

콩 이소플라본이 난소를 절제한 성장기 흰쥐의 골격대사에 미치는 영향

김영경 · 이현옥 · 엄애선
한양대학교 생활과학대학 식품영양학과

Effects of Soy Isoflavone on the Bone Metabolism in Ovariectomized Growing Rats

Young-Kyoung Kim, Heon-Ok Lee, Ae-Son Om

Department of Food Science and Nutrition, College of Human Ecology, Hanyang University, Seoul, Korea

Abstract

This study attempted to investigate if the soy isoflavone, genistein, influences bone metabolism in ovariectomized, 4-week-old female Wister rats. All the rats were divided into sham (SH) and ovariectomized (OVX) groups consisting of OVX-17 β -estradiol(10 μ g/kg b.w.), OVX-1mg or 5 mg or 10mg of genistein/kg b.w. The rats were allowed ad libitum access to foods and water for 8 weeks. The Results showed that body weight had significantly increased in the OVX group compared to the SH group ($p < 0.05$) and was not different among the OVX-GEN and OVX-ES groups and the OVX group. The liver and uterus weights in the OVX groups were slighter than those in SH group ($p < 0.05$). The kidney weight in the OVX groups was decreased compared to in that in the SH group but was not significantly different among all OVX groups. Femoral length in the OVX groups was longer than in the SH group and was not different. Rats in the OVX groups had higher creatinine levels than those in the SH group and hydroxyproline level did not differ significantly among any of the groups. Serum ALP activity and Ca in bone, feces, urine and serum did not change among the groups. Bone mineral density (BMD) decreased in the OVX groups compared to the SH group and was slightly increased by feeding genistein ($p > 0.05$). Breaking force and stiffness did not change by ovariectomy and feeding genistein. Hence, these results suggested that estrogen may affect bone mineralization in growing rats and that genistein be may involved in the prevention of bone loss. However, more studies are needed to identify the proper mechanism of genistein and bone formation.

Key words : genistein, ovariectomy, osteoporosis

1. 서 론

골다공증은 골질량의 감소로 인하여 골조직에 변화가 생겨 약한 충격에도 골절을 일으키는 질병으로 최

근 노인 인구의 증가와 더불어 골다공증 발생 빈도수도 세계적으로 증가하고 있으며 국내에는 200만 명 이상의 골다공증 환자가 있다(박영희 등 2001, 유용석 2002). 골다공증은 제 1형의 경우 폐경기 이후 여성에게서 에스트로겐의 감소로 발생하며, 제2형은 노화와 관련된 골다공증으로 70세 이상의 남녀 노인들에게 나타나며 모든 신진대사의 감소가 원인이 된다. 이와 달리 골조직의 손실을 유발시키는 약제나 질병에 의해 생기는 2차적 골다공증은 성장기 혹은 젊은 여성에게

Corresponding author: Ae-Son Om, Department of Human Ecology,
Hanyang University, Seoul 133-791, Korea.
Tel : +82-2-2220-1203
Fax : +82-2-2281-8285
E-mail : aesonom@hanyang.ac.kr

생기게 된다(Williams와 Melvin 2000). 또한 골다공증은 지리적인 위치, 인종, 성별, 나이, 운동, 호르몬, 식습관 및 최대 골밀도 등에 따라 발생률이 크게 차이가 난다. 즉 서구 여성보다는 아시아 여성이, 백인이나 황인보다는 흑인이, 여성보다는 남성이 골다공증 발생률이 적으며, 식이 중 칼슘 섭취량 및 대두 식품의 섭취가 많을수록 골다공증을 예방시킨다는 보고가 있다(조수현 1993, 김은미 1996). 이 중 약 25세까지 이루어지는 최대 골밀도는 노년기와 폐경기 이후에 오는 골다공증의 중요한 요인 중 하나인데, 유전적인 요인뿐만 아니라 성장기 동안 Ca, Vit. D, 대두 등의 식이 섭취, 운동량과 같은 환경적 요인 또한 골질량 및 골격 발달에 중요하다(김경희 1999). 현재까지 발표된 연구결과를 보면 골다공증이 발생하지 않도록 예방하는 것이 가장 중요하며, 현재 처방되고 있는 estrogen, calcitonin, bisphosphonate, ipiriflavone 등의 약물은 더 이상의 골손실이 일어나지 않도록 지연시킬 뿐 손실된 골질량을 보수하기는 힘들다는 결과가 대부분이다(서부일과 안덕균 1998, Argmandi 2000). 그러므로 골다공증을 예방하기 위하여 성장기 동안 최대 골밀도에 이르게 하는 것이 중요하며, 골질량을 감소시키는 위험인자를 피해야 할 것이다.

