

난소절제 흰쥐에서 신령버섯의 β -Glucan과 난각 Ca 복합체가 골 대사에 미치는 효과

노경희¹ · 장지현¹ · 김진주¹ · 박철우² · 김정옥² · 김재철¹ · 송영선^{1*}

¹인제대학교 의생명공학대학 식품생명과학부, 식품과학연구소 및 바이오헬스소재연구센터
²(주)HK 바이오텍

Effect of *Agaricus blazei* β -Glucan and Egg Shell Calcium Complex on Bone Metabolism in Ovariectomized Rats

Kyung-Hee Noh¹, Ji-Hyun Jang¹, Jin-Ju Kim¹, Cherl-Woo Park²,
Jeong-Ok Kim², Jae-Cherl Kim¹ and Young-Sun Song^{1*}

¹School of Food and Life Sciences, Food Science Institute, and Biohealth
Product Research Center, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

²HK Biotech Co., Ltd., Jinju 660-972, Korea

Abstract

This study was designed to evaluate the effect of *Agaricus blazei* β -glucan and egg shell calcium complex on bone metabolism in ovariectomized (OVX) rats. Forty Sprague-Dewley female rats, 10 weeks of age (248 ± 1.7 g), were divided into 4 groups and fed on the experimental diets for 6 weeks: sham operated control treated with normal diet containing 0.5% calcium (Sham-C), OVX-control treated with normal diet containing 0.5% calcium (OVX-C), OVX- β -glucan group treated with β -glucan diet containing 0.5% calcium (OVX-G), and OVX- β -glucan egg shell calcium complex treated with OVX- β -glucan egg shell calcium complex containing 0.5% calcium (OVX-GE). Bone weight of femur was higher in the OVX-GE group than in the other OVX groups. Bone mineral density of femur was significantly different ($p < 0.05$) among the experimental groups and showed the highest level in the OVX-GE group. Calcium absorption rate and retention were higher in the β -glucan supplement groups than in the other groups ($p < 0.05$). Alkaline phosphatase activities and osteocalcin levels of serum showed lower in the β -glucan supplement groups than in the OVX-C group. Deoxypyridinoline crosslink values of urine, indicator of bone absorption, showed the lowest in the OVX-GE group. The β -glucan supplemented groups had a lower bone resorption ratio than in the OVX-C group. We concluded that bioavailability of calcium is higher in β -glucan supplement groups compared to those in OVX rats. From the above results, these findings suggest the possibility of using β -glucan egg shell calcium complex as a functional food material related to bone metabolism, even though there is no significant difference between the groups of β -glucan and β -glucan-egg shell calcium complex supplementation.

Key words: *Agaricus blazei* β -glucan, bone metabolism, egg shell calcium, ovariectomized rat, β -glucan egg shell calcium complex

서 론

골다공증(osteoporosis)은 전신성 골 질환으로 골질량(bone mass) 또는 골밀도(bone density)의 감소와 골격기능 손상으로 골절이 쉽게 유발될 수 있으며 노화와 관련된 중요한 공중 건강 문제로 대두되고 있다(1,2). 골다공증은 폐경기 이후 여성의 약 30%에서 발생하는 가장 흔한 대사성 질환으로 노년기 골절의 주요한 요인이다. 노년기 인구의 증가로 인한 골다공증 유병률이 급격히 증가되고 있는 추세로 우리나라에도 약 300만 명 정도의 골다공증 환자가 있는 것으로

추정되고 있다(3,4). 골다공증은 폐경기 이후의 여성들뿐 아니라 젊은 여성들에게서도 불충분한 식이 Ca 섭취로 인한 장에서의 Ca 흡수 감소로 기인되는 음의 Ca 균형을 가진 여성들에게 있어서도 발병한다.

신령버섯(*Agaricus blazei* Murill)은 담자균류로 들버섯속 송이과에 속하는 식용버섯으로 브라질이 원산지로 알려져 있으며 국내에서는 아가리쿠스버섯 혹은 흰들버섯으로 불리고 있다. 전체적인 외형은 양송이와 유사하지만 양송이보다 향이 강하고 포자의 흑변이 느리며 버섯대가 두껍고 길며 육질의 맛이 좋은 것이 특징이고(5,6) 신령버섯은 혈당

*Corresponding author. E-mail: fdsnsong@inje.ac.kr
Phone: 82-55-320-3235, Fax: 82-55-321-0691

및 혈압강하 효과(7,8)와 콜레스테롤 저하(8), 항종양, 항암 및 항돌연변이 효과 등의 약리작용(9,10)이 있는 것으로 알려져 있다. 주요성분으로는 다당류인 β -1,6-D-polyglucose, β -glucan, peptide-glucan, ergosterol, 새로운 polysaccharide protein complex, (1 \rightarrow 6)- β -D-glucan-protein complex 등이 있다(6). 또한 Choi와 Koo(9)는 신령버섯에는 β -D-glucan이 함유되어 있으며 비만인 당뇨 쥐의 식후 혈당의 상승을 억제하는 효과가 있고 중성지방 농도를 낮추어 혈액의 지질 조성을 개선시켜 심혈관질환을 감소시킬 수 있는 것으로 보고되고 있는 등 생리활성에 관한 연구가 진행되고 있다. 신령버섯의 다양한 약리작용이 알려지고 성인병 예방 및 치료제로 이용되고 있으나 골 대사에 대한 연구는 아직 미비한 실정이다.

난각의 발생량은 전국적으로 하루 144톤에 이르나 대부분 그대로 폐기되고 있는 실정이다. 난각에는 약 1,700개의 기공이 있으며 이들 기공은 외부로부터 미생물 침입을 막기 위하여 탄백질 섬유가 matrix를 형성하고 그 사이에 탄산칼슘(CaCO_3) 결정체로 채워져 있다. 또한 난각은 40%의 칼슘을 CaCO_3 의 형태로 함유하고 있으며 무기물로부터 생성된 칼슘보다 유기체로부터 추출 제조된 칼슘화합물은 칼슘의 흡수율이 증진된다는 보고가 있으며 이것은 유기체에 존재하는 활성물질이 칼슘의 생체 내 흡수를 촉진시키는 때문으로 설명된다(11). 칼슘급원으로서의 가치는 그 함량뿐만 아니라 체내로의 흡수율과 유용성에 의해 판정된다. 따라서 난각에 풍부한 CaCO_3 를 어떠한 형태로 가공하느냐 하는 것은 난각 칼슘의 흡수율과 유용성을 증진하는데 큰 영향을 미칠 수 있다(12).

