

골절 유발 Rat에 대한 血府逐瘀湯의 전임상 연구

허건 · 오민석

대전대학교 한의과대학 한방재활의학교실

The Preclinical Study of *Hyeolbuchugeo-tang* (*Xuefuzhuyu-tang*) on Bone Healing in Rats with Rib Fracture

Gun Huh, K.M.D., Min-Seok Oh, K.M.D.

Department of Korean Medicine Rehabilitation, College of Korean Medicine, Daejeon University

RECEIVED June 17, 2020

REVISED June 22, 2020

ACCEPTED June 23, 2020

CORRESPONDING TO

Min-Seok Oh, Department of
Korean Medicine Rehabilitation,
College of Korean Medicine,
Daejeon University, 75
Daedeok-daero, 176beon-gil,
Seo-gu, Daejeon 35235, Korea

TEL (042) 470-9424

FAX (042) 470-9005

E-mail ohmin@dju.ac.kr

Copyright © 2020 The Society of
Korean Medicine Rehabilitation

Objectives The purpose of this study is to evaluate the healing effect of *Hyeolbuchugeo-tang* (HC) in rats with rib fracture.

Methods Rats were randomly divided into 5 groups (naive, control, positive control, HC-L and HC-H). All groups except naive group were subjected to bone fracture of rib. Naive group received no treatment at all. Control group was fed with phosphate buffered saline. Positive control group was orally medicated with tramadol. Experimental group was orally medicated with HC extract (50 mg/kg for low concentration [HC-L], 100 mg/kg for high concentration [HC-H]). X-ray and micro-computed tomography (micro-CT) were conducted to assess the effect of HC. We analysed the level of 2) transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), Ki67, alkaline phosphatase (ALP), receptor activator of nuclear factor kappa- β , runt-related transcription factor 2 (Runx2) and tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) on 7 and 14 days after fracture. ALP, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, blood urea nitrogen, creatinine was measured for safety assessment.

Results X-ray and micro-CT, showed HC enhance bone repair process. Callus formation was increased in experimental group at 7 days after fracture, but decreased at 14 days after fracture. 7 days after fracture, the level of TGF- β 1 in experimental group was decreased. The level of Ki67, Runx2 in HC-H, TRAP in HC-L was increased. 14 days after fracture, the level of Ki67 in HC-L and HC-H was decreased. The level of ALP, Runx2, BUN in HC-L, TRAP in HC-L and HC-H was increased.

Conclusions Taken together the results, HC promoted healing of bone fracture. In conclusion, HC has a potential to promote healing of bone fracture. (*J Korean Med Rehabil* 2020;30(3):23-44)

Key words Herbal medicine, Rib fractures, Bone fractures, Gene expression

서론»»»»

골절이란 과도한 힘이 뼈나 연골에 가해져 그 연속성이 일부 혹은 전체에서 상실된 상태를 말하며 피부, 피하조직, 근막, 혈관 및 신경 등의 손상을 동반한다¹⁾.

골절의 치료는 수술적 치료와 비수술적 치료로 나눌 수 있으며 환자의 전신상태, 다른 손상의 동반 유무, 골절의 폐쇄성 혹은 개방성 여부, 골절의 위치와 전위 정도 등의 사항을 고려하여 치료의 방향을 결정한다²⁾.

골절의 치유 과정은 골절 직후 1~5일 사이의 염증기,

4~40일 사이의 복원기, 이후 수 주~수 개월간의 재형성기 과정 등 크게 세 단계로 나눌 수 있는데³⁾ 이 기간에 적절한 치료가 이루어지지 않을 경우 관절 변형, 외상성 관절염, 불유합, 지연유합 등의 합병증이 유발될 수 있기 때문에 적절한 치료 계획을 세우는 것은 매우 중요하다⁴⁾.

한의학적 골절 치료는 골절을 초기, 중기, 후기로 나누어 접근을 하는데 골절 초기에는 筋脈이 손상되어 瘀血阻滯, 腫脹疼痛한 상태로 보고 活血化瘀, 消腫止痛하는 약물을 사용하며, 중기에는 腫脹 및 瘀血이 줄어드는 단계로 接骨續斷하는 약물을, 후기에는 골이 유합되었으나 氣血이 부족해 근육의 정상적인 기능이 회복되지 못한 상태로 補氣養血, 補益肝腎하는 약물을 사용한다⁵⁾.

혈부축어탕은 清代 王清任이 저술한 《醫林改錯》⁶⁾에 처음 기록되었고 瘀血證을 치료하는 대표적인 처방으로 瘀血과 관련된 여러 증상에 광범위하게 활용되고 있으며⁷⁾ 자궁근증⁸⁾, 골다공증⁹⁾, 다낭성난소증후군¹⁰⁾, 전뇌허혈¹¹⁾, 신경보호 및 재생효과¹²⁾, 동맥경화¹³⁾에 효과가 있음이 실험적으로 연구되었지만 아직 골절 유합과 관련된 보고는 없었다.

이에 저자는 혈부축어탕이 瘀血과 관련된 골절에 미치는 영향을 확인하고자 rat의 늑골에 골절을 유발시킨 후 골절 유합과 관련된 형태조직학적 검사 및 안전성 검사를 실시하여 유의한 결과를 얻었으므로 보고하는 바이다.

재료 및 방법»»»

1. 재료

1) 약재

실험에 사용한 혈부축어탕(Hyeolbuchugeo-tang, HC)의 구성 약재는 桃仁, 當歸, 生地黃, 紅花, 牛膝, 枳殼, 赤芍藥, 桔梗, 川芎, 柴胡, 甘草이며 약재별 용량은 《醫林改錯》⁶⁾을 기준으로 하였다. 약재는 음니허브(Daegu, Korea)에서 구입하였으며 그 내용은 Table I과 같다.

2) 실험동물

실험동물은 대한바이오링크(Eumseong, Korea)에서 7

주령 수컷 Sprague Dawley rat (300~350 g)를 분양받아 5주일간 사육한 뒤 실험에 사용하였다. 실험동물은 실험 당일까지 고형사료와 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 사육환경은 자유식이하면서 온도는 23±1℃로 맞추었고 12시간 light-dark cycle의 환경에 7일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 본 연구의 동물실험에 관한 모든 사항은 대전대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받은 후 진행하였다(승인번호: DJUARB2019-006).

2. 방법

1) 약재 추출

2첩 분량의 한약재 192 g에 1 L의 증류수를 넣고 약탕기(Daewoong, Naju, Korea)를 이용하여 약 2시간 동안 열수추출하였다. 끓인 약재는 Whatman No. 2 filter (Maidstone, UK)로 여과해 용액에 추출된 성분만을 분리하였다. 여액은 rotary evaporator (Buchi, Switzerland)로 70℃에서 감압증발한 뒤 동결건조하여 38.8 g의 건조분말을 얻어 추출효율은 20.2%였다. 분말은 -80℃에 분주하여 보관하였으며 사용하기 전 phosphate buffered saline (PBS)로 희석하여 0.45 μm필터로 거른 후 사용하였다.

2) 골절 유발 방법

실험 동물에게 60 mg/kg의 ketamine (Yuhan Corporation, Seoul, Korea)과 500 μL/kg의 rompun (Bayer, Leverkusen, Germany)을 섞어 근육 주사하여 마취하였다. 골절 유발

Table I. The Herbal Composition of Hyeolbuchugeo-tang

Scientific name	Amount (g)
<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch	16
<i>Angelica gigas</i>	12
<i>Rehmannia glutinosa</i> (Gaertner) Libosch.	12
<i>Carthamus tinctorius</i> L.	12
<i>Achyranthes japonica</i> (Miq.) Nakai	12
<i>Citrus aurantium</i> L.	8
<i>Paeonia lactiflora</i> Pall.	8
<i>Platycodon grandiflorum</i> (Jacq.) A. DC.	4
<i>Ligusticum officinale</i> (Makino) Kitag.	4
<i>Bupleurum chinense</i> Cd	4
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	4
Total amount	96

을 위한 방법으로 가슴을 삭모한 다음 피부와 근육을 절개한 뒤 수술용 가위를 이용하여 왼쪽 9번 늑골을 절단하여 골절을 유발하였다. 골절 유발 후 근육, 피부 순서로 봉합사를 이용하여 5 mm 간격으로 단순 결찰 봉합하였다.

3) 실험군 분류 및 약물 투여

실험동물은 무작위로 각각의 그룹으로 나누었다. 정상군(Nor)과 대조군(Con), 양성대조군(Tra)은 6마리씩, 약물 투여군은 저농도와 고농도로 나누어 각각 10마리씩 배속시키고 골절 후 1주와 2주에 치사하였다. 정상군은 늑골 골절 손상을 주지 않았다. 그 외 모든 그룹의 실험동물은 늑골에 골절 손상을 주었고 실험 약물은 1주 혹은 2주 동안 1일 1회 일정 시간에 경구 투여하였다. 양성 대조군은 임상에서 골절 혹은 수술 후 진통제로 사용하는 tramadol (20 mg/kg; Sigma Aldrich Co., Ltd., St. Louis, MO, USA)을 사용하였다. 실험군(HC-L, HC-H)은 HC (50 mg/kg, 100 mg/kg)을 사용하였다.

4) Plasma 분리

마취된 실험동물의 심장에서 직접 채혈한 뒤 곧장 ethylenediaminetetraacetic acid가 들어 있는 BD vacutainer tube (BD, Franklin Lakes, NJ, USA)에 넣고 가볍게 흔들어 혈액 응고를 억제하였다. 이후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 뒤 상등액을 취하여 plasma를 확보하였다.

5) 골절 부위의 영상학적 관찰

(1) X-ray

골절된 뼈와 재생된 뼈를 확인하기 위하여 X-ray (ROTANODE-E7239X; Toshiba, Tokyo, Japan)를 사용하여 늑골을 촬영하였다. X-ray 소스는 관전압 36 kVp, 관전류 5 mA로 촬영하였다. X-ray 촬영 후 이미지는 Fire-CR (3DIHC, 3DISC, Herndon, VA, USA)을 사용하여 영상을 분석하였다.

(2) Micro-computed tomography (Micro-CT)

재생된 뼈를 확인하기 위하여 micro-CT (Quantum FX micro-CT; Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA)를 사용하여 늑골을 스캔하였다. X-ray 소스는 관전압 90 kVp, 관전류 160 μ A로 3분간 스캔하였다. 8.8 μ m의 공간 분해능에서 0.7°의 회전 단계로 360°에 걸쳐 스캔을 수

행하였다. Micro-CT 스캔 후 이미지는 Dataview (Bruker, Ettlingen, Germany)를 사용하여 정리하였다.

6) 골절 조직 분석

(1) 조직슬라이드 제작

치사된 실험동물에서 골절을 유발한 늑골 부위를 적출한 뒤 10% formalin에 1주일동안 조직을 고정하고 조직처리 과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후 파라핀 블록을 4 μ m 두께로 박절하여 절편을 만들었다.

(2) Hematoxylin & Eosin (H&E) staining

탈 파라핀 후 함수, 수세 과정을 거쳐 Hematoxylin 과정을 10분간 처리하고, 수세 후 Eosin에 1분 40초간 처리하였다. 그 다음 함수, 청명과정을 거쳐 cover glass를 덮고 봉입하였다. 조직슬라이드는 40배의 배율로 bright field microscope (Nikon, Tokyo, Japan)로 관찰하였다.

(3) Safranin O staining

탈 파라핀 후 Weigert's iron hematoxylin 과정을 5분간 처리하였다. 수세 후 0.02% fast green 5분, 1% acetic acid 10초, 0.1% Safranin O 5분의 처리과정을 순서대로 거쳤다. 그 다음 함수, 청명과정을 거쳐 cover glass를 덮고 봉입하였다. 조직슬라이드는 40배의 배율로 bright field microscope (Nikon)로 관찰하였다.

7) Immunohistochemistry (IHC) 분석

(1) IHC 슬라이드 제작

치사된 실험동물에서 골절을 유발한 늑골 부위를 적출한 뒤 10% formalin에 1주일동안 조직을 고정하였다. 고정된 조직을 조직처리 과정(processing)을 거쳐 파라핀에 포매(embedding)한 후 파라핀 블록을 4 μ m 두께로 박절(cutting)하여 절편(section)을 만들고 탈 파라핀, 함수 과정을 거쳐 증류수로 세척하였다. 내인성 peroxidase의 활성을 없애기 위해 Peroxide Blocking (DAKO, Glostrup, Denmark)을 실온에서 10분간 처리하고 PBS로 2회 세척하였다.

(2) Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), Ki67

항체 TGF- β 1 (Dilution 1:200; Abcam, Cambridge, UK), Ki67 (Dilution 1:100; Abcam)를 4°C에서 overnight동안 반응시킨 후 Wash buffer (DAKO)로 세척하고 Envision+ Rabbit (DAKO)으로 30분간 반응시켰다.

반응 후 반응용액은 Wash buffer (DAKO)로 세척하고, 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)으로 약 3 분간 발색하였다. 발색 후 증류수로 중화하고, Mayer hematoxylin으로 대조 염색 후 수돗물에 세척하여 남은 염색 시약을 제거한 뒤 흡수, 청명과정을 거쳐 cover glass를 덮고 봉입하였다. 조직슬라이드는 200배, 400배의 배율로 bright field microscope (Nikon)로 관찰하였다.

