

杜冲이 卵巢摘出 흰쥐의 骨組織 形態와 骨代謝에 미치는 影響

慶熙大學校 韓醫科大學 婦人科學教室

楊成祐, 曹禎焄, 張峻福, 李京燮

ABSTRACT

Effects of *Eucommiae Cortex* (杜冲) on the Bone Histomorphometry and Metabolism in Ovariectomized Rats

Sung-Woo Yang, Jung-Hoon Cho, Jun-Bock Jang, Kyung-Sub Lee
Dept. of Oriental Gynecology, College of Oriental Medicine,
Kyung-Hee University, Seoul, Korea

Objective: This study was undertaken to investigate the effects of *Eucommiae Cortex* on the osteoporosis in ovariectomized rats.

Materials and Methods: We used Sprague-Dawley female rats in 8-week-old. They were divided into three groups. Sample group was ovariectomized and administered with 10 mg/100 g/day *Eucommiae Cortex* extract solution for 10 weeks. Control group was ovariectomized and sham group was conducted by sham's operation. And control group and sham group were administered with normal saline as the same way.

We measured rats's body and uterus weight and also measured the serum levels of Ca, phosphorus and ALP. We stained the specimens of rat's tibial bones with Goldner's modified Masson's Trichrome and then examined bone histomorphometry with Bioquant computer program of image analysis system. We measured the thickness of osteoid and callus as static parameters and measured bone volume and mineral apposition rate as dynamic parameters. We observed the expressions of RANKL and OPG mRNA of the tibial bone by RT-PCR.

Results: The body weight was significantly ($p < 0.05$) increased in control and sample groups compared with sham group, respectively. The uterus weight was significantly ($p < 0.05$) decreased in control and sample group compared with sham group. In the change of Ca, phosphorus and ALP there were no significant changes among three groups. There were no significant changes of trabecula cortical and osteoid bones' thickness and volume. But trabecula mineral apposition rate (MAR) was significantly ($p < 0.05$) increased in sham and sample group compared with control group. In the expression of RANKL mRNA, sample group was decreased compared with control group, and in that of OPG mRNA, sample group was increased compared with control group.

Conclusion: This study shows that *Eucommiae Cortex* has the beneficial effects on bone histomorphometry and metabolism in the ovariectomized rats. We suggest that *Eucommiae Cortex* be useful for the treatment of osteoporosis.

Key words : *Eucommiae Cortex* (杜冲), ovariectomized rat, bone metabolism, bone histomorphometry, RANKL mRNA, OPG mRNA, RT-PCR

I. 緒論

骨多孔症은 骨形成과 骨吸收의 불균형으로 骨의 화학적 조성에는 변화없이 단위용적 내의 骨量減少를 초래하여 경미한 충격에도 쉽게 骨折을 일으키는 대사성 질환이다^{1,2)}.

骨多孔症 발생율은 남성보다 여성이 4배 이상 높으며, 특히 閉經期 이후에 발생 빈도가 현저히 증가한다. 평균 수명이 증가하면서 노령인구가 많아짐에 따라 骨多孔症 환자도 증가하고 있어 그에 따른 예방과 치료 및 사회보건의학적 관심이 증가되고 있다^{3,4)}.

骨多孔症은 특별한 증상 없이 진행되며, 대부분 骨折이 발생되어 발견되므로 조기검진과 치료가 중요하다. 骨多孔症에 대해 骨基質 감소 유발 인자 제거를 통해 骨吸收를 억제하고, 骨形成을 촉진하여 감소된 骨량을 회복시키는 약제들이 사용되나 모든 환자에게 적용시킬 수 없다는 점과 부작용이 있으므로 보완적인 연구가 필요하다⁵⁾.

韓醫學 文獻에서 骨多孔症은 骨痺, 骨痿, 虛勞, 虛痺, 腎虧, 骨寒, 骨熱, 骨枯, 骨痛 등의 범주에 해당되며 腎陰虛, 腎陽虛, 肝腎虧虛, 脾腎陽虛, 氣滯血瘀, 氣血兩虛 등으로 辨證分類하고 있다⁶⁻⁸⁾. 骨多孔症의 豫防과 治療는 腎主骨과 腎主骨髓를 근거로 補肝腎을 위주로 시행되고 있다³⁾. 韓藥材를 이용한 骨多孔症의 예방과 치료 효과를 규명하기 위한 연구로는 龍骨, 牡蠣, 龜板, 鱉甲, 阿膠, 紫河車, 鹿茸, 紅花子 등에 대한 보고가 있다⁹⁻¹¹⁾.

杜沖은 補肝腎, 強筋骨, 安胎 등의 효능이 있고, 骨多孔症으로 인한 다양한 骨代謝와 骨組成에 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료되나^{3,12-15)}, 杜沖의 骨組織 形態變化와 骨代謝 關聯 遺傳子 發顯에 대한 研究는 아직까지 보고된 바 없다.

이에 著者는 杜沖이 骨多孔症에 미치는 영

향을 알아보고자 卵巢摘出로 骨多孔症을 유발한 흰쥐에 杜沖 檢液을 투여한 후 體重, 子宮 무게 및 生化學的 變化와 骨組織 形態 變化, 骨代謝 關聯 遺傳子 發顯 등을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗

1. 材料

1) 動物

6주령 Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐 (대한바이오링크, 한국)을 사용하였으며, 고휘사료 (삼양사, 한국)과 물을 충분히 공급하면서 12시간 소등과 점등 및 23 °C 조건의 실험실 환경에 2주간 적응시켰다.

2) 藥材

杜沖科에 속한 낙엽교목인 *Eucommia ulmoides* Oliver의 樹皮를 건조한 杜沖을 경희대학교 한의과대학 부속한방병원 약제과에서 구입하여 사용하였다.

2. 方法

1) 檢液의 製造

杜沖 500 g에 증류수 4,000 ml를 가하고 직 화상에서 2시간 가열 추출 후 약제를 분리하고 여과하여 1차 추출액을 얻었다. 약제에 증류수 4,000 ml를 다시 가한 후 동일한 방법으로 2차 추출액을 얻은 후, 1차 추출액과 2차 추출액을 합하고 rotary evaporator (Eyela, Japan)로 감압농축하여 65 g (수득률 13%)의 최종 추출물을 얻었다. 杜沖 抽出物 100 mg을 증류수 10 ml에 용해하여 杜沖 檢液을 만들었다.

