

능골 골절을 유도한 흰쥐에서 홍화씨 분말 및 분획들의 급여가 골절 회복 중 골조직에 미치는 영향*

서현주 · 김준한** · 콧동윤** · 전선민 · 구세광*** · 이재현*** · 문광덕** · 최명숙[§]

경북대학교 식품영양학과, 경북대학교 식품공학과,** 경북대학교 수의학과***

The Effects of Safflower Seed Powder and Its Fraction on Bone Tissue in Rib-fractured Rats during the Recovery

Seo, Hyun Ju · Kim, Jun Han** · Kwak, Dong Yun** · Jeon, Seon Min
Ku, Sae Kwang*** · Lee, Jae Hyun*** · Moon, Kwang Deog** · Choi, Myung Sook[§]

Department of Food and Nutrition, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea
Department of Food Science and Technology,** Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea
Department of Veterinary Medicine,*** Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

ABSTRACT

This study was carried out to investigate the effects of the Korean Safflower(*Carthamus tinctorius L.*) seed powder and its water & ethanol extracts on bone metabolism during the recovery of rib-fracture induced by surgical operation in rats. Male Sprague-Dawley rats, 10 weeks old weighing about 320g, were divided into 9 groups after arrival: the 10d control(AIN-76 semipurified diet), 10d safflower seed powder(10d SS-powder), 10d safflower seed ethanol extract(10d SS-EtOH), 10d safflower seed water extract(10d SS-H₂O), the 20d control(AIN-76 semipurified diet), 20d safflower seed powder(20d SS-powder), 20d safflower seed ethanol extract(20d SS-EtOH), 20d safflower seed water extract(20d SS-H₂O), the 20d sham-operation(20d sham). The levels of all supplements were 5% in diet which is based on raw material weight. They were fed experimental diets for 10 days before the rib fracture operation and for 10 or 20 days more days after operation. A number 9 rib was fractured surgically and sham-operation was also performed. After the rib-fracture operation, rats were sacrificed on the 10th or the 20th day after operation. The body weight were decreased after operation in all rib-fractured groups but recovered gradually thereafter. The fractured sections of SS-EtOH group and SS-H₂O group were more strongly adhered and more rapidly repaired than those of control groups. More detailed effects of the supplementation safflower seed powder and its extracts can be summarized as follows. 1) In callus formation, the portion of hyaline cartilage was notably higher in safflower seed groups than in control group at the 10th day after rib-fracture. SS-H₂O group had the highest portion of trabecular bone at the 10th day after rib-fracture. More hyaline cartilage was observed in all safflower groups than in control group at the 20th day after rib-fracture. 2) The Bone resorption was also occurred more rapidly in SS-powder group and SS-H₂O group than in other groups as indicated by a large number of osteoclast cells observed. It is concluded that the fracture healing were repaired more rapidly in rats supplemented with safflower seed powder and its fractions than in control rats. Among them the SS-H₂O fraction, which was the most effective fraction, stimulated bone remodeling since it increased both bone resorption and bone formation during fracture healing. (*Korean J Nutrition* 33(4) : 441~420, 2000)

KEY WORDS: safflower seed, rib-fracture, callus, bone resorption, fracture healing.

서 론

골 조직의 형성과 골절 및 치유에 관하여서는 오래 전부터 관심의 대상이 되어왔으며, 골절치유 과정을 규명하기 위하여 유전적인 요인, 성장기에 따른 영향, 혈액 공급에 의

채택일 : 2000년 5월 15일

*This research was supported by a grant from Woori Safflower Seed Farmer's Association in 1998.

[§]To whom correspondence should be addressed.

한 영향, 고정 방법에 따른 영향, 골 이식의 여부, 기타 치유 촉진인자 투여 등의 여러 가지 관점에서 많은 연구가 진행되어 왔었다.¹⁾ 그러나 신속한 골절치유를 위한 노력과 많은 연구에도 불구하고 뚜렷한 효과를 거두지는 못하고 있으며 골절치유를 위한 다양한 요인들 중 공통적인 부분들이 있겠으나, 아직까지는 골절치유 과정을 확립적으로 이해하기는 힘든 실정이다.

골절이란 뼈나 골단관 또는 관절면의 연속성이 비정상적으로 끊어진 상태²⁾로서 일반적으로 뼈의 깨짐을 일컫는다.³⁾

골절을 유발하는 원인으로서는 교통사고 등의 외상, 산업장에서 일어나는 안전사고 및 산업재해의 결과, 골다공증 등 질병으로 인한 뼈의 변화 및 스포츠나 하중으로 인한 반복적인 뼈에 대한 스트레스 등이 있다.⁵⁶⁾

골절의 치유란 골절로 인해 손상된 골 조직이 비연속적인 상태에서부터 일련의 생리적 과정을 거쳐 골절에 의한 골의 연속성이 재개되어 궁극적으로 골격 본래의 부하를 견딜 수 있는 정도를 되찾는 복잡한 과정이다.²⁸⁾ 이 때 완전한 회복이 곤란한 골절의 경우, 신체장애를 비롯하여 골절부위의 통증으로 인한 육체적 고통, 심리적 불안, 경제적 손실 등을 주어 개인에 있어 삶의 질을 저하시키고 사회에는 경제적 손해를 초래한다.

골대사는 조골세포의 작용에 의한 골형성과 파골세포의 작용에 의한 골흡수라는 상반된 2가지 요소로 이루어져 있다.⁷⁾ 성장이 끝난 골의 표면은 주기적으로 손상이 된 골을 제거하고 새로운 골을 만들어 채워주는 골재형(bone remodeling)이라는 과정을 거쳐 골을 튼튼하게 유지한다.

골의 재형 과정은 여러 종류의 전신호르몬과 국소 인자에 의하여 조절되는데 대표적인 전신적 호르몬으로는 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone, PTH), calcitonin, 1,25-dihydroxyvitamin D, estrogen, alkaline phosphatase 등을 들 수 있으며,⁹⁾ 국소인자로는 IGF-1, TGF- β , IL-1(interlukin-1), IL-6(interlukin-6) 등의 여러 가지 성장인자와 사이토카인(cytokine)이 관여한다.⁹⁾ 그외에도 운동,¹⁰⁾ 칼슘과 인의 농도 비율,¹¹⁾ 성장 호르몬(growth hormone),¹²⁻¹⁴⁾ bisphosphonate류,¹⁵⁾¹⁶⁾ vitamin류,¹⁷⁻¹⁹⁾ insulin²⁰⁾ 등의 여러 물질들이 복합적인 관계를 이루면서 골절에 영향을 미치게 된다.

