난소 절제한 흰쥐에서 도라지 추출물이 골 대사에 미치는 영향

김미향*

신라대학교 식품영양학과

Effect of *Platycodon Grandiflorum* A. Extract in Bone Metabolism in Ovariectomized Rats

Mihyang Kim*

Department of Food and Nutrition, Silla University

Osteoporosis is one of the major health problem affecting postmenopausal women. Estrogen deficiency results in an increase in bone turnover, lead to bone resorption and an increase risk of fracture. The aim of this study was to evaluate the effects of *Platycodon grandiflorum* A. extract (PG) in bone metabolism in ovariectomized estrogen-deficient rats. Two groups were surgically ovariectomized (OVX). The third group was sham operated. Sprague-Dawley female rats were randomly assigned to the following groups : sham-operated rats (Sham), ovariectomized control rats (OVX-control), ovariectomized rats supplemented with PG at 50mg/kg body wt (OVX-PG50) The *Platycodon grandiflorum* extracts were orally administrated at 1mL per day. The ovariectomy caused a decreasing in the levels of collagen content in bone, cartilage and skin tissues. However PG group, supplementation with *Platycodon grandiflorum* extract, were increased the level of collagen content in bone, cartilage and skin tissues than OVX-control group. PG group had a higher content of pyridinoline in collagen than OVX-control group. Alkaline phosphatase activity on serum were decreased after supplemented with the PG extract. These results might be expected that *Platycodon grandiflorum* is believed to be possible protective effects in postmenopausal bone loss.

Key words : *Platycodon grandiflorum* A., bone loss, collagen, ALP, pyridinoline, ovariectomized rats

서 론

도라지(길경, Platycodon grandiflorum A. DC)는 초롱과(Campanulaceae)에 속하는 다년생초로서 한국을 비롯한 중국, 일본 등지에 자생하며, 배농, 거담, 기관지염, 천식 등의 호흡기계질환에 사용되어온 생약재로서 도라지가 배합되어 있는 한방처방 수는 동의보감에 273건, 방약합편에 49건이 수록되어 있을 정도로 다양한 약리작용을 가지고 있다[1,2]. 도라지의 약리 성분에 대한 연구는 Akiyama 등[3]이 platycodigenin을 분리함으로써 도라지에 대한 관심이 고조되었으며, 그 후 platycodigenin I, platycodigenic acid A, B, C 등의 구조가 규명되었는데 이들은 triterpenoid계 saponin으로 밝혀졌으며, 또 betulin과 α-spinasterol의 존재도 보고된 바 있다[4]. 동물실험에서 이 물질은 진해, 거담작용, 중추신경억제작용(진정, 진통, 해열효과), 급만성 염증에 대한 항염증작용, 항궤양 및 위액분비억제작용, 혈관을 확장하여 혈압을 낮추는 항콜린작용, 혈당강하작용, 콜레스테롤 대사 개선작용 등이 있는 것으로 밝혀졌다[5-7]. 이외에 도라지의 열수 및 에탄올 추출물은 곰팡이의 아프라톡신을 억제하며, 이눌린 분획은 식균작용과 고형암 및 복수암에 대한 강력한 항종양 효능이 규명된 바 있으며, 산성 체질을 개선해 주며 노화 방지 및 항 돌연변이성 효과 등에 관해서도 연구, 발표되고 있다[8-10].

과학과 문명의 발달로 점차 인간의 평균 수명이 연장되어 노년층 인구의 증가와 함께 중년이후의 삶이 길어지고 있고, 실질적으로 현대 여성의 삶 중에서 1/3을 폐경전후로 오는 갱년기를 보내게 되므로 이 시기의 삶의 질을 향상시키기 위한 노력들이 이루어지고 있다[11,12]. 폐경이 진행되는 여성은 골 대사 이상에 따른 골다공증에 대한 문제가 대두되고 있다. 골다공증은 동일 연령과 성별의 정상인에 비해 골 량이 현저히 감소된 상태로 골

