Journal of Korean Medicine Rehabilitation Vol. 26 No. 3, July 2016
pISSN 1229-1854 eISSN 2288-4114
http://dx.doi.org/10.18325/jkmr.2016.26.3.31

JKMR
Original Article

左歸丸이 산화적 손상, 염증 및 골절유합 관련 인자에 미치는 영향

이옥진 · 오민석
대전대학교 한의과대학 한방재활의학교실

Effects of *Joaguihwan* (JGH, 左歸丸) Extract on Changes of Anti-oxidation, Anti-inflammatory in RAW 264.7 Cells and on Factors Related with Bone Metabolism in Skull Fractured Rat

Yu Chen Li, K.M.D., Min-seok Oh, K.M.D.
Department of Oriental Rehabilitaion Medicine, College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University

Objectives The study was designed to evaluate the healing effects of *Joaguihwan* (JGH) extract on Anti-oxidation, Anti-inflammatory in RAW 264.7 Cells and factors related with bone metabolism in skull fractured Rat.

Methods The fracture healing effect of JGH was measured by scavenging activities of1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) and nitric oxide (NO) in RAW 264.7 cells. The inhibitory effect against the production of inflammatory mediators including interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necosis factors-α (TNF-α) expression was inhibited in RAW 264.7 cells was experimented using JGH. The effects of JGH on healing fractured rats was measured by osteocalcin, calcitonin, CTXII, TGF-β, BMP-2, Insulin, ALP in the serum. and was checked every 3 weeks from 0 week to 6week using x-ray.

Results 1. DPPH free radica and ABTS scavenging activity of JGH were increased according to concentration of JGH in RAW 264.7 Cells. 2. In the experiment, NO, IL-1 β, IL-6, TNF-α all showed decrease, in general. Especially NO and IL-1 β showed significantly decrease at a concentration of 10, 100 (μg/ml). 3. In the production of osteocalcin in the serum, JGH 200, 400 mg/kg experimental group showed significant increased effect at 2 weeks. 4. In the production of calcitonin in the serum. JGH 200 mg/kg experimental group showed significant increased effect at 4, 6 weeks. JGH 400 mg/kg experimental group showed significant increased effect at 2, 4, 6 weeks. 5. In the production of CTX, TGF-β, BMP-2 in the serum, experimental group showed increased effect. but no significant effect. 6. In the production of insulin in the serum. JGH 200, 400 mg/kg experimental group showed significant decrease effect at 2, 4, 6 weeks. 7. In the production of ALP in the serum. JGH 200 mg/kg experimental group showed significant increased effect at 2, 4, 6 weeks. JGH 400 mg/kg experimental group showed significant increased effect at 4, 6 weeks. 8. In the change of X-ray, the experimental group showed better healing effects on skull fractured rats than control group.

Conclusions From above results, JGH showed healing effect on Anti-oxidation, Anti-inflammatory in RAW 264.7 Cells, factors related with bone metabolism in the serum of skull fractured rat and x-ray, which is expected to be applied in clinics. **(J Korean Med Rehabil 2016;26(3):31-49)**

RECEIVED June 19, 2016
ACCEPTED July 7, 2016

CORRESPONDING TO
Min-Seok Oh, Department of Oriental Rehabilitaion Medicine, College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University, 1136, Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon 35235, Korea

TEL (042) 470-9424
FAX (042) 470-9005
E-mail ohmin@dju.ac.kr

Copyright © 2016 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

Key words Joaguihwan (JGH, 左歸丸), Skull Fracture, Bone Metabolism, RAW 264.7 cells

서론»»»»

현대사회는 교통사고와 각종 산업재해 그리고 여가시간과 소득수준의 향상으로 다양한 스포츠 레저 활동이 많아지면서, 이에 따른 각종 골절질환의 발생도 높아지고 있다[1].

골절이란 뼈의 연속성이 완전 혹은 불완전하게 소실되거나 선상의 변형을 일으킨 상태를 말하며, 대부분 피부, 피하조직, 근막, 근골막, 혈관 및 신경 등의 손상을 동반한다[2].

골절에 대한 치료는 크게 정복, 정복상태의 고정, 기능회복을 위한 물리치료를 원칙으로 삼고 있다[3]. 골절의 치유과정은 염증기, 복원기, 재형성기의 세 과정이 연속적으로 중복되면서 진행된다[3]. 이에 골 유합이 일어날 때까지 호르몬과 영양상태, 골절의 형태, 골절 부위의 혈액공급, 치료 방법 등의 요소들이 골절유합의 영향을 미친다[4,5]. 약물치료는 성장호르몬, 갑상선호르몬, calcitonin, insulin, anabolic steroid, 적당량의 비타민 A와 D 등을 선택적으로 사용하고 있으나, 보다 안전하고 효과적인 골절치유를 촉진시키는 치료제 개발이 필요한 실정이다[6].

한의학 古書에서 골절에 대한 치료약물로는 ≪太平惠民和劑局方≫[7]의 "接骨續筋止痛活血法"과 ≪聖濟總錄≫[8]의 "接骨各有方劑存言 當按症施治"와 같은 약물요법의 활용을 설명하고 있으며, 초기에는 化瘀活血, 중기에는 接骨續筋, 후기에는 補氣養血, 健壯筋骨의 치법을 활용한다[3].

한약을 이용한 골절 치료에 실험적 연구로는 人蔘[9], 紅花[10,11], 自然銅[12,13], 加味身痛逐瘀湯[14], 加味芎歸湯 및 加味芎歸湯加鹿茸[15], 順氣活血湯[16], 當歸鬚散과 中性瘀血藥鍼[17], 復元活血湯[18], 六味地黃湯[19-21], 六味地黃湯과 鹿茸藥鍼[22,23]등이 있다. 하지만 골절 초기에 사용하는 化瘀活血에 대한 연구가 많고 후기에 사용하는 補氣養血, 健壯筋骨에 대한 연구는 부족하며, 실험부위가 경골 골절에 대한 연구는 많으나 다른 부위의 대한 연구는 부족한 실정이다.

左歸丸은 明代 張景岳의 ≪景岳全書 · 新方八陣 · 補陣≫[24]에 기재된 處方으로 熟地黃, 山藥, 山茱萸, 枸杞子, 菟絲子, 鹿角膠, 龜板, 牛膝로 구성되어 있으며, "治眞陰腎水不足, 不能滋養榮衛, 腰酸脚軟, 內精髓內虧, 津液枯涸等證, 俱速宜壯水之主, 以培左腎之元陰, 而精血自總矣, 宜此方主之"이라 하여 補肝腎, 補氣養血, 健壯筋骨의 효능이 있어, 골절유합의 촉진에도 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

이에, 저자는 左歸丸이 두개골 골절유합의 미치는 영향을 알아보고자 RAW 264.7 세포에서 항산화 및 항염증 효능을 측정하였다. 또한, 두개골 골절 유발한 흰쥐를 이용하여 혈청 및 방사선 검사 등을 실시한 결과, 골절유합의 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

대상 및 방법»»»»

1. 재료

1) 세포

실험에 사용된 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(서울, 한국)에서 구입하였다.

2) 약재

실험에 사용한 左歸丸(*Joaguihwan* 이하, JGH로 표기)의 구성 약재들은 ㈜옴니허브(대구, 한국)에서 구입하였으며, 대전대학교 TBRC-RIC에서 정선 후 사용하였다. 그 내용과 용량(1첩)은 다음과 같다(Table I).

3) 동물 및 사료

실험동물인 수컷 11주령의 SD Rat (310～360 g)는 ㈜라온바이오(경기도, 한국)에서 공급 사용하였다. 사료는 고형사료 ㈜퓨리나(서울, 한국)를 사용하였다. 사료와 물을 실험 당일까지 충분히 공급하고 습도 55±15%, 온도는 22±2°C, 12시간-12시간(light-dark cycle)의 환경에서 실험을 2주간 적응시킨 후에 하였다. 본 실험은 대전대학교 동물실험윤리 위원회의 승인(동물사용 윤리위원회 승인번호-DJUARB 2015-024)을 받아 시행하였다.

Table I. The Prescription of *Joaguihwan* (JGH)

Herbal medicine name	Pharmacognostic name	amount (g)
熟地黃	*Rehmanniae Radix Prpearata*	8
山 藥	*Dioscoreae Rhizoma*	4
山茱萸	*Corni Fructus*	4
枸杞子	*Lycii Fructus*	4
菟絲子	*Cuscutae Semen*	4
鹿角膠	*Cervi Cornus Colla*	4
龜版膠	*Testudinis Plastrum*	4
牛 膝	*Achyranthis Radix*	3
Total amount		35

4) 시약

사용된 시약은 isopropanol (Sigma Co., U.S.A.), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS:Welgene, Korea), ether (Sigma Co., U.S.A.), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM: Gibco BRL Co., U.S.A.), 우태아혈청(fetal bovine serum: FBS, Invitrogen Co., U.S.A.), lipopolysaccharide (LPS: Sigma Co., U.S.A.), cell viability assay kit (Daeillab sevice, Korea), nitric oxide detection kit (Intron Biotechnology, Korea), dimethyl sulfoxide (DMSO: Sigma Co., U.S.A.), 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH:Sigma Co., U.S.A.), streptomycin (Hyclone Co., U.S.A.), 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS: Sigma Co., U.S.A.), penicillin (Hyclone, Co., U.S.A.), formaldehyde (Sigma Co., U.S.A.), trypan blue (Sigma Co., U.S.A.), TGF-β1 ELISA Kit (R&D system, U.S.A.), PGE2 ELASA Kit (R&D system, U.S.A.), mouse magnetic luminex screening assay (R&D system, U.S.A.), BMP-2 ELISA Kit (R&D system, U.S.A.), rat cross-linked c-terminal telopeptides of type II Collagen ELISA Kit (CTXII: MyBioSource, U.S.A.), rat calcitonin ELISA Kit (MyBioSource, U.S.A.), rat insulin ELISA kit (Biovender., CZECH), alkaline phosphatase assay kit (Abcam., UK), rat-MID^{TM} osteocalcin ELISA kit (IDS Co., UK), HNO_3 (Duksan, Korea), As, Pb, Hg, Cd standard solution (SCP Science, Canada), water (Duksan, Korea), acetonitrile (Duksan, Korea) 등을 사용하였다.

5) 기기

사용된 기기는 rotary vacuum evaporator (Büchi B-480 Co., Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co., Japan), CO_2 incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo Co., Japan), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), centrifuge (Sigma Co., U.S.A.), deep-freezer (Sanyo Co., Japan), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), plate shaker (Lab-Line Co., U.S.A.), ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A.), ICP (Shimadzu, Co., Japan), 수은분석기(TELEDYNE Leeman Labs, U.S.A.), 환류 추출기(Mtops, Korea), 동결 건조기 (IlShinBioBase, Korea), Portable X-ray- InAlyzer (GE healthcare Co., UK) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

JGH 2첩(70 g)을 3시간 동안 distilled water (DW) 1,000 ml을 넣고 환류추출 후 여과액을 얻어 감압 농축을 rotary vacuum evaporator에서 하였다. 분말 5.0 g (수득율 7.1%)은 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 얻었다. 얻어진 분말은 실험에 따라 필요한 농도로 증류수의 희석하여 사용하였으며 초저온 냉동고(−80°C)에서 보관하였다.

2) 중금속 검사

납, 비소, 카드뮴 분석의 경우 JGH 추출물 0.5 g을 극초단파 시료전처리장치 전용용기에 넣고 질산 10 ml을 넣은 후, 용기를 후드 안에 정치시켜 발생 가스를 제거하고 극초단파 시료전처리장치를 사용하여 분해하였다. 분해가 끝나고 나서 분해액을 여과지로 여과하여 용량플라스크에 넣고 물을 넣어 적절하게 표준액의 농도범위로 희석하여 검액으로 하였다. 공시험액은 따로 질산 10 ml를 극초단파 시료전처리장치 전용용기에 넣어 검액 조제와 같은 방법으로 조작하여 사용하였다. 검액 측정은 준비된 검액, 표준액 및 공시험액을 가지고 유도결합플라즈마분광계(inductively coupled plasma, ICP)를 이용하여 검량선을 작성하고 공시험액으로 보정하여 측정하였다. 수은분석의 경우 수은분석기를 이용하여 JGH 추출물 50 mg을 정확하게 달아 특별한 전처리 과정 없이 측정하였다.

