

자발성 고혈압 흰쥐의 대퇴골두
무혈성괴사에서 골성장판 내
연골세포의 세포역동학적 연구

연세대학교 대학원

의과학과

공 선 영

자발성 고혈압 흰쥐의 대퇴골두
무혈성괴사에서 골성장판 내
연골세포의 세포역동학적 연구

지도교수 김 진

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2003년 6 월 일

연세대학교 대학원

의과학과

공 선 영

공선영의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2003년 6 월 일

감사의 글

기초생물학에서 의학으로, 그 중에서도 병에 대해서 공부하는게 너무나 생소하고 막막하였던 기억이 엇그제 같은데 벌써 이년이 되었습니다. 그동안 무수한 시행착오와 실수의 연속이었던 대학원 생활이었지만 주위 분들의 따스한 가르침과 애정 어린 시선이 있었기에 무사히 졸업에 이르게 되었습니다.

학문이 무엇인지 자상한 가르침으로 때로는 따끔한 꾸중으로 인도해주신 김진 교수님께 머리 숙여 감사드립니다. 논문 쓰는 동안 세심한 지도와 조언을 주신 양규현 교수님, 연구과제 시작부터 논문 마지막 글자를 쓰기까지 아낌없는 지도와 책임 있는 과제수행에 대하여 일깨워 주신 김현우 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

학부 때 일찍이 서투른 저에게 기회를 주시고 연구의 길을 제시해 주신 서숙재 교수님, 미국에서 열심히 연구하고 계신 옥종민 교수님, 대학원 생활동안 많은 관심과 걱정으로 따스하게 해주신 이은주 교수님, 맛있는 김현실 선생님께도 감사의 말씀 올립니다. 힘들 때 마다 항상 밝은 미소로 도와주신 우리 의국원들인 김은정 선생님, 최정희 선생님, 김성수 선생님 그리고 석사과정 처음부터 끝까지 함께한 동기 남희와 후배 분들인 이쁜 주경, 차충민 선생님, 광명은 선생님과 실험의 시작이자 끝인 조직표본을 만들어 주신 홍준철 선생님, 격려와 웃음을 아끼지 않으신 지원주 선생님께 깊은 감사를 드립니다.

지금은 미국에 있어서 자주 뵙지 못하지만 실험이 무엇인지 처음 가르쳐주시고 뜻 깊은 조언을 해 주시는 향미언니, 친언니처럼 아껴주신 은주언니, 좋은 선배이자 마음 잘 맞는 친구인 소연, 친구처럼 많은 얘기를 들어준 최인복 선생님, 대학원 생활의 활력소가 되어준 박재희 선생님, 임상센터에 있는 후배 보아, 기쁠 때 힘들 때 항상 같이 있어준 친구 소진과 둘도 없는 벗 상미 외의 모든 친구들에게도 이 자리를 빌어서 고맙다는 말씀드립니다.

동생이지만 오히려 누나를 잘 챙겨준 은표, 저를 항상 믿으시고 아낌없는 지원과 격려를 주신 부모님 그리고 항상 함께 하시는 하느님께 감사드립니다.

논문이라는 조그만 결실을 맺었으나 아직 모자라고 배울 것이 너무나 많은 것을 절감하고 있습니다. 그러기에 이것이 끝이 아니라 더 많이 배우기 위한 시작점이라 생각하고 정진하겠습니다.

차 례

그림차례	iii
표차례	iv
국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	5
1. 실험동물 및 분류	5
2. 연구방법	5
가. 세포증식능 연구	5
(1) 5-bromo-2'-deoxyuridin 주사	5
(2) BrdU 면역조직화학염색법	6
나. 골성장판내 세포고사의 관찰 biotin nick end labeling(TUNEL) assay	6
다. 조직형태학적 계측	7
라. 통계처리	8
III. 결 과	9
1. 골성장판 형태계측학적 분석	9
가. 주령에 따른 골성장판의 길이비교	10
2. 세포증식능 측정	16
3. 세포고사율 측정	17

IV. 고 찰	22
V. 결 론	25
참고문헌	26
영문요약	31

그림 차례

그림 1. Image analyzer에서 골성장판 길이측정	8
그림 2. 6주 대퇴골두 사진	10
그림 3. 6주 골성장판 길이비교	10
그림 4. 9주 골성장판 길이비교	11
그림 5. 12주 골성장판 길이비교	12
그림 6. 15주 골성장판 길이비교	13
그림 7. 18주 골성장판 길이비교	14
그림 8. 세포증식율 사진	15
그림 9. 주령별 전체 세포증식율의 비교	16
그림 10. 주령별 정지대 및 증식대의 세포증식율 비교	16
그림 11. 주령별 세포고사율 비교	18
그림 12. 세포고사의 조직학적 사진	19
그림 13. 18주 전체 세포고사율 비교	20
그림 14. 6주 정지대에서 세포고사율 비교	20
그림 15. 9주 증식대에서 세포고사율 비교	21

표 차례

표 1. 주령에 따른 골성장판의 길이 비교	9
표 2. 주령에 따른 골성장판의 세포고사율 비교	17

국문요약

자발성 고혈압 흰쥐의 대퇴골두 무혈성괴사에서 골성장판 내 연골세포의 세포역동학적 연구

Legg-Calvé-Perthes씨 병은 소아 대퇴골두의 골화중심에 무혈성 괴사가 발생하는 질환이다. 허혈성 괴사의 주요 손상부위가 대퇴골두의 골단 뿐 만 아니라 골성장판에도 미친다고 생각되나 실제 골성장판에서 일어나는 병적 변화에 대한 연구는 진행된 바 없다. 이를 밝히기 위한 동물모델로 자발성 고혈압 흰쥐(Spontaneously Hypertensive Rats, SHR)를 이용하여 Legg-Calvé-Perthes씨 병의 발생 및 치유과정 중 일어나는 골성장판내 병적 변화를 세포역동학(cellular kinetics) 방법을 통해 규명하고, 이를 통해 골성장판내 성장장애로 인한 임상적 문제에 대한 병인을 유추하고자 하였다.

각각 6, 9, 12, 15, 18주령의 자발성 고혈압 흰쥐 12마리씩 총 60마리를 실험군으로, 동일 주령의 WKY 각각 6마리씩 총 30마리를 대조군으로 하였다. 양쪽 대퇴골두를 적출하고 광학현미경 하에서 관찰하여 조직학적 검사 상, 자발성 고혈압 흰쥐의 골단에서 성장장애 및 괴사 소견이 관찰된 경우를 SHR+n군, 정상적인 골화현상을 보였던 경우를 SHR-n군, 대조군 WKY군 등 세 그룹으로 나누었다. 희생 전 5-bromo-2'-deoxyuridin(BrdU)를 주사하여 BrdU 면역화학조직염색법으로 세포동력학적 계측을 하였으며 세포고사도를 알기위하여 TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labeling) assay를 수행하여 전체 골성장판 및 부위별로 나눈 정지대, 증식대 그리고 과성장대 각각의 양성인 세포의 백분율을 내었다. 조직형태학적 계측을 위하여 골성장판의 길이 역시 동일한 방법으로 각 부위별로 측정하여 모든 결과를 two-way ANOVA 처리하였다. 주령이 증가할수록 전체 골성장판의 길이가 짧아지는 것을 관찰하였으며 SHR+n군이 WKY군과 SHR-n군에 비하여 성장초기에는 정

지대 및 증식대에서, 성장후기에는 과성장대에서 길이가 짧아지는 결과를 보였다. 세포증식도의 경우 SHR군이 WKY군 보다 성장초기의 정지대에서 낮은 증식률을 보였으며, 세포고사도의 경우 SHR-n군과 SHR+n군이 WKY군에 비하여 성장초기에는 정지대 및 증식대에서, 성장후기에는 과성장대에서 높은 세포고사율을 보였다. 결론적으로 자발성 고혈압 흰쥐의 대퇴골두 무혈성 괴사에서 이차골화중심 뿐 아니라 골성장판의 성장장애가 있음을 확인하였으며 이는 골성장판 전 부위에 영향을 미친 것으로 관찰되었다.

