

한국산 홍화씨분말 보충식이의 급여가 골절된 흰쥐의 골대사지표에 미치는 영향*

전선민 · 김준한** · 이희자 · 이인규*** · 문광덕** · 최명숙

경북대학교 식품영양학과, 경북대학교 식품공학과, ** 계명대학교 의과대학 내과학교실***

The Effects of Korean Safflower(*Carthamus tinctorious L.*) Seed Powder Supplementation Diet on Bone Metabolism Indices in Rats during the Recovery of Rib Fracture

Jeon, Seon Min · Kim, Jun Han** · Lee, Hee Ja
Lee, In Kyu*** · Moon, Kwang Deog** · Choi, Myung Sook

Department of Food and Nutrition, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

Department of Food Science and Technology,** Kyungpook National University,
Taegu 702-701, Korea

Department of Internal Medicine,*** College of Medicine, Keimyung University,
Taegu 700-711, Korea

ABSTRACT

This study was carried out to investigate the effects of Korean safflower(*Carthamus tinctorious L.*) seed powder supplementation on bone metabolism during the recovery of rib-fracture induced by surgical operation in rats. Male Sprague-Dawley rats of 10 weeks old, weighing $370 \pm 5g$, were divided into two groups after arrival : the control group(C group, AIN-76 semipurified diet) and safflower seed group(S group, AIN-76 semipurified diet+10% safflower seed powder). They were fed experimental diets for 12 days before the rib fracture operation and for 30 more days after the operation. A number 9 rib was fractured surgically and sham-operation was also performed. After the rib-fracture operation, rats were sacrificed on the 8th, 11th, 16th, 21st, and 30th day, respectively. The body weights were decreased on the 8th day after operation in both groups but recovered gradually thereafter. The fractured sections of the S group were more strongly adhered and more rapidly repaired than those of C group. Effects of safflower seed powder supplementation on indices of bone metabolism during the repairing of rib-fracture can be summarized as following. There were no differences between C and S group. In the levels of PTH and calcitonin, which regulate the concentration of plasma calcium. However, PTH level on the 8th day was significantly higher than that on the 16th day in control group. There were also no differences between groups or within groups in the levels of calcitonin. Osteocalcin levels, one of the bone-formation indices, were similar in two groups. Activities of total-ALP in plasma were highest at the 8th day in both groups and decreased thereafter, except on the 30th day in control group. The activities of bone-specific ALP that is directly related to bone calcification, showed higher levels in the S group than in the C group

채택일 : 1998년 7월 15일

*This study was supported by a grant from Woori Safflower Seed Farmer's Association in 1997.

throughout the experimental period. They were significantly increased in the S group on the 11th, 16th, and 21st days. In comparisons of plasma calcium and phosphate levels, Ca levels were tended to be lower in the S group than in the C group and P levels showed the opposite trend. It seems that the fractured ribs were more rapidly repaired in rats supplemented with safflower seed powder than in control rats, possibly due to stimulation of bone calcification from increased activity of bone-specific ALP. (*Korean J Nutrition* 31(6) : 1049~1056, 1998)

KEY WORDS : safflower seed · rib-fracture · bone metabolism · bone-specific alkaline phosphatase.

서론

골격의 주요기능은 신체의 구조를 형성함으로써 신체의 여러기관을 보호할 수 있는 형태와 견고성을 주고 근육과 건이 뼈에 연결되어 움직일 수 있게 한다¹⁾. 뼈 조직의 또 한가지 중요한 기능은 혈액을 만들어 신체 각 조직에 공급하는 것이다. 뼈기질은 건조중량의 약 50%가 무기물질로 구성되어 있다. 뼈무게의 60~66%는 무기질에 해당하며 나머지 34~40%는 수분과 단백질 중량이다. 골단백질로는 콜라겐, osteonectin, osteocalcin 등이 있으며, 이 중 osteocalcin은 주요한 3개의 γ -carboxyglutamic acid 잔기를 포함한 49개의 아미노산 잔기로 이루어진 peptide로 bone gla-protein으로 알려져 있으며 뼈구조에서 hydroxyapatite 및 칼슘과 단단하게 결합한다²⁾³⁾. 기질내 이들 콜라겐과 무형질들은 무기질화 또는 석회화되어 인체의 지지기능을 수행한다.

골절 치유과정 중 뼈형성에 관련된 여러 요인들은 치유속도에 영향을 미치는 것으로 추측되나 이와 관련된 골대사의 지표변화에 대해서는 거의 보고된 바가 없다. 뼈의 생성과정 또는 석회화 기전에는 막내골화와 연골내골화가 있으며, 골모세포(osteoblast)와 파골세포(osteoclast)의 작용과 함께 무기염류가 침착하여 딱딱한 골로 된다⁴⁾. 이 때 막내골화는 결합조직에서 바로 뼈가 되고 연골내골화는 연골에서 전환된다. 혈장에 존재하는 total alkaline phosphatase(total-ALP) 가운데 그 중 뼈의 석회화에 관여하는 것은 bone-specific alkaline phosphatase(bone-ALP)이다. Alkaline phosphatase의 isoform 중 하나인 bone-ALP는 골모세포 표면에서 발견되는 당단백질의 일종이며⁵⁾, 이 효소의 기능은 골격 무기질화(skeletal mineralization)에 관여한다고 보고되었다³⁾⁵⁾⁶⁾.

