

馬骨 추출물의 성장기 흰쥐 장골 길이 성장에 대한 효과

이세나^{1#}, 최한^{2#}, 손재봉¹, 정재승¹, 김윤정², 강대평³, 박수영⁴, 강세찬⁵, 임강현^{1*}

1: 세명대학교 한의과대학 본초학교실 2: (주) 아이지에스 3: 제주마산업(주)
4: 제주하이테크산업진흥원 제주생물종다양성연구소 5: 세명대학교 자연약재과학과

Effects of Horse Bone Powder Extract on Longitudinal Bone Growth in Adolescent Male Rats

Sena Lee^{1#}, Han Choi^{2#}, Jaebong Son¹, Jaeseung Jeong¹, Yunjung Kim²,
Daepyung Kang³, Sooyeong Park⁴, Sechan Kang⁵, Kanghyun Leem^{1*}

1: Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Semyung University
2: IGSbio Co. Ltd 3: Jeju Industrial Horse a Limited Company
4: Jeju Biodiversity Research Institute, Jeju Hi-Tech Industry Development Institute
5: Department of Natural Medicine Resources, Semyung University

ABSTRACT

Objectives : This study was designed to investigate the effects of horse bone powder extract on the growth of longitudinal bone in adolescent male rats.

Methods : Longitudinal bone growth was measured by fluorescent microscopy. To examine the effects on the growth plate metabolism, the total height of growth plate, the induction of local insulin-like growth factor-1 (IGF-1), and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) were measured.

Results : Horse bone powder extract enhanced longitudinal bone growth and total height of the growth plate. Also, it promoted the induction of local IGF-1 and BMP-2 of the growth plate.

Conclusions : This study shows that the horse bone powder extract effects longitudinal bone growth in adolescent rats and might be used for both stunted adolescents and inherent growth failure patients.

Key words : Horse bone extract, Longitudinal bone growth, Insulin-like growth factor-1, Bone morphogenetic protein-2, Growth plate

서론

현대에 이르러 신장에 대한 우리나라 국민들의 인식이 많이 서구화됨에 따라 큰 키에 대한 선호도가 갈수록 높아지고 있다. 이에 따라 身長의 발달이 집중적으로 일어나는 청소년기의 체격 성장에 대한 관심도 마찬가지로 증가하고 있다. 큰 키에 대한 선호가 사회적인 심미관으로 확립되면서 비록 병리적이지는 않지만 또래에 비해 상대적으로 작은 신장은 성장기 청소년들의 스트레스와 소외감의 원인이 되고 있다. 실제로 청소년들은 키가 큰

경우 자신의 외모에 만족하고 스스로를 존중하는 경향이 있고¹⁾, 낮은 신장으로 인한 자신의 외모에 대한 불만족이 신체지각의 비정상적으로 발전하여 심한 경우 신체적 건강을 해칠 뿐만 아니라 우울, 섭식장애와 같은 정신적 부작용을 초래하기도 한다²⁾. 현재 청소년 성장클리닉 등에서 이루어지고 있는 성장장애에 대한 치료가 비단 小人症(Homunculus) 같은 극단적인 신장 성장의 부재로 인한 사례보다는 평균에 비해 미약한 발육부진이나 성장부진 등의 경미한 증상에 초점을 맞추고 있다는 점을 보아도 이러한 경향을 인식할 수 있다.

* 교신저자 : 임강현, 충북 제천시 신월동 세명대학교 한의과대학 본초학교실

: 제 1 저자로 논문 기여도가 같음

· Tel : 043-649-1341 · E-mail : heavenok@dreamwiz.com

· 접수 : 2009년 8월 19일 · 수정 : 2009년 9월 21일 · 채택 : 2009년 9월 23일

서양의학적인 관점에서 청소년기의 성장은 2차 성장과 그 궤를 같이 한다. 性的인 성숙과 더불어 골격과 장기의 폭발적인 성장과 성숙이 일어나는데 이는 해부학적이고 형태학적인 변화뿐만 아니라 생리학적인 변화도 수반하게 된다.

한편 한의학적인 관점에서 청소년기의 성장은 先天之精과 後天之精의 충만으로써 이야기 된다. 先天之精은 부모에게 물려받은 것으로 腎臟이 그 근본이 되고(腎爲先天之本), 後天之精은 호흡과 섭식으로 형성되는 것으로 脾臟이 그 근본이 된다(脾爲後天之本)³⁾. 腎과 脾는 성장의 원동력을 제공하는 요소로서 虛損하게 되면 성장부진의 증상들이 나타나게 되며 대표적으로 五遲, 五軟, 疳症 등이 그 예이다⁴⁾. 이들 증상은 모두 虛症으로 분류되어 이에 대한 치료도 虛를 補하는 개념으로 진행되며, 상용하는 약물도 대부분 補益法을 위주로 구성되게 된다⁵⁾.

馬骨은 일반적으로 널리 사용되는 약물은 아니나 말의 주요 산출지인 제주도에서는 민간요법의 일환으로 널리 사용되었다⁶⁾. 馬骨의 가루는 특히 골다공증을 비롯한 각종 골질환, 어린이의 성장에 좋다는 민간의 전승이 존재하는데, 최근 연구에서 馬骨이 골질환 인자 등에 긍정적인 영향을 주고, 골다공증에 유의한 효과를 가지는 것으로 보고되어 이를 뒷받침해주게 되었다^{7,8)}. 그러나 현재까지 馬骨의 성장 효능에 관한 직접적인 연구는 크게 미흡하였다.

한의학에서도 馬骨이 고대로부터 사용된 흔적을 찾을 수 있다. 《중화본초》에서는 馬骨의 성미는 달고(甘), 약간 차가우며(微寒) 주로 醒神, 解毒斂瘡에 사용하였고, 嗜睡, 痘瘡, 耳瘡, 陰瘡, 癰疽를 치료하는 효능이 있다고 하였고⁹⁾, 《동의보감》에서도 馬頭骨과 馬脛骨에 대한 언급이 있으며, 馬脛骨은 성질이 차고, 맛이 달며 陰을 보하고 火를 사하여 黃芩이나 黃連의 대신으로 쓴다고 하였다¹⁰⁾.

