

## 이소플라본 보충이 다른 나이에 난소를 절제한 흰쥐의 골대사에 미치는 영향

변재순<sup>1\*</sup> · 노숙령<sup>1</sup> · 박종성<sup>2</sup> · 박형무<sup>3</sup>

<sup>1</sup>중앙대학교 식품영양학과

<sup>2</sup>삼성생명과학연구소 실험동물연구센터

<sup>3</sup>중앙대학교 의과대학 용산병원 산부인과

### Effect of Isoflavone Supplementation on Bone Metabolism in Ovariectomized Rats at Different Ages

Jae Soon Byun<sup>1\*</sup>, Sook Nyung Rho<sup>1</sup>, Jong Seong Park<sup>2</sup> and Hyoung Moo Park<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food and Nutrition, Chungang University, Anseong 456-756, Korea

<sup>2</sup>Laboratory Animal Research Center, Samsung Biomedical Research Institute, Seoul 135-710, Korea

<sup>3</sup>Dept. of Obstetrics & Gynecology, Yongsan Hospital College of Medicine, Chungang University, Seoul 140-757, Korea

#### Abstract

Osteoporosis that is associated with estrogen deficiency in menopause is by far the most common cause of age-related bone loss. Since isoflavone had been reported as a natural substance that minimizes bone loss, we have begun this study to examine the effect of the substance on bone metabolism in ovariectomized rats. Five week-old (n=22) and 25 week-old (n=22) Sprague-Dawley female rats were classified into young (Y) and adult (A) groups. Each group consisted of three subgroups; sham operated group (SH), ovariectomized group (OVX), and isoflavone supplemented group (OVX+ISO 80 mg/kg B.W.). They were fed chow for 9 weeks. The result showed that body weight gain was increased in YOVS in comparison to YSH group, (p<0.05) serum osteocalcin concentration and urinal deoxypyridinoline (DPD) excretion had significantly increased in YOVS more than in YSH group, and significantly decrease in OVX+ISO than in YOVS group (p<0.05). We concluded that soy isoflavones may decrease bone turnover in young rats. However, isoflavone supplement didn't show significant influence on bone metabolism of adult rats.

**Key words:** isoflavone, bone density, ovariectomized rats, osteoporosis

#### 서 론

의학기술의 발달과 경제 수준의 향상에 따라 우리 나라 여성의 평균 수명이 2001년 통계청 자료에 의하면 80.2세로 보고되었다(1). 폐경은 일반적으로 45~50세에 이루어지므로 일생의 삼분의 일 이상은 폐경 후의 삶으로 영위하게 된다. 폐경은 노화현상의 일종으로, 근본적인 원인은 아직까지 확실히 밝혀지지 않았으나, 난소의 노화현상으로 에스트로겐 호르몬의 감소가 주된 원인으로 알려지고 있다(2). 폐경기 이후 여성의 약 30%에서 발병되는 골다공증은 가장 흔한 대사성 골질환으로 노년기 골절의 주요한 요인이 되며, 노년기 인구의 증가로 인한 골다공증 유병률이 급격히 증가되고 있는데 우리 나라에도 약 300만 명 정도의 골다공증 환자가 있는 것으로 추정되고 있다(3). 임상 양상은 크게 두 가지로 구분되는데, 폐경기 후 골다공증은 폐경이 주된 원인으로 폐경기 이후 여성이나, 수술로 난소를 절제한 젊은 여성에서

에스트로겐 결핍으로 발생되며 주로 해면골로 구성된 골격계에 영향을 미치는 형태이고, 노인성 골다공증은 남녀 모두 연령이 증가함에 따라 진행되어 70세 이후에 해면골 및 피질골로 구성된 골격계에 모두 영향을 미치는 노화의 한 형태이다(4,5).

골다공증의 예방과 치료에는 호르몬대체요법(hormone replacement therapy, HRT)이 적용되고 있으나 장기간의 호르몬치료는 2002년 미국보건원에서 유방암과 같은 여러 부작용이 우려되어 조기 중단이 발표(6)되면서 에스트로겐과 유사한 구조를 가지고 있는 phytoestrogens의 활용에 대한 관심이 집중되고 있다(7,8).

식물에서 유래되고 비스테로이드성이며 에스트로겐성 활성을 지닌 물질을 식물성 에스트로겐(phytoestrogen)이라 하고, 자연계에서 약 20종의 식물성 에스트로겐이 발견되고 있다. 주로 콩류, 곡류, 과일, 야채, 허브 등에 풍부하며 화학적으로 식물성 에스트로겐은 이소플라본(isoflavone), 쿠메

\*Corresponding author. E-mail: medison7@joins.com  
Phone: 82-31-670-3270. Fax: 82-31-676-9932

스탄(coumestans), 리그난(lignan)으로 구분된다. 이소플라본은 주로 대두에서 많이 발견되며 genistein, daidzein, glycitein 등이 있으며, 대두의 종류 및 대두 가공품에 따라 차이는 있지만 건조 무게 g당 0.2~1.6 mg의 이소플라본이 함유되어 있다(9). 대두 제품 섭취 후 배당체 형태인 이소플라본은 장내의  $\beta$ -glucosidase에 의해 가수분해되어 활성형의 비배당체 형태로 흡수된다(10). 이와 같은 대두의 이소플라본은 골다공증 치료제로 현재 이용되는 ipriflavone과 구조적으로 유사하여 폐경 모델인 난소절제 동물이나, 폐경 여성을 대상으로 한 연구에서 이소플라본 보충은 골손실을 억제하는데 유익하다는 보고가 있다(11,12).

