

# 六味地黃湯이 대퇴골절 동물모델의 골절 유합인자 및 형태학적 변화에 미치는 영향

김현석 · 전동휘 · 오민석  
대전대학교 한의과대학 한방재활의학과교실

## Healing Effect of *Yukmijihwang-tang* on Fracture Factor and Morphological Changes in Femur Fractured Mice

Hyun-Seok Kim, K.M.D., Dong Hwi Jeon, K.M.D., Min-Seok Oh, K.M.D.  
Department of Korean Medicine Rehabilitation, College of Korean Medicine, Daejeon University

This research was supported by the Daejeon University research grants (2018).

RECEIVED October 7, 2020  
REVISED October 19, 2020  
ACCEPTED October 21, 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@dj.ac.kr

Copyright © 2020 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

**Objectives** The purpose of this study is to evaluate the healing effect of *Yukmijihwang-tang* (YM) on femur fractured mice.

**Methods** Mice were randomly divided into 6 groups: normal, control, positive control, YM with low, medium, high dosage each. All groups were prepared with femur fracture and treated differently. In order to measure bone regeneration effects, we analysed the levels of cyclooxygenase-2 (COX2), bone morphogenetic protein-2 (BMP2), collagen type II alpha 1 chain (Col2a1), Sox9, runt-related transcription factor 2 (Runx2), and osterix genes expressed in bone. For morphological analysis, muscles were removed and femur was observed with naked eye.

**Results** COX2 gene expression in bone marrow significantly decreased. BMP2 gene expression significantly increased. Col2a1 gene expression significantly increased. Sox9 gene expression increased as well. Runx2 gene expression in bone marrow increased, but there was no statistical significance. Osterix gene expression significantly increased. Union of the fracture site progressed more in YM group compared to the control group. The fracture union score was significantly decreased in YM group compared to the control group.

**Conclusions** YM showed anti-inflammatory effect, promoted bone regeneration by stimulating the bone regeneration factor. In conclusion, YM can help fracture healing and it will be applied clinically to patients with fracture. (**J Korean Med Rehabil 2020;30(4):17-30**)

**Key words** Korean traditional medicine, Anti-inflammatory agents, Gene expression, Bone regeneration, Fracture healing

## 서론»»»»

골절은 외상, 반복적인 과부하, 종양 등으로 인해 뼈의 연속성이 소실된 상태로 대부분 주위의 연부조직 손상이 동반된다<sup>1)</sup>. 평균 수명이 연장되고 이로 인해 골다

공증이 동반된 노인 인구가 증가하면서 골절의 발생률은 지속적으로 증가하는 추세이다<sup>2)</sup>.

골절의 치유 과정은 염증기, 연성 가골기와 경성 가골기로 이루어진 복원기, 재형성기로 나누어지며, 각 단계들은 어느 정도 중복되면서 이행된다<sup>3)</sup>.

골절 치료의 궁극적 목표는 통증 완화, 골절의 정복 및 정복상태의 유지, 골유합 촉진, 골절 후에 유발될 수 있는 골절질환 예방, 기능 및 형태 회복을 통해 조기에 본래의 생활로 복귀시키는 데 있다<sup>1,4)</sup>.

한의학 서적 중 『聖濟總錄』<sup>5)</sup>은 골절 치료의 약물 요법에 대해 자세히 설명하고 있는데, 초기에는 活血祛瘀, 중기에는 接骨續筋, 후기에는 健壯筋骨, 補氣養血하는 방법을 활용한다.

한편 腎臟은 藏精, 主骨, 生骨髓하여 骨의 성장발육을 主管하는 臟器로서<sup>6)</sup>, 腎臟과 골절은 밀접한 관련이 있어, 滋腎陰法의 대표적인 처방인 六味地黃湯<sup>7)</sup>이 골절 유합에 미치는 영향을 실험적으로 규명하는 것은 의미 있는 일로 생각된다. 또한, 六味地黃湯의 골형성에 관한 연구로 Shin 등<sup>8)</sup>은 六味地黃湯 加味方이 transglutaminase type 2, bone morphogenetic protein-4 (BMP4)의 활성을 증가시키고, Park 등<sup>9)</sup>은 六味地黃湯이 bone morphogenetic protein-2 (BMP2)와 bone morphogenetic protein-1, osteonectin, matrix gla protein, collagen type 1 등의 전사량을 조절한다고 보고하고 있으나, 두 논문 모두 *in vitro* 연구로 골절 유합에 대한 실험적 연구로써는 한계가 존재한다.

이에 저자는 六味地黃湯이 골절 동물모델의 골절유합에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험동물에 대퇴부 골절을 유발한 후 BMP2, collagen type II alpha 1 chain (Col2a1), Sox9, runt-related transcription factor 2 (Runx2), osterix를 측정하고 골절 부위의 형태학적 변화를 관찰한 결과, 의미 있는 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

실험에 사용한 六味地黃湯 (Yukmijihwang-tang, YM)의 구성 약재는 참다림 한약국(Daejeon, Korea)으로부터 구입하여 사용하였으며, 구성 약재 및 1첩 분량은 『方藥合編』<sup>10)</sup>에 근거하였다(Table I).

**Table I.** The Herbal Composition of Yukmijihwang-tang

Botanical name	Amount (g)
<i>Rehmanniae Radix Preparata</i>	16
<i>Dioscoreae Rhizoma</i>	8
<i>Corni Fructus</i>	8
<i>Paeoniae Radix Alba</i>	6
<i>Moutan Cortex Radicis</i>	6
<i>Alismatis Rhizoma</i>	6
Total amount	50

### 2) 동물

실험동물은 대한바이오링크(Eumseong, Korea)에서 7주령 수컷 C57/BL6 mouse (19-22 g)를 분양받아 사용하였다. 동물은 물과 고형사료를 실험 당일까지 자유롭게 섭취할 수 있게 하였다. 실험동물은 자유식이 하면서 12시간 light-dark cycle 및 23±1°C의 환경에서 7일간 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다. 본 연구의 동물 실험은 대전대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 진행하였다(승인번호: DJUAR2017-025).

## 2. 방법

### 1) 시료 추출

YM을 제조하기 위하여 2첩 분량의 한약재 100 g에 1 L의 증류수를 넣은 뒤 약탕기 (Daewoong, Korea)를 사용하여 2시간 동안 열수추출하였다. 끓인 약재는 Whatman No. 2 filter (Maidstone, UK)로 여과해서 용액에 추출된 성분만 분리하였다. 여액은 rotary evaporator (Buchi, Switzerland)로 70°C에서 감압증발 후 동결건조하여 19.17 g의 건조분말을 얻어 추출 효율은 19.17%이었다. 분말은 -80°C에 분주하여 보관하였으며 사용하기 전에 식염수 또는 증류수로 희석하고 0.45 µm 필터로 거른 뒤에 사용하였다.

### 2) 화학 분석 방법

YM 건조분말을 증류수에 용해하여 3 µL를 liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) 분석에 사용하였다. LC/MS 분석은 Dionex ultra-high pressure liquid chromatography system (Thermo Fisher Scientific, Warrington, UK)과 ABSciex Triple ToF 5600+ (SCIEX,

Framingham, MA, USA)를 이용하여 분석하였다. ACQUITY UPLC BEH C18 column (2.1×150 mm, 1.7 μm; Waters Co., Milford, MA, USA)을 사용하여 크로마토그래피 분석을 실시하였고 40°C에서 이동상 A (water)와 이동상 B (0.1% formic acid를 포함하는 acetonitrile)를 사용하여 0.4 mL/min의 flow rate로 분획하였다. 초기 농도 구성은 95%A/5%B를 1분 동안 유지하고 20분까지 80%B로 증가시킨 후 24분까지 0%A로 낮춰 3분동안 유지하였다. Column 재사용을 위해 3분 동안 초기 농도구배 조건에서 평형을 이루게 하는 방법으로 세척하였다. 200-500 nm의 파장에서 검출되는 물질들은 photodiode array를 사용하여 측정하였다. Peakview system (SCIEX)에서 제공하는 menu-driven 소프트웨어를 이용하여 Data-dependent tandem mass spectrometry (MS/MS) 분석을 실시하였다. 모든 분석은 automatic gain control conditions으로 수행하였다.

### 3) 골절 유발 방법

실험동물에게 avertin (Sigma Aldrich Co., Ltd., St. Louis, MO, USA) 300 mg/kg을 복강 내 주사하는 방법으로 마취한 뒤, 한쪽 다리의 털을 제거하였다. 골절은 Bonnarens과 Einhorn의 방법<sup>11)</sup>에 따라 진행하였는데 실험동물의 앞다리를 평평한 판 위에 올린 뒤 대퇴골 중앙부에 두께 2 mm, 너비 15 mm의 탄소강으로 만들어진 무딘 날을 위치시켰다. 무딘 날 위로 길이 100 cm, 내부 지름 17 mm의 관을 수직으로 세운 후 무게 16.28 g, 지름 15.87 mm의 쇠구슬을 떨어뜨렸다. 골절 후 해당 부위를 나무 부목(10×3 mm)으로 지지한 뒤 접착붕대로 감았다.

