

성장기 암컷 쥐에서 콩 단백질과 Isoflavones가 골 대사에 미치는 영향*

최미자[§] · 조현주

계명대학교 식품영양학과

Effects of Soy and Isoflavones on Bone Metabolism in Growing Female Rats*

Choi, Mi-Ja[§] · Cho, Hyun-Ju

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

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine which differences in the source of protein (soy vs casein) and isoflavones in soy protein are responsible for the differential effects of bone marks and hormones in growing female rats. Forty-two 21-day-old Sprague-Dawley female rats were randomly assigned to one of three groups, consuming casein (control group), soy protein isolate (57 mg isoflavones/100 g diet), or soy protein concentrate (about 1.2 mg isoflavones/100 g diet). All rats were fed on experimental diet and deionized water ad libitum for 9 weeks. Bone formation was measured by serum osteocalcin and alkaline phosphatase (ALP) concentrations. And bone resorption rate was measured by deoxypyridinoline (DPD) crosslinks immunoassay and corrected for creatinine. Serum osteocalcin, growth hormone, estrogen and calcitonin were analyzed using radioimmunoassay kits. Diet did not affect weight gain and mean food intake. Food efficiency ratio was lower in the soy protein groups. The soy isolate group had a higher ALP and osteocalcin concentration and lower crosslinks value than the casein group. Therefore, the soy isolate groups had a higher bone formation/resorption ratio than the casein group. And, the soy group had significantly higher growth hormone than the casein group. The findings of this study suggest that soy protein and isoflavones are beneficial for bone formation in growing female rats. Therefore, exposure to these soy protein and isoflavones early in life may have benefits for osteoporosis prevention. (*Korean J Nutrition* 36(6): 549~558, 2003)

KEY WORDS : isoflavones, osteocalcin, PTH, DPD, calcitonin, growth hormone, growing female rats.

서 론

노년기의 골다공증 예방은 성장기에 최대 골밀도를 얼마나 높이는 것과 50대 이후에 골밀도 감소를 얼마나 지연 또는 감소시키느냐는 것에 따라 좌우된다.¹⁾ 골격은 1년에 4~5%가 새로 바뀌고 재생되며 골질량은 골형성과 골용해의 균형에 의해 결정되는데, 이 두 가지 대사량의 상대적 비율은 여러 가지 생리적, 유전적, 영양적 요인에 의해 영향을 받게 된다.²⁾ 역학조사에서 서구에서는 골다공증의 발병률이 높은 반면,³⁾ 다양한 형태의 콩 제품을 많이 섭취해

온 아시아에서는 골다공증의 발병률이 상대적으로 낮다.⁴⁾ 따라서 콩 단백질에 대한 연구가 활발히 이루어지면서 콩 단백질의 isoflavones가 골다공증을 예방⁵⁾ 하는데 영향을 미치는 것으로 보고되었다. isoflavones는 endogenous estrogen인 17β -estradiol과 그 구조가 매우 유사하며 에스트로겐 수용체 (ER)에 대하여 17β -estradiol의 1×10^{-2} ~ 1×10^{-4} 정도의 활성과 친화력을 갖는다.⁶⁾ 이러한 성질 때문에 isoflavones는 폐경기 이후 여성에서 에스트로겐 분비 부족으로 인한 골손실의 위험을 감소시켜 줄 수 있다고 제안이 되었고, 실제 폐경 후 여성 또는 난소 절제 동물을 대상으로 한 연구에서 isoflavones가 풍부한 콩 단백질은 골손실을 막는데 유효하였다는 실험 연구가 상당수 보고되었다.⁷⁾ 그러나 *in vitro* 실험에서 isoflavones는 에스트로겐으로써의 효과뿐 만 아니라 antiestrogen으로써의 효과도 함께 나타내는 것으로 보고되어 isoflavones가 폐경 후 여성에서는 에스트로겐으로 작용하나 폐경기 이

접수일 : 2003년 1월 15일

채택일 : 2003년 7월 7일

*This work was supported by grant No. (R05-2000-000-00212-0) from the Basic Research Program of the Korea Science and Engineering Foundation.

[§]To whom correspondence should be addressed.

전 여성에서는 수용체의 결합 부위에 대하여 endogenous estrogen과 경쟁하므로 약한 antiestrogen으로써 작용할 수도 있다고 제안하였다.⁸⁾ 이러한 이론에 근거하여 isoflavones가 성장기나 젊은 여성에게서 오히려 endogenous estrogen의 활성을 떨어뜨려 유익하지 못할 것이라는 우려와,⁹⁾ endogenous estrogen의 기능이 isoflavones에 의해 그만큼 제한을 받을 수 있다고 제안하였으며,¹⁰⁾ endogenous estrogen 대신에 수용체 결합 활성이 더 낮은 isoflavones가 결합하면 endogenous estrogen이 결합할 때보다 그 효과가 감소하여 isoflavones는 antiestrogen으로써 작용한다고⁹⁾ 하였다.

그러나 최근 성장기 수컷 쥐를 대상으로 isoflavones가 풍부한 콩 단백질의 섭취 시 척추 골밀도와 대퇴 골밀도에 유익한 것으로 사료된다고 하였고,¹¹⁾ 또한 성장기 암컷 쥐에서도 isoflavones가 풍부한 콩 단백질은 척추와 대퇴의 골밀도에 유리한 것으로 나타났다.¹²⁾ 그러나 isoflavones는 estradiol과의 구조적 유사성 때문에 *in vitro*에서 에스토로겐 수용체의 결합 부위에 대하여 estradiol과 경쟁한다고 보고되어 isoflavones는 에스트로겐의 agonist 또는 antagonist로 작용할 수 있다고 제안하였으므로⁹⁾ 실제 성장기 암컷에서 혈 중 에스트로겐의 농도에 미치는 효과를 검증할 필요가 있다. 또한 혈 중 칼슘 농도와 뼈의 칼슘 함량은 체내 여러 가지 호르몬의 영향을 받게 되는데, 부갑상선 호르몬, 칼시토닌, 성 호르몬에 영향을 받으며 성장호르몬도 간접적으로 영향을 미친다고 보고되었다.¹³⁾ 콩 단백질이 성장 호르몬의 분비를 증가시킬지도 모른다고 추론한 선행 연구가¹⁴⁾ 있으나 이것에 대한 검증은 없다. 그리고 폐경 후의 여성에서 isoflavones는 에스트로겐과 다른 기전으로 골용해를 감소시켜 골밀도에 유익한 효과를 보인다고 주장한 연구와,¹⁵⁾ 골형성을 촉진 시켜 골밀도에 유익한 효과를 준다는 연구 보고가 있으므로¹⁶⁾ 성장기에 isoflavones는 골형성 지표나 골용해 지표에 어떤 영향을 미치는지 알아 볼 필요가 있다.