최근 Pearl 등(13)은 난소절제 흰쥐에서 골손실 억제효과에 대해 이소플라본군과 칼슘복합조성물군에서 대퇴골과 요추골의 골밀도가 유의적으로 증가하여, 이소플라본과 고농도 칼슘의 복합식이 골다공증 예방 효과가 있는 것으로 보고하였다. Lee 등(14)은 12주령의 난소절제 흰쥐를 대상으로 16주간 이소플라본을 보충시킨 실험에서 대퇴골, 요추골의 골밀도가 유의적으로 증가하여, 이소플라본 보충이 폐경 후 골손실 억제효과가 있음을 보고하였다. Christel 등(15)은 7개월된 난소절제 흰쥐를 대상으로 한 84일간의 실험에서 이소플라본 보충은 혈중 osteocalcin과 뇨중 deoxypyridinoline(DPD) 농도를 유의적으로 감소시킴으로써 골대사에 긍정적인 효과를 보고하였다.

그러나 이소플라본이 골대사에 미치는 영향과 관련된 대부분의 동물실험은 골의 성장이 진행되고 있어 최대골밀도가 형성되지 않은 10주령 전후의 어린 쥐(16)를 난소절제하여 골다공증을 유발한 모델을 대상으로 하였고, 이소플라본의 단독효과보다는 대두의 효과 또는 대두 단백질이나 칼슘과의 혼합물에 대한 효과를 보고하였다(13,17). 본 실험 동물인 암컷 흰쥐는 일반적으로 출생 후 10주령이 되었을 때 규칙적인 성주기를 보이고 실제로 교배가 이루어지므로 5주령은 성장기에 있는 어린 쥐, 25주령은 성숙한 쥐라 할 수 있다.

이에 본 연구에서는 5주령된 어린 쥐와 25주령된 성숙한 암컷 흰쥐를 난소 절제하여 폐경을 유도하고, 폐경의 시기가 다른 쥐를 대상으로 이소플라본이 골대사에 영향을 줄 수 있는 농도 설정을 위해 Christel 등(15)의 연구에서 골대사에 생리적 활성 수준을 나타낸 80 mg/kg B.W. 이소플라본을 각각 9주간 투여하여, 골대사 지표(biochemical bone markers)와 골밀도를 통하여 골대사에 미치는 영향을 비교 분석하고자 하였다. 따라서 본 연구결과를 통하여 대두 이소플라본 섭취가 다른 나이에 난소절제를 함으로써 폐경에 따른 골대사에 미치는 영향을 규명하고, 골다공증에 대한 예방과 치료에 기초자료로 활용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

평균체중이 132 g(5주령), 348 g(25주령)인 Sprague-

Dawley 암컷 쥐 44마리 (5주령: 22마리, 25주령: 22마리)를 (주)오리엔트로부터 구입하여 1주 동안 적응기간을 거친 후 가짜 수술군(sham: SH), 난소절제군(ovariectomized: OVX), 난소절제 후 isoflavone보충군(OVX+ISO)으로 5주령, 25주령을 각각 분류하고 어린 쥐와 성숙기 쥐로 표현하였다.

**난소 절제:** 난소를 제거하기 위해 ketamine 45 mg/kg b.w.와 xylazine 90 mg/kg b.w.의 혼합액을 복강 내 주사하여 마취 후, 제모, 복부 정중 절개한 다음 양측 난관을 실로 묶고, 양측 난소를 모두 칼로 제거한 후 다시 봉합하였다. 가짜 수술군에서는 다른 군과 같이 동일한 마취, 제모, 복부 정중 절개 후 난소를 제거하지 않고 다시 봉합하였다.

**실험동물 사육:** 실험동물은 성균관대학교 의과대학 실험동물 사육장 내에 있는 SPF(Specific Pathogen Free)사육실에서 사육하였으며 환경온도는  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , 상대습도  $55 \pm 5\%$ 로 유지하였고 명암은 12시간주기(light 08:00~20:00)로 조절하였다. 실험식이와 식수는 자유롭게 급여하였고 실험기간동안 체중은 일 주일에 1번씩 일정시간에 측정하였다.

**실험식이:** 실험에 사용한 이소플라본은 풀무원으로부터 제공받았으며, 40% glucoside type(daidzin:genistin=1:1)이다. 일반식이는 이소플라본이 함유되어있지 않은 우유 카제인을 기본으로 하는 AIN-93G purified diet(18)를 base로 하였고, 이소플라본 보충군은 일반식이에 이소플라본 함량을 80 mg/kg body weight가 되게 첨가하여 9주간 자유급식시켰다. 실험동물의 1일 사료 투여량은 60 g/kg body weight 기준으로 하였고, 실험동물의 1일 사료 섭취량은 3일 동안 섭취하는 사료를 정량하여 평균하였다.

### 시료수집

**뇨:** 실험 종료 일주일 전부터 각 군 당 대사장(metabolic cage)에서 24시간 뇨를 수집하고, 총량을 측정하였다. 부패방지를 위해 HCl 소량을 넣고 잘 섞은 후, 여과지(whatman No.5)로 거르고 액체질소로 급속냉동시킨 후 분석 전까지  $-70^\circ\text{C}$ 에서 냉동 보관하였다.