3) 간 및 신장 기능 검사

혈청 내에서 AST (aspartate aminotransferase), ALP (alanine aminotransferase), Cr (Creatinine), BUN (blood urea nitrogen)활성도를 측정하기 위해 실험 종료 후 심장 천자법을 이용하여 혈액을 채취하였다. 상온에서 혈액을 30분간 굳힌 뒤 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 혈청을 분리하여, 대전대학교 한방 Bio Fab lab (대전, 한국)에 분석 의뢰 하여 생화학 자동분석기로 측정하였다.

4) 세포독성 측정

RAW 264.7 세포는 96 well plate에 1.5×10^5 cells/well로 분주하여 배양을 24시간 동안 하였다. 배양액은 실험을 하기 전에 새롭게 교체하였고, JGH를 각각 1, 10, 100 (μg/ml)의 농도로 처리하여 다시 배양을 24시간 동안 하였다. 배양 후 10 μl의 WST solution을 첨가하여 30분간 세포배양기(37°C, 5% CO_2)에서 반응시켰다. 반응 후 흡광도의 변화를 450 nm에서 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시 하였다.

5) RAW 264.7 cell 배양

동결된 RAW 264.7 세포를 50 ml 튜브에 옮기고 D-PBS 9 ml을 넣어 세포를 부유시킨 뒤 1,200 rpm에서 5분간 원심분리하여 상청액을 제거하였다. 세포가 있는 튜브에 10% FBS와 1% penicillin으로 조성된 DMEM 배지 1 ml을 넣어 부유시켰다. 배양을 100 mm dish에 9 ml의 배지를 넣고, 세포를 부유시켜 세포배양기(37°C, 5% CO_2)에서 배양하였다. 계대배양 횟수는 5회 이상으로 하였고, 시료들을 처리하기 전에 적응을 24시간 시켰다.

6) 두개골 골절 유발 및 시료 처리

11주령의 SD 흰쥐를 2주간 안정기를 거친 뒤 13주령이 된 흰 쥐에 마취제(케타민 0.5 ml＋럼푼 0.1 ml)로 마취하여 두개골 주변을 깨끗이 제모한 후, 수술대에 고정시켰다. 고정된 흰쥐의 두개골 두피 부위를 매스를 이용하여 절개하고 trephine bur를 이용하여 두개골에 직경 8 mm의 골절을 유발 후 봉합을 실시하였다. 실험은 정상군과 증류수를 투여하는 대조군 및 200 mg/kg의 농도로 JGH를 투여하는 실험군과 400 (mg/kg)의 농도로 JGH를 투여하는 실험군 등 그룹당 3마리씩 총 4개의 그룹으로 나누어 매일 1회, 오후 2시에 식약처 동물실험 가이드라인[25]에 따라 흰쥐 기준 100 g 당 최대 경구투여 용량인 1 ml을 넘지 않는 안전한 범위인 2 ml씩 경구 투여하였다. 실험이 진행되는 동안 자유 식이를 하였으며, JGH 투여량은 1회 분량을 성인 체중 60 kg에 1회 섭취량으로 하며, 1회 섭취량으로부터 얻은 시료를 흰쥐 체중 310 g으로 기준하여 산출하였다. 두개골 골절이 유발된 시점을 0주차로 기준을 두고 총 6주간의 경구 투여를 실시하였다.

7) 혈청 분리

실험 0, 2, 4주차의 혈액은 ethyl ether로 마취한 후 꼬리 채혈을 통해 혈액을 채취하였으며, 6주차의 혈액은 실험 종료 후 ethyl ether로 마취한 상태에서 채혈을 심장천자법을 이용한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리한 후, 측정 하였다.

8) In vitro

(1) 항산화 효능 측정

① DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical 소거능 측정

JGH 추출물은 최종 농도가 1, 10, 100, 1,000 (μg/ml)의 농도로 될 수 있게 희석시켰다. 에탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 150 μl와 JGH 추출물을 각각 100 μl씩 혼합하여 30분간 37°C에서 반응 시켰다. 반응 후 흡광도 측정을 517 nm에서 하였다. 시료액의 대조군은 증류수를 넣었고, DPPH 용액의 대조군으로써는 에탄올을 넣어 보정 값을 얻었다. DPPH 자유라디칼 소거율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{소거율}(\%)=\left(\frac{\text{대조군의 흡광도}-\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}\right)\times100$$

② ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radical 소거능 측정

ABTS assay 방법[26]은 기존에 보고된 방법을 96 well plate에 맞게 수정하여 실시하였다. JGH 추출물은 최종 농도가 1, 10, 100, 1,000 (μg/ml)의 농도로 될 수 있게 희석시켰다. ABTS 용액은 7.4 mM ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)와 2.6 mM potassium persulphate를 제조한 후, 암소에 하루 동안 방치하여 양이온(ABTS·＋)을 형성시킨 다음 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 값이 1.5 이하가 나오도록 희석하고, 희석된 ABTS·＋ 용액 150 μl와 JGH 추출물을 각각 5 μl 혼합하고, 10분간 실온에서 반응시킨 후, 흡광도를 측정을 734 nm에서 하였다. 항산화능은 증류수를 대조군으로 하고 대조군에 대한 ABTS 라디칼 소거능을 백분율로 나타내었다.

$$\text{소거율}(\%)=\left(1-\frac{\text{(시료 첨가군의 흡광도)}}{\text{대조군의 흡광도}}\right)\times100$$

(2) 항염증 효능 측정

① NO (Nitric oxide) 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitric oxide 농도를 griess reagent system을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 1.5×10^5 cells/well로 분주하여 배양을 24시간 동안 하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였고 JGH 추출물을 각각 1, 10, 100 (μg/ml)의 농도와 LPS 1 μg/ml의 농도를 처리하여 다시 배양을 24시간 동안 하였다. N1 buffer 50 μl를 각 well에 처리하여 상온에서 10분간 반응 한 후, N2 buffer 50 μl를 각 well에 처리하고 10분간 반응시켰다. 흡광도를 측정을 반응 후 540 nm에서 하였다. 배양액의 NO 농도 결정을 Nitrite standard의 농도별 표준곡선을 이용하여 하였다.

② Cytokine 생성량 측정

세포 내에서 염증성 사이토카인을 12 well plate에 RAW 264.7 세포를 2×105 cells/well이 되게 분주하여 배양을 24시간 동안한 후 새로운 배양액으로 교체하였다. JGH 추출물을 1, 10, 100 (μg/ml)의 농도로 처리하고, LPS 1 μg/ml의 농도로 처리하여 다시 배양을 24시간 동안 세포배양기(37°C, 5% CO_2)에서 하였다. 원심분리 후 상청액으로 IL-1β, IL-6, TNF-α는 Luminex를 이용하여 측정하였다.

9) In vivo

(1) 혈청내 Osteocalcin 측정

Osteocalcin ELISA kit를 이용하여 각 well에 biotinylated osteocalcin을 100 μl씩 분주하여 30분 동안 plate mixing시켜 코팅을 진행하였다. 코팅된 plate를 washing 완충 용액을 이용하여 세척하고 primary antibody와 primary incubation buffer, standard, control, 혈청을 넣은 후 1시간 동안 plate mixing 작업을 진행하였다. 그 후, 다시 washing 완충 용액을 이용하여 세척한 뒤 secondary antibody를 각 well에 100 μl씩 넣은 뒤 15분간 plate mixing하고 stopping solution 100 μl를 넣은 후 흡광도 측정을 ELISA reader 450 nm에서 하였다.

(2) 혈청 내 Calcitonin 및 CTXII (Concentration of C-telopeptide fragments of type II collagen) 측정

Calcitonin과 CTXII ELISA kit를 이용하여 각 well에 standard와 control, 혈청 50 μl씩 분주하고 HRP-conjugate 100 μl를 가하여 혼합한 후 1시간 동안 37°C 인큐베이터에 넣어 반응시켰다. 반응 후 washing 완충 용액을 이용하여 세척하고 chromogen solution 용액을 100 μl씩 넣은 뒤 다시 37°C 인큐베이터에서 15분간 반응을 시켰다. 마지막으로 stop solution을 50 μl 넣고 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) 혈청 내 TGF-β 및 BMP-2 측정

TGF-β와 BMP-2 ELISA kit을 이용하며, 우선, TGF-β 측정을 위해 혈청 40 μl에 1 N HCl 용액을 가하여 10분간 37°C 인큐베이터에서 반응시킨 후 10 μl 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES를 혼합하여 샘플을 만들었다. 그 후 각 well에 TGF-β 측정 시에는 assay diluent를 50 μl를 넣었으며, BMP-2 측정 시에는 100 μl를 넣은 뒤 standard, control, 혈청을 50 μl 씩 넣고 2시간동안 TGF-β 측정 plate는 37°C 인큐베이터에, BMP-2 측정 plate는 plate mixing을 시켰다. 그 후 washing 완충 용액을 이용하여 세척하고 100 μl의 TGF-β conjugate와 200 μl의 BMP-2 conjugate를 넣은 뒤 다시 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후 다시 washing 완충 용액을 이용하여 세척하고 substrate solution을 각각 100 μl와 200 μl를 넣은 뒤 30분 동안 반응시키고 stop solution을 100 μl과 50 μl을 취하여 흡광도 측정을 ELISA reader 450 nm에서 하였다.

(4) 혈청 내 Insulin 측정

rat insulin ELISA kit를 이용하며 코팅 된 insulin plate에 washing 완충 용액을 이용하여 세척하고 100 μl의 biotin conjugate와 10 μl의 standard, 혈청을 넣은 뒤 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후 다시 washing 완충 용액을 이용하여 세척하고 100 μl의 HRP conjugate를 넣은 뒤 30분 동안 반응시키고 세척작업 후 100 μl의 substrate chromogen reagent를 넣은 후 30분 동안 반응시켰다. 측정 전 reaction stopper를 100 μl를 취한 뒤 ELISA reader 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(5) 혈청 내 ALP 측정

Alkaline phosphatase assay kit을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. Well plate에 standard와 control, 혈청을 넣은 후 샘플 및 control well에는 5 mM *p*NPP solution 50 μl를, ALP enzyme solution 10 μl는 standard well에 추가한 후 1시간 동안 반응을 시켰다. 반응 후 20 μl의 stop solution을 취한 뒤 ELISA reader 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

10) 방사선 검사

방사선 검사는 (주)라온바이오(경기도, 한국)에 의뢰하여 실험 0, 3, 6주차에 X-ray 촬영을 실시하였다. 튜브의 전압은 60 kVp로 0.8～1.2 mAs의 조건으로 5 cm의 거리에서 촬영을 실시하였다.

3. 통계처리

실험 결과는 SPSS 11.0의 unpaired student's t-test 및 ANOVA를 사용하여 통계처리 하였으며 $p<.05$, $p<.01$ 및 $p<.001$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

Table II. Content of Plomb (Pb), Arsenic (As), Cadmium (Cd) and Hydrargyre (Hg) in JGH[1)]

	Pb	As	Cd	Hg
Rermissive Concentration (mg/kg)	5	3	0.3	0.2
JGH	ND[2)]	ND[2)]	0.001	ND[2)]

[1)]JGH: Joaguihwan, [2)]N.D. : Not detected.

결과»»»»

1. 중금속 함량

JGH 추출물의 중금속 함량을 측정한 결과, 카드뮴의 경우 기준치 이하로 검출되었으며 납, 비소, 수은은 검출되지 않았다(Table II).

1) JGH: Joaguihwan
2) N.D.: Not detected.