따라서 성장기 암컷을 대상으로 isoflavones가 풍부한 콩 단백질의 섭취 시 혈 중 estrogen 농도와 함께 골형성 지표와 골용해 지표 및 골대사에 관련된 호르몬에 대하여 알아보자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물 및 실험 식이

Sprague-Dawley 암컷 쥐 (60 ± 5 g)를 주식회사 대한 동물 사육 센터로부터 분양 받아 1주일 간의 적응 기간

동안 고형사료 (rat chow, 삼양사)로 사육한 후 난괴법을 이용하여 각 군당 12마리씩 3군으로 나누어 9주간 실험 식 이를 공급하였다. 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 조절하였다. 실험 기간 동안 식이와 물은 자유롭게 섭취케 하였으며 물은 모두 2차 이온교환수를 사용하였다. 실험 식이는 단백질 급원으로 카제인과 콩 단백질을 사용하였다. 이때 콩 단백질은 isoflavones의 함량을 달리하기 위하여 isoflavones가 풍부한 soy protein isolate (isoflavones 3.4 mg/g protein)과 isoflavones가 거의 함유되어 있지 않은 soy protein concentrate를 각각 사용하였다. 실험군의 분류는 casein군, soy isolate protein군, soy concentrate protein군이다. 식이의 기본 조성은 AIN-93G에 기준 하여 조제하였다.¹⁷⁾ 실험식이의 조성은 Table 1과 같다.

2. 실험 분석

1) 식이 섭취량 및 체중 측정

실험 기간 동안 식이 섭취량은 이틀에 한 번씩, 체중은 1주일에 한 번씩 일정한 시간에 측정하였다.

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

Ingredients	Casein	Soy isolate	Soy concentrate
Casein ¹⁾	200	—	—
Soy protein isolate ²⁾	—	202	—
Soy protein concentrate ³⁾	—	—	226
Corn starch	530	528	504
Sucrose	100	100	100
Soybean oil	70	70	70
Cellulose	50	50	50
Min-mix ⁴⁾	35	35	35
Vit-mix ⁵⁾	10	10	10
L-cystine	3	3	3
Choline	2.5	2.5	2.5
Tert-butyl hydroquinone	0.014	0.014	0.014

¹⁾Casein high protein (total protein 85%), Teklad Test Diets, Medison, Wisconsin, USA

²⁾Soy protein isolate (total protein 84%, total isoflavones 3.4 mg/g protein), Protein Technologies International, St. Louis, MO 63188, USA

³⁾Soy protein concentrate (total protein 75%, total isoflavones 0.1 mg/g protein), Protein Technologies International, St. Louis, MO 63188, USA

⁴⁾AIN-93G-MX, Teklad Test Diets, Medison, Wisconsin, USA

⁵⁾AIN-93G-VM, Teklad Test Diets, Medison, Wisconsin, USA

*Calorie % of diet - carbohydrate : protein : fat = 64 : 19 : 17

2) 시료 수집

9주간 사육 후 희생 전 24시간 동안 절식시킨 후 요를 수집하였고, ether 마취 하에 복부를 절개하여 대동맥에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 상온에서 30분간 방치한 후 3000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리한 후 -70°C에서 냉동 보관하였다.

3) 생화학적 지표 및 호르몬 분석

골형성 측정을 위하여 혈청 alkaline phosphatase (ALP)의 측정은 TECHNICON CHEN™ SYSTEM을 이용하여 자동 분석기 (automatic chemical analyzer)로 측정하였고, osteocalcin의 측정은 one-step solid phase를 이용한 competitive radioimmuno-assay¹⁸⁾에 기초한 OSTEOCALCIN MYRIA kit (Techno genetics, Italia)으로 radioimmuno-assay를 한 후,¹⁹⁾ gamma-counter를 이용하여 항원 항체 결합 정도를 측정하였다. 골 흡수 측정은 요 중 deoxypyridinoline (DPD), creatinine, crosslinks value의 측정은 collagen crosslinks™ Kit (cat. No : 8001. Metra Biosystems Inc. U.S.A.)을 이용하여 ELISA (enzyme-linked immuno sorvent assay)법에 의해 분석하였다. 골대사와 관련된 호르몬의 측정으로 calcitonin, PTH, 성장 호르몬 분석은 시험관에 부착된 항체와 125-I으로 표식 된 항체를 함께 사용하여 항원과 항체간에 'sandwich'를 형성하게 하는 non-competitive radioimmuno-assay²⁰⁾을 이용한 DSL-7700 ACTIVETM Calcitonin IRMA kit, DSL-8000 ACTIVETM Intact PTH IRMA kit (Diagnostic System Laboratories Inc., USA), hGH IRMA CT kit (Radim, Roma, Italia)으로 radioimmuno-assay를 한 후,¹⁹⁾ gamma-counter를 이용하여 항원 항체 결합 정도를 측정하였다. 혈 중 estrogen 농도 측정을 위하여 Coat-A-Count estradiol kit (Diagnostic System Laboratories, Inc USA)을 이용하여 radioimmuno-assay 한 후 gamma count를 이용하여 분석하였다.

3. 통계 분석

실험 결과는 SAS를 이용하여 각 실험군의 평균과 표준

오차를 계산하였고, 실험군 간의 비교는 One way ANOVA 분석을 이용하였으며, Duncan's multiple range test에 의해 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다. 그리고 골지표와 각종 호르몬들 간의 상관관계는 Pearson correlation coefficient로 처리하였다 ($p < 0.05$).

결과 및 고찰

1. 체중 증가량, 식이 섭취량 및 식이 효율에 미치는 영향

9주 간의 체중 증가량, 평균 식이 섭취량 및 식이 효율을 Table 2에 나타내었다. 9주 간의 체중 증가량과 평균 식이 섭취량은 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다. 식이 효율은 soy isolate군과 soy concentrate군이 casein군보다 유의적으로 낮아 단백질 급원에 따라 식이 효율이 다르게 나타났으나 isoflavones 함유 여부에 따른 차이는 나타나지 않았다. 성장기 흰쥐의 경우 사람 보다 메티오닌의 요구량이 더 많기 때문에 성장이 빠른 어린 쥐에게 있어서는 메티오닌 함량이 제한되어 있는 콩 단백질의 식이 효율이 단백질 효율이 더 낮게 평가되었다.²¹⁾

2. 골형성 지표와 골용해 지표

골교체 (bone turnover)를 평가하는 생화학적 지표는 골격의 형성 또는 용해 세포의 주요 효소 활성을 측정하거나, 골형성 또는 골용해 동안 혈액으로 빙출된 골기질 성분을 측정하여 이용한다.¹³⁾ 골형성 지표로는 serum osteocalcin, serum alkaline phosphatase, 골용해 지표로는 urinary DPD crosslinks를 이용하였는데 osteocalcin과 DPD crosslinks의 면역학적 분석은 최근 골다공증의 임상적 판정을 위한 골교체에 대한 가장 예민하고 특이한 지표로 이용되고 있는데,¹⁵⁾ collagen의 crosslink인 pyridinoline 및 DPD는 골격 내에 분포하며 다른 연골조직은 제외되고 골격의 뼈에서만 유리된다. 파골 세포의 흡수와 더불어 이들 collagen의 부산물의 생성은 혈 중을 통해 소변으로 배설되게 된다. 따라서 소변 내의 이러한 crosslink를 측정하는 것은 골 흡수의 특이적인 지표로 보고되고 있다. 즉 골 교체율이 빠를 때 요 중 pyridinoline, DPD, cro-

