

眞武湯이 흰쥐의 대퇴골 골절 치유에 미치는 실험적 연구

박정오 · 오민석

대전대학교 한의과대학 한방재활의학교실

The Healing Effect of *Jinmu-tang* (*Zhenwu-tang*) in Femur Fractured Rats

Jung-Oh Park, K.M.D., Min-Seok Oh, K.M.D.

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

Objectives The aim of this study is to evaluate the fracture healing effect of *Jinmu-tang* (JM) on femur fractured rats.

Methods Rats were randomly divided into 5 groups (normal, control, positive control, JM extract with low concentration and JM extract with high concentration). All group except normal group went through both femur fracture. Normal and control group received no treatment at all. Positive control group were medicated with tramadol (20 mg/kg) once a day for 14 days. Experimental group was orally medicated with JM extract (10 mg/kg for low concentration, 50 mg/kg for high concentration) once a day for 14 days. In order to investigate fracture healing process, plasma and serum were obtained. Also, micro-computed tomography was conducted to see the fracture site visually. Immunohistochemistry for transforming growth factor- β 1, Ki67, alkaline phosphatase, runt-related transcription factor 2, receptor activator of nuclear factor kappa- β , tartrate resistant acid phosphatase was conducted to observe bone healing progress after 14 days since fracture occurred. Aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, blood urea nitrogen and creatinine levels were measured in plasma, for hepatotoxicity and nephrotoxicity of JM extract. Osteocalcin was measured to observe activity of osteoblast.

Results Through Micro-CT, more fracture healing was observed on both experimental group than control and positive control group. Through Hematoxylin & Eosin and safranin O staining showed bone cell proliferation and bone formation in the experimental group. RANK was significantly increased in the experimental groups. JM with high concentration showed statistically significant of TGF- β and Osteocalcin. NO, TRAP and ALP were not significantly changed. Liver toxicity was not significantly observed. Creatinine significantly increased in both experimental groups after 28 days.

Conclusions As described above, JM extract showed anti-inflammatory effect, promoted fracture healing by stimulating the bone regeneration factor, and showed little hepatotoxicity and nephrotoxicity. In conclusion, JM extract can promote fracture healing and it can be used clinically to patients with fracture. (*J Korean Med Rehabil* 2020;30(2):19-35)

RECEIVED March 16, 2020

REVISED March 27, 2020

ACCEPTED March 30, 2020

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 © 2020 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

Key words Herbal medicine, Bone fractures, Fracture healing, Gene expression

서론»»»»

골절이란 뼈의 연속성이 완전하게 혹은 불완전하게 소실된 질환으로¹⁾ 통증, 주변 연부조직 손상, 구조적 변형 등의 다양한 증상을 나타낸다²⁾. 주된 원인은 외상, 반복된 외력, 종양 등이며, 치료는 골절의 위치, 정도, 폐쇄성 혹은 개방성 여부 및 전신상태 등을 고려하여 정복술, 고정술 등의 수술적 치료나 석고고정, 보조기 등의 비수술적 치료 중 적절한 치료법을 선택한다²⁾.

한의학에서는 《外臺祕要》³⁾에서 ‘急療骨折, 接骨如故’라 하여 골절에 대해 최초로 언급하였고, 치료에는 보조기 뿐만 아니라 침, 뜸, 한약 등 다양한 방법을 이용하였다^{4,6)}. 특히 한약을 이용한 연구로는 단미재로 紅花⁷⁻⁹⁾, 鹿茸¹⁰⁾, 人參¹¹⁾ 등이, 처방으로는 六味地黃湯^{12,13)}, 加味芍歸湯¹⁴⁾, 接骨散¹⁵⁾ 등이 골절유합에 효과적임을 보고하였다.

眞武湯은 玄武湯이라고도 하며 《傷寒論》에 ‘少陰病二三日不已 至四五日 腹痛. 小便不利 四肢沈痛 自下利者 此爲. 有水氣 其人或咳 或小便利 或下利. 或嘔者 眞武湯主之’라 하여 처음 소개된 처방은 茯苓 芍藥 生薑 白朮 附子로 구성되어 있다¹⁶⁾. 眞武湯에 대한 연구로는 Choi 등¹⁷⁾이 갑상선기능저하증에 효과가 있음을, Ann¹⁸⁾이 근위축증의 치험례를, Yang 등¹⁹⁾은 골관절염에 효과가 있음을 보고하였다.

眞武湯의 구성약재 중 附子は 補腎陽, 茯苓 白朮은 健脾化濕, 芍藥은 補血, 生薑은 溫裏하는 작용이 있어 골절 후 발생한 血虛, 陽虛상태에 응용할 수 있을 것으로 생각되나 眞武湯의 골절 치유에 관한 연구는 찾아보기 어려웠다.

이에 저자는 眞武湯이 골절 치유에 미치는 영향을 알아보고자 흰쥐의 대퇴골을 골절시킨 뒤 micro-computed tomography (micro-CT) 검사, haematoxylin & eosin staining, safranin O staining 및 골절조절인자들의 면역화학 검사 및 혈액생화학적 분석 등을 통하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법»»»»

1. 재료

1) 동물

실험동물은 대한바이오링크(Eumseong, Korea)에서 11주령 수컷 Sprague Dawley rat (300-350 g)를 분양받아 1주일간 사육한 뒤 실험에 사용하였다. 최근 동물실험의 윤리적 경향이 동물희생을 최소화하는 것인데, 본 골절실험에서 양 성의 차이를 보려면 성별 균을 더 분류하여 동물의 희생을 추가로 늘려야 한다. 그러나 본 실험의 목적이 진무탕의 성별에 따른 골절치유 효과를 확인하고자 하는 것이 아니므로 양 성의 차이를 모두 확인하고자 동물의 희생을 추가로 늘리는 것은 적절하지 않은 것으로 판단하였다. 양 성중 수컷 쥐만을 대상으로 실험을 진행한 이유는 골절 치유에 여성호르몬의 변화가 영향을 주므로, 암컷 쥐를 대상 동물로 하였을 경우 생리주기에 따른 호르몬 변화를 제어하기 어렵다고 판단하였다. 이러한 이유로 동일 주령의 수컷 쥐를 동일한 조건에서 사육하면서 중재방법만을 달리하여 중재가 골절 치유에 미치는 영향을 분석하고자 하였다. 실험동물은 실험 당일까지 고품사료와 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 사육환경은 자유식이 하면서 온도는 23±1°C로 맞추었고 12시간 light-dark cycle의 환경에 7일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 본 연구의 동물 실험에 관한 모든 사항은 대전대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받은 후 진행하였다(승인번호: DJUAR2019-007).

2) 약재

실험에 사용한 眞武湯(Jinmu-tang, JM)의 약재는 ㈜음니허브(Daegu, Korea)에서 구입하였으며, 약물의 구성 및 용량은 《傷寒論》¹⁶⁾에 따랐다(Table I).

2. 방법

1) 시료 추출

2첩 분량의 한약재 48 g에 1 L의 증류수를 넣고 약탕기(Daewoong, Naju, Korea)를 이용하여 약 2시간 동안 열수추출을 하였다. 끓인 약재는 Whatman No. 2 filter

Table I. The Herbal Composition of *Jinmu-tang* (*Zhenwu-tang*)

Latin name	Amount (g)
<i>Poria sclerotium</i>	6
<i>Paeoniae radix</i>	6
<i>Aconitum lateralis radix preparata</i>	2
<i>Atractylodes rhizoma alba</i>	4
<i>Zingiberis rhizoma crudus</i>	6
Total	24

(Whatman, Maidstone, UK)로 여과해 용액에 추출된 성분만을 분리하였다. 여액은 rotary evaporator (Buchi, Flawil, Switzerland)로 70°C에서 감압증발한 뒤 동결건조하여 7.9 g의 건조분말을 얻어 추출효율은 16.5%였다. 분말은 -80°C에 분주하여 보관하였으며 사용하기 전 phosphate-buffered saline (PBS)로 희석하여 0.45 μ m 필터로 거른 후 사용하였다.

2) 골절 동물 모델

흰쥐에게 60 mg/kg의 ketamine (Yuhan Co., Seoul, Korea)과 500 μ l/kg의 rompun (Bayer Korea, Ansan, Korea)을 섞어 근육 주사하여 마취하였다. 골절 유발을 위한 방법으로 양측 대퇴부를 삭모한 다음 피부와 근육을 절개한 뒤 수술용 전동 드릴(Saeshin Precision Co., Ltd., Daegu, Korea)을 이용하여 대퇴골 간부에 직경 3.0 mm의 관통골절을 유발하였다. 피질골에서 골수강까지 관통시켰으며 반대쪽 피질골은 관통하지 않고 한쪽 피질골만을 관통시켰다. 골절 유발 후 근육, 피부 순서로 봉합사를 이용하여 5 mm 간격으로 단순 결찰 봉합하였다. 흰쥐의 양쪽 뒷다리 모두 골절을 유발하였다.

3) 실험군 분류 및 약물 투여

흰쥐는 무작위로 5개의 그룹으로 나누었다. 정상군(normal)과 대조군(control), 양성대조군(tramadol 군)은 각각 6마리씩, 眞武湯 투여군은 고농도군(JM-H)과 저농도군(JM-L)에 각각 10마리씩 배속시키고, 골절 후 14일과 28일에 치사하였다. 정상군은 대퇴부 골절 손상을 주지 않았다. 그 외 모든 그룹의 흰쥐는 대퇴부에 골절 손상을 주었고 실험 약물은 실험기간 동안 1일 1회 일정 시간에 경구 투여하였다. 양성 대조군은 tramadol 20 mg/kg (Sigma Aldrich Co., Ltd., St. Louis, MO, USA)을 사용

하였다. 眞武湯 투여군은 저농도군의 경우 10 mg/kg을, 고농도군의 경우 50 mg/kg을 사용하였다.

4) Plasma 분리

마취된 실험동물의 심장에서 직접 채혈한 뒤 곧장 ethylen dianmin acetic acid가 들어 있는 BD vacutainer tube (BD, Franklin Lakes, NJ, USA)에 넣고 가볍게 흔들어 혈액 응고를 억제하였다. 이후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 뒤 상등액을 취하여 plasma를 확보하였다.

5) Serum 분리

마취된 실험동물의 심장에서 직접 채혈한 뒤 곧장 serum separate tube (BD)에 넣고 가볍게 흔든 뒤 30분 정도 응고가 형성되도록 세워 놓았다. 이후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 뒤 상등액을 취하여 serum을 확보하였다.

6) Micro-CT 촬영

재생된 뼈를 확인하기 위하여 micro-CT (Quantum FX Micro-CT; Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA)를 사용하여 대퇴골을 스캔하였다. X-선 소스는 관전압 90 kVp, 관전류 160 μ A로 3분간 스캔하였다. Micro-CT 스캔 후 이미지는 dataview (Bruker, Ettlingen, Germany)를 사용하여 정리하였다. 또한 micro-CT 이미지에서 callus 영역을 측정하기 위해 image J 프로그램(U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)을 사용하였다. 실험동물의 골절된 부분의 동일한 면적에서의 callus 영역을 측정하였으며, 측정값은 대조군을 기준으로 상대적인 값으로 나타내었다.

