폐경기 여성의 골다공증 예방 및 치유를 위한 우유의 연구

전병주 · 곽해수

세종대학교 식품공학과

폐경기 여성의 골다공증 예방 및 치유를 위한 우유의 연구

전병주 · 곽해수
세종대학교 식품공학과

Ⅰ. 서 론

골다공증은 노령화에 따른 골격 대사 이상 또는 뼈 칼슘 대사의 불균형으로 인한 질환 중 가장 전형적인 것으로, 뼈의 골질량(bone mass) 또는 골밀도(bone density)가 감소함으로써 쉽게 골절을 초래하는 증후군을 말한다[1]. 골다공증의 유발 요인은 다요인적(multifactorial)이고, 복합적인 것으로 알려져 있는데[2], 즉 인종, 연령, 성별, 내분비 호르몬, 신체 활동 등 유전적, 생리적, 환경적 요인뿐 아니라 단백질, 미네랄, 비타민, 섬유소 등의 영양적 요인들이 상호 복합적으로 관여된다고 보도되어 왔다[3]. 골은 파골세포(osteoclast)에 의해 골흡수가 일어나고, 조골세포(osteoblast)에 의하여 새로운 골 조직으로 대치함으로서 골의 생체 기계적 능력(biomechanical competence)을 유지하게 되지만[4], 여성의 폐경 이후 호르몬의 분비 장애와 더불어 골다공증 증상이 나타나게 되면, 조직의 하나인 골의 항상성이 깨어져 골밀도의 감소가 일어나게 된다. 최근 골다공증을 완화시키는 방법으로 호르몬 대체 요법(hormone replacement therapy)이 중요시 되는데, 이를 장기간 사용시 자궁암, 유방암, 전립선암 등의 발병율을 증가시키는 부작용을 일으킨 다는 사실이 밝혀졌다[5].

이소플라본(isoflavone)은 식물성 에스트로겐(phytoestrogen)의 일종으로 최근 여성 호르몬과 유사 작용이 밝혀져 갱년기 이후 여성들의 높은 관심사가 되고 있다[6]. 이소플라본의 주된 기능으로는, 여성 호르몬 수용체에 인식되어 갱년기 장해나 폐경 후 증상(안면 홍조, 발한, 불면)의 예방과 해소의 측면이 있고, 특히 폐경 후 여성의 골다공증 발병 위험을 줄여줄 수 있는데, 이는 골다공증 치료 약물인 ipriflavone과 구조적으로 유사하다는 점 때문이고, 이러한 뼈조직에 대한 선택적 효과 때문에 폐경기 이후 여성에서 에스트로겐 분비 부족으로 인한 골 소실의 위험을 낮춰줄 수 있다고 보고되었다[7].

한편 우유에는 대부분의 영양소를 골고루 함유하고 있고 칼슘과 같은 다양한 생리 활성 물질도 많이 함유하고 있지만, 폐경기 이후에는 이러한 우유 칼슘이 뼈 생성에 활용되지 않는다. 이러한 점을 극복하기 위해서 여성 호르몬의 기능을 가진 isoflavone을 우유에 첨가하게 되면 우유내 영양 성분과 더불어 폐경기 이후의 여성의 골다공증 예방과 치료에 효과적일 것이라 생각된다. Isoflavone을 식품에 직접 첨가할 경우 isoflavone 특유의 색의 변화, 이미, 이취를 발생시키게 되는데, 이를 방지하기 위해 미세 캡슐화(microencapsulation) 기술을 사용한다. 캡슐화 기술은 고체, 액체, 기체상의 핵물질(core material)을 특정 조건 하에서 피복 물질(coating material)로 포장하는 기술이라 할 수 있다.

골다공증의 표본으로는 난소 제거술로 골다공증을 유발시킨 흰쥐가 주로 이용되는데[8], 이는 난소 적

출 후 골다공증의 유발 여부의 확인과 진행 정도에 따른 민감도, 특이도를 신속히 판단할 수 있고, 이에 따른 치료 방법 및 예방의 효율성을 증대시킬 수 있는 중요한 방법이기 때문이다. 골다공증을 평가하는 방법으로는 생화학적 표지자(혈청, 뇨)를 이용하는 방법, 골밀도, 강도 검사 방법, 조직학적 방법 등이 있다[9]. 생화학적 표지자를 이용하는 방법은 주로 혈액이나 소변을 이용한 방법으로 전신의 골대사를 반영한다는 점에서 주로 이용되고 있으며, 주로 골 형성과 골 흡수를 반영하는 지표로 나뉘어진다[10]. 또한 골밀도를 검사하는 방법은 단위 면적당 골질량을 수치화하는 것이며, 골의 질량 감소와 골절을 예상, 진단하는 방법으로 매우 민감하다고 할 수 있으며, 골강도 검사는 골의 파단력을 측정하여, 골의 강도와 최대 하중 등을 측정하는 방법이라 할 수 있다. 골의 조직학적 방법[11]은 골조직을 박편화하여 주로 선택 부위의 성장판 아랫 부분을 측정하여, 그 골다공증의 정도를 해석하는 것인데, 이는 주관적이고 객관성이 결여되어 있다는 단점이 있어, 이러한 단점을 최소화하기 위하여 최근에는 골의 조직 형태 계측적 방법(histomorphometric technique)을 사용하기도 한다[9].

골다공증은 폐경기 이후 대부분의 여성에게 나타나는 대표적인 갱년기 질환으로 이를 조기 진단하고 예방하는 효과적인 방법이 시급히 필요하므로, 이에 본 연구에서는 흰쥐 동물 모델에 난소를 인위적으로 절제함으로써 골다공증을 유도하였고, 이들을 일정군으로 나누어 일반 식이에 칼슘, 비타민 D, K로 구성된 성분을 첨가, 공급하고 캡슐화한 이소플라본이 첨가된 우유 등을 투여하여 생화학적 표지자, 골밀도, 골강도, 골조직 등을 관찰함으로써, 조합물의 골다공증에 대한 개선 효과를 조사하는 것을 목적으로 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 실험 재료

실험에 사용된 이소플라본은 (주)바이오랜드로부터 제공받은 이소본이며, 거의 대부분이 배당체 glycone의 형태를 가지고 있다. 이는 대두 추출물을 정제한 것이며, 총 isoflavone의 함량이 약 34% 정도 된다. 이소플라본을 캡슐화하기 위해 사용된 coating material은 (주)일신유화에서 구입한 fatty acid ester인 MCT(medium chain triglyceride)를 사용하였고, 이들은 모두 식품 첨가물 등급이었다. 여기서 사용된 칼슘은 비타민 하우스에서 공급하는 유청 칼슘 40.9%인 밀크 칼슘 제품이며, 비타민 D_3는 화일약품에서 공급하는 활성도 108,893 IU의 분말 형태이며, 식품 첨가용을 사용하였다. 비타민 K_1은 (주)인성케미칼에서 공급받았으며, 총 비타민 함량이 5%인 식품 첨가용 분말 제품을 사용하였다.

2. 실험 대상

본 연구는 4주령인 체중 70~90g의 Sprague-Dawley 종 암컷 흰쥐 30마리를 중앙실험동물(주)로부터 구입하여 사용하였다. 각각은 스테인레스 스틸 케이지 안에서 사육하였으며, 초기 1주일간 실험동물용 사료를 공급하며 적응하는 기간을 두었다. 실험실의 온도는 22±2℃, 습도는 40~60%로 하였고, 명암은 12시간마다 주기적으로 반복되게 하였으며, 식수는 수돗물을 제한 없이 공급하였다.

