

# 當歸鬚散이 대퇴골절 유발 생쥐에 미치는 영향

전동휘 · 오민석

대전대학교 한의과대학 한방재활의학교실

## Healing Effect of *Danggwisu-san* (*Dangguixu-san*) on Femur Fractured Mice

Dong-Hwi Jeon, K.M.D., Min-Seok Oh, K.M.D.

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

RECEIVED December 14, 2020  
REVISED December 29, 2020  
ACCEPTED January 7, 2021

### 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 © 2021 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

**Objectives** This study was designed to evaluate the effects of *Danggwisu-san* (*Dangguixu-san*, DG) on bone repair from femur fracture in mice.

**Methods** Mice were randomly divided into 4 groups (normal, control, positive control and DG 300 mg/kg-treated group). In order to investigate the effects of DG on gene expressions in experimental animals with fracture, we measured the levels of bone morphogenetic protein-2 (BMP2), cyclooxygenase-2 (COX2), Sox9, collagen type II alpha 1 chain (Col2a1), runt-related transcription factor 2 (Runx2), osterix genes. After the cytotoxicity test, we analyzed the levels of expression of osteocalcin and Runx2, and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a pro-inflammatory cytokine. The process of fusion in the fracture was also investigated by gross examination.

**Results** Through in vivo BMP2, COX2 gene expression significantly decreased. Sox9 significantly increased. Col2a1, Runx2, osterix gene expression also increased as well, but there was no statistical significance. The degree of unilateral fracture fusion investigated by gross examination was significantly faster than those of the other groups. Through in vitro the level of TNF- $\alpha$  in macrophages was increased by DG in a dose-dependent manner and 250 and 500  $\mu$ g/mL showed statistical significance. Osteocalcin and Runx2 genes expressions increased when DG was treated in osteoblasts.

**Conclusions** DG promotes the healing of the fracture through the expression of bone repair-related genes and TNF- $\alpha$  production. This study may set the foundation for the clinical application of DG to the patients with bone fractures. (**J Korean Med Rehabil 2021;31(1):1-16**)

**Key words** Bone regeneration, Gene expression, Tumor necrosis factor-alpha, Fracture healing

## 서론

골절이란 과도한 힘이 뼈나 연골에 가해져 그 연속성이 끊어진 상태를 말하며 대부분 피부, 피하조직, 근막, 근골막, 혈관 및 신경 등의 손상을 동반한다<sup>1)</sup>. 골절이 유발되면 통증, 압통, 기능 장애, 외관상의 변형, 자세의 변화, 비정상적 운동, 신경 및 혈관 손상 등이 나타난다<sup>2)</sup>.

골절의 치료는 해부학적 정복, 내고정, 골과 주위 조직 손상의 감소를 목적으로 하며<sup>3)</sup>, 치유과정은 염증기, 복원기, 재형성기를 거치게 되는데<sup>4)</sup> 복원기는 다시 연성 가골기와 경성 가골기로 나뉘게 된다<sup>5)</sup>.

골절 치유에 관련된 한약 연구로는 人蔘<sup>4)</sup>, 紅花<sup>6,7)</sup>, 自然銅<sup>3,8)</sup>, 加味身痛逐瘀湯<sup>9)</sup>, 加味芎歸湯 및 加味芎歸湯加鹿茸<sup>10)</sup>, 順氣活血湯<sup>11)</sup>, 當歸鬚散과 中性瘀血藥<sup>12)</sup>, 復元

活血湯<sup>13)</sup>, 六味地黃湯<sup>14-16)</sup>, 鹿茸藥鍼<sup>17,18)</sup> 등이 골절 유합에 유효함을 보고하고 있다.

當歸鬚散은 李梴의 『醫學入門』<sup>19)</sup>에 “治打撲 以致氣凝血結 胸腹脇痛 或寒熱如挫閃 氣血不順腰脇痛”으로 처음 기록되어 있으며, 『東醫寶鑑』<sup>20)</sup>에서는 “治打撲損傷, 致氣凝血結, 胸腹脇痛”이라 하여 瘀血로 인한 腫痛을 치료한다고 하였다.

當歸鬚散의 골절에 대한 실험적 연구로 Jung<sup>21)</sup>은 대퇴 골절을 일으킨 랫트에서 當歸鬚散과 자연동의 동시 복용을 통해, Ahn 등<sup>12)</sup>은 중성어혈 약침과 當歸鬚散의 복용을 통해 골절 유합을 촉진시킨다고 보고하였다. 그러나 두 연구 모두 실험기간이 2주로 충분치 못하였고, 관찰 항목 또한 혈청 내 검사 및 조직형태학적 검사에 머무른 아쉬움이 있다.

이에 저자는 當歸鬚散의 4주간의 복용으로 골절 유합 관련 유전자 발현 및 형태학적 변화에 미치는 영향을 관찰하고자 실험동물의 대퇴골에 골절을 유발한 후 골수조직에서 발현되는 bone morphogenetic protein-2 (BMP2), cyclooxygenase-2 (COX2), Sox9, collagen type II alpha 1 chain (Col2a1), runt-related transcription factor 2 (Runx2), osterix 유전자의 발현량을 측정하였고, 조골 세포에서 osteocalcin과 Runx2를 대식세포에서 전 염증 효소인 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )의 발현량을 분석하였으며, 육안적으로 뼈의 재형성 과정을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법 >>>>

### 1. 재료

#### 1) 실험동물

실험동물은 대한바이오링크(Eumseong, Korea)에서 7주령의 수컷 C57/BL6 마우스(19~22 g)를 분양받아 사용하였고, 실험 당일까지 고형사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다. 동물은 2마리씩 사육하였으며 사육실 온도는 23±1°C로 맞추었고 12시간 light-dark cycle의 환경에서 7일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 실험에 관한 모든 사항은 대전대학교 동물실험 윤리 위원회의 승인을 받은 후 진행하였다(승인번호: DJUARB 2017-025).

#### 2) 약재

약재는 當歸尾, 赤芍藥, 烏藥, 香附子, 蘇木, 紅花, 桃仁, 桂皮, 甘草로 음니허브(Daegu, Korea)로부터 구입하였으며, 當歸鬚散 (Danggwisu-san, DG)의 구성은 『東醫寶鑑』<sup>20)</sup>에 근거하였다(Table I).

#### 3) 세포

MG63 세포와 RAW264.7 세포는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 분양받았으며, 100 units/mL penicillin/streptomycin과 10% fetal bovine serum이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco BRL Co., New York, NY, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 배양하였다.

**Table I.** The Herbal Composition of *Danggwisu-san*

| Scientific name                                | Botanical name           | Amount (g) |
|--|--------------------------|------------|
| <i>Angelica sinensis</i> (Oliv.) Diels         | Angelicae Sinensis Radix | 6          |
| <i>Paeonia lactiflora</i> Pallas               | Paeoniae Radix           | 4          |
| <i>Lindera strichnifolia</i> Fernandez- Villar | Linderae Radix           | 4          |
| <i>Cyperus rotundus</i> Linné                  | Cyperi Rhizoma           | 4          |
| <i>Caesalpinia sappan</i> Linné                | Sappan Lignum            | 4          |
| <i>Carthamus tinctorius</i> Linné              | Carthami Flos            | 3.2        |
| <i>Prunus persica</i> Batsch                   | Persicae Semen           | 2.8        |
| <i>Cinnamomum cassia</i> Presl                 | Cinnamomi Cortex         | 2.4        |
| <i>Cinnamomum cassia</i> Presl                 | Cinnamomi Cortex         | 2          |
| Total amount                                   |                          | 32.4       |

## 2. 방법

### 1) 약재 추출

약재를 조성에 맞게 섞은 뒤 64.8 g의 한약재에 1.2 L의 증류수를 넣고 약탕기(Naju, Korea)를 이용하여 2시간 동안 열수추출하였다. 끓인 약재는 Whatman No. 2 filter (Maidstone, UK)로 여과하여 용액에 추출된 성분만 분리하였다. 여액은 rotary evaporator (Buchi, Switzerland)로 70°C에서 감압 증발한 뒤 동결건조하여 7.9 g의 건조분말을 얻었고, 추출 효율은 12.29%였다. 분말은 -80°C에 분주하여 보관하였고 사용하기 전에 증류수 또는 식염수로 희석하여 0.45 µm 필터로 거른 후 사용하였다.

### 2) 화학분석방법(liquid chromatography-mass spectrometry, LC/MS)

DG 건조분말을 증류수에 용해한 뒤 3 µL를 LC/MS 분석에 사용하였다. LC/MS 분석은 ABSciex Triple ToF 5600+ (Sciex, Framingham, MA, USA)와 Dionex ultra-high pressure liquid chromatography system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 이용하여 분석하였다. 크로마토그래피를 이용한 분석은 ACQUITY UPLC BEH C18 column (2.1×150 mm, 1.7 µm; Waters Co., Milford, MA, USA)을 사용하였으며 40°C에서 이동상 A (water)와 이동상 B (0.1% formic acid를 포함하는 acetonitrile)을 사용하여 0.4 mL/min의 flow rate로 분석하였다. 초기 농도 구성은 95%A/5%B를 1분 동안 유지하다가 20분까지 80%B로 증가시킨 뒤 24분까지 0%A로 낮춘 뒤 3분 동안 유지하였다. 재사용을 위한 Column 세척은 초기 농도 구배 조건으로 3분 동안 평형을 이루게 하였다. Photodiode array를 사용하여 200~500 nm의 파장 영역에서 검출되는 물질들을 측정하였다. Data-dependent tandem mass spectrometry 분석은 Peakview system에서 제공되는 menu-driven 소프트웨어를 사용하여 조절하였다. 모든 분석은 automatic gain control conditions로 수행하였다.

### 3) 골절 동물 모델

실험동물에게 300 mg/kg의 avertin (Sigma Aldrich Co., Ltd., St. Louis, MO, USA)을 복강 내 주사하여 마취하였고, 마취 후 골절시킬 다리의 털을 제거하였다.

골절은 Bonnarens와 Einhorn의 방법<sup>22)</sup>에 따라 진행하였는데 실험동물의 오른쪽 앞다리를 평평한 판위에 위치시키고 너비 15 mm, 두께 2 mm의 탄소강으로 만들어진 무딘 날을 대퇴골 중앙부에 위치시켰다. 무딘 날 위로 내부 지름 17 mm, 길이 100 cm의 관을 수직으로 세운 뒤, 지름 15.87 mm, 무게 16.28 g의 쇠구슬을 떨어뜨려 골절을 유발한 후 육안으로 확인하였다.

