

白殭蠶이 남성 골다공증에 미치는 영향

김호현 · 안상현¹ · 박선영*

세명대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 해부학교실

Effects of *Bombycis Corpus* on Male Osteoporosis

Ho Hyun Kim, Sang Hyun Ahn¹, Sun Young Park*

Department of Physiology, 1: Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Semyung University

To investigate the effect of *Bombycis Corpus* on male osteoporosis, we performed Dual Energy X-Ray Absorptiometry(DEXA) and histochemical methods. The animals were used ICR-based male mice of 8 weeks and 50 weeks, respectively. ICR male mice at 8 weeks were used in the control group, and ICR male mice at 50 weeks were used in aging group and *Bombycis Corpus* group(BC group). In the aging group, 0.5 ml of distilled water was administered once a day for 6 months. In BC group, *Bombycis Corpus*(0.78g/kg) was dissolved in distilled water for 6 months once a day. As a result, *Bombycis Corpus* decreased bone loss, increased bone density by reducing the loss of bone matrix in the femur due to aging, and increased osteoblast - induced osteopontin(OPN) and osteocalcin(OPC) positive reaction. In addition, administration of *Bombycis Corpus* decreased Reaction of activation of nuclear factor kappa B ligand(RANKL) positive reaction, increased osteoprotegerin(OPG) positive reaction, and decreased matrix metalloproteinase-3(MMP-3) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG) positive reaction. Taken together, *Bombycis Corpus* increases the activity of osteoblasts, inhibits osteoclast function, promotes osteoblast function, inhibits bone tissue degradation, and inhibits bone loss due to oxidative stress. It was observed that *Bombycis Corpus* reduced bone loss and increased bone density caused by aging to improve male osteoporosis. Therefore, *Bombycis Corpus* may be used as a preventive and therapeutic agent for male osteoporosis.

keywords : *Bombycis Corpus*(BC), Male osteoporosis, OPN, OPC, RANKL, OPG, MMP-3

서론

일반적으로 남성이나 여성 모두 연령의 증가에 따른 골량의 감소와 미세구조의 변화로 뼈의 강도가 약해지고 작은 충격에도 골절이 쉽게 발생하게 된다. 국민건강보험공단 자료에 의하면 50세 이상의 남녀에서 발생한 손목, 척추 및 대퇴골 골절의 발생빈도는 각각 50세 인구 10,000명당 22.4명, 26.3명, 20.8명으로 국내 골절 유병률은 높은 편이며¹⁾, 현재 OECD 국가 중 가장 빠른 속도로 고령화가 진행되고 있는 사회의 특성을 고려해본다면 노인 골절의 발생률은 더욱 높아질 것이라 예상할 수 있다.

세계보건기구는 골다공증을 노인 골절의 가장 주된 원인이라 하였는데, 골다공증이란 노인인구의 절반 가까이에서 발생할 정도로 노년층에서 흔히 발생하며, 병리학적으로는 골의 절대량이 감소되어 근골격계 불균형을 초래하고 외부의 작은 충격에 의해서도 골절을 일으키게 되는 대사성 질환을 말한다^{2,3)}. 또한, 골다공증은 질환으로 인한 삶의 질 저하뿐만 아니라 골절의 발생으로 심하면 사

망에까지 이를 수 있는 질환이기 때문에 이에 대해 의학적이나 사회적으로도 각별한 관심이 필요하다.

골다공증은 골질량 감소가 서서히 이루어기 때문에 골절이 발생할 때까지 별다른 증상이 나타나지 않는다. 그래서 많은 골다공증 환자들은 효과적인 치료시기를 놓치게 되는 경우가 많으며 이미 골다공증이 발병한 후에도 안전하고 확실한 치료법이 없어 원상회복이 매우 어려우므로 진단 및 치료도 중요하지만 그보다 예방이 더 중요한 질환이다⁴⁾.

골다공증이 발생하는 원인으로 유전적 요인, 인종적 요인, 영양적 요인 및 연령, 성별, 호르몬 분비, 체중, 활동량, 음주, 카페인, 흡연 등 다양한 원인들이 있지만⁵⁻⁷⁾, 아직까지 뚜렷하게 밝혀진 원인은 없으며, 치료법도 경구용 골다공증치료제가 있지만 많은 단점이 있어⁸⁾ 기존 치료제의 단점을 보완하면서 골다공증 개선 효과를 갖춘 치료제 개발이 필요하다.