* 교신저자 : 김미향, 부산시 사상구 괘법동 산 1-1 신라대학교 식품영양학과
· E-mail : mihkim@silla.ac.kr, · Tel : 051-999-5620
· 접수 : 2007/11/07 · 채택 : 2008/01/27

의 구성성분의 양적감소를 주 병변으로 하는 대사성 골 질환이다[13]. Riggs와 Melton 등은 50세 이후의 골다공증을 제 1형 (폐경기성) 골다공증과 제 2형(노인성) 골다공증으로 분류하였다[14]. Estrogen 결핍에 의한 골다공증은 골절이 쉽게 일어날 수 있는 조건이 되며 이 경우의 estrogen투여는 골의 무기질 성분의 증가와 함께 교원섬유의 조성에도 영향을 미쳐서 골절의 예방효과를 지닌다고 보고되고 있다[15,16]. 노령화 현상과 더불어 조직 실질세포 수는 감소하고 그 결과 고령기에 대부분의 조직 중량이 감소한다[17]. 이러한 감소현상은 심장, 폐, 뇌와 같이 개체의 생명유지에 직접 관계하는 조직보다는 골, 연골, 골격근, 피부 등 개체의 생활 활동에 중요한 역할을 하는 조직에 현저하다. 연골 또는 골 등의 결합조직을 구성하고 있는 collagen은 연령과 함께 변화하며, 특히 collagen 가교 형성은 결합조직의 강도를 유지하기 위하여 필요하다[18-22]. 피부 섬유아세포 중의 collagen은 estrogen에 의하여 생성량이 증가한다는 연구보고도 있으나[23], 연령과 함께 나타나는 골기질량의 감소와 collagen 변화에 관해서는 불명확한 점이 많다. 또한 골다공증 및 연골조직의 노화 골관절염 병인에 연골조직의 collagen이 손상되고, 피부의 collagen에 영향을 받으며 난소 절제 시 collagen구조가 비정상적으로 변한다고도 보고되고 있다[24,25]. collagen의 성숙한 가교물질인 pyridinoline과 deoxypyridinoline은 파골세포에 의한 골질 파괴시 소변으로 유리되어 배설되며 이들은 골과 연골에 주로 존재하기 때문에 이는 골 대사 변질, bone cancer, 골다공증과 같은 각가지 병리행태에서 골분해의 평가를 위한 확실한 biomaker로서 임상에 이용되고 있다[26].

본 실험에 사용된 실험 model인 흰쥐의 난소절제 시술은 혈중 estrogen농도를 감소시키는 갱년기 장애유발의 대표적인 방법으로서 골다공증 및 여성의 심혈관계 질환의 연구에서 광범위하게 이용되고 있다[27]. 본 연구는 난소를 절제하여 갱년기 장애를 유도한 흰쥐에 도라지를 투여함으로써 난소절제에 의한 estrogen결핍에서 발생되는 혈 중 alkaline phosphatase, 골 중 주요 단백질인 collagen 함량 변화 및 골다공증의 biomaker인 pyridinoline 및 deoxypyridinoline 함량 변화에 미치는 영향을 집중적으로 검토하였다.

재료 및 방법

1. 시료 제조방법

본 실험에 사용한 도라지(안동)는 부산시 엄궁동 농수산물 시장에서 구입하여(2003년) 수세, 정선 및 탈수과정을 거쳐서 동결 건조하여 분말화 하였다. 건조시료에 80% 에탄올을 가해 2회 추출하여 감압농축기로 농축한 후 동결 건조하여 에탄올 추출물로 동물실험에 사용하였다.

2. 실험동물

실험동물은 체중이 평균 180 g되는 Sparaque-dawley 계 암컷 흰쥐를 효창사이언스(대구)로부터 구입하여 본 실험실에서 고형사료(삼양유지)로 사육하였고, 실험 시작 1주일 동안 대조군 식이로 적응시킨 후 동물의 체중에 따라 3군으로 나누었다. 즉 실험동물은 난소절제 대조군(OVX-control), 난소절제 없이 절개부분을 봉합한 군(Sham), 난소절제 후 도라지 추출물 50 mg/kg 투여군 (OVX-PG50)으로 나누어 실험하였다(Table 1).