3. 실험 방법

(1) 미세 캡슐의 제조

MCT로 coating한 수용성 isoflavone의 미세 캡슐 제조 방법은 다음과 같다. 액상의 MCT(medium chain triglyceride)와 수용성 isoflavone을 일정 비율로 혼합하여 2,000rpm의 속도로 1분간 교반하였다. 이 혼합액을 W-300 spray gun(Wagner Spray Tech. Co. Markdorf. Germany)으로 0.05%의 Tween-60이 용해된 5℃의 분산액에 분무하고 이 분무액을 4,520×g에서 10분간 원심분리하여 캡슐화된 상층부와 캡슐화 되지 않은 여액으로 분리하고 상층부를 취하여 동량의 Tween-60 분산액을 가해 원심분리를 1회 더 실시하여 캡슐화 되지 않은 수용성 isoflavone을 제거하여 미세 캡슐을 제조하였다[12].

(2) 수율 측정

미세 캡슐화 한 수용성 isoflavone의 수율 측정은 간접적인 방법에 의하여 수용성 isoflavone을 분무한 분산액에서 미세캡슐 외부 용액에 존재하는 수용성 isoflavone의 양을 측정하여 미세 캡슐 내부에 존재하는 수용성 isoflavone 량을 계산하는 방법을 사용하였고, 원심분리하여 얻은 미세 캡슐의 외부 용액을 적당량 취하여 HPLC의 시료로 사용하였다. HPLC 분석시 사용된 column은 Waters 사(USA)의 μ-Bondapak C_{18} column, detecter는 254nm UV detector(Shimazu, Japan)를 사용하였으며, injection volume은 20 μl로 하였다. Mobile phase A, B는 20%, 60% methanol을 사용하였으며, solvent gradient는 시료 주입 후 mobile phase A를 100으로 시작하여 50분까지 mobile phase B가 100으로 직선적으로 상승시켰으며, 그 후 60분까지 mobile phase A를 100%로 하였으며, 그 후 65분까지 mobile phase A를 100%로 유지하여 detector와 column을 안정화 시켰다.

(3) 동물 실험

1) 난소 절제 수술

6주령 흰쥐(100~130g)에 염산 케타민 1ml/kg(체중)을 복강 투여하여 흰쥐를 마취시켰다. 마취 후 등 양쪽 부위의 털을 넓게 완전히 제거한 후, 제거된 부분을 포비돈으로 소독하여 무균 조작 하에서 수술을 시행하였다. 먼저 흰쥐의 등 왼쪽 척추뼈 하단 부위(갈비뼈와 다리 뼈 사이 부분)의 외피부 조직을 실험용 안과 가위로 1.5cm 가량 자른 후, 복근 및 복막 조직을 잇달아 자른다. 이후 난소를 꺼내어 겸자로 고정시키고, 봉합사로 결찰한 후 난소를 완전히 제거한다. 멸균 봉합사를 이용하여 복막, 복근, 외피를 순서대로 봉합하고, 이와 같은 과정을 반대쪽도 동일하게 실행하였다. 수술 1일 후 일정량의 항생제를 투여하였으며, 약 일주일 정도의 회복기를 가졌다. Sham 군은 난소를 꺼낸 후 제거하지 않고 다시 제자리에 넣어 복막, 복근, 외피를 봉합하는 모의 수술(Sham operation)을 실시하였다.

2) 군 설정 및 사료 투여

실험은 난소 절제 수술을 한 4군(OVX, OVX+Vit+Ca, OVX+Iso, OVX+Iso+Vit+Ca)과 수술을 하지 않은 Sham군(정상군) 등, 총 5군으로 나누어 실행하였으며, 각 군을 6마리로 구성하였는데, 각 군의 사료 구성은 다음과 같다. 우선 OVX(대조군)과 Sham군은 일반사료(AIN-76 Purified Diet)만을 공급하였고, OVX+Vit+Ca 군은 일반 사료에 칼슘, 비타민 D, 비타민 K를 배합하여 공급하였다. OVX+Iso군은 일반 사료를 공급하고, 일정량의 우유에 캡슐화 된 이소플라본을 분산하여 경구 투여하였으며, OVX+Iso+Vit+Ca 군은 일반 사료에 칼슘, 비타민 D, 비타민 K를 배합하여 공급하고, 우유에 캡슐화된 이소플

라본을 분산하여 경구 투여하였다. 일반 사료와 칼슘, 비타민 사료는 가루 형태로 혼합하여 pellet 형태로 만들어(Fuji Paudal Co. Ltd. Pelleter, 한국식품개발연구원) 공급하였으며, 각 군 모두 매일 동일한 양의 우유를 경구 투여하였다. 사료는 19주 동안 투여하였으며, 모든 군에 대한 물, 일반 사료, 조합물 사료는 무제한 공급하였다.

3) 체중, 섭취량, 뼈무게, 길이

체중은 수술 시작 전 각 군의 체중과 수술 시행 19주 후의 체중을 측정하였고, 일일 체중 증가량은 19주 후 측정된 체중에서 수술 시작 전 체중을 빼 준 값을 실험 기간으로 나누어 주었다. 섭취량은 수술 후 식이를 공급할 때부터 1주일에 2번 적당한 양을 공급하여 그 섭취량을 측정하였다. 대퇴골, 경골의 무게는 수술 후 19주 만에 희생시켜 랫드의 좌측 대퇴골, 경골을 취하여, 근육, 지방, 인대 등을 제거한 상태로 습중량(wet weight)을 측정하였으며, 체중에 대한 대퇴골, 경골의 무게의 비율은 체중에 대한 무게를 계산하여 산출하였다. 뼈의 길이는 대퇴골, 경골을 각각 calipers를 이용하여 측정하였다.

4) 시료의 수집

소변은 실험 종료 일주일전 두 번에 걸쳐 metabolic cage((주)중외제약)를 이용하여 각각 24시간 동안 채취한 후 -20℃에서 냉동 보관하였다. 혈액 채취를 위해 수집 12시간 전 랫드를 절식시키고, 안구를 통하여 채혈하였다. 혈액은 항응고제인 heparin 처리가 되어 있는 tube에 수집되었고, 이를 4,000rpm에서 15분간 원심 분리하여, 상층액에 뜬 혈청을 수집하였다. 수집된 혈청은 분석 전까지 -20℃의 냉동고에 보관되었다.

5) 생화학적 검사

① Alkaline Phosphatase

- TALP의 측정

TALP의 측정은 p-nitrophenylphosphate를 기질로 하여 ALP의 발색 정도를 보는 Bessey-Lowry법에 따랐다[13]. 준비된 혈청을 4℃에서 24시간 해동하여 사용하였는데, test tube에 stock substrate sol.(p-nitrophenylphosphate : Sigma Chem. Co. USA) 0.5ml와 alkaline buffer sol.(2-amino-2-methyl-1-propanol : Sigma Chem. Co. USA) 0.5ml를 혼합하고, 해동한 혈청 0.1ml를 첨가하여 37℃에서 30분간 incubation 하였다. 이 용액에 0.05N NaOH 10ml를 작용시켜 정색 반응을 얻어 blank를 대조로 UV spectrophotometer(DU 650, Beckman Instruments. Inc., California, USA)를 이용하여 420nm에서 흡광도를 측정하고, 이 용액에 HCl 몇 방울 첨가 혼합 후 420nm에서 흡광도를 측정하여 얻은 값을 뺀 수치를 TALP치로 하였다.

