

# 發芽한 鼠目太가 난소적출 흰쥐의 Cathepsin-K에 미치는 영향

정호룡 · 차윤엽\* · 이응세

상지대학교 한의과대학 한방재활의학과교실

## Effect of Germinated Seed of *Rhynchosia Volubilis* on Cathepsin-K in Ovariectomized Rats

Ho Long Jung, Yun-Yeop Cha\*, Eung Se Lee

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

The aim of this study is to find out what inhibition effects the Germinated Seed of *Rhynchosia Volubilis*(GSRV) has by its feeding period on the bone absorption in ovariectomized white rats. Close examination of the amounts of the Cathepsin-K in the rats by the groups of one, two and three-day germination periods led to the following conclusions. Feeding non-ovariectomized white rats with GSRV by the groups of one, two and three-day germination periods showed less amounts of Cathepsin-K in their proximal tibia in all the feeding periods of two, three and four weeks than in the case of control group, revealing a statistical significance. Feeding ovariectomized white rats with GSRV by the groups of one, two and three-day germination periods showed less amounts of Cathepsin-K in their proximal tibia in all the feeding periods of two, three and four weeks than in the case of the control group, revealing a statistical significance. Therefore, the Germinated Seed of *Rhynchosia Volubilis*(GSRV) is believed to have inhibition effects on bone resorption.

Key words : *Rhynchosia Volubilis*, Cathepsin-K, Osteoporosis, bone resorption

### 서 론

골다공증(osteoporosis)은 가장 흔한 골의 대사성 질환(metabolic bone disease)의 하나로 같은 성별 및 연령층에 비하여 총 골량(total bone mass)이 감소한 상태인데, 선천성, 폐경기 후 노인성 혹은 불용성 골다공증 및 갑상선 기능 항진증, 부갑상선 기능 항진증, 만성 신부전증, 부신 피질 호르몬 투여 등에 따른 속발성 골다공증 등 다양한 원인에 의해서 발생한다<sup>1)</sup>.

골다공증의 치료제로 에스트로젠(estrogen)이 현재 가장 널리 사용되는 골흡수 억제제이나 에스트로젠 사용이 자궁내막암, 유방암의 발생빈도를 증가시키고, 혈전증, 담석증, 고혈압, 부종, 유방통 등을 유발시킬 수 있으며, 폐경 후 에스트로젠과 프로게스테론(progesterone)을 동시 투여한 여성을 추적 관찰한 결과에서도 유방암, 뇌졸중, 폐색전 등의 발생률이 높다는 것이 증명되었다<sup>2,3)</sup>. 따라서 보다 안전하고 장기복용이 가능한 한약재를 포함한

약물 연구에 대한 필요성이 대두 되는 바이다.

대두 이소플라본이 약한 에스트로젠 활성을 나타내고<sup>4)</sup>, 대두 발아과정이 이소플라본 생성에 영향을 준다는 보고<sup>5)</sup>에 근거하여 콩류중 높은 이소플라본을 함유한 것으로 알려진 발아한 서목태(鼠目太)가 골다공증에 유효할 것으로 사료된다. 서목태를 이용한 기존의 논문으로는 조 등<sup>6)</sup>은 약콩과 대두추출물이 MG-63조골세포에 대하여 증식과 estrogen receptor의 발현을 증가됨을 보고하였다.

이에 저자는 발아한 서목태가 파골세포에 의한 골흡수 과정에 관여하는 효소로 골다공증 치료 또는 예방약물의 개발에 중요한 표적 중에 하나인 Cathepsin-K에 대한 효소활성 검사를 실시한 결과 유의성 있는 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 1. 실험동물

실험에 사용한 동물은 동물 센터에서 분양을 받은 생후 8주 된 Sprague-dawley계 암컷 흰쥐를 사용하였으며 쥐의 체중은

\* 교신저자 : 차윤엽, 강원도 원주시 우산동, 상지대학교 부속한방병원

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

· 접수 : 2004/11/12 · 수정 : 2004/12/13 · 채택 : 2005/01/17

200±10g이었다. 사료로는 마우스 페레트형 고품 압축사료(삼양 식품사)를 사용하였으며 식수는 충분히 공급하였다. 사육은 경희대 한의대 동물실험실에서 40×25×17cm 크기의 cage에 각각 여섯 마리씩 사육하였다.

2. 검액의 제조

정선산 서목태를 발아시키지 않은 것과 1일, 2일, 3일 발아시켜 총 200g을 분쇄한 후 시료의 무게의 20배인 1차 증류수 4L를 집어넣어 2시간 동안 열수추출한 후 여과하여 여액을 감압농축 후 72시간 동안 동결 건조한 것을 시료로 사용하였다.

3. 발아시기별 서목태의 형태

본 실험에서는 28℃에서 재배하여 3일 만에 최적의 콩나물을 얻었다고 보고한 Aminah<sup>7)</sup> 등과 신 등<sup>8)</sup>의 방법을 참고로 하여 incubator의 온도를 평균 27℃(26-28℃)를 유지하고, 17℃의 지하수를 1일 8회 갈아주었다. 1일, 2일, 3일째 콩나물의 사진은 아래와 같다(Fig. 1).

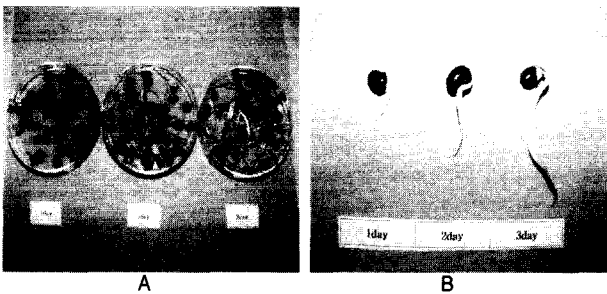


Fig. 1. A: Germinating Condition, B: Shapes among Germinating Periods

4. 실험군 설정

발아 전, 발아 후 1일, 발아 후 2일, 발아 후 3일째의 서목태를 투여한 흰 쥐 6마리를 각 군으로 하여 난소 적출 전을 normal 군으로, 난소 적출 후 서목태를 투여하지 않은 군을 control 군으로 하고 각각 2주, 3주, 4주 투여군을 비교군으로 설정하였다. 열추출한 검액을 투여한 군 중 난소적출 전 군은 2, 3, 4주 전부터 난소를 적출하기까지 서목태 건조 엑기스를 발아 시기별에 따라 마리당 240mg/200g을 각각 2주, 3주, 4주간 1일 1회 경구 투여하였다. normal 군은 1주 동안 동량의 생리식염수를 경구투여 하였고 control 군은 난소 적출 전 후 1주 동안 동량의 생리식염수를 경구 투여하였다.

