

난소적출 마우스를 이용한 골다공증 개선효과를 나타내는 巴戟天과 肉蓯蓉 熱水 抽出物의 복합 최적 조성 선택 실험

대구한의대학교 한의학과 부인과교실
안뜰에봄, 김동철

ABSTRACT

Selection of the Fittest Anti-osteoporotic Mixed Compositions Consist of *Morindae Radix* and *Cistanchis Herba* Aqueous Extracts on Ovariectomized Mice

Tteul-E-Bom An, Dong-Chul Kim

Dept. of Korean Obstetrics & Gynecology, College of Korean Medicine,
Daegu Haany University

Objectives: To select the optimal ranges showing obvious synergic anti-osteoporotic potential after adjust mixed formula consisted of *Morindae Radix* (MR) and *Cistanchis Herba* (CH) as compared with those of each single formula or risedronate sodium (RES) using bilateral ovariectomized (OVX) female mice.

Methods: Fourteen groups, total eight sham or 104 OVX mice were selected based on the body weights at 34 days after OVX surgery. After that, 9 types mixed compositions, single formula of MR and CH, and RES were orally administered for 35 days. And we measured changes in body weight and gain, femur weight, bone mineral density (BMD), bone strength (failure load) and mineral content - calcium (Ca) and inorganic phosphorus (IP), osteocalcin contents and bone specific alkaline phosphatase (bALP) activities of all mice.

Results: The OVX-induced estrogen-deficient osteoporotic signs were significantly inhibited by 35 days of continuous oral treatment of all treated mice as compared with OVX control mice. Especially, MR:CH 1:3 and 1:1 mixed formula treated mice showed significantly more favorable inhibitory activities against estrogen-deficient osteoporosis symptoms as compared to those of each single formula of MR and CH. Although RES also ameliorated the decreases of the femur BMD, strength and trabecular bone architectures through the inhibited the increases of bone turnover, but they did not critically influenced on the bone formations.

Conclusions: The results suggest that MR:CH 1:3 mixed formula showed somewhat lower anti-resorptive effects as compared to those of RES, but they also showed bone formation effects. therefore, it is expected that MR:CH 1:3 mixture will be promising as a potent protective agents for relieving the osteoporosis in menopausal women.

Key Words: *Morindae Radix*, *Cistanchis Herba*, OVX, Menopause, Osteoporosis

I. 서 론

골다공증은 불균형한 뼈 형성에 의해 뼈의 양이 줄어들어 결국 골절로 이어질 수 있는 대사 장애이다¹⁾. 미국에서는 골다공증의 유병률이 앞으로 수십 년 동안 빠르게 증가 할 것으로 예상되며, 국내에서도 증가하는 추세이다^{1,2)}.

골다공증을 유발하는 두 가지 주요 위험 요소는 뼈 질량 부족과 노령화 및 폐경으로 인한 빠른 뼈 손실이다^{3,4)}. 골다공증은 또한 폐경의 만성 질환으로 정의 되는데, 여성들은 나이가 들수록 여성 호르몬이 감소되어 골다공증의 위험에 점점 노출되기 때문이다⁵⁾. 골다공증은 X선 검사로 진단되고 T 점수가 2.5 미만인 경우 진단한다⁶⁾. 현대 의학에서는 비스포스포네이트, 선택적 여성 호르몬 수용체 조절제, 여성 호르몬, tibolone, 칼시토닌, denosumab, 부갑상선 호르몬 등을 사용하여 조절하고 있는데, 골다공증의 첫 번째 치료제로 자주 사용되는 비스포스포네이트의 경우 턱괴사나 비정형 대퇴부 골절과 같은 부작용의 위험을 고려해야 하며, 또한 선택적 여성 호르몬 수용체 조절제는 발적과 같은 다른 갱년기 증상을 악화시킬 수 있고 여성 호르몬 요법은 유방암의 위험을 증가시키는 것과 같은 한계가 있는 실정이다⁷⁻⁹⁾.

골다공증의 유병률이 점차 높아지면서 한의학에서도 다양한 의약품 및 임상 응용에 대한 연구가 증가하고 있다¹⁰⁾. 한의학에서는 신장이 뼈와 밀접한 관계가 있기 때문에 영양상태가 좋지 않고 뼈의 힘이 감소된 증상을 보이는 腎氣虛의 변증이 골다공증에 가까운 것으로 보고 있

다^{11,12)}. 따라서 腎臟의 陰陽을 補하여 強骨하여 골다공증의 증상 완화 및 치료를 유도 할 수 있을 것으로 여겨진다¹³⁾.

과극천(*Morindae Radix*, MR)은 한약재 중 하나인 *Morinda officinalis*의 건조한 뿌리 부분으로 腎陽을 보충하는 효과가 있어 류머티즘, 야뇨증, 불임 등의 많은 질병을 치료하는데 2,000년 이상 널리 사용되고 있다^{14,15)}. 그리고 *Cistanche deserticola* Y. C. Ma(Orobanchaceae)의 전체 건조 식물인 육종용(*Cistanchis Herba*, CH)은 발기 부전, 불임, 조루와 같은 증상으로 腎虛을 치료하는 데 주로 사용되는 補陽劑이다¹⁶⁾. 이 두 가지 약재는 오래전부터 자주 병용되어 사용되었으나¹⁷⁾, 병용했을 때의 효과나 조성비에 대한 연구는 지금까지 진행되지 않았다. 그래서 난소 절제술을 한 쥐에서 이 두 가지 허브의 최적 조성비를 조사하였고, 그 결과를 얻었기에 보고 하는 바이다.

II. 실험

1. 동물 및 사육방법

160마리의 암컷 SPF/VAF outbred CrljOri:CD1[ICR] mice(7-week old; OrientBio:Seungnam, Korea)을 7일간의 순화과정을 거쳐 사용하였다. 사육장은 습도 45-55%, 온도 20-25℃로 조절하였고, 명암주기는 12시간씩으로 하였다. 사료(standard rodent chow Cat. No 38057 Purinafeed, Seungnam, Korea)와 음수는 자유롭게 공급하였다.

이 연구는 대구한의대학교 동물실험윤리위원회(Gyeongsan, Gyeongbuk, Korea Approval No DHU 2017-033, April 11, 2017)의 승인을 받아 진행하였다. 양측난

소절제수술(bilateral ovariectomy, OVX) 후 34일에 모든 실험체의 체중을 측정하여 그 편차를 참고하여 실험군을 배정하

였다(Table 1, Fig. 1). 마우스들은 OVX, 첫 경구투여 및 조직적출 전 18시간 동안 절식하였고, 음수는 자유롭게 허용하였다.

Table 1. Experimental Design Used in This Study

Group	Surgery	Dose (mg/kg/day)
Control	Sham	Distilled water 10 ml/kg; once a day for 35 days
Control	OVX	Distilled water 10 ml/kg; once a day for 35 days
Reference	OVX	RES (2.5 mg/kg); once a day for 35 days
Single formula		
Active	OVX	MR (200 mg/kg); once a day for 35 days
Active	OVX	CH (200 mg/kg); once a day for 35 days
Mixed formula - MR:CH		
Active	OVX	MR:CH 1:1 (100:100 mg/kg); once a day for 35 days
Active	OVX	MR:CH 1:3 (50:150 mg/kg); once a day for 35 days
Active	OVX	MR:CH 1:5 (33:167 mg/kg); once a day for 35 days
Active	OVX	MR:CH 1:7 (25:175 mg/kg); once a day for 35 days
Active	OVX	MR:CH 1:9 (20:180 mg/kg); once a day for 35 days
Active	OVX	MR:CH 3:1 (150:50 mg/kg); once a day for 35 days
Active	OVX	MR:CH 5:1 (167:33 mg/kg); once a day for 35 days
Active	OVX	MR:CH 7:1 (175:25 mg/kg); once a day for 35 days
Active	OVX	MR:CH 9:1 (180:20 mg/kg); once a day for 35 days

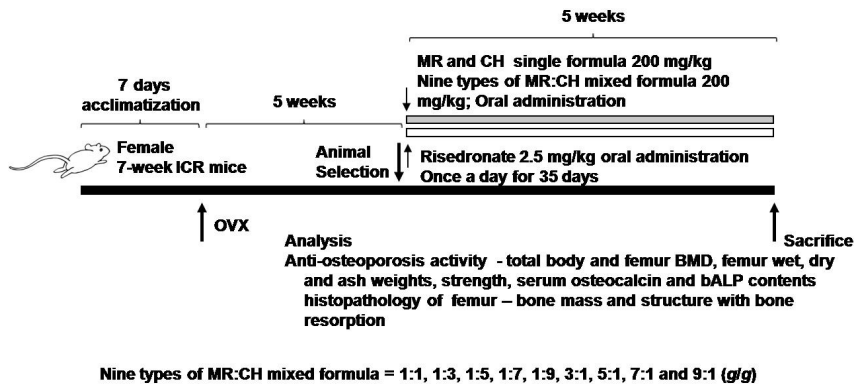


Fig. 1. Experimental design used in this study.

