

## 加味八味地黄湯 및 加味羌活續斷湯이 卵巢摘出 흰쥐의 骨多孔症 誘發抑制에 미치는 影響

張東淳·金光湖

慶熙大學校 韓醫學科大學, 慶熙大學校 韓醫學研究所

### The Effects of *Kamipalmijiwhangtang* and *Kamigangwhalsokdantang* on Osteoporosis in Ovariectomized Rats

Dong-Soon Jang · Kwang-Ho Kim

College of Oriental Medicine, Kyung Hee University  
Institute of Oriental Medicine, Kyung Hee University  
Seoul 137-702, Korea

#### ABSTRACT

In order to compare and study the effects of *Kamipalmijiwhang tang*(加味八味地黄湯) & *Kamigangwhalsokdantang*(加味羌活續斷湯) on inhibition of osteoporosis induced by ovariectomy, the author administered *Kamipalmijiwhangtang* & *Kamigangwhalsokdantang* to the sample groups per orally before and after ovariectomy. The author observed the activities of cathepsin L, K and the contents of calcium, calcitonin, osteocalcin and phosphorus in the serum for the biochemical index, the contents of IL-6 in the serum and bone marrow for immunological index, the state of bone loss in the metaphysis of tibia by histological study, the expression of ELAM-1 & collagen IV by immunohistochemical analysis, the expression of fos by immunocytochemical analysis.

The results were as follows:

1. The activities of cathepsin L, K in the serum had a significant inhibitive effects in all sample groups compared with the control group. The inhibitive effects of Sample A-1 & B-1 was better than those of A-2 & B-2 and the inhibitive effects of sample B-1 & B-2 was better than those of A-1 & A-2.
- 2 The content changes of IL-6 in the serum and bone marrow had a significant inhibitive effects in all sample groups compared with the control group. The inhibitive effects of sample A-1 & B-1 was better than those of A-2 & B-2 and the inhibitive effects of sample B-1 & B-2 was better than those of A-1 & A-2.
3. In the histological study of tibial metaphysis all the sample groups inhibited bone loss significantly compared with the control group and expressed trabecula shape of bone similar to the normal group.
4. The expression of ELAM-1 & collagen IV decreased a little bit in sample A-2. It also decreased

to a similar degree in sample B-2 like normal group and disturbed itself.

5. The expression of fos was inhibited in all sample groups compared with control group. The inhibitive expression of sample B-1 & B-2 was more remarkable than those of A-1 & A-2.

6. The serum calcium had a significant increasing effects in all sample groups compared with control group. Each sample groups didn't have any significant difference.

7. The serum calcitonin had a significant increasing effects in sample A-1, A-2 and B-1 groups compared with control group. Each sample groups didn't have any significant difference.

8. The serum osteocalcin and phosphorus didn't have any significant difference in all sample groups compared with control group.

## I. 緒 論

醫學의 발달로 人間の 平均壽命이 늘어나면서 人口의 老齡化 현상이 심하여짐에 따라 骨多孔症 患者가 增加하여<sup>23,28,31,36</sup> 이에 대한 醫學的 觀心과 研究가 활발히 進行되고 있다<sup>43</sup>.

骨多孔症은 骨 組織 내에서 造骨細胞의 機能이 低下되고 破骨細胞의 機能은 活性化되어 誘發되는 代謝性 疾患<sup>36</sup>으로서 骨의 化學的 組成에는 變化가 없고 單位 容積當 骨量이 減少된 狀態로<sup>6,8,28</sup>, 初期에는 臨床症狀이 없는 경우가 많으며 더욱 進行되면 背部疼痛, 身長의 減少, 脊椎의 後彎變形 및 骨折 등이 주된 症狀으로 나타난다<sup>8,10,28,49,50,54</sup>.

骨多孔症은 여러가지 原因<sup>4,8,9,10,13,36,43,60,64,91,92,97</sup>에 의하여 惹起될 수 있으나 특히 老化和 estrogen의 缺乏이 중요하다<sup>43,49,61,83,92,99</sup>. 閉經期後 骨多孔症의 原因은 대부분 estrogen의 缺乏으로 오는 骨量 減少에 起因하며<sup>8,9,43,49,61,83,92</sup>, estrogen의 投與로 骨多孔症을 豫防하거나 回復할 수 있다고 알려져 있다<sup>43,100</sup>. 閉經期 estrogen의 缺乏은 interleukin-6(IL-6)를 媒介로 gp130의 발현을 誘導하여 破骨細胞의 發生을 刺戟하게 되고<sup>48</sup>, 酸性 條件이 초래되면 cathepsin L 및 cathepsin K의 活性化가 促進되어 결국에 骨 組織의 collagen과  $Ca^{2+}$ 의 結合이 分解되면서 骨吸收를 增加시켜 閉經期性 骨多孔症이 發生하게 된다<sup>27,74</sup>.

韓醫學 文獻에는 骨多孔症이란 病名은 없으나 骨의 柔弱狀態를 표현하는 骨痿, 骨枯, 骨極, 骨痺, 髓減 등의 範疇에 속한다고 할 수 있다<sup>9</sup>. 또한 黃帝內經<sup>17</sup>에서 “腎主骨”, “肝主筋”의 理論이 提示된 이후 腎精이 充實하면 骨髓가 充實하여져 骨格이 堅實하여지며, 腎精이 不足하면 骨髓의 化源이 不足하여져 骨格을 충분히 滋養하지 못하면 骨이 萎弱하게 된다고 認識하였다. 筋은 骨格을 維持시키는데 肝의 精血이 虧少하거나 肝氣가 不舒하면 筋을 濡養할 수 없으므로 筋의 運動力이 減少하게 되고 심하면 屈伸을 할 수 없어서 骨이 萎弱하게 된다고 보았으며<sup>5</sup>, 腎은 主骨하고 肝은 主筋하는데 陰虛火動하면 筋骨이 所養을 잃으므로 腰膝痠軟證이 나타난다<sup>11</sup>고 하였는바, 이로 볼 때 骨多孔症은 腎, 肝과 관계가 있으며, 특히 腎과 밀접한 관계가 있을 것으로 생각된다.

腎, 肝과 관련된 骨多孔症의 實驗的 研究로는 朴<sup>24</sup>은 右歸飲과 左歸飲이, 鄭<sup>39</sup>은 加味二仙湯이, 安<sup>33</sup>은 鹿茸藥鍼刺戟과 鹿茸經口投與가, 金<sup>18</sup>은 鹿茸 및 六味地黃湯 加 鹿茸이, 張<sup>37</sup>은 大營煎이 각각 卵巢를 摘出した 흰쥐의 骨多孔症 및 骨代謝에 미치는 影響을 報告한 바 있다.

한편 肝腎이 俱虛하여 風濕이 內攻하면 腰膝作痛하고 冷痺無力하여 屈伸不利한 證이 나타나는데<sup>11</sup> 이는 骨多孔症의 症狀과 매우 類似하며, 風濕痺痛證을 治療하기 위하여 木瓜, 牛膝, 杜

冲, 續斷, 狗脊 등의 藥劑가 다양하게 活用되고 있는 바 風濕이 骨多孔症과 相關關係가 있을 것으로 생각된다.

風濕과 관련된 骨多孔症의 實驗的 研究로는 金<sup>20)</sup>은 木瓜가, 冷<sup>21)</sup>은 牛膝이, 吳<sup>34)</sup>는 杜冲이, 崔<sup>42)</sup>는 續斷이, 沈<sup>29)</sup>은 狗脊이 각각 卵巢를 摘出した 흰쥐의 骨多孔症의 誘發抑制에 미치는 影響을 報告한 바 있으나, 이와 같은 祛風濕之劑의 骨多孔症에 미치는 影響에 관한 研究가 不足하였다고 思慮된다.

이에 著者는 腎陽虛의 代表的 處方인 八味丸<sup>16)</sup>에 牛膝, 杜冲, 五加皮를 加味한 加味八味地黄湯과 肝腎俱虛로 인한 風濕痺痛證에 活用되는 羌活續斷湯<sup>16)</sup>에 威靈仙, 木瓜, 陳皮, 貢砂仁, 玄胡索, 木香을 加味한 加味羌活續斷湯<sup>1)</sup>이 卵巢摘出로 誘發된 흰쥐의 骨多孔症에 미치는 影響을 豫防 및 治療效果로 구분하여 比較 檢討하고자 卵巢摘出 前後에 각각 加味八味地黄湯과 加味羌活續斷湯을 投與한 후 生化學的 指標로 骨組織내의 cathepsin L, cathepsin K의 酵素 活性度와 血清 중 calcium, calcitonin, osteocalcin, phosphorus 含量을, 免疫學的 指標로 血清 및 骨髓 중의 IL-6의 含量을, 組織學的으로 脛骨 骨幹端部の 骨 消失 狀態를, 免疫組織化學的 分析 方法으로 collagen IV, endothelial leukocyte adhesion molecule-1(ELAM-1)의 발현양상을, 免疫細胞化學的 分析 方法으로 Fos의 발현양상을 관찰한 바 유의한 結果를 얻었기에 이에 報告하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 材料

#### 1) 動物

實驗에 사용된 動物은 대한동물센터에서 분양 받은 체중 200±10g의 Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐를 사용하였으며, 實驗期間 동안 마우스용 페레트형 固形壓縮飼料(三養食品社)와 물을 충분히 공급하면서 實驗室 環境에서 2주일간 適應시킨 후 實驗에 사용하였다. 飼育은 慶熙大學 校 韓醫科大學 動物 飼育室에서 40×25×17cm 크기의 飼育場에서 각각 6마리씩 飼育하였다.

#### 2) 藥材

實驗 藥材는 서울 경동시장에서 구입하여 精選한 후 사용하였다.

##### (1) 加味八味地黄湯(Kamipalmijihwangtang)

加味八味地黄湯은 許<sup>16)</sup>의 東醫寶鑑에 收載된 八味丸에 牛膝, 杜冲, 五加皮를 加한 處方으로 處方內容과 1貼 分量은 다음과 같다.

藥 物 名	生 藥 名(學名)	分 量(g)
熟 地 黃	Rehmanniae Radix (Rehmannia glutinosa Liboschitz)	16
山 藥	Dioscoreae Radix (Dioscorea japonica Thunb)	8
山 茱 萸	Corni Fructus (Cornus officinalis Sieb. et Zucc.)	8

藥物名	生藥名(學名)	分量(g)
白茯苓	Polia (Polia cocos (Schw.) Wolf)	6
牡丹皮	Moutan Cortex Radicis (Paeonia suffruticosa Andr.)	6
澤瀉	Alismatis Rhizoma (Alisma canaliculatum All. Br. et Bouche)	6
肉桂	Cinnamomi Cortex (Cinnamomum cassia Blume)	2
附子	Aconiti Tuber (Aconitum carmichaeli Debeaux)	2
五加皮	Acanthopanacis Cortex Radicis (Acanthopanax sessiliflorum (Ruprecht) Seemann)	16
牛膝	Achyranthis Radix (Achyranthes japonica (Miqel) Nakai)	8
杜仲	Eucommiae Cortex (Eucommia ulmoides Oliv)	8
Total amount		86

## (2) 加味羌活續斷湯(Kamigangwhalsokdintang)

加味羌活續斷湯은 許<sup>16)</sup>의 東醫寶鑑에 收載된 羌活續斷湯에 威靈仙, 木瓜, 陳皮, 貢砂仁, 玄胡索, 木香을 加한 處方<sup>1)</sup>으로 處方內容과 1貼 分量은 다음과 같다.

藥物名	生藥名(學名)	分量(g)
續斷	Phlomidis Radix (Phlomis umbrosa Turczaninow)	12
元杜仲	Eucommiae Cortex (Eucommia ulmoides Oliv)	8
羌活	Angelicae koreanae Radix (Angelica koreana Maximowicz)	6
元防風	Sileris Radix (Siler divaricatum Bentham et Hooker)	6
白芷	Angelicae Radix (Angelica daburia (Fisch.) Benth. et Hook.)	4
細辛	Asiasari Radix (Asiasarum heterotropides var. seoulense (Nakai) F. Maekwa)	4
牛膝	Achyranthis Radix (Achyranthes japonica (Miqel) Nakai)	4
秦艽	Gentianae Radix (Gentiana macropyla Pall.)	4
熟地黃	Rehmanniae Radix (Rehmannia glutinosa Liboschitz)	4
當歸	Angelicae gigantis Radix (Angelica gigas Nakai)	4
人參	Ginseng Radix (Panax ginseng C.A. Mey)	4

藥 物 名	生 藥 名(學名)	分 量(g)
白 芍 藥	Paeoniae Radix (Paeonia albiflora pallas var. trichocarpa Bunge.)	4
威 靈 仙	Clematidis Radix (Clematis mandshurica Masimowicz)	4
木 瓜	Chaenomelis Fructus (Chaenomeles sinensis Koehne)	4
陳 皮	Aurantii nobilis Pericarpium (Citrus nobilis Makino)	4
赤 茯 苓	Polia (Polia cocos (Schw.) Wolf)	3
貢 砂 仁	Amomi Semen (Amomum xanthioides (Jacq.) A. DC.)	3
唐 木 香	Helenii Radix (Saussurea lappa Clarke)	2
肉 桂	Cinnamomi Cortex (Cinnamomum cassia Blume)	2
川 芎	Cnidii Rhizoma (Cnidium officinale Makino)	2
玄 胡 索	Corydalis Tuber (Corydalis turtschaninovii Bess. var. genuina (Maximowicz) Nakai)	2
Total amount		94

## 2. 方法

### 1) 檢液 調製

加味八味地黄湯과 加味羌活續斷湯 20帖 分量을 각각 細切하여 round flask에 넣고 6,000ml의 증류수를 가한 후 냉각기를 부착하여 3시간 加熱 抽出한 다음 吸引 濾過한 濾液을 凍結乾燥하여 加味八味地黄湯 乾燥 엑기스 273g(收率 15.9%), 加味羌活續斷湯 乾燥 엑기스 267g(收率 14.2%)을 얻었으며 각각 182mg/ml, 178mg/ml의 濃度로 調整하여 사용하였다.

### 2) 實驗群 設定

實驗群은 흰쥐 6마리를 한 群으로 하여 Normal群, Control群, Sample A-1群, Sample B-1群, Sample A-2群, Sample B-2群으로 나누고 Normal群을 제외한 모든 實驗群은 卵巢를 摘出하였다. Sample A-1群 및 Sample B-1群은 卵巢摘出 1주일 전부터 1주간과 卵巢摘出 1주일 후부터 2 및 3주간 加味八味地黄湯 乾燥 엑기스 364mg/200g을, 加味羌活續斷湯 乾燥 엑기스 356mg/200g을, Sample A-2群 및 Sample B-2群은 卵巢摘出 1주일 후부터 2 및 3주간 加味八味地黄湯 乾燥 엑기스 364mg/200g을, 加味羌活續斷湯 乾燥 엑기스 356mg/200g을 1일 1회 經口投與하였으며 Normal群과 Control群에는 同量의 生理食鹽水를 經口投與하였다.

