

구기자와 구기엽 추출물이 난소적출 흰쥐의 골다공증에 미치는 영향

김진호 · 김정상[†]

동신대학교 한의과대학 해부학교실

Effects of Lycii Fructus and Lycii Folium Extracts on Osteoporosis in Ovariectomized Rats

Jin-Ho Kim and Jeong-Sang Kim[†]

Dept. of Anatomy, College of Korean Medicine, Dongshin University, Jeonnam 520-714, Korea

ABSTRACT The effects of Lycii fructus and Lycii folium on osteoporosis and serum cholesterol levels were tested in ovariectomized (OVX) rats. Twenty-four female Sprague-Dawley rats were divided into four groups: Sham group (sham-operated), Control group (OVX, ovariectomized model), LCF group (Ovx+Lycii fructus extract), and LCL group (OVX+Lycium folium extract). After 8 weeks, the OVX (330±5.39 g), LCF (315±2.99 g), and LCL (318±2.06 g) groups showed increased body weight compared with sham group (281±1.71 g). The levels of serum osteocalcin (OC) also increased in the LCF (444.6±26.9 ng/mL) and LCL (407±18.9 ng/mL) groups compared with the OVX group (107±3.52 ng/mL). The activities of serum alkaline phosphatase (ALP) increased in the LCF (108±2.7 U/L) and LCL (407±18.9 ng/mL) groups compared with the OVX group (95±2.9 U/L). Stereomicroscopy found that the low bone density that developed in the OVX group was significantly reversed in the LCF and LCL groups after 8 weeks. We also obtained molecular-based *in vivo* evidence that supports a mechanism of action involving novel estrogen receptor (ER α) modulator in the uterus. We found that expression of ER α mRNA in the OVX rat uterus was elevated by *Lycium chinense*. These results suggest that Lycii fructus and Lycii folium administered to rats during 8 weeks after oophorectomy may partially recover postmenopausal osteoporosis or delay the progression of osteoporotic changes.

Key words: *Lycium chinense*, ovariectomized rat, estrogen receptor, osteoporosis

서 론

골다공증(osteoporosis)은 뼈의 강도를 약화시키고 골절의 위험성이 증가되는 골격계 질환이다(1). 세계보건기구(WHO)에 따르면 전 세계적으로 7,500만 명의 골다공증 환자가 있으며 매년 9백만 명의 새로운 골절환자들이 발생하는 것으로 추정하였다(2,3).

골다공증이란 만성적이고 여러 가지 원인에 의한 골격계 질환으로 뼈의 질량이 감소하고 미세구조적인 변형의 원인이 된다(4,5). 골다공증의 병리·생리적인 면은 유전적, 호르몬, 또는 환경적인 요인 등과 같은 복합적인 것이라 할 수 있다(6). 또한 골다공증에 의한 골절은 일반적으로 병의 사망률이나 의료비용 증가 등 사회·의학적 면에서 중요하다(7). 골다공증은 폐경기 이후 estrogen의 결핍 때문에 급격히 증가하고(8-10), 전 세계적으로 여성의 약 30~40%가 평생 동안 한번 이상의 골절 경험을 한다고 하였다(11).

많은 연구자들은 난소적출 후 유발된 동물모델을 이용하

여 골다공증에 대한 다양한 연구들을 수행하여 왔다(12-14). 또한 골다공증은 여러 요인들에 의해서 발병되는 질환이기에 난소적출 동물모델과 식이의 관련성에 관한 연구를 하였다(15). Estrogen은 성장과 분화뿐만 아니라 뼈 대사와 심혈관계에도 영향을 미치며(16), angiotensin 전환효소를 감소시키기 때문에 폐경기 이후의 여성들은 관상동맥 질환의 위험성이 높아진다고 하였다(17). 폐경 후 여성 호르몬의 결핍은 뼈의 재형성과정에 관여하는 뼈모세포(osteoblast)와 뼈파괴세포(osteoclast)에 영향을 미치게 된다. 그 결과 뼈 흡수 속도가 뼈 생성 속도보다 빠르게 진행되기 때문에 뼈 손실이 유발된다고 하였다(18).

