

桂枝茯苓丸이 흰쥐의 골절유합에 미치는 영향

윤정원 · 김순중

세명대학교 한의과대학 한방재활의학교실

The Effect of Gyejibokryunghwan on Fracture Union in Tibia-fractured Rats

Jeong-Won Yoon, K.M.D., Soon-Joong Kim, K.M.D.

Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Oriental Medicine, Semyung University

RECEIVED September 12, 2019

ACCEPTED September 26, 2019

CORRESPONDING TO

Soon-Joong Kim, Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, Semyung University Korean Medicine Hospital, 66, Semyeong-ro, Jecheon 27136, Korea

TEL (043) 649-1920

FAX (043) 645-1382

E-mail kimsj@semyung.ac.kr

Copyright © 2019 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

Objectives The object of this study was to assess the effect of Gyejibokryunghwan (GBH) on anti-oxidant and anti-inflammatory activities in RAW 264.7 cells and on factors associated with fracture union in tibia-fractured rats.

Methods The 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity was measured to assess anti-oxidant activity. The production of nitric oxide (NO), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the RAW 264.7 cells were measured to assess anti-inflammatory activity. 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) in serum of tibia-fractured rats were measured to assess the effects of fracture union. X-rays were taken every two weeks from 0 to 4th week to assess fracture union effect.

Results DPPH radical scavenging activity of GBH was increased according to concentration of GBH in RAW 264.7 cell. NO, prostaglandin E₂ (PGE₂), IL-6, IL-1 β and TNF- α were significantly decreased, indicating anti-inflammatory effect. Osteocalcin, calcitonin, TGF- β were significantly increased in the experimental groups. CTX II was significantly decreased in the experimental groups. BMP-2 was not significantly changed in the experimental groups. The X-ray showed that the experimental group has better healing effects on tibia-fractured rats than control group.

Conclusions From above result, GBH has an effect on anti-oxidant, anti-inflammatory activities in RAW 264.7 cells. GBH showed significant results in factors related with fracture union and radiologic examination. In conclusion, GBH can help fracture union and it will be expected to be used actively in clinics. (**J Korean Med Rehabil 2019; 29(4):1-14**)

Key words Gyejibokryunghwan, Anti-oxidation, Anti-inflammatory, Fracture

서론»»»»

골절은 뼈에 가해지는 과도한 힘으로 인하여 뼈의 연속성이 일부 혹은 전체에서 상실된 것을 말하며 대개 주위의 연부조직 손상을 동반한다¹⁾. 골절이 발생하면 보통 통증과 압통, 종창, 기능장애 등의 국소증상이 나

타나며 심할 경우 호흡곤란, 쇼크 등의 전신증상이 나타날 수 있다²⁾.

골절은 손상 정도, 합병증의 유무, 손상 부위 등에 따라 수술적 치료 혹은 보존적 치료로 구분하여 치료하게 된다³⁾. 골절 치료의 궁극적인 목표는 골 유합을 유도하여 통증을 완화시키고, 기능을 회복시켜 본래의 생활로

복귀시키는 것이다¹⁾.

골절의 치유 과정은 보통 세 단계로 나누어 설명하는데 이는 염증기, 복원기, 재형성기이다⁴⁾. 이 과정에서 적절한 치료가 이루어지지 않을 경우 지연유합, 불유합, 관절변형, 외상성 관절염 등의 합병증이 유발될 수 있어 최적의 치료 계획을 세우는 것은 매우 중요하다²⁾.

골절의 한의학적 치료는 초기에 攻下逐瘀, 行氣消瘀, 清熱涼血하며 중기에 和營生新, 接骨續筋, 舒筋活絡하고 후기에 補氣養血, 調理脾胃, 補益肝腎하는 치법을 활용하며, 瘀血이라는 병적 개념을 도입하여 치료한다⁵⁾.

桂枝茯苓丸은 張仲景의 《金匱要略》에 처음 수록된 처방으로 桂枝, 茯苓, 牡丹皮, 桃仁, 赤芍藥으로 구성되어 있으며 하복부 瘀血로 인한 婦人의 癥病을 치료하며⁶⁾, 근래에 와서 남녀를 불문하고 瘀血 및 그로 인해 유발된 癥瘕 등의 병증에 활용되고 있다⁷⁾. 현재까지 계지복령환과 관련하여 시행된 연구는 자궁경부암⁷⁾, 자궁근종⁸⁾, 배란장애⁹⁾, 동맥경화¹⁰⁾, 혈전증¹¹⁾, 간암¹²⁾, 비알콜성 간염¹³⁾ 등 대부분 부인과 질환, 심혈관 질환 및 간장 질환 위주로 진행되어 왔다. 최근에는 피부부합 후의 상처¹⁴⁾, 근육타박상¹⁵⁾ 등과 같은 외상으로 인한 瘀血證에 대한 효과를 알아보는 연구로 범위가 넓어지고 있으나 골절 치료에 관한 연구는 미진한 실정이다.

이에 저자는 계지복령환이 瘀血에 의한 골절 초기 치료에 미치는 영향을 확인하고자 RAW 264.7 cell에서 계지복령환의 항산화 및 항염 효과를 살펴보았다. 또한 경골 골절을 유발시킨 Sprague Dawley rat (SD rat)에 계지복령환을 투여한 후 골절유합 관련 인자 및 방사선 검사를 시행하여 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법»»»»

1. 재료

1) 세포

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

2) 약재

본 실험에 사용한 계지복령환(Gyejibokryunghwan, GBH)은 (주)옴니허브(Daegu, Korea)에서 구입하였고, 처방의 구성은 《東醫寶鑑》¹⁶⁾에 근거하였다. 구성 약재와 분량(1첩)은 Table I과 같다.

3) 동물 및 사료

실험동물로 5주령의 수컷 SD rat (120~130 g)을 샘타코 BIO KOREA (Osan, Korea)로부터 공급받은 후 실험 당일까지 고품사료(Purina, Seongnam, Korea)와 물을 충분히 공급하며 온도는 22±2°C로 습도는 55±15%로 유지하여, 12시간-12시간(light-dark cycle) 환경에서 2주간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 적응 후 실험 시작일에 재측정한 SD rat의 체중은 162~172 g이었다. 본 연구의 동물 실험에 관한 모든 사항은 세명대학교 동물 실험윤리위원회의 승인을 받은 후 진행하였다(승인번호: smecae 18-12-01).

4) 시약

시약은 isopropanol (Sigma Co., Cookstown, NJ, USA), ethyl ether (Sigma Co.), Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM; Gibco BRL Co., New York, NY, USA), Dulbecco's phosphate buffered saline (Welgene, Gyeongsan, Korea), fetal bovine serum (FBS; Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA), dimethyl sulfoxide (Sigma Co.), lipopolysaccharide (LPS; Sigma Co.), 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH; Sigma Co.), 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), penicillin (Hyclone Co., Logan, UT, USA), streptomycin (Hyclone Co.), formaldehyde (Sigma Co.), trypan

Table I. The Compositions of Gyejibokryunghwan Extracts

Herb name	Pharmacognostic name	Amount (g)
Poria cocos Wolf	<i>Poria cocos</i>	6
Paeonia suffruticosa Andrews	<i>Moutan cortex</i>	6
Prunus persica	<i>Persicae semen</i>	6
Cinnamomum cassia Presl	<i>Cinnamomi ramulus</i>	6
Paeonia lactiflora Pallas	<i>Paeoniae radix</i>	6
Total		30

blue (Sigma Co.), Prostaglandin E₂ (PGE₂) ELISA Kit (R&D system, Minneapolis, MN, USA), interleukin-1β (IL-1β) ELISA Kit (Komatech, Daegu, Korea), interleukin-6 (IL-6) ELISA Kit (Komatech), tumor necrosis factor-α (TNF-α) ELISA Kit (Komatech), Osteocalcin ELISA Kit (R&D system), Calcitonin ELISA Kit (MyBioSource, San Diego, CA, USA), Rat cross-linked c-terminal telopeptides of type II Collagen ELISA Kit (CTXII; MyBioSource), transforming growth factor-β1 ELISA Kit (R&D system), bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) ELISA Kit (R&D system) 등을 사용하였다.

