# 무부하 백서에서 열충격과 항산화물이 골성장판 및 관절연골세포에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의 학 과

박 재 현

# 무부하 백서에서 열충격과 항산화물이 골성장판 및 관절연골세포에 미치는 영향

지도 박 희 완 교수

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2004 년 12 월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

박 재 현

박재현의 박사학위 논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2004 년 12 월 일

# 감사의 글

본 논문이 완성되기까지 많이 부족한 저에게 자상하신 지도와 끊임없는 가르침으로 이끌어 주신 박희완 지도 교수님께 충심으로 감사드리며, 본 연구를 위하여 각별한 학문적인 조언을 아끼지 않으신 한창동 교수님, 서활 교수님, 육종인 교수님 및 김현우 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 또한, 바쁘신 중에도 정성스럽게 실험을 도와주신 연구원 공선영 선생님께도 깊은 고마움을 보냅니다.

변함없는 격려와 깊은 배려로 항상 힘이 되어 주신 어머님과 장인, 장모님께 감사의 마음을 올립니다. 끝으로 인생을 함께 일구어 나갈 사랑하는 아내와 딸 세연과 아들 성진에게 깊은 애정을 보내며 본 논문을 돌아가신 아버님 영전에 소중히 바칩니다.

저자 씀

# 차 례

국문요약 ..... 1

Ⅰ. 서론 ..... 3

II. 재료 및 방법 ..... 5

1. 실험방법 ..... 5

가. 하지현수법 ..... 5

나. 열충격 방법 ..... 6

다. 항산화제 투여 ..... 7

라. 실험동물 분류 ..... 7

2. 연구 방법 ..... 8

가. 세포증식능 연구 ..... 8

(1) 5-bromo-2′-deoxyuridin 주사 ..... 8

(2) BrdU 면역조직화학염색법 ..... 8

나. 골성장판 내 세포고사의 관찰(biotin nick end labeling TUNEL assay) ..... 9

다. Indianhedgehog(Ihh) 및 Heat shock protein(HSP) 면역조직화학염색 ..... 10

라. Microspectrophotometric assay ..... 10

마. 조직형태학적 계측 및 결과분석 ..... 11

III. 결과 ····· 11
1. 골성장판에서의 변화 ····· 11
가. 각 군별 골성장판 길이비교 ····· 11
나. BrdU 면역조직화학염색법을 통한 세포증식 관찰 ····· 13
다. 세포고사도 ····· 14
라. 열충격단백질 HSP 47/70 면역조직화학염색 ····· 15
마. Indian hedgehog(Ihh)의 발현 ····· 16
바. 혈관내피성장인자(VEGF)의 발현 ····· 17
IV. 고찰 ····· 20
V. 결론 ····· 24
참고문헌 ····· 25
영문요약 ····· 29

# 그림 차례

그림 1. 하지현수법 ..... 6
그림 2. 골성장판 길이 비교 ..... 12
그림 3. 골성장판의 세포증식도 비교 ..... 13
그림 4. 골성장판의 세포고사도 비교 ..... 14
그림 5. Heat Shock Protein 47의 발현 ..... 15
그림 6. Heat Shock Protein 70의 발현 ..... 16
그림 7. Indianhedgehog의 발현 ..... 17
그림 8. Vascular endothelial growth factor의 발현 ..... 18

# 표 차례

표 1. 실험동물 분류 ····· 8
표 2. 골성장판 길이 비교 ····· 12
표 3. 골성장판의 세포증식도 ····· 13
표 4. 골성장판의 세포고사도 ····· 14
표 5. 무부하군의 관절연골의 두께 ····· 19
표 6. 열충격 및 항산화제 처리한 군의 관절연골의 두께 ····· 19

국문요약


무부하 백서에서 열충격과 항산화물이
골성장판 및 관절연골세포에 미치는 영향

외상이나 여러 내·외과적 질환으로 인해 체중 부하가 감소되거나 결여되는 상황에 처할 경우 골격계에서는 골 량의 감소뿐 아니라 불가역적인 변화가 초래될 수 있다. 기존의 연구에서는 주로 체중부하 결여에 의한 골다공증 혹은 골소실과 관련된 피질골이나 해면골에서의 변화를 관찰하였으나 골의 재형성은 막내골화 뿐만 아니라 연골내골화에 의해서도 조절되므로 이에 관여하는 연골세포의 활성도 변화에 대한 연구가 필수적이다. 본 연구에서는 하중부하의 변화로 인한 연골세포의 세포활성도 변화를 관찰하고 골격계에 대한 부작용을 최소화하거나 기능 저하를 억제할 수 있는 하나의 대안으로 열충격과 항산화물의 역할을 알아보고자 하였다. 이를 위해 열충격이 연골세포의 활성 저하를 억제시키는 효과가 있는지를 검증하였고 항산화물의 추가적인 적용이 열충격과 더불어 골격계의 위축을 방지할 수 있는지를 조사하였으며, 열충격단백질 등의 발현 정도와 세포기능 간의 상관관계, 항산화물의 작용과 세포기능 간의 상관관계, 연골형성과 관계되는 여러 가지 단백질의 발현과 세포손상과의 관계 등을 분석함으로써 세포손상은 억제되면서 그 기능은 최대한 증가될 수 있는 조건을 찾고자 하였다.

각 군당 6주령의 흰쥐 6마리에 대해 tygon 튜빙을 등 피부에 고정한 후 꼬리를 고정하고 하지를 들어 올려 무부하 상태를 유도하는 하지현수 장치를 적용시켰다. 3주간 무부하 상태의 실험군Ⅰ(U-group), 3주 무부하 후 1주간 재부하시킨 실험군Ⅱ(R-group), 각각의 실험군Ⅰ과Ⅱ에 열충격을 처리한 실험군(U-HS-group, R-HS-group)과 항산화물을 투여한 실험군

(U-AO-group, R-AO-group), 열충격과 항산화물을 동시에 처리한 실험군(U-HSAO-group, R-HSAO-group), 그리고 실험기간 동안 체중부하에 전혀 변화를 주지 않은 동일 주령의 흰쥐를 대조군(C-group, CR-group)으로 하였다. 원위 대퇴골과 근위 경골을 포함한 슬관절 부위를 적출하고 통상적인 방법으로 조직슬라이드를 제작하여 BrdU, Indian hedgehog, Heat shock protein, vascular endothelial growth factor등 연골세포의 활성과 관련된 단백질에 대한 면역조직화학염색법 및 세포고사 측정을 위한 TUNEL assay와 관절연골의 변화를 보기위한 Microspectrophotometric assay를 수행하였다.

대조군과 비교 시 무부하군에서는 골성장판의 길이가 79.7%로 감소를 보였으며 단독으로 열충격 혹은 항산화물을 처리한 군에서는 골성장판의 길이 변화에 큰 차이 없었던 반면 열충격과 항산화물을 동시에 처리한 군에서는 대조군의 92%로 회복됨을 관찰하였다. 세포증식도의 경우(BrdU incorporation) 무부하군의 세포 증식도는 13.3%로 감소하였으며 단독으로 열충격 혹은 항산화물을 처리한 군에서는 큰 차이를 보이지 않은 반면, 열충격과 항산화제를 동시에 처리한 군에서는 18.9%의 세포증식도를 보여 세포 활성이 회복됨을 시사 하였다. Ihh, VEGF 면역조직화학염색 결과, 열충격과 항산화물을 동시에 처리한 군이 단독으로 처리한 군보다 발현정도가 대조군과 유사하였고, 열충격과 항산화물을 동시에 처리한 군에서 HSP 47, 70의 발현 정도와 연골의 두께가 가장 정상에 가까움을 관찰하였다.

위의 결과로 보아 무부하상태의 흰쥐에서 관찰되는 연골세포의 활성저하는 열충격과 항산화물을 동시에 처리하므로 써 회복됨을 관찰하였고, 향후 이의 기전에 대한 연구가 후행되어야 할 것으로 사료되었다.

---

핵심 되는 말 : 체중부하, 연골세포, 열충격, 항산화물

무부하 백서에서 열충격과 항산화물이
골성장판 및 관절연골세포에 미치는 영향

<지도교수 **박 희 완**>

연세대학교 대학원 의학과

**박 재 현**

## Ⅰ. 서 론

근육과 골격은 몸의 균형을 잡아주고 운동을 일으키는 하나의 통합기관 역할을 하며 그 중 하지의 반중력근(anti-gravity muscle)은 자세 유지를 위해 끊임없이 수축 활동을 하고 골격은 근육의 작용을 전달하는 지렛대 역할을 한다. 한편 체중 부하가 감소되거나 결여되는 상황에 처할 경우 신체는 더 이상 정상적인 하중 스트레스를 받지 않게 되고 하지의 근수축단백질과 골기질 소실에 의한 위축/약화현상(atrophy/weakness)이 발생한

다. 즉, 부하를 받지 않는 골에서는 골량이 감소되는 반면 정상적인 하중을 받는 골에서는 골량에 전혀 영향을 미치지 않는 것을 볼 수 있으며, 이를 조직형태학적(histomorphometric) 검사를 통해 조사해 보면 골형성세포(osteoblast) 수의 감소, 피질골(cortical bone)과 망상골(cancellous bone)의 골량(bone volume) 감소, 피질골(cortical bone)에서의 골막 미네랄(mineral) 형성 이상에 의한 골밀도 감소 등이 관찰된다[1-4]. 골형성의 저하는 골형성세포 및 골형성 간세포(osteogenic stem cells)의 증식, 성숙 및 활성도를 떨어뜨리는 기전에 의해 유발되는 것으로 알려져 있으며 골수에서 기원하는 간세포 수의 감소라든지 TGF-beta2, Insulin-like growth factor-2 및 osteopontin mRNA 발현의 저하 등이 관여한다고 한다[5].