2. 간 기능에 미치는 영향

1) AST (Aspartate aminotransferase) 함량

간 기능 측정의 지표 성분인 AST를 측정한 결과, 정상군은 147.8±21.5 U/L, 대조군은 104.8±9.1 U/L, JGH 200 mg/kg 투여군은 143.3±31.4 U/L, JGH 400 mg/kg 투여군은 150.2±25.7 U/L로 나타났다(Fig. 1).

2) ALT (Alanine aminotransferase) 함량

간 기능 측정의 지표 성분인 ALT를 측정한 결과, 정상군은 48.2±3.7 U/L, 대조군은 47.3±11.0 U/L, JGH 200 mg/kg 투여군은 48.7±7.2 U/L, JGH 400 mg/kg 투여군은 51.7±5.7 U/L로 나타났다(Fig. 2).

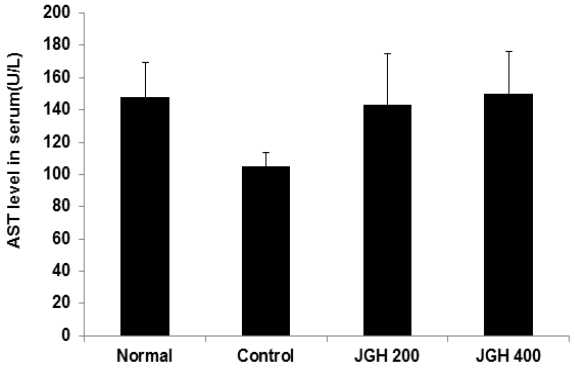

Fig. 1. Effect of *Joaguihwan* (JGH) extract on the AST (aspartate aminotransferase) of serum in Skull Fracture Rat. Skull fracture model followed by the administration of JGH for 6 weeks.
The result were presented by the mean±S.D. (n=3).
Normal: Non treated Rat, Control: The skull fracture rats were treated orally with DW, JGH 200: The skull fracture rats were treated orally with JGH 200 mg/kg/day, JGH 400: The skull fracture rats were treated orally with JGH 400 mg/kg/day.

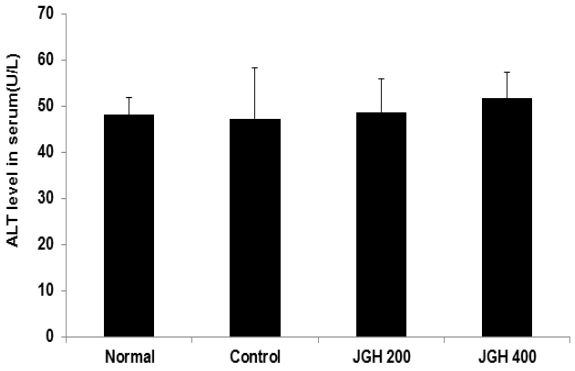

Fig. 2. Effect of *Joaguihwan* (JGH) extract on the ALT (alanine aminotransferase) of serum in Skull Fracture Rat. Skull fracture model followed by the administration of JGH for 6 weeks.
The result were presented by the mean±S.D. (n=3).
Normal: Non treated Rat, Control: The skull fracture rats were treated orally with DW, JGH 200: The skull fracture rats were treated orally with JGH 200 mg/kg/day, JGH 400: The skull fracture rats were treated orally with JGH 400 mg/kg/day.

3. 신 기능에 미치는 영향

1) Creatinine 함량

신 기능 측정의 지표 성분인 creatinine을 측정한 결과, 정상군은 0.5±0.1 mg/dl, 대조군은 0.5±0.1 mg/dl, JGH 200 mg/kg 투여군은 0.5±0.1 mg/dl, JGH 400 mg/kg 투여군은 0.5±0.1 mg/dl로 나타났다(Fig. 3).

2) BUN (Blood urea nitrogen) 함량

신 기능 측정의 지표 성분인 BUN을 측정한 결과, 정상군은 22.2±1.7 mg/dl, 대조군은 18.4±2.0 mg/dl, JGH 200 mg/kg 투여군은 20.8±1.1 mg/dl, JGH 400 mg/kg 투여군은 21.0±0.7 mg/dl로 나타났다(Fig. 4).

4. RAW 264.7 세포에 대한 세포독성이 미치는 영향

RAW 264.7 세포에서 세포 독성을 측정한 결과, 대조군을 100.0±4.8%로 나타냈을 때 JGH 추출물의 1, 10, 100 (μg/ml) 농도에서 102.6±4.4%, 101.8±0.5%, 98.6±1.7%의 세포 생존율 나타냈다(Fig. 5).

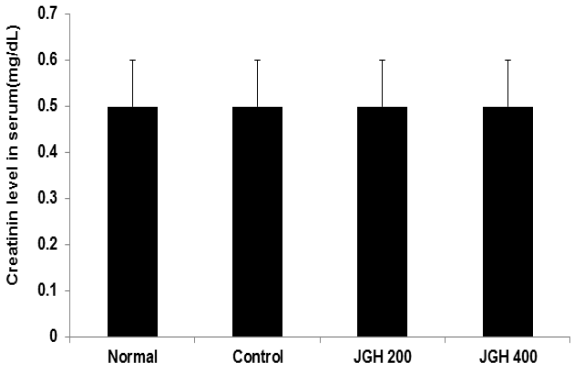

Fig. 3. Effect of *Joaguihwan* (JGH) extract on the Creatinine of serum in Skull Fracture Rat. Skull fracture model followed by the administration of JGH for 6 weeks.
The result were presented by the mean±S.D. (n=3).
Normal: Non treated Rat, Control: The skull fracture rats were treated orally with DW, JGH 200: The skull fracture rats were treated orally with JGH 200 mg/kg/day, JGH 400: The skull fracture rats were treated orally with JGH 400 mg/kg/day.

5. In vitro

1) 항산화 효능에 미치는 영향

(1) DPPH radical 소거능

JGH 추출물의 DPPH 소거율을 측정한 결과, 1 μg/ml 농도에서 2.2±0.4%, 10 μg/ml 농도에서 2.8±0.8%, 100 μg/ml 농도에서 5.3±0.4%, 1,000 μg/ml 농도에서 23.0±1.3%로 나타나 농도 의존적으로 radical 소거능이

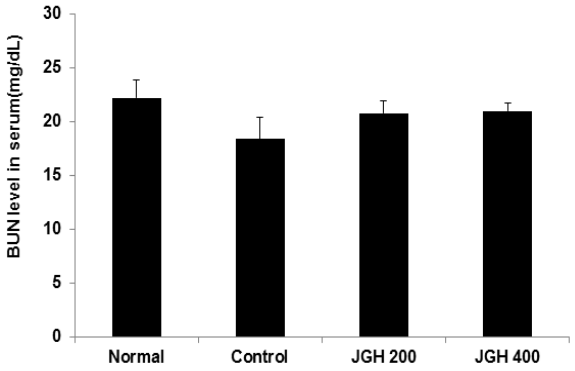

Fig. 4. Effect of *Joaguihwan* (JGH) extract on the BUN (blood urea nitrogen) of serum in Skull Fracture Rat. Skull fracture model followed by the administration of JGH for 6 weeks.
The result were presented by the mean±S.D. (n=3).
Normal: Non treated Rat, Control: The skull fracture rats were treated orally with DW, JGH 200: The skull fracture rats were treated orally with JGH 200 mg/kg/day, JGH 400: The skull fracture rats were treated orally with JGH 400 mg/kg/day.

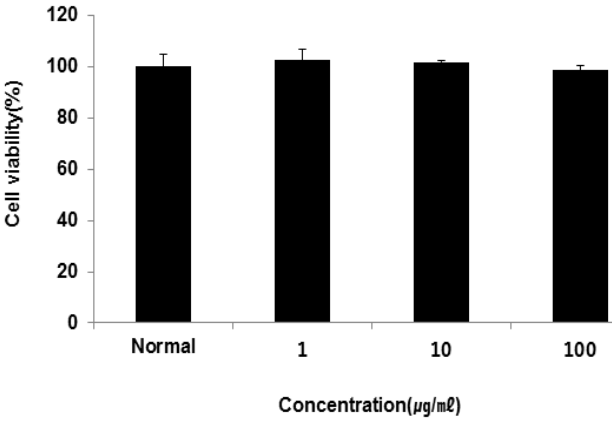

Fig. 5. Cell viability of *Joaguihwan* (JGH) extract in RAW 264.7 cells. Each cell was treated with 1, 10 and 100 (μg/ml) of JGH extract for 24 hours. Cytotoxicity was measured using an MTT assay.
The results were expressed as mean±S.D. from three independent experiments.

증가함을 보였다(Fig. 6).

(2) ABTS radical 소거능

JGH 추출물의 ABTS 소거율을 측정한 결과, 1 μg/ml 농도에서 0.3±1.3%, 10 μg/ml 농도에서 2.0±0.7%, 100 μg/ml 농도에서 7.1±1.3%, 1,000 μg/ml 농도에서 16.7±3.3%로 나타나 농도 의존적으로 라디컬 소거능이 증가함을 보였다(Fig. 7).

6. 항염증 효능에 미치는 영향

1) NO (nitric oxide) 생성량

RAW 264.7 세포에서 JGH 추출물의 NO 생성량을 측정한 결과, 대조군을 100.0±9.8%로 나타냈을 때 정상군은 40.2±4.3%, JGH 추출물은 1 μg/ml 농도에서 91.0±6.8%, 10 μg/ml 농도에서 75.4±5.1%, 100 μg/ml 농도에서 61.2±6.5%로 나타나, 대조군에 비하여 10, 100 (μg/ml)의 농도에서 유의성 있는(***p<.001, **p<.01) 감소를 나타내었다(Fig. 8).

2) Cytokine에 미치는 영향

(1) IL-1β (interleukin-1β)생성량

RAW 264.7 세포에서 JGH 추출물의 IL-1β 생성량을 측정한 결과, 대조군이 48.0±6.2 pg/ml, 정상군이 12.6±1.0 pg/ml, JGH 추출물은 1 μg/ml 농도에서 43.2±9.8 pg/ml, 10 μg/ml 농도에서 25.1±4.2 pg/ml, 100 μg/ml 농도에서 30.8±6.7 pg/ml로 나타나, 대조군에 비하여 10, 100 (μg/ml)의 농도에서 유의성 있는 (*p<.05) 감소를 나타내었다(Fig. 9).

(2) IL-6 (interleukin-6) 생성량

RAW 264.7 세포에서 JGH 추출물의 IL-6 생성량을 측정한 결과, 대조군이 1269.3±8.9 pg/ml, 정상군이 200.6±71.3 pg/ml, JGH 추출물은 1 μg/ml 농도에서 1,152.3±

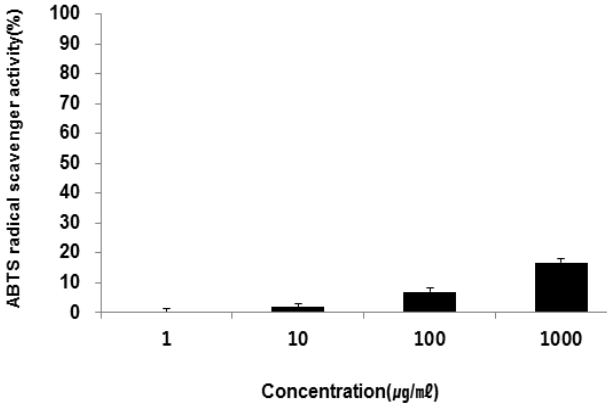

Fig. 7. ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical scavenging activity of *Joaguihwan* (JGH) extract at various concentration. Extract was incubated with ABTS solution at 37°C for 10 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 732 nm.
The results were expressed as mean±S.D. from three independent experiments.

