

化癥煎이 조골세포 및 경골골절 유발 생쥐의 골유합에 미치는 영향

이수환* · Kira Parichuk[†] · 차윤엽[‡]

상지대학교 일반대학원 한의학과*, 상지대학교 한의과대학 약리학교실[†], 상지대학교 부속한방병원 한방재활의학과[‡]

Affirmative Effect of *Hwaweo-jeon* (*Huayu-jian*) in Osteoblast Cells and Tibia Fracture-induced Mice

Soo-Hwan Lee, K.M.D.* , Kira Parichuk, M.D.[†] , Yun-yeop Cha, K.M.D.[‡]

Department of Oriental Medicine, Sangji University General Graduate School*, Department of Pharmacology, College of Korean Medicine, Sangji University[†], Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, Sangji University Korean Medicine Hospital[‡]

Objectives This study was performed to decide the bone union effect of *Hwaweo-jeon* on tibia fractured mice.

Methods In this study, laboratory experiments were implemented by the stage of *in vitro* and *in vivo*. In *in vitro*, MC3T3-E1 cells were treated with various concentration of *Hwaweo-jeon* extract (HWJ). To investigate effect of HWJ for osteoblast, relative mRNA expression of 5 substances (alkaline phosphatase [ALP], runt-related transcription factor 2 [Runx2], osteocalcin [OCN], osterix [OSX] and collagen type II alpha 1 chain [Col2a1]) was used as a marker of osteogenesis. In order to determine HWJ's effect for fracture healing, relative gene expression level of ALP, Runx2, OCN, OSX and Col2a1 were used to find out the influence to osteoblast. Furthermore, receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand and osteoprotegerin relative mRNA expression were used to estimate the impact to osteoclast. Also, X-ray was used for the purpose of identifying bone union in tibia-fracture mouse model.

Results In *in vitro* experiment, most part of relative mRNA expression were increased compared to control group. In *in vivo* and *in vitro* experiment, HWJ induced osteoblast activation by verifying relative mRNA expression of 5 substances. And *in vivo* experiment, we can also identify that HWJ triggered osteoclast activation during early stage of tibia fracture. Furthermore, X-ray pictures show noticeable recovery of tibia fracture.

Conclusions HWJ extract promotes bone union by facilitating the osteoblast. But, HWJ may occur liver & kidney toxicity over specific concentration. Therefore, when HWJ is applied to human body, doctors have to follow up the liver function test & renal function test of patient. (**J Korean Med Rehabil 2020; 30(1):13-29**)

RECEIVED December 13, 2019
REVISED December 29, 2019
ACCEPTED January 3, 2020

CORRESPONDING TO

Yun-yeop Cha, Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, Sangji University Korean Medicine Hospital, 80, Sangjidaegil, Wonju 26338, Korea

TEL (033) 741-9260
FAX (033) 732-2124
E-mail omdcha@sangji.ac.kr

Copyright © 2020 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

Key words *Hwaweo-jeon* (Huayu-jian), Tibia fractured mice, Osteoblasts, Osteoclasts, Bone union, mRNA expression

서론»»»»

골절(骨折)이란 골부의 연속성이 일부 혹은 완전하게 소실되거나, 사상 및 횡상 등을 포함한 선상 변형을 일

으킨 상태를 말한다. 골절 발생 시 대부분 피부, 피하조직, 근육, 신경 및 혈관 등의 손상이 병발하게 되는데, 치료는 골절 전 상태로 변형 없이 골절이 유합되는 것과 기능회복을 대원칙으로 한다¹⁾. 만일 장기손상이 동반되

면 장기손상 치료를 우선시하게 된다. 치료 방법으로는 정복 필요 여부, 유합 시까지 고정 여부, 개방골절 시 치료, 입원의 필요성 등 다양한 항목에 따라 수술치료법과 비수술적 치료법 등이 있다²⁾.

본 연구에서 시약으로 사용된 화어전(化瘀煎)은 Kim³⁾의 『晴崗醫鑑』에 타박, 추락 등으로 인해 기혈어체(氣血瘀滯)되어 견인작통(牽引作痛) 증상에 처방되는 방제라 제시되어 있다.

화어전을 사용한 기존 연구로는 Yoo 등⁴⁾의 외상성 경막하 출혈 환자의 섬망 치험 1예와 Kim 등⁵⁾의 두부 외상으로 발생한 이명 치험 1예로 도합 2예만 보고되었고, 골절 관련 연구결과는 보고되지 않았다. 또한, 현재까지 화어전을 구성하는 약물 중의 하나인 홍화에 관한 실험연구로 Chung 등⁶⁾의 홍화자(紅花子)의 골절회복 효과, Seo⁷⁾의 흰 쥐의 늑골골절 치료에 관한 실험적 연구가 발표되었으나 화어전이라는 방제를 사용한 골절 치료를 위한 실험연구는 보고된 바 없다.

골절이 발생하면 병리기전상 골부(骨部)뿐만 아니라 주위 연부조직, 혈관 및 신경이 손상되고 혈액순환 불리로 인해 국소 혈류가 정체되고 종통(腫痛)을 유발한다. 이를 토대로, 골절의 병리적 증상 발현 이전에 어혈 개념을 적용하여 임상에 응용하고 있다⁸⁾. 이는 『理傷續斷方』에서 밝힌 ‘瘀不去則骨不能接 瘀去新骨生’의 문구와 일맥상통하여 활혈제 투여를 통해 어혈을 제거함으로써 새로운 기혈이 공급되고, 신생골이 성장하여 골절이 회복되는 기전을 유추할 수 있다⁹⁾.

화어전은 앞에서 기재한 바와 같이 어혈증에 처방되는 한약으로, 골절 발생 시 활혈화어, 접골속근을 통한 골절 유합이라는 한의학적 기전을 보다 객관적으로 밝히고자 본 실험연구를 진행하게 되었다.

골절치유 효과를 객관적으로 살펴보기 위해 alkaline phosphatase (ALP) staining을 통한 조골세포 생성 여부를 분석하였고, ALP, runt-related transcription factor 2 (Runx2), osteocalcin (OCN), osterix (OSX), collagen type II alpha 1 chain (Col2a1), osteoprotegerin (OPG) 및 receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)의 유전자 발현량을 측정하였으며, 추가적으로 방사선 판독(X-ray)을 시행하였다. 위의 실험을 통해 화어전의 골절회복 촉진 기전에 대해 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법»»»»

1. 재료

1) 약재

본 연구에 사용된 처방은 『晴崗醫鑑 - 皮膚 및 外科疾患』³⁾ 편에 수록된 화어전이며, 상기 처방을 구성하는 한약재는 當歸尾, 蘇木, 香附子, 赤芍藥, 烏藥, 青皮, 桃仁, 川芎, 白芥子, 紅花, 桂心 등이다. 각 한약재들은 태양한약국(Wonju, Korea)에서 구입하였다. 처방의 구성과 1첩당 용량(g)은 Table I과 같으며, 한약재 전탕 시 酒水相半煎(주수상반전) 방식을 사용하였다(Table I). 본 논문에서 관찰하고자 하는 바는 본 탕전 시 추출된 추출물 전체의 작용을 측정하는 것으로 유효성분에 대한 연구는 아님을 밝힌다.

2) 동물

실험에 사용된 동물들은 42마리의 11주령 웅성(雄性)의 C57BL/6J mouse로 대한바이오링크(Daejeon, Korea)에서 분양받았다. 상기 동물들은 적절히 환기된 22±2°C, 12시간 주기의 light/dark cycle, 그리고 습도 55±9%의 방이라는 변형된 외부환경에 적응을 위해 1주간 적응 기간을 가졌으며, 실험 당일까지 자유롭게 물과 음식을 섭취할 수 있도록 하였다. 본 연구 내의 동물실험은 상지대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받은 뒤 시행

Table I. Herbal Compounds of *Hwaweo-Jeon (Huayu-jian)* for Each Cheop

Scientific name	Amount (g)
<i>Angelica gigas Nakai</i>	9.375
<i>Caesalpinia sappan Linné</i>	9.375
<i>Cyperus rotundus Linné</i>	5.625
<i>Paeonia lactiflora Pallas</i>	3.75
<i>Lindera strichnifolia Fernandez-Villar</i>	3.75
<i>Citrus unshiu Markovich</i>	3.75
<i>Prunus persica Batsch</i>	3.75
<i>Cnidium officinale Makino</i>	3.75
<i>Sinapis alba Linné</i>	2.625
<i>Cinnamomum cassia Blume</i>	2.625
<i>Carthamus tinctorius Linné</i>	2.625
Total	51

하였다(승인번호: 2019-5).

3) 시약 및 화학약품

Dexamethasone, red blood cell lysis buffer, nefopam, 그리고 기타 모든 다른 화학약품은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Alpha-modified minimal essential medium (α -MEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin는 Life Technologies, Inc. (Grand Island, NY, USA)로부터 구매하였다. SYBR green master mix는 Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)로부터 구입하였다. Oligonucleotide primers는 Bioneer (Daejeon, Korea)로부터 구입하였다.

2. 실험방법

1) 시료 추출 방법

化癩煎 8첩 분량의 한약재 408 g을 8시간 동안 60°C의 물에 35% 에탄올을 증탕시킨 용액(35 mL EtOH/1,000 mL of solution)을 사용하여 추출하였다. 추출물(Hwaweo-jeon, HWJ)은 10 μ m cartilage paper를 사용하여 추출하였으며, 에탄올은 vacuum rotary evaporation (EYELA, Tokyo, Japan)으로 제거하였다. 추출물은 동결건조하고, 추출 효율은 14% 정도로 계산되었다. 건조된 분말은 -20°C에서 보관하고, 사용 전 실험을 위해 증류수에서 희석하여 사용하였다. Voucher sample은 상지대학교 한의과대학 약리학실험실에 보관하였다.

2) *in vitro* 실험 방법

(1) 전조골세포(pre-osteoblast) MC3T3-E1의 세포 배양 전조골세포(pre-osteoblast) MC3T3-E1 (Subclone 4)은 ATCC (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 이 세포들은 10% FBS, penicillin (100 U/mL), 그리고 100 μ g/mL의 streptomycin이 첨가된 37°C와 5% CO₂ incubator 조건의 α -MEM에서 배양하였다. 세포 배양 배지는 3일마다 교체하였다.

(2) 조골세포생성 분석(osteoblastogenesis assay)

조골세포 분화를 위해 MC3T3-E1 세포는 1 mL당 1×10^5 개의 밀도로 된 12-well plate에서 증식하였다. 상기 세포들은 HWJ의 농도 차이와 관계없이 골 생성 배지(50 μ g/mL ascorbic acid, 10 mM β -glycerophosphate,

and 1 μ M dexamethasone)에서 배양하였다. 세포 배양 배지는 2일마다 교체하였다.