골대사에서 석회화된 뼈성분이 다시 파괴 또는 분해되는 것을 골흡수라 하며 뼈표면에 존재하는 파골세포

는 골흡수를 담당한다. 뼈에 있는 칼슘은 두 가지 기전에 의해 유리되는데⁴⁾, 첫번째 기전은 hydroxyapatite crystal로부터 간질액으로의 단순한 칼슘이온 전이로서 빠르게 일어난다. 칼슘을 유리시키는 두번째 기전은 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone, PTH)이 뼈기질의 흡수를 촉진시키는 파골세포의 수를 증가시키거나 활성화시켜 칼슘을 유리시킨다. PTH와 반대로 calcitonin은 갑상선에서 합성되어 뼈기질 흡수를 방해한다. 골대사에서 골흡수와 골형성이 짝지어져 일어날 때 이를 골의 재형성 또는 골대사회전(bone-turnover)이라 한다. 골형성지표 중의 하나인 osteocalcin은 골형성시 골모세포의 활성을 간접적으로 반영하는데⁷⁾⁸⁾, 골흡수 증가로 인해 골밀도가 감소할 때 이차적으로 골모세포의 활동이 증가되며 골모세포에서 osteocalcin의 합성이 증가된다⁹⁾.

뼈에 영향을 미치는 요소들은 여러가지가 복합적 관계를 이루고 있는데, PTH와 calcitonin 이외에 운동, 에스트로겐, 혈액내 칼슘과 인의 농도비율 등을 들 수 있다. 한편 국내산 약초 중 홍화(또는 잇꽃, *Carthamus tinctorius L.*)의 꽃은 혈소판 응고를 억제하고 출혈시간을 지연시키는 효과가 있을 뿐만 아니라¹⁰⁾, 혈장 콜레스테롤과 중성지방 저하기능¹⁰⁾과 함께 여성들의 통경약(월경유도제)이나 조직내 응고된 혈액을 풀어주는 약제로 한방에서 널리 사용해 왔다. 최근 그 작용기작은 전혀 밝혀진 바 없으나 홍화의 씨가 굵이 가거나 다친 뼈를 빠르고 튼튼하게 회복시키는 등 뼈질환에 뛰어난 효과가 있다고 민간에 알려지면서 민간요법에 사용되기 시작하였다. 뿐만 아니라 보건복지부는 98년 상반기에 홍화씨를 홍화유와 다른 형태로 가공식품화하는 것을 허용하여 국내 재배량도 급격히 증가될 것으로 보인다. 이에 본 연구팀은 최근들어 골절치료의 민간요법에 사용되고 있는 홍화의 효능을 과학적으로 확인하고 기능성 성분을 탐색하는 연구의 접근으로 홍화씨 분말식의 급여가 늑골이 골절된 흰쥐의 골절 치유과정에서 골대사 지표에 미치는 영향을 조사하였다.

Table 1. Experimental design for the effect of safflower seed powdered diet on repairing the rib fracture in rats

Duration of animal experiment after rib fracture(days)	Control	Safflower seed	Sham-operation
8	C1 (4) ¹⁾	S1 (5)	-
11	C2 (7)	S2 (6)	-
16	C3 (6)	S3 (6)	-
21	C4 (7)	S4 (5)	-
30	C5 (6)	S5 (6)	Sham (7)

1) Number of animals

실험재료 및 방법

1. 홍화씨 분말의 조성

토중 홍화씨는 의성군 소재 우리홍화인 영농조합에서 제공된 시료를 사용하였다. 수확된 홍화씨를 정선, 선별하여 세척하고 160~180℃에서 15~20분간 구운 후 20mesh이하로 분쇄한 시료를 사용하였다. 홍화씨 재료의 일반 성분조성은 수분이 5.2%, 고형분이 94.8%였고, 고형분 중 회분, 조단백질, 조지방, 탄수화물 함량은 각각 2.9, 18.4, 22.9, 50.6%였으며, 탄수화물 중 당질이 25.2%, 섬유소가 25.4%로 분석되었다.

2. 실험식이 및 골절상 유도

체중이 약 370g인 Sprague-Dawley 10주령 수컷 쥐 65마리를 한국화학연구소로부터 구입하여 7일간 고행사료로 적응시킨 후 Table 1과 같이 무작위로 2개의 대군(정상식이군, 홍화식이군)으로 나누어 Table 2의 식이조성을 가진 정상식이(AIN-76 semipurified diet)와 10% 홍화씨분말 혼합식이로 각각 12일간 사육시켰다. 두 식이군의 식이조성은 홍화씨 분말의 일반성분 조성을 참고로 하여 두 군 식이의 영양소밀도가 동일하도록 만들었다. 실험식이 13일째에는 수술방법에 의한 골절상을 유도하였는데, 그 부위는 소형동물에서 골절상이 빈번히 일어나는 늑골을 선택하였다. 마취제인 ketamine HCl(유한양행)을 체중 1kg 당 75mg의 용량으로 근육주사한 후 가슴피부의 일부를 최소면적으로 개복하여 우측 제 9번 늑골을 수술용 가위로 자르고 골절부위를 육안으로 확인한 후 수술사로 봉합하였다. Sham-operation군은 골절을 가하지 않고 가슴부위의 개복수술만 하여 봉합함으로써 실험종류 후 골절그룹과 대조하였다. 골절유도 후 실험식이를 급여한 30일간의 사육기간이 진행되는 동안 Table 2와 같이 골절후 8, 11, 16, 21 및 30일째 되는 날 각 식이군으로부터 4~7마리의 동물을 무작위로 선택하여 각각 희생하고

