

## 쑥의 부위별 골다공증 치료효과

김정숙\* · 하혜경 · 김혜진 · 이제현<sup>1</sup> · 송계용<sup>2</sup>

한국한의학연구원 한약제제연구부, <sup>1</sup>경희대학교 약학대학 한약학과,  
<sup>2</sup>중앙대학교 의과대학 병리학교실

## *Pueraria lobata* Ohwi as an Osteoporosis Therapeutics

Chungsook Kim\*, Hyekyung Ha, Hyejin Kim, Je-Hyun Lee<sup>1</sup> and Kye-Yong Song<sup>2</sup>

Korea Institute of Oriental Medicine, <sup>1</sup>College of Pharmacy, Kyunghee University

<sup>2</sup>Medical School, ChoongAng University

It is reported that *Pueraria Radix* contains phytoestrogens whereas flower, and bud of *Pueraria lobata* Ohwi were not known. In the present study, we determined the amount of phytoestrogen in each portion of *P. lobata* Ohwi and carried out therapeutic effects of osteoporosis. The amounts of genistein, daidzein, and formononetin in *Pueraria Radix* (PR), *Pueraria Flos* (PF), and young *Pueraria Folium* (PL) were quantitated using a HPLC system. Proliferation of osteoblast and growth inhibitory effect on osteoclast were measured in order to screen their effects on osteoporosis. Proliferation of osteoblast-like cells (Saos-2) was analyzed by both MTT methods and alkaline phosphatase (ALP) assays. Growth inhibitory effect on osteoclast was also detected as Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) assay. Ovariectomized rat as an *in vivo* animal model was selected and administrations of PR were 1 g/kg/day (PR-1) and 5 g/kg/day (PR-5) for 9 weeks, respectively. Trabecular bone areas (TBAs) of tibia and lumbar were analyzed using histomorphological methods. Results show that PR contains the highest level of daidzein (10435 ± 2143 mg/kg of dried herb) and stimulated ALP activity, approximately 160 % of the control. Growth inhibitory effect on osteoclast by both PR and daidzein were almost identical with control although IC<sub>50</sub> of genistein was 5.81 × 10<sup>-7</sup> M. Increases in body weight of OVX rats were suppressed by administration of PR but wet weights of uterus in PR-5 group were increased (p<0.05). Plasma ALP and HDL-cholesterol levels were decreased following ages (p<0.01), and LDL-cholesterol level was also decreased in PR-5 group at 20 weeks of age (p<0.01). TBAs of tibia and lumbar in PR-1 and PR-5 groups were higher than those of the control although the values were less than those of the sham group (each p<0.01). In conclusion, administrations of PR prevented loss of TBAs of tibia and lumbar in OVX rats, while PL and PF did not (p<0.01).

Key words : *Pueraria lobata* Ohwi, osteoblast, osteoclast, osteoporosis

### 서 론

갈근은 콩과(Leguminosae)의 쑥(*Pueraria lobata* Ohwi)의 주 피를 제거한 뿌리를 건조한 것<sup>(1,2)</sup>으로 한국, 북한, 중국, 일본의 약전에는 쑥 *Pueraria lobata* (WILLD.) OHWI (= *P. thunbergiana* BENTH.)으로 수재되어 있다<sup>(2,5)</sup>. 한의학에서는 쑥의 여러 부위를 약용으로 사용하며, 쑥뿌리를 건조한 것을 갈근으로 사용하는 이외에 꽃은 갈화, 열매는 갈곡 혹은 갈실, 잎은 갈엽, 덩굴은 갈등 혹은 갈만으로 각각의 효능이 있다<sup>(1)</sup>.

갈근(*Pueraria Radix*: PR)은 한의학에서 피부에 정체된 기의 활성화에 기인한 발한작용(升陽解肌), 감염에 의한 두드러기의 치료 및 지사약(透疹止瀉), 비장이나 위에 작용하여 갈증해소 및 해열작용(除煩止瀉)으로 널리 활용하는 약제이다. PR은 국내에서 전국에 걸쳐서 자생하는 식물로 약용 뿐 아니라 과거에는 구황식물로 널리 활용되었으며, 최근에는 약용 이외에 기호식품 및 건강식품 등으로 점차 사용량이 증가하고 있다. 갈화(*Pueraria Flos*: PF)는 쑥의 꽃아 완전히 피기 전에 자루와 잎을 제거하고 건조시킨 것으로 한국과 북한 의 약전 수재품이고<sup>(2,3)</sup>, 주된 효능은 지혈, 술의 해독제 혹은 지사(止瀉)작용이 있다<sup>(1)</sup>. PR의 주성분은 전분이고 이외에 이소플라본계 성분인 puerarin(2.0% 이상), puerarinxyloside, daidzein 및 daidzin과 β-sitosterol, arachidonic acid를 함유하고 있는 것으로 알려져 있고, PF의 성분으로는 kakkalide, kakkatin, kaikasaponin III, soyasaponin I, daid-

\*Corresponding author : Chungsook Kim, Drug Research and Development Team, Korea Institute of Oriental Medicine, 129-11 Chungdam-dong, Kangnam-ku, Seoul 135-100, Korea  
Tel: 82-2-3442-1994-223, 82-2-3442-2120  
Fax: 82-2-3442-0220, 82-2-3442-1030  
E-mail: cskim@kiom.re.kr

zein, daidzin, genistein, genistin, rutin, quercetin, biochanin A, formononetin, ononin 등이 있으며<sup>(6-8)</sup>, 갈엽(Pueraria Folium)의 성분은 kaikasaponin III, daidzin, genistin, rutin, robinin(0.17~0.35%), nicotiflorin 등이 보고되어 있다<sup>(8)</sup>. PR, PF와 함께 췌의 약용가능성이 높을 것으로 추정되는 어린순(갈용: PL)을 선택하였는데 이는 PR의 작용기전에 의하면 봄에 움튼 새순(PL)이 PR의 승발지기(升發之氣)가 가장 높은 것으로 생각되며, 따라서 PL도 약용가능성이 높을 것으로 추정된다.

골은 조골세포와 파골세포의 작용으로 골 생성과 골 재흡수가 지속적으로 유지되어 평형을 유지하지만<sup>(9)</sup> 폐경기 여성들의 급격한 에스트로겐 감소, 노화, 코르티코이드 제제의 투여, 흡연, 알코올 섭취 등 여러 가지 원인으로 조골세포와 파골세포 작용의 불균형이 생겨 골 생성보다 골 소실이 증가할 때 골다공증이 유발된다<sup>(9-11)</sup>. 골다공증의 치료제로 NaF, Calcitriol(1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), 17β-estradiol(E2), Ipriflavone, Raloxifene, Aminobisphosphonate, SERMs(selective estrogen receptor modulators) 등이 시판되고 있으나 부작용 등 여러 가지 문제점을 내포하고 있다<sup>(9-16)</sup>. 특히 식물성 호르몬인 phytoestrogen은 Estrogen receptor-α(ER-α) 및 Estrogen receptor-β(ER-β)에 대한 친화력이 좋고 생체이용률(bioavailability)은 비교적 낮으나 유방암 등 부작용이 적어 골다공증 치료제인 E2의 대체약품으로 각광을 받고 있다<sup>(12-14,17)</sup>. 특히 콩 및 콩 가공품 등 식품에 함유된 Genistein이나 Daidzein 등의 phytoestrogen을 응용하여 장기간 복용할 수 있고 상대적으로 부작용이 적은 골다공증 예방 및 치료제로 개발하고자 많은 연구가 진행 중이다. 우리나라는 췌의 여러 부위를 약용으로 사용하여 왔고 같은 phytoestrogen이 다량 함유된 것으로 알려져 있으나 췌의 각 부위에 대한 연구는 없었으므로 본 연구에서는 췌의 각 부위의 phytoestrogen의 함량을 정량하고 동시에 골다공증에 대한 효능연구를 수행하였다.