한편 우리 나라에서는 한방에서 통경, 진통, 혈액순환 촉진 약으로 잘 알려진 홍화(또는 잇꽃, *Carthamus tinctorius* L.)의 씨가 골절, 골다공증, 골형성부전증 등 골절환의 치료에 효과가 있음이 민간에 전해져 왔다.²¹⁾ 홍화는 한국, 일본, 중국 등지에서 약용을 주목적으로 재배하여왔으며, 20세기부터는 미국, 인도 등지에서 식용유 생산용으로 재배되고 있는 자원작물이기도하다. 홍화의 약용부위는 꽃이며, 약용성분은 Cartharmin($C_{12}H_{22}O_{11}$)인데,²²⁻²⁴⁾ 한방의 처방 예로는 홍화탕, 활혈통경탕 등이 있으며,²⁵⁾ 꽃은 혈소판 응고를 억제하고 출혈시간을 지연시키는 작용이 있을 뿐만 아니라,¹¹⁾²¹⁾ 혈장 콜레스테롤과 중성지방 저하기능도 있어 여성들의 통경약이나 어혈을 푸는 약제로 한방에서 널리 사용해 왔다. 홍화씨에는 지방이 다량 함유되어 있는데, 특히 linoleic acid의 함량이 높아 혈중 콜레스테롤 저하작용을 나타낸다고 보고되었다.²⁶⁻²⁹⁾ 또한 뇌수막염(ence-

phalomyelitis)의 증상개선³⁰⁾ 등의 연구가 보고된 바 있으며, methanol추출물의 CCl_4 간독성에 대한 보호작용³¹⁾ 등이 연구되었으나 현재까지 골절 등에 관한 영향이나 작용기작은 구체적으로 연구·보고된 바는 없다.

따라서 본 연구에서는 1997년 홍화의 기능성 성분을 탐색하기 위한 실험에서 홍화씨 분말을 10% 수준으로 식이에 혼합하여 급여했을 때 골절치유 기간이 단축된 연구 결과³²⁾³³⁾를 근거로 하여, 홍화씨를 분말, 에탄올 추출물 및 물 추출물 형태로 가공하여 이들 성분이 녹골 골절된 흰쥐의 골절치유에 어떠한 영향을 미치는지를 관찰하고자 하였다. 즉 홍화씨 분말 및 분획 등을 혼합 식이 제조 시 5% 수준으로 첨가한 후, 녹골 골절된 흰쥐에게 급여하여 시간경과에 따른 골절 부위의 외형적인 형태 변화 및 현미경적 변화를 관찰하여 홍화씨 분말 및 분획 등의 골절치유에 대한 효과를 검정함과 동시에 그 기능성 분획을 확인하고자 하는데 연구목적이 있다.

재료 및 방법

1. 실험동물

한국화학연구소에서 생산된 10주령의 체중 300~320g인 Sprague-Dawley rat 수컷을 60마리 구입하여 7일간 교형사료(pellet)로 적응시킨 후, 난괴법(randomized block design)에 의해 9개의 group(각 group당 6~7마리)으로 나누었다. 동물들은 항온($25^{\circ}C \pm 2$)과 항습($60\% \pm 2$), 그리고 매일 12시간의 광주기하에서 각기 stainless wire cage에 한 마리씩 분리 사육되었으며 식이와 물은 자유로이 섭취할 수 있도록 하였고, 식이 섭취량은 매일 1회, 체중은 매주 1회 일정시간에 측정하였다.

2. 용매별 홍화씨 추출물의 제조

실험에 사용된 토종 홍화씨는 경북 의성군 소재 우리홍화인 영농조합으로부터 재배, 생산된 시료를 사용하였다. 수확된 홍화씨는 정선, 선별하여 세척하고 $180^{\circ}C$ 에서 15~20분간 roasting한 후 20 mesh 이하로 분쇄한 것을 사용하였으며, 본 실험실에서 분석된 홍화씨 분말의 일반성분 조성은 수분 5.2%, 회분 2.9%, 조단백질 18.4%, 조지방 22.9%, 당질 25.2%, 섬유소 25.4%로 확인되었다. 열수 추출물의 제조 시에는 볶음 홍화씨 분말 600g에 증류수 5배량(3,000ml)을 가하여 $90^{\circ}C$ 에서 6시간동안 1회 추출한 후 whatman No. 2 여과지를 이용하여 감압 여과하였다. 남은 잔류물에 다시 증류수 3,000ml을 가하여 반복 추출한 후 whatman No. 2 여과지로 감압 여과한 추출액을 $40^{\circ}C$

에서 다시 감압 농축하여 용매를 제거하였다. 이러한 절차에 의해 얻어진 추출물을 -50℃에서 동결 건조하여 분말화 하였으며 동결 건조된 열수 추출물의 수율은 10.1%로 계산되었다. 에탄올(EtOH) 추출물의 제조 시에는 볶음 홍화씨 분말 600g에 80% 에탄올 5배량(3,000ml)을 가하여 85℃에서 6시간동안 1회 추출한 후 whatman No. 2 여과지로 감압 여과하였다. 남은 잔류물에 다시 80% 에탄올 3,000ml을 가하여 반복 추출한 후 whatman No. 2 여과지로 감압 여과한 추출액을 40℃에서 다시 감압 농축하여 용매를 제거하였다. 이러한 절차에 의해 얻어진 추출물은 -50℃에서 동결 건조하여 분말화 하였으며 동결 건조된 에탄올(EtOH) 추출물의 수율은 4%로 계산되었다.

3. 실험식이 제조 및 급여

식이 group들은 Table 1과 같이 2개의 대조군(골절 후 10일째와 골절 후 20일째 group)으로 大分하여 각 group 내에서 무작위로 대조군(Control), 홍화씨 분말군(SS-powder), 홍화씨 에탄올 분획군(SS-EtOH), 홍화씨 물 분획군(SS-H₂O)으로 다시 나누었다. 실험식으로는 Table 2의 식이 조성을 가진 정상식이(AIN-76 semipurified diet)와 5% 홍화씨 혼합식을 제조하여 골절 유도 수술 10일전부터 골절 유도 수술 후 10일째와 20일째 되는 날까지 각각 급여하였다. 실험군의 식이 조성은 홍화씨 분말의 일반성분 조성을 참고로 하여 모든 군의 식이 내 영양소 밀도가 동일하도록 제조하였으며, 식이 내 홍화씨 분획의 농도는 용매 추출 전 홍화씨 분말상태로 계산하여 사료의 5% 수준이 되도록 첨가하였다. 단 sham-operation군은 대조군과 동일한 식이를 급여하였으며 모든 사료는 4℃로 냉장 보관하여 신선하게 공급하였다.

4. 골절 유도 수술

실험식이 11일째에는 수술방법에 의한 골절상을 유도하기 위하여 소형 동물에서 골절상이 빈번히 일어나는 늑골³⁶을 선택하였다. 생후 12주령의 수컷 Sprague-Dawley rat (체중 320~390g)에 ketamine-hydrochloride(유한양행)와 rompun(바이엘코리아주식회사)을 각각 체중 100g당 0.3 ml, 0.05ml의 용량으로 근육 주사하여 마취한 후 가슴부위의 털을 제거한 후 수술대에 고정하고 10% 포타딘 용액으로 수술할 부위를 소독하였다. 가슴피부의 일부를 최소면적으로 개복하여 우측 제9번 늑골을 수술용 가위로 자르고 골절부위를 육안으로 확인한 후 수술사로 봉합하였다. Sham-operation군은 골절을 가하지 않고 가슴부위의 개복 수술만 실시하여 봉합함으로써 실험종료 후 골절그룹과 대조하였다.

