

## 블레기말 추출물이 난소를 절제한 갱년기 장애 모델의 혈청 지질 변화 및 골 형성에 미치는 영향

이주영<sup>1</sup> · 김보경<sup>1</sup> · 박미화<sup>1</sup> · 최경하<sup>1</sup> · 공창숙<sup>1</sup> · 이상현<sup>2</sup> · 김육용<sup>3</sup> · 유기환<sup>3</sup> · 김미향<sup>1</sup>

<sup>1</sup>신라대학교 식품영양학과

<sup>2</sup>신라대학교 바이오산업학부 제약공학전공

<sup>3</sup>(주)이삭에프앤비

### Effects of *Colpomenia sinuosa* Extract on Serum Lipid Level and Bone Formation in Ovariectomized Rats

Juyeong Lee<sup>1</sup>, Bokyung Kim<sup>1</sup>, Mi-Hwa Park<sup>1</sup>, Kyung-Ha Choi<sup>1</sup>, Changsuk Kong<sup>1</sup>,  
Sang-Hyeon Lee<sup>2</sup>, Yuck Yong Kim<sup>3</sup>, Ki Hwan Yu<sup>3</sup>, and Mihyang Kim<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition and

<sup>2</sup>Division of Bio-industry, Major in Pharmaceutical Engineering, Silla University

<sup>3</sup>ISAAC F&B Ltd.

**ABSTRACT** In this study, the effects of *Colpomenia sinuosa* (CS) extract on serum lipid level and bone formation in an ovariectomized animal model were investigated. Twenty four nine-week old female Sprague-Dawley rats were randomly assigned to four groups: sham-operated rats (SHAM), ovariectomized control rats (OVX-CON), and ovariectomized rats supplemented with CS extract at 50 mg/kg bw (OVX-CS50) or 200 mg/kg bw (OVX-CS200). Three OVX groups were surgically ovariectomized while the SHAM group was sham-operated. CS extract was orally administered at 1 mL per day. Analysis of serum lipid contents found that the total cholesterol, triglyceride, and low density lipoprotein cholesterol levels in the OVX-CON group were higher than those in the SHAM group. Notably, upon administration of CS extract after ovariectomy, triglyceride levels tended to significantly decrease. In addition, platelet aggregation ability decreased in groups treated with CS extract compared to the OVX-CON group. Serum alkaline phosphatase activity as an indicator of bone formation was lower in the CS extract group compared to the OVX-CON group. Collagen contents in bone and cartilage were reduced by ovariectomy, whereas the CS extract-supplemented groups exhibited higher concentrations in bone. According to these results, CS extract improved serum lipid parameters and osteogenesis in ovariectomized rats.

**Key words:** *Colpomenia sinuosa*, collagen, ovariectomized rats, platelet aggregation, serum lipids

## 서 론

2015년 현재 동아시아에서 일본의 경우 고령인구의 비율이 약 26%로 이미 초고령 사회에 접어들었고 한국을 포함한 나머지 국가들도 고령화 사회에 진입하였으며, 아직 개발경제 수준에 머무는 중국 또한 고령인구 비율이 약 9.5%로 고령화 사회에 진입하였다(1). 현재의 인구 추이가 앞으로도 계속된다고 가정한다면 2030년에는 동아시아에서 중국을 제외한 모든 국가가 초고령화 사회가 될 것으로 예측할 수 있으며, 특히 고령화 문제에 일찍 봉착한 일본의 경우 총인구의 약 30%, 나머지 국가들은 20% 이상이 고령자로 구성

될 전망이다(1). 또한, 통계청 자료에 따르면 2019년에는 우리나라가 고령화 사회(aging society)에서 고령사회(aged society)로 바뀔 것으로 예상하며, 최근 조사에서는 그 시기가 더 앞으로 앞당겨질 것으로 나타나고 있다(2).

