

인도메타신투여가 개의 하악두에서 COX-2와 IGF-I의 발현과 분포에 미치는 영향

남 종 현^a · 이 기 수^b · 강 윤 구^a

이 연구는 PGE₂ 생합성 억제제인 인도메타신의 투여 시 성장기 개의 하악두 연골에 나타나는 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 insulin-like growth factor I (IGF-I)의 발현과 분포를 관찰하여 인도메타신이 하악두 연골 성장에 미치는 영향을 규명하기 위하여 시행하였다. 생후 12-13주된 집견 8마리를 4군으로 구분하였다. 통상적 복용량인 인도메타신 2 mg/Kg/day을 각각 7일과 14일간 투여한 군, 과량인 8 mg/Kg/day을 14일간 투여한 군과 무처치군인 대조군으로 구분하였으며, 하악두를 연구대상으로 하였다. 연구대상 하악두는 5 µm 두께의 절편을 만들어, H-E 중염색, COX-2 면역염색, IGF-I 면역염색을 시행하여 광학 현미경으로 검경하였으며, tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) 염색 후 파연골세포의 수를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 인도메타신은 하악두 연골의 증식대에서 COX-2와 IGF-I의 발현과 분포를 억제시켰으며, 인도메타신의 투여기간에 비례해서 파연골세포 수는 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.01$). IGF-I의 발현과 분포는 인도메타신의 투여 양과 기간에 비례하여 억제되었다. 이상의 결과에 의하면 인도메타신의 투여는 하악두 연골에서 COX-2와 IGF-I의 발현과 분포를 억제하고 파연골세포의 수를 감소시켜 하악두 성장을 억제할 가능성이 있음을 시사한다.

(주요 단어: 인도메타신, COX-2, IGF-I, 파연골세포)

서 론

하악두 연골은 이차 연골로서, 일차 연골인 연골 결합, 비중격 연골, 골단의 성장판, 대퇴골 두부의 연골과는 발생학적인 기원뿐만 아니라 성장 형태, 생화학적 특징도 다르다.^{1,2} 일차 연골은 상대적으로 독립적인 성장 잠재력을 가지고 있으며, 기능적인 요소에 대

한 적응력이 떨어진다. 반면에 이차 연골인 하악두 연골은 생역학적인 힘에 높은 적응력을 가진다. 하악두 연골은 적응할 수 있는 개조 능력이 있음이 증명되었지만, 발육동안 적응력과 내재된 성장 잠재력 사이의 상대적인 중요성 사이에는 항상 의견이 다양하고, 명확하게 밝혀지지 않았다. 연골 성장은 일부분 후천적으로 결정되고, 기계적 자극 같은 외적 요인에 의해 영향을 받을 뿐만 아니라, 호르몬 같은 전신적 요소와 성장 인자와 사이토카인 같은 국소적 요소에 영향을 받는다고 알려져 있다.³

인도메타신은 비스테로이드성 항염증제로 cyclooxygenase의 이형체인 COX-I과 COX-2를 비특이적으로 억제하여 효과적으로 프로스타글란딘 합성을 억제한다. Lerner⁴는 시험관 실험에서 인도메타신은

^a 대학원생, ^b 교수, 경희대학교 치과대학 교정학교실.

교신저자: 남종현

서울시 동대문구 회기동 1

경희대학교 치과대학 교정학교실 / 02-958-9390

orthonia@unitel.co.kr

원고접수일: 2005년 5월 11일 / 원고최종수정일: 2005년 7월 28일

/ 원고채택일: 2005년 7월 30일

내재성 프로스타글란딘 합성을 억제하여 파골세포의 수적 감소를 일으키고 골 흡수를 억제한다고 하였다.

프로스타글란딘은 골 형성과 흡수를 자극하거나 억제하는 다양한 기능의 조정자로 정상적인 연골대사와 골관절염, 염증성 관절 질환의 병인을 조절하는 중요한 요소이다. 이러한 작용은 프로스타글란딘 형, 노출시간, 농도, 세포 종류에 따라 달라진다. 프로스타글란딘 E₂(PGE₂)는 프로스타글란딘 중 골에 가장 풍부한 eicosanoid이고, 골격 조직에서 중요하다.⁵ 초기에 PGE₂는 강력한 골 흡수 물질로서 설명되었다.^{6,7,8} 또한 PGE₂는 성장판과 하악두 연골의 발육과 활성도를 조정하는 많은 조절 요소들의 효과를 중재하는 이차전령의 기능을 하며, 자가 분비 인자 또는 주위 분비 인자로 정상적인 연골 성장과 발육에 중요한 역할을 한다.^{9,10}

연골대사의 동화작용을 조절하는 중요한 조절 요소 중의 하나는 insulin-like growth factor-I(IGF-I)이다. IGF-I은 연골모세포의 증식과 분화를 증진시켜 연골 성장에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. Suzuki 등¹¹과 Maor 등¹²은 IGF-I은 장골의 성장뿐만 아니라 하악두 연골의 성장에도 중요한 역할을 한다고 하였다. Peacey와 Shalet¹³은 하악골 과성장을 보이는 말단비대증을 보이는 환자의 혈액내 IGF-I 농도는 높게 나타난다고 하였다.

PGE₂와 IGF-I과의 관계에 관하여, DiBattista 등¹⁴은 PGE₂는 IGF-I binding protein 3 발현과 단백질 합성, 분비를 조정하고, 이러한 조정은 IGF-I에 대한 연골세포 반응성을 수정할 수 있고, 연골대사에 영향을 미친다고 하였다. 또한 Schwartz 등⁹은 PGE₂는 골모세포에서 IGF-I 합성을 유도하고, 유도된 IGF-I은 자가 분비 인자와 주위 분비 인자처럼 작용한다고 보고하였다.

이 연구는 PGE₂ 억제제인 인도메타신의 투여가 성장기 개의 하악두 연골 세포 및 파골세포와 골모세포에 미치는 영향을 COX-2와 IGF-I의 발현과 분포를 통해 관찰하는 것이다.