5) 기기

기기는 rotary vacuum evaporator (Bühi B-480 Co., Flawil, Switzerland), ELISA reader (Gen5 [Ver1.10]; BioTek Co., Winooski, VT, USA), 동결건조기(Freezezone 6; Labconco, Kansas City, MO, USA), CO₂ incubator (Forma Scientific Co., Marietta, OH, USA), clean bench (Vision Scientific Co., Daejeon, Korea), autoclave (Sanyo Co., Osaka, Japan), vortex mixer (Vision Scientific Co.), centrifuge (Sigma Co.), deep-freezer (Sanyo Co.), icemaker (Vision Scientific Co.), plate shaker (Lab-Line Co., Woburn, MA, USA), 동결건조기(IIShinBioBase, Dongducheon, Korea) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

GBH 5첩(150 g)에 4,000 mL의 Distilled Water를 넣고 4시간 동안 환류추출한 후에 여과액을 얻어 rotary vacuum evaporator를 이용하여 감압 농축을 하였다. 농축된 용액으로 freeze dryer를 이용해 동결건조된 분말 8.1 g을 얻었고(수득률 5.4%), 얻어진 분말은 초저온 냉동고(-80°C)에 보관하면서 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

2) RAW 264.7 cell의 배양

동결건조된 RAW 264.7 cell을 50 mL 튜브로 이동시켜 PBS 9 mL을 넣고 세포를 부유시킨 후에 1,200 rpm의 속도로 5분 동안 원심분리한 후, 상청액을 제거하였

다. 세포가 있는 튜브에 1% penicillin과 10% FBS로 조성된 DMEM에 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 10회 이하로 하였다. 시료들을 처리하기 전에 24시간을 적응시켰다.

3) 세포 독성

RAW 264.7 cell은 96 well plate에서 1×10⁵ cells/well로 분주 후, 24시간 동안 배양하였다. 실험 시작전 새로운 배양액으로 교체하였고, GBH를 10, 50, 100, 200, 400 μg/mL의 농도로 처리한 후에 24시간 동안 배양하였다. 배양한 후에 10 μL의 water soluble tetrazolium salt solution을 첨가한 후 세포배양기(37°C, 5% CO₂)를 이용하여 30분 동안 반응시켰다. 그리고 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포의 생존율을 백분율로 표시하였다.

4) 항산화 효능

(1) DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) radical 소거능 측정

GBH 추출물은 10, 50, 100, 200 μg/mL의 농도가 되도록 희석시켰다. 150 μL의 GBH 추출물과 에탄올로 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액을 각 100 μL씩 섞어 37°C에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도 측정을 하였다. DPPH 용액의 대조군에는 에탄올을, 시료액의 대조군에는 증류수를 넣어서 보정값을 얻었다. DPPH radical 소거율은 아래의 식으로 계산하였다.

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

5) 항염증 효능

(1) NO (nitric oxide) 측정

NO의 농도는 griess reagent system을 이용하여 배양액 내에서 측정하였다. RAW 264.7 cell은 96 well plate에서 1×10⁵ cells/well로 분주한 뒤 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 새로 교체하였고, N1 buffer 50 μL를 각각의 well에 처리하여 상온에서 10분 동안 반응시킨 뒤, N2 buffer 50 μL를 각각의 well에 처리하고 10분

동안 반응시켰다. 반응 후 흡광도를 540 nm에서 측정하였다. NO의 농도 측정은 nitrite standard 농도별 표준곡선을 이용하였다.

(2) PGE₂ 측정

GBH 추출물은 10, 50, 100, 200 µg/mL의 농도가 되도록 희석시켰다. 각 well에 50 µL의 primary antibody solution를 넣은 후 500±50 rpm으로 설정된 수평 케도 마이크로 플레이트 셰이커(0.12" 케도)에서 1시간 정도 웨이킹하였다. 플레이트를 세척하지 않고 각 well에 50 µL의 PGE₂ conjugate를 추가한 후 새 플레이트 실러로 덮고 셰이커(0.12" 케도)에서 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 각 well을 aspirate하고 워시 버퍼(400 µL)를 사용하여 총 4회 세척한 후 각 well에 200 µL의 substrate solution을 첨가하였다. 빛을 차단하고, 상온에서 30분 정도 기다린 다음 각 well에 100 µL의 stop solution을 첨가하고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) Cytokine 측정

12 well plate에서 RAW 264.7 cell을 1×10⁵ cells/well로 분주한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 새로 교체하여 GBH 추출물을 1, 10, 100 µg/mL의 농도와 LPS 1 µg/mL의 농도로 처리하여 세포배양기(37°C, 5% CO₂)를 이용하여 24시간 동안 재배양하였다. 원심분리 후에 얻어진 상청액으로 Lumine x를 이용하여 IL-1β, TNF-α, IL-6을 측정하였다.

6) 경골 골절 유발

실험동물에 1 mg/kg 졸레틸을 복강내 주사하여 마취하였다. 마취 후 실험동물의 좌측 뒷다리를 평평한 판에 위치시키고 너비 1.5 cm, 두께 2 mm의 탄소강으로 만들어진 무딘 날을 경골 중간에 위치시켰다. 무딘 날 위로 내부 지름 3.5 cm, 길이 70 cm 정도의 판을 세운 후, 지름 3 cm, 무게 200 g의 쇠로 된 추를 떨어뜨렸다. X-ray로 골절을 확인한 후 (주)금정화학의 정형외과 스프린트용 고정테이프(Hwaseong, Korea)로 골절 부위를 고정시켰다.

7) 그룹 배정 및 시료 처리

실험은 경골 골절을 유발하지 않은 정상군, 경골 골절 유발 후 증류수를 투여하는 대조군, 경골 골절 유발 후 GBH를 200 mg/kg의 농도로 투여하는 실험군 등 모

두 3개의 그룹으로 나누었으며, 각 그룹당 12마리씩 배정하여 실험을 시행하였다. 실험 2주차, 3주차, 4주차에 각 그룹당 3마리씩 치사하였다. 1일 1회, 오후 2시에 식약처 동물실험 가이드라인에 따라 SD rat 기준으로 100 g 당 경구투여 허용 용량인 1 mL을 넘지 않도록 2 mL씩 경구 투여하였다. 실험기간 동안 자유 식이를 하였다. 경골 골절을 유발시킨 시점을 0주차로 하여 총 4주간 경구 투여를 실시하였다.

8) 혈청 분리

실험 0, 1, 2, 3, 4주차에 ethyl ether로 마취한 뒤 심장천자 채혈의 방법으로 혈액을 채취하였고, 15분간 3,000 rpm의 속도로 원심 분리하여 골절유합 관련인자들을 측정하였다.

