

음곡(KI10) 구기자 약침이 난소적출 생쥐의 골다공증에 미치는 영향

황규태·이현

대전대학교 한의과대학 침구학교실

Effects of the Herbal-Acupuncture with *Lycii Fructus* Extract at KI10 (Eumgok) on Osteoporosis in Ovariectomized ddy mice

Hwang Gyu-tae, Lee Hyun

Dept. of Acupuncture & Moxibution, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Abstract

Objective & Methods : The purpose of this study is to observe the effects of herbal-acupuncture with *Lycii Fructus* (LF-HA) at KI10 (Eumgok) on osteoporosis in ovariectomized (OVX) ddy mice. We carried out several experimental items which were known to be related with osteoporosis.

Results : 1. Tibial BMD was significantly increased in the LF-HA group. 2. Tibial Ca level was significantly increased in the LF-HA group. 3. Osteoclast like cell in tibia was significantly decreased in the LF-HA group. 4. Histological change of tibia was improved, the trabecular bone thickness was significantly increased and the growth plate length was significantly decreased in the LF-HA group.

Conclusion : These results suggest that LF-HA at KI10 has therapeutic effects on osteoporosis especially by way of suppressing osteoclast cells in ovariectomized ddy mice.

Keywords : Osteoporosis, Herbal-acupuncture, *Lycii Fructus*, Umgok(KI10)

I. 서 론

대사성 골 질환 중 가장 흔한 골다공증은 골량의 감소와 골질의 변화로 인하여 뼈의 미세구조가 파괴되고 사소한 외력에 의해서 취약골절이 발생하는 전신 질환이다¹⁾.

사회경제적 수준의 향상과 의학의 발전으로 인간의 수명이 점차 연장됨에 따라 노령 인구가 급증하고 이로인한 골다공증의 증가는 더 이상 개인의 건강문제라기 보다는 커

다란 사회적 문제이다. 골다공증은 소리없이 찾아오는 질환으로 폐경 후 여성에서 흔하지만 모든 연령에서 발생할 수 있고 만성통증, 골절, 우울증 그리고 사회로부터의 분리를 야기할 수 있는 질환이다. 특히 노인성 질환 중에서 골다공증은 골절과 관련되고 이로 인한 경제적 손실이 막대하고 특히 대퇴골 골절환자의 20%에서 사망에 이르게 되므로 그 예방 및 치료가 대단히 중요하다²⁾.

한의학적으로 골질환은腎과 밀접한 관계를 갖는다고 보고 있는데 “腎主骨”이라하여骨과髓는腎이主하고腎은精을藏하고

· 교신저자: 이현, 충청남도 천안시 두정동 621 대전대학교 부속천안한방병원 척추관절센터, Tel. 041-521-7581, e-mail : acuhyun@hanmail.net
· 투고 : 2009/02/28 심사 : 2009/03/11 채택 : 2009/03/20

精은 髓를 生하며 髓는 骨을 養하며 髓는 骨중에 所藏되어 있기 때문에 骨髓라고 부르며 腎精이 充足하면 骨髓가 풍부해지고 골격도 견고 견실해진다고 하였다³⁾. 그리하여 골다공증에 관한 기존 연구도 滋陰 補腎 하는 약재나 처방을 중심으로 골다공증 예방 및 치료에 유의하다는 보고가 진행되어 왔는데 대표적인 약재로는 속단, 두충, 녹용, 석곡, 숙지황, 파극천, 쇠양 등⁴⁻¹⁰⁾을 비롯하여 육미지황탕, 사물탕, 대영전, 독활기생탕 등¹¹⁻¹³⁾과 같은 처방들이 다양하게 보고되었다.

본 실험에서 약물은 구기자, 경혈은 음곡을 선정하여 실험하였는데, 음곡은 足少陰腎經의 合水穴로서 自經의 自穴이며 滋補肝腎, 疏泄厥氣의 效能이 있어 膝關節炎, 股關節痛, 痺證등의 퇴행성 관절 질환에 다용되며¹⁴⁾, 구기자는 대표적인 보음약으로 肝腎二經으로 들어가 滋補肝腎, 益精補髓의 효능으로 腰膝酸軟, 肝腎虧損, 遺精 등을 치료하므로¹⁵⁾ 골다공증 치료에 유의성이 있을 것으로 사료되었다.

이에 저자는 난소적출로 골다공증이 유발된 생쥐의 음곡에 구기자 약침을 시술하고 체중, 자궁무게, 경골길이 및 골밀도의 변화, 혈청분석, 경골회분 및 경골내 osteoclast like cell 분석, 경골의 조직학적 변화분석 등을 통하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

1. 재료

1) 동물

4주령에 난소를 적출한 7주령 암컷 ddy mouse(체중 22±5 g)를 (주)중앙실험동물(경기도, 한국)로부터 공급받아, 실험당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료)와 물을 충분히 공급하고, 실온(22±2℃)을 유지하여 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

2) 약재

본 실험에 사용된 구기자(*Lycci Fructus*)는 대전대학교 부속 대전한방병원에서 구입하여 이용하였다.

3) 시약 및 기기

Table 1. Chemical material to experiment

시약명	제조사	제조국
Ethyl ether	Samchun	Korea
Ca kit	Asan	
Phosphorus kit		
Phosphate buffer saline (PBS)	CAMBREX	
RPMI1640 medium		
Differentiation Basal medium		
MSC Osteogenic Single Quots	LONZA	
Mouse Osteocalcin ELISA Kit	Biomedical	USA
	Tech. Inc.	
3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)	Sigma	
Trypan blue		
Formalin		

II. 연구 방법

Table 2. Machinery and tools to experiment

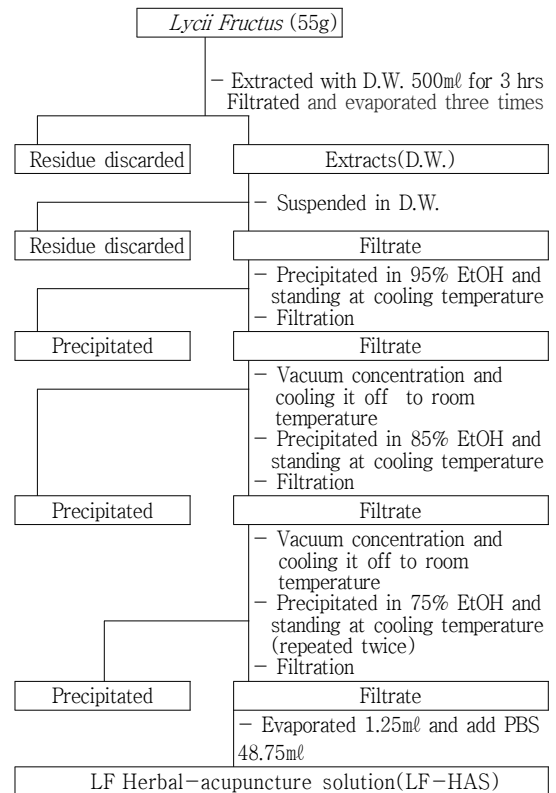
기기명	제조사	제조국
Rotary evaporator	Eyela	
Camera(DXM 1200F)	Nikon	Japan
ECLIPSE E600 microscopy		
Syringe	Korea vaccine Co.	
Centrifuge	Hanil	Korea
Ice maker	Daewoong	
Furnace	TECAN	Canada
ELISA reader	GE Lunar Co.	USA
Bone densitometer (PIXImus)		

2. 방법

1) 약침액의 제조

분쇄기를 이용해서 구기자(*Lycii Fructus*) 55 g을 분쇄하여 분말로 만들어, 삼각 flask에 넣고 증류수 500 ml를 가하여 3시간 동안 shaking water bath에서 유출한 후, 유출액을 여과하였다. 여과액을 여과지로 3회 여과한 후, rotary evaporator에 감압 농축 하였다. 농축액에 95% ethyl alcohol 30 ml를 가하여, 실온에서 교반한 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator로 감압농축한 후, 농축액을 다시 여과하였다. 이 여과액에 85% ethyl alcohol 30 ml를 가하여 잠시 교반 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 여과액에 75% ethyl alcohol 30 ml를 가하고 교반한 후 방치하였다가 다시 여과하는 조작을 2회 반복하였다. 여과액 중의 ethyl alcohol 성분을 rotary evaporator로 감압 제거하고, 남은 농축액이 20 ml가 되게 하였다. 구기자 55g로부터 얻은 구기자 약침액을 감압농축하여 수분을

모두 날렸을 때에 분말 수율은 10.15g(수득율 18.45%)이었다. 1N NaOH를 이용하여 농축액을 pH 6.8이 되도록 조절하고, 4°C에서 12시간 방치한 후, 침전물을 제거하기 위해 syringe filter를 실시하였다. 여과된 농축액에 PBS를 첨가하여 2.5%로 희석하여 약침액으로 사용하였다(Scheme 1).



