를 이용한 쥐의 대퇴골 골절 모델을 만들었다. 그 후 Perkins등[14] 도 그 모델의 유용성을 보고하였다. 두부 손상을 일정량 주는 동물 모델은 그 동안 추 낙하에 의한 모델이 이용되어 왔으나, 최근 수압을 이용하여[4] 일정량의 뇌 손상을 정량적으로 주는 방법이, 정확성과 재연성이 높은 것으로 인정되어 사용되고 있다. 따라서 이들 두 가지 방법을 접목하여 정량적이고, 재연성이 뛰어난 외상성 두부 손상과 장골 골절의 동물 모델을 만들 수 있을 것으로 사료된다.

이 연구의 목적은 골 형성이 촉진되는 외상성 두부 손상 동물 모델을 만들어 그의 재연성을 확인하고, 여기에 보상 디옥시리보핵산 검색법을 접목시키어서 두부 손상이 없는 쥐와 두부 손상이 있는 쥐에서 골절 치유 시 유전자 발현 양상을 분석할수 있음을 증명하여, 이 과정의 기전을 밝히고, 나아가서 골절 유합 촉진 인자를 찾는데 기초적인 도움이 되고자 한다.

대상 및 방법

1. 골절 유합이 촉진되는 두부 손상 동물 모델

동물 실험 위원회의 승인을 얻은 후 면역학적으로 이상 없는 30마리의 생후 8개월 이상 몸무게 280~350 gm 암컷 Sprague-Dawley (S/D) 백서를 이용하였다. 백서 30마리를 15마리씩 두 군으로 나누어, 대조군 15마리는 백서의 복강 내에 케타민 50 mg/ml을 0.5~0.7 ml 주입하여 전신 마취 시킨 다음 무균 조작 하에 수술을 시행하였다. 왼쪽 하지 고관절과 슬관절부 털을 깎은 후 10% Betadine으로 수술 부위를 소독하였다. 슬개골 직상에 약 0.5 cm 피부 절개를 하고 원위

Fig. 1. (**A**) This fracture apparatus was used to make the femur fracture. (**B**) The rat was applied for fracture.

대퇴 골수강안에 20게이지를 바늘을 골수강내 삽입하여 고정한다. 20게이지 주사 바늘로 고정된 대퇴골을 Bonnaren's[3]의 골절 장치의 동물 지지대 (Fig. 1A-B) 의 가운데에 놓는다. 높이 35 cm에서 무게 1 kg의 추를 떨어뜨려 대퇴골을 골절시킨다. 실험군 15마리도 대조군과 같은 방법으로 전신 마취 후, 외측 수압 두부 손상 (lateral fluid percussion injury) 을 주기 위해 무균조작 하에 두부를 면도한다. 이후 소독된 수술 기구를 이용하여 두부 두피 및 골막을 제거한후 두개골을 노출시킨다. 두개골을 0.9×0.9 cm 크기 드릴로 구멍을 뚫은 후 수압으로 뇌 손상을 주는 장치 (Dragonfly R&D HPD-1700, Muromachi, Japan)를 이용하여 0.83 cm의 호스 구멍을 통해 4.5~5 기압의 수압으로 백서 외측 뇌에 손상을 준다 (Fig. 2A-B). 이후 피부를 4-0 나일론를 이용하여 봉합하였다. 두부 손상 시술후 즉시 대조군과 동일하게 대퇴골 골절 수술을 하였다. 시술 후 수술한 사지는 외부에서 고정하지 않았으며, 동물은 사육장내에서 자유롭게 활동하도록 하였다.

2. 방사선 검사

각 군의 실험동물을 술후 제 1, 3, 8, 14, 28일에 시기별로 3마리씩 희생시키고 골절시킨 대퇴골을 채취하였다. 이 대퇴골을 먼저 단순 방사선 촬영기로 촬영하여 그의 영상을 GE PACS Pathspeed 8.1 (GE, Cambridge, MA) 소프트 웨어를 이용하여 가골의 대조군과 실험군의 방사선상 가골 형성량의 부피를 계산하였다 (Fig. 3-C).

