

발육중인 생쥐 하악 과두에서 연골 및 골의 특이 유전자 발현

지국섭¹⁾ · 윤영주²⁾ · 박주철³⁾ · 김광원⁴⁾

하악과두 연골이 발생하고 분화하는 과정에서 나타내는 특성을 규명하기 위하여, 발생 16, 18일과 출생 1일, 5일, 10일, 20일 및 30일 후의 ICR 생쥐의 하악과두를 형태학적으로 분석하고, 생쥐 I형, II형, X형 교원질, Indian hedgehog (IHH) 및 BMP-4 등의 mRNA 발현을 *in-situ hybridization* 방법으로 연구하였다.

1. 생쥐 I형 및 II형 교원질 mRNA는 하악과두의 발생 및 성장과정에서 모두 발현되었다. I형 교원질 mRNA는 휴지총과 증식총의 상부에서 관찰된 반면 II형 교원질은 휴지총과 증식총 그리고 비대연골총의 상부에서 관찰되었다.
2. 하악과두 연골은 성장에 따라 비대연골총이 계속 증가하는 소견을 보였으며, 비대 연골총의 세포들은 특징적으로 X형 교원질 mRNA의 발현을 보였다.
3. BMP-4 mRNA는 하악과두 연골 원기와 골화중인 하악골체에서 모두 발현되었다.
4. IHH mRNA는 하악과두의 발생과정에서 증식 연골총의 하부와 비대연골총의 상부에서 선택적으로 관찰되었다.

(주요 단어 : 연골, 하악과두, 분화, 교원질, 유전자)

I. 서 론

뼈는 발생학적으로 미분화 간엽세포에서 직접 골이 발생하는 막내 골화와 간엽세포에서 먼저 연골이 형성되어 일차 골격계를 이루다가 차후 연골이 이차적으로 골로 대체되는 연골내 골화의 두 가지 방법으

로 분화한다¹⁾. 연골성 골화 과정은 대표적으로 성장기의 장골과 하악과두에서 관찰 할 수 있다²⁾. 그러나 장골의 성장판 연골과 하악 과두연골의 골화과정은 연골의 발생, 성숙 및 골화 과정에서 상당한 차이가 있는 것으로 알려지고 있다³⁻⁵⁾.

하악과두 연골과 성장판 연골이 다른 점은 첫째, 발생학적으로 성장판 연골은 미분화 간엽세포의 축합(condensation)으로부터 발생 초기에 일차 연골 골격을 형성하는 일차연골의 형태인 반면에, 하악과두 연골은 일차적으로 하악골이 발생한 후에 그와 연관하여 연골이 발생하는 이차연골이며 둘째, 성장판 연골은 유리연골(hyaline cartilage)로 구성되어 있으나 하악과두 연골은 섬유연골과 유리연골의 혼합으로 이루어져 있으며, 셋째, 하악과두 연골과 성장판 연골의 연골세포는 형태학적으로 서로 다르고, 넷째, 하악과두 연골은 성장판 연골과 비교하여 biomechanical

¹⁾ 조선대학교 치과대학 교정학교실, 대학원생.

²⁾ 조선대학교 치과대학 교정학교실, 부교수.

³⁾ 조선대학교 치과대학 구강조직학교실, 부교수.

⁴⁾ 조선대학교 치과대학 교정학교실, 교수.

교신저자 : 김광원

광주광역시 동구 서석동 375

조선대학교 치과대학 교정학교실 / 062-220-3870

kwkim@chosun.ac.kr

원고접수일 : 2003년 6월 26일 / 심사통과일 : 2003년 8월 21일

* 본 연구는 1997년 조선대학교 교내 학술연구비 지원에 의하여 이루어진 것임.

stress와 humoral factor에 대한 반응성도 상이하며, 다섯째, 하악과두 연골과 성장판 연골의 연골세포는 그 증식과 분화양상도 서로 다른 것으로 알려져 있다^{6,7)}. 그러나, 이러한 특성 차이에 관한 많은 연구에도 불구하고 하악과두 연골이 하악골의 골막에서 발생하는 것인지 아니면 하악골과 관계없이 독립적인 간엽세포 축합으로부터 이루어지는지 여부와 하악과두 연골이 성장판 연골에서와 같이 자발적인 성장능력을 지니고 있는지, 또한 성장판 연골과 달리 출생 전 근육의 활동과 출생 후 저작력과 같은 기능력의 영향으로 과두의 성장 즉 과두 연골의 분화과정이 촉진되는 것은 어떤 과정을 통해서 어떻게 이루어지는지 등에 관하여는 아직도 논란이 계속되고 있다⁸⁾.

Ishii⁹⁾등은 하악과두 연골은 발생 개시 과정에서부터 I형 교원질과 II형 교원질이 발현되어 연골 분화 과정에 따라 I형 교원질에 비하여 II형 교원질이 증가한다고 하였으나, Fukuda¹⁰⁾등은 생쥐 발생 14일의 하악과두 연골의 발생 원기에서 II형 교원질은 발현되지 않으나 I형 교원질, aggrecan 및 알칼리성 인산 분해효소가 발현되고, 이어서 발생 15, 16일에 연골세포가 분화되면 그 초기 과정에서부터 X형 교원질이 발현되고, 18일경에 골로 전환된다고 하여 서로 상반된 결과를 보고하였다. 이러한 서로 다른 연구 결과는 연골의 발생 기원과 연골이 연골내 골화 과정을 통해서 골로 전환되는 과정에서 하악과두 연골의 성장능력 등을 이해하는데 많은 어려움을 야기하고 있으며, 또한 하악과두 연골의 특성 연구가 출생전의 발생과정에 치우쳐 있어서 하악과두 연골 분화를 발생 과정에서부터 출생 후 저작 활동 등의 기능력이 작용되는 시기까지 종합적으로 판단하는데도 많은 문제점이 있다.

