

Ca 혼합처방인 SG 및 GN이 난소절제 백서의 골다공증에 미치는 영향 연구

지규용* · 윤군애¹ · 김영만¹

동의대학교 한의과대학 한의학과, 1: 동의대학교 생활과학대학 식품영양학과

Effects of Herbal Compounds with Tuna bone Powder on Rodent Osteoporosis Model Induced by Ovariectomy

Gyoo Yong Chi*, Gun Ae Yoon¹, Young Man Kim¹

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, 1: Department of Food Science and Nutrition, Dongeui University

In this research 2 sample compounds are made and analyzed in terms of the in vivo and in vitro effects on the ovariectomized rats. The 2 compounds are prescribed based on pathologic patterns of osteoporosis, and added calcium citrate from tuna bone powder. SG is for menopausal women(Type I osteoporosis) and GN is for senile men(Type II osteoporosis). Through these, SG manifested significant effects on the T4, osteocalcin level, and through the histological changes of osteoid tissues and lipocytes. On the other hand GN showed significant increase on the biochemical markers of osteocalcin, TALP, even in histological features and bone mineral density and intensity of femur it showed meaningful changes. But In the results of RT-PCR on the IL-1β, IL-6, TNFα, there weren't coherent results with in vivo test, that is they were increased in the sample compound group than control group. These increase of bone resorption was seemed that those cytokines had the osteoclasts promote their own resorptive functions after fragments of bone tissues were increased in the cavity. And this clearance of inner fragments help the bone to strengthen its own substance. Putting together above facts, the sample compounds, SG and GN, made of tuna bone powder and herbal solutions are predicted that there would be pharmacological actions improving the osteoporosis initiated from the disorders of calcic absorption and increase of bone resorption. And GN has more effective actions than SG at least in the animal model.

Key words : Osteoporosis, BMD, tuna bone, SG, GN, bone resorption

서 론

골다공증은 골용량(bone mass)의 감소로 인해 외부에서 가해지는 작은 충격으로도 쉽게 골절을 일으킬 수 있는 상태로써 무기질과 유기질의 상대적인 비율은 변하지 않는다는 점에서 골연화증(비율 감소)과 구분된다¹⁾. 그러므로 무기질(mineralized tissue)뿐만 아니라 유기질도 지속적으로 감소하여 피질골(cortical bone)은 얇아지며 골소주(trabecula)의 수량과 크기도 감소한다. 이처럼 골량이 감소하는 이유는 유전적 또는 체질적

소인으로 인한 섬세한 골질, 골형성의 부진, 골흡수의 증가 등으로 크게 요약할 수 있는데 이는 원인이나 연령 등에 따라 차이가 있게 된다. 폐경기의 여성과 관련해서는 성호르몬(estrogen)의 분비부족이 가장 큰 이유이지만 특발성 골다공증도 문제일 수 있다. 내과학적으로 특발성 골다공증²⁾이란 특별한 원인 없이 젊은 남성과 조기폐경이 되는 여성에게 나타나는 것으로 授乳나 妊娠과 관련하여 나타나기도 하고 Serum alkaline phosphatase가 낮아지면서, 혹은 Ca과 P의 소실이 과량으로 증가되면서 생기기도 한다. 현재 치료용이 아닌 건강식품용으로 흔히 이용되는 골격대사기능 호전식이소재는 칼슘이 주류를 이룬다. 그런데 칼슘제가 갖고 있는 일반적인 부작용, 즉 고칼슘혈증과 결석, 변비³⁾ 등은 골다공증 환자에게 부담이 된다. 따라서 칼슘식이소재는 이러한

* 교신저자 : 지규용, 부산시 부산진구 양정동 45-1, 동의대학교 한의과대학
· E-mail : cgyu@dongeui.ac.kr · Tel: 051-850-8659
· 접수 : 2003/07/25 · 수정 : 2003/08/29 · 채택 : 2003/10/06

부작용을 보완하기 위해서라도 부가적인 조치가 필요하다. 즉 의학적 기능성을 높이면서도 잠재적인 장기독성을 제거하고 미각적 선호도를 높일 수 있다면 보다 좋은 식이소재가 될 수 있다. 우선 본 논문에서는 의학적 기능성을 확보하기 위해 장기적으로 한방입상에서 노인성 근골위약에 사용되어 왔던 약재들을 기본으로 하고 칼슘제와 혼합하여 처방을 구성하고 치료효능을 측정하였다. 병증모델은 폐경기 이후의 type I 골다공증 모형인 난소 제거에 의한 골다공증모델을 이용하였다. 효능평가항목은 여러 가지가 있을 수 있으나 본 실험에서는 혈액의 생화학적 골대사 지표들을 검사하는 방법과 함께 골강도의 변화에 대한 영향을 동시에 측정하였다.

재료 및 방법

1. 동물

본 실험에 사용한 동물은 대한바이오링크에서 공급받은 8주령 180g 전후의 female Sprague Dawley계 백서이다. 실험에 사용하기 위하여는 일정한 노화단계에 이르도록 할 필요가 있기 때문에 총 6개월간을 실험실 환경(22±1℃, 50±5%)에서 사육하였다. 수술은 체중이 294±16.9g에 이른 백서에 ketamine과 rumpun을 1:1로 혼합한 다음 30mg/kg의 용량을 복강주사하여 전신마취하고, 除毛와 消毒(povidone)을 실시한 후 양측 난소를 적출하였으며 術後 kanamycin을 복강내에 주사하여 감염을 예방하였다. 실험군은 칼슘흡수 촉진성을 평가하기 위해 정상군(칼슘+비수술)과 위장수술군(칼슘+개복수술), 대조군(칼슘+개복수술+난소제거), 골다공증1군(칼슘+개복수술+난소제거+SG), 골다공증2군(칼슘+개복수술+난소제거+GN)의 총 5군으로 나누었다.