보통 골다공증이라는 질환은 여성만의 질환으로 여겨져 대부분의 골다공증에 대한 연구 및 진료의 관심대상은 골다공증이 다발하

* Corresponding author

Sun-Young Park, Department of Physiology, College of Korean Medicine, Semyung University 65, Semyung-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do, Korea

E-mail : blbee@semyung.ac.kr Tel : +82-43-649-1345

Received : 2018/12/26 Revised : 2019/02/08 Accepted : 2019/02/20

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2019.02.33.1.56

Available online at https://kmpath.jams.or.kr

는 폐경 이후의 여성에게 집중되어 있었다. 그 이유로 여성에게는 여성호르몬의 급격한 감소에 의한 폐경이라는 확실한 기준점이 있어 골다공증에 대한 진단 및 치료, 예방이 비교적 손쉽게 가능하지만 남성의 경우 확실히 드러나는 신체증상이 없어 골절이 있기 전까지는 골다공증에 대해 인지하지 못하기 때문이다. 또한 연령 증가에 따라 골다공증의 유병률도 급격히 증가하고 있고, 척추나 고관절에 골절이 발생하였을 때 사망률은 여성보다 남성에게서 더 높게 나타나고 있으므로⁹⁻¹¹⁾ 남성 골다공증에 대한 연구가 필요함에도 불구하고 여성 골다공증 관련 연구보다 미흡한 실정이다.

한편 白僵蠶는 性味가 辛, 鹹, 平 無毒하며, 肝, 肺, 胃 3經에 歸經하면서 祛風勝濕, 瀉熱散結, 通利經絡하여 무릇 經絡의 風寒과 濕熱貯滯를 疏通시키며, 그 功이 肝氣를 運行시키고 血熱을 흠어뜨린다고 하였다^{12,13)}. 또한 鹿角, 紅花, 昆布 등과 白僵蠶의 혼합물이 예전부터 골다공증의 치료에 사용되었다고 알려져 있으며¹⁴⁾, 白僵蠶 물 추출물이 여성 골다공증을 개선시킨다는 보고도 있다¹⁵⁾.

이에 여성 골다공증의 개선에도 효과를 보이는 白僵蠶이 남성 골다공증에도 개선효과를 나타낼 것이라고 생각하여 Dual Energy X-Ray Absorptiometry(DEXA)와 조직화학적 방법을 통하여 실험을 진행해보았다.

재료 및 방법

1. 실험동물

8주령의 수컷 ICR계 생쥐(샘타코, 한국)와 50주령의 수컷 ICR계 생쥐(중앙실험동물, 한국)는 구입한 후 온도 23±2 °C, 습도 55±5 %의 항온항습실에서 일주일 적응시킨 후 사용하였고, 적응기간 동안 사료와 음수는 자유 섭취케 하였다.

본 동물실험은 세명대학교 동물실험윤리위원회의 승인(smecae 18-12-04)하에 실시되었다.

2. 白僵蠶 추출물 제조와 투여

白僵蠶 추출물은 白僵蠶(Bombycis Corpus, BC) 300 g을 증류수 2000 mL과 함께 round flask에 넣고 2시간 동안 가열 추출한 후 rotary evaporator(Eyela, Japan)로 감압 농축하여 동결건조기로 건조하였고, 본 과정을 통해 분말 17.09 g을 얻었다.

실험군은 정상군(control group)과 노화군(Aging group), 白僵蠶군(Bombycis Corpus group, BC group) 총 3군으로 분류하였다.

정상군은 아무런 처치를 하지 않은 8주령의 ICR계 생쥐를 사용하였고, 노화군과 白僵蠶군은 50주령의 ICR계 생쥐를 사용하였다. 노화군은 별다른 처치 없이 증류수 0.5 mL를 1일 1회씩 6개월 동안 투여하였고, 白僵蠶군은 白僵蠶 추출물(0.78g/kg)을 D.W에 녹여 1일 1회씩 6개월 동안 투여하였다.

3. 골다공증에 미치는 영향

1) 대퇴골의 골손실 분석

Sodium pentobarbital로 마취하고, x-ray absorptiometry (Analyzer, Medikors, 서울, 대한민국)를 통해 골 손실을 분석하였다.

2) 조직 표본 제작

흰쥐를 ether로 마취하여 대퇴골을 적출한 후 대퇴골 주위의 지방 및 근육들을 제거하고 실온에서 24시간동안 10% NBF에 고정하였으며, 고정된 대퇴골은 탈회액 (decalcification solution, BBC, UK)에 12시간 처리하고 세척한 후 통상적인 방법으로 파라핀에 포매하여 5 µm 두께로 연속절편을 만들었다.

3) 골다공증 관찰을 위한 조직화학

대퇴골 뼈기질의 변화를 관찰하기 위해 Masson trichrome 염색을 실시하였다. 우선 50-60°C Bouin 용액에서 1시간동안 매염 처리한 다음 70% 에탄올에서 picric acid를 제거하였다. Weigert iron hematoxylin에서 10분 동안 반응시켜 핵 염색하고, Biebrich scalet-acid fuchsin와 phosphomolybdic-phosphotungstic acid에서 각각 15분간, aniline blue에 5분간 처리한 후 광학현미경 (BX51, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

4) 뼈모세포 활성 관찰을 위한 면역조직화학

뼈모세포에서 생성되는 osteocalcin (OPC)과 osteopontin (OPN)의 분포변화를 조사하기 위해 mouse anti OPC와 mouse anti OPN를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 뼈조직절편을 proteinase K (20 µg/mL)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum에서 2시간 동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 mouse anti OPC (1:50, Santa Cruz Biotech, USA)과 mouse anti OPN (1:50, abcam, USA)에 4°C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG1 (1:100, DAKO, USA)에 실온에서 24시간 link 하였고, 그런 다음 avidin biotin complex kit (Vector Lab, USA)에 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하였다.