구기자 나무(*Lycium chinense* Miller)는 가지과(Solanaceae)에 속하는 덩굴성 관목으로 우리나라를 비롯하여 중국, 대만, 일본 등지에서 재배 및 자생하고 있다. 열매인 구기자(Lycii fructus), 뿌리인 지골피(Lycii cortex), 그리고 구기엽(Lycii folium) 등은 콩팥과 간을 보호하고 근육과 뼈를 튼튼하게 하며, 눈을 밝게 하고 관절염 등을 치료하며, 갈증을 멈추게 하는 효능이 있다고 알려져 있다(19). 구기자의 주요 유효성분으로는 betaine, zeaxanthin, β -sitosterol, physaligen, cholin 등이 보고되고 있다(20,21). Park 등(22)은 구기자 추출물을 trimethyltin을 투여하여 뇌손상을 유발

Received 2 September 2013; Accepted 14 October 2013

[†]Corresponding author.

E-mail: jskim@dsu.ac.kr, Phone: +82-61-330-3512

시킨 흰쥐에 2주 동안 투여(100 mg/kg)한 결과 기억력과 학습의 향상 효과가 있었다고 하였으며, Koo(23)의 연구에서도 골다공증 동물모델에 구기자 추출액을 투여한 결과 칼슘과 인의 뼈 기질 내 저장효과가 있다고 하였으나, 그 이후 구기자과 골다공증에 관한 연구는 거의 이루어지지 않았으며, 특히 구기엽이 골다공증에 미치는 연구는 이루어지지 않았다. 구기자과 구기엽은 우리나라에서는 청양과 진도에서 많이 재배되고 있으며, 건강 기능성식품으로 활용하기 위해서는 보다 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 사료되었다.

본 연구는 Salville의 방법(24)에 의하여 난소를 적출한 흰쥐에 구기자과 구기엽의 물추출물을 투여하여 체중의 변화, 뼈 형성인자 osteocalcin(OC)과 혈청 alkaline phosphatase(ALP), 뼈의 형태학적 관찰, 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ERα)의 유전자 발현 등의 검사를 통하여 효능을 구명하고자 시행하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험에 사용할 동물은 200±10 g의 암컷 Sprague-Dawley 계 흰쥐를 선타코(오산, 한국)로부터 구입하였다. 실험동물은 동신대학교 한의과대학 동물사육실에서 고형사료(rat용, 다물사이언스, 대전, 한국)와 물을 충분히 공급하면서 1주간 실험실 환경(온도: 21±2°C, 습도: 50~60%, 명암: 12시간 주기)에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

구기자과 구기엽의 추출 및 동결건조

본 실험에 사용한 약물은 진도산 구기자(Lycii fructus)와 구기엽(Lycii folium)을 2010년 10월 수확한 것을 (주)옴니허브(대구)에서 구입하여 사용하였다. 구기자 500 g과 구기엽 500 g에 증류수 500 mL를 각각 가하여 대용약탕기(DWP-9900T, 대용, 증평, 한국)로 2시간 30분 전탕하였다. 전탕 후 추출액은 부직포와 Whatman paper No. 1(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 여과한 다음 감압 농축하였으며, 동결건조기(FD8505, 일신, 동두천)를 이용하여 동결건조 후 구기자 25 g, 구기엽 22.5 g 분말 추출물을 얻었다.

흰쥐의 난소적출

생후 9주령의 Sprague-Dawley 흰쥐(SD계)를 무균 조작 하에 양측 난소적출술을 시행하였다. 일반적인 수술 전 처치방법에 따라 10% 포비돈 요오드로 수술부위 및 주위를 소독한 후, 무균 조작 하에서 하복부의 피부, 근육, 복막의 절개를 시행하여 양쪽 난소를 모두 노출시킨 후 난소를 적출하고 절제부위는 결찰 및 봉합하였다.

