J East Asian Soc Dietary Life
22(4): 480~488 (2012)

난소 절제 쥐에서 우롱차의 섭취가 골밀도 및 골대사 지표에 미치는 영향

정 윤 정 · 최 미 자†

계명대학교 식품영양학과

Effects of Oolong Tea Supplementation on Bone Mineral Density and Bone-Related Markers in Ovariectomized Rats

Yun-Jung Jung and Mi-Ja Choi†

Dept. of Food and Nutrition. Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Abstract

Polyphenols may be primarily responsible for the health benefits associated with tea consumption. However, the benefits of the tea polyphenols to bone health have not been studied well. The purpose of this study was to investigate the effects of Oolong tea on bone mineral density and bone-related markers in ovariectomized rats. Sprague-Dawley female rats were randomly assigned to Sham-Control, Sham-Oolongtea, Ovx-Control, and Ovx-Oolongtea groups. Bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) were estimated by using PIXImus (GE Lunar Co, Wisconsin.) in the spine and femur. After 6 weeks of the experimental diets, body weight gain, food intake, and food efficiency ratio (FER) were significantly higher in Ovx groups than in Sham groups regardless of diet. The serum concentration of calcium, phosphorus, ALP, and calcitonin were not significantly different according to Oolong tea supplementation. There were no significant differences in urinary calcium and phosphorus excretion between all groups. The urinary DPD crosslinks value was significantly higher in the Ovx-Control group than in the Sham-Oolongtea group. Spine BMD, femur BMD, and spine BMD per body weight were significantly lower in the Ovx groups than in the Sham groups regardless of diet. In the OVX group, spine BMC per body weight, femur BMD per body weight and femur BMC per body weight were significantly higher in the Oolong tea groups than in Control groups. It was concluded that Oolong tea supplementation positively influenced bone health in ovariectomized rats.

Key words : Oolong tea, ovariectomized rats, bone mineral density, bone mineral contents, spine, femur.

서 론

Camellia sinensis 잎으로부터 제조하는 차는 제조 방법에 따라 발효차인 홍차, 반발효차인 우롱차, 비발효차인 녹차로 구분한다. 전 세계적으로 차의 제조 방법에 따른 생산 형태로 보면 78%는 홍차, 20%는 녹차, 2%는 우롱차로 생산되고 있고, 소비 형태로 구분하면 일반적으로 서구는 발효차인 홍차, 아시아 국가에서 비발효차인 녹차, 중국에서는 반발효차인 우롱차의 형태로 주로 소비하는 것으로 나타났다(Yang & Landau 2000, Shen *et al* 2009).

차 잎에 함유된 성분은 카테킨(catechin)류와 카페인(caffeine), 테아닌(theanine) 등으로 이것은 차 맛에 영향을 주는 주요 성분이다. 차에는 flavonoid flavanol 계열의 catechin 구조의 폴리페놀이 다량 함유되어 있다(Yang *et al* 2000). 차의 주 성분인 catechin은 free radical을 억제시키는 항산화 작용과 항암 작용을 하는 것으로 알려져 있고(Henning *et al* 2003), 차와 항산 화작용에 대한 연구는 주로 녹차를 중심으로 보고되어 있다(Shen *et al* 2008, Henning *et al* 2003).

또한 발효차인 홍차에 대한 연구를 살펴보면 발효차에는 catechin, theaflavin 및 그 유도체인 theaflavin-3-gallate, theaflavin-3'-gallate, theaflavin-3,3'digallate(TFDG)가 있는데(Yoshino *et al* 2010), 발효차의 주성분은 theaflavin으로 이것은 녹차의 catechin이 나타내는 항산화 활성과 동등한 효과가 있는 것으로 보고되었다(Leung *et al* 2001).

에스트로겐(estrogen)은 골세포에서 산화 스트레스를 감소시키기 때문에 에스트로겐 같은 성 호르몬의 감소는 골격의 퇴화를 가속화시키므로(Almeida *et al* 2007) 폐경으로 인한 에스트로겐 결핍 시에는 골밀도의 급격한 감소로 골격 대사에 불리하다. 최근 폐경기 골격에 관한 연구로는 난소 절제 쥐를 대상으로 녹차의 섭취가 골밀도에 미치는 영향을 분석한 선행 연구가 보고되었는데, 정상 칼슘 섭취 시(Choi & Jung 2010b) 난소 절제 쥐의 척추 및 대퇴 골밀도와 골함량은 Sham 대조군과 유의적 차이없이 같은 수준을 유지하였

† **Corresponding author** : Mi-Ja Choi, Tel : +82-53-580-5874, E-mail : choimj@kmu.ac.kr

고, 칼슘 결핍 시(Choi & Jung 2010a)는 녹차 분말 섭취에 따른 유의적인 차이는 없는 것으로 나타나, 녹차 섭취는 골밀도에 영향을 미치지 않는 것으로 제시되었다. 그리고 Shen *et al*(2008)은 난소 절제 쥐에서 녹차의 폴리페놀이 노화로 인한 골감소에 대해 방어 작용을 나타내었는데, 그 이유로 녹차 폴리페놀이 항산화 활성의 증가로 인한 산화 스트레스를 감소함으로써 노화와 난소 절제 두 가지 요인 모두에 의한 복합적 골손실에 방어 작용을 나타내는 것으로 보고하였다. 또한 역학 연구에서 차의 생리활성 성분인 폴리페놀과 골 건강과의 관련성을 조사한 결과, 골밀도 소실을 지연시키고 골절의 위험성을 감소시키는 것으로 나타났다(Kanis *et al* 1999, Hegarty *et al* 2000). 차에는 catechin 이외에 카페인도 함유되어 있는데, 카페인 섭취는 폐경 후 여성의 골밀도에 부정적인 영향을 주는 것으로 보고되었고(Harris & Dawson-Hughes 1994), 차의 섭취와 골밀도와의 관련성에 대한 연구는 일관되지 않은 결과가 제시되고 있다(Shen *et al* 2011a, Choi & Jung 2010a, Iwaniec *et al* 2009).