연구재료 및 방법

실험 동물

이번 실험에서 사용된 동물은 체중 5.5-8.9 Kg의 생후 12-13주된 8마리의 잠견으로 1주일간의 사육장 적응기간을 제공하였고, 구강 상태는 양호하였으며 전

신적인 질환은 없었다. 실험 기간 동안 아침과 저녁으로 고형사료와 물을 제공하였다.

실험 동물은 인도메타신(인테반스펜솔, 유한양행)의 통상적 투여량 범위인 2 mg/Kg/day를 7일간 투여한 1군, 14일간 투여한 2군, 약간의 과잉 투여량인 8 mg/Kg/day를 14일간 투여한 3군, 그리고 무처치군인 대조군으로 나누었으며, 각 군에 2마리씩 배정하였다. 인도메타신은 12시간 간격으로 하루에 2회 구강으로 투여하였으며, 대조군은 placebo로 빈 캡슐만 투여하였다. 약물은 미세 저울을 이용하여 각 실험 동물의 체중에 맞추어 정량하였으며, 캡슐에 밀봉하여 마취 없이 개의 연하 반사가 일어나는 지점까지 구강내로 밀어 넣어 연하를 확인하고, 투여 후에 구토가 없는지를 다시 확인하였다.

실험기간 종료 후 Xylaxine (Rompun[®], Bayer) 5 mg/Kg와 Ketamine(케타민[®], 유한양행) 25 mg/Kg을 정맥내 주사하여 마취시킨 후, 4 mol의 KCl 용액을 정맥내 주사하여 희생시켰으며, 연조직을 제거하고 하악골을 절취하였다.

조직 처리 및 검경

절취된 하악골에서 하악두를 분리하여 즉시 10% 중성 포르말린 용액에서 24시간 이상 고정하였다. 조직은 10% EDTA 용액으로 약 3-4주간 탈회하고, 통상적 방법에 따라 파라핀 포매 후, 과두의 장축에 따라 5 μm 두께로 절단하여 조직 절편을 만들었다. 통법에 따라 H-E 중염색과 tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) 염색법을 시행하였다. 면역조직화학적 염색으로 COX-2 염색과 IGF-I 염색을 시행하였다.

면역 염색

IGF-I (polyclonal goat anti-insulin-like growth factor-1, Sigma, USA)에 대한 면역 염색은 1/200로 희석하고, Cyclooxygenase-2 (polyclonal murine antibody, Cayman chemical, USA)는 1/100로 희석하여 사용하였다. 일차항체는 streptavidin이 부착된 것을 사용하였으며, 이차항체로는 biotinylated anti-mouse IgG를 사용하였다.

슬라이드 상에 준비된 조직 절편을 수화시킨 후, endogenous peroxidase의 차단을 위해 에탄올과 peroxide를 혼합한 액을 가하였다. 면역 염색 과정 중 조직의 antigen retrieval을 위한 microwave를 이용

한 전 처치는 COX-2에만 시행하였다. 일차 항체는 상온에서 1시간 반응시켰으며 이차항체는 20분간 반응시켰다. 검출제로 LSAB (Labelled streptavidine biotin, Dako Co., Denmark) kit를 이용하였고 발색을 위해서 DAB (Diamino-benzidine, Dako Co., Denmark)를 이용하였다. 대조 염색으로 Meyer's Hematoxylin을 사용하였으며 5분간 염색 후에 증류수 및 buffer에 수세한 후, 단계별로 탈수하고 cover glass를 씌워서 슬라이드를 완성한 후, 하악두 연골과 그 하방 부위를 검경하였다. 항체의 비특이적인 반응성 검사 및 염색 과정 중의 오류의 검정을 위해 일차 항체를 처리하지 않고 이차 항체만을 처리시킨 음성 대조군 염색도 시행하였다.

TRAP 염색

파연골세포의 정확한 검출을 위해 TRAP (Sigma-aldrich, USA) 염색을 시행하였다. 슬라이드 상에 준비된 조직을 저농도의 알코올로 순차적으로 처리하여 합수하였으며 그 후 10분간 수세하여 합수하였다. 37°C로 중탕한 220 ml의 증류수에 10 ml씩의 acetate solution과 naphthol AS-BI phosphoric acid 그리고 tartrate solution을 가한 후, TRAP kit의 Fast Garnet GBC salt를 5 capsule 첨가하여 TRAP 염색액을 만들었다. 이 염색액으로 조직 슬라이드를 1시간 동안 암실에서 처리하였으며, 처리 동안 37°C의 수조에 염색조를 위치시켜 온도를 유지하였다. 염색 후 5분 동안 수세하고 Meyer's Hematoxylin으로 대조 염색을 시행하였다. 대조 염색 후 10분간 다시 수세하였으며, 공기 중에서 건조 후 cover glass를 씌워서 슬라이드를 완성하였다.

각종의 조직 염색 소견은 광학 현미경으로 검경하였으며, 디지털 CCD 카메라를 통해 Kappa Image Base v.4.5.2 프로그램(Kappa Image, LEIchen, Germany)을 이용하여 10배, 40배, 100배, 400배 사진을 컴퓨터(Intel Pentium 4. 2GHz)상에서 촬영하였다. 단, TRAP 염색 소견은 염색 직후에만 촬영하였다. Kappa Image Base v.4.5.2를 이용하여 TRAP 염색 소견에서 광화대를 따라 400배 사진을 연속적으로 촬영하여, 사진 상에서 하악두 연골의 광화대 부위에 출현한 파연골세포의 수를 세었다. 통계분석은 SPSS window 11.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)을 이용하였으며, 4개 군의 파연골세포 수의 유의성을 검증하기 위해서 일원 분산 검정(One-Way ANOVA)을 시행하였으며, Duncan's multiple range test로 추가적인

분석을 시행하였다.

연구성적

대조군의 현미경 소견

H-E 염색 소견

성장 중인 하악두 연골의 전형적인 소견인 증식대, 비대 및 성숙대, 광화대의 소견이 관찰되었으며, 비대 하방에서는 매우 활동적인 연골 파괴 및 골조직의 형성이 관찰되었으며, 심층에서는 다수의 구형세포들이 밀집되어 있는 골수 조직이 관찰되었다. 증식대에서 연골세포는 긴 방추형의 편평한 세포로 관찰되었으며 세포질은 적은 것으로 관찰되었다. 비대에서 연골세포는 타원형 내지는 원형의 세포로서 세포질은 넓게 관찰되었으나 염색 상에서 세포질이 투명하게 관찰되었다. 광화대에서는 광화된 연골 기질이 eosinophilic한 염색소견으로 관찰되었으며 주변으로 다수의 골모세포 및 파연골세포가 관찰되었다. 다수의 핵을 가지는 파연골세포는 광화된 연골 기질 주변 외에도 골수의 구형세포들 사이에서도 다수 발견되었다.