본 연구는 이 馬骨 추출물이 성장기 흰쥐의 장골 길이 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해 계획되었다. 장골 길이 성장에 대한 영향을 관찰하기 위하여 장골 성장 길이와 성장판 전체 높이를 측정하였으며, 면역 화학적 조직 염색을 통한 insulin-like growth factor-1 (IGF-1)과 bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)의 성장판내 발현 정도를 관찰하였다. 상기의 연구 활동에서 소정의 결과를 얻었으므로 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

실험에 사용한 동물은 80±10 g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐(3주령)를 대한실험동물로부터 구입하여 사료와 물을 충분히 공급하면서 1주간 실험환경에 적응시킨 다음 대조군과 실험군으로 나누어 실험에 사용하였다(n=10). 본 연구는 세명대학교 동물윤리위원회의 승인을 받

아 이루어졌다(smecae09-06-01).

실험에 사용된 馬骨은 제주마산업(주)을 통해 구입한 제주산 36개월령 웅성 말(*Equus caballus*)의 넙다리뼈를 사용하였다. 섬오가피(*Acanthopanax koreanum* Nakai)는 (주)아이지에스에서 제주 한라산에서 채집한 것을, 세명대학교 본초학교실에서 검증하여 사용하였으며, 세명대학교 자연약재과학과에 보관하였다(No. SMN-130).

2. 방법

1) 시료의 조제

실험에 사용된 馬骨 추출물과 섬오가피 추출물은 다음의 공정으로 만들어진 것을 (주)아이지에스로부터 공급받아 사용하였다. 제주산 36개월령의 웅성 말의 넙다리뼈를 수세하여 가공분쇄기(NIRO Atomizer, Denmark)를 통해 미분쇄하여 馬骨 분말 12 kg을 얻었으며, 이를 열풍건조기에서 1차 건조시킨 후 냉동보관하였다. 위의 馬骨 분말에 5배의 50% acetone을 넣고 60°C에서 2시간 추출하고, 와트만 종이 여과지(Whatman NO. 1)로 여과하여 그 여액을 감압농축시킨 후 동결건조기(FD 8512, 일신랩, 한국)를 이용하여 동결건조하여 사용하였다. 섬오가피는 10배의 70% EtOH을 가하여 60°C에서 2시간 추출하고 와트만 종이 여과지(Whatman NO. 1)로 여과하여 그 여액을 감압농축하여 분말로 제조하였다. 위의 공정을 거친 馬骨 추출물을 시료 A로 하였고, 馬骨 추출물과 섬오가피 추출물을 1:1로 혼합한 것을 시료 B로 하였다.

2) 시료의 투여와 실험군의 설정

흰쥐의 골성장에 대한 시료 A, B의 효능을 관찰하기 위하여 골성장 측정을 위해 Hansson이 처음 시도한 방법을 사용하였다¹¹⁾. 이는 정상적인 골대사를 관찰하기 위한 방법으로 형광인자가 칼슘과 칼레이트결합을 통해 골에 침착되는 현상을 이용한 것이다. 골생성이 가장 활발한 성장기에 골성장판 하부의 골신생부에 가장 많이 침착하여 선을 형성하는데 이를 이용하여 일정기간을 두고 투여하여 각 선 사이의 길이를 형광현미경으로 관찰하여 성장한 길이를 측정하였다. 투여된 약물은 성장판에 도달하여 작용을 미치는 시간이 최소 12시간이 걸리므로¹²⁾, 본 실험에서는 충분한 약효의 발현을 위해 부검 4일 전부터 하루 1회 시료를 투여하기로 결정하였다.

대조군(증류수투여군)은 증류수를 경구투여하였고, 시료 A 투여군은 고, 중, 저농도의 3개 농도(250, 50 및 10 mg/kg, p.o.)로, 시료 B 투여군은 고농도 1개 농도(250 mg/kg, p.o.)로 실험개시일(1일)부터 5일간 매일 1회 투여하였다. 모든 실험군에 똑같이 실험개시 후 4일에 칼세인(calcein: 10 mg/kg, i.p.: Sigma, USA)을 투여하였다.

3) 체중

실험개시일부터 종료일까지 매일 같은 시각 체중을 측정하였다.

4) 조직표본제작

형광인자 투여 1일 후에 흰쥐를 chloral hydrate (純正化學, Japan, 35.0 mg/kg, i.p.)로 마취시켜 개흉한 다음, 우심이를 절개하고 needle (No. 18)을 좌심실에 주입한 후 헤파린처리된 5% sodium nitrite (Sigma, USA) 생리 식염수를 심장에 관류시키고, 이어서 0.1 M phosphate buffer에 녹인 pH 7.4의 4% formalin 고정액으로 관류시켰다. 그 후 흰쥐의 좌우 족경골(tibia)을 떼어내어 2시간 동안 0.1 M phosphate buffered formalin 고정액에 후고정 시킨 다음, 50 mM EDTA에 2~3일 동안 방치하여 탈회 후, 동결에 대한 보호를 위해 30% sucrose에 담가 4°C에서 하룻밤 동안 유지하였다. 고정된 골조직을 동결한 후 sliding microtome (HM440E, Zeiss, Germany)을 사용하여 족경골(tibia) 근위(proximal part)부의 시상절편(sagittal section)을 매 40 μm씩 수집하였다.

5) 골성장 측정 및 성장판 관찰

매 40 μm로 수집된 족경골 근위부 시상절편을 슬라이드 글라스 위에 올리고 건조한 후 형광현미경을 이용하여 골 조직 내 형광인자의 침착으로 형성된 선과 성장판 사이의 길이를 측정하여 1일간의 골 성장 지표로 사용하였다.

길이 측정 후 cresyl violet 염색한 다음 성장판 내의 휴지부, 증식부 및 비대부의 연골세포를 관찰하고, 전체 높이를 측정하였다.