7) 골절 조직 염색

(1) 조직 슬라이드 제작

치사된 흰쥐에서 골절을 유발한 뒷다리 부위를 적출하고 대퇴골을 감싸고 있는 근육조직들을 제거한 뒤, 10% paraformaldehyde에 1주일동안 조직을 고정하였다. 고정된 조직을 조직처리 과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후 파라핀 블록을 4 μ m 두께로 절단하여 절편을 만들었다.

(2) Haematoxylin & eosin staining

탈파라핀 후 흡수, 수세 과정을 거쳐 haematoxylin 과정을 10분간 처리하고, 수세 후 eosin에 1분 40초간 처

리하였다. 그 다음 합수, 청명과정을 거쳐 cover glass를 덮고 봉입하였다. 조직슬라이드는 40배의 배율로 bright field microscope (Nikon, Tokyo, Japan)로 관찰하였다.

(3) Safranin O staining

탈파라핀 후 Weigert's iron haematoxylin 과정을 5분간 처리하였다. 수세 후 0.02% fast green 5분, 1% acetic acid 10초, 0.1% safranin O에 5분의 처리과정을 순서대로 거쳤다. 그 다음 합수, 청명과정을 거쳐 cover glass를 덮고 봉입하였다. 조직슬라이드는 40배의 배율로 bright field microscope로 관찰하였다.

8) Immunohistochemistry (IHC) 분석

(1) IHC 슬라이드 제작

치사된 흰쥐에서 골절을 유발한 뒷다리 부위를 적출하고 대퇴골을 감싸고 있는 근육조직들을 제거한 뒤, 10% formaldehyde에 1주일동안 조직을 고정하였다. 고정된 조직을 조직처리 과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후 파라핀 블록을 4 μm 두께로 절단하여 절편을 만들고 탈파라핀, 합수과정을 거쳐 증류수로 세척하였다. 내인성 peroxidase의 활성을 없애기 위해 peroxide blocking (DAKO, Glostrup, Denmark)를 실온에서 10분간 처리한 후 PBS로 2회 세척하였다.

(2) Transforming growth factor-β1 (TGF-β1), Ki67⁺

항체 TGF-β1 (Dilution 1:200; Abcam, Cambridge, UK), Ki-67 (Dilution 1:100; Abcam)를 4°C에서 over night동안 반응시킨 후, wash buffer (DAKO)로 세척하고 envision+rabbit (DAKO)으로 30분간 반응시켰다. 반응 후 반응용액은 wash buffer로 세척하고, 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)로 약 3분간 발색하였다. 발색 후 증류수로 중화하고, Mayer haematoxylin으로 대조 염색 후 수돗물에 세척하여 남은 염색 시약을 제거한 뒤 합수, 청명과정을 거쳐 cover glass를 덮고 봉입하였다. 조직슬라이드는 200배, 400배의 배율로 bright field microscope로 관찰하였다.

(3) Alkaline phosphatase (ALP), runt-related transcription factor 2 (Runx2)

항체 ALP (1:200; MyBioSource, San Diego, CA, USA), Runx2 (Dilution 1:100; Abcam)를 4°C에서 over night동안 반응시킨 후, wash buffer (Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, IL, USA) 세척하고 biotinylated antibody-

rabbit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)으로 30분간 반응시켰다. 반응 후 반응용액은 wash buffer로 세척하고, avidin biotin HRP complex (Vector Laboratories)로 반응시켰다. Wash buffer로 세척 후 DAB로 약 3분간 발색하였다. 발색 후 증류수로 중화하고, Harris haematoxylin으로 대조 염색 후 수돗물에 세척하여 남은 염색 시약을 제거한 뒤 합수, 청명과정을 거쳐 cover glass를 덮고 봉입하였다. 조직슬라이드는 200배의 배율로 bright field microscope로 관찰하였다.

(4) Receptor activator of nuclear factor kappa-β (RANK)

항체 RANK (Dilution 1:100; Abcam)를 4°C에서 over night동안 반응시킨 후, wash buffer (Thermo Fisher Scientific)로 세척하고 biotinylated antibody-mouse (Vector Laboratories)로 30분간 반응시켰다. 반응 후 반응용액은 wash buffer로 세척하고, avidin biotin HRP complex로 반응시켰다. Wash buffer로 세척 후 DAB로 약 3분간 발색하였다. 발색 후 증류수로 중화하고, Harris haematoxylin으로 대조 염색 후 수돗물에 세척하여 남은 염색 시약을 제거한 뒤 합수, 청명과정을 거쳐 cover glass를 덮고 봉입하였다. 조직슬라이드는 200배의 배율로 bright field microscope로 관찰하였다.

(5) Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP)

항체 TRAP (Dilution 1:100; Abcam)를 4°C에서 over night동안 반응시킨 후, wash buffer (Thermo Fisher Scientific)로 세척하고 biotinylated antibody-rabbit으로 30분간 반응시켰다. 반응 후 반응용액은 wash buffer (Thermo Fisher Scientific)로 세척하고, avidin biotin HRP complex로 반응시켰다. Wash buffer로 세척 후 DAB로 약 3분간 발색하였다. 발색 후 증류수로 중화하고, Harris haematoxylin으로 대조 염색 후 수돗물에 세척하여 남은 염색 시약을 제거한 뒤 합수, 청명과정을 거쳐 cover glass를 덮고 봉입하였다. 조직슬라이드는 200배의 배율로 bright field microscope로 관찰하였다.

9) IHC staining score

조직슬라이드의 정보를 블라인드 처리한 후 발현량 정도를 0부터 5까지 scoring하였다. 발현량 score 점수는 Table II와 같다.

Table II Grade of IHC Score

Score	0	1	2	3	4	5
Staining intensity	No staining	Weak	Mild weak	Moderate	Mild strong	Strong

IHC: immunohistochemistry.

10) 혈액생화학적 분석

혈액생화학적 분석을 위하여 COBAS 8000 C702 analyzer (Roche Diagnostic, Basel, Switzerland)를 사용하였다. 시약은 Roche Diagnostics를 사용하였다. ALP, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT)는 colorimetry 검사법을 이용하였고, blood urea nitrogen (BUN)은 kinetic test, creatinine은 enzyme법, osteocalcin은 enzyme-linked immunosorbent assay법을 이용하였다. 실험동물로부터 분리한 serum을 사용하여 각각의 혈액생화학적 분석을 수행하였다.

3. 통계처리

모든 실험 결과는 mean±standard error of the mean으로 기록되었으며, 통계처리는 GraphPad Prism 5 프로그램(version 5.01; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)을 이용하였고, Mann Whitney test로 유의성을 검증하였다. p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과»»»»

1. Micro-CT 관찰

Micro-CT를 이용하여 관찰한 결과 대조군과 양성대조군에서는 대퇴골 골절부위의 회복이 관찰되지 않았으며, 골절부위 근처에 callus 생성이 관찰되었다. 眞武湯 저농도군과 고농도군에서는 대퇴골 골절부위의 면적이 감소하였다(Fig. 1).

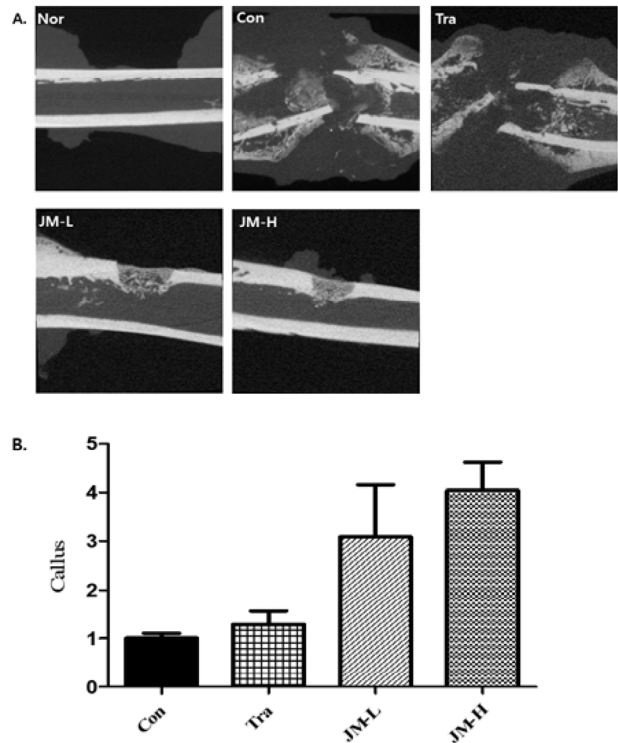


Fig. 1. Sprague Dawley rats shaft fracture and treated with 10 mg/kg/day and 50 mg/kg/day of *Jinmu-tang* for 14 days. (A) Micro-CT image in bone fracture, (B) Callus area in micro-CT image. Nor: non treated group, Con: group with bone fracture and vehicle, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), JM-L: fractured group treated with *Jinmu-tang* (10 mg/kg/day), JM-H: fractured group treated with *Jinmu-tang* (50 mg/kg/day).

2. 조직 관찰

1) Haematoxylin & eosin staining

Haematoxylin & eosin staining 결과, 골절 유발 14일 후 대조군과 양성대조군에서 대퇴골의 골절 유합이 지연되었으며, 眞武湯 저농도군과 고농도군에서 대퇴골의 골절 후 회복과 회복부위에 골세포의 증식이 관찰되었다(Fig. 2).

2) Safranin O staining

Safranin O staining 결과, 골절 유발 14일 후 대조군에서 cartilage의 영역이 확대되어 있었고 chondrocyte가 증식되어 있는 것을 관찰할 수 있었으며 약간의 woven bone이 관찰되기도 하였다. 眞武湯 저농도군과 고농도군에서 cartilage의 영역이 사라지고 골형성이 이루어진 것이 관찰되었다(Fig. 3).

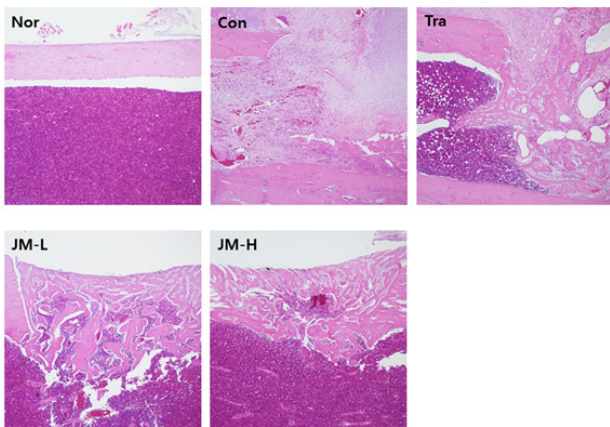


Fig. 2. The histological analysis of bone fracture process with haematoxylin and eosin staining (magnification, $\times 40$). Sprague Dawley rats shaft fracture and treated with 10 mg/kg/day and 50 mg/kg/day of *Jinmu-tang* for 14 days. The damaged rats femurs were isolated and used for tissue slide specimen. Nor: non treated group, Con: group with bone fracture and vehicle, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), JM-L: fractured group treated with *Jinmu-tang* (10 mg/kg/day), JM-H: fractured group treated with *Jinmu-tang* (50 mg/kg/day).