### 4) 동물실험 설계

실험동물은 무작위로 4그룹으로 나뉘었다. 각 군마다 실험동물을 12마리씩 배속시키고 골절 후 3일, 7일, 14일, 28일마다 3마리씩 치사하였다. 정상군(naive)은 대퇴부 골절 손상을 주지 않았다. 그 외 모든 그룹의 실험동물은 대퇴부에 골절 손상을 주었고 골절 후 회복을 위해 골절 부위는 나무 부목(3×10 mm)으로 지지한 후 점착 붕대로 감아 고정하였다. 실험 약물은 1일 1회, 일정 시간에 경구 투여하였다. 대조군(Con)은 동일한 양의 생리식염수(phosphate buffered saline, PBS)를 경구 투여하였다. 양성 대조군에서는 tramadol (20 mg/kg; Sigma Aldrich Co., Ltd.)을 경구 투여하였다. 실험군(DG)은 DG (300 mg/kg)를 경구 투여하였다. 약물은 총 64.8 g의 약재로 얻은 2첩 분량의 열수추출물을 1일 1회로 나누어 사용하였다.

### 5) in vivo

#### (1) Bone marrow 분리

실험동물은 골절을 유도한 뒤 각각 3일, 7일, 14일, 28일째 치사하여 시료를 채취하였다. 실험동물을 치사하기 위하여 ether를 포함하는 glass chamber에 실험동물을 넣고 깊은 마취에 걸릴 때까지 약 1~2분 방치하였다. 치사된 실험동물로부터 bone marrow를 분리하고자 골절을 입은 대퇴부(오른쪽 다리) 전체를 몸통으로부터 분리하였다. 분리 후 뼈를 둘러싸고 있는 근육들을 가위로 최대한 제거하여 femur와 tibia를 분리하였다. Femur와 tibia의 양 끝 골단을 가위로 자른 뒤 골간 부위 영역만을 취하였다. 골간의 골수공간에 23게이지의 주사바늘을 갖는 3 mL 주사기를 사용하여 DMEM 세포 배양액을 밀어 넣어 골수를 분리하였다. 주사기를 사용하여 골수 조직을 여러 번 주사기로 넣고 뼈는 과정을 반복하여 세포들을 하나씩 분리하였다. 용액에 남은 찌꺼기나

부서진 뼈조각들을 제거하고자 70  $\mu\text{m}$ 의 strainer (BD bioscience, San Jose, CA, USA)로 걸러주었다. 골수조직 분리에 사용한 DMEM 배양액을 제거하고자 1,500 rpm에서 5분 동안 원심분리하고 상등액을 제거하였다.

#### (2) Total RNA 추출

채취된 골수로부터 총 합량 RNA를 다음과 같이 추출하였다. 실험동물로부터 채취된 골수세포에 10 mL의 PBS를 넣고 pipeting하여 세포를 풀어준 뒤 1,500 rpm에서 5분 동안 원심분리하고 상등액을 제거하여 세척하고 남아있는 골수세포에 easy Blue (iNtRON, Seongnam, Korea) 0.5 mL를 가하여 homogenizer로 세포를 갈아주었다. 이후 lysis된 골수세포 용액에 chloroform 100  $\mu\text{L}$ 를 넣고 vortex를 사용하여 용액이 잘 섞이도록 교반한 뒤 13,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액 200  $\mu\text{L}$ 를 새로운 튜브로 옮겨준 다음 200  $\mu\text{L}$ 의 isopropanol을 가하고 튜브를 위아래로 4~5회 뒤집는 과정을 반복하여 용액이 잘 섞이도록 한 뒤 10분간 실온에서 방치하였다. Total RNA를 침전시키고자 13,000 rpm, 4°C에 10분간 원심분리하고 상등액을 제거하여 침전된 RNA를 수득한 후 75% 에탄올 1 mL을 가하여 펠렛을 씻어주어 남아있는 불순물을 제거하였다. 펠렛을 잘 말려준 후 DEPC water (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 20-50  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 RNA를 녹였다.

#### (3) Complementary DNA 합성

언어진 RNA를 NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific)으로 정량하여 200 ng/ $\mu\text{L}$ 로 맞춘 후 Easy cDNA Synthesis kit (NanoHelix, Daejeon, Korea)을 이용하여 다음과 같이 cDNA를 합성하였다. RNA 주형 5  $\mu\text{L}$ , Oligo-d(T) 1  $\mu\text{L}$  그리고 DEPC water 9  $\mu\text{L}$ 를 넣고, 65°C에서 5분 동안 반응시킨 후 즉시 아이스에 방치하였다. 각 튜브에 미리 만들어둔 두번째 혼합물(5 $\times$  RT reaction mix 4  $\mu\text{L}$ +RT enzyme mix 1  $\mu\text{L}$ )을 5  $\mu\text{L}$ 씩 넣어 50°C에서 40분, 70°C에서 10분 동안 반응하여 cDNA 합성을 완료하였다.

#### (4) Real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR)

유전자들의 발현을 측정하기 위하여 Power SYBR green PCR master mix (Thermo Fisher Scientific)을 이용한 실시간 정량 PCR (real-time quantitative PCR)을 실시하였고, 기기는 QuantStudio™ 3 real time PCR sys-

tem (Thermo Fisher Scientific)을 사용하였다. 모든 유전자의 PCR 산물의 크기는 100 bp 내외로 하였고,  $T_m$  (melting temperature) 값도 60°C 부근으로 디자인하였다. Real-time PCR 반응은 총 20  $\mu\text{L}$  내에 1/3으로 희석한 cDNA 2  $\mu\text{L}$ 와 10  $\mu\text{L}$ 의 2 $\times$  SYBR mix, primer는 각각 10 pmol/ $\mu\text{L}$ 의 농도로 0.3  $\mu\text{L}$ 씩 첨가하였고, 나머지는 증류수로 채워 주었다. 모든 유전자에 대하여 PCR 증폭 단계는 다음과 같고 증폭 cycle은 40 cycles을 실시하였다. Hot start를 위해 95°C에서 10분, 증폭 단계의 denaturation을 95°C에서 15초, annealing을 60°C에서 60초, extension을 72°C에서 30초간 반복하며 각 cycle의 extension 후에 형광 값을 기록하였다. 모든 cycle이 완료된 후 primer의 특이성을 확인하기 위해 melting curve 분석을 실시하였다. 결과의 분석은 Thermo Fisher Scientific에서 제공하는 Real-time PCR Instrument software로 분석하였다(Table II).

#### 6) in vitro

##### (1) 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay

세포를  $5 \times 10^5$  cells/mL로 96-well에 분주하고 24시간 동안 안정화하였다. DG 추출물을 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 부터 1/2씩 희석하여 농도별로 처리하고 24시간 동안 CO<sub>2</sub> 배양기에 배양하였다. 배양 후 MTT 0.5 mg/mL (Sigma Aldrich Co., Ltd.) 용액을 처리하고 4시간 동안 CO<sub>2</sub> 배양한 후 DMSO를 넣고 30분 동안 37°C에서 방치한 후 540 nm 파장에서 microphotometer (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)로 분석하였다. 상대생존율은 시료를 처리하지 않은 대조군의 생존율을 100%로 설정하고 흡광도의 상대적인 값을 비교하여 구하였다.

##### (2) 세포의 시료 처리 및 cDNA 합성

Human osteoblast-like MG63 세포를 6-well plate에  $2 \times 10^5$  cells/mL의 세포를 500  $\mu\text{L}$ 씩 분주하고 24시간 동안 배양한 다음 DG 추출물 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 1시간 동안 처리한 후 1 $\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D3 (50 nm; Sigma Aldrich Co., Ltd.)를 처리한 후 36시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양하였다. 배양 후 차가운 PBS로 2회 세척하고, easy Blue 0.5 mL를 가하여 세포를 수거한 후 chloroform 100  $\mu\text{L}$ 를 넣고 잘 교반하여 13,000 rpm, 4°C에 15분간 원심 분리하였다. 층이 분리되면 상등액

**Table II** Nucleotide Sequence of Primer for Real-Time Polymerase Chain Reaction

| Gene           | Primer sequences       |                         |
|----------------|------------------------|-------------------------|
|                | Forward                | Reverse                 |
| <i>mBMP2</i>   | CACACAGGGACACACCAACC   | CAAAGACCTGCTAATCCTCAC   |
| <i>mCOX2</i>   | CAGACAACATAAACTGCGCCTT | GATACACCTCTCCACCAATGACC |
| <i>mCol2a1</i> | ACTGGTAAAGTGGGGCAAGAC  | CCACACCAAATTCCTGTTCA    |
| <i>mSox9</i>   | GAGGCCACGGAACAGACTCA   | CAGCGCCTTGAAGATAGCATT   |
| <i>mRunx2</i>  | AGGACTATGGCGTCAAACA    | GGCTCACGTCGCTCATCTT     |
| <i>mOsx</i>    | CGCTTTGTGCCTTTGAAAT    | CCGTCAACGACGTTATGC      |
| <i>mGAPDH</i>  | CCCATCACCATCTTCCAGGAGC | CCAGTGAGCTTCCCCTTCAGC   |

**Table III** Nucleotide Sequence of Primer for Real-Time Polymerase Chain Reaction

| Gene                | Primer sequences        |                        | Product size |
|---------------------|-------------------------|------------------------|--------------|
|                     | Forward                 | Reverse                |              |
| <i>hOsteocalcin</i> | AGGTGCAGCCTTTTGTGTCCAAG | GCAAGGGGAAGAGGAAAGAAGG | 263          |
| <i>hRunx2</i>       | CCCCACGACAACCGCACCAT    | CACTCCGGCCCAACAATC     | 270          |
| <i>hβ-actin</i>     | CAAGAGATGGCCACGGCTGCT   | TCCTTCTGCATCCTGTGGCA   | 274          |

200  $\mu$ L를 새로운 튜브로 옮겨준 다음 동량의 isopropanol을 가하여 10분간 실온에서 방치한 후 13,000 rpm, 4°C에 10분간 원심 분리하여 RNA를 수득한 후 75% 에탄올 1 mL을 가하여 펠렛을 씻어주어 남아있는 불순물을 제거하였다. 펠렛을 잘 말린 후 DEPC water 30  $\mu$ L를 첨가하여 RNA를 녹였다. 얻어진 RNA를 NanoDrop 2000을 이용하여 정량한 후 200 ng/ $\mu$ L로 맞춘 후, Easy cDNA Synthesis kit로 합성하였다. 과정은 RNA 주형 5  $\mu$ L, Oligo-d(T) 1  $\mu$ L 그리고 DEPC water 9  $\mu$ L를 넣고, 65°C에서 5분 동안 반응시킨 후 아이스에 즉시 방치한다. 각 튜브에 미리 만들어둔 두번째 혼합물(5 $\times$  RT reaction mix 4  $\mu$ L+RT enzyme mix 1  $\mu$ L)을 5  $\mu$ L씩 넣어 50°C에서 40분, 70°C에서 10분 동안 반응하여 cDNA를 합성하였다.

