

백서 경골에서 골절치유 및 신연 골형성시 Osteocalcin 및 Transglutaminase C의 발현

서울대학교 의과대학 정형외과학교실 · 생화학교실* · 중앙대학교 의과대학 병리학교실**

성상철 · 최인호 · 이명철 · 박상철* · 송계웅**

— Abstract —

Expression of Osteocalcin and Transglutaminase C during Fracture Healing and Distraction Osteogenesis in Rat's Tibia

Sang-Cheol Seong, M.D., In-Ho Choi, M.D., Myung-Chul Lee, M.D.,
Sang-Chul Park, M.D.* and Kye-Yong Song, M.D.**

Department of Orthopaedic Surgery and Biochemistry,
Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea*

*Department of Pathology**, Chungang University College of Medicine, Seoul, Korea*

Incorporation of bromodeoxyuridine(BrdU) and expression of osteocalcin and transglutaminase C(TGase C) during fracture healing and distraction osteogenesis were investigated in the rat with immunohistochemical studies. Transverse osteotomy was made at the proximal tibia. Bilateral dynamic mini-fixator was applied to immobilize the fracture and also to lengthen the leg. Distraction was started, at the rate of 0.25 mm twice daily, from the 4th operative day and continued for 7 days. Animals were killed for immunohistochemical studies on the 1st, 3rd, 5th, 7th, 14th, 28th, 42nd, 56th, and 84th day after osteotomy or distraction. Longitudinal histologic sections of the healing bone were stained with monoclonal antibodies against BrdU, osteocalcin, and TGase C.

Radiologically, complete fracture healing was achieved in 6 weeks after osteotomy, while neo-osteogenesis was successfully achieved in the distracted gap in 7 weeks after the completion of distraction.

During active healing stage of the fracture and distraction osteogenesis, BrdU was mainly expressed in the perisoteal and endosteal osteoprogenitor cells while osteocalcin was expressed in the proliferating osteoprogenitor cells, osteoblast, osteocyte, osteoid matrix,

* 통신저자 : 성 상 철

서울시 종로구 연건동 28

서울대학교 의과대학 정형외과학교실

* 이 논문은 1992년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

* 이 연구는 1992년도 한국과학재단 연구비 지원에 의한 결과임 (과제번호 ; 92-29-00-12).

and chondrocyte. The expression of BrdU and osteocalcin in the mesenchymal cells from the surrounding soft tissues around the osteotomy site was negligible.

At the site of enchondral bone formation, TGase C was expressed in the cytoplasm of more centrally located and matured chondrocytes, while osteocalcin was mainly expressed in the cytoplasm of peripherally located chondrocyte. These findings may suggest that osteocalcin participates in early phase of enchondral bone formation, while TGase C in the late phase, suggesting the role of TGase C in matrix stabilization. At the site of intramembranous bone formation, the expression of TGase C was weakly positive in both osteoprogenitor cell and osteoblast. The reason of the difference in the expression of TGase C between the enchondral bone formation and intramembranous bone formation should be further investigated.

Fracture healing and distraction osteogenesis was predominantly induced by intramembranous ossification rather than enchondral ossification. Periosteal osteoprogenitor cells appeared to initiate and to lead bone formation after osteotomy and distraction. Active proliferation and differentiation of osteoprogenitor cell occurred during entire periods of distraction. Also, active osteoid matrix formation and mineralization was started from the 5th day of distraction and continued thereafter for further 4 weeks after completion of the lengthening. These findings indicate that preservation of the periosteum is essential to achieve successful fracture healing and distraction osteogenesis.

Key Words : fracture healing, distraction osteogenesis, enchondral ossification, intramembranous ossification, bromodeoxyuridine, osteocalcin, transglutaminase

서 론

신속한 골절 치유를 위한 노력과 연구는 세계적으로 진행되고는 있으나 뚜렷한 효과를 거두지 못하고 있는 실정이다. 골절의 치유 과정은 크게 육아 조직기(granulation tissue stage), 가골기(callus stage), 골화기(remodelling stage)로 나누며 이 과정에서 chemotaxis, mitosis, 그리고 differentiation이 차례로 진행된다^{9,15)}. 여기서 중요시 되는 것 중의 하나가 분화되어 가는 세포들이 생성하는 세포간 물질, 즉 골 기질의 위치, 농도 및 상호 작용이라고 할 수 있으며 이 과정중의 어떤 부분에 장애가 발생한다면 골절 치유가 늦어지거나 정상적인 골절 치유로 이행되지 못할 것으로 사료된다. 골형성 간 세포(osteogenic stem cell)의 유래에 관해서도 논란이 많으며, 골막의 cambium 세포층에 위치하는 골원 세포(osteoprogenitor cell)가 증식하여 섬유아세포, 연골아세포, 골아세포를 거쳐 골 기질을 형성한다는 이론과 골수강(medullary cavi-

ty)의 stromal stem cell에서 유래한다는 주장이 있다¹⁾.

한편 정형외과 영역에서 큰 비중을 차지하는 신연 골형성술은 많은 임상례의 축적에도 불구하고 현재까지 골 연장술시 신연 골형성의 정확한 기전이나 골 유도 인자에 대한 보고는 전무한 형편이다. 즉 신연 골형성시에 골형성을 유도하는 근본적인 기전은 무엇인지, 과연 일반 골절 치유 기전과 다른지, 하는 의문을 제기할 수 있다. 이런 의문점을 규명하기 위하여는 신연 골형성 과정에 대한 분자적 차원의 이해가 필수적인 요소라고 생각되어진다. 앞에서 지적한 바와 같이 신연 골형성은 특히 그 초기 단계에서 일반 골절의 치유 과정과 큰 차이가 있다. 그러므로 일반 골절의 치유 과정과 신연 골형성 과정의 분자 생물학적 차이점을 서로 비교함으로써 신연 골형성의 기전을 규명하고, 또한 일반 골절 치유시 연골 형성의 단계를 없애거나 짧게 하는 요소(생화학적 물질)를 발견할 수 있는 기초를 제공할 수 있으리라 사료된다.

골내에는 여러가지 골형성 촉진 인자가 있어서 이들이 골절시 작용하여 골형성을 유도하는 것으로 알려져 있는데 이들은 모두 비섬유성 유기 물질(non-collagenous organic substance)로 골 기질을 이루고 있다. 즉 현재까지 알려진 bone morphogenic protein(BMP)²⁹⁾ 등의 골형성 촉진 인자 외에도 최근 골의 세포외 비교원성 유기 물질인 fibronectin, osteonectin, osteocalcin, osteopontin 등은 골형성 과정에서 그 발현 시기가 다르게 보고되고 있으며 골형성에서의 그 역할이 강조되고 있다^{28, 32)}. 그중 osteocalcin은 골형성에 긴요한 기질 단백질(matrix protein)중의 하나로서 세포외 골 기질의 비교원성 유기 물질(non-collagenous organic material of the extracellular bone matrix)의 10-20%를 점유한다^{13, 14)}. 이는 골아세포(osteoblast)의 분화와 더불어 발현이 조절된다고 알려져 있으며, 조직면역화학적 방법에 의한 분석상 골세포(osteocyte)와 층판골 기질(lamellar bone matrix)에서 발견되는바³¹⁾, 골아세포의 표지자(marker)로 생각되어지고 있으며, osteoblast에서 생성되어 분비되는 것으로 알려져 있다^{3, 20)}.

