

## 이소플라본 보충과 운동의 병행이 성장기 쥐의 골격대사에 미치는 영향

정윤정 · 최미자<sup>†</sup>

계명대학교 식품영양학과

### Effects of combined intervention of isoflavone supplementation and exercise on bone metabolism in growing rats

Jung, Yun-Jung · Choi, Mi-Ja<sup>†</sup>

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

#### ABSTRACT

**Purpose:** This study examined the effects of combined intervention of isoflavones and exercise on bone mineral density, bone mineral content, and biochemical bone markers. **Methods:** Forty rats were divided into four groups; Control, Isoflavones (IF), Isoflavones + Running (IFR), and Isoflavones + Swimming (IFS). All of the rats in this study were fed an experimental diet and deionized water ad libitum for nine weeks. Bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) were estimated using PIXImus (GE Lunar Co, Wisconsin) in spine and femur nine weeks after feeding or training. **Results:** The combined intervention did not affect weight gain, mean food intake, or food efficiency ratio. The serum concentrations of ALP and osteocalcin were not significantly different by combined intervention. The urinary DPD crosslinks values were not significantly different by combined intervention. There were no significant differences in serum PTH, calcitonin, and estradiol among all groups. Spine BMD, spine BMC and femur BMC were not significantly different by combined intervention. However, femur BMD was significantly higher in the IFR group than in the control group. Compared with the control group, spine BMD, spine BMC, and femur BMD per weight were markedly increased in the isoflavones supplementation and combined intervention group. In addition, femur BMC per weight was significantly higher in the IFS group than in the control group. Compared with the isoflavones supplemented group, BMD and BMC were not significantly different by combined intervention. **Conclusion:** It can be concluded that isoflavones supplementation or combined intervention of isoflavone and exercise had a beneficial effect on spine and femur peak bone mass in growing female rats.

**KEY WORDS:** isoflavones, exercise, combined intervention, bone mineral density, bone mineral content

## 서 론

골다공증의 치료에 사용하는 에스트로젠은 직접적으로 조골세포의 활성을 조절하고<sup>1,2</sup> 사이토카인이나 성장인자가 간접적으로 파골세포의 생성을 조절함으로써 골용해를 저해하는 것으로<sup>3</sup> 보고되고 있다. 하지만 에스트로젠의 장기간 사용은 유방암과 자궁암의 발생 위험을 증가시키는 부작용이 있어 많은 여성들이 에스트로젠 사용을 기피하고 있다.<sup>4,5</sup>

식물체 내에서 광합성으로 만들어지는 식물유래 천연물질 중 대표적인 phytoestrogen인 이소플라본 (isoflavones)은 식물성 에스트로젠 중에서 현재 관심을 끌고 있는 성분

으로 여성호르몬인 17 $\beta$ -estradiol과 그 구조가 유사하며 특히 대두에 많이 함유되어 있다. 여성호르몬 유사 활성을 나타내는 이소플라본의 섭취는 생식세포 조직의 증식은 자극하지 않고 골격 건강을 증진시킴으로써 폐경 전, 후 여성,<sup>6,7</sup> 난소절제<sup>8</sup> 및 성장기 동물<sup>9</sup>을 대상으로 한 여러 연구에서 골손실을 방지하고 골격형성에 효과적이라고 보고되고 있다.

또한, 규칙적인 신체활동과 운동은 골밀도와 최대 골질량을 증가시키는 것으로 알려져 있다.<sup>10</sup> 폐경 전, 후 여성에서 운동을 수행한 연구들을 메타분석한 결과, 대부분의 경우 척추에서는 유산소 운동과 체중부하운동인 웨이트 트레이닝 (weight-training) 모두가 효과를 나타내었지만 대

Received: March 12, 2015 / Revised: April 6, 2015 / Accepted: April 9, 2015

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

tel: +82-53-580-5874, e-mail: choimj@kmu.ac.kr

© 2015 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

퇴경부에서는 유산소 운동만이 효과를 나타내었다고 하였다.<sup>11</sup> 쥐를 대상으로 한 연구<sup>12</sup>에서 체중부하 골격 (weight-bearing bone)은 비체중부하 골격 (less weight-bearing bone)보다 체중부하 운동인 달리기보다 더 민감한 반응을 보였고, 장골의 체중부하활성 (weight-bearing activity)에 미치는 달리기 효과가 실험동물<sup>13</sup>에서 증명되었다.

에스트로겐 보충과 운동의 병행은 사람<sup>14</sup>과 동물<sup>15</sup>을 대상으로 한 연구에서 에스트로겐 결핍으로 인한 골손실을 억제하였다고 보고하였다. 이러한 결과들은 단독 효과보다는 골손실을 예방하는데 있어 운동과 이소플라본의 병행에 따른 상승효과가 존재한다는 것을 간접적으로 지지하는 것이다.

골밀도 연구에서 노화나 폐경 모델을 대상으로 골손실 지연에 대한 연구가 주로 이루어지고 있으나, 골다공증 예방을 위해서는 최대골밀도 형성이 중요하므로 성장기에 이소플라본과 운동의 병행이 골대사에 미치는 영향에 대한 연구는 의미 있다고 판단된다. 따라서 본 연구에서는 성장기 암컷 쥐를 대상으로 이소플라본 보충과 운동을 동시에 실시하였을 때 골밀도 및 골대사 지표에 미치는 영향을 분석하고자 하였다.

## 연구방법

### 실험동물 및 실험식이

Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐 ( $60 \pm 5$  g)를 대한 동물사육센터로부터 분양받아 일주일간의 적응 기간 동안 고형 사료로 사육하였다. 적응 사육을 실시한 후 난피법을 이용하여 각 군당 10마리씩 나누어 9주간 실험식이를 공급하였고, 운동을 실시하였다. 실험동물은 9주간 stainless steel wire cage에서 한 마리씩 분리 사육하였으며, 사육실의 온도는  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도는  $63 \pm 5\%$ 로 유지하고 매일 광주기, 암주기를 12시간이 되도록 자동 조절 (light 6:00~18:00)하였다. 실험기간 동안 식이와 물은 자유롭게 섭취케 하였으며 물은 모두 2차 이온교환수를 사용하였다. 동물실험의 전 과정은 실험동물 윤리규정에 근거하여 실험을 실시하였다.

