대한한방부인과학회지
THE JOURNAL OF ORIENTAL OBSTETRICS & GYNECOLOGY
VOL.18, NO.3 : 032 - 050 (2005)

生血補髓湯이 난소적출 흰쥐 대퇴골의 형태계측학적 변화 및 골대사 관련인자에 미치는 영향

세명대학교 한의과대학 부인과학교실
정재숙, 서일복, 김형준

ABSTRACT

Effects of *Saenghyeolbosu-Tang* on the Morphometric Changes of Femur, and on the Factors Related with Bone Metabolism in Ovariectomized Rats

Jae-Sook Jeong, Il-Bock Seo, Hyung-Jun Kim
Dept. of Oriental Gynecology, College of Oriental Medicine, Se-Myung University

Purpose : This study was carried out to investigated the effects of *Saenghyeolbosu-Tang* on the morphometric changes of femur, and on the hormones and cytokines associated with bone metabolism in ovariectomized rats.

Methods : Twenty-four female Sprague-Dawley rats were divided into sham operated group(normal), ovariectomized group(control), and treated with extract of *Saenghyeolbosu-Tang* group(treated). Each group was evaluated the changes of body weight at 0, 3, 6, 8, weeks after ovariectomy.
Morphometric analysis(femur weight, femur/body weight, femur ash weight, femur ash/body weight, cross sectional area of compact bone and cancellous bone of femur) and histopathological examination were performed at 8 weeks after ovariectomy. Estrogen and cytokines(TNF-α, IL-1β, IL-6) assay were performed at 8 weeks after ovariectomy.

Results :
1. The femur weight(g) of treated group(1.59±0.08) was significantly increased($p<0.05$) compared with the control group(1.50±0.07) at 8 weeks.
2. The femur/body weight(g) of treated group(5.27±0.36) was significantly increased($p<0.05$) compared with the control group(4.78±0.37) at 8 weeks.
3. In the cross sectional area of cancellous bone of femur(㎟) the treated group(1.60±0.20) was significantly increased($p<0.01$) compared with the control group(1.19±0.19) at 8 weeks.
4. The serum estrogen level(pg/㎖) of treated(83.67±27.44) and control group(800.49±22.27) showed no significantly different changes at 8 weeks.
5. The serum TNF-α level(pg/㎖) of treated(33.71±6.43) and control group(41.35±8.47) showed no significantly different changes at 8 weeks.
6. The serum IL-1β level(pg/㎖) of treated group(53.78±10.83) was significantly decreased($p<0.001$) compared with the control group(79.80±11.40) at 8 weeks.
7. The serum IL-6 level(pg/㎖) of treated group(55.52±9.02) was significantly decreased($p<0.01$) compared with the control group(69.69±7.95) at 8 weeks.

Conclusion : This study shows that *Saenghyeolbosu-Tang* inhibits bone resorption in ovariectomized rats. These results may be related to the inhibitory effect of *Saenghyeolbosu-Tang* on the secretion of IL-1β and IL-6 in the pathogenesis of osteoporosis.

Key Words : *Saenghyeolbosu-Tang*, osteoporosis, histopathology, IL-1β, IL-6

교신저자(김형준) : 충북 제천시 신월동 세명대학교 부속한방병원 부인과
전화 : 043-649-1901 이메일 : khjoongy@hanmail.net

Ⅰ. 緖 論

骨多孔症은 골형성의 減少와 골흡수의 增加로 인해 골량이 감소하고, 골의 형태를 유지하는 미세한 구조가 파괴됨으로 인해 骨의 柔軟性이 增加하여, 輕微한 충격에도 쉽게 骨折이 발생되는 전신적인 骨疾患이다[1-4].

골밀도에 영향을 미치는 인자로는 연령, 성별, 폐경, 인종, 체형, 골다공증의 가족력, 칼슘이나 비타민D의 부족, 운동량 부족, 흡연 및 음주, 수유력과 출산력 등을 들 수 있으며[5,6]. 이중 연령이 골밀도의 감소에 가장 큰 영향을 주는 요인으로 40대 이후부터는 골밀도가 감소한다. 여성의 경우 폐경후에는 폐경전보다 골흡수가 가속화되어 골소실이 발생하며, 불가피한 수술로 난소기능을 상실한 여성은 자연 폐경된 여성에 비해 골밀도가 급격히 낮아진다[7,8]. 폐경 여성의 30% 이상이 경험할 정도로 흔한 骨多孔症性 骨折과 그 合併症은[9,10], 의학적으로 높은 死亡率과 罹患率을 초래하므로 骨多孔症의 예방 및 치료의 중요성이 대두되고 있다[11].

韓醫學에서는 골다공증이라는 직접적인 병명은 없으나 <素問>[12] <靈樞>[13] 에서술된 骨痿, 骨痺, 骨枯 등이 骨多孔症과 유사하다고 보며[14], <素問>[12]에 기록된 "女子....七七 任脈虛 太衝脈衰 天癸竭 地道不通 故形壞而無子也"는 폐경후 골다공증과 유사한 문헌적 개념이라고 볼 수 있다[15,16]. 여성의 月經과 人身의 骨은, 腎이 주관하며 腎精의 滋養을 받아 발현되므로[17,18] 폐경후 骨多孔症에 대한 硏究는 주로 腎虛의 범주에서 진행되어 왔으며[19], 補腎·强筋骨의 效能이 있는 本草[20-25]들과 方劑[26-32]들에 대한 實驗的 硏究가 진행되고 있다.

본 實驗에서 사용된 生血補髓湯은 腎精을 補하고 筋骨을 補强시키는 五加皮[25]를 君藥으로 하고, 肝脾腎經으로 歸經하여 補血, 生血, 活血작용을 하는 四物之劑와, 補肝腎·强筋骨之材인 牛膝[20], 杜冲[21], 續斷[22], 木瓜[23], 補氣升陽之材인 黃芪[33], 活血通經之材인 紅花[24], 그리고 健脾和胃작용을 하는 消食藥材인 山査, 神曲, 麥芽, 砂仁[33]으로 구성된 四物湯加味方으로써 臨床에서 활용되고 있는 經驗方이다.

저자는 본 方劑의 보다 計量化되고 客觀化된 效能을 검증하기 위하여, 난소적출로 유발된 골다공증모형 흰쥐에 生血補髓湯을 투여하여 형태계측학적 검사와 더불어 혈청학적 검사로 여러 cytokine들의 변화를 관찰하여 骨多孔症의 病理發生에 미치는 영향을 확인하고자 본 연구를 수행하였다.

Ⅱ. 材料 및 方法

1. 실험동물

실험에 사용한 동물은 200 g 내외의 암컷 Sprague-Dawley계 흰쥐(샘타코, 한국)로, 온도 23±1℃, 습도 55±5%의 항온항습사육장치(대종기기상사, 한국)내에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험기간동안 사료(신촌사료, 한국)와 음수는 자유급식케 하였다.

2. 약재 및 검액의 조제

실험에 사용된 生血補髓湯의 재료는 세명대학교 한방병원에서 구입한 후 엄선하여 사용하였다. 처방의 내용과 분량은 Table Ⅰ과 같다.

生血補髓湯 4첩 분량(388 g)을 2,000 mℓ의 증류수에 1시간 동안 沈漬 시킨 후, 2시간 30분간 전탕하였다. 전탕액을 원심분리하여 침전된 성분을 제거한 후 감압농축기(EYELA, NE-1001, Japan)로 100 mℓ로 농축시키고 농축액 1 mℓ를 실험동물의 마리 당 1일 투여량으로 하였다.