Scheme 1. Manufacturing procedure of LF-HA Solution.

2) 세포독성 측정

정상 ddy mice의 골세포 1×10^5 cell/well에 5%, 1%, 0.5%의 구기자 약침액을 처리한 후 MTT assay¹⁶⁾를 이용하여, 세포 생존률을 측정하였다.

(1) Osteoblast cell 분리 및 배양

정상 ddy mice의 경골과 대퇴골을 적출하였다. 차가운 PBS에 담귀 근육을 제거하고, 깨끗한 PBS를 syringe에 넣어 골 내부로 침투시켜 골세포들을 골 내부로부터 분리하였다. 분리된 세포들을 1200 rpm에 5분간 원심 분리하여 상층액은 버리고 침전된 골세포들은 MSC osteogenic singleQuots를 첨가한 differentiation Basal medium(Cat No. PT-3924, Lonza, USA)을 이용하여 3번 세척하였다. 준비된 세포는 7일간 세포 배양을 실시하여 osteoblast cell의 분화를 유도하였다.

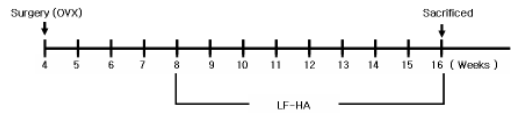
(2) MTT assay

분화된 osteoblast cell의 viability를 trypan blue를 이용하여 확인한 뒤, 96 well plate에 세포를 1×10^5 cells/well으로 분주하고, MSC osteogenic singleQuots를 첨가한 differentiation Basal medium (Cat No. PT-3924, Lonza, USA)에 구기자 약침액을 농도별로 처리하고, 72시간동안 세포 배양을 실시하였다. 72시간 후에, MTT solution (5 mg/ml, Cat No. 135038, Sigma, USA)을 각 well에 20 μ l씩 분주하고 5시간 동안 37°C에서 incubation을 실시하였다. 5시간 후, 각 well에 있는 medium을 100 μ l씩 버리고, solubilizing solution을 100 μ l씩 분주한 뒤 pipetting을 강하게 하여 well에 dark blue crystals가 침전하는 정도를 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 optical densities를 확인하였다.

3) 골다공증 동물 모델

본 실험에서 사용된 골다공증 모델은 난소적출 ddy mouse 모델¹⁷⁾로, (주)중앙실험동물에서 4주령에 난소적출 수술(ovariectomy)을 시행하고 3주 동안 골다공증을 유도한 암컷 ddy 생쥐를 이용하였다.

난소적출 수술은, 동물을 에테르로 마취시킨 다음 클리퍼로 등의 털을 깎고, 에탄올 솜으로 절개부위를 잘 닦은 후 시행하였다. 동물의 dorso-lateral abdominal wall을 미세가위로 직경 1 cm 정도 절개한 후, abdominal muscle 층을 절개하여 핀셋으로 지방층에 둘러싸인 난소 및 자궁을 꺼낸다. 난소와 자궁을 연결하는 난관을 봉합사로 잘 묶은 다음, 난소를 완전히 제거하고, 봉합사로 근육층과 피부를 잘 봉합한 후, 1주간 회복시켰다(scheme 2).



Scheme 2. Experimental protocol

4) 취혈

骨度分寸法에 의거하여 생쥐의 뒷다리의 semimembranosus와 semitendinosus muscle의 tendon사이에서 인체의 음곡(Umgog; KI10)에 상응하는 부위를 선택하였다.

5) 실험군 분류 및 처치

실험군은 ddy 생쥐 9마리씩을 한 군으로 하여 정상군(normal), 偽수술군(sham-OVX), 대조군(control), HG군(hand

grasping), NP군(needle prick), saline군(saline injection), 구기자약침군(LF-HA)의 7군으로 나누었다.

정상군(normal)은 아무런 처치도 하지 않았다. 僞수술군(sham-OVX)은 복부를 절개한 후 난소를 적출하지 않고 다시 봉합한 뒤, 이후 아무런 처치도 하지 않았다. HG군은 난소적출 후, 약침처치시와 같이 생쥐를 잡았다 놓는 동작만 하고, 이외의 처치는 하지 않았다. 대조군(control)은 난소 적출 이외의 처치는 하지 않았다. Saline군은 난소적출 후 saline 0.2 ml를 음곡(KI10) 상응부위에 注入하였다. NP군은 난소적출 후, 음곡(KI10) 상응부위에 26 gauge 주사기를 0.5 cm 정도 깊이로 자입하고 즉시 제거하였다. 구기자약침군(LF-HA)은 난소적출 후, 음곡(KI10) 상응부위에 2.5%의 구기자약침액(LF-HAS) 0.2 ml를 주입하였다. NP, saline 주입, 구기자약침 처치는 모두 난소적출 4주 이후부터 8주간 주 3회 시행하였고, NP, saline 주입, 구기자약침 시술은 실험동물의 後肢에서 음곡(KI10) 상응부위를 매 시술시마다 좌우 교대로 취하여 시술하였다(scheme 2).

6) 골다공증 평가

(1) 체중 측정

난소적출 4주 이후부터 실험 종료 시까지 1주일 간격으로 각 실험군의 실험동물의 체중을 측정하여 기록하였다.

(2) 자궁 무게 및 자궁비중 측정

실험 종료 후, 각 실험군의 실험동물의 자

궁 무게를 측정하여 기록하였다. 자궁비중은 실험동물의 몸무게에 대한 자궁무게의 백분율로 계산하였다.

$$\text{uterus index} = \frac{\text{uterus 무게 (g)}}{\text{실험동물 체중 (g)}} \times 100$$

(3) 경골 길이 측정 및 경골 회분 분석

실험 종료 후, 각 실험동물의 경골을 적출하여 주위 근육 및 연 조직을 제거한 다음 경골의 길이를 측정하였다. 경골을 120℃에서 8시간 동안 건조시킨 후, furnace(Lab companion, Korea)에서 800℃에서 6시간 동안 가열하여 탄화한 뒤 경골 회분 무게를 측정하였다. 탄화된 골을 HCl 500 μl에 완전히 용해시키고, 용해된 탄화 골 200 μl에 증류수를 10 ml 첨가하여 희석한 다음, 탄화골의 단위 무게 당 칼슘(Ca)과 인(P)의 양을 측정하여 mg/g 단위로 나타내었다. 칼슘과 인의 비율 Ca/P ratio (%)은 다음의 공식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Ca/P ratio (\%)} = \left(\frac{\text{Calcium contents of tibia}}{\text{Phosphorus contents of tibia}} \right) \times 100$$

(4) 골밀도 측정

실험 종료 후, 각 실험군의 실험동물의 경골을 적출하여 주위 근육 및 연 조직을 제거한 다음 24시간 동안 10%의 formalin에 고정한다. 24시간 이후, 경골을 흐르는 물에 씻은 후, PIXImus(Lunar meison,WI) 기기를 사용하여 DEXA(dual-energy x-ray absorptionmetry)의 방법으로 골밀도(bone mineral density, BMD)를 측정하였다.

(5) 혈청 분석

실험 종료 후, ethyl ether를 이용하여 실

험동물을 마취하고, 심장 채혈 법으로 혈액을 채취하였다. 채혈한 혈액에서 혈장을 분리하여, (주)이원 임상검사센터(대전, 한국)에 의뢰하여 혈청 ALP, Phosphorus, calcium, osteocalcin의 함량을 측정하였다. 혈청 중 osteocalcin 함량은 Mouse Osteocalcin ELISA Kit(Cat No. BT-470, Biomedical Tech. Inc., USA)와 ELISA reader를 이용하여 ng/ml의 단위로 측정하였다.

(6) 경골 내 osteoclast like cell 분석

각 군에서 절취한 경골에서 골세포를 15 ml tube에 모아, 차가운 PBS를 이용하여 세척한 후 trypan blue를 사용하여 세포를 계수하였다. 계수한 골세포를 2×10^6 cell/vial으로 FACs전용 tube에 분주한다. 골세포 중 osteoclast like cell의 비율을 확인하기 위하여 표식항체 MHC II 와 CD115를 반응시켜 flow cytometry로 분석하였다.

(7) 경골의 조직학적 분석

① H&E 염색

실험 종료 후, 각 군의 실험동물의 경골을 절취하여, 주변의 근육조직을 제거한 다음, 10%의 formalin에 고정하고 paraffin에 박정하였다. 박정한 조직을 (주)바이오톡스텍(오창, 한국)에 의뢰하여 microtome을 이용하여 5 μ m으로 절편하고 Hematoxylin and eosin염색을 실시하였다.

