

The effect of combined *Rehmannia glutinosa Libosch* and *Eleutherococcus senticosus Max* (OPB) extracts on bone mineral density in ovariectomized rats.

Jung-Keun Kim¹, Se-Won Kim¹, Seon-Yle Ko^{1,2}, Se-Nyun Kim¹, Jong-Seok Kwon¹, and Hyeon-Hwan Hwang³

¹Dept. of Pharmacology and Mechanism, Research Institute, Oscotec Inc.

²Dept. of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Dankook University

³Dept. of Safety and Toxicology, Research Institute, Oscotec, Inc.

(Received December 7, 2007; Accepted December 24, 2007)

This study was conducted to investigate the preventing effects of OPB (*Rehmannia glutinosa Libosch* and *Eleutherococcus senticosus Max* extracts) and combined OPB/Calcium therapy on bone loss in ovariectomized rats. Sixty Sprague Dawley rats of 12-week-old were divided into eight groups: OVX (ovariectomized), OPBL (OPB 50 mg/kg), OPBM (OPB100 mg/kg), OPBH (OPB 200 mg/kg), OPBL/CAL(OPBL+CAL), OPBM/CAL (OPBM+CAL), OPBH/CAL (OPBH+CAL) and CAL (Calcium citrate 88.33 mg/kg +1 α , 25-dihydroxy-vitamin D, 33.33 IU/kg). Bone mineral density (BMD), bone mineral content (BMC), bone strength indices and cortical thickness were analyzed by peripheral quantitative computerized tomography (pQCT). pQCT scanning showed that OVX induced a significant decrease in trabecular bone mineral density and bone mineral content in the proximal tibia (-36.4 \pm 2.4%, -21.8 \pm 12.7%). These decreases were significantly prevented by the administration of OPBM and OPBM/CAL. Cortical BMD and BMC of tibia were slightly enhanced by OPB and OPB/CAL. However there was no significant difference between OVX and OPB, OPB/CAL treated group. Bone strength indices and cortical thickness were not significantly different. Our results suggest that OPB and combined OPB/Calcium therapy are effective in preventing the development of bone loss induced by ovariectomy in rats.

Keywords : *Rehmannia glutinosa Libosch*, *Eleutherococcus*

*Corresponding author: Dept. of Safety and Toxicology, Research Institute, Oscotec, Inc. 2-17, Omok-ri, Seonggeoeup, Cheonan, Choongnam, 330-831, Korea. Tel.: +041-555-7666, Fax.: 041-555-7668; E-mail: hwan3301@oscotec.com

senticosus Max, Osteoporosis, bone mineral density, bone mineral content

서 론

골다공증(osteoporosis)은 가장 일반적인 골의 대사성 질환으로 성별이나 연령층에 비하여 골밀도가 감소하고 골질의 감수성이 증가된 상태로 정의 할 수 있으며(Lane 과 Nydick, 1999), 낮은 골밀도는 골다공증으로 발전될 수 있는 가장 중요한 위험인자로 인식되고 있다(Hough, 1998).

골다공증은 칼슘대사의 불균형으로 인해 골격의 화학적 조성에는 변화가 없고 단위용적당 질량(골밀도)이 감소되는 증상으로 칼슘대사와 관련성을 가지며, 칼슘(Harrison 과 Fraser, 1961), 에스트로겐(Cruess와 Hong, 1979; Wronski 등, 1988), 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone, PTH) (Orimo 등, 1972), Vitamin D(Ash 와 Goldin, 1988) 및 calcitonin(Austin 과 Heath, 1981) 등의 변화에 기인한다고 보는 것이 일반적인 견해이다. 일찍이 Albright 이 후로 골다공증의 원인은 에스트로겐의 감소가 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 왔다(Albright 등, 1941). 폐경으로 인한 에스트로겐의 감소는 칼슘 이용을 저하시키고 PTH에 의한 뼈의 칼슘 재흡수를 증가시켜 골다공증을 유발하게 되고 현저하게 골량이 감소하게 된다. 골량의 감소는 개인차, 또는 다른 여러 가지 원인으로 인해 그 정도의 차이가 있지만, 병적으로 과다하게 골량이 감소하여 일정치 이하로 저하되면 작은 충격에도 쉽게 골절이 생기게 된다(Wasnich, 1996). 골다공증은 그 증세 자체보다는 골의 약화에 따라 용이하게 초래되는 각

종 골절, 특히 대퇴골 골절 또는 척추골절 등으로 장기간 활동을 제한하여 건강한 생활을 영위할 수 없고, 결과적으로 노인층 사망의 15%에 대한 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 과도한 파골세포의 활성화에 의해 유발된 골질환의 치료나 예방의 목적으로 내인성 조절인자들 이외에도 여러 물질들이 연구되고 있다. 이러한 목적으로 현재 사용되고 있는 약물들은 일정한 약리작용을 나타내고 있으나, 여러 가지 부작용과 복용상의 어려움을 갖고 있음이 알려져 있어(Recker, 1993; Rodan, 1994; Reginster, 1995; Stock, 1996) 새로운 작용 및 약물구조를 가지면서 독성과 부작용이 적으며 골다공증의 예방 또는 치료에 효과적인 신물질의 개발이 요구되고 있다. 또한 이러한 신물질은 예로부터 민간요법으로 사용되어온 독성이 없는 천연물에서 발견될 가능성이 높기 때문에 천연물로부터 신약을 창출하려는 시도가 활발히 진행되고 있다.

지황(*Rehmannia glutinosa*)은 현삼과에 속한 약용식물의 뿌리를 써서 말린 것으로 한방에서 약재로 사용되고 있으며, 허리와 무릎이 시리고 아픈 증상이나 월경이상, 어지럼증 등을 치료하고 각종 만성병 중 몸이 허약하여 나타나는 내열(內熱), 인후건조(咽喉乾燥), 갈증 등의 증상에 쓰여져 왔다. 또한 지황은 약재의 가공방법에 따라 생지황, 건지황 및 숙지황으로 분류된다. 즉, 지황의 근엽과 잔뿌리를 제거하고 흙을 깨끗이 씻은 것을 생지황, 생지황을 말린 것을 건지황, 생지황을 황주 또는 백주에 넣고 구증구폭한 것을 숙지황이라 분류하며, 이때 다른 성분이 분리되어 각각 약리효과를 달리하여 사용하고 있다(生藥學研究會, 1998). 이전의 연구에서 지황의 주요 성분으로 β -sitosterol, stigmasterol과 campesterol등을 포함하는 phytosterol류, 당류, 아미노산, iridoid glycosides, inorganic elements, chryseoriol, luteoline, stachyose, verbascose, mannotriose, raffinose 등이 보고되어 있으며(Tang과 Eisenbrand, 1992; Zhao 등, 2006), 이 중 iridoid glycosides는 free radical을 제거할 수 있는 항산화 효과를 가지고 있다는 연구 결과가 있다(Raju 등, 2004; Sridhar 등, 2004; Kim 등, 2005).