### (3) Semi-quantitative real-time PCR (RT-PCR)

유전자들의 발현을 측정하기 위하여 AccuPower PCR PreMix kit (Bioneer, Daejeon, Korea)을 이용하여 PCR을 수행하였다. 기기는 DTC-4C thermal cycler (Tianlong, Xi'an, China)을 사용하였다. PCR 반응은 총 20  $\mu$ L 내에 1/3으로 희석한 cDNA 2  $\mu$ L와 primer는 각각 10 pmol/ $\mu$ L의 농도로 1  $\mu$ L씩 첨가하였고, 나머지는 증류수로 채워 주었다. 모든 유전자에 대하여 PCR 증폭 단계는 다음

과 같고 증폭 cycle은 30 cycles을 실시하였다. Hot start를 위해 95°C에서 10분, 증폭 단계의 denaturation을 95°C에서 15초, annealing을 60°C에서 30초, extension을 72°C에서 30초간 반복하였다. PCR 결과의 산물은 1% agarose gel에서 전기영동을 실시한 뒤 UV 램프 아래에서 확인하였다(Table III).

### (4) Enzyme linked immuno-sorbent assay

Raw264.7 세포를 24-well plate에  $2 \times 10^5$  cells/mL의 농도로 500  $\mu$ L씩 분주 후 DG 추출물을 100, 250, 500  $\mu$ g/mL의 농도로 1시간 동안 전처리하였다. 전처리가 끝난 후 lipopolysaccharide (100 ng/mL; LPS)를 세포 배양액에 처리한 뒤 24시간 후에 상등액을 취하였다. TNF- $\alpha$  ELISA kit (eBioscience, San Diego, CA, USA)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 coating buffer에 capture antibody를 희석한 후 96 well-immunoplate에 각각 100  $\mu$ L씩 분주 후 덮개로 덮어 4°C에서 16시간 동안 방치하였다. 각 well을 washing buffer로 3회의 세척을 한 뒤 assay diluent를 well에 200  $\mu$ L씩 넣고 덮개로 덮은 후 1시간 동안 상온에서 방치하였다. 그 후 3회 세척을 한 뒤 표준 품과 혈청을 각 well에 100  $\mu$ L씩 넣고 plate를 덮개로 덮은 후 상온에서 방치하였다. 두 시간 뒤 3회의 세척을 하고, detection antibody를 100  $\mu$ L씩 분주한 뒤

1시간 동안 상온에서 방치하였다. 다시 3회의 세척을 한 뒤 enzyme working reagent를 100  $\mu$ L씩 분주하고 30분간 상온에서 방치하였다. 다시 5회 세척을 한 뒤 TMB one-step substrate reagent를 100  $\mu$ L씩 분주한 뒤 빛이 차단된 장소에서 30분간 상온에서 방치 후 50  $\mu$ L의 stop solution을 넣었다. 분석은 30분 이내에 spectrophotometer (Molecular Device)를 이용하여 450~570 nm의 파장으로 측정하였다.

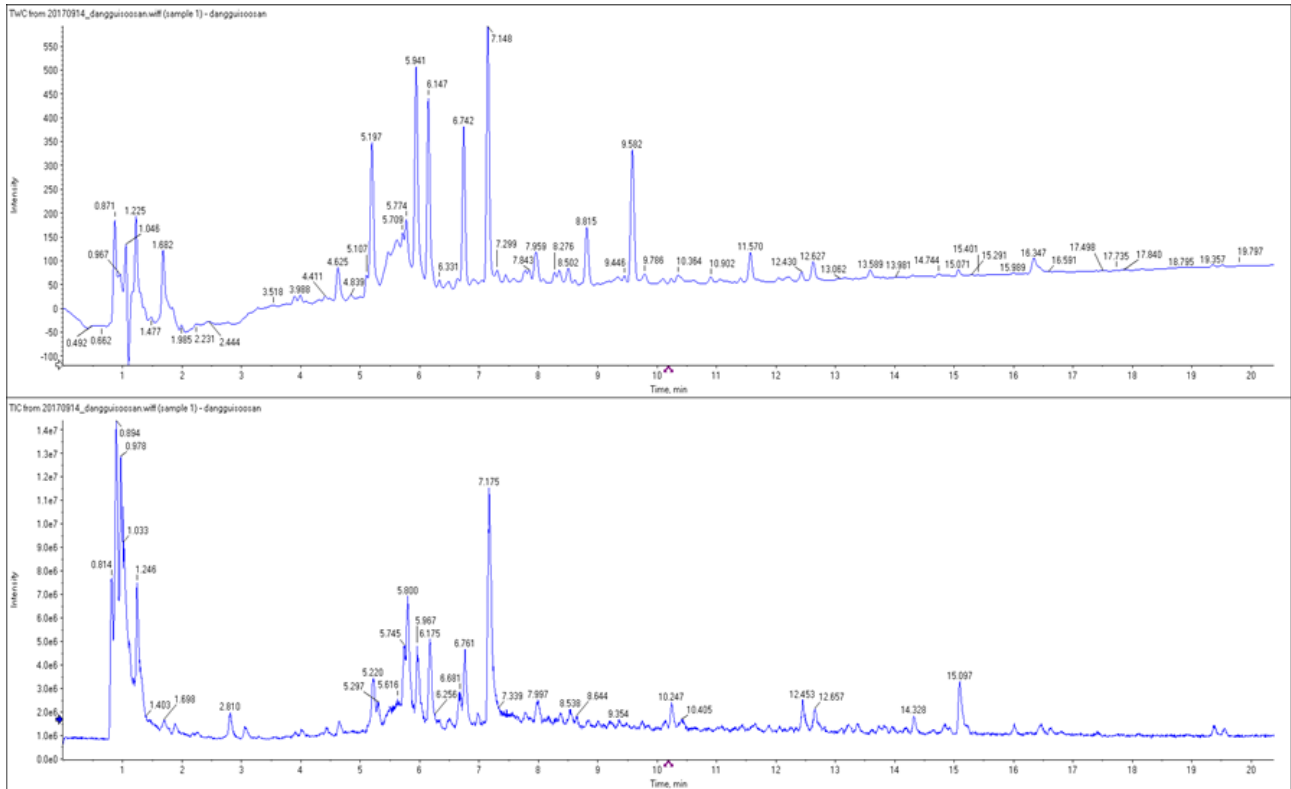
### 3. 통계 분석

모든 실험 결과는 mean $\pm$ standard deviation로 기록하였으며, 통계처리는 IBM SPSS Statistics 23 프로그램 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 이용하였고, 일원 배치 분산분석(one-way analysis of variance) 시스템을 사용하여 Tukey's HSD test 또는 Duncan's test로 유의성을 검증하였다. p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

## 결과»»»»

### 1. LC/MS 분석

Fig. 1의 상단 그림은 DG의 high-pressure liquid chromatography 분획물에 대한 UV 검출 결과이며 하단 그림은 mass 분석으로 도출된 검출결과이다. LC/MS 분석을 통해 5.220, 5.967, 6.175, 6.761, 7.175 retention time (RT)에 주요 peak가 검출되었다. Peak에 대한 예상 표준물질을 분석한 결과 UV detector의 RT를 기준으로 Table IV와 같은 표준물질이 예측되었다. 예를 들어 7.175의 RT에서는 mass 분석을 통해 463.1599 m/z에서 exotocin, agehouston A, purpurascenin, farrerol 7-O-glucoside가 예측되었으며, 503.1543 m/z에서는 apigenin-7-O- $\beta$ -D-glucuronide butyl ester 또는 actinosporin B로 예측되었다(Table IV).



**Fig. 1.** LC/MS analysis of DG. UHPLC mass spectrophotometry analysis of the DW extract from DG. (upper) PDA chromatogram of DW extract, (lower) high-resolution mass chromatogram. LC/MS: liquid chromatography-mass spectrometry, UHPLC: ultra-high-pressure liquid chromatography, DG: *Danggwisu-san*, DW: distilled water, PDA: photo diode array.

**Table IV.** Summary of Metabolite Screening from *Danggwisu-san*

| Retention time (min) | <i>m/z</i> ([M+H] <sup>+</sup> ) | Formula ([M+H] <sup>+</sup> )                   | ppm  | Identification  |
|----------------------|----------------------------------|---|------|---|
| 5.220                | 269.0812                         | C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>  | 1.4  | Formononetin<br>isoformononetin                                     |
| 5.967                | 591.1277                         | C <sub>34</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub> | -1.5 | Mulberrofuran M   |
|                      | 314.1394                         | C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub> | 2.3  | Coumarin 314  |
| 6.175                | 287.0914                         | C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>  | 1.4  | Sakuranetin<br>Isosakuranetin                                       |
|                      | 631.1810                         | C <sub>34</sub> H <sub>30</sub> O <sub>12</sub> | -1.4 | lichenicolin A<br>Orientoside A                                     |
| 6.761                | 481.1718                         | C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>11</sub> | 2.8  | Paeoniflorin<br>albiflorin<br>bruceine B                            |
| 7.175                | 463.1599                         | C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> O <sub>10</sub> | 2.6  | Exoticin<br>Agehouston A<br>Purpurascenin<br>Farrerol 7-O-glucoside |
|                      | 503.1543                         | C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> O <sub>11</sub> | -1   | Apigenin-7-O-β-D-glucuronide butyl ester<br>actinosporin B          |

## 2. in vivo

### 1) BMP2 유전자 발현에 미치는 영향

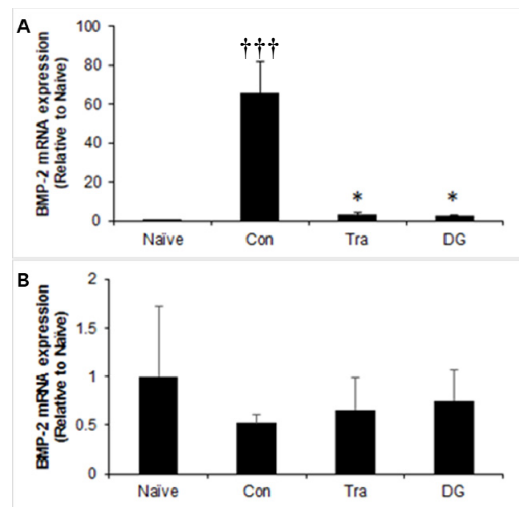
골절 발생 후 3일째, 정상군에서 BMP2의 발현이  $1 \pm 0.00$ 이었을 때 대조군은  $65.64 \pm 16.40$ 으로 발현량이 유의성 있게 증가하였다. DG군에서는  $2.57 \pm 0.38$ 로 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2A).