2) 實驗群 設定과 檢液 投與

흰쥐 15마리를 sham군, control군 및 sample군에 각각 5마리씩 무작위로 배정하였다. 실험 개시일에 sham군은 pentothalsodium (중

외제약, 한국) 500 mg을 증류수 16 ml에 용해하여 0.1 cc/100 g을 정맥주사 하여 전신마취를 시킨 다음, 등 쪽의 피부를 절개한 후 포타딘 (삼일약품, 한국)으로 수술부위를 소독하고 봉합하여 sham operation을 시행하였다. Control군과 sample군은 sham군과 동일한 방법으로 피부를 절개한 후, 무균 조작 하에서 양측 난소를 절제하고 포타딘으로 수술부위를 소독하였다. 각 군은 수술부위의 감염 방지를 위해 겐타마이신 (신풍제약, 한국) 2 ml/80 mg을 0.1 cc/100 g으로 1회 근육주사 하였다.

Sample군은 난소적출 후 5일째부터 杜冲 檢液을 10 mg/100 g의 용량으로 1일 1회 오전 10시경 10주간 경구 투여하였으며 sham군과 control군은 동량의 normal saline을 동일한 방법으로 투여하였다.

3) 體重과 子宮무게 測定

실험 개시일과 실험 종료일인 10주째에 전자저울 (WYD6039-a89111, Santorius Interface, Germany)를 사용하여 흰쥐의 체중을 측정하였고, 실험 종료일인 10주째에 실험동물을 경추 분리법으로 도살한 후, 자궁을 적출하여 子宮 무게를 측정하였다.

4) 生化學的 檢査

실험 종료일인 10주째에 실험동물을 ether로 마취한 후, cardiac puncture로 全血 5 ml를 채취하고, 10분간 3,000 rpm으로 원심분리 (Hanil, Korea)하여 血清을 얻은 후 생화학적 검사를 실시하였다. 血清 내 calcium은 O-Cresol Phthalin Complexone법¹⁶⁾으로, phosphorus는 Phosphomolybdate법¹⁶⁾으로, alkaline phosphatase (이하 ALP)는 Bessey-Lowry법¹⁶⁾으로 측정하였다.

5) 骨組織의 形態學的 檢査

실험 종료일인 10주째에 경추분리법으로 도살한 흰쥐에서 脛骨을 채취하여 70% 알코올에 고정하고 점차로 알코올 농도를 100%까지 높여 탈수한 후, 54 ml의 uninhibited methyl methacrylate (Sigma, St. Louis MO, USA), 5 mg의 polyethylene glycol (Sigma, St. Louis MO, USA) 및 2.5 ml의 dibutyl phthalate (Sigma, St. Louis MO, USA)가 혼합된 플라스틱에 포매하여 비탈회 플라스틱 블록을 제작하였다.

포매된 조직을 경조직 절삭기를 이용하여 10 μ m의 두께로 절삭한 후, Goldner's modified Masson's Trichrome 염색을 실시하고 광학현미경 (Nikon, Japan)하에서 骨組織의 形態學的 變化를 관찰 ($\times 100$)하였다.

6) 骨組織의 形態計測學的 檢査

골의 역동적인 변화를 관찰하기 위해, 골표지 인자인 calcein green 2 g을 증류수 10 ml에 용해하여 pH 7.2로 만든 후, 실험 종료일 3주전과 일주일전에 1 ml씩 피하주사 하여 類骨 표면에 침착시켰다.

形態學的 檢査와 동일한 방법으로 骨組織 표본을 제작한 후, 靜的 指數 (static parameter)로 皮質骨의 평균 두께 (cortical thickness)와 小柱骨 표면을 피복하고 있는 類骨의 평균 두께 (osteoid thickness)를 측정하였다. 動的 指數 (dynamic parameter)로 無機質 沈着 速度 (mineral apposition rate, 이하 MAR)은 小柱骨 표면에 이중으로 침착한 형광물질의 폭을 측정한 후 단위날짜로 나누어 기록하였으며 骨量 (bone volume)은 전체 小柱骨 표면을 전체 골 volume으로 나누어 백분율로 표시하였다.

정확한 形態計測을 위해 영상분석기 (Bioquant 컴퓨터 프로그램)를 이용하였다.

7) 骨代謝 關聯 遺傳子 測定

(1) RNA 分離

실험 종료일인 10주째에 경추분리법으로 도살한 흰쥐에서 脛骨을 적출하여 -70 °C에서 냉동시킨 후 주발에 넣고 LN2를 넣어 분쇄하였다. RNeasy kit (QIAGEN)를 사용하여 sample 30 mg당 RLT 600 μ l를 넣고 20 gauge 주사기로 homogenization한 후, 최대 속도로 3분간 원심분리하여 상층액 600 μ l를 조심스럽게 다른 tube로 옮겼다. 70% ethanol 600 μ l을 가하고 pipetting한 후, kit내의 column에 옮겨 8,000 \times g에서 15초간 원심분리하였다. 여액을 제거한 후, RW1 700 μ l를 넣고 8,000 \times g에서 15초간 원심분리하고, 새 tube에 옮긴 후 RPE 500 μ l를 넣고 8,000 \times g에서 15초간 원심분리를 2회 반복한 후, RNase-free water 30 μ l로 elution하여 RNA를 分離하였다.

(2) cDNA 合成

cDNA 합성은 1st strand cDNA synthesis kit (Roche, Germany)를 사용하였다. 10x buffer 2.0 μ l, 25mM MgCl 4.0 μ l, dNTP 2.0 μ l, oligo-dT primer 2.0 μ l, RNasin 1.0 μ l 및 AMV reverse transcriptase 0.8 μ l에 RNA 1.0 μ g을 첨가한 후, sterile water로 final volume을 20.0 μ l로 조절하였다. 이를 Thermal cycler (9700, Applied biosystems)에서 25 °C/10분,

42 °C/60분, 99 °C/5분간 반응시켜 cDNA를 合成하였다.