COX-2 면역 염색 소견

COX-2는 하악두 연골의 증식대에서 연골세포의 세포질에서 과립형으로 풍부하게 나타났으나, 비대 및 성숙대 하방으로 갈수록 분포가 감소하거나 일부에서는 발견되지 않았다 (Fig 1). 또한 비대 하방의 골모세포 및 파연골세포의 세포질에서 풍부한 분포가 관찰되었다 (Fig 2). 구형의 세포가 밀집되어 관찰되는 골수 조직에서도 구형 세포의 세포질에서 강하게 양성 소견이 관찰되었으나 구형세포가 없는 소성 결합 조직부에서는 발현이 관찰되지 않았다.

IGF-I 면역 염색 소견

IGF-I도 COX-2와 유사한 분포로 연골 조직의 증식대에서 강하게 분포함이 관찰되었으며, 세포질 뿐만 아니라 일부에서는 세포핵에서도 관찰되었으나 비대 및 성숙대에서는 분포가 관찰되지 않았다 (Fig 3). 또한 골모세포에서는 풍부하게 분포함이 관찰되었으나, COX-2와는 다르게 대부분의 파연골세포의 세포질에는 관찰되지 않았고 일부의 파연골세포에서만 관찰되었다 (Fig 4, 5). 골수 조직의 구형세포에서도 IGF-I은 관찰되지 않았으나, 소성 결합 조직 부위에서는 세포 외 기질과 세포 성분에서 일부 관찰되었다.

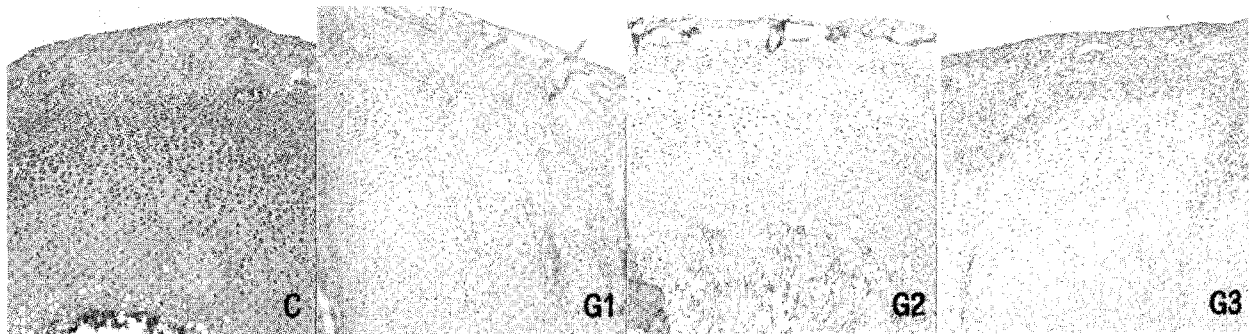


Fig 1. Immunohistochemical staining for COX-2 expression and distribution. This photomicrograph was obtained from the proliferative and hypertrophic zone of condylar cartilage. **C**, Control; **G1**, group 1; **G2**, group 2; **G3**, group 3. COX-2 immunostaining 100x. COX-2 immunostaining of C was shown mainly on the proliferative zone and upper hypertrophic zones. G1 was lacking distribution and expression of COX-2 as compared with C on the proliferative zone. Distribution and expression of COX-2 on the hypertrophic zone did not differ from C. G2 was lacking distribution and expression of COX-2 as compared with C on the proliferative zone. Differences between G1 and G2 was not recognized on the proliferative zone. The hypertrophic zone was not stained with COX-2. G3 was lacking distribution and expression of COX-2 as compared with C on the proliferative zone. Differences between G2 and G3 was not recognized on the proliferative zone. The hypertrophic zone was not stained with COX-2.

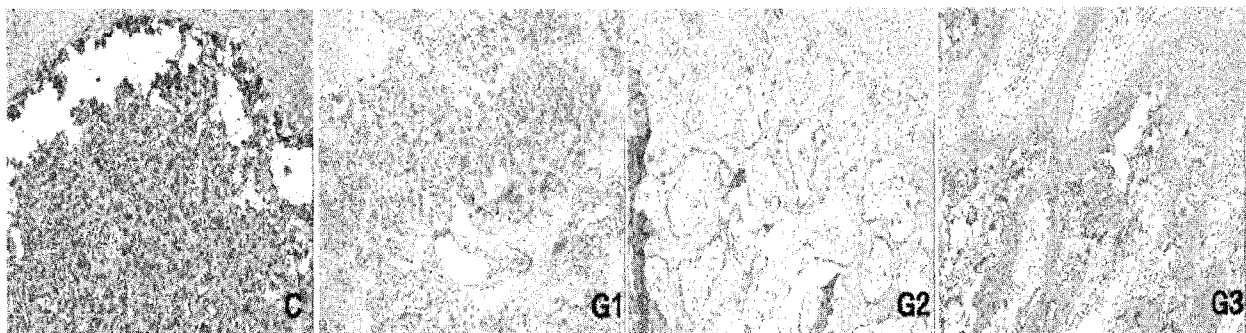


Fig 2. Immunohistochemical staining for COX-2 expression and distribution. This photomicrograph was obtained from the mineralization zone of condylar cartilage. **C**, Control; **G1**, group 1; **G2**, group 2; **G3**, group 3. COX-2 staining 100x. COX-2 distribution and expression of C is shown abundantly. The difference of COX-2 immunostaining between C and G1 on the mineralization zone was not found. G2 and G3 was lacking distribution and expression of COX-2 as compared with the C on the mineralization zone. G3 was lacking distribution and expression of COX-2 as compared with G2 on the mineralization zone.