### 4) 동물 실험 설계

실험동물은 무작위로 6그룹으로 나뉘었다. 각 군마다 실험동물을 12마리씩 배속시키고, 골절 후 3일, 7일마다 6마리씩 치사하였다. 정상군(naive)은 대퇴부 골절을 유발하지 않았고, 나머지 그룹의 실험동물은 대퇴부에 골절을 유발하였다. 실험 약물은 골절을 유발한 다음날부터 일정 시간에 1일 1회 경구 투여하였다. 대조군(control)은 생리식염수(phosphate buffered saline, PBS)를 경구 투여하였고, 양성 대조군은 tramadol (20 mg/kg; Sigma Aldrich Co., Ltd.)을 경구 투여하였다. 실험군(YM)

은 YM (100, 200, 300 mg/kg)을 경구 투여하였다. 실험 기간 중에 실험동물에게 부작용은 나타나지 않았다.

### 5) Bone marrow 분리

심장에서 직접 채혈을 하여 치사한 실험동물의 bone marrow를 분리하기 위해 몸통에서 골절을 유발한 대퇴부(오른쪽 다리) 전체를 분리하였다. 분리한 대퇴부의 근육들을 가위를 사용하여 최대한 제거한 뒤 femur와 tibia를 분리하였다. Femur와 tibia의 양 끝을 가위로 잘라서 골간부위 영역만을 취했다. 골간의 골수공간에 23 gauge의 3 mL 주사기를 이용하여 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 세포 배양액을 밀어넣는 방법으로 골수를 분리하였다. 골수 조직을 주사기로 넣고 빼는 과정을 여러 번 반복하여 세포들을 하나씩 분리하였다. 용액에 남은 찌꺼기나 부서진 뼈조각들을 제거하기 위해 70 μm의 strainer (BD biosciences, San Jose, CA, USA)로 걸러주었다. 5분 동안 1,500 rpm에서 원심분리하고 상등액을 제거하여 골수조직 분리에 사용한 DMEM 배양액을 제거하였다.

### 6) Total RNA 추출

채취한 골수에서 총 함량 RNA를 추출하기 위해 다음과 같이 시행하였다. 실험동물에서 채취한 골수세포에 10 mL의 PBS를 넣고 pipeting하여 세포를 풀어주고 5분 동안 1,500 rpm에서 원심분리하고 상등액을 제거하여 세척한 후 남아있는 골수세포에 easy blue (iNtRON, Seongnam, Korea) 0.5 mL를 가하여 호모게나이저로 세포를 갈아주었다. 이후 lysis된 골수세포 용액에 클로로포름 100 μL를 넣은 뒤 vortex를 사용하여 용액이 잘 섞이도록 교반하고 15분간 13,000 rpm, 4°C에서 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액 200 μL를 새로운 튜브에 옮겨 아이소프로판올 200 μL를 가하고 튜브를 위아래로 뒤집는 과정을 4-5회 반복하여 용액이 잘 섞이도록 한 후 실온에서 10분간 방치하였다. Total RNA를 침전시키기 위해 4°C, 13,000 rpm에 10분간 원심분리한 뒤 상등액을 제거하여 침전된 RNA를 얻은 뒤, 75% 에탄올 1 mL를 가하고 펠렛을 씻어서 남아있는 불순물을 제거하였다. 펠렛을 잘 말린 뒤, DEPC water (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 20-50 μL를 첨가하여 RNA를 녹였다.

7) complementary DNA (cDNA) 합성

NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific)으로 얻은 RNA를 200 ng/μL로 정량하고, Easy cDNA synthesis kit (NanoHelix, Daejeon, Korea)을 사용하여 cDNA를 합성하였다. RNA 주형 5 μL, Oligo-d(T) 1 μL, DEPC water 9 μL를 넣고, 5분 동안 65°C에서 반응시킨 뒤 즉시 ice에 방치하였다. 미리 만들어둔 두 번째 혼합물 (5× RT reaction mix 4 μL + RT enzyme mix 1 μL)을 각 튜브에 5 μL씩 넣어 50°C에서 40분, 70°C에서 10분 동안 반응하여 cDNA를 합성하였다.

8) Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

유전자 발현을 측정하기 위해 Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 RT-qPCR을 시행하였고, 기기는 QuantStudio™ 3 Real Time PCR system (Thermo Fisher Scientific)을 사용하였다. 모든 유전자의 PCR 산물 크기는 100 bp 내외로 하였고, Tm (melting temperature) 값은 60°C 부근으로 디자인하였다. Real-time PCR 반응은 총 20 μL 내에 1/3로 희석한 cDNA 2 μL와 10 μL의 2× SYBR mix, primer는 각각 0.3 μL씩 10 pmol/μL의 농도로 첨가하였고 나머지는 증류수로 채웠다. 모든 유전자의 증폭 cycle은 40 cycles을 적용하였고, PCR 증폭 단계는 다음과 같이 실시하였다. Hot start를 위하여 95°C에서 10분, 증폭 단계의 denaturation을 95°C에서 15초, annealing을 60°C에서 60초, extension을 72°C에서 30초간 반복하며, 각 cycle의 extension 뒤에 형광 값을 기록하였다. 모든

cycle이 완료된 뒤, primer의 특이성 확인을 위해 melting curve 분석을 실시하였다. 결과 분석은 Thermo Fisher Scientific에서 제공하는 Real-Time PCR Instrument software를 사용하였다(Table II).

9) 골절 부위의 형태학적 변화

실험동물을 치사한 뒤 골절된 대퇴골을 분리하고 육안으로 확인하여 골절이 치유된 정도에 따라 아래의 기준으로 점수를 부여하였으며 점수가 낮을수록 골절 유합의 속도가 빠른 것으로 평가하였다.

- 1점: 정상적인 뼈의 형태
- 2점: 골절이 거의 관찰되지 않으며 callus의 형성이 거의 관찰되지 않음
- 3점: callus가 형성되어 있으며 골절 부위가 회복되고 있는 형태
- 4점: 골절 부위가 확연하게 확인되며 유합이 시작되고 있는 형태
- 5점: 개방된 골절이 보이는 형태

3. 통계 분석

실험 결과는 평균±표준편차(Mean±standard deviation)로 기록하였으며 IBM SPSS Statistics 23 프로그램(IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 사용하여 통계처리하였고, duncan 분석으로 유의성을 검증하였다. p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

Table II. Nucleotide Sequence of Primer for Gene Expression Measurement

Gene	Primer sequences	
	Forward	Reverse
<i>mBmp2</i>	CACACAGGGACACACCAACC	CAAAGACCTGCTAATCCTCAC
<i>mCox2</i>	CAGACAACATAAACTGCGCCTT	GATACACCTCTCCACCAATGACC
<i>mCol2a1</i>	ACTGGTAAAGTGGGGCAAGAC	CCACACCAAATTCCTGTTC
<i>mSox9</i>	GAGGCCACGGAACAGACTCA	CAGCGCCTTGAAGATAGCATT
<i>mRunx2</i>	AGGGACTATGGCGTCAAACA	GGCTCACGTCGCTCAICTT
<i>mOsx</i>	CGCTTTGTGCCTTTGAAAT	CCGTCAACGACGTTATGC
<i>mGAPDH</i>	CCCATCACCATCTTCCAGGAGC	CCAGTGAGCTTCCCCTTCAGC

## 결과»»»»

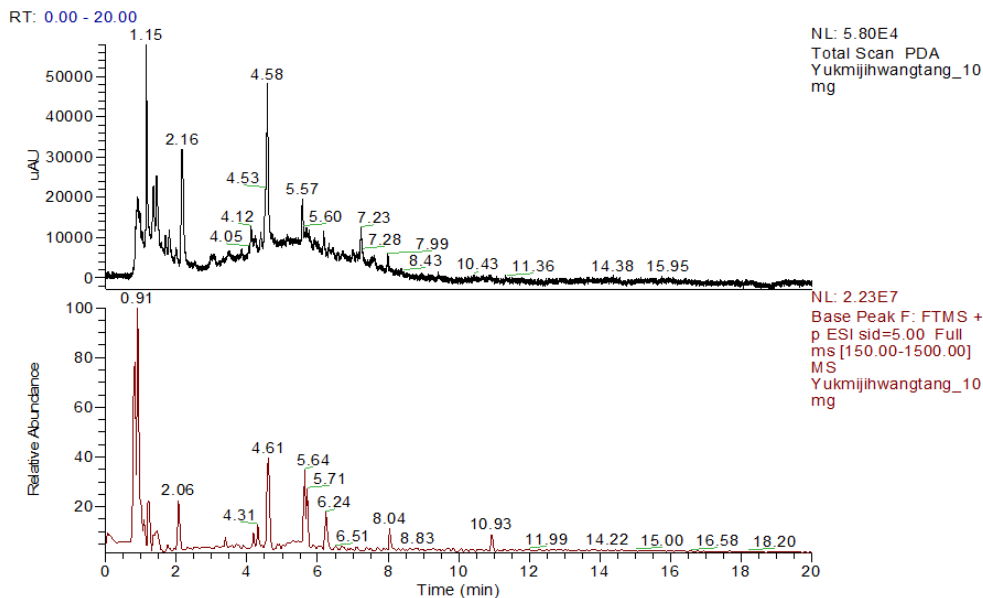
### 1. 구성성분에 대한 LC/MS 분석

Fig. 1의 상단은 YM의 high-performance liquid chromatography 분획물에 대한 UV 검출결과이고 Fig. 1의 하단은 mass 분석을 통해 도출된 검출 결과이다. LC/MS 분석을 통해 2.16, 4.12, 4.58, 5.57, 5.69, 6.17, 7.99, 10.89 retention time (RT)에 주요 peak가 검출되었다. 예

를 들어 5.57의 RT에서는 mass 분석을 통해 391.1606 m/z에서 loganin으로 예측되었다(Table III).

