

桃紅四物湯이 골절 유합에 미치는 실험적 연구

하현주 · 오민석

대전대학교 한의과대학 한방재활의학교실

Experimental Study of *Dohongsamul-tang* (*Taohongsiwu-tang*) on Fracture Healing

Hyun Ju Ha, K.M.D., Min-Seok Oh, K.M.D.

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

This research was supported by the Daejeon University fund (2019).

RECEIVED March 17, 2020

REVISED March 26, 2020

ACCEPTED April 1, 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

Objectives The purpose of this study is to evaluate the bone healing effect of *Dohongsamul-tang* (*Taohongsiwu-tang*; DH) on femur fractured mice.

Methods Mice were randomly divided into 4 groups (naive, control, positive control and DH). All groups except naive group were subjected to bone fracture on both hind limb femurs. Naive group received no treatment at all. Control group was fed with normal saline, and positive control group was orally medicated with tramadol. DH-treated group was orally medicated with DH. We analysed the levels of *BMP2*, *COX2*, *Col2a1*, *Sox9*, *Runx2*, and *Osterix* genes on 3, 7 and 14 days after fracture. Alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, blood urea nitrogen, creatinine, total cholesterol, and triglyceride levels were measured for safety assessment.

Results In morphological, histological analysis, callus formation process of DH-treated group was faster than the control group. *BMP2*, *Sox9* gene expression were significantly increased at 7 days after fracture compared to the control group. *COX2*, *Col2a1* gene expression were significantly increased at 14 days after fracture compared to the control group. Total cholesterol was significantly increased by DH at 3 days. Triglyceride was significantly decreased by DH at 3, 7 days after fracture compared to the control group.

Conclusions *Dohongsamul-tang* promoted bone healing process after fracture by stimulating the bone regeneration factors. And DH shows no hepatotoxicity, nephrotoxicity and serum lipid abnormality. In conclusion, it seems that DH helps to promote fracture regeneration after bone fracture by regulating gene expressions related to bone repair. (*J Korean Med Rehabil* 2020;30(2):47-66)

Key words Korean traditional medicine, Bone fractures, Fracture healing, Gene expression, Toxicity tests

서론»»»»

골절이란 과부하로 인해 뼈의 연속성이 소실되는 상태를 의미하며, 뼈 주변 연부조직의 손상이 동반되고 통증 유발한다. 기능 장애가 나타나며, 외관상 변형이나

신경 및 혈관의 손상이 동반되기도 한다. 대부분 방사선 검사로 확진하며, 정확한 진단을 내리기 어려운 경우 전산화단층촬영(computed tomography)을 사용하기도 한다.

골절 치료의 목적은 적절한 해부학적 위치에서의 골절 유합과 기능 회복에 있으며, 골절의 치료에는 대부

분 고정과 운동 제한이 요구되므로 활동기의 성인에게 발생하는 외상성 골절은 개인뿐 아니라 사회경제적 손실을 야기하게 된다¹⁾.

한의학에서 골절은 《外臺祕要》에서 ‘救急療骨折, 接骨如故...’라 하여 처음으로 언급되었으며, 이후 《醫宗金鑑》 등에서 골절에 대해 체계적으로 기술하고 있다. 한방 의료에서 골절은 초기, 중기, 후기로 나누어 치료하는데 골절 초기에는 筋脈이 손상되어 瘀血阻滯, 腫脹疼痛한 상태로 보고 活血化瘀, 消腫止痛할 수 있는 약물을, 중기에는 瘀血이 줄어들고 腫脹이 감소하는 단계로 接骨續斷 하는 약물을, 후기에는 골은 유합되었으나 氣血이 부족해 근육의 기능이 회복되지 못한 상태로 補氣養血, 補益肝腎하는 약물을 사용한다²⁾.

桃紅四物湯은 四物湯의 變方으로 清代 吳의 《醫宗金鑑·婦科心法要訣》³⁾에 처음 기재되었다. 活血, 化瘀 등의 역할을 하여 瘀血로 인한 月經不調, 痛經 등의 부인과 질환에 많이 활용되며⁴⁾, Chang 등⁵⁾은 桃紅四物湯이 자궁내막증의 증식을 억제하는데 유의한 효과가 있다고 보고하였다. 또한 桃紅四物湯이 뇌질환 예방⁶⁾, 항암화학요법의 부작용인 수족중후군의 개선⁷⁾에 유의하게 작용한다는 보고도 있다. 이와 같이 桃紅四物湯은 각종 瘀血性 질환의 치료 및 예방에 다양하게 연구되고 있는 바 瘀血의 병태를 보이는 골절 초기에 桃紅四物湯을 응용할 수 있을 것으로 생각한다.

이에 桃紅四物湯이 골절 유합에 미치는 효과를 알아보기 위하여 생쥐의 대퇴골에 골절을 유발시킨 후 골절 유합 관련 유전자를 분석하고 형태조직학적 검사 및 안전성 검사를 실시하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 실험동물

실험동물은 5주령 수컷 C57/BL6 마우스(19-22 g)를 대한바이오링크(Eumseong, Korea)에서 분양받아 1주일간 사육한 뒤 실험에 사용하였다. 실험동물은 실험 당일 까지 고형사료와 물을 자유식이 하였다. 온도는 23±1°C

로 설정하였고 7일 동안 12시간 light-dark cycle 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 본 연구의 동물실험에 관한 모든 사항은 대전대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 진행하였다(승인번호: DJUARB2018-013).

2) 약재

桃紅四物湯 (Dohongsamul-tang, DH)의 약재 구성은 <<醫宗金鑑>>³⁾을 근거로 하였다. 桃仁, 當歸, 生地黃, 赤芍藥, 川芎, 紅花를 (주)옴니허브(Daegu, Korea)에서 구입하여 각각 2:2:2:1:1:1의 비율로 구성하였다(Table I).

2. 방법

1) 약재 추출

桃紅四物湯을 추출하기 위해 2첩 분량의 한약재 72 g에 1.5 L의 증류수를 넣고 대웅 약탕기(Naju, Korea)를 이용하여 약 2시간 동안 열수 추출하였다. Whatman No. 2 filter (Maidstone, UK)로 약재를 여과해 용액에 추출된 성분만을 분리하였다. Rotary evaporator (Buchi, Flawil, Switzerland)를 이용해 70°C에서 여액을 감압증발한 후 동결 건조하여 11.2 g의 건조분말을 얻어 추출효율은 15.6%였다. 분말은 -80°C에 분주하여 보관하였으며 사용하기 전 식염수로 희석하여 0.45 μm 필터로 거른 뒤 사용하였다.

2) 골절 동물 모델

실험동물에게 Avertin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 300 mg/kg을 복강 내 주사하여 마취하고, 마취 후 다리의 털을 제거하였다. 골절은 ‘Bonnarens and Einhorn’ 방법⁸⁾에 따라 실험동물의 뒷다리를 평평한 판 위에 고

Table I. The Herbal Composition of *Dohongsamul-tang*

Herb name	Amount (g)
Semen of <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch	8
Radix of <i>Angelica gigas</i>	8
Radix of <i>Rehmannia glutinosa</i> (Gaertner) DC	8
Radix of <i>Paeonia lactiflora</i> Pall.	4
Rhizome of <i>Ligusticum officinale</i> (Makino) Kitag.	4
Flower of <i>Carthamus tinctorius</i> L.	4
Total amount	36

정하고 대퇴골 중앙에 두께 2 mm, 너비 15 mm의 탄소강으로 이루어진 무딘 날을 위치시켰다. 길이 100 cm, 내부 지름 17 mm 관을 날 위에 수직으로 세워 무게 16.28 g, 지름 15.87 mm의 쇠구슬을 떨어뜨렸고, 골절을 육안으로 확인하였다. 양쪽 뒷다리 모두 골절을 유발하였다.

3) 군 분류 및 약재 투여

실험동물은 무작위로 4그룹으로 나누었다. 정상군은 10마리를 배속하였으며 대퇴부 골절 손상을 하지 않았다. 대조군은 60마리를 배속하고 골절 후 1일, 3일, 5일, 7일, 10일, 14일에 각 10마리씩 치사하였다. 양성 대조군과 실험군(DH군)은 각각 18마리씩 배속하고 골절 후 3일, 7일, 14일에 각 6마리씩 치사하였다. 정상군 외 모든 그룹의 실험동물에 대퇴부 골절 손상을 하였으며 회복을 위해 나무 부목(3×10 mm)으로 골절 부위를 지지하고 접착붕대로 감았다. 실험 약물은 골절을 유발한 당일부터 2주 동안 1일 1회 일정 시간에 경구 투여하였다. 대조군은 생리식염수를 경구 투여하고, 양성 대조군은 임상에서 외상, 골절 혹은 수술 후 진통제로 사용하는 tramadol (20 mg/kg; Sigma Aldrich)을 투여하여 통증을 감소시키고자 하였다⁹⁾. 실험군은 DH (160 mg/kg)를 사용하였다.

4) 골수(bone marrow) 분리

골절을 유도한 뒤 실험동물을 치사하여 실험에 사용할 시료를 채취하였다. 실험동물을 치사하기 위해 에테르가 포함된 유리 시약장(glass chamber)에 동물을 넣고 깊이가 마취될 때까지 약 1~2분 정도 방치하였다. 치사된 실험동물로부터 골수를 분리하고자 골절시킨 대퇴부 전체를 몸통에서 분리하였다. 다리를 분리한 후 뼈 주변부 근육들을 가위로 최대한 제거하여 대퇴골과 경골을 분리하였다. 대퇴골과 경골의 양 끝 골단을 가위로 잘라내어 골간부위 영역을 취하였다. 골간 골수공간에 23 게이지의 3 ml 주사기(Korea Vaccine, Ansan, Korea)를 사용하여 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 세포 배양액을 밀어 넣어 골수를 분리하였다. 주사기를 사용해 골수 조직을 넣고 뼈는 과정을 여러 번 반복하여 세포들을 하나씩 분리하였다. 70 μm의 여과기(strainer) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)로 걸러 용액에 남은 찌꺼기 및 뼈 조각들을 제거하였다. 골수조직 분리에

사용한 DMEM 배양액을 제거하기 위해 1,500 rpm에서 5분 동안 원심분리하고 상등액을 제거하였다.

5) Total RNA 추출

채취된 골수에서 총 합량 RNA를 다음과 같이 추출하였다. 실험동물로부터 채취된 골수세포에 phosphate-buffered saline (PBS) 10 ml를 넣고 피펫팅하여 세포를 풀어준 뒤 1,500 rpm에서 5분 동안 원심분리하고 상등액을 제거하여 세척하였다. Easy Blue (iNtRON, Seongnam, Korea) 0.5 ml를 남아 있는 골수세포에 가하여 호모게나이저로 세포를 갈아주었다. 클로로포름 100 μL를 lysis된 골수세포 용액에 넣고 vortex를 이용하여 용액이 잘 섞이도록 교반한 후 13,000 rpm, 4°C에서 15분 동안 원심 분리하였다. 이후 상등액 200 μL를 새로운 튜브에 옮긴 후 200 μL의 isopropanol을 가하고 튜브를 4~5회 위아래로 뒤집어 용액이 잘 섞이도록 한 뒤 10분 동안 실온에서 방치하였다. Total RNA를 침전시키기 위해 13,000 rpm, 4°C에 10분 동안 원심분리하고 상등액을 제거하여 침전된 RNA를 수득하였으며, 이후 75% 에탄올 1 ml을 가해 펠렛을 씻어주어 남은 불순물을 제거하였다. 펠렛을 잘 말린 뒤 20~50 μL의 DEPC water (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 첨가해 RNA를 녹였다.

6) Complementary DNA 합성

얻어진 RNA를 NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Warrington, UK)으로 정량하여 200 ng/μL로 맞추고 easy cDNA synthesis kit (NanoHelix, Daejeon, Korea)을 이용하여 다음과 같이 cDNA를 합성하였다. RNA 주형 5 μL, Oligo-d(T) 1 μL, DEPC water 9 μL를 넣고 5분간 65°C에서 반응시킨 뒤 즉시 아이스에 방치하였다. 튜브에 미리 만들어 두었던 두번째 혼합물 (5x RT reaction mix 4 μL+RT enzyme mix 1 μL)을 각 5 μL씩 넣고 50°C에서 40분, 70°C에서 10분간 반응시켜 cDNA 합성을 완료하였다.

7) Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

DH가 골 유합의 다양한 단계에 미치는 영향을 확인하기 위해 골모세포의 증식에 관여하는 *BMP2*, *Sox9*, *Runx2*, *Osterix*¹⁰⁾, 염증 반응 및 파골세포의 분화에 관

여하는 *COX2*¹¹⁾, 연골 생성에서 발현하는 *Col2a1*¹²⁾ 유전자를 선정하여 관찰하기로 하였다. 이 유전자들의 발현을 측정하기 위하여 power SYBR green PCR master mix (Thermo Fisher Scientific)을 이용한 실시간 정량 PCR (real-time PCR)을 실시하였다. 기기는 QuantStudio™ 3 real time PCR system (Thermo Fisher Scientific)을 사용하였다. 유전자의 PCR 산물 크기는 100 bp 내외로 설정하였고, melting temperature (Tm) 값도 60°C 부근으로 디자인하였다. Real-time PCR 반응을 위해 총 20 µL 내에 1/3으로 희석한 cDNA 2 µL와 10 µL의 2X SYBR mix, primer는 각각 10 pmol/µL의 농도로 0.3 µL씩 첨가하였고, 나머지는 증류수로 채웠다. 모든 유전자의 PCR 증폭 단계는 다음과 같으며 증폭 cycle은 40 cycles을 실시하였다. Hot start를 위하여 95°C에서 10분, 증폭 단계에서 변성(denaturation)을 95°C에서 15초, 결합(annealing)을 60°C에서 60초, 신장(extension)을 72°C에서 30초 동안 반복하며 각 cycle의 extension 후에 형광 값이 기록되었다. 모든 cycle 완료 후 primer의 특이성 확인을 위해 melting curve 분석을 시행하였다. 결과는 real-time PCR Instrument software (Thermo Fisher Scientific)로 분석하였다(Table II).

8) 골절 부위의 형태학적 관찰

정상군은 10마리, 대조군, 양성 대조군, 실험군은 각각 6마리씩 일자별로 치사한 뒤 골절된 대퇴골을 분리하여 골절이 치유된 정도를 육안으로 확인하였다. 각 군에서 대표성을 띠는 2마리의 양쪽 대퇴골을 선택하여 사진 촬영하였다.

9) 골절 부위의 조직학적 관찰

치사된 실험동물로부터 골절을 유발한 양쪽 뒷다리 부위를 적출하고 대퇴골을 감싸고 있는 근육조직들을 제거한 뒤, 10% paraformaldehyde에 1주일동안 담가 조직을 고정하였다. 고정된 조직을 조직처리(processing) 과정을 거쳐 파라핀에 포매(embedding)한 후 파라핀 블록을 4 µm 두께로 박절(cutting)하여 절편(section)을 만들고 탈파라핀 후 Weigert's iron hematoxylin 과정을 5분간 처리하였다. 수세 후 0.02% fast green 5분, 1% acetic acid 10초, 0.1% Safranin O 5분의 처리과정을 순서대로 거쳤다. 그 다음 함수, 청명과정을 거쳐 cover glass를 덮고 봉입하였다. 조직슬라이드는 40배의 배율로 명시야 현미경(bright field microscope; Nikon, Tokyo, Japan)로 관찰하였다.

10) Transforming growth factor-β1 (TGF-β1) immunohistochemistry

치사된 실험동물로부터 골절을 유발한 양쪽 뒷다리 부위를 적출하고 대퇴골을 감싸고 있는 근육조직들을 제거한 뒤, 10% paraformaldehyde에 1주일동안 담가 조직을 고정하였다. 고정된 조직을 조직처리(processing) 과정을 거쳐 파라핀에 포매(embedding)한 후 파라핀 블록을 4 µm 두께로 박절(cutting)하여 절편(section)을 만들고 탈파라핀, 함수과정을 거쳐 증류수로 세척하였다. 내인성 peroxidase의 활성을 없애기 위해 peroxide blocking (DAKO, Glostrup, Denmark)을 실온에서 10분간 처리하였다. PBS로 2회 세척 후 anti-TGF beta-1 antibody (Dilution 1:100; Abcam, Cambridge, UK)를 4°C에서 over

Table II. Nucleotide Sequences of Primers for Real-time Polymerase Chain Reaction

Gene	Primer sequences	
	Forward	Reverse
<i>mBMP2</i>	CACACADIGACACACCAACC	CAAAGACCTGCTAATCCTCAC
<i>mCOX2</i>	CAGACAACATAAACTGCGCCTT	GATACACCTCTCCACCAATGACC
<i>mCol2a1</i>	ACTDITAAAGTDIDICAAGAC	CCACACCAAATTCCTGTTC
<i>mSox9</i>	GADICACDIAACAGACTCA	CAGCGCCTTGAAGATAGCATT
<i>mRunx2</i>	ADIGACTATDICGTCAAACA	DICTCACGTCGCTCATCTT
<i>mOx</i>	CGCTTTGTGCCTTTGAAAT	CCGTCAACGACGTTATGC
<i>mGAPDH</i>	CCCATCACCATCTTCCADIAGC	CCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC

night동안 반응시킨 후 wash buffer (DAKO)로 세척하고 envision+rabbit으로 30분간 반응시켰다. 반응 후 반응용액은 wash buffer로 세척하고, DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride)으로 약 3분간 발색하였다. 발색 후 증류수로 중화하고 Mayer hematoxylin으로 대조 염색 후 수돗물에 세척하여 남은 염색 시약을 제거한 뒤 합수, 청명과정을 거쳐 cover glass를 덮고 봉입하였다. 조직 슬라이드는 40배의 배율로 명시야 현미경으로 관찰하였다.

11) 혈장 분리

마취된 실험동물의 심장에서 직접 채혈한 뒤 곧장 ethylenediaminetetraacetic acid가 들어 있는 BD vacutainer tube (BD, Franklin Lakes, NJ, USA)에 넣고 가볍게 흔들어 혈액 응고를 억제하였다. 이후 1,500 rpm에서 10분간 원심분리한 뒤 상등액을 취하여 혈장을 확보하였다.

12) 혈액생화학적 분석

실험동물로부터 분리한 혈장을 사용하여 각각의 혈액생화학적 분석을 수행하였다. 혈액생화학적 분석을 위하여 COBAS 8000 C702 analyzer (Roche Diagnostic System, Basel, Switzerland)를 사용하였다. 시약은 Roche Diagnostics (Basel, Switzerland)를 사용하였다. Alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT)는 colorimetry 검사법을 이용하였고, blood urea nitrogen (BUN)은 kinetic test, creatinine은 Jaffe법, total cholesterol과 triglyceride는 enzymatic colorimetry 검사법을 이용하였다.

3. 통계 분석

모든 실험 결과는 mean±standard error of the mean으로 기록되었으며, 통계처리는 GraphPad Prism 5 프로그램(GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)을 이용하였고, unpaired T-test로 유의성을 검증하였다. p값이 0.05 미만인 경우에 통계적으로 유의성이 있다고 하였다.

결과»»»»

1. 골절 부위 관찰

1) 형태학적 변화

대퇴골 골절을 유발한 실험동물에서 골절을 유발한 다리 근육을 제거하고 대퇴골을 분리하여 뼈에 나타난 골절 부상부위를 육안으로 확인하였다. 골절 유발 3일 후 관찰된 DH군에서는 대퇴골 간부(shaft)에 골절된 영역이 나타났다(Figs. 1, 2). 7일 후 확인하였을 때 DH군은 골절된 영역이 나타나는 개체도 있고, 대퇴골 부위의 유합이 나타나는 개체도 있었다(Fig. 2). 10일, 14일 후 확인하였을 때 대조군은 골절 부위의 유합이 나타난 것이 보였으나 골절 영역이 확연히 구분되었다. DH군은 골절된 영역을 구분할 수는 있었지만 대조군과 양성 대조군에 비해 뚜렷하게 증가된 가골(callus)을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

2) 조직학적 변화

골절 조직의 유합을 확인하고자 골절 유발 1, 3, 5, 7, 10, 14일 후에 골절조직을 슬라이드로 만든 뒤 safranin O로 염색하고 현미경으로 관찰하였다. 골절 후 3일까지

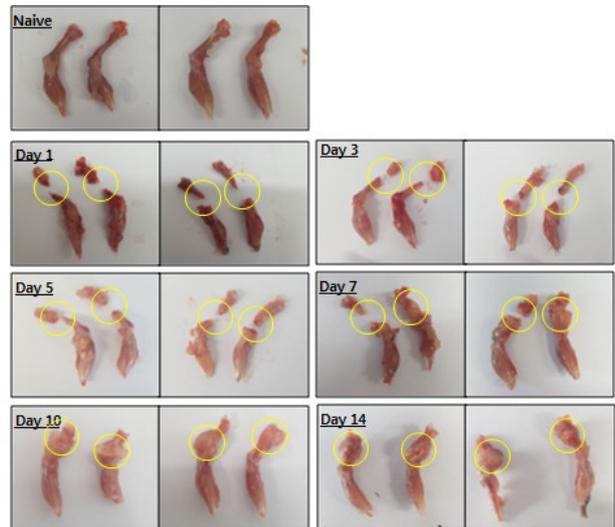


Fig. 1. Bone regeneration in femoral shaft fracture-induced mice on 1, 3, 5, 7, 10 and 14 days after bone fracture. The damaged femur was isolated by removing the muscles around the bone and investigated by gross examination. Yellow circle indicates the damaged bone region.

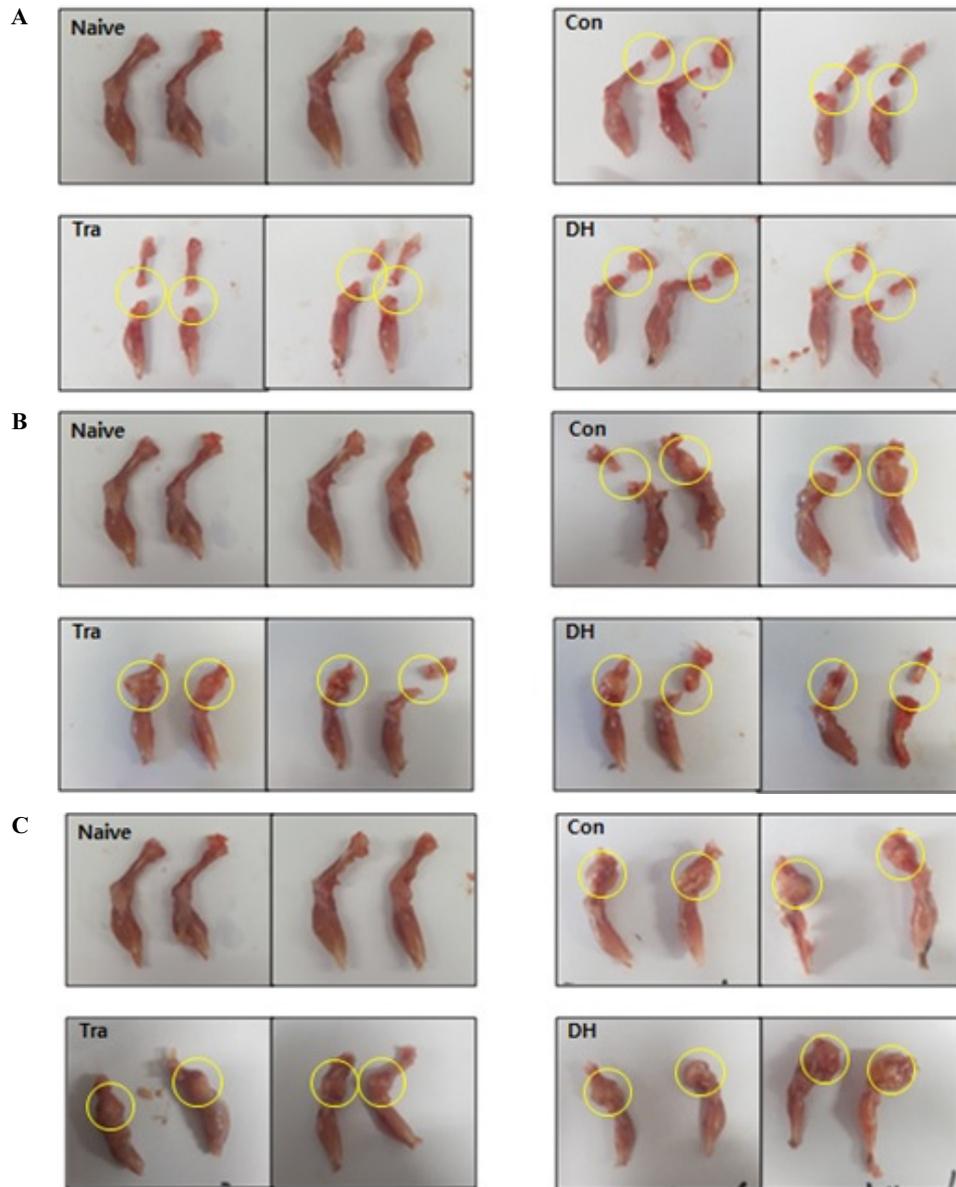


Fig. 2. Effect of *Dohongsamul-tang* on bone regeneration in femoral shaft fracture-induced mice model on 3, 7 and 14 days after bone fracture. C57/BL6 mice had femoral shaft fracture and treated with 160 mg/kg/day of *Dohongsamul-tang* for 3 (A), 7 (B) and 14 (C) days. The damaged femur was isolated by removing the muscles around the bone and investigated by gross examination. Yellow circle indicates the damaged bone region. Naive: non-treated mice, Con: fractured group treated with normal saline, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), DH: fractured group treated with *Dohongsamul-tang* (160 mg/kg/day).