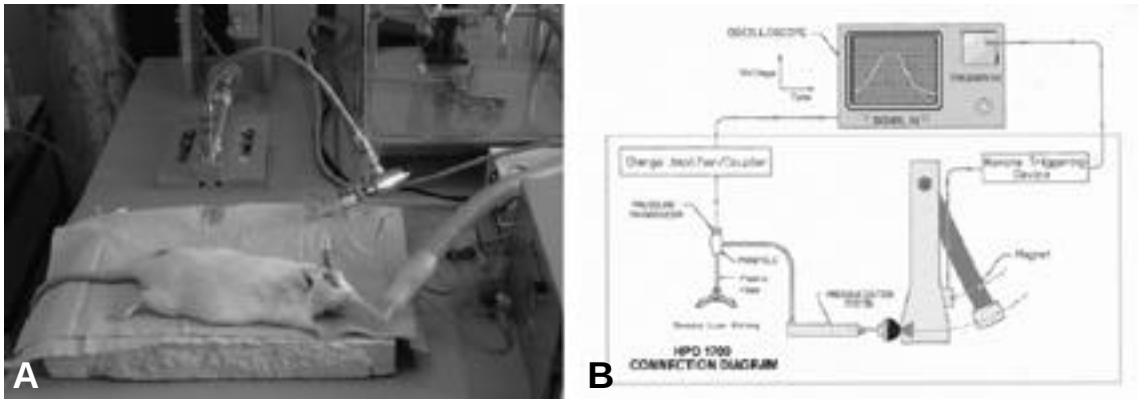

Fig. 2. (**A**) A craniotomy of 9 mm diameter was done over the right partial cortex. Fluid percussion injury was induced by hitting the piston with the pendulum, using the Dragon Fly fluid percussion device. (**B**) A scheme of device for the traumatic brain injury

3. 골절된 대퇴골에서의 RNA 추출

모든 리보핵산을 술후 3일된 대퇴골의 가골에서 추출했다. 추출된 대퇴골을 액체 질소를 채운 막자사발에 넣어 파우더 형태로 간다. 가루화 된 대퇴골을 녹기 전에 50 ml 원심분리 용기에 넣는다. TRIZOL (GibcoBRL, Gaithersburg, MD)용액을 대퇴골의 20배만큼 넣어준다.

조직 분쇄기 (homogenizer, Biospec Products, Bartleville, OK)를 이용하여 2분 동안 균질이 되게 한다. 4℃ 3000rpm에서 5분 동안 원심 분리한 다음 상층 액을 새 용기에 담는다. 50℃에서 10분 배양하고 1 ml 용기(eppendorf tube)로 옮겨준다. TRIZOL 1 ml당 0.2 ml의 클로로포름 을 첨가한 후 15초 동안 거칠게 흔들어 준다. 4℃ 15000rpm에서 15분 동안 원심 분리한다. 상층 액을 새 용기로 옮긴 후, 같은 양의 이소프로필 알콜을 첨가한 후 -70℃에서 20~30분 동안 배양한다. 4℃ 15000rpm에서 15분 동안 원심 분리한다. 상층 액을 깨끗이 제거한 후 200 μℓ 정제된 증류수를 첨가하고, 200 μℓ의 클로로포름-이소아밀알콜을 첨가한 후 4℃ 15000 rpm에서 10분 동안 원심 분리한다. 상층 액을 새 용기로 옮기고, 2배의 100% 에탄올과 1/10 양의 3M 쏘듐 아세테이트를 첨가한 후 4℃ 15000rpm에서 10분 원심분리 한다. 상층 액을 제거한 후 1 ml의 75% 에탄올을 첨가한 후 4℃ 15000rpm에서 5분 동안 원심 분리한다. 상층 액을 깨끗이 제거후 10분 동안 건조시킨다. 정제 증류수 30~50 μℓ를 첨가하여 자외선 판독기로 질과 양을 판독한 후 -70℃에 보관하였다.