(3) Alkaline phosphatase (ALP), Runt-related transcription factor 2 (Runx2)

항체 ALP (1:200; MyBioSource, San Diego, CA, USA), Runx2 (Dilution 1:100; Abcam)를 4°C에서 overnight동안 반응시킨 후, Wash buffer (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)로 세척하고 Biotinylated antibody-Rabbit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)으로 30분간 반응시켰다. 반응 후 반응용액은 Wash buffer (Thermo Fisher Scientific)로 세척하고, Avidin Biotin HRP complex (Vector Laboratories)로 반응시켰다. Wash buffer로 세척 후 DAB로 약 3분간 발색하였다. 발색 후 증류수로 중화하고, Harris hematoxylin으로 대조 염색 후 수돗물에 세척하여 남은 염색 시약을 제거한 뒤 흡수, 청명과정을 거쳐 cover glass를 덮고 봉입하였다. 조직슬라이드는 200배의 배율로 bright field microscope (Nikon)로 관찰하였다.

(4) Receptor activator of nuclear factor kappa- β (RANK)

항체 RANK (Dilution 1:100; Abcam)를 4°C에서 overnight동안 반응시킨 후 Wash buffer (Thermo Fisher Scientific)로 세척하고 Biotinylated antibody-Mouse (Vector Laboratories)로 30분간 반응시켰다. 반응 후 반응용액은 Wash buffer (Thermo Fisher Scientific)로 세척하고, Avidin Biotin HRP complex (Vector Laboratories)로 반응시켰다. Wash buffer로 세척 후 DAB로 약 3분간 발색하였다. 발색 후 증류수로 중화하고, Harris hematoxylin으로 대조 염색 후 수돗물에 세척하여 남은 염색 시약을 제거한 뒤 흡수, 청명과정을 거쳐 cover glass를 덮고 봉입하였다. 조직슬라이드는 200배의 배율로 bright field microscope (Nikon)

로 관찰하였다.

(5) Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP)

항체 TRAP (Dilution 1:100; Abcam)를 4°C에서 overnight동안 반응시킨 후 Wash buffer (Thermo Fisher Scientific)로 세척하고 Biotinylated antibody-Rabbit (Vector Laboratories)으로 30분간 반응시켰다. 반응 후 반응용액은 Wash buffer (Thermo Fisher Scientific)로 세척하고, Avidin Biotin HRP complex (Vector Laboratories)로 반응시켰다. Wash buffer로 세척 후 DAB로 약 3분간 발색하였다. 발색 후 증류수로 중화하고, Harris hematoxylin으로 대조 염색 후 수돗물에 세척하여 남은 염색 시약을 제거한 뒤 흡수, 청명과정을 거쳐 cover glass를 덮고 봉입하였다. 조직슬라이드는 200배의 배율로 bright field microscope (Nikon)로 관찰하였다.

8) IHC staining score

조직슬라이드의 정보를 블라인드 처리 후 발현량 정도를 0부터 5까지 Scoring하였다. 발현량 score 점수는 Table II와 같다.

9) 혈액생화학학적 분석

혈액생화학학적 분석하기 위하여 COBAS 8000 C702 analyzer (Roche Diagnostic System, Basel, Switzerland)를 사용하였다. 시약은 Roche Diagnostics (Basel, Switzerland)를 사용하였다. ALP, aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT)는 Colorimetry 검사법을 이용하였고, blood urea nitrogen (BUN)은 Kinetic test, creatinine는 Enzyme법을 이용하였다. 실험동물에서 분리한 plasma를 사용하여 각각의 혈액생화학학적 분석을 수행하였다.

10) Osteocalcin 분석

Rat Gla-Osteocalcin ELISA kit (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan)를 이용하여 antibody coated microtiter plate에 plasma를 100 μ L씩 분주하고 1시간 동안 반응시킨다.

Table II. Grade of Immunohistochemistry Score

Score	0	1	2	3	4	5
Staining intensity	No staining	Weak	Mild weak	Moderate	Mild strong	Strong

Washing buffer를 이용하여 세척하고, antibody-POD conjugate를 각 well에 100 μ L씩 넣어 1시간 동안 반응시킨 뒤 다시 washing buffer를 이용하여 세척하고, tetramethylbenzidine을 각 well에 100 μ L씩 넣는다. 15분 뒤에 stop solution 100 μ L를 넣은 후 흡광도 측정을 ELISA reader 450 nm에서 하였다.

3. 통계분석

모든 실험 결과는 mean \pm standard error of the mean으로 기록하였으며, 통계처리는 GraphPad Prism 5 (version 5.01; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) 프로그램을 이용하였고, Mann-Whitney test로 유의성을 검증하였다. p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과»»»

1. 골절 부위의 영상학적 분석

1) X-ray

X-ray 관찰 결과 골절 유발 7일 후에는 대조군을 포함한 모든 그룹에서 늑골의 골절 부위가 회복되지 않았고, HC-L과 HC-H에서는 callus가 형성된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

골절 유발 후 14일이 지난 실험동물에서도 1주와 마찬가지로 대조군을 포함한 모든 그룹에서 늑골의 골절 부위를 확인할 수 있었고, HC-H에서는 골 유합이 진행되고 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

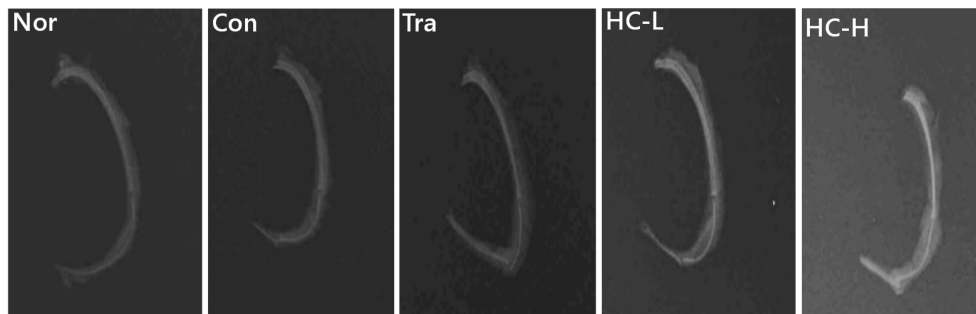


Fig. 1. X-ray image of rib bone at 7 days after fracture. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 7 days. The fractured rib bone was isolated and analyzed by X-ray. HC: Hyeolbuchugeo-tang, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day).

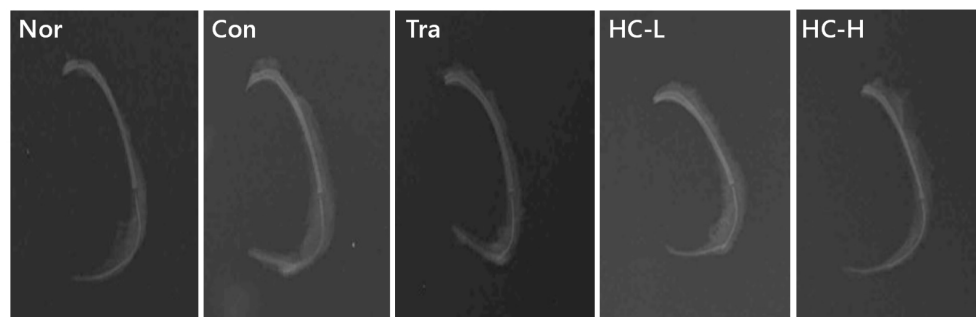


Fig. 2. X-ray image of rib bone at 14 days after fracture. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 14 days. The fractured rib bone was isolated and analyzed by X-ray. HC: Hyeolbuchugeo-tang, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day).

2) Micro-CT

Micro-CT 관찰 결과 골절 유발 후 7일 후에는 대조군을 포함한 모든 그룹에서 늑골의 골절 부위가 회복되지 않았고, HC-H에서는 골 유합이 진행되고 있었다(Fig. 3).

골절 유발 후 14일이 지난 실험동물에서도 1주와 마찬가지로 대조군을 포함한 모든 그룹에서 늑골의 골절 부위를 확인할 수 있었고, HC-L에서 골 유합이 진행되고 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

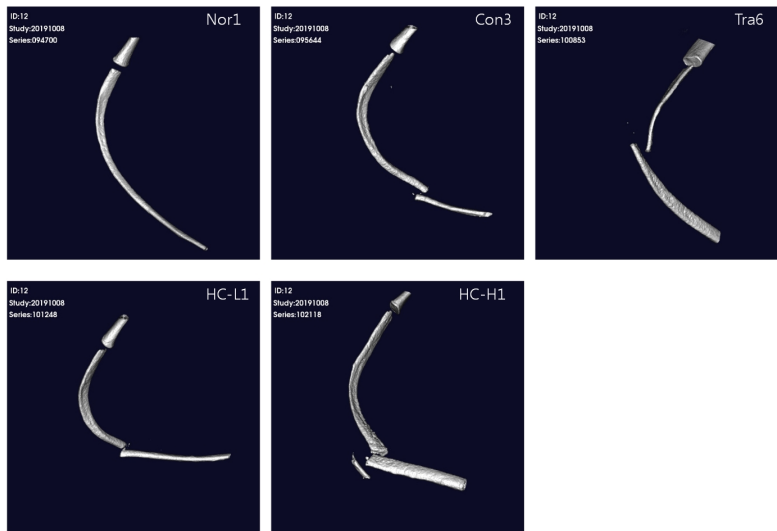


Fig. 3. Micro-CT image of rib bone at 7 days after fracture. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 7 days. The fractured rib bone was isolated and analyzed by micro-CT. Micro-CT: micro-computed tomography, HC: *Hyeolbuchugeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day).

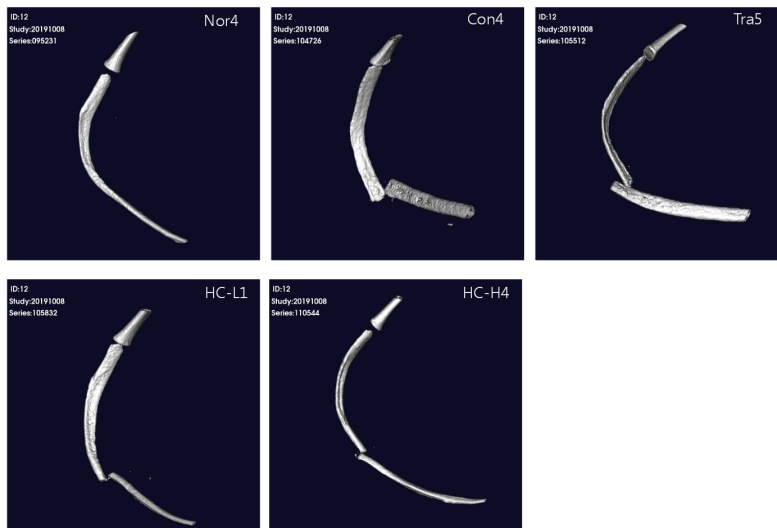


Fig. 4. Micro-CT image of rib bone at 14 days after fracture. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 14 days. The fractured rib bone was isolated and analyzed by micro-CT. Micro-CT: micro-computed tomography, HC: *Hyeolbuchugeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day).

2. 골절 조직 슬라이드 분석

1) H&E staining

H&E로 염색하고 현미경으로 관찰한 결과 골절 유발 후 7일 후에는 대조군 및 양성대조군 그리고 HC-L 및 HC-H에서 모두 골절이 관찰되었고, HC-L과 HC-H의 골절 부위에서의 callus 형성이 대조군과 양성대조군에 비해 증가하였다(Fig. 5).

골절 유발 후 14일 후에는 대조군 및 양성대조군 그리고 HC-L 및 HC-H에서 모두 골절이 관찰되었고, 대조군에 비해 양성대조군 및 HC-L과 HC-H의 골절 부위에서의 callus 형성이 감소되는 것이 관찰되었다(Fig. 6).

2) Safranin O staining

Safranin O로 염색하고 현미경으로 관찰한 결과 골절 유발 후 7일 후에는 대조군 및 양성대조군 그리고 HC-L 및 HC-H에서 모두 골절이 있었고, HC-L의 골절 부위에서의 callus 형성이 대조군에 비해 증가하였지만 양성대조군과 HC-H의 골절 부위에서의 callus가 대조군과 비슷하게 형성되는 것이 관찰되었다(Fig. 7).

골절 유발 후 14일 후에는 대조군 및 양성대조군 그

리고 HC-L 및 HC-H에서 모두 골절이 관찰되었고, 대조군에 비해 양성대조군 및 HC-L과 HC-H의 골절 부위

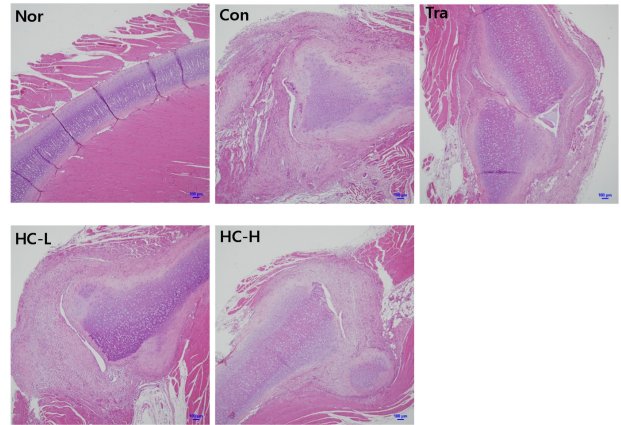


Fig. 6. The histological analysis of rib fracture with Hematoxylin and Eosin staining after 14 days. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 14 days. The damaged rats ribs were isolated and used for tissue slide specimen. The tissue was stained with H&E and visualized with bright field microscope. Magnification, $\times 40$. HC: *Hyeolbuchugeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day).