핵심되는말 : 자발성 고혈압 흰쥐, 무혈성 괴사, 골성장판

자발성 고혈압 원주의 대퇴골두 무혈성괴사에서 골성장판 내 연골세포의 세포역동학적 연구

< 지도교수 김 진 >

연세대학교 대학원 의과학과

공 선 영

I. 서론

Legg-Calvé-Perthes씨 병은 소아 대퇴골두의 골화중심에 무혈성 괴사가 발생하는 질환이다¹⁻⁵. 대퇴골두의 아탈구 없이 적절한 치료가 이루어질 경우 골괴사가 있던 대퇴골두는 완전한 구형으로 복원될 수 있으나 약 반수의 환자에서는 대전자부가 과성장되고 대퇴경부가 굽어지며 하지길이가 단축되는 현상을 보인다^{4,6}. 이들 현상은 임상적으로 전혀 예측이 불가능하며 허혈성 괴사의 주요 침범부위가 대퇴골두의 골단 뿐 만 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 왔으며 단순히 혈류의 일시적인 차단에 의해 일어난다고

추정되나 아직 정확한 원인은 밝혀진 바 없다^{1,2,6-9}. 이제까지 이 질환에 대한 연구로 부검을 통한 조직병리학적인 변화를 관찰한 연구가 있었으며², 동물실험으로는 piglet의 고관절을 과도하게 외전시키거나 대퇴경부 혈관을 결찰하는 방법이 시도된 바 있다¹⁰. 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 근친교배한 종으로 수축기 혈압이 평균 200mmHg 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 피사가 나타나고 주령이 늘어나면서 자연적으로 치유가 되는 특징을 지님으로 인해 Legg-Calve-Perthes씨 병의 좋은 실험동물 모델로서 제시된 바 있다¹¹⁻¹⁵. 본 연구에서는 자발성 고혈압 흰쥐에서 허혈성 변화 후 속발되는 치유과정 중 일어나는 골성장판내 병적 변화를 세포역동학적(cellular kinetics) 방법을 통해 규명하고자하며, 이를 통해 전술한 골성장판내 성장장애로 인한 임상적 문제에 대한 병인을 유추하고 임상적으로 활용 가능한 기초자료로 삼고자 한다.

II. 재료 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 마취하에 실험동물을 희생시키고 Smith-Peterson 도달법으로 조심스럽게 대퇴골두를 노출시킨 후 대퇴 경부에서 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 μ m 두께로 자른 후 silane coating slide(MUTO PURE CHEMICALS CO., LTD, Japan)를 사용하여 고정하였으며, hematoxylin과 eosin으로 염색하여 광학현미경 하에서 관찰하였다. SHR의 모든 개체에서 대퇴골두 골화중심에 피사가 나타나지 않으므로 조직학적 검사 상 자발성 고혈압 흰쥐의 골단에서 성장장애 및 피사 소견이 관찰된 경우를 [SHR+n] 군으로, 정상적인 골화현상을 보였던 경우를 [SHR-n] 군으로 정의하였다.

2. 연구방법

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 복강내 주사(100mg/kg)하였다.

(2) BrdU 면역조직화학염색법

통상적인 방법으로 슬라이드를 제작하여 60℃ oven에서 1시간 동안 파라핀을 녹인 후 다시 xylene으로 10분씩 3번 처리하였으며, 함수를 위하여 100, 90, 70% ethanol 및 이차증류수로 수세하였다. 3% hydrogen peroxide(H_2O_2)로 조직내 내인성 peroxidase를 불활성 시킨 후 0.4% pepsin으로 20분간 반응시켜 조직을 반응하였다. 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 hematoxylin으로 대조염색을 수행하였다. 70, 90, 100% 에틸알코올에서 탈수하고 봉입(mounting)하여 광학현미경 하에서 관찰하였다. BrdU 면역조직화학염색법에 양성인 세포는 각 슬라이드에서 임의로 세 부분을 지정하여 150 μ m X 250 μ m 크기의 사각형내의 전체 세포 수와 염색된 세포의 수를 측정하고 전체세포에서의 양성인 세포에서 성장판의 각 위치별 세포의 양성세포율을 계산하였다.

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

각 조직슬라이드를 Tris-HCl용액(pH 8.0)에서 10분동안 전처리 하고 20분간 proteinase K(SIGMA, St. Louis, MO, USA)로 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 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 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 봉입하였다. TUNEL assay에 양성인 세포는 각 슬라이드에서 임의로 세 부분을 지정하여 150 μ m X 250 μ m 크기의 사각형내의 전체 세포수와 염색된 세포의 수를 측정하고 전체세포에서의 양성인 세포에서 성장판의 각 위치별 세포의 양성세포율을 계산하였다.

다. 조직형태학적 계측

골성장판 전체의 길이와 정지대(resting zone), 증식대(proliferation zone) 및 과성장대(hypertrophic zone) 각각의 길이를 Imagepro[®] program을 이용하여 측정하였다¹⁶⁻¹⁸. 모든 조직학적인 관찰은 골단에 피사가 관찰된 부위의 성장판과 동일한 위치에서 임의로 네 부분을 선정하여서 수직으로 전체길이를 측정하고 전체 길이에서 각 부위별 측정을 수행하였다.

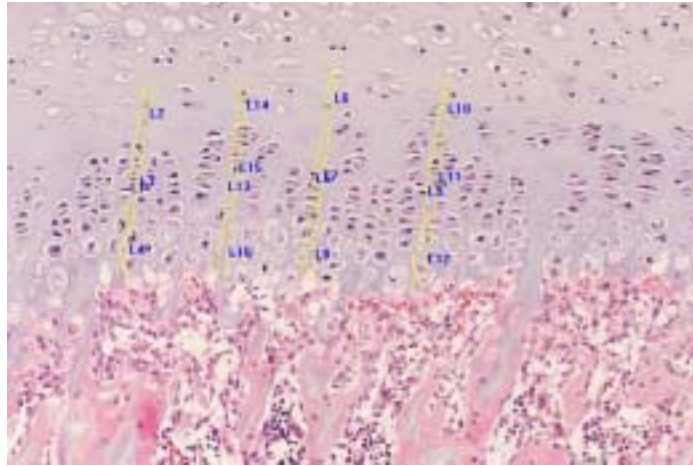


그림 1. Image analyzer에서 골성장판 길이측정. (x100)

라. 통계처리

WKY군, 피사를 보이지 않았던 SHR-n군 및 피사를 보였던 SHR+n군에 대한 골성장판의 전체길이, 정지대, 증식대 및 과성장대의 길이, 세포고사의 비율, BrdU 비율에 관한 결과에 대해서 주경과 군의 유의성은 two-way ANOVA를 이용하여 검증하였으며, $P=0.01$ 에서 통계학적 유의성을 결정하였다.