종래에는 골 조직의 특수성 및 연구 방법상의 문제점으로 이 분야의 연구에 한계가 있었으나 이제는 monoclonal 또는 polyclonal antibody를 이용한 면역조직화학적 검사법의 도움으로 골조직 내의 생화학적 분석이 용이해 졌다. 즉, 원시 간엽 세포의 골세포로의 분화 및 역동을 조사하기 위해서는 골세포의 표지자인 osteonectin²⁷⁾, osteocalcin⁵⁾과 thymidine analogue인 bromodeoxyuridine(BrdU)¹¹⁾을 이용한 이중 면역조직 화학적 방법이 가능하다. Bromodeoxyuridine(BrdU)은 thymidine analogen으로서 S-phase 동안의 핵 DNA에 삽입되는 특성을 갖고 있다.

일반 골절 치유 및 신연 골형성 과정에서 골기질 생성과 이들 기질들의 구조적 안정화는 필수적인 반면 이에 대한 연구는 국내외적으로 미진한 상태이다. transglutaminase(이하 TGase라 약함)는 펩티드 결합성 글루타민 잔기의 감마 카르복사미드(γ -carboxamide)기가 acyl기 공급체로 작용하는 칼슘 의존성 아실 전이 반응을 촉매하여 분자들 간의 isopeptide 결합을 형성하는 일련의 효소이다⁸⁾. 동효소의 생물학적 의의는 동효소에 의한 교결합

이 여러 조직의 구조적 안정화에 기여함에서 찾아볼 수 있다. 이런 효소가 골 형성 과정에서 특히 골기질의 형성 및 안정화 과정에 중요한 기능을 하고 있으리라 충분히 생각할 수 있으며, 나아가 골형성 기전이 각각 다르다고 알려진 일반 골절 치유 및 신연 골형성과정에서 그 발현 양상의 차이점을 관찰함으로써 일반 골절 치유 및 신연 골형성에서의 기전을 밝히는데 도움을 얻을 수 있으리라 사료된다.

본 연구에서는 골 분화 과정의 지표로서 골 기질 단백질중의 하나인 osteocalcin과 조직의 분화 또는 apoptosis의 지표로 이용되고 있는 TGase C에 대한 특이 항체를 사용한 면역조직화학적 검사를 통하여 골절치유 및 신연 골형성의 각 단계에서 기질의 생성과 분화의 정도를 파악하고 BrdU에 대한 단클론 항체를 이용하여 골형성 과정에 관여하는 세포들의 증식도를 비교 분석함으로써, 원시 간엽 세포로부터 골세포로의 분화 및 역동을 조사하여, 골형성의 각 단계에서의 관여하는 세포 및 일반 골절의 치유와 신연골형성에서의 차이점 등을 밝히고자 한다.

연구대상 및 방법

1. 실험 동물

250g 내외의 수컷 Sprague-Dawley계 백서를 서울대학교 동물 사육실에서 취하여 실험전 2주간의 적응 기간을 가졌다. 사료는 삼악식품 제조 고형 압축 사료를 사용하고, 식수는 수도물을 사용하였으며, 12시간 주기의 밤과 낮 그리고 섭씨 20도 내외의 환경에서 사육하였다. 실험 기간중 백서는 제한된 공간에서 자유로이 활동할 수 있게 하였다.

2. 정상 골절 치유군

백서 좌측 후지의 털을 깎은 후 1% urethane 및 ketamine을 복강내에 주입하여 전신마취한 뒤 10% Betadine 용액으로 소독한 후 무균 조작하에 수술을 시행하였다. 1mm 직경의 threaded K-강선 4개를 경골의 장축에 수직이 되도록 수평 방향으로, 골수강의 중심을 통과하도록 내측에서 외측으로 삽입하였다. 강선의 삽입 위치는 가장 근위 강선이 경골 조면의 바로 근위부에 오도록 하며 그곳에서 외 고정장치의 핀점자의 간격에 맞추어 원위 3개의 핀을 삽입하였다. 4개의 핀이 확실하게 골수강의 중심

을 통과한 것을 확인한 후 외고정장치를 내·외측에 약간 느슨한 상태로 부착하고 하퇴 경골 골간단-간부 경계의 전면에 경골능을 따라 0.5cm의 피부 종절개를 가하여 근육과 골막을 박리한 후 골막하로 경골에 도달한 다음, 노출된 경골의 중간 부위에 전기 미세톱을 이용한 절골술을 실시하였다. 절골 부위의 종적 선열 및 부착이 잘 유지되도록 유의하면서 핀검자의 나사를 꼭 조여 견고한 외고정이 되도록 하였으며 절골 부위의 골막과 피부를 3-0 나일론사를 사용하여 봉합하였다.

3. 신연골형성군

정상 골절 치유군과 동일한 방법으로 마취 및 술전 준비를 시행하고 수술을 시행하였다. 1mm 직경의 threaded K-강선 4개를 경골의 장축에 수직이 되도록 수평방향으로, 골수강의 중심을 통과하도록 내측에서 외측으로 삽입하였던 바, 강선의 삽입 위치는 가장 근위 강선이 경골 조면의 바로 근위부에 있도록 하였으며 그곳에서 소형 신연기구의 핀 검자의 간격에 맞추어 원위 3개의 핀을 삽입하였다. 4개의 핀이 확실하게 골수강의 중심을 통과한 것을 확인한 후 소형 신연기구를 내·외측에 약간 느슨한 상태로 부착하였다. 그 다음 하퇴 경골 골간단-간부 경계의 전면에 경골능을 따라 0.5cm의 피부 종절개를 가하여 근육과 골막을 박리한 후 골막하로 경골에 도달한 다음, 노출된 경골의 중간 부위에 미세 절골도를 이용하여 절골술을 실시하였다. 같은 피부 절개를 통하여 비골의 간부도 절골시킨 후 상하 경골 골편을 움직여서 절골이 완전히 된 것을 확인한 다음, 절골 부위의 종적 선열 및 부착이 잘 유지되도록 조심하면서 핀검자의 나사를 꼭 조여서 견고한 양측성 고정성이 되도록 하였다. 절골 부위의 골막과 피부를 3-0 나일론사를 사용하여 봉합하였다.

수술후 3일(72시간)이 경과한 후, 소형 신연기구의 하단의 원형 손잡이를 하루에 두번씩 한번에 180도 회전시켜 하루에 0.5mm씩 신연되게 하여 7일간 총 3.5mm의 신연 간격을 얻도록 하였다.