② Histomorphometry

H&E 염색한 조직을 형광현미경(ECLIPSE E600, Nikon, Japan)을 이용하여 관찰한 후, digital camera(DXM 1200F,

Nickon, Japan)를 이용하여 사진을 촬영하고, ACT-1 program을 이용하여 분석하였다. TBT(trabecular bone thickness)와 GPL(growth plate length)는 자동 조직분석 프로그램(I-solution)을 이용하여 측정하였고, TBV(trabecular bone volume)는 다음 수식을 이용하여 계산하였다.

$$TBV(\%) = \left(\frac{\text{trabecular bone volume of sample section}}{\text{total bone volume of sample section}} \right) \times 100$$

7) 통계분석

실험 결과는 각 실험군에서 얻은 데이터의 평균과 표준편차로 나타내었다. 데이터 분석 결과, 위수술군(sham-OVX)과 HG군(hand grasping)은 정상군과 유의한 차이를 나타내지 않아, 본 논문의 실험성적에서는 위수술군과 HG군을 제외하고 통계처리 하였다. 각 실험군의 결과값은 SPSS(14.0 KO) 통계프로그램의 ANOVA test를 사용하여 비교하였으며, 사후검정은 Scheffe's test를 이용하였다. 정상군과 대조군의 평균 비교에는 독립표본 t-test를 이용하였다. 각 실험군의 결과값을 비교하여 신뢰도 95%($p < 0.05$)일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 성적

1. 약침액의 세포 독성

정상 생쥐로부터 얻은 골세포 중 조골세포만을 취하여 여러 가지 농도의 구기자 약

침액을 처리한 후 조골세포의 세포생존률을 확인하였다. 구기자 약침액(LF-HAS)을 처리한 경우 control에 비하여 조골세포의 생존율이 농도의존적으로 유의하게 증가하였다(Fig. 1).

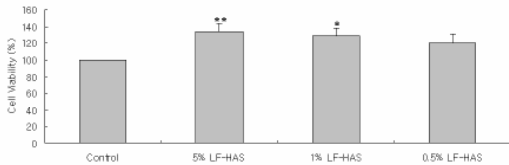


Fig. 1. Cell viability rate with various concentrations of LF-HAS.

Bone marrow cells from normal ddy female mice were prepared and cultured with various concentration of LF-HAS. The cell survival rates were measured by MTT assay. Values represent the means \pm SEM of 3 independent experiments.

** : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ compared to control group.

2. 골다공증 평가

1) 체중 변화

실험동물의 몸무게를 주 1회 측정하였다. Normal군에 비하여 Control군에서 몸무게가 전반적으로 높게 나타났으며, 구기자약침군(LF-HA)에서는 control군에 비하여 몸무게가 낮게 나타났다(Fig. 2).

실험동물의 몸무게 변화량을 주간 단위로 측정하였다. Normal군에 비하여 control군에서 몸무게가 꾸준히 증가하였으며, LF-HA군에서는 control군에 비하여 몸무게 변화율에 뚜렷한 차이는 나타나지 않았다(Fig. 3).

Fig. 2. Effect of LF-HA on body weight in ovariectomized mice.

The ddy mice underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the mice were treated as described in the materials and method. All animals were weighted weekly during the experimental period. Values represent the mean \pm SD (n=9).

Normal : Normal ddy mice

Control : Ovariectomized (OVX) mice

NP : OVX and single prick with an injection needle at KI10

Saline : OVX and saline(0.2ml) injection at KI10

LF-HA : OVX and herbal acupuncture with LF-HAS(5%, 0.2ml) at KI10

Fig. 3. Effect of LF-HA on body weight increasing rate in ovariectomized mice.

The ddy mice underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the mice were treated as described in the materials and method. All animals were weighted weekly during the experimental period and the rate of body weight change was monitored. Values represent the mean \pm SD (n=9).

Normal : Normal ddy mice

Control : Ovariectomized (OVX) mice

NP : OVX and single prick with an injection needle at KI10

Saline : OVX and saline (0.2ml) injection at KI10

LF-HA : OVX and herbal acupuncture with LF-HAS (5%, 0.2ml) at KI10

2) 자궁 무게

실험 종료 후, 실험동물의 자궁을 적출하여 무게를 측정하였다. Normal군에 비하여 control군에서 자궁 무게가 현저하게 감소하였다. NP군, saline군, 구기자 약침군 (LF-HA)에서는 control군에 비하여 자궁무게에 유의한 변화가 없었다(Fig. 4).

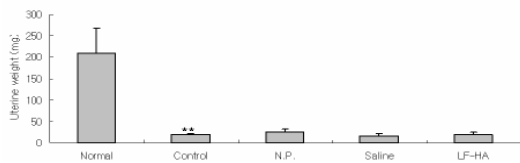


Fig. 4. Effect of LF-HA on the uterine weight in ovariectomized mice.

The ddy mice underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the mice were treated as described in the materials and method. Uterine was weighed after the mice were sacrificed. Data were expressed as mean \pm SD (n=9).

Normal : Normal ddy mice

Control : Ovariectomized (OVX) mice

NP : OVX and single prick with an injection needle at KI10

Saline : OVX and saline(0.2ml) injection at KI10

LF-HA : OVX and herbal acupuncture with LF-HAS(5%, 0.2ml) at KI10

** : p<0.01 compared to normal group by t-test.

3) 자궁비중

실험동물의 몸무게에 대한 자궁 무게의 백분율을 계산하였다. Normal군에 비하여 control군에서 자궁 비중이 유의하게 감소하였다. NP군, saline군, 구기자 약침군 (LF-HA)에서는 모두 control군에 비하여 자궁비중에 유의한 변화가 없었다(Fig. 5).

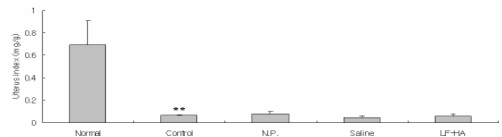


Fig. 5. Effect of LF-HA on the uterus index in ovariectomized mice.

The ddy mice underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the mice were treated as described in the materials and method. Uterine was weighed after the mice were sacrificed and the uterus index was represented as uterine weight divided by body weight. Data were expressed as mean \pm SD (n=9).

Normal : Normal ddy mice

Control : Ovariectomized (OVX) mice

NP : OVX and single prick with an injection needle at KI10

Saline : OVX and saline(0.2ml) injection at KI10

LF-HA : OVX and herbal acupuncture with LF-HAS(5%, 0.2ml) at KI10

** : p<0.01 compared to normal group by t-test.

4) 경골 길이

실험 종료 후, 실험동물의 경골을 적출하여 길이를 측정하였다. Normal군에 비하여 control군에서 경골 길이가 유의하게 증가하였다. 구기자 약침군(LF-HA)에서는 control군에 비하여 경골길이가 약간 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 6).

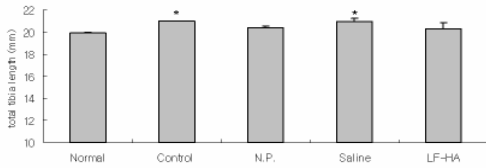


Fig. 6. Effect of LF-HA on the tibial length in ovariectomized mice.

The ddy mice underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the mice were treated as described in the materials and method. Tibia was weighed after the mice were sacrificed. Data were expressed as mean \pm SD (n=9).

Normal : Normal ddy mice
 Control : Ovariectomized (OVX) mice
 NP : OVX and single prick with an injection needle at KI10
 Saline : OVX and saline(0.2ml) injection at KI10
 LF-HA : OVX and herbal acupuncture with LF-HAS(5%, 0.2ml) at KI10
 * : p<0.05 compared to normal group.

5) 골밀도

실험 종료 후, 동물의 경골을 적출하여, 골밀도를 측정하였다. Control군에서 Normal군에 비하여 골밀도가 유의하게 감소하였으며, 구기자 약침군(LF-HA) 및 NP군에서 control군에 비하여 골밀도가 유의하게 증가하였다(Fig. 7).

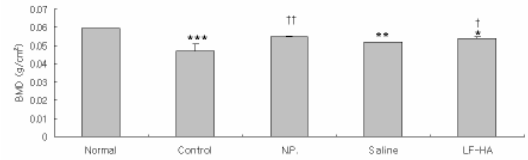


Fig. 7. Effect of LF-HA on tibial BMD in ovariectomized mice.

The ddy mice underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the mice were treated as described in the materials and method. After the mice were sacrificed, bone mineral density (BMD) of mouse tibia was measured by DEXA (dual-energy x-ray absorptionmetry) using PIXImus (Lunar meison, WI). Data were expressed as mean \pm SD (n=3).