2. 시험 물질의 준비 및 투여

Rotary vacuum evaporator(N-1110, Eyela, Tokyo, Japan)와 programmable freeze-dryer (FDB-5503, Operon, Kimpo, Korea)를 이용하여 감압, 농축 및 동결건조 시키는 표준화된 방법으로 파극천(Root of *Morinda*

officinalis How(Rubiaceae), MR)과 육종용(whole plant of *Cistanche deserticola* Y. C. Ma(Orobanchaceae), CH)의 동결건조 분말이 준비되었다. 약제는 지역의 판매상(Jecheon-hanbangyakcho, Jecheon, Korea)을 통하여 구입하였으며 현미경하에서 관능

검사를 통하여 선별 후 사용하였다. 각 약재 100 g을 증류수 10 L에 60°C에서 4시간 동안 3번 가열 추출한 후 완전히 동결 건조시켰다. 총 19.50 g(수율=19.50%)의 동결건조 MR과 21.30 g의 CH(수율=21.30%)를 얻었으며 실험에 사용하기 전까지 -20°C에 냉동 보관하였다. RES는 TEVA Tapi (Sheva, Israel)에서 얻었으며 변성을 막기 위해 어둡게 보관하고 4°C에서 냉장 보관했다. MR과 CH 혼합물은 총 20 mg/ml 농도 - 10:10, 5:15, 3.3:16.7, 2.5:17.5, 2:18, 15:5, 16.7:3.3, 17.5:2.5, 18:2, 20:10의 비로 MR과 CH를 증류수에 용해시켜 표 2에 나타낸 바와 같이 제조했다(Table 2). 이는 10 ml/kg의 부피로 합계 200 mg/kg의

당량으로 OVX수술 5주후부터 35일간 하루 1회 투여 하였다.

RES 대조군은 0.25 mg/ml의 농도에서 10 mg/kg(2.5 mg/kg의 당량)의 농도의 RES 증류수 용액을 OVX 수술 후 5주부터 하루 1회씩 35일간 경구 투여하였다. 대조군에서는 동일한 양에 해당하는 증류수를 동일기간 같은 방법으로 경구 투여하여 스트레스 경험차이를 최소화했다.

MR:CH, 200 mg/kg의 총 투여량은 인간의 한계 용량을 고려하여 가장 적합한 혼합식을 선택하기 위한 이전의 효능 실험을 기준으로 선택되었고¹⁸⁾ RES 용량은 이전에 있었던 골다공증에 대한 생체내 효능 연구를 참고하였다^{19,20)}.

Table 2. Actual Compositions of Test Substances Used in This Study

Groups	Compositions (mg)			Vehicle (10 ml)
	RES	MR	CH	
Controls				
Sham	0	0	0	Distilled water
OVX	0	0	0	Distilled water
Reference				
RES	2.5	0	0	Distilled water
Single formula				
MR	0	200	0	Distilled water
CH	0	0	200	Distilled water
Mixed formula - MR:CH				
1:1	0	100	100	Distilled water
1:3	0	50	150	Distilled water
1:5	0	33	167	Distilled water
1:7	0	25	175	Distilled water
1:9	0	20	180	Distilled water
3:1	0	150	50	Distilled water
5:1	0	167	33	Distilled water
7:1	0	175	25	Distilled water
9:1	0	180	20	Distilled water

3. 양측난소절제

표준설치류흡입마취장치(Surgivet, Waukesha, WI, USA)를 이용하여 28.5% O₂, 70%

N₂O 및 2-3% isoflurane(Hana Pharm. Co., Hwasung Korea)의 혼합물을 rodent ventilator(Model 687, Harvard Apparatus,

Cambridge, UK)를 사용하여 마우스를 마취시켰다. 수술 과정은 정해진 방법을 따랐다^{18,21,22}. OVX 처치군은 백색선을 따라 개봉하고 1-0 silk(Camel, Daeho Ind. Gwangju, Korea)로 연결하였다. 봉합에는 용해 가능한 3-0 catgut 봉합사(4/0; F1154044, B. Braun Melsungen AG, Hessen, Germany)를 사용하였다. 대조군도 백색선 절개를 하고 봉합하였으나 OVX는 시행하지 않았다. 상처관리에는 Aluspray™ (Vétoquinol, Cedex, France)와 Povidone Iodine(Betadine™, Korea Pharma, Hwasung, Korea)을 사용하였다.

4. 체중의 측정

체중변화의 측정은 OVX 수술 1일전, 수술일, 약물 투여 1일전, 투여 1, 7, 14, 21, 28, 34일의 투여 후, 그리고 희생직전에 시행하였다. 측정은 automatic electronic scale(XB 320M, Precisea Instrument, Dietikon, Switzerland)을 사용하였다. 모든 마우스는 OVX 수술개시와 희생시에 음식섭취로 인한 체중변화를 최소화하기 위해 금식시켰다. 체중의 증가량은 아래 수식에 따라 계산하였다.

Equation [1]. Body Weight Gains(g)

OVX recovery/induced periods(35 days)
= Body weight at initial test substance treatment-body weight at the day of OVX surgery

After administration(35 days) = Body weight at sacrifice-body weight at initial test substance treatment

5. 골밀도 측정

전신과 오른쪽 대퇴골의 평균 골밀도(Bone mineral density, BMD)를 마우스의

마지막 35번째 처치가 끝나고 24시간 후 1회 live dual-energy x-ray absorptionmetry (DXA; InAlyzer, Medikors, Seungnam, Korea)을 이용하여 검출하였다.

6. 골 중량 측정

OVX 수술 후 35일간의 처치기간이 끝난 뒤 결합 조직, 근육 및 과편을 쥐의 오른쪽 대퇴골에서 절제하고 뼈 조직을 절대 습윤 중량 수준에서 측정하였다. 건조중량은 뼈를 200℃의 고온의 오븐(LD0-080, Daihan Labtech Co, Seoul, Korea)에서 8시간 동안 건조시키고, 이를 800℃에서 6시간 동안 탄화시켰다(LEF-1055-1, Daehan Labtech Co, Seoul, Korea). 이 과정을 통한 잔량은 절대 회분 중량에 해당되며, 개체별 체중차이를 줄이기 위해 희생 시 체중과 절대 습식, 건조, 회분 중량에 대한 % 상대 중량을 다음 공식[2]을 이용하여 산출하였다.

Equation [2]. Relative Bone Weights (% of body weight) = [(Absolute bone weight/Body weight at sacrifice)×100]

7. 골 강도 측정

골 강도는 컴퓨터시험장비(SV-H1000, Japan Instrumentation System co., Japan)를 사용하여 3점 굽힘 시험을 통해 우측 대퇴 중간축의 실패하중 뉴턴(N)값을 이용하여 산출하였다.

8. 채혈 및 혈청분리

실험체의 희생 시, 대정맥으로부터 혈액 1 ml를 채취하였고, 응고된 활성화혈청튜브(Becton Dickinson, Franklin lkes, NJ, USA)를 사용하여 4℃ 미만의 온도에서 15,000 rpm으로 10 분간 원심 분리

하고, 분석 전까지 -150°C 의 초저온냉장고(MDF-1156, Sanyo, Tokyo, Japan)를 사용하여 동결시켰다.