3. IHC 분석

골절 치유과정에 관여하는 조절인자들에 대한 IHC 분석을 시행하여 Table III과 같은 결과를 얻었다.

1) TGF- β 1 분석

골절조직의 TGF- β 1을 분석한 결과, 대조군을 포함하여 골절이 일어난 병변 부위에서 TGF- β 1 발현이 증가한

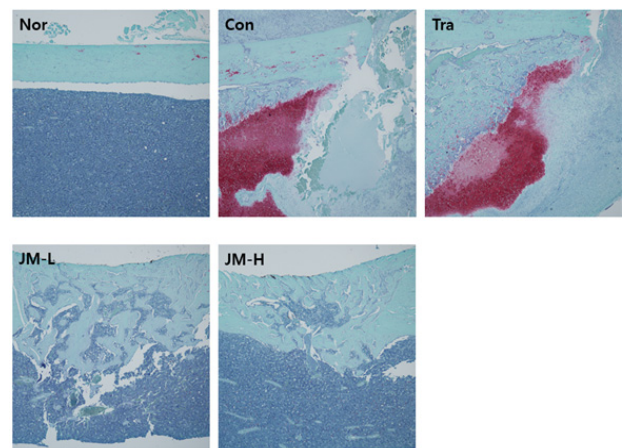


Fig. 3. The histological analysis of bone fracture process with Safranin O staining (magnification, $\times 40$). Sprague Dawley rats shaft fracture and treated with 10 mg/kg/day and 50 mg/kg/day of *Jinmu-tang* for 14 days. The damaged rats femurs were isolated and used for tissue slide specimen. Nor: non treated group, Con: group with bone fracture and vehicle, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), JM-L: fractured group treated with *Jinmu-tang* (10 mg/kg/day), JM-H: fractured group treated with *Jinmu-tang* (50 mg/kg/day).

Table III IHC Scoring of Each Factor

	Normal	Control	Tramadol	JM-L	JM-H
TGF- β 1	1.0 \pm 0.00	2.5 \pm 1.00*	4.0 \pm 0.82 [†]	2.3 \pm 0.50	3.8 \pm 0.50 [‡]
Ki67	1.8 \pm 1.26	2.0 \pm 1.15	2.8 \pm 1.26	1.8 \pm 1.26	1.5 \pm 1.00
ALP	1.3 \pm 0.50	3.3 \pm 0.96 [§]	3.0 \pm 0.00	2.3 \pm 0.50	3.3 \pm 0.50
RANK	1.3 \pm 0.50	2.0 \pm 0.00*	2.8 \pm 0.50 [†]	3.5 \pm 0.58 [†]	3.5 \pm 0.58 [†]
Runx2	0.8 \pm 0.50	3.3 \pm 0.50 [§]	1.5 \pm 0.58 [†]	1.5 \pm 0.58 [†]	1.5 \pm 0.58 [†]
TRAP	2.3 \pm 0.96	2.0 \pm 0.00	0	2.3 \pm 0.96	1.8 \pm 0.96

Normal: non treated group, Control: group with bone fracture and vehicle, Tramadol: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), JM-L: fractured group treated with *Jinmu-tang* (10 mg/kg/day), JM-H: fractured group treated with *Jinmu-tang* (50 mg/kg/day), IHC: immunohistochemistry, TGF- β 1: transforming growth factor- β 1, ALP: alkaline phosphatase, RANK: receptor activator of nuclear factor kappa- β , Runx2: runt-related transcription factor 2, TRAP: tartrate resistant acid phosphatase.

*Significantly different from normal ($p < 0.05$), [†]Significantly different from control ($p < 0.01$), [‡]Significantly different from control ($p < 0.05$), [§]Significantly different from normal ($p < 0.01$).

것을 확인하였다. 특히 眞武湯 고농도군에서 TGF- β 1 발현세포가 대조군에 비해 유의하게 증가하였다(Fig. 4).

2) Ki67⁺ 분석

골절조직의 Ki67⁺를 관찰한 결과, 대조군과 양성대조군의 골절이 일어난 병변 부위에서 Ki67⁺ 발현이 증가한 것을 확인하였다. 그러나 眞武湯 저농도군과 고농도군에서는 대조군에 비하여 Ki67⁺ 발현이 감소하였다(Fig. 5).

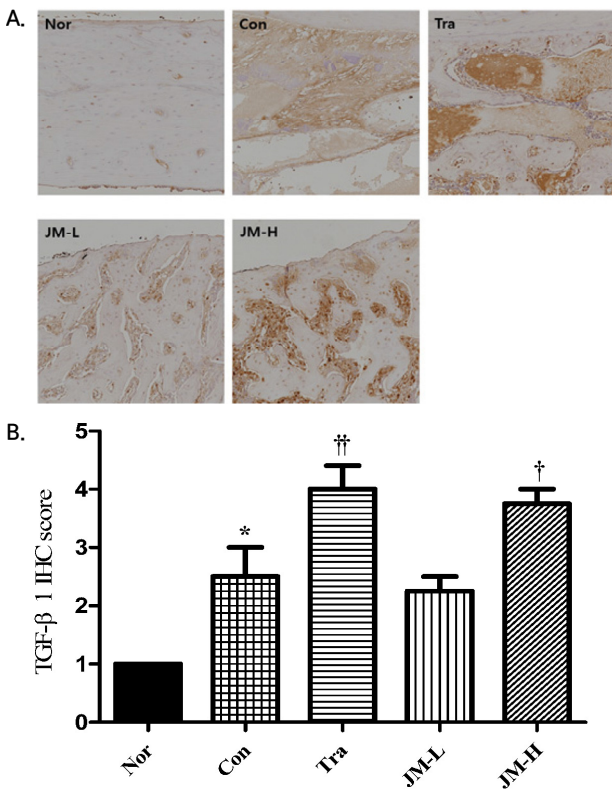


Fig. 4. Sprague Dawley rats shaft fracture and treated with 10 mg/kg/day and 50 mg/kg/day of *Jinmu-tang* for 14 days. The damaged rats femurs were isolated and used for tissue slide specimen. The sliced bone tissue were incubated with TGF- β 1 antibody and subjected to IHC. (A) TGF- β 1 IHC staining in bone fracture (magnification, $\times 200$), (B) IHC score of TGF- β 1. Nor: non treated group, Con: group with bone fracture and vehicle, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), JM-L: fractured group treated with *Jinmu-tang* (10 mg/kg/day), JM-H: fractured group treated with *Jinmu-tang* (50 mg/kg/day), IHC: immunohistochemistry, TGF- β 1: transforming growth factor- β 1. *Significantly different from normal ($p < 0.05$), [†]Significantly different from control ($p < 0.05$), ^{††}Significantly different from control ($p < 0.01$).

3) RANK 분석

골절조직의 RANK를 분석한 결과, 대조군을 포함하여 골절이 일어난 병변 부위에서 RANK 발현이 증가한 것을 확인하였다. 眞武湯 저농도군과 고농도군 모두 대조군에 비해 RANK 발현이 유의하게 증가하였다(Fig. 6).

4) TRAP 분석

골절조직의 TRAP를 분석한 결과, 대조군과 양성대조군의 골절이 일어난 병변 부위에서 TRAP 발현이 감소된 것을 확인하였다. 眞武湯 저농도군에서는 TRAP

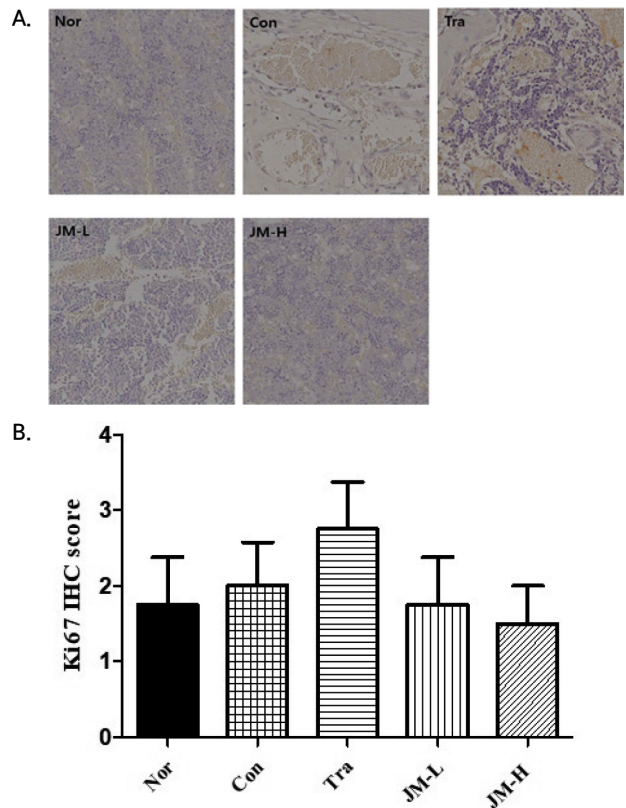


Fig. 5. Sprague Dawley rats shaft fracture and treated with 10 mg/kg/day and 50 mg/kg/day of *Jinmu-tang* for 14 days. The damaged rats femurs were isolated and used for tissue slide specimen. The sliced bone tissue were incubated with Ki67⁺ antibody and subjected to IHC. (A) Ki67⁺ IHC staining in bone fracture (magnification, $\times 400$), (B) IHC score of Ki67⁺. Nor: non treated group, Con: group with bone fracture and vehicle, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), JM-L: fractured group treated with *Jinmu-tang* (10 mg/kg/day), JM-H: fractured group treated with *Jinmu-tang* (50 mg/kg/day), IHC: immunohistochemistry.

발현이 증가하였으나 유의하지는 않았다(Fig. 7).

5) ALP 분석

골절조직의 ALP를 분석한 결과, 대조군을 포함하여 골절이 일어난 병변 부위에서 ALP 발현이 증가한 것을 확인하였다. 眞武湯 고농도군에서 ALP 발현이 증가하였으나 유의하지 않았다(Fig. 8).