(3) 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay

본 연구는 세포 생존능(cell viability)을 평가하기 위해 MTT 분석법을 사용하였다. MC3T3-E1 세포들을 1 well 마다 1×10^4 밀도로 된 96-well plate로 배정하였고, 이후 48시간 동안 5% CO₂를 함유한 37°C의 습기찬 공기에서 HWJ 1.25~1,000 μ g/mL 농도 범위로 처치하였다. 처치한 세포들에 4시간 동안 37°C의 MTT 용액(5 mg/mL)을 첨가하여 염색하였다. 상등액 세척 후 MTT solution인 침전된 비수용성 formazan product를 dimethyl sulfoxide에 용해하였다. 세포 생존능력은 Epoch[®] microvolume spectrophotometer system (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)을 이용하여 570 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. Relative cell viability는 HWJ를 처치하지 않은 normal group의 생존율을 100% 기준으로 하여 대조군들에서 나타나는 흡광도의 수치를 normal group과 비교하여 상대적 세포 생존율을 산출하였다.

(4) ALP 염색(ALP staining)

본 연구는 조골세포생성 분석을 위하여 MC3T3-E1 세포를 골 생성 배지 내에서 HWJ 1.25~1,000 μ g/mL 농도 조건으로 배양하였다. ALP 염색은 6일 이후 시중에서 유통되는 염색 키트(Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan)를 사용하여 시행하고, 염색된 세포들은 Leica DM IL LED microscope (Leica, Wetzlar, Germany)로 관찰하였다. 추가로 HWJ 투여에 대한 효과를 명확하게 확인하기 위해 아래에 기재한 유전자 발현으로 수치를 통해 객관화하였다.

3) *in vivo* 실험 방법

(1) 골절 유발

본 연구의 골절 mouse model로써 골수 내 핀 고정을 한 편측의 개방형 횡상 경골골절이 사용되었다.

실험동물은 20 mg/kg 용량의 Zoletil 50 (Virbac, Carros Cedex, France)을 복강 내 주사(intraperitoneal injection, IP)로 마취하였으며, 통증 완화를 목적으로 골절 전 30분과 외과적 처치 후 3일 경과 시점에서 nefopam 20 mg/kg/day IP 요법이 사용되었다.

본 실험에서는 실험동물에서 경골골절 유발 시 골편의 크기, 골절 방향, 연부 조직의 손상 등 균일한 골절

표본을 유발하기 위해서 Bonnarens and Einhorn 방법¹⁰⁾을 변형하여 사용하였다. 고정된 mouse의 아랫다리를 평평한 판 위에 위치시키고, 경골 위로 수직으로 길이 100 cm, 내부 지름 20 mm의 긴 유리관을 수직으로 세운다. 이 관을 통해 무게 약 17 g의 쇠구슬을 4.42 m/s의 속도로 낙하시켜 경골골절을 유발하였다.

마취 후 실험동물의 무릎 부분 주위를 면도하여 毛를 제거하였으며, Povidone antiseptic solution (Green Pharmaceutical Co., Ltd., Seoul, Korea)을 사용하여 소독 처치하였다. 피부 절개는 외과용 scissors를 사용하여 내측 patella 부위에 시행하였다. 골절 부위를 안정시키기 위해서 patellar ligament 외측 부분에 경골 상관절면을 통해 경골의 골수강을 향해 26 gauge syringe needle (Kovax-Syringe 1 mL; Korea Vaccine Co., Ltd, Ansan, Korea)을 주입하였다.

절개 부위는 항균 용액에 의해 소독하였으며, sutures (B. Braun Melsungen, Melsungen, Germany)를 사용하여 봉합하였다. 외과적 처치 부위의 연부조직을 보호하기 위해 붕대를 적용하였다.

(2) 군 분류 및 약물 투여

실험동물은 무작위로 4개의 group으로 분배하고 각각의 그룹에 동일하게 9마리씩 배속시켰다. 정상군(normal group)은 경골골절 손상을 주지 않은 비골절군(non-fracture group)으로 설정하였고, 대조군(control group)은 경골에 골절을 유발한 골절 단독군(bone fracture group), 이외 2그룹은 경골에 골절을 유발 후 각각 HWJ를 50, 100 mg/kg로 투여한 군으로 나누었다. HWJ를 처치한 2개의 군 모두 매일 경구로 HWJ를 섭취하게 하였다. 각 군별 HWJ는 1회/day, 10 A.M.에 투여하였다. 대조군 및 HWJ 처치군은 골절 유발 후 7, 14, 21일에 3마리씩 처사하였다.

(3) 골편 채취

골절 유발 후 7, 14, 21일에 mouse들의 경골을 대퇴골과 족부 및 주위의 연부조직으로부터 세심하게 분리하였다. Bone callus들은 액체성의 nitrogen으로 즉시 담가졌고, RNA 추출에 앞서 powder 형태로 분쇄되었다.

(4) Bone marrow 분리(bone marrow-derived macrophage [BMDMs]의 세포 배양)

골수 유래 대식세포(BMDMs)는 골절군과 비골절군에서 분리하였다. 군별 mouse들은 골절 후 7, 14, 21일

에 각각 3마리씩 처사하여 골절된 것과 골절되지 않은 경골을 수집하였다. 주위의 연부조직은 세심하게 제거하여 골간과 골단 사이의 선을 따라 절개한 후 골 표본을 채취하였다. 이후 26 gauge의 1 mL syringe needle에 냉각된 멸균의 1×phosphate buffer saline (PBS)를 채워 경골의 골수강에 주입하였다. 골 공동(bone cavity)은 bone marrow를 제거하기 위하여 흰색이 보이는 지점까지 2-5 mL의 1×PBS 용액으로 세척하였다. 세정된 BMDMs를 함유한 1×PBS는 얼음 내의 멸균된 cell strainer (FALCON, Durham, NC, USA)에 수집하였다. 모아진 세포들은 멸균된 50 mL 원추형의 원심분리기관에서 처리하였고, 이 과정은 3분 동안 1,500 rpm의 조건에서 시행하고 상등액은 폐기하였다. 1×red blood cells lysis buffer가 5분 동안 얼음 위에 incubating된 cell pellet에 첨가하였다. 이후 1,500 rpm에서 3분동안 원심분리하고 상등액은 폐기하였다. Pellets는 두 번의 1,500 rpm, 3분 조건의 원심분리와 상등액의 폐기를 겸하여 1 mL의 차갑게 멸균된 1×PBS에 의해 세척하였다. 용해된 세포들은 차후 분석을 위해 -80°C에서 보관하였다.

(5) Plasma 분리

골절과 관계없이 HWJ의 간·신독성(liver & kidney toxicity)을 평가하기 위해 12주령의 C57BL/6J mouse 2마리를 대조군으로 설정하고, 추가 4마리에 각각 2마리씩 HWJ 50, 100 mg/kg을 처치하였다. 투여 21일 후 mouse들은 12시간 동안 금식 처치를 받았으며, 복강 내 주사요법으로 Zoletil 50 (20 mg/kg)을 주사하여 마취하였다. 혈액 표본은 안구 후방에 나타난 출혈 부위에서 채취된 blood samples로 측정되었다. 혈액은 plasma를 분리하기 위해서 1,000×20분으로 원심분리하였다.

(6) 혈액 생화학적 분석

HWJ의 안전성 검사를 하기 위해 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) 및 creatinine (CRE) 수치를 측정하였다. 이를 위해 원심분리된 plasma를 시중에 유통되는 kits (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA)를 이용하여 혈액 생화학적 분석을 시행하였다.

4) 유전자 분석 방법

(1) Total RNA 추출

용해된 BMDMs와 ALP staining된 MC3T3-E1 cells 및 분쇄된 Callus에서 total RNA를 추출하기 위하여

Easy-Blue[®] reagent (Intron Biotechnology, Seongnam, Korea)를 사용하였다. Total RNA는 Epoch microvolume spectrophotometer system (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)을 통해 수량화하였다.

(2) Complementary DNA (cDNA) 합성

cDNA는 isolated total RNA (1 µg), d(T) 16 primer, 그리고 avian myeroblastosis virus 역전사효소(AMV reverse transcriptase)를 사용하여 합성하였다.

(3) Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

상대적인 유전자 발현은 SYBR Green PCR Master Mix 와 oligonucleotide primers를 겸한 real-time PCR technique (Real Time PCR System 7500; Applied Biosystems)을 사용하여 탐지하였다(Table II).

Threshold cycle (Ct)은 RT-qPCR 실험 결과 산출된 수치를 계산하기 위해 사용하는 단위이다. 유전자의 발현 정도를 객관화하기 위하여 house keeping gene인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase의 Ct 값을 기준값으로 사용하였다. 이 수치를 바탕으로 조골과 유관한 ALP, Runx2, OCN, OSX, Col2a1 유전자 및 파골과 관련된 OPG과 RANKL 등 각 유전자 발현의 상대적 수치를 도출하였다. 유전자 발현 분석에는 Applied Biosystems의 gene express 2.0 program을 사용하였다.

5) 골절 부위의 영상의학적 관찰(radiography)

경골골절 model이 성공적으로 준비되었는지를 확인

하기 위해 X-ray를 사용하였다. 실험에 사용된 동물들은 상기한 골절 시술 직후, 즉각적으로 방사선 system (high-resolution digital radiograph system)(Galaxy A26430; Medien International Co. Ltd., Seoul, Korea)으로 경골골절이 잘 되었음을 확인하였다(Fig. 1). 이후 Mouse들은 골절 유발 후 7, 14, 21일에 마취되었고, 방사선 촬영을 통해 골절 치유 정도가 평가되었다.

6) 통계 분석 방법(statistical analysis method)

각각의 결과는 삼중의 실험을 통한 평균±표준편차(mean ±standard deviation)로 결과값을 나타내었다. 통계 분석은 GraphPad Prism (version 5.01; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)을 사용하였고, One-way ANOVA 시스템으로 Dunnett's post hoc test로 유의성 여부를 결정하였다. p값이 0.05 미만일 경우 유의미하다고 판정하였다.

