

## 오디가 난소를 절제한 흰쥐 결합조직 중의 collagen 함량 변화에 미치는 영향

최경하 · 박미화 · 김미향\*

신라대학교 자연과학대학 식품영양학과

Received November 15, 2005 / Accepted December 15, 2005

**Effects of Mulberry Fruits on Collagen Content of Connective Tissues in Ovariectomized Rats.** Kyung-Ha Choi, Mi-Hwa Park and Mihyang Kim\*. *Department of Food Science and Nutrition, Silla University, Busan 617-736, Korea* – The aim of this study was to evaluate effects of mulberry cultivars extracts on the collagen content of the connective tissues in ovariectomized rats. From day 2 until day 37 after ovariectomy, Sprague-Dawley female rats were randomly assigned to the following groups : sham-operated rats (Sham), ovariectomized control rats (OVX-control), and ovariectomized rats supplemented with 80% ethyl alcohol extracts from various kinds of Tajikistan mulberry, Korea mulberry and China mulberry at 200 mg/kg bw/day, respectively. The mulberry extracts were orally administrated at 1 mL per day. The OVX rats were significantly heavier than the sham-operated rats were at all time points, but supplementation with the mulberry extracts tended to gain weight less than OVX-control did. The ovariectomy caused a decreasing in the levels of collagen content in bone and cartilage tissues. However, supplementation with mulberry extracts prevented the decrease in the collagen level in bone and cartilage tissues. Therefore, it may be used to possibly improve the quality of life in menopausal women.

**Key words** – collagen, connective tissues, mulberry, ovariectomized rats

최근 현대의학의 발달로 인해 인간의 평균수명은 점차 증가되고 있으며, 노인의 복지와 건강을 위한 실버산업에 많은 투자가 이루어지고 학문적으로는 건강한 노년기를 위한 노인분야의 연구들이 다각도로 행해지고 있다. 그 중에서도 특히 여성은 보통 50대에 폐경이 되어 인생의 1/3을 폐경 상태에서 보내게 되므로 이 시기의 삶의 질을 보다 향상시키기 위한 노력들이 이루어지고 있다[2, 29]. 난소기능의 감퇴로 야기된 시상하부-뇌하수체-난소로 이어지는 성선 축의 기능실조가 원인이 되고 이로 인하여 성호르몬, 지질 및 지단백질 변화와 골 대사 등의 신체 및 정신적인 변화가 나타난다 [20,24].

폐경기에 도달함에 따라 estrogen의 생산과 분비가 중단되는데 그에 따른 병리현상으로는 안면홍조, 불안증, 우울, 신경과민 및 기억력 감퇴 등의 증상을 나타내며[4,5], 호르몬 치료요법은 골다공증, 혈관계 질병, 알츠하이머 등을 감소시키는 것으로 알려져 있으나, estrogen 치료요법으로 유방암 및 자궁암 발생위험도는 높아지는 것으로 보고 되고 있다 [10, 12, 13, 36, 38]. 장기적인 estrogen의 생산과 분비가 중단됨으로써 초래되는 골다공증은 가장 심각한 문제점 중의 하나로서 치료보다는 예방적 측면이 중요시되고 있는데, 최근에 골다공증의 치료에 대한 많은 약제들의 효용성이 보고 되어 있다[41].

골다공증은 동일 연령과 성별의 정상인에 비해 골량(단위 부피 당 골 질량)이 현저히 감소된 상태로 골의 구성 성분의 양적 감소를 주 병변으로 하는 대사성 골 질환이다[30]. 노년기에 있어서 골격손실은 골 형성과 골 흡수의 불균형에 의한 것이며 또한 그 원인은 명확하지 않지만 내분비학적, 영양학적, 유전학적 인자들이 관여하고 있는 것으로 알려지고 있다 [17]. Estrogen결핍에 의한 골다공증은 골질이 쉽게 일어날 수 있는 조건이 되며, 이 경우의 estrogen투여는 골의 무기질 성분의 증가와 함께 교원섬유의 조성에도 영향을 미쳐서 골질의 예방에 효과를 지닌다고 보고 되고 있다[9,14].

노령화 현상과 더불어 조직 실질 세포 수는 감소하고 그 결과 노령기에 대부분의 조직 중량이 감소한다[6]. 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[11, 23, 28, 34, 35]. 피부 섬유아세포 중의 collagen은 estrogen에 의하여 생성량이 증가한다는 연구보고도 있으나[33], 연령과 함께 나타나는 골기질량의 감소와 collagen 변화에 관해서는 불명확한 점이 많다.

