

하수오 물 추출물이 마우스 골다공증에 미치는 영향

도윤정* · 구세광** · 김홍태*** · 오태호 · 조영무* · 김성우* · 유일선* · 이근우¹

경북대학교 수의과대학, *농촌진흥청 국립축산과학원, **대구한의대학교 한의과대학, ***부산광역시 보건환경연구원

(게재승인: 2011년 8월 27일)

Antiosteoporotic Effects of Polygoni Multiflori Radix (PMR) in Ovariectomized (OVX)-Induced Osteoporosis ddY Mice

Yoon-Jung Do*, Sae-Kwang Ku**, Hong-Tae Kim***, Tae-Ho Oh, Young-Moo Cho*,
Sung-Woo Kim*, Il-Sun Ryu* and Keun-Woo Lee¹

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

*National Institute of Animal Science, Namwonsi 590-832, Korea

**College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, Kyungsansi 617-763, Korea

***Busan Metropolitan City Institute of Health & Environment, Busansi 616-810, Korea

Abstract : Polygoni Multiflori Radix (PMR), a dried root tuber of Polygonum multiflorum Thunberg with bioactivities in bone metabolism is one of the most famous tonic traditional medicines. To observe in vivo anti-osteoporotic efficacy of PMR extracts, we orally administered once a day for 28 days (Qd × 28) to bilateral ovariectomized (OVX)-induced osteoporosis ddY mice after 1 week of recovery periods at 125, 250 and 500 mg/kg (of body weight). A positive control drug, Alendronate (FOSA) 10 mg/kg-dosing group was added. As results of OVX-induced osteoporotic process, estrogen-deficient osteoporotic changes were also dramatically decreased in all PMR extracts-dosing groups. Especially middle dosage of PMR extracts, 250 mg/kg constantly and significantly ($p < 0.01$ or $p < 0.05$) inhibited the loss of bone strength and bone quality. Based on the results, it was concluded that PMR extracts (125, 250 or 500 mg/kg; orally dosing) has relatively good favorable effect to prevention and/or treatment of OVX-induced osteoporosis. Therefore, although the efficacy was slighter than that of Alendronate on the inhibition of bone loss, it is expected that PMR extracts will be promising as a new anti-osteoporotic agents for prevent the fracture induced in osteoporotic patients because natural herbal medicine origin PMR extracts will be dose not show serious side effects especially the problem in upper alimentary irritation by bisphosphonate and hypercalcaemia of parathyroid hormone analogs.

Key words : Polygoni Multiflori Radix(PMR), anti-osteoporotic effect, osteoporosis, Alendronate (FOSA), ovariectomized (OVX).

서 론

마디풀과(Polygonaceae)에 속하는 하수오(*Polygonum multiflorum* THUNBURG, 何首烏)는 다년생 민년 초본이며, 뿌리를 자른 면은 옅은 유향색 또는 갈색으로서, 원형의 특이한 무늬를 이루고 있으며 국내에서는 전남, 경남북, 충북, 강원, 경기, 황해, 함남 지방 등 각지에 분포되어있고, 중국, 일본 및 한국에서 가장 유명한 강장제 중의 하나로 알려져 있다(6,7,12,15).

구성성분으로는 anthraquinone 유도체인 emodin, chryso-phenol 및 이들의 배당체와 stilbene glucoside로서 (E)-

2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucopyranoside, rhapontin 등, phenolic glucoside로서 polygoacetophenoside 등을 함유하는 것으로 알려져 있으며(5,22) 또한 (E)-2,3,5,4'-tetrahydroxy stilbene-2-O-beta-D-glucopyranoside는 중등도의 항산화 효과가(7,37), anthraquinone은 허혈-재관류에 의한 산화적 스트레스 상태에 대하여 보호 작용을 가진것으로 알려져 있다(7,51). 하수오의 에탄올 추출물은 동맥경화에 대한 예방 효과를 가진 것으로 알려져 있고(7,45), 질병의 예방 뿐만 아니라 항노화 효과(7,47), 세포 생존 시간 연장 및 면역 조절 기능, 신진 대사 기능이 있으며(7,14), 쥐를 이용한 실험에서 하수오는 콜린성 신경계에 대하여 보호 작용이 있다고 보고되었다(7,31). 이 밖의 lecithin은 신경조직을 구성하고, 특히 뇌척수의 주요성분이 되며, 동시에 혈구 및 기타

¹Corresponding author.
E-mail : kwolee@knu.ac.kr

세포막의 중요한 원료로서, 혈청 cholesterol 농도를 저하시키고 cholesterol의 간장 내 침착을 저지하여 동맥경화를 경감하는 작용을 가진다는 보고도 있다(1). 또한, 심혈관계 보호 작용 및 항산화와 항 free radical 특성을 가진 것으로도 보고되었다(50).

일반적으로 골다공증이란 낮은 골 량과 골의 미세구조 이상으로 골절에 대한 감수성이 증가하는 전신성 골 질환으로서, 대사성 골 질환 중 가장 흔한 질환이며(2), 정상 골 수복 과정의 억제, 골 형성과 재흡수간의 불균형에 의하여 유발 되는 것이다(38).

의학의 발달로 수명이 연장됨에 따라 폐경기 이 후의 여성 인구가 급격히 증가되었고 이에 따른 골다공증의 발생 빈도 또한 증가하고 있으며(4) 육체적 운동량의 감소로 인한 이환률도 증가하는 실정이다(5). 이러한 골다공증의 예방과 치료에 대한 사회적인 관심이 높아지는 가운데, 흰쥐에서 난소적출로 골다공증을 유발한 후 하수오 추출물의 골다공증에 대한 예방 효과에 관하여 보고된 바있으며(28), 병행하여 골다공증의 예방과 치료에 사용되는 골 흡수 억제제인 Alendronate [Brand name: FOSAMAX]인 Nitrogen-containing bisphosphonate의 효과와도 비교하여 보고된 바있다.

ddY 마우스를 이용한 estrogen 결핍성의 난소적출(ovariectomized) 골다공증 모델은 수술 후 4 에서 6주에 골다공증의 몇 가지 요인들이 분명히 감소되기 때문에 골다공증 약의 평가에 널리 이용 되고 있다. 약의 효과는 골의 무게, 골 밀도, 골의 강도, 골의 미네랄 함량, 그리고 osteocalcin, Ca, P와 같은 혈청 생화학검사를 포함한 지주골과 피질골 두께의 조직형태학적 변화에 의하여 판단하는 것으로 알려져 있다(8,9,20,21,38,41,52).

골 질환의 치료 또는 예방에 대하여 새로운 물질을 개발하고자 하는 수많은 연구가 진행되고 있으며(36) 현재도 항 골 흡수 물질은 광범위하게 이용되고 있지만 여전히 안전하고 효과적인 흡수 억제제에 대한 관심 및 요구가 증가되고 있다. 하지만 골 형성을 촉진할 수 있는 동화물질은 항 흡수 물질에 비하여 인식이 비교적 낮기 때문에(23) 조골세포 분화와 골 형성에 관하여서는 지속적인 연구가 필요하며 또한 이러한 관점에서 골 질환에 대한 치료효과를 나타내는 천연 물질에 대한 관심이 증가되고 있는 실정이다.

본 실험에서는 하수오 물 추출물(Polygoni Multiflori

Radix; PMR)의 항 골다공증에 대한 치료 효과를 확인하고 세부적으로 관찰하기 위하여, 양측 난소절제로 유도된 골다공증 ddY 마우스에 하수오 물 추출물을 경구 투여하였으며, 마우스를 희생시킬 때 혈청 osteocalcin, Ca, P 함량과 체중 변화, 골 중량, 골 길이와 두께, 골 Ca과 P 함량, 골 밀도, 골 강도, 조직학적 소견과 조직형태학적 변화를 관찰하였다. 또한 양성 대조군으로서 bisphosphonate로 잘 알려진 항 골다공증 약물인 Alendronate 의 투여그룹을 추가하였으며 그 효과를 매체대조군과 난소 비적출군, 그리고 하수오 물 추출물의 효과와 비교하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 6 주령의 ddY 마우스를 일본에서 구입하였다.

60 두의 암컷 ddY 마우스 (6-wk old upon receipt, SLC, Japan)를 12 일간 순화시킨 후 사용하였으며 온도(20-25°C)와 습도(40-45%)를 조절한 사육실에서 polycarbonate cage 당 5 마리씩 사육 하였다. 명암주기는 12 시간 : 12 시간으로 조절하였으며, 사료(Samyang, Korea)와 물은 자유롭게 공급하였다. 50 두는 양측 난소를 적출하였으며 나머지 10 두의 마우스는 양측 난소를 적출하지 않은 난소 비적출군 이었다. 실험물질은 1 주일의 회복기 후 투여를 시작하였으며, 행동학적 소견과 체중을 기준으로 하여, 난소적출 1 주일 후 반수의 동물을 선택하여 실험에 사용하였다.

투여 방법

125, 250, 500 mg/kg의 하수오 물 추출물을 증류수에 녹여 체중 kg 당 10 ml 의 용량으로, 난소 적출 1 주일 후 부터 4 주간 sonde가 부착된 3 ml syringe를 이용하여 투여하였으며, 대조약물인 Alendronate 는 10 mg/kg의 용량으로 투여하였다. 본 실험에 사용한 약물의 투여량과 투여 방법 등은 Table 1에 기록하였다.

수술

난소 적출 군은 Ketamine hydrochloride (ICN Biochemicals Inc., USA)와 Xylazine hydrochloride (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Japan)의 마취 하에 개복 후 양측

Table 1. Experimental designs used in OVX osteoporotic mice study

Group		Dose	Vehicle	Route	Schedule
OVX-induced osteoporotic group	Sham	10 ml/kg			
	Control	10 ml/kg			
	FOSAMAX	10 mg/kg/10 ml	Distilled Water	Oral	Once a day for 4 weeks
		125 mg/kg/10 ml			
	PMR extracts	250 mg/kg/10 ml			
	500 mg/kg/10 ml				

*All test articles and vehicle were dosed by gastric gavage for 4 weeks; Operation was conduct under Ketamine and Xylazine anesthesia

난소를 절제하였으며, 난소 비적출군에서는 양측의 난소를 노출 시킨 뒤 제거하지 않고 복강을 폐쇄하였다.