이소플라본 보충과 운동의 병행에 따른 실험군은 1) 대조군 (Control), 2) 이소플라본군 (Isoflavones, IF), 3) 이소플라본 보충과 달리기 운동병행군 (Isoflavones + Running, IFR), 4) 이소플라본 보충과 수영 운동병행군 (Isoflavones + Swimming, IFS)의 네 군으로 분류하여 골격대사에 미치는 영향을 분석하였다. 실험식은 단백질 급원으로 카제인 (casein : total protein 85%)을 사용하였고 식이의 기본 조성은 대조군의 경우 카제인을 20% 하여 AIN-93G 정제

식이를 기준으로 조제하였다.<sup>16</sup> 이소플라본 첨가수준은 선행연구<sup>17</sup>에서 성장기 쥐에서 골격형성에 효과적인 연구 결과에 근거한 양 ( $57.8$  mg isoflavones/100 g diet)을 기본 식이에 첨가하였다.

### 운동방법

체중부하 여부에 따른 운동의 형태로 체중부하 운동인 달리기와 비체중부하 운동인 수영으로 구분하여 운동을 실시하였다. 운동방법은 성장기 암컷 쥐를 대상으로 트레드밀로 달리기 운동을 실시하였을 때 척추 골밀도가 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다고 보고한 연구<sup>18</sup>를 참고하였다. 달리는 트레드밀 (Motor Treadmill : Jung Do Co., Korea)을 이용하여 1주일에 3일간 실시하였고 트레드밀의 적응을 위하여 실험 처음 1주간은 속도  $5$  m/min로 10분, 2주째는  $10$  m/min로 20분, 3주째부터 실험 종료까지  $15$  m/min로 30분,  $15^\circ$  경사로 운동속도와 시간을 차츰 늘려가면서 운동을 실시하였다. 수영은 선행연구<sup>19</sup>의 운동방법을 참고로 물의 온도가  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 가 유지되도록 하였으며 수영조의 깊이는  $50$  cm, 한 마리당 수영면적은  $960$  cm<sup>2</sup>로 하였다. 수영에 대한 적응을 위하여 실험 1주간은 10분간 수영을 실시하며 매주 10분씩 증가시켜 실험 3주째부터 실험 종료까지 30분씩, 1주일에 3일간 달리기와 동일한 빈도와 운동시간으로 실시하였다.

### 식이섭취량 및 체중 측정

실험식이를 시작한 날을 기준으로, 식이섭취량은 이틀에 한 번씩 일정한 시간에 측정하였고, 체중은 1주일에 한 번씩 일정한 시간에 측정하였다. 식이효율 (Food Efficiency Ratio : FER)은 실험기간 동안의 체중증가량을 총 식이섭취량으로 나누어 계산하였다.

### 골대사 관련 생화학적 지표 분석

Alkaline phosphatase (ALP)는 p-nitrophenyl phosphate (PNPP) 기질에 ALP가 함유된 시료를 첨가하여 PNPP를 p-nitrophenol 로 분해시킨 후 p-nitrophenol의 발색정도를  $405$  nm에서 비색정량법으로 측정하였다.<sup>20</sup> 혈청 칼시토닌 (calcitonin)과 부갑상선 호르몬 (parathyroid hormone; PTH) 분석은 시험관에 부착된 항체와 I<sup>25</sup>로 표지된 항체를 사용하여 항원과 항체간에 'sandwich'를 형성하게 하는 비경쟁 방사면역학적 분석법을 이용하였다.<sup>21</sup> 분석시 각각 DSL-7700 ACTIVE™ Calcitonin IRMA kit (Diagnostic System Laboratories, Inc., USA)과 DSL-8000 ACTIVE™ Intact PTH IRMA kit (Diagnostic System Laboratories, Inc., USA)을 이용하였다. Estradiol은 경쟁적 방사면역분

석법에 기초하여 Coat-A-Count Estradiol kit (Diagnostic System Laboratories Inc., USA)로 분석하였다.<sup>22</sup> Osteocalcin은 경쟁적 방사면역분석법으로 OSTEOCALCIN MARIA kit (Techno genetics, Italia)을 이용하여 분석하였다.<sup>23</sup> 요중 deoxypridinoline (DPD)과 creatinine의 측정에는 collagen crosslinks™ Kit (Metra Biosystems Inc., USA)을 이용하여 ELISA (enzyme-linked immuno sorvent assay) 법에 의해 분석한 후 crosslinks value를 구하였다.

### 골밀도 측정

실험동물은 9주간의 실험식이 공급과 운동 후 골밀도를 측정하였다. 골밀도 측정기기는 동물전용 골밀도 측정기인 PIXImus (GE Lunar Co., Madison, Wisconsin, USA)를 이용하여 척추 (spine)와 대퇴골 (femur)의 골밀도 (bone mineral density, BMD)와 골함량 (bone mineral content, BMC)을 측정하였다.

### 통계 분석

본 실험에서 얻은 결과는 SAS package (Statistical Analysis System, Version 9.12: SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 분석하였다. 각 실험군의 변수들은 평균과 표준편차를 구하여 나타내었으며 각 군의 비교는 one-way ANOVA test를 하였고 군 간의 통계적 유의성은  $\alpha = 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검증하였다.

