

고콜레스테롤 식이를 섭취한 난소절제 흰쥐에서 녹차가공품이 골 대사 지표에 미치는 효과

노경희 · 장지현 · 조미경 · 송영선[†]

인제대학교 BK21 식의약생명공학과, 식품과학연구소 및 바이오헬스 소재 연구센터

Effect of Green Tea Products on Bone Metabolism Marker in Ovariectomized Rats with High Cholesterol Diet Intake

Kyung-Hee Noh, Ji-Hyun Jang, Mi-Kyung Cho, and Young-Sun Song[†]

BK21 Center of Smart Foods and Drugs, Food Science Institute, and Biohealth Product Research Center, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

Abstract

This study was designed to evaluate the effect of green tea products (GTP) on bone metabolism marker in ovariectomized (OVX) rats fed high cholesterol diet. Forty Sprague-Dawley female rats, 10 weeks of age (279 ± 2 g), were divided into 4 groups and fed on the experimental diets for 6 weeks: sham operated control (Sham-C) and OVX-control (OVX-C) groups treated high cholesterol diet. OVX-GTP 5% (OVX-G5) and OVX-GTP 20% (OVX-G20) groups were treated with high cholesterol diet containing 5% GTP and 20% GTP, respectively. Food efficient ratio was significantly ($p < 0.05$) lower in OVX-G20 than in the other OVX groups. Bone mineral density of femur was not significantly different among the experimental groups in the order of Sham-C > OVX-G5 and OVX-G20 > OVX-C. Alkaline phosphatase activities on serum was lower in the GTP supplement groups than in the OVX-C. Estradiol levels of serum were higher in the GTP supplement groups than in the OVX-C. Osteocalcin levels of serum was the lowest in the OVX-G20. Deoxypyridinoline crosslink values of urine, indicator of bone absorption, was the lowest in the OVX-G20 group. The GTP supplemented groups had a lower bone resorption ratio than in the OVX-C group. From the above results, these findings suggest the possibility of using GTP as a functional food materials related to bone metabolism in menopause.

Key words: green tea products, bone metabolism, ovariectomized rat, functional food

서 론

골다공증(osteoporosis)은 전신성 골 질환으로 골질량(bone mass) 또는 골밀도(bone density)의 감소와 골격기능 손상으로 골절이 쉽게 유발될 수 있으며 폐경기 이후 여성의 약 30%에서 발생하는 가장 흔한 대사성 질환이다(1-3). 노년기 인구의 증가로 인한 골다공증 발병률이 급격히 증가되고 있는 추세이며 우리나라에도 약 300만 명 정도의 골다공증 환자가 있는 것으로 추정되고 있다(4). 폐경기 여성은 호르몬 불균형과 칼슘 결핍 및 체내 산화적 스트레스 증가로 여러 질병의 위험에 처해 있으며 호르몬 치료요법은 골다공증, 심혈관계 질환, 알츠하이머 등을 감소시키는 것으로 알려져 있으나 에스트로겐 치료요법에 따른 유방암 및 자궁암의 발생위험도는 높아지는 것으로 보고되고 있다(5).

식이성분이나 약물의 보충효과를 알아보는 골다공증 연구에서 골밀도의 변화가 비교적 장기간에 걸쳐서 나타나기

때문에 골밀도 이외에 다양한 골 대사 지표 물질을 측정하여 그 영향을 확인하고 있다(6). 골 대사 지표 물질 중 osteocalcin은 골과 상아질에 특이성을 가지는 단백질로서 조골세포에서 만들어지기 때문에 조골세포의 활동력을 알 수 있으며(7), 폐경기 후 여성의 혈청에서의 osteocalcin 농도 증가는 골밀도와 음의 상관관계를 나타내어 골 교체의 증가를 의미한다(8). Deoxypyridinoline(DPD)은 골 조직에서 발견되며 파골세포에 의한 콜라겐이 분해되면서 유리되며 특이도가 높아 골 용해를 반영(9)하는 가장 뚜렷한 생화학적 지표라 할 수 있다(10).

녹차는 차나무(*Camellia sinensis*)의 잎으로 발효시키지 않은 차잎을 사용해서 만든 차로 최근 건강에 대한 관심으로 선호현상이 두드러져 소비가 급속히 증가하고 있는 실정으로 녹차에 대한 여러 기능성이 과학적으로 규명됨에 따라 기능성식품으로 그 가치가 재평가되고 있다. 녹차의 폴리페놀류는 카테킨으로 알려져 있으며 주요 카테킨 성분으로

[†]Corresponding author. E-mail: fdsnsong@inje.ac.kr
Phone: 82-55-320-3235, Fax: 82-55-321-0691

(-)-epicatechin, (-)-epicatechin-3-gallate, (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG) 등이 보고되었고, 이 가운데 EGCG가 주요 구성성분으로서 항산화·항동맥경화 및 암 예방 활성이 높은 것으로 알려져 있다(11-15). 녹차의 제조방법에 따라 생리활성성분의 함량이 크게 변화하는 것으로 알려져 있으며, 일반적으로 녹차에는 말린 잎을 기준으로 카테킨 함량이 30~42% 함유되어 있다. 녹차의 카테킨 성분은 암, 당뇨, 동맥경화 등 각종 질병을 예방하고 다이어트에도 효과가 있는 것으로 알려지면서 마시는 녹차에 대한 수요가 증가하고 있으나 녹차를 마실 경우 카테킨이 충분히 우려나오지 않는 문제가 있다. 또한 녹차에 함유되어 있는 탄닌은 체내에서 금속이온과 결합하여(16) 난용성 염을 형성하는 점을 고려할 때 체내 칼슘 이용성에 대한 연구도 필요하다(17). 두충 추출물과 대두의 iso-flavone은 골다공증 예방에 효과를 가지는 것으로 보고(6,18)되었다.