Normal : Normal ddy mice
 Control : Ovariectomized (OVX) mice
 NP : OVX and single prick with an injection needle at KI10
 Saline : OVX and saline(0.2ml) injection at KI10
 LF-HA : OVX and herbal acupuncture with LF-HAS(5%, 0.2 ml) at KI10
 *** : p<0.001, ** : p<0.01, * : p<0.05 compared to normal group.
 ††: p<0.01, †: p<0.05 compared to control group.

3. 혈청 분석

각 실험동물의 혈청으로부터 ALP, phosphorus, calcium 및 osteocalcin의 농도를 측정하였다.

1) Alkaline phosphatase (ALP)

각 실험동물에서 취한 혈청에서 alkaline phosphatase(ALP)의 농도를 측정하였다. Normal군에 비하여 control군에서 혈청 ALP가 유의하게 증가하였고, 구기자 약침군(LF-HA)에서는 control군에 비하여 혈청 ALP가 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 8).

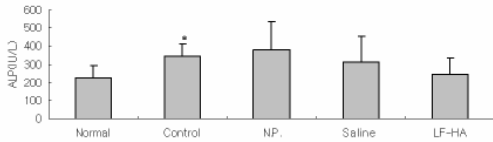


Fig. 8. Effect of LF-HA on serum ALP level in ovariectomized mice.

The ddy mice underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the mice were treated as described in the materials and method. Blood samples were taken from mice heart and serum ALP level was analysed. Data were expressed as mean \pm SD (n=5).

Normal : Normal ddy mice

Control : Ovariectomized (OVX) mice

NP : OVX and single prick with an injection needle at KI10

Saline : OVX and saline(0.2ml) injection at KI10

LF-HA : OVX and herbal acupuncture with LF-HAS(5%, 0.2 ml) at KI10

* : p<0.05 compared to normal group by t-test.

2) Phosphorus

각 실험동물에서 취한 혈청에서 phosphorus의 농도를 측정하였다. Normal군에 비하여 control군에서 phosphorus의 농도가 약간 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다. 구기자 약침군(LF-HA)에서 control군에 비하여 phosphorus의 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 9).

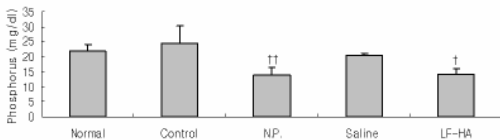


Fig. 9. Effect of LF-HA on serum Ca level in ovariectomized mice.

The ddy mice underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the mice were treated as described in the materials and method. Blood samples were taken from mice heart and the level of phosphorus in serum was analysed. Data were expressed as mean \pm SD (n=5).

Normal : Normal ddy mice

Control : Ovariectomized (OVX) mice

NP : OVX and single prick with an injection needle at KI10

Saline : OVX and saline(0.2ml) injection at KI10

LF-HA : OVX and herbal acupuncture with LF-HAS(5%, 0.2 ml) at KI10

†† : p<0.01, † : p<0.05 compared to control group.

3) Calcium

각 실험동물에서 취한 혈청에서 calcium의 농도를 측정하였다. 각 실험군의 혈청 calcium 농도는 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 10).

Fig. 10. Effect of LF-HA on serum calcium level in ovariectomized mice.

The ddy mice underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the mice were treated as described in the materials and method. Blood samples were taken from mice heart and the level of calcium in serum was analysed. Data were expressed as mean \pm SD (n=5).

Normal : Normal ddy mice

Control : Ovariectomized (OVX) mice

NP : OVX and single prick with an injection needle at KI10

Saline : OVX and saline(0.2ml) injection at KI10

LF-HA : OVX and herbal acupuncture with LF-HAS(5%, 0.2 ml) at KI10

4) Osteocalcin

각 실험동물에서 취한 혈청에서 osteocalcin level을 ELISA를 이용하여 측정하였다. Normal군에 비하여 control군에서 osteocalcin의 농도가 유의하게 증가하였다. 구기자 약침군(LF-HA)에서는 control군에 비해 혈청 osteocalcin의 농도가 감소하였으나 통계적 유의성은 없었고, saline군에 비해서는 혈청 osteocalcin 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 11).

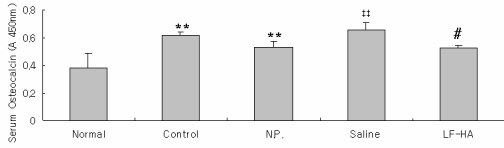


Fig. 11. Effect of LF-HA on serum osteocalcin level in ovariectomized mice.

The ddy mice underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the mice were treated as described in the materials and method. Blood samples were taken from mice heart and serum osteocalcin level was analysed. Data were expressed as mean \pm SD (n=5).

Normal : Normal ddy mice
 Control : Ovariectomized (OVX) mice
 NP : OVX and single prick with an injection needle at KI10
 Saline : OVX and saline(0.2ml) injection at KI10
 LF-HA : OVX and herbal acupuncture with LF-HAS(5%, 0.2ml) at KI10

** : p<0.01 compared to normal group.
 ‡ : p<0.01 compared to NP group.
 # : p<0.05 compared to saline. group.

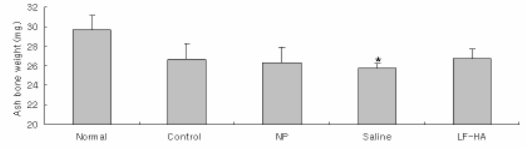


Fig. 12. Effect of LF-HA on the ash bone weight in ovariectomized mice.

The ddy mice underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the mice were treated as described in the materials and method. After the mice were sacrificed, tibias were removed, dried, and incinerated, and the ash was weighed. Data were expressed as mean \pm SD (n=9).

Normal : Normal ddy mice
 Control : Ovariectomized (OVX) mice
 NP : OVX and single prick with an injection needle at KI10
 Saline : OVX and saline(0.2ml) injection at KI10
 LF-HA : OVX and herbal acupuncture with LF-HAS(5%, 0.2ml) at KI10

* : p<0.05 compared to normal group

2) Calcium 함량

각 실험군에서 취한 경골을 회분한 뒤, 경골 내 calcium의 함량을 측정하였다. Control군에서 normal군에 비하여 calcium 함량이 유의하게 감소하였다. Saline군에서는 control군 및 NP군에 비하여 calcium 함량이 유의하게 증가하였으며, 구기자 약침군(LF-HA)에서는 control군에 비하여 calcium 함량이 유의하게 증가하였다(Fig. 13).

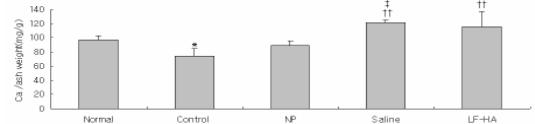


Fig. 13. Effect of LF-HA on tibial Ca level in ovariectomized mice.

The ddy mice underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the mice were treated as described in the materials and method. After the mice were sacrificed, tibia was removed, dried, carbonized and dissolved in HCl and the tibial Ca level was evaluated. Data were expressed as mean \pm SD (n=4).

Normal : Normal ddy mice
 Control : Ovariectomized (OVX) mice
 NP : OVX and single prick with an injection needle at KI10
 Saline : OVX and saline(0.2ml) injection at KI10
 LF-HA : OVX and herbal acupuncture with LF-HAS(5%, 0.2ml) at KI10

* : p<0.05 compared to normal group.
 ‡ : p<0.01 compared to control group.
 † : p<0.05 compared to NP group.

4. 경골 회분 분석

각 실험군의 경골을 회분하여 얻은 시료를 이용하여 경골 내 Ca 및 P 함량과 Ca/P ratio를 측정하였다.

1) 경골 회분 무게

실험 종료 후, 실험 동물의 경골을 태워 경골 내 회분 함량을 측정하였다. Control군에서 normal군에 비하여 회분함량이 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다. 구기자 약침군(LF-HA)에서는 control군에 비하여 경골 회분 함량에 유의한 차이가 없었다(Fig. 12).

3) Phosphorus 함량

각 실험군에서 취한 경골을 회분한 뒤, 경골 내 phosphorus의 함량을 측정하였다. Control군에서 normal군에 비하여 경골내 phosphorus의 함량이 약간 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다. 구기자 약침군(LF-HA)에서는 control군에 비하여 경골내 phosphorus 함량이 유의하게 증가하였다(Fig. 14).

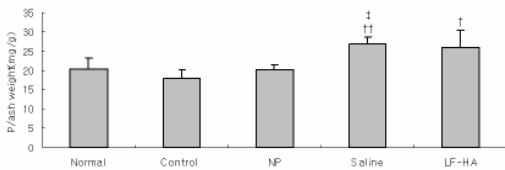


Fig. 14. Effect of LF-HA on tibial phosphorus level in ovariectomized mice.