## 결 과

### 이소플라본 보충과 운동의 병행이 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율에 미치는 영향

이소플라본 보충과 운동의 병행에 따른 체중증가량, 평균 식이섭취량 및 식이효율을 Table 2에 나타내었다. 9주간의 체중증가량은 대조군이 168.7 g, IF군 163.9 g, IFR군은 165.5 g, IFS군은 164.0 g으로 이소플라본 첨가와 운동의 병행에 따른 유의적인 차이는 없었으며 평균 식이섭취량은 13.9~14.7 g으로 실험군 간에 유의적인 차이가 없었고 식이효율도 유의적인 차이가 없었다.

### 이소플라본 보충과 운동의 병행이 골대사지표에 미치는 영향

골형성 지표인 혈청 ALP와 osteocalcin 농도를 Table 3에 나타내었다. 혈청 ALP 농도는 대조군 58.3 U/L, IF군 53.3 U/L, IFR군 63.8 U/L, IFS군 55.4 U/L으로 실험군 간에 유의적인 차이는 없었다. 혈청 osteocalcin 농도는 대조

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

Ingredients	Control	Isoflavones(IF) <sup>9)</sup>
Casein <sup>1)</sup>	200	200
Corn starch	529.5	527.6
Sucrose	100	100
Soybean oil	70	70
$\alpha$ -Cellulose <sup>2)</sup>	50	50
Min-mix <sup>3)</sup>	35	35
Vit-mix <sup>4)</sup>	10	10
L-Cystine <sup>5)</sup>	3	3
Choline <sup>6)</sup>	2.5	2.5
Tert-butylhydroquinone <sup>7)</sup>	0.014	0.014
Isovon compound <sup>8)</sup>	.	1.93

1) Casein high protein (total protein 85%), Teklad Test Diets, Madison, Wisconsin, USA 2)  $\alpha$ -Cellulose, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA 3) AIN-93G-MX, Teklad Test Diets, Madison, Wisconsin, USA 4) AIN-93-VM, Teklad Test Diets, Madison, Wisconsin, USA 5) L-Cystine, Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA 6) Choline bitartrate, Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA 7) Tert-butyl hydroquinone, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA 8) Isovon: Isoflavones compound (total isoflavones 30%: genistein 13.31%, daidzein 7.52%), Pacific Pharmaceuticals Co., Korea 9) Isoflavone group: diet with isoflavone 578 mg per kg diet  
\* Calorie % of diet - carbohydrate : protein : fat = 64 : 19 : 17

**Table 2.** Effects of isoflavones and exercise on weight gains, mean food intake and food intake efficiency ratio (FER) in growing female rats

Group	Weight gains (g)	Mean food intake (g/day)	FER
Control	168.7 ± 19.0 <sup>1)</sup>	14.7 ± 1.18	0.205 ± 0.02
IF <sup>2)</sup>	163.9 ± 10.6	13.9 ± 1.21	0.194 ± 0.01
IFR <sup>3)</sup>	165.5 ± 15.4	14.6 ± 0.67	0.207 ± 0.01
IFS <sup>4)</sup>	164.0 ± 11.9	14.3 ± 1.08	0.209 ± 0.01

1) Mean ± SD 2) IF: Isoflavones 3) IFR: Isoflavones + Running 4) IFS: Isoflavones + Swimming

**Table 3.** Effects of isoflavones and exercise on serum alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin in growing female rats

Group	ALP(U/L)	Osteocalcin (ng/mL)
Control	58.3 ± 13.5 <sup>1)</sup>	3.35 ± 0.30
IF <sup>2)</sup>	53.3 ± 15.8	4.45 ± 0.38
IFR <sup>3)</sup>	63.8 ± 12.8	3.79 ± 0.25
IFS <sup>4)</sup>	55.4 ± 2.8	4.58 ± 0.14

1) Mean ± SD 2) IF: Isoflavones 3) IFR: Isoflavones + Running 4) IFS: Isoflavones + Swimming

군 3.35 ng/mL, IF군 4.45 ng/mL, IFR군 3.79 ng/mL, IFS군 4.58 ng/mL으로 이소플라본 보충과 운동의 병행에 따른 유의적인 차이가 없었다.

Table 4에 요 중 deoxypridinoline (DPD), creatinine, crosslinks value에 대한 결과를 나타내었다. 요 중 DPD 농도는 대조군 508.5 nM, IF군 417.8 nM, IFR군 588.1 nM, IFS군 450.1 nM으로 실험군간에 유의적인 차이는 없었고,

**Table 4.** Effects of isoflavones and exercise on deoxypyridinoline (DPD), creatinine and crosslinks value in growing female rats

Group	DPD(nM)	Creatinine (mM)	Crosslink value (nM/mM)
Control	508.5 ± 122.4 <sup>1)</sup>	4.3 ± 2.2	135.9 ± 69.2
IF <sup>2)</sup>	417.8 ± 148.5	3.6 ± 1.3	120.1 ± 29.4
IFR <sup>3)</sup>	588.1 ± 203.0	4.4 ± 1.0	155.0 ± 89.9
IFS <sup>4)</sup>	450.1 ± 182.3	2.7 ± 1.7	194.3 ± 67.6

1) Mean ± SD 2) IF: Isoflavones 3) IFR: Isoflavones + Running  
4) IFS: Isoflavones + Swimming

**Table 5.** Effects of isoflavones and exercise on serum parathyroid hormone (PTH), calcitonin and estradiol in growing female rats

Group	PTH (pg/mL)	Calcitonin (pg/mL)	Estradiol (pg/mL)
Control	11.74 ± 2.33 <sup>1)</sup>	1.64 ± 0.24	233.4 ± 31.9
IF <sup>2)</sup>	14.12 ± 3.87	1.84 ± 0.40	283.9 ± 67.8
IFR <sup>3)</sup>	15.27 ± 4.12	1.53 ± 0.28	274.6 ± 121.8
IFS <sup>4)</sup>	13.79 ± 3.04	1.67 ± 0.15	222.3 ± 51.6

1) Mean ± SD 2) IF: Isoflavones 3) IFR: Isoflavones + Running  
4) IFS: Isoflavones + Swimming

crosslinks value는 대조군 135.9 nM/mM, IF군 120.1 nM/mM, IFR군 155.0 nM/mM, IFS군 194.3 nM/mM으로 이소플라본 보충과 운동에 따른 유의적인 차이가 없었다.