2. 약물 조제 및 투여

본 실험에는 골다공증을 가진 폐경기 여성에게 사용할 목적으로 구성된 처방이 사용되었다(Table 1).

Table 1. Prescription of Jygyungwon(SG) and Gagnowon(GN) per paper(chub)

韓藥名	생약명	용량(g)
숙지황	Rehmaniae Radix	28
당귀	Angelicae Gigantis Radix	20
기타		50
SG	Total amount	98
토사자	Cuscutae Semen	15
숙지황	Rehmaniae Radix	15
기타		56
GN	Total amount	86

SG 5첩 분량과 GN 6첩 분량을 각각 3000cc 용적의 환저 플라스크에 증류수 1500cc와 함께 넣어 3시간 동안 가열하고 濃液을 여과지로 여과한 다음 다시 3000rpm에서 10분간 원심분리하고 감압농축기로 농축한 후 동결건조를 거쳐 건조예거스 98g과 108.8g을 얻었다. 동물에 투여시에는 SG와 GN은 각각 50mg/100g, calcium은 7mg/100g을 증류수에 녹여 feeding zonde를 사용하여 경구투여를 하였다. 투여기간은 8주로 하고

실험동물의 스트레스를 줄이기 위하여 주 6회, 매일 오전10시경에 투여하였다. 칼슘 분말은 참다람어에서 수득한 뼈를 회화처리하고 시트르산염의 형태로 만들어 시료로 사용하였으며 이 중에서 순수한 칼슘은 33%였다.

3. 체중측정

난소를 제거한 후에 식이섭취를 2개월간 투여한 다음 심장에서 혈액을 채취하기 직전에 체중을 측정하였다. 체중은 소수점 첫째자리에서 반올림하여 정수로 하였고 평균은 소수 첫째 자리까지 구하였다.

4. 혈액 채취 및 생화학적 분석

백서를 에테르로 마취한 후 심장천자하여 전혈을 약 10ml 채혈한 후 상온에서 약 30분간 방치하였다. 혈액이 응고된 뒤 2500rpm에서 15분간 원심분리하여 상층부의 혈청을 파펫으로 분리하고 검체로 사용하였다.

5. 대퇴골의 강도 측정

대퇴골 시료를 추출한 다음 연조직을 제거하고 -20℃ 온도 환경에서 냉동 보관하였다. 시료의 건조도를 맞추기 위해 5일을 경과한 후 대퇴골의 강도를 만능강도시험기(Universal testing machine, Instron 1011, USA)로 측정하였다(Table 2). Head의 직경은 13mm, 높이는 13mm인 원기둥을 사용하였으며, 최대하중이 가해질 때 시료의 변형률은 2mm/min로 하였고, 최대 응력은 단위 면적당 가해지는 최대하중을 측정하였으며 단위는 MPa(1MPa=1N/mm²)로 하였다.

Table 2. Conditions of measurement on the mechanical strength of the femoral neck

Head	Condition
Testing instrument machine	Instron model 1011
Cross head speed	10mm/min
Weight of load cell	500kg
Chart speed	50mm/min
Cross Head diameter	13mm

6. 골조직표본 제작과 primary culture

Rat의 대퇴부에서 대퇴골을 분리한 다음 10% Formalin buffer에 넣어 24시간동안 고정한 다음 각 조직을 ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)를 이용하여 2주 동안 탈회시켰다. 탈회된 조직은 xylene과 ethanol을 이용하여 탈수한 후 paraffin block을 만들었다. 그리고 paraffin 포매된 조직을 microtome을 이용하여 6μm의 두께로 박리한 다음 슬라이드에 부착시킨 후 H&E 염색과정을 거쳐 현미경으로 관찰, 판정하였다. 골세포의 primary culture는 collagenase를 이용하여 37℃에서 3시간 동안 반응시키고 여과하여 대퇴골로부터 골세포를 분리하였다. 세포는 DMEM에 10% FBS, 그리고 1×Antimycotic antibacterium을 포함한 배지에서 2주간 배양하였다.

7. 요추의 골밀도 측정

혈액채취를 마친 백서를 희생시킨 후 척추 전체를 채취하고 연부조직을 외과용 칼과 가위로 제거한 후 DEXA(dual energy X-ray absorptiometry, Lunar Piximus #51039)를 이용하여 골무기질 농도(bone mineral density, BMD)를 측정하였다. 측정 부위를 선택할 때는 1번 요추체 상단부터 6번 요추체 중간선까지를 선택하였으며 측정 결과는 자동계산된 수치이다.

8. Interleukin 1β의 immunoprecipitation과 western blotting 및 RT-PCR

먼저 동물의 대퇴골조직으로부터 primary culture한 cell을 회수하고 4℃에서 14,000rpm으로 원심분리하여 cell을 모은 다음, 상층액을 버린 후 모은 cell은 freezing and thawing으로 깨어서 total protein을 Bradford method로 정량한다.