4. cDNA microarray

모든 과정은 EZ-START™ kit manual (Genomic Tree, 대전, 대한민국)에 따라 실험하였다. 50 μg의 총 리보핵산을 이중 나선형의 디옥시 핵산으로 합성하기 위해 사용하였다. 리보핵산이 디옥시 핵산으로 역전사 되는 동안 cy3'-dUTP와 cy5'-dUTP(NEN)가 디옥시 핵산에 끼어 들게 된다.

cDNA에 0.1N NaOH 10 μℓ를 첨가해 42℃에서 10분간 반응 후 0.1N 염산 (Hcl)을 10 μℓ 첨가한다. 반응이 끝나면 각각의 생성물을 QIAGEN quick PCR purification kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)을 이용하여 정제하기 위해 500 μℓ 흡착 중화제 (binding buffer)를 각각의 용기에 첨가한 후 10초간 vortex후 잠깐 원심 분리한다. 이것을 column에 첨가한 후 13000rpm에서 30초간 원심 분리한다. 여기서 생성된 용액을 버리고, 세척 중화제 (washing buffer) 500 μℓ를 첨가해 13000rpm에서 30초간 원심 분리한 후 생성된 용액은 버린다. 최대 속도로 1분간 원심 분리하여 남아있는 세척 중화

Fig. 3. Plain radiography showed fractured femur 2 weeks after surgery. (**A**) The callus formation was minimal. (**B**) Lots of callus formation was observed. (**C**) The callus was measured using the GE PACS Speed 8.1 version

제를 완전히 제거한다. 여기에 100 μℓ 세척 중화제를 넣어 2분간 실내 온도에서 반응 후 13000rpm에서 1분간 원심 분리하여 세척한다. 두 개의 탐침 (probe)를 섞은 다음 human cotI DNA, polyA RNA, yeast tRNA와 TE 완충용액을 첨가한다. 섞은 탐침를 Micro-30 tube (Millipore, Bedore, MA, USA)에 넣어 50 염기 (base) 이하의 핵산(nucleotide)로 만들을 파괴시킨다. 원하는 량 (32 μℓ~64 μℓ)을 상층에 얻을 때까지 13000rpm에서 7분 동안 원심 분리한다. 새 용기로 옮긴 후 20x SSC 용액과 10% SDS 용액을 첨가한 후 100℃에서 2분간 변성시킨다. 13000rpm에서 2분간 원심 분리 후 이 디옥시 핵산(DNA)을 65℃에서 8시간 이상 16시간 이하로 약 5000개의 백서 유전자를 가진 쥐 보상 디옥시 핵산 칩과 보합반응(hybridization)시킨다. 보합반응이 끝나면 다양한 농도의 SSC 용액으로 세척한 후 형광 레이저 탐색장치 (fluorescent laser scanning device)를 이용하여 측정한다.

결 과

육안 검사에서 두부 손상을 준 군에서는 술 후 14일부터 풍부한 가골 형성과 실험자의 손으로 흔들어 보았을 때 미세 운동이 없이 유합 되었음을 알 수 있었다. 단순 방사선 촬영을 한 결과도 이와 동일하게 두부 손상이 있는 군에서 술후 14일부터 풍부한 가골의 형성을 볼 수 있었다 (Fig. 3-B). 반면에 두부 손상이 없는 대조 군에서는 육안 검사에 술 후 2주 이상이 경과되어야 육안으로 식별이 가능한 가골을 볼 수 있었고, 단순 방사선상 2주가 경과하여서도 아직 유합되지 않아서 골절 부위 간격이 아직 벌어져 있으며 소량의 가골 만이 생성됐음을 알 수 있었다 (Fig. 3-A). 이들 골절이 유합된 시기를 육안으로 판정한 골절된 대퇴골의 치유되는 평균시간은 실험 군에서

Table 1. The Amount of Callus Formation

Time to Euthanasia	1 day	3 days	8 days	14 days	28 days
Fracture with TBI*	0	0	3.1±2.4	6.1±4.7	27.4±8.5
Fracture onl(control)	0	0	0	2.7±1.8	13.0±6.3

