

홍화씨의 경골골절치유에 미치는 영향

정수연* · 최현진 · 정면우 · 안미령 · 유태무 · 류항목 · 양지선

식품의약품안전청 국립독성연구소 약리부

(Received April 14, 1999)

Effects of Safflower-seed on the Fracture Healing in Rat Tibia

Soo Youn Chung[#], Hyun Jin Choi, Myeon Woo Chung, Mee Ryung Ahn,
Tae Moo Yoo, Hang Mook Rheu and Ji Sun Yang

Department of Pharmacology, National Institute of Toxicological Research, Korea Food and
Drug Administration, Nokbun-dong, Eunpyung-gu, Seoul, 122-704

Abstract — We investigated the effect of safflower-seed on fracture healing of fracture model in rat. Fracture healing was evaluated by examining the degree of wound healing macroscopically, radiography, bone histomorphometry and biochemical examination. After 1, 3, 5, 7 days, the wound healing was accelerate in safflower-seed diet group. Radiography does not reveal the difference in fracture healing between two groups. After 2 weeks, safflower-seed had a significant, stimulatory effect on external callus formation ($p < 0.05$). But after 4, 6, 8 weeks, no difference was observed between normal and safflower-seed diet group in callus size. Urinary hydroxyproline, osteocalcin and total alkaline phosphatase decreased significantly ($p < 0.05$) in safflower-seed treated group at 2 week after fracture.

Keywords □ Fracture, safflower, callus volume, urinary hydroxyproline, osteocalcin, total alkaline phosphatase.

골절은 최근 교통사고 및 스포츠 등으로 인하여 증가되고 있는 실정이나 골절 치유에 대한 연구는 미비하다.^{1,2)} 골절의 치유는 골의 연속성이 비정상적으로 끊어진 상태에서부터 일련의 생리적 과정을 거쳐 골의 연속성이 회복되어 궁극적으로 골격 본래의, 부하를 견딜 수 있는 강도를 되찾는 것으로 일반적인 상처치유 과정을 포함하는 매우 복잡한 과정이다.^{3,4)} 골절의 치유과정은 편의상 세 단계로 나눌 수 있는데 이 단계는 손상된 골절부위의 파괴된 혈관으로부터 나온 혈액으로부터 혈액응고덩어리인 혈종(hematoma)을 형성하게 되고 이로 인해 염증반응이 유발되어 급성부종을 일으키는 염증기, 섬유아세포의 증식과 더불어 혈관신생을 동반한 육아조직(granulation tissue)으로 인해 기질화

(organization)가 일어나 골절부위를 둘러싸는 연골과 미성숙 골조직인 가골(callus)이 형성되어 점차 연골내 골화과정을 거쳐가는 복원기, 형성된 가골이 점차 성숙층판성골(mature lamellar bone)로 바뀌면서 과도하게 생성된 골이 파골세포(osteoclast)에 의해 흡수되고 재성형(remodelling)되는 재성형기이다. 이같은 골절 치유기간을 단축시키고 골유합을 촉진시키기 위하여 많은 학자들로부터 가골형성 및 골유합에 관한 연구가 진행되어 왔는데 현재까지 연구된 바에 의하면 직접적으로 신생골의 형성을 자극하거나 유도하는 골, 골수 및 기질을 이식하는 방법^{5,6,7)}이 임상적으로 시행되고 있으며 실제 골절치유과정에 관여한다고 알려진 TGF β (transforming growth factor β), α , β -FGF(fibroblast growth factor), PDGF(platelet derived growth factor), bone morphogenetic protein류 등의 growth factor 의 국소적인 주입이 골절치유개선에 효과가 있

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-380-1805 (팩스) 02-380-1806

음이 보고된 바 있다.^{8,9,10,11,12,13)}

한편 우리나라에서는 한방에서 통경, 진통, 혈액순환 촉진약으로 잘 알려진 홍화(*Carthamus tinctorius L.*)의 씨가 골절, 골다공증, 골형성 부전증 등 골질환의 치료에 효과가 있음이 구전되어 왔다. 홍화씨는 그 성분 및 효능에 대한 연구가 드므나 추출유에는 리놀레산이 다량 함유되어 있고 홍화씨유의 동맥경화 예방 및 치료,¹³⁾ 뇌수초염 (encephalomyelitis)의 증상개선,¹⁴⁾ 홍화씨 methanol 추출물의 CCl₄ 간독성에 대한 보호작용¹⁵⁾ 등이 보고 된 바 있으나 현재까지 골절에 대한 영향에 대하여는 보고된 바는 없다.

본 연구에서는 홍화씨가 골절의 치유에 미치는 영향을 알아보고자 흰쥐 골절모델을 작성하여 골절치유도를 평가하였다. 골절모델에 10% 홍화씨혼합사료 형태로 8주간 투여하였으며, 골절치유에 대한 효과확인의 지표로서 골절부조직의 육안적 확인, 방사선 사진, 가골의 조직형태학적 관찰, serum osteocalcin, total alkaline phosphatase, urinary hydroxyproline 함량 등을 통하여 홍화씨의 골절치유에 대한 효과를 검색하고자 하였다.

실험방법

실험동물 - 식품의약품안전청 실험동물자원실에서 생산된 5주령의 Sprague-Dawley 흰쥐 수컷을 온도 23 ± 2°C, 습도 55 ± 10%, 12시간 조명주기의 조건하에서 계속적으로 사육하여 사용하였으며, 물은 자유로이 섭취할 수 있도록 하였다.