실험군의 현미경 소견

H-E 염색 소견

대조군과 마찬가지로 연골세포의 3개 층이 관찰되었으며, 비대 하방에서의 파연골 활성 및 조골 활성

이 관찰되었다. 다수의 파연골세포가 광화된 연골세포 표면 및 골양조직 표면에서 관찰되었으나 대조군에 비해 수가 감소된 양상이 관찰되었다. H-E 염색 소견은 대조군과 실험군이 동일한 소견을 나타내었다.

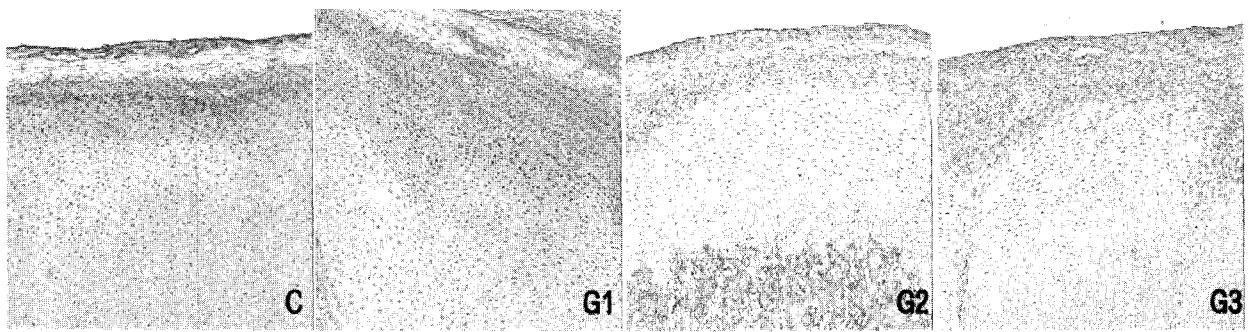


Fig 3. Immunohistochemical staining for IGF-I expression and distribution. This photomicrograph was obtained from the proliferative and hypertrophic zone of condylar cartilage. **C**, Control; **G1**, group 1; **G2**, group 2; **G3**, group 3. IGF-I staining 100x. IGF-I immunostaining of C is visible as a dark strip on the proliferative zone. The distribution and expression of IGF-I in G1 was decreased insignificantly as compared with C on the proliferative zone. G2 and G3 was lacking distribution and expression of IGF-I as compared with C on the proliferative zone. The hypertrophic zone of C, G1, G2 and G3 was not stained with IGF-I. G3 was lacking distribution and expression of IGF-I as compared with G2 on the proliferative zone.

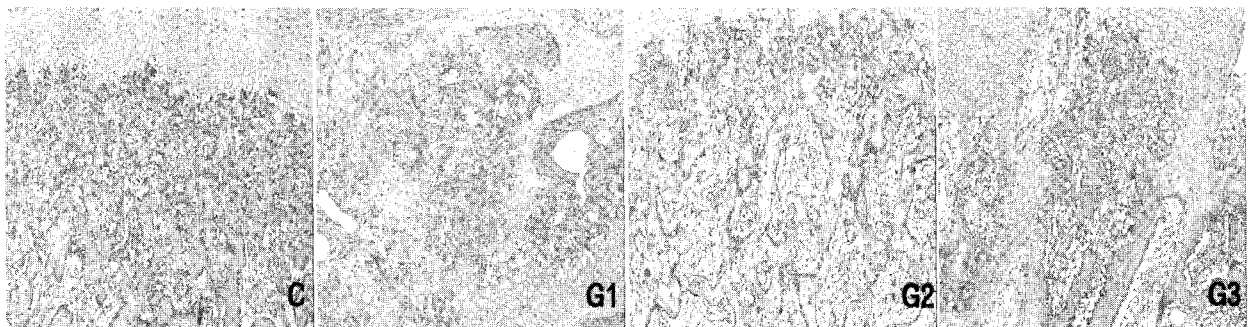


Fig 4. Immunohistochemical staining for IGF-I expression and distribution. This photomicrograph was obtained from the mineralization zone of condylar cartilage. **C**, Control; **G1**, group 1; **G2**, group 2; **G3**, group 3. IGF-I staining 100x. The IGF-I distribution and expression of C is shown abundantly. C and G1 were stained similarly but G1 was decreased slightly. G2 and G3 was lacking distribution and expression of IGF-I as compared with C. Most osteoblasts of G2 and G3 were lacking distribution and expression of IGF-I.

COX-2 면역 염색 소견

COX-2의 분포는 대조군과 비슷한 양상으로 관찰되었으나 1군, 2군, 3군 모두에서 연골세포층의 증식대에서 분포가 되지 않거나 거의 없는 소견이 관찰되었다. 비대에서 1군은 대조군에 비해 COX-2의 분포가 거의 차이 없이 관찰되었으나, 2군 및 3군에서는 COX-2의 분포가 관찰되지 않았으며 2군과 3군 간의 차이는 관찰되지 않았다 (Fig 1). 비대 하방의 파열골세포 및 콜모세포가 풍부히 관찰되는 부분에서는 COX-2의 분포 정도는 대조군과 1군 간에는 큰 차이

가 관찰되지 않았으나 (Fig 2), 2군 및 3군에서는 COX-2의 분포가 명확히 대조군 및 1군에 비해 감소된 것이 관찰되었다 (Fig 2). 이러한 COX-2 분포의 감소 정도는 2군에 비해 3군에서 조금 더 명확하게 관찰되었으나 큰 차이는 보이지 않았다.