4. 시편 채취 및 표본 제작

정상 골절 치유군은 수술후 1, 3, 5, 7일과 2, 4, 6, 8, 12주에, 신연 골형성군은 신연을 시작한 후 1, 3, 5, 7일과 2, 4, 6, 8, 12주에, 각각 5마리씩

희생시키되, 희생시키기 2시간전 체중 kg당 25mg의 BrdU를 복강내에 주입하고 단순 방사선 검사를 실시하였다. 외 고정장치를 제거한 후 슬관절 및 족관절에서 절단하여 경골 전체를 시편으로 삼아 약 48-72시간동안 Carnoy's solution에 고정하였다.

얻어진 시편은 10% nitric acid에서 약 6시간 동안 탈회한 후 통상적인 방법으로 조직 표본을 제작하였다. 얻어진 4개의 표본 중 1개는 일상적인 hematoxylin eosin 염색을 하며, 나머지는 각각 TGase C, osteocalcin 및 BrdU에 대한 면역조직화학적 검사를 실시하였다.

5. 항체의 조제

Osteocalcin에 대해서는 기존에 알려진 peptide 서열을 중심으로 비교적 다른 단백질과 homology가 낮은 부위를 선택하여 peptide를 합성하고, 동 peptide의 C 말단에 cysteine을 첨가하여 Keyhole limpet hemocyanin과 conjugation한 다음 이를 항원으로 토끼에 주사하여 선택적 항체를 제조하였던 바, IGFQDAYKRIYGGT-서열을 이용하였다. 0.1mg의 conjugated polypeptide를 같은 부피의 complete Freund's adjuvant에 혼합하여 2주 간격으로 3회 주사하였으며, incomplete Freund's adjuvant로 10일 간격으로 2회에 걸쳐 booster injection을 실시하였다. 혈청을 획득한 후, 항체의 특이성(specificity)은 bovine serum albumin-conjugated synthetic peptide를 사용한 Western blot 검사로 실시하였다.

TGase C의 특이 항체의 제조는, guinea pig liver TGase 100 μ g을 동량의 complete Freund's adjuvant와 섞어 토끼의 피하에 주사한 다음 adjuvant없이 TG 150 μ g을 3주 간격으로 2회 더 주사하고 1주 경과후 얻은 혈청을 protein A column을 통과시켜 순수한 항체를 얻는 방법으로 실시하였다.

6. 단순방사선검사

Mammography film(FUJOI)을 사용하여, 160mAs, 30KVP, 보정 2+의 조건하에 2배 확대되도록 촬영하였다.

7. 면역조직화학적 검사

골절 치유 및 신연 골형성부에서의 증식 세포의 비율, 골아세포의 분포, 및 osteocalcin의 염색도 등을 계측하여 시기별 변화를 도출하고자 하였다.

가. TGase C

표본을 정상 goat serum 및 1:800 diluted rabbit anti-TGase C antibody(Park et al., 1991)에 incubation 한 후 biotinylated anti-rabbit IgG(Vector), avidine-biotin-peroxidase complex(Vector) 및 diaminobenzidine(Sigma)으로 처리하였다.

나. Osteocalcin

앞서 기술한 방법으로 제작된 osteocalcin에 대한 항체와 avidin-biotin-peroxidase kit(Vector) 및 diaminobeniznie(Sigma)으로 염색하였다.

다. BrdU

앞에서 기술한 표본 제작 과정의 일환으로 포매된 파라핀 블록을 4 μ m 두께로 절편하여, poly-L-lysine를 입힌 슬라이드에 부착하고 통상적인 방법으로 파라핀을 제거하였다. DNA를 denature시키기 위해 1N HCl 용액에 60 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 처리한 후 0.1M Borax(Na₂B₄O₇) 용액에서 중화시키고 수세하였다. 염색은 Synbio 회사 제품의 anti-BrdU mouse monoclonal antibody와 Vector 회사 제품의 avdin-biotin-peroxidase complex kit를 사용하였다.

결 과

1. 정상 골절 치유군

가) 단순 방사선 검사

골절 후 약 2주부터 골절 부위에 가골이 보이기 시작하였다. 골절후 4주 단순 방사선사진상 가골 형성은 상당히 진행되었으나 아직 골절 간극이 관찰되었고, 골절 후 약 6주에 완전한 골 유합 소견을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

나) 면역조직화학적 검사

1) 막내 골화 부위에서의 소견

골막의 cambium layer의 골막 골원 세포들은

골절후 1일째부터 특히 골절부위의 인접한 부위에서 활발히 증식하였으며 이러한 증식 세포들은 항 BrdU 항체에 반응하는 핵을 가진 갈색으로 염색되는 핵을 보이는 세포들로서 관찰되었다(Fig. 2-A, B). 이러한 골막의 증식성 골원 세포들은 osteocalcin에 강하게 염색되었으며(Fig. 2-C), 골절 1일째부터 활발히 증식하여 그후 서서히 감소하는 양상을 보여 골절후 6주까지 관찰되었다(Fig. 11). 이런 증식성 골원 세포는 시간이 경과함에 따라 골아세포로 분화하여 유골 기질을 형성하였으며, 유골 기질은 골아세포에 의해 둘러 싸이는 소견을 보였다(Fig. 3-B, C).

한편 osteocalcin의 발현은 골절 1일째부터 골막의 증식성 골원 세포에서 상당히 강하게 관찰되었으며(Fig. 2-C), 골막의 증식성 골원 세포에서의 발현은 그후 서서히 감소하는 양상을 보였다. 골막의 증식성 골원 세포에서 분화되는 세포로부터 세포간 기질이 형성됨에 따라 osteocalcin은 세포간 기질에서 관찰되기 시작하여 세포간 기질이 성숙되어 감에 따라 기질에서의 발현이 서서히 증가하였다. 골절후 5일째 유골 기질이 형성되는 것이 관찰되었던바, osteocalcin이 유골기질에서 잘 관찰되었다(Fig. 3-C). 골절 1주일이 경과하면서 유골 기질내의 osteocalcin의 발현은 골절 5일째 보다 강해졌으나, 골막의 골원 세포와 골아세포에서의 osteocalcin은 골절 5일째 보다 약하게 관찰되었다(Fig. 4-C). 골

Fig. 1. Radiograph of fracture healing of tibia. (A) Post-fracture 1 day. (B) Post-fracture 6 weeks. Solid bony union was achieved (mammography film, 160mAs, 30KVP, X2).

Fig. 2. Intramembranous ossification on 1 day after fracture. (A) H & E. Expression of BrdU (B), osteocalcin (C) and TGase C(D) in proliferating periosteal osteoprogenitor cells(X100).

Fig. 3. Intramembranous ossification on 1 day after fracture. (A) H & E. (B) Expression of BrdU in proliferating periosteal cells. Expression of osteocalcin(C) and TGase C(D) in periosteal cells, osteoblast and osteoid matrix (X100).

