

난소적출 흰쥐를 이용한 칩 발효액이 골다공증 예방 효과에 미치는 영향 연구

마진열*[#] · 이정운* · 김동현** · 이영철*** · 나혜숙**** · 지옥표*****

*한국한의약연구원 한약제제연구부, **경희대학교 약학대학, ***한국식품연구원
****한중제약, *****성균관대학교 약학대학

(Received October 10, 2005; Revised December 8, 2005)

The Research Regarding a Prevention Effect of Osteoporosis used an Arrowroot Fermentation from Ovaryectomized SD Rat

Jin Yeul Ma*[#], Joung Woon Lee*, Dong-Hyun Kim**, Young Chul Lee***,
Hye Sook Na**** and Ok Pyo Zee*****

*Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon, Korea

**College of Pharmacy, KyungHee University, Seoul, Korea

***Korea Food Research Institute, Kyunggi-do, Korea

****Han Zung Pharmaceutical Company, Korea

*****College of Pharmacy, SungKyunKwan University, Kyunggi-do, Korea

Abstract — In our study, osteoporosis was induced by ovariectomized in female Sprague-Dawley rats, and the prevention and treatment efficacy of the climacteric disease the postmenopausal Type I pattern was examined by using the experimental substance soybeans and arrowroot. After ovariectomy, the amount of estrogen was found to be reduced by 21.37% and it showed the tendency to be increased by 4.49% in T1 (extraction of soybeans group) and 7.62% in T2 (extraction of ferment soybeans group). The change of bone density, 14 weeks after ovariectomy in the femur, was decreased by 9.33% in N.C. group, and 5.46% in T3 (extraction of ferment arrowroot group). As pathological findings, the trabeculae of femur were detected to be abundant as normal and the frequency of the appearance of osteoclasts was very minimal. In the T3, the frequency of the appearance of the trabeculae of femur was increased to the level that could be distinguished. In regard to the accumulation of lipid in the bone marrow, the accumulation of lipid in the bone marrow was low as normal. However, in T3, the decrease to the level that could be distinguished was detected. In addition, in regard to the pathological findings of the uterus, normal uterine tissue findings were detected. In the T3, the minimal atrophy findings were detected. In conclusion, when the T3 was orally administered continuously for 14 weeks, it was thought that a certain proportion of the hormonal balance was maintained that functioned as a substance interfering the accumulation of fat, and it was considered to be of help in the treatment of not only osteoporosis Type I, but also for the prevention and treatment of various endocrinal diseases.

Keywords □ fermentation, menopausal disorder, arrowroot

갈근(葛根)은 콩과(*Leguminosae*) 식물의 다년생 초본인 칩의 주피를 제거한 뿌리를 건조한 것으로 한국, 중국, 일본 각 지역의 산에 자생하는 생약이다. 한의학에서는 칩의 여러 부위(칩뿌리, 갈근, 꽃, 갈화, 열매, 갈곡 또는 갈실, 잎, 갈엽, 덩굴, 갈단)을 질병의 증상 및 치료방법에 따라 각각 다르게 사용하여 왔다.^{1,2)}

갈근의 성상은 불규칙한 원주형이고 겉은 자갈색 또는 적갈색이며 세로 간에 주름이 있다. 길이 30 cm, 폭 5~10 cm, 두께는 1 cm 정도이며 판상을 이루고 속은 엷은 회황색을 띠며, 색이 희고 가루가 많고 질이 치밀한 것이 상품으로 알려져 있다. 세로로 갈라지기 쉬우며 종단면은 섬유성이며 냄새는 없고 맛은 완화하며 조금 달다. 약리작용으로 혈류량을 증가시키는 순환기 계통에 대한 작용, 혈당강화 작용, 진정작용, 해열작용 등이 있으며, 갈근의 유효성분 중 daidzein은 미성숙 마우스의 자궁 중량을 증가시키고 에스트로겐 양을 증가시키는 것으로 보고되어 있다. 특

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 042-868-9466 (팩스) 042-868-9466
(E-mail) jyma@kiom.re.kr

히 한의학에서는 비장이나 위에 작용하여 갈증해소 및 해열작용으로 널리 활용되는 약재이다. 최근에는 약용 이외에 기호식품 및 건강식품 등으로 점차 사용량이 증가되고 있는 추세이다. 갈근(*Puerariae Radix*)의 주성분은 전분(19~20%)이고 이외에 isoflavonoid계 성분인 puerarin, puerarinxyloside, daidzein 및 daidzin과 β -sitosterol, arachidonic acid를 함유하고 있는 것으로 알려져 있다. 갈화의 성분으로는 kakkalide, kakkatin, kaikasaponin III, soyasaponin I, daidzein, daidzin, genistein, genistin, rutin, quercetin, biochanin A, formononetin, ononin 등이 있으며, 갈엽(*Pueraria Folium*)의 성분은 kaikasaponin III, daidzin, genistein, rutin, robinin, nicotiflorin 등³⁻⁵⁾이 보고되어 있다.

갱년기 때 유발되는 대표적 질병인 골다공증을 치료하기 위해 NaF, Calcitriol(1,25(OH)2D3), 17 β -estradiol(E2), Ipriflavone, Raloxifene, Aminobisphosphonate, SERMs(selective estrogen receptor modulators) 등이 시판되고 있으나 장기간 복용 시, 압 등의 부작용같은 여러 가지 문제점을 내포하고 있다⁶⁻¹³⁾. 특히 식물성 호르몬인 phytoestrogen은 estrogen receptor- α (ER- α) 및 estrogen receptor- β (ER- β)에 대한 친화력이 좋고 생체이용률은 비교적 낮으나 유방암 등의 부작용이 적어 골다공증 치료제인 E2의 대체 의약품으로 각광을 받고 있다.

예로부터 한국은 콩 및 칩의 여러 부위를 민간에서 약용으로 사용하여 왔고 갈근은 phytoestrogen이 다량 함유되어 있다. 이에 본 연구에서는 발효 기법을 이용하여 콩, 갈근, 갈화의 효능을 한층 더 강화시켜 갱년기 질환 예방 및 치료에 대한 효능 연구로 실험동물을 이용하여 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물

흰쥐 암컷((주) 오리엔트, 서울시 금천구 가산동 459-24) 8주령을 사용하였다. 동물입수 시 외관을 육안으로 검사한 후, 7일간 시험을 실시하는 동물실에서 순화시키고 난소 적출술을 시행하였다. 난소적출 7일 후, 군분리하여 건강한 동물 중 90마리를 선별하여 시험에 사용하였다.

시험물질

시험물질 추출방법은 시료 건조함량의 10배수로 1차 증류수를 가하여 180분간 열수추출하였으며 추출한 시험물질에 유산균을 접종하여 48시간동안 37°C에서 배양하였다. 그 후 배양한 시험물질을 동결건조하여 필요량을 산출하여 시험에 사용하였다.