따라서 녹차가루와 녹차추출물, 두충추출물, 감잎추출물 및 검정콩 등을 배합하여 조제된 녹차가공품은 칼슘, 이소플라본, 비타민 C, 카테킨 등이 풍부하여 여성호르몬과 칼슘 흡수 저하 등으로 인한 폐경 후 골다공증 개선에 기여할 수 있을 것으로 사료된다. 그러므로 본 연구에서는 폐경기 여성과 유사한 생리적 특성을 유도하기 위해 흰쥐의 난소를 절제한 후 2주간의 적응기를 거친 후 6주간 녹차가공품을 섭취시켜 골 대사 지표에 미치는 효과를 분석하여 골다공증 예방을 위한 건강기능성 제품으로의 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

실험재료

녹차가루(15%)와 녹차잎 추출물(35%), 두충추출물(15%), 감잎추출물(15%), 검정콩 가루(18%) 및 참쌀 풀과 꿀(2%) 등을 배합하여 조제된 녹차가공품(GTP)은 경남하동 소재 화개제다(花開製茶)로부터 제공받아 분말화하여 식이조제에 첨가하였다. GTP 일반성분 조성은 전보(19)에서와 같다.

실험동물 관리 및 식이조성

전보(19)에서와 같이 난소가 성숙하여 임신 가능한 10주령의 Sprague-Dawley 암컷 흰쥐의 평균 체중 279±2 g인 실험동물을 완전임의배치로 한 군당 10마리씩 4군으로 나누어 stainless steel wire cage에서 사육하였다. 실험동물의 체중 100 g당 케타민(유한, Korea)과 럽폰(바이엘코리아, Korea)을 각각 0.11 µL와 0.05 µL를 사용하여 마취시킨 후 양쪽 난소를 절제(ovariectomy: OVX)하였다. Sham 대조군은 실험군과 동일한 스트레스를 주기 위해 난소를 절제하지 않고 개복수술만 실시한 후 실험하였다. 사육실의 온도는 20~25°C, 상대습도 60~70%로 유지하였으며 명암은 12시간 간격으로 점등 및 소등하였다.

무기질과 지질대사와의 관계에서 칼슘을 직접 투여하지 않고 식이로 섭취시켰을 때 혈청 콜레스테롤 수준을 낮추는 효과가 있는 것으로 보고되었다(20). 최근 Ca과 식이섬유 섭취와 관련된 역학연구에서 Zittermann 등(21)은 젊은 여성들에게 식이섬유를 4주간 12 g/일을 보충한 결과 골 대사의 생화학적 지표로 사용되는 골 교체율에 영향을 미치지 않았다고 하였으며 Chen 등(22)도 노인들에게 wheat bran fiber를 3년간 매일 2 g과 13.5 g을 각각 보충 시 골 손실에 대한 유의적인 효과를 나타내지 않았다고 보고하였다. 또한 Wong 등(23)은 난소절제 쥐에게 AIN' 76에 기초한 식이에 Ca 농도를 0.3%로 조정한 후 14일간 3종의 버섯을 5% 보충하여 제공하였을 때 Ca과 Mg의 흡수가 증가되었다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 난소 절제 쥐에게 고콜레스테롤 식이에 GTP를 첨가한 식이를 제공하여 골 대사 지표에 미치는 효과를 확인하고자 난소 절제 후 2주간 배합사료를 급여한 후 Sham-대조군(Sham-C)과 OVX-대조군(OVX-C)은 AIN' 76에 기초해서 제조한 콜레스테롤 첨가 식이(24)를, OVX 실험군은 GTP 5%(OVX-G5)와 20%(OVX-G20)로 첨가하여 조제한 콜레스테롤 첨가 식이로 6주간 급여하였다. 식이 조제 시 Ca 함량은 총 식이의 0.4% 수준으로 조정하였으며 Sham-C, OVX-C와 OVX-G5는 CaCO₃를 첨가하여 조정하였고 OVX-G20는 Ca 함량이 0.4%였으므로 별도의 CaCO₃를 첨가하지 않았다. Table 1과 같은 조성으로 실험군의 식이를 혼합하여 분말 형태로 제조하여 급여하였으며 식이 제조에 사용한 vitamin mixture와 mineral mixture (AIN-76A), α-cellulose, vitamin free casein, cholesterol,

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

	Group ¹⁾			
	Sham-C	OVX-C	OVX-G5	OVX-G20
Casein ²⁾	200	200	184.95	139.8
Corn oil	50	50	47.95	41.8
coconut butter	50	50	47.95	41.8
Vitamin mixture ³⁾	10	10	10	10
Mineral mixture ⁴⁾	40	40	40	40
DL-methionine	3	3	3	3
Choline chloride	2	2	2	2
Corn starch	587	587	556.39	464.6
α-Cellulose	50	50	50	50
Cholesterol	5	5	5	5
Sodium cholate	2	2	2	2
CaCO ₃	1.009	1.009	0.76	-
GTP ⁵⁾	-	-	50	200

¹⁾Sham-C: sham-operated control and fed high cholesterol diet, OVX-C: ovariectomized control and fed high cholesterol diet, OVX-G5: ovariectomized and fed high cholesterol diet containing 5% GTP, OVX-G20: ovariectomized and fed high cholesterol diet containing 20% GTP.

²⁾Casein (vitamin free); ICN.

³⁾Vitamin mixture; AIN-76A.

⁴⁾Mineral mixture (Ca free); ICN.

⁵⁾GTP: green tea products.

DL-methionine, choline bitartrate와 sodium cholate 등은 ICN Biochemicals(ICN Aurora, Ohio, USA) 제품을 사용하였고, 옥수수 전분은 두산, 옥수수유는 제일제당, cocoa butter는 선인 제품을 시중에서 구입하여 사용하였다. 실험 식이와 탈 이온수는 자유섭취방법(*ad libitum*)으로 급여하였으며 사육에 필요한 모든 기구는 0.4% EDTA로 씻은 후 탈 이온수로 행구어 사용하였다. 실험동물의 식이섭취량과 체중은 각각 1주일에 3회와 1회씩 정기적으로 측정하였다.

시료수집

실험 종료 전 실험동물을 하룻밤 절식시킨 후 dry ice로 마취하여 심장에서 채혈하였다. 채취된 혈액은 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 분리된 혈장을 -70°C 에서 냉동 보관하면서 분석에 사용하였다. 혈액 채취 후 즉시 간장과 신장 및 좌우 대퇴골을 적출하였다. 간장 및 신장조직은 부착되어 있는 지방이나 근육을 깨끗이 제거한 후 차가운 0.9% NaCl로 세척하여 혈액을 제거한 다음 여과지로 물기를 제거하고 무게를 측정하였다. 대퇴골은 적출하여 골격에 붙어있는 근육, 인대, 지방 등을 제거한 후 무게를 측정하여 -70°C 에서 보관하며 골밀도와 골 길이를 측정하였다. 요는 실험종료 1주일 전 대사장에서 2일간 적응시킨 후 24시간 동안 채취하였다. 요는 여과지(filter paper(Ca free), No 6, Advantec, Japan)를 사용하여 여과한 후 분석 전까지 냉동 보관하면서 분석하였다.