6) Runx2 분석

골절조직의 Runx2를 분석한 결과, 대조군에서 Runx2

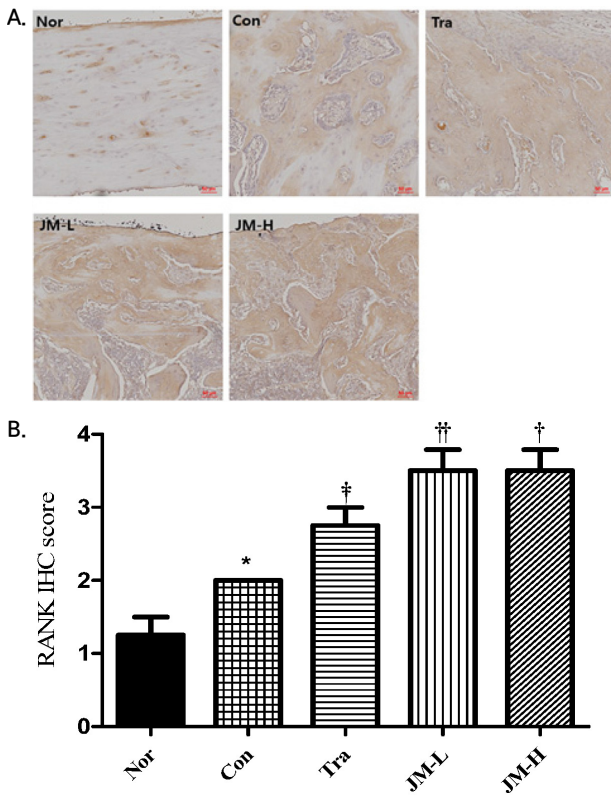


Fig. 6. Sprague Dawley rats shaft fracture and treated with 10 mg/kg/day and 50 mg/kg/day of *Jinmu-tang* for 14 days. The damaged rats femurs were isolated and used for tissue slide specimen. The sliced bone tissue were incubated with RANK antibody and subjected to IHC. (A) RANK IHC staining in bone fracture (magnification, $\times 200$), (B) IHC score of RANK. Nor: non treated group, Con: group with bone fracture and vehicle, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), JM-L: fractured group treated with *Jinmu-tang* (10 mg/kg/day), JM-H: fractured group treated with *Jinmu-tang* (50 mg/kg/day), IHC: immunohistochemistry, RANK: receptor activator of nuclear factor kappa- β . *Significantly different from normal ($p < 0.05$), †Significantly different from control ($p < 0.05$), ‡Significantly different from control ($p < 0.01$).

가 유의하게 증가하였다. 眞武湯 저농도군과 고농도군에서는 Runx2 발현이 유의하게 감소하였다(Fig. 9).

4. 혈액분석

1) 간기능 검사

(1) ALP

혈청 내 ALP를 측정된 결과, 골절 유발 14일 후 ALP 값은 정상군에서 328.2 ± 17.22 이었을 때 대조군은 294.8 ± 15.19 로 정상군에 비해 감소하였다. 양성대조군은 241.0 ± 23.01 로 정상군에 비해 유의하게 감소하였고, 대조군에 비해 감소하였지만 유의하지 않았다. 眞武湯 저농도군과 고

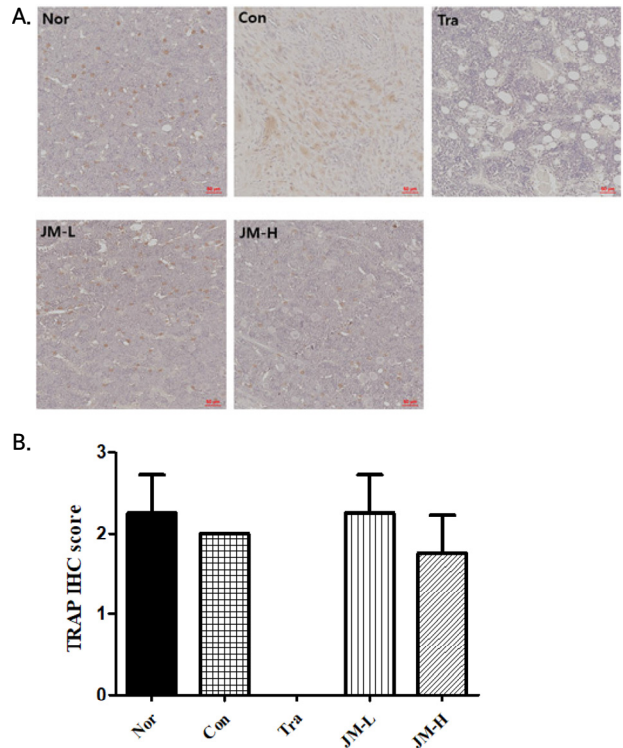


Fig. 7. Sprague Dawley rats shaft fracture and treated with 10 mg/kg/day and 50 mg/kg/day of *Jinmu-tang* for 14 days. The damaged rats femurs were isolated and used for tissue slide specimen. The sliced bone tissue were incubated with TRAP antibody and subjected to IHC. (A) TRAP IHC staining in bone fracture (magnification, $\times 200$), (B) IHC score of TRAP. Nor: non treated group, Con: group with bone fracture and vehicle, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), JM-L: fractured group treated with *Jinmu-tang* (10 mg/kg/day), JM-H: fractured group treated with *Jinmu-tang* (50 mg/kg/day), IHC: immunohistochemistry, TRAP: tartrate resistant acid phosphatase.

농도군에서는 각각 242.8 ± 15.75 와 272.3 ± 7.52 로 정상군과 대조군에 비해 감소하였으며, 眞武湯 저농도군에서는 유의하게 감소하였다(Fig. 10).

골절 유발 28일 후 ALP 값은 정상군에서 328.2 ± 17.22 이었을 때 대조군은 292.3 ± 22.35 로 정상군에 비해 감소하였다. 양성대조군은 253.0 ± 15.29 로 정상군과 대조군에 비해 감소하였으며, 眞武湯 저농도군은 267.6 ± 24.69 로 대조군에 비해 감소하였다. 그러나 眞武湯 고농도군에서는 351.8 ± 24.91 로 대조군에 비해 증가하였으나 유의하지는 않았다(Fig. 11).

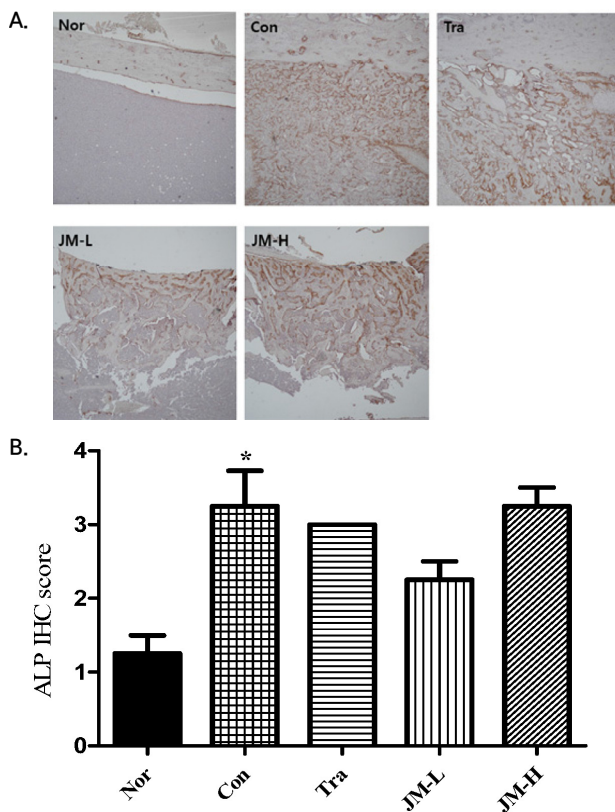


Fig. 8. Sprague Dawley rats shaft fracture and treated with 10 mg/kg/day and 50 mg/kg/day of *Jinmu-tang* for 14 days. The damaged rats femurs were isolated and used for tissue slide specimen. The sliced bone tissue were incubated with ALP antibody and subjected to IHC. (A) ALP IHC staining in bone fracture (magnification, $\times 40$), (B) IHC score of ALP. Nor: non treated group, Con: group with bone fracture and vehicle, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), JM-L: fractured group treated with *Jinmu-tang* (10 mg/kg/day), JM-H: fractured group treated with *Jinmu-tang* (50 mg/kg/day), IHC: immunohistochemistry, ALP: alkaline phosphatase. *Significantly different from normal ($p < 0.05$).

(2) ALT

혈청 내 ALT 측정 결과, 골절 유발 14일 후 ALT 값은 정상군에서 49.98 ± 5.78 이었을 때 대조군은 47.03 ± 4.45 로 정상군에 비해 감소하였다. 양성대조군은 40.80 ± 5.54 로 정상군과 대조군에 비해 감소하였지만 유의하지 않았다. 眞武湯 저농도군에서는 44.68 ± 10.15 로 정상군과 대조군에 비해 감소하였고 고농도군에서는 52.18 ± 3.99 로 정상군과 대조군에 비해 증가하였으나 두 군 모두 유의하지는 않았다(Fig. 12).

골절 유발 28일 후 ALT 값은 정상군에서 49.98 ± 5.78 이었을 때 대조군은 48.85 ± 3.79 로 정상군에 비해 감소

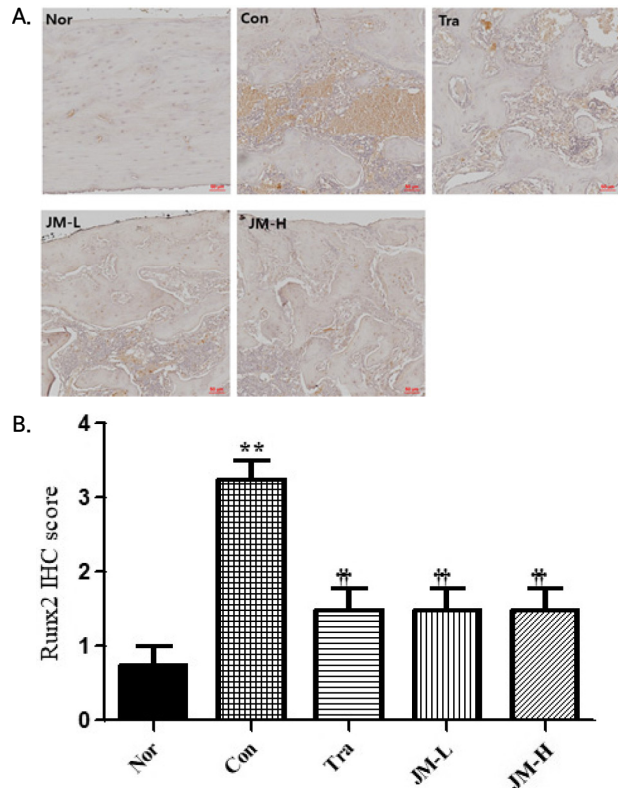


Fig. 9. Sprague Dawley rats shaft fracture and treated with 10 mg/kg/day and 50 mg/kg/day of *Jinmu-tang* for 14 days. The damaged rats femurs were isolated and used for tissue slide specimen. The sliced bone tissue were incubated with Runx2 antibody and subjected to IHC. (A) Runx2 IHC staining in bone fracture (magnification, $\times 200$), (B) IHC score of Runx2. Nor: non treated group, Con: group with bone fracture and vehicle, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), JM-L: fractured group treated with *Jinmu-tang* (10 mg/kg/day), JM-H: fractured group treated with *Jinmu-tang* (50 mg/kg/day), IHC: immunohistochemistry, Runx2: runt-related transcription factor 2. *Significantly different from normal ($p < 0.01$), **Significantly different from control ($p < 0.01$).

