

난소절제 랫드에서 회화나무 이소플라본의 갱년기증상 개선효과 및 신경세포 보호효과

주성수 · 원태준 · 이용진 · 박소영* · 황광우 · 이도익#

중앙대학교 약학대학, *Feinberg School of Medicine, Northwestern University

(Received July 5, 2005; Revised August 12, 2005)

Anti-oxidant Effect and Enhancement of Menopausal Signs by *Sophorae fructus*-derived Isoflavones in Ovariectomized Rats and Cytoprotective Effect in Neuro-2a

Seong-Soo Joo, Tae-Joon Won, Yong-Jin Lee, So-Young Park*, KwangWoo Hwang and Do-Ik Lee#

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea and

*Department of Cell and Molecular Biology, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, IL 60611, USA

Abstract — Isoflavones are reported to play a role in menopausal women as a phytoestrogen, which can replace estradiols in hormone replacement therapy (HRT). Recently, due to the risk of breast cancer by HRT, phytoestrogens (e.g. isoflavones) have been focused as an alternative therapy in menopause. In the study, we investigated whether isoflavones derived from *Sophorae fructus* (SISO) have more benefit than that of soybean isoflavones in estrogen deficient rats. We found that SISO effectively controlled H_2O_2 comparing with the baseline ($p < 0.01$ vs. post value of OVX-Cont), and the blood sugar and weight were also controlled with decreasing patterns. Additionally, in LDH assay for cytoprotective effect in Neuro-2a cell line, SISO protected cells from the damage by SNAP ($p < 0.05$). In conclusion, SISO may have more beneficial effect in enhancing the menopausal signs than that of soybean isoflavones and the cytoprotective effect in neuron cells suggests that SISO can play a certain role in neuroprotection after menopause.

Keywords □ Isoflavones, *Sophorae fructus*, hormone replacement therapy, estrogen, soybean, LDH assay

갱년기는 폐경을 전후하여 난소의 기능이 쇠퇴하고 호르몬의 분비에 변화가 생기는 시기로 생리적으로 큰 변화가 생기는 전환기로 분류된다. 이러한 생리적 변화는 여성뿐만 아니라 남성에게도 찾아오지만 여성에 비해 그 변화가 아주 완만하게 오므로 갱년기의 변화로 인한 증상은 주로 여성에게서 많이 나타나는 것이 일반적이다. 특히 여성의 경우 갱년기는 난소기능이 저하되면서 폐경 수년전 전부터 폐경이 된 이후의 수년간의 기간을 총칭하며, 난소에서 분비되는 에스트로젠(Estrogen)의 역할이 중요한 인자이다.¹⁾ 갱년기증상은 신체적인 폐경기로 인한 에스트로젠의 부족의 호르몬 변화로 인해 자율신경의 기능이 불안정하게 되어 얼굴이 상기되며, 어지럽고, 두통, 견비통, 요통, 이명, 다몽, 초조, 불안감, 기억력 감퇴, 우울 등의 여러 변화가 초래된

다. 특히 얼굴이 화끈거리는 홍조증, 불면증, 오줌소태 등은 여성 호르몬 결핍과 밀접한 관련이 있어 호르몬 대체 요법(ERT, estrogen replacement therapy)이 임상적으로 권장 및 사용되고 있다.²⁾ 이와 같은 갱년기 증상 중 안면홍조(facial flushing)는 폐경이 완전히 되기 수개월 전부터 발생하는 가장 특징적인 폐경 증상의 하나인데, 이는 폐경시작 전부터 에스트로젠의 양이 불규칙해져 뇌와 혈관에 영향을 미쳐 얼굴부위가 갑자기 달아오르는 것을 말하며 이는 여포자극호르몬(follicle stimulating hormone)의 변화가 주요 원인인 것으로 알려져 있다.³⁾ 이와 같이 갱년기에 접어드는 여성의 경우 혈당 조절기능이 저하되므로 폐경기 여성에 있어 비만 및 당뇨병등과 같은 성인병여부도 아울러 고려되어야 한다. 즉 혈당 조절은 증가된 혈중 글루코스에 대한 인슐린분비로 조절되는데 이러한 인슐린은 폐경과 함께 감소되고 혈중 농도가 낮아져 당뇨병에 노출된다. 또한 에스트로젠의 비만억제, 간 지질대사 촉진, 간의 글루코스 생산억제 및 췌장 베타세포 보호 등의 효과도 사라지거나 저하되므로 혈당수준

