

음곡(KI10) 금앵자 약침이 난소적출 생쥐의 골다공증에 미치는 영향

김동수 · 김정호 · 김영일

대전대학교 한의과대학 침구학 교실

Received : 09. 10. 29

Accepted : 09. 11. 12

Key Words:

Osteoporosis, Herbal-acupuncture, Rosae Laevigatae Fructus, KI10(Umgok)

Effects of Herbal-Acupuncture with Rosae Laevigatae Fructus Extract at KI10(Umgok) on Osteoporosis in Ovariectomized Mice

Kim Dong-soo, Kim Jeoung-ho, Kim Young-il

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

ABSTRACT

Objective & Methods : The purpose of this study was to observe the effects of herbal-acupuncture with Rosae Laevigatae Fructus extract(RLF-HA) at KI10(Umgok) on osteoporosis in ovariectomized(OVX) ddy mice. We carried out several experimental items to analyze the changes in body weight, uterine weight, uterus index, tibial length, the ash bone weight, tibial BMD, serum ALP, serum osteocalcin, serum Ca, and the levels of Ca, P, Ca/P ratio in tibia, and we performed histological and histomorphological analysis as well.

Results :

1. Herbal-acupuncture with Rosae Laevigatae Fructus at KI10(Umgok) and saline injection at KI10(Umgok) significantly inhibited the reduction of tibial calcium level in ovariectomized mice.
2. Herbal-acupuncture with Rosae Laevigatae Fructus at KI10(Umgok) significantly inhibited the increase of tibial osteoclast cells in ovariectomized mice.
3. Herbal-acupuncture with Rosae Laevigatae Fructus at KI10(Umgok) significantly inhibited the reduction of tibial trabecular bone thickness(TBT) in ovariectomized mice.
4. Herbal-acupuncture with Rosae Laevigatae Fructus at KI10(Umgok) significantly inhibited the overgrowth of tibial growth plate length(GPL) in ovariectomized mice.

Conclusion : These results suggested that herbal-acupuncture with Rosae Laevigatae Fructus at KI10(Umgok) has a therapeutic effect on osteoporosis, and to be put to practical use in the future osteoporosis clinic.

I. 서론

우리나라에서는 평균 수명의 증가에 따라 노인 인구가 증가하여 1960년에 노인 인구 비율이 2.9%이었으나 2005년에는 9.1%로 세배 이상 증가하였는데, 骨多孔症은 연령증가에 비례하여 발병률이 상승하는 대표적인 질환으로, 骨多孔症으로 인한 고관절 및 척추골 골절은 직접 사

망의 원인이 되기도 하며 심각한 장애가 동반되고 많은 의료비가 소모되며 합병증이 흔히 병발되어 현재 전 세계적으로 관심이 높아지고 있다¹⁾.

韓醫學 文獻에서는 骨多孔症이라는 病名은 찾을 수 없었으나 骨의 危弱한 상태를 나타내는 骨痿, 骨痺, 骨枯,

*Corresponding author : Kim Young-il, Dae-jeon Uni. Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Daejeon University. 1136 Dunsandong Seogu Daejeon, Korea
Tel. +82-42-470-9137 E-mail: omdkim01@djju.ac.kr

骨極이라는 病名이 骨多孔症과 가장 유사하고, 이들 병증은 腎虛에 의한 骨髓不足에 기인한다고 하였다²⁾.

금앵자(*Rosae laevigata fructus*)는 장미과에 속한 금앵자나무의 성숙한 과실을 건조한 것으로 性味는 平, 無毒, 酸澁하고 歸經은 腎, 膀胱, 大腸이며 固精, 縮尿, 止帶하는 효능이 있다³⁾.

陰谷(KI10)은 足少陰腎經의 經穴로 足少陰의 合水穴이며 滋補肝腎의 효능이 있어 腎虛에 의한 骨髓의 부족으로 인한 각종 증상을 主治한다⁴⁾.

骨多孔症과 관련된 한의학적 연구로는 右歸飲 등⁵⁻⁷⁾의 한약복합처방과 熟地黃 등⁸⁻¹⁰⁾의 單味劑에 관한 연구가 있었고, 五加皮 등¹¹⁻¹³⁾의 藥鍼에 관한 연구가 있었고, 金櫻子를 이용한 연구로는 항산화효과와 혈액성상에 관한 연구¹⁴⁻¹⁶⁾는 있었으나, 金櫻子를 이용한 骨多孔症 연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 생쥐의 난소를 적출하여 骨多孔症을 유도하여 金櫻子 藥鍼을 흰쥐의 陰谷에 해당하는 부위에 시술한 후 체중변화, 자궁무게, 자궁비중, 경골길이, 골밀도 측정, 혈청내 ALP, creatinine, phosphorus, calcium, osteocalcin, 경골내 calcium, phosphorus, Ca/P ratio, osteoclast like cell 분석, 경골의 조직학적분석 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℃)을 유지하여 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 藥材

실험에 사용된 금앵자(*Rosae laevigata fructus*)는 대전대학교 부속한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

3) 시약 및 기기

(1) 시약 (Table 1)

(2) 기기 (Table 2)

2. 방법

1) 약침액의 제조

분쇄기를 이용해서 금앵자 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 95% ethyl alcohol 30ml를 가하여, 실온에서 교반한 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator로 감압농축한 후, 농축액을 다시 여과하였다. 이 여과액에 85% ethyl alcohol 30ml를 가하여 잠시 교반 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 여과액에 75% ethyl alcohol 30ml를 가하고 교반한 후 방치하였다가 다시 여과하는 조작을 2회 반복하였다. 여과액중의 ethyl alcohol 성분을 rotary evaporator로 감압 제거하고, 남은 농축액이 20ml가 되게 하였다. 금앵자 55g으로부터 얻은 금앵자 약침액을 감압농축하여 수분을 모두 날렸을 때 분말 수율은 7.85g이었다(수득율 14.27%). 1N NaOH를 이용하여 농축액을 pH 6.8이 되도록 조절하고, 4℃에서 12시간 방치한 후, 침전물을 제거하기 위해 syringe filter를 실시하였다. 여과된 농축액에 PBS를 첨가하여 5%로 희석하여 약침액으로 사용하였다.