따라서 본 연구에서는 칼슘 급원으로서 β -glucan-egg shell calcium complex(β -glucan-Ca 복합체)의 골 대사에 미치는 유효성을 확인하여 칼슘 보충제 개발에 활용하고자 실시하였다. 신령버섯에서 추출한 β -glucan과 난각의 Ca를 결합시켜 β -glucan-Ca 복합체를 제조하였으며 체내 골 대사에 미치는 효과는 난소절제 후 골다공증을 유발시킨 흰쥐 모델을 이용하여 β -glucan 및 β -glucan-Ca 복합체를 6주간 제공한 후 섭취효과를 비교하였다.

재료 및 방법

신령버섯으로부터 β -glucan 난각 Ca 복합체의 조제

β -glucan과 β -glucan-Ca 복합체는 경남 진주소재 (주)HK 바이오텍에서 제공받아 실험에 사용하였다. β -glucan 생성을 위한 버섯 균사체 배양은 HK 기본 액체 배지(대두 분해물 0.141%, 황백당 1.2%, MgSO_4 0.0375%, KH_2PO_4 0.0375%, Ribose 0.005%(w/w, %))를 121°C에서 90분간 멸균처리 후 신령버섯 균사체 배양액을 총 용량의 4.3%(v/v)가 되도록 접종하여 25°C에서 5일간 배양하였다. β -glucan 함유 버섯 균사체 시료 제조는 배양이 완료된 신령버섯 균사체 27 L를

자가분해효소 반응을 유도하기 위하여 60°C 진탕 항온기(Jeiotech, Korea)에서 12시간 동안 반응시켜 균사체를 파괴한 후 β -glucan을 생성하였다. 생성된 β -glucan은 Brix meter(ATAGO, Japan)를 사용하여 Brix 50 농도까지 진공 농축된 β -glucan 농축액에 무수 결정포도당과 함수 결정포도당 혼합물을 1:4(w/w)의 비로 혼합한 후 동결 건조하여 수분함량 3.0%의 β -glucan 분말 3.6 kg을 제조하였다. β -glucan-Ca 복합체 제조는 배양이 완료된 신령버섯 균사체 32 L에 난각 분말 465 g을 혼합하여 진탕 항온기(60°C, 12 h)에서 반응시킨 후 균사체에서 분비하는 효소계를 이용하여 균사체 및 난각 분말의 분해-결합반응을 유도하여 β -glucan-Ca 복합체를 형성하였다. 생성된 β -glucan-Ca 복합체를 β -glucan 분말 제조와 같은 방법으로 처리하여 약 4.8 kg(수분함량 3.0%)의 β -glucan-Ca 복합체 분말을 제조하였다. 그리고 β -glucan-Ca 복합체의 칼슘함량은 AOAC 법(13)으로 측정하였다.

실험동물 관리 및 식이조성

난소가 성숙하여 임신 가능한 10주령의 Sprague-Dewley 암컷 흰쥐의 평균 체중 248.4 ± 1.7 g인 실험동물을 완전입의 배치로 한 군당 10마리씩 4군으로 나누어 stainless steel wire cage에서 사육하였다. 실험동물의 체중 100 g 당 케타민(유한)과 럼폰(바이엘코리아)을 0.11 μL 와 0.05 μL 를 사용하여 마취시킨 후 양쪽 난소를 절제(ovariectomy: OVX)하였다. Sham 대조군은 실험군과 동일한 스트레스를 주기 위해 난소를 절제하지 않고 개복수술만 실시한 후 실험하였다. 난소를 절제한 후 실험식을 급여하였으며 사육실의 온도는 20~25°C, 상대습도 60~70%로 유지하였으며 명암은 12시간 간격으로 점등 및 소등하였다.

실험군의 식이는 Table 1과 같은 조성으로 혼합한 후 pel-

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

	Group ¹⁾			
	Sham-C	OVX-C	OVX-G	OVX-GE
Casein ²⁾	200	200	200	200
Corn oil	50	50	50	50
Vitamin mixture ³⁾	10	10	10	10
Mineral mixture ⁴⁾	40	40	40	40
α -Cellulose	50	50	50	50
Corn starch	632.5	632.5	498.5	506
DL-methionine	3	3	3	3
Choline chloride	2	2	2	2
CaCO_3	12.5	12.5	12.5	-
β -glucan	-	-	134.0	-
β -glucan-Ca complex ⁵⁾	-	-	-	139.0

¹⁾Sham-C: sham-operated and fed normal diet containing 0.5% Ca, OVX-C: ovariectomized control and fed normal diet containing 0.5% Ca, OVX-G: ovariectomized and fed β -glucan diet containing 0.5% Ca, OVX-GE: ovariectomized and fed β -glucan-egg shell Ca complex diet containing 0.5% Ca.

²⁾Casein(vitamin free); ICN.

³⁾Vitamin mixture; AIN-76A.

⁴⁾Mineral mixture (Ca free); ICN.

⁵⁾ β -glucan and egg shell Ca complex.

let의 형태로 제조하여 급여하였다. Sham-대조군(Sham-C) 및 OVX-대조군(OVX-C)과 OVX- β -glucan군(OVX-G)은 CaCO_3 로 Ca 함량이 0.5%가 되도록 조정하였으며, OVX-G는 β -glucan을 첨가하여 제공하였다. OVX- β -glucan-Ca 복합체군(OVX-GE)은 β -glucan-Ca 복합체의 Ca 농도가 0.5% 함유하도록 조정하여 실험식이를 각각 조제하여 6주간 급여하였다. Sham-C군은 negative control로, OVX-C군은 positive control로 하여 비교하였다. 식이제조에 사용한 vitamin mixture(AIN-76A), mineral mixture(Ca free), α -cellulose, vitamin free casein, DL-methionine, choline chloride 등은 ICN Biochemicals(ICN Aurora, Ohio, USA), 옥수수 전분(두산), 옥수수유(제일제당), CaCO_3 (Sigma) 제품을 사용하였다. 실험식이와 탈 이온수는 자유섭취방법(ad libitum)으로 급여하였으며 사육에 필요한 모든 기구는 0.4% EDTA로 씻은 후 탈 이온수로 헹구어 사용하였다. 실험동물의 식이섭취량과 체중은 각각 1주일에 3회와 1회씩 정기적으로 측정하였다.

