

## 이소플라본이 난소절제 쥐에서 골밀도와 골무기질 함량에 미치는 영향

최 미 자<sup>§</sup> · 강 유 정

계명대학교 식품영양학과

### Effects of Isoflavones on Bone Mineral Density and Bone Mineral Content in Ovariectomized Rats

Choi, Mi-Ja<sup>§</sup> · Kang, You-Jung

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

#### ABSTRACT

A recent study reported that a diet rich in isoflavones is beneficial for bone formation in growing rats. It therefore seemed desirable to find out whether the beneficial effect of isoflavones in ovariectomized rats could also be reproduced with same amount of isoflavones which used for growing rats. To study the effect of isoflavones, an equal amount of isoflavones which used for growing rats, on bone mineral density and bone mineral content in ovariectomized rats were performed. Forty female Sprague-Dawley rats (body weight  $210 \pm 5$  g) were divided into two groups, ovariectomy and sham groups, which were each randomly divided into two subgroups that were fed casein and casein supplemented with isoflavones diets for 9 weeks after operation. All rats were fed on experimental diet and deionized water ad libitum for 9 weeks. Bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) were measured using PIXImus (GE Lunar Co, Wisconsin) in spine and femur. Serum alkaline phosphatase activity (ALP) and osteocalcin and urinary DPD crosslinks value were measured as markers of bone formation and resorption. The results of this study indicate that body weight gain and food intake were higher in ovariectomy groups than in sham groups regardless of diets. Serum Ca concentration was lower in ovariectomy groups than in SHAM groups. Serum ALP, osteocalcin, and crosslink value were increased in ovariectomy groups. Spine BMD/weight, femur BMD/weight, and femur BMC/weight of ovariectomy groups were significantly lower than SHAM groups after 9 weeks. However, isoflavones supplemented group in ovariectomy groups, serum ALP and osteocalcin concentrations, spine BMD/weight and spine BMC, femur BMD/weight and femur BMC/weight were significantly increased after 9 weeks. In conclusion, the beneficial effect of isoflavones on bone in ovariectomized rats was shown on 9 weeks after feeding with an equal amount of isoflavones supplementation which used for growing rats. (*Korean J Nutrition* 39(3) : 236~243, 2006)

**KEY WORDS** : isoflavone, BMD, BMC, osteocalcin, ovariectomized rats.

#### 서 론

노인인구의 증가로 골다공증의 예방 및 치료에 대한 관심이 증대되고 있다. 우리나라의 폐경기 여성 중 40대 25%, 50대 50%, 60대 77.8%가 골다공증인 것으로 보고<sup>1)</sup>되었다. 골다공증의 치료법으로 폐경 여성에서 호르몬 대체요법이 널리 사용되어 왔으나 에스트로겐 치료는 유방암의 위험을 증

가<sup>2,3)</sup>와 자궁암, 당뇨병, 담낭질환, 혈관계 질환, 그리고 고혈압 등의 위험을 증가시킬 수 있다는 보고<sup>4,5)</sup>가 있어 최근 많은 사람들이 꺼리고 있다. 이러한 호르몬 요법의 부작용을 고려하여, 약물치료 이외의 골손실 치료 및 골손실을 지연하는 기능성 물질에 관심을 갖는 연구자들이 많아지게 되었다. 그 중 이소플라본은 여성호르몬 17-베타 에스트라디올 ( $17\beta$ -estradiol)과 구조가 유사하여 호르몬 요법을 대체할 수 있는 식물성 에스트로겐으로 많은 주목을 받고 있다.<sup>6)</sup> 이소플라본이 골대사에 미치는 영향에 대한 연구로, Ishimi 등<sup>7)</sup>은 이소플라본을 함유하는 콩단백질은 폐경 여성에서 골소실을 지연시켰다고 보고하였고, Erdman 등<sup>8)</sup>은 폐경 여성에게 90 mg/day의 이소플라본을 24주간 섭취시킨 결과 척추의 골

접수일 : 2006년 3월 14일

채택일 : 2006년 4월 10일

<sup>§</sup>To whom correspondence should be addressed.

E-mail : choimj@kmu.ac.kr

밀도가 유의하게 증가되었다고 보고하였고, Alekel 등<sup>9)</sup>은 폐경이 진행 중인 여성들에게 80.4 mg/day 이소플라본을 24주간 보충시킨 결과 요추의 골손실을 감소시키는 효과가 있었다고 보고하였다. 또한 Potter 등<sup>10)</sup>은 폐경 여성에게 이소플라본 함량이 다른 콩단백질을 6개월간 섭취시킨 결과, 55 mg/day 수준으로 섭취한 군은 효과가 없었으나 90 mg/day의 수준으로 섭취한 군은 척추 골밀도에 유의한 효과가 있다고 보고하여 이소플라본의 섭취량에 따라 다르게 나타났다.

동물실험에서도 이소플라본의 보충이 난소절제쥐의 대퇴골과 척추골의 손실을 줄이거나 노화와 관련된 골손실의 개시를 늦추었다는 보고<sup>11)</sup>가 있다. 그러나 난소절제 쥐에게 이소플라본을 6주 동안 각각 8 mg/day, 16 mg/day 섭취시켰을 때, 8 mg/day 이소플라본을 섭취시킨 군은 골격칼슘과 인의 손실을 예방하는 반면, 16 mg/day을 섭취한 군은 그러한 효과를 얻지 못하였다고 보고<sup>12)</sup>하였다. 또한 난소절제쥐에서 이소플라본의 성분 중 제니스틴 (genistein)을 8주 동안 2 mg/day와 20 mg/day를 섭취시켰을 때 골밀도가 증가하였으나, 1 mg/day의 저 농도를 섭취시킨 난소절제 쥐는 골밀도에 효과를 미치지 못하였다고 보고<sup>13)</sup>하였다. 또한, Anderson과 Garner<sup>14)</sup>은 0.5 mg/day의 이소플라본의 제니스틴을 섭취한 난소절제군은 골손실을 예방하는 반면, 더 높은 수준의 이소플라본의 제니스틴을 섭취한 군은 예방하지 아니하고 오히려 역효과를 나타내었다고 하여 상반된 결과를 보고하였다.