최근 연구결과 구기자과 숙지황 혼합 추출액이 간암세포의 증식억제와 세포사멸(apoptosis) 유도하였다고 보고되었으며(Chao 등, 2006), 숙지황 추출물이 superoxide radical, hydroxyl radical 및 hydrogen peroxide을 포함하는 산소 자유기에 대한 제거효과를 가지며, cisplatin으로 유도된 HEI-OC1 auditory cells의 세포손상을 억제함이 보고된 바 있다(Yu 등, 2006). 또한 지황, 참마(*Dioscorea japonica* THUNB), 산수유(*Cornus officinalis* SIEB et. ZUCC), 청미래덩굴(*Smilax glabra* ROXB), 모란(*Paeonia suffruticosa* ANDR), 질경이 택사(*Alisma platago-aquatica* var. *orientale* SAMUELS)와 자하거(*Hominis placenta*) 등의 7가지 생약제로 제조된 육미지황탕이 cyclooxygenase 발현 등을 조절함으로써 골흡수를 억제함이 보고되었다

(Jin 등, 2006).

가시오가피(*Eleutherococcus senticosus*)는 두릅나무과(Araliaceae)에 속하는 오가피나무(*Acanthopanax sessiliflorum* Seeman) 및 그 동속 식물의 뿌리와 줄기 및 가지의 껍질을 건조한 것으로, 한방에서 약재로 사용되고 있다. 오가피는 맛이 맵고 쓰며 따뜻한 성질을 갖고 있고, 자양강장(Awang, 1996), 강정, 진경 및 신진대사 활성작용이 있는 생약으로, 1960년대 러시아의 학자들이 자생식물인 가시오가피의 성분 및 약효 연구를 시행하여 오가피나무 및 동속 식물의 연구가 활발해졌다. 또한 연구 결과 위궤양의 억제(Fujikawa 등, 1996), 항염작용(Wang 등, 1992), 면역억제작용(Wang 등, 1991; Shen 등, 1991; Shan 등, 1999)등의 효과가 있다고 알려져 있다. 그 성분으로는 eleutherosides A-G로 동정된 화합물이 주를 이루며(Awang, 1996), carotene, ligustrin, 7-methyl-6,8-dimethylcoumarinoglycoside, galactoside, syringaresinol di-o-beta-D-glucoside 및 caryophyllenol 등 다종의 배당체와 chlorogenic acid, flavone, 정유, 다당 등을 성분으로 함유하며, eleutheroside B(syringin)와 eleutheroside E(syringaresinol di-O- β -D-glucoside; liri dendrin)가 오가피의 활성을 나타내는 성분으로 알려져 있다(Takasugi 등, 1985). 저혈압에도 효과가 있으며 사람을 흥분 시키지 않기 때문에 인삼과는 달리 불면증 등의 부작용이 없다고 한다(Ben-Hur 와 Fulder, 1981). 최근에는 가시오가피, *Leuzea carthamoides*, 홍경천(*Rhodiola rosea*), 오미자(*Schizandra chinensis*) 열매 등으로 제조한 혼합 추출액이 화학치료를 받는 난소암환자에서 저하된 면역계를 증대시켰다고 보고한 바 있다(Kormosh 등, 2006).

본 논문은 골흡수 억제 및 골형성 촉진 작용을 갖는 물질을 찾고자 자생식물을 검색하던 중 이전의 연구 결과에서 두 종류의 천연물 추출액을 혼합하는 경우 *in vitro* 실험으로 상승효과를 확인하였으며(Kim 등, 2007), 난소 절제에 의한 골다공증 동물모델을 이용하여 골밀도 감소 억제효과가 있음을 확인하였다(Kim 등, 2007). 이에 본 연구는 난소를 절제한 흰쥐를 대상으로 숙지황과 가시오가피의 혼합추출물인 OPB를 농도별로 세분화 하여 농도에 따른 효능을 확인하고 여러 임상에서 사용하고 있는 칼슘과 식물 추출물인 OPB를 병합하여 OPB/칼슘 병합 효과를 확인하여 골다공증에 대한 예방 및 치료효과를 연구하고자 하였다.

연구 방법

천연물의 추출 및 시료 조제

천연물 원자재 구입

본 연구에서는 숙지황과 가시오가피 두 종류의 천연물을 실험에 이용하였다. 실험에 사용한 숙지황은 경북 안

동의 풍산제약에서 제조한 숙지황을 구입하여 사용하였으며, 가시오가피는 중국 동북지역에서 자생하는 것을 동제약회사를 통하여 절편된 것을 구입 후 사용하였다.

숙지황과 가시오가피 혼합추출물 (OPB) 제조방법

숙지황과 가시오가피를 원재료 무게비 4 : 1(wt : wt) 비율로 200 g을 혼합하여 3 추출기에 넣고 정제수 10배수를 가하여 95~100°C에서 8시간 동안 가열 추출하였다. 상기 추출액을 suction filter를 사용하여 여과하여 진공감압 농축기로 40°C이하에서 농축한 후(수율: 38.2%)을 얻어 냉장 보관하며 실험에 사용하였다.

품질관리방법 (지표물질 선정 및 확인)

숙지황의 지표성분은 Stachyose이며(Figure 1), 가시오가피의 지표성분은 Eleutheroside E {(-)-Syringaresinol-4-4'-O- β -D-Diglycoside}를 사용하였으며(Figure 2), 최종 추출물 (OPB)의 지표성분 함량은 Stachyose는 4.6 mg/g과 Eleutheroside E는 0.32 mg/g이었다.

HPLC 기기는 shimadzu LC-10A(Japan)를 사용하였으며, 숙지황의 지표물질인 stachyose의 분석을 위하여 column은 Asahipak NH2P-50 4E(4.6×250 mm, 5 μ m, Shodex, Japan)을 사용하였고 이동상으로는 acetonitrile/water(71/29, v/v), 이동상유속은 1.0 ml/min였으며, 굴절률 검출기를 사용하였다. 가시오가피의 지표물질인 Eleutheroside E의 분석은 Discovery C18 column(4.6×150 mm, 5 μ m, Supelco, USA)을 사용하였고 이동상으로는 acetonitrile/water(15/85, v/v), 이동상유속은 1.0 ml/min였으며, UV 210 nm에서 검출하였다.