9. 혈청 생화학

Osteocalcin mouse ELISA Kit(Cat. No., MBS495064, MyBioSource, San Diego, CA, USA)를 ng/ml 수준으로 사용하여 혈청 오스테오칼신 수치를 측정하였고 Mouse bALP ELISA Kit(Cat. No. MBS2501503, MyBioSource, San Diego, CA, USA)를 ELISA Reader(Sunrise, Tecan, Männedorf, Switzerland)를 사용하여 U/L 수준으로 분석하였다.

10. 대퇴골 무기질 함량 측정

오른쪽 대퇴골의 회분 골 중량을 측정 한 후, 분말로 갈아서 질산에 용해시켰다. 희석된 용액에서 orthocresolphthalein complexon 과 효소법을 사용하여 Ca와 IP 함량을 mg/g으로 계산 하였다^{21,22}. 또한, Ca/IP 비율은 아래 수식 [3]과 같이 계산하였다.

$$\text{Equation [3]. Bone Ca/IP Ratio (\%)} = \left[\frac{\text{Bone Ca contents}}{\text{Bone IP contents}} \times 100 \right]$$

11. 통계 처리

표준 컴퓨터 패키지(SPSS V14K, SPSS Inc. USA)를 이용하여 통계 분석을 수행하였고, 모든 값의 표준 편차(SD)를 평균으로 나타내었다²³. 서로 다른 용량을 투여한 그룹에 대해 여러 비교 분석을 수행했다. Levene 테스트를 사용하여 분산을 검사하고 차이가 발견되지 않으면 one-way ANOVA를 사용하여 다중 비교 테스트를 수행하였다²⁴. Kruskal-Wallis H 테스트를 Mann-Whitney U(MW)테스트와 함께 사용하여 쌍을 이룬 샘플 그룹

간의 차이점을 확인했다. 처치한 약물이 마우스의 뼈에 영향을 주었는지 여부를 판단하기 위해 위 수술군과 OVX 처치군의 표본 사이에 발견 된 차이를 다음수식 [4, 5]과 같이 백분율로 계산하였다^{25,26}.

$$\text{Equation [4]. Percentage Changes as Compared with Sham Control (\%)} = \left[\frac{(\text{Data of OVX control mice} - \text{Data of sham control mice})}{\text{Data of sham control mice}} \times 100 \right]$$

$$\text{Equation [5]. Percentage Changes as Compared with OVX Control (\%)} = \left[\frac{(\text{Data of test material treated mice} - \text{Data of OVX control})}{\text{Data of OVX control}} \times 100 \right]$$

III. 결 과

1. 체중과 체중증가량에 대한 효과

각 실험군은 위수술군과 비교하여 체중이 유의하게 ($p < 0.01$) 증가하였고, OVX 처치 후 34일에 일반적인 난소적출 동물의 상태를 보였다(OVX처치군 : 37.88 ± 1.03 g, 범위 35.4-40.2 g; 위수술군 : 30.64 ± 1.42 g, 범위 28.4-32.7 g). 결과적으로, OVX처치군에서는 위수술군에 비해 체중이 유의하게 ($p < 0.01$) 증가했다. 그러나 MR 및 CH 단일투여군과 1:5, 3:1, 7:1 혼합물 투여군의 경우 투여 28일부터, 1:7, 1:9, 5:1 및 9:1 혼합물 투여군의 경우 투여 34일부터, 그리고 1:1, 1:3 혼합물 투여군의 경우는 투여 14일부터 OVX대조군과 비교하여 체중증가량의 감소가 관찰되었다. 또한, MR 및 CH 단일 및 복합물 투여군은 모두 OVX대조군과 비교하여 체중증가량의 유의한 ($p < 0.01$) 감소를 보였다. 특히 MR:CH 1:3 및 1:1 복합물 투여군의 경우 투여 34일에는 단일조성물 투여군이나 타비올의 복합물 투여군에

비해 유의한($p < 0.05$ or $p < 0.01$) 체중 감소를 보였다. 이 연구에서 OVX대조군에 비해 RES 처치군의 경우는 체중이나 체중 증가에 큰 변화가 없는 것으로 관찰되었다(Table 3, Fig. 2).

2. 대퇴골 중량에 대한 효과

위수술군과 비교하여 OVX대조군의 상대 습윤 중량과 절대 및 상대 건조 중량, 대퇴부 조직의 회분중량이 유의하게($p < 0.01$) 감소되었다. 대퇴골 조직 건조 중량 및 회분 중량이 OVX대조군($p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$)

에 비해 RES처치군을 포함한 모든 약물 처리군에서 유의하게 증가했다. 특히, MR:CH 1:3 및 1:1 혼합물 투여군은 대퇴골 조직의 절대 및 상대적 건조 중량 및 회분 중량이 단일 복용군에 비해 유의하게 증가하였다($p < 0.05$ or $p < 0.01$). 모든 OVX군에서 위수술군에 비해 절대 대퇴부 습윤 중량에 유의한 변화는 없었으며 RES 처치군 및 모든 MR 및 CH 단일 또는 혼합물 투여군에서는 OVX대조군과 비교하여 절대 및 상대 대퇴 습윤 중량의 유의한 변화가 나타나지 않았다(Table 4, 5).

Table 3. Body Weight Gains in Sham or OVX Operated Mice

Groups	Periods	Body weights (g)			Body weight gains (g)	
		At OVX [A]*	At initial treatment [B]*	At sacrifice [C]*	OVX recovery [B-A]	Treatment [C-B]
Control						
	Sham	25.80±0.95	27.34±1.64	28.76±1.58	1.54±0.98	1.43±0.59
	OVX	25.76±1.18	34.84±1.28 ^{††}	40.20±2.07 ^{††}	9.08±0.80 ^{**}	5.36±0.98 [*]
Reference						
	RES	25.83±0.85	34.98±0.76 ^{**}	39.74±1.68 ^{††}	9.15±0.62 ^{**}	4.76±1.28 [*]
Single formula 200 mg/kg						
	MR	25.80±0.97	34.88±1.28 ^{**}	37.96±0.95 ^{††§§}	9.08±0.57 ^{**}	3.09±1.14 [‡]
	CH	25.54±0.55	34.63±0.67 ^{††}	37.86±0.87 ^{††§§}	9.09±0.58 ^{**}	3.24±0.72 [‡]
Mixed formula - MR:CH 200 mg/kg						
	1:1	25.68±0.87	34.86±1.15 ^{**}	36.59±1.05 ^{†††† ¶¶}	9.19±0.44 ^{**}	1.73±0.70 ^{* ¶}
	1:3	25.85±0.99	34.96±1.11 ^{**}	36.41±0.84 ^{†††† ¶¶}	9.11±0.62 ^{**}	1.45±0.95 ^{‡§¶}
	1:5	25.74±1.12	34.86±1.14 ^{**}	37.93±1.29 ^{††§§}	9.13±0.21 ^{**}	3.06±0.65 [‡]
	1:7	25.64±1.22	34.86±1.60 ^{**}	37.70±1.64 ^{††§§}	9.23±0.47 ^{**}	2.84±0.81 [‡]
	1:9	25.63±0.89	34.88±0.92 ^{††}	37.58±1.39 ^{††§§}	9.25±0.26 ^{**}	2.70±0.69 [‡]
	3:1	25.61±1.03	34.66±0.93 ^{††}	37.56±1.51 ^{††§§}	9.05±0.27 ^{**}	2.90±1.02 [‡]
	5:1	25.64±1.03	34.74±0.95 ^{**}	37.94±1.10 ^{††§§}	9.10±0.24 ^{**}	3.20±0.42 ^{††}
	7:1	25.70±0.91	34.86±1.15 ^{**}	37.46±2.19 ^{††§§}	9.16±0.25 ^{**}	2.60±1.23 [‡]
	9:1	25.68±0.84	34.68±1.02 ^{**}	37.54±1.15 ^{††§§}	9.00±0.43 ^{**}	2.86±0.63 [‡]

Values are expressed mean±S.D. of eight mice.