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

Group	Initial weight (g)	Weight gain (g)	Food intake (g/day)	FER ²³⁾
Casein	77.3 ± 3.7 ²¹⁾	160.8 ± 10.2	13.75 ± 0.8	0.17 ± 0.01 ²²⁾
Soy isolate	77.2 ± 3.2	160.6 ± 8.4	14.20 ± 1.72	0.16 ± 0.01 ^b
Soy concentrate	77.6 ± 3.5	158.9 ± 9.2	14.62 ± 1.35	0.16 ± 0.01 ^b

²¹⁾Mean ± SD

²²⁾Values with different superscripts within the column are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

²³⁾Food intake efficiency ratio (FER)

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

Group	ALP (U/l)	Osteocalcin (ng/ml)
Casein	64.88 ± 10.68 ¹¹	4.75 ± 0.73
Soy isolate	76.11 ± 20.23	5.19 ± 1.16
Soy concentrate	66.77 ± 25.56	5.05 ± 0.92

¹¹Mean ± SD

sslinks value가 높아지게 된다. 요 중 pyridinoline, DPD, crosslinks value는 요 중 creatinine에 대한 비로 나타내며 이 지표는 매우 정확하다고 보고되고 있다.²²⁾

Table 3에 골형성 지표인 혈청 ALP와 osteocalcin 농도에 대한 결과를 나타내었다.

1) 혈청 오스테오칼신 (Osteocalcin)

오스테오칼신 (osteocalcin)은 뼈에 매우 특이한 단백질로써 조골 세포의 활동성을 평가하고 골형성 정도를 반영하는 가장 좋은 단일 지표로 보고되었다.²³⁾ 오스테오칼신은 49개의 잔기를 가진 peptide로서 뼈에서 collagen 다음으로 많은 decollagen 물질로 3분자의 gamma-carboxyl glutamic acid (GLA) 잔기를 포함하므로 bone-gla-protein으로 불려지기도 하며 뼈에 특이적이다.²⁴⁾ 오스테오칼신 농도는 유아나 아동에게서 더 높고, 사춘기에 최고 수준에 달한 후 안정적이다가 50~60세 경부터 다시 증가하기 시작하며,²⁵⁾ 남성은 모든 연령 대에서 서서히 증가하는데 대부분의 정상 성인에게 있어 폐경 전인 경우에는 여성보다 남성이 오스테오칼신 농도가 더 높다.²⁶⁾ 혈 중 오스테오칼신 농도는 갑상선 호르몬, 성장 호르몬 농도가 증가된 사람에게서 높고, 골교체율이 감소되어 있는 갑상선 기능 저하증, 성장 호르몬 결핍증인 경우에는 그 농도가 감소될 수 있다.^{23,24)} 본 실험에서 혈청 오스테오칼신 농도는 casein군 4.75 ng/ml, soy concentrate군 5.05 ng/ml, soy isolate군 5.19 ng/ml로 단백질 급원이나 isoflavones 함유 여부에 따른 유의적인 차이가 없었으나 isoflavones가 풍부한 콩 단백질을 섭취한 soy isolate군이 casein군 보다 9.1% 높은 수준이었다. 그리고 이것은 선행 연구¹¹⁾에서 같은 주령의 성장기 수컷의 경우 오스테오칼신 농도가 16~18 ng/ml인 것에 비하여 상당히 낮은 편이다. 이것은 사람에 있어 일반적으로 성장기에 남성이 여성에 비하여 높다고 하는 것과²⁶⁾ 일치한다. 선행 실험 동물 연구의 오스테오칼신 농도를 비교해 보면, Murakami 등²⁷⁾은 4주 된 SD종 수컷 흰쥐의 오스테오칼신 농도가 30.8 ng/ml 수준이었다고 보고하였고, 본 연구의 동물과 주령과 성이 같은 Sprague-Dawley종 암컷 흰쥐를 대상으로 한 연구에서 13주령에서 osteocalcin 농도는 5~13 ng/ml 수준

으로 보고하여 본 연구 결과와 매우 비슷하였다.²⁸⁾ 그리고 Hauschka 등²⁹⁾은 5개월 된 수컷 흰쥐의 일반적인 오스테오칼신 농도는 17 ng/ml, 9개월 된 쥐는 50 ng/ml로 보고하여 골교체가 높은 시기에 오스테오칼신 농도도 높아짐을 알 수 있다.

2) ALP (Alkaline phosphatase)

혈청 alkaline phosphatase (ALP)는 골격 형성의 지표로서 가장 흔하게 사용되며 조골 세포의 활성을 반영한다. 그러나 혈 중 ALP의 반이 뼈로부터 유리되며 ALP는 간과 신장에서도 합성되므로 골의 미세한 변화를 반영하기에는 특이도와 예민도가 떨어지는 단점이 있다.³⁰⁾ 혈청 ALP 농도는 casein군 64.88 U/l, soy concentrate군 66.77 U/l, soy isolate군 76.11 U/l으로 soy isolate군이 가장 높았으며 이는 대조군과 비교하여 17.3% 높은 수준이었으나 실험군 간에 유의적인 차이는 없었다. 또한 본 연구의 실험 동물과 주령이 같은 SD의 수컷일 경우 ALP의 농도는 77~88 U/l 정도로 수컷의 경우가 약간 높은 편¹²⁾ 이었다. 그리고 성장기 흰쥐에서 식이 단백질의 종류나 isoflavones의 첨가는 혈 중 ALP 농도에 유의적인 차이를 나타내지 않았다는 선행 연구와 일치한다.

3) 요 중 Deoxypyridinoline (DPD) crosslinks

골용해에 대한 생화학적 지표로써 pyridinoline (PYD)와 DPD는 주로 뼈와 연골 부위에서 발견되며 소량이나마 다른 결체 조직에서도 발견된다. 그러나 소변 내 PYD의 거의 대부분은 뼈의 흡수로부터 생성된 것으로 보는데 그 이유는 양적인 면에서 뼈에 존재하는 양이 연골에 있는 것 보다 많고, 연골의 골전환율은 매우 낮기 때문에 골용해 지표로써 매우 민감하다고 인정되어 있다.²³⁾ 특히 DPD는 거의 대부분 뼈의 collagen에서만 발견되므로 pyridinoline (PYD) 보다 골용해를 매우 특이적으로 반영해주는 지표로 보고되고 있다.

Table 4에 요 중 DPD, creatinine and crosslinks value에 대한 결과를 나타내었다. 요 중 DPD 농도는 카제인군 511.06 nM로 나머지 두 군보다 유의적으로 높았다. Crosslinks value는 casein군 95.34 nM/mM, soy concentrate군 90.07 nM/mM, soy isolate군, 86.71 nM/mM으로 단백질 급원이나 isoflavones 함유 여부에 따른 유의적인 차이가 없었으나 isoflavones가 풍부한 콩 단백질을 섭취한 soy isolate군이 카제인군 보다 9.1% 낮은 수준이었다. 동물 실험에서 보고된 pyridinoline의 crosslinks value 농도는 SD종 성장기 수컷 흰쥐의 경우 83~138 nM/mM 이었으며,³¹⁾ 성장기 암컷 흰쥐는 55~85 nM/mM이었으

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

Group	DPD (nM)	Creatinine (mM)	Crosslink value (nM/mM)
Casein	511.06 ± 82.21 ^{1,2)}	5.36 ± 2.66 ^a	95.34 ± 29.06
Soy isolate	393.94 ± 77.83 ^b	4.54 ± 1.12 ^b	86.71 ± 22.87
Soy concentrate	359.17 ± 122.72 ^b	3.99 ± 2.64 ^b	90.07 ± 33.85

¹⁾Mean ± SD²⁾Values with different superscripts within the column are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test

며,²⁸⁾ 난소 절제 흰쥐의 경우에는 250~600 nM/mM이었다.³²⁾ 본 실험 동물의 DPD 수치는 87~102 nM/mM의 범위로 성장기 수컷 흰쥐에서 83~138 nM/mM로 보고한 것¹¹⁾ 보다 약간 낮은 편이다.