(3) RANKL과 OPG mRNA 發現 分析

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)은 amplitaq (Roche, Germany)를 사용하였다. 10x buffer 2.5 μ l, 2.5mM dNTP 2.0 μ l, primer (20 pmol/ μ l) 1.0 μ l 및 amplitaq 0.5 μ l에 cDNA 1.0 μ l을 첨가한 후, sterile water로 final volume을 25.0 μ l로 조절하였다. 이를 Thermal cycler (9700, Applied biosystems)에서 primer별 (Table 1)로 β actin은 94 °C/40 sec, 63 °C/1 min, 72 °C/40 sec, RANKL은 94 °C/1 min, 63 °C/1 min, 72 °C/1 min, OPG는 94 °C/1 min, 57 °C/1 min, 72 °C/1 min로 각각 30 cycle씩 반응시켰다. 각 산물을 ethidium bromide가 함유된 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 발현여부를 확인하였으며, RANKL과 OPG mRNA의 발현량은 β -actin의 비로 보정하였다

8) 統計處理

통계는 SPSS ver 8.0 for windows를 이용하여 one-way ANOVA로 분석하였고, 유의한 (p<0.05) 것으로 판단될 경우 Duncan 법으로 multiple comparison test를 시행하였다.

Table 1. Primer Sequence Used in the RT-PCR of β -actin, RANKL and OPG

Gene (Expected Size of Amplified Products)	Primer Sequence
β -actin (254 bp)	5'-AAC ACC CCA GCC ATG TAC G-3' (sense) 5'-ATG TCA CGC ACG ATT TCC C-3' (antisense)
Rat RANKL (346 bp)	5'-TCG GGT TCC CAT AAA GTC AG-3' (sense) 5'-GGA CGD TAA TTT CCT CAC CA-3' (antisense)
Rat OPG (357 bp)	5'-TTG TGT GAC AAA TGT GCT CC-3' (sense) 5'-TGC TTT CGA TGA CGT CTC AC-3' (antisense)

Ⅲ. 結果

1. 體重의 變化

실험 개시일 흰쥐의 평균체중은 sham군이 188.8±2.38 g, control군이 195.2±1.92 g 및 sample군이 193.8±6.57 g으로 측정되어 유의한 차이가 없었으나, 실험 종료일인 10주째 평균체중은 sample군이 289.4±6.19 g, control군이 282.6±8.85 g으로 측정되어 sham군의 241.8±8.87 g에 비하여 유의한 증가 (p<0.05)를 나타내었다 (Table II).

2. 子宮무게의 變化

실험 종료일인 10주째 흰쥐의 子宮무게는 sample군이 0.17±0.03 g, control군이 0.15±0.041 g으로 측정되어 sham군의 0.56±0.06 g에 비하여 유의한 감소 (p<0.05)를 나타내었다 (Table III).

3. 生化學的 變化

실험 종료일인 10주째 흰쥐의 혈청 calcium 함량은 sham군이 10.74±0.19 mg/dl, control군이 10.86±0.15 mg/dl 및 sample군이 10.60±0.19 mg/dl으로 측정되어 각 군간에 유의한 차이는 없었으며, 혈청 phosphorus 함량은 sham군이 6.56±1.08 mg/dl, control군이 6.94±0.94 mg/dl 및 sample군이 6.20±0.83 mg/dl로 측정되어 각 군간에 유의한 차이는 없었다. 혈청 ALP 함량은 sham군이 312.60±54.69 IU/L, control군이 337.60±49.63 IU/L 및 sample군이 284.80±24.07 IU/L로 측정되어 각 군간에 유의한 차이는 없었다 (Table IV).

Table II. Effect of *Eucommiae Cortex* Extract Solution on Body Weight in Rats

Group (No. of Rats)	Body Weight of 8-week-old Rats (g)	Body Weight of 18-week-old Rats (g)
Sham (n=5)	188.8±2.38 ¹⁾	241.8±8.87 ^{a,2)}
Control (n=5)	195.2±1.92	282.6±8.85 ^b
Sample (n=5)	193.8±6.57	289.4±6.19 ^b
p-value ³⁾	ns	p<0.05

1) Mean ± standard deviation

2) The same letters indicate non-significant difference between groups based on Duncan's multiple comparison test.

3) Statistical significances were tested by ANOVA.

ns : non-significant

Sham : Sham operated and normal saline administered group

Control : Ovariectomized and normal saline administered group

Sample : Ovariectomized and *Eucommiae Cortex* extract solution administered group

Table III. Effect of *Eucommiae Cortex* Extract Solution on Uterus Weight in Rats

Group (No. of Rats)	Uterus Weight in 18-week-old Rats (g)
Sham (n=5)	0.56±0.06 ^{1),a,2)}
Control (n=5)	0.15±0.041 ^b
Sample (n=5)	0.17±0.03 ^b
p-value ³⁾	p<0.05

1) Mean ± standard deviation

2) The same letters indicate non-significant difference between groups based on Duncan's multiple comparison test.

3) Statistical significances were tested by ANOVA.

Sham : Sham operated and normal saline administered group

Control : Ovariectomized and normal saline administered group

Sample : Ovariectomized and *Eucommiae Cortex* extract solution administered group

Table IV. Effect of *Eucommiae Cortex* Extract Solution on Serum Calcium, Phosphorus and ALP Levels in Rats

Group (No. of Rats)	Calcium (mg/dl)	Phosphorus (mg/dl)	ALP (IU/L)
Sham (n=5)	10.74±0.19	6.56±1.08	312.60±54.69 ¹⁾
Control (n=5)	10.86±0.15	6.94±0.94	337.60±49.63
Sample (n=5)	10.60±0.19	6.20±0.83	284.80±24.07
p-value ²⁾	ns	ns	ns

1) Mean ± standard deviation

2) Statistical significances were tested by ANOVA.