대두는 일반적으로 단백질 약 35%, 지방 17%와 탄수화물 31% 외에 phytochemical, phytate, saponin, trypsin inhibitor, 올리고당, 식이섬유 등의 비영양소인 생리활성물질을 함유한다(최혜미 등 1999, 김성란 등 1999). 생리활성 물질 중 대표적인 phytochemical인 이소플라본은 대두 속에 약 0.1~0.4% 정도 들어있으며(최현배와 손현수 1998), 그 구조 및 활성이 estrogen과 유사하여 phytoestrogen이라고도 한다. 최근 이소플라본이 골다공증을 예방하는 효과를 지녔다는 많은 연구 결과들이 발표되었다. 이소플라본은 조골세포를 활성화시키고, 파골세포의 활성을 억제(Viereck 등 2002)하며, 난소를 절제한 폐경기 이후 골다공증 모델 쥐에서 골손실을 예방(Christel 등 2000, Arjmandi 등 1996)하였으며, 대두식품을 많이 섭취한 여성에게서 폐경기 이후 골다공증 발병위험이 현저히 낮았다(Potter 등 1998, Wangen 등 2000). 그러나 유아기와 청소년기에서 이소플라본을 꾸준히 섭취한 경우에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다. 성장기 동안 이소플라본 섭취는 최대골질량을 유지함으로써 골연화증으로의 진행을

막아 노년기 골질량의 손실을 억제할 수 있는 효과가 있을 것으로 예상된다.

따라서 본 실험에서는 성장기 쥐를 대상으로 난소를 절제한 후 대두 이소플라본인 genistein을 경구 투여하여 성장기 흰쥐의 골격에 미치는 영향을 알아보았다.

II. 재료 및 방법

1. 실험설계 및 실험동물

실험동물은 3주령인 암컷 흰쥐(Wistar female rats: Samtaco. Co. LTD, Young-In, Korea)를 구입하여 1주 동안 적응시킨 후 난괴법(randomized complete block design)으로 군을 분류하였다. 난소절제한 군들은 sodium pentobarbitol(40 mg/kg b.w.)로 마취한 후 복부를 절개하여 양쪽 난소를 절제(ovariectomized: OVX)하였고, sham군은 복부를 개복한 후 난소를 절제하지 않고 다시 복부를 봉합하였다. 모든 동물은 수술 후 1주 동안의 회복기를 거쳐 5주령이 되었을 때 6군(SH군: Sham, OVX군: Ovariectomy, OVX+ES군: Ovariectomy + 17 β -estradiol 10 μ g/kg b.w. in corn oil, OVX+GEN 1: Ovariectomy + genistein 1mg/kg b.w. in corn oil, OVX+GEN 5: Ovariectomy + genistein 5mg/kg b.w. in corn oil, OVX+GEN 10: Ovariectomy + genistein 10 mg/kg b.w. in corn oil)으로 나누어 대두의 genistein (BioSpectrum Co. LTD, Young-In, Korea) 및 17 β -estradiol(Sigma U.S.A.)을 매일 일정량씩 공급하였다. 성장률이 가장 높은 기간을 고려하여 난소 절제 후 8주 동안 사육하였다. 모든 실험기간 동안 물과 사료(Orient. Co. LTD, Young-In, Korea)는 자유롭게 주었으며, 사료의 함량은 Table 1에 제시하였다. 동물 사육실 환경은 온도 22 \pm 2 $^{\circ}$ C, 상대습도 65 \pm 5%, 명암 주기 12시간(6:00~18:00)으로 조절하였고, 실험기간동안 체중은 매일 일정한 시간에 측정하였다.

2. 시료채취 및 보관

각 군에 해당하는 실험시료를 8주간 경구투여한 후 뇨와 변을 수집하고 혈액을 채취한 다음 개복하여 간, 신장, 비장, 자궁 및 뼈를 적출하였다. 뇨와 변은 실험 종료 일주일 전에 대사장(metabolic cage)에서 15시간 뇨와 대변을 수집하였으며 장기는 채취 후 주변의 조직을 모두 제거하였다. 모든 시료는 분석 전까지 -20

℃에서 냉동보관하였다.

3. 시료분석

1) 체중변화량

실험동물의 체중은 실험개시일로부터 종료일 전날 까지 매일 측정하여 체중 증가량을 구하였고, 희생 시키기 직전에 몸무게를 측정하여 장기무게를 보정 하였다.

2) 뇨 creatinine과 hydroxyproline(OHPr) 측정

뇨 creatinine 함량은 Creatinine kit(AsanPharm. Co. Asan, Korea)으로 520 nm에서, hydroxyproline (OHPr) 측정은 Jamall 등(1981)의 방법을 이용하여 558 nm에서 각각 흡광도를 측정하여 농도를 산출하였다.

3) 혈청 alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정

혈청 ALP의 활성은 ALP-S Kit(AsanPharm. Co. Asan, Korea)로 500 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 산출 하였다.

4) Ca 측정

대퇴골, 혈청, 뇨, 변에서 Ca 측정은 AOAC의 방법 (1984)을 이용하여 분석하였다.

