대한골절학회지 제14권, 제2호, 2001년 4월
The Journal of the Korean Society of Fractures
Vol.14, No.2, April, 2001

백서 가골에서 주령에 따른 골절 치유 속도의 비교

송상호* · 최영희† · 심창구 · 유상호 · 박영의†

인천기독병원 정형외과학 교실
한림대학교 의과대학 병리학 교실†, 송상호 정형외과*

<국문초록>

목 적 : 장관 골의 골 유합 과정에 관여하는 요소는 연령이 하나의 인자로서 관여하는 것으로 알려져 있는데, 본 연구는 가골 형성에 관여하는 세포의 활성을 관찰하여 연령이 골 유합에 미치는 영향에 대하여 알아보고 이를 형태학적으로 확인하였다.

대상 및 방법 : 실험동물은 8주, 32주, 70주령의 수컷 Sprague-Dawley계 백서 18마리 (8주, 7:32주, 6:70주, 5)를 사용하여 골절을 유발한 후 2주 후에 가골을 채취하여, H&E 염색 후 Image analyzer를 이용하여 가골 부위의 간엽 조직, 연골조직, 미성숙 피질골 및 해면골의 성분별 면적을 구하여 비교하였고, H&E 및 PCNA, TUNEL, TRAP 등에 대한 면역 조직 화학 염색 후에 가골 부위를 관찰하여 간엽 세포조직, 연골, 미성숙 골에서 각 세포의 발현 수 및 면역 조직화학 염색에 양성인 세포의 백분율을 구하여 가골 내 각 세포의 활성도를 비교하였다.

결 과 : 골절 2주째에 막내 골화에 의한 신생골은 어린 주령에서 많았고(8주:22.32%, 32주:7.09%, 70주: 5.37%), 연골내 골화 및 막내 골화 부위에서 PCNA 양성인 조골 세포의 수는 8주에서 64.25 %, 32주에서 57.40%, 70주에서 29.54 %로 주령이 증가할수록 감소하였다. H&E 염색상 골화 경계부위에서의 파골 세포의 수는 8주에서 43개로 32주(25.57개), 70주(29.87개)에 비하여 의미 있게 증가하였다. TRAP 양성인 파골 세포의 수는 8주에서 2.2개, 32주에서 4.29개, 70주에서 4.5개로 주령과는 관련이 없었다. 그러나 골화 경계부위에서 5.89개로 골간단 2.08개에 비하여 양성세포수가 많았다.

결 론 : 주령이 감소할수록 신생골 형성이 많았으며 조골 세포의 활성도가 강하였고(P<0.05) 조골 세포 및 파골 세포의 발현도 많아 골절 치유 속도가 빠른 것을 알 수 있었다.

색인 단어 : 골절 치유, 연령, histomorphometry, 면역 조직 화학 염색

※통신저자 : **송 상 호**
경기도 부천시 원미구 중동 1035-3
송상호 정형외과
Tel : (032) 323-5114
Fax : (032) 327-2333

서 론

장관골의골절치유과정에영향을주는요소들을 정확히평가하는것은 골절치료에있어중요한과정 이다. 골절의치유에는골절양상, 전신상태, 영양상 태, 연령 등 수많은 인자가관여하며 연령이 어릴수 록 골 유합이 잘되는 것으로 알려져 있다[18]. 저자들 은주령과골절치유속도와의상관관계를 알아보기 위하여가골의주령별면적의 차이와가골내세포의 활성도차이를비교하고자하였다. 8주, 32주, 70주의 주령에 따라 대퇴골 간부에서 골절을 유발한 후 2주 후에 채취한 가골의 주령별 면적을 비교하기 위해 hematoxylin and eosin(H&E)염색후 scanner를이용하여 영상을얻은 후가골부위의간엽 조직, 연골조직, 미 성숙피질골및해면골의성분별면적을구하여비교 하였고, proliferating cell nuclear antigen(PCNA)에 대한 면역 조직 화학 염색을 이용하여 간엽 세포조직, 연 골, 미성숙골에서의각 세포의 발현 수 및면역 조직 화학염색에양성인세포의백분율을구하여 세포의 활성도를 비교하였다. tartrate resistance alkaline phosphatase (TRAP) 염색을 이용하여 파골 세포의 발 현 및 활성도를 관찰하여 파골 세포와 골 재형성에 미치는 영향에 대하여 알아보았다. 또한 transferase-mediated biotin-dUTP nick end-labelling(TUNEL)염색으 로가골을 형성하는 세포들의 세포 자멸사(apoptosis) 를 관찰하여 주령과 골 유합, 세포 자멸사와의 관계 를알아보았다.