고령화 사회로 접어들면서 노인 인구 증가에 따른 항노화의 요인과 퇴행성 질환에 관한 관심이 증가하는 추세로, 폐경 후 여성에서는 에스트로겐 감소에 의해 지방이 점점 복부 내장에 축적되어 중심성 비만(central obesity)이 유발되는 것으로 보고되고 있다(3-5). 복부의 지방 축적은 폐경 후 많은 대사 변화와 연관되며, 지질대사의 변화에서 고밀도 지단백(high density lipoprotein, HDL) 콜레스테롤은 감소하고 총중성지방, 총콜레스테롤 및 저밀도 지단백(low density lipoprotein, LDL) 콜레스테롤은 증가하게 된다(6). 여성에서 심혈관 질환의 위험도가 남성보다 10년 정도 늦은 50~64세경에 급격히 증가하는 것 또한 이를 뒷받침한다

Received 23 February 2016; Accepted 28 March 2016

Corresponding Author: Mihyang Kim, Department of Food and Nutrition, Silla University, Busan 46958, Korea  
E-mail: mihkim@silla.ac.kr, Phone: +82-51-999-5620

(7). 한편 폐경기 여성의 골다공증은 칼슘섭취의 부족과 함께 계속 증가하고 있어서 중요한 공중보건문제의 하나로 대두하고 있다(8). 골다공증 환자는 고령화의 영향으로 꾸준히 늘어 5년 동안 31% 증가하였고 전체 환자 가운데 93%가 여성일 정도로 여성이 월등히 많으며, 이는 여성이 폐경기 이후 골밀도가 급격히 떨어지기 때문이다(9). 골다공증은 요통 이외에는 뚜렷한 자각증상이 없어 조기발견이 어렵고 잦은 골절 및 지방색전으로 인해 골절 1년 이내에 10% 정도의 사망률을 초래하는 대퇴골 골절을 일으키기도 한다고 보고되어 있어(10) 조기발견과 치료가 매우 중요하다. 따라서 최근 들어 골다공증 치료를 위한 에스트로겐 투여의 여러 부작용을 보완하기 위해 골 형성 증가에 관련된 몇 종류 천연물의 효능을 근거로 한약재 및 식품 등 천연물의 활성성분을 이용한 연구가 활발하게 진행되고 있다(11-14). 이와 같이 에스트로겐 일정량은 인체 내 유익한 효과가 있는 필요한 물질로써, 에스트로겐 손실은 심혈관계 및 골 대사에 불균형을 가져오기 때문에 최근 이러한 갱년기 장애가 가져오는 부작용을 줄이기 위해 호르몬 대체 요법(hormone replacement therapy)이 개발되어 사용되고 있다(15).

우리나라는 삼면이 바다로 둘러싸여 있고 비교적 해양생물자원이 풍부해서 과거부터 해산물을 식용으로 널리 이용해 왔고 해조류는 고대부터 식용으로 소비해 왔다. 더욱이 제주도 연안은 우리나라에서 가장 수온이 높고 다른 지역에서 볼 수 없는 아열대성의 남방계 해조류를 많이 볼 수 있으며, 특히 툇과 모자반을 이용한 전통 음식이 많이 전해 내려오고 있다(16,17).

최근에는 해조류의 다양한 건강 기능성이 알려지면서 해조류에 대한 관심이 증가하고 있다. 해조류에는 녹조류, 갈조류, 홍조류가 있는데 이 중에서 갈조류에는 항암과 항염증 생리활성을 갖는 라미나란(laminaran)과 푸코이단(fucoi-dan)이라는 물질이 함유되어 있다고 보고되어 있다(18,19). 선행연구에서는 감태, 곰피, 대황과 같은 해조류가 갱년기 장애에 개선 효과가 있는 것으로 보고한 바 있다(20-22). 본 연구에서는 갈조류 중의 하나인 블레기말에 대한 검토를 하고자 하였다. 블레기말은 해조류에서도 고리매과에 속하고 주로 조간대 하부의 바위 위나 해조에 착생하여 공 모양 또는 불규칙한 모양으로 전 세계에 분포한다(23). 블레기말을 이용한 생리활성 연구로는 신경세포 독성의 억제 효과(24)가 있는 것으로 보고되어 있지만, 그 외는 전혀 없는 실정이다.

Kimble 등(25)은 흰쥐에서 난소를 절제하면 골의 교환(turnover)이 가속되고 골의 밀도가 현저하게 감소한다고 하였고, 연골 또는 골 등의 결합조직을 구성하고 있는 콜라겐은 난소절제 시 그 함량이 감소하는 것으로 보고하였다. 또한, alkaline phosphatase(ALP)는 폐경 시 에스트로겐의 결핍으로 인하여 뼈 전환이 증가하기 때문에 폐경 후 여성의 골다공증에서 증가하는 양상을 보이며(26), 성인기 여성에서는 골절과의 관련성을 보여 폐경 전후 여성에게 있어 뼈

형성 지표로써 널리 사용되고 있다(27).

