

# 陰谷(KI10) 산수유 약침이 난소적출 생쥐의 골다공증에 미치는 영향

김광성<sup>1</sup>, 이병렬<sup>2</sup>, 양기영<sup>2</sup>, 안택원<sup>3</sup>, 임윤경<sup>1</sup>

대전대학교 한의과대학 <sup>1</sup>경락경혈학교실, <sup>3</sup>사상체질의학교실, <sup>2</sup>부산대학교 한의학전문대학원 임상의학부

## Effects of the Herbal-Acupuncture with *Corni Fructus* Extract at Eumgok(KI10) on Osteoporosis in Ovariectomized Mice

Kwang-Sung Kim<sup>1</sup>, Byungryul Lee<sup>2</sup>, GiYoung Yang<sup>2</sup>, Taek-Won An<sup>3</sup>, Yun-Kyoung Yim<sup>1</sup>  
Dept. of <sup>1</sup>Meridian & Acupoint, <sup>3</sup>Sasang Constitutional Medicine, College of Oriental medicine, Daejeon University  
<sup>2</sup>Division of Clinical Medicine, School of Korean Medicine, Pusan National University

### Abstract

**Objective & Method:** The purpose of this study is to investigate the effects of herbal-acupuncture with *Corni Fructus* extract (CF-HA) at Eumgok(KI10) on osteoporosis in ovariectomized (OVX) ddy mice. I carried out several experimental items to analyze the changes in body weight, uterine weight, uterus index, tibial length, the ash bone weight, tibial BMD, the levels of serum ALP, osteocalcin, Ca, P and the levels of tibial Ca, P, Ca/P ratio, and we performed histological and histomorphological analysis as well.

**Result:** 1. CF-HA at Eumgok(KI10) significantly did not increase the level of bone mineral density in ovariectomized mice. 2. CF-HA at Eumgok(KI10) significantly decreased the level of serum phosphorus in ovariectomized mice and significantly increased the level of serum calcium in ovariectomized mice. 3. CF-HA at Eumgok(KI10) significantly increased the levels of tibial calcium and phosphorus in ovariectomized mice. 4. CF-HA at Eumgok(KI10) significantly decreased the number of tibial osteoclast like cell in ovariectomized mice. 5. In the histomorphometric analysis of tibia, GPL(growth plate length) was significantly decreased by CF-HA at Eumgok(KI10) in ovariectomized mice.

**Conclusions:** These results suggest that CF-HA at Eumgok(KI10) may have useful therapy effects on osteoporosis in ovariectomized mice.

**key words:** *Corni Fructus*, Herbal-Acupuncture, Eumgok(KI10), Osteoporosis, Ovariectomy

## I. 서 론

골다공증은 가장 흔한 대사성 골질환으로 골절의 위험이 높은 골격계 질환이다<sup>1)</sup>. 고령인 경우 여성의 1/3, 남성의 1/6에서 대퇴골 골절이 발생하며, 아주 많은 사회적 비용

이 들기 때문에 골다공증 치료가 중요하다<sup>2)</sup>. 세계보건기구(WHO)에서는 골다공증을 골밀도의 측정치가 젊은 성인군 평균치의 (T score) 2.5 표준편차 이하의 경우라고 정의하였다<sup>3)</sup>.

골다공증은 크게 원발성과 속발성으로 구분되고, 원발성은 다시 I형과 II형으로 나뉘는데, 저자는 폐경기 여성에게 다발하는 I형 골다공증에 대한 한의학적 치료에 대해 연

· 교신저자: 임윤경. 대전광역시 동구 용운동 96-3 대전대학교 한의과대학 경락경혈학교실. Tel. 042-280-2610, Fax. 042-280-2611, E-mail: docwindy@dj.ac.kr  
· 투고 : 2010/03/04 심사 : 2010/03/19 채택 : 2010/03/23

구하고자 하였다.

한의학적으로는 骨痿, 骨痺, 骨枯라는 병명이 골다공증과 가장 유사한 것으로 보인다<sup>4)</sup>. 골은 腎이 주관하며 골다공증의 한의학적 병리기전은 腎氣熱과 腎氣虛損에 의한 골수의 부족이라고 볼 수 있다.

골다공증의 한의학적 치료를 위한 약물요법으로는 六味地黄湯<sup>5)</sup>, 靑娥地黄湯<sup>6)</sup> 등이 연구되었고, 침구치료에서는 足太陽膀胱經, 足少陰腎經, 足少陽膽經 등의 경락과 懸鍾, 大杼, 上關, 腎俞 등의 경혈이 문헌상에서 다용되었다고 보고되었다<sup>7)</sup>.

산수유는 산수유과(층층나무과: Cornaceae)에 속한 落葉小喬木인 산수유나무 *Cornus officinalis* SIEB. et. ZUCC.의 성숙한 果實을 건조한 것이다. 性은 微溫無毒하고, 味는 酸澁하다. 肝腎으로 入하며, 補益肝腎 澁精固脫의 효능이 있다<sup>8)</sup>. 산수유의 추출물을 이용한 항균<sup>9)</sup>, 항산화<sup>10)</sup> 등에 관한 연구들이 있었으며, 산수유 구강투여를 통한 난소적출로 유발된 흰쥐의 골다공증에 미치는 영향에 관한 연구<sup>11)</sup>도 있었다. 산수유는 骨을 주관하는 腎을 補하며, 精을 수렴시키는 효과가 있으므로 골다공증을 야기하는 골손실을 억제하는 효과가 있을 것으로 사료되었다.

약침요법은 침구요법과 약물요법을 결합하여 경락론과 기미론을 모두 이용하는 신침요법의 일종이다<sup>12)</sup>. 골다공증에 대한 약침 연구로는 골쇄보<sup>13)</sup>, 음양곽<sup>14)</sup>, 향부자<sup>15)</sup> 등이 있었다. 산수유 약침이 골다공증에 미치는 영향에 관한 연구는 찾아 볼 수 없었다.

이에 著者は 난소적출로 골다공증이 유도된 생쥐에 足少陰腎經의 合水穴인 陰谷을

선택하여 산수유 약침을 시술한 후 골다공증에 미치는 영향을 관찰한 바, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험

### 1. 재료

#### 1) 동물

4주령에 난소를 적출한 7주령 암컷 ddy 생쥐(체중  $22 \pm 5$  g)를 (주)중앙실험동물(경기도, 한국)로부터 공급받아, 실험당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료)와 물을 충분히 공급하고, 실온( $22 \pm 2$  °C)과 습도(50~60%)를 유지하여 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 본 실험은 대전대학교 동물실험윤리규정을 준수하여 시행하였다

#### 2) 시약 및 기기

##### (1) 시약

Table 1. Reagents

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

##### (2) 기기

**Table 2. Instruments**

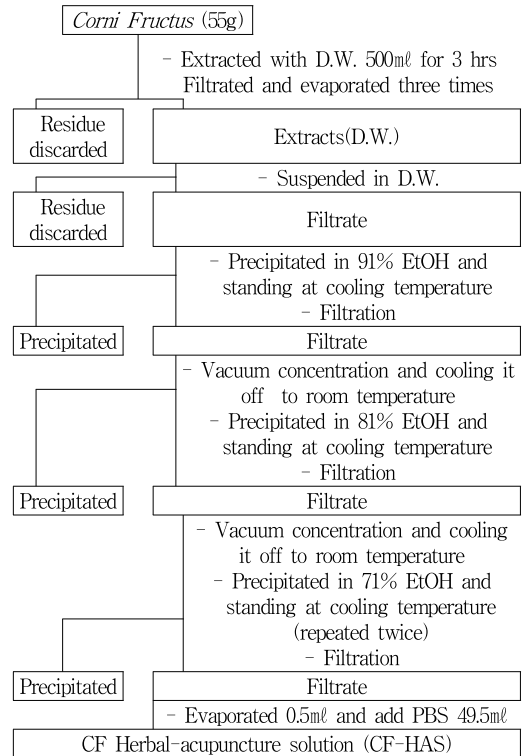
기 기 명	제조사	제조국
Rotary evaporator	Eyela	
Camera(DXM 1200F) ECLIPSE E600 microscopy	Nikon	Japan
Syringe Centrifuge Ice maker Furnace	Korea vaccine Co. Hanil Daewoong	Korea
ELISA reader	TECAN	Canada
Bone densitometer (PIXImus)	GE Lunar Co.	USA

## 2. 방법

### 1) 약침액의 제조

분쇄기를 이용해서 산수유 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 감압농축 하였다. 농축액에 91% 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 81% ethyl alcohol 30 ml를 가하여 잠시 교반 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 여과액에 71% ethyl alcohol 30 ml를 가하고 교반한 후 방치하였다가 다시 여과하는 조작을 2회 반복하였다. 여과액에서 ethyl alcohol 성분을 rotary evaporator로 감압 제거하고, 남은 농축액이 20 ml가 되게 하였다. 산수유 55 g에 대한 약침액을 감압농축하여 분말은 4.25 g을 얻었다(수율 7.72%). 1N NaOH를 이용하여 농축액을 pH 6.8이 되도록 조절하

고, 4 °C에서 12시간 방치한 후, 침전물을 제거하기 위해 syringe filter를 실시하였다. 여과된 농축액에 PBS를 첨가하여 1%로 희석하여 약침액으로 사용하였다(Scheme 1).



**Scheme 1. Manufacturing procedure of CF-HA Solution.**

### 2) 세포독성 측정

정상 생쥐의 골세포  $1 \times 10^5$  cell/well에 5%, 1%, 0.5%의 산수유 약침액을 처리한 후 MTT assay를 이용하여, 세포 생존률을 측정하였다.