9) 골절유합 관련 인자 측정

(1) Osteocalcin 측정

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

(2) Calcitonin 및 CTXII 측정

Calcitonin 및 CTXII는 calcitonin과 CTXII ELISA kit의 측정방법을 이용하여 측정하였다. 각 well에 standard, control, 혈청을 50 µL씩 분주하고, horse radish peroxidase-conjugate 100 µL를 가하여 혼합한 뒤, 37°C의 인큐베이터에 넣어 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 washing 완충 용액으로 세척하고 chromogen solution 용액 100 µL씩을 넣은 뒤 다시 37°C의 인큐베이터에서 15분간 반응시켰다. 마지막으로 stop solution 50 µL를 넣고 ELISA reader를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

(3) TGF-β 및 BMP-2 측정

TGF-β 및 BMP-2는 TGF-β와 BMP-2 ELISA kit의 측정방법을 이용하여 측정하였다. 우선, TGF-β 측정을 위하여 혈청 40 μL에 1 N HCl 용액을 가해 37°C의 인큐베이터에서 10분간 반응시킨 뒤, 10 μL 1.2 N NaOH/0.5 M HEPES를 혼합해 샘플을 만들었다. 그 후 각 well에 TGF-β 측정을 위해서 assay diluent를 50 μL를 넣었으며, BMP-2 측정을 위해서는 100 μL를 넣은 뒤 standard, control, 혈청을 50 μL 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 μL의 TGF-β conjugate와 200 μL의 BMP-2 conjugate를 넣어 다시 2 시간 동안 반응시켰다. 반응 후 재차 washing 완충 용액으로 세척하고 substrate solution을 각각 100 μL와 200 μL를 넣어 30분간 반응시키고 stop solution 100 μL과 50 μL을 취하여 ELISA reader를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

10) 방사선 검사

실험 0, 2, 4주차에 Inalyzer (Medikors Inc., Seongnam, Korea)를 사용하여 X-ray 촬영을 실시하였다.

3. 통계처리

SPSS 18.0 통계 프로그램(IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 이용하여 결과는 평균 ± 표준편차(mean±standard deviation)로 표시하고 one-way repeated analysis of variance, post-hoc Duncan을 이용하여 p<0.05, p<0.01, p<0.001 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과»»»»

1. 안전성

1) RAW 264.7 cell에 대한 세포 독성

RAW 264.7 cell에서 세포 독성을 측정한 결과, 대조군을 100.0±1.2%로 나타냈을 때 GBH 추출물의 10, 50, 100, 200, 400 μg/mL 농도에서 98.37±2.6%, 97.60±1.3%, 95.55±3.6%, 91.10±3.84%, 87.93±2.74%의 세포 생존율을 나타내었고, 통계적으로 유의하지는 않지만 400 μg/mL에서 10% 이상의 세포독성이 관찰되어 본 실험에서는 200 μg/mL 농도까지를 실험농도로 설정하였다(Fig. 1).

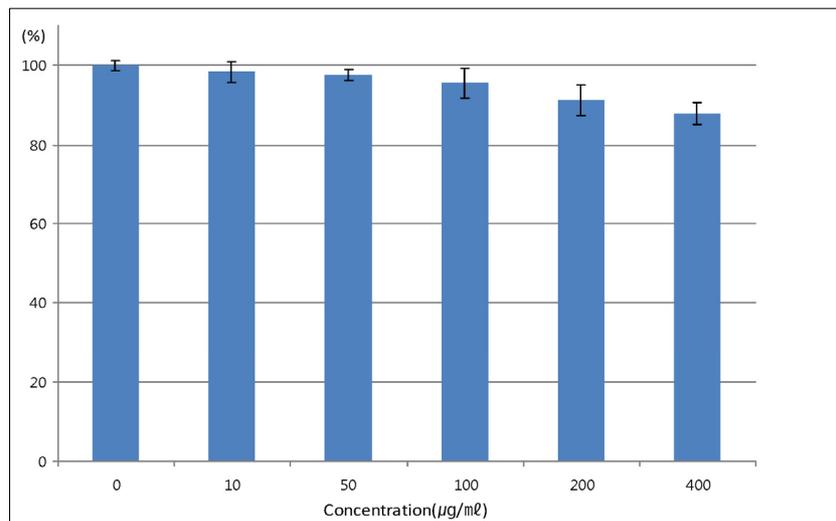


Fig. 1. Cell viability of GBH extract in RAW 264.7 cells. Each cell was treated with 0, 10, 50, 100, 200 and 400 μg/mL of GBH extract for 24 hr. The results were presented by the mean±standard deviation from three independent experiments. GBH: Gyejibokryunghwan.

2. 항산화 효능

1) DPPH radical 소거능

GBH 추출물의 농도에 따른 DPPH 소거율을 측정한 결과, 농도 의존적으로 radical 소거능이 증가함을 보였다(Table II).

3. 항염증 효능

1) NO 생성량

RAW 264.7 cell에서 GBH 추출물의 농도에 따른 NO 생성량을 측정한 결과, 농도 의존적으로 NO 생성량이 감소하였으며 대조군에 비하여 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 유의하게($p < 0.05$) 감소하였다(Table III).

2) PGE₂ 생성량

RAW 264.7 cell에서 GBH 추출물의 농도에 따른

Table II. DPPH Free Radical Scavenging Activity of GBH Extract at Various Concentration

Treatment ($\mu\text{g}/\text{mL}$ GBH extract)	Scavenging activity
10	11.8 \pm 0.6
50	23.7 \pm 0.3
100	44.2 \pm 1.4
200	62.6 \pm 3.0

Values are presented as means \pm standard deviation.

DPPH: 1,1-diphenyl-1-picrylhydrazyl, GBH: Gyejibokryunghwan.

Table III. Effect of GBH Extract on LPS-induced NO Production in RAW 264.7 Cells

Treatment	NO
Normal group	9.5 \pm 1.0
Control group ($\mu\text{g}/\text{mL}$ GBH extract)	100.0 \pm 12.3
10	91.8 \pm 11.1
50	81.0 \pm 11.5
100	71.9 \pm 10.6
200	63.2 \pm 8.8*

Values are presented as means \pm standard deviation.

GBH: Gyejibokryunghwan, LPS: lipopolysaccharide, NO: nitric oxide.

*significantly different($p < 0.05$).

PGE₂ 생성량을 측정한 결과, 농도 의존적으로 PGE₂ 생성량이 감소하였으며 대조군에 비하여 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 유의하게 ($p < 0.05$) 감소하였다(Table IV).

3) Cytokine 생성량

(1) IL-1 β

RAW 264.7 cell에서 GBH 추출물의 농도에 따른 IL-1 β 생성량을 측정한 결과, 농도 의존적으로 IL-1 β 생성량이 감소하였으며 대조군에 비하여 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 유의하게($p < 0.05$) 감소하였다(Table V).

(2) IL-6

RAW 264.7 cell에서 GBH 추출물의 농도에 따른 IL-6 생성량을 측정한 결과, 농도 의존적으로 IL-6 생성량이 감소하였으며 대조군에 비하여 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 유의하게($p < 0.05$) 감소하였다(Table VI).

Table IV. Effect of GBH Extract on LPS-induced PGE₂ Production in RAW 264.7 Cells

Treatment	PGE ₂ (pg/mL)
Normal group	72.3 \pm 0.9
Control group ($\mu\text{g}/\text{mL}$ GBH extract)	779.8 \pm 8.7
10	754.4 \pm 21.7
50	651.2 \pm 14.1
100	620.6 \pm 4.9
200	517.4 \pm 45.5*

Values are presented as means \pm standard deviation.

GBH: Gyejibokryunghwan, LPS: lipopolysaccharide, PGE₂: prostaglandin E₂,

*significantly different ($p < 0.05$).

Table V. Effect of GBH Extract on LPS-induced IL-1 β Production in RAW 264.7 Cells

Treatment	IL-1 β (pg/mL)
Normal group	114.9 \pm 1.0
Control group ($\mu\text{g}/\text{mL}$ GBH extract)	258.4 \pm 19.9
10	246.0 \pm 17.7
50	242.3 \pm 35.5
100	191.9 \pm 20.0*
200	183.8 \pm 36.5*

Values are presented as means \pm standard deviation.

GBH: Gyejibokryunghwan, LPS: lipopolysaccharide, IL-1 β : interleukin-1 β .

*significantly different ($p < 0.05$).