체중의 변화

수술 당일, 난소 적출 1주일 후, 투여 시작일 및 최종 희생일을 포함하여 투여 기간 동안 1주일에 한번씩 체중을 각각 측정하였다. 투여 시작시와 최종 희생 시 사료섭취에 의한 오차를 줄이기 위하여, 모든 실험동물을 절식(약 18 시간) 시켰으며, 회복기(recovery period ; Gain_I) 및 투여기(dosing period ; Gain_II) 동안의 체중 변화(증체량)를 계산하였다.

EQUATION 1. Weight gains (g) were calculated during

Gains_I=(Body weight at 1 week after operation - Body weight at operation) Gains_II=(Body weight at sacrifice - Body weight at dosing)

골 중량 변화

최종 희생 시, 양측의 대퇴골과 경골의 무게를 g 단위로 측정하여, 절대중량으로 하였으며, 체중에 따른 오차를 줄이기 위하여, 최종 희생 시 체중에 대한 골 중량의 비율인 상대중량(%)을 다음과 같이 계산하였다.

EQUATION 2. Relative bone weight (%)

Relative weight = [(Absolute bone weight / Body weight at sacrifice) × 100]

골 두께 및 길이의 측정

골의 무게를 측정한 후, 오른쪽 대퇴골과 경골의 장측(세로) 길이와 골단 부위의 두께를 electronic digital caliper를 이용하여 mm 수준에서 측정하였다.

골 무기질 함량 측정

최종 희생 시, 우측 경골을 채취하여 120°C에서 8 시간 동안 건조시킨 다음, 800°C에서 약 6 시간 동안 탄화시켰으며(carbonization), 이 후 nitric acid에 용해시켰다. 용해된 희석 용액에서 Ca와 P 함량을 각각 orthocresolphthalein complexon과 enzyme methods를 이용하여 mg/g bone 단위로 측정하였으며 Ca/P 비율은 하기의 공식으로 측정하였다.

EQUATION 3. Tibiae Ca/P ratio (%)

Ca/P ratio (%) = [(Tibia Ca contents / Tibia P contents) × 100]

혈청 생화학 검사

희생 시, 1 ml의 정맥혈을 대정맥에서 채취하고, clotting activated serum tube를 이용하여 실온에서 3,000 rpm으로 15 분간 원심분리 하여 혈청을 분리하였다. 혈청 중 osteocalcin 함량은 RIA kit를 이용해 ng/ml 단위로 automated gamma counter (HE model, ICN Co., CA, USA)를 이용하여 측정

하였으며, 혈청 Ca 함량은 Ca strip (WAKO, JAPAN)을 이용하여 OCPC 방법으로 자동혈액분석기(Toshiba 200FR, JAPAN)를 이용하여 mg/ml 단위로 측정하였고, 또한 혈청 P 함량은 mg/ml 단위로 P strip (WAKO, JAPAN)을 이용한 Kinetic UV method로 자동혈액분석기로 측정하였다.

골 밀도와 골 강도의 변화

좌측 대퇴골 골단 부위의 골 밀도를 mg/cm² 단위로 dual-energy x-ray absorptionmeter (DEXA, PxiMus; Lunar Medison WI)를 이용하여 측정하였다. 경골의 골체 부위의 강도는 computerized testing machine (Instron 6022; Instron, USA, speed at 20 mm/min)을 이용하여 three-point bending test로 N (Newton) 단위로 측정하였다.

조직학적 검사

모든 실험동물의 우측 대퇴골을 분리하여 10% neutral buffered formalin (NBF)에 고정하고 5일간 칼슘제거 용액(24.4% formic acid and 0.5 N sodium hydroxide)을 이용하여 탈회하였다(탈회 용액은 5 일 동안 하루 한번 교환하였다.). 이 후 파라핀에 봉입한 다음, 3~4 μm의 연속절편을 제작하고, Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 실시 하였다.

조직 형태학적 검사

준비한 우측 대퇴골의 조직표본에서 지주골량(Tbv), 지주골 두께(Tbt), 지주골 수(Tbn) 그리고 지주골 길이(Tbl), 피질골 두께(Cbt) 및 파골세포 수(Ocn) 를 조직 형태학적으로 측정하였다.

지주골량 (TBV)의 측정

TBV는 성장판을 제외한 우측 대퇴골의 뼈끝 도르래 부위의 일정 부위를 현미경 (×100, Zeiss, Germany)과 automated image analyzer (analySIS Image Processing; Germany)를 이용하여 측정하였으며, percentage (%) level로 측정하였다.

지주골 (Tb)의 조직형태학적 변화 측정

일정한 뼈끝 도르래 부위에서 지주골 두께(Tbt), 지주골 수(Tbn) 및 지주골 길이(Tbl)를 역시 현미경과 automated image analyzer를 이용하여 측정하였다. Tbt와 Tbl은 μm 으로, Tbn은 골단 부위의 횡단면에서의 수(number/whole cross sectional part of epiphyseal region)로 각각 측정하였다. 이 중 Tbt와 Tbl은 골단 연골륜 부위의 일정한 부위 중 지주골이 가장 잘 발달된 부위를 기준으로 각각 측정하였다.

피질골 두께 (Cbt) 의 측정

Cbt는 대퇴골의 연골륜 목 부위에서 측정하였으며, 현미경 (×200, Zeiss, Germany)과 automated image analyzer (analySIS Image Processing; Germany)를 이용하여 μm 단위로 측정 하였다.

파골세포 수 (Ocn)의 측정

Ocn/bone parameter 역시 현미경 (×200, Zeiss, Germany) 과 automated image analyzer (analySIS Image Processing; Germany)를 이용하여, 200 μm²의 뼈끝 도르래 부위의 단면에서 파골세포수를 측정하여 number/cross (of 200 μm² of epiphyseal regions levels)로 표시하였다.

통계 분석

모든 자료는 평균 ± 표준편차로 계산하였으며, 통계학적 분석은 Windows용 SPSS (Release 6.1.3., SPSS Inc., USA) 로 Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W test (MW test)를 이용하여 실시하였다. 난소 적출에 의한 골다공증의 유발 정도를 파악하기 위하여 난소 비적출군과 매체 대조군 사이의 비율을 아래의 공식을 이용하여 산출 하였으며, 매체 대조군과 투여군에 있어서 투여 효과를 명확히 판정하기 위하여 매체 대조군과 비교하여 그 비율 변화 역시 아래의 공식을 이용하여 평가하였다.

EQUATION 4. Percentage Changes vs Sham (%)
 = [(Data of vehicle control - Data of Sham) / Data of Sham] × 100]

EQUATION 5. Percentage Changes vs Vehicle (%)
 = [(Data of test groups - Data of vehicle control) / Data of Vehicle control] × 100]

결 과

체중의 변화

하수오 물 추출물의 난소 적출에 따른 체중 변화에 미치는 변화를 관찰하기 위하여, 수술 당일과 수술 후 1 주일, 투여 시작일 및 최종 희생일을 포함하여 하수오 물 추출물 투여기간 동안 1 주일에 1회 체중의 변화를 측정하였으며, 투여 시와 최종 희생 시 사료에 의한 오차를 줄이기 위하여 절식하여 체중을 측정된 결과, 각 그룹별 체중의 평균은 다음과 같다(Table 2).

난소 비적출군의 경우 수술 일, 수술 1 주일 후, 투여 시작일, 투여 1 주일 후, 3 주일 후, 4 주일 후 및 희생 시의 평균 체중은 각각 25.50 ± 0.55, 28.58 ± 1.11, 25.18 ± 0.73, 30.12 ± 1.13, 31.54 ± 1.27, 32.00 ± 0.95 및 29.64 ± 1.10 g을 나타내었으며, 매체 대조군의 경우 각각 25.50 ± 1.68, 28.72 ± 1.67, 25.90 ± 1.66, 30.78 ± 1.78, 32.56 ± 2.72, 33.44 ± 3.00 및 31.18 ± 3.01 g을, Alendronate 투여군의 경우 각각 24.68 ± 1.33, 27.76 ± 1.61, 24.56 ± 1.23, 30.22 ± 2.22, 31.50 ± 1.74, 32.10 ± 1.65 및 29.52 ± 1.37 g을, 하수오 물 추출물 125 mg/kg 투여군의 경우 각각 25.48 ± 2.01, 27.64 ± 2.94, 25.64 ± 2.82, 29.60 ± 2.61, 31.78 ± 2.02, 33.28 ± 2.02 및 31.00 ± 2.46g을, 하수오 물 추출물 250 mg/kg 투여군의 경우 26.16 ± 1.43, 29.00 ± 1.83, 26.84 ± 1.71, 31.30 ± 2.13, 32.96 ± 1.89, 34.32 ± 0.96 및 31.80 ± 1.26 g을, 하수오 물 추출물 500 mg/kg 투여