결과»»»»

1. *in vitro* 실험 결과

1) MTT assay 결과

MC3T3-E1 세포에 HWJ를 각기 다른 농도(15.6~1,000 µg/mL)로 처리하였고, MTT assay를 통해 세포 생존율 (cell viability)을 결정하였다. 정상군(HWJ 별무처리 및

Table II. The Primer Sequences for Quantitative Real-time PCR

Gene	Primer sequences	
	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
ALP	AACCCAGACACAAGCATTCC	GAGAGCGAAGGGTCAGTCAG
Runx2	ACTCTTCTGGAGCCGTTTATG	GTGAATCTGGCCATGTTTGTG
OCN	AAGCAGGAGGGCAATAAGGT	TTTGTAGGCGGTCTTCAAGC
OSX	CGCTTTGTGCCTTTGAAAT	CCGTCAACGACGTTATGC
Col2a1	ACTGGTAAAGTGGGGCAAGAC	CCACACCAAATTCCTGTTC
RANKL	TCCTGAGACTCCATGAAAACGCAG	GCCACATCCAACCATGAGCCTTC
OPG	TGAGAGAACGAGAAAGACCTGC	CGGATTGAACCTGATCCCTAT
GAPDH	GACGGCCGCATCTTCTTGT	CACACCGACCTTCACCATTTT

PCR: polymerase chain reaction, ALP: alkaline phosphatase, Runx2: runt-related transcription factor 2, OCN: osteocalcin, OSX: osterix, Col2a1: collagen type II alpha 1 chain, RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, OPG: osteoprotegerin, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

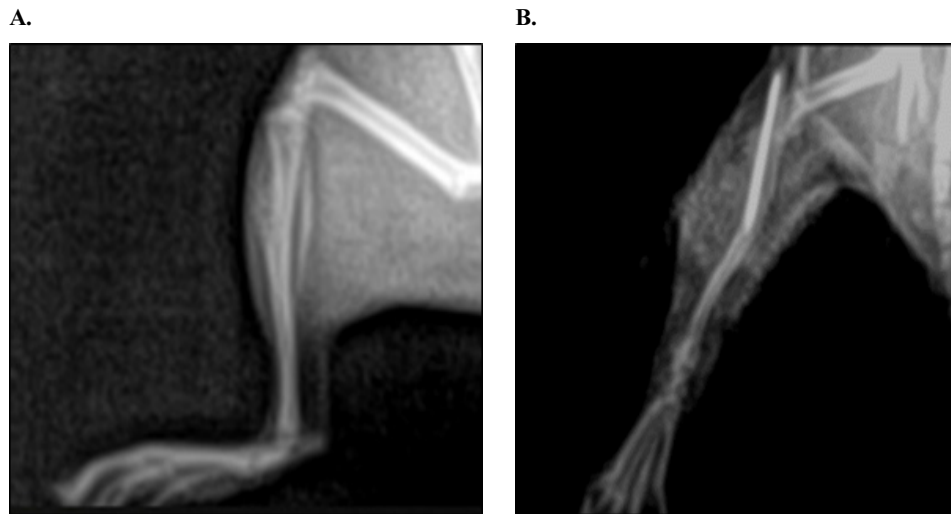


Fig. 1. The changes between normal tibia and fractured tibia. The tibia fracture mouse model was performed successfully. (A) Normal non-fractured mouse bones, (B) fractured mouse tibia after immediate fracture-inducing.

미분화된 세포군)의 세포 생존율은 $100 \pm 6.01\%$ 로 나타났다. 분화된 군에서의 세포 생존율은 $150.61 \pm 5.67\%$ 이었다. 분화된 MC3T3-E1 cell에 HWJ $15.6 \mu\text{g/mL}$ 를 처치한 군에서의 세포 생존율은 $138.82 \pm 2.40\%$ 으로 측정되었으나 유의성은 없었다. HWJ $31.2, 62.5 \mu\text{g/mL}$ 처치군에서의 세포 생존율은 각각 $135.50 \pm 3.91\%, 135.18 \pm 10.46\%$ 로 측정되었으며, 두 군 모두 $p < 0.01$ 로 세포 생존율에 영향이 없음이 유의하게 나타났다. HWJ $125, 250, 500 \mu\text{g/mL}$ 처치군에서는 각각 $129.63 \pm 0.88\%, 129.18 \pm 3.80\%, 114.31 \pm 4.68\%$ 로 계산되었으며, 세 군 모두 $p < 0.001$ 로 HWJ 처치가 각 농도군별 세포 생존에 미치는 영향이 없음이 유의미하게 확인되었다. HWJ $500 \mu\text{g/mL}$ 이하의 농도까지는 세포 생존율이 100% 이상 유지되었으나, HWJ $1,000 \mu\text{g/mL}$ 처치군에서의 세포 생존율은 $65.17 \pm 7.42\%$ 로 측정되어 유의미한 세포독성이 있고 세포 생존율이 유의하게 감소함을 확인할 수 있어(Fig. 2) 이후 실험에서는 HWJ $500 \mu\text{g/mL}$ 이하의 농도를 사용하였다.

2) ALP staining 분석 결과

HWJ의 조골세포 분화 향상 여부를 조사하기 위해 7 일간의 골 유도 환경에서 ALP 염색을 시행하였다. 육안으로 확인했을 때 ALP 염색은 조골세포 분화군에서 색이 짙어졌으며, 200배율과 500배율 사진 모두에서 조골세포 분화와 HWJ $62.5 \mu\text{g/mL}$ 농도 이하의 약물처리

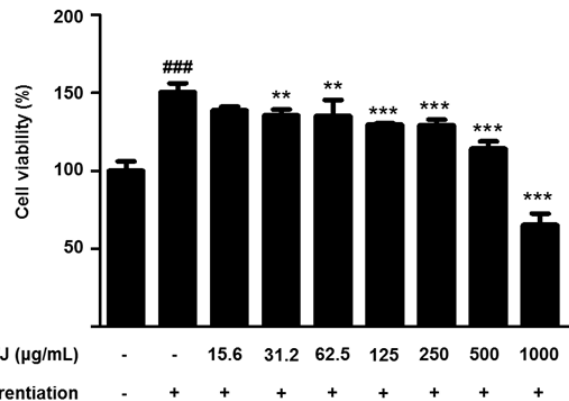


Fig. 2. Effect of HWJ on the viability of MC3T3-E1 cells. Pre-osteoblasts were treated by various concentrations of HWJ for 48 hours in presence or absence of differentiation conditions, and their viability was estimated using MTT assay. The values are represented as mean±standard deviation. Significances were determined using one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. HWJ: *Hwaweo-Jeon*, MTT: 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide. ### $p < 0.001$ versus normal group, ** $p < 0.01$ versus differentiation group, *** $p < 0.001$ versus differentiation group.

를 겸한 군에서 더욱 짙어지는 것이 나타났다. 이는 HWJ $62.5 \mu\text{g/mL}$ 이하 농도에서 HWJ에 의한 조골세포 분화능의 현저한 증가를 의미한다(Fig. 3).

3) 전조골세포(MC3T3-E1) 유전자 분석 결과

HWJ의 추가적인 효과를 명확히 하기 위하여 MC3T3-E1

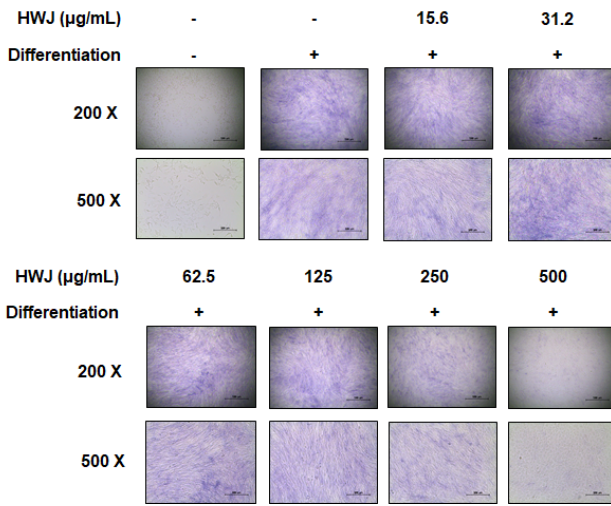


Fig. 3. Effect of HWJ on osteogenesis of MC3T3-E1 cells. We used ALP staining to analyze whether HWJ promotes differentiation of pre-osteoblast (MC3T3-E1 cell). MC3T3-E1 cells were stimulated by osteoinductive media in presence or absence of indicated HWJ concentrations for 7 days and subjected to ALP staining. The stained cells were visualized using Leica DM IL LED microscope at 500× and 200× magnification. This picture shows that the color of ALP staining below the concentration of HWJ 62.5 µg/mL are darker than that of other groups. HWJ: *Hwaweo-Jeon*, ALP: alkaline phosphatase.

cells는 차후 PCR 분석을 목적으로 염증기와 연성가골기의 경계 기간인 7일 동안 각각 HWJ 12.5, 25, 50 µg/mL 농도로 처치하였다. 조골세포 분화를 확인하기 위한 표지인자로 ALP, Runx2, OCN, OSX와 Col2a1을 사용하였다. 조골세포 분화 표지자들의 상대적인 mRNA 발현은 정상군인 differentiation 단독 군과 비교했을 때 증가한 것으로 나타났다.

(1) ALP 유전자 발현에 미치는 영향

대조군에서 ALP의 상대적인 mRNA의 발현이 1.00±0.16으로 측정되었다. HWJ 12.5, 25, 50 µg/mL 군에서 각각 10.56±7.48, 10.38±12.03, 20.39±14.37로 측정되어 농도 증가에 따라 ALP 유전자 발현이 점차 증가하였음을 확인할 수 있었다. 그러나 농도별 대조군과 차이에 있어서 유의성은 없었다(Fig. 4).

(2) Runx2 유전자 발현에 미치는 영향

대조군에서 Runx2의 상대적인 mRNA의 발현이 1.00±0.19로 측정되었다. HWJ 12.5, 25, 50 µg/mL 군에서는 각각 4.81±0.82, 4.10±0.19, 3.60±0.93로 계산되었다. HWJ 12.5 µg/mL 군에서 가장 발현이 증가하였으며, HWJ를 처치한 모든 실험군에서 대조군과 비교 시 유의한 차이

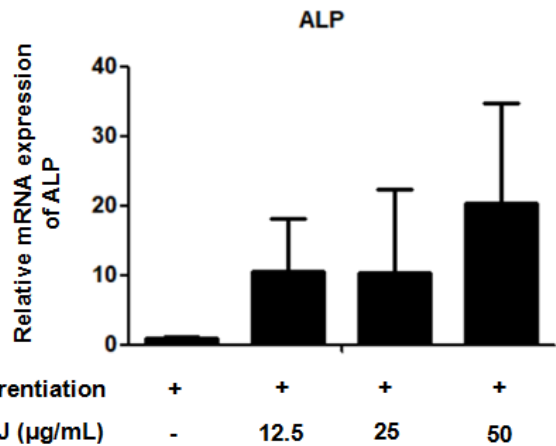


Fig. 4. Effect of HWJ on mRNA level of ALP in MC3T3-E1 cells on 7 days after osteogenesis inducing. MC3T3-E1 cells were cultured in osteoinductive media in presence or absence different concentrations of HWJ (12.5, 25 and 50 µg/mL) for 7 days for subsequent PCR analyses. The mRNA level of ALP was detected by qRT-PCR. Values are the mean±standard deviation (n=3). HWJ: *Hwaweo-Jeon*, ALP: alkaline phosphatase, PCR: polymerase chain reaction, qRT-PCR: real-time reverse transcription-PCR.

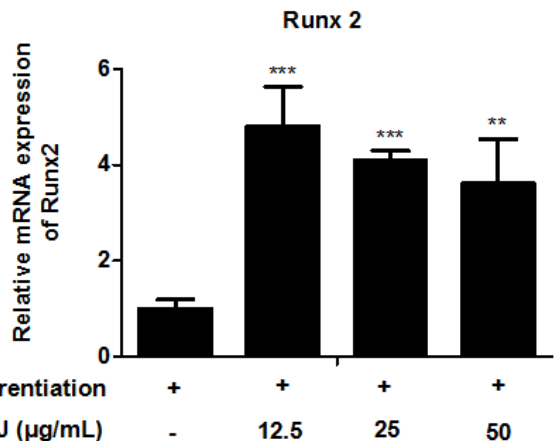


Fig. 5. Effect of HWJ on mRNA level of Runx2 in MC3T3-E1 cells on 7 days after osteogenesis inducing. MC3T3-E1 cells were cultured in osteoinductive media in presence or absence different concentrations of HWJ (12.5, 25 and 50 µg/mL) for 7 days for subsequent PCR analyses. The mRNA level of Runx2 was detected by qRT-PCR. Values are the mean±standard deviation (n=3). HWJ: *Hwaweo-Jeon*, Runx2: runt-related transcription factor 2, PCR: polymerase chain reaction, qRT-PCR: real-time reverse transcription-PCR. **p<0.01 versus differentiation group, ***p<0.001 versus differentiation group.