실험군의 설정 및 약물 투여

구기자과 구기엽의 골다공증 예방효과에 관한 실험군은

정상군으로 난소적출 하지 않고 하복부의 피부와 복막 절개 후 봉합한 가장수술군(Sham), 난소적출군(OVX), 난소적출 후 구기자 투여군(LCF)과 구기엽 투여군(LCL) 등 4개군으로 분류하였다. 난소를 적출한 다음날부터 Sham군은 음용수로 물을 투여하였으며, LCF군과 LCL군은 음용수에 건조분말 100 mg/kg을 희석하여 매일 공급하였다. 모든 실험군은 6마리씩 사용하였다.

체중 측정

대조군과 실험군의 체중은 12시간 동안 절식시킨 다음 측정(MW2-N, CASFA, Yangju, Korea)하였으며, 2주 간격으로 8주 동안 측정하였다.

혈청 중 osteocalcin 측정

혈청 중 osteocalcin 함량은 osteocalcin RIA kit(Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, CA, USA)를 사용하여 radioimmunoassay(RIA)법에 의하여 측정하였다.

혈청 중 alkaline phosphatase(ALP) 측정

혈청 중 ALP의 활성도 측정은 Kind-King법에 따라 ALP 측정용 시약(Asan Pharm., Anseong, Korea)을 사용하여 혈청 중 ALP 함량을 측정하였다.

넙다리뼈의 실체현미경 관찰

흰쥐의 대퇴골(femur)을 분리 적출한 다음 5% nitric acid에서 탈회 후 세로 절단한 다음 실체현미경(SMZ1000, Nikon, Tokyo, Japan)을 이용하여 촬영하였다.

Estrogen receptor의 유전자 발현

흰쥐의 자궁을 획득한 후 RNA-spin™ total RNA extraction kit(Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 총 RNA를 얻었다. 총 RNA는 분광광도계를 이용하여 OD값을 측정하고 총 RNA 양을 정량한 후 -70°C 냉동고에 보관하였다. Reverse transcription은 DEPC-DW로 최종부피를 50 μL로 맞춘 후 total RNA에 RT-premix(Bioneer, Daejeon, Korea) 혼합용액을 사용하여 70°C에서 5분 동안 RNA를 변성시키고 42°C에서 1시간 동안 역전사하여 cDNA를 합성하며, 94°C에서 5분 동안 M-MLV reverse transcriptase를 불활성화 시키는 과정으로 진행되었다. 합성된 cDNA는 PCR-PreMix(Bioneer)와 각각의 primer(Table 1)를 사용하여, β-actin은 94°C 50초, 58°C 50초, 72°C 50초의 30 cycle로, Bcl-2는 94°C 50초, 57°C 50초, 72°C 50초의 35 cycle로, Bax는 94°C 50초, 56°C 50초, 72°C 50초의 35 cycle로, TGF-β1은 94°C 50초, 61°C 50초, 72°C 50초의 35 cycle로, COX-2는 94°C 50초, 60°C 50초, 72°C 50초의 35 cycle로 PCR을 수행하였다. 이렇게 얻어진 PCR product는 1.5% agarose gel에서 전기 영동하여 분리한 후 ethidium bromide(EtBr) 염색을 통하여 발현

Table 1. Primers used for real-time PCR

Gene	Left primer	Right primer
ER α	AAT-GAA-ATG-GGT-GCT-TCA-GG	AAG-GAC-AAG-GCA-GGG-CTA-TT
GAPDH	GAG-GAC-CAG-GTT-GTC-TCC-TG	GGA-TGG-AAT-TGT-GAG-GGA-GA

의 정도를 비교하였다.

통계 분석

실험으로부터 얻은 결과들의 실험군별 상호비교를 한 평균치는 평균±표준오차(mean±SE)로써 산출하였다. 실험군들 간의 통계처리는 Student's *t* test를 하였고 *P*-value가 0.05 미만인 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

