

성장 중인 흰쥐 악관절의 basic fibroblast growth factor(bFGF) 분포에 관한 면역조직화학적 연구

김종하 · 이상철

경희대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Abstract

IMMUNOHISTOCHEMICAL PROFILE OF BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR(bFGF) IN GROWING RAT T-M JOINT

Jong-Ha Kim, DDS, MSD, Sang-Chull Lee, DDS. Ph.D.

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Dentistry, Kyung-Hee University

This study was designed to localize the distribution of basic fibroblast growth factor(bFGF) in the developing rat condylar region and to elucidate the associated function of bFGF in the condyle development. The condyles of temporomandibular joint of Sprague-Dawley rats (27g of weight) were used. The tissues were examined with electron microscope and immunohistochemical method.

The results were as follows:

1. The developing condylar region are divided in to 5 zones apparently: proliferative, maturation, hypertrophic, calcifying, and ossification zones.
2. The cells in the proliferative zone are condensed and have under-developed cell organells in the cytoplasm. This zone shows a strong immunoreactivity of bFGF.
3. The cells in the maturation zone are typical chondroblasts showing well-developed cell organells and round nucleus. The cartilaginous matrix does not show the immunoreactivity of bFGF, while the chondroblasts show the immunoreactivity.
4. The cells in the hypertrophic zone show hypertrophic change having the degenerated cell organelles and small nucleus. There are no immunoreactivity of bFGF in this zone except the nucleus and endoplasmic region showing mild immunoreactivity.
5. The cells in the calcifying zone show hypertrophic change and cell organelles are disappeared. The cells are surrounded by the calcified cartilaginous matrix. There are no immunoreactivity of bFGF in this zone except the endoplasmic region showing mild immunoreactivity.
6. In the zone of bone formation, chondroblasts are disappeared. Newly differentiated osteoblasts secreting osteoid around the calcified cartilaginous matrix. The bone marrow shows the immunoreactivity of bFGF, while the bone matrix does not show the immunoreactivity of bFGF.

I. 서 론

성장인자는 조직발생, 치유 및 재생에 관련되는 세포를 포함한 여러 종류의 세포증식 (proliferation), 세포이동 (migration), 혹은 바탕질 합성 (matrix synthesis)을 조절하기 위해 생체에서 자연적으로 분비되는 생물학적 중계물질(biologic mediator)의 한 종류이다. 조직발생 중 성장인자의 역할, 즉 세포증식, 세포이동, 바탕질 합성을 위한 국소조절인자 (local regulator)로서 조직 치유와 재생에 필수요소이므로, 조직치유와 재생에 가장 중요한 성장인

자에 관하여 많은 연구가 진행되고 있다. 세포간의 정보교환은 다음 두가지 방법으로 가능하다. 즉, 세포와 세포의 직접적인 접촉이나 한 세포에서 합성분비한 전달물질이 다른 세포막 수용체에 전달되는 방법 등을 들 수 있다.

세포들은 세포막 수용체의 발달과 사이토카인 같은 여러 가지 물질들을 합성분비 함으로써 서로 간에 정보를 교환할 수 있고 세포자체의 기능에도 영향을 미칠 수 있다. 세포들이 이런 물질들을 인식하거나 포착하면 세포의 기능과 세포의 표현형 (phenotype)에 영향을 주게 된다. 현재에는 점점 많은 수의 사이토카인이 발견되고 있으며, 그 중 중요한 것의 하나는 성장인자 (growth factor)이다. 많은 선학들의 연구에 의하면 여러가지 성장인자는 연골세포의 분화와 성장에 중요하다고 보고되었다¹⁾.

Fibroblast growth factor (FGF)는 세포분열, 세포의 화학주성 (chemotaxis), 세포의 분화를 자극시키는 다능성 (multipotential)인 18-kDa의 polypeptide이다. FGF과(family) 중 가장 오래전에, 그 성질이 잘 알려진 것으로 FGF-1 (acidic FGF: aFGF)과 FGF-2 (basic

이 상 철

130-702, 서울특별시 동대문구 회기동 1
경희대학교 치과대학 구강악안면외과학교실

Sang-Chull Lee

Dept. of OMFS, College of Dentistry, Kyung-Hee University
1, Hoegi-Dang, Dongdaemun-Gu, Seoul, 130-702, Korea
Tel: 82-2-958-9441 Fax: 82-2-966-4572

FGF: bFGF)가 있다. 이 두 가지는 신호펩티드를 가지지 않았음에도 불구하고 세포 외에도 존재하며, 생체 내에 널리 분포되어 있다. 여러 가지 성장인자 중, 이전에 그 유래 및 성질이 다른 이름으로 알려졌던 endothelial cell growth factor (ECGF), α -heparin binding growth factor (HGF α), eye-derived growth factor II (EDGF II), α -retina-derived growth factor (α RDGF), anionic hypothalamus-derived growth factor (aHDGF)는 FGF-1 군에 해당되며, β -heparin binding growth factor (HGF β), tumor angiogenesis factor (TAF), eye-derived growth factor-I (EDGF I), β -retina-derived growth factor (β RDGF), cartilage-derived growth factor (CDGF), cationic hypothalamus-derived growth factor (cHDGF) 등을 FGF-2와 동일한 것이라고 생각하고 있다²⁾.

최근 Gonzalez 등³⁾은 18일 된 흰쥐 태아에서 bFGF를 분리하였고, Peters 등⁴⁾은 생쥐 사지뼈의 연골내골화 과정에서 bFGF가 생성되어 분포한다고 보고하였다. 또한 Jinguishi 등⁵⁾은 흰쥐 경골성장판에서 aFGF와 bFGF 및 TGF- β 1이 분포된다고 보고하였고, Twal 등⁶⁾ 마우스의 경골골단 성장판에서 bFGF를 분리하였으며, Wezeman과 Bollnow⁸⁾는 bFGF의 전신투여로 마우스 장골 관절연골의 연골내골화를 촉진시켰다고 보고하였다.