지 골 조직에서는 특별한 변화가 관찰되지 않았다. 5일 후에 붉은색 영역으로 나타나는 연골세포(chondrocyte)들이 약간 생성된 것이 관찰되었다. 이후 골절 7일 후에 연골(cartilage)이 약간 생성되면서 골절조직의 유합을 위한 조직 형태의 변화가 나타나기 시작하였다. 10일 후부터 연골이 왕성하게 형성되고 연골세포들이 확연하게 증가하였으며 14일 후에는 연골세포의 생성이 유

의적으로 증가하고 골절부위의 유합이 나타나기 시작하였다(Fig. 3).

골절 유발 3일 후 각 군의 골절조직을 비교 관찰한 결과 골절이 유발된 그룹인 대조군, 양성 대조군, DH군에서 골절에 의해 손상된 조직이 관찰되었다(Fig. 4). 7일 후 골절조직을 관찰한 결과 대조군에 골절 면 주위를 중심으로 연골 형성이 시작된 것을 관찰할 수 있었으며 DH

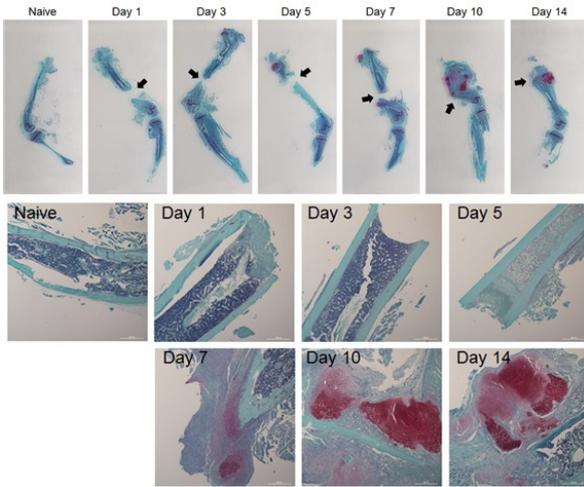


Fig. 3. The histological analysis of bone fracture process with safranin O staining. The femurs were isolated from mice on the indicated day after bone fracture, and used for tissue slide specimen. The sliced bone tissue were stained with safranin O. Arrows indicate bone fracture lesions.

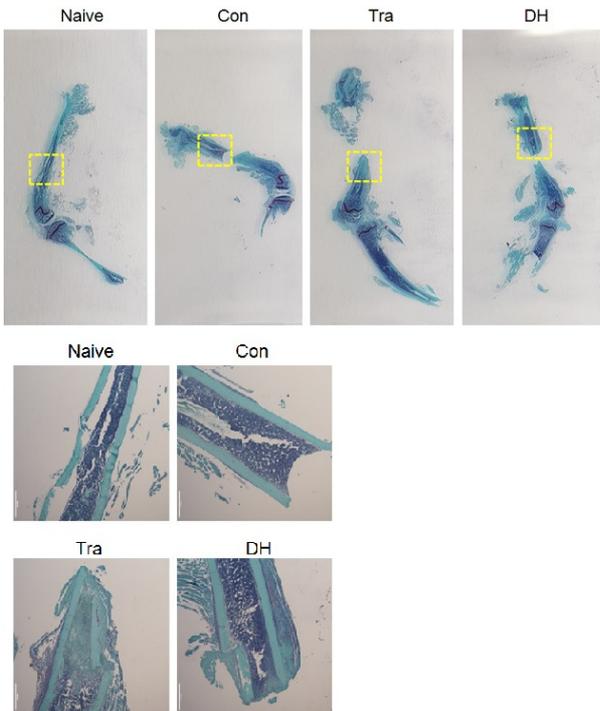


Fig. 4. The histological analysis of bone fracture process with safranin O staining on 3 days after bone fracture. C57/BL6 mice had femoral shaft fracture and treated with 160 mg/kg/day of *Dohongsamul-tang* for 3 days. The damaged mice femurs were isolated and used for tissue slide specimen. The sliced bone tissue were stained with safranin O (magnification, $\times 40$). Naive: non-treated mice, Con: fractured group treated with normal saline, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), DH: fractured group treated with *Dohongsamul-tang* (160 mg/kg/day).

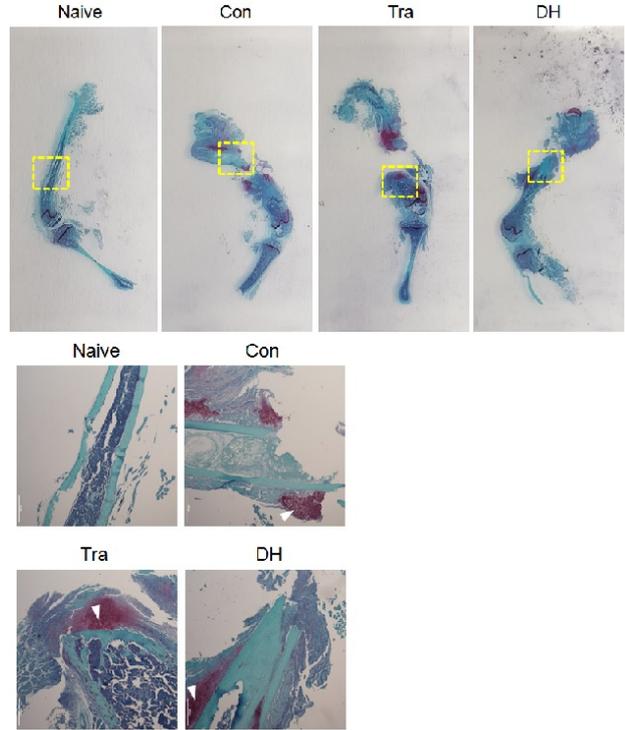


Fig. 5. The histological analysis of bone fracture process with safranin O staining on 7 days after bone fracture. C57/BL6 mice had femoral shaft fracture and treated with 160 mg/kg/day of *Dohongsamul-tang* for 7 days. The damaged mice femurs were isolated and used for tissue slide specimen. The sliced bone tissue were stained with safranin O (magnification, $\times 40$). Arrow heads indicate chondrocytes. Naive: non-treated mice, Con: fractured group treated with normal saline, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), DH: fractured group treated with *Dohongsamul-tang* (160 mg/kg/day).

군의 골절 병변부위에서도 확연하게 증가한 연골세포가 관찰되었다(Fig. 5). 골절 14일 후 골절조직을 확인한 결과 대조군에서 연골의 영역이 확대되어 있으며 연골 세포가 증식되어 있는 것을 관찰할 수 있었고 약간의 직골(woven bone)이 관찰되기도 하였다. DH군에서도 연골의 형성이 잘 관찰되었으며 여전히 다수의 연골세포들이 잘 관찰되었다(Fig. 6).

3) 골절 조직 부위에서 발현되는 TGF- $\beta 1$ 변화

골절 후 시간 경과에 따른 TGF- $\beta 1$ 의 발현을 확인하고자 골절 조직에 대한 TGF- $\beta 1$ 의 면역조직염색을 시행하였다. 골절 유발 3일 후에 골수영역에서 TGF- $\beta 1$ 이 급격히 증가하는 것이 관찰되었고, 10일 후부터 TGF- $\beta 1$ 을 발현하는 세포들이 연골세포가 주로 분포하는 곳에서

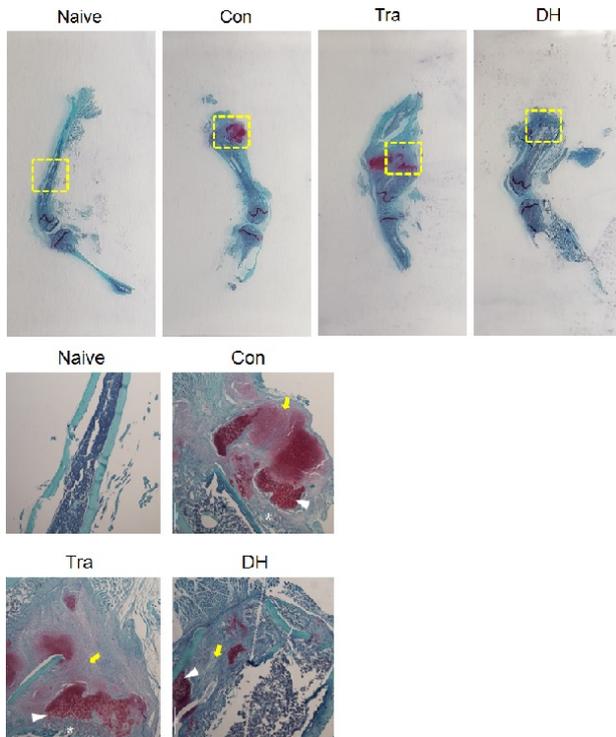


Fig. 6. The histological analysis of bone fracture process with safranin O staining on 14 days after bone fracture. C57/BL6 mice had femoral shaft fracture and treated with 160 mg/kg/day of *Dohongsamul-tang* for 14 days. The damaged mice femurs were isolated and used for tissue slide specimen. The sliced bone tissue were stained with safranin O (magnification, $\times 40$). Asterisks indicate woven bone, arrow heads indicate chondrocytes, yellow arrows indicate cartilage. Naive: non-treated mice, Con: fractured group treated with normal saline, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), DH: fractured group treated with *Dohongsamul-tang* (160 mg/kg/day).

면역 염색되는 영역이 증가하는 것이 관찰되었다(Fig. 7).

골절 유발 3일 후에 골절 조직을 비교하였을 때 DH 군에서 TGF- $\beta 1$ 을 발현하는 조직이 거의 관찰되지 않았다(Fig. 8). 7일 후 골절조직에서 발현되는 TGF- $\beta 1$ 을 관찰한 결과 DH군에서 TGF- $\beta 1$ 을 발현하는 세포들이 증가하는 것이 관찰되었다. TGF- $\beta 1$ 을 발현하는 세포들은 주로 연골세포들이 나타나는 영역에 분포하였다(Fig. 9). 골절 14일 후 골절조직을 확인한 결과 대조군을 포함하여 골절이 일어난 실험동물의 병변 부위에서 확연하게 증가한 TGF- $\beta 1$ 발현을 확인할 수 있었다. 특히 DH군에서 확연하게 증가한 TGF- $\beta 1$ 발현세포들이 관찰되었다(Fig. 10).

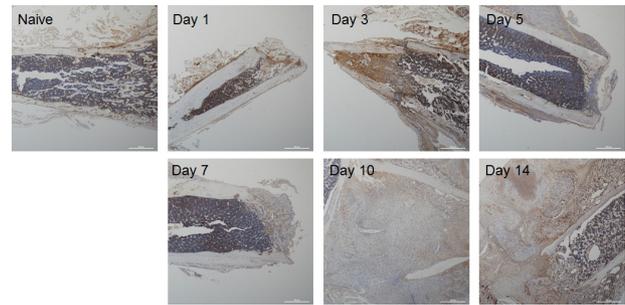


Fig. 7. TGF- $\beta 1$ immunohistochemistry staining in bone fracture. The damaged mice femurs were isolated and used for tissue slide specimen. The sliced bone tissue were incubated with TGF- $\beta 1$ antibody and subjected to immunohistochemistry. TGF- $\beta 1$: transforming growth factor- $\beta 1$.

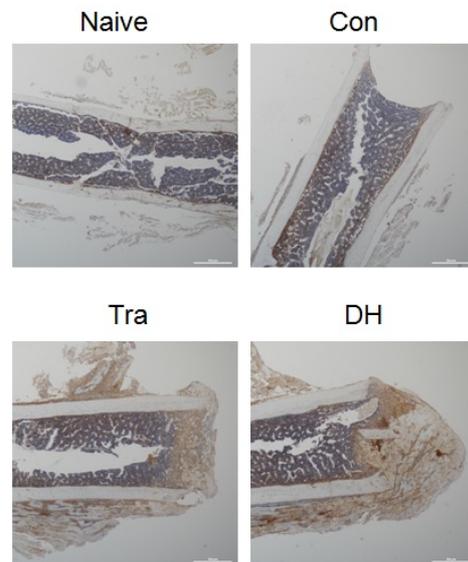


Fig. 8. TGF- $\beta 1$ immunohistochemistry staining in bone fracture on 3 days after bone fracture. C57/BL6 mice had femoral shaft fracture and treated with 160 mg/kg/day of *Dohongsamul-tang* for 3 days. The damaged mice femurs were isolated and used for tissue slide specimen. The sliced bone tissue were incubated with TGF- $\beta 1$ antibody and subjected to immunohistochemistry (magnification, $\times 40$). Naive: non-treated mice, Con: fractured group treated with normal saline, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), DH: fractured group treated with *Dohongsamul-tang* (160 mg/kg/day), TGF- $\beta 1$: transforming growth factor- $\beta 1$.