IGF-I 면역 염색 소견

IGF-I의 분포는 대조군에 비해 실험군에서 감소된 소견이 관찰되었다. 대조군과 1군의 증식대에서의 IGF-I의 분포 소견은 거의 차이가 없었으나 1군이 미

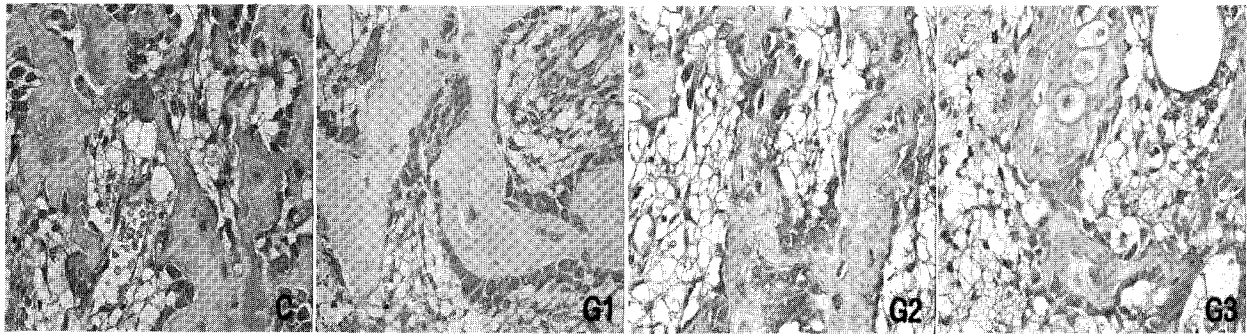


Fig 5. Immunohistochemical staining for IGF-I expression and distribution. This photomicrograph was obtained from the mineralization zone of condylar cartilage. A comparison of IGF-I expression and distribution in chondroclasts and osteoblasts. **C**, Control; **G1**, group 1; **G2**, group 2; **G3**, group 3. IGF-I staining 400x. In the control group, the cytoplasm of chondroclasts were not stained with IGF-I but osteoblasts were darkly stained. Part of the osteoblasts in G1 were not stained with IGF-I. In G2 and G3, the majority of osteoblasts and chondroclasts were not stained with IGF-I.

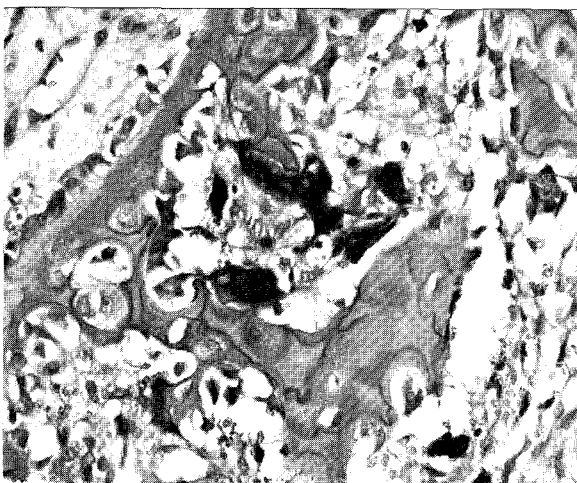


Fig 6. TRAP staining. Note the distinguished deep red stained cytoplasm of chondroclasts. 400x.

약하게 분포가 감소한 소견이 관찰되었다 (Fig 3). 그러나 대조군 및 1군과는 다르게 2군과 3군에서는 증식대에서 IGF-I의 분포가 명확하게 감소된 소견이 관찰되었고 2군에서는 일부 증식대의 세포질 및 세포핵에서 매우 미약하게 분포하는 것이 관찰되었으나, 3군에서는 더욱 감소되어 관찰되었다 (Fig 3). 비대에서는 대조군과 마찬가지로 실험군에서도 IGF-I의 분포가 관찰되지 않았다. 비대 하방에서는 대조군과 1군 사이에서의 분포는 유사하게 나타났으나 1군이 분포가 감소하여 나타났고 (Fig 4), 또한 일부 골모세포

에서 IGF-I의 분포가 없는 것이 관찰되었다 (Fig 5). 2군과 3군에서는 비대 하방에서 IGF-I의 분포가 대조군 및 1군에 비하여 명확하게 감소된 소견이 관찰되었으며 감소된 소견은 2군보다 3군에서 더욱 분명하여 대부분의 골모세포에서 IGF-I의 분포가 관찰되지 않았다 (Fig 4, 5). 2군 및 3군에서는 파골세포에서도 IGF-I의 분포가 관찰되지 않았다.

파연골세포 수의 비교

파연골세포 수의 비교를 위하여 파연골세포를 특이적으로 염색하는 TRAP 염색을 시행하고 (Fig 6), 광화대를 따라 400배 사진을 연속적으로 촬영하였다. 촬영한 현미경 상의 수는 Table에 제시하였다. 400배 광학 현미경 상에서 보이는 파연골세포 수의 평균과 표준오차도 Table에 제시하였다. 일원 분산 검정을 시행한 결과에 의하면 4개 군의 파연골세포 수는 유의성있게 감소하였다 ($p < 0.01$). Duncan's multiple range test 결과에 의하면 4개 군은 2개의 집단으로 나누어지는데, A집단에는 대조군과 1군, B집단에는 2군과 3군이 속하게 된다. 각 집단 내에서는 유의성 있는 차이를 보여주지 못하고 ($p > 0.01$), 집단 간에는 유의성 있는 차이를 보여준다 ($p < 0.05$). 즉 투여기간이 길어질수록 유의성 있게 감소된 파연골세포 수를 보이고, 투여량이 많을수록 파연골세포 수가 감소하나, 그 차가 미미하고 유의성은 인정되지 않는다.

Table. The number of chondroclast and photograph on the mineralization zone

	Number of chondroclast		Number of photograph		
	Mean \pm SD	Experimental animal 1	Experimental animal 2	Total	
Control ^A	5.05 \pm 2.45	41	18	59	
Group 1 ^A	4.56 \pm 2.46	35	33	68	
Group 2 ^B	3.61 \pm 2.15	34	42	76	
Group 3 ^B	3.04 \pm 2.66	29	42	71	

^{A, B} : identical superscript describes a homogeneous subset classified by Duncan's multiple range test.

