

경골 파혈산동탕(破血散疼湯)이 골절 생쥐의 골 유합에 미치는 영향

신우석* · Kira Parichuk[†] · 차운엽[‡]

상지대학교 대학원*, 상지대학교 한의과대학 약리학교실[†], 상지대학교 부속 한방병원 한방재활의학과[‡]

Effect of *Pahyeolsandong-tang* (*Poxiesanteng-tang*) in Tibia Fracture-induced Mice

Woo-Suk Shin, K.M.D.*, Kira Parichuk, M.D.[†], Yun-Yeop Cha, K.M.D.[‡]

Sangji University Graduate School*, Department of Pharmacology, College of Korean Medicine, Sangji University[†],
Department of Korean Rehabilitation Medicine, Sangji University Korean Medicine Hospital[‡]

RECEIVED September 17, 2020

REVISED October 7, 2020

ACCEPTED October 13, 2020

CORRESPONDING TO

Yun-Yeop Cha, Department of
Korean Rehabilitation Medicine,
Sangji University Korean Medicine
Hospital, 80 Sangjidae-gil, Wonju
26338, Korea

TEL (033) 741-9260

FAX (033) 732-2124

E-mail omdcha@sangji.ac.kr

Copyright © 2020 The Society of
Korean Medicine Rehabilitation

Objectives The main purpose of this study was to evaluate the bone healing effect of *Pahyeolsandong-tang* (PHT)(*Poxiesanteng-tang*) extract in tibia fracture-induced mice.

Methods PHT was extracted using a solution of 35% ethanol in 60°C for 8 hours. Mice were randomly divided into 4 groups (normal, control, PHT 50 and PHT 100). Mice of experimental groups were medicated with PHT 50 or 100 mg/kg for 7 to 21 days. To clarify the effect of bone fracture healing, relative messenger RNA (mRNA) expressions of osteocalcin (OCN), runt-related transcription factor 2 (Runx2), osterix (OSX), Sox9, collagen type II alpha 1 chain (Col2a1), receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG) were examined.

Results In *in vitro* experiment, relative mRNA expression of OCN, Runx2, Col2a1 was significantly increased in PHT treated group to compare with control differentiation group. In *in vivo* experiment, relative mRNA expression of OCN, Runx2, OSX, Sox9, Col2a1, RANKL, OPG was significantly increased in PHT treated group.

Conclusions This study showed that PHT accelerates bone fracture healing through the activation of osteoclasts and osteoblasts. It was showed that PHT significantly promotes osteoblasts differentiation by osteoblast differentiation markers such as OCN, Runx2, Col1a2. Also it was investigated that PHT had stimulatory effect on osteoblasts function through enhancing OCN, Runx2, OSX, Sox9, Col2a1 and, osteoclasts function through enhancing RANKL and OPG markers. PHT effectively promotes bone fracture healing process through activation of osteoblasts and osteoclasts. (*J Korean Med Rehabil* 2020;30(4):1-16)

Key words *Pahyeolsandong-tang* (*Poxiesanteng-tang*), Osteoblasts, Osteoclasts, Chondrogenesis, Fracture healing

서론»»»»

골절이란 뼈의 연속성이 완전하게 또는 불완전하게

소실된 상태를 말하며 골조직 뿐 아니라 피부, 피하조직, 근육, 혈관, 신경 등의 손상이 같이 나타날 수 있다¹⁾. 골절은 흔한 손상의 하나로 대개는 교통사고, 폭력, 낙

상, 스포츠 손상과 같은 외상에 의해 발생하지만 골다공증과 같이 비외상성으로 발생하는 경우도 있다. 골절의 일반적인 증상으로는 통증 및 압통, 골절단의 출혈, 연부조직 손상 등으로 인한 부종, 각종 기능장애, 구조변형, 신경과 혈관의 손상 등이 나타날 수 있다²⁾.

한의학에서는 골절에 해당하는 개념으로 折骨, 折傷, 骨斷, 傷折, 骨損 등의 용어를 사용해왔다³⁾. 최초로 골절의 명칭이 등장한 것은 『外臺祕要』⁴⁾의 ‘救急療骨折, 接令如故, 不限人畜也方’이란 구절이었으며 치료법으로 고정의 필요성을 제시하였다. 『東醫寶鑑』⁵⁾에서는 골절을 骨折筋斷傷이라 하였으며 ‘骨折損折肘臂腰膝出臼蹉跌, 須用法整頓歸元, 先用麻藥與服 使不知痛 然後可用手法’의 구절에서 골절 시 올바른 정복 및 수기법에 대한 필요성을 언급하였다. 한편 『聖濟總錄』⁶⁾에서는 골절 치료에 대한 약물 치료 원칙을 제시하였는데 초기에 活血化瘀, 消腫止痛을 위한 외용약 및 내복약을 활용하고, 중기에 接骨續斷을 위한 약물을 사용하며 후기에 기능적 회복을 위하여 補氣養血, 補益肝腎, 強壯筋骨하는 약물을 사용한다고 정리되어 있다. 한약치료는 이와 같이 골절상 이후 시기와 단계에 맞게 응용이 가능하기 때문에 골절 치료에 보다 효과적으로 적용할 수 있는 장점이 있다.

이에 저자는 골절상을 입었을 때 나타나는 어혈 및 종창에 대한 치료를 위해 『東醫寶鑑』의 파혈산동탕(破血散疼湯)을 사용해 왔으며 그 효과에 대해 규명해보고자 본 연구를 진행하였다. 파혈산동탕의 주지증은 ‘治墮落損傷, 跌其腰脊, 惡血留於脇下, 痛楚不能轉側’⁵⁾으로, 이는 파혈산동탕이 각종 타박 및 추락과 같은 외상성 손상에 쓰이는 것을 알 수 있으며 외상으로 발생한 골절 초기에 나타나는 어혈성 증상의 치료와 연관성이 있다고 판단하였다. 한편 파혈산동탕의 각종 효과에 대한 실험 및 증례 연구는 아직까지 보고된 바가 없기 때문에 저자는 파혈산동탕의 어혈 제거 및 골절 유합에 대한 효과를 확인하고 이에 대한 근거를 정립하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

본 처방의 골 유합 효과를 확인하기 위하여 mouse에 인위적인 경골 골절을 일으킨 후 파혈산동탕 추출물을 투여하여 실험을 진행하여 파혈산동탕의 골 유합 촉진에 대한 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법 >>>>

1. 재료

1) 시약

Dexamethasone, red blood cell lysis buffer, nefopam 및 기타 화학약품들은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay에 필요한 alpha-modified minimal essential medium (α -MEM), fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin-streptomycin은 Life Technologies, Inc. (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. Polymerase chain reaction (PCR)에 사용된 SYBR green master mix는 Applied Biosystem (Waltham, MA, USA)로부터 구입하였으며, oligonucleotide primers는 Bioneer (Daejeon, Korea)에서 구입하였다.

2) 약재

『東醫寶鑑』에 수록된 파혈산동탕의 처방 구성은 水蛭, 連翹, 當歸, 柴胡, 蘇木, 羌活, 防風, 桂心, 麝香이다. 각각의 약재는 모두 태양한약국(Wonju, Korea)에서 구입하였다. 1첩에 대한 개별 약재의 양은 Table I과 같다.

3) 실험 동물

본 실험에는 대한바이오링크(Eumseong, Korea)에서 분양받은 11주령 수컷 C57BL/6J mouse (23-26 g) 36마리가 사용되었다. 실험에 사용된 mouse들은 환기가 잘

Table I. Herbal Composition of *Pahyeolsandong-tang* (*Poxiesanteng-tang*)

Herb name	Amount (g/cheop)
<i>Hirudo nipponica</i> Whitman	11.25
<i>Forsythia suspensa</i> Vahl	7.5
<i>Angelica gigas</i> Nakai	7.5
<i>Bupleurum falcatum</i> Linné	7.5
<i>Caesalpinia sappan</i> Linné	5.625
<i>Ostericum koreanum</i> Maximowicz	3.75
<i>Saposhnikovia divaricata</i> Schiskin	3.75
<i>Cassiae cortex</i> Interior	3.75
<i>Moschus moschiferus</i> Linné	1.875
Total	52.5

되는 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 온도, 12시간 간격의 명암주기, $55 \pm 9\%$ 습도에 해당하는 변형된 환경에 적응하기 위하여 1주일간 적응 기간을 거쳤다. 적응 기간 내 실험동물들은 물과 음식을 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다. 본 실험은 상지대학교 실험동물윤리위원회의 허가를 받아 진행되었다(승인번호: 2019-4).

4) 실험 세포

본 실험에서 세포 배양을 위해 사용된 전조골세포인 MCT3-E1 (subclone 4) 세포는 ATCC (Manassas, VA, USA)에서 구매하였다. 해당 세포들은 10% FBS와 penicillin-streptomycin $100 \mu\text{g/mL}$ 이 첨가된 37°C , 5% CO_2 환경하의 α -MEM 배지에서 배양되었다. 세포 배양 배지는 3일마다 신선한 것으로 교체되었다.

2. 실험방법

1) 약재 추출

『東醫寶鑑』에 기재된 파혈산동탕의 탕전 방식은 酒水相半煎(주수상반전)이므로, 이를 구현하고자 파혈산동탕 8첩 분량을 60°C 의 물에 8시간 동안 35%의 에탄올 중탕시킨 용액을 사용하여 추출하였다. 해당 과정을 거친 추출물(Pahyeolsandong-tang, PHT)은 $10 \mu\text{m}$ 거름종이로 정제하였다. 이후 회전증발농축기(EYELA, Tokyo, Japan)를 사용하여 에탄올을 제거하였다. 모든 처리 과정을 거친 추출물을 동결건조하였고 수율은 13%로 계산되었다. 실험을 위해 분말을 증류수에 용해시켜 사용하였으며 잔류 분말은 -20°C 에서 보관하여 필요한 시점에 사용할 수 있도록 하였다.

2) *in vitro* 실험 방법

(1) 조골세포생성 분석

조골세포 분화(differentiation)를 촉진하기 위해 MC3T3-E1 세포를 1 mL당 5×10^4 의 밀도로 된 6-well plate에서 분주(seeding)하였다. 세포들은 PHT 농도 차와 관계없이 골 형성 배지($50 \mu\text{g/mL}$ ascorbic acid, 10 mM β -glycerophosphate, and $1 \mu\text{M}$ dexamethasone)에서 배양되었다. 세포 배양 배지는 2일마다 신선한 것으로 교체하였다.