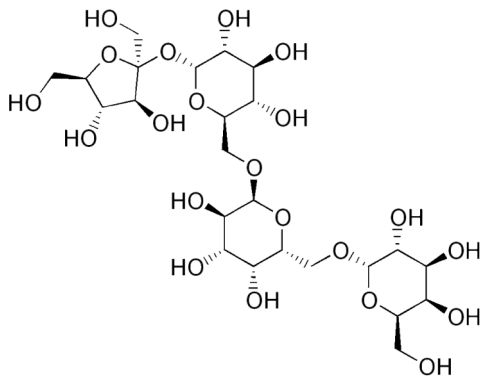


Fig. 1. Chemical structure of stachyose.

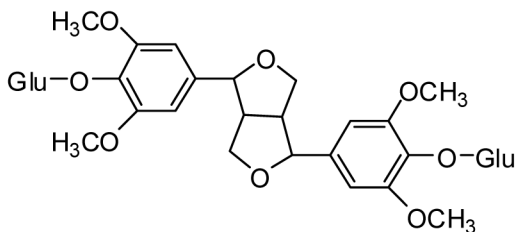


Fig. 2. Chemical structure of eleutheroside E

실험동물 및 사육방법

실험동물은 (주) 오리엔트에서 구입한 생후 10주된 몸무게 250 g 내외의 건강한 Sprague-Dawley 암컷 흰쥐 80마리를 2주일간 동일 조건 (실내온도 22±1°C, 상대습도 50±5%)하에 적응시켜 사육한 후 실험에 사용하였다. 사료는 전체 실험기간을 통하여 rodent chow (5L79 rat & mouse 18% chow, manufactured for Charles River Laboratories; PMI Nutrition International Inc., USA)를 공급하였으며, 사료와 물은 자유롭게 섭취시켰다. 모든 실험동물은 Institute of Laboratory Animal Resource의 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animal' (1996, USA)에 준하여 취급하였으며 동물실험은 (주)오스코텍 동물실험윤리위원회의 승인하에 수행되었다.

골다공증 유발

Ketamine(Keara 100 mg/kg)과 2% Xylazine (Rompun 0.15 ml/kg)으로 전신마취 후 통법에 따라 제모 및 술 전 무균처리(10% 프로비돈-아이오다인 스크럽 후 70% 알코올 소독)를 시행하였다. 흰쥐의 복측 중앙에 1 cm가량의 절개를 시행한 뒤 횡격막이나 간 등 주요 장기에 손상이 가해지지 않도록 주의를 하며 자궁을 따라 난소를 확인한 후 봉합용 실로 난소를 결찰 한 뒤 난소 절제를 양측으로 시행하였다. 난소 절제 후 각 장기를 복강 내로 재위치 시킨 후 봉합용 실로 층별 봉합을 시행하고, 수술 후 감염방지를 위해 항생제(cefazolin 50 mg/kg)를 근육주사 하였다

실험군 설정 및 약물투여

실험동물 80마리는 난소절제 전 골밀도를 측정하여 60여 마리를 선택하고, 골밀도 평균이 유사한 7마리를 8개 군으로 나누어 약물투여를 시행하였다. 난소를 절제하고 vehicle(물, 2.5 ml/kg)을 경구 투여한 군을 음성대조군으로 사용하였다(OVX). 나머지 실험군은 OPBL(OPB 50 mg/kg), OPBM (OPB 100 mg/kg), OPBH(OPB 200 mg/kg), CAL(구연산 칼슘 83.33 mg/kg + 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ 33.33 IU/kg), OPBL/CAL(OPBL+ CAL), OPBM/CAL(OPBM+CAL), OPBH/CAL(OPBH+CAL)으로 나누어 음성대조군과 동일한 vehicle에 녹여 난소절제 3일 후부터 8주간 매일 아침 동일시간에 존데를 이용하여 경구 투여하였다(Figure 3).

골밀도, 골함유량, 골강도 지수, 치밀골 두께 측정

골밀도(BMD: bone mineral density), 골함유량(BMC: bone mineral content), 골강도 지수(bone strength index) 및 치밀골 두께(cortical thickness)는 pQCT 방식인 XCT Research SA (Noland Stratec, Germany)을 이용하여 측정하였다. voxel size 0.1 mm×0.1 mm×0.1 mm로 먼저 경골(Tibia)의 전체 모습을 Scout scan하였으며, Scout

Group 1 :	OVX		Vehicle(water, 2.5 ml/kg)
Group 2 :	OPBL		OPB 50 mg/kg
Group 3 :	OPBM		OPB 100 mg/kg
Group 4 :	OPBH		OPB 200 mg/kg
Group 5 :	OPBL/CAL		OPB(50 mg/kg) + Calcium Citrate(83.33 mg/kg) + 1 α , 25-dihydroxyvitamin D ₃ (33.33 IU/kg)
Group 6 :	OPBM/CAL		OPB(100 mg/kg) + Calcium Citrate(83.33 mg/kg) + 1 α , 25-dihydroxyvitamin D ₃ (33.33 IU/kg)
Group 7 :	OPBH/CAL		OPB(200 mg/kg) + Calcium Citrate(83.33 mg/kg) + 1 α , 25-dihydroxyvitamin D ₃ (33.33 IU/kg)
Group 8 :	CAL		Calcium Citrate(83.33 mg/kg) + 1 α , 25- dihydroxyvitamin D ₃ (33.33 IU/kg)

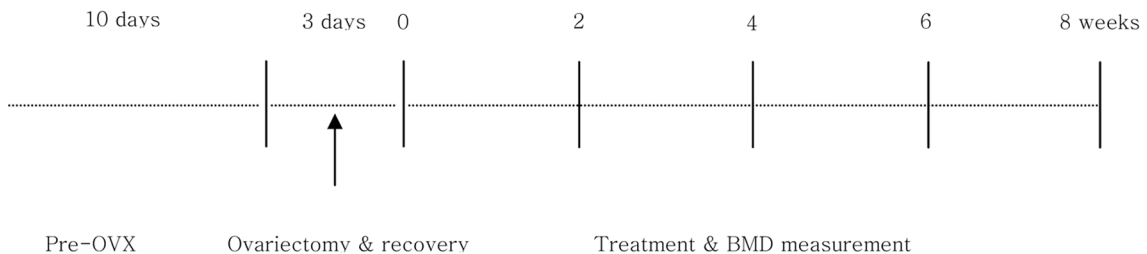


Fig. 3. Experimental design. The bone mineral density of proximal tibia was measured by pQCT at pre-OVX (before surgery) and Bilateral ovariectomies were performed. Rats were randomized into eight treatment groups and treated daily for 8 weeks (from day 3-56 post-surgery). BMD measurements were carried out 2, 4, 6 and 8 weeks after treatment.

scan을 통해 확인된 경골의 이미지를 통해 성장판에서 2 mm 떨어진 위치에서 0.2 mm 간격으로 2개의 단면을 선택하여 골밀도 및 골함유량을 측정하였다. 골밀도 측정은 난소절제 전, 약물투여 후 2주, 4주, 6주 그리고 약물투여를 마친 8주까지 동일 부위를 2회 이상 측정하였다. 약물 투여를 마친 8주에서 bone strength index 및 cortical thickness 측정은 pQCT software(version 5.40)에 의해 시행되었다.

