한국전자현미경학회지 제 31 권 제 4 호 2001
Korean J. Electron Microscopy 31(4), 307~314(2001)

홍화(*Carthamus tinctorius* L.)씨 분말의 랫드 골절에 대한 치유 효과

박 창 현, 엄 창 섭[1], 배 춘 식[2,*]
고려대학교 의과대학 전자현미경실, [1]해부학교실
[2]전남대학교 수의과대학 및 동물의학연구소

Effects of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Seed Powder on Fracture Healing in Rats

Chang-Hyun Park, Chang-Sub Uhm[1] and Chun-Sik Bae[2,*]
Electron Microscope Laboratory, [1]Department of Anatomy and Institute of Human Genetics,
Korea University College of Medicine
[2]Department of Surgery and Institute of Veterinary Medical Science,
College of Veterinary Medicine, Chonnam National University
(Received September 14, 2001)

ABSTRACT

Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) is a thistle-like annual plant mainly grown in dry hot climates as an oilseed or birdseed. Traditionally, the oil has mainly been sold in the health food market because it is unsaturated having high linoleic and oleic acid levels. With increased health consciousness in recent years, the oil quality has become a more general health issue.

This study was designed to understand whether safflower seed powder has positive effects on the fracture healing in rats. Simple transverse fracture of rat fibula was made with a rotating diamond disc saw. The histologic changes of rats were observed with a scanning electron microscope.

The fractured fibulae showed a complete fusion at the fracture site in the 4th to 5th week after a simple transverse fracture. Administration of safflower seed powder facilitated the speed of histologic changes without affecting qualitative changes.

These results suggest that safflower seed powder may have substances that help the fracture healing process.

Key words : Fracture, Rat, Safflower seed powder

본 논문의 요지는 한국전자현미경학회에서 발표되었음.
* Correspondence should be addressed to Dr. Chun-Sik Bae, Department of Surgery and Institute of Veterinary Medical Science, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, 300 Yongbong-dong, Puk-gu, Kwangju, 500-757 Korea. Ph.: 062-530-2876, FAX: 062-530-2809, E-mail: csbae210@chonnam.ac.kr
Copyright ⓒ 2001 Korean Society of Electron Microscopy

서 론

골절은 각종 기계적인 자극으로 인하여 골 또는 연골조직의 연속성이 일부 또는 전부 상실되어 있는 상태를 말한다.

골절의 치유를 위해서는 전기자극이나 vitamin D (Bae et al., 1997), calcium, calcitonin, bisphosphonate (Licata, 1997; Kruger et al., 1998) 등을 이용하였으며 이들의 효과에 대해서는 일치하지 않았으며 오히려 상반되는 견해도 있었다.

홍화는 높이 1m 내외의 일년초로 꽃에 홍색 색소 carthamin (0.3～0.6%), 황색 색소 saffron yellow (20～30%), 그 밖에 점액질, 지방유 (oleic acid, linoleic acid 및 glycoride)가, 잎에 luteolin-7-glucoside가, 종자에 linoleic acid ligand의 tracheloside를 함유하고 있으며, 파어활혈 (破瘀活血), 통경 (通經), 부인병, 냉증, 혈행장해, 무월경, 협심통 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다 (Yook, 1989).

또한 홍화씨는 골절치유에 탁월한 효능이 있다고 (Kim, 1992) 알려져 있으며 최근에는 홍화씨를 주성분으로 하는 키 성장 촉진제가 시판되고 있는 실정이다.

이에 저자들은 랫드의 골절치유에 미치는 홍화씨 분말의 영향을 살펴보고자 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 실험군의 설정

12주령 암컷 *Sprague-Dawley* 랫드 (229.0±7.5 g) 50마리를 1주일간의 예비사육을 통하여 실험환경에 적응시킨 후, 인위적으로 비골의 골절을 유발하고 홍화씨 분말투여군 (실험군)과 대조군으로 나누고 각각 25마리씩 배치를 하였으며 각 군은 매주마다 5마리씩 배정하여 1주부터 5주까지 골절의 치유과정을 관찰하였다. 각 군의 실험동물은 12시간의 명암주기가 교대로 유지되는 실내에서 사육하였으며 사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2. 비골의 골절유발

실험동물은 ketamin hydrochloride (케타라®, 유한양행) 15 mg/체중 100 g를 복강내 주사하여 전신마취를 유발하였다. 마취된 랫드는 측와위로 고정하고 우측 뒷다리의 전경골근과 비복근을 둔성분리하여 비골을 노출시킨 후 회전하는 dental polisher의 마이크로 모터 handpiece에 diamond disk를 부착한 후 마찰열에 의한 조직의 손상을 방지하기 위하여 생리식염수를 떨어뜨려 주면서 비골의 횡골절을 유발하고 회복시켰다 (Bae, 1999).