5. 골다공증 유도

골다공증 유도는 Waynforth 방법을 사용하였다. 즉 흰 쥐 한 마리당 ketamin hydrochloride(ketamin, 유한양행) 0.5ml를 복강내 주사하여 마취한 다음 복강을 절제하여 양측 난소를 확인하여 모두 적출하여 복강을 봉합하였다.

6. Cathepsin-K의 효소 활성도 측정

골 조직내의 혈청 중 Cathepsin-K의 효소 활성도를 측정하

기 위하여 Kazuhiko의 방법을 변형하여 substance로서 Boc-A-G-P-R-MCA 50uM을 사용하였으며 시료는 골 조직내의 골수를 50μl을 취하여 96-well plate에 분주하고 substance를 0.02mM이 되게 DMSO에 녹여 250μl를 첨가하고 50mM MES(pH 5.5), 2mM EDTA, 4mM DTT의 반응액 200μl와 함께 혼합하여 37℃에서 60분간 반응한 후 기질에서 7-amino-4methylcoumarin의 생성량을 fluorescence plate reader (Corona-MTP32, Ibaraki, Japan)로 460/360nm에서 측정하였다.

7. 통계분석

모든 결과는 평균값(mean ± standard error of mean, SEM)으로 나타내었다. 대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검정은 one-way ANOVA검정을 적용하였으며 P값이 0.05 이하인 경우 유의한 것으로 하였다.

실험결과

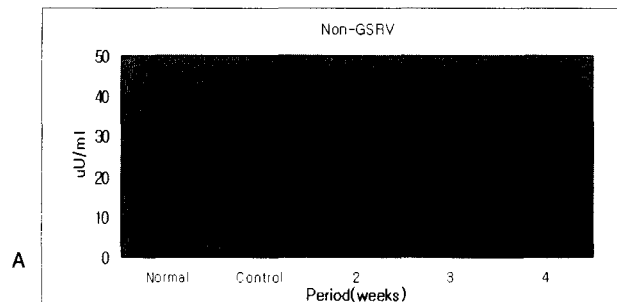
1. 서목태 추출물을 복용 후 흰쥐의 난소적출 후 근위부 경골에서 발현된 Cathepsin-K의 활성도

서목태 추출물의 발아시기에 따른 골다공증에 대한 예방효과를 알아보기 위하여 흰쥐의 난소를 적출하기 전에 각각의 서목태를 투여하고 경골내 Cathepsin-K 활성도를 측정한 결과 생리식염수를 투여한 normal 군은 5.1±2.0uU/ml, 난소를 적출한 control 군은 40.0±3.0uU/ml 이었으며, 발아 1일 서목태를 투여하고 난소를 적출한 군은 2, 3, 4주가 되면서 30.2±2.5, 30.2±1.6, 28.7±1.7uU/ml로 감소추이를 보였으며 이는 발아 2일 후나 3일 후의 시료결과와 유사한 결과를 보였으며 통계적으로도 control 군에 비해 의미 있게 감소하였다(Table 1, Fig. 2, Fig. 3).

Table 1. Effects of GSRV on Cathepsin-K activity in proximal tibia of non-ovariectomized rats

Sample (uU/ml)	group by Tx period	Normal (n=6)	Control (n=6)	2-weeks (n=6)	3-weeks (n=6)	4-weeks (n=6)
Sample GSRV0		5.1±2.0	40.0±3.0	42.2±1.5	40.1±2.5	39.2±1.5
Sample GSRV1		5.1±2.0	40.0±3.0	30.2±2.5	30.2±1.6	28.7±1.7
Sample GSRV2		5.1±2.0	40.0±3.0	31.2±1.8	31.2±2.6	21.2±2.5
Sample GSRV3		5.1±2.0	40.0±3.0	32.1±2.5	31.0±1.5	28.3±2.5

Sample GSRV0: non-GSRV, Sample GSRV1: 1day following the germination, Sample GSRV2: 2day following the germination, Sample GSRV3: 3day following the germination, Normal Group : non-ovariecting group(n=6), Control Group : ovariecting group as not treated(n=6), 2weeks Tx : ovariecting group of 2weeks GSRV treated(n=6), 3weeks Tx : ovariecting group of 3weeks GSRV treated(n=6), 4weeks Tx : ovariecting group of 4weeks GSRV treated(n=6)



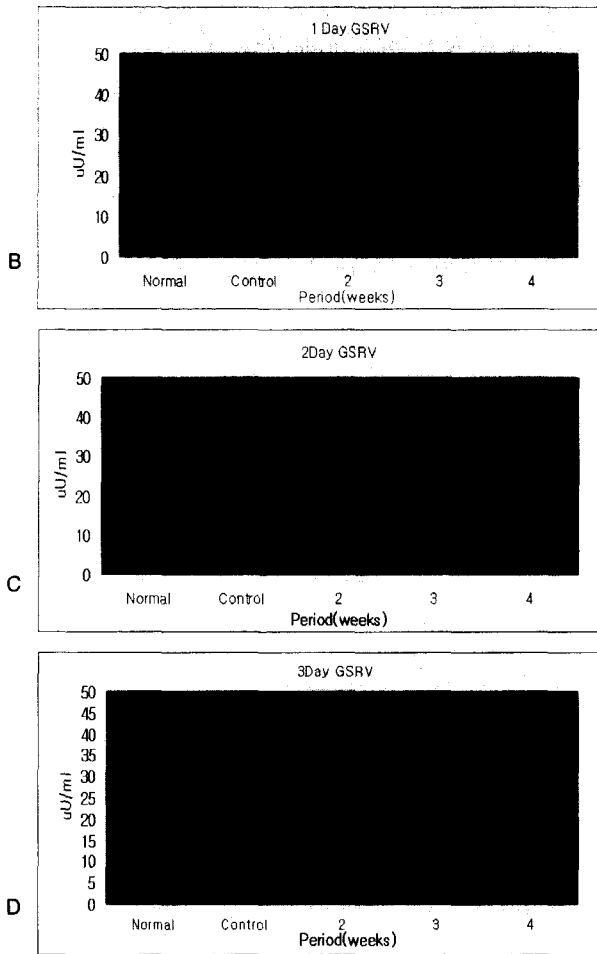


Fig. 2. A: Activity of Cathepsin-K in case the rats are fed with non-Germinated Seed of *Rhynchosia Volubilis* before ovariectomy. B: Activity of Cathepsin-K in case the rats are fed with GSRV of one day after its germination before ovariectomy. C: Activity of Cathepsin-K in case the rats are fed with GSRV of two days after its germination before ovariectomy. D: Activity of Cathepsin-K in case the rats are fed with GSRV of three days after its germination before ovariectomy.