이들 골격계에서의 변화는 외상이나 여러 내·외과적 질환으로 인해 침상안정을 요하는 경우, 휠체어에 의존하는 장애인, 자율신경실조증 혹은 활동력이 떨어진 노인들에서 흔히 나타나는 병적 현상으로서 이를 극복하여 운동하고자 할 경우 갑자기 걸리게 될 부하를 견디기 힘들고 이미 불가역적인(irreversible) 변화가 초래된 경우 이로 인한 합병증 및 장애는 매우 크다. 골격계는 운동유지를 위해 보조를 맞추며 활동하는데 운동계로서의 이러한 중요성에도 불구하고 부하 감소에 따른 기능위축에 대한 원인과 기전은 아직 정확히 밝혀진 바 없다. 특히 골격계의 경우, 이제까지는 주로 체중부하 결여에 의한 골다공증(osteoporosis) 혹은 골소실(bone loss)과 관련된 뼈에서의 변화를 관찰하는데 치우쳐 왔으며 실제로 동물 실험의 경우 인간보다 훨씬 빠른 골막내 골화(periosteal bone formation)를 보임으로 인해 그 실험결과를 해석하고 이를 임상적으로 이용하는데 많은 어려움을 내포하고 있다. 또한 골의 재형성(remodelling)은 막내골화(intramembranous bone formation) 뿐만 아니라 연골내 골화

(endochondral bone formation)에 의해 조절되므로 이들에 대한 연구가 필수적이다. 이와 같이 하중부하의 변화로 인한 신체의 병리현상과 그 적응과정을 충분히 이해함으로써 골격계에 대한 부작용을 최소화하거나 기능저하를 억제할 수 있는 치유방법(countermeasures)을 모색하는 것은 중요한 현안이라 할 수 있다.

현재까지 체중부하의 감소로 인한 운동기관의 기능 저하를 억제할 수 있는 치유방법으로써 현재까지 연구 되어온 방법으로는 전통적인 운동(훈련)요법(exercise therapy), 전기치료법(functional electrical stimulation), 호르몬요법(hormonal therapy, 예: growth hormone 투여) 등이 있으며[6,7], 최근에는 열충격(heat shock)이나 생리활성물질(bioactive materials)의 활용이 이러한 전통적 방법들에 대한 궁극적인 대안으로 주목받기 시작했다[8]. 세포가 열충격을 받게 되면 열충격단백질(heat shock protein, 예 HSP70 family) 발현이 유도되는데 선행 연구들에 의하면 무부하 상태에 노출되기 전 열충격(직장온도, cloacal temperature = ~41.6°C)을 겪은 쥐는 그렇지 못한 대조군에 비해 근위축이 현저히 줄어드는 것으로 알려져 있다[9,10]. 또한, 전반적으로 기계적 부하에 영향을 받는 골이 성장하고 재형성되는 과정에서 국소적인 열충격에 노출될 경우 뼈의 재흡수 및 새로운 골 형성이 선택적으로 활성화된다고 하였다[11]. 그러나 문제는 열충격에 노출될 경우 체내 대사율이 증가 된다는 사실이며 이는 세포내 활성산소(reactive oxygen species, ROS)의 생성을 증가시켜 세포의 손상 등 악영향을 미칠 가능성이 높아진다는 점이다[12]. 한편 이런 상황에서 항산화제(antioxidants)를 투여한 경우 세포 손상을 줄일 수 있어 무부하 상태에서의 조직의 손상과 위축을 완화하였다는 연구 보고도 있었다[13]. 이러한 결과들을 종합해 보면, 열충격이나 항산화제를 적용하는 것이 골격계세포의 활성을 유지하고 세포내 주요 단백질들과 세포막의 손상을 억제시키는 하

나의 대안이 될 수 있을 것이다. 본 연구에서는 첫째, 열충격이 골격계 연골세포의 활성 저하를 억제시키는 효과가 있는지를 검증하고자 하였고 둘째, 항산화제의 추가적인 적용이 열충격과 더불어 골격계의 위축 억제효과를 더욱 높일 수 있는 지를 조사하였으며, 이를 위해 열충격 단백질(heat shock protein) 등의 발현 정도와 세포기능 간의 상관관계, 항산화 작용과 세포기능 간의 상관관계, 그리고 골, 연골형성과 관계되는 여러 가지 단백질의 발현과 세포손상과의 관계 등을 분석함으로써 세포손상은 억제되면서 그 기능은 최대한 증가될 수 있는 조건을 찾고자하였다.

# Ⅱ. 재료 및 방법

## 1. 실험방법

### 가. 하지현수법

하지현수장치는 Nyhan 등[14]의 모델을 개량하여 흰쥐의 등과 꼬리를 고정하는 방법을 사용하였다. 이 장치는 흰쥐가 무부하를 경험하는 기간 동안 상지만을 이용하여 cage 안에서 자유로운 이동과 먹이섭취가 가능하도록 고안되었으며 흰쥐가 받는 스트레스를 최소화 하고자 하였다. 즉, 흰쥐의 하지를 들어 올려 무부하 상태로 만들기 위해 tygon 튜빙을 등의 피부에 고정한 후 테이프를 이용하여 꼬리를 고정하였다. 흰쥐에 연결된 튜빙은 하지현수장치의 구속 장치에 연결하였으며 기울기를 항상 일정하게 유지하도록 하였다(그림 1). 무부하 실험을 하고 있지 않은 대조군과 재부하

단계의 실험동물은 흰쥐용 사육 우리에 1마리씩 넣어 여러 마리를 함께 넣었을 때 흰쥐 사이에서 발생할 수 있는 문제점을 미연에 방지하였다.

그림 1. 하지현수법

## 나. 열충격 방법

41°C 온도 및 60~70%의 습도를 유지할 수 있는 chamber를 준비하고 해당 실험동물을 하지현수 상태에서 chamber 속에 넣어 매번 1시간 동안 열충격을 가하였다. thermocouple을 이용하여 열충격을 가하는 동안 직장 체온이 41.5°C 이상 올라가지 않도록 제한하였으며, 3주간의 하지현수 동안 각 실험동물에 적용할 열충격을 주 3회로 조절하였다.

### 다. 항산화제 투여

항산화제로는 비타민 E를 사용하였으며 매일 1회 투여하였다. 비타민 E의 투여는 Appell 등[13]의 방법을 수정하여 α-tocopherol acetate(60mg/kg body mass)를 10% polyoxyethylene hydrogenated caster oil 및 10% propylene glycerol (sodium citrate 완충액)에 용해시킨 뒤 체중의 0.5%에 해당되는 양(ml)을 취해 Zonde 주사기로 경구투여 하였다.

### 라. 실험동물 분류

각 군당 6주령의 Sprague-Dawley 흰쥐(100g 내외) 6마리씩을 대상으로 하였으며 하지현수법(그림 1)을 이용한 무부하(unloading) 및 재부하(reloading) 상황을 얻음으로써 하중부하의 변화 및 체액의 재분배를 유도하였다. 실험동물은 하지현수 상태로 3주 혹은 하지현수 후 재부하 상태를 경험하는 동안 열충격 및 항산화제의 투여방법 차이에 따라 다음과 같이 세분화하였다(표 1).

① 무부하(Unloading group)군 -- 3주간 무부하 상태의 개체들
② 재부하(Reloading group)군 -- 3주간 무부하 후, 1주간 재부하한 개체들
③ 열충격(heat shock group, HS)군 -- 무부하 3주간 일정 수준의 열충격을 가한 개체들
④ 항산화물투여(antioxidant group, AO)군 -- 무부하 3주간 일정 양의 항산화물을 투여한 개체들

⑤ 열충격-항산화제(HSAO)군 -- 무부하 3주간 열충격과 항산화물을 함께 적용한 개체들

⑥ 대조(Control, Control-reloading)군 -- 정상 체중 부하시킨 개체들

표 1. 실험동물 분류

| | Control | Unload / Reload | HS | AO | HSAO |
|---|---|---|---|---|---|
| Unloading | C group | Unloading 3W | Unloading + HS | Unloading + AO | Unloading + HSAO |
| Reloading | CR group | Reloading 1W | Reloading + HS | Reloading + AO | Reloadong + HSAO |

C-무부하군에 대한 대조군; CR-재부하군에 대한 대조군; Unloading-무부하군; Reloading-재부하군; HS-열충격처리; AO-항산화물처리; HSAO-열충격과 항산화물처리

## 2. 연구방법

에테르 흡입마취 하에 실험동물을 희생시키고 경골과 대퇴경부에서 절골술을 가하여 근위경골을 포함한 슬관절 부위를 적출하였다. 적출된 조직을 4% paraformaldehyde로 고정하고 2주간 10% ethylenediaminetetracetic acid(EDTA) 용액에서 탈회한 후 통상적인 방법으로 파라핀 포매 하였다. 4㎛ 두께로 자른 후 silane coating slide(MUTO PURE CHEMICALS CO., LTD, Japan)를 사용하여 고정하였으며 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 광학현미경 하에서 관찰하였다.