재료 및 방법

1. 실험동물및골절유발

실험동물은 8주, 32주, 70주령의 수컷 Sprague-Dawley 계백서 18마리(8주, 7; 32주, 6; 70주, 5)를사용 하였다. Bak[2]의 방법에 따라 ether로 전신마취를 한 후 피부절개를 하여 우측 대퇴골에 반경 1㎜ 드릴로 3곳을 구멍을낸 후 외반력을 가하여 골간의중앙에 골절을 유발시켰고 골절부의 고정은 시행하지 않았 다. 골절후제 14일에근위및 원위골편을붙인채로 가골을 분리해냈다. 조직은 먼저 실온에서 4% paraformaldehyde 용액에 8시간 고정한 후 15% EDTA 용액에4일간탈석회화하고파라핀블록을제작하였 다.

2. 실험방법

1) Image analyzer를 이용한 가골의 구성성분 비율 측정

H&E 염색된 조직표본은 scanner(Scanjet 5200C, Hewlett-Packard, Loveland, USA)를이용하여디지털영 상으로 바꾸어 histomorphometry를 구하였으며(Fig. 1)[1], 디지털화한 조직 영상중에 가골의 전체 면적과 미숙해면골, 미숙피질골, 연골, 간엽세포층으로구 분하여 각각 면적 비율을 구하였다. Lehr[14,15]가기술 한 방법에 따라 디지털 영상을 Photoshop(Version 4, Adobe System, San Jose, USA)를이용하여분석하였다.

디지털화한 조직표본 영상에서 각 구성성분의 면 적을구하기위해영상의각 pixel에저장된색상정보

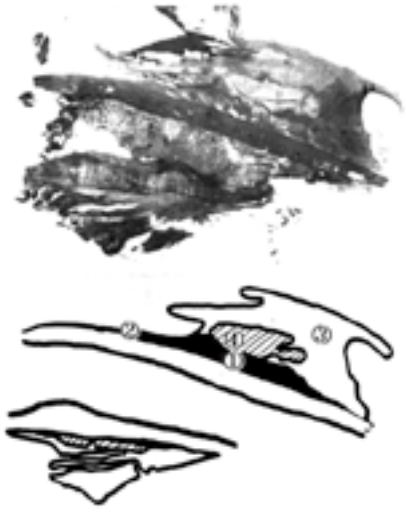

Fig 1. Histomorphometry of callus. Histologic section through the center of the medullary cavity was scanned by comuterized scanner. The areas of tissue components were measured by the image analyzer (1)endochondral new bone, (2)intramembranous new bone, (3)mesenchymal layer, (4)cartilage layer.

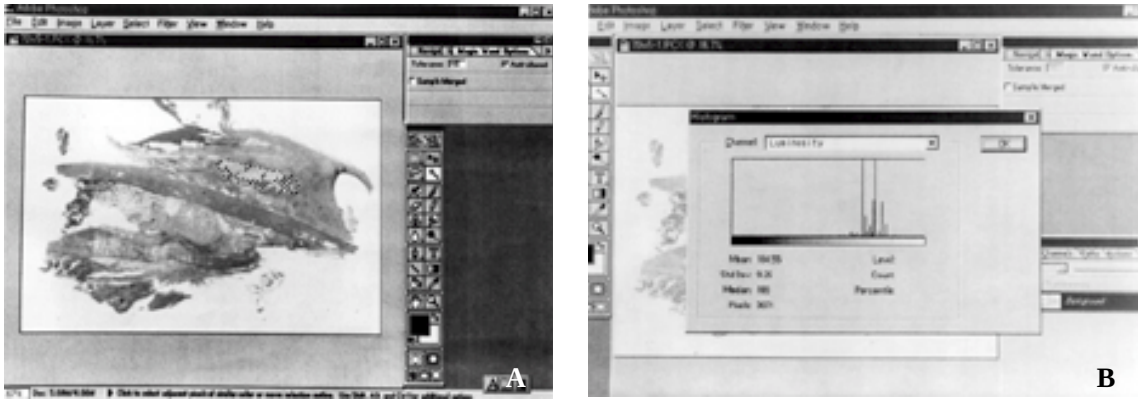

Fig 2. Schematic demonstration of the pertinent steps of Photoshop-based image analysis. Image analysis is perfromed of digitized represenattive fields within the fracture callus slide. A: The Magic Wand tool is used to select each areas of fracture callus. The selected area is automatically highlighted. B: The Histogram tool in the Image menu generates a graph, in which each vertical line represents the number of pixels in the area.