### 3) 骨多孔症 誘發

骨多孔症을 誘發하기 위하여 흰쥐에 ketamin hydrochloride(케타라, 유한양행)를 체중 200g 당 0.5ml를 腹腔내 주사하여 痲醉를 誘導한 후 腹腔을 切開하여 兩側 卵巢를 摘出<sup>5)</sup>하였고 手

術 후 抗生劑는 投與하지 않았다.

#### 4) 採血 및 血清分離

卵巢摘出 3주째와 4주째 흰쥐를 ether로 痲醉시킨 다음 心臟穿刺와 骨髓穿刺로 採血하였다. 心臟穿刺로 採血한 血液은 실온에서 약 30분간 방치한 후 3,000rpm에서 15분간, 骨髓穿刺로 採血한 血液은 실온에서 약 30분간 방치한 후 10,000rpm에서 5분간 遠心 分離하여 血清을 分離하였다.

#### 5) 生化學的 測定

##### (1) Cathepsin L 酵素 活性度 測定<sup>71,73)</sup>

骨 組織내 血清 중 cathepsin L 酵素 活性度を 測定하기 위하여 Barrett와 Kirschke의 方法을 變형한 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)법에 따라 기질로 benzyloxycarbonyl-phenylalanine-arginine-methyl coumarylamide(Z-Phe-Arg-MCA, Peptide Institute, Osaka, Japan)를 사용하였다. 骨 組織내 血清을 20 $\mu$ l을 취하여 96 microplate에 분주하고 여기에 기질을 0.02mM이 되게 dimethyl sulfoxide (DMSO, supercools easily)에 녹인 용액 250 $\mu$ l를 첨가한 다음 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 후 반응 정지액(8mM cysteine hydrochloride, 352mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 48mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4mM disodium EDTA, pH 5.5) 30 $\mu$ l를 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 반응정지 시킨 후 fluorimeter ELISA (Perkin-Elmer MPF-44B, C.A., USA)를 사용하여 흡광도 540/630nm에서 측정하였으며 酵素 活性도는 분당 MCA pM/ml( $\mu$ U/ml)의 생성량을 지표로 測定하였다.

##### (2) Cathepsin K 酵素 活性度 測定<sup>84,85)</sup>

骨 組織내 血清 중 cathepsin K 酵素 活性度を 測定하기 위하여 ELISA법에 따라 기질로써 benzyloxycarbonyl-leu-isin-arginine-4-methoxy-beta-naphthylamide(Z-Leu-Arg-MNA, Peptide Institute, Osaka, Japan)를 사용하였다. 骨 組織내 血清을 20 $\mu$ l을 취하여 96 microplate에 분주하고 기질을 0.02mM이 되게 DMSO에 녹인 용액 200 $\mu$ l를 첨가한 다음 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시킨 후 반응 정지액(50mM MES, 2mM EDTA, 4mM DTT, pH 5.5) 30 $\mu$ l를 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 반응정지 시킨 후 fluorimeter ELISA를 사용하여 흡광도 450/630nm에서 측정하였다.

#### 6) 免疫學的 血清 및 骨髓 중 IL-6 含量 測定<sup>59)</sup>

血清 및 骨髓 중 IL-6 含量을 測定하기 위하여 ELISA법에 따라 boitinylated polyclonal rat anti-mouse IL-6 antibody (Pharmingen, Serotec Ltd., U.K.)를 사용하였다. 血清 20 $\mu$ l를 10nM의 기질이 coated된 multititer plate에 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 10% fetal bovine serum(FBS)이 함유된 phosphated-buffed saline(PBS, pH 7.5) 100 $\mu$ l와 0.05% Tween 20 30 $\mu$ l를 첨가하여 blocking한 다음 결합하지 않은 항원은 세척하여 제거한 후 p-nitrophenylphosphatase(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 반응액 50 $\mu$ l를 첨가하여 반응시킨 후 반응 정지액으로 10nM diethanolamine 용액을 첨가한 후 ELISA reader (Hyperion, Promega, USA)를 사용하여 흡광도 405nm에서 測定하였다. Control群은 rat IL-6 표준용액을 첨가하였다.

#### 7) 組織學的 檢査<sup>52)</sup>

卵巢摘出 후 4주째 脛骨 骨幹端部에서 조직 절편을採取하여 탈회, 포매, 조직 염색 과정을 거

친 후 光學顯微鏡(Carl Zeiss LSM410, Germany)을 사용하여 骨小柱의 形態變化를 觀察하였다.

탈회과정은 길이 1.5mm 정도의 骨 組織 시료를 10% formalin용액에 24시간 저장하여 고정 한 다음 5% 질산용액에 5일간 탈회한 후 12시간 이상 흐르는 물로 수세하였다. 탈회하여 고정된 조직 절편을 75% 알코올에서 2시간, 95% 알코올에서 2시간씩 2회, 100% 알코올에서 2시간 처리하여 탈수과정을 거친 후 xylene으로 2시간 처리하여 투명과정을 거친 다음 파라핀을 2시간씩 2회에 걸쳐 반복 처리하는 침투과정을 통하여 각각 조직들을 파라핀 포매하여 block 을 만들었다. 파라핀 포매된 骨 組織의 염색과정은 표준 Hematoxylin & Eosin (H/E) 염색법에 따라 파라핀 포매된 조직을 Microtome을 이용하여 4~5 $\mu$ m로 절단한 후 유리 slide에 부착 시킨다. 파라핀을 제거하기 위하여 xylene에 1분씩 3회 통과시킨 다음 탈수된 조직을 함수시키기 위하여 100% 무수알코올에서 5분씩 2회, 95% 알코올에서 5분씩 2회 처리한 후 xylene에 1분씩 3회 처리한 다음 Canada Balsam을 유리 slide 위에 놓고 cover glass를 덮어 光學顯微鏡을 사용하여 관찰하였다.

#### 8) 免疫組織化學的 分析<sup>51)</sup>

骨 組織내 collagen IV와 ELAM-1의 발현양상을 分析하기 위하여 시약으로 avidine-biotin peroxidase complex(ABC) kit(Ultra Tek, Biotech. Co., USA)를, 1차 항체로 각각 rat anti-collagen IV antibody와 rat anti-(ELAM-1) antibody(Pharmingen, Serotec Ltd., U.K.)를 사용하였다.

組織學的 檢査와 동일한 과정을 거쳐 만들어진 파라핀 포매된 骨 組織을 유리 slide 위에서 xylene에 1시간 저장한 다음 100% 알코올에 30분간, 95% 알코올에 30분간, 75% 알코올에 30분간 담가 탈수과정을 거쳐 파라핀을 제거한 후 PBS에 10분간 담가 1차 항체를 표지하고, 표지 되지 않은 항체를 제거하기 위하여 2% bovine serum albumin(BSA)으로 blocking시킨 다음 PBS로 세척한 후 2차 항체인 anti-polyvalent antibody로 표지하고 Ultra Tek HRP으로 발색시켜 광학현미경을 사용하여 관찰하였다.

#### 9) 免疫細胞化學的 分析<sup>53)</sup>

骨 組織내 fos의 발현양상을 분석하기 위하여 시약으로 fluorescein isothiocyanate(FITC, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)를, 1차 항체로 각각 rat anti-Fos antibody(Pharmingen, Serotec Ltd., U.K.)를 사용하였다.

免疫組織化的 分析 方法과 동일하게 탈파라핀화 과정을 거친 다음 1차 항체를 1시간동안 표지하고, 표지 되지 않은 항체를 제거하기 위하여 2% BSA로 30분간 blocking시킨 다음 PBS로 10분간 세척한 후 2차 항체인 anti-rat conjugate FITC antibody를 1시간 동안 반응시켜 표지한 후 UV-light가 부착된 螢光顯微鏡(Carl Zeiss, LSM410, Germany)을 사용하여 관찰하였다.

#### 10) 其他 血清 成分의 含量 測定

##### (1) 血清 中 calcium 含量 測定<sup>3,96)</sup>

血清 中 calcium 含量은 Colorimetry법에 따라 calcium kit (Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 automatic chemistry analyzer(Hitachi 747, Tokyo, Japan)로 측정하였다.

##### (2) 血清 中 calcitonin 含量 測定<sup>63,97)</sup>

血清 中 calcitonin 含量은 Radioimmunoassay법에 따라 calcitonin kit(Brahams, Germany)를 사용하여  $\gamma$ -counter(Cobra II Quantum 5010, Packard, USA)로 측정하였다.

(3) 血清 중 osteocalcin 含量 測定<sup>90)</sup>

血清 중 osteocalcin 含量은 Radioimmunoassay법에 따라 osteocalcin kit(EuroDPC)를 사용하여 automatic chemistry analyzer로 측정하였다.

(4) 血清 중 phosphorus 含量 測定<sup>65,70)</sup>

血清 중 phosphorus 含量은 UV test 법에 따라 Inorganic phosphorus kit(Randox, Germany)를 사용하여  $\gamma$ -counter로 측정하였다.

### III. 結 果

#### 1. 生化學的 變化

##### 1) Cathepsin L 酵素 活性度 變化

흰쥐의 cathepsin L 酵素 活性도를 卵巢摘出 후 3 및 4주째에 測定한 結果 Normal群, Control群, Sample A-1群, Sample B-1群, Sample A-2群 및 Sample B-2群은 각각 3주 째에서는  $12.8 \pm 0.8$ ,  $33.3 \pm 0.8$ ,  $13.7 \pm 0.5$ ,  $13.2 \pm 0.8$ ,  $17.2 \pm 0.8$  및  $13.8 \pm 0.4 \mu\text{U/ml}$ 이었고, 4주 째에서는  $9.5 \pm 1.1$ ,  $29.8 \pm 0.8$ ,  $12.0 \pm 0.6$ ,  $11.2 \pm 0.4$ ,  $16.0 \pm 0.6$  및  $11.3 \pm 0.5 \mu\text{U/ml}$ 로 모든 實驗群은 유의성 있게 酵素活性을 抑制하였다.

3 및 4주째 모두 Sample A-1群, Sample B-1群 및 Sample B-2群은 Sample A-2群에 비하여 酵素活性 抑制效果가 양호하였다(Table 1).

Table 1. Effects of Kamipalmijiwhangtang(加味八味地黃湯) and Kamigangwhalsokdintang(加味羌活續斷湯) on Cathepsin L Activity in Serum of Ovariectomized Rats

Group	No. of animals	Dose (mg/200g p.o.)	Cathepsin L Activity ( $\mu\text{U/ml}$ )			
			3		4 (weeks)	
Normal	6	-	$12.8 \pm 0.8^a)$	C <sup>b)</sup>	$9.5 \pm 1.1$	D
Control	6	-	$33.3 \pm 0.8$	A	$29.8 \pm 0.8$	A
Sample A-1	6	364	$13.7 \pm 0.6$	C	$12.0 \pm 0.6^{***}$	C
Sample B-1	6	356	$13.2 \pm 0.8$	C	$11.2 \pm 0.4^{***}$	C
Sample A-2	6	364	$17.2 \pm 0.8$	B	$16.0 \pm 0.6$	B
Sample B-2	6	356	$13.8 \pm 0.4$	C	$11.3 \pm 0.5^{****}$	C
F-Value			821.14		716.06	
Pr > F			0.0001		0.0001	

Normal : Treated with saline.

Control : Treated with saline after ovariectomy(OVX).

Sample A-1 : Treated with Kamipalmijiwhangtang from 1 week before OVX to OVX and from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

Sample B-1 : Treated with Kamigangwhalsokdintang from 1 week before OVX to OVX and



from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

Sample A-2 : Treated with Kamipalmijiwhangtang from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

Sample B-2 : Treated with Treated with Kamigangwhalsokdintang from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

a) : Mean  $\pm$  Std. Dev.

b) : Means with the same letter are not significantly different at  $\alpha=0.05$  by Tukey's Studentized Range (HSD) Test.

\* : Statistically significant difference between 3 weeks and 4 weeks by T-test (\* :  $p<0.05$ ,

\*\*\* :  $p<0.001$ , \*\*\*\* :  $p<0.0001$ ).

2) Cathepsin K 酵素 活性도 變化

흰쥐의 cathepsin K 酵素 活性도를 卵巢摘出 후 3 및 4주째에 測定한 結果 Normal群, Control群, Sample A-1群, Sample B-1群, Sample A-2群 및 Sample B-2群은 각각 3주째에서는  $5.0\pm 0.6$ ,  $35.0\pm 0.6$ ,  $13.3\pm 0.5$ ,  $5.7\pm 0.5$ ,  $7.7\pm 0.5$  및  $6.0\pm 0.6$ nM/min이었고, 4주 째에서는  $6.0\pm 0.6$ ,  $35.7\pm 0.5$ ,  $10.5\pm 0.6$ ,  $6.5\pm 0.6$ ,  $5.8\pm 0.4$  및  $7.5\pm 0.6$ nM/min로 모든 實驗群은 유의성 있게 酵素活性을 抑制하였다.

3주 째에서는 Sample B-1群 및 Sample B-2群이 가장 양호한 酵素活性 抑制效果가 인정되었으며, 다음으로 Sample A-2群이 Sample A-1群에 비하여 酵素活性 抑制效果가 양호하였다.

4주 째에서는 Sample B-1群 및 Sample A-2群이 가장 양호한 酵素活性 抑制效果가 인정되었으며, 다음으로 Sample B-2群이 Sample A-1群에 비하여 酵素活性 抑制效果가 양호하였다 (Table II).

Table II. Effects of Kamipalmijiwhangtang(加味八味地黃湯) and Kamigangwhalsokdintang(加味羌活續斷湯) on Cathepsin K Activity in Serum of Ovariectomized Rats

Group	No. of animals	Dose [mg/200g p.o.]	Cathepsin K Activity ( $\mu$ U/ml)			
			3		4 (weeks)	
Normal	6	-	$5.0\pm 0.6^a)$	D <sup>b)</sup>	$6.0\pm 0.6$	D
Control	6	-	$35.0\pm 0.6$	A	$35.7\pm 0.5$	A
Sample A-1	6	364	$13.3\pm 0.5$	B	$10.5\pm 0.6^{****}$	B
Sample B-1	6	356	$5.7\pm 0.5$	D	$6.5\pm 0.6$	D
Sample A-2	6	364	$7.7\pm 0.5$	C	$5.8\pm 0.4^{****}$	D
Sample B-2	6	356	$6.0\pm 0.6$	D	$7.5\pm 0.6$	C
F-Value			2428.53		2853.23	
Pr > F			0.0001		0.0001	

Normal : Treated with saline.