3. 홍화씨 분말의 투여 및 표본 채취

농장에서 수확한 홍화씨 (칠곡토종홍화농장 제공)에서 이물질을 골라낸 후 깨끗이 씻어 건조시킨 후 150～170°C의 온도에서 15분간 볶은 후 분쇄기로 분쇄하여 분말을 만들어 실험에 사용하였다. 실험군에서는 골절 당일부터 분쇄된 가루를 랫드 1마리 당 1일 0.3 g씩 경구 투여하였으며, 1주일 간격으로 5주까지 골절시와 동일하게 마취한 후 비골을 채취하였다.

4. 홍화씨 성분분석

홍화씨가 함유하고 있는 유용한 미네랄과 유해성분을 조사하고자 기초과학지원연구소 서울분소에 의뢰하여 유도결합 플라즈마방출 분광분석기 ICP-AES (Jobin Yvon 138 Ultrace)를 이용하여 홍화씨 분말의 성분분석을 실시하였다.

5. 주사전자현미경 관찰

절취된 비골을 4시간 동안 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.3)에 희석한 2.5% glutaraldehyde와 2% paraformaldehyde 혼합용액으로 실온에서 고정하고, 동일 완충액으로 15분씩 2회 세척한 후, 10% 질산을 사용하여 12시간 동안 탈회하였다. 탈회된 표본은 완충액으로 15분씩 3회 세척하였으며 동일 완충액으로 완충된 1% osmium tetroxide 용액으로 2시간 동안 후고정하였다. 고정된 비골은 상승농도의 알코홀을 사용하여 탈수하고, HMDS (hexamethyldisilazane)으로 15분씩 2회 치환하여 대기 중에서 건조하여 (Park et al.,

1995) 알루미늄 표본대에 붙여 면도칼로 횡단면을 노출시킨 후 ion coater를 사용하여 20 nm의 두께로 금 도금하여 Hitachi S-450 주사전자현미경으로 15 kV의 가속전압 하에서 관찰하였다(Bae, 1999).

결 과

1. 홍화씨 성분분석

홍화씨의 성분을 분석한 결과 도표(Table 1)에서 나타나는 것과 같이 칼슘(Ca)과 마그네슘(Mg), 칼륨(K)이 다량 함유되어 있었으며, 철(Fe), 아연(Zn), 구리(Cu), 알루미늄(Al) 및 나트륨(Na) 등의 미량 광물질도 다량 포함되어 있었다. 수은(Hg), 비소(As), 카드뮴(Cd), 납(Pb) 등의 유해물질은 기계검출한계이하로 나타났으며 백금(Pt), 코발트(Co) 및 금(Au) 등도 검출되지 않았다.

Table 1. Concentration of elements from safflower seed powder (ppm)

Item	Concentration	Item	Concentration
Ca	1,604±10.2*	Pb	N.D.
Hg	N.D.	Cu	12.25±0.19
K	7,916±14.4	Al	21.29±0.19
Fe	116.3±1.26	Na	21.58±0.58
As	N.D.	Mn	N.D.
Se	N.D.	Zn	51.9±0.58
Mg	2,518±14.2	Pt	N.D.
Cr	N.D.	Au	N.D.
Cd	N.D.	Co	N.D.

* : Mean±S.D., N.D. : Not detected.

2. 주사전자현미경 관찰

골절 유발 후 1주에 대조군(Fig. 1b)과 실험군(홍화씨 분말 투여군, Fig. 1a) 모두 골절선을 중심으로 가골이 형성되어 길이 방향으로 방추상으로 팽대된 모양을 하고 있었으며 골절편 사이의 공간은 결합조직으로 채워져 있었다.