III. 결과

1. 주령에 따른 골성장판 및 각 부위별 길이

표 1. 주령에 따른 골성장판의 길이 비교

(단위; μm)

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

WKY군 및 자발성 고혈압 흰쥐에서 골성장판의 길이를 6주에서 18주까지 관찰한 결과 주령(age)이 증가할수록 골성장판 전체의 길이가 감소함을 관찰하였다(표 1). 성장 초기인 6, 9 및 12주에서 Wister Kyoto Rat(WKY), 피사가 없는 자발성고혈압흰쥐(SHR-n) 및 피사가 있는 자발성 고혈압흰쥐(SHR+n)의 골성장판의 길이 간에 차이가 관찰되었으며, 특히 주령 6주 골성장판 전체길이의 경우 SHR+n군의 길이가 WKY군 및 SHR-n군에 비해 유의성 있게 감소하여 WKY군의 63% 정도에 불과하였다. 그러나 이후 골 성장이 진행됨에 따라 세 군 모두 골성장판 길이의 감소를 보여 세 군 간의 길이차이는 초반에 비해 감소하여 주령 18주에서 SHR-n군과 WKY군 사이에 유의한 차이는 없었다. 그러나 SHR+n군에서의 길이 감소는 두

군과의 유의한 차이를 유지하였다.

주령 6주의 경우 각각 세 군 사이에 차이가 있었으며, 특히 증식대의 경우 SHR+n군이 각각 WKY군 및 SHR-n군 보다 유의하게 감소되었음을 관찰하였다(그림 2, 3).

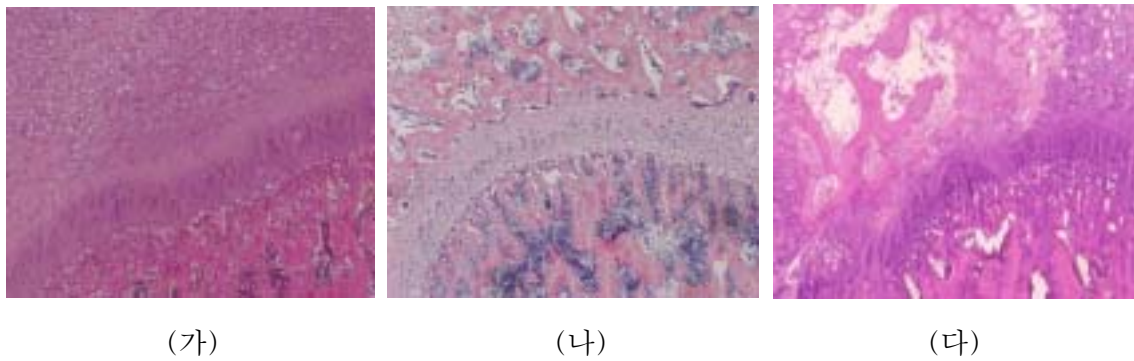


그림 2. 6주 대퇴골두 사진 (X40, Hematoxylin and Eosin 염색).

(가) 6주 WKY, (나) 6주 SHR-n, (다) 6주 SHR+n.

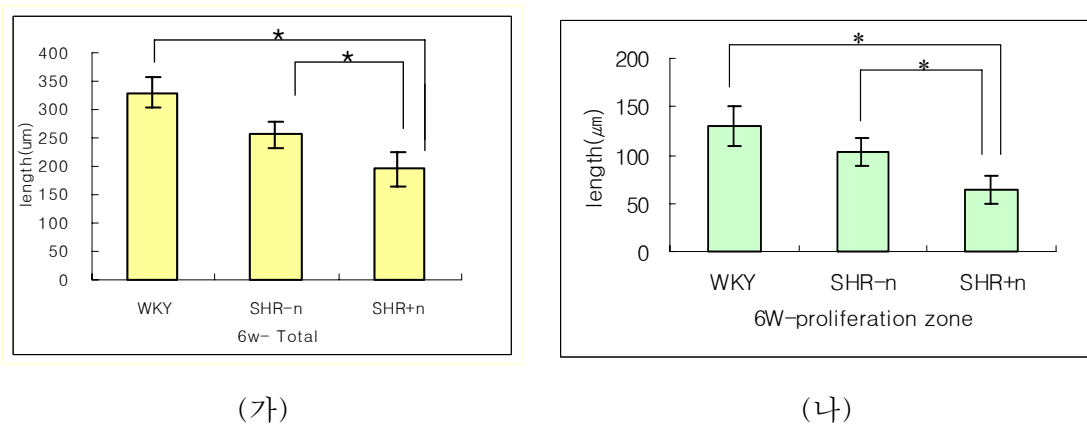


그림 3. 6주 골성장판 길이 비교. (*p<0.0001)

(가) 6주 전체 골성장판 (나) 6주 증식대

한편, 9주 골성장판 전체 길이의 경우 각각 WKY군의 경우 $215.17 \pm 15.8 \mu\text{m}$, SHR-n군이 $189.8 \pm 18.1 \mu\text{m}$, SHR+n군이 $172.36 \pm 16.2 \mu\text{m}$ 로 6주 때 보다 길이 차이가 크지 않았다. WKY군과 SHR+n군 간에 길이 차이가 있었으며 이는 각 부위별 관찰에서는 정지대의 경우 SHR+n군이 WKY군과 SHR-n군에 비해 현저하게 감소함을 관찰하였으나, 증식대 및 과성장대에서는 유의한 길이 차이를 보이지 않았다 (그림 4).

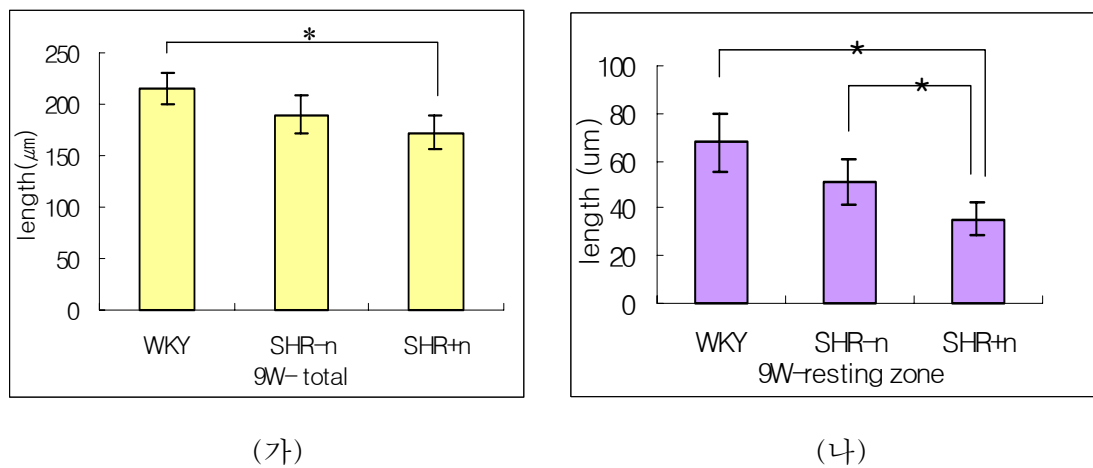


그림 4. 9주 골성장판 길이 비교. (*p<0.0001)

(가) 9주 전체 골성장판 (나) 9주 정지대

주령 12주 때의 골성장판 전체길이의 경우 SHR+n군이 WKY군 보다 골성장판의 길이가 짧았으며 각 부위별 관찰시 정지대에서 SHR-n군과 SHR+n군이 WKY군 보다 현저하게 길이가 감소하였다. 증식대 및 과 성장대에서는 각 군 간의 큰 차이를 관찰할 수 없었다(그림 5).