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-820-5608 (팩스) 02-820-5608
(E-mail) leedi@cau.ac.kr

의 증감변화는 갱년기 증세의 주요한 인자로 판단된다.^{1,4)} 또한 폐경기 이후 신체의 기능적 생리적 노화현상이 급격히 나타나는데 이 때 노화현상의 주요인자로서 조직 내 산화물질 축적이 나타난다. 따라서 산화 물질제거 또한 폐경기를 전후해 조절되어야 할 주요인자이다.^{5,6)}

전술한 바와 같이 갱년기증상에 대한 치료요법으로 에스트로젠 대체요법이 권장되고 있으나 에스트로젠 투여 시 생식기관의 암 발생 가능성이 증가한다는 많은 연구보고가 있어 대부분의 폐경기 여성에서 호르몬 요법을 기피하고 있는 실정이다.^{7,8)} 이러한 대체요법으로서 식물성 에스트로젠의 연구가 활발히 이루어지고 있으며,^{9,10)} 이 중 대두에서 분리된 이소플라본이 많은 관심을 끌고 있다. 이소플라본의 주요한 성분으로서 제니스틴(genistin)과 다이드진(daidzin)이 에스트라디올 17 β 와 유사한 구조를 가지고 있어 이러한 특징으로부터 이소플라본이 에스트로젠 활성, 항암활성, 관상동맥질환 예방, 및 항산화 등의 생리적 기능을 가지는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 대두로부터 추출되는 이소플라본의 폐경기 증상개선효과가 많은 연구에서 그 가능성을 보고하고 있다.¹¹⁻¹³⁾ 이와 같이 대두 이소플라본이 식물성 에스트로젠의 주류를 이루고 있으나 회화나무에서도 이소플라본이 다량 존재하고 있어 생리활성효과의 비교우수성이 확보될 때 회화나무 이소플라본의 약물학적 활용도가 높아질 것으로 생각된다.

이에 본 연구에서는 83% 이상의 고순도 회화나무 이소플라본(SISO)의 항산화효과 및 갱년기증상 개선효과를 통하여 폐경기 여성에 대한 비호르몬 대체요법제로의 가능성을 알아보고자 산화 인자 및 에스트로젠 결핍과 관련된 인자의 변화를 분석하였으며 본 연구의 동물모델로서 난소절제 랫드를 사용하였다.

실험방법 및 재료

실험동물 및 재료

본 실험에 사용된 동물은 10주령의 암컷 Sprague-Dawley 랫드(오리엔트, Korean distributor for Charles River, Canada)를 구입하여 평균온도 24°C, 습도 50% 및 12시간 조명주기를 유지하는 SPF room에서 약 2주간 적응기간을 거친 뒤 실험에 사용하였다. 적응기간을 끝낸 랫드는 무작위 배정법에 의해 다음의 5군으로 나누었다; 일반 식이가 투여된 난소절제군(OVX-Cont; n=6), 500 mg/kg 회화나무 이소플라본(SISO)이 투여된 난소절제군(OVX-SISO; n=6), 500 mg/kg 대두 이소플라본이 투여된 난소절제군(OVX-BISO; n=6), 10 μ g/ml 에스트라디올 17 β (E2)이 투여된 난소절제군(OVX-E2; n=6), 일반 식이가 투여된 난소비절제군(Non-OVX; n=6). 각 실험동물들은 피하투여를 실시한 OVX-E2군을 제외한 모든 군에 경구투여를 실시하였다. 실험동물은 약 1주간의 적응기간을 거친 뒤 무작위 방법에 의해 배정

