

원저

自然銅의 투여가 인체의 뼈모세포 활성화와 생쥐 정강이뼈 골절에 미치는 영향

황지혜* · 안지현** · 김진택*** · 안상현*** · 김경호* · 조현석* · 이승덕* · 김은정* · 김갑성*

*동국대학교 한의과대학 침구학교실
**동국대학교 의과대학 정형외과학교실
***동국대학교 한의과대학 해부조직학교실

Abstract

Effects of Administration of Pyritum on Activation of Osteoblast Cells in Human Body & on Tibia Bone Fracture in Mice

Hwang Ji-hye*, Ahn Ji-hyun**, Kim, Jin-teck***, Ahn Sang-hyun***, Kim Kyung-ho*, Cho Hyun-seok*, Lee Seung-deok*, Kim Eun-jung* and Kim Kap-sung*

*Dept. of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Dongguk University

**Dept. of Orthopedics, College of Medicine, Dongguk University

***Dept. of Anatomy & Histology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Backgrounds and Objectives : A fracture means a loss of continuity in the substance of bone. Bone differs from other musculoskeletal tissue due to its ability to repair and heal itself without leaving a scar. The cutter head has multinucleated osteoclast cells to resorb the dead bone. The tail, with its conical surface, is lined with osteoblast cells laying down new bone. The conjugation of fracture is a unique biological process regulated by a complex array of signaling molecules and proinflammatory cytokines.

Pyritum, one of the important prescriptions in the oriental medicine, has been used for conjugation fracture. The purpose of this study is to evaluate the effects of administration of Pyritum on activation of osteoblast cells in human body & on tibia bone fracture in mice.

* 본 논문은 동국대학교의료원 동서의학협진기금 지원으로 수행되었음

· 접수 : 2009. 3. 23. · 수정 : 2009. 4. 8. · 채택 : 2009. 4. 8.

· 교신저자 : 황지혜, 경기도 성남시 분당구 수내동 동국대학교 분당한방병원 침구과

Tel. 031-710-3727 E-mail : jiejenara@naver.com

Materials and Methods : Four weeks aged 30 female DBA mice were used for this study. They were divided three groups, normal group, control group(fracture elicitate mice: FE group) and experimental group(Pyritum administered mice group after fracture elicitation : PA group). Left tibia bones of mice in FE and PA groups were fractured by bone cutters. MG-63 cells in human body th Pyritum in the ratio of 1 mg/ml, and the cells were further incubated for 24 hours.

Activation of osteoblast was identified using osteopontin, FGF in vitro test.

In vivo test, regeneration of fractured tibia through the morphological changes was observed, and also activation of inflammation through NF- κ B p65, iNOS, COX-2, osteoblast through osteopontin, FGF and osteoblast's proliferation in each group was measured.

Results and Conclusions :

1. In vitro test for activation of osteoblast cells in human body by Pyritum, osteopontin and FGF production were remarkably increased in Pyritum treated MG-63 cells.

2. In regeneration of fractured tibia by Pyritum, fractured area in external tibia morphology was decreased more in the PA group than that of the FE group. Osteogenesis in fractured area was increased more in the PA group than that of the FE group. Also, endochodrial ossification in central area of fracture and osteoid in lateral area of fracture were increased more in the PA group than those of the FE group.

3. In activation of inflammation by Pyritum administered, activation of NF- κ B p65, increase of iNOS and COX-2 production were higher in the PA and the FE groups than those of the control group. Especially, the PA group showed higher activation and increase than those of the FE group.

4. In activation of osteoblast by Pyritum, increase of osteopontin, FGF and osteoblast's proliferation were higher in the PA and the FE groups than those of the control group. Especially, the PA group showed higher increase and proliferation than those of the FE group.

Key words : Pyritum, osteoblast cells, bone fracture

I. 서론

골절이란 골의 연속성이 완전 또는 불완전하게 소실된 것으로 유발원인에는 사고나 재해로 인한 외상, 골다공증 등 질병으로 인한 뼈의 변화 그리고 스포츠나 하중으로 인한 뼈에 대한 반복적인 스트레스 등이 있다.^{1,2)}

골절의 치유는 골절로 인해 손상된 골조직이 비연속적인 상태에서부터 일련의 생리적 과정을 거쳐 골절에 의한 골의 연속성이 재개되어 궁극적으로 골격 본래의 부하를 견딜 수 있는 정도를 되찾는 복잡한 과정으로, 염증기, 수복기, 재모형기로 대별한다. 골절 치료의 원리는 정확한 해부학적 정복, 견고한 내고정, 골과 주위조직 손상의 감소 및 주위관절의 조기 운동

이며, 목적은 통증의 해소, 골질의 정복과 정복상태의 유지, 골유합의 촉진, 기능의 유지와 회복 등이다.^{3,4)}

한의학에서는 《外臺秘要》⁵⁾에서 처음으로 “救急療骨折, 接骨如故, 不限人畜也方. 取鉛鏹, 銅錯取末, 仍搗, 以絹篩, 和少酒服之, 亦可食物和服之, 不過兩方寸匕以來, 任意斟酌之”라 하여 골절을 언급하였고 골절의 치법은 초기에는 化瘀活血, 중기에는 接骨續筋, 후기에는 補氣養血, 健壯筋骨이다⁶⁾.

최근의 骨折癒合과 관련된 약물연구로는 人蔘⁷⁾, 紅花⁸⁻¹⁰⁾, 順氣活血湯¹¹⁾, 自然銅^{12,13)} 등이 보고되고 있다.

이 중 自然銅은 광물성 약재로 石髓鉛 또는 山骨이라고도 하는데 ‘安心止驚悸, 療折傷, 散血止痛, 排膿, 消瘀血, 續筋骨’의 효능^{14,15)}으로 실제 임상에서도 골절 치료에 효용이 있는 것으로 알려져 왔다.

따라서 自然銅과 관련하여 수침법^{16,17)}, 성분¹⁸⁾, 기원¹⁹⁾,

함유금속원소의 體內 축적상태 및 금속원소간의 상호작용²⁰⁾을 비롯하여 골절치유에 관한 생화학적, 조직형태학적, 형태계측학적, TGF-β1에 대한 면역 조직학적 방법 등에 관한 연구결과들^{12,13)}이 보고되었지만 골절부위에서 염증반응의 순차적인 변화나 뼈모세포 활성화와 관련된 연구는 없었다.

이에 저자는 自然銅의 골절에 대한 효과를 조사하기 위하여 인체의 MG-63 세포를 이용하여 뼈모세포 활성화에 미치는 영향, 인위적으로 생쥐 정강이뼈 골절을 유발한 후 골절부위의 형태변화, 뼈모세포 활성화에 미치는 영향 및 골절부위에 순차적으로 일어나는 염증반응 변화를 염증 전사인자 NF-κB와 NF-κB에 의해 활성화되는 염증효소인 iNOS와 COX-2의 골절부위 내 분포변화를 통해 면역조직화학적으로 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 동물 및 재료

1) 실험동물

태령 4주된 DBA 암컷 생쥐(오리엔트, 대한민국)를 고형사료(삼양, 대한민국)와 물을 충분히 공급하면서 무균사육장치내에서 2주일 동안 적응시킨 후 체중 20g 된 생쥐를 선별하여 사용하였다.