#### (1) Osteoblast cell 분리 및 배양

정상 생쥐의 경골과 대퇴골을 적출한다. 차가운 PBS에 담가 근육을 제거하고, 깨끗한 PBS를 syringe에 넣어 골 내부로 침투

시켜, 골세포들을 1200 rpm에 5분간 원심 분리한다. 상층액은 버리고, 침전된 골세포들은 MSC osteogenic singleQuotes를 첨가한 differentiation Basal medium(Cat No. PT-3924, Lonza, USA)을 이용하여 3번 세척한다. 준비된 세포는 7일간 세포 배양을 실시하여 osteoblast cell의 분화를 유도한다.

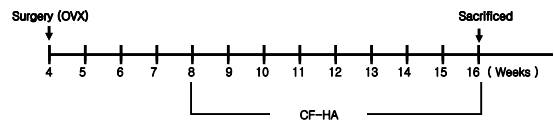
### (2) MTT assay

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

### 3) Osteoporotic mouse model

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

난소적출 수술은, 동물을 에테르로 마취시킨 다음 클리퍼로 등의 털을 깎고, 에탄올 소독으로 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 회복시킨다.



Scheme 2. Osteoporotic mouse experiment period

### 4) 취혈

骨度分寸法에 의거하여 생쥐의 뒷다리 무릎의 뒤편쪽 면의 오금 주름에서 semimembranous muscle의 tendon 바로 가쪽에서 인체의 陰谷(Eumgok; KI10)과 상응하는 부위를 取하였다.

### 5) 실험군 분류 및 처치

실험군은 생쥐 9마리씩을 한 군으로 하여 정상군(normal), 위수술군(sham-OVX), 대조군(control), H.G.군(hand grasping), N.P.군(needle prick), saline군(saline injection), 산수유약침군(CF-HA)의 7군으로 나누었다.

정상군(normal)은 아무런 처치도 하지 않았다. 위수술군(sham-OVX)은 복부를 절개한 후 난소를 적출하지 않고 다시 봉합한

뒤, 이후 아무런 처치도 하지 않았다. H.G. 군은 난소적출 후, 약침 처치 시와 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 陰谷(KI10) 상응부위에 주입하였다. N.P.군은 난소적출 후, 陰谷(KI10) 상응부위에 26 gauge 주사기를 0.5 cm 정도 깊이로 자입하고 즉시 제거하였다. 산수유약침군(CF-HA)은 난소적출 후, 陰谷(KI10) 상응부위에 1%의 산수유약침액(CF-HAS) 0.2 ml를 주입하였다. N.P. 자극, saline 주입, 산수유약침 시술은 실험동물의 뒷다리에서 陰谷(KI10) 상응부위를 매 시술시마다 좌우 교대로 취하여 시술하였다.

## 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 자궁 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 탄화시킨 뒤 경골 회분 무게를 측정하였다. 탄화된 골을 HCl 500 μl에 완전히 용해시키고, 용해된 탄화 골 200 μl에 증류수를 10 ml 첨가하여 희석한 다음, 탄화 골의 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 absorptiometry)의 방법으로 골밀도(bone mineral density, BMD)를 측정하였다.

### (5) 혈청 분석

실험 종료 후, ethyl ether를 이용하여 실험동물을 마취하고, 심장채혈법으로 혈액을 채취하였다. 채혈한 혈액에서 혈장을 분리하여, (주)이원 임상검사센터(대전, Korea)에 의뢰하여 혈청 ALP(alkaline phosphatase), 칼슘(calcium)의 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 계수한다. 계수한 골세포를  $2 \times 10^6$  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 분석

실험 종료 후, 각 군의 실험동물의 경골을 절취하여, 주변의 근육조직을 제거한 다음, 10%의 formalin에 고정하고 paraffin에 얇게 절편하였다. 절편한 조직을 (주)바이오톡스텍(오창, Korea)에 의뢰하여 미세박편 절단기를 이용하여 5  $\mu$ 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, Nikon, Japan)를 이용하여 사진을 촬영하고, ACT-1 program을 이용하여 분석하였다. TBV(trabecular bone volume)는 다음 수식을 이용하여 계산하였으며, TBT(trabecular bone thickness)와 GPL(growth plate length)은 자동 조직분석 프로그램 (I-solution)을 이용하여 측정하였다.

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

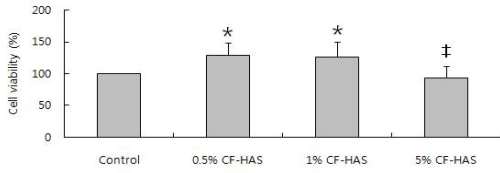
#### 7) 통계분석

실험 결과는 각 실험군에서 얻은 데이터의 평균과 표준편차로 나타내었다. 데이터 분석 결과, 위수술군(sham-OVX)은 정상군과 유의한 차이를 나타내지 않았고, H.G.군(hand grasping)은 대조군(control)과 유의한 차이를 나타내지 않았다. 따라서 본 논문의 실험성적에서는 위수술군과 H.G.군을 제외하고 통계분석을 하였다. 정상군과 대조군의 평균비교에는 SPSS(14.0 KO) 통계프로그램의 Wilcoxon rank sum test를 이용하였으며, 대조군, N.P.군, saline군, CF-HA군간의 비교는 Kruskal-Wallis 검정(SPSS 12.0 KO for windows)을 시행한 후 유의확률  $p < 0.05$  일 경우에 한하여 Wilcoxon rank sum test를 시행하였다. 실험군 간 유의확률  $p < 0.05$  일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

### III. 성 적

#### 1. 약침액의 세포 독성

정상 생쥐로부터 얻은 골세포 중 조골세포만을 취하여 산수유 약침액을 여러 가지 농도로 처리한 후 세포생존율을 확인하였다. 5% 산수유 약침액(CF-HAS)을 처리한 경우 조골세포의 생존율이 대조군(control)에 비하여 약간 감소하였고, 1%와 0.5% 산수유 약침액(CF-HAS)을 처리한 경우 조골세포의 생존율이 대조군(control)에 비하여 약간 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 1).



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

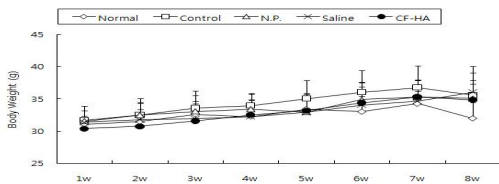
Bone marrow cells from normal ddy female mice were prepared and cultured with various concentration of CF-HAS. The cell survival rates were measured by MTT assay. Values represent the means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments.

\* :  $p < 0.05$  compared to control group by Kruskal-Wallis test.  
‡ :  $p < 0.05$  compared to control group by Kruskal-Wallis test.

## 2. 골다공증 평가

### 1) 체중 변화

실험동물의 몸무게를 주 1회 측정하였다. 정상군(normal)에 비하여 대조군(control)에서 몸무게가 전반적으로 더 무거웠으며, 산수유약침군(CF-HA)에서는 대조군(control)에 비하여 몸무게가 가벼웠다(Fig. 2).



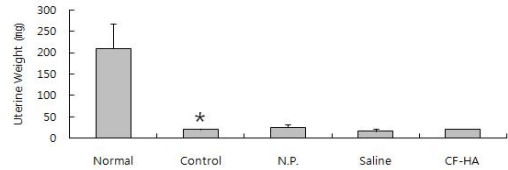
**Fig. 2. Effect of CF-HA on body weight of ovariectomized mice**

All experimental animals except those in the normal group underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the ovariectomized mice were randomly allocated to each experimental groups and treated as described in the materials and methods. All animals were weighted weekly during the experimental period. Values represent the mean  $\pm$  SD (n=9).

### 2) 자궁 무게

실험 종료 후, 실험동물의 자궁을 적출하여 무게를 측정하였다. 정상군(normal)에 비

하여 대조군(control)에서 자궁 무게가 유의하게 감소하였다. N.P.군, saline군 및 산수유 약침군(CF-HA)에서는 대조군에 비하여 자궁무게에 유의한 차이가 없었다(Fig. 3).



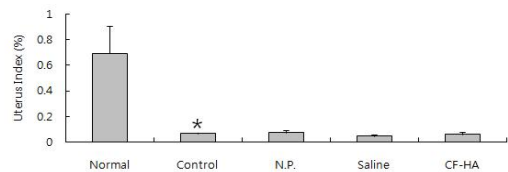
**Fig. 3. Effect of CF-HA on the uterine weight of ovariectomized mice**

All experimental animals except those in the normal group underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the ovariectomized mice were randomly allocated to each experimental groups and treated as described in the materials and methods. Uteri were weighed after the mice were sacrificed. Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n=9).

\*:  $p < 0.05$  compared to normal group by Wilcoxon rank sum test.

### 3) 자궁비중

실험동물의 몸무게에 대한 자궁 무게의 비율을 계산하였다. 정상군(normal)에 비하여 대조군(control)에서 자궁 비중이 유의하게 감소하였다. N.P.군, saline군 및 산수유 약침군(CF-HA)에서는 대조군에 비하여 자궁 비중에 유의한 차이가 없었다(Fig. 4).



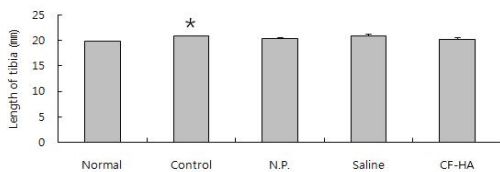
**Fig. 4. Effect of CF-HA on the uterus index in ovariectomized mice**

All experimental animals except those in the normal group underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the ovariectomized mice were randomly allocated to each experimental groups and treated as described in the materials and methods. Uteri were weighed after the mice were sacrificed. Uterus index was represented as uterine weight divided by body weight. Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n=9).