### 2. COX2 유전자 발현에 미치는 영향

골절 발생 후 3일째, 정상군에서 COX2 유전자 발현이  $1.00 \pm 0.94$ 이었을 때 대조군은  $1.66 \pm 1.19$ 로 발현량이 증가하였으나 유의하지 않았다. YM 100 mg/kg 투여군의 발현량이  $1.94 \pm 1.25$ 로 대조군에 비해 증가하였으나



**Fig. 1.** LC/MS analysis of YM. UHPLC and mass spectrophotometry (LC-MS) analysis of the DW extracted from YM. (Upper) PDA chromatogram of DW extract, (Lower) high-resolution mass chromatogram. LC/MS: liquid chromatography-mass spectrometry, YM: *Yukmijihwang-tang*, UHPLC: ultra-high-pressure liquid chromatography, DW: distilled water, PDF: photo diode array.

**Table III.** Summary of Metabolite Screening from YM

RT (min)	m/z ([M+H] <sup>+</sup> )	Formula ([M+H] <sup>+</sup> )	△ppm	Compound
2.16	166.0862	C9 H12 O2 N	-0.151	phenylalanine
4.12	295.1656	C15 H23 O4 N2 C19 H23 O N2	1.106 -0.581	Troxipide Cinchonine
4.58	424.1818	C32 H24 O	-0.818	Neollnustatin
5.57	391.1606	C17 H27 O10	1.883	loganin
5.69	359.1339	C16 H23 O9	0.616	Sweroside
6.17				unknown
7.99	381.1185 565.1526	C18 H21 O9 C26 H29 O14	1.368 -4.498	Drosophylloside lepidoside
10.89	427.1391	C23 H23 O8	0.810	11-hydroxytephrosin

YM: *Yukmijihwang-tang*, RT: retention time, M+H: molecule+hydrogen.

유의하지 않았으며 YM 200, 300 mg/kg 투여군은 각각  $0.87 \pm 1.10$ ,  $0.79 \pm 0.62$ 로 대조군에 비해 감소하였으나 유의하지 않았다.

골절 발생 후 7일째, 정상군에서 COX2 유전자 발현이  $1.00 \pm 0.21$ 이었을 때, 대조군은  $0.84 \pm 0.49$ 로 유전자의 발현량이 감소하였으나 유의하지 않았다. YM 200 mg/kg 투여군의 발현량이  $0.57 \pm 0.17$ 로 대조군에 비해 감소하였으나 유의하지 않았으며, YM 100, 300 mg/kg 투여군은 각각  $0.35 \pm 0.37$ ,  $0.19 \pm 0.19$ 로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 2).

### 3. BMP2 유전자 발현에 미치는 영향

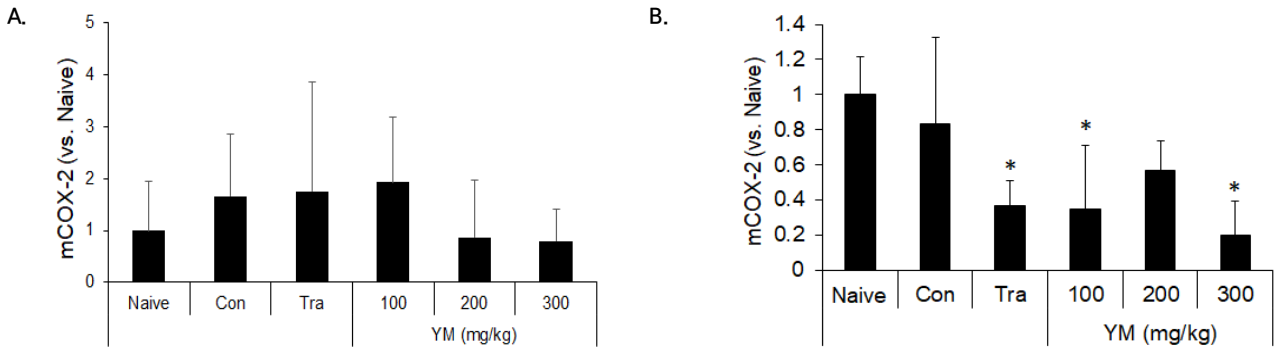
골절 발생 후 3일째, 정상군에서 BMP2 유전자 발현이  $1.00 \pm 0.65$ 이었을 때 대조군은  $0.84 \pm 0.05$ 로 발현량이 감소하였으나 유의하지 않았다. YM 100, 200, 300 mg/kg

투여군의 발현량은 각각  $0.29 \pm 0.06$ ,  $0.51 \pm 0.07$ ,  $0.42 \pm 0.11$ 로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다.

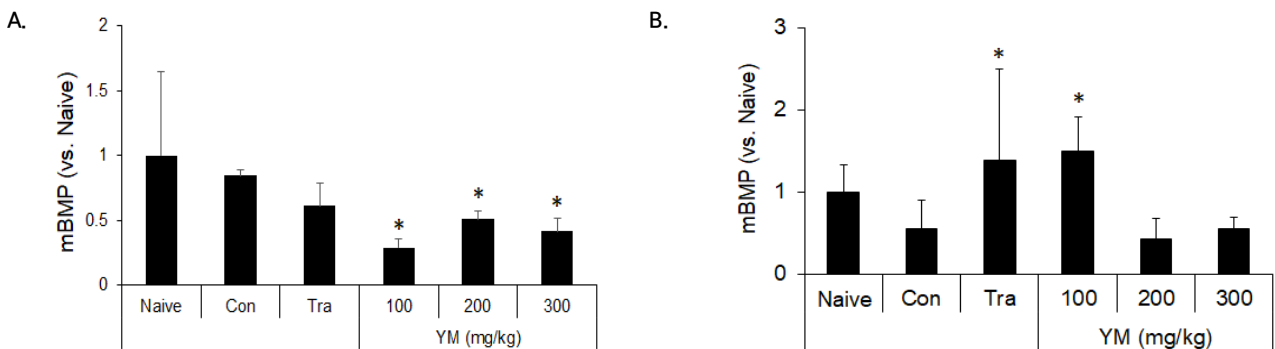
골절 발생 후 7일째, 정상군에서 BMP2 유전자 발현이  $1.00 \pm 0.32$ 이었을 때 대조군은  $0.55 \pm 0.35$ 로 발현량이 감소하였으나 유의하지 않았다. YM 200, 300 mg/kg 투여군은 각각  $0.43 \pm 0.25$ ,  $0.54 \pm 0.14$ 로 대조군에 비해 감소하였으나 유의하지 않았고, YM 100 mg/kg 투여군의 발현량은  $1.49 \pm 0.42$ 로 대조군에 비해 유의하게 증가하였다(Fig. 3).

### 4. Col2a1 유전자 발현에 미치는 영향

골절 발생 후 3일째, 정상군에서 Col2a1 유전자 발현이  $1.00 \pm 0.85$ 이었을 때 대조군은  $0.98 \pm 0.64$ 으로 발현량이 감소하였으나 유의하지 않았다. YM 100, 200, 300 mg/kg 투여군의 발현량은 각각  $0.78 \pm 0.35$ ,  $0.63 \pm 0.28$ ,  $0.91 \pm 0.26$



**Fig. 2.** Effect of YM on COX2 expression in bone marrow from mouse femur on 3 days (A) and 7 days (B) after bone fracture. Naive: without bone fracture, Con: bone fracture and vehicle, Tra: tramadol (20 mg/kg/day) treated group after bone fracture, YM: *Yukmijihwang-tang* treated group after bone fracture. COX2: cyclooxygenase-2. \* $p < 0.05$  vs Control.



**Fig. 3.** Effect of YM on BMP2 expression in bone marrow from mouse femur on 3 days (A) and 7 days (B) after bone fracture. Naive: without bone fracture, Con: bone fracture and vehicle, Tra: Tramadol (20 mg/kg/day) treated group after bone fracture, YM: *Yukmijihwang-tang* treated group after bone fracture. BMP2: bone morphogenetic protein-2. \* $p < 0.05$  vs Control.

으로 대조군에 비해 감소하였으나 유의하지 않았다.

골절 발생 후 7일째, 정상군에서 Col2a1 유전자 발현이  $1.00 \pm 0.40$ 이었을 때 대조군은  $2.29 \pm 1.15$ 로 발현량이 증가하였으나 유의하지 않았다. YM 200, 300 mg/kg 투여군의 발현량은 각각  $3.74 \pm 4.3$ ,  $4.10 \pm 2.12$ 로 대조군에 비해 증가하였으나 유의하지 않았고, YM 100 mg/kg 투여군의 발현량은  $43.8 \pm 27.2$ 로 대조군에 비해 유의하게 증가하였다(Fig. 4).

