

원저

## 自然銅이 초기 골절 생쥐 정강이뼈의 Re-modeling에 미치는 영향

신경민 · 정찬영 · 황민섭 · 이승덕 · 김경호 · 김갑성

동국대학교 한의과대학 침구학교실

### Abstract

#### Effects of Administration of Pyritum on Fracture Healing in Mice

Shin Kyung-min, Jung Chan-yung, Hwang Min-seop, Lee Seung-deok, Kim Kyung-ho and Kim Kap-sung

Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Dongguk University

**Objectives** : Pyrite is one of the important prescriptions that has been used in oriental medicine for healing of fracture. It is reasonable, therefore, to postulate that native copper affects the process of bone metabolism and bone formation. The purpose of this study is to discover the effect of Pyrite on the healing of tibia fracture.

**Methods** : 1. *In vitro* test : MG-63 cell in human body and the Pyritum in the ratio of 0.5mg/ml, 1.0mg/ml, 1.5mg/ml, 2.0mg/ml were incubated for 24 hours. After 24 hours, RNA was extracted via trizol reagent (Sigma, USA). In order to understand the activation of osteoblast, the level of OPN mRNA, osteopontin, was measured.

2. *In vivo* tesgroups normal group, control group and experimental group. Left tibia bones of mice in CON and JT groups were fractured by bone cutters. Pyrite was orally administered to the experimental group. After 14 days, each group's tibia specimen was constructed to observe changes in activation of proinflammatory cytokines in relation to MIF and IL-6. Also, proliferation of osteoblast and osteopontin were measured via changes in levels of OPN and OPN mRNA.

**Results** : In *in-vitro* test, the level of OPN mRNA, osteopontin production was remarkably increased in Pyritum-treated MG-63 cells.

In *in-vivo* test, fractured area in external tibia morphology was increased more in the JT group than that of the CON group. Osteogenesis, endochodrial ossification, and osteoid in fractured area were also

· 접수 : 2009. 9. 10. · 수정 : 2009. 9. 23. · 채택 : 2009. 9. 25.  
· 교신저자 : 김갑성, 경기도 고양시 일산동구 식사동 814 동국대학교 부속한방병원 침구과  
Tel. 031-961-9121 E-mail : kapsung@unitel.co.kr

increased more in the JT group than that of the CON group. Increase in OPN mRNA, osteopontin level and osteoblast's proliferation were observed. Activation of MIF and IL-6 was confirmed from the fracture region.

**Conclusions** : From the result, development of a new stimulator in healing fracture via pyrite is expected.

**Key words** : Pyrite; Pyritum; native copper ; osteoblast; bone fracture

## I. 서론

현대 사회는 늘어나는 자동차로 인한 교통사고의 증가, 산업 재해, 다양한 여가 활동으로 인한 각종 스포츠 손상, 수명 연장으로 인한 노인 인구 증가 등으로 인해 골절 사고가 증가하고 있다.

골절이란 뼈의 연속성이 완전 혹은 불완전하게 상실된 상태를 말하며<sup>1)</sup> 《外臺秘要》<sup>2)</sup>에 “救急療骨折接令如故”라 하여 오늘날과 같은 ‘골절’이라는 병명이 처음 언급되고 있다. 골절의 증상으로는 동통과 압통, 골절단의 출혈, 연부조직의 손상으로 인한 종창과 반상출혈, 염발음, 기능장애, 변형, 자세의 변화, 신경과 혈관 손상, 심할 경우 전신 증상으로 호흡곤란, 출혈, 쇼크 등이 나타날 수 있다<sup>3)</sup>.

골절의 치유는 단백질 결핍, 비타민 B6 결핍, NSAIDs 사용, 흡연, 당뇨, 골다공증이 있는 경우 등에서 지연 유합되며<sup>4,5)</sup> 지연 유합, 불유합의 경우 아직까지 뚜렷한 치료법은 없는 편으로 대개 골 유합이 일어날 때까지 보존적 치료를 하게 된다. 하지만 골절 치료가 장기화될 경우 환자의 이동이 제한되어 폐렴, 욕창, 심부 정맥 혈전증, 폐색전증 등의 합병증이 발생할 수 있고 장기간의 외고정 장치술은 운동제한을 유발하여 정상적 기능 유지와 회복을 늦어지게 한다<sup>1)</sup>. 그러므로 골절 치료의 원리는 정확한 해부학적 整復, 견고한 內固定, 골과 주위조직 손상의 감소 및 주위관절의 조기 운동으로, 그 목적은 통증의 해소, 骨折의 整復과 整復 狀態의 유지, 골유합의 촉진, 기능의 유지와 회복 등에 있다<sup>1)</sup>.

골절 유합에 있어 한의학에서는 자연동을 ‘接骨之要藥’이라 하여 예로부터 接骨紫金丹<sup>6)</sup>, 接骨丹<sup>6)</sup> 및 自然銅散<sup>7)</sup> 등의 처방에서 많이 사용하여 왔다.

이에 저자는 消瘀血, 續筋骨하는 自然銅이 골절 초

기 리모델링에 대해 어떤 효과를 나타내는지 살펴보기 위해 MG-63 세포를 이용하여 自然銅이 뼈모세포 활성화에 미치는 영향에 대해 조사하였고 인위적으로 생쥐 정강이 뼈 골절을 유발한 후 골절부위 뼈모세포의 형태적인 변화와 전염증 효소(MIF와 IL-6)의 변화를 면역조직화학적으로 관찰하였다.

## II. 실험

### 1. 재료

#### 1) 동물

태령 4주된 DBA 암컷 생쥐(오리엔트社, 대한민국)를 무균사육장치내에서 2주일동안 적응시킨 후 체중 20g된 생쥐를 선별하여 사용하였다.

#### 2) 自然銅 수치, 투여 및 첨가

自然銅(*Jayeundong* : *Pyritum*)은 동국대학교 한의과대학에서 購入하여 精選한 후 煨紅하여 自然銅 500g당 米醋 250ml의 비율로 米醋에 7회 담금질한 후 곱게 가루로 만들고 水飛한 침전물을 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 실험군의 분류

정상군, 정강이뼈 골절을 유발한 대조군, 정강이뼈 골절 유발 후 自然銅을 투여한 실험군(JT군)으로 나누었으며, 각 군에 각 10마리씩 배정하였다.

