

發芽 鼠目太가 골육종세포 중 HOS-TE85의 골형성에 미치는 영향

김진연 · 차윤엽* · 이응세

상지대학교부속 한방병원 한방재활의학교실

Study on the Effects of Germinated Rhynchosia Volubilis on Osteosarcoma HOS-TE85 Related to Bone Morphogenesis

Jin Yeon Kim, Yun Yeop Cha*, Eung Se Lee

Department of oriental Rehabilitation Medicine, College of Oriental Medicine, Sang-ji University

The aim of this study was to find out the effectiveness on germinated Rhynchosia Volubilis for Female Bone Morphogenesis. For this purpose, experiments using germinated Rhynchosia Volubilis(GRV) according to germinating days were conducted to measure the polyphosphate contents and to examine the effects of the transcription activity of gene related to bone morphogenesis on the formation of bone in female. The quantitative analysis of the polyphosphate contents showed that 1 day geminated Rhynchosia Volubilis(GRV) group is treble better contents of polyphosphate than non-germinated Rhynchosia Volubilis, 2 day and 3 day GRV groups. The active of the COL1, OTN, MGP, BMP genes was less than the increase of the polyphosphate contents.

Key words : Germinated Rhynchosia Volubilis(GRV), polyphosphate, bone morphogenesis, HOS-TE85

서 론

골다공증이란 골량의 감소와 골의 미세구조 이상으로 골절에 대한 감수성이 증가하는 전신성 골격질환으로서 대사성 골질 환증 가장 흔한 질환이다.¹⁾ 우리나라에서 골다공증의 유병률에 관한 정확한 통계는 없는 것으로 보고되었으나 여성의 골다공증 유병률은 50대에서 26.9%, 60대에서 55.4%, 그리고 70대에서 77.2%로서 동연령층의 남성과 비교하여 약 5~15배나 높은 것으로 나타나고 있다.²⁾

현재 골다공증에 대한 약물요법으로는 골흡수억제제인 estrogen이 가장 널리 사용되고 있다.³⁾ 그러나 estrogen 사용이 자궁내막암, 유방암의 발생빈도를 증가시키고, 혈전증, 담석증, 고혈압, 부종, 유방통 등을 유발시킬 수 있으며^{3,4)}, 폐경 후 estrogen과 progesteron을 동시 투여한 여성을 추적 관찰한 결과, 유방암, 뇌졸중, 폐색전 등의 발생률이 높다는 것이 증명되었다.⁴⁾

대부분의 골관련 질환은 만성적인 질환이므로 오랜 투약기간 및 치료가 필요한 만큼 안전하게 장기간 사용할 수 있는 새로운 치료 수단의 개발이 절실히 요구되며, 유효성과 안정성 면에서 한약재를 통한 치료제의 검색 및 유효물질의 개발이 필요하다고 사료된다.

인중합체(polyphosphate)는 수십 또는 수백 개의 orthophosphate가 높은 에너지의 phosphoanhydride결합으로 연결된 선상 복합체로서⁵⁾, 인중합체의 골형성과 관련된 연구를 살펴보면, 조골세포양세포(osteoblast-like cells)에서 다량 발견되고 골조직의 무기질 과정의 조절과 관련이 있으며, 칼슘대사 및 골절시 골형성에 관여하며 Osteocalcin 발현량을 증가시킴으로 골화세포의 생성을 촉진시킨다.⁶⁻¹⁴⁾

金¹⁵⁾의 연구에 의하면, 鹿茸, 鹿角, 大豆黃卷, 野菊花, 鼠目太, 발아한 鼠目太의 인중합체 함량을 분석한 결과 인중합체가 많은 鼠目太, 발아한 鼠目太, 野菊花, 大豆黃卷이 골형성 관련 유전자의 전사활성에도 활성증가를 보여 인중합체가 골형성에 유효하며, 이중 鼠目太는 BMP-4 gene(Bone Morphogenetic Protein, BMP)의 전사활성의 증가를 보였으며, 특히 female세포인 HOS-TE83세포에서 鼠目太와 大豆黃卷 등 콩류가 전사활성

* 교신저자 : 차윤엽, 강원도 원주시 우산동 283 상지대학교 부속한방병원

· E-mail : omdcha@sangji.ac.kr, · Tel : 033-741-9260

· 접수 : 2004/07/23 · 수정 : 2004/08/23 · 채택 : 2004/09/24

증가를 보였다고 보고한 바 있다.

갱년기 이후 estrogen이 부족한 여성에게 나타나는 갱년기 장애 및 골다공증 예방의 한 방법으로 isoflavone을 섭취한다는 연구¹⁶⁻²²⁾와 대두의 발아과정이 isoflavone의 생성에 영향을 준다는 보고²³⁾에 근거하여 한약재중 발아된 서목태를 이용하여 인중합체 정량을 분석하고, 골모세포인 HOS-TE83 세포주의 증식, 골형성 관련 유전자들의 전사활성을 통하여 여성의 골형성에 미치는 영향을 살펴보았다.

재료 및 방법

1. 재료

1) Cell line

본 실험에는 HOS-TE85 (human, female, osteosarcoma, Cat. #21543) 세포주를 한국세포주은행에서 분양 받아서 사용했다.

2) 약재

정선산 서목태를 발아시키지 않은 것과 1일, 2일, 3일 발아시킨 것을 분쇄한 후 1차 증류수 1ℓ를 집어넣어 2시간 동안 추출한 후 여과하여 여액을 감압농축 후 72시간 동안 동결건조한 것을 시료로 사용하였다.

발아일수에 따른 서목태 회수율은 0일에는 32.26%, 1일에는 20.59%, 2일과 3일에는 13.44%와 29.55%로 각각 나타났다.

3) Primer

GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), OTN(Osteonectin), MGP(Matrix Gla protein), COL1(Collagen type 1), BMP1A (bone morpho -genic protein 1A), BMP2B(bone morphogenic protein 2B)를 사용하였다.

2. 방법

1) Cell culture

100mm 배양 접시 또는 T-75 배양 flask에 사람의 osteosarcoma 세포주인 HOS-TE85 세포주를 분주하고 배양 접시에 부착된 HOS-TE85(human female)는 2g/ℓ sodium bicarbonate가 첨가된 RPMI 1640 배양배지를 사용하였다. 배양 배지에는 penicillin 및 streptomycin이 함유된 1% antibacterial antifungal solution(Gibco BRL, Co., USA)과 10% FBS (Gibco BRL, Co., USA), HEPES 6g/ℓ를 첨가하였다. 배양 시 습도는 95%, 온도는 37℃를 유지하면서 5% CO₂를 계속 공급하였다. 배지는 7~10ml씩 주 2회 교체해 주었고 주 1~2회 계대배양(subculture)하였다.