식이 단백질 또는 isoflavones가 골형성 지표 또는 골용해 지표에 미치는 영향에 대해서는 난소 절제 동물이나 폐경 후 여성을 대상으로 비교적 많은 연구가 보고되었다. 폐경 여성이나 난소 절제 모델을 이용한 연구에서 isoflavones가 함유된 콩 단백질은 골용해를 감소시켰다고 보고되었다.¹⁵⁾ Bonaccorsi 등³³⁾은 폐경 후 여성에서 콩 단백질은 DPD의 요 중 배설을 유의적으로 감소시켰고, isoflavones는 골용해 지표인 요 중 N-telopeptide 농도를 유의적으로 낮추었으나³⁴⁾ 골형성 지표인 오스테오칼신 농도는 차이가 없었다. 이외에도 Draper 등,¹⁵⁾도 난소 절제 동물 모델에서 isoflavones가 에스트로겐 부족으로 인한 골용해를 감소시켰다고 보고하여 대부분 골형성보다 골용해를 지연시켰다는 결과가 많다. 또한 isoflavones는 섭취 수준과 기간에 따라 다르게 나타나는데 난소 절제 쥐³⁵⁾에서 isoflavones 섭취량을 0, 20, 40, 80 mg/kg wt./d 수준으로 공급한 경우, 식이 공급 12주에는 isoflavones 섭취량에 대한 차이가 없었으나 24주에는 isoflavones 섭취량이 40 mg/kg wt./d인 군과 80 mg/kg wt./d인 군에서 난소 절제로 증가한 혈청 오스테오칼신 농도와 요 중 DPD 배설량을 유의적으로 감소시켰다고 보고하였다. 또한, 난소 절제 쥐에서 daidzin, genestein 또는 glycitin을 각각 25, 50, 100 mg/kg/d씩 공급한 Uesugi 등³⁶⁾의 실험에서는 glycitin과 daidzin을 50 mg/kg/d씩 공급받은 군에서만 요 중 PYD와 DPD의 배설이 감소하여 투여량에 따라 isoflavones의 효과가 다르게 나타났다. isoflavones의 골용해 감소 효과는 섭취량에 따라 다르게 나타나 적정 섭취 수준에 대한 연구가 요망된다.

성장기 흰쥐를 대상으로 콩 단백질이 골대사 지표에 미치는 연구를 살펴보면, 9주 간의 콩 단백질의 섭취는 성장기 수컷 흰쥐의 PYD의 crosslinks value를 약간 감소시켰으나 osteocalcin, ALP, 요 중 PYD crosslinks value에 유의적인 영향은 미치지 못하였고,³⁷⁾ 본 연구와 동일한 양

Table 5. Effects of soy protein and soy isoflavones on serum bone formation (ALP, osteocalcin)/bone resorption (cross link value) mark ratio in growing female rats

Group	ALP (U/l) / crosslink value	Osteocalcin (ng/ml) / crosslink value
Casein	0.6805 ± 0.044 ^{1,2)}	0.0498 ± 0.0073 ^a
Soy isolate	0.8777 ± 0.054 ^c	0.0598 ± 0.0061 ^b
Soy concentrate	0.7413 ± 0.052 ^b	0.0560 ± 0.0062 ^b

¹⁾Mean ± SD²⁾Values with different superscripts within the column are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test

의 isoflavones를 공급받은 성장기 수컷의 경우에는 PYD crosslinks value가 감소하는 경향을 보였다.³¹⁾ 본 실험에서 soy isolate군의 식이에 함유된 isoflavones의 함량은 57 mg/100 g diet로 체중 당 1일 섭취량으로 환산하면 약 34~42 mg/kg wt./d 수준으로 폐경 후 여성에서 골용해 지표를 감소시키는데 효과가 있었다고 보고한 40 mg/kg wt./d,²⁸⁾ 50 mg/kg wt./d³⁶⁾와 유사한 양이다. 본 연구의 결과에서 골용해 지표인 crosslinks value를 보면 유의적이지 않으나 isoflavones가 풍부한 콩 단백질 섭취 시 낮았다.

4) 골형성 지표와 골용해 지표의 비율

본 연구의 결과에서 골형성 지표인 ALP와 osteocalcin과 골용해 지표의 DPD crosslink value를 비교하였을 때 isoflavones가 풍부한 콩 단백질 섭취시 골형성 지표는 높은 경향을 골흡수 지표는 낮은 경향을 보였는데 이것을 골형성 지표/ 골흡수 지표의 비로 비교하였을 때 isoflavones가 풍부한 콩 단백질 섭취 시 골형성 지표/ 골흡수 지표의 비율이 유의적으로 높았는데 (Table 5), 이 결과는 성장기 수컷 쥐의 결과와 일치한다. 그리고 isoflavones가 성장기 암컷 흰쥐의 골대사 지표에 미치는 영향에 대한 보고는 거의 없어 타 연구의 결과와 비교가 어려운 실정이다. 그리고 선행 연구에서 폐경 후 여성에서 isoflavones는 골형성에는 영향을 미치지 않고 골용해를 감소시켜 골소실을 지연시켜 골밀도에 유익하다고 한 것과³⁸⁾ 또한 골용해의 감소에는 영향이 없고 골형성을 촉진시켜 골밀도에 유익하다고 한 것이¹⁶⁾ 있는데 본 연구의 성장기의 경우 isoflavones는 골 형성 지표와 골 용해 지표는 통계적 유의성이 없었으나 골형성 지표/ 골흡수 지표의 비율이 유의적으

Table 6. Effects of soy protein and soy isoflavones on serum calcitonin and parathyroid hormone (PTH) in growing female rats

Group	Casein	Soy isolate	Soy concentrate
PTH (pg/ml)	6.08 ± 2.23 ¹⁾	8.87 ± 3.38	10.32 ± 7.54
Calcitonin (pg/ml)	1.30 ± 0.20	1.25 ± 0.16	1.38 ± 0.15
Estradiol (pg/ml)	270.4 ± 110.8 ¹⁾	205.6 ± 59.4	235.4 ± 65.5

¹⁾Mean ± SD

로 높아서 골형성과 골용해에 동시에 작용하여 골밀도 형성에 유익한 것으로 사료된다.

3. 골형성 관련 호르몬

골격대사는 조골 세포와 파골 세포 계열에 영향을 미치는 호르몬에 의한 조절을 받는다. 콩 단백질과 isoflavones 가 parathyroid hormone (PTH)와 calcitonin에 미치는 효과를 Table 6에 제시하였다.

