

SAM p6 mouse에서 자하거 주사제의 골다공증 개선에 대한 연구

김미정^{#1}, 염도영², 구분탁², 마진열¹, 신현규¹, 이미영³, 신동원⁴, 박종철⁴, 유영범^{1*}

1: 한국한의학연구원 한약제제연구부, 2: (주) 인바이오넷,
3: 한국한의학연구원 한약자원연구부, 4: 순천대학교 한약자원학과

Effects on osteoporosis of Senescence Accelerated Mice (SAM) P6 by Injection of Placenta extracts (Beuronel[®])

Mi-Jung Kim^{#1}, Do-Young Yum², Bon-Taq Koo², Jin-Yeul Ma¹, Hyun-Kyu Shin¹,
Mi Young Lee³, Dong-Won Shin⁴, Jong-Cheol Park⁴ and Young-Beob Yu^{1*}

1: Department of Herbal Pharmaceutical Development, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon
305-811, Korea ,

2: INBIONET Corporation, Daejeon 305-811, Korea

3: Department of Herbal Research, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea

4: Department of Oriental Medicine Resources, Sunchon National University, Suncheon 540-742, Korea

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to examine the effects of the Hominis placenta extracts on improvement of senile osteoporosis (Type 2) in SAM P6. In traditional Oriental medicine, Placenta (Jahageo) is indicated for insufficiency of blood and tidal fever due to steaming bone disorder.

Methods : At 10 weeks after birth, Placenta ex. was given 100 mL, 200 mL/kg/day, i.p. 3 times a week for 4 weeks in SAM P6 mice. And then we measured complete blood cells, blood urea nitrogen, creatinine, inorganic phosphate and total iron. In addition, we tested bone mineral density (BMD) using the soft X-ray.

Results : As a result, in SAM P6, injection of Placenta ex. (200 mL) increased in RBC, HB and PLT, in comparison with control group. It was also found that the inorganic phosphate levels increased significantly in the injection groups of the Placenta ex. from that of the control group, but blood urea nitrogen was no significant. Moreover, Placenta ex. were showed a trend of increase in bone mineral density (BMD) of the vertebrae lumbales and tibia in P6 mice.

Conclusions : These findings suggest that Placenta ex. are effective in preventing bone loss in SAMP6.

Key words : Placenta, osteoporosis, Senescence Accelerated Mice

* 교신저자: 유영범, 대전광역시 유성구 전민동 461-24 한국한의학연구원 한약제제연구부
· Tel : 042-868-9463 · E-mail : ybyu@kiom.re.kr
#제1저자: 김미정, 대전광역시 유성구 전민동 461-24 한국한의학연구원 한약제제연구부
· 접수: 2007년 7월 19일 · 수정: 2007년 9월 19일 · 채택: 2007년 9월 21일