#### 2) 세포주와 세포배양

실험에 사용한 사람 뼈모세포인 MG-63세포는 Korean

Cell Line Bank(KCLB ; Korea)에서 구입하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub>incubator(Sanyo, Japan)에서 10% Fetal Bovine Serum(Sigma, USA)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Welgin, Korea)을 사용하여 배양하였다. 오염방지를 위해 항생제로 100 unit/ml penicillin(Sigma, USA), 100µg/ml streptomycin(Gibco/BRL, USA)을 첨가하였다.

3) MTT assay 및 자연동 투여

정강이뼈 골절이 유발된 JT군에 매일 1g/kg/day 량의 자연동을, 자연동 1mg당 생리 식염수 0.1ml의 비율로 생리 식염수에 녹여 1일 1회 구강투여 하였다. 한편 *In vitro*에 사용된 自然銅의 첨가량은 MTT assay 결과 10mg/ml까지는 세포 생존률의 변화가 일어나지 않아 0.5, 1.0, 1.5 및 2.0mg/ml로 결정하였다.

4) 自然銅의 뼈모세포 활성능 조사

自然銅이 뼈모세포의 Osteopontin(OPN) 생성에 미치는 영향을 조사하기 위해 MG-63세포의 OPN mRNA 발현 변화를 역전사 중합 효소 연쇄 반응법(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)으로 측정하였다. MG-63세포 - 5×10<sup>5</sup> cells/well을 6well에 plating하고 12시간 후에 自然銅 0.5, 1.0, 1.5 및 2.0mg/ml을 농도별로 첨가하여 24시간 동안 배양한 후 수거한 RNA를 trizol reagent(Sigma, USA)를 사용하여 추출한 다음 fluorometer(Introgen, USA)로 RNA를 정량하였다. RT-PCR kit(Premega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 OPN primer를 PCR machine으로 반응시켰다. PCR 산물은 1~2% agarose gel상에서 전기영동하여 relative intensity로 측정하였다. 한편 RT-PCR의 정확성을 평가하기 위하여 internal standard인 β-actin의 증폭을 동시에 실시하였다. mRNA 발현의 relative intensity는 Optimas 5.2(Optima, USA)를 이용한 영상분석(image analysis)을

통해 비교하였다(Table 1).

5) 정강이뼈 골절 생쥐에 대한 뼈 재생 효과 조사

1) 정강이뼈 골절 유발

왼쪽 정강이의 털을 제거하고 정강이 앞쪽·안쪽(anterio-medial) 피부를 절개하여 정강이뼈의 앞 모서리를 확인한 다음 bone cutters(FST, Canada)를 사용하여 발목쪽 1/3 지점의 정강이뼈에 골절을 유발하였다. 골절 유발 후 피부를 봉합한 다음 골절부위를 신축성 밴드(Nippon sigma, Japan)로 고정하였다. 골절 유발 3일 후 발목 부위를 조사하여 괴사 증후가 없는 것을 선별하여 실험에 사용하였다.

2) 정강이뼈 표본 제작

골절 유발 후 14일 후 각 군을 sodium pentobarbital 용액으로 마취하고 vascular rinse와 10% 중성 포르말린용액(neutral buffered formalin : NBF)으로 심장관류고정을 실시하였다. 적출된 정강이뼈를 탈회액(decalcification solution, BBC, UK)에 24시간 처리하고 세척한 후 통상적인 방법으로 파라핀에 포매하여 5µm 두께로 연속절편을 만들었다. 만들어진 연속절편은 Hematoxylin-Eosin법으로 염색하여 표본을 제작하였다.

3) 영상 분석

골절부위의 외부형태적 변화를 영상분석 하기 위해 정강이뼈 주변의 근육을 제거한 후 정강이뼈를 x4 배율로 촬영하였다. Optimas 5.2에서 먼저 image 기능의 sharpen low-filter를 사용하여 골절부위를 명확하게 한 후 binary morphology에서 invert 기능을 선택하여 골절부위를 intensity 180~200으로 전환·부

Table 1. The Primer of OPN and β-actin mRNA

Primer		Primer sequences	Product (bp)	No. of cycles
OPN	Sense	5'-TAG GAT CCA TAC CAG TTA AAC AGG CTG ATT CTG GAA G-3'	347	35
	Antisense	5'-GTA AGC TTT TAC CTC AGT CCA TAA ACC ACA CTA TCA CCT CGG CCA-3'		
β-actin	Sense	5'-GGAGAAGATCTGGCACCACACC-3'	840	35
	Antisense	5'-CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCTGG-3'		

OPN : Osteopontin.

각시킨 다음, Histogram을 통해 동일 영역의 pixel를 계수하였다.

4) 골절부위의 조직화학과 면역조직화학

① 뼈기질 생성 변화 관찰

골절부위에 뼈 기질 생성 변화를 조사하기 위해 mallory azan 염색법을 실시하였다. 우선 azocarmine 용액에 1시간 동안 반응시킨 후 aniline blue 용액에 2 시간동안 대조 염색하였다.

② 염증반응 변화 관찰

골절 부위 내 혈관 신생성 변화를 관찰하기 위해 Wright's stain을 실시하였다. 우선 조직을 Wright's stain solution에 30분간 반응 후 stop buffer를 처리한 다음 관찰하였다.

한편 골절 초기 염증에 관여하는 전염증효소인 macrophage migration inhibitory factor(MIF)와 interleukin(IL)-6의 골절부위내 분포를 조사하기 위해 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 절편을 blocking serum인 10% normal goat serum(1 : 20, DAKO, Denmark)에서 2시간 동안 반응시켜 비특이적 면역반응을 억제하였다. 그리고 1차 항체인 mouse anti mouse MIF(1 : 50, Santa Cruz Biotec, USA)와 mouse anti mouse IL-6(1 : 200, Santa Cruz Biotec, USA)에 4°C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰으며, 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG(1 : 50, Santa Cruz Biotec, USA)에 4°C humidified chamber에서 24시간 link 하였다. Avidin

biotin complex(Dako, Denmark)에 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 3,3'-diaminobenzidine(DAB, Sigma)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액(pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

③ 뼈모세포 활성 변화 관찰

뼈모세포에서 생성되는 OPN의 골절부위내 분포변화를 조사하기위해 항 mouse anti OPN(1 : 50, Santa Cruz Biotec, USA)항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

6) 영상분석과 통계처리

면역조직화학의 결과의 수치화를 위해 Optimas 5.2 (Optima Co., USA)를 이용한 영상분석 (image analysis)을 실시하였다. 영상분석 결과는 Sigmaplot 2000 (SPSS INC, USA)을 통해 유의성을 검증하였다.

