

원저

복분자 음곡 약침이 난소적출 흰쥐의 골다공증에 미치는 영향

신희웅 · 이현

대전대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

Effects of Phamacopuncture with *RUBI FRUCTUS* Infusion Solution at KI₁₀ on Osteoporotic Rats Induced by Ovariectomy

Shin Hee-woong and Lee Hyun

Dept. of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medecine, Daejon University

Objectives : The purpose of this study is to observe the effects of *RUBI FRUCTUS* phamacopuncture infusion solution at KI₁₀ on osteoporotic Rats Induced by ovariectomy.

Methods : The author performed several experimental items to analyze cytotoxic, osteoporosis evaluation, change of ALP, creatinine, Ca, P, osteocalcin, Ca/P ratio and histological change of serum and tibia.

Results :

1. Creatinine and phosphorus in serum was decreased significantly in RF-HA than control group.
2. Calcium and phosphorus in tibia was increased significantly in RF-HA than control group.
3. Osteoclast like cell in tibia was increased significantly in control group, decreased significantly in RF-HA.
4. In the histological study in tibia, TBT was significantly increased, GPL was significantly decreased in the RF-HA than control group.

Conclusions : This study suggested that RF-HA at KI₁₀ has significant effect on osteoporosis.

Key words : Osteoporosis, phamacopuncture, RUBI FRUCTUS, KI₁₀, Phosphorus, Osteoclast like cell

· 접수 : 2010. 7. 9. · 수정 : 2010. 8. 1. · 채택 : 2010. 8. 1.
· 교신저자 : 이현, 충남 천안시 두정동 621 대전대학교 부속천안한방병원 침구과
Tel. 041-521-7579 E-mail : ih2000@hanmir.com

I. 서론

최근 평균 수명이 늘어나면서 연령과 관련된 질병의 치료와 예방에 대해 관심이 증가하고 있다. 그 중, 여성들에게 폐경으로 이행되는 과정에서 성호르몬의 감소는 신체적 및 정신적 변화를 초래하게 되는데 특히 폐경기 동안 영향을 주게 되며 가장 영향을 많이 받는 호르몬은 에스트로겐이다¹⁾.

에스트로겐의 분비 부족으로 발생할 수 있는 대표적인 질환인 골다공증은 골 형성보다 골 흡수가 증가되어 발생하는 대사성 골 질환으로 고령화로 인해 더욱 늘어나는 추세다²⁾. 특히 골다공증 자체보다는 골다공증으로 인한 골의 약화에 의해 쉽게 초래되는 골절이 더욱 큰 문제로 대두하고 있다³⁾.

한의학적으로 골다공증이라는 병명은 없으나, 문헌 상 ‘骨痿’, ‘骨痺’, ‘痺證’, ‘虛勞’ 등의 범주에 속하며⁴⁾, 骨의 脆弱한 상태를 나타내는 ‘骨枯’, ‘骨極’ 등과 가장 유사하다고 할 수 있다⁵⁾. 또한 骨多孔症은 五臟六腑 中 腎과 직접적인 관계가 있는 것으로 생각되고 있다⁶⁾.

복분자(RUBI FRUCTUS)는 薔薇果(장미과)에 속한 낙엽관목인 華東覆盆子 Rubus chingii Hu의 과실을 건조한 것으로, 性은 溫 無毒하고 味는 甘酸하며 肝, 腎, 膀胱經으로 歸經한다. 益腎, 固精, 縮尿의 效能이 있어 腎虛遺尿, 小便頻數, 陽痿早泄, 遺精滑精 등 肝腎虛로 인한 증상을 치료하는 것으로 알려져 있다⁷⁾.

골다공증에 대한 한의학적인 연구로는 한약복합처방⁸⁾, 녹용 등의 단미제⁹⁾, 紅花子·鹿茸·紫河車 등의 약침¹⁰⁾을 이용한 골다공증에 대한 보고가 있었으나, 益腎固精, 強陰補髓하는 효능을 지닌 복분자를 이용한 약침이 골다공증에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 흰 쥐의 난소를 적출하여 골다공증을 유발하고, 足少陰腎經의 含水穴로서 滋補肝腎, 調經利水 效能을 지닌 陰谷穴¹¹⁾에 복분자약침을 시술한 후, 체중, 자궁 무게 및 자궁 비중, 경골길이 및 회분 함량, 골밀도, 혈청분석, 경골내 Ca 및 P 함량, osteoclast like cell, 경골의 조직학적 변화 등을 통하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재료

1) 동물

4주령에 난소를 적출한 7주령 암컷 ddy mice(체중 22±5g)를 (주)중앙실험동물(경기도, 한국)로부터 공급받아, 실험당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료)와 물을 충분히 공급하고, 실온(22±2℃)과 습도(20~60%)를 유지하여 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 본 실험은 대전대학교 동물실험 윤리규정을 준수하여 시행하였다.

2) 약재

실험에 사용된 복분자(RUBI FRUCTUS)는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

2. 방법

1) 약침액의 제조

분쇄기를 이용해서 복분자 55g을 분쇄하여 분말로 만들어, 삼각 flask에 넣고 증류수 500ml를 가하여 3시간 동안 shaking water bath에서 유출한 후, 유출액을 여과하였다. 여과액을 여과지로 3회 여과한 후, rotary evaporator에 감압농축 하였다. 농축액에 91% ethyl alcohol 30ml를 가하여, 실온에서 교반한 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator로 감압농축한 후, 농축액을 다시 여과하였다. 이 여과액에 81% ethyl alcohol 30ml를 가하여 잠시 교반 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 여과액에 71% ethyl alcohol 30ml를 가하고 교반한 후 방치하였다가 다시 여과하는 조작을 2회 반복하였다. 여과액 중의 ethyl alcohol 성분을 rotary evaporator로 감압 제거하고, 남은 농축액이 20ml가 되게 하였다. 복분자 55g으로부터 얻은 복분자약침액을 감압농축하여 수분을 모두 날렸을 때에 얻은 분말은 12.5g이었다(수득률 22.73%). 1N NaOH를 이용하여 농축액을 pH 6.8이 되도록 조절하고, 4℃에서 12시간 방치한 후, 침전물을 제거하기 위해 syringe filter를 실시하였다. 여과된 농축액에 PBS를 첨가하여 1%로 희석하여 약침액으로 사용하였다.

2) 세포독성 측정

정상 ddy mice의 골세포 1×10⁵cell/well에 5%, 1%, 0.1%의 복분자약침액을 처리한 후 MTT assay를 이용하여, 세포 생존율을 측정하였다.

(1) Osteoblast cell 분리 및 배양

정상 ddy mice의 경골과 대퇴골을 적출하였다. 차가운 PBS에 담귀 근육을 제거하고, 깨끗한 PBS를 syringe에 넣어 골 내부로 침투 시켜, 골세포들을 1,200rpm에 5분간 원심 분리하였다. 상층액은 버리고, 침전된 골세포들은 MSC osteogenic singleQuots를 첨가한 differantiation Basal medium(Cat No. PT-3924, Lonza, USA)을 이용하여 3번 세척하였다. 준비된 세포는 7일간 세포 배양을 실시하여 osteoblast cell의 분화를 유도하였다.

(2) MTT assay

분화된 osteoblast cell의 viability를 trypan blue를 이용하여 확인한 뒤, 96well plate에 세포를 1×10⁵cells/well으로 분주하고, MSC osteogenic singleQuots를 첨가한 differantiation Basal medium(Cat No. PT-3924, Lonza, USA)에 약침액을 농도별로 처리하고, 72시간 동안 세포 배양을 실시하였다. 72시간 후에, MTT solution(5mg/ml, Cat No. 135038, Sigma, USA)을 각 well에 20μl씩 분주하고 5시간 동안 37℃에서 incubation을 실시하였다. 5시간 후, 각 well에 있는 medium을 100μl씩 버리고, solubilizing solution을 100μl씩 분주한 뒤 pipetting을 강하게 하여 well에 dark blue crystals가 침전하는 정도를 ELISA reader를 이용하여 570nm에서 optical densities를 확인하였다.

3) 골다공증 동물 모델

본 실험에서 사용된 골다공증 모델은 난소적출 ddy mouse 모델로, (주)중앙실험동물에서 4주령에 난소적출 수술(ovariectomy)을 시행하고 3주 동안 골다공증을 유도한 암컷 ddy 생쥐를 이용하였다.

난소적출 수술은, 동물을 에테르로 마취시킨 다음 클리퍼로 등의 털을 깎고, 에탄올 솜으로 절개부위를 잘 닦은 후 시행하였다. 동물의 dorso-lateral abdominal wall을 미세가위로 직경 1cm 정도 절개한 후, abdominal muscle층을 절개하여 핀셋으로 지방층에 둘러싸인 난소 및 자궁을 꺼냈다. 난소와 자궁을 연결하는 난관을 봉합사로 잘 묶은 다음, 난소를 완전히

제거하고, 봉합사로 근육층과 피부를 잘 봉합한 후, 1주간 회복시켰다.

4) 취혈

骨度分寸法¹²⁾에 의거하여 생쥐의 뒷다리에서 인체의 음곡(Umgok ; KI₁₀)에 상응하는 부위를 취하였다.

5) 실험군 분류 및 처치

실험군은 ddy생쥐 9마리씩을 한 군으로 하여 정상군(normal), 위수술군(sham-OVX), 대조군(control), HG군(hand grasping), NP군(needle prick), Saline군(saline injection), 복분자약침군(RF-HA)의 7군으로 나누었으며 무작위로 배정하였다.