혈장의 생화학적 분석

혈장 중 osteocalcin은 rat osteocalcin EIA kit(Biomedical Technologies Inc., Stoughton, USA)를 사용하여 측정하였다(25). Estradiol 농도는 estradiol EIA kit(Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA)을 사용하여 분석하였으며(26) 요 속의 골 흡수 진단 시 지표로 DPD는 METRA DPD EIA kit(QUIDEL Corp., San Diego, USA)를 사용하여 분석하였다(27). 뼈 형성 biomarker인 alkaline phosphatase(ALP)의 활성은 Kind와 King의 비색법(28)을 토대로 Daichi 시약을 이용한 kit(영동제약, Korea)을 사용하였으며 요 중의 creatinine 농도는 modified kinetic Jaffe method(29)를 이용한 kit(영동제약, Korea)를 사용하여 비색법으로 측정하였다. 혈장의 단백질 및 Ca과 P의 함량은 영동제약 kit를 사용하여 자동분석기(Hitachi U-2000, Japan)로 분석하였다.

대퇴골의 Ca과 P의 함량

대퇴골은 $70\pm 5^{\circ}\text{C}$ 에서 건조시킨 후 건조 무게를 측정 한 후 $550\sim 600^{\circ}\text{C}$ 에서 5~6시간 회화시켜 회분함량을 측정하였다. 회화된 회분은 HCl과 HNO_3 를 이용하여 분해한 후 영동제약 kit로 자동분석기(Hitachi U-2000, Japan)를 사용하여 Ca과 P의 함량을 측정하였다.

골밀도, 골부피 및 골길이

대퇴골의 밀도와 부피는 Archimedes의 원리(30)를 이용하여 측정하였다. 즉, 증류수가 담긴 비커를 Mettler balance의 weighing pan 위에 놓고 한쪽 끝이 구부러진 철사를 천정으로부터 매달았다. 그리고 물이 담긴 비커에 철사가 잠긴 상태에서 뼈를 넣고 물속에서의 뼈의 무게를 측정 한 후 뼈의 물기를 제거한 후 weighing pan 위에 놓고 1분 후에 무게를 측정하였다. 뼈의 부피(cm^3)는 뼈의 공기 중의 무게(mg)에서 물속에서의 무게(mg)를 뺀 값을 25°C 에서의 물의 밀도로 나누었으며 뼈의 밀도(mg/cm^3)는 뼈의 무게(mg)를 뼈의 부피(cm^3)로 나눈 값으로 계산하였다(31). 대퇴골의 길이는 캘리퍼를 사용하여 측정하였다.

$$V = \frac{M_A - M_w}{D_w}$$

$$D = \frac{M}{V}$$

M_A : wet weight in air (mg) M : wet weight (mg)

M_w : weight in water (mg) V : volume of bone (cm^3)

D_w : water density at 25°C D : density of bone (mg/cm^3)

통계분석

실험 결과는 SPSS PC⁺ package를 이용하여 각 실험군의 평균 \pm 표준오차로 표시하였고 일원배치분산분석으로 비교하였으며 Duncan's multiple range test에 의해 각 실험군 간에 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

체중변화와 식이효율

Table 2에서 보는 바와 같이 실험군의 체중증가량은 난소 절제군(OVX군) 간에는 유의적인 차이를 보이지 않았으며 OVX군이 Sham-C에 비해 상대적으로 높은 수준을 보였고 식이섭취량과 식이효율은 각 군 간에 유의적인 차이($p < 0.05$)를 보였다. 난소 절제로 유발된 체중 증가 현상은 여러

Table 2. Body weight, body weight gain, and food efficiency rate in the experimental groups

Group ¹⁾	Initial BW (g)	Final BW (g)	Weight gain (g/week)	Food intake (g/week)	FER ²⁾ (%)
Sham-C	260 \pm 4 ³⁾⁴⁾	297 \pm 6 ^{b)}	6.2 \pm 0.91 ^{b)}	115 \pm 5 ^{b)}	5.49 \pm 0.92 ^{b)}
OVX-C	277 \pm 7 ^{a)}	359 \pm 1 ^{a)}	13.6 \pm 1.44 ^{a)}	127 \pm 2 ^{b)}	10.7 \pm 1.06 ^{a)}
OVX-G5	288 \pm 5 ^{a)}	374 \pm 9 ^{a)}	14.4 \pm 1.06 ^{a)}	136 \pm 6 ^{b)}	10.6 \pm 0.67 ^{a)}
OVX-G20	283 \pm 5 ^{a)}	354 \pm 6 ^{a)}	11.9 \pm 0.63 ^{a)}	178 \pm 16 ^{a)}	6.97 \pm 0.77 ^{b)}

¹⁾Refer to Table 1. ²⁾FER: Food efficiency ratio. ³⁾Mean \pm SE.

⁴⁾Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

연구에서 보고되었다(1,32-34). 조골세포(osteoblast)와 지방세포는 같은 배아세포에서 분화되며 에스트로젠은 같은 배아세포에서 조골세포의 분화를 촉진하는 반면에 지방세포의 분화는 억제시킨다는 보고(35)에 근거할 때 난소 제거 후 에스트로젠 결핍으로 인한 체중증가는 지방조직 축적에서 기인(1,36)된 것으로 사료된다. OVX군에서의 식이효율은 OVX-G5가 유의적으로 낮았으며 Sham-C와 유사한 수준을 보였다.

간장과 신장의 무게

실험동물의 간장과 신장의 무게는 Table 3과 같다. 간장의 무게는 각 군 간에 유의적인 차이를 보였으며 OVX-C에 비해 GTP를 첨가한 군에서 높은 경향을 보였고 체중 100 g당 OVX-C에 비해 GTP를 첨가한 식이를 섭취한 OVX-G5와 OVX-G20에서 유의적으로 높은 수준을 보였다. 신장의 무게는 각 군 간의 유의적인 차이를 보여 GTP를 첨가한 식이를 섭취한 군에서 다소 높은 경향을 보였다. 체중 100 g당 신장의 무게는 OVX-C에 비해 GTP 20%를 첨가한 식이를 섭취한 군에서 유의적으로 높았으며 GTP의 첨가량이 높을수록 Sham-C와 비슷한 수준을 보여 GTP의 섭취가 신장의 무게를 증가시키는 경향이 있는 것으로 사료된다.