**골형성 관련 호르몬: 부갑상선 호르몬과 칼시토닌 (calcitonin), Estradiol**

이소플라본 보충과 운동의 병행에 따라 부갑상선 호르몬, 칼시토닌 및 estradiol에 미치는 효과를 Table 5에 제시하였다. 혈중 부갑상선 호르몬은 대조군 11.74 pg/mL, IF군 14.12 pg/mL, IFR군 15.27 pg/mL, IFS군 13.79 pg/mL으로 실험군 간에 유의적인 차이는 없었다. 혈중 칼시토닌 농도는 대조군 1.64 pg/mL, IF군 1.84 pg/mL, IFR군 1.53 pg/mL, IFS군 1.67 pg/mL으로 실험군 간에 유의적인 차이는 없었다. 여성호르몬인 estradiol 농도는 대조군 233.4 pg/mL, IF군 283.9 pg/mL, IFR군 274.6 pg/mL, IFS군 222.3 pg/mL으로 유의적인 차이가 없었다.

**이소플라본 보충과 운동의 병행이 골밀도와 골함량에 미치는 영향**

**척추골밀도와 척추골함량 및 체중 당 척추골밀도와 척추골함량**

Table 6에 이소플라본과 운동의 병행이 골밀도에 미치는 영향을 알아보기 위해 척추골밀도 (Spine BMD)와 척추골함량 (Spine BMC), 체중 당 척추골밀도 및 체중 당 척추골함량을 나타내었다. 척추골밀도는 대조군 0.143 g/cm<sup>2</sup>, IF군 0.147 g/cm<sup>2</sup>, IFR군 0.153 g/cm<sup>2</sup>, IFS군 0.152 g/cm<sup>2</sup>이었고, 척추골함량은 대조군 0.428 g, IF군 0.432 g, IFR군 0.457 g, IFS군 0.443 g으로 이소플라본 보충과 운동 병행에 따른 유의적인 차이는 없었다.

척추골밀도를 체중으로 나눈 값인 체중 당 척추골밀도 (Spine BMD/wt)는 대조군 0.59 g/cm<sup>2</sup>/kg, IF군 0.66 g/cm<sup>2</sup>/kg, IFR군 0.65 g/cm<sup>2</sup>/kg, IFS군 0.68 g/cm<sup>2</sup>/kg 이었고, 체중 당 척추골함량 (Spine BMC/wt)은 대조군 1.75 g/kg, IF군 1.92 g/kg, IFR군 1.98 g/kg, IFS군 2.01 g/kg으로 체중 당 척추골밀도 및 체중당 척추골함량은 IF군, IFR군, IFS군이 대조군보다 유의적으로 높았고 이소플라본 단독 보충과 운동 병행에 따른 차이는 없었다.

**대퇴골밀도와 대퇴골함량 및 체중 당 대퇴골밀도와 대퇴골함량**

Table 7에 이소플라본 보충과 운동의 병행에 따른 대퇴골밀도 (Femur BMD)와 대퇴골함량 (Femur BMC), 체중 당 대퇴골밀도 및 체중당 대퇴골함량을 나타내었다. 대퇴골밀도는 대조군 0.196 g/cm<sup>2</sup>, IF군 0.198 g/cm<sup>2</sup>, IFR군 0.208 g/cm<sup>2</sup>, IFS군 0.201 g/cm<sup>2</sup>로 IFR군이 유의적으로 높았고, 대퇴골함량은 대조군 0.353 g, IF군 0.356 g, IFR군 0.367 g, IFS군 0.362 g으로 실험군간에 유의적인 차이가 없었다.

체중당 대퇴골밀도 (Femur BMD/wt)는 대조군 0.79 g/cm<sup>2</sup>/kg, IF군 0.88 g/cm<sup>2</sup>/kg, IFR군 0.89 g/cm<sup>2</sup>/kg, IFS군 0.90 g/cm<sup>2</sup>/kg으로 IF군, IFR군, IFS군이 대조군보다 유의적으로 높았고 이소플라본 단독 보충과 운동 병행에 따른 차이는 없었다. 체중 당 대퇴골함량 (Femur BMC/wt)은 대조군 1.49 g/kg, IF군 1.60 g/kg, IFR군 1.59 g/kg, IFS군

**Table 6.** Effects of isoflavones and exercise on spine bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC)

Group	Spine BMD (g/cm <sup>2</sup> )	Spine BMC (g)	Spine BMD (g/cm <sup>2</sup> ) /wt (kg)	Spine BMC (g) /wt (kg)
Control	0.143 ± 0.006 <sup>1)</sup>	0.428 ± 0.008	0.59 ± 0.04 <sup>a2)</sup>	1.75 ± 0.21 <sup>a</sup>
IF <sup>3)</sup>	0.147 ± 0.008	0.432 ± 0.033	0.66 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.92 ± 0.16 <sup>b</sup>
IFR <sup>4)</sup>	0.153 ± 0.006	0.457 ± 0.028	0.65 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.98 ± 0.09 <sup>b</sup>
IFS <sup>5)</sup>	0.152 ± 0.013	0.443 ± 0.053	0.68 ± 0.06 <sup>b</sup>	2.01 ± 0.18 <sup>b</sup>

1) Mean ± SD 2) Values with different superscripts within the column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test. 3) IF: Isoflavones 4) IFR: Isoflavones + Running 5) IFS: Isoflavones + Swimming