6) 면역조직화학염색

면역조직화학염색을 통해 IGF-1과 BMP-2의 성장판 내 발현을 관찰하고자 하였다. 상기와 같이 40 μm로 준비된 조직절편을 사용하였다. 면역염색에 사용된 1차 항체는 각각 IGF-1 antibody (Santa Cruz Biotech, USA)와 BMP-2 antibody (Santa Cruz Biotech, USA)를 사용하였다. IGF-1의 2차 항체로는 anti-rabbit antibody (Vector Lab, USA)를 사용하였고, BMP-2의 2차 항체로는 anti-goat antibody (Vector Lab, USA)를 사용하였다. 또한 Vectastatin elite ABC kit (Vector Lab, USA)를 사용하였다. 실험방법은 조직 절편들을 0.1 M PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.2)에 5분 동안 담그고, Triton-X 100 용액(Sigma, USA)에서 15분간 2회, 0.1 M PBS+

0.5% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma, USA)에서 15분간 2회 씻어낸 다음, 1차 항체와 함께 상온에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 다음날 15분간 2회 0.1 M PBS+0.5% BSA에서 행군 다음 그 section을 60분간 secondary antibody와 함께 반응시키고, 다시 0.1 M PBS+0.5% BSA로 15분간 2회 행군 후 60분 동안 ABC (avidin-biotin-peroxidase) 복합체를 1:50의 농도로 첨가하여 상온에서 반응시켰다. 각 조직절편들을 0.1 M PB로 15분간 2회 수세한 다음 최종적으로 0.05%의 DAB (3,3-diaminobenzidine, Sigma, USA)과 0.03% 과산화수소가 있는 0.1 M PB에 반응시켰다. 발색된 후 새로운 0.1 M PB에 각 조직절편을 넣어 반응을 중지한 뒤 슬라이드표본으로 제작하여 관찰하였다.

3. 통계

약물의 효과를 판정하기 위해 one way ANOVA test를 이용하였고 사후 검정을 위해 대조군과 비교하는 Dunnett's post hoc test를 사용하였다. 통계학적 유의성은 $p < 0.05$ 이하인 것으로 하였다.

결 과

1. 체중 변화

대조군의 체중은 첫 번째, 두 번째, 세 번째, 네 번째, 다섯 번째 날 각각 81.2±2.3 g, 89.5±2.5 g, 95.9±2.6 g, 102.4±3.0 g, 107.3±3.1 g이었다. 시료 A 고농도군의 체중은 첫 번째, 두 번째, 세 번째, 네 번째, 다섯 번째 날 각각 81.0±2.1 g, 88.8±2.1 g, 94.1±2.3 g, 102.8±2.5 g, 108.5±2.7 g이었다. 시료 A 중농도군의 체중은 첫 번째, 두 번째, 세 번째, 네 번째, 다섯 번째 날 각각 92.6±1.4 g, 98.8±1.6 g, 107.4±1.8 g, 113.8±1.6 g, 121.0±1.8 g이었다. 시료 A 저농도군의 체중은 첫 번째, 두 번째, 세 번째, 네 번째, 다섯 번째 날 각각 81.1±2.1 g, 90.3±1.9 g, 95.5±2.0 g, 103.7±2.2 g, 111.2±2.3 g이었다. 시료 B 고농도군의 체중은 첫 번째, 두 번째, 세 번째, 네 번째, 다섯 번째 날 각각 81.0±1.8 g, 87.3±2.0 g, 94.8±2.2 g, 102.2±2.4 g, 108.6±2.9 g이었다(Table 1).

Table 1. Daily Body Weight Change for Five Days in Adolescent Male Rats

Group	Body weight (g)				
	1	2	3	4	5th day
Normal(n=8)	81.2±2.3	89.5±2.5	95.9±2.6	102.4±3.0	107.3±3.1
A-high(n=8)	81.0±2.1	88.8±2.1	94.1±2.3	102.8±2.5	108.5±2.7
A-middle(n=8)	92.6±1.4	98.8±1.6	107.4±1.8	113.8±1.6	121.0±1.8
A-low(n=8)	81.1±2.1	90.3±1.9	95.5±2.0	103.7±2.2	111.2±2.3
B-high(n=8)	81.0±1.8	87.3±2.0	94.8±2.2	102.2±2.4	108.6±2.9

Normal : DW administrated group. A-high : Sample A (250 mg/kg) administrated group. A-middle : Sample A (50 mg/kg) administrated group. A-low : Sample A (10 mg/kg) administrated group. B-high : Sample B (250 mg/kg) administrated group. Each value is the mean±SEM of ten animals.

넷째날에서 다섯째날 (1일간) 체중변화를 관찰한 결과 대조군은 4.8 ± 0.4 g의 체중변화가 관찰되었고, 시료 A 고농도군에서는 5.7 ± 0.4 g의 체중변화가 관찰되었고, 시료 A 중농도군에서는 7.3 ± 0.7 g의 체중변화가 관찰되었고, 시료 A 저농도군에서는 7.5 ± 0.5 g의 체중변화가 관찰되었고, 시료 B 고농도군에서는 7.5 ± 0.5 g의 체중변화가 관찰되었고, 시료 B 저농도군에서는 6.4 ± 0.8 g의 체중변화가 관찰되었다. 대조군 및 시료 A 고농도군, 시료 A 중농도군, 시료 A 저농도군, 시료 B 고농도군의 체중에서 Normal군과 시료 A 고농도군, Normal군과 시료 B 중농도군, Normal군과 시료 A 저농도군 사이에 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었다(Fig. 1).

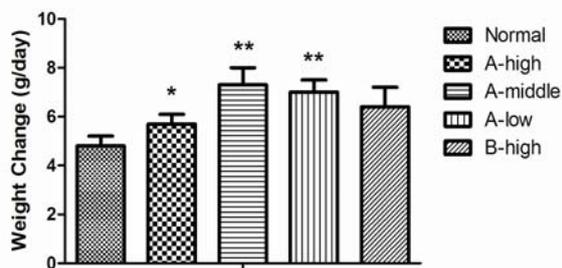


Fig. 1. Weight gain for a day while the experiment was performed from 4th day to 5th day in adolescent male rats

Normal : DW administrated group. A-high : Sample A (250 mg/kg) administrated group. A-middle : Sample A (50 mg/kg) administrated group. A-low : Sample A (10 mg/kg) administrated group. B-high : Sample B (250 mg/kg) administrated group. Each value is the mean \pm SEM of ten animals. * Significantly different from the control, $p < 0.05$. ** Significantly different from the control, $p < 0.01$.

2. 장골 길이 성장에 대한 효과

칼슘과 결합하는 형광물질인 칼세인을 1회 투여하고 24시간 후에 찍은 사진을 보면, 증류수를 투여한 대조군 (Fig. 2A)에 비해 시료 A, B, C 투여군(Fig. 2B, 대표적으로 시료 C만 그림)은 성장판과 뼈의 경계부위로부터 형광표식인자까지의 거리가 더 증가됨을 관찰할 수가 있다. 이 거리가 바로 1일간 성장한 길이이다.