시료수집

실험 종료 전 실험동물을 하룻밤 절식시킨 후 dry ice로 마취하여 심장에서 채혈하였다. 채취된 혈액은 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 분리된 혈청을 -70°C 에서 냉동 보관하였다. 혈액 채취 후 즉시 간장과 신장 및 좌우 대퇴골을 적출하였다. 간장 및 신장조직은 부착되어 있는 지방이나 근육을 깨끗이 제거한 후 0.9% NaCl로 세척하여 혈액을 제거한 다음 여과지로 물기를 제거하고 무게를 측정하였다. 대퇴골은 적출하여 골격에 붙어있는 근육, 인대, 지방 등을 제거한 후 무게를 측정하여 -70°C 에서 보관하며 골밀도와 골 길이를 측정하였다. 요와 변은 실험종료 1주일 전 대사장에서 2일간 적응시킨 후 24시간 동안 채취하였다. 요는 여과지(Advantec filter paper(Ca free), No 6)를 사용하여 여과한 후 분석 전까지 냉동 보관하였으며 변은 $105 \pm 5^\circ\text{C}$ 에서 3시간 건조시켜 분말로 만들어 분석하였다.

혈액 및 요와 변의 생화학적 분석

혈액 중의 호르몬인 osteocalcin은 rat osteocalcin EIA kit(Biomedical Technologies Inc., Stoughton, MA 02072, USA)를 사용하여 측정하였다(14). Estradiol 농도는 estradiol EIA kit(Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI 48108, USA)을 사용하여 분석하였다(15). 뼈 형성 biomarker인 alkaline phosphatase(ALP)의 활성은 Kind와 King(16)의 비색법을 토대로 Daichi 시약을 이용한 kit(영동 제약)을 사용하였으며 요 속의 골 흡수 진단시 지표로 deoxy-pyridinoline는 METRA DPD EIA kit(QUIDEL corporation, REF.8007, USA)를 사용하여 분석하였다(17). 요 중의 creatinine 농도는 modified kinetic Jaffe method(18)를 이용한 kit(영동제약)를 사용하여 비색법으로 측정하였으며 혈액과 요의 칼슘 함량은 자동분석기(Hitachi U-2000)를 이용

하여 분석하였다. 변의 칼슘 함량은 대퇴골과 같은 방법으로 처리하여 칼슘함량을 측정하였다.

대퇴골의 Ca과 P의 함량

대퇴골은 $70 \pm 5^\circ\text{C}$ 에서 건조시킨 후 건조 무게를 측정한 후 $550 \sim 600^\circ\text{C}$ 에서 5~6시간 회화시켜 회분함량을 측정하였다. 회화된 회분은 HCl과 HNO_3 를 이용하여 분해한 후 자동분석기(Hitachi U-2000)를 사용하여 칼슘과 인의 함량을 측정하였다.

골밀도, 골부피 및 골길이

대퇴골의 밀도와 부피는 Archimedes의 원리(19)를 이용하여 측정하였다. 즉, 증류수가 담긴 비커를 Mettler balance의 weighing pan 위에 놓고 한쪽 끝이 구부러진 철사를 천정으로부터 매달았다. 그리고 물이 담긴 비커에 철사가 잠긴 상태에서 뼈를 얹고 물속에서의 뼈의 무게를 측정한 후 뼈의 물기를 제거한 후 weighing pan 위에 놓고 1분 후에 무게를 측정하였다. 뼈의 부피(cm^3)는 뼈의 공기 중의 무게(mg)에서 물속에서의 무게(mg)를 뺀 값을 25°C 에서의 물의 밀도로 나누었으며 뼈의 밀도(mg/cm^3)는 뼈의 무게(mg)를 뼈의 부피(cm^3)로 나눈 값으로 계산하였다(20).

$$V = \frac{M_A - M_W}{D_w} \qquad D = \frac{M}{V}$$

M_A : wet weight in air (mg) M : wet weight (mg)
 M_W : weight in water (mg) V : volume of bone (cm^3)
 D_w : water density at 25°C D : density of bone (mg/cm^3)

대퇴골의 길이는 캘리퍼를 사용하여 측정하였다.

통계분석

실험 결과는 SPSS PC+ package를 이용하여 각 실험군의 평균±표준오차로 표시하였고 one-way ANOVA를 사용하여 비교하였으며 Duncan's multiple range test에 의해 각 실험군 간의 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

체중변화와 식이효율

실험군의 체중증가와 식이효율은 Table 2에서 보는 바와 같다. 실험군의 체중증가량과 식이섭취량 및 식이효율은 각 군 간의 유의적인 차이($p < 0.05$)를 보였으며 난소절제군(이하 OVX군)이 Sham-C에 비해 상대적으로 높은 수준을 보였다. 난소절제로 유발된 체중 증가 현상은 여러 연구에서 보고(1,21-23)되었다. 조골세포(osteoblast)와 지방세포는 같은 배아세포에서 분화되며 에스트로젠은 같은 배아세포에서 조골세포의 분화를 촉진하는 반면에 지방세포의 분화는 억제시킨다는 보고(24)에 근거할 때 난소 제거 후 에스트

Table 2. Body weight, body weight gain, and food efficiency rate in the experimental groups

Group ¹⁾	Initial BW (g)	Final BW (g)	Weight gain (g/week)	Food intake (g/week)	FER ²⁾ (%)
Sham-C	248.7 ± 1.7 ^{3)NS4)}	291.5 ± 4.7 ^{NS}	7.14 ± 0.79 ^{ab5)}	127.3 ± 2.0 ^a	5.80 ± 0.61 ^a
OVX-C	248.6 ± 4.6	314.3 ± 8.3	11.6 ± 1.41 ^b	142.0 ± 3.4 ^b	8.14 ± 0.81 ^b
OVX-G	248.3 ± 2.7	311.3 ± 3.9	10.5 ± 0.48 ^b	158.4 ± 1.2 ^c	6.64 ± 0.33 ^{ab}
OVX-GE	248.8 ± 4.0	322.8 ± 8.1	12.3 ± 0.94 ^b	149.5 ± 6.6 ^{bc}	8.25 ± 0.52 ^b

¹⁾Refer to Table 1. ²⁾Food efficiency ratio. ³⁾Mean ± SE. ⁴⁾Not significant.