본 연구에서는 발생 14일의 생쥐 배자에서부터 출생 후 30일의 다양한 발생과정의 하악과두 연골을 이용하여 하악과두 연골의 초기발생 과정에서부터 기능력 적용 시기 및 성장 완료 후의 하악과두 연골의 특성을 살펴보고자 I형, II형, X형 교원질, Indian hedgehog (IHH), 및 BMP(Bone morphogenetic protein)-4 등의 다양한 연골-특이 유전자들의 발현을 확인하였다. 유전자 발현 해석을 통하여 하악과두 연골이 하악골의 골막과 연관되어 이차적으로 발생하는 것인지 아니면 독립적인 간엽세포 축합으로부터 생겨나는지와 저작근이 분화하고 저작력과 같은 기능력이 작용하는 출생 후에는 연골의 분화과정에 어떤 차이가 있는가를 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 동물 준비 및 조직 절편 제작

하악과두 발생 단계에 따른 유전자 분포 확인을 위하여 발생 16, 18일과 출생 1일, 5일, 10일, 20일 및 30일 후의 ICR 생쥐 70마리를 실험에 이용하였다. 조직 절편 제작을 위해 생쥐를 4°C, 4% paraformaldehyde 용액에서 16시간 고정한 후 10% EDTA 용액에서 2-4주간 탈회하고, RNAase-free 조건에서 통법에 따라 탈수, 포매한 후 5μm 두께로 박절(발생 단계의 경우는 연속절편 제작)한 후, ethoxysilran-coated 슬라이드에 붙여 사용 전까지 4°C에 보관하였고 일부의 절편들은 hematoxylin-eosin 염색하여 형태학적으로 관찰하였다.

2. cRNA probe의 제작

1) RNA의 추출과 RT-PCR 그리고 염기서열 분석
연골- 및 골-특이 유전자들이 발현되는 것으로 알려진 시기인 출생 5일의 생쥐 척추, 하악과두 및 장골에서 Total RNA Isolation Kit(Promega Co., WI, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. 일부의 total RNA는 oligo(dT)-latex(Promega Co.)를 이용하여 poly(A)⁺RNA를 추출하였다. Total RNA 및 poly(A)⁺RNA 1μg당 25U의 AMV reverse transcriptase (RT)(Promega Co.)와 oligo-d(T) primer를 이용하여 first-strand cDNA를 합성하였다. 생쥐 I형, II형, X형 교원질, IGG, 및 BMP-4 등의 유전자의 염기서열을 blast search program(NCBI)을 이용하여 얻고, 이에 부합하는 sense와 antisense oligonucleotide primer를 주문 제작하여 실험에 이용하였다(Table 1).

Reverse transcription(RT) 과정을 통하여 합성한 cDNA를 template로 각각의 primer를 이용하여 94°C : 4min, 36cycle (94°C : 1min, 55°C : 3sec, 72°C : 2min), 72°C : 5min의 조건으로 PCR 증폭(PCR cycler, MJ research)을 시행한 후 1.5% agarose gel에 전기 영동하여 유전자의 발현을 확인하였다. 분리된 유전자 단편들을 pGEM-T easy Vector System (Promega Co.)을 이용하여 subcloning하고 ABI automatic sequencer (Perkin-Elmer, Foster city, CA, USA)를 이용하여 database상의 생쥐 I형, II형, X형 교원질, IHH 및 BMP-4 유전자의 염기 서열과 동일한지 확인하였다.

Table 1. Oligonucleotide primers used in the PCR amplification of mouse type I, II, and X collagen, IHH, and BMP-4 mRNAs.

Primer	Gene (expected size)	Primer sequence
mCol I-s	COLIA1 (275bp)	5' primer: 5'-TCTCTCTTGCTGTCCTTTG-3' 3' primer: 5'-TGTGCCTTAATGAGTCGCT-3'
mCol I-a		
mCol II-s	COLIIA1(584bp)	5' primer: 5'-AAGACCCCTACAGATGCT-3' 3' primer: 5'-TTGACCTGTGCTCCTGCTGT-3'
mCol II-a		
mCol X-s	COLXA1 (437bp)	5' primer: 5'-CTAGGAAACATGCAGGAATT-3' 3' primer: 5'-TTTATTCTTCCACTCGATTGA-3'
mCol X-a		
mIhh-s	IHH (414bp)	5' primer: 5'-AGAGCACCTTCCATCCAC-3' 3' primer: 5'-TGAGGGTCAAGCCCCATCTA-3'
mIhh-a		
mBmp4-s	BMP4(431bp)	5' primer: 5'-GAACTGCCGTCGCCATTTC_3' 3' primer: 5'-GCAGTTGTGTTGATGTGT-3'
mBmp4-a		

2) cRNA 프로브 합성

T-easy vector에 subcloning된 생쥐 I형, II형, X형 교원질, Indian hedgehog(IHH), BMP-3 및 BMP-4 cRNA probe로 이용할 유전자 단편들을 5' 및 3' 돌출형 제한효소로 절단한 후, pBluescript-SK(+) vector (Promega Co.)에 다시 한 번 subcloning하였다. 그 후 다시 한 번 sequencing하여 DNA insert의 방향을 확인하고 DNA를 선형화하고 Proteinase K 처리 후 DIG RNA labelling kit(Boehringer-Mannheim biochemicals, Mannheim, Germany)와 T3 및 T7 RNA polymerase (Boehringer-Mannheim biochemicals)를 이용하여 sense와 antisense cRNA probe를 작성하였다.