**Table 7.** Effects of isoflavones and exercise on femur bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC)

Group	Femur BMD (g/cm <sup>2</sup> )	Femur BMC (g)	Femur BMD (g/cm <sup>2</sup> ) /wt (kg)	Femur BMC (g) /wt (kg)
Control	0.196 ± 0.004 <sup>1) a2)</sup>	0.353 ± 0.015	0.79 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.49 ± 0.09 <sup>a</sup>
IF <sup>3)</sup>	0.198 ± 0.009 <sup>ab</sup>	0.356 ± 0.022	0.88 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.60 ± 0.08 <sup>ab</sup>
IFR <sup>4)</sup>	0.208 ± 0.007 <sup>b</sup>	0.367 ± 0.034	0.89 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.59 ± 0.08 <sup>ab</sup>
IFS <sup>5)</sup>	0.201 ± 0.010 <sup>ab</sup>	0.362 ± 0.034	0.90 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.67 ± 0.13 <sup>b</sup>

1) Mean ± SD 2) Values with different superscripts within the column are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. 3) IF: Isoflavones 4) IFR: Isoflavones + Running 5) IFS: Isoflavones + Swimming

1.67 g/kg으로 이소플라본 단독 보충과 이소플라본과 달리 기운동의 병행에 의해 증가하는 경향을 보였으며 IFS군은 대조군보다 유의적으로 높았다.

## 고 찰

본 연구에서는 이소플라본 보충과 운동을 동시에 실시 (combined intervention)하였을 때 성장기 암컷 흰쥐의 골격대사에 미치는 효과를 알아보고자 하였다. 이소플라본 보충과 운동의 병행이 골대사지표 및 골대사 관련 호르몬에 미치는 영향을 분석한 결과, 골형성 지표인 혈중 ALP와 osteocalcin은 이소플라본 보충과 운동의 병행에 따라 실험군간에 유의적인 차이가 없었고, 골용해 지표인 요 중 DPD crosslink value는 실험군간에 유의적인 차이가 없었다. 또한 골대사관련 호르몬인 혈중 부갑상선 호르몬, 칼시토닌 및 에스트로겐 농도도 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다. 그러나 이소플라본과 운동의 병행이 골격에 미치는 효과에 대해 일부 연구자에 의해 보고되었는데,<sup>24,25</sup> 성호르몬 결핍 쥐를 대상으로 골밀도만 분석한 결과를 보고하였을 뿐 대부분 골대사 관련 생화학적 지표는 분석하지 않아 본 연구결과를 다른 선행연구와 비교할 수는 없었다. 이소플라본 보충이 골격에 영향을 미친 선행연구의 대부분은 골교체율의 변화가 심한 난소호르몬 결핍의 폐경 여성<sup>6</sup>이나 난소절제 동물<sup>8</sup>을 대상으로 이소플라본에 의한 골손실 감소효과를 제시하였다. 그러나 본 연구는 성장기 암컷 쥐를 대상으로 하였고 성장에 필요한 적합한 조성으로 이루어진 표준화된 정상식을 공급하였기 때문에 식이 중 이소플라본의 첨가와 운동의 병행에 따른 골대사지표의 변화는 없었다. 또한 9주의 장기간 실험식을 공급하여 일상적인 식이의 적응으로 골대사 지표에서는 항상성을 유지하여 유의적 차이가 나타나지 않은 것으로 보인다.

이소플라본 섭취가 성호르몬에 미치는 영향을 보고한 선행연구로는 폐경전 여성에게 이소플라본이 풍부한 콩단백질 60 g을 매일 공급한 식사는 성호르몬결합 글로블린을 증가시키고 황체화호르몬을 낮추어 활성호르몬 농

도를 낮추는 것으로 나타나,<sup>26</sup> 이소플라본에 의해 폐경전 여성의 생리주기가 연장되고 호르몬 대사에 변화를 일으켜서 고농도의 이소플라본은 폐경전 여성에서는 다른 작용을 할 수 있는 것으로 보고하였다. 그러나 본 연구에서 성장기 쥐에서 공급한 이소플라본 양은 1일 평균 8~11 mg/day이었고 성호르몬인 estradiol 농도는 실험군간에 유의적인 차이가 없어 이 수준의 이소플라본 섭취는 성장기 성호르몬 변화에 영향을 주는 수준은 아니었다.

9주간 이소플라본 보충과 운동의 병행은 척추골밀도와 척추골함량, 대퇴골함량에 유의적인 차이가 없었으나 이소플라본 보충과 운동의 병행은 대퇴골밀도에 유의적인 영향을 나타내었는데 IFR군은 대조군보다 유의적인 증가를 보였고, IF군과 IFS군은 대조군과 유의적인 차이는 없었으나 높은 경향을 나타내었다. 따라서 성장기 쥐에서 이소플라본 보충과 함께 체중부하운동인 달리기를 병행하였을 때 대퇴골밀도 형성에 유리한 것으로 나타났다. 암컷 쥐에서 체중부하 골격은 비체중부하 골격보다 체중부하운동인 달리기에 더 민감한 반응을 보였는데<sup>12</sup> 본 연구에서도 이소플라본 보충과 달리기를 병행하였을 때 대퇴골밀도가 유의적으로 증가하여 선행연구 결과와 일치하였다.

골밀도는 체중의 영향을 받으므로 체중 당으로 산출하여 대조군과 비교한 결과, 이소플라본과 운동의 병행에 따른 체중 당 척추골밀도는 각각 IF군 11.9%, IFR군 10.2%, IFS군 15.3% 유의적으로 높았고, 체중 당 척추골함량은 IF군 9.7%, IFR군 13.1%, IFS군 14.9% 유의적으로 높았으며, 체중당 대퇴골밀도는 IF군 11.4%, IFR군 12.7%, IFS군 13.9% 유의적으로 높아 이소플라본 단독 보충과 운동 병행은 모두 체중당 골밀도와 골함량 증가에 유리하였고, 특히, 이소플라본 보충과 수영운동을 병행하였을 때 대조군과 비교하여 증가비율이 가장 높았다. 체중 당 대퇴골함량은 이소플라본 단독 보충과 이소플라본과 달리기운동의 병행에 의해 증가하는 경향을 보였으며 IFS군은 대조군보다 14.8% 유의적으로 높았다.