* $p < 0.01$ and [†] $p < 0.05$ as compared with sham control by LSD test

[‡] $p < 0.01$ as compared with OVX control by LSD test

[§] $p < 0.01$ and ^{||} $p < 0.05$ as compared with MR single formula by LSD test

[¶] $p < 0.01$ as compared with CH single formula by LSD test

^{**} $p < 0.01$ and ^{††} $p < 0.05$ as compared with sham control by MW test

^{†††} $p < 0.01$ and ^{§§} $p < 0.05$ as compared with OVX control by MW test

^{|||} $p < 0.05$ as compared with MR single formula by LSD test

^{¶¶} $p < 0.05$ as compared with CH single formula by LSD test

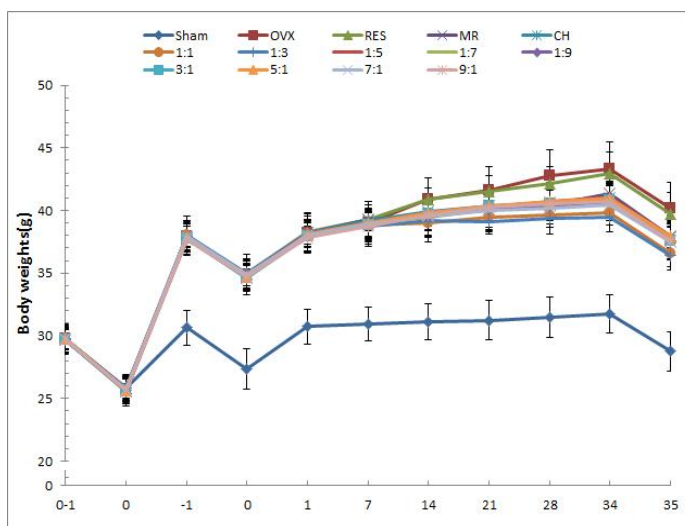


Fig. 2. Body weights observed in sham or OVX operated mice. Values are expressed as Mean±S.D. of eight mice. O-1 means 1 day before OVX surgery. O means the day of OVX operation. -1 means 1 day before start of administration at 34 days after OVX surgery. 0 means at start of administration, at 35 days after OVX. 35 means 35 days after start of administration, at sacrifice. All mice were deprived of food before the procedures, surgery and sacrifice.

Table 4. Right Femur Absolute Weights in Sham or OVX Operated Mice

Groups	Items (unit)	Absolute weights (g)		
		Wet	Dry	Ash
Controls				
	Sham	0.093±0.008	0.065±0.009	0.049±0.006
	OVX	0.093±0.008	0.044±0.006*	0.024±0.006*
Reference				
	RES 2.5 mg/kg	0.096±0.005	0.067±0.006†	0.050±0.005†
Single formula 200 mg/kg				
	MR	0.091±0.006	0.052±0.005*§	0.034±0.004**
	CH	0.091±0.006	0.052±0.005*§	0.032±0.003**
Mixed formula - MR:CH 200 mg/kg				
	1:1	0.090±0.007	0.060±0.005*†‡	0.043±0.006*†**
	1:3	0.089±0.003	0.061±0.003*†**	0.047±0.005*†**
	1:5	0.090±0.005	0.051±0.007*§	0.032±0.004**
	1:7	0.093±0.005	0.054±0.008**	0.035±0.004**
	1:9	0.093±0.005	0.052±0.006**	0.034±0.005**
	3:1	0.092±0.007	0.051±0.007*§	0.033±0.005**
	5:1	0.093±0.004	0.052±0.006**	0.035±0.005**
	7:1	0.090±0.007	0.053±0.006**	0.034±0.006**
	9:1	0.093±0.006	0.052±0.006**	0.034±0.007**

Values are expressed mean±S.D. of eight mice.
 *p<0.01 and †p<0.05 as compared with sham control by LSD test
 ‡p<0.01 and §p<0.05 as compared with OVX control by LSD test
 ¶p<0.01 and †p<0.05 as compared with MR single formula by LSD test
 **p<0.01 and ††p<0.05 as compared with CH single formula by LSD test

Table 5. Right Femur Relative Weights in Sham or OVX Operated Mice

Groups	Items (unit)	Relative weights (% of body weight)		
		Wet	Dry	Ash
Controls				
	Sham	0.324±0.041	0.227±0.040	0.171±0.024
	OVX	0.231±0.023	0.108±0.015	0.060±0.014 [*]
Reference				
	RES 2.5 mg/kg	0.242±0.015	0.168±0.015 [¶]	0.125±0.013 ^{**}
Single formula 200 mg/kg				
	MR	0.239±0.014	0.136±0.013 [¶]	0.088±0.011 ^{**}
	CH	0.241±0.014	0.136±0.012 [¶]	0.083±0.008 ^{**}
Mixed formula - MR:CH 200 mg/kg				
	1:1	0.245±0.018	0.163±0.011 ^{¶***§}	0.117±0.015 ^{**†§}
	1:3	0.243±0.009	0.169±0.010 ^{¶***§}	0.129±0.014 ^{**†§}
	1:5	0.239±0.018	0.134±0.021 ^{**}	0.086±0.012 ^{**}
	1:7	0.247±0.012	0.142±0.019 [¶]	0.092±0.013 ^{**}
	1:9	0.247±0.013	0.138±0.015 [¶]	0.090±0.011 ^{**}
	3:1	0.246±0.020	0.136±0.019 ^{**}	0.088±0.015 ^{**}
	5:1	0.245±0.015	0.138±0.017 [¶]	0.093±0.016 ^{**}
	7:1	0.241±0.016	0.141±0.017 [¶]	0.090±0.016 ^{**}
	9:1	0.249±0.023	0.139±0.018 [¶]	0.090±0.021 ^{**}

Values are expressed mean±S.D. of eight mice.
^{*}p<0.01 as compared with sham control by LSD test
[†]p<0.01 as compared with OVX control by LSD test
[‡]p<0.01 as compared with MR single formula by LSD test
[§]p<0.01 as compared with CH single formula by LSD test
^{||}p<0.01 as compared with sham control by MW test
[¶]p<0.01 and ^{**}p<0.05 as compared with OVX control by MW test
^{**}p<0.01 as compared with MR single formula by LSD test
^{††}p<0.01 as compared with CH single formula by LSD test

3. 혈청 조직학에서의 효과

OVX대조군에서 위수술군과 비교하여 혈청 오스테오칼신 농도의 유의한(p<0.01) 증가 및 혈청 bALP 활성의 유의한(p<0.01) 감소를 보였으며, OVX대조군과 비교하여 혈청 bALP 활성의 증가와 혈청 오스테오칼신 농도의 감소가 모든 MR 및 CH 단일 및 복합물 투여군에서 관찰되었다. 특히, MR:CH 1:3 및 1:1 혼합물 투여

군은 단일조성물 투여군이나 타비올의 복합물 투여군에 비해서도 혈청 오스테오칼신 농도의 유의한(p<0.05 or p<0.01) 감소 및 혈청 bALP 활성의 증가를 보였다. 본 연구에서는 RES처치군 또한 OVX대조군에 비하여 혈청 오스테오칼신 수치의 유의한(p<0.01) 감소를 보였으나, 혈청 bALP수치에서는 OVX대조군에 비하여 큰 차이가 없었다(Fig. 3, 4).

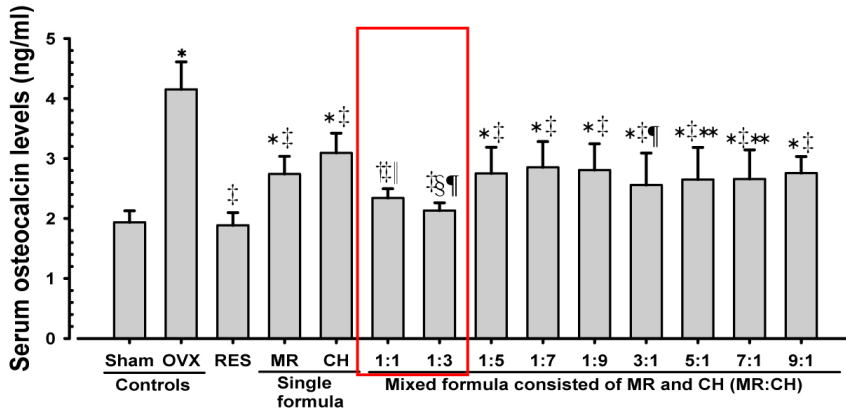


Fig. 3. Changes on the serum osteocalcin levels in sham or OVX operated mice. Values are expressed mean±S.D. of eight mice.