따라서 이소플라본이 골 대사에 영향을 미치는 효과는 이소플라본의 섭취량, 섭취 기간, 이소플라본의 노출 시기에 따라 효과가 다르게 나타났음을 알 수 있다. 최근 난소절제쥐를 대상으로 Deyhim 등<sup>15)</sup>은 이소플라본을 6주간 11.5 mg/day 섭취 시 골밀도 및 골무기질 소실 방지에 효과가 없었고, Toda 등<sup>16)</sup>은 4주간 10 mg/day를 공급하였을 때 골손실이 예방된다고 보고하여 서로 상반된 보고가 있다. 그러나 Deyhim 등<sup>15)</sup>은 골강도를 측정하여 골밀도를 계산하였고 Toda 등<sup>16)</sup>은 생화학적 자료로 골밀도를 측정하였다. 골밀도는 골밀도 기기로 직접 측정하는 것이 가장 정확한 방법임을 고려할 때 직접 골밀도의 측정이 요망된다.

또한 Deyhim 등<sup>15)</sup>과 Toda 등<sup>16)</sup>이 사용한 이소플라본량 (10~11.5 mg/day)과 비슷한 양의 이소플라본 (11.5 mg/day)을 9주간 섭취한 성장기에서 골밀도와 골무기질 함량에 유의하였다는 연구<sup>17,18)</sup>가 있다. 따라서 본 연구는 성장기에서 골대사에 유리한 효과를 나타낸 이소플라본 섭취량이 난소절제 쥐에서도 동일한 양과 노출기간으로 하였을 때 골밀에 유의한 효과가 나타나는지 알아보고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 식이

평균 체중이 약 200 g 정도인 6주령 Sprague-Dawley 암컷 쥐 40마리를 난소절제 수술한 난소절제 (OVX) 군과 난소절제는 하지 않고 수술을 통하여 동일한 스트레스를 준 SHAM군으로 나누어 1주일간 적응시킨 후 식이의 조성에 따라 각각 대조군으로 Casein, 실험군으로 Casein에 이소플라본을 첨가하여 Casein + IF군으로 나누어 9주간 실험하였다. 실험동물은 stainless steel wire cage에서 한 마리씩 분리 사육하였으며, 사육 기간 동안 사육실의 온도는 22 ± 2°C, 습도는 65 ± 5%를 유지하였고 광주기와 암주기를 12시간 간격으로 자동조절장치를 이용하여 조절하였다. 식이와 물은 자유롭게 섭취 (ad libitum)하도록 하였고, 이때 사용된 물은 모두 2차 이온 교환수를 이용하였다. 실험 식이는 AIN-93M 조성을 따랐으며, 이소플라본 첨가군의 이소플라본 첨가량은 선행연구에서<sup>17,18)</sup> 성장기 쥐가 섭취한 이소플라본 양 (8~11 mg/day)과 비슷한 11.5 mg/day를 첨가하였다 (Table 1).

### 2. 실험 방법

#### 1) 체중 측정 및 실험식이 섭취량 측정

체중측정은 1주일 단위로 일정한 시간에 측정하였고, 식이 섭취량은 이틀에 한번씩 일정한 시간에 측정하였다. 식이

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

Ingredients	Casein <sup>1)</sup>	Casein + IF <sup>2)</sup>
Casein <sup>3)</sup>	200	200
Corn starch	529.486	527.556
Sucrose	100	100
Soybean oil	70	70
α-Cellulose	50	50
Min-mix <sup>4)</sup>	35	35
Vit-mix <sup>5)</sup>	10	10
L-cystine	3	3
Choline <sup>6)</sup>	2.5	2.5
Tert-butyl hydroquinone <sup>7)</sup>	0.014	0.014
Isovon <sup>8)</sup>		1.93

- 1) Control diet
- 2) Isoflavone supplementation in Control diet
- 3) Casein high protein, Teklad Test Diet, Madison, Wisconsin, USA
- 4) AIN-93M-MX, Teklad Test Diets, Medison, USA
- 5) AIN-93M-VX, Teklad Test Diets, Medison, USA
- 6) Choline bitartrate, Corning Laboratory Services Company, Teklad Test Diets, Medison, USA
- 7) Tert-butyl hydroquinone, Corning Laboratory Services Company, Teklad Test Diets, Medison, USA
- 8) Isovon: Isoflavones compound (total isoflavones 32%), Pacific Chemical

**Table 2.** Body weight change, food intake and FER of experimental rats

Group	SHAM		OVX	
	Casein	Casein + IF	Casein	Casein + IF
Initial weight (g)	196.3 ± 10.6 <sup>1)ns2)</sup>	197.7 ± 14.0 <sup>ns</sup>	209.2 ± 13.1 <sup>ns</sup>	208.9 ± 5.1 <sup>ns</sup>
Final weight (g)	274.9 ± 42.6 <sup>3)</sup>	251.1 ± 19.3 <sup>b</sup>	328.1 ± 33.6 <sup>c</sup>	301.6 ± 24.9 <sup>c</sup>
Weight gain (g)	78.5 ± 36.6 <sup>a</sup>	53.4 ± 10.7 <sup>b</sup>	119.8 ± 36.1 <sup>c</sup>	92.8 ± 22.1 <sup>d</sup>
Food intake (g/day)	14.62 ± 1.8 <sup>a</sup>	14.33 ± 1.4 <sup>a</sup>	17.44 ± 1.1 <sup>b</sup>	16.14 ± 1.2 <sup>c</sup>
FER <sup>4)</sup>	0.093 ± 0.032 <sup>a</sup>	0.067 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.121 ± 0.032 <sup>c</sup>	0.106 ± 0.019 <sup>c</sup>