\* :  $p < 0.05$  compared to normal group by Wilcoxon rank sum test.

#### 4) 경골 길이

실험 종료 후, 실험동물의 경골을 적출하여 길이를 측정하였다. 정상군(normal)에 비하여 대조군(control)에서 경골 길이가 유의하게 증가하였다. N.P.군 및 산수유 약침군(CF-HA)에서 대조군(control)에 비하여 경골 길이가 약간 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 5).



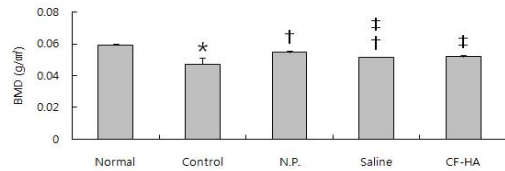
**Fig. 5. Effect of CF-HA on the tibial length in ovariectomized mice**

All experimental animals except those in the normal group underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the ovariectomized mice were randomly allocated to each experimental groups and treated as described in the materials and methods. The length of tibia was measured after the mice were sacrificed. Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n=9).

\* : p<0.05 compared to normal group by Wilcoxon rank sum test.

#### 5) 골밀도

실험 종료 후, 동물의 경골을 적출하여, 골밀도를 측정하였다. 대조군(control)에서 정상군(normal)에 비하여 골밀도가 유의하게 감소하였다. N.P.군에서 대조군(control)에 비하여 골밀도가 유의하게 증가하였으며, 산수유 약침군(CF-HA)에서도 대조군(control)에 비하여 골밀도가 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 6).



**Fig. 6. Effect of CF-HA on tibial BMD in ovariectomized mice**

All experimental animals except those in the normal group underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the ovariectomized mice were randomly allocated to each experimental groups and treated as described in the materials and methods. After the mice were sacrificed, bone mineral density (BMD) of mouse tibia was measured by DEXA (dual-energy x-ray absorptiometry) using PIXImus (Lunar meison, WI). Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n=3).

\* : p<0.05 compared to normal group by Wilcoxon rank sum test.

† : p<0.05 compared to control group by Kruskal-Wallis test.

‡ : p<0.05 compared to N.P. group by Kruskal-Wallis test.

### 3. 혈청 분석

각 실험동물의 혈청으로부터 AST, ALT, ALP(alkaline phosphatase), creatinine, 인(phosphorus), 칼슘(calcium) 및 osteocalcin의 농도를 측정하였다(Table 1).

**Table 3. Effect of CF-HA on various components in serum of ovariectomized mice.**

Parameter	Normal	Control	N.P.	Saline	CF-HR
AST (IU/L)	346.33 $\pm$ 89.81	441 $\pm$ 62.39	275.33 $\pm$ 124.07	413.67 $\pm$ 69.0	203 $\pm$ 37.723
ALT (IU/L)	64 $\pm$ 12.36	77 $\pm$ 2.16	67.25 $\pm$ 22.94	63.75 $\pm$ 10.658	54.667 $\pm$ 6.028
ALP (IU/L)	187 $\pm$ 91.717	338.5 $\pm$ 57.651	317.5 $\pm$ 179.199	261.75 $\pm$ 153.048	299.75 $\pm$ 124.751
Creatinine (mg/dl)	0.75 $\pm$ 0.063	1.06 $\pm$ 0.167	0.615 $\pm$ 0.055	0.985 $\pm$ 0.033	0.618 $\pm$ 0.04
Phosphorus (mg/dl)	21.89 $\pm$ 2.106	24.248 $\pm$ 6.104	13.995 $\pm$ 2.448	20.403 $\pm$ 0.61	13.628 $\pm$ 1.081
Calcium (mg/dl)	7.35 $\pm$ 0.208	7.05 $\pm$ 0.835	7.9 $\pm$ 0.716	6.55 $\pm$ 0.719	7.75 $\pm$ 0.465
Osteocalcin (O.D.)	0.420 $\pm$ 0.12	0.586 $\pm$ 0.065	0.508 $\pm$ 0.06	0.646 $\pm$ 0.048	0.585 $\pm$ 0.146

All experimental animals except those in the normal group underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the ovariectomized mice were randomly allocated to each experimental groups and treated as described in the materials and methods. Blood samples were taken from mice heart and the levels of various components in serum were analysed. Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n=5).



### 1) AST

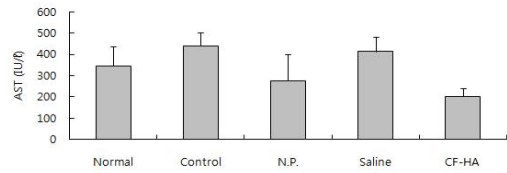
각 실험동물에서 취한 혈청에서 AST의 농도를 측정하였다. 대조군(control)에서 정상군(normal)에 비하여 혈청 AST의 농도가 증가하였으나 유의성은 없었다. 산수유 약침군(CF-HA)에서 대조군(control)군에 비하여 혈청 AST의 농도가 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 7).

### 2) ALT

각 실험동물에서 취한 혈청에서 ALT의 농도를 측정하였다. 대조군(control)에서 정상군(normal)에 비하여 혈청 ALT의 농도가 증가하였으며, 산수유 약침군(CF-HA)에서 대조군(control)에 비하여 혈청 ALT의 농도가 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 8).

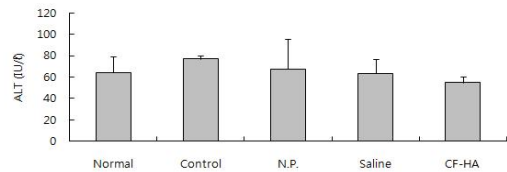
### 3) ALP(alkaline phosphatase)

각 실험동물에서 취한 혈청에서 ALP(alkaline phosphatase)의 농도를 측정하였다. 정상군(normal)에 비하여 대조군(control)에서 혈청 ALP(alkaline phosphatase)가 증가하였으나, 유의성은 없었다. 산수유 약침군(CF-HA)에서 대조군(control)에 비하여 혈청 ALP(alkaline phosphatase)가 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 9).



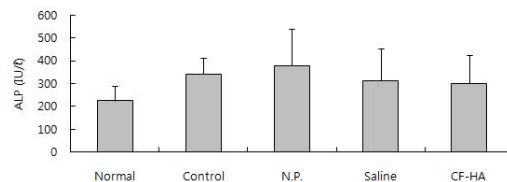
**Fig. 7. Effect of CF-HA on serum AST level in ovariectomized mice**

All experimental animals except those in the normal group underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the ovariectomized mice were randomly allocated to each experimental groups and treated as described in the materials and methods. Blood samples were taken from mice heart and serum AST level was analysed. Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n=5).



**Fig. 8. Effect of CF-HA on serum ALT level in ovariectomized mice**

All experimental animals except those in the normal group underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the ovariectomized mice were randomly allocated to each experimental groups and treated as described in the materials and methods. Blood samples were taken from mice heart and serum ALT level was analysed. Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n=5).

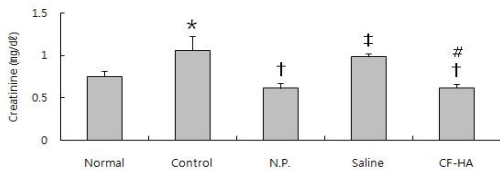


**Fig. 9. Effect of CF-HA on serum ALP level in ovariectomized mice**

All experimental animals except those in the normal group underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the ovariectomized mice were randomly allocated to each experimental groups and treated as described in the materials and methods. Blood samples were taken from mice heart and serum ALP level was analysed. Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n=5).

#### 4) Creatinine

각 실험동물에서 취한 혈청에서 creatinine의 농도를 측정하였다. 정상군(normal)에 비하여 대조군(control)에서 creatinine의 농도가 증가하였으나 유의성은 없었다. 산수유 약침군(CF-HA)에서 대조군(control) 및 saline군에 비하여 creatinine의 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 10).



**Fig. 10. Effect of CF-HA on serum creatinine level in ovariectomized mice**

All experimental animals except those in the normal group underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the ovariectomized mice were randomly allocated to each experimental groups and treated as described in the materials and methods. Blood samples were taken from mice heart and serum creatinine level was analysed. Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n=5).

\* : p<0.05 compared to normal group by Wilcoxon rank sum test.

† : p<0.05 compared to control group by Kruskal-Wallis test.

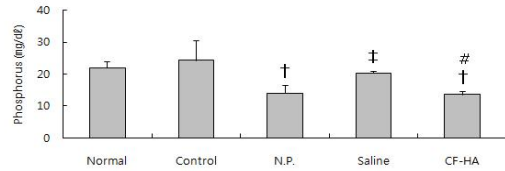
‡ : p<0.05 compared to N.P. group by Kruskal-Wallis test.

# : p<0.05 compared to saline group by Kruskal-Wallis test.

#### 5) Phosphorus

각 실험동물에서 취한 혈청에서 인(phosphorus)의 농도를 측정하였다. 정상군(normal)에 비하여 대조군(control)에서 인(phosphorus)의 농도가 증가하였으나 유의성은 없었다. N.P.군 및 산수유 약침군(CF-HA)에서 대조군(control)에 비하여 인(phosphorus)의 농도가 유의하게 감소하였다

(Fig. 11).