관절연골은 골의 발육과 성장에 중요한 역할을 하지만 하악두 관절연골은 조직학적 형태에서 장골의 관절연골과는 구별된다. 생리학적, 기능적으로 다른점은 장골과는 달리 생물학적 힘(bio-mechanical force)에 대한 반응이 다르고^{9,10)} 세포의 구성과 수¹¹⁾, 그리고 세포외기질 성분에 차이^{12,13)}가 있다.

이상의 선행학들의 연구를 볼 때 구강악안면 영역의 악관절연골은 장골의 관절연골과 다른 생물학적 특징을 가지고 있으므로 악관절연골에서 bFGF의 분포 및 그 기능이 다른 관절연골과는 다를 것으로 예상된다. 따라서 본 연구는 하악두 관절연골에서도 bFGF의 분포가 예상되며 그 분포 위치와 관련 기능을 밝히고 자 성장 중인 흰쥐 턱관절을 면역조직화학법으로 관찰하여 다소의 지견을 얻어 보고하는 바이다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

실험동물로는 임신한 어미쥐에서 출생하여 동일한 조건하에서 14일 사육된 체중 27g 내외의 웅성 Sprague-Dawley계 백서 40마리를 사용하였으며 이 중 20마리는 면역조직화학염색에, 10마리는 전자현미경 절편제작으로 사용하였으며, 나머지 10마리는 일반 조직 절편제작에 사용하였다.

2. 실험 방법

1) 광학현미경 관찰법

각 실험동물을 ethyl ether로 마취시킨 후 인산 완충용액(pH7.4)에 희석시킨 4% paraformaldehyde로 심장을 통해 관류고정 후 하악과두부를 절취하여 같은 용액에 3~4시간 담가 고정

하였다. 그 후 10% EDTA로 4°C에서 20일간 탈회하고 일련의 에탄올로 탈수한 후 xylene을 거쳐 파라핀에 포매하여 5 μ m의 절편을 얻었다. 그 후 H-E 염색을 시행하여 광학현미경으로 관찰하였다.

2) 전자현미경 관찰법

각 실험동물을 ethyl ether로 흡입마취 시킨 후 10% 중성 완충 formalin (pH 7.0)으로 심장을 통하여 전신관류고정한 후 하악두를 절취하여 같은 용액에 4시간 고정하였다. 그 후 구강점막 이외의 불필요한 연조직을 제거하고, 0.1M 인산완충용액 (pH 7.4)으로 30분간 수세하여 0.1M 인산완충용액에 희석시킨 10% EDTA (pH 7.4)로 4°C에서 7일간 탈회하였다. 일련의 ethanol로 탈수한 후 propylene oxide를 거쳐 Epon으로 포매된 시료를 다이아몬드 칼을 부착시킨 RMCMTX 초박절편기로 600~900Å 두께로 잘라 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 전자염색한 후 Jeol 1010 투과 전자현미경으로 관찰하였다.

3) 면역조직화학적 관찰

면역조직화학적 관찰을 위해서 Avidin-Biotin Conjugate (ABC)법을 사용하여 면역염색을 시행하였으며, 일차항체로는 흰쥐 bFGF 항체 (Chemicon, USA)를 사용하였다. 각 실험동물을 ethyl ether로 흡입마취시킨 후 10% 중성 완충 formalin (pH 7.0)으로 심장을 통하여 전신관류고정한 후 대구치 치배를 포함하여 상악골을 절취하여 같은 용액에 4시간 더 고정하였다. 그 후 구강점막 이외의 불필요한 연조직을 제거하고, 0.1M 인산완충용액 (pH 7.4)으로 30분간 수세하여 0.1M 인산완충용액에 희석시킨 10% EDTA (pH 7.4)로 4°C에서 7일간 탈회하였다. 일련의 ethanol로 탈수시킨 후 파라핀으로 포매하여 박절기 (Reichert-Jung, 2050 Supercut, West Germany)로 5 μ m의 절편을 제작하였다.

조직절편의 파라핀을 xylene으로 제거하고, 일련의 ethanol과 증류수로 각 5분씩 재함수시켰다. 과산화효소는 일반조직 내에도 존재할 가능성이 있는데, 이 실험에서 사용하는 방법에서는 과산화효소가 발색을 일으키는 효소로 사용되므로, 내재성 과산화효소의 가양성반응을 불활성화시키기 위해 methanol에 희석한 0.3% H₂O₂로 실온에서 30분간 처리한 후, 0.01M 인산완충식염수 (phosphate buffered saline, PBS, pH 7.2)로 10분씩 2회 수세하였다. 비특이적 반응을 방지하기 위해 goat 정상혈청으로 20분간 반응시켰다. 여분의 혈청을 제거해 내고, 절편에 일차항체로서 흰쥐 bFGF에 대한 1차항체(Chemicon, USA)를 PBS로 각각 적당한 농도로 희석하여 적용시킨 후, 조직절편이 건조되지 않도록 습도를 유지한 상태로 실온에서 2시간 반응시켰다. 이때 음성대조로 일차항체 대신 0.01M PBS를 반응시켰다.