Table 1. Experimental design for the effect of different fractions of safflower seed(SS) on repairing of rib-fracture

Duration after rib-fracture	Symbols of groups	N*	Types of safflower seed
10 days	Control	7	-
	SS-powder	7	Powdered seed
	SS-EtOH	7	Powdered EtOH extract
	SS-H ₂ O	6	Powdered H ₂ O extract
20 days	Control	7	-
	SS-powder	7	Powdered seed
	SS-EtOH	7	Powdered EtOH extract
	SS-H ₂ O	6	Powdered H ₂ O extract
	Sham	6	-

*Number of animals

Table 2. Diet compositions of experimental diets(%) fed to rib-fractured animals

Ingredients	Dietary groups			
	Control	SS-powder	SS-EtOH	SS-H ₂ O
Casein	20.0	19.06	19.97	19.82
SS-powder	—	5	—	—
SS-EtOH extract	—	—	0.15	—
SS-H ₂ O extract	—	—	—	0.5
D,L-methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Corn starch	15.0	14.64	14.99	14.98
Sucrose	50.0	48.79	49.99	49.93
Cellulose	5.0	3.43	4.98	4.90
Corn oil	5.0	4.27	4.93	4.95
Mineral mix ^a	3.5	3.31	3.49	3.42
Vitamin mix ^b	1.0	1.0	1.0	1.0
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2

^aAIN mineral mixture 76(American Institute of Nutrition, Report of the AIN Ad Hoc Committee on standards for nutritional studies. J Nutr 107 1340-1348, 1977)

^bAIN vitamin mixture 76-A contained(in g/kg mixture): thiamin HCl, 0.6. riboflavin, 0.6. pyridoxine HCl, 0.7. nicotinic acid, 0.003. D-calcium pantothenate, 0.0016. folate, 0.2. D-biotin, 0.02. cyanocobalamin(vitamin B-12), 0.001. retinyl palmitate premix, 0.8. DL-alpha tocopheryl acetate, premix, 20. cholecalciferol(vitamin D₃), 0.0025. menaquinone(vitamin K), 0.05. antioxidant, 0.01. sucrose, finely powdered, 972.8.

5. 골 조직 표본의 제작, 현미경 관찰 및 파골세포수 분석

골절 유도 후 10일째와 20일째에는 사육된 각 군의 실험 동물로부터 골절부위인 우측 9번 늑골을 절취 즉시 Bouin 액에 침지하여 24시간 이상 고정하였으며, 5~7% 질산(Nitric acid)용액에서 3일간 매일 질산액을 교환하면서 탈회를 실시하였다. 탈회완료 후 5% sodium sulfate 수용액에 24시간 침지시키고 에탄올(ethanol) 계열로 탈수시킨 후 통상적인 방법으로 paraffin 포매를 실시하여 5~10µm의 연속절편을 제작하고, Hematoxylin-eosin(H & E)염색과 Masson's trichrome 염색을 행하여 광학현미경으로

조직을 관찰하였다.³⁴⁾³⁵⁾ 파골세포수는 조직 1mm²당 10군데를 counting하여 평균과 표준편차를 구하였다.

6. 통계처리 및 분석

본 연구의 모든 실험결과는 SPSS package program을 이용하여 각 변인마다 평균과 표준편차를 구하였고, 각 대조군의 실험 기간에 따른 차이를 분석하기 위하여 students' t-test를, 각 대조군들의 동일 기간 내 군별 비교는 one-way analysis of variance(ANOVA)분석을 이용하였다.

결과 및 고찰

1. 식이 섭취량, 수술 후 체중 증가량

실험기간에 따라 나누어진 각 군을 대상으로 녹골 골절을 유도한 후 10일 및 20일간의 식이 섭취량 및 체중 증가량을 측정하여 Table 3에 나타내었다. 1일 평균 식이 섭취량은 모든 군에서 비슷한 수준이었으며, 치유가 진행되는 동안의 체중 증가량은 수술 10일 후 대조군을 제외하고는 수술에 의한 약간의 체중감소가 있었으나, 수술 20일 후에는 모든 군에서 체중이 증가되어 군간 식이 섭취량과 체중 증가에 대한 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다. 수술 후 체중의 부하와 영양적인 차이에 따라 골절치유도에 변화가 있다는 보고가 있으나³⁶⁻³⁸⁾ 본 실험결과에서는 식이군 간 수술 후 체중 증가와 식이 섭취량에 대한 차이가 없었다.

2. 골절 조직의 형태학적 변화 분석 결과

1) 녹골 골절 치유기간동안 관찰된 골조직의 외형변화

골절 후 일어나는 초기반응은 골절로 손상된 부위에 호중성구와 거식세포가 많이 모여 응고된 혈액, 죽은 골세포 조각 및 파괴된 골기질과 같은 골 조직 찌꺼기를 제거하게 된

다.³⁹⁾ 다음으로 섬유아세포의 증식과 더불어 혈관신생을 동반한 육아조직(granulation tissue)으로 인해 기질화(organization)가 일어나고 진행하여 골절부위를 둘러싸는 연골과 불규칙하게 형성된 미성숙골의 지주(trabecular)가 골절된 뼈의 양끝을 일시적으로 결합시키는 가골(bony callus)이 형성되어 점차 골화 과정이 진행된다. 이 단계를 통해 골절된 부위의 결합조직에서는 작은 연골조각으로부터 연골내 골화과정(endochondral ossification)이 일어나거나 막내 골화과정(intramembranous ossification)을 통해서 미성숙골(immature bone)이 형성된다.³⁹⁾⁴⁰⁾ 마지막으로 형성된 가골이 점차 성숙 층판골(mature lamellar bone)로 바뀌면서 과도하게 생성된 골이 파골세포(osteoclast)에 의해 흡수되고 재형형(remodeling)이 완성되어지면서 골절 부위가 완전히 복구되어진다.³⁹⁾⁴⁰⁾ 골절부위를 덮고 있는 두꺼운 결합조직 및 초자연골로 이루어진 가골은 골절된 부위를 안정화시키며 뼈의 접착을 도모하게 되는데,³⁹⁾ 골절치유 과정 중 분리된 녹골의 외형적인 변화는 Fig. 1과 같다. 골절 부위를 덮고 있는 두꺼운 결합조직 및 초자연골로 이루어진 가골은 골절후 10일째 이미 두텁게 형성되었는데 이는 골절된 부위를 안정화시키며 뼈의 접착을 도모한다.³⁹⁾ 형성된 가골의 대략적인 경도는 가골을 중앙에 둔 녹골을 좌우에 잡고 아래로 휘었을 때 쉽게 부러지는 정도로 시험하였다. 그 결과 골절후 10일째에서는 군간 가골 두께에 큰 차이가

Table 3. Food intake and weight gain in rib-fractured rats fed different fractions of safflower seed diet

Duration after rib-fracture	Dietary groups	Food intakes (g/day)	Weight gains (g/day)
10 days	Control	25.71 ± 0.94 ¹⁾	0.30 ± 0.42
	SS-powder	24.50 ± 1.23	-0.09 ± 0.40
	SS-EtOH	27.79 ± 0.88	-0.64 ± 0.37
	SS-H ₂ O	25.54 ± 1.15	-0.27 ± 0.24
20 days	Control	26.93 ± 0.82	1.06 ± 0.17
	SS-powder	26.89 ± 1.11	0.94 ± 0.12
	SS-EtOH	28.18 ± 0.58	1.16 ± 0.23
	SS-H ₂ O	26.63 ± 0.49	0.85 ± 0.50
	Sham	27.46 ± 0.46	1.34 ± 0.08

1) Mean ± S.E.