Alkaline phosphatase (ALP) 염색을 위해 MC3T3-E1 세포는 골 형성 배지에서 배양하였고, 다양한 농도

(15.6 - $1,000 \mu\text{g/mL}$)의 PHT 용액으로 처리하였다. 7일 후, 염색 kit (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan)를 사용하여 ALP 염색을 진행하였다. 염색된 세포들을 Leica DM IL LED microscope (Leica, Wetzlar, Germany)을 통하여 관찰하였다.

PHT 투여에 대한 효과를 확인하기 위하여 MC3T3-E1 세포를 7일 동안 각각 PHT 12.5 , 25 , $50 \mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였다. 조골세포의 분화를 확인하고자 PCR 분석을 통해 osteocalcin (OCN), runt-related transcription factor 2 (Runx2), collagen type II alpha 1 chain (Col2a1) 등 표지자들의 상대적 messenger RNA (mRNA) 발현량을 수치화하였다.

(2) 세포 독성 유무 확인

세포 독성 유무를 알아보기로 MTT assay를 사용하여 세포 생존능(cell viability)을 평가하였다. MC3T3-E1 세포들을 세포 분화 조건의 유무에 상관없이 1 well당 2×10^4 의 밀도로 된 96-well plate로 분주하였고, 이어서 이를 지정된 농도의 PHT에서 5%의 CO_2 를 머금고 있는 37°C 의 가습된 공기에서 48시간 동안 처리하였다. 처리 후, MTT 용액 5 mg/mL 을 첨가하여 4시간 동안 세포를 염색하였다. 상등액을 세척한 후, 세포 속에 갇혀있던 불용성 formazan 결정을 dimethyl sulfoxide에 용해시켰다. 이를 가지고 Epoch[®] microvolume spectrophotometer system (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 통해 570 nm 에서 흡광도를 측정하여 세포 생존능을 확인하였다. 상대적 세포 생존능은 PHT를 처리하지 않은 군의 생존율을 100%로 기준을 잡고 대조군들에서 나타나는 흡광도 수치를 비교하여 산출하였다.

3) *in vivo* 실험방법

(1) 경골 골절 유발 및 골편 채취

본 연구의 골절 model로 mouse 우측 경골 부위의 골수 내에 needle을 고정시켜 이를 바탕으로 경골의 개방형 횡상 골절을 유발하는 방법을 사용하였다⁷⁾.

윤리적 동물 실험을 실행하기 위하여 Zoletil 50 (Virbac, Carros Cedex, France)을 20 mg/kg 용량으로 복강 내 주사를 통해 마취시켰으며, mouse의 통증을 줄이기 위해 nefopam 20 mg/kg/day 을 복강 내 주사로 골절 시술 30분 전 및 시술 이후 3일 동안 사용하였다⁸⁾. 마취 이후 mouse의 무릎 주변을 면도한 후 povidone (Green Pharmaceutical

Co., Ltd., Seoul, Korea)을 도포하여 소독하고 외과용 가위로 내측 슬개골 부위를 절개하였다. 슬개골 인대 외측으로 경골의 상관절면을 통하여 경골의 골수강을 향해 26 gauge 주사기의 needle (Kovax-Syringe 1 mL; Korea Vaccine Co., Ltd, Seoul, Korea)이 경골부위 고정 을 위해 주입되었다. 절개 부위의 상처는 항생제 용액 으로 소독하였고, 봉합사 5-0 (B. Braun, Melsungen, Germany)을 사용하여 봉합되었다. 시술이 이루어진 부 위의 연부 조직을 보호하고자 붕대로 처치하였다.

경골 내 needle 고정을 마친 후 일관된 경골 골절 유발 및 주변 연부조직 손상을 최소화하기 위하여 Bonnarens 와 Einhorn⁹⁾이 시행한 방법을 변형하여 진행하였다. 실험 mouse의 경골 부위를 수평한 판에 고정시키고, 그 위로 17 g의 쇠구슬을 1 m 높이에 지름 20 mm인 유리 관을 통해 약 4.42 m/s로 해당 부위에 떨어뜨려 골절을 인위적으로 유발하였다.

골절을 일으키고 7, 14, 21일 후에 mouse의 경골 골 절 부위에서 골편을 절개하여 채취하였다. 이후 채취된 골편을 바로 액화질소에 담고 RNA 추출 전에 분말 형태로 분쇄하였다.

(2) 실험군 분류

본 실험에서 사용된 mouse들은 무작위로 4개의 군으 로 나누었다. 정상군(normal group)은 골절을 일으키지 않은 그룹이고, 대조군(control group)은 골절을 일으킨 후 아무런 처치를 하지 않은 그룹이다. 실험군은 경골 골절 유발 후 PHT 50 mg/kg 투여군 및 PHT 100 mg/kg 투여군으로 분류하였으며, 1일 1회 오전 10시에 용량별 로 PHT를 경구 투여하였다. 각 군의 배정은 Table II와 같다. 대조군 및 PHT 50 및 100 mg/kg 투여한 2개 군에 서는 골절 발생 7, 14, 21일 후에 각 3마리씩 치사하여 골편을 채취하였다.

(3) PHT의 간독성 및 신독성 평가

PHT의 간독성 및 신독성을 평가하기 위하여 11주령 의 C57BL/6J mouse를 PHT 투여군을 대상으로 진행하 였다. PHT 50 mg/kg 투여군에 2마리, 100 mg/kg 투여 군에 2마리씩 배정하였으며 약물 투여 28일이 지난 후 혈액을 채취하였다. 혈액 채취 전 12시간 동안 공복 상 태를 유지하게 하였으며, Zoletil 50 (20 mg/kg)을 복강 내로 주사하여 마취시켰다. 혈액 채취는 안구 뒷면의 출혈 부위를 통해 이루어졌다. 이를 통해 확보한 혈액 샘 플에서 1,000×20분 동안 4°C에서 원심분리를 통해 혈장 을 분리하였다. 분리된 혈장에서 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST)의 수치를 해당 kit (Asan Pharmaceutical. Co. Ltd., Seoul, Korea)를 통 해 측정하였으며, creatinine, blood urea nitrogen (BUN) 의 수치도 해당 kit (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA)를 통해 측정하였다.

4) 유전자 분석 방법

(1) Total RNA 추출

Easy-Blue[®] 시약(Intron Biotechnology, Seongnam, Korea) 을 사용하여 가골과 MC3T3-E1 세포에서 total RNA를 분리하였다. Epoch[®] microvolume spectrophotometer sys- tem을 이용하여 분리된 Total RNA를 정량화하였다.

(2) Complementary DNA 합성

분리된 total RNA (1 µg), d(T)16 primer, avian myer- oblastosis virus 역전사효소를 사용하여 complementary DNA를 합성하였다.

(3) Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) 분석

PHT가 골절 치유과정에 미치는 영향을 확인하고자 SYBR green PCR master mix 및 oligonucleotide primer를 사용한 real-time PCR을 실시하여 골 유합 관련 표지자들

Table II. Classification of Each Group

Group	Numbers	Intervention
Normal	9	Non-fractured group
Control	9	Bone fractured with non-treated group
PHT 50	9	Bone fractured with PHT-treated group (PHT 50 mg/kg)
PHT 100	9	Bone fractured with PHT-treated group (PHT 100 mg/kg)

PHT: *Pahyeolsandong-tang*.

의 상대적인 유전자 발현을 검출하였다(Table III). 실험 기기는 Real Time PCR System 7500 (Applied Biosystems) 을 사용하였다.

유전자 발현 정도를 객관적으로 나타내기 위하여 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 Ct값을 사용하였다. 이 수치를 기반으로 하여 조골 및 파골작용과 관련이 있는 Col2a1, osterix (OSX), OCN, Runx2, Sox9, receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG) 유전자 발현의 상대적 수치를 도출해 냈고, Gene express 2.0 program (Applied Biosystems)을 사용하여 GAPDH의 Ct 값으로 정규분포화 하였다. 유전자 발현의 배수 변화를 계산하기 위하여 comparative Ct 방법을 사용하였다.

5) X-ray 상 골절 확인

골절을 유발한 후 골절 여부를 확인하기 위하여 X-ray

검사를 진행하였다. X-ray 검사기(Galaxy A26430, Medien International Co. Ltd., Seoul, Korea)로 촬영한 결과 Fig. 1과 같이 경골 골절 여부를 확인하였다.

6) 통계 분석

각각의 결과값은 삼중 실험에서 나온 평균±표준편차 (mean±standard deviation) 수치로 표시하였다. GraphPad Prism (version 5.01; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 통계 분석을 하였다. MTT assay 및 MC3T3-E1 유전자 분석에서는 one-way analysis of variance (ANOVA) 시스템을 이용한 Dunnett's post hoc test를 사용하였고, qRT-PCR 분석결과 해석에서는 two-way ANOVA 시스템을 사용한 Bonferroni post hoc test를 사용하였다. 통계학적 유의 수준은 p-value<0.05로 하였다.

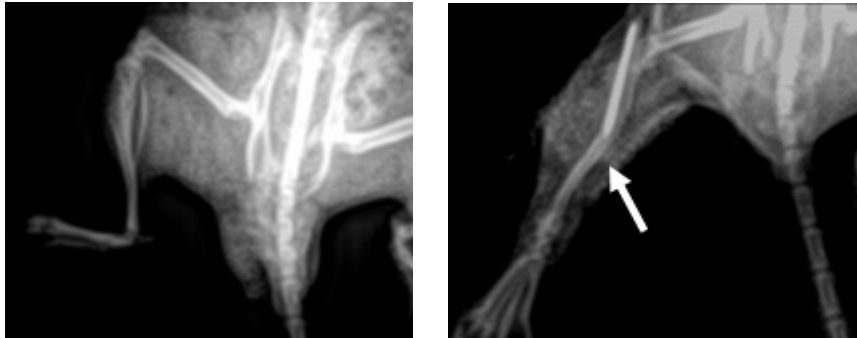


Fig. 1. The comparison of tibial X-ray before and after fracture in mouse.

Table III. The Primer Sequences for Quantitative Real-time PCR

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Col2a1	ACTGGTAAAGTGGGCAAGAC	CCACACCAAATCCTGTTC
OSX	CGCTTTGTGCCTTTGAAAT	CCGTCAACGACGTTATGC
OCN	AAGCAGGAGGGCAATAAGGT	TTTGTAGGCGGTCTTCAAGC
Runx2	ACTCTTCTGGAGCCGTTTATG	GTGAATCTGGCCATGTTGTG
Sox9	GAGGCCACGGAACAGACTCA	CAGCGCCTTGAAGATAGCATT
OPG	TGAGAGAACGAGAAAGACCTGC	CGGATTGAACCTGATTCCCTAT
RANKL	GTACTTTTCGAGCGCAGATGG	TCCAACCATGAGCCTTCCAT
GAPDH	GACGGCCGCATCTTCTTGT	CACACCGACCTTCACCATTTT

PCR: polymerase chain reaction, Col2a1: collagen type II alpha 1 chain, OSX: osterix, OCN: osteocalcin, Runx2: runt-related transcription factor 2, OPG: osteoprotegerin, RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

결과»»»»

1. *in vitro* 실험결과

1) 세포 생존능에 대한 영향

MTT assay를 사용하여 PHT를 다양한 농도(15.6-1,000 µg/mL)에 걸쳐 분화 조건의 유무에 따라 48시간 동안 처리하고 이를 바탕으로 PHT의 MC3T3-E1에서 세포 생존능에 대해서 알아보았다.