조직절편을 0.01M PBS로 5분씩 2회 수세한 후, 이차항체로서 biotin을 결합시킨 goat anti-rabbit IgG를 적용하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 0.01M PBS로 5분간 2회 수세 후 avidin-biotin conjugate reagent로 실온에서 30분간 적용시켰다. 절편을 0.01M PBS로 5분간 수세하고, 마지막으로 0.1M Tris buffer (pH7.2)에 0.1% DAB (diaminobenzidine tetrahydrochloride)용액과 0.02% H₂O₂를 동

량으로 섞은 용액을 적용하여 암실조건에서 5분간 반응시켰다. 다음에 slide를 흐르는 증류수로 10분간 수세하고, 필요한 경우 Mayer's hematoxylin으로 3분간 대조염색하여 NH₄H₂O로 처리한 후 수용성봉입제인 Glycerol Gelatin (Sigma Diagnostics, USA)으로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

III. 실험 성적

1. 광학현미경 소견

관절연골은 크게 두 부분으로 즉 연골층과 석회화연골층으로 구별되며, 연골층은 연골세포와 기질의 구조에 따라 관절면에서 석회화연골층쪽으로 네 층이 구별되어 관찰되었다. 즉 하악두표면에서부터 골쪽으로 연골세포가 납작하며 아교섬유와 함께 표면에 평행하게 배열되어 있는 증식층과 증식층에 이어진 층으로서 난원형 내지 구형의 성숙된 연골세포가 불규칙하게 배열되어 있는 성숙층과 이보다 더 깊은 곳에 연골세포들이 퇴행성 비대 현상을 보이는 비대층 및 연골세포가 소실되고 연골기질이 석회화되어 있는 층인 석회화연골층으로 구별되어 관찰되었다 (Fig. 1, 2).

2. 전자현미경 및 면역조직화학적 소견

bFGF 일차항체 대신 0.01M PBS로 반응시킨 음성대조 절편에서는 면역반응이 나타나지 않았지만 (Fig. 3), bFGF를 일차항체로 사용한 실험군에서는 섬유층 아래에 위치한 골단연골에서 뚜렷한 면역반응을 나타내었다 (Fig. 4).

1) 증식층

증식층의 기질 속에 난원형, 또는 구형의 세포가 밀집되어 있었으며, 세포의 핵은 대체로 둥글고 뚜렷한 1-2개의 핵소체를 가지고 세포질에는 소수의 작은 사립체가 산재해 있고 골지장치와 과립세포질세망이 아직 덜 발달되어있으며 유리리보소체와 미세섬유다발도 적었다 (Fig. 5).

증식층에서의 bFGF의 면역반응은 성장 중인 흰쥐 하악두 관절 연골의 다른 세포구역에 비해 뚜렷이 구별되어 관찰되었다. 섬유모세포와 교원섬유로 구성되어있는 표면과 그 아래쪽 미분화 중간엽세포로 밀집되어져 있는 아래층에서 강한 면역반응이 관찰되었다 (Fig. 6).

2) 성숙층

성숙층의 세포는 전형적인 난원형의 연골세포로 관찰되었다. 연골세포에서 핵은 대체로 둥글고 뚜렷한 핵소체를 가지고 있었으며 세포질에는 소수의 작은 사립체가 산재해 있고 뚜렷한 골지장치와 과립세포질세망이 잘 발달되어있으며 많은 유리리보소체와 미세섬유다발도 관찰되었다. 그 밖에 당원입자와 다양한 크기의 지방방울도 나타나며, 골지장치의 주위에서는 분비소포들도 관찰되었다 (Fig. 7). 성숙층에서의 bFGF의 면역염색에서 연

골기질에서는 거의 면역반응을 보이지 않았지만 성숙된 연골세포에는 면역반응이 관찰되었다 (Fig. 8).

3) 비대층

비대층의 연골세포는 비대되어 있고 핵은 작고 염색질이 소실되고 핵소체는 밀집되어 있었으며 세포질에는 소수의 작은 사립체가 산재해 있고 미약한 골지장치와 과립세포질세망이 퇴화되어있으며 유리리보소체와 미세섬유다발도 감소되었다(Fig 9). 비대층에서의 bFGF의 면역염색에서 전체적으로 거의 면역반응을 보이지 않았지만 핵과 주변에서는 약한 면역반응이 관찰되었다 (Fig. 10).

4) 석회화층

연골세포가 완전히 비대되어 세포질 속의 소기관들이 퇴화되어 사라졌고, 부분적으로 파괴된 석회화 연골기질로 둘러싸여 있었다 (Fig. 11). 석회화층에서의 bFGF의 면역염색에서 연골세포의 핵주변에 약한면역반응을 제외하고는 면역반응이 관찰되지않았다 (Fig. 12).

5) 화골층

화골층에는 연골세포가 소실되고 골모세포가 광화연골에 유골이 침착되어 그 주변을 둘러싸고 있었다(Fig. 13). bFGF의 면역반응은 골소강내의 골수조직에서는 반응을 보였지만 골기질에서는 전혀 면역반응을 보이지 않았다 (Fig. 14).

IV. 총괄 및 고안

하악두의 섬유층 아래에는 섬유연골이 나타난다. 이러한 연골의 존재는 발생학적으로 악관절의 발생과 연관되어 나타나는 이차성장연골이 하악두연골을 형성한다는 것을 의미한다. 이것은 어떤 면에서 보면 발생중인 장골에서 발견되는 골단연골과 유사하다. 이 하악두연골은 기본적으로 연골성장에 필요한 전구세포 역할을 하는 분열가능 세포로 구성된 증식층을 가지고 있다. 이 세포들은 연골모세포가 되어 단백당(proteoglycan)과 2형 교원질을 분비하여 연골의 세포외기질을 형성하며 동시에 연골모세포의 크기가 커진다. 이후에 연골이 광화되고 혈관이 침입해 들어오며, 연골세포는 소실되고, 골모세포가 분화하여 광화된 연골 구조 위에 골을 형성하는 등의 일련의 과정이 일어난다. 이러한 과정에서 하악두연골이 장골의 골단연골과 다른 점은 하악두의 경우 연골세포들이 질서정연한 세포기둥을 형성하지 않는다는 점이다. 하악두연골에 연골세포의 딸세포로 구성된 기다란 세포기둥이 없다는 것은 큰 의미를 갖는다. 전형적인 장골의 골 단판에서 볼 수 있는 특징적인 기다란 세포기둥의 존재는 연골이 한 방향으로만 성장하는데 필수적인 것으로 생각된다. 즉 골은 연골세포의 세포분열 결과로 생긴 세포기둥 방향으로 길어진다. 반면에 하악두는 어느 방향으로든지 성장할 수 있으며 하악궁이 가장 좋은 해부학적 위치가 되도록 상, 후 방향의 어느 조합으로든지 연골이 증식할 수 있다. 쥐의 하악두연골을 연구한 바에 따

르면 세포증식, 세포비대, 그리고 세포외물질의 생성이 1 : 1.6 : 4의 비율로 연골성장에 기여한다는 사실이 밝혀졌다¹⁰⁾.

