

淸經四物湯 추출물의 성장기 흰쥐 장골길이 성장에 대한 효과

이정현[#], 이세나[#], 손재봉, 금소현, 임강현*

세명대학교 한의과대학 본초학교실

Effects of *Cheunggyeongsamul-tang* Extract on Longitudinal Bone Growth in Adolescent Female Rats

Junghun Lee[#], Sena Lee[#], Jaebong Son, Sohyun Keum, Kanghyun Leem*

Department of Herbology, College of Oriental Medicine, Semyung University

ABSTRACT

Objectives : This study was designed to investigate the effects of *Cheunggyeongsamul-tang* extract on the growth of longitudinal bone in adolescent female rats.

Methods : Longitudinal bone growth was measured by fluorescent microscopy. To examine the effects on the growth plate metabolism, the total height of growth plate, the induction of local insulin-like growth factor-1 (IGF-1), IGF-1 receptor, bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), BMPR-1A, indian hedgehog (IHH), and parathyroid hormone-related protein (PTH-rP) were measured.

Results : *Cheunggyeongsamul-tang* extract enhanced longitudinal bone growth and total height of the growth plate. Also, it promoted the induction of local IGF-1, BMP-2, IHH and PTH-rP of the growth plate.

Conclusions : This study shows that the *Cheunggyeongsamul-tang* extract effects longitudinal bone growth in adolescent rats and might be used for both stunted adolescents and inherent growth failure patients.

Key words : *Cheunggyeongsamul-tang*, Longitudinal bone growth, Growth plate, Insulin-like growth factor-1, Bone morphogenetic protein-2, Indian hedgehog, Parathyroid hormone-related protein

서 론

月經先期는 월경 날짜가 앞당겨지는 것으로 구체적으로는 월경간격이 연속 2주기 이상 21일 미만인 경우를 말하며, '經早', '月經前期', '經水先期', '經水一月再行'이라고도 한다. 이러한 月經先期에 대해, 《東醫寶鑑》에서는 월경 날짜가 앞당겨지는 것은 血이 虛하고 熱이 있기 때문(血虛有熱) 또는 기혈이 모두 열하기 때문(氣血俱熱)이라고 하였고, 淸經四物湯을 쓴다고 하였다¹⁾.

月經先期에 대표적으로 쓰이는 淸經四物湯에는 當歸 1돈 반, 生乾地黃·條芩·香附子 각각 1돈, 白芍藥·黃連(생강즙에 축여 볶은 것) 각 8푼, 川芎·阿膠珠·黃栢·

知母 각 5푼, 艾葉·甘草 각 3푼이 들어간다¹⁾. 즉 四物湯에서 熟地黃 대신 生乾地黃을 넣고 條芩·香附子·黃連·阿膠珠·黃栢·知母·艾葉·甘草를 가한 것이다.

이 淸經四物湯은 실제로 임상에서는 여아들의 성장 촉진 처방으로 활발히 사용되고 있으며, 그 문헌적 근거를 《동의보감》의 月經先期에 쓰이는 用例로 두고 있다. 여아 성장의 경우, 초경여부가 여아의 성장과 매우 밀접한 관계가 있으므로 초경을 늦게 시작하도록 하면 여아의 성장 시기를 연장시키는 효과가 있어, 결과적으로 성장을 돕는다는 것이다.

본 연구에서는 淸經四物湯 추출물이 과연 성장효과가 있는지 그리고 어떤 인자들이 관여하여 그러한 효과를

* 교신저자 : 임강현, 충북 제천시 신일동 세명대학교 한의과대학 본초학교실

제1저자로서 논문 기여도가 같음

· Tel : 043-649-1341 · E-mail : heavenok@dreamwiz.com

· 접수 : 2009년 11월 22일 · 수정 : 2009년 12월 11일 · 채택 : 2009년 12월 21일

나타내는지 알아보고자, 성장기 암컷 흰쥐에 대하여 장골 길이 성장에 대한 영향 및 각종 성장 관련 인자들의 성장판 내 발현 정도를 관찰하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

실험에 사용한 동물은 80 ± 10 g의 Sprague-Dawley 계 암컷 흰쥐(3주령)를 대한실험동물로부터 구입하여 사료와 물을 충분히 공급하면서 1주간 실험환경에 적응시킨 다음 대조군과 실험군으로 나누어 실험에 사용하였다 ($n = 15$). 본 연구는 세명대학교 동물윤리위원회의 승인을 받아 이루어졌다(smecae09-06-04).

실험에 사용된 약제는 광명당제약을 통해 구입하여 세명대학교 본초학교실에서 검증하여 사용하였다.

2. 방법

1) 시료의 조제

실험에 사용된 淸經四物湯은 《東醫寶鑑》¹⁾에 근거하여 다음과 같은 약재와 비율로 조제하였다. 當歸 6g, 生乾地黃·條芩·香附子 각 4g, 白芍藥·黃連(생강즙에 축여 볶은 것) 각각 3.2g, 川芎·阿膠珠·黃柏·知母 각 2g, 艾葉·甘草 각 1.2g의 약재에 10배의 70% 에탄올을 가하여 3일간 침출하여 여과지(Whatman NO. 1)로 여과하여 그 여액을 감압농축한 다음 동결건조하여(수율: 13.1%) 실험에 사용하였다.

2) 시료의 투여와 실험군의 설정

흰쥐의 골성장에 대한 淸經四物湯의 효능을 관찰하기 위하여 골성장 측정을 위해 Hansson이 처음 시도한 방법을 사용하였다²⁾. 이는 정상적인 골대사를 관찰하기 위한 방법으로 형광인자가 칼슘과 칼레이트결합을 통해 골에 침착되는 현상을 이용한 것이다. 골생성이 가장 활발한 성장기에 골성장판 하부의 골신생부에 가장 많이 침착하여 선을 형성하는데 이를 이용하여 일정기간을 두고 투여하여 각 선 사이의 길이를 형광현미경으로 관찰하여 성장한 길이를 측정하였다. 투여된 약물은 성장판에 도달하여 작용을 미치는 시간이 최소 12시간이 걸리므로³⁾, 본 실험에서는 충분한 약효의 발현을 위해 부검 4일 전부터 하루 1회 淸經四物湯 시료를 투여하기로 결정하였다.

