

## 닭의 대퇴부 골단조직의 세포증식에 대한 면역조직화학적 관찰

곽수동 · 김종섭 · 강정부

경상대학교 수의과대학  
(1994년 3월 18일 접수)

### Immunohistochemical observations of proliferating cells in distal epiphyseal tissue of chicken femurs

Soo-dong Kwak, Chong-sup Kim, Chung-boo Kang

College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University  
(Received March 18, 1994)

**Abstract:** The present study was focussed to assess the proliferating cells in the distal epiphyseal tissue of the chicken femur by immunohistochemical staining methods.

Four chickens were administrated intraperitoneally by twice consecutive injections, 1 day interval with bromodeoxyuridine(Brdur, 0.05 mg/gm BW/time), and then were killed by exsanguination of jugular vein at 2 hours after last injection. Samples were taken from femur distal epiphyseas of chicken. Labeling indexes(LI) were calculated as the ratio of the number of anti-Brdur monoclonal antibody-labeled cells in the each tissue layers from basal layer of the integument to bone marrow.

The overall LI were found to be  $13.90 \pm 3.44\%$ ,  $30.03 \pm 7.52\%$ ,  $16.00 \pm 9.41\%$ ,  $0.00 \pm 0.00\%$  and  $60.03 \pm 13.39\%$  at basal layer of integument, perichordrium, reserving zone in cartilage, hypertrophic zone in cartilage and bone marrow respectively. LI in proliferating zone of cartilage were found to be  $36.99 \pm 7.59\%$ ,  $32.83 \pm 5.38\%$  and  $22.02 \pm 6.27\%$  at reserving zone side region, middle region, and hypertrophic zone side region respectively. The tissue layers with higher LI were odered as bone marrow, reserving zone side region in proliferating zone, middle region in proliferating zone, perichondrium, hypertrophic zone side region in proliferating zone. reserving zone of cartilage and basal layer of integument.

These data indicate that the overall LI in the each tissue layer of distal epiphyseas of the chicken femur were concluded to be higher than that in another tissue of adult birds but hypertrophic zone of cartilage were appeared to be not proliferating cells.

**Key words :** proliferating cells, bromodeoxyuridine, immunohistochemistry, chicken femurs

### 서 론

동물이 개체는 지속되고 있어도 그 개체의 조직내 세

포는 일정한 주기로 새로운 세포로 대체되고 있다. 세포분열은 연령, 장기, 조직, 세포의 기능 및 정상 여부 등에 따라서도 세포분열 주기에 현저한 차이가 있다.

특히 태아기의 세포, 상처부위의 세포, 종양세포등은 다른 세포 보다도 분열력이 더 왕성하고 근육세포는 분열력이 약하며 신경세포는 유아기 이후에는 분열이 일어나지 않는다.

분열세포의 검색은 과거에는  $^3\text{H}$ -thymidine( $^3\text{H}$ -TdR)을 이용한 방사선 자기법(자기방사법)을 가장 많이 이용하여 왔다.<sup>1,8</sup> 이 방법은 방사선 同位元素로 결합시킨  $^3\text{H}$ -thymidine을 투여하면 증식하려는 세포에서 복제하는 DNA에 흡수 결합하게 하여 이 세포를 방사선 자기법으로 표지되도록 하여 규명하는 방법이다. 그러나 이 방법은 조직을 4~5주간 냉장 暗室에서 感作시키는 문제, 방사능 오염방지를 위한 취급시설, 조직내 back ground grains과 fog의 출현 등 개선할 문제점이 많다.

근래에는 면역조직화학적 방법을 이용하여 분열세포를 검색하는 간편한 방법이 개발되었다.<sup>9,21</sup> 이 방법은 실험기간을 단축할 수 있어 정상 동물에서 세포의 신생과 교체,<sup>9,11,12,15,16,18,21</sup> 조직손상으로 인한 傷處治癒, 癥 등 각종 腫瘍진단과 치료,<sup>9,12,17</sup> hormone이 영향을 미치는 세포의 규명<sup>13,14</sup> 등 발생학, 조직학 및 병리학 등에 광범하게 방사선 자기법을 대신하여 연구가 집중되고 있는 현상이다.

