

接骨散이 골절치유에 미치는 영향

이한길 · 오민석

대전대학교 한의과대학 한방재활의학교실

Effects of *Jeopgolsan* (JGS) Extract on Fracture Healing

Han-Gil Lee, K.M.D., Min-Seok Oh, K.M.D.

Department of Korean Medicine Rehabilitation, College of Korean Medicine, Daejeon University

Objectives The purpose of this study was to evaluate the effect of *Jeopgolsan* (JGS) extract on anti-oxidant, anti-inflammatory activities in RAW 264.7 cells and on factors related with fracture healing in skull fractured rat.

Methods Experimental animals were divided into four groups: normal group without any treatment (Normal), control group were treated orally with distilled water (Control), Experimental group were treated orally with JGS at a concentration of 200 mg/kg/day (JGS 200) and Experimental group were treated orally with JGS at a concentration of 200 mg/kg/day (JGS 400). Rats in each group except the normal group were induced fractures in the skull. *< In vitro >* The 1,1-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) radical scavenging activity were measured to evaluate antioxidant activity. The production of nitric oxide (NO), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the RAW 264.7 cells were measured to evaluate anti-inflammatory activity. *< In vivo >* The production of osteocalcin calcitonin, carboxy-terminal telepeptides of type II collagen (CTX II), transforming growth factor- β (TGF- β), bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), Insulin and alkaline phosphatase (ALP) in serum of rats were measured to evaluate the effects of fracture healing at 0, 2, 4, and 6th week. X-rays were taken every 3 week from 0 to 6th week to evaluate fracture healing effect.

Results 1. No cytotoxicity was observed. 2. DPPH and ABTS radical scavenging activity were increased in a concentration dependent manner, indicating anti-oxidant effect. 3. NO, IL-1 β , IL-6, and TNF- α were not significantly changed, indicating no anti-inflammatory effect. 4. Osteocalcin, Calcitonin, TGF- β and ALP were significantly increased in the experimental groups. 5. CTX II, insulin were significantly decreased in the experimental groups. 6. Radiologic examination showed that union of fracture was promoted.

Conclusions From above results, JGS showed significant results in factors related with fracture healing and radiologic examination. Therefore, JGS is expected to be effective in the treatment of fracture. (**J Korean Med Rehabil 2018;28(1):1-17**)

RECEIVED December 26, 2017

REVISED January 8, 2018

ACCEPTED January 12, 2018

CORRESPONDING TO

Min-Seok Oh, Department of Korean Medicine Rehabilitation, College of Korean Medicine, Daejeon University, 75 Daedeok-daero, 176beon-gil, Seo-gu, Daejeon 35235, Korea

TEL (042) 470-9424

FAX (042) 470-9005

E-mail ohmin@dju.ac.kr

Copyright © 2018 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

Key words *Jeopgolsan* (JGS), Anti-oxidant, Anti-inflammation, Fracture

서론»»»»

건강보험 심사평가원의 통계에 따르면 골절질환의 연

간 환자수가 꾸준한 증가세를 보이고 있다¹⁾. 작은 충격으로도 상대적으로 골절 가능성이 높은 노인인구의 증가 및 여가시간 및 소득수준의 향상에 따른 스포츠 활동 증가²⁾

로 인해 이러한 추세는 계속될 것으로 보인다.

골절질환은 발생한 위치와 정도에 따라 다르지만 대부분 부목고정이나 석고고정 등의 보존적 치료 또는 수술적 치료가 필요하다³⁾. 이러한 치료 과정은 활동의 제한을 초래하며 치료기간도 길어 각 개인 뿐 아니라 사회적으로도 큰 손실을 가져 온다⁴⁾. 따라서 기존의 치료를 보완하거나 대체할 수 있는 새로운 치료법이 요구된다.

골절의 치유는 염증기, 복원기 그리고 재형성기를 거치게 되는데⁵⁾ 한약치료는 이러한 골절의 치유 단계에 따라 변증을 통해 효과적인 약물을 선정할 수 있는⁶⁾ 장점이 있어 환자의 현재 상태에 따른 맞춤 치료가 가능하다. 또한 기존의 정형외과적 치료를 받은 환자에게 골유합을 촉진시키는 한약을 투여하여 치료 기간을 단축할 수 있을 것으로 기대되며, 특히 노인 환자에 있어서는 전신 상태를 고려한 약물의 배아가 가능하다. 이러한 한약치료의 장점을 활용하기 위해서는 우선 골절의 한약치료에 있어 각 치유 단계별로 작용하는 한약에 대한 실험적 연구가 선행되어야 한다. 하지만 골절의 한약치료에 대해서는 1993년부터 2013년까지 加味芎歸湯, 順氣活血湯, 復原活血湯, 六味地黃湯과 녹용약침, 중성어혈 약침과 당귀수산을 투여한 결과에 대한 실험이 각각 1편이었으며, 자연동을 투여한 실험이 3편으로 총 8편에 불과하여⁷⁾, 좀 더 다양한 한약처방에 대한 체계적인 연구가 필요하다.

이에 저자는 《東醫寶鑑·雜病編·諸傷》⁸⁾의 <骨折筋斷傷>에 기재된 골절 관련 처방 중 接骨散을 선정하고, 接骨散이 골절치유에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RAW 264.7 cell에서 接骨散의 항산화와 항염증의 효능을 측정하였다. 또한 두개골 골절을 유발시킨 Sprague Dawley rat (SD rat)에 接骨散을 투여한 후 혈청학적 검사 및 방사선 검사를 시행하여 골절의 치유에 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

대상 및 방법

1. 재료

1) 세포

RAW 264.7 cell은 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

2) 약재

본 실험에 사용한 接骨散(JupGolSan 이하, JGS로 표기)을 구성하는 약재들은 대전대학교 TBRC-RIC에서 (주)옴니허브(Daegu, Korea)를 통하여 구입하여 정선한 후 사용했고, 그 구성 약재와 분량(1첩)은 아래와 같다(Table 1).

3) 동물 및 사료

실험동물로 11주령의 수컷 SD Rat (310~360 g)을 라온바이오(Gyeonggi-do, Korea)로 부터 공급 받아 실험 당일까지 고품사료((주)퓨리나, Korea)와 물을 충분히 공급하여 온도는 22±2°C로 습도는 55±15%로 유지하여, 12시간-12시간(light-dark cycle) 환경에서 2주동안 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다. 대전대학교 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호-DJUARB 2015-023)을 받아 동물윤리 준칙에 의거하여 실험하였다.

4) 시약

시약은 isopropanol (Sigma Co., U.S.A.), ethyl ether (Sigma Co., U.S.A.), Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS: Welgene, Korea), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM: Gibco BRL Co., U.S.A.), 우태이혈청(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 sulfide (DMSO: Sigma Co., U.S.A.), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH: Sigma Co., U.S.A.), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS: Sigma Co., U.S.A.), penicillin (Hyclone, Co., U.S.A.), streptomycin (Hyclone Co., U.S.A.), formaldehyde (Sigma Co.,

Table 1. The Prescription of *Jeopgolsan* (JGS)

Herbal medicine name	Scientific name	Dose (g)
乳香	<i>Frankincense</i>	5
沒藥	<i>Myrrha</i>	5
自然銅	<i>Pyrite</i>	10
滑石	<i>Talc</i>	20
龍骨	<i>Draconis Os</i>	3
赤石脂	<i>Halloysite</i>	3
Total amount		41

U.S.A.), trypan blue (Sigma Co., U.S.A.), TGF- β 1 ELISA 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 Calcitonin ELISA Kit (MyBioSource, U.S.A.), Rat Cross-Linked C-Terminal Telopeptides of Type II Collagen ELISA Kit (CTX II: MyBioSource, U.S.A.), Rat insulin ELISA kit (Biovender, Czech), Alkaline Phosphatase Assay kit (Abcam, UK), Rat-MID™ Osteocalcin ELISA kit (IDS Co., UK), Ketamine (Yuhan Co., Korea), Rompun Inj. (Bayer Co., Korea) 등을 사용하였다.

5) 기기

기기는 rotary vacuum evaporator (Büchi B-480 Co., Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co., Japan), CO₂ 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), 환류 추출기(Mtops, Korea), 동결 건조기 (IlShinBioBase, Korea), Trepine Bur (Ace Surgical Supply Co., U.S.A.) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

JGS 2첩(92 g)에 1,000 ml의 distilled water (DW)를 넣고 3시간 동안 환류추출한 뒤 여과액을 얻고 rotary vacuum evaporator를 이용하여 감압 농축하였다. 농축된 용액으로 freeze dryer를 이용해 동결건조 된 분말 3.3 g (수득율 3.6%)을 얻었고, 얻어진 분말은 초저온 냉동고 (-80°C)에 보관하면서 필요한 농도로 증류수에 희석한 뒤 사용하였다.

2) RAW 264.7 cell의 배양

동결처리된 RAW 264.7 cell을 50 ml 튜브로 이동시켜 PBS 9 ml을 넣고 세포를 부유시킨 후, 1,200 rpm의 속도

로 5분 간 원심분리한 뒤 상청액을 제거하였다. 세포가 들어 있는 튜브에 1% penicillin과 10% fetal bovine serum (FBS)으로 조성된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 1 ml 넣어 부유시켰다. 100 mm dish 위에 9 ml 배지를 넣고, 세포를 부유시킨 뒤 세포배양기(37°C, 5% CO₂)를 이용하여 배양하였다. 계대배양 횟수는 5회 이상으로 하였다. 시료들을 처리하기 전 24시간을 적응시켰다.

3) 세포 독성

RAW 264.7 cell은 96 well plate에서 1.5×10^5 cells/well로 분주한 뒤, 24시간 동안 배양하였다. 실험 시작 전 새로운 배양액으로 교체하였고, JGS를 1, 10, 100 μ g/ml의 농도로 처리한 뒤 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 μ l의 water soluble tetrazolium salt solution을 첨가한 후 세포배양기(37°C, 5% CO₂)를 이용하여 30분 간 반응시켰다. 그리고 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정해 대조군에 대해 세포의 생존율을 백분율로 표시하였다.