**Fig. 11. Effect of CF-HA on serum P level in ovariectomized mice**

All experimental animals except those in the normal group underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the ovariectomized mice were randomly allocated to each experimental groups and treated as described in the materials and methods. 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).

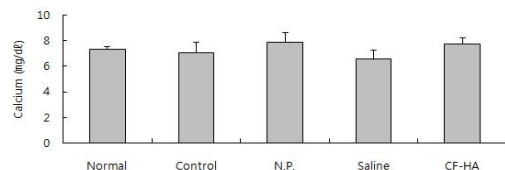
† : p<0.05 compared to control group by Kruskal-Wallis test.

‡ : p<0.05 compared to N.P. group by Kruskal-Wallis test.

# : p<0.05 compared to saline group by Kruskal-Wallis test.

#### 6) Calcium

혈청 칼슘(calcium)의 농도를 측정하였다. 각 실험군의 혈청 칼슘(calcium) 농도는 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 12).

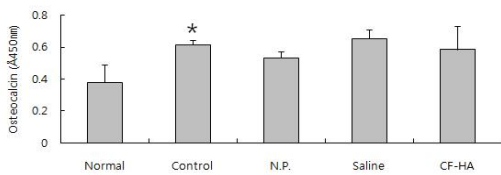


**Fig. 12. Effect of CF-HA on serum Ca level in ovariectomized mice**

All experimental animals except those in the normal group underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the ovariectomized mice were randomly allocated to each experimental groups and treated as described in the materials and methods. 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).

### 7) Osteocalcin

혈청 osteocalcin level을 ELISA를 이용하여 측정하였다. 정상군(normal)에 비하여 대조군(control)에서 osteocalcin의 농도가 유의하게 증가하였다. 산수유 약침군(CF-HA)에서는 대조군(control)에 비하여 유의한 차이가 없었다(Fig. 13).



**Fig. 13. Effect of CF-HA on serum osteocalcin level in ovariectomized mice**

All experimental animals except those in the normal group underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the ovariectomized mice were randomly allocated to each experimental groups and treated as described in the materials and methods. Blood samples were taken from mice heart and serum osteocalcin level was analysed. Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n=5).

\* : p<0.05 compared to normal group by Wilcoxon rank sum test.

### 4. 경골 회분 분석

각 실험군의 경골을 회분화하여 무게를 측정하고, 경골 내 Ca 및 P 함량과 Ca/P ratio를 측정하였다(Table 2).

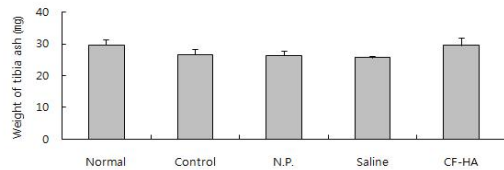
**Table 4. Effect of CF-HA on Ca, P, Ca/P ratio in tibia of ovariectomized mice.**

Group	Levels in tibia (mg/g bone)		Ca/P ratio (%)
	Ca levels	P levels	
Normal	96.89 $\pm$ 5.55	20.30 $\pm$ 2.81	482.70 $\pm$ 57.02
Control	74.56 $\pm$ 10.61	17.76 $\pm$ 2.31	419.57 $\pm$ 14.88
N.P.	89.62 $\pm$ 5.64	20.09 $\pm$ 1.19	446.14 $\pm$ 12.64
Saline	122.12 $\pm$ 3.13	26.96 $\pm$ 1.71	465.38 $\pm$ 32.86
CF-HA	103.93 $\pm$ 2.85	23.58 $\pm$ 1.91	442.38 $\pm$ 26.30

All experimental animals except those in the normal group underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the ovariectomized mice were randomly allocated to each experimental groups and treated as described in the materials and methods. After the mice were sacrificed, tibia was removed, dried, carbonized and dissolved in HCl and the tibial Ca level and phosphorus level were evaluated. And the tibial Ca/P ratio was calculated. Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n=4).

### 1) 경골 회분 무게

실험 종료 후, 실험 동물의 경골을 태워 경골 내 회분 함량을 측정하였다. 대조군(control)에서 정상군(normal)에 비하여 회분 함량이 감소하였으나 유의성은 없었다. 산수유 약침군(CF-HA)에서는 대조군(control), N.P.군 및 saline군에 비하여 경골의 회분 함량이 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 14).

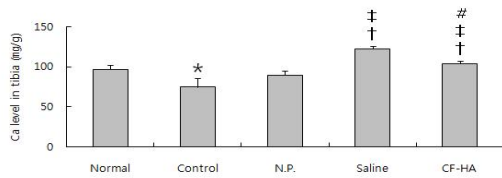


**Fig. 14. Effect of CF-HA on the ash bone weight in ovariectomized mice**

All experimental animals except those in the normal group underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the ovariectomized mice were randomly allocated to each experimental groups and treated as described in the materials and methods. 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).

### 2) Calcium 함량

각 실험군에서 취한 경골을 회분화한 뒤, 경골 내 칼슘(calcium)의 함량을 측정하였다. 대조군(control)에서 정상군(normal)에 비하여 칼슘(calcium) 함량이 유의하게 감소하였다. 산수유 약침군(CF-HA)에서는 대조군(control), N.P.군에 비하여 칼슘(calcium) 함량이 유의하게 증가하였다(Fig. 15).



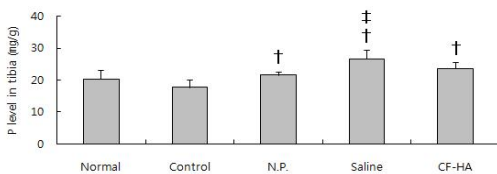
**Fig. 15. Effect of CF-HA on tibial Ca level in ovariectomized mice**

All experimental animals except those in the normal group underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the ovariectomized mice were randomly allocated to each experimental groups and treated as described in the materials and methods. 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).

\* : p<0.05 compared to normal group by Wilcoxon rank sum test.  
† : p<0.05 compared to control group by Kruskal-Wallis test.  
‡ : p<0.05 compared to N.P. group by Kruskal-Wallis test.  
# : p<0.05 compared to saline group by Kruskal-Wallis test.

### 3) Phosphorus 함량

각 실험군에서 취한 경골을 회분화한 뒤, 경골 내 인(phosphorus)의 함량을 측정하였다. 대조군(control)에서 정상군(normal)에 비하여 경골 내 인(phosphorus)의 함량이 약간 감소하였으나 유의성은 없었다. N.P. 군, saline군 및 산수유 약침군(CF-HA)에서는 대조군(control)에 비하여 경골 내 인(phosphorus) 함량이 유의하게 증가하였다 (Fig. 16).



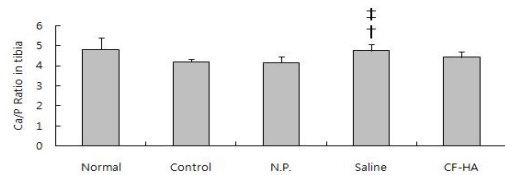
**Fig. 16. Effect of CF-HA on tibial phosphorus level in ovariectomized mice**

All experimental animals except those in the normal group underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the ovariectomized mice were randomly allocated to each experimental groups and treated as described in the materials and methods. 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).

† : p<0.05 compared to control group by Kruskal-Wallis test.  
‡ : p<0.05 compared to N.P. group by Kruskal-Wallis test.

### 4) Ca/P ratio

각 실험군에서 취한 경골을 회분화한 뒤, 경골 내에서 칼슘(calcium)과 인(phosphorus)의 비율을 측정하였다. 대조군(control)에서 정상군(normal)에 비하여 Ca/P 비율이 약간 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다. saline군에서 대조군에 비하여 Ca/P 비율이 유의하게 증가하였다. 산수유 약침군(CF-HA)에서는 대조군(control)에 비하여 Ca/P 비율에 유의한 차이가 나타나지 않았다(Fig. 17).



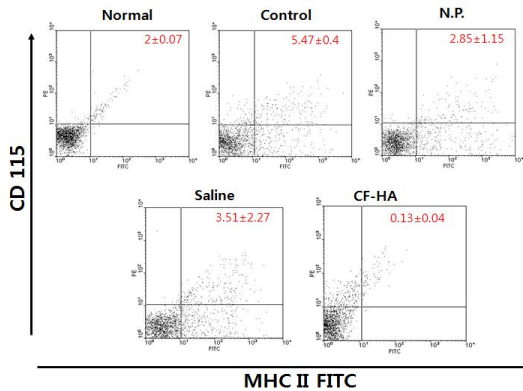
**Fig. 17. Effect of CF-HA on tibial Ca/P ratio in ovariectomized mice**

All experimental animals except those in the normal group underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the ovariectomized mice were randomly allocated to each experimental groups and treated as described in the materials and methods. 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).

† : p<0.05 compared to control group by Kruskal-Wallis test.  
‡ : p<0.05 compared to N.P. group by Kruskal-Wallis test.

### 5. 경골 내 osteoclast like cell 분석

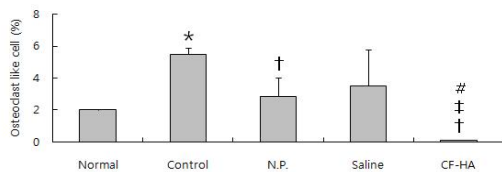
경골 내 osteoclast like cell의 비율을 flow cytometry assay를 이용하여 측정하였다. 대조군(control)에서 MHCII<sup>+</sup>/CD115<sup>+</sup>세포의 비율은 5.47 $\pm$ 0.4로 나타나 정상군(normal)의 2 $\pm$ 0.079에 비하여 현저하게 증가하였으며, 산수유 약침군(CF-HA)에서는 0.13 $\pm$ 0.04로 나타나 대조군(control), N.P.군 및 saline군에 비하여 감소하였다(Fig. 18).