* TBI: Traumatic Brain Injury

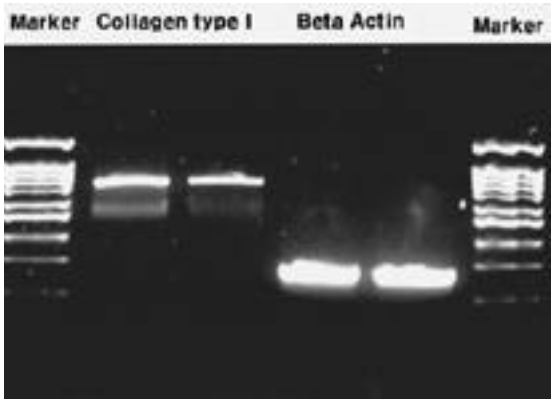

Fig. 4. Gel-electrophoresis analysis was performed using the PCR products with the rat fracture callus. Left and right columns are the 100 base pair (bp) marker. Second and third column is the 264 bp collagen type I. Fourth and fifth column are the 721 bp beta actin.

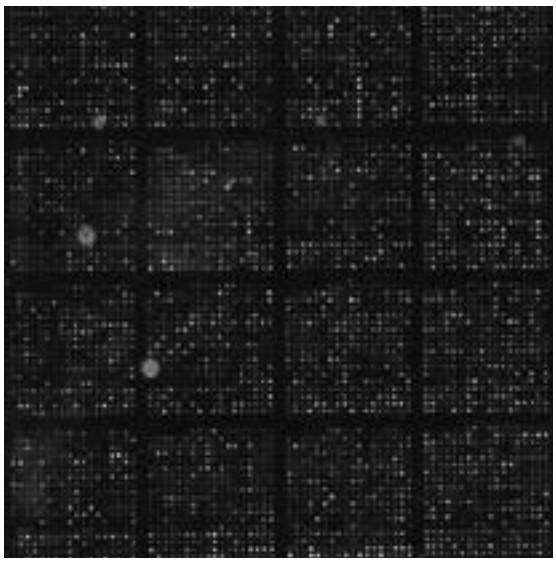

Fig. 5. Image of an rat gene typing cDNA microarray hybridized to labeled mRNA generated with brain injured rat callus.

14일, 대조 군에서 28 일으로 큰 차이가 있었다.

측면 방사선 사진에서 측정된 가골 량은, 두부 손상된 실험 군은 손상 후 8일부터 가골이 형성되기 시작하여 28일에는 27.4±8.5 mm^2의 많은 가골 형성을 볼 수 있다. 반면에 두부 손상 입지 않은 대조 군은 골절 후 14일 정도부터 가골 형성이 되기 시작했으나 2.7±1.8 mm^2으로써 실험군의 8일 후 가골인 3.1±2.4 mm^2보다 훨씬 작은 양이었다. 28일째 형성된 대조군의 가골의 양은 거의 최고 치에 이른 가골의 양을 형성한 실험군의 절반 정도인 13.0±6.3 mm^2에 불과하다. 대조군에서 형성된 가골은 실험군에 비해 훨씬 작은 증가폭을 나타내었다 (Table 1). 두부 손상 입은 동물에서 가골의 부피는 대조군보다 확실히 상당한 증가량을 나타냈고 두부 손상과 직접적인 연관이 있음을 시사한다.