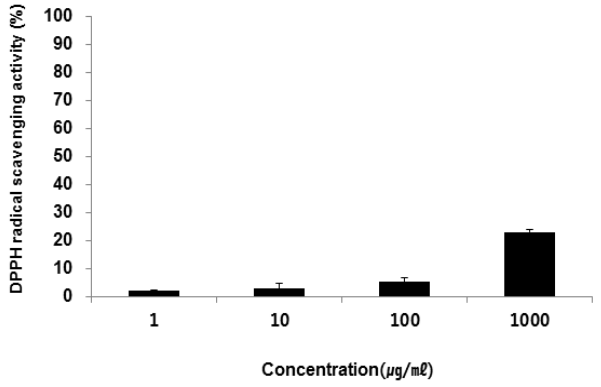

Fig. 6. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging activity of *Joaguihwan* (JGH) extract at various concentration. Extract was incubated with DPPH solution at 37°C for 30 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 517 nm.
The results were expressed as mean±S.D. from three independent experiments.

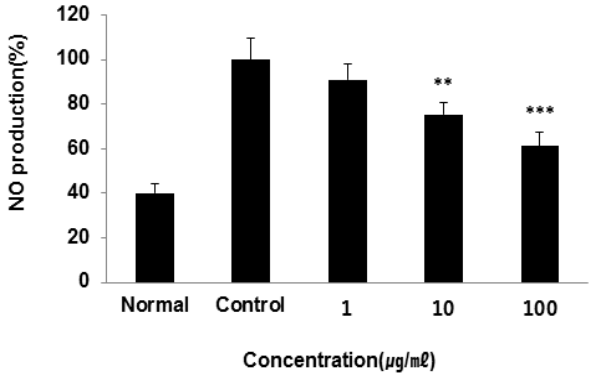

Fig. 8. Effect of *Joaguihwan* (JGH) extract on LPS-induced NO(nitric oxide) production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cell was treated with 1, 10 and 100 (μg/ml) of JGH extract and LPS (1 μg/ml) for 24 hr. The amount of nitric oxide in supernatant was measured using Griess reagent.
The results were expressed as mean±S.D. from three independent experiments (***p<.001, **p<.01).

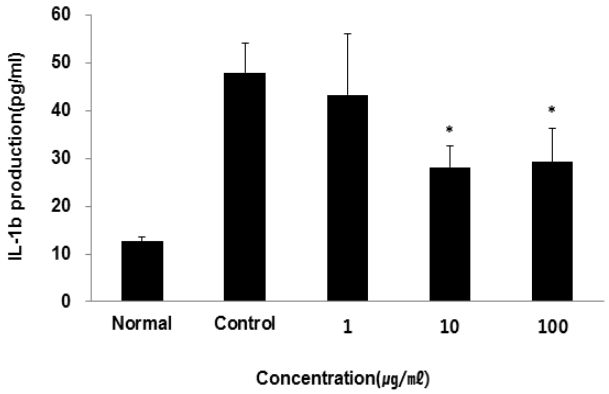

Fig. 9. Effect of JGH extract on LPS-induced IL-1β (Interleukin-1β) production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 1, 10 and 100 (μg/ml) of JGH extract in the presence of LPS (1 μg/ml) for 24 hr.
The results were expressed as mean±S.D. from three independent experiments (*p<.05).

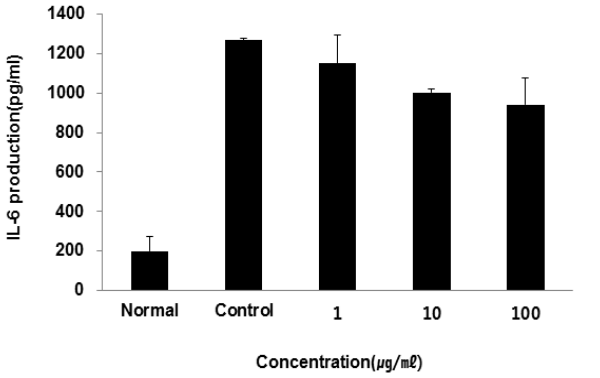

Fig. 10. Effect of *Joaguihwan* (JGH) extract on LPS-induced IL-6 (interleukin-6) production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 1, 10 and 100 (μg/ml) of JGH extract in the presence of LPS (1 μg/ml) for 24 hr.
The results were expressed as mean±S.D. from three independent experiments.

143.5 pg/ml, 10 μg/ml 농도에서 1,002.5±17.7 pg/ml, 100 μg/ml 농도에서 942.6±136.8 pg/ml로 나타나 감소는 하였으나 유의성은 없었다(Fig. 10).

(3) TNF-α (tumor necrosis factor-α) 생성량

RAW 264.7 세포에서 JGH 추출물의 TNF-α 생성량을 측정한 결과, 대조군은 6,451.3±557.6 pg/ml, 정상군은 573.0±52.3 pg/ml, JGH 추출물은 1 μg/ml 농도에서 6,130.4±765.3 pg/ml, 10 μg/ml 농도에서 6,032.5±178.2 pg/ml, 100 μg/ml 농도에서 6,048.5±80.6 pg/ml로 나타나 감소는 하였으나 유의성은 없었다(Fig. 11).

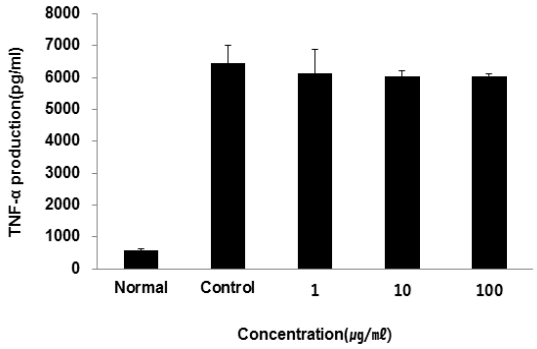

Fig. 11. Effect of *Joaguihwan* (JGH) extract on LPS-induced TNF-α production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with 1, 10 and 100 (μg/ml) of JGH extract in the presence of LPS (1 μg/ml) for 24 hr.
The results were expressed as mean±S.D. from three independent experiments.

7. In vivo

1) Osteocalcin 생성량

JGH 투여가 osteocalcin 생성량에 미치는 영향을 확인하고자 두개골 골절을 유발한 0주차부터 6주차까지 2주 간격으로 혈청을 채취하여 측정한 결과, 정상군은 0주차에서 316.1±50.5 ng/ml, 2주차에서 588.9±33.6 ng/ml, 4주차에서 410.4±42.9 ng/ml, 6주차에서 195.7±41.1 ng/ml의 결과가 나타났으며, 대조군은 0주차에서 211.9±85.7 ng/ml, 2주차에서 240.7±1.5 ng/ml, 4주차에서 252.3±86.2 ng/ml, 6주차에서 152.1±35.4 ng/ml의 결과를 나타내었다. JGH 200 mg/kg 투여군은 0주차에서 273.3±69.0 ng/ml, 2주차에서 330.4±56.9 ng/ml, 4주차에서 242.1±118.7 ng/ml, 6주차에서 201.9±35.0 ng/ml의 결과가 나타났으며, JGH 400 mg/kg 투여군은 0주차에서 288.3±34.4 ng/ml, 2주차에서 354.3±5.7 ng/ml, 4주차에서 203.1±46.4 ng/ml, 6주차에서 192.6±13.6 ng/ml의 결과를 나타내어 2주차에서 JGH 200, 400 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는(**p<.01) 증가를 나타내었다(Fig. 12).

2) Calcitonin 생성량

JGH 투여가 calcitonin 생성량에 미치는 영향을 확인하고자 두개골 골절을 유발한 0주차부터 6주차까지 2주 간격으로 혈청을 채취하여 측정한 결과, 정상군은 0주차에

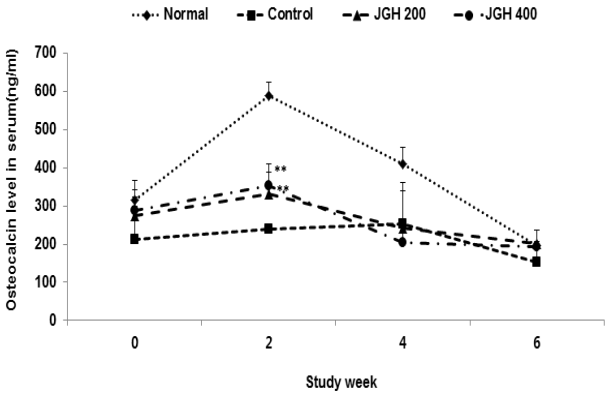

Fig. 12. Effect of *Joaguihwan* (JGH) on the level of osteocalcin in the serum of Skull Fracture Rat.
The results were represent the mean±S.D. (**p<.01) (n=3).
Normal: Non treated Rat, Control: The skull fracture rats were treated orally with DW, JGH 200: The skull fracture rats were treated orally with JGH 200 mg/kg/day, JGH 400: The skull fracture rats were treated orally with JGH 400 mg/kg/day.

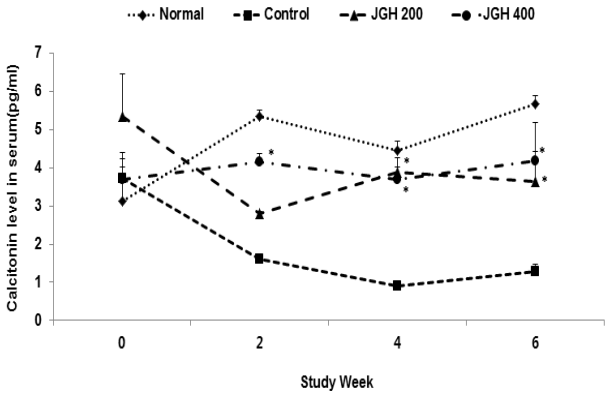

Fig. 13. Effect of *Joaguihwan* (JGH) on the level of calcitonin in the serum of Skull Fracture Rat.
The results were represent the mean±S.D. (*p<.05) (n=3).
Normal: Non treated Rat, Control: The skull fracture rats were treated orally with DW, JGH 200: The skull fracture rats were treated orally with JGH 200 mg/kg/day, JGH 400: The skull fracture rats were treated orally with JGH 400 mg/kg/day.

서 3.1±0.9 pg/ml, 2주차에서 5.4±0.2 pg/ml, 4주차에서 4.4±0.2 pg/ml, 6주차에서 5.7±0.2 pg/ml의 결과가 나타났으며, 대조군은 0주차에서 3.7±0.5 pg/ml, 2주차에서 1.6±0.1 pg/ml, 4주차에서 0.9±0.1 pg/ml, 6주차에서 1.3±0.2 pg/ml의 결과를 나타내었다. JGH 200 mg/kg 투여군은 0주차에서 5.3±1.1 pg/ml, 2주차에서 2.8±0.1 pg/ml, 4주차에서 3.9±0.4 pg/ml, 6주차에서 3.6±0.8 pg/ml의 결과가 나타났으며, JGH 400 mg/kg 투여군은 0주차에서 3.7±0.7 pg/ml, 2주차에서 4.1±0.2 pg/ml, 4주차에서 3.7±0.3 pg/ml, 6주차에서 4.2±1.0 pg/ml의 결과를 나타내어 JGH 200 mg/kg 투여군은 4, 6주차에서, JGH 400 mg/kg 투여군은 2, 4, 6주차에서 대조군에 비하여 유의성 있는(*p<.05) 증가를 나타내었다(Fig. 13).

3) CTXII 생성량

JGH 투여가 CTXII 생성량에 미치는 영향을 확인하고자 두개골 골절을 유발한 0주차부터 6주차까지 2주 간격으로 혈청을 채취하여 측정한 결과, 정상군은 0주차에서 144.4±44.0 pg/ml, 2주차에서 144.8±54.8 pg/ml, 4주차에서 453.8±83.9 pg/ml, 6주차에서 581.7±93.9 pg/ml의 결과가 나타났으며, 대조군은 0주차에서 121.2±5.5 pg/ml, 2주차에서 116.1±20.7 pg/ml, 4주차에서 283.9±106.3 pg/ml, 6주차에서 500.7±275.6 pg/ml의 결과를 나타내었다. JGH 200 mg/kg 투여군은 0주차에서 145.5±27.4 pg/ml, 2주차에서 408.6±27.4 pg/ml, 4주차에서 316.1±75.5 pg/ml, 6주차에서 533.9±13.3 pg/ml의 결과가 나타났으며, JGH 400 mg/kg 투여군은 0주차에서 160.4±44.6 pg/ml, 2주차에서 170.9±29.8 pg/ml, 4주차에서 675.4±363.6 pg/ml, 6주차에서 120.8±20.0 pg/ml의 결과를 나타내었다(Fig. 14).