고 찰

연골의 항상성에서 프로스타글란딘의 역할은 명확하게 규명되지 않았지만, 동화 작용 뿐만 아니라 이화 작용 효과도 있으며, PGE₂는 연골세포 증식의 조절과 세포 기질 합성에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.^{5,15}

이 연구에서 대조군의 하악두 연골 증식대에서 COX-2와 IGF-I의 발현이 강하게 나타났다. 하악두 연골이 성장하는 동안 IGF-I의 발현은 미분화 세포들이 있는 증식대에서 얇은 띠 형태로 나타난다는 Visnapuu 등¹⁶의 보고와 일치하고, 연골세포의 분화와 증식에 PGE₂가 관여한다는 많은 보고들과 일치한다.^{3,12,16}

Miyamoto 등¹⁷에 의하면 PGE₂는 cAMP를 이차전령으로 하여 증식대 연골세포의 프로테오글라이칸 축적과 제2형 교원질 mRNA 발현을 자극해서 연골세포 분화를 촉진하는데 이러한 효과는 4 종류의 Prostaglandin E receptor 중 EP2와 EP4가 동시에 자극되어 일어나는 것이라 하였으며, 관절염이 있는 악관절에서 자주 관찰되는 골증식체 형성은 연골세포 분화를 촉진시키는 PGE₂의 작용에 의한 것이고, 이소성 골화가 일어나는 환자의 소변에서는 PGE₂가 증가된다고 하였으며, Banovac 등¹⁸은 골증식체 형성과 이소성 골화는 인도메타신에 의해 예방된다고 하였다. Schwartz 등⁹은 저농도의 PGE₂는 농도에 비례해서 세포수와 thymidine 결합을 증가시키고, 알칼리성인산분해효소 활성도를 자극하고, 이런 효과는 휴지기 증과 성장 증 연골 세포에서 공통적으로 나타난다고 하였다.

PGE₂는 하악두 연골에서 IGF-I 생산을 자극하고,¹⁴ IGF-I은 연골모세포의 증식과 분화를 증진시켜 연골 성장에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.^{3,12} Visnapuu 등¹⁶은 IGF-I 수용체는 하악두 연골의 섬유성 표

면과 하악두 연골의 미분화층, 비대의 상층부에 분포하고, 이러한 수용체는 간에서 유도된 IGF-I의 목표가 되고 국소적인 조절을 위한 IGF-I은 미분화층의 수용체와 결합된다고 하였으며, 국소적인 IGF-I의 합성이 간에서 유도된 IGF-I보다 하악두 성장에 중요하다고 하였다. Maor 등¹⁹은 태생후 하악두 연골의 배양에서 IGF-I은 연골 전구 세포의 분화를 유도하고 증식을 증진시킨다고 하였으며, Suzuki 등¹¹은 하악두에 대한 IGF-I의 효과는 성장기의 쥐보다 성숙된 쥐에서 더 큰 효과를 나타낸다고 하였으며, 15주된 쥐에 투여한 IGF-I은 하악두 연골에서 연골 층의 두께를 증가시키고, 하악두 연골 하방의 해면골 층에서 골 면적 비율을 감소시키며, 연골내골형성의 양을 증가시킨다고 하였다. 연골내골형성이 활발히 이루어지는 미성숙 하악두의 하악두 연골 하방의 해면골 층은 골 면적이 작고, 나이에 따라 증가하게 된다. 그러므로 골 면적의 감소는 골 개조의 재활성화를 의미하기 때문에 IGF-I은 성숙된 과두에서 연골내골형성을 재활성화시켜 실제적인 골 성장을 유도한다고 하였다.

실험군의 하악두 연골 증식대에서 COX-2는 거의 발현되지 않았거나 분포가 미미하였으며, 군 간의 차이가 없었다. 인도메타신은 COX-2의 강력한 억제제로 알려져 있는데, 하악두 연골의 증식대 세포에서는 인도메타신 농도와 기간에 따른 차이가 나타나지 않았다. 하악두 연골 증식대에서 IGF-I은 대조군과 1군 사이에 차이가 미약했으나, 2군과 3군에서 명확하게 감소되어 관찰되었다. 특히 3군에서 더욱 감소되어 나타났다. 하악두 연골의 증식대에서 IGF-I의 발현과 분포는 인도메타신의 농도와 시간에 비례해서 감소됨을 알 수 있다.

Lin과 Oberauer²⁰에 의하면 시험관 실험에서 IGF-I mRNA의 발현은 증식대, 비대, degenerative cell layer의 연골세포에 국소화 된다고 하였다. 그러나 이

연구에서는 대조군과 실험군 모두 비대에서 IGF-I 을 관찰할 수 없었다.

이 연구에서 대조군 비대 하방의 골모세포에서는 COX-2와 IGF-I이 모두 풍부하게 관찰되었다. PGE₂와 IGF-I이 골모세포에 미치는 영향에 대해서는 많은 연구들이 있다. Jee 등²¹에 의하면 프로스타글란딘이 성장하는 쥐에서 골모세포 전구세포의 분화와 증식을 자극하여, 경골 골간단의 교직골을 형성하고, 골간단의 경조직을 두드러지게 증가시키는데, 성숙된 쥐에서 6 mg/Kg의 PGE₂ 투여 시 골간단의 경조직은 64% 증가하는데, 골간단의 경조직이 증가한 것이 경조직 흡수의 억제에 의한 것인지 알 수 없다고 하였다. Hakada 등²²은 PGE₂는 골모세포양세포의 분화와 증식을 자극한다고 하였으며, Hock 등²³은 IGF-I이 분화된 골모세포에서 교원질 합성을 증가시키며, 골모세포 전구세포에서 세포의 증식을 촉진시킴으로써 골 기질 형성과 세포의 증식에 독립적으로 영향을 미친다고 보고하였다.

이 연구에서 실험군 비대 하방의 파연골세포 및 골모세포가 풍부히 관찰되는 부분에서 COX-2의 분포 정도는 특히 2군 및 3군에서 감소되어 관찰되었으며, 2군과 3군 간의 차이는 명확하지 않았다. IGF-I의 분포는 2군과 3군에서 대조군 및 1군에 비하여 명확하게 감소된 소견이 관찰되었으며, 감소된 소견은 2군보다 3군에서 더욱 분명하게 나타났다.

McCarthy 등²⁴에 의하면 PGE₂는 골모세포에서 IGF-I 합성을 유도하고, 유도된 IGF-I은 자가 분비 인자 또는 주위 분비 인자처럼 작용하여, 생체에서 PGE₂는 성장기 쥐의 골간단의 경조직을 증가시킬 뿐만 아니라 성장된 동물에서 골막 쪽과 치밀골 내부의 골 형성을 증가시킨다고 하였다. 비대 하방에서 COX-2와 IGF-I의 분포가 감소한 것은 인도메타신의 투여에 의해 골모세포에서 PGE₂가 억제되고, PGE₂ 자극의 감소로 IGF-I 합성이 감소된 것으로 생각되며, 인도메타신에 의한 PGE₂의 억제는 시간에 비례하고, IGF-I의 억제는 시간과 인도메타신 농도에 비례하는 것을 알 수 있다.