관절연골에서 bFGF의 분포는 다양하게 나타났다⁸⁾. bFGF의 유전자는 3개의 exon과 2개의 intron으로 이루어지며, 4번째 염색체에 있다. mRNA는 7kb, 3.7kb, 1.7kb의 3개가 있다. 단백질은 분자량 18,000, 154개의 아미노산으로 이루어지며, 등전점은 약 9.6으로 당사슬(sugar chain)이 없는 것이 표준적이지만, bFGF polypeptide가 통상의 AUG 개시 codon을 읽어서 얻어질 수 있는 것인데 비해, CUG codon을 읽어서 얻어지는 157개와 163개의 아미노산으로 이루어져, 각각 분자량 21 kD, 22.5kD이 되는 고분자량형 bFGF가 존재한다. bFGF는 신호배열이 없으며, 분비의 메카니즘은 불분명하지만, 쓸개암환자의 혈중이나 뇨중에 FGF가 증가하는 것으로 보고된 바 있다. bFGF의 X선결정해석에서는, 12개의 역평행 β chain으로 이루어지는 조상구조를 보인다. interleukin-1 β (IL-1 β)와 매우 유사하며, FGF와 IL-1은 아과(superfamily)를 형성한다¹¹⁾.

연골세포들이 아래쪽으로 계속 진행되면서 기능적 기준으로 증식층, 성숙층, 비대층, 광화층 등의 구역으로 구분된다. 증식층에는 작으면서 약간 납작한 세포들이 있는데 이 세포들은 신생 세포의 주요 공급원이 된다. 본 실험에서 다른 세포층에 비해 bFGF의 면역반응이 강하게 관찰되었다. 특히 세포핵에 집적되어 있는 것이 관찰되었다. 흰쥐의 골단연골 성장판의 bFGF의 분포를 면역조직화학적으로 연구 한 이전의 Jingushi 등⁹⁾의 연구에서도 bFGF가 연골휴지층과 증식층에 분포되어 나타났다. bFGF는 연골세포 뿐만 아니라 섬유모세포, 혈관내피세포, 근모세포, 혈관평활근세포, 연골세포, 골모세포, glia 세포 등의 중배엽, 신경유래세포 외에, 전립선, 신노세관, 유선, 폐포, 갑상선 등의 상피세포의 유전자전사를 직접 제어하여 증식도 촉진한다¹²⁾.

비대 및 성숙층은 가장 넓은 구역이다. 연골세포들이 비대해질 때 이 세포의 분비에 관여하는 세포소기관들이 증가한다. 연골세포는 비대해지는 시기의 초기에는 2형 아교질을 분비하므로 기질의 주요 성분을 이루게 된다. 이어서 세포가 더욱 비대해짐에 따라 주로 proteoglycan이 분비된다. 이와 같은 연골세포의 비대화와 분비 증가로 인하여 하악두의 크기가 커진다. 연골세포의 크기가 최대에 달하면 이 세포는 X형 아교질과 chondrocalcin을 분비한다. 이 물질은 proteoglycan의 부분적인 파괴와 함께 연골기질이 광화될 수 있는 잠재력을 갖도록 한다. 본 연구에서도 성숙층의 세포는 핵이 둥글고 세포질소기관이 잘 발육된 전형적인 난원형의 연골세포로 관찰되었으며, bFGF의 면역염색에서 연골기질에서는 거의 면역반응을 보이지 않았지만 성숙된 연골세포에는 면역반응이 관찰되었다. 비대층의 연골세포는 작은 핵과 퇴화된 세포질 소기관을 가지고 비대되어 있었고 bFGF의 면역염색에서 전체적으로 거의 면역반응을 보이지 않았지만 핵과 주변에서는 약한 면역반응이 관찰되었다. 핵에서 bFGF의 분포는 G1기에 특이적이며¹³⁾, FGF와 같이 혈관신생물질의 하나인 angiogenin도, 증식층의 세포에서만 핵으로의 이동이 관찰된다¹⁴⁾. 최근 bFGF에 있어서, 세포증식의 신호전달에는 수용체로부터만이 아니고, 핵이행도 관여하고 있다는 것이 보고되었다¹⁷⁾.

heparin에의 친화성은 bFGF의 하나의 특징으로, heparin과 결합한 bFGF는 산, 열, 단백질분해효소 등의 처리에 대해 저항성을 가진다. 또한 세포표면이나 세포외기질중의 heparan sulfate는, 세포외에서의 bFGF의 제1의 저장장소인 것만이 아니고, FGF의 저친화성 receptor에도 관여하고 있다. FGF는 신호펩티드를 갖지 않지만, 이 유전자에 신호 배열을 결합시켜 정상 형질의 세포에 전달 시킨다⁷⁸⁾.

반면에 Twal 등⁷⁾은 골단연골 성장판의 냉동절편의 효소처리 후 분포상황이 다르게 나타났다. 즉 bFGF는 증식층에서 연골세포의 세포분열을 일으키는데 작용하지만 비대된 연골세포로부터 벗어날 때 뼈몸통끝 혈액세포증식을 위한 화학주성 신호로서 작용할지 모른다. 최근 마우스 경골 성장판과 관절연골의 면역조직화학적연구⁸⁾에서 연골의기질에서 bFGF에 대해 양성반응을 보고하였지만 본 실험에서는 기질에서는 나타나지 않았다. 이러한 상반된 결과는 다른 고정방법, 사용된 항체 및 실험동물의 차이로 설명된다. 그러나 여기에서 보는 바와 같이 이 요소를 생산하는 세포의 종류에 따라 변화가 많다¹⁸⁾. 이러한 정황으로 봐서 다른 세포에서의 분포는 연골에서 이들 분자의 역할이 다르기 때문으로 설명된다. bFGF가 유전자 특이적 방법으로 핵속에 직접 전사(transcription)조절이 가능하므로¹⁹⁾, 세포표면의 heparan sulphate가 수용체로 bFGF를 부착시켜 이 복합체가 성장과 분화를 위해 연골세포를 자극시킨다²⁰⁾.