Table 3 Weight of liver and kidney in experimental groups

Group ¹⁾	Liver		Kidney	
	g	g/100 g BW	g	g/100 g BW
Sham-C	11.1±0.55 ^{2)c3)}	3.72±0.12 ^b	1.96±0.05 ^b	0.66±0.01 ^a
OVX-C	13.6±1.01 ^b	3.76±0.19 ^b	1.98±0.09 ^b	0.55±0.02 ^c
OVX-G5	16.4±0.48 ^a	4.38±0.62 ^a	2.22±0.09 ^a	0.59±0.02 ^{bc}
OVX-G20	15.6±0.71 ^a	4.42±0.19 ^a	2.17±0.03 ^a	0.61±0.01 ^{ab}

¹⁾Refer to Table 1. ²⁾Mean±SE.

³⁾Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05.

대퇴골의 무게, 골길이, 골밀도

대퇴골의 무게는 Table 4에서 보듯이 체중 100 g당 대퇴골의 습윤 무게는 OVX-C에 비해 GTP를 첨가한 식이를 섭취한 군에서 유의적인 차이가 없었으며 체중 100 g당 건조시킨 대퇴골의 무게는 OVX군 간에 유사한 수준이었다. 대퇴골의 부피, 길이와 골밀도는 각 군 간에 유의적인 차이는 보이지 않았으나 골 부피는 Sham-C> OVX-G5> OVX-G20> OVX-C의 순이었고 골 길이는 OVX-G5> OVX-G20> OVX-C> Sham-C의 순으로 나타났다. 대퇴골의 골 밀도는 Sham-C> OVX-G5와 OVX-G20> OVX-C의 순으로 나타났다. 본 연구에서는 대퇴골의 무게, 길이 및 밀도에 유의적인 차이를 보이지 않았으며 이러한 결과는 Won(17)의 녹차 열수추출물이 콩 단백질을 급여한 흰쥐의 칼슘대사와 골격 강도에 미치는 영향 연구와 유사한 결과를 보였다. 일반적으로 탄닌이 Ca의 흡수율을 낮추는 것으로 알려져 있다. 녹차의 탄닌 함량은 품질에 따라 다르며 상품녹차에 비해 하품녹차에 높아 녹차의 종류와 섭취수준, 동물의 연령과 식이조건에 따라 달라질 수 있으며 여러 무기질에 대한 녹차 섭취의 영향 연구가 좀 더 세분화되어야 한다는 보고(17,37)가 있다. 또한 Lee와 Lee(37)는 캡슐 형태와 같은 녹차 추출물의 과잉 섭취는 체내 무기질 대사에 영향을 줄 수 있으며 녹차추출물을 식이의 0.5~5% 제공한 연구에서 무기질 흡수율이 유의적으로 낮았으며 녹차를 식이의 1% 수준으로 첨가할 때까지 Ca의 흡수율을 낮추지 않는 것으로 보인다고 보고하였다.

대퇴골의 회분과 Ca 함량

대퇴골의 회분과 칼슘 및 인의 함량은 Table 5와 같다. 대퇴골의 회분함량은 각 군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 체중 100 g당 대퇴골의 칼슘 함량은 OVX군 간에 유의적인 차이는 보이지 않았으나 GTP 20%를 첨가한 식이

Table 4. Bone weight, bone length and bone mass density of femur in experimental groups

Group ¹⁾	Bone weight (g/100 g BW)		Bone volume (cm ³)	Bone length (cm)	BMD ²⁾ (mg/cm ³)
	Wet	Dry			
Sham-C	0.258±0.01 ^{3)a4)}	0.231±0.00 ^a	206±7 ^{NS5)}	3.66±0.02 ^{NS}	3.62±0.11 ^{NS}
OVX-C	0.218±0.00 ^b	0.192±0.00 ^b	198±6	3.72±0.03	3.44±0.08
OVX-G5	0.220±0.00 ^b	0.199±0.00 ^b	204±12	3.77±0.03	3.59±0.18
OVX-G20	0.219±0.00 ^b	0.196±0.00 ^b	199±9	3.71±0.03	3.59±0.10

¹⁾Refer to Table 1. ²⁾Bone mineral density. ³⁾Mean±SE.

⁴⁾Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05.

⁵⁾Not significant.

Table 5. Ash, calcium and phosphorus content of femur in experimental groups

Group ¹⁾	Ash		Ca		P		Ca+P		Ca/P
	mg	mg/100 g BW	mg	mg/100 g BW	mg	mg/100 g BW	mg	mg/100 g BW	
Sham-C	469±5 ^{2)NS3)}	158±4 ^{NS}	144±7 ^{NS}	48.6±2.62 ^{a4)}	130±3 ^{NS}	43.8±1.05 ^a	274±5 ^{NS}	92.4±1.84 ^a	1.10±0.04 ^{NS}
OVX-C	455±12	127±5	149±4	41.5±1.26 ^b	129±3	36.1±0.46 ^b	278±4	77.6±0.86 ^b	1.15±0.03
OVX-G5	453±5	122±3	150±6	40.2±1.92 ^b	131±4	35.1±0.66 ^b	281±5	75.3±1.29 ^b	1.14±0.05
OVX-G20	457±7	129±3	152±4	43.1±0.74 ^{ab}	132±4	37.4±0.85 ^b	284±4	80.5±0.80 ^a	1.16±0.03

¹⁾Refer to Table 1. ²⁾Mean±SE. ³⁾Not significant.

⁴⁾Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05.

Table 6. Protein, calcium and phosphorus levels of plasma in experimental groups

Group ¹⁾	Protein (mg/mL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Ca/P
Sham-C	103.8±1.23 ^{2)NS3)}	13.15±0.20 ^{NS}	8.37±0.20 ^{NS}	1.58±0.05 ^{NS}
OVX-C	106.0±1.36	13.50±0.25	8.62±0.20	1.57±0.05
OVX-G5	104.9±1.15	13.44±0.24	8.53±0.37	1.58±0.09
OVX-G20	102.3±2.98	13.24±0.26	8.50±0.14	1.56±0.04

¹⁾Refer to Table 1. ²⁾Mean±SE. ³⁾Not significant.