### 5. Sox9 유전자 발현에 미치는 영향

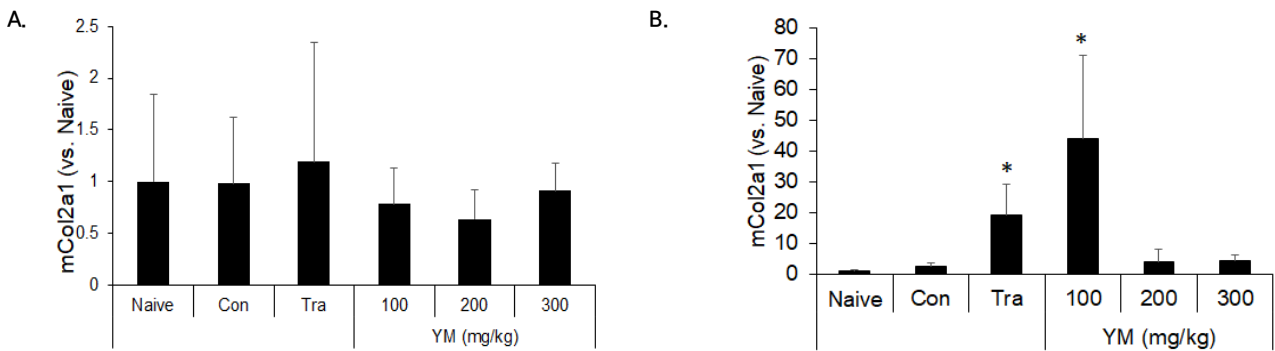
골절 발생 후 3일째, 정상군에서 Sox9 유전자 발현이  $1.00 \pm 0.58$ 이었을 때 대조군은  $1.07 \pm 0.42$ 로 증가하였으나 유의하지 않았다. YM 100 mg/kg 투여군의 발현량은  $0.93 \pm 0.36$ 으로 대조군에 비해 감소하였으나 유의하지 않았으며, YM 200 mg/kg 투여군의 발현량은  $1.34 \pm 0.44$

로 대조군에 비해 증가하였으나 유의하지 않았다. YM 300 mg/kg 투여군은  $1.89 \pm 0.57$ 로 대조군에 비해 유전자의 발현량이 유의하게 증가하였다.

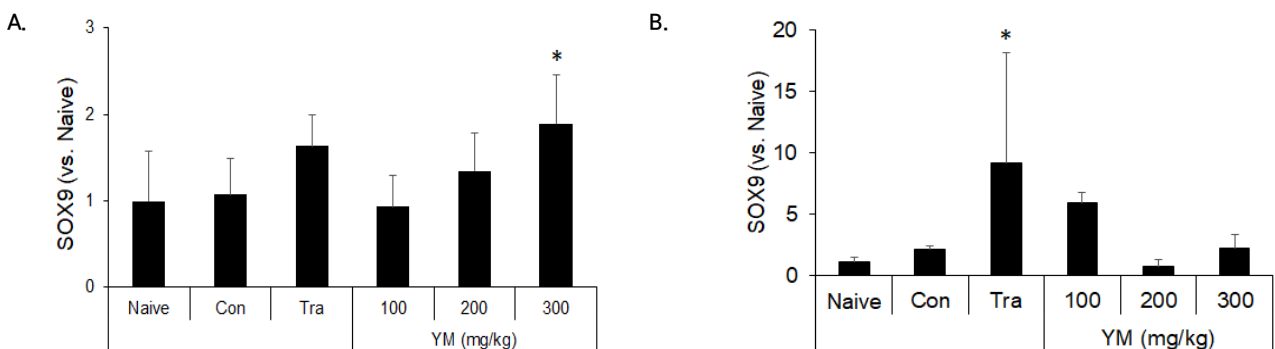
골절 발생 후 7일째, 정상군에서 Sox9 유전자 발현이  $1.00 \pm 0.37$ 이었을 때 대조군은  $1.96 \pm 0.30$ 으로 증가하였으나 유의하지 않았다. YM 200 mg/kg 투여군의 발현량은  $0.73 \pm 0.51$ 로 대조군에 비해 감소하였으나 유의하지 않았으며, YM 100, 300 mg/kg 투여군은 각각  $5.34 \pm 0.81$ ,  $2.03 \pm 1.15$ 로 대조군에 비해 증가하였으며 유의하지 않았다(Fig. 5).

### 6. Runx2 유전자 발현에 미치는 영향

골절 발생 후 3일째, 정상군에서 Runx2의 발현이  $1.00 \pm 0.29$ 이었을 때 대조군은  $1.61 \pm 0.07$ 로 그 발현량이 증가하였으나 유의하지 않았다. YM 100, 200, 300 mg/kg



**Fig. 4.** Effect of YM on Col2a1 expression in bone marrow from mouse femur on 3 days (A) and 7 days (B) after bone fracture. Naive: without bone fracture, Con: bone fracture and vehicle, Tra: tramadol (20 mg/kg/day) treated group after bone fracture, YM: *Yukmijihwang-tang* treated group after bone fracture. Col2a1: collagen type II alpha 1 chain. \* $p < 0.05$  vs Control.



**Fig. 5.** Effect of YM on Sox9 expression in bone marrow from mouse femur on 3 days (A) and 7 days (B) after bone fracture. Naive: without bone fracture, Con: bone fracture and vehicle, Tra: tramadol (20 mg/kg/day) treated group after bone fracture, YM: *Yukmijihwang-tang* treated group after bone fracture. \* $p < 0.05$  vs Control.

투여군의 발현량은 각각  $1.23 \pm 0.24$ ,  $1.03 \pm 0.48$ ,  $0.82 \pm 0.32$ 로 대조군에 비해 감소하였으나 유의적이지 않았다.

골절 발생 후 7일째, 정상군에서 Runx2의 발현이  $1.00 \pm 0.19$ 이었을 때 대조군은  $1.05 \pm 0.17$ 로 그 발현량이 증가하였으나 유의하지 않았다. YM 100 mg/kg 투여군의 발현량은  $0.97 \pm 0.34$ 로 대조군에 비해 감소하였으나 유의하지 않았으며, YM 200, 300 mg/kg 투여군은 각각  $1.27 \pm 0.69$ ,  $1.14 \pm 0.41$ 로 대조군에 비해 증가하였으며 통계적으로 유의하지 않았다(Fig. 6).

### 7. Osterix 유전자 발현에 미치는 영향

골절 발생 후 3일째, 정상군에서 osterix의 발현이  $1.00 \pm 0.52$ 이었을 때 대조군은  $0.94 \pm 0.63$ 으로 발현량이 감소하였으나 유의하지 않았다. YM 100, 200, 300 mg/kg 투여군은 각각  $1.53 \pm 0.47$ ,  $0.99 \pm 0.23$ ,  $1.07 \pm 0.13$ 으로 대

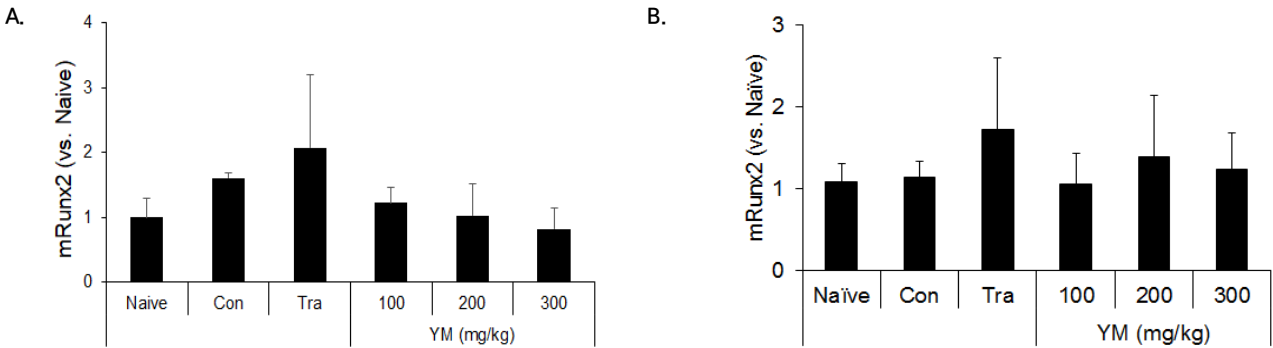
조군에 비해 증가하였으나 유의하지 않았다.

골절 발생 후 7일째, 정상군에서 Osterix의 발현이  $1.00 \pm 0.81$ 이었을 때 대조군은  $1.31 \pm 0.57$ 로 발현량이 증가하였으나 유의하지 않았다. YM 200, 300 mg/kg 투여군은 각각  $0.41 \pm 0.18$ ,  $0.76 \pm 0.32$ 로 대조군에 비해 감소하였으나 유의하지 않았으며, YM 100 mg/kg 투여군의 발현량은  $5.15 \pm 2.29$ 로 대조군에 비해 유의하게 증가하였다(Fig. 7).