골절 발생 후 7일째, 정상군에서 BMP2의 발현이  $1.000 \pm 0.726$ 이었을 때 대조군은  $0.519 \pm 0.093$ 로 유전자의 발현량이 감소하였으나 유의하지 않았다. DG군은  $0.754 \pm 0.317$ 로 대조군에 비해 증가하였으나 유의하지 않았다(Fig. 2B).

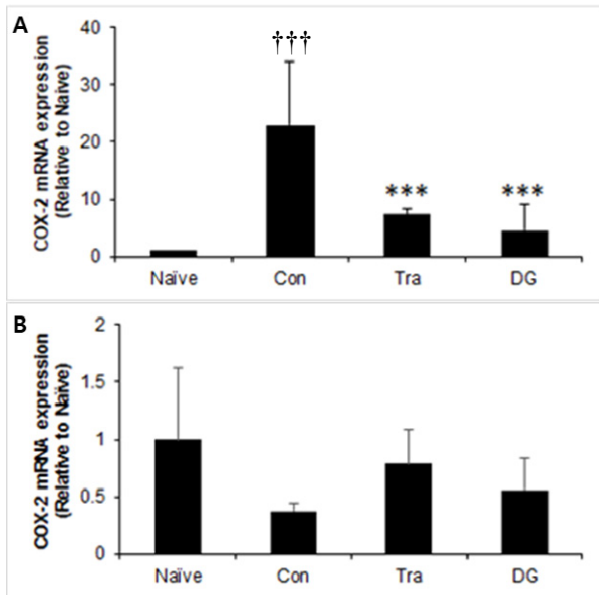
### 2) COX2 유전자 발현에 미치는 영향

골절 발생 후 3일째, 정상군에서 COX2의 발현이  $1 \pm 0.00$ 이었을 때 대조군은  $22.91 \pm 11.03$ 으로 그 발현량이 유의성 있게 증가하였다. DG군에서는  $4.53 \pm 4.47$ 로 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 3A).

골절 발생 후 7일째, 정상군에서 COX2의 발현이  $1.000 \pm 0.629$ 이었을 때 대조군은  $0.377 \pm 0.066$ 으로 유전자의 발현량이 감소하였으나 유의하지 않았다. DG군은  $0.561 \pm 0.274$ 으로 대조군에 비해 증가하였으나 유의하



**Fig. 2.** Effect of DG on BMP2 expression in bone marrow from mouse femur on 3 and 7 days after bone fracture. C57/BL6 mice had femoral shaft fracture and treated with 300 mg/kg/day of DG for (A) 3 and (B) 7 days. Total RNAs were isolated from bone marrow of damaged femur and subjected to real-time PCR to measure the expression of BMP2 gene with SYBR green. GAPDH was used as an internal control to normalize. The relative gene expression was calculated by comparing with that of control. Naive: without bone fracture, Con: control, bone fracture and vehicle, Tra: tramadol treated group (20 mg/kg/day), DG: *Danggwisu-san* treated group (300 mg/kg/day). BMP2: morphogenetic protein-2, PCR: polymerase chain reaction, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. \**p*<0.05 vs Control, †††*p*<0.001 vs Naive.



**Fig. 3.** Effect of DG on COX2 expression in bone marrow from mouse femur on 3 and 7 days after bone fracture. C57/BL6 mice had femoral shaft fracture and treated with 300 mg/kg/day of DG for (A) 3 and (B) 7 days. Total RNAs were isolated from bone marrow of damaged femur and subjected to real-time PCR to measure the expression of COX2 gene with SYBR green. GAPDH was used as an internal control to normalize. The relative gene expression was calculated by comparing with that of control. Naive: without bone fracture, Con: control, bone fracture and vehicle, Tra: tramadol treated group (20 mg/kg/day), DG: *Danggwisu-san* treated group (300 mg/kg/day). COX2: cyclooxygenase-2, PCR: polymerase chain reaction, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. \*\*\* $p < 0.001$  vs Control, ††† $p < 0.001$  vs Naive.

지 않았다(Fig. 3B).

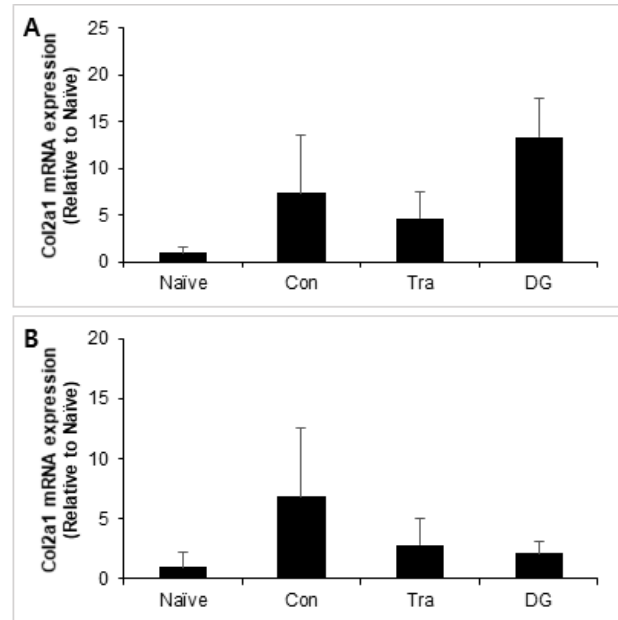
### 3) Col2a1 유전자 발현에 미치는 영향

골절 발생 후 14일째, 정상군에서 Col2a1의 발현이  $1.00 \pm 0.59$ 이었을 때 대조군은  $7.37 \pm 6.20$ 로 유전자의 발현량이 증가하였으나 유의하지 않았다. DG군은  $13.36 \pm 4.16$ 으로 대조군에 비해 증가하였으나 유의하지 않았다(Fig. 4A).

골절 발생 후 28일째, 정상군에서 Col2a1의 발현이  $1.00 \pm 1.27$ 이었을 때 대조군은  $6.85 \pm 5.72$ 로 유전자의 발현량이 증가하였으나 유의하지 않았다. DG군은  $2.10 \pm 1.07$ 로 대조군에 비해 감소하였으나 유의하지 않았다(Fig. 4B).

### 4) Sox9 유전자 발현에 미치는 영향

골절 발생 후 14일째, 정상군에서 Sox9의 발현이



**Fig. 4.** Effect of DG on Col2a1 expression in bone marrow from mouse femur on 14 and 28 days after bone fracture. C57/BL6 mice had femoral shaft fracture and treated with 300 mg/kg/day of DG for (A) 14 and (B) 28 days. Total RNAs were isolated from bone marrow of damaged femur and subjected to real-time PCR to measure the expression of Col2a1 gene with SYBR green. GAPDH was used as an internal control to normalize. The relative gene expression was calculated by comparing with that of control. Naive: without bone fracture, Con: control, bone fracture and vehicle, Tra: tramadol treated group (20 mg/kg/day), DG: *Danggwisu-san* treated group (300 mg/kg/day). PCR: polymerase chain reaction, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

$1.00 \pm 1.16$ 이었을 때 대조군은  $3.13 \pm 3.12$ 로 유전자의 발현량이 증가하였으나 유의하지 않았다. DG군은  $8.19 \pm 1.04$ 로 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다(Fig. 5A).

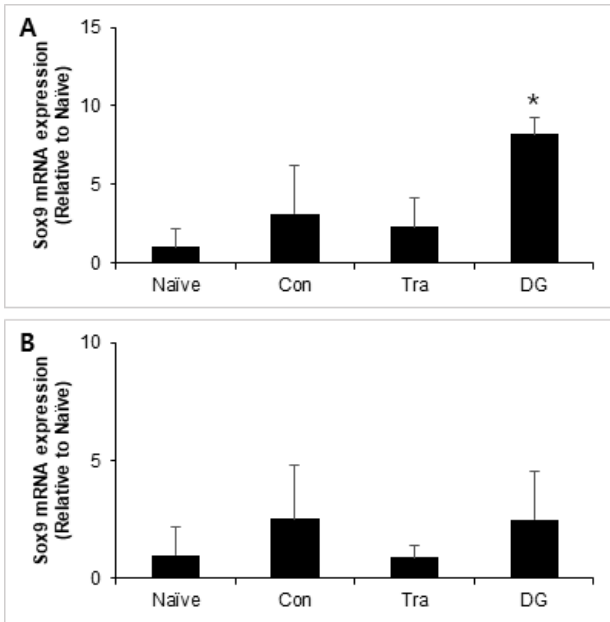
골절 발생 후 28일째, 정상군에서 Sox9의 발현이  $1.00 \pm 1.22$ 이었을 때 대조군은  $2.53 \pm 2.28$ 로 유전자의 발현량이 증가하였으나 유의하지 않았다. DG군은  $2.49 \pm 2.07$ 로 대조군에 비해 약간 감소하였으나 유의하지 않았다(Fig. 5B).

### 5) Runx2 유전자 발현에 미치는 영향

골절 발생 후 14일째, 정상군에서 Runx2의 발현이  $1.00 \pm 0.48$ 이었을 때 대조군은  $6.51 \pm 4.07$ 로 유전자의 발현량이 증가하였으나 유의하지 않았다. DG군은  $9.17 \pm 2.42$ 로 대조군에 비해 증가하였으나 유의하지 않았다(Fig. 6A).