- 1) 명 칭 : T1 (extract of soybeans)
- T2 (extract of fermented soybeans)
- T3 (extract of fermented arrowroot)
- T4 (extract of fermented arrowflower)

각 시험물질은 한국식품연구원에서 제공받았으며 멸균 생리식염수(중외제약 주식회사)로 녹여서 사용하였다.

2) 갈근 발효 전후의 이소플라보노이드 조성 변화

HPLC(YMCAM 303-A coloum 4.6*250 mm; kyoto, Japan)을 이용하여 분석하였다. 성분 분석 방법은 0.1% acetic acid in acetonitrile solvent A와 0.1% acetic acid in water solvent B를 혼합하여 1 ml/min 유속으로 254 nm에서 검출하였다.

성분 (mg/100 g)	발효시간 (hr)				
	0	12	24	36	48
푸에라린	1606.0	1619.0	1615.0	1624.2	1665.4
다이드진	774.6				
글리시틴	237.1				
제니스틴	24.9				
마로닐 다이드진	197.0				
이리소리돈					207.1
다이드제인	476.7	3545.9	3759.2	3849.4	3850.4
칼칼라이드		259.3	278.9	270.2	273.4
제니스테인		36.8	46.9	66.4	48.2

투여량 및 시험군의 구성

본 시험물질은 콩과식물 중, phytoestrogen이 다량 함유된 식물을 선정하여 시험물질로 사용하였으며, 시험물질 건조함량 5 g/kg을 용매(1차 증류수)로 추출하여 투여용량으로 결정하였다.

시험군의 구성, 투여농도 및 용량

군	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (g/kg)	투여량 (ml/kg)
C	15	1~15	0	10
N.C	15	16~30	0	10
T1	15	31~45	5	10
T2	15	46~60	5	10
T3	15	61~75	5	10
T4	15	76~90	5	10

C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans group, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group.

동물의 군분리는 다음과 같이 실시하였다. 먼저, 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물의 체중을 측정 후, 5 g 간격으로 구분하여 각각의 평균체중에 가까운 동물 90마리를 선택하였다. 이렇게 선택된 90마리를 각 군에 15마리씩 균등한 체중으로 분배되도록 순위화한 체중과 난수를 이용한 무작위법으로 분배하였다. 동물의 개체식별은 피모의 색소염색법과 개체식별카드 표시법으로 실시하였다.

시험물질의 투여

각각의 시험물질은 건조함량(5 g/kg)을 기준으로 멸균 생리식염수(10 ml/kg)에 녹여 투여물질로 사용하였으며, 배부피부 고정

법으로 실험동물을 고정하고 경구투여용 금속제 존데와 주사관을 이용하여 위내에 강제 경구투여 하였다. 대조군 및 N.C군은 주사용 멸균 생리식염수(10 ml/kg)를 투여하였다. 투여는 매일 오전에 개체별로 경구 투여하였다. 투여기간은 7주 및 14주로 결정하였으며, 투여액은 매주 1회 측정된 체중을 기준으로 하여, 각각의 군별 투여량에 맞게 투여액을 계산하였다.

실험방법

골다공증 유발 - 골다공증을 유발하는 동물모델은 폐경기 이후의 Type I으로, 골다공증을 유발시키는 흰쥐 암컷을 대상으로 난소적출 모형을 선택하여 갱년기 질환의 치료효능을 연구하였다.

난소 적출술 - 마취약(염산 ketamine 50 mg/ml, 유탄양행 + xylazine 20 mg/ml, 바이엘코리아주식회사)을 실험동물 등배부에 근육 주사하여 전신마취 시킨 다음, 하복부의 털을 제거하고 배복위 (dorsoventral recumbency)로 보정하였으며, 요오드(삼일제약)로 수술부위를 소독한 후, 난소적출을 시행하였다. 실험동물의 복측 정중선을 중심으로 하복부를 1cm 정도 절개하고 핀셋으로 난소를 노출시킨 후 난관을 견사로 결찰하여 난소를 제거하였다. 감염방지를 위해 항생제(셀파포르테-4, 유니화학주식회사) 0.4 ml를 복강내 주입하였고 견사로 복막, 복근 및 피부를 봉합하였다.

부검조건 - 투여 7주 및 14주째에 Ether 마취 하에서 하복부를 개봉한 후, 복대동맥에서 채혈하였으며 내부 장기를 육안으로 관찰하였다.

장기무게 측정 - 부검시 채혈한 후, 잔혈은 방혈하였으며 자궁, 뇌, 뇌하수체, 비장, 부신, 신장, 간, 폐 및 심장의 무게를 저울(Mettler, AT261)을 이용하여 측정하였다.

혈구 및 혈액생화학 분석 - 혈액학적 검사는 WBC(white blood cell), RBC(red blood cell), HGB(hemoglobin), HCT(hematocrit), MCHC(Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration), MCH(Mean Corpuscular Hemoglobin), MCV(Mean Corpuscular Volume), PLT(platelet)를 혈구분석기 (Coulter Co., Miami, FL, U.S.A)를 이용하여 측정하였다. 생화학분석기(Airon 200, Italy)를 사용하여 무기인, 칼슘, ALP(alkaline phosphatase)농도를 각각 측정하였다.

골밀도 측정 - 동물 부검시, 우측 대퇴골을 적출하여 근육을 제거하고 10% 중성 포르말린에 7일간 고정하였다. 골밀도 측정은 포르말린을 제거한 후 Dual Energy X-ray Absorption(LUNAR® Corp. PIXl mus. Madison, WI U.S.A) 기기를 사용하여 7주 및 14주에 각각 측정하였다.

파골세포 측정 - 암컷 흰쥐의 난소를 강제로 적출하여 골다공증을 유발시키고 본 실험물질을 투여하여 대퇴골에서 파골세포를 분리하였으며, 활성을 측정하여 실험물질의 효과를 관찰하였다.

조직 검사 - 실험물질을 7주, 14주간 연속 경구투여 후, 부검시 대퇴골 및 자궁 조직을 10% 중성 포르말린에 고정한 후

xylene, 에탄올 탈수 및 함수과정을 거쳐 파라핀을 침투하여 포매 한다. 4 µm 두께로 절편을 만들어 Hematoxyline-Eosin(H&E) Stain하여, 광학현미경으로 대퇴골 골간 및 골간단내 소주(小柱), 파골세포의 출현정도 및 골수내 지방축적을 상대적 평가로 측정하였다. 대퇴골 뼈 지주의 값은 골다공증 정도를 평가할 수 있는 가장 중요한 평가 항목이며, 파골세포의 출현정도는 파골세포의 활성도를 개략적으로 평가할 수 있다. 골수내에서 지방의 축적은 골수의 위축정도를 평가할 수 있다.