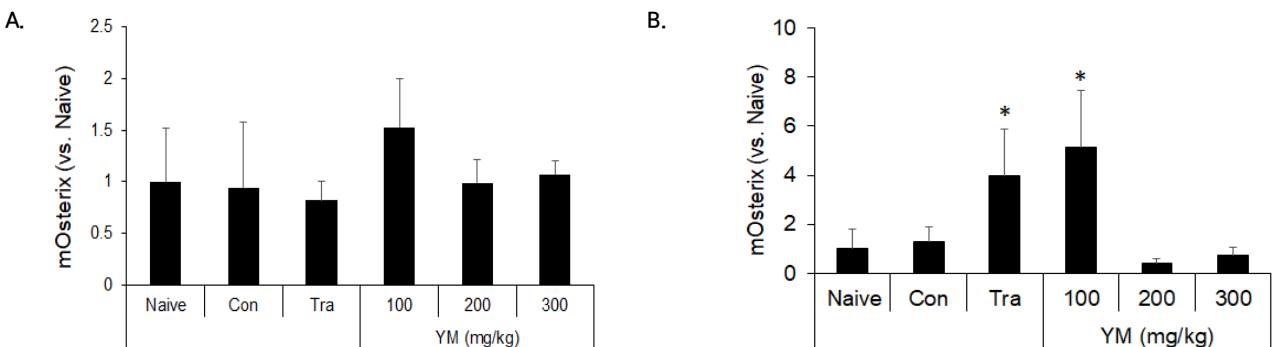
### 8. 골절 부위의 형태학적 변화

#### 1) 골절 발생 후 3일째

골절 발생 후 3일째, 대조군은 대퇴골 shaft 영역에 골절된 영역이 나타났다. YM 투여군은 유합이 시작되고 있었으며 약간의 callus가 형성되는 것이 관찰되었다(Fig. 8).

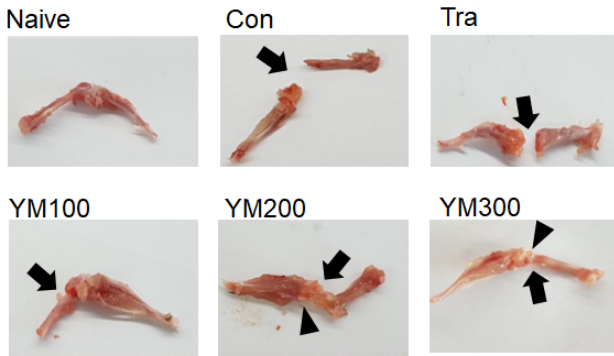


**Fig. 6.** Effect of YM on Runx2 expression in bone marrow from mouse femur on 3 days (A) and 7 days (B) after bone fracture. Naive: without bone fracture, Con: bone fracture and vehicle, Tra: tramadol (20 mg/kg/day) treated group after bone fracture, YM: *Yukmijihwang-tang* treated group after bone fracture. Runx2: runt-related transcription factor 2.

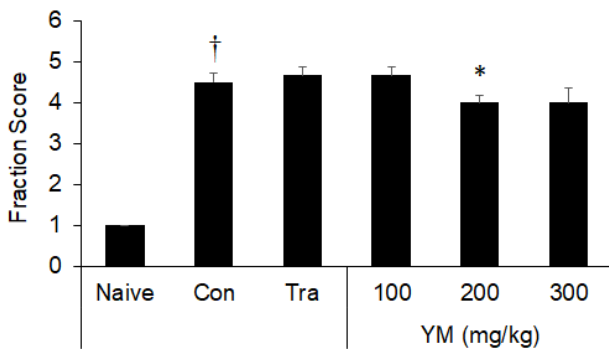


**Fig. 7.** Effect of YM on osterix expression in bone marrow from mouse femur on 3 days (A) and 7 days (B) after bone fracture. Naive: without bone fracture, Con: bone fracture and vehicle, Tra: tramadol (20 mg/kg/day) treated group after bone fracture, YM: *Yukmijihwang-tang* treated group after bone fracture. \* $p < 0.05$  vs Control.





**Fig. 8.** Effect of YM on bone regeneration in femoral shaft fracture-induced mice model at 3 days after injury. Arrow: damaged bone region, arrowhead: callus. Naive: without bone fracture, Con: bone fracture and vehicle, Tra: tramadol (20 mg/kg/day) treated group after bone fracture, YM: *Yukmijihwang-tang* treated group after bone fracture.

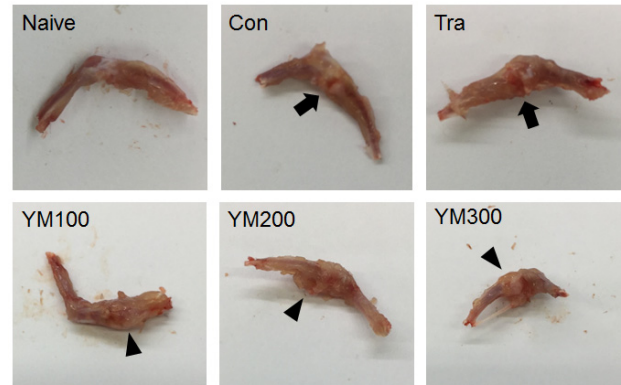


**Fig. 9.** Effect of YM on bone regeneration score in femoral shaft fracture-induced mice model at 3 days after injury. Naive: without bone fracture, Con: bone fracture and vehicle, Tra: tramadol (20 mg/kg/day) treated group after bone fracture, YM: *Yukmijihwang-tang* treated group after bone fracture. †p<0.05 vs Naive, \*p<0.05 vs Control.

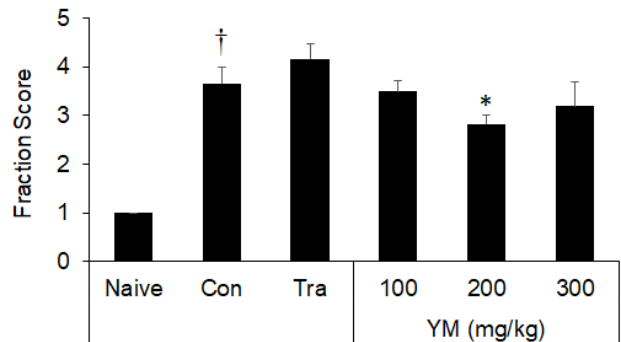
골절 부위의 유합 정도에 따라 점수를 부여하였다. 그 결과 정상군에서  $1.00 \pm 0.00$ 이었을 때 대조군은  $4.50 \pm 0.22$ 로 나타났다. YM 100 mg/kg 투여군은  $4.67 \pm 0.21$ 로 대조군에 비해 증가하였으나 유의하지 않았으며, YM 300 mg/kg 투여군은  $4.00 \pm 0.33$ 으로 대조군에 비해 감소하였으나 유의하지 않았다. YM 200 mg/kg 투여군은  $4.00 \pm 0.16$ 으로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다 (Fig. 9).

## 2) 골절 7일 후

골절 발생 후 7일째, 대조군은 골절된 부위의 유합이



**Fig. 10.** Effect of YM on bone regeneration in femoral shaft fracture-induced mice model at 7 days after injury. Arrow: damaged bone region, arrowhead: hard callus. Naive: without bone fracture, Con: bone fracture and vehicle, Tra: tramadol (20 mg/kg/day) treated group after bone fracture, YM: *Yukmijihwang-tang* treated group after bone fracture.



**Fig. 11.** Effect of YM on bone regeneration score in femoral shaft fracture-induced mice model at 7 days after injury. Naive: without bone fracture, Con: bone fracture and vehicle, Tra: tramadol (20 mg/kg/day) treated group after bone fracture, YM: *Yukmijihwang-tang* treated group after bone fracture. †p<0.05 vs Naive, \*p<0.05 vs Control.

나타난 것이 보였으나 골절된 영역을 확연히 구분할 수 있었다. YM 투여군은 골절부위의 유합이 완료되어 거의 회복된 것으로 보였으며 YM의 투여량이 증가할수록 더 큰 크기의 hard callus가 형성되어 있었다(Fig. 10).

골절 부위의 유합 정도에 따라 점수를 부여하였다. 그 결과 정상군에서  $1.00 \pm 0.00$ 이었을 때 대조군은  $3.67 \pm 0.33$ 으로 나타났다. YM 100, 300 mg/kg 투여군은 각각  $3.50 \pm 0.22$ ,  $3.20 \pm 0.49$ 로 대조군에 비해 감소하였으나 유의하지 않았다. YM 200 mg/kg 투여군은  $2.80 \pm 0.17$ 로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다(Fig. 11).

## 고찰»»»»

골절이란 뼈 또는 관절면의 연속성이 끊어진 상태로 일반적으로 뼈의 깨짐을 말한다<sup>12)</sup>. 골절을 유발하는 원인은 교통사고 등의 외상, 산업현장에서 일어나는 산업 재해 및 안전사고의 결과, 골다공증 등의 질병, 스포츠 등 뼈에 대한 스트레스의 반복 등이 있다<sup>13,14)</sup>.

골절은 신체장애를 비롯하여 통증, 심리적 불안, 경제적 손실 등을 야기하여 개인의 삶의 질을 저하시키고 사회의 경제적인 손실을 초래한다<sup>15)</sup>.