4) In vitro

(1) 항산화 효능

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

JGS 추출물은 1, 10, 100, 1,000 μ g/ml의 농도가 되도록 희석시켰다. 150 μ l의 JGS 추출물과 에탄올로 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액을 각각 100 μ l씩 섞어 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 흡광도 측정을 517 nm에서 하였다. 시료액의 대조군에는 증류수를, DPPH 용액의 대조군에는 에탄올을 넣어서 보정값을 얻었다. DPPH radical 소거율은 아래의 식과 같이 계산하였다.

$$\text{소거율}(\%) = \left(\frac{\text{대조군 흡광도} - \text{시료 첨가군 흡광도}}{\text{대조군 흡광도}} \right) \times 100$$

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

ABTS assay 방법⁹⁾은 기존에 보고되었던 방법을 96 well plate에 맞도록 수정하여 실시하였다. 1, 10, 100, 1,000 μ g/ml의 농도로 JGS 추출물을 희석시켰다. 7.4 mM의 ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))용액과 2.6 mM의 potassium persulphate를 만들어 어두운 곳에 24시간 동안 방치해 양이온(ABTS · +)을 형성시켜

732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 값이 1.5 이하가 나오게 희석시키고, JGS 추출물을 각각 5 μ l과 희석된 ABTS + 용액 150 μ l를 혼합하여 10분간 실온에서 반응시킨 뒤, 흡광도를 734 nm에서 측정하였다. ABTS radical 소거율은 아래의 식과 같이 계산하였다.

$$\text{소거율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료 첨가군 흡광도}}{\text{대조군 흡광도}}\right) \times 100$$

(2) 항염증 효능

① Nitric oxide (NO) 측정

NO의 농도는 배양액 내에서 griess reagent system을 이용해 측정하였다. RAW 264.7 cell은 96 well plate에서 1.5×10^5 cells/well로 분주한 뒤 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 새로 교체하였고, N1 buffer 50 μ l를 각각의 well에 처리하여 상온에서 10분 동안 반응시킨 뒤, N2 buffer 50 μ l를 각각의 well에 처리하고 10분간 반응시켰다. 반응 후 흡광도를 540 nm에서 측정하였다. NO의 농도는 Nitrite standard 농도별 표준곡선을 이용하여 측정하였다.

② Cytokine 측정

세포 안에서 염증성 cytokine을 12 well plate에서 RAW 264.7 cell을 2×10^5 cells/well로 분주한 뒤 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 새로 교체하여 JGS 추출물을 1, 10, 100 μ g/ml의 농도와 LPS 1 μ g/ml의 농도로 처리하여 세포배양기(37°C, 5% CO₂)를 이용하여 24시간 동안 재배양하였다. 원심분리 후 얻어진 상청액으로 Luminex를 이용하여 interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α)을 측정하였다.

5) 두개골 골절 유발

11주령의 SD Rat를 2주간 안정기를 거친 뒤 마취제 (Ketamine 0.5 ml + Rompun 0.1 ml)로 마취하여 두개골을 깨끗이 제모한 후, 수술대에 고정시켰다. 고정된 SD rat의 두피를 매스를 이용하여 절개한 뒤, 두개골에 trephine bur로 직경 8 mm의 골절을 유발하여 봉합을 실시하였다.

6) 그룹 배정 및 시료 처리

실험은 정상군, 증류수를 투여하는 대조군, 200 mg/kg

의 농도로 JGS를 투여하는 실험군, 400 mg/kg의 농도로 JGS를 투여하는 실험군 등 모두 4개의 그룹으로 나누었으며, 각 그룹당 6마리씩 배정하여 실험을 시행하였다. 정상군을 제외한 나머지 군들은 두개골에 골절을 유발시켰다. 1일 1회, 오후 2시에 식약처 동물실험 가이드라인²⁵⁾에 따라 SD Rat 기준으로 100 g 당 경구투여 허용 용량인 1 ml을 넘지 않도록 2 ml씩 경구 투여하였다. 실험기간 동안 자유 식이를 하였다. JGS투여 용량은 저농도와 고농도로 섭취하는 그룹으로 나누었으며, 체중 60 kg의 성인 1회 섭취량을 기준으로 1회에 섭취하는 용량을 각각 12 g, 24 g인 200 mg/kg, 400 mg/kg으로 지정하였으며, 1회 섭취량으로부터 얻은 시료를 SD Rat 체중 310 g으로 기준하여 산출하여 투여하였다. 두개골 골절이 유발된 시점을 0주차로 하여 총 6주간 경구 투여를 실시하였다.

7) 혈청 분리

실험 0, 2, 4주차에 ethyl ether로 마취한 뒤 꼬리 채혈의 방법으로 혈액을 채취하였고, 6주차에 실험 종료 후 ethyl ether 흡입 마취 후 심장천자법을 이용하여 혈액을 채취한 뒤, 15분간 3,000 rpm의 속도로 원심 분리하여 골절치유 관련인자들을 측정하였다.

8) *In vivo*

(1) Osteocalcin 측정

Osteocalcin ELISA kit를 이용하여 각 well에 biotinylated osteocalcin을 100 μ l씩 분주하여 30분간 plate mixing시켜 코팅을 진행하였다. 코팅된 plate를 washing 완충 용액으로 세척한 뒤 primary antibody, primary incubation buffer, standard, control, 혈청을 넣고 1시간 동안 plate mixing을 하였다. 그 뒤, 다시 washing 완충 용액으로 세척한 뒤 각 well에 secondary antibody를 100 μ l씩 넣어 15분간 plate mixing을 하고, stop solution 100 μ l를 넣은 후 ELISA reader를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

(2) Calcitonin 및 carboxy-terminal telepeptides of type II collagen (CTX II) 측정

Calcitonin과 CTX II ELISA kit를 이용하여 각 well에 standard, control, 혈청을 50 μ l씩 분주하고, horse radish peroxidase-conjugate 100 μ l를 가하여 혼합한 뒤, 37°C의 인큐베이터에 넣어 1시간 동안 반응시켰다. 반응

후 washing 완충 용액으로 세척하고 chromogen solution 용액 100 μ l씩을 넣은 뒤 다시 37°C의 인큐베이터에서 15분 간 반응시켰다. 마지막으로 stop solution 50 μ l를 넣고 ELISA reader를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

(3) Transforming growth factor- β (TGF- β) 및 bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) 측정

TGF- β 와 BMP-2 ELISA kit을 이용하며, 우선, TGF- β 측정을 위해 혈청 40 μ l에 1 N HCl 용액을 가하여 37°C의 인큐베이터에서 10분 간 반응시킨 뒤, 10 μ l 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES를 혼합해 샘플을 만들었다. 그 후 각 well에 TGF- β 측정을 위해서 assay diluent를 50 μ l를 넣었으며, BMP-2 측정을 위해서는 100 μ l를 넣은 뒤 standard, control, 혈청을 50 μ l 씩 넣고 TGF- β 측정 plate는 2시간 동안 37°C의 인큐베이터에서 반응시키고, BMP-2 측정 plate는 mixing을 시켰다. 그 후 washing 완충 용액으로 세척을 하고 100 μ l의 TGF- β conjugate와 200 μ l의 BMP-2 conjugate를 넣어 다시 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후 재차 washing 완충 용액으로 세척하고 substrate solution을 각각 100 μ l와 200 μ l를 넣어 30분 간 반응시키고 stop solution 100 μ l과 50 μ l를 취하여 ELISA reader를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

(4) Insulin 측정

Rat insulin ELISA kit를 이용해 코팅 되어진 insulin plate에 washing 완충 용액으로 세척하고 100 μ l의 biotin conjugate, 10 μ l의 standard, 혈청을 넣고 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후 재차 washing 완충 용액으로 세척하고 100 μ l의 HRP conjugate를 넣고 30분 간 반응시켜 세척작업을 한 뒤 100 μ l의 substrate chromogen reagent를 넣고 30분 동안 반응시켰다. 측정 전 reaction stopper 100 μ l를 취하여 ELISA reader를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

(5) Alkaline phosphatase (ALP) 측정

Alkaline phosphatase assay kit을 이용해 다음과 같이 측정하였다. Well plate에 standard, control, 혈청을 넣은 후 샘플 및 control well에는 50 μ l의 5 mM pNPP solution를, 10 μ l의 standard well에는 ALP enzyme solution을 넣어 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 20 μ l의 stop solution을 취하여 ELISA reader를 이용하여 405 nm

에서 흡광도를 측정하였다.

9) 방사선 검사

실험 0, 3, 6주차에 (주라온바이오(경기도, 한국)에 의뢰하여 60 kVp, 0.8~1.2 mAs의 조건하에 5 cm의 거리에서 X-ray 촬영을 실시하였다.

3. 통계처리

본 연구의 실험 결과는 그룹별로 평균값 \pm 표준 편차(mean \pm S.D.)로 표시하였다. 각 처리군의 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA) 방법을 이용하였고, Student's t-test를 사용하여 통계적 유의성을 검증하였다(***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 compared to control).

결과»»»»

1. 세포 독성

RAW 264.7 cell에서 세포 독성을 측정한 결과, 대조군을 100.0 \pm 4.8%로 나타냈을 때 JGS 추출물의 1, 10, 100 μ g/ml 농도에서 102.6 \pm 4.3%, 101.5 \pm 0.6%, 99.4 \pm 2.1%의 세포 생존율을 나타내 안전한 것으로 나타났다(Fig. 1).

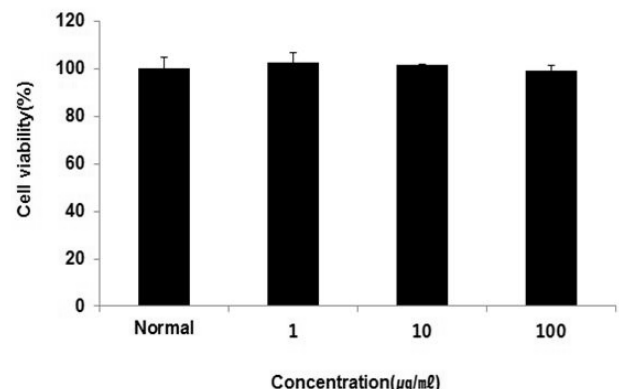


Fig. 1. Cell viability of JGS extract in RAW 264.7 cells. Each cell was treated with 1, 10, 100 μ g/ml of JGS extract for 24 hr. Cytotoxicity was measured using an MTT assay. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

2. In vitro

1) 항산화 효능

(1) DPPH radical 소거능

JGS 추출물의 DPPH 소거율을 측정된 결과, 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $2.4 \pm 0.5\%$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $3.3 \pm 0.7\%$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $6.9 \pm 0.6\%$, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $24.8 \pm 1.1\%$ 로 나타나 radical 소거능이 농도 의존적으로 증가함을 보였다(Fig. 2).