(3) TNF- α

RAW 264.7 cell에서 GBH 추출물의 농도에 따른 TNF- α 생성량을 측정한 결과, 농도 의존적으로 TNF- α 생성량이 감소하였으며 대조군에 비하여 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 유의하게 ($p < 0.05$) 감소하였다(Table VII).

지 1주 간격으로 혈청을 채취해 측정한 결과, GBH 투여군은 실험 4주차에서 대조군에 비해 유의하게($p < 0.05$) 증가하였다(Table VIII).

4. 골절유합 관련 인자 측정

1) Osteocalcin 생성량

GBH 투여가 osteocalcin 생성량에 미치는 영향을 확인하기 위하여 경골 골절을 유발한 0주차부터 4주차까

2) Calcitonin 생성량

GBH 투여가 calcitonin 생성량에 미치는 영향을 확인하고자 경골 골절을 유발한 0주차부터 4주차까지 1주 간격으로 혈청을 채취하여 측정한 결과, GBH 투여군은 실험 4주차에서 대조군에 비해 유의하게($p < 0.05$) 증가하였다(Table IX).

Table VI Effect of GBH Extract on LPS-induced IL-6 Production in RAW 264.7 Cells

Treatment	IL-6 (pg/mL)
Normal group	76.1 \pm 1.9
Control group ($\mu\text{g/mL}$ GBH extract)	368.7 \pm 31.6
10	335.7 \pm 25.0
50	316.4 \pm 25.0
100	278.7 \pm 49.0*
200	186.4 \pm 11.4*

Values are presented as means \pm standard deviation.
GBH: Gyejibokryunghwan, LPS: lipopolysaccharide, IL-6: interleukin-6.
*significantly different ($p < 0.05$).

Table VII Effect of GBH Extract on LPS-induced TNF- α Production in RAW 264.7 Cells.

Treatment	TNF- α (pg/mL)
Normal group	78.1 \pm 1.3
Control group ($\mu\text{g/mL}$ GBH extract)	3,270.4 \pm 324.4
10	3,214.9 \pm 186.6
50	3,083.6 \pm 279.1
100	2,810.2 \pm 205.7
200	2,635.3 \pm 273.0*

Values are presented as means \pm standard deviation.
GBH: Gyejibokryunghwan, LPS: lipopolysaccharide, TNF- α : tumor necrosis factor- α .
*significantly different ($p < 0.05$).

Table VIII Effect of GBH on the Osteocalcin Level in the Serum of Tibia-fractured Rat

Group	0 week	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
Normal	0.72 \pm 0.04	0.69 \pm 0.02	0.73 \pm 0.03	0.73 \pm 0.05	0.74 \pm 0.04
Control	0.62 \pm 0.12	10.36 \pm 0.09	9.98 \pm 0.48	8.95 \pm 0.45	4.49 \pm 0.24
GBH	0.77 \pm 0.02	10.17 \pm 0.38	10.80 \pm 0.79	10.13 \pm 0.24	9.72 \pm 0.65*

Values are presented as means \pm standard deviation.
GBH: Gyejibokryunghwan.
*significantly different ($p < 0.05$).

Table IX. Effect of GBH on the Calcitonin Level in the Serum of Tibia-fractured Rat

Group	0 week	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
Normal	2.40 \pm 0.05	2.28 \pm 0.43	2.41 \pm 0.08	2.51 \pm 0.05	2.21 \pm 0.05
Control	2.51 \pm 0.05	2.21 \pm 0.21	2.24 \pm 0.26	2.53 \pm 0.08	2.83 \pm 0.56
GBH	2.53 \pm 0.05	2.40 \pm 0.43	2.11 \pm 0.08	3.46 \pm 0.05	4.57 \pm 0.05*

Values are presented as means \pm standard deviation.
GBH: Gyejibokryunghwan.
*significantly different ($p < 0.05$).

3) CTXII 생성량

GBH 투여가 CTXII 생성량에 미치는 영향을 확인하고자 경골 골절을 유발한 0주차부터 4주차까지 1주 간격으로 혈청을 채취하여 측정된 결과, GBH 투여군은 실험 3주차에서 대조군에 비해 유의하게($p < 0.05$) 감소하였다(Table X).

4) TGF- β 생성량

GBH 투여가 TGF- β 생성량에 미치는 영향을 확인하기 위하여 경골 골절을 유발한 0주차부터 4주차까지 1주 간격으로 혈청을 채취해 측정된 결과, GBH 투여군은 실험 3주차에서 대조군에 비해 유의하게($p < 0.01$) 증가하였다(Table XI).

5) BMP-2 생성량

GBH 투여가 BMP-2 생성량에 미치는 영향을 확인하

기 위하여 경골 골절을 유발한 0주차부터 4주차까지 1주 간격으로 혈청을 채취해 측정된 결과, 대조군과 GBH 투여군은 통계적으로 유의한 차이가 없었다(Table XII).

5. 방사선 소견

GBH 투여가 경골의 골절유합에 미치는 영향을 확인하고자 경골 골절을 유발한 날부터 4주까지 2주 간격으로 대조군 및 GBH 투여군 각각 3마리씩 경골 X-ray 촬영을 하였다. 대조군 3마리 모두 0주차부터 4주차까지 골절이 유발된 부위의 경계선이 관찰되었고 유합이 아직 많이 이루어지지 않았다(Fig. 2). 반면, GBH 투여군 A와 B는 경계선이 거의 없어지고 뼈의 윤곽이 뚜렷하게 관찰되며 C는 경계선이 관찰되나 대조군에 비해 유합이 촉진된 모습이 관찰되었다(Fig. 3).

Table X. Effect of GBH on the CTXII Level in the Serum of Tibia-fractured Rat

Group	0 week	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
Normal	871.3±42.4	961.4±28.3	911.3±14.1	881.3±28.3	911.3±14.1
Control	911.3±70.8	1,231.8±184.1	1,101.6±56.6	1,362.0±28.3	1271.9±70.8
GBH	951.4±42.4	941.4±28.3	851.2±14.6	931.4±70.8*	911.3±42.4

Values are presented as means±standard deviation.

GBH: Gyejibokryunghwan, CTXII: carboxy-terminal telepeptides of type II collagen.

*significantly different ($p < 0.05$).

Table XI. Effect of GBH on the TGF- β Level in the Serum of Tibia-fractured Rat

Group	0 week	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
Normal	499.78±1.52	498.70±1.83	501.29±2.44	498.91±2.13	499.35±0.91
Control	499.78±0.30	1,105.44±71.50	1,053.58±37.28	1,021.17±59.28	590.96±23.52
GBH	527.87±43.08	1,238.76±7.63	1,252.16±15.58	1,185.60±56.53*	848.53±35.13

Values are presented as means±standard deviation.

GBH: Gyejibokryunghwan, TGF- β : transforming growth factor- β .

*significantly different ($p < 0.05$).

Table XII. Effect of GBH on the BMP-2 Level in the Serum of Tibia-fractured Rat

Group	0 week	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
Normal	150.60±1.84	149.30±4.91	150.17±1.22	149.73±4.29	144.96±2.45
Control	150.17±1.22	184.46±17.80	198.65±17.80	165.36±5.52	168.4±25.77
GBH	126.43±2.03	182.83±27.93	172.05±13.71	141.16±0.50	144.39±17.27

Values are presented as means±standard deviation.

GBH: Gyejibokryunghwan, BMP-2: bone morphogenetic protein-2.