골절의 치유는 손상된 골 조직이 일련의 생리적 과정을 거쳐 골의 연속성이 재개되어 궁극적으로 본래의 부하를 견딜 수 있을 정도로 회복되는 과정이다<sup>16,17)</sup>.

골절이 일어나면 염증이 발생하게 되고 골절 후 약 7일간 지속된다. 염증기에는 골절 주위 연부조직 손상, 혈관 손상, 골막 손상 등으로 인하여 골막 하에 혈종(hematoma)과 염증성 삼출물이 생기고, 염증 세포들과 섬유아세포(fibroblast), 줄기세포(stem cell) 등이 골절부로 동원된다<sup>18)</sup>. 이후 연성 가골기에는 혈중으로 인한 통증과 부종이 감소하고 가골(callus)이 형성되어 골절 부를 일차적으로 고정시키는데 골절 후 약 3주경에 해당된다. 가골에 의해 골절 부위가 연결되면 경성 가골기가 시작되고, 연성 가골들이 골화를 통해 견고한 석회성 조직으로 전환되며 약 3~4개월간 지속된다. 골절 부위가 단단하게 유합되고 난 뒤 재형성기가 시작되어 수개월에서 수년 동안 걸쳐 진행된다. 미숙골(woven bone)은 서서히 층판골(lamellar bone)로 전환되고 파골세포가 출현하여 과도하게 형성된 가골을 흡수하는 과정이 뼈가 원래의 형태로 완전히 돌아올 때까지 진행된다<sup>14)</sup>.

한의학적 골절 치료 방법은 『聖濟總錄』<sup>5)</sup>에 ‘接骨各有方劑存言 當按症施治’라 기록되어 있다. 골절 초기에는 筋脈이 손상되어 瘀血阻滯, 腫脹疼痛하므로 活血化瘀, 消腫止痛의 처방을 사용하고, 腫脹, 瘀血이 감소하고 골절 부위가 성장 접촉하는 중기에는 接骨續斷하는 약물을 사용한다. 후기에 접어들면 골은 이미 유합되었으나 그 영양상태가 불량하고 지체가 힘이 없어 기능회복을 기다리는 시기이므로 補氣養血, 補益肝腎, 強壯筋骨하는 약물을 활용한다고 제시하였다<sup>4)</sup>.

『素問·宣明五氣篇』<sup>19)</sup>에서는 ‘五臟所主...腎主骨’라 하였으며, 『素問·六節藏象論篇』<sup>19)</sup>은 ‘腎者...氣充在骨’이

라 하여 腎과 骨과 骨髓의 성장과 밀접한 관련성을 말하고 있다. 腎은 精을 저장하고 精은 髓를 生하고 髓는 骨을 滋養하여, 腎은 骨을 주관한다. 腎精이 충족하면 骨髓가 풍부해지고 骨도 堅實해지고, 만약 腎精이 허약하면 骨髓의 생성이 부족해지고 골격을 충분히 滋養하지 못하여 骨이 약하고 무력해지는 병변 현상이 나타난다. 즉 骨의 정상과 병태는 腎精의 성쇠에 따라 진단되며, 補腎法을 활용하여 骨의 증상을 완화 또는 치료할 수 있다<sup>6)</sup>.

六味地黃湯은 『金匱要略』<sup>20)</sup>에서 기원한 八味地黃丸을 변형한 처방으로, 宋代의 錢乙의 『小兒藥證直訣』<sup>21)</sup>에서 肉桂와 附子를 제외하고 六味地黃元이라 명명하였으며 당제로 복용할 수 있도록 조절하였다. 滋陰補血의 효능이 있어, 腎水不足, 陰虛陽亢, 先天元氣不足, 腎精不足으로 인한 증상들에 광범위하게 활용되었다<sup>22)</sup>.

六味地黃湯은 滋腎填精하는 熟地黃, 肝腎을 滋養하고 澀精하는 山茱萸, 脾陰을 補益하여 固精하는 효능이 있는 山藥, 淡滲脾濕하여 山藥의 益脾하는 작용을 돕는 白茯苓, 肝火를 清泄하고 山茱萸의 溫性을 制約하는 牡丹皮, 腎火를 清泄하면서 熟地黃의 滋膩한 성질을 방지하는 澤瀉로 구성되어, 腎陰을 補하는 효능이 있는 처방이다<sup>7)</sup>.

이에 저자는 한의학적으로 腎과 骨이 밀접한 관련을 가지고 있으며 임상적으로 補腎法을 활용할 수 있음에 근거하여, 滋陰補腎하는 효능이 있는 六味地黃湯이 골절 치료에 유효할 것이라는 가설을 세워 이를 평가하고자 하였다.

실험동물에게 Bonnarens과 Einhorn의 방법<sup>11)</sup>에 따라 골절을 유발하고 YM을 경구 투여하였다. 골절 유발 후 시기별로 골수조직에서 발현되는 유전자를 실시간 PCR을 통해 확인하였으며, 골절이 유합되는 과정을 육안적으로 관찰하였다.

실험용 마우스의 수명은 약 24개월<sup>23)</sup>이며, 인간의 평균 수명은 약 80세<sup>24)</sup>이다. 이러한 차이를 계산해보면 본 실험에서 사용한 7주령 수컷 C57/BL6 마우스는 인간의 약 8세에 해당한다. 골 조직의 치유는 연령 및 골절 부위에 따라 다르게 진행되는데 나이가 증가할수록 치유 속도가 늦어지며 20세 이후에는 거의 일정한 속도로 치유된다. 대퇴 간부 골절의 경우 20세 이후에는 20주 이상 소요되지만 8세에서는 8주가 소요된다<sup>1)</sup>. 평균적으로 성인의 골절 회복 과정에서 염증기는 골절 후

약 7일, 연성 가골기는 약 3주경에 해당되며, 그 이후는 경성 가골기가 진행된다. 이를 8세 기준으로 계산하면, 염증기는 골절 후 3일, 연성 가골기는 약 7일경에 해당한다. 이를 근거로 하여, 골절 발생 후 3일과 7일에 유전자 발현량을 확인하였다.

COX2는 염증효소로 섬유모세포, 대식세포 등 여러 세포에서 발현되며<sup>25)</sup> prostaglandin을 분비하여 염증반응을 일으키고 파골세포의 분화에 기여한다<sup>26)</sup>. 골절 유발 3일째에는 YM 100 mg/kg 투여군의 COX2 발현량이  $1.94 \pm 1.25$ 로 대조군에 비해 증가하였으나 유의하지 않았으며, YM 200, 300 mg/kg 투여군은 각각  $0.87 \pm 1.10$ ,  $0.79 \pm 0.62$ 로 대조군에 비해 감소하였으며 유의하지 않았다. 골절 유발 7일째에는 YM 200 mg/kg 투여군의 COX2 발현량이  $0.57 \pm 0.17$ 로 대조군에 비해 감소하였으나 유의하지 않았으며, YM 100, 300 mg/kg 투여군은 각각  $0.35 \pm 0.37$ ,  $0.19 \pm 0.19$ 로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 이는 YM이 골절 직후 염증기의 염증효소 발현을 억제하여 항염증 효과가 있는 것으로 볼 수 있다.

골절 후 염증이 지나면 연성 가골기가 진행되며 연골세포 발현 유전자와 골모세포 발현 유전자에 의해 중간엽세포들이 연골세포와 골모세포로 분화하여<sup>27)</sup> 가골을 형성하게 된다.

BMP는 골형성 단백질로 배아발생, 세포의 성장과 분화부터 뼈의 성장과 골절의 회복과정까지 다양한 세포의 기능에서 중요한 역할을 하는 사이토카인이다<sup>28-30)</sup>. 현재까지 알려진 BMP는 약 20종이 있으며, 그 중 특히 BMP2는 연골 및 골모세포 분화를 유도하여 연골 내 골화를 촉진시켜 강력한 골형성을 유도한다<sup>28)</sup>.

본 연구에서 골절 유발 3일째, 7일째에 각각 BMP2 유전자 발현량을 측정된 결과 3일째에는 YM 100, 200, 300 mg/kg 투여군의 발현량이 각각  $0.29 \pm 0.06$ ,  $0.51 \pm 0.07$ ,  $0.42 \pm 0.11$ 로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 골절 유발 7일째에는 YM 200, 300 mg/kg 투여군은 각각  $0.43 \pm 0.25$ ,  $0.54 \pm 0.14$ 로 대조군에 비해 감소하였으나 유의하지 않았고, YM 100 mg/kg 투여군의 발현량은  $1.49 \pm 0.42$ 로 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 이는 YM이 연성 가골기에 BMP2 발현을 촉진하여 연골 및 골모세포의 분화를 유도하는 것으로 볼 수 있다.

Col2a1과 Sox9는 연골세포 발현 유전자 중 하나로, 중간엽세포가 연골세포로 분화하는 데 필수적이다<sup>27)</sup>.