## 실험 방법

### 시약 및 시료의 추출

PR(경북 김천, 표본번호 KIOM 99-3-0019) 및 PF(중국, 표본번호 KIOM 99-3-0021)는 경동시장에서 구입하였고 PL(KIOM 00-3-0009)은 직접 채집한 후(경기도 양평군 양수리, 2000년 5월 중순) 감정을 거쳐 사용하였고 시료들은 한국한의학연구원에 보관 중이다. 각 약재를 분쇄한 후 분말 무게의 5배 부피의 70% 메탄올을 첨가하여 상온에서 48시간 추출한 후 농축, 동결 건조시켜 추출물을 제조하였다. 전처리한 시료들은 산-기수분해(1 M HCl, 100°C에서 2시간) 및 10 M NaOH로 중화한 후 동결 건조하였다. 세포 및 동물 실험에서 활성 비교 물질로 NaF(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA), 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>(BIOMOL Research Lab., Inc., Plymouth Meeting, PA, USA), 17β-estradiol(Aldrich Chem. Co., Inc., Milwaukee, WI, USA)을 사용하였다.

HPLC의 표준물질로는 aloe-emodin, genistein, daidzein(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하였으며, formononetin은 본 연구팀이 추출 정제하고 NMR, MS로 확인한 후에 사용하였다<sup>(18-19)</sup>. HPLC용 메탄올(Merck Co.,

Darmstadt, Germany), 에탄올은 일등급을 증류하여 사용하였고 그 외의 시약들은 시약용을 사용하였다.

### 이소플라본의 HPLC 분석

이소플라본의 HPLC 정량 분석은 spectra system P1000(Thermo Separation Products, Fremont, CA, USA)을 사용하였고, 컬럼은 Luna C18(250×4.60 mm, 5 μ: Phenomenex Co., Torrance, CA, USA)을 사용하였다. 이동상은 5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 용액(pH 4.6)과 메탄올의 혼합액(4:6)을 사용하였고, 유속은 1 mL/min로 260 nm에서 흡광도를 측정하였고 내부 표준물질은 aloe-emodin을 사용하였다<sup>(19)</sup>. 각각의 daidzein(0.051~213.71 μg/mL), genistein(0.056~194.20 μg/mL), 및 formononetin(0.025~5.00 μg/mL)의 피이크들의 높이를 각각 내부 표준물질의 피이크 높이에 대한 비율(peak height ratio)로 계산하여 검량선을 작성하였다. 시료에 함유된 이소플라본의 분석은 각 추출물을 내부표준물질(4 μg/mL)이 함유된 메탄올에 녹여 14,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리한 후, 그 상등액을 0.45 μm로 여과한 후, 그 여액을 HPLC로 분석하였다<sup>(19)</sup>.

### Saos-2 세포의 세포증식 실험

Saos-2 세포는 한국세포주은행(서울)에서 분양받아 사용하였고, FBS(fetal bovine serum; Life Technologies, Grand Island, NY, USA)를 10% 함유하는 RPMI 1640배지(Life Technologies, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하였다. 세포증식 실험은 96-well plate에 2×10<sup>4</sup> cells/well의 농도로 세포를 분주하고 디메틸설포사이드(DMSO, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 용해한 시료들을 최종농도 1×10<sup>-1</sup>~1×10<sup>-8</sup> mg/mL가 되도록 첨가하여(DMSO 최종농도: 0.05%) 배양하였다. 72시간 후 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 최종농도 0.5 mg/mL가 되도록 첨가하여 4시간 배양한 후, 생성된 formazan 결정을 DMSO로 용해시켜 550 nm의 흡광도를 ELISA 측정기(Ceres UV 900C, Bio-tech instrument, USA)로 측정하였다<sup>(20)</sup>. 세포에 첨가한 시료는 PR, PF 및 PL의 70% 메탄올 추출물과 각각을 전처리한 시료를 사용하였다. 또한 조골세포의 세포수, alkaline phosphatase(ALP) 활성 및 세포의 collagen 합성을 증가시키는 것으로 알려진 NaF(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA)와 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>를<sup>(21)</sup> 조골세포의 활성 증가의 기준물질로 사용하였으며, 현재 골다공증 치료제로 널리 사용되는 17β-estradiol(Aldrich Chem. Co., Inc., Milwaukee, WI, USA)도 사용하였다. ALP 활성측정은 Saos-2 세포를 위의 세포증식 실험과 동일하게 72시간 배양한 후 수집하여 1% Triton X-100를 첨가하고 초음파 파쇄하여 4°C, 14,000×g에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 사용하였다<sup>(21)</sup>. Bowers와 McComb<sup>(22)</sup>의 방법을 이용하여 405 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.

### 파골세포의 세포증식 억제

파골세포의 발현은 Shioi 등의 방법<sup>(23)</sup>에 따라 ICR 생쥐(대 한바이오링크, 음성, 충북)의 골수를 대퇴골과 경골에서 채취하여 골수세포를 10% FBS 함유 α-MEM 배지(Life Technologies, Grand Island, NY, USA)에 분주하여 37°C에서 24시간

배양하였다. 생쥐의 기질세포인 ST-2 세포(RIKEN Cell Bank, Tsukuba, Japan)를 10% FBS 함유  $\alpha$ -MEM에 부유시켜 24 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well의 농도로 분주하여 24시간 배양하고 위의 분리된 골수세포( $1 \times 10^6$  cells/well)를 첨가하여 6일간 공동 배양하였다. 파골세포가 발현되면 시료를 최종 농도  $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-5}$  mg/mL가 되도록 첨가하여 2일간 배양하였다. 생성된 파골세포의 수는 시판되는 Tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP) 염색 kit(Sigma chemical Co., St Louis, MO, USA)의 방법으로 염색한 후 염색된 3개 이상의 핵을 가지는 다핵세포의 개수로 측정하였다<sup>(23)</sup>. Tyrosine kinase inhibitor인 genistein이 파골세포의 증식을 억제하는 것으로 보고되어 있으므로<sup>(16)</sup> 이를 파골세포의 증식억제 효과의 기준물질로 사용하였다. 또한 phytoestrogen의 일종인 daidzein의 활성을 검색하였다.

### Type I 골다공증 모델의 동물실험

동물실험은 type I 골다공증 동물모형인 난소적출 흰쥐를 사용하였다. 한국화학연구소(대전)에서 분양받은 암컷 흰쥐(Sprague-Dawley rat: 10주령, 200~300 gram, 각 군 n = 10)를 전신 마취 후 난소를 적출하였다. Sham군은 난소적출을 제외한 수술과정을 동일하게 처리하였다. 1주일의 회복기를 거친 후 11주령부터 20주령까지 9주간 PR 추출물 1g/kg/day (PR-1군) 또는 5g/kg/day(PR-5군)를 1일 1회 경구투여 하였으며 대조군과 Sham군은 해당량의 식수를 경구투여 하였고 양성 대조군으로 골다공증 치료제로 사용되는 17 $\beta$ -estradiol을 투여하는 E2군은 17 $\beta$ -estradiol(1  $\mu$ g/kg/day)을 복강주사 하였다. 각 군은 수술 전(10주령), 투약 전(11주령) 및 9주간의 투여 후(20주령)에 채혈하여 혈액분석 및 생화학검사를 하였다. 9주간의 투여 후 간, 신장, 자궁, 경골 및 요추골의 무게를 측정하였고 조직학적 관찰을 위하여 4% 포르말린 용액에서 고정시켰다. 혈액분석은 Coulter counter(Coulter Co., Miami, FL, USA)를 이용하여 적혈구, 헤모글로빈, 적혈구 용적비 등을 측정하였다.

