J. Ginseng Res.
Vol. 30, No. 3, 112-116 (2006)

TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin)로 급성독성을 유도한 자성 기니픽의 대퇴골 무게감소에 대한 홍삼사포닌의 방어효과

곽이성# · 경종수 · 송용범 · 위재준 · 박종대 · 김시관* · 황미선 · 김석창 · 박채규 · 도재호
KT&G 중앙연구원 인삼과학연구소, *건국대학교 생명과학
(2006년 7월 15일 접수; 2006년 9월 14일 수리)

Protective Effect of Red ginseng Saponin on Decrease of Femur Weight in Female Guinea Pigs Acutely Exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-ρ-dioxin (TCDD)

Yi-Seong Kwak#, Jong-Soo Kyung, Yong-Bum Song, Jae-Joon Wee, Jong-Dae Park, Si-Kwan Kim*, Mi-Sun Hwang, Seok-Chang Kim, Chae-Kyu Park and Jae-Ho Do
KT&G Central Research Institute., Daejon 305-805, Kore
**Konkuk University, Dept. of Biological Science, Korea*
(Received July 15, 2006; Accepted September 14, 2006)

Abstracts : To investigate the protective effect of saponin from red ginseng extract, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo--dioxin (TCDD) was exposed to female guinea pigs and then femur weights was measured. Forty eight female guinea pigs (820±25 g) were divided into 6 groups. Normal control group (NC) received vehicle and saline; only TCDD-treated group (TT) received TCDD (5.0 μg/kg, single dose) intraperitoneally; pretreated group of saponin 10 (PE 10) received 10 mg/kg of saponin *i.p.* for 4 weeks from 1 week before TCDD-exposure; pretreated group of saponin 20 (PE 20) also received 20 mg/kg of saponin *i.p.* for 4 weeks from 1 week before TCDD-exposure. While, post-treated group of saponin 10 (CE 10) received 10 mg/kg of saponin *i.p* for 3 weeks after TCDD-exposure. Post-treated group of saponin 20 (CE 20) received 20 mg/kg saponin *i.p* for 3 weeks after TCDD-exposure. Body weight of TT group was significantly decreased after TCDD-exposure. However, body weight in all saponin-treated gropus increased throughout the experimental period, although the increasing rate was slower than that of NC group. Body weights of PE 10 and 20 groups showed more higher increase than those of CE groups during the experimental period. Decrease of femur weights in female guinea pigs by TCDD intoxification was significantly recovered by the saponin treatment. Decrease of Ca^{2+} level of femurs in female guinea pigs exposed TCDD also recovered by the treatment of saponin from red ginseng extract. Especially, PE20 group showed the highest increase of the Ca^{2+} level in femur among the saponin treated groups. These results suggest that ginseng saponin might be a useful protective agent against femur damage caused to decrease of Ca^{2+} by TCDD.

Key words : TCDD, Saponin, Red ginseng, Femur, Ca^{2+}

서 론

사회의 급격한 서구화와 공업발전에 따라 인간의 평균수명은 연장되고 문화적 혜택을 누리게 되었지만 반면 문명의 발달에 기인된 환경문제로 인해 여러 가지 질병이 유발되기도 한다. TCDD(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-ρ-dioxin)는 현재까지 인간에 의해 합성된 화합물 중 가장 독성이 강한 화합물로써 제초제의 부산물로서 쓰레기 소각장 등에서 미량 생성되는 것으로 알려져 있다. TCDD는 인체의 거의 모든 장기에 영향을 미치는 독성물질로써 암 및 고지혈을 유발하고, 뼈의 발육에도 영향을 미치는 등 수 많은 독성작용이 보고된 바 있다.[1)]

반면 홍삼은 간질환, 당뇨병, 암, 피로, 스트레스, 동맥경화증, 고혈압 등의 여러 질병에 유효한 것으로 알려져 있으며,[2,3)] 예로부터 말초혈관을 확장시켜서 수족냉증을 개선하고 적혈구 변형능을 촉진시켜 말초혈액 순환개선에 효과를 나타낸다는

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-866-5535; (팩스) 042-861-1949
(E-mail) yskwak@ktng.com