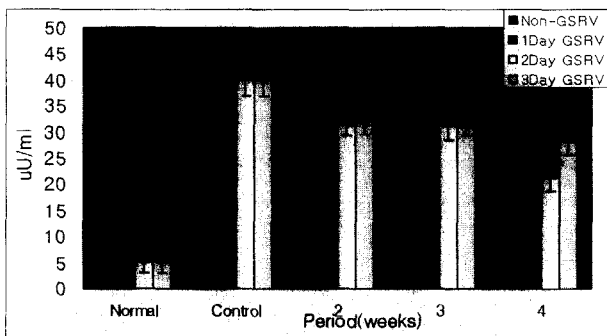


Fig. 3. Comparison of effects of GSRV on Cathepsin-K activity in proximal tibia of non-ovariectomized rats. The data was presented as mean  $\pm$  S.E.M. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  as compared to not treated control.

2. 서목태 열추출물의 발아시기 및 섭취기간에 따른 난소 적출 후 흰쥐의 Cathepsin-K 효소 활성도

골다공증의 치료효과를 알아보기 위해서 흰쥐의 난소를 적출

한 후에 서목태를 투여하고 근위부 경골 중에 Cathepsin-K 활성도를 측정된 결과 발아 1일 후의 시료가  $22.0 \pm 2.2$ ,  $16.2 \pm 2.6$ ,  $15.0 \pm 2.0 \mu\text{U/ml}$ 의 감소한 바 발아 2, 3일후의 시료보다 현저한 감소를 나타내었으며, 발아하지 않은 서목태와 발아한 서목태를 복용한 모두에서 통계적으로도 control군에 비해 의미 있게 감소하였다(Table 2, Fig. 4, Fig. 5).

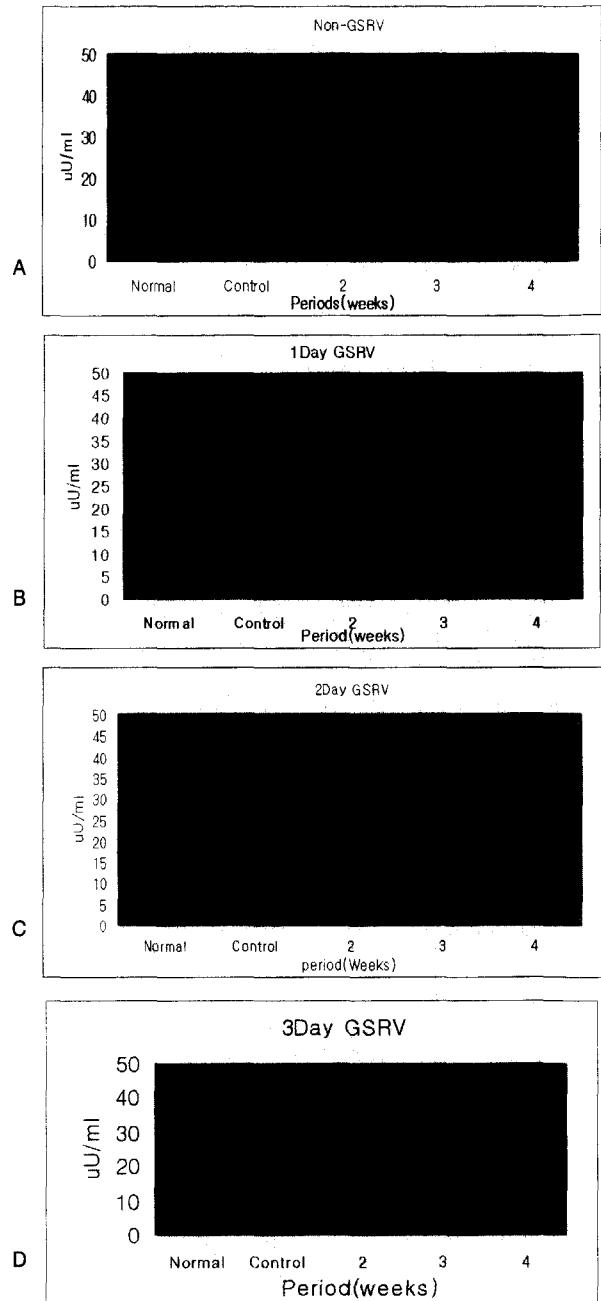


Fig. 4. A: Activity of Cathepsin-K when ovariectomized rats are fed with non-Germinated Seed of *Rhynchosia Volubilis*. B: Activity of Cathepsin-K when ovariectomized rats are fed with GSRV of one day after its germination. C: Activity of Cathepsin-K when ovariectomized rats are fed with GSRV of two days after its germination. D: Activity of Cathepsin-K when ovariectomized rats are fed with GSRV of three days after its germination

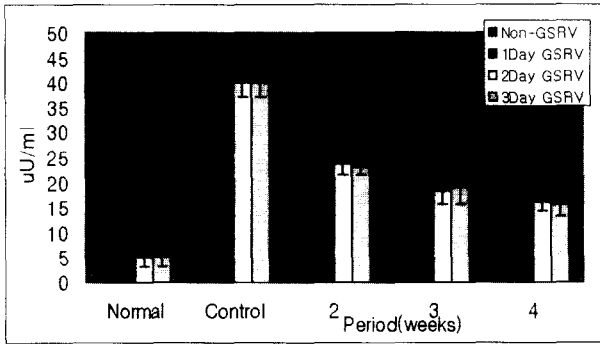


Fig. 5. Comparison of effects of GSRV on Cathepsin-K activity in proximal tibia of ovariectomized rats. The data was presented as mean  $\pm$  S.E.M. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 as compared to not treated control.