Table Ⅰ. Prescription of Saenghyeolbosu-Tang

Name of Herbs	Pharmacognostic Name	Weight (g)
五加皮	*Acanthopanacis Cortex Radicis*	20
當 歸	*Angelicae gigantis Radix*	8
川 芎	*Cnidii Rhizoma*	8
白芍藥	*Paeoniae Radix*	8
乾地黃	*Rehmankiae Radix*	8
牛 膝	*Achyranthis Radix*	6
杜 冲	*Eucommiae Cortex*	6
續 斷	*Phlomidis Radix*	6
黃 芪	*Astragali Radix*	6
木 瓜	*Chaenomelis Fructus*	4
紅 花	*Carthami Flos*	2
山査子	*Crataegi Fructus*	6
神 麴	*Massa Medicata Fermentata*	3
麥 芽	*Hordei Fructus Germinatus*	3
砂 仁	*Amomi Semen*	3
Total		97

3. 난소적출 및 실험군 설정

흰쥐 8마리를 한 군으로 하여 체중 kg당 100 ㎎의 pentobarbital sodium (Sigma, USA)을 복강주사하여 마취시킨 후 개복하여 양쪽 난소적출술을 시행한 후 대조군(control group) 및 처치군(treated group)에 배정하였다. 8마리는 난소를 적출하지 않고 단순히 개복술만을 시행한 정상군(normal group)에 배정하였다.

난소적출술을 시행한 다음 날부터 정상군 및 대조군에는 증류수 1 mℓ를, 처치군에는 생혈보수탕 농축액 1 mℓ를 1일 1회 8주간 경구투여 하였다.

4. 형태계측학적 검사

1) 체중 측정

실험 개시일, 3주, 6주 및 실험 종료일인 8주째에 모든 개체의 체중을 측정하였다.

2) 대퇴골무게 및 대퇴골무게/체중 비 측정

실험 8주째에 양쪽 대퇴골을 적출하여 주위 결합조직을 깨끗하게 정리한 후 각각의 무게를 측정한 후 합산하여 대퇴골무게로 표시하였으며, 이를 체중비로 환산하였다.

3) 대퇴골 회분중량 및 대퇴골 회분중량/체중 비 측정

좌측 대퇴골의 무게를 측정한 후, 600℃의 전기로(JISICO, J-FM2, 한국)에서 16시간 가열한 후 회분을 회수하여 중량을 측정하였으며, 이를 체중비로 환산하였다.

4) 대퇴골의 병리조직학적 관찰

실험 8주째에 적출한 우측 대퇴골을 10% 중성 포르마린 용액에 1일간 고정한 후, 0.5M EDTA 용액에 2주간 침지시켜 탈회하였다. 탈회된 대퇴골을 24시간 수세 후, 대퇴골체 중앙 부위의 횡단면과 대퇴골 원위단의 종단면 절편을 만들고, 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매한 후 5㎛의 박절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

5) 대퇴골의 치밀골 및 해면골 단면적

측정

치밀골 단면적은 대퇴골체 중앙 부위의 횡단면 절편상에서 측정된 치밀골의 단면적으로 표기하였고, 해면골 단면적은 대퇴골 원위단의 종단면 절편상에서 성장판(epiphyseal plate) 상단의 골간단(metaphysis) 부위에서 측정된 해면골의 단면적으로 표기하였다. 치밀골과 해면골의 단면적은 칼라영상분석기(Media Cybernetics, Image-Pro Plus, USA)를 이용하여 측정하였다.

5. 혈청학적 검사

실험 8주째에 모든 개체를 체중 ㎏당 100 ㎎의 pentobarbital sodium (Sigma, USA)으로 마취 후 심장채혈하였다. 혈액은 3,000 rpm에서 20분간 원심하여 혈청을 분리하고, 분리된 혈청은 분석 전까지 -60℃에 보관하였다.

1) 혈중 Estrogen 함량 측정

혈중estrogen 함량은 radioimmunoassay(RIA)법으로 gamma counter (Packard, COBRA-II, USA)를 이용하여 측정하였다. 측정용 시약은 Total-Estrogens Kit (ICN, USA)를 사용하여 kit에 제공된 방법에 따라서 실시하였다.

2) 혈중 Tumor necrosis factor-α(TNF-α) 함량 측정

혈중 TNF-α 함량은 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay(ELISA) kit (Endogen, USA)로 측정하였다. 표준액 및 검액은 1시간, biotinylated antibody reagent는 2시간, streptavidin-HRP solution은 30분간 반응시키고, TMB substrate solution을 30분간 반응시켜 발색시킨 후 stop solution으로 반응을 정지시키고 ELISA reader(Molecular Devices, E10514, USA)로 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

6단계의 TNF-α표준액(2500, 833, 278, 93, 31, 10.3 pg/㎖)에서 측정된 흡광도로부터 회귀방정식 {TNF-α 함량 = (818 x 흡광도) + 12} 을 구하였으며, 검액의 흡광도를 이 방정식에 적용하여 TNF-α의 농도를 구하였다.

3) 혈중 Interleukin-1β(IL-1β) 함량 측정

혈중 IL-1β 함량은 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay(ELISA) kit (Endogen, USA)로 측정하였다. 표준액 및 검액은 2시간, biotinylated antibody reagent는 30분간, streptavidin-HRP solution은 30분간 반응시키고, TMB substrate solution을 30분간 반응시켜 발색시킨 후 stop solution으로 반응을 정지시키고 ELISA reader(Molecular Devices, E10514, USA)로 450nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

6단계의 IL-1β표준액(2500, 1000, 400, 160, 26, 10.4 pg/㎖)에서 측정된 흡광도로부터 회귀방정식 {IL-1β 함량 = (1504 x 흡광도) + 17 } 을 구하였으며, 검액의 흡광도를 이 방정식에 적용하여 IL-1β의 농도를 구하였다.

4) 혈중 Interleukin-6(IL-6) 함량 측정

혈중 IL-6 함량은 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay(ELISA) kit (Endogen, USA)로 측정하였다. 표준액 및 검액은 2시간, biotinylated antibody reagent는 1시간, streptavidin-HRP solution은 30분간 반응시키고, TMB substrate

solution을 30분간 반응시켜 발색시킨 후 stop solution으로 반응을 정지시키고 ELISA reader(Molecular Devices, E10514, USA)로 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

8단계의 IL-6 표준액(2000, 1000, 500, 250, 125, 62, 31, 15.5 pg/㎖)에서 측정된 흡광도로부터 회귀방정식 {IL-6 함량 = (1820 * 흡광도) + 21 } 을 구하였으며, 검액의 흡광도를 이 방정식에 적용하여 IL-6의 농도를 구하였다.

6. 통계처리

모든 항목의 결과에 대한 통계는 SPSS(SPSS 9.0 for Windows)를 이용하여 student's t-test로 처리하였다.

Ⅲ. 結 果

1. 형태계측학적 변화

1) 체중 변화

실험 3주 후부터 전 실험기간 동안 난소를 적출한 대조군과 처치군의 체중은 정상군에 비해서 모두 유의성 있게 증가되었으며, 처치군은 대조군에 비해서 체중이 다소 감소되는 경향을 보였으나 두 군간에 유의성 있는 변화는 없었다(Fig. 1).

2) 대퇴골 무게 변화

실험 8주에서 대조군의 대퇴골 무게는 정상군에 비해 유의성 있게 감소되었으나, 정상군과 처치군 간에 유의성 있는 변화는 없었다. 처치군의 대퇴골 무게는 대조군에 비해서 유의성 있게 증가되었다(Fig. 2).

3) 대퇴골무게/체중 비 변화

실험 8주에서 대조군과 처치군의 대퇴골무게/체중 비는 모두 정상군에 비해 유의성 있게 감소되었으며, 처치군은 대조군에 비해서 유의성 있게 증가되었다(Fig. 3).

4) 대퇴골 회분(ash) 중량 변화

실험 8주에서 대조군의 대퇴골 회분중량은 정상군에 비해서 유의성 있게 감소되었으며, 처치군은 대조군에 비해서 다소 증가되었으나 유의성은 없었다(Fig. 4).

5) 대퇴골 회분(ash) 중량/체중 비 변화

실험 8주에서 대조군과 처치군의 대퇴골 회분중량/체중 비는 모두 정상군에 비해서 유의하게 감소되었으며, 처치군은 대조군에 비해서 다소 증가되었으나 유의성은 없었다(Fig. 5).

6) 대퇴골의 병리조직학적 소견

대퇴골의 병리조직학적 소견에서 정상군의 치밀골은 골원(Haversian system)이 잘 발달되어 있어 규칙적인 구조를 나타내고 있었으나, 대조군에서는 중심관(Haversian canal)이 확장되어 있고 간질층판(interstitial lamella)이 불규칙한 형태로 관찰되었다. 처치군에서 관찰된 치밀골의 소견은 대조군과 유사한 정도로 관찰되었으나 중심관의 확장은 비교적 완화되었다.

