大韓獸醫學會誌(2010) 第50卷 第3號
Korean J Vet Res(2010) 50(3) : 171~177

<원 저>

랫드 두개골 결손부에서 단삼 수용성 추출물의 골형성 효과

심경미[1] · 김세은[2] · 강성수[2,*]

[1]남부대학교 방사선학과, [2]전남대학교 수의과대학

(게재승인: 2010년 7월 9일)

Effect of water extract of Danshen on bone regeneration of rat calvarial defect model

Kyung Mi Shim[1], Se Eun Kim[2], Seong Soo Kang[2,*]

[1]*Department of Radiology, Nambu University, Gwangju 500-706, Korea*
[2]*College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea*

(Accepted: July 9, 2010)

Abstract : The purpose of this study was to evaluate the osteogenic capacity of water extract of danshen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge). We have established in rat critical-sized calvarial defect model using the combination with collagen scaffold and danshen hydrophilic extract. All rats were extinguished at 8 weeks after bone graft surgery, and the bone regeneration ability of bone grafting sides was evaluated by plain radiography and micro-CT. These results revealed water extract of danshen had the potential to promote osteogenesis especially continuous oral administration with local treatment compared to one-shot local treatment. This compound may provide a new alternative agent for growth factors to promote bone healing and bone regeneration. In conclusion, these results suggest that danshen hydrophilic extract have the potential to promote osteogenesis in bone defects. Further studies about fusion technology with salvianolic acid B, peptides, growth factors, and scaffolds using of the combination of tissue engineering, cell engineering and mechanical engineering are needed.

Keywords : danshen, osteogenesis, rat, salvianolic acid B

서 론

골이식은 주로 정형외과 수술 시 골결손부를 채우거나 부전유합 및 지연유합을 치료하기 위해 [11, 13, 22], 심하게 복잡골절된 골절부위를 치유시키기 위해 [28], 척추를 융합시키기 위해 [25], 광범위한 종양절제부위를 채우기 위해 [23], 관절고정술이나 사지구제술을 실시하는 경우 [12, 26]에 적용된다. 그리고 치과영역에서 치주질환에 의한 골흡수와 하악골절 부위를 채워 골재생을 돕기 위해 [7, 29, 30], 치과용 임플란트가 안착하기에 치조골이 부족한 경우 [6, 32]에 실시된다. 골이식은 1668년 Job van Meekeren [8]에 의해 최초로 시행된 후, 끊임없는 시도와 연구를 거쳐 현재는 혈액 다음으로 가장 빈번히 이식되는 조직으로 발전했다 [2]. 1999년 Shors [31]는 미국에서만 연간 500,000건의 골이식이 시행되고 있고, 나머지 나라에서 그 두 배인 1,000,000건이 시행되고 있다고 보고하였다.

현재 동종골과 이종골 및 합성골의 골재생능을 증진시키기 위해 다양한 연구가 진행되고 있으며, 주로 기계적 강도를 유지하면서 골전도능을 향상시키기 위한 기질(matrix)의 크기와 다공성(porosity)에 대한 연구 [1, 10], bone morphogenetic protein과 같이 골유도능을 갖는 성장인자에 대한 연구 [19, 27], mesenchymal stem cell과 같이 골형성능을 갖는 세포에 대한 연구가 끊임없이 진행 중에 있다 [7, 21]. 그리고 실제 임상 상황에서, 생체에서 채취한 골형성과 관련된 세포를 일련의 배양과정

*Corresponding author: Seong Soo Kang
College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
[Tel: +82-62-530-2877, Fax: +82-62-530-2809, E-mail: vetkang@chonnam.ac.kr]

을 통하여 증식시킨 후 이들 세포의 활동을 촉진시키는 성장인자와 세포의 성장을 보존시킬 수 있는 지지체를 인위적으로 제작하여 이를 통하여 새로운 골조직을 형성하는 과정인 골조직공학(bone tissue engineering)이 요구되고 있다.