통계학적 방법

모든 실험군에 대하여 동물측정용 저울로 체중을 측정하고 평균과 표준 편차를 구하였다. 용매 대조군과 처치군 사이의 통계학적 유의차는 Dunnett test에 의하여 검정하였고, p<0.05를 실험군간의 유의성 있는 차이로 판정하였다.

결 과

일반증상 및 사망동물

시험기간 중, 시험물질 투여에 의한 이상증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다(Table I).

체중측정

난소를 적출한 실험동물의 체중이 대조군에 비해 1주부터 유의성(p<0.01)있게 증가되었으며, 시험물질 2주간 연속 경구투여 시 증가됐던 체중이 T3군에서 유의성(p<0.01)있게 감소됐음을 확인하였다(Table II).

부검조건

부검조건에서는 모든 투여 군에서 시험물질 투여와 관련된 이상소견은 나타나지 않았다. 그러나 난소 적출에 의한 자궁 위축 현상이 관찰되었다(Table III).

장기무게 측정

시험물질 투여에 의한 장기의 육안적 이상 변화는 관찰되지 않았으나, 난소 적출에 의한 자궁 위축 현상이 N.C 군에서 뚜렷

Table I - Clinical signs of female rats orally treated with substances

	Group	C	N.C	T1	T2	T3	T4
Variable	Dose (g/kg)	0	0	5	5	5	5
	No. of animal	15	15	15	15	15	15
	normal	15	15	15	15	15	15
abnormal	0	0	0	0	0	0	

C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans group, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group.

Table II - Mean body weight changes of female rats orally treated with test substances for 14 weeks

Variable	\Group	C	N.C	T1	T2	T3	T4
	\Dose (g/kg)	0	0	5	5	5	5
	\No. of animal	15	15	15	15	15	15
Administration (AD before)		253.76 ^a (18.62) ^b	266.8 (17.22)	265.45 (20.31)	267.67 (15.77)	268.9 (18.07)	265.38 (16.15)
Administration (1 week)		261.62** (18.91)	284.54 (16.6)	283.82 (21.09)	278.82 (14.3)	281.36 (19.63)	282.33 (15.07)
Administration (2 weeks)		272.73** (20.51)	309.07 (18.92)	296.16 (20.40)	298.74 (17.61)	283.46** (19.23)	306.37 (18.34)
Administration (3 weeks)		277.97** (22.81)	327.18 (22.7)	318.98 (22.59)	314.46 (17.6)	288.25** (19.45)	320.4 (22.2)
Administration (4 weeks)		283.61** (24.85)	337.82 (23.77)	328.44 (23.77)	325.15 (17.3)	294.3** (16.67)	325.04 (21.02)
Administration (5 weeks)		286.78** (22.49)	350.23 (25.15)	340.16 (24.97)	334.67 (19.82)	307.56** (18.79)	341.43 (24.3)
Administration (6 weeks)		293.93** (24.36)	354.71 (23.24)	344.39 (25.04)	342.11 (18.97)	302.67** (17.56)	344.94 (24.64)
Administration (7 weeks)		302.87** (27.47)	360.98 (23.66)	351.35 (26.08)	347.26 (20.41)	307.04** (18.14)	356.88 (26.01)
Administration (8 weeks)		303.83** (30.6)	366.96 (25.52)	354.38 (28.76)	350.98 (21.31)	310.76** (17.38)	359.33 (27.1)
Administration (9 weeks)		306.33** (29.18)	372.22 (24.34)	360.03 (25.26)	357.08 (23.21)	313.63** (18.54)	368.11 (30.32)
Administration (10 weeks)		310.62** (29.65)	365.85 (21.87)	351.68 (24.52)	347.9 (21.42)	309.78** (16.1)	361.63 (30.64)
Administration (11 weeks)		313.63** (32.08)	374.02 (24.44)	361.8 (24.59)	356.84 (22.5)	319.81** (15.87)	372.41 (32.26)
Administration (12 weeks)		316.27** (33.13)	383.13 (24.81)	371.33 (25.53)	365.01 (24.44)	324.01** (20.34)	382.7 (34.56)
Administration (13 weeks)		324.03** (35.53)	385.35 (25.74)	372.56 (26.18)	369.17 (24.68)	332.45** (19.5)	385.59 (36.48)
Administration (14 weeks)		324.54** (33.33)	390.38 (28.73)	373.3 (27.38)	374.12 (25.04)	327.56** (19.73)	391.79 (37.52)

C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans group, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group (**p<0.01).

Table III - Autopsy finding of female rats orally treated with test substances for 7(A) & 14(B) weeks

A)							B)						
Group	C ¹⁾	N.C ²⁾	T1 ³⁾	T2 ⁴⁾	T3 ⁵⁾	T4 ⁶⁾	Group	C ¹⁾	N.C ²⁾	T1 ³⁾	T2 ⁴⁾	T3 ⁵⁾	T4 ⁶⁾
Dose (g/kg)	0	0	5	5	5	5	Dose (g/kg)	0	0	5	5	5	5
No. of animal	5	5	5	5	5	5	No. of animal	10	10	10	10	10	10
Normal	5	0	0	0	1	0	Normal	10	0	0	0	0	0
Uterus Atrophy		5	5	5	4	5	Uterus Atrophy		10	10	10	10	10
Minimal		0	0	0	3	0	Minimal					4	0
Moderate		1	1	3	1	4	Moderate		2	5	6	6	7
Severe		4	4	2	0	1	Severe		8	5	4	0	3

Autopsy finding at 7 weeks treatment of Test Substances, ¹⁾Control group, ²⁾Negative control group, ³⁾Extraction of soybeans group, ⁴⁾Extraction of ferment soybeans group, ⁵⁾Extraction of ferment arrowroot group, ⁶⁾Extraction of ferment arrowflower group.

이 나타났다. 그러나 시험물질 투여 T3군에서는 음성대조군 보다 위축된 정도가 7주 23.64%, 14주에는 24.44%에 그쳐 통계적으로 유의성(p<0.05) 있게 자궁위축 정도가 감소되었다(Fig. 1). 비장은 대조군에 비해 난소 적출군에서 증대 되었으며 시험물질 14주 연속 경구투여시, 비대된 비장을 유의성(p<0.05) 있게 감소시켰다(Fig. 2).

혈구분석

난소 적출군에서 혈소판이 대조군에 비해 유의성(p<0.05) 있게 감소된 것이 관찰되었다. 그러나 시험물질 7주간 경구투여 시, 모든 군에서는 혈소판이 음성대조군에 비해 증가되는 경향을 보였다. 특히 14주째에 T3군에서는 음성 대조(N.C)군에 비해 유의성(p<0.05) 있게 증가되었다(Table IV).