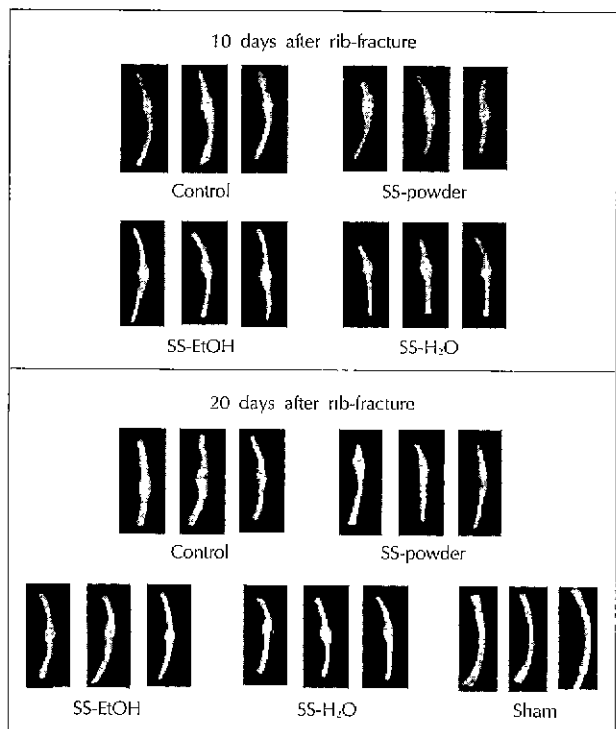


Fig. 1. Callus of fractured ribs at the 10th day and 20th day.

없었으며 모든 군들의 늑골절단면은 외형적으로는 두터운 가골속에 접착되어 있는 것처럼 보였지만 외부의 기계적인 힘에 의해 그 절단면이 쉽게 분리되었다. 골절후 20일째에는 SS-EtOH군과 SS-H₂O군이 다른 군에 비해 가골의 크기가 다소 축소되어 있었으며 골절 절단면이 다른 군에 비해 좀 더 강하게 유착되어 쉽게 분리되지는 않았으나 분리는 가능하였다.

2) 늑골 골절 치유기간동안 관찰된 골조직의 현미경적 변화

늑골 골절 치유에 있어서 가골이 형성되는 동안 뼈선조세포(osteoprogenitor cell)로부터 분화된 조골세포는 골절 부위로부터 같은 거리상의 위치에 있는 골표면에 축적되면서 골절부위를 향해 새로운 뼈의 재형성을 진행시키게 된다.³⁹⁾ 손상된 늑골에서 일어난 전체적인 변화로는 섬유아세포(fibroblast)들과 모세혈관 조직의 증식이 관찰되었으며, 골절부위에 새로이 형성된 느슨한 결합조직(granulation tissue)이 점차로 두꺼워져 가고, 섬유아세포(fibroblast)들과 골절주변 세포들은 세포성 조직을 형성하는 것으로 나타났다. 골절된 늑골의 치유가 계속 진행되는 동안 가골 내 생성된 콜라겐(collagen)과 초자연골(hyaline cartilage)은 bony callus로 교체되었는데, 이 과정에서는 이미 알려진 것처럼 막성 골화와 연골내 골화과정³⁹⁾⁽⁴¹⁾⁽⁴⁴⁾에 의해 원래의 가골에 형성된 초자연골이 파골세포에 의해 파괴되고 좀 더 단단한 뼈인 미성숙골(immature bone) 또는 지주골(trabecular bone)로 교체되는 과정이 관찰되었다. 골절치유가 더욱 구체적으로 진행되는 동안 bony callus의 이러한 연골 지주골들이 연골파골세포(chondroclast)에 의해 파괴된 후, 다시 석회화되어 치밀골(compact bone)인 층판골(lamellar bone)로 교체되는 골재구성⁴¹⁾ 과정이 진행된 것으로 나타났다. 보고에 의하면 흰쥐에 있어 골절치유 단계 중 염증기는 골절 후 약 0~10일, 가골이 형성되는 복

원기는 골절 후 5~28일, 과도 형성된 가골이 흡수되고 본래의 뼈모양을 되찾는 재성형기는 28일 이후까지인 것으로 알려져 있으며²⁾⁽⁴⁵⁾⁽⁴⁶⁾ 본 실험결과에서도 그 시기는 큰 차이를 나타내지 않았다. 또한 사람의 경우에는 개인의 영양상태나 골절 형태 등에 따라 다소 다르나 건강한 사람의 경우 6~12주가 걸리는 것으로 알려졌다.⁴⁰⁾ 본 실험에서는 홍화씨 분말의 급여가 이러한 골절치유에 걸리는 시간을 단축하는 것으로 나타났으며 골절된 조직의 치유진행에 따라 관찰된 홍화씨 실험군들과 대조군의 조직형태를 구체적으로 비교하면 다음과 같다.

(1) Sham군의 늑골 조직

Sham-operation군의 늑골 조직은 정상군과 동일한 조직조건이 인정되었는데, 즉 하버스관(Haversian canal)을 중심으로 층판골(lamella bone)이 양파모양으로 배열되어 있는 골단위(osteon)로 구성된 치밀골(compact bone)들이 골수강을 중심으로 존재하며, 이들 치밀골 이외 손상된 골 조직에서 관찰되는 지주골(trabecular bone), 초자연골(hyaline cartilage), 결합조직(connective tissue) 등은 거의 관찰되지 않았다(Fig. 2A, 2B).

(2) 골절 후 10일째 골절 조직

골절 선을 중심으로 결합조직, 초자연골 및 지주골로 구성된 가골의 형성이 관찰되었으며, 특히 대조군에서는 가골 내에서 다량의 결합조직이 여전히 남아있는 것으로 관찰된 반면, SS-powder군, SS-EtOH군 및 SS-H₂O군에서는 중등도의 결합조직이 관찰되었다(Table 4). 또한 초자연골은 모든 홍화씨 실험군에서 비교적 많은 양으로 관찰되었으나, 대조군에서는 중등도로 관찰되어 다량의 초자연골이 관찰된 홍화씨 실험군과 차이를 나타내었다. 한편 골절치유 회복기부터 나타나는 지주골은 대조군, SS-powder군 및 SS-EtOH군에서 소량 관찰되어 별 다른 차이를 나타내지 않았

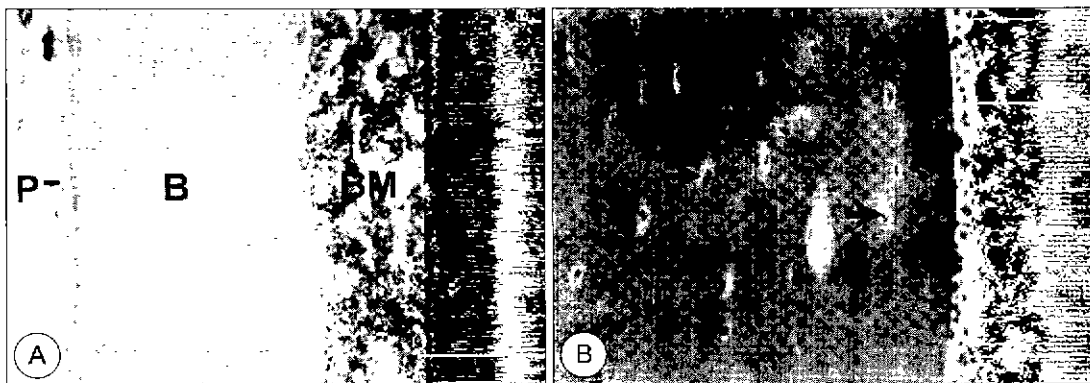


Fig. 2. Histological profiles of bone structures in sham-operated group at the 20th day after operation. B Bone, BM Bone marrow, P Periosteum, Arrow Osteocyte. A Masson's trichrome stain, X 150, B: Hematoxylin-eosin stain, X 300.