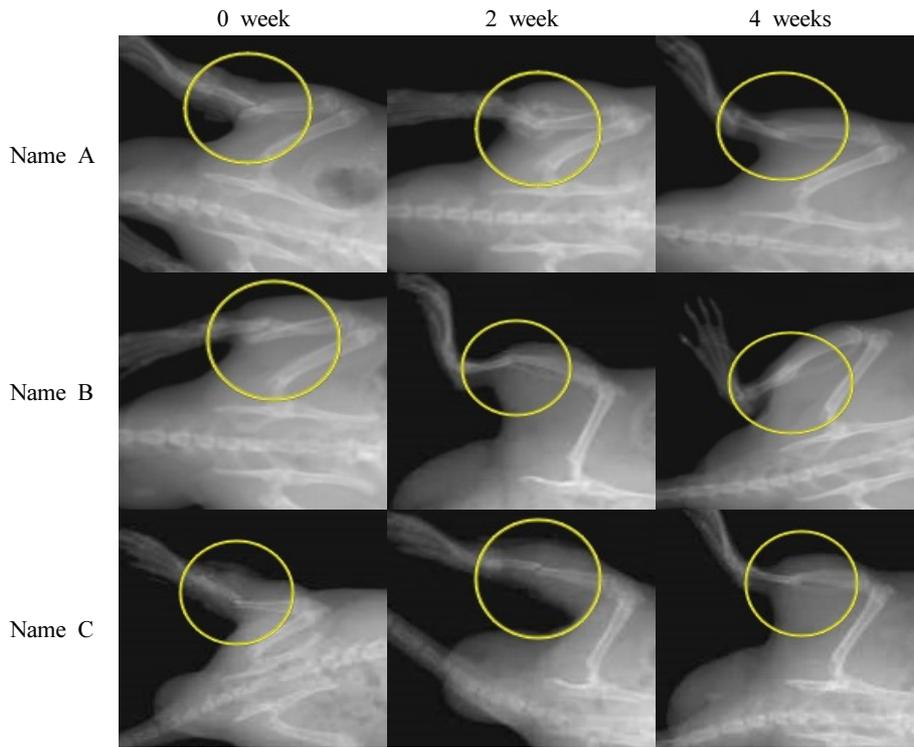


Fig. 2. Image of bone regeneration using X-ray in control group. The portable X-ray system was used to take a tibia X-ray after anesthesia of rat. Circle indicated the fracture site. Control group: The tibia-fractured rats were treated orally with distilled water.

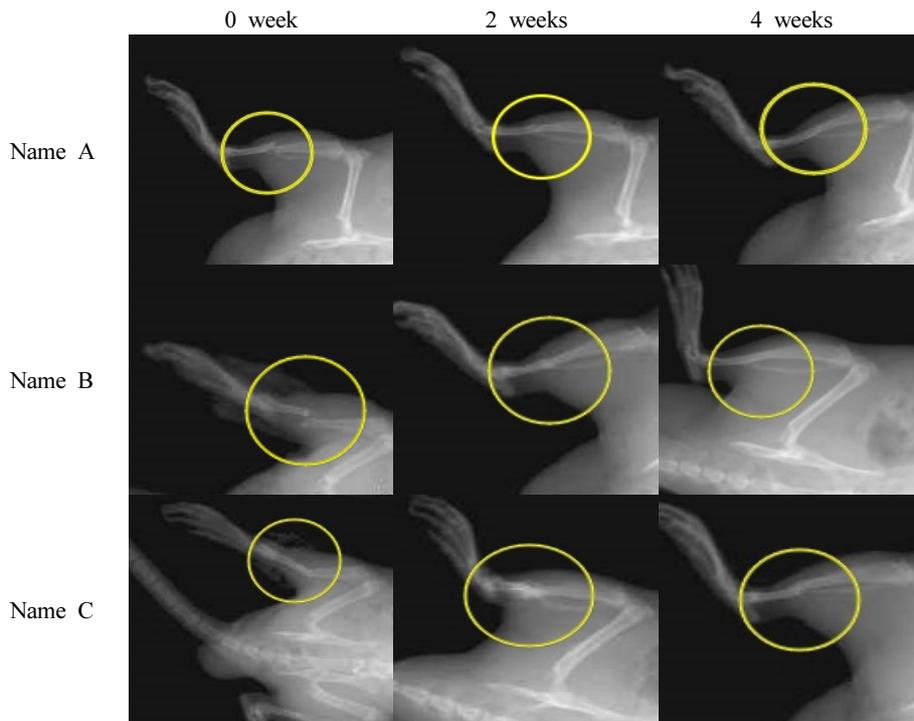


Fig. 3. Image of bone regeneration using X-ray in GBH group. The portable X-ray system was used to take a tibia X-ray after anesthesia of rat. Circle indicated the fracture site. GBH group: The tibia-fractured rats were treated orally with GBH 200 mg/kg/day. GBH: Gyejibokryunghwan.

고찰»»»

골절은 교통사고, 산업재해, 골다공증 같은 질병, 스포츠 손상 등에 의해 발생하며¹⁷⁾ 통증, 기능장애, 심리적 불안 등을 야기하여 삶의 질을 저하시키고 사회적 및 경제적 손실을 초래한다¹⁸⁾.

골절의 치유 과정은 조직학적으로 편의상 세 단계로 나누는데 이는 염증기, 복원기, 재형성기이다¹⁾. 염증기는 골절이 발생한 직후부터 시작되는데 연관된 혈관이 파열되고 혈종이 발생하면서 염증세포 및 섬유세포가 동원된다¹⁹⁾. 이어서 혈소판과 염증세포는 염증성 cytokine을 분비하고, 혈종은 점차 육아 조직으로 대체된다¹⁹⁾. 섬유모세포는 새로운 기질을 만들기 시작하고 파골세포가 출현하기 시작하여 골흡수를 시작한다¹⁾. 복원기에는 조골세포, 연골모세포 등의 세포들이 증식되면서 혈종이 있던 부위에는 섬유성 조직과 초자연골 및 미성숙 골로 이루어진 가골이 형성된다³⁾. 이어서 섬유성 조직과 초자연골도 미성숙 골로 치환된다³⁾. 재형성기에는 불필요하고 과잉 형성된 가골이 파골세포에 의해 흡수되고 조골세포에 의해 성숙한 골이 만들어지면서 골절이 임상적 그리고 방사선적으로 유합되어 모든 골의 상태가 정상으로 되돌아간다³⁾.

한의학에서 골절은 《外臺秘要》²⁰⁾에서 처음으로 “救急療骨折，接令如故，不限人畜也方”라고 언급되어 골절은 빨리 치료하여 원래대로 붙게 해야 하는데 이는 사람뿐만 아니라 짐승들도 이 방법을 따른다 하였고, 《醫宗金鑑》²¹⁾에서는 “此膏治跌打損傷，筋斷骨折，腫硬青紫”로 외상으로 힘줄이 끊어지고 골절이 되면 손상 부위가 붓고 청자색이 되는데, 이는 膏藥으로 치료한다 하였고, 《傷科補要》²²⁾에서는 “或有从高倒墜，天柱骨折，致頸插入腔內”로 높은 곳에서 떨어져 경추가 골절되면 목이 흉강 내로 함입된다 하여 골절의 원인, 증상, 손상 형태, 치료에 대한 구체적 언급이 있었다.

골절이 발생하면 뼈와 연부조직, 주위의 혈관 및 신경 등이 손상되고 이어서 기혈의 운행이 통하지 못하게 되어 국소에 血流가 壅結되면서 腫痛을 일으키기 때문에 골절 기전에 瘀血이라는 병적 개념을 도입하여 치료하고 있다²³⁾.

계지복령환은 張仲景의 《金匱要略》에 최초로 수록되었으며 桂枝, 茯苓, 牡丹皮, 桃仁, 赤芍藥으로 구성되어

있다⁶⁾. 桂枝는 發汗解肌, 溫經通脈의 효능이 있고 茯苓은 利水滲濕, 健脾寧心하고 牡丹皮는 清熱涼血, 活血散瘀하고 桃仁은 活血祛瘀, 潤腸通便하고 芍藥은 養血柔肝, 緩中止痛, 斂陰收汗하여²⁴⁾ 이를 종합하면 계지복령환은 活血祛瘀, 理氣止痛, 破瘀消癥 등의 치료효과가 있다²⁵⁾.