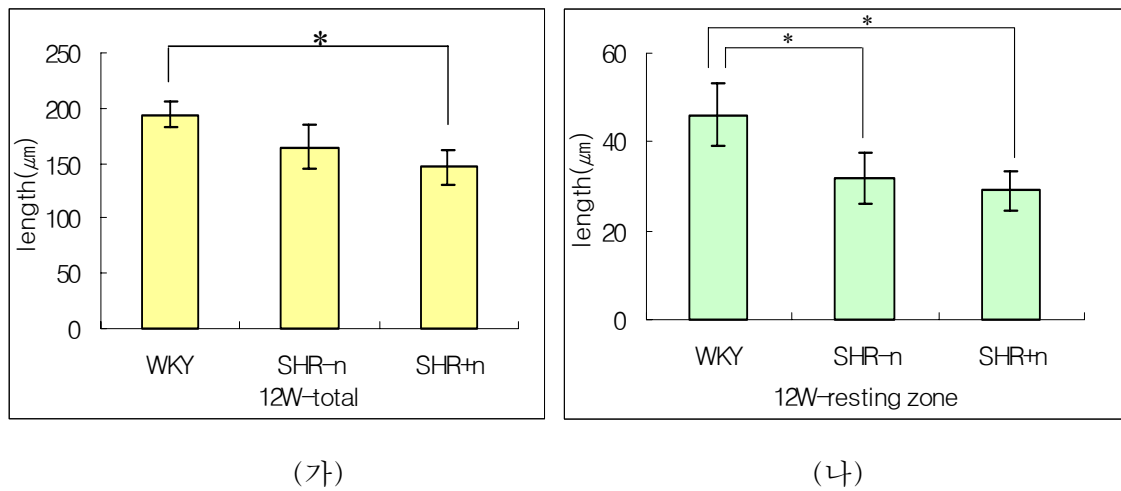
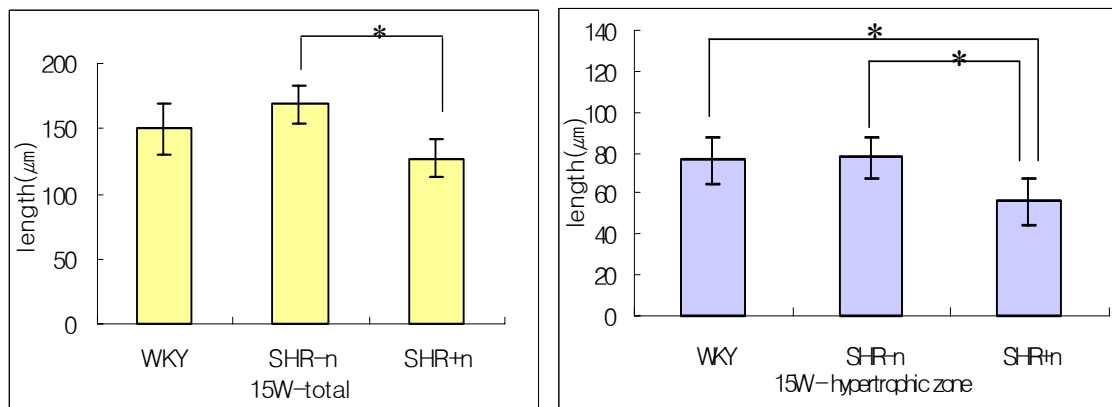


그림 5. 12주 골성장판 길이 비교. (*p<0.0001)

(가) 12주 전체 골성장판 (나) 12주 정지대

성장 후반인 15주, 18주의 골성장판 길이 관찰에서는 6, 9, 12주와 같은 SHR+n군의 전체 골성장판 길이가 가장 짧은 결과를 보이나 성장초반인 6, 9, 12주의 성장판 길이와는 다르게 SHR-n군의 길이가 WKY군 보다 긴 것을 관찰할 수 있었다.

15주의 골성장판 길이에서 길이가 가장 긴 SHR-n군이 SHR+n군과 길이 차이를 보였으며 각 부위별 관찰시 정지대에서 WKY군과 SHR+n군의 길이 차이를 보이나 증식대에서는 SHR-n군과 SHR+n군 간의 길이 차이를 보였다(그림 6).



(가)

(나)

그림 6. 15주 골 성장판 길이비교. (* $p < 0.0001$)

(가) 15주 전체 골성장판 (나) 15주 과성장대

18주 골성장판 전체 길이에서 SHR+n군이 WKY군, SHR+n군과 길이 차이를 보였으며 정지대에서 세 군 간의 큰 차이를 보이지 않았고 증식대에서 SHR+n군이 WKY군, SHR-n군과 길이 차이를 보였고 과성장대에서는 SHR-n군과 SHR+n군 간의 큰 차이를 보였다(그림 7).

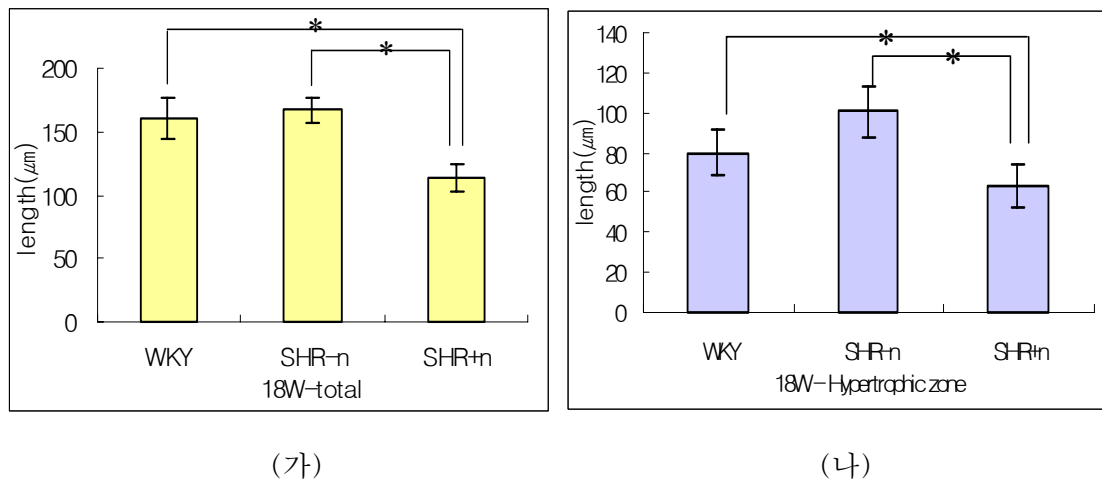


그림 7. 18주 골 성장판 길이비교. (*p<0.0001)

(가) 18주 전체 골성장판 (나) 15주 과성장대

2. 세포증식능 측정

BrdU 면역조직화학염색법의 경우, BrdU 양성 세포는 세포증식에 관여하는 정지대 및 증식대에서 주로 관찰되었다(그림 8). 성장초기인 6주에서 WKY군이 23.2% SHR군이 18.6%의 세포증식률을 보이며, 9주의 WKY군이 19.9%이며 SHR군이 17.2%의 세포증식률을 보이며 WKY군에서 높은 세포증식률을 보였다(그림 9). 각 부위별로 관찰한 결과 6. 9주의 정지대에서 WKY군이 16.5%, 27.9%, SHR군이 9.2%, 9.4%의 세포증식률로 증식대의 6, 9주에서 WKY군이 26.2%, 17.8%, SHR군이 21.5%, 18.4%의 세포증식률 보다 큰 증식률의 차이를 관찰하였다(그림 10).



