

난소적출 흰쥐에서 홍화 (*Carthamus tinctorius* L.) 씨 분말이 골흡수에 미치는 영향

배춘식*, 박창현^{1,2}, 장병준¹, 김휘율¹, 조익현¹, 엄창섭³
전남대학교 수의과대학, ¹건국대학교 수의과대학,
²고려대학교 의과대학 전자현미경실, ³해부학교실

Effects of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Seed Powder on Bone Resorption in Ovariectomized Rats

Chun-Sik Bae*, Chang-Hyun Park^{1,2}, Byung-Joon Chang¹,
Hwi-Yool Kim¹, Ick-Hyun Cho¹ and Chang-Sub Uhm³

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University,

¹College of Veterinary Medicine, Konkuk University, ²Electron Microscope Laboratory,

³Department of Anatomy, College of Medicine, Korea University

(Received December 7, 2000)

ABSTRACT

Safflower has been cultivated in Korea and thought to have excellent effects on bone in oriental medicine and folk remedy and has been taken for a long time. Safflower is thought to be helpful for the development and sustenance of bones according to the result of recent assay of its components. Otherwise, any reliable experimental data have not been suggested so far. We have carried out this study to examine the prophylactic effects of safflower-seed-powder on the prevention of osteoporosis induced by the ovariectomy.

12 Weeks-old Sprague-Dawley rats weighing about 230 g was kept in the experimental condition and used in this study. Animals were taken 0.3 g of safflower-seed-powder once a day for 1, 3, 5, and 7 weeks after ovariectomizing both ovaries and observed the fine structure of tibia. Tissues were fixed with traditional SEM preparation methods and decalcified for 10 hours with 10% nitric acid and dehydration, drying, and gold-coating were followed by the routine procedures and observed with scanning electron microscope (Hitachi, S-450).

Loss of bone was started just after ovariectomy and thickness of bone from the medullary cavity to the compact bone was reduced and the extension of medullary cavity was serious in the control group of 7 weeks. Experimental groups taken safflower-seed-powder showed similar findings from 1 week to 7 weeks.

These results suggest that the safflower-seed-powder is thought to be efficient for the prevention of osteoporosis owing to the deficiency of female sex hormone.

Key words : Osteoporosis, Rat, Safflower seed powder

본 연구는 칠곡홍화씨농장의 일부 연구비 지원(배춘식)에 의해 수행되었음.

본 논문의 요지는 제30차 한국전자현미경학회 추계학술대회에서 발표되었음.

*Correspondence should be addressed to Dr. Chun-Sik Bae, Department of Surgery, College of Veterinary Medicine, Chonnam National University

E-mail: csbae210@chonnam.ac.kr

Copyright © 2001 Korean Society of Electron Microscopy

서 론

골다공증은 골밀도의 감소와 골조직의 미세한 구조적 약화에 의하여 골의 취약성과 골절에 대한 감수성의 증가가 특징인 골의 대표적인 대사성 골격질환이다(Kleerekoper, 1998).

골다공증은 병인에 따라 크게 원발성 골다공증과 속발성 골다공증으로 구분되며, 원발성 골다공증은 폐경기 후의 여자나 나이든 남자와 여자에서 보여지는 골밀도의 감소와 골질의 감수성이 증가된 상태이며, 속발성 골다공증은 인슐린의존성 당뇨병, 과도한 위절제, 갑상선기능항진증 등의 특이적이고 명확한 임상적 질병에 기인한 골소실을 의미한다(Gennari et al., 1998).

골다공증은 다양한 병인론을 가지고 있으므로 예방과 치료에는 어느 한가지의 병리학적인 원인을 찾아서 원인에 대처하는 것이 매우 힘들며 첫째, 최적의 최대골밀도치가 유년시절, 청소년기 및 초기 성인기 동안에 성취되도록 하며 둘째, 현재의 골량을 유지하며 셋째, 연령증가에 따른 골소실을 억제함으로써 예방할 수 있다(Kulak & Bilezikian, 1998).