를 나타냈다(Fig. 5).

(3) OCN 유전자 발현에 미치는 영향

대조군에서 OCN의 상대적인 mRNA의 발현은 1.00±0.35

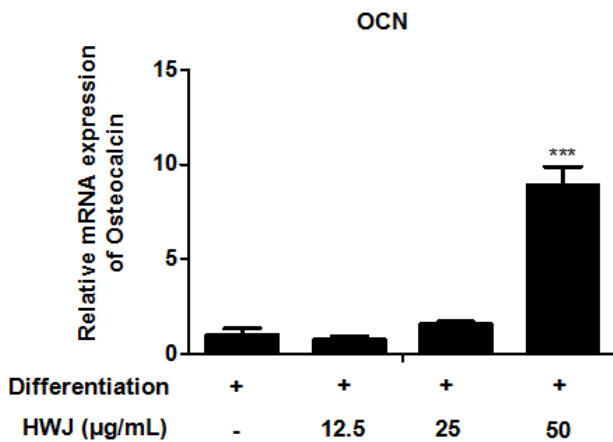


Fig. 6. Effect of HWJ on mRNA level of OCN in MC3T3-E1 cells on 7 days after osteogenesis inducing. MC3T3-E1 cells were cultured in osteoinductive media in presence or absence different concentrations of HWJ (12.5, 25 and 50 µg/mL) for 7 days for subsequent PCR analyses. The mRNA level of OCN was detected by qRT-PCR. Values are the mean±standard deviation (n=3). HWJ: *Hwaweo-Jeon*, OCN: osteocalcin, PCR: polymerase chain reaction, qRT-PCR: real-time reverse transcription-PCR. ***p<0.001 versus only differentiation group.

로 측정되었다. HWJ 12.5 µg/mL 군에서는 0.74±0.22로 상대적으로 OCN 발현이 감소하였다. HWJ 25, 50 µg/mL 군에서는 각각 1.57±0.14, 8.91±0.98로 계산되었다. HWJ 50 µg/mL 군에서 대조군 대비 유의성 있는 발현증가를 나타냈다(Fig. 6).

(4) OSX 유전자 발현에 미치는 영향

대조군에서 OSX의 상대적인 mRNA의 발현이 1.00±0.04로 측정되었다. HWJ 12.5, 25, 50 µg/mL 군에서는 각각 2.63±0.33, 7.66±1.24, 3.80±0.30으로 측정되었다. OSX 유전자 발현에 있어 대조군보다 실험군이 유의성 있는 증가세를 보였다(Fig. 7).

(5) Col2a1 유전자 발현에 미치는 영향

대조군에서 Col2a1의 상대적인 mRNA의 발현이 1.00±0.24로 측정되었다. HWJ 12.5, 25 µg/mL 군에서는 각각 1.81±0.57, 2.14±0.50으로 측정되었으며, 25 µg/mL 농도에서 유의하게 증가하였다. HWJ 50 µg/mL 군에서 0.63±0.10으로 대조군보다 mRNA 발현이 감소한 양상을 보였다(Fig. 8).

2. *in vivo* 실험 결과

1) 안전성 검사 결과

HWJ의 간독성을 탐지하기 위해 ALT, AST의 plasma

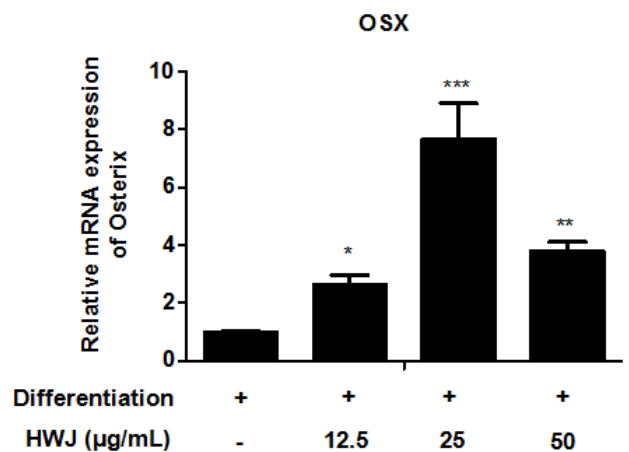


Fig. 7. Effect of HWJ on mRNA level of OSX in MC3T3-E1 cells on 7 days after osteogenesis inducing. MC3T3-E1 cells were cultured in osteoinductive media in presence or absence different concentrations of HWJ (12.5, 25 and 50 µg/mL) for 7 days for subsequent PCR analyses. The mRNA level of OSX was detected by qRT-PCR. Values are the mean±standard deviation (n=3). HWJ: *Hwaweo-Jeon*, PCR: polymerase chain reaction, OSX: osterix, qRT-PCR: real-time reverse transcription-PCR. *p<0.05 versus only differentiation group, **p<0.01 versus only differentiation group, ***p<0.001 versus only differentiation group.

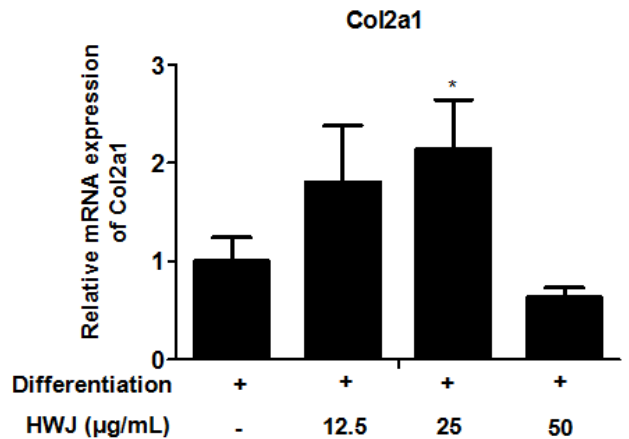


Fig. 8. Effect of HWJ on mRNA level of Col2a1 in MC3T3-E1 cells on 7 days after osteogenesis inducing. MC3T3-E1 cells were cultured in osteoinductive media in presence or absence different concentrations of HWJ (12.5, 25 and 50 µg/mL) for 7 days for subsequent PCR analyses. The mRNA level of Col2a1 was detected by qRT-PCR. Values are the mean±standard deviation (n=3). HWJ: *Hwaweo-Jeon*, Col2a1: collagen type II alpha 1 chain, PCR: polymerase chain reaction, qRT-PCR: real-time reverse transcription-PCR. *p<0.05 versus only differentiation group.

level을 평가하기로 했으며, 신장 독성 평가를 위해 CRE의 plasma level을 평가하기로 했다. HWJ 처치군은 대

조군과 정상 수치 범주를 가진 mouse군에 비교해 수치가 유사하거나 소폭 증가하였으나 임상적 고려할 만한 수준은 아니었다(Table III).

2) BMDMs의 유전자 분석 결과

본 연구자는 *in vivo* 실험에서 조골세포의 분화에 대한 HWJ의 영향을 객관화하기 위해 BMDMs의 조골세포 내 ALP, Runx2, OCN, OSX, Col2a1 등의 substance에서 유전자의 상대적인 mRNA 발현을 측정하였다. *in vitro* 실험에서와 동일한 측정방법으로 quantitative RT-PCR을 사용하였다.

(1) ALP 유전자 발현에 미치는 영향

ALP 유전자 발현은 골절 발생 후 7일째 대조군이 1.00±0.22이었을 때, HWJ 50 mg/kg 군은 10.40±2.50으로 유의성 있게 증가하였다. HWJ 100 mg/kg 군은 3.20±0.94로 대조군보다 발현이 증가하였으나 유의성은 없었다. 골절 발생 후 14일째 대조군의 ALP 유전자 발현이 1.00±0.68이었을 때, HWJ 50, 100 mg/kg 군에서 각각 15.74±4.26, 24.53±5.30으로 두 군 모두 대조군보다 유의한 발현 증가를 보였다. 골절 발생 후 21일째 대조군의 ALP 유전자 발현이 1.00±0.52이었을 때, HWJ 50 mg/kg 군과 100 mg/kg 군은 각각 0.31±0.10, 0.31±0.15로 대조군보다 발현이 감소하였으나, 유의성은 없었다(Fig. 9).

(2) Runx2 유전자 발현에 미치는 영향

Runx2의 유전자 발현은 골절 발생 후 7일째 대조군이 1.00±0.22이었을 때, HWJ 50 mg/kg 군은 1.40±0.03, HWJ 100 mg/kg 군은 0.35±0.02로 대조군보다 각각 증감을 보였으나, 유의성은 없었다. 골절 발생 후 14일째 대조군에서 발현이 1.00±0.62이었을 때, HWJ 50 mg/kg 군과 100 mg/kg 군은 각각 5.89±0.67, 14.49±3.25로 모두 대조군보다 유의하게 증가하였다. 골절 발생 후 21일

째 발현이 대조군에서 1.00±0.35이었을 때, HWJ 50 mg/kg 군과 100 mg/kg 군에서 각각 0.30±0.14, 0.99±0.16으로 모두 대조군보다 유의성 없는 발현 감소를 나타냈다(Fig. 10).

(3) OCN 유전자 발현에 미치는 영향

OCN의 유전자 발현은 골절 발생 후 7일째 대조군이 1.00±0.20이었을 때, HWJ 50 mg/kg 군과 100 mg/kg 군은 각각 1.00±0.10, 0.17±0.05였으며 유의하지 않았다. 골절 발생 후 14일째 대조군의 발현이 1.00±0.30이었을 때, HWJ 50 mg/kg 군과 100 mg/kg 군은 각각 3.75±0.38, 17.16±1.86으로 대조군보다 유의성 있는 발현증가를 보였다. 골절 발생 후 21일째 OCN의 유전자 발현이 1.00±0.72이었을 때, HWJ 50 mg/kg 군과 100 mg/kg 군 각각 4.90±1.95, 18.36±1.07로 대조군 대비 유전자 발현이 증가하였고, 유의한 수치였다(Fig. 11).

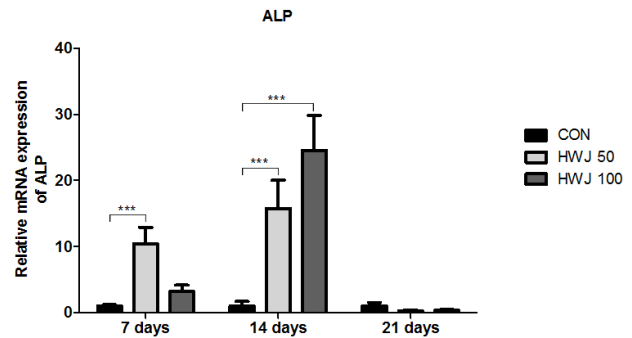


Fig. 9. Effect of HWJ on mRNA level of ALP in bone callus from mouse tibia on 7, 14, and 21 days postfracture. BMDMs were isolated from non-fractured, fractured and fractured with HWJ-administered mouse tibia at different time points (7, 14 and 21 days postfracture) and used for total RNA extraction. Prepared RNA was used for measuring the expression of mRNA of ALP. CON: Only bone fracture group, HWJ 50: bone fracture with HWJ 50 mg/kg treated group, HWJ 100: bone fracture with HWJ 100 mg/kg treated group. ALP: alkaline phosphatase, HWJ: *Hwaweo-Jeon*, BMDMs: bone marrow-derived macrophage. ***p<0.001 versus CON group.