된 순서에 따라 OVX군 전체에 대해 수술을 실시하였으며,¹⁴⁾ 수술 후 약 2주간 회복기간을 두고 각 개체에 대한 모니터링을 실시하였으며, 수술 후유증이 나타나거나 쇼크사한 개체들은 본 실험에서 제외하였고 각 군당 최종 개체수는 6마리로 조정하였다. 체중측정 및 혈액채취는 식이투여전, 식이투여중 및 식이투여 종료 시점에서 경정맥(jugular vein)을 통해 실시하였으며 혈액채취 당일에 사용하지 않은 혈액은 원심분리를 통해 serum 상태로 -20°C 냉동보관을 하였다. 세포독성 실험을 위해 Neuro-2a 세포주(한국세포주은행)를 사용하였다. 즉 동결마이알을 37~40°C에서 해동 후 Serum free DMEM 배지로 2회 세척하여 12-well 배양판에서 5% FBS(heat-inactivated fetal bovine serum, Cellgro, USA) DMEM(Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) 배지로 충분한 양의 세포(>90% in plate)를 배양하여 세포독성 실험을 실시하였다. 본 실험에 사용된 genistein, daidzein 및 estradiol 17 β 는 >98% 순도로서 Sigma사에서 구입하여 사용하였다.

실험식이 조제

본 실험에 사용된 회화나무 이소플라본 및 대두 이소플라본은 (주)렉스진바이오텍으로부터 제공받아 사용하였으며 에스트라디올 17 β (E2)는 Sigma(USA)사로부터 구입하여 사용하였다. 각 이소플라본은 정제수에 혼합하여 제조하였으며 투여 총량이 2 ml이 넘지 않도록 하였다. 각 개체 당 투여량은 500 mg/kg이 되도록 하였다. 피하주사용 E2는 >98% 에탄올 1 ml에 E2 1 mg을 녹인 후 39 ml의 식염수를 희석하였으며 체내 흡수를 높이기 위해 PEG400 10 ml를 추가하여 20 μ g/ml 저장용액을 제조하였다.

체중, 혈당 및 항산화물질 측정

각 군의 체중은 0.1g까지 측정할 수 있는 전자저울을 사용하였으며 3회 반복 측정된 평균치를 기록하였다. 혈당측정은 채취한 혈청을 통해 3회 반복 측정값을 적용하였으며, 측정도구는 Accu-Chek Active(Roche, Germany)를 사용하여 샘플 투여 전 및 투여 후 각 각 경동맥을 통해 채취된 혈액의 당 농도를 측정하였다. 또한 산화물질 측정은 Hydrogen Peroxide Detection Kit(Assay Designs, USA)을 이용하여 체내 존재하는 대표적인 산화물질인 H₂O₂를 흡광도 550 nm에서 측정하였으며 각 농도는 공급회사에서 제공하는 표준곡선을 통해 계산하였다.

세포보호효과 측정(lactate dehydrogenase (LDH) method)

세포보호효과는 사멸한 세포로부터 배지로 유리되는 LDH 활성을 측정하여 정량화 하였다. 즉, LDH는 세포내 안정한 상태의 효소로서 존재하나 세포상해가 일어나 cell lysis가 진행되면 세포외부로 방출되는데, 이때 측정되는 LDH의 양은 세포의

활성상태를 알려주며 동시에 세포독성 및 세포보호의 결과도 제공한다. 본 실험에서 사용된 CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay(Promega, USA)는 ⁵¹Cr과 같은 방사성물질을 사용하지 않는 색변화(colorimetric) 방법을 이용하므로 반응 후 신속히 LDH를 정량할 수 있는 장점이 있다. 실험방법은 제조사에서 제공한 프로토콜에 의해 수행하였으며(Promega Technical Bulletin No. 163), 흡광도 490 nm에서 측정하였다.