이 방법의 원리는 세포가 증식하며 합성기에 있을 때 bromodeoxyuridine(Brdur)을 투여하여 이들 물질과 결합하게 하여 이 조직에 이들 각 물질에 대한 monoclonal antibody를 이용하여 면역조직 화학적 방법으로 發色토록 하여 분열세포를 檢索하는 방법이다.

성장기의 동물의 골단부는 세포증식이 가장 많이 일어나는 부위에 속한다. 이러한 부위에서 조직의 각 층에서 세포증식의 양상을 조사하는 것은 이 부위의 상처치유, 골절의 치유, 성장 등을 연구하는데 기초자료가 될 것으로 판단된다.

본 연구는 병아리를 대상으로 Brdur을 투여하여 대퇴골의 골단부에서 각 조직층 별로 세포분열이 일어나는 차이를 면역 조직화학적 방법으로 조사한 결과를 보고코자 한다.

## 자료 및 방법

공시동물의 처치 : 20일령 중추 4수(아베에िका, 430~500gm)를 Brdur(Sigma)을 체중 당 0.05mg 씩 되게 saline에 희석하여 24시간 간격으로 2회 복강내 주입하고 2회째 주입 1시간 후, 경정맥을 절단하고 방혈한 후 대퇴골의 골단부를 피부와 골조직을 포함하여 조직검사용으로 채취하였다.

조직화학적 염색 : 채취한 뼈 조직에 석회분을 제거하기 위하여 5% nitric acid( $\text{HNO}_3$ )에 침지하여 3일이상 경과시킨후 10% 중성 formalin에 48시간 이상 재고정하고 paraffin 절편을 만들어 vectabond reagent (Vector Lab)로 coating한 glass에 부착하여 탈 paraffin한 후에 0.1M phosphate-buffer(PBS, pH 7.4)에 수세하였고 0.3% 과산화수소수 PBS에 30분간 처리한 후 2N HCl에 1시간 동안 처리하고 0.1M PBS에 5분씩 3번 수세하고 0.1% proteinase에 10분간 처리하여 phosphate buffer goat serum Triton X-100(PBGT)에 1:100-1:200으로 희석한 anti-Brdur mouse Ig G (Oncogene Sci)를 1차 항체로 하여 overnight 처리한 후 0.1M PBS로 3번 각 5분씩 수세하였다. 그리고 anti-mouse Ig G를 PBGT에 1:100-1:250으로 희석한 용액을 2차 항체로 하여 1시간 처리한 후 다시 0.1M PBS에 5분씩 3회 수세하였다. 다음 3차 항체인 mouse peroxidase anti-peroxidase(Sigma) complex를 PBGT에 1:100-1:300으로 희석하여 1시간 실온에서 반응시킨 다음 PBS에 5분간 3회 수세한 후 0.5% 과산화수소수 Tris buffered saline saline(TBS 0.05 M/L, pH 7.6)용액에 0.005% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB, Sigma)를 희석하여 5~10분간 발색시키고 hematoxylin으로 대조염색을 한후, 증류수에 수세하여 mounting하고 표면의 피부에서 골수까지 조직내 세포 중에 黃赤色으로 核이 發色된 세포를 분열로 표지된 세포(이하 표지된 세포)로 간주하고 전체세포에 대한 표지된 세포의 비율을 micro-reticle이 장치된 광학 현미경으로 관찰하였다.