Table III Effect of HWJ on ALT, AST and CRE of Plasma in Mice Regardless of Tibia Fracture

Group	Parameters (IU/L)		
	ALT	AST	CRE
Normal range	25-60	50-100	0.097-0.184
Control	32.49±8.15	64.09±22.63	0.20±0.07
HWJ (50 mg/kg)	39.84±8.00	95.96±54.92	0.20±0.09
HWJ (100 mg/kg)	48.68±1.5	113.69±3.65	0.54

Values are the mean±standard deviation.

HWJ: *Hwaweo-Jeon*, ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase, CRE: creatinine.

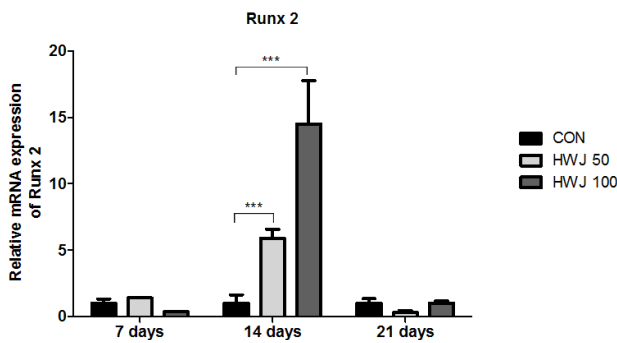


Fig. 10. Effect of HWJ on mRNA level of Runx2 in bone callus from mouse tibia on 7, 14, and 21 days postfracture. BMDMs were isolated from non-fractured, fractured and fractured with HWJ-administered mouse tibia at different time points (7, 14 and 21 days postfracture) and used for total RNA extraction. Prepared RNA was used for measuring the expression of mRNA of Runx2. CON: only bone fracture group, HWJ 50: bone fracture with HWJ 50 mg/kg treated group, HWJ 100: bone fracture with HWJ 100 mg/kg treated group. HWJ: *Hwaweo-Jeon*, Runx2: runt-related transcription factor 2, BMDMs: bone marrow-derived macrophage. *** $p < 0.001$ versus CON group.

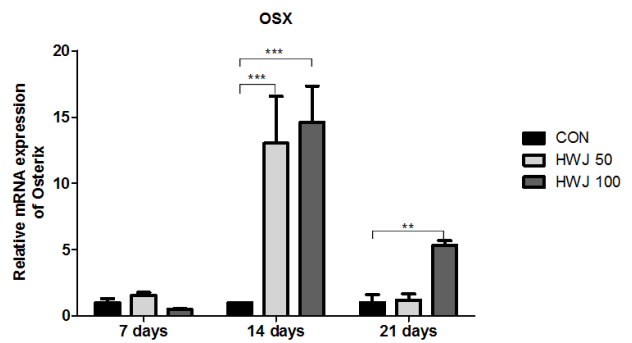


Fig. 12. Effect of HWJ on mRNA level of OSX in bone callus from mouse tibia on 7, 14, and 21 days postfracture. BMDMs were isolated from non-fractured, fractured and fractured with HWJ-administered mouse tibia at different time points (7, 14 and 21 days postfracture) and used for total RNA extraction. Prepared RNA was used for measuring the expression of mRNA of OSX. CON: only bone fracture group, HWJ 50: bone fracture with HWJ 50 mg/kg treated group, HWJ 100: bone fracture with HWJ 100 mg/kg treated group. HWJ: *Hwaweo-Jeon*, OSX: osterix, BMDMs: bone marrow-derived macrophage. ** $p < 0.01$ versus CON group, *** $p < 0.001$ versus only CON group.

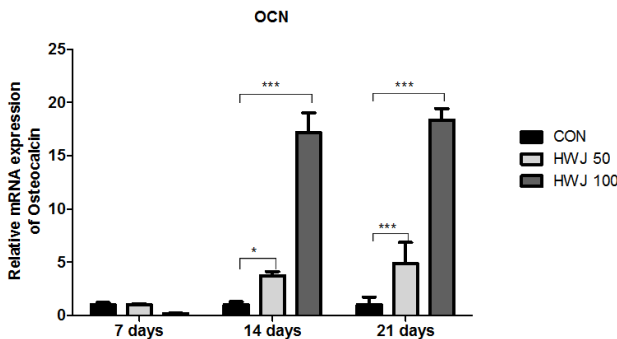


Fig. 11. Effect of HWJ on mRNA level of OCN in bone callus from mouse tibia on 7, 14, and 21 days postfracture. BMDMs were isolated from non-fractured, fractured and fractured with HWJ-administered mouse tibia at different time points (7, 14 and 21 days postfracture) and used for total RNA extraction. Prepared RNA was used for measuring the expression of mRNA of OCN. CON: only bone fracture group, HWJ 50: bone fracture with HWJ 50 mg/kg treated group, HWJ 100: bone fracture with HWJ 100 mg/kg treated group. HWJ: *Hwaweo-Jeon*, OCN: osteocalcin, BMDMs: bone marrow-derived macrophage. * $p < 0.05$ versus CON group, *** $p < 0.001$ versus CON group.

(4) OSX 유전자 발현에 미치는 영향

OSX의 유전자 발현은 골절 발생 후 7일째 대조군이 1.00 ± 0.20 이었을 때, HWJ 50 mg/kg 군, 100 mg/kg 군은 각각 1.00 ± 0.10 , 0.18 ± 0.05 로 대조군보다 유사하거나 감소한 발현을 보였으나, 유의미한 수치는 아니었다.

골절 발생 후 14일째 발현이 1.00 ± 0.30 이었을 때, HWJ 50 mg/kg 군, 100 mg/kg 군 각각 3.75 ± 0.38 , 17.16 ± 1.86 으로 대조군 대비 유의성 있는 발현 증가세를 보였다. 골절 발생 후 21일째 대조군의 발현이 1.00 ± 0.72 이었을 때, HWJ 50 mg/kg 군은 4.90 ± 1.95 로 대조군 대비 유의하지 않게 증가하였고, HWJ 100 mg/kg 군은 18.36 ± 1.07 로 유의성 있게 증가하였다(Fig. 12).

(5) Col2a1 유전자 발현에 미치는 영향

Col2a1의 유전자 발현은 골절 발생 후 7일째 대조군이 1.00 ± 0.00 이었을 때, HWJ 50 mg/kg 군과 HWJ 100 mg/kg 군 수치 모두 0.00 ± 0.00 으로 대조군 대비 발현이 극미하였으며, 통계적인 의미는 없었다. 골절 발생 후 14일째 대조군 발현이 1.00 ± 0.53 이었을 때, HWJ 50 mg/kg 군, 100 mg/kg 군이 각각 20.16 ± 4.02 , 8.13 ± 0.85 로 대조군 대비 유의하게 증가하였다. 골절 발생 후 21일째 Col2a1의 유전자 발현이 대조군에서 1.00 ± 0.28 이었을 때, HWJ 50 mg/kg 군과 100 mg/kg 군은 각각 0.10 ± 0.04 , 0.39 ± 0.04 로 대조군보다 유의성 없는 감소세를 보였다(Fig. 13).

(6) RANKL 유전자 발현에 미치는 영향

동물 모델에서 파골세포의 분화에 대한 HWJ의 효과를 설명하기 위하여 BMDMs의 파골세포 내 RANKL과 같은 특정한 유전자의 상대적인 mRNA 발현을 결정하기 위해 quantitative RT-PCR을 시행하였다. 골절 발생

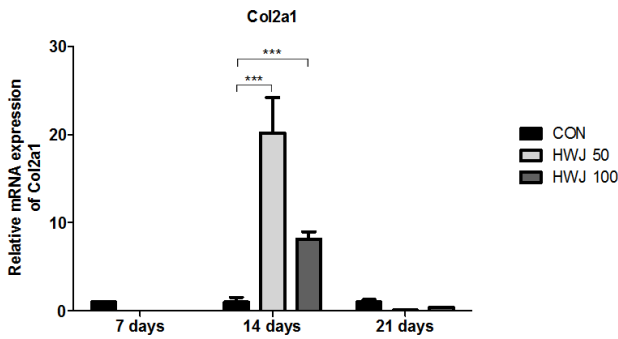


Fig. 13. Effect of HWJ on mRNA level of Col2a1 in bone callus from mouse tibia on 7, 14, and 21 days postfracture. BMDMs were isolated from non-fractured, fractured and fractured with HWJ-administered mouse tibia at different time points (7, 14 and 21 days postfracture) and used for total RNA extraction. Prepared RNA was used for measuring the expression of mRNA of Col2a1. CON: only bone fracture group, HWJ 50: bone fracture with HWJ 50 mg/kg treated group, HWJ 100: bone fracture with HWJ 100 mg/kg treated group. HWJ: *Hwaweo-Jeon*, Col2a1: collagen type II alpha 1 chain, BMDMs: bone marrow-derived macrophage. *** $p < 0.001$ versus only CON group.

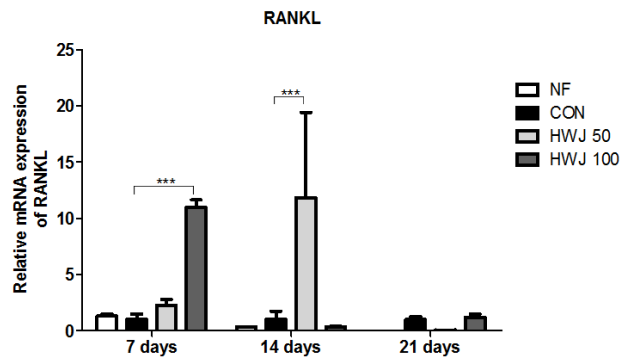


Fig. 14. Effect of HWJ on mRNA level of RANKL in bone callus from mouse tibia on 7, 14, and 21 days postfracture. BMDMs were isolated from non-fractured, fractured and fractured with HWJ-administered mouse tibia at different time points (7, 14 and 21 days postfracture) and used for total RNA extraction. Prepared RNA was used for measuring the expression of mRNA of RANKL. NF: without bone fracture group, CON: only bone fracture group, HWJ 50: bone fracture with HWJ 50 mg/kg treated group, HWJ 100: bone fracture with HWJ 100 mg/kg treated group. HWJ: *Hwaweo-Jeon*, RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, BMDMs: bone marrow-derived macrophage. *** $p < 0.001$ versus CON group.