서론

골다공증은 만성통증, 골절, 우울증 등을 수반하는 질환으로 대퇴골 골절환자의 20%가 사망에 이르고 있어 그 예방과 치료에 많은 관심이 대두되고 있다. 골다공증은 estrogen 결핍, vitamin-D 결핍, 부갑상선 호르몬 (parathyroid hormone: PTH) 과잉, 칼슘의 섭취부족이나 장에서의 흡수 능력 저하 등이 직접적인 원인으로 지목되고 있다^{1,2)}. 생활습관에서 흡연자, 만성알콜중독자, 스테로이드제제 치료 중 인자는 고 위험군으로 알려져 있으며, 특히 흡연은 칼슘흡수를 방해하고 에스트로젠 농도를 저하시키는 것으로 알려져 있다. 골다공증 치료 약물로는 파골세포의 활동을 억제하는 bisphosphonate제제, estrogens, calcitonin, teriparatide 등이 치료용 약물로 사용되고 있으나 위자극에 의한 속쓰림, 구역, 구토 등의 부작용도 보고되고 있다³⁾. 최근에 가장 널리 활용되고 있는 천연 약물은 phytoestrogens이 있으며 특히 콩과 식물의 isoflavones과 lignans 화합물들의 활성효과가 잘 알려져 있다⁴⁾. 한약제제 중 補中益氣湯이 난소를 제거한 쥐에서 에스트로젠을 투여한 것과 비슷하게 골밀도를 유지한다는 보고가 있다^{5,6)}. 한의학에서 태반은 자하거 (紫河車, HOMINIS PLACENTA)라 불리며 성미는 甘鹹, 溫하고 귀경은 肺, 肝, 腎經으로 들어가며, 補腎益精, 補氣養血, 補肺定喘의 효능이 있는 것으로 알려져 있다.⁷⁾ 한방에서 골다공증은 腎虛에 기인한 것으로 생각하고 있으며, 補腎益精의 효능을 가진 자하거가 골다공증 개선에 유익할 것으로 사료되어 본 연구의 소재로 선택하게 되었다. 현대학적으로 태반의 가수분해물은 DNA 합성을 촉진시킨다고 알려져 있으며,⁸⁾ baby hamster kidney cells의 proliferation을 활성화시킨다는 보고가 있고,⁹⁾ 색소성질환에 대한 태반추출물 국소주사법이 미백효과가 보고된 바 있다¹⁰⁾. 자하거는 주사제, 정제 등 다양한 의약품이 허가 유통되고 있으며, 특히 고가 화장품 산업에는 큰 영향을 미치고 있고 한의학적으로 활용범위가 넓으나 효능에 관한 연구가 부족한 실정이다. 본 연구는 한의학적으로 補腎益精의 효능을 가진 태반제제가 골다공증에 유의적인 효능이 있는지 SAM mouse (Senescence accelerated mice)를 활용한 골다공증 모델에서 실험적 근거를 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 투여물질 - 본 실험에 사용한 자하거추출물은 인태반의 가수분해물로서 (주) 인바이오넷 (경기도, 한국)에서 생산되는 뷰로넬 주사제를 (Beuronel®) 직접 공급받아 사용하였다.

2) 실험동물 - SAM (Senescence Accelerated Mouse)은 일본 SLC에서 사육한 것을 중앙실험동물 (서울, 한국)로 부터 SAM-R1과 SAM-P6 두 strain을 8주령 수컷을 분양받았다. 동물입수 시 외관을 육안으로 검사한 후, 14일간 시험을 실시하는 동물실에서 순화시키면서 건강한 동물만 선별하여 시험에 사용하였다.

2. 방법

1) 사육환경 - 본 시험은 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 조명시간 12시간(오전 7시~오후 7시), 환기횟수 10~20회/hr. 및 조도 150~300 Lux로 설정된 한국한의학연구원 동물실험실에서 실시되었다. 사료는 실험동물용 고품사료(제일사료 주식회사)를 자유 섭취시켰다. 물은 상수도수를 자유섭취 시켰으며 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

2) 군분리 및 동물식별 - 동물의 군분리는 다음과 같이 실시하였다. 먼저, 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물의 체중을 측정 후, 각각의 평균체중에 가까운 동물만 30마리를 선택하였다. 이렇게 선택된 30마리를 각 군에 5마리씩 균등한 체중으로 분배되도록 순위화한 체중과 난수를 이용한 무작위법으로 분배하였다. (Table I)

Table 1. Experimental design for animal test

Group		Animal	Volume (mL/kg)
R1	control	5	100 (Saline)
R1	Beu-100	5	100
R1	Beu-200	5	200
P6	control	5	100 (Saline)
P6	Beu-100	5	100
P6	Beu-200	5	200

3) 약물투여 - 생후 10주차 부터 100 mL, 200 mL/kg/day으로 일주일에 3번 4주 동안 투여하였다. 각 그룹의 대조군은 해당량에 준하여 식염수를, 그리고 실험군은 실험물질을 복강투여 하였다. 각 약물의 투여직전 (10주차, 0일)과 물질을 투여한 후 7 (11주차), 14 (12주차), 21 (13주차), 28 (14주차)일에 각각 해당되는 날에 체중을 측정하였다.