The ddy mice underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the mice were treated as described in the materials and method. After the mice were sacrificed, tibia was removed, dried, carbonized and dissolved in HCl and the tibial phosphorus level was measured. Data were expressed as mean \pm SD (n=4).

Normal : Normal ddy mice
 Control : Ovariectomized (OVX) mice
 NP : OVX and single prick with an injection needle at KI10
 Saline : OVX and saline(0.2mℓ) injection at KI10
 LF-HA : OVX and herbal acupuncture with LF-HAS(5%, 0.2mℓ) at KI10
 †† : p<0.01, † : p<0.05 compared to control group.
 ‡ : p<0.05 compared to NP group.

4) Ca/P ratio

각 실험군에서 취한 경골을 회분한 뒤, 경골 내에서 calcium과 phosphorus의 비율을 측정하였다. Control군에서 normal군에 비하여 Ca/P 비율이 약간 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다. 구기자 약침군(LF-HA)에서는 control군에 비하여 Ca/P 비율에 유의한 차이가 나타나지 않았다(Fig. 15).

Fig. 15. Effect of LF-HA on tibial Ca/P ratio in ovariectomized mice.

The ddy mice underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the mice were treated as described in the materials and method. After the mice were sacrificed, tibia was removed, dried, carbonized and dissolved in HCl and the tibial Ca/P ratio was calculated. Data were expressed as mean \pm SD (n=4).

Normal : Normal ddy mice
 Control : Ovariectomized (OVX) mice
 NP : OVX and single prick with an injection needle at KI10
 Saline : OVX and saline(0.2mℓ) injection at KI10
 LF-HA : OVX and herbal acupuncture with LF-HAS(5%, 0.2mℓ) at KI10

5. 경골 내 osteoclast like cell 분석

경골 내 osteoclast like cell의 비율을 flow cytometry assay로 측정하여 군간 비교한 결과, control군에서 normal군에 비하여 osteoclast like cell 비율이 유의하게 증가하였으며, 구기자 약침군(LF-HA)에서는 control군 및 saline군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 16).

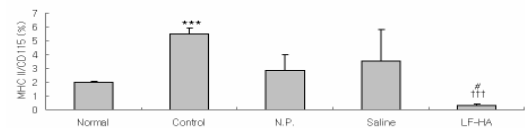


Fig. 16. Effect of LF-HA on osteoclast like cell in tibia of ovariectomized mice.

The ddy mice underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the mice were treated as described in the materials and method. After the mice were sacrificed, tibia was removed, and the number of osteoclast like cell in tibia was analyzed using flowcytometry. Data were expressed as mean \pm SD (n=4).

Normal : Normal ddy mice
 Control : Ovariectomized (OVX) mice
 NP : OVX and single prick with an injection needle at KI10
 Saline : OVX and saline(0.2mℓ) injection at KI10
 LF-HA : OVX and herbal acupuncture with LF-HAS(5%, 0.2mℓ) at KI10
 *** : p<0.001 compared to normal group.
 ††† : p<0.001 compared to control group.
 # : p<0.001 compared to saline group.

6. 경골의 조직학적 분석

1) H&E 염색 분석

실험동물의 경골조직을 절편하여 Hematoxylin and eosin(H&E) 염색을 실시하였다. Control군은 normal군에 비하여 골 내부에 pore가 많이 나타났고, 지주골이 적게 분포하였다. 구기자약침군(LF-HA)에서는 control군, NP군 및 saline군에 비하여 pore의 생성이 감소되었으며, 지주골도 normal군과 유사하게 유지되었다(Fig. 17).

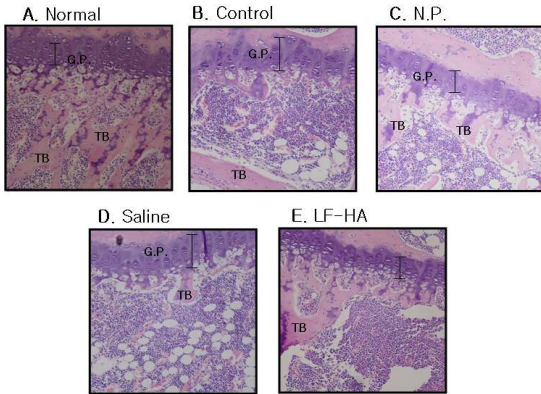


Fig. 17. Histological analysis (H&E stain) of tibia in ovariectomized mice

The ddy mice underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the mice were treated as described in the materials and method. After the mice were sacrificed, the mouse tibia was sliced and embedded in paraffin, and 5 μ m sections were stained with Hematoxylin and Eosin($\times 200$). G.P.: growth plate, TB: trabecular bone
 Normal : Normal ddy mice
 Control : Ovariectomized (OVX) mice
 NP : OVX and single prick with an injection needle at KI10
 Saline : OVX and saline(0.2ml) injection at KI10
 LF-HA : OVX and herbal acupuncture with LF-HAS(5%, 0.2 ml) at KI10

2) Histomorphometry

(1) TBV (trabecular bone volume)

실험동물의 경골조직을 절편하여 H&E 염색을 한 후, 자동분석 프로그램을 이용하여 지주골량(TBV)을 측정하였다. Control군에서 normal군에 비해 지주골량(TBV)이 유의하게 감소하였으며, 구기자 약침군(LF-HA)에서는 control군에 비하여 지주골량(TBV)이 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 18).

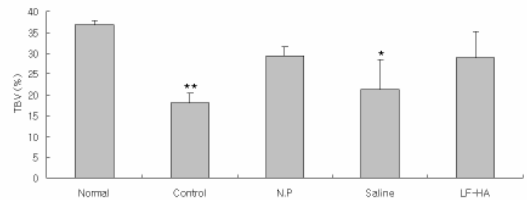


Fig. 18. Effect of LF-HA on the trabecular bone volume of tibia in ovariectomized mice.

The ddy mice underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the mice were treated as described in the materials and method. After the mice were sacrificed, the mouse tibia was sliced and embedded in paraffin, and 8 μ m sections were stained with Hematoxylin and Eosin. Trabecular bone volume of tibia was analyzed using a computer-assisted bone histomorphometric analysing system.

Normal : Normal ddy mice

Control : Ovariectomized (OVX) mice

NP : OVX and single prick with an injection needle at KI10

Saline : OVX and saline(0.2ml) injection at KI10

LF-HA : OVX and herbal acupuncture with LF-HAS(5%, 0.2 ml) at KI10

** : p<0.01 compared to normal group.

(2) TBT (trabecular bone thickness)

실험동물의 경골조직을 절편하여 H&E 염색을 한 후, 자동분석 프로그램을 이용하여 지주골의 두께(TBT)를 측정하였다. Control군에서 정상군에 비하여 TBT가 유의하게 감소하였으며, 구기자 약침군(LF-HA)에서는 control군에 비하여 TBT가 유의하게 증가하였다(Fig. 19).

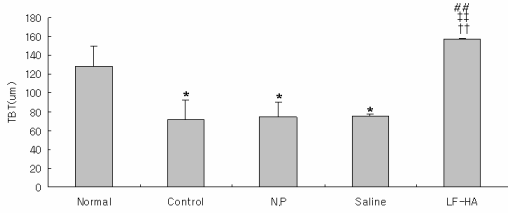


Fig. 19. Effect of LF-HA on the trabecular bone thickness of tibia in ovariectomized mice.

The ddy mice underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the mice were treated as described in the materials and method. After the mice were sacrificed, the mouse tibia was sliced and embedded in paraffin, and 8µm sections were stained with Hematoxylin and Eosin. Trabecular bone thickness of tibia was measured using a computer-assisted bone histomorphometric analysing system.

Normal : Normal ddy mice
 Control : Ovariectomized (OVX) mice
 NP : OVX and single prick with an injection needle at KI10
 Saline : OVX and saline(0.2mℓ) injection at KI10
 LF-HA : OVX and herbal acupuncture with LF-HAS(5%, 0.2mℓ) at KI10

* : p<0.05 compared to normal group.
 †† : p<0.01 compared to control group.
 ††† : p<0.01 compared to NP group.
 ## : p<0.01 compared to saline group.

(3) GPL(growth plate length)

실험동물의 경골조직을 절편하여 H&E 염색을 한 후, 자동분석 프로그램을 이용하여 성장판의 길이(GPL)를 측정하였다. Control 군에서 정상군에 비해 성장판의 길이가 유의하게 증가하였다. 구기자 약침군(LF-HA)에서는 control군에 비하여 성장판의 길이가 유의하게 감소하였다(Fig. 20).