골절 발생 후 28일째, 정상군에서 Runx2의 발현이





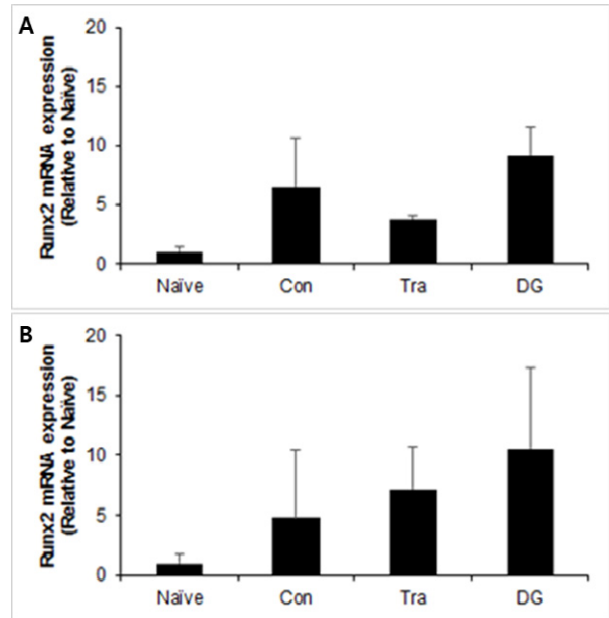
**Fig. 5.** Effect of DG on Sox9 expression in bone marrow from mouse femur on 14 and 28 days after bone fracture. C57/BL6 mice had femoral shaft fracture and treated with 300 mg/kg/day of DG for (A) 14 and (B) 28 days. Total RNAs were isolated from bone marrow of damaged femur and subjected to real-time PCR to measure the expression of Sox9 gene with SYBR green. GAPDH was used as an internal control to normalize. The relative gene expression was calculated by comparing with that of control. Naive: without bone fracture, Con: control, bone fracture and vehicle, Tra: tramadol treated group (20 mg/kg/day), DG: *Danggwisu-san* treated group (300 mg/kg/day). PCR: polymerase chain reaction, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. \* $p < 0.05$  vs Control.

1.00±0.83이었을 때 대조군은 4.78±5.64로 유전자의 발현량이 증가하였으나 유의하지 않았다. DG군은 10.56±6.73으로 대조군에 비해 증가하였으나 유의하지 않았다(Fig. 6B).

#### 6) Osterix 유전자 발현에 미치는 영향

골절 발생 후 14일째, 정상군에서 osterix의 발현이 1.00±0.71이었을 때 대조군은 6.51±4.26으로 유전자의 발현량이 증가하였으나 유의하지 않았다. DG군은 9.17±7.35로 대조군에 비해 증가하였으나 유의하지 않았다(Fig. 7A).

골절 발생 후 28일째, 정상군에서 osterix의 발현이 1.00±1.21이었을 때 대조군은 4.21±1.57로 유전자의 발현량이 증가하였으나 유의하지 않았다. DG군은 3.74±0.68로 대조군에 비해 약간 감소하였으나 유의하지 않았다(Fig. 7B).



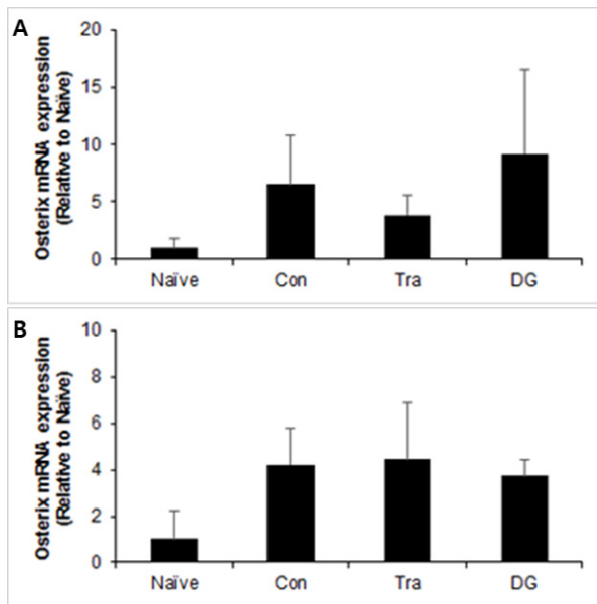
**Fig. 6.** Effect of DG on Runx2 expression in bone marrow from mouse femur on 14 and 28 days after bone fracture. C57/BL6 mice had femoral shaft fracture and treated with 300 mg/kg/day of DG (A) 14 and (B) 28 days. Total RNAs were isolated from bone marrow of damaged femur and subjected to real-time PCR to measure the expression of Runx2 gene with SYBR green. GAPDH was used as an internal control to normalize. The relative gene expression was calculated by comparing with that of control. Naive: without bone fracture, Con: control, bone fracture and vehicle, Tra: tramadol treated group (20 mg/kg/day), DG: *Danggwisu-san* treated group (300 mg/kg/day). PCR: polymerase chain reaction, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

#### 7) 뼈의 재형성에 미치는 영향

골절 발생 후 3일째, 대조군은 shaft 영역에 골절된 영역이 나타났다. DG군과 tramadol군도 대조군과 비슷한 병변을 나타내었다(Fig. 8A).

골절 발생 후 7일째, 대조군은 shaft 영역에 골절된 영역이 나타났다. DG군은 골절이 일어난 대퇴골 부위의 유합이 나타난 것을 육안으로 확인할 수 있었다. Tramadol군의 골절부위는 대조군과 유사한 골절 형태를 보였다(Fig. 8B).

골절 발생 후 14일째, 대조군은 골절된 부위의 유합이 나타난 것이 보였으나 골절된 영역을 확연히 구분할 수 있었다. DG군은 골절이 일어난 대퇴골 부위의 유합이 거의 완결되어 골절부위가 손상으로부터 회복된 것으로 보였다. Tramadol군의 골절 부위는 대조군과 유사



**Fig. 7.** Effect of DG on osterix expression in bone marrow from mouse femur on 14 and 28 days after bone fracture. C57/BL6 mice had femoral shaft fracture and treated with 300 mg/kg/day of DG for (A) 14 and (B) 28 days. Total RNAs were isolated from bone marrow of damaged femur and subjected to real-time PCR to measure the expression of osterix gene with SYBR green. GAPDH was used as an internal control to normalize. The relative gene expression was calculated by comparing with that of control. Naive: without bone fracture, Con: control, bone fracture and vehicle, Tra: tramadol treated group (20 mg/kg/day), DG: *Danggwisu-san* treated group (300 mg/kg/day). PCR: polymerase chain reaction, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

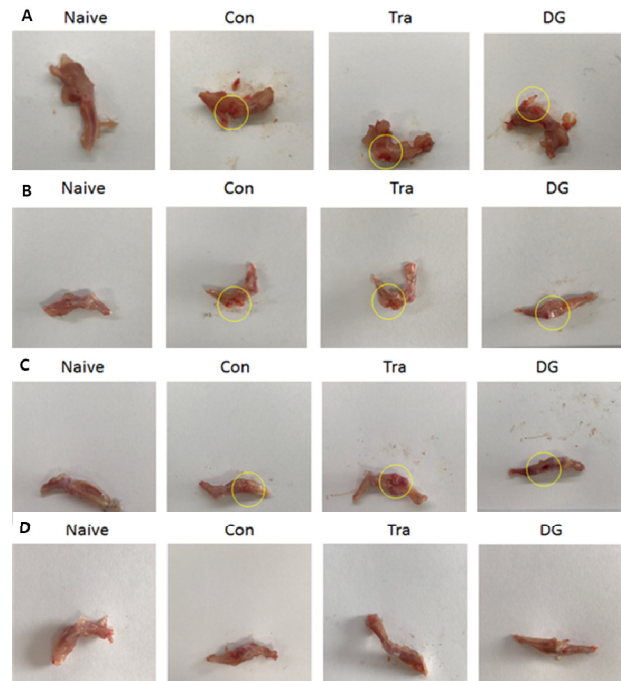
한 골절 형태를 보였다(Fig. 8C).

골절 발생 후 28일째, 대조군은 골절된 부위의 유합이 거의 완결된 것으로 보였으나 골절된 영역에 붉은색의 병변을 가지고 있었다. DG군은 골절이 일어난 대퇴골 부위가 거의 정상과 유사하여 골절 부위가 손상으로부터 회복된 것으로 보였다. Tramadol군의 골절 부위도 손상으로부터 거의 회복한 것으로 보였다(Fig. 8D).

### 3. in vitro

#### 1) 조골세포의 세포독성에 미치는 영향

MG63 cells에서 세포독성을 측정한 결과 DG는 62.5  $\mu\text{g/mL}$ 까지 세포독성이 나타나지 않았으나 125  $\mu\text{g/mL}$  이상의 농도에서는 10~15% 정도의 유의적인 세포독성이 나타났다. 그러나 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도까지 80% 이



**Fig. 8.** Effect of DG on bone regeneration in femoral shaft fracture-induced mouse model at 3, 7, 14 and 28 days after bone fracture. C57/BL6 mice were femoral shaft fracture and treated with 300 mg/kg/day of DG for (A) 3, (B) 7, (C) 14 and (D) 28 days. The damaged femur was isolated by removing the muscles around the bone and investigated by gross examination. Naive: without bone fracture, Con: control, bone fracture and vehicle, Tra: tramadol treated group (20 mg/kg/day), DG: *Danggwisu-san* treated group (300 mg/kg/day). Yellow circles indicate the damaged bone region.

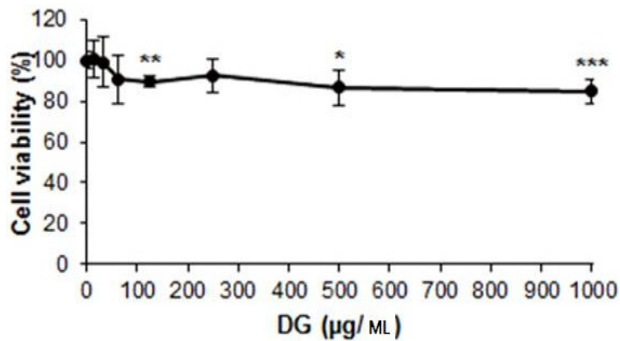
상 세포 생존율이 유지되었다(Fig. 9).