후 7일째 대조군(골절 단독군)의 RANKL 유전자 발현이 1.00 ± 0.48 이었을 때, HWJ 50 mg/kg 군은 2.26 ± 0.52 로 증가하였으나 유의성은 없었다. HWJ 100 mg/kg 군은 10.95 ± 0.68 로 대조군 대비 유의하게 발현이 증가하였다. 골절 발생 후 14일째 대조군 수치가 1.00 ± 0.73 이었을 때, HWJ 50 mg/kg 군은 11.82 ± 7.59 로 유의성 있는 증가를 보였다. HWJ 100 mg/kg 군에서는 0.32 ± 0.10 으로 CON군에 비해 발현이 감소하였고 유의하지 않았다. 골절 발생 후 21일 되었을 때, 대조군이 1.00 ± 0.24 이었을 때, HWJ 50 mg/kg 군과 100 mg/kg 군 각각 0.02 ± 0.00 , 1.19 ± 0.30 으로 대조군보다 감소와 증가세를 보였으나 유의성은 없었다(Fig. 14).

(7) OPG 유전자 발현에 미치는 영향

골절 발생 후 7일째, 대조군의 OPG 유전자 발현이 1.00 ± 0.00 이었을 때, HWJ 50 mg/kg 군에서는 1.17 ± 0.18 로 증가하였으나, 유의미하지 않았다. HWJ 100 mg/kg 군에서는 3.45 ± 3.51 로 유의성 있게 증가하였다. 골절 발생 후 14일째, 대조군의 OPG 유전자 발현이 1.00 ± 0.36 이었을 때, HWJ 50 mg/kg 군과 100 mg/kg 군은 각각 0.40 ± 0.02 , 2.08 ± 0.76 이었으나, 각 군의 증감이 유의하지 않았다. 골절 발생 후 21일째, 대조군이 1.00 ± 0.19 이었을 때, HWJ 50 mg/kg 군과 100 mg/kg 군은 각각 0.03 ± 0.00 ,

0.54 ± 0.10 으로 유의하지 않은 감소를 나타냈다(Fig. 15).

3) 영상의학적 분석 결과

방사선 사진 분석 결과 HWJ 투여로 골절 회복과정이 촉진되었음을 보여준다(Fig. 16). 골절 7일 경과 시, 대조군과 HWJ 50 mg/kg 군, HWJ 100 mg/kg 군 모두 골절 부위를 명확하게 확인할 수 있었다. 골절 14, 21일 경과 시 방사선 사진에서는 화살표로 표시한 부분에 골절 치유가 진행되었음이 나타났다. 골절 단독군의 방사선 사진과 비교했을 때, HWJ 투여군에서 bone callus의 크기가 증가한 것으로 골유합이 진행되었다는 사실을 판단할 수 있었다. 방사선 사진상 대조군과 실험군의 골절부 주위 연부조직의 swelling 정도를 비교했을 때 HWJ 50, 100 mg/kg 군에서 미약하게 완화된 상태를 관찰할 수 있었다. 이를 토대로 HWJ가 방사선적 골유합을 촉진하고, 주변 연부조직 회복에 영향을 미친다고 간주할 수 있다.

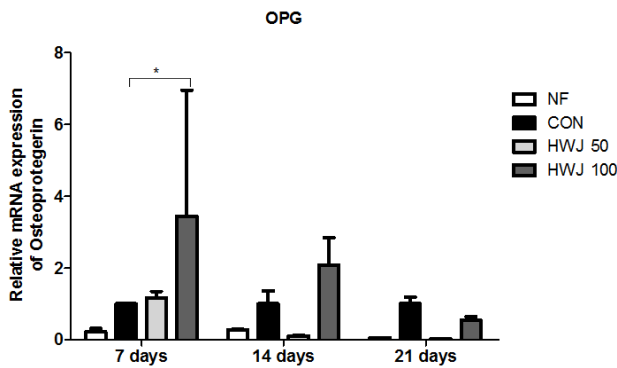


Fig. 15. Effect of HWJ on mRNA level of OPG in bone callus from mouse tibia on 7, 14, and 21 days postfracture. BMDMs were isolated from fractured, fractured HWJ-administered and non-fractured mouse tibia at different time points (7, 14 and 21 days postfracture) and used for total RNA extraction. Prepared RNA was used for measuring the expression of mRNA of OPG. NF: without bone fracture group, CON: only bone fracture group, HWJ 50: bone fracture with HWJ 50 mg/kg treated group, HWJ 100: bone fracture with HWJ 100 mg/kg treated group. HWJ: *Hwaweo-Jeon*, OPG: osteoprotegerin, BMDMs: bone marrow-derived macrophage. * $p < 0.05$ versus CON group.

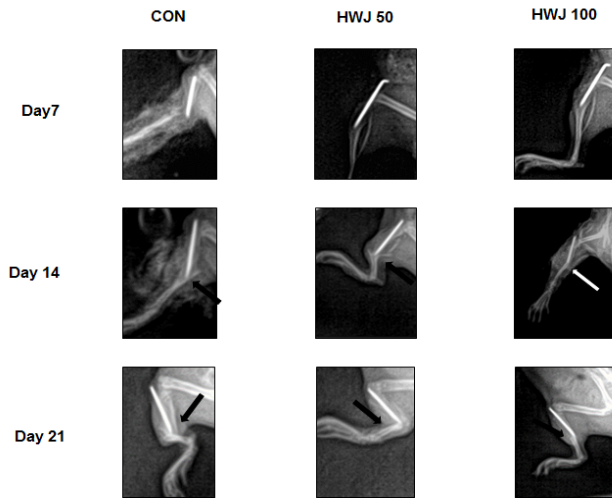


Fig. 16. Effect of HWJ on fracture healing process (X-ray data). These X-ray radiographic pictures of fracture bones show that tibias are nearly recovered by treating HWJ 50 mg/kg and HWJ 100 mg/kg after 14, 21 days of fracture. CON: only bone fracture group, HWJ 50: bone fracture with HWJ 50 mg/kg treated group, HWJ 100: bone fracture with HWJ 100 mg/kg treated group. HWJ: *Hwaweo-Jeon*.

고찰»»»»

골절은 교통사고, 스포츠 손상 등의 외인적 요인과 골다공증과 같은 내인적 요인에 의해서 발생한다¹¹⁾.

한의학적으로 골절은 唐代 王燾가 편찬한 『外臺祕要』¹²⁾에 “救急療骨折, 接骨如故...”이란 문구에 근거하여 명칭 기원을 설명하였고, 동시대의 『千金要方』¹³⁾에서 “以竹編來裏令遍縛令急勿令轉動”이라 하여 골절 발생 후 고정 치료의 필요성이 언급되었다. 이후 宋代의 『太平惠民和劑局方』¹⁴⁾에 “接骨續筋止痛活血法”라 하여 골의 연속성을 회복하기 위해 활혈법을 제시하였다. 『聖濟總錄』¹⁵⁾에서 “接骨各有方劑存言 當按症施治”라 하여 증상발현부위 축지 후 변증시치한다고 하였다. 또한, 초기에 화어활혈(化瘀活血), 중기에는 접골속근(接骨續筋), 후기에는 보기양혈(補氣養血), 건장근골(健壯筋骨)을 치법으로 한다고 하여 시기별 치료법을 구체적으로 제시하였다¹⁶⁾. 清代의 서적인 『醫宗金鑑』¹⁷⁾에는 “此膏治跌打損傷, 筋斷骨折, 腫硬青紫”로 외상으로 골절과 연부조직 손상이 동반될 경우 膏藥으로 치료한다고 하였고, 『傷科補要』¹⁸⁾에서는 “惑有從高倒墜, 天柱骨折, 致頸插入腔內”라 하여 경추 골절의 병인병리에 대한 구체적 언급이 있었다.

이와 같이 골절은 뼈나 연골의 연속성이 일부 혹은 전체적으로 소실된 상태이며, 염증기(inflammatory phase), 복원기(reparative phase), 재형성기(remodeling phase) 3가지 병기를 통해 회복된다¹⁹⁾. 염증기는 골절 후 약 1주일의 기간으로 골절 병리과정 중 급성기에 해당한다. 골절 발생 시 골부와 주위 연부조직의 열상 및 혈관 파괴와 혈전 형성을 동반하고 이로 인해 골절 부위에 혈류 차단이 발생하여 저산소·저영양상태가 되어 조직 변성을 유발하고, 조직 괴사 및 기질화가 초래된다²⁰⁾. 복원기는 골절 후 약 1~2개월로 가골기 또는 가골형성기로도 불린다. 기질화된 결합조직에서 조골세포가 증식되어 유골 및 직골로 변화하며, 연골모세포로부터 초자연골이 형성되어 골조직으로 치환되는 시기로, 이 중 발병일로부터 약 3주경에 해당하는 연성 가골기는 골편이 자유롭게 움직이지 못하게 되는 시기이다²¹⁾. 기능적 재구성기인 재형성기는 임상적 유합 형성 시기이다. 역학적 작용으로 골 흡수, 기능적 재건을 통한 remodeling이 일어나는 시기로 수개월에서 수년이 소요된다²¹⁾.

골절로 인한 조직의 혈중형성, 괴사 유발 과정은 한

의학적 관점에서 각종 외상에 기인하고, 혈류순환 저하의 병리 상태인 혈어증과 일맥상통한다고 볼 수 있다²²⁾. 전국한의과대학 한방재활의학 공동교육과정에서는 위의 문헌적, 인체생리학적 관계에 근거하여 더욱 구체적인 치법을 제시하였다. 발병일로부터 1~2주인 초기 염증기에는 활혈화어, 소종지통하고, 3~6주인 중기 복원기에는 화영생신·접골속근·서근활락하며, 7주 이후인 후기 재형성기에는 보기양혈, 조리비위, 보익간신하는 치법을 적용한다⁹⁾.

화어전은 당귀수산(當歸鬚散)²³⁻²⁵⁾의 변방으로 기혈어체·견인작통에 응용되며, 활혈거어(活血祛瘀)하는 한약재인 당귀미, 천궁, 소목, 도인, 홍화와 이기행기(理氣行氣)하는 향부자, 오약, 청피, 청열량혈(淸熱涼血)하는 적작약, 온화한담(溫化寒痰)하는 백개자, 발산풍한(發散風寒)하는 계심 등으로 구성되어 있다³⁾. 원방(原方)인 당귀수산에 비해 1첩당 소목이 1錢半, 당귀미가 1錢, 향부자, 적작약, 오약이 5分 및 도인 3分이 증량되었고, 홍화와 계심이 각 1分씩 감량되었다. 그 외 청피, 천궁, 백개자가 가미되었으며 감초가 제외되었다. 종합적으로 당귀수산 대비 활혈제와 행기제가 증량 및 추가되어 당귀수산과 비교하면 어혈제거 및 혈류순환 촉진을 강화한 방제라 할 수 있으며, 활혈통락(活血通絡), 거어생신(祛瘀生新)이라는 한의학적 기전으로 골절 치료에 응용되고 있다.