2. 유전자 발현에 미치는 영향

1) *BMP2* 유전자

BMP2 유전자 발현은 대조군에서 골절 유발 1일 후 1.80 ± 0.22 로 정상군에 비해 유의하게 증가하였다. 3일 후

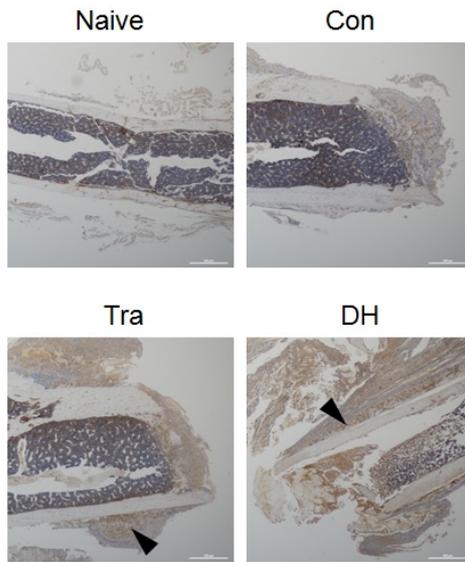


Fig. 9. TGF-β1 immunohistochemistry staining in bone fracture on 7 days after bone fracture. C57/BL6 mice had femoral shaft fracture and treated with 160 mg/kg/day of *Dohongsamul-tang* for 7 days. The damaged mice femurs were isolated and used for tissue slide specimen. The sliced bone tissue were incubated with TGF-β1 antibody and subjected to immunohistochemistry (magnification, ×40). Arrow heads indicate positively stained cells with TGF-β1. Naive: non-treated mice, Con: fractured group treated with normal saline, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), DH: fractured group treated with *Dohongsamul-tang* (160 mg/kg/day), TGF-β1: transforming growth factor-β1.

에는 1.28 ± 0.14 로 1일 후에 비해 감소하기 시작하여, 5일 후 0.57 ± 0.20 , 7일 후 0.41 ± 0.16 , 10일 후는 0.52 ± 0.15 , 14일 후에는 1.26 ± 0.25 로 유의하지 않았다(Fig. 11).

BMP2 유전자 발현은 DH군이 3일 후 0.37 ± 0.10 로 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다. 또한 7일 후 2.82 ± 0.26 로 대조군 및 정상군에 비해 *BMP2* 발현량이 유의하게 증가하였다. 14일 후 1.78 ± 0.91 로 정상군 및 대조군과 비교하여 증가하였으나 유의하지 않았다(Fig. 11).

2) *COX2* 유전자

COX2 유전자 발현은 대조군에서 골절 유발 1일, 3일 후 각각 0.52 ± 0.14 , 0.35 ± 0.05 로 감소하였으나 유의하지 않았다. 5일 후에는 발현량이 0.27 ± 0.05 로 정상군에 비해 유의하게 감소하였다. 7일 후에는 0.14 ± 0.05 로 정상군에 비해 유의하게 감소하였으며 10일 후에는 0.29 ± 0.17 , 14일 후에는 0.94 ± 0.19 로 유의하지 않았다(Fig. 12).

COX2 유전자 발현은 DH군이 3일 후 0.75 ± 0.53 로

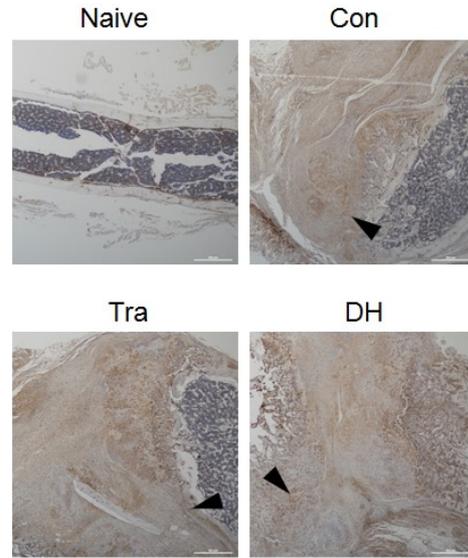


Fig. 10. TGF-β1 immunohistochemistry staining in bone fracture on 14 days after bone fracture. C57/BL6 mice had femoral shaft fracture and treated with 160 mg/kg/day of *Dohongsamul-tang* for 14 days. The damaged mice femurs were isolated and used for tissue slide specimen. The sliced bone tissue were incubated with TGF-β1 antibody and subjected to immunohistochemistry (magnification, ×40). Arrow heads indicate positively stained cells with TGF-β1. Naive: non-treated mice, Con: fractured group treated with normal saline, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), DH: fractured group treated with *Dohongsamul-tang* (160 mg/kg/day), TGF-β1: transforming growth factor-β1.

대조군에 비해 증가하였으나 유의하지 않았다. 7일 후 0.74 ± 0.38 로 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, 14일 후에는 16.09 ± 10.67 로 정상군, 대조군과 비교하여 유의하게 증가하였다(Fig. 12).

3) *Col2a1* 유전자

Col2a1 유전자 발현은 대조군에서 골절 유발 1일 후 1.47 ± 0.30 로 정상군에 비해 증가하였지만 유의하지 않았다. 3일 후에는 1.12 ± 0.36 , 5일 후에는 0.55 ± 0.22 , 7일 후에는 0.58 ± 0.16 , 10일 후에는 0.84 ± 0.17 , 14일 후에는 1.03 ± 0.22 로 모두 정상군에 비해 유의하지 않았다(Fig. 13).

Col2a1 유전자 발현은 DH군이 3일 후 0.20 ± 0.04 로 정상군에 비해 유의하게 감소하였다. 7일 후 0.08 ± 0.06 로 정상군과 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 그러나 14일 후에는 3.50 ± 0.52 로 정상군 및 대조군과 비교하여 유의하게 증가하였다(Fig. 13).

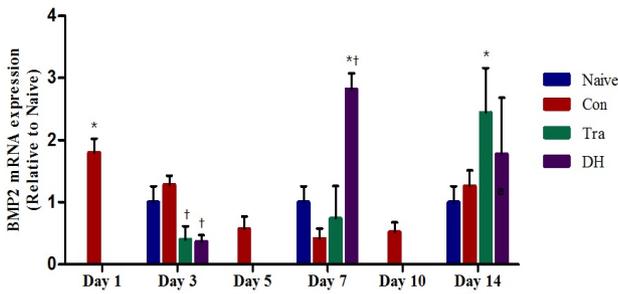


Fig. 11. Effect of *Dohongsamul-tang* on *BMP2* expression in bone marrow from mice femur on 3, 7 and 14 days after bone fracture. Six-week old C57/BL6 mice had femoral shaft fracture and treated with 160 mg/kg/day of *Dohongsamul-tang* for 3, 7 and 14 days. Total RNAs were isolated from bone marrow of damaged femur and subjected to real time-polymerase chain reaction to measure the expression of *BMP2* genes with SYBR green. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase was used as an internal control to normalize. The relative gene expression was calculated by comparing with that of naive. The data was presented by the mean±standard error of the mean. Naive: non-treated mice, Con: fractured group treated with normal saline, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), DH: fractured group treated with *Dohongsamul-tang* (160 mg/kg/day). *Significantly different from naive ($p<0.05$), †Significantly different from control ($p<0.05$).

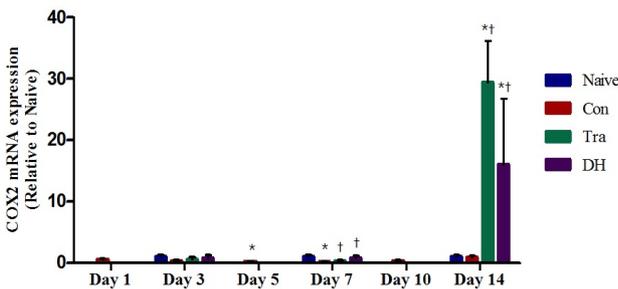


Fig. 12. Effect of *Dohongsamul-tang* on *COX2* expression in bone marrow from mice femur on 3, 7 and 14 days after bone fracture. Naive: non-treated mice, Con: fractured group treated with normal saline, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), DH: fractured group treated with *Dohongsamul-tang* (160 mg/kg/day). *Significantly different from naive ($p<0.05$), †Significantly different from control ($p<0.05$).

4) *Sox9* 유전자

Sox9 유전자 발현은 대조군에서 골절 유발 1일 후 1.55 ± 0.62 로 정상군에 비해 증가하였으나 유의하지 않았다. 3일 후에는 0.94 ± 0.26 으로 정상군과 비슷한 발현량을 보였으며 5일 후에는 0.34 ± 0.16 , 7일 후에는 0.41 ± 0.19 로 정상군에 비해 유의하게 감소하였다. 10일 후에는 $0.99\pm$

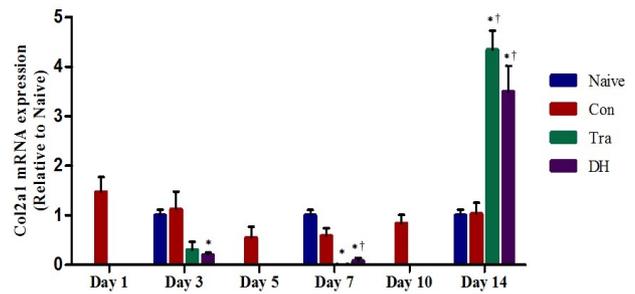


Fig. 13. Effect of *Dohongsamul-tang* on *Col2a1* expression in bone marrow from mice femur on 3, 7 and 14 days after bone fracture. Naive: non-treated mice, Con: fractured group treated with normal saline, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), DH: fractured group treated with *Dohongsamul-tang* (160 mg/kg/day). *Significantly different from naive ($p<0.05$), †Significantly different from control ($p<0.05$).

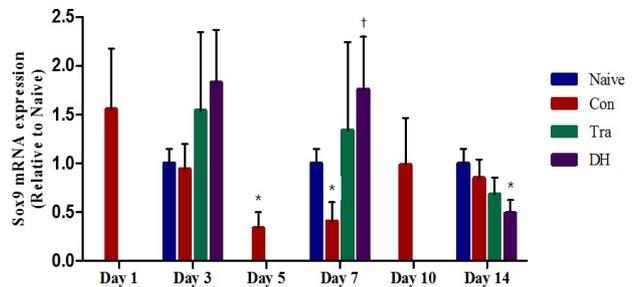


Fig. 14. Effect of *Dohongsamul-tang* on *Sox9* expression in bone marrow from mice femur on 3, 7 and 14 days after bone fracture. Naive: non-treated mice, Con: fractured group treated with normal saline, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), DH: fractured group treated with *Dohongsamul-tang* (160 mg/kg/day). *Significantly different from naive ($p<0.05$), †Significantly different from control ($p<0.05$).

0.48, 14일 후에는 0.85 ± 0.19 로 정상군에 비해 유의하지 않았다(Fig. 14).

Sox9 유전자 발현은 DH군이 3일 후 1.83 ± 0.54 로 대조군에 비해 발현이 증가하였으나 유의하지 않았다. 7일 후 1.76 ± 0.54 로 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 14일 후 0.49 ± 0.13 로 대조군과 비교해 감소하였으나 유의하지 않았다(Fig. 14).

5) *Runx2* 유전자

Runx2 유전자 발현은 대조군에서 골절 유발 1일 후에는 0.09 ± 0.08 , 3일 후에는 0.39 ± 0.39 , 5일 후에는 4.42 ± 2.41 , 7일 후에는 5.76 ± 2.57 로 모두 정상군에 비해 유의하지 않았다. 10일 후에는 14.33 ± 5.26 , 14일 후에는 9.18 ± 3.60 로

정상군에 비해 유의하게 증가하였다(Fig. 15).

Runx2 유전자 발현은 DH군이 3일 후 1.47 ± 1.00 으로 대조군에 비해 증가하였으나 유의하지 않았다. 7일 후에는 0.96 ± 0.45 , 14일 후에는 1.17 ± 1.13 으로 모두 대조군과 비교해 감소하였으나 유의하지 않았다(Fig. 15).

6) *Osterix* 유전자

Osterix 유전자 발현은 대조군에서 골절 유발 1일 후 0.60 ± 0.16 으로 정상군에 비해 유의하게 감소하였다. 3일 후에는 2.47 ± 0.49 로 정상군에 비해 유의하게 증가하였고, 5일 후에는 0.65 ± 0.19 , 7일 후에는 1.26 ± 0.27 , 10일 후에는 1.33 ± 0.36 , 14일 후에는 1.02 ± 0.26 으로 모두 정상군에 비해 유의하지 않았다(Fig. 16).