으나, SS-H₂O군에서는 중등도로 관찰되어 나머지군들에 비해 많은 양으로 나타났다.

골절 10일째 파골세포의 수적 변화는 Fig. 4, 5과 같이 대조군에서는 3.80 ± 0.84 로 관찰되었으나, SS-powder군과 SS-H₂O군에서는 각각 6.80 ± 0.84 와 5.60 ± 0.55 로 관찰되어 대조군에 비해 유의적으로($p < 0.01$) 증가되었다. 그러나 SS-EtOH군에서는 3.60 ± 0.89 로 관찰되어 대조군과 거의 유사한 것으로 관찰되었다.

(3) 골절 후 20일째 골절 조직

모든 실험군에서 골절 후 10일째와 유사하게 결합조직, 초자연골 및 지주골로 구성된 가골이 풍부하게 관찰되었으

Table 4. Composition of bony callus formed in rib-fractured rats supplemented with different types of safflower seed preparation

Duration after rib-fracture	Dietary groups	Connective tissue	Hyaline cartilage	Trabecular bone
10 days	Control	+++	++	+
	SS-powder	++	+++	+
	SS-EtOH	++	+++	+
	SS-H ₂ O	++	+++	++
20 days	Control	+	++	++
	SS-powder	±	+	+++
	SS-EtOH	+	+	+++
	SS-H ₂ O	±	±	+++

Remarks: +++: numerous, ++, moderate, +, a few, ±: rare

나, 골절 후 10일째에 비해 비교적 결합조직과 초자연골량은 감소한 반면, 지주골의 양은 증가되었다(Table 4). 대조군의 결합조직은 골절 후 10일째에 비하여 현저히 감소되었지만 소량 관찰되었고, 초자연골과 지주골은 중등도로 관찰되어 골절 후 10일째와 유사한 수준으로 나타났다. 한편 SS-powder군과 SS-H₂O군의 결합조직량은 극소량만이 관찰되어 대조군에 비하여 현저히 작은 양이었으나, SS-EtOH군에서는 대조군과 유사한 양이 관찰되었다 또한 초자연골의 양은 SS-powder군과 SS-EtOH군에서 소량 관찰되었으며, SS-H₂O군에서는 극소량 관찰되어 대조군에 비하여 현저한 감소를 볼 수 있었다. 골절치유 후반기에 나타나는 지주골량은 대조군에 비해 SS-powder군, SS-EtOH군 및 SS-H₂O군에서 다량 관찰되어 실험식이에 보충된 홍화씨 분말, 홍화씨 에탄올 분획 및 홍화씨 물 분획 모두가 골골절 치유기간을 단축시킨 것으로 나타났다(Fig. 6).

한편 골절 후 20일째 파골세포의 수적변화는 Fig. 5, 7에 서와 같이 대조군에서는 3.60 ± 1.14 로 관찰되었으나, SS-powder군과 SS-H₂O군에서는 각각 7.20 ± 0.84 와 6.20 ± 1.30 으로 관찰되어 대조군에 비해 유의적으로($p < 0.01$) 증가되었으며, 골절 후 10일째에 비해서도 다소 증가되었다. 그러나 골절 후 20일째 SS-EtOH군의 파골세포수는 4.00 ± 0.71 로 관찰되어 대조군 및 골절 후 10일째에 비해 증가

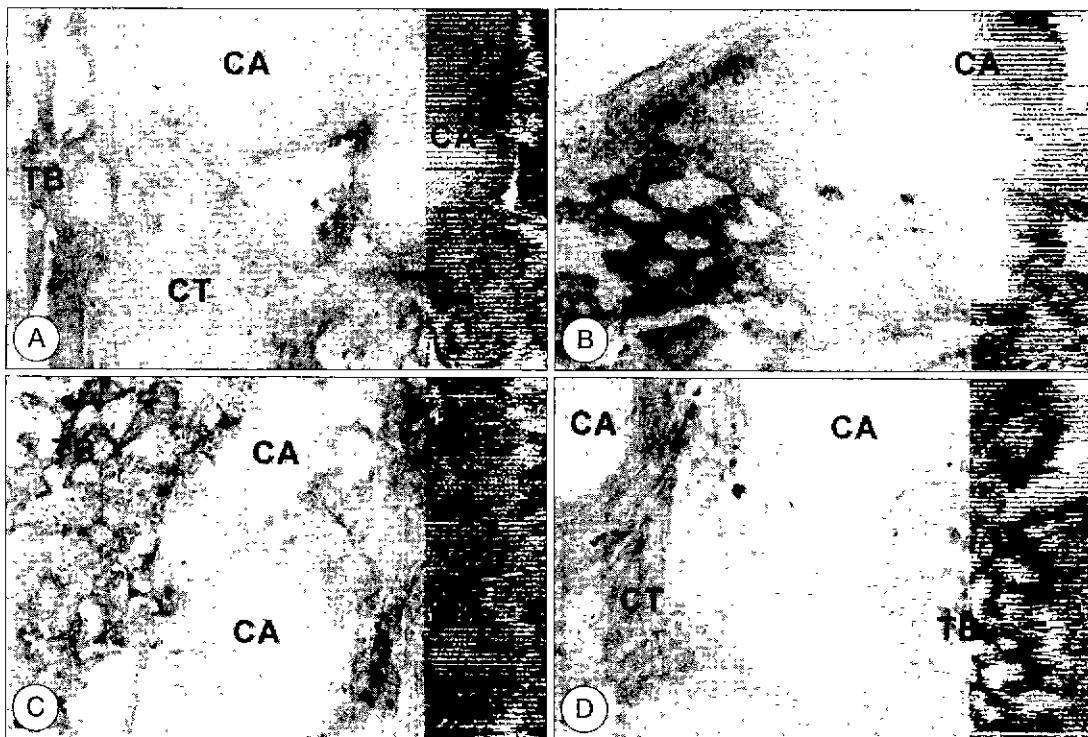


Fig. 3. Histological profiles of bone structure at the 10th day after rib-fracture(Masson's trichrome stain, X 150). CA Hyaline cartilage, CT Connective tissue, TB: Trabecular bone. A Control group, B: SS-powder group, C: SS-EtOH group, D SS-H₂O group