5) 대퇴골에서 골밀도, 파단력, stiffness 측정

골밀도(bone mineral density: BMD) 측정은 이중에너지 방사선 골밀도 측정기(Dual energy X-ray absorptionmeter, Hologic QDR-4500A, Waltham, MA, U.S.A.) 중 소동물 분석기를 이용하여 측정하였다(양승오와 함수연 2001). 파단력(breaking force)은 먼저 대퇴골의 길이를 디지털 계측기(Mitutoyo Absolute digimatic, Model CD-15CP, JAPAN)로 측정한 후 Instron(model 1127, Instron Co. U.S.A.)을 이용하여 threepoint loading 방법으로 load cell(50 kg), crosshead speed(5mm/min)의 조건에서 뼈가 부러지기 직전의 파단력(breaking force, maximum load, kg)을 측정하였다 (Turner CH와 Burr DB 1993). 힘이 가해진 단면적을 측정하기 위해 뼈를 얇게 자르고 완전히 건조시킨 후 FE-SEM(field emission scanning electron microscope, JSM-6340F, JAPAN)으로 25배 확대하여 촬영하였다. 이 단면도를 image processing을 이용하여 대퇴골 단면적(mm²)을 구하였다.

Table 1. Composition of diet

Ingredient	g
Casein	160
Cornstarch	490
Sucrose	200
Cellulose	50
Corn oil	48.4
Cysteine	1.5
Methionine	3
Cholin bitartrate	2
BHT ¹⁾	0.015
Mineral mixture ²⁾	35
Vitamin mixture ³⁾	10
Total	1,000

1) BHT: Butylated Hydroxytoluene

2) Mineral mixture(g/100g): CaHPO₄·2H₂O, 0.43; KH₂PO₄, 34.31; NaCl, 25.06; Fe(C₆H₅O₇)·6H₂O, 0.623; MgSO₄·7H₂O, 9.98; ZnCl₂, 0.02; MnSO₄·4·5H₂O, 0.121; CuSO₄·5H₂O, 0.156; KI, 0.0005; CaCO₃, 29.29; (NH₄)₆Mo₇O₂·4H₂O, 0.0025

3) Vitamin mixture(mg/100g): Vitamin A acetate, 93.2; Vitamin D3, 0.5825; α-tocopherol-acetate, 1200; Vitamin K3, 6.0; Vitamin B1 Hydrochloride, 59.0; Vitamin B2 59.0; Vitamin B6 hydrochloride, 29.0; Vitamin B12, 0.2; Vitamin C, 588; D-Biotin, 1.0; Folic acid, 2; Pantothenic acid, 235; Nicotinic acid, 294; Inositol, 1176; Lactose, 96257

4. 통계처리

본 실험의 결과는 SPSS(Statistical Package for Social Science 9.0 Program, SPSS. Co. U.S.A.)를 이용하여 평균값(mean)과 표준편차(SD)를 계산하였고, 각 군간의 유의성을 검증하기 위해 one-way ANOVA를 사용하였다. ANOVA에 의하여 통계적 유의성이 나타나는 경우 각 군간의 유의성은 Duncan's multiple range test에 의해서 분석하였다.

III. 실험 결과 및 고찰

1. 체중 증가량

난소절제 후부터 실험기간 동안 실험동물의 체중변화를 측정된 결과는 Table 2와 같았다. 수술 8주 후 OVX군의 체중 증가(230.2±25.15 g)가 SH군의 체중 증가(170.6±20.51 g)에 비해 유의적으로 높게 나타났으나 (p<0.05), OVX+GEN군과 OVX+ES군의 체중 증가는 OVX군에 비해 유의적인 차이를 보이지 않았다. 여러

연구를 통해서 난소절제로 유발된 체중 증가는 이미 보고된 바 있으며, 특히 김화영 등(1998)은 10개월된 난소절제 쥐보다 2개월된 난소절제 성장기 쥐에서 체중증가량이 높음을 관찰한 바 있다.

2. 장기무게와 대퇴골의 무게 및 길이

각 군간의 간, 신장, 비장, 자궁의 무게를 체중 100 g당으로 나타내었으며, 그 결과는 Table 3와 같았다. 체중 당 간의 무게는 난소를 절제한 모든 군에서 SH군에 비해 유의적으로 낮았으며(p<0.05), 신장의 무게 또한 SH군에 비해 난소를 절제한 군에서 유의적으로

감소하였으나(p<0.05), 난소절제군 사이에서 유의적인 차이는 없었다. 반면, 비장의 경우는 모든 군간에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 이같은 결과는 난소를 절제한 군에서 간과 신장의 무게가 감소한다는 안혜선(1997)의 연구와 일치하였으며, 난소 절제 시 체중의 증가로 체중 100 g당 간과 신장의 무게가 상대적으로 낮게 나타난 것으로 판단된다. 자궁의 무게는 난소절제 시 estrogen의 감소로 자궁의 발육이 억제되어 SH군과 비교했을 때 확연한 차이를 나타내었다(p<0.05). 자궁은 estrogen에 의존적으로 변화하여 17β-estradiol의 투여시 무게가 증가한 연구 결과가 있었으나(Jung KY 등 2004), 본 연구에서는 17β-estradiol의 투여로 자궁의 무게가 유의적으로 증가하지는 않았다. Soy protein을 난소절제한 쥐의 식이로 공급한 Arjimandi 등(2002)의 연구 결과에 따르면 자궁에서 이소플라본은 estrogen의 역할보다는 selective estrogen receptor modulators (SERMs)를 유도하는 역할을 하여 자궁의 무게에는 영향을 주지 않는다고 하였다. 본 연구에서도 genistein을 투여한 군의 자궁의 무게는 영향을 받지 않았다.