골조직공학에서는 지지체, 세포 이외에도 세포의 활성을 증가시키는 생물학적 인자의 사용이 고려되고 있다. 다수의 식물 추출물(natural products)에 대한 골형성 촉진 효과는 여러 연구에 의해 밝혀져 있으며, 이들은 국소 또는 전신 투여되어 골형성을 증가시키거나 골흡수를 감소시켜 그 효과를 발휘한다. 대표적인 골형성 촉진 천연물에는 칡, 두충, 단삼, 골쇄보 등이 있으며, 이들은 생체 내에서 골유도능을 발휘한다. 이들의 대표적인 약리효과로 isoflavones나 flavones와 같은 식물성 에스트로겐(phytoestrogens)을 다량 함유하여 칼슘의 장 내 흡수를 증가시키고 칼슘의 뇨배출을 감소시킴으로써 칼슘 이용률을 높이는 능력을 들 수 있다. 이 외에 광물화 및 골모세포 활성을 촉진시키고 파골세포(osteoclast)의 활성을 억제시키는 등의 효과도 가지고 있다 [34]. 단삼(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)은 동서양에서 심혈관계 질환의 치료 및 예방을 목적으로 널리 사용되는 약제로 혈류를 개선시키고 창상 치유를 촉진시키는 약리효과를 갖는다 [4, 5, 36]. 그리고 파골세포의 활성을 억제하고 [16, 18] 신생골 형성을 촉진시킴으로써 골형성에 기여할 수 있다. 특히 단삼의 수용성 성분 중 하나인 salvianolic acid B는 그 함량이 높으며, 혈관신생작용(angiogenesis) 및 골수세포의 alkaline phosphatase(ALP) 활성을 증강시키는 약리작용을 갖는다 [9, 20, 33].

본 연구는 salvianolic acid B를 주성분으로 하는 단삼 수용성 추출물의 임상적 적용 가능성을 확인하고자 실시되었다. 본 연구진은 예비실험을 통하여 salvianolic acid B의 골모세포 활성 촉진 효과를 확인하였다. 그러나 단삼에서 순수한 1가지 특정 성분인 salvianolic acid B의 분리를 위한 적절한 추출 조건을 찾기 위해서는 시간 및 비용 면에서 매우 불리한 경우가 많다. 그리고 특정 약리효과를 나타내는데 있어 한 가지 성분만 작용하지 않고, 여러 성분이 서로 작용하여 그 효과를 증강시키기도 한다. 따라서 salvianolic acid B만을 임상에 적용하기에는 비용적 부담이 너무 크므로, 단삼으로부터 수용성 성분을 추출하여 임상실험에 적용하고자 하였다. 그리고 추출 과정에서 salvianolic acid B의 구조변화를 막고, 추출되는 양 및 용해성을 최대화시키기 위해 다양한 추출조건을 비교, 분석하고자 하였다. 그리고 랫드 두개골 결손부에서 단삼 수용성 추출물의 골재생 효과를 단순 방사선 및 Micro CT를 이용하여 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

단삼으로부터 수용성 성분의 추출

환류 및 저온 초음파 추출법의 비교: 5 g의 단삼 파우더를 50 mL의 70% 메탄올을 용매로 하여 끓는점에서 환류시키면서 추출하거나, 물을 용매로 하여 20°C에서 30 Hz 초음파로 1시간 동안 추출하였다. 그리고 추출 결과물의 salvianolic acid B의 양을 thin-layer chromatogram (TLC) 상에서 표준물질(Ivy Fine Chemicals, USA)과 비교하였다. TLC는 실온에서 silica gel 60 F_{254} TLC plates (Merck, USA)에서 시행되었다. 시료 1 μL를 silica gel plate에 점적한 후, ethyl acetate-acetic acid-water(3 : 1 : 1, v/v/v)의 용액을 전개용매로 사용하였고, 건조하였다. 그 후, 생성된 산물들은 0.3%(w/v) N-(1-naphthyl)-ethylene-diamine과 5%(v/v) H_2SO_4를 함유하고 있는 메탄올에 담그고, 말린 후 121°C 오븐에서 10분간 구워주고, 나타나는 물질을 표준물질과 비교하여 확인하였다.

추출 용매에 따른 추출 효과 비교: 단삼의 수용성 성분 추출을 위한 저온 초음파 추출 시 가장 효과적인 용매를 평가하기 위해 물, 10% 메탄올, 70% 메탄올을 용매로 하여 20°C에서 30 Hz 초음파로 1시간 동안 추출하였다. 추출물을 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻은 후, TLC 상에서의 스팟을 NIH 프로그램으로 정량하여 salvianolic acid B의 양을 비교 분석하였다. 동물실험에 사용할 시료는 저압상태와 저온의 동결건조기에 미리 −80°C에서 동결한 샘플을 넣고, 액상을 거치지 않고 직접 수증기로 승화시킨 후 건조하는 방법을 이용하여 샘플을 동결건조하였다.

단삼 수용성 추출물의 골재생 효과 확인

실험동물: 체중 200 g 전후의 건강한 6주령 수컷 랫드(SD rat; Samtaco, Korea) 30마리를 실험환경에 적응시키기 위하여 1주일의 적응기를 거친 후, 실험 전 기간 동안 사육환경을 온도 23 ± 2°C, 상대습도 60 ± 10%로 유지하고 12시간의 명암주기가 유지되는 실내에서 사료와 식수를 자유로이 공급하였다. 동물의 사육과 실험은 전남대학교 동물실험 지침에 따라 수행되었다.