보고가 있다.[4] 또한 Punnone과 Lukola[5]는 인삼사포닌은 화학적으로 스테로이드 호르몬의 전구물질인 cholesterol의 구조와 유사하므로 생식기능을 활발하게 하는 역할을 한다고 주장하였다. Ogita[6]는 갱년기 여성 40 명을 대상으로 고려홍삼을 3 개월간 투여한 임상실험 결과 고려홍삼이 수족냉증, 피로감, 정서불안과 같은 자각증상을 현저히 개선시킨다고 하였다. 아울러 홍삼사포닌이 골다공증을 개선시킨다는 보고도 있었다[7]. 여성 갱년기 장애에는 주로 골다공증이 발생하므로 치료효과의 유효성 및 기전이 확실하게 밝혀진 상태는 아니지만 calcium 및 phosphate 제제, 여성 호르몬 estrogen 제제, vitamin D 및 calcitonin 등이 현재 투여되고 있는 실정이다[8,9]. Kwak 등[10]은 난소절제된 흰쥐에 홍삼사포닌을 투여한 후 대퇴골 무게를 측정한 결과 난소절제에 의해 유도된 대퇴골 무게감소가 홍삼사포닌에 의해 억제되었다고 보고한 바도 있다.

한편 Kim[11] 과 Hwang 등[12]은 홍삼물추출물이 TCDD로 독성을 유도한 실험동물에서 독성예방효과 및 방어효과를 나타낸다고 보고한 바 있으며, Kim 등[13]은 랫드를 이용한 실험에서 홍삼이 TCDD의 독성을 방어하고, 특히 생식독성을 방어하여 정자의 질을 향상시킨다고 보고한 바 있다. 본 연구는 환경호르몬 TCDD의 독성 방어연구를 수행하던 중 TCDD는 뼈의 발육을 억제하는 반면 홍삼은 골다공증 등에 효과를 나타낸다는 사실에 기인하여 TCDD의 독성에 의해 유발된 대퇴골의 무게감소를 홍삼사포닌이 억제한다는 사실을 확인하였기에 이에 대한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 자성 기니픽 (female, Hartely, 820±25 g)을 삼육실험동물 (경기도 오산)로부터 구입하여 사용하였다. 기니픽은 8 마리씩 6 군 (총 48 마리)으로 나누어 실험에 사용하였다. 실험동물의 사육조건은 온도: 23±1, 습도: 40-60%, 명암 주기: 12 시간의 조건으로 하였다. 사료는 고형사료 (주식회사 퓨리나)를 제공하였고, 식수는 제한없이 공급하였다.

2. 홍삼물추출물로부터 사포닌의 분리

홍삼물추출물은 수삼 (KT&G 중앙연구원 원료연구소 2001년산, 6 년근) 을 고려인삼창 (한국인삼공사, 부여)에서 홍삼물추출물로 제조하였다. 홍삼물추출물로부터 홍삼사포닌의 분리는 Diaion HP-20 수지흡착방법[14]에 의해 분리한 후 본 실험에 사용하였다.

3. 홍삼사포닌의 HPLC 분석

실험에 사용한 홍삼사포닌은 추후 시료의 일관성을 유지하기 위해 HPLC를 이용하여 분석하였다. 홍삼사포닌 50 mg을 10 ml의 MeOH (HPLC 급)에 용해시킨 후 여과 (0.45 μm)하여 분석하였다. HPLC 분석은 Lichrosorb-NH_2 column (Merck, 10 μm, ID 0.46cm×25cm)에 acetonitril/water/*n*-butanol (80:20:10)을 이동상으로 하여 ELSD 검출기로 검출하여 정량하였다.