골밀도에 대한 이소플라본과 운동의 병행 효과를 보고

한 선행연구를 살펴보면, 난소절제 마우스를 대상으로 6.4 mg/day 이소플라본 (daidzein 20.4%, genistein 4.6%)과 트레드밀 (12 m/min, 30 min/day, 6 days/wk, 10°)로 6주간 실험한 결과 이소플라본 공급군에서 척추 골밀도 감소를 방지하였고, 이소플라본과 운동의 병행에 의해서 전골, 척추, 대퇴의 골밀도가 운동군이나 대조군보다 유의적으로 높았다고 보고하였다.<sup>25</sup> 또한 Wu 등<sup>27</sup>은 난소절제 마우스에서 0.4 mg/day genistein 보충과 트레드밀로 달리기를 매일, 4주간 실시하였을 때 (12 m/min, 30 min/day, 10°) genistein과 운동의 병행으로 난소절제에 의한 대퇴 골손실을 위장절제군과 유사한 수준으로까지 방지하였다고 하였다. 정소제거 쥐를 대상으로 genistein과 운동의 병행 효과도 보고되었는데 매일 4주간 0.4 mg/day genistein과 트레드밀 (12 m/min, 30 min/day, 10°) 운동을 실시한 결과, 대퇴골밀도는 genistein 공급만으로는 유의적인 영향이 없었으나 genistein과 운동 병행시 근위 대퇴와 원위 대퇴 부위에서 골밀도 감소를 완전히 예방하였다.<sup>24</sup> 이처럼 난소절제 쥐와 정소제거 쥐에서 이소플라본과 운동의 병행 연구 결과에서 단독 방법보다 병행에 의해 유의적으로 골손실 방지를 보고하였으나 병행에 의해 골밀도가 증가한 것은 골대사 지표의 분석이 이루어지지 않아 부분적으로 골형성 증가에 기인한 것인지 아니면 골손실 억제에 기인한 것인지 그 기전을 설명할 수 없었다.

본 연구에서 식이에 첨가한 이소플라본의 양을 단위 체중 (kg) 당으로 환산하면 32~35 mg/kg wt/day으로 이 수준의 이소플라본 섭취 또는 30분/day, 주3회의 규칙적인 달리기와 수영운동은 실험동물의 대퇴골밀도와 체중당 골밀도 및 체중당 골함량을 증가시키는데 유효한 보충수준과 운동방법으로 성장기 골격형성에 유리하게 작용하였다. 그러나 본 연구결과에서 이러한 작용은 이소플라본 섭취에 의한 것인지, 운동에 의한 것인지, 또는 이소플라본 섭취와 운동의 상호작용에 의한 것인지를 확인할 수 없었다. 따라서 이소플라본 보충과 운동의 병행이 성장기 골밀도에서 이소플라본이나 운동 단독과 비교하여 유리한지 확인하기 위해 추후연구에서는 본 연구에 확인하지 못한 운동단독군을 보강하거나 이소플라본 섭취수준을 달리하여 검증하는 것이 필요하겠다. 이소플라본 보충이나 육체적 운동의 병행에 의한 골밀도 보호 효과는 아직 밝혀지지 않았으므로 골대사에 있어서 이소플라본과 운동 사이의 상호작용 메커니즘을 규명하는 것이 후속연구에서 요망되거나 성장기 골격형성을 위해서 식이를 통한 이소플라본의 적절한 섭취와 더불어 효율성을 향상시키기 위하여 실질적으로 운동 같은 다른 방법과 병행하여 활용하는 것이 제안될 수 있다고 사료되어진다.

12주령 난소절제 쥐를 대상으로 genistein (12 mg/kg bw/day)과 달리기 (20 m/min) 운동을 100 g 부하와 함께 1분 달리기, 1분 휴식으로 40 set를 4주간 실시한 연구에서 대퇴골밀도는 genistein 섭취 또는 운동으로 유의적으로 증가되었고, genistein과 달리기 운동을 병행함으로써 골손실 방지에 상호협조적 작용을 나타내었으나 genistein과 운동의 병행에 따른 상승효과는 대퇴 골밀도와 골강도만 증가시켰고 척추에서는 병행에 따른 상승효과가 나타나지 않았다고 보고하였다.<sup>28</sup> 신체활동에 의한 골질량의 증가는 수행된 운동의 형태에 따라 영향이 다른 것으로 보고되었고,<sup>29</sup> 또한 골밀도에 대한 운동의 효과는 골 위치에 따라 특이성 (site-specific)을 보여 주로 부하를 받거나 사용하는 부위의 골밀도에 영향을 미치는 것으로 보인다.<sup>11</sup> 본 연구에서도 성장기 쥐의 경우 각 실험군 중 이소플라본과 달리기 운동의 병행시 대퇴골밀도에서 가장 효과적인 것으로 나타났는데 이는 대퇴의 경우 달리기 운동에 의해 직접적인 영향을 받는 부위이기 때문으로 보여진다.