Fig. 4. Intramembranous ossification on 7 days after fracture. (A) H & E. (B) Expression of BrdU in proliferation periosteal cells. (C) Osteocalcin in periosteal cells, osteoblast and osteoid matrix. (D) TGase C in periosteal cell and osteoblast(X100).

Fig. 5. Intramembranous ossification on 2 weeks after fracture. (A) H & E. (B) Expression of BrdU in proliferation periosteal cells. (C) Osteocalcin in chondrocyte, osteoid matrix and osteocyte. (D) TGase C-positive hypertrophic chondrocyte in the central region of callus(X100).

절후 2주째 osteocalcin은 유골 기질 및 이를 둘러싸고 있는 골아세포에서 관찰되었으나 유골 기질에서의 발현은 골아세포에 인접한 유골 기질에서는 강하게, 골아세포에서 거리가 있는 유골 기질에서는 약하게 나타나는 양상을 보였다(Fig. 5-C).

한편 TGase C는 골절후 1일에 골막의 골원 세포에서 약하게 관찰되었으며(Fig. 2-D) 골원 세포에서의 발현은 골절후 5일까지 약하게 지속되었다. 골아세포에서의 발현은 골절후 3일째 약하게 관찰되어 골절후 2주까지는 약하게 관찰될 수 있었으며, 골절

Fig. 6. Enchondral ossification on 7 days after fracture. (B) Expression of BrdU in periphery of chondroid callus. (C) Osteocalcin in chondrocyte, osteoid matrix and osteocyte. (D) TGase C-positive hypertrophic chondrocyte in the central region of callus(X100).

치유의 전과정을 통하여 유골 기질에서의 발현은 관찰되지 않았다(Fig. 3-D, 4-D, 5-D).

2) 연골내 골화 부위에서의 소견

유연골 기질은 골절후 5일째 처음으로 골절 부위에서 관찰되었다. 연골내 골화가 일어나는 부위에서의 세포 증식은 유연골 기질의 변연부에서만 활발하게 관찰되었고, 이러한 증식성 세포들은 항 BrdU 항체에 반응하는 핵을 가진 세포들의 존재로 확인 가능하였다(Fig. 6-B). 골절 부위의 연골편들이 그 크기가 커지고 성숙되어 감에 따라 증식성 미성숙 연골아세포들은 유연골 기질에 함몰되어 점점 유연골 기질의 중심부위에 위치하게 되었고, 그 세포의 크기도 점점 커졌던 바, osteocalcin은 분화된 연골 세포의 세포질에서 관찰되었으나 유연골 기질에서는 전혀 관찰되지 않았으며, 골절후 1주일이 경과하면서 유연골 기질에 유골기질이 존재하게 됨을 관찰할 수 있었고 이 유골 기질은 osteocalcin 염색에 양성 소견을 보였다(Fig. 6-C).

한편 TGase C는 osteocalcin의 발현이 관찰되는 유연골 기질내의 연골세포보다 더 중앙에 위치하고 더 성숙된 연골세포에서 관찰되었다(Fig. 6-D).

골절후 4주가 경과되면서 세포들의 증식은 거의

Fig. 7. Radiographs during the course of the distraction osteogenesis of tibia. (A) 3 days after operation just before distraction was started. (B) After 7 days of distraction. 3 weeks (C) and 7 weeks (D) after the completion of distraction(mammography film, 160mAs, 30 KVP, X2).

찾아보기 힘들어 졌으며, 유골이 골수강을 완전히 채우게 되었고 이는 망상골로 성숙되어졌다.

2. 신연 골형성군

가. 단순 방사선 검사

신연 5일째의 사진에서 골 신연부에 골막을 따라 형성되는 가골이 관찰되기 시작하였으며 신연 7일째에는 약 3.2mm의 신연을 얻을 수 있었으며 신연 간격에 골형성을 관찰할 수 있었다.

신연 시작후 4주째의 단순 방사선사진상 신연 간격에 골소주 형상을 보이는 양호한 골 연장이 이루어 졌음을 알 수 있었으며 단순 방사선사진상 골 신연부의 견고한 골형성은 신연 시작후 8주에 관찰되었다(Fig. 7).

나. 면역조직화학적 검사

신연을 시작한 후 1일에 이미 신연부에 인접한 골 외막 및 골내막 골원 세포들의 활발한 증식을 관찰할 수 있었던 바, 골외막으로부터의 증식이 골내막으로부터의 증식보다 활발하였고 이러한 증식 세포들은 항 BrdU 항체에 반응하는 핵을 가진 세포들로 관찰되었다(Fig. 8-A, B). 이러한 골외막 및 골내막 골원 세포의 증식은 7일간의 신연 기간동안

Fig. 8. Expression of BrdU in distraction osteogenesis. Actively proliferating periosteal osteoprogenitor cells(A), and endosteal cells(B) after 1 day of distraction. (C) Proliferating periosteal osteoprogenitor cells after 7 days of distraction (X200). (D) 3 weeks after the completion of distraction, proliferation of cells was minimal and the distraction gap was filled with newly formed bone(X10).

매우 강하게 지속적으로 관찰되었으며 (Fig. 8-C) 신연 완료 후 1주(신연 시작 후 2주)까지 상당히 활발히 진행되었고 그 후 서서히 감소하여 신연 완료 후 3주(신연 시작 후 4주) 후에는 거의 관찰되지 않았다 (Fig. 8-D).

골외막 및 골내막의 증식성 골원 세포에서 osteocalcin은 신연 시작 1일부터 신연 7일째까지 비슷한 강도로 관찰되었으며 그 후 감소하여 신연 시작 4주에는 관찰되지 않았다. 신연 시작 1일부터 osteocalcin의 발현이 관찰된 골막의 증식성 골원 세포는 골아세포로 분화하여 유골 기질을 형성하였던 바, 절골 후 3일간의 휴지기를 거쳐 1일간 신연하였던 군에서부터 분화된 골아세포에 의한 유골 기질 형성을 관찰할 수 있었고 이 때 osteocalcin은 골아세포 및 이에 인접한 유골 기질에서 관찰되었다(Fig. 9-A). 골아세포에서 osteocalcin은 7일간의 신연기간동안 비교적 강하게 관찰되었고(Fig. 9-B, C) 신연 완료 후 서서히 감소하여 신연 완료 후 3주(신연 시작 후 4주)에는 거의 관찰되지 않았으며, 유골 기질에

Fig. 9. Expression of osteocalcin in distraction osteogenesis. (A) Expression of osteocalcin in periosteal osteoprogenitor cells, osteoblast and osteoid matrix after 1 day of distraction, (B) after 5 days of distraction and (C) 7 days of distraction. (D) 3 weeks after the completion of distraction, osteocalcin was noted in osteoid matrix and not noted in osteoblast(X200).

서의 osteocalcin은 신연 1일째부터 관찰되기 시작하여 신연이 진행됨에 따라 그 정도가 증가하였고 신연 완료 후 3주(신연 시작 후 4주)까지 강하게 관찰되었다(Fig. 9-D). 신연 완료 후 3주(신연 시작 후 4주)군에서 osteocalcin은 유골기질에서만 관찰되었으며 골막의 골원세포 및 골아세포에서의 osteocalcin의 발현은 관찰할 수 없었다. 신연 시작 6주에는 신연 간격 및 인접 부위에서 osteocalcin의 발현은 관찰되지 않았다.