4. TCDD 및 사포닌의 투여

TCDD는 AccuStandard Inc. (New Haven, CT, USA)으로부터 순도 >99.1% (Gas chromatography 분석)를 구입하여 Kim 등[11]의 방법에 준해 TCDD (2 mg)를 미량의 DMSO (50 μl)와 소량의 acetone (450 μl)에 녹인 다음 4.5 ml의 corn oil (Sigma Co.)로 희석하여 사용하였다. 한편 실험동물에 사포닌 및 TCDD의 투여는 Kim 등[11]의 방법에 준해 실행하였다(Fig. 1). Fig. 1에 나타낸 바와 같이 정상대조군에는 TCDD의 운반체 (미량의 DMSO와 소량의 acetone을 함유한 대두유)를, TCDD 단독투여군 (TT군)에 대해서는 TCDD (5.0 μg/kg, single dose, *i.p.*)와 생리식염수를 복강주사하였다. 홍삼 사포닌의 예방효과를 조사하기 위해 사포닌 10 및 20 mg/kg 투여군 (PE 10 및 20)은 TCDD 투여 1 주일 전부터 3 주간 총 4 주 동안 각각 10 mg/kg 및 20 mg/kg의 용량으로 복강 주사하였다. 치료효과를 조사하기 위해서는 TCDD 투여 직후부터 총 3 주 동안 예방효과 실험과 동일한 용량인 10 및 20 mg/kg (CE10 및 20)으로 복강주사하였으며, 주사액의 부피는 200 μl로 하였다.

5. 체중의 측정

실험군의 체중은 1 주일 간격으로 총 4 주 동안 오후 2시경에 측정하였으며, 결과는 평균±표준편차 값으로 표시하였다.

6. 대퇴골 무게의 측정

에테르로 기니픽을 마취시킨 다음 cervical dislocation으로 도살한 후 복부를 절개하여 대퇴골을 적출하였다. 대퇴골의 무게는 Kwak 등[10]의 방법에 따라 좌측 및 우측의 대퇴골을 모두 적출하여 골막분리후 건조후의 무게 (12 시간, 105)를 측정하였다.

7. 무기물 함량의 측정

건조시켜 무게를 측정한 대퇴골을 전기회화로 (Fisher Model 184A)에서 550, 10 시간 직접회화법[15]으로 회화시킨 후 60°C의 수욕조에서 원자흡광분광광도계용 10% HCL로

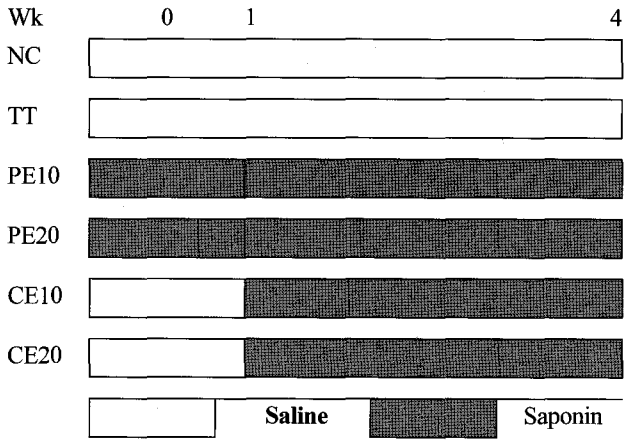

Fig. 1. Schematic diagram for the treatment of TCDD and saponin from red ginseng extract.
Note : Normal control group (NC) guinea pigs received vehicle (corn oil and small amount of acetone containing trace amount of dimethylsulfoxide) and saline. TCDD-treated group (TT) received TCDD and saline. Saponin from Red ginseng extract was *i.p.* administered. Pretreatment group of saponin (PE) received before 1 week TCDD-exposure with a dose of 10 mg/kg (PE10) and 20 mg/kg (PE20) for total 4 weeks. Curative treatment groups of saponin (CE) were received concurrent with TCDD-exposure with a dose of 10 mg/kg (CE10) and 20 mg/kg (CE20) for total 3 weeks. Each group consists of 8 female guinea pigs. TCDD was injected (*i.p.*) at the first week of the experiment at a single dose of 5.0 μg/kg,b.w. Saponin from red ginseng extract was administered at daily dose of 10 mg/kg or 20 mg/kg for 4 weeks.

용해시켰다. 여과지 (Whatman No.41)로 여과한 후 일정비율로 희석하여 원자흡광분광광도계 (Varian Spectra AA-30, DS-15 data station)로 분석하였다. 이때 사용한 Ca^{2+} 원소는 Sigma 사의 표준품을 일정농도로 희석하여 표준곡선을 구하여 분석하였다.