실험방법: 무작위로 6마리씩 임계결손부군(대조군), 콜라겐 기질(TERUPLUG; Termo, Japan) 이식군, 콜라겐 기질에 단삼 수용성 추출물 국소 이식군 및 국소 이식 후 실험 전 기간 동안 수용성 단삼 추출물을 경구투여한 군으로 나누었다. 랫드 두개골 결손부 형성을 위해서 ketamine 40 mg/kg과 xylazine 10 mg/kg을 복강주사하여 전신마취한 후 랫드 두개골 부위를 전모하고, 포비돈으로 소독하였다. 두개 정중부 피부 및 골막을 U자형으로 절개한 후, 골막하 박리를 통하여 두개골을 노출시

켰다. 생리식염수 관주 하에 8 mm trephin bur와 #2 round bur를 이용하여 뇌경막이 손상되지 않도록 두개골 중앙부에 원형 결손부를 형성하였다. 이 원형 결손부에 임계결손부군은 아무 처리도 하지 않고(대조군), 콜라겐 기질 이식군에는 준비된 직경 8 mm, 두께 2 mm의 TERUPLUG를, 나머지 두 군에는 TERUPLUG를 단삼 수용성 추출물(salvianolic acid B 5 mg/mL)에 15분 동안 담궜다 이식하였다. 골막은 4-0 흡수성 봉합사(Surgisorb; Samyang, Korea)로 연속봉합하였고, 피부는 3-0 비흡수성 봉합사(Black Silk; Ailee, Korea)로 단순결절봉합 하였다. 단삼 수용성 추출물 국소 이식 및 경구 투여군에는 실험 전 기간에 걸쳐 1일 체중 100 g 당 salvianolic acid B 1 mg을 음수에 첨가하여 공급하였다.

골이식부에 대한 방사선학적 평가

골이식 후 8주째에 실험동물에 이산화탄소를 흡입시켜 희생시킨 후, diamond disc로 골결손부위를 포함하여 골조직을 채취한 후 Port-X portable X-ray (Genoray, Korea)를 이용하여, 70 kVp, 3 mA, 0.03 sec, 20 cm FFD의 조건으로 일반 방사선 촬영을 실시하였다. 획득된 영상은 Digi-X intra oral digital sensor(한진덴탈, 한국)를 통해 저장되었고, 각 군별로 방사선 밀도의 변화를 영상분석 프로그램을 이용하여 비교 및 평가하였다.

Micro CT 촬영 및 골형성량 측정

채취된 골조직을 Skyscan 1172 Desktop X-ray Microtomograph (Skyscan, Belgium)를 이용하여 50 kVp의 관전압과 200 μA의 노출 조건으로 컴퓨터 단층촬영하였다. 획득된 영상에 대해 Skyscan CTan ver. 1.5.0 및 Shortcut to ANT (Skyscan, Belgium) 영상분석 프로그램을 이용해 골밀도(bone mineral density; BMD)와 골부피(bone volume; BV)를 측정하고, 삼차원 영상으로 재구성하였다.

결 과

단삼으로부터 수용성 성분의 추출

환류 및 저온 초음파 추출법의 비교: 단삼의 수용성 성분 추출 시 효과적인 추출법을 평가하기 위해 메탄올을 용매로 한 고온 환류 추출법과 물을 용매로 한 저온 초음파 추출법을 비교하였다. 수율 및 성분의 안정성은 TLC 상에서 salvianolic acid B를 기준으로 평가하였다. TLC 상에서의 스팟을 NIH 프로그램으로 정량하여 salvianolic acid B의 양을 비교 분석하였다. 그 결과 salvianolic acid B의 수율 면에서 고온 환류 추출법 및 저온 초음파 추출법이 차이가 없었다. 그리고 고온 환류 추출법의 경우 더 다양한 성분들이 추출되었고,