1) Mean ± SD

2) NS: no significantly different at &lt;0.05

3) Values with different superscripts within the row are significantly different at p&lt;0.05 by duncan's multiple range test

4) FER: Food efficiency ratio = weight gain (g) / food intake (g)

효율 (Food Efficiency Ratio: FER)은 평균 식이 섭취량을 체중 증가량으로 나누어 계산하였다.

## 2) 골밀도 측정

실험동물은 척추 (spine) 및 대퇴골 (femur)의 골밀도 (bone mineral density: BMD)와 골무기질함량 (bone mineral content: BMC)를 측정하였다. 골밀도는 LUNAR사의 PIXImus (Dual energy x-ray absorptiometry, DEXA)를 사용하여 측정하였다.

## 3) 생화학 분석

요 및 혈청 칼슘과 인은 TECHNICON CHEN<sup>TM</sup> SYSTEM을 이용하여 자동분석기로 측정하였고, 요 중 deoxypyridinoline, creatinine의 측정은 collagen crosslinks<sup>TM</sup> Kit (Metra Biosystems Inc. U.S.A)을 이용하여 ELISA (enzyme-linked immuno sorvent assay)법에 의하여 분석하여 deoxypyridinoline과 creatinine의 crosslinks value를 구하였다. Alkaline phosphatase (ALP)는 TECHNION CHEM<sup>TM</sup> SYSTEM을 이용하여 효소법에 의해 405 nm에서 비색정량하여 자동분석기로 측정하였고, 혈청 내 Osteocalcin은 Osteocalcin kit (Techno genetics, Italia)를 이용하여 gamma counter로 radioactivity를 측정하였다.

## 3. 자료 처리 및 통계

통계처리는 SAS package를 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차를 구하였으며, 각 군의 비교는 one-way-ANOVA를 하였고, 군 간의 통계적인 유의성은 Duncan's multiple range test를 이용하여 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 체중 증가량, 식이 섭취량 및 식이효율 (FER)

실험 시작 시 동물의 체중은 유의적인 차이는 없었으나 9주간 실험 후 체중은 OVX군이 SHAM군에 비해 유의적으

로 증가하였다 (Table 2). OVX군이 SHAM군에 비해 유의적으로 증가하여 선행연구<sup>19)</sup>와 일치하였다. 이것은 Wronski<sup>20)</sup>이 난소를 절제한 흰쥐가 체중을 증가시키므로써 체중 지탱 능력 (Weight bearing activity)을 키우고 에스트로젠 생성이 가능한 체지방을 증가시키려는 기전으로 풀이된다고 하였다. 그리고 OVX군과 SHAM군 모두에서 이소플라본 첨가군은 Casein군에 비해 체중이 유의적으로 낮았다. 이것은 이소플라본이 체중의 증가율을 낮추었다는 여러 선행연구<sup>21-23)</sup>와 일치하였고, 그 기전은 아직 밝혀지지 않았는데 성장 호르몬 분비를 촉진시키면 복부비만을 감소시킬 수 있다는 추론이 있으며<sup>24)</sup> Choi와 Jo<sup>17)</sup>의 연구에서 이소플라본이 풍부한 콩 단백질을 섭취시켰을 때 성장호르몬 분비가 증가되었다고 보고하였다. 평균 일일 식이 섭취량은 SHAM군에서는 Casein군 (14.62 ± 1.8 g/day)과 Casein + IF군 (14.33 ± 1.4 g/day)간에 유의적인 차이가 없었고, OVX군 내에서 Casein군은 17.44 ± 1.1 g/day, Casein + IF군은 16.14 ± 1.2 g/day로 이소플라본 첨가군에서 유의적으로 낮았다. 그리고 SHAM군과 OVX군 간에 식이 섭취량을 비교해보면 Casein 식이는 각각 14.62 ± 1.8 g/day와 17.44 ± 1.1 g/day, Casein + IF군은 14.33 ± 1.4 g/day와 16.14 ± 1.2 g/day로 OVX군의 식이섭취량이 유의적으로 증가하였다. 이것은 선행연구에서 난소절제 시에 식이 섭취량이 증가하였다고 보고한 Park<sup>25)</sup>과 Chung 등<sup>26)</sup>의 연구결과와 일치한다. 또한 본 연구의 실험동물의 이소플라본의 섭취량은 11.5 mg/day로서 선행연구 Deyhim 등<sup>15)</sup>의 11.5 mg/day와 Toda 등<sup>16)</sup>의 10 mg/day와 비슷한 수준이었다.

식이효율 (FER)을 보면 SHAM군내에서 Casein군은 0.093 ± 0.32, Casein + IF은 0.067 ± 0.01로 Casein군이 유의적으로 높았다. OVX군 내에서는 Casein군이 0.121 ± 0.032, Casein + IF군이 0.106 ± 0.019으로 OVX군 차이는 없었으나 이소플라본 첨가 군이 낮은 경향을 보였다. 최근 Choi와 Jo 연구<sup>17)</sup>에서 Casein군이 콩단백질군 보다 식이 효율이 높은 것으로 보고하였는데 본 실험도 동일한 결

과를 볼 수 있었다. Casein군간 비교를 해보면 SHAM군은  $0.093 \pm 0.032$ , OVX군은  $0.106 \pm 0.019$ 로 OVX군이 유의적으로 높게 나타났다. 이것은 OVX군의 체중 증가율이 유의적으로 높은 것과 관계가 있다.