Osterix 유전자 발현은 DH군이 3일 후 6.69 ± 2.05 로 정상군에 비해 유의하게 증가하였다. 7일 후에는 2.42 ± 0.66 으로 정상군에 비해 유의하게 증가하였으나 대조군에 비해서는 유의하지 않았다. 14일 후에는 1.23 ± 0.75 로 대조군과 비교하여 증가하였으나 유의하지 않았다(Fig. 16).

3. 안전성 검사

1) ALP

ALP는 정상군에서 154.0 ± 8.96 이었을 때 골절 14일 후에는 DH군이 88.67 ± 7.79 로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 17).

2) AST

AST는 정상군에서 141.1 ± 41.6 이었을 때 DH군은 골절 3일, 7일, 14일에 모두 대조군과 비교하여 유의한 변화는 없었다(Fig. 18).

3) ALT

ALT는 정상군에서 31.86 ± 4.58 이었을 때 DH군은 3일, 7일, 14일 모두 대조군에 비해 유의한 변화는 없었다(Fig. 19).

4) BUN

BUN은 정상군에서 21.90 ± 0.82 였을 때 DH군에서 골절 3일, 7일, 14일 모두 대조군과 비교하여 유의한 변화는 없었다(Fig. 20).

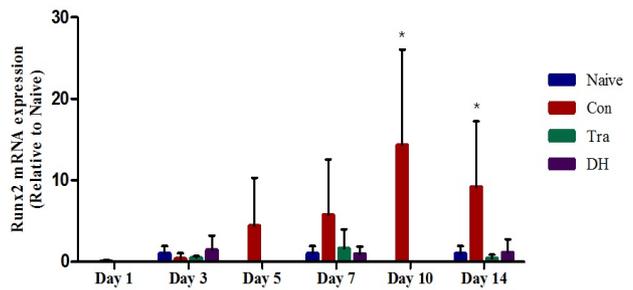


Fig. 15. Effect of *Dohongsamul-tang* on *Runx2* expression in bone marrow from mice femur on 3, 7 and 14 days after bone fracture. Naive: non-treated mice, Con: fractured group treated with normal saline, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), DH: fractured group treated with *Dohongsamul-tang* (160 mg/kg/day). *Significantly different from naive ($p < 0.05$).

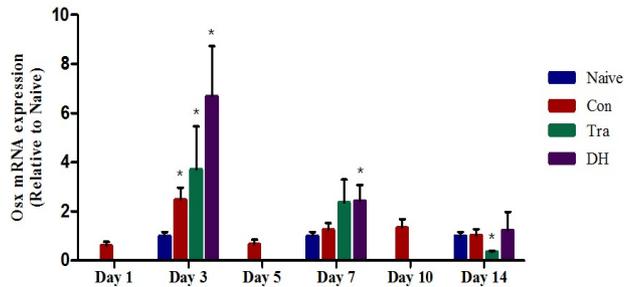


Fig. 16. Effect of *Dohongsamul-tang* on *Osterix* expression in bone marrow from mice femur on 3, 7 and 14 days after bone fracture. Osx: Osterix, Naive: non-treated mice, Con: fractured group treated with normal saline, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), DH: fractured group treated with *Dohongsamul-tang* (160 mg/kg/day). *Significantly different from naive ($p < 0.05$).

5) Creatinine

Creatinine은 정상군에서 0.18 ± 0.01 이었을 때 DH군에서 골절 3일, 7일, 14일 모두 대조군과 비교하여 유의한 변화는 없었다(Fig. 21).

6) Total cholesterol

DH군의 total cholesterol은 7일 후 100.7 ± 1.92 로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 14일 후 98.00 ± 2.61 로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 22).

7) Triglyceride

Triglyceride는 정상군에서 108.0 ± 12.92 이었을 때 DH군에서는 골절 3일 후 80.20 ± 6.01 로 대조군에 비해 유의

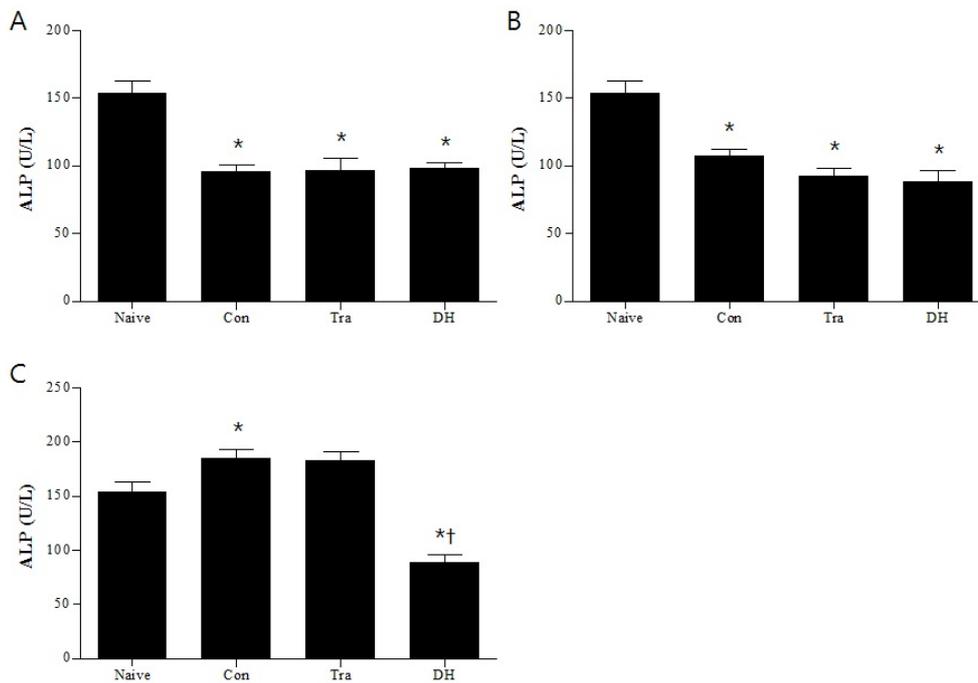


Fig. 17. Effect of *Dohongsamul-tang* extract on the ALP of plasma in femoral shaft fracture mice on 3 (A), 7 (B) and 14 (C) days after bone fracture. Naive: non-treated mice, Con: fractured group treated with normal saline, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), DH: fractured group treated with *Dohongsamul-tang* (160 mg/kg/day), ALP: alkaline phosphatase. *Significantly different from naive ($p < 0.05$), †Significantly different from control ($p < 0.05$).

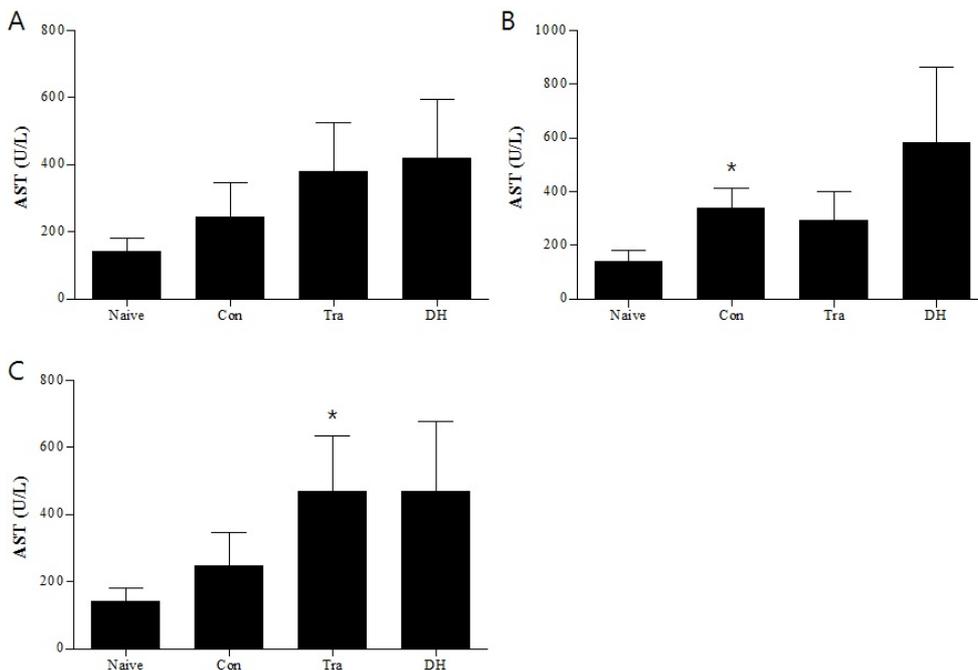


Fig. 18. Effect of *Dohongsamul-tang* extract on the AST of plasma in femoral shaft fracture mice on 3 (A), 7 (B) and 14 (C) days after bone fracture. Naive: non-treated mice, Con: fractured group treated with normal saline, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), DH: fractured group treated with *Dohongsamul-tang* (160 mg/kg/day), AST: aspartate aminotransferase. *Significantly different from naive ($p < 0.05$).

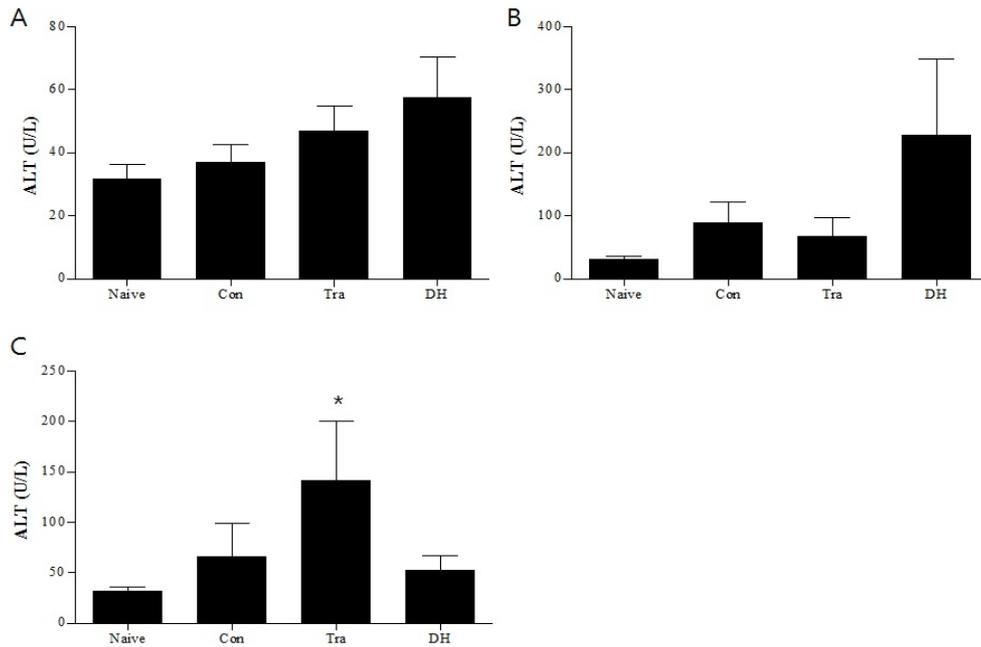


Fig. 19. Effect of *Dohongsamul-tang* extract on the ALT of plasma in femoral shaft fracture mice on 3 (A), 7 (B) and 14 (C) days after bone fracture. Naive: non-treated mice, Con: fractured group treated with normal saline, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), DH: fractured group treated with *Dohongsamul-tang* (160 mg/kg/day), ALT: alanine aminotransferase. *Significantly different from naive ($p < 0.05$).

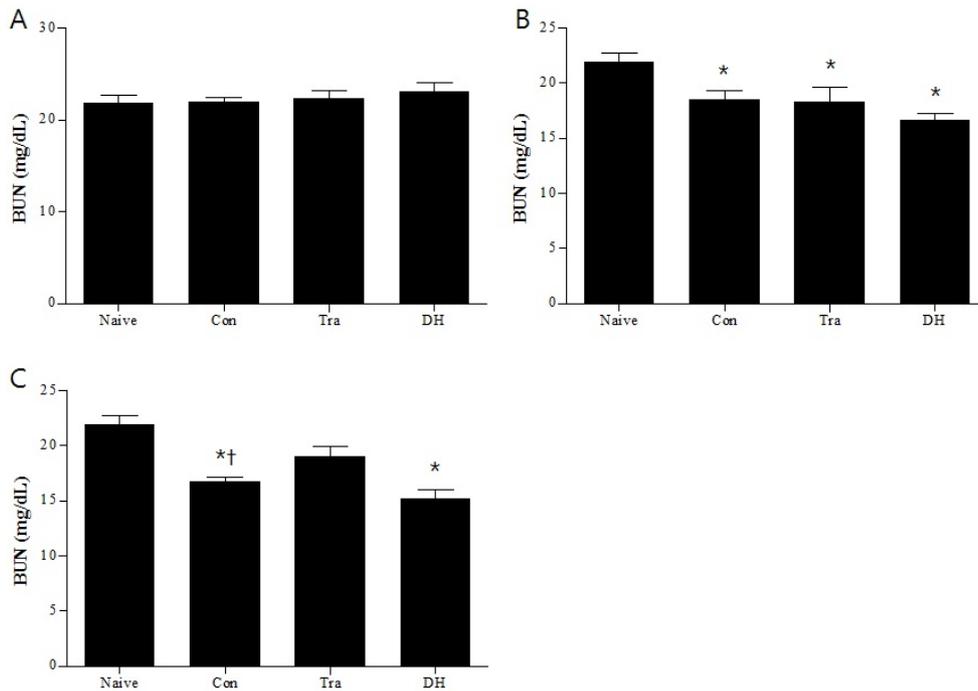


Fig. 20. Effect of *Dohongsamul-tang* extract on the BUN of plasma in femoral shaft fracture mice on 3 (A), 7 (B) and 14 (C) days after bone fracture. Naive: non-treated mice, Con: fractured group treated with normal saline, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), DH: fractured group treated with *Dohongsamul-tang* (160 mg/kg/day), BUN: blood urea nitrogen. *Significantly different from naive ($p < 0.05$), †Significantly different from control ($p < 0.05$).