2) 세포독성 측정

정상 ddy mice의 골세포 1 × 10⁵ cell/well에 5%, 1%, 0.5%의 금앵자 약침액을 처리한 후 MTT assay를 이용하여, 세포 생존률을 측정하였다.

(1) Osteoblast cell 분리 및 배양

정상 ddy mice의 경골과 대퇴골을 적출하였다. 차가운 PBS에 담귀 근육을 제거하고, 깨끗한 PBS를 syringe에 넣어 골 내부로 침투시켜, 골세포들을 1200rpm에 5분간 원심 분리하였다. 상층액은 버리고, 침전된 골세포들은 MSC osteogenic singleQuotes를 첨가한 differentiation 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 1×10^5 cells/well으로 분주하고, MSC osteogenic singleQuots를 첨가한 differaentiation Basal medium (Cat No. PT-3924, Lonza, USA)에 금앵자 약침액을 농도별로 처리하고, 72시간동안 세포 배양을 실시하였다. 72시간 후에, MTT solution (5mg/ml, Cat No. 135038, Sigma, USA)을 각 well에 20 μ l씩 분주하고 5시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 incubation을 실시하였다. 5시간 후, 각 well에 있는 medium을 100 μ l씩 버리고, solubilizing solution을 100 μ l씩 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(scheme 1).

4) 取穴

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

5) 실험군 분류 및 처치

실험군은 ddy 생쥐 9마리씩을 한 군으로하여 정상군(normal), 위수술군(sham-OVX), 대조군(control), HG군(hand grasping), NP군(needle prick), saline군(saline injection), 금앵자약침군(RLF-HA)의 7군으로 나누었다.

정상군(normal)은 아무 처치도 하지 않았고, 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 않았으며 HG군은 난소적출 후, 약침 처치시와 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 주입하였다. 금앵자약침군(RLF-HA)은 난소적출 후, 음곡(KI10) 상응부위에 5%의 금앵자약침액(RLF-HAS) 0.2ml를 주입하였다. N.P.군, saline군, 금앵자약침군은 모두 난소적출 4주 이후부터 8주간 주 3회 실험동물의 後肢에서 음곡(KI10) 상응부위를 매 시술시마다 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 자궁 무게를 측정하여 기록하였다. 자궁비중은 실험동물의 몸무게에 대한 자궁무게의 백분율로 계산하였다.

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

(3) 경골 길이 측정 및 경골 회분 분석

실험 종료 후, 각 실험동물의 경골을 적출하여 경골의 길이를 측정하였다. 경골을 120 $^{\circ}$ C에서 8시간 동안 건조시킨 후, furnace(Lab companion, Korea)에서 800 $^{\circ}$ C에서 6시간 동안 가열하여 탄화한 뒤 경골 회분 무게를 측정하였다. 탄화된 골을 HCl 500 μ l에 완전히 용해시키고, 용해된 탄화 골 200 μ l에 증류수를 10ml 첨가하여 희석한 다음, 탄화 골의 단위 무게 당 칼슘(Ca)과 인(P)의 양을 측정하여 mg/g 단위로 나타내었다. 칼슘과 인의 비율 Ca/P ratio(%)은 다음의 공식을 이용하여 계산하였다.

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

(4) 골밀도 측정

실험 종료 후, 각 실험군의 실험동물의 경골을 적출하여 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 골밀도를 측정하였다.

(5) 혈청 분석

실험 종료 후, ethyl ether를 이용하여 실험동물을 마취하고, 심장 채혈 법으로 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 2×10^6 cell/vial로 FACs전용 tube에 분주한다. 골세포 중 osteoclast like cell의 비율을 확인하기 위하여 표식항체 MHC II 와 CD115를 반응시켜 flow cytometry로 분석하였다.

(7) 경골의 조직학적 분석

① H&E 염색

실험 종료 후, 각 군의 실험동물의 경골을 절취하여, 10%의 formalin에 고정하였다. 고정한 조직을 (주)바이오 투스텍(오창, 한국)에 의뢰하여 microtome을 이용하여 5 μ m으로 절편하고 H&E 염색을 실시하였다.

② Histomorphometry

H&E 염색한 조직을 형광현미경(ECLIPSE E600)을 이용하여 관찰한 후, digital camera(DXM 1200F)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)는 자동 조직분석 프로그램(I-solution)을 이용하여 측정하였다.