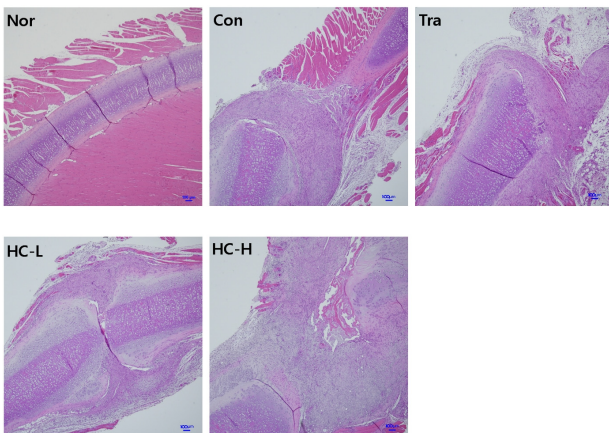


Fig. 5. The histological analysis of rib fracture with hematoxylin and Eosin staining after 7 days. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 7 days. The damaged rats ribs were isolated and used for tissue slide specimen. The tissue was stained with H&E and visualized with bright field microscope. Magnification, $\times 40$. HC: *Hyeolbuchugeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day).

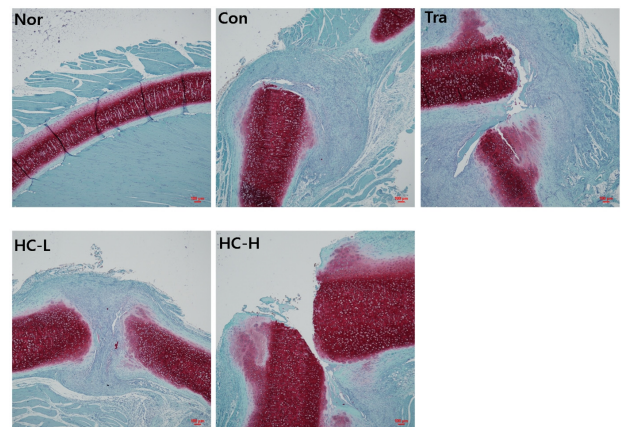


Fig. 7. The histological analysis of rib fracture with safranin O staining after 7 days. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 7 days. The damaged rats ribs were isolated and used for tissue slide specimen. The tissue was stained with safranin O and visualized with bright field microscope. Magnification, $\times 40$. HC: *Hyeolbuchugeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day).

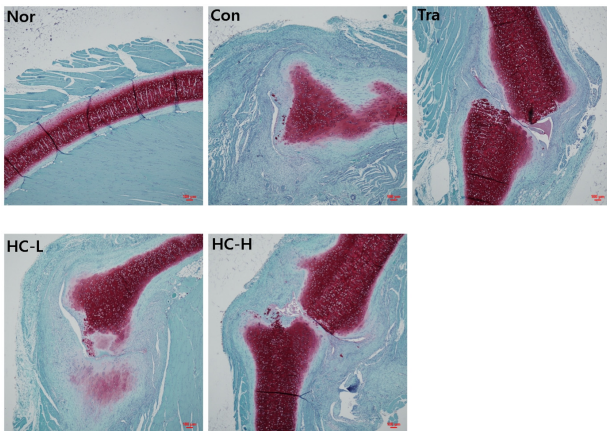


Fig. 8. The histological analysis of rib fracture with safranin O staining after 14 days. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 14 days. The damaged rats ribs were isolated and used for tissue slide specimen. The tissue was stained with safranin O and visualized with bright field microscope. Magnification, $\times 40$. HC: *Hyeolbuchugeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day).

에서의 callus 형성이 감소되는 것이 관찰되었다(Fig. 8).

3. IHC 분석

1) TGF- β 1

TGF- β 1에 대한 항체를 결합한 뒤 면역조직염색을 실시하고 현미경으로 관찰한 결과 골절 유발 후 7일 후에는 대조군(4.3 ± 0.50)의 병변 부위에서 확연하게 증가한 TGF- β 1 발현세포들을 확인할 수 있었다. 그러나 HC-L (2.8 ± 0.50)와 HC-H (3.5 ± 0.58)에서 실험동물의 병변 부위에서 대조군에 비해 TGF- β 1 발현세포들이 감소하였다(Fig. 9).

골절 유발 후 14일 후에는 양성대조군(0.5 ± 1.00)을 제외한 모든 군에서 실험동물의 병변 부위에 확연하게 증가한 TGF- β 1 발현세포들을 확인할 수 있었다. 그러나 대조군(1.8 ± 0.50)에 비해 HC-L (1.8 ± 0.96)과 HC-H (2.0 ± 0.82)의 골절 부위에서의 TGF- β 1 발현세포들의 변화는 거의 없는 것으로 관찰되었다(Fig. 10).

2) Ki67

Ki67에 대한 항체를 결합한 뒤 면역조직염색을 실시

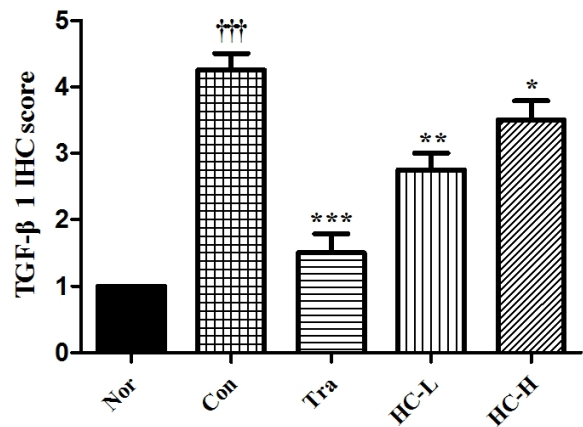
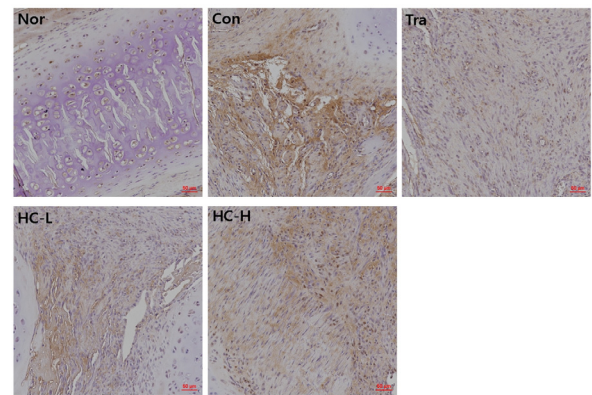


Fig. 9. IHC staining with TGF- β 1 in rib fracture after 7 days. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 7 days. The damaged rats ribs were isolated and used for tissue slide specimen. The sliced bone tissue were incubated with TGF- β 1 antibody and subjected to IHC. Magnification, $\times 200$. IHC: immunohistochemistry, TGF- β 1: transforming growth factor- β 1, HC: *Hyeolbuchugeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day). ***Significantly different from normal ($p < 0.001$), *Significantly different from control ($p < 0.05$), **Significantly different from control ($p < 0.01$), ***Significantly different from control ($p < 0.001$).

하고 현미경으로 관찰한 결과 골절 유발 후 7일 후에는 대조군(1.0 ± 0.82)과 양성대조군(1.8 ± 0.96)의 골절이 일어난 병변 부위에서 Ki67의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 HC-L (1.8 ± 0.50)과 HC-H (3.8 ± 0.50)에서 실험동물의 골절병변부위에서 대조군에 비해 Ki67 발현 세포들이 증가하는 것이 관찰되었고, 그 중 HC-H에서 확연하게 증가하였다(Fig. 11).

골절 유발 14일 후에는 대조군(3.8 ± 0.50)을 포함하여 골절이 일어난 실험동물의 병변 부위에서 확연하게 감소

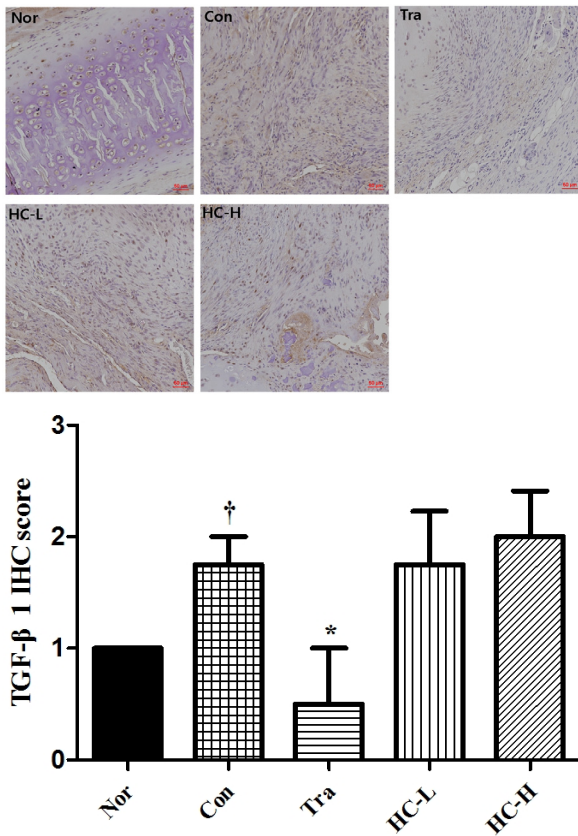


Fig. 10. IHC staining with TGF-β1 in rib fracture after 14 days. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 14 days. The damaged rats ribs were isolated and used for tissue slide specimen. The sliced bone tissue were incubated with TGF-β1 antibody and subjected to IHC. Magnification, ×200. IHC: immunohistochemistry, TGF-β1: transforming growth factor-β 1, HC: *Hyeolbuchugeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day). *Significantly different from normal ($p<0.05$), *Significantly different from control ($p<0.05$).

한 Ki67 발현을 확인할 수 있었다. 또한 HC-L (1.0 ± 0.00)과 HC-H (2.8 ± 0.50)의 실험동물 골절병변부위에서 대조군에 비해 Ki67 발현세포들이 감소하였다(Fig. 12).

3) ALP

ALP에 대한 항체를 결합한 뒤 면역조직염색을 실시하고 현미경으로 관찰한 결과 골절 유발 7일 후에는 대조군(1.8 ± 0.50), 양성대조군(1.8 ± 0.50), HC-L (1.8 ± 0.50), HC-H (2.8 ± 0.50)에서 실험동물의 골절이 일어난 병변 부위에서 ALP의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었

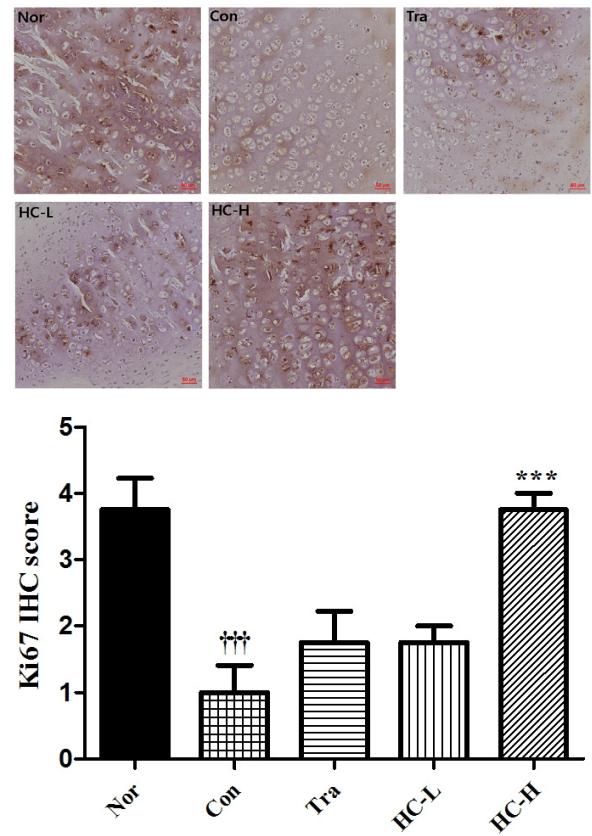


Fig. 11. IHC staining with Ki67 in rib fracture after 7 days. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 7 days. The damaged rats ribs were isolated and used for tissue slide specimen. The sliced bone tissue were incubated with Ki67 antibody and subjected to IHC. Magnification, ×200. IHC: immunohistochemistry, HC: *Hyeolbuchugeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day). ***Significantly different from normal ($p<0.001$), ***Significantly different from control ($p<0.001$).

다. HC-H에서 실험동물의 골절병변부위에서 대조군에 비해 ALP 발현세포들이 증가되는 것이 관찰되었지만 HC-L에서는 변화가 거의 없었다(Fig. 13).

골절 유발 14일 후에는 대조군(0.8 ± 0.50)과 양성대조군(1.5 ± 0.58)에서 골절이 일어난 실험동물의 병변 부위에서 큰 변화가 거의 없었다. 그러나 HC-L (2.3 ± 0.96)과 HC-H (2.0 ± 0.82)에서 실험동물의 골절병변 부위에서 대조군에 비해 ALP 발현이 증가되는 것이 관찰되었다(Fig. 14).