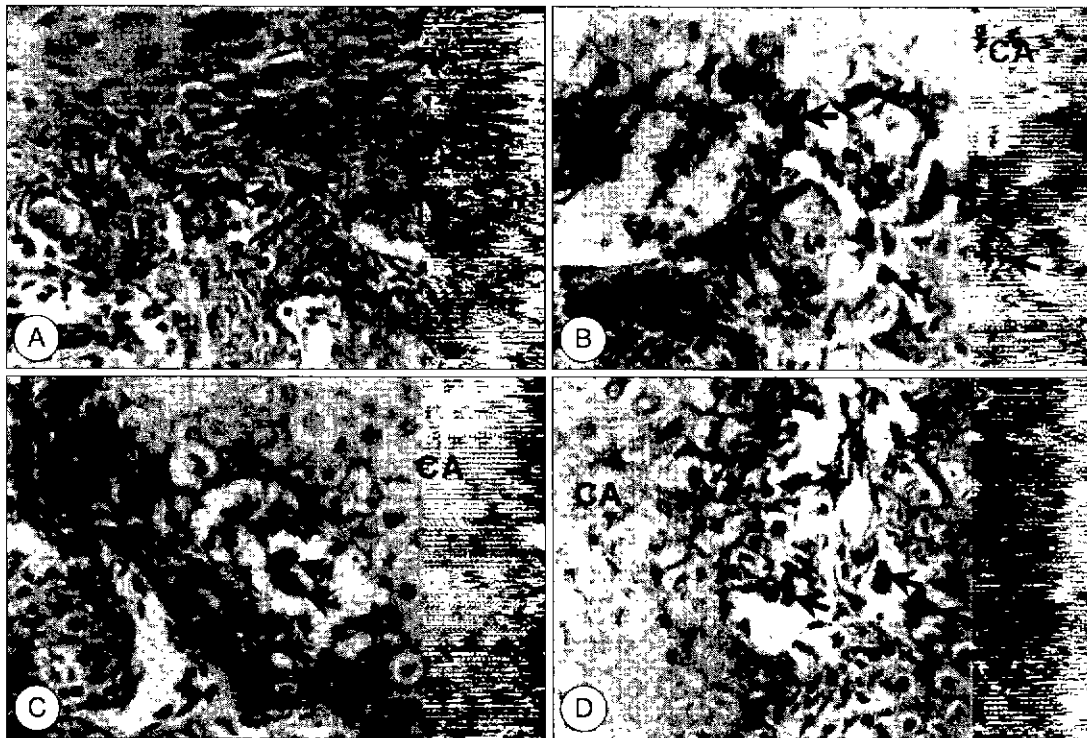


Fig. 4. Distribution of osteoclast cell of bone structure at the 10th day after rib-fracture(Hematoxylin-eosin stain, X 300). CA: Hyaline cartilage, CT: Connective tissue, TB: Trabecular bone, Arrow: Osteoclast cell. A: Control group, B: SS-powder group, C: SS-EtOH group, D: SS-H₂O group.

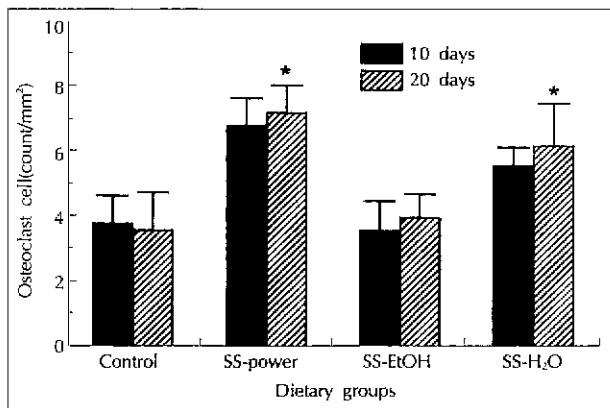


Fig. 5. Numbers of osteoclast cells in rib-fractured rats supplemented with different fraction of safflower seed. Each values are expressed as a mean \pm S.E.(n = 6) The numbers were counted under 400 magnification of light microscope. *p < 0.01 significantly different from control group.

된 경향을 보였으나 유의성은 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 미루어 보아 홍화씨 에탄올 분획은 골흡수 과정을 촉진시키지 않고 능골 골절 치유에 기여하는 것으로 보이며, 그 작용기전은 홍화씨 분말이나 홍화씨 물 분획과는 다른 것으로 추측된다.

이상과 같은 형태학적 분석결과, 가골 조직의 구성 및 파골세포의 수적변화로 미루어 보아 SS-powder, SS-EtOH

분획 및 SS-H₂O 분획의 투여에 의하여 골절의 치유가 촉진되는 것으로 사료되며, 그중 특히 SS-powder와 SS-H₂O 분획이 골절치유에 보다 유효한 것으로 평가되었다. 이 결과는 경골 골절이 유발된 흰쥐에게 10%의 홍화씨 혼합사료를 임의 투여하였을 때 가골이 형성되는 골절치유 초기단계에 홍화씨가 가골의 형성을 촉진시켰다는 송 등⁴⁾의 연구결과와도 일치한다.

요약 및 결론

기계문명의 발달로 인해 산업재해와 교통사고 등의 발생이 급증하면서 골절은 일상생활에서 아주 흔하게 볼 수 있는 질병의 하나가 되었다. 골절은 신체 장애를 비롯하여 골절 부위의 통증으로 인한 육체적 고통, 심리적 불안, 경제적 손실 등을 주어 개인에 있어 삶의 질을 저하시키고 사회에는 경제적인 손실을 초래하므로 골절 치유를 신속하게 하는 치료방법이나 물질 등을 찾는 것이 시급한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 홍화씨가 골절, 골다공증, 골형성부전증 등의 골질환 치료에 효과가 있다는 동의보감의 기록을 근거로 하여 홍화씨를 분말, 에탄올 추출물 및 열수 추출물로 가공하여 이들 성분이 능골 골절된 흰쥐의 골절 치유에 어떠한 영향을 미치는지를 관찰하고 그 효과를 검증하며 홍화씨

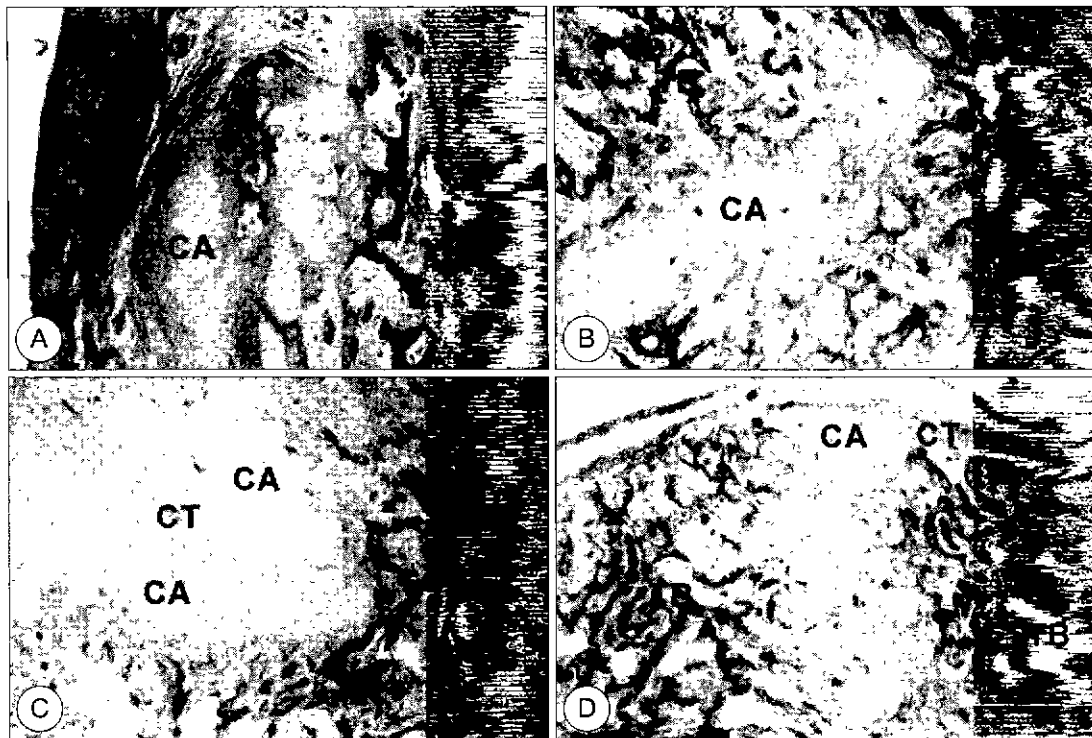


Fig. 6. Histological profiles of bone structure at the 20th day after rib-fracture(Masson's trichrome stain, X 150). CA: Hyaline cartilage, CT: Connective tissue, TB: Trabecular bone. A: Control group, B: SS-powder group, C: SS-EtOH group, D: SS-H₂O group.