실험군 광화대에서 측정된 파연골세포 수의 평균은 대조군에 비해 감소하며, 대조군과 비교해서 2군과 3군에서 유의성 있게 파연골세포 수가 줄었다. 인도메타신 투여 기간이 길수록 유의성 있게 감소된 파연골세포 수를 보인다. 인도메타신은 파골세포같은 단핵세포의 모집을 억제하는 효과가 있다는 Soekanto²⁵의 보고와 일치한다. 1군의 파연골세포 수

는 대조군에 비해 감소하였으나, 유의성은 인정되지 않는다. 이것은 Zhou 등²⁶이 보고한 인도메타신은 파골세포나 TRAP에 즉각적으로 효과를 나타내지 않으며, 이미 존재하는 파골세포는 인도메타신에 의해 억제되지 않고, 인도메타신은 단핵인 파골세포 전구세포의 모집을 감소시키는 효과를 가진다는 보고에 의해 설명될 수 있다.

Leroux와 Saffar²⁷에 의하면 인도메타신은 농도에 따라 파골세포 수와 골 흡수를 억제한다고 하였다. 이 연구에서 인도메타신의 농도에 따라 파연골세포 수가 감소하나, 그 차이가 미미하고 유의성은 인정되지 않았다. 신과 이²⁸는 인도메타신에 의하여 파치세포의 수가 감소하며, 농도에 따른 감소는 인정되지 않았으나 파치세포의 핵 수는 농도에 따라 감소의 경향을 나타낸다는 이 연구와 유사한 결과를 보고하였다.

이 연구에 의하면 인도메타신의 투여는 하악두 연골세포의 증식을 억제시키고, 연골내골형성을 억제하여 부분적으로 하악두 성장을 억제할 것으로 생각된다. 그러나 앞으로 정량적인 연구가 필요하리라 생각된다.

결 론

이 연구는 PGE₂ 생합성 억제제인 인도메타신의 투여가 성장기 개의 하악두 연골 성장에 미치는 영향을 규명하기 위해 시행하였다. 인도메타신은 COX-2를 비특이적으로 억제하여 PGE₂ 생합성을 억제한다. PGE₂는 하악두 연골에서 IGF-I 생산을 자극하고, IGF-I은 연골모세포의 증식과 분화를 증진시켜 연골 성장에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

생후 12-13주된 잡견 8마리를 통상적 복용량인 인도메타신 2 mg/Kg/day를 각각 7일과 14일간 투여한 군과 과량인 8 mg/Kg/day를 14일간 투여한 군과 무처치군인 대조군으로 구분하였으며 하악두를 연구대상으로 하였다. 연구대상 하악두는 5 μm 두께의 절편을 만들고, H-E 중염색, COX-2 면역염색, IGF-I 면역염색을 시행하여 광학 현미경으로 검경하였으며, TRAP 염색 후 광화대에서 파연골세포의 수를 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 대조군의 성장 중인 하악두 연골의 증식대에는 COX-2와 IGF-I의 발현이 강하고, 풍부하게 분포되어 나타났다.
2. 인도메타신은 하악두 연골의 증식대에서 COX-2와

IGF-I의 발현과 분포를 억제시켰다.

3. 인도메타신의 투여기간에 비례해서 파연골세포 수는 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.01$).
4. 하악두 연골에서 IGF-I의 발현과 분포는 인도메타신의 투여 양과 기간에 비례하여 억제되었다.

이상의 결과에 의하면 인도메타신의 투여는 하악두 연골에서 COX-2와 IGF-I의 발현과 분포를 억제하고 파연골세포의 수를 감소시켜 하악두 성장을 억제할 가능성이 있음을 시사한다.