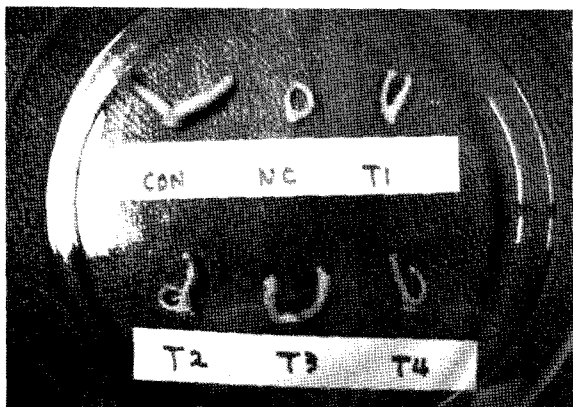


Photo 1 - The photograph of the uteri treated with test substances for 14 weeks. C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans group, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group.

호르몬 측정

난소적출시 에스트로겐 함량은 대조군에 비해 21.37% 감소하는 것으로 나타났으며 시험물질 투여 T1군 4.49%, T2군 7.62 %

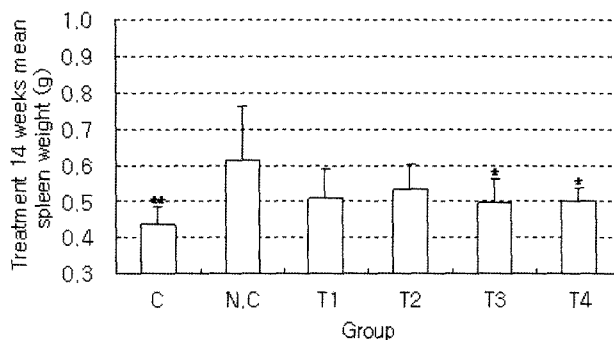


Fig. 2 - The changes of mean spleen weight orally treated with test substances for 14 weeks. C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans group, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group. Statistically Significantly different from negative control group (**p<0.01, *p<0.05).

로 각각의 에스트로겐 농도는 음성대조군 보다 증가하는 경향을 보였고 시험물질 투여 T3군 100.46%, T4군 117.65%로 대조군 보다 각각 증가되었다. 특히 T4군은 통계적으로 유의성(p<0.01) 있게 관찰되었다.

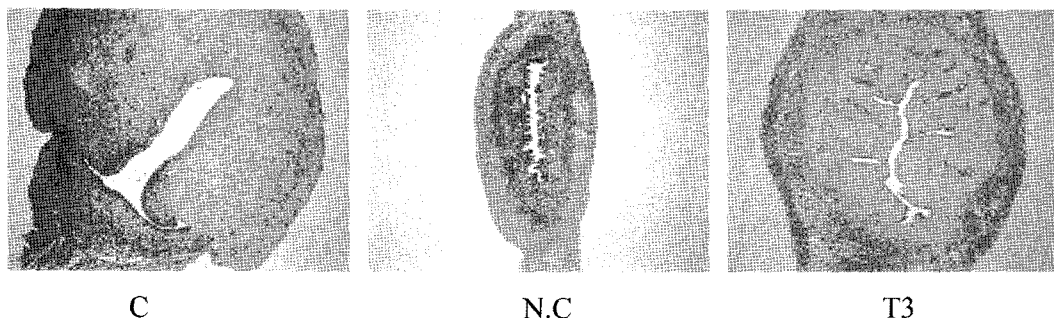


Photo 2 - The photomicrograph of the uteri treated with test substances for 14 weeks (H-E stain, ×40). C; control group, normal arrangement of uterus cells. N.C; Negative control group, severe atrophy arrangement of uterus cells. T3; Extraction of ferment arrowroot group, minimal atrophy arrangement of uterus cells.

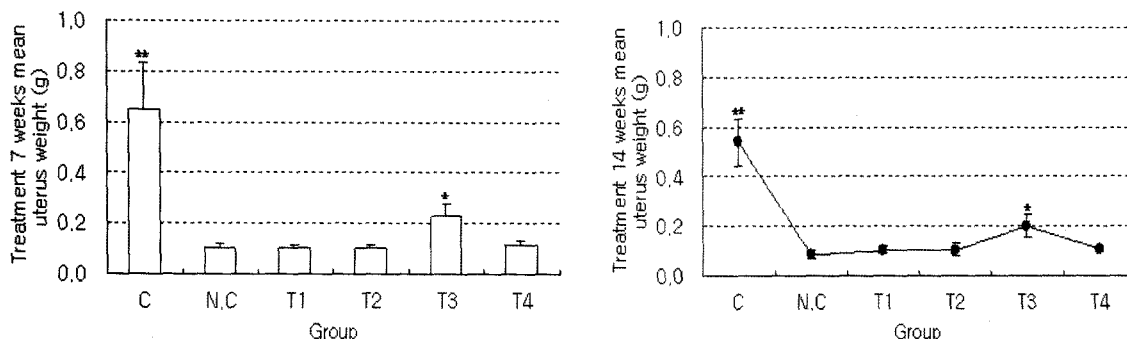


Fig. 1 - The changes of mean uterus weight orally treated with test substances for 7 and 14weeks. C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans group, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group. Statistically Significantly different from negative control group (*p<0.05, **p<0.01).

Table VI -

1. Hematological values treated orally with test substances for 7 weeks

Tested Unit	WBC ×1000	#LYM %	#MO %	#GR %	RBC ×10 ⁶	HGB g/dl	HCT %	MCV fl	MCH pg	MCHC g/dl	PLT ×1000
Group : C											
Mean	9.80 ^a	91.74	7.16	1.10	7.36	13.94	41.6	56.58	18.96	33.52	1088*
SD	0.74 ^b	1.68	1.59	0.22	0.33	0.49	1.7	2.72	0.72	0.52	314
Group : N.C											
Mean	8.20	90.72	7.9	1.38	7.62	14.22	42.52	55.88	18.54	33.2	640
SD	2.74	1.67	1.67	0.4	0.82	1.29	3.65	1.77	1.0	1.31	316
Group : T1 (5 g/kg/day)											
Mean	11.26	92.68	5.74	1.58	7.92	14.34	44.42	56.22	18.18	32.32	984
SD	4.31	1.49	0.92	0.84	0.55	0.57	1.59	2.93	1.38	1.99	214
Group : T2 (5 g/kg/day)											
Mean	10.56	91.96	6.4	1.64	7.95	14.86	45.4	57.18	18.72	32.72	962
SD	2.86	2.56	1.26	1.42	0.36	0.48	0.80	2.48	0.98	0.85	260
Group : T3 (5 g/kg/day)											
Mean	9.9	89.92	8.08	2.0	7.73	14.6	43.8	56.72	18.94	33.38	956
SD	4.73	5.89	3.61	2.37	0.71	1.0	3.65	0.84	0.59	0.72	131
Group : T4 (5 g/kg/day)											
Mean	7.74	90.68	7.68	1.64	7.55	14.58	43.02	56.98	19.32	33.94	880
SD	1.82	1.75	1.46	0.53	0.44	0.75	2.6	2.06	0.78	0.82	169