흰쥐의 장골 길이 성장을 측정된 결과 대조군에서 404.0 ± 9.5 μ m의 길이 성장을 나타내었고, 시료 A (250, 50 및 10 mg/kg) 투여군에서 각각 482.2 ± 12.2 μ m, 518.6 ± 21.7 μ m 및 405.5 ± 11.9 μ m의 길이 성장을 나타내었고, 시료 B (250 mg/kg) 투여군에서 428.6 ± 11.9 μ m의 길이 성장을 나타내었다.

정리하면 시료 A 고농도 및 중농도 투여군에서 모두 골성장 촉진효과를 나타내었는데, 그 중에서도 중농도 투여군이 가장 우수하게 성장한 것으로 나타났다. 시료 A 고농도 및 중농도 (250 및 50 mg/kg) 투여군에서는 $p < 0.001$ 의 통계적인 유의성을 보였다. 시료 A 저농도 (10 mg/kg) 투여군에서는 통계적인 유의성이 나타나지 않았다. 시료 B 고농도 (250 mg/kg) 투여군에서는 골성장이 증가하는 경향을 나타내었으나 통계적인 유의성은 없었다.

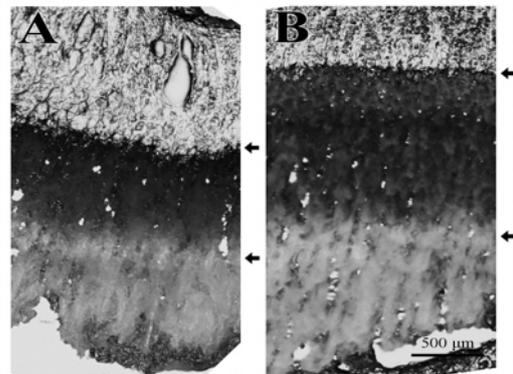


Fig. 2. Fluorescence photomicrograph of a longitudinal section of the proximal tibia

The fluorescent line correspond to the injection of calcein (10 mg/kg).

A : Fluorescence photomicrograph of longitudinal bone growth in normal group.

B : Fluorescence photomicrograph of longitudinal bone growth in Sample A administrated group (50 mg/kg).

Upper arrows mean the line between the growth plate and bone. Lower arrows mean the line formed by calcein injection. Scale bar = 500 μ m.

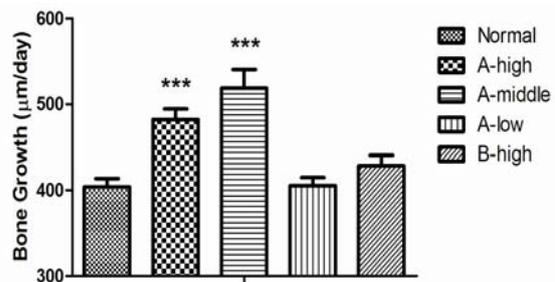


Fig. 3. Effects of Sample A, B, C on the longitudinal bone growth in adolescent male rats

Normal : DW administrated group. A-high : Sample A (250 mg/kg) administrated group. A-middle : Sample A (50 mg/kg) administrated group. A-low : Sample A (10 mg/kg) administrated group. B-high : Sample B (250 mg/kg) administrated group. Each value is the mean \pm SEM of ten animals. *** Significantly different from the control, $p < 0.001$.

시료 B 투여군의 골성장 길이가 시료 A 투여군의 골성장 길이보다 낮게 나온 것은 Fig. 1의 1일간 체중 증가량 그래프로 미루어보아 체중은 증가시키나 조골의 성장과의 관련성은 미약한 것으로 판단되고, 이것이 골 길이 성장의 저하로 나타난 것이라고 생각된다. 馬骨과 섬오가 피는 모두 성장에 유의한 것으로 알려져 있으나, 두 가지를 혼합하여 투여한 결과, 둘의 상충작용으로 인하여 성장효과가 미흡하게 나타난 것으로 생각되어 확실한 검증 을 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

3. 성장판 연골세포대사에 미치는 영향

증류수를 투여한 대조군(Fig. 4A)에 비해 시료 A 투여군(Fig. 4B)은 연골세포대사를 촉진하여 성장판의 전체

높이를 증가시켰다. 특히 증식부(proliferative zone)와 비대부(hypertrophic zone)의 높이를 증가시켰으며 휴지부(resting zone)의 변화는 상대적으로 적었다. 그리고 골화부(ossification zone; OZ)는 비대부와 분명하게 구분되지 않았다(Fig. 4).

전체 성장판의 높이를 측정한 결과 대조군에서 561.3 ± 1.1 μm의 성장을 나타내었고, 시료 A(250, 50 및 10 mg/kg) 투여군에서 각각 606.6±9.1 μm, 615.6±11.4 μm 및 615.1±8.9 μm의 성장을 나타내었고, 시료 B(250 mg/kg) 투여군에서 642.4±16.9 μm의 성장을 나타내었다. 시료 A 투여군의 전농도(250, 50 및 10 mg/kg)에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이를 관찰할 수 있었다($p < 0.001$, Fig. 5). 시료 B 투여군(250 mg/kg)에서도 대조군과 비교하여 $p < 0.05$ 의 통계학적으로 유의한 차이를 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

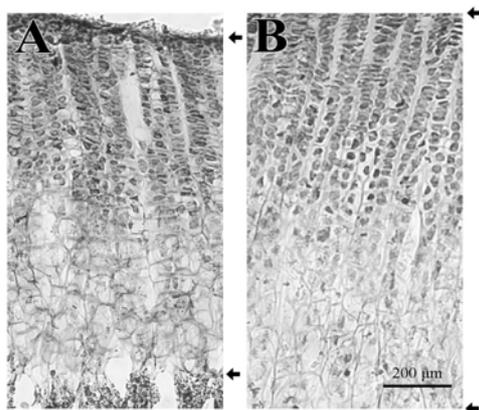


Fig. 4. Photographs of growth plates in a proximal tibia
Sections were stained with cresyl violet.
A : Photomicrograph of cresyl violet-stained chondrocytes in the growth plate of normal group.
B : Photomicrograph of cresyl violet-stained chondrocytes in the growth plate of Sample C administrated group (200 mg/kg).
The growth plate is located between upper and lower arrows. Scale bar = 200 μm.