실험결과

회화나무 이소플라본의 산화물질 조절효과

약물투여 전 및 투여 후에 채취된 각 혈액으로부터 회화나무 이소플라본의 항산화효과를 분석하였다(Fig. 1). 난소절제 정상식이군(OVX-Cont)에서 보이는 경향은 이소플라본군(OVX-SISO, OVX-BISO) 및 E2군에서 나타나는 결과에 반하여 측정되었다. 이는 난소절제 후 정상식이를 하는 군에서 에스트로젠 결핍에 의한 산화물질 제거가 정상적으로 이루어지고 있지 않는 결과로 판단되며, 반면 난소 비 절제 정상식이군(Non-OVX)은 정상적인 산화물질 처리가 되고 있음을 보여주고 있다. 특히, Non-OVX군에서는 실험시작 전과 후에서 평균치의 편차를 감안 동일한 수준의 H₂O₂가 측정되었다. 반면, 이소플라본군 및 에스트라디올 군에서 식이 후 4주에 산화물질 감소가 일어났음이 관찰되었고

Anti-oxidant effect (H₂O₂)

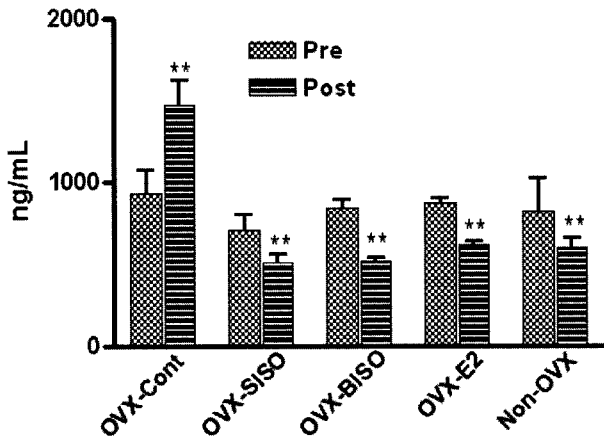


Fig. 1 – Anti-oxidant effect of SISO. H₂O₂ was measured before and after the administration of each compound. The subjects were grouped by ovariectomized (OVX) or non-ovariectomized (Non-OVX) rats and fed with normal food (OVX-Cont and Non-OVX), 500 mg/kg isoflavons (OVX-SISO and OVX-BISO), and 10 µg/ml estradiol 17β (OVX-E2) for 4 weeks. Data were analyzed by H₂O₂ detection kit as described in the Materials and Methods and the concentration was calculated via a standard curve in ng/ml level. Data values are mean±S.D.; **p<0.01 vs. OVX-Cont (post values).

(p<0.01), OVX-Cont군 및 Non-OVX군을 제외한 약물 투여 군간(inter group) 통계학적 유의성이 나타나지 않아 에스트라디올과 거의 동일한 수준의 항산화효과가 이소플라본에서 나타남을 알 수 있었다.

Blood Sugar

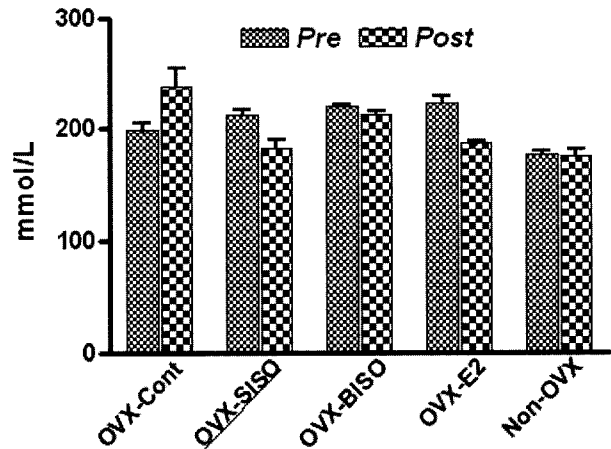


Fig. 2 – Control of blood sugar in serum. Whole blood from the jugular vein was collected at week-0 and week-4 and measured the level of blood sugar using Accu-Chek Active in triplicate. The blood sugar was compared with ovariectomized control group (OVX-Cont). Data values are mean±S.D.