이를 위해서는 적당량의 칼슘과 vitamin D의 섭취, 규칙적인 운동 및 호르몬 대체요법 등이 필요하다(Lane & Nydick, 1999; Le Pen et al., 2000).

홍화(*Carthamus tinctorius* L.)는 옛부터 잇꽃이라는 이름으로 널리 알려졌으며 꽃에서 뽑아낸 carthamin이라는 빨간색 색소와 safflower yellow라는 노란색 색소가 최고급 염료로 이용되어 왔으나 광물성 염료의 개발로 인하여 요즘에는 그 이용이 드물다. 홍화는 이집트가 원산지로 기원전 2천 5백년에 재배했다는 기록이 있으며, 우리나라에서는 삼국시대 이전부터 재배했을 것으로 짐작되고 있다(Lee & Choi, 1998). 홍화씨는 칼슘과 칼륨, 마그네슘을 비롯하여 홍화유라 부르는 지방유 oleic acid와 linoleic acid를 함유하고 있으며 관상동맥경화증의 예방(McCullagh et al., 1976), 혈장 콜레스테롤과 중성지방 저하기능(Ohshima et al., 1996), 혈소판 응고를 억제하고 출혈 시간을 지연시키는 효과(Van Way et al., 1983) 등이 있다.

최근에는 홍화씨가 뼈가 부러지거나 금이 갔을 때, 골다공증과 같은 뼈와 관련된 질환에 뛰어난 효과가 있음이 민간에 알려지기 시작하였으나 골다공증과 관련된 임상실험 연구결과는 거의 보고된 바가 없었다. 이에 저자들은 랫드의 양쪽 난소를 적출한 후 골흡수에 미치는 홍화씨 분말의 유용성을 확인하고자 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 실험군 배정

12주령 암컷 Sprague-Dawley 흰쥐 (227.4 ± 8.7 g)를 난소적출 후 골흡수에 미치는 홍화씨 분말의 효과를 살펴보기 위해 난소적출군(이하 대조군)과 난소적출 후 홍화씨 분말 투여군(이하 실험군)으로 나누고 각 군마다 각각 20마리씩 배정하여 총 40마리를 사용하였으며, 실험기간 동안 명·암의 주기는 12시간 주기로 조절하고, 사료(삼양사료(주))와 수돗물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2. 난소적출

Ketamin hydrochloride(케타라®, 유한양행) 15 mg/100 g를 복강내 주사하여 전신마취를 유발한 후 난소를 노출시켜, 난관을 silk사로 결찰한 후 난소를 절제하고 봉합하였다(Bae, 2000).

3. 홍화씨 분말의 투여

농장에서 수확한 홍화씨를 물로 일어서 돌이나 다른 이물질질을 골라낸 후 깨끗이 씻어서 햇볕에 말려 완전히 건조시킨 후 $150 \sim 170^\circ\text{C}$ 의 온도에서 15분 정도 볶은 후 분쇄기로 미세한 분말로 만들어 실험에 사용하였다. 실험군에서는 난소적출 당일부터 분쇄된 가루를 랫드 1마리 당 1일 0.3g씩 경구 투여하였다.

4. 홍화씨 성분의 분석

고려대학교 기초과학지원연구소에 의뢰하여 유도 결합 플라즈마방출 분광분석기 ICP-AES(Jobin Yvon 138 Ultrace)를 이용하여 홍화씨 분말의 성분분석을

실시하였다.

5. 주사전자현미경적 관찰

절취된 경골을 0.1 M 인산완충액 (pH 7.3)에 완충시킨 2.5% glutaraldehyde와 2% paraformaldehyde 혼합액으로 4시간 동안 실온에서 고정하고, 동일 완충액으로 15분씩 2회 세척한 후, 10% 질산을 사용하여 12시간 동안 탈회하였다. 탈회된 표본은 완충액으로 15분씩 3회 세척하였으며 동일 완충액으로 완충된 1% osmium tetroxide 용액으로 2시간 동안 후고정하였다. 고정된 경골은 탈수과정을 거쳐서 hexamethyldisilazane으로 15분씩 2회 치환하여 대기 중에서 건조하여 (Park et al., 1995) 골단부위의 단면을 노출시켜서 알루미늄 표본대에 붙여 이온 도금장치를 사용하여 20 nm 두께의 금도금을 실시한 후 Hitachi S-450 주사전자현미경으로 15 kV의 가속전압하에서 관찰하였다 (Bae et al., 1999).