ns : non-significant

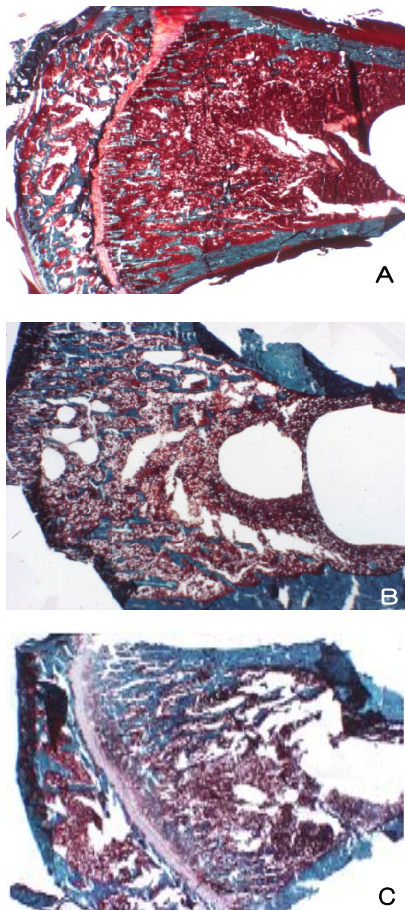
Sham : Sham operated and normal saline administered group

Control : Ovariectomized and normal saline administered group

Sample : Ovariectomized and *Eucommiae Cortex* extract solution administered group

4. 骨組織의 形態學的 變化

실험 종료일인 10주째 흰쥐의 骨組織을 광학 현미경하 (×100)에서 形態學的 變化를 관찰한 결과, sham군은 骨端部와 骨幹部 모두에서 骨小柱가 잘 보존되어 있었으나, control군은 骨端部와 骨幹部 모두에서 골다공증에 의한 骨小柱의 감소가 보였다. Sample군은 骨端部の 骨小柱는 잘 보존되어 있었고 骨幹部の 骨小柱는 sham군에 비해서 약간 감소되었으나 control군에 비해서 잘 보존되어 있었다 (Fig. 1).



A : sham group B : control group
C : sample group

Fig. 1. Histologic findings of tibial bones in rats (Goldner's modified Masson's Trichrome stain, ×100)

5. 骨組織의 形態計測學的 變化

실험 종료일인 10주째 흰쥐 脛骨의 形態計測學的 變化를 표현하는 靜的 指數 중 皮質骨 두께는 sham군이 382.55±73.03 μm, control군이 443.34±40.72 μm 및 sample군이 467.46±41.90 μm으로 측정되어 각 군간에 유의한 차이는 나타나지 않았으며, 類骨 두께는 sham군이 8.81±2.53 μm, control군이 7.68±1.87 μm 및 sample군이 9.00±1.09 μm로 측정되어 각 군간에 유의한 차이를 나타내지 않았다.

動的 指數 중 MAR는 sham군이 1.69±0.23 μm/day, control군이 1.14±0.40 μm/day 및 sample군이 1.62±0.19 μm/day으로 측정되어 sham군과 sample군이 control군에 비하여 유의한 증가 (p<0.05)를 나타내었으며, 骨량은 sham군이 23.24±7.36%, control군이 16.56±1.47% 및 sample군이 22.40±2.41%로 나타나 각 군간에 유의한 차이는 없었다 (Table V).

6. RANKL과 OPG mRNA 發顯量의 變化

실험 종료일인 10주째 흰쥐 脛骨의 RANKL mRNA의 發顯은 sham군이 0.8378 ODu/mm², control군이 1.1064 ODu/mm² 및 sample군이 1.0232 ODu/mm²로 측정되어 control군이 sham군에 비하여 증가하였으나, sample군은 control군에 비하여 감소하였다.

OPG mRNA의 發顯은 sham군이 0.9174 ODu/mm², control군이 0.8410 ODu/mm² 및 sample군이 0.9991 ODu/mm²으로 측정되어 control군이 sham군에 비하여 감소하였으며, sample군은 sham군과 control군에 비하여 증가하였다 (Fig. 2, 3, 4, 5).

Table V. Effect of *Eucommiae Cortex* Extract Solution on Bone Morphometry in the Tibial Bones of Rats

Group (No. of Rats)	Cortical Thickness (μm)	Osteoid Thickness (μm)	MAR ($\mu\text{m}/\text{day}$)	Bone Volume (%)
Sham (n=5)	382.55 \pm 73.03 ¹⁾	8.81 \pm 2.53	1.69 \pm 0.23 ^{b2)}	23.24 \pm 7.36
Control (n=5)	443.34 \pm 40.72	7.68 \pm 1.87	1.14 \pm 0.40 ^a	16.56 \pm 1.47
Sample (n=5)	467.46 \pm 41.90	9.00 \pm 1.09	1.62 \pm 0.19 ^b	22.40 \pm 2.41
p-value ³⁾	ns	ns	p<0.05	ns

1) Mean \pm standard deviation

2) The same letters indicate non-significant difference between groups based on Duncan's multiple comparison test.

3) Statistical significances were tested by ANOVA.

ns : non-significant

Sham : Sham operated and normal saline administered group

Control : Ovariectomized and normal saline administered group

Sample : Ovariectomized and *Eucommiae Cortex* extract solution administered group