1) Immunoprecipitation(IP)

각 total protein을 200μg씩 E-tube에 넣고 IL-1β Ab를 20μl를 넣고 4℃에서 약 1시간 이상 반응시킨다. 1시간이 지난 후에 protein A/G plus agarose를 20μl씩 넣고 또다시 4℃에서 rocker에 올려 1시간 이상 반응시킨다. 반응이 끝난 후 4℃에서 1000×G로 30초간 원심분리한 후 상층액은 버리고 PBS로 세척한다. 이 때 pellet을 2~4번 PBS로 세척한다. 마지막 세척 후 40μl의 sample buffer를 넣고 2~3분간 100℃에서 끓인다. Sample을 20μl씩 loading하여 전기영동한다. 전기영동이 끝난 후 western blotting을 한다.

2) Western blotting

transfer한 NC membrane을 5% skim milk를 넣어 blacking한 후 IL-1β Ab를 1:500으로 넣어 반응시킨다. 1시간 이상 반응시킨 후 TBST로 약 10분간 3번 세척한다. 세척 후 2차 Ab를 넣어 1시간 이상 반응시킨 후 다시 TBST로 약 10분간 3번 세척하고 ECL solution으로 발광시킨 후 X-ray film에 감광시킨다.

역전사반응(reverse transcription polymerase chain reaction)은 primary culture하여 얻은 세포로부터 RNA를 분리한 다음 시행하였다. RNA는 Tri-zol을 이용하여 chloroform으로 불순물을 제거하였고, isopropanol로 RNA를 응축시켜 추출하였다. 대조군으로는 GAPDH를 사용하였고, primer sequence는 다음과 같다. IL-1β는 GATTCTCGACAAG, GATGGCTCAT TCTAATGC IL-6은 GCTTTCAAGATGAGTTGGATGGT, CCCAACTTCCC AATGCTCCCTA TNF-α는 CTCCTCTCCGCCATCAAGAG, TGGGCTCATACCAGGGCTT GAPDH는 GAACATCATCCC TGCATCCA, CCAGTGAGCTTCCCGTTCA이다.

RT반응은 72℃에서 10분간 denaturation하고, 42℃에서 60분간 반응하였고, PCR반응은 95℃ 5분, 56℃에서 10분, 72℃에서 10분간 반응하였다.

9. 통계분석

얻어진 자료에 대한 통계분석은 Microsoft Excel 2000을 사용하였다. 정상군과 위장수술군, 대조군 및 실험군간에 표현되는 특성차이의 유의성에 대한 분석은 Student's t-test를 사용하였고 유의수준은 p<0.05로 하였다.

실험결과

1. 체중 측정

체중은 난소절제가 유의성 있게 이루어졌는지를 판단하기 위한 목적으로 측정한 결과는 다음과 같다(Table 3). Sham군과 control군 사이에는 유의성있는 체중증가가 있었으나 GN군과 SG군은 control군과 비교하여 감소하는 경향은 있으나 유의성은 인정되지 않았다.

Table 3. Body weight of each group.

	Normal	Sham	Control	GN	SG
No. of Animal	8	8	8	8	8
Initiation	282.1±10.78*	280.6±10.41	284.3±11.23	283.4±9.78	284.9±10.14
completion	294.3±11.09	295.6±11.19	314.5±10.13**	309.7±10.89	302.1±10.37

* Mean±SD(standard deviation), **: p<0.025

2. 혈액의 생화학적 분석

1) 혈청중 T4의 측정

혈청중에 들어있는 Thyroxine(T4)의 측정치는 정상군이 3.72±0.515이고 위장수술군이 4.06±0.403이며 대조군이 4.23±0.322, GN군이 3.79±0.580, SG군이 3.78±0.299로 나타나 정상군과 대조군 사이에는 유의성있는 차이가 있었으나(p<0.05) 위장수술군과 대조군 사이에는 유의성있는 차이가 없었다. 대조군과 GN군과의 사이에는 유의성있는 차이가 없었으나 SG군과는 유의성있는 차이(p<0.025)가 인정되었다(Fig. 1).

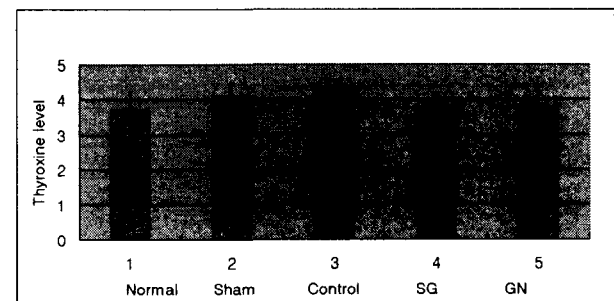


Fig. 1. Effects on the T4 level of each group

2) Osteocalcin 함량 측정

혈청 중에 들어있는 osteocalcin의 함량은 정상군이 1.37±0.237이고 위장수술군이 1.62±0.108이며 대조군이 1.13±0.097, SG군이 1.41±0.243, GN군이 1.36±0.211로 나타났다. 정상군과 대조군 사이에도 유의성있는 차이가 있었을 뿐만 아니라 (p<0.05) 위장수술군과 대조군 사이에는 매우 고도의 유의성 있는 차이(p<0.001)가 있었다. 대조군과 GN군과의 사이에도 유의성있는 차이(p<0.025)가 있었고 SG군과는 유의성있는 차이(p<0.01)가 인정되었다(Fig. 2).

3) Alkaline phosphatase 함량 측정

혈청 중에 들어있는 alkaline phosphatase의 함량은 정상군이 350.0±137.46이고 위장수술군이 543.8±90.89이며 대조군이 580.7±161.12, SG군이 554.8±150.57, GN군이 427.1±161.03으로 나

타났다. 정상군과 대조군 사이에는 유의성 있는 차이($p < 0.05$)가 있었으나 위장수술군과 대조군 사이에는 유의성 있는 차이가 없었다. 대조군과 GN군과의 사이에는 유의성 있는 차이($p < 0.05$)가 있었으나 SG군과는 유의성 있는 차이가 없었다(Fig. 3).