정상군(normal)은 아무런 처치도 하지 않았다. 위수술군(sham-OVX)은 복부를 절개한 후 난소를 적출하지 않고 다시 봉합한 뒤, 이후 아무런 처치도 하지 않았다. 대조군(control)은 난소 적출 이외의 처치는 하지 않았다. HG군은 난소적출 후, 약침 처치 시와 같이 생쥐를 잡았다 놓는 동작만 하고, 이외의 처치는 하지 않았다. NP군은 난소적출 후, 음곡(KI₁₀) 상응부위에 26gauge 주사기를 0.5cm 정도 깊이로 자입하고 즉시 제거하였다. Saline군은 난소적출 후 saline 0.2ml를 음곡(KI₁₀) 상응부위에 注入하였다. 복분자약침군(RF-HA)은 난소 적출 후, 음곡(KI₁₀) 상응부위에 1%의 복분자약침액(RF-HAS) 0.2ml를 주입하였다. NP, saline 주입, 복분자약침 처치는 모두 난소적출 4주 이후부터 8주간 주 3회 시행하였고, NP, saline 주입, 복분자약침 시술은 실험동물의 뒷다리에서 음곡(KI₁₀) 상응부위를 매 시술 때마다 좌우 교대로 취하여 시술하였다.

6) 골다공증 평가

(1) 체중 측정

난소적출 4주 이후부터 실험 종료 시까지 1주일 간격으로 각 실험군의 실험동물의 체중을 측정하여 기록하였다.

(2) 자궁 무게 및 자궁비중 측정

실험 종료 후, 각 실험군의 실험동물의 자궁 무게를 측정하여 기록하였다. 자궁비중은 실험동물의 몸무게에 대한 자궁무게의 백분율로 계산하였다.

$$\text{uterus index}(\%) = \frac{\text{uterus 무게}(g)}{\text{실험동물 체중}(g)} \times 100$$

(3) 경골 길이 측정 및 경골 회분 분석

실험 종료 후, 각 실험동물의 경골을 적출하여 주위 근육 및 연 조직을 제거한 다음 경골의 길이를 측정하였다. 경골을 120℃에서 8시간 동안 건조시킨 후, furnace(Lab companion, Korea)에서 800℃로 6시간 동안 가열하여 탄화한 뒤 경골 회분 무게를 측정하였다. 탄화된 골을 HCl 500μl에 완전히 용해시키고, 용해된 탄화 골 200μl에 증류수 10ml를 첨가하여 희석한 다음, 탄화 골의 단위 무게당 칼슘(Ca)과 인(P)의 양을 측정하여 mg/g 단위로 나타내었다. 칼슘과 인의 비율 Ca/P ratio(%)는 다음의 공식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Ca/P ratio (\%)} = \left(\frac{\text{Calcium contents of tibia}}{\text{Phosphorus contents of tibia}} \right) \times 100$$

(4) 골밀도 측정

실험 종료 후, 각 실험군 실험동물의 경골을 적출하여 주위 근육 및 연 조직을 제거한 다음 24시간 동안 10%의 formalin에 고정한다. 24시간 이후, 경골을 흐르는 물에 씻은 후, PIXImus(Lunar meison, WI) 기기를 사용하여 DEXA(dual-energy x-ray absorptionmetry)의 방법으로 골밀도(bone mineral density, BMD)를 측정하였다.

(5) 혈청 분석

실험 종료 후, ethyl ether를 이용하여 실험동물을 마취하고, 심장채혈법으로 혈액을 채취하였다. 채혈한 혈액에서 혈장을 분리하여, (주)이원 임상검사센터(대전, 한국)에 의뢰하여 혈청 ALP, calcium의 함량을 측정하였다. 혈청 중 osteocalcin 함량은 Mouse Osteocalcin ELISA Kit(Cat No. BT-470, Biomedical Tech. Inc, USA)와 ELISA reader를 이용하여 ng/ml의 단위로 측정하였다.

(6) 경골 내 osteoclast like cell 분석

각 군에서 절취한 경골에서 골세포를 15ml tube에 모아 차가운 PBS를 이용하여 세척한 후 trypan blue를 사용하여 세포를 계수한다. 계수한 골세포를 2×10⁶cell/vial으로 FACs전용 tube에 분주한다. 골세포 중 osteoclast like cell의 비율을 확인하기 위하여 표식항체 MHC II와 CD115를 반응시켜 flow cytometry로 분석하였다.

(7) 경골의 조직학적 분석

① H&E 염색

실험 종료 후, 각 군 실험동물의 경골을 절취하여, 주변의 근육조직을 제거한 다음, 10%의 formalin에 고정하고 paraffin에 박정하였다. 박정한 조직을 (주)바이오톡스텍(오창, 한국)에 의뢰하여 microtome을 이용하여 5μm으로 절편하고 Hematoxylin and eosin 염색을 실시하였다.

② Histomorphometry

H&E 염색한 조직을 형광현미경(ECLIPSE E600, Nikon, Japan)을 이용하여 관찰한 후, digital camera (DXM 1200F, Nikon, Japan)를 이용하여 사진을 촬영하고, ACT-1 program을 이용하여 분석하였다. TBV(trabecular bone volume)는 다음 수식을 이용하여 계산하였으며, TBT(trabecular bone thickness)와 GPL(growth plate length)은 자동 조직분석 프로그램(I-solution)을 이용하여 측정하였다.

$$\text{TBV (\%)} = \left(\frac{\text{trabecular bone volume of sample section}}{\text{total bone volume of sample section}} \right) \times 100$$

7) 통계분석

실험 결과는 각 실험군에서 얻은 데이터의 평균과 표준편차로 나타내었다. 각 실험군의 결과값은 SPSS (14.0 KO) 통계프로그램의 ANOVA test를 사용하여 비교하였으며, 사후검정은 Scheffe's test를 이용하였다. 정상군과 대조군의 평균비교에는 대응 t-test를 사용하였다. 각 실험군의 결과값을 비교하여 신뢰도 95% 이상(p<0.05)일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 복분자약침액의 세포 독성

정상 생쥐로부터 얻은 골세포 중 조골세포만을 취하여 복분자약침액을 여러 가지 농도로 처리한 후 세포생존율을 확인하였다. 복분자약침액(RF-HAS)을 처리한 경우 control에 비하여 조골세포의 생존율이 유의하게 증가하였으며, 약침액의 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 조골세포의 생존율이 증가하였다(Fig. 1).

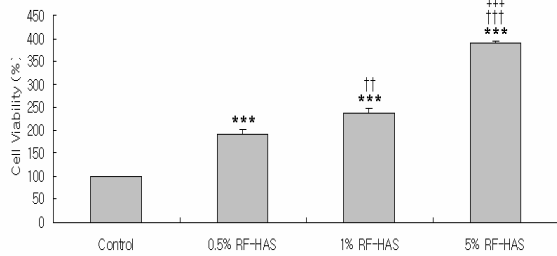


Fig. 1. Cell viability rate with various concentrations of RF-HAS

*** : $p < 0.001$ compared to control by ANOVA test.
 ††† : $p < 0.001$, †† : $p < 0.01$ compared to 0.5% RF-HAS by ANOVA test.
 †††† : $p < 0.01$ compared to 1% RF-HAS by ANOVA test.

2. 골다공증 평가

1) 체중 변화

실험동물의 몸무게를 주 1회 측정하였다. 정상군(normal)에 비하여 대조군(control)에서 몸무게가 전반적으로 높게 나타났으며, 복분자약침군(RF-HA)에서는 7주째까지 대조군(control)에 비하여 몸무게가 낮게 나타났다.

2) 자궁 무게

실험 종료 후, 실험동물의 자궁을 적출하여 무게를 측정하였다. 정상군(normal)에 비하여 대조군(control)에서 자궁의 무게가 유의하게 감소하였다. NP군, saline군 및 복분자약침군(RF-HA)에서는 대조군에 비하여 자궁의 무게에 유의한 변화가 없었다.

3) 자궁 비중

실험동물의 몸무게에 대한 자궁 무게의 백분율을 계산하였다. 정상군(normal)에 비하여 대조군(control)에서 자궁의 비중이 유의하게 감소하였다. NP군, saline군 및 복분자약침군(RF-HA)에서는 대조군에 비하여

자궁비중에 유의한 차이가 나타나지 않았다.

4) 경골 길이

실험 종료 후, 실험동물의 경골을 적출하여 길이를 측정하였다. 정상군(normal)에 비하여 대조군(control)에서 경골 길이가 유의하게 증가하였다. NP군, saline군 및 복분자약침군(RF-HA)에서는 대조군에 비하여 경골 길이가 감소하였으나 유의성은 없었다.

5) 경골 회분 무게

실험 종료 후, 실험동물의 경골을 태워 경골 내 회분 함량을 측정하였다. 대조군(control)에서 정상군(normal)에 비하여 회분함량이 감소하였으나 유의성은 없었다. 복분자약침군(RF-HA)에서는 대조군(control), NP군 및 saline군에 비하여 경골의 회분 함량이 증가하였으나 유의성은 없었다.

6) 골밀도

실험 종료 후, 동물의 경골을 적출하여, 골밀도를 측정하였다. 대조군(control)에서 정상군(normal)에 비하여 골밀도가 유의하게 감소하였다. NP군에서 대조군(control)에 비하여 골밀도가 유의하게 증가하였으며, 복분자약침군(RF-HA)에서는 대조군에 비하여 유의한 변화가 없었다.

3. 혈청 분석

각 실험동물의 혈청으로부터 ALP, creatinine, phosphorus, calcium, 및 osteocalcin의 농도를 측정하였다 (Table 1).

1) Alkaline phosphatase

각 실험동물에서 취한 혈청에서 Alkaline phosphatase(ALP)의 농도를 측정하였다. 대조군(control)에서

Table 1. Effect of RF-HA on Various Components in Serum of Ovariectomized Mice

Parameter	Normal	Control	N.P.	Saline	RF-HA
ALP(IU/L)	224.000±66.363	342.000±70.090	378.670±160.370	312.670±139.930	360.500±145.608
Creatinine(mg/dl)	0.750±0.063	1.060±0.167	0.615±0.055	0.985±0.033	0.550±0.037
Phosphorus(mg/dl)	21.890±2.106	24.248±6.104	13.995±2.448	20.403±0.610	12.093±0.688
Calcium(mg/dl)	7.350±0.208	7.050±0.835	7.900±0.716	6.550±0.719	7.825±0.737
Osteocalcin(O.D.)	0.380±0.108	0.616±0.027	0.533±0.041	0.653±0.056	0.508±0.140

정상군(normal)에 비하여 혈청 ALP의 농도가 유의하게 증가하였다. 복분자약침군(RF-HA)에서 대조군(control)에 비하여 혈청 ALP의 농도에 유의한 변화가 없었다.