**혈액:** 실험 동물들은 희생시키기 전 12시간동안 절식시킨 후 ether로 마취시키고, 복부를 절개하여 후대정맥에서 채혈을 실시하고 30분간 방치한 후 3000 rpm으로 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하고, 액체질소로 급속냉동시킨 후 분석 전까지  $-70^\circ\text{C}$ 에서 냉동 보관하였다.

**대퇴골:** 혈액을 채취한 후 왼쪽 대퇴골(femur)을 적출하여 뼈에 부착되어 있는 근육, 지방, 인대 등을 깨끗이 제거하고, 액체질소로 급속냉동시켜 분석 전까지  $-70^\circ\text{C}$ 에서 냉동 보관하였다.

### 시료의 분석

**혈청 Osteocalcin 분석:** 혈청 osteocalcin의 농도는 sandwich ELISA(enzyme-linked immuno solvent assay)법에 의해 rat osteocalcin EIA kit는 Biomedical Technologies Inc.(USA)를 이용하여 VERSAmax(Molecular device, USA)

로 분석하였다.

**뇨의 deoxyypyridinoline(DPD)분석**: 뇨중 deoxyypyridinoline분석은 competitive enzyme immunoassay방법으로 Pylinks-D kit(Metra Biosystems Inc., USA)를 이용하여 IMMULITE2000(DPC Inc., USA)로 정량 분석하였다. 소변 농축의 정도에 따라 DPD 수치가 달라질 수 있으므로 소변 중의 creatinine수치를 측정하여 교정한 crosslinks value를 구하였다.

**혈액과 뇨의 calcium, phosphorus 분석**: 혈청과 뇨중 칼슘은 O-cresol phenolphthalein과 알칼리 조건 하에서 적자색을 형성하였다. 이 적자색의 흡광도는 HITACHI 7600-210(HITACHI, JAPAN)를 이용하여, 570 nm에서 측정하여 비색정량법으로 분석하였다.

혈청과 뇨중 인은 황산 존재 조건 하에서 ammonium molybdate와 반응하여 phosphomolybdate complex를 형성하므로 이를 HITACHI 7180(HITACHI, JAPAN)를 이용하여, 340 nm에서 비색정량하는 방법으로 측정하였다.

**대퇴골의 분석**: 대퇴골 골밀도(Bone mineral density: BMD) 측정은 LUNAL PIXImus 2(USA)의 rat 진단용 방사선 발생장치를 이용하였다. 골밀도는 골무기질의 양(bone mineral content: g/cm<sup>2</sup>)을 골폭(bone width: cm<sup>2</sup>)으로 나눈 값이다.

#### 자료의 처리

실험의 결과는 SPSS(Statistical Package for Social Science 10.0)를 이용하여 평균값(mean)과 표준편차(SD)를 계산하고, 각 군간 유의성을 검증하기 위해 각 연령별로 one way-ANOVA를 사용하여 분산분석하였다. ANOVA에 의하여 통계적 유의성이 나타나는 경우 각 군 간의 유의성은 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test로 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 체중변화

9주간 식이섭취 후 체중변화에 대한 결과는 Table 1과 같다. 어린 쥐의 체중 증가량은 난소를 절제하지 않은 군(142.6±23.86)에 비해 난소 절제군(174.8±15.36)에서 유의성(p<0.05) 있게 증가되었고, 난소절제군에 비해 이소플라본 보충군(159.6±9.93)은 다소 감소되었다. 성숙기 쥐는 난소절제, 이소플라본보충 유무에 따른 각 군 간의 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다

Yamazaki와 Yamaguchi(19)는 4, 10주령 흰쥐에 난소를 제거한 실험에서 4, 10주령의 어린 쥐는 난소를 제거하지 않은 군보다 체중이 증가했고, 체중 증가의 대부분은 체내 지방의 축적에 기인하는 것으로 보고하였다. 본 실험에서 총 체중 증가량은 어린 쥐가 성숙기 쥐보다 높았다. 이는 5주령의 어린 쥐는 성장기에 있는 상태이므로 실험기간동안 활발한 성장이 이루어진 반면, 성숙기 쥐는 이미 성장이 완

**Table 1. The effects of isoflavone supplementation on body weight at 9 weeks after feeding** (unit: g)

Group <sup>1)</sup>	N	Initial weight	Final weight	Gain weight
YSH	6	197.3±14.6 <sup>2)NS3)</sup>	340.0±25.2 <sup>4)</sup>	142.6±23.8 <sup>b</sup>
YOVS	8	212.3±10.1	387.2±16.3 <sup>a</sup>	174.8±15.3 <sup>a</sup>
YOVS+ISO	8	207.3±8.0	367.0±13.5 <sup>b</sup>	159.6±9.9 <sup>ab</sup>
ASH	6	344.1±29.5 <sup>NS</sup>	391.3±35.0 <sup>NS</sup>	47.1±11.5 <sup>NS</sup>
AOVS	7	354.1±29.6	400.7±50.3	46.5±30.7
AOVS+ISO	8	338.3±20.2	401.7±42.5	63.3±43.9

<sup>1)</sup>YSH: Sham-operated young rats, YOVS: Ovariectomized young rats, YOVS+ISO: Ovariectomized young rats plus isoflavone fed at 80 mg/kg b.w., ASH: Sham-operated adult rats, AOVS: Ovariectomized adult rats, AOVS+ISO: Ovariectomized adult rats plus isoflavone fed at 80 mg/kg b.w.

