원 저

음곡 애엽약침이 난소적출 흰쥐의 골다공증에 미치는 영향

정주열 · 김정호 · 김영일

대전대학교 한의과대학 침구학교실

Abstract

Effects of Herbal-acupuncture with *Artemisiae Vulgaris Folium* Extract at KI_{10}(*Eumgok*) on Osteoporosis in Ovariectomized Mice

Jung Ju-youl, Kim Jung-ho and Kim Young-il

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

Objectives & Methods : The purpose of this study is to observe the effects of herbal-acupuncture with *Artemisiae Vulgaris Folium* extract(AaH-HA) at KI_{10}(*Eumgok*) on osteoporosis in ovariectomized(OVX) ddy mice. We carried out several experimental items to analyze the changes in body weight, urine, weight, uterus index, tibial length, the ash bone weight, tibial BMD, serum ALP, serum osteocalcin, serum Ca, and the levels of Ca, P, Ca/P ratio in tibia, and we performed histological and histomorphological analysis as well.

Results : 1. Herbal-acupuncture with AaH-HA at KI_{10} significantly inhibited the reduction phosphorus level in serum in ovariectomized mice.

2. Herbal-acupuncture with AaH-HA at KI_{10} significantly inhibited the reduction creatinine level in serum in ovariectomized mice.

3. Herbal-acupuncture with AaH-HA at KI_{10} significantly inhibited the increase of tibial osteoclast cells in ovariectomized mice.

4. Herbal-acupuncture with AaH-HA at KI_{10} significantly inhibited the reduction of TBV(trabecular bone volume) and TBT(trabecular bone thickness) in ovariectomized mice.

5. Herbal-acupuncture with AaH-HA at KI_{10} significantly inhibited the overgrowth of tibial growth plate length(GPL) in ovariectomized mice.

Conclusions : In conclusion, our study suggested that Herbal-acupuncturing with AaH-HA at KI_{10} can be effective treatment for osteoporosis.

Key words : herbal-acupuncture, osteoporosis, KI_{10}(Eumgok)

· 접수 : 2011. 11. 8. · 수정 : 2011. 11. 16. · 채택 : 2011. 11. 17.

· 교신저자 : 김영일, 대전광역시 서구 둔산동 1136 대전대학교 부속둔산한방병원 침구과
Tel. 042-470-9137 E-mail : omdkim01@dju.ac.kr

Ⅰ. 서 론

골다공증은 연령 증가에 비례하여 발병률이 상승하는 질환으로 골다공증으로 인한 고관절 및 척추골 골절은 사망의 원인이 되기도 하며 많은 의료비가 소모되고 합병증이 병발하여 현재 세계적으로 관심이 높아지고 있는 추세이다[1].

골다공증은 骨質은 정상이나 骨量이 性別, 年齡, 種族을 감안하여 기대치 이하로 감소된 경우를 말하며, WHO는 측정한 骨量이 젊은 성인 骨量의 평균에서 2.5SD (standard deviation)보다 감소된 경우를 골다공증이라고 정의하였다[2].

韓醫學에서는 문헌상 골다공증이란 병명은 찾아볼 수 없으나, 유사한 表現으로는 骨[3], 骨痿[3], 骨枯[3], 骨痺[3], 骨極[4], 骨寒熱[5]이 있으며 骨의 生長과 機能은 腎氣의 盛衰에 따라서 결정되어 骨病은 대개 先天稟受가 不足하거나 腎氣가 虛弱한 者에게 나타난다고 하였다[6].

藥鍼療法은 鍼과 藥物의 자극을 동시에 加하여 보다 양호한 치료효과를 얻고자 함을 목적으로, 특정질환에 유효한 藥物이나 處方을 選用하여 藥鍼液으로 만들어 일정한 穴位, 壓通點 및 피부의 陽性 反應點에 注入함으로써 生理的인 기능을 강화시키고 病理的인 상태를 개선시키는 新鍼療法[7]의 일종이다.

灸法의 주재료인 애엽(*Artemisiae Vulgaris Folium*)은 菊花科에 속한 다년생 초목인 황해쑥, 약쑥과 野艾의 잎을 건조한 것으로, 調理氣血, 祛寒濕, 溫經止血의 효능이 있고, 항염증 작용 및 진통 작용이 있다고 하고 항산화 효과, 면역활성 효과가 우수하다고 알려져 있다[8),9)].

陰谷(KI_{10})은 足少陰腎經의 經穴로 足少陰의 合水穴이며 滋補肝腎의 효능이 있어 腎虛에 의한 骨髓의 부족으로 인한 각종 증상을 主治한다[7].

최근 骨多孔症에 대한 한의학의 실험적 연구로는 右歸飮 등[10-16]의 한약복합처방과 何首烏 등[17-21]의 단미제에 관한 연구가 있었고, 약침실험으로는 巴戟天 등[22-24]이 있었으나, 調理氣血하고 溫經하는 효과가 있는 애엽에 관한 약침연구는 아직 접하지 못하였다.

이에 저자는 애엽약침이 폐경으로 의한 골다공증에 미치는 영향을 알아보고자 흰쥐의 난소를 적출하여 estrogen 결핍에 의한 골다공증을 유도하여 애엽약침을 흰쥐의 음곡혈(KI_{10})에 시술하고, 체중변화, 자궁무게, 자궁비중, 경골길이, 경골회분무게, 골밀도(BMD)를 측정하여 골다공증을 평가하고 혈청분석 및 경골 내 Ca 및 P 함량을 측정하여 그 변화를 관찰, 연구하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

4주령에 난소를 적출한 7주령 암컷 ddy mice(체중 22±5g)를 (주)중앙실험동물(경기도, 한국)로부터 공급받아, 실험당일까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료)와 물을 충분히 공급하고, 실온(22±2℃)과 습도(20~60%)를 유지하여 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며 대전대학교 동물실험윤리위원회의 규칙을 따랐다.

2) 약재

실험에 사용된 애엽(*Artemisiae Vulgaris Folium*)은 대전대학교 부속둔산한방병원에서 구입한 것을 정선하여 사용하였다.

3) 시약 및 기기

(1) 시약(Table 1.)

Table 1. Reagent

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

(2) 기기(Table 2.)

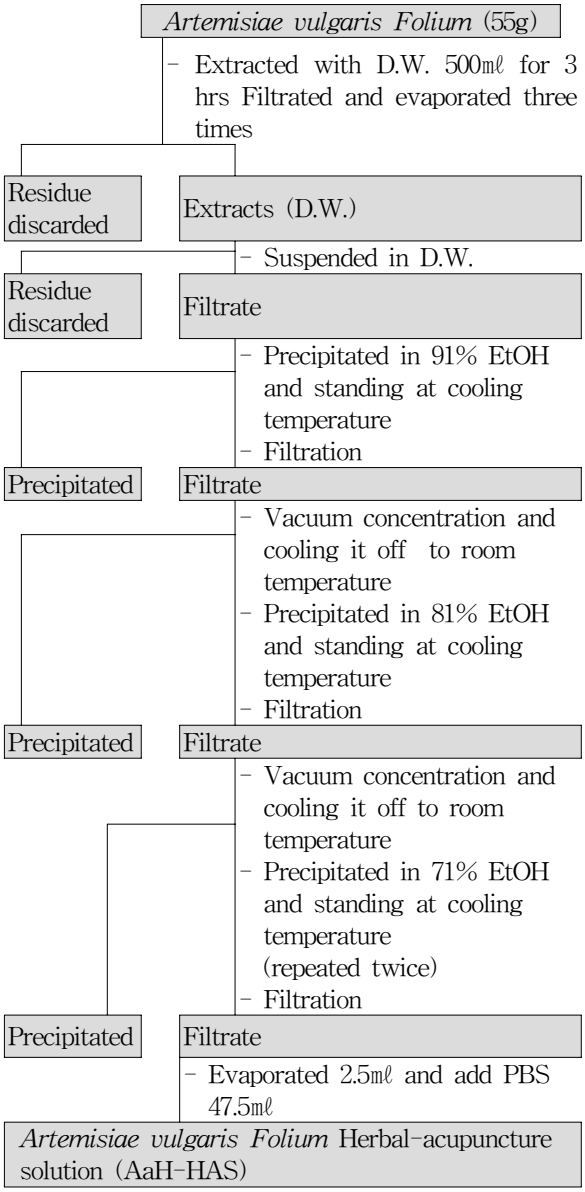
Table 2. Equipment

Reagent	Company	Country
Rotary evaporator	Eyela	Japan
Camera (DXM 1200F) ECLIPSE E600 microscopy	Nikon	
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 애엽 55g을 분쇄하여 분말로 만들어, 삼각 flask에 넣고 증류수 500㎖를 가하여 3시간 동안 shaking water bath에서 유출한 후, 유출액을 여과하였다. 여과액을 여과지로 3회 여과한 후, rotary evaporator에 감압농축하였다. 농축액에 91% ethyl alcohol 30㎖를 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㎖를 가하여 잠시 교반 후 방치하여, 침전물이 생성되게 한 후 여과하였다. 여과액에 71% ethyl alcohol 30㎖를 가하고 교반한 후 방치하였다가 다시 여과하는 조작을 2회 반복하였다. 여과액 중의 ethyl alcohol 성분을 rotary evaporator로 감압 제거하고, 남은 농축액이 20㎖가 되게 하였다. 애엽 55g으로부터 얻은 약침액을 감압 농축하여 수분을 모두 날렸을 때에 분말은 2.2g(수득율 4%)이었다. 1N NaOH를 이용하여 농축액을 pH 6.8이 되도록 조절하고, 4℃에서 12시간 방치한 후, 침전물을 제거하기 위해 syringe filter를 실시하였다. 여과된 농축액에 PBS를 첨가하여 5%로 희석하여 약침액으로 사용하였다(Scheme 1).



Scheme 1. Manufacturing procedure of AaH-HA solution

2) 세포독성 측정

정상 ddy mice의 골세포 1×105cell/well에 5%, 1%, 0.1%의 애엽 약침액을 처리한 후 MTT assay를 이용하여, 세포 생존률을 측정하였다.

(1) Osteoblast cell 분리 및 배양

정상 ddy mice의 경골과 대퇴골을 적출하였다. 차가운 PBS에 담궈 근육을 제거하고, 깨끗한 PBS를 syringe에 넣어 골 내부로 침투시켜, 골세포들을 1,200rpm에 5분간 원심 분리하였다. 상층액은 버리고, 침전된 골세포들은 MSC osteogenic singleQuots를 첨가한 differaentiation Basal medium(Cat No. PT-3924, Lonza, USA)을 이용하여 3번 세척하였다. 준비된 세포는 7일간 세포 배양을 실시하여 osteoblast cell의 분화를 유도하였다.

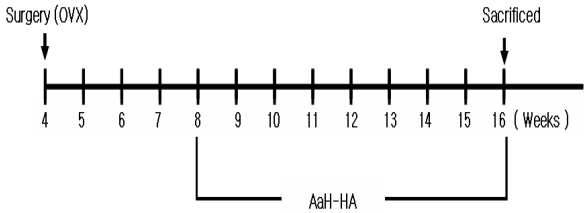
(2) MTT assay

분화된 osteoblast cell의 viability를 trypan blue를 이용하여 확인한 뒤, 96 well plate에 세포를 1×105 cells/well으로 분주하고, MSC osteogenic singleQuots를 첨가한 differaentiation Basal medium (Cat No. PT-3924, Lonza, USA)에 애엽약침액을 농도별로 처리하고, 72시간 동안 세포 배양을 실시하였다. 72시간 후에, MTT solution(5㎎/㎖, Cat No. 135038, Sigma, USA)을 각 well에 20㎕씩 분주하고 5시간 동안 37℃에서 incubation을 실시하였다. 5시간 후, 각 well에 있는 medium을 100㎕씩 버리고, solubilizing solution을 100㎕씩 분주한 뒤 pipetting을 강하게 하여 well에 dark blue crystals가 침전하는 정도를 ELISA reader를 이용하여 570㎚에서 optical densities를 확인하였다.