Table 2. Diet compositions of the control diet and safflower seed powdered diet fed to rib-fractured rats

Ingredients	Control diet(%)	Safflower seed powdered diet(%)
Casein	20.0	18.15
Safflower seed	-	10.0
D, L-methionine	0.3	0.3
Corn starch	15.0	14.25
Sucrose	50.0	47.45
Cellulose	5.0	2.43
Corn oil	5.0	2.72
Mineral mix ¹⁾	3.5	3.5
Vitamin mix ²⁾	1.0	1.0
Choline bitartrate	0.2	0.2

1) AIN mineral mixture 76(American Institute of Nutrition. Report of the AIN Ad Hoc Committee on standards for nutritional studies. J. Nutr. 107 : 1340-1348, 1977) contained(in g/kg mixture) calcium phosphate, dibasic 500.0 ; sodium chloride, 74.0 ; potassium citrate, monohydrate, 220.0 ; potassium sulfate 52.0 ; magnesium oxide 24.0 ; manganous carbonate 3.5 ; ferric citrate 6.0 ; zinc carbonate, 1.6 ; cupric carbonate 0.3 ; potassium iodate 0.01 ; sodium selenite, 0.01 ; chromium potassium sulfate, 0.55 ; sucrose, finely powdered 118.03.

2) AIN vitamin mixture 76-A contained(in g/kg mixture) : thiamin HCl, 0.6 ; riboflavin, 0.6 ; pyridoxine HCl, 0.7 ; nicotinic acid, 0.003 ; D-calcium pantothenate, 0.0016 ; folate, 0.2 ; D-biotin, 0.02 ; cyanocobalamin (vitamin B-12), 0.001 ; retinyl palmitate premix, 0.8 ; DL-alpha tocopheryl acetate, premix, 20 ; cholecalciferol(vitamin D₃), 0.0025 ; menaquinone(vitamin K), 0.05 ; antioxidant, 0.01 ; sucrose, finely powdered, 972.8.

늑골을 채취하였다. 단 sham-operation군은 대조군과 동일한 식이를 급여하여 마지막 30일째에 모두 희생하였다. 실험동물은 각기 stainless wire cage에서 한마리씩 분리사육하였다. 사육실의 온도는 약 25℃, 습도는 약 60%를 유지하였으며, 광주기는 매일 12시간이 되도록 조절하고 식이 섭취량은 매일 1회, 체중은 3일에 한번씩 일정시간에 측정하였다.

3. 늑골과 혈액채취 및 생화학적 분석

동물희생전 12시간동안 공복시킨 후 ketamin을 주사하여 마취시키고 복부 대정맥으로부터 채혈하였다. 채취한 혈액은 3,000rpm에서 20분간 원심분리하여 혈장을 분리하고, 분석시까지 -60℃에 보관하였다. 골절된 늑골에 형성된 가골은 육안으로 확인되었고 가골부위는 골외형의 형태학적 분석에 사용되었다.

혈장 칼슘과 인은 아산제약(경기도 화성군)의 칼슘과 무기인 측정용 kit, total-ALP 활성도는 동일회사의

Table 3. Food intakes and body weight gains in rib-fractured rats fed the control and safflower seed powdered diets for various periods

Groups	Duration of animal experiment after rib fracture(days)	Food intakes (g/day)	Body Weight gains during bone repair (g/day)
C1	8	22.2±1.1 ¹⁾	-0.5±0.4
S1	8	23.7±1.5	-1.3±1.4
C2	8	21.6±0.9	1.8±2.2
S2	11	22.9±1.3	1.5±1.5
C3	16	22.7±0.8	2.4±2.5
S3	16	22.9±1.0	2.9±3.5
C4	21	19.8±1.4	2.1±2.7
S4	21	21.2±1.1	2.5±3.1
C5	30	21.9±1.0	1.9±3.3
S5	30	22.7±0.9	2.0±2.5
Sham	30	22.9±1.1	2.3±2.1

1) Mean±S.D

ALP 측정용 kit를 각각 사용하여 분광광도법으로 측정하였다. 혈장 PTH 수준과 calcitonin 수준은 각각 면역분석법을 적용한 INTACT PTH kit(Nichols Institute Diagnostics, U.S.A)와 Calcitonin Double Antibody kit(Diagnostic Products Corporation, U.S.A)를 이용하였으며, 동위원소 활성은 Gamma Counter로 측정하였다. Bone-ALP 활성도는 B-ALP ALKPASE-B™ kit(Metro Bio systems Inc, U.S.A)를 이용하여 면역분석법으로 측정하였고, 또한 혈장 osteocalcin 농도측정에는 two-site immunoradiometric assay를 이용한 Human Osteocalcin kit(Nichols Institute Diagnostics and Immutopics, Inc. U.S.A)가 사용되었다.

4. 통계처리 및 분석

통계처리는 SPSS package를 이용하여 각 변인마다 평균과 표준오차를 구하고, Students' *t*-test로 두 식이군간의 각 변이에 대한 차이를 분석하고, one-way ANOVA 분석으로 동일군내의 각 변인에 대한 차이를 비교하였다.