따라서 본 연구에서는 흰쥐를 이용하여 인위적으로 갱년기를 유도한 후 블레기말 추출물을 투여한 다음 혈청지질 함량, 항혈소판 응집능, 혈중 ALP 활성 및 골조직 중 콜라겐 함량 변화에 미치는 영향을 검토하여 그 효과를 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 추출물의 제조

본 실험에 사용한 블레기말(*Colpomenia sinuosa*)은 2015년 6월 제주도 해안 일대에서 채취된 것을 세척, 자연 건조 후 분쇄하여 판매하는 것을 구입하여 사용하였다. 분말시료에 각각 20배량(w/v)의 3차 증류수를 첨가한 후, 80°C에서 4시간 동안 2회 추출하고 감압 농축기로 농축한 다음 분말로 조제하여, 실제로 동물실험에서는 투여량 1 mL 중 체중 kg당 50 mg 및 200 mg이 되도록 증류수에 용해하여 사용하였다.

### 실험동물

실험동물은 230~270 g인 9주령의 암컷(Sprague-Dawley) 흰쥐 24마리를 (주)오리엔트 바이오(Seongnam, Korea)에서 분양받아 3일간 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다. 동물실험실 사육조건은 온도 24±2°C, 습도 50~55%를 유지하였으며, 광주기 및 암주기를 12시간 간격으로 조절하였다. 실험동물은 비 난소절제 대조군(SHAM), 난소절제 대조군(OVX-CON), 난소절제 후 블레기말 열수 추출물 50 mg/kg bw 투여군(OVX-CS50), 난소절제 후 블레기말 열수 추출물 200 mg/kg bw 투여군(OVX-CS200)으로 각 6마리씩 4군으로 나누어 1 mL의 시료를 6주간 매일 경구 투여하였다(Table 1). 실험기간 동안 식이 섭취량과 체중은 매일 일정한 시간에 측정하였으며, 체중은 이틀에 한 번씩 측정하였고 물과 사료는 제한하지 않고 섭취시켰다. 실험 시료는 증류수에 용해하였으며, 대조군(SHAM군 및 OVX-CON군)은 동일 용량의 증류수를 투여하였다. 실험에 사용된 식이는 일반사료를 구입하여 사용하였으며, 동물실험은 신라대학교 동물실험윤리 위원회의 승인(SUACAC-2015-002)을 받아 관리지침에 따라 수행하였다.

**Table 1.** Experimental design of animals

Group (n) <sup>1)</sup>	Treatment
SHAM (6)	Operated rats
OVX-CON (6)	Ovariectomized rats
OVX-CS50 (6)	Ovariectomized rats supplemented <i>Colpomenia sinuosa</i> water extract 50 mg/kg bw/d
OVX-CS200 (6)	Ovariectomized rats supplemented <i>Colpomenia sinuosa</i> water extract 200 mg/kg bw/d

<sup>1)</sup>n: number of rats.

### 난소절제 시술

3일 동안 주위환경에 적응시켜 난괴법에 의해 군을 나누어 난소절제 수술을 하였다. 수술은 ethyl ether 마취 후 심마취기에 이르면 늑골하부를 절개하여 난소를 제거하고 절개부는 봉합하였다. 시술 후 3일부터 매일 불레기말 열수 추출물을 경구 투여하였다. 또한, 대조군 설정을 위하여 비난소절제군은 복막 절개까지 난소절제 수술과 같은 방법으로 시행하고, 양측의 난소를 노출하였다가 절제하지 않고 복막 속으로 다시 넣어 난소절제와 같은 스트레스를 주고 다시 봉합하는 모의수술(sham operation)을 시행하여, 이들을 대조군으로 사용하였다.

### 혈액 및 조직 채취

실험동물의 혈액은 해부 전 24시간 절식시킨 후 ethyl ether를 이용하여 마취한 다음 개복하여 복대 정맥에서 채취하였다. 혈소판 응집능 실험을 위하여 혈액 채취 시 헤파린으로 처리된 튜브를 사용하고, 3.2% sodium citrate를 1:9의 비율로 혼합하여 분석에 사용하였다. 또한, 혈액의 생화학적 분석을 위해 상온에서 30분간 방치한 후, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리에 의해 혈청을 분리하여 사용하였다. 한편 심장, 신장, 부신, 자궁, 비장, 폐, 간을 적출하여 생리식염수로 세척한 다음 주위의 지방과 물기를 제거하고 늑골과 연골은 경계면에서 분리하여 실험 시까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

### 혈청 중의 지질 농도 분석

실험동물에서 채취한 혈청을 이용하여 중성지방(triglyceride), 총콜레스테롤(total cholesterol), HDL-콜레스테롤을 분석하였고, 지질 농도 분석은 자동 측정용 slide kit (FUJI FILM, Tokyo, Japan)을 이용하여 Dry Chemistry Analyzer 3500i(FUJI, Asaka, Japan)를 사용하여 분석하였다.