여성의 생식기계 질환을 치료할 목적으로 시행되는 난소 절제술은 estrogen의 생성을 저하시켜서 인위적인 폐경을 야기하므로 이로 인한 골다공증의 연구에서 광범위하게 이용되고 있으며 골다공증에서 나타나는 골의 손실을 유발시키

\*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5620, Fax : +82-51-999-5176  
E-mail : mihkim@silla.ac.kr

는 인자규명 및 골 손실을 방지하는 요인에 관한 연구가 다양하게 이루어지고 있다[16]. 난소를 절제한 흰쥐에서 해면골의 손실이 유발되었으며 이는 estrogen의 감소가 파골 세포의 활성을 촉진시키고 이는 다시 골조직의 연결을 악화시킨다고 하였다[32]. 최근에는 일상적으로 섭취하는 자연식품으로부터 체내 지질 및 갱년기 장애 개선효과가 있는 성분을 찾으려는 노력이 활발하다. 자연 식품 중의 식물성 phytoestrogen은 생식 호르몬 유사물질로서 폐경기 여성에게 estrogen 대체 작용을 할 수 있는 것으로 알려져 있다[15].

오디는 뽕나무과(Moraceae)의 뽕나무속(Morus)에 속하는 교목성 낙엽수로 온대에서 아열대에 이르기까지 널리 분포하며, 분포밀도가 가장 높은 곳은 동아시아의 한국, 중국대륙 및 일본열도이다[21]. 이 식물은 우리나라에서 예로부터 민간 상용 약초로 부인들의 붕증, 혈결 및 요통, 타박상, 지통, 습진, 유행성이하선염, 폐결핵, 급성관절 등을 치료하는데 사용되었으며, 특히 그 뿌리와 줄기를 달여 먹으면 간암치료에 특효하다고 전해 내려오고 있다[25]. 현재까지 오디에 관한 연구로는 잎에 flavone, steroids, triterpenes, amino acids, vitamin 및 다량의 미네랄 성분이 존재하고 있으며[18], 또한 전통 생약으로 당뇨병을 예방, 치료하며 갈증을 해소시키는 것으로 알려져 있다[8,26]. 그 이외에 줄기 및 잎에 관련한 항당뇨 효과에 대한 연구가 이루어졌으나[7], 국내산 오디의 경우 수급이 원활하지 않아 가격이 비싸기 때문에 산업체에서 국내산 오디를 사용하기가 무척 어려운 실정이다.

본 연구에서는 인위적 폐경을 야기 시켜 estrogen 분비가 저하되었을 때 흰쥐의 갱년기 장애에 미치는 오디의 영향뿐만 아니라, 국내산 오디보다 비교적 가격이 싼 중국산 및 타지키스탄 오디를 국내산오디와 비교하여 호르몬 대체 작용 효과가 있다면 외인성 estrogen 공급으로 인한 부작용을 감소시킬 수 있을 것으로 추측되어 그 효과를 검토하였다.

**재료 및 방법**

**실험재료**

본 실험에 사용된 국내산 오디(*Morus alba* spp.)는 전라북도남원양잠농업협동조합에서 (주)천호식품을 통하여 구입하였으며, 중국내산 오디(*Morus alba* Linn.)와 타지키스탄 오디(*Morus alba* Linn.)는 부산시 초량동 건재한약방에서 구입하여 수세, 정선 및 탈수과정을 거쳐 자연 건조시켜 분말화하여 사용하였다. 각각의 건조시료에 에탄올을 가해 추출한 후

감압농축기로 농축한 후 동결 건조한 에탄올 추출물을 0.9% 생리식염수로 희석한 후 동물실험에 사용하였다.