2) 세포주와 세포배양

인체 뼈모세포인 MG-63 세포는 Korean Cell Line Bank(KCLB; Korea)에서 구입하였다. 세포는 37℃, 5% CO₂ incubator(Sanyo, Japan)에서 10% Fetal Bovine Serum(Sigma, USA)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Welgin, Korea)을 사용하여 배양하였다. 오염방지를 위해 항생제로 100 unit/ml penicillin(Sigma, USA), 100µg/ml streptomycin(Gibco/BRL, USA)을 첨가하였다.

3) 自然銅의 제조

自然銅(Pyritum)은 동국대학교 한의과대학 분당한방병원 조제실에서 購入하여 精選한 후 煨紅하여 自然銅 500g당 米醋 250ml의 비율로 米醋에 담금질하는 과정을 7회 반복한 후 분쇄하여 곱게 가루로 만들고

혼탁함이 제거될 때까지 水飛하여 남은 침전물을 사용하였다²¹⁾.

2. 실험

1) 실험군의 분류 및 약물투여

실험은 무처치한 정상군(NOR), 정강이뼈 골절 유발군(fracture elicitate: FE) 및 정강이뼈 골절 유발 후 자연동 투여군(Pyritum administered : PA)으로 분류하였으며, 각 군에 각 10마리씩 배정하였다.

自然銅을 실험군(PA)군에 50mg/kg/day의 비율로 1회 1mg/1회/1일을 생리식염수 0.1ml에 녹여서 intubation tube를 이용하여 투여하였다.

in vitro에서 自然銅 투여량은 MTT assay 결과 10 mg/ml까지 세포생존율의 변화가 관찰되지 않았으므로 1회 투여량을 1.0mg/ml로 결정하였다.

2) 뼈모세포 활성화 조사

自然銅이 뼈모세포의 osteopontin과 fibroblast growth factor(FGF) 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해 MG-63 세포를 이용한 면역조직화학을 실시하였다.

MG-63 세포 -5×10⁵cells/well을 coating slide에 plating하고 12시간 후에 自然銅 1.0mg/ml 첨가하여 24 시간동안 배양하였다.

배지를 제거한 후 vascular rinse와 10% neutral buffered formalin으로 고정을 실시하고, Slide를 blocking serum인 10% normal goat serum(1 : 20, DAKO, Denmark)에서 1시간 동안 반응시켜 비특이적 면역반응을 억제하였다. 그리고 1차 항체인 mouse anti mouse osteopontin(1 : 100, Santa Cruz Biotech, USA)에 4℃에서 1시간 동안 반응시켜 비특이적 면역반응을 억제하였다.

그리고 1차 항체인 mouse anti mouse osteopontin(1 : 100, Santa Cruz Biotech, USA), mouse anti mouse b-FGF(1 : 100, Santa Cruz Biotech, USA)에 4℃ humidified chamber에서 2시간 동안 반응시켰으며, 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG(1 : 50, DAKO, Denmark)에 4℃ humidified chamber에서 1시간 link 하였다.

Avidin biotin complex(ABC, DAKO, Denmark)에 1시간동안 실온에서 반응시킨 후 0.05% 3,3'-diaminobenzidine(DAB, Sigma, USA)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액(pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하여 광학현미

경으로 관찰하였다.

3) 정강이뼈 골절 생쥐에 대한 뼈 재생 효과 조사

(1) 정강이뼈 골절 유발

왼쪽 정강이의 털을 제거하고 정강이 앞쪽·안쪽 (anterio-medial) 피부를 절개하여 정강이뼈의 앞모서리를 확인한 다음 bone cutters (FST, Canada) 사용하여 발목쪽 1/3 지점의 정강이뼈에 골절을 유발하였다. 골절 유발 후 피부를 봉합한 다음 골절부위를 신축성 밴드 (Kinesio, Japan)로 고정하였다. 골절 유발 3일 후 발목 부위를 조사하여 괴사 증후가 없는 것을 선별하여 실험에 사용하였다.

(2) 정강이뼈 표본 제작

골절 유발 제21일 후 각 군을 sodium pentobarbital 용액으로 마취하고 vascular rinse와 10% neutral buffered formalin으로 심장관류고정을 실시하였다. 적출된 정강이뼈를 decalcification solution(BBC, UK)에 24시간 처리하고 세척한 후 통상적인 방법으로 파라핀에 포매하여 5 μ m 두께로 연속절편을 만들었다. 만들어진 연속절편은 Hematoxylin-Eosin법으로 염색하여 표본을 제작하였다.

(3) 영상분석

골절부위의 외부형태적 변화를 영상분석 하기 위해 정강이뼈 주변의 근육을 제거한 후 정강이뼈를 x4 배율로 촬영하였다. Optimas 5.2에서 먼저 image 기능의 sharpen low - filter를 사용하여 골절부위를 명확하게 하였다. 그런 다음 binary morphology에서 invert 기능을 선택하여 골절부위를 intensity 180-200으로 전환·부각시킨 다음, Histogram을 통해 동일 영역의 pixel을 계수하였다.

(4) 골절부위의 조직화학과 면역조직화학

① 연골성 뼈 발생 부위 관찰

골절부위에 연골성 뼈 발생 변화를 조사하기 위해 Wright's stain법을 실시하였다. 우선 조직을 Wright's stain solution(Sigma, USA)에 30분간 반응 후 stop buffer를 처리한 다음 관찰하였다.

② 뼈기질 생성 변화 관찰

골절부위에 뼈 기질 생성 변화를 조사하기 위해

Phloxine-tartrazine 염색법을 실시하였다. Mayer's hematoxylin(Sigma, USA)에 5분간 핵 염색한 후 phloxine 용액(Sigma, USA) 30분간 반응시켰다. 그런 다음 tartrazine 용액(Sigma, USA)에서 분별 후 광학 현미경으로 관찰하였다

③ 염증반응 변화 관찰

염증유발유전자들을 조절하는 전사인자 NF- κ B, 염증 효소인 iNOS와 COX-2의 골절부위내 분포를 조사하기 위해 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 절편을 blocking serum인 10% normal goat serum (1:20, DAKO, Denmark)에서 12시간 동안 반응시켜 비특이적 면역반응을 억제하였다. 그리고 1차 항체인 mouse anti mouse NF- κ B p65(1:500, Santa Cruz Biotech, USA), mouse anti mouse iNOS(1:200, Santa Cruz Biotech, USA) 그리고 rabbit anti mouse COX-2(1:50, Santa Cruz Biotech, USA)에 4 $^{\circ}$ C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰으며, 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG(1:50, Santa Cruz Biotech, USA)와 biotinylated goat anti rabbit IgG(1:50, Santa Cruz Biotech, USA)에 4 $^{\circ}$ C humidified chamber에서 24시간 link 하였다. ABC에 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 DAB에서 발색시킨 후, hematoxylin(Sigma, USA)으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