시험물질의 구입 - 홍화씨는 경동시장에서 구입하였다. Alkaline phosphatase reagent kit는 Bayer 제품을, osteocalcin kit는 OSTEOMETER 제품을, hydroxyproline, ethanol 등 그 밖의 시약은 모두 특급 이상의 시약을 사용하였다.

홍화씨 첨가사료의 제조 - 홍화씨첨가사료는 홍화씨를 분쇄기로 간 후 10%로 일반사료에 혼합하여 식품의약품안전청 실험동물자원실 사료조제실에서 조제하였다.

골절동물모델작성 - 생후 13주령의 수컷 Sprague Dawley 흰쥐(체중 450~500 g)에 ketamine(1 mg/kg)을 근육주사하여 마취한 후 오른쪽 뒷다리 경골(tibia)의 수술부위를 제모하고 피부절개하였다. 경골의 대퇴골(femur)과의 관절부위에 치과용 드릴(dental drill)을

이용하여 stainless steel 강선 삽입부위를 천공한 후 강선을 약 3 mm 정도 삽입 후 경골거친면(tibial tuberosity) 아래 1~1.5 cm 부위에 electric micro-motor를 이용하여 횡축골절을 유발하였다. 강선이 더 이상 들어가지 않을 때까지 깊숙히 삽입(골수강내 고정)한 후 강선을 절단하고 수술부위를 소독한 후 피부 봉합하였다.

수술후 처치와 군분리 - 수술후 수술받은 하지의 전체중 부하(full weight bearing)를 허락하였다. 골절유발 직후부터 대조군은 일반사료를, 홍화씨 투여군은 10% 홍화씨혼합사료를 임의 투여하였다. 두 군은 수술 후 1, 3, 5, 7일, 2, 4, 6, 8주군으로 나누어 군당 5마리를 설정하였다.

채혈 및 뇨 채취 - 흰쥐를 대사 케이지에 넣어 24시간 뇨를 받아 분석할 때까지 -70°C에 냉동 보관 후 hydroxyproline은 Jamall법¹⁶⁾에 따라 정량하였다. Ether로 마취한 다음 복부를 절개하여 복대정맥으로부터 채혈하여 원심분리한 다음 -70°C에서 냉동보관 후 alkaline phosphatase kit를 사용하여 혈액자동생화학 분석기(RA-XT, Technicon Co.)로 측정하였다. 또한 혈액중 osteocalcin(Bone Gla-protein, BGP)농도는 ELISA kit(OSTEOMETER A/S, DK)방법에 의해 정량하였다.

단순방사선 검사 - 단순방사선사진은 수술 후 1, 3, 5, 7일, 2, 4, 6, 8주에 군당 5마리씩 치사하여 dental X-ray film(Kodak)을 사용하여 노출시간이 0.2 초가 되도록 촬영하였다.

상처치유도의 육안적 확인 - 수술 후 1, 3, 5, 7일에 단순방사선사진을 촬영한 후 군당 각각 5마리의 골절부위 피부의 부종, 봉합선 존재유무, 발적 상태 등을 확인하였으며 부검하여 골절부위 근육의 혈종(hematoma), 봉합선과 골절뼈부위의 혈종, 육아세포(granulation tissue) 및 가골(callus) 형성과 진행상태 등을 육안적으로 관찰하였다.

가골의 조직형태학적 관찰 - 양측 경골의 골표본을 채취하여 골수강내 고정된 강선을 제거한 후 carnoy's solution [ethanol 60%, chloroform 30%, acetic acid (glacial) 10%]에 약 3일 고정하였다. 고정된 양측 경골을 이용하여 생성된 가골의 무게, 부피 및 직경(diameter)을 측정하였다. 가골의 무게는 한 개체내에서 골절이 유발되어 가골이 형성된 오른쪽 경골의 무게에서 골절이 유발되지 않은 왼쪽 경골의 무게를 빼

어 결정하였으며 가골의 부피는 plethysmometer (UGO BASILE, Italy)를 이용하여 한 개체내에서 골절이 유발되어 가골이 형성된 오른쪽 경골의 부피에서 골절이 유발되지 않은 왼쪽 경골의 부피를 빼어 결정하였고 가골의 직경은 digimatic caliper(Mitutoyo, Japan)를 이용하여 가골의 가장 넓은 부위를 측정하였다.

헤마톡실린-에오신(H&E) 염색과 가골의 총면적 측정 - 골절이 유발된 경골 시편은 고정 후 10% nitric acid에서 6시간 이상 탈회한 후 골간면과 평행하게 삭정하고 탈수치환과 파라핀 침투과정을 거쳐 통상적인 방법으로 파라핀 포매하여 조직표본을 제작하였다. 제작된 경골의 파라핀 조직표본은 rotary microtome (Leica Ins., Germany)을 이용하여 5 µm로 절편하였다. 조직절편을 gelatin-coated slide에 부착하여 histomatic auto slide stainer(Fisher Scientific, USA)를 이용하여 H & E 염색하였다. 염색된 표본의 가골의 총면적은 자동영상분석기(IBAS, Kontron, Germany)를 이용하여 측정하였다.

통계학적인 분석 - 모든 실험결과는 student's *t*-test를 이용하여 통계 처리하였으며 p-value가 0.05미만인 것을 유의성이 있다고 판정하였다.