대퇴골의 무게 및 길이는 Table 4와 같았다. 대퇴골의 무게는 모든 군간에서 유의적인 차이가 없었다. 반면 대퇴골의 길이는 SH군에 비해 OVX군에서 길었는데, 이는 각 동물의 개인적 차이(Kopple JD 1996)에 의한 것으로 보인다.

4. 뇨 중 creatinine 함량

뇨 중 creatinine의 양은 Table 5와 같았다. 15시간 채

Table 2. Effects of genistein on body weight and weight gain of experimental rats.¹⁾

Group ²⁾	N	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Weight gain for 8 weeks (g)	
SH	6	103.2±0.84 ^{NS}	273.8±20.86 ^a	170.6±20.51 ^a	
OVX	6	104.4±5.90	334.6±26.32 ^c	230.2±25.15 ^c	
OVX + ES	8	105.2±6.30	322.0±38.57 ^{bc}	216.8±36.60 ^{bc}	
OVX	1	6	105.2±7.40	334.4±40.76 ^c	229.2±35.31 ^c
+	5	5	105.2±7.40	324.0±11.58 ^{bc}	217.3±7.23 ^{bc}
GEN	10	6	106.8±5.32	331.0±38.59 ^{bc}	226.4±37.79 ^c

¹⁾ Values are Mean ± S.D.

²⁾ SH, Sham-operated; OVX, ovariectomized; OVX+ES, Ovariectomized + 17β-estradiol 10 μg/kg b.w. in corn oil; OVX+GEN 1, Ovariectomized + genistein 1 mg/kg b.w. in corn oil, OVX+GEN 5, Ovariectomized + genistein 5 mg/kg b.w. in corn oil, OVX+GEN 10, Ovariectomized + genistein 10 mg/kg b.w. in corn oil

^{NS} Not significantly different among groups.

^{abc} Value with different letters are significantly different among groups at p<0.05 by Duncan multiple range test

Table 3. Effects of genistein on liver, spleen, kidney, and uterus weight of experimental rats¹⁾

Group ²⁾	N	Liver weight (g/100g b.w.)	Kidney weight (g/100g b.w.)	Spleen weight (g/100g b.w.)	Uterus (cm)	
SH	6	3.48±0.13 ^b	0.82±0.04 ⁰	0.29±0.02 ^{NS}	4.37±0.72 ^c	
OVX	6	2.95±0.17 ^a	0.71±0.08 ^a	0.30±0.04	0.88±0.55 ^{ab}	
OVX + ES	8	2.94±0.11 ^a	0.74±0.11 ^a	0.28±0.04	0.86±0.11 ^{ab}	
OVX	1	6	3.06±0.14 ^a	0.72±0.05 ^a	0.30±0.06	0.76±0.45 ^a
+	5	5	2.91±0.19 ^a	0.75±0.08 ^a	0.24±0.04	0.63±0.15 ^a
GEN	10	6	2.83±0.19 ^a	0.72±0.10 ^a	0.25±0.03	0.66±0.35 ^a

¹⁾ Values are Mean ± S.D.

²⁾ SH, Sham-operated; OVX, ovariectomized; OVX+ES, Ovariectomized + 17β-estradiol 10 μg/kg b.w. in corn oil; OVX+GEN 1, Ovariectomized + genistein 1 mg/kg b.w. in corn oil, OVX+GEN 5, Ovariectomized + genistein 5 mg/kg b.w. in corn oil, OVX+GEN 10, Ovariectomized + genistein 10 mg/kg b.w. in corn oil

^{NS} Not significantly different among groups.

^{abc} Value with different letters are significantly different among groups at p<0.05 by Duncan multiple range test.

취한 뇨 중 SH군의 creatinine 양이 5.25±0.37 mg/15hr urine ml로 가장 낮았으며, 난소 절제한 군의 creatinine 양은 모두 증가하였다. 뇨 중 creatinine은 신사구체에서 여과되어 세뇨관에서는 재흡수되지 않고 체외로 배설되며, 신장 이외에는 영향을 받지 않으므로 신장의 기능을 나타내는 지표가 되는데 여성은 폐경기 이후에는 estrogen의 결핍으로 신장 기능이 저하된다(Kopple JD 1996). 송미경(1996)의 연구에서도 난소절제군에서 creatinine의 양이 증가하여 본 실험 결과와 일치하였다. 난소절제 후 genistein을 처리했을 때 난소절제 후 genistein을 처리하지 않은 군에 비해 뇨중 creatinine 양은 감소하였다.