결과 및 고찰

1. 식이섭취량, 수술 후 체중증가량 및 장기중량

실험기간에 따라 나누어진 각 동물군을 대상으로 골절상 유도 후 최대 30일간 실험동물의 식이섭취량 및 체중증가량을 Table 3에 나타내었다. 수술 후 평균 1일 섭취량은 모든 군에서 비슷한 수준이었으며, 치유가 진행되는 동안 일어난 체중변화는 처음 8일째에는 수술에

Table 4. Organ weights in rats fed the control and safflower seed diets for various periods

Groups	Liver(g)	Heart(g)	Kidney(g)
C1	16.72±2.28 ¹⁾	1.23±0.06	3.06±0.06
C2	14.59±1.43	1.19±0.07	3.14±0.07
C3	15.13±1.50	1.27±0.09	3.09±0.09
C4	12.66±1.47	1.40±0.16	2.94±0.16
C5	14.23±1.95	1.27±0.12	2.93±0.12
S1	17.64±2.80	1.26±0.10	3.32±0.10
S2	14.89±1.35	1.25±0.12	3.05±0.12
S3	14.79±2.33	1.33±0.07	3.28±0.07
S4	13.02±1.08	1.32±0.11	3.19±0.11
S5	15.96±2.90	1.29±0.18	3.26±0.18
Sham	17.13±3.31	1.35±0.14	3.19±0.14

1) Mean±S.D

의한 체중감소가 관찰되었으나 11일째부터는 다시 체중이 증가되었다. Sham-operation군의 체중증가량이 높은 경향을 보였는데 이는 sham-operation군의 동물들은 골절 스트레스가 없었기 때문으로 추측된다. 장기중량의 비교에서는 Table 4와 같이 간, 심장, 신장의 중량들은 대조군과 홍화씨분말군간의 차이가 전혀 없었으며 장기의 비대현상이나 경화현상은 관찰되지 않았다.

2. 홍화씨 분말식이 골절치유속도에 미치는 효과

뼈는 결합조직의 특수한 형태인 세포와 세포외 기질로 구성되어 있으며, 특수한 결합조직 형태로 기질이 인산칼슘인 hydroxyapatite crystals로 무기질화(mineralization)되어 있다⁴⁾. 골절이 치유될 때는 골절부에 섬유성 연골이 골막과 골내막으로부터 생겨 골절된 뼈사이를 채우게 되고 골모세포가 나타나 가골(callus)을 만든 다음 뼈가 새로 생성되는 골화(ossification) 단계를 거쳐 완전한 유합이 이루어진다. 골절 후 일어나는 초기반응은 골절로 손상된 부위에 호중성구와 거식세포가 많이 모여 응고된 혈액, 죽은 뼈세포 조각 및 파괴된 뼈기질과 같은 골조직 찌꺼기를 제거하게 된다⁴⁾. 골절부위를 덮고 있는 두꺼운 결합조직 및 초자연골로 이루어진 가골은 골절 8일째 이미 두텁게 형성되었는데 이는 골절된 부위를 안정화시키며 뼈의 접착을 도모한다. 형성된 가골의 대략적인 경도는 가골을 중앙에 둔 늑골을 좌우에 잡고 아래로 휘었을 때 쉽게 부러지는 정도로 시험하였다. 그 결과 C1군, S1군, C2군, S2군들의 늑골절단면은 외형적으로는 두터운 가골속에 접착되어 있는 것처럼 보였지만 외부의 기계적인 힘에 의해 그 절단면이 쉽게 분리되었다. 골절 후 16일동안 사육한 C3군과 S3군에서는 식이에 의한 차이가 관찰되었는데 S3군이 C3군에 비해 골절 절단면이 앞의 식이군들에 비해 좀더 강하게 유착되어 쉽게 분리되지 않았

나 골절 절단면의 분리는 가능하였다. 그 이후까지 사육된 군들(C4, S4, C5, S5군)에서 절취된 늑골들은 가골이 더욱 단단해지거나 가골형태가 사라지는 현상을 보였는데 특히 골절 치유말기에 도달한 S5군에서는 가골이 사라지고 늑골의 외형 및 그 직경이 원래대로 복구되어 육안으로는 절단면 위치가 잘 구별되지 않았다. C5군에서는 가골의 크기는 많이 축소되었으나 절단면 주위의 늑골직경이 나머지 부위에 비해 여전히 크게 남아있었다. 이 실험결과 중 골조직의 외형과 세부적인 구조 변화는 이미 보고된 바¹¹⁾와 같이 골절 후 홍화씨분말군이 정상구조로 회복되는 기간이 대조군에 비해 단

축되었다.

3. 혈액의 생화학적 지표분석

1) 혈장 parathyroid hormone(PTH)과 calcitonin 농도

혈장 칼슘농도가 정상치보다 감소되었을 때 골흡수를 촉진시켜 혈중으로 칼슘을 동원하는 PTH와, PTH의 작용과 상반되는 기능을 가진 calcitonin의 혈중농도를 Table 5에 나타내었다. PTH 수준은 대조군과 홍화씨분말군간 유의적인 차이가 없었고, 골절 후 8일째 희생된 C1군만이 골절 후 16일째 희생된 C3군에 비해 높게 나타나 골절 직후 대조군의 PTH 분비가 치유중기에 비해 상승되어 있었음을 알 수 있었다. 혈장 calcitonin의 농도는 두 식이군의 군간비교뿐만 아니라 동일군내 비교에서도 유의적 차이는 없었지만 홍화씨분말군이 대조군에 비해 약간 높은 경향이였다. Sham-operation군의 동일 호르몬 농도를 이들 두 군과 비교했을 때는 홍화씨군이 전체적으로 sham-operation군에 가까웠다. Calcitonin의 생리적 기능은 아직도 완전히 알려지지 않았지만 혈장 칼슘과 인의 농도를 적절한 수준으로 낮추는 효과가 있다¹²⁾. 특히 혈장 칼슘농도가 높을 때 calcitonin의 분비가 증가되는 것으로 알려져 있다¹³⁾. PTH의 기능은 calcitonin과 길항적으로 작용하여 혈장 칼슘수준이 낮을 때 그 분비가 증가되며 파골세포에 의한 골의 흡수를 도모하는 것으로 보고되었다¹⁴⁾. 대조군이 홍화씨분말군에 비해 PTH 수준은 약간 높은 경향을 나타낸 반면 calcitonin 수준은 약간 낮은 경향을 보여 홍화씨분말의 보충이 뼈침착에 관련있을 듯하나 앞으로 이에 대한 확인실험이 요구된다.