5) 골다공증 발병 조절 관찰을 위한 면역조직화학

골다공증 발병기전에 관여하는 Reaction of activation of nuclear factor kappa B ligand (RANKL, 1:50, Santa Cruz Biotech, USA)과 osteoprotegerin (OPG, 1:50, Santa Cruz Biotech, USA), 골성조직의 분해에 관여하는 matrix metalloproteinase-3 (MMP-3, 1:50, Santa Cruz Biotech, USA)의 변화를 관찰하기 위해 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

6) 산화스트레스 조절 관찰을 위한 면역조직화학

산화스트레스에 의한 유전자손상에 관여하는 8-OHdG(1:100, Santa Cruz Biotech, USA)의 변화를 관찰하기 위해 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

4. 영상 분석 및 통계

면역조직화학 결과를 조사하기 위해 Image pro Plus (Media Cybernetic, USA)을 이용한 영상분석 (image analysis)을 실시하여 수치화 (means ± standard deviation) 하였다. 각 군의 표본에서 임의로 선정된 지역을 x40 또는 x400배율에서 촬영한 다음 positive pixels/20,000,000 pixels로 영상분석 하였다. 통계는 SPSS software (SPSS 23, SPSS Inc., USA)를 사용하였으며,

one-way ANOVA 시행을 통해 유의성 ($P < 0.05$)을 검증하고 Duncan's multiple range test로 사후 검증하였다.

결 과

1. 白僵蠶이 대퇴골의 골손실에 미치는 영향

X-ray absorptiometry를 이용한 DEXA를 통해 골밀도를 검사한 결과, control군에 비해 aging군의 대퇴골에서 골손실의 증가가 관찰되었지만, BC군에서는 aging군에 비해 대퇴골의 골손실이 감소되었다.

또한 골밀도는 control군에 비해 aging군의 골밀도가 감소되었지만, BC군의 골밀도는 Aging군에 비해 60% 증가하였다.

Table 1. Results of bone mineral density(BMD) test by DEXA in the femur

Objective	Group		
	Control	Aging	BC
BMD	0.187±0.016	0.092±0.007	0.148±0.012***

Values are means ± standard deviation(n=8). Image analysis for 20,000,000 pixel cells. *** $p < 0.001$ compared with Aging.

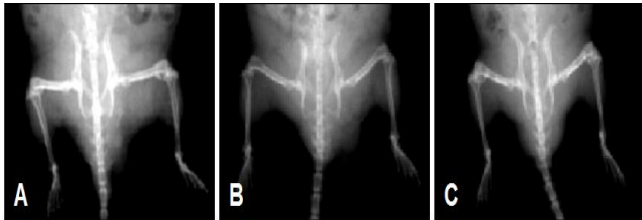


Fig. 1. Effect of *Bombycis Corpus* on bone loss in the femur. A, Control group; B, Aging group; C, *Bombycis Corpus* group.

2. 白僵蠶이 대퇴골내 뼈기질에 미치는 영향

대퇴골내 뼈기질의 변화를 관찰하기 위해 Masson trichrome 염색을 실시한 결과, 치밀뼈내 뼈기질 유실에 따른 빈공간은 control군에 비해 aging군에서 증가되었지만, BC군에서는 aging군에 비해 감소되었다.

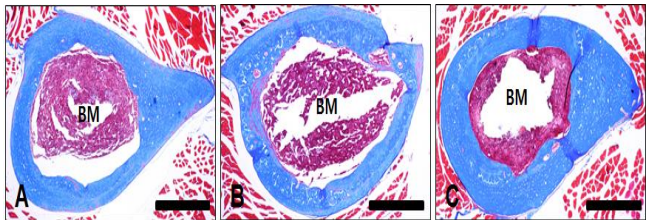


Fig. 2. Effect of *Bombycis Corpus* on the bone matrix in the femur. A, Control group; B, Aging group; C, *Bombycis Corpus* group; BM, bone marrow; Bar size, 50µm.

3. 白僵蠶이 뼈모세포의 활성화에 미치는 영향

뼈모세포에서 생성되는 osteopontin (OPN)과 osteocalcin (OPC)의 분포변화를 조사하기 위해 면역조직화학적 염색을 실시한 결과, OPN 양성반응은 BC군에서 aging군에 비해 145% 증가하였고, OPC 양성반응은 BC군에서 aging군에 비해 150% 증가하였다.

Table 2. The Image Analysis for OPN, OPC in the femur of mouse

Objective	Group		
	Control	Aging	BC
OPN	65,168±2,289	12,814± 726	27,497± 756***
OPC	75,920±1,547	22,741±1,000	56,722±1,177***

Values are means ± standard deviation(n=10). Image analysis for 20,000,000 pixel cells. *** $p < 0.001$ compared with Aging.