실험결과

체중 및 사료섭취량 - 수술 후 체중의 부하¹⁷⁾와 영양적인 차이^{18,19)}에 따라 골절치유도에 변화가 있다는 보고가 있으므로 수술 후 일반사료와 10% 홍화씨혼합

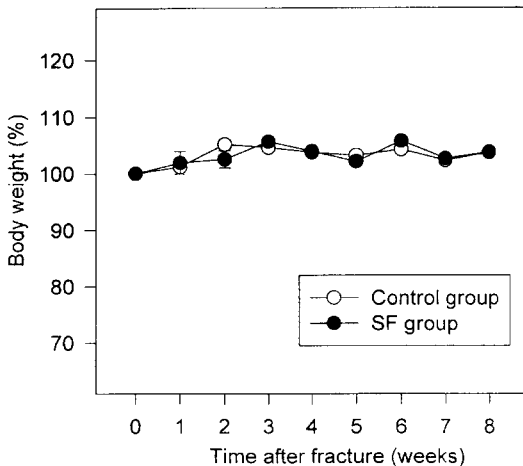


Fig. 1 - The change of body weight after fracture in rats treated with normal or safflower seed (SF) diet.

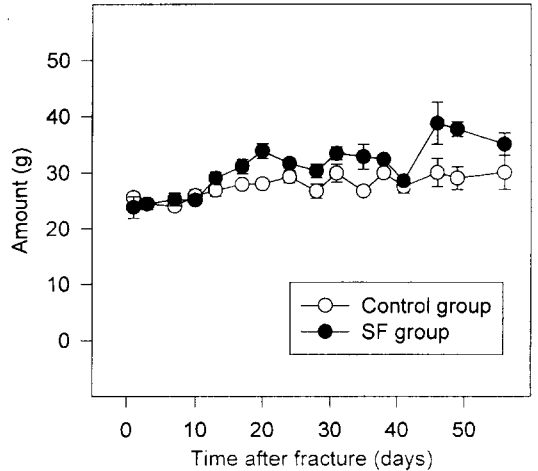


Fig. 2 - The change of feed consumption after fracture in rats treated with normal or safflower-seed (SF) diet.

사료를 임의 투여한 후부터 주 1회 대조군과 홍화씨투여군의 체중의 변화를 측정하였으며, 주 2회 사료섭취량의 변화를 확인하였다. 확인결과 수술 후 대조군과 홍화씨사료투여군간의 체중과 사료섭취량에 있어 유의적인 차이는 없었다(Fig. 1, 2).

골절부위 피부, 근육 상처치유도 및 부검한 조직시편의 육안적 소견 - 골절모델에서 수술 후 1일에 있어 골절부위 피부의 부종, 발적상태가 심하였으며, 수술 후 3일에 있어 골절부위 피부의 부종, 발적상태가 현저히 개선되었으며 근육 및 골절뼈부위의 혈종이 빠르게 사라지는 소견을 나타내었으며 골절부위 피부 및 근육의 봉합선 치유도는 두 군간에 뚜렷한 차이를 발견할 수 없었다. 골절뼈부위에 있어 수술 후 5일에 대조군에서는 육아세포(granulation tissue)의 성장을 확인할 수 있었으며 홍화씨 투여군에서는 육아세포로부터 골절 뼈부위를 잇는 가골의 형성으로 진행된 양상을 나타내었다. 수술 후 7일에 있어 대조군에서도 육아조직에서 가골로의 진행이 관찰되었으며 홍화씨투여군에서는 대부분의 개체에서 가골의 형성이 진행됨을 확인할 수 있었다(Table 1).

가골 생성정도의 조직형태학적 분석 - 수술 후 2주에 있어 홍화씨투여군은 대조군에 비하여 가골의 무게, 부피, 직경(diameter) 및 단면의 총면적을 유의하게 증가시켜 홍화씨투여군에 있어 대조군에 비해 촉진된 가골의 형성을 확인할 수 있었다(Table 2). 하지만 수술후 4주, 6주 및 8주에 있어서는 홍화씨투여군과 대조군

Table I – Macroscopic findings during early fracture healing in rats treated with normal or safflower-seed (SF) diet

	Skin			Muscle		Fracture site		
	edema	suture line	redness	hematoma	muscle suture line	hematoma	granulation tissue	callus
Control 1	+	-3/+2	++	++++	-0/+5	++	-5/+0	-5/+0
SF 1	++	-4/+1	+	+++	-0/+5	+	-5/+0	-5/+0
Control 3	+++	-1/+5	+++	+++	-2/+4	-	-6/+0	-6/+0
SF 3	-	-2/+3	+	+	-3/+2	-	-5/+0	-5/+0
Control 5	-	-3/+2	-	+	-2/+3	-	-2/+3	-5/+0
SF 5	-	-1/+4	-	-	-4/+1	-	-4/+1	-3/+2
Control 7	-	-4/+0	-	-	-4/+1	-	-2/+2	-2/+2
SF 7	-	-4/+1	-	-	-5/+0	-	-4/+1	-1/+4

+ & - means ++++ : most severe, +++ : severe, ++ : moderate, + : mild, - : negative in skin edema, redness, muscle hematoma and fracture hematoma, + : positive, - : negative in suture line and fracture site granulation tissue, callus.