본 연구에서 운동을 병행한 경우 골밀도 및 골함량의 증가를 나타낸 것은 달리기 운동시 트레드밀의 경사도를 조절하는 방법으로 적절한 운동강도를 부가하였기 때문으로 보인다. 대부분 트레드밀 운동시 경사를 조절하지 않은 채 실시하였고, Wu 등<sup>25</sup>은 10° 경사, Bravenboer 등<sup>30</sup>은 5° 경사로 달리기를 실시한 것에 반해 본 연구에서는 15°의 높은 경사로 운동을 수행하여 운동강도를 높이는 요인으로 작용하여 골밀도의 유의적 증가를 나타내었다. 또한 달리기 운동은 피질골 형성은 증가시키지만 척추에서는 총 조 직량에 대한 해면골량의 비율과 골형성에는 영향을 주지 않기 때문에 일반적으로 피질골은 해면골보다 달리기 운동에 더욱 민감하게 반응할 수 있다는 것으로 해석된다.<sup>31</sup>

운동은 성장호르몬의 분비를 자극하며 운동에 따른 근수축이 활발하게 이루어져 골격근의 성장을 유발하는 것으로 보고되고 있다.<sup>32</sup> 또한 Hart 등<sup>33</sup>은 난소절제 쥐에서 수영 (60 min/day, 5 days/wk)을 12주 동안 실시하였을 때 수영군은 대퇴골밀도와 골함량이 유의적으로 높았고 골구조, 골 강도 등의 기계적 특성에서 수영 운동의 유의한 효과를 증명하였다. 쥐를 대상으로 실제 운동을 수행하는 과정을 보면, 운동하는 시간동안 수영은 전신운동으로 움직임이 많아 골격에 자극을 가한 것에 기인하는 것으로 생각된다. 성장기 쥐에서는 비체중부하 운동인 수영도 체중부하운동인 달리기와 같은 운동시간동안 유사한 효과를 나타낸 것으로 보이나 추후 연구를 통해 다시 검토되어야 할 것으로 보여진다. 또한 쥐의 경우 사지를 이용하여 트레드밀 달리기를 하므로 체중부하 정도가 사람과 달라서 골격에 대한 운동의 반응정도에 차이가 있을 것이라는 점도

고려해 보아야 할 것으로 생각된다.

골격은 체중의 하중에 영향을 받으므로 골밀도와 골합량을 체중 당으로 분석한 결과에서 이소플라본 보충과 운동의 병행에 의해 체중 당 척추골밀도 및 척추골합량, 체중 당 대퇴골밀도는 대조군과 비교하여 이소플라본 단독 보충, 달리기운동 병행, 수영운동 병행 모두 유의적으로 증가하였다. 실험군내에서 이소플라본 보충과 운동 병행에 따른 유의적 차이는 없었고 운동병행군에서는 운동형태에 따라 달리기와 수영에 따른 차이가 없었다. 이소플라본 보충과 운동의 병행 효과는 대조군과 비교하여 대퇴골밀도에서는 달리기운동 병행시, 체중당 대퇴골합량에서는 수영운동 병행시 유의적으로 더 높았다. 이상의 결과를 바탕으로 성장기 쥐에서 이소플라본의 섭취 및 달리기와 수영운동 병행 각각은 척추 및 대퇴 골밀도와 골합량에 유리하게 작용하여 성장기 골격형성에 도움이 되는 것으로 보여진다.

## 요 약

이소플라본 보충과 운동의 병행이 성장기 암컷 흰쥐의 골격대사에 미치는 영향을 알아보고자 생화학적 골대사 지표 및 골대사 관련 호르몬, 척추와 대퇴 골밀도 및 골합량에 미치는 영향을 분석하였다. 그 결과, 체중증가량과 식이섭취량, 식이효율은 이소플라본 보충과 운동의 병행에 따라 실험군간에 유의적인 차이가 없었다. 골형성 지표인 혈중 ALP와 osteocalcin은 이소플라본 보충과 운동의 병행에 따라 실험군간에 유의적인 차이가 없었고, 골용해 지표인 요 중 DPD crosslink value는 실험군간에 유의적인 차이가 없었다. 골대사관련 호르몬인 혈중 부갑상선 호르몬, 칼시토닌 및 에스트로겐 농도도 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다. 척추 골밀도, 척추 골합량 및 대퇴골합량은 이소플라본 보충과 운동의 병행에 의해 유의적인 차이가 없었고 대퇴골밀도는 IFR군이 대조군보다 유의적으로 높았다. 체중당 대퇴골합량은 IFS군이 대조군보다 유의적으로 높았다. 체중 당 척추골밀도 및 척추골합량, 체중 당 대퇴골밀도는 대조군과 비교하여 이소플라본 단독 보충, 달리기운동 병행, 수영운동 병행 모두 유의적으로 증가하여 실험군내에서 이소플라본 보충과 운동 병행에 따른 유의적 차이는 없었고 운동병행군에서는 운동형태에 따라 달리기와 수영 운동의 차이가 없었다. 결론적으로 성장기 쥐에서 이소플라본 보충과 운동의 병행은 이소플라본 단독 보충과 비교하여 상승효과는 없었으나 이소플라본의 섭취 및 달리기와 수영운동 병행 각각은 척추 및 대퇴 골밀도와 골합량을 증가시켜 성장기 최대골밀도 형성에 유리한

것으로 나타났다.