- BALP의 측정

BALP의 침전은 wheat germ agglutinin이 혈청내 BALP의 N-acetylglucosamine과 결합하는 성질을 이용한 Rosalki and Ying Foo[14] 방법에 따랐다. 혈청을 4℃에서 24시간 해동하고, lectin sol.은 wheat germ agglutinin(*Triticum vulgaris* wheat germ lectin. Sigma Chem. Co. USA)을 5g/L의 비율로 희석하여 만들었으며, Triton-X 100 sol.은 Triton-X surfactant(Sigma Chem. Co. USA)를 20g/L의 비율로 희석하여 준비하였다. 준비된 혈청 50㎕에 동량의 lectin sol.을 첨가한 뒤 37℃에

30분간 incubation 하고, 이 용액에 Triton-X 100 sol.을 5㎕ 첨가하여 잘 혼합하고 37℃에서 30분간 다시 incubation 하였다. 이렇게 얻은 serum mixture를 2,000rpm에서 15분간 원심분리하여 상청액과 침전물로 분리하였는데, 침전물에는 혈청 내에 존재하는 BALP가 wheat germ agglutinin과 결합하여 있다. 그러므로 침전된 나머지 부분 즉, 상청액을 약 0.1ml 정도 취하여 TALP의 측정법과 동일한 방법으로 ALP 치를 측정하였고, BALP는 TALP에서 상청액의 ALP 치를 빼고 남은 값으로 하였다. B/T는 TALP 중에 차지하고 있는 BALP를 백분율로 하여 계산하였다.

② Osteocalcin

혈청 내 osteocalcin의 양를 측정하기 위해 RIA법(Radio Immuno Assay: 방사면역 측정법)으로 하였는데, Osteocalcina Myria(Techno Genetics사) 시약을 이용하여 Cobra Ⅱ γ-counter(Packard, USA)로 측정하였다.

③ Ca, P

혈중 Ca의 양은 OCPC 법으로 측정하였는데, Wako R1 R2(Wako) 시약을 이용하여 Tosiba-200FR, Olympus(Hitachi)로 측정하였다.

혈중 P의 양은 일반 비색법으로 측정하였는데, Inorganic phosphorus(Wako)를 이용하여 Tosiba-200FR, Olympus(Hitachi)로 측정하였다.

④ Deoxypyridinoline

소변 중 deoxypyridinoline의 양을 측정하기 위해 EIA법(Enzyme Immuno Assay : 효소 면역 측정법)으로 하였는데, Metra Dpd EIA Kit를 이용하여 Cobra Ⅱ γ-counter(Packard, USA)로 측정하였다.

⑤ Hydroxyproline

소변 중 hydroxyproline의 양을 측정하기 위해 우선 각각의 소변을 원심분리한 후, 상청액 400㎕을 eppendorf tube에 넣는다. 여기에 6M HCl 1ml를 넣고 stirring 후 질소 gas를 충전하고, heating block에서 110℃ 18시간 가수분해한다. 가수분해가 끝나면, 이를 감압 후 o-phthalaldehyde 100㎕를 가하여 실온에서 약 5분간 방치한다. 이를 감압하여 날려보낸 후 PTC화 시약을 80㎕ 가하고 실온에서 20분간 방치한다. 다시 감압 후 solvent A(0.1M ammonium acetate buffer pH 6.0)를 1ml 가하여 잘 섞어주고, 원심분리하여 상층액을 따로 모아 filtering 하여 준다. Hydroxyproline은 HPLC에 의하여 그 양을 분석하였는데, 분석시 사용된 column은 'Grom-Sil 18 FE Column (4.6mm× 250mm, 5.0㎛, Germany)이고, detecter는 Waters 486 absorbance detector (254nm)를 사용하였으며, injection volume은 20㎕로 하였다. Mobile phase A는 0.1M ammonium acetate buffer pH 6.0을 사용하였으며 B는 60% acetonitrile solution를 사용하였다. Solvent gradient는 시료 주입 후 mobile phase A를 100으로 시작하여 35분까지 mobile phase B가 100으로 직선적으로 상승시켰으며, 그 후 40분까지 mobile phase A를 100%로 하였으며, 그 후 45분까지 mobile phase A를 100%로 유지하여 detector와 column을 안정화시켰다.

6) 골 검사

① 골밀도, 골강도

골밀도와 골강도의 측정을 위하여 동물을 희생한 후, 모두 랫드의 오른쪽 다리 대퇴골 부분을 취하였다. 골밀도 측정은 일반적으로 DEX(Dual energy X-ray bone density) 방식으로, 소동물 골밀도 측정기(Lunar Piximus Bone Densitometer, Lunar Co. Ltd. Madison WI, USA)를 이용하여 샘플을 측정한 뒤, 프로그램에서 각 샘플의 골밀도(Bone mineral density; BMD, $mg/cm^{2)}$를 분석하였다. 골강도의 측정은 three-point bending 방법을 이용하였고, Bone strength meter(EJ-02R, Iwoo Scientific Corporation, Korea)를 사용하여 랫드의 대퇴골 부위의 최대 하중(maximum load, N) 및 강도(stiffness, N/mm)를 측정하였다.

② 골소주 면적

골소주 면적 검사는 랫드의 오른쪽 경골 부위, 골단판(epiphyseal plate)을 기준으로 바로 아래 부위를 측정하였는데, 정확한 측정을 위하여 경골부가 현미경의 시야에 충분히 들어오는 상태인 50배율로 하여 사진을 만들고, photoshop 7.0을 이용하여, 골단판의 가장 높은 지점에서 0.2mm, 각각 내부 해면골을 둘러싼 조직으로부터 0.4mm 떨어진 곳을 직사각형 형태를 만들었다. 시야 내 직사각형 안쪽 부분의 골소주의 면적을 image tool 1.28을 이용하여 면적을 계수화 하였고, 이것으로 골소주 면적 비율을 계산하였다. 즉, 직사각형 내에서 계수화된 골소주의 면적을 직사각형의 전체 면적으로 나누어 백분율로 나타내었으며, 각 군의 면적 비율을 계산하여, 평균으로 하였다.

③ 골조직 검사

골조직 검사를 위하여 랫드를 희생시킨 후, 오른쪽 다리 경골 부위를 취하였다. 취한 경골은 검사가 진행되기 전까지 10% formalin 용액에 담그어 고정시켰다. 표본을 만들기 위하여 우선 취한 경골을 decalcification 용액(hydrochloric acid 40ml + formic acid 40ml + DW 920ml)에서 탈회하였다. 탈회 후 조직처리과정(Tissue-Tek VIP 5 Jr.(SAKURA))을 거친 후 파라핀으로 embedding(Tissue-Tek TEC, SAKURA)하고, 골 절단용 microtome(Leica RM 2145)으로 3 μm 두께의 조직절편을 만들기 위하여 골을 section 하였다. 그 후 hematoxylin & eosin으로 염색하고 balsam으로 봉입하여 슬라이드 글라스에 표본을 고정하였다. 골조직의 정확한 검사를 위해 적합한 조직인 해면골(sponge bone)이 많은 부위를 택하였는데, 즉, 골소주(trabecula)가 가장 많이 관찰되는 골단판(epiphyseal plate) 바로 아래 부위를 기준으로 하였고, 50배율(ZEISS Germany Axiophot, Olympus IX70)로 관찰하였다.

