

이소플라본 섭취수준이 성장기 암컷 쥐의 골밀도에 미치는 영향*

최 미 자[§] · 정 윤 정

계명대학교 식품영양학과

The Effects of Level of Isoflavones Supplementation on Bone Mineral Density in Growing Female Rats*

Choi, Mi-Ja[§] · Jung, Yun-Jung

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

ABSTRACT

The overall purpose of this study was to investigate the effects of level of isoflavones supplementation on bone metabolism in growing female rats. The effects of level of isoflavones supplementation on bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) were inspected in this study. Forty-five rats divided into three groups: Casein, $\frac{1}{2}$ IF, IF. The serum and urine concentrations of calcium and phosphorus were determined. BMD and BMC were estimated by using PIXImus (GE Lunar Co, Wisconsin.) in spine and femur on 3, 6, 9 weeks after feeding. This study of results were as follows: The isoflavones supplementation level did not affect weight gain, mean food intake and food efficiency ratio. The serum concentration of calcium, phosphorus were not significantly different by different level of isoflavones supplementation. The urinary calcium and phosphorus excretion were not significantly different, too. Spine and femur BMD, BMC were not significantly increased by different level of isoflavones supplementation on 3 and 6 weeks after feeding. Spine BMD and spine BMC per weight, femur BMC per weight were significantly increased in the groups $\frac{1}{2}$ IF and IF at the ninth week after feeding, but there was no significant difference by different level of isoflavones supplementation. Spine BMD per weight and femur BMD per weight were significantly higher in the group of IF than in the group of Casein and $\frac{1}{2}$ IF at the ninth week after feeding. These results suggest that the group of IF with rich isoflavones supplementation was effective to the increase of BMD spine and femur in growing female rats, respectively. (Korean J Nutrition 39(4): 338~346, 2006)

KEY WORDS : growing female rats, level of isoflavones supplementation, bone mineral density, bone mineral content.

서 론

골다공증은 골의 강도가 약화되어 골절이 쉽게 일어나는 전신적인 질환으로 골다공증 그 자체로는 증상이 없으나 낮은 골량과 골조직의 구조적 약화로 인하여 대퇴골, 척추, 손목 등의 골절 위험도를 증가시키는 원인이 된다.¹⁾ 평균 수명이 증가되어 인구가 고령화됨에 따라 골다공증으로 인한 사회경제적 손실이 증가되고 있다. 이러한 골다공증의

예방과 치료를 위하여 에스트로겐과 유사한 구조를 가지고 있는 대두 내 비영양 생리활성 물질인 이소플라본 (isoflavones)이 피토에스트로겐 (phytoestrogen)으로 주목을 받고 있다. 이소플라본이 골다공증 위험을 감소시키는 효과로서 이소플라본의 약한 에스트로겐 기능, 이소플라본과 골다공증 치료제인 ipriflavone과의 구조적 유사성, 그리고 대두 소비가 많은 아시아 여성들에서 골절이 비교적 낮은 이유 등에 근거하고 있다.²⁾ 또한 난소절제 한 쥐와 폐경기 전후의 사람을 대상으로 한 실험에서 이소플라본은 골손실 예방에 유익하였다고 보고하였다.³⁻¹¹⁾ 이러한 이소플라본의 골 보호효과에 대한 작용 기전은 아직 완전히 밝혀지지 않았지만 이소플라본이 뼈의 분해를 저해하고 뼈의 형성을 촉진한다고 제시되고 있다.²⁾

그러나 이소플라본이 골밀도에 미치는 영향은 섭취량에 따라 상이한 결과가 보고되었다. 난소절제 쥐에게 체중 당

접수일 : 2006년 3월 15일

채택일 : 2006년 5월 29일

*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.

E-mail : choimj@kmu.ac.kr

20, 40, 80 mg의 세 가지 수준으로 이소플라본을 공급하였을 때 대퇴골의 피질골 부위와 해면골 부위 골밀도가 대조군보다 유의적으로 높았고 피질골 부위에서 더 민감하게 반응하여 이소플라본의 첨가수준에 따라 골의 부위에서 반응하는 영향이 다르게 나타났다고 보고하였다.¹²⁾ 다른 선행연구¹³⁾에서는 유사한 조건으로 이소플라본을 공급하였을 때 이소플라본을 첨가한 세 가지 수준에서 대퇴 (total femur) 골밀도가 대조군과 비교하여 유의적인 변화가 없었다고 보고하였다.

또한 사람을 대상으로 한 연구들^{14~17)}에서 이소플라본 섭취수준에 따라 골밀도에 미치는 효과를 살펴본 결과 폐경 후 중국여성¹⁶⁾과 일본여성을 대상¹⁷⁾으로 한 연구에서 이소플라본 섭취량이 높은 여성들은 섭취량이 낮은 여성들보다 척추 (lumbar spine)의 골밀도가 유의적으로 높았다고 보고하였다. 식이 대두 이소플라본과 골밀도와의 상관성을 살펴본 Greendale 등¹⁸⁾의 결과에 의하면 중국 여성에 비해 식사에서 genistein 섭취가 훨씬 많았던 폐경 전 일본 여성은 genistein 섭취와 골밀도가 양의 상관성을 보였고 중국여성은 상관성이 없었다. 이 연구 결과에서 뼈에 영향을 주기 위한 genistein 섭취는 역치수준이 요구되어진다는 것을 제안하였다. 이처럼 이소플라본이 골밀도에 미치는 영향은 섭취량에 따라 다른 결과를 나타내고 있어 골밀도에 유효한 영향을 미치는 섭취수준은 다양하게 제시되고 있다.