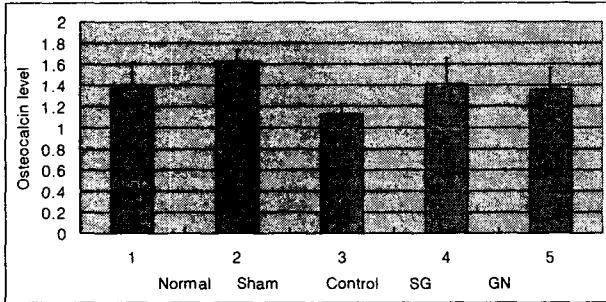


Fig. 2. Effects on the osteocalcin level of each group

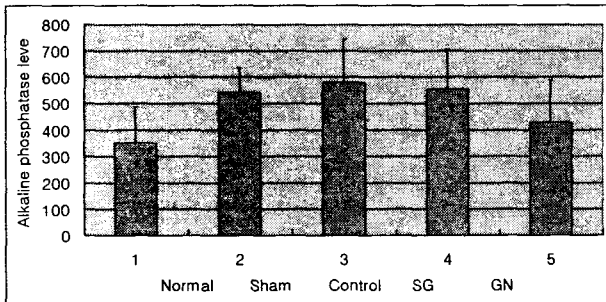


Fig. 3. Effects on the alkaline phosphatase level

4) 혈중칼슘 함량의 측정

혈청 중에 들어있는 Ca^{++} 의 함량은 정상군이 9.30 ± 0.208 이고 위장수술군이 9.31 ± 0.253 이며 대조군이 9.31 ± 0.241 , SG군이 9.25 ± 0.192 , GN군이 9.32 ± 0.225 로 나타났다. 따라서 모든 군 사이에는 유의성 있는 차이가 전혀 없었다(Fig. 4).

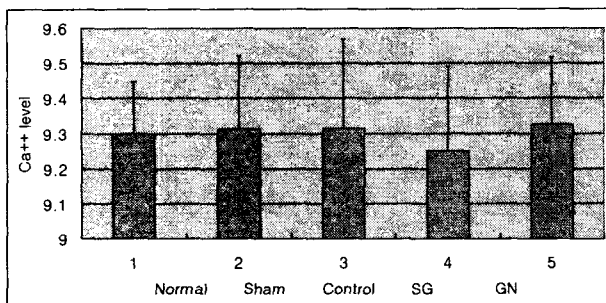


Fig. 4. Effects on Ca^{++} level of ovariectomized osteoporosis model rat

5) 대퇴골 강도 측정

대퇴골 경부에서 측정한 Instron 강도는 정상군이 6.08 ± 0.376 이고 위장수술군이 4.80 ± 0.294 이며 대조군은 4.10 ± 0.339 이고 SG군은 4.30 ± 0.607 이며 GN군은 4.70 ± 0.531 이었다. 정상군 및 위장수술군과 대조군 사이에는 고도의 유의성 있는 차이($p < 0.01$)가 있었으나 대조군과 SG군 사이에는 유의성을 나타내지 못하였고 대조군과 GN군 사이에는 유의성 있는 차이($p < 0.05$)가 인정되었다.

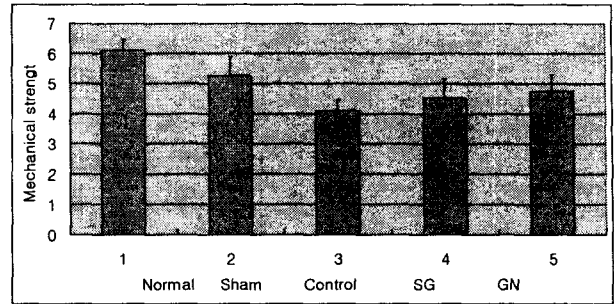


Fig. 5. Effects on the mechanical strength of the femoral neck

6) 요추의 골밀도 측정

요추의 평균골밀도는 정상군에서는 0.203 ± 0.0148 이고 위장수술군은 0.199 ± 0.0097 이었으며 대조군에서는 0.171 ± 0.0029 이고 SG군에서는 0.176 ± 0.0086 , GN군에서는 0.176 ± 0.0045 였다. T-test에서는 정상군과 비교하여 대조군에서 현저한 유의성이 있는 것으로($p < 0.002$) 나타나 골조송증이 매우 성공적으로 일어났음을 알 수 있다. 또한 대조군과 비교하였을 때 SG군에서는 유의성이 나타나지 않았지만 GN군과 비교하면 유의성이 인정되었다($p < 0.02$).