체중 변화에 미치는 영향

폐경 후 난소 호르몬 생산의 감소는 지방 축적에 의한 체중의 증가, 인슐린 민감도의 감소, 심혈관질환의 고위험성 등이 특징이다(25). 호르몬 대체치료는 폐경기 이후 약 60%까지 증가하는 것을 완화하고, 이와 같은 사실은 심혈관질환의 위험 요인들에 긍정적인 영향을 미치게 된다고 하였다(26). 남성에 비하여 폐경기 이전의 여성이 심혈관질환의 위험성 낮다는 것은 잘 알려져 있는 사실이지만, 폐경기 이후에는 남녀 차이가 없는 것은 에스트로겐이 심혈관의 건강에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(27). 난소를 절제한 실험동물은 estrogen의 결핍 때문에 전반적으로 체중이 증가하는 것으로 알려져 있다(23,28). 본 연구에서는 OVX에 의하여 유도된 골다공증 흰쥐에 구기자과 구기엽 추출물의 효과를 검색한 결과 2주 후부터 Sham군(248±1.71 g)에 비하여 OVX군(283±3.50 g)의 체중은 증가하였다. 4주 후부터 Sham군(265±1.8 g)에 비하여 OVX군(312±3.51 g)에서 증가하였으며, LCF군(297±3.02 g)과 LCL군(295±3.12 g) 또한 Sham군에 비하여 증가하였으나 OVX군에 비하여 감소하였다. 8주 후에는 Sham군(281±1.71 g)에 비하여 OVX군(330±5.39 g)은 약 17% 증가하였으며, 이에 비하여 LCF군(315±2.99 g)과 LCL군(318±2.06 g)은 Sham군에 비하여 증가하였으나 OVX군에 비해서는 감소하였다(Fig. 1). Koo(23)의 연구 결과에서는 구기자 투여군이 대조군보다 다소 증가하였으나, 본 연구에서는 구기자를 투여한 실험군이 대조군에 비하여 4주 후부터 다소 감소하였다.

혈청 중 osteocalcin(OC) 농도 변화에 미치는 영향

OC는 뼈의 구조에서 칼슘과 단단하게 결합되어 있는데, 새로운 뼈 형성 시 뼈모세포의 활성을 간접적으로 반영하는 뼈 형성지표로 알려져 있다(29). 혈청 중 OC 함량은 난소절제를 시행하면 다소 감소한다고 하였다(30).

본 실험 결과 Sham군(63.8±5.70 ng/mL)이 가장 낮았으

며, OVX군(107±3.52 ng/mL)은 Sham군에 비하여 증가하였으나, LCF군(444.6±26.90 ng/mL)과 LCL군(407±18.90 ng/mL)은 OVX군에 비하여 통계적으로 유의성 있게(*P*<0.05) 증가하였다(Fig. 2). 이와 같은 결과는 여러 연구자들의 보고와 일치하였다(11-13). 그러나 실험군인 구기자와 구기엽 투여군에서 OC의 농도는 높았다. 이러한 결과는 구기자와 구기엽 추출액의 투여가 난소절제 결과 유발된 골다공증의 뼈에서 뼈모세포를 활성화 시켰을 것으로 보이며, 또한 뼈과피세포 활성화도는 감소시켰을 것으로 생각된다.

혈청 중 alkaline phosphatase(ALP)에 미치는 영향

난소를 절제하면 뼈를 재구성하는 표지물질인 혈청 ALP는 감소한다고 하였다(30). 본 연구 결과에서도 난소를 절제한 OVX군(95±2.9 U/L)에서 가장 낮게 나타났다. 그러나 실험군인 LCF군(108±2.7 U/L)과 LCL군(109±2.0 U/L)은

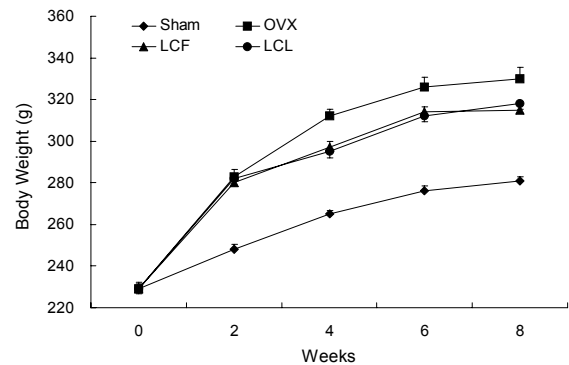


Fig. 1. Changes of body weight in rats. Sham, sham-operated; OVX, ovariectomized; LCF and LCL, ovariectomized and each of LCF and LCL administered group. Each point represents the mean value±SE (n=6).