1) 부갑상선 호르몬 (Parathyroid hormone, PTH)

부갑상선 호르몬은 주된 칼슘 조절 호르몬으로서 골용해를 자극하고 신장에서 칼슘의 재흡수를 증가시킨다. PTH에 의한 골용해의 자극은 파골 세포에 PTH 수용체가 존재하지 않는 것으로 보아 간접적인 영향으로 보인다.³⁹⁾ 혈중 PTH는 각각 casein군 6.08 pg/ml, soy concentrate 군 10.32 pg/ml, soy isolate군 8.87 pg/ml으로 실험군 간에 유의적인 차이는 없었다. Mei 등³⁴⁾은 폐경 후 중국 여성을 대상으로 실시한 조사에서 isoflavones 섭취량이 높은 군의 혈청 PTH 농도는 19.83 pg/ml였으나 isoflavones 섭취량이 낮은 군의 혈청 PTH 농도는 26.56 pg/ml 으로 isoflavones 섭취량이 높은 군의 혈청 PTH 농도가 유의적으로 낮게 나타나 isoflavones가 estrogen 부족으로 인한 부갑상선 기능 항진을 역전시켜 폐경으로 인한 골교체율의 증가를 낮추어 줄 수 있다고 제안하였다. 그리고 Kalu 등⁴⁰⁾은 Fischer종 수컷 늙은 흰쥐를 대상으로 한 실험에서 콩 단백질 식이는 연령 증가로 인한 부갑상선 기능 항진 (hyperparathyroidism)을 감소시켜 가령으로 인한 골손실을 부분적으로 예방해 줄 수 있다고 제안하였다. 그러나 Kalu 등⁴⁰⁾이 이용한 콩 단백질의 isoflavones 함량에 대한 정보가 없어서 콩 단백질의 다른 성분 때문인지 isoflavones 때문인지 더욱 많은 연구가 요망된다.

2) 칼시토닌 (Calcitonin)

칼시토닌은 갑상선에서 분비되는 호르몬으로 골용해를 강력하게 억제하는 호르몬이다. 칼시토닌은 파골 세포 표면에 존재하는 칼시토닌 고 친화성 수용체를 통하여 파골

세포에 직접 작용하여 파골 세포에 의해 야기되는 골용해를 저해하는 작용을 한다. 그러나 골형성에는 관여하지 않는 것으로 알려져 있다.⁴¹⁾ 연구 보고에 따르면 혈 중 칼시토닌 수준은 연령증가에 따라 감소하고 남성보다 여성에서 더 낮다. 에스트로겐은 칼시토닌 분비를 자극하여 골격 대사에 관여하고 있는데, 폐경 후에 에스트로겐의 분비 부족이 칼시토닌 분비 저하를 초래하고 골손실량을 더욱 증가시키는 것으로 설명되고 있다.²⁵⁾ 그렇지만 골다공증 환자에게 있어서 calcitonin은 낮거나 정상 수준이라고 한다.⁴⁰⁾ 콩 단백질이 혈 중 칼시토닌의 농도에 미치는 효과에 대한 연구로 폐경 후 여성에서 연령의 증가로 칼시토닌의 증가 현상이 있었고, 콩 단백질 섭취로 인한 혈 중 칼시토닌의 감소 효과는 나타나지 않았다고 보고하였다.⁴⁰⁾ 본 연구에서 혈 중 칼시토닌 농도는 casein군 1.30 pg/ml, soy concentrate군 1.38 pg/ml, soy isolate군 1.25 pg/ml로 실험군 간에 유의적인 차이는 없었다. 따라서 본 연구에서 isoflavones가 풍부한 콩 단백질은 성장기 암컷 흰쥐의 골대사에 관련하는 PTH와 calcitonin 농도에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

콩 단백질이나 isoflavones가 골형성 및 골용해 호르몬에 미치는 연구에 관하여 폐경 후나 늙은 쥐를 대상으로 연구한 결과는 보고되었으나^{14,34,40)} 성장기의 사람이나 동물을 대상으로 콩 단백질이나 isoflavones가 골형성이나 골용해를 조절하는 호르몬에 미치는 효과에 대한 연구 보고가 거의 없어서 고찰이 어렵다. 본 연구에서 콩 단백질이나 isoflavones는 골형성 및 골용해 호르몬의 농도는 유의적인 차이를 보이지 않았는데 이것은 실험 모델의 골격 성장이 매우 빠르고 지속적으로 골함량이 증가하고 있는 성장기 흰쥐였으므로 식이가 이들 호르몬에 미치는 효과는 폐경이나 노화로 인한 부갑상선 기능 항진과 같은 대사 이상이 초래된 경우와는 다르게 나타난 것으로 생각되고, 또한 골대사에 유리하게 작용하는 에스트로겐이 안정적으로 분비되고 있는 시기인 것도 한가지 요인으로 작용하였을 것으로 생각되나 그 명확한 기전은 향후 연구에서 규명되어야 하겠다.

3) 여성 호르몬 (Estradiol)

여성 호르몬의 분비 정도를 알아보기 위하여 측정한 혈청 estradiol의 농도를 Table 6에 제시하였다. 본 실험 결과, 혈청 estradiol의 농도는 205~283 ng/ml 사이로 실험군 간에 유의적인 차이는 없었다. Estrogen의 정확한 작용은 아직 규명되어 있지 않지만 PTH, 칼시토닌과 vitamin D의 활성형인 1,25-(OH)₂-vitamin D와의 상호 작

용에 의해서 간접적으로 뼈의 손실을 방지하는 것으로 추측되고 있다.³⁸⁾ 에스트로겐은 칼시토닌 분비를 자극하여 골격 대사에 관여하고 있는데, 폐경 후에 에스트로겐 분비 부족이 칼시토닌 분비 저하를 초래하고 골손실량을 더욱 증가시키는 것으로 보고되고 있다.³⁸⁾ 혈 중 estradiol 농도는 수컷의 경우 128~138 ng/ml의 범위였고 isoflavones의 섭취가 혈중 농도에 영향을 미치지 않았는데,¹²⁾ 암컷의 경우 200~270 ng/ml의 범위로 수컷에 비해 유의적으로 높았고, 수컷에서와 같이 isoflavones의 섭취에 따른 차이가 없었다. 콩 단백질이 골다공증의 위험을 줄여 줄 수 있다고 제시되는 기전 중의 하나로 estrogen과 유사한 구조 때문에 에스트로겐과 같은 역할로 골손실을 보호해 줄 것이라는 견해와는 달리 isoflavones는 에스트로겐과는 다른 기전으로 골손실을 예방한다고 제시되었다. 선행 연구에서 폐경 후 isoflavones를 섭취시켰을 때 혈 중 에스트로겐 농도에는 영향을 미치지 않았다고 보고하였다.^{34,42,43)} 즉, 폐경 후 여성에서 짧은 기간 (12주) 동안 높은 수준 (90 mg/day)으로 isoflavones를 공급한 경우와⁴²⁾ 장기간 (6개월) 낮은 수준 (38 mg/day)으로 공급한 경우⁴³⁾ 모두에서 isoflavones의 섭취는 혈 중 에스트로겐 농도에 영향을 미치지 않았다고 보고하여 isoflavones가 폐경 후 여성의 혈 중 에스트로겐 농도에 영향을 미치지 않음을 보여주었다. 또한 Arjmandi 등⁴⁴⁾은 콩 단백질의 골손실 보호효과는 골용해를 저해시키기 보다는 골형성을 촉진시킴으로써 일어난다고 하였다. Alekel 등¹⁶⁾은 폐경 초기 여성에게 isoflavones가 풍부한 콩 단백질의 공급은 요추의 골밀도는 증가시켰으나 혈청 bone-specific alkaline phosphatase 와 요중 N-telopeptides는 감소시키지 못하였다고 하였다. 이러한 결과로 isoflavones가 에스트로겐이나 다른 골용해 억제제 (anti-resorptive agent)와는 다른 기전으로 골손실을 예방한다고 제안하였다. 분리 콩 isoflavones를 투여한 경우에도 이와 같은 결과들이 보고되었는데, Fanti 등⁴⁵⁾은 난소 절제한 흰쥐에게 genistein을 투여했을 때 조골 세포 (osteoblast)의 수와 혈청 오스테오칼신 수준이 증가하였으나 파골 세포 (osteoclast)의 수와 요 중 PYD crosslink 수준이 감소하지 않았으므로 genistein은 골용해를 억제하기 보다 골형성을 자극하는 기전을 통해 골손실을 억제한다고 보고하였다. Kim⁴⁶⁾의 연구에서도 isoflavones의 첨가가 대퇴골 및 요추골의 칼슘과 인의 손실은 감소시켰으나 혈청 ALP와 TrACP 활성을 감소시키지 않은 것으로 나타나 에스트로겐과는 다른 기전으로 골손실을 막은 것으로 제안하였다.

