Korean J. Food & Nutr. Vol. 18. No. 1, 72~80 (2005)

THE KOREAN JOURNAL OF FOOD AND NUTRITION
한국식품영양학회

난소적출 수술을 받은 흰쥐에서의 골밀도, 골강도 및 골대사의 생화학적 지표에 대한 한방요법의 효과

이주원* · 김현진* · 지옥화* · 원해단* · 유영조** · 이민호** · 김태화** · 엄애선*** · †강주섭*

*한양대학교 의과대학 약리학실, **한양대학교 의과대학 의학과, ***한양대학교 생활과학대학 식품영양학과

Effects of Alternative Medicine Extract on Bone Mineral Density, Bone Strength and Biochemical Markers of Bone Metabolism in Ovariectomized Rats

Joo-Won Lee*, Hyunjin Kim*, Okhwa Jhee*, Haedan Won*, Youngjo Yu**, Minho Lee**, Taewha Kim**, Aeson Om*** and †Juseop Kang*

*Department of Pharmacology & Clinical Pharmacology Laboratory, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea

**Department of Internal Medicine, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea

***Department of Food Science and Nutrition, College of Human Ecology, Hanyang University, Seoul, Korea

Abstract

To prevent and treat the osteoporosis, diverse therapies have been applied, which is still need to solve negative side effects. We investigated the effects of the extract from alternative medicine(AM) on the progress of bone loss in ovariectomized-rats fed with Ca-deficient diet for 7 or 14 weeks. Ovariectomy(OVX) concomitant with Ca-deficiency caused bone loss evidently decreased in bone mineral density and bone strength of femoral epiphysis and vertebrae, which were ameliorated with administration of AM extract. Also, the effect of AM extract on the biochemical markers were measured. The increased serum alkaline phosphatase caused by OVX and Ca-deficiency were observed, which were not affected by administration of AM extract. Administration of AM extract may have preventive effect on the elevated serum acid phosphatase concentrations caused by OVX and Ca-deficiency at 14 wks, implicating that AM extract possibly acts toward reducing born resorption, even though the results were not statistically significant. Serum osteocalcin and urinary deoxypyridinoline, the markers of bone turn over, were not changed by estrogen deficiency or AM extract. We concluded that the AM extract treatment had potently preventive effects on the decreased bone density and bone strength induced by OVX and Ca-deficiency. The changes of biochemical markers related to the effect of AM extract were not manifested but it still suggest that AM extract may inhibit the bone resorption derived from OVX and Ca-deficiency.

Key words : osteoporosis, bone mineral density, bone strength, biochemical markers

서 론

경제적 발전과 평균수명이 증가됨에 따라 노인 연령층에서 골다공증의 이환율의 증가는 중요한 건강문제로 대두되고 있다. 미국의 경우 골다공증으로 인한 골절환자가 매년 150 만명 정도 발생되며[1], 우리나라

† Corresponding author : Juseop Kang, Department of Pharmacology & Clinical Pharmacology Laboratory, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea.

Tel : +82-2-2220-0652, Fax : +82-2-2292-6686, E-mail : jskang@hanyang.ac.kr

의 경우도 약 200 만명이 골다공증으로 진단 받고, 매년 약 5~10 만명이 골절을 일으키는 것으로 추정되고 있다[2]. 골다공증은 전신성 골질환으로서 골질량의 감소와 골격 기능 손상으로 골절이 쉽게 일어날 수 있는 상태로[3], 남성에서보다 여성에서 발병률이 높다. 이는 여성이 남성보다 최대 골질량(peak bone mass)이 낮고, 골 손실이 빨리 시작되며, 특히 폐경기후 에스트로겐 생성 감소로 조골세포(osteoblast) 및 파골세포(osteoclast) 에 영향을 미치어 골 교체율이 빨라지고 골 흡수가 골 형성보다 높아 골 소실율이 가속화 되기 때문이다[4,5]. 최대 골량에 관여하는 요인으로 유전적인 요소와 일상, 환경적인 요인 즉 흡연, 음주, 운동 부족, 칼슘 섭취 부족, 비타민 D 결핍 등이 중요하며[6] 또한 비타민 K의 결핍도 골다공증과 골절에 위험한 요인으로 알려져 있다[7].

여러 임상연구 및 동물실험 등에서 호르몬 보충요법[8,9] 및 파골세포의 작용을 억제하는 항 골 흡수제(bisphosphonate)[10~13]의 골다공증 치료 및 예방 효과가 잘 보고되어 있으며 현재까지 골다공증 치료 및 예방을 위해 가장 많이 사용되고 있다. 그러나 장기간 투여로 인해 암을 유발하거나 여러 호르몬 분비 및 조절 이상 또는 치료 효능의 감소 등의 치료과정에 동반되는 금단상의 문제는 아직 해결해야 할 문제로 남아 있다. 골다공증 치료 및 예방목적으로 그밖에도 칼슘, 비타민 D 섭취, 운동, calcitonin 등이 적용되고 있다[14].