를이용하였다. 특정한색상으로영상을구분하기위해 Magic Wand tool을원하는부위에위치시키고 click하였으며 선택된 영역은 자동적으로 테두리지어졌다(Fig. 2-A). Magic Wand tool에서 동일하게인식하는 색상의 범위를 결정하기 위하여 Tolerance value(0-255)를 이용하였으며 낮은 숫자일수록 적은 범위의 색상을동일하게인식하였다. 본실험에서는 15-20의 Tolerance value를사용하였고, 영상의일정부분이선택되어지면 Image 메뉴에서 Histogram을선택하였다. 선택된 영역의 Histogram은 막대그래프로 표시되며(Fig. 2-B), 영역안의 모든 pixel수가 자동으로 세어지므로각각의면적을백분율로구하여비교하였다.

2) PCNA에대한면역조직화학적염색

탈 파라핀화 함수과정을 거친 슬라이드에 과산화수소수(Ultravision Mouse Tissue Detection System, Anti-Mouse, HRP/AEC; Lab vision, 이하 UMTDS)를 실온에서 30분간 가하여 내인성 과산화효소활성을 억제하였다. 증류수로씻은 후 pepsin을 37°C에서 30분간반응하였다. Ultra block(UMTDS)을 실온에서 5분간 반응한 후 Rodent block (UMTDS)을 실온에서 120분간 반응하였다. 그 후 항 PCNA (NCL-PCNA, Novocastra) 항체를 4°C에서 밤새 반응하였다. 그 후 실온에서 PBS 로 30분간 씻은 후 Biotinylated anti-Mouse secondary antibody (UMTDS)를 실온에서 60분간 반응하였다. Streptoavidin peroxidase (UMTDS)를 실온에서 30분간 반응한 후 Triton x-100 (1%) 용액으로 30초간 반응한후 DAB로발색하여 Mayer 's Hematoxylin으로 대조염색한후 봉입하였다. 구해진 PCNA 조직표본은 세포핵에 양성 반응을 보였으며(Fig. 3), Harris와 Weinberg[7]의방법에따라 Point-counting technique (Fig. 4)으로 세었다. 400배의 배율에서 중첩시킨 eyepiece grid를통해각구성성분별로미숙해면골및미숙피

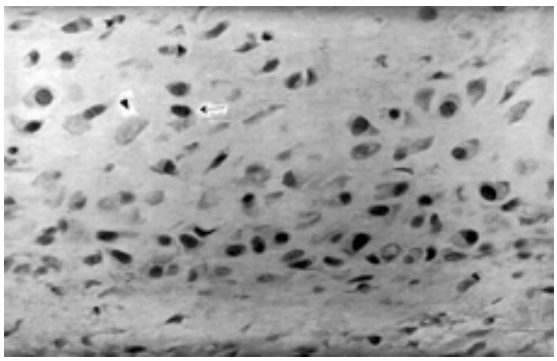

Fig 3. Immunohistochemical staining for PCNA shows nuclear positivity in osteochondrous portion of the callus(arrow). The arrow head indicates nuclear negative osteoblast(x 400).

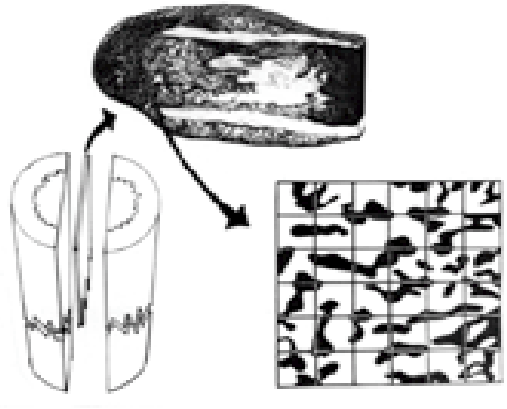

Fig 4. Histologic section and point counting method were used to quantitate new bone formation and the immunohistochemical activity(PCNA, TRAP, TUNEL). The point counting technique was used at a magnificaion of 400. The area between the lines was analyzed. The areas analyzed were (1)endochondral new bone, (2)intramembranous new bone, (3)mesenchymal layer, (4)hypertrophic chondrocyte layer, (5)proliferative chondrocyte layer.

질골 내에서는 조골 세포를, 연골 내에서는 증식성 및 비후성 연골세포를, 간엽 세포층 에서는 간엽 세포 및 섬유 모세포 수를 세었으며, 100개의 grid내의 세포의 수를 센 후 핵에 염색된 것을 양성으로 관찰하여 발현이많은부위를 택하여관찰하여백분율을 구하였다.