4) 골밀도 측정 - 각 약물의 투여직전 (10주차, 0일)과 물질을 투여한 후 14 (12주차), 28 (14주차)일에 각각 해당되는 날에 total BMD와 vetebrae lumbales (경추), femur (대퇴골), tibia (경골) 부위의 골밀도를 측정하였다. 마취는 ketamine hydrochloride (케타민, 유한양행경기도, 한국)와 xylazine hydrochloride (렘폰, (주) 바이엘코리아, 경기도, 한국)을 9:1비율로 혼합하여 50 mL 주사하였다. 골밀도 측정은 soft X-ray (Lunar Piximus, USA)를 이용하였고, 분석용 소프트웨어로는 VIDAS image analysis system (PIXIMUS Densitometer Application)을 사용하여 분석을 실시하였다.

5) 혈구 분석 실험 (Coulter's complete Blood Cells Counts) - 혈구 분석은 약물의 투여직전 (10주차, 0일)과 물질을 투여한 후 28 (14주차)일에 복대정맥으로부터 총 혈액을 채취하여 RBC (red blood cell), RDW (Red Cell distribution), MPV (Mean platelet volume), HB (hemoglobin), HCT (hematocrit), MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration), MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin), MCV (Mean Corpuscular Volume), PLT (platelet)를 혈구분석기 (Coulter JT, Miami, FL, USA)를 사용하여 측정하였다.

6) 혈액생화학적 검사 - 혈액생화학적 분석은 약물의 투여직전 (10주차, 0일)과 물질을 투여한 후 28 (14주차)일에 복대정맥으로부터 총 혈액을 채취한 후 실온에서 30분간 방치하여 응고 시킨 후, 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여, 혈청을 분리시켜 실험에 사용하였다. 분리된 혈청은 서울임상병리검사 센터에 의뢰하여 protein, albumin (ALB), blood urea nitrogen (BUN), creatinine, Pi, Glu-FBS, Iron을 각각 검사하였다.

3. 통계학적 분석

모든 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 대조군과 투여군 사이의 통계학적 유의성은 Student's T test를 이용하여 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 수준에서 검증하였다.

결 과

1. 인태반 가수분해물 투여에 의한 체중 변화

대조군인 R그룹의 체중은 4주동안 29g을 유지하였다. Figure 1에 나타낸 바와 같이 P6군에서는 태반제제 100 mL를 투여하자 1주부터 유의적으로 체중이 증가하였다. 200 mL 투여군에서는 1주, 2주에는 감소하는 경향을 보였으나 4주에는 처음의 체중으로 회복하였다 (Fig. 1).

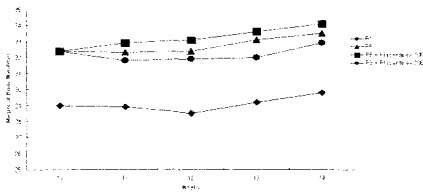


Fig 1. Changes in weight from SAM R1, P6 mice after intraperitoneal injection of the placenta extract (Beuroneil®).

2. 골밀도 (Bone Mineral Density)의 변화

골밀도 (BMD)는 단위 면적당 골 용량 (BMC)로 표기(g/cm²)하였다. 실험조건이 정상적으로 수립되었는지를 확인하기 위하여 0주 (10주차), 14일 (12주차), 28일 (14주차)의 R1과 P6 mice의 약물투여하지 않은 군을 비교한 결과 0주차 BMD값에 비하여 28일에서는 P6 군이 R1군에 비하여 골밀도가 현저히 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 SAM mice의 고유한 특성으로 17주차에 가장 많은 편차로 R1 군이 P6군에 비하여 골밀도가 증가한다고 보고되어 있다. 그룹마다 BMD값을 비교하여 보면 자하거 주사액 200 mL를 주사한 군에서 요추와 경골에서 약물을 투여하지 않은 P6군에 비하여 유의적인 골밀도 차이를 나타내었다. 이는 골다공증의 골형성과 골흡수의 불균형에 의하여 단위 용적내에 골량의 감소를 초래

하는 증상이 약물에 의해 감소시키는 것으로 판단된다 (Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5, Table II).