Table 5. Changes of the plasma parathyroid hormone and calcitonin levels in rats fed the control and safflower seed diets for various periods

Groups	Parathyroid hormone(pg/ml)	Calcitonin(pg/ml)
C1	4.00±0.89 ¹¹⁾	31.40±3.66 ²⁾
C2	3.25±0.26 ^{ab}	32.88±5.93
C3	2.54±0.16 ^b	33.03±5.79
C4	2.75±0.18 ^{ab}	29.00±3.36
C5	3.01±0.37 ^{ab}	35.20±7.55
S1	2.59±0.08 ^{NS3)}	29.55±4.00 ^{NS}
S2	2.80±0.18 ^{NS}	40.18±7.57 ^{NS}
S3	2.44±0.17 ^{NS}	33.40±6.29 ^{NS}
S4	2.87±0.26 ^{NS}	43.44±9.03 ^{NS}
S5	2.64±0.17 ^{NS}	35.10±9.62 ^{NS}
Sham	2.87±0.76	42.89±26.2

- 1) Different letters indicate significant differences(p<0.05) within the control or safflower seed group
- 2) Each values are expressed as a mean±S.E.
- 3) NS : Not significant between control and safflower seed group

Table 6. Changes of the osteocalcin levels and activities of the bone specific alkaline phosphatase and total alkaline phosphatase in plasma of rats fed the control and safflower seed diets for various periods

Groups	Osteocalcin(ng/ml)	Bone specific alkaline phosphatase(U/L)	Total alkaline phosphatase(K-A)
C1	0.29±0.01 ¹⁾	0.37±0.03 ^{ab2)}	37.22±5.11 ^a
C2	0.29±0.01	0.32±0.01 ^a	26.75±2.46 ^b
C3	0.26±0.01	0.34±0.03 ^{ab}	25.89±3.01 ^b
C4	0.31±0.04	0.30±0.04 ^a	20.79±1.63 ^b
C5	0.26±0.01	0.45±0.05 ^b	28.40±2.08 ^{ab}
S1	0.25±0.01 ^{NS3)}	0.45±0.06	33.06±6.47 ^{NS}
S2	0.27±0.01 ^{NS}	0.45±0.05 ^{*4)}	19.76±2.17 ^{bNS}
S3	0.26±0.01 ^{NS}	0.56±0.04 [*]	20.35±0.93 ^{bNS}
S4	0.29±0.01 ^{NS}	0.43±0.03 [*]	16.79±1.19 ^{bNS}
S5	0.27±0.02 ^{NS}	0.54±0.04	23.88±1.55 ^{bNS}
Sham	0.28±0.03	0.57±0.11	20.05±2.60

- 1) Each values are expressed as a mean±S.E.
- 2) Different letters indicate significant differences(p<0.05) within the control or safflower seed group.
- 3) NS : Not significant between control and safflower seed group
- 4) *symbol indicates significant differences(p<0.05) between the control and safflower seed group(C1 : S1, C2 : S2, C3 : S3, C4 : S4, and C5 : S5)

2) 혈장 osteocalcin 농도, total alkaline phosphatase(total-ALP) 활성도 및 bone-specific alkaline phosphatase(bone-ALP) 활성도

Table 6에 나타난 바와 같이, 골형성지표 중의 하나인 혈장 osteocalcin 농도는 두 군에서 거의 동일한 수준으로 나타났고, 녹골 치유과정에서 시간경과에 따른 차이도 전혀 보이지 않았다. 혈장 total-ALP 활성도는 두 식이군간 유의적으로 다르지 않았으나, 두 식이군 모두에서 골절 후 8일째 그 수준이 가장 높았다. 이는 골절초기 골절부위의 인산이온농도가 국소적으로 크게 증가됨을 의미할 수도 있으나 bone-ALP 활성도 변화와는 일치하지 않았다. 뼈의 석회화 과정을 직접적으로 도모하는 bone-ALP 활성도는 골절이 치유되는 동안 홍화씨분말군이 전체적으로 높은 상태를 유지하였으며, 특히 골절 후 11일째, 16일째 그리고 21일째에는 대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났다.