2) Cell proliferation assay

배양한 HOS-TE85 세포를 96 well plate 각 well에 1×10⁴ cells/well/100μℓ 로 배양을 하고 24시간 후 약물을 각 농도(0, 0.1, 1, 10, 100, 1000, 10000μg/ml)의 한약재 추출물들을 처리하여 48시간동안 습도는 95%, 온도는 37℃를 유지하면서 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 종료 1시간 전에 빛을 차광하고 cell proliferation assay solution(CellTiter 96@Aqueous Cell Proliferation Assay. Promega Co., USA)을 20μℓ/well을 처리한

다. 발색된 각 well의 흡광도를 ELISA reader 흡광도 490nm에서 측정하고 대조군의 흡광도와 비교하여 세포증식율을 백분율로 환산하였다.

3) RNA 추출

Cell proliferation assay에서 세포증식율이 가장 좋은 농도의 약재를 처리 48시간 후 Trizol solution method을 이용하여 배양 세포주들로부터 전체 세포 RNA를 추출한다. 먼저 원심분리를 통하여 수확한 세포들에 1ml의 Trizol solution (Gibco BRL, Co., U.S.A.)을 처리하여 18~21 G syringe로 균질화시킨 다음 4℃에서 12,000rpm으로 원심 분리하여 상층액을 수거한 후 5분 정도 상온에 두었다가 200μℓ phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1)을 섞은 다음 12,000rpm 에서 10분간 원심 분리한다. 맑은 상층액을 수거한 후 동량의 isopropanol을 혼합한 뒤 -20℃에서 30분간 보관하여 RNA pellet을 침강시켰다. 침강된 RNA는 100μℓ의 DEPC water에 녹인 후 spectrophotometer(Hewlett Packard, Co., U.S.A.)를 사용하여 정량하였다.

4) cDNA 합성과 RT-PCR

cDNA합성 (Reverse Transcription)을 위해 각 sample에서 추출한 RNA 5~10μg에 Random primer 0.5μg/μℓ 1μℓ를 첨가한 후 70℃에서 5분간 heating 시킨 후 바로 얼음에 담근다. 그 이후에 MMLV 1X Reaction buffer, 0.4mM dNTPs, 20U RNase inhibitor, DEPC-DW을 전체 총 양이 30μℓ가 되게 첨가한다. 상온에서 2분간 incubation 한 후 200U M-MLV RTase를 첨가한 후 42℃에서 50분, 70℃에서 15분 동안 반응시켰다. PCR을 위한 positive control로써는 house keeping gene인 Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)를 사용하였다. GAPDH, BMP1A(bone morphogenic protein 1A), BMP2B(bone morphogenic protein 2B), MGP(Matrix Gla protein), OTN (Osteonectin), COL1(Collagen type 1)는 95℃에서 10분 1cycle, 95℃에서 45초, 60℃에서 45초, 72℃에서 60초 50cycle, 72℃에서 10분 1cycle 동안 반응을 수행하였다.

5) PCR products의 전기영동

10μℓ의 PCR product를 1.5% agarose gel에 loading하였다. 전기영동은 100V에서 40분 동안 수행하였으며 0.5×TAE buffer를 사용하였다. 분리된 PCR product를 육안으로 확인하기 위하여 gel을 500ml의 ethidium bromide(Et-Br) 용액으로 20분간 염색한 후 GEL DOC (BIO RAD Co., U.S.A.)을 이용하여 정량분석 관찰하였다.

6) 발아 서목태 추출물 내 인중합체(polyphosphate) 함유량 측정

Test tube의 이물질질을 제거하기 위해서 6N HCl 에서 24시간 동안 tube를 세척하였다. 그리고 증류수로 다시 세척을 한 후 dry시켰다. Tube에 각 한약재의 sample을 100μℓ 넣고 60μℓ의 10% Mg(NO₃)₂ 6H₂O를 첨가하였다. Tube를 알코올램프로 가열하였다. Tube의 색이 갈색에서 투명색으로 변하고 sample의 색깔은 불투명액체에서 흰색의 분말로 변할 때까지 가열을 한다. polyP와 인의 가수분해를 위해 0.6ml의 0.5 N HCl을 넣어주고 15분동안 water bath에 boiling하고 바로 cooling을 한다. 1.4ml의 molyb -denumascorbate reagent(0.42% ammonium molybdate

in 1N H₂SO₄:10% ascorbic acid in dH₂O, 6:1, v/v)의 혼합액을 넣어주고 45℃에서 20분간 incubation을 한다. 그리고 흡광도 530/630의 spectrophotometer(Hewlett Packard, Co., U.S.A.)로 정량측정을 한다.

결 과

1. 발아 서목태 추출물내 인중합체 정량분석(OD530/630)

1) 발아 서목태 추출물내 인중합체 OD530/630 값 측정

서목태를 발아시키기에 따라 인중합체 양을 OD530/630 값으로 측정하여 전체 건조중량에 따른 인중합체의 전체 총량을 분석한 결과 발아 1일에서 가장 많은 양을 나타냈고, 0일 2일 3일 순으로 인중합체가 검출되었다. 특히 발아하지 않은 것과 2일 3일 발아시켰을 때는 크게 차이가 없지만, 1일 발아시켰을 때에는 발아시키지 않은 서목태와 비교하였을 때 인중합체량이 약 300% 이상 증가하는 것을 볼 수 있다.

2. 발아 일수에 따른 HOS-TE85세포의 세포증식능 측정

1) 발아시키지 않은 서목태를 처리한 HOS-TE85 세포의 세포증식능 측정

발아하지 않은 서목태를 처리한 HOS-TE85세포의 세포증식능은 약 10%내의 세포증식능이 감소하여, 세포증식능에 거의 영향을 주지 않았으며, 항산화 효과를 볼 수 있는 과산화수소를 처리하여 세포 증식능을 본 결과 대부분 유사한 수치를 나타내었지만, 1mg/ml을 처리하였을 경우 약 4% 정도 증가하는 것을 볼 수 있었다. 서목태만 처리하였을 경우와 서목태와 과산화수소를 동시에 처리하였을 때, 10mg/ml에서는 세포 독성이 나타났다.