#### 2) 조골세포의 osteocalcin, Runx2 유전자 발현에 미치는 영향

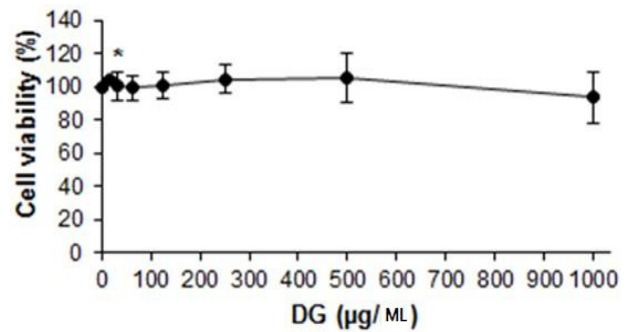
MG63 cells에서 osteocalcin, Runx2의 유전자의 발현을 semi-quantitative RT-PCR로 측정한 결과 DG는 osteocalcin, Runx2 유전자의 발현이 증가하였다. 양성대조군인 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>도 osteocalcin, Runx2의 발현이 증가하였다(Fig. 10).

#### 3) 대식세포의 세포독성에 미치는 영향

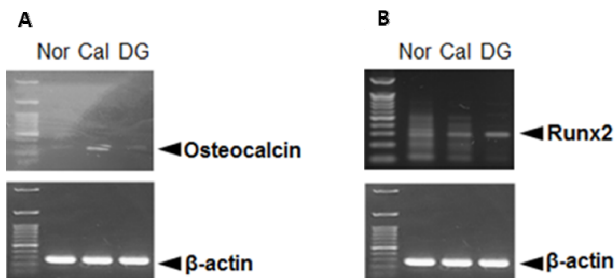
Raw264.7 cells에서 세포독성을 측정한 결과 DG는 1,000  $\mu\text{g/mL}$  농도까지 세포의 생존율을 감소하지 않아 세포독성을 나타내지 않았다(Fig. 11).



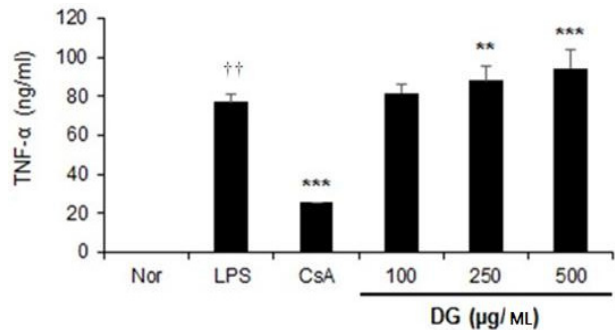
**Fig. 9.** Cytotoxic effect of DG in MG63 cells. The MG63 cells were cultivated with in the presence of DG upto 1,000 µg/mL for 24 hours. The cell viability of MG63 cells were measured by MTT assay. The cell viability was calculated by comparing with the relative optical density of vehicle treated group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. 0 µg/mL-treat control. DG: *Danggwisu-san*, MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide.



**Fig. 11.** Cytotoxic effect of DG in RAW264.7 cells. The RAW264.7 cells were cultivated with in the presence of DG upto 1,000 µg/mL for 24 hours. The cell viability of RAW264.7 cells were measured by MTT assay. The cell viability was calculated by comparing with the relative optical density of vehicle treated group. DG: *Danggwisu-san*, MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide. \* $p < 0.05$  vs 0 µg/mL-treat control.



**Fig. 10.** Effect of DG on osteocalcin and Runx2 expression in MG63 cells. The MG63 cells were cultivated with 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (calcitriol) or DG (500 µg/mL) for 24 hours. The total RNAs were isolated from the cells and used for semi-quantitative RT-PCR with (A) osteocalcin or (B) Runx2 specific primers. The PCR products were analyzed with gel electrophoresis. Nor: vehicle-treated group, Cal: calcitriol-treated group, DG: *Danggwisu-san* treated group. Runx2: runt-related transcription factor 2, RT-PCR: real-time polymerase chain reaction.



**Fig. 12.** Effect of DG on TNF-α production in RAW264.7 cells. The RAW264.7 cells were treated with DG for 24 hours in the presence of lipopolysaccharide (LPS) (1 µg/mL) and the cell culture supernatant were harvested. The level of TNF-α in the cell culture supernatant was measured by ELISA. Nor: normal cells without LPS stimulation, LPS: LPS (1 µg/mL) with PBS, CsA: LPS (1 µg/mL) with cyclosporin A (1 µM), DG: LPS (1 µg/mL) with *Danggwisu-san*. TNF-α: tumor necrosis factor-α, PBS: phosphate buffered saline. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs LPS, †† $p < 0.01$  vs Nor.

#### 4) 대식세포의 TNF-α 발현에 미치는 영향

Raw264.7 cells에서 TNF-α 발현량을 측정한 결과 LPS가 처리된 군에서는 0.11±0.02 µg/mL에서 77.13±3.92 µg/mL로 증가하였다. DG를 투여한 결과 250, 500 µg/mL의 농도에서 각각 88.13±3.48, 94.28±4.10 µg/mL로 유의성 있게 증가하였다. 양성대조군인 cyclosporin A는 25.39±0.33 µg/mL로 나타났다(Fig. 12).

#### 고찰»»»»

골절의 치유 과정 중 염증기는 연골이나 골이 형성되기 시작할 때까지로 골절 후 약 1~7일간 지속된다<sup>4)</sup>. 골절 후 초기 반응으로 골절 부위에 혈종이 생기고 피브린 응고가 형성되면서 TNF-α, C-X-C chemokine receptor type 4, stromal cell-derived factor 1 및 platelet-derived

growth factor와 같은 염증성 사이토카인 및 성장 인자가 골절 혈종으로 분비된다. 또한 BMP, COX2, prostaglandin E2, Wnt,  $\beta$ -카데닌 및 Notch 신호 전달 경로는 골절 후 주로 골막과 골수에 위치한 줄기세포 전구세포를 활성화시켜 유전자 발현의 현저한 변화를 일으키고, 세포 대사를 야기한다<sup>23)</sup>.

이후 연성 가골기에서 혈종으로 인한 부종과 통증이 감소하면서 연성 가골이 형성되는데 골편이 더 이상 자유롭게 움직이지 않게 되는 시기로 골절 후 약 3주경에 해당된다<sup>22)</sup>. 이 시기에 골절 부위의 가골에 혈류와 모세혈관의 침투가 증가하는데 바로 이 골절부의 혈행을 빠르게 개선하는 것이 중요하다는 연구 결과들이 있다<sup>22)</sup>. 염증기 이후 확장된 줄기세포 집단은 연성 가골기에 이르러 연골세포 발현유전자(Sox9, Col2a1, ColXa1) 및 골모세포 발현 유전자(Runx2, osterix, Col1a1)의 발현을 통해 각각 연골과 뼈로 분화된다. 골모 세포는 손상이 덜 심한 골절의 끝단에서 뼈의 표면을 따라 직접 뼈를 형성하게 되고, 연골은 손상이 가장 심한 골절의 중심부인 저산소 영역에서 형성된다<sup>23)</sup>.

이후 말단의 분화, 석회화, 혈관 신생 및 리모델링 과정은 osteocarcin, vascular endothelial growth factor, MMP13 및 receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand의 발현과 연관되어 있다<sup>23)</sup>.

한의학적 관점에서 외상에 의한 어혈의 발생은 『東醫寶鑑·諸傷』<sup>19)</sup>에서 “人爲刀斧所傷, 或墮落險地, 或撲身體損傷, 筋骨皮肉, 皆出血不止, 或瘀血停積,...”, “凡墮墜壓傷, 或從高墮落, 皆驚動四肢五藏, 必有惡血在內,...”라 하여 打撲, 墜下, 倒撲, 打閃, 打撲損傷, 落馬, 骨折의 손상을 받게 되면 瘀血이 발생한다고 하였다.

염증기의 혈종은 어혈의 의미를 포괄하고 있다<sup>24-27)</sup>. 어혈은 전신 혈액의 운행이 不暢하거나 국부의 혈액 정체 혹은 체내에 존재해서 소산되지 못한 離經의 혈액을 말하는 것으로<sup>24-27)</sup>, 치료는 초기에 化瘀活血, 중기에 接骨續筋, 후기에 補氣養血 健壯筋骨을 주로 한다<sup>1)</sup>.

어혈로 인한 통증에 사용되는 대표적인 처방인 當歸鬚散의 실험적 연구에서는 타박으로 어혈이 생긴 랫트에서 조직과 기능의 손상을 치유하여 운동능력을 회복시키고<sup>28)</sup>, 외상성 창상을 일으킨 랫트에서 만성염증과 피부 재생피화를 감소시키는<sup>29)</sup> 등의 효과가 보고되고 있다.

當歸鬚散의 처방구성을 고찰하면 活血祛瘀하는 當歸尾와 蘇木, 營血을 補하는 赤芍藥, 理氣行氣하는 烏藥 香附子, 破瘀活血하는 桃仁和 紅花, 溫經通絡하는 肉桂, 調和諸藥하는 甘草 등으로 구성된 처방으로 전체적으로 破瘀 行氣 溫經之濟로 구성되어 혈액순환이나 신진대사 등을 촉진시켜 活血祛瘀하는 처방이다<sup>30)</sup>.

이에 본 실험에서는 當歸鬚散이 活血化瘀 작용으로 골절로 인해 발생한 염증기에 혈종인 어혈을 제거시키고 順氣活血 작용으로 연성 가골기에 골절 부위 가골 형성을 증진시켜 골유합을 촉진시킬 수 있을 것이라는 가설을 세우고 이를 평가하고자 하였다.

실험동물에게 Bonnarens와 Einhorn<sup>22)</sup>의 방법으로 대퇴골 중앙부에 칼날의 무딘 면을 위치시킨 후 쇄구슬을 떨어뜨려 골절을 유발하고 DG를 경구 투여하였다. 골절 유발 후 시기별로 유전자의 발현을 확인하였는데 염증기로 볼 수 있는 골절 후 3일, 7일째에는 골수조직에서 발현되는 BMP2, COX2 유전자의 발현량을 확인하였고, 연성 가골기로 볼 수 있는 14일, 연성 가골기에서 경성 가골기로 넘어가는 시기로 볼 수 있는 28일째에는 Sox9, Col2a1, Runx2, osterix 유전자의 발현량을 확인하였다<sup>3)</sup>. 또한 in vitro 검사로 세포독성 검사 후 대표적 골 형성 지표인 osteocalcin, 전 염증 효소인 TNF- $\alpha$ 의 발현량을 분석하였으며 골절이 유합되는 과정 또한 육안적으로 관찰하였다.