(가)



(나)

그림 8. 세포증식을 사진. (X100, BrdU 면역화학조직염색)

(가) 6주 WKY, (나) 6주 SHR.

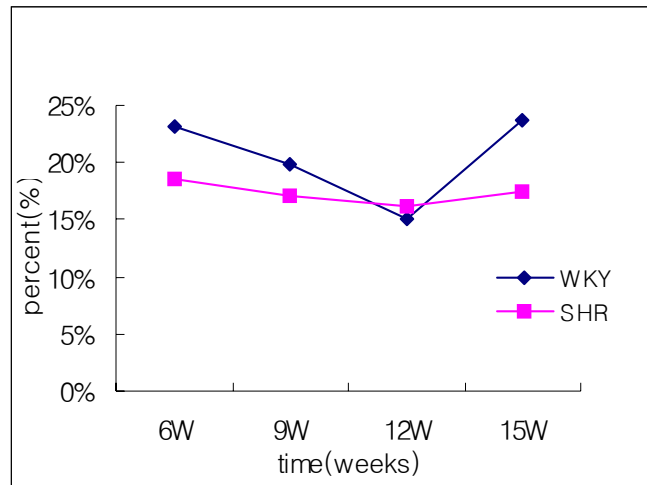
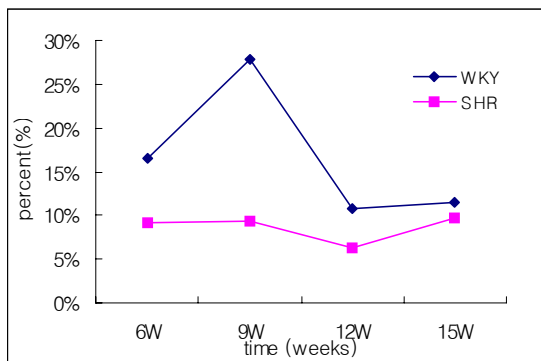
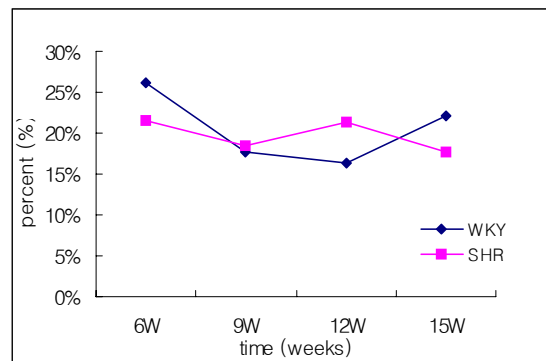


그림 9. 주령별 전체 세포증식율의 비교.



(가)



(나)

그림 10. 주령별 정지대 및 증식대의 세포증식율 비교.

(가) 정지대의 세포증식율, (나) 증식대의 세포증식율.

3. 세포고사율 측정

골성장판내 전체 세포 수에 대한 세포고사의 비율은 주수가 늘어날수록 높아지는 것을 관찰할 수 있었으며 12주 이후부터는 전체 세포의 20% 이상이 세포고사를 보였다(표 2, 그림 11, 12).

표 2. 주령에 따른 골성장판의 세포고사율 비교

		(단위; %)			
		전체길이	정지대	증식대	과성장대
6주	WKY	15.37±3.85	9.92±5.90	17.37±4.78	14.3±4.61
	SHR-n	24.18±6.32	30.72±9.08	26.02±6.40	16.23±5.94
	SHR+n	19.24±7.53	36.1±14.69	10.97±9.10	18.27±8.94
9주	WKY	19.44±4.83	28.49±4.96	5.81±2.43	24.1±7.3
	SHR-n	17.89±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
12주	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
15주	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
18주	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

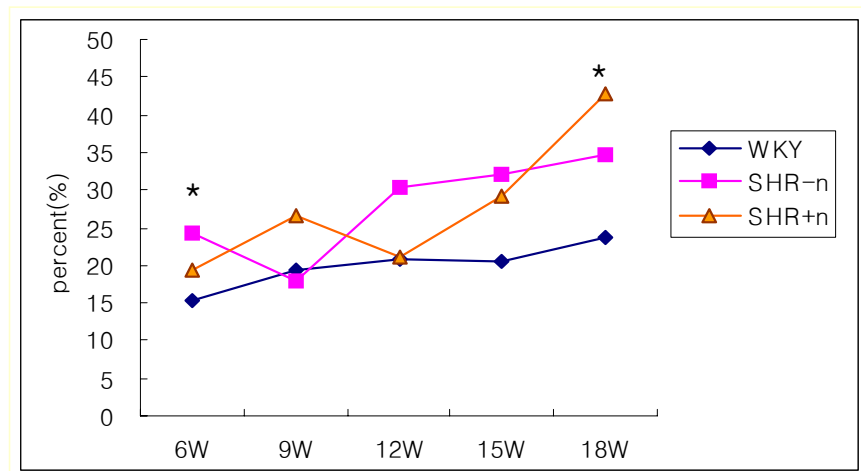


그림 11. 주별 세포고사율 비교. (* $p < 0.0001$)

6주 때 세포고사율의 경우 SHR-n군이 가장 높은 고사율을 보였으며 세 군이 15-24%의 세포고사율을 보였으나, 18주 때 전체 세포고사율의 세 군간 비교에서는 각각 WKY군이 23.7%, SHR-n군이 34.7%, SHR+n군이 42.9%로서 과사가 일어난 군에서 WKY군 보다 2배 가까운 높은 세포고사율을 나타내었다(그림 13, 14)

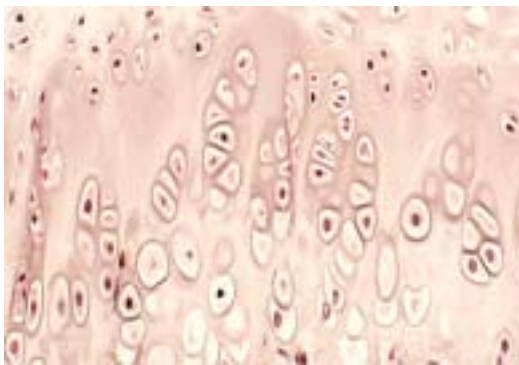
WKY군에서는 주령이 늘어남에도 불구하고 과성장대의 세포고사율이 6주 때의 15.4%에서 18주의 23.7%로 증가는 있었으나 차이가 크지 않고 20% 전후의 낮은 비율을 유지하는 결과에 비하여 SHR+n군에서는 6주때 19%였던 세포고사율이 18주에서 47%로 증가하였다. 6주의 정지대의 세 군간 비교에서 WKY군의 세포고사율이 9.9%인 반면에 각각 SHR-n군은 30.7%, SHR+n군에서는 36.1%로서 SHR 두 군이 WKY군에 비해 높은 세포고사율을 보였다(그림 15). 증식대에서는 SHR-n군이 26%의 가장 높은 비율을 보였으며 과성장대에서는 14-18% 정도의 차이를 보였다.