최근 성장기 흰쥐에서도 콩 단백질의 섭취가 혈 중 에스-

트로겐 농도에 영향을 미치지 않았음을 보고하였는데, 정확한 isoflavones의 함유량은 제시되지 않았으나 콩 단백질을 섭취한 군과 카제인을 섭취한 군간에 혈 중 에스트로겐의 농도 차이가 없었다.²⁸⁾ 본 연구에서도 isoflavones의 함유량에 따라 혈 중 에스트로겐의 농도에 영향을 미치지 않아서 선행 연구 결과와²⁸⁾ 일치하였다.

4) 성장 호르몬

성장 호르몬 분비는 노화가 진행되면서 분비가 감소하는데, 남성에 비해 여성에서 그 감소가 현저하여 10년마다 약 14%가 감소하는 것으로 알려져 있다.⁴⁷⁾ 노인에게서는 estrogen 같은 성장 호르몬 분비를 촉진하는 호르몬이 감소하게 되고 또한 GHRP (growth hormone releasing peptide)의 분비 감소와 somatostatin의 분비 증가에 의해 성장 호르몬이 감소한 것으로 설명되어지고 있다.⁴⁷⁾ 성장 호르몬 결핍성 왜소증을 진단하기 위한 방법 중의 하나로 arginine이나 인슐린 등 성장 호르몬의 분비를 촉진시키는 약물을 사용한다.⁴⁸⁾ 성장 호르몬은 연령 증가에 따른 여러 신체 기능의 저하와 관련이 있으며 골격 성장이나 골다공증의 병인과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 성장 호르몬 결핍 소아에서 골밀도가 감소되고 성장 호르몬 치료시 골밀도가 증가한다고 보고되었다.^{49,50)} 그리고 골다공증 환자들에게 arginine 투여로 성장 호르몬 분비 능력을 측정한 결과 성장 호르몬의 분비가 저하된다고 하였다.⁵¹⁾ 또한 Monson 등⁵²⁾은 성장 호르몬이 아동기의 골질량 획득의 주된 인자서 최대 골밀도 형성과 마지막 신장 결정에 중요한 인자로 작용하며 성인기 동안에는 골 재형성을 결정하여 골밀도 유지에 영향을 미친다고 하였다. Attie 등⁵⁰⁾ 역시 성장 호르몬은 아동기의 골격성장과 최대 골밀도 형성 및 성인기의 골량 보유와 감소 예방에 중요한 인자라고 지적하였다.

혈 중 성장 호르몬 농도를 Table 7에 나타내었다. 성장 호르몬 농도는 콩 단백질을 섭취한 soy concentrate군과 soy isolate군이 대조군인 카제인군 보다 유의적으로 높았다. 따라서 콩 단백질이 성장 호르몬의 분비를 증가시킬지도 모른다고 추론한 선행 연구와¹⁴⁾ 수컷의 경우 isofla-

Table 7. Effects of soy protein and soy isoflavones on serum growth hormone in growing female rats

Group	Casein	Soy Isolate	Soy Concentrate
Growth hormone	0.170 ± 0.008 ^{11,12)}	0.176 ± 0.009 ^b	0.180 ± 0.018 ^b (ng/ml)

¹¹⁾Mean ± SD

¹²⁾Values with different superscripts within the row are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test

vones가 풍부한 경우 성장 호르몬의 분비가 증가하였다는 보고와¹²⁾ 일치한다. 본 실험에서도 isoflavones가 풍부한 콩 단백질군의 성장 호르몬 농도가 카제인군에 비하여 유의적으로 증가하여 이와 유사한 결과를 나타내었다. 그런데, 본 연구에서는 isoflavones가 거의 함유되어 있지 않은 soy concentrate를 섭취한 군에서도 성장 호르몬 분비가 카제인군 보다 유의적으로 높았다. 식이 단백질이 성장 호르몬의 분비에 영향을 미치는 것에 대한 보고로 Pfeuffer 는⁵³⁾ 카제인이 콩단백질에 비하여 성장호르몬의 분비가 낮다고 하였다. Nass 등⁵³⁾은 1998년에 아미노산 중 arginine 은 성장 호르몬 분비를 자극한다고 보고한 바 있다. Arginine은 성장 호르몬의 분비를 촉진시키는 물질로 성장 호르몬 결핍성 왜소증을 진단을 위해 사용되어지는데,⁴⁸⁾ 그 기전은 arginine을 투여함으로서 somatostatin 분비가 억제되어 성장 호르몬의 분비가 증가한다고 보고되었다.^{47,48)} 성장기 수컷 흰쥐를 대상으로 한 Kim과 Kim의 연구⁵⁴⁾에서는 카제인군 보다 soy isolate군에서 혈청 arginine 농도가 높았음을 보고한 바 있다. 본 실험에 이용한 soy isolate 와 soy concentrate의 arginine 함량은 카제인에 함유된 arginine량 보다 약 2.3배 정도 높다. 본 연구에서의 콩 단백질의 성장 호르몬 분비 증가효과는 이러한 콩 단백질의 아미노산 조성의 차이에서 기인된 것으로 사료되나 검증이 필요하며 연구가 요망된다. 선행연구에서 분리 제조한 isoflavones를 섭취시킨 경우에도 성장 호르몬의 분비가 증가되었으므로 단백질의 아미노산의 조성과 isoflavones의 영향이 함께 작용하는지에 대한 연구가 필요하다. 선행 연구에서 성인 남자에게 우유 단백질과 콩 단백질 (40 g/day) 을 3개월 간 공급한 경우 콩 단백질은 IGF-1의 분비를 증가시켜 골량을 증가시키나 혈청 ALP와 요 중 DPD 배설량에는 영향을 미치지 않았다고 보고하여⁵⁵⁾ 남성의 경우는 폐경 후 여성에서와 같이 isoflavones가 풍부한 콩 단백질의 골 용해 억제 효과나 골교체율의 감소 효과를 확인

할 수 없었다고 보고했다. 따라서 isoflavones가 골대사에 영향을 미치는 기전으로 IGF-1의 분비를 상승시켜 골밀도 형성을 촉진시킬 수 있다고 사료되나 선행 연구에서 골밀도의 측정결과가 없어 더욱 연구가 요망된다.