통계처리방법

본 연구의 분석 결과는 각 실험군 간의 평균치와 표준

오차로 표시하였다. 각 군의 골밀도 분석치는 수술 전 분석치에 대한 상대 값으로 비교, 검증은 하였고, 군간의 실험결과 분석은 Student's *t*-test를 하여 유의성(p<0.05)을 검증하였다.

결 과

해면골의 골밀도 (trabecular bone mineral density)

난소를 절제한 후 8주간 해면골의 골밀도 측정 후 골밀도 변화를 Table 1에 나타내었다. 그 결과 음성대조군

Table 1. The effect of OPB, OPB/CAL and CAL on change of trabecular bone mineral density (BMD). 12-week-old rats were ovariectomized and treated with vehicle (OVX), OPB, OPB/CAL and CAL for 8 weeks post-surgery. The BMD was measured in the proximal tibial metaphysis at 2 mm distal to the growth plate at the baseline in the anaesthetized rats using pQCT. A voxel size of 0. mm³ was chosen. The data represent a mean^ostandard error of each group (n = 7). (*: P < 0.05, **: P < 0.01 versus OVX)

Group	Change of Trabecular BMD(%)		
	0	4 weeks	8 weeks
Group 1 : OVX	0.0 ± 0.0	-20.6 ± 1.9	-36.4 ± 2.4
Group 2 : OPBL	0.0 ± 0.0	-18.0 ± 1.9	-30.2 ± 2.1
Group 3 : OPBM	0.0 ± 0.0	-13.3 ± 0.9**	-28.1 ± 1.6*
Group 4 : OPBH	0.0 ± 0.0	-20.3 ± 2.1	-34.5 ± 3.1
Group 5 : OPBL/CAL	0.0 ± 0.0	-14.9 ± 2.2	-31.5 ± 3.9
Group 6 : OPBM/CAL	0.0 ± 0.0	-16.2 ± 1.1*	-29.1 ± 1.9*
Group 7 : OPBH/CAL	0.0 ± 0.0	-19.5 ± 3.3	-30.3 ± 3.3
Group 8 : CAL	0.0 ± 0.0	-19.9 ± 2.7	-32.0 ± 1.5

OVX: OVX+vehicle

OPBL: OPB 50 mg/kg, orally

OPBM: OPB 100 mg/kg, orally

OPBH: OPB 200 mg/kg, orally

CAL: Calcium citrate 83.33 mg/kg+ 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃33.33 IU/kg, orally

OPBL/CAL: OPBL+CAL, orally

OPBM/CAL: OPBM+CAL, orally

OPBH/CAL: OPBH+CAL, orally

(OVX)의 골밀도는 2주부터 골다공증이 유발되어 골밀도가 감소하였으며 난소절제 이전에 비해 4주 및 8주에서 각각 $-20.6 \pm 1.9\%$, $-36.4 \pm 2.4\%$ 로 정상군에 비해 유의적으로 낮은 것으로 나타났다. 난소절제 후 OPB를 투여한 실험군은 OVX군에 비해 골밀도 감소가 억제됨을 확인하였으며, 특히 OPBM(OPB 100 mg/kg) 투여군은 4주와 8주에서 각각 $-13.3 \pm 0.9\%$, $-28.1 \pm 1.6\%$ 으로 통계적으로 유의한 차이를 보였다($p < 0.05$). OPB와 칼슘을 혼합하여 투여한 실험군(OPB/CAL) 또한 음성대조군에 비해 골밀도 감소가 억제되었으며, OPBM/CAL 투여군은 4주와 8주에서 각각 $-16.2 \pm 1.1\%$, $-29.1 \pm 1.9\%$ 으로 OVX군에 비해 유의한 차이를 보였다. 칼슘(Calcium+1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃)을 투여한 실험군 (CAL)은 4주와 8주에서 OVX군에 비해 골밀도 감소 억제가 확인되었으나, 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. OPB 및 칼슘의 병합효과를 확인하기위해 OPB 투여군과 OPB/CAL 투여

군간 차이를 분석하였으나 유의한 차이를 보이지 않았다.

치밀골의 골밀도 (cortical bone mineral density)

난소를 절제한 후 8주 동안 치밀골의 골밀도 측정 후 골밀도 변화를 Table 2에 나타내었다. 그 결과 OVX군의 골밀도는 난소절제 이전에 비해 4주 및 8주에서 각각 $8.0 \pm 2.2\%$, $14.3 \pm 2.4\%$ 로 증가하였다. OPB, OPB/CAL, CAL 투여 실험군 모두 OVX군에 비해 골밀도가 증가하였으나, 유의한 차이를 보이지 않았으며 군간 유의적인 차이를 보이지 않았다.

해면골의 골함유량 (trabecular bone mineral content)

난소를 절제한 후 8주간 해면골의 골함유량을 측정하여 Table 3에 나타내었다. OVX군은 난소절제 후 4주까지는 골함유량이 증가하였지만 4주 이후 골함유량이 감소하여 난소절제 전 2.64 ± 0.29 mg/mm³에 비해 1.90 ± 0.12 mg/mm³으로 약 -21.8% 로 감소하였다. OPB 투여 실험군 및 OPB/CAL 투여

Table 2. The effect of OPB, OPB/CAL and CAL on change of cortical bone mineral density (BMD). 12-week-old rats were ovariectomized and treated with vehicle (OVX), OPB, OPB/CAL and CAL for 8 weeks post-surgery. The BMD was measured in the proximal tibial metaphysis at 2 mm distal to the growth plate at the baseline in the anaesthetized rats using pQCT. A voxel size of 0.1 mm³ was chosen. The data represent a mean^ostandard error of each group (n = 7).