차는 기호식품으로 개인적인 선호에 따라 섭취할 수 있으며, 우리나라 성인을 대상으로 녹차와 우롱차를 섭취한 후 속쓰림 발생과의 관련성을 연구한 결과, 우롱차가 녹차에 비해 속쓰림 빈도 점수가 낮게 나타났는데, 이것은 우롱차가 녹차에 비해 카페인 함량이 낮기 때문으로 추론하였다(Kim *et al* 2010). 국내 시판 중인 차를 발효 정도에 따라 함유 성분을 비교해 본 결과를 살펴보면, 플라보놀 함량은 녹차 162.99 mg/100 g, 우롱차 194.80 mg/100 g으로 우롱차가 유의적으로 높았다. 또한 catechin과 카페인 함량은 epigallocatechin gallate(EGCG)가 녹차는 1,079.5 mg/100 g, 우롱차는 1,157.8 mg/100 g이었고, 카페인 함량은 녹차 357.7 mg/100 g, 우롱차 333.3 mg/100 g으로 발효 정도에 따라 유의적인 차이를 보였는데(Jung *et al* 2009), 우롱차는 녹차에 비해 플라보놀 함량은 높았고, catechin 함량은 비슷하였으며, 카페인 함량은 낮아 카페인에 민감한 사람은 발효차가 좋다고 보여진다.

최근 차의 폴리페놀은 항산화능에서 기인하여 골흡수를 억제하고 골형성을 증가시킴으로써 골손실을 감소시키는 것으로소 보고되고 있으나, 이는 녹차에 대한 연구가 대부분이다(Shen *et al* 2010, Shen *et al* 2011b). 일상적으로 녹차의 섭취를 높이게 되면 폴리페놀의 섭취가 증가하나, 동시에 카페인의 섭취도 증가하게 되므로 반발효차인 우롱차는 독특한 풍미가 있고 폴리페놀은 풍부하면서 녹차와 비교하여 카페인 함량이 낮아(Jung *et al* 2009) 섭취 후 속쓰림이 덜하여(Kim *et al* 2010) 우롱차의 섭취는 골대사에 유리할 수 있다고 사료된다. 그러나 우롱차에 대한 연구는 혈중지질 감소와 항산화 작용에 대한 연구가 일부 보고되고 있으나(Kuo *et al* 2005), 골격 대사와의 관련성에 대한 연구(Oka *et al* 2012)는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 폐경 모델인 난소 절제 쥐를 대상으로 우롱차 첨가 식이를 공급하여 골밀도 및 골대사지표에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

연구 방법

1. 실험 동물 및 실험식이

실험 동물인 암컷 흰쥐(rat)의 성성숙은 생후 60~70일 째부터 성주기가 안정되고 80일부터 완전 성성숙에 이르는데, 성성숙시의 체중은 200~400 g 정도이므로(Lee 2000) 실험동물의 생리주기와 체중을 고려하여 본 연구의 실험 모델을 정하였다. Sprague-Dawley 암컷 흰쥐(평균 체중 약 200±10 g, 8주령) 28마리를 분양받아 실험식이를 시작하기 전 1주일간의 적응시킨 후, 난소 절제(OVX)군과 난소 절제는 하지 않고 수술 스트레스만을 준(Sham)군으로 나누어 수술을 실시하였다. 수술은 마취제 rompun(바이엘 코리아 주식회사, 23.32 mg/mL) 0.04 mL/100 g body weight을 먼저 근육 주사하고, ketamin(유한양행, 50 mg/mL) 0.25 mL/100 g body weight의 용량을 근육에 주사한 후 난소 절제 수술을 실시하였다. Sham군은 난소 절제는 하지 않고 개복 수술만 실시하여 수술 스트레스를 주었고, 1주일간 회복 기간을 거쳐서 각 군당 7마리씩 4군(Sham 대조군, Sham 우롱차군, OVX 대조군, OVX 우롱차군)으로 나누어 stainless steel wire cage에서 한 마리씩 분리 사육하였다. 6주 동안 실험식이를 공급하였으며, 실험기간 동안 식이와 물은 자유롭게 섭취하게 하였다. 실험 동물의 사육 환경으로 온도는 22±2℃, 습도는 63±5%로 유지하며, 매일 광주기, 암주기를 12시간(6:00~18:00) 간격으로 자동조절 장치를 이용하여 조절하였다.

실험식이는 카제인을 단백질 급원으로 한 AIN-93G 정제식이의 기본 조성을 대조군 식이로 하였으며(Reeves *et al* 1993), 우롱차 첨가 식이는 대조군식이에 우롱차 분말(Amore Pacific Co., Korea)을 5% 첨가하여 조제하였고, 실험식이의 조성은 Table 1에 나타내었다. 본 연구의 실험식이에 우롱차 첨가 수준은 수컷 쥐를 대상으로 한 선행 연구(Kuo *et al* 2005)에서 4% 우롱차 분말 첨가 식이를 섭취시켜 우롱차의 효과를 보고한 결과에 근거하여 공급하였다. 본 연구는 선행 연구와 우롱차 섭취가 비슷한 수준이 되도록 폐경 모델인 난소 절제 쥐의 평균 식이 섭취량을 감안하여 5% 수준으로 하였다.

2. 체중 및 식이 섭취량 측정

실험 동물의 체중은 실험식이를 시작한 날을 기준으로 일정한 시간에 1주일 단위로 체중을 측정하여 체중 증가량을 측정하였다. 실험 기간 동안 식이 섭취량은 이틀에 한 번씩 일정한 시간에 측정하였고, 식이효율(food efficiency ratio : FER)

Table 1. Composition of experimental diets (g/kg diet)

Ingredients	Control	Oolongtea
Casein[1)]	200	200
Corn starch	529.486	479.486
Sucrose	100	100
Soybean oil	70	70
α-Cellulose[2)]	50	50
Min-mixture[3)]	35	35
Vit-mixture[4)]	10	10
L-Cystine[5)]	3	3
Choline bitartate[6)]	2.5	2.5
TBHQ[7)]	0.014	0.014
Oolong tea powder[8)]	–	50

1) Casein, Maeil Dairy Industry Co. Ltd., 480, Kyunggi-Do, Korea.
2) α-Cellulose, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.
3) Mineral-Mix, AIN-93G-Mx, Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA.
4) Vitamin-Mix, AIN-93Vx, Dyets Inc., Bethlehem, PA, USA.
5) L-Cystine, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.
6) Choline Bitartate, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.
7) Tert-Butylhydroquinone, Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA.
8) Amore Pacific Co., 2-181 Hangangro, Yongsangu, Seoul, Korea.