(3) 통계처리

실험 결과는 SAS program을 이용하여 각 실험군마다의 평균과 표준편차를 계산하여 Mean±SD로 표시하였고, 각 실험군 간의 비교는 ANOVA로 분석하였다. 각 실험군 간의 유의적 차이는 Duncan's multiple range test에 의해 α=0.05에서 검정하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

Table 1. Yield of microencapsulation with different ratios of MCT and isoflavone from soybean

Ratio(w/w)		Yield(%)
MCT[1]	Isoflavone	
5	1	57.3[c]
10	1	63.1[b]
15	1	70.2[a]
20	1	68.6[ab]

Means of duplicate.

[1]Medium-chain triglyceride.

1. 미세캡슐의 수율

Coating material로 사용한 MCT는 상온에서 액체 상태이기 때문에 증류수를 첨가할 필요가 없으며, 수용성 isoflavone과의 비율을 5 : 1, 10 : 1, 15 : 1, 20 : 1로 하여 사용하였다. Coating material의 비율에 의해서 수용성 isoflavone 미세 캡슐화의 최적 조건을 결정하기 위해 다양한 비율로 MCT와 수용성 isoflavone을 혼합하여 미세 캡슐한 결과를 Table 1에 나타내었다. MCT : 수용성 isoflavone의 비율이 5 : 1일 때는 미세 캡슐의 수율이 57.3%, 10 : 1일 때는 63.1%, 15 : 1일 때는 70.2%, 20 : 1일 때는 68.6%로 각각의 비율에서 수율은 큰 차이가 없었지만, 15 : 1일 때 70.2%로 가장 우수하였고, MCT의 비율이 15 : 1보다 높아지거나 낮아지면 수율이 낮아지는 경향을 보였다.

2. 몸무게, 섭취량, 식이효율

난소 절제 전과 난소 절제 19주 후의 몸무게와, 실험 기간 동안의 변화된 랫드의 몸무게를 Table 2에 나타내었다. 난소 절제 전 OVX의 무게는 117.32g에서 난소 절제 19주 후에는 324.67g으로 207.35g 가량 증가하였고, OVX+Vit+Ca 군은 121.97g에서 333.83g으로 211.87g이 증가하였고, OVX+Iso 군은 114.48g에서 327.8g으로 213.32g 증가하였으며, OVX+Iso+Vit+Ca 군은 120.63g에서 327g으로 206.38g 만큼 증가하였다. 체중 증가량은 129.2g에서 289.67으로 160.47g 만큼 증가한 Sham군에 비해 난소 절제술을 시행한 군들에서 더 큰 값을 나타내었고, 전체적으로 난소 절제를 한 군이 난소 절제를 하지 않은 sham군 보다 약 1.31배 정도 높은 체중 증가를 나타내었다. 본 실험에서 이소플라본을 첨가한 OVX+Iso, OVX+ Iso+Vit+Ca 군을 첨가하지 않은 OVX, OVX+Vit+Ca 군과 비교하여 볼 때, 유의적 차이가 발견되지 않아 체중 변화에 대한 이소플라본의 영향이 없음을 알 수 있었다. 또한 19주 동안의 일일 성장률은 골다공증을 유발시킨 OVX, OVX+Vit+Ca, OVX+Iso, OVX+Iso+Vit+Ca 군이 Sham군에 비해 높았고, 몸무게의 증가와 유사한 경향을 나타내었다.

3. 뼈 무게, 길이

양측 대퇴골과 경골의 무게와 체중에 따른 비율을 Table 3에 나타내었다. 대퇴골의 경우 Sham 군과 OVX 군은 각각 1.54g, 1.65g으로 그 무게가 비슷하였고, 절제 수술을 한 후 isoflavone, vitamin 등을 처리한 OVX+Vit+Ca, OVX+Iso, OVX+Iso+Vit+Ca 군은 1.75g, 1.81g, 1.78g 등으로 Sham, OVX 군과

Table 2. The changes of body weight, weight gain and growth rate for ovariectomized rats fed microencapsulated isoflavone added milk during 19 weeks

Group	Initial body weight(g)	Final body weight(g)	Weight gain for 19 weeks(g)	Growth rate(g/day)
Sham	129.20±3.14^{a}	289.67±17.26^{b}	160.47±17.10^{b}	1.19±0.13^{b}
OVX	117.32±8.46^{bc}	324.67±15.43^{a}	207.35±14.02^{a}	1.54±0.10^{a}
OVX+Vit+Ca	121.97±4.44^{b}	333.83±18.67^{a}	211.87±17.49^{a}	1.57±0.13^{a}
OVX+Iso	114.48±5.55^{c}	327.80±27.12^{a}	213.32±29.21^{a}	1.58±0.22^{a}
OVX+Iso+Vit+Ca	120.63±1.86^{bc}	327.00±18.14^{a}	206.38±17.20^{a}	1.53±0.13^{a}

1) Sham : sham operated + administration of normal diet.
OVX : ovariectomized + administration of normal diet.
OVX+Vit+Ca : ovariectomized + addition of Vit D, K and Ca into normal diet.
OVX+Iso : ovariectomized + administration of normal diet + microencapsulated isoflavone with milk.
OVX+Iso+Vit+Ca : ovariectomized + addition of Vit D, K and Ca into normal diet + microencapsulated isoflavone with milk.
2) Means in a column by the same letter are not significantly different($P<0.05$).

Table 3. The changes of femur, tibia weight and femur, tibia / body weight for ovariectomized rats fed microencapsulated isoflavone added milk during 19 weeks

Group	Femur weight (g)	Tibia weight (g)	Femur / body weight(%)	Tibia / body weight(%)
Sham	1.54±0.07^{c}	1.17±0.057^{b}	0.534±0.018^{ab}	0.406±0.023^{a}
OVX	1.65±0.07^{bc}	1.23±0.17^{ab}	0.509±0.025^{b}	0.377±0.041^{a}
OVX+Vit+Ca	1.75±0.13^{ab}	1.49±0.44^{a}	0.526±0.036^{ab}	0.444±0.109^{a}
OVX+Iso	1.81±0.14^{a}	1.37±0.14^{ab}	0.554±0.028^{a}	0.419±0.029^{a}
OVX+Iso+Vit+Ca	1.78±0.07^{ab}	1.32±0.06^{ab}	0.544±0.035^{ab}	0.406±0.033^{a}

1) Sham : sham operated + administration of normal diet.
OVX : ovariectomized + administration of normal diet.
OVX+Vit+Ca : ovariectomized + addition of Vit D, K and Ca into normal diet.
OVX+Iso : ovariectomized + administration of normal diet + microencapsulated isoflavone with milk.
OVX+Iso+Vit+Ca : ovariectomized + addition of Vit D, K and Ca into normal diet + microencapsulated isoflavone with milk.
2) Means in a column by the same letter are not significantly different($P<0.05$).