대조군(증류수투여군)은 증류수를 경구투여하였고, 실험군은 淸經四物湯 시료를 고농도(200 mg/kg) 및 저농도(40 mg/kg)의 2개 농도로 실험개시일(1일)부터 5일간 매일 1회 경구투여하였다. 모든 실험군에 똑같이 실험개시 후 4일에 칼세인(calcein: 10 mg/kg, i.p.: Sigma, USA)을 투여하였다.

3) 체중

실험개시일부터 종료일까지 매일 같은 시각 체중을 측정하였다.

4) 조직표본제작

형광인자 투여 1일 후에 흰쥐를 chloral hydrate (純正化學, Japan, 35.0 mg/kg, i.p.)로 마취시켜 개흉한 다음, 우심이를 절개하고 needle (No. 18)을 좌심실에 주입한 후 헤파린 처리된 5% sodium nitrite (Sigma, USA) 생리식염수를 심장에 관류시키고, 이어서 0.1 M phosphate buffer에 녹인 pH 7.4의 4% formalin 고정액으로 관류시켰다. 그 후 흰쥐의 좌우 족경골(tibia)을 떼어내어 2시간 동안 0.1 M phosphate buffered formalin 고정액에 후고정시킨 다음, 50 mM EDTA에 2~3일 동안 방치하여 탈회 후, 동결에 대한 보호를 위해 30% sucrose에 담가 4°C에서 하룻밤동안 유지하였다. 고정된 골조직을 동결한 후 sliding microtome (HM440E, Zeiss, Germany)을 사용하여 족경골(tibia) 근위(proximal part)부의 시상절편(sagittal section)을 매 40 μ m씩 수집하였다.

5) 골성장 측정 및 성장판 관찰

매 40 μ m로 수집된 족경골 근위부 시상절편을 슬라이드 글라스 위에 올리고 건조한 후 형광현미경을 이용하여 골조직 내 형광인자의 침착으로 형성된 선과 성장판 사이의 길이를 측정하여 1일간의 골 성장 지표로 사용하였다.

길이 측정 후 cresyl violet 염색한 다음 성장판 내의 휴지부, 증식부 및 비대부의 연골세포를 관찰하고, 전체 높이를 측정하였다.

6) 면역조직화학염색

면역조직화학염색을 통해 IGF-1, IGF-1 receptor, BMP-2, BMPR-1A, IHH, PTH-rP의 성장판 내 발현을 관찰하고자 하였다. 상기와 같이 40 μ m로 준비된 조직절편을 사용하였다. 면역염색에 사용된 1차 항체는 각각 IGF-1 antibody (Santa Cruz Biotech., USA), IGF-1 receptor antibody (Abcam, UK), BMP-2 antibody (Abcam, UK), BMPR-1A antibody (Santa Cruz Biotech., USA), IHH antibody (Abcam, UK), PTH-rP antibody (Santa Cruz Biotech., USA)를 사용하였다. 2차 항체로는 anti-rabbit antibody (Vector Lab, USA)를 사용하였다. 또한 Vectastatin elite ABC kit (Vector Lab, USA)를 사용하였다. 실험방법은 조직 절편들을 0.1 M PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.2)에 5분 동안 담그고, Triton-X 100 용액 (Sigma, USA)에서 15분간 2회, 0.1 M PBS + 0.5% Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma, USA)에서 15분간 2회 씻어낸 다음, 1차 항체와 함께 상온에서 하룻밤 동안 반응시켰다 (BMP-2 antibody는 1:500, IGF-1, IGF-1 receptor, BMPR-1A, IHH, PTH-rP antibody는

1:100의 농도로 첨가). 다음날 15분간 2회 0.1 M PBS + 0.5% BSA에서 행군 다음 그 section을 60분간 secondary antibody와 함께 반응시키고, 다시 0.1 M PBS + 0.5% BSA로 15분간 2회 행군 후 60분 동안 ABC (avidin-biotin-peroxidase) 복합체를 1:50의 농도로 첨가하여 상온에서 반응시켰다. 각 조직절편들을 0.1 M PB로 15분간 2회 수세한 다음 최종적으로 0.05%의 DAB (3,3-diaminobenzidine, Sigma, USA)과 0.03% 과산화수소가 있는 0.1 M PB에 반응시켰다. 발색된 후 새로운 0.1 M PB에 각 조직절편을 넣어 반응을 중지한 뒤 슬라이드표본으로 제작하여 관찰하였다.

7) 혈중 IGF-1 농도의 측정

부검 시 혈액을 채취하여 상온에서 30분간 방치한 후 원심분리(3,000 rpm, 10분)하여 혈청을 취하였다. Rat/Mouse IGF-1 ELISA Kit (IDS Ltd, UK)을 사용하여 혈중 IGF-1의 농도를 측정하였다.

8) 통계방법

약물의 효과를 판정하기 위해 one way ANOVA test를 이용하였고 사후검정을 위해 대조군과 비교하는 Dunnett's post hoc test를 사용하였다. 통계학적 유의성은 $p < 0.05$ 이하인 것으로 하였다.

결 과

1. 체중변화

대조군의 체중은 첫 번째, 두 번째, 세 번째, 네 번째, 다섯 번째 날 각각 84.4 ± 0.8 g, 91.5 ± 1.0 g, 96.9 ± 1.1 g, 103.1 ± 1.2 g, 110.8 ± 1.3 g이었다. 淸經四物湯 고농도군의 체중은 첫 번째, 두 번째, 세 번째, 네 번째, 다섯 번째 날 각각 84.3 ± 0.8 g, 89.2 ± 1.0 g, 95.9 ± 1.1 g, 101.4 ± 1.1 g, 108.1 ± 1.2 g이었다. 淸經四物湯 저농도군의 체중은 첫 번째, 두 번째, 세 번째, 네 번째, 다섯 번째 날 각각 84.0 ± 0.9 g, 89.4 ± 0.8 g, 96.1 ± 0.9 g, 102.0 ± 1.1 g, 108.7 ± 1.2 g이었다(Table 1).

Table 1. Daily Body Weight Change for Five Days in Adolescent Female Rats

Group	Body weight (g)				
	1	2	3	4	5th day
Normal (n=15)	84.4 ± 0.8	91.5 ± 1.0	96.9 ± 1.1	103.1 ± 1.2	110.8 ± 1.3
CG-high (n=15)	84.3 ± 0.8	89.2 ± 1.0	95.9 ± 1.1	101.4 ± 1.1	108.1 ± 1.2
CG-low (n=15)	84.0 ± 0.9	89.4 ± 0.8	96.1 ± 0.9	102.0 ± 1.1	108.7 ± 1.2

Normal : DW administrated group. CG-high : *Cheunggyeongsamul-tang* (200 mg/kg) administrated group. CG-low : *Cheunggyeongsamul-tang* (40 mg/kg) administrated group. Each value is the mean ± SEM of fifteen animals.