골절 후 2주 대조군(Fig. 2b)과 실험군(Fig. 2a)의 가골 부위에서는 골화가 진행되고 있었는 데, 골절면의 연장에 해당하는 부위는 아직 초자연골로 이루어져 있었고, 대조군에서 실험군보다 초자연골의 분포정도가 커서 골화가 늦게 진행됨을 알 수 있었다. 대조군과 실험군 모두에서 골절사이 공간은 결합조직이 골화중인 초자연골로 대체되어 있었다.

골절 후 3주 대조군(Fig. 3b)과 실험군(Fig. 3a)에서는 골화가 더욱 진행되어 었다. 양 군 모두에서 골절사이 공간의 초자연골은 점차 지주골조직으로 대체되고 있었으며, 가골의 양도 많이 감소되어 있었다.

골절 후 4주 대조군(Fig. 4b)이 골절사이 공간은 초자연골과 지주골이 함께 존재하고 있었으나 홍화씨를 투여한 실험군(Fig. 4a)의 골절사이 공간은 거의 완벽하게 유합되어 지주골은 가골 부위에 국한되어 관찰되었다.

골절 후 5주 대조군(Fig. 5b)에서는 골절 후 4주보다 성숙된 신생골이 골절단을 채우면서 유합을 이루었으나 아직 대부분 지주골의 형태를 취하고 있었으며, 실험군(Fig. 5a)의 골절단 주변으로 아직 약간의 지주골이 존재하기는 하나 거의 대체적으로 성숙된 골조직으로 대치되어 있었으며, 중심부의 골수강도 서로 개통되어 있었다.

고 찰

뼈가 골절되어 손상된 부위에는 골막이 증식하여 결합조직성 가골이 형성되고 연골조직으로 대체된 후 골화되어 결합함으로써 정상적인 뼈로 회복된다. 골절의 치유라 하는 것은 이렇게 파괴된 골이 완전히 수복되어 생리적으로 정상적인 기능을 발휘할 수 있는 상태로 회복하였을 때를 말한다. 뼈의 발생은 막성뼈발생(intramembranous ossification)과 연골성뼈발생(Cartilaginous ossification)으로 구분되며, 골절이 치유되는 과정은 학자에 따라서 다소 차이가 있으나 대체적으로 출혈 및 응혈, 육아조직의 조직화, 섬유연골성 가골 형성에 의한 뼈파편 결합, 망상의 지주(trabeculae)에 의한 뼈가골 형성, 골막과 골내막에서 연골모세포와 뼈모세포의 증식, 뼈기질 대체 및 해면골의 치밀골로의 대치, 흡수 및 회복 단계로 구분된다(Faucett, 1986). 또한, 골절 회복 과정의 특성에 관하여 Hiltunen et al. (1993)이 마우스 경골의 골절을

대상으로 한 연구에 의하면, 간엽조직의 양은 골절 후 5일과 7일에 최고에 달하며, 가골 중 연골이 차지하는 면적은 골절 후 9일에 전체 가골의 45%로 최고에 도달하며, 가골 자체의 크기, 횡단면적, 양은 골절 후 2주에 최고에 달한 후 점차 감소하는 과정을 밟는다고 하였다. 본 실험에서 비골골절 후 홍화씨를 투여하지 않은 대조군 1주에서는 골절단의 유합이 이루어지지 않은 채 골절편 사이의 공간을 결합조직이 채우고 있었으며, 2주와 3주에서는 골절편 사이에 주로 연골과 결합조직이 많았으며 4주에서 5주로 시간이 경과함에 따라 성숙한 신생골 조직으로 골절단이 채워져 있어 Hiltunen et al. (1993)과 유사한 경향을 보였다. 홍화씨를 투여한 실험군에서는 골절 후 2주군부터 연골세포의 빠른 증식이 이루어진 후 4주에서는 이미 골실질이 완전하게 유합되었고, 5주에서는 골수강이 개통되어 치유에 있어서의 질적인 차이는 보이지 않았으나, 치유 속도가 대조군에 비하여 빠르게 진행되었음을 알 수 있는데, 조직학적 소견만으로 판단하면 홍화씨를 투여한 실험군의 치유속도가 완전 유합된 4주에서 대조군보다 1.5주 정도 빠르게 진행된 것으로 추정할 수 있다.