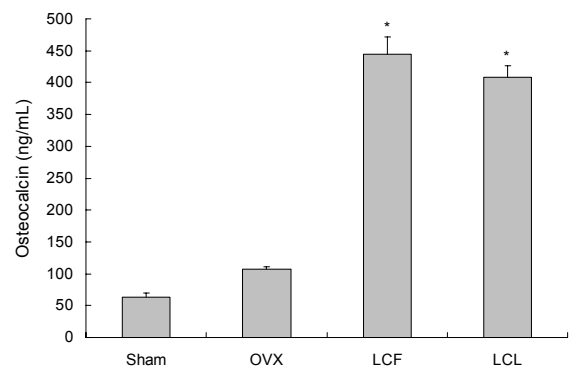


Fig. 2. Serum osteocalcin (OC) levels after 8 weeks of treatment with LCF and LCL extracts. Groups: See Fig. 1. Scale bars represent the mean value±SE (n=6). *Significant difference when compared with OVX rats (*P*<0.05).

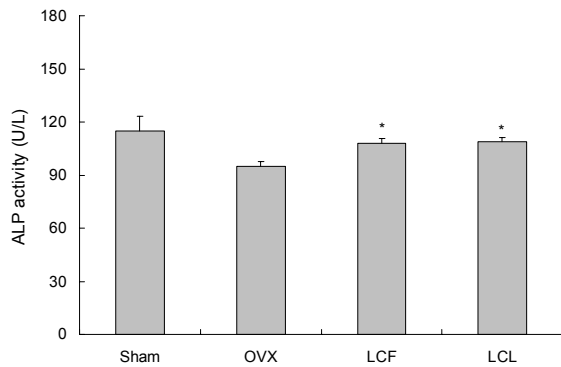


Fig. 3. Serum alkaline phosphatase (ALP) after 8 weeks of treatment with LCF and LCL extracts. Groups: See Fig. 1. Scale bars represent the mean value±SE (n=6).

OVX군에 비하여 증가하였지만 Sham군(115±8.2 U/L)에 비하여 낮았다(Fig. 3). 이와 같은 결과로 보아 구기자 추출액과 구기엽 추출액은 뼈의 재구성에 관여하는 것으로 사료되었다.

넙다리뼈의 실체현미경 관찰

난소를 절제한 흰쥐의 뼈에서는 골질의 밀도가 낮아지며, 뼈간기둥(trabecule)의 양이 감소한다고 하였다(10). 뼈의 강도와 골절 위험성의 지표인 골밀도의 감소는 임상적으로 골절 위험성이 높다고 할 수 있다. 동물모델에서 OVX를 시행한 흰쥐는 estrogen이 결핍되기 때문에 뼈의 재흡수가 이루어지고, 그 결과 뼈 기질 밀도(bone mineal density, BMD)가 감소한다(30). 본 실험에서 흰쥐의 넙다리뼈를 실체현미경으로 관찰한 결과 Sham군(Fig. 4A)은 뼈 기질 밀도가 매우 높게 관찰되었다. OVX군(Fig. 4B)은 뼈 기질 밀도가 매우 낮았으며, 뼈 몸통 부분은 뼈 기질의 소실이 나타났다. 실험군인 LCF군(Fig. 4C)과 LCL군(Fig. 4D)은 Sham군에 비하여 다소 뼈 기질 밀도가 낮았지만 OVX군에 비해서는 높았다. 이와 같은 결과는 Koo(23)의 연구에서 밝힌 구기자 추출액 투여가 뼈 칼슘 농도의 증가에 기여한다는