Weight

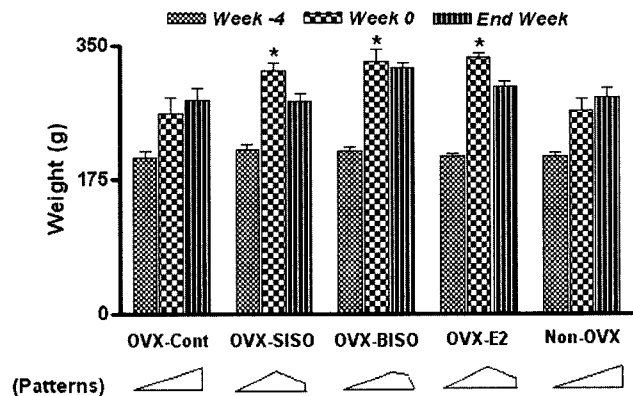


Fig. 3 – Weight changes during the administration of each compound. The weights were measured at week-4 (first housed, before operation), week 0 (after operation) and end week (on administration, after operation) in triplicate. The patterns of weights were expressed on the bottom of the graph. OVX-Cont, ovariectomized dose with normal food; OVX-SISO, ovariectomized dosed with *Sophorae fructus*-derived isoflavones; OVX-BISO, ovariectomized dosed with soybean isoflavones; OVX-E2, ovariectomized dosed with estradiol 17β; Non-OVX, non-ovariectomized dosed with normal food. Data values are mean±S.D.; *p<0.05 vs. week-4.

혈당 및 체중 조절 효과

각 군의 혈당은 식이 전 및 후에 Accu-Chek Active를 사용하여 경동맥에서 채혈된 혈액에서 측정하였다. Fig. 2에서 나타나는 것과 같이 투여 전후의 통계학적 유의성은 인정되지 못하였으나 전체적인 경향성은 회화나무 이소플라본(14% ↓) 및 에스트라디올군(16% ↓)에서 OVX-Cont과 반대의 경향성을 띄어 난소절제 후 당 조절이 점차 정상적으로 회귀하고 있음을 암시하고 있으며, 이러한 결과는 난소 비 절제군의 결과와 비교 시 회화나무 이소플라본에 의해 체내의 혈당이 조절되고 있는 것으로 생각된다. 당 조절과 밀접한 관계를 가지는 체중변화는 Fig. 3에 나타내었다. 체중 변화의 전반적인 경향성을 관찰하기 위하여 각 난소절제 수술 3주 전(식이 투여시점 4주 전)에서 측정된 체중을 포함하였으며 식이 전 후의 체중과 비교하였다. 각 개체의 성장에 따른 정상적인 체중의 증가가 OVX-Cont 군 및 Non-OVX에서 관찰되었으나 회화나무 이소플라본(13% ↓) 및 에스트라디올군(12% ↓)에서 식이 투여 후 4주에 체중조절이 되고 있음이 관찰되었다. 반면에 대두 이소플라본에서 식이 전과 비교하여 거의 체중의 변화가 발견되지 않았으나 OVX-Cont군과 비교 시 식이 투여 후 체중의 경향성 변화가 관찰되었다.