3. In-situ hybridization

4°C에 보관된 절편을 xylene으로 탈 파라핀 처리하고 100%, 90%, 80%, 70% ethanol의 순서로 함수한 후, 고정액(4% formaldehyde in 1X PBS(Phosphate buffered saline, pH 7.4))에 10분간 고정하였다. PBS로 두 차례 세척하고 acetylation 용액(0.25% acetic anhydride in 0.1M triethanolamine-HCl, pH 8.0)에 10분간 처리한 후 2X SSC(0.15M sodium chloride, 0.015M sodium citrate)로 두 차례 세척한 다음 탈수 및 탈지(70% ethanol : 1분, 80% ethanol : 1분, 95% ethanol : 2분, 100% ethanol : 1분, 100% ethanol : 5분, 95% ethanol : 1분) 과정을 거쳐 공기 중에서 건조시켰다. 50% formamide, 10mM Tris-HCl, 200μg/ml tRNA 600mM NaCl, 0.25% SDS, 1 mM EDTA, 1X Denha-

rdt's solution, 10% Dextran sulfate가 함유된 용액에 cRNA 프로브를 넣고 50°C에서 16시간 hybridization하였다. Hybridization 후 2X SSC, 0.2X SSC I, 0.2X SSC II로 각각 세척한 다음 1.5% Bloking Reagent (Behringer Manheim)가 함유된 Digbuffer (100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 500mM MgCl₂)으로 세척하고 NBT/BCIP로 발색하고 Dig buffer IV(10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA)로 3분간 세척한 다음 methyl green으로 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

III. 연구결과

1. 생쥐 I형, II형, X형 교원질, Indian hedgehog(IHH), 및 BMP-4 유전자 단편들의 동일성 확인

RT-PCR에서 분리하여 cRNA probe 합성에 이용할 유전자 단편들의 염기서열을 blast search program (NIBI)을 이용하여 확인한 결과, 분리 유전자들은 database 상의 생쥐 I형, II형, X형 교원질, Indian hedgehog(IHH), 및 BMP-4 유전자들의 염기서열과 동일한 것으로 확인되었다.

2. 형태학적 관찰

하악과두 원기는 발생 16일에 메켈 연골의 외측에서 관찰되었으며 상부에서는 발생중인 측두골과 관절강도 관찰되었다. 하악과두 주위에는 접형골과 근



Fig 1a. Mandibular condyle anlage at d(day) 16 of gestation. Each section was cut in the coronal plane, $\times 40$. Cartilage of mandibular condyle (MC) adjacent to ossifying mandible (OM). Sphenoid bone (S), temporal bone (T), Meckels cartilage (M), and developing muscle (Ms) are seen in (a) (H-E stain).

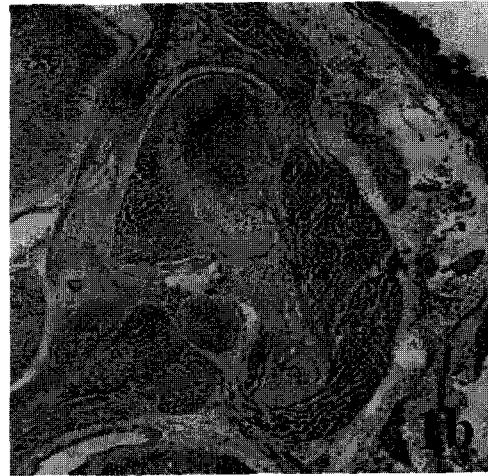


Fig 1b. Mandibular condyle anlage at d 16 of gestation. Each section was cut in the coronal plane, $\times 40$. (b) mRNAs are expressed in the differentiating cartilage cell (arrow in b).

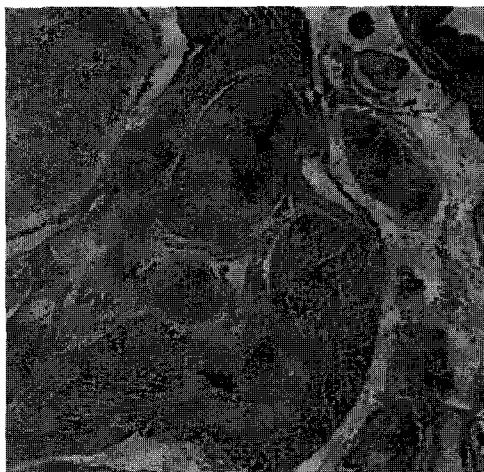


Fig 1c. Mandibular condyle anlage at d 16 of gestation. Each section was cut in the coronal plane, $\times 40$. (c) Type I collagen mRNAs are observed in not only cartilagenous cell (arrow in c) but also developing perichondrium and /or periosteum



Fig 2. Cartilage anlage of future mandibular condyle cut in the coronal plane on d 18 of gestation, $\times 40$. Expression for type II collagen mRNAs is not seen in perichondrium / periosteum (arrowheads), but is seen cartilagenous cell (arrow) of mandibular condyle. Ds, disk; MC, mandibular condyle; Ms, muscle; T, temporal bone; Ti, tibia.

육들이 발생하고 있었으며 하악과두 연골은 연골의 다양한 층들은 구분할 수 없었으나, 골화가 개시된 하악골의 상부에서 연속된 형태로 나타났다(Fig 1a). 발생 18일에는 관절강에 측두하악관절 원판에 의하여 관절강이 상 하부로 나뉘어져 있었으며, 하악과두

연골에서는 극소수의 비대 연골세포도 관찰되었다(Fig 2). 생후 1일의 하악과두의 후방면에서는 연골이 발생하는 부위에 미분화 간엽세포들이 모여들고 그

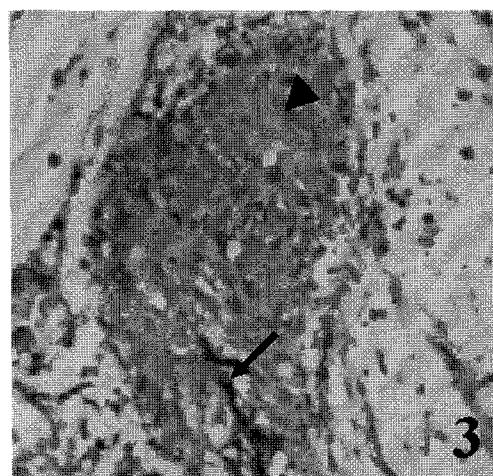


Fig. 3. Developing mandibular condyle of 1-day-old mice. BMP-4 mRNAs are expressed in ossifying mandible (arrow) and slightly detected in the differentiating chondrocytes (arrowhead), $\times 200$.