Control : Treated with saline after ovariectomy(OVX).

Sample A-1 : Treated with Kamipalmijiwhangtang from 1 week before OVX to OVX and from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

Sample B-1 : Treated with Kamigangwhalsokdintang from 1 week before OVX to OVX and from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

Sample A-2 : Treated with Kamipalmijiwhangtang from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

Sample B-2 : Treated with Treated with Kamigangwhalsokdintang from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

a) : Mean  $\pm$  Std. Dev.

b) : Means with the same letter are not significantly different at  $\alpha=0.05$  by Tukey's Studentized Range (HSD) Test.

\* : Statistically significant difference between 3 weeks and 4 weeks by T-test (\* :  $p<0.05$ , \*\* :  $p<0.01$ , \*\*\*\* :  $p<0.0001$ ).

## 2. 免疫學的 變化

### 1) 血清 중 IL-6 含量 變化

원위의 血清 중 IL-6 含量을 卵巢摘出 후 3 및 4주째에 測定한 結果 Normal群, Control群, Sample A-1群, Sample B-1群, Sample A-2群 및 Sample B-2群은 각각 3주 째에서는  $48.8\pm 0.8$ ,  $233.5\pm 13.4$ ,  $47.5\pm 0.8$ ,  $37.3\pm 1.5$ ,  $49.2\pm 1.7$  및  $37.2\pm 0.8$  pg/ml 이었고, 4주 째에서는  $48.7\pm 1.0$ ,  $236.5\pm 9.5$ ,  $47.5\pm 1.1$ ,  $37.2\pm 0.8$ ,  $49.8\pm 0.8$  및  $44.0\pm 0.6$  pg/ml 로 모든 實驗群은 유의성 있게 IL-6 含量을 減少시켰다.

3주 째에서는 Sample B-1群 및 Sample B-2群이 Sample A-1群 및 Sample A-2群에 비하여 IL-6 含量 減少效果가 양호하였다.

4주 째에서는 Sample B-1群이 가장 양호한 IL-6 含量 減少效果가 인정되었으며, 다음으로 Sample B-2群이 Sample A-1群 및 Sample A-2群에 비하여 IL-6 含量 減少效果가 양호하였다 (Table III).

Table III. Effects of Kamipalmijiwhangtang(加味八味地黃湯) and Kamigangwhalsokdintang(加味羌活續斷湯) on IL-6 in Serum of Ovariectomized Rats

Group	No. of animals	Dose [mg/200g p.o.]	IL-6 in Serum (pg/ml)			
			3		4 (weeks)	
Normal	6	-	$48.8\pm 0.8^{a)}$	B <sup>b)</sup>	$48.7\pm 1.0$	B
Control	6	-	$233.5\pm 13.4$	A	$236.5\pm 9.5$	A
Sample A-1	6	364	$47.5\pm 0.8$	B	$47.5\pm 1.1$	B
Sample B-1	6	356	$37.3\pm 1.5$	C	$37.2\pm 0.8$	C
Sample A-2	6	364	$49.2\pm 1.7$	B	$49.8\pm 0.8$	B
Sample B-2	6	356	$37.2\pm 0.8^{****}$	C	$44.0\pm 0.6$	C B
F-Value			1160.80		2348.20	
Pr > F			0.0001		0.0001	

Normal : Treated with saline.

Control : Treated with saline after ovariectomy(OVX).

Sample A-1 : Treated with Kamipalmijiwhangtang from 1 week before OVX to OVX and from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

Sample B-1 : Treated with Kamigangwhalsokdantang from 1 week before OVX to OVX and from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

Sample A-2 : Treated with Kamipalmijiwhangtang from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

Sample B-2 : Treated with Treated with Kamigangwhalsokdantang from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

a) : Mean  $\pm$  Std. Dev.

b) : Means with the same letter are not significantly different at  $\alpha=0.05$  by Tukey's Studentized Range (HSD) Test.

\* : Statistically significant difference between 3 weeks and 4 weeks by T-test (\*\*\*\* :  $p<0.0001$ ).

2) 骨髓 중 IL-6 含量 變化

흰쥐의 骨髓 중 IL-6 含量을 卵巢摘出 후 3 및 4주 째에 測定한 結果 Normal群, Control群, Sample A-1群, Sample B-1群, Sample A-2群 및 Sample B-2群은 각각 3주 째에서는  $44.5 \pm 1.5$ ,  $776.5 \pm 13.5$ ,  $124.7 \pm 15.1$ ,  $58.8 \pm 10.3$ ,  $102.7 \pm 4.3$  및  $72.3 \pm 3.1$  pg/ml 이었고, 4주 째에서는  $52.7 \pm 9.2$ ,  $742.8 \pm 6.3$ ,  $116.3 \pm 2.1$ ,  $56.2 \pm 4.9$ ,  $100.7 \pm 1.4$  및  $69.7 \pm 1.6$  pg/ml 로 모든 實驗群은 유의성 있게 IL-6 含量을 減少시켰다.

3 및 4주 째 모두 Sample B-1群, Sample B-2群, Sample A-2群, Sample A-1群 順으로 IL-6 含量 減少效果가 양호하였다(Table IV).

Table IV. Effects of Kamipalmijiwhangtang(加味八味地黃湯) and Kamigangwhalsokdantang(加味羌活續斷湯) on IL-6 in Bone Marrow of Ovariectomized Rats

Group	No. of animals	Dose [mg/200g] p.o. $\ddagger$	IL-6 in Bone Marrow (pg/ml)			
			3		4 (weeks)	
Normal	6	-	$44.5 \pm 1.5^a)$	E <sup>b)</sup>	$52.7 \pm 9.2$	E
Control	6	-	$776.5 \pm 13.5$	A	$742.8 \pm 6.3$	A
Sample A-1	6	364	$124.7 \pm 15.1$	B	$116.3 \pm 2.1$	B
Sample B-1	6	356	$58.8 \pm 10.3$	D E	$56.2 \pm 4.9^{****}$	E
Sample A-2	6	364	$102.7 \pm 4.3$	C	$100.7 \pm 1.4$	C
Sample B-2	6	356	$72.3 \pm 3.1$	D	$69.7 \pm 1.6$	D
F-Value			5,382.36		17,024.52	
Pr > F			0.0001		0.0001	

Normal : Treated with saline.

Control : Treated with saline after ovariectomy(OVX).

Sample A-1 : Treated with Kamipalmijiwhangtang from 1 week before OVX to OVX and from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

Sample B-1 : Treated with Kamigangwhalsokdintang from 1 week before OVX to OVX and from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

Sample A-2 : Treated with Kamipalmijiwhangtang from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

Sample B-2 : Treated with Treated with Kamigangwhalsokdintang from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

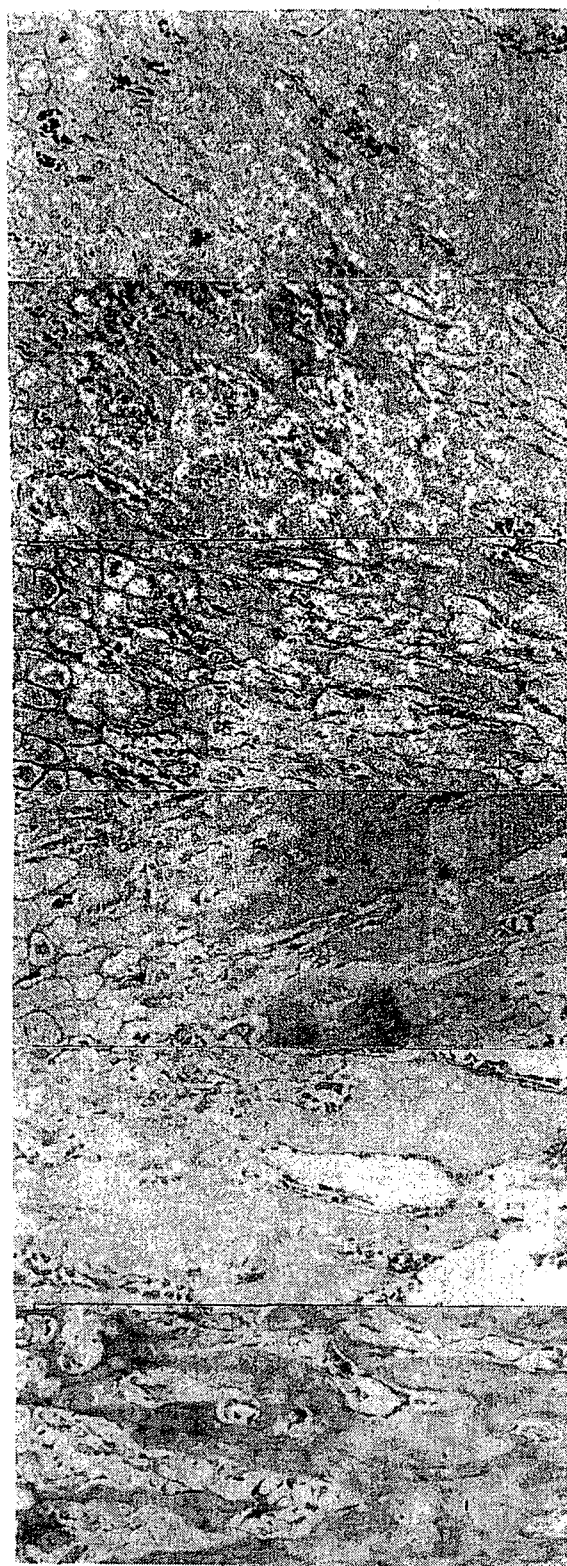
a) : Mean  $\pm$  Std. Dev.

b) : Means with the same letter are not significantly different at  $\alpha=0.05$  by Tukey's Studentized Range (HSD) Test.

\* : Statistically significant difference between 3 weeks and 4 weeks by T-test (\*\*\*\* :  $p<0.0001$ ).

### 3. 組織學的 變化

骨小柱의 組織學的 形態變化를 알아보기 위하여 卵巢摘出 후 4주째 脛骨 骨幹端部の 骨基質內 骨小柱의 양상을 H/E 염색법으로 관찰한 바, Normal群의 骨 組織에서는 성장판을 기점으로 骨基質內 骨小柱가 골고루 분포되어 있었고 Control群에서는 骨小柱가 가늘어지거나 消失되어 骨小柱間 연결부분이 끊어진 곳이 많은데 비하여 모든 實驗群에서는 Control群의 骨小柱 消失 양상과는 달리 약간 骨小柱가 가늘어진 정도로 비교적 Normal群과 類似的 組織學的 形態를 나타내었으며, 그 중 Sample B-1群 및 Sample B-2群이 가장 Normal群과 유사한 組織學的 形態를 보였다(Fig. 1).



Normal                      Control                      Sample A-1                      Sample B-1                      Sample A-2                      Sample B-2

Fig. 1. Histological changes of the proximal tibia of rats on 4 weeks after ovariectomy(OVX). H/E staining( $\times 200$ ).

Normal : Treated with saline.

Control : Treated with saline after OVX.

Sample A-1 : Treated with *Kamipalmitujuhangtang* from 1 week before OVX and from 1 week after OVX to 4 weeks after OVX.

Sample B-1 : Treated with *Kamigangwhalsokdantang* from 1 week before OVX and from 1 week after OVX to 4 weeks after OVX.

Sample A-2 : Treated with *Kamipalmitujuhangtang* from 1 week after OVX to 4 weeks after OVX.

Sample B-2 : Treated with *Kamigangwhalsokdantang* from 1 week after OVX to 4 weeks after OVX.

#### 4. 免疫組織化學的變化

##### 1) ELAM-1 발현양상에 대한 免疫組織化學的變化

免疫血清學的으로 骨 組織내 炎症反應에 自家免疫으로 活性化되는 ELAM-1의 발현양상을 分析하기 위하여 卵巢摘出후 4주째 脛骨 骨幹端部를 免疫組織化學的 分析 方法으로 관찰한 結果 Normal群의 骨 組織에서는 거의 갈색 양성반응이 없었고, Control群에서는 강한 갈색 양성반응을 보이는 부위가 넓게 분포하고 있는데 비하여 Sample A-2群에서는 갈색 양성반응이 다소 減少되었고, Sample B-2群에서는 갈색 양성반응이 현저하게 減少되는 양상을 나타내었다 (Fig. 2).

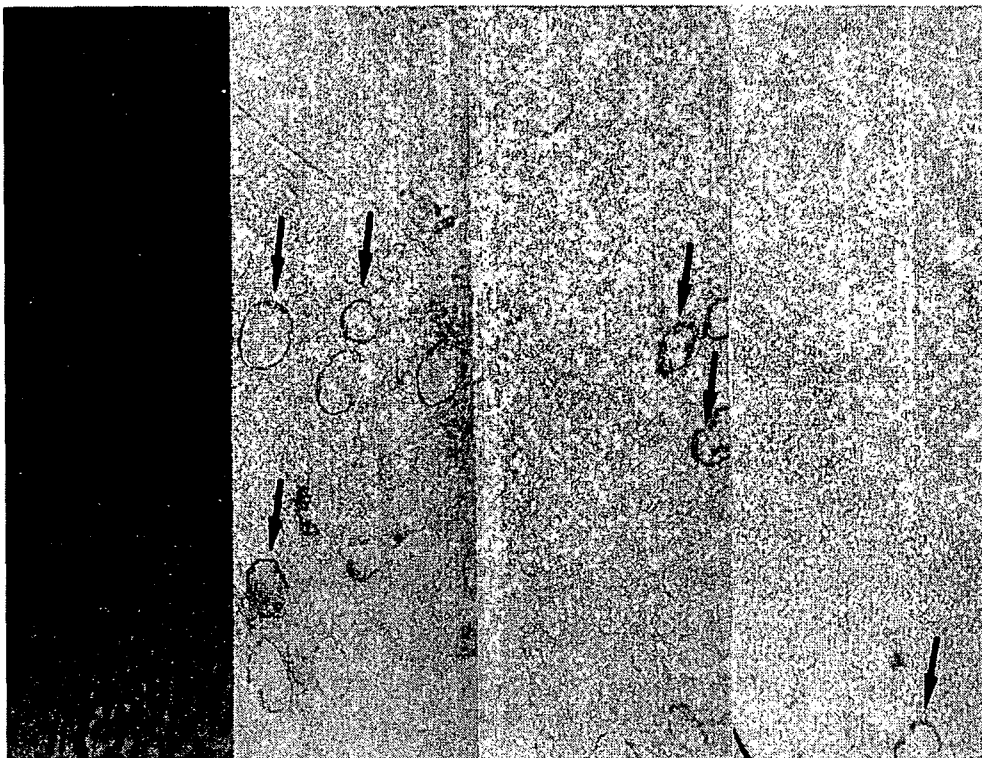


Fig. 2. Immunohistochemistry analysis of ELAM-1 expression in the proximal tibia of rats on 4 weeks after OVX. ABC staining( $\times 200$ )

Normal : Treated with saline.