Table 4. The changes of femur, tibia length for ovariectomized rats fed microencapsulated isoflavone added milk during 19 weeks

Group	Femur length(cm)	Tibia length(cm)
Sham	3.58±0.098[a]	4.05±0.055[a]
OVX	3.48±0.256[a]	3.96±0.372[a]
OVX+Vit+Ca	3.65±0.084[a]	4.14±0.073[a]
OVX+Iso	3.52±0.117[a]	4.18±0.098[a]
OVX+Iso+Vit+Ca	3.61±0.049[a]	4.11±0.066[a]

1) Sham : sham operated + administration of normal diet.
OVX : ovariectomized + administration of normal diet.
OVX+Vit+Ca : ovariectomized + addition of Vit D, K and Ca into normal diet.
OVX+Iso : ovariectomized + administration of normal diet + microencapsulated isoflavone with milk.
OVX+Iso+Vit+Ca : ovariectomized + addition of Vit D, K and Ca into normal diet + microencapsulated isoflavone with milk.
2) Means in a column by the same letter are not significantly different($P<0.05$).

비교했을 때, 유의적인 차이를 나타내었다($P<0.05$). 경골의 경우 Sham 군과 OVX 군이 1.17g, 1.23g으로 다른 군에 비하여 다소 낮은 값을 나타내었지만, 유의적인 차이는 없었고, 체중에 대한 대퇴골, 경골 무게의 비율은 대체적으로 OVX 군이 다른 군에 비해 낮은 값을 나타내었지만, 서로 유의적인 차이는 없었다($P>0.05$). 앞서 골다공증을 유발시킨 군들을 관찰해 보면, 골다공증을 유발시키지 않은 Sham 군보다 유의적으로 체중이 더 많이 나가는 것을 볼 수 있는데, 여기서 골다공증을 유발시킨 군은 체중의 증가에 따라 대퇴골, 경골의 무게도 또한 비례적으로 증가하는 것을 알 수 있다. 다만, OVX 군의 경우 OVX+Vit+Ca, OVX+Iso, OVX+Iso+Vit+Ca 군에 비하여 대퇴골의 무게와 체중과의 비율에서 낮은 값이 나타난 것으로 보아, 상대적으로 OVX 군에서의 골 손실이 골다공증 유발 후 isoflavone, vitamin, Ca 등을 첨가한 군보다 더 일어났음을 알 수 있다. 대퇴골과 경골의 길이는 Table 4에 나타내었는데, OVX 군이 다른 군에 비해 그 수치가 조금 낮았지만 서로 유의적인 차이는 없었다($P>0.05$).

4. 생화학적 검사

① 혈중 ALP

골 형성 지표의 하나로 ALP의 활성도를 Table 5에 나타내었다. 혈중 Total-ALP의 활성도는 Sham 군과 OVX 군이 4.42U/L, 5.35U/L로 비교적 낮은 활성도를 나타내었고, OVX+Vit+Ca, OVX+Iso, OVX+Iso+Vit+Ca 군 등은 각각 6.70U/L, 6.70U/L, 7.43U/L로서 좀 더 높은 경향을 나타내었다. Bone-ALP의 값은 OVX+Vit+Ca, OVX+Iso, OVX+Iso+Vit+Ca 군 각각 4.80U/L, 4.34U/L, 4.24U/L로서 Sham, OVX 군의 2.82U/L, 3.77U/L에 비해 값이 높았고, T-ALP와 비교하여 비율적으로 증가하는 경향을 나타내었다. TALP에 대한 BALP 비율의 변화는 OVX 군이 약 70% 정도로 64~68%인 Sham, OVX+Iso,

Table 5. Contents of alkaline phosphatase in serum for ovariectomized rats fed microencapsulated isoflavone added milk during 19 weeks

Group	TALP(IU/100ml)	BALP(IU/100ml)	BALP / TALP(%)
Sham	4.42±1.46^{c}	2.82±0.79^{b}	64.93±6.62^{b}
OVX	5.35±1.95^{bc}	3.77±1.33^{ab}	70.70±4.14^{a}
OVX+Vit+Ca	6.70±1.42^{ab}	4.80±1.16^{a}	68.16±3.72^{ab}
OVX+Iso	6.70±0.91^{ab}	4.34±0.80^{a}	64.59±3.80^{b}
OVX+Iso+Vit+Ca	7.43±1.23^{a}	4.24±0.58^{a}	57.43±2.97^{c}

1) Sham : sham operated + administration of normal diet.
OVX : ovariectomized + administration of normal diet.
OVX+Vit+Ca : ovariectomized + addition of Vit D, K and Ca into normal diet.
OVX+Iso : ovariectomized + administration of normal diet + microencapsulated isoflavone with milk.
OVX+Iso+Vit+Ca : ovariectomized + addition of Vit D, K and Ca into normal diet + microencapsulated isoflavone with milk.

2) Means in a column by the same letter are not significantly different(P<0.05).

OVX+Vit+Ca 군에 비해 높았고, OVX+Iso+Vit+Ca 군은 57%로 가장 낮았다. OVX 군에서는 에스트로겐의 감소에 따라 골다공증이 진행되고, 골 흡수를 대체하여 골 전환 과정이 극도로 높게 일어나 골 형성에 중요한 B-ALP가 더욱 증가함을 알 수 있고, OVX+Iso, OVX+Iso+Vit+Ca 군은 식이 중 에스트로겐 대체제인 isoflavone의 첨가로 인하여 B-ALP의 값이 증가하지 않았음을 알 수 있었다.

② 혈중 Osteocalcin

골 형성 지표 중의 다른 하나인 혈중 osteocalcin의 수치를 Table 6에 나타내었다. OVX, OVX+Vit+Ca, OVX+Iso, OVX+Iso+Vit+Ca 군은 각각 osteocalcin의 수치가 2.59ng/ml, 3.1ng/ml, 2.86ng/ml, 3.29 ng/ml로 나타난 반면, Sham 군은 2.22ng/ml로 가장 낮은 수치를 나타내었다. 특히 OVX+Vit+Ca, OVX+Iso+Vit+Ca 군은 Sham 군에 비해 유의적인 값의 증가를 나타내었다. 본 실험에서는, 실험 기간을 약 19주 정도로 실행하였는데, 이는 난소 제거 후 골다공증이 완전히 유발되는 초기-중간 단계에 해당된다고 볼 수 있다. 따라서 초기 난소 제거에 의한 골 손실의 증가에 따른 혈중 osteocalcin의 증가가 OVX, OVX+Vit+Ca, OVX+Iso, OVX+Iso+Vit+Ca 군에 나타남을 알 수 있고, 특히 isoflavone, Ca 등을 첨가한 OVX+Vit+Ca, OVX+Iso+Vit+Ca 군에서 osteocalcin의 수치가 더욱 증가된 것으로 보아, 골 형성 촉진인자로 알려져 있는 isoflavone, Ca 등에 영향을 받는다고 사료된다.

③ 혈중 Ca, P

혈중 Ca와 P의 농도를 Table 7에 나타내었다. 혈중 Ca은 Sham 군과 OVX+Iso+Vit+Ca 군에서 각각 11.58mg/dL, 11.68mg/dL으로 서로 유의적인 차이가 없었고, OVX, OVX+Iso, OVX+Vit+Ca 군은

Table 6. Contents of osteocalcin in serum for ovariectomized rats fed microencapsulated isoflavone added milk during 19 weeks

Group	Osteocalcin(ng/mL)
Sham	2.22±0.63[b]
OVX	2.59±0.74[ab]
OVX+Vit+Ca	3.10±0.81[a]
OVX+Iso	2.86±0.27[ab]
OVX+Iso+Vit+Ca	3.29±0.41[a]

1) Sham : sham operated + administration of normal diet.
OVX : ovariectomized + administration of normal diet.
OVX+Vit+Ca : ovariectomized + addition of Vit D, K and Ca into normal diet.
OVX+Iso : ovariectomized + administration of normal diet + microencapsulated isoflavone with milk.
OVX+Iso+Vit+Ca : ovariectomized + addition of Vit D, K and Ca into normal diet + microencapsulated isoflavone with milk
2) Means in a column by the same letter are not significantly different($P<0.05$).