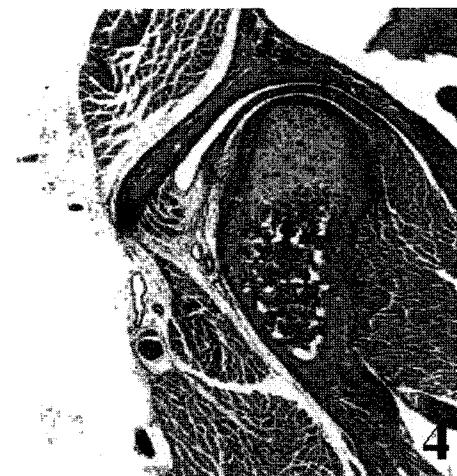


Fig. 4. Condylar cartilage of mandible and ulna at 5 of postnatal mice, $\times 40$. Condylar cartilage increased in size due to accumulation of hypertrophic chondrocytes and ossifying mandible, H-E stain.

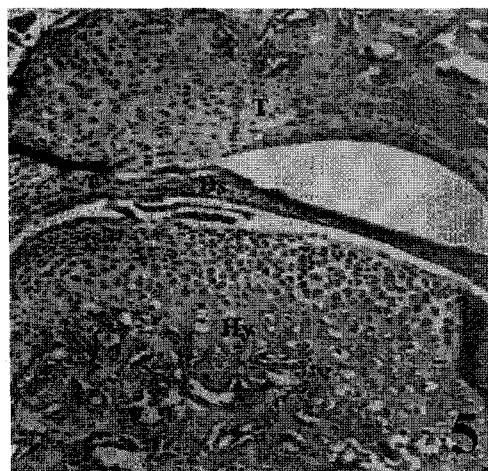


Fig. 5. Condylar cartilage at d 10 of postnatal mice, H-E stain, $\times 100$. The resting, proliferative, transition, hypertrophic cartilage (Hy) and chondro-osseous junctional zones are distinguishable.

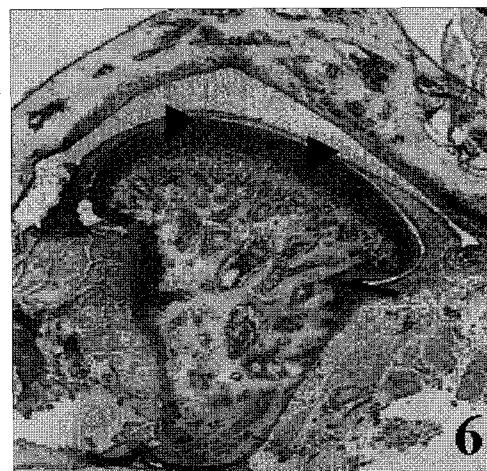


Fig. 6. Condylar cartilage, temporomandibular joint and nasal cartilage at d 20 of postnatal mice. Type I collagen mRNAs are expressed in cells of the temporal fossa (arrowhead), condylar chondrocyte and periosteum (arrow) of the mandibular condyle, $\times 40$.

하방에는 골양 조직들이 소수 나타났다. 생후 5일에는 완전한 형태의 측두하악관절이 형성되었으며 하악과두 연골도 휴지층(resting zone), 증식층(proliferative zone), 비대 연골층(hypertrophic cartilage zone), 이행 연골층(transition zone), 석회화 연골층(calcified cartilage zone/chondro-osseous junction), 골화층(ossification zone) 등을 구분할 수 있을 정도

로 성숙되어 있었으며, 생후 10일, 20일 및 30일로 성장해감에 따라 비대 연골 세포층이 다른 층들에 비하여 상대적으로 두터워지면서 하악골의 골화가 빠르게 진행되는 소견을 보였다(Fig 5, 6, 7, 8). 성숙한 비대 연골세포들은 세포의 핵이 비정상적으로 커지면서 2-3개로 분열된 양상을 나타냈다.

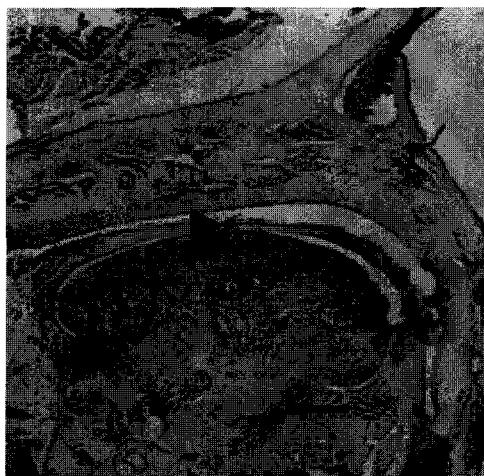


Fig. 7a. Condylar cartilage of mandible at d 30 of postnatal mice. (a) Type I collagen mRNAs are still expressed in condylar chondrocytes (arrowhead in a), and periosteum (arrow in a) of the mandibular condyle, $\times 40$.