2. 생화학분석

1) 혈청 칼슘 및 인 함량

혈청 내 칼슘과 인의 함량을 Table 3에 나타내었다. 쥐의 혈청 칼슘의 정상 수준은 7.2~13.0 mg/dl인데 실험 군 모두 정상범위에 속하였다.<sup>27)</sup> 그러나 혈청 칼슘은 SHAM군에 비해 OVX군이 유의적으로 낮았다. 이것은 OVX군이 혈청 칼슘이 감소하는 경향을 나타내었다고 보고한 Kim<sup>28)</sup>의 연구와 일치하였다. 그러나 Uesugi<sup>29)</sup>은 4주 동안 대두 이소플라본의 daidzin, genistin, glycytin을 각각 25, 50, 100 mg/kg wt/day를 경구 투여한 11주령 난소절제 쥐에서 혈청 칼슘과 인의 농도는 이소플라본의 종류와 공급수준에 따라 유의적인 차이를 나타내지 않았다고 보고하였다. 따라서 이소플라본의 섭취기간, 섭취량, 실험동물의 주령에 따라 다르게 나타남을 알 수 있다. 혈청 인은 정상수준으로 SHAM군과 OVX군 간에 유의적인 차이는 없었고 이 결과는 선행연구<sup>30)</sup>와 일치하였다.

2) 요 중 칼슘 및 인 배설량

요 중 칼슘과 인의 배설량을 Table 4에 나타내었다. 요 중

칼슘 배설량은 SHAM군내에서 Casein군이  $0.67 \pm 0.31$  mg/day, Casien + IF군이  $0.55 \pm 0.20$  mg/day, OVX군내에서 Casien군이  $0.96 \pm 1.07$  mg/day, Casien + IF군이  $0.89 \pm 0.59$  mg/day로, 요 중 칼슘배설량은 SHAM군에 비해 OVX군이 유의적이지 않았으나 높게 나타났고, Casein에 이소플라본을 첨가한 경우 OVX군이나 SHAM군 모두 낮은 경향을 보였다. 이것은 쥐에서 이소플라본을 첨가한 식이를 섭취하게 한 경우 통계적으로 유의성은 없으나 요 중 칼슘의 배설이 낮은 경향을 보였다는 Choi와 Jo<sup>17)</sup>의 선행연구와 일치하였다. 또한 Cecchetin 등<sup>31)</sup>은 이탈리아 폐경 여성에게 이플리플라본 200 mg/day을 12개월 보충하였을 때, 요 중 칼슘 배설량이 유의적으로 낮았다고 보고 하였다.

3) 혈청 ALP와 Osteocalcin 함량

최근 골형성 지표로 혈중 ALP (alkaline phosphatase)와 osteocalcin농도가 가장 많이 사용되고 있다.<sup>32)</sup> ALP는 조골세포의 활성을 반영해 주지만 혈중 ALP의 반이 뼈에서 유리되며 ALP는 간과 신장에서도 합성이 되어 골의 미세한 변화를 반영하는데 어려움이 있는데 반해,<sup>33)</sup> Osteocalcin은 골과 상아질에 특이성을 가지는 단백질로 조골세포에서 만들어지기 때문에 조골세포의 활동력을 알 수 있어 골형성 정도를 반영해주는 좋은 단일지표로 보고<sup>34)</sup>되었다. 혈중 ALP와 Osteocalcin 농도를 Table 5에 나타내었다.

Table 3. Serum calcium and phosphorus concentrations

Group	SHAM		OVX	
	Casein	Casein + IF	Casein	Casein + IF
Serum Ca (mg/dl)	$11.35 \pm 0.40^{1,a2)}$	$11.02 \pm 0.33^a$	$10.03 \pm 0.39^b$	$10.00 \pm 0.55^b$
Serum P (mg/dl)	$8.52 \pm 2.57^{NS3)}$	$11.05 \pm 8.30^{NS}$	$8.52 \pm 0.40^{NS}$	$7.50 \pm 0.38^{NS}$

1) Mean  $\pm$  SD  
 2) Values with different superscripts within the row are significantly different at  $p < 0.05$  by duncan's multiple range test  
 3) NS: no significantly different at  $< 0.05$

Table 4. Urinary calcium and phosphorus excretion in rats

Group	SHAM		OVX	
	Casein	Casein + IF	Casein	Casein + IF
Urinary Ca (mg/d)	$0.67 \pm 0.31^{1,NS2)}$	$0.55 \pm 0.20^{NS}$	$0.96 \pm 1.07^{NS}$	$0.89 \pm 0.59^{NS}$
Urinary P (mg/d)	$11.39 \pm 3.37^{NS}$	$9.54 \pm 0.92^{NS}$	$13.24 \pm 1.60^{NS}$	$13.37 \pm 4.17^{NS}$

1) Mean  $\pm$  SD  
 2) NS: no significantly different at  $< 0.05$

Table 5. Alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin

Group	SHAM		OVX	
	Casein	Casein + IF	Casein	Casein + IF
ALP (U/l)	$34.25 \pm 9.17^{1,a2)}$	$43.75 \pm 9.94^a$	$52.00 \pm 9.67^c$	$73.33 \pm 13.32^b$
Osteocalcin (ng/mg)	$2.43 \pm 0.23^a$	$2.24 \pm 0.44^a$	$3.11 \pm 0.74^b$	$3.90 \pm 1.02^c$