⁵⁾Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05.

Table 3. Weight of liver and kidney in the experimental groups

Group ¹⁾	Liver		Kidney	
	g	g/100 g BW	g	g/100 g BW
Sham-C	7.67 ± 0.21 ^{2)NS3)}	2.73 ± 0.77 ^{NS}	2.00 ± 0.05 ^{NS}	0.71 ± 0.03 ^{b3)}
OVX-C	8.43 ± 0.38	2.67 ± 0.06	1.93 ± 0.06	0.61 ± 0.01 ^a
OVX-G	8.72 ± 0.25	2.80 ± 0.08	1.95 ± 0.05	0.63 ± 0.01 ^a
OVX-GE	8.48 ± 0.43	2.62 ± 0.08	2.04 ± 0.10	0.63 ± 0.02 ^a

¹⁾Refer to Table 1. ²⁾Mean ± SE. ³⁾Not significant.

⁴⁾Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05.

Table 4. Bone weight of femur in the experimental groups

Group ¹⁾	Wet weight		Dry weight	
	g	g/100 g BW	g	g/100 g BW
Sham-C	0.749 ± 0.02 ^{2)NS3)}	0.267 ± 0.01 ^{b4)}	0.562 ± 0.01 ^{NS}	0.194 ± 0.01 ^b
OVX-C	0.720 ± 0.01	0.228 ± 0.00 ^a	0.556 ± 0.01	0.176 ± 0.00 ^a
OVX-G	0.726 ± 0.01	0.231 ± 0.00 ^a	0.548 ± 0.01	0.176 ± 0.00 ^a
OVX-GE	0.736 ± 0.01	0.237 ± 0.00 ^a	0.572 ± 0.01	0.182 ± 0.00 ^a

¹⁾Refer to Table 1. ²⁾Mean ± SE. ³⁾Not significant.

⁴⁾Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05.

로겐 결핍으로 인한 식이섭취량 증가와 체지방 축적 및 체중 증가는 지방조직 축적에서 기인(1,25)된 것으로 보이며 난소 절제 동물의 특성을 나타낸 것으로 사료된다.

간장과 신장의 무게

실험동물의 각 군 간의 간장과 신장의 무게는 Table 3과 같다. 최종 체중의 무게가 각 군 간의 차이가 있어 간장과 신장의 무게를 체중 100 g 당으로 계산하였다. 간장의 무게는 각 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았으나 체중 당 신장의 무게는 Sham-C에 비해 OVX군에서 감소하는 경향을 보였다. 그러나 OVX군에서는 OVX-C에 비해 β-glucan을 첨가한 군에서는 상대적으로 증가하는 경향을 보였다.

대퇴골의 무게와 길이 및 골밀도

대퇴골의 무게는 Table 4에서 보는 바와 같다. 대퇴골의 습윤 무게는 각 군 간의 유의적인 차이는 보이지 않았으나 OVX-C에 비해 OVX-G와 OVX-GE에서 상대적으로 증가하는 경향을 보였다. 체중 100 g 당 대퇴골의 습윤 무게는 각 군 간의 유의적인 차이(p<0.05)를 보였으며 Sham-C에 비해 OVX군에서 유의적으로 감소하였으나 β-glucan-Ca 복합체를 첨가한 군에서 OVX-C에 비해 다소 증가하였다. 대퇴골의 건조 무게는 각 군 간의 유의적인 차이는 보이지 않았으나 β-glucan-Ca 복합체를 첨가한 OVX-GE에서 가장 높은 경향을 보였다. 체중 100 g 당 건조시킨 대퇴골의

무게는 Sham-C이 가장 높은 수준을 보였고 그 다음이 OVX-GE>OVX-G와 OVX-C의 순이었다.

Table 5에서 보듯이 대퇴골의 부피는 각 군 간의 유의적인 차이가 없었다. 대퇴골의 길이는 각 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았으나 OVX-GE>OVX-G와 OVX-C>Sham-C의 순으로 나타났다. 대퇴골의 길이 성장에 β-glucan이 영향을 미치는 것으로 보이며 β-glucan보다는 β-glucan-Ca 복합체가 더 많은 영향을 미치는 것으로 사료된다.

대퇴골의 골밀도는 각 군 간의 유의적인 차이(p<0.05)를 보였으며 OVX-C가 가장 낮은 수준이었고 OVX-C에 비해 OVX-GE에서 유의적으로 높았다. Sham-C와 β-glucan을 첨가한 식이를 제공받은 OVX-G와 OVX-GE에서는 골밀도

Table 5. Bone length and bone mineral density of femur in the experimental groups

Group ¹⁾	Bone volume (cm ³)	Bone length (cm)	BMD ²⁾ (mg/cm ³)
Sham-C	295.6 ± 8.4 ^{3)NS4)}	3.63 ± 0.03 ^{NS}	2.78 ± 0.06 ^{ab5)}
OVX-C	259.3 ± 6.5	3.66 ± 0.02	2.65 ± 0.06 ^a
OVX-G	262.8 ± 18.3	3.66 ± 0.01	2.84 ± 0.16 ^{ab}
OVX-GE	266.4 ± 12.1	3.71 ± 0.02	2.92 ± 0.15 ^b

¹⁾Refer to Table 1.

²⁾Bone mineral density.

³⁾Mean ± SE. ⁴⁾Not significant.

⁵⁾Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05.