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

7) 통계분석

실험 결과는 각 실험군에서 얻은 데이터의 평균과 표준편차로 나타내었다. 데이터 분석 결과, 위수술군(sham-OVX)과 HG군은 normal군과 유의한 차이를 나타내지 않아, 본 논문의 실험에서는 위수술군과 HG군을 제외하고 통계처리 하였다. 각 실험군의 결과값은 SPSS(14.0 KO) 통계프로그램을 사용하여 비교하였다. 정상군과 대조군의 평균비교에는 대응 t-test를 사용하였고, 대조군과 나머지 실험군의 평균비교에는 ANOVA test를 사용하였으며, 사후검정은 Scheffé's test를 이용하였다. 각 실험군의 결과값을 비교하여 신뢰도 95%이상($p < 0.05$)일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 성적

1. 금앵자 약침액의 세포 독성

정상 생쥐로부터 얻은 골세포 중 조골세포만을 취하여 금앵자 약침액을 여러 가지 농도로 처리한 후 세포생존율을 확인하였다. 금앵자 약침액을 처리한 경우 control군에 비하여 조골세포의 생존율이 농도에 의존적으로 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 1).

2. 골다공증 평가

1) 체중 변화

실험동물의 몸무게를 주 1회 측정하였다. 몸무게 변화는 군간 유의한 차이가 없었다.

2) 자궁 무게

실험 종료 후, 실험동물의 자궁을 적출하여 무게를 측정하였으나 자궁 무게에 유의한 변화가 없었다.

3) 자궁비중

실험동물의 몸무게에 대한 자궁 무게의 백분율을 계산하였는데 유의한 변화가 없었다.

4) 경골 길이

실험 종료 후, 실험동물의 경골을 적출하여 길이를 측정하였으나 유의한 차이는 없었다.

5) 골밀도 측정

실험 종료 후, 실험동물의 경골을 적출하여, 골밀도를 측정하였으나 유의한 변화가 없었다.

3. 혈청 분석

각 실험동물의 혈청으로부터 ALP, creatinine, phosphorus, calcium, 및 osteocalcin의 농도를 측정하였다

1) Alkaline phosphatase(ALP)

각 실험동물에서 취한 혈청에서 ALP의 농도를 측정하였다. Normal군에 비하여 control군에서 혈청 ALP가 유의하게 증가하였다. RLF-HA군에서 control군에 비하여 혈청 ALP가 감소하였으나, 통계적 유의성은 없었다.

2) Creatinine

각 실험동물에서 취한 혈청에서 creatinine의 농도를 측정하였다. Normal군에 비하여 control군에서 creatinine의 농도가 유의하게 증가하였으며, RLF-HA군에서 control군 및 saline군에 비하여 creatinine의 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 2).

3) Phosphorus

각 실험동물에서 취한 혈청에서 phosphorus의 농도를 측정하였다. Normal군에 비하여 control군에서 phosphorus의 농도가 약간 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다. RLF-HA군에서 control군에 비하여 phosphorus의 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 3).

4) Calcium

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

5) Osteocalcin

각 실험동물에서 취한 혈청에서 osteocalcin 농도를 ELISA를 이용하여 측정하였다. 각 실험군의 혈청 osteocalcin의 농도는 유의적 차이가 없었다.

4. 경골 회분 분석

각 실험군의 경골을 회분하여 얻은 시료를 이용하여 경

골 내 Ca 및 P 함량과 Ca/P ratio를 측정하였다.

1) 경골 회분 무게

실험 종료 후, 실험동물의 경골을 태워 경골 내 회분 함량을 측정하였으나 유의적 차이는 없었다.

2) Calcium

각 실험군에서 취한 경골을 회분한 뒤, 경골 내 calcium의 함량을 측정하였다. Saline군 및 RLF-HA군에서는 control군 및 NP군에 비하여 calcium 함량이 유의하게 증가하였다(Fig. 4).

3) Phosphorus

각 실험군에서 취한 경골을 회분한 뒤, 경골 내 phosphorus의 함량을 측정하였다. RLF-HA군에서는 control군에 비하여 경골 내 phosphorus 함량이 유의하게 증가하였다(Fig. 5)

4) Ca/P ratio

각 실험군에서 취한 경골을 회분한 뒤, 경골 내에서 calcium과 phosphorus의 비율을 측정하였으나 유의한 차이가 나타나지 않았다.

5. 경골 내 osteoclast like cell 분석

경골 내 osteoclast like cell의 비율을 flow cytometry assay를 이용하여 측정하였다. Control군에서 MHCII⁺/CD115⁺세포의 비율은 5.47 ± 0.4 로 나타나 normal군의 2 ± 0.079 에 비하여 현저하게 증가하였으며, RLF-HA군에서는 1.49 ± 0.5 로 나타나 control군, NP군 및 saline군에 비하여 감소하였다.

경골 내 osteoclast like cell의 비율을 flow cytometry assay로 측정하여 군간 비교한 결과, control군에서 osteoclast like cell 비율은 normal군에 비하여 유의하게 증가하였으며, RLF-HA군에서는 control군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 6).

6. 경골의 조직학적 분석

1) H&E(Hematoxylin and eosin) 염색

실험동물의 경골조직을 절편하여 H&E 염색을 실시하

였다. RLF-HA군에서는 control군, NP군 및 saline군에 비하여 pore의 생성이 감소되었으며, 지주골도 normal군과 유사하게 유지되었다(Fig. 7)

2) Histomorphometry

(1) TBV(Trabecular Bone Volume, 지주골량)

실험동물의 경골조직을 절편하여 H&E 염색을 한 후, 자동분석 프로그램을 이용하여 TBV를 측정하였으나 통계적 유의성은 없었다.