Control : Treated with saline after OVX.

Sample A-2 : Treated with Kamipalmijiwhangtang(加味八味地黄湯) from 1 week after OVX to 4 weeks after OVX.

Sample B-2 : Treated with Kamigangwhalsokdantang(加味羌活續斷湯) from 1 week after OVX to 4 weeks after OVX.

##### 2) Collagen IV 발현양상에 대한 免疫組織化學的變化

骨 組織내에서 破骨細胞의 활성화에 관여하는 collagen IV의 발현양상을 分析하기 위하여 卵巢摘出 后 4주째 脛骨 骨幹端部를 免疫組織化學的 分析 方法으로 관찰한 바, Normal群의 骨 組織에서는 collagen IV의 갈색 양성반응이 거의 없었고, Control群에서는 강한 갈색 양성

반응이 많이 나타난대 비하여 Sample A-2群에서는 갈색 양성반응이 다소 減少되었고, Sample B-2群에서는 갈색 양성반응이 현저하게 減少된 것으로 관찰되었다(Fig. 3).

Normal                  Control                  Sample A-2                  Sample B-2

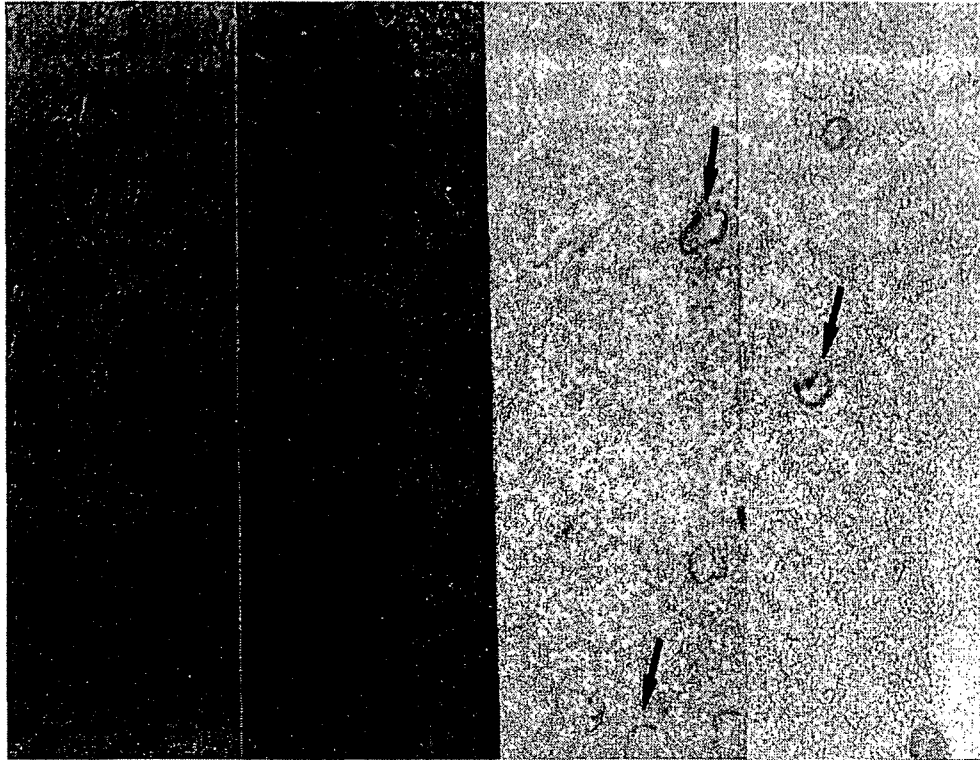


Fig. 3. Immunohistochemistry analysis of collagen IV expression in the proximal tibia of rats on 4 weeks after OVX. ABC staining( $\times 200$ ).

Normal : Treated with saline.

Control : Treated with saline after OVX.

Sample A-2 : Treated with Kamipalmijiwhangtang(加味八味地黄湯) from 1 week after OVX to 4 weeks after OVX.

Sample B-2 : Treated with Treated with Kamigangwhalsokdantang(加味羌活續斷湯) from 1 week after OVX to 4 weeks after OVX.

### 5. Fos 발현양상에 대한 免疫細胞化學的 變化

骨多孔症의 誘發 因子 중에서 하나의 maker로 인정되고 있는 Fos의 발현양상을 分析하기 위하여 卵巢摘出 4주째 脛骨 骨幹端部를 免疫細胞化學的 分析 方法으로 관찰한 結果 Normal 群에서는 Fos에 대한 녹색의 양성 반응은 없었고, Control 群에서는 강한 녹색의 양성 반응이 많이 관찰되어진데 비하여 모든 實驗群에서는 녹색의 양성 반응이 消失되는 경향을 보였으며, Sample B-1群과 Sample B-2群은 Sample A-1群과 Sample A-2群에 비하여 Fos의 발현양상이 減少되는 경향을 보였다(Fig. 4).

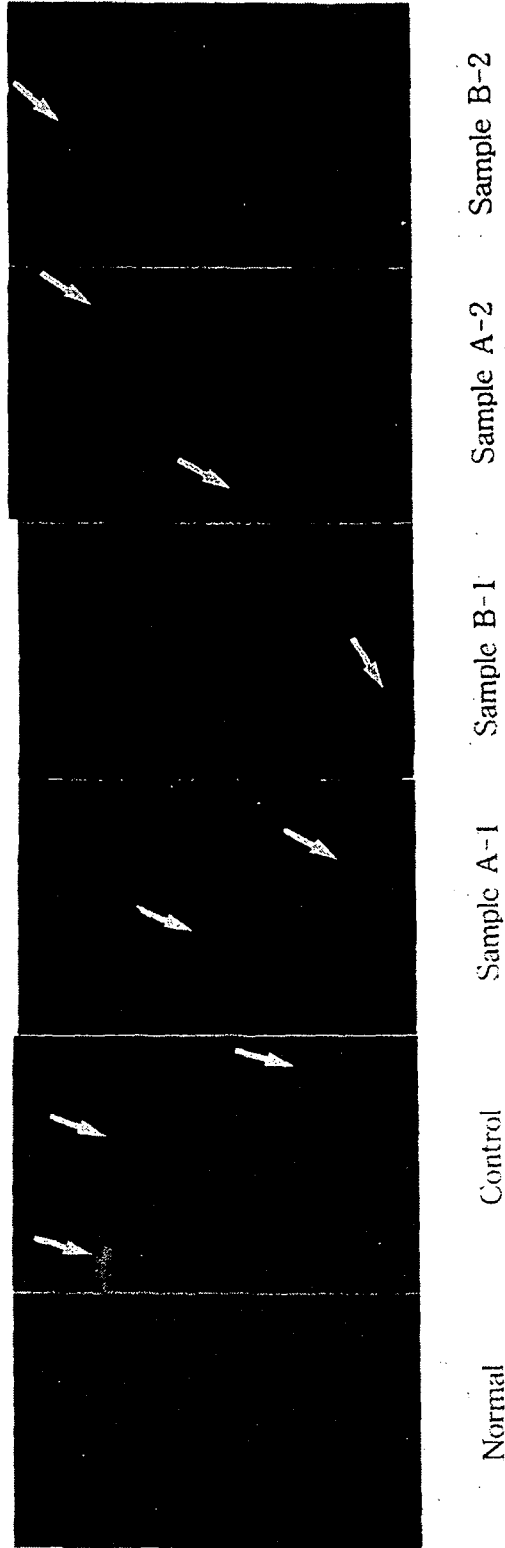


Fig. 4. Immunocytochemistry analysis of Ios expression in the proximal tibia of rats on 4 weeks after ovariectomy(OVX).

FFTC staining( $\times 200$ ).

Normal : Treated with saline.

Control : Treated with saline after OVX.

Sample A-1 : Treated with *Kamipalmijiuhangtang*(加味八味地黃湯) from 1 week before OVX to OVX and from 1 week after OVX

X to 4 weeks after OVX.

Sample B-1 : Treated with *Kamigangwalsokdantang*(加味羌活斷腸湯) from 1 week before OVX to OVX and from 1 week after OVX to

4 weeks after OVX.

Sample A-2 : Treated with *Kamipalmijiuhangtang* from 1 week after OVX to 4 weeks after OVX.

Sample B-2 : Treated with *Kamigangwalsokdantang* from 1 week after OVX to 4 weeks after OVX.



6. 기타 血清 成分의 含量 變化

1) 血清 중 calcium 含量 變化

血清 중 calcium 含量을 卵巢摘出 후 3 및 4주 째에 測定한 結果 Normal群, Control群, Sample A-1群, Sample B-1群, Sample A-2群 및 Sample B-2群은 각각 3주 째에서는  $13.2 \pm 1.2$ ,  $11.2 \pm 0.5$ ,  $10.7 \pm 0.3$ ,  $11.0 \pm 1.2$ ,  $13.1 \pm 1.7$  및  $11.8 \pm 0.8$ mg/dl 이었고, 4주 째에서는  $11.4 \pm 0.6$ ,  $10.3 \pm 0.5$ ,  $11.1 \pm 0.9$ ,  $11.5 \pm 1.0$ ,  $11.5 \pm 1.0$  및  $12.8 \pm 1.7$ mg/dl로 3주 째에서는 Sample A-2群이 가장 양호한 血清 중 calcium 含量의 增加가 認定되었고, 다음으로 Sample B-2群이 유의한 增加를 보였으며, Sample A-1群, Sample B-1群은 유의성이 없었다. 4주 째에서는 모든 實驗群이 유의성 있게 血清 중 calcium 含量을 增加 시켰으며, 그중 Sample B-2群이 가장 양호한 增加를 보였다(Table V).

2) 血清 중 calcitonin 含量 變化

血清 중 calcitonin 含量을 卵巢摘出 후 3 및 4주 째에 測定한 結果 Normal群, Control群, Sample A-1群, Sample B-1群, Sample A-2群 및 Sample B-2群은 각각 3주 째에서는  $34.7 \pm 5.7$ ,  $25.8 \pm 2.8$ ,  $35.8 \pm 6.4$ ,  $29.5 \pm 1.4$ ,  $27.5 \pm 5.5$  및  $24.3 \pm 6.8$ pg/ml 이었고, 4주 째에서는  $48.5 \pm 8.2$ ,  $28.1 \pm 4.4$ ,  $33.9 \pm 8.3$ ,  $32.5 \pm 5.4$ ,  $30.3 \pm 3.6$  및  $29.3 \pm 8.6$ pg/ml로 3주 째에서는 Sample A-1群이 가장 양호한 血清 중 calcitonin 含量의 增加가 認定되었고, 다음으로 Sample B-1群, Sample A-2群이 유의한 增加를 보였으며, Sample B-2群은 유의성이 없었다.

Table V. Effects of Kamipalmijiwhangtang(加味八味地黃湯) and Kamigangwhalsokdantang(加味羌活續斷湯) on Calcium in Serum of Ovariectomized Rats

Group	No. of animals	Dose (mg/200g p.o.)	Calcium in Serum (ng/dl)			
			3		4 (weeks)	
Normal	6	-	$13.2 \pm 1.2^{a)}$	A <sup>d)</sup>	$11.4 \pm 0.6$	BA
Control	6	-	$11.2 \pm 0.5$	B	$10.3 \pm 0.5$	B
Sample A-1	6	364	$10.7 \pm 0.3$	B	$11.1 \pm 0.9$	BA
Sample B-1	6	356	$11.0 \pm 1.2$	B	$11.5 \pm 1.0$	BA
Sample A-2	6	364	$13.1 \pm 1.7$	A	$11.5 \pm 1.0$	BA
Sample B-2	6	356	$11.8 \pm 0.8$	BA	$12.8 \pm 1.7$	A
F-Value			6.37		3.52	
Pr > F			0.0004		0.0091	

Normal : Treated with saline.

Control : Treated with saline after ovariectomy(OVX).

Sample A-1 : Treated with Kamipalmijiwhangtang from 1 week before OVX to OVX and from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

Sample B-1 : Treated with Kamigangwhalsokdantang from 1 week before OVX to OVX and from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

Sample A-2 : Treated with Kamipalmijiwhangtang from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks

after OVX.

ample B-2 : Treated with Treated with Kamigangwhalsokdintang from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

a) : Mean  $\pm$  Std. Dev.

b) : Means with the same letter are not significantly different at  $\alpha=0.05$  by Tukey's Studentized Range (HSD) Test.

\* : Statistically significant difference between 3 weeks and 4 weeks by T-test (\* :  $p<0.05$ ).

Table VI. Effects of Kamipalmijiwhangtang(加味八味地黃湯) and Kamigangwhalsokdintang(加味羌活續斷湯) on Calcitonin in Serum of Ovariectomized Rats

Group	No. of animals	Dose (mg/200g p.o.)	Calcitonin in Serum (pg/ml)			
			3		4 (weeks)	
Normal	6	-	34.7 $\pm$ 5.7 <sup>a)</sup>	BA <sup>b)</sup>	48.5 $\pm$ 8.2	A
Control	6	-	25.8 $\pm$ 2.8	BC	28.1 $\pm$ 4.4	B
Sample A-1	6	364	35.8 $\pm$ 6.4	A	33.9 $\pm$ 8.3	B
Sample B-1	6	356	29.5 $\pm$ 1.4	BAC	32.5 $\pm$ 5.4	B
Sample A-2	6	364	27.5 $\pm$ 5.5	BAC	30.3 $\pm$ 3.6 <sup>**</sup>	B
Sample B-2	6	356	24.3 $\pm$ 6.8	C	29.3 $\pm$ 8.6	B
F-Value			5.04		7.42	
Pr > F			0.0018		0.0002	

Normal : Treated with saline.

Control : Treated with saline after ovariectomy(OVX).

Sample A-1 : Treated with Kamipalmijiwhangtang from 1 week before OVX to OVX and from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

Sample B-1 : Treated with Kamigangwhalsokdintang from 1 week before OVX to OVX and from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

Sample A-2 : Treated with Kamipalmijiwhangtang from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

Sample B-2 : Treated with Treated with Kamigangwhalsokdintang from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

a) : Mean  $\pm$  Std. Dev.

b) : Means with the same letter are not significantly different at  $\alpha=0.05$  by Tukey's Studentized Range (HSD) Test.

\* : Statistically significant difference between 3 weeks and 4 weeks by T-test (\*\* :  $p<0.01$ ).

4주 째에서는 모든 實驗群이 血清 중 calcitonin 含量을 다소 增加시키는 경향은 있었으나 유의성은 認定되지 않았다(Table VI).