*p<0.01 and †p<0.05 as compared with sham control by LSD test

‡p<0.01 as compared with OVX control by LSD test

§p<0.01 and †p<0.05 as compared with MR single formula by LSD test

*p<0.01 and **p<0.05 as compared with CH single formula by LSD test

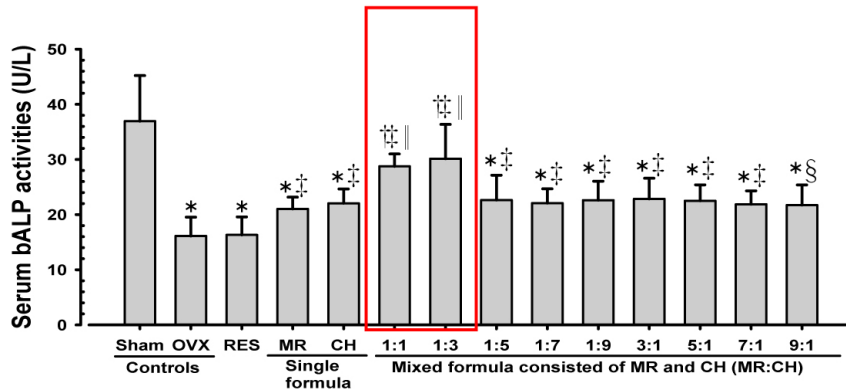


Fig. 4. Changes on the serum bALP levels in sham or OVX operated mice. Values are expressed mean±S.D. of eight mice.

*p<0.01 and †p<0.05 as compared with sham control by MW test

‡p<0.01 and §p<0.05 as compared with OVX control by MW test

†p<0.01 as compared with MR single formula by MW test

*p<0.01 as compared with CH single formula by MW test

4. 대퇴골밀도에서의 효과

OVX대조군의 전체 및 우측 대퇴골 평균 BMD는 위수술군에 비해 유의하게(p<0.01) 감소했다. 그러나 MR 단일 제형을 포함한 모든 약물 투여군에서 OVX대조군과 비교하여 전체 및 대퇴골 평균 BMD의 유의한(p<0.05 or p<0.01) 증가가 검출되었다. 특

히, MR:CH 1:3, 1:1 혼합물 투여군은 또한 각 단일물 또는 타비올 복합물투여군과 비교해서도 유의한 전체 및 우측 대퇴골 골밀도의 증가를 보였다(Table 6).

5. 골강도에 대한 효과

OVX대조군의 우측 건조 대퇴골 중간

측 영역의 강도는 위수술군과 비교하여 유의하게 ($p<0.01$) 감소했지만, OVX대조군과 비교하여 대퇴골 골강도의 유의한 ($p<0.01$) 증가가 모든 약물투여군에서 나타났다. 특히, MR:CH 1:3 및 1:1 복합

물 투여군의 경우 단일물 투여군이나 타비올 복합물 투여군에 비해서도 유의한 ($p<0.01$) 대퇴골 중간축 강도의 증가를 보여주었다(Table 6).

Table 6. Total Body and Right Femur BMD, Right Femur Strength in Sham or OVX Operated Mice

Items (unit)	BMD (mg/cm ²)		Strength (Newton)
	Total body	Femur	Femur
Controls			
Sham	0.0244±0.0007	0.0271±0.0015	12.77±1.49
OVX	0.0213±0.0004 [¶]	0.0227±0.0006 [¶]	5.78±1.33 [*]
Reference			
RES 2.5 mg/kg	0.0242±0.0011 ^{**}	0.0264±0.0018 ^{**}	11.59±1.44 ^{†*}
Single formula 200 mg/kg			
MR	0.0223±0.0004 ^{¶**}	0.0239±0.0004 ^{¶**}	8.23±0.56 ^{**}
CH	0.0219±0.0002 ^{¶**}	0.0237±0.0003 ^{¶**}	7.75±0.94 ^{**}
Mixed formula - MR:CH 200 mg/kg			
1:1	0.0230±0.0005 ^{¶**††§§}	0.0248±0.0006 ^{¶**††§§}	10.00±0.77 ^{¶*§§}
1:3	0.0236±0.0009 ^{¶**††§§}	0.0260±0.0008 ^{¶**††§§}	11.27±1.09 ^{¶*§§}
1:5	0.0221±0.0005 ^{¶**}	0.0241±0.0007 ^{¶**}	8.34±1.00 ^{**}
1:7	0.0221±0.0004 ^{¶**}	0.0240±0.0006 ^{¶**}	8.30±1.04 ^{**}
1:9	0.0222±0.0006 ^{¶**}	0.0239±0.0007 ^{¶**}	8.03±1.13 ^{**}
3:1	0.0222±0.0007 ^{¶††}	0.0239±0.0006 ^{¶**}	8.44±1.27 ^{**}
5:1	0.0222±0.0004 ^{¶**}	0.0238±0.0005 ^{¶**}	8.21±0.76 ^{**}
7:1	0.0222±0.0002 ^{¶**}	0.0237±0.0004 ^{¶**}	8.26±0.97 ^{**}
9:1	0.0221±0.0007 ^{¶††}	0.0237±0.0003 ^{¶**}	8.17±0.92 ^{**}

Values are expressed mean±S.D. of eight mice.

* $p<0.01$ and [†] $p<0.05$ as compared with sham control by LSD test

[†] $p<0.01$ as compared with OVX control by LSD test

[§] $p<0.01$ as compared with MR single formula by LSD test

[¶] $p<0.01$ as compared with CH single formula by LSD test

[¶] $p<0.01$ as compared with sham control by MW test

^{**} $p<0.01$ and ^{††} $p<0.05$ as compared with OVX control by MW test

^{††} $p<0.01$ as compared with MR single formula by LSD test

^{§§} $p<0.01$ and ^{||} $p<0.05$ as compared with CH single formula by LSD test

6. 대퇴 무기질 함유량에 대한 효과 - 칼슘(Ca)과 인(IP)

OVX대조군에서 위수술군에 대해 대퇴골 Ca 및 IP 함유량의 감소가 유의하게($p<0.01$) 나타났다. 그러나, 모든 약물투여군에서는 OVX대조군과 비교하여 대퇴골 Ca 및

IP 함유량의 유의한($p<0.05$ or $p<0.01$) 증가가 관찰되었다. 특히, MR:CH 1:3 및 1:1 복합물 투여군의 경우는 단일 또는 타비올 복합물 투여군에 비해서도 유의한($p<0.05$ or $p<0.01$) 대퇴골의 Ca 및 IP 함유량의 증가를 보였다. OVX대조군에

서는 위수술군과 비교하여 Ca/IP 비율의 여군에서도 관찰되지 않았다(Table 7). 변화는 보이지 않았고 다른 모든 약물투

Table 7. Right Femur Mineral Contents (Ca and IP) in Sham or OVX Operated Mice

Groups	Items (unit)	Mineral contents (mg/g bone)		Ratio
		Ca [A]	IP [B]	Ca/IP [A/B]
Controls				
	Sham	61.81±10.20	51.52±9.45	1.20±0.04
	OVX	33.15±3.98*	27.78±3.62*	1.20±0.04
Reference				
	RES 2.5 mg/kg	57.49±12.09*	48.31±11.75*	1.20±0.07
Single formula 200 mg/kg				
	MR	39.46±3.30*§	33.12±3.29*§	1.19±0.06
	CH	38.71±3.18*§	32.16±1.90*§	1.20±0.07
Mixed formula - MR:CH 200 mg/kg				
	1:1	47.12±4.90*†‡***	39.53±4.33*†‡***	1.20±0.10
	1:3	51.56±5.01*†‡***	42.94±5.56*†‡***	1.21±0.05
	1:5	40.37±2.84**	33.52±3.30**	1.21±0.06
	1:7	38.97±3.52*†	32.87±3.75*§	1.19±0.04
	1:9	40.27±5.00*†	33.88±4.45*§	1.19±0.03
	3:1	39.98±4.30*§	33.48±3.75*§	1.20±0.03
	5:1	40.52±6.91*§	34.06±5.20*§	1.19±0.05
	7:1	38.78±3.18*§	32.62±2.83*§	1.19±0.04
	9:1	38.26±2.41*§	32.00±1.80*§	1.20±0.03

Values are expressed mean±S.D. of eight mice.