④ 뼈모세포 활성 변화 관찰

뼈모세포에서 생성되는 osteopontin과 성장물질 FGF의 골절부위내 분포변화를 조사하기 위해 mouse anti osteopontin(1:50, Santa Cruz Biotech)항체와 mouse anti FGF(1:200, Santa Cruz Biotech) 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

한편 뼈모세포의 세포분열 조사를 위해 항 BrdU 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였는데, 우선 정강이뼈를 적출하기 5시간 전, 3시간 전, 1시간 전에 생리식염수에 녹인 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU; Sigma, USA) 50mg/kg을 복강주사하였다. 얻어진 연속절편은 4 $^{\circ}$ C와 37 $^{\circ}$ C의 2N HCl용액에서 각각 20분씩 반응시켜 DNA-denaturation을 일으켰다. 0.1M borate 완충용액 처리로 안정시킨 후 비특이적 면역반응을 억제하기위해 0.01%의 proteinase K(DAKO, Denmark)가 포함된 normal goat serum에 1시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 1차 항체인 mouse anti mouse BrdU(1:50, Amersham, UK)에 4 $^{\circ}$ C incu-

bation chamber내에서 72시간 반응시켰고, 이후 동일한 과정으로 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

4) 영상분석과 통계처리

면역조직화학의 결과의 수치화를 위해 Optimas 5.2(Optima Co, USA)를 이용한 영상분석(image analysis)을 실시하였다. 영상분석 결과는 Sigmaplot 2000(SPSS INC, USA)을 통해 student-t test로 유의성을 검증하였다.

III. 결 과

1. 뼈모세포 활성화 조사

1) MG-63 세포 변화

自然銅 처치 MG-63 세포는 세포질 가장자리가 잘 발달된 것으로 관찰되었으며, 활성화된 형태의 세포수도 自然銅 무처리 MG-63 세포군에 비해 증가된 것으로 관찰되었다(Fig. 1-A).

2) osteopontin 생성 조사

MG-63 세포에서 관찰되는 osteopontin 양성 반응

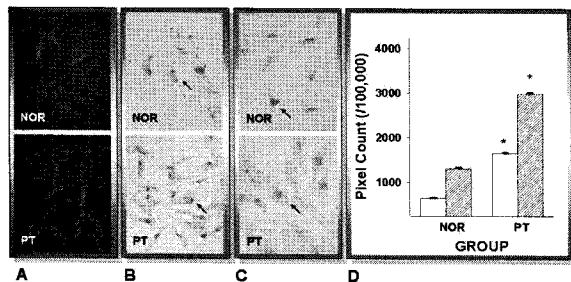


Fig. 1. Activation of osteoblast cells by Pyritum in vitro

- A : activation of MG-63 cells (x1000).
- B : Increase of osteopontin (arrow) production (osteopontin immunohistochemistry, x1000).
- C : Increase of FGF (arrow) production (FGF immunohistochemistry, x1000).
- D : Image analysis of osteopontin (□) & FGF (▨) production.

The MG-63 cells were treated with Pyritum (1mg/ml), and the cells were further incubated for 24 hours. The osteopontin and FGF production were remarkably increased in Pyritum treated MG-63 cells.

Values represent the Mean±Standard Deviation. * : P < 0.05 compared with NOR.

Abbreviation. NOR, No-treated MG-63 cells; PT, Pyritum treated MG-63 cells.

은 핵주변 세포질에서 강하게 나타났으며, 自然銅 처치 MG-63 세포군에서 증가한 것으로 측정되었다. 自然銅 처치 MG-63 세포군의 osteopontin 양성반응이 自然銅 무처리 MG-63 세포군(649±7/100,000 particles)에 비해 154%(1651±14/100,000 particles)로서 유의성(p<0.05) 있게 증가하였다(Fig. 1-B, D).

3) FGF 생성 조사

MG-63 세포에서 관찰되는 FGF 양성 반응은 세포질 가장자리에서 강하게 나타났으며, 自然銅 처치 MG-63 세포군에서 증가한 것으로 측정되었다. 自然銅 처치 MG-63 세포군의 FGF 양성반응이 自然銅 무처리 MG-63 세포군 (1315±15/100,000 particles)에 비해 127%(2990±13/100,000 particles)로서 유의성(p<0.05) 있게 증가하였다(Fig. 1-C, D).

2. 정강이뼈 골절 생쥐에 대한 뼈 재생 효과

1) 외부형태의 변화 관찰

FE군에서는 골절부위가 제대로 융합되지 않아 생긴 뒤틀림을 확인할 수 있었으나, PA군에서는 FE군에 비해 이러한 뒤틀림은 적었다. 한편 골절 융합부위를 영상분석 결과, PA군은 FE군(3467±35/100,000 particles)에 비해 골절 융합부위가 41%(2033±18/100,000 particles) 감소한 것으로 측정되었다(Fig. 2-A).

2) 일반적인 형태 변화

FE군 골절부위의 양극단면에서 연골성 뼈 발생이 관찰되었고, 그 사이에 염증관여세포의 침적이 증가하였다. 또한 연골성 뼈 발생부위와 염증관여세포 사이에서 모세혈관의 분포가 증가되었다. PA군에서도 FE군과 같은 변화가 잘 관찰되었는데, FE군에 비해 연골성 뼈 발생부위 사이 간격은 줄어든 반면, 염증관여세포의 침적은 증가하였다. 또한 모세혈관의 분포도 증가하였다(Fig. 2-B).

3) 연골성 뼈 발생 증가

FE군의 골절 중심부위에서 연골성 뼈 발생이 증가하여 골절부위로 생성된 연골침식이 증가하였다. PA군도 FE군과 같은 양상을 보였지만, FE군보다 증가된 연골성 뼈 발생을 보였으며 골절부위로의 더 많은 연골침식이 나타났다(Fig. 2-C).

4) 뼈기질발생 증가

FE군의 골절 가쪽부위에서는 생성된 뼈기질이 나타났고, 주변으로 뼈모세포의 침적과 모세혈관의 분포가 관찰되었다. PA군도 FE군과 같은 양상을 보였지만, FE군보다 뼈기질의 생성, 침적된 뼈모세포 그리고 모세혈관의 분포가 증가한 것으로 관찰되었다 (Fig. 2-D).