2) Creatinine

각 실험동물에서 취한 혈청에서 creatinine의 농도를 측정하였다. 정상군(normal)에 비하여 대조군(control)에서 creatinine의 농도가 유의하게 증가하였다. 복분자약침군(RF-HA)에서는 대조군(control) 및 saline군에 비하여 creatine의 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 2).

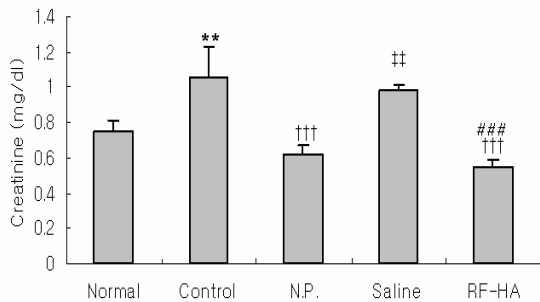


Fig. 2. Effect of RF-HA on serum creatinine level in ovariectomized mice

** : $p < 0.01$ compared to normal group by *t*-test.
 *** : $p < 0.001$ compared to control group by ANOVA test.
 ††† : $p < 0.01$ compared to NP group by ANOVA test.
 ### : $p < 0.001$ compared to saline group by ANOVA test.

3) Phosphorus

각 실험동물에서 취한 혈청에서 phosphorus의 농도를 측정하였다. 정상군(normal)에 비하여 대조군(control)에서 phosphorus의 농도가 유의하게 증가하였다. NP군에서 대조군(control)에 비하여 phosphorus의 농도가 유의하게 감소하였고, 복분자약침군(RF-HA)에서는 대조군 및 saline군에 비하여 phosphorus의 농도가

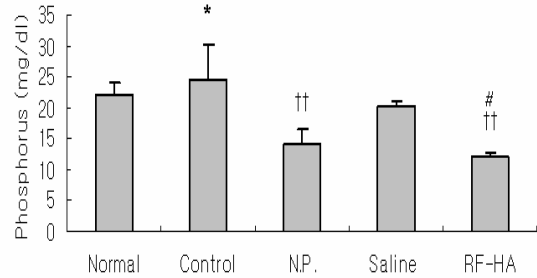


Fig. 3. Effect of RF-HA on serum P level in ovariectomized mice

* : $p < 0.05$ compared to normal group by *t*-test.
 †† : $p < 0.01$ compared to control group by ANOVA test.
 # : $p < 0.05$ compared to saline group by ANOVA test.

유의하게 감소하였다(Fig. 3).

4) Calcium

각 실험동물에서 취한 혈청에서 calcium의 농도를 측정하였다. 각 실험군의 혈청 calcium 농도는 유의한 차이를 나타내지 않았다.

5) Osteocalcin

각 실험동물에서 취한 혈청에서 osteocalcin level을 ELISA를 이용하여 측정하였다. 정상군(normal)에 비하여 대조군(control)에서 osteocalcin의 농도가 증가하였으나 유의성은 없었다. 복분자약침군(RF-HA)에서는 대조군에 비하여 osteocalcin의 농도가 감소하였으나 유의성은 없었다.

4. 경골 회분 무게 및 경골 내 Ca, P 함량

각 실험군의 경골을 회분하여 얻은 시료를 이용하여 경골 내 Ca 및 P 함량과 Ca/P ratio를 측정하였다(Table 2).

Table 2. Effect of RF-HA on Ca, P, Ca/P Ratio in Tibia of Ovariectomized Mice

Group	Levels in tibia(mg/g bone)		Ca/P ratio(%)
	Ca levels	P levels	
Normal	96.890±5.550	20.300±2.810	482.700±57.020
Control	74.560±10.610	17.760±2.310	419.570±14.880
N.P.	89.620±5.640	20.090±1.190	446.140±12.640
Saline	122.120±3.130	26.960±1.710	465.380±32.860
RF-HA	127.274±27.256	29.849±3.972	423.385±43.808

1) Calcium

각 실험군에서 취한 경골을 회분한 뒤, 경골 내 calcium의 함량을 측정하였다. 대조군(control)에서 정상군(normal)에 비하여 calcium 함량이 유의하게 감소하였다. saline군에서는 대조군(control)군에 비하여 calcium함량이 유의하게 증가하였으며, 복분자약침군(RF-HA)에서는 대조군(control)군 및 saline군에 비하

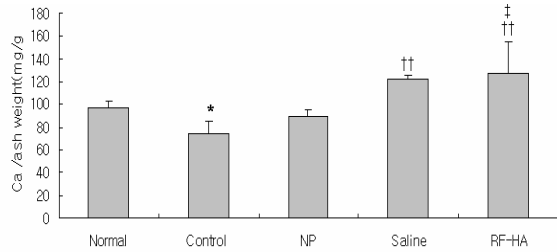


Fig. 4. Effect of RF-HA on tibial Ca level in ovariectomized mice

* : $p < 0.05$ compared to normal group by *t*-test.
 †† : $p < 0.01$ compared to control group by ANOVA test.
 ‡ : $p < 0.05$ compared to NP group by ANOVA test.

여 경골 내 calcium함량이 유의하게 증가하였다(Fig. 4).

2) Phosphorus

각 실험군에서 취한 경골을 회분한 뒤, 경골 내 phosphorus의 함량을 측정하였다. 대조군(control)에서 정상군(normal)에 비하여 경골내 phosphorus의 함

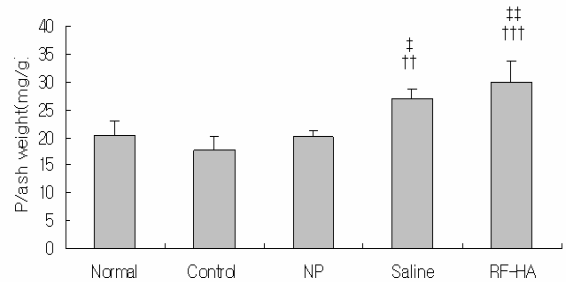


Fig. 5. Effect of RF-HA on tibial phosphorus level in ovariectomized mice

††† : $p < 0.001$, †† : $p < 0.01$ compared to control group by ANOVA test.
 ‡ : $p < 0.01$, ‡ : $p < 0.05$ compared to NP group by ANOVA test.

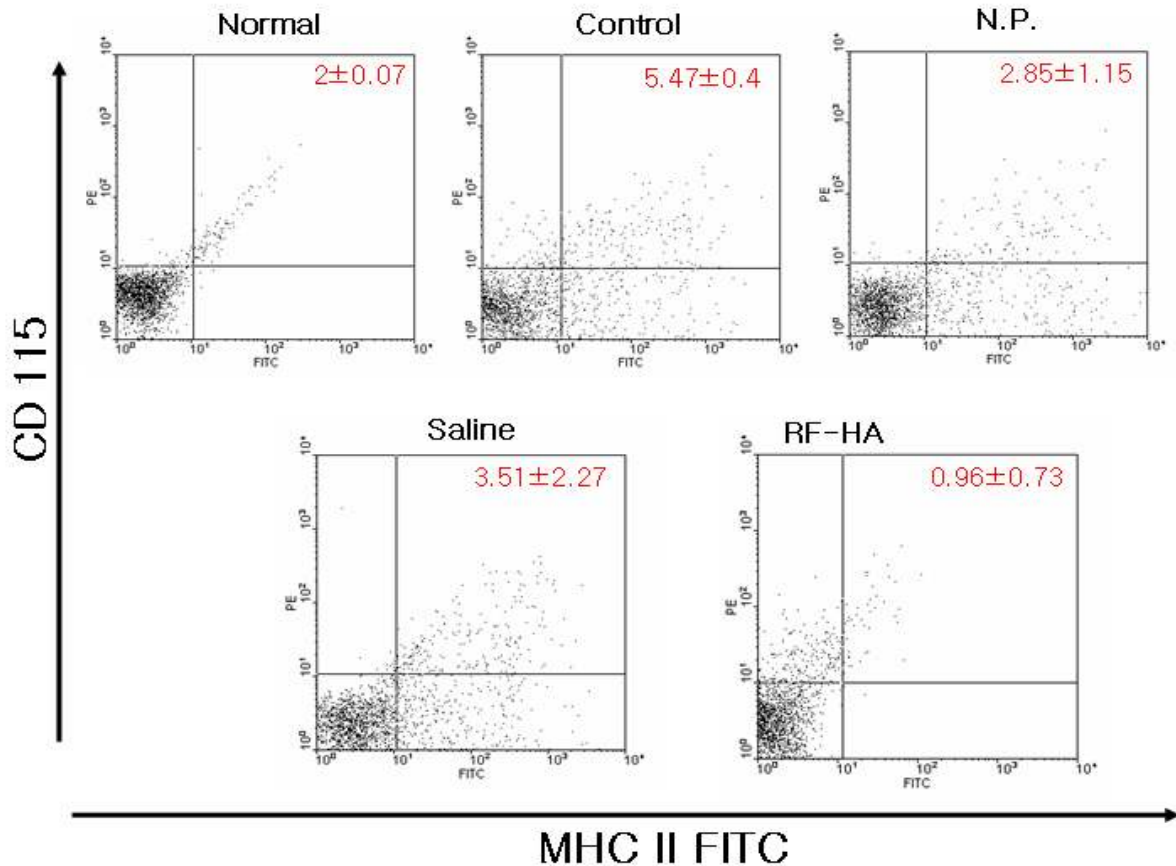


Fig. 6. Effect of RF-HA on osteoclast like cell in tibia of ovariectomized mice

량이 약간 감소하였으나 유의성은 없었다. saline군 및 복분자약침군(RF-HA)에서는 대조군(control) 및 NP군에 비하여 경골내 phosphorus 함량이 유의하게 증가하였다(Fig. 5).