신연 시작 1일째부터 관찰되었던 절골 부위에 인접한 골외막으로 부터의 활발한 골형성은 신연 시작 후 5-7일경부터 신연 간격쪽으로 퍼져나갔으며(Fig. 10-B), 이는 골내막으로부터 형성된 신생골과 합하여져서 시간이 경과함에 따라 신연 간격을 채우는 양상을 보였다. TGase C는 신연 시작 1일군의 골외막 및 골내막 증식성 골원 세포에서 관찰되기 시작하여 신연 기간동안 약하게 관찰되다가(Fig. 10-A) 신연 완료 후 1주(신연 시작 후 2년)이후에는 거의 관찰되지 않았다. 신연 시작 1일부터 관찰되었던 골아세포

속적으로 관찰되었으며(Fig. 10-B, C), 그 후 발현 정도는 미미한 수준으로 감소하여 신연 완료후 5주(신연 시작후 6주) 이후에는 관찰되지 않았다.

고 찰

골은 손상후 완전한 재생을 기대할 수 있는 신체 내 특이한 기관임에도 골 수복에 있어 골 재형성의 자세한 기전은 잘 알지 못하고 있는 실정이다. 단지 몇가지의 성장 인자(growth factors)와 세포 증식 유도 인자들이 골의 재생 및 분화에 관련되어 알려져 있다.

실제로 골절 치유에 대한 조직학적 연구는 매우 미미한 상태로 이미 시행된 연구들도 혈관의 분포를 밝히거나 교원질 유형에 관한 것 등으로 대부분 특별한 분야에 국한되어 왔다. McKibbin¹⁹⁾은 골절 치유 과정에서 유골의 형성은 두가지의 서로 다른 근원을 갖는 세포들에 의해 서로 다른 방식으로 유래된다고 하였던 바, 그 중 하나는 골절 인접부 골막 및 골수의 골원성 세포들에 의한 일차성 유골 형성 반응으로 이 세포들은 직접 골절부의 골막 부위에서 막내골화에 의한 골형성을 이룬다고 하였다. 다른 하나의 유골 형성 방법은 골절 주위 조직에서 유래된 것으로서 이것은 연골형성 능력이 있는 원시 간엽세포에서 형성된다고 하였다. 본 실험의 경골

Fig. 10. Expression Tase C in distraction osteogenesis. (A) Expression of Tase C in periosteal osteoprogenitor cells and osteoblast after 5 days of distraction, (B) after 7 days of distraction and (C) 7 days after the completion of distraction(X200).

에서 Tase C는 골원 세포에서의 발현보다 강하게 관찰되어 신연 완료후 1주(신연 시작후 2주)까지 지

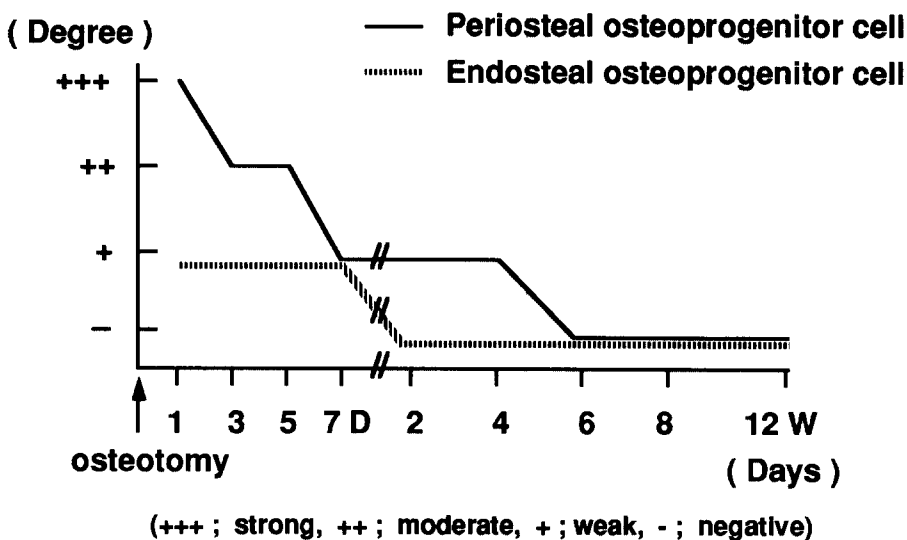


Fig. 11. Expression of BrdU in fracture healing

골절 치유과정에서는 연골내 골화에 비하여 막내 골화가 우세한 양상을 보였던바, 이는 여러가지 요인에 의한 것으로 설명되어 질 수 있을 것으로 사료된다. Von der Mark와 Conrad³¹⁾는 골절 부위의 고정기가 잘 될수록, 그리고 골절 부위의 산소분압이 양호할수록 연골내 골화에 의한 골형성 보다는 막내 골화에 의한 골형성이 잘 유도된다고 하였으며 McKibbin¹⁹⁾은 골절치유시 유연골 기질의 양은 고등 동물 일수록 적다고 하였다. 또한 Lindholm등¹⁸⁾은 골절치유시 가골이 크기는 골절부 골편 사이의 움직임 정도에 비례한다고 하였던바, 골절편 사이의 움직임으로 인해 주위 근육 및 혈관의 간접조직 형성이 증가되고 신생 혈관의 수도 증가하는 것이 가골 크기가 커지는 것과 관련 있는 것으로 생각하였다. 본 실험의 정상 골절 치유군에서는 경골 골절을 유발시킨 후 소형 외 골 고정기구를 사용하여 견고한 골절부 고정을 얻을 수 있었던 바 이로 인해 막내골화가 연골내골화보다 우세하고, 가골의 양도 적었던 것으로 사료되었다.

Osteocalcin의 분포에 대한 면역조직화학적 연구는 여러 저자들에 의해 행하여 졌던바, 쥐의 골^{4,12)}, 쥐의 치아¹⁰⁾ 등을 대상으로 하였다. Vermeulen 등³⁰⁾에 의하면 다클론 항체를 사용한 실험에서, osteocalcin은 골아세포와 골세포에서 관찰되었을 뿐 아니라 성숙골 기질에서도 관찰되었다고 하였다. 그들이 가골 형성 과정중에서의 연골세포에서 osteocalcin의 발현에 대해서는 언급하지 않았으나, 이들의 결과는 본 실험의 결과와 매우 유사한 결과라고 사료되었다. 본 실험에서는 정상 골절 치유과정 및 신연 골원 세포와 가골의 연골세포, 골아세포 및 유골 기질에서 osteocalcin의 발현을 관찰할 수 있었으나 유연골 가골에서는 그 발현을 관찰할 수 없었다 (Fig. 4-C, 6-C, 9-B, C).