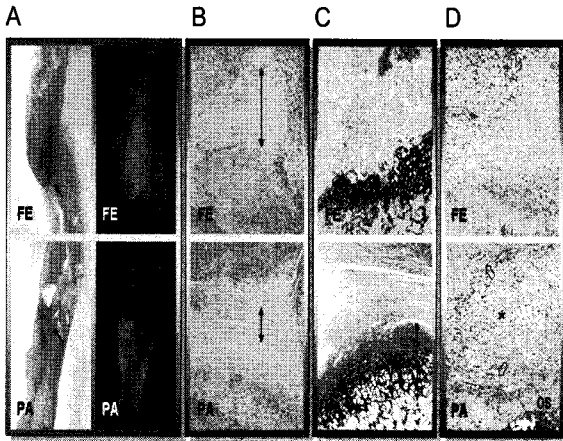


Fig. 2. Regeneration of fractured tibia by Pyritum

- A : Decrease of fractured area (arrow) in external tibia morphology (L. x4; R. inverted photo).
- B : Increase of osteogenesis (↔) in fractured area (H & E, x40).
- C : Increase of endochondrial ossification (↔) in central area of fracture (Wright's stain, x100).
- D : Increase of osteoid in lateral area of fracture (*, area of inflammatory cell infiltration; vacant arrow, capillary; Phloxine-tartrazine, x100).

Abbreviation. FE, fracture elicitate mice; PA, Pyritum administered mice after fracture elicitation; OS, osteoid.

5) 염증반응 조사

(1) NF-κB 활성화 조사

NF-κB p65 활성화 조사에서 정상군(NOR)의 213±6/100,000particles에 비하여 대조군(FE)은 885±14/100,000 particles 및 실험군(PA)은 3561±55/100,000particles로 모두 증가하였으며, 특히 실험군이 대조군(FE)에 비하여 유의성(p<0.05) 있는 증가를 나타내었다(Table. 1).

영상분석에서 NF-κB p65 세포의 양성반응은 골절 부위에서 광범위하게 관찰되었으며, 특히 핵과 핵막 주변 세포질에서 강한 양성반응을 나타내었다(Fig. 3-A).

(2) 염증효소 생성 조사

염증 효소인 iNOS의 생성 조사에서 정상군(NOR)의 197±9/100,000particles에 비하여 대조군(FE)은 1774±26/100,000particles 및 실험군(PA)은 4946±95/100,000particles로 모두 증가하였으며, 특히 실험군이 대조군(FE)에 비하여 유의성(p<0.05) 있는 증가를 나타내었다(Table. 1).

영상분석에서 iNOS 양성반응은 골절부위에서 관찰되었고, 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. 이러한 iNOS 양성반응은 대조군에 비해 FE군과 PA군에

Table 1. The Image Analysis for Activation of NF-κB p65 by Pyritum

Objective	Groups(n=10)		
	NOR	FE	PA
NF-κB p65	213±6	885±14	3561±55*
iNOS	197±9	1774±26	4946±95*
COX-2	295±9	3911±42	5562±44*

Image analysis for 200,000 particles/range of intensity: 80-120.

Values represent the Mean ± Standard Deviation.

* : P < 0.05 compared with FE.

Abbreviation.

NF-κB p65, nuclear factor-κB p65; iNOS, induce Nitric oxide synthase; COX-2, cyclooxygenase-2; NOR, No-treated mice; FE, fracture elicitate mice; PA, Pyritum administered mice after fracture elicitation.

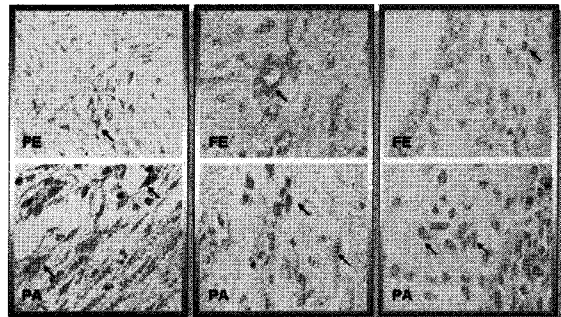


Fig. 3. Activation of inflammation by Pyritum

- A : Activation of NF-κB p65 (arrow, NF-κB p65 immunohistochemistry, x1000).
- B : Increase of iNOS (arrow) production (iNOS immunohistochemistry, x1000).
- C : Increase of COX-2 (arrow) production (COX-2 immunohistochemistry, x1000).

Abbreviation. NF-κB p65, nuclear factor-κB p65; iNOS, induce Nitric oxide synthase; COX-2, cyclooxygenase-2; FE, fracture elicitate mice; PA, Pyritum administered mice after fracture elicitation.

서 모두 증가하지만, PA군에서 더 큰 증가를 보였다 (Fig. 3-B).

한편 염증 효소인 COX-2의 생성 조사에서 정상군(NOR)의 295±9/100,000particles에 비하여 대조군(FE)은 3911±42/100,000particles 및 실험군(PA)은 5562±44/100,000particles로 모두 증가하였으며, 특히 실험군이 대조군(FE)에 비하여 유의성(p<0.05) 있는 증가를 나타내었다(Table. 1).

영상분석에서 COX-2 양성반응은 골절부위에서 관찰되었고, 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. 이러한 COX-2 양성반응은 대조군에 비해 FE군과 PA군에서 모두 증가하지만, PA군에서 더 큰 증가를 보였다(Fig. 3-C).

6) 뼈모세포 활성화 조사

(1) osteopontin 생성조사

osteopontin 생성은 정상군(NOR)의 141±6/200,000 particles에 비하여 대조군(FE)은 797±9/200,000 particles로 증가하였으며, 대조군(FE)에 비하여 실험군(PA)은 1953±47/200,000 particles로서 유의성(p<0.05) 있는 증가를 나타내었다(Table. 2).

Osteopontin의 양성반응은 골절부위 주변의 골성조직에서 관찰되었고 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. 이러한 osteopontin 양성반응은 정상군(NOR)에 비해 대조군(FE)과 실험군(PA)에서 모두 증가하지만, 특히 실험군(PA)에서 더 큰 증가를 보였다(Fig. 4-A).

(2) FGF 생성조사

FGF의 생성은 정상군(NOR)의 267±6/200,000particles에 비하여 대조군(FE)은 1356±26/200,000particles로 증가하였으며, 대조군(FE)에 비하여 실험군(PA)은 6748±39/200,000particles로서 유의성(p<0.05) 있는 증가를 나타내었다(Table. 2).

FGF의 양성반응은 골절부위 주변의 골성조직과 인근 염증발생부위에 관찰되었고, 세포질 가장자리에 강한 양성반응을 보였다. 이러한 FGF 양성반응은 정상군(NOR)에 비해 대조군(FE)과 실험군(PA)에서 모두 증가하지만, 특히 실험군(PA)에서 더 큰 증가를 보였다(Fig. 4-B).