Table 2. Changes on the body weight gains after OVX and/or drug administration

Body weight	At OVX	1wk after OVX	At Dosing	Wks after dosing			At Sacrifice
				1 wk	3 wks	4 wks	
Sham	25.50 ± 0.55	28.58 ± 1.11	25.18 ± 0.73	30.12 ± 1.13	31.54 ± 1.27	32.00 ± 0.95	29.64 ± 1.10
Control	25.50 ± 1.68	28.72 ± 1.67	25.90 ± 1.66	30.78 ± 1.78	32.56 ± 2.72	33.44 ± 3.00	31.18 ± 3.01
Alendronate	24.68 ± 1.33	27.76 ± 1.61	24.56 ± 1.23	30.22 ± 2.22	31.50 ± 1.74	32.10 ± 1.65	29.52 ± 1.37
PMR extracts							
125 mg/kg	25.48 ± 2.01	27.64 ± 2.94	25.64 ± 2.82	29.60 ± 2.61	31.78 ± 2.02	33.28 ± 2.02	31.00 ± 2.46
250 mg/kg	26.16 ± 1.43	29.00 ± 1.83	26.84 ± 1.71	31.30 ± 2.13	32.96 ± 1.89	34.32 ± 0.96	31.80 ± 1.26*
500 mg/kg	26.30 ± 1.53	28.50 ± 1.68	26.66 ± 1.67	30.16 ± 1.54	32.12 ± 1.18	34.18 ± 1.81	31.74 ± 2.04
Body weight gains during							
Group	Recovery periods (g, 1 week)		Dosing periods (g, 4 weeks)				
Sham	3.08 ± 0.78		4.46 ± 0.70				
Control	3.33 ± 0.58		5.28 ± 1.62				
Alendronate	3.08 ± 1.03		4.96 ± 0.79				
PMR extracts							
125 mg/kg	2.16 ± 1.65		5.36 ± 1.59				
250 mg/kg	2.82 ± 0.81		4.96 ± 1.33				
500 mg/kg	2.20 ± 0.93		5.08 ± 1.45				

n = 5; (Mean ± S.D.), g; Gains during recovery periods = (Body weight at 1 week after operation - Body weight at operation); Gains during dosing periods = (Body weight at sacrifice - Body weight at dosing); * p < 0.01 compared to that of Sham by MW test

군의 경우 각각 26.30 ± 1.53 , 28.50 ± 1.68 , 26.66 ± 1.67 , 30.16 ± 1.54 , 32.12 ± 1.18 , 34.18 ± 1.81 및 31.74 ± 2.04 g을 나타내었다. 또한 회복 기간 중 각 그룹의 증체량은 난소 비적출군의 경우 3.08 ± 0.78 g, 매체 대조군은 3.33 ± 0.58 g, Alendronate 투여군은 3.08 ± 1.03 g, 하수오 물 추출물 125, 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 2.16 ± 1.65 , 2.82 ± 0.81 및 2.20 ± 0.93 g 으로 나타났으며, 투여 기간 동안의 증체량은 난소 비적출군의 경우 4.46 ± 0.70 g, 매체 대조군은 5.28 ± 1.62 g, Alendronate 투여군은 4.96 ± 0.79 g, 하수오 물 추출물 125, 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 5.36 ± 1.59 , 4.96 ± 1.33 및 5.08 ± 1.45 g 으로 관찰되었다.

난소 적출을 하지 않은 난소 비적출군과 비교했을 때 매체 대조군에서 유의성 없는 체중 증가가 인정되었으며, 매체 대조군과 비교시 모든 용량의 처리군에서 유의한 체중 변화는 인정되지 않았으나 난소 비적출군과 비교해서 하수오 물 추출물 250 mg/kg 투여군에서 투여 27일에 국한되어 유의한 체중증가($p < 0.01$)가 관찰되었다(Table 2).

골 중량의 변화

최종 희생 시, 양측의 대퇴골과 경골의 무게를 각각 측정하였으며, 체중에 대한 상대 중량을 개체 차이에 의한 오차를 줄이기 위해 산출하였다.

매체 대조군에서는 난소 비적출군과 비교하여, 대퇴골과 경골의 절대 및 상대 중량의 유의성 있는 감소가($p < 0.05$) 인정되었으며, Alendronate 처리군에서 대퇴골의 상대 중량과 경골의 절대 중량의 유의한($p < 0.05$) 증가가 인정되었다. 한편 용량 의존성은 인정되지 않았으나, 매체대조군과 비교시 하수오 물 추출물 처리군에도 유의한($p < 0.01$, $p < 0.05$) 경미한 골 중량의 증가가 각각 인정되었다(Table 3).

매체 대조군에서 최종 희생 시 대퇴골의 절대중량은 0.069 ± 0.006 g 으로 난소 비적출군의 0.079 ± 0.005 g에 비해 -12.96% 를 나타내었고 Alendronate, 하수오 물 추출물 125, 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 0.071 ± 0.004 , 0.073 ± 0.008 , 0.078 ± 0.007 및 0.078 ± 0.010 g 으로 매체 대조군에 비해 각각 3.71, 6.47, 13.62, 13.99%의 변화를 나타내었다.

매체 대조군에서 희생 시 대퇴골의 상대중량은 $0.221 \pm 0.024\%$ 로서 난소 비적출군의 $0.266 \pm 0.019\%$ 에 비해 -16.84% 로 나타났으며 Alendronate, 하수오 물 추출물 125, 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 0.241 ± 0.015 , 0.236 ± 0.031 , 0.245 ± 0.027 및 $0.245 \pm 0.020\%$ 로서 매체 대조군에 비해 각각 9.06, 6.99, 11.04, 11.00%의 변화를 나타내었다.

매체 대조군에서 희생 시 경골의 절대무게는 0.050 ± 0.004 g으로 난소 비적출군의 0.058 ± 0.004 g에 비해 -14.77% 의 변화를 나타내었으며 Alendronate, 하수오 물 추출물 125, 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 0.054 ± 0.002 , 0.054 ± 0.004 , 0.058 ± 0.003 및 0.059 ± 0.003 g으로 매체 대조군에 비해 각각 8.97, 9.85, 13.69, 15.32%의 변화를 나타내었다.

매체 대조군에서 희생 시 경골의 상대중량은 $0.161 \pm 0.025\%$ 로서 난소 비적출군의 $0.196 \pm 0.013\%$ 에 비해 -18.08% 의 변화를 나타내었으며 Alendronate, 하수오 물 추출물 125, 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 0.183 ± 0.009 , 0.177 ± 0.020 , 0.183 ± 0.010 및 $0.185 \pm 0.010\%$ 로서 매체 대조군에 비해 각각 13.89, 9.85, 13.69, 15.32%의 변화를 나타내었다.

골 두께 및 길이의 변화

오른쪽 대퇴골과 경골의 세로 길이와 골단부위의 두께를 각각 측정하였다.

매체 대조군에서는 난소 비적출군에 비해, 대퇴골 및 경골 골단부의 두께가 유의한 감소($p < 0.05$)를 나타내었으나, 하수오 물 추출물 125 mg/kg 투여군을 제외한 모든 용량의 투여군에서는 매체 대조군에 비해 유의한 대퇴골 및 경골 골단부 두께의 현저한 증가 ($p < 0.05$)가 관찰되었다. 한편, 하수오 물 추출물 125 mg/kg 투여군에서는 매체 대조군과 유사한 두께의 변화를 나타내었다(Table 4). 대퇴골과 경골의 세로길이에 있어서는 난소 비적출군에 비해, 매체 대조군을 포함하여 모든 투여군에서 유의성 있는 변화가 인정되지 않았다(Table 4).

매체 대조군에서 대퇴골의 골단부위의 두께는 1.49 ± 0.07 mm로서 난소 비적출군의 1.85 ± 0.12 mm에 비해 -19.59% 로 나타났으며, Alendronate, 하수오 물 추출물 125, 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 1.74 ± 0.16 , 1.56 ± 0.05 , $1.63 \pm$

Table 3. Changes of bone weights after OVX and drug administration

Bone weight	Absolute bone weights (g)		Relative bone weights (% vs body weight)	
	Femur	Tibia	Femur	Tibia
Sham	0.079 ± 0.005	0.058 ± 0.004	0.266 ± 0.019	0.196 ± 0.013
Control	$0.069 \pm 0.006^*$	$0.050 \pm 0.004^*$	$0.221 \pm 0.024^*$	$0.161 \pm 0.025^*$
Alendronate	$0.071 \pm 0.004^*$	$0.054 \pm 0.002^{* \# \#}$	$0.241 \pm 0.015^{* \# \#}$	$0.183 \pm 0.009^{* \# \#}$
	PMR extracts			
125 mg/kg	0.073 ± 0.008	0.054 ± 0.004	$0.236 \pm 0.031^{* \# \#}$	$0.177 \pm 0.020^{* \# \#}$
250 mg/kg	$0.078 \pm 0.007^{\# \#}$	$0.058 \pm 0.003^{\#}$	$0.245 \pm 0.027^{\# \#}$	$0.183 \pm 0.010^{* \# \#}$
500mg/kg	$0.078 \pm 0.010^{\# \#}$	$0.059 \pm 0.003^{\#}$	$0.245 \pm 0.020^{* \# \#}$	$0.185 \pm 0.010^{\# \#}$

n = 10 (bilateral sides, Mean \pm S.D.); * $p < 0.01$ and ** $p < 0.05$ compared to that of Sham by MW test; # $p < 0.01$ and ## $p < 0.05$ compared to that of vehicle control by MW test

Table 4. Changes of bone thickness/lengths after OVX and drug administration

Bone weight	Bone thickness (mm)		Bone lengths (mm)	
	Femur	Tibia	Femur	Tibia
Sham	1.85 ± 0.12	2.00 ± 0.04	16.50 ± 0.51	19.06 ± 0.30
Control	1.49 ± 0.07*	1.89 ± 0.06**	16.38 ± 0.49	18.96 ± 0.32
Alendronate	1.74 ± 0.16 ^{##}	1.99 ± 0.06 ^{##}	16.66 ± 0.42	19.07 ± 0.44
PMR extracts				
125 mg/kg	1.56 ± 0.05*	1.95 ± 0.05	16.43 ± 0.55	19.17 ± 0.15
250 mg/kg	1.63 ± 0.04**.#	2.01 ± 0.07 ^{##}	16.73 ± 0.60	19.23 ± 0.15
500 mg/kg	1.65 ± 0.10**.#	2.04 ± 0.08 ^{##}	16.65 ± 0.76	19.26 ± 0.35

n = 5 (right sides, Mean ± S.D.); *p < 0.01 and **p < 0.05 compared to that of Sham by MW test; #p < 0.01 and ##p < 0.05 compared to that of vehicle control by MW test

Table 5. Changes on bone mineral contents after OVX and drug administration

Bone contents	Ca levels (mg/g bone)	P levels (mg/g bone)	Ca/P ratio ¹⁾
Sham	59.64 ± 2.49	40.89 ± 1.90	146.18 ± 10.64
Control	37.41 ± 5.53*	22.36 ± 1.80*	167.81 ± 25.46
Alendronate	49.76 ± 6.57**.#	31.86 ± 6.74**.#	159.32 ± 22.55
PMR extracts			
125 mg/kg	41.12 ± 4.91*	28.03 ± 7.91**	159.33 ± 60.13
250 mg/kg	47.13 ± 4.29*.#	28.24 ± 2.97*.#	168.30 ± 21.92
500 mg/kg	49.08 ± 7.18**.#	28.76 ± 6.55*.#	178.10 ± 51.70

n = 5 (Right tibia, Mean ± S.D.); ¹⁾ Ca/P ratio (%) = (Tibia Ca contents / Tibia P contents) × 100; *p < 0.01 and **p < 0.05 compared to that of sham by MW test; #p < 0.05 compared to that of vehicle control by MW test

0.04 및 1.65 ± 0.10 mm로서 매체 대조군에 비해 각각 17.09, 4.98, 9.83, 11.17%의 변화가 관찰되었다.