PHT를 처리하지 않은 분화군의 세포 생존능은 $100.00 \pm 3.76\%$ 로 나타났고 미분화군은 $66.39 \pm 3.99\%$ 로 나타났다.

분화된 MC3T3-E1에 PHT 15.6 µg/mL 처리군의 세포 생존능은 $91.83 \pm 7.54\%$ 로 측정되었고, PHT 31.2 µg/mL 처리군은 $90.77 \pm 3.19\%$ 로 측정되었으나 통계적 유의성이 나타나지 않았다.

PHT 62.5 µg/mL 처리군에서 세포 생존능은 $87.93 \pm 8.60\%$ 이었고, PHT 125 µg/mL 처리군은 $74.75 \pm 5.66\%$, PHT 250 µg/mL 처리군은 $68.65 \pm 2.21\%$, PHT 500 µg/mL 처리군은 $66.83 \pm 3.12\%$ 으로 각각 나타났다. 세 그룹 모두 세포 생존능에 영향이 없었고 통계적 유의성을 나타냈다. 한편, PHT 1,000 µg/mL 처리군에서 세포 생존능은 $53.90 \pm 3.19\%$ 로 측정되었으며 통계적으로 대조군 대비 유의미하게 낮게 나와 세포 독성이 있음을 확인하였다 (Fig. 2). 따라서 이후의 실험에서는 500 µg/mL 이하의 농도를 사용하였다.

2) 조골세포분화 촉진에 대한 효과

PHT가 조골세포 분화를 촉진하는지 확인하고자 7일 동안 골 유도 배양 후 ALP 염색을 수행하였다. 100배를 사진 확인 결과, 조골세포 분화가 있었으면서 PHT를 각각 15.6, 31.2, 62.5 µg/mL 처리한 군에서 상대적으로 짙게 염색되어있음을 확인하였다. 이는 62.5 µg/mL 농도 이하의 PHT 투여군에서 조골세포 분화 촉진 작용을 활발하게 이루어지고 있음을 나타내고 있다(Fig. 3). 따라서 이후의 실험에서 62.5 µg/mL 이하의 농도로 투여된 군을 사용하였다.

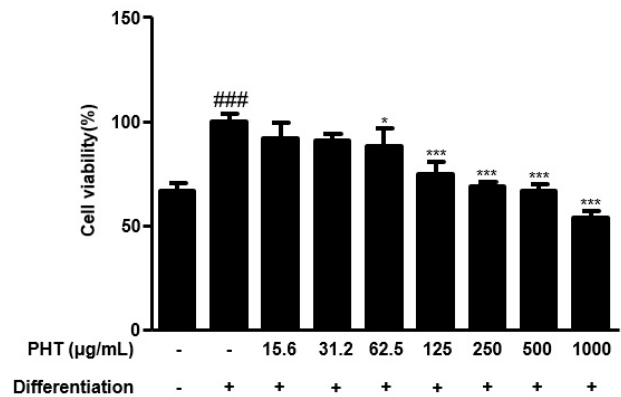


Fig. 2. Effect of PHT on the viability of MC3T3-E1 cells. MC3T3-E1 cells were treated by various concentrations of PHT for 48 hours in presence or absence of differentiation conditions, and their viability was estimated using MTT assay. PHT: *Pahyeolsandong-tang*, MTT: 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide. The values are represented as mean±standard deviation. ^{###}*p*<0.001 vs. control group, ^{*}*p*<0.05 vs. differentiation group, ^{***}*p*<0.001 vs. differentiation group. Significances were determined using one-way analysis of variance followed by Dunnett's post hoc test.

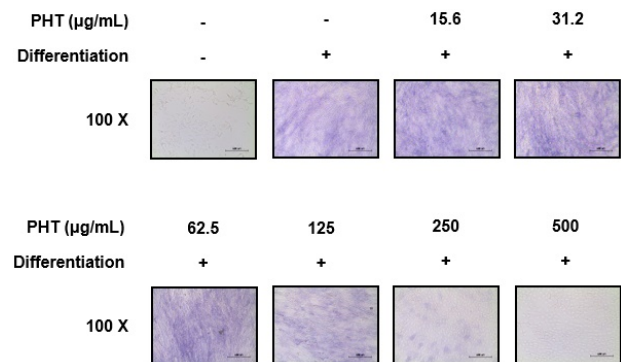


Fig. 3. Effect of PHT on osteogenesis of MC3T3-E1 cells. MC3T3-E1 cells were stimulated by osteoinductive media in presence or absence of indicated PHT concentrations for 7 days and subjected to ALP staining. The stained cells were visualized using Leica DM IL LED microscope (Leica, Wetzlar, Germany) at 100X magnification. PHT: *Pahyeolsandong-tang*, ALP: alkaline phosphatase.

3) 조골세포 분화관련 표지자 발현에 대한 효과

(1) OCN 유전자 발현에 미치는 영향

대조군의 OCN 상대적인 mRNA 발현은 1.00 ± 0.09 로 나타났다. PHT 12.5 µg/mL 투여군은 1.81 ± 0.15 , PHT 25 µg/mL 투여군은 2.06 ± 0.04 , PHT 50 µg/mL 투여군은 2.53 ± 0.15 로 나타났다. OCN의 상대적 mRNA 발현은 모

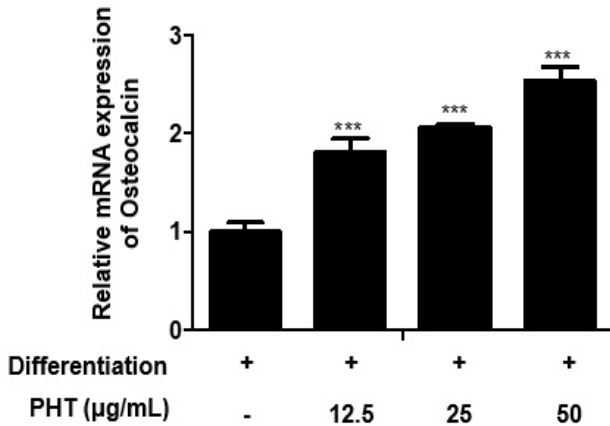


Fig. 4. Effect of PHT on mRNA level of OCN in MC3T3-E1 cells on 7 day after osteogenesis inducing. MC3T3-E1 cells were cultured in osteoinductive media in presence or absence different concentrations of PHT (12.5, 25 and 50 μg/mL) for 7 days for subsequent PCR analyses. The mRNA level of OCN was detected by qRT-PCR. PHT: *Pahyeolsandong-tang*, mRNA: messenger RNA, OCN: osteocalcin, PCR: polymerase chain reaction, qRT-PCR: quantitative real-time-PCR. Values are the mean±standard deviation. ***p<0.001 vs. the PHT-treated groups. Significances between groups were determined using one-way analysis of variance followed by Dunnett's post hoc test.

든 실험군에서 대조군 대비 유의하게 증가하였다(Fig. 4).

(2) Runx2 유전자 발현에 미치는 영향

대조군의 Runx2 상대적 mRNA의 발현은 1.00 ± 0.23 로 나타났다. PHT 12.5, 25 μg/mL 투여군은 각각 1.12 ± 0.09 , 0.79 ± 0.09 로 나타났고, 통계적 유의성이 없었다. PHT 50 μg/mL 투여군은 1.42 ± 0.18 로 나타났으며 대조군 대비 mRNA 발현량이 유의한 수준으로 증가하였다(Fig. 5).

(3) Col2a1 유전자 발현에 미치는 영향

대조군의 Col2a1 상대적 mRNA 발현은 1.00 ± 0.25 로 나타났다. PHT 12.5 μg/mL 투여군은 2.17 ± 0.11 로 측정되었으며 대조군 대비 mRNA 발현량이 유의하게 증가하였다. PHT 25 μg/mL 투여군은 1.35 ± 0.02 로 측정되었으나 통계적으로 유의하지 않았다. PHT 50 μg/mL 투여군은 2.77 ± 0.17 로 측정되었으며 대조군 대비 mRNA의 상대적 발현량이 유의하게 증가하였다. Col2a1의 상대적 mRNA 발현은 PHT 12.5, 50 μg/mL 투여군에서 대조군 대비 유의하게 증가하였다(Fig. 6).

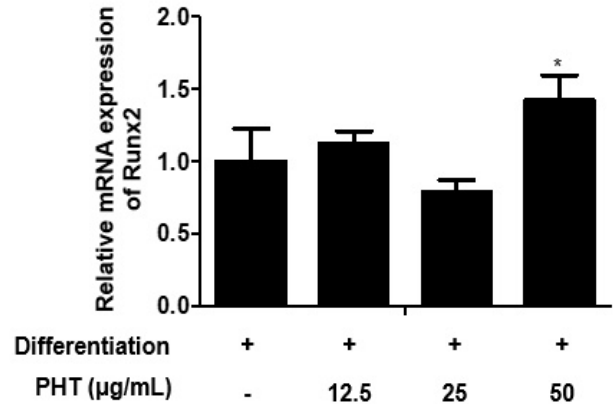


Fig. 5. Effect of PHT on mRNA level of Runx2 in MC3T3-E1 cells on 7 day after osteogenesis inducing. MC3T3-E1 cells were cultured in osteoinductive media in presence or absence different concentrations of PHT (12.5, 25 and 50 μg/mL) for 7 days for subsequent PCR analyses. The mRNA level of Runx2 was detected by qRT-PCR. PHT: *Pahyeolsandong-tang*, mRNA: messenger RNA, Runx2: runt-related transcription factor 2, PCR: polymerase chain reaction, qRT-PCR: quantitative real-time-PCR. Values are the mean±standard deviation. *p<0.01 vs. the PHT-treated groups. Significances between groups were determined using one-way analysis of variance followed by Dunnett's post hoc test.