Table 2. Effects of GSRV on Cathepsin-K activity in proximal tibia of ovariectomized rats

group by Tx period	Normal (n=6)	Control (n=6)	2-weeks (n=6)	3-weeks (n=6)	4-weeks (n=6)
Sample GSRV0	5.1 $\pm$ 2.0	40 $\pm$ 3.0	43.0 $\pm$ 1.5	32.0 $\pm$ 1.7	23.0 $\pm$ 2.0
Sample GSRV1	5.1 $\pm$ 2.0	40 $\pm$ 3.0	22.0 $\pm$ 2.2	16.2 $\pm$ 2.6	15.0 $\pm$ 2.0
Sample GSRV2	5.1 $\pm$ 2.0	40 $\pm$ 3.0	24.0 $\pm$ 2.5	18.3 $\pm$ 2.6	16.0 $\pm$ 1.7
Sample GSRV3	5.1 $\pm$ 2.0	40 $\pm$ 3.0	23.0 $\pm$ 1.6	19.2 $\pm$ 3.6	15.7 $\pm$ 2.5

Sample GSRV0 : non-GSRV, Sample GSRV1 : 1day following the germination, Sample GSRV2 : 2day following the germination, Sample GSRV3 : 3day following the germination. Normal Group : non-ovariectomized group(n=6), Control Group : ovariectomized group as not treated(n=6), 2 weeks Tx : ovariectomized group of 2weeks GSRV treated(n=6), 3 weeks Tx : ovariectomized group of 3weeks GSRV treated(n=6), 4 weeks Tx : ovariectomized group of 4weeks GSRV treated(n=6)

## 고찰

한의학에서는 골다공증이라는 병명을 찾아볼 수는 없으나 병인과 임상양상으로 보아 “骨痿” “骨痺”와 유사하다고 할 수 있다<sup>9-11)</sup>. 皇帝內經에서는 “骨痿”에 대하여 《素問·痺論》에 “腎主腎之骨髓…腎氣熱，則腰脊不舉，骨枯而髓減，發爲骨痿，有所遠行勞倦，達大熱而渴，渴則陽氣內伐，內伐則熱舍於腎，腎者水臟也，今水不勝火，則骨枯而髓虛，故足不任身，發爲骨痿也”라 하였고, “骨痺”는 《素問·痺論》 “腎痺者，善脹，尻以伐腫，脊以伐頭”，《素問·長刺節論》에 “病在骨，骨重不可舉，骨髓酸痛，寒氣至，名曰骨痺”라고 하였다<sup>12,13)</sup>. 이를 살펴보면 증상과 병기가 현대의학의 골다공증과 대단히 유사하여 한의학에서도 명칭만 다를 뿐 이미 오래 전부터 골다공증에 대하여 인식하고 있었음을 추론할 수 있다<sup>14)</sup>. 한의학에서는 腎의 精氣가 모이는 곳을 骨이라고 하여 骨의 生長發育 強弱 衰弱등의 기능성 盛衰와 밀접한 관계가 있어 骨의 生理病理는 직접 腎의 主宰를 받는다고 인식하고 있다<sup>15,16)</sup>. 이러한 骨과 腎의 관계에 대해서 《素問·宣明五氣篇》에서는 “腎主骨”，《素問·陰陽應像大論》에서는 “腎主骨髓”라고 말하고 있으며, 《靈樞·經脈篇》에서도 “人始生 先成精 精成而腦髓生骨爲幹 脈爲營 筋爲剛 皮膚堅而毛髮長 穀入於胃 脈道以通 血氣乃行”<sup>17)</sup> 이라하여 腎이 骨髓를 주관하고 腎精이 인체의 生長發育를 촉진시키므로 腎精이 증축하면 骨髓가 풍부해 지고 능히 骨格이 生長하고 堅實해 진다고 하였다.

사람의 골격은 성장기에서부터 지속적으로 성장하고 골밀도도 계속 증가하여 35세경 최대 골량이 이루어진다. 이후 연령이

증가하면서 파골세포(osteoclast)의 골흡수와 골모세포(osteoblast)의 골형성에 의한 재형성 과정의 불균형으로 골의 재형성보다는 재흡수가 증가하여 골소실이 발생하며 폐경기에 이르면 에스트로겐의 결핍으로 골소실이 더욱 촉진되어 골다공증이 발생한다. 폐경기 후에 발생하는 골다공증은 폐경기 여성에서 골흡수를 촉진하는 파골 세포의 수와 활동성이 증가 하는게 원인이며, IL-6, TNF- $\alpha$ , G-CSF 등은 이러한 파골세포의 분화와 발달을 자극하고 에스트로겐은 이러한 작용을 억제하며 한편 골모 세포에서 분비되는 TGF- $\beta$ 는 에스트로겐과 함께 파골세포의 세포사멸을 촉진 시킨다<sup>18,19)</sup>. 에스트로겐의 결핍이 골다공증을 유발시키는 작용기전에 대한 연구가 여러 저자들에게 의해서 보고 되었으나, 현재까지 정확한 기전은 밝혀지지 않은 상태이다<sup>20)</sup>. 일반적으로 에스트로겐 결핍은 폐경 후 여성들에게 있어 서 혈중 estrogen양이 폐경 전 보다 약 20% 가량 감소되고, 골 소실도 폐경 후 5년간 가속화된다. 에스트로겐 복용 시 골관련 monocyte의 IL-1 생성을 막고, osteoblast의 IL-2생성을 막아 파골세포 활성화인 IL-1, IL-6의 양을 감소시킴으로서 파골세포의 활성을 저지하는데서 기인한다는 것이 일반적인 정설이다<sup>21)</sup>. Hahn<sup>21)</sup>은 estrogen이나 부갑상선 호르몬은 골대사 과정에서 골아세포와 파골세포의 성장과 분화에 관여하고 있다고 보고 하였고 Eriksen<sup>22)</sup>와 Marie 등<sup>23)</sup>은 골모세포와 유사한 세포(osteoblast like cell)에는 estrogen receptor가 있어 에스트로겐이 골에 직접 영향을 끼치는 것으로 보고하고 있으나 아직 그 작용기전은 확립되지 않았다.