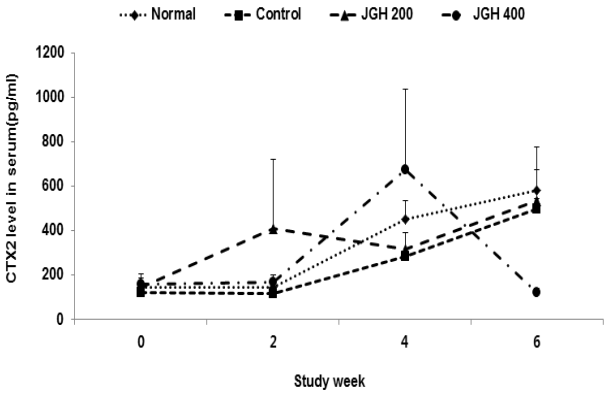

Fig. 14. Effect of *Joaguihwan* (JGH) on the level of CTXII in the serum of Skull Fracture Rat.
The results were represent the mean±S.D. (n=3).
Normal: Non treated Rat, Control: The skull fracture rats were treated orally with DW, JGH 200: The skull fracture rats were treated orally with JGH 200 mg/kg/day, JGH 400: The skull fracture rats were treated orally with JGH 400 mg/kg/day.

4) TGF-β 생성량

JGH 투여가 TGF-β 생성량에 미치는 영향을 확인하고자 두개골 골절을 유발한 0주차부터 6주차까지 2주 간격으로 혈청을 채취하여 측정한 결과, 정상군은 0주차에서 4,930.2±437.0 pg/ml, 2주차에서 6,492.8±597.7 pg/ml, 4주차에서 5,596.5±894.6 pg/ml, 6주차에서 4,199.6±749.3 pg/ml의 결과가 나타났으며, 대조군은 0주차에서 11,711.5±1,817.9 pg/ml, 2주차에서 7,852.2±1,026.7 pg/ml, 4주차에서 9,061.8±1,320.1 pg/ml, 6주차에서 7,069.1±1,349.9 pg/ml의 결과를 나타내었다. JGH 200 mg/kg 투여군은 0주차에서 9,768.7±1,870.2 pg/ml, 2주차에서 10,186.0±1,348.6 pg/ml, 4주차에서 9126.9±916.5 pg/ml, 6주차에서 10,650.9±995.3 pg/ml의 결과가 나타났으며, JGH 400 mg/kg 투여군은 0주차에서 9,748.5±1,005.8 pg/ml, 2주차에서 8,486.8±1590.6 pg/ml, 4주차에서 10,546.0±2,440.0 pg/ml, 6주차에서 9,596.3±984.6 pg/ml의 결과를 나타내었다(Fig. 15).

5) BMP-2 생성량

JGH 투여가 BMP-2 생성량에 미치는 영향을 확인하고자 두개골 골절을 유발한 0주차부터 6주차까지 2주 간격으로 혈청을 채취하여 측정한 결과, 정상군은 0주차에서 65.8±2.1 pg/ml, 2주차에서 61.9±1.5 pg/ml, 4주차에서 63.8±1.3 pg/ml, 6주차에서 63.6±1.8 pg/ml의 결과가 나타났으며, 대조군은 0주차에서 63.5±5.3 pg/ml, 2주차에서 63.6±0.5 pg/ml, 4주차에서 65.8±2.6 pg/ml, 6주차에서 61.4±2.2 pg/ml의 결과를 나타내었다. JGH 200 mg/kg 투여군은 0주차에서 64.9±4.2 pg/ml, 2주차에서 59.9±5.2 pg/ml, 4주차에서 61.2±2.8 pg/ml, 6주차에서 71.3±11.9 pg/ml의 결과가 나타났으며, JGH 400 mg/kg 투여군은 0주차에서 68.0±1.4 pg/ml, 2주차에서 59.9±2.5 pg/ml, 4주차에서 63.5±0.6 pg/ml, 6주차에서 60.8±3.6 pg/ml의 결과를 나타내었다(Fig. 16).

6) Insulin 생성량

JGH 투여가 insulin 생성량에 미치는 영향을 확인하고자 두개골 골절을 유발한 0주차부터 6주차까지 2주 간격으로 혈청을 채취하여 측정한 결과, 정상군은 0주차에서 76.0±4.6 μU/ml, 2주차에서 80.0±5.9 μU/ml, 4주차에서 68.8±6.8 μU/ml, 6주차에서 44.5±6.2 μU/ml의 결과가 나타났으며, 대조군은 0주차에서 386.9±29.8 μU/ml, 2주차에서 691.4±57.6 μU/ml, 4주차에서 578.5±116.8 μU/ml, 6주차에서 582.3±102.9 μU/ml의 결과를 나타내었다. JGH 200 mg/kg 투여군은 0주차에서 513.1±25.0 μU/ml, 2주차에서 343.6±64.6 μU/ml, 4주차에서 295.7±75.5 μU/ml, 6주차에서 312.5±35.2 μU/ml의 결과가 나타났으며, JGH 400 mg/kg 투여군은 0주차에서

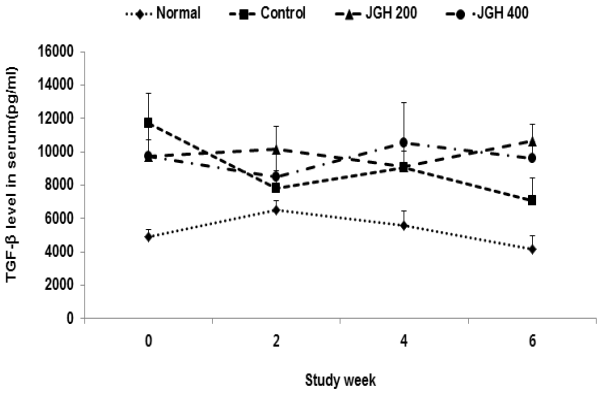

Fig. 15. Effect of *Joaguihwan* (JGH) on the level of TGF-β in the serum of Skull Fracture Rat.
The results were represent the mean±S.D. (n=3).
Normal: Non treated Rat, Control: The skull fracture rats were treated orally with DW, JGH 200: The skull fracture rats were treated orally with JGH 200 mg/kg/day, JGH 400: The skull fracture rats were treated orally with JGH 400 mg/kg/day.

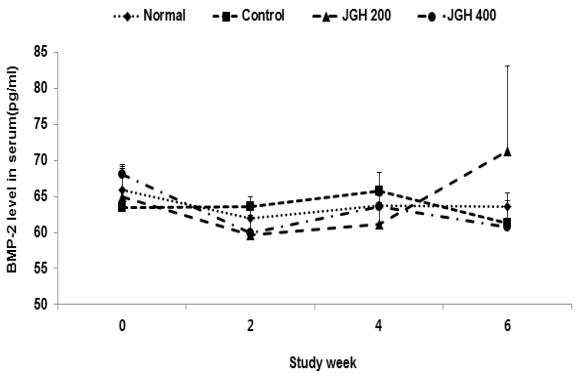

Fig. 16. Effect of *Joaguihwan* (JGH) on the level of BMP-2 in the serum of Skull Fracture Rat.
The results were represent the mean±S.D. (n=3).
Normal: Non treated Rat, Control: The skull fracture rats were treated orally with DW, JGH 200: The skull fracture rats were treated orally with JGH 200 mg/kg/day, JGH 400: The skull fracture rats were treated orally with JGH 400 mg/kg/day.

428.9±15.6 μU/ml, 2주차에서 399.2±74.8 μU/ml, 4주차에서 304.9±88.5 μU/ml, 6주차에서 227.6±22.6 μU/ml의 결과를 나타내어 JGH 200, 400 mg/kg 투여군은 2, 4, 6주차에서 대조군에 비하여 유의성 있는(***p<.001, **p<.01) 감소를 나타내었다(Fig. 17).

7) ALP (alkaline phosphatase) 생성량

JGH 투여가 ALP 생성량에 미치는 영향을 확인하고자 두개골 골절을 유발한 0주차부터 6주차까지 2주 간격으로 혈청을 채취하여 측정한 결과, 정상군은 0주차에서 34.5±6.1 U/ml, 2주차에서 42.2±4.8 U/ml, 4주차에서 38.8±11.6 U/ml, 6주차에서 41.6±8.9 U/ml의 결과가 나타났으며, 대조군은 0주차에서 234.9±78.5 U/ml, 2주차에서 240.6±43.7 U/ml, 4주차에서 216.0±62.5 U/ml, 6주차에서 312.5± 48.6 U/ml의 결과를 나타내었다. JGH 200 mg/kg 투여군은 0주차에서 208.4±50.6 U/ml, 2주차에서 431.8±89.6 U/ml, 4주차에서 632.5±110.4 U/ml, 6주차에서 602.5±119.6 U/ml의 결과가 나타났으며, JGH 400 mg/kg 투여군은 0주차에서 192.6±49.5 U/ml, 2주차에서 290.6±75.9 U/ml, 4주차에서 466.0±32.4 U/ml, 6주차에서 804.3±139.9 U/ml의 결과를 나타내어 JGH 200 mg/kg 투여군은 2, 4, 6주차에서, JGH 400 mg/kg 투여군은 4, 6주차에서 대조군에 비하여 유의성 있는(**p<.01, *p<.05) 증가를 나타내었다(Fig. 18).

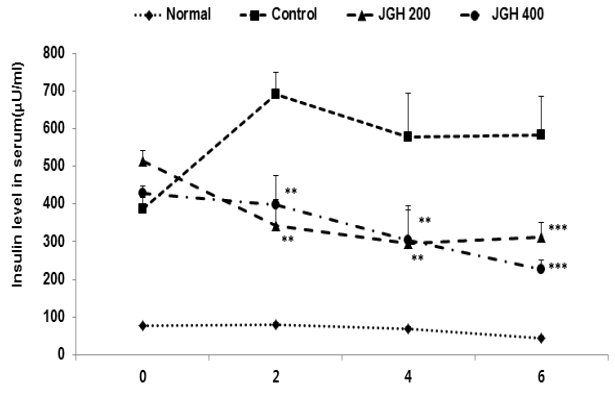

Fig. 17. Effect of *Joaguihwan* (JGH) on the level of insulin in the serum of Skull Fracture Rat.
The results were represent the mean±S.D. (***p<.001, **p<.01) (n=3).
Normal: Non treated Rat, Control: The skull fracture rats were treated orally with DW, JGH 200: The skull fracture rats were treated orally with JGH 200 mg/kg/day, JGH 400: The skull fracture rats were treated orally with JGH 400 mg/kg/day.

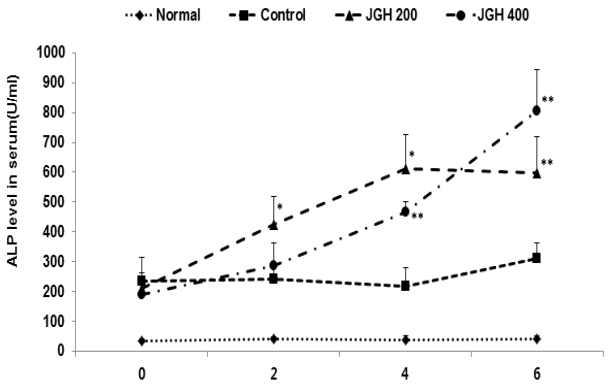

Fig. 18. Effect of *Joaguihwan* (JGH) on the level of alkaline phosphatase (ALP) in the serum of Skull Fracture Rat.
The results were represent the mean±S.D. (**p<.01, *p<.05) (n=3).
Normal: Non treated Rat, Control: The skull fracture rats were treated orally with DW, JGH 200: The skull fracture rats were treated orally with JGH 200 mg/kg/day, JGH 400: The skull fracture rats were treated orally with JGH 400 mg/kg/day.