(2) TBT(trabecular bone thickness, 지주골의 두께)

실험동물의 경골조직을 절편하여 H&E 염색을 한 후, 자동분석 프로그램을 이용하여 TBT를 측정하였다. Control군에서 normal군에 비하여 TBT가 유의하게 감소하였으며, RLF-HA군에서는 control군에 비하여 TBT가 유의하게 증가하였다(Fig. 8).

(3) GPL(growth plate length, 성장판의 길이)

실험동물의 경골조직을 절편하여 H&E 염색을 한 후, 자동분석 프로그램을 이용하여 GPL를 측정하였다. RLF-HA군에서 control군에 비하여 성장판의 길이가 유의하게 감소하였다(Fig. 9).

IV. 고찰

뼈는 손상되었거나 오래된 뼈를 새로운 뼈로 대체하는 골의 재형성과정을 통해 건강한 상태로 유지된다. 조골세포는 새로운 뼈를 생성하는 골생성 과정에, 파골세포는 낡은 뼈를 파괴하는 골흡수에 관여하는데, 폐경 후에는 골 흡수 정도가 골 생성 정도보다 많아져 골 손실을 유발하게 된다¹⁷⁾.

세계보건기구(WHO)는 骨多孔症을 “골량의 감소와 미세구조의 이상을 특징으로 하는 전신적인 골격계질환으로, 결과적으로 뼈가 약해져서 부러지기 쉬운 상태가 되는 질환”으로 정의하고 있다¹⁸⁾.

骨多孔症의 주된 임상적 합병증은 척추와 손목, 골반, 상완골 및 경골의 골절이다. 척추 골절의 가장 흔한 증상은 허리통증과 척추의 기형이다. 요통 이외에는 뚜렷한 자각증상이 없이 점진적으로 진행되어 골 기형이나 골절이 발생한 후에야 병원을 찾게 되는 경우가 많으므로 조기진단과 치료가 어려운 실정이다¹⁷⁾.

骨多孔症의 치료 약제로 미국 FDA의 승인을 받은 것은 bisphosphonate, 선택적 estrogen 수용체 조절제인 raloxifene, calcitonin과 부갑상선 호르몬인 teriparatide가 있으며 WHI 연구가 발표된 이후 호르몬제의 장기적 안정성에 대한 문제로 인해 estrogen의 경우 骨多孔症의 예방 약제로만 승인되었다¹⁹⁾.

이러한 약재들은 속쓰림, 嘔逆, 嘔吐, 潰瘍등의 소화기 자극 증상이나, 안면홍조, 관상동맥 질환의 위험도 증가, 유방암, 뇌졸중, 혈전 색전증 등의 유발 가능성 등의 부작용 뿐만 아니라 부갑상선 호르몬 제제의 경우는 치료기간이나 용량에 대한 연구가 아직까지 부족한 실정이다²⁰⁾.

骨多孔症에 대하여 한의학에서는 질환명은 없으나 《素問·五臟生成論》²¹⁾에서 “腎之合骨也”, 《素問·陰陽應象大論》²¹⁾에서 “腎生骨髓”의 표현에서 보듯이 腎이 骨과 骨髓을 주관하는것을 알 수 있다.

《素問·痿論》²¹⁾에 “腎氣熱, 則腰脊不舉, 骨枯而髓減, 發爲骨痿. 故下經曰, 骨痿者, 生於大熱也.”라고 하여 腎氣熱과 腎氣虛損이 발생원인이며 骨枯而髓虛하여 발생된다고 하였고 坐不能起, 腰脊不舉, 肌膚削而形羸瘦, 腰膝疼痛 등의 증상을 나타내는데 이는 骨多孔症과 매우 유사한 발병기전을 가진다고 하겠다.

《素問·痺論》²¹⁾에 “風寒濕三氣雜至, 合而爲痺也, ... 帝曰, 其有五者 何也? 岐伯曰, 以冬遇此者爲骨痺,”라 하여 五痺중의 일종으로 骨痺의 임상증상은 骨重不可舉, 骨髓酸痛, 舉節不用而痛으로 骨多孔症의 주요 임상표현인 腰背痛과 일치한다.

이상의 骨病과 腎과의 관계에서 한의학의 腎기능계가 현대의학의 내분비계통의 개념을 포함한다고 할 때³²⁾ 골 질환에 관한 한의학적 병리기전이 골다공증의 현대학적 병태생리와 유관하다고 볼 수 있으며 골다공증의 원인이 腎虛에 의한 骨髓不足에 기인한다고 사료된다²⁾.

藥鍼療法은 침자극과 약물을 결합시킨 新鍼療法으로서 이는 經絡學說에 의거하여 운용된 약물을 유관부위, 압통점, 혹은 체표에 촉진으로 나타나는 양성 반응점에 주입함으로써 생체의 기능을 조절하고 병리상태를 개선시켜 질병을 치료하는 방법이다²²⁾.

陰谷(KI10)은 足少陰腎經의 經穴로 膝下內輔骨後大筋下 小筋上에 위치한다⁴⁾. 足少陰의 合水穴이며 自性穴로서, 滋補肝腎의 효능이 있어 腎虛에 의한 骨髓의 부족으로 인한 骨多孔症 및 股關節痛, 膝關節炎, 膝不能屈伸, 膝股內側痛등을 主治한다⁴⁾.