IV. 考 察

세계보건기구는 골다공증을 “골량의 감소와 미세구조의 이상을 특징으로 하는 전신적인 골격계질환으로 결과적으로 뼈가 약해져서 부러지기 쉬운 상태가 되는 질환”으로

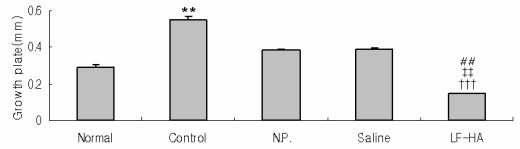


Fig. 20. Effect of LF-HA on growth plate length of tibia in ovariectomized mice.

The ddy mice underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the mice were treated as described in the materials and method. After the mice were sacrificed, the mouse tibia was sliced and embedded in paraffin, and 8µm sections were stained with Hematoxylin and Eosin. Growth plate length of tibia was measured using a computer-assisted bone histomorphometric analysing system.

Normal : Normal ddy mice
 Control : Ovariectomized (OVX) mice
 NP : OVX and single prick with an injection needle at KI10
 Saline : OVX and saline(0.2mℓ) injection at KI10
 LF-HA : OVX and herbal acupuncture with LF-HAS(5%, 0.2mℓ) at KI10

** : p<0.01 compared to normal group.
 ††† : p<0.01 compared to control group.
 †† : p<0.05 compared to NP group.
 ## : p<0.05 compared to saline group.

정의하고 있으며 최근 미국 국립보건원에서는 이를 축약하여 “골강도의 약화로 골절의 위험성이 증가하게 되는 골격계질환”으로 규정하였다. 골강도는 골량과 골질에 의해 결정되는데 골량은 주로 골밀도에 의해 표현되고 골질은 구조, 골교체율, 무기질화, 미세 손상 축적 등으로 구성된다¹⁸⁾.

초기에는 외모에서나 방사선 검사 상 특이 소견이 나타나지 않으며 척추 골절이 서서히 진행되면서 키가 작아지고 등이나 허리가 구부러지면서 환자는 골다공증에 이환된 것을 알게되며 치료를 하지 않을 경우에는 취약골절이 발생하여 사망률과 이환율은 매우 높아진다¹⁾. 또한 50세 이상 여성 골다공증 환자의 과반수와 70세 이상 골다공증 환자의 대부분에서 활동적인 삶이 제약된다. 골다공증 고관절 골절 후 50% 정도의 환자

는 골절 전의 기동능력과 독립성을 회복할 수 없고 25%의 환자들은 오랜 기간 요양기관이나 집에서의 보호가 필요하며, 사망률도 평균 20%나 된다¹⁸⁾.

골다공증은 발생 원인과 발병 연령, 임상적 특징에 따라 일차성 골다공증과 이차성 골다공증으로 분류된다. 일차성 골다공증은 성인에서 골다공증을 일으킬 수 있는 다른 질환이 동반되지 않은 상태에서 발생하는 골다공증으로 여성에서 폐경기후에 발생하는 제1형 골다공증 또는 폐경 후 골다공증과 70세 이후의 남녀에서 발생하는 제2형 골다공증 또는 노인성 골다공증으로 나누어진다. 이차성 골다공증은 발병연령에 상관없이 골다공증을 유발시키는 분명한 원인질환이 선행되어서 발생한 골다공증으로 여러 종류의 내분비 질환을 비롯하여 유전질환, 간-담도질환, 위장관 및 교원성 질환이 포함되며 골다공증을 일으키는 약물로는 부신피질호르몬제, 갑상선 호르몬, 헤파린, 카바마제핀 등이 있으며 알코올, 흡연도 골다공증을 유발하는 것으로 알려져 있다¹⁾.

한의학적으로 골다공증 관련 내용을 살펴보면 《素問·痿論》¹⁹⁾에 “腎主身之骨髓……腎氣熱則腰脊不舉，骨枯而髓減，發爲骨痿…有所遠行勞倦，逢大熱而渴，渴則陽氣內伏，內伏則熱邪于腎，腎者，水臟也，今水不勝火則骨枯而髓減，故足不任身發爲骨也”라 하여腎과 관련하여 ‘骨痿’의 개념이 기술되었고 《素問·長刺節論》¹⁹⁾에 “病在骨 骨髓不可舉 骨髓酸痛 寒氣至 名曰骨痺”，《素問·逆調論》¹⁹⁾에 “腎孤臟也 一水不能勝二火 故不能凍溼 病名曰骨痺 是人當攣節也”，

《素問·痺論》¹⁹⁾에서는 “腎痺者，善脹，尻以代踵，脊以代頭”라 하여 병이 뼈에 있는 ‘骨痺’，‘腎痺’에 대해 언급되었으며，《普濟方》²⁰⁾에 “夫骨極之病 本於腎臟中風 腎主身之骨髓 風邪中其臟則傷骨 故爲骨極 所爲骨極者 令人瘦削齒苦痛 手足煩疼不可久立 臥不欲動是也”라하여腎의 문제로 뼈이 상한 ‘骨極’에 대해 언급되었다.

『素門·宣明五氣論』에서는 “腎主骨”이라 하였고, 『素門·陰陽應象大論』에서는 “腎主骨髓”라 하여腎이骨髓를 主管하고腎精이人體의 生長發育을 촉진시키므로,腎精이 充足하면骨髓가 豊富해지고骨格이 生長하고 健실해지므로骨과腎의 生理를 밀접하게 연관시키고 있다^{21,22)}. 이러한 병기로 인하여 골다공증은 오장육부 중腎과 직접적인 관계가 있는 것으로 생각되고 있으며²³⁾, 골다공증에 관한 연구도腎과 관련된 약물이나 처방들을 위주로 이루어졌으니 대표적인 것이 속단⁴⁾, 두충⁵⁾, 녹용⁶⁾, 석곡⁷⁾, 숙지황⁸⁾, 파극천⁹⁾, 쇠양¹⁰⁾ 등을 비롯하여 육미지황탕¹¹⁾, 사물탕¹¹⁾, 대영전¹²⁾, 독활기생탕¹³⁾ 등이 골다공증에 유효한 것으로 보고되어 있다.

기존의 골다공증 연구들은 주로 약물의 경구투여 효과 입증에 치우쳤으나 최근들어鍼과 藥物의 자극을 동시에 하여 보다 양호한 치료효과를 얻을 수 있는 약침치료의 효과도 보고되고 있는데^{24,25)}, 본 실험에서는 足少陰腎經의 合水穴로서 自經의 自穴이며 滋補肝腎, 疏泄厥氣의 效能이 있어 膝關節炎, 股關節痛, 痺證등의 퇴행성 관절 질환에 다용되는 穴位인 陰谷¹⁴⁾을 선택하여 구기자

약침을 시술, 실험하였다.

구기자는 가지과에 속한 구기자나무 *Lycium chinense* Mill.의 성숙한 과실을 건조한 것으로 性味는 甘寒하고 質이 潤하여 肝腎二經으로 들어가 腎을 보하여 生精하고 또한 肝血을 養하여 明目하므로 肝腎을 補益하는 요약이되어 腰膝酸軟, 肝腎虧損, 遺精 등을 치료하므로 골다공증 치료에 유의성이 있을 것으로 생각되었다.

ddy mouse 모델은 골다공증 실험에서 유용하게 사용되는 실험동물인데¹⁷⁾, 본 실험에서 사용된 ddy 생쥐는 폐경으로 나타나는 여성의 골다공증과 유사한 병변을 관찰 될 수 있도록 태어난 후 4주에 골다공증의 유도를 위하여 ovariectomy(OVX)를 실시하여 골 형성과정에 장애를 인위적으로 만들었다. 그 결과 8주령의 ddy 생쥐에는 폐경기 여성에게서 나타나는 골다공증과 유사한 병변을 확인할 수 있었다.

이에 저자는 난소적출로 골다공증이 유발된 ddy 생쥐의 음곡에 구기자 약침을 시술하고 골다공증과 연관하리라 사료되는 지표들인 체중, 자궁무게, 경골길이 및 골밀도의 변화, 혈청분석, 경골회분 및 경골내 osteoclast like cell분석, 경골의 조직학적 변화 분석 등을 통하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

정상 생쥐의 조골세포에 구기자 약침을 5%, 1%, 0.5% 농도로 각각 처리한 후 조골세포의 세포생존율을 관찰한 결과 농도가 증가할수록 세포수가 증가하여 약침액이 세포증식효과를 확인할 수 있었으며 실험에 사용할 약침액의 농도를 5%로 정하여 사용

하였다(Fig. 1).