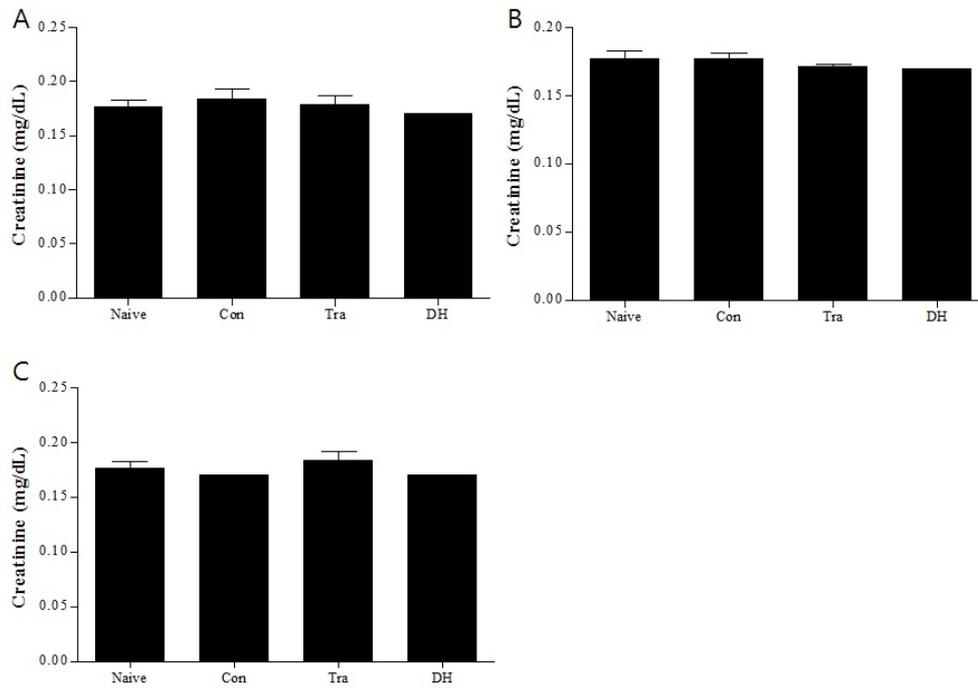


Fig. 21. Effect of *Dohongsamul-tang* extract on the creatinine of plasma in femoral shaft fracture mice on 3 (A), 7 (B) and 14 (C) days after bone fracture. Naive: non-treated mice, Con: fractured group treated with normal saline, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), DH: fractured group treated with *Dohongsamul-tang* (160 mg/kg/day).

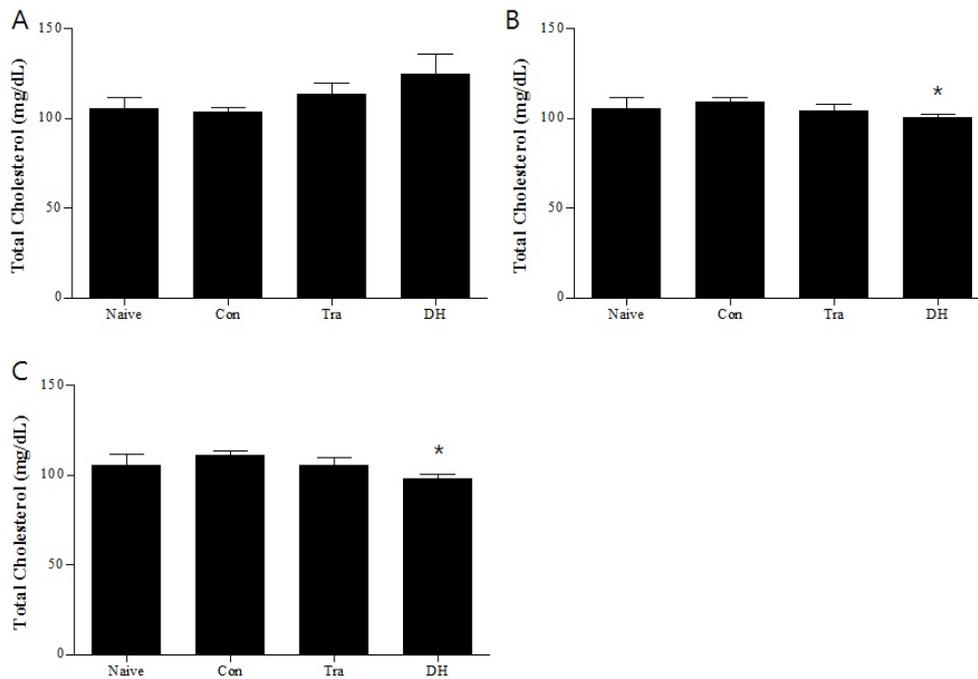


Fig. 22. Effect of *Dohongsamul-tang* extract on the total cholesterol of plasma in femoral shaft fracture mice on 3 (A), 7 (B) and 14 (C) days after bone fracture. Naive: non-treated mice, Con: fractured group treated with normal saline, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), DH: fractured group treated with *Dohongsamul-tang* (160 mg/kg/day). *Significantly different from control ($p < 0.05$).

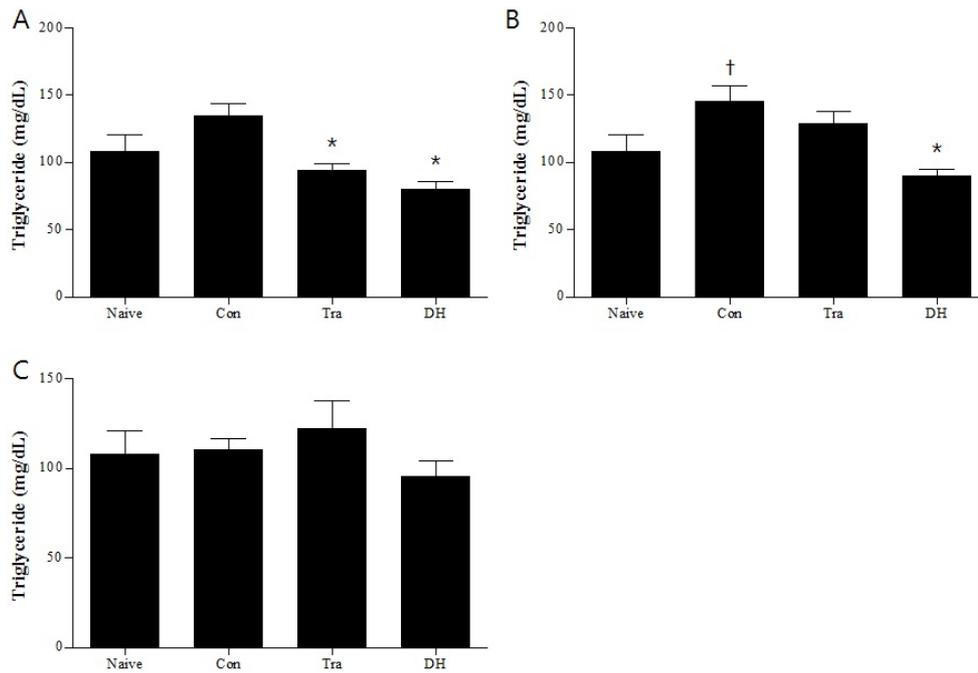


Fig. 23. Effect of *Dohongsamul-tang* extract on the triglyceride of plasma in femoral shaft fracture mice on 3 (A), 7 (B) and 14 (C) days after bone fracture. Naive: non-treated mice, Con: fractured group treated with normal saline, Tra: fractured group treated with tramadol (20 mg/kg/day), DH: fractured group treated with *Dohongsamul-tang* (160 mg/kg/day). *Significantly different from control ($p < 0.05$), †Significantly different from naive ($p < 0.05$).

적으로 감소하였다. 7일 후에는 90.17 ± 4.69 로 대조군에 비해 유의하게 감소하였으며 14일 후에는 95.50 ± 8.95 로 대조군과 비교해 감소하였으나 유의하지 않았다(Fig. 23).

고찰»»»»»

골절의 치유는 뼈의 연속성이 끊어진 상태에서 골질의 재생에 의하여 본래와 유사한 구조 및 기능으로 돌아가는 생리적 과정이다. 골절 후 2주경에는 골절 주변에 혈액 공급이 약 6배 정도 증가하며, 수개월이 지나면 정상치로 돌아오게 된다. 골절된 부위가 골질에 의해 연결되는 과정은 수주에서 수개월이 걸리며, 이후 몇 년에 걸쳐 재형성 과정을 거치게 된다.

일반적인 골절의 자연 치유 과정은 크게 염증기, 복원기, 재형성기의 세 단계를 거치며, 세 과정이 연속적으로 중첩되며 진행된다. 골절 직후 염증기(inflammation phase)에는 손상된 조직에서 염증 반응이 발생하여 혈종이 형성된다. 골절 주변에 혈관이 형성되고, 혈종 내에서는 세포가 광범위하게 증식된다. Interleukin (IL)-1, IL-6 등

의 사이토카인이 염증 세포를 불러오고 세포의 분화를 촉진시킨다. 섬유모세포(fibroblast)와 골모세포(osteoblast)에 의해 육아 조직이 형성되어 골절 부위의 혈종을 대체한다¹⁾.

복원기(reparative phase)는 연골 세포, 가골의 형성 등과 관련된 세포가 증식 및 분화하는 단계이다. 기질화가 일어나면서 골절 부위가 기질화된 조직인 가골로 연결되어 안정성을 갖는다. 복원기 초기 염증 부위 주변에서 골모세포가 활발히 분열하여 막내 골화(intramembranous ossification)를 일으켜 경성 가골(hard callus)을 만든다. 골절 중심부에서는 중간엽 세포와 연골 세포가 발생하여 연성 가골(soft callus)을 형성하고, 신생 혈관이 형성되어 영양을 공급한다. 이후 연성 가골은 연골내 골화(endochondral ossification) 과정을 거쳐 경성 가골(hard callus)로 대체되고, 이 과정을 통해 연골이 직골(woven bone)로 변한다¹⁾. 쥐나 토끼와 같은 동물 모델에서는 외상 후 7~9일에 연성 가골이 형성되고, 14일에 경성 가골의 형성이 최고치에 달하는 것으로 알려져 있다¹³⁾.

재형성기(remodeling phase)에서는 경성 가골이 층판골(lamellar bone)로 대체되고, 과잉 생성된 골은 파골세

포에 의해 흡수된다. 동물 모델과 사람 모두에게서 3~4 주 사이에서 시작되나 완전한 골격 구조로 돌아가기까지는 몇 년이 걸린다¹⁾.

정복이나 수술을 진행하더라도 기본적으로 골절 부위가 유합되기까지는 많은 시간을 필요로 한다. 또한 연령이나 기저질환 유무 등이 골절의 유합에 영향을 줄 수 있기 때문에 골절의 유합을 촉진시키기 위한 연구가 진행되어 왔다⁴⁾. 골 이식과 같은 침습적 방법¹⁵⁾, 초음파¹⁶⁾ 등의 비침습적 방법과 부갑상선 호르몬¹⁷⁾ 투여 등의 다양한 연구 결과가 있다. 그러나 아직 임상적 근거가 부족하거나 오히려 치유 촉진과 관련이 없다는 논란이 있는 등 임상에서 활용하는데 한계가 있다¹⁷⁾. 이에 골절 유합의 한의 치료를 임상에 활용하기 위한 추가적인 연구가 필요하다.