3) 파골세포에대한TRAP 염색

acid phosphatase, leukocyte kit (Sigma, 387)를 사용하였다. 미리 시험관에 0.5㎖ Fast Garnet GBC Base solution과 0.5㎖ Sodium Nitrite Solution을섞어서 2분간 두었다. 이용액을 37℃의증류수 45㎖, Naphthol AS-B1 Phosphate Solution 0.5㎖, Acetate Solution 2㎖, Tartrate Solution 1㎖에 섞어서 탈 파라핀화 슬라이드에 37℃에서 40분간 반응하였다. 그 후 증류수로 씻고 hematoxylin으로대조염색한후 0.5% ammonia에 10초간반응한후봉입하였다. H&E 및 TRAP 염색하에고배율(x 200)시야 당 미숙 해면골 및 미숙 피질골에서 100개의 gride당 파골 세포 수 및 TRAP 양성 세포 수를구하였다(Fig. 5).

4) 세포자멸사에대한TUNEL 염색

TACS In situ Apoptosis Detection Kits (Trevigen)를 사용하였는데, 탈파라핀화함수과정을거친 슬라이드에 protein kinase 를 20분간반응하고, 과산화수소수를 5분간반응한후침투화과정 (permeabilization)을얼음위에서5분간시행하였다. TdT와 Labelling buffer를 넣고 37℃에서 70분간 반응하고, Anti-FITC HRP-conjugate를 37℃에서 30분간 반응한 후 DAB로 발색하여 Mayer 's hematoxylin으로 대조염색하고 봉입하

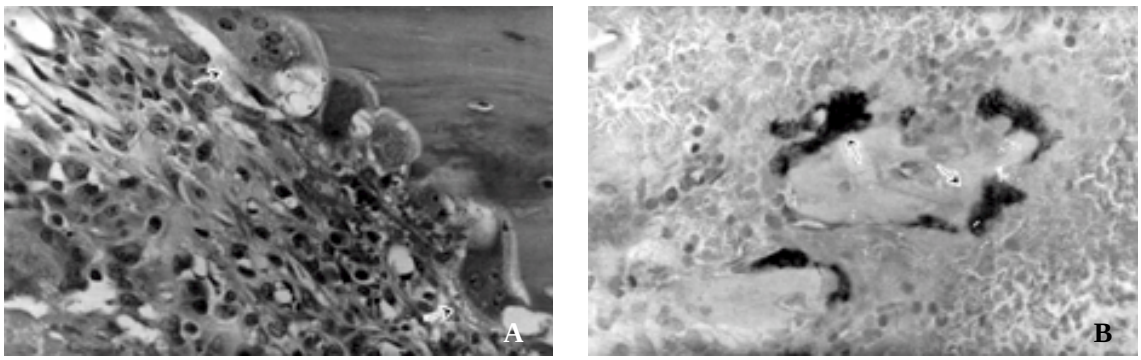

Fig 5. Osteoclast in the fracture callus. A: Multinuclear osteoclasts are present at the peripheral area of the bony trabecula(arrows, H&E, x 400). B: Tartrate resistant acid phosphatase(TRAP) stain shows positive osteoclasts(arrows, x 400).

Table 1. The percentage of compostion of fracture callus measured by image analyzer.

Age	endochondral newbone	intramembranous newbone*	mesenchymal layer	cartilage layer
8wk	20.30	22.32	48.26	16.06
32wk	17.07	9.23	66.42	13.06
70wk	23.54	6.90	57.27	20.19

*; The percentage of intramembranous newbone in the younger was higher than the older($p < 0.05$).

Table 2. The percentage of PCNA positive cells in rat femur callus (x 400).

Age	Endochondral osteoblast*	Hypertrophic chondrocyte	Proliferative chondrocyte	Mesenchymal layer	Intramemtranous osteoblast
8wk	64.25	29.00	74.74	49.17	44.77
32wk	57.40	15.26	86.56	49.14	38.36
70wk	29.54	12.35	79.49	57.81	38.39

*; At 2 weeks after injury, the PCNA positive endochondral osteoblast($p<0.05$) was declined with aging. But, the PCNA positive intramembranous osteoblast was not different with aging in the rat callus($p<0.05$).

였다. 총 세포수중 양성 세포 수를 세어서 백분율을 구하였다. 400배율로 관찰하였을 때 가골내 각 구성 성분중증식성및비후성연골및간엽및섬유모세포 층에서 100개의 grid당 전체 세포 중 TUNEL 양성인세포수를구하여백분율로나타내었다.