Col2a1은 연골 섬유의 성분 중 type II collagen을 인코딩하는 요소이다<sup>31)</sup>. 골절 유발 3일째 YM 100, 200, 300 mg/kg 투여군의 Col2a1 발현량은 각각  $0.78 \pm 0.35$ ,  $0.63 \pm 0.28$ ,  $0.91 \pm 0.26$ 으로 대조군에 비해 감소하였으나 유의하지 않았다. 골절 유발 7일째 YM 200, 300 mg/kg 투여군의 발현량은 각각  $3.74 \pm 4.3$ ,  $4.10 \pm 2.12$ 로 대조군에 비해 증가하였으나 유의하지 않았고, YM 100 mg/kg 투여군의 발현량은  $43.8 \pm 27.2$ 로 대조군에 비해 유의하게 증가하였다.

Sox9는 연골발생 초기에 발현되는 전사인자<sup>32)</sup>로 연골 발생 및 발달에 핵심적이며, 연골 형성 과정에서 Col2a1과 밀접한 관련이 있다<sup>33)</sup>. 골절 유발 3일째 YM 100 mg/kg 투여군의 Sox9 발현량은  $0.93 \pm 0.36$ 으로 대조군에 비해 감소하였으나 유의하지 않았으며, YM 200 mg/kg 투여군의 발현량은  $1.34 \pm 0.44$ 로 대조군에 비해 증가하였으나 유의하지 않았다. YM 300 mg/kg 투여군은  $1.89 \pm 0.57$ 로 대조군에 비해 유전자의 발현량이 유의하게 증가하였다. 골절 유발 7일째 YM 200 mg/kg 투여군의 발현량은  $0.73 \pm 0.51$ 로 대조군에 비해 감소하였으나 유의하지 않았으며, YM 100, 300 mg/kg 투여군은 각각  $5.34 \pm 0.81$ ,  $2.03 \pm 1.15$ 로 대조군에 비해 증가하였으나 유의하지 않았다. 이는 YM이 연골 세포 분화를 촉진시켜 연골 형성 및 발달을 증가시키는 것으로 생각된다. 특히 염증이 생각되었던 골절 유발 3일째 Sox9 발현량이 증가한 것으로 보아 YM이 염증을 단축시키고 연성 가골기를 촉진시키는 것으로 생각된다. 다만 YM 100, 200 mg/kg 투여군의 결과는 통계적으로 유의하지 않았고 농도별 실험결과가 일관되지 않아 단정짓기 보다는 이에 관한 추가 연구가 필요할 것으로 생각한다.

Runx2와 osterix는 골모세포 발현 유전자로<sup>27)</sup> 중간엽세포가 골모세포로 분화하는데 필수적인 전사인자이다. Runx2는 분화 초기에 발현되어 후기에는 자연적으로 감소된다<sup>34-36)</sup>. Osterix는 Runx2의 하위 유전자로 Runx2에 의해 직접적으로 조절되며<sup>37)</sup> 골모세포 분화동안 계속 발현된다<sup>38)</sup>.

본 연구에서 골절 유발 3일째, 7일째 각각 Runx2와 osterix 발현량을 측정된 결과, 골절 유발 3일째 YM 100, 200, 300 mg/kg 투여군의 Runx2 발현량은 각각  $1.23 \pm 0.24$ ,  $1.03 \pm 0.48$ ,  $0.82 \pm 0.32$ 로 대조군에 비해 감소하였으나 유의하지 않았다. 골절 유발 7일째에는 YM 100 mg/kg

투여군의 Runx2 발현량이  $0.97 \pm 0.34$ 로 대조군에 비해 감소하였으나 유의하지 않았으며, YM 200, 300 mg/kg 투여군은 각각  $1.27 \pm 0.69$ ,  $1.14 \pm 0.41$ 로 대조군에 비해 증가하였으며 통계적으로 유의하지 않았다.

골절 유발 3일째 YM 100, 200, 300 mg/kg 투여군의 osterix 발현량은 각각  $1.53 \pm 0.47$ ,  $0.99 \pm 0.23$ ,  $1.07 \pm 0.13$ 으로 대조군에 비해 증가하였으나 유의하지 않았다. 골절 유발 7일째 YM 200, 300 mg/kg 투여군의 osterix 발현량은 각각  $0.41 \pm 0.18$ ,  $0.76 \pm 0.32$ 로 대조군에 비해 감소하였으나 유의하지 않았으며, YM 100 mg/kg 투여군의 발현량은  $5.15 \pm 2.29$ 로 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. Osterix는 Runx2에 의해 직접적으로 조절되는데 골절 유발 3일째 YM 투여군의 osterix 발현량은 대조군에 비하여 증가하였으나 Runx2의 발현량은 대조군에 비하여 감소하였다. 이때, 증가한 osterix 발현에 앞서 Runx2의 발현이 진행되어야 하므로 골절 유발 3일째 Runx2의 발현은 이미 증가하였다가 감소한 것으로 생각된다. 하지만 YM 투여군의 Runx2와 osterix 발현량이 통계적으로 유의하지 않으므로, 추후 유전자 발현량 측정 시기를 세분화한 연구가 필요할 것으로 보인다.

YM이 골절 유합 과정에 미치는 영향을 확인하고자 골절 유발 3일째, 7일째 대퇴골을 분리한 뒤 육안으로 골절부위를 관찰하고 유합 정도에 따라 점수를 부여하였다. 골절 유발 3일째 대조군은 개방된 골절이 보이는 상태인 반면, YM 투여군에서는 골절 부위에 가골이 형성된 것을 확인할 수 있었다. YM 100 mg/kg 투여군의 골절 유합 점수는  $4.67 \pm 0.21$ 로 대조군에 비해 증가하였으나 유의하지 않았으며, YM 300 mg/kg 투여군은  $4.00 \pm 0.33$ 으로 대조군에 비해 감소하였으나 유의하지 않았다. YM 200 mg/kg 투여군은  $4.00 \pm 0.16$ 으로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 골절 유발 7일째 대조군은 유합이 진행되었으나 골절된 영역을 확연히 구분할 수 있는 반면, YM 투여군은 골유합이 거의 마무리된 것으로 보였다. YM 100, 300 mg/kg 투여군의 골절 유합 점수는 각각  $3.50 \pm 0.22$ ,  $3.20 \pm 0.49$ 로 대조군에 비해 감소하였으나 유의하지 않았고, YM 200 mg/kg 투여군은  $2.80 \pm 0.17$ 로 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 향후 조직학적 관찰을 통해 세부적인 골유합 정도를 확인하는 연구가 필요하리라 생각한다.

본 연구에서 경구 투여하는 YM의 용량을 100, 200,

300 mg/kg로 세분화하였는데 Col2a1, osterix 유전자 발현량은 YM 100 mg/kg 투여군의 결과가, 골절 부위의 형태학적 변화는 YM 200 mg/kg 투여군의 결과가, Sox9 유전자 발현량은 YM 300 mg/kg 투여군의 결과가 가장 효과적으로 나타나는 등 일관되지 않았다. 이는 본 연구의 실험동물의 수가 군당 6~7마리로 적어서 나타난 현상으로 보이며 추후 실험동물의 수를 늘리고 투여량을 세분화한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

이상의 연구 결과를 종합하면, 대퇴골에 골절을 유발한 실험동물에게 7일 동안 YM을 경구 투여한 결과 대조군에 비해 빠르게 골절 유합이 진행되는 것을 확인할 수 있었다. 염증기인 골절 유발 3일째에 염증효소인 COX2 유전자의 발현량이 대조군에 비해 감소하였고, 연성 가골기인 골절 유발 7일째에 연골 및 골모세포 분화를 유도하는 BMP2 유전자, 연골세포 발현 유전자인 Col2a1과 Sox9, 골모세포 발현 유전자인 Runx2와 osterix의 발현량은 대조군에 비해 증가함을 알 수 있었다. 이는 YM이 골절 후 치유과정에서 항염증 효과로 염증기의 염증효소 발현을 억제하고, 연성 가골기에 연골세포 및 골모세포의 분화를 촉진시켜 골절 유합의 속도를 증가시키는데 일정한 효과가 있는 것으로 추정된다.

본 연구를 진행하면서 중재약물 농도에 따라 일관적이지 않은 결과가 나타나거나 동일한 과정의 유전자인데도 통계적 유의성이 일부에서만 확인되는 한계가 있었다. 이는 다음과 같은 요인에 의한 것으로 생각된다.

첫째, Bonnarens과 Einhorn의 방법<sup>11)</sup>으로 유발한 골절은 골절면이 일정하지 않다. 골절 치유 기간은 골절 형태에 따라 달라지며 골절의 접촉 면적이 클수록 빠르게 회복된다<sup>1)</sup>. 따라서 추후 골절 연구 설계 시 일정한 골절면이 발생할 수 있도록 골절 유발 방법을 고안해야 하며 골절 유발 이후 골절면을 확인하는 것도 필요할 것이다. 둘째, 골절 치유 과정 및 기간은 사람을 기준으로 알려져 있으며, 아직까지 mouse의 골절 치유과정 및 기간에 대한 정보는 부족하다. 따라서 추후 mouse의 골절 치유 기간 및 관련 유전자 발현 시기에 대한 추가 연구도 필요할 것으로 생각된다. 셋째, 일반적으로 유전자 발현량의 변화는 단백질 발현량의 변화보다 약 1일 정도 더 빨리 진행된다. 따라서 일반적으로 알려진 염증기, 연성 가골기 등의 시기와 유전자 발현이 일어나는 시기가 일치하지 않을 가능성 또한 있다.