### 생화학 검사

생화학 분석기 Airon 200(Crony Instruments, Rome, Italy)과 분석시약들(Trace Am. Inc., Miami, FL, USA)을 사용하여 혈장의 ALP, 칼슘, 크레아티닌, 무기성 인산염, 혈중 요소소 질소, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 농도를 측정하였다<sup>(22,24-27)</sup>.

### 소주골 면적(Trabecular bone area; TBA)

적출한 경골 및 요추골을 4% 포르말린 용액에 고정한 후, formic acid 내에서 탈회를 시행한 후 70% 알코올에서 100% 알코올과 아세톤에 이르는 단계별 탈수과정을 거쳐 자일렌(xylen)으로 청명하고 파라핀 포매를 시행하였다. 파라핀 포매된 골조직을 5  $\mu$ m로 절단하고 hematoxyline & eosin 염색을 실시하였다. 광학현미경으로 관찰 후 조직의 슬라이드 사진을 이용하여 소주골(trabecular bone)의 소실정도를 분석하였다. 골의 성장판 직하부에서 기준면적  $2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$  안에서 관찰되는 소주골의 면적을 영상분석기(Wild Leitz Co., Wetzlar, Germany)를 이용하여 계산하였다<sup>(28)</sup>.

### 통계처리

Systat<sup>®</sup> 프로그램(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 시료를 첨가하지 않은 대조군과 시료 첨가군을 비교하여 Bonferroni multiple comparison analysis법을 이용하여  $P < 0.05$  이하인 것<sup>(29)</sup>을 의미있는 차이가 있는 것으로 정의하였다.

## 결 과

### 시료의 추출 및 이소플라본의 정량분석

한약재의 메탄올 추출물의 수확율은 건조약재에 대해 PR은  $10.32 \pm 1.00\%$ , PF  $17.28 \pm 0.50\%$ , PL은  $16.90 \pm 0.11\%$ 였다. Daidzein, genistein, formononetin 및 내부표준물질인 aloemodin의 머무름 시간은 5.82분, 8.25분, 13.37분 및 21.27분이었고 위의 HPLC조건에서 daidzein과 genistein의 검출한계(UV 260 nm)는 50 ng/mL이었고, formononetin의 검출한계(UV 260 nm)는 25 ng/mL으로 분석되었다<sup>(19)</sup>. PR 및 PF에 함유된 이소플라본의 정량은 앞에서 기술한 HPLC 조건하에서 정량하였고 phytoestrogen의 함량은 표준 검량곡선을 이용하여 계산하였으며(daidzein:  $Y = -0.165 + 3.425X$ , genistein:  $Y = -0.494 + 2.232X$ , formononetin:  $Y = 0.0099 + 1.480X$ , 각  $r^2 = 0.99$ , Y; 260 nm에서의 흡광도, X; 농도, ng/mL) PR과 PF 모두 daidzein의 함량이 다른 이소플라본의 함량보다 높았으며 PR의 함량이 PF의 함량보다 약 10배 이상 높았다( $P < 0.001$ , Table 1).

### Saos-2 세포의 세포증식 실험

인간 유사조골세포주인 Saos-2의 세포증식 실험결과, 조골세포의 세포증식 및 활성을 증가시키는 것으로 알려진 NaF

**Table 1. Isoflavone concentrations in 70% Methanol Extract of Pueraria Radix (PR), Pueraria Flos (PF) and young Pueraria Folium (PL)**

Samples	Daidzein (mg/kg)		Genistein (mg/kg)		Formononetin (mg/kg)	
	Free <sup>1)</sup>	Total <sup>2)</sup>	Free	Total	Free	Total
PR	$303.5 \pm 51.7$	$10436.2 \pm 2143.8$	$30.6 \pm 2.7$	$232.1 \pm 83.3$	$24.3 \pm 1.8$	$308.9 \pm 60.8$
PF	$21.43 \pm 3.50$	$1002.5 \pm 206.4$	ND	ND	ND	ND
PL	ND <sup>3)</sup>	ND	ND	ND	ND	ND

<sup>1)</sup>Free: aglycone of each constituent.

<sup>2)</sup>Total: total content of each constituent.

<sup>3)</sup>ND: not detected.

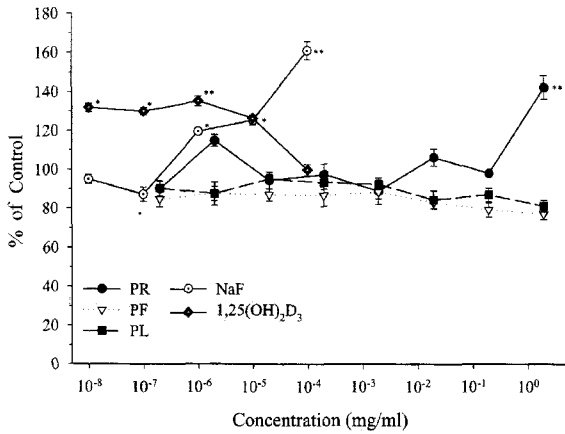


Fig. 1. Cell proliferatory effect on Saos-2 in the presence of Pueraria Radix (PR), Pueraria Flos (PF) and young Pueraria Folium (PL) extracts.

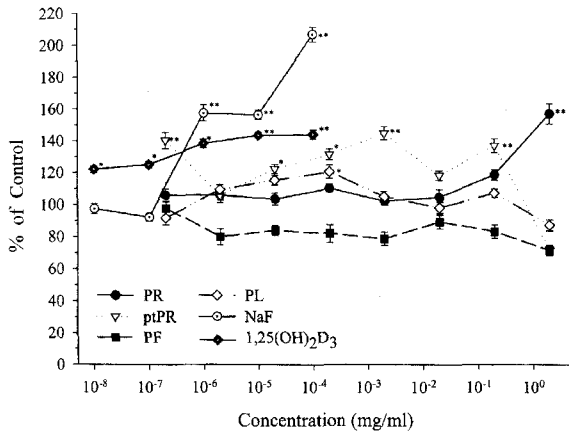


Fig. 2. Alkaline phosphatase activities on Saos-2 in the presence of Pueraria Radix (PR), Pueraria Flos (PF) and young Pueraria Folium (PL) extracts. ptPR: pretreated Pueraria Radix. Comparison to control by Bonferroni multiple adjustment method, \*; P<0.05, \*\*; P<0.01.

처리군은 대조군의 168% 이상( $1 \times 10^{-4}$  mg/mL),  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  처리군은 대조군의 130~140% 이상( $1 \times 10^{-8}$ ~ $1 \times 10^{-5}$  mg/mL)으로 높은 세포증식효과를 나타내었으나 E2( $1 \times 10^{-8}$ ~ $1 \times 10^{-1}$  mg/mL) 처리에 의한 세포증식효과는 없었다. PR 처리군(5 mg/mL)은 대조군의 158% 정도의 세포증식효과를 나타내었으나, 전처리한 PR, PF 및 PL 처리군의 세포증식효과는 없었다(Fig. 1).