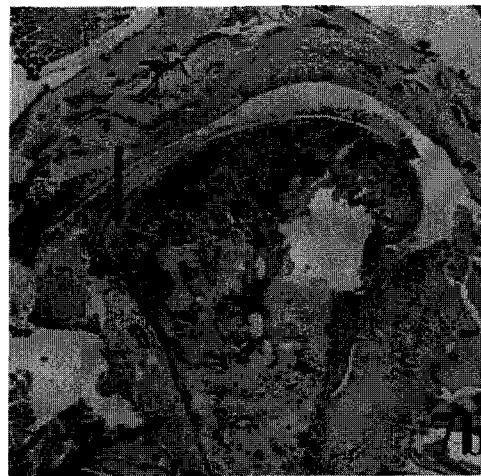


Fig. 7b. Condylar cartilage of mandible at d 30 of postnatal mice. (b) Expression of the type II collagen (arrow in b) is visible in cells of the glenoid fossa due to the transformation of Fig the connective tissue cells (fibroblasts) into fibrous cartilage cells, $\times 40$.

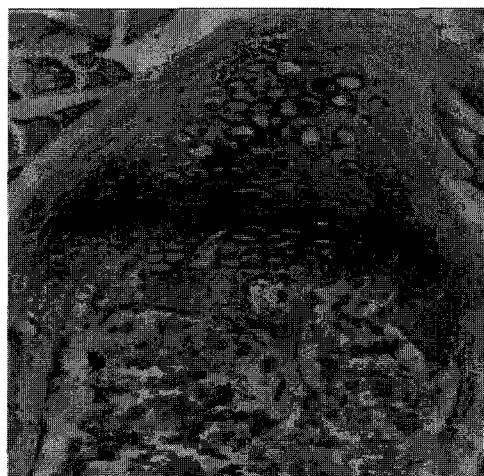


Fig. 7c. Condylar cartilage of mandible at d 30 of postnatal mice. (c) Hypertrophic chondrocytes are characterized by the expression of type X collagen mRNA, $\times 100$.

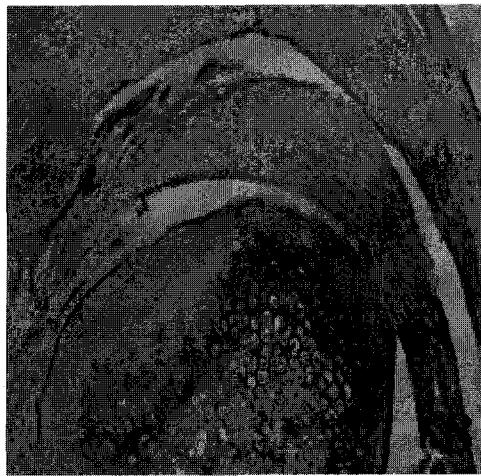


Fig. 8. Condylar cartilage of mandible at d 30 of postnatal mice, $\times 100$. IHH mRNA is limited exclusively in the lower part of the proliferative zone and the upper part of the hypertrophic cartilage zone and mandibular condyle.

3. In situ hybridization 법에 의한 I형, II형, X 형 교원질, Indian hedgehog(IHH), 및 BMP-4 mRNA의 발현 검색

I 형 교원질 mRNA는 발생 16일의 하악과두 원기에서 분화중인 연골세포 전체와 주위의 연골막, 근육

과 결합조직 등에서 전체적으로 발현되었다(Fig 1c). 하악과두의 발생이 진행됨에 따라 I 형 교원질 mRNA의 발현은 하악과두의 비대 연골층과 골형성층을 제외한 연골층과 연골막에서 선택적으로 발현 되었으며, 그 발현 양상은 발생 18일, 생후 1일, 생후 10일,

생후 20일 및 생후 30일까지 지속되었다(Fig 6, 7a). II형 교원질 mRNA는 발생 16일의 하악과두 원기에서 분화중인 연골세포의 중심부와 메켈연골에서 전체적으로 발현되었으나 골막 등의 다른 부위에서는 그 발현이 관찰되지 않았다(Fig 1b). 발생 18일에는 하악과두에서 II형 교원질 mRNA의 발현은 비대연골세포로 생각되는 세포에서는 나타나지 않았으며 휴지층과 증식층의 연골세포에서 선택적으로 관찰되었다(Fig 2). 그 후 하악과두 성장과 함께 뚜렷이 연골세포의 다양한 층이 구분되고 활발히 골화가 진행되는 생후 30일의 조직에서도 하악과두 상부의 관절면과 비대연골층 및 골화층을 제외한 연골세포층에서 발현되었으며 측두하악 관절와의 일부 섬유연골세포에서도 발현이 확인되었다(Fig 7b).

골의 특성을 확인하는데 이용할 수 있는 BMP-3 mRNA는 발생중인 하악과두 연골원기와 골화가 진행중인 하악골체에서 동시에 발현되어(Fig 3), 하악과두 연골 발생이 하부에서 발생하는 골과 연관성이 있음을 나타냈다.

X형 교원질 mRNA는 형태학적으로 하악과두의 성장에 따라 증대된 것으로 보이는 비대연골층에 선택적으로 발현이 관찰되어, 근육의 작용이나 저작 등의 기능력의 작용에 따라 하악과두가 성장하는 주된 이유가 비대연골세포의 빠른 증식에 기인함을 확인할 수 있다(Fig 7c). 또한, Indian hedgehog(IHH) mRNA의 발현은 X형 교원질 mRNA와는 다르게 성장한 하악과두의 증식층의 하부 연골세포와 비대연골층의 상부의 연골세포에서 확인되었다(Fig 8).

IV. 총괄 및 고찰

생쥐 하악과두 연골의 발생은 발생 14.5일에 하치조신경의 분지 부위에서 출현하는 메켈연골의 외측에 하악골 발생 원기가 출현하면서 시작되어, 발생 15일에 처음으로 연골세포가 출연하고 발생 16일에는 비대연골세포가 나타나며, 발생 18일에는 비대연골세포가 골로 전환되면서 연골 하방골(subchondral bone)이 침착되고 성장과 근육과 저작력의 작용에 따라 기능적 및 형태학적 변화가 나타나는 것으로 알려져 있다^{7,10,11)}. 최근에 하악과두 연골의 분화와 기능적 특성을 이해하기 위해서 생쥐, 흰쥐, 토끼 등의 하악과두 연골 분화 과정에서, I형, II형, X형 교원질과 aggrecan 등의 연골-특이 유전자와 알칼리성 인산분해효소, 골형성 단백질(BMP), osteocalcin, bone

sialoprotein(BSP) 등의 골-특이 유전자들의 발현을 면역조직화학 및 RNA in-situ hybridization 방법으로 평가한 연구들이 알려지고 있다^{12,13)}.