8. 통계분석

실험결과는 mean±SD로 표기하였으고 각 실험군간 비교는 paired Student's *t*-test를 사용하여 통계분석하였으며, p 값이 5% 및 1% 미만일 경우 통계적으로 유의성이 있다고 표기하였다.

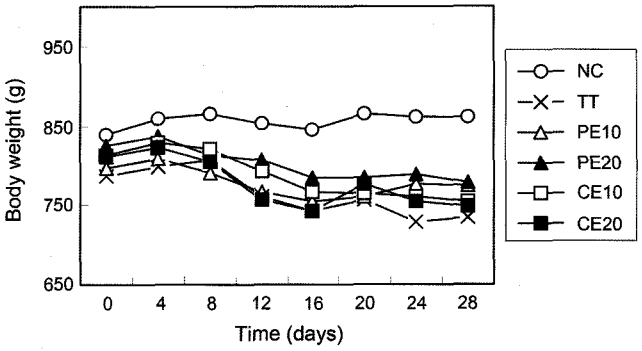

Fig. 2. Effect of red ginseng extract on changes of body weight in female guinea pigs. Note on group designations are the same as in Fig. 1.

결과 및 고찰

1. 홍삼사포닌의 ginsenoside 함량 분석

실험에 사용된 홍삼사포닌의 ginsenoside 함량을 HPLC로 분석한 결과 는 Table 1에 나타낸 바와 같다. Ginsenoside-Rg_1, -Re, -Rf, Rb_1, -Rb_1, -Rc, -Rb_2, -Rd는 각각 0.44 ±0.02, 0.71±0.05, 1.29±0.04, 1.28±0.06, 4.08±0.09, 1.92±0.03, 2.20±0.05, 1.92±0.06% 이었고, Rg_2의 이성체 (S) 및 (R) form은 각각 2.22±0.08, 1.13±0.06% 이었다. 가장 높은 함량은 Rg_3의 이성체 (S) 및 (R) form 으로 각각 5.68±0.03, 2.21±0.04% 이었고, 시료의 total ginsenoside 함량은 25.08% 이었다.

2. 기니픽 체중의 변화에 미치는 홍삼사포닌의 영향

TCDD로 독성을 유도하고 홍삼사포닌을 투여한 후 체중변화를 관찰한 결과 (Fig. 2), 홍삼사포닌-투여 실험동물군은 TCDD 투여에 의한 체중감소를 억제하는 것으로 나타났다. TT군은 TCDD 투여 (7일째) 3일 경과 시점 (10일째)부터 급격한 체중감소를 나타내어 28일째에는 최초체중의 00%가 감소되었다. 반면 PE군 (사포닌 전투여군: TCDD 투여 7일 전부터 사포닌 투여군) 및 CE군 (사포닌 후투여군: TCDD 투여 7일째부터 사포닌을 투여하기 시작한 군)은 모두 TT군보다 높은 체중함량을 나타내었고, CE군보다는 PE군의 경우가 체중감소 억제효과가 높은 것으로 나타났다.

Table 1. Determination of contents of ginsenosides by HPLC.

Ginsenosides[a](%)												
Rg_1	Re	Rf	Rh_1	Rg_2 (S)[b]	Rg_2 (R)[c]	Rb_1	Rc	Rb_2	Rd	Rg_3 (S)[d]	Rg_3 (R)[e]	Total
0.44±0.02	0.71±0.05	1.29±0.04	1.28±0.06	2.22±0.08	1.13±0.06	4.08±0.09	1.92±0.03	2.20±0.05	1.92±0.06	5.68±0.03	2.21±0.04	25.08

[a]Content is calculated by based on dry basis. Values is means± SD by three experiments. [b,d]S forms of ginsenoside-Rg_2 and -Rg_3. [c,e]R form of ginsenoside-Rg_2 and -Rg_3.

Table 2. Effect of saponin from red ginseng extract on femur[a] in female guinea pigs exposed to TCDD.