체중은 실험 사육 기간 중에 격일로 일정 시간에 측정하고, 식이 섭취량은 매일 식이 잔량을 측정하여 산출하였다. 동물 실험실의 사육조건은 온도 24±2℃, 습도 55~60%을 유지 시키며 물과 식이는 자유 공급하였고, 실험시료는 증류수로 용해하여 매일 1 mL씩 6주간 경구 투여 하였고, 대조군은 동일 용량의 증류수를 투여하였다.

Table 1. Experimental design of animals.

Group (No.)	Treatment
Sham (8)	operated rats
OVX-control (8)	ovariectomized rats
OVX-PG50 (8)	ovariectomized rats supplemented *Platycodon grandiflorum* A. ethanol extracts at 50mg/kg bw/day

3. 난소절제시술

1주일 동안 주위환경에 적응시켜 난괴법에 의해 군을 나누어 난소 절제 수술을 실시하였다. 수술은 ether 마취 후 심마취기에 이르면 늑골하부를 절개하여 난소를 제거하고 절개 부는 봉합하였다. 시술 후 3일부터 매일 도라지 시료를 경구 투여 하였다.

4. 혈액 채취 및 장기 적출

혈액은 실험동물을 해부 전 24시간 절식 시킨 후 ether 마취하에서 개복한 후 대동맥에서 채취하였고, 혈청 중의 효소활성 및 지질 농도는 실온에서 한 시간 방치 후 3,000 rpm, 4℃에서 10분간 원심분리 하여 분석하였다. 늑골과 연골은 경계면에서 분리하였으며 피부는 털과 표피위의 지방을 제거하여 실험 시 까지 -70℃에서 보관하였다.

5. 혈청 중의 Alkaline phosphatase 분석

혈 중 Alkaline phosphatase(ALP) 활성은 분리한 혈청을 자동 측정용 slide (FU-JI FILM, Japan)를 이용하여 Dry chemistry analyzer 3500i (Fuji, Japan)로 측정하였다.

6. Collagen 함량분석

적출한 결합 조직 골, 연골, 피부는 6N HCl 10 mL을 첨가하여 110℃에서 20시간 가수분해한 후 여과 농축하여 증류수로 5배 희석한 후 시료용액으로 하였다. 결합조직의 collagen 함량은 Woessner법을 변형하여 분석하였다. Hydroxyproline의 정량분석을 위해 조제한 sample을 다시 증류수로 일정량 희석한 후 실험에 사용하였다. 반응액은 UV visible spectroscopy를 이용하여 흡광도 560 nm에서 측정하였다. 표준 곡선을 이용하여 hydroxyproline양을 구한 다음 collagen 함량으로 환산하였다. Collagen의 아미노산 조성으로부터 collagen 중의 hydroxyproline 비율은 평균 110잔기/1000잔기이므로 collagen 양의 환산은 일반적으로 다음 식에 준한다.

collagen (ug) = 9.09 × hydroxyproline (ug)

7. Pyridinoline/ Deoxypyridinoline (PYD/ DPD) 함량분석

Collagen 중의 가교물질인 pyridinoline 함량 측정은 위의 방법에서 얻어진 collagen분석시료를 HPLC를 이용하여 행하였다.

HPLC 분석 조건은 Table 2과 같고, 결과에 관한 분석은 standard의 peak를 이용하여 PYD/DPD의 peak를 파악 한 후 standard area% 농도와 시료의 area%농도를 계산하여 PYD/collagen, DPD/collagen 으로 나타내었다.

Table 2. Instrumental conditions for pyridinoline analysis by high performance liquid chromatography.