세포보호효과

세포보호효과는 신경세포인 Neuro-2a에서 관찰하였으며,

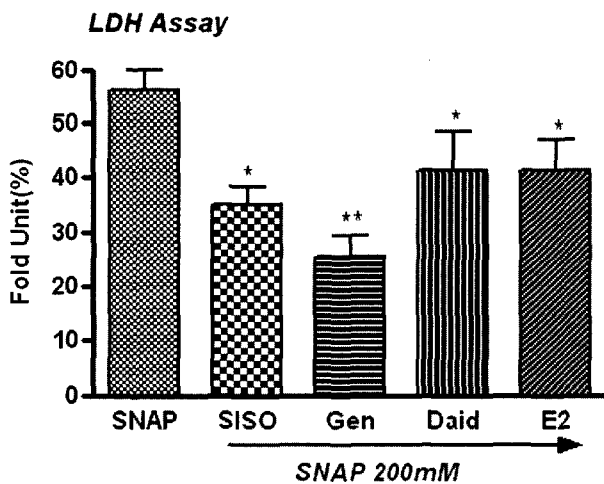


Fig. 4 - Analysis of cytoprotective effect of SISO. The cytoprotective effect was analyzed with the amount of lactate dehydrogenase (LDH) released from the damaged cells. Neuro-2a cells were treated with 200 mM SNAP as a donor of nitric oxide in the presence with 5 μ g/ml SISO, 10 μ M Gen, 10 μ M Daid, and 0.5 μ M E2 and incubated for 24 h. After the incubation, each supernatant was placed on to the 96 well plate and measured in ELISA reader at 490 nm. SNAP, S-nitroso-N-acetyl-penicillamine; SISO, *Sophorae fructus*-derived isoflavones; Gen, genistein; Daid, daidzein; E2, estradiol 17 β . Data values are mean \pm S.D.; *, ** p < 0.05, p < 0.01 vs. SNAP.

측정대상으로서 LDH의 양적 변화를 관찰하였다. 즉, 각 군 (SNAP, 회화나무 이소플라본(SISO), genistein(Gen), daidzen (Daid), 에스트라디올(E2))간 고농도의 SNAP(S-nitroso-N-acetyl-penicillamine, NO donor) 처리 시 손상 받은 세포로부터 배지로 방출되는 LDH를 정량화하여 24시간 내 각 군의 세포보호효과를 측정하였다(Fig. 4). LDH 정량결과 회화나무 이소플라본과 genistein에서 낮은 LDH가 관찰되었으며, 이는 상대적으로 높은 세포보호효과가 있음을 의미하며, 이와 상대적으로 본 연구에서는 daidzein과 에스트라디올군에서 control 대비 50% 이상의 세포보호효과를 보이나 통계학적 유의성은 관찰되지 않았다.

고찰

본 연구는 모든 여성에게서 일생 동안 경험하게 되는 폐경 (menopause) 후 호르몬 결핍이 가져다주는 여러 가지 생리적 변화를 중심으로 나타나는 갱년기증상에 대한 phytoestrogen의 약물학적 유용성을 확인하고자 하였다. 특히 갱년기 이후 점차 노화되어가는 신체대사의 개선책에 대한 실마리를 줄 수 있는 연구의 결과를 도출하고자 하였으며, 동일한 회화나무 이소플라본 (SISO)으로 앞선 연구에서 이미 골밀도 증가 및 골 소실예방에 유효한 결과를 도출 한바 있어,^{15,16} SISO가 에스트로젠 결핍 시 나타나는 생리적 변화를 개선시켜 줄 수 있는 효과가 기대되었다. 본 연구에 사용된 SISO는 회화나무유래 isoflavone으로서 활성물질(e.g. genistein) 83% 이상의 순도가 매우 높은 이소플라본으로서 사전실험에서 대두 이소플라본보다 우수한 효과가 예상되었다(Data not shown). 따라서 본 연구에서는 난소가 적출되어 에스트로젠이 결핍된 랫드 모델을 이용하여 에스트로젠 결핍 시 SISO의 항산화효과(Fig. 1), 혈당/체중 조절효과(Fig. 2, 3) 및 *in vitro* 상의 세포보호효과(Fig. 4)를 관찰하였다. 폐경기 이후 신체의 기능적 생리적 노화현상이 급격히 나타나는데 이때 폐경에 따른 노화현상의 주요인자로서 조직 내 산화물질 축적이 잘 알려져 있으므로,⁵ 본 연구에서는 산화물질의 일종인 H₂O₂를 측정하여 항산화효과를 분석하였다. 항산화효과는 이소플라본군(회화나무 및 대두)과 에스트라디올군에서 모두 관찰되었으며 (p < 0.01), 이는 이소플라본이 식물성 에스트로젠으로서 작용하고 있음을 제시하는 것이다. OVX-Cont군에서 식이 투여 4주 후 상대적으로 높은 H₂O₂는 산화물질의 정상적인 제거가 일어나지 못하는 것으로 생각된다. 또한 일반적으로, 증가되는 혈중 글루코스에 대한 인슐린의 분비 및 조절로 혈당이 조절되는데, 이러한 인슐린이 에스트로젠의 결핍이 일어나는 폐경과 함께 감소되고 혈 중 농도가 낮아지게 되어 당뇨병에 쉽게 노출될 수 있어 폐경 후 혈당 조절은 매우 중요하다.¹⁷ 더불어 비만억제효과를 가지는 에스트로젠이 결핍될 경우 폐경 후 체중증가가 유발되어 각종 성인병에 쉽게 노출될 수 있다.^{18,19} 따라서 본 연구에서 갈