2) 1일 발아시킨 서목태를 처리한 HOS-TE85 세포의 세포증식능 측정

1일 발아시킨 서목태를 처리한 HOS-TE85세포의 세포증식능은 농도가 증가함에 따라 점차 감소하였고, 1mg/ml에서는 약 20%정도 세포증식능이 감소되었다. 항산화 효과를 볼 수 있는 과산화수소를 처리하여 세포 증식능을 본 결과 대부분 유사한 수치를 나타내었지만, 1mg/ml을 처리하였을 경우 약 5%정도 증가하는 것을 볼 수 있었다. 서목태만 처리하였을 경우와 서목태와 과산화수소를 동시에 처리하였을 때 10mg/ml에서는 세포독성이 나타났다.

3) 2일 발아시킨 서목태를 처리한 HOS-TE85 세포의 세포증식능 측정

2일 발아시킨 서목태를 처리한 HOS-TE85세포의 세포증식능은 변화가 없거나 약 10%내의 세포증식능이 감소하여, 거의 세포증식능에 영향을 주지 않았으며, 항산화 효과를 볼 수 있는 과산화수소를 처리하여 세포 증식능을 본 결과 0일 발아 경우와 1일 발아 경우에 비해서 전체적으로 항산화효과가 증가하였다. 특히 1mg/ml을 처리한 경우에는 control에 비하여 약 16%정도 항산화 효과가 증가함을 볼 수 있었다. 서목태만 처리하였을 경우와 서목태와 과산화수소를 동시에 처리하였을 때 10mg/ml에서는 세포독성이 나타났다.

4) 3일 발아시킨 서목태를 처리한 HOS-TE85 세포의 세포증식능 측정

3일 발아시킨 서목태를 처리한 HOS-TE85세포의 세포증식능은 거의 변화가 없거나 약 10%내의 세포증식능이 감소하여, 거의 세포증식능에 영향을 주지 않았으며, 항산화 효과를 볼 수 있는 과산화수소를 처리하여 세포 증식능을 본 결과 0일 발아 경우와 1일 발아 경우에 비해서 전체적으로 항산화효과가 증가하였다. 특히 100ug/ml을 처리한 경우에는 control에 비하여 약 11%정도 항산화 효과가 증가함을 볼 수 있었다. 서목태만 처리하였을 경우와 서목태와 과산화수소를 동시에 처리하였을 때 10mg/ml에서는 세포독성이 나타났다.

3. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction 및 PCR

1) 발아 서목태 추출물의 HOS-TE85 세포 전사 활성

(1) HOS-TE85 세포의 골형성 관련 유전자인 GAPDH의 전사 활성

전체적으로 10% FBS 상태에서 서목태를 처리한 sample은 전반적으로 GAPDH발현이 비슷한 양상을 보였으며, 과산화수소를 처리하였을 때에는 control에 비하여 약 10~20%정도 발현량이 감소하였다. 아래의 GAPDH 결과를 BMP1A, BMP2B, MGP, OTN, COL1의 대조군으로 사용하였다.

(2) HOS-TE85 세포의 골형성 관련 유전자인 COL1의 전사활성

발아시키지 않은 서목태는 control과 발현량 차이가 거의 없었으나 1일에서는 약 50%정도 감소하였고, 2일과 3일에서는 각각 19%, 23% 증가하였으며, 과산화수소를 처리하였을 때에는 control의 발현량과 비슷하거나 약 10% 정도 감소하였으나 3일에서는 11% 증가하였다.

(3) HOS-TE85 세포의 골형성 관련 유전자인 OTN의 전사 활성

전체적으로 10% FBS 상태에서 서목태를 처리한 sample은 전반적으로 OTN발현이 약 10% 안으로 비슷하게 증가하는 양상을 보였으며, 과산화수소를 처리하였을 때에는 10% FBS만 처리하였을 때에 비하여 서목태 처리와 관계없이 OTN 발현량이 전체적으로 증가하였으며, 특히 0일과 3일에서 약 30% 정도 크게 증가하는 것을 알 수 있다.

(4) HOS-TE85 세포의 골형성 관련 유전자인 MGP의 전사 활성

전체적으로 10% FBS 상태에서 서목태를 처리한 sample은 전반적으로 MGP발현이 control에 비해서 감소하지만 특이하게도 0일에서는 약 46% 증가하는 것을 볼 수 있다. 과산화수소를 처리하였을 때에는 10% FBS만 처리하였을 때에 비하여 전체적으로 MGP 발현이 증가하였지만 control과 비교하여 크게 증가하거나 감소한 그룹은 나타나지 않았다.

(5) HOS-TE85 세포의 골형성 관련 유전자인 BMP1A의 전사 활성

전체적으로 10% FBS 상태에서 서목태를 처리한 sample은 전반적으로 BMP1A 발현이 비슷한 양상을 보였으나, 2일에서 발현량이 control에 비하여 약 76% 감소하는 것을 볼 수 있었다. 과산화수소를 처리하였을 때에는 10% FBS만 단독으로 처리하였을 때에 비하여 약 30~50% 정도 감소하였지만 발아시기와 관계없

이 전체적인 BMP1A 발현양은 유사하였다.

(6) HOS-TE85 세포의 골형성 관련 유전자인 BMP2B의 전사 활성

전체적으로 10% FBS 상태에서 서목태를 처리한 sample은 전반적으로 BMP2B 발현이 비슷한 양상을 보이며 약 10~15% 증가하였으나, 2일에서는 control에 비하여 약 15%정도 발현양이 감소하였다. 과산화수소를 처리하였을 때에는 10% FBS만 단독으로 처리하였을 때에 비하여 control에서는 약 10% 정도 감소하였고, 서목태를 처리하였을 때는 발아시기와 관계없이 control에 비하여 약 10% 정도 감소하였다.

고찰

골다공증은 골량이 감소하고 골조직의 미세구조 결함으로 골의 취약성이 증가되며 골절의 위험성이 증가되는 질환²⁴⁾으로 정의된다. 골다공증은 노령화에 따른 골격대사의 이상 또는 골격무기질 대사의 불균형에 의해 골질량(Bone mass)이 감소되고 골절빈도가 높아지는 것을 특징으로 하는 퇴행성 골격질환의 하나이다.