3. 통계학적분석

통계학적 분석은 PC-SAS (version 6.12, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)로 Mantel-Haenszel chi square test, Kruskal-Wallis test 및 Spearman's correlation test, Duncan test를 이용하였으며, $p < 0.05$ 이하인 것을 통계적으로유의하다고판정하였다.

결 과

1) Image analyzer를이용한가골의구성성분비율

막내 골화의 경우는 8주에서 높았고 주령이 증가할수록감소하는경향을보였다($p<0.05$). 연골내골화의경우는신생골과연골조직에서는주령에따른차이를 보이지 않았으나, 간엽 조직에서는 8주에 48.26%로 32주와 70주의 주령에 비해 낮았다($p<0.05$) (Table 1).

2) PCNA의발현에대한연구

연골내 골화 부위에서 PCNA 양성인 조골 세포의 수는 8주에서 64.25%, 32주에서 57.40%, 70주에서 29.54%로 주령이 증가할수록 감소하였다($p<0.05$) (Table 2).

3) 파골세포의발현에관한연구

골화경계부위에서의파골세포의수는 H&E염색상 8주에서 100개의 격자당 43개, 32주; 25.57개로 32주령에 비해 8주령에서 높았다($p<0.05$)(Table 3). TRAP 양성인 파골 세포의 수는 8주에서 2.2개, 32주에서 4.29개, 70주에서 4.5개로주령과의관련은없었으며, 골화 경계부위와 골 간단 부위에서 발현도를 비교하였을 때는 골화 경계부위에서 평균 5.89개로 골 간단에서의 평균 2.08개에 비하여 양성세포수가 많았다($p<0.05$)(Table 3).

4) 세포자멸사발현에관한연구

연골내 골화 조직, 비후성 연골조직, 증식성 연골조직, 간엽 조직모두에서 8주에 비해 32주에서양성인세포수가 증가하였고, 통계적으로유의한차이를 보였다($p<0.05$). 막내골화조직에서는 8주; 1.87, 32주; 2.78, 70주; 1.14 였으며, 32주와 70주사이에의미있는

Table 3. The number of osteoclast in rat femur callus stained by H&E and TRAP (x 200).

Age	HE (Osteochondral junction)*	TRAP (Osteochondral junction) †	TRAP (Metaphysis) †	TRAP (Total)
8wk	43.00	4.00	1.75	2.2
32wk	25.57	6.67	2.5	4.29
70wk	29.87	7.0	2.0	4.5
Average	32.81	5.89	2.08	3.66

*; The number of osteoclast at 8 weeks was more than older ages($p < 0.05$).

†; The number of TRAP positive osteoclast at the osteochondral junction was more than that of metaphysis($p < 0.05$).

Table 4. The number of TUNEL positive cell in rat femur callus (x 400).

Age	Endochondral osteoblast	Hypertrophic chondrocyte*	Preliferative chondrocyte	Mesenchymal layer	Intramemtranous osteoblast
8wk	1.25	2.88	0	1.88	1.87
32wk	0.89	4.11	0.63	4.90	2.78
70wk	2.71	2.14	0	1.14	1.14

*; The number of TUNEL positive cell in the hyperchondrocyte was more than others($p < 0.05$).

변화를관찰할수있었다($p<0.05$)(Table 4).

고 찰

골절의치유형태는크게연골내골화와막내골화로나뉘며연골내 골화는혈종이골절부위에서형성된후염증기, 복원기, 재형성기를거쳐완전한골유합을이루는것으로알려져있다[18,19]. 염증기에는혈종이응고되며염증세포들이이혈종부위로이동하여괴사조직을 제거하고섬유모세포가나타나면서새로운기질의형성이시작된다. 이어복원기에접어들면서 조건에 따라 여러 가지 세포로 분화될 수 있는 간엽 세포가 나타나며, 이들은 초기의 염증 반응의변두리에서막내 골화를일으키고중심부에서연골내 골화를 일으킨다[12]. 초기의 가골은 섬유조직, 연골 및직골로 구성되며, 간엽 세포에서 골원 세포가형성되어점차연골의골화가진행되고성장판에서처럼 증식성 연골 세포, 비후성연골 세포를거쳐 골 조직으로 대치되어 골 유합이 진행된다. 과 형성된가골은재형성기를거치면서골절전의상태로회복되게 된다. 장관 골에서 막내 골화는 골절 인접부의 골 막 부근에서 조골 세포의 작용에 의하여 직골이형성되고다시점차치밀골의형태로치환되는과정을거친다[3].