### III. 결 과

#### 1. 정강이뼈 골절 생쥐에 대한 뼈 재생 효과

##### 1) 외부형태

대조군에서는 골절부위가 제대로 유합되지 않아 생긴 뒤틀림을 명확히 확인할 수 있었으나, JT군에

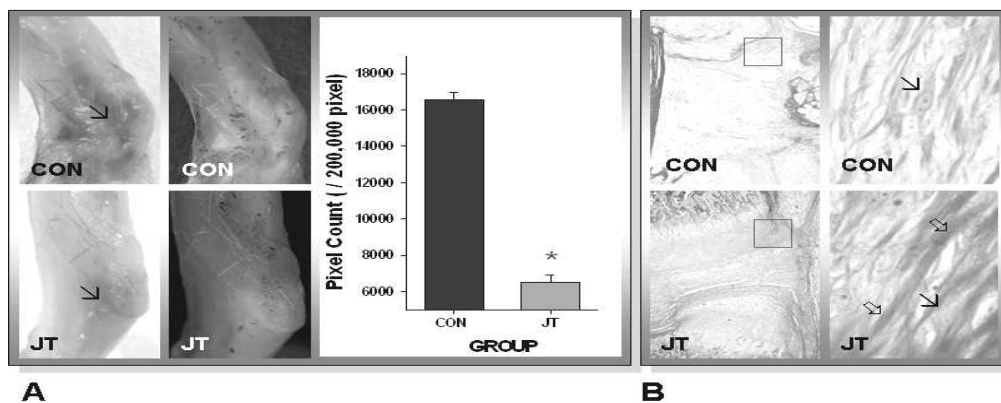


Fig. 1. Regeneration of fractured Tibia by Pyrite

A. Decrease of fractured area (arrow) in external tibia morphology (L. x4; M. inverted photo; Graph Image analysis).

B. Increase of osteogenesis in fractured area (L, x40, mallory azan stain; R, enlargement of Box in L. photo, x1,000; arrow, osteoblast; vacant arrow, osteoid).

CON : fracture elicitate mice. JT : Pyrite administered mice after fracture elicitation.

\* :  $p < 0.05$  compared with CON.

서는 대조군에 비해 이러한 뒤틀림이 감소되어 나타났다. 한편 골절 유합 부위를 영상 분석한 결과, JT군의 골절 유합 부위(6,487±416/200,000 pixel)는 대조군(16,558±394/200,000 pixel)의 골절 유합 부위의 61%에 해당하며 JT군에서 골절 유합 속도가 대조군에 비해 유의성( $p<0.05$ )있게 증가한 것으로 측정되었다(Fig. 1-A).

2) 뼈기질 발생 증가

대조군의 골절 가쪽부위에서는 뼈기질이 생성되었고, 그 주변으로 뼈모세포의 침적이 관찰되었다. JT군도 대조군과 같은 양상을 보였으나, 대조군보다 뼈기질의 생성과 침적된 뼈모세포의 분포가 더 증가한 것으로 관찰되었다(Fig. 1-B).

3) 혈관 신생성 증가

대조군 골절 가쪽부위의 염증관여세포 침적부위에서 모세혈관의 분포 증가가 관찰되었다. JT군도 대조군과 같은 양상을 보였으나, 대조군보다 모세혈관의 분포가 더 증가한 것으로 관찰되었다(Fig. 1-B).

2. 염증 반응 변화

1) MIF 활성 증가

전염증 효소인 MIF의 양성반응은 골절부위에서 관찰되었고, 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. 이러한 MIF 양성반응은 정상군에 비해 대조군과 JT군에서 모두 증가하지만, JT군에서 더 큰 증가를 보였다. MIF 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군

Table 2. The Image Analysis for Activation of Pre-inflammation Cytokine by Pyrite

Objective	Group		
	NOR	CON	JT
MIF	260±32	4,068±143	8,058±309*
IL-6	275±10	4,757±199	6,622±172*

Image analysis for 200,000 particles / range of intensity : 80-130.

M±S.D : Mean±Standard Deviation.

MIF : Macrophage migration inhibitory factor.

IL-6 : Interleukin-6.

NOR : No-treated mice.

CON : fracture elicitate mice.

JT : Pyrite administered mice after fracture elicitation.

\* :  $p<0.05$  compared with CON.