Item	Conditions
Apparatus	Nanospace SI-2
Detector	Fluorescence HPLC RF
Column	Inertsil ODS-25um (250×4.6mm id)
Eluent	Acetonitrile/ 0.1M Sodium phophate buffer pH3.5 (25:75) containing SDS and Na_2EDTA
Flow Rate	0.5 mL/min
Excitation Wavelength	295 nm
Emission Wavelength	395 nm

8. 통계처리

본 실험에 대한 모든 실험의 결과는 mean±SD치로 나타내었고, 실험군 간의 유의성은 ANOVA로 검증한 후, a=0.05수준에서 Scheffe법, Bonferroni법으로 다중비교 하였다.

결과 및 고찰

1. 식이 섭취량, 체중 증가량 및 장기의 중량

Table 3은 실험기간 동안 실험동물의 체중 증가량 및 식이효율을 나타낸 것이다. 난소 절제에 의한 estrogen 분비감소가 체중 증가를 가져온 여러 보고와 마찬가지로[28-30] 본 실험에서도 난소를 절제한 OVX-control이 난소를 절제하지 않은 Sham군에 비해 체중이 증가하였다. 일반적으로 난소절제로 인한 estrogen 분비 부족은 지방조직의 지 단백 리파아제(lipoprotein lipase)의 활성을 저하시키고 호르몬 민감성 리파아제(hormone sensitive lipase) 활성을 증가시켜 체 지방 축적을 억제한다고 알려져 있다[31,32]. OVX-control이 Sham 군에 비해 체중이 증가하는 것은 여성호르몬 부족으로 인한 체내 지방조직의 증가에 의한 것이며, 또한 지방조직에서도 여성호르몬을 생성 할 수 있는 기능을 갖고 있기 때문에, 지방조직에서 난소의 기능을 대체 하고자 하는 체내의 비상대책으로 여겨진다. 난소 절제 후 도라지를 투여한 군에서 Sham군과 비교해 높은 체중 증가량 나타내어 도라지 추출물이 체중감소에는 크게 영향을 미치지 않았다.

Table 3. The body weight gain, food intake and food efficiency ratio on supplementation of *Platycodon grandiflorum* A. ethanol extracts diets for 6 weeks.

Group[1]	Final body weight (g)	Body Weight gain(g/day)	Food intake (g/day)	Food efficiency ratio(FER)[3]
Sham	288.61±13.24[2]	0.59±6.41	16.21±6.43	0.03±0.01
OVX-control	310.14±12.40	1.02±13.32	16.63±8.39	0.06±0.02
OVX-PG50	301.35±9.84	2.39±4.37	19.37±9.20	0.12±0.04

1) Refer to comment in Table 1. 2) All values are means±SD. 3) FER :weight gain (g/day) /food intake (g/day). Values are not significantly different among treatment groups.

2. 혈 중 Alkaline phosphatase 함량 변화

Alkaline phosphatase (ALP)는 phosphomonoesterase, phosphodiesterase, phosphoric anhydrase 등으로 분류할 수 있는데 phosphomonoesterase의 경우 십이지장이나 장의 점막에 상당히 많은 양이 있으나 신장, 고등생물의 선(grand), 뼈, 정상적인 혈액에서는 적은 농도로 존재하고 있다. 따라서 이러한 정상적인 조직에서 이상이 생기거나 osteocarcoma의 경우 혈청 내에서 ALP가 증가하게 된다[33-37]. Fig. 1은 도라지 추출물이 혈청 ALP함량에 미치는 영향을 나타내었다. 난소를 절제한 군이 난소를 절제하지 않은 군에 비해 혈청 중의 ALP활성이 높아지는 경향을 나타내었고, 난소 절제 후 도라지 추출물의 투여로 인해 Sham군보다 유의적으로 감소하였다. ALP는 조골 대사와 관련이 깊은 것으로 대사성 골 질환 등 골 대사 회전이 빠를 때, 즉 골격 형성 시 조골 세포의 활동이 증가하여 골 교체율이 빠를 때 혈장 내에서의 농도가 증가한다[38]. OVX-control 군에 비해 도라지 투여군의 ALP 활성이 낮아져 앞으로 폐경 후 골 대사에 유익한 효과가 기대된다.