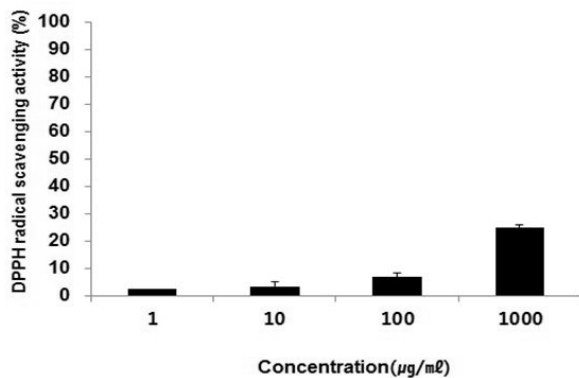


Fig. 2. DPPH free radical scavenging activity of JGS extract at various concentration. Extract was incubated with DPPH solution at 37°C for 30 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 517 nm. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments. ELISA reader 405 nm.

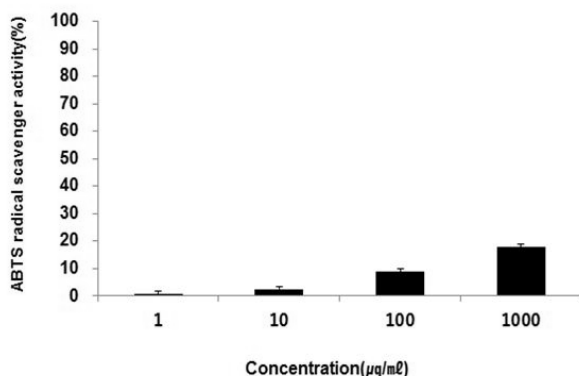


Fig. 3. ABTS cation radical scavenging activity of JGS extract at various concentration. Extract was incubated with ABTS solution at 37°C for 10 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 732 nm. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

(2) ABTS radical 소거능

JGS 추출물의 ABTS 소거율을 측정된 결과, 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $0.7 \pm 1.6\%$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $2.6 \pm 0.9\%$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $8.9 \pm 1.1\%$, 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $17.7 \pm 3.6\%$ 로 나타나 radical 소거능이 농도 의존적으로 증가함을 보였다(Fig. 3).

2) 항염증 효능

(1) NO 생성량

RAW 264.7 cell에서 JGS 추출물의 NO 생성량을 측정된 결과, 정상군에서 $42.8 \pm 8.0\%$, 대조군에서 $100.0 \pm 6.2\%$, JGS 추출물은 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $64.0 \pm 8.6\%$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $64.4 \pm 8.1\%$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 $56.2 \pm 9.4\%$ 로 나타났다(Fig. 4).

(2) Cytokine 생성량

① IL-1 β

RAW 264.7 cell에서 JGS 추출물의 IL-1 β 생성량을 측정된 결과, 정상군에서 12.6 ± 1.0 pg/ml, 대조군에서 48.0 ± 6.2 pg/ml, JGS 추출물은 1 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 41.3 ± 7.6 pg/ml, 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 29.7 ± 5.9 pg/ml, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 33.9 ± 7.9 pg/ml로 나타나, 대조군에 비하여 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유의한(*: $p < 0.05$) 감소를 보였다(Fig. 5).

② IL-6

RAW 264.7 cell에서 JGS 추출물의 IL-6 생성량을 측정

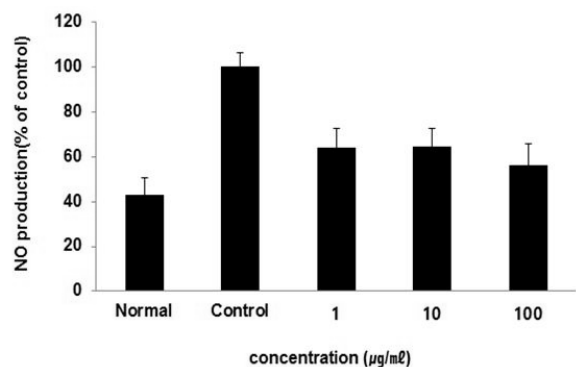


Fig. 4. Effect of JGS extract on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cell was treated with 1, 10 and 100 $\mu\text{g/ml}$ of JGS extract and LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hr. The amount of nitric oxide in supernatant was measured using Griess reagent. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments (No significant changes among the groups).

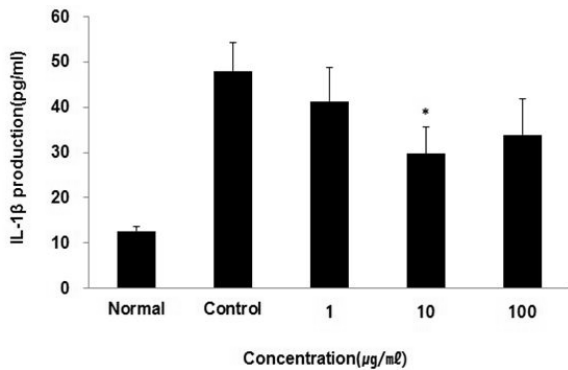


Fig. 5. Effect of JGS extract on LPS-induced IL-1 β production in RAW 264.7 cells, RAW 264.7 cells were treated with 1, 10 and 100 μ g/ml of JGS extract in the presence of LPS (1 μ g/ml) for 24 hr. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments (Significance of results, *: $p < 0.05$ compared to control).

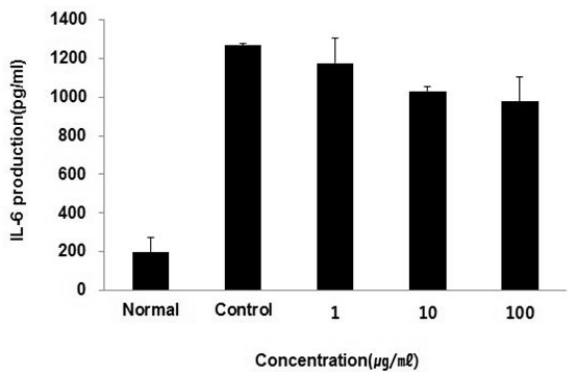


Fig. 6. Effect of JGS extract on LPS-induced IL-6 production in RAW 264.7 cells, RAW 264.7 cells were treated with 1, 10 and 100 μ g/ml of JGS extract in the presence of LPS (1 μ g/ml) for 24 hr. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments (No significant changes among the groups).

한 결과, 정상군에서 200.6 \pm 71.3 pg/ml, 대조군에서 1269.3 \pm 8.9 pg/ml, JGS 추출물은 1 μ g/ml 농도에서 1176.9 \pm 128.6 pg/ml, 10 μ g/ml 농도에서 1029.7 \pm 26.4 pg/ml, 100 μ g/ml 농도에서 977.6 \pm 128.6 pg/ml로 나타났다(Fig. 6).

③ TNF- α

RAW 264.7 cell에서 JGS 추출물의 TNF- α 생성량을 측정된 결과, 정상군에서 573.0 \pm 52.3 pg/ml, 대조군에서 6451.3 \pm 557.6 pg/ml, JGS 추출물은 1 μ g/ml 농도에서 6159.8 \pm 718.5 pg/ml, 10 μ g/ml 농도에서 6055.7 \pm 188.1

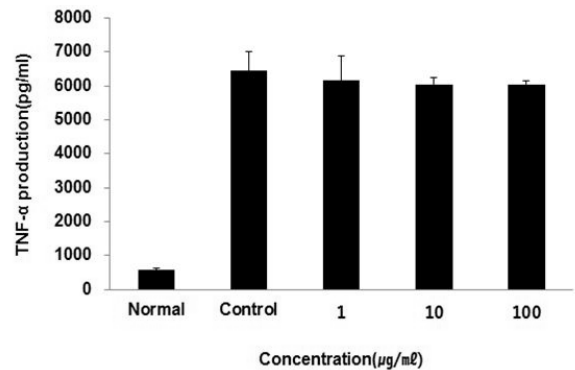


Fig. 7. Effect of JGS extract on LPS-induced TNF- α production in RAW 264.7 cells, RAW 264.7 cells were treated with 1, 10 and 100 μ g/ml of JGS extract in the presence of LPS (1 μ g/ml) for 24 hr. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments (No significant changes among the groups).

pg/ml, 100 μ g/ml 농도에서 6051.7 \pm 94.4 pg/ml로 나타났다(Fig. 7).

3. In vivo

1) Osteocalcin 생성량

JGS 투여가 osteocalcin 생성량에 미치는 영향을 확인하고자 두개골 골절을 유발한 0주차부터 6주차까지 2주 간격으로 혈청을 채취하여 측정된 결과, 정상군은 0주차에서 316.1 \pm 50.5 ng/ml, 2주차에서 588.9 \pm 33.6 ng/ml, 4주차에서 410.4 \pm 42.9 ng/ml, 6주차에서 195.7 \pm 41.1 ng/ml의 결과가 나타났으며, 대조군은 0주차에서 211.9 \pm 85.7 ng/ml, 2주차에서 240.7 \pm 1.5 ng/ml, 4주차에서 252.3 \pm 86.2 ng/ml, 6주차에서 152.1 \pm 35.4 ng/ml의 결과가 나타났다. JGS 200 mg/kg 투여군은 0주차에서 184.7 \pm 96.1 ng/ml, 2주차에서 363.9 \pm 17.6 ng/ml, 4주차에서 315.9 \pm 47.8 ng/ml, 6주차에서 202.6 \pm 34.5 ng/ml의 결과가 나타났으며, JGS 400 mg/kg 투여군은 0주차에서 232.6 \pm 138.1 ng/ml, 2주차에서 329.2 \pm 91.6 ng/ml, 4주차에서 284.0 \pm 35.8 ng/ml, 6주차에서 230.0 \pm 58.8 ng/ml의 결과가 나타나, JGS 200, 400 mg/kg 투여군은 실험 2주차에서 대조군에 비해 유의한(**: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$) 증가를 보였다(Fig. 8).

2) Calcitonin 생성량

JGS 투여가 calcitonin 생성량에 미치는 영향을 확인하

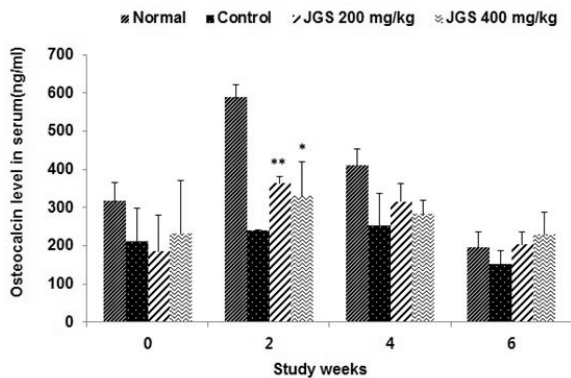


Fig. 8. Effect of JGS on the level of osteocalcin in the serum of skull fractured rat. The results were represent the mean±S.D. (Significance of results, **: p<0.01, *: p<0.05 compared to control) (n=6).