를 섭취한 군에서 다소 높은 경향을 보였으나 Sham-C에 비해 다소 낮은 수준이었다. 체중 100 g당 대퇴골의 인 농도는 OVX군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았으며 대퇴골의 Ca/P는 각 군 간의 유의적인 차이가 없었다.

혈장 속의 Ca대사 관련 지표

Table 6에서 보는 바와 같이 혈장의 단백질, Ca과 P의 농도 및 Ca/P는 각 군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 혈장의 단백질 농도는 OVX군 간에 유의적인 차이는 없었으나 OVX-C에 비해 OVX-G5군과 OVX-G20군에서 다소 낮은 것으로 나타났다. Pyrimidine crosslinks는 식사로부터 대사나 흡수가 되지 않는다. 그래서 흡수 동안 분리된 약 60%의 crosslinks는 단백질과 결합하며 40%는 단백질과 결합하지 않은 free 상태로 남는다. 난소호르몬의 결핍은 골 흡수를 촉진시키며 DPD는 폐경 후 요 중의 농도가 증가되며 호르몬 요법(38)이나 골 흡수제의 사용(39,40)은 요 중의 DPD 농도를 감소시킨다고 보고하였다. 따라서 혈장 단백질의 농도가 낮은 것은 GTP의 보충에 의해 요 속의 골 흡수 진단 시 지표로 사용되는 DPD의 mediated가 소변으로 분비가 증가되어지는 것에 기인한다(41). 혈장의 Ca과 P의 농도는 OVX-C> OVX-G5> OVX-G20> Sham-C의 순으로 GTP를 보충한 군에서 다소 낮은 수준을 보였다. 혈장의 Ca/P는 각 군 간에 유의적인 차이는 없었다. 임상연구에 의하면 폐경기 이후 혈장 칼슘의 농도가 높다는 보고(42)가 있으며 본 연구에서도 OVX군에서의 칼슘 농도가 Sham-C에 비해 상대적으로 높은 경향을 보여 유사한 결과를 보였다. 일반적으로 골 흡수는 혈장 Ca 수준이 높을 때 낮으며, 골 흡수와 골 형성은 혈장 P의 수준이 정상농도보다 높을 때 둘 다 자극되어진다(41). 이상의 결과들에서 보면 난소절제 흰쥐에게 GTP의 보충이 각 군 간에 유의적인 차이를 보이지는 않았지만 골 흡수와 골 형성을 다소 증가시켜 주는 경향을 보인다고 할 수 있을 것 같다.

Table 7에서 보듯이 골격 형성의 생화학적 지표인 ALP의 활성은 OVX군 간에 유의적인 차이는 나타내지 않았으나 GTP를 첨가한 식이를 섭취한 군에서는 다소 감소되는 경향을 보였다. Sham-C에 비해 OVX군에서 ALP 활성이 유의적으로 높은 것으로 나타났다. ALP는 parathyroid hormone의 표적 효소에 속하며 조골세포에서 분비되는 당단백질로 임상에서 가장 흔히 이용되는 골 형성 지표이며 ALP는 조골세포에서 골 생성 시 생성되는 단백질로 골 신생이 활발하게

Table 7. ALP, estradiol and osteocalcin levels of plasma in experimental groups

Group ¹⁾	ALP ²⁾ (Units/L)	Estradiol (pg/mL)	Osteocalcin (ng/mL)
Sham-C	114.1±6.0 ^{3)b4)}	5.30±0.50 ^{NS5)}	56.9±6.3 ^b
OVX-C	161.1±7.9 ^a	2.10±1.35	119.3±14.0 ^a
OVX-G5	157.1±13.7 ^a	2.76±1.84	94.1±13.2 ^{ab}
OVX-G20	140.5±12.4 ^{ab}	4.85±2.35	65.0±11.9 ^b

¹⁾Refer to Table 1. ²⁾Alkaline phosphatase. ³⁾Mean±SE.

⁴⁾Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05.

⁵⁾Not significant.

진행될 때 혈 중 농도가 훨씬 증가되며 골 생성 작용의 지표로 골다공증, 골절 환자와 성장기 초기, 그리고 Ca결핍 시와 고 Ca을 공급받을 때 증가한다는 보고(43)가 있다. 혈장의 ALP 농도는 폐경 후 골다공증 환자에게서 높게 관찰된다. 혈장 ALP 농도가 Sham-C에 비해 난소 절제군에서 높게 관찰된다는 연구 보고(44)들은 본 연구의 결과와 일치하였다. Moon 등(45)은 ALP는 골밀도가 증가할수록 유의하게 감소함으로써 골격 및 칼슘대사를 조절하는 요인임을 보고하였고 Aloia 등(46)의 연구에서 ALP 활성도는 골질량과 음의 상관관계를 보였다고 하였으며 본 연구에서도 골밀도가 가장 낮은 OVX-C에서 ALP 활성이 가장 높게 나타났다. Estradiol의 농도는 각 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았으나 Sham-C> OVX-G20> OVX-G5> OVX-C의 순으로 나타났다. GTP를 첨가한 식이를 제공한 군에서 OVX-C에 비해 농도가 증가하는 경향을 보였으며 GTP의 첨가량이 높을수록 증가하는 경향을 보여 GTP 20%를 보충한 군에서의 estradiol 수준은 Sham-C와 유사한 수준을 보여 GTP가 혈 중 estradiol 농도에 영향을 미치는 것으로 사료된다. Osteocalcin은 직접적인 골 흡수를 나타내지 않고 골 흡수 작용에 수반해서 일어나는 골 형성의 증가를 나타내며 조골세포에서 생성된 것 중 약 30%가 혈액 중으로 방출되므로 골 형성의 정도를 예측할 수 있는 생화학 지표(47)로 사용되고 있다. Osteocalcin은 폐경 후 증가하며 폐경 후 골 소실을 잘 예측할 수 있는 지표로 알려져 있다. 본 연구에서는 각 군 간의 유의적인 차이를 보여 OVX-C에 비해 GTP를 첨가한 군에서 유의적으로 감소하였으며 GTP의 첨가량이 많을수록 혈장 osteocalcin의 농도가 감소하였고 OVX-G20에서는 Sham-C와 유사한 수준으로 나타났다.