**실험방법**

**1) 실험동물**

실험동물은 체중이 평균 185g되는 Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐를 경기도에 있는 샘타코로부터 분양받아 본 실험실에서 고형사료(삼양유지사료) 및 조건(온도: 24±2℃, 습도: 55~60%, 명암: 12시간 light/dark cycle)으로 물과 식이를 자유 공급하며 사육하였다. 각 오디 추출물 투여군은 실험시작 전 1주일 동안 대조군 식이로 적응시킨 후 체중에 따라 난피법(Randomized Complete Block Design)에 의해 10마리씩 5군 【난소절제 없이 절개부분을 봉합한 군(Sham), 난소 절제 후 0.9% 생리 식염수 투여군(OVX-control), 난소절제 후 타지키스탄 오디 200 mg/kg 투여군(OVX-TM), 난소절제 후 국내산 오디 200 mg/kg 투여군(OVX-KM), 난소절제 후 중국산 오디 200 mg/kg 투여군(OVX-CM)】으로 나누어(Table 1) 6주간 실험하였다. 수술 후 대조식으로 2~3일간 회복하게 한 후 오디 추출물을 매일 1mL씩 6주간 경구투여 하였으며, 대조군은 동일용량의 생리식염수를 경구 투여하였다. 체중은 이틀에 한 번씩 측정하였다. 동물실험실의 사육조건은 온도 24±2℃, 습도 55~60%를 유지시켰고, 실험 식이와 물은 자유 급여하였다.

**2) 난소절제시술**

1주일 동안 주위 환경에 적응시켜 체중에 따라 난피법(Randomized Complete Block Design)에 의해 군을 나누어 난소절제 수술을 실시하였다. 수술은 ether 마취 후 심마취기에 이르면 복부를 절개하여 난소를 제거하고 절개부는 봉합하였다.

**3) 혈청분리 및 장기적출**

실험 종료 후 실험동물은 ether 마취 하에서 개복한 후, 정맥에서 채취한 혈액은 실온에서 30분 방치하여 8000xg, 4℃에서 10분간 원심분리에 의해 혈청을 분리하였다. 혈청 분리 후 0.9% 생리 식염수 용액으로 관류시킨 후 폐는 적출하여 주위의 지방과 물기를 제거하였고, 늑골과 연골은 경계면에서 분리하였으며 피부는 털을 잘라내고 표피 위의 지방을 제거하여 무게를 잰 후 실험 시까지 -70℃에 보관하였다.

**4) 분석 시료의 조제 및 분석 방법**

분리한 혈청의 ALP 활성은 Kind-King의 개변법(33)에 준

Table 1. Experimental design of animals.

Group (No.)	Supplement
Sham (10)	sham-operated rats
OVX-control (10)	ovariectomized rats
OVX-TM (10)	ovariectomized rats supplemented with Tajikistan Mulberry at 200mg/kg bw/day
OVX-CM (8)	ovariectomized rats supplemented with China Mulberry at 200mg/kg bw/day
OVX-KM (10)	ovariectomized rats supplemented with Korea Mulberry at 200mg/kg bw/day

하여 시료를 조제한 후 UV visible spectroscopy를 이용하여 흡광도 500 nm에서 측정하였다. 적출한 결합조직 폐, 꿀, 연골, 피부는 6N HCl 10 mL을 첨가하여 110°C에서 20시간 산 가수분해 후 여과 농축하여 시료용액으로 하였다. 결합조직 중의 collagen 양은 Woessner법에 의하여 hydroxyproline 양을 측정한 후 collagen 양으로 환산하였다[34]. Collagen의 아미노산 조성으로부터 collagen 중의 hydroxyproline 비율은 평균 110잔기/1000잔기이므로 collagen 양의 환산은 일반적으로 다음 식에 준한다.

$$\text{collagen } (\mu\text{g}) = 9.09 \times \text{hydroxyproline } (\mu\text{g})$$

5) 통계처리

연구에 대한 모든 실험결과는 평균치와 표준편차로 나타내었고, 대조군에 대한 각 실험군 간의 유의성 검증은 Student's t-test를 이용하여 상호 비교하였다.

결과 및 고찰

식이 섭취량, 체중 증가량

Table 2는 난소절제 흰쥐에 오디의 추출물을 투여하여 식이 섭취량과 체중증가량의 변화를 살펴본 결과이다. 폐경 후 여성의 비만은 독특한 생리적 현상으로 실제로 폐경 후의 여성이나 난소를 제거한 동물의 경우 음식물 섭취가 촉진되고, 몸무게와 지방조직이 증가된다. 실험시기 동안 식이 섭취량은 전반적으로 난소를 절제하지 않은 Sham 군에 비해 난소절제 군들의 섭취량이 많은 경향을 나타냈다. 실험동물의 체중 증가량은 실험기간 중의 건강상태를 나타내는 지표라 할 수 있으며 난소 절제한(OVX-control) 군이 Sham 군보다 체중이 증가하는 경향을 보였다. 이것은 난소 절제에 의해 체지방 침착이 증가된다는 여러 연구의 보고 [1, 40]에서와 같이 여성의 폐경 이후나 난소 절제 시에는 여성호르몬의 부족으로 체내 지방조직이 증가하게 된다. 또한 지방조직에서도 여성호르몬을 생성할 수 있는 기능을 갖고 있기 때문에 지방조직에서 난소의 기능을 대체하고자 하는 우리 몸의 비상대책으로 여겨진다. 각 난소를 절제한 군 간에 유의성 있는 변