3) 골다공증 동물모델

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

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



Scheme 2. Osteoporotic mouse model

4) 취혈

骨度分寸法에 의거하여 생쥐의 뒷다리에서 인체의 음곡(*Eumgog* ; KI_{10})에 상응하는 부위를 取하였다.

5) 실험군 분류 및 처치

실험군은 ddy생쥐 9마리씩을 한 군으로 하여 정상군(normal), 위수술군(sham-OVX), HG군(hand grasping), 대조군(control), NP군(needle prick), saline군(saline injection), 애엽약침군(AaH-HA)의 7군으로 나누었다.

정상군은 아무런 처치를 하지 않았다. 위수술군은 복부를 절개한 후 난소를 적출하지 않고 다시 봉합한 뒤, 이후 아무런 처치를 하지 않았다. HG군은 난소적출 후, 약침처치 시와 같이 생쥐를 잡았다 놓는 동작만 하고, 이외의 처치는 하지 않았다. 대조군은 난소적출 이외의 처치는 하지 않았다. Saline군은 난소적출 후 saline 0.2㎖를 음곡(KI_{10}) 상응 부위에 注入하였다. NP군은 난소적출 후, 음곡(KI_{10}) 상응 부위에 26 gauge 주사기를 0.5cm 정도 깊이로 자입하고 즉시 제거하였다. 애엽약침군(AaH-HA)은 난소적출 후, 음곡(KI_{10}) 상응 부위에 5%의 애엽약침액(AaH-HAS) 0.2㎖를 주입하였다. N.P., saline 주입, 애엽약침 처치는 모두 난소적출 4주 이후부터 8주간 주 3회 시행하였고, N.P., saline 주입, 애엽약침 시술은 실험동물의 後肢에서 음곡(KI_{10}) 상응 부위를 매 시술 시마다 좌우 교대로 취하여 시술하였다(scheme 2).

6) 골다공증 평가

(1) 체중측정

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

(2) 자궁무게 및 자궁비중 측정

실험 종료 후, 각 실험군의 실험동물의 자궁무게를 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 길이측정 및 경골 회분분석

실험 종료 후, 각 실험동물의 경골을 적출하여 주위 근육 및 연 조직을 제거한 다음 경골의 길이를 측정하였다. 경골을 120℃에서 8시간 동안 건조시킨 후, furnace(Lab companion, Korea)에서 800℃에서 6시간 동안 가열하여 탄화한 뒤 경골 회분무게를 측정하였다. 탄화된 골을 HCl 500㎕에 완전히 용해시키고, 용해된 탄화 골 200㎕에 증류수를 10㎖ 첨가하여 희석

한 다음, 탄화 골의 단위 무게당 칼슘(Ca)과 인(P)의 양을 측정하여 ㎎/g 단위로 나타내었다. 칼슘과 인의 비율 Ca/P ratio(%)는 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 고정하였다. 24시간 이후, 경골을 흐르는 물에 씻은 후, PIXImus (Lunar meison, WI) 기기를 사용하여 DEXA (dual-energy x-ray absorptionmetry)의 방법으로 골밀도(bone mineral density, BMD)를 측정하였다.

(5) 혈청분석

실험 종료 후, ethyl ether를 이용하여 실험동물을 마취하고, 심장 채혈법으로 혈액을 채취하였다. 채혈한 혈액에서 혈장을 분리하여, (주) 이원 임상검사센터(대전, 한국)에 의뢰하여 혈청 ALP, calcium의 함량을 측정하였다. 혈청 중 osteocalcin 함량은 mouse osteocalcin ELISA Kit(Cat No. BT-470, biomedical Tech. Inc, USA)와 ELISA reader를 이용하여 ng/㎖의 단위로 측정하였다.

(6) 경골 내 osteoclast like cell 분석

각 군에서 절취한 경골에서 골세포를 15㎖ tube에 모아, 차가운 PBS를 이용하여 세척한 후 trypan blue를 사용하여 세포를 계수하였다. 계수한 골세포를 2×106cell/vial으로 FACs전용 tube에 분주하였다. 골세포 중 osteoclast like cell의 비율을 확인하기 위하여 표식항체 MHC II와 CD115를 반응시켜 flow cytometry로 분석하였다.

(7) 경골의 조직학적 분석

① H&E 염색분석

실험 종료 후, 각 군의 실험동물의 경골을 절취하여, 주변의 근육조직을 제거한 다음, 10%의 formalin에 고정하고 paraffin에 박정을 실시하였다. 박정한 조직을 (주) 바이오톡스텍(오창, 한국)에 의뢰하여 microtome을 이용하여 5㎛으로 절편하고 Hematoxylin and eosin 염색을 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)는 자동 조직분석 프로그램 (I-solution)을 이용하여 측정하였다.

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

7) 통계분석

실험 결과는 각 실험군에서 얻은 데이터의 평균과 표준편차로 나타내었다. 데이터 분석결과, 위수술군과 HG군(hand grasping)은 정상군과 유의한 차이를 나타내지 않아, 본 논문의 실험성적에서는 위수술군과 HG군을 제외하고 통계처리하였다. 각 실험군의 결과값은 SPSS(14.0 KO) 통계프로그램의 ANOVA test를 사용하여 비교하였으며, 사후검정은 Scheffe's test를 이용하였다. 정상군과 대조군의 평균비교에는 대응 t-test를 사용하였다. 각 실험군의 결과값을 비교하여 신뢰도 95% 이상($p<0.05$)일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 약침액의 세포독성

정상 생쥐로부터 얻은 골세포 중 조골세포만을 취하여 애엽약침액을 여러 가지 농도로 처리한 후 조골세포의 세포생존율을 확인하였다. 5% 애엽약침액(AaH-HAS)을 처리한 경우 control에 비하여 조골세포의 생존율이 유의하게 증가하였다(Fig. 1).

2. 골다공증 평가

1) 체중변화

실험동물의 몸무게를 주 1회 측정하였다. 정상군에 비하여 대조군에서 몸무게가 전반적으로 높게 나타났

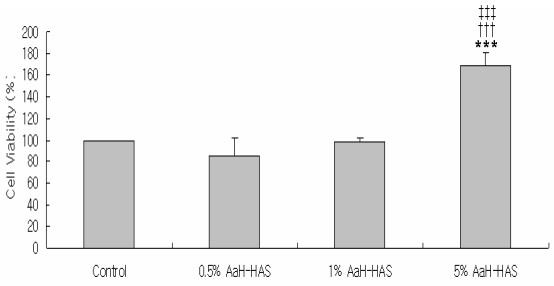


Fig. 1. Cell viability rate with various concentrations of AaH-HAS

Bone marrow cells from normal ddy female mice were prepared and cultured with various concentration of AaH-HAS(*Artemisiae vulgaris Folium* Herbal acupuncture solution). The cell survival rates were measured by MTT assay. Values represent the means ± SEM of 3 independent experiments.

*** : $p<0.001$ compared to control group by ANOVA test.

† † † : $p<0.001$ compared to 0.5% AaH-HAS by ANOVA test.

‡ ‡ ‡ : $p<0.001$ compared to 1% AaH-HAS by ANOVA test.

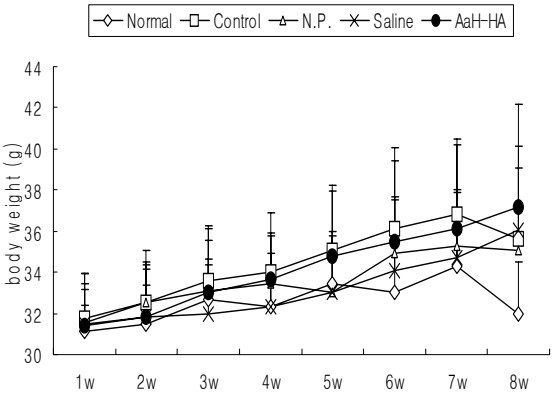


Fig. 2. Effect of AaH-HA on body weight of ovariectomized mice

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 method. All animals were weighted weekly during the experimental period. Values represent the mean ± SD (n=9).

Normal : normal ddy mice.

Control : ovariectomized (OVX) mice.

N.P. : OVX and single prick with an injection needle at KI_{10}.

Saline : OVX and saline (0.2㎖) injection at KI_{10}.

AaH-HA : OVX and herbal acupuncture with AaH-HAS (5%, 0.2㎖) at KI_{10}.

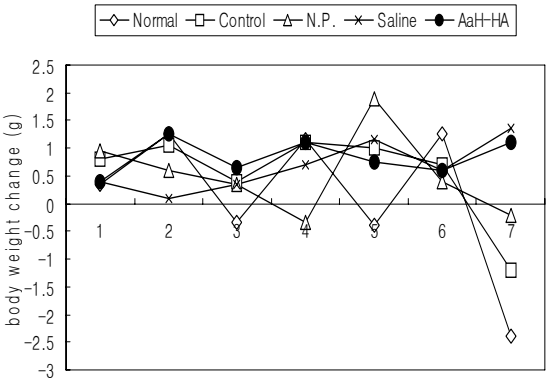


Fig. 3. Effect of AaH-HA on Body Weight Increasing Rate in Ovariectomized mice

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 method. All animals were weighted weekly during the experimental period and the body weight increasing rate was calculated. Values represent the mean ± SD (n=9).

Normal : normal ddY mice.

Control : ovariectomized (OVX) mice.

N.P. : OVX and single prick with an injection needle at KI_{10}.

Saline : OVX and saline (0.2㎖) injection at KI_{10}.

AaH-HA : OVX and herbal acupuncture with AaH-HAS (5%, 0.2㎖) at KI_{10}.

으나, 모든 실험군의 몸무게에 유의한 차이가 없었다(Fig. 2).

실험동물의 몸무게의 변화를 주간 단위로 측정하였다. 모든 실험군에서 전반적으로 몸무게 변화는 두드러지지 않았으나, 실험 마지막 주에는 saline군과 AaH-HA군을 제외한 모든 군에서 몸무게가 감소하였다(Fig. 3).

2) 자궁무게

실험 종료 후, 실험동물의 자궁을 적출하여 무게를 측정하였다. 정상군에 비하여 대조군에서 자궁무게가 유의하게 감소하였다. 애엽약침군(AaH-HA)에서는 대조군에 비하여 자궁무게에 유의한 차이가 없었다(Fig. 4).

3) 자궁비중

실험동물의 몸무게에 대한 자궁무게의 백분율을 계산하였다. 정상군에 비하여 대조군에서 자궁비중이 유의하게 감소하였다. 애엽약침군(AaH-HA)에서는 대

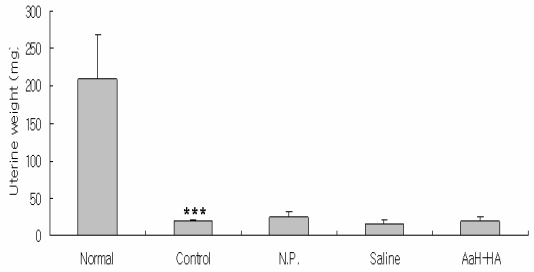


Fig. 4. Effect of AaH-HA on the uterine weight of ovariectomized mice

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 method. Uterine was weighed after the mice were sacrificed. Data were expressed as mean ± SD (n=9).
Normal : normal ddy mice.
Control : ovariectomized (OVX) mice.
N.P. : OVX and single prick with an injection needle at KI_{10}.
Saline : OVX and saline (0.2㎖) injection at KI_{10}.
AaH-HA : OVX and herbal acupuncture with AaH-HAS (5%, 0.2㎖) at KI_{10}.
*** : $p<0.001$ compared to normal group by t-test.