3) Ca/P ratio

각 실험군에서 취한 경골을 회분한 뒤, 경골 내에서 calcium과 phosphorus의 비율을 측정하였다. 대조군(control)에서 정상군(normal)에 비하여 Ca/P 비율이 약간 감소하였으나 유의성은 없었다. 복분자약침군(RF-HA)에서는 대조군에 비하여 Ca/P 비율에 유의한 변화가 없었다.

5. 경골 내 osteoclast like cell 분석

경골 내 osteoclast like cell의 비율을 flow cytometry assay를 이용하여 측정하였다. 대조군(control)에서 MHCII+/CD115+세포의 비율은 5.47 ± 0.4 로 나타나 정상군(normal)의 2 ± 0.079 에 비하여 현저하게 증가하였으며, 복분자약침군(RF-HA)에서는 0.96 ± 0.73 로 나타나 대조군(control), NP군 및 saline군에 비하여 감소하였다(Fig. 6).

경골 내 osteoclast like cell의 비율을 flow cytometry assay로 측정하여 군간 비교한 결과, 대조군(control)에서 osteoclast like cell 비율은 정상군(normal)에 비하여 유의하게 증가하였으며, 복분자약침군(RF-HA)에서는 대조군(control)에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 7).

6. 경골의 조직학적 분석

1) H&E 염색 분석

실험동물의 경골조직을 절편하여 Hematoxylin and eosin(H&E) 염색을 실시하였다. 대조군(control)에서 정상군(normal)에 비하여 골 내부에 pore가 많이 나

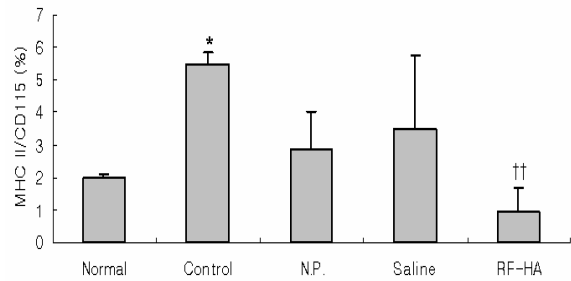


Fig. 7. Effect of RF-HA on osteoclast like cell in tibia of ovariectomized mice

* : $p < 0.05$ compared to normal group by *t*-test.

** : $p < 0.01$ compared to control group by ANOVA test.

타났고, 지주골이 적게 분포하였다. 복분자약침군(RF-HA)에서는 control군, NP군 및 saline군에 비하여 pore의 생성이 감소되었으며, 지주골도 정상군(normal)과 유사하게 유지되었다(Fig. 8).

2) Histomorphometry

(1) Trabecular bone volume(TBV)

실험동물의 경골조직을 절편하여 H&E 염색을 한 후, 자동분석 프로그램을 이용하여 지주골량(TBV)을 측정하였다. 대조군(control)에서 정상군(normal)에 비해 지주골량(TBV)이 유의하게 감소하였으며, NP군 및 복분자약침군(RF-HA)에서는 대조군(control)에 비하여 지주골량(TBV)이 증가하였으나 유의성은 없었다.

(2) Trabecular bone thickness(TBT)

실험동물의 경골조직을 절편하여 H&E 염색을 한 후, 자동분석 프로그램을 이용하여 지주골의 두께(TBT)를 측정하였다. 대조군(control)에서 정상군에 비하여 TBT가 유의하게 감소하였으며, 복분자약침군(RF-HA)에서는 대조군(control), NP군 및 saline군에 비하여 TBT가 유의하게 증가하였다(Fig. 9).

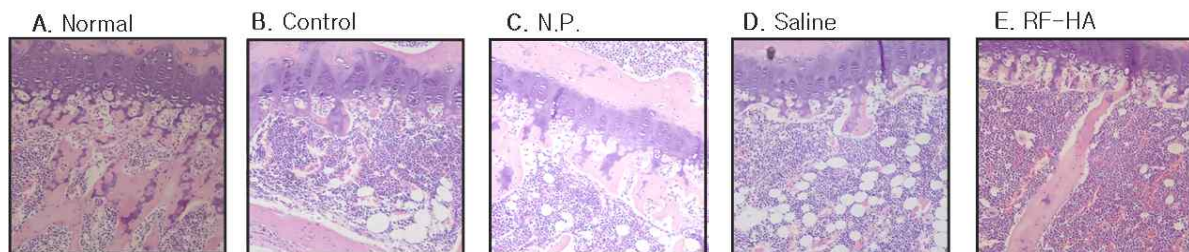


Fig. 8. Histological analysis(H&E stain) of tibia in ovariectomized mice

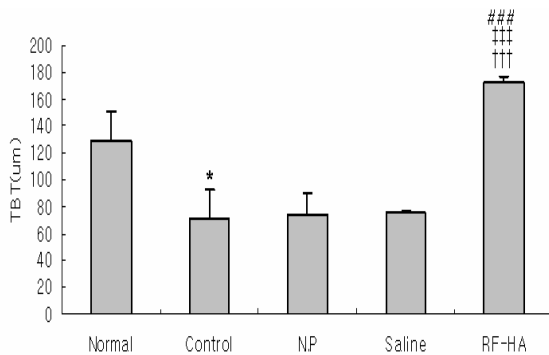


Fig. 9. Effect of RF-HA on the trabecular bone thickness of tibia in ovariectomized mice

* : $p < 0.05$ compared to normal group by t -test.
 ††† : $p < 0.001$ compared to control group by ANOVA test.
 †††† : $p < 0.001$ compared to NP group by ANOVA test.
 ### : $p < 0.001$ compared to saline group by ANOVA test.

(3) Growth plate length (GPL)

실험동물의 경골조직을 절편하여 H&E 염색을 한 후, 자동분석 프로그램을 이용하여 성장판의 길이 (GPL)를 측정하였다. 대조군(control)에서 정상군에 비해 성장판의 길이가 유의하게 증가하였다. 복분자약 침군(RF-HA)에서는 대조군(control), NP군 및 saline 군에 비하여 성장판의 길이가 유의하게 감소하였다 (Fig. 10).

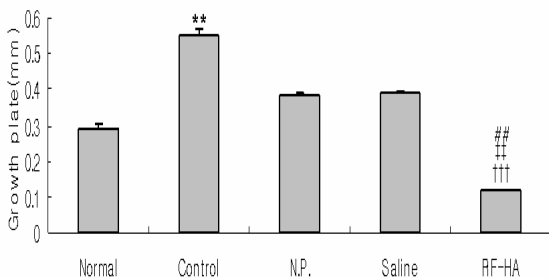


Fig. 10. Effect of RF-HA on growth plate length of tibia in ovariectomized mice

** : $p < 0.01$ compared to normal group by t -test.
 ††† : $p < 0.01$ compared to control group by ANOVA test.
 †††† : $p < 0.05$ compared to N.P. group by ANOVA test.
 ### : $p < 0.05$ compared to saline group by ANOVA test.

IV. 고찰

최신 의학의 발달로 인간의 평균수명이 늘어나면

서 노후생활에 대한 의학적 관심과 연구가 활발히 진행되고 있으며¹³⁾, 고령인구가 늘어남에 따라 임상적으로 접할 수 있는 골다공증 환자의 수도 증가하고 있어, 골다공증은 중요한 노인질환의 하나로 대두되었다¹⁴⁾.

골다공증은 골의 화학적 조성에는 변화가 없고 단위 용적 내 골 질량의 감소를 초래하여 경미한 충격에도 쉽게 골절을 일으킬 수 있는 질환으로, 이로 인해 심각한 신체적·정신적 손상과 개인 및 사회 경제적 손실을 가져올 수 있어 임상적으로 중요하게 취급된다¹⁵⁾. 특히 골다공증 자체보다는 그로 인한 골절 약화에 따라 용이하게 초래되는 각종 골절, 그 중 대퇴골 골절 또는 척추 골절 등은 장기간 활동을 제한시키고 결과적으로 노인층 사망원인의 15%에 이르게 한다는 점에서 문제가 되고 있다¹⁶⁾.

골밀도는 남녀 모두 30~35세에 최대로 높아지고 이후 5~10년부터 남자는 매년 0.3%씩 골밀도가 손실되고, 여성은 폐경 전까지 남자와 같은 비율로 손실되나, 폐경 후에는 2.2~3.0%씩 손실된다. 척추 뼈와 같이 수질골이 많은 부위는 폐경 직후 6~8%씩 손실된다. 이와 같은 골밀도의 감소는 결국 골절을 유발하게 된다¹⁷⁾.

골다공증의 원인에 대해서는 명확히 알려져 있지 않지만, 내분비학적·영양학적·물리적·유전적 인자들이 고려되고 있으며, 이에 estrogen 결핍, 활성 vitamin D 결핍, calcitonin 결핍, PTH(Parathyroid hormone) 과잉, calcium의 섭취부족 및 장관으로 부터의 calcium 흡수능력 저하 등 여러 가지 원인이 있다¹⁸⁾. 특히 골 소실에 가장 중요한 요인은 estrogen 결핍인데 estrogen의 결핍은 폐경기 여성이나 자궁적출을 한 여성의 주요한 골다공증 요인이 되며 자궁적출을 한 여성은 자연 폐경기 여성에 비해 골밀도가 유의성 있게 저하되어 골다공증으로 인한 골절의 위험성이 높은 실정이다¹⁹⁾.