1) Mean  $\pm$  SD  
 2) Values with different superscripts within the row are significantly different at  $p < 0.05$  by duncan's multiple range test

혈청 ALP 농도는 SHAM군에 비해 OVX군이 유의적으로 높은 수치를 나타내었다. SHAM군내에서 Casein군은 34.25 ± 9.17 U/l, Casein + IF군은 43.75 ± 9.94 U/l로 유의적인 차이가 없었고, OVX군 내에서는 Casien 군은 52.00 ± 9.67 U/l, Casein + IF군은 73.33 ± 13.32 U/l로 이소플라본 첨가군의 ALP가 유의적으로 높았다. OVX군 내에서 이소플라본의 첨가는 ALP의 농도를 더욱 증가시켰다.

혈청 Osteocalcin은 SHAM군에 비해 OVX군은 유의적으로 높았으며, SHAM군 내에서 Casein군은 2.43 ± 0.23 ng/mg, Casein + IF군은 2.24 ± 0.44 ng/mg으로 차이가 없었고, OVX군 내에서 Casein군은 3.11 ± 0.74 ng/mg, Casein + IF군은 3.90 ± 1.02 ng/mg으로 유의적으로 높았다. 본 결과는 성장기의 쥐에서 이소플라본을 함유한 콩단백질의 섭취 시 Casein 식이를 섭취시킨 군에 비하여 ALP와 Osteocalcin 농도가 증가하였다고 보고한 Choi 연구<sup>22)</sup>와 일치하였다. 성장기의 ALP나 Osteocalcin 농도의 증가는 골형성과 관련이 높으나 폐경모델인 난소절제쥐에서 Osteocalcin의 증가는 골형성의 증가의 의미도 있지만 골교체율의 증가를 의미하기도 하므로<sup>35)</sup> 실제 골밀도의 측정이 요망된다. Arjmandi 등<sup>11)</sup>은 난소절제한 쥐에게 에스트라디올이나 대두 식품을 주었을 때 골형성 지표와 골용해 지표가 유의적으로 높게 나타나 골교체율이 높았지만, 대조군보다 척추와 대퇴골의 골밀도가 높게 나타나 난소절제에 의한 골용해 보다 대두단백에 의한 골 형성이 증가한 것으로 사료된다고 보고하였다.

**4) 요 중 Deoxypyridinoline (DPD), Creatinine과 Crosslinks value**

골흡수 지표로는 요 중 total and dialyzable hydroserum tartrate resistant acid phosphatase, urinary hydroxypyridinoline crosslinks 등이 있는데, Deoxypyridinoline (DPD)는 골조직에서 발견되며, 파골 세포에 의해 파괴되어 골기질에서 빠져 나와 대사 되지 않는 그대로 소변으로 배설<sup>36)</sup>되어 특이도가 높아 골흡수를 반영하는 가장 뚜렷한 생화학적 지표라 할 수 있다.<sup>37)</sup> 따라서 소변 중 DPD는 폐경 전에 비해 폐경 후에 많이 배설된다. 본 실험에서는 Table 6에 Deoxypyridinoline (DPD)와 Creatinine, Crosslinks value를 나타내었다. Crosslinks value를 보면 OVX군은 SHAM군에 비하여 높았고, SHAM군과, OVX군 내에서 이소플라본의 첨가에 의한 차이는 볼 수 없었다.

**3. 골밀도 및 골무기질함량**

**1) 척추 골밀도 (BMD)와 골무기질함량 (BMC)**

척추 골밀도 및 척추 골무기질 함량은 Table 7에 나타내었다. SHAM군에 비해 OVX군의 척추 골밀도는 유의적인 차이가 없었다. 체중의 증가는 골밀도 및 골함량을 증가시키므로 골밀도 및 골무기질 함량에 매우 큰 영향을 미치는데<sup>38)</sup> 체중당 척추 골밀도는 SHAM군에 비해 OVX군이 유의적으로 낮았다. 이소플라본의 첨가가 척추 골밀도에 미치는 효과를 보면 SHAM군은 Casein에 비해 Casein + IF군이 13%, OVX군은 Casein에 비해 Casein + IF군이 12%로 유의적

**Table 6.** Urine deoxypyridinoline, creatinine and crosslinks value in animals

Group	SHAM		OVX	
	Casein	Casein + IF	Casein	Casein + IF
Deoxypyridinoline (nM)	573.2 ± 302.1 <sup>1)NS2)</sup>	1039.6 ± 443.4 <sup>NS</sup>	1064.9 ± 328.6 <sup>NS</sup>	987.2 ± 371.9 <sup>NS</sup>
Creatinine (mM)	3.19 ± 1.61 <sup>NS</sup>	6.07 ± 2.34 <sup>NS</sup>	4.44 ± 2.17 <sup>NS</sup>	3.77 ± 2.37 <sup>NS</sup>
Crosslinks value (nM/mM)	179.7 ± 33.6 <sup>3)</sup>	171.3 ± 29.1 <sup>a</sup>	239.2 ± 56.8 <sup>b</sup>	249.0 ± 64.5 <sup>b</sup>

1) Mean ± SD  
 2) NS: no significantly different at <0.05  
 3) Values with different superscripts within the row are significantly different at p < 0.05 by duncan's multiple range test