화는 보이지 않았으나, 다른 군에 비해 타지키스탄 오디추출물 투여군의 경우 몸무게가 뚜렷이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 인위적으로 난소를 제거한 후 오디를 투여할 경우 Sham군과 비교해 유의적으로 체중 증가 현상이 나타났는데 이것 역시 여성호르몬의 부재에 의한 것으로 오디 추출물이 체중감소에는 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다. 하지만 식이 섭취율을 살펴보면 OVX-control군에 비해 유사하거나 높았음에도 불구하고, 최종 몸무게는 OVX-control에 비해 낮은 것으로 보아 오디가 갱년기 장애의 대표적인 증상인 체중 증가를 감소시킬 수 있는 기능성 식품으로의 연구도 가능할 것으로 보인다.

혈청 중 Alkaline phosphatase 활성

폐경 후 골 손실율의 정도는 골 전환의 증가와 직접적인 연관이 있고, 이것은 또한 생화학적 골 대사 지표로 평가할 수 있다. Alkaline phosphatase (ALP)는 phosphomonoesterase, phosphodiesterase의 경우 십이지장이나 장의 mucosa에 상당히 많은 양이 있으나 신장, 고등동물의 선(gland), bone, 정상적인 혈액에서는 적은 농도로 존재한다. 따라서 이러한 정상적인 조직에 이상이 생기거나 폐경기 또는 osteosarcoma의 경우 혈청 내에서 alkaline phosphatase의 활성도가 증가하게 된다[22]. Fig. 1은 난소 절제 흰쥐에 오디 추출물을 농도별로 투여하여 혈청 중의 효소활성 변화를 나타낸 결과이다. 흰쥐의 정상 ALP 활성치는 일반적으로 16~48 U/L이라고 알려져 있으며[3, 37], 본 연구의 결과 OVX-control군은 난소를 절제하지 않은 Sham군에 비해 ALP 활성이 증가하였으나, 난소 절제 후 오디 분획물 투여(OVX-TM, OVX-CM, OVX-KM)군에서는 감소하는 경향을 나타내었다. 이것은 난소 절제 후 estrogen의 분비가 감소되는데 반해 오디 추출물 투여가 estrogen 대체 작용을 함으로써 난소 절제로 인한 골 손실 정도를 완화시켜 준 것으로 추측되어진다.

결합조직 중의 collagen 함량

흰쥐의 난소 절제 후 오디 분획물 투여군의 collagen 함량

Table 2. The body weight gain, food intake and food efficiency ratio by supplementation of Mulberry ethanol extracts diets for 6 weeks

Group <sup>1)</sup>	Final body weight (g)	Body Weight gain(g/day)	Food intake (g/day)	Food efficiency ratio(FER) <sup>3)</sup>
Sham	235.80±5.4	3.76±7.96	15.87±3.76	0.37±0.26
OVX-control	280.10±16.6	6.21±8.74	16.35±5.65	0.70±0.19
OVX-TM	267.60±5.2	6.50±13.83	17.14±5.98	0.42±0.12
OVX-CM	259.70±15.2	6.04±9.84	15.86±4.44	0.61±0.29
OVX-KM	266.70±6.0	6.57±9.86	18.23±6.47	0.57±0.20

<sup>1)</sup> Refer to comment in Table 1.

<sup>2)</sup> Values are means±SD.

<sup>3)</sup> FER :weight gain(g/day)/food intake(g/day)

Values are not significantly different among treatment groups

변화를 Fig. 2에 나타내었다. 난소 절제 대조군은 난소를 절제하지 않은 Sham 군에 비하여 조직과 피부에서 모두 collagen 함량이 감소하였다. 반면, 난소 절제 후 오디 추출물을 투여한 군에서는 골 및 연골 조직에서 collagen 함량이 증가하는 경향을 보였고, 그 중에서 국내산 오디 추출물 투여군에서 collagen 합성이 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ).