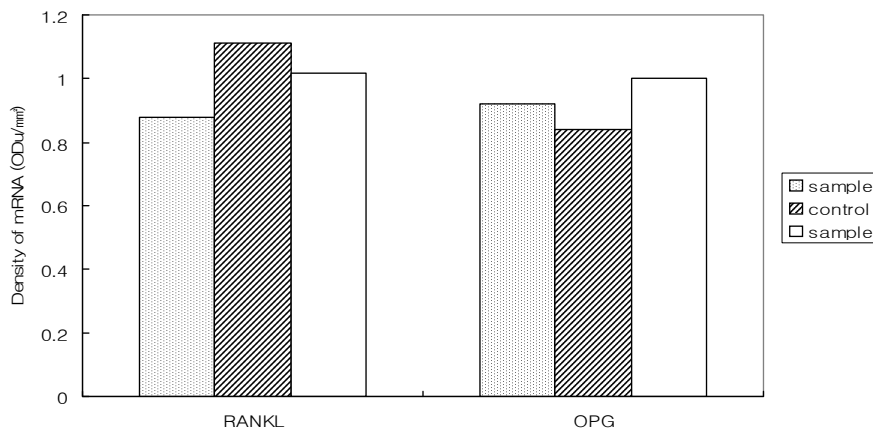


Fig 2. mRNA expression of RANKL and OPG assessed by RT-PCT

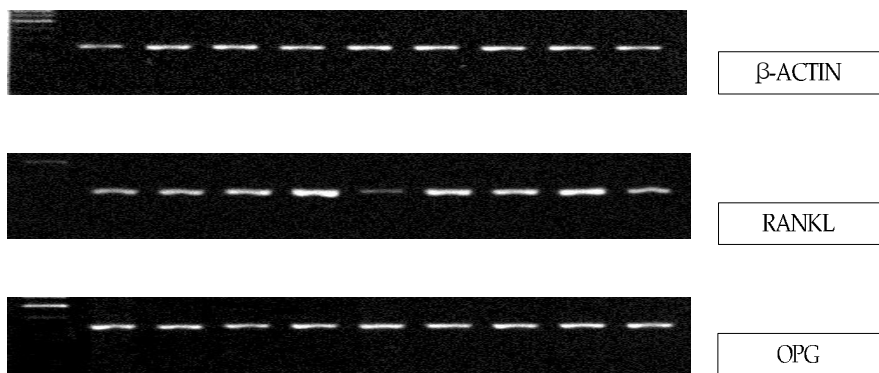


Fig. 3. β -ACTIN, RANKL, OPG mRNA expression in sham group

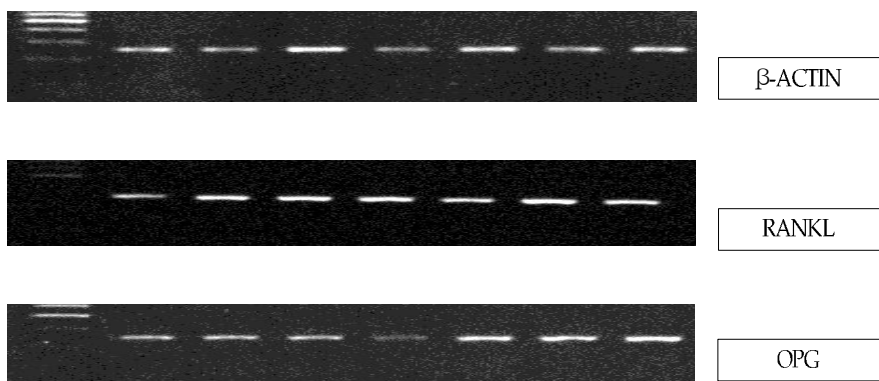


Fig. 4. β -ACTIN, RANKL, OPG mRNA expression in control group

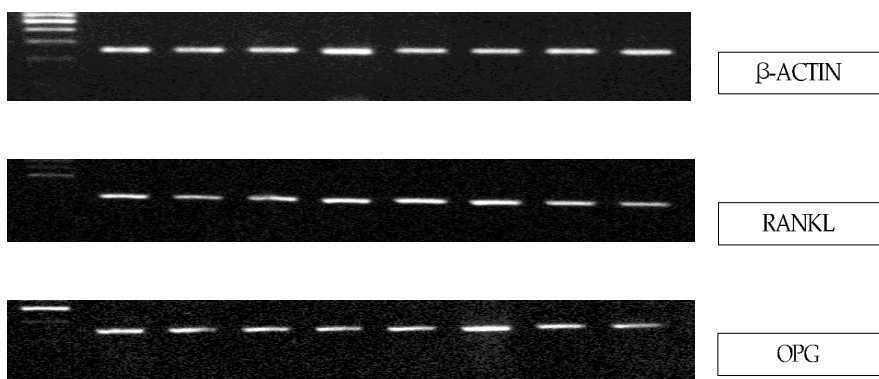


Fig. 5. β -ACTIN, RANKL, OPG mRNA expression in sample group

IV. 考察

骨多孔症은 노화에 따른 骨折頻度の 증가와 직접적으로 연관되어 있으며, 骨折 발생시 치료가 어렵고 또한 치료비용이 많이 소요되기 때문에 문제가 된다³⁾. 그러나 예방이 가능하기 때문에 선진국에서는 공중보건의 문제로 대두되어 의사뿐만 아니라 환자와 정부에서도 많은 관심을 가지고 노력중이다⁴⁾.

骨多孔症은 骨形成과 骨吸收의 불균형으로 骨의 화학적 조성에는 변화없이 단위용적 내의 骨量감소를 초래하는 대사성 질환으로¹²⁾ 그 원인은 내분비학적, 면역학적, 물리학적, 유전학적 인자들이 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁾. 骨多孔症의 위험인자로는 성호르몬 감소, 연령 증가, 칼슘섭취 부족, 비타민 D 결핍, 부갑상선 부족 또는 기능 항진증, 부신피질 기능 항진증, corticosteroid 과다 복용, 음주, 운동부족, 성별 등이 있다^{5,17,18)}.

骨多孔症은 크게 원발성과 속발성으로 구분되는데 폐경 후 骨多孔症은 원발성 제 1형으로 小柱骨의 감소로 脊椎骨의 壓迫骨折를 특징으로 하며, 노인성 骨多孔症은 원발성 제 2형으로 주로 70세 이상의 남녀에게 볼 수 있으며 皮質骨과 小柱骨이 모두 감소되는 특징을 보인다⁵⁾.

骨多孔症의 치료는 감소된 骨形成을 증가시키고 증가된 骨吸收를 억제시켜 骨質량을 증가시키고 骨質을 호전시킴으로써 骨折를 감소시키거나 骨多孔症을 방지하는데 근본적인 목적이 있다. 현재 사용되는 骨吸收를 억제시키는 약제로는 여성호르몬, 칼씨토닌, bisphosphonate, 칼슘, 비타민 D제제가 있고, 骨形成을 증진시키는 약물로는 불소제제, 부갑상선호르몬제 등이 있다⁵⁾. 그러나 이런 치료제는 모든 骨多孔症 환자에게 적용시킬 수 없다는 제한점과 약간의 부작용이 따를 수 있으므로 이에 대한 보완과

연구가 필요한 실정이다⁵⁾.