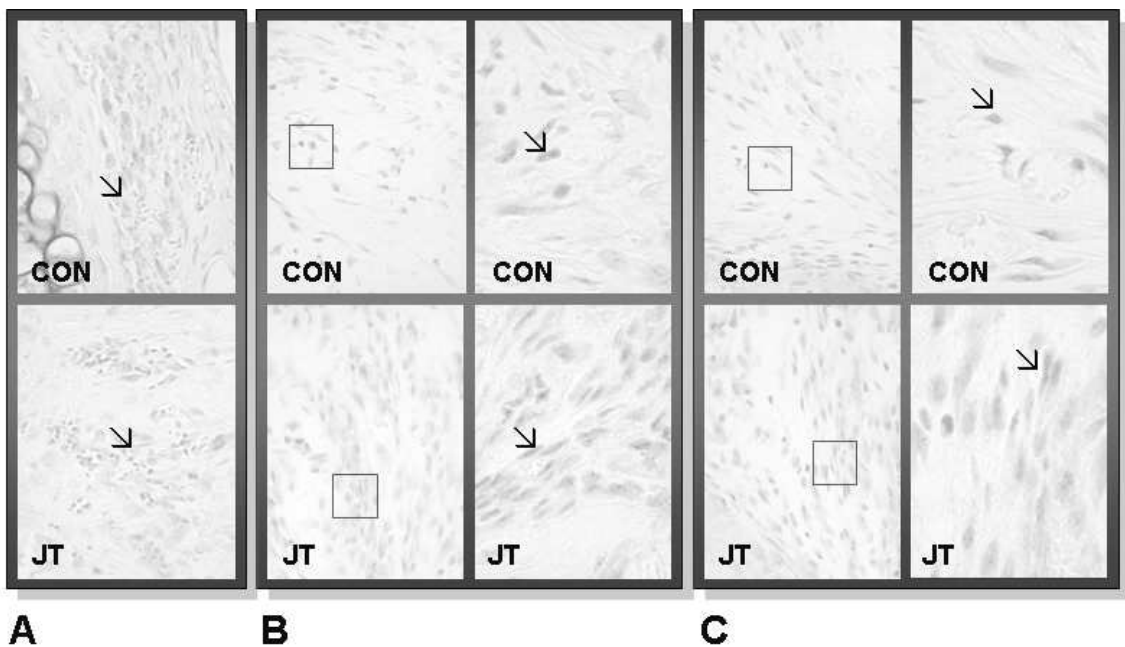


Fig. 2. Activation of Inflammation in fractured Tibia by Pyrite

A : Increase of angiogenesis (arrow, capillary, Wright's stain, ×2,000).

B : Activation of MIF (arrow; L. MIF immunohistochemistry, ×200; R. enlargement of Box of L. photo, ×1,000).

C : Activation of IL-6 (arrow; L. IL-6 immunohistochemistry, ×200; R. enlargement of Box of L. photo, ×1,000).

MIF : Macrophage migration inhibitory factor. IL-6 : interleukin-6. CON : fracture elicitate mice. JT : Pyrite administered mice after fracture elicitation.

에 비해 1,463% 증가하였고, JT군은 대조군에 비해 98% 증가하여 유의성( $p < 0.05$ ) 있는 증가를 보였다 (Table 2, Fig. 2-B).

### 2) IL-6 생성 증가

전염증 효소인 IL-6의 양성반응은 골절부위에서 관찰되었고, 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. 이러한 IL-6 양성반응은 정상군에 비해 대조군과 JT군에서 모두 증가하지만, JT군에서 더 큰 증가를 보였다. IL-6 양성반응의 영상분석 결과 대조군은 정상군에 비해 1,630% 증가하였고, JT군은 대조군에 비해 39% 증가하여 유의성( $p < 0.05$ ) 있는 증가를 보였다 (Table 2, Fig. 2-C).

### 3. 뼈모세포 활성 변화

#### 1) MG-63세포의 OPN mRNA 발현 증가

自然銅자극에 의한 MG-63세포의 OPN mRNA 발현은 농도 의존적으로 증가하였으며, 세포질 가장자리가 잘 발달된 것으로 관찰되었다. OPN mRNA 발현은 0.5mg/ml에서 34.9%, 1.0mg/ml에서 43.1%, 1.5mg/ml에서 53.7%, 그리고 2.0mg/ml에서 67.3% 증가하였다 (Fig. 3-A).

#### 2) OPN 생성 증가

뼈모세포에서 생성되는 OPN의 양성반응은 골절부위 주변의 골성조직에서 관찰되었고, 핵막주변 세포질에서 강한 양성반응을 보였다. 이러한 OPN 양성반응은 정상군에 비해 대조군과 JT군에서 모두 증가하였고, 대조군에 비해 JT군에서 더 큰 증가를 보였다.

Table 3. The Image Analysis for Activation of Osteoblast by Pyrite

Objective	Group		
	NOR	CON	JT
OPN	175±18	7,760±274	13,207±419*

Image analysis for 200,000 particles / range of intensity : 80-120.

OPN : Osteopontin.

M±S.D : Mean±Standard Deviation.

MIF : Macrophage migration inhibitory factor.

IL-6 : interleukin-6; NOR, No-treated mice.

CON : fracture elicitate mice.

JT : Pyrite administered mice after fracture elicitation.

\* :  $p < 0.05$  compared with CON.

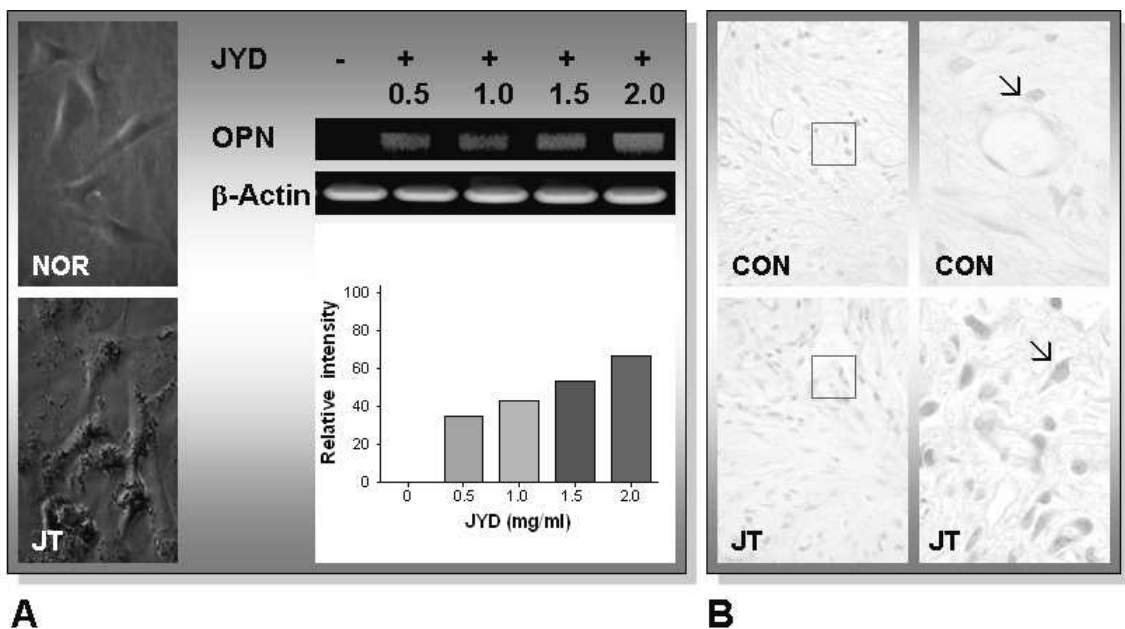


Fig. 3. Activation of Osteoblast by Pyrite

A : Increase of OPN mRNA expression. The MG-63 cells were treated with 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0mg/ml of Pyrite, and the cells were further incubated for 24 hours. The OPN mRNA expression were dose-dependantly increased in Pyrite treated MG-63 cells.