골다공증은 요통 이외에는 뚜렷한 자각증상이 없어 오랫동안 가볍게 진행되므로 진단과 치료가 늦어지기 쉬우며, 배부동통, 身長의 감소, 척추의 후만변형 그리고 골절 등의 증상을 동반한다²⁰⁾. 그 중에서 골절의 경우, 가벼운 외상에도 쉽게 골절이 일어나며 척추의 압박골절, 대퇴 경부 골절, 요골 원위부 골절 및 상완골 골절 등이 호발된다.

골다공증의 치료목표는 주요한 위험인자를 제거하여 주는 한편, 골 흡수를 억제하고 골 형성을 촉진하여 감소된 골량을 회복시킴으로써 골절을 방지하는 것이

라고 할 수 있다. 최근 골다공증에 사용되는 치료제로는 estrogen, calcitonin, bisphosphonates 등의 골 흡수 억제제²¹⁾, sodium fluoride, PTH(Parathyroid Hormone 부갑상선 호르몬), GH(Growth Hormone), IGF-1 등의 골 형성 촉진제가 있다²²⁾.

그러나 이러한 대부분의 약물치료가 골소실을 더 이상 진행시키지 않는 효과는 기대할 만하지만, 이미 감소된 골량을 충분히 증가시키기는 어렵다는 사실 등으로 실제 임상에서 치료목표를 달성하기는 매우 어려운 실정이다²³⁾. 또한 이러한 약제들은 속쓰림, 구역, 구토, 궤양 등의 소화기 자극 증상이나 안면홍조, 관상동맥 질환의 위험도 증가, 유방암, 뇌졸중, 혈전색전증 등을 유발할 가능성이 높기도 하지만, 부갑상선 호르몬 제제의 경우에는 치료기간이나 용량에 대한 연구가 아직까지 부족한 실정이다. 또한 치료 중단 시 골소실 정도가 시간에 따라 치료 이전의 수준으로 되돌아가는 등의 문제점들을 안고 있으며²⁴⁾, 골 흡수 억제제만으로는 35~50% 내외의 골질 억제효과 밖에는 볼 수 없어 최근에는 양질의 골 형성을 촉진하는 새로운 개념의 약제를 찾기 위한 연구에 초점을 맞추고²⁵⁾, 식물성 에스트로겐, 한약제제, DHEA, strontium ranelate 등에 대한 연구가 진행 중이다²⁴⁾.

한의학에서 골다공증은 오장육부 중腎과 직접적인 관계가 있는 것으로 생각하고 있으며⁶⁾, 이를 살펴보면 두 가지 방면으로 인체에 영향을 미친다고 볼 수 있는데, 첫째,腎과 骨, 骨髓와의 관계이다. 《黃帝內經·素門·宣明五氣論》에서는 “腎主骨”이라 하였고²⁶⁾, 《黃帝內經·素門·陰陽應象大論》에서는 “腎生骨髓”라 하였고²⁶⁾, 《黃帝內經·素問·六節臟象論篇》 “腎者主蟄封藏之本精之處也 其華在髮 其充在骨”²⁶⁾, 《黃帝內經·素問·脈要精微論》 “骨爲幹”, “骨屬屈伸”, “腰者腎之府, 骨者髓之府, 不能久立 行則振掉 骨將憊矣”라고 하여²⁶⁾, 骨이 五臟 중에 腎과 밀접한 관계가 있어 腎이 骨髓를 主管하고 腎精이 충실하면 髓가 充盛하고 골격 또한 生長이 견실하게 된다. 腎精이 虛少하면 骨髓化源이 부족하게 되므로 골격을 자양할 수 없게 되어 骨髓萎弱 또는 무력해진다고 보았다. 즉 腎虛에 의한 骨髓의 부족이 골다공증의 主要病機로 인식하고 있다⁹⁾. 또한 骨의 생리기능에 대하여 “骨爲幹”, “骨屬屈伸”이라 하여 인체의 지지와 역학운동의 중심이 됨을 설명하였고, “骨者 髓之府”라 하여 骨의 작용과 성장발육을 돕는다고 하였다⁴⁾. 둘째, 腎과 天癸와의 관계이다. 《黃帝內經·素門·上古天真論》에 “男子八歲, 腎氣實, 髮長齒更, … 七八 … 天癸竭, 精小,

腎臟衰, 形體皆極, 八八則齒髮去”, “女子七歲, 腎氣盛, 齒更髮長, 二七而天癸至 … 三七腎氣平均 故眞牙生而長極 … 四七筋骨堅 髮長極身體盛壯 夫八歲腎氣實 髮長齒更 … 七七, 任脈虛, 太衝脈衰, 天癸竭, 地道不通, 故形衰而無子也”라고 하여²⁷⁾, 天癸는 성선을 자극하는 내분비선의 기능과 밀접한 관련이 있어서 腎精이 쇠퇴해지는 폐경 이후에는 衝任脈이 쇠퇴하고 天癸가 고갈되어 내분비선과 성호르몬의 작용이 終止하거나 줄어들다는 것을 설명하고 있다²⁸⁾. 그러므로 한의학적으로 腎氣-天癸-衝任脈과 서양의학의 내분비선의 성호르몬과의 관계는 용어만 다를 뿐 일치하는 설명이다⁸⁾. 즉 腎精의 성쇠와 연령은 밀접한 관계가 있으며 여성들은 폐경기에 氣血이 虛해져 골다공증에 노출되기 쉬움을 언급해 놓아 현대의학의 개념의 골다공증의 病機를 일찍부터 잘 이해하고 있음을 보여준다.

한의학 문헌상 골다공증이라는 병명은 없으나 ‘骨痿’, ‘骨痺’ 등의 범위에 속하며⁴⁾, 骨의 脆弱한 상태를 나타내는 ‘骨極’의 병명과 가장 유사하다 할 수 있다⁵⁾.

이상에서 볼 때, 骨은 腎之府이고, 髓는 腎에서 生하니 骨格의 生長과 기능은 腎氣의 성쇠에 따라서 결정되고 骨病은 대개 先天稟受가 부족하거나 腎氣가 虛弱한 자에게 많으며, 골질의 악화를 나타내는 ‘骨痿’, ‘骨痺’, ‘骨極’ 등이 임상증상과 발병원인으로 보아 골다공증과 밀접한 관계가 있다고 할 수 있겠다⁵⁾.

골다공증에 관한 최근의 한의학적인 연구에 의하면 腎은 현대의학의 신경내분비기능을 포괄하며 그 중에서 시상하부-뇌하수체-성선 軸은 성장과 노쇠와 가장 긴밀한 관계를 가지므로 腎虛는 성선기능저하에 해당하고 腎氣能이 왕성하면 내분비환경을 조정하여 골 흡수를 억제하고 골 형성을 증가시켜서 골다공증의 발전과정을 지연시킨다라고 인식되고 있다⁶⁾.

이러한 것에 근거하여 골다공증과 유관한 골질환에 다용된 경락 중 骨髓를 濡養하는 작용이 있는 足少陰腎經이 골다공증의 치료에 응용할 수 있으리라 사료되며, 그 중 족소음신경의 合水穴로서 自經의 自穴이며 補腎培元, 調經利水의 효능을 지니고 있어서 股關節痛, 膝關節炎, 膝不能屈伸, 膝股內側痛 등을 主治하는 陰谷穴¹¹⁾을 선택하였다.

복분자(RUBI FRUCTUS)는 薔薇果(장미과)에 속한 낙엽관목인 華東覆盆子Rubus chingii Hu의 과실을 乾燥한 것으로, 性은 溫 無毒하고 味는 甘酸하며 肝, 腎, 膀胱經으로 歸經한다. 益腎, 固精, 縮尿의 효능이 있어 腎虛遺尿, 小便頻數, 陽痿早泄, 遺精滑精 등 肝腎虛로 인한 증상을 치료하는 것으로 알려져 있다⁷⁾.

복분자와 관련한 그동안의 연구로는 김 등²⁹⁾의 복분자가 항암 활성화와 면역활성과 관련이 있는 항스트레스 활성화에 좋은 효과를 나타낸다는 보고와 김 등³⁰⁾의 성숙한 복분자 열매의 과육과 받침을 제거한 씨앗이 미성숙한 열매보다 배란에 더 효과적이라는 보고 등 항암 및 항스트레스 효과, 배란과 난소에 미치는 영향에 대한 연구는 있었으나 약침을 이용하여 골다공증과의 연관성에 대한 것은 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 腎虛와 유관한 것으로 생각되고 있는 골다공증에 益腎, 固精 등의 효능이 있는 복분자의 활용이 적합하리라 생각되어 복분자에서 약침액을 추출, 정상 생쥐 조골세포에 대한 세포독성을 확인 후 난소적출로 estrogen 결핍성 골다공증이 유발된 흰 쥐의 陰谷에 시술하여, 체중 변화, 자궁 무게, 자궁 비중, 경골 길이, 경골 회분 무게, 골밀도를 측정하여 골다공증을 평가하고 혈청분석 및 경골 내 Ca 및 P 함량, osteoclast like cell, 경골의 조직학적 분석을 관찰, 연구하여 그 변화를 관찰하였다. 본 연구에서 데이터 분석 결과, 위수술군(sham-OVX)과 HG군(hand grasping)은 정상군과 유의한 차이를 나타내지 않아, 본 논문의 실험성적에서는 위수술군과 HG군을 제외하고 통계처리하였다.

약침액의 세포독성의 평가는 정상 골세포에 약침액을 처리하였을 때 세포에 미치는 영향을 관찰한 것으로, 정상 생쥐로부터 얻은 골세포 중 조골세포만을 취하여 RF-HA를 여러 가지 농도로 처리한 후 세포 생존율을 확인한 결과, control군에 비하여 RF-HA의 농도가 0.5%에서 1%로, 1%에서 5%로 증가함에 따라 농도 의존적으로 조골 세포의 생존율이 증가하였다. 따라서 농도 의존적으로 RF-HA의 세포 증식 효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 1). 하지만, 약침의 효율과 세포에 대한 독성을 고려하여 1%의 약침액을 이용하여 실험하였다.