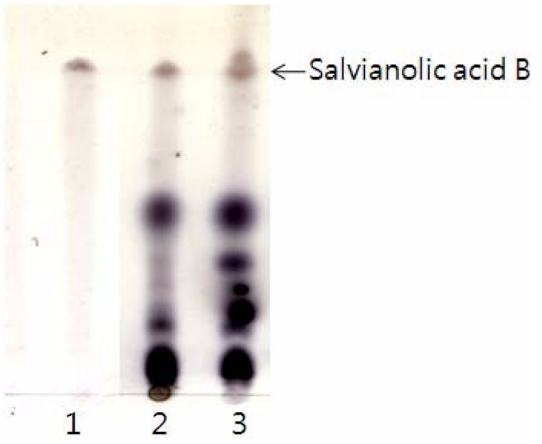

Fig. 1. Thin-layer chromatogram of Danshen extract. Lane 1, authentic salvianolic acid B; Lane 2, Danshen extract with water by temperature controlled ultrasonography; Lane 3, Danshen extract with 70% MeOH by reflux. One μL of the sample was spotted onto a lane on a silica gel plate, and the plaste was developed with a solvent mixture of ethyl acetate-acetic acid-water (3 : 1 : 1, v/v/v). The developed plate was then dried and visualized.

salvianolic acid B의 구조가 변형되어 스팟이 분리된 것을 확인하였다(Fig. 1).

용매에 따른 추출 효과 비교: 저온 초음파 추출 시 효과적인 추출 용매를 찾기 위해 물, 10% 메탄올, 70% 메탄올을 용매로 하여 salvianolic acid B의 수율을 평가하고, 이를 물에 대한 수율과 비교하였다. 그 결과 10% 메탄올이 물의 106.7%, 70% 메탄올이 96.8%로 10% 메탄올, 물, 70% 메탄올 순으로 추출되는 salvianolic acid B의 양이 줄어들었다(Fig. 2). 추후 시료의 용해성을 고려하여 용매를 물로 선택하여 5 g의 단삼 파우더를 50 mL의 물로 초음파추출하여 원심분리한 결과 30 mL의 추출용액을 얻었고, 이를 저온동결건조한 결과 1,400 mg의 파우더를 획득할 수 있었다. 그리고 총 1,400 mg의 파우더에서 salvianolic acid B가 차지하는 양은 80.5 mg이었다.

단삼 수용성 추출물의 골재생 효과 확인

골이식부에 대한 방사선학적 평가 결과: 콜라겐 기질과 단삼의 수용성 추출물이 랫드 두개골 결손부의 골형성에 미치는 영향을 평가하기 위해 골이식 후 8주째에 실험동물을 희생시켜 채취된 골조직을 일반방사선 촬영하였다. 임계결손부군은 대부분의 개체에서 골형성이 미미하여 결손부의 방사선 투과도가 높았다. 결손부 가장자리로부터의 신생골 형성으로 부분적인 방사선 비투과

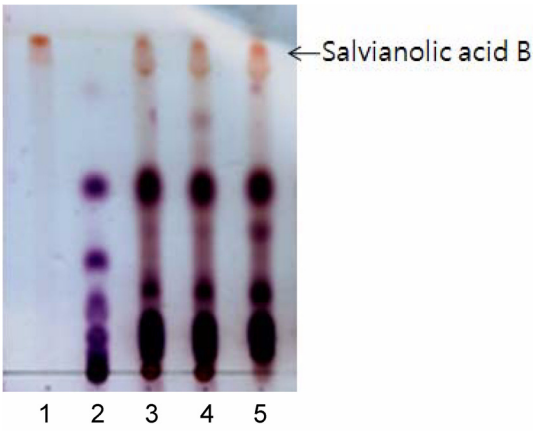

Fig. 2. Thin-layer chromatogram of Danshen extracted by temperature controlled ultrasonography. Lane 1, authentic salvianolic acid B; Lane 2, isomalto oligosaccharide; Lane 3, Danshen extract with water; Lane 4, Danshen extract with 10% MeOH; Lane 5, Danshen extract with 70% MeOH. One μL of the sample was spotted onto a lane on a silica gel plate, and the plaste was developed with a solvent mixture of ethyl acetate-acetic acid-water (3 : 1 : 1,

도를 보였으나, 신생골 부위의 방사선 밀도는 정상골에 비해 낮았다. 콜라겐 기질만 이식한 군에서도 신생골 형성이 관찰되었으며, 이는 임계결손부군에 비해 양 및 질적으로 훨씬 우수한 것으로 확인되었다. 콜라겐 기질을 단삼의 수용성 추출물에 적셔 이식한 군 및 실험 전 기간 동안 단삼의 수용성 추출물을 경구투여한 군에서도 다량의 신생골 형성이 관찰되었으며, 그 양이 콜라겐 기질만을 이식한 군보다 더 많음을 확인할 수 있었다.