리보핵산은 술후 3일된 대퇴골절 부위의 가골에서 추출하였다. 추출한 리보핵산의 질은 흡수률비 (Absorbance 260/280nm)가 1.7-1.9 이었으며, 량(quantity은 5 μg/μℓ 이었다. 이들 리보핵산의 질을 직접적으로 평가하기 위해 일반적으로 상존하는 유전자로 알려진 베타 액틴 (β actin)과 제 1형 콜라젠의 유전자를 효소 중합 반응 (polymerase chain reaction, PCR)로 확인하였다 (Fig. 4). cDNA microarray 결과 실험에 사용한 디옥시 핵산 칩 (rat cDNA chip)이 포함하고 있는 5000여 개의 백서의 유전자 중에서 실험 군이 대조 군에 비해서 R. norvegicus mRNA for pro alpha 1 collagenase 유전자 등 100배 이상 증가하는 312여 개의 유전자를 발견하였다. 이외에도 실험 군에서 대조 군보다 의미 있게 감소하는 Rat NADPH-cytochrome

Table 2. The Example of Down and Up-regulated mRNA in the Callus

	Gene Name	Log Ratio
Up regulated§		
	NADPH*-cytochrome P-450 oxidoreductase	3.7
	Neurofilament, heavy polypeptide	3.5
	Anti-acetylcholine receptor antibody	3.5
	R-norvegicus mRNA † for ADP ‡ ribosylation	3.4
Down regulated‖		
	Rattus norvegicus type I procollagen	-8.7
	Aargininosuccinate lyase	-6.5
	Rat liver mRNA for gap junction protein	-4.5
	Rat phosphorylase kinase	-4.5

*: Reduced form of Nicotinamide Adenine Diphosphate, †: Messenger Ribonucleic Acid,
‡: Adenosine Diphosphate
§Up regulated: Gene presentation is diminished on the TBI group compared with the control group
‖ Down regulated: Gene presentation is increased on the TBI group compared with the control group

P-450 oxidoreductase 등의 227 개의 유전자를 발견 할 수 있었다 (Fig. 5, Table 2).

고 찰

두부 손상을 동반한 골절환자에서 단순 골절환자에 비해 치유과정 중 가골이 과도하게 생성되고, 또한 이소 골 형성의 빈도가 매우 높다. Glenn 등[8]은 가골 형성이 풍부한 것은 두부 손상시에 골절부위에서의 근육 세동 등 미세 운동이 많은 것등의 신경계 장애에 의한 과도한 가골의 형성이 원인으로 생각했다. Binder 등[1]은 두부 손상이 있는 환자의 혈장에 백서의 골아 세포의 증식을 촉진하고 뼈를 만드는 것을 보고함으로써 두부 손상 시 골절 치유 능력의 증가에 어떤 체액성 요소가 관여함을 주장하였다. Klein 등[11]은 실제로 두부 손상을 준 쥐의 혈장으로 쥐의 골아 세포를 배양한 실험에서도 뼈 형성이 촉진됨을 보고하였다.

저자들은 두부 손상 환자의 과잉 가골 형성과 빠른 골 유합 기전에 미지의 체액성 요소 또는 국소의 알려지지 않은 요소가 관여한다는 가설 하에 실험을 시행하였다. 현재까지 백서를 이용한 골절과 두부손상 모델은 정립되지 않아서, 먼저 두부 손상 시에 골절 치유가 촉진되고, 가골의 형성이 많은 동물의 모델을 만들었다. 저자들은 Bonarrens 과 Einhorn[2,6]이 제작한 골절장치를 이용하여 백서 골절 모델과 수압을 이용하여 심각한 두부 손상을 주는 백서 뇌 손상 모델을 제시하였다. 실험에서 조건을 만족시키기 위해 백서에게 가능한 많은 두부 손상을 주고 생존을 시키어야 했다. 예비 실험에서 1~2 기압의 경증의 뇌 손상을 준 경우 백서에서는 혼수 상태가 없이 1~2 시간 안에 거의 모든 운동이 정상으로 돌아 왔으며, 골절 치유에 영향이 적었다. 이에 비해서 4~5 기압으로 양측 뇌에 손상을 준 경우는 치사율이 90%로 거의 생존하는 동물이 매우 적었다. 이러한 여러 예비 실험 후에 한 측 뇌에서 심한 수압의 충격을 주어서 4.5~5 기압의 수압으로 손상을 주면 약 20 % 정도가 사망하고, 약 80% 생존하였으며, 그 결과는 골절 치유가 촉진되는 실험에 적합한 동물 모델을 만들 수 있었다. 저자들이 문헌 고찰을 한 바에 따르면, 이렇게 두부 손상의 기압 숫자 및 부위를 명기한 동물 모델의 제시는 저자들이 처음으로 생각된다.