정상군의 해면골 및 치밀골 내막에서는 낮은 입방형의 활성화된 골아(osteolast)가 많은 부위에서 증식되어 있었으나, 대조군 및 처치군에서는 활성화된 입방형의 골아포가 매우 드물게 관찰

되었으며 부위에 따라서는 많은 수의 파골세포(osteoclast)의 증식과 파골세포의 활성으로 인한 골침식 소견이 자주 관찰되었다.

정상군의 대퇴골 골간단(metaphysis)에서는 성장판(epiphyseal plate)주위의 해면골이 비교적 두텁고 치밀하게 발육되어 있었으며, 골수세포도 충실하게 분포되어 있었다.

대조군의 대퇴골 골간단에서의 해면골의 두께 및 길이는 정상군에 비해서 현저하게 감소하였고 골수세포도 지방조직으로 대치되어 골수세포의 충실도도 현저하게 감소되어 있었다.

처치군의 대퇴골 골간단에서의 해면골의 발달 및 골수세포의 충실도는 정상군에 비해서 감소되기는 하였으나, 대조군에 비해서는 증가되어 있었다.

7) 대퇴골체 치밀골 단면적의 변화

실험 8주에 측정된 대퇴골체 중앙부 치밀골의 단면적은 대조군이 정상군에 비해서 유의성 있게 감소하였으며, 처치군은 대조군에 비해 증가되었으나 유의성 있는 변화는 없었다(Fig. 6)

8) 대퇴골체 해면골 단면적의 변화

실험 8주에 측정된 대조군과 처치군의 해면골 단면적은 정상군에 비해서 모두 유의성 있게 감소하였으나, 처치군은 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었다(Fig. 7).

2. 혈청학적 변화

1) 혈중 estrogen 함량 변화

실험 8주에서 대조군과 처치군의 혈중 estrogen 함량은 모두 정상군에 비해 유의성 있게 감소하였으며, 처치군은 대조군에 비해서 다소 증가되었으나 유의성은 없었다(Fig. 8).

2) 혈중 Tumor necrosis factor-α(TNF-α) 함량 변화

실험 8주에서 대조군과 처치군의 혈중 TNF-α 함량은 모두 정상군에 비해서 유의성 있게 증가되었으며, 처치군은 대조군에 비해서 감소되었으나 유의성은 없었다(Fig. 9).

3) 혈중 Interleukin-1β(IL-1β) 함량 변화

실험 8주에서 대조군과 처치군의 혈중 IL-1β 함량은 모두 정상군에 비해서 유의성 있게 증가되었으며, 처치군은 대조군에 비해서 유의성 있게 감소되었다(Fig. 10).

4) 혈중 Interleukin-6(IL-6) 함량 변화

실험 8주에서 대조군과 처치군의 혈중 IL-6 함량은 모두 정상군에 비해서 유의성 있게 증가되었으며, 처치군은 대조군에 비해서 유의성 있게 감소되었다(Fig. 11).

Ⅳ. 考 察

骨多孔症은 그 발생기전에 따라 원발성과 속발성 골다공증으로 구분되며, 원발성 골다공증은 폐경후성 골다공증과 노인성 골다공증으로 분류한다. 폐경후성 골다공증은 가장 흔한 형태의 骨多孔症으로써, 폐경후 골질량이 급속히 감소되면서 脊椎体의 壓迫骨折과 遠位部 撓骨骨折을 초래하며[7,34-36], 골절이 발생하기 전 2-3년간의 요통경력을 가지고 있는 경

우가 많다[6,35]. 특히 脊椎骨折, 撓骨 遠位部 骨折과 大腿骨 近位部 骨折은 가장 많이 발생하는 3대 골절로 이중 脊椎骨折은 가장 흔한 골절이며 大腿骨 遠位部 骨折은 가장 위험한 골절이다[19,37,38].

골다공증의 대표적인 治療劑로 FDA로부터 공인된 estrogen[10,39] 은 骨多孔症의 예방치료뿐만 아니라 갱년기증상의 治療에도 많이 사용되어졌다[1,40]. 그러나 2002년의 美國 國立 保健院의 한 연구에서, 폐경기 여성들을 대상으로 estrogen과 progestin의 복합호르몬 投與시, 骨折危險의 정도와 大腸癌발생의 減少는 어느 정도 기대에 부응했지만, 冠狀動脈疾患 乳房癌 腦卒中 및 肺塞栓 등의 발생위험이 增加되었으므로 호르몬 투여를 중단했다고 報告하여[41,42], 호르몬투여의 위험성이 대두되었다.

그러므로 호르몬 투여요법 외에 藥材를 통해 부작용 없이 閉經後性 骨多孔症을 치료하는 많은 硏究가 이루어지고 있으며, 韓醫學界에서도 韓藥材의 식물성 estrogen으로서의 효능 검증에 대해 많은 연구가 진행되고 있다[26-32, 43-45].

한의학에서는 骨과 骨髓에 관하여 <素問>[12]에 腎이 骨과 骨髓를 주관한다고 하였다. 그러므로 骨體는 腎精과 髓液의 조절을 받아 成長·發育·衰退·老化되므로, 腎虛로 인해 발생하는 骨髓不足은 骨病의 원인이 된다[46]. 이와 같은 骨病의 원인과 함께 <素問·靈樞>에 기록된 骨痿, 骨枯, 骨痺, 骨寒熱, 骨痛, 腎虧, 腎虛腰痛 등은 모두 病理機轉과 臨床症狀상 그리고 한의학의 腎機能體系가 현대의학의 뇌하수체 부신피질의 내분비계통 개념을 포함하고 있음을 생각해볼 때[15,47], 腎虛로 인해 발생한 骨多孔症의 범주에 속한다고 할 수 있다[14,19,38].

骨多孔症의 韓醫學的 辨證은, 발현되는 증상에 근거하여 腎陰虛, 腎陽虛, 腎虛, 肝腎虧虛, 脾腎兩虛, 氣滯血瘀, 氣血兩虛로 분류한다. 治療에 있어서는 補腎陰, 補腎陽, 補肝腎, 健脾益氣, 理氣活血, 氣血雙補의 治法을 활용하나 補腎이 가장 주된 治法이며[48,49], 실험적인 치료방법으로는 鍼灸[50,51], 藥鍼[47,52,53], 煎湯液투여[20-32,43-45,55,56] 등의 방법이 연구되어 왔다.

본 實驗에서 사용된 生血補髓湯은 肝腎經으로 歸經하여 補肝腎, 强筋骨, 祛風濕하는 五加皮[25]를 君藥으로 하고, 肝脾腎經으로 歸經하여 補血, 活血, 生血작용을 하는 四物之劑로써, 調經止痛하는 當歸, 行氣去風하는 川芎, 養血柔肝하는 白芍藥, 淸熱生津하는 乾地黃을 배합하고, 肝腎經으로 歸經하여 筋骨을 强化시키는 强筋骨之材로써, 引血下行하는 牛膝[20], 補腎溫陽하는 杜冲[21], 血脈通利하는 續斷[22]과, 肝脾經에 歸經하여 舒筋活絡하는 木瓜[23], 心肝經에 歸經하여 活血通經하는 紅花[24], 肺脾經에 歸經하여 補中益氣하는 黃嗜[33], 그리고 飮食積滯를 소화시키고 健脾和胃하는 消食藥材들인 山査, 神曲, 麥芽, 砂仁[33]으로 구성된 四物湯 加味方이다. 이와 같이 구성된 生血補髓湯은 血虛와 陰虛症을 지닌 風濕性 관절질환에 본인과 한의사들이 임상에서 활용하고 있는 經驗方이다.

본 연구에서 난소를 적출한 대조군의 경우 체중은 꾸준히 증가하여 실험 8주에는 315 g으로 정상군의 266 g에 비해 약 18.4%의 유의성 있는 증가를 나타냈으며, 처치군의 체중은 303 g으로 정상군에 비해 13.9% 증가되었다. 이러한 결과는 난소를 적출하면 estrogen이 감소되면

서 지방분해가 억제되고 지방세포의 크기가 커져 복부에 많은 지방질이 축적되어 체중이 증가한다는 사실과 일치[2,53]하고 있음을 보여준다. 혈중 estrogen함량은 대조군과 처치군이 정상군의 159.56 ㎖에 비해 각각 80.49 ㎖, 83.67 ㎖로 49.5%, 47.5%의 유의성 있는 감소를 보였는데 이상의 두 가지 결과로 난소적출이 성공적으로 수행되었음을 알 수 있다.