은 평균 식이 섭취량을 체중 증가량으로 나누어 계산하였다.

식이 효율(FER)=총 체중 증가량(g)/총 식이 섭취량(g)

3. 생화학적 분석

골대사관련 지표 측정을 위해 희생하기 전 24시간 요를 수집하였고, 12시간 동안 절식시킨 후 에테르 마취 하에 복부를 절개하여 대동맥에서 혈액을 채취하였으며, 급속 냉동시킨 후 분석 시까지 −70℃에서 냉동 보관하였다가 생화학적 분석을 하였다. 혈청과 요중 칼슘은 칼슘이 함유되어 있는 시료에 *o*-CPC(*o*-cresolphthalein complexone)를 첨가하여 생성되는 발색 복합물의 흡광도를 570 nm에서 비색정량법으로 측정하였다(Anderegg *et al* 1954). 인은 시료에 몰리브덴산을 첨가하여 생성되는 인-몰리브덴산 복합체의 발색 정도를 340 nm에서 측정한 인-몰리브덴산 비색정량법으로 측정하였다(Daly & Ertings 1972). Alkaline phosphatase(ALP)는 p-nitrophenyl phosphate(PNPP) 기질에 ALP가 함유된 시료를 첨가하여 PNPP를 p-nitrophenol로 분해시킨 후 p-nitrophenol의 발색 정도를 405 nm에서 비색정량법으로 측정하였다(Tietz 1980). 혈청 칼시토닌(calcitonin) 분석은 시험관에 부착된 항체와 I^{125}로 표식된 항체를 사용하여 항원과 항체 간에 'sandwich'를 형성하게 하는 비경쟁 방사면역학적 분석법(non-competitive radioimmunoassay)을 이용하였다(Nanda *et al* 1994). 요중 deoxypyridinoline(DPD)과 creatinine의 측정은 collagen crosslinks™ Kit(Metra Biosytems Inc., USA)을 이용하여 ELISA (enzyme-linked immuno sorvent assay)법에 의해 분석한 후 crosslinks value를 구하였다.

4. 골밀도 및 골함량 측정

골밀도 측정기기는 동물 전용 골밀도 측정기인 PIXImus (GE Lunar Co., Madison, Wisconsin, USA)를 이용하여 척추(spine)와 대퇴골(femur) 부위의 골밀도(bone mineral density, BMD)와 골함량(bone mineral content, BMC)을 측정하였다. 체중은 골밀도와 골함량에 영향을 미치는 요인이므로 골밀도 및 골함량을 체중으로 나누어 체중당 골밀도 및 체중당 골함량으로 제시하였다.

5. 통계처리

본 연구의 실험 결과는 SPSS(IBM SPSS Statistics, version 19)을 이용하여 분석하였다. 각 실험군의 변수들은 평균과 표준편차를 구하여 나타냈으며, 각 군 간의 비교는 ANOVA로 하였고, 군 간의 통계적 유의성은 α=0.05 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 체중 증가량

실험 시작 시 체중 및 실험 종료 시 체중과 실험 기간 6주 동안의 체중 증가량을 Table 2에 나타내었다. 실험 시작 시 체중은 Sham 대조군 206.8 g, Sham 우롱차군 207.2 g, OVX 대조군 206.4 g, OVX 우롱차군 205.9 g으로 각 군 간의 유의적인 차이가 없었다. 실험 종료 시 체중은 Sham 대조군 251.8 g, Sham 우롱차군 254.2 g, OVX 대조군 329.5 g, OVX 우롱차군 316.1 g으로 OVX군이 Sham군에 비해 유의적으로 높았으나, 우롱차 첨가 식이 섭취에 따른 유의적인 차이는 없었다. 6주간의 실험식이 섭취로 인한 체중 증가량도 OVX군이 Sham군에 비해 유의적으로 높게 나타났다.

본 연구에서 실험종료 시 체중과 실험 기간 동안 체중 증가량은 난소 절제군이 Sham군보다 유의적으로 높아, 에스트로겐 부족 상태인 난소 절제 시의 전형적인 체중 증가 현상을 보였다. 이것은 난소 절제로 인한 에스트로겐 분비 결핍으로 에스트로겐의 지방세포의 분화 억제 능력이 결여되어 지방 조직이 축적되기 때문이라고 보고된 이전의 연구 결과와 일치한다(Okasaki *et al* 2002).

난소 절제 쥐에서 우롱차 섭취에 따른 체중 변화는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났는데, 이것은 난소 절제 쥐에

Table 2. The effect of Oolong tea diet on body weight and weight gain in OVX rats

Variables	Sham		OVX	
	Control	Oolongtea	Control	Oolongtea
Initial weight(g)	206.8±5.7[1)a2)]	207.2±3.1[a]	206.4±2.2[a]	205.9±2.6[a]
Final weight(g)	251.8±17.4[a]	254.2±8.1[a]	329.5±11.7[b]	316.1±6.5[b]
Weight gain(g)	45.9±14.5[a]	47.0±8.4[a]	123.0±11.6[b]	110.1±36.1[b]

1) Mean±S.D.
2) Values with different superscripts within the row are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