韓醫學에서 骨은 腎의 精氣가 모이는 곳으로 骨의 生成, 發育, 強勁, 衰弱 등은 腎精盛衰와 밀접한 관계를 형성한다. 만약 腎精充足하면 髓生化有源하여 骨格이 滋養할 바를 얻어 強健有力해지나 腎精不足하면 骨髓生化乏源하여 骨格失養하고 骨質量的 減少로 인해 骨多孔症이 발생된다³⁾.

韓醫學 文獻에서 骨多孔症에 대한 언급은 없으나 骨痺, 骨痿, 虛勞, 虛痺, 腎虧, 骨寒, 骨熱, 骨枯, 骨痛 등의 범주에 속한다^{6,7)}. 이중 骨痺는 骨重不可舉하고 骨髓酸痛한 증상으로 寒氣가 病因이며, 骨痿는 腎氣熱하여 腰背不舉하고 骨枯而水減하여 足不任身한 질환이다. 骨多孔症은 腰背酸痛, 腰膝酸軟, 全身乏力 등의 증상이 腎虛證과 유사하며, 椎體가 壓縮되어 키가 작아지고 등이 굽는 것은 骨痿와 유사하다^{3,19)}.

최근 骨多孔症 환자에 補腎 위주의 처방을 사용한 임상례가 보고되고 있으며 특히 杜沖을 포함한 경우가 多數이다^{3,15,20)}. 杜沖이외에도 龍骨, 牡蠣, 龜板, 鱉甲, 阿膠, 紫河車, 鹿茸, 紅花子 등 다양한 韓藥材의 骨多孔症 치료효과 연구가 있다^{9,11)}.

杜沖은 性이 溫無毒하고 味가 辛甘하여 肝, 腎 二經으로 入하여 補肝腎, 強筋骨, 安胎의 효능이 있어 肝腎不足으로 인한 腰膝痠痛, 陽萎, 眩暈, 小便頻數, 胎元不固, 胎動 등에 사용되었다¹²⁻¹⁵⁾. 李²⁰⁾와 吳²¹⁾는 杜沖의 난소기능저하로 인한 骨多孔症에 대한 효과를 보고하였으나, 骨組織 形態 變화와 骨代謝 關聯 遺傳子 發顯에 대한 연구는 아직까지 보고된 바 없었다.

이에 著者は 杜沖이 骨多孔症에 미치는 영향을 알아보고자 卵巢摘出로 骨多孔症을 유발한 흰쥐에 杜沖 檢液을 투여한 후 體重, 子宮 무게 및 生化學的 變화와 骨組織 形態 變화, 骨代謝 關聯 遺傳子 發顯 등을 관찰하였다.

흰쥐를 실험적으로 骨多孔症을 유발한 것은 Savile²²⁾이 처음이며 흰쥐에서 난소를 제거하면 皮質骨과 海綿骨의 교체가 증가하며 骨多孔症을 일으키므로 난소적출 흰쥐는 폐경기 전후의 骨格系 변화에 대한 많은 연구^{1,18)}에서 사용되었으므로 이 실험에서도 이용하였다.

실험 종료일인 10주째 흰쥐의 평균체중은 sample군과 control군이 sham군에 비해서 통계적으로 유의한 증가를 보여 Turner²³⁾ 등의 난소적출 흰쥐에서 성장속도가 증가하여 체중이 증가된다는 보고와 일치하였다.

흰쥐에서 난소 제거술이 성공적으로 되었는지를 알기 위해서는 혈청내에서 estrogen의 농도를 측정하는 것이 정확하나 자궁은 자궁내막 및 자궁근이 모두 estrogen에 의존적이며 난소가 제거되면 자궁은 위축현상이 나타나기 때문에 자궁무게 변화를 관찰함으로써 간접적인 난소 절제술의 효과를 판정할 수 있다. 이 실험에서도 적출 자궁무게가 sample군과 control군이 sham군에 비해서 통계적으로 유의하게 감소하여 자궁위축 소견이 보여 난소제거술이 성공적으로 이루어졌음을 알 수 있었다.

Calcium은 생체 내에서 99.9%는 골에 나머지 0.1%는 세포외액 중에서 평형상태를 유지하고 있다. 세포내 칼슘은 세포외액의 약 1/1000 정도를 유지하면서 세포상호작용, 혈액응고, 신경전달, 근수축, 호르몬 자극전달 등 중요한 기능을 담당하고 있는데, 통상 뼈에 기계적 스트레스(중력)가 가해지면 칼슘염의 骨沈着이 촉진되어 뼈가 보강된다²⁴⁾. 이 실험에서 혈청내 calcium 함량은 각 군사이의 유의한 차이는 없었다.

Phosphorus의 80-85%는 뼈와 치아에 존재하는데, phosphorus 대사는 칼슘대사와 밀접하여 혈액의 경우 calcium과 phosphorus의 농도비율은 일정하게 된다²⁵⁾. 이 실험에서 혈청내 phosphorus 함량은 각 군사이의 유의한 차이는 없었다.

ALP는 생체 내에서 널리 분포하지만 혈중에 출현하는 것은 한정된 장기의 ALP에 의한 것으로, 흡수분비가 활발한 부위에서는 ALP가 풍부하여 통상 밖으로 배설된다²⁵⁾. ALP의 활성치는 骨成長과 관계가 있기 때문에 성장기에 높은 활성치를 보인다. 이 실험에서 혈청내 ALP 함량은 각 군사이의 유의한 차이는 없었다.

Goldner's modified Masson's Trichrome 으로 염색한 표본에서 각 군의 조직형태학적 변화를 관찰하였던 바 sample군이 sham군에 비해서 骨幹部의 骨小株가 약간 감소되었으나 control군에 비하여 骨幹部와 骨端部の 骨小柱가 모두 잘 보존되어 있었다.