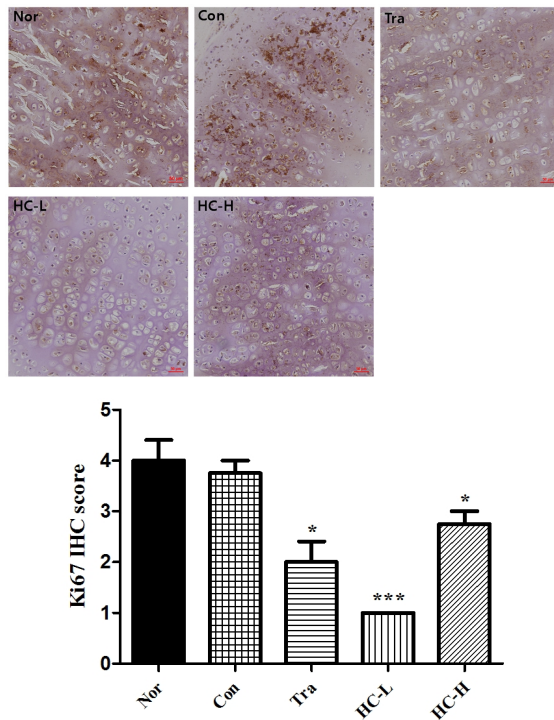


Fig. 12. IHC staining with Ki67 in rib fracture after 14 days. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 14 days. The damaged rats ribs were isolated and used for tissue slide specimen. The sliced bone tissue were incubated with Ki67 antibody and subjected to IHC. Magnification, $\times 200$. IHC: immunohistochemistry, HC: *Hyeolbugeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day). *Significantly different from control ($p < 0.05$), ***Significantly different from control ($p < 0.001$).

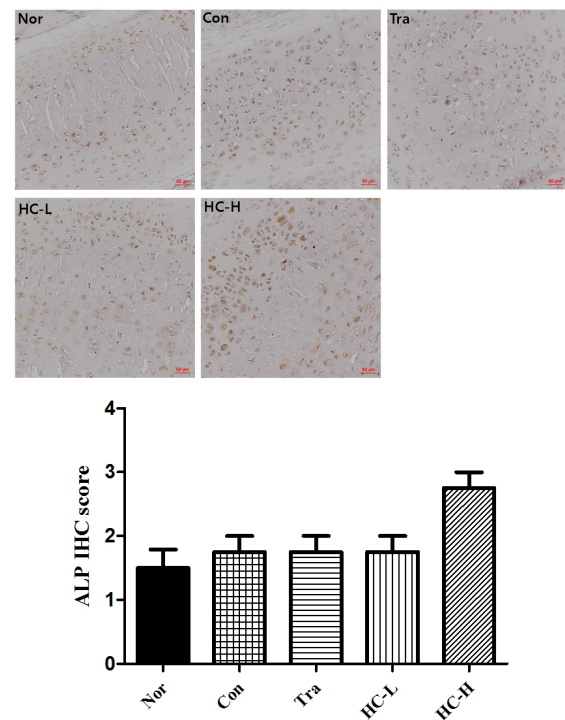


Fig. 13. IHC staining with ALP in rib fracture after 7 days. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 7 days. The damaged rats ribs were isolated and used for tissue slide specimen. The sliced bone tissue were incubated with ALP antibody and subjected to IHC. Magnification, $\times 200$. IHC: immunohistochemistry, ALP: alkaline phosphatase, HC: *Hyeolbugeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day).

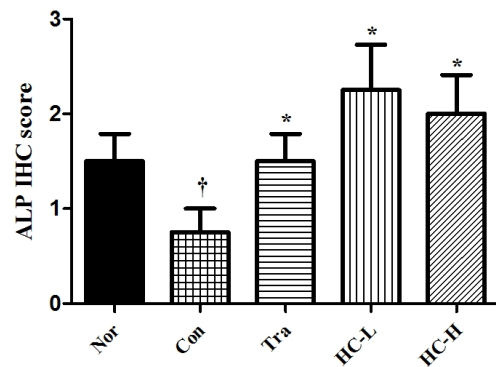
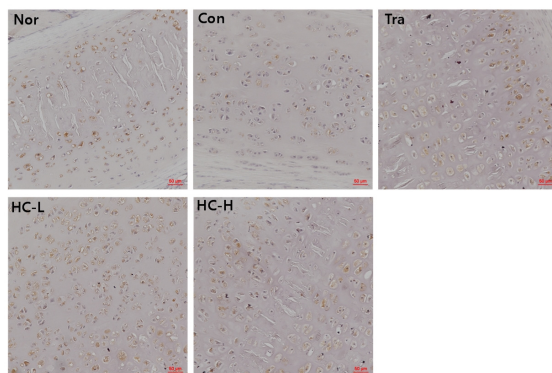


Fig. 14. IHC staining with ALP in rib fracture after 14 days. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 14 days. The damaged rats ribs were isolated and used for tissue slide specimen. The sliced bone tissue were incubated with ALP antibody and subjected to IHC. Magnification, $\times 200$. IHC: immunohistochemistry, ALP: alkaline phosphatase, HC: *Hyeolbugeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day). †Significantly different from normal ($p < 0.05$), *Significantly different from control ($p < 0.05$).

4) RANK

RANK에 대한 항체를 결합한 뒤 면역조직염색을 실시하고 현미경으로 관찰하였다. 그 결과 골절 유발 7일 후에는 대조군(2.5 ± 1.29)과 양성대조군(2.3 ± 1.26) 및 HC-L (2.3 ± 1.71), HC-H (3.3 ± 0.96)을 포함하여 골절이 일어난 병변 부위에서 RANK의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. HC-L에서 실험동물의 골절병변부위에서 대조군에 비해 RANK의 발현이 큰 변화가 없는 것으로 관찰되었지만 HC-H에서는 RANK 발현이 증가하는 것이 관찰되었다(Fig. 15).

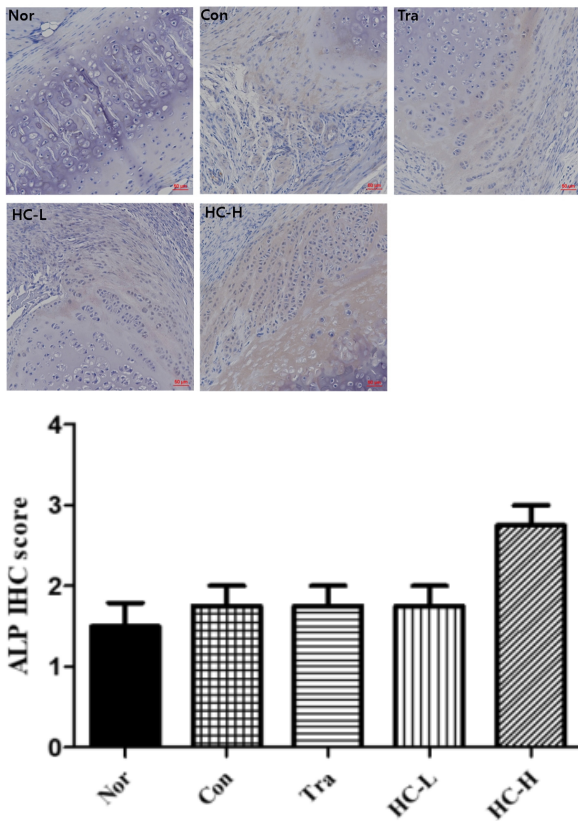


Fig. 15. IHC staining with RANK in rib fracture after 7 days. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 7 days. The damaged rats ribs were isolated and used for tissue slide specimen. The sliced bone tissue were incubated with RANK antibody and subjected to IHC. Magnification, $\times 200$. IHC: immunohistochemistry, RANK: receptor activator of nuclear factor kappa- β , HC: *Hyeolbuchugeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day).

골절 유발 14일 후에는 대조군(1.8 ± 1.26)을 포함한 양성대조군(1.3 ± 0.96)과 HC-L (1.3 ± 0.96), HC-H (2.0 ± 1.41)에서 골절이 일어난 실험동물의 병변 부위에 증가한 RANK 발현을 확인할 수 있었다. 또한 HC-L에서는 대조군에 비해 RANK의 발현이 감소하였고 HC-H에서 실험동물의 골절병변부위에서 대조군에 비해 RANK의 발현이 증가되는 것이 관찰되었다(Fig. 16).

5) Runx2

Runx2에 대한 항체를 결합한 뒤 면역조직염색을 실시하고 현미경으로 관찰한 결과 골절 유발 후 7일 후에

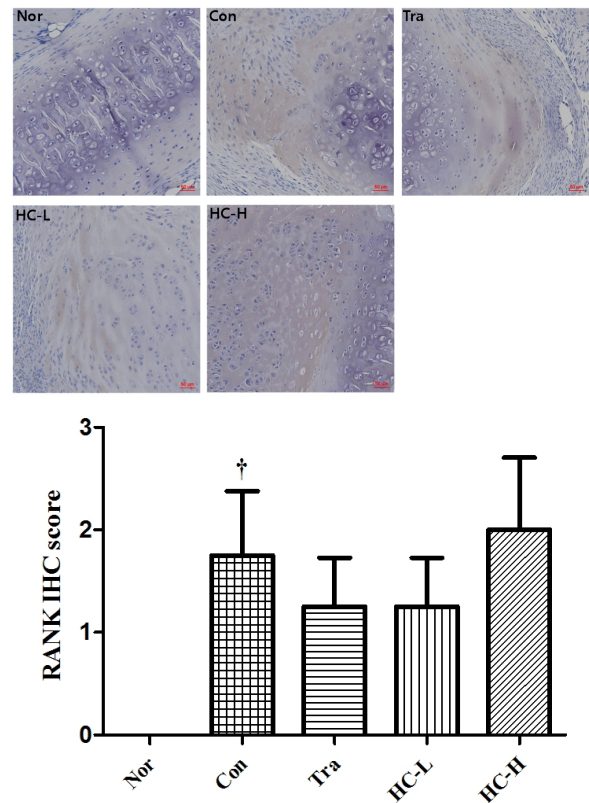


Fig. 16. IHC staining with RANK in rib fracture after 14 days. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 14 days. The damaged rats ribs were isolated and used for tissue slide specimen. The sliced bone tissue were incubated with RANK antibody and subjected to IHC. Magnification, $\times 200$. IHC: immunohistochemistry, RANK: receptor activator of nuclear factor kappa- β , HC: *Hyeolbuchugeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day). *Significantly different from normal ($p < 0.05$).

는 대조군(1.0 ± 0.82)과 양성대조군(0.3 ± 0.50)의 골절이 일어난 병변 부위에서 Runx2의 발현이 거의 변화가 없었다. HC-L (1.0 ± 1.15) 또한 대조군에 비해 발현 변화가 거의 없었으며, HC-H (2.3 ± 0.96)에서는 실험동물의 골절병변부위에서 대조군에 비해 Runx2 발현이 증가되는 것이 관찰되었다(Fig. 17).

골절 유발 후 14일 후에는 대조군(1.3 ± 0.50)과 양성대조군(0.5 ± 0.58) 및 HC-L (2.5 ± 0.58), HC-H (1.3 ± 0.50)을 포함하여 골절이 일어난 실험동물의 병변 부위에서 증가한 Runx2의 발현을 확인할 수 있었다. HC-L에서는

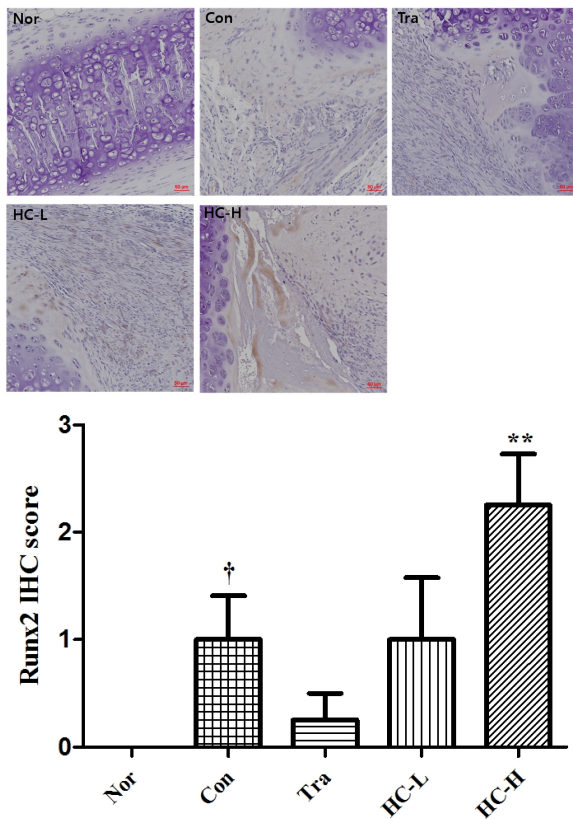


Fig. 17. IHC staining with Runx2 in rib fracture after 7 days. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 7 days. The damaged rats ribs were isolated and used for tissue slide specimen. The sliced bone tissue were incubated with Runx2 antibody and subjected to IHC. Magnification, $\times 200$. IHC: immunohistochemistry, Runx2: runt-related transcription factor 2, HC: *Hyeolbuchugeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day). [†]Significantly different from normal ($p < 0.05$), ^{**}Significantly different from control ($p < 0.01$).

Runx2 발현이 증가되는 것이 관찰되었고, HC-H에서는 대조군에 비해 Runx2의 발현이 큰 변화는 없는 것으로 관찰되었다(Fig. 18).