연골의 경우, 난소를 절제하지 않은 Sham군에 비해 OVX-control은 난소절제에 의해 collagen 함량이 감소하였으나, 난소 절제 후 각각의 오디 추출물을 투여함으로써 모든 군에서 그 수치가 회복하는 경향을 보였고, 특히 국내산 오디 추출물 투여군(OVX-KM)은  $161.90 \pm 14.43$ (mg/g)로 유의적으로 증가하였다(Fig. 2,  $p < 0.05$ ). 골 조직에서는 난소를 절제한 OVX-control군이 난소를 절제하지 않은 Sham군에 비해 유의적으로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 3). 또한 난소를 절제한 후 각각의 오디 추출물을 투여한 군 모두 OVX-control군에 비해 유의적으로 증가하여 collagen 생성을 촉진하는 결과를 나타내었다. 피부조직 또한 난소절제군의 collagen 함량이 Sham군에 비해 감소하는 경향을 나타내었고 난소 절제 후

오디 추출물에 의해 collagen 함량은 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다. 폐 조직에서의 결과도 피부조직과 유사한 결과를 나타내었다(Fig. 5). 인체의 정상골은 파골세포(osteoclast)에 의한 골 흡수와 그에 따른 조골세포(osteoblast)에 의한 새로운 골기질 형성 과정이 끊임없이 반복적으로 일어난다. 폐경 후 estrogen의 감소에 의해 파골세포에 의한 골 흡수가 폐경

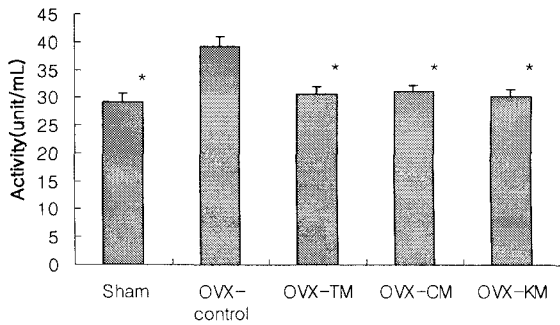


Fig. 1. Effect of Mulberry ethanol extracts on serum alkaline phosphatase activities in ovariectomized rats. Groups are the same as in Table 1. Significantly different from the value of OVX-control group at  $*p < 0.05$ .

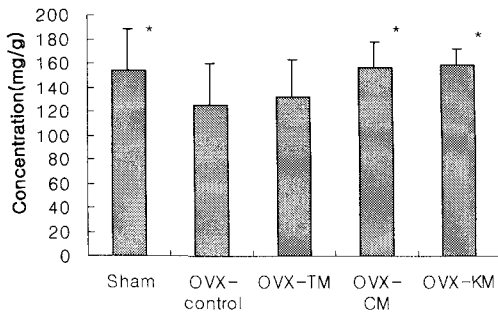


Fig. 2. Effect of Mulberry ethanol extracts on collagen concentration in cartilage of ovariectomized rats. Groups are the same as in Table 1. Significantly different from the value of OVX-control group at  $*p < 0.05$ .

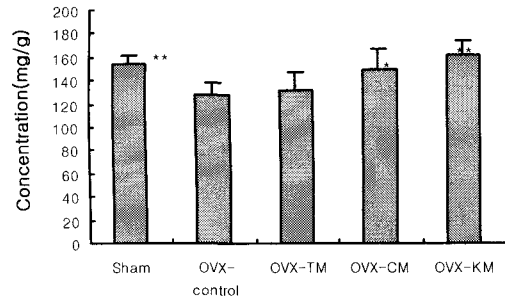


Fig. 3. Effect of Mulberry ethanol extracts on collagen concentration in bone of ovariectomized rats. Groups are the same as in Table 1. Significantly different from the value of OVX-control group at  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ .

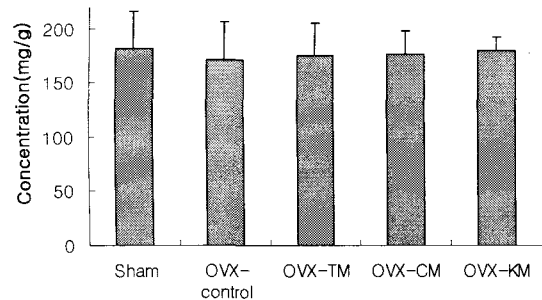


Fig. 4. Effect of Mulberry ethanol extracts on collagen concentration in skin of ovariectomized rats. Groups are the same as in Table 1.