Bone histomorphometry는 대사성 骨疾患 또는 약물에 의해 유발된 뼈의 해면체 조직과 피질 조직의 변화를 조사하는데 사용된다²⁶⁾. 이 연구에서는 bone histomorphometry를 통하여 骨組織 변화를 관찰하였다.

脛骨은 두가지 경로로 성장을 한다. 하나는 막뼈발생(membranous ossification)과 연골속 뼈발생(endochondral ossification)을 통하여 성장한다. 전자는 결합조직중에서 뼈 발생이 시작되고 후자의 경우 遊離軟骨에서 뼈발생이 시작된다. 하지만 공통적으로 骨基質(bone matrix)를 형성한 이후 석회화 과정을 통해 성장을 하게 된다²⁷⁾. 骨多孔症에서 피질이 얇게 되는데, 이 실험에서는 sample군이 control군에 비해 증가하였으나 유의한 차이는 없었다.

骨原性 細胞(osteoprogenitor cell)로부터 분화된 造骨細胞(osteoblast)는 새로운 뼈의 재형성을 진행시킨다. 즉, 造骨細胞(osteoblast)가 骨基質을 합성하여 아직 석회화되지 않은 骨性組織인 類骨(osteoid)을 만들게 된다. 骨再形成 과정에 杜冲이 미치는 영향을 알아보기 위해 類骨 두께를 측정할 결과 각 군간의 유의한 차이는 없었다.

造骨細胞가 활발하게 합성하여 만든 기질층인 類骨은 미리 형성된 뼈와 섬유모세포층

사이에 존재한다. 새로 형성된 기질에 칼슘염의 침착이 계속되면 骨의 성장과정인 骨附加(bone apposition)이 완성된다. 骨附加의 완성에 미치는 영향을 알아보기 위해 형태계측의動的指數로 MAR을 측정된 결과 sample군이 control군에 비해 통계적으로 유의한 증가를 나타내었다.

Most²⁸⁾는 hypogonadism이 있는 남녀에서 낮은 骨密度를 보였으며, 성호르몬이 결핍된 여성과 쥐에서 bone metabolism이 骨生成과정중 骨吸收가 지나치게 증가된 양상을 보였다고 보고하였다. 骨多孔症은 단위면적내의 骨량의 감소를 초래하는데 이 실험에서는 sample군이 control군에 비해 증가하였으나 유의한 차이는 없었다.

骨改形과정에 있어서 전통적으로 破骨細胞는 骨髓 혹은 脾臟 기원의 전구세포에서 1 α ,25-(OH)2D3을 첨가하여 배양하였고 骨髓基質細胞에서 형성되는 M-CSF 및 활성물질이 필요하다고 알려져 왔다²⁹⁻³¹⁾. 이러한 활성물질은 ODF (osteoclast differentiation factor)로 명명되었고 이는 ligenda의 일종인 RANKL (Receptor Activator of NF-kappaB Ligenda) 및 TRANCE와 동일한 물질로 규명되었다. 이는 破骨細胞의 형성을 억제하는 OPG (Osteoprotegerin; OCIF)라는 TNF receptor superfamily의 용해 가능한 한 성분에 대한 ligenda이다. 이에 대한 뒷받침으로 OPG를 과발현하는 transgenic mice는 破骨細胞의 형성이 억제되어 骨化石症을 유발하고 OPG를 knock down시킨 mice는 破骨細胞의 숫자가 증가되어 骨多孔症이 초래된다^{32,33)}.

RANKL은 세포막에 위치는 TNF superfamily의 하나로 破骨細胞 전구체에 존재하는 RANKL에 결합하여 破骨細胞의 형성 및 활성을 증가시키고 그 활성은 역으로 OPG에 의해 역으로 조절된다. OPG는 용해 가능한 TNF receptor superfamily의 하나로 RANKL과 결

합하여 RANKL-RANKL간의 상호작용을 방해하는 역할을 하므로 破骨細胞의 형성이 억제된다. 따라서 국소 부위에서의 RANKL과 OPG간의 비율이 破骨細胞 形成 및 骨吸收 조절에 매우 중요한 요소이다^{34,35)}.

이 실험에서 RANKL mRNA의 발현은 sample군에서 control군에 비해 감소하였고, OPG mRNA의 발현은 sample군에서 control군에 비해 증가하였다. 이는 난소적출 흰쥐에 대한 杜冲 檢液의 투여로 RANKL mRNA의 발현을 감소시키고, OPG mRNA의 발현을 증가시킨다는 것을 알 수 있었다.

이상의 실험결과를 종합하여 보면 흰쥐의 난소를 적출하여 骨吸收와 骨成長의 불균형으로 발생한 骨多孔症에 杜冲 檢液을 투여하여 骨組織 형태에서 骨端部와 骨幹部の 小柱骨이 잘 보존되어 있었고, 骨組織 形態計測上 無機質 沈着速度가 증가하여 骨成長過程인 骨附加의 完成을 촉진하였으며, 骨代謝와 관련하여 破骨細胞의 형성을 자극하는 RANKL mRNA의 발현을 감소시키고, 破骨細胞의 형성을 억제하는 OPG mRNA의 발현을 증가시켜 杜冲이 骨多孔症에 유의한 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

향후 투약이전 단계부터 투약기간에 따른 骨成長 변화과정을 추적 관찰하고 유효성분 분석과 적정 투여농도에 대한 연구가 지속적으로 진행된다면 骨多孔症 치료에 있어 杜冲의 임상적 활용이 가능할 것으로 사료된다.

V. 結 論

杜冲이 骨多孔症에 미치는 영향을 알아보고자 卵巢摘出로 骨多孔症을 유발한 흰쥐에 杜冲 檢液을 투여한 후 體重, 子宮 무게 및 生化學的 變化와 骨組織 形態 變化, 骨代謝 關聯 遺傳子 發顯 등을 관찰하여 다음과 같

은 결론을 얻었다.