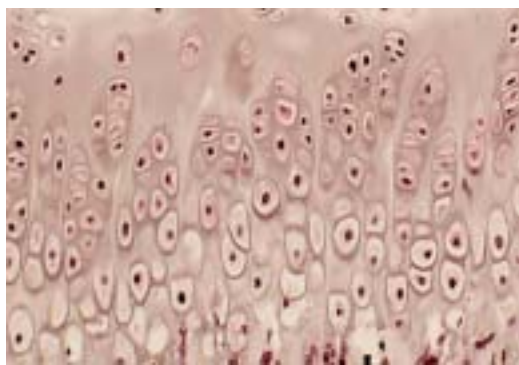
(가)



(나)



(다)



(라)

그림 12. 세포고사의 조직학적 사진. (X40 ;(가)-(나), X100 ;(다)-(라), TUNEL assay) (가) negative control, (나) positive control, (다) 12주 WKY, (라) 12주 SHR+n

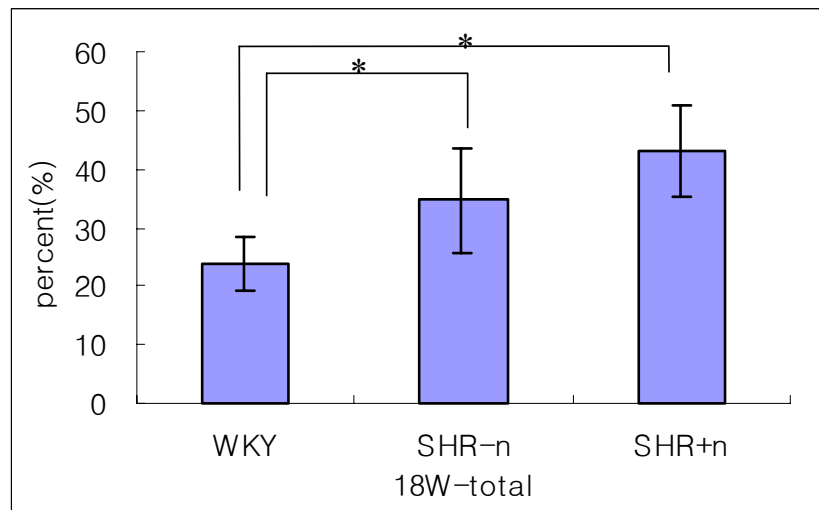


그림 13. 18주 전체 세포고사율 비교. (* $p < 0.0001$)

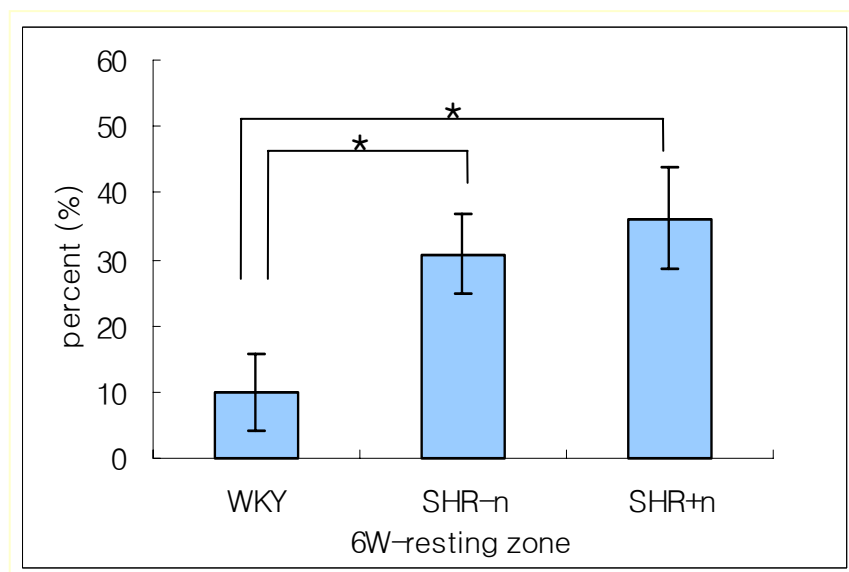


그림 14. 6주 정지대의 세포고사율 비교. (* $p < 0.0001$)

한편 9주의 세포고사율은 전체에서 WKY군, SHR-n군이 각각 19.4%, 17.9%이며 SHR+n군에서는 26.7%의 세포고사율을 보였다. 정지대에서 SHR+n군이 44.3%로 가장 높은 퍼센트였으며 다른 군은 27%전후의 유사한 세포고사율을 나타내었으며 증식대의 경우 WKY군이 5.8%인 반면 SHR-n군과 SHR+n군에서는 각각 22%대의 세포고사율을 보여 SHR군에서 WKY군에 비해 높은 세포고사 퍼센트를 보였다(그림 15).

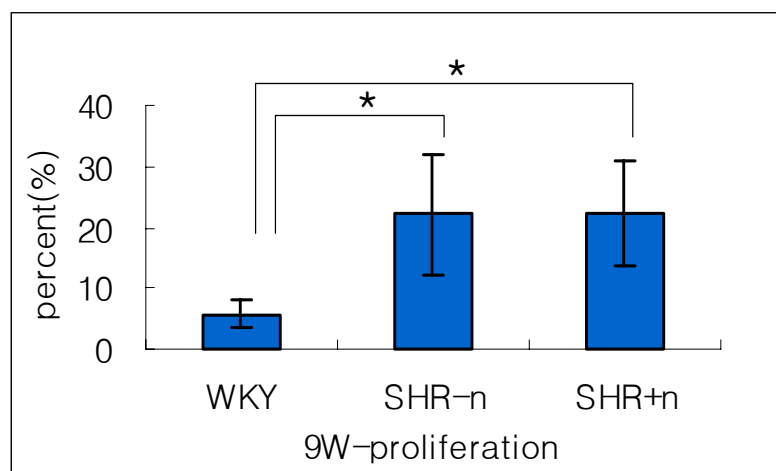


그림 15. 9주 증식대의 세포고사율 비교. (* $p < 0.0001$)

12주에서는 SHR-n군의 전체고사율이 30.3%로 WKY군 및 SHR+n군의 20%보다 높았으며 15주에서 SHR-n군과 SHR+n군이 30% 전후인 반면에 WKY군에서는 20.4%였다. 18주령의 전체 세포고사도에서 WKY군이 23.7%, SHR-n군이 34.7%이며 SHR+n군이 42.9%의 차이를 보이며 특히 과성장대에서 WKY군이 26.5%, SHR-n군과 SHR+n군이 45% 전후의 세포고사율로 유의성 있는 차이를 보였다.

IV. 고찰

골성장판은 크게 정지대(resting zone), 증식대(proliferation zone), 과성장대(hypertrophic zone) 및 석회화대(mineralizing zone)로 나뉜다^{16,17,19}. 정지대에서의 연골세포는 비 활성화된 납작한 형태의 연골세포로서 증식을 위한 새로운 세포를 공급하며 증식대의 세포는 세포분열을 반복하고 둥근 형태로 성숙되면서 세포질의 부피를 증가시켜 성장판 내에서 수직적인 공간을 만드는 한편 세포외 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 세포 역동성을 나타낸다²⁰⁻²⁶.