골 세포의 대사는 골아 세포(osteoblast), 골 세포(osteocytes), 파골 세포(osteoclast)의 상호작용으로 골 형성과 골 흡수의 평행으로 생리적 강도를 유지하는데, 만일 골 흡수를 담당하는 파골 세포의 작용이 강하거나 골 형성을 담당하는 골아 세포의 작용이 저하된다면 골다공증이 발생하게 된다.²⁵⁻²⁷⁾ 세포 수준에서 볼 때에는 골아세포(Osteoblast)의 활성 저하와 파골세포(Osteoclast)의 활성 증진에 따른 골격대사의 불균형에 기인한다.²⁸⁻³⁰⁾

골다공증은 원발성과 속발성으로 대별된다. 원발성 골다공증은 연소기, 특발성, 폐경기후와 노년기 골다공증이 있으며, 고령에 따른 성호르몬의 감소가 골손실의 주된 원인이 된다. 이는 여성의 폐경기 전후와 난소를 제거한 여성에게 estrogen을 투여한 임상실험을 통해서 골다공증의 발생이 적은 것으로 증명된다.^{1,31)} 속발성 골다공증은 부갑상선 기능항진증, 부신피질 기능항진증, 갑상선 기능항진증, 선단거대증, Heparin 치료, 임신, 장기간 고정과 만성질환의 합병증으로 발생한다.³²⁾ 특히 여성에서는 폐경에 의해 estrogen 분비가 감소되면 골형성에 비해 골흡수가 급속히 증가하고 이로인한 골손실이 가속화되어 골다공증이 발생하게 된다.³³⁾

골다공증은 대분의 경우 골절이 일어나기 전에는 그 증상이 없으므로 많은 골손실이 진행된 후에 골다공증을 발견하게 된다. 골다공증을 예방하는 방법으로 ERT(Estrogen Rplacement Treatment)가 있다고 하여도 여러 가지 부작용 특히 자궁내막암, 유방암 등에 대한 염려로 인하여 장기간 사용하지 못하는 실정이다. 현재까지 진행된 많은 연구결과에 의하면 estrogen을 사용했던 여성이 사용하지 않은 여성에 비하여 유방암의 위험이 증가하지 않았다고 보고되고 있으나,^{34,35)} 오랫동안 사용한 경우에는 유방암의 위험률이 약간 증가하여, 최소 15년 이상을 사용했던 여성들을 대상으로 연구한 결과에 의하면 위험률이 1.3배 정

도인 것으로 알려져 있다.³⁶⁾ 최근들어 Souw등³⁷⁾은 미국에서 가장 흔히 사용되는 estrogen과 progestin의 동시 투여에 대해 폐경 후 16,608명의 여성을 약 5년 2개월간 추적 관찰한 결과, 유방암, 뇌졸중, 폐색전 등의 위험성이 위약군보다 높음을 증명하였다. 현재 사용되고 있는 대부분의 치료방법들은 만성적으로 발병한 골다공증에 식생활의 개선, 운동요법과 약물요법 등을 총체적으로 사용하고 있으며, 질병을 치료하기 보다는 예방의 효율성을 강조하고 있다. 현재 사용되는 약제로는 여성호르몬인 estrogen, 선택적 estrogen 수용체 조절제(SERM, Selective Estrogen-receptor Modulator), 비스포스포네이트(Bisphosphonate) 제제, 칼시토닌(Calcitonin), 비타민D, 칼슘 등이 사용되고 있지만, 불소제제와 부갑상선 호르몬을 제외하면 대부분 골흡수 억제제를 사용하고 있으며, 골형성을 촉진시키는 것 보다는 골흡수를 억제하는데 집중되어 있다.³⁸⁾ 골다공증의 궁극적인 치료를 위해서는 골 흡수 억제는 물론 골 형성을 자극하는 약제들이 시급히 요구되는 실정이다. 최근에 골 전환에 관여되는 국소 인자들, 특히 골 형성 과정에 관여되는 인자들을 골다공증 치료에 이용하는 연구들이 시도되고 있다. 약재로 사용될 가능성이 높은 인자들로는 BMP, IGF-1, IGF-1+IGF-BP3, TGF, FGF 및 PDGF 등을 들 수 있다.³⁹⁾

골다공증은 만성적으로 발생하는 질환으로 장기간의 치료가 필요하므로 이에 따른 한약재 추출물에 의한 치료 및 예방이 더욱 유효성 및 안정성을 확보할 수 있으리라 보여지며, 한약재에 의한 골관절 질환 치료제의 검색 및 한약재내 유효물질의 개발이 매우 중요한 것으로 사료된다.

인중합체(polyphosphate)는 세균, 곰팡이, 원생동물, 식물, 포유동물 등의 거의 모든 생물체에서 발견되며,⁴⁰⁾ 인체에 무해하고 식품의 신선도를 유지시켜 식품첨가물로 많이 이용되고,⁴¹⁾ 항균제로 분류되지는 않았지만 항균효과를 가진다고 보고되어 있으며,^{42,43)} 인중합체의 기능은 ATP 대체물과 에너지원, Pi의 저장소, 금속 이온의 chelator, 알칼리에 대한 완충제, DNA 출입을 위한 통로, 스트레스와 생존을 위한 조절자, 발생(development)의 조절자, 세포의 외내막의 구성요소로 요약된다.⁴⁴⁾ Schröder에 따르면, 인중합체는 proliferation phase, matrix maturation phase, mineralization phase, apoptosis phase에 관련된 다양한 물질들에 영향을 미친다고 나와 있다. 인중합체와 골형성과 관련된 연구를 종합해 보면, 인중합체는 조골세포양 세포(osteoblast-like cells)에서 다량 발견되고 골조직의 무기질 과정의 조절과 관련이 있으며, 골과 칼슘대사에 관여하며, 골절시 골형성이 촉진되는 것으로 골유도 효과가 있으며, osteocalcin 발현량을 증가시킴으로 골화세포의 생성을 촉진시킬 수 있다는 것이다.^{7,9)} 하지만 현재까지는 인중합체의 기전이 명확하게 알려진 바는 없으며, 단지 골대사에 중요한 역할을 하고 있다는 것만이 추측되어지고 있다. 따라서, 한약재 내에서 인중합체의 정량을 분석하고 골형성과 관련된 다른 실험을 통하여 인중합체 함량과의 상관성을 비교하는 것이 필요하다고 사료된다.

본 실험에서 인중합체를 골형성과 관련된 하나의 factor로 보아 발아 서목태를 사용하여 인중합체를 정량 분석하였다. 발아

서목태를 발아시기에 따라 인중합체 양을 OD530/630 값으로 측정하여 전체 건조중량에 따른 인중합체의 전체 총량을 분석한 결과 발아 1일에서 가장 많은 양(9.467ng/ml)을 나타냈고, 0일(3.711ng/ml), 2일(2.403ng/ml), 3일(1.949ng/ml) 순으로 인중합체가 검출되었다. 특히, 발아하지 않은 것과 2일, 3일 발아시켰을 때는 크게 차이가 없지만, 1일 발아시켰을 때에는 발아시키지 않은 서목태와 비교하였을 때 인중합체량이 약 300% 이상 증가하는 것을 볼 수 있다.