6) TRAP

TRAP에 대한 항체를 결합한 뒤 면역조직염색을 실시하고 현미경으로 관찰한 결과 골절 유발 7일 후에는 대조군(2.3 ± 0.50)과 양성대조군(3.5 ± 0.58) 및 HC-L (2.5 ± 0.58), HC-H (1.3 ± 0.50)을 포함한 실험동물의 골절이 일어난 병변 부위에서 TRAP의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 HC-H에서 실험동물의 골절병변부위

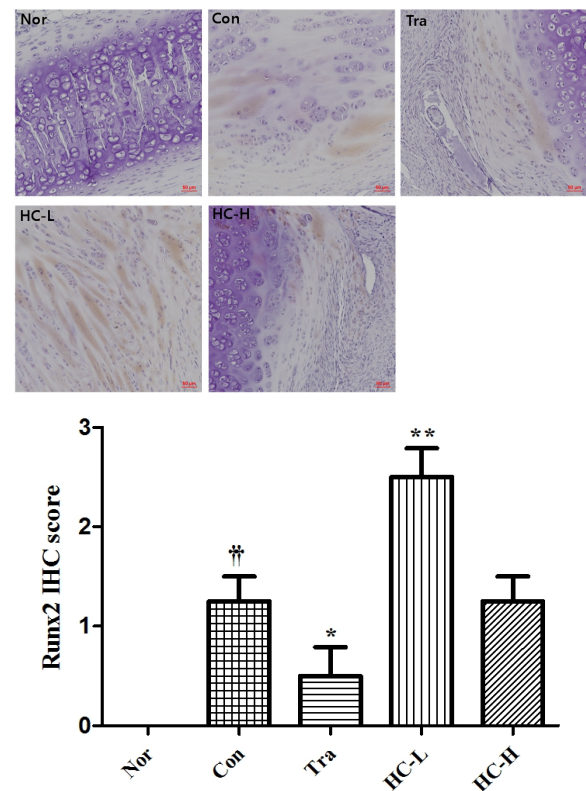


Fig. 18. IHC staining with Runx2 in rib fracture after 14 days. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 14 days. The damaged rats ribs were isolated and used for tissue slide specimen. The sliced bone tissue were incubated with Runx2 antibody and subjected to IHC. Magnification, $\times 200$. IHC: immunohistochemistry, Runx2: runt-related transcription factor 2, HC: *Hyeolbuchugeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day). ^{††}Significantly different from normal ($p < 0.01$), ^{*}Significantly different from control ($p < 0.05$), ^{**}Significantly different from control ($p < 0.01$).

에서 대조군에 비해 TRAP 발현세포들이 감소되는 것이 관찰되었다(Fig. 19).

골절 유발 후 14일 후에는 대조군(0.3 ± 0.50)과 양성 대조군(2.0 ± 0.82) 및 HC-L (2.5 ± 1.29), HC-H (3.0 ± 0.82)을 포함하여 골절이 일어난 실험동물의 병변 부위에서 확연하게 감소한 TRAP 발현을 확인할 수 있었다. 또한, HC-L과 HC-H에서 실험동물의 골절병변부위에서 대조군에 비해 TRAP 발현세포들이 증가되는 것이 관찰되었다(Fig. 20).

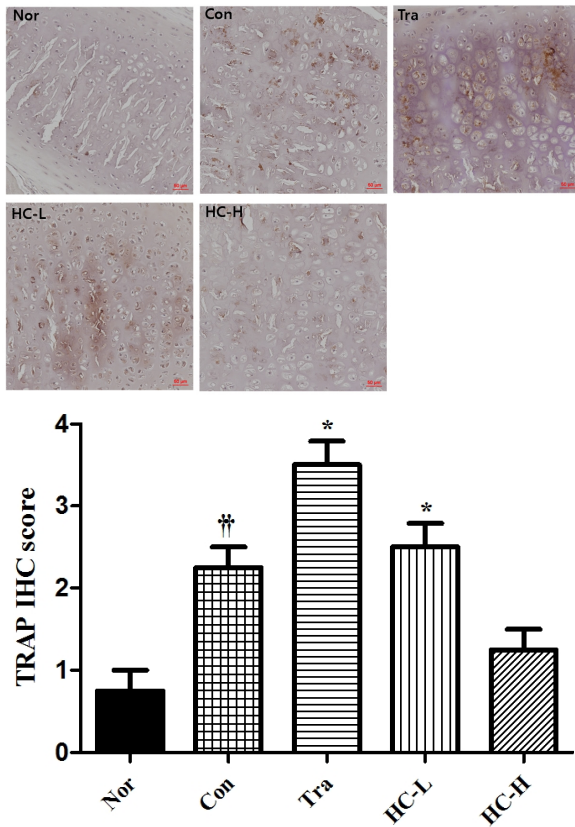


Fig. 19. IHC staining with TRAP in rib fracture after 7 days. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 7 days. The damaged rats ribs were isolated and used for tissue slide specimen. The sliced bone tissue were incubated with TRAP antibody and subjected to IHC. Magnification, $\times 200$. IHC: immunohistochemistry, TRAP: tartrate resistant acid phosphatase, HC: *Hyeolbuchugeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day). **Significantly different from normal ($p < 0.01$), *Significantly different from control ($p < 0.05$).

4. 안전성 검사

1) 간독성 평가

(1) ALP

골절 유발 7일 후 ALP 수치는 정상군에서 320.3 ± 31.73 이었을 때 대조군은 267.2 ± 24.0 으로 정상군에 비해 감소하였다. 양성대조군은 229.5 ± 20.66 으로 정상군과 대조군에 비해 감소하였으며, HC-L은 271.6 ± 37.26 으로 정상군에 비해서는 감소하였지만 대조군에 비해서는 변화가 거의 없었다. HC-H는 198.2 ± 20.00 으로 정상군

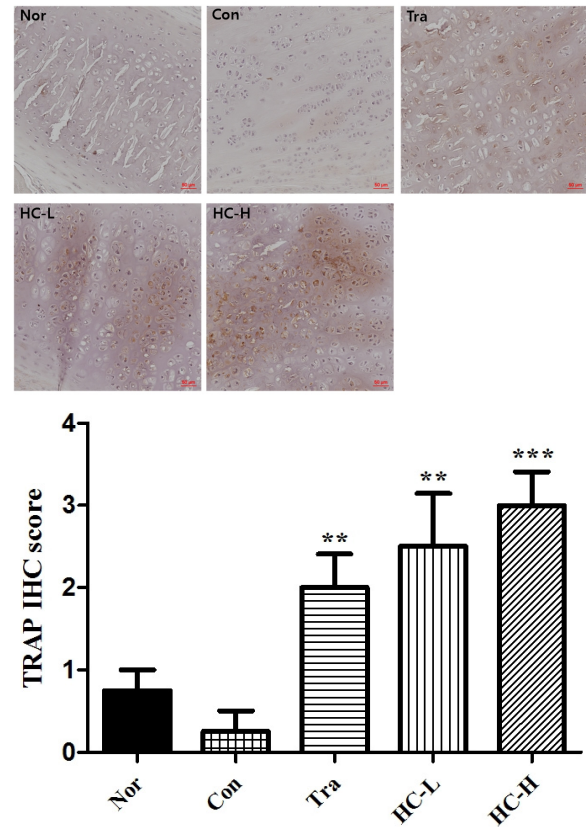


Fig. 20. IHC staining with TRAP in rib fracture after 14 days. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 14 days. The damaged rats ribs were isolated and used for tissue slide specimen. The sliced bone tissue were incubated with TRAP antibody and subjected to IHC. Magnification, $\times 200$. IHC: immunohistochemistry, TRAP: tartrate resistant acid phosphatase, HC: *Hyeolbuchugeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day). **Significantly different from control ($p < 0.01$), ***Significantly different from control ($p < 0.001$).

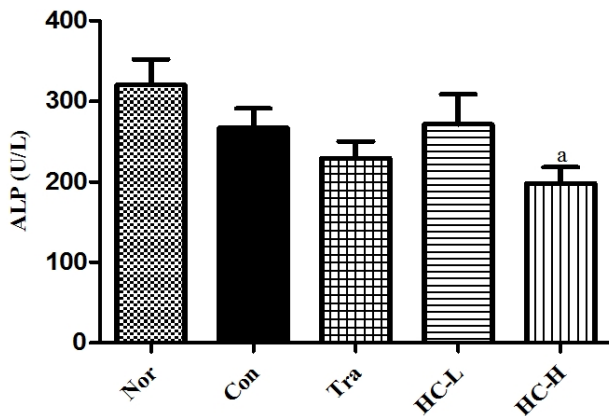


Fig. 21. Level of ALP in serum of rib fracture model of rats after 7 days. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 7 days. The level of ALP was measured by biochemical analyzer. The result were presented by the mean±standard error of the mean. ALP: alkaline phosphatase, HC: *Hyeolbuchugeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day). ^aSignificantly different from normal ($p<0.05$).

에 비해 유의적으로 감소하였고, 대조군에 비해 역시 감소하였다(Fig. 21).

골절 유발 14일 후 ALP 수치는 정상군에서 320.3 ± 31.73 이었을 때 대조군은 281.2 ± 13.33 으로 정상군에 비해 감소하였다. 양성대조군은 217.8 ± 7.13 으로 정상군과 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으며, HC-L과 HC-H는 각각 253.6 ± 7.48 , 263.0 ± 31.69 로 정상군과 대조군에 비해 감소하였다(Fig. 22).

(2) ALT

골절 유발 7일 후 ALT 수치는 정상군에서 51.13 ± 2.31 이었을 때 대조군은 48.30 ± 3.39 로 정상군에 비해 감소하였다. 양성대조군은 56.47 ± 2.0 으로 정상군과 대조군에 비해 증가하였지만 유의하지 않았다. HC-L과 HC-H는 50.36 ± 2.03 , 52.42 ± 4.11 로 정상군과 대조군에 비해 거의 변화가 없었다(Fig. 23).

골절 유발 14일 후 ALT 수치는 정상군에서 51.13 ± 2.31 이었을 때 대조군은 46.26 ± 5.01 로 정상군에 비해 감소하였다. 양성대조군은 60.20 ± 5.83 으로 정상군과 대조군에 비해 증가하였으며, HC-L은 43.24 ± 5.58 로 정상군과 대조군에 비해 감소하였고, HC-H는 50.86 ± 5.82 로 정상군과 비슷하지만 대조군에 비해 증가하였다(Fig. 24).

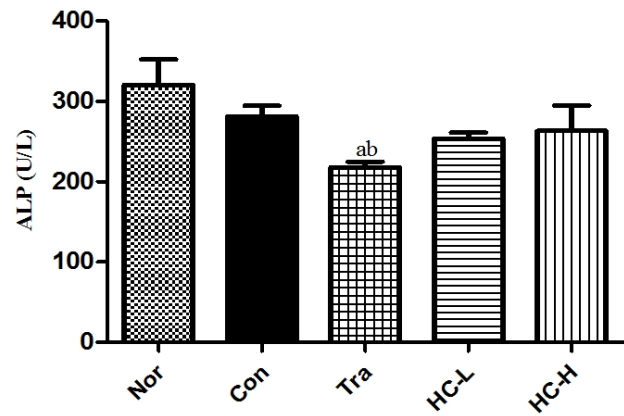


Fig. 22. Level of ALP in serum of rib fracture model of rats after 14 days. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 14 days. The level of ALP was measured by biochemical analyzer. The result were presented by the mean±standard error of the mean. ALP: alkaline phosphatase, HC: *Hyeolbuchugeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day). ^aSignificantly different from normal ($p<0.05$), ^bSignificantly different from control ($p<0.05$).

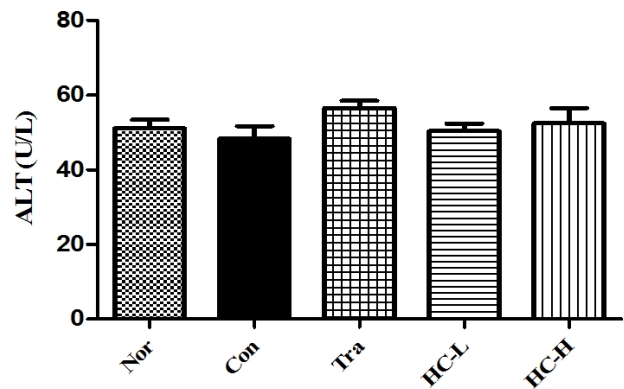


Fig. 23. Level of ALT in serum of rib fracture model of rats after 7 days. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 7 days. The level of ALT was measured by biochemical analyzer. The result were presented by the mean±standard error of the mean. ALT: alanine aminotransferase, HC: *Hyeolbuchugeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day).

(3) AST

골절 유발 7일 후 AST 수치는 정상군에서 73.83 ± 7.21 이었을 때 대조군은 71.72 ± 5.74 로 정상군에 비해 감소

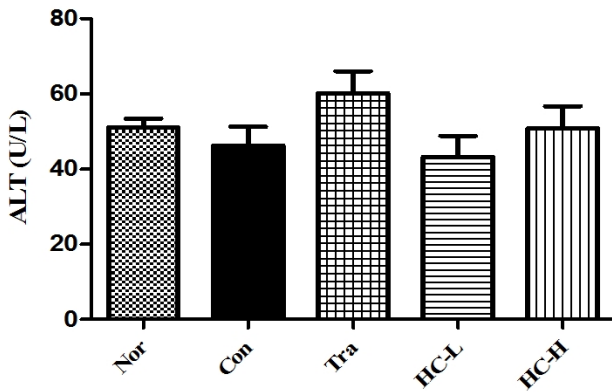


Fig. 24. Level of ALT in serum of rib fracture model of rats after 14 days. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 14 days. The level of ALT was measured by biochemical analyzer. The result were presented by the mean±standard error of the mean. ALT: alanine aminotransferase, HC: *Hyeolbuchugeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day).

하였다. 양성대조군은 117.3 ± 12.70 으로 정상군과 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다. HC-L과 HC-H에서는 각각 105.3 ± 14.87 과 89.08 ± 5.82 로 정상군과 대조군에 비해 증가하였으나 유의하지는 않았다(Fig. 25).