## 결 과

닭에 Brdur를 투여한 후 anti-Brdur monoclonal antibody를 이용하여 면역 조직화학적 방법으로 대퇴부 골단부에 세포의 분열상을 조사하기 위하여 이 골단의 조직을 피부에서 골수까지 조직의 층별로 각 층의 부위당 10-20개의 현미경 시야에서 시야당 200-300개의 세포에서 발색되어 표지된 세포의 분포(단, 골수는 성숙세포만으로 구성된 저장집단세포는 조사대상에서 제외함)를 조사하였던 바, 피부는 기저층세포에서만 일어났고 연골부에서는 분열연골세포의 분포율이 높았으나 부위에 따라 증식율의 차이가 많아 5개부위로 세분하게 되었다. 골수에서는 분열이 일어나는 세포는 혈구의 기간세포가 주었고 그의 지방세포, 결합조직의 세망세포, 내피세포, 골모세포 등이 있었다.

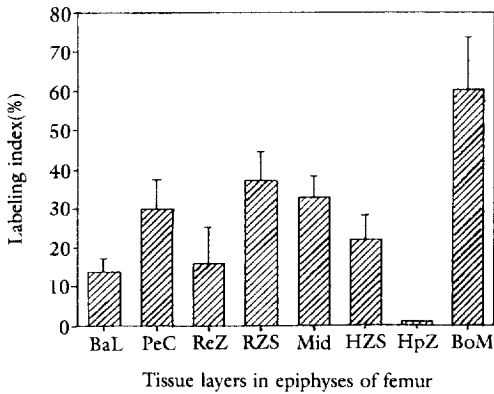


Fig 1. Labeling index (%) of proliferating cells in the distal epiphyses of chicken femur

BaL; basal layer of epithelium, PeC; perichondrium, ReZ; reserving zone in cartilage, RZS; reserving zone side region in proliferating zone of cartilage, Mid; middle region in proliferating zone of cartilage, HZS; hypertrophic zone side region in proliferating zone of cartilage, HpZ; hypertrophic zone of cartilage, BoM; bone marrow

이들 전체세포에 대한 분열세포의 비율을 조사하기 위하여 Fig 1과 같이 피부기저층, 연골막, 연골, 골수의 4개 층으로 구분하고 연골은 다시 보존대, 증식대의 보존대쪽 부위, 증식대의 중간부위, 증식대의 비대대쪽 부위, 연골의 비대대 및 골수 등 8개부위로 구분하고 8개부위 조직층별로 전체 세포중에 세포분열이 표지된 세포의 비율을 조사 하였던 바, 피부의 기저층(Photo 1, 2)은  $13.90 \pm 3.44\%$ , 연골막(Photo 3)은  $30.03 \pm 7.52\%$ , 연골의 보존대(Photo 4)는  $16.00 \pm 9.41\%$ 였고, 연골 증식대(Photo 5)에서는 보존대쪽 부위는  $36.99 \pm 7.59\%$ , 중간 부위는  $32.83 \pm 5.38\%$ , 비대대쪽 부위는  $22.02 \pm 6.27\%$ , 연골의 비대대(Photo 6)는  $0.00 \pm 0.00\%$ , 골수(Photo 7)는  $60.03 \pm 13.39\%$ 였다. 이들 8개 부위 조직층 중에서 표지된 세포의 비율이 높은 순서는 골수, 연골증식대의 보존대쪽 부위, 연골증식대의 중간부위, 연골막, 연골 증식대의 비대대쪽 부위, 연골의 보존대, 기저막 순이었고 연골의 비대대에서는 표지된 세포가 관찰되지 않아 증식이 전혀 일어나지 않는 것을 알 수 있었고 연골의 비대대를 제외하고는 모든 조직층에서 높은 세포분열이 일어나고 있었다.