한편, 천연물질에서 추출한 성분 등이 골다공증에 미치는 효과에 대한 연구가 보고되었다. 인도에서 뼈와 관련된 질병에 민간요법으로 사용된 *Praval bhasma* 식물[15]과 *Praval bhasma*를 주성분으로 제조한 OST-6[16,17] 등은 난소적출 수술을 받은 쥐에서 골손실을 막는 효과를 나타내었고 black tea 추출물 투여로 에스트로겐 결핍으로 유발된 골 교체율 증가와 골 손실을 감소 효과를 보였다[18]. 또한 중국에서 isoflavone이 풍부하다는 *Puerariae radix*의 난소적출을 받은 쥐에서 골다공증 예방효과가 관찰되었고[19] Kim 등[20]은 *Astragalus membranaceus*의 추출물의 골 손실 방지효과를 보고 하였다. 또한 우리나라 한방에서 사용되고 있는 홍화씨의 골절부위의 석회과정을 촉진하며, 골절치유시간을 단축시켰다는 결과가 보고되었으며, [21] 두충[22], 두충과 목의 혼합액[23], 청아지황탕[24] 등의 난소 제거를 한 쥐에서 골다공증의 치료효과가 보고된 바 있다.

지금까지 사용되고 있는 골다공증 약물 치료제는 단지 골 손실의 진행을 막는 예방적 차원에 머물고 있으며, 장기간 복용 시 부작용 유발이라는 한계점이 있다. 따라서 독성 및 부작용이 적고 골다공증 예방 및 치료에 효과적인 신 물질의 개발이 절실하게 요구되고 있다. 이러한 신 물질은 민간요법으로 적용되어온 천연물에서 발견될 가능성과 확률이 높기 때문에 본 연구에서는 적절한 치료제 개발을 위한 일환으로 과거에 오랫동안 한방에서 골 질환에 사용되어온 한방 혼합 추출물의 골다공증에 대한 효과를 조사하였다. 특히, 두충 등 노인성 및 퇴행성 질환에 효과가 있다[21,24]는 약재를 포함하여, 서로 조화되어 약효를 상승, 보완 작용이 있는 여러 약재성분을 혼합한 한방 추출물을 사용하였으며, 칼슘 결핍 식이 및 난소 제거로 골다공증이 유발된 흰쥐에 적용시킨 후 골밀도, 골강도 및 골상태를 판정할 수 있는생화학적 지표들을 분석하여 한방 추출물의 골다공증에 대한 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 실험식이

실험동물은 Sprague-Dawley 계 암컷 흰쥐를 중앙동물 실험으로부터 구입해서 기본사료와 물을 자유로 공급하면서 일주일 동안 실험 환경에 적응시켰다. 체중이 250 g(생후 90일) 정도의 흰쥐를 5 마리씩 각각 대조군, 비 난소절제군(sham) 그리고 난소절제군(ovariectomy)으로 나누었다. 난소절제군은 난소가 위치하는 복막 양쪽을 절개한 후 양측 난소를 절제하였으며 비 난소절제군은 개복수술만 시행하였다. 수술 후 일주일이 경과한 후 대조군은 정상 사료, Sham 1군은 칼슘결핍 식이, Sham 2군은 칼슘결핍 식이 및 한방추출물, OVX 1군은 칼슘결핍 식이, OVX 2 칼슘결핍 식이 및 한방 추출물을 각각 7주 또는 14주 동안 적용하였다.

본 실험에서 사용된 한방 추출물은 혼합물(두충, 토사자, 숙지황, 별갑, 백작약, 산수유, 구기자, 흑임자, 백봉령, 홍화인, 속단, 녹용, 감초, 당귀)을 증류수로 가열 추출한 혼합추출물을 Cyclogen 으로부터 공급 받았다(공개 특허번호 : 2003-0042183)[25]. 실험식이 및 식수는 실험기간 동안 자유급여하였으며 한방 추출물(1.2 mL 농축액/kg body weight/day)은 매일 1 회씩 경구투여 하였다. 칼슘결핍 식이는 AIN-76 purified diet 조성에 준하였으며(Table 1), 식이 중 칼슘 함량은 calcium phosphate dibasic($CaHPO_4$)가 potassium phosphate, monobasic(KH_2PO_4) 으로 대체된 calcuium free American Institute of Nutrition(AIN)-76 salt mix(중앙 실험동물, 서울)를 사용하여 제한하였다. 실험기간 동안의 체중 증가량을 측정하였다.

Table 1. Composition of calcium-deficient diet

Ingredient	g/kg
Casein	200
DL-Methionine	3
Corn starch	150
Sucrose	500
Cellulose	50
Corn oil	50
Salt mix - Ca free	35
Vitamin mix	10
Choline Bitartrate	2

2. 척주골 및 대퇴골의 밀도 및 강도 측정

실험동물을 희생시킨 후 대퇴골과 척추골을 추출하여 골밀도는 Dual Energy X-ray Absorptiometry(DEXA, QDR-4500, Hologic Inc. Waltham, MA)를 이용하여 측정하였다. 대퇴골에서 단순한 강도만 측정하는 인장강도를 Universal tester(UT 24, Larson Systems Inc., USA)를 이용하여 측정하였으며 또한 대퇴골의 단위면적을 고려한 인장강도도 함께 나타내었다. 압축강도는 스폰지골 양이 많은 골조직을 측정하는 방법으로, 제 3번 요척추골(lumbar spine)에서 Universal tester를 이용하여 측정하였다. 인장강도 및 압축강도는 strain(ε-F_{max}) and stress(N/mm^2) 로 나타내었다.