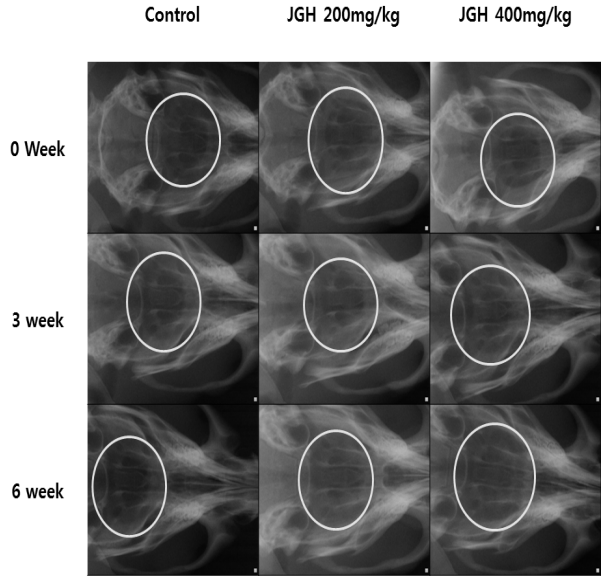

Fig. 19. Effects of *Joaguihwan* (JGH) on imaging of metopic synostosis using X-ray in Skull Fracture Rat. All skull were radiographed with a portable X-ray system after anesthesia of rat. Yellow circle indicated the fracture site.
Control: The skull fracture rats were treated orally with DW, JGH 200: The skull fracture rats were treated orally with JGH 200 mg/kg/day, JGH 400: The skull fracture rats were treated orally with JGH 400 mg/kg/day.

8. 방사선 소견

JGH 투여가 두개골 골절 유합에 미치는 영향을 확인하고자 두개골 골절을 유발한 0주차부터 6주차까지 3주 간격으로 X-ray 촬영을 실시한 결과, 대조군에서는 두개골 골절을 일으킨 0주차부터 6주차까지 골절이 유발된 부위의 경계선이 뚜렷하고 유합이 많이 이루어지지 않아 골의 형태가 육안으로 관찰되지 않았다. 반면, JGH 200, 400 mg/kg 투여군은 6주차로 실험이 진행될수록 경계선이 불분명해지고 골의 윤곽이 뚜렷하게 나타나 골절의 유합 과정이 진행되고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 19).

고찰»»»

골절은 치료 하는데 국소적인 면 뿐만 아니라 전체적인 면을 중시하며, 외상과 내상을 고려하고, 고정과 활동이 결합되어야 하며, 골절의 치유와 기능 회복이 동시에 진행되어야 한다[27].

골절유합 초기에는 조직 결손부와 혈종이 육아조직으로 바뀌지고 결합조직이 증식한다. 그 부위에서 조골세포가 증식하여 뼈의 기질을 만든 것을 가골(callus)이라고 하여 골절된 뼈의 양 끝을 일시적으로 결합시킨다. 조골세포가 증식하여 만든 기질인 유골(osteoid)에 칼슘이 침착하면 초기골(woven bone)이 된다[28]. 일반적으로 골절부위는 과잉의 가골을 형성하면 파골세포(osteoclast), 조골세포가 관여하여 자가 교정을 일으켜서 뼈가 재형성되고 점차 원래의 형태를 갖추게 된다[29].

이러한 유합과정 중에 단백질 결핍, 비타민 B6결핍, NSAIDs 사용, 당뇨, 흡연, 골다공증이 있는 경우 지연 유합된다. 환자의 연령, 수상시의 상해정도, 동반 손상의 정도, 골절된 골의 종류, 부위, 형태, 전위 정도, 골 소실, 골절부위의 혈액 공급, 연부조직의 손상 정도, 감염증의 유무, 치료 방법에 따라 골절 치유 속도가 달라지게 된다[2,30]. 골절 치료가 장기화될 경우 환자의 이동이 제한되며 폐렴, 욕창, 심부정맥 혈전증, 폐색전증 등이 발생할 수 있다. 장기간의 외고정 장치술은 운동제한을 유발하기도 하지만[2], 지연 유합, 불유합에 대한 뚜렷한 치료법은 없는 실정이다[13].

骨의 병변은 腎이나 骨髓의 생리작용과 밀접한 관련이 있다. 腎은 精을 간직하며 精은 髓를 生하고 髓는 骨을 滋養시켜 이를 骨生髓라 하고 腎精이 충실하면 髓가 充盛하고 골격 또한 생장이 堅實한다, 이는 骨이 腎之府이고 髓는 腎에서 생하여 골격의 생장과 기능이 腎氣의 盛衰에 따라서 결정되고 骨病은 대개 先天稟賦가 부족하거나 腎氣가 허약한 자에게 많다고 인식하고 있다[31]. 이를 ≪素問・宣明五氣論≫에서는 "五臟所主 …腎主骨"이라 하고, ≪素問・六節藏象論≫에서는 "腎者…氣充在骨"이라 하였는데[32], 이는 腎과 骨髓의 생장발육이 밀접한 관계가 있음을 표현한 것이다[33].

左歸丸은 六味地黃湯에 三瀉藥인 牧丹皮, 澤瀉, 白茯笭을 거하고 枸杞子, 菟絲子, 鹿角膠, 龜板, 牛膝을 加味한 처방이다[34]. 구성약물의 효능[24]은 熟地黃은 滋陰補血, 調經止痛하며, 山藥은 益肺腎, 澀精止滯하며, 山茱萸는 滋補肝腎, 固經止血,澀精斂汗하며, 枸杞子는 養陰補血, 滋補肝腎하며, 鹿角膠는 補血益精, 溫陽暖宮하며, 菟絲子는 補腎益精하며, 龜板膠는 滋陰潛陽, 斂虛火, 益衝任, 通血脈하며, 牛膝은 回陽救逆, 溫腎助陽한다. 그러므로 左歸丸은 腎水不足으로 精髓內虧하여 발생하는 병증을 치료하는 滋陰補腎, 益精養血의 처방이다.

左歸丸의 기본방은 六味地黃湯으로, 기[22] 등은 골절을 유발한 당뇨 유발 흰쥐에게 六味地黃湯 경구 투여 및 녹용약침을 시술한 뒤, 가골의 형성 촉진 및 형성된 가골의 피질골 부위로의 이동의 촉진, total alkaline phosphatase (T-ALP) 및 TGF-β1의 활성을 보고하였다.

左歸丸 구성 약재 중 우슬과 관련, 서[35]은 우슬 추출물이 alkaline phosphatase (ALP)의 활성도를 유의하게 증가시켰다고 보고하였다.

左歸丸 구성 약재 중 토사자와 관련된 김[36] 연구에서 토사자가 난소를 적출한 흰쥐의 phosphorous와 calcium의 농도를 증가시키며, 골소주 두께와 면적을 증가시켜주고, osteoblast가 차지하는 면적과 osteoclast 수를 유의하게 감소시킴을 보고하였다.

본 연구에서는 한의학적으로 腎이 골의 生理病理와 밀접한 관련이 있으며, 임상적으로 補氣養血, 補益肝腎, 健壯筋骨 치법이 적용될 경우가 있음에 근거하여, RAW 264.7 세포에서 항산화 및 항염증을 효능을 측정하고, 흰쥐에서 두개골절을 유발시킨 뒤, 6주 동안 左歸丸을 투여하여 흰쥐의 골절치료에 미치는 영향을 알아보았다.

Free radical은 정상적인 신체 대사과정 중에서 생성된

한 개 이상의 비공유전자를 가진 불안정한 상태의 이온이다. DNA 손상을 일으키고 단백질의 과산화물을 생성하여 지질과산화를 유발하여 여러 염증반응과 연관되어 노화 및 조직손상과 밀접한 관련이 있으며[37], 골의 손상, 지나친 골회전과 관련이 있다[38].

골절 발생 시 손상된 조직에서는 free radical이 유발되고, 이는 골의 손상을 가져오며 산화반응과 상호작용을 한다. 골절 치유 과정 중의 항산화는 과도한 free radical이 제어 되며, 이는 골절유합을 향상시키는데 도움이 된다[38].

체내에서 생성되는 산화 스트레스는 염증반응을 유발하는 원인 중하나가 되므로, 다량의 항산화성분은 산화 스트레스를 억제함으로써 염증반응의 유발을 감소하게 한다[37].

DPPH는 화학적으로 안정화된 free radical을 가용성 물질이다. 항산화 활성이 있는 물질과 만나게 되면 전자를 내어주면서 radical이 소멸되며 색깔이 변한다. 이것은 다양한 천연 소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다[39].

ABTS와 potassium persulfate를 암소에 방치하면 ABTS radical이 생성되는데 추출물의 항산화력에 의해 ABTS radical이 소거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색된다. ABTS radical 탈색반응은 이미 생성된 free radical의 제거 정도를 흡광도로 나타내어 ABTS radical의 소거 활성능을 측정하는 방법이다. ABTS radical 탈색 반응이 1분 안에 종료 되어 단시간에 측정할 수 있으며, 소수성과 친수성 모두에 적용 가능하다[40].

JGH 추출물의 DPPH radical 소거능 분석 결과 농도 의존적으로 radical 소거능의 증가를 나타냈으며(Fig. 6), ABTS radical 소거능 분석 결과 농도 의존적으로 radical 소거능의 증가를 나타냈다(Fig. 7). JGH 추출물이 항산화 활성이 유효함을 알 수 있었다.

골의 재형성과 항상성 유지에는 여러 가지의 cytokine이 관련되어 있다[41-44]. 골절은 다른 외상의 경우처럼 순차적인 염증반응이 일어난다. 초기 골절 부분에 이동한 큰 대식세포를 비롯한 다양한 면역세포들은 전 염증효소인 IL-1 (interleukin-1), IL-6 (interleukin-6), TNF-α (tumor necrosis factor-α)등을 분비하여 extracellular martix의 합성, 혈관 신생성, 섬유모세포의 이주 등을 촉진시킴으로써 골절의 재형성과 항상성을 유지시키는 중요한 조절자로서의 역할을 한다[13].

NO는 높은 반응성을 가진 생체 생성분자로써 NO synthase (NOS)에 의한 L-arginine으로부터 생성된다[45,46]. NO는 신경전달, 혈관의 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여한다. 특히 대식세포를 LPS로 자극하면 inducible NOS (iNOS)가 발현되어 NO을 생성하게 된다. 이렇게 생성된 NO는 염증반응을 매개하는 역할을 하게 된다[46-49].

단핵구와 림프구에서 생성되는 cytokine들 중 TNF-α, IL-1β, IL-6 등이 파골세포의 형성 및 활성과 골아세포의 활성에 관련된 대표적인 국소인자이다[50].

IL-1β는 파골세포의 조혈전구세포 증식과 분화를 촉진시켜 골 흡수를 일으키며 성숙한 파골세포가 골 흡수를 할 수 있도록 활성화 시킨다[50]. IL-1β와 TNF-α와 같은 cytokine들은 골아세포와 다른 간엽조직에 의한 IL-6의 생산을 촉진 시킨다[51].

골세포에서 TNF-α는 골 구조의 국소적 조절인자로서 중요한 역할을 담당하는데, 골 아세포의 collagen과 alkaline phosphatase의 합성을 억제하고, osteocalcin 유전자 발현을 억제하며, IL-6와 대식세포 집락자극인자를 증진시켜 파골세포의 분화를 증강시키고 골 아세포의 기능에 강력한 억제효과를 보인다. 또한 골아세포에서 파골세포에 의한 골흡수촉진제로 알려진 IL-1β유리를 촉진하여 골의 흡수를 촉진한다[50].

IL-6는 골아세포에서 분비되는 주변의 전파골세포의 소집과 증식을 증가 시켜 골 흡수를 촉진시킨다[50].