홍화씨를 투여한 실험군에서 치유 속도가 빠르게 진행되는 이유로 우선 홍화씨에 함유된 칼슘과 같은 풍부한 무기질이 뼈의 재생에 도움이 된 결과로 생각해 볼 수 있다. 홍화씨의 성분을 분석하여 보고한 바에 따르면 홍화씨는 칼슘, 마그네슘, 칼륨 등을 다량 함유하고 있으며, 일반적으로 뼈의 성장에 영향을 미치는 중요한 무기질로는 칼슘, 인, 마그네슘 등을 생각할 수 있다. Meller et al. (1984)에 의하면, 개에 골절을 유발하였을 때 골절 직후에 칼슘의 농도가 급격히 감소하였다가 시간 경과에 따라 점차 증가하여 정상 수준으로 회복되며, 이와 반대로 인은 골절 직후에는 증가하였다가 시간 경과에 따라 점차 감소하여 정상으로 회복되는데 그 정도가 칼슘의 변화보다 커서 Ca/P의 비율도 골절 직후에는 감소하였다가 정상으로 회복된다고 한다. 본 실험에서 사용한 홍화 속에 다량 함유되어 있는 칼슘은 이와 같이 골절 직후에 소실되는 칼슘을 보충시킴으로써 정상적인 골형성 과정에 도움이 될 가능성이 높은 것으로 판단된다. 마그네슘은 혈액순환에 영향을 미치고 (Ludbrook et al., 1999), 칼슘 농도를 조절 (Matsuda et al., 1999)하는 것으로 알려져 있다. 마그네슘 결핍은 뼈의 부갑상선 호르몬에 대한 응답을 제한하여 뼈모세포를 감소시키고, 뼈의 소실 (Rude et al., 1998), 나아가서는 골다공증을 발생시키고 (Rude et al., 1999), 지속적인 저칼슘증을 유발 (Ragosta et al., 1996)하는 것으로 알려져 있다. 이러한 의미에서 홍화씨 속에 포함되어 있는 다량의 마그네슘은 골절 후 발생할 가능성이 있는 여러 원인에 의한 골소실을 예방함으로써 골절 치유에 긍정적인 효과를 나타낼 수 있다고 판단된다. 이 외에 홍화씨에 미량의 백금도 포함하고 있으며 (Lee & Choi, 1998) 포함된 백금 성분이 뼈의 결합을 촉진시킨다는 주장도 있으며 (Kim, 1992), 백금 전극을 이용하여 자극을 주면 가골형성이 촉진 (Okada & Shiba, 1984)된다는 주장도 있어 홍화씨에 포함된 백금도 칼슘, 마그네슘과 같이 뼈의 형성과 결합에 중요한 요소로 작용할 가능성이 있을 것으로 사료되었으나 저자 등이 기초과학지원연구소에 홍화씨의 성분을 분석의뢰한 결과 홍화씨에서는 백금이 검출되지 않았으며 다른 연구자 (Lee & Choi, 1998)가 원자력연구소에 분석의뢰한 실험에서도 검출되지 않았다. 따라서 지금까지 주장되어온 홍화씨에 함유되어 있다는 백금의 역할은 추측에 불과하였다고 판단되며, 골절 치유를 촉진시는 요소는 백금이 아니라 마그네슘 또는 지금까지 밝혀지지 않은 다른 요소라고 사료된다. 특히 최근에는 골절치유 과정에서 뼈형태발생단백질 (bone morphogenetic protein, BMP)의 발현에 관한 연구 (Bostrom, 1998; Murakami & Noda, 2000)가 활발해지고 있는 실정이지만 국내에서는 BMP에 대한 연구가 거의 없으며, 홍화씨 속에 포함되어 있는 다른 유기물질에 관련된 구체적인 연구가 아직 미약하다. 본 실험에서 홍화씨를 계속 섭취하는 경우 절단된 골단의 유합의 촉진되는 현상을 보인 것은 위에서 논의한 무기물 외에도 골의 형성과정에서 보여지는 결합조직으로부터의 초자연골 형성, 초자연골로부터의 골형성 등 골형성과 관련된 세포의 분화 및 성장을 촉진하는 성분의 포함여부 및 BMP와의 관련성이 있을 가능성도 배제할 수 없어 앞으로 이에 대한 연구가 필요하다고 사료된다.