나이가어릴수록골절치유가빠른것으로알려져있는데, 그 기전으로는 간엽 세포의 분화능력이 더 크고[2,22] 전구세포의 수가 많으며[24] 전신 호르몬에 더잘반응하고[21] 부분적인연골내골화에의한골화능력이더빠르기[10] 때문으로알려져있다.

본연구에서는 골화의면적을주령 별로비교하였고, 골화와 관련된 세포의 활성도를 면역 조직 화학염색을이용하여주령별로비교하였다.

골화 면적의 계측 방법으로는 과거에는 grid를 이용한 육안 계측 방법[7]이 사용되었으나 최근에는 컴퓨터 이미지 분석으로 Photoshop을 이용한 image analysis가육안 계측보다 더간단하고정확하여많이 이용되고있다[14,15]. 주령과골화면적과의관계에있어서는 Irving[10]이 6주령과 24주령의 흰 쥐 대퇴부에탈 칼슘화한 골 분(demineralized bone powder)를 이식한 후 골화 양상을 비교하여 6주령에서는 14일에 모든 쥐에서 골화 부위가 발견되었으나 24주령에서는 23일까지골화부위가발견되지않아주령이증가함에따라골화의진행속도가느려진다고보고하였다.

본 연구에서는 Photoshop의 영상분석척도(color, saturation, hue, luminosity)들 중 color index를 이용하여 영상을분석하여가골내각구성성분의면적을구하였고, 막내 골화에 의한 골화 면적이 어린 주령에서 더많이계측되어주령이감소할수록골화진행이빠르다는것을보여주었으나연골내골화에의한골화면적은 주령에 따른 변화를 보여주지 못했다. 이는 본실험에서골절부의고정을시행하지않은데에영향을 받은 것으로 생각되어 향후 연구에서는 Bonnarens 등[4]이 제시한 바와 같이 표준화된 내고정 및폐쇄적골절유발방법을사용하는것이실험상의 오류를줄일수있는방법으로생각된다[16].

PCNA는 36 kD의핵내 polypeptide로서세포주기의 late G1 및 S기에서 DNA 복제와 수선에 관여하여 증식세포들에서주로세포의증식과관계하여나타난다. 최근에PCNA에대한단일클론성항체를검출하여 파라핀에 봉입된 정상조직이나 종양의 증식부분을나타내는데이용되고있다[8]. Iwaki 등[11]은골절후 시간대 별로 PCNA의 발현이 나타나는 부위를 관찰해서처음 36시간에는골막부위, 3일에는간엽 조직 및 막내 골화 부위, 1-2주에는 연골내 골화 부위에서 높은 발현을 나타내며 2주가 지나면막내골화부위에서는PCNA 양성세포가적어지며 연골내골화부위에서많이나타남을보고하였다. 본실험에서는골절 후 2주째인 가골을 관찰하여 막내 골화 부위에서는주령과 PCNA 양성세포의발현율에유의한 차이가없었으나연골내골화 부위에서는어린주령일수록 PCNA 양성세포의발현율이높았다. 이는어린주령에서 골유합에 관여하는 세포의활성이증가하여 골유합이더활발하게일어나고있음을나타내는것이라 하겠으며, 막내골화와 연골내 골화에서 PCNA 양성세포가나타나는기간이상이하므로향후연구에서는골절후실험재료를얻는시간을다양하게설정하는것이동적인골절치유과정을비교하는데에 유리할것으로생각된다.

비후성연골세포의운명에대하여성장판의골연골경계부위에대한관찰에서골수로부터혈관이자라들어 오면서 비후성 연골 세포는 모두 고사 후 골수에서 기원한 조골 세포로 치환된다고 하였으나[6] 최근에는골연골경계부위의일부비후성연골세포는 조골 세포로 직접 전환되는 것이 보고되고 있다[17]. 본 연구에서도 비후성 연골층의 골 연골 경계부위에서 PCNA양성세포가관찰됨으로써비후성연골세포의일부가 조골세포로직접전환됨을시사하였다.