계지복령환은 임상에서 瘀血證 치료에 계지복령환을 처방한다는 응답이 74%에 달해 당귀수산 다음으로 활용도가 높은 처방이다²⁶⁾. 그동안 계지복령환의 실험적 연구로는 부인과 질환⁶⁻⁸⁾, 심혈관질환^{9,10)}, 간장질환^{11,12)} 등에 관한 것이 대다수였지만 최근에는 피부의 창상치유¹³⁾, 타박상을 입은 근육의 재생¹⁴⁾ 등에 긍정적인 효과가 있다는 것이 밝혀져 계지복령환의 활용 범위가 넓어지고 있다. 그런데 골절과 관련한 연구는 미흡한 실정이며, 계지복령환이 가지고 있는 活血祛瘀, 理氣止痛, 破瘀消癥의 효과가 어혈로 인한 골절 초기의 치료 방법과 부합하므로 계지복령환이 골절의 유합을 촉진시킬 것이라는 가설을 세웠다.

이에 저자는 계지복령환이 골절유합에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 RAW 264.7 cell을 이용하여 항산화 및 항염증의 효능을 측정하였다. 또한, 경골 골절을 유발한 SD rat을 이용하여 골절유합 관련 인자 및 방사선 검사를 시행하였다.

활성산소는 세포 내의 에너지 대사 과정에서 산소가 불완전하게 환원된 형태를 말하며 골절 발생 시 손상된 조직에서도 발생할 수 있다²⁷⁾. 활성산소는 염증반응을 유발하는 원인 중 하나가 되며²⁸⁾, 세포를 구성하는 단백질, DNA 등과 반응하여 세포 손상을 유발하기 때문에 골절이 발생할 경우 뼈의 발생과 성장을 조절하는 골모세포 등에 영향을 끼쳐 골절 치유를 지연시킬 수 있다²⁹⁾. 그러므로 항산화 작용은 골절 후 염증반응의 유발을 감소시키고 골유합을 유도하는데 기여를 할 수 있다²⁷⁾.

DPPH는 free radical 중 하나로 항산화 효과가 있는 물질과 반응하면 전자를 내어주면서 free radical이 소멸되어 색깔이 탈색되는 원리로 항산화 활성을 측정한다³⁰⁾.

GBH의 DPPH 소거율을 측정한 결과 radical 소거능이 농도 의존적으로 증가되는 것이 확인되어 GBH에 항산화 효능이 있음을 알 수 있었다.

골절이 발생하면 다른 외상과 동일하게 일단 염증성 반응이 나타나며, 골절 직후엔 대식세포가 염증인자인 NO, PEG₂를 생성하고 염증성 cytokine인 IL-1 β , TNF- α ,

IL-6의 발현이 극적으로 항진된다³¹⁾. 이들은 골모세포의 증식을 조절하고 파골세포의 분화와 활성화에 작용하여 골흡수를 촉진하여 골유합을 지연시킨다³²⁾.

NO는 L-arginine에서 NO synthase에 의해 생성되며 특히 TNF- α 와 같은 염증성 cytokine의 자극이 있을 때 발현되어 염증유합에 중요한 역할을 한다³³⁾. 과도한 NO의 형성은 정상세포의 손상을 초래하여 염증을 유발시키며 조직 손상, 혈관 확장, 신경 손상 등을 유발한다³⁴⁾. NO는 염증반응을 가속화하는 역할을 하므로 NO 생성의 억제는 항염 역할을 할 수 있다³⁵⁾.

GBH는 농도 의존적으로 NO의 생성량을 감소시켰으며, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 대조군에 비하여 유의하게 감소시켰다.

PGE₂는 cyclooxygenase와 prostaglandin E synthase에 의해 생성되며 모세혈관의 강력한 혈관 확장, 혈관 투과성의 증가를 일으켜 염증반응을 일으키고 골흡수를 촉진시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다³⁵⁾.

GBH는 농도 의존적으로 PGE₂ 생성량을 감소시켰으며, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 대조군에 비하여 유의하게 감소시켰다.

TNF- α 는 IL-1 β , IL-6 등의 생성을 유발하여 염증을 증폭시키고³⁶⁾, 골아세포의 collagen과 alkaline phosphatase의 합성을 억제하며³⁷⁾, 연골세포의 사멸을 유발한다³⁸⁾. IL-1 β 는 파골세포의 조혈전구세포를 증식 및 분화시켜서 골흡수를 일으킨다³⁹⁾. IL-6은 골아세포에서 분비되는데 IL-1 β 와 TNF- α 에 의해 분비가 촉진되며 파골세포 분화를 증가시켜 골흡수를 촉진하여 골생성을 방해한다⁴⁰⁾. 이러한 염증성 cytokine의 발현이 지속되어 염증이 길어질수록 연골 형성이 지연되며 가골의 크기는 작아진다⁴¹⁾. 그러므로 이들의 발현을 억제시켜주는 방법은 골절의 치유를 유도할 수 있다.

본 연구에서는 골절 시 발생하는 염증반응에 대한 GBH의 항염증 효과를 알아보기 위하여 RAW 264.7 cell에서 cytokine 중 IL-1 β , TNF- α , IL-6의 생성량을 측정하였는데 IL-1 β 와 IL-6은 대조군에 비하여 GBH 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 유의한 감소를 보였고, TNF- α 는 대조군에 비하여 GBH 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 유의한 감소를 보였다.

위의 결과로 볼 때 GBH가 염증 관련 인자들인 NO, PGE₂, IL-1 β , TNF- α , IL-6의 생성량을 유의하게 감소시켜

골절 후 초기 염증 반응을 감소시키고 조골세포의 증식을 유도하며 골흡수를 억제시켜 염증기의 기간을 단축해 골절유합을 촉진할 수 있을 것으로 생각된다.

골대사의 지표는 골형성과 골흡수지표로 나뉘는데 골형성지표는 조골세포가 생산하는 효소나 단백을 측정하거나 골형성 중에 유리되는 성분을 측정하며 골흡수지표는 골흡수과정 중 유리되는 골기질 성분이나 파골세포에서 만들어내는 효소를 측정한다⁴²⁾.

Osteocalcin은 골아세포에서 생성되는 산성단백질로 뼈에서 가장 풍부한 비교원성 단백질이며 골 재형성에 중요한 기능을 한다⁴³⁾. Osteocalcin은 골아세포의 활성도를 반영하는 대표적인 골형성지표 중 하나로⁴⁴⁾, osteocalcin의 발현이 골절 치유의 초기에는 낮게 나타나지만, 가골의 골화가 진행될 때에 증가한다⁴⁵⁾. 즉, 혈청 중의 osteocalcin의 농도가 증가하는 것은 골 재형성이 활발히 일어나는 것이다⁴⁶⁾.

GBH 투여군은 2주차부터 대조군보다 증가된 osteocalcin 생성량을 나타내었으며, 특히 실험 4주차에서 대조군에 비해 유의한 증가를 보였다. Osteocalcin 생성량이 증가된 것은 GBH 투여가 골 재형성을 촉진하는 것으로 생각된다.

Calcitonin은 갑상선에서 생성되는 호르몬으로 부갑상선 호르몬, vitamin D3와 함께 칼슘대사를 조절하는 중요한 호르몬 중의 하나이다⁴⁷⁾. 이는 파골세포 기능을 억제하여 칼슘농도를 조절한다. 혈장 내의 칼슘 농도가 증가하면 calcitonin 분비가 증가하여 골흡수를 억제하여 칼슘 농도를 낮추며, 칼슘 농도가 정상 이하가 되면 분비는 중지된다⁴⁸⁾. 즉, calcitonin의 수치가 증가되면 파골세포의 기능을 억제하여 골흡수가 억제되는 상황이 유발된다.