3. 골다공증 생화학적 지표 측정

실험동물을 희생시키기 하루 전에 실험동물을 metabolic cage로 옮긴 후 16시간 동안 뇨를 채취하였다. 실험동물을 희생시킨 후 혈청 중 생화학 지표를 측정하기 위해 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 -80℃에 분석할 때까지 보관하였다. 혈청 중 총 estrogen(E_2) 농도는 radioimmunoassay-kit(CIS biointernational, France)로 제조회사에서 제공한 방법에 의거해서 측정하였고, calcium(Ca) 농도는 비색법을 기초로 한 kit(Sigma Chemical, USA)를 이용하여 automic absorption spectrometer (AA100, Variab Inc., USA) 로 측정하였다. 혈청 중 alkline phosphatase(ALP) 활성도와 acid phosphatase(AP) 활성도는 각각의 진단용 시액 Kit(아산제약, Korea)로, 혈청 중 osteocalcin(OC)농도는 radioimmunoassay - kit(CIS biointernational, France)로 제조회사에서 제공한 방법에 의거해서 측정하였다. 뇨중 deoxypyridinoline(DPD) 함량을 RIA-kit(IDS, UK)를 이용하여 측정하였다.

4. 통계 분석

모든 측정결과는 평균±표준오차로 나타내었으며, 군 간의 차이점은 one-way ANOVA으로 검정하였으며, 군 간의 평균치의 특이한 유의차는 Student-Newman-Keuls comparison 검정법을 사용하였다. 표준편차에서는 유의한 차이가 있으나 parametric ANOVA 검정이 적절치 않은 경우에는 Kruskall-Wallis test와 Mann-Whitney Wilcoxon U-검정법을 이용하였다.

결과 및 고찰

1. 체중 증가량

7주 및 14주간 실험식이 후 체중 증가량은 Table 2와 같다. 개복수술만 받은 Sham 군(Sham 1, Sham 2)에서 한방요법 투여군(Sham 2)의 체중 증가량은 오히려 한방요법을 받지 않은 Sham 1군보다 낮게 관찰되었고, 14주째에서는 유의적으로($p<0.05$) 낮게 나타났다. 난소 제거 수술을 받은 OVX 군(OVX 1, OVX 2)은 개복수술만 받은 Sham 1, Sham 2 군에 비해 비교적 체중 증가량이 높게 나타났다. 이러한 난소 절제로 유발된 체중 증가 현상은 기존의 연구에서도 이미 보고된 바 있다[9,26,27]. 골아세포와 지방세포는 같은 배아세포에서 분화되는데[28] 에스트로겐은 같은 배아세포에서 골아세포의 분화를 촉진하는 반면에 지방세포의 분화는 억제시킨다는 보고에 근거할 때[29] 난소 제거 후 에스트로겐 결핍으로 인한 체중 증가는 지방조직 축적에서 기인된 것이라 사료된다. 반면에, 본 실험에서 한방

Table 2. Effect of alternative medicine(AM) extract on body weight gain in sham or ovariectomized rats fed Ca-deficient diet

	Body weight gain	
	(g/ 7 weeks)	(g/ 14 weeks)
Sham 1	40.3±11.3	73.3± 9.7
Sham 2	25.1±10.1	36.8± 5.9*[3]
OVX 1	69.1±24.8	78.8±30.2
OVX 2	99.5±20.0**[2]	145.3±36.2*[1]

[1] Sham 1 - sham + Ca deficient diet; Sham 2 - sham + Ca deficient diet + AM extract; OVX 1 - ovariectomy + Ca deficient diet; OVX 2 - ovariectomy + Ca deficient diet + AM extract.

[2] Means±SE (n=5).

[3] *[1] ; $p<0.05$ in OVX 2 and OVX 1 group at 14 weeks.

[4] **[2]; $p<0.01$ in OVX 2 and OVX 1 group at 7 weeks.

[5] *[3]; $p<0.05$ in Sham 2 group at 14 weeks.

요법을 투여한 OVX 2 군의 7주($p<0.01$) 및 14주째 ($p<0.05$) 체중 증가량은 한방요법을 받지 않은 OVX 1 군에 비해 유의적으로 높게 나타난 것에 미루어 볼 때, 한방요법은 난소를 제거한 쥐에 에스트로겐의 투여는 체중 증가를 억제한다는 보고[9,26]와는 달리 체중 증가를 억제하는 효과는 없는 것으로 사료된다. 그러나 난소를 절제한 한방요법 투여군(OVX 2)에서의 체중 증가는 한방요법이 난소 절제로 인한 골조직의 감소 억제효과에서 기인할 수 있다는 가능성도 배제할 수 없다.

2. 골밀도 및 골강도의 변화

난소 절제 수술 및 칼슘 결핍 식이는 골밀도를 감소시킨다는 기존의 보고와 같이[12,16,30,31] 본 실험에서도 이와 같은 상관관계가 관찰되었다(Table 3). 칼슘결핍 식이만 적용시킨 Sham 1 군에서 비록 유의적인 변화는 관찰되지 않았지만 대퇴골 골단부(femoral epiphysis)의 골밀도가 감소되는 경향을 보였으며, 한방요법을 투여한 Sham 2군의 대퇴골 골단부의 골밀도가 대조군과 유사한 수준으로 증가되었다. 이와는 달리 대퇴골 골간부(femoral diaphysis)의 골밀도는 칼슘 결핍 식이만 또는 칼슘 결핍 식이 및 동시에 난소 절제에 의해 크게 변화되지 않았다. 해면골(trabecular bone)이 많이 분포되어 있는 척추골의 경우 무기질 교환이 치밀골보다 8 배나 높다는 보고를 고려할 때[32] 이러한 결과는 아마도 대퇴골의 골간부는 뼈의 재흡수가 빨리 일어나는 해면골보다는 치밀골(compact bone)이 주로 분포되어 있어서 해면골이 많은 대퇴골의 골단부보다 적게 영향을 받은 것으로 사료된다. 칼슘결핍 식이 및 난소 절제 수술을 받은(OVX 1 군) 경우에 해면골이 많은 대퇴골 골단부 및 척추골(spine)의 골밀도가 감소되었으며, 이러한 결과는 장기간 적용시킨 14 주에서 7 주보다 더 현저하게 관찰되었다. 또한 한방요법은 이러한 대퇴골 골단부 및 척추골 골밀도 감소를 유의적으로($p<0.05$) 증가시켰다. 이와 유사하게, 본 실험에서 사용된 한방 추출물중 한 성분인 두충이 난소 제거 수술을 받은 쥐에서 간접적으로 골밀도를 나타내 주는 스폰지골의 면적을 증가시킨 보고도 있다[22]. 따라서 이러한 결과는 한방요법이 난소 절제 및 칼슘 결핍 식이로 유발된, 특히 골대사가 빨리 진행되는 해면골의 골밀도의 손실을 억제하는 효과가 있음을 시사해 주며 더 나아가서 해면골의 골밀도는 골절 위험의 중요한 지표로 알려져 있으므로[33] 이러한 한방 추출물의 골밀도에 대한 효과는 골다공증환자의 골절 위험율에도 영향을 미칠 것으로 사료된다.