Table II – Histomorphometric differences in fracture healing in rats treated with normal or safflower-seed (SF) diet

Weeks	Group	Callus weight (g)	Callus volume (ml)	Callus diameter (mm)	Callus total area (mm ²)
2	Control	0.297 ± 0.032	0.190 ± 0.032	6.964 ± 0.280	16.217 ± 1.023
	SF	0.461 ± 0.044*	0.354 ± 0.042*	7.858 ± 0.226*	22.233 ± 1.971*
	P-value	0.017	0.014	0.039	0.018
4	Control	0.454 ± 0.047	0.316 ± 0.037	7.488 ± 0.146	18.107 ± 0.447
	SF	0.587 ± 0.038	0.386 ± 0.018	7.704 ± 0.197	21.856 ± 2.983
	P-value	0.057	0.126	0.404	0.260
6	Control	0.599 ± 0.085	0.412 ± 0.055	7.766 ± 0.165	13.876 ± 2.288
	SF	0.582 ± 0.077	0.373 ± 0.048	7.423 ± 0.210	13.096 ± 0.930
	P-value	0.890	0.617	0.232	0.776
8	Control	0.528 ± 0.086	0.348 ± 0.068	7.500 ± 0.262	11.166 ± 0.887
	SF	0.487 ± 0.079	0.318 ± 0.084	7.568 ± 0.224	11.168 ± 1.279
	P-value	0.738	0.791	0.851	0.999

Data represents mean ± S.E. Significantly different from the control value, *p<0.05 (Student's t test)

두군간의 가골의 무게, 부피, 직경 및 단면의 총면적에 유의적인 차이는 없었다.

단순방사선검사 소견 - 수술 후 1일에 경골의 횡측 골절이 유발되었으며 골수강내 고정된 강선을 확인하였다. 수술 후 7일 소견에서 수술 후 1일과 비교하여 큰 차이를 확인할 수 없었으며 홍화씨투여군과 대조군 양측 모두에서 확실한 가골형성의 소견은 관찰되지 않았다. 두 군 모두 수술 후 2주에 가골의 형성이 부분적으로 확인되었으며 수술 후 4주 소견에서 대조군과 홍화씨투여군 양측 모두에서 골절부를 잇는 가골의 전체적인 모습을 선명하게 관찰할 수 있었으며 부분적인 골유합이 관찰되었다. 수술 후 6주에 두 군 모두에서 완전하지는 않으나 부분적인 방사선적 골유합의 소견을 나타내었다. 수술 후 8주에 두군 모두 대부분의 개체에서 골절전 정상상태와 유사한 골유합이 이루어진 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

생화학적인 변화 - 수술 후 2주에 홍화씨투여군에서

는 골 흡수능력의 지표인 뇨중 hydroxyproline농도는 대조군에 비하여 유의하게 감소되었고 골형성능력의 지표인 혈중 osteocalcin농도와 alkaline phosphatase농도는 대조군에 비하여 유의하게 감소되었다(Table 3).

고 찰

본연구에서는 골절모델을 작성하여 홍화씨에 대한 효과를 골절부위 피부, 근육 상처치유도 및 부검한 조직시편의 육안적 소견, 가골의 조직형태학적 분석, 단순방사선 사진 및 생화학적 지표를 측정함으로써 평가하였다.

골절의 치유는 골절주위의 근육 및 피부의 손상을 포함하는 개방성골절인 경우 골의 연속성의 재현 뿐 아니라 일반적인 상처의 치유과정까지를 포함하게 된다. 골절모델에서 홍화씨가 골절부의 피부 및 근육의 상처치유에 미치는 영향을 육안적으로 확인하여 보았다.

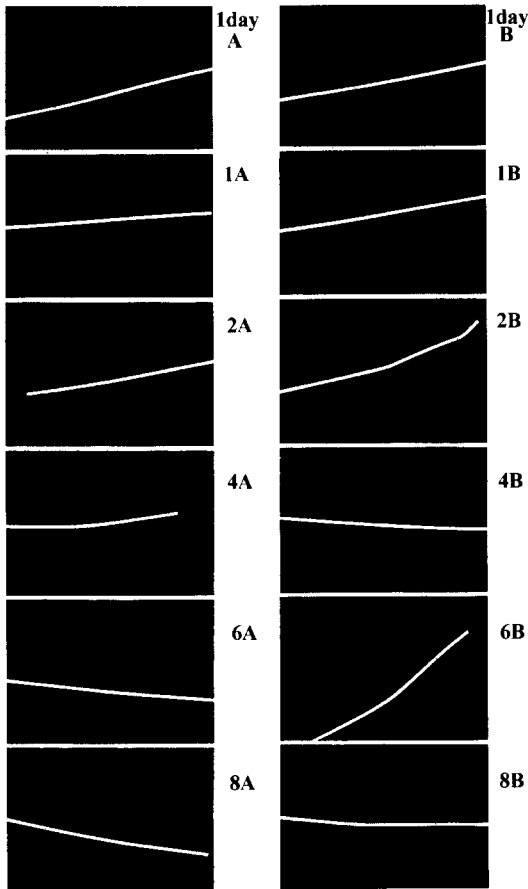


Fig. 3 – Radiographs of the right tibias taken 1 days and 1, 2, 4, 6, 8 weeks after fracture. Numbers refer to weeks of healing. A: control group, B: safflower-seed (SF) group

Table III – Osteocalcin, alkaline phosphatase and hydroxyproline during fracture healing rats treated with safflower for 2-weeks

Group	Osteocalcin (mg/ml)	Alkaline phosphatase (μ/L)	Hydroxyproline (μMol/L)
Control	4.97 ± 0.21	185.25 ± 18.86	576.48 ± 15.70
Safflower	4.48 ± 0.35*	142.75 ± 26.29	486.5 ± 11.83*

Result show the mean ± S. E. (n=4-6) of a single experiment Significantly different from the control value, *p<0.05 (Student's t test)