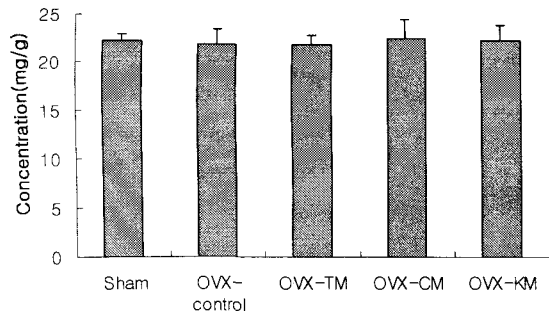


Fig. 5. Effect of Mulberry ethanol extracts on collagen concentration in lung of ovariectomized rats. Groups are the same as in Table 1.

전에 비해 매우 많아져 1~5%의 빠른 골 손실을 초래한다고 한다[31]. 흔히 노인들이 뼈에 칼슘 양이 부족하기 때문에 쉽게 골절이 발생하는 것으로 일반적으로 알려져 있으나, 실제로 20대 젊은이들 중 6~8명에 1명꼴로 뼈의 칼슘 양이 노인과 비슷하게 감소되어 있음에도 불구하고 이런 젊은이들에게 쉽게 골절이 발생되지 않는 것은 뼈의 강도를 유지해 주는 또 하나의 성분인 collagen이 충분하기 때문인 것으로 알려져 있다. 어린이나 젊은이의 뼈는 탄력성이 있으므로 부러질 정도로 큰 힘이 가해져도 골절까지는 되지 않으나 노인이 되면 골격 중의 collagen도 노화되는데 여기에 칼슘 량까지 감소되면 더욱 골절되기 쉽게 된다. 고령화와 함께 골다공증의 발생률이 증가하는 이유가 collagen과 관련성이 있는 것으로 보고 되고 있는데, 사람의 피부 진피층과 골 조직 내의 collagen은 나이가 들어감에 따라 특히 여성들의 폐경기 전후에 감소되면서 노화가 촉진되고 골다공증 역시 빠르게 진행된다[31].

Estrogen은 골의 균형 유지에 있어서 가장 중요한 역할을 담당하는 호르몬으로서 폐경 후의 여성에서 빈발하는 골다공증은 estrogen의 감소에 따른 골의 재형성과 흡수의 균형 파괴에서 기인한다고 알려져 있으며 이에 대한 치료적 요법으로서 estrogen 투여가 효과적인 것으로 알려져 있다[19]. estrogen 투여가 골 손실의 억제에 효과적인 것으로 알려져 있는 현 실정에서 본 연구 결과로부터 난소절제에 의한 골 대사의 지표로 이용되는 collagen 합성의 감소가 각각의 오디 추출물을 투여함으로써 회복되는 결과를 보였다. 이러한 변화는 estrogen 부족으로 인한 골 손실에 오디 추출물이 유의한 효과를 가지는 것으로 보이며, 이는 오디 중에 함유되어 있는 칼슘, 비타민 등 외에 estrogen 활성을 가지는 phytoestrogen이 작용하였을 것으로 사료되어진다.

## 요 약

폐경을 앞둔 여성에게는 폐경을 전후하여 지속되는 골 손실 가속화 등의 문제점을 가지고 있다. 그러므로 본 연구에서는 인위적 폐경을 유발시킬 수 있는 난소 절제 쥐에서의 골 손실의 유무를 결합조직 중의 collagen 함량 변화를 통하여 그 효과를 검토하였다. 그 결과 생화학적 골 대사 지표인 혈 중 ALP 활성은 난소 절제(OVX-control)로 인하여 증가하는 반면, 난소 절제 후 오디 추출물 투여(OVX-EE, OVX-EA)로 혈 중 ALP 활성은 감소하는 경향을 보여 골 흡수를 저하시킬 수 있는 가능성을 나타내었다. 한편 난소 절제 후 오디 추출물 투여에 의해 폐 조직과 골·연골 조직에서 collagen 함량이 증가하는 경향을 보였고, 그 중 연골 조직에서는 collagen 함량의 저하가 정상적으로 회복되었다. 한편 피부 조직에서도 난소 절제 후 오디 추출물 투여군 모두에서 collagen 합성량이 유의적으로 증가하였다. 오디 추출물이 estrogen