가 유사한 수준이었으며 OVX-GE>OVX-G>Sham-C>OVX-C의 순으로 나타났다. 이상의 결과들로 미루어 볼 때 β -glucan이 골밀도를 증진시키는 효과가 있는 것으로 사료되며 β -glucan-Ca 복합체 형태로 제공한 OVX-GE와 β -glucan과 CaCO_3 로 제공한 OVX-G 간에는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

대퇴골의 회분과 Ca 함량

대퇴골의 회분과 Ca 함량은 Table 6과 같다. 체중 100 g 당 대퇴골의 회분 함량은 OVX군에서 β -glucan을 포함한 식이를 제공받은 군에서 회분 함량이 높은 것으로 나타났으며 β -glucan-Ca 복합체를 제공받은 OVX-GE가 가장 높은 수준을 보였다. 체중 100 g 당 대퇴골의 Ca 함량은 Sham-C에서 Ca 함량이 높은 수준을 보였으나 OVX군에서는 비슷한 경향을 나타냈다. 대퇴골의 체중 100 g 당 P의 함량은 OVX군에 비해 상대적으로 Sham-C에서 높은 경향을 보였다. 대퇴골의 Ca/P는 각 군 간에 유의적인 차이($p<0.05$)를 보여 OVX-C에서 가장 높은 수준이었으며 β -glucan을 첨가한 군에서 Ca/P의 비가 감소하였다. OVX군에서는 OVX-C에 비해 OVX-GE에서 유의적으로 낮은 수준으로 Sham-C와 유사한 수준을 보였다. β -glucan의 첨가가 Ca/P의 비를

감소시켜 Ca/P의 비를 낮추는 것으로 사료된다.

Ca 섭취량과 배설량의 균형

Ca 섭취량과 변 중의 Ca 함량은 Table 7에서 보는 바와 같이 각 군 간의 유의적인 차이를 보였으나 요 중의 Ca 함량은 각 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다. Ca 체내 흡수율과 보유량은 각 군 간의 유의적인 차이($p<0.05$)를 보였으며 OVX-C이 Sham-C에 비해 높았으며 OVX군에서는 β -glucan를 첨가한 군이 유의적으로 높은 수준이었다. 이상의 결과를 보면 Sham-C에 비해 OVX군에서의 Ca 흡수율과 보유량이 높은 수준이었고 β -glucan을 함유한 식이를 섭취한 군에서 높아 β -glucan이 체내 Ca의 흡수율과 보유량을 높이는 것으로 사료된다.

혈액 속의 Ca대사 관련 지표

혈청의 Ca 농도는 Table 8에서 보는 바와 같이 각 실험군 간에 유의적 차이를 보이지 않았으나 Sham-C에 비해 OVX-C에서는 다소 높은 경향을 보였다. β -glucan을 첨가한 OVX-G에서는 Sham-C보다 오히려 낮았으며 OVX-GE에서는 Sham-C와 유사한 수준을 보였다. 임상연구에 의하면 폐경기 이후 혈장 Ca의 농도가 높다는 보고(26)가 있으며 본 연구에서도 OVX군에서의 Ca 농도가 Sham-C에 비해

Table 6. Ash, calcium and phosphorus content of femur in the experimental groups

Group ¹⁾	Ash		Ca		P		Ca/P
	mg	mg/100 g BW	mg	mg/100 g BW	mg	mg/100 g BW	
Sham-C	354.0±9.56 ^{2)NS3)}	123.0±2.64 ^{b4)}	150.0±5.82 ^{NS}	54.5±2.37 ^b	81.8±2.81 ^{NS}	29.7±1.35 ^b	1.83±0.02 ^a
OVX-C	332.4±0.72	104.9±2.04 ^a	145.8±2.50	47.7±1.41 ^a	76.5±1.54	25.0±0.57 ^a	1.91±0.01 ^b
OVX-G	336.0±5.76	106.7±1.63 ^a	145.8±2.93	46.3±1.17 ^a	77.5±0.89	24.8±0.45 ^a	1.88±0.02 ^{ab}
OVX-GE	338.8±5.53	108.2±2.48 ^a	149.0±2.19	46.0±1.19 ^a	80.9±1.60	25.3±0.59 ^a	1.84±0.01 ^a

¹⁾Refer to Table 1. ²⁾Mean±SE. ³⁾Not significant.

⁴⁾Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

Table 7. Calcium intake, Ca absorption and Ca retention in the experimental groups

Group ¹⁾	Ca intake (mg/day)	Fecal Ca excretion (mg/day)	Urinary Ca excretion (mg/day)	Ca absorption ⁵⁾ rate (%)	Ca retention ⁶⁾ (mg/day)
Sham-C	89.6±1.76 ^{2)a3)}	24.9±1.30 ^b	1.01±0.01 ^{NS4)}	72.1±1.77 ^a	63.8±3.24 ^a
OVX-C	101.4±2.40 ^b	25.2±3.16 ^b	0.05±0.01	75.3±2.73 ^{ab}	76.2±2.43 ^a
OVX-G	113.1±0.88 ^c	19.8±1.64 ^{ab}	0.11±0.02	82.5±1.48 ^c	93.2±1.99 ^b
OVX-GE	106.8±4.72 ^{bc}	14.7±3.67 ^a	0.14±0.03	81.2±2.72 ^{bc}	91.9±6.31 ^b

¹⁾Refer to Table 1. ²⁾Mean±SE.

³⁾Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

⁴⁾Not significant.

⁵⁾{(Ca intake-fecal Ca excretion)/Ca intake}×100.

⁶⁾Ca intake-fecal Ca excretion-urinary Ca excretion.

Table 8. Calcium, ALP activity, estradiol and osteocalcin levels of serum in the experimental groups

Group ¹⁾	Ca (mg/dL)	ALP ²⁾ (Units/L)	Estradiol (pg/mL)	Osteocalcin (ng/mL)
Sham-C	14.88±0.98 ^{3)NS4)}	94.9±3.3 ⁵⁾	6.56±0.56 ^{NS}	136.9±7.8 ^{NS}
OVX-C	16.60±0.85	113.8±5.4 ^b	4.80±0.40	170.3±11.0
OVX-G	14.01±0.79	107.4±3.0 ^b	6.10±4.10	155.0±10.8
OVX-GE	14.92±0.88	107.8±3.4 ^b	8.33±0.93	148.9±15.5

¹⁾Refer to Table 1. ²⁾Alkaline phosphatase. ³⁾Mean±SE. ⁴⁾Not significant.

⁵⁾Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

상대적으로 높은 경향을 보여 유사한 결과를 보였다.