대퇴골 골단부의 골강도는 해면골의 골밀도에 의해 영향을 받는다는 보고가 있다[34]. 따라서 한방요법의 골강도에 미치는 효과를 조사하였다. Kobayashi 등의 연구에서는[31] 칼슘결핍으로 골강도(maximum load) 감소가 관찰되었다. 이와는 달리 본 실험의 경우 칼슘결핍식이만 적용시킨 군(Sham 1 군)에서 대퇴골의 인장강도는 영향을 미치지 않았으며 한방요법으로 인한 대퇴골의 인장강도의 변화도 관찰되지 않았다. 그러나

Table 3. Effect of extract from alternative medicine (AM) on bone mineral density in sham or ovariectomized rats fed Ca-deficient diet (g/cm^2)

	7 weeks			14 weeks		
	Femur		Spine	Femur		Spine
	Diaphysis	Epiphysis		Diaphysis	Epiphysis	
Control	0.14±0.02	0.20±0.02	0.27±0.01	0.12±0.00	0.21±0.02	0.28±0.04
Sham 1	0.14±0.01	0.18±0.03	0.31±0.02	0.15±0.01	0.16±0.02	0.26±0.01
Sham 2	0.14±0.02	0.21±0.04	0.32±0.03	0.14±0.02	0.2 ±0.04	0.19±0.04
OVX 1	0.13±0.01	0.19±0.02	0.25±0.04	0.12±0.01	0.16±0.01*[2)]	0.13±0.02
OVX 2	0.15±0.02	0.19±0.04	0.26±0.02	0.13±0.02*[3)]	0.19±0.02*[1)]	0.25±0.03*[1)]

[1)] Sham 1 - sham + Ca deficient diet; Sham 2 - sham + Ca deficient diet + AM extract; OVX 1 - ovariectomy + Ca deficient diet; OVX 2 - ovariectomy + Ca deficient diet + AM extract.

[2)] Means±SE (n=5).

[3)] *[1)]; $p<0.05$ in OVX 2 and OVX 1 group at 14 weeks.

[4)] *[2)]; $p<0.05$ in OVX 1 at 7 weeks versus 14 weeks.

[5)] *[3)]; $p<0.05$ in OVX 2 at 7 weeks versus 14 weeks.

칼슘결핍식이 및 난소제거 수술을 받은 OVX 1 군에서 대퇴골의 인장강도가 감소되었으며 이러한 현상은 7주째 더욱 현저하게($p<0.01$) 나타났다. 이는 난소 절제로 인한 에스트로겐 결핍증상이 전형적으로 나타난 것으로 판단된다. 난소 절제 수술을 한 후 한방요법을 받은 군의 인장강도는 7주째에 Sham 1, Sham 2 와 같은 수준으로 증가하였으며, OVX 1군에 비해 200% 이상 증가되었다(Table 4). 골조직의 단면적을 고려한 인장강도에서도 난소 절제군에서(OVX 1) 다른 군에 비해서 감소하였으며, 7주째에 유의적으로($p<0.01$) 감소하였다. 난소 절제군에 한방요법의 투여는 7주째에 단면적을 고려한 강도를 75% 증가시켰으며, 14주째에도 증가되었으나 통계적으로 유의하지 않았다. 반면에 개복수술만 받은 군에서는 한방요법과 관계된 유의한 변화가 관찰되지 않았다(Table 4).

제 3번 요추골을 사용하여 해면골이 많은 골조직의 강도를 측정한 결과는 Table 4와 같다. 칼슘 결핍 식이만 또는 칼슘 결핍 식이 및 난소 절제 수술은 척추골 압축강도를 저하시켰으며 특히 난소 절제 및 칼슘 결핍 식이를 받은 군(OVX 1)에서 에스트로겐의 결핍으로 인한 압축강도가 현저하게 감소하였으며, 7주째에서는 통계적으로 유의성($p<0.05$)을 보였다. 한방 추출물의 투여는 칼슘 결핍으로 저하된 척추골의 압축강도를 정상대조군과 유사한 수준으로 증가시켰으며 난소 절제 수술을 받은 OVX 2 군은 한방요법의 투여로 척추골 압축강도가 7주째에서는 Sham 1 군과 같은 수준으로 증가되었으며, OVX 1 군에 비해 45%($p<0.05$) 증가되었다. 제 14주째의 한방요법 투여로 인한 변화에서도 7주째의 변화와 거의 흡사한 결과를 나타내었다(Table 5).