5. 뇨 중 hydroxyproline(OHpr) 함량

뇨 중 OHpr과 OHpr/creatinine의 측정결과는 Table 5와 같았다. 배설된 OHpr의 양은 난소절제 및 genistein의 투여에 의한 영향을 받지 않았다. OHpr은 주로 콜라겐에 존재하며, 체내에 존재하는 OHpr은 여러 형태의 콜라겐이 분해되어 생성된다. 콜라겐은 골에 50% 이상 존재하여 뇨 중의 OHpr은 골용해 지표로 사용되며, 일반적으로 뼈에 장애가 있을 때 배설량이 증가하게 된다(Anderson JJB 1998). 박영희(2000)의 연구에서 13주령의 쥐를 난소 절제 후 16주 동안 이소플라본 처

리했을 때 난소절제군에서 유의적으로 뇨 중 OHpr 함량이 증가하였고, 이소플라본 처리 시 감소하였다. 김화영 등(1998)의 연구에서 난소를 절제한 2개월 흰쥐가 10개월 흰쥐보다 OHpr의 배설량이 낮은 것으로 보아, 본 연구에서도 노화쥐가 아닌 성장기 쥐를 사용하여 골용해가 증가되지 않았다고 예상된다.

6. 혈청 중 alkaline phosphatase(ALP) 활성

혈청 내 ALP의 활성은 Table 6와 같았다. ALP 활성은 OVX군에서 낮았으며, OVX+ES와 OVX+GEN군에서 다시 높아지는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 김민선(1999)의 연구에서도 8주령 쥐를 난소절제한 후 7주 동안 이소플라본을 처리했을 때 ALP의 농도는 증가하였으나 유의적인 차이는 없었다. ALP는 골아세포에 존재하며, 국소부위의 골에 무기질이 침착되는 것을 항진시키는 역할을 하므로 조골세포의 활성을 나타내는 인자로, 소아가나 골형성이 활발하게 진행되는 시기에는 혈청 내에 증가됨을 볼 수 있다(서부일과 안낙균 1998). 본 실험에서는 모든 군에서 ALP 활성에 유의적 차이는 없었는데 ALP가 골 뿐만 아니라 다른 조직인 간, 신장에서도 존재하므로 뼈에서의 monoclonal antibody를 이용한 특이적인 ALP의 활성만을 측정할 필요가 있겠다.

Table 4. Effects of genistein on femoral dry weight and length¹⁾

Group ²⁾	N	Femur	
		Dry weight (mg/100g b.w.)	Length (mg/100g b.w.)
SH	6	5.30±0.41 ^{NS}	3.36±0.06 ^a
OVX	6	5.52±0.36	3.50±0.09 ^{bc}
OVX + ES	8	5.57±0.53	3.42±0.09 ^{abc}
OVX 1	6	5.68±0.67	3.46±0.11 ^{bc}
+ 5	5	5.39±0.43	3.38±0.08 ^a
GEN 10	6	5.40±0.43	3.39±0.04 ^{ab}

¹⁾ Values are Mean ± S.D

²⁾ SH, Sham-operated; OVX, ovariectomized; OVX+ES, Ovariectomized + 17β-estradiol 10 μg/kg b.w. in corn oil; OVX+GEN 1, Ovariectomized + genistein 1 mg/kg b.w. in corn oil, OVX+GEN 5, Ovariectomized + genistein 5 mg/kg b.w. in corn oil, OVX+GEN 10, Ovariectomized + genistein 10 mg/kg b.w. in corn oil

^{NS} Not significantly different among groups.

^{abc} Value with different letters are significantly different among groups at p<0.05 by Duncan multiple range test.

Table 5. Effects of genistein on urinary creatinine and hydroxyproline concentration¹⁾

Group ²⁾	N	Creatinine	Hydroxyproline	
		(mg/15hr urine ml)	ug/15hr urine ml	ug/mg creatine
SH	6	5.25±0.37 ^a	233.87±46.37 ^{NS}	39.47±17.81 ^{NS}
OVX	6	7.06±0.90 ^{ab}	256.37±16.68	36.41±4.38
OVX + ES	8	6.47±1.07 ^{ab}	227.30±57.77	35.92±6.12
OVX 1	6	6.52±0.63 ^{ab}	193.26±25.23	29.92±8.83
+ 5	5	6.31±0.58 ^b	257.88±17.94	35.48±5.85
GEN 10	6	6.36±1.18 ^{ab}	227.74±36.29	37.93±9.53

¹⁾ Values are Mean ± S.D.

²⁾ SH, Sham-operated; OVX, ovariectomized; OVX+ES, Ovariectomized+17β-estradiol 10 μg/kg b.w. in corn oil; OVX+GEN 1, Ovariectomized + genistein 1 mg/kg b.w. in corn oil, OVX+GEN 5, Ovariectomized + genistein 5 mg/kg b.w. in corn oil, OVX+GEN 10, Ovariectomized + genistein 10 mg/kg b.w. in corn oil

^{NS} Not significantly different among groups.

^{abc} Value with different letters are significantly different among groups at p<0.05 by Duncan multiple range test.