본 연구의 실험 결과에서는 ALP 활성이 증가될수록 osteocalcin의 농도도 증가되는 경향을 보였으며 이러한 결과

는 Flolik 등(32)과 Sarioglu 등(47)의 연구 결과와 유사하게 나타났다. 폐경기에 ALP나 osteocalcin의 농도가 높은 것은 골 교체율이 빠른 것을 나타내므로 OVX군이 Sham-C에 비해 골 교체율이 빠르며, OVX군에서의 골 교체율은 OVX-C가 GTP를 보충한 군보다 빠르게 일어나는 것을 보여준다.

요 중의 골 흡수 지표

골 흡수를 진단하는데 특이성이 높아 골 흡수 지표로 알려진 콜라겐의 crosslink인 DPD는 골격 내에 분포하며 골격에서만 유리되며 파골세포의 흡수와 더불어 이들 콜라겐 부산물의 생성은 소변으로 배설된다. 따라서 소변 속의 crosslink value를 측정하는 것은 골 흡수의 특이적인 지표로 보고되고 있다(48). 요 중의 DPD 양은 현재의 골의 양 측정보다는 역동적인 전신의 골 대사에 따른 변화 상태를 잘 반영한다고 판정할 수 있다(49,50). DPD의 crosslink value는 소변 속의 크레아티닌(nM)에 대한 DPD(nM)의 비(nM/mM)로 나타내며 이 지표는 매우 정확한 것으로 알려져 있다. 요 중의 DPD 배설량의 증가는 파골세포의 활성으로 골 흡수 증가를 의미하고 폐경 후 골밀도와는 음의 상관관계를 가지며(3) 요 중 DPD 농도는 종, 연령, 성장률, 호르몬 상태, 스트레스 등 여러 가지 요인에 의해 영향을 받기 때문에 실험에 따라 보고된 값이 차이가 나며(51) 최근 여러 골 대사질환에 DPD 배설량 측정을 이용하고 있다(49).

요 중의 골 흡수 지표는 Fig. 1에서 보는 바와 같으며 crosslink value는 OVX군의 DPD crosslink value가 Sham-C에 비해 현저하게 높은 수준으로 나타나 OVX군의 골 흡수가 높음을 확인할 수 있었으나 OVX군에서는 GTP를 첨가한 식이를 제공한 OVX-G5와 OVX-G20의 DPD crosslink value가 OVX-C에 비해 낮은 수준이었다. 난소호르몬의 결핍은 골 흡수를 촉진시키며 DPD는 폐경 후 요 중의 농도가 증가되며 호르몬 요법(38)이나 골 흡수제의 사용(39,40)은 요 중의 DPD 농도를 감소시킨다고 보고하였으며 DPD의

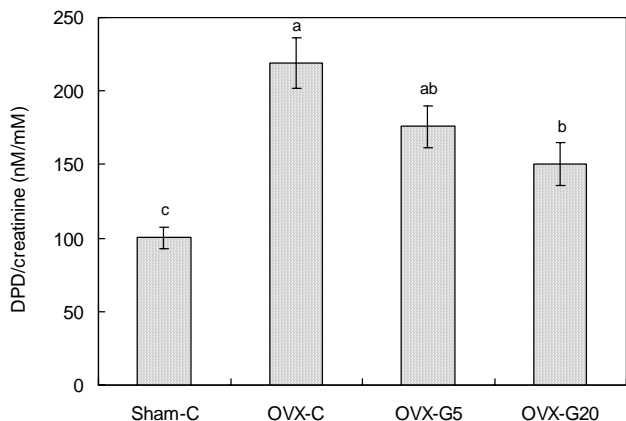


Fig. 1. Deoxypyridinoline crosslink values of the experimental groups. Groups are the same as in Table 1. Data represent the means±SE. Values sharing same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at p<0.05.

감소는 골 교체율을 낮추고 골 용해를 감소시켜 골 대사에 유리한 작용을 하는 것으로 보인다. 따라서 본 연구의 결과에서는 GTP 첨가가 난소 절제 흰쥐 모델에서 골 흡수율을 억제하여 골 보호 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 폐경 후 녹차잎 함유 건강기능성 제품으로 녹차가루(15%)와 녹차잎 추출물(35%), 두충추출물(15%), 감잎추출물(15%), 검정콩 가루(18%) 및 찹쌀 풀과 꿀(2%) 등을 배합하여 조제된 녹차가공품(이하 GTP)이 고콜레스테롤 식이를 섭취시킨 난소절제 흰쥐의 골 대사에 미치는 효과를 알아보았다. 실험동물은 10주령의 Sprague-Dewley 암컷 흰쥐(평균 체중 279±2 g)로 완전임의배치로 한 군당 10마리씩 4군으로 나누어 사육하였으며 양쪽 난소를 절제(ovariectomy: OVX)하였다. Sham 대조군은 실험군과 동일한 스트레스를 주기 위해 난소를 절제하지 않고 개복수술만 실시한 후 2주간 배합사료를 급여한 후 Sham-대조군(Sham-C)과 OVX-대조군(OVX-C)은 AIN' 76에 기초해서 제조한 콜레스테롤 첨가 식이를, OVX 실험군은 콜레스테롤 첨가 식이에 GTP 5%(OVX-G5)와 20%(OVX-G20)를 함유한 실험 식이를 조제하여 6주간 급여하였다. 식이 조제 시 Ca 함량은 총 식이의 0.4% 수준으로 조정하였으며 Sham-C, OVX-C와 OVX-G5는 CaCO₃를 첨가하여 조정하였고 OVX-G20은 Ca 함량이 0.4%였으므로 별도의 CaCO₃를 첨가하지 않았다. OVX군에서의 식이효율은 OVX-G5가 유의적으로 낮았으며 Sham-C과 유사한 수준을 보였다. 대퇴골의 골밀도는 각 군 간에 유의적인 차이는 없었으나 Sham-C>OVX-G5와 OVX-G20>OVX-대조군의 순으로 나타났다. 골격 형성의 생화학적 지표인 alkaline phosphatase 활성은 OVX군 간에 유의적인 차이는 나타내지 않았으나 GTP를 첨가한 식이를 섭취한 군에서는 다소 감소되는 경향을 보였다. Estradiol의 농도는 각 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았으나 Sham-C>OVX-G20>OVX-G5>OVX-C의 순으로 나타나 GTP 20%를 첨가한 군과 Sham-C가 유사한 수준을 보였다. Osteocalcin 농도는 OVX-C에 비해 GTP를 첨가한 군에서 유의적으로 감소하였으며 GTP의 첨가량이 많을수록 혈청 osteocalcin 수준이 감소하였고 OVX-G20에서는 Sham-C과 유사한 수준으로 나타났다. 본 연구의 결과는 ALP 활성이 증가될수록 osteocalcin의 농도도 증가되는 경향을 보였다. DPD crosslink value는 OVX-G20이 OVX-C에 비해 유의적으로 낮은 수준이었다. 폐경기에 ALP 활성과 osteocalcin의 농도가 높은 것은 골 교체율이 빠른 것을 나타내므로 난소절제 흰쥐에서 GTP가 골 교체율을 감소시켜 골 흡수율을 억제함으로써 골 보호 효과를 나타내는 것으로 사료된다. 그러나 GTP 5%와 20%의 첨가량에 따른 차이는 보이지 않았다. 이상의 결과들로 미루어 볼 때 난소절제 흰쥐모