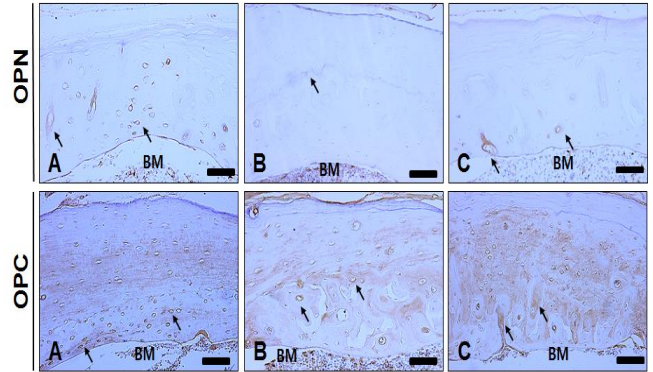


Fig. 3. Distribution of osteopontin (OPN) and osteocalcin (OPC) in osteoblasts. Arrow, positive reaction; OPN, OPN immunohistochemistry; OPC, OPC immunohistochemistry; A, Control group; B, Aging group; C, *Bombycis Corpus* group; BM, bone marrow; Bar size, 50µm.

Table 3. The Image Analysis for OPG, RANKL, MMP-3 in the femur of mouse

Objective	Group		
	Control	Aging	BC
OPG	63,405±1,195	16,250±795	35,715± 620***
RANKL	10,481± 710	75,270±1,065	26,764±1,256***
MMP-3	4,879± 302	67,007±1,165	42,975±1,219***

Values are means ± standard deviation(n=10). Image analysis for 20,000,000 pixel cells. *** $p < 0.001$ compared with Aging.

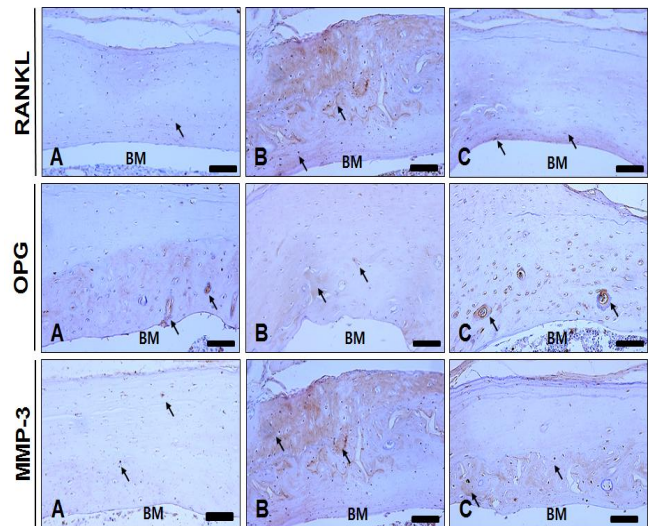


Fig. 4. Distribution of RANKL, OPG, and MMP-3 involved in osteoporosis pathogenesis. Arrow, positive reaction; RANKL, RANKL immunohistochemistry; OPG, OPG immunohistochemistry; MMP-3, MMP-3 immunohistochemistry; A, Control group; B, Aging group; C, *Bombycis Corpus* group; BM, bone marrow; Bar size, 50µm.

4. 白僵蠶이 골다공증의 발병기전에 미치는 영향

골다공증 발병기전에 관여하는 RANKL, OPG, 골성조직의 분

해에 관여하는 MMP-3의 변화를 관찰하기 위해 면역조직화학적 염색을 실시한 결과, RANKL 양성반응은 BC군에서 aging군에 비해 64% 감소되었고, OPG 양성반응은 BC군에서 aging군에 비해 120% 증가되었으며, MMP-3 양성반응은 BC군에서 aging군에 비해 36% 감소되었다.

5. 白蠟蠟이 대퇴골의 산화스트레스에 미치는 영향

산화스트레스에 의한 유전자손상에 관여하는 8-OHdG의 변화를 관찰하기 위해 면역조직화학적 염색을 실시한 결과, 8-OHdG 양성반응은 BC군에서 aging군에 비해 62% 감소되었다.

Table 4. The Image Analysis for 8-OHdG Positive Reactions in the femur of mouse

Objective	Group		
	Control	Aging	BC
8-OHdG	9,994±470	72,964±1,239	28,105±1,189***

Values are means ± standard deviation(n=10). Image analysis for 20,000,000 pixel cells. *** p<0.001 compared with Aging.

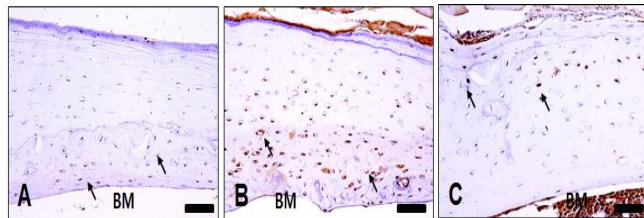


Fig. 5. Changes in 8-OHdG involved in gene damage caused by oxidative stress. Arrow, positive reaction; A, Control group; B, Aging group; C, *Bombycis Corpus* group; BM, bone marrow; Bar size, 50µm.