Group (n=8)	Weight (g)
NC	2.5±0.4 (100.0)
TT	2.2±0.3 (88.0)
PE10	2.3±0.3 (92.0)
PE20	2.4±0.1 (96.0)#
CE10	2.3±0.3 (92.0)
CE20	2.3±0.2 (92.0)

Parentheses mean relative percent ratio when compared with NC group 100%. [a]The femur weights were determined after dried for 24 h at 105°C. # significant at $p<0.05$ vs TT. Note on group designations are the same as in Fig. 1.

Table 3. Effect of saponin from red ginseng extract on Ca^{2+} content of femur in female guinea pigs exposed to TCDD.

Group (n=8)	Ca^{2+} (mg/g of femur)
NC	186±25
TT	148±19
PE10	154±15
PE20	165±17#
CE10	155±17
CE20	160±20

The values were mean±S.D. # significant at $p<0.05$ vs TT. Note on group designations are the same as in Fig. 1.

3. 기니픽의 대퇴골 무게감소에 미치는 홍삼사포닌의 영향

TCDD를 투여한 후 홍삼사포닌을 투여하여 기니픽의 대퇴골 무게를 측정한 결과 (Table 2), 대퇴골의 무게는 NC군은 2.5±0.4 g 인데 반해 TT군은 2.2±0.3 g으로 NC군 대비 12.0% 무게감소가 관찰되었다. 반면 PE10 및 PE20 군은 각각 2.3±0.3, 2.4±0.1 g으로 NC군 대비 8%, 4%의 무게감소에 그쳐 홍삼사포닌은 TCDD에 의한 대퇴골 무게감소를 억제하는 것으로 나타났다. CE10 및 CE20 군도 대퇴골 무게가 각각 2.3±0.3, 2.3±0.2 g으로 NC군 대비 8%의 무게감소에 그쳐 TCDD에 의한 대퇴골 무게감소를 억제하는 것으로 나타났다.

TCDD는 동물에 섭취되었을 경우 급격한 체중감소를 야기하고, 또한 강력한 발암물질 및 성교란물질로서 작용한다고 알려진 대표적인 환경성 독성물질이다. 본 실험에서도 TCDD가 투여된 기니픽은 급격한 체중감소를 나타내었는데 사포닌 투여는 이를 방어하는 것으로 나타났다. 아울러 TCDD투여는 기니픽의 대퇴골의 무게도 감소시켰으나 조사포닌 투여군은 대퇴골 무게감소를 크게 억제하는 것으로 나타났다. 특히 사포닌 20 mg/kg 전투여군 (PE20)은 대퇴골의 무게감소를 유의적 ($p<0.05$)으로 억제하였다. 이러한 결과는 TCDD가 야기하는 독성을 홍삼사포닌이 방어하는 것으로 생각된다.

한편, 인위적으로 난소를 절제하여 골다공증을 유도한 자성랫드에 홍삼조사포닌을 투여하였더니 난소절제로 야기된 대퇴골의 무게감소를 유의하게 억제하였다는 보고[10]에서 보는 바와같이 홍삼조사포닌은 흰쥐의 생리적 기능을 정상화함으로써 갱년기장애의 하나의 지표인 골다공증을 예방하는 것으로 생각된다.

4. 대퇴골의 Ca^{2+} 함량에 미치는 홍삼사포닌의 영향

TCDD로 급성독성을 유도한 기니픽의 대퇴골 무기질 함량 변화에 미치는 홍삼사포닌의 영향을 조사하기 위하여 무기질 중 뼈의 주성분으로 알려진 Ca^{2+} 함량을 측정하였다 (Table 3). Table 3에 나타낸 바와 같이 NC군의 대퇴골 중 Ca^{2+} 함량은 186±25 mg/g 이었지만 TT군은 148±19 mg/g으로 NC군대비 20.4%의 Ca^{2+} 함량이 감소되었다. 반면 PE10 및 PE20 군은 각각 154±15, 170±14 mg/g으로 TT군에 비해 함량이 높아서 Ca^{2+}이 회복되는 경향을 보여 주었다. CE10 및 20군도 각각 155±17, 160±20 mg/g으로 TT군보다 Ca^{2+} 함량이 높은 경향을 나타내었다. PE군 및 CE군은 모두 용량의존적으로 사포닌 20 mg/kg 투여군이 Ca^{2+} 함량이 높았으며, 특히 PE20군은 사포닌 투여군 중 가장 높은 Ca^{2+} 함량 회복효과를 나타내었다($p<0.05$). 이러한 결과로부터 사포닌의 대퇴골무게의 회복작용은 TCDD에 의해 억제된 Ca^{2+} 흡수를 사포닌이 촉진시켜줌으로써 정상대조군 수준으로 회복시키는 것으로 추론해 볼 수 있겠다.