(3) 세포분열 조사

세포분열증인 뼈모세포에서 관찰되는 BrdU의 양성반응은 정상군(NOR)의 102±7/200,000particles에 비

하여 대조군(FE)은 536±7/200,000particles로 증가하였으며, 대조군(FE)에 비하여 실험군(PA)은 1910±24/200,000particles로서 유의성(p<0.05) 있는 증가를 나타내었다(Table. 2).

BrdU의 양성반응은 골절부위 주변의 골성조직에서 관찰되었고, 핵에서 강한 양성반응을 보였다. 이러한 BrdU 양성반응은 정상군(NOR)에 비해 대조군(FE)과 실험군(PA)에서 모두 증가하지만, 특히 실험군(PA)에서 더 큰 증가를 보였다(Fig. 4-C).

Table 2. The Image Analysis for Activation of Osteoblast cells by Pyritum

Objective	Groups(n=10)		
	NOR	FE	PA
OPN	141±6	797±9	1953±47*
FGF	267±6	1356±26	6748±39*
BrdU	102±7	536±7	1910±24*

Image analysis for 200,000 particles/range of intensity: 80-120.

Values represent the Mean±Standard Deviation. * : P < 0.05 compared with FE.

Abbreviation. OPN, Osteopontin; FGF, fibroblast growth factor; BrdU, 5-bromo-2'-deoxyuridine; NOR, No-treated mice; FE, fracture elicitate mice; PA, Pyritum administered mice after fracture elicitation.

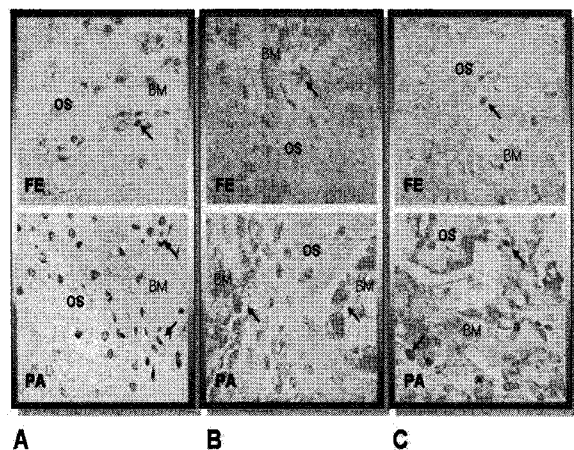


Fig. 4. Activation of osteoblast cells by Pyritum

A : Increase of OPN (arrow) production (OPN immunohistochemistry, x1000).

B : Increase of FGF (arrow) production (FGF immunohistochemistry, x1000).

C : Increase of osteoblast's proliferation (arrow, BrdU immunohistochemistry, x1000).

Abbreviation. OPN, Osteopontin; FGF, b-fibroblast growth factor; BrdU, 5-bromo-2'-deoxyuridine; FE, fracture elicitate mice; PA, Pyritum administered mice after fracture elicitation; OS, osteoid; BM, bone marrow.

IV. 고찰

현대는 늘어나는 교통사고와 각종 산업재해 그리고 여가 시간과 소득 수준의 향상으로 활발한 스포츠 레저 활동이 이루어져 이에 따른 각종 골절질환의 발생이 높아지는 추세이다²²⁾. 임상적으로 대부분의 골절은 큰 합병증을 남기지 않고 잘 치유되지만 심각한 합병증은 국소 감염을 동반한 개방성 골절에서 잘 일어나며, 골절의 지연유합, 불유합, 관절 강직 등의 결과를 유발해서¹⁾ 빠른 정상 생활로의 복귀를 지연시켜 사회적, 경제적으로 큰 손실을 초래할 수 있다. 따라서 이러한 합병증을 초래하는 골절에 대해 빠른 골유합이 반드시 필요하다.

이에 지금까지 골절치유 및 골절유합을 증강시키는 치료제 개발을 위한 연구가 활발히 진행되어 왔다. vitamin A, D²³⁾, 인산칼슘²⁴⁾, 부갑상선 호르몬²⁵⁾, 산화구리²⁶⁾ 등의 약물요법 및 전류 및 전기자극²⁷⁾, 각운동(Angulatory Motion)²⁸⁾ 등 골절치유에 대한 다양한 연구가 이루어졌으며, 한약물을 이용한 연구로는 人蔘⁷⁾, 紅花⁸⁻¹⁰⁾, 順氣活血湯¹¹⁾, 自然銅^{12,13)} 등이 골절치유를 촉진시키는 효과가 있다고 보고되었다.

自然銅은 동축정계에 속하는 광물로서 이황화철(FeS₂), 산화철을 주성분으로 하는 황화철광이다. 이 약은 지름 3-20mm의 입방체로 바깥면은 평탄하며 회록흑색-열은 흑갈색 또는 황록색을 나타내고 금속 광택이 있다. 자른면은 황백색이고 질은 굳으니 쉽게 깨뜨려진다. 경도는 6.0-6.5, 비중은 4.9-5.2이며 약간의 특이한 냄새와 신 맛이 있다. 성분은 FeS₂를 함유하고 이외에 미량의 Co, Ni, Cu, Ti, Pb, Mn 등을 함유한다^{14,29)}.

주효능은 “療折傷, 消瘀血, 續筋骨”한다 하였으며, 약리실험에서 신속한 骨接合과 打撲傷, 驚悸, 癭瘤, 瘡瘍, 火傷 등에 쓴다고 하였다^{15,29-33)}.

자연동은 광물로 반드시 수치가 필요한데 修治法은 自然銅 덩어리를 불 속에 넣어 약재 전체가 붉게 될 때까지 달군 다음 꺼내어 식초를 담은 그릇에 넣어 식히기를 4-7번 한 후 부드럽게 水飛한다고 하였다³⁰⁻³⁵⁾.

본 실험에서는 自然銅을 煨紅하여 米醋에 담금질하는 과정을 7회 반복한 후 水飛한 침전물을 사용하였다. 煨紅하면 황철석질 自然銅은 자류철석으로 전환되므로 새로운 결정입자의 경계면이 생기고 동시에 As, S가 흩어져 없어지며, 이것은 분쇄와 치료효과를

발휘하는데 유리하다고 알려져 있다. 그리고 식초에 담그면 결정입자 표층의 철을 초산철로 전환시켜 유효성분의 용출을 유리하게 하여 치료효과를 발휘하며 水飛는 조용히 놓고 침전하여 가벼운 부분은 제거하여 사용한다고 하였다¹⁴⁾.

골절이 되면 국소에 어혈이 생겨 붓고 아프며 피부는 푸르스름해진다. 뼈가 완전히 부러지면 뼈의 轉位, 변형, 뼈스침소리. 이상 가동, 길이 단축 또는 연장, 기능 장애 등이 있다. 이와 함께 심한 통증, 출혈 등으로 정신을 잃거나 내장장기의 손상이 동반될 수도 있다. 뼈가 완전히 부러진 것은 正骨手法에 의한 正復, 국소 부목에 의한 고정, 기능요법을 하거나 수술을 한다. 정복한 다음이나 뼈가 완전히 부러지지 않았을 때는 어혈을 없애고 부기를 가라앉히며 뼈를 잘 붙게하는 방법으로 正骨紫金丹, 復元活血湯, 接骨丹, 自然銅 등을 쓴다. 만일 피부 손상, 출혈, 의식 장애, 내장장기의 손상 등이 동반되면 그에 대한 치료를 먼저 해야한다. 병적 골절일 때에는 그 원인에 대한 치료를 같이 해야한다³⁰⁾.