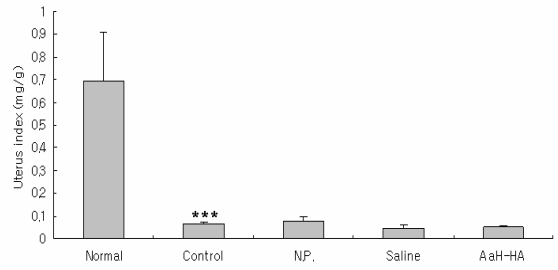


Fig. 5. Effect of AaH-HA on the uterus index in ovariectomized mice

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 method. Uterine was weighed after the mice were sacrificed. Uterus index was represented as uterine weight divided by body weight. Data were expressed as mean ± SD (n=9).
Normal : normal ddy mice.
Control : ovariectomized (OVX) mice.
N.P. : OVX and single prick with an injection needle at KI_{10}.
Saline : OVX and saline (0.2㎖) injection at KI_{10}.
AaH-HA : OVX and herbal acupuncture with AaH-HAS (5%, 0.2㎖) at KI_{10}.
*** : $p<0.001$ compared to normal group by t-test.

조군에 비하여 자궁비중에 유의한 차이가 없었다(Fig. 5).

4) 경골길이

실험 종료 후, 실험동물의 경골을 적출하여 길이를 측정하였다. 정상군에 비하여 대조군에서 경골길이가 유의하게 증가하였다. NP군에서 대조군에 비하여 경골길이가 유의하게 감소하였다. 애엽약침군(AaH-HA)에서는 대조군에 비하여 경골길이가 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 6).

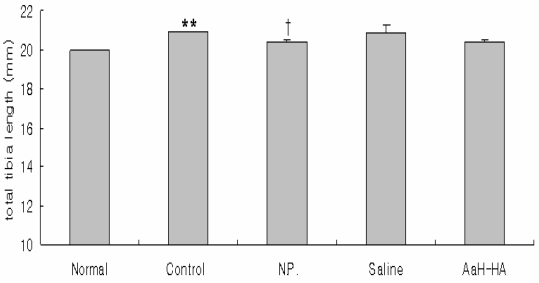


Fig. 6. Effect of AaH-HA on the tibial length in ovariectomized mice

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 method. The length of tibia was measured after the mice were sacrificed. Data were expressed as mean ± SD (n=9).
Normal : normal ddy mice.
Control : ovariectomized (OVX) mice.
N.P. : OVX and single prick with an injection needle at KI_{10}.
Saline : OVX and saline (0.2㎖) injection at KI_{10}.
AaH-HA : OVX and herbal acupuncture with AaH-HAS (5%, 0.2㎖) at KI_{10}.
** : $p<0.01$ compared to normal group by t-test.
† : $p<0.05$ compared to control group by ANOVA test.

5) 골밀도 측정

실험 종료 후, 동물의 경골을 적출하여, 골밀도를 측정하였다. 대조군에서 정상군에 비하여 골밀도가 유의하게 감소하였다. NP군에서 대조군에 비하여 골밀도가 유의하게 증가하였으며, 애엽약침군(AaH-HA)에서도 대조군에 비하여 골밀도가 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 7).

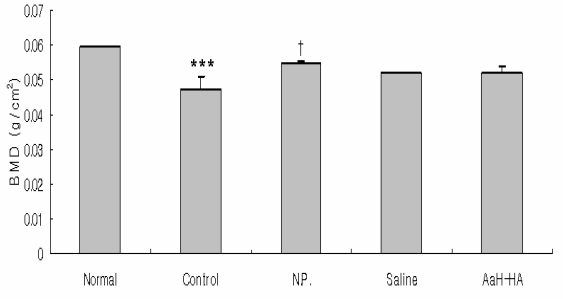


Fig. 7. Effect of AaH-HA on tibial BMD in ovariectomized mice

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 method. After the mice were sacrificed, bone mineral density (BMD) of mouse tibia was measured by DEXA (dual-energy x-ray absorptionmetry) using PIXImus (Lunar meison, WI). Data were expressed as mean ± SD (n=3).
Normal : normal ddy mice.
Control : ovariectomized (OVX) mice.
N.P. : OVX and single prick with an injection needle at KI_{10}.
Saline : OVX and saline (0.2㎖) injection at KI_{10}.
AaH-HA : OVX and herbal acupuncture with AaH-HAS (5%, 0.2㎖) at KI_{10}.
*** : $p<0.001$ compared to normal group by t-test.
† : $p<0.05$ compared to control group by ANOVA test.

3. 혈청분석

각 실험동물의 혈청으로부터 GOT, GPT, ALP, creatine, phosphorus, calcium, 및 osteocalcin의 농도를 측정하였다(Table 3).

1) GOT

혈청 GOT 농도를 측정하였다. 대조군 에서 정상군에 비하여 혈청 GOT의 농도가 증가하였으며, 애엽약침군(AaH-HA)에서 대조군군에 비하여 혈청 GOT의 농도가 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 8).

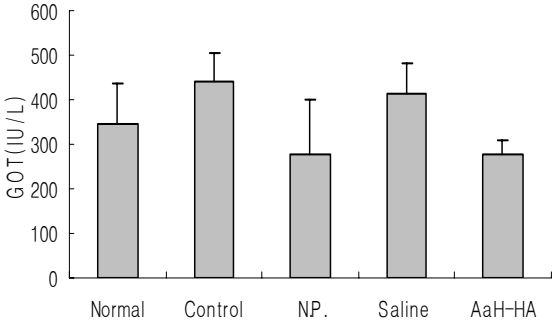


Fig. 8. Effect of AaH-HA on serum GOT level in ovariectomized mice

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 method. Blood samples were taken from mice heart and serum GOT level was analysed. Data were expressed as mean ± SD(n=5).
Normal : normal ddy mice
Control : ovariectomized (OVX) mice.
N.P. : OVX and single prick with an injection needle at KI_{10}.
Saline : OVX and saline(0.2㎖) injection at KI_{10}.
AaH-HA : OVX and herbal acupuncture with AaH-HAS (5%, 0.2㎖) at KI_{10}.

2) GPT

혈청 GPT의 농도를 측정하였다. 대조군에서 정상

Table 3. Effect of AaH-HA on Various Components in Serum of Ovariectomized Mice

Parameter	Normal	Control	N.P.	Saline	AaH-HA
GOT(IU/L)	346.330±89.810	441.000±62.390	275.330±124.070	413.670±69.000	277.750±31.784
GPT(IU/L)	64.000±12.360	77.000±2.160	67.250±22.94	63.750±10.658	51.500±2.646
ALP(IU/L)	224.000±66.363	342.000±70.090	378.670±160.370	312.670±139.930	520.250±204.144
Creatinine(㎎/dℓ)	0.750±0.063	1.060±0.167	0.615±0.055	0.985±0.033	0.533±0.063
Phosphorus(㎎/dℓ)	21.890±2.106	24.248±6.104	13.995±2.448	20.403±0.610	9.185±0.513
Calcium(㎎/dℓ)	7.350±0.208	7.050±0.835	7.900±0.716	6.550±0.719	7.975±0.435
Osteocalcin(O.D.)	0.380±0.108	0.616±0.027	0.533±0.041	0.653±0.056	0.659±0.110

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 method. Blood samples were taken from mice heart and the levels of various components in serum were analysed. Data were expressed as mean ± SD (n=5).

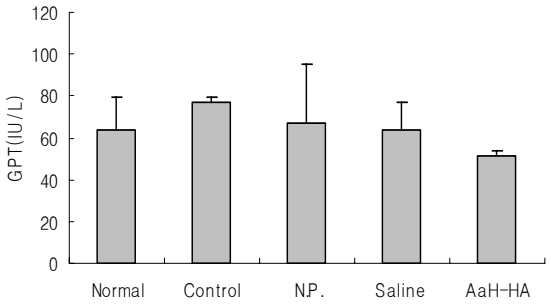


Fig. 9. Effect of AaH-HA on serum GPT level in ovariectomized Mice

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 method. Blood samples were taken from mice heart and serum GPT level was analysed. Data were ex- pressed as mean ± SD (n=5).
Normal : normal ddy mice.
Control : ovariectomized (OVX) mice.
N.P. : OVX and single prick with an injection needle at KI_{10}.
Saline : OVX and saline (0.2㎖) injection at KI_{10}.
AaH-HA : OVX and herbal acupuncture with AaH-HAS (5%, 0.2㎖) at KI_{10}.

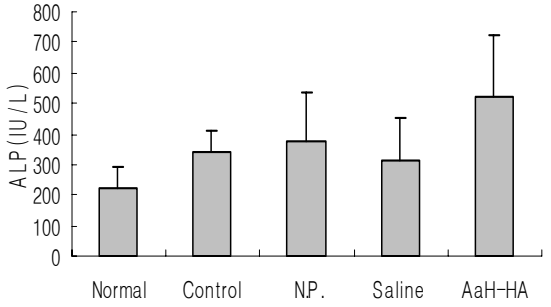


Fig. 10. Effect of AaH-HA on serum ALP level in ovariectomized mice

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 method. Blood samples were taken from mice heart and serum ALP level was analysed. Data were expressed as mean ± SD (n=5).
Normal : normal ddy mice.
Control : ovariectomized (OVX) mice.
N.P. : OVX and single prick with an injection needle at KI_{10}.
Saline : OVX and saline (0.2㎖) injection at KI_{10}.
AaH-HA : OVX and herbal acupuncture with AaH-HAS (5%, 0.2㎖) at KI_{10}.

군에 비하여 혈청 GPT의 농도가 증가하였으며, 애엽약침군(AaH-HA)에서 대조군에 비하여 혈청 GPT의 농도가 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 9).

3) Alkaline phosphatase (ALP)

혈청 ALP의 농도를 측정하였다. 정상군에 비하여 대조군에서 혈청 ALP가 증가하였으나 유의성은 없었다. 애엽약침군(AaH-HA)에서 대조군에 비하여 혈청 ALP에 유의한 변화는 없었다(Fig. 10).

4) Creatinine

각 실험동물의 혈청에서 creatinine의 농도를 측정하였다. 정상군에 비하여 대조군에서 creatinine의 농도가 유의하게 증가하였다. 애엽약침군(AaH-HA)에서는 대조군 및 saline군에 비하여 creatinine의 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 11).

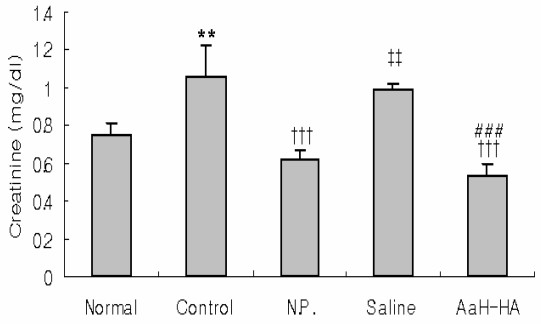


Fig. 11. Effect of AaH-HA on serum creatinine level in ovariectomized mice

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 method. Blood samples were taken from mice heart and serum creatinine level was analysed. Data were expressed as mean ± SD (n=5).
Normal : normal ddy mice
Control : ovariectomized (OVX) mice
N.P. : OVX and single prick with an injection needle at KI_{10}.
Saline : OVX and saline (0.2㎖) injection at KI_{10}.
AaH-HA : OVX and herbal acupuncture with AaH-HAS (5%, 0.2㎖) at KI_{10}.
** : $p<0.01$ compared to normal group by t-test.
† † † : $p<0.001$ compared to control group by ANOVA test.
‡ ‡ : $p<0.01$ compared to N.P. group by ANOVA test.
: $p<0.001$ compared to saline group by ANOVA test.