골절 유발 14일 후 AST 수치는 정상군에서 73.83 ± 7.21 이었을 때 대조군은 81.72 ± 13.11 로 정상군에 비해 증가하였다. 양성대조군은 98.00 ± 11.63 으로 정상군과 대조군에 비해 증가하였으나 유의하지 않았고, HC-L과 HC-H 또한 각각 102.2 ± 11.72 , 94.18 ± 15.17 로 정상군과 대조군에 비해 증가하였으나 유의적이지는 않았다(Fig. 26).

2) 신독성 평가

(1) Creatinine

골절 유발 7일 후 creatinine 수치는 정상군에서 0.32 ± 0.02 이었을 때 대조군은 0.26 ± 0.01 로 정상군에 비해 유의적으로 감소하였다. 양성대조군은 0.20 ± 0.02 로 정상군과 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으며, HC-L은 0.28 ± 0.03 으로 정상군에 비해 감소하였지만 대조군에 비해서는 증가하였고, HC-H는 0.23 ± 0.02 로 정상군에 비해 유의적으로 감소하였고, 대조군에 비해서도 감소하였다(Fig. 27).

골절 유발 14일 후 creatinine 수치는 정상군에서 0.32 ± 0.02 이었을 때 대조군은 0.24 ± 0.03 으로 정상군에 비해 감소

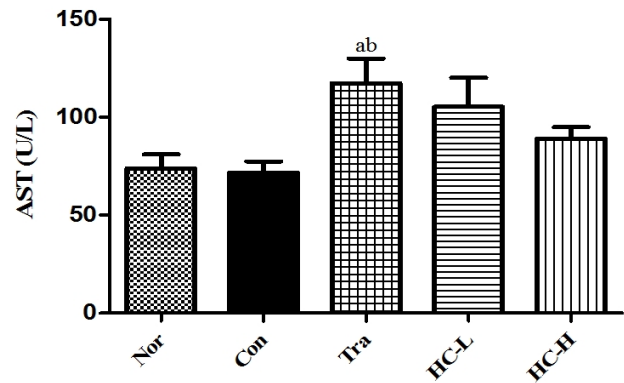


Fig. 25. Level of AST in serum of rib fracture model of rats after 7 days. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 7 days. The level of AST was measured by biochemical analyzer. The result were presented by the mean±standard error of the mean. AST: aspartate aminotransferase, HC: *Hyeolbuchugeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day). ^aSignificantly different from normal ($p < 0.05$), ^bSignificantly different from control ($p < 0.05$).

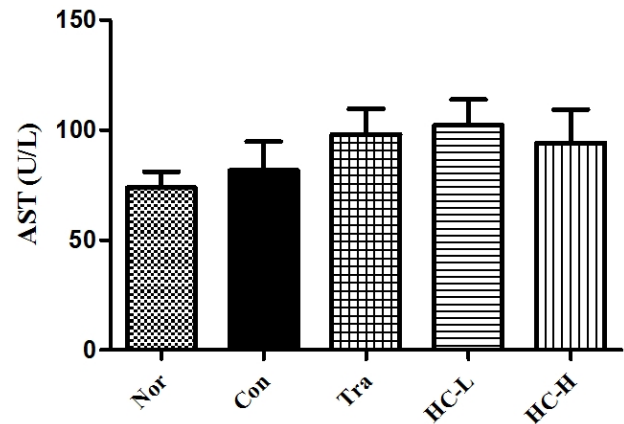


Fig. 26. Level of AST in serum of rib fracture model of rats after 14 days. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 14 days. The level of AST was measured by biochemical analyzer. The result were presented by the mean±standard error of the mean. AST: aspartate aminotransferase, HC: *Hyeolbuchugeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day).

하였으며, 양성대조군은 0.25 ± 0.02 로 정상군에 비해 유의적으로 감소하였다. HC-L은 0.29 ± 0.02 으로 정상군에 비해서는 감소하였지만 대조군에 비해서는 증가하였고

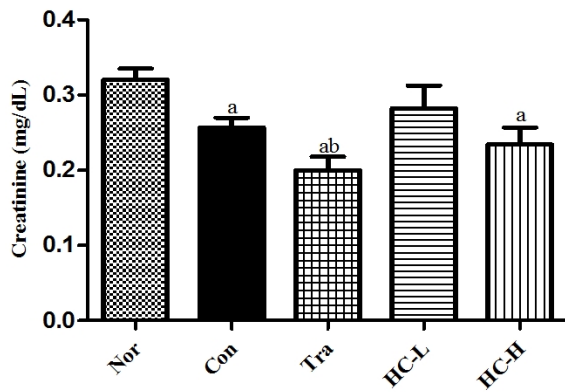


Fig. 27. Level of creatinine in serum of rib fracture model of rats after 7 days. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 7 days. The level of creatinine was measured by biochemical analyzer. The result were presented by the mean±standard error of the mean. HC: *Hyeolbucheogeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day). ^aSignificantly different from normal ($p<0.05$), ^bSignificantly different from control ($p<0.05$).

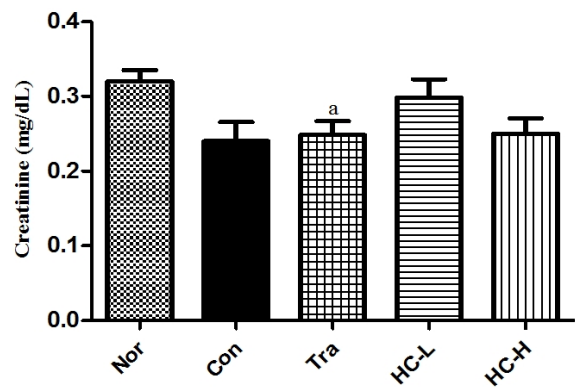


Fig. 28. Level of creatinine in serum of rib fracture model of rats after 14 days. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 14 days. The level of creatinine was measured by biochemical analyzer. The result were presented by the mean±standard error of the mean. HC: *Hyeolbucheogeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day). ^aSignificantly different from normal ($p<0.05$).

HC-H는 0.25 ± 0.02 로 대조군과 거의 비슷하였다(Fig. 28).

(2) BUN

골절 유발 7일 후 BUN 수치는 정상군에서 18.20 ± 1.06 이었을 때 대조군은 16.68 ± 0.76 으로 정상군에 비해 감소하였다. 양성대조군은 13.27 ± 0.90 으로 정상군과 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으며, HC-L은 17.64 ± 0.42 로 대조군과 비슷하였고 HC-H는 14.80 ± 1.27 로 정상군과 대조군에 비해 감소하였다(Fig. 29).

또한, 골절 유발 14일 후 BUN 수치는 정상군에서 18.20 ± 1.06 이었을 때 대조군은 17.98 ± 0.26 으로 정상군에 비해 감소하였다. 양성대조군은 16.03 ± 0.57 로 정상군과 대조군에 비해 감소하였으며, HC-L은 21.36 ± 1.01 로 정상군과 대조군에 비해 증가하였고, HC-H는 16.46 ± 0.72 로 정상군과 대조군에 비해 매우 약하게 감소하였다(Fig. 30).

5. Osteocalcin

Osteocalcin 수치는 정상군에서 5.71 ± 0.74 이었을 때 대조군은 4.11 ± 0.40 으로 정상군에 비해 감소하였고, 양성대조군 또한 4.146 ± 0.51 로 대조군과 비슷한 수치를 나

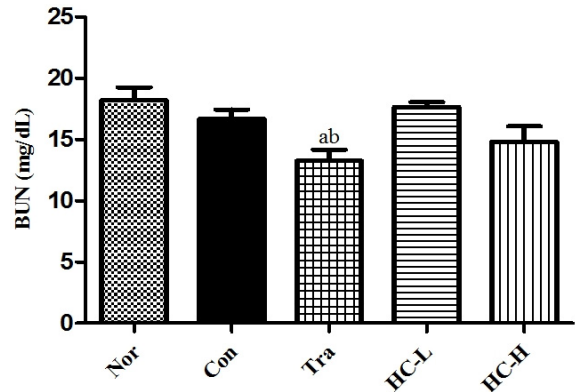


Fig. 29. Level of BUN in serum of rib fracture model of rats after 7 days. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 7 days. The level of BUN was measured by biochemical analyzer. The result were presented by the mean±standard error of the mean. BUN: blood urea nitrogen, HC: *Hyeolbucheogeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day). ^aSignificantly different from normal ($p<0.05$), ^bSignificantly different from control ($p<0.05$).

타내었다. HC-L은 3.74 ± 0.29 로 정상군과 대조군에 비해 감소하였다. HC-H는 4.59 ± 0.32 로 정상군에 비해서는 감소하였지만 대조군에 비해서는 증가하였다(Fig. 31).

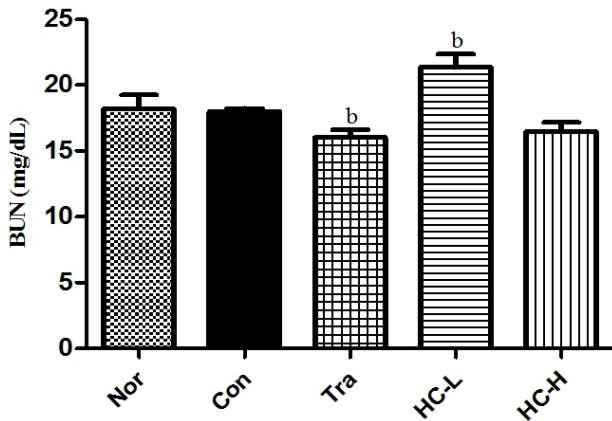


Fig. 30. Level of BUN in serum of rib fracture model of rats after 14 days. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 14 days. The level of BUN was measured by biochemical analyzer. The result were presented by the mean±standard error of the mean. BUN: blood urea nitrogen, HC: *Hyeolbuchugeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day). ^bSignificantly different from control ($p<0.05$).

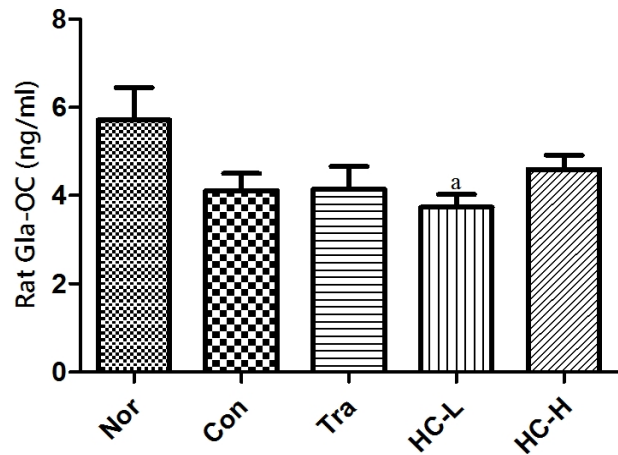


Fig. 31. Level of osteocalcin in serum of rib fracture model of rats after 14 days. Sprague Dawley rats were subjected to rib fracture and orally administered with HC (50 mg/kg/day and 100 mg/kg/day) for 14 days. The level of osteocalcin was measured by commercially available ELISA kit. The result were presented by the mean±standard error of the mean. HC: *Hyeolbuchugeo-tang*, Nor: normal, no fracture, Con: control, rib fracture with vehicle, Tra: rib fracture with tramadol (20 mg/kg/day), HC-L: rib fracture with HC (50 mg/kg/day), HC-H: rib fracture with HC (100 mg/kg/day). ^aSignificantly different from normal ($p<0.05$).

고찰»»»»

골절이란 과부하 등 여러 원인으로 인해 뼈의 연속성이 소실된 상태를 말한다. 뼈 주위의 연부조직 손상과 함께 통증을 유발하며 신경 및 혈관의 손상이 동반되기도 하고 외관상 변형을 초래하기도 한다. 대부분은 방사선 검사로 확진이 가능하며 정확한 진단을 내리기 어려운 경우 전산화단층촬영(CT)를 사용하기도 한다¹⁾.

골절의 유합 과정은 염증기, 복원기, 재형성기 등 3단계로 나눌 수 있으며 복원기는 연성 가골기와 경성 가골기로 나눌 수 있다³⁾. 염증기때 파열된 혈관에서 혈종과 염증성 삼출물이 발생하여 골절 부위의 움직임을 급격하게 감소시키고 혈소판이 모여 혈전 및 응고 작용이 진행된다. 이후 섬유모세포와 골모세포에 의해 육아조직이 형성되며 이는 골절 부위의 혈종을 대체한다¹⁴⁾. 연성가골기는 대체로 골절 후 3주 정도의 기간에 일어나며 혈종으로 인한 통증과 부종이 감소하면서 골편이 움직이지 않는다¹⁵⁾. 연골세포 발현유전자와 골모세포 발현유전자는 발현을 통해 각각 연골과 뼈로 분리되며 골모세포는 손상이 덜 심한 골절의 끝단에서 뼈의 표면

을 따라 직접 뼈를 형성하게 되고, 연골은 손상이 가장 심한 골절의 중심부인 저산소 영역에서 형성된다¹⁶⁾. 경성가골기에는 가골들이 연골 내 골화와 막내 골화를 통해 견고한 석회성 조직으로 전환된다¹⁷⁾.