금앵자(*Rosae laevigata fructus*)는 刺梨子, 山石榴,

山雞頭子라고도 불리우며 性味는 平, 無毒, 酸澁하고 歸經은 腎, 膀胱, 大腸이며 固精, 縮尿, 止帶하는 효능으로 遺精, 遺尿, 崩漏, 帶下, 陽痿, 滑泄, 疝氣등에 활용되고 있다^{23,24}. 久服하면 養精, 益腎, 五臟을 고르게 하며 活血하므로 얼굴이 좋아지고 늙지 않고 몸을 가볍게 해준다²⁵ 하여, 元氣回復, 精力補強 등에 널리 응용된다²⁶.

이에 저자는 금앵자 약침이 骨多孔症에 미치는 영향을 알아보고자 흰쥐의 난소를 적출하여 骨多孔症을 유도한 후 금앵자 약침을 흰쥐의 陰谷에 해당하는 부위에 시술한 후 체중변화, 자궁무게, 자궁비중, 경골길이, 골밀도 등을 측정하고, 혈청내 ALP, creatinine, phosphorus, calcium, osteocalcin, 경골내 calcium, phosphorus, Ca/P ratio, osteoclast like cell 분석, 경골의 조직학적 분석 등을 시행하였다.

금앵자 약침액의 독성을 평가하기 위해 정상 생쥐로부터 얻은 골세포 중 조골세포만을 취하여 금앵자 약침액을 여러 농도로 처리한 후 세포생존율을 확인한 결과 0.5%, 1%, 5%의 금앵자 약침액(RLF-HA)을 처리한 경우 control군에 비하여 조골세포의 생존율이 농도에 의존적으로 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 1). 이에 5% 금앵자 약침액을 본 실험에 사용하였다.

실험동물의 몸무게를 주 1회 측정된 결과 군간 유의한 차이가 없는 것으로 보아 음곡 금앵자 약침은 난소 적출로 인한 체중증가에 유의한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 또한 실험 종료 후, 실험동물의 자궁 무게, 경골의 길이와 골밀도를 측정된 결과 유의한 변화를 나타내지 않아, 음곡 금앵자 약침이 자궁을 위축시키는 기능, 경골의 길이 증가 및 골밀도감소에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

골의 재형성률 즉, 골형성과 골흡수의 속도 평가를 위해 혈액과 소변을 통한 일부 생화학적 검사들이 이용되고 있는데 이들 검사는 어느 한 시점에서 골재형성의 전반적인 상태를 측정한다²⁷. ALP는 폐경후에 증가하며, 폐경 후 골다공증 환자에서는 더욱 상승한다. 따라서 이것은 골형성 활동의 유용한 지표가 된다²⁸⁻³⁰. Creatinine은 정상인에서 일정한 속도로 근육으로부터 유리되고 있어 농도는 항상 일정하게 유지된다. 오직 신장을 통해서만 체외로 배설되므로 요중 배설율은 체내의 creatinine 생성율과 동일하며, 이 수치로 사구체 여과율의 감소 정도를 예측할 수 있다³¹. Phosphorus는 폐경 후 여성에게는 정상 성인에 비하여 약간의 증가가 일어난다^{32,33}. 골 흡수시 phosphorus농도는 상승하므로 골대사와 밀접한 관련이

있다³⁴. Osteocalcin은 골의 재형성시에 농도가 높아지므로²⁹ 최근에 골형성의 생화학적 지표로 여러 가지 대사성 골질환에서 측정되고 있다³⁴.

본 실험에서 음곡 금앵자 약침은 혈청 ALP, phosphorus, calcium, osteocalcin의 측정에서는 통계적 유의성이 없었고, 혈청 creatinine의 증가를 유의하게 감소시켰으나 골다공증의 치료와는 직접적인 연관은 없다고 사료된다.

인체 골격은 칼슘염의 침착에 의해 생성된 거친 유기 기질로 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 calcium과 phosphorus으로 구성되어 있으며 대부분의 결정성 염은 수산화인회석이다. 난소를 절제한 쥐에서는 골의 calcium 함량과 phosphorus 함량이 감소하며, 이러한 결과를 통하여 골흡수가 증가된 것으로 볼 수 있다³⁵. Osteoclast like cell은 골의 흡수 및 제거와 관련된 큰 다핵세포로서 부갑상선호르몬의 존재 하에 크게 활성화되어 골 흡수와 세포 외액으로 calcium 및 phosphorus의 방출을 증가시킨다³⁶.

본 실험에서 음곡 금앵자 약침은 경골내 회분 함량, phosphorus, Ca/P ratio 를 측정된 결과 통계적 유의성은 없었고, RLF-HA군과 saline군에서는 경골내 calcium의 감소를 유의하게 억제시켜 골소실의 억제에 효과가 있는 것으로 나타났고, RLF-HA군은 osteoclast like cell의 비율의 증가를 억제시켜 골흡수의 억제에 효과가 있는 것으로 나타났다.

또한 실험동물의 경골조직을 절편하여 H&E 염색을 실시한 결과, RLF-HA군에서는 control군, NP군 및 saline군에 비하여 pore의 생성이 감소하였으며, 지주골도 normal군과 유사하게 유지되었다(Fig. 7). 같은 방법으로 염색을 한 후, 자동분석 프로그램을 이용하여 TBV와 TBT를 측정된 결과, TBT는 control군에서 RLF-HA군에서는 control군에 비하여 TBT가 유의하게 증가하였다(Fig. 8).