Jung³⁷⁾의 연구에서는 성장기 수컷 흰쥐에서 isoflavones 가 풍부한 콩 단백질의 섭취로 골밀도와 골무기질 함량에 대한 칼슘 효율이 높아졌으므로 골밀도에 유익한 영향을 미칠 것으로 보고하였으며, 최근 성장기 수컷 흰쥐의 casein 식이에 isoflavones를 첨가한 실험³⁷⁾에서도 골밀도가 향상되었다고 보고하였다.

4. 골형성 및 골용해 지표와 호르몬과의 상관관계

골형성 지표인 ALP와 오스테오칼신은 PTH와 각각 ($r = 0.49 p < 0.05, r = 0.65 p < 0.05$) 양의 상관 관계를 나타내었고, 성장 호르몬은 오스테오칼신과 DPD cross-links value와 각각 음의 상관관계 ($r = -0.37 p < 0.05, r = -0.39 p < 0.05$)를 그리고 골형성 지표 ALP에 대한 골흡수 지표 DPD crosslinks value의 비율에 대하여 양의 상관관계를 ($r = 0.48 p < 0.05$), 골형성 지표 오스테오칼신에 대한 골흡수 지표 crosslinks value의 비율에 대하여 양의 상관관계를 ($r = 0.43 p < 0.05$) 나타내었다 (Table 8). 따라서 골용해 호르몬의 분비가 왕성할 때 골형성 물질의 분비가 왕성하고 성장 호르몬은 골형성과 골용해 지표의 비율과 양의 상관 관계를 보여 골형성에 유리하게 작용하는 것으로 사료된다.

결 론

성장기 암컷 흰쥐에서 콩 단백질과 isoflavones가 골격 대사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 9주간 수행된 본 연구의 결과를 아래와 같이 요약하였다.

1) 체중 증가량과 식이 섭취량은 실험군 간에 유의적인 차이가 없었고 식이 효율은 카제인 섭취군이 콩 단백질 섭

Table 8. Correlation coefficient among variables

	ALP	Estrogen	PTH	GH	Osteo-calcin	DPD	Calcitonin	Crosslink	ALP/Crosslink
Estrogen	-0.04								
PTH	0.49*	-0.12							
GH	0.02	0.16	-0.05						
Osteo-calcin	0.17	-0.13	0.65**	-0.37*					
DPD	0.23	0.25	-0.09	-0.20	-0.08				
Calcitonin	-0.19	-0.03	-0.11	0.12	-0.10	-0.06			
Crosslink	-0.11	-0.18	0.18	-0.39*	0.21	-0.13	-0.07		
ALP/Crosslink	0.07	-0.02	-0.00	0.48**	-0.11	-0.43*	0.08	-0.71***	
Osteocalcin/Crosslink	-0.09	-0.04	-0.00	0.43*	-0.02	-0.49**	0.11	-0.65**	0.97***

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

취근 보다 유의적으로 높았다.

2) 골형성 지표인 혈청 ALP, 오스테오칼신 농도는 실험군 간에 유의적인 차이는 없었다.

3) 골흡수 지표인 DPD crosslinks value는 실험군 간에 유의적인 차이는 없었다.

4) 골형성 지표/ 골흡수 지표의 비율은 isoflavones가 풍부한 콩 단백질의 경우 유의적으로 높았다.

5) 혈 중 칼슘 농도에 관여하는 PTH와 칼시토닌 농도는 실험군간에 유의적인 차이가 없었다.

6) 혈 중 에스트로겐 농도는 단백질의 종류나 콩 단백질 내에서 isoflavones의 함유 유무에 따라 유의적인 차이가 없었다.

7) 성장 호르몬 농도는 카제인군 보다 콩 단백질과 isoflavones가 풍부한 콩 단백질을 섭취한 군에서 유의적으로 높았다.

결론적으로 성장기의 isoflavones가 풍부한 콩 단백질은 골형성 지표/ 골용해 지표의 비율을 유의적으로 증가시켰고, 성장 호르몬의 분비를 증가시켜 골밀도 형성에 유익할 것으로 사료된다. 따라서 일찍이 isoflavones가 풍부한 콩 단백질의 섭취는 골다공증 예방에 유익할 것으로 사료된다.