### 혈소판 응집력 분석

혈소판 분리는 실험동물에서 채취한 혈액을 3.2% sodium citrate 용액과 1:9 비율로 혼합한 후 1,100 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상층의 PRP(platelet rich plasma)를 얻은 다음, PRP를 3,000 rpm에서 10분간 더 원심분리하여 상층의 혈장을 제거하였다. EDTA를 포함하는 washing buffer(138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0.36 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 5.5 mM glucose, 1 mM EDTA, pH 6.5)를 가하여 혈소판을 재 현탁시켰다. 이 혈소판을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 다시 suspending buffer(138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0.36 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 5.5 mM glucose, 0.49 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.25% gelatin, pH 7.4)로 현탁시켜 washed platelet을 조제하였다. Washed platelet은 suspending buffer로 희석하여 혈소판 수가  $5 \times 10^8/\text{mL}$ 가 되도록 하였다.

불레기말 추출물의 항혈소판 응집 효과는 Whole blood lumi-aggregometer(Chrono-Log Co., Havertown, PA, USA)를 사용하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 optical 방법으로 혈소판 응집을 측정하였다. 응집 유도제로 콜라겐을 사용하였으며, micro-magnetic bar를 넣은 cuvette에는 미리  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 incubation 시킨 PRP 50  $\mu\text{L}$ 와 suspending buffer, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ 를 넣고 다시 incubation 한 후 콜라겐 2.5  $\mu\text{L}$ 를 가하여 5분간 반응시켰다. 교반 속도는 1,100 rpm으로 유지하였고, PRP를 얻은 후 2시간 안에 모든 실험을 진행했다. 혈소판 응집에 작용하는 시료의 효과는 응집 저해율과 slope, lag time, amplitude로 나타낼 수 있다. Slope은 반응이 일어나기 시작할 때의 속도를 나타내며, lag time은 반응하는 시간, amplitude는 최대 응집력을 나타낸다. 응집력은 반응이 최종적으로 끝났을 때의 광학밀도를 나타낸다.

### 혈청 중 ALP 활성 측정

혈청 중 골격 형성지표인 ALP 활성은 측정용 kit(FUJI DRY-CHEM SLIDE, Tokyo, Japan)을 이용하여 자동생화학분석기 Dry Chemistry Analyzer 3500i(FUJI)를 사용하여 측정하였다.

### 결합 조직 중의 collagen 함량 측정

골, 연골 및 피부 조직을 취하여 가수분해(6 N HCl,  $110^{\circ}\text{C}$ , 20 h)하고 여과, 농축하여 증류수로 시료를 녹인 후 정용하여 실험에 사용하였다. 이 시료의 용액은 Woessner(28)의 방법으로 colorimetric method로 hydroxyproline(Hyp) 양을 측정된 후, collagen의 아미노산 조성으로부터 collagen 양을 환산하였다. 일반적으로 collagen 중의 Hyp의 비율은 평균 110잔기/1,000잔기이므로 조직 중의 collagen ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 양은  $100/11 \times \text{Hyp}$  양( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 식에 따라 산출하였다.

### 통계처리

본 실험에 대한 모든 실험의 결과는  $\text{mean} \pm \text{SD}$ 로 표시하였고, 통계적 유의성 검정은 SAS 9.1 version 프로그램(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 실시하였다. 집단 간의 차이를 알아보기 위해 일원변량분석(one-way ANOVA)을 이용하여 분석하였고, 사후검정은 Duncan's multiple range test에 의해  $P < 0.05$  수준에서 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 식이 섭취량, 체중 증가량 및 장기 중량

난소절제 및 불레기말 추출물의 투여에 따른 총 실험 기간 동안의 체중 변화와 식이 섭취량을 Table 2에 나타내었다. 난소를 절제한 OVX-CON군의 최종 체중은 난소를 절제하지 않은 SHAM군에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 난소절

**Table 2.** Body weight gain, food intake, and food efficiency ratio of rats supplemented *Colpomenia sinuosa* water extracts for 6 weeks