델의 골 대사 지표에 다소 유리하게 영향을 미치는 것으로 나타나 녹차가공품이 골다공증 예방을 위한 기능성식품으로서의 가능성을 보여주었으며, 골다공증 예방을 위한 녹차가공품의 효과적인 섭취량은 계속적으로 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 제13차 산학연 공동기술개발 컨소시엄 사업의 연구 사업비 지원으로 이루어진 결과이며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Lee JW, Kim HJ, Jhee OH, Won HD, Yu YJ, Lee MH, Kim TW, Om AS, Kang JS. 2005. Effects of alternative medicine extract on bone mineral density, bone strength and biochemical markers of bone metabolism in ovariectomized rats. *Korean J Food Nutr* 18: 72-80.
- Lee YB, Lee HJ, Kim KS, Lee JY, Nam SY, Cheon SH, Sohn HS. 2004. Evaluation of the preventive effect of isoflavone extract on bone loss in ovariectomized rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 1040-1045.
- Byun JS, Rho SN, Park JS, Park HM. 2005. Effect of isoflavone supplementation on bone metabolism in ovariectomized rats at different ages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 1350-1356.
- The Korean Society of Bone Metabolism. 1997. *Osteoporosis*. Seoul, Korea.
- Grodstein E, Stamfer MJ, Colditz GA, Willet WC, Manson JE, Joffe M, Rosner B, Fuchs C, Hankinson SE, Hunter DJ, Hennekens CH, Speizer FE. 1997. Postmenopausal hormone therapy and mortality. *New Engl J Med* 336: 569-573.
- Lee DH, Sung CJ. 2003. Effect of soy isoflavone supplementation on bone metabolism marker and urinary mineral excretion in postmenopausal women. *Korean J Food Nutr* 36: 476-482.
- Brown JP, Delmas PD, Malaval L, Edouard C, Cahpuy MC, Meunier PJ. 1984. Serum bone-gla protein: a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 1: 1091-1093.
- Liu G, Peacock M. 1998. Age-related changes in serum undercarboxylated osteocalcin and its relationships with bone density, bone quality, and hip fracture. *Calcif Tissue Int* 62: 286-289.
- Telci A, Catatay U, Kurt BB, Kayali R, Sivas A, Akcay T, Gokyigit A. 2000. Changes in bone turnover and deoxypyridinoline levels in epileptic patients. *Clin Chem Lab Med* 38: 47-50.
- Sirtori P, Sosio C, Polo RM, Tenni R, Rubinacci A. 1997. A comparative study on biochemical markers of collagen breakdown in postmenopausal women. *Pharmacol Res* 36: 229-235.
- Kim MJ, Choi JH, Yang JA, Kim SY, Kim JH, Lee JH, Kim JK, Rhee SJ. 2002. Effects of green tea catechin on enzyme activities and gene expression of antioxidative system in rat liver exposed to microwaves. *Nutr Res* 22: 733-744.
- Rhee SJ, Kwag OG, Kim SO. 1998. Effect of catechin on the microsomal mixed function oxidase system and lipid peroxidation of lung in diabetic rats. *Kor J Gerontol* 8: 49-55.
- Kim MJ, Choi JH, Yang JA, Kim SY, Kim JH, Lee JH, Kim JK, Rhee SJ. 2002. Effects of green tea catechin on enzyme activities and gene expression of antioxidative system in rat liver exposed to microwaves. *Nutr Res* 22: 733-744.
- Sartippour MR, Heber D, Ma J, Lu Q, Go VL, Nguyen M. 2001. Green tea and its catechins inhibit breast cancer xenografts. *Nutr Cancer* 40: 149-156.
- Sin MK, Han SH, Han GJ. 1997. The effect of green tea on the serum lipid and liver tissue of cholesterol fed rats. *Korean J Food Sci Technol* 29: 1255-1263.
- Lee JW, Shin HS. 1993. Antioxidant effect of aqueous extract obtained from green tea. *Korean J Food Sci Technol* 25: 759-763.
- Won HR. 2005. The effect of hot water soluble extract from green tea on metabolism of calcium and bone strength in rats fed soy protein diet. *Korean J Community Living Science* 16: 59-64.
- Oh HS, Kim HC, Lee SI, Ahn DK. 1995. Effect of *Eucommiae cortex* and folium on the ovariectomized rat as the model of postmenopausal osteoporosis. *J Herbology* 10: 59-68.
- Cho MK, Noh KH, Kim JJ, Song YS. 2007. Anti-atherogenic effect of green tea product through hypolipidemic and anti-oxidative action in ovariectomized rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1263-1270.
- Diersen-Schade DA, Richard MJ, Norman LJ. 1984. Effect of dietary calcium and fat on cholesterol in tissues and faces of young goats. *J Nutr* 114: 2292-2300.
- Zittermann A, Scheld K, Ganz A, Stehile P. 1999. Wheat bran supplementation does not affect biochemical markers of bone turnover in young adult women with recommended calcium intake. *Br J Nutr* 82: 431-435.
- Chen Z, Stini W, Marshall JR, Martinez ME, Guillen-Rodriguez JM, Roe D, Alberts DS. 2004. Wheat bran fiber supplementation and bone loss among older people. *Nutrition* 20: 747-751.
- Wong KH, Katsumata SI, Masuyama R, Uehara M, Suzuki K, Cheung P. 2006. Dietary fibers from mushroom sclerotia. 4. in vivo mineral absorption using ovariectomized rat model. *J Agric Food Chem* 54: 1921-1927.
- Liao F, Andalibi A, deBeer FC, Fogelman AM, Lusic AJ. 1993. Genetic control of inflammatory gene induction and NF- κ B-like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice. *J Clin Invest* 91: 2572-2579.
- Zeni S, Gornez-Acotto C, Di Gregorio S, Mautalen C. 2000. Differences in bone turnover and skeletal response to thyroid hormone treatment between estrogen-depleted rats. *Calcif Tissue Int* 67: 173-177.
- Erickson GF. 1996. The ovary: basic principles and concepts. In *Endocrinology and Metabolism*. 3rd ed. Felig P, Baxter JD, Frohman LA, eds. McGrawHill Inc, New York, USA. p 973-1015.
- Knott L, Bailey AJ. 1998. Collagen crosslinks in mineralizing tissues: A review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone* 22: 181-187.
- Longlands MG, Wiener K. 1978. Anomalous behavior of control sera in automated versions of the Kind and King alkaline phosphatase method. *Ann Clin Biochem* 15: 164-167.
- Chasson AL, Grady HT, Stanley MA. 1961. Determination of creatinine by means of automatic chemicals analysis. *Am J Clin Pathol* 35: 83-89.
- Bray DL, Briggs CM. 1984. Decrease in bone density in young male guinea pigs fed high levels of ascorbic acid. *J Nutr* 114: 920-928.
- Choi SJ, Kim MK. 2003. Effect of grape intake on cadmium