### 가. 세포증식능 연구

#### (1) 5-bromo-2'-deoxyuridin 주사

-20℃에서 보관된 5-bromo-2'-deoxyuridin(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㎎/㎏)하였다.

#### (2) BrdU 면역조직화학염색법

통상적인 방법으로 슬라이드를 제작하여 60℃ 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 불활성 시킨 후 proteinase K(SIGMA, St. Louis, MO, USA)로 10분간 조직을 반응시켰다. 2N HCl로 30분간 DNA변성 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 hematoxilin으로 대조염색을 수행하였으며 70, 90, 100% 에틸알코올에서 탈수하고 봉입(mounting)하여 광학현미경 하에서 관찰하였다. BrdU 면역조직화학검사상 양성인 세포는 각 슬라이드에서 임의로 세 부분을 지정하

여 80㎛ X 150㎛ 크기의 사각형내의 성장판 증식대(proliferation zone of growth plate)세포 수와 염색된 세포의 수를 측정하여 양성인 세포의 양성세포율을 계산하였다.

### 나. 골성장판내 세포고사의 관찰(biotin nick end labeling TUNEL assay)

각 조직슬라이드를 Tris-HCl용액(pH 8.0)에서 10분 동안 전처리 하고 20분간 proteinase K로 처리하였다. PBS 용액으로 수세 한 뒤 3% $H_2O_2$로 조직에 있는 peroxidase를 불활성 시킨 후 PBS로 다시 수세하였다. 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 deoxyuridin triphosphated(TdT, SIGMA, St. Louis, MO, USA) buffer에서 15분 간 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 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 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 봉입하였

다. TUNEL assay에 양성인 세포는 각 슬라이드에서 임의로 세 부분을 지정하여 80㎛ X 150㎛ 크기의 사각형내의 전체 세포 수와 염색된 세포의 수를 측정하고 전체세포에서의 양성인 세포에서 성장판의 각 위치별 세포의 양성세포율을 계산하였다.

다. Indianhedgehog(Ihh), Heat shock protein(HSP) 및 Vascular endothelial growth factor(VEGF) 면역조직화학염색

통상적인 방법으로 슬라이드를 제작하여 60℃ 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 불활성 시킨 후 blocking serum으로 실온에서 10분간 반응한 뒤, Heat Shock Protein 일차항체(HSP47, Stress gene, Victoria, Canada; HSP70, Zymed, San Francisco, CA, USA), Ihh 일차항체(Santa cruz, California, USA) 및 VEGF 일차항체(Santa cruz, California, USA)로 37℃ 에서 2시간 반응시켰다. Ihh 수행 시, hyaluronidase (Worthington chemical,)로 37℃에서 한 시간 동안 반응하여 epitope을 노출시킨 후 일차항체와 반응시켰다. Avidin-biotin(Zymed Histo Plus kit, San Francisco, CA, USA)방법을 이용하여 면역조직화학염색을 수행하였으며 blocking serum에서 일차항체 단계를 제외한 각 단계에서 PBS용액으로 수세하였다. 3,3'-diaminobenzidine(DAB, Vector laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA)으로 발색하고 Mayer's hematoxilin으로 대조염색을 수행하였고 70, 90, 100% 에틸알코올에서 탈수하고 봉입하여 광학현미경 하에서 관찰하였다.

### 라. Microspectrophotometric assay

조직샘플은 microspectrophotometer(MPV 3; Leitz Wetzlar, Wetzler, Germany)를 이용하여 정량하기 위해 실험군과 대조군의 슬라이드를 각각 Safranin-O 염색하였다. 연골에서 연골하골(subchondral bone)까지의 흡광도 spot 측정(spot diameter, 0.8um; 빛의 파장, 500nm)은 12.5nm 간격으로 수행하였으며, 정량화하는 위치는 단백다당(proteoglycan) 깊이 50㎛로 범위를 정하였고 실험동물 당 각각의 위치에서 2~3개의 sections을 정량화하였다. 연속된 50㎛층에서 비골화(non-ossifying)와 골화된 부위를 구분하여 염색정도를 계산하였다. Safranin-O 염색정도는 염색도와 연골의 두께에 따른 것과 그 부위의 단백다당의 양에 따라 정량되어졌으며, 비석회화와 석회화된 연골에서의 Safranin-O 염색정도 계산은 50㎛층의 위치에 따라서 분류하였고 비탈회된 연골과 탈회된 연골의 두께는 microspectrophotometric 정량으로 측정하였다.

### 마. 조직형태학적 계측 및 결과분석

무부하와 재부하 및 무부하와 재부하군에 각각 열충격, 항산화제를 단독으로 처리한 군 및 열충격과 항산화제를 동시에 처리한 군의 골성장판 전체의 길이와 정지대(resting zone), 증식대(proliferation zone) 및 과성장대(hypertrophic zone) 각각의 길이를 Imagepro® program을 이용하여 측정하였다. 모든 조직학적인 관찰은 임의로 네 부분을 선정하여 수직으로 전체길이를 측정하고 전체 길이에서 각 부위별 측정을 수행하였다. 세포의 증식도와 세포고사도의 비율을 전체 골성장판 및 각 부위별로 측정하였으며, 관절연골의 두께를 6부위로 나누어 측정하여 Wilcoxon signed rank

test를 이용하여 검증하였으며 P=0.05에서 통계학적 유의성을 결정하였다.

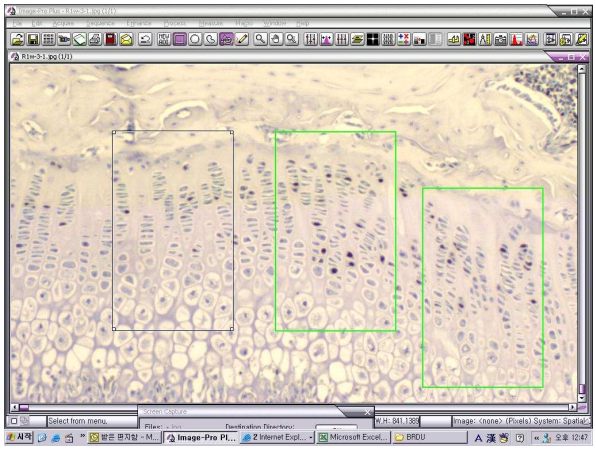

그림 2. 조직형태학적 계측

# Ⅲ. 결 과

## 1. 골성장판에서의 변화

### 가. 각 군별 골성장판의 길이(vertical height) 비교

실험기간 동안 각 군별 골성장판 길이 변화의 경우, 무부하군 및 재부하군은 각각의 대조군에서의 골성장판 전체길이(무부하 대조군; 382.9 ± 11.7㎛, 재부하 대조군; 324.5 ± 13.8㎛)보다 감소하여 각각 77.6㎛과 42.3㎛의 유의한 길이 차이를 보였으며, 단독으로 열충격을 가하거나 항산화제만을 투여한 군에서도 대조군과 유의한 길이 차이를 관찰하였다. 한편, 무부하 후 열충격과 항산화제 모두 투여한 군과 재부하 후 열충격과 항산화제를 모두 투여한

군에서의 골성장판은 길이 감소가 관찰된 다른 실험군들과는 달리 대조군과 유의한 차이가 없었다 (그림 2, 표 2).