매체 대조군에서 대퇴골의 세로길이는 16.38 ± 0.49 mm로 난소 비적출군의 16.50 ± 0.51 mm에 비해 -0.74%로 나타났으며, Alendronate, 하수오 물 추출물 125, 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 16.66 ± 0.42, 16.43 ± 0.55, 16.73 ± 0.60 및 16.65 ± 0.76 mm로 매체 대조군에 비해 각각 1.70, 0.34, 2.12, 1.65%의 변화가 관찰되었다.

매체 대조군에서 경골의 골단 부위의 두께는 1.89 ± 0.06 mm로 난소 비적출군의 2.00 ± 0.04 mm에 비해 -5.50%로 나타났으며, Alendronate, 하수오 물 추출물 125, 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 1.99 ± 0.06, 1.95 ± 0.05, 2.01 ± 0.07 및 2.04 ± 0.08 mm로 매체 대조군에 비해 각각 5.08, 2.96, 6.14 및 7.83%의 변화가 관찰되었다.

매체 대조군에서 경골의 세로길이는 18.96 ± 0.32 mm로 난소 비적출군의 19.06 ± 0.30 mm에 비해 -0.51%로 나타났으며, Alendronate, 하수오 물 추출물 125, 250 및 500 mg/kg 투여군은 각각 19.07 ± 0.44, 19.17 ± 0.15, 19.23 ± 0.15 및 19.26 ± 0.35 mm로 매체 대조군에 비해 각각 0.60, 1.13, 1.42 및 1.58%의 변화가 관찰되었다.

골 무기질 함량의 변화

최종 희생 시에 오른쪽 경골을 채취하여 건조한 뒤 800°C

에서 carbonization을 거치고 nitric acid에 용해하여 Ca와 P의 함량을 각각 측정하였다.

난소 비적출군과 비교하여, 매체 대조군에서는 경골의 Ca와 P함량의 유의성 있는 감소(p < 0.01)가 각각 관찰되었으나 골 무기질 함량의 유의성 있는 증가(p < 0.05)가 하수오 물 추출물 125 mg/kg 투여군을 제외한 모든 용량의 투여군에서 관찰되었다. 하수오 물 추출물 125 mg/kg 투여군에서도 유의성은 인정되지 않았으나 경미한 경골내 무기질 함량의 증가가 인정되었다(Table 5). 한편 Ca/P ratio에서의 유의성 있는 변화는 매체 대조군을 포함하여 확인되지 않았다(Table 5).

매체 대조군에서 경골의 Ca 함량은 37.41 ± 5.53 mg/g bone으로 난소 비적출군의 59.64 ± 2.49 mg/g bone에 비해 -37.62%의 변화를 나타내었으며, Alendronate, 하수오 물 추출물 125, 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 49.76 ± 6.57, 41.12 ± 4.91, 47.13 ± 4.29 및 49.08 ± 7.18 mg/g bone으로 매체 대조군에 비해 각각 33.03, 9.94, 26.00, 31.20%의 변화가 관찰되었다.

매체 대조군에서 경골의 P 함량은 22.36 ± 1.80 mg/g bone으로 난소 비적출군의 4.089 ± 1.90 mg/g bone에 비해 -45.33%의 변화를 나타내었으며, Alendronate, 하수오 물 추출물 125, 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 31.86 ± 6.74, 28.03 ± 7.91, 28.24 ± 2.97 및 28.76 ± 6.55 mg/g bone으로 매체 대조군에 비해 각각 42.53, 25.38, 26.33, 28.64%의 변화

가 관찰되었다.

매체 대조군에서 경골의 Ca/P ratio는 167.81 ± 25.46 으로 난소 비적출군의 146.18 ± 10.64 에 비해 14.80%의 변화를 나타내었으며, Alendronate, 하수오 물 추출물 125, 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 159.32 ± 22.55 , 159.33 ± 60.13 , 168.30 ± 21.92 및 178.10 ± 51.70 으로 매체 대조군에 비해 각각 -5.06, -5.06, 0.29, 6.13%의 변화가 관찰되었다.

혈액 생화학적 변화

최종 희생 시 복대정맥에서 정맥혈을 채취하여, 혈청을 분리하였으며 혈청 osteocalcin, Ca 및 P의 함량을 각각 측정하였다.

매체 대조군에서 난소 비적출군에 비해 혈청 osteocalcin 함량의 유의성 있는 증가($p < 0.01$)가 혈청 Ca와 P함량의 유의성 있는 감소($p < 0.01$)와 함께 관찰되었으나, 매체 대조군과 비교시 하수오 물 추출물 125 mg/kg 투여군을 제외한 모든 투여군에서 유의성 있는 혈청 Ca와 P 함량의 증가 ($p < 0.01$, $p < 0.05$)와 혈청 osteocalcin 함량의 감소가 각각 나타났다(Table 6).

매체 대조군에서 혈청 osteocalcin 함량은 33.07 ± 3.31 ng/ml로서 난소 비적출군의 20.68 ± 1.33 ng/ml에 비해 59.90%의 변화를 나타내었으며, Alendronate, 하수오 물 추출물 125, 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 25.41 ± 2.86 , 29.98 ± 2.80 , 28.16 ± 1.99 및 27.26 ± 1.89 ng/ml로서 매체 대조군에 비해 각각 -23.16, -12.36, -14.84, -17.57%의 변화가 관찰되었다.

매체 대조군에서 혈청 Ca 수준은 8.66 ± 0.64 mg/dl로서 난소 비적출군의 11.20 ± 0.65 mg/dl에 비해 -22.68%의 변화를 나타내었으며, Alendronate, 하수오 물 추출물 125, 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 9.60 ± 0.28 , 8.96 ± 0.96 , 9.68 ± 0.46 및 10.02 ± 0.26 mg/dl로서 매체 대조군에 비해 각각 10.85, 3.46, 11.18, 15.70%의 변화가 관찰 되었다.

매체 대조군에서 혈청 P 수준은 7.34 ± 0.98 mg/dl로 난소 비적출군의 11.82 ± 1.81 mg/dl에 비해 -37.90%의 변화를 나타내었으며,

Alendronate, 하수오 물 추출물 125, 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 9.08 ± 0.23 , 7.92 ± 0.72 , 9.42 ± 0.83 및 9.62 ± 1.08 mg/dl로서 매체 대조군에 비해 각각 23.71, 7.90, 28.34, 31.06%의 변화가 관찰되었다.

골 밀도(BMD)의 변화

본 실험에서는 희생 시 좌측 대퇴골의 골단 부위의 골 밀도를 모든 실험 동물에서 각각 측정하였다.

난소 비적출군과 비교 시 매체 대조군에서 대퇴골 골 밀도의 유의성 있는 감소($p < 0.01$)가 인정되었으나, 하수오 물 추출물 125 mg/kg 투여군을 제외한 모든 투여군에서 매체 대조군에 비해 유의성 있는 대퇴골 골 밀도의 증가 ($p < 0.05$)가 관찰되었으며, 특히 하수오 물 추출물 투여군에서 용량 의존적인 증가가 관찰되었다(Table 7).

매체 대조군에서 대퇴골의 골 밀도는 0.41 ± 0.03 mg/cm²로서 난소 비적출군의 0.68 ± 0.03 mg/cm²에 비해 -39.53%의 변화를 나타내었으며, Alendronate, 하수오 물 추출물 125, 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 0.52 ± 0.07 , 0.43 ± 0.04 , 0.49 ± 0.01 및 0.49 ± 0.03 mg/cm²로 매체 대조군에 비해 각각 27.80, 4.88, 19.02, 20.00%의 변화가 관찰되었다.

골 강도(FL)의 변화

Three-point bending test를 이용하여, 경골 의 중간 부위의 골 강도를 측정하였다.

매체 대조군에서는 난소 비적출군에 비해 경골 강도의 유의성 있는 감소 ($p < 0.01$)가 관찰되었으나, 하수오 물 추출물 125 mg/kg 투여군을 제외한 모든 투여군에서 매체 대조군에 비해 유의성 있는($p < 0.05$) 경골 강도의 증가가 각각 관찰되었다(Table 7).