3) 血清 중 osteocalcin 含量 變化

血清 중 osteocalcin 含量을 卵巢摘出 후 3 및 4주 째에 測定한 結果 Normal群, Control群, Sample A-1群, Sample B-1群, Sample A-2群 및 Sample B-2群은 각각 3주 째에서는  $2.4 \pm 0.8$ ,  $2.9 \pm 0.5$ ,  $2.9 \pm 0.4$ ,  $2.3 \pm 0.4$ ,  $2.6 \pm 0.5$  및  $2.9 \pm 0.5 \text{ ng/ml}$  이었고, 4주 째에서는  $3.0 \pm 0.3$ ,  $2.7 \pm 0.5$ ,  $2.5 \pm 0.6$ ,  $1.9 \pm 0.5$ ,  $2.9 \pm 0.5$  및  $2.8 \pm 0.4 \text{ ng/ml}$ 로 3 및 4주째 모든 實驗群에서 osteocalcin 含量이 다소 減少되는 傾向은 보였으나 유의성은 認定되지 않았다(Table VII).

4) 血清 중 phosphorus 含量 變化

血清 중 phosphorus 含量을 卵巢摘出 후 3 및 4주 째에 測定한 結果 Normal群, Control群, Sample A-1群, Sample B-1群, Sample A-2群 및 Sample B-2群은 각각 3주 째에서는  $11.7 \pm 1.6$ ,  $10.7 \pm 1.2$ ,  $10.7 \pm 1.5$ ,  $10.0 \pm 0.9$ ,  $11.4 \pm 2.5$  및  $10.2 \pm 1.2 \text{ mg/dl}$  이었고, 4주 째에서는  $9.8 \pm 2.1$ ,  $8.2 \pm 0.5$ ,  $11.0 \pm 1.6$ ,  $10.9 \pm 2.2$ ,  $10.5 \pm 0.8$  및  $11.3 \pm 1.8 \text{ mg/dl}$ 로 3 및 4주째 모든 實驗群에서 phosphorus 含量은 增加되는 傾向은 보였으나 유의성이 認定되지 않았다(Table VIII).

Table VII. Effects of Kamipalmijiwhangtang(加味八味地黃湯) and Kamigangwhalsokdantang(加味羌活續斷湯) on Osteocalcin in Serum of Ovariectomized Rats

Group	No. of animals	Dose (mg/200g p.o.)	Osteocalcin in Serum (ng/ml)			
			3		4 (weeks)	
Normal	6	-	$2.4 \pm 0.8^a)$	A <sup>b)</sup>	$3.0 \pm 0.3$	A
Control	6	-	$2.9 \pm 0.5$	A	$2.7 \pm 0.5$	BA
Sample A-1	6	364	$2.9 \pm 0.4$	A	$2.5 \pm 0.6$	BA
Sample B-1	6	356	$2.3 \pm 0.4$	A	$1.9 \pm 0.5$	B
Sample A-2	6	364	$2.6 \pm 0.5$	A	$2.9 \pm 0.5$	A
Sample B-2	6	356	$2.9 \pm 0.5$	A	$2.8 \pm 0.4$	BA
F-Value			1.67		3.89	
Pr > F			0.17		0.0078	

Normal : Treated with saline.

Control : Treated with saline after ovariectomy(OVX).

Sample A-1 : Treated with Kamipalmijiwhangtang from 1 week before OVX to OVX and from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

Sample B-1 : Treated with Kamigangwhalsokdantang from 1 week before OVX to OVX and from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

Sample A-2 : Treated with Kamipalmijiwhangtang from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

Sample B-2 : Treated with Treated with Kamigangwhalsokdantang from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

a) : Mean  $\pm$  Std. Dev.

b) : Means with the same letter are not significantly different at  $\alpha=0.05$  by Tukey's Studentized Range (HSD) Test.

Table VIII. Effects of Kamipalmijiwhangtang(加味八味地黃湯) and Kamigangwhalsokdantang(加味羌活續斷湯) on Inorganic Phosphorus in Serum of Ovariectomized Rats

Group	No. of animals	Dose (mg/200g p.o.)	Inorganic Phosphorus in Serum (mg/dl)			
			3		4	(weeks)
Normal	6	-	11.7±1.6 <sup>a)</sup>	A <sup>b)</sup>	9.8±2.1	BA
Control	6	-	10.7±1.2	A	8.2±0.5	B
Sample A-1	6	364	10.7±1.5	A	11.0±1.6	A
Sample B-1	6	356	10.0±0.9	A	10.9±2.2	BA
Sample A-2	6	364	11.4±2.5	A	10.5±0.8	BA
Sample B-2	6	356	10.2±1.2	A	11.3±1.8	A
F-Value			1.16		3.13	
Pr > F			0.3523		0.0217	

Normal : Treated with saline.

Control : Treated with saline after ovariectomy(OVX).

Sample A-1 : Treated with Kamipalmijiwhangtang from 1 week before OVX to OVX and from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

Sample B-1 : Treated with Kamigangwhalsokdantang from 1 week before OVX to OVX and from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

Sample A-2 : Treated with Kamipalmijiwhangtang from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

Sample B-2 : Treated with Treated with Kamigangwhalsokdantang from 1 week after OVX to 3, or 4 weeks after OVX.

a) : Mean ± Std. Dev.

b) : Means with the same letter are not significantly different at  $\alpha=0.05$  by Tukey's Studentized Range (HSD) Test.

\* : Statistically significant difference between 3 weeks and 4 weeks by T-test (\* :  $p<0.0001$ ).

#### IV. 考 察

骨多孔症은 뼈의 化學的 組成에는 變化가 없이 單位容積當 骨質量의 全般的인 減少를 일으켜 骨이 脆弱하여지는 疾患으로써<sup>4,8,16,23,40,75,86</sup> Albright<sup>56)</sup>가 骨量의 減少라고 定義한 이래 많은 研究가 이루어졌으며, Johnston과 Epstein<sup>38,75)</sup>은 骨量의 減少로 경미한 外傷에 의하여서도 骨折이 誘發되는 상태로, Lane과 Vigorita<sup>38,80)</sup>는 骨量의 減少로 放射線 所見上 骨減少가 있고 臨

床的으로는 骨折을 誘發하는 상태라고 定義한 바 있다.

骨은 살아있는 組織에 의하여 만들어진 것이며 꾸준히 再生되어지는 것이다. 骨이 再生되어지는 過程은 形成과 吸收라는 두 가지 단계로 이루어지는데 吸收 過程에 의하여 오래된 뼈는 分解되고 이렇게 分解된 뼈는 다시 形成 過程을 거쳐서 새로운 뼈로 代替되는 것이다<sup>89)</sup>. 일반적으로 사람의 骨 成長은 20세가 지나면 骨 成長板이 閉鎖되면서 길이 成長은 멈추고 骨膜으로부터 骨附加 現象에 의하여 두께 成長만이 계속된다. 이때부터 骨이 일정한 모양과 骨량을 유지하려면 造骨細胞의 骨形成과 破骨細胞의 骨吸收 現象이 동일한 정도로 일어나야 한다. 그런데 年齡이 增加함에 따라 25~35세의 骨質量 最大時期를 지나면 35세부터 吸收되는 骨량에 비하여 새로이 形成되는 骨량이 不足하여지게 되고, 특히 여성에서는 閉經 후 첫 4~5년 동안 造骨細胞 機能은 低下되고 破骨細胞 機能이 활발하여져 骨吸收가 한층 더 加速된다. 이러한 현상은 閉經 외에도 卵巢摘出, 視床下部 疾患, 腦下垂體 疾患 등 estrogen 缺乏이 오는 어떠한 경우에도 초래될 수 있다<sup>9,25,35,49,86,94)</sup>.

骨多孔症은 原因에 따라 先天性和 後天적으로 大別되며 先天性은 年少期性, 特發性, 閉經期性 및 老人性으로 분류되고 後天性은 副甲狀腺 機能亢進症, 副腎皮質 機能低下症, 甲狀腺 機能亢進症, 先端巨大症, 해파린 治療, 長期間의 寢床安定 및 石膏繃帶 固定, 宇宙旅行 등을 비롯하여 여러 가지 慢性疾患의 合併症으로 發生된다<sup>49)</sup>. 骨多孔症 중에서 특히 退行性 骨多孔症은 주로 中年期 이후에 發病하며, 이는 다시 50~60세 사이의 閉經期 後 여성에게 빈번히 發生하는 閉經期性 骨多孔症과 60~70세 사이 남녀 모두에게 發生하는 老人性 骨多孔症으로 나눌 수 있다. 특히 閉經期性 骨多孔症은 대부분 estrogen의 缺乏으로 인한 骨量 減少에 기인한다<sup>57)</sup>. 少量의 骨量 減少는 45세 이후의 여자와 50~60세 이후의 남녀 모두에게서 불가피하게 發生되는 生理的 現象으로 이 경우에 있어서는 骨多孔症의 原因이 정확히 밝혀지지 않은 상태이다<sup>4,9,86)</sup>.

骨多孔症의 原因으로 Mazess<sup>86)</sup>와 Lindsay 등<sup>82)</sup>은 閉經 後 estrogen의 缺乏이 주원인이라고 주장하였고 Riggs와 Melton<sup>92)</sup>, Riggs와 Wahner<sup>93)</sup>는 閉經 前부터 脊椎의 骨密度的 減少가 있음을 관찰하여 estrogen 외에도 다른 요인이 있을 것이라고 주장하였으며 현재까지 骨多孔症의 原因으로 破骨細胞의 活性化, IL-1, IL-6, cathepsin L, cathepsin K, tumor necrosis factor alpha(TNF- $\alpha$ ), TGF- $\beta$ , type I collagen, estrogen receptor, vitamin D receptor 등이 보고되고 있는데 이중 특히 문제가 되는 것은 estrogen 缺乏에 의한 骨多孔症의 誘發이다. 閉經으로 인하여 estrogen이 減少되면 IL-6가 增加되고 이로 인하여 破骨細胞내에서 gp130의 발현이 誘導되어 破骨細胞의 增殖이 促進되며, 酸性 條件이 되면 cathepsin L 및 cathepsin K가 活性化되어 骨 組織의 collagen과 Ca<sup>2+</sup>의 結合이 分解되면서 骨吸收가 增加되어 閉經期性 骨多孔症이 發生되는 것으로 알려져 있다<sup>74)</sup>.

閉經期에서처럼 卵巢 機能이 消失되면 사람이나 동물 모두 骨이 消失되기 시작하는데 이러한 閉經期性 骨多孔症은 여성 호르몬 缺乏에 의한 것으로 여성 호르몬의 投與로 骨多孔症을 豫防하거나 回復할 수 있다고 알려져 있다. 最近 骨多孔症에 사용되는 治療劑로는 estrogen, progesterone, calcitonin, bisphosphonate, calcium, vitamin D, sodium fluoride, anabolic steroids, parathyroid hormone, raloxifene, tamoxifen, nafoxidine, 1, 25-dihydroxyvitamin D, 1- $\alpha$ -hydroxyvitamin D, dehydroepiandrosterone(DHEA) 등이 報告되고 있다<sup>4,22,41,76,79,95)</sup>. 이와 같은 藥物治療는 骨多孔症의 積極的인 治療라기 보다는 豫防的 차원에서 이루어지는 것이 많

으며, 특히 合成 estrogen 製劑 등 몇몇 藥材의 경우 副作用으로 乳房癌이나 子宮頸部癌의 發生率이 높아지는 문제가 있어 보다 治療 效果가 높고 안전한 代替療法 開發에 많은 관심을 갖게 되었으며, 이에 호응하여 韓醫學界에서도 骨多孔症에 대한 韓方藥材 開發에 관하여 研究가 진행되고 있다.

骨多孔症을 韓醫學的인 觀點에서 보면 骨痿, 骨枯, 骨極, 髓減 등의 範疇에 속한다고 할 수 있다<sup>9)</sup>. 그중 腰脊이 不舉하고 骨이 乾槁하며 髓가 涸竭하는 骨痿<sup>16,44,45)</sup>와 가장 類似하다고 할 수 있다. 素問·痿論<sup>17)</sup>에 “腎氣熱則, 腰脊不舉, 骨枯而髓減, 發爲骨痿,……腎者水藏也, 今水不勝火則, 骨枯而髓虛, 故足不任身, 發爲骨痿. 骨痿者, 生於大熱也”라 하였고, 本草綱目<sup>46)</sup>에는 痿證의 原因을 濕熱, 濕痰, 瘀血, 血虛屬肝腎과 氣虛屬脾肺라 하였고, 또한 醫學入門<sup>15)</sup>에서는 “水不勝火, 骨髓空虛, 色黑齒槁, 名曰骨痿, 則腰膝與脊不舉, 骨痿不能起於床者死.”라 한 것을 보면 骨痿가 骨多孔症과 매우 類似함을 알 수 있다<sup>18,26)</sup>.

骨은 腎에 屬하고 腎은 骨을 主하여 腎과 骨은 밀접한 관계가 있으니<sup>9,10,18,20,21)</sup> 이러한 腎과 骨의 관계를 韓醫學적 理論으로 살펴보면 黃帝內經 素問·五臟生成論<sup>17)</sup>에서는 “腎之合骨也”, 素問·宣明五氣論<sup>17)</sup>에서는 “五臟所主…腎主骨”, 이라 하였고 素問·六節臟象論<sup>17)</sup>에서는 “腎者主蟄, 封藏之本, 精之處也. 其華在髮, 其充在骨”이라 하였으며, 素問·陰陽應象大論<sup>17)</sup>에서는 “腎生骨髓”, 素問·脈要精微論<sup>17)</sup>에서는 “骨者髓之府, 不能久立, 行則振掉, 骨將慙矣”라 하였고, 素問·逆調論<sup>17)</sup>에는 “腎不生則, 髓不能滿, 故寒甚至骨也”라 하여 腎은 精을 간직하고 精은 髓를 생하며 髓는 骨을 滋養한다고 認識하고 있다. 그러므로 腎精이 充足하면 骨髓가 充實해져 骨格이 堅實해지며, 腎精이 不足하면 骨髓의 化源이 不足하여 骨格을 充分히 滋養하지 못해 骨이 脆弱無力하게 되므로 骨의 健康과 脆弱이 腎의 精氣盛衰의 重要標識이 된다<sup>5)</sup>. 따라서 腎陽이 不足하면 骨이 寒冷하고 骨節以攣痺하여 化生하지 못하고, 腎陰이 不足하면 腎이 骨을 生養하지 못하니 髓가 充滿하지 못하는 것이므로 骨의 病은 대개 稟賦不足하거나 腎精이 不足한 경우가 많다<sup>9,17,25)</sup>. 이러한 병리기전을 감안할 때 骨多孔症의 原因이 腎虛에 의한 骨髓不足에 起因된다고 볼 수 있다.