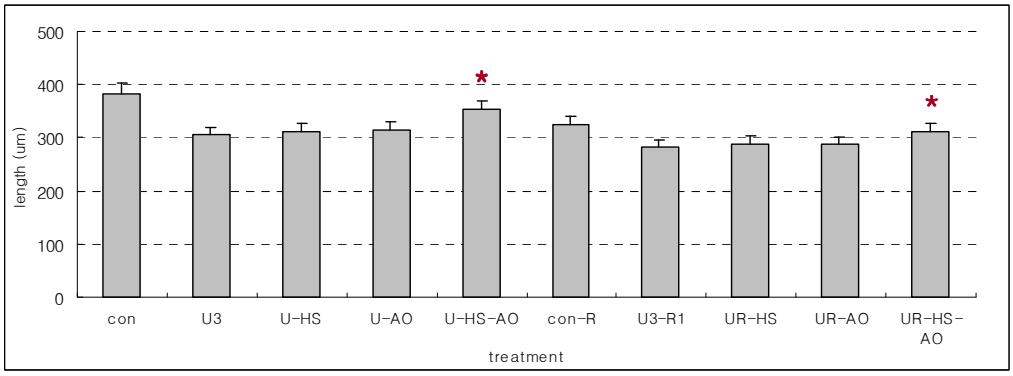


그림 2. 골성장판 길이 비교 (con; 대조군, U3; 무부하 3주군, U-HS; 무부하와 열충격처리군, U-AO; 무부하와 항산화물처리군, U-HS-AO; 무부하와 열충격, 항산화물을 모두 처리한 군, con-R; 대조군, U3-R1; 재부하군, UR-HS; 재부하와 열충격처리군, UR-AO; 재부하와 항산화물 리군, UR-HS-AO; 재부하와 열충격, 항산화물을 모두 처리한 군, *P<0.05)

표 2. 골성장판 길이 비교 (단위 : ㎛)

| | Control | Unloading3w/ Reloading1w | Heat Shock (HS) | Antioxidant (AO) | HS + AO |
|---|---|---|---|---|---|
| Unloading Group | 382.9 ± 11.7 | 305.3 ± 14.2 | 314.2 ± 12.3 | 312.7 ± 13.3 | 352.6 ± 12.7 |
| Reloading Group | 324.5 ± 13.8 | 282.2 ± 10.3 | 288.7 ± 9.8 | 286.9 ± 11.5 | 311.1 ± 7.9 |

## 나. BrdU 면역조직화학염색법을 통한 세포증식 관찰

세포증식을 의미하는 BrdU 양성 연골세포는 모든 군에서 성장판내의 증식대(proliferation zone)에서 관찰되었고, 대조군은 각각 22.9%와 15.1%의 양성세포율을 나타내었다. 한편 무부하 및 재부하군, 열충격 혹은 항산화물을 단독처리한 군들은 각각 13% 및 11%의 BrdU 양성세포율을 보여 대조군에 비해 각각 58.1%, 74.2%의 유의한 감소를 나타내었다. 그러나 열충격과 항산화제를 동시에 처리한 군의 경우 각각 대조군의 82.5%와 96.7% 수준으로 회복되었음을 관찰하였다(그림 3, 표 3).

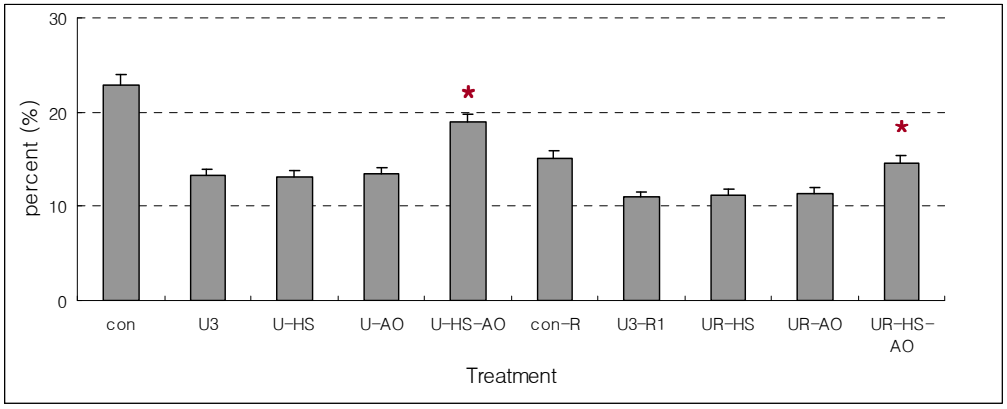


그림 3. 골성장판 세포증식률 비교 (con; 대조군, U3; 무부하 3주군, U-HS; 무부하와 열충격처리군, U-AO; 무부하와 항산화물처리군, U-HS-AO; 무부하와 열충격, 항산화물을 모두 처리한 군, con-R; 대조군, U3-R1; 재부하군, UR-HS; 재부하와 열충격처리군, UR-AO; 재부하와 항산화물 리군, UR-HS-AO; 재부하와 열충격, 항산화물을 모두 처리한 군, *P<0.05)

표 3. 골성장판의 세포증식도 (단위; %)

| | Control | Unloading3w/ Reloading1w | Heat Shock (HS) | Antioxidant (AO) | HS + AO |
|---|---|---|---|---|---|
| Unloading Group | 22.9 ±11.7 | 13.3 ± 14.2 | 13.1 ± 12.3 | 13.5 ± 13.3 | 18.9 ± 12.7 |
| Reloading Group | 15.1 ± 13.8 | 11 ± 10.3 | 11.2 ± 9.8 | 11.4 ± 11.5 | 14.6 ± 7.9 |

## 다. 세포고사도

각 대조군의 세포고사도 31.9%와 32.9% 와 비교하여 8개의 실험군에서의 세포고사율은 약 35% 전후로 측정되어 실험조건에 다른 유의한 차이는 관찰되지 않았다(그림 4, 표 4).

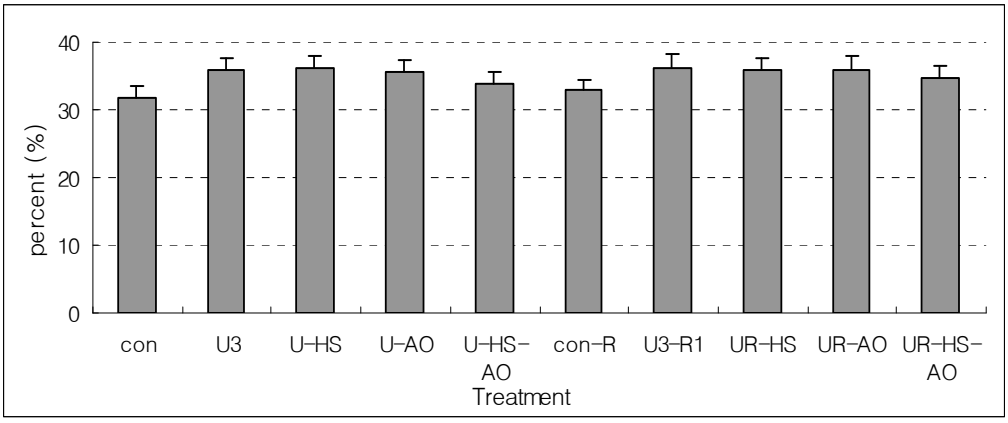


그림 4. 골성장판 세포고사도 비교 (con; 대조군, U3; 무부하 3주군, U-HS; 무부하와 열충격처리군, U-AO; 무부하와 항산화물처리군, U-HS-AO; 무부하와 열충격, 항산화물을 모두 처리한 군, con-R; 대조군, U3-R1; 재부하군, UR-HS; 재부하와 열충격처리군, UR-AO; 재부하와 항산화물 리군, UR-HS-AO; 재부하와 열충격, 항산화물을 모두 처리한 군, *P<0.05)

표 4. 골성장판의 세포고사도 (단위: % )

| | control | Unloading3w/ Reloading1w | Heat Shock (HS) | Antioxidant (AO) | HS + AO |
|---|---|---|---|---|---|
| Unloading Group | 31.9 ± 8.7 | 35.8 ± 10.2 | 36.1 ± 9.9 | 35.7 ± 11.4 | 33.9 ± 13.3 |
| Reloading Group | 32.9 ± 11.4 | 36.3 ± 9.6 | 35.9 ± 10.3 | 36.0 ± 10.5 | 34.8 ± 8.2 |

## 라. 열충격단백질 HSP 47/70 면역조직화학염색

HSP 47의 경우, 골성장판 내 증식대와 상부 과성장대(upper hypertrophic zone) 에서의 발현이 뚜렷하였으며 무부하군이 대조군에 비해 강한 발현 양상을 보였다. 재부하군 역시 대조군(control-reload group)보다 강하게 발현되었으며 무부하군에서 가장 강한 발현 양상을 나타내었다. 특히 단독으로 열충격을 가한 무부하군에서 두 개의 대조군에서 보다 강한 발현 양상이 관찰하였다.

HSP 70의 경우, 골성장판내 하부과성장대(lower hypertrophic zone)와 연골-골 접합부(cartilage-bone junction) 및 관절연골(articular cartilage)에서 주로 발현되었다. 또한 실험군보다는 각각의 대조군에서 강한 발현을 관찰하였으며 재부하군 및 재부하와 동시에 열충격 혹은 항산화제를 처리한 그룹에서는 약한 발현 양상이 관찰되었다. 또한 열충격과 항산화제를 동시에 처리한 군의 관절연골에서도 강한 발현이 관찰되었다(그림 5,6).