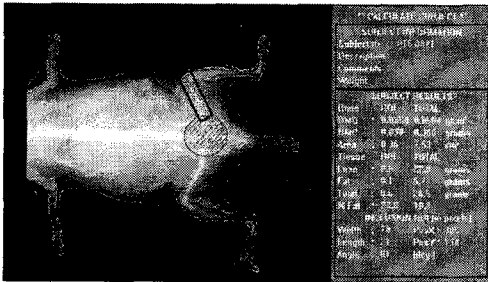


Fig. 2. Analysis of bone mineral density from SAM P6 mice after intraperitoneal injection of the placenta extract (Beuronel®)

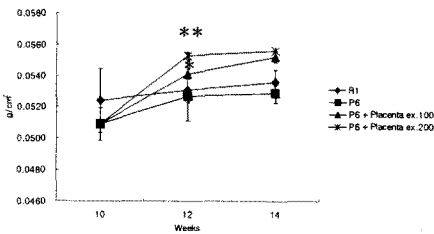


Fig. 3. Changes of bone mineral density of tibia after intraperitoneal injection of the placenta extract (Beuronel®)

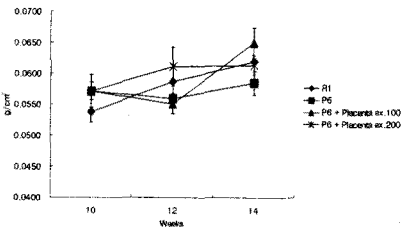


Fig. 4. Changes of bone mineral density of vertebrae lumbales after intraperitoneal injection of the placenta extract (Beuronel®).

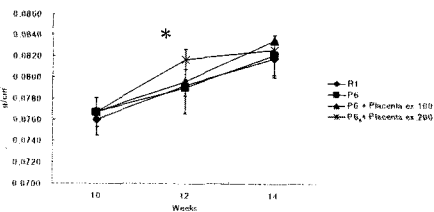


Fig. 5. Changes of bone mineral density of femur after intraperitoneal injection of the placenta extract (Beuronel®).

Table II. Changes of bone mineral density after intraperitoneal injection of the placenta extract (Beuronel®).

Group	Day	Drug (mL)	Vertebrae lumbales		Femur		Tibia	
R1	10 weeks	—	0.0538	0.001	0.0760	0.001	0.0524	0.002
R1	12 weeks	—	0.0587	0.003	0.0792	0.002	0.0531	0.002
R1	14 weeks	—	0.0620	0.003	0.0818	0.001	0.0536	0.0007
P6	10 weeks	—	0.0572	0.002	0.0767	0.001	0.0509	0.001
P6	12 weeks	—	0.0560	0.001	0.0790	0.0007	0.0527	0.0004
P6	14 weeks	—	0.0585	0.003	0.0821	0.002	0.0528	0.0004
P6 + Placenta ex.	12 weeks	100	0.0551	0.001	0.0796	0.001	0.0541	0.0001
P6 + Placenta ex.	14 weeks	100	0.0550 *	0.002	0.0825	0.0005	0.0552 *	0.0003
P6 + Placenta ex.	12 weeks	200	0.0612	0.003	0.0817	0.0009	0.0553	0.001
P6 + Placenta ex.	14 weeks	200	0.0614	0.001	0.0826	0.001	0.0563 **	0.0007

Each value represents mean±S.E(n=5). Comparison between control of P6 and treatment group of P6. *p<0.05, **p<0.01

3. 혈액학적 변화 (Coulter's complete Blood Cells Counts)

R1 군과 P6군 약물 투여군, 비투여군 모두 0일과 28일에 혈액학적 소견에서 현저한 변화가 관찰되지 않았다. P6 그룹 간의 비교에서 28일 약물 투여군이 약물 투여하지 않은 P6군보다 RBC, HB, HCT 가 증가하는 경향을 나타내었다. 김15)등의 연구 결과에서도 노화촉진 생쥐에 녹용을 투여했을 때 적혈구, 혈색소, 적혈구 용적비 수치가 증가하는 경향을 나타내어 본 연구결과와 유사하였다. 자하거 주사액의 투여로 적혈구 증가와 조혈기능과의 연관성을 밝히기 위한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 생각된다 (Table III, Table IV).

Table III. Changes in complete blood cells counts from SAM R1, P6 mice after intraperitoneal injection of the placenta extract (Beurone1®).