실험 8주후 대퇴골무게와 대퇴골무게/체중 비에서 대조군과 처치군은 정상군에 비해 유의성 있게 감소되거나 감소경향을 나타냈으며, 처치군은 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었다. 또한 대퇴골회분중량, 회분중량/체중 비에서는 대조군은 정상군에 비해 유의성 있게 감소되었으며, 처치군은 대조군에 비해 다소 증가하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 난소를 적출한 군에서는 모두 골질량의 감소가 진행되었지만, 처치군이 대조군보다 골질량의 감소가 억제된 것으로 보아, 生血補髓湯이 골질량의 감소에 영향을 미치고 있음을 알 수 있다.

대퇴골간 부위의 치밀골 면적과 대퇴골 원위단의 해면골 면적을 형태계측학적 방법으로 측정한 결과, 8주후에 치밀골 면적은 대조군이 4.04 ㎟ 로 정상군의 4.4 ㎟보다 8.1% 감소되었으며, 해면골 면적은 대조군이 1.19 ㎟로 정상군의 2.68 ㎟보다 55.6% 감소되어 유의성 있는 변화를 보였다. 이러한 결과는 대조군의 해면골의 감소가 치밀골보다 빠르게 진행되고 있음을 보여준다. 즉 폐경후성 骨多孔症 초기에는 해면골에서 매년 3-10%, 치밀골에서 2-3%정도씩 각각 골질량이 감소되므로[55], 골질량의 감소가 해면골에서 시작되어 점차 치밀골까지 진행된다는 보고와 일치되는 소견이라 볼 수 있다[56]. 그리고 처치군의 경우 치밀골의 단면적은 4.18 ㎟로 대조군의 4.04 ㎟와 비교시 변화가 없었으나, 해면골 단면적은 처치군이 1.60 ㎟로 대조군의 1.19 ㎟보다 34.5%나 증가되었다. 이는 生血補髓湯이 폐경후성 骨多孔症 초기의 해면골 조직에 더욱 유의하게 작용하여 골다공증의 진행을 억제하고 있음을 형태계측학적으로 나타내는 것이다.

병리조직학적 소견에서 정상군에서는 골아세포가 입방형으로 활성화되고 골수세포도 치밀하게 발달되어 있었으나, 대조군에서는 골아세포가 편평형으로 불활성화되고 파골세포는 증식되고 활성화하여 골침식 소견이 관찰되었으며, 골수세포는 많은 부분이 지방조직으로 대치되어 있었다. 그러나 처치군에서는 대조군보다 골수세포가 증가되었으며 해면골도 어느 정도 유지되어 있었다. 이러한 결과로 生血補髓湯이 estrogen 결핍시 발생하는 골다공증을 억제한다는 것을 조직학적으로 확인할 수 있었다.

그러나 이와 같은 형태계측학적, 조직학적 자료만으로는 파골세포의 활성 억제가 어떠한 기전에 의한 것인지 알 수 없으므로 혈청학적 검사로 혈중 estrogen과 골다공증의 병리발생에 밀접한 관련성이 있는 cytokine들의 검사를 병행하였다.

Estrogen은 골흡수와 관련있는 호르몬인 parathormone의 작용을 억제하고[57], 골생성을 촉진하는 calcitonin의 합성을 촉진하여 골감소를 방지한다[58]. 또한 골흡수자극물질인 TNF-α, IL-1β, IL-6, prostaglandin, E_2 등의 생산을 억제하고 골형성자극물질인 Insuline-like growth

factor 1, transforming growth factor-β 등의 생산을 증가시켜서 골소실을 억제하거나 골형성을 촉진하여 골질 감소를 방지하는 효과가 있다[59,60]. 본 연구에서 처치군과 대조군의 혈중 estrogen함량에는 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았는데, 이는 生血補髓湯이 estrogen생성을 증가시켜 골다공증을 억제한다기보다는 다른 기전에 의해 골다공증을 억제하는 것으로 사료된다[61].

최근에는 단핵구와 림프구에서 생산되는 cytokine들 중 특히 TNF-α, IL-1β, IL-6 등이 파골세포의 형성 및 활성과 골아세포의 활성에 관련된 대표적인 국소인자[62]로 골다공증에 영향을 준다고 알려져 있다.

골세포에서 TNF-α는 골구조의 국소적 조절인자로서 중요한 역할을 담당하는데, 골아세포의 collagen과 alkaline phosphatase의 합성을 억제하고[63], osteocalcin 유전자 발현을 억제하며[64], IL-6와 대식세포 집락자극인자를 증진시켜 파골세포로의 분화를 증강시키고 골아세포의 기능에 강력한 억제효과를 보인다[65]. 또한 골아세포에서 파골세포에 의한 골흡수촉진제로 알려진 IL-1β유리를 촉진하여 골의 흡수를 촉진한다[66,67].

TNF-α함량은 대조군과 처치군 모두 정상군에 비해 유의성 있는 증가를 보였으며, 처치군은 대조군에 비해 약간의 감소 경향을 나타내었을 뿐 유의성은 없었으므로, 生血補髓湯의 TNF-α의 분비억제에 대한 정확한 기전연구가 좀더 필요할 것으로 사료된다.

IL-1β는 파골세포의 조혈전구세포 증식과 분화를 촉진시켜 골흡수를 일으키며 성숙된 파골세포가 골흡수를 할 수 있도록 활성화시킨다[68,69]. IL-1β와 TNF-α와 같은 cytokine들은 골아세포와 다른 간엽조직에 의한 IL-6의 생산을 촉진시키는데, IL-6은 폐경기 여성에게서 비정상적으로 골흡수가 증가하는데 관여하는 가장 중요한 인자로 추정된다[4].

IL-6는 골아세포에서 분비되어 주변의 전파골세포의 소집과 증식을 증가시킴으로써 골흡수를 촉진시키며[70], 폐경기후 골다공증에서 나타나는 골흡수의 증가는 골아세포와 골수기질세포로부터의 IL-6 분비 증가가 주요 역할을 하는 것으로 알려져 있다[71].

본 실험에서 대조군과 처치군의 IL-1β와 IL-6의 함량은 모두 정상군에 비해 유의성 있는 증가를 가져왔으며, 처치군은 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다. 이러한 결과는 난소적출로 인하여 IL-1β와 IL-6의 분비가 활성화되어 골질량이 감소되었으며, 生血補髓湯 투여로 IL-1β와 IL-6의 분비가 억제되어 골질량의 감소를 막아 골다공증의 치료에 유효하게 작용했다고 볼 수 있다.

이상의 實驗結果를 종합해 볼 때, 生血補髓湯은 혈중 estrogen의 함량에는 영향을 주지 않았지만 IL-1β와 IL-6의 함량의 감소를 가져와 해면골을 중심으로 骨質의 흡수를 감소시켜 骨多孔症의 發生을 억제하는 것으로 사료된다.

Ⅴ. 結 論

生血補髓湯이 골다공증에 미치는 영향을 관찰하기 위해 흰쥐를 개복수술만을 시행한 정상군, 난소적출술을 시행한 대조군, 난소적출술 시행 후 生血補髓湯 농축액을 8주간 경구 투여한 처치군으로 분류하고 형태계측학적, 병리조직학적 및

혈액학적 방법으로 그 효과를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 대퇴골중량은 처치군이 대조군에 비해서 유의성 있게 증가되었다.
2. 대퇴골중량/체중 비는 처치군이 대조군에 비해서 유의성 있게 증가되었다.
3. 해면골 단면적은 처치군이 대조군에 비해서 유의성 있게 증가되었다.
4. 혈중 Estrogen 함량은 처치군과 대조군간에 유의성 있는 변화는 없었다.
5. 혈중 TNF-α 함량은 처치군과 대조군간에 유의성 있는 변화는 없었다.
6. 혈중 IL-1β 함량은 처치군이 대조군에 비해서 유의성 있게 감소되었다.
7. 혈중 IL-6 함량은 처치군이 대조군에 비해서 유의성 있게 감소되었다.