ALP 활성 측정결과, NaF 처리군은 대조군의 160~210% 이상( $1 \times 10^{-6}$ ~ $1 \times 10^{-4}$  mg/mL),  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  처리군은 대조군의 150% 이상( $1 \times 10^{-8}$  및  $1 \times 10^{-6}$ ~ $1 \times 10^{-5}$  mg/mL) ALP 활성을 증가시켰다. E2는 세포증식효과는 없었으나 ALP의 활성은 대조군의 약 130%( $1 \times 10^{-7}$  및  $1 \times 10^{-3}$  mg/mL) 정도 증가시켰다. PR 처리군(5 mg/mL)은 대조군의 160% 이상 ALP의 활성을 증가시켰으며 이는 세포증식 실험 결과와 일치하였다. 전처리한 PR 처리군( $5 \times 10^{-7}$  및  $5 \times 10^{-2}$  mg/mL)은 대조군의 140% 이상 ALP의 활성을 증가시켰으나 PF는 세포증식효과

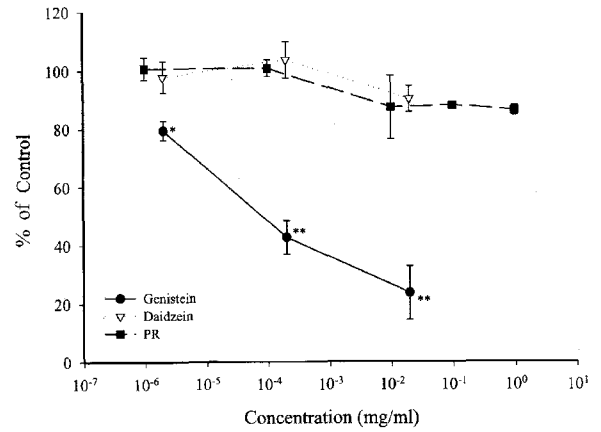


Fig. 3. Cell Growth inhibitory effect of Pueraria Radix (PR) extracts on osteoclasts. Comparison to control by Bonferroni multiple adjustment method, \*; P<0.05, \*\*; P<0.01.

및 ALP 활성의 증가가 없었다(Fig. 1, Fig. 2). PL은 세포증식효과가 없었고 ALP 활성은 증가시켰으나, 전처리한 PL은 세포증식 효과 및 ALP 활성의 증가가 없었다(Fig. 2).

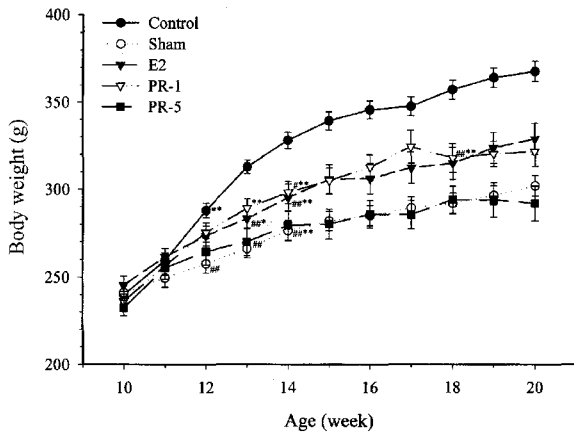
파골세포의 세포증식 억제

파골세포의 증식억제실험 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같이 genistein의 IC<sub>50</sub>는  $1.57 \times 10^{-4}$  mg/mL( $5.81 \times 10^{-7}$  M)이었고, daidzein은 세포증식 억제 효과가 없었으며, PR 추출물은 1 mg/mL~ $1 \times 10^{-6}$  mg/mL의 농도에서 파골세포의 세포증식 억제작용이 약하여 IC<sub>50</sub>를 구할 수가 없었다.

Type I 골다공증 모델의 동물실험

체중의 변화를 각 주령에서 대조군과 비교한 결과, sham군은 12주령부터 체중증가가 둔화되었으며(p<0.01), E2군과 PR-5군은 13주령부터 체중증가가 둔화되었고(p<0.01), PR-1군은 14주령부터 체중의 증가가 둔화되었다(p<0.05). 그러므로 난소적출군(대조군)이 sham군보다 난소적출 1주 후부터 체중의 증가가 급격하게 나타났으나 이러한 체중의 증가는 E2 또는 PR 추출물의 투여로 둔화되었다(Fig. 4).

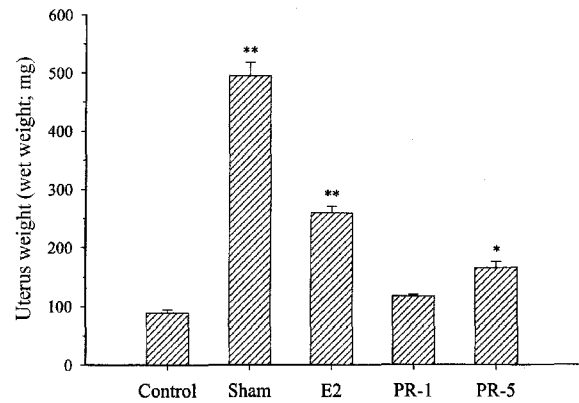
투약이 종료된 후 각 동물의 간, 신장, 뇌, 자궁, 경골, 피부 등의 장기를 적출하고, 그 무게를 측정하여 대조군과 비교한 결과, 자궁을 제외한 나머지 장기들의 무게는 대조군에 비하여 다른 모든 군과 차이가 없는 것으로 나타났으나, 자궁의 무게는 투여군 간의 차이가 크게 나타났(Fig. 5). 정상상태인 sham군의 자궁보다 난소적출한 대조군은 크게 감소되었으나(p<0.01), 난소적출 후 E2군 또는 PR-5군의 자궁의 무게는 대조군에 비해 증가되었고(각각 p<0.01, p<0.05), PR-1군은 대조군과 유의성이 없었다(Fig. 5). 혈액분석기를 이용하여 적혈구, 헤모글로빈, 적혈구 용적비를 난소적출 전(10주령) 및 실험 종료 후(20주령)에 측정한 결과, 적혈구( $\times 10^6$  cells/ $\mu\text{L}$ )의 경우 난소적출 전에 대조군은  $7.4 \pm 0.1$ , sham군  $7.5 \pm 0.1$ , E2군  $7.4 \pm 0.1$ , PR-1군  $7.3 \pm 0.1$ , PR-5군  $7.5 \pm 0.1$ 였고, 실험종료 후 대조군  $7.5 \pm 0.1$ , sham군  $7.0 \pm 0.1$ , E2군  $7.2 \pm 0.2$ , PR-1군  $7.5 \pm 0.1$ , PR-5군  $7.5 \pm 0.2$ 였다. 헤모글로



**Fig. 4. Changes in body weight during administration of Pueraria Radix extracts.**

PR-1: dosage of Pueraria Radix was 1 g/kg/day.  
 PR-2: dosage of Pueraria Radix was 5 g/kg/day.  
 Comparison to 10 weeks by Bonferroni multiple comparison test, \*, p<0.05, \*\*, p<0.01.  
 Comparison to Control by Bonferroni multiple comparison test, #, p<0.05, ##, p<0.01.

빈(g/dl)은 난소적출 전에 대조군 15.7±0.3, sham군 15.8±0.2, E2군 15.5±0.2, PR-1군 15.3±0.2, PR-5군 15.4±0.2 였 으며, 실험종료 후에 대조군 14.7±0.1, sham군 13.9±0.3, E2 군 14.5±0.3, PR-1군 14.2±0.2, PR-5군 14.8±0.3으로 나타 났다. 또한 적혈구 용적비(%)는 난소적출 전에 대조군 42.8 ±0.6, sham군 43.3±0.5, E2군 42.5±0.3, PR-1군 42.3±0.5,



**Fig. 5. Wet weight of uterus in ovariectomized rat after 9 weeks administration of the Pueraria Radix extracts (Mean ± S.E.M.)**  
 PR-1: dosage of Pueraria Radix was 1 g/kg/day.  
 PR-2: dosage of Pueraria Radix was 5 g/kg/day.  
 Comparison to control group by Bonferroni multiple comparison method, \*, p<0.05, \*\*, p<0.01.