또한, 閉經期性 骨多孔症의 原因인 閉經으로 인한 estrogen 缺乏을 韓醫學的으로 考察하여 보면 素問·上古天真論<sup>17)</sup>에 “女子…七七歲, 任脈虛, 太衝脈衰少, 天癸竭, 地道不通, 故形壞而無子也”라 하여 閉經이 衝任失養, 衝任不調에 起因된다고 하였다. 衝脈과 任脈은 奇經八脈 중의 하나로, 肝·腎과 밀접한 관계가 있어 肝·腎의 虛弱은 衝任脈의 盛衰에 直接的인 影響을 미치므로 肝·腎의 機能에 異常이 생기면 衝任脈이 失調 된다고 하였다<sup>2)</sup>. 따라서 閉經期性 骨多孔症의 原因은 肝·腎의 虛弱으로부터 起因된다고 볼 수 있다.

加味八味地黃湯은 東醫寶鑑<sup>16)</sup>의 八味丸에 補肝腎하고 強筋骨하는 五加皮, 牛膝, 杜沖을 加味한 處方으로 處方 중의 熟地黃은 滋陰養血之品으로 補腎壯水하고, 山藥·山茱萸는 固精強陰 助陽收澇之品으로 益腎 養陰 助陽하며, 牡丹皮는 君相의 伏火를 瀉하고 涼血 退蒸하고, 茯苓·澤瀉는 濕熱을 滲하여 通腎交心하며, 附子·肉桂는 溫補腎陽之品으로 扶元 回陽 散寒하고, 五加皮는 祛風濕 壯筋骨하며, 牛膝·杜沖은 補肝腎 強筋骨하여<sup>14)</sup> 腎陽이 不足하고 命門의 火가 衰退하여 腰膝痠軟, 形寒肢冷 등 證에 活用되고 있는 方劑<sup>16)</sup>로 腎陽虛에 의한 骨髓不足에 起因되는 骨多孔症에 活用할 수 있을 것으로 생각된다.

加味羌活續斷湯은 東醫寶鑑<sup>16)</sup>의 羌活續斷湯에 威靈仙, 木瓜, 陳皮, 貢砂仁, 玄胡索, 木香을 加味한 處方으로 處方 중의 羌活과 細辛은 少陰經에 들어가 血脈을 通하게 하고 秦艽, 防風,

白芷, 威靈仙과 함께 經絡을 疏通시키고 升陽하여 祛風勝濕시키며, 續斷은 肝腎을 補益하여 杜沖, 牛膝과 함께 健骨強筋시키어 固下시키고, 川芎, 當歸, 白芍藥, 熟地黄은 活血補陰하며, 玄胡索은 利氣活血하여 止痛시키고, 人蔘, 肉桂, 茯苓, 甘草는 益氣補陽하며, 木瓜는 利筋骨 調營衛하여 舒筋止痛하고, 砂仁은 行氣調中之品으로 木香, 陳皮와 함께 通行結滯하여 行氣시키니 肝腎이 모두 虛함으로 인하여 風濕이 內攻하여 腰膝作痛하고 冷痺無力하며 骨痠痿厥하여 屈伸이 不利한 證에 活用되고 있는 方劑로 이와 같은 適應症은 骨多孔症의 臨床症狀와 유사하여 閉經期 肝腎虛弱으로 衝任脈이 失調되어 發生되는 骨多孔症에 效果가 있을 것으로 기대된다.

實驗的 骨多孔症의 誘發法으로는 卵巢摘出法, 低칼슘食餌法, 固定法, 舉丸摘出法 등이 있으나 腎虛 및 肝腎俱虛證의 人工的 誘發方法이라 할 수 있는 閉經期 後 骨多孔症을 模倣한 卵巢摘出에 의한 骨多孔症 誘發 方法을 選定하였다<sup>32)</sup>.

이에 著者는 加味八味地黄湯과 加味羌活續斷湯<sup>1)</sup>이 卵巢摘出로 誘發된 흰쥐의 骨多孔症에 미치는 影響에 대하여 豫防效果를 알아보기 위하여 卵巢摘出 前 1주일부터 1주일간 및 卵巢摘出 後 1주일부터 2 및 3주간 각각 加味八味地黄湯과 加味羌活續斷湯을 投與하였고, 治療效果를 알아보기 위하여 卵巢摘出 後 1주일부터 2 및 3주간 각각 加味八味地黄湯과 加味羌活續斷湯을 投與한 후 生化學的 指標로 骨 組織 내 cathepsin L, cathepsin K의 酵素 活性도와 血清 중 calcium, calcitonin, osteocalcin, phosphorus 含量을, 免疫學的 指標로 血清 및 骨髓 중 IL-6의 含量을, 組織學的으로 脛骨 骨幹端部の 骨 消失상태를, 免疫組織化學的 分析 方法을 이용하여 collagen IV, ELAM-1의 발현양상을, 免疫細胞化學的 分析 方法을 이용하여 Fos의 발현양상을 관찰하였다.

Cathepsin L 및 cathepsin K는 일종의 蛋白質 分解 酵素로 estrogen이 缺乏되어 酸性화가 招來되면 活性化되어 骨 組織 내 collagen과  $Ca^{2+}$  結合을 分解시켜 骨多孔症을 誘發하는 것으로 알려져 있다<sup>27,71,73,78)</sup>. 본 實驗에서 血清 중 cathepsin L 酵素 活性도의 變化는 3 및 4주째 모든 實驗群이 control群에 비하여 유의성 있게 cathepsin L 酵素活性을 抑制하였으며 Sample A-1群, Sample B-1群 및 Sample B-2群은 Sample A-2群에 비하여 양호하였다. 이러한 結果는 加味八味地黄湯 및 加味羌活續斷湯 모두 cathepsin L 酵素活性을 감소시켜 骨吸收를 抑制하는 效果가 있으며, 豫防 및 治療效果間 比較에 있어서는 豫防效果가 治療效果보다 양호하고, 藥材間 比較에 있어서는 加味羌活續斷湯이 加味八味地黄湯보다 우수하며, 檢液 投與 期間別 比較에 있어서는 4주 째가 3주 째보다 양호한 것으로 생각된다(Table I).

血清 중 cathepsin K 酵素 活性도의 變化는 3 및 4주째 모든 實驗群이 control群에 비하여 유의성 있게 cathepsin K 酵素活性을 抑制하였으며, 3주 째에서는 Sample B-1群 및 Sample B-2群이 가장 우수하였고 다음으로 Sample A-2群, Sample A-1群 順으로 양호하였으며, 4주 째에서는 Sample B-1群 및 Sample A-2群이 가장 우수하였고 다음으로 Sample B-2群, Sample A-1群 順으로 cathepsin K 酵素活性 抑制效果가 양호하였다. 이는 加味八味地黄湯 및 加味羌活續斷湯 모두 cathepsin K 酵素活性을 감소시켜 骨吸收를 억제하는 效果가 있으며 豫防 및 治療效果間 比較에 있어서는 治療效果가 豫防效果보다 양호하였으며, 藥材間 比較에 있어서는 加味羌活續斷湯이 加味八味地黄湯보다 우수하였고, 檢液 投與 期間別 比較에 있어서는 加味八味地黄湯은 4주 째가 3주 째보다 양호하였고 加味羌活續斷湯은 3주 째가 4주 째보다 양호하였다(Table II).

IL-6는 骨小柱내에서 破骨細胞의 增殖을 促進시키는 cytokine의 일종으로써<sup>74)</sup> 나이가 들면서

IL-6의 生産에 대한 調節機能이 低下되면 血清내 IL-6의 濃도가 점차 增加하게 된다<sup>62,67</sup>. 그러나 IL-6 生産의 增加는 나이에만 관련이 있는 것이 아니고 estrogen의 缺乏과도 관련이 있어 閉經이 되면 estrogen이 缺乏되고, estrogen이 缺乏되면 骨芽細胞에서 IL-1과 IL-6 등의 cytokine이 분비되어 骨吸收가 增加하는 것으로 알려져 있다<sup>58</sup>. 따라서 estrogen의 缺乏은 IL-6를 매개로 破骨細胞의 增殖을 促進하여 骨吸收를 增加시킴으로써 閉經期性 骨多孔症을 誘發하는 것으로 생각된다<sup>74</sup>. 본 實驗에서 血清 중 IL-6의 含量 變化는 3 및 4주째 모든 實驗群은 control群에 비하여 有意성 있게 IL-6 含量을 減少시켰으며, 3주 째에서는 Sample B-1群 및 Sample B-2群이 Sample A-1群 및 Sample A-2群에 비하여 IL-6 含量 減少效果가 양호하였고, 4주 째에서는 Sample B-1群이 가장 우수하였으며 다음으로 Sample B-2群, Sample A-1群 및 Sample A-2群의 順으로 양호하였다. 이러한 結果는 加味八味地黃湯 및 加味羌活續斷湯 모두 IL-6 含量을 減少시켜 骨吸收를 抑制하는 效果가 있는 것으로 생각되며, 豫防 및 治療效果間 比較에 있어서 豫防效果가 治療效果보다 우수하였으며, 藥材間 比較에 있어서 加味羌活續斷湯이 加味八味地黃湯보다 양호하였으며 檢液 投與期間別 比較에 있어서는 다소 차이는 있으나 有意성은 인정되지 않았다(Table III).

骨髓 중 IL-6의 含量 變化는 3 및 4주째 모든 實驗群은 control群에 비하여 有意성 있게 IL-6 含量을 減少시켰으며, 3주 째에서는 Sample B-1群 및 Sample B-2群이 가장 양호한 IL-6 含量 減少效果가 인정되었으며 다음으로 Sample A-2群, Sample A-1群의 順으로 양호하였고, 4주 째에서는 Sample B-1群 및 Sample A-2群이 가장 우수하였으며 다음으로 Sample B-2群, Sample A-1群의 順으로 양호하였다. 이는 加味八味地黃湯 및 加味羌活續斷湯 모두 IL-6 含量을 減少시켜 骨吸收를 抑制하는 效果가 있는 것으로 생각되며, 豫防 및 治療效果間 比較에 있어서는 有意성 있는 차이가 認定되지 않았으며, 藥材間 比較에 있어서는 加味羌活續斷湯이 加味八味地黃湯보다 양호하였고 檢液 投與期間別 比較에 있어서는 4주 째가 3주 째보다 양호한 것으로 나타났다(Table IV).

骨小柱의 組織學的 形態變化를 알아보기 위하여 卵巢摘出 후 4주째 脛骨 骨幹端部의 骨基質內 骨小柱의 양상을 관찰한 바, Normal群의 骨 組織에서는 骨基質內 骨小柱가 골고루 분포되어 있었고 Control群에서는 骨小柱가 가늘어지거나 소실되어 骨小柱間 연결부분이 끊어진 곳이 많은데 비하여 모든 實驗群에서는 Control群에 비하여 약간 骨小柱가 가늘어진 정도로 비교적 Normal群과 유사한 組織學的 形態를 나타내었으며, 그 중 Sample B-1群 및 Sample B-2群이 가장 Normal群과 유사한 組織學的 形態를 보였다. 이러한 結果는 cathepsin L 및 IL-6 含量 變化와 일치하는 결과로 加味八味地黃湯과 加味羌活續斷湯 모두 骨多孔症의 誘發을 抑制하는 效果가 있으며 加味羌活續斷湯이 加味八味地黃湯보다 양호한 骨多孔症 誘發抑制 效果가 있는 것으로 생각된다(Fig. 1).

ELAM-1은 免疫血清學的으로 骨 組織내 炎症反應이 發生되면 自家免疫으로 活性化되는 endothelial leukocyte 附着分子로써 estrogen이 缺乏되면 骨 組織내 微細 環境 하에서 骨 組織 破壞因子 중 하나인 leukocyte의 活性化가 촉진되어 ELAM-1의 발현이 增加되는데 이는 破骨細胞에 의한 骨吸收가 촉진되었음을 의미한다. 본 實驗에서 卵巢摘出 후 4주째 脛骨 骨幹端部에서 ELAM-1의 발현 양상을 免疫組織化學的 分析 方法으로 관찰한 바, Normal群의 骨 組織에서는 갈색 양성반응이 없었고, Control群에서는 강한 갈색 양성반응을 보이는 부위가 넓게 분포하고 있는데 비하여 Sample A-2群에서는 갈색 양성반응이 다소 감소되었고, Sample B-2群



에서는 갈색 양성반응이 현저하게 감소되는 양상을 나타내었다. 이는 組織學的 所見과 일치하는 結果로 加味八味地黄湯 및 加味羌活續斷湯 모두 骨多孔症의 誘發을 抑制하여 ELAM-1의 발현을 減少시키는 效果가 있으며 加味羌活續斷湯이 加味八味地黄湯보다 우수한 것으로 사려 된다(Fig. 2).

Collagen IV는 蛋白質 分解酵素로써, estrogen이 缺乏되면 여러 가지 蛋白質 分解酵素가 活性化되는데 이 중 collagen IV의 活性化는 破骨細胞의 增殖을 誘導하여 骨 組織의 collagen과 Ca<sup>2+</sup>의 結合을 分解시켜 骨吸收를 增加시킴으로써 骨多孔症을 誘發하게 된다. 본 實驗에서 卵巢摘出 후 4주째 脛骨 骨幹端部에서 collagen IV를 免疫組織化學的 分析 方法으로 관찰한 結果 Normal群의 骨 組織에서는 collagen IV의 갈색 양성반응이 거의 없었고, Control群에서는 강한 갈색 양성반응이 많이 나타난 데 비하여 Sample A-2群에서는 갈색 양성반응이 다소 감소되었고, Sample B-2群에서는 갈색 양성반응이 현저하게 감소된 것으로 관찰되었다. 이와 같은 結果는 組織學的 所見 및 ELAM-1의 발현 양상과 일치하는 結果로 加味八味地黄湯 및 加味羌活續斷湯 모두 collagen IV의 발현을 減少시켜 骨多孔症의 誘發을 抑制하는 效果가 있으며 加味羌活續斷湯이 加味八味地黄湯보다 우수한 것으로 생각된다(Fig. 3).

Fos는 DNA 전사인자로서 破骨細胞의 核에 존재하는 單位 蛋白質이며 gp 130이 活性化되면 jun과 結合하여 破骨細胞의 活性化를 유도하게 되므로 骨多孔症의 誘發因子 중 하나의 maker로 인정되고 있다. Fos의 발현양상을 분석하기 위하여 卵巢摘出 4주째 脛骨 骨幹端部를 免疫細胞化學的 分析 方法으로 관찰한 結果 Normal群에서는 Fos에 대한 녹색의 양성 반응은 없었고, Control群에서는 강한 녹색의 양성 반응이 많이 관찰되었는데 비하여 모든 實驗群에서는 녹색의 양성 반응이 소실되는 경향을 보였으며, Sample B-1群과 Sample B-2群은 Sample A-1群과 Sample A-2群에 비하여 Fos의 발현양상이 감소되는 경향을 보였다. 이와 같은 結果는 加味八味地黄湯 및 加味羌活續斷湯 모두 fos의 발현을 減少시켜 骨多孔症 誘發을 抑制하는 效果가 있으며 加味羌活續斷湯이 加味八味地黄湯보다 우수한 것으로 생각된다(Fig. 4).