골절 치유에 있어서 조직은 다른 조직과 마찬가지로 손상을 받을 경우 자연치유경과를 밟으며, 수복과정은 발생과정에서의 골형성과 유사한 방법으로, 그리고 단계적으로 일어난다. 일반적으로 골절의 치유 과정은 염증기, 수복기, 재모형기로 대별하며, 각 시기 별 뚜렷한 경계없이 서로 중복되어 나타난다. 치유기간은 대략 2-3개월이 걸리지만 치료방법, 연령, 골절의 종류, 영양상태, 기존 질병의 유무 등 다양한 변수에 의하여 치유기간이 달라질 수 있다. 염증기는 골절 후 약 5일까지 기간으로 골절 부분의 파열로 인하여 출혈과 혈종이 발생하고, 양쪽 골절면에는 혈류의 차단으로 괴사가 발생한다. 또한 혈관투과성이 증가하여 염증반응과 함께 혈장이 증가한다. 이때 나타나는 염증세포는 주로 중성구와 탐식구이며, 비감염성 염증이다. 혈장내 섬유소들이 세망섬유, 기존의 교원질 등과 함께 느슨한 섬유소망을 형성하여 다음에 섬유모세포의 출현과 교원질의 합성, 새로운 혈관이 생성되어서 육아조직을 형성하는데 도움을 준다. 동시에 염증세포, 혈소판으로부터 혈소판 유래 성장인자, 압전변형성장인자, 섬유모세포섬유인자 등이 분비되어 골막, 골수 및 주변 연부조직에 있는 골전조세포를 활성화하며, 이들은 장차 골모세포 및 연골모세포로 분화한다. 괴사된 조직이나 파편들은 점차 흡수된다. 따라서 염증기에서는 골절면을 서로 연결하는 기질화가 일어난 혈종을 형성하는데 이것을 전가골이라 하

며, 다음 골기질이 침착할 수 있는 여건을 조성하는 시기이다. 수복기는 골절후 4-40일 정도의 기간으로서 염증기에서 기질화된 혈중에 더욱 혈관세포로 분화하면서 골막하, 골표면, 골절면의 표면에 골기질을 침착하여 직골로 구성된 골소주를 형성하며, 곧 무기질이 침착한다. 상대적으로 저산소증상태인 병소의 심부에는 연골로 분화한다. 따라서 골절치유과정에서 일어나는 골형성은 골발생과정에서 간엽세포로부터 직접 골모세포로 분화하여 골기질을 형성하는 막내골형성과 연골모세포에서 연골을 형성하면서, 점차 골조직으로 치환되어가는 연골내골형성이 동시에 일어난다는 사실을 알 수 있다. 재모형기는 25-50일 정도의 기간이지만 수년이 걸리는 경우도 있다. 조직학적으로 직골은 점차 층판골로 대체되어 더욱 단단한 가교를 형성하는데 이를 이차성 가골이라 한다. 방사선소견상 가골의 크기가 작아지고, 무기질침착의 증가와 더불어 교원질의 배열이 더욱 규칙적인 층판골로 치환됨에 따라 골경화가 증가하다가, 재모형화가 계속 진행될수록 정상골에 가까워진다¹⁾.

消瘀血, 續筋骨의 효능을 갖는다는 自然銅의 골절에 대한 치료효과를 조사하기 위해 행해진 본 연구는 MG-63 세포를 이용하여 自然銅이 뼈모세포 활성화에 미치는 영향을 조사하였다. 인위적으로 생쥐 종아리뼈 골절을 유발한 후 골절부위의 형태변화, 뼈모세포 활성화에 미치는 영향을 관찰하였고, 골절부위의 순차적으로 일어나는 염증반응 변화를 염증 전사인자 NF-κB와 염증효소인 iNOS와 COX-2의 골절부위 내 분포변화를 통해 면역조직학적으로 관찰하였다.

골절도 다른 외상의 경우처럼 순차적인 염증반응이 일어나며, 골절지역에 이주한 큰포식세포를 비롯한 다양한 면역세포들은 IL-1, IL-6, TNF-α 등을 분비하여 extracellular matrix의 합성, 혈관신생성, 섬유모세포의 이주 등을 촉진시킴으로써 골절뼈의 remodeling과 항상성을 유지시키는데 중요한 조절자로서의 역할을 한다. 본 실험에서는 自然銅 처리 후 골절부위에 순차적으로 일어나는 염증반응 변화를 염증 전사인자 NF-κB와 염증효소인 iNOS와 COX-2의 골절부위 내 분포변화를 통해 면역조직학적으로 관찰하였다. 골절부위내 전염증효소(IL-1, IL-6, TNF-α)의 과도한 증가는 IκB kinase로 알려진 IKK(IKKα, β)를 활성화시켜 IκB protein의 serine residue를 인산화시킴으로써 불활성화된 상태로 세포질에 존재하는 NF-κB의 세포내 작용을 유도하며, 그 결과 골절부위에서 NF-κB 활성화는 증가된다^{36,37)}. 본 실험에서도 골절부위

내 fractural cap 사이에서 NF-κB p65의 양성반응이 증가된 것으로 관찰되었다. 이렇게 유리된 NF-κB는 핵으로 들어가 target 유전자의 NF-κB binding site (consensus sequence: 5'-GGGpuNNPyPyCC-3')에 결합하여 염증관련유전자의 발현을 유도하는데³⁸⁾, 특히 NO 생성에 관련된 iNOS와 prostagladin 생성에 관련된 COX-2 유전자 발현을 일으킨다. 골절부위의 iNOS 발현 증가는 NO에 의한 혈관투과성 증가를 유도하여³⁹⁾ 혈관봉괴로 인해 hypoxia 상태인 골절 부위에 O₂ 공급을 향상시킴으로써 osteoblast, chondroblast, adipocytes, myoblast 등과 같은 mesenchymal stem cell-기원세포의 이주를 증진시켜⁴⁰⁾ 골절부위의 remodeling을 유도한다⁴¹⁾. 본 실험에서 골절부위의 iNOS 생성 증가와 혈관신생성의 증가도 관찰되었다. 한편 유도성 동종효소(inducible isoform)로 섬유모세포와 대식세포를 포함한 여러 세포에서 발현되는 COX-2⁴²⁻⁴⁴⁾는 성장인자와 mitogen에 유도되어 prostagladin 분비 지속을 통해 bone healing에 관여하는데⁴⁵⁾, non-steroidal anti-inflammatory drug(NSAID)인 COX-2 저해제는 골절환자의 5-10%에서 치료 지연을 일으키고⁴⁶⁾, 실제 생쥐 골절모델에서 골 생성을 억제하였다⁴⁷⁾. 본 실험에서 COX-2 생성 증가가 관찰되었다.