신생골 형성에 의한 각 군 간의 방사선 밀도의 변화를 비교하기 위해 영상분석 프로그램을 이용해 골결손부의 OD 값을 측정하였다. 콜라겐 기질과 단삼 수용성 추출물 국소 이식군($p < 0.05$) 및 경구투여를 병행한 군($p < 0.01$)에서 임계결손부군에 비해 신생골 형성이 통계적 유의성을 띠며 증가하였고, 특히 단삼의 지속적인 경구투여가 단 회 국소적용보다 효과가 큰 것으로 확인되었다(Table 1).

Micro CT 촬영 및 골형성량 측정 결과: 채취된 골조직을 Skyscan 1172 Desktop X-ray Microtomograph를 이용하여 50 kVp의 관전압과 200 μA의 노출 조건으로 컴퓨터 단층촬영하여 골단면의 영상을 획득하고 3차원 영상으로 재구성하였다. 그리고 골결손부 양쪽의 정상골 및 가장자리, 골결손부 중앙의 단면상에 대해 신생골 형성을 평가하였다. 그 결과 임계결손부군에서는 골결손부 가장자리에서만 소량의 얇은 골신생을 확인할 수 있

Table 1. Bone regeneration of water extract of Danshen (WED) on rat calvarial defect model (mean ± SD)

Group	OD
Critical Defect (control)	1.51 ± 0.13
Collagen	1.71 ± 0.12
Collagen with WED local administration	1.78 ± 0.02*
Collagen with WED local and oral administration	1.88 ± 0.17**

*$p < 0.05$ as compared with the control (critical defect) group. **$p < 0.01$ as compared with the control (critical defect) group. Values are expressed in mean ± SD (n = 5).

Table 2. Effect of WED on bone mineral density (BMD) of rat calvarial defect model

Group	BMD
Critical Defect (control)	0.148 ± 0.022
Collagen	0.204 ± 0.014**
Collagen with WED local administration	0.217 ± 0.008**
Collagen with WED local and oral administration	0.242 ± 0.003*,**

*$p < 0.05$ as compared with the collagen graft group. **$p < 0.01$ as compared with the control (critical defect) group. Values are expressed in mean ± SD (n = 5).

Table 3. Effect of WED on bone volume (BV) of rat calvarial defect model

Group	BV
Critical Defect (control)	9.6800 ± 0.035
Collagen	11.9267 ± 1.194
Collagen with WED local administration	14.5000 ± 0.504
Collagen with WED local and oral administration	16.7833 ± 0.777*

*$p < 0.05$ as compared with the control (critical defect) group. Values are expressed in mean ± SD (n = 5).

었다. 콜라겐 기질을 이식한 군에서는 약간의 골신생이 관찰되었으나, 단삼 수용성 추출물을 함께 이식한 군에 비해 새로 형성된 골의 양이 적었다. 그리고 단삼 수용성 추출물을 단회 국소적용한 군보다 이식 후 지속적으로 경구투여한 군에서 신생골 형성이 현저히 많았다(Fig. 3). 초기 골결손 형성부를 측정영역으로 설정하여 골밀도(BMD) 및 골부피(BV)를 측정하였다. 그 결과 모든 군에서 임계결손부에 비해 골밀도가 유의적으로 높았고($p < 0.01$), 단삼 수용성 추출물을 국소 및 경구투여한 군은 콜라겐만 이식한 군에 비해서도 골밀도가 높았다($p < 0.05$) (Table 2). 골부피 또한 단삼 수용성 추출물 국소

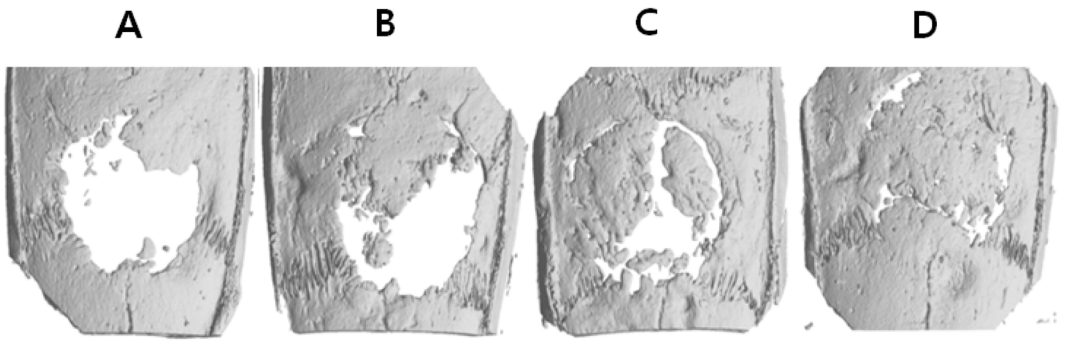

Fig. 3. 2D and 3D micro CT images of 8 mm critical-size calvarial defects at 8 weeks postsurgery (A; critical defect, B; collagen, C; collagen with water extract of Danshen (WED) local administration, D; collagen with WED local and oral administration). In collagen with WED local and oral administration groups, the defect almost completely repaired by the graft materials after 8 weeks of postsurgery.