골다공증은 한의학적으로 腎虛에 속하는 것⁴⁵⁾으로, 《素問·宣明五氣篇》에서 "五臟所主, …… 腎主骨"이라 하였고, 《素問·六節臟象論》에 "腎者, 主蛰封藏之本, 精之處也, …… 其充在骨"이라 하였고, 《素問·陰陽應象大論》에 "北方生寒, 寒生水, 水生鹹, 鹹生腎, 腎生骨髓"라고 하여⁴⁶⁾ 腎은 精을 藏하고 精은 髓를 生하며 髓는 骨을 養한다고 하였다. "髓者, 骨之充也"라 하여⁴⁷⁾ 腎精이 骨髓의 盛衰와 밀접하게 관련되어 있는 것을 설명하고 있다.

한의학에서는 골다공증을 '骨痿', '骨痺'의 범주에 포함⁴⁸⁾시켰으며 또한 '腎主骨'이라 하여 腎과 骨과는 밀접한 연관성을 가지고 있는 것으로 인식하고 있으며 腎이 骨을 主한다는 것은 腎이 水液을 조절하고 先天과 後天의 精을 이용하여 骨髓를 滋養함으로써 腎精이 骨髓를 生長시킨다는 의미를 내포하고 있는데 이는 骨의 생리, 병리 과정에서 腎의 기능이 아주 중요한 역할을 담당하고 있음을 알려준다.⁴⁹⁾

동양인들보다 칼슘 섭취량이 3~4배 많은 서양에서 골밀도가 낮고, 골절환자 발생율이 4~5배 높은 것은 동양인들이 콩과 같은 isoflavone 함량이 많은 음식을 섭취하는 것에 기인하는 것으로 알려져 있다. 콩류는 phytoestrogen의 하나인 isoflavone을 많이 포함하고 있으며, isoflavone은 estrogen의 1/1000~1/100000 활성을 나타낸다.⁵⁰⁻⁵²⁾ 그 중 대두의 isoflavone은 estrogen과 구조가 유사하고 약한 estrogen 활성을 나타내나 체내에 축적되지 않아서 estrogen 대신 사용한다면 estrogen의 치료 효과를 얻을 뿐 아니라 장기간 호르몬 치료에 의한 부작용을 감소시킬 것으로 기대되고 있다.^{23),53)} 김⁵⁴⁾은 대두 isoflavone이 난소를 절제한 성장기 흰쥐의 estrogen의 감소로 인한 부작용을 억제하는 효과가 있으며 고농도의 isoflavone의 섭취가 부작용을 나타나지 않았다고 하였다.

서목태는 쌍떡잎 식물 장미목 콩과의 *Rhynchosia Volubilis Lour*의 성숙한 종자이며,⁵⁵⁾ 신농본초경⁵⁶⁾에 鹿藿이라고 기재된 이후 쥐눈이콩, 豨豆라 하고 약용으로 알려져 있으며,⁵⁷⁾ 빛이 검으면서 단단하고, 작은 수콩(雄豆)을 약으로 쓰는 것이 더 좋다고 한다. 性은 溫하고 味는 甘하며, 無毒하고, 中焦를 고르게 하고 氣를 내리며, 脈이 막힌 것을 통하게 한다.⁵⁸⁾ 민간과는 달리 한의학에서는 종자보다는 줄기와 잎, 뿌리를 임상에서 주로 응용하여 왔으며, 涼血解毒의 기능으로 頭痛, 腰疼腹痛, 產褥熱, 癰癤, 癰腫 등을 치료한다.⁵⁷⁾ 서목태에는 isoflavone이 매우 풍부하게 함유되어 있어서 식이를 통하여 체내에 흡수되면 천연 여성호르몬과 같은 작용을 함으로써 여성들의 폐경기 이후의 호르몬 결핍으로 인한 골다공증에 널리 이용되고 있다.^{59,60)}

이에 따라 본 연구에서는 대두 isoflavone을 많이 함유한 것으로 알려진 발아 서목태를 실험약제로 선택하였고 이를 통하여, 골모세포의 증식과 RT-PCR법을 이용한 골형성 관련 유전자들(COL1, OTN, MGP, BMP)의 전사활성을 통하여 골형성에 미치는 영향을 살펴보았다.

HOS-TE85 세포주는 골모세포의 특징을 유지하고 있는 골종양 세포주이다.⁶¹⁾ 김⁶²⁾은 cDNA array 기법을 이용하여 HOS 세포주가 골모세포의 알려진 형질을 비교적 잘 유지하고 있는 것으로 판단하였다. 본 실험에서 HOS-TE85 세포주의 세포증식능을 평가한 결과 발아 0, 2, 3일에서는 거의 변화가 없거나 약 10% 내의 세포증식능이 감소하였으며, 발아 1일에서만 농도가 증가함에 따라 점차 세포증식능이 감소하며, 1mg/ml에서 약 20% 정도 세포증식능이 감소되었다. 항산화 효과를 볼 수 있는 과산화수소를 처리하여 세포 증식능을 본 결과 대부분 유사한 수치를 나타내었지만, 1mg/ml을 처리하였을 경우 발아 0, 1일에서 약 4~5% 정도 증가하였고, 발아 2일에서는 16% 증가, 발아 3일에서는 100ug/ml을 처리하였을 때 11% 항산화 효과가 증가하였다. 위의 항산화 효과 실험은 골다공증으로 인한 염증반응을 치료할 수 있을지 알아보려고 진행하였고, 발아 2, 3일된 서목태가 항산화 효과가 있는 것으로 나타남에 따라 IL-2, 4, 10 등의 전사물 및 다양한 실험을 통해서 발아 서목태의 다른 기능을 알아보는 것도 좋을 것으로 추정된다.

COL1(collagen type 1)은 뼈의 유기질의 90%를 차지하고 있는 단백질로서, 많은 질환이 이를 만드는 유전자의 결함과 연관되어 있다. osteonectin, osteopontin의 표현과 관련된 연구에서 이들은 단지 ossification에만 관여하는 것으로 알려져 있다. 동물의 세포 외 매트릭스의 주성분으로 오랫동안 구조 유지라는 물리적 기능을 위한 불활성 단백질이라고 생각되어 있었지만, 현재는 세포접착활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 콜라겐 분자는 I ~ X III형으로 많은 종류가 있다. 그 중 I형은 교원섬유를 이루는 콜라겐으로 섬유형성 콜라겐 또는 간질형 콜라겐이라고 불리운다.