Table I - The trends of H₂O₂/Blood sugar between pre and post measurement and the relationship with weight in SISO group. The measurement of blood samples and weights was performed before (pre) and after (post) the administration. Data values are mean±S.D.; *p<0.05 (paired t-test)

Variable	Pre (Mean±SD)	Post (Mean±SD)	Probability value Paired t-test	Trends
H ₂ O ₂ (ng/ml)	587±138.9	408±107.1	p=0.092	↓
Blood sugar (mmol/l)	212±13.2	182±14.7	p=0.108	↓
Weight (g)	316±15.5	275±16.2	p=0.023(*)	↓

*p<0.05.

은 개체의 혈당 및 체중을 비교하여 체중과 혈당과의 관계를 알고자 하였으며, 관찰결과 실험기간 동안 측정된 체중과 혈당의 변화는 통계학적 유의성을 보이지는 않았으나 전체적인 경향성에서 SISO가 에스트라디올과 유사한 결과를 나타내(Fig. 2, 3) 혈당 및 체중조절에 대해 잠재적인 식물성 에스트로젠으로서 작용하고 있는 것으로 판단된다. 또한 Table I에서와 같이 H₂O₂, 혈당, 및 체중의 경향성이 모두 감소되고 있는 결과로부터, SISO의 약물학적인의는 높게 평가된다. 더욱이 *in vitro* 실험에서 나타난 신경세포 보호효과(Fig. 4)는 폐경 후 에스트로젠이 결핍된 여성에게서 높게 나타나는 노인성 뇌질환(예, 치매)을 예방할 수 있는 긍정적인 결과로 판단되며, 특히 비교군인 genistein이 순도 98%의 정제품이라는 것을 감안하였을 때 SISO의 세포보호효과(p<0.05 vs. SNAP)는 의미 있는 결과로 생각된다. 특히 알츠하이머형 치매는 베타아밀로이드라는 단백질의 뇌내 축적에 따르는 만성염증으로 인한 세포사의 결과로서 pro-inflammatory 인자인 nitric oxide에 대한 세포보호효과는 의미 있는 결과로 생각된다.

이상의 결과로부터, 회화나무 이소플라본이 폐경에 따르는 에스트로젠 결핍 시 나타나는 생리학적 변화를 조절하여 주는 식물성 에스트로젠으로서 가능성이 예상되며, 특히 항산화 효과 및 혈당/체중 조절 등의 효과 등에 의해 폐경 증상의 완화도 기대된다. 또한 *in vitro*에서 나타난 세포보호효과는 뇌신경세포의 보호라는 측면에서 에스트로젠과 함께 퇴행성 뇌질환의 개선에도 효과가 있을 것으로 생각된다. 본 연구의 결과는 난소절제 수술을 전후하여 안정기 1주 수술 및 회복기 3주, 약물투여기 4주 등 총 8주간의 기간에서 도출된 결과이므로 보다 정확한 결과는 장기 투여에 의한 결과가 포함되어야 할 것이나, 본 실험결과 회화나무 이소플라본은 에스트로젠 유사효과로부터 갱년기 증상 개선에 에스트로젠 대체제제로 그 가능성이 크다고 할 수 있다.