<sup>2)</sup>Mean±SD.

<sup>3)</sup>Not significant.

<sup>4)</sup>Value with different superscripts within the column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

료되어 지방이 축적된 상태에서 실험이 시작되었기 때문이라 생각된다. 또한 어린 쥐에서 난소절제 후 체중이 유의적으로 증가한 것은 Wronski(20)가 제시한 것과 같이 체중을 증가시키므로써 체중 지탱 능력(weight bearing activity)을 키우고 에스트로겐 생성이 가능한 체지방을 증가시키려는 기전으로 풀이된다. Christel 등(15)은 난소절제 흰쥐에 이소플라본을 체중 1 kg 당 27.8 mg/d 섭취시킨 경우 난소절제 쥐에서 나타나는 전형적인 체중증가 현상이 없이 난소를 절제하지 않은 군과 유사한 체중을 보여 이소플라본이 난소절제 쥐에서 체중증가를 막아 줄 수 있다고 보고하였다. 이는 본 연구의 어린 쥐에서도 유사하게 나타났다. 그러나 이러한 현상이 성숙기 쥐에서는 나타나지 않아 지방 축적이 이루어진 성숙기 쥐는 난소절제와 이소플라본의 보충이 체중에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

### 혈청 osteocalcin

혈중 osteocalcin 농도는 Table 2와 같다. 어린 쥐에서 혈청 osteocalcin 농도는 난소를 절제하지 않은 군(24.44±4.6)에 비해 난소절제군(33.27±6.7)에서 유의성(p<0.05)있게 증가되었고, 난소절제군에 비해 이소플라본 보충군(25.45±5.6)은 유의성(p<0.05)있게 감소되었다. 성숙기 쥐는 난소절제, 이소플라본보충 유무에 따른 각 군 간 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

뼈에서는 조골세포(osteoblast)에 의한 골형성과 파골세포(osteoclast)에 의한 골용해가 반복적으로 발생하고 있으며, 이러한 현상을 통해 끊임없이 뼈의 오래된 부분이 새로운 부분으로 교체되는 재형성(bone remodeling)과정이 활발히 일어난다(21). 일반적으로 폐경기 여성에서는 골교체율이 증가하면서 혈청 osteocalcin농도가 약 2배정도 증가하고 에스트로겐과 유사한 폐놀고리 구조를 가진 이소플라본은 골형성 대사에 작용함으로써 골을 보호하는 효과를 나타내는 것으로 해석할 수 있다(22). 혈청 osteocalcin농도의 증가

**Table 2. The effects of isoflavone supplementation on the serum osteocalcin at 9 weeks after feeding**

Group	No. of animals	Osteocalcin level (ng/mL)
YSH	5	24.4 ± 4.6 <sup>1) b2)</sup>
YO VX	7	33.2 ± 6.7 <sup>a</sup>
YO VX + ISO	6	25.4 ± 5.6 <sup>b</sup>
ASH	6	11.3 ± 2.3 <sup>NS3)</sup>
AO VX	6	15.4 ± 6.5
AO VX + ISO	8	15.0 ± 5.5

<sup>1)</sup>Mean ± SD.  
<sup>2)</sup>Value with different superscripts within the column are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test.  
<sup>3)</sup>Not significant.

는 젊은 연령층에서는 골형성의 증가를 의미하는 긍정적인 면으로 해석되지만, 폐경 후에는 골밀도와 음의 상관관계를 갖는 것으로 보고되어 골교체율의 증가를 의미한다(23).

우리 나라 일부 폐경 후 여성을 대상으로 12주 동안 매일 90 mg의 이소플라본을 보충시킨 Lee와 Sung(24)의 연구에서 이소플라본 보충전과 후에 혈청 osteocalcin 농도가 50.5% 감소되어, 이소플라본 보충이 골교체율을 낮추어 골흡수를 억제하는 것으로 보고했다. 그러나 Morabito 등(25)은 폐경 후 이탈리아 여성에게 분리 대두 이소플라본인 genistein 154 mg을 12개월 동안 매일 보충시킨 후 혈청 osteocalcin 농도가 보충 전보다 오히려 유의적인 증가를 보였다는 상반된 보고도 있다.

Christel 등(15)이 난소절제한 7개월의 Wistar rats를 대상으로 이소플라본을 0, 20, 40, 80 mg/kg b.w./day 공급한 실험에서, 12주 후에 희생시킨 군에서는 난소절제에 의한 차이만 나타나고 이소플라본 섭취량에 대한 차이는 나타나지 않았다. 그러나 24주 후에 희생시킨 경우에는 40, 80 mg/kg b.w./day 군에서 혈청 osteocalcin 농도가 유의적으로 감소되었음을 보고했다.

본 연구의 어린 쥐에서 난소 절제로 유도된 에스트로겐 결핍은 혈중 osteocalcin 농도를 증가시키고, 이소플라본 보충으로 혈중 osteocalcin 농도를 감소시킨 실험 결과는 이소플라본이 골교체율을 감소시켜 골흡수를 억제함으로써 골 보호 효과를 나타낸 것으로 사료되고, 성숙기 쥐에서 이러한 결과가 나타나지 않은 원인은 나이에 따라 에스트로겐 민감성과 이소플라본 반응시기가 다르게 나타나서 골대사에 영향을 주지 않은 것으로 사료된다.