본 실험에서 관찰된 바로는, 골절 인접부의 osteocalcin 양성 반응을 보이는 골원 세포들은 골절주위의 연부조직에서 기원하는 간엽 세포 보다는 확실히 골막의 세포들에서 기원하는 것으로 사료되었다. 골절후 1일째, 활발히 증식하는 세포들은 골막내에서 밀집되어 관찰되었으나 연부조직에서 기원하는 간엽 세포에서는 그런 활발한 증식을 보이지 않았으며 (Fig. 2-B), 이런소견은 골절 치유 전과정을 통해 관찰되었다. 골절치유 과정의 초기부터 활

발히 증식하던 상기 세포들은 치유 과정의 초기부터 osteocalcin에 강하게 염색되었으며 시간이 흐름에 따라 유골 기질을 형성하였고, 골절후 5일이 지나면서 형성된 유골 기질에서도 osteocalcin이 강하게 발현되었다 (Fig. 2-C, 3-C). 골절부위의 연골내 골화 부위에서 유연골 기질은 변연부에서 증식하는 세포에 의해 성장하였고 증식 세포들은 서서히 골아세포로 분화하였다. 증식 세포들은 항BrdU 항체에 의해 갈색으로 염색되는 핵이 관찰되는 세포들로서 구별되었고, 유연골 기질의 변연부에 위치하던 증식 세포들은 세포들이 유연골 기질내로 함몰되어 감에 따라 세포질내에 osteocalcin의 발현이 관찰됨으로써 변연부의 증식세포들이 비대 연골세포를 거쳐 골세포로 분화된다고 생각할 수 있었다 (Fig. 6-C). 이런 소견들은 골절부 가골 형성에 골절부 부위의 근육등을 포함하는 연부조직들이 기여를 하지 못한다고 한 Stafford등²⁴⁾의 결과와 매우 유사한 것으로서 이는 McKibbin (1978)¹⁹⁾의 견해와는 다른 것으로 매우 흥미롭다 하겠다.

절골 부위의 신연을 통한 신연 골형성과정은 일반적으로 절골부 양쪽에서 생긴 골외막 및 골수강 가골이 신연부를 연결하는 주로 막내 골화에 의한 골형성이 주종을 이루는 것으로 알려져 있으며^{7,16)}, Kojimoto등(1988)¹⁷⁾은 동물실험을 통하여 신연 골형성이 성공적으로 수행하려면 골외막의 보존이 매우 중요하다고 하였다. 이는 본 실험의 소견과도 일치하는 것으로 사료되었던 바, 본 실험의 신연 골형성시 BrdU 및 osteocalcin이 양성 반응을 보이는 골아세포로 분화되는 골원 세포의 증식과 골아세포에 의한 골형성은 주로 골외막에서 이루어졌고, 골내막으로부터의 골형성은 미미하였으며, osteocalcin에 양성반응을 보이는 골원 세포들이 신연간극이나 신연부 주위 연부조직에서 유래되는 소견은 관찰되지 않았다 (Fig. 8, 9). 즉 신연 1일째부터 골외막으로부터 형성되기 시작하던 신생골은 신연 기간 동안 계속 그 양이 증가하여 골내막으로부터 형성된 신생골과 함께 신연 간격을 채워나가는 양상을 보였다. 이와 같이 직접 골형성을 이루는 골원 세포의 존재 및 그 위치, 그리고 골형성의 정도는 osteocalcin에 대한 면역조직화학적 검사로 더욱 확실히 알 수 있었다.

신연 골형성과정에서 osteocalcin의 발현 위치는

정상 골절 치유군에서의 막내 골화예의한 골형성 과정의 순견과 유사하였으나, 골절 치유군에 비하여 발현 기간이 상대적으로 오래 지속되었다. 즉 신연 기간동안 osteocalcin은 골막 골원성 세포, 골아세포 및 유골기질에서 상당히 많은 양으로 지속적으로 관찰되었으며 신연 완료후에도 골막 골원 세포 및 골아세포에서는 약 2주간, 유골 기질에서는 약 4주간 더 관찰되었다(Fig. 13, 14). 이는 신연 효과로

인한 것으로 사료되며, 7일간의 신연 기간 뿐 아니라 신연 완료후 약 4주 정도의 상당한 기간 동안에도 활발한 골형성이 일어남을 의미한다 하겠다.

7일간의 신연 기간 중 유골 기질에서의 osteocalcin의 발현은 3일이 경과한 후 가장 강해져 신연 종료후 약 4주 동안 강하게 관찰되었던 반면, BrdU 염색으로 확인되었던 골막 골원 세포의 증식은 신연 시작 1일부터 신연 완료후 약 1주 까지 이루어 졌다