해면골의 밀도는 골강도에 영향을 미친다는 보고에 근거하여[34] 본 실험에서 해면골이 많은 척추골에서 칼슘 결핍 및 난소 절제로 인한 골밀도의 감소는 척추골의 골강도 감소와 상관관계가 있다고 추정되며, 이러한 상관관계는 또한 골밀도 및 골강도에 대한 한방 추출물의 효과에서 관찰되었다.

Table 4. Effect of extract from alternative medicine (AM) on bone strength of femur in sham-oprated or ovariectomized rats fed Ca-deficient diet

	7 weeks		14 weeks	
	Strain (ε-Fmax)	Stress (N/mm^2)	Strain (ε-Fmax)	Stress (N/mm^2)
C	0.23 ± 0.10^a	0.02 ± 0.01^a	0.28 ± 0.03	0.03 ± 0.00
S1	0.24 ± 0.05^a	0.25 ± 0.03^a	0.12 ± 0.04	0.26 ± 0.01
S2	0.18 ± 0.03^a	0.21 ± 0.04^a	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.04
O1	0.15 ± 0.01^b	0.14 ± 0.02^b	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.02
O2	0.26 ± 0.01^a	0.26 ± 0.04^a	0.21 ± 0.01	0.25 ± 0.03

1) Sham 1 - sham + Ca deficient diet; Sham 2 - sham + Ca deficient diet + AM extract; OVX 1 - ovariectomy + Ca deficient diet; OVX 2 - ovariectomy + Ca deficient diet + AM extract.

2) Means±SE (n=5).

3) ^{ab} within the column indicates significantly different at $p<0.01$ by Student-Newmarn-Keuls test.

3. 생화학적 지표들의 변화

골 대사의 변화를 나타내는 생화학적 지표들의 변화가 Table 6에 요약되어 있다. 난소를 제거한 OVX 1, OVX 2 군에서 혈중 에스트로겐(E_2) 농도는 Sham 1, Sham 2에 비해 각각 67%, 77% 감소하였고, 한방요법 적용 군과 비적용 군의 혈중 에스트로겐 농도가 유사한 것으로 미루어 한방요법의 투여는 에스트로겐 생성과는 무관한 것으로 판단된다.

우리 몸의 99%의 칼슘은 뼈에 존재하며 뼈는 뼈의

Table 5. Effect of extract from alternative medicine (AM) on third lumbar spine bone strength in sham-operated or ovariectomized rats fed Ca-deficient diet

	7 weeks		14 weeks	
	Strain (ε-Fmax)	Stress (N/mm^2)	Strain (ε-Fmax)	Stress (N/mm^2)
C	0.16 ± 0.01^a	0.015 ± 0.009	0.14 ± 0.04	0.014 ± 0.001
S1	0.12 ± 0.01^a	0.010 ± 0.001	0.16 ± 0.05	0.014 ± 0.001
S2	0.15 ± 0.04^a	0.015 ± 0.004	0.14 ± 0.03	0.013 ± 0.005
O1	0.08 ± 0.01^b	0.006 ± 0.003	0.07 ± 0.06	0.007 ± 0.007
O2	$0.11\pm0.05^{a*}$	0.009 ± 0.003	0.10 ± 0.04	0.008 ± 0.003

1) Sham 1 - sham + Ca deficient diet; Sham 2 - sham + Ca deficient diet + AM extract; OVX 1 - ovariectomy + Ca deficient diet; OVX 2 - ovariectomy + Ca deficient diet + AM extract.

2) Means±SE (n=5).

3) ^{ab} within the column indicates significantly different at $p<0.01$ by Student-Newmarn-Keuls test.

4) * ; $p< 0.05$ in OVX 1 and OVX 2 at 7 weeks.

Table 6. Effect of extract from alternative medicine (AM) on biochemical markers of bone metabolism in sham-operated or ovariectomized rats fed Ca-deficient diet

	Control	Sham 1	Sham 2	OVX 1	OVX 2
			7 weeks		
E2 (pg/mL)	186.3±22.3	225.0±32.5	279.7±183.6	73.0±11.3	61.7±33.95
Ca (mg/dL)	9.4± 0.7	9.8± 0.1	9.2± 0.3	9.4± 0.4	9.3± 0.4
ALP (1U/L)	86.7±29.1	125.5±82.7	125.7±22.3	142.5±71.4	140.0±12.8
AP (1U/L)	10.3± 0.4	13.2± 0.4	13.5± 3.5	13.2± 0.9	13.1± 4.7
OC (ng/ml)	0.2± 0.1	0.2± 0.0	0.2± 0.1	0.2± 0.0	0.2± 0.1
DPD (nM/creatinine)	66.7± 2.1	75.3±45.8	94.8±36.4	47.4±24.7	49.5±24.8
			14 weeks		
E_2 (pg/mL)	86.5±38.9	57.3± 4.5	79.0± 1.4	42.0± 5.2	37.0± 9.5
Ca (mg/dL)	9.0± 0.8	9.5± 0.3	10.4± 1.5	9.2± 0.5	9.4± 0.2
ALP (1U/L)	42.0±11.3	109.0±17.0	126.0±25.0	103.7±42.3	114.7±25.9
AP (1U/L)	2.9± 0.9	7.2± 2.6	11.1±13.2	4.0± 1.2	2.2± 0.5
OC (ng/mL)	0.1± 0.0	0.2± 0.0	0.1± 0.0	0.1± 0.0	0.1± 0.0
DPD (nM/creatinine)	55.8± 9.4	51.9±42.3	35.9±11.5	45.5± 2.5	43.5±10.6

[1] Sham 1 - sham + Ca deficient diet; Sham 2 - sham + Ca deficient diet + AM extract; OVX 1 - ovariectomy + Ca deficient diet; OVX 2 - ovariectomy + Ca deficient diet + AM extract.