골격 형성의 생화학 지표인 alkaline phosphatase(ALP)의 활성은 각 군 간에 유의적인 차이($p < 0.05$)를 보여 OVX-C에서 Sham-C에 비해 상대적으로 높은 수준을 보였다. OVX군에서는 β -glucan을 첨가한 군이 다소 낮은 ALP 활성을 보였다. ALP는 parathyroid hormone의 target enzyme에 속하며 조골세포에서 분비되는 당단백질로 임상에서 가장 흔히 이용되는 골 형성 지표이며 ALP는 조골세포에서 골 생성시 생성되는 단백질로 골 신생이 활발하게 진행될 때 혈 중 농도가 훨씬 증가되며 골 생성 작용의 지표로 골다공증, 골절 환자외 성장기 초기, 그리고 칼슘결핍 시와 고칼슘을 공급받을 때 증가한다는 보고(27)가 있다. 혈 중 ALP 농도는 폐경 후 골다공증 환자에게서 높게 관찰된다. 혈 중 ALP 농도가 Sham-C에 비해 난소 절제군에서 높게 관찰된다는 연구 보고(28)들은 본 연구의 결과와 일치하였다. Moon 등(29)은 ALP와 PTH는 골밀도가 증가할수록 유의하게 감소함으로써 골격 및 칼슘대사를 조절하는 요인임을 보고하였고 Aloia 등(30)의 연구에서 ALP 활성도는 골질량과 음의 상관관계를 보였다고 하였으며 본 연구에서도 골밀도가 가장 낮은 OVX-C에서 ALP 활성이 가장 높게 나타났다.

Estradiol의 농도는 각 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았으나 Sham-C에 비해 OVX-C에서의 농도 감소가 현저하였으며 β -glucan을 첨가한 식이를 섭취한 군에서는 OVX-C에 비해 오히려 농도가 증가되는 결과를 보여 β -glucan이 estradiol 농도에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

Osteocalcin은 직접적인 골 흡수를 나타내지 않고 골 흡수 작용에 수반해서 일어나는 골 형성의 증가를 나타내며 조골세포에서 생성된 것 중 약 30%가 혈 중으로 방출되므로 골 형성의 정도를 예측할 수 있는 생화학 지표(31)로 사용되고 있다. Osteocalcin은 폐경 후 증가하며 폐경 후 골 소실율을 잘 예측할 수 있는 지표로 알려져 있다. 본 연구에서는 각 군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았으나 Sham-C에 비해 OVX군에서 osteocalcin 농도가 상대적으로 증가되었다. 특히 β -glucan이 첨가되지 않은 OVX-C에서 혈중 osteocalcin의 농도가 가장 높은 수준이었으며 OVX-G와 OVX-GE에서는 OVX-C에 비해 감소하는 경향을 보였다. 본 연구의 실험 결과에서는 ALP 활성이 증가될수록 osteocalcin의 농도도 증가되는 경향을 보였으며 이러한 결과는 Frolik 등(21)과 Sarioglu 등(32)의 연구 결과와 유사하게 나타났다. 폐경기에 ALP나 osteocalcin의 농도가 높은 것은 골 교체율이 빠른 것을 나타내며 OVX군이 Sham-C에 비해 골 교체율이 빠르며, OVX군에서의 골 교체율은 OVX-C이 β -glucan을 첨가한 OVX-G와 OVX-GE에서 보다 빠르게 일어나는 것을 보여준다. 따라서 본 연구의 결과는 β -glucan이 골 교체율을 감소시켜 골 흡수를 억제함으로써 골 보호효과를 나타낸 것으로 사료된다.

요 중의 골 흡수 지표

골 흡수를 진단하는데 특이성이 높아 골 흡수 지표로 알려진 collagen의 crosslink인 deoxypyridinoline(DPD)는 골격 내에 분포하며 골격에서만 유리되며 파골세포의 흡수와 더불어 이들 collagen 부산물의 생성은 소변으로 배설된다. 따라서 소변 속의 crosslink value를 측정하는 것은 골 흡수의 특이적인 지표로 보고되고 있다(33). 요 중의 DPD 양은 현재의 골의 양 측정보다는 역동적인 전신의 골 대사에 따른 변화 상태를 잘 반영한다고 판정할 수 있다(34,35). DPD의 crosslink value는 소변 속의 creatinine(nM)에 대한 DPD(nM)의 비(nM/mM)로 나타내며 이 지표는 매우 정확한 것으로 알려져 있다. 요 중의 DPD 배설량의 증가는 파골세포의 활성으로 골 흡수 증가를 의미하고 폐경 후 골밀도와는 음의 상관관계를 가지며(3) 요 중 DPD 농도는 중, 연령, 성장률, 호르몬 상태, 스트레스 등 여러 가지 요인에 의해 영향을 받기 때문에 실험에 따라 보고된 값이 차이가 나며(36) 최근 여러 골 대사질환에 DPD 배설량 측정을 이용하고 있다(34).

요 중의 골 흡수 지표는 Fig. 1에서 보는 바와 같으며 crosslink value는 각 군 간에 유의적인 차이($p < 0.05$)를 보였다. OVX군의 DPD crosslink value가 Sham-C에 비해 현저하게 높은 수준으로 나타나 OVX군의 골 흡수가 높음을 확인할 수 있었으나 OVX군에서는 β -glucan을 첨가한 식이를 제공한 OVX-G와 OVX-GE의 DPD crosslink value가 OVX-C에 비해 유의적으로 낮은 수준이었다.

난소호르몬의 결핍은 골 흡수를 촉진시키며 DPD는 폐경 후 요 중의 농도가 증가되며 호르몬 요법(37)이나 골 흡수제의 사용(31,38)은 요 중의 DPD 농도를 감소시킨다고 보고하였다. 따라서 본 연구의 결과에서는 β -glucan이 난소 절제 흰쥐 모델에서 골 흡수율을 낮추어 골 보호효과를 나타내는 것으로 사료된다.