참 고 문 헌

Bae CS: Effects of 1α, 25 dihydroxycholecalciferol on osteoporotic fracture: Light microscopic and scanning electron microscopic observation. Korean J Electron Microscopy 29(3) : 315-321, 1999. (Korean)

Bae CS, Cho YS, Chang KJ: Effect of electrical stimulation and vitamin AD_3E on fracture healing in a rat model. Korean J Vet Res 37(4) : 863-873, 1997. (Korean)

Bostrom MP: Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. Clin Orthop 355S : S116-23, 1998.

Faucett DW: A textbook of histology. W.B. Saunders Co. Philadelphia, pp. 230-231, 1986.

Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT: A standardized experimental fracture in the mouse tibia. J Orthop Res 11(2) : 305-312, 1993.

Kim IH: Shinyakboncho. Kwang Jae Won, Seoul, 48, 1992. (Korean)

Kruger MC, Coetzer H, de Winter R, Gericke G, van Papendorp DH: Calcium, gamma-linolenic acid and eicosapentaenoic acid supplementation in senile osteoporosis. Aging (Milano) 10(5) : 385-394, 1998.

Lee IW, Choi JK: Safflower Seed and Health. Taeil publication, Seoul, pp. 181-185, 1998. (Korean)

Licata AA. Bisphosphonate therapy. Am J Med Sci 313(1) : 17-22, 1997.

Ludbrook GL, James MF, Upton RA: The effect of magnesium sulfate on cerebral blood flow velocity, cardiovascular variables, and arterial carbon dioxide tension in awake sheep. J Neurosurg Anesthesiol 11(2) : 96-101, 1999.

Matsuda N, Tofukuj M, Morgan KG, Sellke FW: Coronary microvascular protection with Mg^{2+}: intracellular calcium regulation and vascular function. Am J Physiol 276(4) : H1124-1130, 1999.

Murakami S, Noda M: Expression of indian hedgehog during fracture healing in adult rat femora. Calcif Tissue Int 66(4) : 272-6, 2000.

Okada Y, Shiba R: The relationship between electrical callus formation and the amount of electricity. Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi 58(10) : 1013-1023, 1984.

Park CH, Chang BJ, Cho KY: Comparison of scanning electron microscopic specimens dried with different methods. Korean J Electron Microscopy 25(3) : 33-39, 1999. (Korean)

Ragosta KG, Bergstrom WH, Briggs DG, Brandt B: Protamine and acute depletion of magnesium limit bone response to parathyroid hormone. Anesh Analg 82(1) : 29-32, 1996.

Rude RK, Kirchen ME, Gruber HE, Meyer MH, Luck JS, Crawford DL: Magnesium defficiency-induced osteoporosis in the rat: uncoupling of bone formation and bone resorption. Magnes Res 12(4) : 257-267, 1999.

Rude RK, Kirchen ME, Gruber HE, Stasky AA, Meyer MH: Magnesium defficiency induces bone loss in the rat. Miner Electrolyte Metab 24(5) : 314-320, 1998.

Yook CS: Coloured Medicinal Plants of Korea. Academy publication, Seoul, pp. 535, 1989. (Korean)

<국문초록>

12주령 랫드의 비골의 골절을 유발한 후 골절치유에 미치는 홍화씨 분말의 영향을 알아보고자 실험을 실시한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

비골의 골절은 골절유발 후 5주에 성숙된 신생골 조직으로 충만되어 조직형태학적으로 완전한 유합이 이루어지는데, 홍화씨 분말을 투여한 결과 골절유발 후 4주에 성숙된 신생골 조직으로 골절단이 충만되어 완전한 유합을 이룬 후 5주에서는 골수강도 개통되는 등 대조군과 비교하여 유합시기를 기준으로 1.5주 정도의 빠른 골절의 치유가 이루어졌다.

이상의 결과는 홍화씨 분말에 골절의 치유를 촉진시키는 성분이 포함되어 있을 가능성을 시사한다고 사료된다.