**노의 deoxypyridinoline(DPD)**

노중 DPD와 creatinine에 대한 crosslinks value 농도는 Table 3과 같다. 어린 쥐에서 노중 crosslink value 농도는 난소를 절제하지 않은 군(154.78 ± 14.89)에 비해 난소절제 군(203.43 ± 20.60)에서 유의성(p < 0.05)있게 증가되었고, 난소절제군에 비해 이소플라본 보충군(169.43 ± 20.69)은 유의성(p < 0.05)있게 감소하여, 난소를 절제하지 않은 군과 유사한 수준으로 나타났다. 성숙기 쥐는 난소절제, 이소플라본보

**Table 3. The effects of isoflavone supplementation on the urinary DPD at 9 weeks after feeding**

Group	No. of animals	DPD level (nmol/mmol creatinine)
YSH	4	154.78 ± 14.8 <sup>1) b2)</sup>
YO VX	6	203.43 ± 20.6 <sup>a</sup>
YO VX + ISO	6	169.43 ± 20.6 <sup>b</sup>
ASH	6	74.3 ± 27.11 <sup>NS3)</sup>
AO VX	6	73.6 ± 17.4 <sup>NS</sup>
AO VX + ISO	8	48.0 ± 28.5 <sup>NS</sup>

<sup>1)</sup>Mean ± SD.  
<sup>2)</sup>Value with different superscripts within the column are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test.  
<sup>3)</sup>Not significant.

충 유무에 따른 각 군 간 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 최근 골다공증 등 골질환의 임상적 판정을 위한 지표로 이용되고 있는 DPD의 crosslink value는 노 중 creatinine (mM)에 대한 DPD(nM)의 비(nM/mM)로 나타내며, 노 중 DPD는 주로 골과 연골부위에서 발견되고, 거의 대부분 골흡수로부터 생성된 것으로 본다. 노중 DPD농도는 중, 연령, 성장률, 호르몬 상태, 스트레스 등 여러 가지 요인에 의해 영향을 받기 때문에 실험에 따라 보고된 값이 차이가 난다(15). 소변 중 DPD는 폐경 후 여성에서 폐경 전 여성에 비하여 많이 배설되는 골용해의 생화학적 지표가 된다(26). 따라서 노 중 DPD배설량의 증가는 파골세포의 활성화로 골흡수 증가를 의미하고, 폐경 후 골밀도와는 음의 상관관계를 갖는다.

Uesugi 등(27)의 연구에서는 난소절제 후 배당체 형태인 이소플라본 daidzin, genistin, glycitin을 각각 25, 50, 80, 100 mg/kg day으로 보충했을 때, glycitin과 daidzin을 50 mg/kg day 보충한 군에서만 노 중 DPD배설량이 감소하여, 투여량과 이소플라본의 종류에 따라 보충효과가 다르게 나타났음을 보고했다.

Christel 등(15)의 연구에서 7개월의 Wistar rats를 대상으로 난소 절제 후 이소플라본 20, 40, 80 mg/kg b.w./day을 보충했을 때 24주 후 80 mg/kg b.w.보충군에서 노중 DPD배설량이 유의적으로 가장 많이 감소하여, 이소플라본 보충이 용량 의존적으로, 또는 12주 이상 비교적 장기간 이소플라본을 섭취할 경우에 노중 DPD배설량을 낮춘다고 보고했다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 어린 쥐에서 난소절제로 인한 에스트로겐 결핍은 노중 DPD배설량을 증가시키고, 이소플라본 보충이 노중 DPD배설량을 감소시킨 실험 결과는 대두의 이소플라본이 골흡수를 억제함으로써 골보호 효과를 나타낸 것으로 판단된다. 그러나 성장기 쥐에서 어린 쥐와 다른 반응을 나타낸 것은 동량의 이소플라본 보충이 나이에 따라 민감성, 또는 반응시기가 다르게 나타나 골대사에 영향을 주지 않은 것으로 사료된다.

**혈액과 뇨의 calcium, phosphorus**

혈중 칼슘과 인의 농도, 뇨중 칼슘과 인의 농도는 Table 4

**Table 4.** The effects of isoflavone supplementation on the serum and urinary calcium, phosphorus at 9 weeks after feeding

Group	Serum (mg/dL)		Urine (mg/d)	
	Ca	P	Ca	P
YSH	10.1±0.1 <sup>1)NS2)</sup>	5.4±0.9 <sup>b3)</sup>	0.63±0.4 <sup>NS</sup>	13.25±2.2 <sup>NS</sup>
YOVS	9.8±0.3	6.7±0.4 <sup>a</sup>	0.57±0.5	11.51±2.6
YOVS+ISO	10.3±0.4	6.8±1.1 <sup>a</sup>	0.84±0.6	13.36±1.2
ASH	10.1±0.6 <sup>NS</sup>	6.3±1.7 <sup>NS</sup>	0.42±0.1 <sup>NS</sup>	12.92±2.2 <sup>NS</sup>
AOVS	9.7±0.4	6.6±0.8	0.40±0.2	11.31±1.2
AOVS+ISO	10.0±0.2	6.6±0.9	0.44±0.7	9.53±3.2

<sup>1)</sup>Mean ± SD.<sup>2)</sup>Not significant.<sup>3)</sup>Value with different superscripts within the column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