	RBC		HB		HCT		MCV		MCH	
	0day	28day	0day	28day	0day	28day	0day	28day	0day	28day
R1 Control	7.50±0.43	7.41±0.58	13.90±0.44	12.35±0.74	40.83±2.31	42.00±3.15	54.50±0.82	56.68±0.95	18.57±0.74	16.65±0.37
P6 Control	8.33±0.71	7.73±0.71	13.38±1.13	11.84±1.48	38.50±2.83	37.08±3.33	46.28±0.84	47.98±1.14	16.08±0.36	15.28±0.88
Beu. 100 mL		8.35±0.30		12.74±0.30		39.04±1.48		46.80±2.20		15.28±0.61
Beu. 200 mL		8.88±0.49		12.98±0.76		38.92±2.03		43.88±0.47		14.62±0.29

※RBC (red blood cell), HB (hemoglobin), HCT (hematocrit), MCV (Mean Corpuscular Volume), MCH (Mean Corpuscular Hemoglobin)

Table IV. Changes in complete blood cells counts from SAM R1, P6 mice after intraperitoneal injection of the placenta extract (Beurone1®).

	RDW		PLT		MPV		MCHC	
	0day	28day	0day	28day	0day	28day	0day	28day
R1 Control	18.20±0.30	17.65±0.58	1213.33±140.23	1466.75±235.70	3.43±0.15	2.60±0.1	34.10±4.0	29.45±4.7
P6 Control	17.86±0.38	18.90±0.57	1028.75±262.79	911.40±77.43	3.62±0.75	3.08±0.4	34.72±5.1	31.88±7.2
Beu. 100 mL		19.10±0.73		1072.75±179.08		3.76±1.05		32.66±0.52
Beu. 200 mL		18.72±0.35		1033.75±195.00		3.80±0.60		33.34±0.57

※RDW (Red Cell distribution), PLT (platelet), MPV (Mean platelet volume), MCHC (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration)

4. 혈액 생화학적 변화

R1 군과 P6군 모두 0일과 28일에 혈액생화학적 검사에서 현저한 변화가 관찰되지 않았다. 혈청내의 무기인 (Pi)은 임상적 의의로 볼 때 감소는 각종 구

루병 골연화증을 초래한다고 알려져 있으며 본연구에서는 100 mL와 200 mL 투여한 P6 군에서 약물을 투여하지 않은 P6군 보다 증가하는 경향을 나타내었다 (Table V, Table VI).

Table V. Blood biochemical values in SAM R1, P6 mice after intraperitoneal injection of the placenta extract (Beurone1®).

	Protein (g/dL)		ALB (g/dL)		BUN (mg/dL)		Creatinine(mg/dL)	
	0day	28day	0day	28day	0day	28day	0day	28day
R1 Control	4.73±0.61	4.33±0.22	2.93±0.35	2.75±0.06	26.73±5.61	30.18±4.94	0.44±0.07	0.35±0.02
P6 Control	4.30±0.16	4.26±0.29	2.70±0.14	2.68±0.16	21.80±4.84	28.30±5.69	0.40±0.03	0.42±0.03
Beu. 100 mL		4.26±0.55		2.74±0.5		24.44±2.94		0.38±0.04
Beu. 200 mL		4.22±0.13		2.68±0.16		25.08±3.53		0.37±0.02

※ALB (Albumin), BUN (blood urea nitrogen)

Table VI. Blood biochemical values in SAM R1, P6 mice after intraperitoneal injection of the placenta extract (Beurone1®).

	Pi (mg/dL)		Glu-FBS (mg/dL)		Iron(ug/dL)	
	0day	28day	0day	28day	0day	28day
R1 Control	6.70±0.99	4.90±0.36	388.33±126.69	200.00±21.71	97.00±25.46	67.75±12.04
P6 Control	6.60±0.87	4.58±0.64	345.00±113.00	166.60±34.90	90.00±13.00	63.75±6.45
Beu. 100 mL		4.74±1.11		175.20±44.51		57.75±17.71
Beu. 200 mL		5.94±1.15		200.20±18.73		49.20±7.95

※Inorganic phosphorus (Pi)