골절모델에서 홍화씨에 의한 골절부의 피부 및 근육의 상처치유도가 개선되는 경향이 관찰되었다. 대략적으로 혈종기는 1~5일, 육아조직기는 5~14일, 가골형성기는 1~6주, 재성형기는 4~8주로 나타났다. 보고에 의하면 흰쥐에 있어 골절치유단계중 육아조직의 형성기는 골절

후 약 0~10일, 가골의 형성기는 골절 후 5~28일, 과도생성된 가골이 흡수되고 본래의 뼈모양을 되찾는 재성형기는 28일 이후에서 골격 본래의 기능과 강도를 되찾는 시기인 것으로 알려져 있으며,^{4,20,21)} 본 연구에 있어서도 그 시기는 큰 차이를 나타내지 않았으나 Table 1에서 보는 바와 같이 홍화씨투여군에 있어 육아조직 및 가골의 형성이 조금 더 빠르게 진행되는 경향은 나타났다으나 유의한 개선 효과는 관찰되지 않았다.

한편 골 연속성의 재현 측면에서 골절의 치유과정을 골절부위들을 이어주는 가골의 형성단계와 생성된 가골이 흡수되고 원래의 뼈모양을 되찾는 단계로 크게 나누어 볼 때 골절의 치유를 촉진시키는 물질의 효능 검색 방법으로 본 연구에서는 정량적인 방법으로서 가골의 부피를 측정하여 홍화씨가 가골의 형성을 촉진시키는지 여부에 대하여 알아보았다. 가골의 형성이 완전히 확인되는 골절 후 2주부터 8주까지 가골의 부피를 측정하였고 2주에서 6주까지는 가골의 부피가 증가되었으나 6~8주에는 오히려 가골의 부피가 줄어들어 재성형기가 계속됨을 확인할 수 있었다. 그리고 2주를 제외한 다른 주에서는 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 수술 후 2주에 가골의 부피는 홍화씨투여군에서 대조군에 비하여 유의하게 증가되었다(Table 2). 이 같은 가골형성의 촉진효과는 체중부하에 의해서도 일어난다는 보고가 있으니²²⁾ 대조군과 홍화씨투여군의 골절유발 후 사료를 임의투여한 시점부터 두군간의 체중은 유의적인 변화가 없었으므로 골절치유에 대한 체중의 효과는 없었으리라 생각된다. 한편 식이중의 단백질함량과 골절환자의 BMD(bone mineral density), 골절치유말기의 가골 강도의 높은 상관성에 대한 보고^{18,19)} 등이 있으나 일반사료에 홍화씨를 10% 첨가하였을 때 단백질함량의 변화는 거의 없었다. 그러나 이 보고에 근거하면 영양적인 차이에 따라 골절치유에 영향을 미칠 수 있으므로 두 군간의 영양적인 차이를 사료 섭취량의 차이로서 확인한 결과 역시 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

방사선 소견상 골절모델에서 수술 후 1일에 경골의 횡측골절이 유발되었으며 골수강내 고정된 강선을 확인하였다. 수술 후 7일 소견에서 수술 후 1일과 비교하여 큰 차이를 확인할 수 없었으며 홍화씨투여군과 대조군 양측 모두에서 확실한 가골형성의 소견은 관찰되지 않았다. 두 군 모두 수술 후 2주에 가골의 형성이 부분적으로 확인되었으며 수술 후 4주 소견에서 대

조군과 홍화씨투여군 양측 모두에서 골절부를 잇는 가골의 전체적인 모습을 선명하게 관찰할 수 있었으며 부분적인 골유합이 관찰되었다. 수술 후 6주에 두 군 모두에서 완전하지는 않으나 부분적인 방사선적 골유합의 소견을 나타내었다. 수술 후 8주에 두군 모두 대부분의 개체에서 골절전 정상상태와 유사한 골유합이 이루어진 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

골대사의 생화학적 지표는 크게 골형성지표와 골흡수지표로 나누어 진다.^{23,24,25} 골형성 지표는 골을 형성하는 조골세포가 만들어 내는 total alkaline phosphatase, bone alkaline phosphatase, osteocalcin (boneGla-protein), procollagen type I extention peptide가 있으며, 골흡수지표는 파골세포에 의해 분해되는 콜라겐의 분해산물인 urinary hydroxyproline, pyridinoline and deoxypyridinoline(collagen cross link) 등이 있다.^{24,25} 혈장 또는 혈청에서 측정된 total alkaline phosphatase는 가장 널리 쓰이는 골형성 지표이다.^{25,26} 조골세포는 alkaline phosphatase를 생성하여 조골세포의 소포에 저장하는데 이중 일부가 혈액 내로 유리되어 나오게 된다.²⁵ 대부분의 골다공증에서는 골형성과 골흡수는 함께 증가하거나 감소하므로 골형성지표나 골흡수지표중 한가지만 측정해도 가능할 것이며, 이 경우는 골흡수지표가 더 좋다.^{25,26} 본 연구에서는 골형성지표인 osteocalcin과 alkaline phosphatase와 골흡수지표인 hydroxyproline을 측정하였다. 홍화씨투여군에서는 뇨중 hydroxyproline농도는 대조군에 비하여 유의하게 감소되었고 혈중 osteocalcin농도와 alkaline phosphatase농도는 대조군에 비하여 유의하게 감소되었다. 일반적으로 골흡수를 억제하는 약물로는 estrogen, calcitonin, bisphosphanate등이 있고 골형성을 촉진하는 약물로는 parathyroid hormone, fluoride등이 있으며^{25,26} 본 실험의 결과로 보아 홍화씨는 골흡수를 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다.