## 고 찰

증식세포로서 표지된 세포의 비교에 대하여는  $^3\text{H}$ -

Tdr를 이용한 방사선 자기법에 의하여 사람의 위에서 일정 부위의 전체 세포중에 분열세포의 비율에 대하여 Bom et al<sup>1</sup>은 19.4%, Gutierrez et al<sup>3</sup>은  $19.3 \pm 1.9\%$ 였다고 한 바 있고 Inokuchi et al<sup>4</sup>은 mouse 12지장에서 17.9%, Cheng<sup>2</sup>은 mouse 12지장에서  $42.9 \pm 6.0$ , 공장 은  $30.4 \pm 8.4\%$ 로 보고한 바 있고 대장에서는 McGaerity et al<sup>5</sup>은 rat의 결장에서  $53.2 \pm 1.4\%$ 와  $64.3 \pm 5\%$ 로 보고한 바 있다. 대뇌에서는 광<sup>7</sup>은 mouse에서 2.3%에서 32%까지 부위에 따라 차이가 있음을 보고한 바 있다. Brdru를 이용한 면역 조직화학적 방법으로는 Bom et al<sup>1</sup>은 사람의 위에서 18.0%, 소장에서 24.2%, Defazio et al<sup>9</sup>은 mouse의 골수에서  $19.7 \pm 1.6\%$ , Hayaishi et al<sup>12</sup>는 전이성 종양에서 8-29%, 뇌교세포 아종(glioblastoma)에서 3-20%였다고 보고한 바 있다. 분열 세포에 대한 조사는 mouse, rat, 사람의 소화기관 상피 세포나 종양 등에서 주로 연구된 바 있으나 정상적인 연골이나 골수에 대하여는 연구된 바를 찾아 볼수 없었고 특히 닭에 대하여는 조사된 바가 없어 본 조사 결과와 는 비교 할 수 없었다.

본 조사에서 피부의 기저층  $13.90 \pm 3.44\%$ , 연골막  $30.03 \pm 7.52\%$ , 연골의 보존대  $16.00 \pm 9.41\%$ 였고, 연골 증식대에서는 보존대쪽 부위  $36.99 \pm 7.59\%$ , 중간 부위  $32.83 \pm 5.38\%$ , 비대대쪽 부위  $22.02 \pm 6.27\%$ , 연골의 비대대  $0.00 \pm 0.00\%$ , 골수  $60.03 \pm 13.39\%$ 는 mouse, rat 및 사람 등의 각 장기별 표지된 세포의 비율 보다는 상당히 높은 편이고 특히 골수의  $60.03 \pm 13.39\%$ 는 Defazio et al<sup>9</sup>의 mouse골수의  $19.7 \pm 1.6\%$  보다는 월등히 높은 편이다. 이는 골수의 세포조사에서는 이미 분열되어 저장상태에 있는 저장집단 세포는 제외하였기 때문에 월등히 높은 것으로 생각된다.

본 조사에서 연골막, 연골의 증식부위, 골수 등의 분열세포의 비율은 위 보고된 전이성 종양의 최고치 29%와 뇌교세포아종 20% 보다는 높은 것은 종양보다도 골단부의 증식이 더 왕성하다는 것을 알 수 있다. 그러나 연골의 비대대에서 분열세포가 전혀 관찰되지 않는 것은 세포증식은 일어나고 있지 않으나 골조직으로 변화가 일어나는 부위로 연골세포가 괴사되고 골조직으로 전환하는 전단계이기 때문으로 믿어진다. 골모세포의 분열은 골수의 경계부에서 일어나고 있어 골수의 분열 세포에 포함시켰으므로 별도 나타내지 않았으나 분열율은 골수의 다른 조형세포 보다 월등히 낮았다.

동물별, 부위별 차이가 있기 때문에 상호 대비는 어려우나 실험대상 동물이 성장 왕성한 병아리의 골단부이기 때문에 분열세포의 비율이 높은 것으로 생각된다.