Normal: Non treated Rat, Control: The skull fractured rats were treated orally with DW, JGS 200: The skull fractured rats were treated orally with JGS 200 mg/kg/day, JGS 400: The skull fractured rats were treated orally with JGS 400 mg/kg/day.

고자 두개골 골절을 유발한 0주차부터 6주차까지 2주 간격으로 혈청을 채취하여 측정된 결과, 정상군은 0주차에서 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 결과가 나타났다. JGS 200 mg/kg 투여군은 0주차에서 3.7±0.4 pg/ml, 2주차에서 2.3±0.7 pg/ml, 4주차에서 2.5±2.2 pg/ml, 6주차에서 1.3±0.1 pg/ml의 결과가 나타났으며, JGS 400 mg/kg 투여군은 0주차에서 3.9±1.6 pg/ml, 2주차에서 2.2±0.4 pg/ml, 4주차에서 2.0±1.1 pg/ml, 6주차에서 11.9±2.0 pg/ml의 결과가 나타나, JGS 400 mg/kg 투여군은 실험 6주차에서 대조군에 비해 유의한(*: p<0.05) 증가를 보였다(Fig. 9).

3) CTX II 생성량

JGS 투여가 CTX II 생성량에 미치는 영향을 확인하고자 두개골 골절을 유발한 0주차부터 6주차까지 2주 간격으로 혈청을 채취하여 측정된 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 결과가 나타났다. JGS

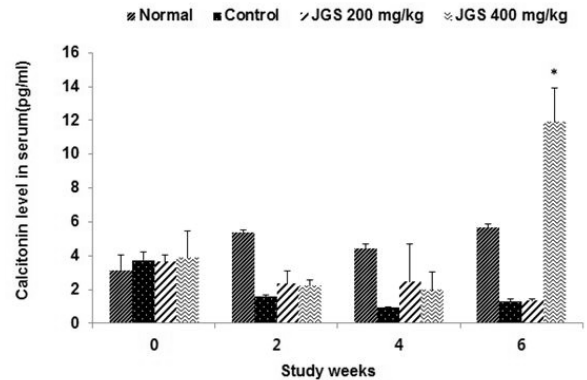


Fig. 9. Effect of JGS on the level of calcitonin in the serum of skull fractured rat. The results were represent the mean±S.D. (Significance of results, *: p<0.05 compared to control) (n=6).

Normal: Non treated Rat, Control: The skull fractured rats were treated orally with DW, JGS 200: The skull fractured rats were treated orally with JGS 200 mg/kg/day, JGS 400: The skull fractured rats were treated orally with JGS 400 mg/kg/day.

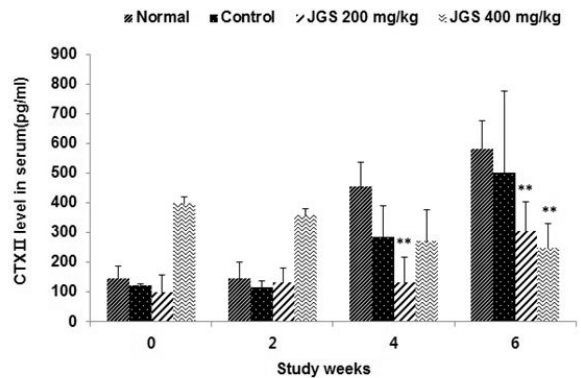


Fig. 10. Effect of JGS on the level of CTX II in the serum of skull fractured rat. The results were represent the mean±S.D. (Significance of results, **: p<0.01 compared to control) (n=6).

Normal: Non treated Rat, Control: The skull fractured rats were treated orally with DW, JGS 200: The skull fractured rats were treated orally with JGS 200 mg/kg/day, JGS 400: The skull fractured rats were treated orally with JGS 400 mg/kg/day.

200 mg/kg 투여군은 0주차에서 99.3±58.3 pg/ml, 2주차에서 132.2±48.9 pg/ml, 4주차에서 130.6±88.6 pg/ml, 6주차에서 305.3±99.0 pg/ml의 결과가 나타났으며, JGS 400 mg/kg 투여군은 0주차에서 397.3±21.6 pg/ml, 2주차에서 357.3±24.9 pg/ml, 4주차에서 272.4±103.7 pg/ml, 6주차에서 246.6±85.8 pg/ml의 결과가 나타나, JGS 200 mg/kg 투여군은 실험 4주, 6주차에서, 400 mg/kg 투여군은 실험 6주차에서 대조군에 비해 유의한(**: p<0.01) 감소를 보였다(Fig. 10).

4) TGF- β 생성량

JGS 투여가 TGF- β 생성량에 미치는 영향을 확인하고자 두개골 골절을 유발한 0주차부터 6주차까지 2주 간격으로 혈청을 채취하여 측정된 결과, 정상군은 0주차에서 4930.2 ± 437.0 pg/ml, 2주차에서 6492.8 ± 597.7 pg/ml, 4주차에서 5596.5 ± 894.6 pg/ml, 6주차에서 4199.6 ± 749.3 pg/ml의 결과가 나타났으며, 대조군은 0주차에서 11711.5 ± 1817.9 pg/ml, 2주차에서 7852.2 ± 1026.7 pg/ml, 4주차에서 9061.8 ± 1320.1 pg/ml, 6주차에서 7069.1 ± 1349.9 pg/ml의 결과가 나타났다. JGS 200 mg/kg 투여군은 0주차에서 12964.6 ± 1399.1 pg/ml, 2주차에서 11602.8 ± 504.7 pg/ml, 4주차에서 10269.1 ± 3476.1 pg/ml, 6주차에서 11403.7 ± 1626.0 pg/ml의 결과가 나타났으며, JGS 400 mg/kg 투여군은 0주차에서 10209.7 ± 1396.8 pg/ml, 2주차에서 10004.5 ± 1176.1 pg/ml, 4주차에서 11510.0 ± 1106.7 pg/ml, 6주차에서 8026.5 ± 794.4 pg/ml의 결과가 나타나, 200 mg/kg 투여군은 실험 2주차에서 대조군에 비해 유의한(**: $p < 0.01$) 증가를 보였다(Fig. 11).

5) BMP-2 생성량

JGS 투여가 BMP-2 생성량에 미치는 영향을 확인하고자 두개골 골절을 유발한 0주차부터 6주차까지 2주 간격으로 혈청을 채취하여 측정된 결과, 정상군은 0주차에서

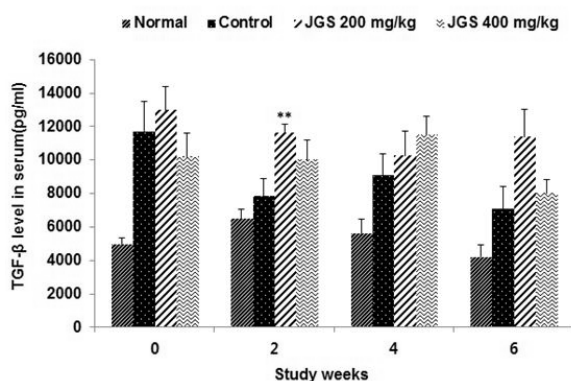


Fig. 11. Effect of JGS on the level of TGF- β in the serum of skull fractured rat. The results were represent the mean \pm S.D. (Significance of results, **: $p < 0.01$ compared to control) (n=6). Normal: Non treated Rat, Control: The skull fractured rats were treated orally with DW, JGS 200: The skull fractured rats were treated orally with JGS 200 mg/kg/day, JGS 400: The skull fractured rats were treated orally with JGS 400 mg/kg/day.

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 결과가 나타났다. JGS 200 mg/kg 투여군은 0주차에서 77.9 ± 2.5 pg/ml, 2주차에서 61.2 ± 4.6 pg/ml, 4주차에서 66.5 ± 5.7 pg/ml, 6주차에서 58.8 ± 2.3 pg/ml의 결과가 나타났으며, JGS 400 mg/kg 투여군은 0주차에서 58.3 ± 4.0 pg/ml, 2주차에서 63.2 ± 0.6 pg/ml, 4주차에서 60.8 ± 1.3 pg/ml, 6주차에서 69.9 ± 6.3 pg/ml의 결과가 나타나, 그룹 간에 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 12).

6) Insulin 생성량

JGS 투여가 insulin 생성량에 미치는 영향을 확인하고자 두개골 골절을 유발한 0주차부터 6주차까지 2주 간격으로 혈청을 채취하여 측정된 결과, 정상군은 0주차에서 76.0 ± 4.6 μ U/ml, 2주차에서 80.0 ± 5.9 μ U/ml, 4주차에서 68.8 ± 6.8 μ U/ml, 6주차에서 44.5 ± 6.2 μ U/ml의 결과가 나타났으며, 대조군은 0주차에서 386.9 ± 29.8 μ U/ml, 2주차에서 691.4 ± 57.6 μ U/ml, 4주차에서 578.5 ± 116.8 μ U/ml, 6주차에서 582.3 ± 102.9 μ U/ml의 결과가 나타났다. JGS 200 mg/kg 투여군은 0주차에서 486.3 ± 21.3 μ U/ml, 2주차에서 321.4 ± 54.7 μ U/ml, 4주차에서

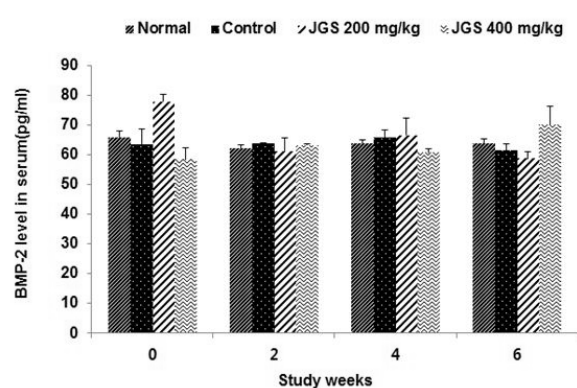


Fig. 12. Effect of JGS on the level of BMP-2 in the serum of skull fractured rat. The results were represent the mean \pm S.D. (n=6). There were no significant changes among the groups. Normal: Non treated Rat, Control: The skull fractured rats were treated orally with DW, JGS 200: The skull fractured rats were treated orally with JGS 200 mg/kg/day, JGS 400: The skull fractured rats were treated orally with JGS 400 mg/kg/day.