Group	Change of Cortical BMD (%)		
	0	4 weeks	8 weeks
Group 1 : OVX	0.0 ± 0.0	8.0 ± 2.2	14.3 ± 2.4
Group 2 : OPBL	0.0 ± 0.0	10.4 ± 1.7	16.1 ± 2.0
Group 3 : OPBM	0.0 ± 0.0	11.5 ± 2.2	17.4 ± 2.5
Group 4 : OPBH	0.0 ± 0.0	9.0 ± 0.5	15.2 ± 0.6
Group 5 : OPBL/CAL	0.0 ± 0.0	8.9 ± 1.9	13.3 ± 2.0
Group 6 : OPBM/CAL	0.0 ± 0.0	12.5 ± 1.9	18.4 ± 1.7
Group 7 : OPBH/CAL	0.0 ± 0.0	10.0 ± 1.5	15.4 ± 1.4
Group 8 : CAL	0.0 ± 0.0	13.2 ± 1.3	20.3 ± 1.5

Table 3. The effect of OPB, OPB/CAL and CAL on change of trabecular bone mineral content (BMC). 12-week-old rats were ovariectomized and treated with vehicle (OVX), OPB, OPB/CAL and CAL for 8 weeks post-surgery. The BMC was measured in the proximal tibial metaphysis at 2 mm distal to the growth plate at the baseline in the anaesthetized rats using pQCT. A voxel size of 0.1 mm³ was chosen. The data represent a mean ± standard error of each group (n = 7).

Group	Trabecular BMC (mg/mm)			
	0	4 weeks	8 weeks	Gain (%)
Group 1 : OVX	2.64 ± 0.29	2.68 ± 0.15	1.90 ± 0.12	-21.8 ± 12.7
Group 2 : OPBL	2.50 ± 0.23	2.79 ± 0.12	2.23 ± 0.11	-4.3 ± 12.6
Group 3 : OPBM	2.45 ± 0.23	2.76 ± 0.12	2.05 ± 0.08	-12.8 ± 7.2
Group 4 : OPBH	2.60 ± 0.18	2.62 ± 0.14	1.85 ± 0.09	-26.4 ± 7.5
Group 5 : OPBL/CAL	2.45 ± 0.22	2.80 ± 0.15	2.08 ± 0.15	-13.4 ± 6.7
Group 6 : OPBM/CAL	2.83 ± 0.16	2.79 ± 0.14	2.07 ± 0.08	-25.5 ± 5.1
Group 7 : OPBH/CAL	2.69 ± 0.28	2.68 ± 0.10	2.01 ± 0.10	-20.0 ± 8.8
Group 8 : CAL	2.58 ± 0.11	2.57 ± 0.07	1.84 ± 0.10	-28.8 ± 1.4

실험군 모두 OVX군에 비해 BMC 양은 많았으나 유의한 차이를 보이지 않았으며, 실험군간 유의한 차이는 나타나지 않았다. CAL 투여 실험군은 OVX군에 비해 BMC가 감소하였다.

치밀골의 골함유량 (cortical mineral content)

난소를 절제한 후 8주간 치밀골의 골함유량을 측정하여 Table 4에 나타내었다. 그 결과 OVX군의 골함유량은 난소절제 이전(4.22±0.46 mg/mm)에 비해 8주에서 6.43 ± 0.22 mg/mm으로 약 66% 증가하였다. OPB, OPB/CAL, CAL 투여 실험군 모두 OVX군에 비해 BMC가 증가하

였으나 유의한 차이를 보이지 않았다.

골강도 지수 (bone strength index) 및 치밀골 두께 (cortical thickness)

난소절제 8주 후에 pQCT를 이용하여 bone strength 및 cortical thickness를 측정하여 Table 5에 나타냈다. Bone strength index인 anti-twisting index, anti-fracture index 및 anti compress index는 OVX군에 비해 OPB, OPB/CAL 및 CAL 실험군 모두에서 유의한 차이를 보이지 않았다. Ring model로 전환하여 만들어진 cortical

Table 4. The effect of OPB, OPB/CAL and CAL on change of cortical bone mineral content (BMC). 12-week-old rats were ovariectomized and treated with vehicle (OVX), OPB, OPB/CAL and CAL for 8 weeks post-surgery. The BMC was measured in the proximal tibial metaphysis at 2 mm distal to the growth plate at the baseline in the anaesthetized rats using pQCT. A voxel size of 0.1 mm³ was chosen. The data represent a mean ± standard error of each group (n = 7).

Group	Cortical BMC(mg/mm)			
	0	4 weeks	8 weeks	Gain (%)
Group 1 : OVX	4.22 ± 0.46	5.25 ± 0.20	6.43 ± 0.22	66.4 ± 22.8
Group 2 : OPBL	3.63 ± 0.27	5.16 ± 0.18	6.15 ± 0.28	74.4 ± 15.0
Group 3 : OPBM	3.62 ± 0.35	5.61 ± 0.19	6.68 ± 0.20	96.8 ± 22.2
Group 4 : OPBH	3.96 ± 0.24	5.53 ± 0.19	6.56 ± 0.19	68.3 ± 7.6
Group 5 : OPBL/CAL	3.99 ± 0.33	5.58 ± 0.13	6.40 ± 0.22	67.4 ± 18.5
Group 6 : OPBM/CAL	3.23 ± 0.30	5.22 ± 0.13	6.19 ± 0.17	101.7 ± 24.1
Group 7 : OPBH/CAL	3.94 ± 0.44	5.53 ± 0.24	6.60 ± 0.27	79.5 ± 19.6
Group 8 : CAL	3.20 ± 0.24	5.26 ± 0.16	6.39 ± 0.18	106.7 ± 19.7

Table 5. The effect of OPB, OPB/CAL and CAL on pQCT densitometric parameters of the proximal tibia bone. The data represent a mean ± standard error of each group (n = 7). The bone strength index is a parameter given by the pQCT software. Cortical thickness was measured as a circular ring model for the tibia cross-sectional shape using the pQCT software (version 5.40).