골 조직이 치유되기 위해서는 골절 부위에 혈관이 형성되고 혈액이 산소와 영양을 원활히 공급할 수 있어야 한다. 따라서 골절을 치료하기 위해서는 혈행을 최대한 유지시키는 것이 중요하다¹⁾. 清代 錢秀昌은 ‘夫跌墮損傷墜墮磕碰之證 專從血論 或有瘀血停積 或爲亡血過多 然後施治 庶不有悞’라고 하였고¹⁸⁾, 清代 陳士鐸은 ‘內治之法 必須以活血化瘀爲先 血不活則瘀不能去 瘀不能去則骨不能接’이라고 하였다⁹⁾. 이와 같이 한의학에서 골절 환자는 瘀血 停積이 있는 것으로 보고 化瘀活血을 주요한 治法으로 삼았다. 이 점은 한의학에서 化瘀活血을 골절의 주요 치료법으로 삼은 것과 일맥상통하는 부분이 있다. 이에 한약 처방을 통해 수술 후 유합을 촉진시키거나, 보존적 치료를 시행하는 환자에게 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

도홍사물탕은 養血, 調血 작용이 있는 四物湯에서 白芍藥을 赤芍藥으로, 熟地黃을 生地黃으로 바꾸어 化瘀, 活血, 涼血 작용을 높이도록 하고, 여기에 주요한 活血 祛瘀 약물인 桃仁, 紅花를 추가한 처방으로²⁰⁾, 《醫宗金鑑·婦科心法要訣》³⁾에서 ‘經水先期而至...若血多有塊 色紫稠點 乃內有瘀血 用四物湯 加桃仁紅花破之 名桃紅四物湯’이라 하여 瘀血로 인한 부인과 질환을 치료하는 처방으로 언급되었다. 《丹溪心法》²¹⁾에서는 ‘中風 在左屬死血少血左以四物湯加桃仁紅花.. 人身諸病 多生於鬱 血鬱 桃仁紅花...’라 하여 補血, 活血, 祛風 하는 데 도홍사물탕을 사용하였다²²⁾.

처방의 각 구성 약물을 살펴보면 當歸는 保血和血, 活

血行氣止痛하여 血病의 要藥이며 특히 부인과 질환에 많이 쓰인다²³⁾. 赤芍藥은 清熱涼血, 活血祛瘀하여 血熱, 血瘀, 肝火에 의한 병증에 주로 쓰인다. 川芎은 血 中の 氣藥으로 活血行氣하면서 祛風止痛의 효과가 있다. 生地黃은 清熱滋陰하여 骨蒸勞熱을 치료하며, 그 외에도 涼血止血, 生津止渴의 효과가 있다. 桃仁은 破瘀行血하면서 油脂가 풍부하여 潤腸通便하며 기타 止咳平喘의 작용을 한다. 紅花 역시 活血通經, 散瘀止痛 작용을 한다. 이와 같이 도홍사물탕이 대부분 瘀血을 제거하고 혈액 순환을 증진시키는 역할을 하는 약재들로 구성되어 있음을 알 수 있다²⁴⁾. 최근 연구에 따르면 瘀血性 부인과 질환⁵⁾ 뿐 아니라 심혈관 질환²²⁾, 뇌신경계 질환⁶⁾ 등에 응용되고 있다. 그러나 도홍사물탕의 골절에 대한 효과는 연구된 바 없는데 처방 구성 중 紅花가 골모세포의 분화를 촉진하고, 신생골의 형성과 성숙을 촉진시켜 골절을 치유한다는 연구가 발표된 바 있어 도홍사물탕 역시 골절 치유에 효과가 있을 것이라 가정하였다²⁵⁾.

이에 본 실험에서는 도홍사물탕이 골절로 인한 瘀血을 제거하고, 골절 부위의 혈류 순환을 개선시켜 골절 유합에 유의하게 작용할 것이라는 가설을 세우고 이를 평가하였다.

한방 치료에서는 골절의 통증 제어뿐 아니라 회복 및 유합을 위한 목적으로 한약을 처방하는 데 비해, 양방에서는 골절의 통증 제어를 목표로 nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), 마약성 진통제 등 다양한 약물을 처방한다. NSAIDs 진통제는 흔히 처방되는 진통제이나 동물 모델의 골 유합을 오히려 저해시킨다는 연구 결과가 있는 데 비해 tramadol은 골 유합 저해의 부작용이 적으며²⁶⁾, 면역계의 활성을 도와 합병증 예방의 역할을 하기도 한다. 이에 tramadol을 양성 대조군에게 투여하였다⁹⁾.

형태학적 관찰 결과는 각 군에서 가장 대표성을 띠는 골절 조직을 채택하여 촬영하였다. 그 결과 7일째에 골 유합이 진행되는 것이 관찰되었고, 14일째에는 대조군보다 가골의 형성이 증가한 것이 관찰되었다(Figs. 1, 2). 또한 safranin O 염색을 통해 골절 조직을 분석하였을 때 7일째 골절조직에서 연골의 형성이 관찰되었고, 14일째 골절조직에서 연골세포가 증식되고 연골 영역이 확장된 것을 관찰할 수 있었다. 특히 7일째 DH군의 골절 조직에서 연골세포가 확연히 증가한 것을 확인하였

다. 동물 모델에서 대략적으로 염증기는 골절 후 1~5일, 연골 형성기는 5~28일, 재형성기는 약 28일 이후로 알려져 있다²⁷⁾. 본 연구에서도 DH군에서 연골 형성이 더 빠르게 진행되는 경향이 관찰되었다(Figs. 3~6).

골절 유발 후 3, 7, 14일째에 골절 조직 슬라이드에 TGF- β 1에 대한 항체를 결합하고 면역조직염색 후 관찰하였다. 그 결과 7일째부터 DH군에서 TGF- β 1 발현 세포가 증가하였으며, 14일째에는 DH군에서 TGF- β 1 발현세포가 확연하게 증가하였다(Figs. 7~10). TGF- β 1은 골모세포의 분화, 증식에 관여하여 복원기에 연골세포 주변에서 발현이 증가하고 재형성기에 성숙골로 변화하면서 감소하게 된다²⁸⁾. 상기 실험 결과 DH가 골절 과정에서 연골 형성을 촉진시키는 데 영향을 줄 수 있음을 예상할 수 있다.

실험동물에게 골절을 유발한 뒤 3, 7, 14일 후에 골수 조직에서 발현되는 *BMP2*, *COX2*, *Col2A1*, *Sox9*, *Runx2*, *Osterix* 유전자를 real time-PCR을 통해 확인하였다. 골 형성 단백질 중 하나인 *BMP2*는 조골세포의 분화를 매개하여 골 형성을 촉진시키는 데 주요한 역할을 한다¹⁰⁾. 본 연구에서 *BMP2*의 경우 대조군은 골절 1일 후에는 유의하게 증가하며, 이후에는 감소 경향을 보이나 14일 후에 대조군에 비해 증가하나 모두 유의하지 않았다. 반면 DH군은 골절 3일 후에 대조군에 비해 유의하게 감소하였으나, 7일 후에는 정상군 및 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, 14일 후에는 정상군, 대조군과 비교하여 증가하였으나 유의하지 않았다(Fig. 11). 이에 DH군이 복원기 초에 작용하여 *BMP2*의 발현을 촉진시키는 데 영향을 줄 것으로 보인다.

COX효소는 골격근의 단백질 합성 및 분해에 기여하며 arachidonic acid를 prostanoid로 전환시킨다. 그 중 *COX2*는 정상 조직에서는 크게 발현되지 않으나 염증 상태나 여러 자극에 의해 증가한다¹¹⁾. 염증 반응의 매개물질인 prostaglandin의 생성을 조절하며 통증을 중추 신경계에 전달하는 역할을 한다. 동물 연구에서는 *COX2*가 골격근 단백질을 합성시키고 조직의 손상을 회복시키는 데에 중요한 역할을 하는 것으로 보고 있다²⁹⁾. 골절 유발 후 *COX2* 발현량을 측정한 결과, 대조군에서는 정상군에 비해 감소 경향을 보이며 특히 5, 7일 후에는 유의하게 감소하였다. 이와 대조적으로 DH군은 골절 유발 3일 후에 대조군에 비해 발현량이 증가하였고, 7일에

는 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 특히 14일 후에는 대조군, 정상군에 비해 뚜렷하게 증가하였다(Fig. 12). 이에 DH가 복원기 전반, 특히 가골 형성이 활발하게 이루어지는 시기에 작용하여 *COX2*의 발현을 유의하게 촉진시킴을 알 수 있었다.

Type 2 콜라겐은 연골에만 존재하는 세포의 단백질로 연골이나 장골(long bone)의 형성에 주요한 영향을 미치며, *Col2A1*는 Type 2 콜라겐을 조절하는 역할을 한다¹²⁾. 골절의 치유 과정에서 연성 가골은 연골 내골화 과정을 거쳐 직골로 대치되는데, 이 과정에서 연골세포는 다량의 type 2 콜라겐을 형성하게 된다³⁰⁾. 본 연구에서 대조군의 *Col2A1* 발현량 변화는 유의하지 않아 뚜렷한 경향을 확인할 수 없었다. 그 반면 DH군의 경우 3일, 7일 후에는 대조군에 비해 유의하게 감소하였으나, 14일 후에는 정상군 및 대조군과 비교해 유의하게 증가하였다(Fig. 13). 이에 DH가 복원기 중반에 *Col2A1*의 발현을 증가시켜 가골의 형성을 유의하게 촉진시키는 것을 알 수 있다.

*Sox9*는 Sox 단백질의 하나로, *Col2A1*과 함께 연골세포 특이 유전자이다. Sox9은 type 2 콜라겐의 전사 활성화 또한 조절하는 역할을 한다³¹⁾. 골절 유발 후 대조군의 Sox9 발현량은 골절 1일 후 높게 나타난 뒤 감소하여 5일, 7일 후에는 정상군에 비해 유의하게 감소하였다. 반면 DH군은 3일째에 대조군에 비해 증가하였고, 7일에는 유의하게 증가하였다. 이후 14일에는 감소하지만 대조군에 대해 유의성은 없었다(Fig. 14). 이에 DH가 복원기 초반에 작용하여 Sox9의 발현을 촉진시키고 연골의 형성에 영향을 주는 것으로 보인다.

*Runx2*는 골모세포의 분화 및 골 형성에 필수적인 전사 인자이다¹⁰⁾. *Runx2*가 결여된 쥐에서는 골 형성이 발생하지 않으며, 골모세포 분화 역시 억제되는 것으로 알려져 있다³²⁾. 골절 유발 후 대조군의 *Runx2* 발현량은 골절 3일 후에는 감소하였으나 이후 증가 경향을 보여 10일, 14일 후에는 정상군에 비해 유의하게 증가하였다. 한편 골절 3일 후 DH군은 대조군에 비해 증가하였으나 유의하지 않았고, 7일, 14일 후에는 대조군에 비해 감소하였으나 모두 유의하지 않았다(Fig. 15).

*Osterix*는 *Runx2*와 함께 골의 발생 및 골모세포의 분화에 필수적인 전사 인자로 전골모세포(preosteoblast)가 성숙한 골모세포로 분화하는 데 기여한다¹⁰⁾. *Osterix*가

결여된 쥐에서는 골형성이 이루어지지 않는 것으로 알려져 있다. 쥐의 뼈가 성장된 후 *Osterix*의 발현이 유지되지 못할 경우 골모세포의 기능이 저하되며, 골 형성 속도가 감소된다는 연구가 있다³³). 골절 유발 후 대조군의 *Osterix* 발현량을 비교한 결과, 골절 3일 후에 정상군에 비해 유의하게 증가하였고 이후에는 유의성이 없어 뚜렷한 경향성을 파악할 수 없었다. DH군은 골절 3일, 7일, 14일 후 모두 대조군과 비교하여 증가하였으나 유의하지 않았다(Fig. 16).

골절 유발 후 각 날짜별로 DH군의 대조군 대비 유전자 발현 변화 추이를 살펴보면 3일 후에 DH군의 *Col2A1* 발현량은 감소하였고, *BMP2*는 유의하게 감소한 반면 *COX2*, *Sox9*, *Runx2*, *Osx* 발현량은 증가하였다. 7일 후 DH군의 *Col2A1*, *Runx2* 발현량은 감소하였고, *Osx* 발현량은 증가하였으나 유의하지 않았던 반면 *BMP2*, *COX2*, *Sox9*는 유의하게 증가하였다. 14일 후 DH군의 *Sox9*, *Runx2* 발현량은 감소하였고, *BMP2*, *Osx*은 증가하였으나 유의하지 않았던 반면 *COX2*, *Col2A1*는 유의하게 증가하였다.