BMP는 강력한 골모세포의 분화 인자로서 세포의 분화를 촉진하여 직접적으로 골 발생을 유도한다<sup>31)</sup>. BMP2는 개체 발생 시 골격 형성, 치아 형성 등에 관여하며 골모세포의 분화를 유도하는 등 다양한 기능을 수행하는 세포에서 신호전달 개시자로 작용함이 잘 알려져 있다<sup>32)</sup>.

본 연구에서 골절 유발 후 3일째, 7일째 각각 BMP2 발현량을 측정된 결과 3일째에는 DG군이 대조군에 비해 발현량이 오히려 유의하게 감소하는 양상을 보였으나, 7일째에는 대조군, 양성대조군에 비해 발현량이 증가하는 결과를 확인할 수 있었다. 이는 염증기 직후보다 후반부에서 DG가 BMP2 발현에 영향을 미치는 것으로 볼 수 있으나 이를 보다 명확히 뒷받침하기 위해서는 향후 염증기를 세분화하여 발현량을 확인하는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

COX2는 섬유모세포와 대식세포를 포함한 여러 세포

에서 발현되는 염증 효소로써<sup>33-35)</sup> 성장인자와 mitogen 에 유도되어 prostaglandin 분비 지속을 통해 bone healing에 관여한다<sup>36)</sup>. Non-steroidal anti-inflammatory drug 인 COX2 억제제는 골절 환자의 5~10%에서 치료 지연을 일으켰고<sup>37)</sup> 생쥐 골절모델에서 골 생성을 억제한 것으로 보고<sup>38)</sup>된 바 있다.

본 연구에서 골절유발 후 3일째, 7일째 각각 COX2 발현량을 측정된 결과 3일째에는 DG군이 대조군에 비해 발현량이 오히려 유의하게 감소한 반면 7일째에는 대조군이나 정상군에 비해 유의적으로 차이가 나는 결과를 얻지 못했다.

이후 연성 가골기에 들어서면 중간엽세포들이 연골세포 발현 유전자(Col2a1, Sox9, ColXa1)와 골모세포 발현 유전자(Runx2, osterix, Col1a1)의 발현으로 인해 각각 연골세포와 골모세포로 분화하게 된다<sup>23)</sup>. 본 연구에서는 연골세포 발현 유전자 중 Col2a1, Sox9, 골모세포 발현 유전자 중 Runx2, osterix의 발현량을 측정하였다.

Col2a1은 연골의 주요 성분중 하나인 type II collagen을 인코딩하는 요소로써 Col2a1 유전자에 변이가 발생하면 2형 연골 무형성증, 연골 저형성증, 선천성 척추골단 이형성증, Kniest, Stickler, 그리고 Wagner 증후군 등 다양한 질환이 유발된다<sup>39,40)</sup>.

Sox9는 연골 발달에 관여하는 유전자에 작용하는 주요 전사 인자로써 Sox9 단백질이 연골 형성 과정에서 Col2a1의 조절에 관여한다. Ng 등<sup>41)</sup>의 연구에서 쥐의 발달 과정 동안 Sox9, Col2a1의 발현량을 비교한 결과 연골 조직에서 두 유전자의 발현량이 유사한 것을 확인할 수 있었다.

Runx2는 중간엽 세포로부터 골모세포가 분화하는데 있어서 필수적인 전사 인자로 골모세포와 연관된 osteocarcin, 제1형 아교질, osteoponin 등의 gene의 전사를 직접적으로 촉진하는 것으로 알려져 있다. Osterix도 골모세포의 분화에 필수적인 전사인자로 osterix의 기능은 Runx2에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다<sup>42)</sup>.

본 연구에서 골절 유발 후 14일째, 28일째 각각 연골세포 발현 유전자(Sox9, Col2a1)와 골모세포 발현 유전자(Runx2, osterix)의 발현량을 측정된 결과 14일째 DG군에서 대조군에 비하여 Sox9, Col2a1, Runx2, osterix 모두 증가하였는데, 이 중 Sox9는 대조군에 비하여, Col2a1은 정상군에 비하여 통계적으로 유의성을 확인할 수 있

었다. 반면 양성대조군인 tramadol군은 다른 군에 비해 가장 낮은 발현량을 보였다. 28일째에서는 Sox9, Col2a1, osterix의 발현량은 대조군에 비해 오히려 감소하는 양상을 보였고, Runx2의 발현량은 대조군에 비해 증가하였으나 유의성은 없었다. 28일째보다 14일째 골 및 연골세포 발현 유전자의 발현량이 현저한 것은 연성 가골기 시기와 일치하는 결과로 보이며, 이는 Nakajima 등<sup>43)</sup>의 연구와 일치하는 결과이다. 향후 본 연구에서 진행하지 않았던 골절 후 21일째 추가 실험을 통해 DG가 연성 가골기에서 골 및 연골세포 발현 유전자의 발현을 촉진하는지를 보다 명확히 확인할 수 있을 것으로 기대한다.

골절 유발 후 DG가 뼈의 재형성에 미치는 영향을 육안적으로 확인하기 위해 본 연구에서는 골절 후 3일째, 7일째, 14일째, 28일째 대퇴골을 분리하여 유합 정도를 확인하였다. 7일째에서는 DG군에서만 대퇴골 부위 유합을 확인할 수 있었고, 14일째부터는 DG군, 대조군, tramadol군에서 모두 유합이 확인 가능하였으나 DG군에서 현저하게 빠른 속도로 유합됨을 확인할 수 있었다. 향후 조직학적 관찰을 통해 골 및 연골의 세부적인 유합 정도를 확인해보는 것이 필요할 것으로 생각한다.

골 형성 지표는 조골 세포가 생산하는 효소나 단백을 측정하거나 골 형성 중에 유리되는 성분을 측정하며, 혈청에서 측정할 수 있는 성분으로는 osteocalcin, bone alkaline phosphatase, total alkaline phosphatase, procollagenI extension peptides 등이 있다<sup>44)</sup>. 이들 중 가장 유용하게 사용되는 것이 osteocalcin으로 조골 세포에서 생산되어 뼈의 세포 외 기질에 축적되는데 새로 합성된 것 중 약 30%가 혈중으로 방출되므로 이를 측정하면 골형성의 정도를 예측할 수 있으며<sup>45)</sup>, 이는 조골 세포의 후기 분화를 반영하는 지표로 여겨진다<sup>46)</sup>. 비타민 D로 알려져 있는 1,25-(OH)<sub>2</sub>D3는 골수 기질세포를 증식시키고 조골 세포로의 분화 및 무기질 침착에 영향을 주는 요소로써<sup>47)</sup> 본 실험에서 DG를 처리한 MG63 조골세포에서 1,25-(OH)<sub>2</sub>D3를 처리한 세포에서와 마찬가지로 osteocalcin의 발현을 확인할 수 있었다.

앞에서 설명한 대로 Runx2는 중간엽 세포로부터 골모세포가 분화하는데 있어서 필수적인 전사 인자로 DG를 처리한 MG63 조골 세포에서도 Runx2의 발현을 확인하였다. 이를 통해 DG가 osteocalcin과 Runx2 유전자

의 발현을 증가시켜 골질의 유합을 촉진한다는 것을 알 수 있었다.

골의 재형성과 항상성 유지에는 여러 가지의 cytokine이 관련되어 있다<sup>48-51)</sup>. 골절은 다른 외상의 경우처럼 순차적인 염증반응이 일어나게 되는데 초기 골절 부분에 이동한 큰 대식세포를 비롯한 다양한 면역세포들은 전 염증 효소인 interleukin (IL)-1, IL-6, TNF- $\alpha$  등을 분비하여 extracellular matrix의 합성, 혈관 신생성, 섬유 모세포의 이주 등을 촉진시킴으로써 골질의 재형성과 항상성을 유지시키는 중요한 조절자로서의 역할을 한다<sup>3)</sup>.

본 연구에서는 대식세포주인 RAW264.7 세포에서 DG가 TNF- $\alpha$ 의 발현에 미치는 영향을 알아보고자 DG 용량을 100, 250, 500  $\mu\text{g/mL}$ 로 증가시켜 TNF- $\alpha$ 의 발현량을 비교하였다. 그 결과 용량이 늘어날수록 TNF- $\alpha$  발현량이 증가하여 250  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0.01$ )과 500  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0.001$ )에서 유의한 결과를 확인할 수 있었다. 이를 통해 DG가 골절 초기 염증기에서 염증 효소인 TNF- $\alpha$ 를 통해 골질의 재형성을 촉진한다는 것을 확인할 수 있었다.

이상의 연구 결과를 종합하면 대퇴골절을 유도한 생쥐에서 4주간 DG를 경구 투여한 결과 골절 유합이 대조군에 비해 빠르게 이루어지는 것을 육안적으로 확인할 수 있었다. 시기별 유전자 발현량은 염증기인 골절 후 7일째에 BMP2, COX2, 연성 가골기인 14일째에 Sox9, Col2a1, Runx2, osterix, 연성 가골기에서 경성 가골기로 넘어가는 28일째 Runx2 모두 대조군에 비해 증가하였고, 이 중 14일째 Sox9, Col2a1에서 통계적 유의성을 확인할 수 있었다. 또한 세포 실험을 통해 osteocalcin, Runx2, 전 염증효소인 TNF- $\alpha$ 의 발현량을 확인할 수 있었고 이 중 TNF- $\alpha$ 는 통계적인 유의성이 검증되었다.