현재 골다공증 치료제로 시판 및 연구되어 지고 있는 것들은 골흡수 억제제와 골형성 촉진제로 나누어져 있다. 골흡수 억제제로는 비타민D(Vitamin D) 유도체, 에스트로겐, 칼시토닌(calcitonin), 비스포스포네이트제제(Bisphosphonates)등<sup>24-27)</sup>이 있으며 골형성 촉진제로는 Sodium fluoride, 성장호르몬(Growth Hormone), 성장인자(Growth Factor) 등이 있다. 그러나 이들은 위장관 출혈, 자궁암 및 유방암 발생 증가, 불명확한 작용기전으로 인해 지속적인 연구가 필요한 실정이다<sup>28)</sup>.

콩은 양질의 단백질과 높은 불포화 지방산 비율 등 우수한 영양성분 외에도 다양한 생리활성을 가진 기능성 물질들을 함유하고 있다. 특히 그동안 항영양인자(antinutritional factor)로 알려졌던 물질들에 오히려 항암성 및 여러 생리적 기능이 있다는 점<sup>29,30)</sup>이 밝혀지면서 콩의 가치는 더욱 커지고 있다. 콩의 대표적인 기능성 물질로 식이성 섬유(dietary fiber), 올리고당(oligosaccharide), 이소플라본, phytic acid, protease inhibitor, saponins, 콩 단백질과 그 가수분해물, 식물성 섬유에 대한 연구는 오래전부터 진행되어 왔다<sup>31)</sup>. 콩의 대표적인 물질인 이소플라본은 주로 콩과류에 들어있는 색소의 한 종류로 페놀계 화합물의 배당체로서 주요한 구성성분으로는 genistein<sup>32)</sup>과 daidzein, glycitein과 이들의 포도당 결합유도체들로 구성되어져 있다<sup>33)</sup>. 이소플라본의 기능 중 대표적인 것이 항암효과로 genistein은 암세포의 증식에 관여하는 효소인 protein tyrosin kinase와 DNA topoisomerase II의 작용을 저해하는 것으로 밝혀져 전립선암 억제 등 발암억제 가능성이 여러 측면에서 보고 되었다. 또한 estrogen receptor와 약하게 결합하여 에스트로겐 활성을 필요로

하는 유방암 세포의 발생을 억제한다고 한다<sup>32)</sup>. 이와 관련된 논문으로는 김<sup>34)</sup>은 발아한 콩의 이소플라본 함량이 증가했음을 보고했으며 김 등<sup>33)</sup>에 의하면 콩피의 색깔이 진할수록 isoflavone의 함량이 높다고 하였다. Daidzein은 뼈의 재흡수를 억제하고 genistein은 약한 에스트로젠 활성을 발휘하여, 노인인 여성의 골다공증 방지에도 효과적이란 연구들도 발표되었으며, 또한 항산화 효과와 심혈관 질환 및 신부전에서의 genistein의 효율성도 검토되고 있다<sup>36-37)</sup>. 또 최근에 밝혀진 콩에 존재하는 성분인 인중합체(polyphosphate)는 수십 수 백개의 orthophosphate가 높은 에너지의 phosphoanhydride 결합으로 연결된 선상 복합체로서 거의 모든 세포의 구성성분에서 발견된다<sup>38)</sup>. 인중합체가 골조직의 무기질화 과정에 관련이 있는 것으로 보고 되고 있으며, 이에 대한 연구로 Schröder<sup>39)</sup>는 인중합체가 골 조직의 무기질화 과정에 관련이 있다는 것을 제시하였고, 이 등<sup>40)</sup>은 동물실험에서 인중합체를 적용하였을 때 대조군에 비해 골형성이 촉진되는 것을 관찰함으로써 인중합체가 골유도 효과가 있다는 가능성을 제시하였으며, 인중합체가 첨가된 골 시멘트가 생체에 무해하면서 골 재생능력이 뛰어나 골 관련 수술에 적용이 가능하다는 것을 연구도 보고 되었다<sup>41)</sup>.

서목태의 기원은 쌍떡잎식물 장미목 콩과의 *Rhynchosia volubilis*의 성숙한 종자이다<sup>42)</sup>. 《神農本草經》에 최초로 “鹿藿”이라고 개재된 이후 약콩, 여우콩, 檲豆라고도 불리었다<sup>43)</sup>. 민간과 달리 한의학에서는 종자보다 줄기와 잎, 뿌리를 임상에서 주로 응용해 왔으며, 涼血 解毒의 효능으로 頭痛, 腰痛腹痛, 癰癤, 癰腫流注를 치료한다<sup>44)</sup>.

콩의 발아는 광합성이 일어나지 않는 상태에서 성장을 위한 호흡과 대사 작용이 일어나는 것으로 발아 중 주요 반응은 에너지 대사에서 초기에 당성분의 이용, 중간단계에서는 단백질과 지방질이 이용되고 결과적으로 뿌리의 성장과 함께 섬유질의 증가가 일어난다. 발아 중 변화는 성분 변화 외에 향미 성분의 변화가 있어 발아 전 콩의 비린 맛 등 특유의 불쾌한 맛이 신선한 맛으로 전환되며 이러한 성분 변화와 관능적 특성 변화는 보고하고 있다<sup>45-47)</sup>. 발아시기에 대한 적정성에 있어서 淸熱藥에 속하는 대두황권은 발아시켜 뿌리가 1.5-2.0cm 정도 되었을 때 쇠건하여 사용하고 Aminah A<sup>48)</sup>에 따르면 발아 3일째 최적의 콩나물을 얻는 바 3일 초과된 상태에의 서목태는 콩보다는 나물에 가까운 형태를 띠게 된다<sup>48,49)</sup>. 발아 중 콩의 성분 변화에 있어서 대체적으로 증가하는 양상을 띠고 있으며 이에 대한 연구에 있어서는 김 50)은 수박태의 발아 중 아미노산 조성을 비교 분석한 결과 총아미노산의 경우 재배일 수가 증가함에 따라 크게 증가하다가 재배 5일째 될 때 급격히 떨어지는 경향을 나타내었으며 아미노산 중 aspartic acid는 현저히 증가하였고, 필수아미노산 중의 하나인 histidine 함량은 3일째 최고 값을 나타내다가 5일째 감소함을 보고하였다. Wang 등<sup>51)</sup>은 조건에 따른 이소플라본의 함량을 보면 발효시켰을 때 이소플라본의 함량이 크게 증가한다고 하였다. 김<sup>52)</sup>은 20가지 약재를 스크린해본 결과 발아 서목태에서 가장 많은 인중합체를 함유하고 골형성 관련 유전자인 BMP-4의 전사 활성에 있어서 HOS-TE85세포에서 서목태 20, 40, 80 $\mu$ g/ml

에서 각각 94, 90, 100%의 높은 전사활동의 증가를 보여서 골흡수 억제에 유효한 약재로 사용될 수 있음을 보고하고 있는바 발아 중 성분들이 대체적으로 증가함을 알 수가 있다.