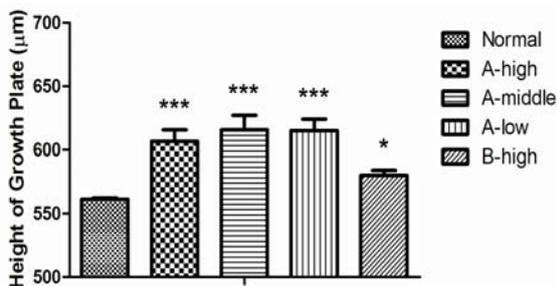


Fig. 5. The longitudinal height of growth plate
Normal : DW administrated group. A-high : Sample A (250 mg/kg) administrated group. A-middle : Sample A (50 mg/kg) administrated group. A-low : Sample A (10 mg/kg) administrated group. B-high : Sample B (250 mg/kg) administrated group. ten animals were treated for each group. Values are means ± SEM. *** Significantly different from the control, $p < 0.001$. * Significantly different from the control, $p < 0.05$.

4. 성장판 내 IGF-1 발현에 미치는 영향

IGF-1의 성장판 조직 내 발현에 대하여, 증류수를 투여한 대조군과 시료 A 투여군을 비교해보았는데 그 결과는 다음과 같았다. 대조군과 시료 A 투여군 모두 휴지부(Fig. 6a, e)와 증식부(Fig. 6b, f)에서 IGF-1 발현이 약하게 나타났으나, 비대부(Fig. 6c, g)와 골화부(Fig. 6d, h)에서는 시료A 투여군에서 면역염색이 증가하여 IGF-1 발현이 증가하였음을 관찰할 수 있었다.

증식부 연골세포에 대해 상세히 관찰해 보면, 대조군의 증식부(Fig. 6b) 별 표식(★) 연골세포 세포질의 IGF-1 발현은 매우 약하게 관찰되었으나, 시료 A 투여군의 증식부(Fig. 6f) 별 표식(★) 연골세포 세포질의 IGF-1 발현이 약간 더 강하게 발현되어 있음을 관찰할 수 있었다.

비대부 연골세포에 대해 상세히 관찰해 보면 대조군 비대부(Fig. 6c) 별 표식(★) 연골세포 세포질의 IGF-1 발현은 보통 수준으로 관찰되었으나, 시료 A 투여군의 비대부(Fig. 6g) 별 표식(★) 연골세포 세포질의 IGF-1 발현이 더 강했고, 더 많은 수의 연골세포에서 발현되었음을 관찰할 수 있었다.

골화부 연골세포의 경우는 비대부 연골세포와 유사하여 대조군 비대부(Fig. 6d) 별 표식(★) 연골세포 세포질의 IGF-1 발현보다 시료 C 투여군의 비대부(Fig. 6h)

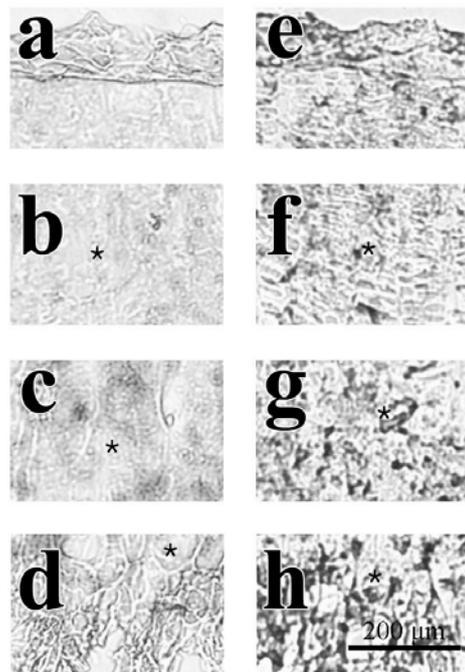


Fig. 6. Immunohistochemical localization of IGF-1 in the growth plate
Normal group was shown at the first column (a, b, c, d). The second column was Sample C administrated group (e, f, g, h). The first row is resting zone (a, e); second row, proliferative zone (b, f); third row, hypertrophic zone (c, g); fourth row, ossification zone (d, h). The asterisks show the main observational region of immunostaining of IGF-1. Scale bar = 200 μm.

별 표식(★) 연골세포 세포질의 IGF-1 발현의 정도가 더 강하고 발현된 연골세포의 수가 더 많음을 관찰할 수 있었다.

5. 성장판 내 BMP-2 발현에 미치는 영향

BMP-2의 성장판조직 내 발현에 대하여, 증류수를 투여한 대조군과 시료 A 투여군을 비교해 본 결과는 다음과 같다. 대조군과 시료 A 투여군 모두 휴지부(Fig. 7a, e)와 증식부(Fig. 7b, f)에선 BMP-2 발현이 약하게 나타났으나, 비대부(Fig. 7c, g)와 골화부(Fig. 7d, h)를 관찰한 결과, 시료 A 투여군에서 면역염색이 증가하여 BMP-2 발현이 증가하였음을 관찰할 수 있었다.

증식부 연골세포에 대해 상세히 관찰해 보면 대조군 증식부(Fig. 7b) 연골세포 세포질의 BMP-2 발현은 매우 약하여 거의 관찰되지 않았으나, 시료 A 투여군 증식부(Fig. 7f) 아래쪽의 성숙시기의 연골세포(별표식 ★ 참조)에서 BMP-2 발현이 약하지만 대조군보다는 더 강하게 관찰되었다.

비대부 연골세포에 대해 상세히 관찰해 보면 대조군 비대부(Fig. 7c) 별 표식(★) 연골세포 세포질의 BMP-2 발현은 보통 수준으로 관찰되었으나, 시료 A 투여군의 비

대부(Fig. 7g) 별 표식(★) 연골세포 세포질의 BMP-2 발현이 더 강하고 발현된 연골세포의 수는 더 많은 수의 세포에서 발현되었음을 관찰할 수 있었다.

골화부 연골세포의 경우는 비대부 연골세포와 유사하게 대조군 비대부(Fig. 7d) 별 표식(★) 연골세포 세포질의 BMP-2 발현보다 시료 A 투여군의 비대부(Fig. 7h) 별 표식(★) 연골세포 세포질의 BMP-2 발현이 더 강한 것을 볼 수 있었다.