및 경구투여군에서 유의적으로 높게 측정되었다($p < 0.05$) (Table 3).

고 찰

단삼은 꿀풀과(Labiate)에 속하는 다년생 약용식물로, 이들의 건조한 뿌리는 신체 기능을 증진시키기 위해 일반적으로 사용되는 전통약제이며, 적삼, 자단삼, 대홍포, 화혈근 이라고도 불리며, 붉은 색을 띠고 있다. 뿌리는 특이한 냄새가 나고, 약간 쓴맛이 나며, 한방에서는 약제로 사용하는데 부인의 생리불순, 생리통, 산후 복통에 쓰인다. 또한, 어혈성의 심복부 동통과 타박상을 치료하고, 불면증, 피부발진 등에도 사용된다. 그리고 동양 뿐 아니라 서양에서도 혈류개선 효과를 보여 심혈관계 질환의 치료 및 예방을 위해 널리 사용되며, 창상 치유를 촉진시키는 효과도 보고되었다 [4, 5, 35, 36].

단삼은 크게 두 가지 서로 다른 성분인 수용성과 지용성 성분으로 구성되고, 이 중 수용성인 페놀성 화합물(phenolic compounds)과 지용성인 디터펜(diterpenes)이 많은 약리활성을 갖는다. 1930년대 초반부터 단삼의 화학성분에 대한 연구가 시행되었고, 초반에는 주로 지용성 성분에 대한 연구가 이루어졌으나, 최근에는 수용성 성분에 대한 연구가 더 활발히 진행되고 있다 [16, 36]. 단삼의 알려진 수용성 유효 성분으로는 salvianolic acid A와 B, danshensu, caffeic acid, protocatechualdehyde, rosmarinic acid 등이 있다 [36]. 특히 salvianolic acid B는 혈관 내피세포에서 산화질소(nitric oxide) 합성을 증가시키고 [24], 안지오텐신전환효소(angiotensin converting enzyme)를 방해하여 혈관을 이완시켜 혈압을 낮추고 [4, 5, 15], 뇌 및 심장과 같은 주요장기의 허혈-재관류 손상을 예방하는 것으로 알려져 있다 [33]. 그리고 골모세포인 MC3T3-E1 세포 및 마우스 골수세포의 ALP 합성을 증가시키고 [9, 20], murine SVR 내피세포주에서 VEGF, VEGF-R2 유전자 발현을 증가시켜 혈관신생을 촉진시킨다는 보고도 있다 [14]. 그리고 다양한 동물실험에서 단삼 추출물의 골형성 촉진 효과가 보고되었다 [3, 16, 18, 33]. Salvianolic acid B의 골모세포 활성 촉진 효과가 증명된 바, 이의 임상적 적용 가능성을 확인하기 위해 랫드 두개골 결손부에서의 골재생 효과를 평가하고자 하였다. 천연물에서 순수한 1가지 특정 성분을 분리해 내는 것은 매우 어려우며, 적절한 추출 조건을 찾기 위해서는 시간 및 비용 면에서 매우 불리한 경우가 많다. 따라서 salvianolic acid B만을 임상에 적용하기에는 비용적 부담이 너무 크므로, 단삼으로부터 수용성 성분을 추출하여 임상실험에 적용하였다. 그리고 추출 과정에서 salvianolic acid B의 구조변화를 막고, 추출되는 양 및 용해성을 최대화시키기 위해 다양한 추출조건을 시도하여 결과적으로 물을 용매로 한 저온 초음파추출법을 확립하였다. 이렇게 추출된 단삼 수용성 성분을 콜라겐 기질을 지지체로 사용하여 랫드 두개골의 8 mm 임계결손부에 이식하였다. 그리고 단삼 수용성 추출물의 경구투여 효과를 확인하기 위해 수술 후 2개월 동안 지속적으로 경구투여한 군과 단회 국소처치군의 골형성 정도를 비교하였다. 신생골 형성은 골이식 후 8주째에 실험동물을 희생시켜 골편을 채취한 후 일반 방사선 촬영하여 획득된 방사선 밀도 차이를 영상분석 프로그램을 이용하여 정량적으로 평가하였다. 일반방사선 사진상에서 콜라겐만 이식한 군에서도 약간의 신생골 형성이 관찰되었고, 단삼 수용성 추출물을 처리하여 이식한 군에서는 현저한 신생골 형성이 관찰되었다. 특히 단삼 수용성 추출물을 지속적으로 경구투여한 군에서 가장 높은 방사선 밀도를 보였다. Micro CT 상의 결과도 일