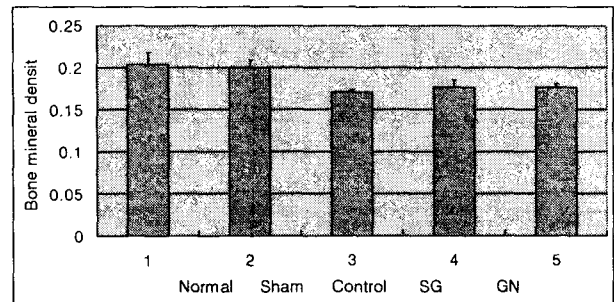
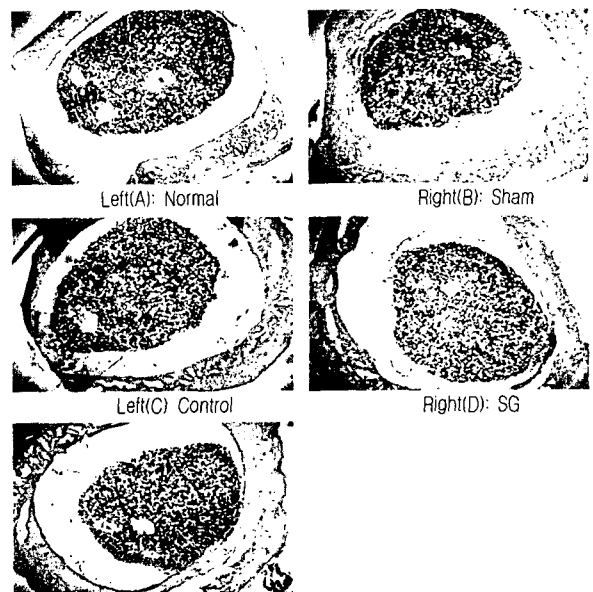


Fig. 6. Effects on BMD of each backbone

7) 골조직 표본과 영상분석



(E) Cross section of the distal neck of femur in GN group($\times 50$)

Fig. 7. Histological features of each group. Normal and sham groups have many osteoid tissues and relatively little lipocytes. But control group has abundant lipid granules and relatively few osteoids. And the osteoids is increased in SG and GN group, and lipocytes are less than control.

8) Immunoprecipitation과 RT-PCR

(1) Interleukin 1β의 immunoprecipitation

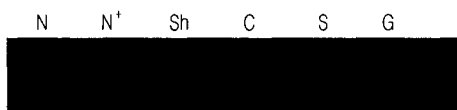


Fig. 8. Detection of IL-1β by IP. N : Normal group and diet without calcium, N' : Normal group and normal diet with calcium, S : Sham operation group, C : Control group ovariectomized, J : SG group G : GN group

(2) IL-1β, IL-6, TNF-α의 RT-PCR

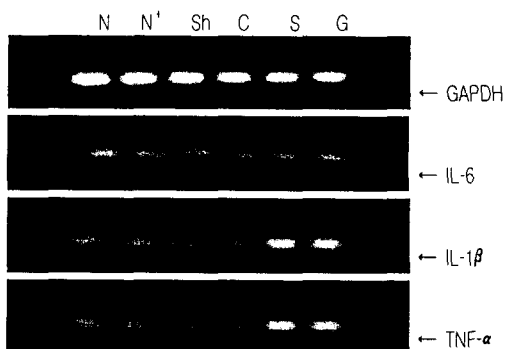


Fig. 9. Expression of each cytokine, IL-6, IL-1β, TNF-α in RT-PCR. N : Normal group and diet without calcium, N' : Normal group and normal diet with calcium, Sh : Sham operation group, C : Control group ovariectomized, S : SG group G : GN group

고찰

뼈는 생리학적으로 끊임없이 골교체가 일어나 조골세포와 파골세포에 의한 골조직대사활동이 매우 활발하게 진행된다. 그렇지만 한의학에서는 뼈의 영양과 기능을腎이 주관하고 沈靜機能系統에 속하며 관찰되는 움직임이 없기 때문에 항상 堅固와 蓄積을 담당하는 기능으로 인식된다. 이러한 이해방식의 차이는 모순적인 것으로 보이지만 사실은 생리학적 사실의 관찰은 한의학에서 이해하는 기능을 유지하기 위해 요청되는 필연적인 기전이다. 즉 골대사가 활발하게 일어나는 이유는 골조직을 강하게 하고 무기질을 축적하여 지지기능을 유지할 수 있게 함이다. 이러한 관점에서 뼈의 기능에 대한 생리학적 이해와 한의학적 이해방식은 서로 표리관계를 이룬다.

임상적으로 골다공증은 남성보다 여성에게 6배정도 높게 이환된다고 하며⁴⁾ 그 이유는 주로 폐경 후 에스트로겐의 감소로 알려져 있고⁵⁾ 수년 경과하면 골질의 위험도 2배 이상 증가한다고 하였다^{6,7)}. 따라서 본 실험에서도 노화시기에 이른 雌性 白鼠에 난소를 절제하고 골다공증을 재현시켰다. 난소적출과 estrogen의 차단이 성공적으로 이루어지면 일반적으로 체중이 증가한다. 본 실험에서도 Table 3. 에서 보는 바와 같이 정상군은 확연한 차이를 보였다. 이미 성장한계에 다다랐기 때문에 정상군은 체중 증가율이 현저히 줄어드는 반면 대조군은 부종과 지질의 증가로 인해 체중이 늘어난다⁸⁾. 어쨌든 이러한 증가는 대조군에서 난소 절제가 성공적으로 이루어졌음을 보여준다. 그렇지만 실험군에

서는 모두 유의성 있는 효과가 나타나지 못하였다. 이는 사육기간이 너무 길어지면서 편차가 너무 벌어진 점과 실험약재의 구성이 체중조절에 주안점이 있는 것이 아니기 때문이다.