2. Hematological values treated orally with test substances for 14 weeks

Tested Unit	WBC ×1000	#LYM %	#MO %	#GR %	RBC ×10 ⁶	HGB g/dl	HCT %	MCV fl	MCH pg	MCHC g/dl	PLT ×1000
Group : C											
Mean	4.13	91.14	7.43	1.43	7.41	14.22	41.7	56.32	19.21	34.13	1034*
SD	1.29	3.9	3.22	0.85	0.38	0.63	2.31	1.65	0.58	1.06	92
Group : N.C											
Mean	6.18	91.64	7.06	1.28	7.54	14.46	42.07	55.84	19.21	34.39	943
SD	2.56	2.86	2.27	0.75	0.25	0.43	1.89	1.89	0.51	0.8	142
Group : T1 (5 g/kg/day)											
Mean	4.06	91.72	7.06	1.22	7.64	14.59	42.89	56.14	19.11	34.07	993
SD	1.18	3.05	2.37	0.75	0.29	0.44	1.81	1.41	0.78	1.44	199
Group : T2 (5 g/kg/day)											
Mean	4.98	90.71	7.67	1.62	7.54	14.63	42.5	56.36	19.4	34.49	973
SD	1.89	4.3	3.28	1.12	0.26	0.44	2.16	1.84	0.38	1.39	102
Group : T3 (5 g/kg/day)											
Mean	5.34	92.62	6.18	1.2	7.74	14.47	42.98	55.6	18.76	33.68	1076*
SD	1.37	2.84	1.99	0.99	0.38	0.58	1.75	1.65	1.03	1.09	148
Group : T4 (5 g/kg/day)											
Mean	5.93	90.32	7.92	1.76	7.61	14.29	42.2	55.54	18.82	33.89	949
SD	1.86	3.64	2.71	1.08	0.44	0.53	1.98	2.31	1.1	1.44	115

All hematological values were measured at 7 (3-1) and 14 weeks (3-2) after treatment of test substance. C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans group, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group. Statistically Significant from Negative control (*P < 0.05).

골밀도 측정

7주 부검동물에서 흉골 및 대퇴골의 골밀도 변화는 측정되지 않았다. 그러나 난소적출 14주 대퇴골에서 대조군에 비해 N.C군 9.33%, T3군 5.46% 감소되었으며, 시험물질 14주 경구투여 시, 그 감소된 양의 41.48%를 회복시키는 것으로 나타났다.

파골세포 측정

난소적출 동물에서 파골세포의 활성이 증가하였으며, 시험물질 7주 처리 T3군에서는 음성대조군에 비해 미약한 활성을 보였다(Photo 3).

조직소견

7주 및 14주간 시험물질 경구투여 후, 대조군의 모든 동물에서 대퇴골의 뼈지주(Trabeculae), 파골세포(Osteoclast)의 출현빈도 및 골수내 지방축적(Fatty accumulation)이 관찰되었다. N.C군에서는 뼈지주가 현저히 감소되었고 파골세포의 출현빈도는 상대적으로 증가하였다(Photo 5). 또한 골수내 지방 축적이 현저히 증가하였다. 난소적출 후에 시험물질 T1, T2 및 T4 투여시 미세한 개선 효과가 형태학적으로 관찰되었으며, T3군에서는 시험물질 7주 및 14주 경구 투여 시, 대퇴골 뼈지주와 파골세포의 출현빈도에서 N.C군에 비해 개선효과가 확인되었고 특히 14주 시험의 경우 대

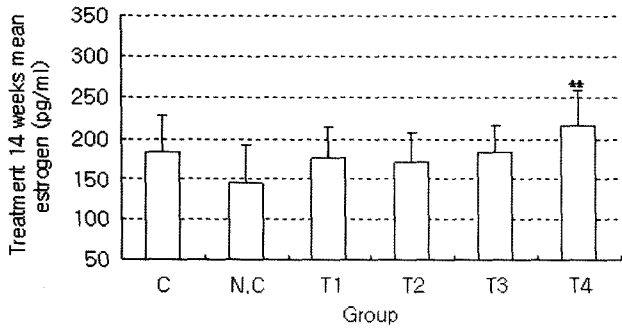


Fig. 3 - The variation of the estrogen hormone between groups (**p<0.01). C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans group, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group.

퇴골 뼈지주에서 7주 시험보다 더 뚜렷한 개선효과가 관찰되었을 뿐만 아니라 지방축적에서도 구별이 가능한 정도의 축적억제 효과가 있는 것으로 나타났다(Photo 4). 자궁조직에 대한 병리소견은 Control군에서는 정상적인 자궁조직 소견이 관찰되었으나 N.C, T1 및 T4군에서는 현저한 자궁위축 소견이 나타났다. 그러나 T3 군에서는 미약한 자궁위축 소견이 관찰되었다(Photo 2).

고찰 및 결론

골다공증의 유형은 크게 2가지 type으로 나눌 수 있는데, 그 첫번째는 원인불명의 골다공증(idiopathic osteoporosis)이나 폐경기 이후 여성호르몬 부족에 의해 나타나는 질환으로 Type I,

Table V - Bone density values treated orally with test substances for 7 and 14 weeks

Variable	Group	C	N.C	T1	T2	T3	T4
	Dose (g/kg/day)	0	0	5	5	5	5
AD 7 weeks							
	Sternum	0.0750(0.005)	0.0732(0.016)	0.0729(0.012)	0.0762(0.004)	0.0701(0.005)	0.071(0.007)
	Femur	0.1814(0.112)	0.1863(0.008)	0.1891(0.008)	0.183(0.008)	0.1839(0.010)	0.1853(0.009)
AD 14 weeks							
	Sternum	0.0658(0.005)	0.056(0.003)	0.0571(0.005)	0.0563(0.003)	0.0592(0.006)	0.0558(0.005)
	Femur	0.2068(0.007)	0.1875(0.01)	0.1912(0.012)	0.1878(0.007)	0.1955(0.008)	0.1867(0.009)

Statistically Significantly different from Negative Control group. C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans group, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group.