매체 대조군에서 경골의 골 강도는 0.97 ± 0.10 N으로 난소 비적출군의 1.71 ± 0.16 N 에 비해 -43.57%의 변화를 나타내었으며, Alendronate, 하수오 물 추출물 125, 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 1.29 ± 0.15 , 1.00 ± 0.05 , 1.10 ± 0.07 및 1.18 ± 0.09 N으로 매체 대조군에 비해 각각 33.33,

Table 6. Changes on serum biochemistry after OVX and drug administration

Serum contents	Osteocalcin levels(ng/ml)	Ca levels (mg/dl)	P levels (mg/dl)
Sham	20.68 ± 1.33	11.20 ± 0.65	11.82 ± 1.81
Control	$33.07 \pm 3.31^*$	$8.66 \pm 0.64^*$	$7.34 \pm 0.98^*$
Alendronate	$25.41 \pm 2.86^{*.*}$	$9.60 \pm 0.28^{*.*}$	$9.08 \pm 0.23^{*.*}$
PMR extracts			
125 mg/kg	$29.98 \pm 2.80^*$	$8.96 \pm 0.96^*$	$7.92 \pm 0.72^*$
250 mg/kg	$28.16 \pm 1.99^{*.*}$	$9.68 \pm 0.46^{*.*}$	$9.42 \pm 0.83^{*.*}$
500 mg/kg	$27.26 \pm 1.89^{*.*}$	$10.02 \pm 0.26^{*.*}$	$9.62 \pm 1.08^{*.*}$

n = 5 (Mean ± S.D.) *p < 0.01 and **p < 0.05 compared to that of Sham by MW test; #p < 0.01 and ###p < 0.05 compared to that of vehicle control by MW test

Table 7. Changes on the BMD of femur and FL of tibia after OVX and drug administration

BMD/FL	BMD (mg/cm ²)	FL (N)
Sham	0.68 ± 0.03	1.71 ± 0.16
Control	$0.41 \pm 0.03^*$	$0.97 \pm 0.10^*$
Alendronate	$0.52 \pm 0.07^{*.*}$	$1.29 \pm 0.15^{*.*}$
PMR extracts		
125 mg/kg	$0.43 \pm 0.04^*$	$1.00 \pm 0.05^*$
250 mg/kg	$0.49 \pm 0.01^{*.*}$	$1.10 \pm 0.07^{*.*}$
500 mg/kg	$0.49 \pm 0.03^{*.*}$	$1.18 \pm 0.09^{*.*}$

n = 5 (left sides, Mean ± S.D.); *p < 0.01 compared to that of Sham by MW test; #p < 0.01 and ###p < 0.05 compared to that of vehicle control by MW test

3.52, 13.87, 22.57%의 변화를 나타내었다.

조직 및 조직 형태학적 변화

조직학적 변화를 관찰하기 위해 우측 대퇴골을 분리하여 고정하고 탈회한 다음, 파라핀에 포매하여 염색을 실시하고 관찰하였으며, 조직 형태학적 변화를 관찰하기 위해 각각 지주골량(TBV), 지주골 두께(Tbt), 지주골 수(Tbn), 지주골 길이(Tbl), 피질골 두께(Cbt)와 파골세포 수(Ocn)를 측정하였다.

매체 대조군에서 결합조직의 증가로 인한 지주골량과 피질골의 현저한 감소와 같은 골다공증의 전형적인 조직 형태학적 변화가 관찰되었다. 또한, 골단 부위에서의 파골세포 수의 현저한 증가(p < 0.01)와 함께 TBV, Tbt, Tbl, Tbn, Cbt 의 유의성 있는(p < 0.01) 감소가 각각 인정되었다. Alendronate 투여군에서는 지주골량의 감소가 현저하게 억제 되었으나, 의미있는 피질골량의 변화는 관찰되지 않았고, 매체 대조군과 비교시 TBV, Tbn, Tbl 의 유의성 있는 증가(p < 0.01)가 관찰되었으나, 파골세포 수는 오히려 현저하게 증가 되었다. 하수오 물 추출물 투여군에서는 용량의존적인 지주골량의 감소 억제가 인정되었으며, 피질골량의 감소 역시 현저히 억제 되었다. 즉, 매체 대조군과 비교시 TBV, Tbt, Tbl, Tbn, Cbt 의 현저한 용량 의존적인 증가가 관찰되었다. 한편, 모든 하수오 물 추출물 투여군에서 매체 대조군과 매우 유사한 Ocn이 각각 인정되었다(Table 8).

1) 매체 대조군에서 대퇴골의 TBV는 21.03 ± 2.78%로 난소 비적출군의 42.06 ± 6.91% 에 비해 -50.01%의 변화를 나타내었으며, Alendronate, 하수오 물 추출물 125, 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 48.20 ± 7.84, 26.34 ± 3.43, 29.16 ± 3.26 및 29.79 ± 3.94%로 매체 대조군에 비해 각각 129.26, 25.27, 38.68, 41.67%의 변화를 나타내었다.

2) 매체 대조군에서 대퇴골 의 Tbt는 42.23 ± 8.98 μm로 난소 비적출군의 93.22 ± 13.42 μm에 비해 -54.70%의 변화를 나타내었으며, Alendronate, 하수오 물 추출물 125, 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 44.45 ± 13.27, 44.67 ± 8.56, 48.24 ±

13.94 및 48.29 ± 9.94 μm로서 매체 대조군에 비해 각각 5.27, 5.78, 14.24, 14.35%의 변화가 관찰 되었다.

3) 매체 대조군에서 대퇴골의 Tbn은 7.20 ± 1.48로서 난소 비적출군의 11.80 ± 0.84에 비해 -39.98%의 변화를 나타내었으며, Alendronate, 하수오 물 추출물 125, 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 16.40 ± 2.97, 9.00 ± 1.41, 11.80 ± 1.92 및 12.20 ± 1.30으로 매체 대조군에 비해 각각 127.78, 25.00, 63.89, 69.44%의 변화가 관찰되었다.

4) 매체 대조군에서 대퇴골의 Tbl은 422.67 ± 49.63 μm로서 난소 비적출군의 826.64 ± 106.33 μm에 비해 -48.87%의 변화를 나타내었으며, Alendronate, 하수오 물 추출물 125, 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 636.95 ± 143.28, 512.64 ± 98.51, 553.69 ± 53.03 및 582.80 ± 98.14 μm로 매체 대조군에 비해 각각 50.46, 21.29, 31.00, 27.78 %의 변화를 나타내었다.

5) 매체 대조군에서 대퇴골의 Ocn은 13.80 ± 2.49로서 난소 비적출군의 4.40 ± 1.82 에 비해 213.64%의 변화를 나타내었으며, Alendronate, 하수오 물 추출물 125, 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 21.60 ± 3.05, 14.20 ± 3.11, 13.40 ± 2.30 및 13.60 ± 1.82로서 매체 대조군에 비해 각각 56.52, 2.90, -2.90, -1.45%의 변화를 나타내었다.

6) 매체 대조군에서 대퇴골의 Cbt는 77.51 ± 17.37 μm로서 난소 비적출군의 196.39 ± 10.52 μm에 비해 -60.53%의 변화를 나타내었으며, Alendronate, 하수오 물 추출물 125, 250, 500 mg/kg 투여군은 각각 82.52 ± 14.62, 96.66 ± 16.28, 105.84 ± 10.86 및 107.62 ± 15.41 μm로서 매체 대조군에 비해 각각 6.46, 24.70, 36.55, 107.62%의 변화를 나타내었다

고 찰

골다공증이란 골 형성과 흡수의 불균형에 의해 발생하는 대사성 골 질환으로써, 현재 활용되고 있는 골다공증 치료법으로는 운동 및 생활 습관의 변화를 요구하는 일반요법(3,11, 15,28,33)과 약물요법이 있다(3). 약물요법 중 호르몬치료의 경

Table 8. Histomorphometrical changes of trabecular and cortical bone at trochlea epiphyseal regions of right femur with osteoclast cell numbers

Femur	TBV ¹⁾	Tbt ²⁾	Tbn ³⁾	Tbl ⁴⁾	Cbt ⁵⁾	Ocn ⁶⁾
Sham	42.06 ± 6.91	93.22 ± 13.42	11.80 ± 0.84	826.64 ± 106.33	196.39 ± 10.52	4.40 ± 1.82
Control	21.03 ± 2.78*	42.23 ± 8.98*	7.20 ± 1.48*	422.67 ± 49.63*	77.51 ± 17.37*	13.80 ± 2.49*
Alendronate	48.20 ± 7.84 [#]	44.45 ± 13.27*	16.40 ± 2.97** [#]	636.95 ± 143.28** [#]	82.52 ± 14.62*	21.60 ± 3.05* ^{##}
PMR extracts						
125 mg/kg	26.34 ± 3.43* ^{##}	44.67 ± 8.56*	9.00 ± 1.41**	512.64 ± 98.51*	96.66 ± 16.28*	14.20 ± 3.11*
250 mg/kg	29.16 ± 3.26** ^{##}	48.24 ± 13.94*	11.80 ± 1.92 ^{##}	553.69 ± 53.03* ^{##}	105.84 ± 10.86* ^{##}	13.40 ± 2.30*
500 mg/kg	29.79 ± 3.94** [#]	48.29 ± 9.94*	12.20 ± 1.30 [#]	582.80 ± 98.14** ^{##}	107.62 ± 15.41* ^{##}	13.60 ± 1.82**

n = 5; (Mean ± S.D.); 1) TBV, trabecular bone volume (Unit, %); 2) Tbt, trabecular bone thickness (Unit, μm); 3) Tbn, trabecular bone number (Unit, number/epiphyseal); 4) Tbl, trabecular bone length (Unit, μm); 5) Cbt, cortical bone thickness (Unit, μm); Ocn, osteoclast cell number (Unit, number/ epiphyseal); All histomorphometrical indices were calculated using automated image analyzer; *p < 0.01 and **p < 0.05 compared to that of Sham control by MW test; [#]p < 0.01 and ^{##}p < 0.05 compared to that of vehicle control by MW test

우 폐경기 이후의 골다공증으로 인한 골절을 예방하는 효과가 있으나 장기간 실시할 경우 관상동맥질환, 뇌일혈, 유방염, 혈전 색전증, 담낭염, 자궁내막염 등의 발생위험이 있으며, 비호르몬 제제의 경우 상부 소화기 장애 및 고칼슘 혈증 등의 부작용이 발생된다는 보고가 있다(25,32). 따라서 보다 안전하고 부작용이 적은 천연물질을 이용한 항 골다공증 치료제의 필요성이 대두됨에 따라 본 실험에서는 난소 적출로 ddY 마우스의 골다공증을 유도한 뒤 하수오 물 추출물을 투여하여 골다공증에 대한 효과를 확인하였다.