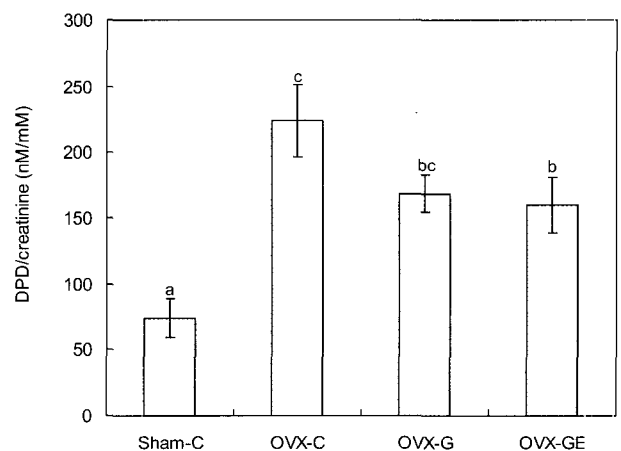


Fig. 1. Deoxypyridinoline crosslink values of the experimental groups.

Groups are the same as in Table 1.

요 약

본 연구는 칼슘 공급원으로서 β -glucan-egg shell calcium complex(β -glucan-Ca 복합체)의 유효성을 확인하여 칼슘 보충제 개발에 활용하고자 실시하였다. 신령버섯에서 추출한 β -glucan과 난각의 Ca를 결합시켜 β -glucan-Ca 복합체로 제조하여 골다공증 실험동물에서 β -glucan 및 β -glucan-Ca 복합체가 골 대사에 미치는 효과를 비교하였다. 10주령의 Sprague-Dewley 암컷 흰쥐의 양쪽 난소를 절제(OVX)한 후 실험식이를 급여하였으며 Sham-대조군(Sham-C)은 실험군과 동일한 스트레스를 주기 위해 난소를 절제하지 않고 개복수술만 실시한 후 실험하였다. 식이조성은 Sham-C, OVX-대조군(OVX-C)와 OVX- β -glucan군(OVX-G)은 CaCO_3 로 Ca 함량이 0.5%가 되도록 조정하였으며, OVX-G 군은 β -glucan을 첨가하여 제공하였다. OVX- β -glucan-Ca 복합체군(OVX-GE)은 β -glucan-Ca 복합체의 Ca 농도가 0.5% 함유하도록 조정하여 실험식이를 각각 조제하여 6주간 급여하였다. 체중 100 g 당 건조시킨 대퇴골의 무게는 Sham-C>OVX-GE>OVX-C와 OVX-G의 순으로 나타나 β -glucan-Ca 복합체를 제공한 OVX-GE에서 다른 OVX군에 비해 상대적으로 골 무게가 증가하는 경향을 보였다. 대퇴골의 골밀도는 각 군 간의 유의적인 차이를 보였으며 Sham-C에 비해 β -glucan을 첨가한 식이를 제공받은 군에서 골밀도가 상대적으로 높은 수준을 보였고 특히 OVX-GE에서 가장 높은 골밀도를 보였다. Ca 체내 흡수율과 보유량은 각 군 간에 유의적인 차이를 보였으며 OVX-C가 Sham-C에 비해 높았으며 OVX군에서는 β -glucan를 첨가한 군이 높은 수준을 보였다. ALP의 활성은 OVX군에서는 β -glucan을 첨가한 군이 다소 낮은 경향을 보였다. 요 중의 골 흡수 지표인 DPD crosslink value는 각 군 간의 유의적인 차이를 보였고 OVX군의 DPD crosslink value가 Sham-C에 비해 현저하게 높은 수준으로 나타나 OVX군의 골 흡수가 높음을 확인할 수 있었다. OVX군에서 β -glucan을 첨가한 식이를 제공한 OVX-G와 OVX-GE의 DPD crosslink value가 OVX-C에 비해 유의적으로 낮은 수준이었으며 β -glucan이 난소 절제 흰쥐 모델에서 골 대사에 영향을 미쳐 골 흡수율을 낮추어 골 보호효과를 나타내는 것으로 보인다. 이상의 결과들로 미루어 볼 때, 비록 β -glucan을 제공한 군과 β -glucan-Ca 복합체를 제공한 두 군 간에는 유의적인 차이를 보이지 않았으나 난소절제 흰쥐모델의 골 대사에서 β -glucan-Ca 복합체 형태가 골다공증 예방을 위한 기능성 식품으로서의 가능성을 보여주었으며, 앞으로 골다공증 예방을 위한 β -glucan-Ca 복합체 형태의 효과적인 농도는 계속적으로 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건의료기술진흥사업(0405-FS00-05-1-0039)

의 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 연구비를 지원해주신 보건복지부에 감사드립니다.

문 헌

1. Lee JW, Kim HJ, Jhee OH, Won HD, Yu YJ, Lee MH, Kim TW, OM AS, Kang JS. 2005. Effects of alternative medicine extract on bone mineral density, bone strength and biochemical markers of bone metabolism in ovariectomized rats. *Korean J Food Nutr* 18: 72-80.
2. Lee YB, Lee HJ, Kim KS, Lee JY, Nam SY, Cheon SH, Sohn HS. 2004. Evaluation of the preventive effect of isoflavone extract on bone loss in ovariectomized rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 1040-1045.
3. Byun JS, Rho SN, Park JS, Park HM. 2005. Effect of isoflavone supplementation on bone metabolism in ovariectomized rats at different ages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 1350-1356.
4. The Korean society of bone metabolism. 1997. *Osteoporosis*. Seoul, Korea.
5. Seo BI. 2003. A study on *Agaricus blazei*. *J Applied Oriental Medicine* 3: 83-89.
6. Sung JM, Yoo YB, Cha DY. 1998. *Mushroom*. Kuohaksa, Seoul. p 3-10.
7. Sugiyama K, Saeki S, Ishiguro Y. 1992. Hypercholesterolemic activity of ningyotake (*Polyporus confluences*) mushroom in rats. *J Jpn Soc Nutr Food Sci* 45: 265-270.
8. Yoshiaki F, Hidekazu K, Koichi O, Ryo S, Takusaburo E. 1998. Tumorcidal activity of high molecular weight polysaccharides derived from *Agaricus blazei* via oral administration in the mouse tumor model. *Nippon Shokuhim Kagaku Kaishi* 45: 246-252.
9. Choi JM, Koo SJ. 2000. Effects of β -glucan from *Agaricus blazei* Murill on blood glucose and lipid composition in db/db mice. *Korean J Food Sci Technol* 32: 1418-1425.
10. Itoh H, Amano H, Noda H. 1994. Inhibitory action of a (1 \rightarrow 6)- β -D-glucan-protein complex isolated from *Adaricus blazei* Murill on metha fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism. *Jpn J Pharmacol* 66: 265-271.
11. Chung HK, Chang NS, Lee HS, Chang YE. 1996. The effect of various types of calcium sources on calcium and bone metabolism in rats. *Korean J Nutrition* 29: 480-488.
12. Recker RR, Bammi A, Barger-Lux J, Heaney RP. 1988. Calcium absorbability from milk products, and imitation milk and calcium carbonate. *Am J Clin Nutr* 47: 93-95.
13. AOAC. 2000. *Official Method of Analysis*. 17th ed. Association of Analytical Communities, Arlington VA, USA.
14. Zeni S, Gomez-Acotto C, Di Gregorio S, Mautalen C. 2000. Differences in bone turnover and skeletal response to thyroid hormone treatment between estrogen-depleted rats. *Calcif Tissue Int* 67: 173-177.
15. Erickson GF. 1996. The ovary: basic principles and concepts. In *Endocrinology and Metabolism*. 3rd ed. Felig P, Baxter JD, Frohman LA, eds. McGrawHill Inc, New York, USA. p 973-1015.
16. Knott L, Bailey AJ. 1998. Collagen crosslinks in mineralizing tissues: A review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone* 22: 181-187.
17. Longlands MG, Wiener K. 1978. Anomalous behavior of control sera in automated versions of the Kind and King alkaline phosphatase method. *Ann Clin Biochem* 15: 164-167.
18. Chassy AL, Grady HT, Stanley MA. 1961. Determination of creatinine by means of automatic chemicals analysis. *Am*