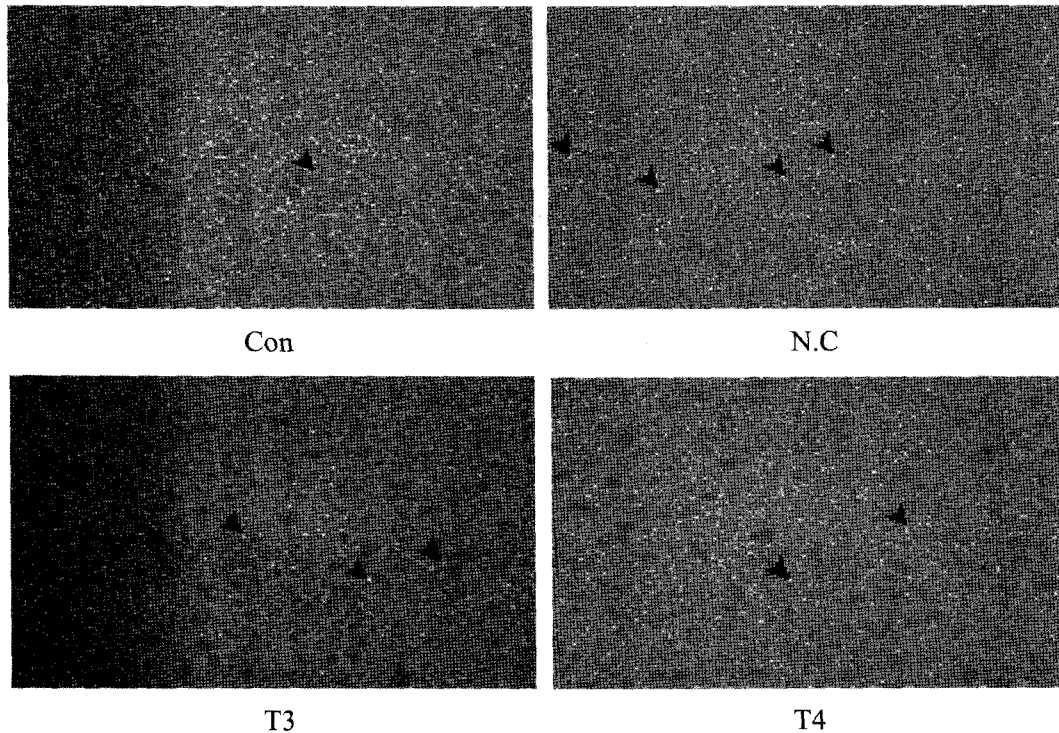


Photo 3 - The photograph of the osteoclast treated with test substances for 7 weeks. C; control group, N.C; negative control group, T3; extraction of ferment arrowroot group, T4; extraction of ferment arrowflower group (Sodium hypochloride stain, ×10,000).

Table VI -

1. Histopathological autopsy findings of trabeculae in epiphysis and metaphysis treated with test substances for 7(A) & 14(B) weeks

A)							B)						
Group	C	N.C	T1	T2	T3	T4	Group	C	N.C	T1	T2	T3	T4
Dose (g/kg)	0	0	5	5	5	5	Dose (g/kg)	0	0	5	5	5	5
No. of animal	5	5	5	5	5	5	No. of animal	10	10	10	10	10	10
4	5	0	0	0	0	0	4	10	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	1	0	3	0	0	0	0	4	0
2	0	2	3	3	4	2	2	0	2	2	2	5	3
1	0	3	2	2	0	3	1	0	8	8	8	1	7

2. Histopathological autopsy findings of the frequency of osteoclast values treated with test substances for 7 weeks

A)							B)						
Group	C	N.C	T1	T2	T3	T4	Group	C	N.C	T1	T2	T3	T4
Dose (g/kg)	0	0	5	5	5	5	Dose (g/kg)	0	0	5	5	5	5
No. of animal	5	5	5	5	5	5	No. of animal	10	10	10	10	10	10
±	5	0	0	0	0	0	±	10	0	0	0	0	0
1	0	1	3	4	4	2	1	0	0	3	3	5	3
2	0	4	2	1	1	3	2	0	1	2	7	5	7
3	0	0	0	0	0	0	3	0	9	8	0	0	0

3. Histopathological autopsy findings of the fatty accumulation values treated with test substances for 7(A) & 14(B) weeks

A)							B)						
Group	C	N.C	T1	T2	T3	T4	Group	C	N.C	T1	T2	T3	T4
Dose (g/kg)	0	0	5	5	5	5	Dose (g/kg)	0	0	5	5	5	5
No. of animal	5	5	5	5	5	5	No. of animal	10	10	10	10	10	10
±	1	0	0	0	0	0	±	8	0	0	0	0	0
1	3	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	1	0
2	1	0	1	0	2	1	2	0	1	2	2	5	0
3	0	5	4	5	3	4	3	0	9	8	8	4	10

C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans group, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group.

둘째는 고령화된 노인층의 남녀에게 발견되는 Type II의 골다공증으로 분류할 수 있다. 치료방법에는 estrogen 효과와 같이 파골세포의 활성을 억제시켜 골다공증을 예방 하는 방법과, Bone modeling unit의 활성을 증가시켜 조골세포의 활성을 높여 골다공증을 치료하는 방법이 있다¹⁴⁾. 그러나 estrogen을 장기간 복용할 경우 자궁비대 및 자궁암(endometrial cancer) 유발할 수 있다는 부작용이 보고되어 있기도 하다¹⁵⁾. 본 연구에서 Sprague-Dawley계 암컷의 난소적출 모형¹⁶⁾ 이용하여 골다공증을 유발하였으며, 폐경기 이후 Type I의 유형인 갱년기 질환의 예방 및 치료효능 연구에 사용하였다.

시험물질을 14주간 경구 투여했을 때 병적인 임상증상 및 사망 동물은 관찰되지 않았으나 난소를 제거한 시험동물의 체중이 대조군에 비해 1주부터 유의성($p < 0.01$)있게 증가되었다가 같은 발효 투여 2주부터 유의성($p < 0.01$)있게 감소됨을 확인하였다. 부검소견으로는 난소 적출에 의한 자궁 위축 현상이 N.C(음성대조)군에서 뚜렷이 관찰되었다. 그러나 T3군에서는 음성대조군 보다 위축된 정도가 7주 23.64%, 14주에는 24.44%로 통계적으로 유의성($p < 0.05$) 있게 자궁위축 정도가 감소되었다.