하악과두 연골은 발생, 성장 및 발육시기에는 연골성 골화 과정에 의하여 하악골의 후방 성장에 관여하고, 발생 과정 후에는 측두하악관절의 일부를 구성하여 개체가 저작 등의 다양한 기능을 수행할 수 있도록 한다. 그러나 하악과두 연골은 연골 세포의 발생, 분화 및 성숙 등의 다양한 과정에서 대표적인 일차연골인 장골의 성장과 연골과는 다른 특성들을 나타내는 것으로 알려지고 있다^{14,15)}.

장골에서의 연골 발생과 골화 과정은 미분화 간엽세포들이 축합한 후 그 중심부에서부터 연골 세포들이 발생되는 일차연골로서, 성장기 동안 이 연골들은 휴지층, 증식층, 비대연골층, 이행연골층, 석회화연골층, 골화층으로 구성된다. 휴지층에서부터 석회화연골층으로 분화해 감에 따라 점차 자신이 분비한 기질들에 의하여 세포들이 서로 분리되고 성숙하여, 골의 장축에 대해 평행하게 세포기둥을 만들고 비대연골을 만들어, 궁극적으로 막내 골화에 의하여 일시적인 골을 만들어 장골의 수직 방향 성장을 유도한다^{1,16)}. 그러나, 하악과두에서는 연골발생이 골막에서 시작되었는지 아니면 골막과 상관없는 간엽세포 축합에서 시작되었는지에 관하여 아직 확실히 밝혀져 있지 않으며, 발생 후에도 저작근 등이 발생하여 기능을 함에 따라 연골층의 구성이 장골의 성장판 연골과 특히 비대연골층의 증가와 골화과정에 있어서 독특한 양상을 보이는 것으로 알려져 있다^{17,18)}. 본 연구에서는 간엽조직 및 골조직에서 발현되는 I형 교원질과 BMP-4 그리고 연골에서 특이하게 발현되는 II형 교원질의 발현을 발생과 성장과정에 따라 비교하여 하악과두 연골세포가 간엽세포에서 기원하는 하악골의 골 발생과 연관되어 발생하는지를 확인하였다. 또한, 연골이 발생하고 근육이 형성되는 출생 전에서부터 저작활동을 하는 생후 30일에 이르기까지 증식층의 하부에서부터 비대연골층에서 선택적으로 발현되는 것으로 알려진 IHH와 비대연골층에서만 선택적으로 발현되는 X형 교원질의 발현 비교를 통하여 하악과두와 장골의 비대연골층의 세포의 구성과 분포가 어떤 변화가 나타나는지 연구하였다.

Devlin¹⁹⁾ 등은 닭 배아의 장골연골원기의 I형과 II형 교원질의 발현에 관한 연구에서, 발생 2일의 stage 18의 연골원기에서는 I형과 II형 교원질이 동시에 발현되나, 연골의 분화에 따라 I형 교원질의 발

현은 감소하여 발생 3~4일의 stage 25에서는 II형 교원질만 존재한다고 하였다. 이는 간엽세포가 연골세포로 분화하면 I형 교원질이 연골-특이 II형 교원질로 대체됨을 시사하는 연구 결과이다. Shibata^{20,21)} 등은 생쥐배의 하악과두의 조직학적 연구에서 발생 18일에 장골 원기 연골에서는 II형 교원질만 발현되나, 하악과두 연골에서는 I형과 II형 교원질이 동시에 관찰되며 골화 과정이 장골보다 하악과두에서 훨씬 더 빠르게 진행된다고 하였다. 본 연구에서는 발생 18일과 생후 1일의 생쥐 장골의 연골원기에서는 II형 교원질만 발현되는 반면에, 하악과두에서는 발생 16일에 I형과 II형 교원질의 발현이 시작되어(Fig 1b, 1c), 발생 18일부터 성장이 완료된 시점인 생후 30일에 이르기까지 발현이 지속되었다(Fig 2, 7b). 이 결과는 하악과두는 발생과정에서부터 장골의 경우와는 달리 연골의 발생에 골을 형성하는 하악골의 골막이 관여하며, 이러한 골 지향성 특징은 성장 후에도 지속됨을 시사한다고 볼 수 있다. 또한, 본 연구에서 하악과두 연골은 성장에 따라서 다른 연골층에 비하여 상대적으로 비대 연골층이 발달된 양상을 보였으며(Fig 5), 비대 연골 세포들도 동형 세포집단(isogenous group)의 수가 적으며 비대 연골층에 선택적으로 발현되는 X형 교원질의 발현도 광범위하게 관찰되었는데(Fig 5, 7c), 이는 저작에 따른 악관절에서의 압력 및 연령 증가에 따라 하악과두 연골의 분화양상이 달라진다고 보고한 Liisa²²⁾ 등의 연구 결과에 부합한다고 볼 수 있다.