하였다. 양성대조군은 40.23 ± 1.61 로 정상군과 대조군에 비해 감소하였다. 眞武湯 저농도군은 47.26 ± 3.46 로 대조군에 비해 감소하였으며, 眞武湯 고농도군은 56.46 ± 3.82

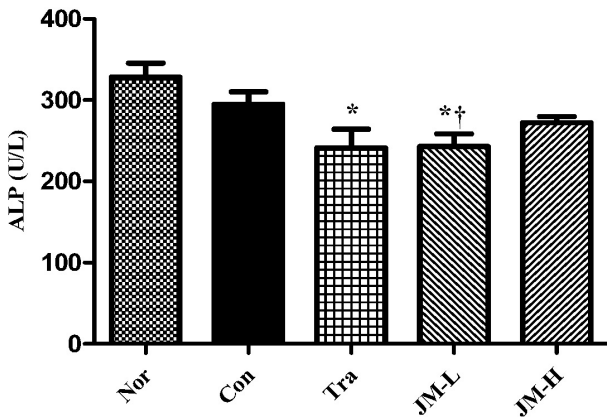


Fig. 10. Effect of JM extract on the ALP of serum in femur fractured rats after 14 days. Sprague Dawley rats had femoral shaft fracture and treated with 10 mg/kg/day and 50 mg/kg/day of JM for 14 days. The result were presented by the mean±standard error of the mean. Nor: non treated group, Con: group with bone fracture and vehicle, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), JM-L: fractured group treated with JM (10 mg/kg/day), JM-H: fractured group treated with JM (50 mg/kg/day), JM: *Jinmu-tang*, ALP: alkaline phosphatase. *Significantly different from normal ($p < 0.05$), †Significantly different from control ($p < 0.05$).

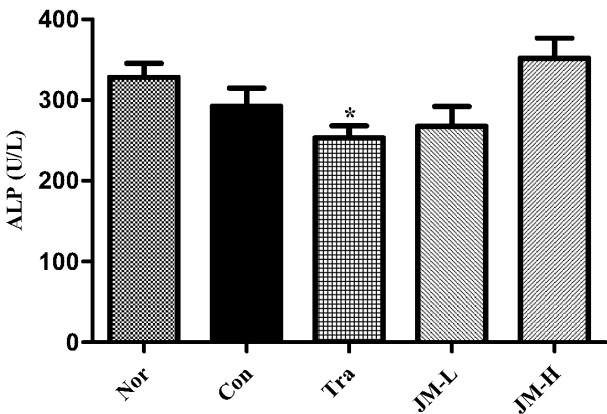


Fig. 11. Effect of JM extract on the ALP of serum in femoral shaft fracture rats after 28 days. Sprague Dawley rats had femoral shaft fracture and treated with 10 mg/kg/day and 50 mg/kg/day of JM for 28 days. The result were presented by the mean±standard error of the mean. Nor: non treated group, Con: group with bone fracture and vehicle, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), JM-L: fractured group treated with JM (10 mg/kg/day), JM-H: fractured group treated with JM (50 mg/kg/day), JM: *Jinmu-tang*, ALP: alkaline phosphatase. *Significantly different from normal ($p < 0.05$).

로 대조군에 비해 증가하였으나 두 군 모두 유의하지는 않았다(Fig. 13).

(3) AST

혈청 내 AST 측정 결과, 골절 유발 14일 후 AST 값은 정상군에서 156.6 ± 34.46 이었을 때 대조군은 162.5 ± 35.16 으

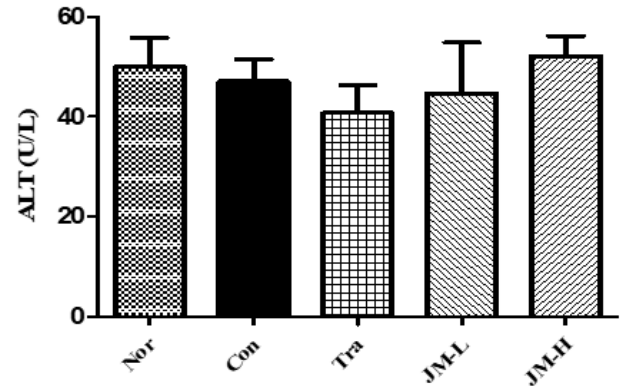


Fig. 12. Effect of JM extract on the ALT of serum in femoral shaft fracture rats after 14 days. Sprague Dawley rats had femoral shaft fracture and treated with 10 mg/kg/day and 50 mg/kg/day of JM for 14 days. The result were presented by the mean±standard error of the mean. Nor: non treated group, Con: group with bone fracture and vehicle, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), JM-L: fractured group treated with JM (10 mg/kg/day), JM-H: fractured group treated with JM (50 mg/kg/day), JM: *Jinmu-tang*, ALT: alanine aminotransferase.

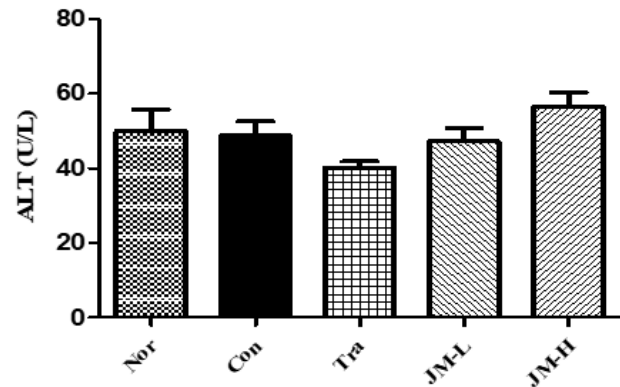


Fig. 13. Effect of JM extract on the ALT of serum in femoral shaft fracture rats after 28 days. Sprague Dawley rats had femoral shaft fracture and treated with 10 mg/kg/day and 50 mg/kg/day of JM for 28 days. The result were presented by the mean±standard error of the mean. Nor: non treated group, Con: group with bone fracture and vehicle, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), JM-L: fractured group treated with JM (10 mg/kg/day), JM-H: fractured group treated with JM (50 mg/kg/day), JM: *Jinmu-tang*, ALT: alanine aminotransferase.

로 정상군에 비해 증가하였다. 양성대조군은 126.5 ± 16.83 으로 정상군과 대조군에 비해 감소하였지만 유의하지 않았다. 眞武湯 저농도군과 고농도군에서는 각각 141.3 ± 35.14 와 132.9 ± 18.20 으로 정상군과 대조군에 비해 감소하였지만 유의하지 않았다(Fig. 14).

골절 유발 28일 후 AST 값은 정상군에서 156.6 ± 34.46 이었을 때 대조군은 110.0 ± 11.83 으로 정상군에 비해 감소하였고, 양성대조군은 104.5 ± 24.39 로 정상군과 대조군에 비해 감소하였다. 眞武湯 저농도군과 고농도군은 각각 139.9 ± 26.01 , 139.9 ± 12.26 으로 대조군에 비해서 증가하였으나 유의하지 않았다(Fig. 15).

2) 신기능검사

(1) Creatinine

혈청 내 creatinine 측정 결과, 골절 유발 14일 후 creatinine 값은 정상군에서 0.178 ± 0.016 이었을 때 대조군은 0.153 ± 0.011 로 정상군에 비해 감소하였다. 양성대조군은 0.165 ± 0.016 으로 정상군에 비해 감소하였지만 대조군에 비해서는 증가하였다. 眞武湯 저농도군에서는 0.210 ± 0.009 로 정상군과 대조군에 비해 유의하게 증가하였지만 고농도군에서는 0.170 ± 0.012 로 정상군과 대조군에 비해 변화가 거의 없었다(Fig. 16).

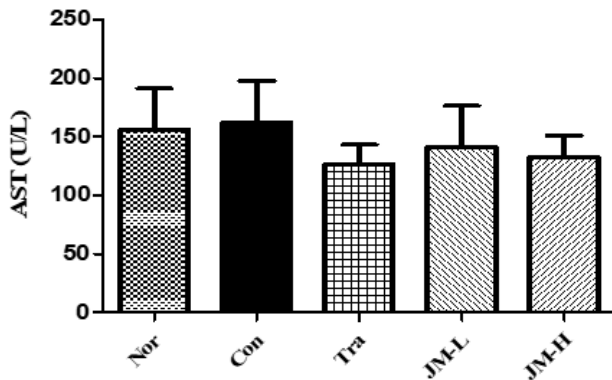


Fig. 14. Effect of JM extract on the AST of serum in femoral shaft fracture rats after 14 days. Sprague Dawley rats had femoral shaft fracture and treated with 10 mg/kg/day and 50 mg/kg/day of JM for 14 days. The result were presented by the mean±standard error of the mean. Nor: non treated group, Con: group with bone fracture and vehicle, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), JM-L: fractured group treated with JM (10 mg/kg/day), JM-H: fractured group treated with JM (50 mg/kg/day), JM: *Jinmu-tang*, AST: aspartate aminotransferase.

골절 유발 28일 후 creatinine 값은 정상군에서 0.178 ± 0.016 이었을 때 대조군은 0.162 ± 0.008 로 정상군에 비해 감소하였다. 양성대조군은 0.188 ± 0.017 로 정상군과 대조군에 비해 증가하였으며, 眞武湯 저농도군과 고농도군에서는 각각 0.208 ± 0.010 , 0.204 ± 0.008 로 두 실험군 모두 대조군에 비해 유의하게 증가하였다(Fig. 17).

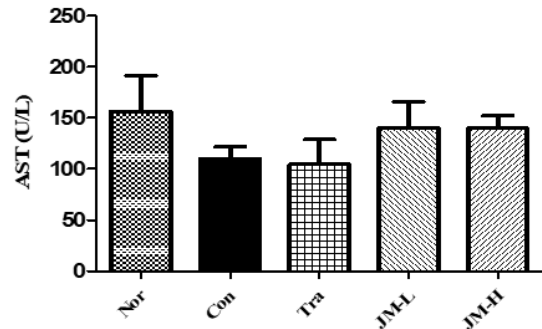


Fig. 15. Effect of JM extract on the AST of serum in femoral shaft fracture rats after 28 days. Sprague Dawley rats had femoral shaft fracture and treated with 10 mg/kg/day and 50 mg/kg/day of JM for 28 days. The result were presented by the mean±standard error of the mean. Nor: non treated group, Con: group with bone fracture and vehicle, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), JM-L: fractured group treated with JM (10 mg/kg/day), JM-H: fractured group treated with JM (50 mg/kg/day), JM: *Jinmu-tang*, AST: aspartate aminotransferase.

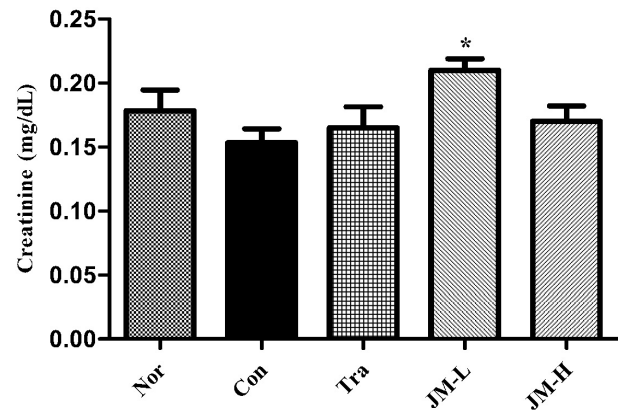


Fig. 16. Effect of JM extract on the creatinine of serum in femoral shaft fracture rats after 14 days. Sprague Dawley rats had femoral shaft fracture and treated with 10 mg/kg/day and 50 mg/kg/day of JM for 14 days. The result were presented by the mean±standard error of the mean. Nor: non treated group, Con: group with bone fracture and vehicle, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), JM-L: fractured group treated with JM (10 mg/kg/day), JM-H: fractured group treated with JM (50 mg/kg/day), JM: *Jinmu-tang*. *Significantly different from control ($p < 0.05$).