식물성 에스트로젠은 isoflavone류, coumestan류, 그리고 lignan류로 분류할 수 있는데, 이들은 hormone 작용, protein tyrosine kinase 및 DNA topoisomerase와 관련한 종양세포 분화 및 mitogenesis, 신 혈관 생성작용, 항산화 작용, 골다공증 등의 생리적 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다¹⁷⁾. 그러나 부작용으로 생식능력 이상, 고환이나 유방암과 같은 에스트로젠 의존적인 암의 발병률을 증가 시킨다¹⁸⁻²⁰⁾. 난소 적출시 에스트로젠 함량은 대조군에 비해 21.37% 감소하였으며 T1군 4.49%, T2군 7.62%로 각각 에스트로젠 농도는 N.C군 보다 증가하는 경향을 보였고, T3군 100.46%, T4군 117.65%로 대조군 보다 각각 증가되었다. 골밀도 측정에서 7주 부검시 흉골 및 대퇴골의 골밀도 변화는 관찰되지 않았다. 그러나 14주째 대퇴골 골밀도는 대조군에 비해 N.C군 9.33%, T3군 5.46% 감소되었다. 파골세포 측정²¹⁾은 난소를 적출한 후, 골다공증을 유발한 흰쥐를 이용하여 대퇴골에서 분리한 파골세포의 활성을 비교 평가하였다. 파골세포의 활성은 난소적출 동물에서 증가되었으며, 시험물질 7주 처리한 T3군에서는 음성대조군에 비해 미약한 활성을 보였다. 병리조직 소견에서 Control군은 대퇴골의 뼈 지주(trabeculae)

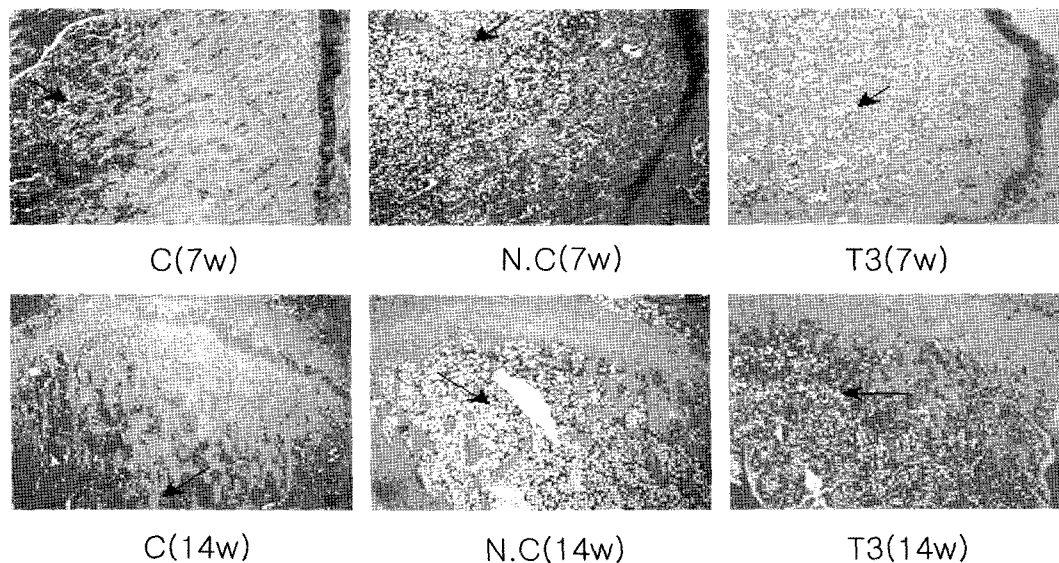


Photo 4 – The photomicrograph of the femur trabeculae and fat cells treated with test substances for 7 and 14 weeks (H-E stain, $\times 40$). C(7w), Femur trabeculae (+4) was observed in large quantities normally while fat (+1) accumulation was showed slightly in bone marrow in the control group; N.C(7w), Femur trabeculae (+2) was remarkably decreased and fat (+3) accumulation was also considerably showed in the negative control group compared to that of the control group; T3(7w), Femur trabeculae (+3) was showed improved effect perceptibly in T3 group and fat (+2) accumulation was considerably decreased compared to that of the N.C. group; C(14w), Femur trabeculae (+4) was observed in large quantities normally while fat (+1) accumulation was showed slightly in bone marrow in the control group; N.C(14w), Femur trabeculae (+1) was severely decreased and fat (+3) accumulation was also considerably showed in the negative control group compared to that of the control group; T3(14w), Femur trabeculae (+3) was showed improved effect perceptibly in T3 group and fat (+2) accumulation was considerably decreased compared to that of the N.C.

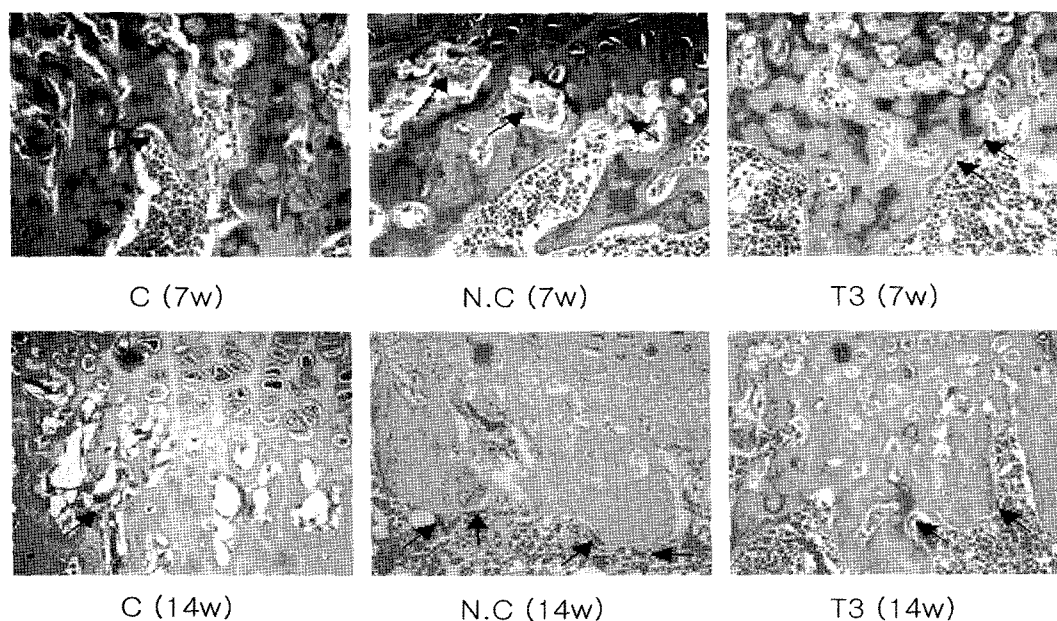


Photo 5 – The photomicrograph of femur osteoclast treated with test substances for 7 and 14 weeks (H-E stain, $\times 400$). C(7w), The appearance probability of femur osteoclast was minimal (+/-) showed in the control group; N.C(7w), The appearance probability of femur osteoclast was remarkably (+2) showed in the negative control compared to that of the control group; T3(7w), The appearance probability of femur osteoclast was mild (+1) showed improved effect recognizably in the T3 group compared to that of the N.C group; C(14w), The appearance probability of femur osteoclast was minimal (+/-) showed in the control group; N.C(14w), The appearance probability of femur osteoclast was severe (+3) showed in the negative control compared to that of the control group; T3(14w), The appearance probability of femur osteoclast was moderate (+2) showed improved effect recognizably in the T3 group compared to that of the N.C group.