7. 대퇴골, 변, 혈청, 뇨에서 Ca 함량

대퇴골에서의 회분 및 Ca 함량과 변에서의 회분, Ca 함량은 Table 7에, 혈청과 뇨에서의 Ca 함량은 Table 8에 각각 제시하였다. 대퇴골의 회분의 양 및 Ca의 함량은 모든 군간에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 김화영 등(1998)의 연구에서는 10개월된 난소 절제한 쥐에서 대퇴골의 회분과 Ca의 양은 낮았으나 2개월된 쥐에서는 난소절제에 의해 영향을 받지 않았다. 그러나 암컷 쥐의 골격성장이 12개월까지 계속되어 그 이후에 멈춘다는 연구결과를 비추어 볼 때(Dike NK 등

1989), 본 실험에서 사용된 쥐는 아직 최대골밀도에 도달하지 않았고 골격형성 중이라 실험결과에 유의적 차이가 나타나지 않았다고 예상된다. 변에서의 회분 및 Ca의 양과 혈청, 뇨에서의 Ca의 양에서는 유의적인 차이가 없는 것으로 보아 성장기 시 짧은 기간 동안에는 난소절제가 골손실에 영향을 주지 않으나 실험기간이 길어지면 골손실이 증가되어 골질량이 감소될 것으로 판단된다.

8. 대퇴골의 골밀도, 파단력, stiffness

대퇴골의 골밀도(bone mineral density), 파단력(breaking force) 및 stiffness는 Table 9에 나타내었다. 대퇴골의 골밀도는 SH군의 $239.82 \pm 8.42 \text{ mg/cm}^2$ 에 비해 난소를 절제한 군에서 낮게 나타났으나 genistein 투여 시 유의적이진 않았으나 다시 증가하는 경향을 보였다. 파단력과 stiffness의 경우 난소절제 및 genistein 처리에 의한 영향을 받지 않았다. Park 등³¹⁾의 성숙한 쥐를 이용한 연구에서 골밀도 뿐만 아니라 파단력이 난소 절제시 유의적으로 감소하였고, 이소플라본의 섭취가 감소된 골밀도 및 파단력을 회복시켰다. Potter 등(1998)은 폐경기 이후 여성에게 genistein이 강화된 대두 추출물 56 mg과 90 mg을 먹었을 때 56 mg을 먹인 군에서는 골밀도가 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 90 mg을 먹인 군에서는 골밀도가 증가하여 고농도의 이소플라본이 골밀도를 증가시킨다는 결과를 보고한 바 있다.

Table 6. Effects of genistein on serum alkaline phosphatase activity¹⁾

Group ²⁾	N	ALP (KA)
SH	6	25.46±11.22 ^{NS}
OVX	6	21.19±6.00
OVX + ES	8	25.50±11.41
OVX	1	24.81±7.14
+	5	26.33±4.91
GEN	10	22.19±6.55

¹⁾ Values are Mean ± S.D.

²⁾ SH, Sham-operated; OVX, ovariectomized; OVX+ES, Ovariectomized + 17β-estradiol 10 μg/kg b.w. in corn oil; OVX+GEN 1, Ovariectomized + genistein 1 mg/kg b.w. in corn oil, OVX+GEN 5, Ovariectomized + genistein 5 mg/kg b.w. in corn oil, OVX+GEN 10, Ovariectomized + genistein 10 mg/kg b.w. in corn oil

^{NS} Not significantly different among groups.

^{abc} Value with different letters are significantly different among groups at p<0.05 by Duncan multiple range test.

Table 7. Effects of genistein on femoral ash, calcium and fecal ash, calcium¹⁾

Group ²⁾	N	Bone femur		Feces	
		Ash/dry bone (%)	Ca mg/g dry bone	Ash/dry feces (%)	Ca (mg/g dry feces)
SH	6	67.55±2.67 ^{NS}	221.36±38.41 ^{NS}	19.92±2.07 ^{NS}	49.61±4.40 ^{NS}
OVX	6	74.87±8.10	225.57±10.51	21.96±0.68	55.91±4.09
OVX+ES	8	81.27±7.92	245.31±13.42	21.50±0.91	56.08±2.63
OVX	1	86.44±2.26	231.49±18.51	21.25±1.32	51.21±6.16
+	5	77.54±11.23	222.15±17.03	21.35±0.58	52.59±4.03
GEN	10	68.44±1.12	224.73±16.00	21.45±0.75	50.38±4.82

¹⁾ Values are Mean ± S.D.

²⁾ SH, Sham-operated; OVX, ovariectomized; OVX+ES, Ovariectomized + 17β-estradiol 10 μg/kg b.w. in corn oil, OVX+GEN 1, Ovariectomized + genistein 1 mg/kg b.w. in corn oil, OVX+GEN 5, Ovariectomized + genistein 5 mg/kg b.w. in corn oil, OVX+GEN 10, Ovariectomized + genistein 10 mg/kg b.w. in corn oil

^{NS} Not significantly different among groups.

^{abc} Value with different letters are significantly different among groups at p<0.05 by Duncan multiple range test.

Table 8. Effects of genistein on serum and urinary calcium concentration¹⁾

Group	N	Serum	Urine
		Ca (ug/ml)	Ca (ug/ml for 15hr urine)
SH	6	143.03±12.39 ^{NS}	565.01±202.52 ^{abc}
OVX	6	144.90±11.92	465.98±104.12 ^{abc}
OVX + ES	8	124.95±20.47	357.64±81.40 ^{ab}
OVX	1	6	126.15±15.97
+	5	5	274.15±49.24 ^a
GEN	10	6	131.63±32.08
			642.73±80.02 ^{bc}
			409.67±50.09 ^{ab}

¹⁾ Values are Mean ± S.D.