이는 DG가 골절 유합 관련 유전자와 TNF- $\alpha$ 의 발현을 통해 골절 치유에 영향을 미칠 수 있음을 확인한 것으로, 그간의 연구에서 다루지 않았던 골절 유합 관련 유전자들의 발현량을 4주간에 걸쳐 분석하고 육안적으로 관찰했다는 것에 의의가 있다. 추후 육안적 관찰뿐만 아니라 조직학적 관찰이 필요할 것으로 생각되며 방사선 검사를 이용한 유합 과정 확인이 필요할 것으로 보인다. 이번 연구 결과를 통해 當歸鬚散이 단순히 초기 염증기에서의 혈중 제거뿐 아니라 골절 유합기 중

복원기에서의 가골 형성에도 일정 부분 관여함을 확인할 수 있었다. 향후 임상적으로 골절의 치료에 더욱 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 결론»»»»

當歸鬚散 (DG)이 대퇴골절 유발 생쥐에 미치는 영향을 살펴보고자 4주간 골절 유합과 관련된 유전자(BMP2, COX2, Sox9, Col2a1, Runx2, osterix)의 발현을 분석하고, 조골 세포에서 osteocalcin, Runx2, 대식세포에서 TNF- $\alpha$ 의 발현량을 측정하였으며 육안적으로도 골절 유합 정도를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

### 1. in vivo

- 1) BMP2 유전자 발현은 골절 후 3일째 DG군에서 대조군에 비해 유의하게 감소하였고, 7일째에서는 증가하였으나 유의하지 않았다.
- 2) COX2 유전자 발현은 골절 후 3일째, DG군에서 대조군에 비해 유의하게 감소하였고, 7일째에서는 증가하였으나 유의하지 않았다.
- 3) Sox9 유전자 발현은 골절 후 14일째, DG군에서 대조군에 비해 유의하게 증가하였고, 28일째에서는 약간 감소하였으나 유의하지 않았다.
- 4) Col2a1 유전자 발현은 골절 후 14일째, DG군에서 대조군에 비해 증가하였으나 유의하지 않았고, 28일째에서는 감소하였으나 유의하지 않았다.
- 5) Runx2 유전자 발현은 골절 후 14일째, 28일째 DG군에서 모두 증가하였으나 유의하지 않았다.
- 6) Osterix 유전자 발현은 골절 후 14일째, DG군에서 증가하였으나 유의하지 않았고, 28일째에서는 약간 감소하였으나 유의하지 않았다.
- 7) 육안적으로 관찰한 결과 DG군에서 7일째, 14일째 및 28일째 모두 대조군에 비해 유합이 빠르게 진행되었다.

### 2. in vitro

- 1) 조골 세포에서 DG를 처리하였을 때, osteocalcin,

Runx2 유전자 발현이 증가하였다.

- 2) 대식세포에서 TNF- $\alpha$ 의 발현량은 DG 용량이 100, 250, 500  $\mu\text{g/mL}$ 로 늘어날수록 증가하였고, 그 중 250, 500  $\mu\text{g/mL}$ 에서는 통계적으로 유의하였다.

이상과 같이 當歸鬚散은 골절 유합에 있어 초기의 염증이 뿐만 아니라 증기의 가골 형성기에도 도움이 되리라고 생각된다.

## References

1. The Society of Korean Medicine Rehabilitation. Korean Medicine Rehabilitation. 4th ed. Paju:Koonja Publishing. 2015:206-10.
2. The Korean Orthopaedic Association. Orthopaedics. 6th ed. Seoul:ChoiSin medical Publishing Co. 2006:779-831.
3. Shin KM, Jung CY, Hwang MS. Effects of administration of pyritum on fracture healing in mice. The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2009;26(5):65-75.
4. Lee HK, Chung MS, Gang SY. Basic study on the effect of Korean Ginseng upon fracture healing of the bone. The Journal of the Korean Orthopaedic Association. 1984;19(3):483-91.
5. Suk SI. Orthopedics. Seoul:The New Medical Journal. 2013:1165-75.
6. Kim JH. The effects of Korean safflower seed powder supplementation diet on the recovery of rib fracture and the improvement lipid metabolism in rats, and development of processed food [dissertation]. Daegu: Kyoungbuk University; 1998:1-7.
7. Jeon SM, Kim JH, Lee HJ. The effects of Korean Safflower (*Carthamus tinctorious* L.) seed powder supplementation diet on bone metabolism indices in rats during the recovery of rib fracture. Journal of Nutrition and Health. 1998;31(6):1049-56.
8. Geum DH, Kim SS. Healing effect of pyrite on tibia fractured rats. J Korean Med Rehabil. 2002;12(2):51-68.
9. Hang TG, Oh MS, Song TW. Helling effect of Sintongchugoetang water extract on tibia fractured rats. Daejeon University, Institute of Korean Medicine. 1999;8(1):727-38.
10. Pyum YH, Oh MS, Song TW. Helling effect of Gamigungguitang and GamigungguitangGaNokyong water extract on tibia fractured rats. Daejeon University Institute of Korean Medicine. 1999;8:675-87.
11. Son WT, Song TW, Oh MS. Healing effect of Soongiwhalhyultang extract on tibia fractured rats. J Korean Med Rehabil. 1999;9(2):350-62.
12. Ahn HL, Shin MS, Kim SJ. Effects of Neutral Eohyeol (Yuxue) herbal acupuncture and DangkisoosanDangkisoosan (Dangguixu-san) on fracture healing in the early stage in rats. J Korean Med Rehabil. 2007;17(1):1-16.
13. Kum DH, Kim SS. Healing effect of Bokwonhwalhyultang on tibia fractured. The Journal of the Korea Institute of Oriental Medical Informatics. 2002;8(1):47-66.
14. Park BC, Cha YY, Lee ES. Study on the polyphosphate content of the Yukmijihwang-tang and its effect on transcription activity of genes related to bone morphogenesis. Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology. 2004;18(6):1769-76.
15. Shin YW, Park YI, Kim HY. Effect of Yukmijihwang-tang kamibang on the expression of osteo-related genes, TG2 and BMP4. The Journals of the Korean Oriental Medical Society. 2002;23(2):190-7.
16. Kim GH. Healing effect of Gamiyungmijihwangtang on fractured dogs [dissertation]. Iksan:Wonkwang University; 1987:1-15.
17. Kee YB, Kim DH, Kang DH. Effects of Yukmijihwang-tang (Liuweidihuang-tang) and cervi pantotrichum cornu pharmacopuncture on fracture healing in diabetic rats. Journal of Oriental Rehabilitation Medicine. 2012;22(3):49-63.
18. Han SW, Choi JY, Lee YH. Healing of bony defects by cervi pantotrichum cornu herbal acupuncture. Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Medicine Society. 2001;18(5):135-46.
19. Lee C. Uihakipmun. Seoul:Namsandang. 1991:2201.
20. Heo J. Donguibogam. Seoul:Yeo Gang Publishing House. 2002:2307-8.
21. Jung IM. Effects of Dangkwisoo-san and native copper on TGF- $\beta$ 1 expression in fractured rats [dissertation]. Naju:Dongshin University; 2017:1-14.
22. Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. J Orthop Res. 1984;2:97-101.
23. Michael H, Regis J. The convergence of fracture repair and stem cells: interplay of genes, aging, environmental factors and disease. Journal of Bone and Mineral Research. 2014;11(29):2307-22.
24. Bae WS. The new oriental medical clinician. Seoul:Uiwondang. 1977:113-4.
25. Wang JS. Question and answer of Chinese medicine basic theory. Hyupseo:Hyupseo Scientific Technique publishing. 1981:115-7.
26. Shanghai Chinese Medical School. The foundation of Chinese medicine. Hongkong:Sangmuinseoguan. 1979:39, 43, 116.
27. Yoon GY. A study on the methodology of oriental

- medicine. Seoul:Sungbosa. 1983:103.
28. Yeo NH, Lee HY. The effect of Dangkwisoo-San on blood enzyme activity in brusied rats. *The Korean Journal of Physical Education*. 2002;41(3):333-40.
  29. Bak JW, Sim BY, Kim DH. The effects of Danggwisusan on restoration ability in wound induced animal models. *The Korea Journal of Herbology*. 2014;29(5):55-63.
  30. Yoon YG. Dongui antisepticology and prescription description. Seoul:Uiseongdang. 2011:679-80.
  31. Kim HJ, Oh WM, Koh JT. Effects of angiotensin-1 on bone morphogenetic protein-2 induced osteoblast differentiation. *Jeonnam Dental Collection of Dissertations*. 2007;19(1):182-99.
  32. Heldin CH, Miyazono K, Dijke PT. TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. 1997;390:465-71.
  33. Groszmann RJ. Hyperdynamic state in chronic liver diseases. *J Hepatol*. 1993;17(2):S38-40.
  34. Rothkotter HJ, Pabst R, Bailey M. Lymphocyte migration in the intestinal mucosa: entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. *Vetrinary Immuno Immunopath*. 1999;72:157-65.
  35. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*. 1998;93(5):705-16.
  36. Andrew BS, Yuehwei HA. Is there an inhibitory effect of COX-2 inhibitor on bone healing. *Pharmacological Research*. 2004;50(2):151-6.
  37. Christian C. General principles of fracture treatment. In: Canale ST ed. *Campbell's operative orthopaedics*. St. Louis:Mobsby. 1988:1993-2041.
  38. Brian HM, Spencer TC, Paul SW. Effect of COX-2 inhibitors and non-steroidal anti-inflammatory drugs on a mouse fracture model. *Injury*. 2006;37(9):827-37.
  39. Spranger J. Bone dysplasia 'families'. *Pathology and Immunopathology Research*. 1988;7(1-2):76-80.
  40. Cole WG. Collagen genes: mutations affecting collagen structure and expression. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 1994;47:29-80.
  41. Ng LJ, Wheatly S, Muscat G. SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Developmental Biology*. 1996;138(1):108-21.
  42. Na SH. Localization of runx2 and osterix in the developing periodontal tissues of mouse [dissertation]. Seoul: Kyung Hee University; 2010:1-2.
  43. Nakajima F, Ogasawara A, Goto K, Moriya H. Spatial and temporal gene expression in chondrogenesis during fracture healing and the effects of basic fibroblast growth factor. *Journal of Orthopaedic Research*. 2001;19(5): 935-44.
  44. Kim DY. Biochemical markers of bone turnover. *Korean Society of Nuclear Meidicine*. 1999;33(2):341-51.
  45. Price PA, Parthermore JG, Doftos LJ. New biochemical marker for bone metabolism. *J Clin Invest*. 1980;66:878-83.
  46. Calvo MS, Eyre DR, Gundberg CM. Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr Rev*. 1996;17:333-68.
  47. Kim HS. Effect of dexamethasone and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on proliferation and osteogenic differentiation of cultured human bone marrow stromal cells. *Endocrinology and Metabolism*. 2002;17(2):206-17.
  48. Beeton CA, Charfield D, Brooks RA. Circulating levels of interleukin-6 and its soluble receptor in patients with head injury and fracture. *J Bone Joint Surg Br*. 2004; 86:912-7.
  49. Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, Levine PM, Horowitz MC. The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res*. 1995;10:1272-81.
  50. Kimbke RB, Bain S, Pacifici R. The functional block of TNF but not IL-6 prevents bone loss in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res*. 1997;12:935-41.
  51. Kon T, Cho TJ, Aizawa T. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res*. 2001;16:1004-14.