골모세포에 의해 합성되는 osteocalcin은 뼈에 특이적인 단백질로 뼈와 혈장에 축적되며 골모세포의 활성성을 평가하고 골형성 정도를 조사하는 골형성지표로 사용된다.¹⁵⁾¹⁶⁾ 일반적으로 혈청 osteocalcin의 수준은 성인보다 유아 및 아이들이 낮고 폐경기 이후에는 증가된다³⁾. 또한 갑상선 호르몬, 성장 호르몬, Vit. D, 부갑상선 호르몬분비가 증가되면 혈청 osteocalcin의 수준이 증가되는 것으로 보고되었다¹⁷⁾. 혈중 ALP의 약 50%는 뼈로부터 유리되므로 total-ALP 활성도가 뼈의 미세한 대사변화를 구체적으로 반영하기에는 미흡한 점이 있다. 따라서 total-ALP 활성도 증가에 대한 임상적 원인을 규명하는 데는 어려움이 따르는데 이 효소의 활성도는 간질환 외에 단순한 골화(mineralization) 이상에 의해서도 증가될 수 있기 때문이다. 그러나 최근 뼈에서 유리된 bone-ALP에 특이하게 반응하는 항체 kit가 개발되어 bone-ALP 활성도만 정확하게 측정하는 방법이 가능하게 되었다.¹⁸⁾¹⁹⁾ Bone-ALP의 활성은 일반적으로 남자가 여자보다 높으며, 여성에서는 골대사회전이 증가되는 폐경기이후 증가된다²⁰⁾. 뼈에 특이적으로 작용하는 효소인 bone-ALP는 뼈의 석회화를 촉진하는 중요한 골형성지표로서, 이 효소의 활성도는 혈중 osteocalcin 농도와 독립적으로 작용할 수도 있다⁸⁾. 골절시 이들 지표의 수준변화에 대해서는 골절 후 골형성이 활발해질 때 bone-ALP와 osteocalcin 수준이 향상된다고 보고되었으나²¹⁾²²⁾, 본 실험결과에서는 홍화씨분말군의 bone-ALP 활성도 수준이 대조군에 비해 높은 상태로 유지되었고, total-ALP 활성도 수준은 유의성은 없지만 대조군에서 높게 나타난 경

Table 7. Concentrations of the plasma protein, calcium and phosphorus in rats fed control and safflower seed diets for various periods

Groups	Calcium(mg/dl)	Phosphate(mg/dl)	Ca/P ratio
C1	8.82±0.40 ^{a1)}	7.70±0.44 ^{ab}	1.15
C2	10.56±0.41 ^b	7.10±0.47 ^a	1.55
C3	10.97±0.59 ^b	7.74±0.93 ^{ab}	1.47
C4	10.58±0.31 ^b	6.84±0.39 ^a	1.64
C5	8.64±0.49 ^a	8.91±0.55 ^b	0.93
S1	9.07±0.44 ²⁾	7.61±0.31 ^{NS4)}	1.19
S2	8.41±0.36 ^{**3)}	8.95±0.91 ^{NS}	0.94
S3	8.65±0.59 [*]	8.46±0.31 ^{NS}	1.02
S4	9.68±0.37	8.12±1.19 ^{NS}	1.09
S5	8.75±0.73	7.57±0.59 ^{NS}	1.12
Sham	8.94±0.81	8.91±1.44	1.00

- 1) Different letters indicate significant differences(p<0.05) within the control or safflower seed group.
- 2) Each values are expressed as a mean±S.E.
- 3) *symbol indicates significant differences(p<0.05) between the control and safflower seed group (C1 : S1, C2 : S2, C3 : S3, C4 : S4, and C5 : S5)
- **symbol indicates significant differences(p<0.01) between the control and safflower seed group (C1 : S1, C2 : S2, C3 : S3, C4 : S4, and C5 : S5)
- 4) NS : Not significant between control and safflower seed group

향을 보였다. Bone-ALP 활성도가 골절치유가 빨리 진행된 홍화씨분말군에서 높은 수준으로 유지되는 것으로 보아 홍화씨분말의 보충이 골절부위의 석회화과정을 촉진시킨 것으로 사료된다.

3) 혈중 칼슘과 인 농도

혈중 칼슘과 인의 농도는 Table 7에 나타내었다. 이들 수준은 치유과정 중 같은 기간에 희생된 대조군과 홍화씨분말군간 비교에서 칼슘수준만이 골절 후 11일째와 16일째에 홍화씨분말군이 대조군에 비해 유의적으로 낮았다. 정상식이를 급여한 대조군의 칼슘농도는 골절 초기와 치유말기에 희생된 C1군과 C5군이 치유 중기에 희생된 C2, C3, 및 C4군들보다 유의적으로 낮게 나타났다. 대조군의 혈장 무기인 농도는 골절 후 시간경과에 따른 명확한 변화는 없었지만 골절 후 16일째와 21일째 희생된 C2와 C4군이 최종 희생된 C5군보다 유의하게 낮았다.

혈중 칼슘농도는 내적, 외적 변화에 대해 항상성을 유지하므로 실험요인을 변화시켜도 칼슘농도는 보통 정상범위내에 있다²³⁾. 본 실험에서도 대조군의 혈장 칼슘농도는 유의적 차이는 없었다. 이들 두 변수의 비율인 Ca/P ratio는 홍화씨분말군(0.94~1.19)이 sham-operation군의 1.00과 비슷한 비율을 보였으며, 대조

Table 8. Correlation coefficients between parameters of bone metabolism in rib-fractured rats fed control and safflower seed diets

	Parameters in plasma							
	ALP ¹⁾	Bone-ALP ²⁾	Osteocalcin	Calcitonin	PTH ³⁾	Ca ⁴⁾	P ⁵⁾	Ca/P ratio
ALP	-							
Bone-ALP	-0.1828	-						
Osteocalcin	-0.1974	-0.1721	-					
Calcitonin	-0.1932	-0.1361	0.0074	-				
PTH	0.0519	-0.2006	0.3193*	0.1169	-			
Ca	0.0123	-0.3343* ⁶⁾	0.0413	0.0495	0.0798	-		
P	-0.0160	0.2989*	0.0508	-0.2605	-0.1146	-0.2355	-	
Ca/P ratio	0.2965	-0.4313	-0.2480	-0.3255	0.2522	0.6940*	-0.5293	-