*p<0.01 and †p<0.05 as compared with sham control by MW test

‡p<0.01 and §p<0.05 as compared with OVX control by MW test

‡p<0.01 and †p<0.05 as compared with MR single formula by MW test

**p<0.01 as compared with CH single formula by MW test

IV. 고 찰

골다공증과 같은 골 질환의 예방 및 치료에서 골재형성은 골건강과 골절 예방에 중요한 역할을 한다²⁷⁾. 골 질환을 예방하거나 치료할 수 있는 의약 보조제를 개발하기 위한 시도는 오랫동안 있어왔다²⁸⁾. 다양한 항 흡수제가 광범위하게 사용되어 왔지만, 그보다 더 우수한 안전성 및 효능을 갖는 효과적인 재흡수 억제제가 여전히 필요한 실정이다. 골 형성을 자극 할 수

있는 약물 중 단백 동화 작용제에 대해선 아직 항 흡수제에 비해 깊게 알려진 바가 없다²⁹⁾. 현재 골아 세포 분화와 골 형성에 대한 지식에 기초하여, 단백 동화 인자의 개발이 계속 시도되고 있다²²⁾.

파극천(MR)과 육종용(CH)은 전통 한방 치료제이며 月經不順, 요술산연과 같은 신양허 치료에 사용되어 왔으며¹⁴⁾, 최근에 파극천과 육종용의 항골다공증 효과에 대한 잠재력은 다른 연구자들에 의해 충분히 입증되었다³⁰⁻²⁾. 그리고 여러 연구에서 천연 제품의 다양한 약리학적 효과가 적절

한 혼합 배합에 의해 상승적으로 증가한다는 사실이 보고되었다^{18,33}. 특히 천연 약제간의 적절한 혼합은 생리 활성 성분의 다양성을 증가시키고 이러한 반응을 통해 뼈 보존 효과가 강화되는 것으로 생각되고 있다^{34,35}. 그래서 MR과 CH로 구성된 적절한 혼합물이 생리 활성 성분의 다양성을 증가시키는 것과 같이 유리한 시너지 효과를 통해 항골다공증 효과를 강화시킬 것이라고 생각하였고, 실험을 시도하였다. 이 실험은 인간 골다공증과 유사한 상태를 보이는 난소적출술을 시행한 암컷 쥐^{18,22}를 사용하여 각 단일 제제의 항골다공증 효과에 대해 시너지 효과를 명확하게 보여주는 MR:CH 조성비를 찾고자한 것이다.

OVX 수술 후 35일 째에 9가지 유형 혼합 조성물 200 mg/kg(MR:CH=1:1, 1:3, 1:5, 1:7, 1:9, 3:1, 5:1, 7:1 및 9:1)과 각 단일 약물을 35일 동안 매일 각 실험군에 경구 투여 한 후 실험 기간 동안 체중과 증감량, 대퇴부 중량, 골밀도, 골 강도(골 절하중), 미네랄 함량(Ca 및 IP), 혈청검사(오스테오칼신 함량 및 bALP 활성도)를 측정하였다. 본 연구에서는 시험 물질의 결과를 골의 수산화인회석에 결합하여 파골 세포 매개성 골 흡수 과정을 억제하는 경구투여 비스포스포네이트의 일종인 RES와 비교 하였다. MR:CH 혼합물의 투여량은 인간의 제한 용량을 고려하여 가장 적합한 조성비를 선택하기 위해 이전의 효능 시험을 기준으로 선택되었다¹⁸. 그리고 단일 실험에서 각 단일 MR 및 CH 제제의 투여량을 MR:CH 혼합제제에 동일한 용량으로 조정하여 효능의 직접 비교를 하였으며, RES의 투여량 또한 생체 내 항골다공증 효능 연구에 근거하여 선택되

었다^{19,20}.

체중의 변화는 OVX 처치한 설치류에서 골밀도 변화의 예측인자로 사용된다³⁶. 생쥐의 체중에 대한 OVX 효과에 관한 기존 데이터는 일관되지 않다. 한 연구에서 OVX가 체중 증가를 유발하는 것으로 나타났지만³⁷, 그렇지 않은 보고도 있다³⁸. 일반적으로 체중의 감소나 체중증가량의 감소는 정상 상태에서는 독성학적 징후로 간주되었지만 비만과 같은 특정 질병 상태에서는 유리한 징후로 간주되어왔다^{18,22}. 본 실험에서는, 위수술군과 비교하여 모든 OVX 처치군에서 체중 및 체중증가량이 유의하게 증가하였고, 이는 폐경 후에스트로겐 결핍의 일반적인 증후이다. 그러나 MR 및 CH 단일투여군과 1:5, 3:1, 7:1 혼합물 투여군의 경우 투여 28일부터, 1:7, 1:9, 5:1 및 9:1 혼합물 투여군의 경우 투여 34일부터, 그리고 1:1, 1:3 혼합물 투여군의 경우는 투여 14일부터 OVX대조군과 비교하여 체중증가량의 감소가 관찰되었다. 또한, MR 및 CH 단일 및 복합물 투여군은 모두 OVX대조군과 비교하여 체중증가량의 유의한($p<0.01$) 감소를 보였다. 특히 MR:CH 1:3 및 1:1 복합물 투여군의 경우 투여 34일에는 단일조성물 투여군이나 타비올의 복합물 투여군에 비해 유의한($p<0.05$ or $p<0.01$) 체중 감소를 보였다. 이 연구에서 OVX 대조군에 비해 RES 처치군의 경우는 체중이나 체중 증가에 큰 변화가 없는 것으로 관찰되었다(Table 3, Fig. 2). 이러한 결과는 MR:CH 1:1 및 1:3 혼합물이 OVX 유발성 대사 장애에 대해 MR 및 CH 단일 제제의 억제 활성을 상승적으로 증가시키는 간접적인 증거로 생각된다. 또한, MR:CH 1:1 혼합물보다 1:3 혼합

물이 서로의 활성을 증가시키는 데에 더 유리하다고 보여진다.

비록 골 중량의 변화가 회분 골 중량을 제외하고 항골다공증 제제의 효능을 검출하는 중요한 지표는 아니지만³⁹⁾ 일반적으로 상대적 골밀도의 증가 경향은 항골다공증 활동의 중요한 지표로 간주되어왔다^{18,22)}. 이 연구에서는 또한 위수술군에 비해 OVX대조군에서 대퇴의 상대 습윤중량, 절대 및 상대 건조중량 및 회분중량의 감소가 나타났다. 반면, OVX대조군에 비해 대퇴 건조 및 회분중량의 현저한 증가가 RES투여군을 포함하여 모든 시험물질투여군에서 나타났다. 특히, MR:CH 1:3 및 1:1 혼합물 투여군은 MR 및 CH 단일 투여군에 비해서도 현저한 절대 및 상대건조중량 및 회분중량의 증가를 보였다(Table 4, 5). 따라서 OVX 처치로 유도된 뼈 중량 감소에 대한 MR 및 CH 단일 제형의 억제 활성은 MR:CH 1:3 및 1:1 비율의 혼합 조성에서 상승적으로 증가하는 것으로 생각된다. 모든 OVX처치군에서 위수술군에 비해 절대 습윤중량의 유의한 차이는 없었고 RES를 포함하여 모든 MR 및 CH 단일 또는 혼합물 투여군 또한 OVX대조군과 비교하여 절대 및 상대 대퇴 습윤중량의 유의한 변화가 없었다.