홍화(紅花, *Carthamus tinctorius* L.)는 민간에서 한방약재로 사용되어온 물질로 주로 통경 등의 부인병에 효과가 있다고 알려져 있으며²⁷ 항염증,²⁸ 마우스 피부의 tumor promotion에 대한 억제효과,²⁹ 혈전증 개선,³⁰ Ca⁺ antagonistic 활성,³¹ 신경보호작용,³² 혈압강화작용,¹⁷ 면역기능억제,¹⁸ 뇌경색에 대한 보호작용¹⁹이 보고되었다.

홍화씨가 혼합사료형태로 투여하였을 때 골절동물의 가골형성을 촉진시키는 기전에 대하여는 홍화씨의 성

분 및 효능에 대한 연구가 매우 미미하다. 홍화씨의 가골형성 촉진의 가능성은 식이 중의 fatty acid 함량의 변화이다. 식이 중 fatty acid의 종류·양과 bone 대사의 관계에 대한 보고가 다수 되었는데 필수지방산인 γ -linoleic acid와 eicosapentanoic acid의 비율에 따라 γ -linoleic acid의 함량이 높을수록 bone의 칼슘 수준을 높임이 보고되었으며, 필수지방산에 의해 소장 내 칼슘의 흡수가 증가한다.^{33,34} 한편 linoleic acid가 풍부한 식이에 의해 요추체 (lumbar vertebral body) 내에서, bone 대사에 관여하는 prostaglandin E의 함량이 증가하고 해면질의 밀도가 증가한다고 알려진 바 있고³⁵ 근위경골간단부에서 bone 대사에 관여한다고 알려진 eicosanoid의 형성이 증가됨이 보고된 바 있다.³⁶ 이 같이 홍화씨를 첨가함으로써 인하여 사료 중의 linoleic acid를 포함한 지방산들의 양의 변화가 일어나 파골세포에 관여하여 골흡수억제로 인하여 홍화씨가 골절치유를 촉진시켰을 수 있다. 두 번째 가능성은 골절치유에 대한 효과가 입증되고 생체내에서 골절치유에 직접적으로 관여함이 알려진 growth factor와 홍화씨 성분에 다량 함유되어 있는 linoleic acid의 관련성이다. TGF- β 1(transforming growth factor)은 골기질에 다량 저장되어 있는 물질³⁷로 골격조직세포의 발생, 성장, 분화 등에 영향을 미치며³⁸ 연골세포에 작용하여 제2형 collagen의 합성에도 영향을 미치는 것으로 보고³⁹되어 있다. 또한 동물실험에서 골절부에 국소적 용하였을 경우 가골의 형성을 촉진시켜 골절치유를 촉진시키는 연구결과가 다수 보고되었다.^{40,41,42} 또한 epidermal growth factor의 연골 및 bone의 형성에 대한 작용이 알려져 있다.^{43,44} 이들 골절치유에 관련된 여러 growth factor들과 홍화씨의 주성분으로 알려진 linoleic acid의 관련성이 골절치유와는 다른 측면에서 여러 실험자들에 의해 보고되었는데, linoleic acid는 *in vitro*에서 TGF β 1의 작용을 매개함이 보고된 바 있으며⁴⁵ 또한 *in vitro*에서 epidermal growth factor의 상피세포에 대한 분화작용을 증강시킴이 알려져 있다.⁴⁶ 이 같은 growth factor 등에 대한 linoleic acid의 작용에 대한 보고에도 불구하고 linoleic acid의 골절치유에 대한 직접적인 작용에 대한 보고는 없으므로 다만 linoleic acid가 골절치유를 촉진시키는 growth factor의 작용을 증가시켜 골절치유를 촉진시킨 것이 아닌간접적으로 추측할 수 있을 뿐이다. 위에서 홍화씨 oil의 주성분으로 알려진 linoleic acid

와 골절치유촉진 기전에 관한 여러 가능성을 생각해 보았는데 골절치유과정은 서론에서 언급한 바와 같이 매우 복잡한 과정을 거치며 bone metabolism에 관하여서도 치유단계에 따라 bone 생성과 흡수의 상반된 과정이 관련되고 있고 더욱이 홍화씨 성분에 관해 알려진 바가 적어 홍화씨의 골절치유촉진기전을 예측하는 것은 매우 어렵다. 또한 또다른 연구자에 의하면 linoleate는 in vitro에서 chondrocyte의 collagen 형성을 억제하는 효과를 지니는 것으로 보고되어⁴⁷⁾ linoleic acid 가 골절치유에 음성적인 영향을 미칠 가능성도 배제할 수는 없으며 홍화씨내에 어떤 다른 성분에 의해 초기의 골절치유가 촉진되었을 수 있다. 한편, 홍화씨내 성분의 직접적인 골절치유에 대한 영향 이외에도 홍화씨내의 어떤 특정성분이 골절치유에 필요한 칼슘, 인 등의 무기질이나 비타민 등 골절치유에 영향을 미칠 수 있는 물질의 체내 흡수나 분포에 영향을 미쳤을 수도 있다.