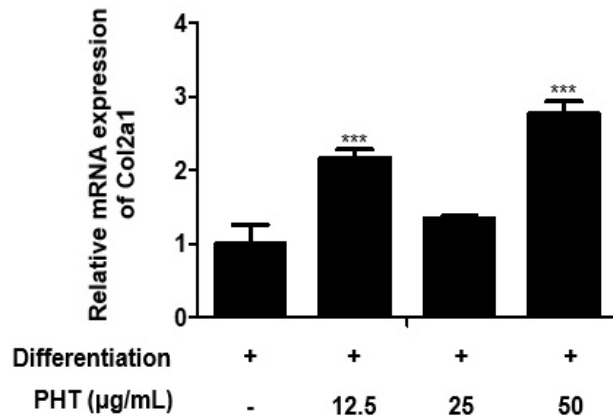


Fig. 6. Effect of PHT on mRNA level of Col2a1 in MC3T3-E1 cells on 7 day after osteogenesis inducing. MC3T3-E1 cells were cultured in osteoinductive media in presence or absence different concentrations of PHT (12.5, 25 and 50 μg/mL) for 7 days for subsequent PCR analyses. The mRNA level of Col2a1 was detected by qRT-PCR. PHT: *Pahyeolsandong-tang*, mRNA: messenger RNA, Col2a1: collagen type II alpha 1 chain, PCR: polymerase chain reaction, qRT-PCR: quantitative real-time-PCR. Values are the mean±standard deviation. ***p<0.001 vs. the PHT-treated groups. Significances between groups were determined using one-way analysis of variance followed by Dunnett's post hoc test.

Table IV. Effect of PHT on Level of ALT, AST, Creatinine and BUN in Mice

Groups	Parameters			
	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Creatinine (mg/dL)	BUN (mg/dL)
PHT 50 mg/kg	50.45±0.00	113.16±51.95	0.27±0.19	17.62±0.96
PHT 100 mg/kg	40.55±6.99	85.69±5.98	0.34±0.10	18.51±2.27
Normal range for mouse	25-60	50-100	0.097-0.184	10-33

PHT: *Pahyeolsandong-tang*, ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase, BUN: blood urea nitrogen.

2. *in vivo* 실험 결과

1) PHT의 간독성 및 신독성 평가 결과

PHT의 간독성 및 신독성을 확인하기 위하여 ALT, AST 및 creatinine과 BUN 수치를 평가하였다. PHT 50 mg/kg 투여군은 AST와 creatinine이 각각 113.16±51.95와 0.27±0.19로 정상수치보다 소폭 높게 나왔으며, PHT 100 mg/kg 투여군은 creatinine이 정상 수치인 0.097-0.184보다 높은 0.34±0.10로 나왔다. 나머지 지표들은 모두 정상범위 이내로 나왔다 (Table IV).

2) 골 유합 관련 표지자 발현에 대한 효과

in vivo 실험에서 조골세포의 분화에 대한 PHT의 영향을 객관적으로 나타내기 위하여 골 유합과 관련된 표지자들인 OCN, Runx2, OSX, Sox9, Col2a1, RANKL, OPG 유전자의 상대적인 mRNA 발현량을 측정하였다.

(1) OCN 유전자 발현에 미치는 영향

OCN 유전자 발현은 골절 발생 7일 후 대조군이 1.00±0.20였을 때 PHT 50 mg/kg 투여군과 100 mg/kg 투여군은 각 0.12±0.03, 0.21±0.02로 나타났으며 통계적으로 유의하지 않았다. 골절 발생 14일 후 대조군이 1.00±0.40였을 때 PHT 50 mg/kg 투여군과 100 mg/kg 투여군은 각 2.68±1.50, 1.18±0.04로 나타났으며 통계적으로 유의하지 않았다.

골절 발생 21일 후 대조군이 1.00±0.31였을 때 PHT 50 mg/kg 투여군과 100 mg/kg 투여군은 각 6.26±1.32, 12.83±2.86으로 나타났으며 모두 대조군 대비 유의미하게 증가하였다(Fig. 7).

(2) Runx2 유전자 발현에 미치는 영향

Runx2 유전자 발현은 골절 발생 7일 후 대조군이 1.00±0.25였을 때 PHT 50 mg/kg 투여군은 0.59±0.14로 통계적으로 유의미하게 발현량이 감소하였다. 한편 골

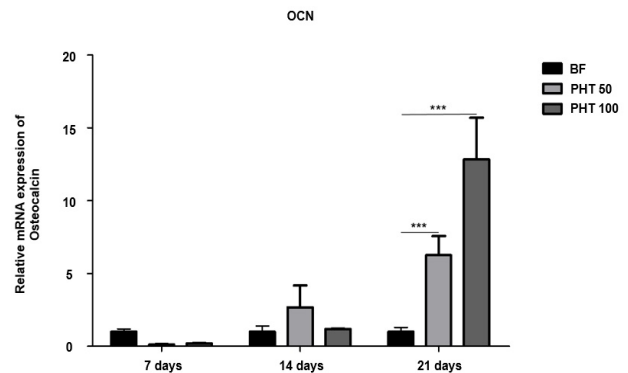


Fig. 7. Effect of PHT on mRNA level of OCN in bone callus from mouse tibia on 7th, 14th, and 21st day post fracture. C57BL/6J mice had tibia fracture and were treated with 50 and 100 mg/kg of PHT daily for 7, 14 and 21 days. Total RNA was isolated from bone callus of fractured tibia from non-treated and PHT-treated mice. RNA was subjected to qRT-PCR to measure expression of OCN gene with SYBR green. BF: bone fracture with non-treated group (control group), PHT 50: bone fracture with PHT-treated group (50 mg/kg), PHT 100: bone fracture with PHT-treated group (100 mg/kg), PHT: *Pahyeolsandong-tang*, mRNA: messenger RNA, OCN: osteocalcin, qRT-PCR: quantitative real-time polymerase chain reaction. Values are the mean±standard deviation. ***p<0.001 vs BF group. Significances between groups were determined using two-way analysis of variance followed by a Bonferroni post hoc test.

절 발생 7일 후 PHT 100 mg/kg 투여군은 0.74±0.04로 감소를 보였으며 통계적 유의성은 없었다. 골절 발생 14일 후 대조군이 1.00±0.01이었을 때 PHT 50 mg/kg 투여군은 2.40±0.33를 보였고 통계적으로 유의하게 증가하였다. 한편 PHT 100 mg/kg 투여군은 0.52±0.05로 나타났으며 통계적으로 유의하게 감소하였다.

골절 발생 21일 후 대조군이 1.00±0.19였을 때 PHT 50 mg/kg 투여군은 1.17±0.01로 나타났으나 통계적 유의성은 없었다. PHT 100 mg/kg 투여군은 2.42±0.16으로 나타났으며 유의한 증가를 보였다(Fig. 8).

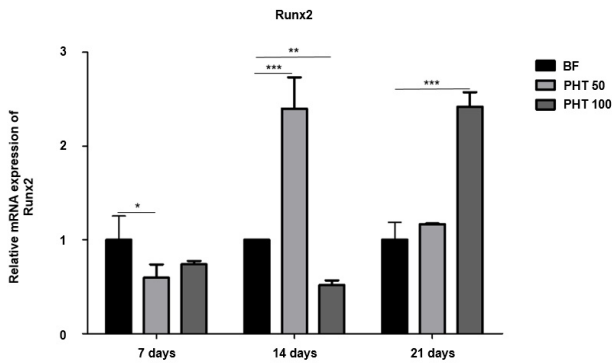


Fig. 8. Effect of PHT on mRNA level of Runx2 in bone callus from mouse tibia on 7th, 14th, and 21st day post fracture. C57BL/6J mice had tibia fracture and were treated with 50 and 100 mg/kg of PHT daily for 7, 14 and 21 days. Total RNA was isolated from bone callus of fractured tibia from non-treated and PHT-treated mice. RNA was subjected to qRT-PCR to measure expression of Runx2 gene with SYBR green. BF: bone fracture with non-treated group (control group), PHT 50: bone fracture with PHT-treated group (50 mg/kg), PHT 100: bone fracture with PHT-treated group (100 mg/kg), PHT: *Pahyeolsandong-tang*, mRNA: messenger RNA, Runx2: runt-related transcription factor 2, qRT-PCR: quantitative real-time polymerase chain reaction. Values are the mean±standard deviation. * $p<0.05$ vs BF group, ** $p<0.01$ vs BF group, *** $p<0.001$ vs BF group. Significances between groups were determined using two-way analysis of variance followed by a Bonferroni post hoc test.

(3) OSX 유전자 발현에 미치는 영향

OSX 유전자 발현은 골절 발생 7일 후 대조군이 1.00 ± 0.30 였을 때 PHT 50 mg/kg 투여군은 1.12 ± 0.19 로 나타났으며 통계적으로 유의성이 없었고 PHT 100 mg/kg 투여군은 2.48 ± 0.52 로 유의한 증가를 보였다. 골절 발생 14일 후 대조군이 1.00 ± 0.00 였을 때 PHT 50 mg/kg 투여군은 3.23 ± 0.00 로 나타났으며 유의한 증가하였다. PHT 100 mg/kg 투여군은 1.51 ± 0.00 로 나타났으며 통계적으로 유의성이 없었다. 골절 발생 21일 후 대조군이 1.00 ± 0.32 였을 때 PHT 50 mg/kg 투여군과 100 mg/kg 투여군은 각 3.27 ± 0.63 , 6.19 ± 0.51 로 나타났으며 모두 통계적으로 유의하게 증가하였다(Fig. 9).

(4) Sox9 유전자 발현에 미치는 영향

Sox9 유전자 발현은 골절 발생 7일 후 대조군이 1.00 ± 0.27 였을 때 PHT 50 mg/kg 투여군과 100 mg/kg 투여군은 각 0.44 ± 0.05 , 1.25 ± 0.28 로 나타났으며 통계적으로 유의성이 없었다. 골절 발생 14일 후 대조군이 1.00 ± 0.09 였을 때 PHT 50 mg/kg 투여군과 100 mg/kg 투

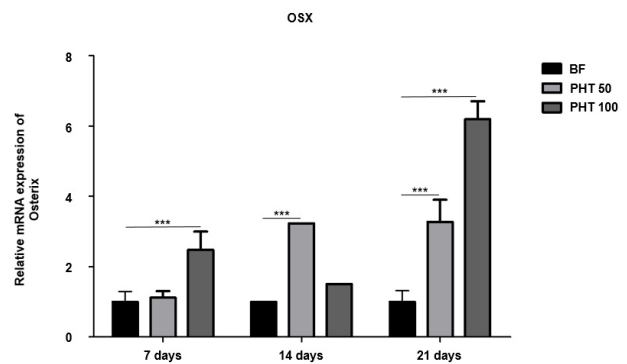


Fig. 9. Effect of PHT on mRNA level of OSX in bone callus from mouse tibia on 7th, 14th, and 21st day post fracture. C57BL/6J mice had tibia fracture and were treated with 50 and 100 mg/kg of PHT daily for 7, 14 and 21 days. Total RNA was isolated from bone callus of fractured tibia from non-treated and PHT-treated mice. RNA was subjected to qRT-PCR to measure expression of OSX gene with SYBR green. BF: bone fracture with non-treated group (control group), PHT 50: bone fracture with PHT-treated group (50 mg/kg), PHT 100: bone fracture with PHT-treated group (100 mg/kg), PHT: *Pahyeolsandong-tang*, mRNA: messenger RNA, OSX: osterix, qRT-PCR: quantitative real-time polymerase chain reaction. Values are the mean±standard deviation. *** $p<0.001$ vs BF group. Significances between groups were determined using two-way analysis of variance followed by a Bonferroni post hoc test.