안전성 평가를 위해 골절을 유발한 실험동물의 심장에서 혈액을 채취하여 ALP, AST, ALT, BUN, creatinine, total cholesterol, triglyceride 값을 측정하였다. ALP는 간, 소장, 뼈, 태반에 존재하여 이들에 문제가 있을 경우 상승하는데, 특히 골 특이적 ALP는 골모세포의 활성도를 확인하는 지표가 된다³⁴). 골절 유발 3, 7일 후 DH군의 ALP 값은 정상군에 비해 유의하게 감소하였으나 대조군에 비해서는 유의하지 않았으며, 14일 후에는 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 17). ALP 값이 감소하였으나 이는 골 특이적 ALP가 아닌 혈장 내 총 ALP의 값이므로 DH가 골 형성에 미치는 영향을 완전히 반영한다고 보기는 어렵다.

간세포가 파괴되면 AST, ALT, LDH 등의 효소가 혈중으로 방출되므로 AST, ALT는 간세포의 손상을 확인할 수 있는 주요 지표가 된다³⁵). AST 값의 경우 DH군은 골절 3일, 7일, 14일 후에 대조군에 비해 증가하였으나 모두 유의성이 없었다(Fig. 18). DH군의 ALT 값은 골절 3일, 7일 후에 대조군보다 증가하고 14일 후에는 감소하나 모두 유의하지 않았다(Fig. 19). 비록 AST가 증가 경향을 보이거나 AST와 ALT 모두 대조군에 비해 유의하지 않으므로 DH가 약물로 인한 급성 간 손상을 유발한

다고 보기는 어려우며 향후 관련 연구가 필요할 것으로 생각한다.

BUN, creatinine은 신기능을 확인할 수 있는 주요 지표이다³⁵). BUN은 DH군에서 골절 3일 후에는 대조군에 비해 증가하고 7일, 14일 후에는 감소하나 모두 유의하지 않았다(Fig. 20). 한편 DH군의 creatinine 값은 3일, 7일, 14일 후 모두 대조군과 비슷한 수치를 보였으나 마찬가지로 유의하지 않았다(Fig. 21). 이에 DH가 신기능에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

마지막으로 total cholesterol 및 triglyceride의 경우 지질 대사이상과 관련된 지표이다³⁵). Total cholesterol의 경우 DH군에서는 골절 3일 후에는 증가하나 유의하지 않았으며 7일, 14일 후에는 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 22). 또한 DH군의 triglyceride 값은 골절 3일, 7일 모두 대조군에 비해 유의하게 감소하였고, 14일째에는 감소하였으나 유의하지 않았다(Fig. 23). 이에 DH가 혈장 지질에 영향을 미치지 않으며 개선 가능성이 있음을 알 수 있었다. 이와 관련하여 加味桃紅四物湯을 이상 지질혈증에 유의한 효과를 미친다는 연구³⁶)가 있어 향후 추가적인 연구가 기대된다.

골절 유발 후 각 날짜별 혈액화학검사 결과 값을 비교해 보면 골절 3일 후에는 대조군에 비해 DH군의 triglyceride 값은 유의하게 감소하였고, creatinine 값은 감소, ALP, AST, ALT, BUN, total cholesterol 값은 증가하였으나 유의하지 않았다. 7일 후에는 DH군의 total cholesterol, triglyceride 값은 유의하게 감소하였으며 ALP, BUN, creatinine 값은 감소하였고 AST, ALT 값은 증가하였으나 유의하지 않았다. 14일 후에는 DH군의 ALP, total cholesterol 값은 유의하게 감소하였고, ALT, BUN, triglyceride 값은 감소, creatinine 값은 유사하였으며 AST 값은 증가하였으나 유의하지 않았다.

이상의 연구 결과를 종합해보면 대퇴골 골절을 유발한 실험동물의 골절 조직을 관찰하였을 때 골절 7일째의 DH군에서 연골 세포의 증가 및 TGF- β 1 발현 조직의 증가를 확인할 수 있었고, 골절 14일째 DH군의 골절 조직에서 TGF- β 1이 대조군에 비해 확연히 증가한 것을 확인할 수 있었다. 또한 대조군의 *BMP2*, *COX2*, *Col2A1*, *Sox9*의 발현량이 유의한 증감을 보이지 않는 데 비해 DH군은 골절 7일째에는 *BMP2*, *COX2*, *Sox9*, 14일째에는 *COX2*, *Col2A1*의 발현량이 대조군에 비해 유의하게 증

가하였다. 또한 안전성 평가를 위해 확인한 혈액 검사에서는 DH가 실험동물에 별다른 영향을 주지 않음을 알 수 있었다. 이에 DH가 복원기 전반에 걸쳐 연골 세포의 증식 및 가골 형성을 유도하여 골절 치료에 유의한 효과가 있는 약물임을 확인하였다.

본 연구에서는 골절 후 실험 기간이 길지 않아 복원 후기 및 재형성기와 같은 골절의 전반적인 유합 과정에서의 효과를 확인하기 어려웠으며 진통제를 양성 대조군으로 선정하였음에도 골절 후 통증 감소의 효과를 비교 확인하지 못하였다는 한계를 가진다. 그러나 도홍사물탕이 골절 초기의 골 유합 작용에 관여하여 한의학적 관점에서의 어혈 병증과 관련하여 유의미한 효과가 있음을 확인할 수 있었으며, 향후 도홍사물탕의 골절에 대한 치료 효과에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론»»»»

桃紅四物湯이 골절의 유합에 미치는 영향을 확인하기 위하여 대퇴골 골절을 유발한 생쥐를 이용하여 골절 조직의 형태조직학적 변화, 골절 유합 관련 유전자 발현, 혈액 검사 등을 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 골절 조직의 형태학적 관찰 결과, 가골의 형성이 대조군에 비해 빠르게 진행되었다.
2. 골절 조직의 safranin O 염색을 통한 조직학적 관찰 결과, 대조군에 비해 연골 형성이 빠르게 진행되었다.
3. 골절 조직 슬라이드에서 TGF-β1 발현 세포를 관찰한 결과, 대조군에 비해 TGF-β1 발현이 확연히 증가하였다.
4. 유전자 발현량을 관찰한 결과, DH군은 골절 7일째에 *BMP2*, *COX2*, *Sox9*, 14일째에 *COX2*, *Col2A1*이 대조군에 비해 유의하게 증가하였다
5. 간독성, 신독성 등의 안전성을 확인하기 위해 혈액 검사를 시행한 결과, AST, ALT, BUN, Creatinine 등에서 유의한 결과가 나타나지 않았다. Total cholesterol과 triglyceride는 감소 경향을 보였다.

이상과 같이 桃紅四物湯은 형태학적으로 연골 및 가골 형성을 촉진시키며 골절의 복원기에 유합 관련 유전

인자의 발현량을 증가시키고, 안전성 평가에서도 특이적 소견을 보이지 않아 향후 골절 치료에도 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

References»»»»

1. The Korean Orthopedic Association. Orthopaedics. 7th ed. Seoul:ChoiSin medical Publishing Co. 2013:1149-86, 1474.
2. The Society of Korean Medicine Rehabilitation. Korean Rehabilitation Medicine. 4th ed. Paju:Koonja Publishing. 2015:206-10.
3. Wuqian. Yizhongjinjian. Beijing:People's Medical Publishing House. 2000:104-6.
4. The Society of Oriental Obstetrics & Gynecology. Korean obstetrics and gynecology. Seoul:Jeongdam Publisher. 2001:186-8, 221.
5. Chang SH, Lim EM, Lee E. Effects of Dohongsamul-tang on surgically induced endometriosis in rats. The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2006;19(1):125-38.
6. Cho KI, Kim HY, Lee SG, Sin SH, Moon BS, Ko SJ. Effects of dohongsamul-tang on the gene expression of photothrombotic ischemia mouse model. Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine. 2009; 23(3):645-61.
7. Han GJ, Jang MW, Seong S, Kim SS. A case report of chemotherapy-induced hand-foot syndrome treated with modified dohongsamul-tang. The Journal of Internal Korean Medicine. 2018;39(2):259-67.
8. Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. J Orthop Res. 1984;2:97-101.
9. Grond S, Sablotzki A. Clinical pharmacology of tramadol. Clinical Pharmacokinetics. 2004;43(13):879-923.
10. Crockett JC, Rogers MJ, Coxon FP, Hocking LJ, Helfrich MH. Bone remodelling at a glance. J Cell Sci. 2011; 124(Pt 7):991-8.
11. Simon AM, Manigrasso MB, O'Connor JP. Cyclo-oxygenase 2 function is essential for bone fracture healing. J Bone Miner Res. 2002;17(6):963-76.
12. Kwak MJ, Myeong HK, Lee HS, Hwang JJ. Allele frequencies of COL2A1 locus in Koreans detected by polymerase chain reaction. The Korean Journal of Legal Medicine. 1994;18(2):1-8.
13. Einhorn TA. The science of fracture healing. J Orthop Trauma. 2005;19(10 Suppl):S4-S6.
14. Park SG, Shon OJ. Impaired bone healing metabolic and mechanical causes. The Journal of the Korean Fracture

- Society. 2017;30(1):40-51.
15. Lee DH, Kim JW. Bone substitutes and the advancement for enhancing bone healing. *The Journal of the Korean Fracture Society*. 2017;30(2):102-9.
 16. Min SG, Chun JS, Yong JH. The effects of pulsed ultrasound on the bone healing process in fracture model of diabetes mellitus rat. *Journal of Korean Society Physical Therapy*. 2006;18(2):47-58.
 17. Oh WT, Song HK, Yang KH. Intermittent parathyroid hormone treatment for stimulation of callus formation on distal femoral fracture in elderly patients. *Journal of Bone Metabolism*. 2011;18(2):137-41.
 18. Qian XC. *Shangkebuyao*. Taipei:Wen Kuang Publishing Company. 1977:70-3.
 19. Qian S. *Byeonzhengkimoon*. Seoul:Haenglim Publishing Company. 1982:311-2.
 20. Shin JY. *Bangyakhappyeon commentary*. Seoul:Traditional Medicine Research Center. 2000:62-4.
 21. Zhu ZH. *Sinpyeon dangyesimbeopbuyeo*. Seoul:Daesung Publishing Company. 1982:67, 515, 533, 541.
 22. Yu BS, Jung JE, Park JY, Yun JM, Lee I, Moon BS. Protective effects of dohongsamul-tang on zinc-mediated cytotoxicity in H9c2 cardiomyoblast cells. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*. 2004;18(5):1374-81.
 23. Kim HW, Choi EG, Chung HJ, Joung YM, Shin DS, Cho SI. Effects of angelicae gigantis radix (AGR) on polycystic ovary induced by estradiol valerate in rats. *Korea Journal of Herbology*. 2011;26(1):81-5.
 24. Hwang DY. *New bangyakhappyeon*. Seoul:Yeonglimsa. 2010:407-9, 413, 434-5, 443, 552-3.
 25. Seo HJ, Kim JH, Kwak DY, Jeon SM, Ku SK, Lee JH, Moon 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.
 26. Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, Steck R, Laschke MW, Wehner T, Bindl R, Recknagel S, Stuermer EK, Vollmar B, Wildemann B, Lienau J, Willie B, Peters A, Ignatius A, Pohlemann T, Claes L, Menger MD. Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone*. 2011;49(4):591-9.
 27. Frost HM. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clinical Orthopaedic Related Research*. 1989;11(248):283-93.
 28. Kang SY, Jung HJ, Jung YB, Jang EC, Lee EY, Lee MK, Kim MK. Matrix metalloproteinase-1 and transforming growth factor- β 1 expression during distraction osteogenesis and fracture healing of the rat. *The Journal of the Korean Orthopaedic Association*. 2008;43(5):529-38.
 29. Hawkey CJ. COX-1 and COX-2 inhibitors. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2001;15(5):801-20.
 30. Jingushi S, Michael EJ, Mark EB. Genetic expression of extracellular matrix proteins correlates with histologic changes during fracture repair. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1992;7(9):1045-55.
 31. Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, Crombrughe B. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro α 1(II) collagen gene. *Molecular and Cellular Biology*. 1997;17(4):2336-46.
 32. Rice DP, Aberg T, Chan Y, Tang Z, Kettunen PJ, Pakarinen L, Maxson RE, Thesleff I. Integration of FGF and TWIST in calvarial bone and suture development. *Development*. 2000;127(9):1845-55.
 33. Baek WY, Kim JE. Gene alterations by osteoblast-specific transcription factor osterix in postnatal bone formation. *Osteoporosis*. 2011;9(1):51-6.
 34. Lee HS, Lee CS, Jang JS, Lee JD, Um MS. Changes of serum alkaline phosphatase and osteocalcin during fracture healing. *The Journal of the Korean Orthopaedic Association*. 2002;37(3):411-5.
 35. The Korean Society of Laboratory Medicine. *Laboratory medicine*. 4th ed. Seoul:E-public. 2009:307, 318, 346.
 36. Lim HC, Jeon SY. The effect of gamidohongsamul-tang (GDT) on the gene expression levels of eNOS, KLF2, ICAM-1 and VCAM-1 in HUVEC cells. *The Journal of Internal Korean Medicine*. 2018;39(1):1-8.