- metabolism of rats during aging. *Korean J Nutr* 36: 997-1012.
32. Frolik CA, Bryant HU, Black EC, Magee DE, Chandrasekhar S. 1996. Time-dependent changes in biochemical bone markers and serum cholesterol in ovariectomized rats: Effects of raloxifene HCl, tamoxifen, estrogen and alendronate. *Bone* 18: 621-627.
 33. Kalu DN, Arjmandi BH, Liu CC, Salih MA, Bimbaum RS. 1994. Effects of ovariectomy and estrogen on the serum levels of insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3. *Bone Miner* 25: 135-148.
 34. Lee YB, Lee HJ, Kim KS, Lee JY, Nam SY, Cheon SH, Shon HS. 2004. Evaluation of the preventive effect of isoflavone extract on bone loss in ovariectomized rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 1040-1045.
 35. Okasaki R, Inoue D, Shibata M, Saika M, Kido S, Ooka H, Tomiyama H, Sakamoto Y, Matsumoto T. 2002. Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) α or β . *Endocrinology* 143: 2349-2356.
 36. O JH, Lee YS. 1993. Effects of dietary calcium levels on the reduction of calcium availability in ovariectomized osteoporosis model rats. *Korean J Nutr* 26: 277-285.
 37. Lee SH, Lee YS. 1998. Effects of late-harvested green tea extract on lipid metabolism and Ca absorption in rats. *Korean J Nutr* 31: 999-1005.
 38. Notelovitz M. 1993. Osteoporosis: screening, prevention and management. *Fertility Sterility* 59: 714-715.
 39. Price PA, Pathermore JG, Doftos LJ. 1980. New biochemical marker for bone metabolism. *J Clin Invest* 66: 878-883.
 40. Choi MJ, Yu TS. 2004. Effects of red-yeast-rice supplementation on bone mineral density and bone mineral content in ovariectomized rats. *Korean J Nutr* 37: 423-430.
 41. Seo HJ, Moon KD, Jeon SM, Kim JH, Choi MS. 2003. Supplementation of safflower seed powder and extracts enhances bone metabolism in rib-fractured rats. *Nutraceuticals & Food* 8: 46-53.
 42. Nordin BEC, Wishart JM, Clifton PM, MaArthur R, Scopacasa F, Need AG, Morris HA, O'Loughlin PD, Horowitz M. 2004. A longitudinal study of bone-related biochemical changes at the menopause. *Clin Endocrinol* 61: 123-130.
 43. Lim SK. 1994. Clinical significance and application of bone turnover marker. *Korean J Bone Metabolism* 1: 1-11.
 44. Lee JA, Noh SH, Ahn DK, Choi HY. 2001. Effects of the *Eucommiae cotrtex* and *Chanenomelis fructus* on the aged ovariectomized rat of postmenopausal osteoporosis. *Kor J Herbology* 16: 201-206.
 45. Moon SJ, Kim JH, Lim SK. 1996. Investigation of risk of low serum 25-hydroxyvitamin D levels in Korean menopausal women. *Korean J Nutr* 29: 981-990.
 46. Aloia JF, Cohr SH, Vaswani A, Yeh JK, Yuen K, Ellis K. 1985. Risk factors for postmenopausal osteoporosis. *Am J Med* 78: 95-100.
 47. Sarioglu M, Tuzun C, Unlu Z, Tikiz C, Taneli F, Uyanik BS. 2006. Comparison of the effects of alendronate and risedronate on bone mineral density and bone turnover markers in postmenopausal osteoporosis. *Rheumatol Int* 26: 195-200.
 48. Erye DR. 1996. Biochemical markers of bone turnover. In *Primer on the metabolic bone diseases and disorder of mineral metabolism*. 3rd ed. Favus MJ, ed. Raven Press, New York, USA. p 114-118.
 49. Uebelhart D, Gineyts E, Chapuy MC, Delmas PD. 1990. Urinary excretion of pyridium crosslinks: a new marker of bone resorption in metabolic bone disease. *Bone Mineral* 8: 87-96.
 50. Seibel MJ, Gartenberg SJ, Ratcliffe A, Robins SP, Bilezikian JP. 1992. Urinary hydroxypyridium crosslinks of collagen in primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 74: 481-486.
 51. Christel P, Catherine BP, Brigitte C, Patrice L, Marie-Jeanne D, Jean-Pierre B, Veronique C. 2001. Soybean isoflavones dose-dependently reduce bone turnover but do not reverse established osteopenia in adult ovariectomized rats. *J Nutr* 131: 723-728.

(2008년 9월 11일 접수; 2008년 10월 27일 채택)