²⁾ SH, Sham-operated; OVX, ovariectomized; OVX+ES, Ovariectomized + 17β-estradiol 10 μg/kg b.w. in corn oil; OVX+GEN 1, Ovariectomized + genistein 1 mg/kg b.w. in corn oil, OVX+GEN 5, Ovariectomized + genistein 5 mg/kg b.w. in corn oil, OVX+GEN 10, Ovariectomized + genistein 10 mg/kg b.w. in corn oil

^{NS} Not significantly different among groups.

^{abc} Value with different letters are significantly different among groups at p<0.05 by Duncan multiple range test.

N. 요약

본 연구에서는 대두 이소플라본이 난소를 절제한 성장기 흰쥐의 골격 발달에 미치는 영향을 알아보기 위하여 3주령 된 Wister 암컷 쥐를 난소절제한 후 8주 동안 genistein을 경구 투여하여 골대사에 미치는 일반 지표 및 생화학지표를 관찰하였다.

1. 체중 증가는 OVX군(230.2±25.15 g)이 SH군(170.6±20.51 g)에 비해 유의적으로 높게 나타났으나 (p<0.05), OVX+GEN군과 OVX+ES군의 체중 증가는 OVX군에 비해 유의적인 차이를 보이지 않았다.
2. 체중 당 간과 자궁의 무게는 난소를 절제한 모든 군에서 SH군에 비해 유의적으로 낮았으며(p<0.05), 신장의 무게 또한 SH군에 비해 난소를 절제한 모든 군에서 유의적으로(p<0.05) 감소하였으나 난소절제군 사이에서 유의적인 차이는 없었다.
3. 대퇴골의 무게는 모든 군간에서 유의적인 차이는 없었으나 대퇴골의 길이는 SH군에 비해 OVX군에서 길게 나타났다.
4. 뇨 중 creatinine의 양은 난소 절제군에서 모두 증가하였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 또한 hydroxyproline 함량도 모든 군간에서 차이가 나타나지 않았다.

Table 9. Effects of genistein on femoral BMD, breaking force and stiffness of rats¹⁾

Group ²⁾	N	BMD (mg/cm ²)	Breaking force(kg)	Stiffness (kg/mm)	
SH	6	239.82±8.42 ^b	16.65±1.47 ^{NS}	15.06±3.70 ^{NS}	
OVX	6	225.10±9.43 ^{ab}	16.22±0.97	13.57±2.68	
OVX + ES	8	222.28±8.06 ^a	16.03±0.94	14.65±2.70	
OVX	1	6	227.16±5.82 ^a	16.54±3.00	12.81±3.49
+	5	5	227.83±10.80 ^a	16.40±0.63	12.22±1.33
GEN	10	6	233.44±13.50 ^a	16.04±1.70	13.26±3.07

¹⁾ Values are Mean ± S.D.

²⁾ SH, Sham-operated; OVX, ovariectomized; OVX+ES, Ovariectomized + 17β-estradiol 10 μg/kg b.w. in corn oil; OVX+GEN 1, Ovariectomized + genistein 1 mg/kg b.w. in corn oil, OVX+GEN 5, Ovariectomized + genistein 5 mg/kg b.w. in corn oil, OVX+GEN 10, Ovariectomized + genistein 10 mg/kg b.w. in corn oil

^{NS} Not significantly different among groups.

^{abc} Value with different letters are significantly different among groups at p<0.05 by Duncan multiple range test.

5. 혈청 ALP 활성은 모든 군에서 차이가 없었으며 대퇴골, 변, 혈청, 뇨에서의 Ca의 함량도 모든 군간에서 유의적인 차이가 없었다.
6. 대퇴골의 골밀도는 SH군에 비해 난소를 절제한 군에서 낮았으며 genistein 투여로 다시 증가하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 파단력과 stiffness의 경우 난소 절제 및 genistein 처리에 의한 영향을 받지 않았다.

본 결과를 통하여 genistein에 의한 투여는 난소를 절제한 성장기의 흰쥐에서도 최대골질량을 유지하고 골질량의 손실을 억제할 수 있는 효과가 있어 성장기 동안의 섭취가 골다공증 예방에 효과가 있을 것으로 예상된다.

감사의 글

본 연구는 2001년 한양대학교 교내 연구비 지원에 의하여 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