본 연구에서, 장골 관절연골과는 다르게 성장중인 하악관절연골은 연골내골화과정에서 bFGF에 의해 매개된 연골세포의 지속적인 교체가 관찰되었다. bFGF에 부착이 가능한 세포막당단백인 heparan sulphate의 syndecan이 교원원섬유, fibronectin, tenascin을 부착한다고 보고 하였다²¹⁾. 이러한 분자들이 하악두 관절연골에 존재하지만, 일차연골에서는 존재하지 않는 것도 있다는 것은 흥미로운 사실이다^{22,23)}. 따라서 하악두연골과 장골 관절연골 사이에 bFGF의 분포가 다른 것은 이 두 관절의 발생과정, 생리적인 환경(혈관분포), 분포가 다르기 때문이 아닌가 생각된다.

광화층에서의 기질광화는 기질소포의 정교한 생성에 의하여 시작된다. 완전히 비대된 연골세포는 무기질로 충분히 둘러싸이면 이 세포는 죽는다. 한편 비대된 연골세포가 죽을 무렵에 다핵세포인 파연골세포들이 나타나 광화연골기질의 대부분을 흡수하여 혈관이 성장할 수 있도록 공간을 만들어 준다. 연골 내부로 침투해 들어온 간엽세포는 골모세포로 분화하여 유골을 침착, 석회화 시킨다. 골기질이 증가되고 서로 연결되면서 이뤄진 골소주 사이의 공간에서 적색골수가 발생한다.

혈관신생에 있어서는, 그 4개의 step인 혈관의 기저막의 소화, 혈관내피세포의 유주, 증식, 분화 모두를 촉진하고, 생체내에서도 투여된 부위에 혈관신생이 증가하는 대표적인 혈관신생인자이다. 배양된 신경세포를 사용한 실험에서는, FGF는 신경세포의 분화나 생존율을 높인다. 발생학적으로는, FGF는 중배엽의 유도에 매우 중요하다⁹⁾. bFGF는, 여러 가지 세포의 유주능을 높인다. bFGF는 또한, 연골세포의 2형 교원질의 생산, 지방세포의 분화, 하수체세포의 호르몬분비를 촉진하지만, 근모세포의 분화는 억

제한다. bFGF를 전신에 투여하면, 혈관이 확장되고 혈압이 저하된다¹⁰.

bFGF의 수반되는 분포는 하악두관절에 독특한 기능적 측면에 이점을 제공한다고 생각한다. Gonzalez 등³는 bFGF 연골기질 속으로 들어가 연골내골화 전에 연골세포의 기능을 조절하는 한 인자로 역할한다고 하였다. 이러한 이론은 타당성이 있는 것 같지만 그러나, 연골세포와 기질의 성장과 성숙은 상승작용하는 세포분화 유도체들에 의해 조절되어지는 복합 과정이라고 주장하고 있다²⁰. 그러므로 하나의 성장인자에 대해 기능적인 대사가 조절된다는 것은 의심의 여지가 많다. 하악두관절의 항상성을 조절하는 인자로서 bFGF와 다른 사이토카인 혹은 세포외기질성분에 대한 연구는 앞으로 더 진행되어야 할 과제라고 생각된다.

V. 결 론

본 연구는 성장 중인 하악두 관절연골에서 basic fibroblast growth factor (bFGF)의 분포위치와 관련 기능을 밝히고자 동일한 조건하에서 사육된 체중 27g 내외의 웅성 Sprague-Dawley계 흰쥐 하악두를 사용하여 일반조직관찰법과 면역조직화학적 방법으로 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 성장중인 하악두연골은 증식층, 성숙층, 비대층, 석회화층 및 화골층으로 뚜렷히 구별되었다.
2. 증식층의 기질 속에 세포질소기관들이 덜 발육된 다소 납작한 세포가 밀집되어 있었으며, 다른 세포층에 비해 bFGF의 면역반응이 강하게 관찰되었다.
3. 성숙층의 세포는 핵이 둥글고 세포질소기관이 잘 발육된 전형적인 난원형의 연골세포로 관찰되었으며, bFGF의 면역염색에서 연골기질에서는 거의 면역반응을 보이지 않았지만 성숙된 연골세포에는 면역반응이 관찰되었다.
4. 비대층의 연골세포는 작은 핵과 퇴화된 세포질소기관이 비대되어 있었고 bFGF의 면역염색에서 전체적으로 거의 면역반응을 보이지 않았지만 핵과 주변에서는 약한 면역반응이 관찰되었다.
5. 석회화층의 연골세포는 완전히 비대되어 세포질 속의 소기관들이 퇴화되어 사라졌고, 부분적으로 파괴된 석회화 연골기질로 둘러싸여 있었으며 bFGF의 면역염색에서 연골세포의 핵주변에 약한 면역반응을 제외하고는 면역반응이 관찰되지 않았다.
6. 화골층에서 연골세포는 소실되고 골모세포가 광화연골에 유골을 침착시켜 주변을 둘러싸고 있었으며, bFGF의 면역반응은 골소강내의 골수조직에서는 반응을 보였지만 골기질에서는 전혀 면역반응을 보이지 않았다.

참고문헌

1. Hiraki, Y., Inoue, H., Kato, Y., Fukuya, M., and Suzuki, F.: Combined effect of somatomedin-like growth factors with fibroblast growth factor or epidermal growth factor in DNA synthesis in rabbit chondrocytes. *Mol. Cell Biochem.*, 76:185-193, 1987.