HOS-TE85 세포의 골형성 관련 유전자들의 대조군인 COL1의 전사활성에서 발아시키지 않은 서목태는 대조군과 발현양 차이가 거의 없었으나 1일에서는 약 50% 정도 감소하였으나, 2일과 3일에서는 각각 19%, 23% 증가하였으며, 과산화수소를 처리하였을 때에는 control에의 발현양과 비슷하거나 약 10% 정도 감소하였으며 3일에서는 11% 증가하였다. 이는 COL1의 경우 발아 3일 된 것이 가장 효율적이라고 사료되는 결과이다.

뼈의 유기질 성분의 90%는 collagen이고 나머지 10%가 osteocalcin, osteonectin, α-HS glycoprotein, cyanoprotein, fetuin 등의 비 collagen성 단백질로 구성된다. 비 collagen성 단백질인 osteonectin(OTN)은 분자량이 32kDa인 인산화 당단백질로서 주로 발육 중인 뼈의 무기성분에 존재하는 비아교단백질이다.⁶³⁾ 석회화 조직에서의 OTN의 기능은 아직 정확히 밝혀지지 않았으나, 시험관에서 아교섬유 위에 수산화인회석 형성의 개시시에 많이 분포된다고 알려져 있으며, 아교섬유와 칼슘에 부착된다고 알려졌다.^{64,65)}

HOS-TE85 세포의 골형성 관련 유전자들의 대조군인 OTN의 전사 활성에서 전체적으로 10% FBS 상태에서 서목태를 처리한 sample은 전반적으로 OTN 발현이 약 10% 안으로 비슷하게 증가하는 양상을 보였으며, 과산화수소를 처리하였을 때에는 10% FBS만 처리하였을 때에 비하여 서목태 처리와 관계없이 OTN 발현양이 전체적으로 증가하였으며, 발아 0일과 3일에서 30% 증가하였다. 이것은 osteonectin이 골형성에 있어서 주로 발현되는 시기인 골기질 성숙단계와 무기질화 단계⁶⁶⁾에 유효하게 관여할 수 있음을 시사한다.

MGP는 작은 matrix 단백질로서 골에서 고립되어 있으며 Price와 Williamson에 의해서 정의되었다.⁶⁷⁾ 이 단백질의 기능은 석회화를 억제하나, 아직 정확한 mechanism은 밝혀지지 않았다. 발달 중인 limbs에서 MGP가 과발현 되면 연골 성숙이 늦어지고 연골 내의 골화가 block 된다. 전체적으로 10% FBS 상태에서 서목태를 처리한 sample은 전반적으로 MGP 발현이 control에 비해서 감소하지만, 특이하게도 0일에서는 약 46% 증가하는 것을 볼 수 있다. 과산화수소를 처리하였을 때에는 10% FBS만 처리하였을 때에 비하여 전체적으로 MGP 발현이 증가하였지만, 대조군과 비교하여 크게 증가하거나 감소한 그룹은 나타나지 않았다. 이는 발아시키는 것이 MGP에는 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 생각된다.

골형성 단백질(Bone Morphogenetic Protein, BMP)은 성장 인자의 하나인데 골 조직의 세포의 간질(extracellular matrix)에도 함유되어 있다. 처음에는 탈회화(demineralized) 골 성분을 연부 조직 내에 주입하였을 때에 골 조직 형성을 유도(bone induction)하는 현상을 통해서 발견되었다.⁶⁸⁾ 이들의 유전자가 밝혀지면서 제1형을 제외하고는 TGF- β 계열에 속하는 성장 인자들로 밝혀졌다.^{69,70)} 구조적으로 BMP-1은 730개의 아미노산으로 된 효소로 pro-collagens I, II, III를 절단하여 성숙한 콜라겐 섬유를 만드는 데 관여한다. 이 1형을 제외하고 BMPs는 TGF β 계열에 속하는 성장인자로 밝혀졌다. 여러 가지 BMP 아형들 가운데 BMP-2와 BMP-4는 신생골 형성 능력이 뛰어나서 골절 치유 과정에서도 중요한 조절인자로 작용할 것으로 기대되고 있다.^{71,72)}

HOS-TE85 세포를 이용한 골형성 관련 유전자인 BMP1A의 전사 활성에 미치는 영향에 대한 실험에서 전체적으로 10% FBS 상태에서 서목태를 처리한 sample은 전반적으로 BMP1A 발현이 비슷한 양상을 보였으나 2일에서 발현양이 control에 비하여 약 76% 감소하였고, 과산화수소를 처리하였을 때에는 10% FBS만 단독으로 처리하였을 때에 비하여 약 30~50%정도 감소하였지만, 발아시기와 관계없이 전체적인 BMP1A 발현양은 유사하였다. BMP2B의 경우 전체적으로 10% FBS 상태에서 서목태를 처리한 sample은 전반적으로 BMP2B 발현이 비슷한 양상을 보이며 약 10~15% 증가하였으나 2일에서는 control에 비하여 약 15% 정도 발현양이 감소하였다. 과산화수소를 처리하였을 때에는 10% FBS만 단독으로 처리하였을 때에 비하여 control에서는 약 10% 정도 감소하였고, 서목태를 처리하였을 때는 발아시기와 관계없이 control에 비하여 약 10% 정도 감소하였다. 이는 2일 이상 발아시킨 서목태는 BMP1A, BMP2B 활성을 많이 감

소시키며 골형성을 유도하는 촉진제로서는 적합하지 않음이 나타나고 있다.

이상에서 발아 서목태의 인중합체를 정량한 결과 발아 1일 서목태가 발아 0, 2, 3일 된 서목태보다 3배 정도의 인중합체를 나타내었다. 하지만 골형성 관련 유전자들(COL1, OTN, MGP, BMP)의 활성을 살펴보면, 발아 1일 서목태가 전반적으로 활발한 활성을 보인데 반해 인중합체의 증가만큼 유전자의 활성이 크게 활성화되지는 않았다. 따라서 보다 효과적인 골다공증 치료를 위해서는 골흡수 억제와 골형성 촉진에 대한 다양한 연구가 필요하며, COL, OTN, MGP, BMP등의 골형성 관련유전자들 간의 상호관계에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

발아 서목태를 발아 일수에 따라 인중합체 함량을 정량 분석하여 비교하고, 골모세포인 HOS-TE85 세포의 증식과 RT-PCR법을 이용한 골 형성 관련 유전자들의 전사활성을 통하여 골형성에 미치는 영향을 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