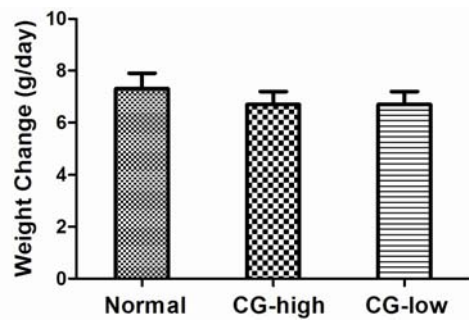


Fig. 1. Weight gain for a day while the experiment was performed from 4th day to 5th day in adolescent female rats
Normal : DW administrated group. CG-high : *Cheunggyeongsamul-tang* (200 mg/kg) administrated group. CG-low : *Cheunggyeongsamul-tang* (40 mg/kg) administrated group. Each value is the mean ± SEM of fifteen animals.

넷째날에서 다섯째날 (1일간) 체중변화를 관찰한 결과 대조군은 7.3 ± 0.6 g의 체중변화가 관찰되었고, 淸經四物湯 고농도군에서는 6.7 ± 0.5 g의 체중변화가 관찰되었고, 淸經四物湯 저농도군에서는 6.7 ± 0.5 g의 체중변화가 관찰되었다. 대조군 및 淸經四物湯 고농도군, 淸經四物湯 저농도군의 체중에서 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다(Fig 1).

2. 장골길이 성장에 대한 효과

칼슘과 결합하는 형광물질인 칼세인을 1회 투여하고 24시간 후에 찍은 사진을 보면, 증류수를 투여한 대조군 (Fig. 2A)에 비해 淸經四物湯 고농도 투여군(200 mg/kg) 및 저농도 투여군(40 mg/kg, Fig. 2B, 고농도군만 그림)에서는 성장판과 뼈의 경계부위로부터 형광표식인자까지의 거리가 더 증가되어 1일간 성장한 길이를 관찰할 수가 있다.

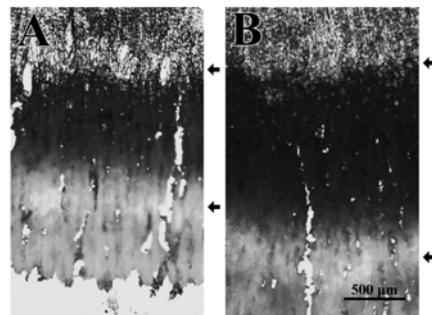


Fig. 2. Fluorescence photomicrograph of a longitudinal section of the proximal tibia
The fluorescent line correspond to the injection of calcein (10 mg/kg).
A : Fluorescence photomicrograph of longitudinal bone growth in normal group.
B : Fluorescence photomicrograph of longitudinal bone growth in *Cheunggyeongsamul-tang* (200 mg/kg) administrated group. Upper arrows mean the line between the growth plate and bone. Lower arrows mean the line formed by calcein injection. Scale bar = 500 μm.

1일간 흰쥐의 장골길이 성장을 측정된 결과 대조군에서 $577.9 \pm 10.1 \mu\text{m/day}$ 의 길이 성장을 나타내었고, 淸經四物湯 고농도군에서 $677.7 \pm 10.8 \mu\text{m/day}$ 의 길이 성장을 나타내었고, 淸經四物湯 저농도군에서 $633.2 \pm 9.5 \mu\text{m/day}$ 의 길이 성장을 나타내었다.

정리하면 대조군과 비교하였을때 淸經四物湯 고농도군 및 저농도군(200 및 40 mg/kg)에서 모두 유의한 골성장 촉진효과를 나타내었으며, 淸經四物湯 고농도군이 더 우수하게 성장한 것으로 나타나, 농도의존적으로 성장한 것을 관찰할 수 있었다.

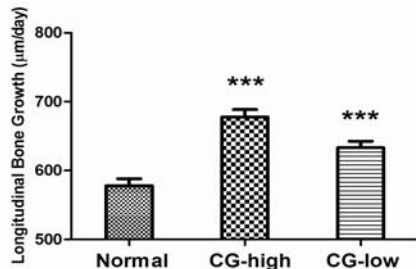


Fig. 3. Effects of *Cheunggyeongsamul-tang* on the longitudinal bone growth in adolescent female rats

Normal : DW administrated group. CG-high : *Cheunggyeongsamul-tang* (200 mg/kg) administrated group. CG-low : *Cheunggyeongsamul-tang* (40 mg/kg) administrated group. Each value is the mean \pm SEM of fifteen animals. *** : Significantly different from the control, $p < 0.001$.

3. 성장판 연골세포대사에 미치는 영향

증류수를 투여한 대조군(Fig. 4A)에 비해 淸經四物湯 고농도 투여군(200 mg/kg) 및 저농도 투여군(40 mg/kg, Fig. 4B, 고농도군만 그림)에서는 연골세포대사를 촉진하여 성장판의 전체 높이를 증가시켰다. 특히 증식부(proliferative zone)와 비대부(hypertrophic zone)의 높이를 증가시켰으며 휴식부(resting zone)의 변화는 상대적으로 적었다. 그리고 골화부(ossification zone; OZ)는 비대부와 분명하게 구분되지 않았다(Fig. 4).

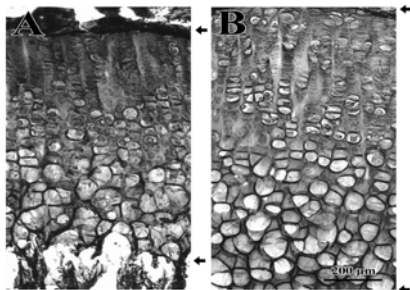


Fig. 4. Photographs of growth plates in a proximal tibia. Sections were stained with cresyl violet

A : Photomicrograph of cresyl violet-stained chondrocytes in the growth plate of normal group.
 B : Photomicrograph of cresyl violet-stained chondrocytes in the growth plate of *Cheunggyeongsamul-tang* (200 mg/kg) administrated group. The growth plate is located between upper and lower arrows. Scale bar = 200 μm .