5) Phosphorus

각 실험동물의 혈청에서 phosphorus의 농도를 측정하였다. 정상군에 비하여 대조군에서 phosphorus의 농도가 유의하게 증가하였다. NP군에서 대조군에 비하여 phosphorus의 농도가 유의하게 감소하였고, 애엽약침군(AaH-HA)에서 대조군 및 saline군에 비하여 phosphorus의 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 12).

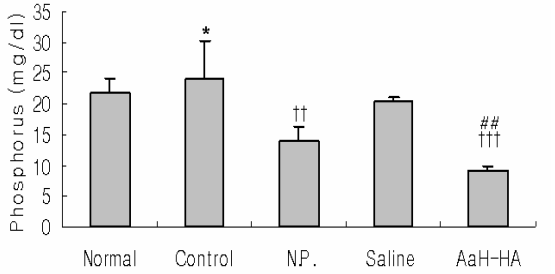


Fig. 12. Effect of AaH-HA on serum phosphorus level in ovariectomized mice

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 method. Blood samples were taken from mice heart and the level of phosphorus in serum was analysed. Data were expressed as mean ± SD (n=5).
Normal : normal ddy mice.
Control : ovariectomized (OVX) mice.
N.P. : OVX and single prick with an injection needle at KI_{10}.
Saline : OVX and saline(0.2㎖) injection at KI_{10}.
AaH-HA : OVX and herbal acupuncture with AaH-HAS(5%, 0.2㎖) at KI_{10}.
* : $p<0.05$ compared to normal group by t-test.
†† : $p<0.01$ compared to control group by ANOVA test.
††† : $p<0.001$.
: $p<0.01$ compared to saline group by ANOVA test.

6) Calcium

각 실험동물의 혈청에서 calcium 농도를 측정하였다. 각 실험군의 혈청 calcium 농도는 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 13).

7) Osteocalcin

각 실험동물의 혈청에서 osteocalcin level을 측정하였다. 정상군에 비하여 대조군에서 osteocalcin의 농도가 증가하였으나 유의성은 없었다. 애엽약침군(AaH-HA)의 osteocalcin 농도는 다른 실험군에 비하여 유의한 차이가 없었다(Fig. 14).

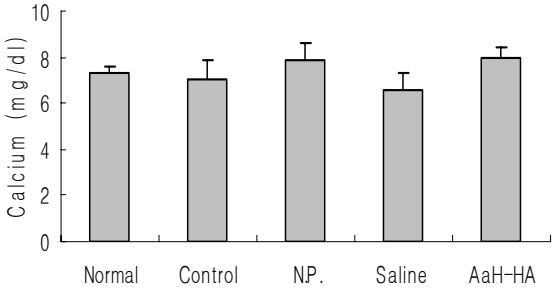


Fig. 13. Effect of AaH-HA on serum Ca level in ovariectomized mice

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 method. Blood samples were taken from mice heart and the level of calcium in serum was analysed. Data were expressed as mean ± SD (n=5).
Normal : normal ddy mice.
Control : ovariectomized (OVX) mice.
N.P. : OVX and single prick with an injection needle at KI_{10}.
Saline : OVX and saline (0.2㎖) injection at KI_{10}.
AaH-HA : OVX and herbal acupuncture with AaH-HAS (5%, 0.2㎖) at KI_{10}.

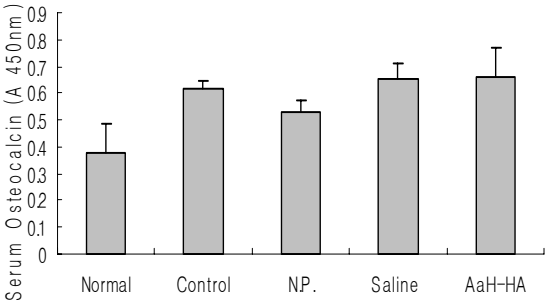


Fig. 14. Effect of AaH-HA on serum osteocalcin level in ovariectomized mice

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 method. Blood samples were taken from mice heart and serum osteocalcin level was analysed. Data were expressed as mean ± SD (n=5).
Normal : normal ddy mice.
Control : ovariectomized (OVX) mice.
N.P. : OVX and single prick with an injection needle at KI_{10}.
Saline : OVX and saline (0.2㎖) injection at KI_{10}.
AaH-HA : OVX and herbal acupuncture with AaH-HAS (5%, 0.2㎖) at KI_{10}.

Table 4. Effect of AaH-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	96.890±5.550	20.300±2.810	482.700±57.020
Control	74.560±10.610	17.760±2.310	419.570±14.880
N.P.	89.620±5.640	20.090±1.190	446.140±12.640
Saline	122.120±3.130	26.960±1.710	465.380±32.860
AaH-HA	95.036±14.536	24.68±2.361	383.529±23.625

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 method. 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 ± SD (n=4).

4. 경골 회분무게 및 경골 내 Ca, P 함량

각 실험군의 경골을 회분하여 무게를 측정하고, 경골 내 Ca 및 P 함량과 Ca/P ratio를 측정하였다 (Table 4).

1) 경골 회분무게

실험 종료 후, 실험동물의 경골 회분하여 경골 내 회분 함량을 측정하였다. 대조군에서 정상군에 비하여 회분함량이 감소하였으나 유의성은 없었다. 애엽약침군(AaH-HA)에서는 대조군, NP군 및 saline군에 비하여 경골 회분함량이 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 15).

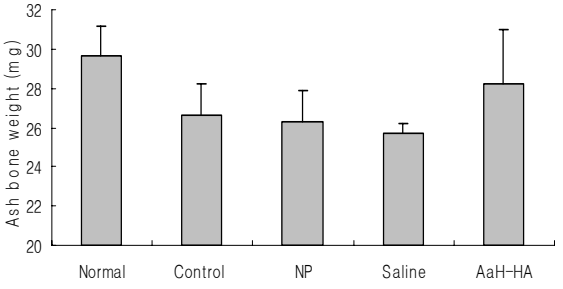


Fig. 15. Effect of AaH-HA on the Ash bone weight in ovariectomized mice

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 method. After the mice were sacrificed, tibias were removed, dried, and incinerated, and the ash was weighed. Data were expressed as mean ± SD (n=9).

Normal : normal ddy mice.

Control : ovariectomized (OVX) mice.

N.P. : OVX and single prick with an injection needle at KI_{10}.

Saline : OVX and saline (0.2㎖) injection at KI_{10}.

AaH-HA : OVX and herbal acupuncture with AaH-HAS (5%, 0.2㎖) at KI_{10}.

2) Calcium

각 실험군의 경골을 회분한 뒤, 경골 내 calcium의 함량을 측정하였다. 대조군에서 정상군에 비하여 calcium 함량이 유의하게 감소하였다. Saline군에서는 대조군 및 NP군에 비하여 calcium함량이 유의하게 증가하였다. 애엽약침군(AaH-HA)은 대조군에 비하여 경골 calcium함량이 증가하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 16).

3) Phosphorus

각 실험군에서 취한 경골을 회분한 뒤, 경골 내 phosphorus의 함량을 측정하였다. 대조군에서 정상군에 비하여 경골내 phosphorus의 함량이 감소하였으나 유의성은 없었다. Saline군에서는 대조군 및 NP군에 비하여 경골내 phosphorus 함량이 유의하게 증가하였으며, 애엽약침군(AaH-HA)에서는 대조군에 비하여 경골 내 phosphorus 함량이 유의하게 증가하였다(Fig. 17).

4) Ca/P ratio

각 실험군에서 취한 경골을 회분한 뒤, 경골 내에서 calcium과 phosphorus의 비율을 측정하였다. 대조군에서 정상군에 비하여 Ca/P 비율이 약간 감소하였

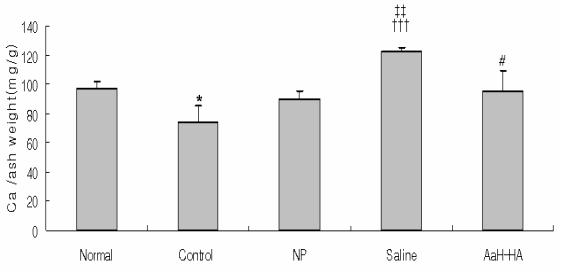


Fig. 16. Effect of AaH-HA on tibial Ca level in ovariectomized mice

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 method. After the mice were sacrificed, tibia was removed, dried, carbonized and dissolved in HCl and the tibial Ca level was evaluated. Data were expressed as mean ± SD (n=4).
Normal : normal ddy mice.
Control : ovariectomized (OVX) mice.
N.P. : OVX and single prick with an injection needle at KI_{10}.
Saline : OVX and saline (0.2㎖) injection at KI_{10}.
AaH-HA : OVX and herbal acupuncture with AaH-HAS (5%, 0.2㎖) at KI_{10}.
* : $p<0.05$ compared to normal group by t-test.
† † † : $p<0.001$ compared to control group by ANOVA test.
‡ ‡ : $p<0.01$ compared to N.P. group by ANOVA test.
# : $p<0.05$ compared to saline group by ANOVA test.

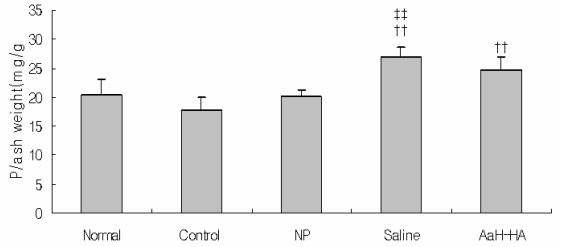


Fig. 17. Effect of AaH-HA on tibial phosphorus level in ovariectomized mice

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 method. After the mice were sacrificed, tibia was removed, dried, carbonized and dissolved in HCl and the tibial phosphorus level was measured. Data were expressed as mean ± SD (n=4).
Normal : normal ddy mice.
Control : ovariectomized (OVX) mice.
N.P. : OVX and single prick with an injection needle at KI_{10}.
Saline : OVX and saline (0.2㎖) injection at KI_{10}.
AaH-HA : OVX and herbal acupuncture with AaH-HAS (5%, 0.2㎖) at KI_{10}.
† † : $p<0.01$ compared to control group by ANOVA test.
‡ ‡ : $p<0.01$ compared to N.P. group by ANOVA test.

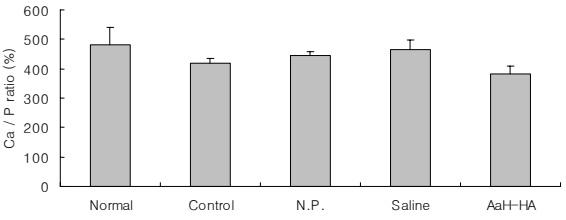


Fig. 18. Effect of AaH-HA on tibial Ca/P ratio in ovariectomized mice

All experimental animals except those in the normal group underwent bilateral ovariectomy (OVX). After recovering for four weeks from the surgery, the ovariectomizd mice were randomly allocated to each experimental groups and treated as described in the materials and method. After the mice were sacrificed, tibia was removed, dried, carbonized and dissolved in HCl and the tibial Ca/P ratio was calculated. Data were expressed as mean ± SD (n=4).
Normal : normal ddy mice.
Control : ovariectomized (OVX) mice.
N.P. : OVX and single prick with an injection needle at KI_{10}.
Saline : OVX and saline (0.2㎖) injection at KI_{10}.
RLF-HA : OVX and herbal acupuncture with AaH-HA (5%, 0.2㎖) at KI_{10}.