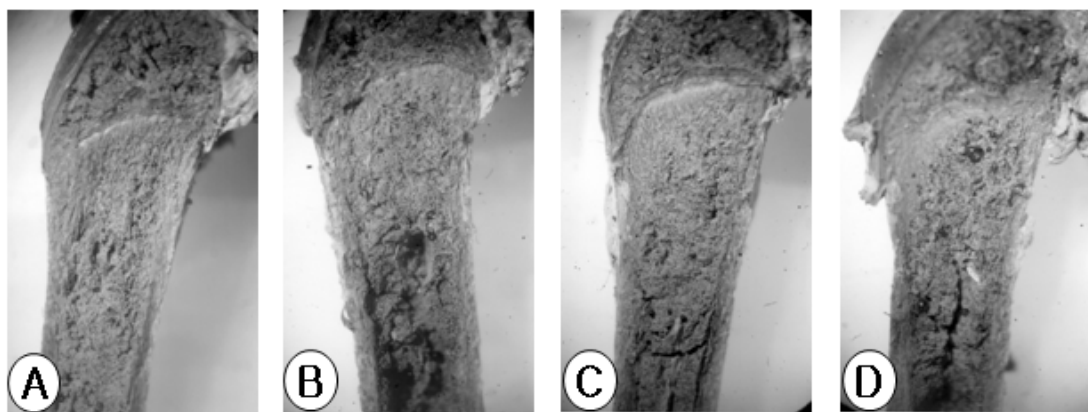


Fig. 4. Scanning micrographs of the longitudinal sections of the right femur sampled at 8 weeks after ovariectomy from a Sham rat (A), OVX (B), and OVX rat treated with LCF (C) or LCL (D). Groups: See Fig. 1.

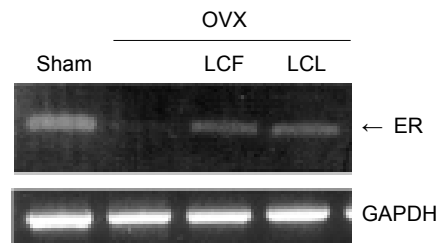


Fig. 5. Effect of LCF and LCL on ER α gene expression in ovariectomized rats. LCF and LCL extracts were administered daily into OVX rats. After 8 weeks, uteri were excised and their total RNA extracted. Estrogen inducible ER α cDNA fragments were determined by RT-PCR using GAPDH as an internal control.

결과와 일치하였다.

Estrogen receptor(ER α)의 유전자 발현에 미치는 영향

장기간 에스트로겐을 투여하면 nitric oxide 합성효소의 조절을 통하여 심혈관질환의 병리·생리학적인 혈관 내피의 기능부전을 개선할 수 있다(31-34). 에스트로겐의 효과는 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ER α)가 정상적인 기능을 하였을 때 나타나며, 난소를 절제한 흰쥐의 조직에서는 ER α 의 유전자 발현이 현격히 감소한다고 하였다(28,35). 본 실험에서도 자궁 조직을 절취하여 ER α 의 유전자 발현을 검색한 결과 OVX군에서는 거의 발현되지 않았다. 정상군에서 유전자 발현 정도가 가장 높게 나타났으며, 실험군인 LCF군과 LCL군 또한 뚜렷한 발현 양상을 보여주었다(Fig. 5). 이와 같이 실험군인 LCF군과 LCL군 또한 뚜렷한 발현 양상을 보여준 것으로 보아 핵에 작용하여 유전자 발현에 영향을 미쳤을 것으로 판단된다. 이와 같은 결과로 보아 구기자과 구기엽 추출물의 투여가 난소절제가 된 흰쥐에서 ER α 의 발현을 촉진시키는 것을 사료되었으나, 유전자 발현의 분자생물학적인 기전에 대해서는 지속적인 연구가 필요할 것이다.