전체 성장판의 높이를 측정된 결과 대조군에서 $579.3 \pm 13.0 \mu\text{m}$ 의 성장을 나타내었고, 淸經四物湯 고농도군에서 $646.2 \pm 17.0 \mu\text{m}$ 의 성장을 나타내었고, 淸經四物湯 저농도군에서 $626.3 \pm 10.8 \mu\text{m}$ 의 성장을 나타내었다. 고농도군 및 저농도군(200 및 40 mg/kg) 모두에서 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이를 관찰할 수 있으며 ($p < 0.01$) 淸經四物湯에 의한 성장판의 높이 증가는 농도의존적인 양상을 보였다(Fig. 5).

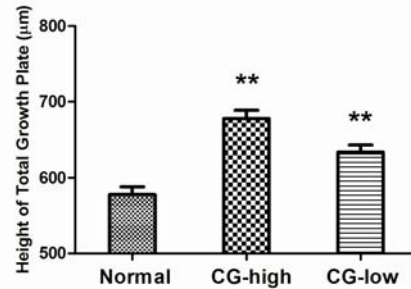


Fig. 5. The longitudinal height of growth plate

Normal : DW administrated group. CG-high: *Cheunggyeongsamul-tang* (200 mg/kg) administrated group. CG-low : *Cheunggyeongsamul-tang* (40 mg/kg) administrated group. Fifteen animals were treated for each group. Values are means \pm SEM. ** : Significantly different from the control, $p < 0.01$.

4. 성장판 내 IGF-1 발현에 미치는 영향

IGF-1의 성장판 조직 내 발현에 대하여, 증류수를 투여한 대조군과 청경사물탕 투여군을 비교해보았는데 그 결과는 다음과 같았다. 대조군과 청경사물탕 투여군 모두 휴식부(Fig. 6a, e)와 증식부(Fig. 6b, f)에서 IGF-1 발현이 약하게 나타났으나, 비대부(Fig. 6c, g)와 골화부(Fig. 6d, h)에서는 청경사물탕 투여군에서 면역염색이 증가하여 IGF-1 발현이 증가하였음을 관찰할 수 있었다.

증식부 연골세포에 대해 상세히 관찰해 보면, 대조군의 증식부(Fig. 6b) 별 표식(★) 연골세포 세포질의 IGF-1 발현은 매우 약하게 관찰되었으나, 청경사물탕 투여군의 증식부(Fig. 6f) 별 표식(★) 연골세포 세포질의 IGF-1 발현이 약간 더 강하게 발현되어 있음을 관찰할 수 있었다.

비대부 연골세포에 대해 상세히 관찰해 보면 대조군 비대부(Fig. 6c) 별 표식(★) 연골세포 세포질의 IGF-1 발현은 보통 수준으로 관찰되었으나, 청경사물탕 투여군의 비대부(Fig. 6g) 별 표식(★) 연골세포 세포질의 IGF-1 발현이 더 강했고, 더 많은 수의 연골세포에서 발현되었음을 관찰할 수 있었다.

골화부 연골세포의 경우는 비대부 연골세포와 유사하여 대조군 비대부(Fig. 6d) 별 표식(★) 연골세포 세포질의 IGF-1 발현보다 시료 C 투여군의 비대부(Fig. 6h) 별 표식(★) 연골세포 세포질의 IGF-1 발현의 정도가 더 강하고 발현된 연골세포의 수가 더 많음을 관찰할 수 있었다.

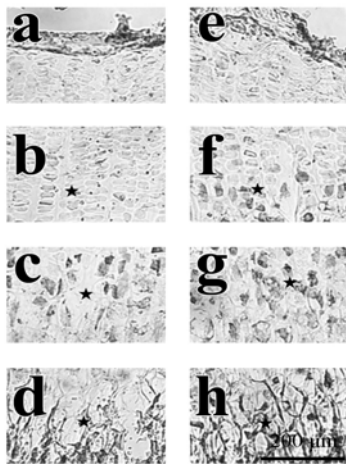


Fig. 6 Immunohistochemical localization of IGF-1 in the growth plate

Normal group was shown at the first column (a, b, c, d). The second column was *Cheunggyeongsamul-tang* (200 mg/kg) administrated group (e, f, g, h). The first row is resting zone (a, e); second row, proliferative zone (b, f); third row, hypertrophic zone (c, g); fourth row, ossification zone (d, h). The asterisks show the main observational region of immunostaining of IGF-1. Scale bar = 200 μ m.

5. 성장판 내 IGF-1 receptor 발현에 미치는 영향

IGF-1 receptor의 성장판 조직 내 발현에 대하여, 증류수를 투여한 대조군과 청경사물탕 투여군을 비교해 본 결과, 휴지부(Fig. 7a, e), 증식부(Fig. 7b, f), 비대부(Fig. 7c, g), 골화부(Fig. 7d, h)에서 서로 비슷한 정도의 발현이 관찰되어, IGF-1 receptor의 존재를 확인할 수 있었다.

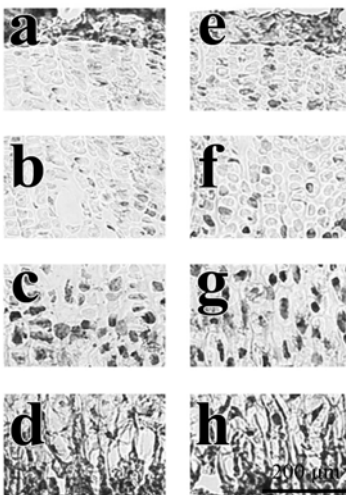


Fig. 7 Immunohistochemical localization of IGF-1 receptor in the growth plate

Normal group was shown at the first column (a, b, c, d). The second column was *Cheunggyeongsamul-tang* (200 mg/kg) administrated group (e, f, g, h). The first row is resting zone (a, e); second row, proliferative zone (b, f); third row, hypertrophic zone (c, g); fourth row, ossification zone (d, h). Scale bar = 200 μ m.

6. 성장판 내 BMP-2 발현에 미치는 영향

BMP-2의 성장판 조직 내 발현에 대하여, 증류수를 투여한 대조군과 청경사물탕 투여군을 비교해 본 결과는 다음과 같다. 대조군과 청경사물탕 투여군 모두 휴지부(Fig. 8a, e)와 증식부(Fig. 8b, f)에선 BMP-2 발현이 약하게 나타났으나, 비대부(Fig. 8c, g)와 골화부(Fig. 8d, h)를 관찰한 결과, 청경사물탕 투여군에서 면역염색이 증가하여 BMP-2 발현이 증가하였음을 관찰할 수 있었다.