- J Clin Pathol* 35: 83-89.
19. Bray DL, Briggs CM. 1984. Decrease in bone density in young male guinea pigs fed high levels of ascorbic acid. *J Nutr* 114: 920-928.
 20. Choi SJ, Kim MK. 2003. Effect of grape intake on cadmium metabolism of rats during aging. *Korean J Nutrition* 36: 997-1012.
 21. Frolik CA, Bryant HU, Black EC, Magee DE, Chandrasekhar S. 1996. Time-dependent changes in biochemical bone markers and serum cholesterol in ovariectomized rats: Effects of raloxifene HCl, tamoxifen, estrogen and alendronate. *Eone* 18: 621-627.
 22. Kalu DN, Arjmandi BH, Liu CC, Salih MA, Bimbaum RS. 1994. Effects of ovariectomy and estrogen on the serum levels of insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3. *Bone Miner* 25: 135-148.
 23. Lee YB, Lee HJ, Kim KS, Lee JY, Nam SY, Cheon SH, Shon HS. 2004. Evaluation of the preventive effect of isoflavone extract on bone loss in ovariectomized rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 1040-1045.
 24. Okasaki R, Inoue D, Shibata M, Saika M, Kido S, Ooka H, Tomiyama H, Sakamoto Y, Matsumoto T. 2002. Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) α or β . *Endocrinology* 143: 2349-2356.
 25. O JH, Lee YS. 1993. Effects of dietary calcium levels on the reduction of calcium availability in ovariectomized osteoporosis model rats. *Korean J Nutrition* 26: 277-285.
 26. Nordin BEC, Wishart JM, Clifton PM, MaArthur R, Scopacasa F, Need AG, Morris HA, O'Loughlin PD, Horowitz M. 2004. A longitudinal study of bone-related biochemical changes at the menopause. *Clin Endocrinology* 61: 123-130.
 27. Lim SK. 1994. Clinical significance and application of bone turnover marker. *Korean J Bone Metabolism* 1: 1-11.
 28. Lee JA, Noh SH, Ahn DK, Choi HY. 2001. Effects of the *Eucommia cotrtex* and *Chanenomelis fructus* on the aged ovariectomized rat of postmenopausal osteoporosis. *Kor J Herbology* 16: 201-206.
 29. Moon SJ, Kim JH, Lim SK. 1996. Investigation of risk of low serum 25-hydroxyvitamin D levels in Korean menopausal women. *Korean J Nutrition* 29: 981-990.
 30. Aloia JF, Cohn SH, Vaswani A, Yeh JK, Yuen K, Ellis K. 1985. Risk factors for postmenopausal osteoporosis. *Am J Med* 78: 95-100.
 31. Price PA, Pathermore JG, Doftos LJ. 1980. New biochemical marker for bone metabolism. *J Clin Invest* 66: 878-883.
 32. Sarioglu M, Tuzun C, Unlu Z, Tikiz C, Taneli F, Uvanik BS. 2006. Comparison of the effects of alendronate and risedronate on bone mineral density and bone turnover markers in postmenopausal osteoporosis. *Rheumatol Int* 26: 195-200.
 33. Erye DR. 1996. Biochemical markers of bone turnover. In *Primer on the metabolic bone diseases and disorder of mineral metabolism*. 3rd ed. Favus MJ, ed. Raven Press, New York. p 114-118.
 34. Uebelhart D, Gineyts E, Chapuy MC, Delmas PD. 1990. Urinary excretion of pyridium crosslinks: a new marker of bone resorption in metabolic bone disease. *Bone Mineral* 8: 87-96.
 35. Seibel MJ, Gartenberg SJ, Ratcliffe A, Robins SP, Bilezikian JP. 1992. Urinary hydroxypyridium crosslinks of collagen in primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 74: 481-486.
 36. Christel P, Catherine BP, Brigitte C, Patrice L, Marie-Jeanne D, Jean-Pierre B, Veronique C. 2001. Soybean isoflavones dose-dependently reduce bone turnover but do not reverse established osteopenia in adult ovariectomized rats. *J Nutr* 131: 723-728.
 37. Notelovitz M. 1993. Osteoporosis: screening, prevention and management. *Fertility Sterility* 59: 714-715.
 38. Choi MJ, Yu TS. 2004. Effects of red-yeast-rice supplementation on bone mineral density and bone mineral content in ovariectomized rats. *Korean J Nutrition* 37: 423-430.

(2006년 10월 13일 접수; 2006년 12월 1일 채택)