**Fig. 18. Effect of CF-HA on osteoclast like cell in tibia of ovariectomized mice**

All experimental animals except those in the normal group underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the ovariectomized mice were randomly allocated to each experimental groups and treated as described in the materials and methods. After the mice were sacrificed, tibia was removed, and the number of osteoclast like cells in tibia was analyzed using flow cytometry. Data were expressed as mean ± SD (n=4).

경골 내 osteoclast like cell의 비율을 flow cytometry assay로 측정하여 군간 비교한 결과, 대조군(control)에서 osteoclast like cell 비율은 정상군(normal)에 비하여 유의하게 증가하였으며, 산수유 약침군(CF-HA)에서는 대조군(control) N.P.군 및 saline군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 19).



**Fig. 19. Effect of CF-HA on osteoclast like cell in tibia of ovariectomized mice**

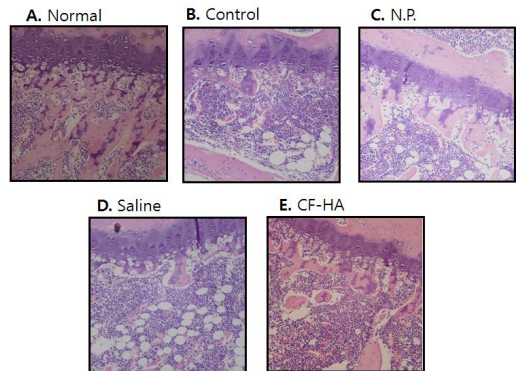
All experimental animals except those in the normal group underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the ovariectomized mice were randomly allocated to each experimental groups and treated as described in the materials and methods. After the mice were sacrificed, tibia was removed, and the number of osteoclast like cells in tibia was analyzed using flowcytometry. Data were expressed as mean ± SD (n=4).

† : p<0.05 compared to control group by Kruskal-Wallis test.  
# : p<0.05 compared to N.P. group by Kruskal-Wallis test.  
# : p<0.05 compared to saline group by Kruskal-Wallis test.

## 6. 경골의 조직학적 분석

### 1) H&E 염색 분석

실험동물의 경골조직을 절편하여 Hematoxylin and eosin(H&E) 염색을 실시하였다. 대조군(control)에서 정상군(normal)에 비하여 골 내부에 작은 구멍들이 많이 나타났고, 지주골이 적게 분포하였다. 산수유 약침군(CF-HA)에서는 control군, N.P.군 및 saline군에 비하여 작은 구멍들의 생성이 감소되었으며, 지주골도 정상군(normal)과 유사하게 유지되었다(Fig. 20).



**Fig. 20. Histological analysis (H&E stain) of tibia in ovariectomized mice**

All experimental animals except those in the normal group underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the ovariectomized mice were randomly allocated to each experimental groups and treated as described in the materials and methods. After the mice were sacrificed, tibia was sliced and embedded in paraffin, and 5µm sections were stained with Hematoxilin and Eosin(×200).

### 2) Histomorphometry

#### (1) TBV (trabecular bone volume)

실험동물의 경골조직을 절편하여 H&E 염색을 한 후, 자동분석 프로그램을 이용하여 지주골량(TBV)을 측정하였다. 대조군(control)에서 정상군(normal)에 비해 지주골

량(TBV)이 유의하게 감소하였으며, N.P.군 및 산수유 약침군(CF-HA)에서는 대조군(control)에 비하여 지주골량(TBV)이 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 21).

(2) TBT (trabecular bone thickness)

실험동물의 경골조직을 절편하여 H&E 염색을 한 후, 자동분석 프로그램을 이용하여 지주골의 두께(TBT)를 측정하였다. 대조군(control)에서 정상군에 비하여 TBT가 유의하게 감소하였으며, 산수유 약침군(CF-HA)에서는 대조군(control), N.P.군 및 saline군에 비하여 TBT가 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 22).

(3) GPL(growth plate length)

실험동물의 경골조직을 절편하여 H&E 염색을 한 후, 자동분석 프로그램을 이용하여 성장판의 길이(GPL)를 측정하였다. 대조군(control)에서 정상군에 비해 성장판의 길이가 유의하게 증가하였다. 산수유 약침군(CF-HA)에서는 대조군(control), N.P.군 및 saline군에 비하여 성장판의 길이가 유의하게 감소하였다(Fig. 23).

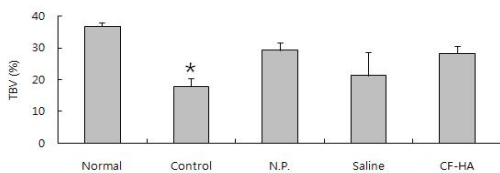


Fig. 21. Effect of CF-HA on the trabecular bone volume of tibia in ovariectomized mice

All experimental animals except those in the normal group underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the ovariectomized mice were randomly allocated to each experimental groups and treated as described in the materials and methods. After the mice were sacrificed, tibia was sliced and embedded in paraffin, and 8 $\mu$ m sections were stained with Hematoxylin and Eosin. Trabecular bone volume of tibia was analyzed using a computer-assisted bone histomorphometric analysing system.  
\* : p<0.05 compared to normal group by Wilcoxon rank sum test.

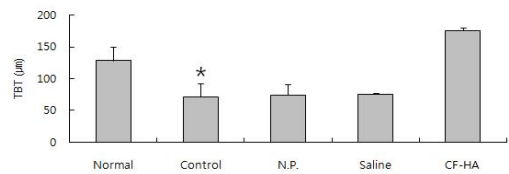


Fig. 22. Effect of CF-HA on the trabecular bone thickness of tibia in ovariectomized mice

All experimental animals except those in the normal group underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the ovariectomized mice were randomly allocated to each experimental groups and treated as described in the materials and methods. After the mice were sacrificed, tibia was sliced and embedded in paraffin, and 8 $\mu$ m sections were stained with Hematoxylin and Eosin. Trabecular bone thickness of tibia was measured using a computer-assisted bone histomorphometric analysing system.  
\* : p<0.05 compared to normal group by Wilcoxon rank sum test.

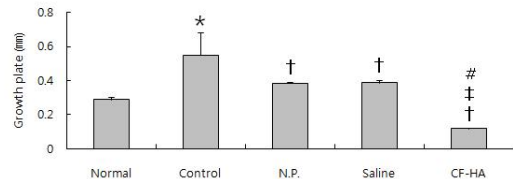


Fig. 23. Effect of CF-HA on growth plate length of tibia in ovariectomized mice

All experimental animals except those in the normal group underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the ovariectomized mice were randomly allocated to each experimental groups and treated as described in the materials and methods. After the mice were sacrificed, tibia was sliced and embedded in paraffin, and 8 $\mu$ m sections were stained with Hematoxylin and Eosin. Growth plate length of tibia was measured using a computer-assisted bone histomorphometric analysing system.  
\* : p<0.05 compared to normal group by Wilcoxon rank sum test.  
† : p<0.05 compared to control group by Kruskal-Wallis test.  
‡ : p<0.05 compared to N.P. group by Kruskal-Wallis test.  
# : p<0.05 compared to saline group by Kruskal-Wallis test.

## IV. 고 찰

인구의 고령화로 연령의 증가와 관련이 있는 골다공증으로 인한 골절은 환자 및 의사 모두가 관심을 가져야 할 질환이고, 이미 서구에서는 의료비 등 여러 면에서 사회적 문제로 대두되고 있다. 골다공증 환자는 대퇴골, 척추, 손목, 상완골, 골반 등에서 작은 충격에 의해서도 골절이 발생하게 된다. 이

러한 골절을 예방하기 위하여 최근 들어 골다공증의 진단 및 치료 분야가 급속도로 발전하고 있다<sup>1)</sup>.

골다공증은 골강도의 손상으로 골절의 위험이 증가되는 골격계 질환이다. 골강도는 골밀도와 골의 질로 결정된다. 골의 질을 현재로서는 측정할 수 없으므로 위의 정의로 골다공증의 진단과 빈도를 추정하기에는 임상적 이용가치가 떨어진다. 골강도의 80%까지 골밀도에 의존하므로 골밀도의 측정이 진단에 유용한 도구가 된다. 그러므로 현재 골다공증의 정의는 골밀도에 의존하고 있다<sup>1)</sup>.

골다공증은 원인, 연령, 임상적 특징에 따라 1차성 골다공증과 2차성 골다공증으로 구분한다. 1차성 골다공증은 다른 원인 없이 성인에서 골다공증이 발생하는 것을 말하며, 폐경 후에 발생하는 제 1형 골다공증과 고령의 남, 여에서 발생하는 제 2형 골다공증으로 나누어진다. 2차성 골다공증은 연령에 관계없으며, 어떤 원인질환이 선행되어 나타나는 골다공증을 말한다<sup>2)</sup>.

골다공증은 골절이나 골밀도의 감소에 의한 2차적 구조변화가 동반되기 전에는 아무런 증상이 없기 때문에 임상적 진단은 매우 까다롭다. 합병증을 동반하지 않은 골다공증 환자는 등과 허리에 골성통증을 동반할 수 있다. 그러나 대부분의 통증은 골절과 동반되어 나타난다<sup>3)</sup>.