Table 7. Contents of Ca and P in serum for ovariectomized rats fed microencapsulated isoflavone added milk during 19 weeks

Group	Serum Ca(mg/dL)	Serum P(mg/dL)
Sham	11.58±0.25[a]	4.44±1.17[b]
OVX	10.62±0.36[b]	5.27±1.25[ab]
OVX+Vit+Ca	11.03±0.50[b]	5.55±1.05[ab]
OVX+Iso	10.74±0.33[b]	5.17±1.10[ab]
OVX+Iso+Vit+Ca	11.68±0.16[a]	5.92±0.24[a]

1) Sham : sham operated + administration of normal diet.
OVX : ovariectomized + administration of normal diet.
OVX+Vit+Ca : ovariectomized + addition of Vit D, K and Ca into normal diet.
OVX+Iso : ovariectomized + administration of normal diet + microencapsulated isoflavone with milk.
OVX+Iso+Vit+Ca : ovariectomized + addition of Vit D, K and Ca into normal diet + microencapsulated isoflavone with milk.
2) Means in a column by the same letter are not significantly different($P<0.05$).

Sham, OVX+Iso+Vit+Ca 군보다 유의적으로 수치가 낮았다. 본 실험에서 Ca 등을 추가로 공급한 OVX+Vit+Ca, OVX+Iso+Vit+Ca 군 등에서 측정된 Ca 수치가 다른 군에 비해 높은 것을 보아, 식이 중

섭취된 Ca의 양이 영향을 미친다고 사료된다. 혈중 P의 수치는 OVX+Iso+Vit+Ca 군에서 5.92mg/dL로 가장 높았으나, OVX, OVX+Vit+Ca, OVX+Iso 군 등과 비교하여 유의적인 차이가 없었다($P>0.05$). 대체적으로 골다공증 유발군이 Sham 군에 비하여 P의 수치가 낮았는데, 혈장 P 농도가 정상 수준보다 높으면 골 흡수가 감소됨과 동시에 골 형성 또한 활발해진다.

④ 뇨중 DPD

Table 8은 골 흡수 지표인 뇨의 deoxypyridinoline의 함량을 나타낸 표이다. Sham 군은 63.38 nM /mMcr로서 매우 낮은 값을 나타낸 반면, OVX, OVX+Vit+Ca 군은 140.51nM/mMcr, 136.66nM/ mMcr으로 Sham 군에 비해 Dpd의 값이 각각 2.21배, 2.15배 증가하는 결과를 나타내었다. 이와는 달리 이소플라본, Ca, Vit 식이를 함께 섭취하였던 OVX+Iso+Vit+Ca 군은 89.33 nM/mMcr으로 낮아서 Sham 군과 유의적인 차이가 없었다. 실험 결과에서 이소플라본만을 첨가한 OVX+Iso 군의 Dpd 수치는 114.02 nM/mMcr으로 OVX보다 다소 낮은 경향을 나타내지만, OVX 군과 유의적인 차이를 보이지 않았다($P>0.05$).

⑤ 뇨중 Hydroxyproline

뇨중 hydroxyproline의 측정 결과는 Table 9와 같다. OVX 군의 hydroxyproline의 값은 429.82ug/dL로서 가장 큰 값을 나타내었지만, 다른 군에 비하여 유의적인 차이를 보이지 않았고($P>0.05$), Sham 군의 값은 324.40ug/dL로 가장 낮았고, OVX+Vit+Ca, OVX+Iso, OVX+Iso+Vit+Ca 군은 각각 368.68 ug/dL, 325.37 ug/dL, 336.98ug/dL로서 그 값이 서로 유사하였으므로, 결과적으로 OVX 군의 hydroxyproline 수치가 가장 크게 나타남을 알 수 있었다.

Table 8. Contents of deoxypyridinoline in urine for ovariectomized rats fed microencapsulated isoflavone added milk during 19 weeks

Group	Deoxypyridinoline(nM/mMcr)
Sham	63.38 ± 16.44^{c}
OVX	140.51 ± 22.42^{a}
OVX+Vit+Ca	136.66 ± 19.56^{a}
OVX+Iso	114.02 ± 36.38^{ab}
OVX+Iso+Vit+Ca	89.33 ± 16.15^{bc}

1) Sham : sham operated + administration of normal diet.
OVX : ovariectomized + administration of normal diet.
OVX+Vit+Ca : ovariectomized + addition of Vit D, K and Ca into normal diet.
OVX+Iso : ovariectomized + administration of normal diet + microencapsulated isoflavone with milk.
OVX+Iso+Vit+Ca : ovariectomized + addition of Vit D, K and Ca into normal diet + microencapsulated isoflavone with milk.

2) Means in a column by the same letter are not significantly different($P<0.05$).

Table 9. Contents of hydroxyproline in urine for ovariectomized rats fed microencapsulated isoflavone added milk during 19 weeks

Group	Hydroxyproline(ug/dL)
Sham	324.40±110.37[a]
OVX	429.82±121.85[a]
OVX+Vit+Ca	368.68±103.04[a]
OVX+Iso	325.37±112.17[a]
OVX+Iso+Vit+Ca	336.98±125.12[a]

1) Sham : sham operated + administration of normal diet.
OVX : ovariectomized + administration of normal diet.
OVX+Vit+Ca : ovariectomized + addition of Vit D, K and Ca into normal diet.
OVX+Iso : ovariectomized + administration of normal diet + microencapsulated isoflavone with milk.
OVX+Iso+Vit+Ca : ovariectomized + addition of Vit D, K and Ca into normal diet + microencapsulated isoflavone with milk.
2) Means in a column by the same letter are not significantly different($P<0.05$).

5. 골 검사

① 골밀도

골밀도 측정은 랫드의 오른쪽 대퇴골 부위를 측정하였으며, 결과는 Table 10에 나타내었다. Sham 군과 OVX 군은 각각 0.197g/cm^2, 0.178g/cm^{2}로 서로 유의적인 차이가 크게 나타났다($P<0.05$). Isoflavone, Vitamin, Ca 등을 각각 첨가한 OVX+Vit+Ca, OVX+Iso 군은 0.185g/cm^2, 0.183g/cm^{2}로 OVX 군보다는 골밀도 값이 더 크게 나타났지만 유의적인 차이는 없었고, isoflavone, vitamin, Ca을 모두 함께 첨가한 OVX+Iso+Vit+Ca 군에서는 Sham 군과 유사한 0.194g/cm^{2}라는 수치를 얻을 수 있었다. 체중에 대한 골밀도의 수치는 Sham 군이 가장 높은 수치인 0.681을 나타냈으며, OVX 군은 0.547로 가장 낮았다. OVX+Vit+Ca, OVX+Iso, OVX+Iso+Vit+Ca 군은 OVX 군보다 그 값이 높았지만 서로 유의적인 차이는 없었다.