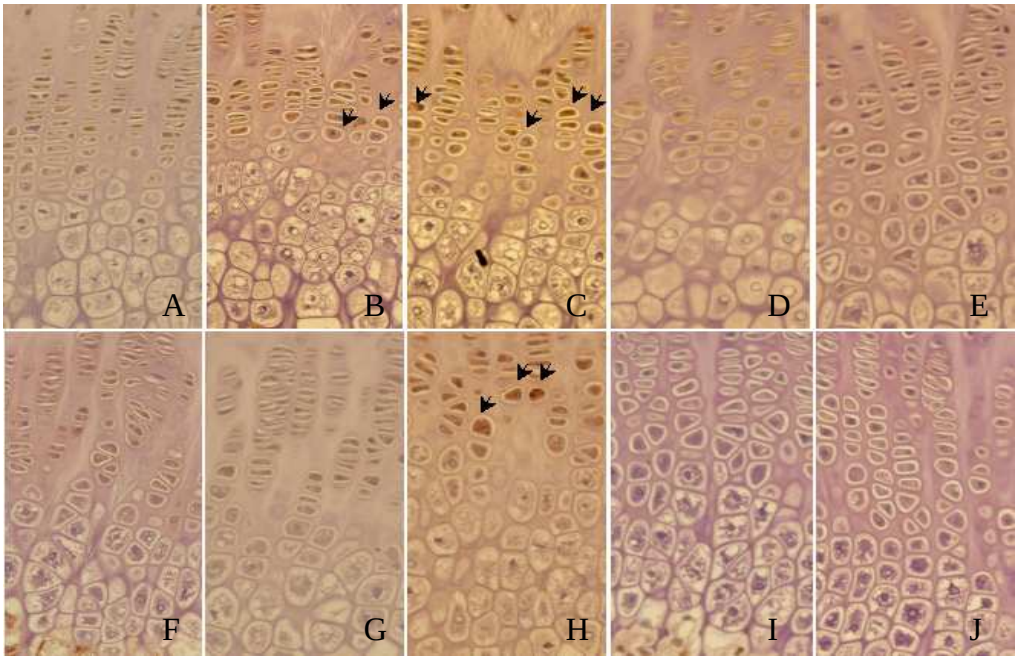


그림 5. Heat shock protein 47의 발현

(A-control group, 대조군; B-unloading group, 무부하군; C-heat shock group, 무부하와 열충격처리군; D-antioxidant group, 무부하군에 항산화물처리군; E-heat shock antioxidant group, 무부하군에 열충격과 항산화물을 모두 처리한 군; F-control reloading group, 대조군; G-reloading group, 재부하군; H-reloading heat shock group, 재부하에 열충격처리군; I-reloading antioxidant group, 재부하에 항산화물처리군; J-reloading heat shock antioxidant group, 재부하군에 열충격과 항산화물을 모두 처리한 군. ×20)

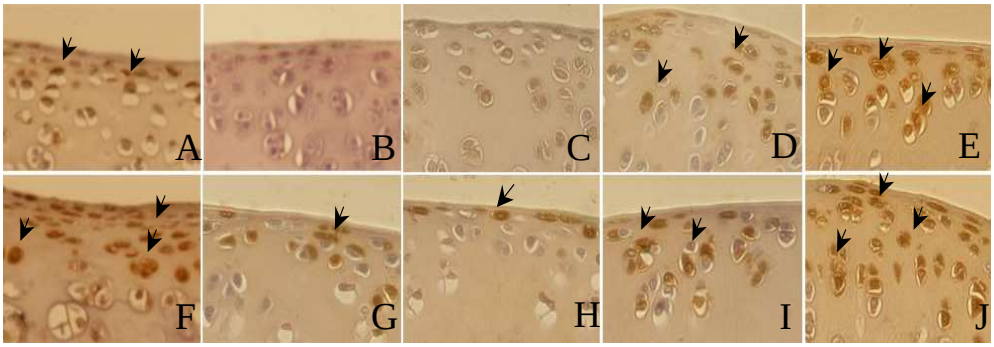


그림 6. Heat shock protein 70의 발현

(A-control group, 대조군; B-unloading group, 무부하군; C-heat shock group, 무부하와 열충격처리군; D-antioxidant group, 무부하군에 항산화물처리군; E-heat shock antioxidant group, 무부하군에 열충격과 항산화물을 모두 처리한 군; F-control reloading group, 대조군; G-reloading group, 재부하군; H-reloading heat shock group, 재부하에 열충격처리군; I-reloading antioxidant group, 재부하에 항산화물처리군; J-reloading heat shock antioxidant group, 재부하군에 열충격과 항산화물을 모두 처리한 군. ×20)

## 마. Indian hedgehog(Ihh)의 발현

Ihh는 골성장판내의 상부 과성장대에서 주로 발현되었으며 재부하군에서 보다는 무부하군에서의 발현정도가 낮았다. 각각의 대조군에서는 강한 발현을 관찰한 반면, 재부하군 및 재부하와 동시에 열충격 혹은 항산화물을 처리한 군에서는 약한 발현 양상이 관찰되었다. 또한 열충격과 항산화물을 동시에 처리한 군의 관절연골에서 강한 발현을 관찰하였다.

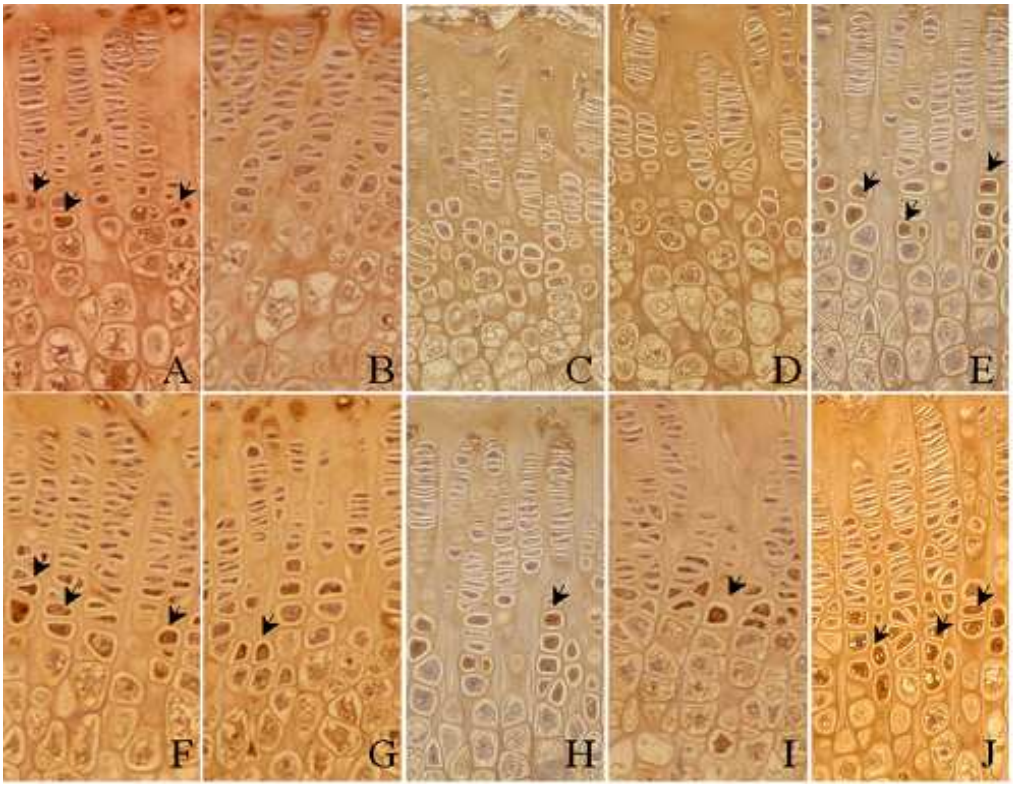


그림 7. Indianhedgehog의 발현

(A-control group, 대조군; B-unloading group, 무부하군; C-heat shock group, 무부하와 열충격처리군; D-antioxidant group, 무부하군에 항산화물처리군; E-heat shock antioxidant group, 무부하군에 열충격과 항산화물을 모두 처리한 군; F-control reloading group, 대조군; G-reloading group, 재부하군; H-reloading heat shock group, 재부하에 열충격처리군; I-reloading antioxidant group, 재부하에 항산화물처리군; J-reloading heat shock antioxidant group, 재부하군에 열충격과 항산화물을 모두 처리한 군. ×20)

바. 혈관내피성자인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF)의 발현

혈관내피성장인자는 골성장판 내 하부 과성장대의 가장 아랫부분에서 주로 발현되었으며, 대조군에서의 강한 발현양상에 비하여 무부하군에서는 거의 발현되지 않았고 재부하군에서는 약한 발현을 보였다. 단독으로 열처리 혹은 항산화물을 처리한 군들에서도 혈관내피성장인자의 발현을 관찰할 수 있었으나 대조군과 비교하였을 때 낮은 발현이 관찰되었다. 열처리 및 항산화물을 동시에 처리한 군에서는 대조군과 비슷한 발현정도를 보였다.