그러나 대부분의 선행연구들은 이소플라본이 여성호르몬의 약한 성질을 가진다는 것에 근거하여 난소호르몬이 결핍된 상태에서 이소플라본이 골감소에 미치는 효과에 대한 많은 연구가 보고되었다.^{3~11)} 여러 연구 결과 여성호르몬이 결핍된 상태에서 이소플라본이 골대사에 유익한 효과를 보고한 연구는 상당히 많이 있다. 그러나 이소플라본이 골대사에 미치는 효과는 생리주기, 섭취기간, 섭취 수준에 따라 다르게 보고되고 있다.^{12,13,19~21)}

한편, 이소플라본은 약한 여성호르몬의 성질을 가지므로 여성호르몬이 분비되는 폐경전 여성에서 항 에스트로겐 역할을 하여 골대사에 부정적인 영향을 미칠지 모른다는 추론이 있다.²²⁾ 그러나 성장기 동안 이소플라본의 섭취가 골대사에 미치는 영향에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 이에 최근 성장기 수컷 쥐를 대상으로 이소플라본을 9주간 섭취시킨 경우 체중 당 총 골밀도와 체중 당 척추 골밀도가 높게 나타났고,^{23,24)} 또한 동일한 실험 조건하에서 성장기 암컷 쥐를 대상으로 한 결과에서도 이소플라본 섭취군의 대퇴 골밀도가 높아 이소플라본의 섭취는 최대골밀도 형성에 유익한 것으로 보고하였다.^{25,26)} 그러나 성장기에 이

소플라본의 섭취가 골밀도에 미치는 영향에 대한 연구는 거의 없는 실정이며, 선행연구에서 사용한 이소플라본의 량을 달리하여 이소플라본의 섭취 수준에 따라 골밀도에 미치는 영향에 대한 후속 연구가 요망되고 있다.

또한, Fanti 등⁷⁾은 난소절제 쥐에게 genistein을 1, 5, 25 μg/kg body weight 수준으로 21일간 공급하였을 때, 1 μg genistein/kg body weight 수준은 골밀도 손실을 방지하지 못하였으나 5, 25 μg genistein/kg body weight 수준은 난소절제에 의한 골손실을 감소시켰고 5 μg과 25 μg의 투여량에 따른 유의적인 차이는 없어 genistein이 골감소에 효과를 나타내는 적정량에 대한 연구가 필요한 것으로 사료된다.

최근 성장기 쥐를 이용하여 이소플라본이 골밀도에 미치는 영향에 대한 선행연구^{23,25,26)}를 보면 이소플라본의 섭취 수준은 이소플라본이 풍부한 콩단백질을 카제인 대신에 대치한 량으로 연구가 되어 이소플라본의 섭취 수준이 더 높거나 혹은 더 낮은 경우에 골밀도에 미치는 효과를 알아볼 필요가 있다. 따라서 본 연구는 성장기 쥐에서 골밀도에 유익하였다고 한 이소플라본 량과 그 절반 수준이 성장기 암컷 쥐의 골밀도에 미치는 효과를 알아보자 하였다.

실험방법 및 내용

1. 실험동물 및 식이

Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐 (60 ± 5 g)를 대한 동물사육센터로부터 분양받아 chow로 적응 사육을 실시한 후 난괴법 (randomized complete block design)을 이용하여 각 군당 15마리씩 나누어 9주간 실험 식이를 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 자동 조절 (light 6 : 00~18 : 00) 하였다. 실험 기간 동안 식이와 물은 자유롭게 섭취케 하였으며 물은 모두 2차 이온교환수를 사용하였다.

실험군은 대조군인 Casein군과 이소플라본 섭취군인 Casein에 이소플라본의 첨가량에 따라 ½IF군, IF군으로 분류하였다. 이소플라본 섭취수준은 선행연구^{23,25,26)}에서 이소플라본이 풍부한 soy protein isolate (3.4 mg isoflavones/g protein)를 섭취시킨 경우 (평균 이소플라본 섭취량 8~11 mg/day) 골밀도와 골무기질 함량에 유익하였다고 보고한 soy protein isolate에 함유된 양과 동일한 양의 이소플라본을 Casein 식이에 첨가한 식이 (3.4 mg isoflavones/g casein protein)를 IF군, 그 양의 절반수준을 첨

가한 식이 (1.7 mg isoflavones/g casein protein)를 $\frac{1}{2}$ IF군으로 정하였다. 실험 식이는 AIN-93G 정제식이²⁷⁾를 기준으로 조제하였고 Table 1에 나타내었다.

2. 실험분석

1) 체중 및 식이 섭취량 측정

실험 식이를 시작한 날을 기준으로 식이섭취량은 이틀에 한 번씩 일정한 시간에 측정하였고, 체중은 일주일 단위로 일정한 시간에 측정하였다. 식이효율 (Food Efficiency Ratio: FER)은 실험기간 동안의 체중 증가량을 총 식이섭취량으로 나누어 계산하였다.

2) 시료 수집 및 생화학분석

9주간 사육한 실험 동물은 대사케이지에 넣어서 절식시키고 식수만 공급하여 24시간 동안 요를 채취하였다. 시료 채취에 사용되는 모든 기구는 2차 이온교환수로 헹구어 사용하였고, 채취한 요는 -70°C 에서 냉동 보관하였다가 분석하였다. 요 채취가 끝난 흰쥐는 에테르로 마취한 상태에서 복부를 절개해 대동맥에서 혈액을 채취하였고, 채취한 혈액은 상온에서 30분간 방치한 후 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리하여 급속 냉동시킨 후 분석 시까지 -70°C 에서 냉동 보관하였다. 혈청과 요중 칼슘은 칼슘이 함유되어 있는 시료에 o-CPC (o-cresolphthalin complexone)를 첨가하여 생성되는 발색복합물의 흡광도를 570 nm에서 측정한 비색정량법으로 분석하였다.²⁸⁾ 인은 시료에 몰리브덴산을 첨가하여 생성되는 인-몰리브덴산 복합체의 발색정도를 340 nm에서 측정한 인

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

Ingredients	Casein	$\frac{1}{2}$ IF ⁵⁾	IF ⁶⁾
Casein ¹⁾	200	200	200
Corn starch	529.5	528.5	527.6
Sucrose	100	100	100
Soybean oil	70	70	70
α -Cellulose	50	50	50
Min-mix ²⁾	35	35	35
Vit-mix ³⁾	10	10	10
L-cystine	3	3	3
Choline	2.5	2.5	2.5
Tert-butyl hydroquinone	0.014	0.014	0.014
Isovovan ⁴⁾	—	0.965	1.93

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

²⁾AIN-93G-MX, Teklad Test Diets, Madison, Wisconsin, USA

³⁾AIN-93G-VM, Teklad Test Diets, Madison, Wisconsin, USA

⁴⁾Isovovan: Isoflavones compound (total isoflavones 32%), Pacific Pharmaceuticals Co., Korea

⁵⁾ $\frac{1}{2}$ IF: diet with 3.4 mg isoflavones/g casein protein

⁶⁾IF: diet with 1.7 mg isoflavones/g casein protein

– 몰리브덴산 비색정량법으로 분석하였다.²⁹⁾

3) 골밀도 측정

암컷 흰쥐의 경우 성성숙은 생후 60~70일 째부터 성주기가 안정되고 80일부터 완전 성성숙에 이르며 성성숙의 체중은 200~400 g 정도이므로 실험동물의 생리주기와 체중을 고려하여,³⁰⁾ 실험 3주째 (6주령), 6주째 (9주령), 9주째 (12주령)로 나누어 여성 호르몬의 분비가 거의 없는 시기 (6주령), 미약한 시기 (9주령), 왕성한 시기 (12주령) 별로 구분하여 이소플라본이 골밀도에 미치는 효과를 측정하였다.