서 1%의 녹차 분말 첨가 식이를 섭취시킨 경우에 체중 감소에 유의적인 차이가 없었다는 보고(Choi & Jung 2010a)와 일치하지만, 섭취량이 달라 직접 비교하기는 어렵다. 그러나 Iwaniec *et al*(2009)의 연구에서는 렙틴 결핍 수컷 비만 쥐(4주령)를 대상으로 6주간 1%와 2% 녹차 추출물을 섭취시킨 경우 유의적인 체중 감소를 보였다. 또한 성장기(4주령)의 비만쥐에게 6주 동안 2% 디카페인 녹차를 섭취시킨 경우도 유의적인 체중 감소를 보고하였다(Richard *et al* 2009). 또한 차의 주요 catechin인 EGCG 추출물 형태로 복강 투여 시 고함량 EGCG 투여군(85 mg EGCG/kg body weight)은 저함량 EGCG 투여군(26~53 mg EGCG/kg body weight)보다 체중 감소율이 3~4배 이상 많아서 EGCG 함량이 높을수록 체중 감소율이 증가하였다(Kao *et al* 2000). 동물실험에서 녹차의 섭취가 체중 감량 효과를 보인 것은 녹차 catechin이 대사율을 증가시키고 소장의 지방 흡수를 억제시키기 때문이며(Westerterp-Plantenga *et al* 2005), EGCG는 지방세포의 기능을 억제하거나 호르몬 자극에 의한 세포의 증식과 분화 조절을 통하여 세포내 지방 축적을 조절하는 효과가 있는 것으로 보고되었다(Erba *et al* 2005).

본 연구의 우롱차 첨가 식이는 Sham군과 난소 절제군 모두에서 체중 감소에는 영향이 없었는데, 본 연구에서는 우롱차 분말 형태로 식이에 첨가하여서 catechin 추출물 형태로 공급한 선행 연구와 달리 식이에 함유된 순수 catechin 함량이 낮기 때문으로 보여지며, 또한 렙틴 결핍 비만 상태와 에스트로겐 결핍으로 인한 체중 증가에 대해 차의 catechin이 다르게 작용한 것으로 사료된다.

2. 식이섭취량 및 식이효율(FER)

우롱차 첨가 식이가 난소 절제 쥐의 평균 식이 섭취량 및 식이효율에 미치는 영향은 Table 3에 나타내었다. 평균 식이 섭취량은 Sham 대조군 15.4 g, Sham 우롱차군 15.9 g, OVX 대조군 18.0 g, OVX 우롱차군 17.1 g으로 OVX군이 Sham군보다 유의적으로 높았고, 우롱차 첨가 식이 섭취에 따른 유의적인 차이는 없었다. 식이효율도 OVX군이 Sham군보다 유의적으로 높았으나, 우롱차 첨가 식이 섭취에 따른 유의적인 차이는 없었다.

3. 혈중 칼슘과 인의 농도 및 요중 칼슘과 인의 배설량

Table 4는 우롱차 첨가 식이가 난소 절제 쥐의 혈중 칼슘과 인의 농도와 요중 칼슘과 인의 배설량을 나타내었다. 혈중 칼슘 농도는 Sham 대조군 9.3 mg/dL, Sham 우롱차군 9.4 mg/dL, OVX 대조군 9.4 mg/dL, OVX 우롱차군 9.6 mg/dL이었고, 혈중 인의 농도는 Sham 대조군 5.7 mg/dL, Sham 우롱차군 6.3 mg/dL, OVX 대조군 6.8 mg/dL, OVX 우롱차군 7.3 mg/dL로 난소 절제 여부와 우롱차 첨가 식이 섭취에 따른 유의적인 차이가 없었다.

요중 칼슘 배설량은 Sham 대조군 0.12 mg/day, Sham 우롱차군 0.10 mg/day, OVX 대조군 0.09 mg/day, OVX 우롱차군

Table 3. The effect of Oolong tea diet on food intake and food efficiency ratio in OVX rats

Variables	Sham		OVX	
	Control	Oolongtea	Control	Oolongtea
Mean intake (g/day)	15.4±1.7[1)a2)]	15.9±2.0[a]	18.0±1.9[b]	17.1±2.1[b]
FER[3)]	0.08±0.02[a]	0.08±0.01[a]	0.18±0.02[b]	0.16±0.04[b]

1) Mean±S.D.
2) Values with different superscripts within the row are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.
3) FER : food efficiency ratio.

Table 4. The effect of Oolong tea diet on serum calcium and phosphorus, urinary calcium and phosphorus excretion in OVX rats

Variables	Sham		OVX	
	Control	Oolongtea	Control	Oolongtea
Serum Ca (mg/dL)	9.3±0.19[1)]	9.4±0.22	9.4±0.26	9.6±0.34
Serum P (mg/dL)	5.7±0.62	6.3±0.51	6.8±0.43	7.3±0.55
Urinary Ca (mg/day)	0.12±0.05[1)]	0.10±0.03	0.09±0.03	0.11±0.04
Urinary P (mg/day)	5.64±1.10	5.37±1.00	5.41±1.16	6.09±0.97

[1)] Mean±SD.

0.11 mg/day이었고, 요중 인의 배설량은 Sham 대조군 5.64 mg/day, Sham 우롱차군 5.37 mg/day, OVX 대조군 5.41 mg/day, OVX 우롱차군 6.09 mg/day로 실험군간에 유의적인 차이가 없었다.

4. 요중 DPD Crosslinks Value

Table 5에 골용해 지표인 요중 deoxypyridinoline(DPD), creatinine, crosslinks value에 대한 결과를 나타내었다. 요중 DPD 농도는 Sham 대조군 1,039.7 nM, Sham 우롱차군 1,159.0 nM, OVX 대조군 1,255.5 nM, OVX 우롱차군 1,040.1 nM이었고, creatinine 농도는 Sham 대조군 56.3 mM, Sham 우롱차군 74.1 mM, OVX 대조군 63.6 mM, OVX 우롱차군 62.1 mM으로 실험군간에 유의적인 차이가 없었다. 요중 crosslinks value는 Sham 대조군 201.8 nM/mM, Sham 우롱차군 182.7 nM/mM, OVX 대조군 229.8 nM/mM, OVX 우롱차군 197.9 nM/mM으로 OVX 대조군이 Sham 우롱차군보다 유의적으로 높게 나타났다. 난소 절제 여부에 관계없이 우롱차 첨가식이 섭취시 대조군보다 낮은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었다.