요 약

본 연구는 구기자과 구기엽 추출물이 난소를 절제한 흰쥐의 체중 증가, 골밀도, 에스트로겐 수용체의 발현에 미치는 영향을 밝히고자 시행하였다. 실험군은 흰쥐 24마리를 가장수술군(Sham군), 난소를 절제한 대조군(OVX군), 난소절제 후 구기자 추출액을 투여한 군(LCF군), 난소절제 후 구기엽 추출액을 투여한 군(LCL군)으로 구분하였다. 8주 후 난소를 절제한 OVX군(330±5.39 g), LCF군(315±2.99 g) 및 LCL군(318±2.06 g)의 체중은 Sham군(281±1.71 g)에 비하여 증가하였다. 혈청 osteocalcin 활성은 OVX군(107±3.52 ng/mL)에 비하여 LCF군(444.6±26.9 ng/mL)과 LCL군(407±18.9 ng/mL)에서 증가하였다. Alkaline phosphatase의 활성은 OVX군(95± 2.9 U/L)에 비하여 LCF군(108±2.7 U/L)과 LCL군(407±18.9 ng/mL)에서 증가하였다. 8주 후 넙다리뼈를 실험현미경으로 관찰한 결과 뼈 기질 밀도는 난소절제군에서 감소하였으나, 구기자과 구기엽을 추출액을 투여한 군에서는 뚜렷이 회복되었다. 에스트로겐 수용체의 mRNA 발현은 OVX군에서는 거의 발현되지 않았으나, LCF군과 LCL군에서 뚜렷이 증가하였다. 이상의 결과로 보아 구기자과 구기엽 물추출물이 난소절제에 의하여 유발된 흰쥐의 뼈 기질 회복 또는 손실 지연에 효과가 있다고 할 수 있을 것이다.

REFERENCES

- National Institutes of Health Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. 2001. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA* 285: 785-795.
- Jennings LA, Auerbach AD, Maselli J, Pekow PS, Lindenaue PK, Lee SJ. 2010. Missed opportunities for osteoporosis treatment in patients hospitalized for hip fracture. *J Am Geriatr Soc* 58: 650-657.
- Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, Solomon DH, Wong JB, King A, Tosteson A. 2007. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States. *J Bone Miner Res* 22: 465-475.
- Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. 2008. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med* 58: 424-430.
- Kaveh K, Ibrahim R, AbuBakar MZ, Ibrahim TA. 2010. Osteoporosis induction in animal model. *Am J Anim Vet Sci* 5: 139-145.
- Zajickova K, Žofkova I. 2003. Osteoporosis: genetic analysis of multifactorial disease. *Endoc Regul* 37: 31-44.
- Berry SD, Kiel DP, Donaldson MG, Cummings SR, Kanis JA, Johansson H, Samelson EJ. 2010. Application of the national osteoporosis foundation guidelines to postmenopausal women and men: the Framingham osteoporosis study. *Osteoporos Int* 21: 53-60.
- Rubin KH, Abrahamsen B, Hermann AP, Bech M, Gram J, Brixen K. 2011. Prevalence of risk factors for fractures and use of DXA scanning in Danish women. A regional population-based study. *Osteoporos Int* 22: 1401-1409.
- Blake GM, Fogelman I. 2007. The role of DXA bone density scans in the diagnosis and treatment of osteoporosis. *Postgrad Med J* 83: 509-517.
- Lin Q, Huang YM, Xiao BX, Ren GF. 2005. Effects of resveratrol on bone mineral density in ovariectomized rats. *Int J Biomed Sci* 1: 76-81.
- Jagtap VR, Ganu JV, Nagane NS. 2011. BMD and serum intact osteocalcin in postmenopausal osteoporosis women. *Indian J Clin Biochem* 26: 70-73.
- Francisco JI, Yu Y, Oliver RA, Walsh WR. 2011. Relationship between age, skeletal site, and time post-ovariectomy on bone mineral and trabecular microarchitecture in rats. *J Orthop Res* 29: 189-196.
- Omi N, Ezawa I. 1995. The effect of ovariectomy on bone metabolism in rats. *Bone* 17: 163-168.
- Ito M, Nishida A, Nakamura T, Uetani M, Hayashi K. 2002. Differences of three-dimensional trabecular microstructure in osteopenic rat models caused by ovariectomy and neuroectomy. *Bone* 30: 594-598.
- Melhus G, Solberg LB, Dimmen S, Madsen JE, Nordsletten L, Reinholt FP. 2007. Experimental osteoporosis induced by ovariectomy and vitamin D deficiency does not markedly affect fracture healing in rat. *Acta Orthop* 78: 393-403.
- Pines A, Fisman EZ, Levo Y, Drory Y, Ben-Ari E, Motro M, Ayalon D. 1993. Menopause-induced changes in left ventricular wall thickness. *Am J Cardiol* 72: 240-241.
- Proudler AJ, Ahmed AI, Crook D, Fogelman I, Rymer JM, Stevenson JC. 1995. Hormone replacement therapy and serum angiotensin-converting-enzyme activity in postmenopausal women. *Lancet* 346: 89-90.
- Christenson RH. 1997. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem* 30: 573-593.
- The co-textbook publishing committee of Korean oriental medicine school. 2010. *The herbal medicine*. Younglimsa, Seoul, Korea. p 655-656.
- Yin J, Tezuka Y, Kouda K, Tran QL, Miyahara T, Chen Y, Kadota S. 2004. Antiosteoporotic activity of the water extract of *Dioscorea spongiosa*. *Biol Pharm Bull* 27: 583-586.
- Park SY, Park WT, Park YC, Ju JI, Park SU, Kim JK. 2012. Metabolomics for the quality assessment of *Lycium chinense* fruits. *Biosci Biotechnol Biochem* 76: 2188-2194.
- Park HJ, Shim HS, Choi WK, Kim KS, Bae H, Shim I. 2011. Neuroprotective effect of *Lycium chinense* fruit on trimethyltin-induced learning and memory deficits in the rats. *Exp Neurobiol* 20: 137-143.
- Koo YM. 2008. Effect of *Lycii fructus* on the ovariectomized osteoporosis of rat. *MS Thesis*. Kyung Hee University, Seoul, Korea.
- Salville PD. 1969. Changes in skeletal mass and fragility with castration in the rat; a model of osteoporosis. *J Am Geriatr Soc* 17: 155-166.
- Mobasser S, Liebson PR, Klein LW. 2004. Hormone therapy and selective estrogen receptor modulators for prevention of coronary heart disease in postmenopausal women estrogen replacement from the cardiologist's perspective. *Cardiol Rev* 12: 287-298.
- Kristensen K, Pedersen SB, Vestergaard P, Mosekilde L, Richelsen B. 1999. Hormone replacement therapy affects body composition and leptin differently in obese and non-obese postmenopausal women. *J Endocrinol* 163: 55-62.
- Lin SE, Huang JP, Wu LZ, Wu T, Cui L. 2013. Prevention of osteopenia and dyslipidemia in rats after ovariectomy with combined aspirin and low-dose diethylstilbestrol. *Bio-med Environ Sci* 26: 249-257.