이상의 성적을 종합하면 生血補髓湯은 난소적출로 유발된 흰쥐의 골다공증 병리발생에서 IL-1β와 IL-6 생산을 억제하고 파골세포의 활성도 억제하여 골질의 흡수를 감소시키는 효과가 있다고 사료된다.

□ 투 고 일 : 2005년 04월 29일
□ 심 사 일 : 2005년 05월 02일
□ 심사완료일 : 2005년 05월 10일

參考文獻

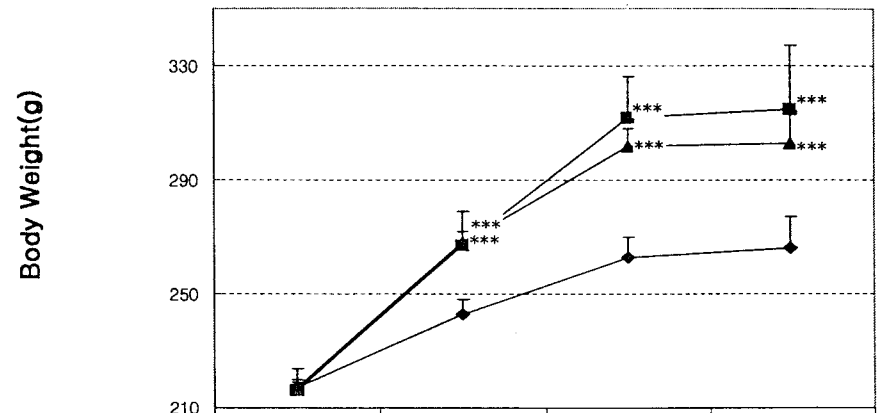
1. 변영순, 신공범. 골다공증이란 무엇인가. 서울:정담. 1997: 15-20, 43-45, 49-50, 70-73.
2. 정승필. 노인에서의 골다공증의 진단 및 치료. 가정의학회지. 1998; 19(11): 1117-1124.
3. 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울: 최신의학사. 2000: 21-26, 152-156.
4. 해리슨내과학편찬위원회. 해리슨내과학. 서울:정담. 1997: 2342-2348.
5. 岡野一年. 골다공증. 광주:서광. 2000: 1-77, 86-104.
6. 윤수진 등. 골다공증의 관련요인. 가정의학회지. 1996; 17(12): 1450-1461.
7. 권동진 등. 정상 한국여성의 폐경전후 요추 골밀도의 변화. 대한산부인과학회지. 1994; 37(12): 2395-2399.
8. Jilka RL. Cytokines, bone remodeling and estrogen deficiency. Bone. 1998; 23: 75-81.
9. Stephen AB, Wallace WA. The management of osteoporosis. J. Bone Joint Surg Br. 2001; 83-B(3): 316-323.
10. 대한골대사학회. 골다공증. 서울:시홍출판사. 2000: 1, 61, 19-21, 28-32.
11. 조주연 등. 노인의학개론. 순천향대학교 교육매체제작센터. 1998: 281-284.
12. 배병철. 금석 황제내경 소문. 서울:성보사. 1994: 51-54, 383-387, 441-444.
13. 배병철. 금석 황제내경 영추. 서울:성보사. 1995: 76-86, 128-159.
14. 이응세, 김혜경. 골다공증의 동의학적 임상문헌에 관한 고찰. 한방재활의학회지. 1997; 7(1): 437-456.
15. 한의부인과학 교재편찬위원회. 한의부인과학(상). 서울:정담. 2001: 53-55.
16. 강성길 등. 골다공증의 침구치료에 관한 문헌적 고찰. 대한침구학회지. 1995; 15(2): 171-189.
17. 김완희 등. 동의생리학. 서울:경희대학교 출판국. 1993: 348-350.
18. 류도곤. 동의생리학 강의. 익산:원광대

학교 출판국. 1999: 698-700.
19. 김희진, 이태균. 폐경기 골다공증에 관한 문헌적 고찰. 대한한방부인과학회지. 1998; 11(1): 131-148.
20. 冷竹平. 牛膝이 흰쥐의 난소적출로 유발된 골다공증에 미치는 영향. 경희대학교대학원 석사학위논문. 1995.
21. 이동선, 변상요. 두충 조성물이 골다공증에 미치는 효과. 한국생물공학회지. 2001; 16(6): 614-619.
22. 최연주 등. 續斷이 흰쥐의 난소적출로 유발된 골다공증에 미치는 영향. 대한본초학회지. 1994; 9(1): 181-189.
23. 이종안. 杜冲과 木瓜의 混合 煎湯液이 흰쥐의 난소적출로 유발된 골다공증에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2001; 16(1): 201-206.
24. 주병주 등. 紅花씨가 난소적출 흰쥐의 골대사에 관련된 hormon과 cytokine에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2002; 15(2): 41-55.
25. 양동식 등. 가시오가피 함유 조성물의 골성장 효과. 한국식품과학학회지. 2003; 35(4): 702-707.
26. 김근우 등. 大營煎이 난소적출로 유발된 백서의 골다공증에 미치는 영향. 대한본초학회지. 1998; 13(1): 59-82.
27. 조한백, 박병렬. 大補元煎이 난소적출로 골다공증이 유발된 백서에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 1999; 12(1): 343-363.
28. 김민수. 靑蛾地黃湯이 난소적출로 유발된 백서의 골다공증에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2003; 18(2): 49-58.
29. 한정우, 육태환. 數種의 한약재와 補骨湯이 흰쥐의 실험적 골다공증에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2001; 18(6): 180-205.
30. 박재웅. 身痛逐瘀湯이 XO/HX에 의해 손상된 골아세포에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 1995; 8(1): 1-27.
31. 이영석 등. 獨活寄生湯이 난소적출로 골다공증이 유발된 백서에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2000; 13(2): 104-119.
32. 이정재 등. 當歸地黃飮이 난소적출 백서의 골다공증에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2004; 17(1): 111-128.
33. 전국한의과대학 본초학교수. 본초학. 서울:영림사. 1991: 427, 526, 369-372, 272.
34. Christiansen C. Osteoporosis diagnosis and management today and tomorrow. Bone. 1955; 17(5): 513-516.
35. 박홍서 등. 성인여성에서 골밀도와 생화학적 지표에 관련된 요인. 가정의학회지. 1996; 17(6): 454-461.
36. 대한병리학회. 병리학. 서울:고문사. 1997: 1073-1075.
37. 대한산부인과학회. 부인과학. 서울:칼빈서적. 1997: 747-756.
38. 전국한의과대학 재활의학교실. 동의재활의학과학. 서울:서원당. 1995: 183-185.
39. 조수현. 폐경과 골다공증. 대한의학협회. 1995; 35(5): 587-598.
40. 김정구 등. 폐경후 여성에서 Ipriflavone의 골밀도 및 골대사에 미치는 영향에 관한 연구. 대한산부인과학회지. 1995; 38(7): 1244-1252.
41. Woman' health Initiative Investigators Risk and Benefits of Estrogen plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women. JAMA. 2002; 288(3): 321-333.