5. 혈중 ALP과 Calcitonin 농도

골형성 지표로 혈청 alkaline phosphatase(ALP)와 calcitonin을 측정한 결과를 Table 6에 나타내었다. 혈청 ALP 농도는 Sham 대조군 301.0 U/L, Sham 우롱차군 269.3 U/L, OVX 대조군 273.8 U/L, OVX 우롱차군 309.5 U/L이었고, 혈중 calcitonin 농도는 Sham 대조군 2.90 pg/mL, Sham 우롱차군 3.26 pg/mL, OVX 대조군 3.58 pg/mL, OVX 우롱차군 2.43 pg/mL로 난소 절제 여부와 우롱차 첨가 식이 섭취에 따른 유의적인 차이가 없었다.

Table 5. The effect of Oolong tea diet on urinary DPD crosslinks value on in OVX rats

Variables	Sham		OVX	
	Control	Oolongtea	Control	Oolongtea
DPD (nM)	1,039.7±693.4[1)]	1,159.0±636.6	1,255.5±550.6	1,040.1±337.1
Creatinine (mM)	56.3±29.9	74.1±44.6	63.6±27.1	62.1±28.1
Crosslinks value (nM/mM)	201.8±28.7[ab2)]	182.7±24.8[a]	229.8±37.7[b]	197.9±41.56[ab]

[1)] Mean±S.D.
[2)] Values with different superscripts within the row are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 6. The effect of Oolong tea diet on serum ALP (alkaline phosphatase) and calcitonin in OVX rats

Variables	Sham		OVX	
	Control	Oolongtea	Control	Oolongtea
ALP (U/L)	301.0±79.1[1)]	269.3±62.3	273.8±65.0	309.5±49.8
Calcitonin (pg/mL)	2.90±0.44	3.26±1.49	3.58±1.62	2.43±0.79

[1)] Mean±S.D.

6. 골밀도와 골함량에 미치는 영향

1) 척추 골밀도와 척추 골함량 및 체중 당 척추 골밀도와 척추 골함량

Table 7에 우롱차 첨가 식이가 난소 절제 쥐의 골밀도 및 골함량에 미치는 영향을 알아보기 위해 측정한 척추 골밀도(spine BMD)와 척추 골함량(spine BMC)을 나타내었다. 척추 골밀도는 Sham 대조군 0.156 g/cm^2, Sham 우롱차군 0.157 g/cm^2, OVX 대조군 0.147 g/cm^2, OVX 우롱차군 0.146 g/cm^{2}으로 OVX군이 Sham군보다 유의적으로 낮았고, 우롱차 첨가 식이 섭취에 따른 유의적인 차이는 없었다. 척추 골함량은 Sham 대조군 0.428 g, Sham 우롱차군 0.421 g, OVX 대조군 0.403 g, OVX 우롱차군 0.431 g으로 실험군간에 유의적인 차이가 없었다.

골밀도와 골함량을 체중으로 나눈 값인 체중 당 척추 골밀도와 골함량을 살펴보면 체중 당 척추 골밀도(spine BMD/wt)는 Sham 대조군 0.62 g/cm^2/kg, Sham 우롱차군 0.62 g/cm^2/kg, OVX 대조군 0.44 g/cm^2/kg, OVX 우롱차군 0.49 g/cm^2/kg으로 OVX군이 Sham군보다 유의적으로 낮았으나, 우롱차 첨가 식이 섭취에 따른 유의적인 차이는 없었다. 체중 당 척추 골함량(spine BMC/wt)은 Sham 대조군 1.69 g/kg, Sham 우롱차군 1.67 g/kg, OVX 대조군 1.23 g/kg, OVX 우롱차군 1.43 g/kg으로 OVX군이 Sham군보다 유의적으로 낮았고, Sham군 내에서는 우롱차 첨가 식이 섭취에 따른 유의적인 차이가 없었으나, OVX군 내에서 우롱차 첨가 식이 섭취 시 대조군보다 유의적으로 높게 나타났다.

2) 대퇴 골밀도와 대퇴 골함량 및 체중 당 대퇴 골밀도와 대퇴 골함량

Table 8은 우롱차 첨가 식이가 난소 절제 쥐의 대퇴 골밀도(femur BMD) 및 대퇴 골함량(femur BMC)에 미치는 영향에 대한 결과를 나타내었다. 대퇴 골밀도는 Sham 대조군 0.196 g/cm^2, Sham 우롱차군 0.193 g/cm^2, OVX 대조군 0.186 g/cm^2, OVX 우롱차군 0.192 g/cm^{2}로 OVX 대조군이 Sham군보다 유의적으로 낮았고, Sham군과 OVX군 내에서 우롱차 첨가 식이 섭취에 따른 유의적인 차이는 없었다. 대퇴 골함량은 Sham 대조군 0.386 g, Sham 우롱차군 0.385 g, OVX 대조군 0.385 g, OVX 우롱차군 0.388 g으로 실험군간에 유의적인 차이가 없었다.

대퇴 골밀도를 체중으로 나눈 체중당 대퇴 골밀도(femur BMD/wt)는 Sham 대조군 0.78 g/cm^2/kg, Sham 우롱차군 0.77 g/cm^2/kg, OVX 대조군 0.57 g/cm^2/kg, OVX 우롱차군 0.64

Table 7. The effect of Oolong tea diet on spine BMD and BMC in OVX rats

Variables	Sham		OVX	
	Control	Oolongtea	Control	Oolongtea
Spine BMD (g/cm^2)	0.156±0.007[1)b2)]	0.157±0.008[b]	0.147±0.005[a]	0.146±0.010[a]
Spine BMC (g)	0.428±0.043	0.421±0.029	0.403±0.025	0.431±0.017
Spine BMD (g/cm^2)/wt (kg)	0.62±0.04[1)b2)]	0.62±0.03[b]	0.44±0.02[a]	0.49±0.10[a]
Spine BMC (g)/wt (kg)	1.69±0.13[c]	1.67±0.09[c]	1.23±0.08[a]	1.43±0.21[b]

1) Mean±S.D.
2) Values with different superscripts within the row are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 8. The effect of Oolong tea diet on femur BMD and BMC in OVX rats