PR-5군 42.5±0.5였고, 실험종료 후 대조군 41.2±0.5, sham 군 39.8±0.4, E2군 41.5±0.5, PR-1군 40.0±0.7, PR-5군 41.4±0.8로 나타났다. 결과적으로, E2군 및 PR-5군은 적혈구, 헤모글로빈 및 적혈구 용적비 모두 큰 변화가 없었고 PR-1 군은 적혈구는 차이가 없었으나 헤모글로빈과 적혈구 용적 비는 감소되었다(각 p<0.01, p<0.05).

**생화학검사**

혈장 ALP 농도를 측정한 결과 모든 실험군에서 주령의 증

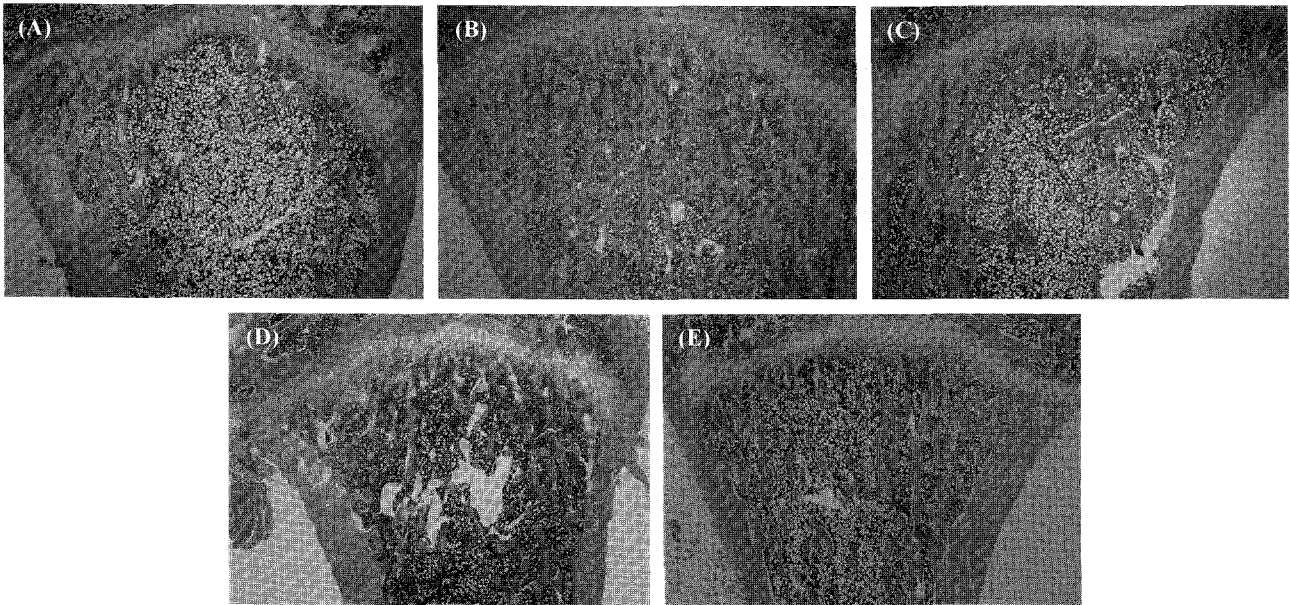
**Table 2. Results of biochemical clinical analysis in plasma of ovariectomized rat after 9 weeks administration of the extracts (N=10)**

	Age (weeks)	Control	Sham	E2	PR-1 <sup>1)</sup>	PR-5 <sup>2)</sup>
ALP (IU/dl)	10	157.06 ± 12.88	149.34 ± 8.64	155.56 ± 8.50	140.39 ± 8.74	147.21 ± 7.99
	11	129.47 ± 16.38	104.92 ± 7.64 <sup>##</sup>	122.95 ± 5.36 <sup>##</sup>	130.50 ± 9.34	121.94 ± 5.92
	20	113.90 ± 9.94	73.02 ± 3.26 <sup>***</sup>	101.36 ± 7.60 <sup>##</sup>	96.67 ± 9.84 <sup>##</sup>	123.99 ± 10.49
Ca (mg/dl)	10	10.64 ± 0.47	10.24 ± 0.39	10.37 ± 0.49	11.99 ± 0.47	10.15 ± 0.16
	11	11.47 ± 0.30	11.70 ± 0.27 <sup>##</sup>	11.51 ± 0.24	10.76 ± 0.13 <sup>#</sup>	9.60 ± 0.14 <sup>**</sup>
	20	11.40 ± 0.19	12.10 ± 0.18 <sup>##</sup>	11.69 ± 0.20 <sup>#</sup>	9.56 ± 0.24 <sup>***</sup>	9.65 ± 0.21 <sup>**</sup>
Inorganic phosphate (mg/dl)	10	5.83 ± 0.27	5.89 ± 0.28	5.90 ± 0.28	6.65 ± 0.31	5.30 ± 0.22
	11	6.31 ± 0.30	6.21 ± 0.24	6.56 ± 0.23	7.19 ± 0.26	5.61 ± 0.22
	20	4.98 ± 0.21	6.11 ± 0.24 <sup>*</sup>	5.47 ± 0.30	5.14 ± 0.32 <sup>##</sup>	4.02 ± 0.34 <sup>##</sup>
Total cholesterol (mg/dl)	10	80.54 ± 4.32	91.92 ± 3.88	87.31 ± 4.65	100.78 ± 4.16 <sup>*</sup>	93.43 ± 3.34
	11	86.12 ± 2.51	79.56 ± 3.51	95.41 ± 4.23	100.35 ± 5.54	98.49 ± 3.48
	20	107.61 ± 3.65 <sup>##</sup>	86.23 ± 3.82 <sup>**</sup>	114.87 ± 5.16 <sup>##</sup>	97.83 ± 4.83	71.07 ± 4.03 <sup>***</sup>
HDL/total cholesterol	10	0.60 ± 0.04	0.60 ± 0.05	0.64 ± 0.03	0.60 ± 0.03	0.58 ± 0.02
	11	0.50 ± 0.05	0.45 ± 0.05 <sup>#</sup>	0.47 ± 0.03 <sup>#</sup>	0.54 ± 0.02	0.53 ± 0.02
	20	0.27 ± 0.01 <sup>##</sup>	0.27 ± 0.02 <sup>##</sup>	0.22 ± 0.02 <sup>##</sup>	0.36 ± 0.01 <sup>##</sup>	0.42 ± 0.04 <sup>**</sup>
LDL/total cholesterol	10	0.40 ± 0.03	0.40 ± 0.04	0.36 ± 0.04	0.40 ± 0.02	0.42 ± 0.03
	11	0.50 ± 0.05	0.55 ± 0.06	0.53 ± 0.05	0.46 ± 0.04	0.47 ± 0.03
	20	0.73 ± 0.03 <sup>##</sup>	0.73 ± 0.05 <sup>##</sup>	0.78 ± 0.06 <sup>##</sup>	0.64 ± 0.06 <sup>##</sup>	0.58 ± 0.05 <sup>#</sup>

<sup>1)</sup>PR-1: dosage of Pueraria Radix was 1 g/kg/day.

<sup>2)</sup>PR-2: dosage of Pueraria Radix was 5 g/kg/day.

Comparison to control group by Bonferroni multiple comparison method, \*, p<0.05, \*\*, p<0.01. Comparison to 10 weeks by Bonferroni multiple comparison method, #, p<0.05, ##, p<0.01.