Cathepsin은 많은 생리적 과정에 있어서 단백질 가수분해 효소의 한 그룹이다. Cathepsin들은 lysosomal protease이며 cysteine protease family의 구성체이다<sup>53)</sup>. Cathepsin-K는 뼈를 재흡수하는 파골세포에 강한 영향을 준다. 파골세포에 의한 골흡수 과정(osteoclast-mediated bone resorption)에 관여하는 Cathepsin-K는 골다공증 치료 또는 예방약물의 개발에 중요한 표적 중에 하나이다<sup>54)</sup>. 그래서 이 효소의 특별한 저해제의 개발은 과도한 골재흡수와 관련된 질병치료제로 사용될 수 있다. 더욱이 최근의 연구에 따르면 in vitro와 in vivo 모델에 있어서 항활성 Cathepsin-K인 비선택적 cystein protease가 골재흡수를 줄여준다는 것을 보고하고 있다<sup>55,56)</sup>.

최근 골다공증의 원인에 있어서 cytokine의 중요성이 부각되고 있는 데 여러 종류의 cytokine은 골수세포와 골세포간의 신호전달을 조성한다. 조골세포는 골흡수에 관여하는 모든 cytokine을 생산하며, 파골세포의 전구세포는 파골세포로 분화하는 동안 cytokine의 영향을 받는다. 즉 난소제거나 폐경 등 에스트로젠 결핍에 의한 골흡수로 조골세포에 의하여 생산되는 cytokine이 파골세포의 전구세포를 분화시켜 이루어진다. IL-6는 부갑상선 호르몬 prostaglandin, IL-1, TNF에 의하여 조골세포에서 생성되어 골흡수를 촉진시킨다. 파골세포는 다핵거대세포로 뼈에 부착되어 그를 자신과 뼈 표면사이에 산성환경을 조성하고 골무기질과 유기성분을 용해시킨다. 이때 cytokine을 단백질 분해효소가 골의 유기성분에 감소에 중요한 역할을 한다. 그 중 Cathepsin-K는 파골세포에서 많이 나타나며 조골세포나 골세포에서는 Cathepsin-K가 보이지 않는다. 즉 Cathepsin-K는 파골세포가 활성화되면 분비되어 골조직에서 Collagen과 Ca<sup>2+</sup> 결합을 분해시켜서 골다공증을 유발한다<sup>53,55)</sup>. 따라서 본 연구에서는 발아한 서목태가 골흡수 억제에 유효성이 있음을 증명하기 위하여 Cathepsin-K를 표지인자로 선택하였다.

서목태 추출물의 발아시기에 따른 골다공증에 대한 예방효과를 알아보기 위하여 흰쥐의 난소를 적출하기 전에 각각의 서목태를 투여하고 근위부 경골의 Cathepsin-K 활성도를 측정하고 결과 생리식염수를 투여한 normal군과 난소를 적출한 control군은 각각 5.1 $\pm$  2.0  $\mu$ U/ml과 40.0 $\pm$ 3.0  $\mu$ U/ml 이었으며 난소를 적출하기 전 2, 3 및 4주 동안 발아하지 않은 서목태를 투여한 군의 흰쥐의 난소를 적출한 후 결과는 42.2 $\pm$ 1.5, 40.1 $\pm$ 2.5, 39.2 $\pm$ 1.5  $\mu$ U/ml 이었으며, 통계적으로 유의성은 없었다. 발아 후의 서목태 시료들을 1, 2, 3일 차로 나누어 준비하였으며 발아 하지 않은 서목태를 투여 했을 때와 동일 한 방법으로 투여하여 발아 1일 후 시료는 생리식염수를 투여한 normal군과 control군이 5.1 $\pm$ 2.0, 40 $\pm$ 3.0으로 발아 전과 동일하나 2, 3, 4주가 되면서 30.2 $\pm$ 2.5, 30.2 $\pm$ 1.6, 28.7 $\pm$ 1.7 $\mu$ U/ml로 감소추이를 보였으며 이는 발아 2일 후나 3일 후의 시료결과와 유사한 결과를 보였으며 통계적으로도 control군에 비해서 유의성을 나타내었다(Table 1, Fig. 2, Fig. 3).

흰쥐의 난소를 적출한 후에 서목태를 투여하고 조직 중에

Cathepsin-K 활성도를 측정 한 결과 발아하지 않은 시료를 투여 한 군에서는 normal군과 control군은 각각  $5.1 \pm 2.0 \mu\text{U/ml}$ 과  $40 \pm 3.0 \mu\text{U/ml}$ 이었으며 난소 적출 후 2, 3 및 4주 동안 발아하지 않은 서목태 시료를 투여한 군의 결과는  $43.0 \pm 1.5$ ,  $32.0 \pm 1.7$ ,  $23.0 \pm 2.0 \mu\text{U/ml}$  이었고 발아 1일 후의 시료에서는 normal과 control군의 수치는 발아 전과 같았으나 난소 적출 후 2, 3, 4주 동안의 Cathepsin-K의 활성도는 현저히 감소하여  $22.0 \pm 2.2$ ,  $16.2 \pm 2.6$ ,  $15.0 \pm 2.0 \mu\text{U/ml}$ 의 감소추이를 보였고 이는 발아 2, 3일 후의 시료에서도 control군에 비해서 유의성 있는 감소를 보였으며 통계적으로도 유의성을 나타내었다(Table 2, Fig. 4, Fig. 5). 이는 발아한 서목태의 섭취가 발아하지 않은 서목태의 섭취에 비해서 Li, Y.P 등<sup>54)</sup>에 의한 Cathepsin-K의 골재흡수 과정에서 파골세포에 대한 영향 능력에 대한 억제에 보다 더 유의한 효능을 보일 수 있음을 예견할 수 있다.