여군은 각 4.18 ± 0.54 , 3.01 ± 0.66 으로 나타났으며 통계적으로 유의한 증가를 보였다. 골절 발생 21일 후 대조군이 1.00 ± 0.11 이었을 때 PHT 50 mg/kg 투여군과 100 mg/kg 투여군은 각 2.88 ± 0.19 , 3.86 ± 0.02 로 나타났으며 모두 통계적으로 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 10).

(5) Col2a1 유전자 발현에 미치는 영향

Col2a1 유전자 발현이 골절 발생 7일 후 대조군이 1.00 ± 0.07 였을 때 PHT 50 mg/kg 투여군과 100 mg/kg 투여군은 각 0.04 ± 0.01 , 0.13 ± 0.03 으로 나타났으며 통계적으로 유의하게 감소하였다. 골절 발생 14일 후 대조군이 1.00 ± 0.22 였을 때 PHT 50 mg/kg 투여군과 100 mg/kg 투여군에서 각 2.36 ± 0.80 , 2.39 ± 0.64 로 나타났으며 통계적으로 유의하게 증가하였다. 골절 발생 21일 후 대조군이 1.00 ± 0.28 이었을 때 PHT 50 mg/kg 투여군은 0.15 ± 0.02 로 나타났으며 통계적으로 유의한 감소하였고, PHT 100 mg/kg 투여군은 0.46 ± 0.13 으로 나타났으며 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 11).

(6) RANKL 유전자 발현에 미치는 영향

RANKL 유전자 발현은 골절 발생 7일 후 대조군이

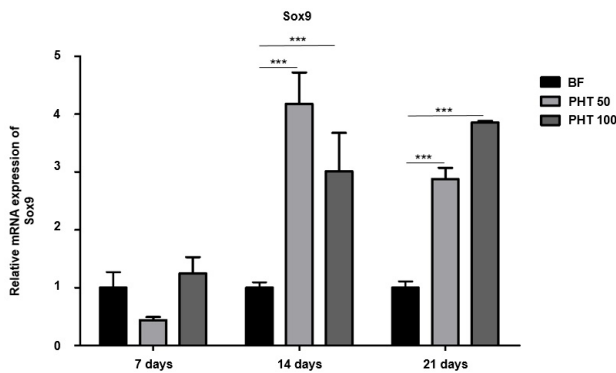


Fig. 10. Effect of PHT on mRNA level of Sox9 in bone callus from mouse tibia on 7th, 14th, and 21st day post fracture. C57BL/6J mice had tibia fracture and were treated with 50 and 100 mg/kg of PHT daily for 7, 14 and 21 days. Total RNA was isolated from bone callus of fractured tibia from non-treated and PHT-treated mice. RNA was subjected to qRT-PCR to measure expression of Sox9 gene with SYBR green. BF: bone fracture with non-treated group (control group), PHT 50: bone fracture with PHT-treated group (50 mg/kg), PHT 100: bone fracture with PHT-treated group (100 mg/kg), PHT: *Pahyeolsandong-tang*, mRNA: messenger RNA, qRT-PCR: quantitative real-time polymerase chain reaction. Values are the mean±standard deviation. *** $p < 0.001$ vs BF group. Significances between groups were determined using two-way analysis of variance followed by a Bonferroni post hoc test.

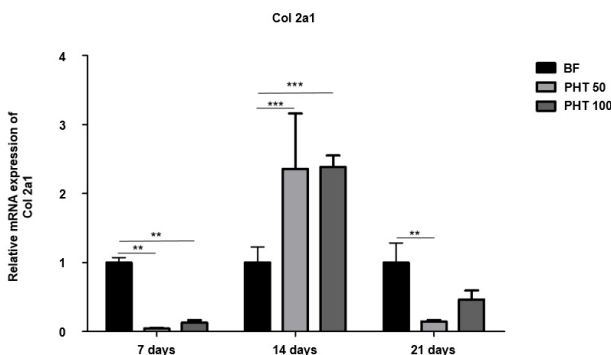


Fig. 11. Effect of PHT on mRNA level of Col2a1 in bone callus from mouse tibia on 7th, 14th, and 21st day post fracture. C57BL/6J mice had tibia fracture and were treated with 50 and 100 mg/kg of PHT daily for 7, 14 and 21 days. Total RNA was isolated from bone callus of fractured tibia from non-treated and PHT-treated mice. RNA was subjected to qRT-PCR to measure expression of Col2a1 gene with SYBR green. BF: bone fracture with non-treated group (control group), PHT 50: bone fracture with PHT-treated group (50 mg/kg), PHT 100: bone fracture with PHT-treated group (100 mg/kg), PHT: *Pahyeolsandong-tang*, mRNA: messenger RNA, Col2a1: collagen type II alpha 1 chain, qRT-PCR: quantitative real-time polymerase chain reaction. Values are the mean±standard deviation. ** $p < 0.01$ vs BF group, *** $p < 0.001$ vs BF group. Significances between groups were determined using two-way analysis of variance followed by a Bonferroni post hoc test.

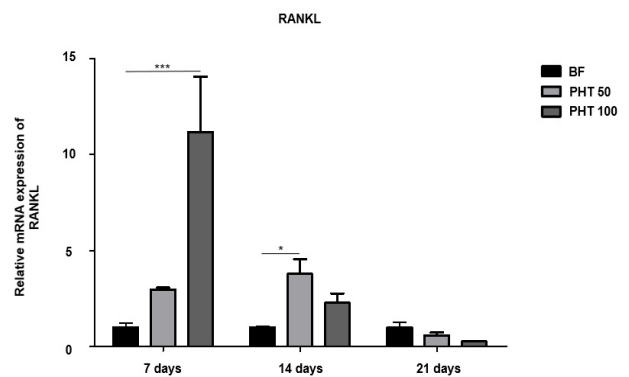


Fig. 12. Effect of PHT on mRNA level of RANKL in bone callus from mouse tibia on 7th, 14th, and 21st day post fracture. C57BL/6J mice had tibia fracture and were treated with 50 and 100 mg/kg of PHT daily for 7, 14 and 21 days. Total RNA was isolated from bone callus of fractured tibia from non-treated and PHT-treated mice. RNA was subjected to qRT-PCR to measure expression of RANKL gene with SYBR green. BF: bone fracture with non-treated group (control group), PHT 50: bone fracture with PHT-treated group (50 mg/kg), PHT 100: bone fracture with PHT-treated group (100 mg/kg), PHT: *Pahyeolsandong-tang*, mRNA: messenger RNA, RANKL: receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, qRT-PCR: quantitative real-time polymerase chain reaction. Values are the mean±standard deviation. * $p < 0.05$ vs BF group, *** $p < 0.001$ vs BF group. Significances between groups were determined using two-way analysis of variance followed by a Bonferroni post hoc test.

1.00±0.22였을 때 PHT 50 mg/kg 투여군은 2.97±0.10로 나타났으나 통계적으로 유의하지 않았다. PHT 100 mg/kg 투여군은 11.17±2.88로 나타났으며 통계적으로 유의하게 증가하였다. 골절 발생 14일 후 대조군이 1.00±0.03였을 때 PHT 50 mg/kg 투여군은 3.77±0.77로 나타났으며 통계적으로 유의하게 증가하였다. PHT 100 mg/kg 투여군은 2.27±0.49로 나타났으며 통계적 유의하지 않았다. 골절 발생 21일 후 대조군이 1.00±0.27였을 때 PHT 50 mg/kg 투여군과 100 mg/kg 투여군은 각 0.58±0.15, 0.26±0.02로 나타났으며 모두 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 12).

(7) OPG 유전자 발현에 미치는 영향

OPG 유전자 발현은 골절 발생 7일 후 대조군이 1.00±0.28였을 때 PHT 50 mg/kg 투여군은 1.18±0.14로 나타났으며 통계적 유의성이 없었다. PHT 100 mg/kg 투여군은 2.38±0.15로 나타났으며 통계적으로 유의하게 증가하였다. 골절 발생 14일 후 대조군이 1.00±0.16였을 때 PHT 50 mg/kg 투여군은 0.13±0.04로 나타났

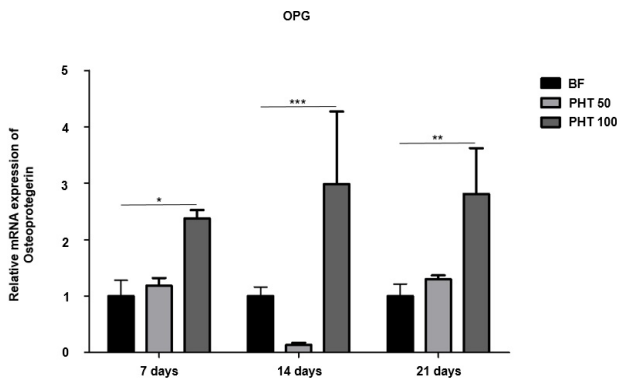


Fig. 13. Effect of PHT on mRNA level of OPG in bone callus from mouse tibia on 7th, 14th, and 21st day post fracture. C57BL/6J mice had tibia fracture and were treated with 50 and 100 mg/kg of PHT daily for 7, 14 and 21 days. Total RNA was isolated from bone callus of fractured tibia from non-treated and PHT-treated mice. RNA was subjected to qRT-PCR to measure expression of OPG gene with SYBR green. BF: bone fracture with non-treated group (control group), PHT 50: bone fracture with PHT-treated group (50 mg/kg), PHT 100: bone fracture with PHT-treated group (100 mg/kg), PHT: *Pahyeolsandong-tang*, mRNA: messenger RNA, OPG: osteoprotegerin, qRT-PCR: quantitative real-time polymerase chain reaction. Values are the mean±standard deviation. * $p<0.05$ vs BF group, ** $p<0.01$ vs BF group, *** $p<0.001$ vs BF group. Significances between groups were determined using two-way analysis of variance followed by a Bonferroni post hoc test.