사육한 흰쥐는 마취제 ketamine hydrochloride (유한양행, 50 mg/ml)를 사용하여 사육 3주, 6주, 9주째에 체중 1 kg 당 75 mg의 용량으로 근육 주사한 후 small animal 전용 골밀도 측정기인 PIXImus (GE, LUNAR, Madison, WI, USA)를 이용하여 척추 (spine)와 대퇴골 (femur)의 골밀도 (bone mineral density, BMD)와 골무기질함량 (bone mineral content, BMC)을 측정하였다.

4) 통계분석

실험한 결과의 통계처리는 SAS package를 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차로 나타냈으며, 각 군의 비교는 $p < 0.05$ 수준에서 one-way ANOVA test를 하였고 군간의 통계적인 유의성은 Duncan's multiple range test를 이용하여 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 체중과 식이섭취량

9주간의 체중 증가량, 평균 식이 섭취량 및 식이효율을 Table 2에 나타내었다. 각 실험군의 9주간 체중증가량은 이소플라본 첨가량에 따른 유의적인 차이가 없었다. 평균 식이 섭취량은 13.9~14.5 g으로 실험군 간에 유의적인 차이가 없었고 이소플라본 첨가량에 따라 식이 효율도 유의적인 차이가 없었다. 이는 성장기 암컷을 대상으로 한 연구²⁶⁾에서도 이소플라본의 첨가에 의한 체중증가와 식이

Table 2. Effects of isoflavones supplementation on weight gains, mean food intake and food intake efficiency ratio in growing female rats

Group	Weight gains (g)	Mean food intake (g/day)	FER ²⁾
Casein	164.9 \pm 10.5 ¹⁾	14.1 \pm 0.82	0.21 \pm 0.01
$\frac{1}{2}$ IF	165.8 \pm 16.7	14.5 \pm 0.59	0.20 \pm 0.01
IF	159.6 \pm 13.1	13.9 \pm 0.99	0.19 \pm 0.01

¹⁾Mean \pm SD

²⁾Food intake efficiency ratio

섭취량은 영향이 없었다고 하여 본 연구결과와 유사하였다.

2. 혈청 칼슘 및 인의 농도와 요 중 칼슘 및 인의 배설량

혈청 칼슘과 인의 농도에 대한 결과를 Table 3에 제시하였다. 혈청 칼슘은 Casein군 11.15 mg/dl, ½IF군 11.35 mg/dl, IF군 11.04 mg/dl로 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다. 혈청 인의 농도도 Casein군 7.77 mg/dl, ½IF군 7.60 mg/dl, IF군 7.55 mg/dl로 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다.

난소절제 쥐를 대상으로 이소플라본을 체중당 0, 20, 40, 80 mg 수준으로 공급하였을 때 혈중 칼슘은 이소플라본 섭취수준에 관계없이 모든 군간에 유의적인 차이가 없었다고 보고하였다.¹²⁾ 또한 Uesugi 등³¹⁾은 난소절제 쥐에게 이소플라본 daidzin, genistin, glycitin 세 종류를 각각 체중당 25, 50 또는 100 mg로 경구투여 하였을 때 혈청 칼슘과 인의 농도가 이소플라본의 종류와 공급수준에 따라서 유의적인 차이가 없었다고 하였으며 성장기 쥐의 경우 이소플라본에 의한 혈청 칼슘과 인의 농도는 유의적인 차이가 없었는데^{24,32)} 본 연구에서도 유의적인 차이가 없어 내분비계의 적응으로 인해 혈액 내 칼슘 농도의 항상성이 유지되는 것으로 보인다.

요 중 칼슘과 인의 배설량에 대한 결과를 Table 3에 나타내었다. 요 중 칼슘 배설량은 Casein군 0.65 mg/day, ½IF군 0.54 mg/day, IF군 0.78 mg/day로 ½IF군이 가장 낮은 경향을 보였으나 이소플라본 첨가수준에 따른 차이는 없었다. 요 중 인의 배설량도 Casein군 17.6 mg/day, IF½군 17.6 mg/day, IF군 14.7 mg/day로 유의적인 차

이가 없었다. 난소절제 쥐를 대상으로 이소플라본 섭취 수준에 따라 요 및 분변의 칼슘과 인의 배설에 미치는 영향을 본 결과, 요 중 및 분변의 칼슘과 인의 배설량은 이소플라본 섭취 수준에 따라 유의적인 차이가 없었고, 칼슘 흡수율과 보유율도 차이가 없었다고 보고하였다.³³⁾ 또한 성장기 암컷 쥐를 대상으로 한 연구²⁶⁾에서 이소플라본 함유여부에 따라 요 중 칼슘 배설량이 유의적인 차이가 없었다고 보고하였다. 일부 연구³⁴⁾에서 이소플라본이 여성호르몬 결핍 시 소장에서의 칼슘흡수율을 높인다고 보고하였으나 아직 이소플라본이 요 중 칼슘 배설에 미치는 영향에 대해서는 여러 견해가 상반 되고 있으며 그 기전도 명확하지 않다.

3. 골밀도와 골함량에 미치는 영향

이소플라본은 미약한 여성호르몬의 성질을 가지는 것으로 알려져 있으므로³⁵⁾ 성장기 암컷 환쥐의 경우 여성호르몬의 분비가 거의 없는 시기 (실험 1~3주), 분비 시작시기 (실험 4~6주), 그리고 분비가 완성한 시기 (실험 7~9주)로 구분이 필요하다고 사료되어 여성호르몬의 분비량의 변화에 따라 생리주기에 맞추어 시기별 골밀도를 측정하여 분석하였다.