와 같다. 어린 쥐에서 혈청 인의 농도는 난소를 절제하지 않은 군(5.46±0.98)에 비해 난소절제군(6.73±0.44), 이소플라본보충군(6.87±1.17)에서 유의성(p<0.05)있게 증가되었고, 혈중 칼슘농도와 뇨중 칼슘, 인의 배설량은 각 군 간 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 성숙기 쥐는 혈중 칼슘과 인의 농도, 뇨중 칼슘과 인의 배설량에서 각 군 간 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

Farzad 등(28)의 연구에서 어린 난소절제 쥐를 대상으로 이소플라본을 보충시킨 실험에서 뇨와 혈중 칼슘농도에 유의적인 변화가 나타나지 않았다고 보고하였다. Choi와 Cho(29)의 연구에서도 난소 절제된 어린 쥐를 대상으로 한 9주간의 실험에서 혈청 칼슘과 인, 뇨중 칼슘과 인의 배설량에 이소플라본 보충효과가 나타나지 않았다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서, 난소절제된 어린 쥐에 혈청 인의 증가는 난소절제로 유도된 에스트로겐 결핍, 또는 어린 나이에 난소절제로 인한 스트레스가 혈청 인의 항상성에 영향을 준 것으로 사료된다.

그 외 어린 쥐와 성숙기 쥐의 혈청 칼슘과 인의 농도, 뇨중 칼슘과 인의 배설량은 에스트로겐 결핍과 이소플라본 보충 요인 보다 골대사와 관련된 호르몬들의 상호조절이 더욱 강하게 작용하여 항상성이 유지된 것으로 판단된다.

#### 대퇴골의 골밀도

대퇴골의 BMD는 Table 5와 같다. 어린 쥐와 성숙기 쥐에서 대퇴골 골밀도는 난소절제, 이소플라본보충 유무에 따른 각 군 간의 유의적인 차이가 나타나지 않았으나, 성숙기 쥐는 난소를 절제하지 않은 군(0.2010±0.0013)에 비해 난소절제군(0.1853±0.0012)은 감소되었고, 난소절제군에 비해 이소플라본 보충군(0.1980±0.0014)은 증가하는 경향을 나타냈다.

폐경기성 골다공증은 폐경 후 초기에는 골 흡수가 선행되고 그 후 평형을 맞추기 위하여 골 형성이 증가하는 골대사를 보인다. 일차적으로 에스트로겐 결핍은 골교체율을 증가시켜 파골세포의 활동력 증가, 골흡수의 증가로 인한 골 손실을 유발하고, 이차적으로 폐경기 여성에 있어 골 형성능력

**Table 5.** The effects of isoflavone supplementation on femoral bone mineral density (BMD) at 9 weeks after feeding

Group	No. of animals	Femur BMD (g/cm <sup>2</sup> )
YSH	6	0.1948±0.0066 <sup>1)NS2)</sup>
YOVS	7	0.1961±0.0013
YOVS+ISO	6	0.1936±0.0016
ASH	6	0.2010±0.0013 <sup>NS</sup>
AOVS	7	0.1853±0.0012
AOVS+ISO	8	0.1980±0.0014

<sup>1)</sup>Mean ± SD.<sup>2)</sup>Not significant.

이 감소하게 되어 서서히 골 손실이 일어나는 것으로 보고되었다(30).

이와 같은 골손실에 대두 이소플라본이 여성호르몬인 에스트로겐과 유사한 구조를 가지고 있기 때문에 에스트로겐 수용체와 결합하여 에스트로겐 활성도를 자극함으로써 골 용해를 막고, 골밀도를 증진시킨다고 보고했다(31).

Blair 등(32)의 연구에서 난소절제 쥐를 대상으로 30일 동안 genistein(44 μmol/day)의 공급은 대퇴골 골밀도를 12% 유의적인 증가를 보였다고 보고했다. 그러나 Farzad 등(28)의 연구에서 3개월 된 난소절제 쥐를 대상으로 40일 동안 이소플라본 보충 결과, 척추 골밀도는 유의적인 증가를 보인 반면 대퇴골 골밀도는 유의성 있는 변화가 나타나지 않았다. 이러한 이유로 대퇴골은 해면골 보다 피질골의 함유 비율이 3배 정도 많아서 대사속도가 늦게 나타나는 반면, 해면골이 많은 척추골에서는 이소플라본 보충에 의한 영향을 빠르고 쉽게 받은 것으로 보고했다. 또한 Rice 등(33)은 이소플라본 함량이 높은 여성의 콩섭취는 척추 골밀도에는 긍정적인 결과를 나타냈으나 대퇴골에는 영향을 미치지 않은 반면, 콩을 일생동안 섭취했을 때에는 대퇴골 골밀도가 유의적으로 증가했음을 보고하여 섭취기간에 따라 부위별로 골밀도에 다른 영향을 나타낼 수 있음을 시사한다.

Anderson 등(34)은 난소절제 쥐에서 2주 동안 매일 genistein을 0.5 mg, 1.6 mg, 5.0 mg 씩 섭취시킨 결과 0.5 mg을 섭취한 군에서는 골에 대한 긍정적인 효과가 나타났으나, 5.0 mg의 과량 보충은 오히려 난소 절제로 인한 골손실을 예방하지 못해 투여량에 따라 이소플라본의 효과가 다르게 나타났음을 보고했다.