며 통계적으로 유의성이 없었다. PHT 100 mg/kg 투여군은 2.99 ± 1.29 로 나타났으며 통계적으로 유의하게 증가하였다. 골절 발생 21일 후 대조군이 1.00 ± 0.21 였을 때 PHT 50 mg/kg 투여군은 1.30 ± 0.07 였으나 통계적으로 유의하지 않았다. PHT 100 mg/kg 투여군은 2.81 ± 0.80 로 나타났으며 통계적으로 유의하게 증가하였다(Fig. 13).

고찰

골절의 치유는 외상 등으로 손상된 골조직이 일련의 과정을 거쳐 골조직의 기질적 회복 및 기능적 회복이 이루어지는 것을 말한다¹⁰⁾. 골절이 발생하게 되면 대부분 자연적으로 유합되지만 치료를 제대로 받지 못하거나 대사성 문제, 환경적 문제로 인하여 지연유합 또는 불유합이 나타날 수 있다¹¹⁾. 골절 치료가 미흡할 경우 신체적 장애, 심리적 불안 및 경제적 손실 등을 야기하여 개인과 사회 모두에 막대한 손해를 초래할 수 있기

때문에 적절한 치료로 골 실질조직의 치유뿐 아니라 기능적 회복을 통해 일상에 복귀할 수 있게 하는 것이 중요하다.

골절의 한의학적 치료에 대해 여러 연구가 있었다. 특히 한약을 이용한 실험 연구로 골절 초기 活血化癥 목적으로 사용되는 처방 및 골절 후기에 補腎, 陽虛 상태 개선을 목적으로 사용되는 처방들에 대한 연구로 분류할 수 있었다. 活血化癥의 목적으로 쓰인 처방에 대한 연구는 Son 등¹²⁾의 순기활혈탕, Keum과 Kim¹³⁾의 복원활혈탕, Hang 등¹⁴⁾의 가미신통축어탕, Jung¹⁵⁾의 당귀수산, Lee와 Oh¹⁶⁾의 접골산, Ha와 Oh¹⁷⁾의 도홍사물탕, Lee¹⁸⁾의 화어전에 대한 연구가 있었다. 補腎, 陽虛 상태 개선을 목적으로 사용되는 처방들은 Ryum 등¹⁹⁾의 가미궁귀탕 및 가미궁귀탕가녹용, Li와 Oh²⁰⁾의 좌귀환, Kim²¹⁾의 청아원, Park과 Oh²²⁾의 진무탕 등이 있었다. 한편 단미재로 散瘀接骨의 목적으로 사용되는 자연동^{23,24)}에 대한 실험도 보고된 바 있다.

파혈산동탕은 『蘭室秘藏』腰痛門에 최초로 기재되었으며, 『東垣試效方』, 『醫學綱目』에는 파혈소통탕(破血消痛湯)이라는 명칭으로 기록된 처방이다. 『東醫寶鑑』에서는 『蘭室秘藏』을 인용하였으며, 처방 구성은 活血化癥 효능의 當歸, 蘇木, 水蛭, 破血除風 효능의 桂心, 清熱解毒 효능의 連翹, 發散風寒 효능의 羌活, 防風, 發散風熱 효능의 柴胡, 開竅醒神 효능의 麝香으로 이루어져 있다⁵⁾. 한편 『蘭室秘藏』의 본 처방 구성 중 肉桂가 『東醫寶鑑』에서는 桂心으로 기재되어 있다. 桂心은 肉桂에서 주피와 겉껍질층을 제거한 것으로 『東醫寶鑑』에서 ‘破血上服內冷痛’, ‘破瘀癰癥痼, 消瘀血, 續筋骨, 生肌肉, 下胞衣’ 등의 효능이 기재되었다⁵⁾. 이는 溫經通脈하는 肉桂와 비교하였을 때 어혈 제거 및 근골 유합에 대한 효능을 최대화하고자 대체한 것으로 생각된다. 본 처방의 특징 중 하나는 水蛭이 포함된 것이다. 水蛭은 어혈로 인한 癰癥積聚, 跌撲打傷과 같은 증상에 응용할 수 있다²⁵⁾. 水蛭의 주성분 중 하나인 hirudin은 fibrinogen이 thrombin에 작용하는 것을 억제하여 혈액의 항응고작용을 하며²⁶⁾, 또한 모세혈관을 확장하고 출혈을 유도하는 작용이 있다고 알려져 있다²⁷⁾. 이러한 연유로 어혈을 제거하고 혈류를 개선하여 골절 후 회복과정에 영향을 줄 수 있다고 보았기 때문에 파혈산동탕의 골 유합과 관련된 효과를 객관적으로 입증하기 위하여 본 실험을

진행하였다.

골절이 일어나게 되면 여러 인자들이 복합적으로 작용하여 치유과정이 진행된다¹¹⁾. 이러한 골절 치유과정은 크게 염증기(inflammatory phase), 복원기(reparative phase), 재형성기(remodeling phase)로 구분할 수 있다¹⁾.

염증기에는 혈종(hematoma)이 형성되고, 염증반응이 일어나면서 골형성 및 신생 혈관 형성을 위한 연쇄 반응이 나타나기 시작한다²⁸⁾. 복원기에는 혈종의 기질화(organization)가 나타나게 되며 골세포 및 가골 형성과 관련된 세포들의 증식과 분화가 나타난다²⁹⁾. 초기에 혈관이 없는 연성 가골(soft callus)이 형성되며, 점차 연성 가골에 신생 혈관이 형성되면서 연골내 골화 작용이 일어난다³⁰⁾. 이 시기를 거치면서 연성 가골은 경성 가골(hard callus)이 되고 조골세포가 작용하여 유골 및 직골 등이 만들어진다. 재형성기는 가골이 점차 무기화된 골 조직으로 바뀌고 골수강을 재형성하는 시기이다²²⁾. 파골세포에 의해 불필요한 가골 및 골조직 등이 흡수된 다음 조골세포에 의해 성숙한 층판골로 대체되어 막내 골화가 이루어지면서 골 유합을 이루게 된다²⁹⁾.

사람의 경우 염증기는 골절 후 대략 수 시간에서 5일 까지 기간이고, 복원기는 골절 후 4-40일가량 소요되며, 재형성기는 골절 후 25-50일가량 소요된다¹⁾. 재형성기의 경우 골조직의 강도는 일정부분 회복되지만 원래 뼈 모양을 회복하기 위해서는 수 년 가량 소요될 수도 있는 긴 과정이다²⁴⁾. Einhorn³¹⁾은 rat model에서 골절 발생 7일경에 연성 가골이 생성되고, 골절 발생 14일경 연성 가골이 경성 가골로 바뀌면서 골절 발생 21일경 골절 부위를 덮은 부위가 모두 경성 가골로 바뀐다고 하였다. 또한 Isaksson 등³²⁾은 mouse model에서 골절 발생 21일경에 가골의 크기가 최대치에 이르고 그 이후에는 점차 크기가 줄어들면서 가골 조직이 점차 성숙한 골조직으로 바뀌며 재형성기가 진행된다고 하였다. 이에 mouse model에서 골절 후 7일은 연성 가골 형성기, 14일은 경성 가골 형성기, 21일은 복원기에서 재형성기로 넘어가는 시점이라고 판단하였기 때문에 골절 발생 후 7일, 14일 및 21일을 기준으로 삼아 연구를 진행하였다.

파혈산동당의 골 유합 촉진 효과를 보기 위하여 본 연구를 설계하고 추출물(PHT)을 이용하여 실험을 실시하였다. *in vitro* 실험에서 PHT의 세포 독성 여부를 판

단하고자 조골세포의 전구체에 해당하는 MT3T3-E1 세포를 배양한 후 MTT assay를 실시하여 세포 생존능을 산출하였다. 그리고 PHT 투여 후 골 형성에 영향 주는 표지자들을 측정하여 상대적 유전자 발현량을 분석하였다. *in vivo* 실험에서 간독성 및 신독성을 확인하고자 혈액 생화학적 검사를 진행하였으며 PCR 분석을 통해 골 유합 관련 표지자들의 상대적인 유전자 발현량을 측정하였다.

in vitro 실험에서는 분화된 MT3T3-E1에 PHT를 각각 15.6-1,000 µg/mL의 농도로 처리한 것으로 MTT assay를 진행하였다. 15.6, 31.2 µg/mL 처치 군에서 대조군 대비 세포 생존능이 100% 이상으로 나왔으나 통계적으로 유의하지 않았고, 62.5-500 µg/mL 투여군에서는 대조군 대비 세포 생존능이 높게 나왔으며 통계적으로 유의하였다. 한편 1,000 µg/mL 투여군에서는 대조군 대비 세포 생존능이 낮게 나왔으며 통계적으로 유의하였기 때문에 이후 PHT를 500 µg/mL 이하로 투여하여 사용하였다. 또한 ALP 염색을 실시하여 PHT 투여 후 MT3T3-E1에서 ALP 증가 여부를 확인하였다. ALP는 체내 여러 조직에 존재하는 세포의효소이며, 부위별로 다양한 종류의 ALP 동위효소가 존재하는데 뼈와 간에서 약 95%가량 생성된다³³⁾. 그 중 bone-specific ALP는 조골세포에 의해 생산되기 때문에 조골세포 활성 증가를 암시한다³⁴⁾. 또한 bone-specific ALP는 골 기질화에 일차적으로 작용하며 반감기가 상대적으로 길어 일중변이가 거의 없기 때문에 골 형성에 대한 반응을 알아보기 위해 유용하다³⁵⁾. 염색 실시 후 100배율 사진에서 PHT 62.5 µg/mL 농도 이하로 처리한 군들에서 염색이 짙게 된 것을 관찰하였다. 이를 통해 PHT 62.5 µg/mL 이하로 투여된 군들에서 조골세포의 분화가 비교적 활성화되었음을 확인하였다.

in vivo 실험에서는 PHT의 생체 안전성을 평가하기 위해 mouse의 혈액을 채취하여 혈액 생화학적 검사를 시행하였다. 간독성 및 신독성 여부를 판단하기 위하여 AST, ALT, creatinine 및 BUN을 분석하였다. AST, ALT는 간 실질 세포의 손상에 민감한 편으로 간 손상과 관련이 있으며³⁶⁾, BUN과 creatinine은 신장을 통해 배설되는데 BUN은 혈중 요소를 나타내는 지표이고, creatinine은 creatine phosphate가 무효소적 변환을 거치면서 생성되며 BUN과는 달리 근육의 양에 비례하지만식이 단백질

의 양에 따라 변화하지 않아 신기능을 비교적 정확하게 반영하는 지표이다³⁷⁾. 본 연구에서 ALT와 BUN은 모두 정상 범주 이내였다. 하지만 AST의 경우 PHT 50 mg/kg 투여군에서 정상치보다 높게 나왔다. AST에 대한 결과는 농도에 따라 일정한 상승을 보이지 않고 편차가 크게 나타났기 때문에 AST에 대한 유의미한 상승을 야기한다고 단정할 수 없으나 추후 간실질 조직에 대한 조직학적 검사 등 추가적인 검사가 보완되어야 한다고 생각한다. Creatinine의 경우 PHT 50 mg/kg, 100 mg/kg 투여군 모두에서 정상 범주를 상회하였다. 이는 약의 용량과 투여 기간에 따라 신 기능에 영향을 줄 가능성이 있기 때문에 추후 glomerular filtration rate 등 신장 기능을 잘 반영할 수 있는 지표를 통한 후속 연구가 필요하다고 본다.