## 결 론

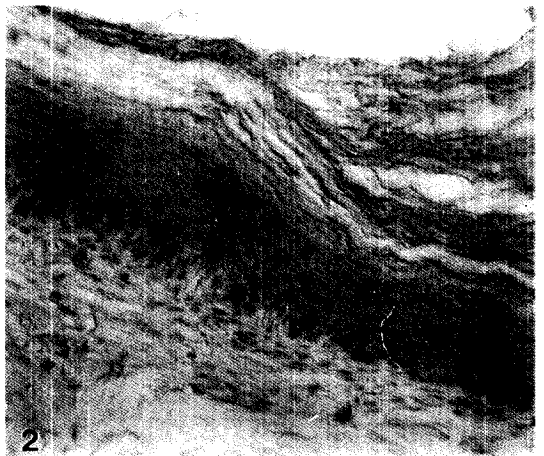
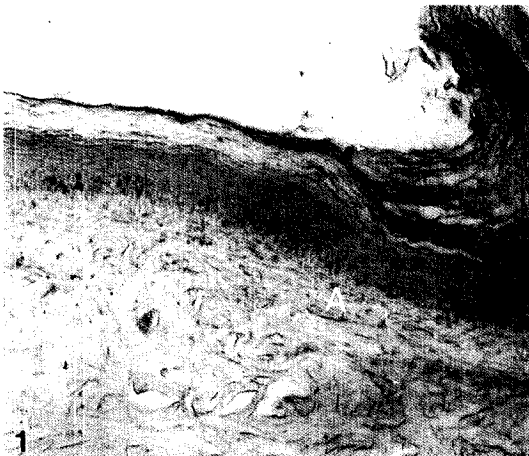
닭에 대퇴부 골단부의 세포분열상을 조사하기 위하여 bromodeoxyuridine(Brdur)을 투여한 후 anti-Brdur monoclonal antibody를 이용한 면역조직 화학적인 방법으로 분열세포를 표지토록 한 후 피부의 표면층으로부터 각 조직을 8개 층으로 구분하고 각 조직 층별로 전체 세포층에 표지된 세포의 비율을 조사하였던 바 피부의 기저층  $13.90 \pm 3.44\%$ , 연골막  $30.03 \pm 7.52\%$ , 연골의 보존대  $16.00 \pm 9.41\%$ 였고, 연골 증식대에서는 보

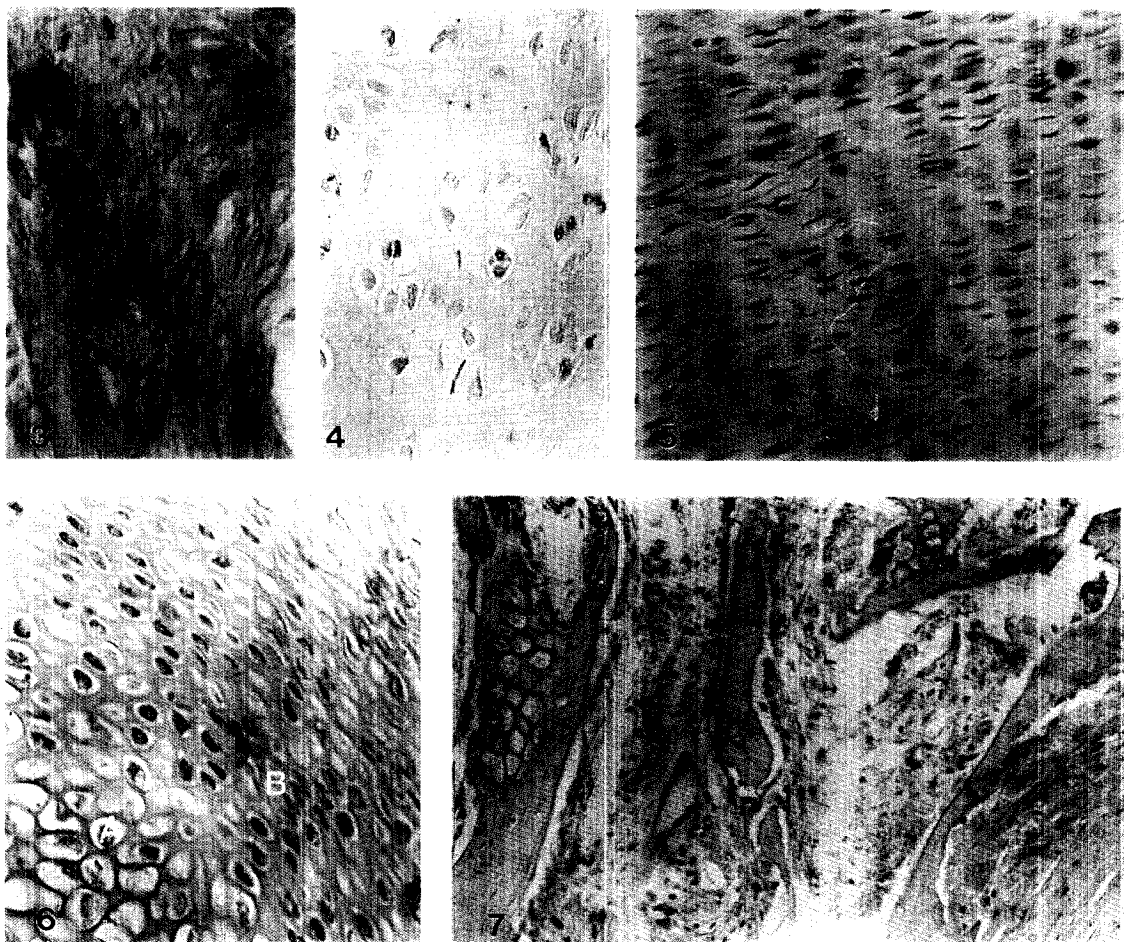
존대쪽 부위  $36.99 \pm 7.59\%$ , 중간 부위  $32.83 \pm 5.38\%$ , 비대대쪽 부위  $22.02 \pm 6.27\%$ , 연골의 비대대  $0.00 \pm 0.00\%$ , 골수  $60.03 \pm 13.39\%$ 였다.