파골세포는간엽세포에서분화되는다른골조직과달리혈액의단핵세포에서분화되어골성형및재형성에관여하며, 조골세포의영향을받는것으로알려져 있다[5]. 파골세포의 분화과정에서의 표지로는 MMP-9, TRAP, the vitronectin receptor,와 calcitonin receptor를 들 수 있으며최근에는TRAP이 파골 세포의기능과골흡수에대한표지자로서많이이용되고 있다[20,25]. 최근 TRAP gene을 무력화 할 경우 성장장애가유발되는것이관찰되면서연골내골화과정에도 관여하는 것으로 생각되고 있다[9]. TRAP은 골 흡수가 주작용은 아니며, 다른 어떠한 작용을 하는 지는 아직 분명하지 않은 것으로 알려져 있다[20]. 본 실험에서는H&E 염색상골화경계부위의파골세포의 수가 8주령에서 많이 발현하고 있어, 어린 주령에서 골흡수 및재형성이더활발함을알수있었다 . 같은 조직의 TRAP 염색에서는 주령에 따른 차이를 보이지않았는데, 이는 TRAP염색이전체파골세포를 나타내지는못하는것을알려주는것이라하겠다.

골조직에서의세포 자멸사에 관한연구는골절치유및성장판의연골내골화과정에서비후성연골의 세포자멸사와조골세포로의치환과정에대하여여러연구들이있었다. Lee 등[13]은흰쥐의대퇴골을골절시킨 후 PCNA와 TUNEL의 발현에 대한 관찰에서 PCNA는골절후 3일에는가골의대부분을형성하는 간엽성 조직, 7일에는 증식성 연골세포에서 발현하였고, 21일까지 서서히 감소하는 양상을 보였으며, TUNEL 양성세포는 14일에서28일사이의비후성연골 세포에서 발현하여 순서적인 발현양상을 나타내는 것을 관찰하여, 골절치유의 과정은 세포의 증식, 성숙, 자멸사가 순서대로 결정되어진 프로그램화된 과정이라고하였다.

성장판의 연골세포에 대한 TUNEL염색에서는 골화 경계부위의 비후성 연골세포에서 양성 세포들이 많이관찰되어연골세포의사멸이골화경계부위에서 일어나는 것을 보여 주었는데[17], 본 연구에서도 가골의골화부위와 인접한비후성연골세포층에서 TUNEL 양성세포의발현이높아가골의형성과정이

성장판에서처럼 순서적으로 일어나며 비후성 연골세포가죽으면서골화가 진행되고 있음을보여주었으나주령에따른상관관계는보이지않았는데, 이는자멸사가일어나는세포의수가너무적기때문에본실험군과같이실험개체가너무적은경우에는통계적차이를발견하기어려울것으로생각된다.

결 론

주령에따른골유합에있어어릴수록막내골화에의한 신생골 형성이 많았으며, 골 유합에 관여하는세포의 활성도가 높았고, 조골 세포 및 파골 세포의발현도많아주령이어릴수록골유합의진행이빠른것을알수있었다.

REFERENCES

1) **Aro H, Eerola E and Aho AJ** : Determination of callus quantity in 4-week-old fracture of the rat tibia. *J orthop res*, 3:101-108, 1985.
2) **Bak B and Andreassen TT** : The effect of aging on fracture healing in the rat. *Calcif Tissue Int*, 45:292-297, 1989.
3) **Bolander ME** : Regulation of fracture repair by growth factors. *Poc soc Exp Biol Med*, 200:165-170, 1992.
4) **Bonnarens and Thomas AE** : Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J orthop Res*, 2:97-101, 1984.
5) **Buckwalter JA and Cooper RR** : Bone structure and function. *Instr. Course Lect*, 36:27-48, 1987.
6) **Farnum CE and 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*, 7:654-666, 1989.
7) **Harris WH and Weinberg ZH** : Microscopic method of measuring increases in cortical bone volume and mass. *Calcif Tissue Res*, 8:190-197, 1972.
8) **Hall PA, Levision DA, Woods AL, Yu CCW, Kellock DB and Watsins JA** : PCNA immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol*, 162:285-294, 1990.
9) **Hayman AR, Foster D, College WH, Evans MJ and Cox TM** : TRAP is essential for normal bone development in the mouse. *J Bone Miner Res*, 10[Suppl 1]:S158, 1995.
10) **Irving JT, LeBolt SA and Schneider EL** : Ectopic bone formation and aging. *Clin Orthop Rel Res*, 154:249-253, 1981.
11) **Iwaki A, Jingushi S, Oda Y et al : Localization and quantification of proliferating cells during rat fracture repair** : Detection of proliferating cell nuclear antigen by immunohistochemistry. *J Bone Miner Res*, 12:96-102, 1997.
12) **Jingushi S, Joyce ME and Bolander ME** : Genetic expression of extracellular matrix proteins correlates with histologic changes during fracture repair. *J Bone Miner Res*, 7:1045-1055, 1992.
13) **Lee FYI, Choi YW, Behrens FF, DeFouw DO and Einhorn TA** : Programmed removal of chondrocytes during endochondral fracture healing. *J Orthop Res* 16:144-150, 1998.
14) **Lehr H-A, van der Loos CM, Teeling P and Gown AM** : Complete chormogen separation and analysis in double immunohistochemical stains using photoshop-based image analysis. *J Histochem Cytochem*, 47(1):119-125, 1999 .
15) **Lehr H-A, Mankoff DA, Corwin D, Santeusanio G and Gown AM** : Application of photoshop-based analysis to quantification of hormone receptor expression in breast cancer. *J Histochem Cytochem*, 45(11):1559-1565, 1997.
16) **Nunamaker DM** : Experimental models of fracture repair *Clin Orthop Rel Res*, 355:56-65, 1998.
17) **Roach HI** : New aspects of endochondral ossification in the chick:chondrocyte apoptosis, bone formation by former chondrocytes, and acid phosphatase activity in the endochondral bone matrix. *J Bone Miner Res*, 12:795-805, 1997.