Calcium은 骨의 主要成分이며 骨은 35%의 有機質, 45%의 無機質, 20%의 水分으로 이루어져 있는데<sup>8)</sup> 전체 calcium의 99%는 骨의 無機質에 含有<sup>12)</sup>되어 있으므로 血清 calcium의 濃度變化는 骨에 존재하는 calcium의 影響을 받게 되는데, Kalu<sup>7)</sup>는 卵巢를 摘出한 쥐의 血清 calcium의 減少를 報告하면서 骨多孔症 患者나 쥐에서 卵巢호르몬 缺乏으로 인한 血清 calcium의 減少는 estrogen 缺乏이 1, 25-dihydroxy vitamin D의 合成을 減少시켜 calcium의 腸內 吸收가 低下되기 때문이라 하였다. 본 實驗에서 血清 중 calcium의 含量變化는 Control群이 Normal群에 비하여 有意性 있는 減少를 보였고, 實驗群에 있어서 3주째에서는 Sample A-2群, Sample B-2群이, 4주째에서는 모든 實驗群이 有意性 있게 血清 중 calcium 含量을 增加시켰다. 이러한 結果는 Kalu<sup>7)</sup>의 報告와 일치하는 結果로써 加味八味地黄湯 및 加味羌活續斷湯은 血清 중 calcium의 腸內 吸收를 增加시켜 骨多孔症 誘發을 抑制하는 것으로 생각되며, 豫防 및 治療效果間 比較에 있어서는 有意性 있는 차이가 認定되지 않았으며, 藥材間 比較에 있어서는 加味羌活續斷湯이 加味八味地黄湯보다 양호하였고 檢液 投與期間別 比較에 있어서는 4주째가 3주째보다 양호한 것으로 나타났다(Table V).

Calcitonin은 甲狀腺 호르몬의 하나로 骨吸收를 抑制하여 血清 중 calcium 濃度を 調節하는 機能이 있다<sup>9)</sup>. 본 實驗에서 血清 중 calcitonin의 含量變化는 3주째에서는 Sample A-1群이 가장 양호한 血清 중 calcitonin 含量의 增加가 認定되었고, 다음으로 Sample B-1群, Sample

A-2群이 유의한 증가를 보였으며, Sample B-2群은 유의성이 없었다. 4주째에서는 모든 실험군이 혈청 중 calcitonin 함량을 다소 증가시키는 경향은 있었으나 유의성은 인정되지 않았다. 이러한 결과는 加味八味地黃湯 및 加味羌活續斷湯이 혈청 중 calcitonin 함량을 증가시켜 骨吸收를 抑制하는 기전에 영향을 미쳐 骨多孔症 誘發을 抑制하는 효과가 있는 것으로 생각되며, 豫防 및 治療效果間 比較에 있어서는 豫防效果가 治療效果보다 양호하였으며, 藥材間 比較에 있어서는 加味八味地黃湯이 加味羌活續斷湯보다 양호하였고, 檢液 投與期間別 比較에 있어서는 3주째가 4주째보다 양호한 것으로 나타났다(Table VI).

Osteocalcin은 vitamin K를 매개로 calcium과 結合되는 非膠原蛋白으로 骨形成 과정에서 造骨細胞에 의하여 沈着되어지는 有機物質인 幼骨의 構成 成分 중 하나<sup>6,90,101</sup>)이며 bone Gla protein(BGP)이라고도 불리 운다<sup>19</sup>). 새로 形成되는 osteocalcin의 일부는 血 中으로 放出되므로 血 中 濃度를 測定하면 骨形成 정도를 알 수 있어 造骨細胞의 活動性을 評價하고 骨形成 정도를 조사하는데 가장 민감하고 특이하다고 알려져 있어<sup>4,101</sup>) 血 清 알칼리성 탈인산효소와 함께 대표적인 骨形成의 指標로 활용되고 있다. osteocalcin은 骨의 成長時期에 增加되고 閉經 後 estrogen 缺乏으로 骨質이 消失되면 이의 補充을 위해 다시 增加되지만 여성 호르몬 治療후에는 減少된다. 本 實驗에서 血 清 중 osteocalcin의 含量 變化는 3 및 4주째 모든 實驗群에서 osteocalcin 含量이 다소 減少되는 경향은 보였으나 유의성은 인정되지 않았다. 이는 加味八味地黃湯 및 加味羌活續斷湯은 骨形成에 미치는 영향이 미약한 것으로 생각된다(Table VII).

Phosphorus는 骨의 無機質 構成 成分 중의 하나로 90% 정도가 뼈에 존재하며 phosphorus의 과다한 섭취는 副甲狀腺 機能亢進症을 誘發하여 骨吸收를 增加시키고 骨吸收時 血 清 phosphorus의 濃度는 상승하게 된다<sup>65,70</sup>). 本 實驗에서 血 清 중 phosphorus의 含量 變化는 3 및 4주째 모든 實驗群에서 phosphorus 含量이 增加의 경향은 보였으나 유의성이 인정되지 않았다(Table VIII).

이상의 모든 實驗 結果를 綜合하여 보면 Control群은 Normal群에 비하여 骨形成이 저하되고 骨吸收가 현저히 增加되어 骨多孔症이 誘發되었으며 모든 實驗群은 骨形成의 低下 및 骨吸收의 增加가 抑制되어 骨多孔症 誘發이 抑制되었음을 알 수 있었고 각 實驗群間의 比較는 다음과 같다.

첫째, 豫防 및 治療效果間 比較는 豫防效果가 治療效果보다 骨多孔症 誘發抑制 作用이 양호하게 나타났다.

둘째, 藥材間 比較는 加味羌活續斷湯이 加味八味地黃湯보다 骨多孔症 誘發抑制의 效能이 우수하였다.

셋째, 檢液 投與期間別 比較는 4주째가 3주째보다 骨多孔症 誘發抑制 效能이 양호하여 檢液 投與 期間이 길수록 骨多孔症 誘發抑制 效能이 높은 것으로 생각된다.

本 實驗으로 加味八味地黃湯 및 加味羌活續斷湯이 骨多孔症의 進行을 억제 할 수 있어 合成 estrogen 製劑의 代替藥物로서 應用할 수 있다는 可能性을 提示하였고 또한 韓醫學的 辨證에 있어서 骨多孔症의 誘發原因 및 治療에 있어서 補肝腎, 祛風濕하는 藥材의 活用價値가 높다는 可能性도 提示하였으나 앞으로 더욱 進一步한 研究가 계속 進行되어야 한다고 생각된다. 첫째, 本 實驗은 複合處方을 研究對象으로 選定하였으며 앞으로는 祛風濕의 效能이 있는 많은 單

味劑의 客觀的 研究가 要求된다. 둘째 본 實驗은 骨吸收 抑制에 초점을 맞추어 研究하였으며, 追後 이미 많은 骨 組織이 破壞된 狀態의 骨多孔症에 대한 骨形成에 效能이 있는지를 檢證할 수 있는 補充 實驗이 必要하다고 생각된다. 셋째, 본 實驗은 卵巢 摘出術을 施行한 지 2주 및 3주의 標本의 骨小柱의 면적은 對照 手術群에 비하여 약 21-23%의 減少를 보이고 4주된 標本은 對照 手術群에 비하여 약 25%의 減少를 보인다는 報告<sup>27)</sup>에 근거하여 4주까지만 實驗이 進行되었으나, 적어도 8주내지 10주까지 實驗을 進行하므로써 回復期의 反應 및 藥物 投與期間의 確認이 必要하리라고 思慮된다.

## V. 結 論

加味八味地黃湯 및 加味羌活續斷湯이 卵巢摘出로 誘發된 骨多孔症에 미치는 影響을 豫防 및 治療效果로 구분하여 比較 檢討하고자 卵巢摘出 前後에 각각 加味八味地黃湯 및 加味羌活續斷湯을 經口投與하고 生化學的 指標로 骨 組織 내 cathepsin L, cathepsin K 의 酵素 活性도와 血清 중 calcium, calcitonin, osteocalcin, phosphorus 含量을, 免疫學的 指標로 血清 및 骨髓 중 IL-6의 含量을, 組織學的으로 脛骨 骨幹端部の 骨 消失狀態를, 免疫組織化學的 分析 方法으로 ELAM-1, collagen IV의 발현양상을, 免疫細胞化學的 分析 方法으로 fos의 발현양상을 관찰한 바 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 骨 組織 내 cathepsin L 및 cathepsin K 酵素 活性도는 모든 實驗群에서 Control群에 비하여 각각 有意성 있는 抑制效果가 있었으며, Sample A-1群 및 Sample B-1群은 Sample A-2群 및 Sample B-2群에 비하여 각각 抑制效果가 양호하였고, Sample B-1群 및 Sample B-2群은 Sample A-1群 및 Sample A-2群에 비하여 각각 抑制效果가 양호하였다.

2. 骨髓 및 血清 중 IL-6 含量 變化는 모든 實驗群에서 Control群에 비하여 각각 有意성 있는 抑制效果가 있었으며, Sample A-1群 및 Sample B-1群은 Sample A-2群 및 Sample B-2群에 비하여 각각 抑制效果가 양호하였고, Sample B-1群 및 Sample B-2群은 Sample A-1群 및 Sample A-2群에 비하여 각각 抑制效果가 양호하였다.

3. 脛骨 骨幹端部の 組織學的 檢査 所見은 모든 實驗群은 Control群에 비하여 骨 消失이 有意성 있게 抑制되어 Normal群과 類似한 骨小柱의 양상을 나타내었다.

4. ELAM-1 및 collagen IV의 발현양상은 Sample A-2群은 약간 減少되었으며 Sample B-2群은 Normal群과 類似한 정도로 減少되어 ELAM-1 및 collagen IV의 발현을 抑制하였다.

5. Fos의 발현양상은 모든 實驗群에서 Control群에 비하여 각각 발현 抑制되는 양상을 보였으며, Sample B-1群 및 Sample B-2群은 Sample A-1群 및 Sample A-2群에 비하여 각각 발현 抑制가 현저하였다.

6. 血清 중 calcium 含量은 모든 實驗群에서 Control群에 비하여 각각 有意성 있는 含量 增加가 認定되었으며 각 實驗群間에서 有意한 차이는 없었다.

7. 血清中 calcitonin 含量은 Sample A-1群, Sample A-2群 및 Sample B-1群에서 Control 群에 비하여 각각 유의성 있는 含量 增加가 認定되었으며 각 實驗群間에서 유의한 차이는 없었다.

8. 血清中 osteocalcin, phosphorus의 含量 變化는 모든 實驗群에서 Control群에 비하여 각각 有意성이 없었다.

이상의 結果로 보아 加味八味地黃湯 및 加味羌活續斷湯은 卵巢를 摘出한 흰쥐에 대하여 骨 吸收를 抑制하여 骨多孔症의 誘發을 抑制하였으며, 加味羌活續斷湯의 誘發 抑制 效果가 加味八味地黃湯보다 더욱 우수함을 알 수 있었고, 豫防效果가 治療效果보다 중요함을 알 수 있었다. 그러므로 加味八味地黃湯 및 加味羌活續斷湯은 骨多孔症의 豫防 및 治療에 應用이 可能하며 추후 지속적인 研究가 필요하다고 생각된다.

## VI. 참고 문헌

1. 慶熙醫療院 韓方病院編: 韓方基本處方集, 서울. 大星文化社, p. 5, 1988.
2. 金光湖, 金聖洙: 東醫豫防醫學, 서울, 慶熙大學校 韓醫科大學 豫防醫學教室, pp. 256-259, 1990.
3. 金井 泉, 金井 正光著, 高文社 編輯部譯: 臨床檢査法提要, 서울, 高文社, pp. 143, 458-460, 476-478, 490-492, 1989.
4. 大韓骨代謝學會: 骨多孔症(骨粗鬆症), 서울, 最新醫學社, pp.3-7, 27-36, 47-56, 60-63, 69-79, 1991.
5. 大韓東醫生理學會: 東醫生理學, 서울, 慶熙大學校出版局, pp.268-270, 324-326, 328-329, 1993.
6. 大韓病理學會: 病理學, 서울, 高文社, p. 1183, 1990.
7. 大韓産婦人科學會 教科書 編纂委員會: 婦人科學, 서울, 칼빈서적, pp.330-333, 1991.
8. 大韓整形外科學會: 整形外科學, 서울, 最新醫學社, pp. 13-14, 81-82, 1992.
9. 杜鎬京 編著: 東醫腎系內科學, 서울, 東洋醫學研究院, pp. 1241-1260, 1993.
10. 杜鎬京: 臨床腎系學研究, 서울, 成輔社, pp. 583-600, 1995.
11. 文濬典, 安圭錫, 崔昇勳: 東醫病理學, 서울, 高文社, p. 332, 1990.
12. 이귀녕, 이종순: 임상병리파일, 서울, 의학문화사, pp.278-282, 300-303, 1993.
13. 李文鎬 外: 內科學, 서울, 金剛出版社, pp. 1669-1675, 1979.
14. 李尙仁: 本草學, 서울, 수서원, pp. 61-66, 85-86, 106-110, 114-116, 224-226, 434-436, 533-534, 1981.
15. 李 挺: 醫學入門, 서울 翰成社, p. 402, 1982.
16. 許 浚: 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, p. 147, 296, 303, 694, 1983.
17. 洪元植 譯: 校勘直譯黃帝內經素問, 서울, 傳統文化研究會, pp. 40-50, 62-68, 97,-108, 150-153, 204-208, 264-268, 1994.
18. 金根模: 鹿茸 및 六味地黃湯加鹿茸이 白鼠의 運動抑制性 骨多孔症에 미치는 影響, 慶山大學校 大學院, 1993.