Estrogen 등의 성호르몬은 남녀 모두에서 사춘기 골단 폐쇄에 중요한 역할을 하므로³⁷ 난소적출로 인해 성호르몬이 억제된 생쥐에서는 골의 길이 성장이 증가한다³⁸. 자동분석 프로그램을 이용하여 GPL을 측정된 결과,

RLF-HA군에서는 control군에 비하여 GPL이 유의하게 감소하였다(Fig. 9).

본 실험에서 음곡 금앵자 약침은 난소 적출로 인한 TBV의 감소와 TBT의 감소를 억제시켰으나 TBV의 측정은 통계적 유의성은 없었고, GPL의 증가를 유의하게 억제시켜 유사 estrogen 작용으로 골소실을 억제시킬수 있을 것이라 사료된다.

이상의 실험 결과를 종합해 보면 음곡 금앵자 약침은 난소적출로 골다공증이 유도된 흰쥐의 경골 내 calcium 함량을 증가시켰으며, 경골 내 osteoclast like cell의 비율을 감소시키고, TBT를 증가시키고, GPL을 감소시켰다. 그러므로 음곡 금앵자 약침이 성호르몬 결여 골다공증에 유효한 치료법이 될 수 있을 것이라 생각되는 바, 향후 이에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

음곡 금앵자 약침이 난소적출로 유발된 흰쥐의 골다공증에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 음곡 금앵자 약침과 음곡 saline injection은 난소적출에 의해서 유도되는 경골 내 calcium 함량의 감소를 억제시켰다.
2. 음곡 금앵자 약침은 난소적출에 의해서 유도되는 경골 내 osteoclast like cell의 비율의 증가를 억제시켰다.
3. 음곡 금앵자 약침은 난소적출에 의해서 유도되는 경골 내 지주골의 두께의 감소를 유의하게 억제시켰다.
4. 음곡 금앵자 약침은 난소적출에 의해서 유도되는 경골 내 성장판의 길이의 증가를 유의하게 억제시켰다.

VI. 참고문헌

1. The Korean Society of Bone Metabolism. Osteoporosis. 3rd Edition. Seoul:Hanmi book. 2006:11-8.
2. Kang S.K, Park Y.B, Ahn H.S. The Bibliograp-

hical studies on the acupuncture treatment of the osteoporosis. The Journal of Korean Acupuncture&Moxibustion Society. 1996;15(2):171-89.

3. Department of Herbology, College of Oriental Medicine. Herbology. Seoul:Younglim book. 1999:627-8.
4. Department of Acupuncture&Moxibustion, College of Oriental Medicine. Acupuncture &Moxibustion, Seoul:Jipmoondang, 2001:531-63, 1457-67.
5. Choi C.M, Lee S.J, Park K.H, Kim S.B, Cho H.B. The effect of Woogyuyeum on the Osteoporosis of Rats Caused by Ovariectomy. The Journal of Oriental Gynecology. 2006;19(4) : 77-92.
6. Lee J.J. The Effects of Dangguijihwangyeum on the Osteoporosis of Rats Caused by Ovariectomy. The Journal of Oriental Gynecology. 2004;17(1):111-28.
7. Choi J.K. The Effects of Gami-Joaguiyeum on the Osteoporosis of Rats Caused by Ovariectomy. The Journal of Oriental Gynecology. 2006;19(2):107-26.
8. Lee J.A. The Effects of Rehmanniae Radix on the Osteoporosis of Rats Caused by Ovariectomy. The Journal of Oriental Gynecology. 2004;17(4):112-24.
9. Jung K.Y. The Effects of Ginseng Radix on the Osteoporosis of Rats Caused by Ovariectomy. The Journal of Herbology. 2004;19(1):1-11.
10. Lee J.A. The Effects of Eucommiae Cortex and Chaenomelis Fructus on the aged Ovariectomized Rat of Postmenopausal Osteoporosis. The Journal of Herbology. 2001;16(1):201-6.
11. Yim Y.K, Jung Y.T. The Effects of Acanthopanax Cortex Herbal Acupuncture at KI10 on the Osteoporosis of Rats Caused by Ovariectomy. The Journal of Meridian&Acupoint. 2008;25(1):165-96.
12. Seok J.W. 巴戟天 A Study on Effects of the