으나 통계적 유의성은 없었다. 애엽약침군(AaH-HA)에서는 대조군에 비하여 Ca/P 비율에 유의한 차이가 나타나지 않았다(Fig. 18).

5. 경골 내 osteoclast like cell 분석

경골 내 osteoclast like cell의 비율을 flow cytometry assay를 이용하여 측정하였다. 대조군에서 $MHCII^+/CD115^+$세포의 비율은 5.47±0.4로 나타나 정상군의 2±0.079에 비하여 현저하게 증가하였으며, 애엽약침군(AaH-HA)에서는 0.85±0.24로 나타나 대조군, NP군 및 saline군에 비하여 감소하였다(Fig. 19).

경골 내 osteoclast like cell의 비율은 대조군에서 정상군에 비하여 유의하게 증가하였으며, 애엽약침군(AaH-HA)에서는 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 20).

6. 경골의 조직학적 분석

1) H&E 염색분석

실험동물의 경골조직을 절편하여 Hematoxylin and eosin(H&E) 염색을 실시하였다. 대조군에서 정상군에 비하여 골 내부에 pore가 많이 나타났고, 지주골이 적게 분포하였다. 애엽약침군(AaH-HA)에서는 control군,

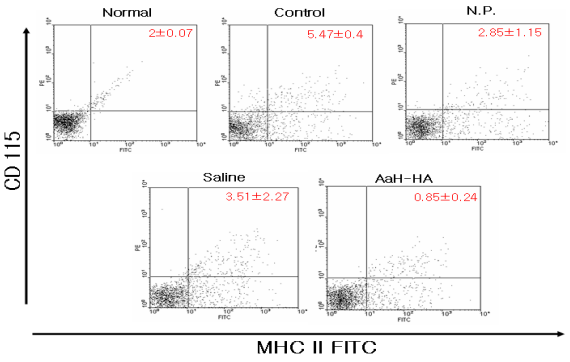


Fig. 19. Effect of AaH-HA on osteoclast like cell in tibia of ovariectomized mice

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 method. After the mice were sacrificed, tibia was removed, and the number of osteoclast like cell in tibia was analyzed using flowcytometry. Data were expressed as mean ± SD (n=4).
Normal : normal ddy mice.
Control : ovariectomized (OVX) mice.
N.P. : OVX and single prick with an injection needle at KI_{10}.
Saline : OVX and saline (0.2㎖) injection at KI_{10}.
AaH-HA : OVX and herbal acupuncture with AaH-HAS (5%, 0.2㎖) at KI_{10}.

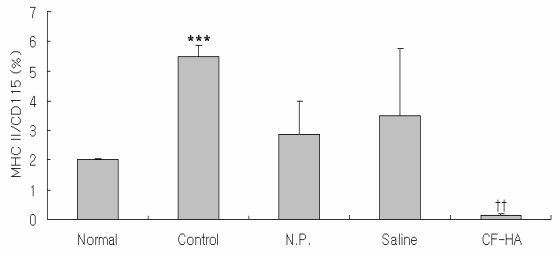


Fig. 20. Effect of AaH-HA on osteoclast like cell in tbia of ovariectomized mice

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 method. After the mice were sacrificed, tibia was removed, and the number of osteoclast like cell in tibia was analyzed using flowcytometry. Data were expressed as mean ± SD(n=4).
Normal : mormal ddy mice.
Control : ovariectomized (OVX) mice.
N.P. : OVX and single prick with an injection needle at KI_{10}.
Saline : OVX and saline (0.2㎖) injection at KI_{10}.
AaH-HA : OVX and herbal acupuncture with AaH-HAS (5%, 0.2㎖) at KI_{10}.
*** : $p<0.001$ compared to normal group by t-test.
† † : $p<0.01$ compared to control group by ANOVA test.

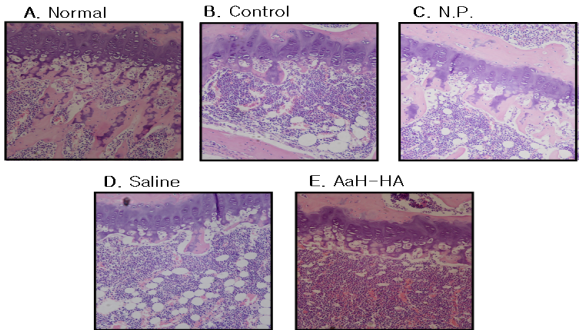


Fig. 21. Histological analysis (H&E stain) of tibia in ovariectomized mice

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 method. After the mice were sacrificed, the mouse tibia was sliced and embedded in paraffin, and 5㎛ sections were stained with Hematoxilin and Eosin (×200).
Normal : normal ddy mice.
Control : ovariectomized (OVX) mice.
N.P. : OVX and single prick with an injection needle at KI_{10}.
Saline : OVX and saline (0.2㎖) injection at KI_{10}.
AaH-HA : OVX and herbal acupuncture with AaH-HAS (5%, 0.2㎖) at KI_{10}.

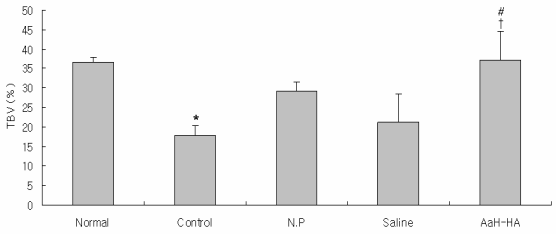


Fig. 22. Effect of AaH-HA on the trabecular bone volume of tibia in ovariectomized mice

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 method. After the mice were sacrificed, the mouse tibia was sliced and embedded in paraffin, and 8㎛ sections were stained with Hematoxilin and Eosin. Trabecular bone volume of tibia was analyzed using a computer-assisted bone histomorphometric analysing system.
Normal : normal ddy mice.
Control : ovariectomized (OVX) mice.
N.P. : OVX and single prick with an injection needle at KI_{10}.
Saline : OVX and saline (0.2㎖) injection at KI_{10}.
AaH-HA : OVX and herbal acupuncture with AaH-HAS (5%, 0.2㎖) at KI_{10}.
*: $p<0.05$ compared to normal group by t-test.
† : $p<0.05$ compared to control group by ANOVA test.
#: $p<0.05$ compared to saline group by ANOVA test.

NP군 및 saline군에 비하여 pore의 생성이 감소되었으며, 지주골도 정상군과 유사하게 유지되었다(Fig. 21).

2) Histomorphometry

(1) TBV(trabecular bone volume)

실험동물의 경골조직을 절편하여 H&E 염색을 한 후, 자동분석 프로그램을 이용하여 지주골량(TBV)을 측정하였다. 대조군에서 정상군에 비해 지주골량(TBV)이 유의하게 감소하였으며, 애엽약침군(AaH-HA)에서는 대조군 및 saline군에 비하여 지주골량(TBV)이 유의하게 증가하였다(Fig. 22).

(2) TBT(trabecular bone thickness)

실험동물의 경골조직을 절편하여 H&E 염색을 한 후, 자동분석 프로그램을 이용하여 지주골의 두께(TBT)를 측정하였다. 대조군에서 정상군에 비하여 TBT가 유의하게 감소하였으며, 애엽약침군(AaH-HA)에서는 대조군, NP군 및 saline군에 비하여 TBT가 유의하게 증가하였다(Fig. 23).

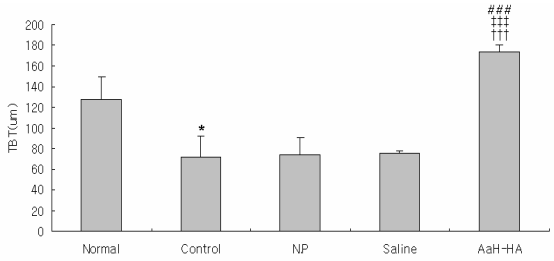


Fig. 23. Effect of AaH-HA on the trabecular bone thickness of tibia in ovariectomized mice

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 method. After the mice were sacrificed, the mouse tibia was sliced and embedded in paraffin, and 8㎛ sections were stained with Hematoxilin and Eosin. Trabecular bone thickness of tibia was measured using a computer-assisted bone histomorphometric analysing system.

Normal : normal ddy mice.
Control : ovariectomized (OVX) mice.
N.P. : OVX and single prick with an injection needle at KI_{10}.
Saline : OVX and saline (0.2㎖) injection at KI_{10}.
AaH-HA : OVX and herbal acupuncture with AaH-HAS (5%, 0.2㎖) at KI_{10}.
* : $p<0.05$ compared to normal group by ANOVA test.
† † † : $p<0.001$ compared to control group by ANOVA test.
‡ ‡ ‡ : $p<0.001$ compared to N.P. group by ANOVA test.
: $p<0.001$ compared to saline group by ANOVA test.

(3) GPL(growth plate length)

실험동물의 경골조직을 절편하여 H&E 염색을 한 후, 자동분석 프로그램을 이용하여 성장판의 길이(GPL)를 측정하였다. 대조군에서 정상군에 비하여 성장판의 길이가 유의하게 증가하였으며, 애엽약침군(AaH-HA)에서는 대조군, NP군 및 saline군에 비하여 성장판의 길이가 유의하게 감소하였다(Fig. 24).

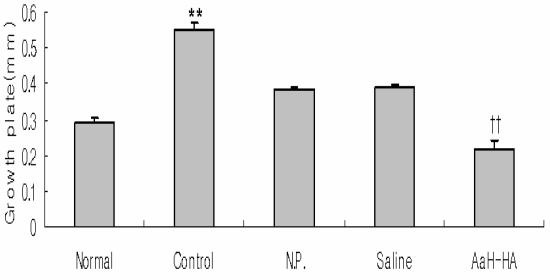


Fig. 24. Effect of AaH-HA on growth plate length of tibia in ovariectomized mice

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 method. After the mice were sacrificed, the mouse tibia was sliced and embedded in paraffin, and 8㎛ sections were stained with Hematoxilin and Eosin. Growth plate length of tibia was measured using a computer-assisted bone histomorphometric analysing system.

Normal : normal ddy mice.
Control : ovariectomized (OVX) mice.
N.P. : OVX and single prick with an injection needle at KI_{10}.
Saline : OVX and saline (0.2㎖) injection at KI_{10}.
AaH-HA : OVX and herbal acupuncture with AaH-HAS (5%, 0.2㎖) at KI_{10}.
** : $p<0.01$ compared to normal group by t-test.
† † : $p<0.01$ compared to control group by ANOVA test.

Ⅳ. 고 찰

뼈는 손상되었거나 오래된 뼈를 새로운 뼈로 대체하는 재형성과정을 통해 건강한 상태로 유지되는데 골의 재형성 과정은 조골세포(osteoblast)와 파골세포(osteoclast)에 의해 이루어진다[25].

조골세포는 새로운 뼈를 생성하는 골생성 과정에, 파골세포는 낡은 뼈를 파괴하는 골흡수에 관여하는데, 폐경에 의해 estrogen의 결핍이 나타나면 조골세포와

파골세포에 영향을 미쳐 골 손실(bone loss)을 유발한다[26].