갑상선 호르몬(thyroid hormone)은 약 90%를 차지하는 T4(tetraiodothyronine; thyroxine)와 약 10%를 차지하는 T3(3,5,3-triiodothyronine)가 thyroglobulin 분자내에서 결합하여 합성된다. 생리작용을 보면 티록신은 말초조직에 직접 작용하기 보다는 보다 활성이 높은 3,5,3-triiodothyronine으로 변환되어 작용하므로 실질적으로는 prohormone이라 할 수 있다. 갑상선 호르몬의 역할은 매우 광범하여 항온동물의 거의 모든 조직에 관여하고 기초대사율을 유지하는데 관여한다. 그리고 임상보고에 의하면 갑상선기능항진증에서는 골흡수의 증가로 인해 골다공증이 발생하였고^{9,10)} 갑상선기능저하증 환자에게 티록신을 투여하여도 역시 海綿骨이 감소된다¹¹⁾고 하였다. 갑상선 호르몬에 의한 골밀도감소 기전은 조골세포 매개성으로 파골세포에 의한 골흡수가 증가하여 Ca를 혈액으로 유리시키는 것이다¹²⁾. 그런데 본 실험에서 위장수술군은 정상군과 달리 대조군과의 사이에 유의성이 있는 차이를 나타내지 않았다. 이는 아마도 수술로 인해 발생했던 조직손상이 지연되어 수복에 소요되는 에너지 소모가 증가하면서 갑상선 호르몬의 생성도 증가되었기 때문으로 사료되지만 결국은 실험상의 오류로 사료된다. 정상군과 대조군 사이에는 유의성이 있었으며 대조군과 실험군을 비교해 보면 SG와 대조군 간에는 유의성 있는 차이가 인정되어 T4의 안정화에 기여한 것으로 판단되며 따라서 SG는 골흡수를 증가시키는데 관여하는 T4를 감소시켜 골다공증 발생을 저지하는 효능이 있는 것으로 판단된다. 다음으로 osteocalcin은 뼈에 있는 비콜라겐 단백질의 20%를 차지하고 석회화의 조절이나 골흡수를 위한 대식세포 조절에 관여하며, 새로 합성되는 osteocalcin의 70%는 골기질에 결합되고 30%가 혈액에 유리되는데 이를 이용하여 측정한다. osteocalcin은 채혈시간이나 나이, 성호르몬 상태에 따라 변동이 있으며 폐경후에 약간 증가되었다가 골흡수억제제를 투여하여 치료하면 다시 감소된다¹³⁾. 그렇지만 골형성이 부족한 경우이거나 성장호르몬이 부족하면 osteocalcin의 수치는 정상보다 낮아지는데¹⁴⁾ 본 실험에서 정상군이나 위장수술군보다 대조군에서 현저하게 낮아진 것은 역시 수술 후에 골형성이 안되기 때문에 비롯된 것이며 SG와 GN을 투여한 군에서는 다시 유의성있게 회복되는 것으로 보아 골형성을 증가시키는데 기여했음을 알 수 있다.

조골세포는 total alkaline phosphatase(TALP)를 생성하여 조골세포막의 소포에 저장하며 이 중 일부가 혈액으로 유리되므로 ALP는 일반적인 골형성지표로 사용된다. 그렇지만 TALP activity의 55%는 간으로부터 오고 40%가 조골세포에서 오며 나머지 5%는 장에서, 임신했을 경우는 태반에서도 유리되기 때문에 골질환에서의 특이성은 별로 높지 않다. 그렇지만 TALP는 폐경 후에 올라가고 골다공증이 있으면 더 올라가며 칼슘제나 골흡수억제제를 사용하면 감소된다¹⁵⁾. Fig. 3.의 결과를 보면 정상군과 대조군 사이에 유의성 있는 차이가 나타나 대조군에서 폐경이나 골다공증에 의한 영향이 있었던 것으로 추정할 수 있다. 또한 대조군과 GN군 사이에는 유의성 있는 차이를 나타내면서

수치를 감소시켰으므로 GN은 칼슘제 혹은 골흡수억제제로서의 역할을 한 것으로 평가된다. 다음으로 혈중 칼슘은 체내에 약 1 kg 정도가 존재하지만 그 중의 약 99.9%는 골격내에 있고 나머지 0.1%가 세포외액에 분포하는데 폐경이나 난소를 적출하여 성호르몬이 중단되면 칼슘이 혈액 속으로 유출되는 양이 더 늘어나게 된다. 따라서 성장기뿐만 아니라 폐경 후에 칼슘을 섭취하면 골소실을 감소시킨다고 하여 1950년대 초부터 치료에 이용되었지만 임상시험 결과는 다른 약물치료보다 골소실 진행도도 높고 골절 빈도도 높아 칼슘 단독치료가 바람직하지 않은 것으로 되어 있다¹⁶⁻¹⁷. Fig. 4를 보면 혈중 칼슘 측정치의 표준편차가 매우 크고 각 군간에 차이가 거의 없어서 유의성 있는 차이를 발견할 수 없었는데 이는 역으로 골다공증에서 칼슘의 단독적인 의의가 별로 없음을 반증하며 그 수치는 모두 정상범위 내에 있었다. 다음으로 대퇴골의 조직 사진을 보면 정상군과 대조군 및 실험군간에 多孔性의 정도가 구분되는 것을 볼 수 있다.