골성장판내 연골세포의 증식 및 과성장, 고사로의 전환에 대한 세포역동성을 인지하기 위한 여러 실험방법 중에서 본 연구에서는 세포증식을 측정하기 위한 BrdU 면역조직화학염색법과 세포고사를 관찰하기 위한 TUNEL assay를 수행하였다. 5-bromo-2'-deoxyuridin(BrdU)는 세포분열과정 중 S phase에서 DNA 복제 시 thymidin에 치환되어 세포분열 과정을 거쳐 표지되는 원리로 세포증식도의 측정에 이용되며, 본 연구에서는 쥐의 골성장판에서 세포주기가 24시간인 것을 참고로 하여 24시간 간격으로 2회 표지 하였으며 anti-BrdU를 이용한 면역조직화학적 검사로써 표지된 BrdU를 인지하여 증식된 세포를 측정하였다^{27,28}. 골성장판에서의 세포고사는 하부과성장대(lower hypertrophic chondrocytes)에서 석회화 과정을 거치면서 골로 전환되는 과정 중 생리적으로 일어나는 세포변화로써^{19,27,29,30} 골로 대체되는 정도를 인지할 수 있으며, 본 연구에서는 골화중심 내의 괴사와 연관이 있을 수 있는 골성장판 내에서의 세포고사 정도를 알아보하고자 하였다^{30,35,36}.

본 연구에서 성장 초반인 6, 9, 12주에서 SHR+n군의 길이가 WKY군과 SHR-n군에 비하여 전체 골성장판의 길이와 부분적인 골성장판의 길이에서 큰 차이가 났는데 이러한 성장장애는 특히 성장 초기의 어린 주령인 6주의 증식대와 9주의 정지

대의 경우 뚜렷하였다. 15, 18주에서는 6, 9, 12주에서와 동일하게 SHR+n군의 전체 골성장판 길이가 가장 짧으나 초반 6주, 9주에서보다 길이차이가 적은 것을 관찰할 수 있었으며 이는 성장과정에서 초반의 피사에 의한 골성장판의 손상이 자연적으로 회복되어가는 것으로 생각되었다. 또한 SHR-n군의 전체 골성장판 길이가 WKY군보다 긴 것을 관찰할 수 있었으며 이는 과성장대의 길이의 증가에 의한 것으로 관찰되었다. WKY군에서도 역시 15주부터 과성장대의 길이 증가를 보였으나, WKY군보다 SHR-n군에서 과성장대의 길이 증가가 컸다. 과성장대의 길이가 골성장판의 성장률과 비례한다는 보고가 있었으나^{25,37} 본 연구의 경우 골간단부로부터 신생 혈관생성 및 혈액공급의 지연으로 골화유도물질 및 골화근원세포의 유입이 정상수치보다 낮아서 연골세포가 골로 대체되지 못하고 적체되어 길이가 증가 되는 것으로 추정하였다. 또한 WKY군과 SHR-n군이 15주에서부터 과성장대의 길이 증가를 보이는데 비하여 SHR+n군에서는 18주부터 길이증가를 보였으며 이는 성장초기 허혈성 변화에 기인한다고 생각되었다.

BrdU 면역조직화학염색법으로 관찰한 세포증식 결과에서 SHR군에서 WKY군보다 세포증식 비율이 낮게 관찰된 결과에서 SHR군이 WKY군보다 성장지연이 되는 것을 알 수 있었다. 이는 SHR군에 대한 이전 보고^{11-15,38}에서도 본 실험결과를 뒷받침하였다. 초반 6, 9주령에서 SHR군과 WKY군 간에 미약한 차이가 있으며 이를 부분적으로 관찰하면 정지대에서는 큰 차이가 있으나 증식대에서는 두 군 간의 큰 차이가 없었다. 세포증식 결과에서는 피사가 있는 SHR군의 개체수가 적어서 WKY군과 SHR군으로 분류하여 수행하였다.

세포고사는 성장판의 하부과성장대에서 골로 대체되는 과정에 특이적으로 생기는 생리적 현상이나, 이차골화중심의 피사에 의한 골성장판의 손상에 의해서도 골성장판 내에 세포고사가 생길 수 있다. 세포고사를 인지하는 TUNEL assay는 Gavrieli 등³⁸에 의해서 DNA 절편을 표지하는 방법이다. TUNEL assay는 세포고사에 의한 DNA절편 이외에도 다른 요인에 대한 DNA 손상 역시 인지하여 세포고사만을 정량하기에는 부정확한 결과를 얻을 가능성이 있으나 이러한 단점에도 불구하고 세포고사를 표지하는 최적의 방법으로 이용되고 있다³². 세포고사가 골성장판에 일어나는

비율을 관찰한 결과, 6주에서는 세 군이 15-24%의 세포고사율을 보이며 각 군 간의 차이가 없었다. 그러나 부위에 따라 관찰한 결과 6주의 정지대, 9주의 증식대에서 두 SHR군과 WKY군 간의 유의한 차이가 났다. 성장 말기인 18주령 전체 골성장판에서는 SHR+n군의 세포고사율이 47.8% 전후로 23.7%인 WKY군 보다 두 배에 가까운 높은 세포고사율을 나타내었다. SHR군의 연골에서 골로 전환되는 정상적인 세포고사 뿐 아니라 다른 요인에 의한 DNA 손상 역시 인지되어 높은 세포고사율을 보이는 것이라 추측하였다.

특이할 만한 점은 골성장판의 길이측정에서는 WKY군과 SHR-n군이 많은 차이를 보이지 않고 SHR+n군과 골성장판에서의 길이차이로 유의성 있는 결과를 보였으나, 세포고사 결과에서는 WKY군이 다른 두 군인 SHR-n군, SHR+n군과 세포고사비율의 차이를 보였다. 이는 세포고사와 골성장판의 길이가 반비례하는 단순한 상관관계가 아니라 많은 다른 요인에 의하여 위와 같은 결과가 나온다고 추측된다. 향후 이를 밝히기 위해서는 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF), 기질금속분해효소-9(matrix metalloproteinase, MMP-9)와 인슐린성장인자(insulin-like growth factor-1, IGF-1)등의 단백질 발현을 관찰할 필요가 있다고 생각되며 특히, VEGF에서는 RNA 및 단백질 단계에서 확인하여 혈관유입에 의한 영향을 알아봄이 중요할 것이다^{26,39,40}.

본 연구결과를 종합할 때 괴사에 의한 골성장판의 손상은 성장판의 길이, 세포증식도, 세포고사율의 결과에서 주별 군별에 따른 골성장판 내 특정 부위에 국한되지 않고 모든 부위에 영향을 미치는 것으로 관찰되었다.

V. 결론

6, 9, 12, 15, 18주령의 자발성 고혈압 흰쥐를 광학현미경하에 피사가 있는 군과 없는 군으로 구분하여 피사가 있는 자발성 고혈압 흰쥐(SHR+n), 피사가 없는 자발성 고혈압 흰쥐(SHR-n) 및 대조군인 WKY 세 군으로 분류하여 관찰한 결과,

1. 골성장판 길이비교에서 피사가 있는 SHR군은 성장초기 대퇴골두 손상에 의해 정상군인 WKY군 및 피사가 없는 SHR군 보다 골성장판 전체길이가 짧으며 성장초기에는 정지대 및 증식대의 길이가 짧았으며 성장후기에는 과성장대의 길이가 짧아졌다.
2. 골성장판 내 세포증식 관찰에서 SHR군은 대조군인 WKY군보다 낮은 세포증식률을 보였으며 부분적으로 관찰한 결과 성장초기 정지대에서 두 군 간의 증식률 차이가 있었다.
3. 골성장판 내 세포고사 관찰에서 모든 SHR군은 대조군인 WKY군보다 높은 세포고사율을 보였으며, 특히 성장초기의 정지대, 증식대와 성장후기 과성장대에서 세포고사율의 차이가 있었다.
4. 골성장판의 길이와 세포고사율은 모두 성장초기에 WKY군과 SHR군에서 차이를 보였으나 직접적인 비례관계에 있지는 않았다.