증식부 연골세포에 대해 상세히 관찰해 보면 대조군 증식부(Fig. 8b) 연골세포 세포질의 BMP-2 발현은 매우 약하여 거의 관찰되지 않았으나, 청경사물탕 투여군 증식부(Fig. 8f) 아래쪽의 성숙시기의 연골세포(별 표식 ★참조)에서 BMP-2 발현이 약하지만 대조군보다는 더 강하게 관찰되었다.

비대부 연골세포에 대해 상세히 관찰해 보면 대조군 비대부(Fig. 8c) 별 표식(★) 연골세포 세포질의 BMP-2 발현은 보통 수준으로 관찰되었으나, 청경사물탕 투여군의 비대부(Fig. 8g) 별 표식(★) 연골세포 세포질의 BMP-2 발현이 더 강하고 발현된 연골세포의 수는 더 많은 수의 세포에서 발현되었음을 관찰할 수 있었다.

골화부 연골세포의 경우는 비대부 연골세포와 유사하게 대조군 비대부(Fig. 8d) 별 표식(★) 연골세포 세포질의 BMP-2 발현보다 청경사물탕 투여군의 비대부(Fig. 8h) 별 표식(★) 연골세포 세포질의 BMP-2 발현이 더 강한 것을 볼 수 있었다.

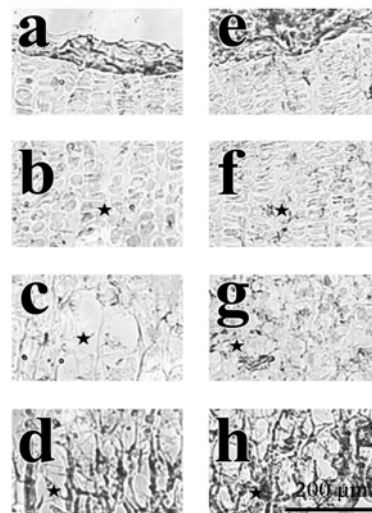


Fig. 8 Immunohistochemical localization of BMP-2 in the growth plate

Normal group was shown at the first column (a, b, c, d). The second column was *Cheunggyeongsamul-tang* (200 mg/kg) administrated group (e, f, g, h). The first row is resting zone (a, e); second row, proliferative zone (b, f); third row, hypertrophic zone (c, g); fourth row, ossification zone (d, h). The asterisks show the main observational region of immunostaining of BMP-2. Scale bar = 200 μ m.

7. 성장판 내 BMPR-1A 발현에 미치는 영향

BMPR-1A의 성장판 조직 내 발현에 대하여, 증류수를 투여한 대조군과 청경사물탕 투여군을 비교해 본 결과, 휴지부 (Fig. 9a, e), 증식부 (Fig. 9b, f), 비대부 (Fig. 9c, g), 골화부 (Fig. 9d, h)에서 서로 비슷한 정도의 발현이 관찰되어, BMPR-1A의 존재를 확인할 수 있었다.

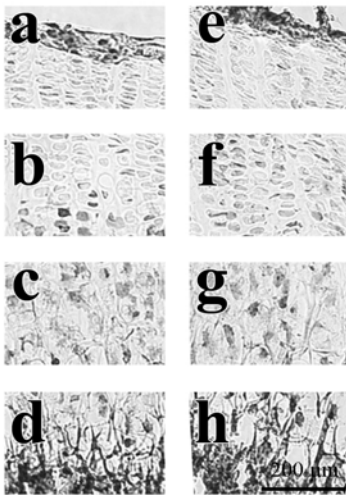


Fig. 9. Immunohistochemical localization of BMPR-1A in the growth plate

Normal group was shown at the first column (a, b, c, d). The second column was *Cheunggyeongsamul-tang* (200 mg/kg) administrated group (e, f, g, h). The first row is resting zone (a, e); second row, proliferative zone (b, f); third row, hypertrophic zone (c, g); fourth row, ossification zone (d, h). Scale bar = 200 μm.

8. 성장판 내 IHH 발현에 미치는 영향

IHH의 성장판 조직 내 발현에 대하여, 증류수를 투여한 대조군과 청경사물탕 투여군을 비교해 본 결과는 다음과 같다. 대조군과 청경사물탕 투여군 모두 휴지부(Fig. 10a, e)와 증식부(Fig. 10b, f)에선 IHH 발현이 약하게 나타났으나, 비대부(Fig. 10c, g)와 골화부(Fig. 10d, h)를 관찰한 결과, 청경사물탕 투여군에서 면역염색이 증가하여 IHH 발현이 증가하였음을 관찰할 수 있었다.

증식부 연골세포에 대해 상세히 관찰해 보면 대조군 증식부(Fig. 10b) 연골세포 세포질의 IHH 발현은 매우 약하여 거의 관찰되지 않았으나, 청경사물탕 투여군 증식부(Fig. 10f) 아래쪽의 성숙시기의 연골세포(별 표식 ★참조)에서 IHH 발현이 약하지만 대조군보다는 더 강하게 관찰되었다.

비대부 연골세포에 대해 상세히 관찰해 보면 대조군 비대부(Fig. 10c) 별 표식(★) 연골세포 세포질의 IHH 발현은 보통 수준으로 관찰되었으나, 청경사물탕 투여군의 비대부(Fig. 10g) 별 표식(★) 연골세포 세포질의 IHH 발현이 더 강하고 발현된 연골세포의 수는 더 많은 수의 세포에서 발현되었음을 관찰할 수 있었다.

골화부 연골세포의 경우는 비대부 연골세포와 유사하

게 대조군 비대부(Fig. 10d) 별 표식(★) 연골세포 세포질의 IHH 발현보다 청경사물탕 투여군의 비대부(Fig. 10h) 별 표식(★) 연골세포 세포질의 IHH 발현이 더 강한 것을 볼 수 있었다.