고찰

대부분의 골은 체내 골의 25%를 차지하는 소주골과 체내 골의 75%를 차지하고 있으면서 소주골 주위를 둘러싸고 있는 치밀골, 골수강으로 구성되는데, 소주골 또는 해면질골은 공간으로 구분되는 골편으로 이루어져 있고, 치밀골은 더 조밀하고 대사적으로 덜 활성화되어 있다. 일생동안 골은 꾸준히 흡수되고, 새 골이 형성되는 과정을 반복하게 된다. 골의 칼슘 교체율은 영아에서는 1년에 100%로 어렸을 때는 주로 골 형성이 활발히 이루어지지만 어른에서는 1년에 18%로 연령이 증가할수록 골 형성은 감소하게 된다.

골의 생성과 흡수에 주로 관여하는 세포는 골수에서 유래하는 조골세포와 파골세포인데, 조골세포는 골을 형성하는 세포로, 이 세포가 골의 안쪽에서 발견되는 골세포로 분화하며, 파골세포는 이미 생성된 골을 침식시키고 흡수하는 역할을 담당한다. 이 두 세포가 상호작용을 하면서 골의 재형성이 이루어지는데, 주로 파골세포가 골을 흡수하고 그 후 조골세포가 골을 생성하는 과정으로 이루어진다.

전체적으로 뼈의 형성보다 뼈의 재흡수가 더 많이 일어나는 질환을 골다공증이라고 하는데, 골다공증의 가장 흔한 형태는 퇴행성 골다공증으로 대부분 고령, 폐경과 관계된다. 노화가 진행되면 운동기능 및 체력이 저하되는데, 이는 근골격계 및 몸을 구성하는 물질들을 약화시키며, 심폐기능과 면역 기능 저하로 이어져 골다공

증, 근위축, 고혈압, 당뇨 등의 만성 질병이 발생하게 된다¹⁶⁾. 이렇게 발생하는 퇴행성 골다공증은 노화와 함께 골격 분해가 증가되고, vitamine D 생성이 감소되며, 칼슘 흡수의 감소 및 부갑상선 호르몬 증가 등의 원인들로 골격이 손실되어 점차 발생하게 되는 병으로^{17,18)}, 노인에게서 흔하게 발생하므로 고령화된 현대사회에서 주된 건강문제로 대두되고 있다. 골다공증으로 뼈의 소실이 가속화 되면 골절의 발생빈도, 특히 팔 말단부의 골절, 척추, 고관절의 골절이 증가되고, 이는 남성에게 갱년기 증상이 찾아올 경우 더욱 심해지며, 노인에게서 발생하는 고관절 골절환자 중 12-20% 정도가 사망한다고 알려져 있으므로 이에 대한 대책이 필요하다¹⁹⁾.

성인 여자는 성인 남자보다 골량이 적고, 폐경기 이후에 같은 나이의 남자에 비해 더 빠르게 뼈의 소실이 있으므로 골다공증은 여자에게서 더 쉽게 발생한다. 이는 여자의 골다공증 유병률이 남자의 5배 정도 높은 사실에서도 확인할 수 있는데, 이러한 이유로 골다공증에 대한 대부분의 연구는 여성을 위주로 진행되어 왔다²⁰⁾. 하지만 전 세계에서 발생한 170만 건의 대퇴부 골절 중 30%가 남성에게서 발생한다는 보고가 있고, 남성의 골절률이 2025년에 가서는 여성의 골절률과 비슷해질 것이라 추정하고 있는 역학연구가 있어^{21,22)} 남성 골다공증에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있다.

남성 골다공증은 원인이 밝혀지지 않은 일차성 골다공증과 비교적 그 원인이 명확히 밝혀진 이차성 골다공증으로 구분할 수 있다. 이차성 골다공증의 원인으로는 성선기능 저하증, 낮은 BMI, 흡연, 알코올 과다 섭취, 스테로이드 사용, 육체적 저활동 등이 있지만 남성 골다공증의 약 40%는 원인이 밝혀지지 않은 일차성 골다공증이다^{10,23)}.

골다공증 진단법으로는 골형성과 소실의 정도를 판정하는 골대사 생화학 지표를 이용하는 방법과, 골조직을 천자하는 생검법, 골밀도 측정기를 이용한 골밀도 측정법 등이 있는데, 이 중 골다공증의 예방과 조기진단을 위해서 그 방법이 간단하고 검사시간이 짧으며, 정확도와 정밀도가 우수한 골밀도 측정 방법으로 이중 에너지 방사선 흡수계측법(DEXA)이 가장 많이 사용되어지고 있다²⁴⁾.