참 고 문 헌

1. Chung S. Hip disorders in infants and children. Philadelphia : Lea & Febiger, 1981, pp19-28, pp235-253
2. Catterall A, Pringle J, Byers P, Fulford G, Kemp H, Dolman C et al. A review of the morphology of perthes' disease. JBJS[Br] 1982, 64-B(3); 269-275
3. Ponseti I, maynard J, Weinstein S, Ippolito E and Pous J. Legg-Calvé-Perthes Disease. JBJS[Am] 1983, 65-A(6): 797-807
4. Schoenecker P. Legg-Calvé-Perthes Disease. orthopaedic review 1986, 9;561-574
5. Oda J, Hirano T, Iwasaki K. and Majima R. Vascular occlusion and cartilage disorders in osteonecrosis of the femoral head in rats. Int. Orthopaedics 1996, 20: 185-189
6. Kim H and Wenger D. "Functional retroversion" of the femoral head in Legg-Calve-Perthes disease and epiphyseal dysplasia; analysis of head-neck deformity and its effect on limb position using three-dimensional computed tomography. J. Pediatric Orthopaedics 1997, 17;240-246
7. Wenger D and Ezaki M. Bilateral femoral head collaps in an adolscent with branchydactyly (multiple epiphyseal dysplasia tarda type Ic). J Pediatr orthop. 1981, 1;267-271
8. 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 1996, 58;201-205
9. 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* 1999, 64:259-262
10. Kim H, Su R. and Qiu Y. Histopathologic changes in growth plate cartilage following ischemic necrosis of the capital femoral epiphysis. *JBJS[Am]* 2001 83-A(5):688-697
 11. Hirano T, Iwasaki K. and Yamane Y. Osteonecrosis of the femoral head of growing, spontaneously hypertensive rats. *Acta Orthop Scand* 1988, 59; 530-5
 12. Hirano T, Iwasaki K. Oda J. and Kumashiro T. Osteonecrosis of the femoral head in spontaneously hypertensive rats. *Acta Orthop Scand* 1992, 63(1); 37-40
 13. Iwasaki K and Hirano T. Osteonecrosis and ossification disturbance of the femoral head in spontaneously hypertensive rats. *J Jpn Orthop Assoc* 1988, 62; 1003-1010
 14. Ohtubo Y. Avascular necrosis in the femoral heads of the spontaneously hypertensive rats. A study on deferring incidence between the sexes. *J Jpn Orthop Assoc* 1992, 66; 83-91
 15. Naito S, Ito M, Sekine I, et al. Femoral head necrosis and osteopenia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats(SHRSPs). *Bone* 1993, 14:745-753
 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. Sternberg S. *Histology for pathologists*. New York: Raven; 1992
 18. Kawahara T, Shimokawa I, Tomita M, Hirano T. and Shindo H. Effects of caloric restriction on development of the proximal growth plate and metaphysis of caput femoris in spontaneously hypertensive rats: microscopic and computer-assisted image analyses. *Microscopy research and technique*

2002, 59:306-312

19. Vanky P, Brockstedt U, Hjerpe A and Wikström. Kinetic studies on epiphyseal growth cartilage in the normal mouse. 1998, 22(4):331-339
20. Roach H, Erenpreisa J. and Aigner T. Osteogenic differentiation of hypertrophic chondrocytes involves asymmetric cell divisions and apoptosis. J. cell biology 1995, 131(2):483-494
21. 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
22. Gibson G. Active role of chondrocyte Apoptosis in Endochondral ossification. Microscopy research and technique 1998, 43:191-204
23. 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. 1999 5(6):623-628
24. Gerber H and Ferrara N. Angiogenesis and bone growth. TrendsCardiovasc Med 2000, 10(5):223-227
25. 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
26. 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. 2002, 111:61-73
27. Farnum C. and Wilsman N. Determination of proliferative characteristics of growth plate chondrocyte by labeling with bromodeoxyuridine. Calcified tissue int 1993, 52:110-119

28. 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
29. 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
30. 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
31. Farnum C. and Wilsman N. Cellular turnover at the chondro-osseous junction of growth plate cartilage: analysis by serial sections at the light microscopical level. *J. Orthop Res.* 1989, 7:654-666
32. Aizawa T, Kokubun S and Tanaka Y. Apoptosis and proliferation of growth plate chondrocytes in rabbits. *J. bone and Joint Surg.[Br]* 1997, 79-B(3); 483-486
33. Roach H, and Clarke N. "Cell paralysis" as an intermediate stage in the programmed cell death of epiphyseal chondrocytes during development. *J. bone& mineral Res.* 1999, 14(8):1367-1378
34. Roach H, and Clarke N. Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis. *J. bone and joint surgery[Br]* 2000, 82-B(4);601-613
35. 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
36. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997, 88:355-365
37. Kuhn J, DeLacey J and Leenellet E. Relationship between bone growth rate

and hypertrophic chondrocyte volume in new zealand white rabbits of varying ages. J Orthp Res 1996, 14;706-711

38. Gavrieli Y, Sherman Y and Bensasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 1992, 119; 493-501
39. Kikkawa M., Imai S. and Hukuda S. Altered postnatal expression of insulin-like growth factor(IGF- I)and typeXcollagen preceding the perthes' disease-like lesion of a rat model. J. bone & mineral Res. 2000, 15(1): 111-119
40. 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

Cellular kinetics of the growth plate of avascular necrosis-induced femoral head in SHR model

Sun Young Kong

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Jin Kim)

Legg-Calvé-Perthes disease is characterized by the occurrence of ischemic necrosis of the secondary ossification center in the femoral head. Although metaphyseal growth plate are assumed to be affected by the disease process, the pathologic changes within the growth plate remains to be unknown. The present study was designed to investigate the histopathological changes in the growth plate using the spontaneously hypertensive rats(SHR). 60 SHRs and 30 Wister Kyoto rats(WKY) were sacrificed at each of 6, 9, 12, 15 and 18 weeks of age. Experimental SHR groups were divided into two groups, SHR-n and SHR+n, according to the histopathological changes of ischemic necrosis of the secondary ossification center of the femoral head and WKY were used as control.. 5-Bromo-2'-deoxydiuridin(BrdU) was injected and BrdU immunohistichemistry was performed for the cell kinetic analysis. TUNEL(transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labeling) assay was done for the

investigation of 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, proliferation, and hypertrophic zone was measured by histomorphometric analysis. All the data were analyzed by two-way ANOVA. Total length of growth plate was found to be decreased overtime. At earlier growth stages, the length of the growth plate of the SHR+n group was shorter in the resting zone and proliferation zone than those of the SHR-n and WKY group. As aging, the hypertrophic zone of growth plate in the group of SHR+n was the mostly affected zone of the growth plate. The cell proliferation analysis of the growth plate of SHR group showed lower activity in resting zone than those of the WKY group at earlier growth stages. Apoptosis of the growth plate of SHR-n and SHR+n groups were observed mainly in the resting and proliferation zone at earlier stages, and hypertrophic zone at later stages than those of the WKY group. In conclusion, the metaphyseal growth plate in the femoral head in the SHR appears to be affected by the disease process of ischemic necrosis of the femoral head, and the growth of femoral head was found to be disturbed through the entire zone of the growth plate.

Key words: avascular necrosis, growth plate, Spontaneously Hypertensive Rats