28. Jayachandran M, Miller VM. 2002. Ovariectomy upregulates expression of estrogen receptors, NOS, and HSPs in porcine platelets. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: 220-226.
29. Villafán-Bernal JR, Sánchez-Enríquez S, Muñoz-Valle JF. 2011. Molecular modulation of osteocalcin and its relevance in diabetes (review). *Int J Mol Med* 28: 283-293.
30. Glowacki J, Lian JB. 1987. Impaired recruitment and differentiation of osteoclast progenitors by osteocalcin-deplete bone implants. *Cell Differ* 21: 247-254.
31. García-Pérez MA, Noguera I, Hermenegildo C, Martínez-Romero A, Tarín JJ, Cano A. 2006. Alterations in the phenotype and function of immune cells in ovariectomy-induced osteopenic mice. *Hum Reprod* 21: 880-887.
32. Hayashi T, Yamada K, Esaki T, Kuzuya M, Satake S, Ishikawa T, Hidaka H, Iguchi A. 1995. Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor-mediated system. *Biochem Biophys Res Commun* 214: 847-855.
33. Hishikawa K, Nakaki T, Marumo T, Suzuki H, Kato R, Saruta T. 1995. Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. *FEBS Lett* 360: 291-293.
34. MacRitchie AN, Jun SS, Chen Z, German Z, Yuhanna IS, Sherman TS, Shaul PW. 1997. Estrogen upregulates endothelial nitric oxide synthase gene expression in fetal pulmonary artery endothelium. *Circ Res* 81: 355-362.
35. Mendelsohn ME, Karas RH. 1999. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 340: 1801-1811.