1) ALP : alkaline phosphatase

2) Bone-ALP : bone-specific alkaline phosphatase

3) PTH : parathyroid hormone

4) Ca : calcium

5) P : phosphate

6) *p<0.05

군(0.93~1.64)은 상대적으로 높은 비율을 보였다. 일반적으로 골대사회전에서 혈장 칼슘농도가 높으면 골흡수가 감소되지만, 혈장 인농도가 정상수준보다 높으면 골흡수가 감소됨과 동시에 골형성도 활발해진다고 보고된 바 있다²⁴⁾.

4) 혈장 골대사지표간의 상관관계

홍화씨분말군의 혈장에서 전체적으로 높게 나타난 bone-ALP 활성도는 Table 8와 같이 혈장 칼슘농도와 음의 상관관계($r = -0.3343, p < 0.05$)를, 그리고 혈장 무기인 농도와는 양의 상관관계($r = 0.2989, p < 0.05$)를 나타내었다. 이는 홍화씨분말군의 혈장 칼슘수준과 Ca/P 비율이 대조군에 비해 낮은 경향을 보여준 현상과 관련이 있는 것으로 보인다. 대조군에서는 골흡수에 영향을 주는 혈장 Ca 수준이 홍화씨분말군보다 높은 경향임에도 불구하고 bone-ALP 활성도의 감소로 인해 골화속도가 지연되는 것으로 사료된다. 아울러 혈장 무기인 수준은 골화와 관련되는 것으로 보이며, bone-ALP 활성도는 total-ALP 활성도에 비해 미세한 골형성까지 반영할 수 있는 bone turnover marker로 평가된다. 또한 PTH와 골형성지표 중의 하나인 osteocalcin 농도간에는 양의 상관관계($r = 0.3193, p < 0.05$)를 보여, 이들 동물에서 빠르게 칼슘이온 유리와 osteocalcin 생성이 동시에 증가되었을 가능성도 있으나 이에 대한 구체적인 후속실험이 요구된다.

이상의 결과에서 나타난 바와 같이 골절된 흰쥐에게 홍화씨분말을 10% 수준으로 정상 식이에 보충하였을 때 골절의 유합 및 치유가 대조군에 비해 빠르게 일어났으며, bone-ALP 활성도 수준도 대조군에 비해 홍화씨 분말에서 높게 나타난 경향을 보여 홍화씨 분말의 보충이 골절부위의 뼈형성과정에서 석회화단계를 촉진시켜 골절유합도 빨라진 것으로 사료된다.

결론

본 실험은 수술적 방법으로 늑골골절을 유도한 흰쥐에게 한국산 토종 홍화씨분말을 보충하였을 때 홍화씨분말이 골절치유과정에서 전반적인 골대사지표에 미치는 영향을 조사하고자 시행되었다. 식이군은 정상식을 급여한 대조군(Control group)과 10% 홍화씨분말을 급여한 홍화씨분말군(Safflower group)으로 대분하여 늑골골절을 유도한 후 치유과정 기간동안 단계별로 변화되는 골대사의 다양한 지표를 비교하였다. 수컷 Sprague-Dawley(체중 : $370 \pm 5g$) 흰쥐들에게 급여된 실험식은 골절수술 전 12일간과 골절수술 후 기간별로 최대 30일간 급여되었다.

수술 후 평균 1일 식이섭취량은 모든 군에서 비슷하였고, 체중은 수술 후 8일째 두 군 모두 체중감소가 있었으나 11일째부터는 회복세를 보였다. 회생 후 각 장기의 중량은 대조군과 홍화군간에 전혀 차이가 없었으며 가골은 8일째 이미 두텁게 형성되어 있었다. 홍화씨분말이 골절치유 속도에 미치는 효과에서는, 두 군 모두에서 8일째 및 11일째 느슨하게 결합 늑골절단면이 외부의 물리적 힘에 의해 쉽게 분리되었고, 그 후부터는 홍화씨분말군의 절단면이 대조군보다 좀더 강하게 유착된 것을 관찰할 수 있었다. 혈장 칼슘농도를 조절하는 호르몬 중 PTH와 calcitonin 수준의 비교에서, PTH 수준은 대조군과 홍화씨분말군간에는 차이가 없었고, 다만 대조군에서 늑골골절 8일째 수준이 16일째에 비해 유의적으로 높게 나타났다. Calcitonin 수준 역시 군간 및 군내 차이가 없는 것으로 나타났다. 골형성지표 중의 하나인 혈장 osteocalcin 농도는 두 군에서 거의 동일한 수준으로 나타났고, 혈중으로 분비된 total-alkaline phosphatase 활성도는 두 군 모두 골

절 후 8일째 수준이 가장 높았으며 구간 차이는 없었다. 뼈의 석회화과정에 특이적으로 작용하는 bone-specific alkaline phosphatase 활성도는 골절치유 기간동안 홍화씨분말군이 전체적으로 높은 상태를 유지하였으며, 특히 골절 후 11일째, 16일째, 그리고 21일째에는 대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 혈장 칼슘수준은 골절 후 16일째 홍화씨분말군이 대조군에 비해 유의적으로 낮았고, 혈장 무기인 농도는 구간차이가 없었으나 전체적인 Ca/P ratio는 홍화씨군(0.94~1.19)이 sham-operation군(1.00)과 비슷한 비율을 보였으며 대조군(0.93~1.64)은 상대적으로 높은 비율을 보였다. 이상의 결과에서 bone-specific alkaline phosphatase 활성도 수준이 골절치유가 빠르게 진행된 홍화씨분말군에서 전체적으로 높게 나타난 것으로 보아 홍화씨분말의 보충이 골절부위의 석회화과정을 촉진시켜 골절부위의 뼈형성을 도모함으로써 그 유효성을 빠르게 한 것으로 사료된다.