331.9±61.4 μU/ml, 6주차에서 326.8±33.5 μU/ml의 결과가 나타났으며, JGS 400 mg/kg 투여군은 0주차에서 415.3±16.4 μU/ml, 2주차에서 387.4±68.5 μU/ml, 4주차에서 312.6±79.2 μU/ml, 6주차에서 243.5±

20.6 μU/ml의 결과가 나타나, JGS 200, 400 mg/kg 투여군은 실험 2, 4, 6주차에서 대조군에 비해 유의한(***: p<0.001, **: p<0.01) 감소를 보였다(Fig. 13).

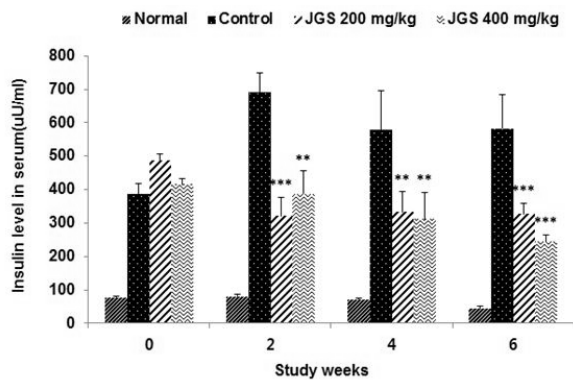


Fig. 13. Effect of JGS on the level of insulin in the serum of skull fractured rat. The results were represent the mean±S.D. (Significance of results, ***: p<0.001, **: p<0.01 compared to control) (n=6).

Normal: Non treated Rat, Control: The skull fractured rats were treated orally with DW, JGS 200: The skull fractured rats were treated orally with JGS 200 mg/kg/day, JGS 400: The skull fractured rats were treated orally with JGS 400 mg/kg/day.

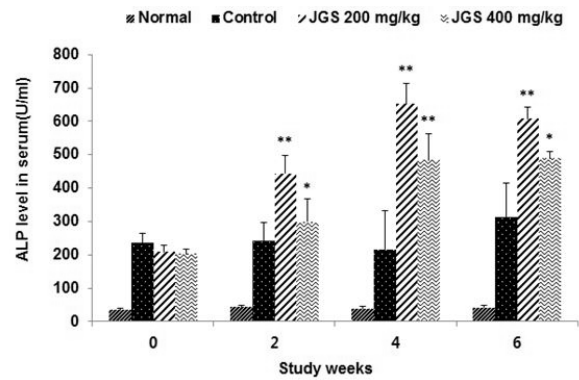


Fig. 14. Effect of JGS on the level of ALP in the serum of skull fractured rat. The results were represent the mean±S.D. (Significance of results, **: p<0.01, *: p<0.05 compared to control) (n=6).

Normal: Non treated Rat, Control: The skull fractured rats were treated orally with DW, JGS 200: The skull fractured rats were treated orally with JGS 200 mg/kg/day, JGS 400: The skull fractured rats were treated orally with JGS 400 mg/kg/day.

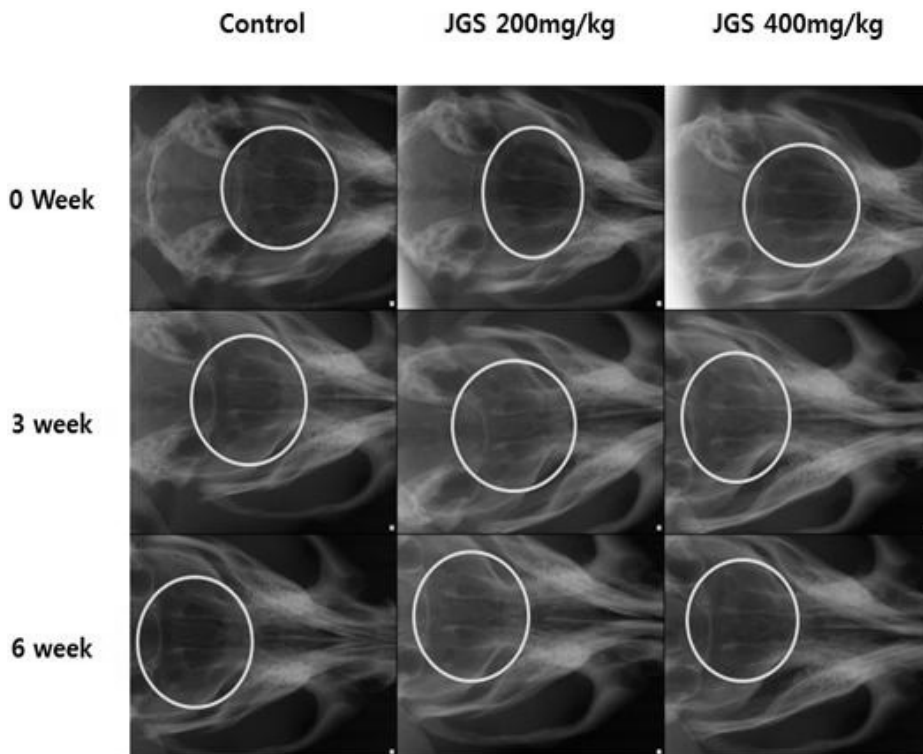


Fig. 15. Effects of JGS on imaging of metopic synostosis using X-ray in skull fractured rat. All skull were radiographed with a portable X-ray system after anesthesia of rat. Yellow circle indicated the fracture site.

Control: The skull fractured rats were treated orally with DW, JGS 200: The skull fractured rats were treated orally with JGS 200 mg/kg/day, JGS 400: The skull fractured rats were treated orally with JGS 400 mg/kg/day.

7) ALP 생성량

JGS 투여가 ALP 생성량에 미치는 영향을 확인하고자 두개골 골절을 유발한 0주차부터 6주차까지 2주 간격으로 혈청을 채취하여 측정된 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 결과가 나타났다. JGS 200 mg/kg 투여군은 0주차에서 207.6 ± 45.6 U/ml, 2주차에서 443.6 ± 77.4 U/ml, 4주차에서 652.8 ± 90.1 U/ml, 6주차에서 607.9 ± 114.2 U/ml의 결과가 나타났으며, JGS 400 mg/kg 투여군은 0주차에서 201.6 ± 47.6 U/ml, 2주차에서 298.7 ± 76.3 U/ml, 4주차에서 482.3 ± 33.4 U/ml, 6주차에서 489.8 ± 117.2 U/ml의 결과가 나타나, JGS 200, 400 mg/kg 투여군은 실험 2, 4, 6주차에서 대조군에 비해 유의한(**: $p < 0.001$, *: $p < 0.01$) 증가를 보였다 (Fig. 14).

4. 방사선 소견

JGS 투여가 두개골의 골절 유합에 미치는 영향을 확인하고자 두개골 골절을 유발한 0주부터 6주까지 3주 간격으로 X-ray 촬영을 한 결과, 대조군에서는 0주차부터 6주차까지 골절이 유발된 부위의 경계선이 뚜렷하게 보이고 유합이 많이 이루어지지 않아 뼈의 형태가 육안으로 관찰되지 않았다. 반면, JGS 200, 400 mg/kg 투여군은 3주차와 6주차로 실험이 진행될수록 경계선이 모호해지고 뼈의 윤곽이 뚜렷하게 보여 골절의 유합 과정이 진행되고 있었다. 두 그룹간의 비교 시 JGS 200 mg/kg 투여군이 JGS 400 mg/kg 투여군에 비하여 유합이 더 빠르게 진행되고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 15).

고찰»»»»»

골절이란 뼈나 골단판 혹은 관절면의 연속성이 완전 또는 불완전하게 소실된 상태를 말한다⁵⁾. 골절을 유발하는 원인으로는 교통사고, 추락 등의 외상, 골다공증 같은

질병으로 인한 뼈의 변화, 스포츠 활동이나 과도한 하중 등으로 반복적으로 뼈에 가해 지는 스트레스 등이 있다¹⁰⁾. 현대사회에서는 생활 수준의 향상으로 인한 취미 및 여가 활동의 증가와 수명연장에 따른 노인 인구의 증가로 인해 골절 질환 발생의 위험성이 높아지고 있다²⁾.

골절의 치유라 함은 뼈의 연속성이 비정상적으로 끊어진 상태에서 시작해 일련의 생리적 과정을 거쳐 뼈의 연속성이 회복되어 골격 본래의 부하를 견딜 수 있는 강도를 되찾기까지의 과정으로 일반적인 상처치유과정을 포함한 매우 복잡한 과정이다^{11,12)}. 골절의 치유는 염증기, 복원기 그리고 재형성기를 거치게 되며, 이 과정으로 손상된 뼈를 원래의 상태로 되돌리게 된다. 염증기에는 골절부위의 손상된 혈관으로부터 나온 혈액이 혈종을 형성하고, 이로 인해 생성된 괴사조직에 의해 염증반응이 유발되어 급성 부종을 일으킨다. 복원기에는 섬유아세포의 증식과 더불어 혈관신생을 동반한 육아조직으로 인해 기질화가 일어나고 진행하여 골절부위를 둘러싸는 연골과 가골이 형성되어 점차 연골내 골화 과정을 거처간다. 마지막으로 재형성기에는 형성된 가골이 점차 성숙층판성골로 바뀌는 한편, 과도하게 생성된 뼈가 파골세포에 의해 흡수되고 재형성된다⁵⁾.