(2) BUN

혈청 내 BUN 측정 결과, 골절 유발 14일 후 BUN 값은 정상군에서 19.28 ± 0.54 이었을 때 대조군은 17.07 ± 0.38 로 정상군에 비해 감소하였다. 양성대조군은 17.50 ± 0.95 로 정상군 비해 감소하였으며 대조군과 거의 변화가 없었다. 眞武湯 저농도군과 고농도군에서는 각각 16.38 ± 1.18 과 17.90 ± 1.25 로 정상군에 비해 감소하였지만 유의하지 않았다(Fig. 18).

골절 유발 28일 후 BUN 값은 정상군에서 19.28 ± 0.54 이었을 때 대조군은 17.52 ± 0.44 로 정상군에 비해 감소하였다. 양성대조군은 17.00 ± 0.65 로 정상군에 비해 감소하였지만 대조군과는 거의 차이가 없었으며, 眞武湯 저농도군에서는 16.90 ± 0.55 로 정상군과 비해 감소하였고 眞武湯 고농도군에서는 18.58 ± 1.09 로 정상군에 비해 감소하였으나 두 군 모두 유의하지 않았다(Fig. 19).

3) Osteocalcin

혈청 내 osteocalcin 측정 결과, 정상군에서 4.58 ± 0.37 이었을 때 대조군은 4.32 ± 0.21 로 정상군에 비해 감소하였고, 양성대조군은 3.13 ± 0.18 로 정상군과 대조군에 비해 감소하였다. 眞武湯 저농도군과 고농도군에서는 각각 3.59 ± 0.12 와 3.37 ± 0.06 으로 정상군과 대조군에 비해

감소하였고, 특히 眞武湯 고농도군에서는 정상군과 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 20).

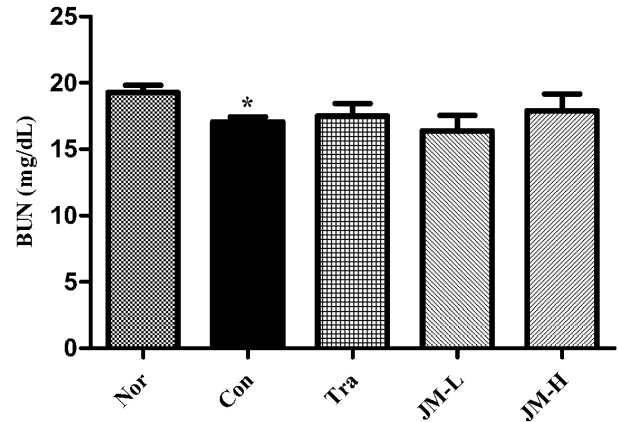


Fig. 18. Effect of JM extract on the BUN of serum in femoral shaft fracture rats after 14 days. Sprague Dawley rats had femoral shaft fracture and treated with 10 mg/kg/day and 50 mg/kg/day of JM for 14 days. The result were presented by the mean±standard error of the mean. Nor: non treated group, Con: group with bone fracture and vehicle, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), JM-L: fractured group treated with JM (10 mg/kg/day), JM-H: fractured group treated with JM (50 mg/kg/day), JM: *Jinmu-tang*, BUN: blood urea nitrogen. *Significantly different from normal ($p < 0.05$).

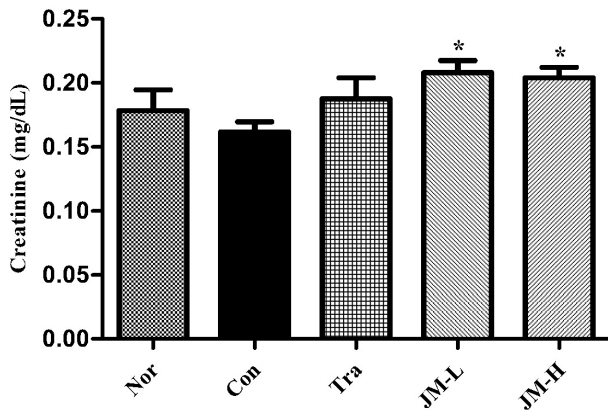


Fig. 17. Effect of JM extract on the creatinine of serum in femoral shaft fracture rats after 28 days. Sprague Dawley rats had femoral shaft fracture and treated with 10 mg/kg/day and 50 mg/kg/day of JM for 28 days. The result were presented by the mean±standard error of the mean. Nor: non treated group, Con: group with bone fracture and vehicle, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), JM-L: fractured group treated with JM (10 mg/kg/day), JM-H: fractured group treated with JM (50 mg/kg/day), JM: *Jinmu-tang*. *Significantly different from control ($p < 0.05$).

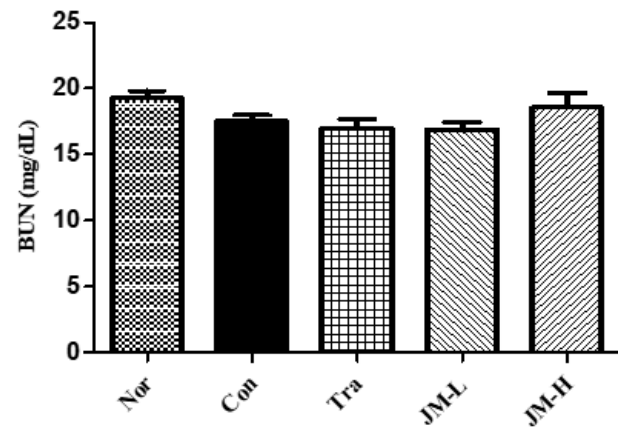


Fig. 19. Effect of JM extract on the BUN of serum in femoral shaft fracture rats after 28 days. Sprague Dawley rats had femoral shaft fracture and treated with 10 mg/kg/day and 50 mg/kg/day of JM for 28 days. The result were presented by the mean±standard error of the mean. Nor: non treated group, Con: group with bone fracture and vehicle, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), JM-L: fractured group treated with JM (10 mg/kg/day), JM-H: fractured group treated with JM (50 mg/kg/day), JM: *Jinmu-tang*, BUN: blood urea nitrogen.

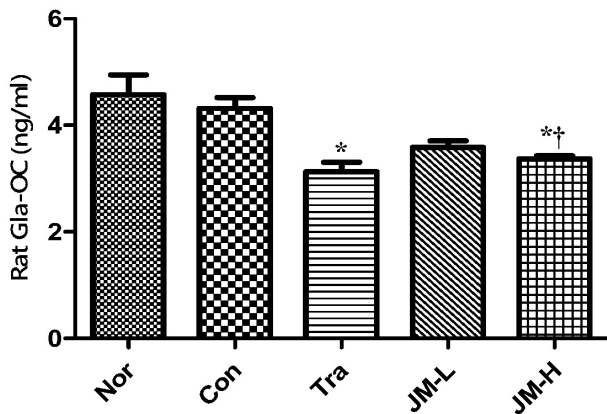


Fig. 20. Effect of JM extract on the osteocalcin of serum in femoral shaft fracture rats after 14 days. Sprague Dawley rats had femoral shaft fracture and treated with 10 mg/kg/day and 50 mg/kg/day of JM for 14 days. The result were presented by the mean±standard error of the mean. Nor: non treated group, Con: group with bone fracture and vehicle, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), JM-L: fractured group treated with JM (10 mg/kg/day), JM-H: fractured group treated with JM (50 mg/kg/day). JM: *Jinmu-tang*, Gla-OC: carboxylated-type of osteocalcin. *Significantly different from normal ($p<0.05$), †Significantly different from control ($p<0.05$).

고찰»»»»»

골절질환의 발생률은 교통사고, 노인인구 및 스포츠 활동의 증가 등으로 인해 갈수록 높아지고 있는데²⁰⁾ 초기에 적절히 치료하지 못하면 골절의 부정유합, 관절의 기능장애 등을 유발하여 경제적, 사회적으로 큰 피해가 발생한다¹⁾. 그러므로 골절질환에 대해서는 초기에 빠른 골유합 촉진, 안정적인 고정, 시기에 따른 재활운동 등이 필요하지만 골유합을 촉진하는 데 있어 뚜렷하게 밝혀진 방법은 없는 실정이다²¹⁾.

가장 기본적인 골절 치료는 골절 부위의 정복, 정복상태의 유지, 재활의 3단계로 나뉘고²⁾, 골절 부위의 전위 정도, 환자의 증상에 따라 K강선 고정술과 같은 수술적 치료나, 석고고정 등의 비수술적 치료 중 치료방법을 선택한다²²⁾.

한의학에서는 《聖濟總錄》²³⁾에서 ‘接骨各有方劑存言當按症施治’하여 골절의 치료를 그 시기에 따라 초기, 중기, 후기에 각각 化瘀活血, 接骨續筋, 補氣養血, 健壯筋骨의 방법을 사용해야 한다고 하였다.

골절의 회복은 크게 염증기, 연성 가골기, 경성 가골기,

재형성기의 4단계로 나뉜다. 염증기는 골절 직후부터 나타나는 골절부위 주변의 염증반응으로 해당 부위를 둘러싼 혈관의 확장, 세포증식 등이 활발해지는 시기이고, 연성 가골기는 부종과 통증이 서서히 감소하면서 연성 가골이 만들어지는 시기, 경성 가골기는 연성 가골기에서 형성된 가골이 단단해지며 양측 골절부위를 연결하여 안정적으로 유합되는 시기이다²⁾. 마지막으로 재형성기는 경성가골을 통해 유합된 뒤 시작되며 골 내부의 골수강 등 뼈 내부의 구조물들이 원래대로 돌아올 때까지 짧게는 수개월, 길게는 수년 동안 지속된다²⁾.

眞武湯은 《傷寒論》¹⁶⁾에 수록된 경험방으로 利水消腫, 鎮痛 등의 작용을 한다. 또한 구성하는 각 약재들도 소염²⁴⁻²⁶⁾, 진통²⁷⁾, 파골세포의 분화 촉진²⁸⁾에 대한 연구가 있다.

이에 저자는 문헌과 각 구성 약물의 연구결과를 바탕으로 眞武湯이 골절 부위의 혈류 순환을 개선하며, 소염진통 작용을 하고, 파골세포의 분화를 촉진하여 한의학적으로 補腎, 健壯筋骨하여 골절 유합을 촉진시킬 수 있을 것이라는 가설을 세우고, 이를 평가하고자 하였다.

眞武湯이 골절 유합에 미치는 영향을 평가하기 위해 골절 후 14일째에 micro-CT를 이용하여 골절부위를 관찰하고, haematoxylin & eosin staining, safranin O staining을 통한 골절 부위 골세포의 증식을 관찰하였으며, 골절부위에서 발현되는 TGF- β 1, Ki67⁺, RANK, TRAP, ALP, Runx2의 발현량을 면역조직화학 검사방법을 이용하여 평가하였고, 혈중 ALP, AST, ALT, creatinine, BUN, osteocalcin의 농도를 측정하였다.