본 연구의 어린 쥐와 성숙기 쥐에서 난소절제에 의한 에스트로겐 결핍, 이소플라본 보충은 대퇴골 골밀도에 유의적인 차이가 나타나지 않아 골대사에 긍정적인 효과는 확인할 수 없었다. 이는 치밀골 함유비율이 높은 대퇴골이 80 mg/kg b.w./day고용량의 이소플라본에 느리게 반응하는 것이나, 혹은 골손실을 예방하지 못하는 것으로 사료된다. 또한 암컷 흰쥐의 골격 성장은 12개월까지 계속되며 그 이후에는 멈춘다고 보고(16)한 결과와 비교해 볼 때, 본 실험에서 어린 쥐는 회생 시 4개월의 나이였고, 성장기 쥐는 8개월의 나이였으므로 최대 골밀도에 도달하지 않은 시기이다. 그러므로

나이가 다르더라도 골의 성장이 진행되고 있다는 점에서 유사한 조건이라는 제한점을 갖는다.

따라서 골의 성장에 따른 이소플라본 섭취량, 골격부위, 이소플라본의 노출시기에 대한 상관관계에 관하여 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

## 요 약

대두 이소플라본의 보충이 어린 쥐와 성숙기 쥐의 골대사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각각 5주령, 25주령 암컷 쥐를 대상으로 난소를 절제하지 않은 군(SH), 난소를 절제한 군(OVX), 난소를 절제하고 이소플라본 80 mg/kg b.w.을 보충시킨 군(OVX+ISO)으로 각각 분류하고 9주동안 실험 식이를 제공한 후 골대사에 미치는 일반지표 및 생화학적 지표를 비교 분석하였으며 그 결과는 다음과 같다. 어린 쥐의 체중 증가량은 난소를 절제하지 않은 군( $142.6 \pm 23.86$ )에 비해 난소 절제군( $174.8 \pm 15.36$ )에서 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 증가되었고, 난소절제군에 비해 이소플라본 보충군( $159.6 \pm 9.93$ )은 다소 감소되었다. 어린 쥐에서 혈청 osteocalcin농도는 난소를 절제하지 않은 군( $24.44 \pm 4.6$ )에 비해 난소절제군( $33.27 \pm 6.7$ )에서 유의성( $p < 0.05$ )있게 증가되었고, 난소절제군에 비해 이소플라본 보충군( $25.45 \pm 5.6$ )은 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 감소되었다. 어린 쥐에서 노중 crosslinks value농도는 난소를 절제하지 않은 군( $154.78 \pm 14.89$ )에 비해 난소절제군( $203.43 \pm 20.60$ )에서 유의성( $p < 0.05$ )있게 증가되었고, 난소절제군에 비해 이소플라본 보충군( $169.43 \pm 20.69$ )은 유의성( $p < 0.05$ )있게 감소하여, 난소를 절제하지 않은 군과 유사한 수준으로 나타났다. 어린 쥐에서 혈청 인의 농도는 난소를 절제하지 않은 군( $5.46 \pm 0.98$ )에 비해 난소절제군( $6.73 \pm 0.44$ ), 이소플라본보충군( $6.87 \pm 1.17$ )에서 유의성( $p < 0.05$ )있게 증가되었고, 혈중 칼슘농도와 노중 칼슘, 인의 배설량은 각 군 간 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 성숙기 쥐는 혈중 칼슘과 인의 농도, 노중 칼슘과 인의 배설량에서 각 군 간 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 어린 쥐와 성숙기 쥐에서 대퇴골 골밀도는 난소절제, 이소플라본보충 유무에 따른 각 군 간의 유의적인 차이가 나타나지 않았으나, 성숙기 쥐는 난소를 절제하지 않은 군( $0.2010 \pm 0.0013$ )에 비해 난소절제군( $0.1853 \pm 0.0012$ )은 감소되었고, 난소절제군에 비해 이소플라본 보충군( $0.1980 \pm 0.0014$ )은 증가하는 경향을 나타냈다. 이상의 결과를 종합해 보면 어린 쥐에서 난소절제에 의한 에스트로겐 결핍은 골대사에 영향을 주었고, 대두 이소플라본 보충은 골대사 지표인 혈중 osteocalcin과 노중 crosslink value함량을 유의적으로 감소시켜 골흡수를 억제하는 것으로 나타났다. 따라서 이소플라본 섭취가 어린 쥐의 골대사에 긍정적인 효과는 확인할 수 있었으나, 성숙기 쥐의 골대사 지표에는 직접적인 영향을 나타내지 않았다.

## 감사의 글

본 연구에 이소플라본을 공급해주신 (주)풀무원에 감사드립니다.