B : Activation of OPN in fractured tibia (arrow; L. OPN immunohistochemistry, ×200; R. enlargement of Box of L. photo, ×1,000).

OPN : Osteopontin. CON : Fracture elicitate mice. JT : Pyrite administered mice after fracture elicitation.

OPN 양성반응의 영상분석 결과 정상군에 비해 대조군은 4,334% 증가하였고, 대조군에 비해 JT군은 83% 증가하여 유의성( $p < 0.05$ ) 있는 증가를 보였다(Table 3, Fig. 3-B).

#### IV. 고찰

골절이란 뼈의 연속성이 완전 혹은 불완전하게 상실된 상태를 말한다<sup>1)</sup>. 《外臺秘要》<sup>2)</sup>에 “救急療骨折接令如故”라 하여 오늘날과 같은 ‘골절’이라는 병명이 처음 언급되고 있으며 《醫宗金監》과 《傷科補要》에 이르러 골절에 대한 연구가 체계화되게 되었다.

골절의 증상으로는 동통과 압통, 골절단의 출혈, 연부조직의 손상으로 인한 종창과 반상출혈, 염발음, 기능장애, 변형, 자세의 변화, 신경과 혈관 손상, 심할 경우 전신 증상으로 호흡곤란, 출혈, 쇼크 등이 나타날 수 있으며<sup>3)</sup> 골절 치료의 원리는 정확한 해부학적 整復, 견고한 內固定, 골과 주위조직 손상의 감소 및 주위관절의 조기 운동으로, 그 목적은 통증의 해소, 骨折의 整復과 整復 狀態의 유지, 골유합의 촉진, 기능의 유지와 회복 등에 있다<sup>1)</sup>.

골절의 치료방법에 대해서 《諸病源候論》<sup>8)</sup>에서는 “所以須先系縛 按摩導引令基血氣復也”, 《備急千金要方》<sup>9)</sup>에서는 “以竹編夾裏令遍 縛令急勿令轉動”이라 하여 整復과 固定의 방법을 제시하고 있으며, 《和劑局方》<sup>10)</sup>에는 “接骨續筋止痛活血法”과 《聖濟總錄》<sup>7)</sup>에는 “接骨各有方劑存言當按症施治”를 提示하여 약물요법에 대하여 설명하고 있다. 또한 《東醫寶鑑》<sup>11)</sup>에서는 “骨折損折肘臂腰膝出白蹉跌, 須用法整頓歸元”, “搦骨歸窠用竹一片夾定一邊一邊不容夾須存屈直處時時拽屈拽直”이라 하여 골절에 있어서 정확한 해부학적 整復, 견고한 內固定 및 주위 관절의 조기 운동이 중요함을 언급하고 있다. 골절 초기에는 筋脈이 손상되고 瘀血阻滯되고 腫脹疼痛하므로 活血化癥 消腫止痛의 약물을 내복하고 중기에는 瘀血이나 腫脹이 감소하고 절단된 골절면이 생장 접촉되는 시기이므로 일반적으로 接骨續斷하는 약물을 사용한다. 골이 이미 유합한 후기에는 기혈 부족, 근골 영양 상실, 지체 무력의 치료를 위해 養血, 補益肝腎, 強壯筋骨하는 약물을 주로 사용한다<sup>3)</sup>.

골절은 단백질 결핍, 비타민 B6 결핍, NSAIDs 사용, 흡연, 당뇨, 골다공증이 있는 경우 지연 유합되며<sup>15)</sup> 환

자의 연령, 수상시의 상해정도(high energy injury), 동반 손상의 정도, 골절된 골의 종류, 부위, 형태, 전위 정도, 골 소실, 골절 부위의 혈액 공급, 연부조직의 손상 정도, 감염, 피부 상태, 치료 방법에 따라 그 치유 속도가 달라지며 때로는 지연 유합, 불유합되기도 한다<sup>1,4)</sup>. 골절 치료가 장기화될 경우 환자의 이동이 제한되어 폐렴, 욕창, 심부 정맥 혈전증, 폐색전증 등이 발생할 수 있으며 장기간의 외고정 장치술은 운동 제한을 유발하기도 한다<sup>1)</sup>. 그러나 지연 유합, 불유합의 경우 아직까지 뚜렷한 치료법은 없는 편이며 대개 골 유합이 일어날 때까지 보존적 치료를 하게 된다.

골절 치유 및 골절 유합을 촉진시키는 한약물에 대한 연구로는 人蔘<sup>12)</sup>, 紅花<sup>13)</sup>, 加味身痛逐瘀湯<sup>14)</sup>, 加味芎歸湯<sup>15)</sup>, 加味芎歸湯加鹿茸<sup>15)</sup>, 順氣活血湯<sup>16)</sup>, 자연동<sup>17)</sup> 등을 이용한 연구들이 유의성 있는 효과가 있다고 보고되어 왔다.

자연동은 味辛, 性平, 無毒하여 肝經에 들어가고 散瘀, 止痛, 續筋, 接骨, 排膿, 安心, 止驚悸, 產後血邪, 散火, 風散毒 하는 효능이 있어 跌打損傷, 筋斷折骨, 瘀血疼痛을 치료하며<sup>18)</sup> 예로부터 ‘接骨之要藥’이라 하여 接骨紫金丹<sup>6)</sup>, 接骨丹<sup>6)</sup> 및 自然銅散<sup>7)</sup> 등의 처방에서 많이 사용되었다.