쥐나 토끼는 동물모델로 다용되며 이들은 외상 후 7~9일에 연성가골의 형성이, 14일에 경성가골의 형성이 최고치에 이른다¹⁸⁾. 가골기가 지난 후에는 재형성기가 진행된다. 경성가골이 층판골로 대체되고, 과잉 생성된 골은 파골세포에 의해 흡수되며 파골세포와 조골세포의 자가 교정을 통해 골이 재형성되고 본래의 형태를 갖춘다²⁾. 재형성기는 사람과 동물 모델 모두 3-4주 사이에 시작되나, 완전한 골격 구조로 돌아가기까지는 몇 년의 시간이 소요된다. 이 4가지 단계의 골 유합 과정은 연속적으로 중첩되며 진행된다^{1,19)}.

한의학에서 골절은 《外臺秘要》에서 처음으로 언급되었으며 《諸病源候論》과 《千金要方》에서 정복과 고정 방법을 제시했고, 《聖濟總錄》에서는 약물을 활용하여 초기에는 活血祛瘀, 중기에는 接骨續筋, 후기에는 補氣養血, 健壯筋骨을 치료 방법으로 제시하였다¹⁷⁾. 이

는 한의학에서 초기 골절 치료에 瘀血을 없애는 것이 중요하다는 사실을 시사한다²⁰⁾.

혈부축어탕은 王淸任의 《醫林改錯》⁶⁾ 처음 기재된 처방으로 血分의 瘀滯를 行하게 하는 약물이 주를 이루며 氣分의 鬱結를 풀고 活血하면서도 耗血하지 않고 祛瘀生新하는 효능이 있는 처방이다. 혈부축어탕은 원래 氣滯血瘀·瘀血內阻를 원인으로 하는 질병들에 적용하고자 창방되었으나 현재에는 瘀血로 인한 여러 증상에 다양하게 적용되고 있다. 처방 구성은 當歸, 生地黃, 川芎, 桃仁, 紅花, 赤芍藥, 牛膝, 桔梗, 柴胡, 枳殼, 甘草로 구성되어 있는데 活血化瘀하면서 補血의 효능을 가지고 있는 桃紅四物湯을 기본으로 하여 行氣藥인 四逆散과 牛膝, 桔梗을 가하고 熟地黃을 生地黃으로 바꾸었다²¹⁾. 각 구성 약물별 효능을 살펴보면 當歸는 補血하면서 活血化瘀하고 生地黃은 清熱涼血하는 효능으로 當歸와 함께 養血潤燥하므로 祛瘀시켜도 陰血을 손상시키지 않게 하고 桃仁, 川芎, 赤芍藥, 紅花는 活血祛瘀하고, 牛膝은 瘀血을 祛하고 血脈을 통하게 하여 引血下行하면서 肝腎을 補養하여 強筋骨하고, 柴胡는 疏肝解鬱, 桔梗과 枳殼은 開胸行氣하며 감초는 諸藥을 조화시킨다^{21,22)}.

이에 본 실험에서는 혈부축어탕이 골절로 인한 瘀血을 제거하고 골절 부위의 혈류 순환을 개선시켜 祛瘀生新하는 효능으로 골절 유합에 유의하게 작용할 것이라는 가설을 세우고 이를 평가하였다.

혈부축어탕이 골절 유합에 미치는 영향을 파악하기 위하여 실험동물을 무작위로 정상군(Nor), 대조군(Con), 양성대조군(Tra)에 6마리씩, 약물 투여군을 저농도군(HC-L)과 고농도군(HC-H)으로 나눈 후 10마리씩 배속시키고 골절 후 1주와 2주에 치사하였다. 정상군은 늑골에 손상을 주지 않았고 나머지 군들은 실험동물의 늑골에 골절 손상을 주었다. 7일 후와 14일 후에 X-ray 촬영을 한 결과 골절 유발 7일 후에는 대조군을 포함한 모든 그룹에서 골절 부위가 회복되지 않았으나 HC-H에서 callus가 형성된 것을 확인할 수 있었다. 골절 유발 14일 후에는 7일 후와 마찬가지로 모든 그룹에서 골절 부위를 확인할 수 있었고 HC-H에서 골 유합이 진행되는 것을 관찰할 수 있었다.

골절의 유합 초기에는 조직 결손부와 혈종이 육아조직으로 바뀌며 결합조직이 증식하게 된다. 그 부위에 조골세포가 증식하여 뼈의 기질을 만든 것을 callus (가

골)이라고 하며 이는 골절 부위의 양 끝 뼈를 일시적으로 결합시킨다. 조골세포가 증식하여 만든 기질에 칼슘이 침착하게 되면 이는 초기골이 되어 골절 유합이 진행된다²³⁾. 이를 고려하였을 때 고농도의 HC가 골절 유합 과정에서 callus의 형성을 촉진시키며 골 유합을 빠르게 진행시키는 것을 알 수 있다.

Micro-CT 촬영에서 골절 유발 7일 후와 14일 후 모든 군에서 골절 부위를 확인할 수 있었다. 하지만 골절 유발 7일 후 HC-H에서 골 유합이 진행되고 있었고 골절 유발 14일 후 HC-L에서 골 유합이 진행되는 것을 관찰할 수 있었다. X-ray 촬영과 마찬가지로 micro-CT 촬영에서도 HC군의 골 유합이 빠르게 진행되는 것을 알 수 있었다. X-ray와 micro-CT 촬영을 관찰한 결과 HC 투여군이 대조군에 비해 골절의 유합을 촉진한다는 것을 확인할 수 있었다.

다음으로 골절의 조직을 H&E와 Safranin O 염색을 사용한 후 현미경으로 관찰하였다. H&E로 염색했을 때 골절 유발 7일 후 HC-L와 HC-H의 골절 부위에서 callus의 형성이 대조군과 양성대조군에 비해 증가되는 것이 관찰되었으며 골절 유발 14일 후에는 대조군에 비해 양성대조군 및 HC-L와 HC-H의 골절 부위에서의 callus의 형성이 감소되는 것이 관찰되었다. Safranin O로 염색했을 때 골절 유발 7일 후 callus의 형성이 HC-L에서 대조군에 비해 증가하는 것이 관찰되었고, 골절 유발 14일 후에는 H&E로 염색했을 때와 마찬가지로 대조군에 비해 양성대조군 및 HC-L와 HC-H의 골절 부위에서의 callus 형성이 감소하는 것이 관찰되었다. 이상의 조직학적 관찰 결과 HC가 callus의 증가시기를 대조군보다 빠르게 앞당겨 초기 골절 유합을 촉진시킨다는 것을 알 수 있었다.

TGF-β1은 연골세포와 골아세포에 의해 합성되어만 들어지는데 연골세포, 골아세포, 파골세포 등을 조절하는 인자로 작용하며 골 및 연골의 분화, 피부 반흔 조직의 생성, 태아의 생성 등에 관여해 골절 치유에 중요한 역할을 한다²⁴⁾. 골절 조직의 TGF-β1을 관찰한 결과, 골절 유발 7일 후 모든 군에서 TGF-β1의 발현이 정상군에 비하여 확연히 증가하였으나 HC-L과 HC-H에서 TGF-β1의 발현은 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 골절 유발 14일 후에는 HC-L와 HC-H의 TGF-β1의 발현이 대조군과 유의한 차이가 없었다. TGF-β1은 골모

세포의 분화, 증식에 관여하여 가골이 활발하게 만들어지는 복원기에 발현이 증가하고 재형성기로 접어들어 가골이 성숙골로 변화하면서 감소하는데²⁵⁾ 이를 X-ray 및 micro-CT의 결과와 연관지으면 HC군의 골유합이 대조군보다 빠르게 일어나 재형성기에 진입하여 초기 골절 유합 시기에 HC군의 TGF- β 1의 발현이 감소했다고 생각된다. 향후 3일 후와 5일 후 TGF- β 1 발현량의 결과를 비교한다면 더 정확한 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

Ki67는 세포주기 중에서 G1기를 제외한 모든 주기에서 세포의 핵에 발현하는 단백질이며 세포의 증식 상태를 직접적으로 나타내주는 표지자로 면역조직화학적 염색을 하여 양성으로 염색된 핵에서 관찰된다²⁶⁾. 골절 유발 7일 후 HC-L과 HC-H에서 Ki67 발현 세포들이 증가하는 것이 관찰되었고 그 중 HC-H에서 유의하게 증가했다. 골절 유발 14일 후에는 HC-L과 HC-H에서 대조군에 비해 Ki67 발현 세포들이 유의하게 감소하였다. Ki67 발현세포가 증가한다는 것은 세포 증식이 활발하다는 것을 의미하기 때문에 앞의 결과들과 마찬가지로 HC가 골절 초기에 세포 증식을 증가하게 하여 골절 유합에 도움을 준다는 사실을 알 수 있었다.

ALP는 임상에서 흔히 이용되는 골형성 표지자로 골아세포에서 분비되는 당단백질이다²⁷⁾. ALP는 유기인산 화합물을 가수분해하여 인산화 기질의 석회화를 촉진하는데 골아세포는 다량의 ALP를 활성화시키기 때문에 혈청 중 ALP의 증가는 골의 무기질화를 의미한다²⁸⁾. 골절조직의 ALP 발현을 관찰한 결과 골절 유발 7일 후에는 HC-H에서 대조군에 비해 ALP의 발현이 증가하였고, 골절 유발 14일 후에는 HC-L과 HC-H 모두 대조군에 비해 ALP의 발현이 유의하게 증가하였다. 골아세포가 분화하는 과정 중에 골기질이 성숙하는 시기에서 ALP가 주로 발현되는데²⁹⁾ 실험 결과 HC가 골기질의 성숙을 촉진시킨다는 사실을 알 수 있었다.

RANK는 파골세포를 분화 및 활성화시키는데 핵심적인 역할을 하는 분자구조물이다. 기질 세포에서 유래하는 조골세포에 주로 발현하는 receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL)은 RANK와 결합하여 파골세포의 분화와 성장에 핵심적인 역할을 하고 RANK는 조혈모 세포에서 기원하는 파골세포전구 세포에서 주로 발현한다³⁰⁾. 초기 파골전구세포 표면의

RANK에 RANKL이 결합하게 되면 nuclear factor kappa B 전사경로가 활성화되어 파골세포의 증식과 분화가 촉진되고 골수에서 증식된 파골세포 전구체가 골 표면으로 이동하여 융합과정을 거쳐 활성 파골세포가 된다. 활성 파골세포는 골 표면에 부착한 뒤 소강에 산성화를 일으켜 기질분해효소가 활성화되고 골의 탈무기질화가 일어난다^{31,32)}. 골절 유발 7일 후 RANK의 발현은 HC-L과 대조군이 큰 차이는 없었으며 HC-H에서는 RANK의 발현이 증가하는 것이 관찰되었으나 유의하지는 않았다. 골절 유발 14일 후에는 HC-L에서 대조군에 비해 RANK의 발현이 감소하였고 HC-H에서 RANK의 발현이 증가하였으나 둘 다 유의하지는 않았다. 이는 앞서 기술한 방사선 검사 결과와 TGF- β 1의 발현 결과를 고려할 때 골 유합 과정 중 염증기와 복원기를 지나 재형성기가 되어 파골세포와 조골세포의 자가교정이 진행되는 단계에서 RANK의 발현이 증가했다고 생각된다.

Runx2는 골아세포를 조절하고 중간엽줄기세포에서 골모세포가 분화하는데 있어서 필수적인 전사인자이며 뼈에 발현하는 여러 단백질들의 생성을 조절하여 골모세포와 연골세포 등의 분화를 촉진시킨다³³⁻³⁵⁾. 골절 유발 7일 후 HC-H에서 대조군에 비해 Runx2의 발현이 유의하게 증가하였고 골절유발 14일 후에는 HC-L에서 Runx2의 발현이 유의하게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 HC가 골절 유합 초기에 고농도로 사용되면 골모세포와 연골세포의 분화를 촉진한다는 것을 알 수 있고 이는 골 유합에 도움이 될 것으로 생각된다.

파골세포의 분화과정 중에 TRAP가 발현되는데 이는 골 기질내의 osteopontin과 bone sialoprotein의 탈인산화 과정에 관여하며 파골세포의 활성 및 분화를 나타내는 표지자로 이용된다³⁴⁾. 골절 유발 7일 후 모든 군에서 TRAP의 발현이 증가했는데 그 중 HC-L은 대조군에 비해 TRAP의 발현이 유의하게 증가했다. 골절 유발 14일 후에는 HC-L과 HC-H에서 대조군에 비해 TRAP의 발현이 유의하게 증가하였다. 이는 HC가 골절 초반에 파골세포가 활발하게 활동하는 것을 막아 주어 골절 유합을 돕는다는 것을 알 수 있으며 가골의 형성이 어느 정도 진행된 후에 이루어지는 재형성기에서 파골세포의 활동을 증가시켜 골의 형성이 이루어질 수 있게 돕는다는 사실을 알 수 있었다.

Osteocalcin은 뼈의 석회화 과정에 관여, 골아세포의 후기분화를 반영하는 지표로 골아세포에서 생산되며 뼈의 세포외기질에 축적되는데 새롭게 합성된 것 중에 약 30%가 혈중으로 방출되어 이를 측정하여 골 형성이 어느 정도 되었는지를 예측할 수 있다³⁶⁾. 골절 유발 14일 후 osteocalcin의 수치를 측정했는데 HC-L은 정상군과 대조군에 비해 감소하였지만 HC-H는 정상군에 비해서는 감소하였지만 대조군에 비해서는 증가하였다. 모두 유의한 차이는 없었으나 3일, 7일, 10일 등 14일보다 짧은 기간에 수치를 측정하는 추가 실험을 시행하면 HC가 osteocalcin에 미치는 영향을 보다 정확하게 확인할 수 있을 것이라고 생각된다.