연골은 근육세포, 지방세포, 조섬유세포 및 골세포 등과 마찬가지로 미분화 간엽세포에서 기원하는데 간엽세포의 축합과 더불어 발생이 시작되어 분화해감에 따라 연골세포가 발생하고 세포들이 다양한 세포 외 기질들을 생산한다. 연골의 세포외 기질은 다른 조직에 비해 그 양이 풍부하고 다양한 것이 특징인데, 대표적으로 II형 교원질, IX형 교원질, XI형 교원질, aggrecan, 및 link protein 등을 들 수 있으며, 최근의 연구에 의하면 세포의 근접부위에 VI형 교원질이 존재하고 그 외 IHH, BMP, decorin, fibromodulin, cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein (CD-RAP), cartilage oligomeric matrix protein, cartilage matrix protein, 및 chondromodulin 등도 존재하는 것으로 알려져 있다^{13,16,23)}.

II형 교원질은 간엽조직과 골조직에서 관찰할 수 없는 연골-특이 유전자로 알려져, 연골과 다른 세포들을 구별하는 표지자로 널리 이용되고 있으며, X형

교원질은 골화 직전의 비대 연골세포에서만 합성되기 때문에 비대연골의 특성이나 골화의 양상 등을 연구하는데 사용되고 있다²⁴⁾. IHH는 Desert hedgehog (DHH), Echidna hedgehog(Echidian HH), Teggy-winkle hedgehog(TwHH), Sonic hedgehog(SHH) 등과 함께 Hedge family를 구성하는 유전자로 연골 분화과정에서 II형 교원질의 발현 직후에 중식 연골층의 하부와 비대연골층의 상부에 발현되며 연골막(perichondrium) 및 Parathyroid Hormone related peptide(PTHrp)와 골화의 양을 조절하는 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁾. 또한, BMP-4는 다양한 인자들과 함께 TGF- β super family를 구성하며 골, 치아 및 연골의 발생뿐만 아니라 발생초기의 여러 기관의 형성에 중요한 기능을 하며, 성장판 연골에서는 비대 연골층의 하부 일부와 골화층에서 발현이 관찰되는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾.

본 연구를 통하여 하악과두 연골이 발생과정과 성숙 및 기능을 수행하는 과정에서 장골의 성장판 연골 즉 일반적인 연골과는 다른 특성을 갖고 있음을 나타내는 결과를 얻었다. 그러나, 최근에 골의 성장과 유지에 기능력이 중요한 역할을 한다는 사실과^{25~29)}, 교정치료 목적으로 기능적 악교정장치의 사용도 증대하고 있는 바, 정상보다 과도한 기능력을 적용하거나 저작근의 절단, 식이 조작, 악간 고정 장치, 치아 발치 및 절치의 절단 방법 등과 같은 기능 저하 상태를 유지하여 기능력이 하악과 연골에 미치는 영향을 체계적으로 밝혀 내는 것이 필요할 것이다. 따라서 본 연구는 향후 기능력의 연골 분화에 대한 작용기전을 분자생물학적으로 규명하고 더 나아가 기능력에 의한 연골 분화유도인자 등을 이용한 하악과두의 성장과 발육 부전 및 교정 치료 뿐만 아니라 노인 인구의 증가와 더불어 증가 추세에 있는 관절염 등의 만성 퇴행성 질환의 치료에 응용하는데 중요한 자료로 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결 론

하악과두 연골이 발생하고 분화하는 과정에서 나타나는 특성을 규명하기 위하여, 발생 16, 18일과 출생 1일, 5일, 10일, 20일, 및 30일 후의 ICR 생쥐의 조직절편을 형태학적으로 분석하고, 생쥐 I형, II형, X형 교원질, Indian hedgehog(IHH) 및 BMP-4 등의 cRNA probe를 이용하여 mRNA의 발현을 in-situ hybridization 방법으로 확인하였다. 하악과두 연골이