1) 척주 골밀도 및 골함량

(1) 3주째 척추 골밀도 및 골함량

Table 4에 여성호르몬의 분비가 거의 없는 실험 시작부터 실험 3주까지 기간의 효과를 분석한 실험 3주째의 척추 골밀도 (Spine BMD)와 골함량 (Spine BMC)을 나타내었다. 척추 골밀도는 Casein군이 0.0954 g/cm², ½IF군이 0.0945 g/cm², IF군이 0.0968 g/cm²이었고 체중 당 척추 골밀도 (Spine BMD/wt)는 Casein군이 0.56 g/cm²/kg, ½IF군이 0.58 g/cm²/kg, IF군이 0.60 g/cm²/kg으로 실험군 간에 유의적인 차이는 없었다. 또한 척추 골함량은 Casein군이 0.1903 g, ½IF군이 0.1926 g, IF군이 0.2028 g 이었고 체중당 척추 골함량 (Spine BMC/wt)은 Casein군이 1.12 g/kg, ½IF군이 1.19 g/kg, IF군이 1.20 g/kg으로 실험군간에 유의적인 차이가 없었다. 그러나 3주째 척추 골밀도 및 골함량은 이소플라본 첨가량에 따라 IF군이

Table 3. Effects of isoflavones supplementation on serum and urinary calcium, phosphorus in growing female rats

Group	Casein	½IF	IF
Serum Ca (mg/dl)	11.15 ± 0.34 ¹⁾	11.35 ± 0.85	11.04 ± 0.59
Serum P (mg/dl)	7.77 ± 0.49	7.60 ± 0.70	7.55 ± 0.81
Urinary Ca (mg/day)	0.65 ± 0.38	0.54 ± 0.14	0.78 ± 0.68
Urinary P (mg/day)	17.6 ± 4.21	17.6 ± 3.28	14.7 ± 6.28

¹⁾Mean ± SD

Table 4. Effects of isoflavones supplementation on spine bone mineral density and bone mineral content in 3 weeks after feeding

Spine BMD & BMC	Casein	½IF	IF
Spine BMD (g/cm ²)	0.0954 ± 0.0072 ¹⁾	0.0945 ± 0.0053	0.0968 ± 0.006
Spine BMD (g/cm ²) / wt (kg)	0.56 ± 0.0340	0.58 ± 0.0416	0.60 ± 0.0546
Spine BMC (g)	0.1903 ± 0.0205	0.1926 ± 0.0077	0.2028 ± 0.0222
Spine BMC (g) / wt (kg)	1.12 ± 0.0967	1.19 ± 0.0719	1.20 ± 0.1500

¹⁾Mean ± SD

가장 높았고 $\frac{1}{2}$ IF군, Casein군 순서로 높은 경향을 나타내었다.

(2) 6주째 척추 골밀도 및 골함량

Table 5에 여성호르몬의 분비가 미약하게 시작되는 실험 4주부터 실험 6주까지 기간의 효과를 분석한 실험 6주째의 척추 골밀도 (Spine BMD)와 골함량 (Spine BMC)을 나타내었다. 척추 골밀도는 Casein군이 0.1235 g/cm^2 , $\frac{1}{2}$ IF군이 0.1271 g/cm^2 , IF군이 0.1246 g/cm^2 이었고 체중당 척추 골밀도 (Spine BMD/wt)는 Casein군이 $0.57 \text{ g/cm}^2/\text{kg}$, $\frac{1}{2}$ IF군이 $0.59 \text{ g/cm}^2/\text{kg}$, IF군이 $0.61 \text{ g/cm}^2/\text{kg}$ 으로 나타났으며 또한 척추 골함량은 Casein군이 0.3367 g , $\frac{1}{2}$ IF군이 0.3335 g , IF군이 0.3408 g 이었고 체중당 척추 골함량 (Spine BMC/wt)은 Casein군이 1.55 g/kg , $\frac{1}{2}$ IF군이 1.54 g/kg , IF군이 1.66 g/kg 으로 실험군간에 유의적인 차이가 없었지만 IF군이 다른 군보다 체중당으로 비교 시 골밀도와 골함량이 높은 경향을 나타내었다.

(3) 9주째 척추 골밀도 및 골함량

Table 6에 여성호르몬의 분비가 완성한 시기인 실험 7주부터 실험 9주까지의 식이효과를 분석한 척추 골밀도 (Spine BMD)와 골함량 (Spine BMC)을 나타내었다. 척추 골밀도는 Casein군이 0.1471 g/cm^2 , $\frac{1}{2}$ IF군이 0.1576 g/cm^2 , IF군이 0.1594 g/cm^2 로 이소플라본을 첨가한 IF

군과 $\frac{1}{2}$ IF군이 유의적으로 높게 나타났으며 Casein군과 비교하여 IF군 8.4%, $\frac{1}{2}$ IF군이 7.1% 높았다. 그리고 체중당 척추 골밀도 (Spine BMD/wt)는 Casein군이 $0.61 \text{ g/cm}^2/\text{kg}$, $\frac{1}{2}$ IF군이 $0.64 \text{ g/cm}^2/\text{kg}$, IF군이 $0.69 \text{ g/cm}^2/\text{kg}$ 으로 IF군이 유의적으로 높게 나타났는데 이는 Casein군보다 13.1% 더 높은 값이었다.

또한 척추 골함량은 Casein군이 0.4455 g , $\frac{1}{2}$ IF군이 0.4864 g , IF군이 0.4704 g 였고 체중당 척추 골함량 (Spine BMC/wt)은 Casein군이 1.84 g/kg , $\frac{1}{2}$ IF군이 1.96 g/kg , IF군이 2.01 g/kg 으로 실험군간에 유의적인 차이가 없었지만 이소플라본 첨가수준에 따라 높은 경향을 유지하였다.