自然銅은 石髓鉛(석수연), 山骨(산골), 産骨(산골), 接骨丹(접골단), 銅鑛石(동광석) 등으로도 불리는 等軸晶系 黃鐵礦族에 속하는 황철석(Pyrite) 또는 황동석으로서 주성분은 含硫化鐵(FeS<sub>2</sub>)이며 국내에서는 주로 황철석(CuFeS<sub>2</sub> : Pyrite)이 사용된다. 자연동의 화학적 조성은 鐵性이 酸化되는 환경에 따라 다소 차이가 있으나 주된 성분은 이황화철(FeS<sub>2</sub>)과 산화철(Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)이며, 그 중에는 철(Fe) 46.6%, 유황(S) 53.4%를 함유하고 아울러 니켈(Ni), 비소(As), 구리(Cu), 코발트(Co), 안티몬(Ab) 등의 雜質을 함유하고 있다<sup>19)</sup>. 자연동의 수치법에 대해 《本草綱目》<sup>20)</sup>에서는 “火醋七次, 研細水飛過用” 한다 하였고, 《本草從新》<sup>21)</sup>, 《本草求真》<sup>22)</sup>에는 “火醋七次, 細研甘草水飛” 한다고 하였다.

골절 치유 과정에서 혈액 속의 Ca, Fe는 일정량을 유지하며, P, S, K, Ni, Cu/Zn은 골절치유과정에서 활발한 대사 작용을 한다. 골절 유발 토끼의 뼈 속 Ca함량 역시 일정량이 유지되며, Fe은 골절 초기에 활발하게 증가한다<sup>23)</sup>. Cu, Zn은 인체에서 Fe, Ca, Mn 등과 함께 뼈의 교질형성을 촉진하여 Ca과 P가 뼈에 빨리 축적되게 하며 골격의 생물학적 기능을 강화하며<sup>24)</sup> 자연동의 경우 Fe, S, Mg, Cu/Zn 등의 성분이 골절 치유

효과를 나타낼 것으로 생각된다.

현재까지 자연동에 대한 기초연구로는 문헌연구<sup>18,25)</sup>, 수침법<sup>26)</sup>, 성분<sup>24)</sup>, 기원<sup>27)</sup>, 함유된 금속원소<sup>28)</sup> 등이 있었으며, 최근에는 자연동의 골절 유합 효과를 조직학적, 골소주의 생성정도, 골절부위의 모세포 활성화와 염증효소를 통한 염증반응상태<sup>17)</sup> 등을 관찰한 연구들이 보고되어지고 있다. 이에 저자는 消瘀血, 續筋骨하는 自然銅의 골절 초기 리모델링에 대한 효과를 살펴보기 위해 MG-63 세포를 이용하여 自然銅이 뼈모세포 활성화에 미치는 영향에 대해 조사하였고 인위적으로 생쥐 정강이 뼈 골절을 유발한 후 골절부위 뼈모세포의 형태적인 변화와 전염증 효소(MIF와 IL-6)의 변화를 면역조직화학적으로 관찰하였다.

골절 치유에 있어서 조직은 다른 조직과 마찬가지로 손상을 받을 경우 자연치유 경과를 밟으며 수복과정은 발생과정에서의 골형성과 유사한 방법으로, 그리고 단계적으로 일어난다. 일반적으로 골절의 치유 과정은 염증기, 수복기, 재모형기로 대별하며 각 시기별 뚜렷한 경계없이 서로 중복되어 나타난다. 염증기는 골절 후 약 5일까지 기간으로 골절 부분의 파열로 인하여 출혈과 혈종이 발생하고, 양쪽 골절면에는 혈류의 차단으로 괴사가 발생한다. 또한 혈관투과성이 증가하여 염증반응과 함께 혈장이 증가한다. 이 때 나타나는 염증세포는 주로 중성구와 탐식구이며 비감염성 염증이다. 혈장내 섬유소들이 세망섬유, 기존의 교원질 등과 함께 느슨한 섬유소망을 형성하여 다음에 섬유모세포의 출현과 교원질의 합성, 새로운 혈관이 생성되어서 육아조직을 형성하는 데 도움을 준다. 동시에 염증세포, 혈소판으로부터 혈소판 유래 성장인자, 암 전환변형성장인자, 섬유모세포섬유인자 등이 분비되어 골막, 골수 및 주변 연부조직에 있는 골선조세포를 활성화하며 이들은 장차 골모세포 및 연골모세포로 분화하며 괴사된 조직이나 파편들은 점차 흡수된다. 따라서 염증기에서는 골절면을 서로 연결하는 기질화가 일어나 혈종을 형성하는데 이것을 전가골이라 하며 다음 골기질이 침착할 수 있는 여건을 조성하는 시기이다. 수복기는 골절후 4~40일 정도의 기간으로서 염증기에서 기질화된 혈종에 더욱 혈관세포로 분화하면서 골막하, 골표면, 골절면의 표면에 골기질을 침착하여 직골로 구성된 골소주를 형성하며 곧 무기질이 침착하며 상대적으로 저산소증상태인 병소의 심부에는 연골로 분화한다. 따라서 골절 치유과정에서 일어나는 골형성은 골발생과정에서 간엽세포로부터 직접 골모세포로 분화하여 골기질을 형성하는

막내 골형성과 연골모세포에서 연골을 형성하면서 점차 골조직으로 치환되어가는 연골내 골형성이 동시에 일어난다는 사실을 알 수 있다. 재모형기는 25~50일 정도의 기간이지만 수 년이 걸리는 경우도 있다. 방사선 소견상 가골의 크기가 작아지고 무기질 침착의 증가와 더불어 교원질의 배열이 더욱 규칙적인 층판골로 치환됨에 따라 골경화가 증가하다가 재모형화가 계속 진행될수록 정상골에 가까워진다<sup>29)</sup>.