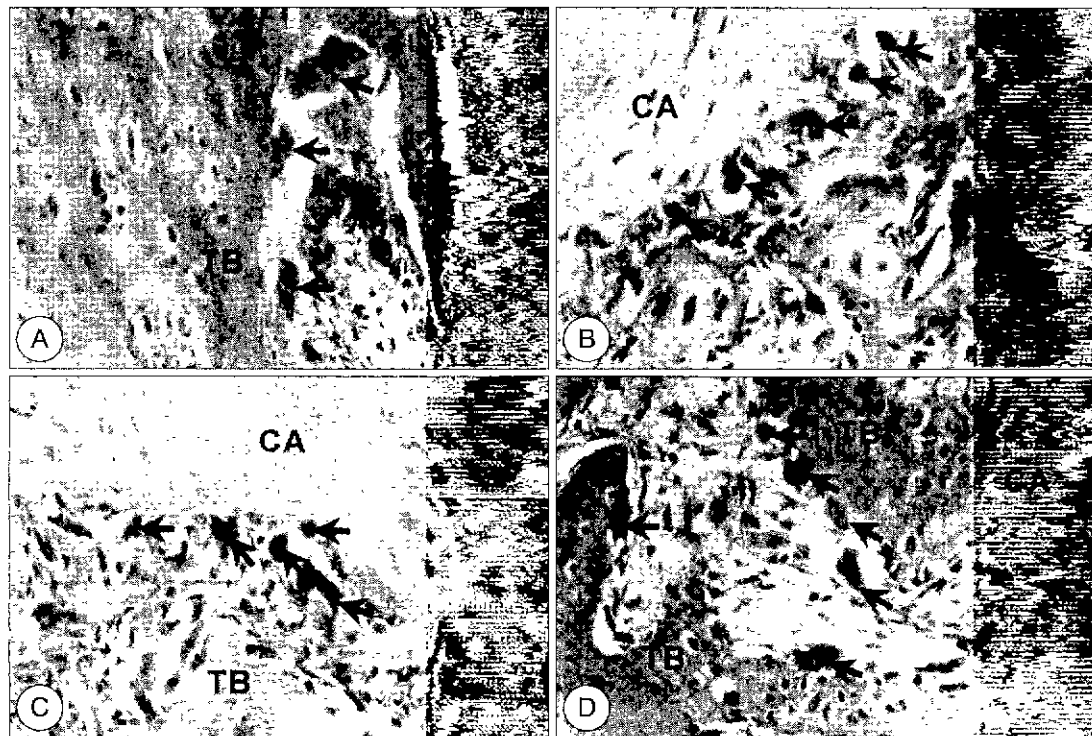


Fig. 7. Distribution of osteoclast cell of bone structure at the 20th day after rib-fracture(Hematoxylin-eosin stain, X 300). CA: Hyaline cartilage, CT: Connective tissue, TB: Trabecular bone, Arrow: Osteoclast cell. A: Control group, B: SS-powder group, C: SS-EtOH group, D: SS-H₂O group.

의 기능성 분획을 확인하고자 하였다. 실험대상은 체중이 약 320 g인 Sprague-Dawley 10주령 수컷 쥐를 선택하였고 실험기간에 따라 크게 골절유도 후 10일째와 20일째까지 사육하는 2 group으로 大分하였다. 각 group내에서는 대조군(control군)과 5% 홍화씨 분말군(SS-powder군), 홍화씨 에탄올 분획군(SS-EtOH군), 홍화씨 물 분획군(SS-H₂O군) 등의 subgroup을 다시 나누어 녹골 골절 유도 수술 전 10일부터 실험식이틀 급여하기 시작하여 녹골 골절 후 10일째 또는 20일째까지 급여하였다.

이에 따른 실험결과를 요약하면 다음과 같다.

1) 수술 후 섭취한 평균 1일 식이 섭취량은 모든 군에서 비슷한 수준이었으며, 체중 증가량은 골절 수술 후 10일째의 경우 대조군을 제외하고는 체중이 다소 감소하였으나 20일째에는 모든 군에서 체중이 증가되었다.

2) 육안으로 본 골절 조직의 형태학적 변화 분석 결과는 골절 수술 후 10일째 군내 비교에서는 가골 두께의 차이가 없었으나 20일째에는 SS-EtOH군과 SS-H₂O군에서 가골의 크기가 다소 축소되었다.

3) 골절 조직의 현미경적 변화로는 골절 후 10일째 대조군에서 다량의 결합조직이, 홍화씨 실험군에서는 다량의 초자연골이 관찰되었으며, 특히 SS-H₂O군에서는 골절 치유 말기에 많이 관찰되는 지주골이 중등도로 관찰되었다. 골절 후 20일째는 10일째에 비해 결합조직과 초자연골의 양은 비교적 감소한 반면, 지주골의 양은 훨씬 증가하였다. 즉 골절 후 20일째 결합조직량은 SS-powder군과 SS-H₂O군에서 극소량만이 관찰되었고, 초자연골량은 SS-powder군과 SS-EtOH군에서 소량 관찰되었으며 특히 SS-H₂O군에서는 극소량 관찰되었다. 골절 후 20일째의 지주골 양은 대조군에 비해 SS-powder군, SS-EtOH군 및 SS-H₂O군에서 다량 관찰되었다.

4) 골절후 10일째 파골세포수의 변화는 대조군에 비해 SS-powder군과 SS-H₂O군이 유의적으로 높았으며 이는 골절후 20일째에서도 동일하게 관찰되었다.

이상과 같은 연구결과를 종합하면 홍화씨 분말, 홍화씨 에탄올 분획 및 물 분획의 투여에 의하여 골절의 치유가 촉진되는 것으로 사료되며, 특히 홍화씨 분말과 물 분획이 부러진 녹골의 유합 속도를 빠르게 하여 복구에 걸리는 시간을 단축시킴으로써 골절 치유에 유효한 것으로 평가되나, 그 기전에 대하여는 아직까지 홍화씨의 성분 및 효능에 대한 연구가 매우 희박하여 그 예측 방향이 극히 제한적이다. 따라서 홍화씨의 골절치유 촉진효과의 기전을 밝히기 위하여는 홍화씨 기능성 분획의 정밀한 성분 분석과 아울러 작용기전에 대한 더욱 많은 연구가 수행되어야 할 것이다.