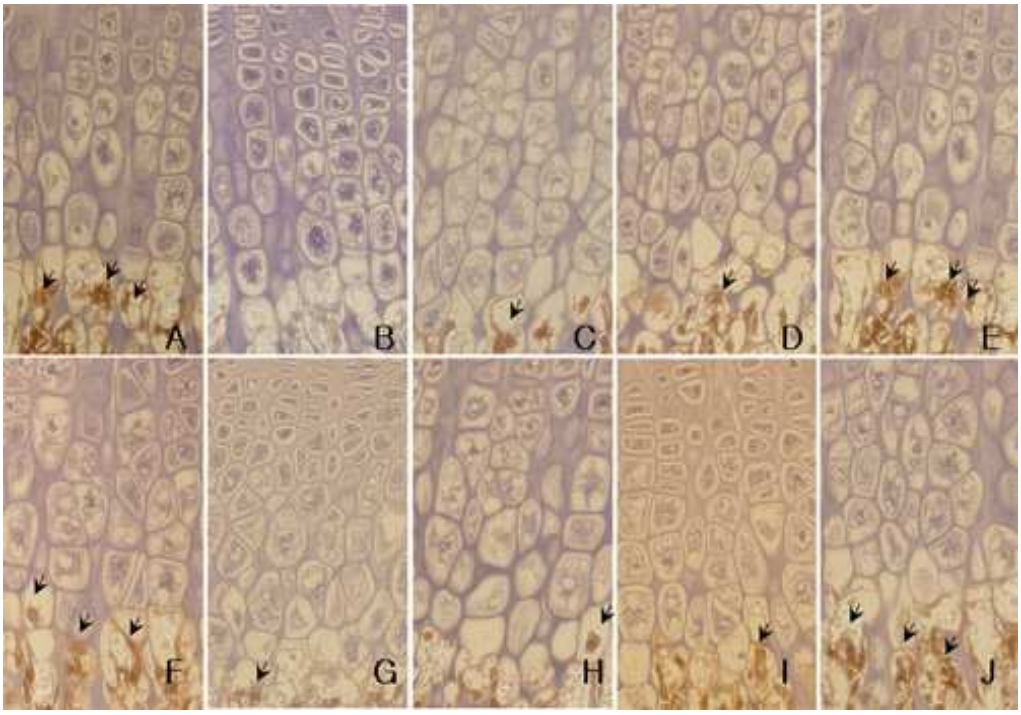


그림 8. Vascular endothelial growth factor의 발현

(A-control group, 대조군; B-unloading group, 무부하군; C-heat shock group, 무부하와 열충격처리군; D-antioxidant group, 무부하군에 항산화물처리군; E-heat shock antioxidant group, 무부하군에 열충격과 항산화물을 모두 처리한 군; F-control reloading group, 대조군; G-reloading group, 재부하군; H-reloading heat shock group, 재부하에 열충격처리군; I-reloading antioxidant group, 재부하에 항산화물처리군; J-reloading heat shock antioxidant group, 재부하군에 열충격과 항산화물을 모두 처리한 군. ×20)

## 사. 관절연골 두께측정

Microspectrophotometric 정량에서 대조군과 무부하 및 열충격과 항산화물을 동시에 처리한 군의 연골두께를 비교하였을 때, 무부하군의 FPI(원위대퇴부의 슬개골 접합부) 골화부분 및 전체 연골 두께와 FMI(대퇴골 내측과 정점)의 비골화부위의 연골 두께가 대조군과 유의한 차이가 보였다. 반면, 열충격과 항산화물을 동시에 처리한 군에서는 대조군의 연골 두께에 근접하는 결과가 관찰되었다.

표 5. 무부하군의 관절연골의 두께 (단위; ㎛)

| Site of analysis | Unloading | | | Control | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Total* | *Uncalcified* | *Calcified* | *Total* | *Uncalcified* | *Calcified* |
| PAT | 58.5±8.3 | 48.7±10.1 | 9.8±4.3 | 68.2±12.0 | 56.6±8.9 | 11.8±2.8 |
| FPS | 45.7±10.6 | 38.4±8.8 | 7.4±2.8 | 50.2±6.8 | 41.6±7.4 | 8.6±3.0 |
| FPI | 46.6±5.7* | 37.9±6.8 | 8.6±2.4* | 52.0±5.2 | 46.6±9.0 | 11.6±2.2 |
| FMA | 57.7±8.8 | 47.3±9.1 | 10.4±4.0 | 69.3±8.3 | 55.0±8.5 | 14.3±3.9 |
| FMI | 82.0±12.1 | 69.5±7.4* | 12.5±3.7 | 102.3±10.6 | 87.1±7.4 | 15.2±4.2 |
| TM | 121.9±9.3 | 109.1±11.3 | 12.8±2.8 | 122.3±11.4 | 110.1±13.0 | 12.1±3.1 |

(PAT=patella; FPS=Superior patellar surface of femur; FPI=Inferior patellar surface of femur; FMA=Anterior surface of medial condyle of femur; FMI=Summit of medial chondyle of femur; TM=Medial condyle of tibia *$P<0.05$)

표 6. 열충격 및 항산화제 처리한 군의 관절연골의 두께 (단위; ㎛)

| Site of analysis | Heat shock-Antioxidant | | | Control-reload | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Total* | *Uncalcified* | *Calcified* | *Total* | *Uncalcified* | *Calcified* |
| PAT | 61.1±9.2 | 52.9±8.1 | 9.9±1.7 | 68.2±12.0 | 56.6±8.9 | 11.8±2.8 |
| FPS | 47.2±10.3 | 40.5±9.0 | 8.2±3.9 | 50.2±6.8 | 41.6±7.4 | 8.6±3.0 |
| FPI | 49.4±11.2 | 42.2±9.5 | 9.0±3.7 | 52.0±5.2 | 46.6±9.0 | 11.6±2.2 |
| FMA | 63.6±11.0 | 51.8±11.3 | 9.7±1.6 | 69.3±8.3 | 55.0±8.5 | 14.3±3.9 |
| FMI | 100.8±8.9 | 84.3±8.7 | 13.4±8.7 | 102.3±10.6 | 87.1±7.4 | 15.2±4.2 |
| TM | 116.8±10.3 | 105.4±9.6 | 11.0±2.0 | 122.3±11.4 | 110.1±13.0 | 12.1±3.1 |

(PAT=patella; FPS=Superior patellar surface of femur; FPI=Inferior patellar surface of femur; FMA=Anterior surface of medial condyle of femur; FMI=Summit of medial chondyle of femur; TM=Medial condyle of tibia)

# Ⅳ. 고 찰

골성장판은 조직학적으로 구분되는 네 가지 연골세포층이 연속적인 종배열 구조(columnar pattern)를 형성하며 크게 정지대(resting zone), 증식대(proliferation zone), 과성장대(hypertrophic zone) 및 석회화대(mineralizing zone)로 나뉜다[15-17]. 정지대에서의 연골세포는 비활성화된 납작한 형태의 연골세포로서 증식을 위한 새로운 세포를 공급하며 증식대의 세포는 세포분열을 반복하고 둥근 형태로 성숙되면서 세포질의 부피를 증가시켜 성장판 내에서 수직적인 공간을 만드는 한편 세포외기질(extracellular matrix)을 생산하여 세포간의 거리가 멀어지면서 과성장대로 진행된다. 과성장대에서는 연골세포 내 칼슘의 축적 및 방출, 기질의 석회화가 이루어지며 동시에 골간단부(metaphysis)로부터의 신생혈관이 침투하면서 골화근원세포(osteogenic precursor cells), 파연골세포(chondroclast)등 골형성에 필수적인 세포가 유입된다. 또한 이들 세포의 유입과 더불어 세포고사 혹은 사멸과정을 거치면서 골로 전환되는 길이성장을 하며 이와 같은 연골세포의 증식, 과성장 및 사멸 등의 전반적인 과정을 겪게 되는 소위 “세포 역동성”을 나타낸다[18-24]. 한편, 골성장판에서의 세포 활성도가 여러 호르몬, 국소 성장인자(local growth factors) 등에 의해 조절된다는 것은 주지의 사실이나 실제 임상적으로는 이들 생물학적 요인에 의한 변화보다는 불가피한 상황에 의해 역학적 하중부하의 감소를 겪게 되는 경우가 더욱 흔하다. 또한 과거의 연구는 주로 역학적 하중변화에 따른 피질골 혹은 해면골에서의 골기질 변화 등에 치우쳐왔으며, 역학적 하중 변화에 따른 골성장판 내 연골세포 활성도의 변화 및 이의 가역성(reversibility)에 영향을 미치는 요인에 대한 연구는 없었다.

골성장판 내 연골세포의 증식, 과성장 및 사멸로의 전환 과정 중 세포역

동성을 인지하기 위한 여러 관찰방법 중 본 연구에서는 세포증식력을 측정하기 위한 BrdU 면역조직화학염색법과 세포고사를 관찰하기 위한 TUNEL assay를 수행하였다. 이는 5-bromo-2'-deoxyuridin(BrdU)가 세포분열과정 중 S phase에서 DNA 복제 시 thymidine에 치환되어 세포분열 과정을 거쳐 표지되는 원리를 이용하여 세포증식력을 측정하는 것으로, 본 연구에서는 쥐의 골성장판에서 세포주기가 24시간인 것을 참고로 하여 24시간 간격으로 2회 표지 하였으며 anti-BrdU를 이용한 면역조직화학적 검사로써 증식된 세포를 측정하였다[25,26]. 본 연구에서 측정된 골성장판 내 세포증식도는 각각의 대조군에서 22.9%와 15.1%로 측정되어 주령이 늘어남에 따라 증식률이 낮아짐을 관찰하였다. 또한 실험군인 무부하군과 재부하군 및 열충격과 항산화물을 단독으로 처리한 군들은 각각의 대조군에 비하여 각각 58.1%, 74.2%의 세포증식도를 보여 현저히 낮아지는 결과를 보인 반면, 열충격과 항산화물을 동시에 처리한 군에서는 다른 실험군과의 비교 시 세포증식률이 정상에 근접하여 회복됨을 관찰하였다.