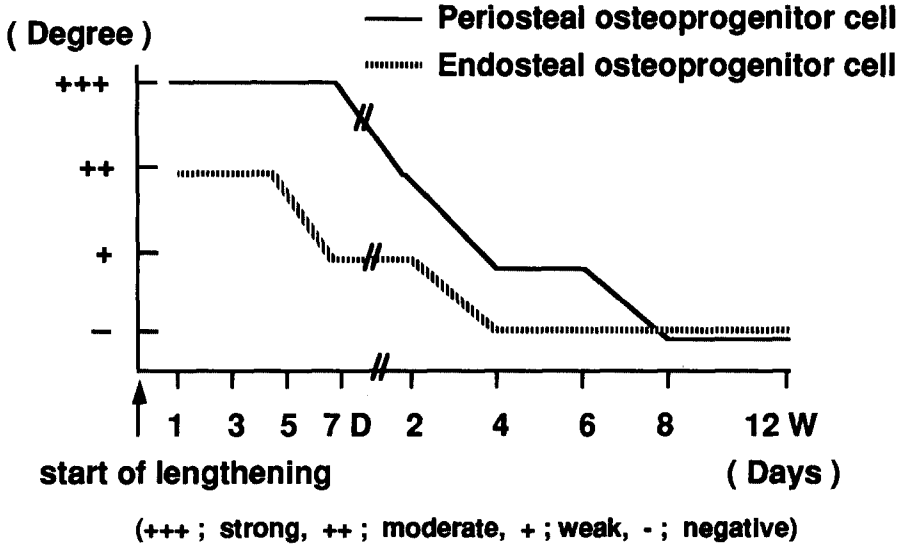


Fig. 12. Expression of BrdU in distraction osteogenesis

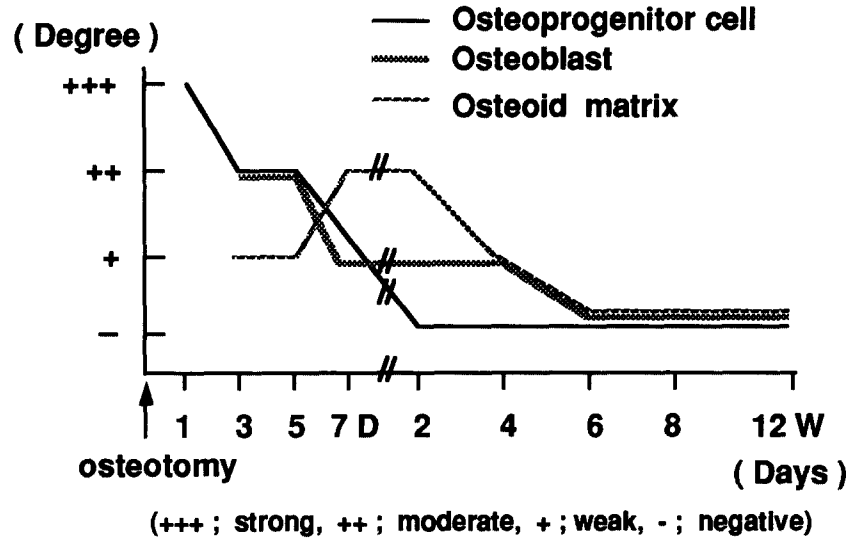


Fig. 13. Expression of osteocalcin in fracture healing

(Fig. 12, 14). 즉 7일간의 신연 기간 중 전반부에서는 골기질 형성에 비하여 골형성 세포의 증식과 분화가 주로 이루어 졌으며 신연 시작후 5일 부터 골기질 형성 및 mineralization이 활발하게 일어나기 시작하여 신연 완료후 약 4주까지 지속되었음을 알 수 있었으며 BrdU의 염색으로 확인되었던 골원 세포의 증식 및 osteocalcin 염색으로 확인된 골원 세포의 골아세포로의 분화는 주로 신연 기간에 일어

났으며 신연 완료 후에는 감소하는 경향을 보임을 알 수 있었다.

본 실험의 정상 골절 치유 과정 중 연골내 골화 과정에서 TGase C의 발현은 osteocalcin이 관찰되던 연골세포보다 더 가골의 중심부에 위치한 비대성 연골세포에서 관찰되었다(Fig. 6-C, D). 골 기질 형성 과정에서, 골 기질 단백질중 하나인 osteopontin 등을 기질로 갖는 TGase^{23,25)}와 역시 골기질

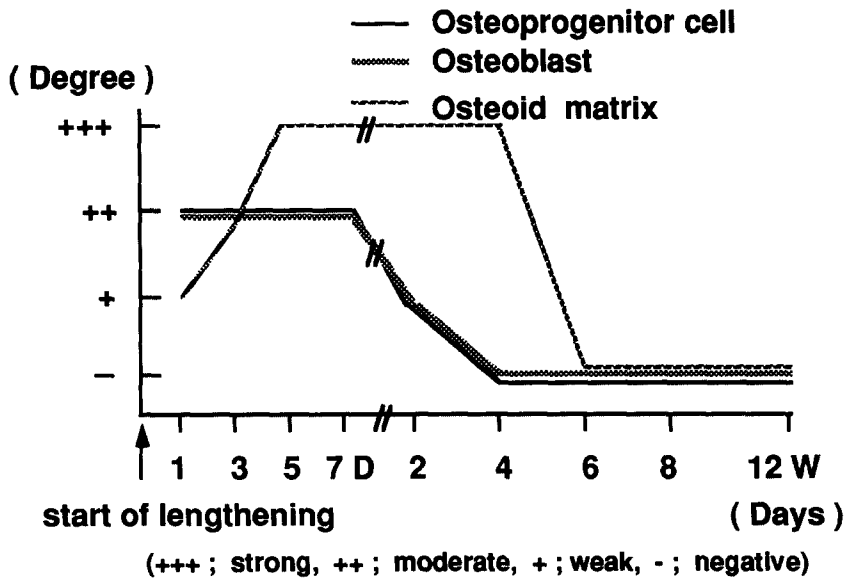


Fig. 14. Expression of osteocalcin in distraction osteogenesis

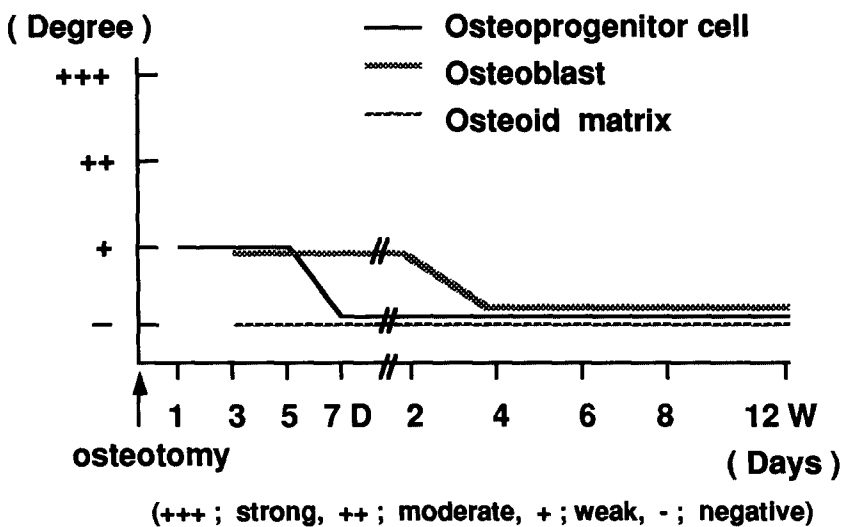


Fig. 15. Expression of TGase C in fracture healing

결과를 얻었다.

1. 단순 방사선 검사상, 정상 골절 치유군은 골절 후 약 6주에 완전한 골유합을 얻을 수 있었으며, 신연골형성군은 한번에 0.25mm씩, 하루에 2회, 7일간 신연으로 예상한 길이의 신연 및 신연부의 만족할 만한 골형성을 얻을 수 있었고, 신연 완료후 약 7주에 신연부의 견고한 골형성을 얻을 수 있었다.

2. BrdU의 발현은, 골절 치유 및 신연 골형성 과정에서 골외막 및 골내막의 골원 세포에 주로 나타났던바, 특히 골외막에서 현저하였으며, 골형성이 진행됨에 따라 BrdU 양성 세포인 증식 세포의 수도 감소되었다.

3. Osteocalcin은, 골절 치유 및 신연 골형성 과정의 막내 골화 부위에서 골원 세포, 골아세포, 골세포 및 유골기질에서 발현되었고, 연골내 골화 부위의 연골세포, 골세포 및 유골기질에서 발현되었던바, 골아세포와 유골 기질에서 가장 강한 양성 반응을 나타냈으며 골형성 과정이 진행되면서 그 반응이 소실되었다.

4. TGase C는, 골절 치유 및 신연 골형성 과정의 연골내 골화 부위에서 osteocalcin이 발현되는 연골세포보다 더 가골의 중심부에 위치한 비대성 연골세포에서 관찰되어, TGase C가 골기질 단백질의 안정화에 기여하며 그 발현이 연골세포의 최종 분화와 높은 상관 관계를 가지고 있음을 보여주고 있다고 사료되었다. 막내 골화 부위에서 TGase C는 골막의 증식하는 골원 세포와 골아세포에서 약하게 관찰되었으며 유골 기질에서는 음성이었다.