실험 후 흰쥐의 체중변화, 자궁무게 및 비중, 경골길이, 골밀도를 측정하여 골다공증을 평가하였는데 일반적으로 난소를 제거한 생쥐의 체중이 증가한다고 알려져 있으며²⁶⁾, 본 실험에서 흰쥐의 몸무게를 매주 측정하여 관찰한 결과 정상군에 비해 대조군의 체중이 증가하였고 구기자 약침군에서 대조군에 비해 체중이 낮게 나타났으나 변화율에는 뚜렷한 차이가 없었다(Fig. 2,3).

자궁 내막과 자궁근은 estrogen의존적이어서 난소적출후 자궁 무게는 감소하는 것으로 알려져 있으며 성호르몬은 골의 길이 성장을 억제하므로 동물실험에서 난소적출후 골의 길이 성장이 촉진되는 것으로 보고된 바 있는데²⁷⁾, 본 실험에서 자궁무게 및 비중은 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 감소하였으나 NP군, Saline군, 구기자 약침군에서 모두 대조군에 비해 유의한 변화가 없었고, 경골길이도 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 경골 길이가 증가하였으나 대조군에 비해 구기자 약침군에서 유의성있는 변화는 없어 구기자 약침이 자궁무게를 회복시키거나 경골성장을 억제하는 작용은 확인할 수 없었다(Fig. 4-6).

골밀도의 경우 난소 적출 시 estrogen결핍으로 인해 골밀도가 저하되는데²⁸⁾ 본 실험에서도 대조군이 정상군에 비해 유의하게 골밀도 저하가 나타났으며 NP군 및 구기자 약침군에서 유의하게 골밀도가 회복되었다(Fig. 7). 이것으로 볼 때 음곡 구기자 약침이 골밀도 회복에 유의한 작용이 있으리라 사료되며 단순 자침도 효과가 있는 것으로

보아 음곡혈 자체도 골밀도 회복에 유의한 작용이 있을 것으로 생각된다.

혈청분석으로 골다공증과 연관하리라 사료되는 ALP(Alkaline Phosphate), phosphorus(P), calcium(Ca), osteocalcin의 혈청내 농도를 분석하였는데, ALP는 골아세포가 골형성을 하는 동안 생성되어 그 중 일부가 혈액 중에 분비되는 효소로 임상에서 가장 흔히 이용되는 골형성 표지자로, 골질환으로 인한 ALP의 증가는 골신생이 있는 경우 즉 골파괴가 일어나는 질환 또는 골파괴에 수반하여 골신생이 일어나는 경우이며 난소절제 후 ALP 활동이 증가한다고 보고되어 있다²⁹⁻³¹. Phosphorus는 뼈의 무기질 구성성분의 하나로 골아세포 수를 증가시켜 뼈의 형성을 자극하는데 성인 체내에 1kg정도 존재하고, 약 85%가 골격에 존재하면서 체내 거의 모든 대사과정에 관여하며, 폐경 후 여성에서는 정상 성인에 비하여 약간의 증가가 일어난다고 알려져 있다³². Calcium도 뼈의 무기질 구성성분의 하나로 성인의 체내에는 약 1-2kg 정도가 존재하는데 이 중 99.9%는 뼈에 존재하며 나머지는 세포외액 중에 항상성을 유지하고 있다³⁰. Osteocalcin은 Ca과 결합하는 vit K 의존성 α -carboxylglutamic acid 단백질로서 골과 상아질에 특이적으로 존재하며, 조골세포의 활동을 나타내는 데에 가장 민감하고 특이한 것으로 알려져 있다^{33,34}. Osteocalcin은 골아세포에 의하여 생성되어 일부는 골기질에 축적되고 일부는 혈액 속으로 방출되는데 골의 재형성시에는 골아세포의 활성이 증가하여 혈청 중에

osteocalcin 농도가 높아지므로 골의 생성지표로 이용된다^{35,36}.

본 실험의 혈청분석에서 ALP는 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 증가하였으나 구기자약침군에서 대조군에 비해 유의한 감소가 나타나지 않았으며(Fig. 8), phosphorus는 구기자약침군에서 대조군에 비해 유의하게 감소하긴 하였으나 대조군자체가 정상군에 비해 유의한 변화가 없어 통계적 의미를 부여하게 어려웠고(Fig. 9), calcium도 모든 실험군에서 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다(Fig. 10). osteocalcin도 구기자약침군에서 saline군에 비해 유의하게 감소하여 구기자약침액의 osteocalcin저하 작용을 생각해 볼 수 있으나 대조군과 비교해 볼 때 감소하긴 하였지만 통계적 유의성이 없어 구기자약침의 osteocalcin 저하작용을 확인할 수 없었다(Fig. 11).

실험 후 경골을 회분하여 경골 회분 무게, 경골내 calcium, phosphorus 함량 및 Ca/P ratio를 측정하였는데 phosphorus와 calcium은 골이 흡수될 때 함께 세포외액으로 방출되고 유기기질이 흡수되어 골대사가 일어나고 있을 때 증가하므로 난소를 절제한 쥐에서는 골의 calcium 함량과 phosphorus 함량이 감소하며^{32,37}, Ca/P ratio는 bone condition과 관련되어 hypomineralization, bone loss, aging 등에서 낮아지는 것으로 알려져 있다³⁸.

경골 회분 무게와 Ca/P ratio는 구기자약침군을 비롯한 모든 실험군에서 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 못하였고(Fig. 12,15), 경골내 phosphorus 함량도 구기자약

침군에서 대조군에 비해 유의하게 증가하였으나 대조군 자체가 정상군에 비해 유의한 차이가 없어 통계적인 의미를 부여하기는 어려운 상태이나(Fig. 14), 경골내 calcium 함량은 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 감소하고 구기자약침군에서 대조군에 비해 유의하게 증가하여 구기자약침이 경골내 calcium 함량을 유의하게 증가시키는 작용을 확인할 수 있었다(Fig. 13).

성인에서 골대사는 골세포의 한 종류인 파골세포(osteoclast)에 의한 골흡수와 골아세포(osteoblast)에 의한 골형성이 균형을 유지하면서 지속적으로 교체되는 재형성과정으로 유지되는데 파골세포(osteoclast)는 골의 흡수 및 제거와 관련된 큰 다핵세포로 부갑상선호르몬의 존재하에 크게 활성화되어 골흡수와 세포외액으로의 Ca 및 P 방출을 증가시키므로 난소적출 생쥐에서는 파골세포(osteoclast)가 증가하게 되는데^{39,40)}, 경골 내 osteoclast like cell을 분석한 결과 대조군에서 정상군에 비하여 유의하게 증가하고 구기자약침군이 대조군에 비하여 유의하게 감소하여(Fig. 16), 음곡 구기자약침이 골다공증이 유발된 생쥐의 경골 내 파골세포를 유의하게 감소시키는 작용이 있는 것으로 파악되며 saline군과 비교해서도 유의하게 감소하여 약침액 자체의 작용이 역할을 한 것으로 생각된다.

경골의 조직학적 분석은 H&E 염색분석 및 자동분석 프로그램을 이용한 지주골량(TBV), 지주골두께(TBT), 성장판길이(GPV)를 측정하여 분석하였다. 골은 형태학적으로 표면부위와 내면부위가 서로 달라

표면은 두껍고 단단한 석회화 조직이고 안쪽은 골 조각을 영성하게 연결한 골수조직을 이루어 골 바깥쪽을 피질골(cortical bone)이라 하고 안쪽을 지주골(trabecular bone)이라고 하는데, 정상의 경우 지주골(trabecular bone)이 성장판에서 골수강내로 길게 신장되어 있으나 난소를 적출하면 지주골의 길이, 폭 및 지주골량이 감소하는 것으로 알려져있다^{39,41)}. 또한 성호르몬은 골 성장을 억제하므로 동물실험에서 난소적출로 성호르몬을 억제하면 골 성장이 촉진되는 것으로 보고 된 바 있는데²⁷⁾, 이는 실험 동물이 실제 폐경기 쥐가 아니기 때문에 골 성장이 촉진되어 성장판이 커지게 되는 것이다.

H&E 염색분석에서는 Control군은 Normal군에 비하여 골 내부에 pore가 많이 나타났고 지주골이 적게 분포하였다. 구기자약침군(LF-HA)에서는 control군, NP군 및 saline군에 비하여 pore의 생성이 감소되었으며, 지주골도 normal군과 유사하게 유지되었다(Fig. 18). 자동분석 프로그램을 이용한 분석에서 지주골량(TBV)은 구기자 약침군에서 통계적으로 유의한 증가는 없었으나(Fig. 19), 지주골의 두께(TBT)는 구기자 약침군에서 대조군에 비하여 유의하게 증가하였고(Fig. 20), 성장판의 길이(GPL)도 구기자 약침군이 대조군에 비하여 유의하게 감소하여(Fig. 21), 구기자약침이 난소 적출된 생쥐에서 골다공증을 억제하는 효과를 조직학적인 변화로 확인할 수 있었다.