결 론

흰쥐에서 골수강내 고정에 의한 경골의 동물골절모델을 확립하고 홍화씨의 골절치유에 대한 효과를 검색하고자 대조군과 홍화씨처리군의 골절치유정도를 골절부 피부 및 근육 상처치유도의 육안적 확인, 방사선사진촬영, 골절치유시 생성되는 가골(callus)의 생성정도로 비교하여 본 결과 홍화씨를 투여한 군에서 대조군에 비하여 골절 초기에 상처치유도가 개선되었으며, 방사선소견상으로는 유의적인 변화가 없었고, 2주에서 가골 부피의 증가, urinary hydroxyproline, serum osteocalcin, total alkaline phosphatase의 감소가 관찰되었다.

문 헌

- 1) Contron, R. S., Kumar, V., and Robbins, S. L.: Pathologic basis of disease 5th ed., W. B. Saunders Com., Philadelphia, 1213 (1994).
- 2) John W. Hole, J.: Human Anatomy Physiology, Wm. C. Brown publisher, Oxford, 170 (1993).
- 3) Hulth, A.: Basic science and pathology: Current concepts of fracture healing. *Clin. Orthop. Rel. Res.* **249**, 265(1989).
- 4) Frost, H. M.: The biology of fracture healing. An overview for clinicians. *Part I. Clin. Orthop.* **248**, 283 (1989).
- 5) Macewen, W.: Observations concerning transplantation of bone illustrated by a case of inter human osseous transplantation: Whereby over two-thirds of the shaft of a humerus was restored. *Proc. R. Soc. Lon.* **32**, 232 (1991).
- 6) Gag, N. K., Gaur, S. and Sharma, S.: Percutaneous autogenous bone-marrow grafting in 20 cases of ununited fracture. *Acta. Orthop. Scand.* **64**, 671 (1993).
- 7) Goshima, J., Goldberg, V. M. and Caplan, A. I.: The origin of bone formed in composite grafts of porous calcium phosphoate ceramic loaded with marrow cells. *Clin. Orthop.* **269**, 274 (1991).
- 8) Dennis, J. E., and Caplan, A. I.: Porous ceramic vehicles for rat-marrow-derived osteogenic cell delivery: Effects of pre-treatment with fibronectin or laminine. *J. oral. Implant.* **19**, 106 (1993).
- 9) Critchlow, M. A., Bland, Y. S. and Ashhurst, D. E.: The effect of exogenous transforming growth factor- β on healing fractures in the rabbit. *Bone* **16**(5), 521 (1995).
- 10) Kawaguchi, H., Kurogawa, T., Hanada, K., Hiyama, Y., Tamura, M., Ogata, E. and Matsumoto, T.: Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology* **135**(2), 774 (1994).
- 11) Nsh, T. J., Howlett, C. R., Martin, C., Steele, J., Johnson, K. A., and Hicklin, D. J.: Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits, *Bone* **15**(1), 203 (1994).
- 12) Wang, E. A.: Bone morphogenetic proteins (BMPs): therapeutic potential in healing bony defects. *Trends Biotechnol.* **11**(9), 379 (1993).
- 13) 藤源美碧, 動脈硬化 治療豫防劑, としてのへ“こ”への效用, *新柴臨床* **8**(5), 71 (1959).
- 14) Harbige, L. S., Yeatman, N., Amor, S. and Crawford, M. A.: prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats by a novel fungal source of gamma-linoleic acid. *Br. J. Nutr.* **74**(5), 701 (1995).
- 15) Jung, K. H. and Jeong, C. S.: Protective effect of