2) 대퇴부 골밀도 및 골함량

(1) 3주째 대퇴 골밀도 및 골함량

Table 7에 실험 3주째 대퇴 골밀도 (Femur BMD)와 골함량 (Femur BMC)을 나타내었다. 대퇴 골밀도는 Casein군이 0.1262 g/cm^2 , $\frac{1}{2}$ IF군이 0.1275 g/cm^2 , IF군이 0.1330 g/cm^2 으로 각 군간에 유의적인 차이가 없었으나 IF군이 가장 높았고 $\frac{1}{2}$ IF군, Casein군 순으로 나타나서 이소플라본 첨가량에 따라 골밀도가 높은 경향을 나타내었다. 대퇴 골함량, 체중당 대퇴 골밀도, 체중당 대퇴 골함량에서도 실험군간에 유의적인 차이 없이 골밀도와 같은 경향

Table 5. Effects of isoflavones supplementation on spine bone mineral density and bone mineral content in 6 weeks after feeding

Spine BMD & BMC	Casein	$\frac{1}{2}$ IF	IF
Spine BMD (g/cm^2)	$0.1235 \pm 0.014^{\text{a}}$	0.1271 ± 0.006	0.1246 ± 0.011
Spine BMD (g/cm^2) / wt (kg)	0.57 ± 0.0511	0.59 ± 0.0214	0.61 ± 0.0411
Spine BMC (g)	0.3367 ± 0.023	0.3335 ± 0.031	0.3408 ± 0.033
Spine BMC (g) / wt (kg)	1.55 ± 0.1022	1.54 ± 0.0805	1.66 ± 0.1168

^aMean \pm SD

Table 6. Effects of isoflavones supplementation on spine bone mineral density and bone mineral content in 9 weeks after feeding

Spine BMD & BMC	Casein	$\frac{1}{2}$ IF	IF
Spine BMD (g/cm^2)	$0.1471 \pm 0.0070^{\text{a},\text{b}}$	$0.1576 \pm 0.0101^{\text{b}}$	$0.1594 \pm 0.0070^{\text{b}}$
Spine BMD (g/cm^2) / wt (kg)	$0.61 \pm 0.04^{\text{a}}$	$0.64 \pm 0.05^{\text{a}}$	$0.69 \pm 0.04^{\text{b}}$
Spine BMC (g)	0.4455 ± 0.0381	0.4864 ± 0.0380	0.4704 ± 0.0459
Spine BMC (g) / wt (kg)	$1.84 \pm 0.13^{\text{a}}$	$1.96 \pm 0.16^{\text{b}}$	$2.01 \pm 0.14^{\text{b}}$

^aMean \pm SD

^bValues with different superscripts within the row are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

Table 7. Effects of isoflavones supplementation on femur bone mineral density and bone mineral content in 3 weeks after feeding

Femur BMD & BMC	Casein	$\frac{1}{2}$ IF	IF
Femur BMD (g/cm^2)	$0.1262 \pm 0.0080^{\text{a}}$	0.1275 ± 0.0039	0.1330 ± 0.0090
Femur BMD (g/cm^2) / wt (kg)	0.76 ± 0.0529	0.77 ± 0.0448	0.81 ± 0.0617
Femur BMC (g)	0.1780 ± 0.015	0.1808 ± 0.009	0.1856 ± 0.010
Femur BMC (g) / wt (kg)	1.07 ± 0.0573	1.10 ± 0.0835	1.15 ± 0.1012

^aMean \pm SD

을 보였다.

(2) 6주째 대퇴 골밀도 및 골함량

실험 6주째 대퇴 골밀도 및 골함량, 체중당 골밀도 및 체중당 골함량에 이소플라본 첨가량에 따른 효과는 볼 수 없었는데 유의성을 나타내지는 않았지만 역시 IF군이 다른 군보다 골밀도와 골함량이 높은 경향을 나타내었다(Table 8).

(3) 9주째 대퇴 골밀도 및 골함량

Table 9에 실험 9주째의 대퇴 골밀도와 골함량을 나타내었다. 대퇴 골밀도는 Casein군이 0.2046 g/cm^2 , $\frac{1}{2}\text{IF}$ 군이 0.2098 g/cm^2 , IF군이 0.2106 g/cm^2 로 실험군간에 유의적인 차이는 없었지만 이소플라본 첨가수준이 높을수록 높은 값을 나타내었다. 체중 당 대퇴 골밀도 (Femur BMD/wt)는 Casein군이 $0.84 \text{ g/cm}^2/\text{kg}$, $\frac{1}{2}\text{IF}$ 군이 $0.86 \text{ g/cm}^2/\text{kg}$, IF군이 $0.92 \text{ g/cm}^2/\text{kg}$ 으로 유의적인 차이를 보여 IF군이 Casein군보다는 9.5%, $\frac{1}{2}\text{IF}$ 군보다는 7.0% 높게 나타나 첨가수준이 높을수록 골밀도가 높았다. 또한 대퇴 골함량은 실험군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았으나 체중당 대퇴 골함량 (Femur BMC/wt)은 Casein군이 1.55 g/kg , $\frac{1}{2}\text{IF}$ 군이 1.63 g/kg , IF군이 1.68 g/kg 으로 이소플라본 첨가에 따라 유의적인 차이를 나타내었으나 첨가수준에 따른 차이는 없었으며 Casein군과 비교하여 IF군이 8.4%, $\frac{1}{2}\text{IF}$ 군이 5.2% 높았다. 체중당 대퇴 골함량은 $\frac{1}{2}\text{IF}$ 군과 IF군이 모두 대조군에 비해 유의적으로 높아서 이소플라본을 첨가한 두 수준 모두 유리하였고 체중당 대퇴 골밀도는 $\frac{1}{2}\text{IF}$ 군이 IF군보다 유의적으로 낮아 이소플라본 첨가수준이 높은 IF군이 더 유리하였다.