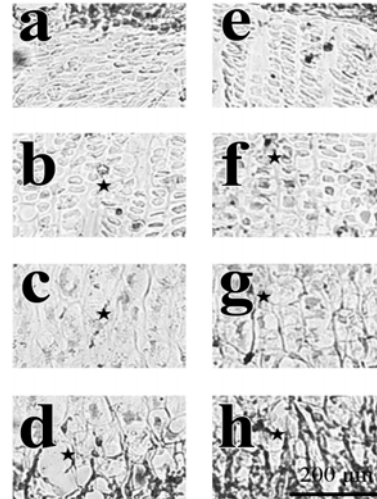


Fig. 10. Immunohistochemical localization of IHH in the growth plate

Normal group was shown at the first column (a, b, c, d). The second column was *Cheunggyeongsamul-tang* (200 mg/kg) administrated group (e, f, g, h). The first row is resting zone (a, e); second row, proliferative zone (b, f); third row, hypertrophic zone (c, g); fourth row, ossification zone (d, h). The asterisks show the main observational region of immunostaining of IHH. Scale bar = 200 μm.

9. 성장판 내 PTH-rP 발현에 미치는 영향

PTH-rP의 성장판 조직 내 발현에 대하여, 증류수를 투여한 대조군과 청경사물탕 투여군을 비교해 본 결과는 다음과 같다. 대조군과 청경사물탕 투여군 모두 휴지부 (Fig. 11a, e)와 증식부(Fig. 11b, f)에선 BMP-2 발현이 약하게 나타났으나, 비대부(Fig. 11c, g)와 골화부(Fig. 11d, h)를 관찰한 결과, 청경사물탕 투여군에서 면역염색이 증가하여 PTH-rP 발현이 증가하였음을 관찰할 수 있었다.

증식부 연골세포에 대해 상세히 관찰해 보면 대조군 증식부(Fig. 11b) 연골세포 세포질(별 표식 ★참조)의 PTH-rP 발현은 매우 약하여 거의 관찰되지 않았으나, 청경사물탕 투여군 증식부(Fig. 11f) 아래쪽의 성숙시기의 연골세포(별 표식 ★참조)에서 PTH-rP 발현이 약하지만 대조군보다는 더 강하게 관찰되었다.

비대부 연골세포에 대해 상세히 관찰해 보면 대조군 비대부(Fig. 11c) 별 표식(★) 연골세포 세포질의 PTH-rP 발현은 보통 수준으로 관찰되었으나, 청경사물탕 투여군의 비대부(Fig. 11g) 별 표식(★) 연골세포 세포질의 PTH-rP 발현이 더 강하고 발현된 연골세포의 수는 더 많은 수의 세포에서 발현되었음을 관찰할 수 있었다.

골화부 연골세포의 경우는 비대부 연골세포와 유사하게 대조군 비대부(Fig. 11d) 별 표식(★) 연골세포 세포질

의 PTH-rP 발현보다 청경사물탕 투여군의 비대부(Fig. 11h) 별 표식(★) 연골세포 세포질의 PTH-rP 발현이 더 강한 것을 볼 수 있었다.

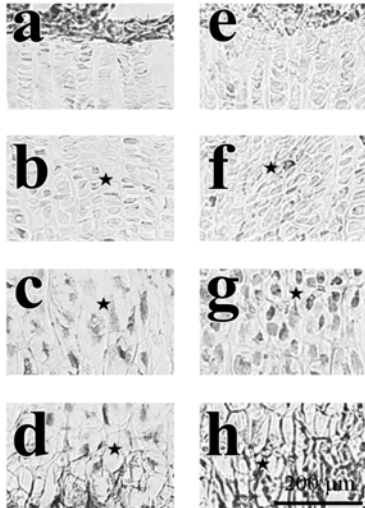


Fig. 11. Immunohistochemical localization of PTH-rP in the growth plate

Normal group was shown at the first column (a, b, c, d). The second column was *Cheunggyeongsamul-tang* (200 mg/kg) administrated group (e, f, g, h). The first row is resting zone (a, e); second row, proliferative zone (b, f); third row, hypertrophic zone (c, g); fourth row, ossification zone (d, h). The asterisks show the main observational region of immunostaining of PTH-rP. Scale bar = 200 μm.

10. 혈중 IGF-1 농도에 미치는 영향

대조군에서 1060.7 ± 117.0 ng/ml의 농도를 나타내었고, *淸經四物湯* 고농도군에서 952.0 ± 46.6 ng/ml의 농도를 나타내었고, *淸經四物湯* 저농도군에서 967.3 ± 43.9 ng/ml의 농도를 나타내었다. *淸經四物湯* 고농도 및 저농도(200 및 40 mg/kg) 투여군에서 통계적인 유의성을 관찰할 수 없었다 (Fig 12).

이는 혈중 IGF-1의 농도가 직접적인 골격계 성장과 관련성이 없다는 기존 논문과 일치하는 내용이다⁴⁾.

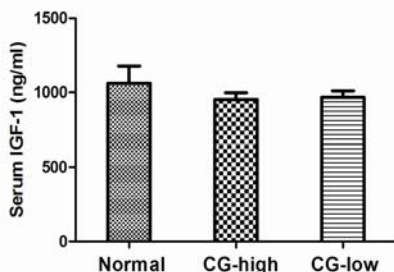


Fig. 12. Serum IGF-1 concentration in adolescent female rats

Normal : DW administrated group. CG-high : *Cheunggyeongsamul-tang* (200 mg/kg) administrated group. CG-low : *Cheunggyeongsamul-tang* (40 mg/kg) administrated group. fifteen animals were treated for each group. Values are means ± SEM. There was no statistical difference.

고 찰

신장 증가의 가장 큰 요인은 골격의 성장이다. 신체의 뼈대를 이루는 골격이 성장함에 따라 인체 다른 조직의 성장도 이루어진다. 인체의 뼈가 생성되는 메커니즘은 총 3가지가 있는데, 즉 膜內骨化(intramembranous ossification), 軟骨內骨化(endochondral ossification), 異所骨化(heterotopic ossification)가 그것이다. 특히 신장 증가에 가장 큰 영향을 주는 장골의 길이 성장은 軟骨內骨化이다⁵⁾. 軟骨內骨化는 포유류의 골격계를 발달시키는 주요한 방법 중의 하나로 장골의 형성⁶⁾은 물론 장골의 길이 성장을 담당한다⁷⁾.