골다공증은 骨質(bone quality)은 정상이나 骨量(bone quantity)이 性別, 年齡, 種族을 감안하여 기대치 이하로 감소된 경우를 말하며 통상 단위 면적당 骨機質 감소로 인한 骨의 弱化로 인해 쉽게 骨折되는 문제를 야기한다. WHO는 측정한 骨量이 젊은 성인 骨量의 평균에서 2.5SD(standard deviation)보다 감소된 경우를 골다공증이라고 정의하였으며, 하나 이상의 骨折이 동반된 경우를 진행된 골다공증이라고 하였다[1].

골다공증은 발생 빈도가 높으며 骨折이 발생하면 治療가 어렵고 또한 치료비용이 많이 소모되는 매우 중요한 질환으로 이 질환을 예방하고 조기에 치료하여 결과적으로 인간의 수명을 연장하고 치료비 부담을 줄이기 위하여 많은 노력을 하고 있다[1].

미국에서는 연간 120만 명 정도가 골다공증에 의한 骨折이 발생되고 일본도 2000년대에는 540만 명의 골다공증 환자가 발생되고 이 중 연간 10만여 명이 骨折傷으로 추정되고 있으며, 한국인 50세 이상 여성에서의 骨多孔症 발병률은 약 23.1%로 보고되고 있다[1,2].

임상적 분류로는 크게 원발성과 속발성으로 나누며 원발성 골다공증에는 폐경기후 골다공증(제1형)과 老人性 골다공증(제2형)이 있고 속발성 골다공증에는 내분비성 골다공증, 영양성 골다공증, 유전성 골다공증, 국소성 골다공증 등이 있다. 흔히 보는 것은 원발성 골다공증이며 제1형 폐경기 후 골다공증은 51세에서 65세의 여자에게서 발병하며 주로 골소주를 침범하기 때문에 척추골절이나 원위 요골 골절과 관계가 깊고 estrogen이 주역할을 하고 제2형 노인성 골다공증은 70세 이후의 남녀에게서 관찰되고 주로 피질골을 침범하므로 고관절부 골절 및 골반골, 상완골 근위부, 경골 근위부 골절과 관계가 깊고 연령이 주원인이라고 하였다[25].

임상 증상으로는 요통과 가벼운 외상에도 쉽게 골절이 일어나서, 척추의 압박 골절, 대퇴 경부 골절, 그리고 요골 원위부 골절 및 상완골 골절 등이 호발된다. 특히 폐경기 후에는 척추의 압박 골절이 호발되며, 노인층에서는 대퇴골 근위부 골절과 요골 원위부 골절 등이 연령에 따라 증가하게 된다. 골절로 인하여 골기형이 되며, 심한 경우에는 키도 작아지게 된다[25].

골다공증은 단순 방사선 촬영만으로는 진단하기 힘든 경우가 많다. 골에 함유된 무기질(mineral)이 30~40% 이상 소실되어야만 방사선 소견이 나타나는 경우가 많고, 골절이 동반되어야만 진단이 가능한 경우도 있기 때문이다[25,26].

검사 소견상, 골다공증은 특이 소견이 보이지 않아 진단에 큰 도움이 되지 못하여 혈청 및 칼슘과 무기인(inorganic phophorous) 그리고 혈청 칼리성 및 산성 인산 분해 효소 등은 대부분의 검사에서 정상으로 나타나거나 경미한 변화를 보일 뿐이다[25,26].

골다공증의 치료는 식생활의 개선, 운동요법과 약물요법 등의 총제적인 치료를 요하며 이미 진행된 상태에서 질병을 치료하기보다는 적극적인 예방이 보다 효과적으로 현재 骨多孔症에서 사용되는 약물은 크게 골흡수 억제제와 골형성 촉진제로 구분한다. 최근 사용되는 약제는 여성호르몬 estrogen, 선택적 estrogen 수용체 조절제(SERM ; selective estrogen-receptor modulators), bisphosphonate제제, calcitonin, 비타민 D, calcium 등이 있다[27,28]. 그러나 이러한 약재들은 속쓰림, 구역, 구토, 궤양 등의 소화기 자극 증상이나, 안면홍조, 관상동맥 질환의 위험도 증가, 유방암, 뇌졸중, 혈전 색전증 등의 유발 가능성 등의 부작용 뿐 아니라 부갑상선 호르몬 제제의 경우는 치료기간이나 용량에 대한 연구가 부족한 실정이다[27,28].

韓醫學에서 骨에 대하여 '骨生髓'라 하여 精은 髓를 生하며 髓는 骨을 滋養시킨다고 하고, ≪黃帝內經·素問·宣明五氣論≫[3]에서는 "五臟所主…腎主骨"이라 하고, ≪黃帝內經·素問·六節臟象論≫[3]에서는 "腎者…其充在骨"이라 하였는데, 이는 腎과 骨髓의 生長發育이 密接한 관계가 있음을 표현하였다.

韓醫學 文獻上에서 骨多孔症이라는 병명은 없으나, 生理病理적으로 유사한 表現으로는 骨, 骨痿, 骨枯, 骨極, 骨痺, 骨寒熱이 있으며 骨痿에 대하여 ≪黃帝內經·素問·痿論≫[3]에 "腎主身之骨髓 … 腎氣熱則腰脊不擧, 骨枯而髓減, 發爲骨痿"라고 하여 骨枯而髓減하여 발생된다고 하였으므로 骨多孔症과 매우 유사한 발병기전이 있다고 할 수 있다.

骨痺에 대하여 ≪黃帝內經·素問·刺節論≫[3]에 "病在骨 骨髓不可擧 骨髓酸痛 寒氣至 名曰骨痺"라 하였고 ≪黃帝內經·素問·逆調論≫[3]에서 "腎孤臟也 一水不能勝二火 故不能凍溧 病名曰骨痺"라 하여 骨과 骨髓, 腎과 연관된 有機的 生理作用의 失調로 骨에 病變이 發生한다고 볼 수 있다.

骨枯에 대해서는 ≪黃帝內經 素問·痿論≫[3]에 "腎者, 水臟也, 今水不勝火則骨枯而髓減, 故足不任身發爲骨也"라 하여 腎經의 氣가 骨髓를 濡養하 못하여 발생하며 骨痿의 발생기전에 해당한다고 볼 수 있다.

骨極은 ≪外臺秘要≫[4]에 "骨極者 主腎也"라 하여 腎臟이 風邪에 感한 후 骨痺를 형성하고 骨痺가 치유되지 않은 상태에서 다시 邪氣에 感하였을 때 발생한다고 하여 骨極은 骨痺가 더욱 深化된 상태라고 할 수 있다.

骨의 寒熱상태를 묘사한 述語로 ≪廣濟秘笈≫[5]에서는 腎臟의 寒熱이 骨의 寒熱을 유발한다고 하였다.

아울러 실험에 사용된 陰谷穴은 足少陰腎經의 열번째 經穴로서 膝下內部輔骨後大筋下 小筋上에 존재하고 足少陰之脈所行爲合水穴로서 自經의 自穴이며 滋補肝腎, 疏泄厥氣의 效能이 있어서 小便頻數, 遺尿失禁, 夜尿, 滑精早泄, 陽痿, 疝氣, 陰中痛, 月經不調, 膝股內側痛 等을 主治한다고 하였고[7], 골다공증의 治療와 관련하여 足太陰腎經이 直接的으로 骨髓를 濡養하는 작용을 수행하므로 腎經에 대한 鍼灸療法이 骨多孔症의 治療와 豫防에 根本的으로 기여할 수 있으리라고 사료된다.

본 연구에 약침으로 활용된 애엽(*Artemisiae Vulgaris Folium*)은 菊花科에 속한 초목인 황해쑥, 약쑥과 野艾의 잎을 건조한 것으로, 성미는 溫有小毒하고 辛苦한 것으로 알려져 있으며 肝·脾·腎 등으로 歸經하여 調理氣血, 祛寒濕, 溫經止血 散寒止痛하는 효능이 있어 小腹冷痛, 月經不調, 崩漏過多, 姙娠後 下血 등을 치료하며[8] 주요한 성분으로는 휘발성 정유가 약 0.2~0.5% 함유되어 있는데, cineole이 약 50%, limonene α-thujone, α-pinene β-pinene, α-terpineneol 등으로 구성되며 이 외에도 adenine, choline, vitamin A·B·C·D와 amylase 등이 포함되어 있으며 진해거담작용, 항혈액응고 작용, 면역증강 작용, 항균 작용 등이 있는 것으로 알려져 있다[9]. 이 외에 애엽에 대한 선행연구로서 김 등[29]의 항암 작용, 정 등[30]의 세포 독성과 항산화 작용, 장[31] 등의 뇌허혈에 대한 보고가 있다.

骨多孔症에 관한 실험적 연구로는 右歸飮[10], 滋陰八味煎[11], 當歸地黃飮[12], 增益歸芪湯[13], 加味左歸飮[14], 身痛逐瘀湯[15], 獨活寄生湯[16], 何首烏[17,18], 熟地黃[19], 人蔘[20], 杜仲[21], 木瓜[21] 등의 복합약제 및 단미제와 약침실험으로는 巴戟天[22], 鹿茸[23,24], 紅花子[23], 紫何車[23] 등이 있으나 부인과 질환과 면역 활성화에 사용되는 애엽에 관한 약침연구는 아직 접하지 못하였다.

그리하여, 이런 일련의 실험에 쓰일 병태 모델로는 폐경기의 여성에게서 골다공증이 유발한다는 점에 착안하여 인위적인 난소 적출로써 骨多孔症을 야기시킨 흰쥐를 선택하게 되었다.

Kalu[32], Yeh[33]에 의하면 이러한 난소적출은 흰쥐에 있어서 주상골의 골아세포와 파골세포의 수를 증가시키며 파골세포의 활동성이 골아세포의 활동성보다 증가하여 골질의 양을 감소시킨다고 하였으며, 이러한 난소적출 후의 골질감소는 혈청 내 골교체율의 지표인 osteocalcin, calcium, alkaline phosphatase 등의 상승을 가져온다고 하였다.

이에 저자는 폐경에 의한 골다공증의 신체증상에 미치는 영향을 알아보고자 흰쥐의 난소를 적출하여 estrogen 결핍에 의한 골다공증을 유도하여, 調理氣血, 祛寒濕, 溫經止血의 효능이 있는 애엽으로 약침액을 제조한 후 滋補肝腎, 疏泄厥氣의 효능이 있는 陰谷穴을 骨度分寸法에 의거하여 생쥐의 뒷다리에서 인체의 음곡(*Eumgog* ; KI_{10})에 상응하는 부위를 취해 시술하여, 체중변화, 자궁무게, 자궁비중, 경골길이, 경골회분무게, 골밀도(BMD)를 측정하여 골다공증을 평가하고 혈청분석 및 경골 내 Ca 및 P 함량을 측정하여 그 변화를 관찰하였다.

애엽약침액(AaH-HAS)의 독성을 평가하기 위해 정상 생쥐로부터 얻은 골세포 중 조골세포만을 취하여 애엽약침액을 여러 가지 농도로 처리한 후 세포생존율을 확인한 결과 0.5%, 1%, 5%의 애엽약침액을 처리한 경우 대조군에 비하여 조골세포의 생존율이 농도 의존적으로 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 1). 이에 5% 애엽 약침액을 본 실험에 사용하였다.