현재까지 사용되고 있는 골다공증 치료법은 경구용 골다공증치료제가 있는데, 이는 대부분 골 재흡수 차단제로 주기적으로 투여 시 뼈의 미네랄 성분을 증가시키고, 새로운 척추 골절의 빈도를 감소시킬 뿐이지 병의 치료에는 효과가 거의 없는 것으로 증명되었다^{7,19)}. 또한 가장 많이 사용되는 비스포스포네이트 제제의 경우 체내 흡수율을 높이기 위해 아침 식사 최소 30분 전에 물과 함께 복용한 후 1시간가량 눕지 않아야 하는 조건이 있어 복용이 매우 불편한 단점이 있으며, 위장장애, 식도염 등의 부작용도 나타날 있다. 따라서 이러한 단점 및 불편함을 보완하면서 효과적인 새로운 치료제에 대한 개발이 필요한 실정이다.

白蠟蠟은 예전부터 鹿角, 紅花, 昆布 등과 혼합하여 골다공증의 치료에 사용되었다고 알려져 있으며¹⁴⁾, 기존에 조골세포의 분화를 유도함으로써 소주골의 부피와 두께를 증가시켜 여성 골다공증 질환을 개선시키는 효과가 있다는 보고도 있다¹⁵⁾.

이에 저자는 여성골다공증 개선에 효과를 나타내는 白蠟蠟이 남성 골다공증에도 개선효과를 나타낼 것이라 생각하였다. 따라서 白蠟蠟이 남성 골다공증에 미치는 영향을 알아보기 위해 수컷 생쥐

를 대상으로 DEXA 및 조직화학적 방법을 이용하여 실험을 진행하였다.

먼저 x-ray absorptiometry를 이용한 DEXA를 통해 골밀도를 검사한 결과, 白蠟의 투여로 대퇴골의 골손실이 감소하였으며 이는 증가된 골밀도 수치에서도 확인할 수 있었다. 또한 대퇴골내 뼈기질을 관찰하였을 때 치밀뼈내 뼈기질 유실에 따른 빈공간도 白蠟의 투여로 감소하였다. 즉, 白蠟은 연령의 증가로 발생한 대퇴골내 치밀뼈의 뼈기질 유실을 감소시킴으로써 골손실을 감소시키고, 골밀도를 증가시킴으로써 골다공증을 개선시키는 것으로 생각된다.

OPN과 OPC는 모두 뼈모세포에서 생성되는 인자로, OPN은 골조직 형성의 초기 biomarker로 주로 사용되는데, 골대사에 관여하는 세포들이 골조직과 부착하고 이동하는 것을 증진시키고 골의 광화도를 증가시킨다고 알려져 있다²⁵. OPC는 골 형성의 특이 생화학적 지표로 골의 재형성 시 조골세포에 의해 합성되며, 새로 합성된 OPC의 약 30%가 혈중으로 방출되기 때문에 혈중 OPC의 농도로 조골세포의 활동성을 파악할 수 있어 골재생의 정도를 반영한다²⁶. 白蠟은 이런 OPN과 OPC 양성반응을 모두 증가시켰으므로 白蠟이 뼈모세포의 활성을 증가시켜 골 형성을 증가시킴으로써 골다공증 개선효과를 나타낸다는 것을 알 수 있다.

조골세포는 파골세포의 발달과 활성을 상반되게 조절하는 2개의 상호 연관된 화학물질, RANKL과 OPG를 생산하는데, RANKL은 파골세포의 작용을 촉진하는 인자로, 대식세포 막 표면에 있는 단백질 수용체인 RANK에 결합하여 대식세포가 파골세포로 분화하도록 유도하고 파골세포의 세포자멸사를 억제함으로써 뼈 흡수를 촉진하며 뼈 중량을 감소시킨다. OPG는 RANKL이 RANK 수용체와 결합하지 못하게 RANKL을 제거함으로써 파골세포의 뼈 흡수활성 촉진을 막는 인자로, 그 결과 조골세포의 기능이 파골세포를 능가하게 되어 뼈 중량이 증가하게 된다. 이렇게 RANKL과 OPG는 서로 균형을 맞추며 골밀도를 유지하게 된다²⁷⁻²⁹. 본 실험에서 白蠟의 투여로 RANKL 양성반응은 감소하였고, OPG 양성반응은 증가하였기 때문에 白蠟은 파골세포의 작용은 억제하고 조골세포의 작용은 촉진함으로써 골다공증 개선효과를 나타내는 것으로 생각된다.

또한 MMP-3은 단백다당을 분해시키고 잠재성 MMP-1을 활성화시킴으로써 교원질과 단백다당을 분해시켜 관절연골기질의 미란, 균열 등을 초래함으로써 골성조직을 분해하는 인자로^{30,31}, 白蠟의 투여로 MMP-3 양성반응이 감소되었기 때문에 白蠟은 골성조직의 분해를 억제함으로써 골다공증 개선효과를 가진다는 사실을 알 수 있다.