Variables	Sham		OVX	
	Control	Oolongtea	Control	Oolongtea
Femur BMD (g/cm^2)	0.196±0.007[1)b2)]	0.193±0.005[b]	0.186±0.006[a]	0.192±0.007[ab]
Femur BMC (g)	0.386±0.019	0.385±0.021	0.385±0.019	0.388±0.014
Femur BMD (g/cm^2)/wt (kg)	0.78±0.04[c]	0.77±0.02[c]	0.57±0.02[a]	0.64±0.11[b]
Femur BMC (g)/wt (kg)	1.52±0.07[c]	1.53±0.08[c]	1.18±0.04[a]	1.28±0.17[b]

1) Mean±S.D.
2) Values with different superscripts within the row are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

g/cm^2/kg으로 OVX군이 Sham군보다 유의적으로 낮았다. Sham 군내에서는 우롱차 첨가 식이 섭취에 따라 체중당 대퇴 골밀도는 유의적인 차이가 없었으나 OVX군 내에서 우롱차 첨가 식이 섭취 시 대조군보다 유의적으로 높게 나타났다. 체중 당 대퇴 골함량(femur BMC/wt)은 Sham 대조군 1.52 g/kg, Sham 우롱차군 1.53 g/kg, OVX 대조군 1.18 g/kg, OVX 우롱차군 1.28 g/kg으로 OVX군이 Sham군보다 유의적으로 낮았고, Sham 군 내에서는 우롱차 첨가 식이 섭취에 따른 유의적인 차이가 없었으나, OVX군 내에서 우롱차 첨가 식이 섭취시 대조군보다 유의적으로 높게 나타나 체중당 대퇴 골밀도와 같은 경향을 나타내었다.

우롱차가 골격대사에 미치는 영향을 분석한 선행 연구가 없어 직접적인 비교는 할 수 없기 때문에 본 연구 결과를 차의 폴리페놀이 골격에 미치는 영향을 분석한 여러 선행 연구와 비교하여 고찰해보면 다음과 같다. *In vitro* 선행 연구(Oka *et al* 2012)에서 차의 폴리페놀이 osteoclast 형성에 미치는 영향을 분석하기 위해 7일간 10 μM과 100 μM 농도의 TFDG (theaflavin-3,3'digallate)와 EGCG(epigallocatechin-3-gallate)를 투여하여 쥐의 osteoclast 전구세포를 배양한 결과, 10 μM TFDG와 EGCG를 투여한 osteoclast는 대조군에 비해 osteoclast가 더 감소하였고, 특히 10 μM TFDG를 투여한 경우 대조군 배양보다 현저하게 감소하여 79.4% 수준으로 나타났다. 100 μM TFDG와 EGCG는 대조군보다 osteoclast 수가 유의적으로 감소하여서 차 폴리페놀은 용량 의존적(dose-dependent)으로 osteoclast 형성을 억제하는 것으로 나타났다. 이 연구 결과에서 TFDG는 EGCG보다 효과적으로 osteoclast 형성과 분화를 억제하여서 발효차의 주성분인 theaflavin은 골밀도 감소를 지연시키는데 효과적인 것으로 보여진다(Oka 2012). 본 연구 결과에서도 우롱차 첨가 식이 섭취로 체중당 척추 골함량, 체중당 대퇴골밀도 및 골함량이 유의적으로 증가하여 선행 연구의 결과와 같이 우롱차의 theaflavin이 골손실을 지연시키는 것으로 나타났다.

차의 폴리페놀 섭취로 인한 골밀도와 항산화 활성의 관련성을 제시한 Shen *et al*(2008)은 녹차 폴리페놀 섭취는 두 수준(0.1%와 0.5%) 모두에서 난소 절제 쥐의 대퇴 골밀도를 유의적으로 높였고, 간조직의 GPX(glutathione peroxidase) 활성은 0.5% 녹차 폴리페놀 섭취 시에만 유의적으로 가장 높게 나타났는데, 이러한 녹차 폴리페놀의 골 보호 작용은 항산화 활성이 증가하여 산화 스트레스에 의한 골 손상이 감소한 것에서 기인하는 것으로 보고되었다(Shen *et al* 2008). 수컷 골다공증 모델인 androgen 결핍 노령 쥐를 대상으로 16주간 음수의 형태로 0.5% GTP(green tea polyphenol, 사람의 경우 매일 4잔의 녹차 섭취와 유사한 수준에 해당)을 공급한 선행 연구(Shen *et al* 2011a)에서는 GTP 보충은 혈청 osteocalcin 농도, 대퇴(femur) 골밀도, 해면골량(trabecular volume), 강도를 증가시켰고, 경골(tibia) 골 형성과 해면골량 및 두께를 증가시키는 것으로 나타났다. 이는 차 폴리페놀의 항산화능으로 기인하여 골흡수를 억제하는 반면 골 형성을 증가시킴으로써 해면골과 치밀골 손실을 감소시키는 것으로 보고하였다(Shen *et al* 2011a). 만성염증으로 유도된 골손실 암컷 쥐를 대상에서 0.5% GTP 섭취는 혈청 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 농도를 유의적으로 감소시켰고 비장에서 염증 수준을 나타내는 cyclooxygenase-2(COX-2)와 tumor necrosis factor-α(TNF-α)의 mRNA 수준을 유의적으로 감소시켰으며, 대퇴 골밀도와 골함량은 유의적인 차이는 아니지만 증가시키는 경향을 보여, 녹차 폴리페놀의 염증 억제 조절로 인한 항염증 작용은 골다공증 위험을 감소시킬 수 있을 것으로 제시하였다(Shen *et al* 2010).

골감소증을 가지고 있는 폐경 후 여성을 대상을 매일 500 mg의 녹차 폴리페놀을 공급한 결과, 섭취 3개월째에 골대사 지표인 BAP/TRAP ratio(bone-specific alkaline phosphatase/ tartrate-resistant acid phosphatase)가 녹차 폴리페놀을 섭취하지 않은 대조군 폐경여성보다 유의적으로 높게 나타났는데, 이는 BAP/TRAP ratio의 증가는 골형성이 증가되거나 골흡수가 감소되었을 경우 골교체율의 상태를 반영하는 것으로 녹차 폴리페놀의 섭취로 골흡수보다 골형성이 증가하였기 때문으로 보고하였다(Shen *et al* 2011b).