하수오 물 추출물이 난소 적출로 인한 체중 변화에 미치는 변화를 관찰하기 위하여, 하수오 물 추출물 투여기간 동안 주 1회 체중의 변화를 측정된 결과, 매체 대조군에서 난소 비적출군에 비하여 체중 증가경향을 나타내었으나, 유의성은 인정되지 않았으며, 하수오 물 추출물 250 mg/kg 투여군에서만 투여 27일에 유의한 체중증가($p < 0.01$)가 관찰되었다.

Rodan과 Martin(36)은 쥐에서 난소 적출로 인한 체중의 증가를 보고 하였으나, Andersson등(9)은 마우스에서는 난소 적출에 의한 체중변화가 나타나지 않았다고 하였다. 본 실험 결과 난소 비적출군에 비하여 난소 적출군에서 체중에 대한 현저한 효과가 인정되지 않은바, 이러한 결과는 Andersson 등(9)의 보고와 일치하는 결과로 생각된다. 또한 본 연구에서 나타난 일시적인 체중증가 경향은 항 골다공증 효과로 인한 것이 아니라 항산화 효과나 면역계 강화와 같은 다른 약리학적 효과에 의한 것으로 생각되며, 김 등(27)과 이 등(30)도 약초나 천연물질이 체중을 증가시키는 경향이 있다는 보고를 한 바 있다.

골 중량의 변화를 관찰하기 위해 최종 희생 시, 양측의 대퇴골과 경골의 무게를 각각 측정된 결과, 매체 대조군에서는 난소 비적출군에 비하여, 대퇴골과 경골의 절대 및 상대 중량의 유의한 감소가($p < 0.05$) 인정되었으며, Alendronate 처리군에서는 대퇴골의 상대 중량과 경골의 절대 중량이 유의하게($p < 0.05$) 증가가 인정되었다. 한편 용량 의존성은 인정되지 않았으나, 매체대조군에 비하여 하수오 물 추출물 처리군에도 유의한($p < 0.01$, $p < 0.05$) 골 중량의 증가가 각각 인정되었다.

일반적으로 Ash bone weight의 변화가 항 골다공증 물질의 효과를 입증하는 중요한 지표라고 하지만(49), 본 연구에서는 모든 용량의 투여군에서 골 중량이 다소 증가하는 경향이 나타남바, 이러한 골 중량의 증가 경향은 하수오 물 추출물의 항 골다공증 효과와 직접 관련 있는 것으로 생각된다.

골 두께 및 길이의 변화 관찰을 위하여 오른쪽 대퇴골과 경골의 세로 길이와 골단부위의 두께를 각각 측정된 결과, 매체 대조군에서는 난소 비적출군에 비하여, 대퇴골 및 경골 골단부의 두께가 유의한 감소($p < 0.05$)를 나타내었으나, 하수오 물 추출물 125 mg/kg 투여군을 제외한 모든 투여군에서는 매체 대조군에 비하여 대퇴골 및 경골 골단부 두께의 현저한 증가($p < 0.05$)가 관찰되었다. 그러나, 하수오 물 추출물 125 mg/kg 투여군에서는 매체 대조군과 유사한 두께의 변화를 나타내었다. 대퇴골과 경골의 세로길이에 있어서는 난소

비적출군에 비하여, 매체 대조군을 포함한 모든 투여군에서 유의한 변화가 인정되지 않았다.

Ederveen 등(18)과 Pytlik등(35)은 난소 적출로 골다공증이 유발된 쥐에서 골의 두께는 유의한 감소를 나타내었으나, 골의 길이는 유의한 변화가 인정되지 않았다고 하였다. 본 실험 결과 하수오 물 추출물 투여군의 대퇴골과 경골에서 골 두께의 용량 의존적인 증가가 나타났으며, 이러한 골 두께의 증가 또는 감소 억제에는 하수오 물 추출물이 골 형성을 증가 시키거나 또는 골 량을 보호한다는 직접적인 증거라고 생각된다. Gittens 등(22)은 난소적출한 쥐에 bone anabolic agent 인 parathyroid hormone를 투여한 실험에서 이와 유사한 효과를 관찰한 바 있다.

골 무기질 함량의 변화 실험을 위하여 최종 희생 시 오른쪽 경골을 채취하여 건조시키고 800°C에서 carbonization을 거친 뒤 nitric acid에 용해하여 Ca과 P의 함량을 각각 측정된 결과, 난소 비적출군에 비하여, 매체 대조군에서는 경골의 Ca과 P함량의 유의한 감소($p < 0.01$)가 각각 관찰되었으나 골 무기질 함량의 유의한 증가($p < 0.05$)는 하수오 물 추출물 125 mg/kg 투여군을 제외한 모든 투여군에서 관찰되었다. 하수오 물 추출물 125 mg/kg 투여군에서도 유의성은 인정되지 않았으나 경미한 경골내 무기질 함량의 증가가 인정되었다. 그러나 Ca/P의 비율은 매체 대조군을 포함한 모든 실험군에서 유의성이 인정되지 않았다.

골 무기질 함량은 일반적으로 골다공증시에는 현저히 감소되며, 특히 골 무기질 중 Ca 과 P 함량이 골에서 가장 현저한 감소를 나타내는 무기질이지만 그 비율에는 일반적으로 변화가 없는것으로 알려져 있다(43,44). 골 무기질 함량의 증가 또는 감소 억제가 하수오 물 추출물이 골 량을 보호하고 또한 골 형성을 증가시키는 직접적인 증거라 생각되며 따라서 골 강도도 증가시킬수 있으리라 판단된다. 김 등(28)도 난소적출 한 쥐에 하수오와 백수오 추출물을 투여한 결과 본 실험결과와 같은 결과를 보고하였으며, 특히 용량 의존적으로 효과를 나타내었다는 사실이 의미있는 결과로 사료된다.

혈액 생화학적 변화를 관찰하기 위하여 최종 희생 시 복대 정맥에서 정맥혈을 채취하여, 혈청을 분리하였으며 혈청 osteocalcin, Ca 및 P의 함량을 각각 측정된 결과, 매체 대조군에서 난소 비적출군에 비하여 혈청 osteocalcin 함량의 유의한 증가($p < 0.01$)가, 혈청 Ca와 P함량의 유의한 감소($p < 0.01$)와 함께 관찰되었으나, 매체 대조군에 비하여서는 하수오 물 추출물 125 mg/kg 투여군을 제외한 모든 투여군에서 이와는 반대의 결과 즉, 혈중 Ca과 P 함량의 현저한 증가($p < 0.01$, $p < 0.05$) 및 혈중 osteocalcin 함량의 현저한 감소가 각각 나타났다.

Osteocalcin은 조골세포에 의해 유리된 vitamin K-dependent alpha-carboxyglutamic acid이며 혈청 osteocalcin 수준은 골 형성의 지표가 된다. 비록 채혈 시간, 연구 형태 그리고 사용된 동물의 종에 따라 다양한 변화가 보고되었으나 혈청 osteocalcin 수준은 일반적으로 bone turnover의 marker로 간주되고 있다(17,26). 본 연구에서 하수오 물 추출물은

난소적출로 유도된 골다공증 모델에서 혈청 osteocalcin의 증가를 용량 의존적으로 현저히 억제한 바, 이는 하수오 물 추출물이 골의 재흡수 억제에 좋은 효과를 가진다는 간접적인 증거로 생각된다.

혈청 Ca 과 P 함량의 증가는 동물의 골다공증 모델에서 골 형성의 지표로 간주되고 있다(29,40). 따라서 난소적출로 유도된 골다공증에서 하수오 물 추출물이 용량 의존적으로 혈청 Ca 과 P 함량을 현저히 증가 시키는 것으로 나타난 바, 이것은 하수오 물 추출물이 용량 의존적으로 골 형성을 증가시키는 효과를 가지는 증거라 생각된다. 하지만 김 등(28)이 흰쥐를 이용한 실험에서 하수오 추출물을 매일 2회 투여한 결과, 혈청 Ca함량은 증가하였으나, P 함량이 감소되었다고 보고 하였으나 이는 하수오 물 추출물의 투여 용량에 의한 차이로 여겨진다.

본 실험에서 골 밀도(BMD)의 변화를 관찰하기 위하여 희생 시 좌측 대퇴골 골단 부위의 골 밀도를 모든 실험 동물에서 각각 측정된 결과, 난소 비적출군에 비하여, 매체 대조군에서는 대퇴골 골 밀도의 유의한 감소($p < 0.01$)가 인정되었으나, 하수오 물 추출물 125 mg/kg 투여군을 제외한 모든 투여군에서는 매체 대조군에 비하여 유의한 대퇴골 골 밀도의 증가($p < 0.05$)가 관찰되었으며, 특히 용량 의존적인 증가가 관찰되었다.

골 밀도는 일반적으로 골의 질적 변화를 검사하는 중요한 지표로 여겨져 왔으며 동물의 골다공증 모델에서도 현저하게 감소되는 것으로 보고되었으며, 또한 항 골다공증 물질의 효과를 나타내기도 한다(42). 하수오 물 추출물 투여군의 대퇴골 골단 부위에서의 골 밀도는 매체 대조군에 비하여 용량 의존적인 증가를 나타내나, 하수오 물 추출물이 난소적출에 의해 유도된 대퇴골에서의 골 밀도 감소 억제에 좋은 효과를 가지는 것으로 생각되며 골다공증 환자에서 자주 발생하는 골절의 예방과 치료에 좋은 효과를 가질 것으로 기대된다.