두부 손상이 골절과 동반 시 골절 유합 속도가 빠르고, 가골량이 많음은 많은 저자가 보고하였다[1,7]. 이러한 현상은 골의 동종 효소인 alkaline phosphatase 의 활성도[19], 제 1형 프로콜라젠의 c-terminal peptide의 농도와[19] 직접적인 관련이

있으며, 이들의 수치가 2달 후의 골화 정도를 예측할 수 있다 하였다. 이러한 현상의 원인으로 Binder 등[1]은 두부 손상 후에 어떠한 체액성 요소가 골화를 촉진시킨다고 하였으며, 실제 두부 손상 환자의 혈장이 백서의 골아 세포의 성장을 촉진함을 보고하였다. Klein 등[11]은 비슷한 실험을 다시 시행하여 골아 세포의 활성도를 증가시킴은 두부 수상 후 48 시간 안의 혈장에만 존재한다고 하였다. 최근 Wildburger 등[19]은 두부 손상과 골절이 같이 있는 환자에서만 insuline like growth factor 1 이 증가함을 근거로 이 성장 호르몬의 역할이 중요하다고 하였다. 그러나 이들 연구는 골절 치유 촉진과 가골 형성의 증가에 동반하는 하나의 호르몬, 성장 인자를 대상으로 한 결과이므로 전체적인 기전을 추론하기는 어렵다.

최근 보상 디옥시리보핵산 검색법이란 기술이 개발되어 분자 생물학계에 큰 영향을 미치고 있으며, 이 기술은 수천 - 수만 개의 유전자의 발현 양상을 한번의 실험으로 얻을 수 있다[5,10,16]. 기존의 리보핵산 수준에서 유전자 발현 양상을 분석하기 위해 대중적으로 사용되었던 방법인 노던 블럿 방법은 인체에 해로운 동위원소를 사용하고, 한번에 하나의 유전자만 검색이 가능하였으므로 기능을 모르는 유전자를 찾아내는 것은 사막에서 바늘을 찾는 것과 같았으나, 이 방법은 수천, 수만 개의 유전자를 한꺼번에 검색하므로 매우 유용할 것으로 인정되고 있다. 이제는 거의 모든 유전자가 밝혀진 post-genome 시대이며 이렇게 알려진 유전자 지도를 이용하여 유전자를 검색할 수 있는 cDNA microarray 방법을 상기한 외상성 뇌 손상 시 골절 촉진 인자를 확인하는데 사용하면 효과적일 것으로 사료된다. 이의 실제 사용을 위해 이 방법이 경성 조직인 골이나 가골에서도 mRNA 추출하여 실험이 가능함을 증명하여야 하는데, 본연구에서는 이러한 전 과장을 실제 가능함을 확인한 것이 의의가 있으며, cDNA microarray 기술을 사용하여 대조 군에 비하여 100배 이상 증가하는 312 개의 유전자와 감소하는 227 개의 유전자를 찾아내었다. 본 연구에서 사용한 유전자 칩이 백서의 26,000 여 개의 전체 유전자 대변하지는 못하였고, 사용한 칩 수가 적어서 증가하거나, 감소한 유전자의 통계학적 의미를 줄 수는 없었지만, 상기 현상의 기전을 밝히는데 새로운 방법을 제시하고 실험 방법의 가능성을 확인한데에 의미가 있다고 할 수 있겠다.

이 연구의 한계점은 가골 부에서 cDNA array 검사를 이용하여 유전자 검사를 하였으므로, 두부 손상 시 발생하는 호르몬이나 성장 인자를 직접 검사한 것이 아니고 이차적인 현상의 결과인 점과, 사용한 유전자 칩의 수가 적어서 좀더 유전자를 압축 못했고, 따라서 통계적 의미를 가지는 유전자 지도를 그릴 수 없는 점이므로 이 연구는 예비적 실험 보고라고 할 수 있을 것이다.