Group	Bone strength index			Cortical thickness (mm)
	Anti-twisting	Anti-compress	Anti-fracture	
Group 1 : OVX	56.5 ± 2.9	9.3 ± 0.4	9.3 ± 0.6	0.478 ± 0.011
Group 2 : OPBL	57.4 ± 3.0	10.4 ± 0.4	9.2 ± 0.4	0.458 ± 0.017
Group 3 : OPBM	56.1 ± 3.2	8.8 ± 0.5	9.2 ± 0.4	0.499 ± 0.011
Group 4 : OPBH	54.7 ± 3.2	8.8 ± 0.4	9.6 ± 0.4	0.494 ± 0.013
Group 5 : OPBL/CAL	57.5 ± 3.6	10.1 ± 0.6	10.0 ± 0.6	0.479 ± 0.014
Group 6 : OPBM/CAL	55.5 ± 2.8	9.3 ± 0.4	9.5 ± 0.2	0.467 ± 0.010
Group 7 : OPBH/CAL	56.8 ± 1.6	9.6 ± 0.3	9.1 ± 0.5	0.491 ± 0.018
Group 8 : CAL	52.1 ± 2.6	8.6 ± 0.4	8.8 ± 0.3	0.488 ± 0.008

Table 6. The effect of OPB, OPB/CAL and CAL on body weight of ovariectomized rats. 12-week-old rats were ovariectomized and treated with vehicle (OVX), OPB, OPB/CAL and CAL for 8 weeks post-surgery. Body weight represents a mean \pm standard error and plotted with group size of each group (n = 7).

Group	Body weight (g)			
	0	4 weeks	8 weeks	Gain (%)
Group 1 : OVX	236.4 \pm 2.1	340.0 \pm 6.5	357.1 \pm 9.2	51.1 \pm 3.8
Group 2 : OPBL	241.4 \pm 5.9	338.6 \pm 8.0	364.3 \pm 11.3	51.0 \pm 3.5
Group 3 : OPBM	230.0 \pm 4.4	343.6 \pm 6.2	365.7 \pm 9.0	59.2 \pm 4.0
Group 4 : OPBH	234.3 \pm 5.4	336.4 \pm 7.1	348.6 \pm 5.1	49.1 \pm 2.7
Group 5 : OPBL/CAL	234.2 \pm 6.5	334.2 \pm 9.2	360.0 \pm 8.6	54.0 \pm 3.8
Group 6 : OPBM/CAL	229.2 \pm 4.2	335.8 \pm 5.2	357.5 \pm 10.6	56.4 \pm 6.0
Group 7 : OPBH/CAL	237.1 \pm 4.2	332.1 \pm 11.0	365.0 \pm 12.9	53.9 \pm 4.5
Group 8 : CAL	228.3 \pm 2.8	338.3 \pm 5.4	365.0 \pm 8.5	59.9 \pm 3.2

thickness는 OVX군과 실험군 사이에 유의한 차이는 보이지 않았다.

체중 변화

8주간 사육한 흰쥐의 체중 증가량은 Table 6과 같다. 수술 전 체중은 각 군간 차이는 없었으며 실험을 마친 OVX군 및 실험군 모두에서 체중 증가를 보였으나 군간 유의적인 차이는 보이지 않았다.

고 찰

골다공증이란 골의 조성은 정상이나 골량이 비정상적으로 감소하여 병적 골절 (pathologic fracture)등을 야기하는 질환으로, 노화에 따른 골소실은 남녀 모두에서 일어나지만 최대 골량이 여성에서 적고 폐경 후 골소실이 가속화됨에 따라 골다공증의 발생 빈도가 여성에게 높게 나타난다. 폐경 후 골량의 감소로 발생하는 골다공증의 정확한 기전은 알려져 있지 않으나, 난소에서 에스트로겐 생성의 감소로 파골세포에 의한 골흡수가 증가된 것이 하나의 원인 일 것으로 추측된다 (Gamero와 Delmas, 1996). 정상상태에서는 골형성과 골흡수가 균형을 이루지만 골흡수가 에스트로겐 감소에 의하여 증가되면 골 소실이 발생하게 되며, 폐경 후 매년 총 골량의 1~3%가 손실되어 수년 후에는 골절 위험도가 2배 이상 증가하게 된다 (Gamero 등, 1996).

폐경기 골소실을 연구하기 위해 실험동물이 갖추어야 할 조건은 난소호르몬 결핍에 기인한 골소실이 있어야 하고, 골소실의 특징과 휴유증이 폐경기 여성에서 볼 수 있는 것과 같아야 한다. 흰쥐의 난소 절제술시 골 형성을 증가하는 골흡수 소견을 가진 골교체율의 증가, 초기에 급속한 골소실이 있는 후 나중에 완전한 골소실 시기가 따라온다는 점이 폐경기 여성의 골격반응과 유사한 소견을 보인다. 따라서 폐경기 여성의 골소실에 대한 본 연구의 실험동물로는 난소 절제술을 시행한 흰쥐가 적합

하다고 할 수 있다(Ammann 등, 1993). 또한 폐경기 여성과 유사한 골격 특징을 가지기 위해 생후 13주 된 흰쥐를 선택하였다. 그러나 주령이 많은 흰쥐는 난소 절제 후 골 조직에서 변화가 일어나려면, 장시간의 실험기간이 필요하기 때문에 생후 3개월이 지난 성숙한 흰쥐로 실험을 하고 있으며(Kalu 등, 1984; Sato와 Grasser, 1990), 본 연구에서도 생후 12 주령이 지난 성숙한 흰쥐를 실험동물로 선택하였다.

본 연구는 기존 골다공증 치료제에서 보이는 부작용이 나타날 가능성이 적은 자생식물인 숙지황과 가시오가피를 4:1의 비율로 혼합하여 제조한 OPB, OPB에 구연산 칼슘을 혼합한 OPB/CAL 및 구연산 칼슘을 난소 절제에 의해 골다공증이 유발된 흰쥐에 투여하여 골의 흡수 및 형성 등에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 체중의 변화, 골밀도의 변화, 골 함유량, bone strength index 및 cortical thickness 변화를 측정하였다.