이상의 선행 연구에서 각기 다른 모델을 대상으로 다양한 지표를 이용하여 녹차의 폴리페놀이 골격에 미치는 영향을 연구한 결과, 차의 섭취는 골격에 유익하게 작용하는 것으로 보고하였다. 본 연구는 5% 우롱차 첨가 식이가 난소 절제 쥐에서 척추와 대퇴의 골밀도와 골함량에 미치는 영향을 분석하였는데 우롱차 첨가 식이는 난소 절제 쥐의 골격 손실을 억제하는 것으로 나타나 선행 연구 결과와 일치하였다(Oka *et al* 2012, Shen *et al* 2008). 그러나 본 연구와 실험 조건이 동일한 난소 절제 쥐를 대상으로 6주간 비발효차인 녹차 분말 첨가 식이를 1% 수준으로 공급한 연구에서 6주간의 녹차 식이는 척추 및 대퇴 골밀도와 골함량에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났는데(Choi & Jung 2010b), 동일한 실험기간동안 골밀도에 미치는 차의 효과가 다른 것은 발효 정도에 따른 차 종류의 차이보다 식이에 함유된 차 첨가량의 차이로 판단된다.

반면, 차에 함유된 폴리페놀인 catechin과 식이섬유는 칼슘 등 무기질과 결합하여 흡수에 불리하게 작용할 수 있는데, 성장기에 다량의 녹차 추출물 섭취가 골격에 부정적인 영향을 미칠 수 있는 것으로 제시하였다(Iwaniec *et al* 2009). 녹차 추출물의 수준별(1%와 2%) 섭취가 성장기 마우스의 골 대사에 미치는 영향을 분석한 결과에서 마우스의 전골,

대퇴골, 척추의 골 부피는 녹차 추출물을 섭취하지 않은 대조군에 비해 수준별과 상관없이 유의적으로 낮았고, 특히 대퇴골의 피질골 부위와 척추의 해면골은 녹차 추출물의 섭취 수준이 높을수록 골의 부피가 유의적으로 더 낮았다. 그리고 녹차 추출물의 종류에 따라 골격 부위에 다르게 영향을 주어 피질골(midshaft) 부위의 골밀도와 부피 및 두께는 유의적으로 감소시켰으나, 해면골(distal) 부위의 부피에는 유의적인 차이가 없었다(Iwaniec *et al* 2009).

본 연구에서 반발효차인 우롱차 분말 5% 첨가 식이는 난소 절제 쥐에서 체중당 대퇴골밀도, 체중당 척추 골함량, 체중당 대퇴 골함량이 유의적으로 높게 나타났는데, 이는 우롱차 섭취에 따른 골밀도 분석을 보고한 선행 연구가 없어 직접적인 비교는 할 수 없지만, 녹차 분말 1% 첨가 식이가 골밀도에 미치는 영향을 보고한 선행 연구(Choi & Jung 2010a)와 비교하여 식이 중 차의 첨가량을 높임으로 인해 차에 함유된 폴리페놀 섭취량이 증가하였기 때문으로 보여진다. 이상의 결과에서 5% 우롱차 분말 첨가 식이는 난소 절제 쥐에서 골대사에 유리한 것으로 나타났으나, 추후 체계적인 연구가 보완되어야 할 것으로 사료된다.

요약 및 결론

본 연구는 난소 절제 쥐를 대상으로 우롱차 첨가 식이를 6주간 공급한 후, 척추 및 대퇴 골밀도와 골함량, 골형성 및 골용해 지표, 골대사 관련 호르몬을 측정하여 골밀도 및 골대사 지표에 미치는 영향을 분석한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 실험 시작 시 체중은 실험군 간에 유의적인 차이가 없었으며, 6주간의 실험식이 섭취 후 체중 증가량은 OVX군이 Sham군보다 유의적으로 높았으나, 우롱차 첨가 식이 섭취에 따른 유의적인 차이는 없었다.

2. 혈중 칼슘 및 인의 농도, 요중 칼슘과 인의 배설량은 난소 절제 여부와 우롱차 첨가 식이 섭취에 따른 유의적인 차이가 없었다.

3. 요중 crosslinks value는 OVX군 내에서 우롱차 첨가 식이 섭취 시 낮은 경향을 보였다.

4. 혈중 ALP(alkaline phosphatase)와 calcitonin 농도는 난소 절제 여부와 우롱차 첨가 식이 섭취에 따른 유의적인 차이가 없었다.

5. 척추 골밀도는 OVX군이 Sham군보다 유의적으로 낮았고 우롱차 첨가 식이 섭취에 따른 유의적인 차이는 없었으며, 척추 골함량과 대퇴 골함량은 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다.

6. 대퇴 골밀도는 OVX 대조군이 Sham군보다 유의적으로 낮았고 OVX군 내에서도 우롱차 첨가 식이 섭취 시 높은 경향이었으나 유의적인 차이가 없었다.

7. 체중당 골밀도 및 체중당 골함량은 OVX군이 Sham군보다 유의적으로 낮았고, OVX군 내에서는 우롱차 첨가 식이 섭취 시 체중당 대퇴 골밀도, 체중당 척추 골함량, 체중당 대퇴 골함량이 유의적으로 높게 나타났다.

결론적으로 5% 우롱차 첨가 식이는 난소 절제 쥐의 골손실을 지연시키는데 유리한 것으로 나타났다.

문 헌

Almeida M, Han L, Martin-Millan M, Plotkin LI, Stewart SA, Roberson PK, Kousteni S, O'Brien CA, Bellido T, Parfitt AM, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC (2007) Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids *J Biol Chem* 282: 27285-27297.

Anderegg G, Flaschka H, Sallmann R, Schwarzenboch G (1954) Metal indicators. *Helvet Chem Acta* 37: 111-120.

Choi MJ, Jung YJ (2010a) Effects of green tea powder on bone mineral density and bone mineral content in ovariectomized rats fed calcium-deficient diet. *Journal of the Korean Tea Society* 16: 99-105.