본 저자는 PHT의 골 유합에 대한 효과를 보고자 mouse에 인위적으로 경골 골절을 유발하였고, 골절 유발 7, 14, 21일 후에 골절 유합 과정에서 나타나는 조골세포, 연골세포 및 파골세포 관련 인자의 상대적 유전자 발현량을 PCR을 통해 측정하였다. 이를 통해 PHT가 OCN, Runx2, OSX, Col2a1, Sox9, RANKL, OPG의 발현량에 유의미한 영향을 미치는지 살펴봤다.

OCN은 칼슘이온과 결합력이 높고 골 흡수 및 골 재형성에 관여하며 조골세포에서 생성되어 조골세포의 후기 분화단계 동안 나타난다³⁸⁾. Lee 등³⁹⁾은 OCN의 발현이 경성 가골로의 변화 및 골 재형성에 기여한다고 하였다. 따라서 OCN 발현의 가속화는 골절 치유에 대한 지표로 볼 수 있다. 본 연구에서 OCN은 골절 발생 21일 후의 PHT 50 mg/kg 투여군과 100 mg/kg 투여군에서 유의미한 증가를 보였다. 이는 PHT가 골유합과정에서 복원기 경성 가골이 형성된 후 재형성기에 넘어갈 무렵 즈음에 OCN 발현량 증가를 유도함으로써 골 유합 및 골절 부위 안정성 유지에 도움이 될 수 있을 것으로 보인다.

Runx2는 중간엽 줄기세포가 조골세포로 분화하기 위해 필요한 인자로 조골세포로 발생할 수 있는 골전구세포 유도에 관여하여 조골세포의 증식을 조절한다⁴⁰⁾. 따라서 Runx2 발현은 조골세포의 활성화를 유도할 수 있어 골형성 증가를 나타내는 지표로 볼 수 있다. 본 연구에서 Runx2의 발현량은 골절 발생 14일 후에서 PHT 50 mg/kg 투여군과 100 mg/kg 투여군에서 모두 유의미한 증가를

보였으며, 골절 발생 21일 후에 PHT 100 mg/kg 투여군에서 유의미하게 증가하였다. Runx2의 발현증가가 경성 가골 형성기 무렵에는 상대적으로 저농도의 PHT에 반응하였고, 재형성기 무렵에는 상대적으로 고농도에 반응하여 나타났다고 볼 수 있다. 투여 용량과 투여 시기에 따라 효과가 다르게 발생할 수 있음을 암시하고 있다. 한편 골절 발생 7일 후 PHT 50 mg/kg 투여군 및 14일 후 PHT 100 mg/kg 투여군에서는 유의미하게 감소하였다. 이는 연성 가골기와 경성 가골기에는 오히려 Runx2 발현을 감소시킬 가능성을 암시하기 때문에 골절 치유 과정에 영향을 줄 수 있다고 본다. 추후 약제의 투여 시기와 농도에 따른 반응에 대한 추가적 연구가 필요하다고 판단하는 바이다.

OSX는 Runx2와 더불어 전조골세포를 성숙한 조골세포로 분화하는데 필요한 인자로 Runx2보다 하위 단계에서 작용한다⁴¹⁾. Nishio 등⁴²⁾은 OSX를 knock-out시킬 경우 중간엽 줄기세포에서 골모세포로 분화가 억제되어 막내 골화가 일어나지 않는다고 하였다. 이처럼 OSX는 Runx2와 마찬가지로 조골세포의 발생에 관여하기 때문에 OSX의 발현은 골 치유과정의 지표가 된다고 볼 수 있다. 본 연구에서 OSX는 골절 발생 7일 후의 PHT 100 mg/kg 투여군, 골절 발생 14일 후 50 mg/kg 투여군 및 골절 발생 21일 후 PHT 50 mg/kg과 100 mg/kg 투여군에서 유의하게 증가하였다. 전반적인 시기에 따라 유의한 증가가 보였고 특히 21일 후에서 50, 100 mg/kg 투여군에서 현저하게 증가하였다. 이는 PHT가 골절 후 연성 가골 형성기 및 경성 가골 형성기에도 작용할 수 있지만, 특히 재형성기로 넘어갈 무렵에 OSX 발현의 증가를 유도함으로써 골 치유과정의 단축에 기여할 수 있다고 본다.

골 형성은 막내(intramembranous) 골 형성과 연골내(endochondral) 골 형성의 두 가지 과정을 통해 나타난다⁴³⁾. 연골모세포는 골 발생에 중요한 연골내 골 형성에 작용하여 연골을 형성하는데, 이를 통해 형성된 연골 기질의 주요소는 Type II collagen이다. Type II collagen은 한 개의 유전자(Col2a1)로 구성되어 있고 α1 chain 3 가닥으로 되어있는 삼중 나선 구조이다⁴⁴⁾. 따라서 Col2a1은 골형성에서 연골 조직 발현을 나타내며 Col2a1 발현의 가속화는 골절 치유과정의 잠재적 지표가 될 수 있다. 본 실험에서 골절 발생 14일 후 PHT 50 mg/kg과

100 mg/kg 투여군 모두에서 Col2a1의 발현이 유의하게 증가하였다. 이는 PHT가 특히 경성 가골 형성기에 작용하여 연골 형성에 기여할 수 있다고 생각한다.

골절 치유 과정에서 중간엽 줄기세포는 조골세포와 연골세포로 분화되어 뼈 형성이 시작되는데 이 중 Sox9은 중간엽 줄기세포가 골연골 전구체 세포로 분화하는 것을 조절하는 인자이다¹¹⁾. Sox9이 억제될 경우 연골의 주성분인 type II collagen과 aggrecan 등의 발현이 감소하여 연골의 형성 및 발달을 저해한다⁴⁵⁾. Sox9은 연골 세포 분화에서 핵심적인 전사인자이며, 이는 연골 생성 뿐 아니라 초기 골격 뼈대(templates) 형성에 있어서도 중요하게 작용한다⁴⁶⁾. 따라서 Sox9의 과발현은 골절 치유 과정의 잠재적 지표로 볼 수 있다. 본 연구에서 Sox9은 골절 발생 14일 및 21일 후의 PHT 50 mg/kg과 100 mg/kg 투여군 모두에서 유의하게 증가하였다. 이는 PHT가 경성 가골 형성기 및 재형성기로 넘어가는 때 Sox9 발현을 증가시켜 연골 형성에 작용할 수 있다고 생각한다.

RANKL은 조골세포 및 활성화된 면역세포에서 생성되며 파골세포 전구세포의 수용체인 RANK에 결합하여 파골세포 생성을 활성화하는 역할을 한다⁴⁷⁾. RANKL은 골 재흡수를 통한 재형성 과정상 중요한 인자로 Dougall 등⁴⁸⁾은 RANKL이 형성되지 않을 경우 파골세포 생성이 억제되어 심한 골 석회화증을 야기한다고 하였다. RANKL은 골절로 인해 손상된 골조직의 재흡수 과정에 작용하여 골 치유과정에 기여하는 지표로 볼 수 있다. 본 연구에서 골절 발생 7일 후 PHT 100 mg/kg 투여군 및 14일 후 PHT 50 mg/kg 투여군에서 유의하게 증가하였다. 이는 PHT가 골절 유발 후 연성 가골 형성기 및 경성 가골 형성기에 골편의 재흡수를 위한 파골세포 활성화에 영향을 미치고 이를 바탕으로 새로운 골조직 형성의 토대를 형성한다고 생각한다. 다만 재형성기로 넘어가는 시점에서는 통계적 유의성을 나타내지는 않았지만 농도와 관계없이 PHT 투여 후 RANKL 발현 정도가 감소하였다. 때문에 해당 시기에 투여하는 것이 골절 치유형성 과정에 있어 골 재흡수를 저해시킬 수 있는 가능성이 있기 때문에 이에 대한 추가적 연구가 필요하다고 생각한다.

OPG는 조골세포 및 골수 내의 다른 세포에서 생산되며 파골세포 전구세포의 RANK와 RANKL이 결합하는 것을 막아 파골세포 생성을 억제하는 기능을 한다⁴⁹⁾.

또한 성숙한 파골세포의 작용 억제에 관여하여 골흡수 조절에 중요한 역할을 하고 있다⁵⁰⁾. 이러한 길항작용을 통해 OPG는 골절 복구동안 막내 골 형성 및 연골내 골 형성을 가능하게 한다⁵¹⁾. Mizuno 등⁵²⁾은 OPG가 결여된 mouse에서 지나친 골흡수 작용으로 인하여 골다공증이 발생한 것을 확인하였으며, 이는 OPG가 골 형성에 중요한 작용을 하는 것을 나타낸다. 때문에 OPG는 파골 세포 조절을 통하여 골 형성에 기여하는 지표로 볼 수 있다. 본 실험에서는 골절 발생 후 7, 14, 21일의 PHT 100 mg/kg 투여군에서 OPG가 유의하게 증가하였다. 이는 PHT가 기간에 상관없이 상대적 고농도에서 OPG 발현을 증가시킬 수 있으며 복원기 및 재형성기 초반에 과발현된 RANKL에 대한 길항작용을 통해 골 형성에 기여할 수 있으리라고 보인다.

이를 종합하였을 때 *In vitro* 실험에서 PHT 처리 시 Col2a1, OCN, Runx2 및 OSX 등의 조골세포 분화와 관련된 표지자의 유전자 발현이 유의미하게 증가하였고, *In vivo* 실험에서 PHT 투여군에서 OCN, Runx2, OSX, Sox9, Col2a1와 같은 조골세포 및 연골 관련 표지자와 RANKL, OPG같은 파골세포 관련 표지자들의 유전자 발현량이 유의미하게 증가하였다. 이는 PHT가 조골세포 활성화, 연골 형성 및 파골세포의 활성화에 기여하여 골절 치유에 영향을 미칠 수 있음을 보여주었다.