무기질의 기능은 생체의 생리작용에 영향을 미치고 각각 상호적으로 관계하고 있다. 생체에서 체조직을 구성하며, $Ca,^{2+}$ $P,^{5+}$ Mg^{2+} 등은 뼈의 구성 무기질로서 중요하다. 또한 다른 성분과 결합하여 생체의 구성성분이 되기도 하며, 조효소로서 효소반응을 활성화시키기도 한다. 무기질은 혈액이나 체액의 양, 삼투압이나 pH를 조절하기도 하며, 근육이나 신경의 수축, 흥분성을 조절하기도 하는 등 다양한 기능을 가지고 있다. 이러한 무기질 중 특히 Ca^{2+}은 치아와 뼈의 형성과 유지, 골다공증 예방, 신체기능 조절, 체내 대사의 조절, 혈액 응고, 체액의 산성화 방지 등 중요한 기능을 담당하고 있다.

한편, TCDD가 투여된 기니픽은 정상군과 비교하였을 때 혈청내 Ca^{2+} 함량은 큰 변화가 관찰되지 않았다.[12] 그러나 TCDD 투여로 감소된 대퇴골의 Ca^{2+} 함량은 홍삼사포닌의 투여에 의해 회복되는 경향을 보여주었다. TCDD는 골격 (뼈)의 Ca^{2+} 함량감소를 유도하지만 홍삼사포닌은 함량감소를 억제하는 것으로 생각되며, 이는 TCDD 투여에 의해 감소된 체중 및 대퇴골의 무게 감소가 사포닌투여에 의해 회복되는 것과 일맥상통하는 것으로 생각해 볼 수 있겠다. 따라서 홍삼사포닌이 TCDD 투여로 급성독성을 유도한 기니픽의 대퇴골 무게감소를 회복시켜 주는 것은 Ca^{2+} 함량의 증가와 밀접히

관련되어 있을 것으로 생각된다. 그러나 이에 대한 자세한 기전은 추후 P^{5+} Fe^{2+} 같은 무기질 분석 및 대퇴골의 무기질 관련효소 분석 등 추가 실험을 필요로 한다 하겠다.

감사의 말씀

본 연구에서 홍삼사포닌의 HPLC 분석을 위해 수고하여 주신 KT&G 중앙연구원의 조병구 박사에게 감사드립니다.

요 약

본 연구는 TCDD로 급성독성을 유도한 자성 기니픽의 대퇴골 무게감소에 대한 홍삼사포닌의 효과를 조사하기 위해 수행하였다. 48 마리의 자성기니픽 (820±25 g)을 6 군으로 나누어 정상군 (NC), TCDD 단독투여군 (TT), 사포닌 전투여군 (PE10, 20), 사포닌후투여군 (CE10, 20)으로 나누었다. NC군은 vehicle과 saline 만을 투여하였고, TT군은 TCDD를 단회투여 (5.0 μg/kg, *i.p*) 하였다. PE10 및 20군은 TCDD 투여 1 주일 전부터 총 3 주동안 사포닌을 투여 (복강) 하였다. 반면 CE10 및 20군은 TCDD 투여한 직후부터 총 3 주동안 사포닌을 투여 (복강) 하였다. 사포닌 투여군의 체중변화를 살펴보면 TT군은 TCDD 투여후 유의적인 체중감소 현상이 관찰되었으나 PE10, 20 및 CE10, 20 등 사포닌 투여군에서는 TT군에 비해 체중이 모두 증가하는 경향을 보였다. TCDD 투여는 자성기니픽의 대퇴골 무게를 유의적으로 감소시키는 반면 홍삼사포닌의 투여는 대퇴골 무게감소를 억제하는 경향을 보였다. 대퇴골 무게감소 억제현상은 PE20 군에서 가장 높게 나타났다. 대퇴골의 Ca^{2+} 도 TT군은 NC 군 대비 약 20.4% 감소하는데 반해 사포닌 투여군은 TT군 대비 Ca^{2+} 함량이 증가되는 경향을 나타내었다. 이러한 결과로부터 홍삼사포닌은 TCDD에 의해 억제된 기니픽의 대퇴골내 Ca^{2+} 함량을 증가시킴으로써 대퇴골의 무게감소를 회복시키는 것으로 추론할 수 있겠다.