고 찰

체중변화에서는 Normal군과 시료 A 고농도군, Normal군과 시료 B 중농도군, Normal군과 시료 A 저농도군 사이에 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었다. 이것은 시료 A, B가 골 길이 성장뿐 아니라 체중도 증가시키는 것으로, 성장기 소아, 청소년의 길이 성장 및 체중 성장 모두에 효과적으로 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

장골 길이는 대조군과 비교하였을 때 일부 실험군에서 장골 길이의 성장이 증가되는 경향을 보였다. 馬骨 추출 물만을 적용한 실험군 중 馬骨 고농도 투여군과 馬骨 중농도 투여군은 통계적으로 유의적인 장골 길이 증가를 보였는데($p < 0.001$), 그 중 馬骨 중농도 투여군이 가장 큰 장골 길이 성장을 나타내었다. 馬骨 저농도 투여군에서 장골 길이 증가가 나타나지 않은 것은 馬骨의 투여량이 효과를 나타내는 최소치에 미달되어 일어난 것으로 여겨진다. 한편 馬骨과 섬오가피가 혼합된 제제를 투여한 실험군은 대조군에 비해 장골 길이 성장이 증가하였으나 통계적인 유의성은 없었고, 馬骨 단독투여에 비해 다소 적은 길이 성장을 보여주었다. 섬오가피는 성장에 효과가 있는 것으로 알려져 있으니¹³⁾ 馬骨과 섬오가피 이 두 제제의 혼합으로 인해 서로 상충되는 효과를 나타내는 것으로 추측된다. 이에 관한 자세한 메커니즘은 앞으로 더욱 상세한 연구가 추가되어야 할 것으로 보인다.

성장판의 길이는 모든 실험군에서 대조군에 비해 증가되는 경향을 보였다. 특히 馬骨 단독투여군에서 성장판에 대한 유의적인 증가를 보였는데 미세한 차이이지만 역시 馬骨 중농도 투여군의 성장판 길이가 가장 길었다. 시료 A 투여군의 전농도(250, 50 및 10 mg/kg)에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이를 관찰할 수 있었다($p < 0.001$, Fig. 5). 시료 B 투여군(250 mg/kg)에서도 대조군과 비교하여 $p < 0.05$ 의 통계학적으로 유의한 차이를 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

성장판 높이가 통계적으로 유의하게 증가함에도 일부 시료에서 유의한 골 길이 성장효과가 나타나지 않은 것은 성장판 높이가 더 민감하여(sensitive) 더 빨리 나타나는 결과이기 때문이다. 즉 성장판 높이가 높아지고 나서 골 길이 성장이 촉진될 확률이 높다. 따라서 골 길이 성장은 촉진되지 않고 성장판 높이만 높아진 경우는 매우 많은데, 골 길이 성장이 촉진된 군이 성장판 높이가 높지

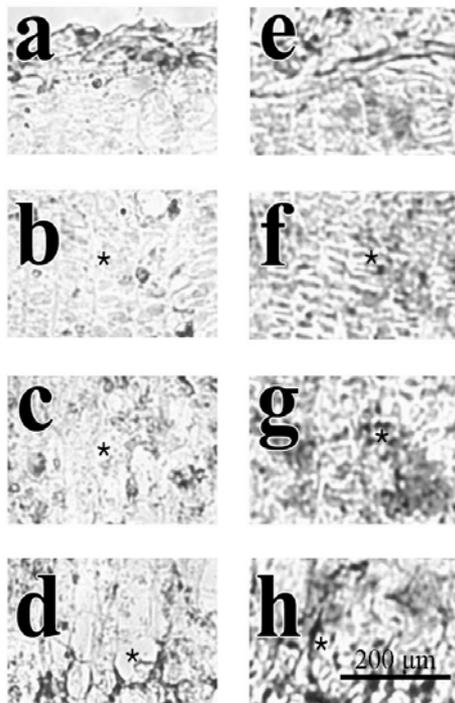


Fig. 7. Immunohistochemical localization of BMP-2 in the growth plate

Normal group was shown at the first column (a, b, c, d). The second column was Sample C administrated group (e, f, g, h). The first row is resting zone (a, e); second row, proliferative zone (b, f); third row, hypertrophic zone (c, g); fourth row, ossification zone (d, h). The asterisks show the main observational region of immunostaining of BMP-2. Scale bar = 200 μ m.

않은 경우는 없다.

성장판의 길이 증가는 곧 연골세포 증식의 결과로 생각할 수 있다. 약물이 어떤 메커니즘으로 연골세포의 증식에 영향을 주었는지 확인하기 위해 추가로 대표적인 성장인자인 IGF-1(인슐린양 성장인자, Insulin-like growth factor 1)과 BMP-2(골형성 단백질, Bone morphogenetic protein 2)의 발현 정도를 면역조직화학염색법(Immunohistochemistry)으로 측정하였다. 그 결과 성장판의 비대부와 골화부에서 대조군에 비해 실험군의 IGF-1과 BMP-2의 발현이 증가하였으며 이를 통해 상기의 성장인자가 성장판에서 국소적으로 증가하여 연골세포의 증식을 활발하게 하였음을 알 수 있다.

성장이란 단순한 체격의 물리적인 증가만을 말하지는 않는다. 서양의학적으로도 성장의 개념은 체격의 형태적 성장뿐만 아니라 내부 장기의 질적인 성숙과 내부 요인들의 리밸런싱(rebalancing) 등을 포함하여 이야기 한다. 그러나 사회적인 통념에 비추어 보면 청소년기 성장이 정상적으로 진행되었다고 할때 그 판단 기준이 되는 것은 특히 체격의 성장, 그 중에서도 신장(height)의 증가가 가장 크다고 할 수 있다. 현재 대부분의 성장클리닉에서 실시하고 있는 치료들도 신장의 증가가 그 목적이라는 점에서 현재 성장에 관한 가장 큰 화두는 역시 신장이다.