42. Suzanne W et al. Failure of Estrogen plus progestin therapy for preventio n. JAMA. 2002; 288(3): 366-368.
43. 박종철 등. 左歸飮과 右歸飮이 난소적출 백서의 성호르몬과 지질 및 골대사에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 1995; 8(1): 1-27.
44. 장수진 등. 紅花子 鹿茸 紫何車 藥鍼이 골다공증에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1998; 19(1): 5-40.
45. 박진완 등. 폐경여성에서의 升麻추출군의 치료효과. 대한산부인과학회지. 2002; 45(1): 117-120.
46. 김완희, 김광중. 장부학의 이론과 임상. 서울:일중사. 1996: 254.
47. 두호경. 동의 신계학(하). 서울:동양의학연구원. 1992: 1240-1253.
48. 하소기. 현대중의내과학. 북경:중국의약과기출판사. 1992: 578-580.
49. 장위장, 왕화명. 중의 골병학. 북경:인민위생출판사. 1994: 255-258.
50. 양희태 등. 침구자극이 난소적출 흰쥐의 여성 hormone과 지질 및 골대사에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1997; 14(1): 313-333.
51. 전재관, 이학인. 뜸이 난소적출된 흰쥐의 골다공증에 미치는 영향. 경산대학교 제한동의학술원논문집. 1998; 3(1): 100-122.
52. 다니엘라 아바지에바, 강성길. 鹿茸藥鍼 자극액이 난소적출 흰쥐의 지질 및 골대사에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1996; 17(2): 168-77.
53. Yamazaki, Yamaguchi H. Characterist ics of an ovariectomized osteopenic rat model. J. Bone Miner Res. 1989; 4(1): 13-22.
54. 김영안, 이상룡. 紫何車 煎湯液이 난소적출로 유발된 흰쥐의 골다공증에 미치는 영향. 대한침구학회지. 1999; 16(4): 213-221.
55. 이태균 등. 골대사와 골다공증. 대한한방부인과학회지. 1999; 12(2): 313-326.
56. 용석중 등. 한국인 성인남녀의 골밀도. 대한의학협회지. 1988; 31: 1350-1358.
57. 민헌기. 임상내분비학. 서울:고려의학. 1990: 187-198, 220-222, 419.
58. 구병삼. 임상부인과 내분비학. 서울:고려의학. 1997: 236-243.
59. 민용기. 여성호르몬과 골밀도. 대한의학협회지. 1995; 38(1): 24-29.
60. Pacifici R. Estrogen, cytokines, and P athogenesis of Postmenopausal Osteo porosis. J. Bone Miner Res. 1996; 11(8): 1043-1051.
61. 대한일차의료학회비만연구회. 비만학 이론과 실제. 서울:한국의학. 1996: 76-77.
62. 김철희 등. IL-6가 사람골수기질세포의 Alkaline Phosphatase, Osteopontin, Decorin 및 al(1)-collagen mRNA발현에 미치는 영향. 대한내분비학회지. 1996; 11(2): 156-162.
63. Centrella M et al. Tumor necrosis f actors-α inhibits collagen synthesis a nd alkaline phosphatase activity inde pendently of its effect on deoxyribon ucleic acid synthesis in osteoblast-enr iched bone cell cultures. Endocrinolo gy. 1988; 123(3): 1442-1448.
64. Nanes MS et al. Tumor necrosis fact or-a inhibits 1,25dihydroxybitamin D 3-stimulated bone G1a protain synth esis in rat osteosarcoma cells by a p

retranslational mechanism. Endocrino logy. 1991; 128: 2577-2582.

65. Felix R et al. Bone resorbing cytokin es enhance release of macrophage co lony-stimulating activity by the osteo blastic cell MB3T3-E1. Calif Tissue In t. 1989; 44: 356-360.
66. Keeting PE et al. Lack of direct effec t of estrogen on proliferation and di fferentiation of normal human osteob last-like cells. J. Bone Miner Res. 199 1; 6: 297-304.
67. 박근용. 백서에서 난소절제술 시행 후 골밀도와 골수 시토킨의 변화에 대한 연구. 대한내분비학회지. 1997; 12(2): 215-221.
68. Pfeilschifter J et al. IL-1 and tumor necrosis factor stimulate the formatio n of human osteoclast-like cells in vi tro. J. Bone Miner Res. 1989; 4: 113-118.
69. Thomson BM et al. Osteoblasts medi ate IL-1 stimulation of bone resorpti on by rat osteoclast. J. Exp Med. 19 86; 164: 104-112.
70. Ishimi Y et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorpt ion. J. Immunol. 1990; 145: 3297-330 3.
71. Jilka RL et al. Increased osteoclast d evelopment after estrogen loss: medi ation by interleukin-6. Science. 1992; 257(3): 88-91.



	0 week	3 weeks	6 weeks	8 weeks
Normal(n=8)	217	243	263	266
Control(n=8)	216	267	312	315
Treated(n=8)	217	268	302	303

Figure 1. Effects of *Saenghyeolbosu-Tang* on the body weight of ovari- ectomized rats. Normal: sham operation and distilled water treated group. Control: ovariectomized and distilled water treated group. Treated: ovariectomized and *Saenghyeolbosu-Tang* treated group. * : Statistically significant compared with normal group(***;$p<0.001$).

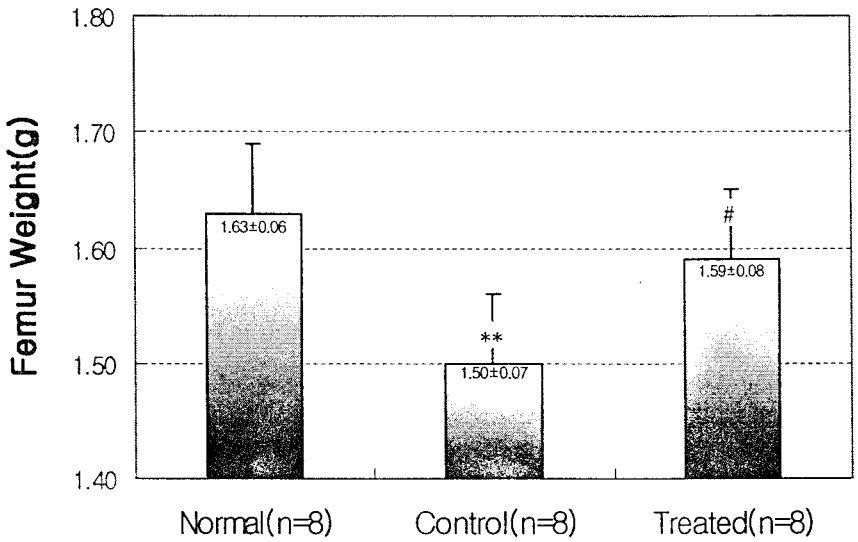


Figure 2. Effects of *Saenghyeolbosu-Tang* on the femur weight of ovariectomized rats at 8 weeks after ovariectomy. Normal: sham operation and distilled water treated group. Control: ovariectomized and distilled water treated group. Treated: ovariectomized and *Saenghyeolbosu-Tang* treated group. * : Statistically significant compared with normal group(**;$p<0.01$). # : Statistically significant compared with control group(#;$p<0.05$).

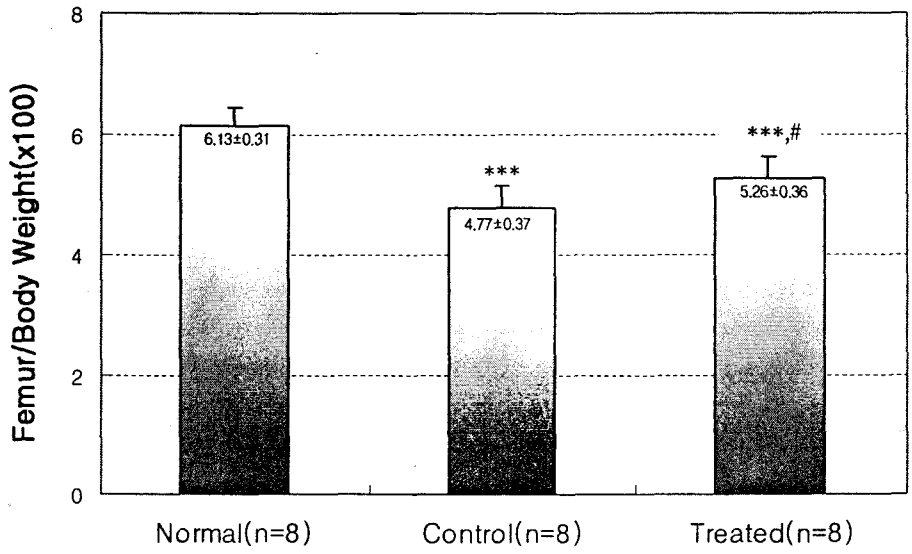


Figure 3. Effects of *Saenghyeolbosu-Tang* on the femur/body weight of ovariectomized rats at 8 weeks after ovariectomy. Normal: sham operation and distilled water treated group. Control: ovariectomized and distilled water treated group. Treated: ovariectomized and *Saenghyeolbosu-Tang* treated group. * : Statistically significant compared with normal group(***;$p<0.001$). # : Statistically significant compared with control group(#;$p<0.05$).