OPB, OPB/CAL 및 구연산 칼슘이 체중변화에 미치는 영향을 살펴보기 위하여, 각 군별로 8주간 체중 변화를 측정하였으며, OVX군에 비해 실험군 모두에서 유의한 차이를 나타내지 않았다. 난소를 절제한 군에서 체중 증가는 난소호르몬의 분비감소로 인해 식이 섭취량이 증가하고 체지방이 축적되어 비만이 초래되는 난소절제 동물의 특성을 나타낸 것으로 해석 할 수 있다. 따라서 OPB 처리가 흰쥐의 영양대사에 문제를 일으키지 않는 것으로 사료된다. 또한 골밀도에 미치는 영향을 검사하기 위하여 경골부위를 측정하였으며, OVX군에서 해면골의 골밀도 감소는 8주 동안 약 -36% 골소실이 일어났고, 이는 pQCT를 이용한 Gasser(Gasser, 1997)의 연구결과와 유사하였다. 숙지황과 가시오가피의 복합추출물인 OPB 투여는 OVX군에 비해 골밀도 감소를 억제하였으며, 특히 OPBM (OPB 100 mg/kg) 투여군에서 유의한 차이를 보였다 (P<0.05). 그러나 고농도를 투여했을 때 골밀도 개선효과가 오히려 감소하는 결과로 보아 OPB가 골조직에 대한 역치효과(threshold effect)를 가진 것으로 여겨진다. 경골에서 치밀골의 골밀도에 미치는 영향을 알아보기 위해 8

주 동안 골밀도를 측정하였다. OVX군과 OPB, OPB/CAL 및 CAL 실험군 모두에서 골밀도 증가를 보였으며 군간 차이는 보이지 않았다. 이는 난소절제 모델에서 골감소는 대부분 해면골에서 일어난다는 Kimmel의 연구와 유사하다 (Kimmel, 1996).

다음으로 골함유량에 미치는 영향을 알아보기로 하자, 경골에서 해면골의 BMC, 치밀골의 BMC를 측정하였다. 본 연구 결과 해면골의 BMC는 OVX군에 비해 OPB, OPB/CAL 및 CAL 군에서 BMC가 높게 나타났다. 치밀골의 BMC는 OVX군 및 실험군 모두에서 증가하였고 OPBM 및 OPBM/CAL 투여군에서 OVX군에 비해 많이 증가하였으나, 유의한 차이를 보이지 않았다. 다음으로 골강도에 미치는 영향을 알아보기로 하자 pQCT에서 bone strength index를 경골에서 측정하였다. OPB를 처리한 실험군에서 anti-twisting index, anti-fracture index 및 anti compress index 모두 OVX군에 비해 높게 나타났으나 유의한 차이를 보이지 않았다. cortical thickness는 OVX군과 실험군간에 차이가 나타나지 않아 OPB 및 OPB/칼슘 혼합이 치밀골의 두께에는 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.

본 연구팀의 *in vitro* 시험결과 OPB는 파골세포의 생성 및 활성을 조절하는 주요 단백질인 receptor activator of NF- κ B ligand의 강력한 생리적 억제제로 알려진 osteoprotegerin 단백질의 분비량을 농도 의존적으로 증가시켰으며, 파골세포의 생성 및 활성을 억제하였다(Kim 등, 2007). 난소절제에 에스트로겐 결핍에 기인하여 골 소실이 일어나는 실험동물모델에서 OPB가 골 소실 감소를 억제 시키는 동일한 결과를 얻었다(Kim 등, 2007). 본 실험에서 칼슘 단독 투여가 골밀도 감소를 억제하고 골형성에 효능을 보였으나 크게 영향으로 주지 못하였다. 또한 OPB 및 OPB/칼슘 병합이 골소실 감소를 억제하고 골형성에도 일정 부분 관여하는 것으로 확인되었으나, 두 군간의 유의한 차이는 나타나지 않았다. 결과적으로 OPB/칼슘 병합에 의한 골밀도 개선은 상당 부분 OPB에서 기인한 것으로 생각된다.

이상의 결과로 보아 숙지황과 가시오가피의 복합 추출물인 OPB 및 OPB/칼슘 혼합 요법은 난소를 절제한 흰쥐에서 골 소실을 방지하는데 효과적인 방안임을 확인할 수 있으며, 임상에서 난소절제 후 또는 폐경 후 골다공증의 개선제로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Albright, F., Smith, P. H. and Richardson, A. M.: Postmenopausal osteoporosis: clinical features. J. Am. Med. Ass. 116:2465-2474, 1941.
- Ammann, P., Rizzoli, R., Muler, K., Slosman D. and Bonjour J. P.: IGF-I and Pamidronate increase bone mineral density in ovariectomized adult rats. Am. Physiol. Soc. E770-776, 1993.
- Ash, S. L. and Goldin, B. R.: Effect of age and estrogen on renal vitamin D metabolism in female rats. Am. J. Clin. Nutr. 47:694-699, 1988.
- Austin, L.A. and Heath, H.: Calcitonin: physiology and pathophysiology. N. Engl. J. Med. 304:269-278, 1981.
- Awang, D.V.C.: Siberian ginseng toxicity may be a case of mistaken identity. Can. Med. Assoc. J. 155:1237, 1996.
- Ben-Hur, E. and Fulder, S.: Effect of Panax ginseng saponins and Eleutherococcus senticosus on survival of cultured mammalian cells after ionizing radiation. Am. J. Chin. Med. 9:48-56, 1981.
- Chao, J.C., Chiang, S.W., Wang, C.C., Tsai, Y.H. and Wu, M.S.: Hot water-extracted Lycium barbarum and Rehmannia glutinosa inhibit proliferation and induce apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. World J. Gastroenterol. 12:4478-4484, 2006.
- Cruess, R.L. and Hong, K.C.: The effect of long term estrogen administration on bone metabolism in the female rat. Endocrinology. 104:1188-1193, 1979.
- Fujikawa, T., Yamaguchi, A., Morita, I., Takeda, H. and Nishibe, S.: Protective effects of Acanthopanax senticosus Harms from Hokkaido and its components on gastric ulcer in restrained cold water stressed rats. Biol. Pharm. Bull. 19:1227-1230, 1996.
- Gamero, P. and Delmas, P.D.: New development in biochemical markers for osteoporosis. Calcif. Tissue Int. 54(Suppl 1):S2-9, 1996.
- Gamero, P., Sornay-Rendu, E., Chapuy, M.C. and Delmas, P.D.: Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. J. Bone Miner. Res. 13(3):337-349, 1996.
- Gasser, J.A.: Quantitative assessment of bone mass and geometry by pQCT in rats in vivo and site specificity of changes at different skeletal sites. J. Jpn. Soc. Bone Morphom. 7:107-114, 1997.
- Harrison, M. and Fraser, R.: Calcium metabolism in osteoporosis. Lancet. 1:1015-1019, 1961.
- Hough, S.: Fast and slow bone losers. Relevance to the management of osteoporosis. Drug Aging. 12(Suppl 1):1-7, 1998.
- Jin, U.H., Kim, D.I., Lee, T.K., Lee, D.N., Kim, J.K., Lee, I.S. and Kim, C.H.: Herbal formulation, Yukmi-jihang-tang-Jahage, regulates bone resorption by inhibition of phosphorylation mediated by tyrosine kinase Src and cyclooxygenase expression. J. Ethnopharmacol. 106:333-343, 2006.
- Kalu, D.N., Hardin, R.R. and Cockerham, R.: Evaluation of the pathogenesis of skeletal changes in ovariectomized rats. Endocr. 115:507-512, 1984.
- Kim, J.K., Kim, S.W., Kim, H.Y., Lee, B.E., Hwang, H.H., Kwon, J.S. and Ko, S.Y.: 숙지황과 가시오가피 복합추출물 (OPB) 이 난소절제 흰쥐의 골밀도 및 골대사에 미치는 영향 대한구강내과학회지 . 32:35-43, 2007.
- Kim, J.K., Kim, S.W., Kim, H.Y., Lee, B.E. and Ko, S.Y.: OPB, a water extract from Rehmannia glutinosa Libosch and Eleutherococcus senticosus Max, inhibits osteoclast differentiation and function. Int. J. Oral Biol. 31:23-24, 2007.
- Kim, S.S., Son, Y.O., Chun, J.C., Kim, S.E., Chung, G.H.,