골 강도(FL)의 변화를 관찰하기 위하여 Three-point bending test를 이용하여, 경골 중간 부위의 골 강도를 측정된 결과, 매체 대조군에서는 난소 비적출군에 비하여 경골의 강도가 유의하게 감소($p < 0.01$)되었으나, 하수오 물 추출물 125 mg/kg 투여군을 제외한 모든 투여군에서는 매체 대조군에 비하여 유의한($p < 0.05$) 경골 강도의 증가가 각각 관찰되었다.

골 강도는 직접적으로 피질골 강도를 나타내기 때문에(48), 항 골다공증 물질의 효과를 예측하는 가장 중요한 지표중의 하나이다(10,24). 하수오 물 추출물 투여군의 왼쪽 경골의 중간부위의 강도는 매체 대조군에 비하여 증가된 바, 골 강도의 이러한 증가가 하수오 물 추출물이 난소 적출에 의해 유도된 골 강도의 감소 억제에 직접적인 효과가 있다고 사료되며, 하수오 물 추출물이 골의 강도 증가에도 좋은 효과를 가지는 직접적인 증거로 생각된다.

하수오 물 추출물 투여에 의한 조직학적 변화를 관찰하기 위하여 우측 대퇴골을 분리하여 고정하고 탈회한 다음, 파라핀에 포매하여 염색을 실시하고 관찰하였으며, 조직 형태학적 변화를 관찰하기 위해 각각 지주골량(TBV), 지주골 두께

(Tbt), 지주골 수(Tbn), 지주골 길이(Tbl), 피질골 두께(Cbt)와 파골세포 수(Ocn)를 측정된 결과, 매체 대조군에서 결합조직의 증가로 인한 지주골량과 피질골의 현저한 감소와 같은 골다공증의 전형적인 조직 형태학적 변화가 관찰되었다. 또한, 골단 부위에서 현저한 파골세포 수의 증가($p < 0.01$)와 함께 TBV, Tbt, Tbl, Tbn, Cbt 의 유의한($p < 0.01$) 감소가 각각 인정되었다. Alendronate 투여군에서는 지주골량의 감소가 현저히 억제 되었으나, 피질골량의 유의한 변화는 관찰되지 않았고, 매체 대조군에 비하여 TBV, Tbn, Tbl 의 유의한 증가($p < 0.01$)가 관찰되었으나, 파골세포 수는 오히려 현저히 증가 되었다. 하수오 물 추출물 투여군에서는 용량의존적으로 지주골량의 감소 억제가 인정되었으며, 피질골량의 감소 역시 현저히 억제되어, 매체 대조군에 비하여TBV, Tbt, Tbl, Tbn, Cbt 의 현저한 용량 의존적인 증가가 관찰되었다. 반면 모든 하수오 물 추출물 투여군에서는 매체 대조군과 매우 유사한 Ocn이 각각 인정되었다.

골다공증에서 조직형태학적 지표인 TBV, Cbt, Tbt, Tbl, osteoblasts/bone perimeter등은 현저히 감소하고, osteoclasts/bone perimeter (Ocn)가 증가 되기때문에 항 골다공증 물질의 효과를 추정하기 위하여서는 골의 현미경적 관찰이 반드시 필요하다고 알려져 있다(34,46,48). 난소적출로 유발된 골다공증 결과를 난소 비적출군과 비교시 매체 대조군에서 TBV, Tbt, Tbl, Tbn, Cbt 의 감소와 Ocn 의 증가를 포함한 전형적인 골의 조직형태학적 변화와 함께 지주골 량과 피질골 량의 현저한 감소가 나타났다. 하수오 물 추출물 투여군에서 이러한 조직 및 조직형태학적인 골다공증에 대한 변화로 특히 지주골 량이 용량 의존적으로 현저히 감소되었다. 하수오 물 추출물의 지주골 량에 대한 효과는 Alendronate 투여군에 비하여서는 다소 낮았지만, 피질골에 대해서는 Alendronate 투여군에 비하여 좋은 효과를 나타내었다. 이러한 하수오 물 추출물에 의한 골 량의 감소 억제 효과는 골 강도와 질의 감소를 억제하는 역할을 할 것으로 기대된다.

본 실험의 결과를 종합적으로 평가해 보면 125 mg/kg 의 하수오 추출물을 투여한 군에서도 난소적출로 유발된 골다공증에 대하여 효과를 나타내었지만 250 mg/kg 의 하수오 물 추출물 투여군에서 골 강도와 골 질의 손실을 지속적이고 현저히 억제하였다($p < 0.01$, $p < 0.05$). 일반적으로 동물실험에서 체중을 근거로 효력 용량의 3~4배 정도가 인체에서 사용되므로, 골다공증 환자에 하수오 물 추출물을 투여한다면 실제 효력 용량은 750내지 1000 mg/head(3~4 time of 250 mg/kg, middle dosage used in this study)로 생각된다. 따라서 본 연구의 결과를 참고하여 인체에 대한 적용 효과와 투여 용량에 대한 추가적인 실험이 실시된다면 하수오 물 추출물은 기존의 치료약물에 비해 부작용 우려가 적은 골다공증 치료를 위한 대체물질로써 활용이 가능할 것으로 기대된다.

결 론

하수오 물 추출물의 골다공증에 대한 효과를 평가하기 위

하여, 난소 적출로 유발된 ddY 마우스 골다공증 모델에서 수술 1주 후부터 매일 1회씩 125, 250 및 500 mg/kg을 4주간 경구투여하고, 체중, 골 중량, 골 두께 및 길이, 골 미네랄 함량, 혈중 osteocalcin, Ca, P 함량, 골 밀도, 골 강도와 함께 골 조직 및 조직 형태학적 변화를 관찰하였으며, 실험 결과는 Alendronate 10 mg/kg 투여군과 비교하였다.

그 결과 난소적출로 유도된 estrogen 결핍성 골다공증 모델을 이용한 실험에서 하수오 물 추출물이 일반적으로 골다공증시 증가하는 혈중 osteocalcin의 수치를 감소시키고 골다공증시 감소하는 혈중 Ca 과 P의 수치를 증가시키는 것으로 나타났다.

마우스 희생 시 대퇴골과 경골의 조직 및 조직형태학적 변화에 있어서 하수오 물 추출물이 골의 무기질 함량의 감소를 억제하며 골다공증의 골 량 감소에 의한 지주골 량, 지주골 수, 지주골 길이와 피질골의 두께 감소를 억제하는 것으로 나타남에 따라 하수오 물 추출물이 estrogen 결핍성 골다공증에 비교적 좋은 효과를 가지는 것으로 결론지어진다. 또한 Alendronate 투여군과 비교했을 때 전체적으로는 그 효과가 낮게 나타났지만 피질골의 두께에서는 Alendronate 보다 훨씬 효과가 좋은 것으로 나타났으며 특히 파골세포의 수에 있어서는 Alendronate가 매체 대조군에 비해 현저히 높은 파골세포 수의 증가가 나타났지만 하수오 물 추출물 투여군에 있어서는 매체 대조군에 비해 파골세포의 유의한 수적 증가가 나타나지 않았다.

골다공증의 치료목표는 유발인자의 제거와 동시에 골 흡수를 억제하고 골 형성을 촉진하여 감소된 골 량을 회복시키는 것이며, 따라서 운동 및 생활 습관의 변화를 요구하는 일반요법을 제외한 약물로는 골 소실을 감소시키는 칼슘제와 비타민 D, 골 소실의 예방 및 골 량을 증가시킬 수 있는 estrogen과 calcitonin, 골 형성을 자극하는 fluoride와 일반적으로 사용되고 있는 파골세포의 기능을 저하시켜 골 흡수를 억제하는 골다공증 치료제인 bisphosphonate 등이 있다. 그러나 estrogen 등의 호르몬을 장기간 활용할 경우 관상동맥질환, 뇌일혈, 유방염, 혈전색전증, 당뇨병, 자궁 내막염 등을 유발시킬 위험이 있고, 자궁출혈 등의 위험을 증가시킬 수 있으며 bisphosphonate에 의한 상부 소화기관 자극이나 parathyroid hormone analogs에 의한 과 칼슘 혈증 등과 같은 심각한 부작용의 위험이 존재한다. 하지만 이와 달리 천연물인 하수오 물 추출물은 위와 같은 부작용의 위험이 없으므로 새로운 골다공증의 예방 및 치료제로서 그 가치가 높다고 생각되며 하수오 물 추출물의 구체적인 골다공증에 대한 분자생물학적 작용기전은 더 연구되어야 하겠다.