[2] Means±SE (n=5).

[3] E_2-estrogen; ALP-alkaline phosphatase; AP-acid phosphatase; OC-osteocalcin; DPP-deoxypyridinoline.

재형성과정을 통해 혈중 칼슘농도를 조절한다. 임상연구에서[35] 폐경이후 총 혈중 칼슘 농도 및 뇨중 칼슘 배설 농도가 증가된 것과는 달리 본 실험에서는 혈중 칼슘농도는 7주 및 14주 후 모든 군에서 유사하게 나타났다(Table 6).

Alkaline phosphatase(ALP) 는 골아세포에서 골생성을 하는 동안 생성되는 단백질로 골 신생이 활발하게 진행될 때 혈중 농도가 훨씬 증가되며 골 생성 작용의 지표가 된다[36]. 혈중 ALP 농도는 폐경후 골다공증 환자에게서 높게 관찰되며[35], 호르몬 요법이나[27] 골흡수 억제제[37]를 사용하는 경우 다시 감소되는 현상을 보였다. 7주 및 14주에서 칼슘 결핍(Sham 1, Sham 2) 또는 칼슘 결핍 및 난소제거군(OVX 1, OVX 2)의 혈중 ALP(1U/L) 농도가 정상 대조군에 비해 증가되었으나 유의적인 변화는 없었다. 또한 다른 연구에서 혈중 ALP 농도가 난소 제거 군에서 높게 관찰 된 것처럼[23], 7주에서 난소 절제 수술을 받은 군의 혈중 ALP 농도가 sham 수술을 받은 경우보다 더 증가되는 경향을 나타내었으나 유의적인 변화는 관찰되지 않았다. 한방 추출물의 적용 또한 혈중 ALP 농도에는 크게 영향을 미치지 않았다(Table 6). 한편, 골아세포가 파골세포에 의한 골 흡수 작용에 중요한 역할을 한다[38]는 사실에 미루어 볼 때 본 실험에서 상승된 골아세포의 지표인 혈중 ALP 농도는 아마도 칼슘 결핍 및 난소 절제로 인하여 파골세포의 골흡수 작용이 촉진될 때 부수되는 결과일 가능성을 제시한다.

혈중 Acid phosphatase(AP) 농도는 골흡수의 한 지표로 사용되는데[39] 7주에 혈중 AP 농도는 정상 대조군에 비해 모든 군에서 높게 나타났으나 유의적인 차이는 없었다. 이는 칼슘결핍 및 칼슘결핍과 난소절제로 인한 파골세포에서의 골흡수가 증가되는 경향을 나타내는 것으로 사료된다. 14 주의 경우에서도 칼슘 결핍 및 난소 절제로 인하여 정상대조군에 비해서 상승된 혈중 AP 농도가 관찰되었으며 7주와는 달리 14주에 한방요법을 적용한 OVX 2군의 경우 혈중 AP 농도가 크게 감소되는 경향을 나타내었으나 유의적인 차이는 없었다. 이는 아마도 한방 추출물이 난소 절제와 칼슘 결핍 식이로 유도된 골 흡수를 억제하는 방향으로 작용하는 것으로 생각된다.

Osteocalcin(OC)은 골아세포에서 합성되어 뼈의 세포내 기질에 침착되고, 새로 합성된 일부가 혈액내로 분비되므로 뼈의 무기질 대사의 지표로 사용된다[39]. 특히 혈청 OC 농도는 폐경 후에 증가되며 폐경후에 나타나는 골소실율을 잘 예측할 수 있는 지표로 알려

져 있다[40,41]. 본 실험의 경우 난소 제거로 골다공증을 유발시킨 군의 혈중 OC 농도는 다른 군과 유사하였으며, 한방요법의 적용도 혈중 OC에는 영향을 미치지 않았다(Table 6). 본 실험과는 상반되게 난소 제거를 한 쥐에서 혈중 OC 농도가 증가되었고, 골흡수 억제제인 alendronate 및 에스트로겐 처방은 이를 억제시켰다는 연구가 보고된 바 있다[9), 37]. 그러나 또 다른 연구에서는 난소 제거 및 한방요법의 투여가 오히려 혈중 OC 농도에 영향을 주지 않았다[23].

Deoxypyridinoline(DPD) 는 성숙한 collagen에 존재하며 피부나 조직보다는 주로 뼈에 분포되어 있고, 사람의 경우 pyridinoline 보다 3배 정도 높게 존재하므로 특히 골 흡수를 진단하는데 특이성이 높다고 알려져 있다[39]. 폐경후 뇨중 DPD 농도가 증가되며, 호르몬 요법[42] 또는 골흡수제의 적용[37]은 이를 억제시킨다고 보고된 바 있다. 이와 달리 본 실험에서는 뇨중 DPD 농도는 7주째에는 난소 제거 수술을 받은 OVX 1, OVX 2 군이 오히려 Sham 1, Sham 2 군보다 낮은 경향을 보였으며, 14주에 유사하게 검출되었으며 한방 추출물의 투여도 크게 영향을 미치지 않았다(Table 6).