- Pakukchun Aqua- acupuncture on the Osteoporosis Induced by Ovariectomy in Rats. The Journal of Acupuncture&Moxibustion. 2000;17(3):140-50.
13. Yook T.H. A Study on the Effects of the Carthami Semen, Cervi Pomtotrichum Cornu, Hominis Placenta Aquacupuncture on the Osteoporosis in the Rats. The Journal of Acupuncture& Moxibustion. 2000;17(3):140-50.
 14. Park Y.H, Lee E, Lim S.C. Effects of Guemen-gja(Rosae Laevigatae Michx.) Extracts on Serum Lipid Composition and Antioxidative Capacity in Rats Fed High Oxidized Fat. The Journal of Plant Resources Society of Korea. 2004 ;17(3):323-30.
 15. Lee E, Lee J.M. The Effects of Rosae Lavigatae Fructus on Blood Characteristic in Rat. The Journal of the Korean Academy of Oriental Medicine Prescription. 2004;12(1):247-54.
 16. Kim K.D, Jeong J.C. The Effects of Rosae Lavigatae Fructus Extract on the Nitric Oxide Synthase Activity and Antioxidan Action in Rats Corpus Cavernosum Penis. The Journal of the Oriental Internal Medicine. 1998;19(1):452-65.
 17. Lee H.Y. A Study of Correlation among the Knowledge of the Disease, Health Promoting Behaviors and the Quality of Life in the Female Patients with Osteoporosis. The Journal of Rheumatology Health. 2001;8(1):65-85.
 18. Jeong H.Y. Osteoporosis Diagnosis and Treatment 2007. The Journal of Korean Society of Bone Metabolism. 2008;23(2):76-108.
 19. Kang B.M. Comparison of Anti-osteoporotic Medications and Alternatives. Korean Journal of Obstetrics and Gynecology. 2006;49(12):2459-73.
 20. Lim S.K. Osteoporosis: Recent Trend. The Journal of Korean Society of Biochemistry and Molecular Biology. 2002;22(3): 270-76.
 21. Wang K.W. Hwangje Naikyung Su-wen. Seoul:Seongbobook. 1983:14, 27, 54, 60, 87, 127, 179, 202, 206, 212, 247, 275, 371.
 22. Korean Institute of Herbal Acupuncture. Manual of Herbal Acupuncture Seoul: The Journal of Korean Institute of Herbal Acupuncture. 1999;13-9.
 23. Lee S.I. The Herbology. Seoul:EuiYsa. 1975:185.
 24. Shin G.G. Herbology. Seoul:Soomunsa. 1982:204.
 25. Herbology Society of Chinese Medicine. Chinese Herbology. Shanghai:Shanghai Science& Technology publisher. 1999:2781-4.
 26. An J.H. Oriental Chinese Medicine. Beijing: Publisher of Renmin. 1991:891-2.
 27. Kasper B, Fauci H, Longo J. Harrison's Principles of Internal Medicine. Seoul:MIP. 1997:2310-21, 2342-3, 2481-92.
 28. H. A. Morris, S. J. Porter, T. C. Durbright, R. J. Moore, A. G. Need, B. E. C. Nordin. Effects of cophorectomy on biochemical and bone variables in the rat. Bone and Mineral. 1992;18:133-42.
 29. Morris Notelovitz. Osteoporosis: screening, prevention, and management. Fertility and Sterility. 1993;59(4):707-25.
 30. Garnero P, Delmas PD. Assessment of the serum level of bone Alkaline Posphatase with a new immunoradimetric assay in patients with metabolic bone disease. J Clin Endocrinol Metab. 1993 ;77(4):1046-53.
 31. Doo H.K. The Oriental Nephrology. Seoul:Oriental Medicine Institute. 1991:654-60, 1049-55.
 32. J. M. Aitken, E. Armstrong, and J. B. Anderson. Osteoporosis after oophorectomy in the mature female rat and the effect of estrogen and/or progestogen replacement therapy in its prevention. 1972 ;55:79-87.
 33. Anthony M. Frumar, David R. Meldrum, F. Geola, Issa M. Shamonki, Ivanna V. Tataryn, Leonard J. Deftos, et al. Realtionship of fasting urinary calcium to circulating estrogen and

- body weight in postmenopausal women. *JCE&M*. 1980;50(1):70-5.
34. Lee K.N, Kweon O.H. *Clinicopathology*. Seoul :Euihak Moonhwasa. 2003:102-5, 278-82, 300-8, 328-31, 425-7, 734-6.
35. Yamazaki I, Yamazaki H. Characteristics of an ovariectomized osteopenic rat model. *J Bone Miner Res*. 1989;4(1):13-22.
36. Lee W.J. *Dictionary of Medicine in English*. Seoul:Academy Book. 1990:1738.
37. Baek S.H, Kim S.Y. Pathogenesis of Osteoporosis. *The Journal of Korean Hip Society*. 2006;18(4): 386-96.
38. 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.

Table 1. The List of Reagents that Used in This Study

Reagent	Manufacturer	Nation
Ethyl ether	Samchun	Korea
Ca kit Phosphorus kit	Asan	
Phosphate buffer saline (PBS) RPMI1640 medium	CAMBREX	USA
Differentiation Basal medium MSC Osteogenic SingleQuots	LONZA	
Mouse Osteocalcin ELISA Kit	Biomedical Tech. Inc.	
3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide(MTT) Trypan blue Formalin	Sigma	

Table 2. The List of Devices that Used in This Study

Device	Manufacturer	Nation
Rotary evaporator	Eyela	Japan
Camera(DXM 1200F) ECLIPSE E600 microscopy	Nikon	
Syringe	Korea vaccine Co.	Korea
Centrifuge Ice maker	Hanil	
Furnace	Daewoong	
ELISA reader	TECAN	Canada
Bone densitometer (PIXImus)	GE Lunar Co.	USA

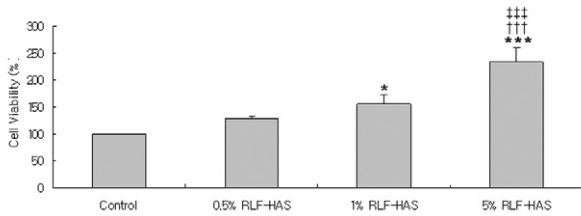
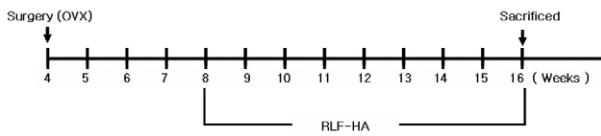


Fig. 1 Cell viability rate with various concentrations of RLF-HAS.
 *** : $p < 0.001$, * < 0.05 compared to control by ANOVA test.
 † † † : $p < 0.001$ compared to 0.5% RLF-HAS by ANOVA test.
 ++ : $p < 0.001$ compared to 1% RLF-HAS by ANOVA test.