골절도 다른 외상의 경우처럼 순차적인 염증반응이 일어나며, 초기 골절지역에 이주한 큰포식세포를 비롯한 다양한 면역세포들은 전염증효소인 interleukin-1 (IL-1), IL-6, Tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$  등을 분비하여 extracellular matrix의 합성, 혈관신생성, 섬유모세포의 이주 등을 촉진시킴으로써 골절뼈의 remodeling과 항상성을 유지시키는데 중요한 조절자로서의 역할을 한다. 본 실험에서는 自然銅 처리 후 골절 초기에 일어나는 염증반응 변화를 전염증효소인 MIF와 IL-6의 골절부위 내 분포변화를 통해 면역조직학적으로 관찰하였다. MIF는 상처 치유기전에 관여하는 중요한 cytokine으로, In vitro와 in vivo 실험을 통해 염증성 질환 진행에 강력한 역할을 하는 것으로 보고 되었으며<sup>30,31)</sup>. 골절시 섬유모세포 증식을 유도하고<sup>32)</sup> 뼈모세포와 연골모세포에서 extracellular matrix의 합성을 촉진시킨다<sup>33)</sup>. 그 결과 연쇄적 염증반응을 가속화시켜 혈관신생성 증가, 섬유화(fibrosis) 그리고 염증부위의 이주세포의 증가를 유도한다<sup>34)</sup>. 본 실험에서 MIF는 초기 골절 지역에서 증가하였다. 한편 MIF의 활성화는 IL-6의 분비 증가를 유도하는데, Janus family tyrosine kinase(Jak) - signal transducers and activators of transcription(STAT) 경로를 통해 ligand 자극에 대한 특정 반응을 정확하고 빠르게 유도한다. 즉 Jak1 & Jak2의 활성화는 IL-6R- $\alpha$ 와 gp130 receptor subunit의 특정 tyrosine residue의 인산화를 유도함으로써 수용체가 Sic homology 2 domain을 매개로한 STAT3과 결합을 이룰 수 있는 docking site를 형성하도록 유도한다. 이어서 cytoplasmic protein인 STAT의 수용체로서의 recruitment가 일어나면 STAT은 receptor-associated Jak에 의하여 conserved tyrosine residue의 인산화를 겪은 후, 수용체로부터 유리되어 hetero-dimerization을 이룬 다음 핵으로 전위되어 IL-6 유전자의 promoter인 STAT-response element에 결합하여 전사조절인자로서 작용함으로써 유전자의 발현을 유도하게 된다<sup>35)</sup>. 이러한 전염증효소의 골절부위 내 과도한 증가는 I $\kappa$ B kinase로 알려진 IKK



(IKK $\alpha$ ,  $\beta$ )를 활성화시켜 I $\kappa$ B protein의 serine residue를 인산화시킴으로써 불활성화된 상태로 세포질에 존재하는 nuclear factor(NF)- $\kappa$ B의 세포내 작용을 유도하며, 그 결과 골절부위에서 NF- $\kappa$ B 활성이 증가된다<sup>36,37</sup>. 본 실험에서 IL-6는 초기 골절 지역에서 증가하였다. OPN은 뼈모세포에서 생성되어  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin을 통해 뼈파괴세포의 뼈 부착과 이주에 관여하고<sup>38</sup> 골절 초기 다양한 성장인자와 bone resorption factor(1,25-dihydroxyvitamine D3 and retinoid acid)에 의해서 생성이 증가되어<sup>39-41</sup> NF- $\kappa$ B 활성화와 그에 따른 anti-apoptosis factor의 생성 증가를 유도하여 골절조직 내 염증 활성을 일으키는 것<sup>42</sup>으로 보고되었다. 본 실험에서 OPN은 초기 골절 지역에서 증가하였다.

自然銅 처리한 MG-63세포에서 OPN mRNA 발현은 농도 의존적으로 증가하였다. 또한 自然銅을 투여한 생쥐 정강이뼈 골절부위에서 뼈기질 생성이 증가하였고, 뼈모세포의 OPN 생성 증가가 일어났다. 또한 골절부위에서 전염증효소(MIF와 IL-6)의 활성 증가가 관찰되었다.

이상의 결과를 고찰하여보면 自然銅은 골절 초기 전염증효소에 의한 염증반응의 조절과 뼈모세포 활성을 통해서 뼈기질 생성을 유도하여 골절부위 remodeling에 기여할 것으로 기대된다.

## V. 결 론

消瘀血, 續筋骨하는 효능이 있는 自然銅(Pyritum)이 골절 초기 골 remodeling에 대하여 어떤 효과를 나타내는지 연구하기 위해 MG-63 세포를 이용한 OPN mRNA 발현 관찰과 인위적으로 생쥐 정강이 뼈 골절을 유발 후 自然銅 투여가 뼈모세포 활성화에 미치는 영향에 대해 조사하였고, 골절부위 뼈모세포의 형태적인 변화와 전염증 효소(MIF와 IL-6)의 변화를 면역조직화학적으로 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 自然銅을 투여한 실험군이 대조군에 비해 외부 형태의 뒤틀림이 적었고 골절 유합속도가 증가하였다.
2. 自然銅을 투여한 실험군이 대조군에 비해 뼈기질 생성이 증가하였다.

3. 自然銅을 투여한 실험군이 대조군에 비해 혈관 신생성이 증가하였다.
4. 自然銅을 투여한 실험군이 대조군에 비해 전염증 효소(MIF와 IL-6 양성반응) 활성이 증가하였다.
5. 自然銅이 처리된 MG-63 세포에서 OPN mRNA, OPN생성이 증가하였다.

## VI. 참고문헌

1. 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울 : 최신의학사. 1999 : 557, 568-71, 580-92.
2. 王燾. 外臺秘要. 서울 : 成輔社. 1975 : 7 49-50.
3. 한방재활의학과학회. 한방재활의학과학. 서울 : 군자출판사. 2005 : 197-202.
4. 김익동, 이수영, 김풍택, 박병철, 박희진. 경골골절의 지연 및 불유합증에 대한 임상적 고찰. 대한정형외과학회지. 1984 ; 19(1) : 157-64.
5. Perumal V, Roberts CS. (ii) Factors contributing to non-union of fractures. Current Orthopaedics. 2007 ; 21(4): 258-61.
6. 李挺. 新校 編註醫學入門. 서울 : 대성문화사. 1996 : 491, 630.
7. 趙倍. 聖濟總錄(7卷). 북경 : 人民衛生出版社. 1987 : 460-4.
8. 南京中醫學院. 諸病源候論校釋. 北京 : 人民衛生出版社. 1982 : 1026-8.
9. 孫思邈. 備急千金要方. 北京 : 人民衛生出版社. 1982 : 454-5.
10. 陳師文 等 編. 太平惠民和劑局方. 中國 : 旋風出版社. 1976 : 220-7.
11. 허준. 동의보감. 서울 : 법인문화사. 1999 : 1522, 1525, 2006.
12. 이한구, 정문상, 윤강섭. 한국 인삼이 골절치유에 미치는 영향. 대한정형외과학회지. 1984 ; 19(3) : 483-91.
13. 김진호, 오승환. 동종골의 치유 과정에 홍화씨를 첨가한 히알루론산의 골 형성에 미치는 영향. 원광치의학. 2003 ; 12(1) : 167-87.
14. 황태경, 오민석, 송태원. 加味身痛逐瘀湯이 흰 쥐의 골절 유합에 미치는 영향. 대전대학교 한의학연구소 한의학논문집. 1999 ; 8(1) : 727-38.
15. 염익환, 오민석, 송태원. 加味芍歸湯 및 加味芍歸