GBH 투여군의 calcitonin 생성량은 2주차를 제외한 0, 1, 3, 4주차에서 대조군보다 많았으며, 특히 4주차에서 대조군보다 유의한 증가를 보였다. 이는 GBH 투여가 calcitonin 생성량을 증가시켜 골흡수를 억제함으로써 골형성을 촉진할 수 있는 것으로 생각된다.

CTXII는 골절시 소변 및 혈중으로 유리되는 콜라겐으로 뼈와 연골의 소실을 반영하는 골흡수지표이다⁴⁹⁾. GBH 투여군의 CTXII 생성량은 1주차부터 4주차까지 대조군에 비해 감소되었으며, 특히 실험 3주차에서 대조군에 비해 유의한 감소를 보였다. CTXII 생성량의 감

소는 GBH가 골흡수를 억제하는 것으로 생각된다.

TGF- β , BMP는 둘 다 TGF- β superfamily에 속하며 비분화 줄기세포가 골원성 세포로 분화하여 골 형성을 하도록 하는 성장인자이다⁵⁰).

TGF- β 는 골아세포에서 교원질의 합성과 증식을 촉진하고, 간엽세포로부터 연골세포와 골아세포로의 증식 및 분화를 일으키며 골기질의 합성을 촉진하여 골형성의 지표가 된다^{51,52}).

실험 시작일로부터 4주차까지 GBH 투여군의 TGF- β 생성량은 대조군보다 많게 측정되었으며, 실험 3주차에서는 대조군에 비해 유의한 증가를 보였다. 이는 GBH가 TGF- β 의 발현량을 증가시켜 골형성을 유도할 수 있는 것으로 생각된다.

BMP는 골형성 단백질로 전체 골 단백질 중량의 0.1%를 차지하며 골절치유 과정 중 세포 증식, 골 형성, 연골 형성의 과정에서 핵심적인 역할을 한다⁵³). 그 중에서도 BMP-2는 연골 및 골모세포 분화를 유도하여 골형성에 매우 중요하다⁵⁴). TGF- β 는 간엽세포에서의 연골세포 분화를 촉진하는 활성을 가지며 BMP-2는 이미 분화가 시작된 세포의 추가적인 분화를 촉진하는데 더 효과적이다⁵⁵).

GBH 투여군의 BMP-2 생성량은 대조군보다 적은 수치를 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없어 BMP-2에는 영향을 미치지 않는 것으로 보인다.

GBH 투여가 골절유합에 미치는 영향을 확인하기 위하여 실험 시작일로부터 4주차까지 2주 간격으로 대조군과 실험군 각각 3마리씩 경골 골절 부위 x-ray를 촬영하였다. 그 결과, 대조군에서는 4주차에 아직 유합이 이루어지지 않아 골절 부위의 경계선이 뚜렷하게 관찰되었고, GBH 투여군은 점차 골절 부위의 경계선이 없어지면서 4주차에는 골의 윤곽이 드러나 유합이 진행되고 있는 것이 육안적으로 관찰되었다.

이상의 연구 결과를 종합하면, 계지복령환은 *in vitro* 실험에서 DPPH radical 소거능을 농도 의존적으로 증가시켜 항산화 작용이 있음이 밝혀졌고 염증 관련 물질인 NO, PGE₂, IL-1 β , TNF- α , IL-6의 생성량을 유의하게 감소시켜 항염 작용에도 효과가 있었다. *In vivo* 실험에서는 골형성을 나타내는 물질인 osteocalcin, TGF- β 의 생성량을 유의하게 증가시켰고 골흡수 지표인 CTXII 생성량은 유의하게 감소시켰다. 골흡수를 억제하는 호르몬인 calcitonin 생성량은 유의하게 증가시켰으며 BMP-2

생성량에는 영향을 끼치지 못하였다. X-ray 검사에서 대조군에 비해 골절 유합이 진행된 것을 육안으로 확인할 수 있었다. 이는 계지복령환이 항산화 및 항염 작용을 통해 골절 후 염증을 단축시켜 복원기로 빨리 넘어갈 수 있게 해주며 골형성 지표를 증가시키고 골흡수 지표를 감소시켜 골절유합을 촉진시킬 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구는 세포 및 동물 실험을 통해 계지복령환이 골절 치유에 효과가 있음을 객관적으로 규명한 것으로 앞으로 임상에서 어혈로 인한 골절 초기 치료에 적극적인 활용이 기대된다.

결론»»»»

계지복령환이 골절유합에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 RAW 264.7 cell로 항산화 및 항염증에 관한 효능을 평가하였으며, 경골 골절을 유발한 SD rat을 이용하여 골절유합 관련 인자 및 방사선 검사를 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DPPH 소거능이 농도 의존적으로 증가하였다.
2. NO 및 PGE₂의 생성량은 GBH 200 μ g/mL의 농도에서 유의하게 감소하였다.
3. IL-1 β 와 IL-6의 생성량은 GBH 100 μ g/mL와 200 μ g/mL의 농도에서 유의하게 감소하였다.
4. TNF- α 의 생성량은 GBH 200 μ g/mL의 농도에서 유의하게 감소하였다.
5. Osteocalcin 및 calcitonin의 생성량은 GBH 투여군에서 실험 4주차에 유의하게 증가하였다.
6. CTXII 생성량은 GBH 투여군에서 실험 3주차에 유의하게 감소하였다.
7. TGF- β 생성량은 GBH 투여군에서 실험 3주차에 유의하게 증가하였다.
8. BMP-2의 생성량은 GBH 투여군이 대조군보다 적었지만 통계적으로 유의한 차이가 없었다.
9. 방사선 검사에서 GBH 투여군이 대조군에 비해 골절의 유합을 촉진함이 육안적으로 관찰되었다.

계지복령환은 항산화 및 항염 작용이 있었고, 골절유합 관련 인자 및 방사선 검사상 골절유합에 유의한 효과가 있음을 확인하였다.