인중합체를 spectrophotometer(OD530/630)로 측정하여 평균한 결과, 1일 발아시켰을 때에는 발아시키지 않은 서목태와 비교하여 인중합체량이 약 300% 이상 증가하는 것을 볼 수 있었다. HOS-TE85세포의 세포증식능을 평가한 결과, 발아 1일에서만 농도가 증가함에 따라 점차 세포증식능이 감소하며, 발아 2, 3일에서는 항산화 효과가 증가하였다. COL1은 발아 1일에서 50% 감소, 2, 3일에서 19%, 23% 증가하였다. 과산화수소를 처리하였을 때에는 control에의 발현양과 비슷하거나 약 10% 정도 감소하였고 3일에서는 11% 증가하였다. OTN은 10% FBS 상태에서 10%정도 증가하고, 과산화수소 처리시 0일과 3일에서 약 30%정도 크게 증가하였다. BMP1A는 전체적으로 10% FBS 상태에서 발현이 비슷한 양상을 보였으나, 발아시기와 관계없이 전체적인 BMP1A 발현양은 유사하였다. BMP2B는 10% FBS 상태에서 발현량이 10~15% 증가하였고, 과산화수소를 처리하였을 때, 발아시기와 관계없이 control에 비하여 약 10% 정도 감소하였다.

이상과 같이 발아 서목태의 인중합체를 정량한 결과 발아 1일 서목태가 발아 0, 2, 3일 된 서목태보다 인중합체의 양이 3배 가량 높게 나타났으며, 골형성 관련 유전자인 COL1, OTN, MGP, BMP의 활성은 인중합체의 증가만큼 유전자의 활성이 크게 나타나지는 않았다.

참고문헌

1. 김영일. 지역사회에서 주폐경기 여성의 골다공증 위험인자와 치료에 관한 연구. 인제대학교 대학원. 박사학위논문. p.1, 2001.
2. 대한골대사학회. 골다공증. pp.3-6, 2000.
3. 임승길. 골다공증 치료의 최신 지견. 대한재과학회지. 57(5): 856-8, 1999.
4. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ,

1. Kooperberg C, Stefanick ML et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women : principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 288(3): 321-33, 2002.
5. 김구순. polyphosphate가 골형성에 미치는 영향에 관한 연구. 경희대학교 대학원(博士). p.2,7, 2001.
6. Fleisch H. Form polyphosphates to bisphosphate and their role in bone and calcium metabolism. *Prog Mol Subcell Biol*. 23; 197-216, 1999.
7. 이진용 외 2人. Inorganic polyphosphate promotes bone regeneration. *대한구강해부학회*. 23; 219-228, 1999.
8. (주)경원메디칼, 인산칼슘(Ca-phosphate)에 골재생(성장) 촉진물질인 인중합체를 첨가한 생체적합적인 골대체 및 재생 소재의 개발. *보건복지부*. pp.11-17, 1999.
9. Leyhausen G, Lorenz B, Zhu H, Geurtsen W, Bohnensack R, Muller WE, Schröder HC. Inorganic polyphosphate in human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res*. 13(5); 803-12, 1998.
10. Schröder HC, Kurz L, Muller WE, Lorenz B. Polyphosphate in bone. *Biochemistry (Mosc)*. 65(3): 296-303, 2000.
11. Khokher MA, Dandona P. Diphosphonates inhibit human osteoblast secretion and proliferation. *Metabolism*. 38(2):184-7, 1989.
12. Reinholz GG, Getz B, Pederson L, Sanders ES, Subramaniam M, Ingle JN, Spelsberg TC. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. *Cancer Res*. 60(21): 6001-6007, 2000.
13. Renier ML, Kohn DH. Development and characterization of a biodegradable polyphosphate. *J Biomed Mater Res*. 34(1):95-104, 1997.
14. Sun JS, Tsuang YH, Liao CJ, Liu HC, Hang YS, Lin FH. The effects of calcium phosphate particles on the growth of osteoblasts. *J Biomed Mater Res*. 37(3); 324-334, 1997.
15. 김영신. 수종 한약재의 인중합체 함량과 골형성 관련 유전자의 활성에 대한 연구. 상지대학교 대학원. 박사학위논문. p.34, 2003.
16. 박영희, 윤선 등. 이소플라본 보충이 난소절제 흰쥐의 골대사에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지*. 30(4): 567-661, 2001.
17. 김성란, 홍희도 등. 콩 및 콩제품 중의 isoflavone 함량과 특성. *한국식품연구*. 16(2):35-46, 1999.
18. 손현수, 이윤실 등. 대두 이소플라본이 인간에 미치는 영향 분석. *한국식품연구*. 17(2): 9-19, 2000.
19. 소은희, 구자환 등. 콩 품종의 isoflavone 함량과 항산화 활성. *한국식품연구*. 33(1): 35-39, 2001.
20. 박철. 서목태 전당액이 XO/HX에 의해 손상된 골아세포에 미치는 영향. 원광대학교 대학원 석사논문. 30,33-4, 2001.
21. Cassidy A. Physiological effects of phyto-oestrogens in relation to cancer and other human health risks. *Proc Nutr Soc*. 55: 399-417, 1996.
22. Wang MF, Kishi K, Takahashi T, Komatsu T, Ohnaka M, Inoue G. Efficiency of utilization of soy protein isolate in Japanese young men. *J Nutr Sci Vitaminol*. 29(2): 201-16, 1983.
23. 김민정. 한국에서 섭취되는 콩 및 가공식품의 이소플라본 및 쿠메스트롤 정량과 섭취량 측정. 서울대학교대학원. 석사학위논문. p. 22, 25, 28, 58, 2001.
24. 대한내분비학회. 내분비학. 서울: 고려의학; p.1269, 1999.
25. 조한백. 대보원전이 난소적출로 골다공증이 유발된 백서에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. pp.30-32, 1998.
26. 김희진, 이태균 등. 폐경기골다공증에 관한 문헌적 고찰. *대한한방부인과학회*. 11(2): 131-148, 1998.
27. 이영구. 난소절제술을 실시한 흰쥐에서 성장호르몬의 골다공증 예방효과. *대한정형외과학회지*. 33(7): 1941-1951, 1998.
28. Anerson JJB, Garner SC. Phytoestrogens and Bone. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*. 12: 543-557, 1998.
29. Drezner MK. Osteoporosis types I and II. In: Anerson JJB, Garner SC, ed. *Calcium and phosphorus in Health and Diseases*, CRC Press, NY: pp.341-354, 1995.
30. Stein GS, Lian JB, Van Wijnen AJ, Montecino M. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol. Rev* 76: 593-629, 1996.
31. 민현기. 임상내분비학. 서울: 고려의학; pp.220-222, 1990.
32. 대한정형외과학회. 정형외과학. 서울: 최신의학사; pp.83-85, 1986.
33. 대한폐경학회. 폐경기 여성의 관리. 서울: 칼빈서적; pp.51-57, 1994.
34. Dupont WD, Page DL. Menopausal estrogen replacement therapy and breast cancer. *Arch Intern Med*. 151(1):67-72, 1991.
35. Grady D, Rubin SM, Petitti DB, Fox CS, Black D, Ettinger B et al. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann Intern Med*. 117(12): 1016-37, 1992.
36. Steinberg KK, Thacker SB, Smith SJ, Stroup DF, Zack MM, Landers WD et al. A meta-analysis of the effect of estrogen replacement therapy on the risk of breast cancer. *JAMA*. 265(15): 1985-90, 1991.
37. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women : principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 288(3): 321-33, 2002.
38. 최웅환. 골다공증의 약물치료: 비호르몬제 치료법. *한양의대 학술지*. vol.22: no.1, 2002.
39. 임승길. 골다공증 치료제로서 bone Formation-stimulating