참고문헌

1) Susan, W. : *Wise Women Way for the Menopausal Years*. Ash. Tree Publ., Co., p. 58 & 133 (1992).
 2) Farrell, E. : Medical choices available for management of menopause. *Best Pract. Res. Cl. En.* **17**(1), 1 (2003).

3) Greendale, G. A., Lee, N. P. and Arriola, E. R. : The menopause. *Lancet.* **353**, 571 (1999).
 4) Wakatsuki, A., Okatani, Y., Ikenou, N., Shinohara, K., Watanabe, K. and Fukaya, T. : Effect of lower dose of oral conjugated equine estrogen on size and oxidative susceptibility of low-density lipoprotein particles in postmenopausal women. *Circulation.* **108**, 808 (2003).
 5) Tamir, S., Izaeal, S. and Vaya, J. : The effect of oxidative stress on ERα and ERβ expression. *J. Steroid Biochem.* **81**, 327 (2002).
 6) Sagar, S., Kallo, I. J., Kaul, N., Ganguly, N. K. and Sharman, B. K.: Oxygen free radicals in essential hypertension. *Mol. Cell Biochem.* **111**, 103 (1992).
 7) Lissin, L. W. and Cooke, J. P. : Phytoestrogens and cardiovascular health. *J. Am. Coll. Cardiol.* **35**, 1403 (2000).
 8) La Vecchia, C. : Reproductive surgery, menopause and breast cancer risk. *Eur. J. Cancer.* **35**, 12 (1999).
 9) Glazier, M., Gina, M. B. and Bowman, M. : A review of the evidence for the use of phytoestrogens as a replacement for traditional estrogen replacement therapy. *Arch. Int. Med.* **161**(9), 1161 (2001).
 10) Kaufert, P., Boggs, P., Ettinger, B., Woods, N. F. and Utian, W. H. : Women and menopause: beliefs, attitudes and behaviors. The North American Menopause Society 1997 survey. *Menopause.* **5**(4), 197202 (1997).
 11) Ososki, A. L. and Kennelly, E. J. : Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytother. Res.* **17**, 845 (2003).
 12) Kenneth, D. R. and Classidy, A. : Dietary isoflavones: Biological effect and relevance to human health. *J. Nutr.* **129**, 758S (1999).
 13) Alice, L., Gisela, W. and Susan, R. : Review-phytoestrogen. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**(2), 297 (1997).
 14) Nakajima, D., Kim, C. S., Oh, T. W., Yang, C. Y., Tatsuki, N., Igawa, S. and Fukio, O. : Suppressive effects of genistein dosage and resistance exercise on bone loss in ovariectomized rats. *J. Physiol. Anthropol.* **20**(5), 285 (2001).
 15) Joo, S. S., Won, T. J., Kang, H. C. and Lee, D. I. : Isoflavones extracted from Sophorae fructus upregulate IGF-I and TGF-β and inhibit osteoclastogenesis in rat born marrow cells. *Arch. Pharm. Res.* **27**, 99 (2004).

- 16) Joo, S. S., Kang, H. C., Lee, M. W., Choi, Y. W. and Lee, D. I. : Inhibition of IL-1 β and IL-6 in osteoblast-like cell by isoflavones extracted from Sophorae fructus. *Arch. Pharm. Res.* **26**, 1029 (2003).
- 17) Jayagopal, V., Albertazzi, P., Kilpatrick, E. S., Howarth, E. M., Jennings, P. E., Hepburn, D. A. and Atkin, S. L. : Beneficial effects of soy phytoestrogen intake in postmenopausal women with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* **25**(10), 1709 (2002).
- 18) Wu, S. I., Chou, P. and Tsai, S. T. : The impact of years since menopause on the development of impaired glucose tolerance. *J. Clin. Epidemiol.* **54**, 117 (2001).
- 19) Gaspard, U. J., Gottal, J. M. and van den Brule, F. A. : Postmenopausal changes of lipid and glucose metabolism: a review of their main aspects. *Maturitas* **21**, 171 (1995).