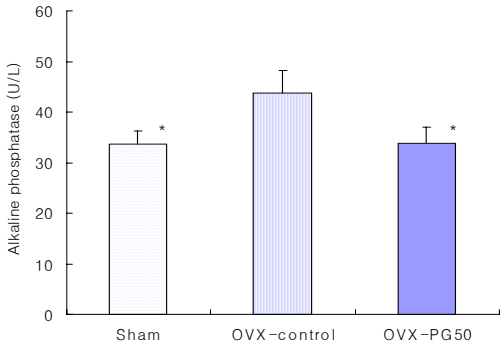

Fig 1. Effect of *Platycodon grandiflorum* A. ethanol extract on serum alkalime phophatase activities in ovariectomized rats. * Significantly different from ovariectomized group : *a=0.05.

3. 결합 조직 중의 collagen 함량

Collagen은 인체 각 결합조직에 분포하는 중요한 단백질로서 골의 nonlinear부분은 주로 type Ⅰ collagen으로 이루어져있고[39], 피부 섬유아세포 중의 collagen은 estrogen에 의하여 생성량이 증가한다고 알려져 있으며[40], 조직 내의 collagen의 손상은 연골 조직의 노화와 골 관절염, 골다공증 병인의 원인이 된다고 한다[25]. 따라서 본 연구에서는 난소절제로 인하여 호르몬 분비가 중지되었을 때 collagen 생성 변화에 있어 도라지 추출물이 어떠한 영향을 주는지 검토하였다(Table 4).

Table 4. Effect of *Platycodon grandiflorum* A. ethanol extract on collagen content in cartilage, bone and skin of ovariectomized rats.

Group[1]	Cartilage (mg/g)	Bone (mg/g)	Skin (mg/g)
Sham	141.01±18.06[2]	167.64±12.13	192.37±21.82
OVX-control	128.40±8.83	157.77±14.77	165.05±4.38
OVX-PG50	145.59±17.55*	170.34±9.79	192.12±39.36

1) Refer to comment in Table 1. 2) Values are means±SD. * Significantly different from ovariectomized group : *a=0.05.

연골의 경우 난소를 절제하지 않은 Sham군에 비해 난소를

절제한 OVX-control군은 collagen 함량이 감소하였으나, 난소 절제 후 도라지 추출물 투여함으로써 유의성 있게 증가하는 경향을 나타내었다(a=0.05). 골 조직에서는 난소를 절제한 OVX-control군이 난소를 절제하지 않은 Sham군에 비해 collagen 함량이 감소하는 경향을 나타내었다.

Estrogen의 투여는 폐경 후의 여성에서 빈발하는 골다공증에 대한 치료적 요법으로서 골 손실의 억제에 효과적인 것으로 알려져 있다[41]. 본 연구 결과에서 난소절제로 인한 collagen 합성의 감소가 도라지 추출물의 투여에 의해 회복되어 estrogen 부족으로 인한 골 손실에 도라지가 유익한 효과를 가지는 것으로 추측된다.

4. Collagen 성숙가교인 Pyridinoline 함량

Hydroxylisine은 collagen내의 다른 아미노산에 비해 양적으로 적으나 collagen 특유의 아미노산으로 존재하고 있으며, collagen합성의 최종단계인 섬유의 숙성 즉, 가교의 형성에 중요한 역할을 하는 아미노산이며. hydroxylysine에서 파생된 pyridinoline은 collagen 성숙가교 물질로써 골대사의 지표로 이용되고 있다[42].

Pyridinoline과 deoxypyridinoline은 골과 연골에 주로 존재하기 때문에 파골세포에 의한 골질 파괴 시 소변으로 유리되는 성질을 가지고 있으며, 이는 골대사의 변질, bone cancer, 골다공증과 같은 각가지의 병리형태에서 골 분해의 평가를 위한 biomaker로서 임상에 이용되고 있다[26].