하지만 본 연구에서는 골 형성 및 치유에 작용하는 transforming growth factor- β , bone morphogenetic protein-2, cyclooxygenase-2 등 유전자 발현량을 측정하지 못하였으며 실험 기간이 3주로 국한되어 복원기 이후의 과정에 대한 골 유합 효과를 확인하지 못한 한계점이 있었다. 또한 creatinine의 상승이 관찰되어 생체 독성에 영향을 미칠 수 있는가에 대한 부분도 추가적인 연구가 필요하다. 향후 다양한 인자에 대한 유전자 발현 측정, 실험 기간의 다변화 및 임상적 사용에 대한 추가 연구를 통해 이러한 부분이 보완되어야 할 것이다.

결론»»»

파혈산동탕이 골절 유합에 어떠한 영향을 미칠 수 있는지 살펴보고자 본 연구를 진행하였다. 경골 골절을 유발시킨 mouse에 PHT 투여 후 조골세포 및 파골세포

형성 관련 표지자들에 대한 유전자의 상대적 발현량을 측정하였고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *in vitro* 실험 결과, MC3T3-E1에 PHT로 처리 시 조골세포 분화와 관련된 OCN, Runx2, Col2a1의 유전자 발현이 증가하였다.
2. *in vivo* 실험에서 PHT 투여군에서 AST와 creatine의 수치가 대조군과 비교하였을 때 높게 나와 추후 추가적인 연구가 필요하다.
3. *in vivo* 실험 결과 PHT 투여군에서 조골 세포 관련 표지자인 OCN, Runx2, OSX, Sox9, Col2a1 및 파골세포 관련 표지자인 RANKL, OPG 유전자 발현이 증가하였다.

상기 결과를 토대로 PHT는 골절 유합을 유의미하게 촉진시키며 향후 실제 임상에서도 적절한 변증을 통해 골절 치료에 적용할 수 있을 것으로 생각한다.

References>>>>

1. The Society of Korean Medicine Rehabilitation. Korean rehabilitation medicine. 4th ed. Paju:Koonja Publishing. 2015:206-10.
2. The Korean Orthopaedic Association. Orthopaedics. 7th ed. Seoul:ChoiSin medical Publishing Co. 2013:87, 94-5, 1161-2, 1385-94.
3. Ji SY. Bibliographic study on method of treating the diseases inside the body applied to fracture. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 1995;8(1):113-29.
4. Wang D. Oedaebiyo. 1st ed. Seoul:Sunbosa. 1975:749-50.
5. Heo Joon. Donguibogam. 1st ed. Seoul:Bubin Publishing Co. 2012:785, 1575, 1582.
6. Jo G. Seongjechongrok. 1st ed. Seoul:Yeogang Publishing Co. 1987:460-4.
7. Jin H, Wang B, Li J, Xie W, Mao Q, Li S, Dong F, Sun Y, Ke HZ, Babij P, Tong P, Chen D. Anti-DKK1 antibody promotes bone fracture healing through activation of β -catenin signaling. Bone. 2015;71(1):63-75.
8. Sharma N, Arora S, Madan J. Nefopam hydrochloride loaded microspheres for post-operative pain management: synthesis, physicochemical characterization and in-vivo evaluation. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2018;46:138-46.
9. Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. J Orthop Res. 1984;2(1):97-101.
10. Frost HM. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. Clin Orthop. 1989;(248):283-93.
11. Park SG, Shon OJ. Impaired bone healing metabolic and mechanical causes. J Korean Fract Soc. 2017;30(1):40-51.
12. Son WT, Song TW, Oh MS. Healing effect of Soongiwhalhyultang extract on tibia fractured rats. J Korean Med Rehabil. 1999;9(2):350-62.
13. Keum DH, Kim SS. Healing Effect of Bokwonhwalhyul-tang on tibia fractured rats. The Journal of the Korea Institute of Oriental Medical Informatics. 2002;8(1):46-66.
14. Hang TG, Oh MS, Song TW, Kim KS. Helling effect of Sintongchugoetang Water Extract on Tibia Fractured rats. Daejeon University, Institute of Korean Medicine. 1999;8(1):727-38.
15. Jung IM. Effects of Dangkwisoo-san(dangguixu-san) and native copper on TGF- β 1 expression in fractured rats [dissertation]. Naju (KR): Dongshin University; 2007.
16. Lee HG, Oh MS. Effects of Jeopgolsan (JGS) extract on fracture healing. J Korean Med Rehabil. 2018;28(1):1-17.
17. Ha HJ, Oh MS. Experimental study of Dohongsamul-tang (Taohongsiwu-tang) on fracture healing. J Korean Med Rehabil. 2020;30(2):47-66.
18. Lee SH. Affirmative effect of Hwaweo-jeon(Huayu-jian) in osteoblast cells and tibia fracture-induced mice [dissertation]. Wonju(KR):Sangji University; 2020.
19. Ryum YH, Oh MS, Song TW. Helling effect of Gamigungguitang and GamigungguitangGaNokyong water extract on tibia fractured rats. Daejeon University, Institute of Korean Medicine. 1999;8(1):675-87.
20. Li YC, Oh MS. Effects of Joaguihwan (JGH) extract on changes of anti-oxidation, anti-inflammatory in RAW 264.7 cells and on factors related with bone metabolism in skull fractured rat. J Korean Med Rehabil. 2016;26(3):31-49.
21. Kim MK. An experimental study of Cheong-A-Won on factors related with bony union in femur fractured mice [dissertation]. Daejeon (KR):Daejeon University; 2018.
22. Park JO, Oh MS. The healing effect of Jinmu-tang (Zhenwu-tang) in femur fractured rats. J Korean Med Rehabil. 2020;30(2):19-35.
23. Keum DH, Kim SS. Healing effect of pyrite on tibia fractured rats. J Korean Med Rehabil. 2002;12(2):61-90.
24. Shin KM, Jung CY, Hwan MS, Lee SD, Kim KH, Kim KS. Effects of administration of pyritum on fracture healing in mice. Journal of Acupuncture Research. 2009;26(5):65-75.
25. Union of College of Korean Traditional Medicine. Phytology (Herbal medicine). Seoul:Yeonglimsa. 2004:

- 473-4.
26. Kejian L. Leech treatment of acute ischemic stroke systematic review of randomized controlled trials. *Mod J Integr Tradit Chin West Med*. 2006;15(17):13-5.
27. Lee JY, Kim EK, Oh HA, Lee HS, Sohn Y, Jung HS, Kim YB, Park SK, Sohn NW. Effect of *Whitmania pigra whitman* on the allergic inflammatory response. *J Korean Orient Med*. 2008; 29(2):81-95.
28. Oryan A, Monazzah S, Bigham-Sadegh A. Bone injury and fracture healing biology. *Biomed Environ Sci*. 2015;28:57-71.
29. Ai-Aql ZS, Alaghl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res*. 2008;87:107-18.
30. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011;42:551-5.
31. Einhorn TA. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma*. 2005;19(10 Suppl):S4-S6.
32. Isaksson H, Grongroft I, Wilson W, Donkelaar CC, Rietbergen B, Tami A, Huiskes R, Ito K. Remodeling of fracture callus in mice is consistent with mechanical. *J Orthop Res*. 2009;27(5):664-72.
33. Magnusson P, Larsson L, Magnusson M, Davie MW, Sharp CA. Isoforms of bone alkaline phosphatase: characterization and origin in human trabecular and cortical bone. *J Bone Miner Res*. 1999;14(11):1926-33.
34. Allen MJ. Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. *Veterinary Clinical Pathology*. 2003;32(3):101-13.
35. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover Part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev*. 2005;26:97-122.
36. Yang JM, Sung DM, Kim EG, Lee SD. Effects of long-term intake of Korean medicine on gynecology. *J Korean Med*. 2020;41(1):84-92.
37. Kim DW, Oh SH, Lee EJ, Kim HK, An IH, Kim SM, Gwen MH, Lee SM, Huh JH. The change of renal function in patient with long term herb medication by frequently prescribed formular. *KOMS*. 1994;15(1):410-8.
38. Yoshikawa M, Ogata A. Expression of the osteoblastic marker in human alveolar bone cells spheroid. *J Jpn Soc Periodontol*. 2006;48:276-84.
39. Lee HS, Lee CS, Jang JS, Lee JD, Um SM. Changes of serum alkaline phosphatase and osteocalcin during fracture healing. *J Korean Orthop Assoc*. 2002;37(3):411-5.
40. Komori T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by Runx2. *Cell and Tissue Research*. 2009;339(1):189-95.
41. Pierre JM. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2008;473(2):98-105.
42. Nishio Y, Dong Y, Paris M, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Drissi H. Runx2-mediated regulation of the zinc finger osterix/Sp7 gene. *Gene*. 2006;372:62-70.
43. Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2000;16:191-220.
44. Kim OH, Nishimura K, Cho TJ. Imaging diagnosis of skeletal dysplasias and malformation syndromes. Seoul: Ryomoongak. 2019:15-7.
45. Cha BH, Kim JH, Kang SW, Do HJ, Jang JW, Choi YR, Park HS, Kim BS, Lee SH. Cartilage tissue formation from dedifferentiated chondrocytes by codelivery of BMP-2 and SOX-9 genes encoding bicistronic vector. *Cell Transplant*. 2013;22(9):1519-28.
46. Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, Crombrughe B. Sox9 is required for cartilage formation. *Nature Genetics*. 1999;22(1):85-94.
47. Sobacchi C, Menale C, Villa A. The RANKL-RANK axis: a bone to thymus round trip. *Front Immunol*. 2019;10:629.
48. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, Daro E, Smith J, Tometsko ME, Maliszewski CR, Armstrong A, Shen V, Bain S, Cosman D, Anderson D, Morrissey PJ, Peschon JJ, Schuh J. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev*. 1999;13:2412-24.
49. Siggelkow H, Eidner T, Lehmann G, Viereck V, Raddatz D, Munzel U, Hein G, Hufner M. Cytokines, osteoprotegerin, and RANKL in vitro and histomorphometric indices of bone turnover in patients with different bone diseases. *J Bone Miner Res*. 2003;18:529-38.
50. Yamamoto M, Murakami T, Nishikawa M, Tsuda E, Mochizuki S, Higashio K, Akatsu T, Motoyoshi K, Nagata N. Hypocalcemic effect of osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin in the thyroparathyroidectomized rat. *Endocrinology*. 1998; 139:4012-5.
51. Aguila HL, Rowe DW. Skeletal development, bone remodeling, and hematopoiesis. *Immunological Review*. 2005;208(1):7-18.
52. Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Ozawa H. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;247:610-5.