신장 증가의 가장 큰 요인은 골격의 성장이다. 신체의 뼈대를 이루는 골격이 성장함에 따라 인체 다른 조직의 성장도 이루어진다. 인체의 뼈가 생성되는 메커니즘은 총 3가지가 있는데 즉, 膜內骨化(Intramembranous ossification), 軟骨內骨化(Endochondral ossification), 異所骨化(Heterotopic ossification)가 그것이다. 특히 신장 증가에 가장 큰 영향을 주는 장골의 길이 증가는 軟骨內骨化(Endochondral ossification)라는 방법으로 이루어 진다¹⁴⁾. 軟骨內骨化는 포유류의 골격계를 발달시키는 주요한 방법중의 하나로 장골의 형성¹⁵⁾은 물론 장골의 길이 성장을 담당한다¹⁶⁾. 장골은 먼저 그 내부에 一次 骨形成 中心(primary centre of ossification)을 형성한다. 一次 骨形成 中心에서는 연골세포(chondrocyte)의 증식이 일어나 비후화되고, 혈관과 신경이 침입하여 영양을 공급한다. 연골세포가 증식되어 연골이 형성되고 연골에 조골세포가 들어와 골화를 시작하여 연골을 경골로 교체한다. 골화가 진행됨에 따라 장골의 끝부분은 영구히 연골로 남아 관절연골을 형성하고 一次 骨形成 中心과 장골 말단 사이에 남은 연골조직에 二次 骨形成 中心이 형성되면서 장골의 길이는 지속적으로 성장한다. 이때 二次 骨形成 中心과 그 주변의 연골조직을 성장판(growth plate) 또는 골단판(epiphyseal plate)이라고 하며 이것은 청소년기에 장골의 길이 성장을 담당하다가 성인기에 들어서면 점차 완전히 골화되어 골단선(epiphyseal line)으로 흔적만 남게 된다¹⁷⁾.

성장판은 청소년기 길이 성장의 가장 중요한 부분으로, 본 실험에서는 성장판의 총 길이를 측정하여 비교하였다. 대조군과 비교했을 때 약물 투여군의 성장판의 길이가 현저히 증가하였는데 성장판의 길이 증가는 곧 장

골의 총 길이 증가에 큰 영향을 미치므로 장골의 길이 또한 증가할 것임을 유추할 수 있다. 단 성장판의 높이성장이 장골의 길이 성장보다 민감하여 앞서 나타날 수 있음을 염두해 두어야 한다. 장골의 길이가 증가한 것은 인체에 적용했을 때 길이 성장을 의미하므로 신장의 증가에 좋은 영향을 미칠 것으로 추측된다.

IGF-1은 성장호르몬(growth hormone)과 관련 깊은 성장인자로 성장호르몬의 자극을 받은 뇌하수체 전엽에서 분비한다. IGF-1은 특히 성장판에서의 연골세포 증식에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다¹⁸⁾. 또한 성장호르몬의 발현 기제에도 관여하여 성장호르몬의 발현과정을 조절하며 인체의 대부분의 장소에서 세포의 분화(differentiation)와 증식(proliferation), 성숙(maturation)을 조절한다¹⁹⁾.

BMP-2는 TGF-β (Transforming growth factor-β) superfamily에 속해 있는 성장인자로서 뼈 형성에 중요한 영향을 미친다²⁰⁾. 특히 retinoid라는 연골세포 증식을 담당하는 물질을 조절하는 것으로 알려져 있으며^{21,22)} noggins라는 골형성 억제인자를 억제하여 골형성을 촉진시키기도 한다²⁰⁾.

고대로부터 말은 재산으로서 가치가 매우 높은 동물이었으므로 말의 뼈를 구하기는 쉽지 않아 약재로서 널리 사용되지는 못했다. 그러나 중국의서의 경우 《神農本草經》, 《名醫別錄》, 《醫學入門·本草》, 《本草綱目》, 《食療本草》 등에서 馬骨에 관한 언급이 있으며, 《東醫寶鑑》에서도 《神農本草經》을 인용한 馬頭骨 부분과 《醫學入門·本草》를 인용한 馬脛骨 부분에서 구체적인 언급을 하고 있다.

《東醫寶鑑》에서 馬頭骨은 “성질이 약간 차다. 머리와 귀에 생긴 헌대를 낮게 한다. 이것으로 베개를 만들어 배면 줄리지 않는다(性微寒療頭耳瘡枕之令人不睡)”고 하였고, 馬脛骨은 “성질이 차고 맛이 달다. 陰을 보하고 火를 瀉하므로 黃芩이나 黃連 대신 쓸 수 있다(性寒微甘補陰瀉火可代芩連用)”고 하였다. 이 내용은 각각 《神農本草經》과 《醫學入門·本草》를 인용한 것으로 되어 있는데 馬頭骨의 경우 《別錄》에서 “頭骨 主喜眠令人不睡”라고 한 것과 《日華子》에서 “頭骨治多睡作沈沈之燒灰敷頭耳瘡佳”라고 한 것에 일맥상통하여 말 머리뼈의 찬 성질을 이용하여 그 재(灰)를 머리와 귀 부분의 瘡證에 주로 적용하였음을 알 수 있고, 馬脛骨의 경우 《醫學入門》에서 “脛骨可代黃芩黃連以治痰火之疾中氣不足者用之”라고 한 것과 《本草綱目》에서 “脛骨煨存性降陰火”라고 한 것에 일맥상통하여 補陰瀉火 개념의 약재로 쓰임이 黃芩, 黃連과 유사하나 찬 성질이 두 약재보다 비교적 약하여 대용품으로 쓰인 것으로 보인다. 또 《本草綱目》에 “扶乳頭 飲兒之夜啼”라 하고 《千金要方》에 “治小兒夜啼不已取馬骨燒灰敷乳上飲兒”라 하여 소아의 夜啼證(어린 아이가 놀라거나 열이 있어 밤에 우는 신경학적인 증상)에도 쓰는 것을 알 수 있다^{9,10)}.