이소플라본 첨가가 성장기 암컷 쥐의 골격에 미치는 효과에 대한 연구로 성호르몬 분비 주기로 구분하여 연구한

보고는 Choi와 Jo²⁵⁾가 처음이며, 본 연구에서 카제인에 이소플라본을 첨가한 대신 선행연구는 본 연구에서 첨가한 량과 동일한 량의 이소플라본을 함유하는 콩단백질을 카제인 대신에 공급하였다. 본 연구결과와 선행연구의 결과에서 이소플라본의 섭취 수준이 같은 IF군과 콩단백질 섭취군을 비교해보면 본 연구는 실험 3주째, 6주째에서는 척추와 대퇴 골밀도 및 골함량에 대한 이소플라본의 첨가수준에 의한 효과는 볼 수 없었고 실험 9주째에 대조군인 Casein군에 비하여 척추 골밀도와 체중당 척추 및 대퇴골의 골밀도가 유의적으로 높게 나타났다. 척추골밀도는 Casein군과 비교하여 IF군에서는 8.4%, $\frac{1}{2}\text{IF}$ 군에서는 7.1% 높았으며, 체중당 척추 골밀도는 Casein군과 비교하여 IF군이 13.1% 높았고 $\frac{1}{2}\text{IF}$ 군은 7.8% 유의적으로 높았다. 체중당 대퇴 골밀도는 IF군이 Casein군과 비교하여 9.5%, $\frac{1}{2}\text{IF}$ 군보다는 7.0% 유의적으로 높게 나타났다. 골밀도에 대한 이소플라본의 효과는 척추 골밀도에서 더 높게 나타나 선행연구 결과와 일치하였다.²⁵⁾ 그러나 본 연구에서는 척추 골밀도에 이소플라본이 미치는 영향이 9주째에 유의적으로 높게 나타난 것과 달리 선행연구에서는 실험 3주째와 6주째에 이소플라본이 풍부한 콩단백질군의 척추 골밀도가 유의적으로 높게 나타나 이소플라본의 생리적 기능 외에 콩단백질의 다른 성분들이 골밀도에 같이 작용하여 효과에 차이가 나타난 것으로 유추되나 추후 연구가 필요한 것으로 보인다. 이소플라본 첨가수준에 따라서는 척추 골밀도에서 유의적인 차이가 없었고 체중당 척추 골밀도에서는 이소플라본 첨가수준이 낮은 $\frac{1}{2}\text{IF}$ 군이 Casein군과 유의적인 차이를 보이지 않고 첨가수준이 높은 IF군에서만 유의적인 증가를 나타내어 첨가수준이 높은 경우에 더 유리한 것으로 나타났다. 또한 체중당 대퇴골에서는 본 연

Table 8. Effects of isoflavones supplementation on femur bone mineral density and bone mineral content in 6 weeks after feeding

Femur BMD & BMC	Casein	$\frac{1}{2}\text{IF}$	IF
Femur BMD (g/cm^2)	$0.1737 \pm 0.0114^{1)}$	0.1668 ± 0.018	0.1753 ± 0.0072
Femur BMD (g/cm^2) / wt (kg)	0.76 ± 0.0935	0.77 ± 0.0910	0.81 ± 0.0595
Femur BMC (g)	0.2903 ± 0.012	0.2818 ± 0.029	0.2948 ± 0.015
Femur BMC (g) / wt (kg)	1.38 ± 0.1319	1.30 ± 0.1447	1.42 ± 0.0868

¹⁾Mean \pm SD

Table 9. Effects of isoflavones supplementation on femur bone mineral density and bone mineral content in 9 weeks after feeding

Femur BMD & BMC	Casein	$\frac{1}{2}\text{IF}$	IF
Femur BMD (g/cm^2)	$0.2046 \pm 0.070^{1)}$	0.2098 ± 0.0112	0.2106 ± 0.082
Femur BMD (g/cm^2) / wt (kg)	$0.84 \pm 0.03^{2)}$	0.86 ± 0.07^a	0.92 ± 0.04^b
Femur BMC (g)	0.3797 ± 0.0265	0.3943 ± 0.0273	0.3824 ± 0.0294
Femur BMC (g) / wt (kg)	1.55 ± 0.08^a	1.63 ± 0.04^b	1.68 ± 0.06^b

¹⁾Mean \pm SD

²⁾Values with different superscripts within the row are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

구와 선행연구 모두 실험 9주째에 유의적인 골밀도 증가 효과를 나타내어 선행 연구결과와 같은 결과를 보였다.²⁵⁾

그러나 $\frac{1}{2}$ IF군의 경우는 IF군과 달리 실험 3주, 6주, 9주째 모두 대조군에 비하여 체중당 척추 골밀도와 체중당 대퇴 골밀도에서 유의적인 차이를 나타내지 않아 이소플라본 섭취수준에 따라 이소플라본이 골대사에 미치는 효과는 다르게 나타났음을 알 수 있었다.

폐경 여성을 대상으로 두 가지 수준의 이소플라본 (56 mg/day와 90 mg/day)을 6개월간 섭취케 하여 대조군과 비교한 연구에서는 저농도의 이소플라본을 섭취한 군은 유의적인 효과가 없었으나, 고농도의 이소플라본을 섭취한 군에서만 척추 골밀도가 유의적으로 2.5% 증가하여 이소플라본을 많이 함유하는 경우에만 척추 골손실을 방지할 수 있다고 하였는데 이러한 결과를 바탕으로 이소플라본은 골격부위에 대한 반응이 다를 뿐만 아니라 이소플라본의 섭취량에 의존적 효과를 보고하였다.³⁶⁾ 이런 결과는 다른 선행연구에서도 볼 수 있었는데, 정소제거 쥐의 경우에도 대퇴 골밀도는 저수준의 0.4 mg/day genistein의 공급으로는 유의적인 영향이 없었으나 고수준의 0.8 mg/day genistein은 유의적으로 골손실을 방지하였는데 이는 성선기 능저하증 (hypogonadism)을 가진 수컷 쥐에서도 골량을 유지하는데 이소플라본의 적정 섭취가 유익하다는 것을 제시한 것이다.³⁷⁾ 본 연구 결과에서는 9주째 척추 골밀도에서 Casein군보다 이소플라본을 첨가한 군의 골밀도가 유의적으로 높았지만, 이소플라본 첨가수준에 따른 차이는 나타나지 않았다. 그러나 체중을 고려하여 체중당 척추 골밀도와 체중당 대퇴 골밀도를 비교하였을 때 첨가수준이 선행연구의 50% 수준인 $\frac{1}{2}$ IF군일 때는 유의적인 차이가 없었으나 IF군은 유의적으로 높게 나타나 이소플라본의 량은 콩단백질 20%의 섭취 수준으로 섭취하는 것이 유리한 것으로 보여진다.