고찰

노화의 대표적 실험동물모델인 SAM mouse (Senescence accelerated mice)는 노화과정이 빠르게 촉진되는 여러 가지 특징들을 가지고 있다. AKR/J 계 생쥐에 형대교배를 계속하여 개발되었으며, SAM-P계 (senescence-accelerated prone mouse)는 대조계통인 SAM-R (senescence-accelerated resist

ant mouse)에 비하여 평균수명이 약 74%이고 활동성 저하, 탈모, 피로광택 감소, 안주위 병변, 백내장, 척추만곡 증가, 면역반응 저하, 수명 단축 등의 특징을 나타낸다. SAM-P계는 현재 SAM-P1, P2, P3, P6, P7, P8, P9, P10, P11이, SAM-R계는 SAM-R1, R4, R5가 있으며, 이들은 각기 노화에 따른 특징적인 병리 현상을 나타낸다. 일반적으로 노인성 아밀로이드침착은 SAM-P1, P2, P7, P9, P10과 P11에서, 신장의 위축은 SAM-P1, P2, P10, P11에서 면역아세포성 임파암과 조직성 육종은 SAM-R1과 R4에서, 면역반응 저하는 SAM-P1, P2, P8에서, 노인성 골다공증은 SAM-P6에서, 학습력 및 기억력과 감정의 장애는 SAM-P8과 P10에서 나타나며, 백내장은 SAM-P9에서, 뇌위축은 SAM-P10에서 특징적으로 나타난다^{11,12,13}.

그 중 SAM P6는 골밀도 (Bone mineral density)가 저하되는 특징으로 보이는 것으로 Suda 박사 등은 생후 10주부터 SAM의 R1과 P6사이에 골밀도가 차이를 보이기 시작하는 것으로 보고하였다¹⁴. 본 연구에서는 태반 가수분해 물인 Beuronel® 주사제 투여가 SAM P-6의 골밀도의 변화와 혈액 생화학적인 변화를 관찰하였다.

개체가 성장한 후 시간의 흐름에 따라 노화가 진행되는데 신체적, 생리적으로 균형이 깨어져 변화가 생김으로써 생물의 기능이 쇠퇴화 된다. 그 중 노화의 대표적인 질병이 노인성 골다공증이다. 생물이 노화가 되면 단위 용적내에 골량의 감소를 초래하는 등 골밀도 수치가 현저히 떨어지며 호르몬이나, 혈구 수치에 변화가 생겨 빈혈이 올 수 있으며 만성 질환의 합병증이 발병하게 된다. 현대에 태반주사제의 사용은 빈번하나 사실상 효능연구는 현재까지 상당히 미비하다. 본 연구는 태반주사제가 노인성 골다공증 마우스인 SAM-P6의 골밀도와 호르몬, 혈구 수치에 미치는 영향을 검토하기 위하여 4주 동안 태반 주사제를 복강 투여 하여 대조군인 R1그룹과의 변화를 분석하였다. 이상의 결과를 살펴보면 태반제제 (뷰로넬주)투여로 인해 골다공증의 가장 큰 증후인 체중과 골밀도 감소를 억제하였으며, 체중에서는 오히려 처음의 상태로 회복하였으며 골밀도 도 대조군인 R1그룹과 처음에는 차이가 있었으나 태반주사제의 투여로 그 차이가 감소함을 볼 수 있었다. 또한 혈구검사와 생화학분석을 한 결과, 자하거 주사액의 투여로 적혈구, 혈색소, 적혈구 용적비 수치 증가하였으며, 혈청내의 무기인이 증가함을 보였다. 자하거의 효능은 EGF 등 다양한 성장인자에 기인한

것으로 추정된다. 이로써 태반제제가 골다공증 치료에 도움이 될 것으로 사료되며, 앞으로 지속적인 연구를 통해 임상에서 활용성이 증가되기를 바란다.

결론

SAM R1과 P6 mice를 이용한 골다공증 실험모델에서 자하거주사액의 효능 실험한 결과 다음과 같은 결과를 나타내었다.

1. 대조군인 R1 군에서는 4주동안 체중이 일정상태를 유지하였으나 골다공증 모델 mouse인 P6 군에서는 태반제제의 200 mL 투여군에서 1, 2주차에 체중이 감소하는 경향을 나타내다가 4주차에 체중이 처음 상태로 회복하였다.