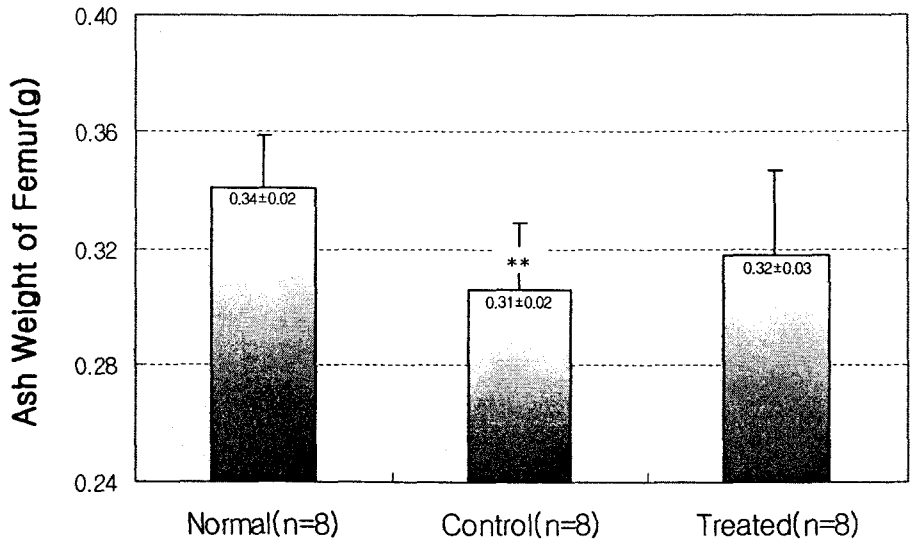


Figure 4. Effects of *Saenghyeolbosu-Tang* on the femur ash weight of ovariectomized rats at 8 weeks after ovariectomy. Normal: sham operation and distilled water treated group. Control: ovariectomized and distilled water treated group. Treated: ovariectomized and *Saenghyeolbosu-Tang* treated group. * : Statistically significant compared with normal group(**;$p<0.01$).

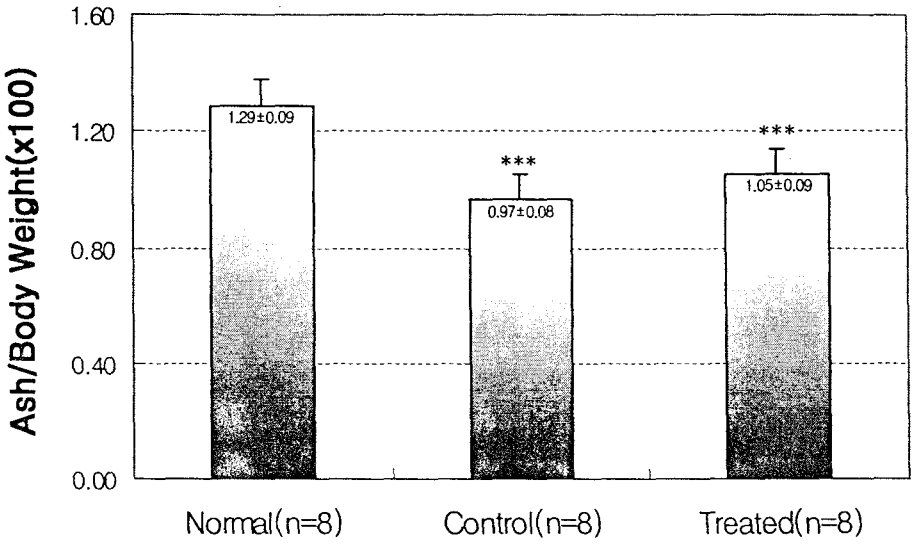


Figure 5. Effects of *Saenghyeolbosu-Tang* on the femur ash/body weight of ovariectomized rats at 8 weeks after ovariectomy. Normal: sham operation and distilled water treated group. Control: ovariectomized and distilled water treated group. Treated: ovariectomized and *Saenghyeolbosu-Tang* treated group. * : Statistically significant compared with normal group(***;p<0.001).

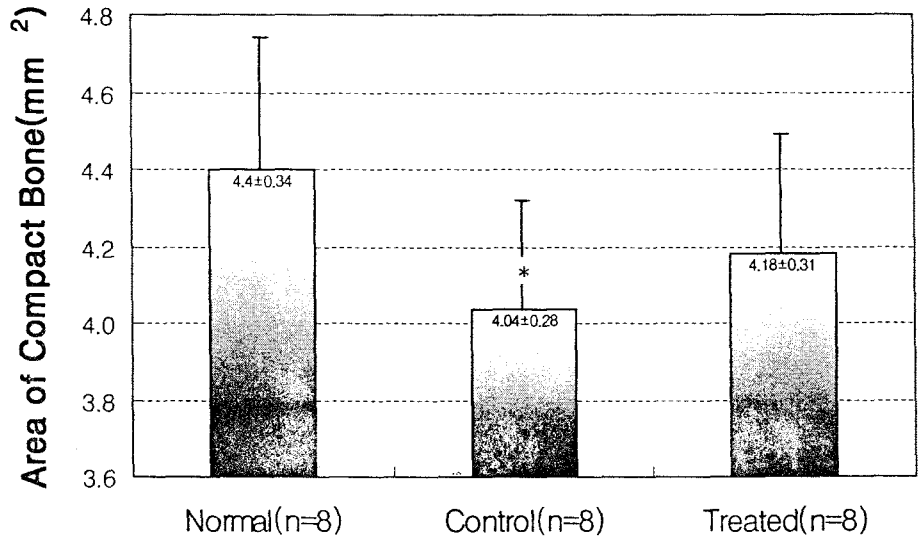


Figure 6. Effects of *Saenghyeolbosu-Tang* on the cross sectional area of compact bone of body of femur of ovariectomized rats at 8 weeks after ovariectomy. Normal: sham operation and distilled water treated group. Control: ovariectomized and distilled water treated group. Treated: ovariectomized and *Saenghyeolbosu-Tang* treated group. * : Statistically significant compared with normal group(*;p<0.05).

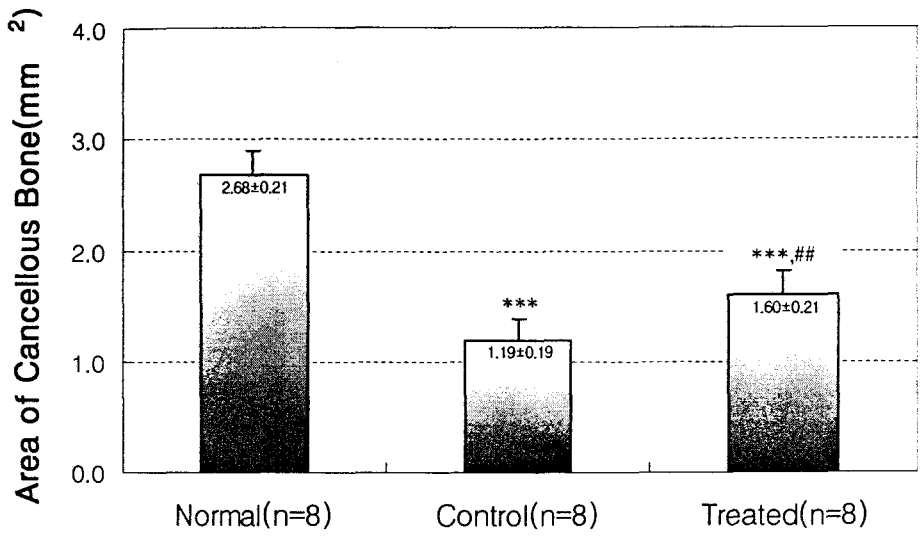


Figure 7. Effects of *Saenghyeolbosu-Tang* on the cross sectional area of cancellous bone of body of femur of ovariectomized rats at 8 weeks after ovariectomy. Normal: sham operation and distilled water treated group. Control: ovariectomized and distilled water treated group. Treated: ovariectomized and *Saenghyeolbosu-Tang* treated group. * : Statistically significant compared with normal group(***;p<0.001). # : Statistically significant compared with control group(##;p<0.01).