Estrogen의 결핍과 체중과의 상관관계에 대해서 Kalu 등³¹⁾에 의하면 난소 적출한 흰쥐의 체중은 증가하는데, 난소 적출한 쥐에게 35일간 estrogen을 투여하면 흰쥐의 체중은 normal군과 같거나 그 이하의 체중을 유지한다고 하였고, Yamazaki 등³²⁾은 흰쥐의 난소를 제거하면 체중이 증가한다고 하였는데, 본 실험에서는 control군에서 몸무게가 전반적으로 높게 나타나고 RF-HA군에서는 7주째까지 나타났으나 유의한 변화는 없었다.

자궁 무게의 변화는 난소 적출 후 감소하는 것으로 알려져 있는데³³⁾, 子宮內膜 및 子宮筋은 에스트로겐에

의존적이고, 에스트로겐은 거의 대부분 난소에서 분비되므로 난소가 제거되면 자궁은 위축된다³⁴⁾. 따라서 자궁 위축은 난소 적출술의 성공여부를 판단하는 기준이 된다. 본 실험 종료 후, 실험동물의 자궁을 적출하여 측정된 무게와 실험동물의 체중에 대한 자궁무게의 백분율을 환산한 결과, normal군에 비하여 control군, NP군, saline군, RF-HA군 등 모든 실험군에서 자궁 무게와 자궁의 비중이 유의하게 감소하여 난소적출로 인한 자궁의 기능적·구조적 退行이 유발됨을 시사하였으나, NP군, saline군 및 RF-HA군이 control군에 비해 유의한 차이가 없는 것으로 나타나 RF-HA이 에스트로겐의 자궁평활근 세포증식 유도에 상응하는 효능을 가지지는 못하는 것으로 사료된다.

에스트로겐은 남녀 모두에서 사춘기 골단폐쇄에 중요한 역할을 하여 골의 길이 성장을 억제하는 것으로 알려져 있어 난소 적출 후 골의 성장이 촉진되는 것으로 보고되어 있다³⁵⁾. 본 실험에서도 흰쥐의 경골을 적출하여 길이를 측정된 결과 normal군에 비하여 control군에서 경골의 길이가 유의하게 증가하여 에스트로겐의 영향에서 벗어난 경골 길이의 성장을 볼 수 있었고, NP군, saline군 및 RF-HA군에서는 control군에 비해 경골길이가 감소하였으나 유의성은 없었다.

난소를 제거한 후 일어나는 골소실은 estrogen의 감소와 밀접한 관계가 있으며, estrogen이 결핍된 생쥐에서는 골 형성의 감소, 골 흡수의 증가, 지주골과 피질골의 골량 감소 등이 나타나게 된다³⁶⁾. 본 실험에서 측정된 경골 내 회분함량은 control군에서 normal군에 비해 유의성은 없으나 경골 무게의 감소가 있었고, RF-HA군도 control군, NP군 및 saline군에 비해 유의성은 없었지만 경골의 회분함량의 증가를 보였다.

실험동물의 경골을 적출하여 골밀도를 측정된 결과 control군에서 normal군에 비해 골밀도가 유의하게 감소하여 난소적출로 인한 에스트로겐 결핍으로 골소실 증가된 것을 보여 주었다. 그런데 RF-HA군에서는 control군에 비하여 유의한 변화가 없었으나, 오히려 NP군에서 control군에 비하여 골밀도가 유의하게 증가하여 추후 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

골의 재형성률, 즉 골 형성과 골 흡수의 속도 평가를 위해 혈액과 소변을 통한 일부 생화학적 검사들이 이용되고 있는데, 이들 검사는 어느 한 시점에서 골 재형성의 전반적인 상태를 측정하며³⁷⁾, 이 골의 재형성률을 반영하는 골대사 지표물질을 통칭하여 생화학적 골대사 지표라고 한다. 이들은 조골세포나 파골세포에서 분비되는 효소이거나 골 형성 시 또는 골 흡

수시 뼈의 기질에서 유리되는 성분들로, 효과적인 골 형성 지표(Bone formation markers)로는 Osteocalcin, ALP, PICP(Procollagen type I C-terminal peptide) 등이 있으며, 그 중 ALP와 Osteocalcin은 골 형성 중 석회화 과정을, PICP는 골기질 합성과정을 주로 반영하는 지표로 생각된다. 효과적인 골 흡수 지표로는 血中 또는 尿中 칼슘, 血中 또는 尿中 크레아티닌, 血中 포스포로스, 尿中 하이드록시프롤라인 등이 있다. 본 실험에서는 골 형성 지표로 ALP와 Osteocalcin의 함량을 측정하였고, 골 흡수 지표로는 혈중 calcium, 혈중 creatinine, 혈중 phosphorus의 함량을 측정하였다.

ALP는 골아세포가 골 형성을 하는 동안 생성되어 그 중 일부가 혈중에 분비되는 효소로서 임상에서 가장 흔히 이용되는 골 형성 표지자로³⁶⁾, 간담도계 질환, 골질환 등에서 증가하며 임상적 의의가 크다. 골질환으로 인한 ALP의 증가는 골신생이 있는 경우로, 주로 골과괴가 일어나는 질환 또는 골과괴에 수반하여 골신생이 일어나는 경우에 증가한다³⁸⁾. 본 실험에서는 control군에서 normal군에 비해 혈청 ALP의 농도가 유의하게 증가하였으나, RF-HA군에서 control군에 비하여 혈청 ALP의 농도에 유의한 변화가 없었다.

Creatinine은 근육 내의 creatine phosphate 대사 결과 생겨난 물질로 정상인에서는 비교적 일정한 속도로 근육으로부터 유리되고 있으므로 그 농도는 항상 일정하게 유지된다. 오직 신장을 통해서만 체외로 배설되므로 요중 배설률은 체내의 creatinine 생성율과 동일하며, 이 수치로 사구체 여과율(GFR)의 감소 정도를 예측할 수 있다²⁰⁾. 尿中 creatinine 농도는 腎臟의 배설기능과 관련이 있으므로 신 혈류량과 신사구체 여과율이 감소할 경우에 증가한다³⁸⁾. 본 실험에서는 尿中 creatinine 농도 대신 血中 creatinine 농도를 측정하였다. 실험 결과 혈중 creatinine의 농도는 normal군에 비하여 control군에서 유의하게 증가하였고, RF-HA에서는 control군 및 saline군에 비하여 creatinine의 농도가 유의하게 감소하였다(Fig 2). 골다공증은 腎과 관련이 있을 것으로 사료되고, 陰谷은 足少陰腎經의 合水穴이며, 복분자는 肝腎膀胱經으로 歸入한다. 본 실험에서 난소적출로 인한 혈청 creatinine증가는 난소적출 골다공증 모델이 腎虛를 바탕으로 하고 있음을 시사한다. 따라서 복분자 음곡 약침에 의해 혈청 creatinine 증가가 의미있게 감소된 것은 난소적출로 유도된 腎虛症이 복분자 음곡 약침의 補腎작용에 의해 회복된 것으로 볼 수 있다. 즉 복분자 음곡 약침은 腎虛로 인한 골다공증에 補腎하여 調

經利水하는 효과를 발휘하는 것으로 생각된다.

P(phosphorus)은 모든 세포의 중요한 구성성분이면서 에너지 대사, 근 수축, 조직으로의 산소공급 등에 관여하며 건강성인의 체내 총량은 500~800g 정도이다. 그 중 80~90%는 골에, 나머지 10~20%가 근육에 존재 한다³⁸⁾. 혈중 P의 농도는 폐경 후 여성에서는 정상 성인에 비해 약간의 증가가 일어난다. 골이 흡수될 때 P은 Ca와 함께 세포외액으로 방출되고 유기기질이 흡수되어 골대사가 일어나고 있을 때 증가한다²⁾. 본 실험에서는 normal군에 비하여 control군에서 혈중 phosphorus의 농도가 유의하게 증가하였다. NP군에서 control군에 비하여 phosphorus의 농도가 유의하게 감소하였고 RF-HA에서는 대조군 및 saline군에 비하여 phosphorus의 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 3). 이러한 결과는 그 동안의 골다공증에 대한 연구에서 찾아보기 어려운 결과로서 복분자의 약리적인 특성과 인체내 P의 대사와의 관계에 대해 향후 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Calcium(Ca)는 생체내 약 1kg 정도 존재하는데 그 중 99.9%가 뼈에, 나머지 0.1%는 세포외액 중에서 평형상태를 유지하고 있다. 세포내 Ca는 세포외액의 약 1/1,000 정도를 유지하며 세포상호작용, 혈액응고, 신경전달, 근수축, hormone 자극 전달 등의 중요한 기능을 담당하고 있다³⁸⁾. 정상적으로 세포외액의 칼슘농도는 매우 정밀하게 조절되어 정상수치를 많이 벗어나지 않는데 골격은 세포외 Ca의 농도가 감소하면 Ca를 분비하고, 과량의 Ca는 다시 저장하는 칼슘 저장도로서의 역할을 담당하기 때문이다³⁹⁾. 혈청 Ca이 증가하는 경우는 세포외액의 분획에 Ca 조절계의 능력을 넘는 과잉 Ca 유입이 있는 경우나 부갑상선, 골, 신장 등에서 Ca의 농도 조절계 자체의 이상이 있을 때 발생하며 부갑상선 기능항진증, Vit D 중독, Ca의 장내흡수 증가, 골의 급격한 파괴, 급성 불용성 골위축의 경우나 Ca와 친화력이 큰 면역globulin이 병적으로 존재하는 경우에 혈청 Ca이 증가하는 것을 볼 수 있다³⁸⁾. 난소적출로 인한 골 교체율의 증가로 골질의 감소를 초래하여 혈중 Ca의 상승을 가져오게 하므로⁴⁰⁾, 혈중 Ca의 농도 변화는 골 흡수와 관계가 있다고 하였다. 그러나 본 실험에서 혈청 calcium 농도를 측정된 결과 normal군에 비하여 control군에서 혈청 calcium 농도가 감소하긴 하였으나 유의성 있는 정도는 아니었고, RF-HA군에서도 control군에 비해 혈청 calcium 농도를 정상화 하긴 하였으나 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.