분화과정에서 성장판 연골과 다른 특성을 나타내고 기능력에도 독특하게 반응한다는 본 연구 결과는 하악파두 연골세포의 기원, 분화 및 성숙과정에 대한 이해와 하악골의 성장과 발육을 연구하는 데 중요한 기초 자료로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Cancedda RC, Castagnola FDP. Chondrocyte differentiation. *Int Rev Cytol* 1995; 159: 265-359.
2. Joseph AB, Michael GE, Linda S, Stephen BT. Skeletal growth and development. *Am Acad Ortho Surg Symp*. 1997; 187-241.
3. Kathryn SEC, Elizabeth TL, Patrick PLT. Expression of the mouse α 1(II) collagen gene is not restricted to cartilage during development. *Development* 1991; 111: 945-53.
4. Kosher RA, Kulyk WM, Gay SW. Collagen gene expression during limb cartilage differentiation. *J Cell Biol* 1986; 102: 1151-6.
5. B² Ami Y, von der Mark k, Franzen A. et al. Immunohistochemical studies of the extracellular matrix in the condylar cartilage of the human fetal mandible : Collagens and noncollagenous proteins. *Am J Anat* 1991; 190: 157-66.
6. Ali AM, Sharawy M. An immunohistochemical study of collagen Types III, IX in rabbit craniomandibular joint tissues following surgical induction of anterior disk displacement. *J Oral Pathol Med* 1996; 25: 78-85.
7. Heli VP, Thesleff I. Initiation of secondary cartilage in the mandible of the syrian hamster in the absence of muscle function. *Archs Oral Biol* 1993; 38: 49-54.
8. Liisa A, Salo A, Tuomo K. Type II collagen expression in the mandibular condyle during growth adaptation : An experimental study in the rabbit. *Calcif Tissue Int* 1993; 52: 465-9.
9. Ishii M, Suda N, Tengen T, Suzuki S, Kuroda T. Immunohistochemical findings type I and type II collagen in prenatal mouse mandibular condylar cartilage compared with the tibial anlage. *Arch Oral Biol* 1998; 43: 545-50.
10. Fukada K, Shibata S, Suzuki S, Ohya K, Kuroda T. In situ hybridization study of type I, II, X collagens and aggrecan mRNAs in the developing condylar cartilage of fetal mouse mandible. *J Anat* 1999; 195: 321-9.
11. David AK. Development of the human temporomandibular joint. *Brit J Oral Surg* 1982; 20: 217-24.
12. Vortkamo A, Lee K, Lanske B, et al. Regulation of rate of cartilage differentiation by indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 1996; 273: 613-22.
13. Kulyk WM, Upholt WB, Kosher RA. Fibronectin gene expression during limb cartilage differentiation. *Development* 1989; 106: 449-55.
14. Ghafari J, Cowin DH. Condylar cartilage in the muscular dystrophic mouse. *Am J Ortho Dentofac Orthop* 1989; 95: 107-14.
15. Deleaersijder W, Hong G, Corturindt R. et al. Isolation of markers for chondro-osteogenic differentiation using cDNA library subtraction. Molecular cloning and characterization of a gene belonging to a novel multifunctional family of integral membrane proteins. *J Biol Chem* 1996; 271: 19475-82.
16. Styipe NS, Geotiner PF. Gene regulation during cartilage differentiation : Temporal and spatial expression of link protein and cartilage matrix protein in the developing limb. *Development* 1989; 107: 23-33.
17. Hinton RJ, Carlson. Response of the mandibular joint to loss of incisal function in the rat. *Acta Anat* 1986; 125: 145-51.
18. Hinton RJ. Effect of dietary consistency on matrix synthesis and composition in the rat condylar cartilage. *Acta Anat* 1993; 147: 97-104.
19. Devlin CJ, Brickell PM, Taylor ER, et al. In situ hybridization reveals differential spatial distribution of mRNAs for type I and type II collagen in the chick limb bud. *Development* 1988; 103: 111-8.
20. Shibata S, Suzuki S, Tengan T, Ishii M, Kuroda T. A histological study of the developing condylar cartilage of the fetal mouse mandible using coronal sections. *Archs Oral Biol* 1996; 41: 47-54.
21. Shibata S, Fukada K, Suzuki S, Yamashita Y. Immunohistochemistry of collagen type II and X, and enzyme-histochemistry of alkaline phosphatase in the developing condylar cartilage of the fetal mouse mandible. *J Anat* 1997; 191: 561-70.
22. Salo LA, Hoyland J, Ayad S. et al. The expression of types X and V collagen and fibrillin in rat mandibular condylar cartilage. *Acta Odontol Scand* 1996; 34: 295-302.
23. Marchi F, Luder HS, Leblond C-P. Changes in cell's secretory organelles and extracellular matrix during endochondral ossification in mandibular condyle of the growing rat. *Am J Anat* 1991; 190: 41-73.
24. Kosher KA, Gay SW, Kamanitz JR. et al. Cartilage proteoglycan core protein gene expression during limb cartilage differentiation. *Develop Biol* 1986; 118: 112-7.
25. Smith DM, McLachlan KR, McCall WD Jr. A numerical model of temporomandibular joint loading. *J Dent Res* 1986; 65: 1046-52.
26. Shaw RM, Molyneux GS. The effects mandibular hypofunction on the development of the mandibular disc in the rabbit. *Archs Oral Biol* 1994; 39: 747-52.
27. Tuominen M, Kantomaa T, Drittiniemi P. Effect of food consistency of the shape of the articular eminence and the mandible. An experimental study on the rabbit. *Acta Odontal Scand* 1993; 51: 65-72.
28. Wabeke KB, Spruijt RJ, Van der Zag J. The reliability of clinical methods for recording temporomandibular joint sounds. *Dent Res* 1994; 73: 1157-62.
29. Yamada K, Kimmel DB. The effect of dietary consistency on bone mass and turnover in the growing rat mandible. *Archs Oral Biol* 1991; 36: 129-38.

- ABSTRACT -

Expression of mRNAs characteristic of cartilage and bone in the developing mandibular condyle of mice

Kuk-Soep Ji¹⁾, Young-Jooh Yoon¹⁾, Joo-Cheol Park²⁾, Kwang-Won Kim¹⁾

¹⁾ Department of Orthodontics, College of Dentistry, Chosun University

²⁾ Department of Oral Histology, College of Dentistry, Chosun University

It has not been elucidated whether the initiation of condylar development of the mandible is related with the periosteum of the mandible, or if it derives from a separate programmed blastema not related with the mandible. Also, although the mandibular condylar cartilage is known to promote growth, few studies have dealt with molecular-biologic mechanisms such as the expression of specific genes according to the differentiation of the mandibular condyle.

To elucidate the unique cellular characteristics, development, and differentiation process of the mandibular condyle, an examination of expressions of genes characteristic of cartilage and bone were carried out using RT-PCR and mRNA *in situ* hybridization.

1. Type?collagen mRNA was detected with type II collagen mRNA in the differentiation and growth process of the cartilage of the mandibular condyle. Type II collagen mRNA was demonstrated in the whole resting and upper part of the proliferative zone, whereas type II collagen mRNA was observed in the resting, proliferative and upper hypertrophic cartilage zone of the mandibular condyle.
2. The condylar cartilage rapidly increased in size due to the accumulation of hypertrophic chondrocytes as characterized by the expression of type II collagen mRNA during postnatal development.
3. BMP-4 mRNA was present in the anlage of the future condylar process and also in the ossifying mandibular body.
4. IHH mRNA was limited exclusively to the lower part of the proliferative zone and the upper part of the hypertrophic cartilage zone during condylar development.

These findings were different from those in the growth-plate cartilage of the long bone, indicating a characteristic feature of the differentiation of the chondrocytes in the condylar cartilage present in prenatal and postnatal development. Furthermore, it was also suggested that chondroblasts of condylar cartilage rapidly differentiate into hypertrophic chondrocytes with increased functional Load force such as muscle activity and mastication.

KOREA. J. ORTHOD. 2004 : 34(2) : 143-52

* Key words : Cartilage, Mandibular condyle, Differentiation, Collagen, gene