장골은 먼저 그 내부에 一次 骨形成 中心(primary centre of ossification)을 형성한다. 一次 骨形成 中心에서는 연골세포(chondrocyte)의 증식이 일어나 비후화되고, 혈관과 신경이 침입하여 영양을 공급한다. 연골세포가 증식되어 연골이 형성되고 연골에 조골세포가 들어와 골화를 시작하여 연골을 경골로 교체한다. 골화가 진행됨에 따라 장골의 끝부분은 영구히 연골로 남아 관절연골을 형성하고 一次 骨形成 中心和 장골 말단 사이에 남은 연골조직에 二次 骨形成 中心이 형성되면서 장골의 길이는 지속적으로 성장한다. 이때 二次 骨形成 中心和 그 주변의 연골조직을 성장판(growth plate) 또는 골단판(epiphyseal plate)이라고 하며 이것은 청소년기에 장골의 길이 성장을 담당하다가 성인기에 들어서면 점차 완전히 골화되어 골단선(epiphyseal line)으로 흔적만 남게 된다⁸⁾. 이처럼 성장판은 청소년기 길이 성장의 가장 중요한 부분으로 성장판의 길이 증가는 곧 장골의 총 길이 증가에 큰 영향을 미친다.

IGF-1은 성장호르몬 (growth hormone)과 관련 깊은 성장인자로 성장호르몬의 자극을 받은 뇌하수체 전엽에서 분비된다. IGF-1은 특히 성장판에서의 연골세포 증식에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다⁹⁾. 또한 성장호르몬의 발현 기제에도 관여하여 성장호르몬의 발현과정을 조절하며 인체 대부분의 장소에서 세포의 분화(differentiation)와 증식(proliferation), 성숙(maturation)을 조절한다¹⁰⁾.

BMP-2는 Transforming growth factor-β (TGF-β) superfamily에 속해 있는 성장인자로서 뼈 형성에 중요한 영향을 미친다¹¹⁾. 특히 retinoid라는 연골세포 증식을 담당하는 물질을 조절하는 것으로 알려져 있으며^{12,13)} noggins라는 골형성 억제인자를 억제하여 골형성을 촉진시키기도 한다¹¹⁾.

IHH는 Hedgehog family에 속하는 단백질로서, 전비대 연골세포에서 발현된다¹⁴⁾. IHH는 성장판에서 PTH-rP를 발현시킴으로써 연골세포의 증식과 조기 분화에 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾. IHH가 없으면 성장판에서 PTH-rP가 발현되지 않는다¹⁴⁾.

PTH-rP는 부갑상선 호르몬 family에 속하는 단백질의 일종으로¹⁶⁾, 대개 골격구성요소 말단에서 연골주위세포에 의해 발현되는데, 세포의 비대분화를 막아 증식 상태에 오래 머물게 한다¹⁴⁾.

IHH와 PTH-rP 사이의 음성 되먹음 기전이 증식부의 길이를 조절함으로써, 결과적으로 골성장 길이를 증가시킨다. BMP는 IHH 발현을 증가시킴으로써 IHH/PTH-rP 경로에 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁴⁾.

본 실험에서 체중변화 수치를 살펴보면, 대조군과 淸經四物湯 고농도군 및 저농도군 사이에 통계적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 1). 이것으로 보아 淸經四物湯은 골길이 성장에 유효하면서도 체중증가를 가져오지 않는 시료로 생각된다.

장골 길이에서는 대조군과 비교하였을 때 淸經四物湯 투여군에서 장골길이의 성장이 뚜렷이 증가되는 양상을 보였다. 고농도군 및 저농도군 모두에서 통계적으로 유의한 ($p < 0.001$, Fig. 3) 골성장 촉진효과가 나타났는데, 그 중에서도 고농도군이 더욱 우수하게 성장한 것으로 나타나, 淸經四物湯이 농도의존적인 장골길이 성장 효과를 가지는 것으로 사료된다.

성장판의 길이는 淸經四物湯 투여군에서 대조군에 비해 증가되는 경향을 보였다. 역시 고농도군 및 저농도군 모두에서 통계적으로 유의한($p < 0.01$, Fig. 5) 성장판 길이 촉진효과가 나타났는데, 그 중에서도 고농도군이 더욱 우수하게 성장한 것으로 나타나, 淸經四物湯이 농도의존적인 성장판 길이 성장 효과를 가지는 것으로 보인다.

성장판관련인자들의 면역조직화학염색 결과를 보면, 성장판의 비대부와 골화부에서 대조군에 비해 청경사물탕 투여군의 IGF-1과 BMP-2의 발현이 증가하였으며 이를 통해 상기의 성장인자가 성장판에서 국소적으로 증가하여 연골세포의 증식을 활발하게 하였음을 알 수 있다. 청경사물탕 투여군에서 IGF-1 receptor 및 BMP-1A의 발현이 발견되었고, IGF-1과 BMP-2의 양이 유의적으로 증가하였으므로, IGF-1 receptor 및 BMP-1A의 작용도 증가하였을 것으로 생각된다. 또한 IHH와 PTH-rP의 발현이 다소 증가된 것으로 보아 성장이 활발하게 이루어진 것으로 짐작할 수 있다.

우리나라 청소년의 성장 양상은 식생활의 변화 및 사회경제적 여건의 변화로 점차 서구화되고 있다. 이러한 변화는 급속한 사회경제적 변화를 겪은 서구 여러 나라에서도 이미 보고된 바 있는데, 이처럼 발육속도가 세대가 바뀌에 따라 촉진되는 현상을 발육가속 현상(acceleration phenomenon)이라 한다^{17,18)}.

청소년기의 성장은 유전적 요인, 영양 상태, 질병, 지리적 위치, 수면 시간, 스트레스 등 다양한 인자들이 복합적으로 영향을 끼치며, 청소년기의 이차 성장을 유발하는 체내 호르몬의 변화도 신체 성장에 중요한 영향을 미친다. 이차 성장 중 초경은 성적 발달의 시작시점을 가지적으로 보여주는 현상으로서 초경 연령에 따라 신체 성장 속도가 변화될 수 있다고 여겨진다¹⁹⁾.

일반적으로 여아의 경우, 11~12세 정도를 전후로 해서 유방의 발육이 시작되고, 사춘기에 들어서는데, 이때부터 2년가량 급성장한 뒤 초경을 하고, 초경 후에는 성장 속도가 둔화되기 때문이다²⁰⁾.