뼈형성(bone formation)은 mesenchymal stem cell이 뼈모세포(osteoblast)로 분화, 성숙됨으로써 시작되는데, 그 과정에 fibroblast growth factor(FGF) family와 receptors(FGFR)가 참여하게 된다. FGFs는 20-35kDa으로 osteogenesis의 중요한 조절자로, 성숙 뼈모세포의 세포분열을 촉진시킬뿐만 아니라, alkaline phosphatase(ALP), Osteocalcin, Osteopontin 등과 같은 다양한 matrix protein 생성에 관여한다⁴⁸⁻⁵¹⁾. 본 실험에서 FGF 양성반응세포가 증가하였고 세포분열증인 뼈모세포도 증가하였다. 세포분열증인 뼈모세포의 확인은 thymidine analogue인 BrdU⁵²⁾를 통해 이루어졌다.

골절부위에서는 FGF를 비롯한 다양한 성장인자, bone resorption factor(1,25-dihydroxyvitamine D3 and retinoid acid)⁵³⁻⁵⁵⁾ 등에 의해서 osteopontin 생성이 증가한다. non-collagenous protein인 osteopontin은 osteoblast에서 생성되어 αVβ3 integrin을 통해 뼈파괴세포(osteoclast)의 뼈 부착과 이주에 관여한다⁵⁶⁾. 또한 osteopontin-/- mice에서 NF-κB 활성화 억제와 그에 따른 anti-apoptosis factor의 생성 억제한다³⁷⁾는 결과로 미루어 osteopontin은 골절조직내 염증 활성화에도 관여하는 것으로 생각된다. 본 실험에서 osteo-

ostepontin은 뼈 생성 지역에서 증가하였다.

이상의 실험결과에서 自然銅 처리한 MG-63세포에서 ostepontin과 FGF의 생성이 증가하였다. 또한 自然銅을 투여한 생쥐 정강이뼈 골절부위에서 연골성 뼈발생과 막성뼈발생으로 인한 뼈기질 생성이 증가하였고, 뼈기질 주변에서 뼈모세포의 활성화(ostepontin과 FGF 양성반응 증가)와 증식(BrdU 반응 증가)이 일어났다. 또한 골절부위에서 NF-κB의 활성화(NF-κB p65 양성반응 증가)을 통한 염증반응 증가(iNOS와 COX-2 양성반응 증가)도 확인되었다. 自然銅은 NF-κB 활성을 통한 염증반응과 뼈모세포 활성을 통해서 뼈기질 생성을 유도하여 골절부위 골생성에 효과가 있을 것으로 기대된다.

V. 결 론

自然銅 투여가 골절에 대한 치료효과를 조사하기 위해 본 연구는 MG-63 세포를 이용하여 自然銅이 인체의 뼈모세포 활성화에 미치는 영향을 조사하였고, 인위적으로 생쥐 정강이뼈 골절을 유발한 후 골절부위의 형태학적 변화를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 自然銅을 처치한 인체의 MG-63 세포에서 ostepontin과 FGF의 생성이 증가되었다.
2. 自然銅을 투여한 생쥐 종아리뼈 골절부위에서 연골성 뼈 발생과 뼈기질 생성이 증가하였다.
3. 뼈기질 주변에서 뼈모세포의 활성화 중 ostepontin과 FGF 양성반응이 증가하였으며 BrdU 반응 또한 증가하였다.
4. 골절부위에서 NF-κB의 활성화 증가를 통한 염증반응 지표인 iNOS와 COX-2 양성반응도 증가하였다.

VI. 참고문헌

1. 대한병리학회. 병리학. 서울 : 고문사. 2000 : 1015-7
2. John W, Hole J. Human Anatomy Physiology. Oxford : WC Brown publisher. 1993 : 170-227.
3. Hulth A. Basic science and pathology : Current concepts of fracture healing. Clin Orthop Real Res 249 : 265-284, 1989.
4. 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울 : 최신의학사. 1999 : 557-59, 572-80.
5. 王燾. 外臺秘要. 서울 : 成輔社. 1975 : 749-50.
6. 한방재활의학과학회. 한방재활의학과학. 서울 : 군자출판사. 2003 : 210-1.
7. 이한구, 정문상, 윤강섭. 한국 인삼이 골절치유에 미치는 영향. 대한정형외과학회지. 1984 ; 19(3) : 483-91.
8. 서현주, 김준한, 박동윤, 전선민, 구세광, 이재현, 문광덕, 최명숙. 늑골골절을 유도한 흰쥐에서 홍화씨 분말 및 분획들의 급여가 골절 회복 중 골조직에 미치는 영향. 한국영양학회지. 2000 ; 33(4) : 411-20.
9. 송해룡, 라도경, 김종수, 정태성, 김용환, 강호조, 강정부, 연성찬, 김은희, 이후장, 신기욱, 박미림, 김곤섭. 홍화씨가 신생골 형성에 미치는 영향. 한국임상수의학회지. 2002 ; 19(1) : 66-72.
10. 김진호, 오승환. 동종골의 치유 과정에 홍화씨를 첨가한 히알루론산의 골 형성에 미치는 영향. 원광치의학. 2003 ; 12(1) : 167-87.
11. 손원택. 순기활혈탕이 흰쥐의 골절유합에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지. 1999 ; 9(2) : 350-62.
12. 금동호. 自然銅이 흰쥐의 골절유합에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지. 2002 ; 12(2) : 51-68.
13. 정인희, 최현식. 산골이 골절치유에 미치는 영향에 대한 연구. 대한정형외과학회 학술대회 초록집. 1968 ; 단행권 단일호 : 29.
14. 이홍초. 동의광물학. 부산 : 부산대학교출판부. 1998 : 296-308.
15. 허준. 동의보감. 서울 : 법인문화사. 1999 : 1522.
16. 민평기, 서영배. 자연동의 수침법에 대한 문헌적 고찰. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 2001 ; 10(1) : 47-53.
17. 최호영, 김기동, 우경하. 자연동 포제의 규격화 연구. 대한본초학회지. 1999 ; 14(1) : 29-35.
18. 국윤범. 自然銅(산골)의 품질표준화 및 炮製 전후의 성분 비교. 대한본초학회지. 2003 ; 18(1) : 21-31.
19. 최호영. 시판되는 自然銅 및 煨自然銅의 기원 연구. 대한본초학회지. 1999 ; 14(1) : 23-7.
20. 윤혜경, 노영수. 藥用 自然銅 中 金屬元素의 흰쥐