2. Hiraki, Y., Inoue, H., Asada, A., and Suzuki, F.: Differential modulation of growth and phenotypic expression of chondrocytes in sparse and confluent cultures by growth factors in cartilage. *J. Bone Miner. Res.*, 5:1077-1805, 1990.
3. Gonzalez, A-M., Buscaglia, M., Ong, M., and Baird, A.: Distribution of basic fibroblast growth factor in the 18-day rat fetus: localization in the basement membranes of diverse tissues. *J. Cell Biol.*, 110:753-765, 1990.
4. Peters K.G., Werner, S., Chen, G., and Williams, L. T.: Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. *Development*, 114:233-243, 1992.
5. Peters K., Ornitz, D., Werner, S., and Williams, L.: Unique expression pattern of the FGF receptor 3 gene during mouse organogenesis. *Dev. Biol.*, 155:423-430, 1993.
6. Jingushi, S., Joyce, M. E., Flanders, K.C., Hjelmeland, L., Roberts A.,B., sporn M.,B., Muniz,O., Howell D., Dean, D., Ryan, U., and Bolander M.,E.: Distribution of acidic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor, and transforming growth factor β 1 in rat growth plate. In: D.V. Cohn, F.H. Glorieux, T.J., Martin(Ed.). *calcium Regulation and Bone Metabolism*. Elsevier, Amsterdam, pp.. 298-303, 1990.
7. Twal, W.O., Vasilatos-Younken, R., Gay, C.V., and Leach, R.M., Jr: Isolation and localization of basic fibroblast growth factor-immunoreactive substance in the epiphyseal growth plate. *J. Bone Miner. Res.*, 9:1737-1744, 1994.
8. Wezeman, F.H., and Bollnow, M.R.: Immuno- histochemical localization of fibroblast growth factor-2 in normal and branchymorphic mouse tibial growth plate and articular cartilage. *Histochem. J.*, 29:505-514, 1997.
9. Hinton, R.J.: Response of the intermaxillary suture cartilage to alterations in masticatory function. *Anat. Rec.*, 220:376-387, 1988.
10. Takahashi, I., Mizoguchi, I., Nakamura, M., Kagayama, M., and Mitani, H.: Effects of lateral pterygoid muscle hyperactivity in differentiation of mandibular condyles in rats. *Anat. Rec.*, 241:328-336, 1995.
11. Strauss, P.G., Closs, E.I., Schmidt, J., and Erfle, V.: Gene expression during osteogenic differentiation in mandibular condyles in vitro. *J. Cell Biol.*, 110:1369-1378, 1990.
12. Mizoguchi, I., Nakamura, M., Takahashi, I., Kagayama, M., and Mitani, H.: An immunohistochemical study of localization of type I and type II collagens in mandibular condylar cartilage compared with tibial growth plate. *Histochemistry*, 93:593-599, 1990.
13. Mizoguchi, I., Nakamura, M., Takahashi, I., Kagayama, M., and Mitani, H.: A comparison of the immunohistochemical localization of type I and type II collagens in craniofacial cartilage of the rat. *Acta Anat.*, 144:59-64, 1992.
14. Wroblewski, J., and Edwall-Arvidsson, C.: Inhibitory effects of basic fibroblast growth factor on chondrocyte differentiation. *J. Bone Miner. Res.*, 10:735-742, 1995.
15. Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J.D., Leder, P., and Ornitz, D.M.: Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factors to its high affinity receptor. *Cell*, 64:841-848, 1991
16. Nakamura, T., Hanada, K., Tamura, M., Shibanushi, T., Nigi, H., Tagawa, M., and Fukumoto, T.: Stimulation of endosteal bone formation by systemic injections of recombinant basic fibroblast growth factor in rats. *Endocrinology*, 136:1276-128, 1995.
17. Klagsbrun, M., and Baird, A.: A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity. *Cell*, 67:229-23, 1991.
18. Tessler, S., and Neufeld, G.: Basic fibroblast growth factor accumulates in the nuclei of various bFGF-producing cell types. *J. Cell physiol.*, 145:310-317, 1990.
19. Nakanishi, Y., Kihara, K., Mizuno, K., Masamune, Y., Yoshitake, Y., and Nishikawa, K.: Direct effect of basic fibroblast growth factor on gene transcription in a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:5216-5220, 1992.
20. Chintala, S.K., Miller R.R., and McDevitt, C.A.: Role of heparan sul-

- fate in the terminal differentiation of growth plate chondrocytes. Arch. Biochem. Biophys., 316:227-234, 1995.
21. Salmivirta, M., Heino, J., and Jalkanen, M.: Basic fibroblast growth factor-syndecan complex at cell surface or immobilized to matrix promotes cell growth. J. Biol. Chem., 267:17606-17610, 1992.
22. Silbermann, M., Reddi, A.H., Hand, A.R., Leapman, R.D., von der Mark, K., and Franzen, A.: Further characterisation of the extracellular matrix in the mandibular condyle in neonatal mice. J. Anat., 151:169-188, 1987.
23. Thesleff, I., Kantomma, T., MacKie, E., and Chiquet-Ehrismann, R.: Immunohistochemical localization of the matrix glycoprotein tenascin in the skull of the growing rat. Archs. Oral Biol., 33:383-390, 1988.
24. Kato, Y., and Iwamoto, M.: Fibroblast growth factor is an inhibitor of chondrocyte terminal differentiation. J. Biol. Chem., 265:5903-5909, 1990.