감소로 인한 collagen 합성저하를 회복시킨 본 실험 결과로 미루어 보아 오디 중의 phytoestrogen이 estrogen 유사 효과를 나타냄을 알 수 있었고, 국내산 오디뿐만 아니라 중국산 오디에서도 갱년기 유도에 의한 collagen 함량 저하를 회복하는 결과가 나타났으므로 외인성 estrogen 투여로 인한 부작용을 줄여 줄 수 있을 것으로 기대된다. 이상과 같이 폐경기 여성에게 오디의 섭취는 폐경으로 인한 장애를 감소시키기 위하여 estrogen의 장기복용에 의한 부작용을 오디 중의 phytoestrogen이 estrogen 대체 작용을 함으로써 그 부작용을 감소시켜 줄 것으로 사료되며, 이들의 구조 및 기전에 대해서는 앞으로 연구가 더 필요한 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Abe, T, J. W. M. Chow, J. M. Lean and T. J. Chambers. 1993. Estrogen does not restore bone lost after ovariectomy in the rat. *J Bone Miner Res* 8: 831-838.
2. Ahn, H. S., J. R. Kwon and S. S. Lee. 1997. Effect of Dietary Lipids and Guar Gum on Lipid Metabolism in Ovariectomized Rats. *Korean Nutr Society* 30: 1123-1131.
3. Baker, H. J., J. R. Lindsey and S. H. Weisbroth. 1984. The laboratory rats. *Academic Press Inc*, New York, vol II: 123-127.
4. Brosage, P. 1995. Hormone therapy: The woman's decision. *Contemp Nurse Pract* 1(5), 3.
5. Bush, T. L. and E. Barret-Connor. 1985. Noncontraceptive estrogen use and cardiovascular disease. *Epidemiol Rev* 7: 89-104.
6. Campos, H., W. F. Wilson Peter, D. Jimenez, J. R. Mcnamara, J. Ordovas and E. J. Schaefer. 1990. 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.
7. Cha, J. Y., H. J. Jun and Y. S. Cho. 2000. Effect of water-soluble extract from leaves of *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata* on the lipid concentrations of serum and liver in rats. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol* 43, 303-308.
8. Chen, F., N. Nakashima, I. Kimura and M. Kimura. 1995. Hypoglycemic activity and mechanisms of extracts from mulberry leaves (*Folium mori*) and cortex *moriradicis* in streptozotocin-induced diabetic mice. *Akugaku Zasshi* 15, 476-482.
9. Clark, A. P. and J. A. Schuttinga. 1992. Targeted estrogen/progesterone replacement therapy for osteoporosis. calculation of health care cost savings. *Osteoporos Int* 2: 195-200.
10. Colditz, G. A., S. E. Hankinson, D. J. Hunter, W. C. Willett, J. E. Manson, M. J. Stampfer, C. Hennekens, B. Rosner and F. E. Speizer. 1995. The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *New Engl J Med* 332: 1589-1593.
11. Fujimoto, D., M. Hira and T. Iwa. 1982. Histidinoalanine,