비록, 채혈시간, 연구의 성격, 사용된 동물 등에 따라 다양한 변화가 있고 골교체와 형성에 근거한 해석에 대해 다소의 논쟁이 있지만, 혈청 오스테오칼신수치는 일반적으로 골교체율의 지표로, bALP수치는 골형성의 지표로 여겨진다^{18,22,40,41)}. 그러나 osteocalcin은 골아세포가 분비하는 비타민 K 의존성 alpha-carboxyglutamic acid이며 혈청 오스테오칼신 농도는 골

형성의 지표로도 간주된다^{41,42)}. 본 연구에서는 OVX대조군에서 위수술군과 비교하여 혈청 오스테오칼신 수준의 유의한 증가와 혈청 bALP 활성의 유의한 감소가 각각 검출되었고, 반면 OVX대조군과 비교하여 MR 및 CH로 구성된 단일 및 혼합물 투여군의 경우 혈청 오스테오칼신 수준의 유의한 감소 및 bALP 활성의 증가를 보였다. 특히 MR:CH 1:3 및 1:1 혼합물 투여군은 MR 및 CH 단일 투여군에 비해서도 혈청 오스테오칼신 수치의 유의한 감소와 bALP 활성의 유의한 증가를 보였다(Fig. 3, 4). 혈청 생화학 분석에서 나타난 이러한 결과는 OVX 처치군에 있어, 골 형성과 골교체억제에 대한 MR 및 CH 각각의 활성이 1:3 및 1:1 복합조성에서 상승 증가된다는 명백한 증거가 된다. RES투여군은 OVX대조군과 비교하여 혈청 오스테오칼신의 유의한 감소를 나타내었으나, bALP 활성은 OVX대조군과 유사한 수준으로 나타났다.

일반적으로 골다공증의 진행에 따라 골 무기질 함량은 유의하게 감소하는 것으로 알려져 있다^{18,22)}. 골 무기질 함량 중에서, Ca과 IP의 수치가 유의하게 감소하는 미네랄 수치이나, 골조직 내에서는 동시에 감소하므로 비율은 거의 고정된다^{18,22,43,44)}. 본 연구의 조직학적 분석에서는, 위수술군과 비교하여 OVX 처치군의 대퇴조직 표본의 Ca 및 IP 수준이 유의한 감소를 나타냈다. 모든 실험 물질 투여군에서 분석한 대퇴조직내의 Ca와 IP는 유의하게 증가하였다. 특히, MR:CH 1:3 및 1:1 혼합물 투여군은 MR 및 CH 단일 투여군과 비교하여 우측 대퇴골에서 Ca 및 IP 함량이 유의하게 증가하였다.

이러한 결과는 MR:CH 1:3 및 1:1 혼합물이 OVX로 유발된 골 무기질 손실에 대해 각 MR 및 CH 단일제제의 억제력을 상승시켰고, 그 상승효과는 특히 MR:CH 1:3 혼합물에서 더욱 유리하게 나타났다. 대퇴골의 Ca/IP 비율은 위수술군과 비교하여 OVX처치군에서 차이가 없었고 OVX 처치군과 약물 투여군을 비교 시에도 차이가 없었다(Table 7).

골밀도는 특히 인간의 경우 치료실에서 골질 변화를 평가하는 데 유용한 지표로 간주되어 왔으며 원인(유발시킨 방법, 상황)에 상관없이 모든 골다공증 동물에서 크게 감소했다^{18,22,45,46}. 임상 연구는 골밀도의 진단 기준을 제공하며 동시에 효과적인 골다공증 제제가 얼마나 효과적인지에 대한 예측 가능한 정보를 제공할 수 있는데, 이런 연구들을 통해 원인에 관계없이 골다공증에서 골 강도가 현저하게 감소한다는 사실을 발견하였다^{18,22,45,46}. 본 실험에서, 전체 및 대퇴골의 평균 BMD, 대퇴골 조직의 강도는 위수술군에 비해 OVX대조군에서 감소했다. 그러나 OVX 대조군에 비해 모든 약물처치군에서 전체 및 대퇴골 평균 골밀도는 유의하게 증가했다. 특히, MR:CH 1:3 및 1:1 혼합물 투여군은 MR 및 CH 각각의 단일 투여군의 경우와 비교하여 전체 및 대퇴부 평균 BMD가 유의하게 증가하였다(Table 6). 이 결과는 MR:CH 1:3 및 1:1 혼합물 투여군에서 각각의 MR 및 CH 단일제제의 골질량 및 골강도 보존 활성을 시너지로 상승시켰고, MR:CH 1:3에서 1:1보다 유리하게 나타났다.

OVX 처치를 받은군은 체중과 혈청 오스테오칼신 수치가 현저하게 증가함과 동시에 혈청 bALP 활성도, 대퇴부 조직

의 습윤, 건조 및 회분 중량과 칼슘과 IP 농도, 골밀도 등이 위수술군과 비교하여 유의하게 감소하였다. 이것은 골조직의 교체 증가와 골다공증에서의 새로운 골조직 형성의 감소가 에스트로겐 결핍으로 인한 것임을 나타낸다. 그러나 이러한 OVX에 의한 에스트로겐 결핍성 골다공증의 골 교체율 증가 및 새로운 골조직 생성 억제는 MR 및 CH로 구성된 모든 단일 및 혼합물의 35일간 유지된 경구 투여군에서 OVX대조군과 비교하여 유의하게 억제되었다. 특히 MR:CH 1:3 및 1:1 혼합물 투여군은 MR 및 CH 단일 투여군과 비교하여도 OVX로 폐경기 증상을 유발한 마우스에서 에스트로겐 결핍성 골다공증에 대해 지속적으로 훨씬 우수한 항골다공증 활성을 보였다.

RES는 골교체율 증가를 억제하여 OVX로 유발된 폐경기 후 에스트로겐 결핍 마우스에서 대퇴골 골밀도, 골 강도 및 골소골 구조의 감소를 유리하게 개선했지만, 이는 새로운 골 형성과 골밀도 증가에는 현저한 영향을 미치지 않았다. 혈청 bALP 활성도는 다른 연구자가 수행한 이전 실험과 일치했다^{22,36}. 이러한 결과는 MR:CH 1:3 및 1:1 혼합 제제가 적어도 하나 이상의 활성 성분의 다양성을 증가시킴으로써 OVX 처치군에서 MR 및 CH의 각 단일제제의 항골다공증 잠재력 효과를 상승적으로 증가시켰다는 것을 시사한다.

신농본초경^{14,47}에서는, 본초를 배합하면, 특별한 관계가 성립한다고 보았다. 이것을 七情이라고 한다며, 이 중 각 기능이 합해져서 효과를 상승시키는 것을 相須라고 하고, 主藥과 輔助藥이 정해져 있어 主藥의 효과를 강화시키는 것을 相

使라고 한다. 파극천과 육종용은 둘다 腎陽을 補하는기능이 있는데, 파극천은 強筋骨하는데 강한 효과를 가지며, 육종용도 腎陽을 올려주나, 그 기능이 순하고 부드럽다. 두 본초의 관계에서, 1:3 복합제제가 가장 항골다공증 효과가 높은 것을 고려했을 때, 육종용이 파극천의 효과를 腎陰을 채워주면서 강화시키므로, 相使와 관계로 시너지효과를 낸다고 보여진다.

OVX 처치군에 대한 현재 실험의 조건에서, MR:CH 1:3 혼합물 투여군은 RES투여군에 비해 다소 낮은 재흡수억제 효과를 보였으나 RES에서는 증명되지 않은 골형성효과를 보여 주었다. 따라서 MR:CH 1:3 혼합제제는 RES에 필적할만한 항골다공증 효과를 가졌다고 생각된다. 그러므로 MR:CH 1:3 혼합물은 폐경기 여성에서 골다공증을 완화시키는 새로운 강력한 보호제로서 기대해 볼직하다. 그러나 MR 및 CH는 매우 다양한 활성 화합물을 갖는 천연 약제이므로, 생물학적 활성에 대해 보다 상세한 메커니즘과 풍부한 동물 연구가 미래에 수행되어야 한다고 생각된다.

V. 결 론

이 연구를 통해, 우리는 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 난소적출로 유도된 현저한 체중 및 혈청 오스테오칼신 수치의 증가와 혈청 bALP 수치, BMD, 골중량, 골장력 및 골형성의 감소는 파극천 및 육종용 단일 및 복합 추출물에 의해 유의하게

억제되었다.

2. 특히, 파극천:육종용 1:3 및 1:1 혼합 추출물의 경우 모든 수치에서 에스트로겐 감소와 관련한 골다공증성 증상을 억제하는데 가장 효과적이었다.

그러므로 파극천:육종용 혼합 추출물은 폐경성 골다공증에 대한 약물로서 잠재력이 있다고 보여지므로, 세부적인 기전과 임상연구가 추가적으로 필요하다.