Table 5는 골 및 연골의 collagen 중의 pyridinoline 함량을 나타낸 것이다. 연골 중의 pyridinoline함량은 차이가 없는 반면, 골에서 pyridinoline 함량은 난소를 절제하지 않은 Sham군이 난소를 절제한 OVX-control군에 비해 높은 경향을 나타냈고, 난소 절제 후 도라지 추출물을 투여한 군에서 난소 절제 시 감소되는 pyridinoline 함량을 난소를 절제하지 않은 Sham군과 비슷한 수준으로 회복시키는 경향을 나타내었다.

Table 5. Effect of *Platycodon grandiflorum* A. ethanol extract on pyridinoline content in cartilage and bone of ovariectomized rats.

Group[1]	Cartilage (μg/g)	Bone (μg/g)
Sham	52.2±9.5[2]	19.4±1.5*
OVX-control	50.8±6.8	15.2±0.6
OVX-PG50	52.4±8.3	19.8±0.8*

1) Refer to comment in Table 1. 2) Values are means±SD. * Significantly different from ovariectomized group : *a=0.05.

Table 6의 연골 중 deoxypyridinoline 함량은 난소를 절제하지 않은 Sham군이 난소를 절제한 OVX-control군에 비해 높은 경향을 나타냈고, 골 조직의 경우 난소 절제 후 도라지 추출물을 투여한 군에서는 난소 절제 시 감소되는 deoxypyridinoline 함량을 난소를 절제하지 않은 Sham보다 오히려 높은 수준으로 회복시키는 경향을 나타내었다. 이상의 결과에서 연골의 pyridinoline 및 deoxypyridinoline은 난소절제에 의해 감소하였고, 도라지 추출물 투여에 의해 증가하여 estrogen부족으로 인한 골 손실에 도라지 추출물이 유익한 효과를 가지는 것으로 보이며, 이는 도라지 중에 함유되어 있는 phytoestrogen에 의한 것으로 추측되어 앞으로 구체적인 검토가 필요한 것으로 사료된다.

Table 6. Effect of *Platycodon grandiflorum* A. ethanol extract on deoxypyridinoline content in cartilage and bone of ovariectomized rats.

Group[1]	Cartilage (ug/g)	Bone (ug/g)
Sham	4.85±1.12[2]	10.51±3.28
OVX-control	4.41±1.28	10.49±2.86
OVX-PG50	4.45±1.78	12.24±3.32

1) Refer to comment in Table 1. 2) Values are means±SD.

요 약

여성의 폐경에 의한 estrogen의 감소는 골다공증을 유발시킨다고 알려져 있다. 최근 새로운 식품으로 각광받고 있는 도라지 추출물을 인위적 갱년기 장애를 유발시킨 흰쥐에 투여하여 혈 중 ALP활성 변화와 골 중의 collagen의 함량 및 collagen 가교물질 pyridinoline과 deoxypyridinoline 함량 변화를 측정하여 그 효과를 검토해 보았다.