Anderson 등¹⁹⁾은 genistein과 daidzein 등의 이소플라본은 적정량으로 공급하였을 때 골 조직에 가장 유익한 영향을 나타낸다고 결론지었다. In vivo 연구에서 적정 공급 수준 범위보다 더 낮거나 더 높을 때에는 이소플라본의 골격에 대한 유익한 효과가 덜하여 이소플라본은 이중성 효과를 나타낸다고 추론하였다. 일반적으로 대부분에서 유리한 이소플라본과 그 제품은 동물과 사람에 의해 적정 수준으로 섭취될 때는 약한 에스트로겐 특성인 agonist로 작용하지만 매우 높은 양에서는 antagonist로 작용하여 해로운 효과가 나타날 수 있으므로 골질량을 향상시키거나 유지시키는 효과를 위해서 사람에서 적정량 섭취가 요구된다고 제시하였다. 난소절제 쥐를 대상으로 한 연구¹²⁾에서 1일

이소플라본을 체중당 20, 40, 80 mg 수준으로 91일간 공급하였을 때 대퇴 (total femur) 골밀도는 이소플라본을 첨가한 세 수준 (체중 당 20, 40, 80 mg) 모두가 대조군보다 유의적으로 높았고 심지어 위장절제군 (sham)과 같은 수준에 도달한 값을 나타내었다. 특히 대퇴골의 괴질골이 풍부한 골간 (diaphysis) 부위 골밀도는 20 mg과 40 mg군에서 대조군보다 유의적으로 높았고 해면골인 주된 골단 (metaphysis) 부위는 40 mg과 80 mg군에서 대조군보다 유의적으로 높아 골의 부위에 따른 이소플라본 첨가수준의 영향이 다르게 나타났다고 보고하였다.¹²⁾ Deyhim 등²¹⁾은 난소절제 쥐를 대상으로 40일간 이소플라본 0.96 mg/day와 1.92 mg/day을 공급시켰으나 두 수준의 실험군 모두에서 대조군과 비교하여 골밀도에 영향이 없었다고 보고하였는데, 이 량은 난소절제 쥐에서 골손실 지연에 미치는 량으로 너무 작은 량이라고 보여진다.

콩단백질을 20% 수준으로 섭취할 때 자연적으로 첨가되는 이소플라본 량의 50, 100% 수준의 식이를 공급한 본 연구결과 척추 골밀도는 첨가수준에 관계없이 이소플라본을 첨가한 군 모두 유의적으로 높게 나타났고 골밀도를 체중으로 나눈 체중 당 척추골밀도는 이소플라본의 첨가량이 낮은 $\frac{1}{2}$ IF군은 Casein군과 유의적인 차이가 없었고 IF 군이 유의적으로 높은 값을 나타내었으며 또 체중 당 대퇴 골밀도도 IF군에서만 유의적으로 높게 나타났다. 체중 당 대퇴 골함량에 있어서는 이소플라본을 첨가한 군 모두 Casein군보다 유의적인 증가를 보였고 첨가수준에 따른 차이는 없었다. 즉 성장기 쥐에서 $\frac{1}{2}$ IF군의 경우 척추 골밀도와 체중당 척추골함량, 체중당 대퇴 골함량이 IF군과 같이 유의적인 증가를 보여서 유리한 것으로 나타났으나 체중당 척추 골밀도와 체중당 대퇴골밀도는 IF군이 $\frac{1}{2}$ IF군보다도 유의적으로 높게 나타나 IF군이 더 유리한 것으로 나타났다.

이러한 결과를 바탕으로 선행연구에서^{23,25,26,32)} 성장기 쥐에서 골밀도에 유익한 영향을 미쳤다고 보고한 이소플라본 수준인 즉, IF군은 선행연구의 절반수준인 $\frac{1}{2}$ IF군보다 골밀도에 더 유리한 것으로 나타났다. 그러나 $\frac{1}{2}$ IF군은 IF군보다 약하지만 대조군보다 골밀도에 유익하게 나타나서 이소플라본 수준의 증가는 골밀도 증가와 비례하는지 IF군보다 더 많은 량의 이소플라본을 성장기 쥐에게 섭취시켜 그 효과를 알아볼 필요가 있다고 사료된다. 그리고 성장기는 여성호르몬이 분비되는 시기이고 골대사가 활발히 이루어지는 시기이므로 최대 골형성을 위하여 다양한 이소플라본의 섭취수준에 따라 골밀도에 미치는 영향에 대한 후속 연구가 요망된다.

요약 및 결론

성장기 암컷 쥐를 대상으로 이소플라본 첨가수준에 따라 척추와 대퇴 골밀도 및 골함량에 미치는 영향을 알아보기 위해 9주간 수행된 연구 결과를 요약하면 다음과 같다.

- 1) 체중증가량, 식이섭취량, 식이효율은 이소플라본 첨가량에 따라 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다.
- 2) 혈청 칼슘과 인의 농도, 요 중 칼슘과 인의 배설량은 이소플라본 섭취수준에 따라 실험 군 간에 유의적인 차이가 없었다.
- 3) 척추와 대퇴 골밀도 및 골함량은 실험 3주와 실험 6주에는 실험군 간에 유의적인 차이가 없었으나 IF군이 높은 경향을 유지하였다.
- 4) 척추 골밀도, 체중당 척추 골함량은 실험 9주에 이소플라본을 첨가한 $\frac{1}{2}$ IF군과 IF군이 Casein군보다 유의적으로 높았으나, 이소플라본 섭취수준에 따른 차이는 없었으며 체중당 척추 골밀도는 IF군이 $\frac{1}{2}$ IF군과 Casein군보다 유의적으로 높게 나타났다.
- 5) 체중당 대퇴 골밀도는 실험 9주에 IF군이 $\frac{1}{2}$ IF군과 Casein군보다 유의적으로 높았고 체 중당 대퇴 골함량은 $\frac{1}{2}$ IF군과 IF군이 Casein군보다 유의적으로 높았으나 이소플라본 섭취수준에 따른 차이는 없었다.

결론적으로 성장기 암컷 쥐에서 이소플라본을 섭취수준에 따라 9주간 섭취시킨 경우 $\frac{1}{2}$ IF군은 척추 골밀도, 체중당 척추 및 대퇴 골함량에서 대조군인 Casein군보다 유리하였고, IF군은 척추 골밀도와 체중당 척추 및 대퇴 골밀도에서 Casein군 및 $\frac{1}{2}$ IF군보다 유의적으로 높아 성장기 암컷 쥐에서 IF군이 척추와 대퇴 골밀도에 더 유익한 것으로 나타났다.