- 에서의 相互作用에 관한 연구. 경희동서약학연구 소보. 1994 ; 11권 단일호 : 145-6.
21. 신민교. 임상본초학. 서울 : 영림사. 1996 : 172, 237, 242, 310, 467, 477, 522, 529, 534, 540.
 22. 최진봉, 이철완. 跌撲, 打撲, 墜落에 起因한 疾病의 文獻의 考察. 韓方物理療法科學會誌. 1994 ; 4(1) : 259.
 23. 배춘식, 조용성, 장경진. 전기자극과 Vitamin ADE가 rat의 골절 치유에 미치는 영향. 대한수의학회지. 1997 ; 37(4) : 863-73.
 24. 엄기동. 비타민-D3와 인산칼슘의 토끼 대퇴골 골절치유 효과에 대한 골수강내 정맥 조영술. 한국임상수의학회지. 1993 ; 10(2) : 185-92.
 25. 김현우. 난소절제술을 시행한 백서에서 간헐적인 부갑상선호르몬 투여가 골절치유에 미치는 영향. 대한정형외과학회지. 1999 ; 34(1) : 207-17.
 26. 정윤정. 토끼의 비골골절에서 산화구리의 골재생 효과. 한국임상수의학회지. 2003 ; 20(4) : 458-66.
 27. 배춘식. 크기가 다른 전압의 전기자극이 랫드 골절치유에 미치는 영향에 관한 연구. 생명과학지. 1996 ; 3 : 11-21.
 28. 정문상. 각운동(Angulatory Motion)이 골절치유(Fracture healing)에 미치는 영향. 대한정형외과학회지. 1981 ; 16(1) : 20-7.
 29. 한의학대사전편찬위원회. 한의학대사전. 서울 : 정담. 1998 : 1324.
 30. 동의학연구소. 동의학총서 8(동약법제). 서울 : 여강출판사. 1994 : 387-8.
 31. 李時珍. 校訂本 本草綱目. 서울 : 의성당. 1993 : 466-8.
 32. 李梴. 新校 編註醫學入門. 서울 : 대성문화사. 1996 : 491, 630.
 33. 黃道淵. 證脈方藥合編. 서울 : 남산당. 1998 : 334.
 34. 吳儀洛. 本草從新. 서울 : 행림출판. 1989 : 203.
 35. 黃宮繡. 本草求真. 台北 : 宏業書局有限公司. 1975 : 244.
 36. Tamiyo K, Taejoon C, Toshimi A, Masashi Y, Nasser N, Dana G, Louis C, Thomas A. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF- κ B ligand(osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. J Bone & Mineral Research. 2001 ; 16(6) : 1004-14.
 37. Muneaki I, Yoichi E, Kunikazu T, Susan RR, Hisashi K, David TD, Mitsuru E, Akira N and Masaki N. Osteopontin is associated with nuclear factor κ B gene expression during tail-suspension-induced bone loss. Experimental Cell Research. 2006 ; 312(16) : 3075-83.
 38. Baeuerle PA and Baltimore D. NF- κ B - Ten years after. Cell. 1996 ; 87 : 13-20.
 39. Anggard E. Nitric oxide : mediator, murderer, and medicine. Lancet. 1994 ; 9 : 1199-206.
 40. Leah F, Damian CG and Clare EY. Hypoxic osteocytes recruit human MSCs through an OPN/CD44-mediated pathway. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2008 ; 366(4) : 1061-66.
 41. Yasemin B, Ashish DD, Richard CA, Zhi MF, Yao W and George ACM. Deletion of iNOS gene impairs mouse fracture healing. Bone. 2005 ; 37(1) : 32-6.
 42. Groszmann RJ. Hyperdynamic state in chronic liver diseases. J Hepatol. 1993 ; 17(2) : S38-40.
 43. HJ Rothkötter, R Pabst and M Bailey. Lymphocyte migration in the intestinal mucosa : entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. Veterinary Immunology and Immunopathology. 1999 ; 72 : 157-65.
 44. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. Cell. 1998 ; 93(5) : 705-16.
 45. Andrew BS and Yuehuei HA. Is there an inhibitory effect of COX-2 inhibitors on bone healing? Pharmacological Research. 2004 ; 50(2) : 151-6.
 46. Christian C. General principles of fracture treatment. In : ST Canale Editor, Campbell's operative orthopaedics. St Louis : Mosby. 1988 : 1993-2041.
 47. Brian HM, Spencer TC, Paul SW, Theodore M, Gayle EL and Gary DB. Effect of COX-2 inhibitors and non-steroidal anti-inflammatory drugs on a mouse fracture model. Injury. 2006 ; 37(9) : 827-37.
 48. Ornitz DM and Marie PJ. FGF signaling

- pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev.* 2002 ; 16 : 1446-65.
49. Fakhry A. Effects of FGF-2/-9 in calvarial bone cell cultures : differentiation stage-dependent mitogenic effect, inverse regulation of BMP-2 and noggin, and enhancement of osteogenic potential. *Bone.* 2005 ; 36 : 254-66.
50. Zhang X, Sobue T and Hurley MM. FGF-2 increases colony formation, PTH receptor, and IGF-1 mRNA in mouse marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 ; 290 : 526-31.
51. Rebecca AJ, Victor N and Simon MC. Coordinated fibroblast growth factor and heparan sulfate regulation of osteogenesis. *Gene.* 2006 ; 379 : 79-91.
52. Martin K, Lisa MM, Arthur S, Laurence SF, Michael JW, Cindy W, Madhu P, Randall WB, Michael L, Donna JM, Elaine L, Donald KC, Barbara O and James M. Measuring cell proliferation in rectal mucosa : Comparing bromodeoxyuridine(BrdU) and proliferating cell nuclear antigen(PCNA) assays. *J Clin Epidem.* 2000 ; 53 : 875-83.
53. Weizmann S, Tong A, Reich A, Genina O, Yaron O and Monsonego-Ornan E. FGF upregulates osteopontin in epiphyseal growth plate chondrocytes: Implications for endochondral ossification. *Matrix Biology.* 2005 ; 24(8) : 520-9.
54. Gordjestani M, Dermaut L, De Ridder L, Thierens H, De Waele P, De Leersnijder WW and Bosman F. Osteopontin and bone metabolism: a histology and scintigraphy study in rats. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2005 ; 34(7) : 794-9.
55. Kasugai S, Todescan R, Nagata T, Yao KL, Butler WT and Sodek J. Expression of bone matrix proteins associated with mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in vitro: inductive effects of dexamethasone on the osteoblast phenotype. *J Cell Physiol.* 2003 ; 147 : 111-20.
56. Rousseau F, Saugier P, Le Merrer M, Munnich A, Delezoide AL, Maroteaux P, Bonaventure J, Nancy J and Sanak M. Stop codon FGFR3 mutations in thanatophoric dwarfism type 1. *Nat Genet.* 1995 ; 10 : 11-2.