**Table 7.** Spine bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC)

Group	SHAM		OVX	
	Casein	Casein + IF	Casein	Casein + IF
SBMD <sup>1)</sup> (g/cm <sup>2</sup> )	0.2023 ± 0.007 <sup>2)NS3)</sup>	0.2119 ± 0.003 <sup>NS</sup>	0.2024 ± 0.014 <sup>NS</sup>	0.2120 ± 0.008 <sup>NS</sup>
SBMD/wt (kg)	0.7485 ± 0.099 <sup>4)</sup>	0.8489 ± 0.064 <sup>b</sup>	0.6263 ± 0.101 <sup>c</sup>	0.7051 ± 0.594 <sup>d</sup>
SBMC (g/cm <sup>2</sup> )	0.3786 ± 0.021 <sup>a</sup>	0.3921 ± 0.017 <sup>b</sup>	0.4086 ± 0.012 <sup>c</sup>	0.4163 ± 0.020 <sup>d</sup>
SBMC/wt (kg)	1.3986 ± 0.016 <sup>a</sup>	1.5661 ± 0.093 <sup>b</sup>	1.2593 ± 0.148 <sup>c</sup>	1.3845 ± 0.108 <sup>c</sup>

1) SBMD: Spine bone mineral density  
 2) Mean ± SD  
 3) NS: no significantly different at <0.05  
 4) Values with different superscripts within the row are significantly different at p < 0.05 by duncan's multiple range test

**Table 8.** Femur bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC)

Group	SHAM		OVX	
	Casein	Casein + IF	Casein	Casein + IF
FBMD <sup>1)</sup> (g/cm <sup>2</sup> )	0.1486 ± 0.011 <sup>2)NS3)</sup>	0.1558 ± 0.008 <sup>NS</sup>	0.1457 ± 0.008 <sup>NS</sup>	0.1473 ± 0.008 <sup>NS</sup>
FBMD/wt (kg)	0.553 ± 0.099 <sup>0d)</sup>	0.624 ± 0.072 <sup>b</sup>	0.4495 ± 0.064 <sup>c</sup>	0.4914 ± 0.054 <sup>d</sup>
FBMC (g/cm <sup>2</sup> )	0.4864 ± 0.049 <sup>NS</sup>	0.4866 ± 0.024 <sup>NS</sup>	0.4886 ± 0.035 <sup>NS</sup>	0.5173 ± 0.042 <sup>NS</sup>
FBMC/wt (kg)	1.796 ± 0.270 <sup>o</sup>	1.942 ± 0.088 <sup>b</sup>	1.5021 ± 0.127 <sup>c</sup>	1.7193 ± 0.118 <sup>d</sup>

1) FBMD: femur bone mineral density

2) Mean ± SD

3) NS: no significantly different at <0.05

4) Values with different superscripts within the row are significantly different at p < 0.05 by duncan's multiple range test

으로 높게 나타나 Lee와 Kim<sup>39)</sup>의 연구와 일치하였다.

척추 골무기질 함량을 보면 SHAM군에 비해 OVX군이 높았으며 Casein군에 비해 Casein + IF군이 SHAM군은 4%, OVX군은 2% 유의적으로 증가하여 이소플라본을 첨가한 군은 Casein군에 비해 두 군 모두 유의적인 증가를 나타내었다.

역학조사<sup>40)</sup>에서 최근 대두 이소플라본 섭취량은 척추 골밀도에 영향을 미쳤으나 대퇴골 경부에 영향을 미치지 않았고 대두를 일생 섭취한 자는 대퇴 경부에는 유의적이었으나, 척추 골밀도에는 유의적이지 않았다고 하였다. 따라서 이소플라본의 섭취량과 섭취기간 노출 시기에 따라 골격 부위에 미치는 영향이 다르게 보고되고 있어 추후 많은 연구가 요망된다.

## 2) 대퇴골 골밀도 (BMD)와 골무기질함량 (BMC)

대퇴골밀도와 골무기질 함량은 Table 8에 나타내었다. 대퇴골밀도는 대조군 식이에서 SHAM군과 OVX군 간에 유의적인 차이는 없었다. 그러나 이소플라본을 첨가한 경우 SHAM군과 OVX군 모두 대조군 식이인 Casein 식이 섭취 보다 높은 경향을 보였다. 체중 당 대퇴골밀도는 SHAM군에 비해 OVX군이 유의적으로 낮았고, 이소플라본을 첨가한 골밀도에 미치는 효과를 보면 SHAM군에서는 12%, OVX군에서는 9%로 유의적으로 증가하여 이소플라본 첨가는 대퇴골 밀도 보호에 효과가 있었다. 선행연구에서 Stephanie 등<sup>41)</sup> 이소플라본을 포함한 콩단백질을 9~13 mg/day를 섭취시킨 난소절제쥐에서 골 표면적과 골형성률이 높았으며 대퇴골의 골밀도가 유의적으로 증가하였다고 보고하여 본 연구와 일치하였다. 대퇴골무기질 함량은 OVX군이 높았는데 이것은 체중이 OVX군이 높기 때문으로 사료된다. 따라서 체중을 고려하여 비교하였을 때 SHAM군에 비해 OVX군의 두 군 모두 유의적으로 낮았고 SHAM군과 OVX군내에서 이소플라본을 첨가한 경우 SHAM군에서는 8%, OVX군에서는 14%로 유의적으로 증가하여 이소플라본 첨가는 대퇴골무기질 보호에 효과가 있었다. 선행연구에서 Fanti<sup>42)</sup>는 이소플라본을

3주간 섭취시킨 난소절제 쥐에서 해면골 손실이 50% 감소하였다고 보고하였으며, Ohta<sup>43)</sup>는 이소플라본의 제니스틴이 난소절제 쥐에서 해면골의 손실을 예방한다고 보고하였다. 또한 Atkinson 등<sup>44)</sup>은 12개월 동안 이소플라본을 섭취시킨 폐경 여성이 척추 골밀도, 골함량 및 골흡수 지표가 증가하였고, 대퇴골밀도 및 골무기질 함량도 증가하였다고 보고하여 본 연구와 일치하였다.