하지만 성 조숙증의 경우 이런 일반적인 경우보다 사춘기 증상이 2~3년 이상 빨리 나타난다. 즉 성조숙증이란 여아는 8세 이전, 남아는 9세 이전에 2차 성징이 나타나는 것으로, 여아에서 많이 관찰된다. 성 조숙증이 오면, 뼈의 나이가 빨리 들고 초경도 빨라진다. 그래서 성장판이 일찍 닫혀 최종 키가 평균보다 작은 것이 문제가 된다. 또한 초경 연령이 빨라지면서 일반 여성에 비해 성호르몬에 노출되는 시간이 길어져 유방암에 걸릴 확률이 50%나 높아진다고 한다^{21,22)}.

淸經四物湯을 성장 촉진에 사용하는 현대적 의미에 대하여, 많은 임상가들은 淸經四物湯이 단순히 초경 시기를 늦추는 것이 아니라, 성장을 일찍 끝나게 하는 성 조숙증을 막아주어 성장에 유효한 효과를 발휘하는 것으로 해석하고 있다.

작은 키가 질병은 아니지만, 지나치게 작은 키는 큰 키를 선호하는 사회에서 열등감이나 스트레스를 초래하기 쉽다. 남성보다 외모에 민감한 여성들의 경우 이는 더 큰 문제가 될 수 있다. 또한 성 조숙은 이른 초경으로 인한 작은 키 뿐만 아니라 유방암과 같은 질병 발생의 위험도 높게 만드는 문제점을 가지고 있다. 그러므로 성 조숙을 막아준다는 취지의 한약을 적절히 투여함으로써 신장의 성장도 돕고 성호르몬의 조기 노출로 인한 각종 부작용을 줄이는 것이 좋은 치료방법이 될 것으로 사료된다.

이번 연구에서는 골성장 효과에 초점을 맞추어, 실제로 흰쥐에 있어 성 성숙이 지연되었다는 증거를 찾지는 못하였다. 성 성숙과 관련된 성호르몬 측정 및 자궁 크기 측정 등 추가 실험을 통해, 淸經四物湯의 성장 기전이 단순히 補血之劑로 인한 성장인지 혹은 많은 임상가들의 淸經四物湯의 方義에 대한 현대적 해석에서 나타난 바와 같이 성 성숙의 지연으로 인한 성장인지를 밝혀내는 것은 향후의 과제가 될 것이라 생각된다.

결론

淸經四物湯 추출물은 성장기 흰쥐의 장골길이 성장에 유의적인 영향을 미쳤다. 장골 성장 길이와 총 성장판 높이를 유의적으로 증가시켰고 성장판 내 IGF-1과 BMP-2, IHH와 PTH-rP의 발현을 향상시켰다.

참고문헌

1. 허준. 동의보감. 서울 : 법민문화사. 2005 : 640-1.
2. Hansson LI, Menander-Sellman K, Stenstrom A, Thorngren KG. Rate of normal longitudinal bone growth in the rat. *Calcif Tissue Res.* 1972 ; 10 : 238-51.
3. De Luca F, Barnes KM, Uyeda JA, De-Levi S, Abad V, Palese T, Mericq V, Baron J. Regulation of

- growth plate chondrogenesis by bone morphogenetic protein-2. *Endocrinology*. 2001 ; 142(1) : 430-6.
4. Derek Le R, Carolyn B, Shoshana Y, Jun-Li L and Andrew B. 2001. The somatomedin hypothesis. *Endocr Rev*. 2001 ; 22(1) : 53-74.
 5. Forriol F, Shapiro F. Bone development: interaction of molecular components and biophysical forces. *Clin Orthop Relat Res*. 2005 : Mar(432) : 14-33.
 6. Frank H Netter, *Musculoskeletal system: anatomy, physiology, and metabolic disorders*. New Jersey : Ciba-Geigy Corporation. 1987 : 130.
 7. Brighton CT, Yoichi S, and Robert MH. Cytoplasmic structures of epiphyseal plate chondrocytes: quantitative evaluation using electron micrographs of rat costochondral junctions with specific reference to the fate of hypertrophic cells. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 1973 ; 55-A : 771-84.
 8. Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008 ; 40(1) : 46-62.
 9. Gerard JT, Sandra RG. *Principles of anatomy & physiology* (10th edition). USA : Wiley. 2003 : 174.
 10. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Vol. II (7th edition). New York : McGraw-Hill. 1995 : 3023-44.
 11. Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, LaPan P, Luxenberg DP, McQuaid D, Moutsatsos IK, Nove J, Wozney JM. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Nat Acad Sci*. 1990 ; 87 : 2220-4.
 12. Hallahan AR, Pritchard JI, Chandraratna RAS, Ellenbogen RG, Geyer JR, Overland RP, Strand AD, Tapscott SJ, Olson JM. BMP-2 mediates retinoid-induced apoptosis in medulloblastoma cells through a paracrine effect. *Nature Med*. 2003 ; 9 : 1033-8.
 13. Cancedda R, Descalzi Cancedda F, Castagnola P. Chondrocyte differentiation. *Int Rev Cytol*. 1995 ; 159 : 265-358.
 14. Byeong S Yoon and Karen M Lyons. Multiple Functions of BMPs in Chondrogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2004 ; 93 : 93-103.
 15. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*. 2003 ; 423(6937) : 332-6.
 16. Henry JG, Mitnick M, Dann PR, Stewart AF. Parathyroid hormone-related protein-(1-36) is biologically active when administered subcutaneously to humans. *J Clin Endocr Metab*. 1997 ; 82 : 900-6.
 17. 구광수. 발육가속현상에 관한 연구. 창원대학교 논문집. 1990 ; 12(2) : 299-311.
 18. 김창수, 남정모, 김덕희, 김현창, 이강희, 지선하, 서일. 초경시기와 아동기 및 청소년기의 신체성장의 변화 -강화연구-. 대한예방의학회지. 2000 ; 33(4) : 521-9.
 19. 김준섭, 권오구, 박진석, 오종수, 박정현, 박제식, 안세한, 이용환, 서정호, 신태섭, 최영배, 김덕수, 이관, 박수경. 경주지역 여고생의 초경과 체성장간의 관계. 동국의학. 2002 ; 9(1) : 139-48.
 20. Styne DM and Grumbach MM. Puberty in the male and female: Its physiology & disorders, Yen's Reproductive Endocrinology edition 1. Philadelphia : Saunders Co. 1978.
 21. 김호성. 성조숙증의 진단과 최신 치료 경향. 대한내분비학회지. 2008 ; 23(3) : 165-73.
 22. 서병규. 성조숙증의 진단과 치료. 소아과. 2001 ; 44(6) : 607 : 13.