- Hwang, K.J. and Lee, J.C.: Antioxidant property of an active component purified from the leaves of paraquat-tolerant *Rehmannia glutinosa*. *Redox. Rep.* 10:311-318, 2005.
- Kimmel, D.B.: Animal models for in vivo experimentation in osteoporosis research. *Osteoporosis*, Academic press. 671-690, 1996.
- Kormosh, N., Laktionov, K. and Antoshechkina, M.: Effect of a combination of extract from several plants on cell-mediated and humoral immunity of patients with advanced ovarian cancer. *Phytother. Res.* 20:424-425, 2006.
- Lane, J.M. and Nydick, M.: Osteoporosis: current modes of prevention and treatment. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 7(1): 19-31, 1999.
- Orimo, H., Fujita, T. and Yoshikawa, M.: Increased sensitivity of bone to parathyroid hormone in ovariectomized rats. *Endocrinology.* 90:760-763, 1972.
- Raju, B.L., Lin, S.J., Hou, W.C., Lai, A.Y., Liu, P.C. and Hsu, F.L.: Antioxidant iridoid glucosides from *Wendlandia formosana*, *Natural Product Res.* 8:357-364, 2004.
- Recker, R.P.: Current therapy for osteoporosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76:14-16, 1993.
- Reginster, J.Y.: Treatment of bone in elderly subjects: calcium, vitamin D, fluor, bisphosphonates, calcitonin. *Horm. Res.* 43:83-88, 1995.
- Rodan, G.A.: Emerging therapies in osteoporosis. *Ann. Rep. Med. Chem.* 29:275-285, 1994.
- Sato, M. and Grasser, W.: Effect of bisphosphonate on isolated rat osteoclasts as examined by reflected light microscopy. *J. Bone Miner. Res.* 5:31-40, 1990.
- Shan, B.E., Yoshita, Y., Sugiura, T. and Yamashita, U.: Suppressive effect of Chinese medicinal herb, *Acanthopanax gracilistylus*, extract on human lymphocytes in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* 118:41-48, 1999.
- Shen, M.L., Zhai, S.K., Chen, H.L., Luo, Y.D., Tu, G.R. and Ou, D.W.: Immunopharmacological effects of polysaccharides from *Acanthopanax senticosus* on experimental animals. *Int. J. Immunopharmacol.* 13:549-554, 1991.
- Sridhar, C., Subbaraju, G.V., Venkateswarlu, Y. and Venugopal, P.T.: New acylated iridoid glucosides from *Vitex altissima*. *J. Natural Products.* 67:2012-2016, 2004.
- Stock, J.L.: Drug therapy in Osteoporosis: Diagnostic and Therapeutic Principles, edited by Rosen, C.J., Totowa, N.J., Humana Press. 173-187, 1996.
- Takahashi, N., Akastu, T., Sasaki, T., Nicholson, G.C., Moseley, J.M., Martin, T.J. and Suda, T.: Induction of calcitonin receptors by 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ in osteoclast-like multinucleated cells formed from mouse bone marrow cells. *Endocrinol.* 123:1504-1510, 1988.
- Takahashi, N., Yamana, H., Yoshiki, S., Roodman, G.D., Mundy, G.R., Jones, S.J., Boyde, A. and Suda, T.: Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. *Endocrinol.* 122: 1373-1382, 1988.
- Takasugi, N., Moriguchi, T., Fuwa, T., Sanada, S., Ida, Y., Shofi, J. and Saito, H.: Effect of *Eleutherococcus senticosus* and its rectal temperature, body and grip tones, motor coordination, and exploratory and spontaneous movements in acute stressed mice. *Shoyakugaku Zasshi.* 39:232-237, 1985.
- Tang, W. and Eisenbrand, G.: Chinese Drugs of Plant Origin: in Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional Modern Medicine, Berlin, Springer-Verlag. 849-854, 1992.
- Wang, J.Z., Mao, X.J., Ito, H. and Shimura, K.: Immunomodulatory activity of polysaccharide from *Acanthopanax obovatus* roots. *Planta. Med.* 57:335-336, 1991.
- Wang, J.Z., Tsumura, H., Shimura, K. and Ito, H.: Antitumor activity of polysaccharide from a Chinese medicinal herb, *Acanthopanax giraldii* Harms. *Cancer Lett.* 65:79-84, 1992.
- Wasnich, R.: What is an osteoporotic fracture in Osteoporosis: Diagnostic and Therapeutic Principles, edited by Rosen, C.J., Totowa, N.J., Humana Press. 79-88, 1996.
- Wronski, T. J., Clintron, M., Doherty, A. L. and Dann, L. M.: Estrogen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized rats. *Endocrinology.* 123:681-686, 1988.
- Yu, H.H., Seo, S.J., Kim, Y.H. and Lee, H.Y., Park, R.K., So, H.S., Jang, S.L. and You, Y.O.: Protective effect of *Rehmannia glutinosa* on the cisplatin-induced damage of HEI-OCI auditory cells through scavenging free radicals. *J. Ethnopharmacol.* 107:383-388, 2006.
- Zhao, Y., Wen, X.S., Cui, J. and Wu, W.H.: Extraction and salting-out purification of alpha-galactosidase and beta-galactosidase from fresh roots of *Rehmannia glutinosa*. *Zhong. Yao. Cai.* 29:137-139, 2006.
- 生藥學研究會 : 현대생약학, 236-265, 1998.
- 小學館, 中藥大辭典 (제 2 권) 350, 1985.
- 辛民教, 原色臨床本草學, 南山堂, 218, 1986.