- 湯加鹿茸이 흰 쥐의 골절 유합에 미치는 영향. 대전대학교 한의학연구소 한의학논문집. 1999 ; 8(1) : 675-87.
16. 손원택. 順氣活血湯이 흰 쥐의 골절 유합에 미치는 영향. 한방재활의학과학회지. 1999 ; 9(2) : 350-62.
  17. 황지혜. 自然銅의 투여가 인체의 뼈모세포 활성화와 생쥐 정강이뼈 골절에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2009 ; 26(2) : 159-70.
  18. 설재욱, 김세진, 안혜림, 정일문, 신미숙, 장하정, 최진봉. 自然銅에 對한 文獻的 考察. 대한한의학방제학회지. 2006 ; 14 : 82-104.
  19. 이홍초. 동의광물학. 부산 : 부산대학교 출판부. 1998 : 296-308.
  20. 李時珍. 校訂本 本草綱目. 서울 : 의성당. 1993 : 466-8.
  21. 吳儀洛. 本草從新. 서울 : 행림출판. 1989 : 203.
  22. 黃宮繡. 本草求真.台北 : 宏業書局有限公司. 1975 : 244.
  23. Sha Yin, Liu Guodong, Lan Wenzheng, Liu Pingsheng, Zhang Peiqun, Lin Han, Wen Xiaoheng. Study on the changes of metal elemental contents in whole blood and bone during fracture healing. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B. 1996 : 358-61.
  24. 국윤범. 自然銅(산골)의 품질표준화 및 炮製 전후의 성분 비교. 대한본초학회지. 2003 ; 18(1) : 21-31.
  25. 민평기, 서영배. 自然銅의 수침법에 대한 문헌적 고찰. 대전대학교 한의학연구소 한의학논문집. 2001 ; 10(1) : 47-53.
  26. 최호영, 김기동, 우경하. 自然銅 포제의 규격화 연구. 대한본초학회지. 1999 ; 14(1) : 29-35.
  27. 최호영. 시판되는 自然銅 및 煨自然銅의 기원 연구. 대한본초학회지. 1999 ; 14(1) : 23-7.
  28. 윤혜경, 노영수. 藥用 自然銅 중 金屬元素의 흰 쥐에서의 相互作用에 관한 연구. 경희대 약대논문집. 1985 ; 18 : 105-22.
  29. 대한병리학회. 병리학. 서울 : 고문사. 2000 : 1015-7.
  30. Morand EF. New therapeutic target in inflammatory disease :macrophagemigration inhibitory factor. J Internal Medicine. 2003 ; 35 : 419-26.
  31. Abe R, Shimizu T, Ohkawara A, Nishihira J. Enhancement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in injured epidermis and cultured fibroblasts. Biochim Biophys Acta. 2000 ; 1500(1) : 1-9.
  32. Mitchell RA, Metz CN, Peng T, Bucala R. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. J Biol Chem. 1999 ; 274(25) : 18100-6.
  33. Lacey D, Sampey A, Mitchell R, Bucala R, Santos L, Leech M, Morand E. Control of fibroblast-like synoviocyte proliferation by macrophage migration inhibitory factor. Arthritis Rheum. 2003 ; 48(1) : 103-9.
  34. Onodera S, Nishihira J, Iwabuchi K, Koyama Y, Yoshida K, Tanaka S, Minami A. Macrophage migration inhibitory factor up-regulates matrix metalloproteinase-9 and -13 in rat osteoblasts. Relevance to intracellular signaling pathways. J Biol Chem. 2002 ; 277(10) : 7865-74.
  35. Carlene T, Luis AD, Nora GS, Lan LL, Anita HK, Raj M, Brian JN, Leslie JC, David AF. Responsiveness of Human T Lymphocytes to Bacterial superantigens presented by cultured Rheumatoid Arthritis Synoviocytes. Am College Rheumto. 1996 ; 39(1) : 125-36.
  36. Tamiyo K, Taejoon C, Toshimi A, Masashi Y, Nasser N, Dana G, Louis C, Thomas A. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. J Bone & Mineral Research. 2001 ; 16(6) : 1004-14.
  37. Muneaki I, Yoichi E, Kunikazu T, Susan RR, Hisashi K, David TD, Mitsuru E, Akira N and Masaki N. Osteopontin is associated with nuclear factor  $\kappa$ B gene expression during tail-suspension-induced bone loss. Experimental Cell Research. 2006 ; 312(16) : 3075-83.
  38. Rousseau F, Saugier P, Le Merrer M, Munnich A, Delezoide AL, Maroteaux P, Bonaventure J, Nancy J and Sanak M. Stop codon FGFR3

- mutations in thanatophoric dwarfism type 1. *Nat Genet.* 1995 ; 10 : 11-2.
39. Weizmann S, Tong A, Reich A, Genina O, Yayon O and Monsonego-Ornan E. FGF upregulates osteopontin in epiphyseal growth plate chondrocytes: Implications for endochondral ossification. *Matrix Biology.* 2005 ; 24(8) : 520-9.
40. Gordjestani M, Dermaut L, De Ridder L, Thierens H, De Waele P, De Leersnijder WW and Bosman F. Osteopontin and bone metabolism: a histology and scintigraphy study in rats. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2005 ; 34(7) : 794-9.
41. Kasugai S, Todescan R, Nagata T, Yao KL, Butler WT and Sodek J. Expression of bone matrix proteins associated with mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in vitro: inductive effects of dexamethasone on the osteoblast phenotype. *J Cell Physiol.* 2003 ; 147 : 111 - 20.
42. Muneaki I, Yoichi E, Kunikazu T, Susan RR, Hisashi K, David TD, Mitsuru E, Akira N and Masaki N. Osteopontin is associated with nuclear factor  $\kappa$ B gene expression during tail-suspension-induced bone loss. *Experimental Cell Research.* 2006 ; 312(16) : 3075-83.