6. 형태계측학적 관찰

골량의 감소 정도를 측정하기 위하여 경골의 골단의 조직 주사전자현미경 사진을 만든 후, 모든 단면 필름을 Northern light® 위에 놓은 다음, Sony® XC-77 CCD 카메라로 촬영하여 Macintosh® 컴퓨터에서 NIH image program® (version 1.60)을 이용하여 포착하여 tiff 파일로 저장하였다. 저장된 파일은 NIH image program® 상에서 척도를 스케일을 μm 로 정한 다음 자유 선택 도구를 이용하여 골조직과 빈 공간의 경계를 그린 후 그 면적을 측정하였다. 이렇게 얻어진 각 단면의 면적을 합한 후 전체 단면의 면적으로 나누어서 백분율로 계산하여 통계 처리하여 분석하였다 (Bae et al., 1999).

7. 통계처리

본 실험에서 얻어진 자료에 대한 실험군간의 통계학적 유의성은 Student's t-test에 의하여 검정하였으며, $p < 0.05$ 이하의 유의성만을 각 군간의 통계학적 차이로 인정하였다.

결 과

1. 홍화씨 성분

본 실험에 사용된 홍화씨 분말의 무기물질 분석 결과 칼슘 (Ca)과 마그네슘 (Mg), 칼륨 (K)이 매우 많이 함유되어 있었으며, 철 (Fe), 아연 (Zn), 구리 (Cu), 알루미늄 (Al) 및 나트륨 (Na) 등의 미량 광물질도 다량 함유되어 있었다. 수은 (Hg), 비소 (As), 셀레늄 (Se), 크롬 (Cr), 카드뮴 (Cd), 납 (Pb), 망간 (Mn), 백금 (Pt), 코발트 (Co) 및 금 (Au) 등은 기계검출한계이하로 함유되어 있었다 (Table 1).

2. 주사전자현미경 관찰

랫드의 난소적출 후 1주일에 대조군 (Fig. 1a)과 실험군 (Fig. 1b)의 피질골의 두께와 골수강의 크기는 서로 비슷한 소견을 나타내었으며, 3주에서는 대조군 (Fig. 2a)은 골수강에서 피질골까지의 두께가 크게 줄어들고 골수강의 크기도 다소 증가되었으나 실험군 (Fig. 2b)은 1주와 비교해서 두드러진 변화가 없었다. 5주에서 대조군 (Fig. 3a)은 피질골의 두께의 감소와 골수강의 크기의 증가가 두드러졌으나 실험군 (Fig. 3b)은 3주와 비교해서 골수강의 크기만 약간 증가하였으며, 7주에서 대조군 (Fig. 4a)은 실험군과 비교하여 피질골의 두께가 매우 감소하고 골수강의 크기도 증가하였으나, 실험군 (Fig. 4b)은 5주와 거의 변화가 없는 소견을 나타내었다.

Table 1. Concentration of elements from safflower seed powder (100 g/ppm)

Item	Concentration	Item	Concentration
Ca	1604 ± 10.2*	Pb	N.D.
Hg	N.D.	Cu	12.25 ± 0.19
K	7916 ± 14.4	Al	21.29 ± 0.19
Fe	116.3 ± 1.26	Na	21.58 ± 0.58
As	N.D.	Mn	N.D.
Se	N.D.	Zn	51.9 ± 0.58
Mg	2518 ± 14.2	Pt	N.D.
Cr	N.D.	Au	N.D.
Cd	N.D.	Co	N.D.

* : Mean ± S.D., N.D. : Not detected.