FIGURE LEGENDS

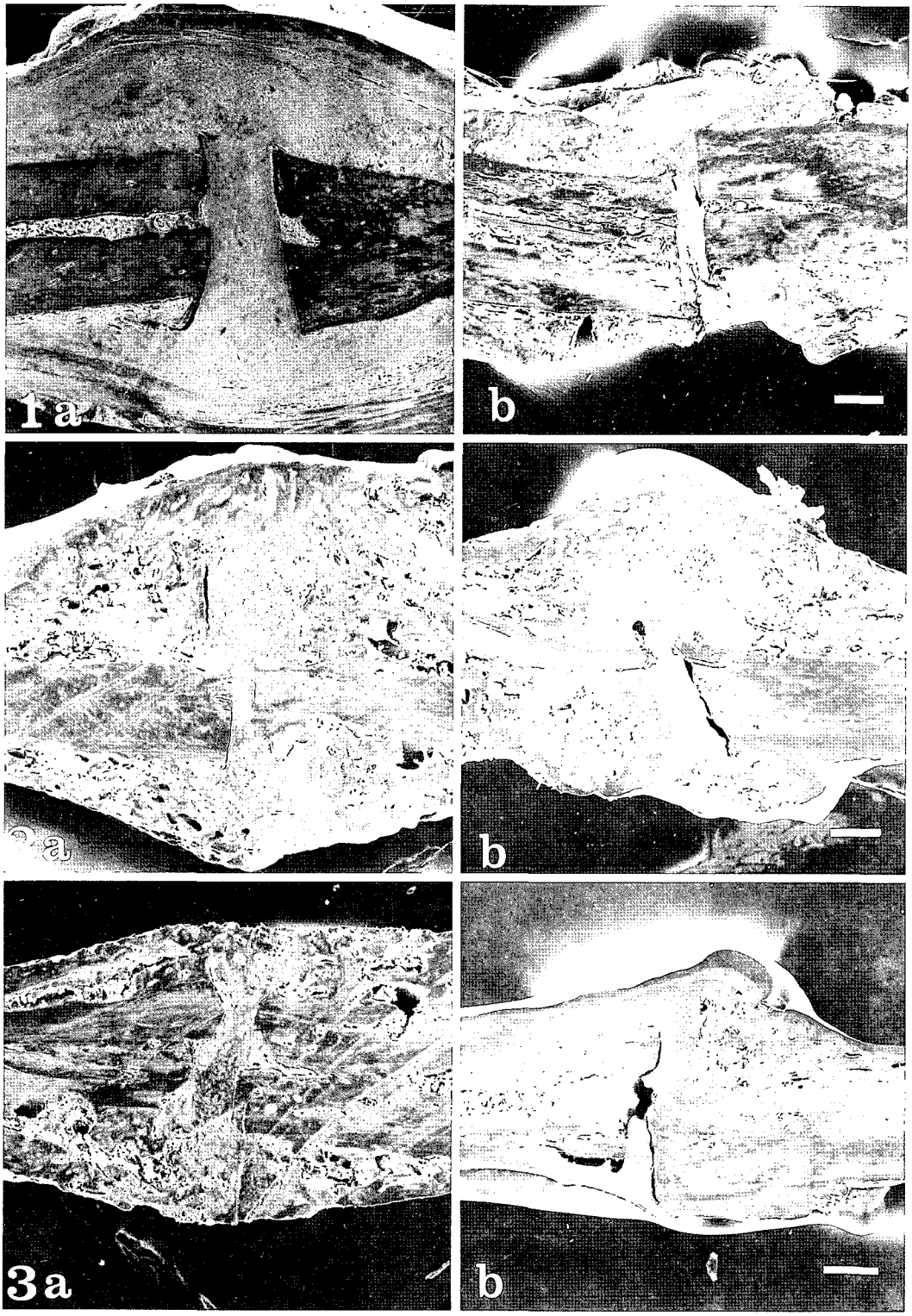
Fig. 1. Scanning electron micrographs of diaphysis of a rat fibula administered safflower seed powder (a) and control (b) 1 week after fracture. Granulation tissue fills the gap between bone fragments. Large callus are formed surrounding the fractured site. (scale bar = 140 μm)