Literature cited

- 1) Lee IM. Human Physiology 3. Hyungseol Press pp.98, 1992
- 2) Banks WJ. Applied veterinary histology. 2nd ed. Williams and Wilkins Publisher pp.119, 1986
- 3) Epstein S. Bone derived proteins. Trends in Endocrinology and Metabolism 1 : 9-14, 1989
- 4) Ross MH, Romred LJ, Kaye GI. Histology a text and atlas. 3rd ed. Williams and Wilkins Publisher pp.150-187, 1995
- 5) Price CP. Multiple forms of human serum alkaline phosphatase : Detection and quantitation. Ann Clin Biochem 30 : 355-372, 1993
- 6) Price CP, Thomson PW. The role of biochemical tests in the screening and monitoring of osteoporosis. Ann Clin Biochem 32 : 244-260, 1995
- 7) Lee MS, Kim SY, Lee MC, Cho BY, Lee HK, Kog CS, Min HK. Negative correlation between the change in bone mineral density and serum osteocalcin in patients with hyperthyroidism. J Clin Endocrinal Metab 70 : 766-770, 1990
- 8) Song JH, Han KO, Kim DY, Woo JT, Kim SW, Yang IM, Kim JW, Kim YS, Choi YK. Markers of bone turnover and bone mineral density in hyperthyroidism and effects of treatment. The Korean Society of Bone Metabolism 1 : 177-185, 1994
- 9) Junqueira LC, Carneiro, J, Kelley RO. Basic Histology. 6th ed. Chapter 8. APPLETON & LANGE pp.136-159, 1989
- 10) Kee CH. The Pharmacology of Chinese Herbs. CRC Press pp.249-250, 1993
- 11) Kim JH, Jeon SM, An MY, Koo SK, Lee JH, Moon KD,

- Choi MS. The effects of Korean Safflower(*Carthamus tinctorius L.*) seed powdered diet on bone tissue in rats during the recovery of rib fracture. Korean Society of Food Science and Nutrition 27(4) : 1-7, 1998
- 12) Lynn A, Heath H. Calcitonin : Physiology and pathophysiology. New England Journal of Medicine 304 : 267-278, 1981
- 13) John T. Calcitonin. Clinical Chemistry News 10(7) : 20-21, 1984
- 14) Aubach JD, Marx SJ, Spiegel AM. Parathyroid hormone, calcitonin and the calciferols. In : Wilson JD, Foster DW, eds. Philadelphia : Saunders pp.144, 1985
- 15) Price PA. Role of vitamin K dependent proteins, bone Gla protein(BPG) and kidney Gla protein(KGP). Nutrition Review 42 : 230-233, 1984
- 16) Garnero P, Grimaux M, Demiaux P, Preaudat C, Seguin P, Delmas PD. Measurement of serum osteocalcin with a human-specific two-site immunoradiometric assay. J Bone Miner Res 12 : 1389-1398, 1992
- 17) Gundberg CM. Alkaline phosphatase and osteocalcin. In : Favus, MJ. Ed. Primer on the metabolic bone disease and disorder of mineral metabolism, Kelseyville CA. American Society for Bone and Mineral Research pp.74-76, 1989
- 18) Duda RJ, O'Brien JF, Katzmann JA. Concurrent assays of circulating bone gla- protein and bone alkaline phosphatase : Effects of sex, age, and metabolic bone disease. J Clin Endocrinol Metab 66 : 951-957, 1988
- 19) Hill CS, Wolfert RL. The preparation of monoclonal antibodies which react preferentially with human bone alkaline phosphatase and not liver alkaline phosphatase. Clin Chim Acta 186 : 315-320, 1989
- 20) van Straalen JP, Sanders E, Prummel MF, Sanders GTB. Bone-alkaline phosphatase as indicator of bone formation. Clin Chim Acta 201 : 27-34, 1991
- 21) Mallmin H, Ljunghsll S, Larsson K. Biochemical marks of bone metabolism in patients with fracture of distal forearm. Clin Orthop 295 : 259-263, 1993
- 22) Bowles SA, Kurdy N, Davis AM, France MW, Marsh DR. Serum osteocalcin, total and bone-specific alkaline phosphatase following isolated tibial shaft fracture. Ann Clin Biochem 33 : 196-200, 1996
- 23) Jeong HK, Kim JY, Lee HS, Kim JY. The effect of dietary calcium and phosphate levels on calcium and bone metabolism in rats. The Korean Nutrition Society 30(7) : 813-824, 1997
- 24) Watson RC, Grossman H, Meyers MA. Radiologic findings in nutritional disturbances, In : Shil ME, Olson JA, Shike M. Modern nutrition in health and disease, 8th ed. Philadelphia : Lea and Febiger pp.861-908, 1994