- Agent의 최신지견. 대한내분비학회지. 14(2): 219-226, 1999.
40. Komberg A. Inorganic polyphosphate : toward making a forgotten polymer unforgoatable. J Bacteriol. 177(3): 191-196, 1995.
 41. Knabel Sj, Walker HW, Hartman PA. Inhibition of *Aspergillus flavus* and selected grampositive bacteria by chelation of essential metal cations by polyphosphates. J Food Prot. 54(5): 360-365, 1991.
 42. 최인식 외. *Porphyromonas gingivalis*에 대한 polyphosphate의 항균효과. 대한미생물학회지. 34: 285-301, 1999.
 43. Hahm, Dae Hyun Yeom, Mi Jung Lee, Eunjoo H. Shim, In Sop Lee, Hye Jung Kim, Hong Yeoul. Effect of *Scutellariae Radix* as a novel antibacterial herb targetting ppk(polyphosphate kinase) of *Salmonella typhimurium*. 대한미생물학회지. vol 11. no6, 2002.
 44. Kornberg A. Inorganic Polyphosphate: A molecular of many Functions. Prog Mol Subcel Biol. 23: 8-11, 1999.
 45. 羅昌洙 외 3人. 頭面 脊椎 四肢病의 診斷과 治療. 서울. 대성문화사. p.142, 1995.
 46. 程士德 主編. 素問注釋匯粹(上冊). 北京, 人民衛生出版社. p.89, 152, 189, 1982.
 47. 王冰 注. 黃帝內經素問. 서울. 大成出版社. p. 21, 101, 212, 274, 340, 768, 1994.
 48. 金貞娟 외 1人. 骨多孔症에 대한 東西醫學의 考察. 韓方再活醫學會誌 6(1), 1996.
 49. 金完熙 외 1人, 臟腑辨證論治. 서울. 成輔社. 281-88, 1985.
 50. Ishida, H., U. Takihiko, K. Hirai, and T. Toda. Prenevite effects of the plant isoflavones, daidzin and genistin, on bone loss in ovariectomized rats fed a calcium-deficient diet, Biol, Pharm, Bull. 21(1): 62-66.19, 1998.
 51. Christine, R.D. Phytoestrogens reduce bone loss and bone resorption in ovariectomized rats, J. Nutr, 127(9): 1795-1799, 1997.
 52. Potter, S.M. Soy protein and isoflavones : their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women, American journal of clinical nutrition, 68:1375-1379, 1998.
 53. Cassidy A. Physiological effects of phyto-oestrogens in relation to cancer and other human health risks. Proc Nutr Soc. 55:399-417, 1996.
 54. 김영경. 대두 이소플라본의 섭취가 난소를 절제한 성장기 흰쥐의 골격대사에 미치는 영향. 한양대학교대학원. 석사학위논문. p.4,5, 2002.
 55. 심상용. 韓方食料解典. 서울. 창조사. p.102, 1976.
 56. 李時珍. 本草綱目. 서울. 행림출판사. p.197, 1972.
 57. 김창민, 신민교 등. 中藥大辭典. 도서출판 정담. pp.777-778, 2000.
 58. 許浚. 對譯東醫寶鑑. 法仁文化社. 서울. p.1802, 1999.
 59. 최윤, 김정란 등. 이소플라본 섭취 수준이 폐경기와 폐경후 여성의 혈청내 지질 패턴과 Total Antioxidant Status에 미치는 영향. 한국영양학회지. 34(3): 322-329, 2001.
 60. 이동선, 문형인 등. 이소플라본의 조성들이 골다공증에 미치는 효과. 한국미생물공학회지. pp.420-425, 2001.
 61. Clover J, Gowen M. Are MG-63 and HOS TE85 human osteosarcoma cell lines representative models of the osteoblastic phenotype. Bone. 15(6): 585-91, 1994.
 62. 김종인. cDNA Array를 이용한 골모세포의 유전자 발현 연구. 부산대학교 대학원. 박사학위논문. p.4,29,56, 2000.
 63. Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. Cell. 26: 99-105, 1981.
 64. Romsberg RW, Werness PG, Riggs BL, Mann KG. Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium binding proteins. Biochem. 25: 1176-80, 1986.
 65. Pacifici M, Oshimao, Fisher LW, Young MF, Shapiro IM, Leboy PS. Changes in osteonectin distribution and levels are associated with mineralization of the chicken tibial growth cartilage. Calcif Tissue Int. 47: 51-61, 1990.
 66. Choi JY, Lee BH, Song KB, Park RW, Kim IS, Sohn KY et al. Expression patterns of bone-related protein during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. J Cell Biochem. 61(4): 609-18, 1996.
 67. Price, P. A. and Williamson, M. K. Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein. J. Biol. Chem. 260(28):14971-14975, 1985.
 68. Urist, MR. Bone formation by autoinduction. Science. 150: 893-99, 1965.
 69. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitscock LM, Whitters MJ, Kriz RW et al. Novel regulators of bone formation : molecular clones and activities. Science. 242: 1528-34, 1988.
 70. Ozkaynak E, Rueger DC, Drier EA, Corbett C, Ridge RJ, Sampath TK et al. OP-1 cDNA encodes an osteogenetic protein in the TGF-beta family. EMBO J. 9: 2085-93, 1990.
 71. Urist MR : Bone : formation and autoinduction Science 150: 893-899, 1965.
 72. King Gn, King N, Cruchley AT. et al. Recombinant human BMP2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects. J Den RES 76:1460-1470, 1997.