2. 혈구분석시험에서 P6 군의 약물을 투여하지 않은 대조군에 비하여 태반제제가 4주차에서 RBC, HB, HCT 등의 지표들이 증가하는 경향을 나타내어 조혈기능에 영향이 있는 것으로 생각되었다.

3. 골밀도 (BMD)측정
태반제제 (뷰로넬주) 주사 (200 mL) 4 주차에 약물을 투여하지 않은 P6 대조군에 비하여 요추와 경골에서 유의적인 골밀도 증가를 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 (주)인바이오넷의 지원으로 한국한의약연구원 (B1M-0010511)에서 수행하였으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 김남현, 이환모, 최종혁, 임승길. 홍삼의 골다공증에 대한 임상적 효능 연구. 고려인삼학회지. 1998; 2: 114~21.
2. 백기현. 골다공증에서 부갑상선호르몬을 이용한 순차치료 및 조합치료. 대한내분비학회지. 2005; 20(4): 319-22.
3. 강병문. 골다공증 치료의 의학약제와 대체약물의 비교. 대한산부인과학회지. 2006; 49(2): 2459-73.
4. Lydeking-Olsen E, Beck-Jensen J, Setchell KDR, Holm-Jensen T. Soy milk or progesterone

for prevention of bone loss-a 2 year randomized placebo-controlled trial. *European Journal of Nutrition*. 2004; 43: 246-57.

5. Sassa S, Sakamoto S, Zhou YF, Mori T, Kikuchi T, Shinoda H. Preventive effects of a chinese herbal medicine, hochu-ekki-to, on bone loss in ovariectomized rats. *In vivo* 2001; 15: 25-8.

6. Sakamoto S, Sassa S, Kudo H, Suzuki S, Mitamura T, Shinoda H, Preventive effects of a herbal medicine on bone loss in rats treated with a GnRH agonist. *European Journal of Endocrinology*. 2000; 143: 139-42.

7. Dan, B., Steven, C., Erich, S., Andrew, G. and Lilian, L. B. (2004) *Materia Medica*(3rd edition), Eastland Press, Inc., WA, USA. 718-806.

8. Liu KX, Okazawa I and Kaku T. Effect of Laennec on liver regeneration (in Japanese). *Clinical Pharmacology and Therapy*. 1995; 5: 2187-94.

9. Yagi A, Nagao M, Okamura N, Ishizu T, Itoh H, Shida T. Effect of cyclo (trans-4-L-hydroxyprolyl-L-serine) from hydrolysate of human placenta on baby hamster kidney -21/C-13 cells. *Natural Medicines*. 1998; 52(2): 156.

10. 김정혜, 최선영, 김선옥, 윤상웅, 박경찬, 허창훈. 색소성질환에 대한 태반 추출물 국소주사법의 효과. *대한피부과학회지* 57차 추계학술대회 자료집. 2005; 175.

11. 박성민, 임명현, 이준희, 박재현. 보중익기탕과 대미지황탕이 노화촉진생쥐의 간장내 항산화작용에 미치는 영향. *대한본초학회지*. 2003; 18(4):175-91.

12. Hong HT, Kim HJ, Kim D W, Lee YC, Park YG, Kim HM, Choo Y K, Kim CH. Inhibitory effect of Honghwain-Jahage on interleukin-1-mediated bone resorption. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002; 79: 143-8.

13. Takeda, T., Hosokawa. M. and Higuichi, K. Senescence-Accelerated Mouse(SAM). A novel murine model of aging. In: Takeda T, editor *The SAM model of senescence*. Amsterdam: Elsevier Science B. V. 1994: 15-22.

14. Suda. T., Miyama. K., Uchiyama, Y., Katagiri, T., Yamaguchi, A. and Sato, T. (1994) Osteoporotic bone changes in SAMP6 are due to a

decrease in osteoblast progenitor cells. In: Takeda T, editor. *The SAM Model of Senescence*. Amsterdam: Elsevier Science B. V. 1994: 47-52.

15. Kim YT, Kim CS. A study of Hematopoietic Action of Pilose Antler in Senescence Accelerated Mice. *Korean Journal Pharmacognosy*. 1996; 27(4): 371-77.