이상에서 발아한 서목태가 발아하지 않은 서목태에 비해 좋은 결과를 나타내었으며, 특히 발아 1일 후의 서목태가 가장 좋은 결과를 나타내어 향후 발아 전 후 서목태의 성분변화에 대한 연구가 필요할 것으로 보이며, 향후 발아 전 후, 발아시기별 골형성 및 골흡수 억제에 대한 추가 연구를 종합한다면 유용한 골다공증 치료제로서의 결과를 얻을 수 있을 것으로 보인다.

## 결 론

발아한 서목태가 난소를 적출한 흰쥐의 골흡수억제에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 섭취시기별, 발아시기별 Cathepsin-K의 발현에 대해서 살펴본 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

서목태 추출물의 발아시기에 따라 난소 추출 전 흰쥐에게 서목태 추출물을 섭취한 후 난소 적출한 결과 Cathepsin-K의 발현에 있어서 control군에 비해 발아하지 않은 서목태 군은 감소하였으나 유의성이 없었으며, 발아 1, 2, 3일군에서 2, 3, 4주간 섭취시기 모두에서 감소하였으며 통계적으로 유의성을 보였다. 서목태 추출물의 발아시기에 따라 난소 추출 한 흰쥐에게 서목태 추출물을 섭취시킨 결과 Cathepsin-K의 발현에 있어서 control군에 비해 발아 1, 2, 3일군에서 2, 3, 4주간 섭취시기 모두에서 모두 감소하였으며 통계적으로 유의성을 보였다.

이상에서 발아한 서목태가 골재흡수 억제에 효과가 있을 것으로 사료되며 임상에서 적용하기 위해서 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 노상권. 백서에서 난소 적출술로 유발한 골다공증에 대한 Estradiol의 투여시기에 따른 효과. 서울대학교 대학원. 석사학위. 논문. 1995.
2. 김기수. 골다공증. 서울. 도서출판 여성신문사. pp. 10, 37, 127-128, 1998.
3. Rossouw JE, Anderson GL, Perntic RL, LaCroix AZ, Koerber C, Stefanick ML et al., Risks and benefits of

- estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women : principal result from the Woman's Health Initiative randomized controlled trial. JAMA. 288(3):321-33, 2002.
4. Cassidy A. Physiological effects of phyto-oestrogens in relation to cancer and other human health risks. Proc Nutr Soc. 55:399-417, 1996.
5. 김민정. 한국에서 섭취되는 콩 및 가공식품의 이소플라본 및 쿠메스트롤 정량과 섭취량 측정. 서울대학교대학원. 석사학위논문. 22,25,28, 58, 2001.
6. 조경희. MG-63 조골세포에서 약공과 대두 추출물의 천연 에스트로겐 효과 비교 및 기전 연구. 경희대학교 동서의학대학원. 박사학위논문. 2002.
7. Aminah A., Ruth E.B., Marison F and Arthur L.K. Sensory attributes and safe aspects of germinatred small seeded soybeans and mungheans. J Food Protec. 47:434, 1984.
8. 신동화, 최웅. 콩나물 재배방법에 따른 생장 특성 비교. Korean. Food SCI Technol. 28(2):240-245, 1996.
9. 盧心宇. 辨證治療老年性骨質疏松症229例. 福建中醫學院. 4(1):25-26, 1994
10. 吳建華,趙光. 中醫藥治療骨質粗松症研究發展. 中醫正骨. 8(1): 30-31, 1996.
11. 陸萬仁. 中藥內服外敷治療骨粗松症228例治療觀察.實用中醫藥雜誌. 3:17,20, 1995.
12. 신동화, 최웅. 콩나물 재배방법에 따른 생장 특성 비교. Korean. Food SCI Technol. 28(2):240-24, 1996.
13. 楊維傑編. 皇帝內經解釋(素問). 서울. 성보사. pp. 52,133,210, 269,330,338,340,399, 1980
14. 이정택. 當歸地黃飲이 卵巢 적출 白鼠의 骨多孔隙症에 미치는 영향, 원광대학교 대학원. 박사학위논문. 2002.
15. 金炯均, 柳志允, 李彥政. 腎主骨에 관한 東西醫學的 考察. 대한한방내과학회지. 12(2):26-29, 1991.
16. 李應世. 金惠慶. 骨多孔隙의 東醫學的 임상문헌에 대한 고찰. 한방재활의학회지. 7(1):437-456, 1997.
17. 楊維傑 編. 黃帝內經解釋(靈樞). 서울. 成輔社 pp. 104, 1980.
18. Riggs BL. The mechanisms of estrogen of bone resorption. J Clin Inest. 106:1203-4, 2001.
19. Linsay R, Tohme J. Estrogen treatment of patients with established postmenopausal osteoporosis. Obstet Gynecol. 76:290-296, 1990.
20. 정성수. 흰쥐에서 난소 적출 술로 유발한 골다공증에 대한 Dehydroe-piandrosterone의 효과. 서울대학교 대학원. 석사학위 논문. 1995.
21. Hahn TJ. Steroid and Drug-induced osteoporosis; In Favus MJ(ed). Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism. Raven Press. New York., pp. 250, 1993.
22. Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, et al., Evidence of Estrogen receptor in Normal Human Osteoblast -Like Cell.