활성산소는 세포내 산화효소가 촉매로 작용하는 산소의 환원반응에서 발생하는데, 이것이 세포성분과 임의로 반응하여 산화체 혹은 과산화체를 형성하고, 이렇게 형성된 산화체가 단백질, 효소, DNA 등 각 세포성분의 본래 기능을 수행하지 못하도록 한다. 특히 연령의 증가에 따라 활성산소가 과도하게 축적되는 것이 노화의 원인이 된다고 알려져 있다. 이러한 활성산소가 골에 미치는 영향에 대해 세포내로 칼슘의 유입을 초래하여 세포내 칼슘의 항상성을 깨뜨리며, 골세포의 파괴를 더욱 가속화시킨다는 보고가 있다³²⁻³⁵.

8-OHdG는 DNA에 대한 산화적 손상을 나타내는 지표로, 세포 손상을 유발하는 산소유리기 중 하나인 수산화기 DNA를 손상시키면 DNA strand의 nucleobase 중 하나인 guanine에 작용하여 8-OHdG가 만들어진다³⁶⁻³⁸. 白蠟을 투여하였을 때 8-OHdG 양성반응은 aging군에 비해 감소된 것은 白蠟이 활성산소로 발생하는 산화스트레스에 의한 골 손실을 억제함으로써 골다공증을 개선시킨다는 사실을 보여준다.

白蠟은 에스트로겐이 결핍된 흰쥐의 난소적출 골다공증 모델 및 MG-63 cell line을 이용한 기존 연구에서 여성 골다공증에 대한 개선효능이 보고되었다¹⁵. 이 연구에서는 Micro-CT를 이용하여 소주골의 용적과 두께를 측정하였고, in vitro assay에서 alkaline phosphatase, type I collagen 및 mineralization의 농도를 측정하였다. 그 결과 白蠟은 뼈 성장인자인 BMP-2의 신호전달 경로를 통해 조골세포의 분화를 유도하였으며, 이를 통해 소주골의 부피와 두께를 증가시켜 골다공증을 개선시킨다는 사실을 확인할 수 있었다.

반면 본 실험의 경우 수컷 노화쥐를 대상으로 DEXA와 조직화학적 실험방법을 이용하여 실험을 진행하였다. 그 결과를 종합해보면, 白蠟은 뼈모세포의 활성을 증가시키고 파골세포의 작용 억제 및 조골세포의 작용을 촉진시키며 골성조직의 분해 억제와 산화스트레스에 의한 골 손실의 억제를 통해 연령의 증가로 발생한 골손실 감소 및 골밀도를 증가시켜 남성 골다공증을 개선시키는 효과를 나타내는 것으로 관찰되었다. 따라서 白蠟은 남성 골다공증에 대한 예방 및 치료제로서 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

여성 골다공증에 대하여 이미 개선효과가 입증된 白蠟이 남성 골다공증에 미치는 영향을 알아보기 위해 DEXA 및 조직화학적 방법을 이용하여 실험을 진행하였다.

그 결과, 白蠟은 연령의 증가로 발생한 대퇴골내 치밀뼈의 뼈기질 유실을 감소시킴으로써 골손실을 감소시키고, 골밀도를 증가시켰으며, 뼈모세포에서 생성되는 OPN과 OPC 양성반응을 증가시켰다. 또한 白蠟의 투여로 RANKL 양성반응은 감소하였고, OPG 양성반응은 증가하였으며 MMP-3 양성반응과 8-OHdG 양성반응은 감소하였다.

이상의 실험결과를 종합하면, 白蠟은 뼈모세포의 활성을 증가시키고 파골세포의 작용 억제 및 조골세포의 작용을 촉진시키며, 골성조직의 분해 억제와 산화스트레스에 의한 골 손실의 억제를 통해 연령의 증가로 발생한 골손실을 감소시키고, 골밀도를 증가시켜 남성 골다공증을 개선시키는 효과를 나타내는 것으로 관찰되었다. 따라서 白蠟은 남성 골다공증에 대한 예방 및 치료제로서 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2016학년도 세명대학교 교내학술연구비 지원에 의해 수행된 연구임.