3. 형태계측학적 관찰

실험을 시작할 때 경골 골단의 빈 공간의 면적은 43.6%이었으나, 홍화씨 분말을 투여한 실험군은 난소 적출 후 1, 3, 5 및 7주에 각각 47.6, 52.6, 39.6 및 43.8%의 빈 공간을 나타내었으며, 대조군의 빈 공간은 난소적출 후 1, 3, 5 및 7주에 각각 53.1, 67.5, 67.7 및 66.9%를 나타내어 난소적출 후 5주부터 두드러진 골소실이 일어났으며 ($p < 0.05$), 홍화씨 분말은 이러한 골소실을 억제하는 효과를 나타내었다.

고 찰

골다공증의 원인인자들 중에서 골밀도가 직접적인 요인으로 가장 중요한 역할을 하고 있으며 이러한 골밀도는 성장과정에서 완성되는 최대골밀도 및 성인에서 발생하는 골소실의 정도에 따라 결정된다.

골밀도는 성장과정에서 점진적으로 증가하여 최대 골밀도치에 도달한 후 35~40세까지 유지되고 그 이후부터는 매년 0.3~0.5%의 골소실이 진행되는 데 여성에서 폐경기가 되면 골소실률이 2~4배 증가된다 (Hough, 1998).

폐경 후 골다공증을 유발하는 모델로는 주로 12주령 전후의 랫드를 이용한 양쪽 난소적출술이 실시되었는데 (Bagi et al., 1992; Peng et al., 1997; Bae, 2000) 본 실험에서도 동일한 방법을 이용하였다.

Estrogen 결핍 이후에 발생하는 일차적인 변화는 골격 밖으로 칼슘의 운반이 증가하는 것이다. 가속화된 골소실에 의해 $1\alpha, 25$ dihydroxycholecalciferol의 생산과 부갑상선 호르몬의 분비가 감소되고, 이에 따라 장내 칼슘흡수의 효율이 감소하고 체내의 칼슘과 골의 칼슘이 소실된다 (Nordin et al., 1998).

또한 estrogen 결핍으로 골흡수를 촉진하는 cytokine인 interleukin (IL)-1, IL-6의 생산이 촉진되고 (Keen et al., 1998), 골형성을 촉진하는 성장인자인 insulin-like growth factor-1과 transforming growth factor- β 의 생산은 억제된다 (Rosen & Donahue, 1998).

골다공증의 예방을 위해서 골흡수 억제제로는 estrogen (Lane et al., 1999), alendronate (Toth et al., 1998), calcitonin (Silverman, 1997), 골형성 촉진제로

는 fluoride (Kleerekoper, 1998), anabolic steroids (Reginster, 1997), parathyroid hormone (Reeve, 1996) 등 작용기전이 서로 다른 약제들을 이용하여 왔는데 이들의 효과에 대해서는 일치하지 않았으며 오히려 상반되는 주장도 있었다.

본 실험결과 난소적출 후 대조군은 매주 골소실이 증가하기 시작하며 골수강의 크기는 증가하고 골수강에서 피질골까지의 두께는 점점 감소하여 5주에는 이러한 경향이 두드러졌는데 이러한 결과는 다른 연구자들과 (Kinney et al., 1995; Li et al., 1997; Peng et al., 1997; Bae et al., 1999) 비슷한 소견을 나타내고 있다.

난소적출 후 홍화씨 분말을 투여한 실험군은 실험 기간동안 골수강에서 피질골까지의 두께와 골수강의 크기가 실험을 시작할때와 비교하여 커다란 변화를 나타내지 않았는데 이것은 estrogen과 필수지방산을 난소를 적출한 랫드에 투여했을 때 난소적출로 인한 골소실을 억제하는 효과가 있었다는 Schlemmer 등 (1999)의 결과와 유사한 경향을 보이고 있다. 이러한 결과는 홍화씨에 함유되어 있는 필수지방산인 linoleic acid가 오줌을 통한 deoxypyridinoline과 hydroxyproline의 배설을 감소시키고 (Schlemmer et al., 1999) 홍화씨에 다량 함유되어 있는 칼슘의 장내 흡수율을 증가시켜 (Claassen et al., 1995) estrogen 결핍으로 인하여 발생하는 칼슘의 소실을 보충해주기 때문인 것으로 사료된다.