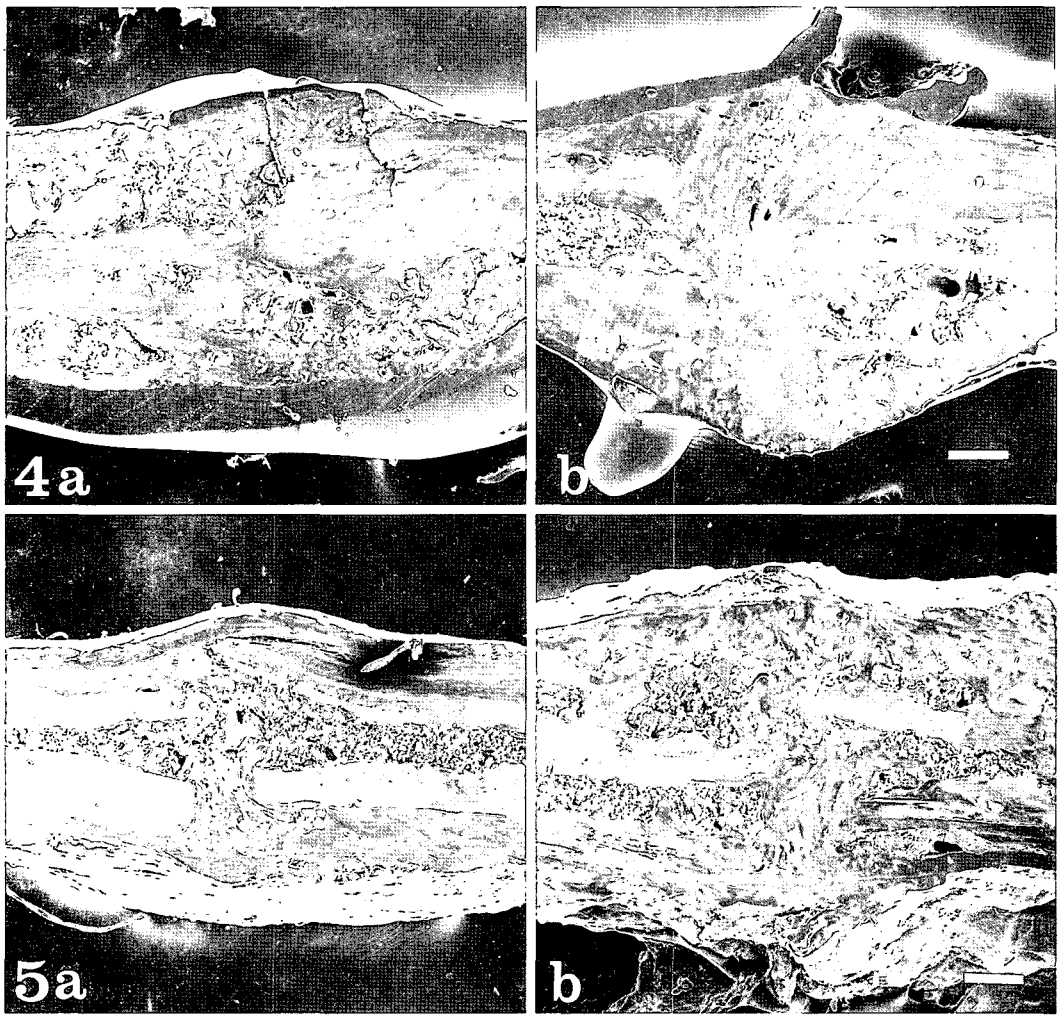
Fig. 2. Scanning electron micrographs of diaphysis of a rat fibula administered safflower seed powder (a) and control (b) 2 weeks after fracture. Gap between fragmented bone shows some cartilagenous changes. Most of the callus are cartilage and bone, suggesting the earlier bone formation in the callus surrounding the fracutre sites than the fracture site itself. (scale bar = 140 μm)

Fig. 3. Scanning electron micrographs of diaphysis of a rat fibula administered safflower seed powder (a) and control (b) 3 weeks after fracture. Gap between fractured fragments are filled with typical cartilage. (scale bar = 140 μm)

Fig. 4. Scanning electron micrographs of diaphysis of a rat fibula administered safflower seed powder (a) and control (b) 4 weeks after fracture. Fractured fragments are fused with a newly formed bony tissue in the fibula of a rat administered safflower seed powder (a), however, same area in control was still filled with cartilage. (scale bar = 140 μm)

Fig. 5. Scanning electron micrographs of diaphysis of rat fibula administered safflower seed powder (a) and control (b) 5 weeks after fracture. In fibula of a rat received safflower seed powder, bone marrow cavity is recanulated (a), however, in control fibula (b), the fractured site are still filled with newly formed bone tissues. (scale bar = 140 μm)


1a
b
2a
b
3a
b


4a
b
5a
b