도라지 추출물을 갱년기를 유도한 흰쥐에 투여하여 혈 중 ALP활성 변화에 미치는 영향을 검토한 결과 난소절제에 의하여 ALP활성이 증가하였으나, 도라지 추출물 투여한 군에서 ALP활성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 난소 절제에 의해 연골의 collagen 함량이 감소되었는데, 이는 도라지 추출물을 투여함으로써 정상적인 수치로 증가하는 경향을 나타내어 도라지 추출물이 골 대사와 관련된 골 대사 질환에 유효한 효과를 나타낼 것으로 추측된다. 또한 collagen 가교물질로써 골대사의 biomaker인 pyridinoline 및 deoxypyridinoline의 골 중의 함량은 난소절제에 의해 감소하였고, 도라지 추출물 투여에 의해 증가하여 estrogen부족으로 인한 골 손실에 도라지 추출물이 유익한 효과를 가지는 것으로 보이며, 이는 도라지 중에 함유되어 있는 phytoestrogen에 의한 것으로 추측되어 앞으로 구체적인 검토가 필요한 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 허준. 동의보감. 서울, 남산당, pp 392-486, 1981.
2. Hong, M.W. Statistical analyses of Platycodi radix prescriptions. Kor J Pharmacog 5: 61-65, 1974.
3. Akiyama, T., Tanaka, O., Shibata, S. Chemical studies on the oriental plant drugs. Chem Pharm Bull 20: 1952-1956, 1972.
4. 伊蘇己代子, 西本和光, 名取信答, 池川信夫, "生藥", 18: 16-20, 1964.
5. Tada, T., Kaneiwa, Y., Shoji, J., Shibat, S. Saponins of the root of P. grandiflorum. Isolation and the structure of platycodin D. Chem Pharm Bull 23: 2-2699, 1975.
6. Kim, K.S. Lee, B.E., Kim, K.J. Lee, Y.T., Cho, K.B., Chung, Y.C. Antitumor and immunomodulatory activities of the Platycodon grandiflorum cultivated for more than 20 years. Yakkak Hoeji 42: 382-387, 1998.
7. Lee, E. B., Pharmacological activities of crude platycodon. J