18) **Rockwood CA Jr, Green DP,.Bucholz RW and Heckman JD** : Fractures in adult, 4th ed, Philadelphia, *Lippincott-Raven Pub*:261-304, 1996.
19) **Rockwood CA Jr, Wilkins KE, and Beaty JH** : Fractures in children 4th ed, Philadelphia, *Lippincott-Raven Pub*:19-49, 1996.
20) **Roodman GD** : Advances in Bone Biology, The osteoclast. *Endocrine Reviews*, 17:308-332, 1996.
21) **Roth GS** : Hormone action during aging: alterations and mechanisms. *Mech Ageing Dev*, 9:497-514, 1979.
22) **Syftestad GT, Urist MR** : Bone ageing. *Clin Orthop Rel Res*, 162:288-297, 1982.
23) **Tonna EA** : Electron microscopic study of bone surface changes during ageing. The loss of cellular control and biofeedback. *J Gerontol*, 33:163-177, 1978.
24) **Tonna EA, Cronkite EP** : Changes in the skeletal proliferative response to trauma concomitant with ageing. *J Bone Joint Surg*, 44-A:1557-1568, 1962.
25) **Zaidi M, Moonga B, Moss DW and MacIntyre I** : Inhibition of osteoclastic acid phosphatase abolishes bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun*, 159:68-71, 1989.

Abstract

The Effects of aging process on fracture healing in rat callus

Sang Ho Song, M.D.*, Young Hee Choi, M.D.†,
Shim Chang Gu, M.D., Sang Ho Yoo, M.D. and Young Euy Park, M.D.†

Department of Orthopaedic surgery, Incheon Christian Hospital, Incheon, Korea..
Department of Pathology, College of Medicine, Hallym University,
Chunchon, Kangwon-Do, Korea †.
*Song's Orthopedic Surgery, Puchon, Korea**

Purpose : Patient age significantly influences the rate of fracture healing. The rate of healing declines with increasing age. The authors compared the aging effect on fracture healing in the callus of rat femur by the light microscopy.

Materials and Methods : In this study the unilateral, closed fractures were created in the femur of 18 Sprague-Dawley rats. The rats were killed in three age group(8 weeks:7, 32weeks:6, 70weeks:5) at 2 weeks after fracture. The composition of fracture callus(new bone, cartilage, mesenchymal layer) was measured by image analyzer with H-E stain. Immunohistochemical stain (PCNA, TUNEL, TRAP) positive cells were counted for the comparing of cellular activity according to the aging.

Results : The percent of intramembranous new bone in the younger rat(8 week:22.32%) was higher than the older ones(30 week:7.09%, 70 week:5.37%). The percent of PCNA positive osteoblast in the newbone decreased according to the aging(8 week:64.25%, 30 week:57.40%, 70 week:29.54%). The number of osteoclast in the osteochondral junction at the 8 week(43) was more than that of 30 week(25.57) and 72 week(29.87). The number of TRAP positive osteoclast was not different as aging, but the number of osteoclast in the osteochondral junction(5.89) was more than that in the metapyseal area(2.08).

Conclusions : More new bone was found in younger rat. There was a strong correlation ($p<0.05$) between age and PCNA activity. More number of active osteoblast and osteoclast was found in younger rat femoral fracture callus, which indicated rapid fracture healing in younger age.

Key words : Fracture healing, Age, Histomorphometry, Immunohistochemistry

Address reprint requests to
Sang Ho Song M.D.
1035-3 Chung Dong Wonmi Gu Puchon Korea
Song's Orthopaedic Surgery
Tel : (032) 323-5114
Fsx : (032) 327-2333