Micro-CT를 이용하여 골절 14일 뒤 골절 부위를 관찰한 결과, 대조군과 양성대조군에서는 대퇴골의 골절부위 회복이 관찰되지 않았으며, 골절부위 근처에 callus 생성이 관찰되었다. 또한, 고정술을 시행하였으나 골절 후 활동으로 인하여 완전 골절로 이행되었다. 眞武湯 저농도군과 고농도군에서는 대퇴골 골절부위의 면적이 감소하였다.

골절부위의 골세포 관찰을 위해 골절조직을 슬라이드로 만든 뒤 haematoxylin & eosin으로 염색하고 현미경으로 관찰하였다. 대조군과 양성대조군에서 대퇴골의 골절이 남아 있음이 관찰되었고, 眞武湯 저농도군과 고농도군에서 대퇴골의 골절 후 회복과 회복부위에 골세포의 증식이 관찰되었다.

골절부위의 골세포 관찰을 위해 골절조직을 슬라이드로 만든 뒤 safranin O로 염색하고 현미경으로 관찰하였다. 그 결과 대조군에서 연골의 영역이 확대되어 있으며 연골세포가 증식되어 있는 것을 관찰할 수 있었으며 약간의 직골(woven bone)이 관찰되기도 하였다. 眞武湯 저농도군과 고농도군에서는 연골의 영역이 사라지고 골형성이 이루어지는 것이 관찰되었다.

TGF-β1은 세포의 혈구세포, 림프구 등의 과도한 증식을 억제하는 물질이다. 특히 골절유합 과정에서 연골세포, 골모세포, 파골세포 등을 조절하는 조절인자로 골절 치유 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁹⁾. 면역조직화학 염색 결과, 두 실험군 모두 증가한 TGF-β1 발현을 확인할 수 있었다. 특히 眞武湯 고농도군에서 실험동물의 골절병변부위에서 대조군에 비해 유의하게 증가한 TGF-β1 발현세포들이 관찰되었다. 이는 眞武湯 고농도군에서 골절부위의 치유가 대조군에 비해 적극적으로 나타난다는 지표가 된다.

Ki67⁺는 세포증식에 관여하는 유전체로써 세포의 분열과정에 적극적으로 관여한다³⁰⁾. 면역조직화학 염색 결과, 대조군과 양성대조군의 골절이 일어난 병변 부위에서 증가한 Ki67⁺ 발현을 확인할 수 있었다. 그러나 眞武湯 저농도군과 고농도군에서 대조군에 비하여 유의한 Ki67⁺ 발현 감소가 나타났다. Ki67⁺ 수치가 낮아 세포 분열이 저하되었다고 생각할 수 있겠으나 Han 등³¹⁾의 연구에 따르면 Ki67⁺ 수치가 높을수록 세포분열이 활발하게 일어나는 것은 맞지만 반드시 국소부위의 농도와 골절 치유 정도가 일치하지는 않는다고 보고하였다. 이에 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

RANK는 파골세포와 파골전구세포에 위치한 수용체로써 파골세포 혹은 면역세포에서 분비되는 cytokine인 RANK ligand와 결합하여 파골세포의 분화와 활성을 촉진, 골흡수를 촉진하는 역할을 한다³²⁾. 면역조직화학 염색 결과, 두 실험군 모두 대조군에 비해 유의하게 증가한 RANK 발현을 확인할 수 있었다. 특히 眞武湯 저농도군에서 RANK 발현세포들의 증가량이 더 크게 나타났다. 이에 실험군 골절부위에서 골절부위의 골 재흡수가 활발히 일어남을 알 수 있다.

TRAP staining은 성숙한 파골세포를 측정하는 지표로 골절 치유과정에 파골세포의 활성도를 나타내는 지표가 된다³³⁾. 면역조직화학 염색 결과, 대조군과 양성대

조군의 병변 부위에서 TRAP 발현이 감소되는 반면 眞武湯 저농도군과 고농도군에서 대조군에 비하여 TRAP 발현이 증가되는 것을 관찰되었으나 유의하지는 않았다. 이에 眞武湯이 파골세포의 증가에 영향을 미친다고 유추할 수 있다.

Runx2는 조골세포의 분화를 촉진하고 골격형성에 관여하는 조절인자이다³⁴⁾. 특히 골모세포와 연관된 osteocalcin, osteopontin, type I collagen과 같은 다른 조골세포 관련 유전자에 결합하여 이들의 발현도 조절한다³⁵⁾. Runx2의 발현은 대조군의 골절이 일어난 실험동물의 병변 부위에서 증가하였다. 반면 眞武湯 저농도군과 고농도군에서는 Runx2 발현이 유의하게 감소한 것이 관찰되었다. Ki67⁺ 분석결과와 마찬가지로 조골세포와 세포증식과정에는 대조군에 비해 긍정적인 영향을 나타내지 않음이 나타났다. 향후 좀 더 면밀할 후속 조치를 통해 해당 조절인자의 발현을 관찰할 필요가 있다고 생각한다.

ALP는 연골 및 골의 무기질화를 촉진하며 골아세포 등에서 생성된다. 골절 후 골 유합과정에서 골아세포의 활성도를 반영하는 대표적인 지표 중 하나이다³⁶⁻³⁸⁾. 조직검사 결과 대조군을 포함하여 골절이 일어난 실험동물의 병변 부위에서 증가한 ALP 발현을 관찰할 수 있었다. 眞武湯 고농도군에서 실험동물의 골절병변부위에서 ALP의 증가가 관찰되었으나, 통계적으로 유의하지는 않았다. 이는 眞武湯 고농도군에서 골 생성이 활발히 일어남을 시사한다.

마지막으로 眞武湯의 골형성 효능과 안정성 평가를 위해 골절 14일 후에 혈액검사를 통해 ALP, AST, ALT, BUN, creatinine, osteocalcin 수치를 관찰하였다.

ALP는 골아세포에서 분비되는 당단백질로 골형성을 측정할 때 임상에서 가장 흔하게 이용하는 지표이지만³⁹⁾, 담관 손상의 지표가 되기도 하며 간염, 간경화 등의 질환에서도 증가한다⁴⁰⁾. 혈액검사 결과, 골절 14일 뒤 혈청 ALP 값은 眞武湯 저농도군과 고농도군에서 정상군에 비해 감소하는 양상을 보였고 특히 眞武湯 저농도군에서는 유의한 감소를 보였다. 28일 뒤 ALP 값은 眞武湯 저농도군에서는 정상군에 비해 감소하였고, 眞武湯 고농도군에서는 정상군에 비해 증가하였으나, 두 실험군 모두 유의하지는 않았다.

간세포에 염증, 손상 등의 장애가 생기면 혈액으로

AST와 ALT가 방출되며, 이를 측정함으로써 간 손상의 정도를 짐작할 수 있다^{41,42}). 골절 14일 뒤 혈액검사를 시행한 결과 AST 값은 眞武湯 저농도군과 고농도군 모두 정상군과 대조군에 비해 감소하였지만 유의하지 않았다. 28일 뒤 AST 값은 眞武湯 저농도군과 고농도군 모두 대조군에 비해서는 증가하였다. 골절 14일 뒤 ALT 값은 眞武湯 저농도군에서는 정상군에 비해 감소하였지만 고농도군에서는 정상군에 비해 증가한 것으로 나타났다. 28일 뒤 ALT 값 또한 眞武湯 저농도군은 정상군에 비해 감소하였고, 眞武湯 고농도군은 정상군에 비해 증가하였고 유의하지 않았다. 위 결과를 통해 眞武湯은 저농도군으로 단기간 복용하는 경우 간수치에 크게 영향을 미치지 않음을 알 수 있으며, 고농도·장기간 복용했을 때에는 간수치를 상승시킬 수도 있음을 알 수 있었다.

약물 복용 후 나타날 수 있는 신기능 장애를 측정할 때 가장 기본적으로 측정하는 신기능 검사 수치는 혈청 BUN, creatinine, 사구체 여과율 등이다⁴³).

혈액요소질소(BUN)는 혈중 요소를 측정하는 것으로, 간에서 생성된 요소는 신장을 통해 배설되므로 신기능 지표로 사용될 수 있다. 크레아티닌(creatinine)은 크레아틴(creatine)으로부터 생성되며 신기능을 평가하는 데에 더 유용하며, BUN과 creatinine 모두 신기능 저하 시 수치가 증가한다⁴⁴).

골절 14일 뒤 creatinine 값은 眞武湯 저농도군에서는 정상군에 비해 유의하게 증가하였지만 고농도군에서는 정상군에 비해 변화가 거의 없었다. 골절 28일 뒤 creatinine 값은 眞武湯 저농도군과 고농도군 모두 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 골절 14일 뒤 BUN 값은 眞武湯 저농도군과 고농도군에서는 정상군에 비해 감소하였으며 유의하지는 않았다. 28일 뒤 BUN 값은 眞武湯 저농도군, 고농도군 모두 정상군에 비해 감소하였고 유의하지는 않았다. 위 결과를 통해 眞武湯이 BUN에는 영향을 끼치지 않지만 장기 복용 시 creatinine 수치를 상승시킬 수 있다. 이에 신독성에 관한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

골아세포의 활성도와 골의 무기질 침착 정도를 알아보기 위해 혈중 osteocalcin 농도를 측정하였다. 골절 14일 뒤 眞武湯 저농도군과 고농도군에서 정상군과 대조군에 비해 감소한 osteocalcin 농도가 측정되었고, 특히 眞

武湯 고농도군에서 유의한 감소를 나타냈다. Osteocalcin은 조골세포의 후기 분화를 나타내는 골 형성의 지표이고 주로 ALP 증가 이후 발생하기 때문에⁴⁵) 향후 관찰 기간을 늘려 후기 골절유합과정에 眞武湯이 끼치는 영향에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

위 실험결과를 통해 眞武湯이 골절 초기에 골절 치유 과정을 촉진하고, 골형성 과정을 빠르게 진행하여 처치를 받지 않는 경우보다 신속한 연골 형성을 일으키고, 신생골의 활발한 무기질화를 일으키는 것을 알 수 있었다. 다만, 고농도·장기간 복용 시 간독성, 신독성을 나타낼 수 있어 안전성에 대한 연구는 추가적으로 시행해야 할 것으로 생각한다.