참 고 문 헌

1. 강소신의학원. 신편중약대사전. 의성당 1992; 862-865.
2. 대한정형외과학회. 정형외과학. 최신의학사. 1992; 13-14, 81-82.
3. 이동선, 변상요, 두충[Eucommia ulmoides Oliver.] 조성물이 골다공증에 미치는 효과. 한국 생물공학회지. 2001; 16:

- 614-619.
4. 이해남, 박용문, 장미경, 변용진. 한국 여성의 요골 골 밀도치에 의한 골다공증의 빈도 및 폐경에 따른 변화. 대한산부회지. 2002; 45: 1186-1190.
5. 조수현. 폐경과 골다공증. 대한의학협회지. 1992; 35: 587-598.
6. 지형준. 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해. 한국메디칼 인텍스사. 1998: 266-267.
7. 한방약재 교재 편찬위원회. 한방약리학. 신일상사. 2006.
8. Alexander JM, Bab I, Fish S, Muller R, Uchiyama T, Gronowicz G, Nahounou M, Zhao Q, White DW, Chorev M, Gazit D, Rosenblatt M. Human parathyroid hormone 1-34 reverses bone loss in ovariectomized mice. J Bone Miner Metab. 2001; 16: 1665-1673.
9. Andersson N, Lindberg MK, Ohlsson C, Andersson K, Ryberg B. Repeated in vivo determinations of bone mineral density during parathyroid hormone treatment in ovariectomized mice. J Endocr. 2001; 170: 529-537.
10. Bilston LE, Little DG, Smith NC, Williams P, Briody J. Zoledronic acid improves the mechanical properties of normal and healing bone. Clin Biomech (Bristol, Avon). 2002; 17: 716-718.
11. Bonaiuti D, Shea B, Iovine R, Negrini S, Robinson V, Kemper HC, Wells G, Tugwell P, Cranney A. Exercise for preventing and treating osteoporosis in postmenopausal women (Cochrane Review). Cochrane Datab Syst Rev. 2002; CD000333.
12. Chan YC, Wang MF, Chang HC. Polygonum multiflorum extracts improve cognitive performance in senescence accelerated mice. Am J Chin Med. 2003; 31: 171-179.
13. Chan YC, Cheng FC, Wang MF. Beneficial effects of different Polygonum multiflorum Thunb. Extracts on memory and hippocampus morphology. J Nutr Sci Vita (Tokyo). 2002; 48: 491-497.
14. Chen K, Li C. Recent advances in studies on traditional Chinese anti-aging material medication. J Tradit Chin Med. 1993; 13: 223-226.
15. Chen WS, Liu WY, Yang GJ, Zhang WD, Chu ZY, Chen HS, Qiao CZ. Structural elucidation of a new tetrahydroxystilbene of Radix Polygoni Multiflori Preparata and study on its cardiovascular activity. Yao Xue Xue Bao. 2000; 35: 906-908.
16. Diez F. Guidelines for the diagnosis of osteoporosis by densitometric methods. J Manip Physiol Therap. 2002; 25: 403-415.
17. Dourador EB, de Falco V, Chahade WH, Cossermelli W, Yoshinari NH. Hormonal and biochemical parameters in postmenopausal osteoporosis. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo. 1997; 52: 60-62.
18. Ederveen AG, Kloosterboer HJ. Tibolone, a steroid with a tissue-specific hormonal profile, completely prevents ovariectomy-induced bone loss in sexually mature rats. J Bone Miner Res. 1999; 14: 1963-1970.
19. Edwards MW, Bain SD, Bailey MC, Lantry MM, Howard GA. 17 beta estradiol stimulation of endosteal bone formation in the ovariectomized mouse: an animal model for the evaluation of bone-targeted estrogens. Bone. 1992; 13: 29-34.
20. Fonseca D, Ward WE. Daidzein together with high calcium preserve bone mass and biomechanical strength at multiple sites in ovariectomized mice. Bone. 2004; 35: 489-497.
21. Fujioka M, Uehara M, Wu J, Adlercreutz H, Suzuki K, Kanazawa K, Takeda K, Yamada K, Ishimi Y. Equol, a

- metabolite of daidzein, inhibits bone loss in ovariectomized mice. *J Nutr.* 2004; 134: 2623-2627.
22. Gittens SA, Wohl GR, Zernicke RF, Matyas JR, Morley P, Uludag H. Systemic bone formation with weekly PTH administration in ovariectomized rats. *J Pharm Pharm Sci.* 2004; 7: 27-37.
 23. Gowen M, Emery JG, Kumar S. Emerging therapies for osteoporosis. *Emerg Drugs.* 2000; 5: 1-43.
 24. Horcajada-Molteni MN, Crespy V, Coxam V, Davicco MJ, Remesy C, Barlet JP. Rutin inhibits ovariectomy-induced osteopenia in rats. *J Bone Miner Res.* 2000; 15: 2251-2258.
 25. Joseph, M. L., Vincent, J. V.. Current concepts review osteoporosis. *J Bone Joint Sur.* 1983; 223-224.
 26. Ke HZ, Foley GL, Simmons HA, Shen V, Thompson DD. Long-term treatment of lasofoxifene preserves bone mass and bone strength and dose not adversely affect the uterus in ovariectomized rats. *Endocrinology.* 2004; 145: 1996-2005.
 27. Kim HJ, Lee WH, Yoon CH, Jeong JC, Nam KS, Kim HM, Choo YK, Lee MC, Kim CH. Bombycis corpus extract prevents amyloid-beta-induced cytotoxicity and protects superoxide dismutase activity in cultured rat astrocytes. *Pharm Res.* 2001; 43: 11-16.
 28. Kim MJ, Seo BI, Shin SS, Park JH. Effect of Polygoni Multiflori Radix and Cynanchi Wilfordii Radix On Prevention of Osteoporosis In Ovariectomized Rats. *Kor J Herbology.* 2004; 19: 23-34
 29. Ladizesky MG, Cutrera RA, Boggio V, Somoza J, Centrella JM, Mautalen C, Cardinali DP. Effect of melatonin on bone metabolism in ovariectomized rats. *Life Sci.* 2001; 70: 557-565.
 30. Lee JH, Yang KJ, Shin HD, Park BR, Son CW, Jang HJ, Park DC, Lee HS, Ku SK. Single subcutaneous dose toxicity of Polycan®, a β -Glucan originated from *Aureobasidium* in mice. *Lab Ani Res.* 2005; 21: 299-305.
 31. Li M, Du XP, Ye H. Protective effect of polygonum multiflorum thubn on the cerebral cholinergic neurofibers in rats Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2003; 28: 361-364.
 32. Li R, Gilliland FD, Baumgartner K, Samet J. Hormone replacement therapy and breast carcinoma risk in Hispanic and non-Hispanic women. *Cancer.* 2002; 95: 960-968.
 33. Lin JT, Lane JM. Nonmedical management of osteoporosis. *Curr Opi Rheumatol.* 2002; 14: 441-446.
 34. Murakami H, Nakamura T, Tsurukami H, Abe M, Barbier A, Suzuki K. Effects of tiludronate on bone mass, structure, and turnover at the epiphyseal, primary, and secondary spongiosa in the proximal tibia of growing rats after sciatic neurectomy. *J Bone Miner Res.* 1994; 9: 1355-1364.
 35. Pytlik M. Effects of tibolone on the development of osteopenia induced by ovariectomy in rats. *Poli J Pharmacol.* 2002; 54: 35-43.
 36. Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science.* 2000; 289: 1508-1514
 37. Ryu G, Ju JH, Park YJ, Ryu SY, Choi BW, Lee BH. The radical scavenging effects of stilbene glucosides from *Polygonum multiflorum*. *Arc of Pharm Res.* 2002; 25: 636-639.
 38. Sakai A, Nishida S, Okimoto N, Okazaki Y, Hirano T, Norimura T, Suda T, Nakamura T. Bone marrow cell development and trabecular bone dynamics after ovariectomy in ddy mice. *Bone.* 1998; 23: 443-451.
 39. Sandstedt J, Tornell J, Norjavaara E, Isaksson OG, Ohlsson C. Elevated levels of growth hormone increase bone mineral content in normal young mice, but not in ovariectomized mice. *Endocrinology.* 1996; 137: 3368-3374.
 40. Shim JG, Yeom SH, Kim HJ, Choi YW, Lee DI, Song KY, Kwon SH, Lee MW. Bone loss preventing effect of Sophorae Fructus on ovariectomized rats. *Arc Pharm Res.* 2005; 28: 106-110.
 41. Sun D, Krishnan A, Zaman K, Lawrence R, Bhattacharya A, Fernandes G. Dietary n-3 fatty acids decrease osteoclastogenesis and loss of bone mass in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res.* 2003; 18: 1206-1216.
 42. Syed Z, Khan A. Bone densitometry: applications and limitations. *J Obstet Gynaecol Can.* 2002; 24: 476-484.
 43. Tanaka S, Shimizu M, Debari K, Furuya R, Kawawa T, Sasaki T. Acute effects of ovariectomy on wound healing of alveolar bone after maxillary molar extraction in aged rats. *Anat Rec.* 2001; 262: 203-212.
 44. Tarvainen R, Arnala I, Olkkonen H, Lappalainen R, Nevalainen T, Alhava E. Clodronate prevents immobilization osteopenia in rats. *Acta Orthop Scand.* 1994; 65: 643-646.
 45. Wang W, Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. Effect of alcoholic extract of prepared radix Polygoni multiflori on preventing atherosclerosis in Japanese quail, 1984; 4: 748-750.
 46. Weinreb M, Patael H, Preisler O, Ben-Shemen S. Short-term healing kinetics of cortical and cancellous bone osteopenia induced by unloading during the reloading period in young rats. *Virchows Arch.* 1997; 431: 449-452.
 47. Xiao PG, Xing ST, Wang LW. Immunological aspects of Chinese medicinal plants as antiageing drugs. *J Ethnopharmacol.* 1993; 38: 167-175.
 48. Yamaguchi K, Yada M, Tsuji T, Kuramoto M, Uemura D. Suppressive effect of norzoanthamine hydrochloride on experimental osteoporosis in ovariectomized mice. *Biological Pharmaceutical Bulletin.* 1999; 22: 920-924.
 49. Yamamoto M, Fisher JE, Gentile M, Seedor JG, Leu CT, Rodan SB, Rodan GA. The integrin ligand echistatin prevents bone loss in ovariectomized mice and rats. *Endocrinology.* 1998; 139: 1411-1419.
 50. Yang PY, Almofti MR, Lu L, Kang H, Zhang J, Li TJ, Rui YC, Sun LN, Chen WS. Reduction of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits and decrease of expressions of intracellular adhesion molecule-1 and vascular endothelial growth factor in foam cells by a water-soluble fraction of *Polygonum multiflorum*. *J Pharmacol Sci.* 2005; 99: 294-300.
 51. Yim Tk, Wu WK, Mark DH, Ko KM. Myocardial protective effect of an anthraquinone-containing extract of *Polygonum multiflorum* ex vivo. *Planta Med.* 1998; 64: 607-611.
 52. Yin J, Tezuka Y, Kouda K, Le Tran Q, Miyahara T, Chen Y, Kadota S. In vivo antiosteoporotic activity of a fraction of *Dioscorea spongiosa* and its constituent, 22-O-methylproto-dioscin. *Planta Med.* 2004; 70: 220-226.