골성장판에서의 세포고사는 하부과성장대(lower hypertrophic chondrocytes)에서 연골세포 및 세포외 기질이 석회화 과정을 거치면서 골로 전환되는 과정 중 일어나는 생리적인 변화로써[17,25,27,28] 정상적인 골로 대치되는 정도를 인지할 수 있다. 이와 같이 골성장판에서 정상적으로 일어나는 세포고사는 여러 가지 원인에 의해 이차골화중심(secondary ossification center)에서 괴사(necrosis) 혹은 성장장애(growth disturbances)가 발생하는 경우 그 정도가 변할 수 있으며, 본 연구에서는 체중부하의 변화 및 이에 관여될 수 있는 여러 인자의 영향에 따른 골성장판 내에서의 세포고사 정도를 관찰하고자 하였다[28-30]. 세포고사를 인지하는 TUNEL assay는 DNA 절편을 표지하는 방법으로 세포고사에 의한 DNA절편 이외에도 다른 요인에 대한 DNA 손상 역시 인지하여 세포고사

만을 정량하기에는 부정확한 결과를 얻을 가능성도 있으나 이러한 단점에도 불구하고 골성장판 내에서의 세포고사를 표지하는 최적의 방법으로 이용되고 있다[31,32]. 본 연구 결과 대조군 및 실험군 모두에서 약 35% 전후의 고른 세포고사율을 보였으나 대조군 및 항산화물을 동시에 처리한 군에서는 하부 과성장대를 중심으로 세포고사가 주로 발생한 반면, 실험군에서는 골성장판 내 모든 부위에서 고른 세포고사가 이루어졌음을 관찰하였다. 또한 실험군 및 단독으로 열충격 혹은 항산화물을 처리한 군에서는 골성장판 내 세포들의 사멸이 증가함을 관찰할 수 있었다.

세포고사 이외에도 여러 성장인자들이 연골내골화에 관여하는 것으로 제시된 바 있으며 이중 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)는 특히 골성장판 과성장대에서 골세포로의 분화에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다[18,19,22,36,37]. 이는 골성장판내 과성장대 및 석회화대 연골세포에서 생성되며, 수용체는 혈관내피세포(endothelial cell) 뿐만 아니라 파연골세포(chondroclast) 및 골모세포(osteoblast)에도 존재한다고 알려져 있다[19]. Gerber등은 연골내골화 과정에서 혈관내피성장인자의 기능을 알아보기 위해 혈관내피성장인자 제 1 수용체(Flt-(1-3)-IgG)를 이용하여 혈관내피성장인자의 작용을 억제한 후 조직학적 변화를 관찰하였는데, 하부 과성장대로의 혈관유입(angiogenesis)이 결여되고 동시에 망상골(trabecular bone)의 형성이 억제되며 과성장대(hypertrophic zone)가 넓어지고 파연골세포(chondroclast)의 유입 및 분화 억제, 연골세포의 흡수(resorption) 등을 보고하였다[18]. 또한 혈관내피성장인자가 발현되는 주변에서 연골내골화의 진행이 정상적이었던 것으로 보아 혈관내피성장인자로 조절되는 신생혈관의 유입은 연골내골화 과정과 연골 재형성에 필수적인 과정임을 의미한다. 본 연구 결과 대조군에서 혈관내피성장인자의 강한 발현이 있었고 무부하군에서는 거의 발현되지 않은

것으로 보아 체중부하의 결여는 정상적인 연골내골화에 나쁜 영향을 미침을 알 수 있었다. 한편, 재부하군 및 단독으로 열처리 혹은 항산화물을 처리한 군들에서 관찰된 혈관내피성장인자의 발현 양상이 비록 정상적인 발현정도와는 차이가 있었지만  골성장판 내 연골세포의 활성이 일부 회복되었음을 의미하였고, 열처리 및 항산화물을 동시에 처리한 군에서는 대조군과 가장 비슷한 발현정도를 보였던 것은 이들의 처리가 보다 정상적인 세포역동성에 기여함을 시사한다고 할 수 있다.

Indian hedgehog(Ihh)는 전구 과성장연골세포(prehypertrophic chondrocyte)에서 분비되어 소위 “perichondrium cell signal”에 관여하며 부갑상선호르몬(Parathyroid Hormone, PTH) 및 Parathyroid Hormone-relate protein(PTHrP) 의 발현을 유도하여 연골세포 비대화(hypertrophy)로의 분화가 억제되도록 유도하는 “negative feed back” 작용을 한다. Ihh signalling은 PTHrP signalling과 더불어 연골세포의 과성장대로의 분화에 관여할 뿐만 아니라 연골세포의 증식 및 골아세포(osteoblast)의 성숙(maturation)에도 작용한다[33,34]. 시험관내 실험에서 Ihh가 골수간엽줄기세포에서 골아세포로의 분화를 촉진한다는 보고가 있었으며, Ihh knockout mouse 모델에서 대조군보다 골의 길이가 월등히 짧거나 형성하지 못하는 연구 결과를 미루어 볼 때 Ihh가 골 형성에 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있다. 본 연구에서는 정상인 대조군 및 열충격과 항산화물을 동시에 처리한 군에서 Ihh의 발현을 관찰한 반면, 무부하군에서 가장 낮은 발현양상을 보였으며 재부하군 및 단독으로 열충격 혹은 항산화물을 처리한 군에서 발현정도가 낮은 양상으로 관찰되었다. 이는 열충격과 항산화물을 동시에 처리할 경우 정상적인 골성장판의 성장 메커니즘 혹은 연골세포의 활성 유지에 가장 근접함을 반영한다고 할 수 있다.

골격계의 성장판에서 열충격단백질(HSP)은 세포고사로부터의 보호와 더

불어 단백질 생합성 동안 “chaperone”을 활성화시키는 기능을 하며 그 예로 aggrecan G3 domain의 chaperone인 HSP27이 있다. 이는 세포고사가 주로 이루어지는 하부 과성장대에서만 관찰되며 제 1 형 교원질의 chaperone인 HSP47은 새로운 골 형성시 해면골내 골모세포의 주변 및 스트레스를 받는 골성장판 내 전구 과성장연골세포에서 발현된다. 본 연구에서는 HSP의 발현 정도와 세포기능 간의 상관관계, 단백질의 발현과 세포손상과의 관계를 분석함으로써 세포손상은 억제되면서 그 기능은 최대한 증가될 수 있는 조건을 찾고자 하였다. 이를 위해 무부하 상태에서 나타나는 HSP의 발현정도와 세포분열정도, 고사과정을 겪게 되는 연골세포의 변화를 관찰하고 이들 변화의 가역성을 관찰하여 골세포의 활성을 촉진시키는 방법을 알아보고자 하였다. 세포가 열충격을 받게 되면 일반적으로 heat shock protein(예, HSP70 family) 발현이 유도되는데 HSP72는 세포 보호와 더불어 다른 단백질 생성 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[8,35]. 본 연구에서 HSP 47의 경우, 무부하군 및 단독으로 열충격을 가한 군에서 가장 강한 발현양상을 보였는데 이는 무부하 및 열충격이 골성장판 내 연골세포가 갖는 정상적인 세포역동성에 역행하는 결과를 초래함을 의미한다고 할 수 있다.

# Ⅴ. 결론

쥐의 골성장판 및 관절연골에서 체중부하 변화에 따른 연골세포의 활성 변화를 관찰하고, 이에 영향을 미칠 수 있는 열충격과 항산화물을 투여하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 3주간의 체중부하 결여로 인한 변화로 골성장판 길이의 단축, 골성장판 내 연골세포의 세포증식도 저하, Ihh와 혈관내피성장인자의 발현 저하, 세포손상으로 인한 열충격 단백질(HSP47)의 발현 증가, 세포보호를 위한 열충격 단백질(HSP72)의 발현 감소 등이 관찰되었다.

2. 체중부하 결여로 인한 연골세포의 활성 저하에 대한 치유방법으로 열충격과 항산화물이 적용되었으며, 열충격 혹은 항산화물을 단독으로 처리한 실험군에서 무부하로 인하여 저하된 연골세포 증식도, Ihh 및 혈관내피성장인자의 발현 증가에 유의한 영향을 미치지 않았다.