**Fig. 6.** Histomorphological analysis of tibia in rats (H&E stain, ×20). Shown are trabecular bone matrix from ovariectomized-control group (A), Sham group (B), E2 group (C), PR-1 group<sup>1)</sup> (D) and PR-5 group<sup>2)</sup>.

<sup>1)</sup>PR-1: dosage of Pueraria Radix was 1 g/kg/day.

<sup>2)</sup>PR-2: dosage of Pueraria Radix was 5 g/kg/day.

가에 따라 감소하는 경향을 보였는데, sham군, E2군 및 PR-1 군은 난소절제 후에 ALP 농도는 감소된 반면(p<0.01), 대조군과 PR-5 군은 주령에 따른 농도의 차이가 크지 않았다. 혈중 칼슘의 농도는 대조군 및 PR-5 군은 주령에 따른 변화가 없었고, sham군 및 E2군은 난소절제 후에 칼슘농도가 증가되었고(각 p<0.05), PR-1 군은 난소절제 후에 감소되었다(p<0.05). 무기인산의 농도는 PR-1 및 PR-5 군은 10주에 비해 20주에 감소되었으나(p<0.01), 다른 군들은 큰 차이가 없었다. 총 콜레스테롤의 농도는 대조군과 E2군에서는 10주에 비해 20주에 크게 증가되었으나(각 p<0.01), sham군과 PR-1 군은 주령에 따른 큰 변화가 없었고, PR-5 군은 10주에 비해 20주에 크게 감소되었다(p<0.01). HDL-콜레스테롤의 농도는 모든 군에서 10주에 비해 20주에 크게 감소된 것으로 나타났으며(각 p<0.01), 반면에 LDL-콜레스테롤의 농도는 PR-5 군을 제외한 모든 군에서 크게 증가된 것으로 나타났다(p<0.01)(Table 2).

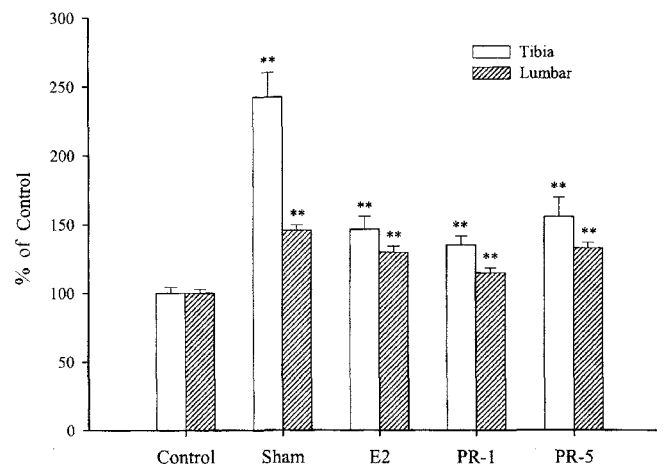
**소주골 면적(trabecular bone area; TBA)**

각군의 경골 소주골의 조직 슬라이드 사진을 Fig. 6에 나타내었다. 난소절제된 대조군에 비해 정상 상태의 sham군의 경골 및 요추골의 면적이 크게 증가되어 있는 것으로 나타났다(각 p<0.01), E2 및 PR 추출물의 투여(1 g/kg/day 및 5 g/kg/day)도 sham에는 미치지 못하나 대조군에 비해 소주골 면적이 증가된 것으로 나타났다(각 p<0.01)(Fig. 7).

**고 찰**

취 중 PR, PL 및 PF에 함유된 daidzein, genistein 및 formononetin 각각의 free form과 total form을 정량한 결과, PR의 daidzein의 총 함량이 10,436.16 mg/kg로 가장 높았고 대

두의 함량(254.90±25.37 mg/kg)<sup>(19)</sup>보다 높았다. 그러나 PF는 PR의 약 1/10의 양을 함유하고 있었고 PL은 정량할 수 없었다. PR은 genistein 232.08 mg/kg 및 formononetin 308.94 mg/kg을 함유하나 PF 및 PL은 측정되지 않았다. 그러나 PF 및 갈엽에 genistein 및 daidzein이 존재한다는 보고<sup>(6-8)</sup>가 있으므로 PF 및 PL은 genistein 및 formononetin의 함량이 HPLC 분석법의 검출한계 이하로 측정되지 않은 것으로 사료된다. 결과적으로 같은 식물에서도 뿌리, 줄기 혹은 잎에 따라 혹은 채취시기에 따라 함유 성분에 큰 차이를 보였고, 따라서 사용부위에 따라 그 성분이 다르므로 다른 약성을 나



**Fig. 7.** Changes in trabecular bone area of tibia and lumbar by administration of Pueraria Radix extracts for 9 weeks.

PR-1: dosage of Pueraria Radix was 1 g/kg/day.

PR-2: dosage of Pueraria Radix was 5 g/kg/day.

Comparison to control group by Bonferroni multiple comparison test, \*\*, p<0.01.

타남을 보여주는 좋은 예라고 할 수 있다. 현재 phytoestrogen의 공급원으로 주목받고 있는 대두에 비해 PR은 가격이 저렴하고, phytoestrogen의 함량도 높아 phytoestrogen의 자원식물로 가능성이 높다. T. Kurihara 등<sup>(6)</sup>의 보고에 의하면 PF는 보관기간에 따라 약재에 함유된 성분의 변화가 일어나며 채취한지 5년 미만의 신선한 PF는 tectoridin 및 tectorigenin을 다량 함유하나 채취한지 5년 이상 보관된 오래된 PF는 tectoridin이 kakkaride로 변화되는 것으로 발표되었다.

골 형성에 관여하는 조골세포는 콜라겐과 점성다당류로 구성된 골 기질을 분비하여 새로운 골을 생성하는 세포로서 부갑상선 호르몬, 활성형 비타민 D, 에스트로겐, 프로스타글란딘 E2에 대한 수용체가 존재하여 이들 호르몬에 의한 영향을 받아 골의 재형성은 계속적으로 진행된다<sup>(9)</sup>. 이러한 조골세포의 활성 검사를 위해 유사조골세포(Saos-2)의 세포 증식을 세포수에 따른 세포증식도를 나타내는 MTT 검색법과 조골세포의 특이적인 효소인 ALP 활성 검사를 실시하였다. 조골세포의 수적 증가보다는 기질성숙(matrix maturation)을 나타내는 ALP 활성은 골다공증 치료제로 사용되고 있는 NaF와 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>가 월등하게 높은 세포활성 효과를 나타내었고, E2는 세포활성 효과가 크지 않았으며 이는 이전의 보고에서 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>와 NaF가 사람 골수기질의 유사조골세포 (human bone marrow stromal osteoblast-like cell)에서 NaF는 세포 증식을 220% 증가시키고 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>는 ALP 활성을 170% 증가시켰다는 결과와 유사하였다<sup>(21)</sup>. PR은 대조군의 160% 이상 (5 mg/mL) 세포의 수적 증가 및 그 활성도를 증가시키는 것으로 사료되고 PF는 세포증식 효과가 없었으며 PL은 ALP 활성은 있었으나 전처리한 PL은 세포증식 효과가 모두 없었으며, 이는 가수분해로 인한 영향으로 사료된다. 이상의 연구 결과를 종합할 때, PR은 유사조골세포 Saos-2 세포에 대하여 높은 세포 증식 효과와 ALP 활성 효과를 나타내어 골다공증 치료제로 사용되고 있는 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>와 비교할 때 조골세포 증식과 활성 효과가 유사하거나 높다고 할 수 있다.