골절의 치료방법은 크게 수술적 치료와 보존적 치료로 구분되며, 전위가 없는 안정골절은 뼈의 자연적인 치유 과정을 기대하여 보존적 치료를 선택하게 된다³⁾. 한방치료는 수술적 치료 후 유합을 촉진하거나 수술이 필요 없는 환자에게 적극적으로 활용하여 효과를 볼 수 있을 것으로 기대되나, 2014년 한방의료 이용 및 한약소비실태조사에 따르면, 전체 골절 환자의 2.0%만이 골절을 주소로 한방 의료기관을 이용한 것으로 나타났다¹³⁾. 이러한 실태는 석고나 부목고정, 수술 등의 정형외과적 처치가 필요한 경우가 많은 골절 질환의 특성에서도 기인하겠지만, 현재 한의사의 X-ray 사용이 원칙적으로 금지되어 있어 골절 질환에 대한 한의사의 접근자체를 막고 있는 것이 미치는 영향 또한 크다. 향후 골절 환자의 주연령층은 고령환자가 될 것이며, 전신상태가 나쁜 초고령 환자들은 비수술적 치료가 불가피하므로⁵⁾, 이러한 환자들에 있어 한약 치료는 가장 손쉬우면서도 효과적인 방법이 될 수 있다. 또한 한약 치료는 정형외과적 처치를 받은 골절 환자에게도 치료기간의 단축이나 후유증의 치료를 위해서도 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

골절의 한약 치료는 초기에 活血化癥, 消腫止痛 하는 약물을 사용하고, 중기에 接骨續斷하는 약물을 사용하며, 후기에 補氣養血, 補益肝腎, 強壯筋骨하는 약물을 사용하는 것⁶⁾이 대원칙이나, 국내에서 이루어진 골절의 한약 치료에 대한 실험적 연구는 총 8건에 불과하여 구체적인 처방이나 약물의 치료효과에 대한 연구는 미비한 실정이다⁷⁾.

이에 저자는 임상에서 가장 많이 쓰이는 서적 가운데 하나인 東醫寶鑑에서 처방을 골절 관련 처방을 선정하여 한약의 골절의 치료효과에 대한 실험을 계획하였다. 《東醫寶鑑·雜病編·諸傷》에는 골절에 사용할 수 있는 내복 약으로 5가지 처방이 제시되어 있는데⁸⁾, 이 중에서 草烏, 鱉甲 등 유독성 약제나 구하기 어려운 약제를 포함하여 임상에서 쉽게 사용하기 어려운 4가지 처방을 제외하여 接骨散을 선정하였고, 接骨散의 처방구성 중 麝香은 너무 고가인 관계로 본 실험에서는 제외하였다. 接骨散은 조선 시대 허준의 《東醫寶鑑·雜病編·諸傷》의 <骨折筋斷傷>에 기재된 처방으로 乳香, 沒藥, 自然銅, 滑石, 龍骨, 赤石脂, 麝香으로 구성되어 있다. 乳香은 活血止痛, 消腫生肌하고, 沒藥은 散血祛瘀, 消腫定痛하며, 自然銅은 散瘀止痛, 接骨續筋하고, 滑石은 利水通淋, 清熱解暑, 祛濕斂瘡하며, 龍骨은 鎮痙安神, 斂汗固精, 止血瀉腸, 生肌斂瘡하고, 赤石脂는 瀉腸, 止血, 生肌斂瘡한다¹⁴⁾. 이러한 약물들의 개별 효능들을 종합하여 보면, 接骨散은 어혈을 제거하고 염증을 가라앉히며 상처의 치유를 촉진하는 방향으로 골절 치료에 사용할 수 있다.

이에 저자는 接骨散이 골절치유에 미치는 영향을 알아보기 위해 RAW 264.7 cell에서 항산화 및 항염증의 효능을 측정하였다. 또한, 두개골 골절을 유발한 SD Rat에게 혈청 검사 및 방사선 검사를 실시하였다.

JGS 투여군은 RAW 264.7 cell에서 세포 독성을 측정 한 결과, 세포생존율이 95% 이상으로 나타나 안전한 것으로 확인되었다(Fig. 1).

활성산소는 세포의 대사과정 중 지속적으로 생성되는 부산물로 산소 free radical 및 이들로부터 생성되는 산소 화합물을 말한다. 불안정하고 반응성이 높아 체내의 여러 생체 물질과 쉽게 반응해 세포막손상, 지질산화, 단백질 분해 등을 포함한 세포대사의 이상을 초래하여¹⁵⁾, 세포대사의 이상¹⁶⁾, 지방간, 간경변증, 동맥경화, 심혈관계 질환¹⁷⁾, 암¹⁸⁾, 노화¹⁹⁾ 등 인체에 다양한 손상을 일으킨다.

골절이 발생하면 해당 병소에서 활성산소가 발생하고²⁰⁾,

위에 언급한 바와 같이 여러 세포의 손상을 가져온다. 따라서 골절의 회복 과정 중 항산화는 이러한 골절유합을 촉진시키는 하나의 요소가 된다.

DPPH와 ABTS는 모두 항산화 활성의 지표로 다용되고 있다. DPPH는 항산화 물질과 반응하여 음이온 radical이 소거되면서 보라색에서 노란색으로 탈색되는 원리로 항산화 활성을 측정하는데 사용된다²¹⁾. ABTS는 항산화 물질과 반응하여 양이온 radical이 소거되면서 청록색에서 무색으로 탈색되는 원리로 항산화 활성을 측정하는데 사용된다²²⁾. 본 연구에서는 JGS 추출물의 항산화 효과에 대해 알아보하고자 JGS 추출물의 DPPH radical 소거능 및 ABTS radical 소거능을 측정하였다. 그 결과 JGS 추출물은 DPPH와 ABTS radical 소거능이 모두 농도 의존적으로 증가하여 항산화 활성을 보였다(Fig. 2, 3).

염증은 병원균 침입이나 조직손상에 의해 일어나는 선천성 면역반응의 전형적인 특징이다²³⁾. 이러한 염증 반응은 cytokine, prostaglandin E2, lysosomal enzyme, free radical 등 여러 매개물질이 관여되어 있다. 대식세포에서는 골절과 같은 외부자극으로 인한 염증반응으로 인해 IL-6와 TNF- α 같은 염증성 cytokine의 발현이 일어나고, inducible nitric oxide (iNO)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)를 코딩하는 유전자의 발현을 유도하여 nitric oxide (NO), PGE2 등의 염증인자를 생성하게 한다²⁴⁻²⁶⁾.

NO는 염증반응을 조절할 수 있다고 알려져 있으며, 다른 free radical과 쉽게 반응하고 생체내에서 혈관의 확장, 신경전달체제, 면역조절, 항균물질 등의 작용에 관여한다²⁷⁾. NO는 전염증성 혹은 항염증성 작용을 가지고 있으나, 생체 내에서 고농도의 NO는 숙주세포의 파괴, shock으로 인한 혈관확장, 염증반응 유발에 의한 조직 상해를 초래할 수 있는 이중적 성질을 가지고 있다²⁸⁻³²⁾.

단핵구와 림프구에서 생성되는 cytokine들 가운데 특히, TNF- α , IL-1 β , IL-6 등은 골아세포의 활성화와 파골세포의 형성 및 활성화에 관련된 대표적인 국소인자이다³³⁾.

TNF- α 는 골세포에서 골구조의 국소적 조절인자로서 중요한 역할을 담당하고 있는데, 골아세포의 collagen과 ALP의 합성을 억제하고³⁴⁾, osteocalcin 유전자 발현을 억제한다³⁵⁾. 또한 TNF- α 는 IL-6와 함께 대식세포 집락자극인자를 증진시켜서 파골세포로의 분화를 촉진하고 골아세포의 기능에 강력한 억제효과를 보인다³⁶⁾. IL-1 β 는 파골세포의 조혈전구세포 증식 및 분화를 촉진하여 골흡수

가 일어나도록 하며, 성숙 파골세포의 골흡수를 활성화시킨다^{37,38)}. IL-6는 골아세포에서 분비되어 주변에 있는 전 파골세포의 소집 및 증식을 증가시킴으로써 골흡수를 촉진시킨다³⁹⁾.

다른 외상의 경우와 같이 골절은 순차적인 염증반응이 일어난다. 골절발생시 수반되는 염증반응에 대한 JGS 추출물의 항염증효과를 알아보려고 본 연구에서는 RAW 264.7 cell에서 염증인자인 NO와 염증매개인자인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성량을 측정하였다. NO의 생성량은 대조군에 비하여 감소하였지만 유의성은 없었다(Fig. 4). IL-1 β 는 대조군에 비하여 10 μ g/ml의 농도에서 유의한 감소($p < 0.05$)를 나타내었다(Fig. 5). IL-6와 TNF- α 는 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다(Fig. 6, 7). 위의 결과로 보아 JGS 추출물은 항염증 효과가 없었다.

일반적으로 골절부위는 과잉의 가골을 형성한 뒤 파골세포, 골아세포가 관여하여 자가 교정을 일으켜 뼈가 재형성되고 점차적으로 원래의 형태를 갖추게 된다⁴⁰⁾. 이러한 골절의 유합과정은 여러 국소적 인자와 전신적 인자가 관여하는데 이 과정 중에 장애가 발생되면 골절유합이 늦어지거나 정상적인 골절유합으로 이행되지 못하게 된다⁴¹⁾. 결국 골형성과 골흡수의 부단한 반복을 통해 골절유합의 과정이 완성되는 것이다.

골대사의 생화학적 지표는 골형성과 골흡수를 반영하는 지표로 나뉜다. 골형성지표는 골아세포가 생산하는 효소 또는 단백을 측정하거나, 골형성과정 중 유리되는 성분을 측정한다. 골흡수지표는 파골세포에서 만들어 내는 효소를 측정하거나 골흡수과정 중 유리되는 골기질 성분을 측정한다. 대표적인 골형성지표에는 ALP, OC 등이 있고, 대표적인 골흡수지표에는 Urinary pyridinium crosslinks, CTX, NTX, TRAP, ICTP 등이 있다⁴²⁾. 전반적으로 골절치환의 치유과정에 있어서는 골형성이 활성화 되고, 골흡수가 억제되어야 하며, 이러한 골형성지표나 골흡수지표를 통해 골절의 치료효과를 가늠할 수 있다.

뼈에서 칼슘은 두 가지 기전으로 유리되는데, 하나의 기전은 hydroxyapatitecrystal에서 간질액으로의 단순한 칼슘이온 전이이며, 이 과정은 빠르게 일어난다. 두 번째 기전은 부갑상선 호르몬이 골기질의 흡수를 촉진시키는 파골세포 수를 증가시키거나 활성화시킴으로써 칼슘을 유리시킨다⁴³⁾. 부갑상선 호르몬과 반대로 osteocalcin은 갑상선에서 합성되어 골기질 흡수를 방해한다. 골대사에서 골형성

과 골흡수가 짝지워져 일어날 때 이를 골재형성 또는 골대사회전이라 한다^{44,45)}.

Osteocalcin은 뼈와 상아질에만 특이적으로 분포하고, 뼈를 구성하는 비콜라겐성 단백질의 20%를 차지한다⁴⁶⁾. Osteocalcin은 뼈의 석회화 과정에 관여하며 골아세포의 후기분화를 반영하는 지표로 골아세포에서 만들어져 뼈의 세포외기질에 축적되는데 새롭게 합성된 것의 약 30%가 혈중으로 방출되므로 이것을 측정하면 골형성 정도를 예측할 수 있다⁴⁷⁾.