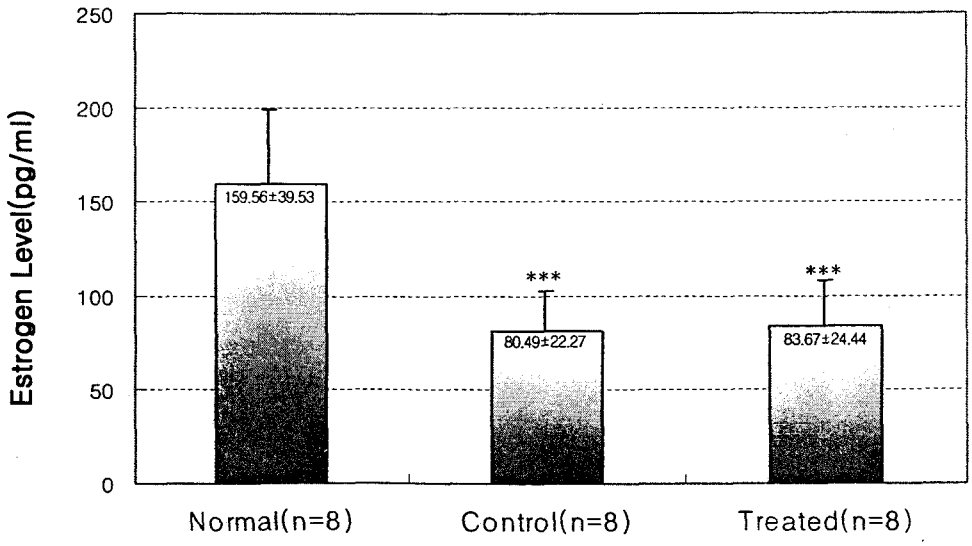


Figure 8. Effects of *Saenghyeolbosu-Tang* on the serum estrogen level of ovariectomized rats at 8 weeks after ovariectomy. Normal: sham operation and distilled water treated group. Control: ovariectomized and distilled water treated group. Treated: ovariectomized and *Saenghyeolbosu-Tang* treated group. * : Statistically significant compared with normal group(***;p<0.001).

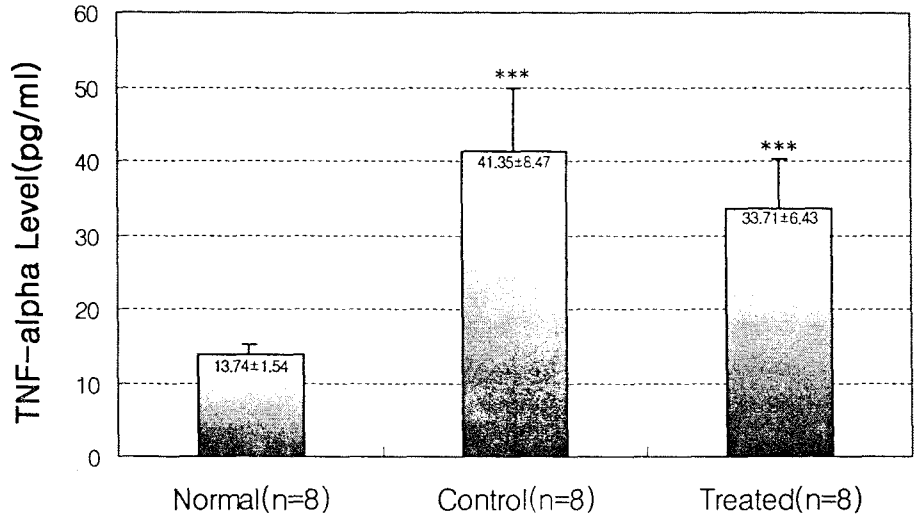


Figure 9. Effects of *Saenghyeolbosu-Tang* on the serum tumor necrosis factor-α level of ovariectomized rats at 8 weeks after ovariectomy. Normal: sham operation and distilled water treated group. Control: ovariectomized and distilled water treated group. Treated: ovariectomized and *Saenghyeolbosu-Tang* treated group. * : Statistically significant compared with normal group(***;p<0.001).

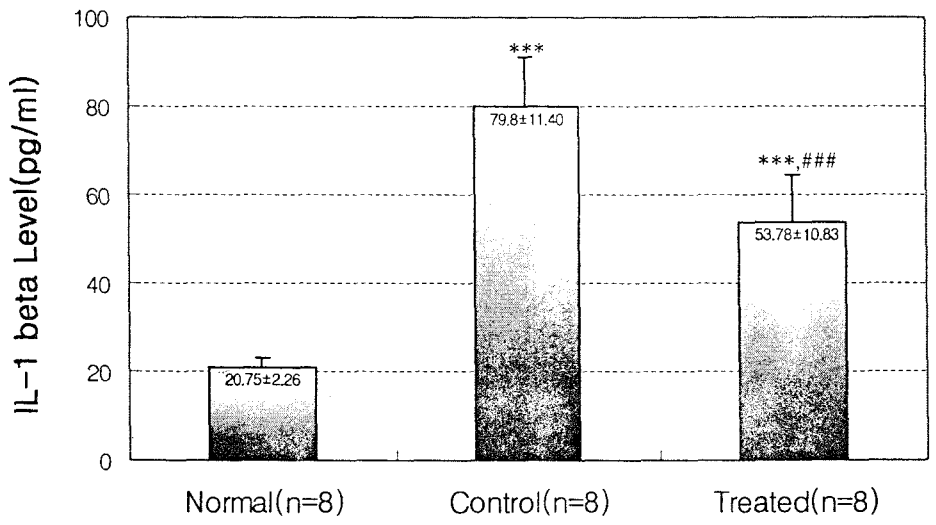


Figure 10. Effects of *Saenghyeolbosu-Tang* on the serum interleukin-1β level of ovariectomized rats at 8 weeks after ovariectomy. Normal: sham operation and distilled water treated group. Control: ovariectomized and distilled water treated group. Treated: ovariectomized and *Saenghyeolbosu-Tang* treated group. * : Statistically significant compared with normal group(***;p<0.001). # : Statistically significant compared with control group(###;p<0.001).

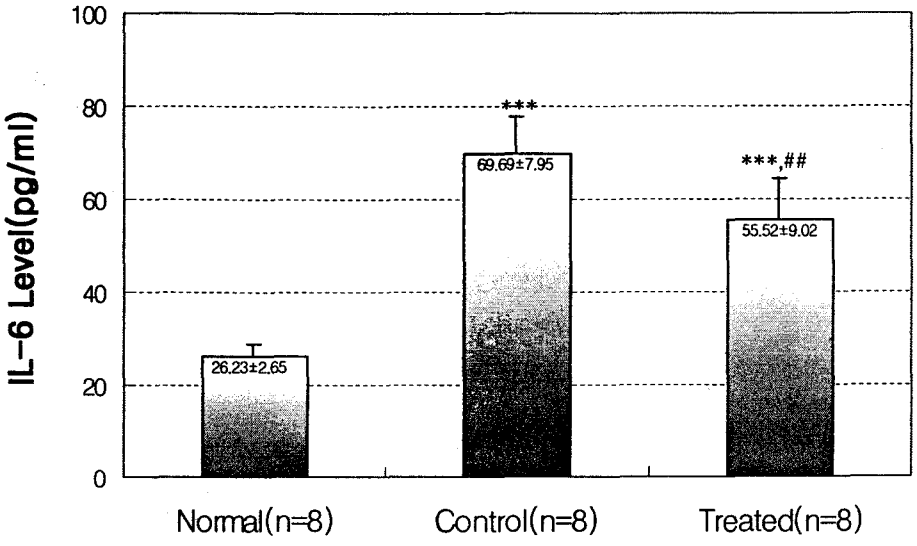


Figure 11. Effects of *Saenghyeolbosu-Tang* on the serum interleukin-6 level of ovariectomized rats at 8 weeks after ovariectomy. Normal: sham operation and distilled water treated group. Control: ovariectomized and distilled water treated group. Treated: ovariectomized and *Saenghyeolbosu-Tang* treated group. * : Statistically significant compared with normal group(***;$p<0.001$). # : Statistically significant compared with control group(##;$p<0.01$).