- a new crosslinking amino acid in calcified tissue collagen. *Biochem Biophys Res Comm* **104**: 1102-1106.
12. Grodstein, F., M. J. Stampfer, G. A. Colditz, W. C. Willett, J. E. Manson, M. Joffe, B. Rosner, C. Fuchs, S. E. Hankinson, D. J. Hunter, C. H. Hennekens and F. E. Speizer. 1997. Postmenopausal hormone therapy and mortality. *New Engl J Med*. **336**: 1769-1775.
  13. Harris, R. B., A. Laws, F. M. Reddy, A. King and W. L. Haskell. 1990. Are women using postmenopausal estrogens? A community survey. *Am J Public Health* **80**: 1266-1268.
  14. Holland, E.F., J. W. Studd and J. P. Mansell. 1994. 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.
  15. Ianghai Liu, E. B. Joanna, Xu Haiyan, Gu Chungang, B. B. Richard, P. L. B. Krishana, B. Nancy, I. C. Andreas, M. P. John, H. S. F. Harry, R. F. Norman and L. B. Juddy. 2001. Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms. *J Agric Food Chem* **49**: 2472-2479.
  16. Imble, R. B., J. L. Vannice and D. C. Bloedow. 1994. Interleukin-1 receptor antagonist decreases bone loss and resorption in ovariectomized rats. *J Clin Invest* **93**: 1959-1967.
  17. Jeffcoat, M. K. and C. H. Chesnut. 1993. Systemic osteoporosis and oral bone loss, evidence shows increased risk factors. *Jadas* **124**: 49-56.
  18. Jeong, C. H, O. S. Joo, K. H. Shim. 2002. Chemical Components and Physiological Activities of Young Mulberry (*Morus alba*) Stem. *Korean journal of Food Preservation* **9(2)**, 228-233
  19. Kafantari H, E. Kounadi, M. Fatouros, M. Milonakis and M. Tzaphidou. 2000. Structural alteration in rat skin and bone collagen fibrils induced by ovariectomy. *Bone* **26**: 349-353.
  20. Kim, C.W. 1996. The study on treatment of climacteric disorder I (osteoporosis). *wonkwang univ* **32**: 109-136.
  21. Kim, H. B, H. S. Bang, H. W. Lee, Y. S. Seuk and B. S. Gyoo. 2002. Chemical Characteristics of Mulberry Syncarp. *Korean J. Seric. Sci.* **41(3)**, 123-128
  22. Kim, I. G., S. B. Kim, J. G. Kim and K. C. Kim. 1993. Serum enzymes as indicators of radiation exposure in rat. *Journal of the Korean academy of family medicine* **18**: 37-44.
  23. Kim, M. H., M. Otsuka and N. Arakawa. 1994. Age-related changes in the pyridinoline content of guinea pigs cartilage and achilles tendon collagen. *J Nutr Sci Vitaminol* **40**: 95-103.
  24. Kim, M. H. 2003. The effects of *sedum sarmentosum bung* on collagen content of connective tissues in ovariectomized rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **32**: 1114-1119.
  25. Kim, S. Y, W. C. Lee, H. B. Kim, A. J. Kim and S. K. Kim. 1998. Antihyperlipidemic effects of methanol extracts from Mulberry leaves in cholesterol-induced hyperlipidemia rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nurt* **27**, 1217-1222
  26. Kim, T. W, Y. B. Lee, J. H. Yang, I. S. Youm, J. K. Lee, H. S and J. Y. Moon. 1996. A study on the antidiabetic effect of mulberry fruits. *Korean. J. Seric. Sci* **38(2)**, 100-107
  27. Kind, P. R. N. and E. J. King. 1954. Estimation of plasma phosphatase by determination of hydrolyzed phenol with aminoantipyrine. *J Clin Pathol* **7**: 322-326.
  28. Kuboki, Y. and G. L. Mechanic. 1982. Comparative molecular distribution of cross-links in bone and dentin collagen. *Calcif Tissue Int* **34**: 306-308.
  29. Kwon, S. C. 1998. 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.
  30. Lee, E. S. and B. H. Kang. 1997. Biochemical bone markers in postmenopausal women. *Korean Soc. Obstetrics & Gynecology* **40**: 1450-1457.
  31. McConkey, B., G. M. Fraser, A. S. Bligh, H. Whiteley. 1963. Transparent skin and osteoporosis. *Lancet* **1**: 693-695.
  32. Myster, D. W., R. Birchman and R. Xu. 1995. Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy. *Bone* **16**: 157-161.
  33. Noda, M. and G. A. Roodon. 1989. Transcriptional regulation of osteopontin production in rat osteoblast-like cells by parathyroid hormone. *J Cell Biol* **108**: 713
  34. Robins, S. P. and A. J. Bailey. 1977. The chemistry of the collagen cross-links. *Biochem J* **163**:339-346.
  35. Seigel, R. C. 1976. Collagen cross-linking. *JBC* **251**: 5786-5792.
  36. Stolley, P. D., J. A. Tonascia, M. S. Tockman, P. E. Sartwell, A. H. Rutledge and M. P. Jacobs. 1975. Thrombosis with low-estrogen oral contraceptives. *Am J Epidem* **102**: 197-201.
  37. The association of Korean Clinical Pathology. 1994. *The clinical pathology*. Korea Medicine Co : 40-79.
  38. Wickelgren, I. 1997. A new weapon against Alzheimer's. *Science* **276**: 676-677.
  39. Woessner, J. F. 1961. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* **93**: 440-447.
  40. Wronski, T. J., M. Cintron and L. M. Dann. 1988. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* **43**: 179-183.
  41. 松本俊夫. 1996. 骨粗鬆症. 羊土社. p16.