JGS 200, 400 mg/kg투여군은 혈청 내 osteocalcin의 생성량이 2주차에 증가하였으며, 그 후에는 약물 투여기간이 지속될수록 osteocalcin의 생성량이 감소하였다. 2주, 4주, 6주차에 osteocalcin의 생성량이 JGS 200, 400 mg/kg투여군은 대조군에 비해 증가되어 있었으며, 특히 2주차에 JGS 200, 400 mg/kg투여군은 대조군에 비해 유의한($p < 0.01$, $p < 0.05$) 증가를 나타내었다(Fig. 8).

Calcitonin은 부갑상선 호르몬, Vit. D3와 함께 칼슘대사를 조절하는 세 가지 중요한 호르몬의 하나이다. 혈중 칼슘 농도가 조금만 올라가도 calcitonin은 파골세포에 작용하여 파골세포의 운동과 기능을 억제하고 세포의 증식을 억제함으로써, 골흡수를 억제하여 칼슘 농도를 낮춘다. 부갑상선 호르몬과 서로 길항작용을 통해 세포외액의 칼슘 농도를 좁은 범위 안에서 일정하게 유지 시킨다⁴⁸⁾. 즉 증가된 수치의 calcitonin은 골흡수의 억제가 이루어지는 상황을 반영한다.

2주, 4주, 6주차에 calcitonin의 혈청 내 생성량이 JGS 200, 400 mg/kg투여군은 대조군에 비해 증가되어 있었으며, 특히 6주차에 JGS 400 mg/kg투여군은 대조군에 비해 유의한($p < 0.05$) 증가를 나타내었다(Fig. 9).

CTX는 뼈의 손상이 있을 때 혈중으로 유리되는 콜라겐 물질으로 소변 및 혈액검사를 통해서 골 흡수상태를 알 수 있는 지표이다⁴⁹⁾.

혈청 내 CTX II 생성량이 JGS 200, 400 mg/kg투여군은 2주차에는 대조군에 비해 증가되었으나 4주, 6주차에는 대조군에 비해 감소되어 있었으며, JGS 200 mg/kg투여군은 4주, 6주차에서, JGS 400 mg/kg투여군은 6주차에서 대조군에 비해 유의한($p < 0.01$) 감소를 나타내었다(Fig. 10).

골절의 치유에는 여러 가지 cytokine과 growth factor들이 기질형성의 조절에 관여하는데, 세포의 증식을 촉진

하고 세포의 분화와 대사 기능에 영향을 끼친다. 골질의 치유과정 중 세포의 기질성분과 성장조절 물질의 유전자 조절에 관한 연구에 의하면 이차적인 가골 형성 시 교원질, proteoglycan, 및 기타 기질 단백질에 대한 유전자가 연차적으로 발현되고, 비특이적 간질, 연골, 골 성분의 시간적 혹은 공간적 출현이 각각의 특징적인 성분을 조절하는 유전자의 발현과 연관됨이 밝혀지고 있다⁵⁰. 이러한 과정은 TGF- β 에 속하는 물질에 의해 조절되는데 이중 BMP는 연골형성과 골형성을 조절하는 중요한 물질임이 밝혀졌고, TGF- β 계열의 성장인자 외에도 FGFs, IGFs, PDGF 등이 골조직의 성장과 분화에 중요한 역할을 담당한다⁵¹. BMP-2는 섬유아세포를 골아세포로 전환시켜주는 유전 단백질인 BMPs⁵² 중 하나로 골형성에 있어 매우 중요한 역할을 하고 있다. BMP-2를 비롯하여 BMP-4, BMP-7 등은 골형성과 성장과정에 광범위 하고 다양하게 영향을 미친다^{53,54}. BMP-2는 *in vivo*에서 동종 및 이종의 골형성을 강력하게 유도한다고 알려져 있을 뿐 아니라, *in vitro*에서도 전골아세포 혹은 미분화된 줄기세포를 골아세포로 분화시킨다⁵⁵.

TGF- β 는 골의 발생, 유도 및 복원의 가장 중요한 조절인자로^{56,57}, 골아세포의 이동과 증식을 조절하고, 세포간질 단백질의 생산과 분해를 조절하여⁵⁸, 골형성의 지표가 된다.

2주, 4주, 6주차에 혈청 내 TGF- β 의 생성량이 JGS 200, 400 mg/kg투여군은 대조군에 비해 증가되어 있었으며, JGS 200 mg/kg투여군은 2주차에서 대조군에 비해 유의한($p < 0.01$) 증가를 나타내었다(Fig. 11).

BMP-2의 생성량이 JGS 200 mg/kg투여군은 4주차, JGS 400 mg/kg투여군은 6주차에서 대조군보다 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 12).

Insulin은 폴리펩티드 호르몬으로 직간접적으로 골대사와 골격의 재형성을 조절한다. 생쥐의 골아세포에 있는 기능적 인슐린 수용체는 그것이 활성화 될 때 골아세포의 증가를 자극하고 콜라겐 생산을 증가시킨다. 반대로 감소된 인슐린 레벨이나 신호전달 능력은 동물과 사람에게서 모두 뼈의 치유를 저하시킨다고 알려져 있다⁵⁹.

JGS 200, 400 mg/kg투여군은 혈청 내 insulin의 생성량이 대조군에 비해 감소하였고 이는 실험 종료시점까지 지속되었다. JGS 200, 400 mg/kg투여군은 2주, 4주, 6주차에 대조군에 비해 유의한($p < 0.001$, $p < 0.01$) 감소를

나타내었다(Fig. 13). 그러나 정상군에 비해서는 JGS 200, 400 mg/kg투여군의 혈청 내 insulin의 생성량이 증가되어 있으므로 이는 적절한 수준의 insulin 분비를 촉진하나 과도한 분비를 막는 것으로 해석해야 할 것이다.

ALP는 골아세포에서 분비되는 당단백질로 임상에서 가장 흔히 이용되는 골형성 표지자이다⁶⁰. ALP는 유기인산화합물을 가수분해하여 인산화 기질의 석회화를 촉진한다. 유골을 형성하는 골아세포는 다량의 ALP 활성을 가지기 때문에 혈청 중 ALP의 증가는 골의 무기질화를 시사한다⁶¹. 골절 후 ALP는 osteocalcin보다 먼저 증가하는데, 이는 골아세포가 분화하는 과정에서 골기질의 성숙시기에서는 ALP가 주로 발현되고 그 다음으로 무기질화의 진행에 따라 osteocalcin이 증가하기 때문이다⁶².

JGS 200, 400 mg/kg투여군은 혈청 내 ALP의 생성량이 대조군에 비해 증가하였고 이는 실험 종료시점까지 지속되었다. JGS 200, 400 mg/kg투여군은 2주, 4주, 6주차에 대조군에 비해 유의한($p < 0.001$, $p < 0.01$) 증가를 나타내었다(Fig. 14).

JGS 투여가 두개골의 골절 유합에 미치는 영향을 확인하고자 두개골 골절을 유발한 0주부터 6주까지 3주 간격으로 X-ray 촬영을 한 결과, 대조군에서는 0주차부터 6주차까지 골절이 유발된 부위의 경계선이 뚜렷하게 보이고 유합이 많이 이루어지지 않아 뼈의 형태가 육안으로 관찰되지 않았다. 반면, JGS 200, 400 mg/kg 투여군은 3주차와 6주차로 실험이 진행될수록 경계선이 모호해지고 뼈의 윤곽이 뚜렷하게 보여 골절의 유합 과정이 진행되고 있었다. 두 그룹간의 비교 시 JGS 200 mg/kg 투여군이 JGS 400 mg/kg 투여군에 비하여 유합이 더 빠르게 진행되고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 15).

이러한 결과를 볼 때, 接骨散은 골절의 치유 과정에서 골형성을 촉진하고 골흡수를 억제하는 한편, 호르몬의 조절을 통해 골절의 유합을 촉진하는 작용을 한다.

또한 방사선 검사 상 JGS 투여군이 대조군에 비해 골절의 유합이 촉진되는 결과를 육안적으로 확인할 수 있었다.

이상의 결과로 볼 때 接骨散은 골절의 유합과 관련된 인자들에 유의한 영향을 미쳐 골절의 치료에 사용할 수 있는 처방이며, 임상에서 적절한 변증시치를 통해 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

결론»»»»

接骨散이 골절 치유에 미치는 영향을 살펴보고자, RAW 264.7 cell을 이용하여 항산화와 항염증에 관한 효능을 평가하였으며, 두개골 골절을 유발한 SD Rat에 혈청 및 방사선 검사를 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 세포독성은 나타나지 않았다.
2. DPPH와 ABTS radical 소거능은 농도 의존적으로 증가되었다.
3. IL-1 β 는 10 μ g/ml 농도에서 유의한 감소를 나타내었으나, NO, IL-6, TNF- α 은 유의한 변화가 없어 항염증 효능은 나타나지 않았다.
4. Osteocalcin은 2주차에 JGS 200, 400 mg/kg 투여군에서 유의한 증가를 나타내었다.
5. Calcitonin은 6주차에 JGS 400 mg/kg 투여군에서 유의한 증가를 나타내었다
6. CTX II는 4주, 6주차에 JGS 200 mg/kg 투여군에서, 6주차에 JGS 400 mg/kg 투여군에서 유의한 감소를 나타내었다.
7. TGF- β 는 2주차에 JGS 200 mg/kg 투여군에서 유의한 증가를 나타내었다.
8. BMP-2는 그룹간에 큰 차이를 보이지 않았다.
9. Insulin은 2주, 4주, 6주차에 JGS 200, 400 mg/kg 투여군에서 유의한 감소를 나타내었다.
10. ALP는 2주, 4주, 6주차에 JGS 200, 400 mg/kg 투여군에서 유의한 증가를 나타내었다.
11. 방사선 검사상 JGS 200, 400 mg/kg 투여군에서 육안적으로 골절의 유합이 촉진됨이 관찰되었다.

이상과 같이 接骨散의 투여는 항산화 및 골절 치유과 관련이 있는 인자들에 있어서 유의한 결과를 나타냈고, 방사선 검사에서도 골절 유합이 촉진되는 것을 확인 할 수 있었다. 향후 임상에서도 골절치유에 적절히 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

References»»»»

1. Health Insurance Review & Assessment Service. Fracture patient statistics 2011 Jan-2015 Dec. [cited 2016 Nov 22]. Available from: URL: <http://opendata.hira.or.kr/op/opc/olapMfmIntrslnsInfo.do>.