현재까지 골절 치료를 위한 다방면의 연구가 보고되었다. 골절환자를 치료한 임상연구로 Chang 등²⁶⁾이 고관절 골절 수술 후 후유증, Hong 등²⁷⁾이 교통사고로 인한 요추부 압박골절 치험례들을 발표하였으며, Lee 등²⁸⁾은 압박골절 증례연구를 보고한 바 있다. 단일 한약제를 사용한 실험연구로 Keum과 Kim²⁹⁾의 자연동(自然銅)의 골유합 촉진 효과가 보고되었다. 한약 처방을 병행한 한방치료 실험연구로, Kee 등³⁰⁾의 육미지황탕(六味地黃湯) 복용과 녹용약침 병행치료의 골절회복 효과 연구, Ahn 등³¹⁾의 당귀수산 복용과 중성어혈약침 시술 병행 시 골절 유합 촉진 연구결과 등이 보고되었다. 화어전과 효능이 유사한 활혈화어를 목적으로 하는 방제를 적용한 실험연구로 신통축어탕(身痛逐瘀湯)³²⁾, 복원활혈탕(復元活血湯)³³⁾, 가미궁귀탕(加味芎歸湯)과 가미궁귀탕가 녹용(加味芎歸湯加鹿茸)³⁴⁾ 등을 시약으로 하는 연구들이 보고되었다. 그러나 화어전의 생물학 및 조직학적 골절

치유 기전을 검증하는 목적의 실험연구는 보고된 바가 없다.

이에 본 저자는 21일간 화어전 추출물인 HWJ를 시약으로 하여 골절 치료 효과의 객관적 검증을 위한 세포·동물실험을 진행하였다. *in vivo* 및 *in vitro* 실험에서 유전자 발현 분석을 통해 HWJ가 조골세포 활성화를 통한 가골 형성에 미치는 영향을 확인하는 것과 더 나아가 파골세포로의 파급력까지 판단하여 접골속단작용을 수치화하는 것을 목표로 하였다. 또한, HWJ 적용 시 골절 부위 회복, 연관된 연부조직의 중창 변화를 방사선학적으로 확인함으로써 활혈화어·접골속단작용 여부를 구체화하고자 하였다.

in vitro experiment에서는 mouse의 osteoblast cell인 MC3T3-E1 cells를 사용하였다³⁵⁾. 골절 유합 효과 증명 이전, *in vitro* 단계에서 HWJ의 안전성 검증을 위해 세포 생존능 산출 목적으로 MTT assay를 시행하였다³⁶⁾. MTT assay 상 분화된 MC3T3-E1 cells에 HWJ 처치 시 HWJ 500 µg/mL 이하 처치군의 100% 이상이었으며, 유의한 결과로 검증되어 본 실험에서는 시약으로 HWJ 500 µg/mL 농도 이하로만 사용하였다.

ALP는 다양한 조직세포에 의해 합성되는 세포막 단백질이며, bone, liver 및 kidney에서 현저한 발현을 보인다. 이 중 bone-specific ALP (BALP)는 단일 골 형성 인자 중 가장 정확한 marker 및 조골 작용 증가 평가를 위한 classic marker로 여겨진다³⁷⁾. MC3T3-E1 cells에서 ALP의 증가를 확인하기 위해 ALP staining을 진행하였다. 호중구, 골모세포 등에서 ALP 활성도 증가에 기인하여 염색 정도를 통한 조골세포 활성화 정도를 확인하였다³⁸⁾. HWJ 62.5 µg/mL 이하에서 ALP 증대를 통한 조골세포 분화능 활성화를 알 수 있다.

HWJ의 안전성을 판단하기 위해 실험동물에게 HWJ 투여 후 21일째에서 간·신 독성검사를 시행하였다. 간 독성은 ALT와 AST를 지표로 사용하였다. ALT와 AST는 간세포 손상 표지 인자로 간세포성 질환 판명에 중요한 지표가 된다. 정상적인 상태에서는 혈청 내 저농도로 존재하지만 간세포막 손상 유발 시 투과성 증가로 수치가 상승하게 된다³⁹⁾. 신장 독성평가에서는 신장 이외의 요인에 영향을 잘 받지 않고, 재흡수 없이 배설되어 blood urine nitrogen보다 신장 손상 정도를 비교적 정확하게 판단할 수 있는 CRE가 사용되었다⁴⁰⁾. 임상적

인 중요성은 크게 찾아보기 어려우나, HWJ 100 mg/kg 이상의 농도로 투여했을 시 간장·신장 세포에 독성을 나타낼 가능성을 염두에 두어야 하며, 추후 인체에 적용 시 한약 농도조절 및 투약 후 간기능 및 신기능검사 추적관찰이 필요함을 시사한다.

실험동물의 골절 유발은 Bonnarens and Einhorn의 방법⁸⁾을 변형하여 시행하였다. Mouse의 경골을 고정하고 쇄골을 낙하하여 골절 유발 후, HWJ 경구 투여하여 조골과 파골에 관련된 성분의 상대적인 mRNA 발현을 측정하였다. 이 모델은 인간의 경골골절 회복과 유사한 손상 회복을 가능하게 하는 표준적인 외과적 접근을 포함한다⁴¹⁾.

HWJ의 접골속근 효능을 객관화하기 위해, 조골·파골세포 분화에 미치는 영향을 관측하였고 측정방법으로 RT-qPCR을 사용하였다. HWJ가 *in vitro*와 *in vivo*에서 ALP, Runx2, OCN, OSX 및 Col2a1의 상대적인 mRNA 발현과, 추가로 *in vivo*에서 RANKL과 OPG의 상대적인 mRNA 발현에 작용하는 영향을 수치화하였다.

ALP는 앞서 언급한 바와 같이 bone, liver, intestine 등에서 생성되며, 간·담도 질환에서도 증가하고 골질환에서는 특이적으로 증가한다. 이 중 BALP는 혈청에서 측정할 수 있는 골 형성지표로 사용된다⁴²⁾. 따라서 ALP 유전자 발현 증감을 통해 골절 발생 부위에서의 골신생 여부를 판단할 수 있다. 실험결과, HWJ이 염증기 및 연성가골기 전반부에 조골세포작용 활성화를 통한 골유합 촉진작용에 긍정적인 영향을 미친다는 것을 확인할 수 있다.

Runx2는 pre-osteoblast의 분화에 요구되는 요소로 Runx2의 발현증가는 골 손상 회복의 잠재적 판단기준이 될 수 있다⁴³⁾. 실험결과, 골절 치료에 대해 농도 의존적이 아닌 일정 농도의 HWJ 투여가 조골세포 분화 극대화를 통한 골유합 유도함을 알 수 있었고, 연성가골기 전반부에 조골세포 증대를 유발하여 골절 치료 촉진을 확인할 수 있었다. 추후 인체에 HWJ를 적용 시 위와 같은 실험적 결과를 바탕으로 투약한다면 이전에 시행되었던 치료보다 수준 높은 기전을 근거로 하는 의학적 치료가 될 수 있으리라 생각된다.

OCN은 골부에 있는 비-교원 단백질(non-collagenous protein)로 분자 1개당 58 kDa의 중량을 가진 49개의 아미노산으로 구성되어 있다. 이 단백질은 혈청에서 측정

할 수 있는 골 형성 중 유리되는 성분 중 하나로, 조골세포의 후기 분화과정에서 관찰되기 때문에 골 유합 진행 정도를 추론할 수 있는 지표로 판단할 수 있다^{44,45)}. 실험결과, HWJ가 연성가골기 전반에 걸쳐 골절 유합을 촉진한다고 생각할 수 있었다. 차후 한층 더 정확한 근거를 바탕으로 한 HWJ의 인체 적용을 위해 다양한 농도에서 반복 측정된 실험결과가 요구되며, 염증기와 연성가골기 외 골절 유합 과정 전체에 걸친 심도 있는 결과 도출의 필요성이 있다.

OSX는 pre-osteoblast에서 mature osteoblast로의 분화에 요구되는 인자이다. 특히, 골 형성 및 석회화에 필수 요소로 작용하는 것이 특이적이다. 성숙한 기능적 조골세포는 OSX 신호에 반응하여 OCN 및 bone sialoprotein 등의 후기 조골세포 표식 유전자를 강하게 발현한다³⁷⁾. 따라서 OSX 발현 촉진 역시 골 손상 회복과정의 지표로 간주할 수 있다. 실험결과, 연성가골기에 HWJ 50 mg/kg에서 조골세포 활성화를 통한 가골 형성 촉진을 유추할 수 있었다. 추가적으로, HWJ 투여는 조골세포작용 촉진을 통해 골유합을 가능하게 하고 연성가골기에 효능을 최대화하였으며, 농도 비의존적이며 특정 농도에서 효과가 있음이 증명되었다. 추후 인체를 대상으로 한 임상시험을 통해 적절한 농도가 규명되어야 한다고 생각된다.

세포막 내 골화에 있어 조골세포 전구체들은 Col2a1을 포함한 골 형성과 연골 형성 지표를 발현한다고 알려졌다. Type 2 collagen은 연골 매트릭스의 주요 구성 성분이며, 증식·성숙단계에서 연골세포에 의해 합성된다⁴⁶⁾. 따라서, Col2a1의 증가 발현은 골 부분 중 연골 부위의 회복에 있어 중요한 표지인자가 될 수 있다. 실험결과, 특정 농도까지 연골 손상을 치유하는 효과가 있을 것으로 판단되며 추후 더욱 다양한 농도를 적용한 심도 있는 연구가 필요하리라 생각된다. 또한, 골절 치료에 있어 HWJ의 효과는 특정 농도에서 극대화되며 HWJ 투여가 연성가골기 전반부에 골유합을 촉진함을 확인할 수 있었다.

RANKL은 파골세포의 분화(differentiation)과 활성화(activation)에서 중요한 역할을 하는 cytokine으로 조골세포 혹은 활성화된 면역세포로부터 유래한다⁴⁷⁾. 이 cytokine은 파골세포에서 기인한 수용체인 RANK와 결합하여 NF- κ B, c-Fos, NFATc1 등과 같은 물질의 발생이

가속화되며, 파골세포의 작용이 촉진되어 골 형성에 길항작용을 한다⁴⁸⁾. OPG는 RANKL과 RANK의 결합을 견제하며, RANKL에 대한 방해 수용체로서 기능뿐만 아니라, osteoclast와 pre-osteoclast의 activation과 maturation을 억제한다. RANKL과 OPG는 골의 형성과 파괴 조절에 직접 관여하며, 서로 반대되는 작용을 한다. 또한, 파골 기전을 조절하여 골 질량 결정에 관여하는 가장 중요한 cytokine들이다⁴⁹⁾. 실험결과, 염증기인 골절 발생 후 7일째 대조군 대비 HWJ 100 mg/kg 군에서 RANKL과 OPG 유전자 발현이 유의하게 증가하였다. 이는 골절 초기 골 파편 제거를 위해 파골세포 활성화되어 RANKL 유전자 발현이 증가하고, 길항적으로 OPG 발현도 증가한 것으로 생각한다. 향후 연구에서 더욱 다양한 농도, 반복적인 실험으로 HWJ의 파골세포에 대한 영향을 구체적, 종합적으로 확인할 필요성이 있다.

HWJ의 접골속단과 더불어 활혈거어 효과를 가지적으로 제시하기 위해 X-ray를 촬영하였다. 판단 지표로 육안적인 골절선 및 연부조직 부위의 음영 변화를 사용하였다. 촬영 결과, 골절선의 현저한 감소와 가골 크기 증대를 확인하였고, 골절부 연부조직 종창이 유지되거나 미약하게 완화된 것으로 판단되었다.