반 방사선 촬영상의 결과와 동일하였고, CT 단면상을 3차원으로 재구성한 결과 신생골 형성 정도를 정확히 확인할 수 있었다. 본 연구를 통하여 단삼으로부터 수용성 성분을 추출하기 위한 추출법으로 물을 용매로 한 저온 초음파 추출법이 매우 유용하였다. 그리고 콜라겐 기질이 신생골 형성을 위한 지지체로 적합하며, 단삼 수용성 추출물의 운반체로도 유용함을 확인할 수 있었다. 또 salvianolic acid B를 포함하고 있는 단삼 수용성 추출물의 단회 국소처치가 생체 내에서 골재생 효과가 뛰어나며, 특히 골이식 후 단삼 수용성 추출물의 지속적인 경구투여로 골재생 효과를 증가시킬 수 있음이 확인되었다. 따라서 단삼 수용성 추출물의 단회 국소처치에 더하여 지속적인 경구투여가 골재생 효과를 극대화 시킬 수 있을 것으로 생각된다.

현재까지의 연구를 통하여 골이식에서 골유도체로서 천연물인 단삼 수용성 추출물의 이용 가능성을 확인할 수 있었다. 이의 사용은 부가적인 수술 부담 및 합병증의 감소, 고비용에 대한 부담의 감소, 합성약제의 고용량 사용에 의한 잠재적인 독성 유발 가능성의 감소 등 다양한 측면에서 임상적 상황에의 적용에 유리할 것으로 생각된다. 앞으로 골형성능을 갖는 세포와 단삼 수용성 추출물 및 이들의 운반체로 적절한 지지체의 스크리닝이 필요할 것으로 생각되며, 이들의 적절한 융합을 위한 골 조직공학적 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2007년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2007-331-E00269).

참고문헌

1. **Bolder SB, Schreurs BW, Verdonschot N, van Unen JM, Gardeniers JW, Slooff TJ.** Particle size of bone graft and method of impaction affect initial stability of cemented cups: human cadaveric and synthetic pelvic specimen studies. Acta Orthop Scand 2003, **74**, 652-657.
2. **Boyce T, Edwards J, Scarborough N.** Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. Orthop Clin North Am 1999, **30**, 571-581.
3. **Chae HJ, Chae SW, Yun DH, Keum KS, Yoo SK, Kim HR.** Prevention of bone loss in ovariectomized rats: the effect of Salvia miltiorrhiza extracts. Immunopharmacol Immunotoxicol 2004, **26**, 135-144.
4. **Chang PN, Mao JC, Huang SH, Ning L, Wang ZJ, On T, Duan W, Zhu YZ.** Analysis of cardioprotective effects using purified Salvia miltiorrhiza extract on isolated rat hearts. J Pharmacol Sci 2006, **101**, 245-249.
5. **Cheng TO.** Cardiovascular effects of Danshen. Int J Cardiol 2007, **121**, 9-22.
6. **Clayman L.** Implant reconstruction of the bone-grafted maxilla: review of the literature and presentation of 8 cases. J Oral Maxillofac Surg 2006, **64**, 674-682.
7. **Clokie CM, Sndor GK.** Reconstruction of 10 major mandibular defects using bioimplants containing BMP-7. J Can Dent Assoc 2008, **74**, 67-72.
8. **de Boer HH.** The history of bone grafts. Clin Orthop Relat Res 1988, **226**, 292-298.
9. **Ding Y, Soma S, Takano-Yamamoto T, Matsumoto S, Sakuda M.** Effects of salvia miltiorrhiza bunge (SMB) on MC3T3-E1 cells. J Osaka Univ Dent Sch 1995, **35**, 21-27.
10. **Dunlop DG, Brewster NT, Madabhushi SP, Usmani AS, Pankaj P, Howie CR.** Techniques to improve the shear strength of impacted bone graft: the effect of particle size and washing of the graft. J Bone Joint Surg Am 2003, **85-A**, 639-646.
11. **Goldberg VM, Stevenson S.** The biology of bone grafts. Semin Arthroplasty 1993, **4**, 58-63.
12. **Hayden RJ, Jebson PJ.** Wrist arthrodesis. Hand Clin 2005, **21**, 631-640.
13. **Hernigou P, Poignard A, Manicom O, Mathieu G, Rouard H.** The use of percutaneous autologous bone marrow transplantation in nonunion and avascular necrosis of bone. J Bone Joint Surg Br 2005, **87**, 896-902.
14. **Huang X, Jiang H, Liu D, Zhou Z, Wang L.** Implantation of calcium phosphate cement/Danshen drug delivery system for avascular necrosis of femoral head. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi 2008, **22**, 307-310.
15. **Kang DG, Oh H, Chung HT, Lee HS.** Inhibition of angiotensin converting enzyme by lithospermic acid B isolated from Radix Salviae miltiorrhiza Bunge. Phytother Res 2003, **17**, 917-920.
16. **Kim HK, Woo ER, Lee HW, Park HR, Kim HN, Jung YK, Choi JY, Chae SW, Kim HR, Chae HJ.** The correlation of Salvia miltiorrhiza extract-induced regulation of osteoclastogenesis with the amount of components tanshinone I, tanshinone IIA, cryptotanshinone, and dihydrotanshinone. Immunopharmacol