임상적으로 반드시 지적되어야 할 사항은 골량의 증가가 골골강도의 증가나 골절의 발생감소를 의미하지는 않는다는 사실이다¹⁸. 이러한 예가 'cortical steal phenomenon'인데 이는 피질골의 감소로 인해 골소주가 증가하는 현상을 의미한다. 따라서 반드시 골강도가 동시에 측정되어야 한다. Fig. 5에서 정상군이나 위장수술군에 비해 대조군은 현저하게 강도가 약해진 것을 볼 수 있다. 그렇지만 실험군에서 강도의 회복 정도는 별로 높게 나타나고 있지 않은데 특히 SG에서는 유의성이 전혀 나타나지 않았다. 반대로 GN군에서는 평균치는 현저하게 높아지지 않았지만 표준오차가 적어서 유의성이 인정되었다. 이는 GN이 생화학적인 검사 성적과 일치하게 물리적 강도의 개선에도 유효한 효과를 나타냈음을 보여준다. 이러한 결과는 Fig. 6의 골밀도 검사에서도 그대로 나타나 GN과 SG에 의해 모두 상승은 되었지만 통계적인 유의성은 분산이 작은 GN에서만 인정되었는데 이는 정확히 일치된 결과를 보여준다. 다음으로 골조직 표본의 슬라이드 사진(Fig. 7)을 보면 정상군과 위장수술군에서는 내부에 유골조직이 많이 포함되어 있고 脂肪球의 분포도 적는데 반해 대조군에서는 유골조직의 수도 적고 지방구가 매우 많이 충전되어 있음을 볼 수 있다. 그리고 SG군에서는 지방구의 수효가 많이 줄어들지는 않았지만 유골조직의 수효가 상대적으로 늘어나 있고 GN군에서는 지방구의 수효도 변연부에서 줄어들고 동시에 유골조직도 늘어나 있음을 볼 수 있다. 따라서 GN군이 상대적으로 좋은 효과를 보였음을 알 수 있다.

IL-1 β 는 골다공증의 형성에 영향을 미치는 cytokine으로 골절이 다발하는 기계의 유전성을 관찰해 보면 interleukin-1과 함께 collagen I- α 1, estrogen receptor, transforming growth factor beta(TGF- β), interleukin-6, calcitonin, parathyroid hormone, and apolipoprotein E, IL-4, IGF 등의 유전자들이 골밀도 형성과 관련되어 있는 것으로 조사되었다¹⁹⁻²⁰. 예를 들어 IL-1이나 TNF를 설치류에 투여하면 골재형성이 증가하며 생체외에서는 파골세포의 형성을 촉진한다. 그렇지만 이들 작용은 직접적인 것이 아니고 다른 조골세포나 기질세포를 매개하여 일어난다²¹. 그러므로 IL-1 β 의 단독적인 영향보다는 복합적인 생체내 환경하에

서 이루어져야만 하는데 primary culture를 통하여 detection한 결과 정상군과 대조군에서 유의성 있는 양적 차이를 발견하지 못하였다. 이러한 원인은 여러 가지 추론이 가능하지만 가장 크게는 실험의 오류 가능성과 워낙 적은 양이 파골세포 형성과 관련하여 분비되기 때문에 골다공증이 아닌 다른 생리적 기전이 혼재하여 관련되었을 가능성이 있다. 우선은 좀 더 정확한 결과를 위해 재시험을 시행할 예정이다. 또한 IL-6는 조혈과정의 초기단계를 촉진하고 파골세포 형성에도 중요한 역할을 하며 분비되는 양도 상대적으로 많다(nM unit). 특히 병적인 상태에서 파골세포 형성에 관여하는데, 즉 에스트로젠이 정상적으로 분비되면 조골세포로부터의 IL-6 생성이 억제되지만 폐경이 되면 에스트로젠량이 감소하면서 IL-6의 생성이 촉진되기 때문에²² 파골세포의 활동이 증가되고 골다공증이 발생하는 것이며 따라서 cytokine 중에서도 특히 중요하게 다루어진다.

그런데 RT-PCR 결과를 보면 IL-6 mRNA의 발현량이 각 군 별로 별 차이를 나타내지 않고 있는데 이는 반복 시험을 해도 같은 결과를 보였다. 이 결과는 Brooks-Asplund 등이²³ 폐경후 여성들의 IL-6와 TNF- α receptor를 측정하여 임상시험에서도 estrogen 단독 투여시 IL-6 receptor의 양에 아무런 변화가 생기지 않았던 관찰사실과 일치하며 적어도 IL-6의 분비량이 증가되지 않고 일정한 수준을 유지하였다는 사실만은 분명히 보여준다. 또한 IL-6의 골다공증에 대한 아직 밝혀지지 않은 관여기전도 현재로서는 배제할 수 없다. 반대로 IL-1과 TNF의 RT-PCR 결과는 정상군이나 위장수술군보다 대조군에서 비교적 적게 발현되고 SG군과 GN군에서 다시 발현량이 증가되었는데 파골세포에 의한 골조직 잔편의 흡수과정이 촉진되고 있음을 추론할 수 있다.

이상의 여러 실험결과를 통하여 참다람여로부터 추출한 칼슘 보충식이 나소제거로 유발된 골다공증 백서에 대하여 특히 골흡수 과정을 억제하고 골조직 잔편들에 대한 제거를 증가시켜 유효하게 골대사과정을 교정하면서 골밀도를 증가시켰음을 알 수 있다. 그리고 이러한 기전은 에스트로젠이 파골세포의 활동을 억제함으로써 골다공증을 예방하거나 치료한다는 사실²⁴과도 일치한다. 따라서 본 칼슘 보충식의 기본적인 작용기전은 Ca량의 보급과 함께 estrogen-mimetic anti-osteoclastic activity라고 요약할 수 있다.