Choi MJ, Jung YJ (2010b) Effects of green tea powder on bone mineral density and bone mineral content in ovariectomized rats. *Journal of the Korean Tea Society* 16: 89-94.

Daly JA, Ertings HG (1972) Direct method for determing inorganic phosphate in serum with the centrifichem. *Clin Chem* 18: 263-265.

Erba D, Riso P, Bordoni A, Foti P, Biagi PL, Testolin G (2005) Effectiveness of moderate green tea consumption on antioxidative status and plasma lipid profile in humans. *J Nutr Biochem* 16: 144-149.

Harris SS, Dawson-Hughes B (1994) Caffeine and bone loss in healthy postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 60: 573-578.

Hegarty V, May H, Khaw K (2000) Tea drinking and bone mineral density in older women. *Am J Clin Nutr* 71: 1003-1007.

Henning SM, Fajardo-Lira C, Lee HW, Youssefian AA, Go VLW, Heber D (2003) Catechin content of 18 teas and a green tea extract supplement correlated with the antioxidant capacity. *Nutr Cancer* 45: 226-235.

Iwaniec UT, Turner RT, Koo SI, Kaur R, Ho E, Wong CP, Bruno RS (2009) Consumption of green tea extract results in osteopenia in growing male mice. *J Nutr* 139: 1914-1919.

Jung CH, Kang ST, Joo OS, Lee SC, Shin YH, Shim KH,

Cho SH, Choi SK, Heo HJ (2009) Phenolic content, antioxidant effect and acetylcholinesterase inhibitory activity of Korean commercial green, puer, oolong and black teas. *Korean J Food Preserv* 16: 230-237.

Kanis J, Johnell O, Gullberg B, Allander E, Elffors L, Ranstam J, Dequeker J, Dilsen G, Gennari C, Vaz A, Lyritis G, Mazzuoli G, Miravet L, Passeri M, Perez Cano R, Rapado A, Ribot C (1999) Risk factors for hip fracture in men from southern Europe: the MEDOS study. Mediterranean Osteoporosis Study. *Osteoporos Int* 9: 45-54.

Kao YH, Hiipakka RA, Liao S (2000) Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. *Endocrinology* 141: 980-987.

Kim YK, Moon JS, Ryu SH, Lee SH, Kim YS (2010) The relationship between the popular beverages in Korea and reported postprandial heartburn. *Korean J Gastroenterol* 55: 109-118.

Kuo KL, Weng MS, Chiang CT, Tsai YJ, Lin-Shiau SY, Lin JK (2005) Comparative studies on the hypolipidemic and growth suppressive effects of oolong, black, pu-erh, and green tea leaves in rat. *J Agric Food Chem* 53: 480-489.

Lee YS (2000) Introduction of experimental animal study. Charoon. pp 126-127.

Leung LK, Su Y, Chen R, Zhang Z, Huang Y, Chen ZY (2001) Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *J Nutr* 131: 2248-2251.

Nanda N, Joshi H, Subbarao SK, Sharma VP (1994) Two-site immunoradiometricassay (IRMA): detection, efficiency, and procedural modifications. *J Am Mosq Control Assoc* 10: 225-227.

Oka Y, Iwai S, Amano H, Irie Y, Yatomi K, Ryu K, Yamada S, Inagaki K, Oguchi K (2012) Tea polyphenols inhibit rat osteoclast formation and differentiation. *J Pharmacol Sci* 118: 55-64.

Okazaki R, Inoue D, Shibata M, Saika M, Kido S, Ooka H, Tomiyama H, Sakamoto Y, Matsumoto T (2002) Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. *Endocrinology* 143: 2349-2356.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents. *J Nutr* 123: 1939-1951.

Richard D, Kefi K, Barbe U, Poli A, Bausero P, Visioli F (2009) Weight and plasma lipid control by decaffeinated green tea. *Pharmacol Res* 59: 351-354.

Shen CL, Cao JJ, Dagda RY, Tenner TE Jr, Chyu MC, Yeh JK (2011a) Supplementation with green tea polyphenols improves bone microstructure and quality in aged, orchidectomized rats. *Calcif Tissue Int* 88: 455-463.

Shen CL, Chyu MC, Yeh JK, Zhang Y, Pence BC, Felton CK, Brismée JM, Arjmandi BH, Doctolero S, Wang JS (2011b) Effect of green tea and Tai Chi on bone health in postmenopausal osteopenic women: a 6-month randomized placebo-controlled trial. *Osteoporos Int* 23: 1541-1552.

Shen CL, Wang P, Guerrieri J, Yeh JK, Wang JS (2008) Protective effect of green tea polyphenols on bone loss in middle-aged female rats. *Osteoporos Int* 19: 979-990.

Shen CL, Yeh JK, Cao JJ, Tatum OL, Dagda RY, Wang JS (2010) Green tea polyphenols mitigate bone loss of female rats in a chronic inflammation-induced bone loss model. *J Nutr Biochem* 21: 968-974.

Shen CL, Yeh JK, Cao JJ, Wang JS (2009) Green tea and bone metabolism. *Nutr Res* 29: 437-456.

Tietz NW (1980) Alkaline phosphatase study group, committee on standards of the AACC, subcommittee on enzymes. Progress in the development of a recommended method for alkaline phosphatase activity measurements. *Clin Chem* 26: 1023-1027.

Westerterp-Plantenga MS, Lejeune MP, Kovacs EM (2005) Body weight loss and weight maintenance in relation to habitual caffeine intake and green tea supplementation. *Obes Res* 13: 1195-1204.

Yang CS, Chung JY, Yang G, Chhabra SK, Lee MJ (2000) Tea and tea polyphenols in cancer prevention. *J Nutr* 130: 472S-478S.

Yang CS, Landau JM (2000) Effect of tea consumption on nutrition and health. *J Nutr* 130: 2409-2412.

Yoshino K, Yamazaki K, Sano M (2010) Preventive effects of black tea theaflavins against mouse type IV allergy. *J Sci Food Agric* 90: 1983-1987.

접 수: 2012년 5월 17일
최종수정: 2012년 8월 23일
채 택: 2012년 8월 23일