본 연구에서 RAW 264.7 세포에서 JGH 추출물의 항염증 효과에 대해 알아보고자 NO, IL-1β, IL-6, TNF-α의 생성량을 측정하였다. NO는 대조군에 비하여 10, 100 (μg/ml)의 농도에서 유의성 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 8). IL-1β는 대조군에 비하여 10, 100 (μg/ml)의 농도에서 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 9). IL-6와 TNF-α는 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 10, 11). 정[50] 연구에서는 실험 8주 후 혈중 TNF-α, IL-1β, IL-6 모두 감소하였으나 IL-1β, IL-6에서 유의성이 나타나 본 실험과 차이가 있다.

골절성 지표는 조골세포가 생산하는 효소 및 단백을 측정하며 골 형성 중에 유리되는 성분을 측정 한다[52]. 혈청에서 측정할 수 있는 osteocalcin은 조골세포에서 생산되는 뼈의 세포외기질에 축적된다. 새로 합성된 것 중 약 30%가 혈중으로 방출되어 이를 측정하면 골 형성의 정도를 예측할 수 있으며, 이는 조골세포의 후기 분화를 반영하는 지표로 여겨진다[17].

실험에서 골절유발 후 2주차에 JGH 200, 400 (mg/kg) 투여군은 혈청 내 osteocalcin의 생성이 증가하였으며 약물 기간이 지속될수록 감소를 나타내었으나 4주차를 제외하고는 대조군에 비해 생성이 증가되었다(Fig. 12). 2주차에서 JGH 200, 400 (mg/kg) 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는($p<.01$) 증가를 나타내었다(Fig. 12). 이는 골격의 산성단백질로 혈액 내 골아세포의 활성을 일으키는 osteocalcin의 유의성 있는 증가는 빠른 골 생성에 있어 JGH이 도움이 될 것이라 사료된다. 안[17]의 연구에서 1주차보다 2주차에서 osteocalcin의 양이 증가 하였으며 2주차에 유의성 있는 변화가 있다는 보고가 있어 유사함을 보였다.

Calcitonin은 32개의 아미노산으로 구성된 펩타이드로서 갑상성의 C 세포에서 생성되며, 파골세포에 직접 작용하여 골 흡수를 강력히 억제 시킨다[53]. 생리적 기능은 아직 완전히 알려지지 않았지만 혈장 칼슘과 인의 농도를 적절한 수준으로 낮추는 효과가 있다. 특히 혈장 칼슘농도가 높을 때 calcitonin의 분비가 증가되는 것으로 알려져 이다[11].

골절유발 후 대조군에 비하여 JGH 200, 400 (mg/kg) 투여군은 혈청 내 calcitonin의 생성을 대조군에 비하여 증가시켰다. 이는 실험 종료 시점까지 지속되었다. JGH 200 mg/kg 투여군은 4, 6주차에서, JGH 400 (mg/kg)투여군은 2, 4, 6주차에서 대조군에 비하여 유의성 있는 ($p<.05$) 증가를 나타내었다(Fig. 13). 이는 JGH 투여로 골형성에 JGH가 도움이 될 것이라 사료된다. 전[11]의 연구에서 calcitonin 수준 군간 및 군내에서 차이가 없는 것으로 나타났다. 이는 본 연구와 차이를 나타났다.

C-telopeptide crosslaps (CTX)는 골재형성의 상태를 반영하는 지표로 현재의 골밀도 상태보다는 골소실(bone loss)과 같은 동적 상태를 반영하는 표지자이며 골 대사를 반영하는 생화학적 골 표시자 분석이다[54]. 최근에 연구에서 연골 퇴행, 관절염 표지자로 CTX-II (concentration of C-telopeptide fragments of type II collagen)가 인정받고 있다[55-58].

JGH 200, 400 (mg/kg) 투여군은 혈청 내 CTXII의 생성을 대조군에 비하여 증가 시켰으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 14).

TGF-β1는 손상된 골조직의 치유 조절의 중요한 역할을 하여 골형성과 연골형성을 증가 시킨다[59,60].

JGH 200, 400 (mg/kg) 투여군은 혈청 내 TGF-β의 생성을 대조군에 비하여 증가시켰으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 15).

BMP는 강력한 골모세포의 분화인자로서 세포의 분화를 촉진하여 직접적으로 골 발생을 유도한다[61]. BMP-2는 개체 발생 시 골격형성, 치아형성 등에 관여하며, 골모세포의 분화를 유도하는 등 다양한 기능을 수행하는 세포에서 신호전달 개시자로 작용함이 잘 알려져 있다[62]. BMP-2가 osteocalcin, bone sialoprotein의 promoter활성을 조절함은 잘 알려져 있다[63]. 골형성 과정에서 혈관형성의 중요성과 임상적 응용을 알아보기 위하여 BMP-2에 대한 연구가 시도되고 있다[61].

골절유발 후 JGH 200 (mg/kg) 투여군에서 혈청 내 BMP-2의 생성이 대조군에 비하여 증가시켰으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 16).

조골세포와 지방세포가 공통된 전구세포를 갖기 때문에 두 세포 분획이 서로 상관된 관계를 가질 가능성들이 있으며 지방세포나 식사와 관련하여 췌장의 β 세포에서 분비되는 여러 호르몬의 영향을 들 수 있다. 인슐린은 실험실에서 조골세포의 증식을 자극하며[64], 생체 내에서 골형성 지표를 증가시킨다는 보고가 있다[65].

JGH 200, 400 (mg/kg) 투여군은 혈청 내 insulin의 생성을 대조군에 비하여 감소시켰다. 이는 실험 종료 시점까지 지속되었다(Fig. 17). JGH 200, 400 (mg/kg) 투여군은 2, 4, 6주차에서 대조군에 비하여 유의성 있는($p<.001$, $p<.01$) 감소를 나타내었다(Fig. 17). 이는 JGH 투여로 인슐린 분비를 감소시켜 인슐린 과다 분비로 인한 골절 치유의 지연을 방지할 수 있는데 도움이 될 것으로 사료된다.

골절 후 골절유합 과정에서 골아세포는 가장 중요한 세포로 골 기질을 형성하고 골의 무기질화과정에서 중요한 역할을 한다. ALP는 골아세포의 활성도를 반영하는 대표적인 인자로 알려져 있다[66].

JGH 200, 400 (mg/kg) 투여군은 혈청 내 ALP의 생성을 대조군에 비하여 증가시켰다. 이는 실험 종료 시점까지 지속되었다. JGH 200 (mg/kg) 투여군은 2, 4, 6주차에서, JGH 400 mg/kg 투여군은 4, 6주차에서 대조군에 비하여 유의성 있는($p<.01$, $p<.05$) 증가를 나타내었다(Fig. 18). 이는 대조군과 비교하여 JGH 투여로 골 혈성의 도움이 될 것으로 사료된다.

한편 황[14]의 실험에서는 대조군과 실험군 모두 2주째부터 현저히 증가한 것이 8주까지 지속된다고 보고하였고, 손[16], 금[12]은 4주에서 유의성 있게 증가한다고 보고하였다. 본 실험에서는 대조군에 비하여 2주부터 유의성 있게 증가하여 약간의 차이가 있다.

Alkaline phosphatase와 osteocalcin의 골절 후 증가시기에 대하여 이견이 있지만 이의 연구에서는 전반적으로 osteocalcin이 증가하는 시기에 앞서 먼저 alkaline phosphatase가 증가한다. 이는 골아세포의 분화과정에서, 먼저 골 기질이 성숙되는 시기에는 alkaline phosphatase가 주로 발현되고 이후 무기질화가 진행되며 osteocalcin이 증가하기 때문이다[67]. 본 연구는 osteocalcin과 alkaline phosphatase는 시기에 차이가 보이지 않았다.

본 연구에서는 JGH 추출물은 안전성 검사에서 중금속이 검출되지 않았으며(Table II), 세포 독성은 대조군에 비하여 95% 이상의 세포 생존율을 나타나 안전한 것으로 확인되었다(Fig. 5). 또한, JGH 투여군은 두개골 골절을 유발한 동물 모델의 혈액 내 간 기능(Fig. 1, 2), 신기능(Fig. 3, 4) 검사에서 모두 정상군의 비하여 큰 차이를 나타나지 않아 체내 독성을 유발하지 않았다.

In vitro검사에서 JGH 추출물의 DPPH radical 소거능, ABTS radical 소거능 분석 결과 농도 의존적으로 radical 소거능의 증가를 나타났다(Fig. 6, 7). JGH 추출물이 NO, IL-1β의 생성을 억제시켜 염증을 효과적으로 감소하게 한다. JGH 추출물의 항산화, 항염증으로 골절의 재형성 과정의 조절을 하는데 도움이 될 것으로 사료된다.

두개골절 흰쥐에서 左歸丸 투여는 골 형성과 골 흡수를 나타내는 지표 중에서 osteocalcin, calcitonin, ALP의 JGH투여군은 대조군의 비하여 유의성 있는 증가를 나타났다(Fig. 12, 13, 19). Insulin의 JGH투여군은 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타났다(Fig. 17). 방사선 검사 상 JGH 200, 400 (mg/kg) 투여군은 대조군에 비하여 골의 윤곽이 뚜렷하게 나타나 골절의 유합 과정이 빠르게 진행되고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 19).

이상의 내용을 종합해 보면 左歸丸은 골절 유합 관련 인자에 유의적인 영향을 미침으로써 실험적으로 유의성이 인정된 것을 알 수 있다. 향후 두부골절 및 뇌수술을 위한 골 절개 후 에도 빠른 골유합을 위해 활용 할 수 있을 것으로 생각된다.

결론»»»»

左歸丸이 골절 유합에 미치는 영향을 살펴보고자, RAW 264.7 세포를 이용하여 산화적 손상과 염증에 관한 효능을 평가 하였으며, 두개골 골절을 유발한 흰쥐를 이용하여 혈청 및 방사선 검사를 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 중금속 검사에서 카드뮴은 기준치 이하로 검출되었으며 납, 비소, 수은은 검출되지 않았다. 세포독성도 나타나지 않았고, 간장, 신장 검사에서도 안전한 것으로 나타났다.

2. DPPH와 ABTS radical 소거능은 농도 의존적으로 증가시켰다.

3. NO와 IL-1β 생성은 유의성 있게 감소시켰다.

4. Osteocalcin 함량은 2주차 200, 400 (mg/kg) 투여군에서 유의성 있게 증가시켰다.

5. Calcitonin 함량은 4, 6주차 JGH 200 (mg/kg) 투여군에서, 2, 4, 6주차 JGH 400 (mg/kg) 투여군에서 유의성 있게 증가시켰다.

6. CTXII, TGF-β, BMP-2 함량은 증가시켰으나 유의적인 결과는 나타나지 않았다.

7. Insulin 함량은 2, 4, 6주차 200, 400 (mg/kg) 투여군에서 유의성 있게 감소시켰다.

8. ALP 함량은 2, 4, 6주차 JGH 200 (mg/kg) 투여군에서, 4, 6주차 JGH 400 (mg/kg) 투여군에서 유의성 있게 증가시켰다.

9. 방사선 검사상 JGH 200, 400 (mg/kg) 투여군에서 형태학적으로 골절의 유합이 촉진되는 결과를 확인할 수 있었다.