참 고 문 헌

1. Copray JC, Jansen HW, Duterloo HS. Growth and growth pressure of mandibular condylar and some primary cartilages of the rat in vitro. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1986;90:19-28.
2. Mizoguchi I, Takahashi I, Nakamura M, Sasano Y, Sato S, Kagayama M, et al. An immunohistochemical study of regional differences in the distribution of type I and type II collagens in rat mandibular condylar cartilage. *Arch Oral Biol* 1996;41:863-9.
3. Delatte M, Von den hoff JW, Maltha JC. Growth stimulation of mandibular condyles and femoral heads of newborn rats by IGF-I. *Arch Oral Biol* 2004;49:165-75.
4. Lerner U. Indomethacin inhibits bone resorption in vitro without affecting bone collagen synthesis. *Agents Actions* 1982;12:466-70.
5. O'Keefe RJ, Crabb JD, Puzas JE, Rosier RN. Influence of prostaglandins on DNA and matrix synthesis in growth plate chondrocytes. *J Bone Miner Res* 1992;7:397-404.
6. Klein DC, Raisz LG. Prostaglandin: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology* 1970;86:1436-40.
7. Santoro MG, Jaffe BM, Simmons DJ. Bone resorption in vitro and in vivo in PGE-treated mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 1977;156:373-7.
8. Park YG, Chung KR, Lee YJ, Noh SH. Prostaglandin E₂ regulates the gene expression of bone matrix metalloproteinase-1 in mouse osteoblasts. *경희치대논문집* 2000;22:49-60.
9. Schwartz Z, Gilley RM, Sylvia VL, Dean DD, Boyan BD. The effect of prostaglandin E₂ on costochondral chondrocyte differentiation is mediated by cAMP and protein kinase C. *Endocrinology* 1998;139:1825-34.
10. Sylvia VL, Del Toro F Jr, Hardin RR, Dean DD, Boyan BD, Schwartz Z. Characterization of PGE₂ receptors (EP) and their role as mediators of 1, 25-(OH)₂D₃ effects on growth zone chondrocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001;78:261-74.
11. Suzuki S, Itoh K, Ohyama K. Local administration of IGF-I stimulates the growth of mandibular condyle in mature rats. *J Orthod* 2004;31:138-43.
12. Maor G, Laron Z, Eshet R, Silbermann M. The early postnatal development of the murine mandibular condyle is regulated by endogenous insulin-like growth factor-I. *J Endocrinol* 1993;137:21-6.
13. Peacey SR, Shalet SM. Insulin-like growth factor I measurement in diagnosis and management of acromegaly. *Ann Clin Biochem* 2001;38:297-303.
14. DiBattista JA, Dore S, Morin N, Abribat T. Prostaglandin E₂ up-regulates insulin-like growth factor binding protein-3 expression and synthesis in human articular chondrocytes by a c-AMP-independent pathway: Role of calcium and protein kinase A and C. *J Cell Biochem* 1996;63:320-33.
15. Blanco FJ, Guitian R, Moreno J, de Toro FJ, Galdo F. Effect of anti-inflammatory drugs on COX-1 and COX-2 activity in human articular chondrocytes. *J Rheumatol* 1999;26:1366-73.
16. Visnapuu V, Peltomaki T, Ronning O, Syrjanen S. Distribution of insulin-like growth factor-I mRNA in the mandibular condyle and rib cartilage of the rat during growth. *Arch Oral Biol* 2002;47:791-8.
17. Miyamoto M, Mukai S, Kobayashi T, Yamamoto H, Kobayashi M, Maruyama T, et al. Simultaneous stimulation of EP2 and EP4 is essential to the effect of prostaglandin E2 in chondrocyte differentiation. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11:644-52.
18. Banovac K, Williams JM, Patrick LD, Haniff YM. Prevention of heterotopic ossification after spinal cord injury with indomethacin. *Spinal Cord* 2001;39:370-4.
19. Maor G, Hochberg Z, Silbermann M. Insulin-like growth factor I accelerates proliferation and differentiation of cartilage progenitor cells in cultures of neonatal mandibular condyles. *Acta Endocrinol* 1993;128:56-64.
20. Lin WW, Oberauer AM. Spatiotemporal expression of alternatively spliced IGF-I mRNA in the rat costochondral growth plate. *J Endocrinol* 1999;160:461-7.
21. Jee WS, Ueno K, Deng YP, Woodbury DM. The effects of prostaglandin E₂ in growing rats: Increased metaphyseal hard tissue and cortico-endosteal bone formation. *Calcif Tissue Int* 1985;37:148-57.
22. Hakada Y, Yoshino T, Nakatani Y, Kurihara N, Maeda N, Kumegawa M. Prostaglandin E₂ stimulates DNA synthesis by a cAMP-independent pathway in osteoblastic clone MC3T3-E1 cells. *J Cell Physiol* 1986;128:155-61.
23. Hock JM, Centrella M, Canalis E. Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology* 1988;122:254-60.
24. McCarthy TL, Centrella M, Raisz LG, Canalis E. Prostaglandin E₂ stimulates insulin-like growth factor-1 synthesis in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone. *Endocrinology* 1991;128:2895-900.
25. Soekanto A. Inhibition of osteoclast-like cell formation by sodium salicylate and indomethacin in mouse bone marrow culture. *Jpn J Pharmacol* 1994;65:27-34.
26. Zhou D, Hughes B, King GJ. Histomorphometric and biochemical study of osteoclasts at orthodontic compression sites in the rat during indomethacin inhibition. *Arch Oral Biol* 1997;42:717-26.
27. Leroux P, Saffar JL. Dose-effect and evidence of escape of inhibition after indomethacin treatment in a synchronized model of bone resorption. *Agents Actions* 1993;38:290-4.
28. 신강섭, 이기수. 인도메타신이 개의 유치 치근흡수에 미치는 영향. *경희대학교 대학원 치의학과 박사논문*, 2003.

- ORIGINAL ARTICLE -

The effects of indomethacin on distribution and expression of COX-2 and IGF-I in the mandibular condyle of growing dogs

Jong-Hyun Nam, DDS, MSD,^a Ki-Soo Lee, DDS, MSD, PhD,^b Yoon-Goo Kang, DDS, MSD^a

This study aimed to investigate the effects of indomethacin on distribution and expression of COX-2 and IGF-I in the mandibular condyle of growing dogs and to examine the number of chondroclasts around the mineralization zone. Indomethacin inhibits prostaglandin E₂ production in the tissue by inhibiting synthesis of cyclooxygenase 2. Prostaglandin E₂ stimulates insulin-like growth factor synthesis. Insulin-like growth factor stimulates growth of mandibular condylar cartilage. Eight mongrel dogs, aged 13 - 14 weeks, were divided into 4 groups. Group 1 and group 2 were administered indomethacin 2 mg/Kg/day orally two times a day for 7 days and 14 days respectively. Group 3 were administered indomethacin 8 mg/Kg/day orally 2 times a day for 14 days, and the control group were administered a placebo. The mandibular condyle heads were sectioned in 5 μ m thickness. The specimens were stained with H-E staining, COX-2 immunohistochemical staining and IGF-I immunohistochemical staining and examined under light microscope. After TRAP staining, the number of chondroclasts were calculated. The observed results were as follows: Indomethacin inhibited expression and distribution of COX-2 and IGF-I on the proliferative zone of condylar cartilage. Indomethacin decreased the number of chondroclastes on the mineralization zone by a time-dependent manner ($p < 0.05$). Indomethacin inhibited expression and distribution of IGF-I by a dose- and time-dependent manner. These results show that indomethacin inhibited expression and distribution of COX-2 and IGF-I on the proliferative zone of condylar cartilage and decreased the number of chondroclasts and suggests that when indomethacin is administered for a long time, condyle growth could be delayed.

Korean J Orthod 2005;35(5):351-60

※ **Key words:** Indomethacin, COX-2, IGF-I, chondroclast

^a Graduate Student, ^b Professor, Department of Dentistry, School of Dentistry, Kyung Hee University

Reprint requests: **Jong-Hyun Nam**

Department of Dentistry, School of Dentistry, Kyung Hee University, 1 Hoegi-Dong, Dongdaemun-Gu, Seoul 130-702, Korea

+82 2 958 9300

orthopia@unitel.co.kr

Received May 11, 2005; Last Revision July 28, 2005; Accepted July 30, 2005