혈부축어탕의 안전성 평가를 위해 골절 유발 7일 후와 14일 후에 혈액검사를 통하여 ALP, ALT, AST, BUN, creatinine 수치를 관찰하였다.

ALP는 뼈, 조직 내 장점막, 태반, 신장, 등에 분포하며 조골세포, 골세포, 비대연골세포에서 발견되는 효소이다. 이는 조직 중 영양분의 운반과 연관이 있는 곳에 풍부하게 있으며 근육이나 적혈구, 비화골성연골, 성숙된 결합조직에서는 발견되지 않는다³⁷⁾. 또한 담관 손상의 지표로서 종양, 간염, 간경화 등의 질환일 경우에 증가한다³⁸⁾. ALP 수치의 경우 골절 7일 후 HC-H에서 정상군에 비해 유의적으로 감소하였고 대조군에 비해서도 감소하였다. 골절 14일 후 HC-L과 HC-H는 정상군과 대조군에 비해 감소하였으나 유의한 차이는 없었다. ALP 수치는 대조군과 비교하였을 때 통계적으로 유의한 차이가 나지 않거나 수치가 감소하는 양상을 보여 HC가 ALP 수치를 상승시키지 않는다는 사실을 확인할 수 있었다.

간기능 검사 중 AST, ALT 검사를 기본적으로 사용하는데 간 실질 세포에 장애가 발생하게 되면 AST, ALT가 혈액으로 방출되기 때문에 AST, ALT의 증가는 간 손상을 의미한다고 볼 수 있다³⁹⁾. 골절 유발 7일 후 ALT 수치는 대조군과 큰 차이가 없었으며 골절 유발 14일 후 HC-L에서는 대조군에 비해 수치가 감소하였으나 HC-H에서는 대조군에 비해 증가한 양상을 보였으나 유의하지는 않았다. 향후 HC의 투여 기간을 길게 조절하여 추가적인 연구를 해 볼 필요가 있을 것으로 생각된다. 골절 유발 7일 후와 14일 후 모두 HC-L과 HC-H에서 AST 수치는 정상군과 대조군에 비해 증가

하였으나 유의하지 않았다. 이를 종합해 보았을 때 HC가 약물로 인한 급성 간 손상을 유발한다고 보기 어렵다고 판단된다.

Creatinine은 신체의 근육량에 따라 일정하게 수치가 유지되며 골격근에서 creatine phosphate가 무효소적 변환을 거쳐 생산되는 물질이다. BUN에 비해 신기능을 정확하게 반영하며 신기능이 저하될 경우 수치가 오른다⁴⁰⁾. 골절 유발 7일 후 HC-L은 정상군에 비해 creatinine 수치가 감소하였지만 대조군에 비해서는 증가하였고, HC-H는 정상군에 비해 유의적으로 감소하였고 대조군에 비해서도 감소하였다. 골절 유발 14일 후 HC-L은 정상군에 비해서는 감소하였지만 대조군에 비해서는 증가하였고 HC-H는 대조군과 거의 비슷하였다.

BUN 수치는 비교적 경미한 신손상에서는 민감하게 수치가 오르지 않으나 중등도 신기능 손상이 있을 경우 수치가 증가한다⁴⁰⁾. 골절 유발 7일 후 HC-L은 대조군과 비슷하였고 HC-H에서는 정상군과 대조군에 비해 감소하였으나 유의한 차이는 없었다. 골절 유발 14일 후에는 HC-L이 대조군에 비해 유의하게 증가하였고 HC-H는 정상군과 대조군에 비해 매우 약하게 감소하였는데 유의한 차이는 보이지 않았다.

HC를 투여하였을 때 creatinine의 유의한 차이는 없었으나 골절 유발 14일 후 HC-L의 BUN 수치가 유의하게 증가하였다. 하지만 골절 유발 14일 후 HC-H의 BUN은 유의한 변화를 보이지 않아 HC-L의 BUN 수치 상승이 HC에 의한 것인지 정확하게 파악하기 어려웠다. 향후 이에 대한 연구가 필요할 것으로 생각한다.

이상의 내용을 종합해보면 모든 실험 수치들이 통계적인 유의성을 보이지 않았으나 형태학적 변화 및 조직학적 관찰 결과 혈부축어탕이 골절 유합에 긍정적으로 작용한다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 혈부축어탕을 瘀血로 인한 골절 초기 치료에 임상적으로 응용할 수 있을 것으로 생각한다.

결론»»»

혈부축어탕(HC)이 골절 유합에 미치는 영향을 평가하기 위하여 Sprague Dawley rat에 늑골 골절을 유발한 뒤 영상의학 검사, 조직학적 관찰 및 혈액검사 등을 시

행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. X-ray 촬영 결과 골절 유발 7일 후에 HC-H에서 callus가 관찰되었고 14일 후에는 골유합이 진행되었다.
 2. Micro-CT 촬영 결과 골절 유발 7일 후에 HC-H에서 골유합이 진행되었고 14일 후에는 HC-L에서 골유합이 진행되었다.
 3. H&E와 Safranin O 염색 결과 골절 유발 7일 후 HC군 callus의 형성이 증가하였으며 14일 후에는 감소하였다.
 4. TGF- β 1의 발현은 골절 유발 7일 후 HC-L과 HC-H가 대조군에 비해 유의하게 감소하였고 14일 후에는 유의한 차이가 없었다.
 5. Ki67의 발현은 골절 유발 7일 후 HC-H가 대조군에 비해 유의하게 증가하였고 14일 후에는 HC-L과 HC-H 모두 대조군에 비해 유의하게 감소하였다.
 6. ALP 발현은 골절 유발 7일 후 유의한 차이가 없었고 14일 후에는 HC-L과 HC-H 모두 대조군에 비해 유의하게 증가하였다.
 7. RANK 발현은 골절 유발 7일 후와 14일 후 모두 유의한 차이가 없었다.
 8. Runx2는 골절 유발 7일 후 HC-H가 대조군에 비해 유의하게 증가하였고 14일 후에는 HC-L이 대조군에 비해 유의하게 증가하였다.
 9. TRAP은 골절 유발 7일 후 HC-L에서 대조군에 비해 유의하게 증가했고 14일 후에는 HC-L과 HC-H 모두 대조군에 비해 유의하게 증가하였다.
 10. Osteocalcin은 골절 유발 14일 후에 유의한 차이가 없었다.
 11. 골절 유발 7일 후와 14일 후에 ALP, ALT, AST, BUN, creatinine 수치를 관찰하였으며 14일 후 HC-L에서 BUN 수치가 유의하게 증가하였다.
- 이상과 같이 영상 및 조직학적 평가를 통하여 혈부축어탕이 골절 유합에 효과가 있음을 알 수 있었다.

References>>>>

1. The Korean Orthopaedic Association. Orthopaedics. 7th ed. Seoul:ChoiSin Medical Publishing Co. 2013:87,

- 94-9, 1149-86, 1161-2, 1385-94, 1474, 1153-75.
2. Seoul National University College of Medicine Department of Orthopaedic. Textbook of fractures and joint injuries. Seoul:Koonja Publishing Co. 2001:105.
3. Lee HK, Chung MS, Gang SY. Basic study on the effect of Korean Ginseng upon fracture healing of the bone. The Journal of the Korean Orthopaedic Association. 1984;19(3):483-91.
4. Park MS. Fracture and dislocation. Seoul:Korea Medical Book Publishing Company. 2000:11-2.
5. The Society of Korean Medicine Rehabilitation. Korean Rehabilitation Medicine. 4th ed. Paju:Koonja Publishing. 2015:206-9.
6. Wang CR. Yilingaicao. Běijīng:Zhongguo Zhongyiyao Chubanshe. 1995:24-8.
7. The Herbal Formula Science. Hongkong:The Commercial Press Limited. 1977:177.
8. Moon NY, Kim DC, Baek SH. Effect of Hyeolbuchukeotang on the inhibition of proliferation of uterine leiomyoma cells and cell apoptosis. The Journal of Oriental Gynecology. 2006;19(2):186-98.
9. Jang SB, Yoo DY, Yoo JE. Effects of Hyeolbuchugeo-tang on osteoclast differentiation and bone resorption. The Journal of Oriental Gynecology. 2017;30(4):1-17.
10. Bae SJ, Kim HJ, Lee DN. Effects of Hyeolbuchukeo-tang on the estradiol valerate-induced polycystic ovaries and the conception of rats. The Journal of Oriental Gynecology. 2012;25(2):43-65.
11. Cho EH, Kwon JN, Kim YG. Neuroprotective effects of Hyeolbuchookau-tang on global cerebral ischemia of the rats. Journal of Korean Medicine. 2007;28(2):44-53.
12. Jung YG, Kim SW, Gong DJ, An HG, Kim GW, Koo BS. Study on the regenerative and inhibitory effect of CT105-induced neuroblastoma cell lines by Hyeolbuchukeo-tang water extract. Journal of Oriental Neuropsychiatry. 2004;15(1):65-76.
13. Lee BJ, Yun SY, Park HW, Park JH, Jo IY, Lee JS, Lew JH. Effects of concurrent administration of Hyeolbuchukeo-tang and aspirin on atherosclerosis in the ApoE(-/-) mouse. Journal of Korean Medicine. 2011;32(1):164-74.
14. The Korean Fracture Society. Principles of fracture management. Seoul:Panmuneducation. 2013:3, 10, 40.
15. Brinker ML, Cook SD, Hyman AL. Pharmacological regulation of the circulation of bone. Journal of Bone and Joint Surgery. 1990;72:964-75.
16. Michael H, Regis JO. The convergence of fracture repair and stem cells: interplay of genes, aging, environmental factors and disease. Journal of Bone and Mineral Research. 2014;11(29):2307-22.
17. Rehabilitation Medicine of Korean Medicine. Oriental Rehabilitation Medicine. 3rd ed. Paju:Koonja Publishing.

- 2011:201-4, 206-10.
18. Einhorn TA. The science of fracture healing. *Journal of Orthopedic Trauma*. 2005;19:S4-S6.
19. Wendeberg B. Mineral metabolism of fractures of the tibia in man studied with external counting of Sr85. *Acta Orthopaedica Scandinavica. Supplementum*. 1961;52:1-79.
20. Na CS. General theory of Korean medicine. Seoul: Uisungdang. 2007:912-6.
21. Nationwide Professors of Herbal Formula Study Co-edit. The herbal formula study. Seoul:Yunglim Publisher. 2008:410-3.
22. Oriental Medicine Textbooks Compiled by the National Joint Council. *Herbology*. Seoul:Younglim Inc. 2010:462-3, 629-31, 447, 231, 236-8, 466-7, 496-7, 186-7, 393-4, 583-5.
23. Song K. Core pathology. Seoul:Korea Medical Book Publishing Company. 1998:772.
24. Matsumoto K, Matsunaga S, Imamura T, Ishidou Y, Yoshida H, Sakou T. Expression and distribution of transforming growth factor- β and decorin during fracture healing. *In Vivo*. 1994;8:215-20.
25. Kang SY, Jung HJ, Jung YB. Matrix metalloproteinase-1 and transforming growth factor- β 1 expression during distraction osteogenesis and fracture healing of the rat. *The Journal of the Korean Orthopaedic Association*. 2008;43(5):529-38.
26. Cattoretti G, Becker MHG, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant part of the Ki-67 antigen(MIB-1 and MIB-3) detect proliferating cell in microwave processed formalin fixed paraffin section. *Journal of Pathology*. 1992;168:357-63.
27. Kim DY. Biochemical markers of bone formation. *Korean Journal of Bone Metabolism*. 1994;1(1):233-9.
28. Yoo J, Johnstone B. The role of osteochondral progenitor cells in fracture repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 1998;335:73-81.
29. Lee HS, Lee CS, Jang JS, Lee JD, Um SM. Changes of serum alkaline phosphatase and osteocalcin during fracture healing. *The Journal of the Korean Orthopaedic*. 2002;37(3):411-5.
30. Joo YS, Cheong MA, Sheen DH, Lim MK, Shim SC, Cheong DH. Expression of receptor activator of NF- κ B Ligand(RANKL) and formation of osteoclast in cultured synovial fibroblasts. *The Journal of the Korean Rheumatism Association*. 2003;10(4):402-12.
31. Vinay K, Abul A, Jon A. Robbins basic pathology. Philadelphia:Elsevier Inc. 2007:804-6.
32. Korean Society for Bone and Mineral Research. Osteoporosis. Paju:Koonja Publishing. 2013:55-91.
33. Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, Amling M, Karsenty G. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes & Development*. 1999;13(8):1025-36.
34. Kern B, Shen J, Starbuck M, Karsenty G. Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(10):7101-7.
35. Komori T. Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2005;95:445-3.
36. Price PA, Parthermore JG, Doftos LJ. New biochemical marker for bone metabolism. *Journal of Clinical Investigation*. 1980;66:878-83.
37. Kim HS, Nam DS. Effect of orthocontic force on the enzyme activities in alveolar bone. *The Korea Journal of Orthodontics*. 1992;22(2):197-308.
38. Sipes IG, McQueen CA, Gandolifi AJ. Comprehensive toxicology. 3rd ed. Didcot:Pergamon. 1997:251-71.
39. Kim HS. Effects of the Saururus chinensis Baill hotwater extract intake on the lipid components and metabolic enzyme activities in hyperlipidemic rats. *Journal of Exercise Nutrition and Biochemistry*. 2006;10:99-106.
40. Kang YJ. Toxic nephropathy. *Korean Journal of Medicine*. 1984;27(6):632-42.