인용문헌

1. Poland, A. and Knutson, J.C. : 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo--dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons; examination of the mechanism of toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **22**, 517-554 (1982).
2. Lin, B.Y., Jee, W.S., Chen, M.M., Ma, Y.F., Ke, H.Z. and Li, X.J. : Mechanical loading modifies ovariectomy induced cancellous bone loss. *Bone Miner.* **25**, 199-210 (1994).
3. Jung, N.P. and Jin, S.H. : Studies on the physiological and biochemical effects of Korean ginseng. *Korean J. Ginseng Sci.* **20**, 431-471 (1996).
4. Kaneko, H., Nakanishi, K., Murakami, A., Aidoh, H. and Kuwhashima, K. : The acute effects of massive dose of red ginseng on healthy adults under the condition of cold stress. Proc. of '96 Korea-Japan Ginseng Symp. p. 22-30 (1996).
5. Punnonen, R. and Lukola, A. : Estrogen-like effect of ginseng. *Br. Med. J.* **281**, 1110 (1980).
6. Ogita, S. : Clinical effectiveness of Korean ginseng climacteric disturbances and its possible mechanism of action. *Korean J. Ginseng Sci.* **14**, 162-166 (1990).
7. Kim, N.H., Lee, H.M. and Choi, C.H. : Effects of saponin on osterolphoresis induced by ovariectomy in rats. *J. Korean Orthop. Assoc.* **30**, 808-816 (1995).
8. Riggs, B.L. and Melton, L.J. : Involutional osteroporesis. *N. Eng. J. Med.* **314**, 1676-1686 (1986).
9. Kamezawa, K. : Inhibitory effects of combined treatment with vitamin K and D on bone loss of ovariectomized rats : a microdiagraphic study. *Fukuoka Igaku Zasshi.* **90**, 71-78 (1990).
10. Yi-Seong Kwak, Jae-Joon Wee, Seok-Yeon Hwang, Jong-Soo Kyung and Si-Kwan Kim. :. Effect of crude saponin fraction from Korean red ginseng on physiological events of ovariectomized rat. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**(2), 288-293 (2000).
11. Kim, S.K., Hwang, S.Y., Wee, J.J., Kwak, Y.S., Kyung, J.S. and Nam K.Y. : Protective effect of crude saponin from Korean red ginseng on Dioxin-induced testicular toxicity. *The Ginseng Review*, No.28, 70-77 (2000).
12. Hwang, S.Y., Kim, S.K, Kim, S.H., Kwak, Y.S. and Jeong, Y.J. : Effect of Korean red ginseng on clinical chemical parameters in male guinea pigs exposed acutely to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo--dioxin. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**(6), 1349-1354 (1999).
13. Kim, W., Hwang, H., Lee, H., Song, H. and Kim, S. : *Panax ginseng* protects the testis against 2,3,7,8-tetrachlorodibezo--dioxin induced testicular damage in guinea pigs. *BJU International*. **83**, 842-849 (1999).
14. Kim, S.K., Kwak, Y.S., Kim, S.W., Hwang, S.Y., Ko, Y.S. and Yoo, C.M. : Improved method for the preparation of crude ginseng saponin. *J. Ginseng Res.* **22**, 155-160 (1998).
15. Yi-Seong Kwak and Eun-Mi Kim : The physicochemical properties of crude polysaccharide fraction isolated from Korean Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Korean J. Food Sci. Technol.* **8**(1), 389-392 (1996).