19. 김덕윤 : 골형성의 생화학적 표지자, 대한골대사학회지 1(1) : 233-239, 1994.
20. 金炳撤 : 木瓜의 水煎劑가 Estrogen 分泌障로 인한 骨多孔症에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院, 1995.
21. 冷竹平 : 牛膝이 흰쥐의 卵巢 摘出로 誘發한 骨多孔症에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院, 1994.
22. 민헌기 : 骨多孔症 治療의 基本概念, 대한내분비학회지, 4(1) : 1-3, 1989.
23. 민헌기 : 골조송증, 대한내과학회지, 34(4) : 442-443, 1988.
24. 박종철 : 左歸飲과 右歸飲이 卵巢摘出 白鼠의 性호르몬과 脂質 및 骨代謝에 미치는 影響, 경산대학교 대학원, 1995.
25. 박형무 : 골 재형성시 호르몬과 국소인자의 역할, 대한의학협회지, 38(1):8-17.
26. 徐富一 : 鹿角이 흰쥐의 卵巢摘出로 誘發된 骨多孔症에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院, 1998.
27. 석세일, 성상철, 이춘기, 이명철, 정성수, 박상철, 송계용 : 흰 쥐에서 난소 적출술로 유발한 骨多孔症에 대한 Dehydroepiandrosterone의 효과, 대한정형외과학회지, 31(2) : 247-254, 1996
28. 석세일, 이춘기, 강홍식, 이지호, 민학진, 차상훈, 정용진 : 骨粗鬆症에서의 척추골절, 대한정형외과학회지, 28(3) : 980-987, 1993.
29. 沈相度 : 狗脊이 흰쥐의 卵巢 摘出로 誘發된 骨多孔症에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院, 1995.
30. 沈相度 : 鹿茸이 흰쥐의 卵巢 摘出로 誘發된 骨多孔症에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院, 1998.
31. 안덕균, 김호철, 최호영 : 鹿茸이 卵巢除去로 誘發한 암컷흰쥐의 骨多孔症에 미치는 影響, 녹용에 관한 국제 심포지움. p. 1-9, 1994.
32. 안현석, 강성길, 박영배 : 骨多孔症의 鍼灸治療에 관한 文獻的 考察, 大韓鍼灸學會誌 11(2) : 171-190, 1995.
33. 안현석, 강성길, 박영배, 고희균, 김창환 : 鹿茸藥鍼刺戟과 鹿茸經口投與가 흰쥐의 骨多孔症 誘發抑制에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集 20(1) : 308-325, 1997.
34. 吳夏植 : 杜冲과 杜冲葉이 흰쥐의 卵巢摘出로 誘發한 骨多孔症에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院, 1995.
35. 용석중, 임승길, 허갑범, 박병문, 김남현 : 한국인 성인 남녀의 골밀도, 대한의학협회지 31(12) : 1350-1358, 1988.
36. 임승길, 정현철, 이미경, 김현만, 이현철, 허가범, 김남현, 박병문 : 한국 여성골조송증환자들에서 보인 골조송증 위험인자(예보), 대한내과학회잡지 34(4) : 444-451, 1988.
37. 張峻福, 李京燮, 宋炳基 : 大營煎이 卵巢摘出 흰쥐의 性호르몬, 脂質 및 骨代謝에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 19(1) : 35-56, 1996.
38. 장준섭, 강군순, 양규현, 박희완, 이석범 : 골조송증과 요통에 관한 고찰, 대한정형외과학회지 24(4) : 1210-1216, 1989.
39. 정석희 : 實驗的 骨多孔症에 미치는 加味二仙湯의 效能에 관한 조직계측학적 연구, 慶熙醫學 11(3-4), 1995.
40. 정화재 : 골조송증, 대한물리치료학회지, 2(1) : 113-122, 1990.
41. 조수현 : 閉經과 骨多孔症, 대한의학협회지, 35(5) : 587-598, 1992.
42. 최연주 : 續斷이 흰쥐의 卵巢摘出로 誘發한 骨多孔症에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院, 1995.

43. 韓寅權, 朴源根, 崔熊煥, 申鉉昊, 金鮮宇: 韓國人 更年期 女性の 骨密度 및 호르몬 變化에 관한 研究, 대한내분비학회지 4(1): 21-28, 1989.
44. 北里研究所附屬 臨床古典研究班: 素問臨床索引集, 東京, 圖書刊行會, pp. 249-251, 昭和54年.
45. 上海中醫學院編: 中醫內科學, 香港, 商務印書館, pp. 193-200, 1975.
46. 李時珍: 本草綱目, 台北, 宏業書局 卷3 pp. 53-54, 1982.
47. 高橋 俊二, 小泉 滿: 骨代謝マーカーの骨轉移診断における意義, Biotherapy 11(1): 75-80, 1997.
48. 日比正彦: gp130:IL-6ファミソールサイトカイン受容体の共通サブユニット, 細胞工學 14(10): 1158-1165, 1995.
49. Francis S. Greenspan: Basic and Clinical Endocrinology, USA, Prentice-Hall International-Inc., pp. 305-311, 1991.
50. Frank H. Netter: The CIBA Collection of Medical Illustration vol. 8, CIBA - GEIGY Co., pp. 216-227, 1987.
51. Johnson, Holborrow: In Handbook of Experimental Immunology 1: Immunochimistry 4th ed., Oxford, Black well Scientific pub.
52. Lillie R.: Histopathologic technique and practical histochemistry 3rd ed., New York, McGraw-Hill, 1965.
53. Palak J.P., Van Noorden S.: Immunocytochemistry 2nd ed., Bristol, John Wright & Sons, 1986.
54. Stanley L. Robbins, Ramzi S. Cotran, Vinay Kumar: Pathologic Basis of Disease, Philadelphia, W.B. Saunders Co., pp. 1327-1329, 1984.
55. Waynforth H.B.: Experimental and surgical techniques in the rat, New York, Academic press, p. 161, 1980.
56. Albright F.: Osteoporosis, Ann. Intern. Med. 27: 861-882, 1947.
57. Albright F., Smith P.H., Richardson A.M.: Postmenopausal Osteoporosis ; It's Clinical Features, JAMA 116: 2465-2474, 1941.
58. Arnaud C.D.: An Integrated View of the Role of the Endocrine System in the Genesis of the Osteoporosis Associated with Aging. Osteoporosis International 3 suppl. 1: 37-39, 1993.
59. Brakenhoff P.J.: Interleukin-6 Receptor Antagonists, DN&P 8(7): 397-403, 1995.
60. Centrella M., Canalis E.: Local regulators of skeletal growth, A perspective Endocr Rev 6: 544-551, 1985.
61. Chesnut III C.H.: An appraisal of the role of estrogens in the treatment of postmenopausal osteoporosis., J. Am. Geriat Soci 32: 604-608, 1984.
62. Daynes R.A., Araneo B.A., Ershler W.B., Maloney C., Li G.Z. and Ryu S.Y.: Altered Regulation of IL-6 Production with Normal Aging. Possible Linkage to the Age-Associated Decline in Dehydroepiandrosteron and it's Sulfated Derivative, Journal of Immunology, 150(12): 5219-5230, 1993.
63. Devlin H., Lumb G., Ferguson MW.: Serum parathyroid hormone and calcitonin levels

- following ovariectomy in the adult rat, *Experimental and Clinical Endocrinology* 99(2) : 84-86, 1992.
64. Donardson CL., Hallay SB., Vogal JM., Hattner RS., Bayers JH., Mac Millan DE : Effect of prolonged bed rest on bone mineral, *Metabolism* 19 : 1071-1084 , 1970.
  65. Draper H.H., Sie T.N., Bergan J.G. : Osteoporosis in aging rats induced by high phosphorus diet, *J. Nut.* 102 : 1133-1142, 1972.
  66. Eriksen E.R., Colvard D.S., Berg N.J., Graham M.L., Mann K.G., Spelsberg T.C. and Riggs B.L. : Evidence of Estrogen Receptor in Normal Human Osteoblast-Like Cell. *Science* 241 : 84-86, 1988.
  67. Ershler W.B., Sun W.H., Binkley N., Volk M.J., Gravenstein S., Kamoske G., Klopp R.G., Roecker E.B., Daynes R.A. and Weindruch R. : Interleukin-6 and Aging. Blood Levels and Mononuclear Cell Production Increase with Advancing Age and In Vitro Production is Modifiable by Dietary Restriction, *Lymphokine and Cytokine Research* 12(4) : 225-230, 1993.
  68. Eva Bornefalk., Sverker Ljunghall, Erik Lindh, Olof Bengtson, Anna G. Johansson, Osten Ljunggren : Regulation of Interleukin-6 Secretion from Mononeuclear Blood Cells by Extracellular Calcium, *Journal of Bone and Mineral Research* 12(2) : 228-233, 1997.
  69. Genant H.K., Cann C.E., Ettinger B., Gordon G.S. : Quantitative computed tomography of vertebral spongiosa : a sensitive method for detecting early bone loss after oophorectomy. *Ann Intern. Med.* 7 : 699-705, 1982.
  70. Goldberg H., Fernandez A. : Simplified method for estimation of inorganic phosphorus in body fluid, *Clin. Chem.* 12 : 871-872, 1966.
  71. Hisao Kakegawa, Takeshi Nikawa, Kahori Tagami, Hiroshi Kamioka, Koji Sumitani, Terushige Kawata, Marinka, Drobnič-Kosorok, Brigita Lenarčič, Vito Turk, Nobuhiko Katunuma : Participation of cathepsin L on bone resorption, *Federation of European Biochemical Societies* 321(2,3) : 247-250, 1993.
  72. James K. Yeh, John F. Aloia, Maria-Louise Barilla : Effects of 17 $\beta$ -estradiol replacement and treadmill exercise on vertebral and femoral bones of the ovariectomized rat, *Bone and Mineral* 24 : 223-224, 1994.
  73. Jean-Marie Delaisse, Pascale Ledent, Gilbert Vaes : Collagenolytic cysteine proteinases of bone tissue (cathepsin B, (pro)cathepsin L and a cathepsin L-like 70 kDa proteinase), *Biochem. J.* 279. 167-174, 1991.
  74. Jilka Hangoc G., Girasole G., Passeri G., Williams D.C., Abrams J.S., Boyce B., Broxmeyer H. and Manolagas S.C. : Increased Osteoclast Development after Estrogen Loss. Mediation by Interleukin-6, *Science* 257 : 88-91, 1992.
  75. Johnston C.C., Epstein S. : Clinical, Biochemical, Radiographic, Epidemiologic and Economic Features of Osteoporosis, *Orthop. Clin. North Am.* 12 : 559-569, 1981.
  76. Joseph : Fluoride in the prevention of osteoporosis and fracture, *Journal of Bone and Mineral Research* 5(1) : s163-s167, 1990.

77. Kalu D.N., Hardin R.R., Cockerham R.: Evaluation of the Pathogenesis of Skeletal Changes in Ovariectomized Rats, *Endocrinology* 115(2): 507-512, 1984.
78. Kazuhiko Aibe, Hidenori Yazawa, Kenji Abe, Kyoko Teramura, Masayoshi Kumegawa, Hiroyuki Kawashima, Kazuo Honda: Substrate Specificity of Recombinant Osteoclast-Specific Cathepsin K from Rabbits, *Biol. Pharm. Bull.* 19(8): 1026-1031, 1996.
79. Knopp P.H.: The effects of postmenopausal estrogen therapy on the incidence of arteriosclerotic vascular disease, *Obste. Gynecol.* 72: 23-30, 1988.
80. Lane J.M., Vigorita V.J.: Current Concepts Review. Osteoporosis, *J. Bone and Joint Surg.* 65-A: 274-278, 1983.
81. Lindgren U., DeLuca H.F.: Role of Parathyroid hormone and 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in the Development of Osteopenia in Oophorectomized Rats, *Calcified Tissue International* 34: 510-514, 1982.
82. Lindsay R., Atkin J.M., Anderson J.B., Hart D.M., Macdonald E.B., Clarke A.C.: Long-term Prevention of Postmenopausal Osteoporosis by Estrogen, *Lancet* I: 1038, 1976.
83. Lindsay R., Coutts J.R.T., Hart D.M.: The effect of endogenous oestrogen on plasma and urinary calcium and phosphate in oophorectomized women, *Clinical Endocrinology* 6: 87-93, 1977.
84. Littlewood-Evans A., Kokubo T., Ishibashi O., Inaoka T., Wlodarski B., Gallagher J.A., Bilbe G.: Localization of Cathepsin K in Human Osteoclasts by In Situ Hybridization and Immunohistochemistry, *Bone* 20(2): 81-86, 1997.
85. Mary E. McGrath, Jeffrey L. Klaus, Michael G. Barnes, Dieter Brömme: Crystal structure of human cathepsin K complexed with a potent inhibitor. *nature structural biology* 4(2): 105-109, 1997.
86. Mazess R.B.: Aging Bone Loss, *Clin. Orthop.* 165: 239-252, 1982.
87. Newton-John H., Morgan D. B.: The Loss of Bone with Age, Osteoporosis, and Fracture., *Clin. Ortho.* 71: 229, 1970
88. Orimo H, Fujita T and Yoshikawa M: Increased Sensitivity of Bone to Parathyroid hormone in Ovariectomized Rats, *Endocrinology* 90: 760-763, 1972.
89. Parfitt A.M.: Trabecular bone architecture in the pathogenesis and prevention of fracture, *Am. J. Med.* 82(Suppl 1B): 68-72, 1987.
90. Power M.J., Gosling J.P., Fottrell P.F.: Radioimmunoassay of osteocalcin with polyclonal and monoclonal antibodies, *Clinical Chemistry* 35: 1408-1415, 1989.
91. Riggs B.L., Melton III L.J.: Evidence for Two Distinct Syndromes of Involutional Osteoporosis, *The American journal of Medicine* 75(6): 899-901, 1983.
92. Riggs B.L., Melton III L.J.: Involutional Osteoporosis, *The new England journal of medicine* 314(26): 1676-1686, 1986.
93. Riggs B.L., Wahner H.W.: Bone Densitometry and Clinical Decision making in Osteoporosis, *Ann. Int. Med.* 108: 293-295, 1988.
94. Rodan G.A.: Introduction to Bone Biology, *Bone* 13: s3-s6, 1992.



95. Sally HG., Farley C.R., David J.B. et al. : Fluoride therapy for osteoporosis promotes a progressive increase in spinal bone density, *Journal of Bone and Mineral Research* 5(1) : s37-s41, 1990.
96. Salomon C.D. : Osteoporosis following calcium deficiency in rats, *Calcified Tissue International* 39 : 267-270, 1986.
97. Shimizu T., Ishoguro N., Miura T. : The effect of calcitonin on osteoporosis of the rat hindlimb induced by denervation and isograft transplantation, *Journal of Reconstructive Microsurgery* 8(1) : 41-45, 1992.
98. Simonet W. S., Lancy D. L., Dunstan C. R., Kelley M., M-S. Chang, Lüthy R., Nguyen H.Q., Wooden S., Bennett L., et al. : Osteoprotegerin : A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density, *Cell* 89 : 309-319, 1997.
99. Struan, F.A. Grant, Stuart H. Ralston : Genes and Osteoporosis, *TEM* 8(6) : 232-236, 1997.
100. Upton G.V. : Therapeutic consideration in the management of the climacteric. *J. Repro. Med* 29 : 71-80, 1984.
101. Vanderschuren D., Jans I., Bouillon R. et al. : Time-related increase of biochemical markers of bone turn over in androgen-deficient male rats, *Bone and Mineral* 26 : 123-131. 1994.