결 론

참다람여 뼈로부터 얻은 Ca염을 한약처방과 함께 혼합한 조성물을 표준시료로 만들었으며 이를 사용하여 난소를 제거한 후 유발된 제1형 골다공증 白鼠에 대한 실험에서 다음과 같은 결과를 얻었다. 체중변화에서 대조군은 정상군보다 유의한 증가가 인정되었으나 실험군에서는 감소경향만 있었을 뿐 유의성 있는 감소는 나타나지 않았다. T4는 대조군에서 유의한 증가를 보였고 SG군에서 다시 유의하게 감소되어 갑상선 호르몬에 의한 골다공증 증가기전에 유효하게 사용될 수 있었다. 반면에 TALP는 SG군에서 유의성이 없었고 GN만 유의성이 있었다. Osteocalcin은 정상군 및 위장수술군과 대조군 사이에 유의성 있는 차이가 인

정되었으며 대조군과 SG군 및 GN군 사이에도 유의성 있는 차이가 인정되어 골다공증 검사에 보다 민감한 변화를 반영하였으며 지표해석에서 두 시료가 모두 osteocalcin의 골재형성기전에 영향을 미침을 알 수 있었다.

대퇴골 강도와 골밀도 측정에서는 대조군이 현저하게 약화되었는데 SG군에서는 유의성있는 회복이 나타나지 못하였고 GN군에서만 유의성이 인정되었다. 골조직 표본 사진에서는 대조군보다 시료에서 회복되었으며 특히 SG 군보다 GN군이 상대적으로 골조직의 재생과 회복을 촉진하였다. 그렇지만 IL-1 β , IL-6, TNF α 등에 대한 RT-PCR 결과는 일차된 결과를 얻기 어려웠으나 병적으로 골조직 단편이 증가된 이후 파골세포의 흡수작용을 촉진하여 골질을 강화하는데 기여하는 것으로 추측된다. 이로부터 GN에서 전반적인 골다공증 치료작용이 더 우수하였으며 골재형성, 특히 골흡수억제 과정에 영향을 미칠 것으로 추정된다.

참고문헌

1. 노인의학: 배철영, 이영진 공저, 고려의학, 서울, p. 260, 1996.
2. Harrison's Principles of Internal Medicine 12th. ed., Wilson J. et al., McGraw Hill, pp. 1924-25, 1991.
3. 대한약학대학협의회 약전분과회, 대한약전 제7개정 의약품각조, 문성사, p. 682, 1998.
4. 윤수진, 이균상, 문호성: 골다공증의 관련요인, 가정의학회지 17(12): 1450-61, 1996.
5. Garneo P, Delmas PD.: New developments in biochemical markers for osteoporosis, Calcif Tissue Int., 54(Suppl 1): S2-9, 1996.
6. Garneo P., Sornay-Rendu E., Chapuy MC., Delmas PD.: Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis, J. Bone Miner Res. 11(3): 337-49, 1996.
7. 최상순, 엄주오, 김송백, 유심근: 육린주가 난소적출 백서의 골다공증에 미치는 영향, 동의생리병리학회지 16(4):794, 2002.
8. Yamazaki I., Yamaguchi H.: Characteristics of an ovariectomized osteopenic rat model, J Bone Miner Res, 4(1): 13-22, 1989.
9. Britto JM, Fenton AJ, Holloway WR, Nicholson GC: Osteoblasts mediate thyroid hormone stimulation of osteoclastic bone resorption, Endocrinology 134: 169-176, 1994.
10. Fallon MD, Perry III, Bergfeld M, Droke D, Teitelbaum SL, Abiolo LV: Exogenous hyperthyroidism with osteoporosis, Arch Int Med 143:442-4, 1983.
11. Coindre JM, David JP, Riviere L: Bone loss in hypothyroidism with hormone replacement: A histomorphometric study, Arch Int Med 146:48-53, 1986.
12. Mundy GR, Shapiro JL, Bandelin JG, Canalis EM, Raisz LG: Direct stimulation of bone resorption by thyroid hormones, J Clinic Invest 58: 529-34, 1976.
13. Karaenzlin ME. Biochemical marker of bone metabolism in osteoporosis, Rheumatology 18: 117-35, 1996.
14. 김기수, 골다공증, 여성신문사, p. 108, 1998.
15. Bikle DD: Biochemical markers in the assessment of bone disease, Am J Med 103: 427-436, 1997.
16. Reid IR, Ames RW, Evans MC, Gamble GD, Sharpe SJ: Effect of calcium supplementation of bone loss in postmenopausal women, N Eng J Med 328: 460-64, 1993.
17. Riis B, Thomsen K, Christiansen C: Does calcium supplementation prevent postmenopausal bone loss? N Eng J Med 316: 173-77, 1987.
18. Mosekilde Li, Kragstrup J, Richards A: Compressive strength, ash weight, and volume of vertebral trabecular bone in experimental fluorosis in pigs. Calcif Tissue Int 40: 318-322, 1987.
19. Gortz B, Fassbender WJ: Genetics of osteoporosis, Orthopade 30(7): 412-7, 2001.
20. Eisman JA: Genetics of osteoporosis, Endocr Rev 20(6): 788-804, 1999.
21. Roodman GD: Advances in bone biology: The osteoclast, Endocr Rev 17: 308-332, 1996.
22. 김기수, 골다공증, 여성신문사, p. 34, 124, 1998.
23. Brooks-Asplund EM, Tupper CE, Daun JM, Kenney WL, Cannon JG: Hormonal modulation of interleukin-6, tumor necrosis factor and associated receptor secretion in postmenopausal women, Cytokine 19(4): 193-200, 2002.
24. Cauley JA, Seeley DG, Browner WS, Ensrud K, Kuller LH, Lipschutz RC, Hulley SB: Estrogen replacement therapy and mortality among older women. The study of osteoporotic fractures, Arch Intern Med. 157(19):2181-7, 1997.