Literature cited

- 1) NIH Consensus Conference. Osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. *JAMA* 285: 785-795, 2001
- 2) Messina M. Soyfood, soybean isoflavones and bone health. *Korean Soybean Digest* 15: 122-136, 1998
- 3) Arjmandi BH, Birnbaum R, Goyal NV, Getlinger MJ, Juma S, Alekel L, Hasler CM, Drum ML, Hollis BW, Kukreja SC. Bone-sparing effect of soy protein in ovarian hormone-deficient rats is related to its isoflavone content. *Am J Clin Nutr* 68 (suppl): 1364s-1368s, 1998
- 4) Omi N, Aoi S, Murata K, Wzawa I. Evaluation of the effect of soybean milk and soybean milk peptides on bone metabolism in the rat model with ovariectomized osteoporosis. *J Nutr Sci Vitaminol* 40: 201-211, 1994
- 5) Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Nutr* 126: 161-167, 1996
- 6) Arjmandi BH, Birnbaum R, Goyal NV. Bone-sparing effect of soy protein in ovarian hormone-deficient rats is related to its isoflavone content. *Am J Clin Nutr* 68: 1364-1368, 1998
- 7) Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z. The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporosis Int* 8: 274-281, 1998
- 8) Ishida H, Uesugi T, Hirai K. Preventive effects of the plant isoflavones, daidzin and genistin, on bone loss in ovariectomized rats fed a calcium-deficient diet. *Biol Pharm Bull* 21: 62-66, 1998
- 9) Horiuchi T, Onouchi T, Takahashi M, Ito H, Orimo H. Effect of soy protein on bone metabolism in postmenopausal women. *Osteoporosis Int* 11: 721-724, 2000
- 10) Atkinson C, Compston JE, Day NE, Dowsett M, Bingham SA. The effects of phytoestrogen isoflavones on bone density in women: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr* 79: 326-333, 2004
- 11) Chen YM, Ho SC, Lam SSH, Ho SSS, Woo SLF. Soy isoflavones have a favorable effect on bone loss in Chinese postmenopausal women with lower bone mass: A double-blind, randomized, controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 88(10): 4740-4747, 2003
- 12) Picherit C, Chanteranne B, Pelissero CB, Davicco MJ, Lebecque P, Barlet JP, Coxam V. Does-dependent bone-sparing effects of dietary isoflavones in the ovariectomized rats. *British Journal of Nutrition* 85: 307-316, 2001
- 13) Picherit C, Bennetau-Pelissero C, Chanteranne B, Lebecque P, Cavicco 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
- 14) Kardinaal AF, Morton MS, Bruggermann-Rotgans IE, Beresteijn EC. Phyto-oestrogen excretion and rate of bone loss in postmenopausal women. *European Journal of Clinical Nutrition* 52 (11) 850-855, 1998
- 15) Nagata C, Shimizu H, Takami R, Hayashi M, Takeda N, Yasuda K. Soy product intake and serum isoflavonoid and estradiol concentrations in relation to bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Osteoporosis Int* 13 (3): 200-204, 2002
- 16) Mei J, Yeung SSC, Kung AWC. High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5217-5221, 2001
- 17) Somekawa Y, Chiguchi M, Ishibashi T, Aso T. Soy intake related to menopausal symptoms, serum lipids, and bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Obstet Gynecol* 97 (1): 109-115, 2001
- 18) Greendale GA, Fitzgerald G, Huang MH, Sternfeld B, Gold E, Seeman T, Sherman S, Sowers M. Dietary soy isoflavones and bone mineral density: Results from the study of women's health across the nation. *Am J Epidemiol* 155: 746-754, 2002
- 19) Anderson JJB, Garner SC. The effects of phytoestrogens on bone. *Nutrition Research* 17 (10): 1617-1632, 1997

- 20) Anderson JJ, Ambrose WW, Garner SC. Biphasic effects of genistein on bone tissue in the ovariectomized, lactating rat model. *Proc Soc Exp Biol Med* 217: 345-350, 1998
- 21) Deyhim F, Stoecker BJ, Brusewitz GH, Arjmandi BH. The effects of estrogen depletion and isoflavone on bone metabolism in rats. *Nutrition Research* 23: 123-130, 2003
- 22) Cassidy A, Bingham S, Setchell KD. Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on menstrual cycle of premenopausal women. *Am J Clin Nutr* 60: 333-340, 1994
- 23) Choi MJ. Effects of soy protein on bone mineral content and bone mineral density in growing male rats. *Korean J Nutr* 35 (4): 409-413, 2002
- 24) Choi MJ, Chae JH. The effect of isoflavone supplementation on bone mineral density and bone mineral content in growing male rats. *Korean J Nutr* 38 (5): 373-379, 2005
- 25) Choi MJ, Jo HJ. Effects of soy protein and isoflavones on bone mineral density in growing female rat. *Korean J Nutr* 36 (4): 59-367, 2003
- 26) Jo HJ. The effects of soy protein and soy isoflavones on bone and lipid metabolism in growing female rats. Dissertation of Ph. D., Keimyung University, Daegu, 2002
- 27) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents. *J Nutr* 123: 1939-1951, 1993
- 28) Anderegg G, Flaschka H, Sallmann R, Schwarzenboch G. Metal indicators. *Helvet Chem Acta* 37: 111-120, 1954
- 29) Daly JA, Erttings HG. Direct method for determine inorganic phosphate in serum with the centrifichem. *Clin Chem* 18: 263-265, 1972
- 30) Lee YS. Introduction of experimental animal study. Charoon, pp.126-127, Seoul, 2000
- 31) 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 glycitein. *Biol Pharm Bull* 24 (4): 368-372, 2001
- 32) Choi MJ. Effects of level of calcium and isoflavones on bone mineral density in growing female rats. 2003 The Korean Nutrition Society Annual meeting and symposium, Abstract, 2003
- 33) Kim MS. Beneficial effect of soy isoflavone on bone loss and hyperlipidemia in ovariectomized rats. Dissertation of Ph. D., Seoul National University, Seoul, 1999
- 34) Arjmandi BH, Khalil DA, Hollis BW. Soy protein: Effects on intestinal calcium transport, serum vitamin D, and insulin-like growth factor-I in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 70 (6): 483-487, 2002
- 35) Murkies AL, Wilcox G, Davis SR. Phytoestrogen. *J Clin Endocrinol Metab* 83 (2): 297-303, 1998
- 36) Potter SM, Baum JA, Teng H, Stillman RJ, Shay NF, Erdman JJW. Soy protein and isoflavones: Their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 68 (suppl): 1375s-1379s, 1998
- 37) Wu J, Wang XX, Chiba H, Higuchi M, Takasaki M, Ohta A, Ishimi Y. Combined intervention of exercise and genistein prevented androgen deficiency-induced bone loss in mice. *J Appl Physiol* 94: 335-342, 2003