## 요약 및 결론

난소절제 쥐에서 이소플라본 식이 (11.5 mg/day)가 골밀도 및 골무기질 함량에 미치는 영향을 알아본 결과는 다음과 같다.

1) 체중 증가량은 난소절제 (OVX)군이 SHAM군에 비해 유의적으로 증가하였고, SHAM군, OVX군 모두에서 이소플라본 첨가군이 유의적으로 낮았다.

2) 식이 섭취량은 난소절제군이 유의적으로 높았고, OVX군에서 Casein군에 비해 이소플라본 첨가 시 유의적으로 낮았다. 식이 효율은 SHAM군에 비해 OVX군이 유의적으로 높았다.

3) 혈중 칼슘의 함량은 SHAM군에 비해 OVX군이 유의적으로 낮았다.

4) 요 중 칼슘배설량은 SHAM군에 비해 OVX군이 증가하는 경향을 보였고, 이소플라본을 첨가하였을 때 감소하는 경향을 보였으나 유의적이지 않았다.

5) 혈중 Osteocalcin 농도는 SHAM군에 비해 OVX군이 유의적으로 높았고, OVX군에서 이소플라본 첨가 시 유의적으로 증가하였다.

6) Crosslinks value는 SHAM군에 비하여 OVX군이 유의적으로 높았고, SHAM군과 OVX군 내에서 이소플라본의 첨가에 따른 유의적인 차이는 없었다.

7) 이소플라본의 첨가 식이는 난소절제쥐에서 체중 당 척추골밀도와 척추골함량, 체중 당 대퇴 골밀도 및 골무기질 함량을 유의적으로 증가시켰다.

결론적으로 성장기 골대사에 유리한 효과를 나타낸 8~11 mg/day 이소플라본의 섭취량은 난소절제한 쥐에서도 골밀도 및 골무기질 함량에 유의하였다.

## Literature cited

- 1) Bae CY, Shin DH, Ku ES, Lee JS, Beak JS. A study for osteoporosis of postmenopausal women. *J Korean Acad Fam Med* 15: 113-120, 1994
- 2) Adlercreutz CHT, Goldin BR, Gorbach SL. Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J Nutr* 125 (suppl): 757s-779s, 1995
- 3) Hempstock J, Kavanagh JP, George NJR. Growth inhibition of human prostatic cell lines by phytoestrogens. *Am J Clin Nutr* 68 (suppl): 527s-534s, 1998
- 4) Knight DC, Eden JA. A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstet Gynecol* 87: 897-904, 1996
- 5) Potter SM. Soy protein and cardiovascular disease: The impact bioactive components in soy. *Nutr Rev* 56: 231-235, 1998
- 6) Lien LL, Lien EJ. Hormone therapy and phytoestrogen. *J Clin Pharm Ther* 21: 101-111, 1996
- 7) Ishimi Y, Miyaura C, Ohmura M, Onoe Y, Sato T, Uchiyama Y, Ito M, Wang X, Suda T, Ikegami S. Selective effects of Genistein, a soy bone isoflavones, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinology* 140 (4): 1893-1900, 1999
- 8) Erdman JW Jr, Stillman RJ, Lee KR, Potter SM. Short-term effects of soybean isoflavone on bone in postmenopausal women. p.219. Second international symposium on the role of soy in prevention and treating chronic disease (abstr), 1996
- 9) Alekel DL, Germain AS, Hanson K. Soy protein isolate with isoflavone prevents loss of lumbar spine bone mineral density in perimenopausal women. *Am J Clin Nutr* 71: 649-656, 1999
- 10) Potter SM, Baum JA, Teng H, Stillman RJ, Shay NF, Erdman JWJ. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 68 (suppl): 137s-1379s, 1998
- 11) Arjmandi BH, Getlinger MJ, Goyal NV, Alekkel L, Hasler CM, Juma S, Drum ML, Hollis BW, Kukreja SC. Role of soy protein with normal or reduced isoflavone content in reversing bone loss induced ovarian hormone deficiency in rats. *Am J Clin Nutr* 68 (suppl): 1364s-1368s, 1998
- 12) Kim MS. Beneficial effect of soy isoflavone on bone loss and hyperlipidemia in ovariectomized rat. Ph D Dissertation. Seoul National University, Seoul, 1999
- 13) Kim YK, Shim JY, Lee HO, Yang SO, Om AS. Study on bone metabolism in growing rats by feeding soy isoflavone, genistein. *Kor Soybean Digest* 20 (2): 71-78, 2003
- 14) Adnerson JJ, Garner SC. Phytoestrogens and bone Baillieres. *Clin Endocrinol Metab* 12: 543-557, 1998
- 15) Deyhim F, Stoecker BJ, Bruswitz GH, Arjmandi BH. The effects of estrogen depletion and isoflavone on bone metabolism in rats. *Nutrition Research* 23: 123-130, 2003
- 16) Toda T, Uesugi T, Hirai K, Nukaya H, Tsuji K, Ishida H. New 6-O-acyl isoflavone glycosides from soybeans fermented with *Bacillus subtilis* (natto). I. 6-O-succinylated isoflavone glycosides, and their preventive effects on bone loss in ovariectomized rats fed a calcium-deficient diet. *Biol Pharm Bull* 22: 1193-1201, 1999
- 17) Choi MJ, Jo HJ. Effects of soy protein and Isoflavones on bone mineral density in growing female rat. *Kor J Nutr* 36: 359-367, 2003
- 18) Choi MJ. Effects of soy protein on bone mineral content and bone mineral density I growing male rats. *Kor J Nutr Soc* 35 (4): 409-413, 2002
- 19) Kim WY, Kim MH. Effect of Estrogen and Dietary Protein Level on Ca and Skeletal Metabolism in Ovariectomized Rats. *Kor J Nutr* 28 (4): 298-308, 1995
- 20) Wronski L. Response of femoral neck to estrogen depletion and parathyroid hormone in aged rats. *Bone* 16: 551-557, 1995
- 21) Picherit C, Bennetau-Pelissero C, Chanterne B, Leecque P, Cavicco MJ, Barlet JP, Coxam V. Soybean isoflavones dose-dependently reduce bone turnover but do not reverse established osteopenia in adult ovariectomized rats. *J Nutr* 131: 723-728, 2001
- 22) Chae JH. The effect of isoflavones on bone mineral density and bone mineral density and bone mineral content in growing male rats. MS Thesis. Keimyung University Daegu, 2002
- 23) Choi MJ. Effects of soy protein and isoflavones on bone markers and hormones in growing male rats. *Kor J Nutr* 36 (5): 452-458, 2003
- 24) Andreassen TT, Jorgensen PH, Flyvbjerg A, Orskov H, Oxlund H. Growth hormone stimulates bone formation and strength of cortical bone in aged rats. *J Bone Miner Res* 10: 1057-1067, 1995
- 25) Park YH. The effect of isoflavone supplementation on bone metabolism in ovariectomized SD rats. Ph D Dissertation. Yonsei University, Seoul, 2000
- 26) Chung LW, Gleave ME, Hsi JT, Hong SJ, Zhou HE. Reciprocal mesenchymal epithelial interaction affecting prostate tumor growth and hormonal responsiveness. (review) *Cancer Surv* 11: 91-121, 1991
- 27) Mituka BM, Rawnsley HM. Clinical biochemical and hemotological reference value in normal experimental animals and normal humans. p.160. 2nd edition, Masson, New York, 1987
- 28) Kim KH. The effect of dietary calcium level on biochemical variable and bone mineral density in ovariectomized female rats. MS Thesis. Keimyung University Daegu, 1993
- 29) Uesugi T, Toda T, Tsuji K, Ishida H. Comparative study on reduction of bone loss and lipid metabolism abnormality in ovariectomized rats by soy isoflavones, daidzin, genistein and glycitein. *Biol Pharm Bull* 24 (4): 368-372, 2001
- 30) Choi MJ, Jung JW. Effects of soybean protein on bone mineral density and bone mineral content in ovariectomized rats. *Kor J Nutr Soc* 38 (4): 279-288, 2005
- 31) Cecchetti M, Bellomitti S, Cremonesi G, Solimeno LP, Torri G. Metabolic and bone effects after administration of ipriflavone and salmon calcitonin in postmenopausal osteoporosis. *Biom Pharm* 49: 465-468, 1995
- 32) Garnero P, Delmas PD. New developments in biochemical markers of osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 59: 2-9, 1996
- 33) Delmas PD. Biological markers of bone turnover for the clinical investigation of osteoporosis. *Osteoporosis Int* 4 (suppl): 81s-86s, 1993
- 34) Johnell O, Oden A, De Laet C, Garnero P, Delmas PD, Kanis JA