이상의 결과를 종합해 보면 14주간의 난소 절제와 칼슘 결핍식이 적용으로 골 손실 및 골 다공증을 유도할 수 있었으며, 이와 같은 골다공증 실험동물에 한방요법을 적용하여 골밀도 및 골강도를 살펴볼 때 한방요법이 골다공증을 유의하게 억제하는 것을 관찰할 수 있었다. 하지만 한방요법이 골대사의 생화학적 지표에 미치는 영향은 뚜렷하지 않았다. 이는 아마도 본 실험에서 사용한 한방 추출물의 농도와 실험식이 투여기간이 골다공증에 대한 한방 효과를 평가하기에 충분하지 않았을 가능성이 있다고 생각되며, 좀 더 장기적으로 적용한다면 골다공증에 대한 억제효과가 더 확실할 것으로 사료된다.

요 약

본 실험은 칼슘 결핍과 난소 제거로 유발한 골다공증에 대한 한방요법의 효과에 대하여 고찰하였다. 1) 난소 제거로 인한 에스트로겐의 결핍 및 칼슘 결핍은 폐경여성에서 관찰되어지는 것처럼 골강도 및 골밀도의 손실을 일으켰다. 2) 한방 추출물의 투여는 에스트로겐 결핍 및 칼슘 결핍으로 유도된 골강도 및 골밀도 손실에 대한 예방효과가 관찰되었다 3) 난소제거로 인한 에스트로겐의 결핍 및 칼슘 결핍은 골대사의 생화학적 지표들(혈청 중 alkaline phosphatase, acid phosphatase, osteocalcin, 그리고 뇨중 deoxyopyridinoline 농도)에 영향을 미치지 않았다. 4) 한방 추출물의 투여 또한 골 대사의 생화학적 지표들에 영향을 미치지 않았다. 결론적으로, 한방 추출물의 골손실에 대한 예방효과는 한방 추출물의 골다공증 치료제로서의 가능성을 제시하며, 새로운 골다공증 치료제 개발 일환으로 한방추출물의 적용기간 및 농도 변화를 통한 계속적인 연구가 요구되어진다.

참고문헌

1. Riggs, BL and Melton, III, LJ. The worldwide problem of osteoporosis: insights afforded by epidemiology. *Bone* 17:505S-511S.
2. 장준섭, 골다공증성 골절의 예방과 치료, 대한골대사학회지 1:147-155. 1994
3. Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am. J. Med.* 94:645-650. 1993
4. Kanis, JA, Melton, LJ, Christiansen, C, Johnston, CC and Khaltaev, N. The diagnosis of osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* 9:1137-1141. 1994
5. Riggs, BL and Melton, LJ. Involutional osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* 314:1676-1686. 1986
6. Dempster, DW and Lindsay, R. Pathogenesis of osteoporosis. *Lancet* 341:781-801. 1993
7. Booth, SL, Tucker, KL, Chen, H, Hannan, MT, Gagnon, DR, Cupples, LA, Wilson, PW, Ordovas, J, Schaefer, EJ, Dawson-Hughes, B and Kiel, DP. Dietary vitamin K intakes are associated with hip fracture but not with bone mineral density in elderly men and women. *Am. J. Clin. Nutr.* 71:1201-1208. 2000
8. Turner, RT, Riggis, BL and Spelsberg, TC. Skeletal effects of estrogen. *Endocrine Rev.* 15:275-300. 1994
9. Frolik, CA, Bryant, HU, Black, EC, Magee, DE and Chandrasekhar, S. Time-dependent changes in biochemical bone markers and serum cholesterol in ovariectomized rats: Effects of raloxifene HCl, tamoxifen, estrogen and alendronate. *Bone* 18:621-627. 1996
10. Cranney, A, Wells, G, Willan, A, Griffith, L, Zytaruk, N, Robinson, V, Black, D, Adachi, J, Shea, B, Tugwell, P and Guyatt, G. Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. II. Meta-analysis of alendronate for the treatment of postmenopausal