② 골 강도

골 강도의 측정은 랫드의 오른쪽 대퇴골 부위를 선정하였으며, 최대 하중(maximum energy)과 강도(stiffness)를 측정하여 Table 11에 결과를 나타내었다. 최대 하중은 OVX 군의 값이 가장 낮았지만(90.74N) 각 군마다 유의적인 차이가 없었고($P>0.05$), OVX를 제외한 군들은 약 100N 정도의 비슷한 값을 나타내었다. 강도는 Sham 군과 OVX 군이 각각 125.72N/mm, 107.46N/mm로 서로 유의적인 차이를 나타내었다($P<0.05$). OVX+Vit+Ca, OVX+Iso, OVX+Iso+Vit+Ca 군들 중 칼슘, 비타민 등을 첨가한 OVX+Vit+Ca 군에서 120.05N/mm로 가장 큰 값을 나타내었고, 다른 군과 비교하여 볼 때 유의적인 차이를 나타나지 않았다($P>0.05$).

Table 10. Bone mineral density(BMD) for ovariectomized rats fed microencapsulated isoflavone added milk during 19 weeks

Group	Bone mineral density(g/cm$^{2)}$	Bone mineral density(BMD)/wt(kg)
Sham	0.197±0.007^{a}	0.681±0.028^{a}
OVX	0.178±0.009^{c}	0.547±0.022^{c}
OVX+Vit+Ca	0.185±0.011^{bc}	0.554±0.028^{bc}
OVX+Iso	0.183±0.005^{c}	0.562±0.041^{bc}
OVX+Iso+Vit+Ca	0.194±0.008^{ab}	0.598±0.052^{b}

1) Sham : sham operated + administration of normal diet.
OVX : ovariectomized + administration of normal diet.
OVX+Vit+Ca : ovariectomized + addition of Vit D, K and Ca into normal diet.
OVX+Iso : ovariectomized + administration of normal diet + microencapsulated isoflavone with milk.
OVX+Iso+Vit+Ca : ovariectomized + addition of Vit D, K and Ca into normal diet + microencapsulated isoflavone with milk.
2) Means in a column by the same letter are not significantly different(P<0.05).

Table 11. Maximum energy(yield energy) and stiffness for ovariectomized rats fed microencapsulated isoflavone added milk during 19 weeks

Group	Maximum energy(N)	Stiffness(N/mm)
Sham	96.97± 5.46^{a}	125.72±12.51^{a}
OVX	90.74± 6.92^{a}	107.46± 8.01^{b}
OVX+Vit+Ca	99.56±19.16^{a}	120.05±16.50^{ab}
OVX+Iso	100.73± 8.60^{a}	112.11±13.09^{ab}
OVX+Iso+Vit+Ca	103.45± 2.78^{a}	114.63± 9.02^{ab}

1) Sham : sham operated + administration of normal diet.
OVX : ovariectomized + administration of normal diet.
OVX+Vit+Ca : ovariectomized + addition of Vit D, K and Ca into normal diet.
OVX+Iso : ovariectomized + administration of normal diet + microencapsulated isoflavone with milk.
OVX+Iso+Vit+Ca : ovariectomized + addition of Vit D, K and Ca into normal diet + microencapsulated isoflavone with milk.
2) Means in a column by the same letter are not significantly different(P<0.05).

③ 골소주 면적

뼈의 골밀도를 측정하기 위한 간접적인 방법으로 흰쥐의 오른쪽 경골 부위 trabecula 즉 골소주의 면

Table 12. Trabecular bone area(%) in tibia for ovariectomized rats fed microencapsulated isoflavone added milk during 19 weeks

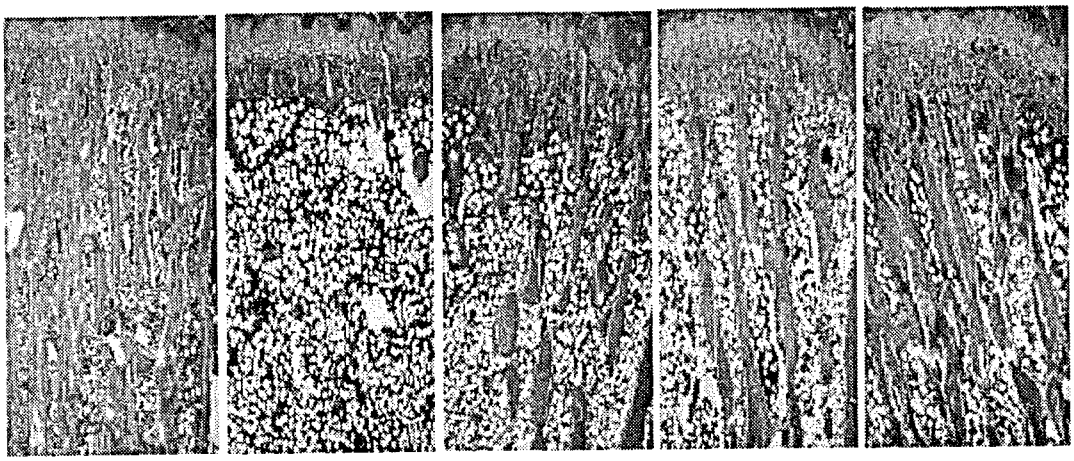
Group	Trabecular bone area(%)
Sham	43.33±10.77[a]
OVX	21.31±10.28[c]
OVX+Vit+Ca	31.65± 8.71[bc]
OVX+Iso	31.46± 8.55[bc]
OVX+Iso+Vit+Ca	36.15± 7.01[ab]

1) Sham : sham operated + administration of normal diet.
OVX : ovariectomized + administration of normal diet.
OVX+Vit+Ca : ovariectomized + addition of Vit D, K and Ca into normal diet.
OVX+Iso : ovariectomized + administration of normal diet + microencapsulated isoflavone with milk.
OVX+Iso+Vit+Ca : ovariectomized + addition of Vit D, K and Ca into normal diet + microencapsulated isoflavone with milk.
2) Means in a column by the same letter are not significantly different($P<0.05$).

적을 측정하여 결과를 Table 12에 나타내었다. 각 군 경골의 평균 골소주 면적 비율은 Sham 군에서 43.33로 가장 큰 값을 나타내었고, OVX 군은 21.31로 가장 낮아서, Sham 군에 비해 골소주 면적의 약 51% 감소가 나타났다. OVX+Iso와 OVX+Vit+Ca 군은 각각 31.65, 31.46로 OVX 군에 비해서는 면적 비율이 다소 증가하는 경향을 보였지만, 서로간 유의적 차이는 없었으며, Sham 군에 비해 27~28%의 골소주 면적의 감소가 나타났으므로, 51%의 감소가 일어난 OVX 군에 비해 골 형성이 더 활발함을 알 수 있다. Isoflavone과 Vit, Ca 등을 동시에 첨가한 OVX+Iso+Vit+Ca 군은 36.15로 Sham 군에 비해서 다소 낮은 면적 수치를 보였지만, Sham 군과 비교시 골소주 면적의 17%의 감소만 보였고, 서로간 유의적인 차이는 없었다. 이와 같이, isoflavone과 Ca, Vit 등은 각각 골다공증 유발 랫드에 골 흡수 억제라는 측면에 있어 효과가 있음을 알 수 있고, 함께 첨가하였을 경우 공동 작용에 의해 골다공증 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