Immunotoxicol 2008, **30**, 347-364.
17. **Kraus KH, Kirker-Head C.** Mesenchymal stem cells and bone regeneration. Vet Surg 2006, **35**, 232-242.
18. **Kwak HB, Yang D, Ha H, Lee JH, Kim HN, Woo ER, Lee S, Kim HH, Lee ZH.** Tanshinone IIA inhibits osteoclast differentiation through down-regulation of c-Fos and NFATc1. Exp Mol Med 2006, **38**, 256-264.
19. **Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ.** Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. Bone 1996, **19** (Suppl), 1S-12S.
20. **Liu YR, Qu SX, Maitz MF, Tan R, Weng J.** The effect of the major components of Salvia Miltiorrhiza Bunge on bone marrow cells. J Ethnopharmacol 2007, **111**, 573-583.
21. **Meijer GJ, de Bruijn JD, Koole R, van Blitterswijk CA.** Cell-based bone tissue engineering. PLoS Med 2007, **4**, e9.
22. **Munk B, Larsen CF.** Bone grafting the scaphoid nonunion: a systematic review of 147 publications including 5,246 cases of scaphoid nonunion. Acta Orthop Scand 2004, **75**, 618-629.
23. **Nishida J, Shimamura T.** Methods of reconstruction for bone defect after tumor excision: a review of alternatives. Med Sci Monit 2008, **14**, RA107-113.
24. **O K, Cheung F, Sung FL, Zhu DY, Siow YL.** Effect of magnesium tanshinoate B on the production of nitric oxide in endothelial cells. Mol Cell Biochem 2000, **207**, 35-39.
25. **Pilitsis JG, Lucas DR, Rengachary SS.** Bone healing and spinal fusion. Neurosurg Focus 2002, **13**, e1.
26. **Safran O, Iannotti JP.** Arthrodesis of the shoulder. J Am Acad Orthop Surg 2006, **14**, 145-153.
27. **Sakou T.** Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. Bone 1998, **22**, 591-603.
28. **Sauer HD, Schoettle H.** The stability of osteosyntheses bridging defects. Arch Orthop Trauma Surg 1979, **95**, 27-30.
29. **Shi H, Ma J, Zhao N, Chen Y, Liao Y.** Periodontal regeneration in experimentally-induced alveolar bone dehiscence by an improved porous biphasic calcium phosphate ceramic in beagle dogs. J Mater Sci Mater Med 2008, **19**, 3515-3524.
30. **Shim KM, Kim SE, Yoo KH, Bae CS, Choi SH, Kang SS.** Case studies of repair of pathological mandibular fracture due to periodontal disease in dogs. J Vet Clin 2007, **24**, 653-657.
31. **Shors EC.** Coralline bone graft substitutes. Orthop Clin North Am 1999, **30**, 599-613.
32. **Tiwana PS, Kushner GM, Haug RH.** Maxillary sinus augmentation. Dent Clin North Am 2006, **50**, 409-424.
33. **Wong RW, Rabie AB.** Effect of Salvia miltiorrhiza extract on bone formation. J Biomed Mater Res A 2008, **85**, 506-512.
34. **Wong RW, Rabie AB.** Traditional Chinese medicines and bone formation°TMa review. J Oral Maxillofac Surg 2006, **64**, 828-837.
35. **Zhao GR, Zhang HM, Ye TX, Xiang ZJ, Yuan YJ, Guo ZX, Zhao LB.** Characterization of the radical scavenging and antioxidant activities of danshensu and salvianolic acid B. Food Chem Toxicol 2008, **46**, 73-81.
36. **Zhou L, Zuo Z, Chow MS.** Danshen: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use. J Clin Pharmacol 2005, **45**, 1345-1359.