뼈는 각 부위별로 20대 초반부터 30대 초반까지의 청장년기에 최대 골량을 이루고, 이후 연령의 증가에 따라 점차 감소한다. 골밀도의 감소에 따른 골다공증은 2가지 요소

에 의해 결정되는데, 먼저 20~30대 초반의 최대 골량이 어느 정도인지와 둘째 연령의 증가와 함께 발생하는 골손실 또는 폐경과 함께 나타나는 골손실이 얼마나 빠르게 나타나는지가 바로 골다공증의 발생을 결정한다<sup>16)</sup>.

최대 골량을 결정하는 인자로는 현재까지는 유전적 요인이 가장 중요한 것으로 확인되고 있다. 또한 최대 골량을 증가시키기 위해서 사춘기 전후의 육체적 활동이 중요하며, 칼슘(calcium) 및 비타민 D의 섭취와 단백질 등의 영양섭취도 중요하다<sup>3)</sup>.

골손실과 관련있는 인자로는 노화, 조기폐경 및 약물의 사용, 폐경과 연관된 여성호르몬의 감소 등이 있다. 폐경 여성의 골손실은 2단계로 나타난다. 초기 단계는 빠른 골손실 단계로 폐경 후 첫 5년간이 이 시기이며, 매년 약 3%의 골손실이 발생한다. 이후의 단계에서는 매년 약 0.5%의 낮은 골손실이 발생하는 시기이며, 남성에서도 55세 이후 시작되는 것으로 알려져 있다<sup>17)</sup>.

골다공증의 치료에 이용되는 약제는 크게 두 종류로 대변할 수 있다. 즉 골흡수를 억제하는 약제와 골형성을 자극하는 약제로 나눌 수 있다. 골흡수를 억제하는 약제는 골교체율을 감소시키며 골손실을 억제하여 골밀도의 감소를 억제한다. 대표적으로 여성호르몬 및 선택적 여성호르몬 수용체 조절제, 칼시토닌, 비스포스포네이트 제제 등이 포함된다. 골형성 자극제는 조골세포를 자극하여 골밀도의 증가를 유발하는 것으로 부갑상샘호르몬, 성장호르몬, 불소 등이 포함된다<sup>3)</sup>.

최근까지 폐경 후 골다공증의 치료에는

여성호르몬이 사용되어 왔다. 그러나 WHI(Women's Health Initiative) 연구 이후 여성호르몬의 유방암 및 뇌졸중 위험성이 확인되면서 새로운 약제들의 이용이 증가하였다<sup>3)</sup>.

이러한 약물들은 속쓰림, 구역, 구토, 궤양 등의 소화기 자극 증상이나, 안면홍조, 관상동맥 질환의 위험도 증가, 유방암, 뇌졸중, 혈전 색전증 등의 유발 가능성 등의 부작용뿐 만 아니라 부갑상선 호르몬 제제의 경우는 치료기간이나 용량에 대한 연구가 아직까지 부족한 실정이다<sup>18)</sup>. 이러한 부작용들 때문에 골다공증의 한의학적 치료방법에 대한 연구가 필요하다.

한의학 문헌에서는 골위(骨痿), 골비(骨痹), 골고(骨枯), 골극(骨極) 등의 증상이 골다공증과 가장 유사한 것으로 보인다<sup>7)</sup>.

한의학은 골의 성장발육과 골질의 상태는 腎中 精氣의 盛衰와 밀접한 관계가 있다고 인식하고 있다. 腎은 藏精을 주관하고, 精은 髓를 생성할 수 있고, 髓는 骨中에서 充養되고, 骨의 充養은 髓에 의지한다. <素問·陰陽應象大論>에서 “腎主骨髓”, <素問·六節藏象論>에서는“腎者 … 其充在骨”, <素問·宣明五氣>에서는 “腎主骨”, <素問·五藏生成論>에서는 “腎之合骨也”라 하였다. 그러므로 腎中の 精氣가 充盛되면 骨髓의 生化는 근원을 갖게 되고, 骨格은 髓가 充養되어, 견고해질 수 있다. 만약 腎中の 精氣가 부족하면 骨髓의 化生根源이 부족하여 骨格을 充養할 수 없게 되어 연약해진다. 이에 대하여 <素問·痿論>에서는 “腎氣가 熱하

면 요적이 不舉하게 되고 骨이 마르고 骨髓가 줄어들어하여 骨痿가 발병된다”라고 하여 骨痿도 骨髓의 부족에 의한 것임을 설명하였다<sup>19)</sup>.

肝과 腎의 관계는 주로 “肝腎同源”으로 표현된다. 肝藏血, 腎藏精하여 藏血과 藏精사이의 관계는 실제로 곧 精과 血사이의 상호 滋生과 상호 傳化의 관계에서 존재한다. 肝血의 化生은 腎中精氣의 氣化에 의존하며, 腎中精氣의 充盛은 또한 肝血의 滋養에 의지한다.

天癸는 腎中の 精氣가 化生하는 것이니, 腎中の 精氣가 充盛하여 일정한 정도에 달하였을 때의 산물이고 몸의 성선 발육, 성숙의 촉진과 생식기능의 유지 작용이 있다. 이로 인하여, “天癸”는 腎中の 精氣의 盛衰와 밀접한 관계가 있다. 노년기에 들어가면, 腎中の 精氣의 쇠퇴로 말미암아 “天癸”도 衰少하여, 심하게 손상되면 폐경기를 맞아서 “形衰而無子”하게 된다. 예를 들면 <素問·上古天真論>에서 “七七任脈虛, 太衝脈衰少, 天癸竭, 地道不通, 故形衰而無子也.(… 천계가 다하고, 생리가 끊어지고 몸이 쇠하고 …)”라고 하였다. <血證論><sup>20)</sup>에서 말하기를 “天癸者, 爲先天腎中之動氣, 化生癸水; 至者, 爲至于胞中也(천계는 선천의 신중 동기가 계수로 화생한 것을 가리킨다. 至란 胞中에 이르렀음을 의미한다)”라고 하였다. “天癸”의 “至”와 “竭”은 월경 來潮 여부의 전제 조건이며, 또한 생식기관 발육 성숙과 기능 퇴화의 주요 인자임을 알 수 있다<sup>21)</sup>. 따라서 폐경으로 인한 골다공증에서 “天癸”과 腎中 精氣가 중요한 요인이 될 수 있다.



약침요법은 침구요법과 약물요법을 결합한 신침요법의 일종이다. 침구요법은 경락론을, 약물요법은 기미론을 바탕으로 하므로 약침요법은 경락론과 기미론 모두를 근간으로 한다. 약침요법은 적응증이 광범위하고 치료효과가 빠르며, 치료과정이 짧고 간단한 장점이 있다<sup>12)</sup>.

이러한 한의학의 이론적 근거를 토대로 폐경기 골다공증에 대한 약침요법의 경혈로서 補腎작용이 있는 足少陰腎經의 合水穴인 陰谷을 택하였다.

약물 선정은 肝腎을 補하는 산수유를 선택하였다. 산수유의 주요 성분으로는 코르닌(Cornin), 벨베나린(Verbenalin), 사포닌(Saponin), 타닌(Tannin), 우르솔산(Ursolic acid), 몰식자산(Gallic acid), 사과산(Malic acid), 주석산(Tartaric acid), 비타민 A가 함유되고 종자의 지방유 중에는 팔미틴산(Palmitic acid), 올레인산(Oleic acid) 및 리놀산(Linoleic acid)이 있다<sup>22)</sup>. 산수유는 性이 微溫無毒하고, 味는 酸澁하며 入肝腎하여 肝腎을 補養하고 정기를 수렴하며 허탈한 기를 고착시키고 骨을 영양한다. 또한, 腎精을 충실하게 하여 女子胞를 자양하므로, 天癸의 고갈을 지연시킬 수 있다. 따라서 폐경 후 골다공증의 예방과 치료에 산수유가 유효할 것이라 추측하였다.

김<sup>11)</sup>은 난소적출 생쥐에게 산수유를 경구 투여한 결과를 보고하였고, 오<sup>13)</sup>, 강<sup>14)</sup>, 김<sup>15)</sup> 등은 생쥐의 陰谷에 여러 가지 약물로 약침 시술하여 골다공증에 유의한 효과가 있음을 보고하였다. 이에 저자는 산수유의 본초학적 효능과 陰谷의 경혈학적 효능을 배합하면

肝腎虛로 인한 골다공증에 유효할 것으로 사료되어, 난소적출로 인해 골밀도의 감소가 유발된 생쥐에 대해 골다공증에 걸린 생쥐로 인식하고 산수유 약침을 시술한 후 골다공증에 미치는 영향을 분석하였다.

난소를 제거한 흰쥐의 체중에 관하여 Yamazaki 등<sup>23)</sup>은 난소를 제거하면 체내 지방질 축적으로 인해 체중이 증가한다고 보고하였고, Kalu 등<sup>24)</sup>은 난소를 제거한 쥐에게 estrogen을 투여하면 체중증가를 억제한다고 하였다. 또한 Jame K. Yeh 등<sup>25)</sup>도 난소를 제거한 흰쥐에게 estrogen을 투여한 결과, 대조군에 비하여 체중이 정상 혹은 그 이하였다고 보고하였다. 본 연구에서는 실험 동물의 몸무게를 주 1회 측정하였다. 정상군(normal)에 비하여 대조군(control)에서 몸무게가 전반적으로 더 무거웠으며, 산수유 약침군(CF-HA)에서는 대조군(control)에 비하여 몸무게가 더 가벼운 것으로 나타났다(Fig. 2). 따라서 陰谷 산수유 약침은 난소가 적출된 생쥐에게 estrogen을 투여한 것과 유사하게 체중증가와 지방축적을 억제하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

난소를 제거하면 estrogen 분비가 억제되어 자궁위축이 일어나게 된다<sup>26)</sup>. 본 실험에서도 난소적출에 의하여 자궁무게와 자궁비중이 유의하게 감소하였다. 陰谷 산수유 약침은 자궁무게와 자궁 비중에 유의한 변화를 나타내지 못하였다. 즉, 陰谷 산수유 약침은 난소 적출에 의한 자궁의 퇴행을 억제하지는 못하는 것으로 보인다.