- Biochemical indices of bone turnover and the assessment of fracture probability. *Osteoporosis Int* 13: 523-526, 2002
- 35) Liu G, Peacock M. Age-related changes in serum undercarboxylated osteocalcin and its relationships with bone density, bone quality, and hip fracture. *Calcif Tissue Int* 62: 286-289, 1998
  - 36) Rubinacci A, Melzi R, Zampino M, Soldarini A, Villa I. Total and free deoxypyridinoline after acute osteoclast activity inhibition. *Clin Chem* 45: 1510-1516, 1999
  - 37) Kleerekoper M. Biochemical markers of bone remodeling. *Am J Med Sci* 312: 270-277, 1996
  - 38) Rico H, Amo C, Revilla M, Arribas I, Gonzales-Rida J, Villa LF, Rodriguez-Puyol M. Etidrinat versus Clodronate in the prevention of postovariectomy bone loss: An experimental study in rats. An experimental study in rats. *Clin Exp Rheumatol* 12: 301-304, 1994
  - 39) Lee YS, Kim EM. Effect of ovariectomy and dietary calcium levels on bone metabolism in rats fed low calcium diet during growing period. *Kor J Nutr Soc* 31: 279-288, 1998
  - 40) Rice MM. Soy consumption and bone mineral density in older Japanese American women in King country. Ph D Dissertation. University of Washington, Seattle, WA, 1999
  - 41) Stephanie CB, Susanne NH, Beth MD, Maren H, Scott CM. Dietary soy protein maintains some indices of bone mineral density and bone formation in aged ovariectomized rats. *J Nutr* 133: 1244-1249, 2003
  - 42) Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z. The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporosis Int* 8: 274-281, 1998
  - 43) Ohta A, Uehara M, Sakai K, Takasaki M, Adlercreutz H, Morohashi T, Ishimi Y. Combination of dietary fructooligosaccharides and isoflavone conjugates increases femoral bone mineral density and equol production in ovariectomized Mice. *J Nutr* 132: 2048-2054, 2002
  - 44) Atkinson C, Compston AJ, Day NE, Dowsett M, Bingham SA. The effects of phytoestrogen isoflavones on bone density I women: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Nutr* 79: 326-333, 2004