이상의 결과들을 종합해보면 난소적출 후 7주에는 골다공증이 유발되며 홍화씨 분말은 이러한 골다공증의 예방효과가 있는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Bae CS: Osteoporotic changes after ovariectomy in rats. Korean J Vet Clin Med 17(1): 212-218, 2000. (Korean)
- Bae CS, Park CH, Uhm CS: Time course of fibular osteoporosis in ovariectomized rats. Korean J Electron Microscopy 29(3): 377-382, 1999. (Korean)
- Bagi CM, Miller SC, Bowman BM, Blomstrom GL, France EP: Differences in cortical bone in overloaded and underloaded femurs from ovariectomized rats: comparison of bone

- morphometry with torsional testing. *Bone* 13 : 35-40, 1992.
- Claassen N, Coetzer H, Steinmann CM, Kruger MC: The effect of different n-6/n-3 essential fatty acid ratios on calcium balance and bone in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 53(1) : 13-19, 1995.
- Gennari C, Martini G, Nuti R: Secondary osteoporosis. *Aging (Milano)* 10(3) : 214-224, 1998.
- Hough S: Fast and slow bone losers. Relevance to the management of osteoporosis. *Drugs Aging* 12(Suppl 1) : 1-7, 1998.
- Keen RW, Woodford-Richens KL, Lanchbury JS, Spector TD: Allelic variation at the interleukin-1 receptor antagonist gene is associated with early postmenopausal bone loss at the spine. *Bone* 23(4) : 367-371, 1998.
- Kinney JH, Lane NE, Haupt DL: In vivo, three-dimensional microscopy of trabecular bone. *J Bone Miner Res* 10(2) : 264-270, 1995.
- Kleerekoper M: The role of fluoride in the prevention of osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 27(2) : 441-524, 1998.
- Kulak CA, Bilezikian JP: Osteoporosis: preventive strategies. *Int J Fertil Womens Med* 43(2) : 56-64, 1998.
- Lane JM, Nydick M: Osteoporosis: current modes of prevention and treatment. *J Am Acad Orthop Surg* 7(1) : 19-31, 1999.
- Lane NE, Haupt D, Kimmel DB, Modin G, Kinney JH: Early estrogen replacement therapy reverses the rapid loss of trabecular bone volume and prevents further deterioration of connectivity in the rat. *J Bone Miner Res* 14(2) : 206-214, 1999.
- Le Pen C, Maurel F, Breart G, Lopes P, Plouin PF, Allicar MP, Roux C: The long-term effectiveness of preventive strategies for osteoporosis in postmenopausal women: a modeling approach. *Osteoporos Int* 11(6) : 524-532, 2000.
- Lee IW, Choi JK: Safflower Seed and Health. Taecil publication, Seoul, pp. 181-185, 1998. (Korean)
- Li M, Shen Y, Wronski TJ: Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. *Bone* 20 : 55-61, 1997.
- McCullagh KG, Ehrhart A, Butkus A: Experimental canine atherosclerosis and its prevention. The dietary induction of severe coronary, cerebral, aortic, and iliac atherosclerosis and its prevention by safflower oil. *Lab Invest* 34(4) : 394-405, 1976.
- Nordin BE, Need AG, Steurer T, Morris HA, Chatterton BE, Horowitz M: Nutrition, osteoporosis, and aging. *Ann N Y Acad Sci* 854 : 336-351, 1998.
- Ohshima A, Cohen BI, Mosbach EH: Dietary fat alters biliary lipid secretion in the hamster. *Lipids* 31(9) : 949-954, 1996.
- Park CH, Chang BJ, Cho KY: Comparison of scanning electron microscopic specimens dried with different methods. *Korean J Electron Microscopy* 25(3) : 33-39, 1995. (Korean)
- Peng ZQ, Vaananen HK, Zhang HX, Tuukkanen J: Long-term effects of ovariectomy on the mechanical properties and chemical composition of rat bone. *Bone* 20 : 207-212, 1997.
- Reeve J: PTH: A future role in the management of osteoporosis? *J Bone Miner Res* 11 : 440-445, 1996.
- Reginster JY: Miscellaneous and experimental agents. *Am J Med Sci* 313(1) : 33-40, 1997.
- Rosen CJ, Donahue LR: Insulin-like growth factors and bone: the osteoporosis connection revisited. *Proc Soc Exp Biol Med* 219(1) : 1-7, 1998.
- Schlemmer CK, Coetzer H, Claassen N, Kruger MC: Oestrogen and essential fatty acid supplementation corrects bone loss due to ovariectomy in the female Sprague Dawley rat. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 61(6) : 381-390, 1999.
- Silverman SL: Calcitonin. *Am J Med Sci* 313(1) : 13-16, 1997.
- Toth E, Fork FT, Lindelow K, Lindstrom E, Verbaan H, Veress B: Alendronate-induced severe esophagitis. A rare and severe reversible side-effect illustrated by three case reports. *Lakartidningen* 95(35) : 3676-3680, 1998.
- Van Way CW 3d, Dunn EL, Hamstra RD: The effect of intravenous safflower oil emulsion on the clotting mechanism. *Am Surg* 49(8) : 460-464, 1983.