Literature cited

- 1) Kim WY. Osteoporosis and dietary factors. *Korean J Nutrition* 27: 636-645, 1994
- 2) Wasnich RD. Bone mass measurements in diagnosis and assessment of therapy. *Am J Med* 91 (suppl5) : 54s-58s, 1991
- 3) Adlercreutz H, Mazur W. Phytoestrogen and western disease. *Ann Med* 29: 95-120, 1997
- 4) Cooper C, Campion G, Melton LJ. Hip fractures in the elderly; a world-wide projection. *Osteoporosis Int* 2: 285-289, 1992
- 5) Scheiber MD, Rebar RW. Isoflavones and postmenopausal bone health. *Menopause* 6: 233-241, 1999
- 6) Miksick RJ. Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. *PSEBM* 208: 44-50, 1995
- 7) Song TT, Hendrich S, Murphy PA. Estrogenic activity of glycinein, a Soy Isoflavone. *J Agric Food Chem* 47: 1607-1610, 1999
- 8) Dwyer JT, Goldin BR, Saul N, Gualtieri L, Barakat S, Adlercreutz H. Tofu and soy drinks contain phytoestrogens. *J Am Diet Assoc* 94: 739-743, 1994
- 9) Martin RM, Horwitz KB, Ryan DS, McGuire WL. Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinology* 198: 1860-1867, 1978
- 10) Shutt DA, Cox RI. Steroid and phytoestrogen binding to sheep uterine receptors in vitro. *J Endocrinol* 52: 299-310, 1972
- 11) Choi MJ. Effects of soy protein on bone mineral content and bone mineral density in growing male rats. *Kor J Nutr* 35 (4) : 409-413, 2002
- 12) Choi MJ, Cho HJ. Effects of soy protein and isoflavones on bone mineral density in growing female rats. *Korean J Nutrition* 36 (5) : 452-458, 2003
- 13) Hannon R, Blumsohn A, Dehaimi AW, Eastell R. The use of biochemical markers of bone turnover to monitor the skeletal response to hormone replacement therapy. *Bone* 10 (suppl2) : 549s-555s, 1995
- 14) 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
- 15) Draper CR, Edel MJ, Dick IM, Randall AG, Martin GB, Raince RL. Phytoestrogens reduce bone loss and bone resorption in oophorectomized rats. *J Nutr* 127: 1795-1799, 1997
- 16) Alekel DL, Germain AS, Peterson CT, Hanson KB, Stewart JW, Toda T. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am J Clin Nutr* 72: 844-852, 2000
- 17) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents. *J Nutr* 123: 1939-1951, 1993
- 18) Xing S, Cekan SZ, Dicafalusi U. Validation of radioimmunoassay for estradiol-17 isotope dilution-mass spectrometry and a test of radiochemical purity. *Clin Chem Acta* 135: 189-201, 1983
- 19) Guarner P, Grimaux M, Seguin P, Delmas P. Characterization of immunoreactive forms of human osteocalcin generated in vivo and in vitro. *J Bone Min Res* 9: 692-698, 1994
- 20) Nanda N, Joshi H, Subbarao SK, Sharma VP. Two-site immuno-radiometric assay (IRMA): detection, efficiency, and procedural modifications. *J Am Mosq Control Assoc* 10: 225-227, 1994
- 21) Mahan LK, Escott-Stump S. *Krauses's food, nutrition & diet therapy*. 9th ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp346, 1996
- 22) Garnero P, Delmas PD. New developments in biochemical markers of osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 59 (7) : 2-9, 1996
- 23) Johnell O, Oden A, De Laet C, Garnero P, Delmas PD, Kanis JA. Biochemical indices of bone turnover and the assessment of fracture probability. *Osteoporos Int* 13: 523-526, 2002
- 24) Delmas PD, Stenner D, Wahner HW, Mann KG, Riggs BL. Increase in serum bone gamma-carboxyglutamic acid protein with aging in women. Implications for the mechanism of age-related bone loss. *J Clin Invest* 71: 1316-1321, 1983
- 25) Eyre DR. Biochemical markers of bone turnover. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 3rd ed. in: Favus MJ. Raven Press, New York, pp114-118, 1996
- 26) Lian JB, Gundberg CM. Osteocalcin biochemical considerations and clinical applications. *Clin Ortho Rel Res* 226: 267-291, 1998
- 27) Murakami H, Nakamura T, Tsurukami H, Abe M, Barbier A, Suzuke K. Effects of tiludronate on bone mass, structure, and turnover, at the epiphyseal, primary, and secondary spongiosa in the proximal tibia growing rats after sciatic neurectomy. *J Bone Miner Res* 9: 1355-1364, 1994
- 28) Mathur SR. Effect of protein source and exercise on skeletal health of growing female rats. *Dissertation of Ph.D in Texas Woman's University*, 1998
- 29) Hauschka PV, Lian JB, Dole DEC, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev* 69: 990-1047, 1989
- 30) Delmas PD. Biological markers of bone turnover for the clinical

- investigation of osteoporosis. *Osteoporosis Int (suppl)* : s81-s86, 1993
- 31) Chae JH. The effect of isoflavones on bone mineral density and bone mineral content in growing male rats. *Master's thesis, Keimyung University*, 2002
 - 32) Calvo MS, Bell RR, Forbes RM. Effect of protein-induced calciuria on calcium metabolism and bone status in adult rats. *J Nutr* 112: 1401-1409, 1982
 - 33) Bonaccorsi G, Albertazzi P, Constantino D. Soy phytoestrogen and bone. *N Am Menopause Soc Meet* 44 (abstract) : 44, 1997
 - 34) Mei J, Yeung SS, Kung AW. High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 86(11) : 5217-5221, 2001
 - 35) Picherit C, Bennetau-Pelissero C, Chanterne B, Lebecque P, Cavigco 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
 - 36) 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, genistin, and glycitin. *Biol Pharm Bull* 24(4) : 368-372, 2001
 - 37) Jung SH. The effect of dietary protein source and sulfur amino acid content on bone metabolism in male rats. *Master's thesis, Keimyung University*, 1995
 - 38) Komm BS, Terpening CM, Benz DJ, Graeme KA, Gallegos A, Korc M, Greene GL, O'Malley BW, Haussler MR. Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Science* 241: 81-84, 1998
 - 39) Min HK. Osteoporosis. *J Korean Soc Internal Medicine* 34: 442-445, 1976
 - 40) Kalu DN, Masoro EJ, Yu BP, Hardin RR, Hollis BW. Modulation of age related hyperparathyroidism and senile bone loss in fischer rats by soy protein and food restriction. *Endocrinology* 122: 1847-1854, 1998
 - 41) Gruber HF, Ivey JL, Baylink DJ. Long Term Calcitonin Therapy in postmenopausal osteoporosis. *Metabolism* 33: 295-303, 1984
 - 42) Lee DH, Lee HS, Kim MH, Yoon ME, Sung CJ. Effect of isoflavones supplementation on bone mineral density and sex hormones in postmenopausal women. *Korean J Nutrition* 35: 863-869, 2002
 - 43) Lowenstein J, Wiencke J, Lee MM, Miike R, Kirk M. Stimulatory influence of soy protein isolate on breast sedretion in pre- and postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5: 785-794, 1996
 - 44) Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized osteoporosis. *J Nutr* 126: 161-167, 1996
 - 45) Fanti O, Faugere MC, Gang Z, Schmidt J, Cohen D, Malluche HH. Systematic administration of genistein partially prevents bone loss in ovariectomized rats in a nonestrogen-like mechanism. *Am J Clin Nutr* 68 (suppl) : 1517s (abs), 1998
 - 46) Kim MS. Beneficial effect of soy isoflavone on bone loss and hyperlipidemia in ovariectomized rats. *Dissertation of Ph.D, Seoul National University*, 1999
 - 47) Lely AJ. Growth Hormone and aging. *GH & IGF Res* 9: 117-119, 1999
 - 48) Dean HJ, Kellett JG, Bala RM. The effect of growth hormone treatment on somatomedin levels in growth hormone deficient children. *J clin Endocrinol Metab* 55: 1167-1173, 1982
 - 49) Monson JP, Arake WM, Carroll PV, Weaver JU, Rodriguez-Arnao J, Savage MO. Influence of growth hormone on accretion of bone mass. *Horm Res* 58 (Suppl) 1: 52s-56s, 2002
 - 50) Attie KM. The importance of growth hormone replacement therapy for bone mass in young adults with growth hormone deficiency. *J Pediatr Endocrinol Metab* 13(suppl) : 1011-1021, 2000
 - 51) Ki OH, Kim DY, Yong HI, Woo JT, Kim SW, Yang IM, Kim JW. Changes of bone turnover markers after treatment with growth retardation. *J Korea Soc Endocrinol* 9: 344-349, 1994
 - 52) Nass R, Pezzoli SS, Chapman IM, Patrie J, Hintz RL, Hartman ML, Thorner MO. IGF-I does not affect the net increase in GH release in response to arginine. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283(4) : E702-710, 2002
 - 53) Pfeuffer M, Wuttke, Baryh CA. Influence of different dietary proteins on plasma growth hormone in rats. *Z Ernahrungsgswiss* 27(4) : 229-35, 1988
 - 54) Kim KL, Kim WY. The effect of soy protein and casein on serum lipid, amino acid. *Korean J Nutr* 17: 309-310, 1983
 - 55) Khalil DA, Lucas EA, Juma S, Smith BJ, Payton ME, Arjmandi BH. Soy protein supplementation increases serum insulin-like growth factor-I in young and old men but does not affect markers of bone metabolism. *J Nutr* 132(9) : 2605-2608, 2002