□ Received : Apr 18, 2019

□ Revised : Apr 22, 2019

□ Accepted : Aug 29, 2019

References

1. Sambrook P, Cooper C. Osteoporosis. *Lancet*. 2006;367(9527):2010-8.
2. Korea Centers for Disease Control and Prevention. 2010 National Health Statistics and 2010 Health Behavior and Chronic Disease Statistics[cited October 18, 2018]. Available from:URL: https://knhanes.cdc.go.kr/knhanes/sub04/sub04__03.do.
3. National Osteoporosis Foundation. Clinician's guide prevention and treatment of osteoporosis. 2008.
4. International Osteoporosis Foundation. Who's at risk?[cited October 18, 2018]. Available from:URL:<https://www.iofbonehealth.org/whos-risk>.
5. The Society of Korean Medicine Obstetrics and Gynecology. *Oriental Obstetrics & Gynecology* 3rd edition. Seoul:Euisseongdang publisher. 2016:252-4.

6. World Health Organization. Prevention and Management of Osteoporosis. 2003.
7. Korean Society for Bone and Mineral Research. Physician's guide for diagnosis & treatment of osteoporosis. 2015.
8. Camacho PM, et al. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology Clinical Practice guidelines for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis - 2016. *Endocr Pract.* 2016;22(4):1-42.
9. Gennari L, et al. Treatment needs and current options for postmenopausal osteoporosis. *Expert Opin Pharmacother.* 2016;17(8):1141-52.
10. Seo MS, et al. The Review on the Study of Osteoporosis in Korean Medicine Journals. *The Journal of Korea CHUNA Manual Medicine for Spine & Nerves.* 2013;8(2):67-78.
11. Kim JY, Song YS. The Study about the Comparison of Korean-Western Medicine on Osteoporosis. *Journal of Oriental Rehabilitation Medicine.* 1996;6:293-315.
12. Kim HG, Yu JY, Lee EJ. The study about the comparison of Korean-Western medicine on sin-ju-gol(腎主骨). *The Journal of Korean Oriental Internal Medicine.* 1991;12(2):26-9.
13. Lee CH, Lee IS. The Study of Document on Osteoporosis through Oriental Medicine. Dong-Eui Institute of Oriental Medicine. 2000 Dec;4:107-27.
14. National College of Oriental Medicine Common Textbook Compilation Committee. Herbal medicine(本草學). Seoul:Yeonglimsa. 2008:594-7.
15. Zhang H, et al. Antioxidant activity and physicochemical properties of an acidic polysaccharide from *Morinda officinalis*. *Int J Biol Macromol.* 2013;58:7-12.
16. Wat E, et al. The protective effect of Herba Cistanches on statin-induced myotoxicity *in vitro*. *J Ethnopharmacol.* 2016;190:68-73.
17. Heo J. Dongeuibogam. Seoul:Bubinbooks. 2008.
18. Kang SJ, et al. Selection of the Optimal Herbal Compositions of Red Clover and Pomegranate according to their Protective Effect against Climacteric Symptoms in Ovariectomized Mice. *Nutrients.* 2016;8(8):447.
19. Harris ST, et al. Effects of risedronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. Vertebral Efficacy With Risedronate Therapy (VERT) Study Group. *JAMA.* 1999;282(14):1344-52.
20. Nam SH, et al. Topically administered Risedronate shows powerful anti-osteoporosis effect in ovariectomized mouse model. *Bone.* 2012;50(1):149-55.
21. Shin HD, et al. Antiosteoporotic effect of Polycan, beta-glucan from *Aureobasidium* in ovariectomized osteoporotic mice. *Nutrition.* 2007;23(11-12):853-60.
22. Joo JH, et al. A Novel Pyrazole Derivative Protects from Ovariectomy-induced Osteoporosis through the Inhibition of NADPH oxidase. *Sci*

- Rep. 2016;6:22389.
23. Ludbrook J. Update: Microcomputer Statistics Packages. A personal view. Clin Exp Pharmacol Physiol. 1997; 24(3-4):294-6.
 24. Levene A. Pathological factors influencing excision of tumours in the head and neck. Part I. Clin Otolaryngol Allied Sci. 1981;6(2):145-51.
 25. Kang SJ, et al. Fermentation with Aquilariae Lignum enhances the anti-diabetic activity of green tea in type II diabetic db/db mouse. Nutrients. 2014;6(9):3536-71.
 26. Choi JS, et al. Blood glycemia-modulating effects of melanian snail protein hydrolysates in mice with type II diabetes. Int J Mol Med. 2017;39(6):1437-51.
 27. Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL. Sex steroids and bone. Recent Prog Horm Res. 2002;57:385-409.
 28. Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic Approaches to Bone Diseases. Science. 2000;289(5484):1508-14.
 29. MacDonald BR, Gowen M. Emerging Therapies in Osteoporosis. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2001;15(3):483-96.
 30. Wu YB, et al. Antiosteoporotic Activity of Athraquinones from *Morinda officinalis* on Osteoblasts and Osteoclasts. Molecules. 2009;14(1):573-83.
 31. Li TM, et al. *Cistanche deserticola* extract increases bone formation in osteoblasts. J Pharm Pharmacol. 2012;64(6):897-907.
 32. Xu X, et al. Therapeutic Effect of Cistanoside A on bone metabolism of ovariectomized mice. Molecules. 2017;22(2):197.
 33. Kang SJ, et al. Dried pomegranate potentiates anti-osteoporotic and anti-obesity activities of red clover dry extracts in ovariectomized rats. Nutrients. 2015;7(4):2622-47.
 34. Choi JS, et al. Effect of Polycalcium, a mixture of Polycan and calcium lactate-gluconate in a 1:9 weight ratio, on rats with surgery-induced osteoarthritis. Exp Ther Med. 2015; 9(5):1780-90.
 35. Park SI, et al. The Effects of Topical Application of Polycal (a 2:98 (g/g) Mixture of Polycan and Calcium Gluconate) on Experimental Periodontitis and Alveolar Bone loss in Rats. Molecules. 2016;21(4):527.
 36. Lorden JF, Caudle A. Behavioral and Endocrinological Effects of Single Injections of Monosodium Glutamate in the Mouse. Neurobehav Toxicol Teratol. 1986;8(5):509-19.
 37. Bain SD, et al. High-dose Estrogen Inhibits Bone Resorption and Stimulates Bone Formation in the Ovariectomized Mouse. J Bone Miner Res. 1993;8(4):435-42.
 38. Andersson N et al. Repeated *in vivo* Determinations of Bone Mineral Density During Parathyroid Hormone Treatment in Ovariectomized Mice. J Endocrinol. 2001;170(3):529-37.
 39. Yamamoto M, et al. The Integrin Ligand Echstatin Prevents Bone Loss
-

- in Ovariectomized Mice and Rats. *Endocrinology*. 1998;139(3):1411-9.
40. Ke HZ, et al. Long-term treatment of lasofoxifene preserves bone mass and bone strength and does not adversely affect the uterus in ovariectomized rats. *Endocrinology*. 2004;145(4):1996-2005.
41. Ederveen AG, Kloosterboer HJ. Tibolone, a steroid with a tissue-specific hormonal profile, completely prevents ovariectomy-induced bone loss in sexually mature rats. *J Bone Miner Res*. 1999;14(11):1963-70.
42. Ismail F, et al. Serum bone gla protein and the vitamin D endocrine system in the oophorectomized rat. *Endocrinology*. 1988;122(2):624-30.
43. Tanaka S, et al. Acute effects of ovariectomy on wound healing of alveolar bone after maxillary molar extraction in aged rats. *Anat Rec*. 2001;262(2):203-12.
44. Tarvainen R, et al. Clodronate Prevents Immobilization Osteopenia in Rats. *Acta Orthop Scand*. 1994;65(16):643-6.
45. Syed Z, Khan A. Bone Densitometry: applications and limitations. *J Obstet Gynecol Can*. 2002;24(6):476-84.
46. Diez F. Guidelines for the Diagnosis of Osteoporosis by Densitometric Methods. *J Manipulative Physiol Ther*. 2002;25(6):403-15.
47. Park JH. Euiyuksinnongbonchokyung (意譯神農本草經). Seoul:Sinil seojeok. 2014:4-5.