< 국문초록 >

홍화씨는 예로부터 국내에서 재배되어 한방 및 민간에서 특히 뼈에 우수한 작용이 있는 것으로 생각되어 오랫동안 복용되어 왔다. 최근 홍화씨를 성분분석한 바에 의하면 칼슘과 마그네슘, 칼슘이 다량 함유되어 있어서 뼈의 발달과 유지에 도움이 있을 것이라고 추측된다.

그러나 아직까지 확실한 실험적 자료가 제시된 것은 별로 없다. 이에 저자들은 홍화씨 분말이 골다공증의 예방에 미치는 효과를 알아보기 위하여 본 실험을 실시하였다.

실험동물은 체중 230 g의 12주령의 Sprague-Dawley Rats를 사용하였으며, 양쪽난소를 제거한 후 홍화씨 분말을 매일 0.3 g씩 복용시키면서 1, 3, 5 및 7주 후에 경골을 채취하여 관찰하였다. 채취된 조직은 통상적인 주사전자현미경 시료제작법으로 고정과정을 거친 후 10% 질산으로 12시간 탈회하여 뼈의 단면을 노출시키고 탈

수, 건조 및 금도금 과정을 거쳐 주사전자현미경(Hitachi, S-450)으로 관찰하여 촬영하였다.

관찰결과 난소적출 후 골소실이 일어나기 시작하여 7주 후에 대조군은 골수강에서 피질골까지의 두께의 감소와 골수강의 확장이 심하였으나, 홍화씨 분말을 투여한 실험군에서는 1주에서 7주까지 거의 같은 소견을 나타내었다.

이상의 결과를 종합해보면 홍화씨 분말은 여성호르몬 결핍으로 인한 골다공증의 예방에 효과가 있는 것으로 사료된다.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Scanning electron micrographs of epiphysis of rat tibia, control (a) and 1 week safflower seed administration group (b) after ovariectomy (scale bar = 110 μ m).

Fig. 2. Scanning electron micrographs of epiphysis of rat tibia, control (a) and 3 weeks safflower seed administration group (b) after ovariectomy (scale bar = 110 μ m).

Fig. 3. Scanning electron micrographs of epiphysis of rat tibia, control (a) and 5 weeks safflower seed administration group (b) after ovariectomy (scale bar = 110 μ m).

Fig. 4. Scanning electron micrographs of epiphysis of rat tibia, control (a) and 7 weeks safflower seed administration group (b) after ovariectomy (scale bar = 110 μ m).