가 정상적으로(+4) 관찰되었으며(7주 및 14주), 파골세포(osteoclast)의 출현빈도는 매우 미약(7주 +/-, 14주 +/-)하였다. 그러나 N.C군에서는 대퇴골에서 뼈 지주가 현저히 감소(7주 +2, 14주 +1)되었고 대퇴골 파골세포의 출현빈도는 상대적으로 증가(7주 +2, 14주 +3)하였다. T3군에서는 대퇴골의 뼈 지주에서는 구별이 가능한 정도의 유의한 개선효과(7주 +3, 14주 +3)가 확인되었다. 파골세포의 출현빈도에 있어서도 T3군에서는 N.C군과 비교할 때 구별이 가능한 정도의 감소(7주 +1, 14주 +2)를 확인하였다. 대퇴골에서의 뼈 지주와 파골세포 출현빈도 외에 본 실험에서 평가한 골수내 지방축적에 있어서는 Control군에서는 골수내 지방축적이 정상적으로 적게(7주 및 14주 +1) 관찰되었으며 N.C군에서는 골수내 지방축적이 현저히 증가(7주 및 14주 +3)하였다. 그러나 T3군에서는 구별이 가능한 정도의 감소(+2)가 확인되었다. 결론적으로 7주 및 14주 시험 모두에서 T3군은 대퇴골 뼈 지주와 파골세포의 출현빈도에서 개선효과가 확인되었고 특히 14주 시험의 경우 대퇴골 뼈 지주에서 7주 시험보다 더 현저한 개선효과가 관찰되었을 뿐만 아니라 지방축적에서도 구별이 가능한 정도의 개선효과가 있는 것으로 나타났다.

시험물질 같은 발효 전·후의 성분 변화를 비교해 볼 때 isoflavonoid glycoside가 장내 유산균에 의해 aglycone sugar로 분해되어 장관내 흡수율을 증가하여 위와 같은 효능을 나타낸 것으로 사료된다. 따라서 실험동물 암컷 흰쥐에서, 난소제거에 의한 호르몬 불균형으로 과량의 지방이 체내 축적되고 이로 인하여 골다공증, 고지혈증, 지방간 등의 각종 대사성 질환이 유발된다. 따라서 시험물질 같은 발효 추출액을 14주간 연속경구 투여 시, 호르몬 균형을 일정부분 유지시켜 지방축적을 저해하는 물질로 작용하는 것으로 생각되며 골다공증 Type I 뿐만 아니라 각종 내분비 질환 예방, 치료에 도움이 될 것으로 사료된다.

참고문헌

- 1) Editorial Committee. *Korean Pharmacopoeia. 7th ed.* pp. 721-988. Korean Medical Index Press, Seoul, Korea (1998).
- 2) Faculties in Department of Herbology. *Oriental Herbology.* pp. 242-244, 167-168. Young-Lim Publishing Co., Seoul (1991).
- 3) Kurihara, T. and Kikuchi, M. : Studies on the constituents of flowers. IV. On the components of the flower of *Pueraria thubergiana* Benth. (3). *Yakugaku Zasshi.* **96**, 1486 (1976).
- 4) Lee, K. T., Sohn, I. C., Kong, E. A., Kim, D. H., Choi, S. K., Choi, J. W. and Park, H. J. : Antioxidative and cytoprotective effects of isoflavones isolated from *Pueraria thubergiana* flowers. *Yakhak Hoeji* **43**, 736 (1999).
- 5) Kinjo, J., Takeshita, T., Abe, Y., Terada, N., Yamashita, H., Yamasaki, M., Takeuchi, K., Murasaki, K., Tomimatsu, T. and Nohara, T. : Studies on the constituents of *pueraria lobata*. IV. Chemical constituents in the flowers and the leaves. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 1174 (1988).
- 6) Consensus Conference. Osteoporosis. *JAMA* **252**, 799 (1984).
- 7) Ryan, P. J., Evans, P., Gibson, T. and Fogelman, I. : Osteoporosis and chronic back pain: A study with single-photon emission computed tomography bone scintigraphy. *J. Bone Miner. Res.* **7**, 1455 (1992).
- 8) Spencer, H., Rubio, N., Rubio, E., Indreika, M. and Seitam, A. : Chronic alcoholism: Frequently overlooked cause of osteoporosis in men. *Am. J. Med.* **80**, 393 (1986).
- 9) Wang, W., Tanaka, Y., Han, E. and Higuchi, C. M. : Proliferative response of mammary glandular tissue to formononetin. *Nutr. Cancer* **23**, 131 (1995).
- 10) Saloniemi, H., Wahala, K., Nykanen-Kurki, P., Kallela, K. and Saastamoinen, I. : Phytoestrogen content and estrogenic effect of legume fodder. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **208**, 13 (1995).
- 11) Bingham, S. A., Atkinson, C., Liggins, J., Bluck, A. and Coward, A. : Phytoestrogens; where are we now? *Brit. J. Nutr.* **79**, 393 (1998).
- 12) Evans, G. L., Bryant, H. U., Magee, D. E. and Tuner, R. T. : Raloxifene inhibits bone turn over and prevents further cancellous bone loss in adult ovariectomized rats with established osteopenia. *Endocrinology* **137**, 4139 (1996).
- 13) Bryant, H. U. and Dere, W. H. : Selective estrogen receptor modulators: an alternative to hormone replacement therapy. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* **217**, 45 (1998).
- 14) Scrip Reports, Dsteoporosis: research, markets, trends and opportunities. PJB Publications Ltd. pp.57-84 (1994).
- 15) Bergkvist, L., Adami, H.-O., Persson, I., Hoover, R. and Schairer, C. : The risk of breast cancer after estrogen and estrogen-progestin replacement. *N. Engl. J. Med.* **321**, 293 (1989).
- 16) Nordin, B. E., Heyburn, P. J., Peacock, M. et al. : Osteoporosis and osteomalacia. *Clin Endocrinol. Metab.* **9**(1), 177 (1980).
- 17) Fotsis, T., Pepper, M., Adlercreutz, H., Flerischmann, G., Hase, T., Montesano, R. and Schweigerer, L. : Genistein a dietary derived inhibition of in vitro angiogenesis. *proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2690 (1993).
- 18) Forman, D. and Moller, H. : Testicular cancer. *Cancer Survey* **19-20**, 323 (1994).
- 19) Sharpe, R. M. and Skakkebaek, N. E. : Are oestrogen involved falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract. *Lancet* **341**, 1392 (1993).
- 20) Wolff, M. S. and Weston, A. : Breast cancer risk and environmental exposure. *Environmental Health Perspectives* **105**, 891 (1977).
- 21) Waynforth, H. B. and Flecknell, P. A. : Experimental and Surgical Techniques in the Rat. Academic press (1992).