이는 실험적으로 眞武湯의 골절 유합에 대한 효과와 약물의 안전성을 부분적으로 규명한 것으로 향후 bone morphogenetic protein-2, osterix 등과 같은 골모세포 관련 유전인자에 대해 추가 측정을 시행하고, 간수치, 신장수치 및 osteocalcin 수치 등의 장기 추이를 통한 발현량의 변화 추이 추적 등 본 연구의 문제점을 보완한 추가적 연구가 이루어진다면 임상적으로 골절의 치료에 더욱 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

결론»»»»

眞武湯이 골절 유합에 미치는 영향 및 안정성을 평가하기 위하여 흰쥐의 대퇴골에 골절을 유발한 뒤 해당 골절부위에 대한 micro-CT 관찰, 골절부위의 조직학적 검사, 골절유합 관련 인자의 발현 측정 및 혈액 검사 등을 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Micro-CT상 대조군에서는 골절부위의 회복이 관찰되지 않았고, 眞武湯 저농도군과 고농도군에서는 대퇴골 골절부위의 면적이 감소하였다.
2. Haematoxylin & eosin 염색 후 현미경으로 관찰한 결과, 대조군과 양성대조군에서 대퇴골의 골절이 관찰되었고, 眞武湯 저농도군과 고농도군에서 골절 후 회복과 해당 부위 골세포 증식이 관찰되었다.
3. Safranin O 염색 후 현미경으로 관찰한 결과, 대조군에서 cartilage의 영역이 확대되어 있었고, 眞武湯 저농도군과 고농도군에서는 cartilage 영역이 사라지고 골형성이 이뤄지는 것이 관찰되었다.

4. TGF-β1 유전자 발현은 대조군과 실험군 모두에서 증가하였고, 특히 眞武湯 고농도군에서 유의한 증가를 나타냈다.
 5. Ki67⁺ 지수는 대조군의 골절 부위에서 증가하였고, 眞武湯 저농도군과 고농도군에서는 대조군에 비하여 Ki67⁺ 발현이 유의하게 감소하였다.
 6. RANK 발현은 모든 군에서 증가하였으며, 특히 眞武湯 저농도군과 고농도군에서 유의하게 증가하였다.
 7. TRAP는 대조군의 병변부위에서는 발현이 감소하였고, 眞武湯 저농도군과 고농도군에서는 TRAP 발현이 증가하는 것이 관찰되었으나 유의하지는 않았다.
 8. ALP 발현은 모든 군에서 증가하였고, 특히 眞武湯 고농도군에서 증가하는 결과를 보였으나 유의성은 없었다.
 9. Runx2 발현은 대조군의 경우 증가하였으나, 眞武湯 저농도군, 고농도군에서는 유의하게 감소하였다.
 10. 간독성 실험 결과, 眞武湯 고농도군에서 28일 복용 시 간독성이 나타날 수 있음을 시사하였으나 유의성을 발견하지는 못했다.
 11. 신독성 실험 결과, 실험군 모두에서 유의한 creatinine 상승 소견이 나타났다.
 12. 혈청 내 osteocalcin 값은 眞武湯 저농도군과 고농도군 모두 정상군과 대조군에 비해 감소하였다.
- 이상과 같이 眞武湯은 중기 이후 골절 유합의 진행을 촉진하고, 몇몇 골절유합 관련 인자의 발현량을 증가시켜 임상적으로 골절 치료에 유용할 것으로 생각된다.

References>>>>

1. The Society of Korean Medicine Rehabilitation. Korean Rehabilitation Medicine. 4th ed. Paju:Koonja Publishing. 2015:206-10.
2. The Korean Orthopaedic Association. Orthopaedics. 7th ed. Seoul:ChoiSin medical Publishing Co. 2013:94-9, 1149-75.
3. Wang D. Oedae biyo. Seoul:Sungbosa. 1975:749-50.
4. Yang KR, Song HS. Effect of bee venom acupuncture complex therapy of thoracolumbar compression fracture. Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2008;25(3):29-39.

5. Kim YH, Oh TY, Lee EJ, Oh MS. A comparative study on the pain and treatment satisfaction between Korean medical treatment combined with ultrasound guided soyeom pharmacopuncture therapy in thoracic paravertebral space and non-guided soyeom pharmacopuncture therapy on patients with ribs fracture: a retrospective study. J Korean Med Rehabil. 2019;29(3):103-12.
6. Ahn HL, Shin MS, Kim SJ, Choi JB. Effects of neutral eoheol(Yuxue) herbal acupuncture and dangkisoo-san (Dangguixu-san) on fracture healing in the early stage in rats. J Korean Med Rehabil. 2007;17(1):1-16.
7. Seo HJ, Kim JH, Kwak DY, Jeon SM, Ku SK, Lee JH, Monn KD, Choi MS. The effects of safflower seed powder and its fraction on bone tissue in rib-fractured rats during the recovery. Journal of Nutrition and Health. 2000;33(4):411-20.
8. Song HR, Ra DK, Kim JS, Jung TS, Kim YH, Kang HJ, Kang SB, Yeon SC, Kim EH, Lee HJ, Shin GW, Park MR, Kim GS. Effects of safflower seed on new bone formation. Journal of Veterinary Clinics. 2002;19(1):66-72.
9. Kim JH, Oh SH. Study on the bone formation capacity of hyaluronic acid mixed with safflower seed in allogeneic bone graft. Journal of Wonkwang dental Research Institute. 2003;12(1):167-87.
10. Jo SJ, Kim JH, Kim JW, Choi HO, Lee SH, Kim MK, Woo SH, Han BH. Comparative studies on velvet deer antler and ossified deer antler on the contents of bioactive components and on the bone mineral density improving activity for oophorectomized rat. Natural Product Sciences. 2013;19(4):303-10.
11. Lee HK, Chung MS, Yoon GS. 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.
12. 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.
13. Shin YW, Park YI, Kim HY, Lee ES. Effect of Yukmijihwang-tang kamibang on the expression of osteo-related genes, TG2 and BMP4. Journal of Korean Medicine. 2002;23(2):190-7.
14. Ryum 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(1):675-87.
15. Lee HG, Oh MS. Effects of jeopgolsan (JGS) extract on fracture healing. J Korean Med Rehabil. 2018;28(1):1-17.

16. Zhang ZJ. Shanghanlun jiangjie. Henan:Henan Science Technology Publishing House. 1988:102-4.
17. Choi IG, Chae EY, Chang SK, Cho CS, Kim CJ. Effects of jinmutang (JMT) on hypothyroidism in rats. The Journal of Korean Oriental Internal Medicine. 2006; 27(4):879-87.
18. Ann SS. A clinical report of muscular atrophy treated by jinmutang. The Journal of Korean Medical Association of Clinical Sanghan-Geumgwe. 2012;4(1):67-74.
19. Yang DH, Woo CH, An HD. Effects of jinmu-tang on the osteoarthritis by MIA in rats. J Korean Med Rehabil. 2018;28(1):19-31.
20. Yim CB, Kim YJ, Oh MS. The oriental and western medical study of fracture. Daejeon University Institute of Korean Medicine. 2007;16(1):157-66.
21. Shin KM, Jung CY, Hwang MS, Lee SD, Kim KH, Kim KS. Effects of administration of pyritum on fracture healing in mice. Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society. 2009;26(5):65-75.
22. The Korean Fracture Society. Principles of fracture management. Seoul:Panmuneducation. 2013:3, 10, 40.
23. Jo G. Seongjechongrok. Seoul:Yeogang Publishing Company. 1987:460-4.
24. Bin CH, Song CH. Ameliorating effects of atractylodes macrocephala koidzumion TNF- α -induced 3T3-L1 adipocyte dysfunction. Korean Journal of Acupuncture. 2015;32:116-23.
25. Koh DK, Yun JM, Lee TH. Effects of aconiti tuberon the change of interleukin-6 and TNF- α level induced by LPS I.C.V. injection in mice. The Korean Journal of Oriental Medical Prescription. 2004;12:195-208.
26. Jung HW, Yoon CH, Park KM, Han HS, Park YK. Hexane fraction of Zingiberis Rhizoma Crudusextract inhibits the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines in LPS-stimulated BV2 microglial cells via the NF-kappaB pathway. Food and Chemical Toxicology. 2009;47:1190-7.
27. Herbology Editorial Committee of Korean Medicine Schools. Herbology. Seoul:Young-Lim Press. 2007:634-5.
28. Tzeng HE, Tsai CH, Ho TY, Hsieh CT, Chou SC, Lee YJ, Tsay GJ, Huang PH, Wu YY. Radix Paeoniae Rubra stimulates osteoclast differentiation by activation of the NF- κ B and mitogen-activated protein kinase pathways. BMC Complement Altern Med. 2018;18(1):132.
29. Matsumoto K, Matsunaga S, Imamura T, Ishidou Y, Yoshida H, Sakou T. Expression and distribution of transforming growth factor- β and decorin during fracture healing. In Vivo. 1994;8:215-20.
30. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int J Cancer. 2000;31(1):13-20.
31. Han D, Han N, Chen Y, Zhang P, Jiang B. Healing of cancellous fracture in a novel mouse model. Am J Transl Res. 2015;7(11):2279-90.
32. Kim JY, Hwang GS. Effects of cuscuta japonica choison gene expression in RANKL-induced RAW 264.7 cell. The Journal of Oriental Medical Preventive. 2010; 14(2):77-89.
33. Wang YM, Lu TL, Hsu PN, Tang CH, Chen JH, Liu KC, Kao JT, Tzen JT, Wu YY. Ribosome inactivating protein B-chain induces osteoclast differentiation from monocyte/macrophage lineage precursor cells. Bone. 2011;48(6):1336-45.
34. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated bone morphogenic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. Endocrine Reviews. 2000; 21:393-411.
35. Ducy P, Starbuck M, Driemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, Amling M, Karsenty G. A Cbfa1-dependent genetic path way controls bone formation beyond embryonic development. Genes Dev. 1999;13:1025-36.
36. Lee HS, Lee CS, Jang JS, Lee JD, Um SM. Changes of serum alkaline phosphatase and osteocalcin during fracture healing. Journal of the Korean Orthopedics of Society. 2002;37(3):411-5.
37. Leung KS, Fung KP, Sher AH, Li CK, Lee KM. Plasma bone specific alkaline phosphatase as an indicator of osteoblastic activity. J Bone Joint Surg. 1993;75(2):288-92.
38. Van Straalen JP, Sanders E, Prummel MF, Sanders GT. Bonealkaline phosphatase as indicator of bone formation. Clin Chim Acta. 1991;201:27-33.
39. Kim DY. Biochemical markers of bone formation. Korean Journal of Bone Metabolism. 1994;1(1):233-9.
40. McQueen CA. Comprehensive toxicology. 3rd ed. Didcot: Pergamon. 1997:251-71.
41. Byun BH, Kim SH, Jeong HG, Kim BY, Nam CH, Roh PU. Effect of garlic on enzyme activities of rats fed lard and alcohol. J Fd Hyg Safety. 1995;10:163-8.
42. Kim HS. Effects of the saururus chinensis baill hotwater extract intake on the lipid components and metabolic enzyme activities in hyperlipidemic rats. Kor J Exercise Nutr. 2006;10:99-106.
43. Yoon YK, Sun TC, Song WS, Kwon SK, Jang HJ. A study of effects on renal function from continuous long-term herbal medication. The Journal of Korean Oriental Internal Medicine. 2004;25(4):300-5.
44. Kang YJ. Toxic nephropathy. Korean Journal of Medicine. 1984;27(6):632-42.
45. Price PA, Parthermore JG, Doftos LJ. New biochemical marker for bone metabolism. Journal of Clinical Investigation. 1980;66:878-83.