김경희. 1999. 성장기 어린이의 골밀도에 영향을 미치는 요인에 관한 연구. 석사학위논문. 한양대학교

- 김민선. 1999. 저 칼슘 식이에 대두 isoflavone 첨가가 난소절제 흰쥐의 뼈 무기질 및 혈청 지질 함량에 미치는 영향. 박사학위논문. 서울대학교
- 김성란, 홍희도, 김성수. 1999. 콩 및 콩제품 중의 isoflavone 함량과 특성. 한국콩연구회지 16(2):35~46,
- 김은미. 1996. 칼슘섭취수준이 성장기 흰쥐의 최대골질량 형성 및 골질량이 다른 난소절제 흰쥐의 골격대사에 미치는 영향. 박사학위논문. 한양대학교
- 김화영, 최현규, 이현숙. 1998. 난소를 절제한 나이가 다른 흰쥐에서 식이칼슘 수준이 골격 대사에 미치는 영향. 한국영양학회지 31(4):716~728
- 박영희. 2000. 이소플라본 보충이 난소절제 흰쥐의 골대사에 미치는 영향. 석사학위논문. 연세대학교
- 박영희, 윤선, 정수연, 양승오, 유무태, 양지선, 권대중. 2001. 이소플라본 보충이 난소절제 흰쥐의 골대사에 미치는 영향. 한국식품영양과학지 30(4):657~661
- 서부일, 안덕균. 1998. 난각이 흰쥐의 난소적출로 유발한 골다공증에 미치는 영향. 대한분초학회지 13(2):45~56
- 송미경. 1996. 칼슘섭취수준과 난소절제가 흰쥐의 신장기능과 무기질 배설에 미치는 영향. 석사학위논문. 한양대학교
- 안혜선. 1997. 식이지방과, guar gum 및 난소절제가 흰쥐의 지질 및 골대사에 미치는 영향. 박사학위논문. 한양대학교
- 양승오, 함수연. 2001. 골밀도 측정법을 이용한 골다공증 치료의 경과 추적. 대한내분비학회지 16:4~5
- 유용석. 2002. 생명과학과 골다공증. 전자신문
- 조수현. 1993. 폐경과 골다공증, 대한의학협회지 35:587~598
- 최현배, 손헌수. 1998. 대두 가공 식품 중의 이소플라본 함량. 한국식품과학회지 30(4):745~750
- 최혜미 외 공저. 1999. 21세기 영양학. 교문사 344~347
- Anderson JJB. 1998. Phytoestrogen and bone. Bailliere's Clin. Endocrin. Metab. 12(4):543~557
- Arjmandi B, Juma S, Beharka A, Bapna M, Akhter M, Meydani S. 2002. Vitamin E improves bone quality in the aged but not in young adult male mice. J Nutr Biochem. 13(9):543-549
- Arjmandi BH, Khalil DA, and Hollis BW. 2002. Soy Protein: Its Effects on Intestinal Calcium Transport, Serum Vitamin D, and Insulin-like Growth Factor-I in Ovariectomized Rats. *Calci Tissue Int* 70:483-487
- Arjmandi BH, Birnbaum RS, Juma S, Barengolts E. and Kukreja SC. 2000. The synthetic phytoestrogen, Ipriflavone, and Estrogen Prevent Bone Loss by different Mechanisms. *Calcif. Tissue Int.* 66:61~65
- Arjmandi BH, Lee A. Bruce WH. Daxa A. Maria SS, Peilin G. and Subhash CK. 1996 Dietary Soybean Protein Prevents Bone Loss in an Ovariectomized rats Model of Osteoporosis. *J. Nutr.* 126:161~167
- Christel P, Veronique C, Catherine BP, Seraphin KC, Marie -JD, Patrice L and Jean-Pierre B. 2000. Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. *J.Nutr.* 130:1675~1681
- Dike NK, Chung-Ching L, Robert RH, and Bruce WB. 1989. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology* 124:7~16
- Fisk CH and Subbarow Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66:375
- Jamall IS, Finelli VN, and Que Hee SS. 1981. A simple method to determine nanogram levels of 4-Hydroxyproline in biological tissues. *Anal. Biochem.* 112:70~75
- Jung KY, Seo BI, Lee ES, Byun BH, Shin SS, and Park JH. 2004. A Efficiency of Ginseng Radix On Prevention of Osteoporosis In Ovariectomized Rats. *Kor. J. Herbology.* 19(1):1-11
- Kopple JD. 1996. Nutrition, diet and kidney. *Mordern Nutrition in health and disease.* Eight edition.
- Maiko F, Mariko U, Jian W, Herman A, Kazuharu S, Kazuki K, Ken T, Kazuhiko Y and Yoshiko I. 2004. Equol, a Metabolite of Daidzein, Inhibits Bone Loss in Ovariectomized Mice. *J. Nutr.* 134:2623-2627
- Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. *Food Compositions Additives Contaminants.* 1984
- Potter SM, Baum JA, Teng H, Stillman R.J. and Erdman JW. 1998. Soy protein and isoflavones : Their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition* 68:1375S~1379S
- Turner CH, and Burr DB. 1993. Basic biomechanical measurements of bone. *Atutorial. Bone.* 14:595~608
- Viereck V, Grundker C, Blaschke S, Siggelkow H, Emöns G, and Hofbauer LC. 2002. Phytoestrogen genistein stimulates the production of osteoprotegerin by human trabecular osteoblasts., *J.Cell. Biochem.* 84:725~735
- Wangen KE, Duncan AM, Merz-Demlow BE, Xu X, Marcus R, Phipps WR, and Kurzer MS. 2000. Effects of soy isoflavones on markers of bone turnover in premenopausal and postmenopausal woman. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 85:3043~3048
- Williams. and Melvin H. 2000. *Nutrition for Health and Fitness.* McGraw Hill. 611~630

(2005년 10월 10일 접수, 2005년 10월 30일 채택)