연골의 비대대에서는 표지된 세포가 관찰되지 않아 증식이 전연 일어나지 않고 있음을 알 수 있었다. 이들 8개 부위 조직층 중에서 표지된 세포의 비율이 높은 순서는 골수, 연골증식대의 보존대쪽 부위, 연골증식대의 중간부위, 연골막, 연골 증식대의 비대대쪽 부위, 연골의 보존대, 기저막 순이었고 연골의 비대대를 제외하고는 모든 조직층에서 높은 세포분열이 일어나고 있었다.

## Legends for photographs

- Photo 1. The bromodeoxyuridine(Brdur)-labelled cells were seen on the basal layer of the integument in the distal epiphyses of the chicken femur. immunohistochemical staining. X 100.
- Photo 2. Higher magnification of "A" region in Fig 1. immunohistochemical staining. X 200.
- Photo 3. The Brdur-labelled cells were seen in the perichondrium of the distal epiphyses. immunohistochemical staining. X 200.
- Photo 4. The Brdur-labelled cells were seen on the reserving zone of the cartilage in the distal epiphyses. immunohistochemical staining. X 100.
- Photo 5. Numerous Brdur-labelled cells were seen on the proliferating zone of the cartilage in distal epiphyses. immunohistochemical staining. X 200.
- Photo 6. The Brdur-labelled cells were mainly seen on the hypertrophic zone side region (B) in the proliferating zone but these cells in the hypertrophic zone (A) were not seen. immunohistochemical staining. X 200.
- Photo 7. The Brdur-labelled cells were predominantly located in the bone marrow. immunohistochemical staining. X 100.