실험동물의 몸무게를 주 1회 측정한 결과, 정상군에 비하여 대조군에서 몸무게가 전반적으로 높게 나타났으나, 모든 실험군의 몸무게에 유의한 차이가 없었다(Fig. 2).

실험동물의 몸무게 변화를 주간 단위로 측정한 결과, 모든 실험군에서 전반적으로 몸무게 변화는 두드러지지 않았으나, 실험 마지막 주에는 saline군과 AaH-HA군을 제외한 모든 군에서 몸무게가 감소하였다(Fig. 3).

본 실험에서 음곡 애엽약침은 난소적출로 인한 체중증가에 유의한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

실험 종료 후, 실험동물의 자궁을 적출하여 무게를 측정한 결과 정상군에 비하여 대조군에서 자궁무게가 유의하게 감소하였고 대조군에 비하여 NP군, saline군 및 애엽약침군(AaH-HA)에서는 자궁의 무게에 유의한 변화가 없었다(Fig. 4).

실험동물의 몸무게에 대한 자궁 무게의 백분율을 계산한 결과 정상군에 비하여 대조군에서 자궁비중이 유의하게 감소하였고 대조군에 비하여 NP군, saline군 및 애엽약침군(AaH-HA)에서는 자궁의 비중에 유

의한 변화가 없었다(Fig. 5).

본 실험에서 음곡 애엽약침은 자궁의 무게 및 자궁의 비중에 유의한 변화가 없어 자궁 위축을 회복시키는 효과는 없었다.

실험 종료 후, 실험동물의 경골을 적출하여 길이를 측정한 결과, 정상군에 비하여 대조군에서 경골 길이가 유의하게 증가하였고, NP군에서 대조군에 비하여 경골 길이가 유의하게 감소하였으나, 애엽약침군(AaH- HA)에서는 유의성은 없었다(Fig. 6).

실험 종료 후 실험동물의 경골을 적출하여, 골밀도를 측정한 결과 대조군에서 정상군에 비하여 골밀도가 유의하게 감소하였고, NP군에서 대조군에 비하여 골밀도가 유의하게 증가하였으며, 애엽약침군(AaH-HA)에서도 대조군에 비하여 골밀도가 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 7)

본 실험에서 음곡 애엽약침은 난소적출로 인한 경골의 길이 증가 및 골밀도의 감소를 억제하지는 못하였으나, NP군에서 대조군에 비하여 골밀도가 유의하게 증가한 것으로 나타난 결과 음곡혈에 대한 효능이라고 사료되어 좀 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

골의 재형성률, 즉 골형성과 골흡수의 속도 평가를 위해 혈액과 소변을 통한 일부 생화학적 검사들이 이용되고 있는데 이들 검사는 어느 한 시점에서 골재형성의 전반적인 상태를 측정한다[25].

본 실험에서는 각 실험동물의 혈청으로부터 GOT, GPT, ALP, creatinine, phosphorus, calcium, 및 osteocalcin의 농도를 측정하였다(Table 3).

혈청 GOT, GPT 농도를 측정한 결과, 대조군에서 정상군에 비하여 혈청 GOT, GPT의 농도가 증가하였으며, 애엽약침군(AaH-HA)에서 대조군군에 비하여 혈청 GOT, GPT의 농도가 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 8, 9).

Alkaline phosphatase(ALP)는 골아세포에 존재하여 국소의 뼈 무기질의 침착을 항진시킨다. 골아세포는 ALP를 생성하여 골아 세포막의 소포에 저장하는데 이중 일부가 혈액으로 유리되어 나오게 되며, 골흡수가 항진되는 경우에는 골형성도 항진되기 때문에, 소아기와 골형성이 활발하게 진행될 때 또는 간담도계 질환 및 골의 생성이 동반되는 골질환에서 혈청 내에서 의미 있게 상승한다[26]. 또한 ALP는 폐경 후에 증가하며, 폐경 후 골다공증 환자에서는 더욱 상승한다. 따라서 이것은 골형성 활동의 유용한 지표가 된다[34-36].

정상군에 비하여 대조군에서 혈청 ALP가 증가하였으나 유의성은 없었으며, 애엽약침군(AaH-HA)에서 대조군에 비하여 혈청 ALP에 유의한 변화는 없었다(Fig. 10).

Creatinine은 근육 내의 creatinine phosphate 대사결과 생겨난 물질로 정상인에서는 비교적 일정한 속도로 근육으로부터 유리되고 있으므로 그 농도는 항상 일정하게 유지된다. 오직 신장을 통해서만 체외로 배설되므로 요중 배설률은 체내의 creatinine 생성률과 동일하며, 이 수치로 사구체 여과율(GFR)의 감소정도를 예측할 수 있다[37].

각 실험동물의 혈청에서 creatinine의 농도를 측정한 결과, 정상군에 비하여 대조군에서 creatinine의 농도가 유의하게 증가하였으며, 애엽약침군(AaH-HA)에서는 대조군 및 saline군에 비하여 creatinine의 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 11).

Phosphorus는 뼈의 무기질 구성 성분 중의 하나로, 성인 체내에 1kg 정도 존재하는데 그 90%가 뼈에 존재한다[28]. 체내의 거의 모든 대사과정에 관여하며, 폐경 후 여성에게는 정상 성인에 비하여 약간의 증가가 일어난다[38,39].

또한 골아세포 수를 증가시켜 뼈의 형성을 자극하는데 골 흡수 시 혈청 중phosphorus 농도는 상승하므로 골대사와 밀접한 관련이 있다[26].

각 실험동물의 혈청에서 phosphorus의 농도를 측정한 결과, 정상군에 비하여 대조군에서 phosphorus의 농도가 유의하게 증가하였고, NP군에서 대조군에 비하여 phosphorus의 농도가 유의하게 감소하였고, 애엽약침군(AaH-HA)에서 대조군 및 saline군에 비하여 phosphorus의 농도가 유의하게 감소하였다(Fig. 12).

생체 내에 존재하는 calcium의 99.9%는 뼈에 존재하며, 나머지는 세포외액 중에서 평형상태를 유지하고 있다. 혈중 calcium 농도의 변화는 뼈에 존재하는 calcium의 영향을 받으므로 골흡수와 관련이 있고, 실험동물의 난소절제 후 혈중 calcium이 감소하고, 요중 calcium 배설이 증가한다고도 알려져 있다[26].

각 실험동물의 혈청에서 calcium 농도를 측정하였으나, 각 실험군의 혈청 calcium 농도는 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 13).

Osteocalcin은 calcium과 결합하는 Vit K 의존성 alpha-carboxyglutamic acid 단백질로서, 조골세포의 활성을 나타내는 데에 가장 민감한 것으로 알려져 있으며, 골아세포에 의해 생성된다. 골의 재형성 시 골아세포의 활성이 증가하며, 혈청 중 osteocalcin level이 높아지므로 골생성의 지표로 이용할 수 있다고 알려져 있고, 난소적출 시 혈중 osteocalcine 함량이 증가는 골

다공증을 평가하는 하나의 중요한 지표가 된다[26,34,35]. 각 실험동물의 혈청에서 osteocalcin level을 측정한 결과, 정상군에 비하여 대조군에서 osteocalcin의 농도가 증가하였으나 유의성은 없었고, 애엽약침군(AaH-HA)의 osteocalcin 농도는 다른 실험군에 비하여 유의한 차이가 없었다(Fig. 14).

본 실험에서 음곡 애엽약침은 혈청 GOT, GPT, ALP, calcium, osteocalcin의 측정에서는 통계적 유의성이 없었고, 혈청 creatinine의 증가를 유의하게 감소시켰으나 골다공증의 치료와는 직접적인 연관은 없고, 대조군 및 saline군에 비하여 phosphorus의 농도가 유의하게 감소한 결과, 음곡 애엽약침이 골대사에 유의한 영향을 미친다고 사료된다.

인체 골격은 칼슘염의 침착에 의해 생성된 거친 유기기질로 구성되어 있는데, 평균적으로 경골은 30%의 기질과 70%의 염으로 이루어져 있고 새로 형성된 골격의 경우는 염에 비하여 기질의 함유량이 더욱 높다. 골격의 유기기질은 90~95%가 collagen 섬유로 이루어져 있고 그 나머지는 기반물질이라고 불리는 균일한 젤라틴 성분으로 이루어져 있다. 골격의 유기기질에 침착하는 결절성 염은 주로 calcium과 phosphorus으로 구성되어 있으며 대부분의 결정성 염은 수산화인회석이다. 난소를 절제한 쥐에서는 골의 calcium 함량과 phosphorus 함량이 감소하며, 이러한 결과를 통하여 골흡수가 증가된 것으로 볼 수 있다[40].

실험 종료 후, 실험동물의 경골을 태워 경골 내 회분 함량을 측정한 결과, 대조군에서 정상군에 비하여 회분함량이 감소하였으나 유의성은 없었고, 애엽약침군(AaH-HA)에서는 대조군, NP군 및 saline군에 비하여 경골 회분 함량이 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 15).

각 실험군의 경골을 회분한 뒤, 경골 내 calcium의 함량을 측정한 결과, 대조군에서 정상군에 비하여 calcium 함량이 유의하게 감소하였고, Saline군에서는 대조군 및 NP군에 비하여 calcium함량이 유의하게 증가하였고, 애엽약침군(AaH-HA)은 대조군에 비하여 경골 calcium 함량이 증가하였으나 유의성은 없었다(Fig. 16).

Phosphorus는 대조군에서 정상군에 비하여 경골 내 phosphorus의 함량이 감소하였으나 유의성은 없었고, saline군에서는 대조군 및 NP군에 비하여 경골 내 phosphorus 함량이 유의하게 증가하였으며, 애엽약침군(AaH-HA)에서는 대조군에 비하여 경골 내 phosphorus 함량이 유의하게 증가하였다(Fig. 17)

경골 내에서 calcium과 phosphorus의 비율을 측정한 결과, 대조군에서 정상군에 비하여 Ca/P 비율이 약간 감소하였으나 통계적 유의성은 없었고, 애엽약침군(AaH-HA)에서는 대조군에 비하여 Ca/P 비율에 유의한 차이가 나타나지 않았다(Fig. 18).

Osteoclast like cell은 골의 흡수 및 제거와 관련된 큰 다핵세포로서 부갑상선호르몬의 존재하에 크게 활성화 되어 골 흡수와 세포 외액으로 calcium 및 phosphorus의 방출을 증가 시킨다[41]. 골격은 골아세포에 의하여 지속적인 침착이 일어나고 파골세포가 활성화된 부위에서는 지속적인 골격의 흡수가 일어나는데 성숙되는 모든 골격에서 골아 세포의 활성도는 지속적으로 유지되며, 성장 중인 골격을 제외하고는 골 침착률과 골 흡수율은 동등하여 골격의 총량을 일정하게 유지한다. 과도한 골 소실은 파골세포의 기능 증가와 혹은 조골세포의 기능 감소 때문에 일어날 수 있다[2].

경골 내 osteoclast like cell의 비율을 flow cytometry assay를 이용하여 측정한 결과, 대조군에서 $MHCII^{+}$/$CD115^{+}$세포의 비율은 5.47±0.4로 나타나 정상군의 2±0.079에 비하여 현저하게 증가하였으며, 애엽약침군(AaH-HA)에서는 0.85±0.24로 나타나 대조군, NP군 및 saline군에 비하여 감소하였다(Fig. 19).

경골 내 osteoclast like cell의 비율은 대조군에서 정상군에 비하여 유의하게 증가하였으며, 애엽약침군(AaH-HA)에서는 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 20).