본 연구를 통해 六味地黃湯이 골 유합의 과정과 속도를 증가시키는데 일정한 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 향후 실험동물 수 및 약물 투여 시기 등 본 연구의 한계점을 보완한 추가적인 연구가 이루어진다면 더 긍정적인 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각되며 임상적으로 골절 환자들에게 六味地黃湯을 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

## 결론»»»»

六味地黃湯(YM)이 골절 동물모델에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험동물에 대퇴부 골절을 유발한 후, 골절 유합 관련인자를 측정하고 형태학적 검사를 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. COX2 유전자 발현은 골절 후 3일째 YM 200, 300 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 감소하였으나 유의하지 않았고, 7일째에는 YM 100, 300 mg/kg 투여군에서 유의하게 감소하였다.
2. BMP2 유전자 발현은 골절 후 3일째 YM 투여군에서 모두 대조군에 비해 유의하게 감소하였고, 7일째에는 YM 100 mg/kg 투여군에서 유의하게 증가하였다.
3. Col2a1 유전자 발현은 골절 후 3일째 YM 투여군에서 모두 대조군에 비해 감소하였으나 유의하지 않았고, 7일째에는 YM 100 mg/kg 투여군에서 유의하게 증가하였다.
4. Sox9 유전자 발현은 골절 후 3일째 YM 300 mg/kg 투여군에서 대조군에 비하여 유의하게 증가하였고, 7일째에는 YM 100, 300 mg/kg 투여군에서 증가하였으나 통계적으로 유의하지 않았다.
5. Runx2 유전자 발현은 골절 후 3일째 YM 투여군에서 모두 대조군에 비해 감소하였으나 유의하지 않았고, 7일째에는 YM 200, 300 mg/kg 투여군에서 증가하였으나 통계적으로 유의하지 않았다.
6. Osterix 유전자 발현은 골절 후 3일째 YM 투여군에서 모두 대조군에 비해 증가하였으나 유의하지 않았고, 7일째에는 YM 100 mg/kg 투여군에서 유의하게 증가하였다.
7. 육안으로 관찰한 결과, 골절 후 3일째, 7일째 모두

YM 투여군에서 대조군에 비해 골절 유합이 더 많이 이루어진 것을 확인할 수 있었다. 골절 유합 점수에서는 골절 후 3일째, 7일째 모두 YM 200 mg/kg 투여군에서 대조군에 비해 유의하게 감소하였다.

이상과 같이 六味地黃湯은 골절 유합을 촉진시키는 데 일정한 효과가 있으며, 임상적으로 골절 환자들에게 활용할 수 있을 것으로 생각한다.

## References»»»»

1. The Korean Orthopaedic Association. Orthopaedics. 7th ed. Seoul:Chosin Medical Publishing. 2013:1149, 1167-8, 1175, 1177.
2. Boopalan PR, Oh JK, Kim TY, Oh CW, Cho JW, Shon WY. Incidence and radiologic outcome of intraoperative lateral wall fractures in OTA 31A1 and A2 fractures treated with cephalomedullary nailing. J Orthop Trauma. 2012;26(11):638-42.
3. Michael M. Peterson's principles of oral and maxillofacial surgery. London:BC Decker Inc. 2004:6-7.
4. Rehabilitation Medicine of Korean Medicine. Oriental rehabilitation medicine. 3rd ed. Seoul:Koonja Publishing. 2011:201-4.
5. Jo G. Sheng ji zonglu. Seoul:Yeo Gang publishing company. 1987:460-4.
6. Professors of Korean Medicinal Physiology Professors. Physiology of eastern medicine. Seoul:Jipmoondang. 2008:299-302.
7. Herb Formula Professor of College of Korean Medicine. Herb formula. Seoul:Yeonglimsa. 2009:298-300.
8. Shin YW, Park YI, Kim HY, Lee ES. Effect of Yukmijihwang-tang kamibang on the expression of osteo-related genes, *TG2* and *BMP4*. The Journal of the Korean Oriental Medical Society. 2002;23(2):190-7.
9. Park BC, Cha YY, Lee ES. Study on the polyphosphate content of the *Yukmijihwang-tang* and its effect on transcription activity of genes related to bone morphogenesis. Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology. 2004;18(6):1769-76.
10. Hwang DY. Mai-zheng-fang-you-ge-bian. Seoul:Namsandang. 2009:166-9.
11. Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. J Orthop Res. 1984;2(1):97-101.
12. Kawamura M1, Urist MR. Induction of callus formation

- by implants of bone morphogenetic protein and associated bone matrix noncollagenous proteins. *Clin Orthop Relat Res.* 1988;236:240-8.
13. John W, Hole J. *Human anatomy physiology.* Oxford: Wm C Brown publisher. 1993:170-227.
  14. Park GS, Lee DB, Lee TY, Cho YC. A study on the changes of whole blood calcium-magnesium and zinc-copper concentrations during the healing process of bone fracture patients. *Chungnam Medical Journal.* 1993; 20(1):143-53.
  15. Seo HJ, Kim JH, Kwak DY, Jeon SM, Ku SK, Lee JH, Moon KD, Choi MS. Effects of safflower seed powder and its fraction in bone tissue in rib-fractured rats during the recovery. *Journal of Nutrition and Health.* 2000;33(4):411-20.
  16. Frost HM. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop Relat Res.* 1989;248: 283-93.
  17. Hulth A. Basic science and pathology current concepts of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1989;249: 265-84.
  18. Kim JJ, Shon HC, Chang JS, Kim JH, Lee KS, Kim SW. *HIF-1 $\alpha$*  and VEGF expression in fracture healing. *J Korean Orthop Assoc.* 2008;43(4):479-87.
  19. Bing W. *Huangjenaegyongsomun.* Seoul:Daesungmunwha Publishing Inc. 1994:21, 101, 212, 274, 340, 768.
  20. Chen JH. Jin Kui Yao Lue. Beijing:People's Hygiene Publishing. 2000:203.
  21. Qian Y. *Key to therapeutics of children's diseases.* Seoul:Euisungdang. 2004:1119.
  22. Lee BG. *Symptom identification treatment.* Seoul:Seongbosa. 1992:467-8.
  23. Wilkinson JE, Burmeister L, Brooks SV, Chen CC, Friedline S, Harrison DE, Hejtmancik JF, Nadon N, Strong R, Wood LK, Woodward MA, Miller RA. Rapamycin slows aging in mice. *Aging Cell.* 2012; 11(4):675-82.
  24. Sengupta P. A small-scale cross-sectional study for the assessment of cardiorespiratory fitness in relation to body composition and morphometric characters in fishermen of Araku valley, Andhra Pradesh, India. *International Journal of Preventive Medicine.* 2014;5(5):557-62.
  25. Andrew BS, Yuehuei HA. Is there an inhibitory effect of *COX-2* inhibitor on bone healing. *Pharmacological Research.* 2004;50(2):151-6.
  26. Park HJ, Lee SY, Lee DS, Yim MJ. Phosphodiesterase4 inhibitor regulates the TRANCE/OPG ratio via *COX-2* expression in a manner similar to PTH in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;354(1):178-83.
  27. Michael H, Regis J. 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.
  28. Hogan Brigid LM. Bone morphogenetic proteins in development. *Current Opinion in Genetics & Development.* 1996;6(4):432-8.
  29. Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:753-91.
  30. John MS, Hwang K, Shelley RW, Jeffrey OH. Bone morphogenetic proteins: an update on basic biology and clinical relevance. *Journal of Orthopaedic Research.* 1999;17(2):269-78.
  31. Ala-Kokko L, Prockop DJ. Completion of the intron-exon structure of the gene for human type II procollagen (*COL2A1*): Variations in the nucleotide sequences of the alleles from three chromosomes. *Genomics.* 1990;8(3):454-60.
  32. Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, Crombrughe B. *Sox9* is required for cartilage formation. *Nat Genet.* 1999;22(1):85-9.
  33. 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 *BMP2* and *SOX9* genes encoding bicistronic vector. *Cell Transplant.* 2013;22(9):1519-28.
  34. Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and *Cbfa1*. *Endocrine Reviews.* 2000;21(4):393-411.
  35. Diana D, Bart V, Koen JD, Alie F, Jose H, Ron W, Christine LM, Everardus V, Wiebe O, Wilma TS. Identification of novel regulators associated with early-phase osteoblast differentiation. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2004;19(6):947-58.
  36. Kim YJ, Lee MH, John MW, Cho JY, Ryoo HM. Bone morphogenetic protein-2-induced alkaline phosphatase expression is stimulated by *Dlx5* and repressed by *Msx2*. *Journal of Biological Chemistry.* 2004;279(49):50773-80.
  37. Kim BI, Na SH, Kim JY, Shin JW, Jue SS. Immunolocalization of Runx2 and osterix in the developing periodontal tissues of the mouse. *International Journal of Oral Biology.* 2011;36(2):51-8.
  38. Lee RH, Kim BC, Choi IS, Kim HN, Choi HS, Suh KT, Bae YC, Jung JS. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem.* 2004;14(4-6):311-24.