References>>>>

1. The Korean Orthopaedic Association. Orthopaedics. 7th ed. Seoul:ChoiSin Medical Publishing Co. 2013:94-9, 1153-75.
2. Park MS. Fracture and dislocation. Seoul:Korea Medical Book Publishing Company. 2000:11-2.
3. Seoul National University College of Medicine Department of Orthopaedic. Textbook of fractures and joint injuries. Seoul:Koonja Publishing Company. 2001:105.
4. The Korean Fracture Society. Principles of fracture management. Seoul:Panmuneducation. 2013:3,10,40.
5. The Society of Korean Medicine Rehabilitation. Korean Rehabilitation Medicine. 4th ed. Paju:Koonja Publishing. 2015:206-9.
6. Jang JK. Jung-gyeongjeonseo. Seoul:Daeseong. 1989:427.
7. Kim YG, Park CG, Kim DC, Baek SH. A study on inhibitory effects of gaejiboknyunghwan on growth of uterine cancer cell and activity of MAP kinase. Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2002;15(1):31-43.
8. Kim JH, Baek SH. A study on inhibitory effects of gaejiboknyunghwan on growth of uterine myoma cell and activity of MAP kinase. Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2001;14(2):85-101.
9. Yasui T, Matsuzaki T, Ushigoe K, Kuwahara A, Maegawa M, Furumoto H, Aono T, Irahara M. Stimulatory effect of the herbal medicine keishi-bukuryo-gan on a cytokine-induced neutrophil chemoattractant, in rat ovarian cell culture. American Journal of Reproductive Immunology. 2003;50(1):90-7.
10. Sekiya N, Goto H, Tazawa K, Oida S, Shimada Y, Terasawa K. Keishi-bukuryo-gan preserves the endothelium dependent relaxation of thoracic aorta in cholesterol-fed rabbit by limiting superoxide generation. Phytotherapy Research. 2002;16(6):524-8.
11. Kim SH, Moon JM. Effects of kyejibokryounghwan, jeodangtang, kyejibokryounghwan & jeodangtangon on intravasclar coagulation induced by endotoxin in rats. Korea Institute of Science and Technology Information. 1996;4(2):91-103.
12. Takahashi Y, Soejima Y, Kumagai A, Watanabe M, Uozaki H, Fukusato T. Japanese herbal medicines sho-saikoto, inchinkoto, and juzentaihoto inhibit high-fat diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in db/db mice. Pathology International. 2014;64(10):490-8.
13. Lee SK, Kim HG, Ahan JC, Kim JG, Chung TW, Moon JY, Park SD, Kim JK, Choi DY, Kim CH, Park WH. Effect of gejibokryunghwan on human hepatocarcinoma cells. Journal of Oriental Physiology & Pathology. 2003;17(2):568-73.
14. Jung H, Lee EJ, Oh MS. The effects of gyeji-bokryeong-hwan for wound healing after skin suture. J Korean Med Rehabil. 2016;26(2):29-50.
15. Lee CH. The effects of kyeji-bokryung-hwan on wound healing in muscle contusion-induced mouse [dissertation]. Daejeon (KR):Daejeon University; 2016.
16. Heo J. Donguibogam. Seoul:Namsandang. 1976:487, 490-1, 614, 712, 727.
17. Hole JW. Human anatomy and physiology. Dubuque: W.C. Brown Publishers. 1993:170-227.
18. Seo HJ, Kim JH, Kwak DY, Jeon SM, Ku SK, Lee JH, Moon KD, Choi MS. Effects of safflower seed powder and its fraction in bone tissue in rib-fractured rats during the recovery. Journal of Nutrition and Health. 2000;33(4):411-20.
19. Vinay K, Abul A, Nelson F, Richard M. Pathology. Seoul:E public. 2009;809.
20. Wang D. Oedaebiyo. Seoul:Sungbosa. 1975:749-50.
21. Oh G. Uijonggeungam. Seoul:Bupin Publishing Company. 2006:1250.
22. Jeon SC. Sanggwaboyo. Seoul:Iljung Publishing Company. 1992:176.
23. The Oriental Pathology Compilation Committee. Oriental Pathology. Yongin:Hanuimoonhwa Publishing Company. 2010:118.
24. The Korean Medicine University Herbology Compilation Committee. Herbology. Seoul:Yeonglim Publishing Company. 2007:154-5, 235-8, 345-7, 462-3.
25. Wang SG. Clinical application of gyejibokryunghwan. The Journal of Unnam China Medical. 1980;6:41-2.
26. Park B, Yun KJ, Jung JY, You SS, Lee JA, Choi JA, Kang BK. Conceptualization andutilization of blood stasis syndrome among doctors of korean medicine: results of a web-based survey. American Journal of Translational Research. 2014;6(6):857-68.
27. Sheweita SA, Khoshhal KI. Calcium metabolism and oxidative stress in bone fractures: role of antioxidants. Current Drug Metabolism. 2007;8(5):519-25.
28. Fu S, Gebicki S, Jessep W, Gebicki JM, Dean RT. Biological fate of amino acid, peptide and protein hydroperoxides. Bichem J. 1995;31(3):821-7.
29. Kim SJ. The effects of corydalis rhizoma on the cultured osteoblast damaged by reactive oxygen species [dissertation]. Wonkwang (KR):Wonkwang University; 2001:21-7.
30. Blois MS. Antioxidant determnication by the use of a stable free radical. Nature. 1958;181:1199-200.
31. Kimble RB, Vannice JL, Bloedow DC, Thompson RC, Hopfer W, Kung VI, Brownfield C, Pacifici R. Interleukin-1 receptor antagonist decreases bone loss and bone resorption in ovarietomized rats. Journal of Clinical Investigation.

- 1994;93:1959-67.
32. Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2001;16:1004-14.
 33. Park JS, Jung SH. Effects of sandalwood essential oil on the iNOS expression and proinflammatory cytokine production. *Yakhak Hoeji*. 2013;57:70-5.
 34. Weisz A, Cicatiello L, Esumi H. Regulation of the mouse inducible type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem J*. 1996;316(1):209.
 35. Robertson RP. *Harrison's principles of internal medicine*. New York: McGraw-Hill. 1994:431-5.
 36. Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment on rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2007;370(9602):1861-74.
 37. Centrella M, Mccarthy TL, Canale E. Tumor necrosis factor-alpha 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.
 38. Aizawa T, Kon T, Einhorn T, Gerstenfeld LC. Induction of apoptosis in chondrocytes by tumor necrosis factor-alpha. *Journal of Orthopaedic Research*. 2001;19:785-96.
 39. 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.
 40. Bang SJ, Kim IS, Kim OS, Kim YJ, Jung HJ. IL-6 gene promoter polymorphisms in korean generalized aggressive periodontitis patients. *Journal of the Korean Academy of Periodontology*. 2008;38:579-88.
 41. Dishowitz MI, Mutyaba PL, Takacs JD, Barr AM, Engles JB, Ahn J, Kut D. Systemic inhibition of canonical notch signaling results in sustained callus inflammation and alters multiple phases of fracture healing. *PLoS One*. 2013;8:e68726.
 42. Kim DY. Biochemical markers of bone turnover. *Korean Journal Nuclear Medicine*. 1999;33(4):341-51.
 43. Lee HS, Lee CS, Jang JS, Lee JD, Um SM. Changes of serum alkaline phosphatase and osteocalcin during fracture healing. *Journal of the Korean Orthopaedic Association*. 2002;37(3):6, 411-5.
 44. Leung KS, Fung KP, Sher AH, Li CK, Lee KM. Plasma bone specific alkaline phosphatase as an indicator of osteoblastic activity. *Journal of Bone Joint Surgery*. 1993;75-B:288-92.
 45. Sandberg MM, Aro HT, Vuorio EI. Gene expression during bone repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1993;289:292-312.
 46. Lane NE. *The osteoporosis book*. New York: Oxford University Press. 1999:19-31.
 47. Kim SW. Clinical endocrinology of calcitonin. *Journal of Korean Society of Endocrinology*. 1991;6(2):117.
 48. Austin LA, Heath HH. *Calcitonin: physiology and pathophysiology*. New England Journal of Medicine. 1981;304:269-78.
 49. Knetter SM, Baxa TJ, Chung KY, Johnson BJ, Minton JE. Steroid implants and markers of bone turnover in steers. *South African Journal of Animal Science*. 2012; (42)3:249-55.
 50. Cho TJ, Lee KS. Bone graft substitute. *Journal of Korean Society*. 2006;19(1):109-16.
 51. Jingushi S, Scully SP, Joyce ME, Sugioka Y, Bolander ME. Transforming growth factor-beta 1 and fibroblast growth factors in rat growth plate. *Journal of Orthopaedic Research*. 1995;13:761-8.
 52. Rosen DM, Stempien SA, Thompson AY, Brennan JE, Ellingsworth LR, Seyedin SM. Differentiation of rat mesenchymal cells by cartilage-inducing factor enhanced phenotypic expression by dihydrocytochalasin B. *Experimental Cell Research*. 1986;165:127-38.
 53. Bostrom MP1, Lane JM, Berberian WS, Missri AA, Tomin E, Weiland A, Doty SB, Glaser D, Rosen VM. Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research*. 1995;13(3):357-67.
 54. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins in development. *Current Opinion in Genetics & Development*. 1996; 6(4):432-8.
 55. Roark EF, Greer K. Transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein-2 act by distinct mechanisms to promote chick limb cartilage differentiation in vitro. *Dev Dyn*. 1994;200:103-16.