위에 기재한 연구결과를 종합해서 결론을 도출하였다. X-ray 사진을 통해 HWJ이 골절 유발 후 14, 21일 경과 시점에서 골유합 촉진효능 및 미약한 연부조직 종창 완화 효과를 확인하였다. 세포실험에서 MC3T3-E1에 HWJ를 다양한 농도로 투여한 결과, 대체적으로 ALP, Runx2, OCN, OSX와 Col2a1 등 여러 물질의 유전자 발현을 토대로 조골세포 활성화를 파악하였고, HWJ 처치가 골절 치료 효능을 발휘할 가능성이 증명되었으나, 동일 내용의 반복적인 실험 및 시약 농도 다양화를 통해 통계적인 정확성을 더할 필요성이 요구된다. 동물실험에서는 경골골절 유발 14일 경과 시점에 HWJ 처치 2군에서 5개의 성분들 모두 상대적인 유전자 발현이 유의하게 증가함이 검증되었다.

본 실험연구는 이전의 연구에서 검증되지 않았던 골절 치료에 대한 화어전의 생명과학적 치료기전을 밝히고 효과를 규명하였으며 한의학의 근거중심의학화에 기여하였다는 의의가 있다. 또한, 기존 한의학 문헌상에는 활혈화어제로만 인지되었으나, 본 연구를 통해 어혈 제거를 통한 접골속단제로 작용할 수 있다는 사실을 증명

한 추가적인 의의가 있다. 그러나 세포 및 동물실험단계에 그쳐 인체를 대상으로 했을 때 동일기전 작용 여부를 정확히 파악하기 곤란하다. 또한, 지표물질을 성분분석한 후 표준화한 물질을 대상으로 한 연구가 아닌, 방제를 탕전한 후 추출한 물질을 대상으로 실험을 하였기에 실험을 반복적으로 시행할 때 동일 연구결과 도출이 불분명하다. 향후 인체를 대상으로 한 임상시험을 통해 화어전의 치료기전을 더욱 명확히 증명한다면 더욱 분명한 치료기전을 가진 골절 치료수단으로 기능할 수 있을 것이다. 추가적으로, 약물의 규격화와 지표물질 성분분석의 표준화가 전제된 연구가 진행된다면 골절 치료 한약제제의 발전까지 기대할 수 있으리라 생각된다.

결론»»»»

1. 化癍煎 추출물(HWJ)이 경골골절을 유발한 mouse에 미치는 영향을 파악할 목적으로 실험과정 3주 동안 조골세포와 연관된 5가지 물질(ALP, Runx2, OCN, OSX, Col2a1)과 파골세포 관련 2가지 물질(RANKL, OPG)의 유전자 발현량을 측정하였다.
2. 단순방사선 검사에서 골절 유합 정도와 연부조직 종창 완화 여부를 관찰하였다.
3. *in vitro* 실험 결과, ALP, Runx2, OCN, OSX와 Col2a1의 유전자 발현이 정상군 대비 증가하였으나, 유의성 없는 결과들이 다수 나타나 추가적인 연구가 필요하다.
4. *in vivo* 실험 결과, 5가지 조골세포 유관 유전자 발현이 증가하였고, 골절 초기 파골세포 작용도 동시에 증가하였다.
5. 결과로 HWJ은 골절을 치료함에 유의한 효과를 기대할 수 있다고 생각한다.

References»»»»

1. Li YC, Oh MS. Effects of Joagjuhwan (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. Journal of Korean Medicine Rehabilitation. 2016;26(3):31-2.

2. Ronald M. Practical fracture treatment. 2nd ed. Seoul: Cheil Company. 1993:28-35.
3. Kim YH. Cheonggangeuigam. 1st ed. Seoul:Sungbosa. 2001:305, 379.
4. Yoo JH, Kim HI, Kim GW, Koo BS. A case of delirium with traumatic subdural hemorrhage patient healed by Hwaeco-jeon. Journal of Oriental Neuropsychiatry. 2005; 16(2):190-9.
5. Kim HJ, Cho AR, Kim CH. A clinical case report of tinnitus after head trauma. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2011;24(2):111-8.
6. Chung SY, Choi HJ, Chung MW, Ahn MR, Yoo TM, Rheu HM, Yang JS. Effects of safflower-seed on the fracture healing in rat tibia. Yakhak Heoji. 1999;43(4): 526-34.
7. Seo HJ. 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.
8. Yoon JW, Kim SJ. The effect of Gyejibokryunghwan on fracture union in tibia-fractured rats. Journal of Korean Medicine Rehabilitation. 2019;29(4):1-14.
9. The Society of Korean Medicine Rehabilitation. Korean rehabilitation medicine. 4th ed. Paju:Koonja Publishing. 2015:15, 206-10.
10. Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. J Orthop Res. 1984;2(1):97-101.
11. Hole JW. Human anatomy and physiology. Dubuque:W.C. Brown Publishers. 1993:170-227.
12. Wang D. Oedaebiyo. 1st ed. Seoul:Sungbosa. 1975:749-50.
13. Son S. Bigeubcheongeumyobang. 1st ed. Beijing: Inminwiseng Publishing Company. 1982:454-5.
14. Jin S. Taepyunghyeminhwajegukbang. 1st ed. Peking:Si Pung publishing company. 1976:220-7.
15. Jo G. Seongjechongrok. 1st ed. Seoul:Yeogang Publishing Company. 1987:460-4.
16. 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 Rehabilitation. 2015;25(3):27-36.
17. Oh G. Uijonggeungam. 1st ed. Seoul:Bubin Publishing Company. 2006:1250.
18. Jeon SC. Sanggwaboyo. 1st ed. Seoul:Iljung Publishing Company. 1992:176.
19. Kang HS, Hong SH, Kang CH. Musculoskeletal Radiology. 1st ed. Seoul:Panmuneducation. 2015: 267-81.
20. The Textbook Compilation Committee of the Histology. Human histology. 6th ed. Seoul:komoonsa. 2011. 104-5.
21. Jeon DH. Healing effect of danggwisu-san (*Dangguixu-san*) on femur fractured mice. Daejeon University. 2018:32.
22. The Society of Pathology in Korean Medicine. Pathology in Korean Medicine. 2nd ed. Seoul:Omdbook. 2009:335-6.
23. Lee C. Euihakipmun. 1st ed. Seoul:Bubinbooks. 2009:2034.
24. Heo J. Dongeuibogam. 1st ed. Seoul:Bubinbooks. 2005:2839.
25. Hwang DY. Bangyakhappyun. 1st ed. Seoul:Younglimsa. 2011:322.
26. Chang HK, Kim HS, Kim SJ, Kim SY, Park JH, Bae HJ, Shin WC, Yoon YJ, Lee HS, Chung WS. Korean medical treatment including phototherapy after hip fracture surgery: three case reports. Journal of Korean Medicine Rehabilitation. 2018;28(4):113-24.
27. Hong JR, Kim YJ, Kim JS, Lee JR, Kim TG, Yoo DH, Choi IS, Lee SW. 4 cases of patients that improved from traffic accident which caused lumbar spine compression fracture by complex Korean medical admission treatment: retrospective case study. Journal of Korean Medicine Rehabilitation. 2017;27(4):163-70.
28. Lee KS, Lee GM, Yeom SC. Clinical study on the case of lumbar compression fracture with traditional Korean medicine, especially the SAAM acupuncture, *Carthami-Flos* herbal acupuncture. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2004;18(4):1228-31.
29. Keum DH, Kim SS. Healing effect of pyrite on tibia fractured rats. Journal of Korean Medicine Rehabilitation. 2002;12(2):51-68.
30. Kee YB, 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 Korean Medicine Rehabilitation. 2012;22(3):49-63.
31. Ahn HL, Shin MS, Kim SJ, Choi BS. Effects of neutral eoheyoel (Yuxue) herbal acupuncture and dangkisoo-san (*Dangguixu-san*) on fracture healing in the early stage in rats. Journal of Oriental Rehabilitation Medicine. 2007;17(1):1-16.
32. Hong TG, Oh MS, Song TW, Kim KS. Healing effect of sintongchugoetang water extract on tibia fractured rats. Daejeon University, Institute of Korean Medicine. 1999;8(1):727-38.
33. Keum DH, Kim SS. Healing effect of bokwonhwal-hyul-tang on tibia fractured rats. The Journal of the Korea Institute of Oriental Medical Informatics. 2002; 8(1):46-66.
34. Yeom IH. Gamigungguitang and Gamigungguitang GaNokyong water extract on tibia fractured rats. Daejeon University, Institute of Korean Medicine. 1999;8(1):675-87.
35. Kim YK, You H, Lim HC, Lee JS, Jung UW, Lee YK, Choi SH. Development and evaluation of synthetic bone graft materials for periodontal tissue regeneration and carriers. Implantology. 2014;19(4):246-59.

36. Kim HJ, Kim JH, Son ES, Lee JM, Park HR. Neuroprotective effect of extracts from root bark of morus alba on glutamate-induced cytotoxicity in neuronal cells. *Journal of Life Science*. 2009;19(7):963-7.
37. Allen MJ. Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. *Veterinary Clinical Pathology*. 2003;32(3):101-13.
38. Korean Society for Laboratory Medicine. *Laboratory Medicine*. 4th ed. Seoul:E-public. 2013:115.
39. Longo DL, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Jameson JJ, Loscalzo J. *Harrison's principles of internal medicine*. 17th ed. Seoul:Mipmedical. 2010:2318.
40. Association of Korean Medicine Professors for Kidney Medicine. *Kidney medicine in Korean medicine*. 1st ed. Seoul:Koonja. 2013:212.
41. Jin H, Wang B, Li J, Xie W, Mao Q, Li S, Dong F, Sun Y, Ke H. Z, Babij P, Tong P, Chen D. Anti-DKK1 antibody promotes bone fracture healing through activation of β -catenin signaling. *Bone*. 2015;71:63-75.
42. Association of Korean Medicine Professors for Liver Medicine. *Liver medicine in Korean medicine*. 5th ed. Seoul:Nado Publishing Co. 2013:243-4.
43. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 1997;89(5):747-54.
44. Yoshikawa M, Ogata A. Expression of the osteoblastic marker in human alveolar bone cells spheroid. *Nihon Shishubyo Gakkai kaishi*. 2006;48(4):276-84.
45. Calvo MS, Eyre DR, Gundburg CM. Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocrine Reviews*. 1996;17(4):333-68.
46. Szabova L, Yamada SS, Wimer H, Chrysovergis K, Ingvarsen S, Behrendt N, Engelholm LH, Holmbeck K. MT1-MMP and type II collagen specify skeletal stem cells and their bone and cartilage progeny. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2009;24(11): 1905-16.
47. Choi HS. Recent update on RANKL inhibitor. *The Korean Journal of Medicine*. 2018;96(3):252-9.
48. Lee JH, Lee MS, Chae SU, Kim HY, Moon SY, Jeon BH, Cho HJ. Effect of water extract of aloe in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*. 2011;25(6):1008-13.
49. Park SY, Suh KT, Ryu CH, Woo SH, Lee JS, Kim SG. Alterations in serum levels of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in patients with head injury and fracture. *Journal of the Korean Fracture Society*. 2008;21(2):145-50.