1. 體重은 杜冲 投藥群과 對照群이 sham 군에 비해서 유의한 증가를 나타내었다.
2. 子宮무게는 杜冲 投藥群과 對照群이 sham 군에 비해서 유의한 감소를 나타내었다.
3. 血清中 calcium, phosphorus, ALP 함량은 杜冲 投藥群과 對照群의 유의한 차이를 나타내지 않았다.
4. 骨組織의 形態는 杜冲 投藥群이 對照群에 비하여 骨端部와 骨幹部의 骨小柱가 잘 보존되어 있었다.
5. 脛骨의 無機質 沈着速度는 杜冲 投藥群이 對照群에 비하여 유의한 증가를 나타내었으나 皮質骨과 類骨의 두께 및 骨量은 유의한 차이가 없었다.
6. RANKL mRNA 의 發顯은 杜冲 投藥群이 對照群에 비하여 감소하였고, OPG mRNA 의 發顯은 杜冲 投藥群이 對照群에 비하여 증가하였다.

□ 투 고 일 : 2005년 01월 20일

□ 심 사 일 : 2005년 01월 28일

□ 심사완료일 : 2005년 02월 03일

參考文獻

1. 김남현, 최종현, 이환모. 흰쥐의 난소제거 후 발생한 골다공증에 대한 紅蓼 사포닌의 효능. 대한정형외과학회지. 1995;30(4): 808-816
2. 민현기. 골다공증 치료의 기본개념. 대한내분비학회지. 1989;4(1):1-3
3. 이용세, 김현경. 骨多孔症의 東醫學의 臨床文獻에 對한 考察. 韓方再活醫學會誌. 1997;(7):437-456
4. 조수현. 골다공증의 개요. 한양의대학술지. 2002;22(1):1-3

5. 대한정형외과학회. 정형외과학 제5판. 서울. 최신의학사. 2002;23, 153-156
6. 韓方再活醫學科學會. 韓方再活醫學科學. 서울. 군자출판사. 2003;78-79, 105-106
7. 김종현. 骨多孔症에 關한 文獻의 考察 大韓鍼灸學會誌. 1998;15(2):437-454
8. 何紹奇. 現代中醫內科學. 北京. 中國醫藥科技出版社. 1992;578-580
9. 제정진, 이종수, 신현대 등. 龍骨, 牡蠣, 龜板, 鱉甲, 阿膠가 骨多孔症에 미치는 影響에 關한 文獻의 考察. 韓方再活醫學會誌. 1997;7(1):254-262
10. 崔金浩, 洪性殷, 朴炳烈 등. 紫河車가 卵巢摘出로 骨多孔症을 誘發한 흰쥐에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 1999;12(2):75-100
11. 張秀鎭, 李昌炫, 陸泰翰. 紫河車, 鹿茸, 紅花子 藥鍼液이 卵巢摘出로 骨多孔症을 誘導한 흰쥐에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌. 1998;19(1):5-18
12. 全國韓醫科大學 本草學教授. 本草學. 서울. 永林社. 1991;556-557
13. 上海中醫學院. 中草藥學. 上海. 商務印書館. 1979;555-557
14. 陶弘景. 名醫別錄. 北京. 人民衛生出版社. 1986;37
15. 新文豐出版公司. 新編中藥大辭典. 大北. 新文豐出版公司. 1982;901-904
16. 金井泉. 臨床檢査法提要. 서울. 고문사. 1993;458-460, 462-463, 473-476
17. 정화재. 골조송증. 대한물리치료학회지 1990;2(1):113-122
18. 박정배, 김경우. 난소절제로 유도된 골다공증 백서의 골격손부 치유에 에스트로겐 투여가 미치는 효과에 관한 실험적 연구. Journal of Dankook Dental Research Institute. 1996;8(1):11-21
19. 洪元植. 精校黃帝內經. 서울. 신광문화사. 1981;88-90, 105-106
20. 이종안. 杜冲과 木瓜의 혼합전탕액이 흰쥐의 난소적출로 유발한 골다공증에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2001;16(1):201-206
21. 오하식. 杜冲의 樹皮와 잎이 卵巢摘出로 誘發된 흰쥐의 骨多孔症에 미치는

- 影響. 大韓本草學會誌. 1995;10(1)59-68
22. Wikkanueva I, Yamaguchi H. Characteristics of an ovariectomized osteopenic rat model. *J Bone min Res.* 1989;4:13-22
 23. Turner RT, Hannon KS, Bell NH et al. Tamoxifen prevents the skeletal effects of ovarian hormone deficiency in rats. *J Bone Mineral Res.* 1974;2:449-459
 24. 이귀녕, 이종순. 임상병리과일. 서울: 의학문화사. 1993;229-232
 25. 김구자, 황애란. 생리학. 서울: 고려의학. 1986;234
 26. E. Hauge, Le. Mosekile, F. Melse N. Miss observations in bone histomorphometry on osteoporosis. Implications and suggestions for an approach. *Bone.* 1999;25(4):389-395
 27. 고정식. 조직학. 서울: 고문사. 2000;123-143
 28. W. Most. Ovariectomy and orchidectomy induce a transient increase in the osteoclastogenic potential bone marrow cell in the mouse. *Bone.* 1997;20(1):27-30
 29. 박혜림, 장기택, 장재석 등. 전립선암의 골전이시 Osteoprotegerin 및 RANKL Ligand의 발현. *대한골대사학회지* 2001;8(2):97-105
 30. Lorenz CH, Armin EH. The role of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor κ B ligand in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *arthritis & rheumatism.* 2001;44(2):253-259
 31. Lorenz CH, Boyle WJ, Riggs BL et al. The role of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res.* 2000;15:2-12
 32. Simonet WS, Lee R, Boyle WJ et al. Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.* 1997;89:309-319
 33. Bucay N, Boyle WJ, Simonet WS et al. Osteoprotegerin deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998;12:1260-1268
 34. Brown JM, Tondravi M, Vessella L et al. Osteoprotegerin and RANKL ligand expression in prostate cancer. *Urology.* 2001;57:611-616
 35. Chikatsu N, Ogata E, Fujita T et al. Interactions between cancer and bone marrow cells induce osteoclast differentiation factor expression and osteoclast-like cell formation in vitro. *Biochem Biophys Res Comm.* 2000;267:632-637