Literature cited

- 1) Kawamura M, Urist MR. Induction of Callus Formation by Implants of Bone Morphogenetic Protein and Associated Bone Matrix Non-collagenous Protein. *Clin Orthop* 236: 240-248, 1988
- 2) Frost HM. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop* 248: 283-293, 1989
- 3) Hulth A. Basic science and pathology Current concepts of fracture healing. *Clin Orthop Rel Res* 249: 265-284, 1989
- 4) Contron RS, Kumar V, Robbins SL. Pathologic basis of disease 5th ed., WB Saunders Com, Philadelphia, 1213-1272, 1994
- 5) John W, Hole J. Human Anatomy Physiology. Wm C Brown publisher, Oxford, 170-227, 1993
- 6) 박가식. 골절의 치유과정에서 전혈중의 Ca-Mg, Zn-Cu의 농도변화에 관한 연구. 충남대학교 대학원 의학과 예방의학박사논문. 1992
- 7) Kang ML. Clinical application of biochemical markers of bone turnover. *대한골대사학회지* 1(2) November. 246-253, 1994
- 8) 김화영. 식이 단백질 수준이 Ca 및 골격대사에 미치는 영향. *식품영양정보*. 제5호. 이화여자대학교 아시아 식품영양연구소. 13-33, 1994
- 9) Kim KS. Cytokines and Bone. The Korean Society of Endocrinology. '97 Endocrinology Update. *조선출판 한의학* 49-54, 1997
- 10) Orwoll ES, et al. The effect of swimming exercise on bone mineral content(abstract). *Clin Res* 35: 194A, 1987
- 11) Kee CH. The Pharmacology of Chinese Herbs. CRC, press 249, 1993
- 12) Bak B, Jorgensen PH, Andreassen TT. The stimulation effect of growth hormone on fracture healing is dependent on onset and duration of administration. *Clin Orthop* 264. 295-301, 1988
- 13) Bak B, Jorgensen PH, Andreassen TT. Dose response of growth hormone on fracture healing in the rat. *Acta Orthop Scand* 61(1) 54-57, 1990
- 14) Mosekilde L, Bak B. The effect of growth hormone on fracture healing in rats. A histological description. *Bone* 14. 19-27, 1993
- 15) Tarvainen R, et al. Effect of clodronate on fracture healing in denervated rats. *Bone* 15(6). 701-705, 1994
- 16) Hyvonen PM, Karhi T, Kosma V-M, Liimola-Luoma L, Hanhijarvi H. The influence of dichloromethylene bisphosphonate on the healing of long bone fracture, composition of the bone mineral and histology of bone in the rat. *Pharmacol Toxicol* 75. 384-390, 1994
- 17) Dodds RA, Catterall A, Bitensky L, Chayen J. Effect in fracture healing of the antagonist of the vitamin K cycle. *Calcif Tissue Int* 36(2). 233-238, 1984
- 18) Durak K, Bilgen OF, Kaeh T, Tuncel P, Ozbek R, Turan K. Antioxidant effect of alpha-tocopherol on fracture haematoma in rabbits. *J Int Med Res* 24(5) 419-424, 1996
- 19) Omeroglu H, Ates Y, Akkus O, Bicimoglu A, Akkas N. Biomechanical analysis of the effects of single high-dose vitamin D₃ on fracture healing in a healthy rabbit model. *Arch Orthop Trauma Surg* 116(3) 271-274, 1997
- 20) Ziegler R, Delling G. Effect of calcitonin on the regeneration of circumscribed bone defect(bored hole in rat tibia). *Acta Endocrinol* 69: 497, 1972
- 21) 동의보감(東醫寶鑑) 제3권, 12장, 풀부, 여강출판사 pp.2763, 1989
- 22) 黒田さか 紅花の色素(1) 日化誌 51 237-256, 1930
- 23) 山口一孝 植物成分分析法(上) 南江堂 260-265, 1963
- 24) Beech DF. Safflower, *Field Crop. Astr* 22 107-119, 1969
- 25) 안덕균, 육창수. 현대본초학. 고분사 358-359, 1975
- 26) Khan AR. Studies in Indian Oil seeds, No 3. *Carthamus tinctorius* L. The types of Safflower. *Memoris, Dept Agn India, Bot, Ser 18* 81-87, 1929
- 27) 西川五郎, 三上蘇之郎, 黒田昭太郎. パニバナの形態と生育に關する研

- 究. 日作記 26(9). 51, 1957
- 28) 藤原美若, 動脈硬化 治療豫防劑, としてのべこ一への效用, 新柴と臨床, 8(5) 71-74, 1959
- 29) Nast HG, N. Katkhuda and I. Tannir. Effects of fertilization and population rate-spacing on Safflower yield and other characteristics. *Agron J* 70: 683-685, 1978
- 30) Harbig LS, Yeatman N, Amor S, Crawford MA. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats by a novel fungal source of gamma-linoleic acid. *Br J Nutr* 74(5). 701-715, 1995
- 31) Jung KH, Jeong CS. Protective effect of *Carthamus tinctoris* L. semen on hepatotoxicity by carbon tetrachloride in rats. *J Appl Pharmacol* 4 426-436, 1996
- 32) Kim JH, Jeon SM, An MY, Ku SH, Lee JH, Choi MS, Moon KD. The effects of Korean safflower(*Carthamus tinctoriosus* L.) seed powdered diet on bone tissue in rats during the recovery of rib fracture. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27(4): 698-704, 1998
- 33) Jeon SM, Kim JH, Lee HJ, Lee IK, Moon KD, Choi MS. The effects of Korean safflower(*Carthamus tinctoriosus* L.) seed powder supplementation on bone metabolism indices in rats during the recovery of rib fracture. *Korean J Nutrition* 31(6): 1049-1056, 1998
- 34) Statter DH. Textbook of small animal surgery. Vol I, WB Saunders Company, Philadelphia, pp.543, 1985
- 35) Culling CFA. Handbook of histopathological and histochemical techniques. 3rd ed, Butterworths, pp.49, 63, 211, 414, 1974
- 36) Sarmiento A, Schaeffer JF, Beckerman L, Latta LL, Enis JE. Fracture healing in rat femora as affected by functional weightbearing. *J Bone Joint Surg* 59(3) 369-375, 1977
- 37) Einhorn TA, Bonnarens F, Burstein AH. The contributions of dietary protein and mineral to the healing of experimental fractures. *J Bone Joint Surg* 68-A(9): 1389-1395, 1986
- 38) Geinoz G, Rapin CH, Rizzoli R, Kraemer R, Buchs B, Slosman D, Michel JP, Bonjour JP. Relationship between bone mineral density and dietary intakes in the elderly. *Osteoporos Int* 3(5). 242-248, 1993
- 39) Ross MH, Romrell LJ, and Kaye GI. Histology a text and atlas. 3rd ed, Williams & Wilkins Publisher, A Waverly Company 150-187, 1995
- 40) Hammersen F. Sobotta/Hammersen Histology color atlas of microscopic anatomy. 3rd ed, Urba & Schwarzenberg Publisher, Baltimore-Munich, p.75, 1985
- 41) Banks WJ. Applied veterinary histology. 2nd ed, Williams & Wilkins Publisher, pp.119, 1986
- 42) Bacha WJ Jr, Wood LM. Color atlas of veterinary histology Lea & Febiger Publisher, Philadelphia · London, pp.21, 1990
- 43) Dellmann HD. Textbook of veterinary histology. 4th ed, Lea & Febiger, Philadelphia, pp.41, 1993
- 44) 강종구, 박수동, 김무강, 김성호, 신태균, 임홍천, 윤여성, 이계현, 이준섭, 장병준. 수의조직학. 정문각. pp. 59, 1996
- 45) Mann FA, Payne JT. Bone healing. *Sem Vet Med Surg* 4 312-321, 1989
- 46) Schelling SH. Secondary(classical) bone healing. *Sem Vet Med Surg* 6 16-20, 1991
- 47) Seung SA, Chung SY, Yang JS, Yoo TM, Yi SY, Kim GJ, Kim HS, Rhee HM. Studies on the pharmacological assay of the fracture healing in long bone. *The Annual Report of KFDA*. 1 456-469, 1997