이상의 실험에서 골밀도, 경골내 calcium 함량, 경골내 osteoclast like cell의 비율 및

조직학적 변화를 중심으로 파악해 볼 때 음곡 구기자 약침이 난소가 적출된 흰쥐의 골다공증을 유의하게 회복시키는 작용이 있음을 확인할 수 있었고 이는 음곡혈과 구기자 약침의 상호작용이라고 판단되며, 특히 구기자 약침액이 경골내 파골세포를 감소시켜 골다공증을 억제하는 작용을 한 것으로 생각된다. 향후 이에 대한 추가적인 연구 및 임상 응용이 필요할 것으로 사료된다.

V. 結 論

음곡 구기자 약침이 난소적출로 유발된 생쥐의 골다공증에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 음곡 구기자약침이 경골 내 골밀도를 유의하게 증가시켰다.
2. 음곡 구기자약침이 경골 내 calcium 함량을 유의하게 증가시켰다.
3. 음곡 구기자약침이 경골 내 osteoclast like cell을 유의하게 감소시켰다.
4. 음곡 구기자약침이 지주골의 두께를 유의하게 증가시키고 성장판의 길이를 유의하게 감소시켰다.

이상의 결과 음곡 구기자 약침이 파골세포의 억제를 통한 골다공증 억제 효능이 있을 것으로 판단되며 추후 임상적인 연구가 필요하리라 생각된다.

參考文獻

1. 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울 : 최신의학사. 2006 : 214-25.
2. 윤상호, 김정구. 폐경 후 골다공증의 최신 치료. 대한산부인과학회지. 2005 ; 48(4) : 844-56.
3. 두호경 편저. 동의신계학. 서울 : 동양의학연구원. 1993 : 5-17.
4. 안덕균, 최연주. 숙단이 흰쥐의 난소적출로 유발한 골다공증에 미치는 영향. 대한본초학회지. 1994 ; 9(1) : 181-9.
5. 오하식, 김호철, 이상인, 안덕균. 두층의 수피와 얇이 난소적출로 유발한 흰쥐의 골다공증에 미치는 영향. 대한본초학회지. 1995 ; 10(1) : 59-68.
6. 안덕균, 심상도. 녹용이 난소적출로 유발된 흰쥐의 골다공증에 미치는 영향. 대한본초학회지. 1999 ; 14(1) : 153-66.
7. 한홍준, 김종환, 조한백, 최규섭. 석곡이 난소적출로 골다공증이 유발된 흰쥐에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2000 ; 13(2) : 120-35.
8. 이진아, 반혜란, 양승증, 조성희, 진천식. 숙지황이 배란적출로 유발된 흰쥐의 골다공증에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2004 ; 17(4) : 112-24.
9. 최홍식. 쇄양과 두층이 골다공증 유발 후 흰쥐의 골밀도와 체중에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2008 ; 23(2) : 19-24.
10. 박지하, 서부일, 최홍식, 김연섭, 서영배, 강정수 외. 파극천이 좌골신경 절단으로 유발된 ddy 마우스 골다공증 모델의 예방효과에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2005 ; 20(4) : 83-94.

11. 이상근, 권영규, 김광중, 김완희. 사물탕과 육미지황탕이 난소적출로 유도된 백서의 골다공증에 미치는 영향. 제한동의 학술원논문집. 1995 ; 31-48.
12. 김근우, 김상찬, 서부일, 김선희 대영전이 난소적출로 유발된 백서의 골다공증에 미치는 영향. 대한본초학회지. 1998 ; 13(1) : 59-81.
13. 이영석, 김종환, 조한백, 최규섭. 독활기생탕이 난소적출로 골다공증이 유발된 백서에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2000 ; 13(2) : 104-19.
14. 전국 한의과대학 침구경혈학교실 편저. 鍼灸學(上). 서울 : 집문당. 2001 : 546.
15. 전국한의과대학 본초학교수 공편저. 본초학. 서울 : 영림사. 1995 : 596-7.
16. M. taira, H. nakao, L. takahashi, Y. araki. Effects of two vitamins, two growth factors and dexamethasone on the proliferation of rat bone marrow stromal cells and osteoblastic MC3T3-E1 cells. Journal of Oral Rehabilitation. 2003 ; 30 : 697-701.
17. 이형식, 홍표원, 구세광, 이재현, 함태수. ddy 마우스를 이용한 골다공증 모델에 대한 비교연구: 난소적출 및 신경절단 모델. 대한수의학회지. 2004 ; 44(4) : 487-95.
18. 대한골대사학회 지킴위원회. 골다공증 진단 및 치료 지침 2007. 대한내분비학회지. 2008 ; 23(2) : 76-108.
19. 王琦 編著. 黃帝內經 素問今釋 서울 : 醫聖堂. 1994 : 52, 126, 166, 206, 211, 247.
20. 張洪, 魏之玉, 王景存. 補腎疏肝健脾方治療老年原發性骨質疏鬆症38例. 山東中醫藥大學學報. 1997 ; 21 : 375-6.
21. 金貞娟, 宋勇善. 골다공증에 대한 동서의학적 고찰. 한방재활의학학회지. 1996 ; 6(1) : 293-315.
22. 이응세, 김혜경. 骨多孔症의 東醫學的 臨床文獻에 관한 考察. 韓方再活醫學學會誌. 1997 ; 7(1) : 437-56.
23. 김형균, 류지윤, 이연정. 腎主骨에 관한 동서의학적 고찰. 대한한방내과학회지. 1991 ; 12(2) : 26-9.
24. 대한약침학회. 약침제제와 임상응용(2). 서울 : 대한약침학회. 1997 : 1-5.
25. 대한약침학회. 약침요법 기술지침서. 서울 : 대한약침학회. 1999 : 1-5.
26. Dike N kalu, Bahran H arjmandi, Chung ching Liu, Mohammed A Salih and Roger S Birnbarum. Effects of ovariectomy and estrogen on the serum levels of insulin-like growth factor binding protein-3. Bone and mineral. 1994 ; 25 : 135-48.
27. D. N. Kalu, C. C. Lin, E. Salerno, B. Hollis, R. Echon and M. Ray. Skeletal response of ovariectomized rats to low and high doses of 17 β -estradiol. Bone and Mineral. 1991 ; 14 : 175-87.
28. BCJ van der Eerden, J Emons, S Ahmed, HW van Essen, CWGM Lowik, JM Wit, M Karperien. Evidence for genomic and nongenomic actions of estrogen in

- growth plate regulation in female and male rats at the onset of sexual maturation. *Journal of Endocrinology*. 2002 ; 175 : 277-88.
29. 김덕윤. 골형성의 생화학적 표지자. *대한골대사학회지*. 1994 ; 1(1) : 233-9.
30. 이귀녕, 권오현. *임상병리과일*. 서울 : 의학문화사. 2003 : 102-5, 300-8, 328-31, 425-7, 734-6.
31. Y Zhang, W.P Lai, P.C Leung, C.F Wu, M.S Wong. Short to mid term effects of ovariectomy on bone turnover, bone mass and bone strength in rats. *Biol. Pharm. Bull*. 2007 ; 30(5) : 898-903.
32. 해리슨 번역편찬위원회. *Harrison's 내과학*. 서울 : 도서출판 정담. 1997 : 2312-3, 2342-3.
33. 대한병리학회. *病理學*. 서울 : 高文社. 1990 : 1134-5, 1141-4.
34. 문기현, 김창표, 강봉구, 이양균. 폐경 후 골다공증에서 생화학적 골대사지표. *대한재활의학회지*. 1998 ; 22(1) : 93-9.
35. Morris Notelovitz. *Osteoporosis: screening, prevention, and management*. *Fertility and Sterility*. 1993 ; 59(4) : 707-25.
36. Garnero P, Delmas PD. Assessment of the serum level of bone Alkaline Phosphatase with a new immunoradimetric assay in patients with metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 ; 77(4) : 1046-53.
37. 임창훈, 오한진, 윤현규, 정호연, 한기옥, 장학철, 한인권. 갱년기 골다공증 환자의 HRT와 Alendornate 1년 병합치료효과. *대한폐경학회지*. 2000 ; 6(1) : 18-24.
38. Arthur C Guyton M.D., John E Hall Ph.D. *의학생리학*. 서울 : 정담. 2002 : 1050-3.
39. 대한골대사학회. *골다공증(골소송증)*. 서울 : 최신의학사. 1991 : 3-7, 27-36, 47-56, 60-3, 69-79.
40. 이우주. *영한의학사전*. 서울 : 도서출판 아카데미서적. 1990 : 1738.