Osteocalcin은 칼슘과 결합하는 Vit K 의존성 α -carboxyglutamic acid 단백질로서⁴¹⁾, 뼈모세포의 활성을 나타내는 데에 가장 민감하고 특이하다고 알려져 있으며, 골아세포에 의해 생성된다⁴²⁾. 골의 재형성 시 골아세포의 활성이 증가하며, 혈청 중 osteocalcin level이 높아지므로 골생성의 지표로 이용할 수 있다고 알려져 있다^{41,42)}. 한편 난소 적출 시 혈중 osteocalcin 함량의 증가는 골다공증을 평가하는 하나의 중요한 지표로 알려져 있는데⁴²⁾, 본 실험에서는 혈청 osteocalcin level을 ELISA를 이용한 결과 normal군에 비하여 control군에서 osteocalcin의 농도가 증가하여 난소적출로 인해 osteocalcin이 증가됨을 볼 수 있었으나 유의성은 없었다. 또한 RF-HA군에서 대조군에 비해 혈청 osteocalcin의 농도가 감소하였으나 유의성은 없었다.

인체 골격은 칼슘염의 침착에 의해 신장된 거친 유기기질로 구성되어 있는데, 평균적으로 경골은 30%의 기질과 70%의 염으로 이루어져 있고 새로 형성된 골격의 경우는 염에 비하여 기질의 함유량이 더욱 높다. 골격의 유기기질은 90~95%가 collagen 섬유로 이루어져 있고 그 나머지는 기반물질이라고 불리어지는 균일한 젤라틴 성분으로 이루어져 있다. 골격의 유기기질에 침착하는 결정성 염은 주로 Ca와 P로 구성되어 있으며 대부분의 결정성 염은 수산화인회석이다. 이런 이유로 경골 내의 Ca 및 P 함량을 측정하게 되었다.

Ca의 경우는 상기한 것과 같이 인체 전체 칼슘의 거의 대부분인 99% 이상이 골격에 저장된다. P(phosphorus)은 모든 세포의 중요한 구성성분이면서 에너지 대사, 근 수축, 조직으로의 산소공급 등에 관여하며³⁸⁾, 난소를 절제한 쥐에서는 골의 calcium 함량과 phosphorus 함량이 감소하며, 이러한 결과를 통하여 골 흡수가 증가된 것으로 볼 수 있는데³²⁾, 경골 내 Ca 및 P 함량 평가는 각 실험군의 경골을 회분하여 얻은 시료를 이용하여 경골 내 Ca 및 P 함량과 Ca/P ratio를 측정하였다(Table 2). 경골 내 Ca 및 P 함량의 평가에 있어 연령이 증가함에 따라 장관에서의 칼슘의 흡수가 감소한다고 알려져 있으며, 골다공증의 경우 장관에서 칼슘의 흡수율이 더욱 감소하여 실험 동물의 난소 적출 시에도 경골 내 칼슘 함량이 감소하는 것으로 알려져 있다²⁾. 본 실험에서 control군이 normal군에 비하여 calcium 함량이 유의하게 감소하였고, saline군에서는 control군에 비하여 calcium 함량이 유의하게 증가하였으며, 복분자약침군에서는 con-

trol군 및 saline군에 비하여 경골 내 calcium 함량이 유의하게 증가하여 복분자약침이 난소 적출로 인하여 감소된 Ca의 함량을 회복시키는 것으로 사료된다(Fig. 4).

경골을 회분한 뒤, 경골 내 Phosphorus의 함량을 측정했을 때는 control군이 normal군에 비해 경골 내 Phosphorus의 함량이 유의성은 없으나 감소한 것을 볼 수 있었다. 또한 RF-HA군에서 control군, NP군, saline군에 비해 경골 내 P의 함량이 유의하게 증가하여 복분자약침이 난소 적출로 인하여 감소된 Phosphorus의 함량을 회복시키는 것으로 생각되나, saline군에서도 역시 유의한 증가를 보인 것은 음극혈의 경혈 특이적인 반응으로 보이므로, 이에 대해서는 추후 연구가 더 필요할 것으로 사료된다(Fig. 5).

Bone의 Ca/P ratio는 bone condition과 관련되어 있으며, 특히 hypomineralization bone loss, aging 등에서 감소하며 또한 Ca와 P의 상대적 비율은 섭취하는 음식물에 따라 변할 수 있는데 일반적으로 무게를 기준으로 볼 때, Ca/P의 비율이 1.3~2.0이다³⁹⁾. control군에서 normal군에 비해 Ca/P 비율이 감소하였으나 유의성은 없었고, RF-HA군에서는 control군에 비해 유의한 변화가 없었다.

Osteoclast like cell은 골의 흡수 및 제거와 관련된 큰 다핵세포로서 부갑상선호르몬의 존재하에 크게 활성화되어 골 흡수와 세포외액으로의 Ca 및 P 방출을 증가시킨다⁴³⁾. 뼈를 녹이는 파골세포(osteoclast)가 뼈속에서 뼈를 녹이며 골수를 넓히는 한편, 뼈를 만드는 골아세포(osteoblast)는 밖에서 뼈를 만들어 뼈를 굳게 한다. 골절된 뼈를 유착시킬 때에도 이와 비슷한 방법을 이용한다⁴⁴⁾. 골격은 골아세포(Osteoblast)에 의하여 지속적인 침착이 일어나고 파골세포(Osteoclast)가 활성화된 부위에서는 지속적인 골격의 흡수가 일어나는데, 성숙되는 모든 골격에서 골아세포의 활성화도는 지속적으로 유지되며, 성장중인 골격을 제외하고는 골침착률과 골 흡수율은 동등하여 골격의 총량을 일정하게 유지한다³⁹⁾. 성인에서 골대사는 골세포의 한 종류인 파골세포(osteoclast)에 의한 골 흡수와 골아세포(osteoblast)에 의한 골 형성이 균형을 유지하면서 지속적으로 교체되는 재형성과정으로 유지되는데, 30~45세 이후 이러한 균형은 깨지고 골 흡수율이 골 침착률을 능가하게 된다. 난소적출 생쥐에서도 파골세포(osteoclast)가 증가한다¹⁹⁾. 이러한 과정은 폐경기 이후의 여성에서 시작하기도 하며, 과도한 골소실은 파골세포의 기능 증가와 혹은 조골세포의 기능 감소 때문에 일어날 수도 있다. 본 실험에서 경골 내

osteoclast like cell의 비율을 flow cytometry assay를 이용하여 측정한 결과 control군에서 MHCII+/CD115+ 세포의 비율은 5.47±0.4로 나타나 normal군의 2±0.079에 비하여 현저하게 증가하였으며, RF-HA군에서는 0.96±0.73으로 나타나 대조군(control), NP군 및 saline군에 비해 유의하게 감소하여 복분자약침의 파골세포 억제 효과를 기대할 수 있으리라 사료된다(Fig. 6, 7).

골은 형태학적으로 표면부위와 내면부위가 서로 달라, 표면은 두껍고 단단한 석회화 조직이고 안쪽은 골 조각을 영성하게 연결한 골수조직을 이루는데, 골 바깥쪽을 피질골(cortical bone)이라 하고 안쪽을 지주골(trabecular bone)이라고 한다¹⁹⁾. 골다공증은 조직학적으로 골피질이 얇아지고 골지주(trabecula)의 수량과 크기가 감소되며 하버시안 계(Haversian system, osteon)와 골수강(bone marrow cavity)이 넓어지는 소견을 보인다⁴⁵⁾. 또한 정상인 경우 지주골이 성장판에서 골수강 내로 길게 신장되어 있는데¹⁹⁾, Durbridge 등은 흰쥐에서 난소 제거술을 시행하여 지주골의 길이, 폭 및 지주골량이 유의하게 감소되었음을 보고한 바 있다⁴⁶⁾.

H&E(Hematoxylin and eosin)염색을 통해 관찰한 실험동물의 경골 조직 절편에서는 control군에서 normal군에 비해 골 내부에 pore가 많이 나타나고 지주골이 적게 분포하였고, RF-HA군에서는 control군, NP군 및 saline군에 비하여 pore의 생성이 감소되었으며, 지주골도 정상군(normal)과 유사하게 유지되었다(Fig. 8). 즉 복분자약침군에서 pore의 생성이 감소되고 지주골량도 정상군과 유사하게 유지되는 등 의미있는 결과를 확인 할 수 있었다.

역시 동일한 방법으로 염색하여 자동분석 프로그램을 이용하여 TBV(지주골량)을 측정하였는데, control군에서 normal군에 비해 지주골량(TBV)이 유의하게 감소하였으며 NP군 및 RF-HA군에서는 control군에 비하여 지주골량(TBV)이 증가하였으나 유의성은 없었으며, 지주골의 두께(TBT)는 normal군에 비해 control군에서 유의한 감소를 보였고, RF-HA군에서 control군, NP군 및 saline군에 비해 유의하게 증가하였다(Fig. 9).

Estrogen 등의 성호르몬은 남녀 모두에서 사춘기 골단 폐쇄에 중요한 역할을 하므로⁴⁷⁾, 난소 적출로 인해 성호르몬이 억제된 생쥐에서는 골의 길이 성장이 증가한다³⁵⁾. 본 실험에서도 흰쥐의 성장판 길이(growth plate length, GPL)를 측정한 결과 control군의 GPL이 normal군에 비해 유의하게 증가하였으며 RF-HA군에

서는 control군, NP군 및 saline군에 비해 GPL이 유의하게 감소하여 복분자약침이 골소실을 억제할 수 있을 것이라 생각되나 향후 성호르몬과의 관계에 대해 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다(Fig. 10).