④ 골조직 검사

Fig. 1은 Sham군, 골다공증을 유발시킨 OVX 군, 골다공증 유발 후 isoflavone 캡슐, Vit, Ca 등을 첨가한 군들의 골조직의 변화를 나타낸 그림이다. 골조직의 활발한 변화를 관찰하기 위하여, 랫드의 오른쪽 경골 골단판(epiphyseal plate)의 아랫 부분 즉 성장판-골간단부 막의 결합 조직(growth plate- metaphyseal junction) 부분을 50배율로 관찰하였다. Sham 군은 골소주(trabecula)의 두께와 그 수에서 정상과 동일하였고, OVX 군은 골소주가 거의 사라지거나 많은 양이 소실되었으며, 매우 가늘어진 모양을 나타내었다. 골다공증 유발 후, Vit, Ca 등을 첨가한 OVX+Vit+Ca 군은 Sham 군에 비해 두께가 좀 더 굵어졌지만 그 숫자는 줄어들었으며, isoflavone 캡슐만을 첨가한 OVX+Iso 군은 Sham군과 비교하여



〈Sham〉 〈OVX〉 〈OVX+Vit+Ca〉 〈OVX+Iso〉 〈OVX+Iso+Vit+Ca〉

Fig. 1. Histological trabecular bone in tibia for ovariectomized rats fed microencapsulated isoflavone added milk during 19 weeks

1) Sham : sham operated + administration of normal diet.
OVX : ovariectomized + administration of normal diet.
OVX+Vit+Ca : ovariectomized + addition of Vit D, K and Ca into normal diet.
OVX+Iso : ovariectomized + administration of normal diet + microencapsulated isoflavone with milk.
OVX+Iso+Vit+Ca : ovariectomized + addition of Vit D, K and Ca into normal diet + microencapsulated isoflavone with milk.
Hematoxylin & Eosin stain, original magnification × 50.

두께가 비슷하였지만 그 수가 감소하였다. Isoflavone 캡슐과 Vit, Ca을 동시에 첨가한 OVX+Iso+Vit+Ca 군은 골소주가 매우 두꺼웠으며, Sham군과 비교하여 그 양이 비슷하였고, 그 수만 약간 감소하여 골소주의 유의적인 감소가 일어나지 않았다.

Ⅳ. 결 론

본 연구는 폐경기 여성의 골다공증을 예방 또는 치유하기 위하여, 미세 캡슐화한 이소플라본을 우유에 첨가, 분산시켰으며, 칼슘, 비타민 D, K 등을 가루식이로 첨가하여 이를 난소가 제거된 흰쥐에 일정기간 섭취시켜 골다공증의 완화 정도를 분석하였다. 미세 캡슐의 수율은 core material과 coating material의 비율이 1:15일 때 가장 높았고, 우유 중에 첨가하였을 경우, 잘 분산되고 저장 시 안정하였다. 미세 캡슐을 제조하여 동물 실험한 결과는 다음과 같다.

실험 기간 동안(19주) 체중 증가량은 Sham 군에서 가장 낮은 값을 나타내었다. 혈청 TALP / BALP는 OVX 군이 70% 정도로 가장 높았고, OVX+Iso+Vit+Ca 군이 57%로 가장 낮았다. 혈청 Osteocalcin의 농도는 OVX+Iso+Vit+Ca 군에서 가장 높았고, 혈청 칼슘의 농도는 다른 군에 비해 Sham 군과 OVX+Iso+Vit+Ca 군에서 가장 높았으며, 인의 농도는 군간 유의적 차이가 나타나지 않았다. 뇨중 Dpd

값은 OVX+Iso+Vit+Ca 군이 Sham 군과 가장 유사한 값을 나타내었고, hydroxyproline의 양은 군간 차이가 없었다.

골검사에서 대퇴골, 경골의 길이는 서로 군간 유의적인 차이가 없었으며, 대퇴골의 무게는 이소플라본, 칼슘, 비타민 D, K 등을 첨가한 군이 OVX 군에 비해 좀 더 높은 값을 나타내었다. 골밀도는 Sham 군과 OVX+Iso+Vit+Ca 군에서 값이 크게 나타났고, 골강도는 서로간 유의적 차이가 없었으며, 골소주면적은 Sham 군과 OVX+Iso+Vit+Ca 군에서 다소 큰 값을 나타내었다. 골조직 검사에서는 OVX 군에서는 골소주가 거의 없었으며, OVX+Iso, OVX+Vit+Ca, OVX+Iso+Vit+Ca 군에서 골소주의 숫자, 두께의 증가가 나타났다. 결과적으로 미세캡슐 이소플라본과 칼슘, 비타민 등을 우유에 첨가하여 이를 흰쥐에 투여하고, 골다공증의 지표로서 매우 중요한 생화학적 검사 및 골 검사 등을 수행한 결과, 골다공증의 예방 및 치료에 효과를 줄 수 있다고 사료된다.

참고문헌

1. Gallagher, J. C. 1990. The pathogenesis of osteoporosis. Bone & Mineral. 9 : 215-227.
2. Lawrence, G. R. and J. A. Smith. 1989. *Pathogenisis, prevention and treatment of osteoporosis.* Ann Rev. Med. 40 : 251-267.
3. Spencer, H. and L. Kramer. 1986. Nih concensus conference : Osteoporosis factors contributing to osteoporosis. J. Nutr. 116 : 316-319.
4. Gauley, J. A., J. P. Gutai, R. B. Sandler, R. E. Laporte, L. H. Kuller and D. T. Sashin. 1986. Relationship of endogenous estrogen to bone density and bone area in normal postmenopausal women. Am. J. Epidemiol. 124 : 752.
5. 손헌수, 이윤심, 신해철, 정형근. 2000. 대두 이소플라본이 인간에 미치는 영향 분석. 한국콩연구회지. 17(2) : 9-19.
6. Lien, L. L. and E. J. Lien. 1996. Hormone therapy and phytoestrogen. J. Clim. Pharm. Ther. 21 : 101-111.
7. Messina, M. and V. Messina. 2000. Soy foods, soybean isoflavones, and health : A brief overview. J. Ren. Nutr. 10(2) : 63-68.
8. Gurkan L., A. Ekland, K. M. Gautvik, N. Langelland, H. Roenningen and L. F. Solheim. 1986. Bone changes after castration in rats. : A model for osteoporosis. Acta. Orthopedica Scandinavica. 57 : 67-70.
9. 이명철, 성인호, 성상철, 최인호, 이동호, 박상철, 송계용. 1994. 흰 쥐에서 난소 적출술로 유발한 골다공증에 대한 estradion의 효과. 대한정형외과학회지. 29(5) : 1326-1334.
10. Calvo, M. S., D. R. Eyre and C. M. Gundberg. 1996. Molecula basis and clinical application of biological markers of bone turnover. Endocr. Rev. 17 : 333-368.
11. Charhon, S. A., P. D. Delmas, L. Malaval, et al. 1986. Serum bone gla-protein in renal osteodystrophy : Comparison with bone histomorphometry. J. Clin. Endocr. and Metabol. 63 : 892-897.
12. Baldwin, E. A., M. O. Nisperoh, R. D. Hagenmaier and R. A. Baker. 1997. Use of lipids in

coatings for food products. Food Technology. 51(6) : 56-62.

13. Fishman, W. H. 1974. Perspectives on alkaline phosphatase isoenzymes. American J. of Med. 56 : 617-650.

14. Rosalki, S. B and A. Y. Foo. 1984. Two new methods for separation and quantifying bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes in plasma. Clin. Chem. 7 : 1182-118.