2. 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.
3. The Korean Orthopaedic Association. Orthopaedics the 7th edition. Seoul:New medical publisher. 2013;87, 94-5, 1161-2, 1385-94.
4. Yeom IH, Oh MS, Song TW. Helling effect of Gamigung-guitang and Gamigungguit-angGaNokyong water extract on tibia fractured rats. Daejeon University, Institute of Kore-an Medicine. 1999;15:683.
5. The Korean Fracture Society. Principles of Fracture Management. Seoul:Panmuneduca-tion. 2013;3,10,40.
6. The Society of Korean Medicine Rehabilitation. Korean medicine rehabilitation. 2nd edition. Seoul:Koonja publisher 2008:201.
7. Bae KJ, Jeong JW, Jung MY, Kim SJ. Reviewing research on the treatment and study of fracture in Korean journals objective-Focus on domestic thesis. Journal of Korean Medicine Rahabilitation. 2015;25(3):27-8.
8. Heo Joon. Donguibogam. Seoul:Hanmi publisher. 2001: 934-5.
9. 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 anti-arthritic and disease modifying drugs. Osteoarthritis and Cartilage. 2002;10:960-7.
10. John W, Hole J. Human anatomy physiology Wm. C Brown publisher Oxford. 1993:170-227.
11. Hulth A. Current concepts of fracture healing. Clinical Orthopaedics & Related Research. 1989;249:265-84.
12. Forst HM. The biology of fracture healing: An overview for clinicians. Part I. Clinical Orthopaedics & Related Research. 1989;248:283-93.
13. Korean health industry development institute. Survey of utilization of Korean medical services and consumption of herbal medicine. 2014:129.
14. Korean medical herbalogy professors. Herbalogy. Seoul:Younglimsa. 2000:316, 411-2, 436, 492, 614.
15. Kim SH, Choi HJ, Oh HT, Cheng BC, Ham SS. Cytoprotective effect by antioxidant activity of Codonopsis lanceolata and Platycodon grandiflorum ethyl acetate fraction in human HepG2 cells. Korean Journal of Food Science and Technology. 2008;40(6):696-701.
16. Videla LA, Fernandez V. Biochemical aspects of cellular oxidative stress. Archivos de Biologia y Medicina Experimentales. 1998;21(1):85-92.
17. Kondo T, Hirose M, Kageyama K. Roles of oxidative stress and redox regulation in atherosclerosis. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis. 2009;16(5):532-8.
18. Fridovich I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. The Journal of Biological Chemistry. 1989;264(14):7761-4.

19. Shon MS, Song JH, Kim JS, Jang HD, Kim Gn. Antioxidant activity of oil extracted from Korean red Ginseng and its moisturizing function. *Korean Journal of Aesthet Cosmetol*. 2013;11(3):489-94.
20. Sheweita SA, Khoshhal KI. Calcium metabolism and oxidative stress in bone fractures: Role of antioxidants. *Current Drug Metabolism*. 2007;8(5):519-25.
21. Bondet V, Band-Williams W, Berset C. Kinetics and mechanism of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *LWT-Food Science and Technology*. 1997;30:609-15.
22. Fellegrini N, Ke R, Yang M, Rice-Evans C. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis (3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. *Methods in Enzymology*. 1999;299:379-89.
23. Dee Unglaub Silverthorn. *Human physiology 6th edition*. Seoul:Life Science. 2014:820.
24. Vinay Kumar, Abul K, Abbas, Nelson Fausto. *Pathologic basis of disease*. Philadelphia:Elsevier. 2005:47-86.
25. Storck M, Schilling M, Prestel R, Abendroth D, Burkhardt K, Prestel R, Hammer C. Production of proinflammatory cytokines and adhesion molecules in ex-vivo xenogeneic kidney perfusion. *Transplant International*. 1994;7(1):647-9.
26. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathology and pharmacology. *Pharmacological Reviews*. 1991;43:109-42.
27. David A, Winka, James B, Mitchell. *Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide*. *Free Radical Biology and Medicine*. 1998;25(4-5):434-56.
28. Kawamata H, Ochiai H, Mantani N, Terasawa K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW264.7 cells, a murine macrophage cell line. *American Journal of Chinese Medicine*. 2000;28(2):217-26.
29. Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW, Lee HW. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *European Journal of Pharmacology*. 2000;406(3):301-9.
30. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Chai KY, Yun YG, Kwon TO, Chung HT. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from *Cudrania tricuspidata* on the expression of nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophages stimulated with interferon- γ and lipopolysaccharide. *General Pharmacology*. 2000;35(1):21-8.
31. Chiou WF, Chou CJ, Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophages. *Life Science*. 2001;69:625-35.
32. Seo WG, Pae HO, Oh GS, Kim NY, Kwon TO, Shin MK, Chai KY, Chung HT. The aqueous extract of *Rhodiola sachalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001;76(1):119-23.
33. Kim CH, Kim DK, Park SI, Sohn KH, Kim GS. Effects of interleukin-6 on mRNA expression of alkaline phosphatase, osteocalcin, decorin and α 1(1)-collagen in human bone marrow stromal cell. *Endocrinology and Metabolism*. 1996;11(2):156-62.
34. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Tumor necrosis factor- α inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity independently of its effect on deoxyribonucleic acid synthesis in osteoblast-enriched bone cell cultures. *Endocrinology*. 1988;123(3):1442-8.
35. Nanes MS, Rubin J, Titus L, Hendy GN, Catherwood B. Tumor necrosis factor- α inhibits 1,25-dihydroxyvitamin D₃-stimulated bone Gla protein synthesis in rat osteosarcoma cells (ROS 17/2.8) by a pretranslational mechanism. *Endocrinology*. 1991;128(5):2577-82.
36. Felix R, Fleisch H, Elford PR. Bone-resorbing cytokines enhance release of macrophage colony-stimulating activity by the osteoblastic cell MC3T3-E1. *Calcified Tissue International*. 1989;44(5):356-60.
37. Pfeilschifter J, Chenu C, Bird A, Mundy GR, Roodman GD. Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclastlike cells in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1989;4(1):113-8.
38. Thomson BM, Saklatvala J, Chambers TJ. Osteoblasts mediate interleukin 1 stimulation of bone resorption by rat osteoclasts. *Journal of Experimental Medicine*. 1986;164(1):104-12.
39. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A, Yoshiki S, Matsuda T, Hirano T. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *Journal of Immunology*. 1990;145(10):3297-303.
40. Song KY. Seoul:Korea medical book publishing company. 1998:772.
41. Seong SC, Choi MH, Lee MC, Park SC, Song KY. Expression of osteocalcin and transglutaminase C during fracture healing and distraction osteogenesis in rat's tibia. *The Journal of the Korean Orthopaedic Association*. 1994;29(5):1312.
42. Kim DY. Biochemical markers of bone turnover. *Korean Journal Nuclear Medicine*. 1999;33(4):341-51.
43. Ross MH, Romred LJ, Kaye GI. *Histology a text and atlas 3rd edition*. Williams and Wilkins publisher. 1995:150-87.
44. Lee MS, Kim SY, Lee MC, Cho BY, Lee HK, Koh CS, Min HK. Negative correlation between the change in bone mineral density and serum osteocalcin in patients with hyperthyroidism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1990;70:766-70.

45. Song JH, Han KO, Kim DY, Woo JT, Kim SW, Yang IM, Kim JW, Kim YS, Choi YK. Markers of bone turnover and bone mineral density in hyperthyroidism and effects of treatment. *The Korean Society of Bone Metabolism*. 1994;1:177-85.
46. Hauschka PV, Carr SA. Calcium-dependent ahelical structure in osteocalcin. *Biochemistry*. 1982;21:2538-47.
47. Price PA, Parthermore JG, Doftos LJ. New biochemical marker for bone metabolism. *Journal of Clinical Investigation*. 1980;66:878-83.
48. Kim SW. Clinical endocrinology of calcitonin. *Journal of Korean Society of Endocrinology*. 1991;6(2):117.
49. Johason JS, Riis BJ, DELmas PD. Plasama BGP. An indicator of spontaneous bone loss and of effect of estrogen treatment in postmenopausal women. *European Journal of Clinical Investigation*. 1998;18:191-5.
50. Joyce ME, Robert AB, Sporn MB, Bolander ME. Transforming growth factor- β in the regulation of fracture repair. *The Orthopedic Clinics of North America*. 1990; 21(1):199-209.
51. Sandberg MM, Aro HT, Vuorio EI. Gene expression during bone repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1993;289:292-312.
52. Minina E, Wenzel HM, Kreschel C, Karp S, Gaffield W, McMahon AP, Vortkamp A. BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development*. 2001;128(22):4523-34.
53. Helvering LM, Sharp RL, Ou X, Geiser AG. Regulation of the promoters for the human bone morphogenetic protein 2 and 4 genes. *Gene*. 2000;256(1-2):123-38.
54. Kawai S, Sugigura T. Characterization of human bone morphogenetic protein(BMP)-4 and -7 gene promoters, activation BMP promotes by Gli, a sonic hedgehog mediator. *Bone*. 2001;29(1):54-61.
55. Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahachi N, Ikeeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara A, Suda T. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *Journal of Cell Biology*. 1994;127:1755-66.
56. Sampath TK, Muthukumaran N and Reddi AH. Isolation of osteogenin, an extracellular matrix associated, bone inductive protein, by heparin affinity chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987;84:7109-13.
57. Urist MR, DeLange RJ, Finerman GAM. Bone cell differentiation and growth factors. *Science*. 1983;220:680-6.
58. Lee KH, Lee YI, Cho KC, Oh IS, Lee JY, Kim SJ. Expression of TGF- β I and II ligands and receptors at epiphyseal plate and fracture callus. *Journal of Korean Orthopedic*. 1998;33(2):458-65.
59. Paglia D, Wey A, Breitbart EA, Faiwiszewski J, Mehta SK, Al-Zube L, Vaidya S, Cottrell JA, Graves D, Benevenia J, O'Connor JP, Lin S. Effects of local insulin delivery on subperiosteal angiogenesis and mineralized tissue formation during fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research*. 2013;31:783-91.
60. Kim DY. Biochemical markers of bone formation. *Korean Journal of Bone Metabolism*. 1994;1(1):233-9.
61. Yoo J, Johnstone B. The role of osteochondral progenitor cells in fracture repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1998;335:73-81.
62. 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.