5. 신연 골형성 군에서 골원 세포의 증식과 골아세포로의 분화는, 주로 신연기간에만 일어났으며, 골기질 형성 및 mineralization은 신연 시작후 약 5일에 활발해져 신연 완료후 약 4주까지 지속되었다.

6. 외 고정기구로 고정한 골절 치유 과정 및 신연 골형성과정에서 골형성은, 주로 골외막 골원 세포들에 의한 막내 골화에 의해 이루어져, 골절 치유 및 신연 골형성이 성공적인 골형성을 위해서 골막의 보존이 매우 중요한 것으로 사료되었다.

REFERENCES

- 1) Aro HT : Internal remodelling of periosteal new bone during fracture healing. *J Orthop Res*, 8:238-246, 1990.
- 2) Barsigian C, Stern AM, Martinez J : Tissue transglutaminase covalently incorporates itself fibrinogen or fibronectin into high molecular weight complexes on the extracellular surface of isolated hepatocytes. *J Biol Chem*, 266:22509, 1991.
- 3) Biancop, Hayashi Y, Silvestrini G, Termine JD, Bonucci E : Osteonectin and Gla-protein in calf bone : Ultrastructural immunohistochemical localization using protein A-gold method. *Calcif Tissue Int*, 37:684-686, 1985.
- 4) Bronckers AL, Gray S, Dimuzio MT, Butler WT : Immunolocalization of gammacarboxyglutamic acid containing proteins in developing rat bones. *Cell Relat Res*, 5 : 273-281, 1985.
- 5) Camonda AJ, Butler T, Finkelman RD : Immunocytochemical localization of gamma-carboxyglutamic acid-containing protein(osteocalcin) in rat bone and dentis. *Calcific Tissue Int*, 40 : 349-355, 1987.
- 6) Clark DD, Mysek MJ, Neidle A : Incorporation of amines into protein. *Arch Biochem Biophys*, 79 : 338-347, 1959.
- 7) Delloye C, Delefortie G, Coutelier L, Vincent A : Bone regenerate formation in cortical bone during distraction lengthening. An experimental study. *Clin Orthop*, 250 : 34-42, 1990.
- 8) Folk JE : Transglutaminases. *Ann Rev Biochem*, 49 : 517-531, 1980.
- 9) Frost HM : The biology of fracture healing. *Clin Orthip*, 248 : 283-293, 1988.
- 10) Gorter de vries E, Quartier E, Boute P, Wisse E, Coomans D : Immunocytochemical localization of osteocacin in developing rat teeth. *J Dent Res*, 66 : 784-792, 1987.
- 11) Gratzner HG : Monoclonal antibody to 5-brome and 5-iododeoxyuridine : A new reagent for detection of DNA replication. *Science*, 218 : 474-475, 1982.
- 12) Groot CG, Danes JK, Blok J, Hoogendijk A, Hauschka PV : Light and electron microscopy demonstration of osteocalcin antigenicity in embryonic abd adult rat bone. *Bone*, 7 : 379-385, 1986.
- 13) Hauschka PV, Lian JB, Gallop PM : Direct identification of the calcium binding amino acid, gammacar-

- boxyglutamate, in mineralized tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 72 : 3925, 1975.
- 14) **Hauschka PV** : Osteocalcin ; The vitamine K-dependent Ca^{++} binding protein of bone matrix. *Haemostasis*, 16 : 258-272, 1986.
 - 15) **Hulth A** : Current concept of fracture healing. *Clin Orthop*, 249 : 265-284, 1988.
 - 16) **Ilizarov GA** : The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues, *Clin Orthop*, 239 : 263-285, 1988.
 - 17) **Kojimoto H, Yasui N, Goto T, Matsuda S, Shimomura Y** : Bone lengthening in rabbits by callus distraction. The role of periosteum and endosteum. *J Bone and Joint Surg*, 70-B : 543-549, 1988.
 - 18) **Lindholm RV, Lindholm TS, Toikkanen S** : Effect of forced inter-fragmental movements on the healing of tibial fracture in rats. *Acta Orthop Scand*, 40 : 721-732, 1969.
 - 19) **McKibbin B** : The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg*, 60-B : 150-162, 1978.
 - 20) **Nishimoto SK, Prince PA** : Secretion of vit K-dependent protein of bone by rat osteosarcoma cells : Evidence for an intracellular precursor. *J Biol Chem*, 255 : 6579-6583, 1980.
 - 21) **Park SC, Kim SY, Kim HC, Song KY** : Differential expression of transglutaminases in human foreskin and cultured keratinocyte. *J Cell Biol*, 197 : 139-151, 1989.
 - 22) **Prince PA, Otsuka AS, Poster JW, Kristaponis J, Raman N** : Characterization of a gammacarboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 73 : 1447-1456, 1976.
 - 23) **Prince CW, Dickie D, Krumdieck CL** : Osteopontin, a substrate for transglutaminase and factor XIII activity. *Biochem Biophys Res Comm*, 177 : 1205-1210, 1991.
 - 24) **Stafford H, Oni OA, Hay J, Gregg PJ** : An investigation of the contribution of the extraosseous tissue to the diaphyseal fracture callus using a rabbit tibial fracture model and in situ immunocyte chemical localization of osteocalcin. *J Orthop Trauma*, 6 : 190-194, 1992.
 - 25) **Sane DC, Moser TL, Phippen AHM, Parker CJ, Achyuthan KE, Greenberg CS** : Vitronectin is a substrate for transglutaminase. *Biochem Biophys Res Comm*, 157 : 115-120, 1988.
 - 26) **Seong SC, Song KY, Lee MC, Park SC** : Immunohistochemical localization of transglutaminase isoenzymes in the fracture site and epiphyseal plate. *J Kor Orthop Ass(Eng. Ed)*, 28(4) : 1427-1435, 1993.
 - 27) **Termine JD, Kleinmann HK, Whitson SW** : Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell*, 26 : 99-105, 1981.
 - 28) **Triffitt JT** : Initiation and enhancement of bone formation. *Acta Orthop Scand*, 58 : 673-671, 1987.
 - 29) **Urist MR, Lietze A, Mizutani M, Takagi K, Triffitt JT, Amstutz J, Delange R, Termine J, Finerman GAM** : A bovine low molecular weight bone morphogenic protein fraction. *Clin Orthop*, 162 : 219-232, 1982.
 - 30) **Vermeulen AHM, Vermeer C, Bosman FT** : Histochemical detection of osteocalcin in normal and pathological human bone. *J Histochem Cytochem*, 37 : 1503-1508, 1989.
 - 31) **Von der Mark K, Conrad G** : Cartilage cell differentiation, *Clin Orthop*, 139 : 185-205, 1979.
 - 32) **Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Witters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA** : Novel regulators of bone formation : Molecular clones and activities. *Research Articles*, 16 : 1528-1539, 1988.