- Science. 241:84-86, 1998.
23. Marie PJ. Human osteoblastic cell. A potential tool to assess the etiology of pathologic bone formation. *J. Bone Miner. Res.*, 9:1847, 1994.
  24. Notoya K, Yoshida K, Tsukuda R et al. Effect of ipriflavone on expression of the osteoblast phenotype in rat bone marrow stromal cell culture. *J. Bone Miner. Res* 9:395-400, 1994.
  25. The Writing Group For The PEPI Trial. Effects of hormone Therapy on bone mineral density: results from the postmenopausal estrogen/progestin interventions (PEPI) trial. *J. AM, MED, ASSOC.* 276:1389-1396, 1996.
  26. Murrills RJ, Shane E, Lindsay R et al: Bone resorption by isolated human osteoclasts in vitro. Effects of calcitonin, *J. Bone Miner, Res* 4:259-68, 1989.
  27. Adache JD, Bensen WG, Brown J et al., Intermittent etidronate therapy to prevent corticosteroid-induced osteoporosis, *N. Engl. J. Med.* 337:382-387, 1997.
  28. G.A. Rodan et al., Emerging therapies for osteoporosis. *Emerging Drugs.* 5(1):1, 2000.
  29. Kinjo J, Nagao S, Tanaka GI, Okabe H. Antiproliferative constituents in the plant and seeds of *Rhynchosia Volubilis*, *Bio Pharm Bull.* Dec;24(12):1443-1445, 2001.
  30. Vimala R, Nagarajon S, Alam M, Susan T, Joy S. Antiinflammatory and antipyretic activity of *Michelia champaca* Lin., (white variety), *Ixora*, *Brachiata* Roxb, and *Rhynchosia cana*(Wild)D.C flower extract. *Indian J Exp Biol.* Dec;35(12): 1310-4, 1997.
  31. 한국식품개발연구원. 콩 생리활성 배당체의 기능성 탐색 및 활용 연구. 농림부. 2000.
  32. Cotter A, Cashman KD. Genistein appears to prevent early postmenopausal bone loss as effectively as hormone replacement therapy. *Nutr Rev.* Oct;61(10):346-51, 2003.
  33. 박미영. 콩 품종에 따른 Isoflavone 함량과 항산화 효과. 공주대학교 대학원 석사학위 논문. 2002.
  34. 김주숙. 콩의 발아 및 초절입이 이소플라본에 미치는 영향. 세종대학교 대학원 박사학위논문. 2002.
  35. 김민정. 우리나라 전통 콩의 이화학적 특성과 기능성 성분에 관한 연구. 용인대학교 대학원 석사학위 논문. 2000.
  36. Koslak R.M., Bookland, R., Bakei, J., Paaren, H. E., and Appelbaum, E. R. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common nod genes by isoflavones isolated from *glycine max.* *Proc , Natl. Acad. Sci.* 84:7428-7432, 1987.
  37. Moris, P. F., Savard, M. E., and Wad, E.W.B. Identification and accumulation of isoflavonoid and isoflavone glucosides in soybean leaves and hypocotyls in resistance responses to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*, *Physiol. Molecular Plant Pathol.* 39(3):229-224, 1991.
  38. Kornberg A. Inorganic polyphosphate: A molecule of many Functions. *Prog Mol Subcel Biol.* 23:8-11, 1999.
  39. H.C. Schröder, L. Kurz, W.E.G Müller. and B. Lorenz. Polyphosphate in Bone. *Biochem.* 65(3):301, 2000.
  40. 이진용, 류동목, 신제원. Inorganic polyphosphate promotes bone regeneration, *대한구강해부학회.* 23:219-228, 1999.
  41. (주)경원메디칼. 인산칼슘(Ca-Phosphate)에 골재생(성장) 촉진물질인 인중합체를 첨가한 생체적합적인 골대체 및 재생 소재 개발. 보건복지부. 1999.
  42. 심상룡. 한방식료사전. 서울. 행림출판사. pp. 102, 1976.
  43. 김창민. 신민교 등. 중약대사전. 서울. 도서출판 정담. pp. 777-778, 2000.
  44. 박 철. 서목태 전탕액이 XO/HX에 의해 손상된 골아세포에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 박사학위논문. 2002.
  45. Ha, S.D., Kim, S.S., Park, C. S., Kim, B.M. Effect of Blanching and Germination of soybeans on the Quality of soymilk. *Korean, J. food sci. technol.* 23(4):485-489, 1991.
  46. Shin, S.R., Park, C.S., Kim,J.N, Kim,K.S. Changes of Non-Cellulos Neutral Sugar of Cell Wall in Soybean Sprouts *J. Korean Soc. food Sci, Nutr.* 27(6):1041-1046, 1998.
  47. Chi, H.D., Kim, S.S., Hong, H.D., Lee,J.Y. Comparison of Physicochemical and Sensory Characteristics of Soybean Sprouts from Different Cultivars *J. Korean Soc. Agrie. Chem. Bidtechnol.* 43(3):207-212, 2000.
  48. Aminah A., Ruth E.B., Marison F and Arthur L.K. Sensory attributes and safe aspects of germinated small seeded soybeans and mungbeans. *J Food Protec.* 47:434, 1984.
  49. 강병수 외10인. 본초학. 서울. 영림사. pp. 187-188, 1999.
  50. 김강성 권태영 김민정. 수박태의 발아 중 아미노산 조성 변화에 관한 연구. 용인대학교 논문집. (21): 555-563, 2003.
  51. Wang, H., Murphy, P.A. Isoflavone content in commercial soybean food, *J. Agric. Food Chem,* 42:1666-1673, 1994.
  52. 김영신. 수종한약재의 인중합체 함량과 골형성 관련 유전자의 활성에 대한 연구. 상지대학교 대학원. 박사학위논문. 2003.
  53. Turk, B., Turk, V. Lysosomal cysteine proteases: More than scavengers. *Biochim, Biophys. Acta.* 147:98-111, 1994.
  54. Li, Y.P., Alexander, M., Wucherpergennig, A.L., Yelick, P., Chen, W. and Stashenko, P. Cloning and complete coding sequence of a novel human cathepsin expressed in giant cells of osteocalstomas. *J. Bone Miner. Res.* 10:1197-1202, 1994.
  55. Evers, V., Delaisse, j. M., Korper, W. and Beersen, W. Cysteine proteinases and matrix metalloproteinases play distinct roles in the subosteoclastic resorption zone. *J.Bone Miner. Res.* 13:1420-1430, 1998.
  56. Falgueyret JP, Oballa RM, Okamoto O, Wesolowski G, Aubin Y, Rydzewski RM, Rasit P, Riendeau D, Rodan SBand Percival MD, Novel. Nonpeptidic cyanamides as potent and reversible inhibitors of human cathepsin K and L. *J. Med. Chem.* 44:94-104, 2001.