본 실험에서 음곡 애엽약침은 경골 내 회분 함량, Ca/P ratio를 측정한 결과 통계적 유의성은 없었으나, saline군에서는 대조군 및 NP군에 비하여 calcium 함량이 유의하게 증가하여, 골소실의 억제에 효과가 있는 것으로 나타났고, 음곡 애엽약침은 osteoclast like cell의 비율의 증가를 유의하게 억제시켜 골흡수의 억제에 효과가 있는 것으로 나타났다.

골다공증은 조직학적으로 골피질이 얇아지고 지주골(trabecula)의 수량과 크기가 감소되며 하버시안 계(haversian system, osteon)와 골수강(bone marrow cavity)이 넓어지는 소견을 보인다[28].

실험동물의 경골조직을 절편하여 Hematoxylin and eosin(H&E) 염색을 실시한 결과, 대조군에서 정상군에 비하여 골 내부에 pore가 많이 나타났고, 지주골이 적게 분포하였고, 애엽약침군(AaH-HA)에서는 control군, NP군 및 saline군에 비하여 pore의 생성이 감소되었으며, 지주골도 정상군과 유사하게 유지되었다(Fig. 21).

자동분석 프로그램을 이용하여 지주골량(TBV)을

측정한 결과, 대조군에서 정상군에 비해 지주골량(TBV)이 유의하게 감소하였으며, 애엽약침군(AaH-HA)에서는 대조군 및 saline군에 비하여 지주골량(TBV)이 유의하게 증가하였다(Fig. 22).

지주골의 두께(TBT)는 대조군에서 정상군에 비하여 유의하게 감소하였으며, 애엽약침군(AaH-HA)에서는 대조군, NP군 및 saline군에 비하여 TBT가 유의하게 증가하였다(Fig. 23).

Estrogen 등의 성호르몬은 남녀 모두에서 사춘기 골단 폐쇄에 중요한 역할을 하므로[42] 난소적출로 인해 성호르몬이 억제된 생쥐에서는 골의 길이 성장이 증가 한다[43].

실험동물의 경골조직을 절편하여 H&E 염색을 한 후, 자동분석 프로그램을 이용하여 성장판의 길이(GPL)를 측정한 결과, 대조군에서 정상군에 비하여 성장판의 길이가 유의하게 증가하였으며, 애엽약침군(AaH-HA)에서는 대조군, NP군 및 saline군에 비하여 성장판의 길이가 유의하게 감소하였다(Fig. 24)

본 실험에서 음곡 애엽약침은 난소적출로 인한 지주골량(TBV)과 지주골의 두께(TBT)를 유의성 있게 증가시켰으며, 성장판의 길이(GPL)의 증가를 유의하게 억제시켜 유사 estrogen 작용으로 골소실을 억제시킬 수 있을 것이라 사료된다.

이상의 실험 결과를 종합하면 애엽약침처치는 난소적출에 의해 유발된 생쥐의 골다공증을 혈청 phosphorus, 경골 내 osteoclast like cell의 비율 그리고 TBV, TBT, GPL 등의 경골 histomorphometry 등은 골다공증에서 그 의미가 중요시되는 인자들이고 본 실험에서도 유의성을 보였으므로 애엽약침요법은 폐경기 골다공증에 유효한 치료법이 될 수 있을 것으로 추정되며, 향후 임상적 활용을 위한 보다 적극적이고 지속적 연구가 필요하다고 사료된다.

Ⅴ. 결 론

음곡 애약침이 난소적출로 유발된 흰쥐의 골다공증에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 음곡 애엽약침은 혈청 내 phosphorus의 농도를 유의하게 감소시켰다.
2. 음곡 애엽약침은 혈청 내 creatinine의 농도를 유의하게 감소시켰다.
3. 음곡 애엽약침은 난소적출에 의해서 유도되는 경골 내 osteoclast like cell의 비율을 유의하게 감소시켰다.
4. 음곡 애엽약침은 난소적출에 의해서 유도되는 경골 내 지주골량과 지주골의 두께를 유의하게 증가시켰다.
5. 음곡 애엽약침은 난소적출에 의해서 유도되는 경골 내 성장판의 길이의 증가를 유의하게 억제시켰다.

Ⅵ. 참고문헌

1. 대한골대사학회. 골다공증(골소송증). 11. 서울 : 최신의학사. 1991 : 3-7, 27-36, 47-56, 60-3, 69-79.
2. Arthur C Guyton, John E Hall. 의학생리학. 서울 : 정담. 2002 : 1050-3.
3. 王琦 外 篇. 黃帝內經素問今釋. 서울 : 성보사. 1983 : 14, 27, 54, 60, 87, 127, 179, 202, 206, 212, 247, 275, 371.
4. 王燾. 外臺秘要. 서울 : 대성문화사. 1992 : 525.
5. 李景華. 廣濟秘笈. 서울 : 계축문화사. 1973 : 36.
6. 김동수, 김영일. 골다공증의 한의학적 인식과 침구치료의 문헌연구. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 2009 ; 18(1) : 9-17.
7. 全國韓醫科大學 鍼灸經穴學敎室. 鍼灸學(上·下). 서울 : 集文堂. 1988 : 4-217, 389, 489-90, 730-2, 1408-9, 1457.
8. 전국한의과대학 공공교재편찬위원회. 본초학. 서울 : 영림사. 1991 : 405-7.
9. 김호철. 한약약리학. 서울 : 집문당. 2001 : 309-11.
10. 최창민, 이수정, 박경환, 김송백, 조한백. 右歸飮의 卵巢摘出 白鼠의 骨多孔症에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2006 ; 19(4) : 77-92.
11. 김덕님. 滋陰八味煎이 난소적출 白鼠의 骨多孔症에 미치는 影響. 대한한방부인과학회지. 2005 ; 18(2) : 12-25.
12. 이정재. 當歸地黃飮이 卵巢摘出 白鼠의 骨多孔症에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2004 ; 17(1) : 111-28.
13. 송영상. 난소적출 흰쥐의 골밀도 및 골대사에 增益歸茸湯이 미치는 영향. 대한한의학회지. 2003 ;

24(3) : 11-22.
14. 최진경. 加味左歸飮이 난소적출로 骨多孔症이 유발된 백서에 미치는 영향. 大韓韓方婦人科學會誌. 2006 ; 19(2) : 107-26.
15. 박재웅. 身痛逐瘀湯이 卵巢摘出 白鼠의 骨多孔症에 미치는 影響. 大韓韓方婦人科學會誌. 2006 ; 19(1) : 81-96.
16. 이영석, 김종환, 조한백, 최규섭. 독활기생탕이 난소적출로 骨多孔症이 유발된 백서에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지. 2000 ; 13(2) : 104-19.
17. 서규태. 生何首烏와 製何首烏가 난소적출로 유발된 흰쥐의 骨多孔症 예방효과에 미치는 영향. 大韓本草學會誌. 2005 ; 20(2) : 137-48.
18. 김민정, 서부일, 신순식, 박지하. 하수오와 백하수오가 난소적출로 유발된 흰쥐의 骨多孔症 예방효과에 미치는 영향. 대한본초학회지. 2004 ; 19(1) : 23-34.
19. 이진아. 熟地黃이 난소적출로 유발된 흰쥐의 骨多孔症 예방효과에 미치는 영향. 大韓韓方婦人科學會誌. 2004 ; 17(4) : 112-24.
20. 정국영. 人蔘이 난소적출로 유발된 흰쥐의 骨多孔症 예방효과에 미치는 영향. 大韓本草學會誌. 2004 ; 19(1) : 1-11.
21. 이종안. 杜仲과 木瓜의 煎湯液이 흰쥐의 骨多孔症 예방효과에 미치는 영향. 大韓本草學會誌. 2001 ; 16(1) : 201-6.
22. 석재욱. 巴戟天 약침이 난소적출로 유발된 백서의 骨多孔症에 미치는 영향. 大韓鍼灸學會誌. 2000 ; 17(3) : 140-50.
23. 육태한. 紅花子·鹿茸·紫河車 약침이 骨多孔症에 미치는 영향. 大韓鍼灸學會誌. 2000 ; 17(3) : 140-50.
24. 한상원 외. 鹿茸약침이 난소적출로 유발된 백서의 骨多孔症에 미치는 영향. 大韓藥鍼學會誌. 2000 ; 3(1) : 177-91.
25. 해리슨 번역 편찬위원회. Harrison's 내과학. 서울 : 정담, 1997 : 2310-21, 2342-3, 2481-92.
26. 이귀녕, 권오헌. 임상병리파일. 서울 : 의학문화사. 2003 : 102-5, 300-8, 328-31, 425-7, 734-6.
27. 김우겸. 인체의 생리. 서울 : 도서출판 생명의 이치. 1995 : 245.
28. 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울 : 최신의학사. 1999 : 152-6.
29. 김경하, 정대영, 민태진, 박시원. 황해쑥의 H9세포에 대한 세포독성 및 항산화효소활성. 약학회지. 1999 ; 43(5) : 598-605.
30. 정대영, 박시원. 황해쑥 물분획물의 L1210세포에 대한 세포독성과 항산화효소 활성변화. 약학회지. 2002 ; 46(1) : 39-46.
31. 장진요, 김재효, 박성섭, 박귀종, 김경식, 손인철. 태충 애엽약침이 일과성 전뇌허혈손상에 미치는 효과. 대한경락경혈학회지. 2005 ; 22(3) : 63-81.
32. Dike N kalu, Bahran H arjmandi, Chung ching Liu, Mohammed A Salih and Roger S Birnbarum. Effects of ovariectomy and estrogen on the serum levels of insulin-like growth factor binding protein-3. Bone and mineral. 1994 ; 25 : 135-48.
33. Yeh JK, Aloia JF, Barilla ML. Effects of β-estradiol replacement and treadmill exercise on vertebral and femoral bone of the ovariectomized rat. Bone Miner. 1994 ; 24(3) : 223-34.
34. HA Morris, SJ Porter, TC Durbright, RJ Moore, AG Need, BE C Nordin. Effects of cophorectomy on biochemical and bone variables in the rat. Bone and Mineral. 1992 ; 18 : 133-42.
35. Morris Notelovitz. Osteoporosis : screening, prevention, and management. Fertility and Sterility. 1993 ; 59(4) : 707-25.
36. Garnero P, Delmas PD. Assessment of the serum level of bone Alkaline Posphatase with a new immunoradimetric assay in patients with metabolic bone disease. J Clin Endocrinol Metab. 1993 ; 77(4) : 1046-53.
37. 두호경. 동의신계학. 서울 : 동양의학연구원. 1991 : 654-60, 1049-55.
38. JM Aitken, E Armstrong and JB Anderson. Osteoporosis after oophorectomy in the mature female rat and the effect of ostrogen and/or progestogen replacement therapy in its prevention. 1972 ; 55 : 79-87.
39. Anthony M Frumar, David R Meldrum, F Geola, Issa M Shamonki, Ivanna V Tataryn, Leonard J Deftos et al. Realtionship of fasting urinary calcium to circulating estrogen and body weight in postmenopausal women. JCE&M. 1980 ; 50(1) : 70-5.
40. Yamazaki I, Yamazaki H. Charateristics of an

ovaroectomized osteopenic rat model. J Bone Mirer Res. 1989 ; 4(1) : 13-22.
41. 이우주. 영한의학사전. 서울 : 도서출판 아카데미서적. 1990 : 1738.
42. 백승훈, 김신윤. 골다공증의 병인론. 대한고관절학회지. 2006 ; 18(4) : 386-96..
43. Falahati-Nini A, Riggs BL, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Eastell R and Khosla S. Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men. J Clin invest. 2000 ; 106 : 1533-60.