- Carthamus tinctoris* L. semen on hepatotoxicity by carbon tetrachloride in rats. *J. Appli. Pharmacol.* **4**, 426 (1996).
- 16) Jamall, I. S., Finelli, V. N. and Que Hee, S. S. : A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissue. *Anal. Biochem.* **115**, 70 (1981).
- 17) Liu, F., Wei, Y., Yang, X. Z., Li, F. G., Hu, J. and Cheng, R. F. : Hypotensive effects of safflower in spontaneous hypertensive rats and influence on plasma renin activity and angiotensin II level. *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao* **27**(10), 785 (1992).
- 18) Lu, Z. W., Liu, F., Hu, J., Bian, D. and Li, F. G. : Suppressive effect of safflower yellow on immune function. *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao* **12**(6), 537 (1991).
- 19) Romano, C., Price, M., Bai, H. Y. and Olney, J. W. : Neuroprotectants in Honghua: glucose attenuates retinal ischemic damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **34**(1), 72 (1993).
- 20) Mann, F. A. and Payne, J. T. : Bone healing. *Sem. Vet. Med. Surg.* **4**, 312 (1989).
- 21) Schelling, S. H. : Secondary (classical) bone healing. *Sem. Vet. Med. Surg.* **6**, 16 (1991).
- 22) Sarmiento, A., Schaeffer, J. F., Beckerman, L., Latta, L. L. and Enis, J. E. : Fracture healing in rat femora as affected by functional weight-bearing. *J. Bone Joint Surg.* **59**(3), 369 (1977).
- 20) Mann, F. A. and Payne, J. T. : Bone healing. *Sem. Vet. Med. Surg.*, **4**, 312 (1989).
- 21) Schelling, S. H. : Secondary (classical) bone healing. *Sem. Vet. Med. Surg.* **6**, 16 (1991).
- 22) Sarmiento, A., Schaeffer, J. F., Beckerman, L., Latta, L. L. and Enis, J. E. : Fracture healing in rat femora as affected by functional weight-bearing. *J. Bone Joint Surg.* **59**(3), 369 (1977).
- 23) Adachi, J. D. : The correlation of bone mineral density and biochemical markers to fracture Risk. *Calcif. Tissue Int.* **59**(1), S16 (1996).
- 24) Alexeeva, L. : Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. *WHO Technical Report Series* **843**, 1 (1994).
- 25) Bettica, P., Moro, L., Robins, S. P., Tayot, J., Singer, F. R., Baylink, D. J. : Bone-resorption markers galactosyl hydrolysine, pyridinium crosslinks, and hydroxyproline compared. *Clin. Chem.* **38**(11), 2313 (1992).
- 26) Aloia, J. F., Cohn, S. H., Vaswani, A., Yeh, J. K., Yuen, K., Ellis, K. : Risk factors for postmenopausal osteoporosis. *Am. J. Med.* **78**, 95 (1985).
- 27) 강소신의학원 : 중약대사전, 上, 상해과학출판사, 서울, 1002 (1978).
- 28) Akihisa, T., Yasukawa, K., Oinuma, H., Kasahara, Y., Yamanouchi, S., Takido, M., Kumaka, K. and Tamura, T. : Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry* **43**(6), 1255 (1996).
- 29) Yasukawa, K., Akihisa, T., Kasahara, Y., Kaminaga, T., Kanno, H., Kumaki, K., Tamura, T. and Takido, M. : Inhibitory effect of alkane-6,8-diols, the components of safflower, on tumor promotion by 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncology* **53**(2), 133 (1996).
- 30) Zhao, L., Zhang, Y. and Xu, Z. X. : Clinical effects and experimental study of xijian tongshuan pill. *Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih* **14**(2), 71 (1994).
- 31) Meselhy, M. R., Kadota, S., Momose, Y., HHatakeyama, M., Kusai, A., Hattori, M. and Namba, T. : Two new quinochalcone yellow pigments from *Carthamus tinctorius* and Ca^{2+} antagonistic activity of tinctormine. *Chem. Pharm. Bull.* **41**(10), 1796 (1993).
- 32) Leung, A. W., Mo, Z. X. and Zheng, Y. S. : Reduction of cellular damage induced by cerebral ischemia in rats. *Neurochem. Res.* **16**(6), 687 (1991).
- 33) Claassen, N., Coetzer, H., Steinmann, C. M. and Kruger, M. C. : The effect of different n-6/n-3 essential fatty acid ratios on calcium balance and bone in rats. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **53**(1), 13 (1995).
- 34) Atteh, J. O. and Leeson, S. : Effects of dietary fatty acids and calcium levels on performance and mineral metabolism of broiler chickens. *Poult. Sci.* **6**(12), 2412 (1983).
- 35) Bartels, T., Hein, W., Taube, C., Runge, H. and mest, H. J. : Correlations between endogenous prostaglandin E formation in the bone and spongiosa density. *Biomed. Biochim. Acta.* **47**(10-11), S278

- (1988).
- 36) Bartels, T., Lueddeckens, G., Hein, W, m Forster, W, Taube, C., Pfffer, M., Pfeiffer, M. and Mest, H. J. : Modification of lipoxigenase products in bone by the linoleic acid content of the diet. *Z. Exp. Chir. Transplant Kunstliche Organe* **23**(3), 171 (1990).
- 37) Joyce, M. E., Robert, A. B., Sporn, M. B. and Bolander, M.E.: Transforming growth factor and the initiation of condrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J. Cell Biol.* **110**, 2195 (1990).
- 38) Noda, M., Yoon, K., Prince, C. W., Butler, W. T. and Rodan, G. A. : Transcriptional regulation of osteopontin production in rat osteosarcoma cells by type transforming growth factor. *J. Biol. Chem.* **263**, 13916 (1988).
- 39) Seyedin, S. M., Thomas, T. C., Thomson, A. Y., Rosen, D. M. and Piez, K. A. : Purification of two cartilage-inducing factors from bovine demineralized bone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 2267 (1985).
- 40) Centrella, M., McCarthy, T. L. and Canalis, E. : Transforming growth factor bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J. Biol. Chem.* **262**(6), 2869 (1987).
- 41) Lind, M., Schumacker, B., Soball, K., Keller, J., Melsen, F. and Bunger, C. : Transforming growth factor factor-b enhances fracture healing in rabbit tibiae. *Acta. Orthop. Scand.* **64**(5), 553 (1993).
- 42) 이광진, 박찬희, 양준영, 고광표: 골절가골 형성에 미치는 TGF- β 1 의 영향에 관한 실험적 연구. 대한정형외과학회지 **29**(2), 364 (1994).
- 43) Canalis, E. and Raisz, L. G. : Effects of epidermal growth factor on bone formation in vitro. *Endocrinology* **104**, 862 (1979).
- 44) Ng, K. W., Patridge, N. C., Nail, M. and Martin, T. J. : Epidermal growth factor receptors in clonal lines of a rat osteogenic sarcoma and in osteoblast rich rat bone cells. *Calcif. Tissue Int.* **35**, 298 (1983).
- 45) Newman, M. J. : Inhibition of carcinoma and melanoma cell growth by type 1 transformong growth factor beta is dependent on the presence of polyunsaturated fatty acid. *Proc. Natl. Acac. Sci.* **87**(14), 5543 (1990).
- 46) Bandyopadhyay, G. K., Imagawa, W., Wallace, D. and Nandi, S. : Linolate metabolite enhance the in vitro proliferative responce of mouse mammary epithelial cells to epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **262**(6), 2750 (1987).
- 47) Watkins, B. A., Xu, H. and Turek, J. J. : Linoleate impairs collagen synthesis in primary cultures of avian chondricytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **212**(2), 153 (1996).