women. *Endocrine Rev.* 23:508-516. 2002

11. Bone, HG, Hosking, D, Devogelaer, J-P, Tucci, JR, Emkey, RD, Tonino, RP, Rodriguez-Portales, JA, Downs, RW, Gupta, J, Santora, AC and Liberman, UA. Ten year's experience with alendronate for osteoporosis in postmenopausal women. *N. Engl. J. Med.* 350:1189-1199. 2004
12. Azuma, Y, Oue, Y, Kanatani, H, Ohta, T, Kiyoki, M and Komoriya, K. Effects of continous alendronate treatment on bone mass and mechanical properties in ovariectomized rats: comparison with pamidronate and etidronate in growing rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286:128-135. 1998
13. Balena, R, Toolan, BC, Shea, M, Markatos, A, Myers, ER, Lee, SC, Opas, EE, Seedor, JG, Klein, H, Frankenfield, D, Quartuccio, H, Fioravanti, C, Clair, J, Brown, E, Hayes, WC and Rodan, GA. The effects of 2-year treatment with the aminobisphosphonate alendronate on bone metabolism, bone histomorphometry, and bone strength in ovariectomized nonhuman primates. *J. Clin. Invest.* 92:2577-2586. 1993
14. Riggs, BL and Melton, LJ. The prevention and treatment of osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* 327:62-627. 1992
15. Reddy, PN, Lakshmana, M and Venkatesh Udupa, U. Effect of Praval bhasma(*Coral calx*), a natural source of rich calcium on bone mineralization in rats. *Phramcol. Res.* 48:593-599. 2003
16. Reddy, PN and Lakshmana, M. Prevention of bone loss in calcium deficient ovariectomized rats by OST-6, a herbal preparation. *J. Ethnopharmacol.* 84:259-264. 2003
17. Mitra, SK, Venkataranganna, MV, Gopumadhavan, S, Seshadri, SJ, Rafiq, M, Anturlikar, SD, Sundraram, R and Tripathi, M. The beneficial effect of OST-6(osteoCare), herbomineral formulation, in experimental osteoporosis. *Phytomedicine* 8:195-201. 2001
18. Das, AS, Mukherjee, M and Mitra, C. Evidence for a prospective anti-osteoporosis effect of black tea (*Camellia sinensis*) extract in a bilaterally ovariecotmized rat model. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 13:210-216. 2004
19. Wang, X, Wu, J, Chiba, H, Umegaki, K, Yamada, K and Ishimi, Y. *Puerariae radix* prevents bone loss in ovariectomized mice. *J. Bone Miner. Metab.* 21:268-275. 2003
20. Kim, C, Ha, H, Lee, JH, Kim, JS, Song, K and Park, SW. Herbal extract prevents bone loss in ovariectomized rats. *Arch. Pharm. Res.* 26:917-924. 2003
21. Kim, KY, Kim, SB and Lim, JW. Effects of safflower seed yougurt on the osteoporosis in ovariectomized rat. *Kor. J. Anim. Sci. & Technol.* 46:69-76. 2004
22. Lee, DS and Byun, SY. Effects of the dietary mixture of *Eucommiae ulmoides* oliver on osteoporosis. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 16:614-619. 2001
23. Lee, JA, Noh, SH, Ahn, DK and Choi, HY. Effects of the *Eucommiae cotrtex* and *Chanenomelis fructus* on the aged overiectomized rat of postmenopausal osteoporosis. *Kor. J. Herbology* 16:201-206. 2001
24. Kim, MS, Seo, BI, Kwak, MA and Jee, SY. Effect of Chungajihwangtang on osteoporosis in overiectomized rats. *Kor. J. Herbology* 18:49-58. 2003
25. Kim, HY. Method for preparing composition for treating osteoporosis. Korea. Patent 2003-0042183. 2003
26. Kalu, DN, Arjmandi, BH, Liu, C-C, Salih, MA and Birnbaum, RS. Effects of ovariectomy and estrogen on the serum levels of insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3. *Bone Miner.* 25:135-148. 1994
27. Lee, Y-B, Lee, HJ, Kim, KS, Lee, J-Y, Nam, S-Y, Cheon, S-H, and Shon, H-S. Evalution of the preventive effect of isoflavone extract on bone loss in ovariectomized rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68:1040-1045. 2004
28. Grigoriadis, AE, Heersche, JN and Aubin, JE. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J. Cell Biol.* 106:2139-2151. 1988
29. Okasaki, R, Inoue, D, Shibata, M, Saika, M, Kido, S, OOka, H, Tomiyama, H, Sakamoto, Y and Matsumoto, T. Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) *a* or β. *Endocrinology* 143: 2349-2356. 2002

30. Ito, M, Azuma, Y, Takagi, H, Kamimura, T, Komoriya, K, Ohta, T and Kawaguchi, H. Preventive effects of sequential treatment with alendronate and 1-hydroxyvitamin D_3 on bone mass and strength in ovariectomized rats. *Bone* 33:90-99. 2003
31. Kobayashi, M, Hara, H and Akiyama, Y. Effect of menatetrenone ($V.K_2$) on bone mineral density and bone strength in Ca/Mg deficient rats. *Folia. Pharm. Jpn.* 120:195-204. 2002
32. Courpron, P. Bone tissue mechanism underlying osteoporosis *Orthp. Clin. N. Am.* 12:513-545. 1981
33. Richardson, ML, Genant, HK, Cann, CE, Ettinger, B, Gordan, GS, Kolg, FO and Reiser, UJ. Assessment of metabolic bone disease by quantitative computed tomography *Clin. Orthop.* 195:224-238. 1985
34. Mizrahi, J, Margulies, JY, Leichter, I and Deutsch, D. Fracture of the human femoral neck: effect of density of the cancellous core. *J. Biomed. Eng.* 6:56-62. 1984
35. Nordin, BEC, Wishart, JM, Clifton, PM, McArthur, R, Scopacasa, F, Need, AG, Morris, HA, O'Loughlin, PD and Horowitz, M. A longitudinal study of bone-related biochemical changes at the menopause. *Clin. Endocrinology* 61:123-130. 2004
36. Lee, HJ. Review of biochemical bone metabolism markers change in osteoporosis incidence factors. *J. Kor. Soc. Phys. Ther.* 14:213-220. 2002
37. Sarioglu, M, Tuzun, C, Unlu, Z, Tikiz, C, Taneli, F and Uvanik, BS. Comparison of the effects of alendronate and risedronate on bone mineral density and bone turnover markers in postmenopasual osteoporosis. *Rheumatol.* Int Epub ahead of print. 2004.
38. McSheey, PM and Chembers, TJ. Osteoblastic cell mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. *Endocrinology* 118:824-828. 1986
39. Delmas, PD. Biochemical markers of bone turnover. *J. Bone Miner. Res.* 8 Suppl 2:S549-555. 1993
40. Johansen, JS, Riis, BJ, Delmas, PD and Christiansen, C. Plasma BGP: an indicator of spontaneous bone loss and of the effect of estrogen treatment in postmenopausal women. *Eur. J. Clin. Invest.* 18:191-195. 1988
41. Slemenda, C, Hui, SL, Longcope, C and Johnston, CC. Sex steroids and bone mass: a study of changes about the time of menopause. *J. Clin. Invest.* 80: 1261-1269. 1987
42. Notelovitz, M. Osteoporosis: screening, prevention and management. *Fertility Sterility* 59:714-715. 1993.

(2005년 2월 4일 접수; 2005년 2월 25일 채택)