이상과 같이 左歸丸은 산화적 손상과 염증 그리고 골유합과 관련이 있는 인자들에 유의적인 결과를 나타냈고, 방사선 검사에서도 골절 유합이 촉진되는 것을 확인 할 수 있었다. 향후 임상에서도 골절유합을 위하여 변증시치에 따라 적절히 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

References»»»»

1. Yim CB, Kim YJ, Oh MS. The Oriental and Western Medical Study of Fracture. Daejeon University, Institute of korean medicine. 2007;16(1):157-66.
2. The Korean orthopaedic Association. Orthopaedices.

seoul:the newest medicine company. 2006:779-831.
3. The society of korean medicine rehabilitation. Department of rehabilitation medicine of Korean medicine. Seoul:Koonja publishing company. 2015:206-10.
4. Hadjiargyrou M, McLeod K, Ryaby J et al. Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. Clinical Orthopaedics & Related Research. 1998;355:216-229.
5. Goodship AE, Cunningham JL, Kenwright J. Strain rate and timing of stimulation in mechanical modulation of fracture healing. Clin Orthop Relat Res. 1998;355:105-15.
6. Ji SY. Bibliographic stury on method of treating the diseases inside the body applied to fracture. The Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology Society. 1995:113-29.
7. Jin S. Taepyunghyemin-hwajegukbang. Peking:Si Pung publishing company.1976.220-7.
8. Jo G. Seongjechongrok. seoul: Yeo Gang publishing company. 1987:460-4.
9. Lee HK, Chung MS, Gang SY. Basic Study on the Effect of Korean Ginseng upon Fracture Healing of the Bone. The Journal of the Korean orthopaedic association. 1984;19(3):483-91.
10. Kim JH. The effects of Korean safflower seed powder supplementation diet on the recovery of rib fracture and the improvement lipid metabolism in rats, and development of processed food. The graduate school of kyongbuk.1998.
11. Jeon SM, Kim JH, Lee HJ, Lee IK, Moon KD, Choi MS. The Effects of Korean Safflower(Carthamus tinctorious L.) Seed Powder Supplementation Diet on Bone Metabolism Indices in Rats during the Recovery of Rib Fracture. Journal of Nutrition and Health. 1998;31(6): 1049-56.
12. Geum DH, Kim SS. Healing effect of pyrite on tibia fractured rats. Journal of Korean medicine rehabilitation. 2002;12(2):51-68.
13. Shin KM, Jung, CY, Hwang, MS, Lee SD, Kim KH, Kim, KS. Effects of Administration of Pyritum on Fracture Healing in Mice. The acupuncture. 2009;26(5):65-75.
14. Hang TG, Oh MS, Song TW. Helling Effect of Sintongchugoetang Water Extract on Tibia fractured Rats. Daejeon University, Institute of Korean medicine. 1999; 8(1):727-38.
15. Pyum YH, Oh MS, Song TW. Helling Effect of Gamigungguitang and GamigungguitangGaNokyong Water Extract on Tibia fractured Rats. Daejeon University, Institute of Korean medicine. 1999;8:675-87.
16. Son WT, Song TW, Oh MS. Healing Effect of Soongiwhalhyultang Extract on Tibia Fractured Rats. Journal of Korean medicine rehabilitation.1999;9(2):350-62.
17. Ahn HL, Shin MS, Kim SJ, Choi IB. Effects of Neutral Eohyeol (Yuxue) Herbal Acupuncture and Dangkisoosan (Dangguixu-san) on Fracture Healing in the Early Stage in Rats. Journal of Korean medicine rehabilitation. 2007;17(1):1-16.
18. Kum DH, Kim SS. Healing Effect of Bokwonhwalhyultang on Tibia fractured. The Journal of the Korea institute of oriental medical informatics. 2002;8(1):47-66.
19. Park BC, Cha YY, Lee ES. Study on the Polyphosphate content of the Yukmijihwang-tang and its Effect on transcription activity of Genes related to Bone Morphogenesis. Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology. 2004;18(6):1769-76.
20. Shin YW, Park YI , Kim HY, Lee ES. Effect of Yukmigihwang-tang kamibang on the Expression of Osteo-related Genes, TG2 and BMP4. The Journals of the Korean Oriental Medical Society. 2002;23(2):190-7.
21. Kim GH. Healing Effect of Gamiyungmijihwangtang on fractured dogs. The graduate school of wonkwang. 1987.
22. Kee YB, Dae Hun Kim DH, Kang DH, Kim SJ, Choi JB. Effects of Yukmijihwang-tang(Liuweidihuang-tang) and Cervi Pantotrichum Cornu Pharmacopuncture on Fracture Healing in Diabetic Rats. Journal of Oriental Rehabilitation Medicine. 2012;22(3):49-63.
23. Han SW, Choi JY, Lee YH. Original Article : Healing of Bony Defects by Cervi Pantotricuhum Cornu Herbal Acupuncture. Journal of Korean acupuncture & moxibustion medicine society. 2001;18(5)135-46.
24. Zhang JB. Gyeongakjeonseo. Daegu: East synthesize communication education publishing company. 1982:642, 678.980-1.
25. Korea Food and Drug Administration. Testing Guidelines for Safety Evaluation of Drugs. Korea Food and Drug Administration. 2009.
26. Laufer S, Greim C, Bertsche T. An in-vitro screening assay for the detection of inhibitors of proinflammatory cytokine synthesis: a useful tool for the development of new antiarthritic and disease modifying drugs. Osteoarthritis and cartilage. 2002;10:960-7.
27. Park JY. Eastern physical therapy Medicine. Seoul: Komoonsa. 1993:325.
28. Song GY. Essential pathology. Seoul: Goryeo medicine. 1998:772.
29. Sung SC. Expression of Osteocalcin and Transglutaminase C during Fracture Healing and Distraction Osteogenesis in Rat's Tibia. Journal of the Korean Orthopaedic. 1994;29(5):1312-25.
30. Kim ID, Lee SY, Kim PT, Park BC, Park HJ. A Clinical Study on Treatment of Delayed and Nonunion of Tibial Fractures. The Journal of the Korean orthopaedic association.1984;19(1):157-64.
31. Kim HH, Kim GJ. Jangsanghak of theory and clinic. Seoul:Ilchung publishing company. 1996:54.

32. Wang B. Wangjenaegyeongsomun. Seoul:Dae Seong publishing company. 1994:21, 101, 212, 274, 340, 768.
33. Wie IJ. China physiognomy science. Nam Ryeong: Gwangseo publishing company. 1988:43-5.
34. Yoon YG. Donguibangje & Cheobanghaeseol. Seoul: Uiseong. 1998:340-1.
35. Seo EA, Moon HC. Effects of Radix Achyranthis Bidentatae Extract on Proliferation and Differentiation in Human Osteoblast-like Cells. Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology. 2004;18(6):1821-4.
36. Kim JH, Kim, HS, Jun JY, Jeong, DW, Cho CY, Sohn YJ, Jung HS. Effects of Cuscutae Semen Extract on Prevention of Osteoporosis in Ovariectomized Rats. The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2012;15(4):1-11.
37. Fu S, Gebicki S, Jessep W, Gebicki JM, Dean RT. Biological fate of amino acid, peptide and protein hydroperoxides. Biochem J. 1995;31(3)821-7.
38. Sheweita SA, Khoshhal KI. Calcium metabolism and oxidative stress in bone fractures: Role of antioxidants. Current Drug Metabolism. 2007;8:519-25.
39. Frankel EN, Huang SW, Aeschbach R, Prior E. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol and rosmarinic acid in bulk oil and oil in water emulsion. J. Agric. Food Chem. 1996; 44(1):131-5.
40. Yu MH, Chae IG, Jung YT, Jeong YS, Kim HI, Lee IS. Antioxidative and antimicrobial activities of methanol extract from Rosmarinus officinalis L. and their fractions. Journal of Life Science. 2011;3:375-84.
41. Beeton CA, Charfield D, Brooks RA, Rushton N. Circulating levels of interleukin-6 and its soluble receptor in patients with head injury and fracture. J Bone Joint Surg Br. 2004;86:912-7.
42. Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, Levine PM, Horowitz MC. The expression of cytokine acitivity by fracture callus. J Bone Miner Res. 1995;10:1272-81.
43. Kimbke RB, Bain S, Pacifici R. The functional block of TNF but not IL-6 prevents bone loss in ovariectomized mice. J Bone Miner Res. 1997;12:935-41.
44. Kon T, Cho TJ, Aizawa T, et al. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand(osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. J Bone Miner Res. 2001;16:1004-14.
45. Min JY, Park YK. Effect of Dipsaci Radix Water Extract on LPS-induced Inflammatory Response in RAW264.7 Mouse Macrophages. The Korea Journal of Herbology. 2009;24(4):189-95.
46. Kawamata H, Ochiai H, Mantani N, Terasawa K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW 264.7cell, a murine macrophage cell line. The American Journal of Chinese Medicine. 2000;28:217-26.
47. Livshits G, Zhai G, Hart DJ, Kato BS, Wang H, Williams FM, Spector TD. Interleukin-6 is a significant predictor of radiographic knee osteoarthritis. Arthritis & Rheumatism. 2009;60(7): 2037-45.
48. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Kwon TO, Yun YG, Kim NY, Chung HT. Inhibitory effects of methanol extract of Cyperus rotundus rhizomes on nitric oxide and superoxide productions by murine macrophage cell line. RAW 264.7 cells. J Ethnopharmacol. 2001;76(1):59-64, 119-23.
49. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. Life science. 2001;69:625-35.
50. Jeong JS, Seo IB, Kim HJ. Effects of SaenghyeolbosuTang on the Morphometric Changes of Femur, and on the Factors Related with Bone Metabolism in Ovariectomized Rats. The Journal Of Oriental Gynecology. 2005;18(3):32-50.
51. Harrison's Internal Medicine the compilation committee. Harrison's Internal Medicine. seoul:Jung Dam. 1997:2342-8.
52. Kim DY. Biochemical Markers of Bone Turnover. Nuclear Medicine and Molecular Imaging. Nuclear Medicine and Molecular Imaging. 1999;33:341-51.
53. Moon JS, Won GJ. The Diagnosis and Treatment of Osteoporosis. Yeungnam University Journal of Medicine. 2008;25(1):19-30.
54. Kim DY. Biochemical markers of bone turnover. Korean Journal of Nuclear Medicine. 1999;33(4):341-351.
55. Garnero P, Ayral X, Rousseau JC, Christgau S, Sandell LJ, Dougados M, et al. Uncoupling of type II collagen synthesis and degradation predicts progression of joint damage in patients with knee osteoarthritis. Arthritis Rheum. 2002;46:2613-24.
56. Christgau S, Garnero P, Fledelius C, Moniz C, Ensig M, Gineyts E, et al. Collagen type II C-telopeptide fragments as an index of cartilage degradation. Bone. 2001;29:209–15.
57. Mouritzen U, Christgau S, Lehmann HJ, Tanko LB, Christiansen C. Cartilage turnover assessed with a newly developed assay measuring collagen type II degradation products: influence of age, sex, menopause, hormone replacement therapy, and body mass index. Ann Rheum Dis. 2003;62:332–6.
58. Garnero P, Piperno M, Gineyts E, Christgau S, Delmas PD, Vignon E. Cross sectional evaluation of biochemical markers of bone, cartilage, and synovial tissue metabolism in patients with knee osteoarthritis: relations with disease activity and joint damage. Ann Rheum Dis. 2001;60:619–26.
59. Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S. Growth factors to stimulate bone formation. J. Journal of Bone and

Mineral Research. 1993;8:565-72.
60. Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM. Transforming growth factor-β gene family members and bone. Endocrine Society. 1994;15:27-39.
61. Kim HJ, Oh WM, Koh JT. Effects of angiopoietin-1 on bone morphogenetic protein-2 induced osteoblast differentiation. Jeonnam dental collection of dissertations. 2007;19(1):182-99.
62. Heldin CH, Miyazono K, Dijke PT. TGF-β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. Nature. 1997;390:465-471.
63. Kearns AE, Donohue MM, Sanyal B, Demay MB. Cloning and characterization of a novel protein kinase that impairs osteoblast differentiation in vitro. J Biol Chem. 2001;276:42213-8.
64. Kim HY. Association of ADIPOR1 and ADIPOR2 gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal Korean women. The graduate school of ulsan. 2007.
65. Cornish J, Callon KE, Reid IR. Insulin increases histomorphometric indices of bone formation In vivo. Calcif Tissue Int. 1996;56:492-5.
66. Leung KS, Fung KP, Sher AH, Li CK, Lee KM. Plasma bone-specific alkaline phosphatase as an indicator of osteoblastic activity. J Bone Joint Surg. 1993;75-B(2):288-92.
67. Lee HS, Lee CS, Jang JS, Lee JD, Um SM. Changes of Serum Alkaline Phosphatase and Osteocalcin during Fracture Healing. The Journal of the Korean orthopaedic association. 2002;37(3):411-5.