EXPLANATION OF FIGURES

- Fig. 1.** The microphotograph of the TMJ region. Condylar region is divided into cartilaginous and calcified cartilaginous region. (H-E, ×40)
- Fig. 2.** The highly magnified microphotograph of the inset of the Fig. 1. Condylar region is composed by 5 zones. fibrous, proliferating, maturation, hypertrophic, and calcified cartilaginous zone. F: fibrous layer, P: proliferating layer, M: maturation layer, H: hypertrophic layer, C: calcified cartilaginous layer (H-E, ×100)
- Fig. 3.** The microphotograph of the condylar region stained immunohistochemically. Negative control section incubated with 0.01M PBS instead of anti-bFGF antibody does not show the immunoreactivity. (negative control, ×40)
- Fig. 4.** The microphotograph of the condylar region stained with anti-bFGF antibody immunohistochemically. There is a strong immunoreaction at the cartilaginous region beneath the fibrous layer. (anti-bFGF, ×40)
- Fig. 5.** The electron microphotograph of the proliferative zone. A number of oval- or round-shaped cells in the proliferative zone. The cells have round nuclei and apparent one or two of nucleoli. Some of mitochondria are scattered in the cytoplasm. Golgi apparatus and rough endoplasmic reticulum are not developed yet. Few of free ribosomes and microfilament bundles are shown. (EM, ×9,500)
- Fig. 6.** The microphotograph of the proliferative zone stained with anti-bFGF antibody immunohistochemically. There is a strong immunoreactivity at proliferative zone. Superficial layer composed with fibroblasts and collagen fibers and undifferentiated cell layer show also a strong immunoreactivity. (anti-bFGF, ×200)
- Fig. 7.** The electron microphotograph of the maturation zone. There are typical ovoid-shaped chondroblasts at the maturation zone. The cell has a round nucleus and apparent nucleoli. Some of mitochondria are scattered in the cytoplasm. Golgi apparatus and rough endoplasmic reticulum are developed well. There are secretory vesicles adjacent the Golgi apparatus. A number of free ribosomes, microfilament bundles, glycogen granules and lipid droplets are shown. (EM, ×9,500)
- Fig. 8.** The microphotograph of the maturation zone stained with anti-bFGF antibody immunohistochemically. The cartilage matrix does not show an immunoreactivity. The matured chondroblasts, however, show an immunoreactivity. (anti-bFGF, ×200)
- Fig. 9.** The electron microphotograph of the hypertrophic zone. The cells in this zone show hypertrophic changes. The cell has a small nucleus and nucleoli are disappeared. Some of mitochondria are scattered in the cytoplasm. Golgi apparatus and rough endoplasmic reticulum are degenerated. The number of free ribosomes and microfilament bundles is also decreased. (EM, ×9,500)
- Fig. 10.** The microphotograph of the hypertrophic zone stained with anti-bFGF antibody immunohistochemically. There is no immunoreactivity at this zone except around the nucleus of chondroblast. (anti-bFGF, ×200)
- Fig. 11.** The electron microphotograph of the calcifying zone. The cell organelles are degenerated and disappeared. The cells are surrounded by calcified cartilaginous matrices partially. (EM, ×9,500)
- Fig. 12.** The microphotograph of the calcifying zone stained with anti-bFGF antibody immunohistochemically. There is no immunoreactivity at this zone except around the nucleus of chondroblast. (anti-bFGF, ×200)
- Fig. 13.** The electron microphotograph of the zone of bone formation. The chondroblasts are degenerated. The newly differentiated osteoblasts secrete the osteoids. (EM, ×9,500)
- Fig. 14.** The microphotograph of the zone of bone formation stained with anti-bFGF antibody immunohistochemically. The bone marrow shows an immunoreactivity, while the bone matrix does not show an immunoreactivity. (anti-bFGF, ×200)