Scheme 1. Experimental Scheme

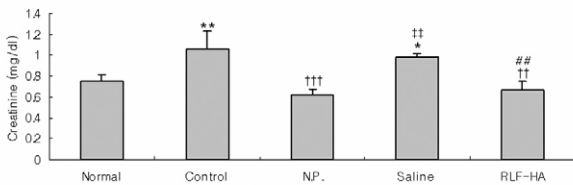


Fig. 2 Effect of RLF-HA on serum creatinine level in ovariectomized mice.
 ** : $p < 0.01$ compared to normal group by t-test.
 † † † : $p < 0.001$, † † : $p < 0.01$ compared to control group by ANOVA test.
 ++ : $p < 0.01$ compared to N.P. group by ANOVA test.
 ## : $p < 0.01$ compared to saline group by ANOVA test.

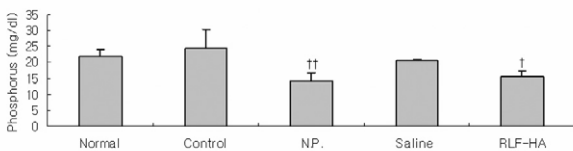


Fig. 3 Effect of RLF-HA on serum P level in ovariectomized mice.
 † † : $p < 0.01$, † : $p < 0.05$ compared to control group by ANOVA test.

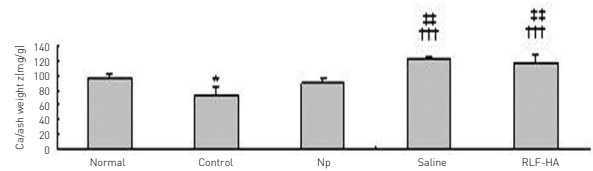


Fig. 4 Effect of RLF-HA on tibial Ca level in ovariectomized mice.
 * : $p < 0.05$ compared to normal group by t-test.
 † † † : $p < 0.001$ compared to control group by ANOVA test.
 ++ : $p < 0.01$ compared to N.P. group by ANOVA test.

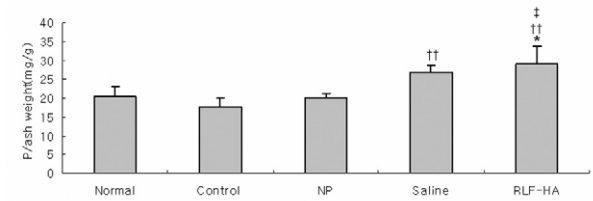


Fig. 5 Effect of RLF-HA on tibial phosphorus level in ovariectomized mice.
 † † : $p < 0.01$ compared to control group by ANOVA test.
 + : $p < 0.05$ compared to N.P. group by ANOVA test.

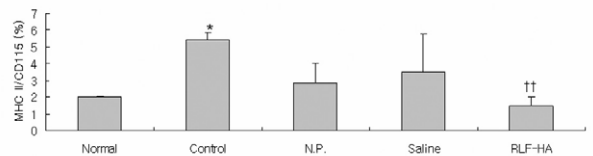


Fig. 6 Effect of RLF-HA on osteoclast like cell in tibia of ovariectomized mice.
 * : $p < 0.001$ compared to normal group by t-test.
 † † : $p < 0.01$ compared to control group by ANOVA test

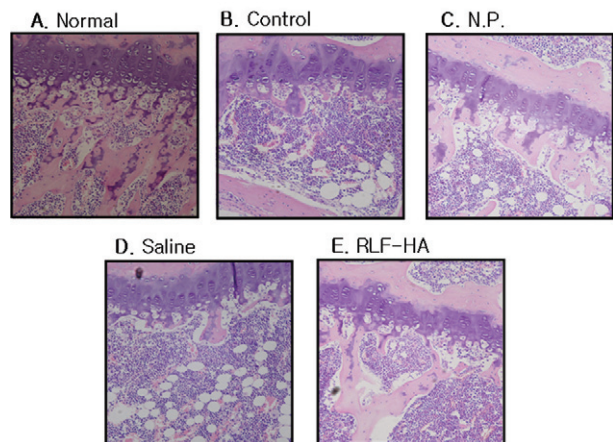


Fig. 7 Histological analysis (H&E stain) of tibia in ovariectomized mice

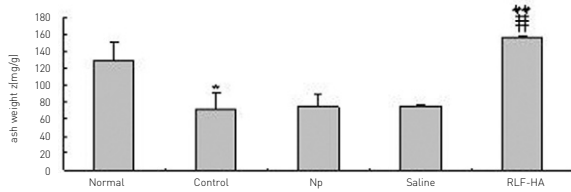


Fig. 8 Effect of RLF-HA on the trabecular bone thickness of tibia in ovariectomized mice.

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

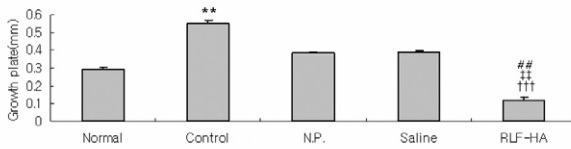


Fig. 9 Effect of RLF-HA on growth plate length of tibia in ovariectomized mice.

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