## 문 헌

1. National Statistical Office. 2001. Life table.
2. Weed SS. 1992. *New menopausal years, the wise woman way: alternative approaches for women 30~90*. Ash Tree Publishing, Woodstock, NY, USA. p 1-6.
3. The Korean society of bone metabolism. 1997. *Osteoporosis*. Seoul, Korea.
4. Riggs BL, Melton LJIII. 1983. Evidence for two distinct syndromes of involuntional osteoporosis. *Am J Med* 75: 899-901.
5. Mazess RB. 1983. Bone density in diagnosis of osteoporosis: Threshold and breakpoints. *Calcif Tissue Int* 41: 117-118.
6. Lim SG. 1993. Medical treatment of osteoporosis. *Korean J Nutr* 26: 213-219.
7. Wrick KL. 2003. The US soy market: An update & outlook. *Nutraceuticals World*. Jan/Feb. <http://www.nutraceuticals.world.com/JanFeb031.htm>.
8. Arjmandi BH. 2001. The role of phytoestrogens in the prevention and treatment of osteoporosis in ovarian hormone deficiency. *J Am Coll Nutr* 20: 398-402.
9. Kurzer MS, Xu X. 1997. Dietary phtoestrogens. *Annu Rev Nutr* 17: 353-381.
10. Setchell KD. 2000. Absorption and metabolism of soy isoflavones from food to dietary supplements and adults to infants. *J Nutr* 130: 654S-655S.
11. Picherit C, Coxam V, Bennetau-Pelissero C, Kati-Coulibaly S, Davicco MJ, Lebecque P, Barlet JP. 2000. Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. *J Nutr* 130: 1675-1681.
12. Park YH, Yoon S, Chung SY, Yang SO, Yoo TM, Yang JS, Kwon DJ. 2001. The effect of isoflavone supplementation on bone metabolism in ovariectomized SD rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 657-661.
13. Breitman PL, Fonseca D, Cheung AM, Ward WE. 2003. Isoflavones with supplemental calcium provide greater protection against the loss of bone mass and strength after ovariectomy compared to isoflavones alone. *Bone* 33: 597-605.
14. Lee YB, Lee HJ, Kim KS, Lee JY, Nam SY, Cheon SH, Sohn HS. 2004. Evaluation of the preventive effect of isoflavone extract on bone loss in ovariectomized rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 1040-1045.
15. Christel P, Catherine BP, Brigitte C, Patrice L, Marie-Jeanne D, Jean-PierreB, Veronique C. 2001. Soybean isoflavones dose-dependently reduce bone turnover but do not reverse established osteopenia in adult ovariectomized rats. *J Nutr* 131: 723-728.
16. Dike NK, Chung-ching L, Robert RH, Bruce WH. 1989. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology* 124: 7-16.
17. Lee DS, Byun SY. 2001. Effects of the dietary mixture of isoflavone on osteoporosis. *Korean J Biotech Bioeng* 16: 420-425.
18. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the re-

- formulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951.
19. Yamazaki I, Yamaguchi H. 1989. Characteristics of an ovariectomized osteopenic rat model. *J Bone Miner Res* 4: 13-22.
  20. Wronski L. 1995. Response of femoral neck to estrogen depletion and parathyroid hormone in aged rats. *Bone* 16: 551-557.
  21. Cecchetti M, Bellometti S, Cremonesi G, Solimeno LP, Torrim G. 1995. Metabolic and bone effects after administration of ipriflavone and salmon calcitonin in postmenopausal osteoporosis. *Biomed & Pharmacother* 49: 465-468.
  22. Setchell KD, Nechemias LZ, Cai J, Heubi JE. 1998. Isoflavones content of infant formulas and the metabolic rate of these phytoestrogens in early life. *Am J Clin Nutr* 68: 1453-1461.
  23. Liu G, Peacock M. 1998. Age-related changes in serum undercarboxy-lated osteocalcin and its relationships with bone density, bone quality, and hip fracture. *Calcif Tissue Int* 62: 286-289.
  24. Lee DH, Sung CJ. 2003. Effect of soy isoflavone supplementation on bone metabolism marker and urinary mineral excretion in postmenopausal women. *Korean J Nutr* 36: 476-482.
  25. Morabito N, Crisafulli A, Vergara C, Gaudio A, Lasco A, Frisina N, D'Anna R, Corrado F, Pizzoleo MA, Cincotta M, Altavilla D, Lentile R, Squadrito F. 2002. Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double blind placebo-controlled study. *J Bone Miner Res* 17: 1904-1912.
  26. Kleerekoper M. 1996. Biochemical markers of bone remodeling. *Am J Med Sci* 312: 270-277.
  27. Uesugi T, Fukui Y, Yamori Y. 2002. Beneficial effects of soybean postmenopausal Japanese women: A four-week study. *Original Research* 21: 97-102.
  28. Deyhim F, Stoecker BJ, Brusewitz GH, Arjmandi BH. 2003. The effects of estrogen depletion and isoflavones on bone metabolism in rats. *Nutrition Research* 23: 123-130.
  29. Choi MJ, Cho HJ. 2003. Effects of soy protein and isoflavones on bone mineral density in growing female rats. *Korean J Nutr* 36: 359-367.
  30. Fanti P, Monier-faugere MC, Geng ZJ, Morris PE, Cohen D. 1988. The phytoestrogen genistein reduce bone loss in short term ovariectomized rats. *Osteoporosis Int* 8: 274-281.
  31. Ishida, Useug T, Hirai K, Toda TK, Nukaya H, Yokotsuka K. 1998. Preventive effect of the plant isoflavone, daizein and genistein on bone loss in ovariectomized rats fed a calcium deficient diet. *Biol Pharm Bull* 21: 62-66.
  32. Blair H, Jordan SE, Peterson TG, Barnes S. 1996. Variable effects of tyrosine-kinase inhibitors on avian osteoclastic activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats. *J Cell Biochem* 61: 629-637.
  33. Rice MM, Lacroix AZ, Lampe JW. 2000. Soy consumption and bone mineral density in older Japanese American women in king country, Washington. *J Nutr* 130: 685.
  34. Anderson JJ, Ambrose WW, Garner SC. 1998. Biphasic effects of genistein on bone tissue in the ovariectomized, lactating rat model. *Proc Soc Exp Biol Med* 217: 345-350.

(2005년 2월 24일 접수; 2005년 11월 4일 채택)