이상의 결과에서 난소적출로 골다공증이 유도된 흰쥐의 陰谷穴에 시술한 복분자약침은 혈청 내 Phosphorus 농도를 감소시키고, 경골 내 P와 Calcium 함량의 증가, 경골 내 osteoclast like cell의 비율 감소 및 조직학상에서도 지주골 두께의 증가, 성장판의 길이를 감소시키는 등 골다공증을 유의하게 회복시키는 것 등을 확인할 수 있었다. 그 중 특히 혈청 내 P를 감소시키고, 경골 내의 P를 증가시킨 것은 기존의 골다공증에 관한 연구에서는 찾아 보기 어려운 특징적인 소견으로, 이에 관하여는 복분자의 약리적인 특성과 인체 내 P의 대사와의 관계에 대해 상세한 기전연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

陰谷에 시술한 복분자약침(RF-HA)이 난소적출 흰쥐의 골다공증에 미치는 영향을 알아보기 위하여 흰쥐의 체중, 자궁 무게 및 자궁 비중, 경골 길이 및 경골 회분 함량, 골밀도, 혈청 내 ALP, Creatinine, Phosphorus, Calcium, Osteocalcin, 경골 내 Calcium 및 Phosphorus 함량, osteoclast like cell의 분석, H&E 염색, TBV, TBT, GPL등을 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 음곡 복분자약침은 혈청 내 Creatinine, Phosphorus의 농도를 유의하게 감소시켰다.
2. 음곡 복분자약침은 경골 내 Calcium, Phosphorus 함량을 유의하게 증가시켰다.
3. 음곡 복분자약침은 경골 내 Osteocalst like cell을 유의하게 감소시켰다.
4. 음곡 복분자약침은 조직학적 변화상 지주골의 두께를 유의하게 증가시켰고, 경골 내 성장판의 길이를 유의하게 감소시켰다.

이상의 결과로 복분자 음곡 약침은 난소적출 흰쥐의 골다공증에 유효한 것으로 생각되며, 향후 지속적인 연구와 임상응용이 필요할 것으로 사료된다.

V. 참고문헌

1. 한방여성의학 편찬위원회. 한방여성의학 I. 서울 : 정담. 2007 : 239-40.
2. 해리슨번역편찬위원회. HARRISOM'S 내과학. 서울 : 정담. 1997 : 2310-21, 2342-3.
3. 고석봉, 이광희, 곽양수, 이두진, 박윤기, 이승호. 폐경기증상과 양측 난소제거술이 골밀도에 미치는 영향. 대한산부회지. 1994 ; 37(10) : 2037-46.
4. 한방재활의학과학회. 한방재활의학과학. 서울 : 군자출판사. 2003 : 4, 105-6.
5. 강성실, 박영배, 안현석. 골다공증의 침구치료에 관한 문헌적 고찰. 대한침구학회지. 1995 ; 15(2) : 171-89.
6. 金貞娟, 宋勇善. 骨多孔症에 對한 東西醫學的 考察. 韓方再活醫學學會誌. 1996 ; 6(1) : 293-315.
7. 전국한의과대학 본초학교실 공편저. 本草學. 서울 : 永林社. 1994 : 630-1.
8. 민경현, 조한백, 김중단, 김철원, 유심근. 청아환가미가 난소적출 백서의 골다공증에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2001 ; 14(1) : 58-72.
9. 安德均, 沈相度. 鹿茸이 卵巢摘出로 유발된 흰쥐의 骨多孔症에 미치는 영향. 大韓本草學會誌. 1998 ; 13(1) : 1-23.
10. 육태한, 이창현, 이학인. 紅花子, 鹿茸, 紫河車 藥鍼이 骨多孔症에 미치는 影響. 대한침구학회지. 2001 ; 18(1) : 61-7.
11. 전국한의과대학 침구경혈학교실 편저. 鍼灸學(上). 서울 : 집문당. 2001 : 546.
12. 임윤경, 김태한, 이지영. 대학 경락경혈학 실습. 대전 : 오비기획. 2007 : 27-8.
13. 한인권, 박원근, 최용환, 신현진, 김선우. 한국인 갱년기 여성의 골밀도 및 호르몬 변화에 관한 연구. 대한내분비학회지. 1989 ; 4(1) : 21-8.
14. 석세일, 이춘기, 강홍식, 이지호, 민학진, 차상훈, 정용진. 골조송증에서의 척추 골절. 대한정형외과학회지. 1993 ; 28(3) : 980-7.
15. 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울 : 최신의학사. 1992 : 13-4, 81-2.
16. 윤혜숙, 장일무. 전통약물로부터 신약 개발 연구법. 서울 : 서울대학교 천연물과학연구소. 1992 : 78-84.
17. 한인권. 폐경기 골다공증의 약물치료. 제12차 대한내분비학회 추계학술대회 1993 : 55-61.
18. Mezquita Raya P, Munoz Torres M, Lopez Rodriguez F, Martinez Martin N, Conde Valero A, Ortego Centeno N, Gonzalez Calvin J, Raya Alvarez E, Luna Jd Jde D, Escobar Jimenez F. Prevalence of vitamin D deficiency in populations at risk for osteoporosis: impact on bone integrity. Med Clin (Barc). 2002 ; 119(3) : 85-9.
19. 대한골대사학회. 골다공증(골조송증). 서울 : 최신의학사. 1991 : 3-7, 11, 27-36, 47-56, 60-3, 69-79.
20. 杜鎬京 編著. 東醫腎系學. 서울 : 財團法人 東洋醫學研究院. 1992 : 255, 334, 654-60.
21. 하승우. 골다공증(골다공증의 치료: 골 흡수 억제제). 대구 : 경북대학교병원. 1995 : 51-5.
22. 이형우. 골다공증(골다공증의 치료: 골 형성 촉진제 및 대증요법). 대구 : 경북대학교병원. 1995 : 56-64.
23. 조수현. 폐경과 골다공증. 대한의학협회지. 1992 ; 35(5) : 587-98.
24. 강병문. 골다공증 치료의 의학약제와 대체 약물의 비교. 대한산부회지. 2006 ; 49(12) : 2459-73.
25. 임승길. 골다공증 연구의 최근 동향. 생화학분자생물학뉴스. 2002 ; 22(3) : 270-6.
26. 홍원식 역. 교감직역황제내경소문. 서울 : 진통문화연구회. 1994 : 40-50, 62-8, 97-108, 150-3.
27. 홍원식. 교합편찬 정교황제내경소문. 서울 : 동양의학연구원. 1981 : 11, 24.
28. 송병기. 한방부인과학. 서울 : 행림출판사. 1994 : 34-5, 55-6, 193-7.
29. 김정화, 김철희, 김효성, 권민철, 송영규, 성낙술, 이승은, 이재선, 권오웅, 이현용 등. 복분자와 당귀 열수추출물의 마우스를 이용한 항암 및 항스트레스 효과. 韓藥作誌. 2006 ; 14(4) : 206-11.
30. 김봉수, 박용기, 강병수. 복분자류가 백서의 배란과 난소에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2001 ; 16(1) : 139-52.
31. Dike N Kalu, Bahran H Arjmandi, Chung Ching Liu, Mohammed A Salih and Roger S Birnbarum. Effects of ovariectomy and estrogen on the serum levels of insulin-like growth factor binding protein-3. Bone and mineral. 1994 : 25 : 135-48.
32. Yamazaki I, Yamazaki H. Characteristics of an

- ovarectomized osteopenic rat model. *J Bone Miner Res.* 1989 ; 4(1) : 13-22.
33. 정국영 외. 인삼이 난소적출로 유발된 흰쥐의 골다공증 예방에 미치는 효능. *대한본초학회지.* 2004 ; 19(1) : 1-11.
34. 이환모, 한수봉, 박병문. 백서의 난소제거술 후 발생한 골조송증에 대한 Calcitonin의 효과. *대한정형학회지.* 1992 ; 27(2) : 577-82.
35. Falahati-Nini A, Riggs BL, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Eastell R and Khosla S. Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men. *J Clin invest.* 2000 ; 106 : 1533-60.
36. 김덕윤. 골 형성의 생화학적 표지자. *대한골대사학회지.* 1994 ; 1(1) : 233-9.
37. 대한내과학회 편. *Harrison's 내과학 16th edition.* 서울 : 도서출판 MIP. 2006 : 2481-92.
38. 이귀녕, 권오현. *임상병리과일.* 서울 : 의학문화사. 2003 : 102-5, 300-8, 328-31, 425-7, 734-6.
39. Arthur C Guyton, John E Hall. *의학생리학.* 서울 : 정담. 2002 : 1050-3.
40. Yeh JK, Aloia JF, Barilla ML. Effects of 17 β -estradiol replacement and treadmill exercise on vertebral and femoral bones of the ovariectomized rat. *Bone and Mineral.* 1994 ; 24(3) : 223-34.
41. Abadjieva DK and 강성길. 녹용약침 자극이 난소적출 흰쥐의 지질 및 골대사에 미치는 영향. *대한한의학회지.* 1996 ; 17 : 168-77.
42. 한병권, 박원근, 최태환, 신현우, 김선우. 한국인 갱년기 여성의 골밀도 및 호르몬 변화에 대한 연구. *대한내분비학잡지.* 1989 ; 4 : 21-8.
43. 이우주. *영한의학사전.* 서울 : 도서출판 아카데미서적. 1990 : 1738.
44. 김우겸. *인체의 생리.* 서울 : 도서출판 생명의 이치. 1995 : 245.
45. *대한정형외과학회. 정형외과학 5판.* 서울 : 최신의학사. 2001 : 152-6.
46. Durbidge TC, Morris HA, Parsons AM, Parkinson IH, Moore RJ, Porter S, Need AG, Nordin BE, Vernon-Roberts B. Progressive cancellous bone loss in rats after adrenalectomy and oophorectomy. *Calcif Tissue Int.* 1999 Dec ; 47(6) : 383-7.
47. 백승훈, 김신윤. 골다공증의 병인론. *대한고관절학회지.* 2006 ; 18(4) : 386-96.