Pharm Soc Kor 19: 164-168, 1975.
8. Nagao, T., Matsuda, H., Namba, K. and Kubo, M. Immune pharmacological studies on platycodi radix II : Antitumor activity of inulin form Platycodi radix. Shoyakugaku Zasshi 40: 375-379, 1986.
9. Sung, N.K., Lee, S.J., Shin, J.H., Kee, I.S., Chung, Y.C. Effect of Platycodon grandiflorum extracts on blood glucose and lipid composition in Alloxan induced hyperglycermic rats. J Korean Soc Food Sci Nutr 25: 986-991, 1996.
10. Kim, S.Y., Kim, H.S., Kim, S.H., Kim, H.S., Su, I.S., Chung, S.Y. Effects of the feeding Platycodon grandiflorum and Codonopsis lanceolata on the fatty acid composition of serum and liver in rats 21: 517-523, 1993.
11. Kwon, S.C. Effects of continuously added oral progestin (medroxy progesterone acetate) on the levels of serum lipid and lipoprotein during estrogen replacement therapy in postmenopausal women. Korean Soc Obstetrics & Gynecology 41: 2442-2446, 1998.
12. Han, S.H. A Study on the menopausal symptoms, menopausal managementand quality of life in middle aged women. MA thesis. Ewha womon's university. 2004.
13. Lee, E.S., Kang, B.H. Biochemiccal bone markers in postmenopausal osteoporotic Women. Korean Soc. obstetrics and Gynecology 40: 1450-1457, 1997.
14. Kim, C.W. The study on Treatment of Climacteric Disorder. Osteoporosis 32: 109-136, 1996.
15. Clack A.P., Schuttinga, J.A. Targeted estrogen/proestrogen replacement therapy for osteoporosis. calculation of health care cost savings. Osteoporos Int 2: 195-200, 1992.
16. Holland E.F., Studd, J.W., Mansell, J.P. Changes in collagen composition and cross-links in bone and skin of osteoporotic postmenopausal women treated with percutaneous estradiol implant. Obstet Gynecol 83: 180-183, 1994.
17. Campos H., Wilson Peter W.F., Jimenez D., Mcnamara J.R., Ordovas J., Schaefer E.J. Differences in apolipoproteins and low density lipoprotein subfractions in postmenopausal women on and off estrogen therapy: Results from the Framingham offspring study. Metabolism 39: 1033-1038, 1990.
18. Fujimoto D., Hira M., Iwa T. Histidinoalanine, a new crosslinking amino acid in calcified tissue collagen. Biochem Biophys Res Comm 104: 1102-1106, 1982.
19. Kim M.H., Otsuka M., Arakawa N. Age-related changes in the pyridinoline content of guinea pigs cartilage and achilles tendon collagen. J Nutr Sci Vitaminol 40: 95-103, 1994.
20. Kuboki Y., Mechanic G.L. Comparative molecular distribution of cross-links in bone and dentin collagen. Calcif Tissue Int 34: 306-308, 1982.
21. Robins S.P., Bailey A.J. The chemistry of the collagen cross-links. Biochem J 163: 339-346, 1977.
22. Seigel R.C. Collagen cross-linking. JBC 251: 5786-5792, 1976.
23. Noda M., Roodon G.A. Transcriptional regulation of osteopontin pro.duction in rat osteoblast-like cells by parathyroid hormone. J Cell Biol 108: 713-718, 1989.
24. Kafantari, H. Kounadi, E. Structual alterations in rat skin and bone collagen fibrils induced by ovariectomy. Bone 26: 349-353, 2000.
25. Tiku, M.L., G.T. Allison. Malondialdehyde oxidation of cartilage collagen by chondrocytes. OsteoArthritis Reaserch Soc Int 11: 159-166, 2003.
26. Kim, J.G., H.D. Chae. Urinary excretion of pyridinoline crosslink in postmenopausal wamen and wamen with premature ovarian Failure. Korean Journal of Obstetrics and Gynecology 38: 2090-2096, 1995.
27. Kang B.K., Hwang S.J., Paik D.J, Kim J.K., Chung H.S. A morphological study in ossification of callus after rib fracture in ovariectomized and estrogen-retreated rats. Hanyang J Med, 17: 82-91, 1997.
28. Abe, T., Chow, J.W.M., Lean, J.M., Chambers, T.J. Estrogen does not restore bone list after ovariectomy in the rat. J. Bone Miner. Res., 8: 831-838, 1993.
29. Aitken, J.M, Armstrong, E., Anderson, J.B. Osteroporosis after ophoretomy in the mature female rat and the effect of estrogen and/or progesterone replacement therapy in its prevention. J. Endocrinol., 55: 79-87, 1972.
30. Wronski, T.J., Cintron, M., Dann, L.M. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. Calcif Tissue. Int., 43: 179-183, 1988.
31. Ramirez, M. E., McMurry, M.P., Wiebke, G.A., Felton, K.J., Ren, K. Evidence for sex steroid inhibition of lipoprotein lipase in men; comparison of abdominal and femoral adipose tissue. Metabolism, 46: 179-185, 1997.
32. Valette.A., Meignen, K.M., Mercier, L., Liehr, J.G., Boyer, J. Effects of 2-fluoroestradiol on lipid metabolism in the ovariectomized rat. J. Steroid Biochem., 25: 575-578, 1986.
33. Baker, H.J., Lindsey, J.R., Weisbroth, S.H. The laboratory rats. Academic Press Inc., New York. Ⅱ, pp 123-127, 1984.
34. Beeson, P.B., McDermott, J.B. Wyngaarden. Text Book of medicine. Saunders Co. Philadelpia, pp 754-764, 1994.
35. Corine, H.R., Emma, S.W. Basic nutrition and diet therapy. 5thed., Macmillan Co., New York., pp 272-273, 1984.
36. Guyton, A.C. Text book of medical physiology. 8th ed., Saunders Co., philadelphia, pp 754-764, 1994.
37. Park, Y.H., Yoon, S., Yoo, T.M. The effect of isoflavone Supplementation on Bone Metabolism in Ovariectomized SD rats. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 30: 657-661, 2001.
38. Kim, I.G., Kim, S.B., Kim, J.G., Kim, K.C. Serum enzymes

as indicators of radiation exposure in rat. Jounal of the Korean academy of family medicine. 18: 37-44, 1993.
41. Lubec, G., Labudova, O. Alpha-Methy-Proline Restored Normal Levels of Bone collagen type I synthesis in ovariectomized Rats., Life sciences, 50: 2245-2253, 1994.
42. Kim, M.H., Otsuka, M., Arakawa, N. Age-related changes in the pyridinoline content of guinea pigs cartilage and achilles tendon collagen. J Nutr Sic Vitaminol, 40: 95-103, 1994.