말에 관련된 식품이나 약품은 대체로 사육이 활발했던 유럽을 중심으로 연구되었다. 우리나라의 경우 馬骨에 대

한 효능 연구는 문헌적으로 거의 찾아볼 수 없으나, 제주도의 특산물로서 뼈와 관련된 증상에 적용되어왔다는 민간전승을 토대로 최근 연구가 진행되고 있다. 고 등은 馬骨 성분 급여에 의한 생리기능에 미치는 영향을 보고했고²³⁾, 이 등은 馬骨의 무기물 함량을 비교하였는데 칼슘과 인의 함량이 2:1로서 뼈대사에 긍정적인 영향을 미치는 이상적인 비율이라는 점을 언급하였다²⁴⁾. 한편 조골세포(Osteoblast)를 이용한 골다공증이나 항암, 항염 효과를 검증한 연구 자료들도 새로이 연구되고 있는데 김은 의에 난소적출과 칼슘 식이 조절에 의해 골다공증을 유발한 흰쥐 모델에서 馬骨이 골다공증에 유의한 효과가 있음을 보고하였고⁷⁾, 박은 뼈모세포 계열인 MG-63 세포를 이용한 세포실험과 흰쥐를 대상으로 한 동물실험을 병행한 결과 馬骨 추출물이 뼈대사 과정에서 뼈흡수를 억제하여 골다공증에 효과가 있음을 밝히기도 하였다⁸⁾. 그러나 馬骨이 골성장에 미치는 영향에 대한 체계적인 연구는 미미한 실정이었다.

이에 본 연구는 馬骨 추출물을 적용한 성장기 흰쥐에서 유의적인 장골 길이 증가와 성장판 길이 증가, 성장인자인 IGF-1과 BMP-2 유전자 발현 증가를 나타냄을 확인하여 馬骨 추출물이 성장이 효과가 있음을 밝혔다. 이 같은 결과를 통해 馬骨을 이용한 성장촉진 기능성 식품이나 약품의 개발이 기대되며, 이런 연구와 개발이 제주도의 특산물인 馬骨의 활용가치를 높이는 한편 육체적·심리적으로 큰 고통을 받을 수 있는 청소년 성장부진 환자들을 치료하는 데 도움이 될 수 있을 것이다.

결 론

馬骨 추출물은 성장기 흰쥐의 장골 길이 성장에 유의한 효과를 갖는다. 장골 성장 길이와 총 성장판 높이를 유의적으로 증가시켰고 성장판 내 BMP-2와 IGF-1의 발현을 향상시켰다.

감사의 글

본 연구는 제주마산업(주)의 지원으로 이루어졌으며, 馬骨 분말 제조와 섬오가피 추출물을 제조, 제공하여 준 (주)아이지에스에 감사드린다.

참고문헌

- 서정희, 백재화, 김효철. 청소년소비자의 외모와 능력에 대한 만족과 평가 및 자아 존중감. 생활과학논문집. 2004 ; 5(2) : 53-68.
- 심미경, 이종한, 박은아. 청소년의 신체지각과 통제신념에 따른 신체관리행동. 한국심리학회 연차학술발표대회 논문집. 2008 : 660-1.
- 이중재. 의종필독(상). 서울 : 목과 토. 2000 : 22-4.
- 김덕곤, 김윤희, 김장현, 박은정, 백정환, 이승연, 이진용, 장규태. 동의소아과학. 서울 : 정담. 2002 : 353, 406-7.
- 임강현, 김호현. 成長관련 한약 혼합제제의 흰쥐 장골 길이 성장에 대한 효과. 대한본초학회지. 2003 ; 18(3) : 181-6.
- 양종훈. 제주 조랑말(1). 한국사진학회. 2000 ; 7(1) : 231-7.
- 김지민. 난소적출 후 칼슘결핍식으로 유발시킨 흰쥐의 골다공증에 대한 말뼉분말의 개선효과. 제주대학교 대학원 수의학과 석사학위논문. 2007.
- 박선순. 말뼉 추출물이 뼈질환 인자에 미치는 영향. 제주대학교 대학원 의학과 석사학위논문. 2009.
- 國家中醫藥管理局 中華本草篇委會. 中華本草. 上海科學技術出版社. 1998 ; 9 : 609.
- 許浚. 東醫寶鑑. 여강출판사. 2005 : 2825.
- Hansson LI, Menander-Sellman K, Stenstrom A, Thorngren KG. Rate of normal longitudinal bone growth in the rat. Calcif Tissue Res. 1972 ; 10 : 238-51.
- De Luca F, Barnes KM, Uyeda JA, De-Levi S, Abad V, Palese T, Mericq V, Baron J. Regulation of growth plate chondrogenesis by bone morphogenetic protein-2. Endocrinology. 2001 ; 142(1) : 430-6.
- 양동식, 차민호, 강봉주, 오세욱, 김영언, 윤유식. 가시오가피가 함유된 성장촉진용 조성물의 골성장효과 연구. 한국식품과학회지. 2003 ; 35(4) : 702-7.
- Forriol F, Shapiro F. Bone development: interaction of molecular components and biophysical forces. Clin Orthop Relat Res. 2005 : Mar(432) : 14-33.
- Netter FH. Musculoskeletal system : anatomy, physiology, and metabolic disorders. New Jersey : Ciba-Geigy Corporation. 1987 : 130.
- Brighton CT, Yoichi S and Robert MH. Cytoplasmic structures of epiphyseal plate chondrocytes: quantitative evaluation using electron micrographs of rat costochondral junctions with specific reference to the fate of hypertrophic cells. Journal of Bone and Joint Surgery. 1973 ; 55-A : 771-84.
- Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. Int J Biochem Cell Biol. 2008 ; 40(1) : 46-62.
- Gerard JT, Sandra RG. Principles of anatomy & physiology (10th edition). USA : Wiley. 2003 : 174.
- Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Vol. II (7th edition). New York : McGraw-Hill.

- 1995 : 3023-44.
20. Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, LaPan P, Luxenberg DP, McQuaid D, Moutsatsos IK, Nove J, Wozney JM. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Nat Acad Sci.* 1990 ; 87 : 2220-4.
 21. Hallahan AR, Pritchard JI, Chandraratna RAS, Ellenbogen RG, Geyer JR, Overland RP, Strand AD, Tapscott SJ, Olson JM. BMP-2 mediates retinoid-induced apoptosis in medulloblastoma cells through a paracrine effect. *Nature Med.* 2003 ; 9 : 1033-8.
 22. Cancedda R, Descalzi Cancedda F, Castagnola P. Chondrocyte differentiation. *Int Rev Cytol.* 1995 ; 159 : 265-358.
 23. 고문석, 이영재. 말뚝 성분 급여가 쥐의 생리기능에 미치는 영향. *난지농업연구소.* 2006.
 24. 이종연. 말고기와 말뚝의 영양 특성. *난지농업연구지.* 2006 ; 15 : 20-2.