## 참 고 문 헌

1. Bom HS, Yoon CM, Rew DS, et al. Autoradiographic and immunohistochemical study on the proliferative kinetics of intestinal metaplasia, *Korean J Interanl Medicine* 1991; 6(1):8-15.
2. Cheng H. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell cell types in the mouse small intestine. II. Mucous cells. *Am J Anat* 1974; 141:481-502.
3. Gutierrez O, Lehy T, Rene E, et al. Epithelial cell proliferation in human fundic and antral mucosae; Influence of supersensitive vagotomy and relationship with gastritis. *Digestive Disease and Science* 1985; 30:1034-1042.
4. Inokuchi H, Fujimoto S, Hattori T, et al. Tritiated thymidine radioautographic study on the origin and renewal of secretin cells in the rat duodenum. *Gastroenterology* 1985; 89:1014-20.
5. McGarrity TJ, Peiffer LP, Colony C. Cellular proliferation in proximal and distal rat colon during 1, 2-diamethylhydrazine-induced carcinogenesis. *Gastroenterology* 1988; 95:343-348.
6. Richards TH, The effects of the carcinogen, 1, 2-dimethylhydrazine, of turnover of  $^3\text{H}$ -thymidine labeled cells from mucosal glands of mouse colon. *Anat Rec* 1981; 200; 299-308.
7. 광수동. 腦神經膠細胞集團의 發生과 移動에 대한 放射線 自記法的 관찰. II. 腦 外胚葉性 神經膠細胞의 分裂과 移動에 대하여. *대한수의학회지* 1992; 32(4):489-496.
8. 이차수, 태반형성(Golden hamster)에 있어서 Autoradiography에 의한 분열세포의 소장. *대한수의학회지* 1983; 23(1):1-8

9. DeFazio A, Leary JA, Hedley DW, et al. Immunohistochemical detection of proliferating cells in vivo. *J Histochem Cytochem* 1987; 35:571-577.
10. Dombrowicz D, Delahaut P, Danguy A, et al. Detection of cell proliferation in pig testis and intestine sections using monoclonal anti-bromo deoxyuridine antibody and immunogold silver staining. *Histochemistry* 1988; 90(1):31-35.
11. Harms G, Goor HV, Koudstaal J, et al. Immunohistochemical demonstration of DNA-incorporated 5-bromo-deoxyuridine in frozen and plastic embedded sections, *Histochemistry* 1986; 85:139-143.
12. Hayashi Y, Koike M, Matsutani M, et al. Effects of fixation time and enzymatic digestion on immunohistochemical demonstration of bromodeoxyuridine in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, *J Histochem Cytochem* 1988; 36:511-514.
13. Hild-petito S, Verhage HG. Immunocytochemical localization of estrogen and progesterin receptors in the Baboon (*Papio anubis*) uterus during implantation and pregnancy. *Endocrinology* 1992; 130:2343-2353.
14. Hild-petito S, Stouffer RL, Brenner RM. Immunocytochemical localization of estradiol and progesterone receptors in the monkey ovary throughout the menstrual cycle. *Endocrinology* 1988; 123:2896-2905.
15. Labrecque C, Huard J, Dansereau G, et al. In vitro bromodeoxyuridine labeling of nuclei; Application to myotube hybridization. *J Histochem Cytochem* 1991; 39(10):1421-1426.
16. Lacy ER, Kuwayama H, Cowart KS, et al. A rapid, accurate, immunohistochemical method to label proliferating cells in the digestive tract. *Gastroenterology* 1991; 100:262.
17. Morstyn G, Hsu SM, Kinsella T, et al. Bromodeoxyuridine in tumors and chromosomes detected with a monoclonal antibody. *Clinic Investigation* 1983; 72:1844-1850.
18. Potten CS, Kellett M, Roberts SA, et al. Measurement of in vivo proliferation in human colorectal mucosa using bromodeoxyuridine. *Gut* 1992; 33:71-78.
19. Raza A, Spiridonidis C, Ucar K, et al. Double labeling of S-phase murine cells with bromodeoxyuridine and a second DNA-specific probe. *Cancer Research* 1985; 45:2283-2287.
20. Risio M, Coverlizza S, Ferrari A, et al. Immunohistochemical study of epithelial cell proliferation in hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas of the large bowel. *Gastroenterology* 1988; 94: 899-906.
21. Schutte B, Reynders MMJ, Bosman FT, et al. Studies with anti-bromodeoxyuridine antibody: Simultaneous immunohistochemical detection of antigen expression and DNA synthesis by vivo labeling of mouse intestinal mucosa. *J Histochem Cytochem* 1987; 35(3):371-374.