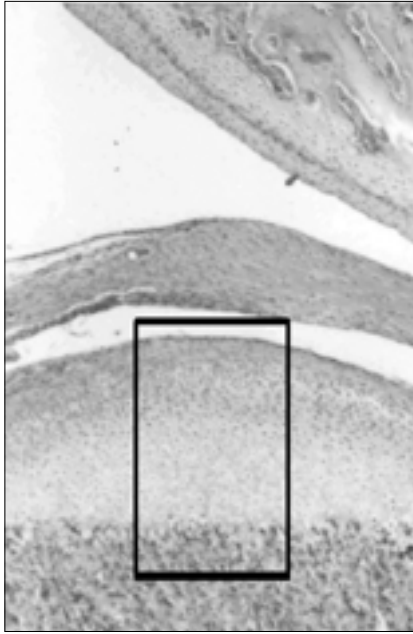


Fig. 1

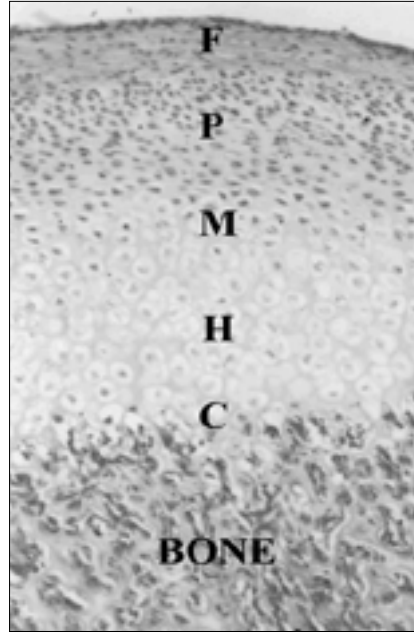


Fig. 2

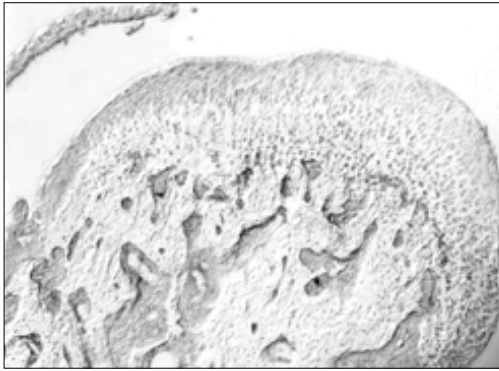


Fig. 3

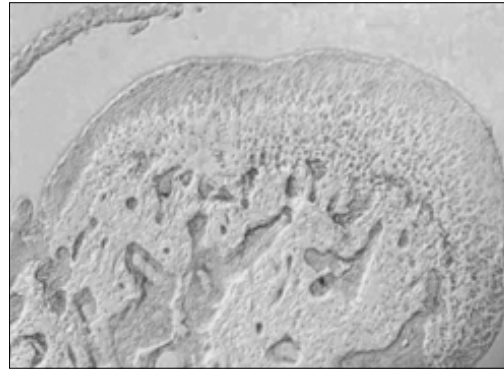


Fig. 4

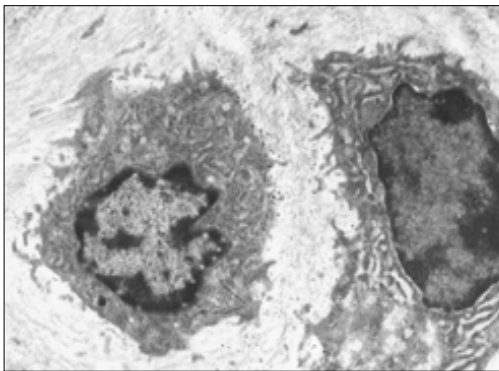


Fig. 5

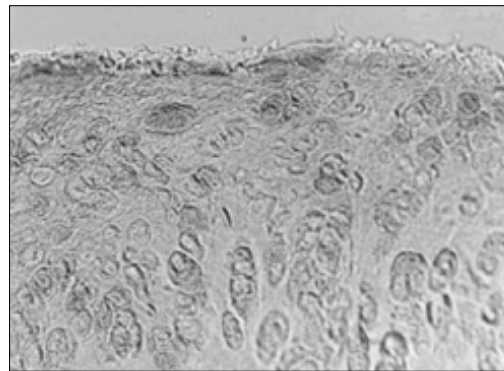


Fig. 6



Fig. 7

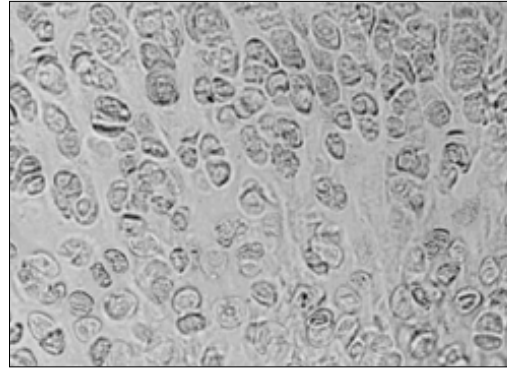


Fig. 8



Fig. 9

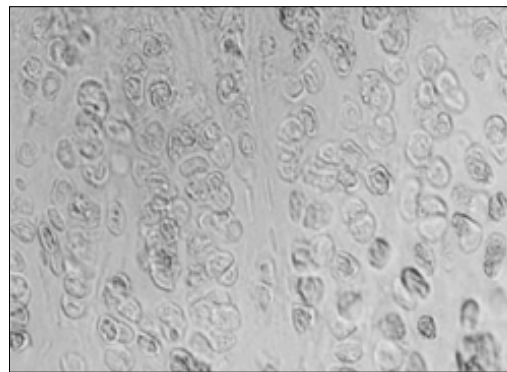


Fig. 10

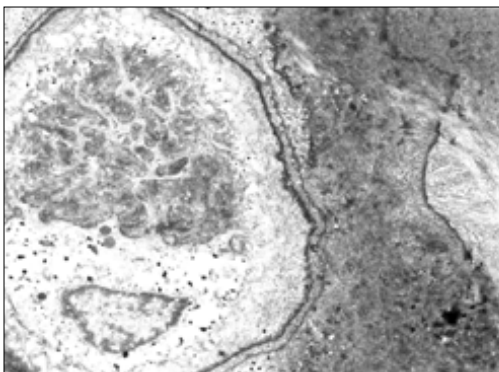


Fig. 11

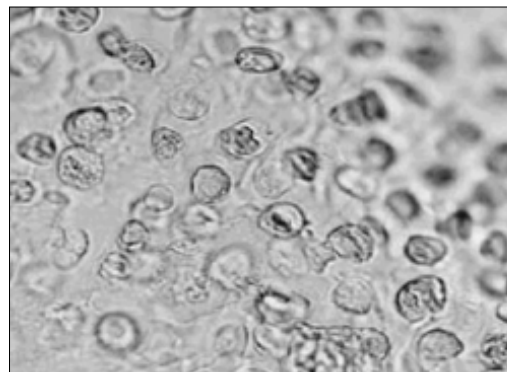


Fig. 12

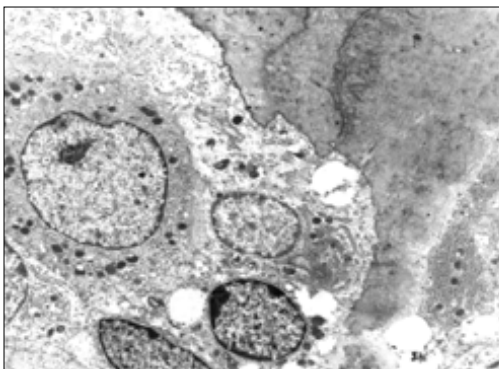


Fig. 13

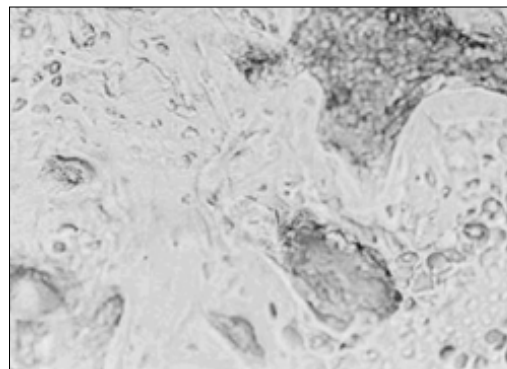


Fig. 14