Estrogen 등의 성호르몬은 남녀 모두에서 사춘기 골단을 폐쇄하며<sup>27)</sup>, 난소 적출로 인해 성호르몬이 억제된 생쥐는 골의 길이 성장이 증가한다<sup>28)</sup>. 본 실험에서 난소적출에 의하여 경골 길이가 유의하게 증가하였다. 陰谷 산수유 약침에 의하여 경골 길이가 약간 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 5). 실험동물의 경골조직을 절편하여 자동분석 프로그램으로 성장판의 길이(GPL)를 측정할 결과, 난소적출에 의하여 성장판의 길이가 증가하였으나 유의성은 없었으며, 陰谷 산수유 약침에 의하여 성장판의 길이가 유의하게 감소하였다(Fig. 23). 陰谷 산수유 약침이 난소적출 생쥐의 경골 길이성장을 유의하게 억제하지는 못하였으나 성장판의 길이가 유의하게 감소한 것으로 보아 난소적출 흰쥐의 성호르몬 부족을 보상하는데 일정 정도의 효과가 있는 것으로 사료된다.

AST, ALT는 간장과 심장에 다량 분포하여 간세포 손상 시 혈청 중의 농도가 현저히 상승하므로 그 활성도는 간계질환의 지표가 된다. ALT는 간세포 손상 시 특이하게 상승하므로 간세포의 손상에 의한 상관성이 AST보다 높고 ALT는 심근경색이나 근육질환의 경우에도 상승한다<sup>29)</sup>.

본 실험에서 정상군(normal)에 비하여 대조군(control)의 혈청 AST와 ALT가 증가하였으나 유의성은 없었다. 산수유 약침군(CF-HA)에서 대조군(control)에 비하여 혈청 ALT와 혈청 AST가 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 7,8). 그러나, 산수유 약침

이 간독성이 없다는 것을 확인할 수 있었다.

ALP(alkaline phosphatase)는 간, 뼈, 백혈구, 장, 태반 등에 분포하며, 혈청 내 ALP(alkaline phosphatase) 대부분은 간과 뼈에서 유래한다<sup>30)</sup>. 또한 ALP(alkaline phosphatase)는 골아세포가 골형성을 하는 동안 생성되어 그 중 일부가 혈 중에 분비되는 효소이다. 이는 임상에서 가장 흔히 이용되는 골형성 표지자이다<sup>31)</sup>. 실험결과, 陰谷 산수유 약침에 의하여 난소적출 생쥐의 혈청 Alkaline phosphatase (ALP)가 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 9).

Creatinine은 염기성의 creatin 탈수물로서 신장 이외의 영향을 받지 않으며 신사구체로 여과되어 세뇨관에서 재흡수 되지 않고 체외로 배설되므로 요중의 1일 배설량은 식이에 관계없이 거의 일정하며, 요중 creatinine 농도는 신장의 배설기능과 관련이 있으므로 신혈류량과 신사구체 여과량이 감소할 경우에 증가한다<sup>32)</sup>.

본 실험에서 난소적출에 의하여 혈중 creatinine의 농도가 증가하였으나 유의성은 없었으며, 陰谷 산수유 약침에 의하여 creatinine의 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 10). 따라서, 陰谷 산수유 약침은 폐경 이후 신장의 배설기능이 저하될 경우 사용될 수 있을 것으로 사료되며 향후 이에 대한 더 심도 깊은 연구를 기대한다.

혈청 중 인(phosphorus)은 혈중 인슐린 농도의 증가, 혈중 순환 catecholamines 농

도의 증가, 골 조직으로의 빠른 무기질의 재공급이 일어날 때 증가한다<sup>33)</sup>. 또한 골흡수 시 인(phosphorus)은 칼슘(calcium)과 함께 세포외액으로 방출되고 유기기질이 흡수되며 골대사가 일어나고 있을 때 증가한다. 본 실험에서 난소적출에 의하여 혈중 인(phosphorus)의 농도가 증가하였으나 유의성은 없었고, N.P.와 陰谷 산수유 약침에 의하여 혈중 인(phosphorus)의 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 11). 이는 N.P.와 陰谷 산수유 약침이 난소적출에 의한 골다공증에서 골흡수를 억제한 결과로 사료되며, 여기에는 陰谷 자극 효과가 작용하였을 것으로 추정된다. saline군의 경우 농도의 감소가 미약한 이유는 陰谷에 불필요한 생리식염수의 주입이 오히려 陰谷의 자극 효과를 떨어뜨리는 것으로 추정된다.

칼슘(calcium)은 인체에서 다섯 번째로 많은 원소로서 (약 1Kg) 99%는 뼈, 치아 같은 견고한 조직에 주로 존재한다. 세포내 칼슘(calcium)은 세포외액의 약 1/1,000 정도를 유지하며 세포상호작용, 혈액응고, 신경전달, 근수축, Hormone 자극 전달 등의 중요한 기능을 담당하고 있다<sup>34)</sup>. Yeh 등<sup>25)</sup>은 난소적출로 인한 골대사의 증가가 골질 감소를 초래하여 혈청내 칼슘(calcium) 농도의 증가를 가져온다고 하였다. 산수유 약침군(CF-HA)에서는 대조군(control), N.P.군에 비하여 칼슘(calcium)함량이 유의하게 증가하였다(Fig. 12).

Osteocalcin은 조골세포에서 분비되는 비

콜라겐 단백질로 골형성 표지자로 이용된다. 그러나 osteocalcin은 골기질 내에 존재하므로 골흡수 과정에도 혈액내로 분비된다. 따라서 혈중 osteocalcin은 골형성과 골흡수 두 과정을 모두 표현한다고 생각하는 것이 옳다<sup>2)</sup>. Morris 등<sup>35)</sup>은 난소제거 후 혈중 osteocalcin이 증가되는 경향이 있다고 하였다. 본 실험에서는 각 실험군의 혈중 osteocalcin 농도에 유의한 차이가 없었다(Fig. 13).

실험 종료 후 실제 골의 변화를 확인하기 위해서 골을 회분화하여 무게를 측정하고, 경골 내 Ca 및 P 함량과 Ca/P ratio를 측정하였다(Table 2). 경골의 회분 함량에는 실험군간 유의성은 없었다(Fig. 14).

골격은 칼슘염의 침착에 의해 신장된 거친 유기기질로 구성되는데, 골격의 유기기질에 침착하는 결정성 염은 주로 Ca과 P로 구성되어 있으며 대부분의 결정성 염은 수산화인회석이다. 따라서 골다공증은 골격의 Ca과 P의 함량을 감소시킨다<sup>31)</sup>.

본 실험에서 난소적출에 의하여 경골의 칼슘(calcium) 함량이 유의하게 감소하였다. N.P.군, saline군 및 산수유 약침군(CF-HA)에서는 대조군(control)에 비하여 칼슘(calcium)함량이 유의하게 증가하였다(Fig. 15). 경골 내 인(phosphorus)의 함량은 난소적출에 의하여 약간 감소하였으나 유의성은 없었다. N.P.군, Saline군 및 산수유 약침군(CF-HA)에서는 대조군(control)에 비하여 경골내 인(phosphorus) 함량이 유의하게 증가하였다(Fig. 16).

이러한 결과는 陰谷 산수유 약침이 난소적출로 유도된 골다공증에서 골흡수를 억제하고 골생성을 증가시킬 수 있음을 의미하며, 이러한 효과에는 陰谷의 자극효과가 작용하였을 것으로 사료된다. 특히 김<sup>11)</sup>의 연구에서 난소적출 흰쥐에 산수유를 경구투여하였을 때 경골의 칼슘(calcium)함량 및 인(phosphorus) 함량에 유의한 변화를 나타내지 못하였으나, 본 실험에서 陰谷 산수유 약침을 시행하여 경골의 칼슘(calcium)함량과 인(phosphorus) 함량을 증가시킨 것은 陰谷의 효능과 약침요법의 강점을 보여주는 것으로 사료된다.

뼈의 Ca/P ratio는 bone condition과 관련되어 있으며, 나이가 들수록 감소하게 되며, 섭취하는 음식물에 따라 변할 수 있는데 일반적으로 무게를 기준으로 볼 때, Ca/P의 비율이 1.3-2.0이다<sup>36)</sup>. 본 실험에서 Ca/P 비율은 각 실험군간 유의한 차이가 나타나지 않았다(Fig. 17).

실험동물의 경골을 적출하여 골밀도를 측정한 결과, 난소적출에 의하여 골밀도가 유의하게 감소하였다. 陰谷 N.P.는 골밀도를 유의하게 증가시켰으며, 陰谷 산수유 약침도 골밀도를 증가시켰으나 유의성은 없었다(Fig. 6).

Osteoclast like cell은 뼈의 흡수 및 제거와 관련된 큰 다핵세포로서 부갑상선 호르몬의 존재 하에 크게 활성화되어 골흡수 및 세포외액으로의 골염기(인 및 특히 칼슘)의 방출을 증가시킨다<sup>36)</sup>.