References

- National Health Insurance Statistics. 2007.
- Report of a WHO Study Group. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 1994;843:1-129.
- Cecil RL, Wyngaarden JB, Smith LH, Bennett JC. Cecil textbook of medicine. 19th ed. Philadelphia: Saunders; 1992. p. 1426-31.
- Kim SY. A literature review and pilot study on risk factors of postmenopausal osteoporosis. Seoul National University Graduate School of Health: Department of Health Science. 1995.
- Choi EJ. A Study on the Correlation between Bone Mineral Density and Dietary Intake and Activity Status of Women after Menopause. Yonsei University Graduate School: Department of Food Science. 1987.
- Oh JW. Effects of Dietary Calcium on the Metabolism of Ca in the Experimental Model of Osteoporosis. Seoul National University Graduate School: Department of Agriculture and Family. 1991.
- Kannus P, Järvinen M, Sievänen H, Oja P, Vuori I. Osteoporosis in men with a history of tibial fracture. *J Bone Miner Res.* 1994 Mar;9(3):423-9.
- The Korean Society of Bone Metabolism Guidebook Compilation Committee. Physicians's guide for diagnosis & treatment of osteoporosis. Seoul: The Korean Society of Bone Metabolism; 2015.
- Marcus R, Feldman D, Kelsey J. Osteoporosis. 2nd ed. Sandiago: Academic press; 2001. p. 745.
- Kelepouris N, Harper KD, Gannon F, Kaplan FS, Haddad JG. Severe osteoporosis in men. *Ann Intern Med.* 1995 Sep 15;123(6):452-60.
- Cho ES. Prevalence and management of Osteoporosis: Korea National Health and Nutrition Examination Survey, 2008-2011. *KCDC.* 2013:1-5.
- Shin MK. Clinical traditional herbology. Seoul: Younglimsa;1992. pp.663-4.
- Shin GG. Shin's herbology. Seoul: Soomoonsa; 1973. p. 320-2.
- Kwon HC, Jung IY, Cho SY, Cho OR, Yang MC, Lee SO, et al. Phospholipids from *Bombycis corpus* and their neurotrophic effects. *Arch Pharm Res.* 2003 Jun;26(6):471-7.
- Park JA. Effect of *Bombycis corpus* on osteoporosis experimental models. Kyunghee University Graduate School of East-West Medical Science: Department of Medical Science. 2008.
- Rhee SJ. A model for elderly health care management. *Journal of Korean Academy of Public Health Nursing.* 1994 Jun;8(2):71-82.
- Fujita T. Calcium and aging. *Calcified Tissue International.* 1985 Jan;37(1):1-2.
- Riggs BL. Overview of osteoporosis. *The Western Journal of Medicine.* 1991 Jan; 154(1):63-77.
- Translated by professors from national medical university. Review of medical physiology. 18th ed. Seoul: Hanwoori; 2002. p. 412-6.
- Kim YA. Osteoporosis or Low Bone Mass in Adults Aged 50 years old and above in Republic of Korea, 2008-2011. Public health weekly report, *KCDC.* 2013;7(42):939-42.
- Cooper C, Campion G, Melton LJ 3rd. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. *Osteoporos Int.* 1992 Nov;2(6):285-9.
- Martin AD, Silverthorn KG, Houston CS, Bernhardson S, Wajda A, Roos LL. The incidence of fracture of the proximal femur in two million Canadians from 1972 to 1984. Projections for Canada in the year 2006. *Clin Orthop Relat Res.* 1991 May;(266):111-8.
- Peris P, Guañabens N, Monegal A, Suris X, Alvarez L, Martinez de Osaba MJ, et al. Aetiology and presenting symptoms in male osteoporosis. *Br J Rheumatol.* 1995 Oct;34(10):936-41.
- Jang JS, Moon SH. Measurement of Bone Mineral Density in Osteoporotic Fracture of the Spine using Dual Energy X-ray Absorptiometry -Evaluation of 154 Postmenopausal and senile Women-. *J. of Korean Orthop. Assoc.* 1992;27(1):57-64.
- Kasugai S, Todescan R Jr, Nagata T, Yao KL, Butler WT, Sodek J. Expression of bone matrix proteins associated with mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in vitro: inductive effects of dexamethasone on the osteoblastic phenotype. *J Cell Physiol.* 1991 Apr;147(1):111-20.
- Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover. *J Bone Miner Res.* 1993 Dec;8 Suppl 2:S549-55.
- Sherwood L. Human Physiology. 9th ed. Seoul: Life science; 2016. p. 788.
- Jones DH, Kong YY, Penninger JM. Role of RANKL and RANK in bone loss and arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2002 Nov;61 Suppl 2:ii32-9.
- McClung M. Role of RANKL inhibition in osteoporosis. *Arthritis Res Ther.* 2007; 9(Suppl 1): S3.
- Kraus VB. Pathogenesis and treatment of osteoarthritis.

- Med Clin North Am. 1997 Jan;81(1):85-112.
31. Woessner JF Jr, Gunja-Smith Z. Role of metalloproteinases in human osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl.* 1991 Feb;27:99-101.
 32. Bracco F, Scarpa M, Rigo A, Battistin L. Determination of superoxide dismutase activity by the polarographic method of catalytic currents in the cerebrospinal fluid of aging brain and neurologic degenerative diseases. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1991 Jan;196(1):36-41.
 33. Dumuis A, Sebben M, Haynes L, Pin JP, Bockaert J. NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature.* 1988 Nov 3;336(6194):68-70.
 34. Compiled by the Institute of Medical Education. *Elderly medicine.* Seoul: Seoul National University Press: 1997. p. 3, 7, 9-10, 14, 22, 27, 29-31, 595.
 35. Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science.* 1992 Oct 23;258(5082):607-14.
 36. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 1998 Apr;78(2):547-81.
 37. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 2004 Nov;266(1-2):37-56.
 38. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2009 Apr;27(2):120-39.