3. 열충격 함께 항산화물을 동시에 처리한 군의 경우, 골성장판의 길이가 대조군에 근접하게 회복 되었으며 골성장판 내 연골세포의 세포증식도 역시 무부하로 인한 저하가 억제되었다. Ihh와 혈관내피성장인자의 발현은 대조군과 유사한 발현 양상을 나타냄으로써 관절연골 및 골성장판의 연골세포가 정상적인 역동성을 회복하였음을 시사 하였으며, 정상적으로 열충격단백질이 발현되어 세포손상 억제에 효과적임을 관찰하였다.

위의 결과로 보아 체중부하의 감소로 인한 연골세포의 활성저하에 대한

열충격과 항산화물의 적용은 연골세포의 손상을 억제하고 세포의 활성을 유지 혹은 촉진시킨다고 사료되었다.

# 참고문헌


1. Globus RK, Bikle DD and Morey-Holton E. Effects of simulated weightlessness on bone mineral metabolism. Endocrinology 1984; 114:2264-2270
2. Globus RK, Bikle DD, Halloan B and Morey-Holton E. Skeletal response to dietary calcium in a rat mdel simulating weightlessness. J Bone Miner Res 1986;1(2):191-197
3. Matsumoto T, Nakayama K, Kodama Y, Fuse H, Nakamura T, and Fukumoto S. Effect of mechanical unloading and reloading on periosteal bone formnation and gene expression in tail-suspended rapidly growing rats. Bone 1998;22:89s-93s
4. Vico L, Lafage-Proust MH, and Alexandre C. Effects of gravitational changes on the bone system in vitro and in-vivo. Bone 1998; 22:95s-100s
5. Zerath E, Holy X, Moullon JM, Farbos B, Machwate M, and Andre C. TGF-β2 prevents the impaired chondrocyte proliferation induced by unloading in growth plates of young rats. Life Sci 1997;61:2387-2406.
6. Eberstein A and Eberstein S. Electrical stimulation of denervated muscle: is it worthwhile? Med Sci Sports Exerc 1996;28:1463-1469
7. Mayr W, Bijak M, Girsch W, Hofer C, Lanmuller H, Rafolt D, et al. MYOSTIM-FES to prevent muscle atrophy in microgravity

and bed rest: preliminary report. Artif Organs 1999;23:428-31
8. Booth FW and Criswell DS. Molecular events underlying skeletal muscle atrophy and the development of effective countermeasures. Int J Sports Med 1997;18:s265-s269
9. Naito H, Powers SK, Demirel HA, Sugiura T, Dodd SL, and Aoki J. Heat stress attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb-unweighted rats. J Appl Physiol 2000;88:359-363
10. Oishi Y, Ishihara A, Talmadge RJ, Ohira Y, Taniguchi K, Matsumoto H, et al. Expression of heat shock protein 72 in atrophied rat skeletal muscles. Acta Physiol Scan 2001;172:123-130
11. Weinberg J, D'Alquen G, Bezio S. Interactive effects of ethanol intake and maternal nutritional status on skeletal development of fetal rats. Alcohol 1990;7(5):383-8
12. Lord-Fontaine S and Averill-Bates DA. Heat shock inactivates cellular antioxidant defenses against hydrogen peroxide: protection by glucose. Free Radical Biology & Medicine 2002;32:752-765
13. Appell H-J, Duarte JAR, and Soares JM. Supplementation of vitamin E may attenuate skeletal muscle immobilization atrophy. Int J Sports Med 1997;18:157-160
14. Nyhan D, Kim S, Dunbar S, Li D, Shoukas A, Berkowitz DE. Impaired pulmonary artery contractile responses in a rat model of micogravity: role of nitric oxide. J Apply Physiol 2002;92(1):33-40

15. Sternberg S. Histology for pathologists. New York: Raven; 1992
16. Streeter G. Developmental horizons in human embryos. A review of the histogenesis of cartilage and bone. Carnegie Inst Wash 583;33:151-167;1949
17. Vanky P, Brockstedt U, Hjerpe A and Wikström. Kinetic studies on epiphyseal growth cartiolage in the normal mouse. 1998;22(4):331-339
18. 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. Nature medicine 1999; 5(6):623-628
19. Gerber H and Ferrara N. Angiogenesis and bone growth. Trends Cardiovasc Med 2000;10(5);223-227
20. Gibson G. Active role of chondrocyte Apoptosis in Endochonral dssification. Microscopy research and technique 1998;43:191-204
21. 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; 2002, p.245-257
22. 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 $VEGF_{164}$ and $VEGF_{188}$. Mechanisms of development. 2002;111:61-73
23. Roach H, Erenpreisa J. and Aigner T. Osteogenic differentiation

of hypertrophic chondrocytes involes asymmetric cell divisions and apoptosis. J cell biology 1995;131(2):483-494

24. Zenmyo M, Komiya S, Kawabata R, Sasaguri Y, Inoue A and Morimatsu M. Morphological and biochemical evidence for apoptosis in the terminal hypertrophic chondrocytes of the growth plate. J of pathology 1996;180:430-433
25. Farnum C. and Wilsman N. Determination of proliferative characteristics of growth plate chondrocyte by labeling with bromodeoxyuridine. Calcified tissue int 1993;52:110-119
26. Wilsman N, Farnum C, Green E, Lieferman E and Clayton M. Cell cycle analysis of proliferative zone chondrocytes in growth plates elongating at different rates. J Orthopaedic Res 1996;14:162-172
27. 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 1994;9(8):1239-1249
28. 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 2001;21(1):30-36
29. 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 miner

Res 1995; 10:1960-1968
30. Nagata S. Apoptosis by death factor. Cell 1997;88:355-365
31. Gavrieli Y, ShermanY and Bensasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 1992;119:493-501
32. Aizawa T, Kokubun S and Tanaka Y. Apoptosis and proliferation of growth plate chondrocytes in rabbits. J bone and Joint Surg[Br] 1997;79B(3):483-486
33. Chung U. Essential role of hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development. Endocrine J 2004;51(1):19-24
34. Karsenty G. Chondrogenesis just ain't what it used to be. J clin Inv 2001;107(4):405-407
35. Kregel, KC. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. J Appl Physiol 2002;92:2177-2186.
36. klagsbrun M and D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor and its receptors Cytokine growth factor rev 1996;7(3):259-270
37. 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 1998; 79:173-181

Abstract

Effect of heat shock and antioxidant on the chondrocyte in the growth plate and articular cartilage of unloaded rats

Jai Hyun Park

*Department of Medicine*
*The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Hui Wan Park)


Bone mass is the results of the balance between bone formation and resorption. Among the multiple factors that regulate bone cell activities, mechanical environment plays a critical role, although it is poorly understood. There will be a reduction of bone mass and even irreversible changes in the skeleton when human is exposed to the situation where normal weight bearing is prohibited due to medico-surgical diseases. Previous studies regarding the effects of non-weight bearing on the cortical or cancellous bone have shown the impairment of osteoblast activity at the cell level and/or lack of osteoblast recruitment at the tissue level. However, growth and remodelling of bone are the results of endochondral ossification as well as periosteal bone formation. This study was conducted to reveal any histopathological changes occurring in the growth plate and the articular cartilage when the rats were subjected to be deprived of normal weight bearing using the model of hindlimb unloading, and to

search for any countermeasures for improving and/or recovering the chondrocyte activities.

Sixty male Sprague-Dawley rats, aged 6 weeks, were acclimatized with standard conditions of temperature and light-controlled environment. They were divided into 10 groups each: Group I-control to unloading; Group II-unloading 3 weeks only; Group III-unloading + application of heat shock; Group IV-unloading + application of antioxidant; Group V-unloading + application of heat shock and antioxidant; Group VI-control to reloading; Group VII-reloading 1 week only; Group VIII-reloading + application of heat shock; Group IX-reloading + application of antioxidant; Group X-reloading + application of heat shock and antioxidant. The animals were double labeled with 5-Bromo-2'-deoxydiuridin(BrdU) and BrdU immunohistichemistry was performed for the cellular kinetic analysis. Transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labeling(TUNEL) assay was done for the investigation of apoptotic changes in the growth plate, and the positive cells were counted in each zones of the growth plate in both TUNEL and BrdU immunohistochemistry. Indian hedgehog(Ihh), vascular endothelial growth factor(VEGF) and heat shock protein (HSP) were immunolocalized to assess the chondrocytic activities in terms of production of extracellular matrix protein. The length of each zone of the growth plate - resting, proliferation, and hypertrophic zone - was measured by histomorphometric analysis, and the microspectrophotometric analysis of articular cartilage was done for

the investigation of any changes occurring in the various zones of weight bearing cartilage.

Three non-weight bearing induced a reduction of height of growth plate, reduced cellular proliferation of chondrocytes, reduced expression of Ihh, VEGF, and altered expression of stress protein of heat shock. When heat shock and/or antioxidant were applied to the unloaded and reloaded rats, only rats in the group of application of both heat shock and antioxidant showed the cellular activities in terms of cellular proliferation and the production of extracellular matrix protein. These results suggest that application of heat shock and antioxidant would be a countermeasure for the restoration of chondrocytic activities when the normal weight-bearing is deprived of.

Key Words : heat shock, antioxidant, chondrocyte, growth plate, articular cartilage