골 재흡수를 일으키는 파골세포는 조골세포(ALP 활성)와 달리 특성적으로 acid phosphatase 활성을 가지므로 TRAP 염색법을 실시한 결과, 세포 내 신호전달의 억제제 및 파골세포의 억제물질로 알려진 genistein의 파골세포 활성 억제효과가 daidzein 및 PR보다 높게 나타났다. 결과적으로 PR은 조골세포의 세포증식이나 활성은 증가 시키나 파골세포의 증식을 억제시키지는 못하였다. PR의 phytoestrogen은 주로 daidzein이었고(Table 1), daidzein은 파골세포의 활성억제효과가 낮았으므로(Fig. 3) PR의 골다공증 치료효과는 파골세포의 활성억제보다는 조골세포의 활성 증가에 기인한다고 사료된다.

난소적출 흰쥐를 사용한 *in vivo* 실험에서 난소적출 대조군의 체중은 수술 후 급격하게 체중증가를 나타내었으며 sham군은 비교적 완만한 체중 증가를 보여 두 군 사이의 체중 차이는 뚜렷하게 나타났다. 그러나 PR의 투여는 그 투여량에 비례하여 체중의 증가를 억제하였고 E2군도 유사한 결과를 나타냈다. 이는 난소제거 후 지방세포의 증가로 인한 체중 증가는 에스트로겐의 감소에 기인하므로 부족된 E2를 투여한 군과 PR 투여군은 에스트로겐 혹은 갈근에 함유된 이와 유사한 물질에 의해 지방세포의 증가가 억제됨으로써 체중증가를 둔화시켰다고 할 수 있다<sup>(30)</sup>. 에스트로겐의 부작용

을 관찰하기 위해 자궁의 무게 변화를 측정된 결과, 대조군은 sham군에 비해 자궁이 많이 퇴화되었으나 E2 투여군은 자궁 비대를 유발하였으며 PR-1 군은 자궁의 무게에 영향을 미치지 않았으나, PR-5 군의 경우, E2군에는 미치지 못하였지만 대조군에 비해 자궁의 크기가 증가되었다( $p < 0.01$ ). 이는 일반적으로 phytoestrogen이 자궁비대를 유발하지 않는다는 보고와는 달리 본 연구에서 투여된 PR의 용량에서는 에스트로겐 1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 의 투여와 유사하게 자궁비대를 유발하는 어떤 성분이 PR에 함유되어 있음을 나타내는 것으로 사료된다.

혈장내의 생화학적 지표중 ALP, 칼슘, 무기성 인산염은 골다공증의 증상을 검색하기 위해서 측정하였다. 특히 폐경기에 나타나는 골다공증환자의 경우에 혈중 콜레스테롤의 증가가 있으며 이는 LDL-콜레스테롤의 증가를 반영한다는 보고가 있으며<sup>(16)</sup>, 폐경기 골다공증환자에게 에스트로겐을 투여할 때 LDL-콜레스테롤은 감소하고 HDL-콜레스테롤은 증가한다는 보고도 있다<sup>(16,30)</sup>. 혈장 ALP는 골대사 뿐만 아니라 다른 장기의 ALP 활성을 모두 반영하는 것이므로 혈장 ALP 농도를 골의 대사에만 한정시켜 연관시킬 수 없는 것으로 사료되며 대조군과 PR-5군은 큰 차이가 없었다. 총 콜레스테롤은 Sham군과 PR-1 군은 변화가 없었으나 PR-5 군은 감소한 것으로 나타났다. HDL/총 콜레스테롤의 비는 모든 군에서 주령의 증가에 따라 감소하였고 특히 20주에 PR-5군은 대조군에 비해 높은 HDL/총 콜레스테롤의 비를 나타내었다 ( $P < 0.01$ ). 이와 더불어 LDL/총 콜레스테롤의 비는 모든 군에서 주령에 따라 증가하였고 20주에 PR-5군은 대조군에 비해 LDL/총 콜레스테롤의 비의 증가가 적었다( $P < 0.01$ ). 이는 연령의 증가에 따라 HDL이 감소하고 LDL이 증가하는 것을 나타내며 이러한 현상은 PR의 투여로 HDL의 감소 및 LDL의 증가가 억제되는 것으로 사료된다. 결과적으로 고용량의 PR 투여는 자궁절제로 인한 급격한 체중의 증가를 정상군과 유사하게 억제시켰으나, 에스트로겐과 유사한 자궁비대의 부작용을 나타냈으며 콜레스테롤 수치를 감소시키는 효과를 보여 PR에는 에스트로겐과 유사한 성분이 함유되어 있는 것으로 사료된다<sup>(16)</sup>.

동물실험 후 분리한 경골 및 요추골의 소주골 면적을 측정된 결과, 정상상태의 Sham군에 비해 자궁절제 후 골다공증을 유발시킨 대조군에서 경골 및 요추골의 TBA가 크게 감소되었고, 이러한 TBA의 감소는 E2 1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ , PR 1  $\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  및 PR 5  $\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 의 투여로 억제되었다( $p < 0.05$ ). 특히 고용량의 PR 투여는 비교물질로 사용한 E2보다 TBA의 감소를 더 억제하는 것으로 나타나 PR의 골다공증 치료효과가 우수함을 증명하였다. 그러나 고용량의 PR 투여는 골다공증 개선효과와 더불어 에스트로겐의 부작용인 자궁 비대 현상이 함께 나타나므로 실제적으로 골다공증 치료제로 개발하기 위하여 부작용을 나타내는 성분에 대한 확인 및 연구가 우선되어야 할 것으로 사료된다. 특히 PR은 에스트로겐의 대체물질로 각광을 받고 있는 daidzein의 함량이 대두보다 4-5배 높으며<sup>(19)</sup> 골다공증 치료제로 주효능을 나타내는 것으로 추정된다. 그러나 daidzein은 genistein보다 에스트로겐 수용체  $\alpha$  및  $\beta$ 에 대한 친화력이 떨어지고 자궁비대 현상은 낮은 것으로 알려졌으나 본 연구결과와는 차이가 있으므로 daidzein 이외의 다른 성분이 존재할 가능성을 배제시킬 수 없다<sup>(17)</sup>. 결론적으로 PR은 골다

공증의 예방 및 치료제로 상당히 우수한 한약재임이 확인되었고, PL과 PF는 PR의 효능에 미치지 못하였다.

요 약

콩과 식물인 갈근에는 genistein과 daidzein이 함유된 것으로 알려졌다므로 본 연구는 갈근(PR), 갈화(PF) 및 어린순인 갈용(PL)에 함유된 phytoestrogen의 함량을 HPLC법으로 정량 분석하였다. 동시에 phytoestrogen의 골다공증 치료제에 대한 효능 검색의 일환으로 조골세포의 증식작용(MTT법 및 ALP분석)과 파골세포의 활성(TRAP법)을 측정하였고 난소절제 흰쥐에 PR 1g/kg/day(PR-1) 및 PR 5g/kg/day(PR-5)을 9주 동안 투여한 후 혈액분석, 혈장 Alkaline phosphatase (ALP), 칼슘, 무기성 인산염, 총콜레스테롤, LDL- 및 HDL-콜레스테롤을 측정하였고 적출된 경골 및 요추골의 소주골면적을 측정하였다.