결 론

본 연구는 두부 손상 시 장골의 골절 치유가 촉진되는 것을 대변하는 모델을 만들었고, 두부손상과 골절치유에 관계된 이런 유전자들의 발현 양상을 cDNA microarray 가 가능함을 증명함으로써 두부 손상 시 골절치유의 초기단계에서 중요한 역할을 할 것이라 예상되어지는 특별한 유전자들을 분석할 수 있는 기초를 마련했다. .

REFERENCES

1) **Binder SM, Rubins IM, Desjardins JV, Zukor DJ and Glotzman D**: Evidence for a humoral mechanism for enhanced osteogenesis after head injury. *J Bone Joint Surg*, 72-A:1144-1149, 1990.
2) **Bonnarens F and Einhorn TA**: Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. J Orthop Res, 2:97-101, 1984.
3) **Clifton GL, Robertson CS, Grossman RG, Hodge S, Foltz R and Garza C**: The metabolic response to severe head injury. *J Neurosurg*. 60:687-696, 1984.
4) **DeRoss AL, Adams JE, Vane DW, Russell SJ, Terella AM and Wald SL**: Multiple head injuries in rats: Effects on behavior. *J Trauma*. 52:708-714, 2002.
5) **Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P and Trent JM**: Expression profiling using

cDNA *microarrays Nat Genet*. 21-S:10-14, 1999.

6) **Einhorn TA**: The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop*, 355-S:7-21, 1998.
7) **Garland DE and Toder L**: Fractures of the tibial diaphysis in adults with head injuries. *Clin Orthop*, 150:198-202, 1980.
8) **Glenn JN, Miner ME and Peltier LF**: The treatment of fractures of the femur in patients with head injuries. *J Trauma*, 13:958-961, 1973.
9) **Gospodarowicz D, Bialecki H and Greenburg G**: Purification of the fibroblast growth factor activity from bovine brain. *J Biol Chem*. 253:3736-3743, 1978.
10) **Khan J, Bittner ML, Chen Y, Meltzer PS and Trent JM**: DNA microarray technology: The anticipated impact on the study of human disease. *Biochim Biophys Acta*, 1423:17-28, 1999.
11) **Klein BY, Shohami E, Reikhinshtein Y, Ben-Bassat H and Liebergall M**: Serum-mediated osteogenic effects of head injury on cultured rat marrow stromal cells. *Calcif Tissue Int*, 65:217-222, 1999.
12) **Knauer DJ and Smith GL**: Inhibition of biological activity of multiplication-stimulating activity by binding to its carrier protein. *Proc Natl Acad Sci*, 77:7252-7256, 1980.
13) **Koutsilieris M, Rabbani SA and Goltzman D**: Effects of human prostatic mitogens on rat bone cells and fibroblasts. *J Endocrinol*, 115:447-454, 1987.
14) **Perkins R and Skirving AP**: Callus formation and the rate of healing of femoral fractures in patients with head injuries. *J Bone Joint Surg*, 69-B:521-524, 1987.
15) **Petersen SR, Jeevanandam M and Harrington T**: Is the metabolic response to injury different with or without severe head injury? Significance of plasma glutamine levels. *J Trauma*, 34:653-660, 1993.
16) **Seth A, Lee BK, Qi S and Vary CP**: Coordinate expression of novel genes during osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res*, 15:1683-1696, 2000.
17) **Smith R**: Head injury, fracture healing and callus. *J Bone Joint Surg*, 69-B:518-520, 1987.
18) **Spencer RF**: The effect of head injury on fracture healing. A quantitative assessment. *J Bone Joint Surg*, 69-B:525-528, 1987.
19) **Wildburger R, Zarkovic N, Dobnig H, Petek W and Hofer HP**: Post-traumatic dynamic change of carboxy-terminal propetide of type I procollagen, alkaline phosphatase and its enzyme as predictors for enhanced osteogenesis in patients with severe head injury. *Res Exp Med*, 194:247-259, 1994.