## References

1. Robinson JA, Waters KM, Turner RT, Spelsberg TC. Direct action of naturally occurring estrogen metabolites on human osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 2000; 15(3): 499-506.
2. Hawse JR, Subramaniam M, Monroe DG, Hemmingsen AH, Ingle JN, Khosla S, Oursler MJ, Spelsberg TC. Estrogen receptor beta isoform-specific induction of transforming growth factor beta-inducible early gene-1 in human osteoblast cells: an essential role for the activation function 1 domain. *Mol Endocrinol* 2008; 22(7): 1579-1595.
3. Gallagher JC. Advances in bone biology and new treatments for bone loss. *Maturitas* 2008; 60(1): 65-69.
4. Kim NN, Stankovic M, Armagan A, Cushman TT, Goldstein I, Traish AM. Effects of tamoxifen on vaginal blood flow and epithelial morphology in the rat. *BMC Womens Health* 2006; 6: 14.
5. North American Menopause Society. Role of progestogen in hormone therapy for postmenopausal women: position statement of the North American Menopause Society. *Menopause* 2003; 10(2): 113-132.
6. Atkinson C, Compston JE, Day NE, Dowsett M, Bingham SA. The effects of phytoestrogen isoflavones on bone density in women: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2004; 79(2): 326-333.
7. Chen YM, Ho SC, Lam SS, Ho SS, Woo JL. Soy isoflavones have a favorable effect on bone loss in Chinese postmenopausal women with lower bone mass: a double-blind, randomized, controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(10): 4740-4747.
8. Picherit C, Chanteranne B, Bennetau-Pelissero C, Davicco MJ, Lebecque P, Barlet JP, Coxam V. Dose-dependent bone-sparing effects of dietary isoflavones in the ovariectomized rat. *Br J Nutr* 2001; 85(3): 307-316.
9. Choi MJ, Jung YJ. The effects of level of isoflavones supplementation on bone mineral density in growing female rats. *Korean J Nutr* 2006; 39(4): 338-346.
10. Fogelholm GM, Sievänen HT, Kukkonen-Harjula TK, Pasanen ME. Bone mineral density during reduction, maintenance and regain of body weight in premenopausal, obese women. *Osteoporos Int* 2001; 12(3): 199-206.
11. Wallace BA, Cumming RG. Systematic review of randomized trials of the effect of exercise on bone mass in pre- and postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 2000; 67(1): 10-18.
12. Iwamoto J, Takeda T, Sato Y. Effect of treadmill exercise on bone mass in female rats. *Exp Anim* 2005; 54(1): 1-6.
13. Bourrin S, Palle S, Pupier R, Vico L, Alexandre C. Effect of physical training on bone adaptation in three zones of the rat tibia. *J Bone Miner Res* 1995; 10(11): 1745-1752.
14. Kohrt WM, Snead DB, Slatopolsky E, Birge SJ Jr. Additive effects of weight-bearing exercise and estrogen on bone mineral density in older women. *J Bone Miner Res* 1995; 10(9): 1303-1311.
15. Yeh JK, Aloia JF, Barilla ML. Effects of 17 $\beta$ -estradiol replacement and treadmill exercise on vertebral and femoral bones of the ovariectomized rat. *Bone Miner* 1994; 24(3): 223-234.
16. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for

- laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123(11): 1939-1951.
17. Choi MJ, Cho HJ. Effects of soy protein and isoflavones on bone mineral density in growing female rats. *Korean J Nutr* 2003; 36(4): 359-367.
  18. Choi MJ. Effect of exercise and calcium supplementation on bone mineral density and bone mineral content in growing female rats. *J Community Nutr* 2002; 4(3): 195-201.
  19. Hong H, Lee JH, Chung DC, So JM, Nagatomi R, Choi EC, Hwang GH, Ahn EH, Maeng WJ. Influence of various types of exercise on bone formation and resorption in rats. *Korean J Nutr* 2001; 34(5): 541-546.
  20. Alkaline Phosphatase Study Group; Committee on Standards of the AACC; Subcommittee on Enzymes, Tietz NW, Burtis C, Ervin K, Petittlerc CJ, Rinker AD, Zygowicz E. Progress in the development of a recommended method for alkaline phosphatase activity measurements. *Clin Chem* 1980; 26(7): 1023.
  21. Nanda N, Joshi H, Subbarao SK, Sharma VP. Two-site immunoradiometric assay (IRMA): detection, efficiency, and procedural modifications. *J Am Mosq Control Assoc* 1994; 10(2 Pt 1): 225-227.
  22. Xing S, Cekan SZ, Diczfalusy U, Falk O, Gustafsson SA, Akerlöf E, Björkhem I. Validation of radioimmunoassay for estradiol-17 beta by isotope dilution-mass spectrometry and by a test of radiochemical purity. *Clin Chim Acta* 1983; 135(2): 189-201.
  23. Garnero P, Grimaux M, Seguin P, Delmas PD. Characterization of immunoreactive forms of human osteocalcin generated in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res* 1994; 9(2): 255-264.
  24. Wu J, Wang XX, Chiba H, Higuchi M, Takasaki M, Ohta A, Ishimi Y. Combined intervention of exercise and genistein prevented androgen deficiency-induced bone loss in mice. *J Appl Physiol* (1985) 2003; 94(1): 335-342.
  25. Wu J, Wang X, Chiba H, Higuchi M, Nakatani T, Ezaki O, Cui H, Yamada K, Ishimi Y. Combined intervention of soy isoflavone and moderate exercise prevents body fat elevation and bone loss in ovariectomized mice. *Metabolism* 2004; 53(7): 942-948.
  26. Cassidy A, Bingham S, Setchell KD. Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *Am J Clin Nutr* 1994; 60(3): 333-340.
  27. Wu J, Wang XX, Takasaki M, Ohta A, Higuchi M, Ishimi Y. Cooperative effects of exercise training and genistein administration on bone mass in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res* 2001; 16(10): 1829-1836.
  28. Nakajima D, Kim CS, Oh TW, Yang CY, Naka T, Igawa S, Ohta F. Suppressive effects of genistein dosage and resistance exercise on bone loss in ovariectomized rats. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci* 2001; 20(5): 285-291.
  29. Layne JE, Nelson ME. The effects of progressive resistance training on bone density: a review. *Med Sci Sports Exerc* 1999; 31(1): 25-30.
  30. Bravenboer N, Engelbregt MJ, Visser NA, Popp-Snijders C, Lips P. The effect of exercise on systemic and bone concentrations of growth factors in rats. *J Orthop Res* 2001; 19(5): 945-949.
  31. Iwamoto J, Yeh JK, Aloia JF. Differential effect of treadmill exercise on three cancellous bone sites in the young growing rat. *Bone* 1999; 24(3): 163-169.
  32. Fan J, Molina PE, Gelato MC, Lang CH. Differential tissue regulation of insulin-like growth factor-I content and binding proteins after endotoxin. *Endocrinology* 1994; 134(4): 1685-1692.
  33. Hart KJ, Shaw JM, Vajda E, Hegsted M, Miller SC. Swim-trained rats have greater bone mass, density, strength, and dynamics. *J Appl Physiol* (1985) 2001; 91(4): 1663-1668.