PR과 PF의 총 daidzein의 함량은 10436±2144 mg/kg와 1003±206 mg/kg이었고 genistein과 formononetin은 PR에만 존재하고 PF 및 PL에는 함유되어 있지 않았다. 인간 유사 조골 세포주인 Saos-2에 PR은 대조군의 158% 정도(5 mg/mL)의 세포증식효과와 ALP 활성을 증가시켰으나 전처리한 PR, PF 및 PL의 세포증식효과는 없었고 PL만이 ALP 활성을 증가시켰다. 파골세포의 증식억제실험에서 genistein의 IC<sub>50</sub>는 1.57×10<sup>-4</sup> mg/mL(5.81×10<sup>-7</sup> M)이었고, daidzein과 PR은 효과가 없었다. 난소절제 흰쥐에 대한 in vivo 실험에서 대조군이 sham군보다 난소적출 1주 후부터 체중의 증가가 급격하게 나타났으나 PR의 투여로 둔화되었다. PR 투약에 의한 자궁의 무게는 PR-5군은 대조군에 비해 증가되었고(p<0.05), PR-1군은 대조군과 유의성이 없었다. 혈장 ALP의 활성은 주령의 증가에 따라 감소하는 경향을 보였고, HDL-콜레스테롤의 농도는 모든 군에서 주령에 따라 감소되었으나(p<0.01), PR-5군의 LDL-콜레스테롤의 농도는 대조군에 비해 감소되었다(p<0.01). 대조군에 비해 sham군의 경골 및 요추골의 면적은 증가되었고(p<0.01), PR 투여군(PR-1 및 PR-5)도 sham보다 적으나 대조군에 비해 소주골 면적이 증가되었다(각 p<0.01). 특히 고용량의 PR 투여는 PR의 골다공증 치료효과가 우수함을 증명하였으며(p<0.01), PL과 PF는 효능이 미비하나 PR은 골다공증의 예방 및 치료제로는 상당히 우수한 한약재임이 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원의 연구비에 의해 수행되었기에 감사를 드립니다.

문 헌

1. Faculties in Department of Herbology. Oriental Herbology. pp. 242-244, 167-168. Young-Lim Publishing Co., Seoul (1991)
2. Editorial Committee. Korean Pharmacopoeia. 7th ed. pp. 721-988. Korean Medical Index Press, Seoul, Korea (1998)
3. Pharmacopoeia Committee. DPRK Pharmacopoeia. p. 265. Medical Science Press, Pyongyang, The Democratic People's Republic

- of Korea (1995)
4. Editorial Committee. Chinese Pharmacopoeia. pp. 16-17. Guangdong Science Press, Guang-dong, China (1995)
5. Editorial Committee. Japanese Pharmacopoeia. 13th ed. pp. 2277-2279. Hirogawa Press, Tokyo, Japan (1996)
6. Kurihara, T. and Kikuchi, M. Studies on the constituents of flowers. IV. On the components of the flower of *Pueraria thubergiana* Benth. (3). Yakugaku Zasshi. 96: 1486-1488 (1976)
7. Lee, K.-T., Sohn, I.-C., Kong, E.-A., Kim, D.-H., Choi, S.-K., Choi, J.-W. and Park, H.-J. Antioxidative and cytoprotective effects of isoflavones isolated from *Pueraria thubergiana* flowers. Yakhak Hoeji 43: 736-742 (1999)
8. Kinjo, J., Takeshita, T., Abe, Y., Terada, N., Yamashita, H., Yamasaki, M., Takeuchi, K., Murasaki, K., Tomimatsu, T. and Nohara, T. Studies on the constituents of *Pueraria lobata*. IV. Chemical constituents in the flowers and the leaves. Chem. Pharm. Bull. 36: 1174-1179 (1988)
9. Consensus Conference. Osteoporosis. JAMA 252: 799-802 (1984)
10. Ryan, P.J., Evans P., Gibson, T., and Fogelman, I. Osteoporosis and chronic back pain: A study with single-photon emission computed tomography bone scintigraphy. J. Bone Miner. Res. 7: 1455-1460 (1992)
11. Spencer, H., Rubio, N., Rubio, E., Indreika, M. and Seitam, A. Chronic alcoholism: Frequently overlooked cause of osteoporosis in men. Am. J. Med. 80: 393-397 (1986)
12. Wang, W., Tanaka, Y., Han, E. and Higuchi, C.M. Proliferative response of mammary glandular tissue to formononetin. Nutr. Cancer 23: 131-140 (1995)
13. Saloniemi, H., Wahala, K., Nykanen-Kurki, P., Kallela, K. and Saastamoinen, I. Phytoestrogen content and estrogenic effect of legume fodder. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 208: 13-17 (1995)
14. Bingham, S.A., Atkinson, C., Liggins, J., Bluck, A. and Coward, A. Phytoestrogens: where are we now? Brit. J. Nutr. 79: 393-406 (1998)
15. Evans, G.L., Bryant, H.U., Magee, D.E. and Turner, R.T. Raloxifene inhibits bone turn over and prevents further cancellous bone loss in adult ovariectomized rats with established osteopenia. Endocrinology 137: 4139-4144 (1996)
16. Bryant, H.U. and Dere, W.H. Selective estrogen receptor modulators: an alternative to hormone replacement therapy. Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 217: 45-52 (1998)
17. Kuiper, G.G.J.M., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., Van Der Saag, P.T., Van Der Burg, B. and Gustafsson, J.A. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β. Endocrinol. 139: 4252-4263 (1998)
18. Kim, J.S. and Kim, C. A Study on the Constituents from the roots of *Astragalus membranaceus* (II). Korean J. Pharmacogn. 28: 75-79 (1997)
19. Kim, C., Lee, Y.S., Kim, J.S. and Hahn, Y. High performance liquid chromatographic analysis of isoflavones in soybean foods. Korean J. Food Sci. Technol. 32: 25-30 (2000)
20. Carmichael, J., DeGraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D. and Mitchell, J.B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res. 47: 936-942 (1987)
21. Kassem, M., Mosekilde, L. and Eriksen, E.F. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 potentiates fluoride-stimulated collagen type I production in cultures of human bone marrow stromal osteoblast-like cells. J. Bone Miner. Res. 8: 1453-1458 (1993)
22. Raab, W.P. Diagnostic value of urinary enzyme determinations. Clin. Chem. 18: 5-25 (1972)
23. Shioi, A., Ross, F.P. and Teitelbaum, S.L. Enrichment of generated murine osteoclasts. Calcif. Tissue Int. 55: 387-394 (1994)
24. Moorehead, W.R. and Briggs, H.C. 2-Amino-2-methyl-1-propanol as the alkalinizing agent in an improved continuous-flow cresolphthalein complexone procedure for calcium in serum. Clin. Chem. 20: 1458-1460 (1974)
25. Knoll, M.H. and Elin, R.J. Mechanism of cefoxitin and cephal-



- othin interference with the Jaffe method for creatinine. Clin. Chem. 29: 2044-2048 (1983)
26. Wang, J., Chen, C.C. and Osaki, S. Optimization of the phosphorus-UV reagent. Clin. Chem. 29: 1255 (1983)
27. Tiffany, T.O., Jansen, J.M., Burtis, C.A., Overton, J.B. and Scott, C.D. Enzymatic kinetic rate and endpoint analysis of substrate by use of a GeMsaec fast analyzer. Clin. Chem. 18: 829-840 (1972)
28. Kim, C., Kim, J.S., Kim, Y.T. and Song, K.Y. Effects of herbal medicine on tibia bone changes in ovariectomized rats and SAM P6. J. Pharm. Soc. Korea 42: 220-228 (1998)
29. Rosner, B. Fundamentals of Biostatistics. PWS-Kent Co., Boston, MA, USA (1990)
30. Kalu, D.N. Evaluation of the pathogenesis of postmenopausal bone loss. Bone 17: 135S-144S (1995)

---

(2002년 3월 20일 접수; 2002년 8월 13일 채택)