난소적출에 의하여 osteoclast like cell이 유의하게 증가하였으며, 산수유 약침군(CF-HA)에서는 대조군(control), N.P.군 및 saline군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 18, 19). 따라서, 산수유 약침이 파골세포를 감소시켜 골흡수를 억제함으로써 골다공증을 예방하는 효과가 있을 것이라고 사료되며, 이러한 효과에는 산수유의 補腎하는 효능이 작용하였을 것으로 보인다.

陰谷 산수유 약침이 혈중 인(phosphorus)을 유의하게 감소시키고, 혈중 칼슘(calcium)의 농도를 유의하게 증가시켰다. 또한, 경골 내 인(phosphorus)와 칼슘(calcium) 함량을 유의하게 상승시켰다. N.P.의 경우 골밀도를 유의하게 증가시켰으나, 혈중 칼슘(calcium)농도에 있어서는 유의성이 없었다. 또한 osteoclast like cell의 감소에는 陰谷 산수유 약침이 가장 효과가 좋았다. 하지만, 골밀도의 회복에 있어서는 유의성이 부족한 것으로 볼 때, 陰谷 산수유 약침이 골흡수 억제와 골생성 촉진에 유효하나, 실험기간 및 실험 환경 등의 제한적 요인으로 인하여 골밀도를 회복하기에는 부족한 점이 있지 않으나 추측된다.

골다공증은 조직학적으로 골피질이 얇아지고 골지주의 수량과 크기가 감소되며 허버시안 계와 골수강이 넓어지는 소견을 보인다<sup>37)</sup>. 대조군(control)에서 골 내부에 작은 구멍이 많이 나타났고, 지주골이 적게 분포하였다. 산수유약침군(CF-HA)에서는 작은 구멍의 생성이 감소되었으며, 지주골도 정상군(normal)과 유사하게 유지되었다(Fig. 20).

또한 경골조직을 절편하여 자동분석프로그램으로 경골의 지주골 두께(TBT)를 측정 한 결과, 난소적출에 의하여 지주골의 두께(TBT)가 유의하게 감소하였으며, 산수유 약침군(CF-HA)에서는 대조군(control), N.P.군 및 saline군에 비하여 지주골의 두께(TBT)가 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 22).

따라서 陰谷 산수유 약침이 골다공증으로 감소되는 지주골을 증가시켰으며, 이러한 효과에는 산수유의 補腎하고 滋精하는 효능이 영향을 미친 것으로 사료된다.

이상의 결과를 총괄하면, 陰谷 산수유 약침은 난소 적출에 의해 유발된 생쥐의 골다공증에 대하여 골소실을 줄이고, 골생성을 증가시키는 효과가 있음을 알 수 있다. 따라서, 향후 陰谷 산수유 약침의 임상적 활용을 위한 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## V. 결 론

산수유 약침을 난소적출 생쥐의 陰谷(KI10)에 시술하여 골다공증에 미치는 영향을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 陰谷 산수유 약침은 난소적출로 골다공증이 유발된 생쥐의 골밀도를 증가시켰으나 유의성은 없었다.
2. 陰谷 산수유 약침은 난소적출로 골다공증이 유발된 생쥐의 혈청 인(phosphorus) 농도를 유의하게 감소시켰고, 혈청 칼슘(calcium) 농도를 유의하게 증가시켰다.

3. 陰谷 산수유 약침은 생쥐의 경골 내 칼슘(calcium) 함량과 인(phosphorus)함량을 유의하게 증가시켰다.
4. 陰谷 산수유 약침은 생쥐의 경골 내 osteoclast like cell의 비율을 유의하게 감소시켰다.
5. 陰谷 산수유 약침은 생쥐의 성장판의 길이를 유의하게 감소시켰다.

## 參考文獻

1. 대한골대사학회. 골다공증. 서울 : 한미의학. 2006 : 11-7.
2. American College of Obstetrics and Gynecologists Women's health Care Physicians. Osteoporosis. Obstet Gynecol. 2004 ; 104(4) : 66-76.
3. 대한가정의학회. 최신가정의학. 서울 : 한국의학. 2007 : 940-7.
4. 한방재활의학과학회. 한방재활의학과학. 서울 : 군자출판사. 2003 ; 105-7.
5. 金根模. 鹿茸 및 六味地黄湯加鹿茸이 白鼠의 運動抑制性 골다공증에 미치는 影響. 경산대학교대학원. 1993.
6. 김문수, 서부일, 광교아, 지선영. 靑娥地黄湯이 卵巢摘出로 誘發된 흰쥐의 골다공증에 미치는 影響. 본초학회. 2003 ; 18(2) : 49-58.
7. 김동수, 김영일. 골다공증의 한의학적 인식과 침구치료의 문헌연구. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 2009 ; 18(1) : 9-18.
8. 전국한외과대학본초학교실. 본초학. 서울

- : 영림사. 1991 : 626-7.
9. 서권일, 이상원, 양기호. 산수유 추출물의 항균 및 항산화성. KOREAN J. POSTHARVEST SCI. TECHNOL. 1999 ; 6(1) : 99-103.
  10. 김옥경. 산수유 추출물이 Streptozotocin 으로 유발된 흰쥐의 항당뇨 및 항산화 작용에 미치는 효과. J. of Korean Oil Chemists' Soc. 2005 ; 22(2) : 157-67.
  11. 주석중, 박지하, 서부일. 한국산 산수유 가 난소적출로 유발된 흰쥐의 골다공증 치료효과에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2007 ; 22(2) : 83-95.
  12. 대한약침학회 학술위원회. 약침학. 서울 : 엘스비어코리아. 2008 : 3-8.
  13. 오치석, 이현. 陰谷(KI10)에 시술한 骨碎補 藥鍼이 난소적출 흰쥐의 골다공증에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2008 ; 25(3) : 71-86.
  14. 강민완, 홍권의, 김영일. 淫羊藿 藥鍼이 난소적출 흰쥐의 골다공증에 미치는 영향. 대한침구학회지. 2009 ; 26(2) : 1-14.
  15. 김정호, 이현. 香附子 藥鍼이 골다공증에 미치는 실험적 연구. 대한침구학회지. 2008 ; 25(2) : 243-57.
  16. S.Cummings , D.Black. Bone mass measurements and risk of fracture in Caucasian women, a review of findings from prospective studies. The American Journal of Medicine. 1995 ; 98(2) : 24-8.
  17. National Institutes of Health Consensus Development Panel. Osteoporosis prevention diagnosis and therapy. JAMA. 2001 ; 285(18) : 2323-4.
  18. 임승길. 골다공증 연구의 최근 동향. 한국 생화학 분자 생물학회. 2002 ; 22(3) : 270-6.
  19. 신민규, 홍무창, 류도곤, 권강범, 김광중, 권영규 외. 개정판 동의생리학. 서울 : 집문당. 2008 : 297-302
  20. 唐宗海. 血證論. 北京 : 北京中醫藥出版社. 1996 : 103.
  21. 나창수, 강정수, 김달호, 김명동, 윤용갑, 채우석 외. 한의학총강. 서울 : 의성당. 2007 : 300-1, 310-1.
  22. 진존인. 도설한방의약대사전. 서울 : 도서출판 송악. 1988 : 206-9.
  23. Yamazaki I, Yamazaki H.. Characteristics of an ovariectomized osteopenic rat model. J Bone Miner Res. 1989 ; 4(1) : 13-22.
  24. Kalu DN, Arjmandi BH, Liu CC, Salih MA, Birnbaum RS. Effects of ovariectomy and estrogen on the serum levels of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3. Bone miner. 1994 ; 25(2) : 135-48.
  25. James K. Yeh, John F. Aloia, Maria-Louise Barilla. Effects of 17  $\beta$  -estradiol replacement and treadmill exercise on vertebral and femoral bones of the ovariectomized rat. Bone and Mineral. 1994 ; 24(3) : 223-4.

26. J. M. Aitken, E. Armstrong, J. B. Anderson. Osteoporosis after oophorectomy in the mature female rat and effect of oestrogen and/or progestogen replacement therapy in its prevention. *Journal of Endocrinology*. 1972 ; 55 : 79-87.
27. 백승훈, 김신윤. 골다공증의 병인론. *대한고관절학회지*. 2006 ; 18(4) : 386-96.
28. Alireza Falahati-Nini, B. Lawrence Riggs, Elizabeth J. Atkinson, W. Michael O'Fallon, Richard Eastell and Sundeep Khosla. Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men. *J Clin invest*. 2000 ; 106(12) : 1553-60.
29. 전국한의과대학 간계내과학교실. *간계내과학*. 서울 : 동양의학연구원. 1989 : 214-5.
30. 김경아. 간기능검사의 이해와 적용. *대한내과학회지*. 2009 ; 76(2) : 163-16.
31. 김덕윤. 골형성의 생화학적 표지자. *대한골대사학회지*. 1994 ; 1(1) : 233-9.
32. 이귀녕, 이종순. *임상병리과일*. 서울 : 의학문화사. 1993 : 278-82, 300-3.
33. John P. Bilezikian, Lawrence G. Raisz, Gideon A. Rodan. *Principle of bone biology*. USA : Academic press. 1996 : 263.
34. 이삼열, 정충변, 권오현, 송경순. *임상병리검사법*. 서울 : 연세대학교출판부. 1982 : 331.
35. Morris Notelovitz. Osteoporosis screening prevention and management. *Fertil Steril*. 1993 ; 59(4) : 707-25.
36. Arthur C Guyton, John E Hall. *의학생리학*. 서울 ; 정담. 2002 : 1050-3.
37. 대한병리학회. *새의학용어사전*. 서울 : KMS. 2007 : 1171.