	Group <sup>1)</sup>			
	SHAM	OVX-CON	OVX-CS50	OVX-CS200
Final body weight (g)	324.75±19.19 <sup>b2)3)</sup>	378.23±26.48 <sup>a</sup>	378.10±1.70 <sup>a</sup>	366.90±7.01 <sup>a</sup>
Body weight gain (g/d)	1.41±0.28 <sup>b</sup>	2.94±0.51 <sup>a</sup>	3.15±0.36 <sup>a</sup>	2.67±0.23 <sup>a</sup>
Food intake (g/d)	14.62±1.74 <sup>b</sup>	18.94±2.02 <sup>a</sup>	18.40±2.06 <sup>ab</sup>	18.09±2.43 <sup>ab</sup>
FER (%) <sup>4)</sup>	0.09±0.00 <sup>c</sup>	0.16±0.03 <sup>ab</sup>	0.19±0.03 <sup>a</sup>	0.15±0.01 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>Refer the legend to Table 1.

<sup>2)</sup>Values are mean±SD.

<sup>3)</sup>Values with different letters in the same row are significantly different at  $P<0.05$  by Duncan's multiple range test.

<sup>4)</sup>FER (food efficiency ratio): weight gain (g)/ dietary intake (g).

제로 유발된 체중 증가 현상은 여러 연구에서 보고되었는데 (29-32), 에스트로겐은 배아세포에서 조골세포의 분화를 촉진하는 반면 지방세포의 분화는 억제한다는 보고에 근거할 때(33) 난소 제거 후 에스트로겐 결핍으로 인한 체중 증가는 지방조직 축적에서 기인한 것으로 추측되고 있다(34). 본 연구결과, 난소절제로 인해 체중이 증가하는 조건에서 블레기말 추출물이 체중 감소에는 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Table 2). Kim(35)의 연구에서도 고리매 추출물이 체중감소에는 큰 효과를 나타내지 않았으며, 이러한 보고들을 근거로 천연식물 추출물은 난소절제로 인한 체중 증가에는 큰 영향을 주지 않는 것으로 추측된다. 사료 섭취량 및 식이 효율에서도 OVX-CON군은 SHAM군보다 유의적으로 높은 결과가 나타났으나, 블레기말 추출물 투여로 인한 효과는 나타나지 않았다.

각 실험동물의 장기 중량을 Table 3에 나타내었다. 간, 심장, 폐, 신장, 부신 및 비장의 무게는 난소절제로 인한 차이를 나타내지 않았다. 한편 자궁 무게의 경우 난소절제군인 OVX-CON군이 SHAM군보다 유의적으로 낮은 것으로 나타났다. 에스트로겐은 스테로이드 복합체로 주로 난소에서 분비된다고 알려졌으며(36), 에스트로겐의 결핍은 혈중 에스트로겐 감소 및 자궁 무게 감소를 유발한다고 알려졌다(37). 따라서 난소절제로 인해 자궁의 퇴화가 일어나 OVX-CON군이 SHAM군보다 자궁 무게가 감소한 것으로 생각된다. 한편 블레기말 추출물 50 mg/kg bw(OVX-CS50) 투여

군의 경우 OVX-CON군보다 증가하는 경향이 나타났으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

**혈청 지질 조성 개선 효과**

갱년기의 시작은 폐경과 더불어 시작되며 폐경기의 에스트로겐 변화로 발생하는 건강 문제 중 심혈관계 질환은 우리나라 사망원인 중 제3순위를 차지하고 있어, 그 발생률이 계속 증가하리라는 예측과 함께 그에 대한 관심 또한 더욱 높아지고 있다(38). 폐경이 되기 수년 전부터 난소의 기능은 난포세포 수의 감소 및 호르몬 합성 능력이 저하되기 시작하여 이에 따라 서서히 폐경기 증상이 나타나기 시작한다(39). 내분비학적 혼란은 혈중 지질 및 지단백질의 변화를 초래하기도 하여 폐경기 이후 여성에게서 심장질환 발생의 원인이 되기도 한다고 보고되고 있으며(40), 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, 중성지방 농도의 상승과 더불어 HDL-콜레스테롤 농도는 변화가 없거나 감소하는 것으로 알려졌다(41). 따라서 폐경 이후 지질 대사가 악화하여 심혈관 질환의 위험이 증가하는 것으로 보고되고 있다(42).

Table 4에 혈청 중 총콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 함량을 나타내었다. 총콜레스테롤의 경우 난소를 절제한 OVX-CON군이 비 난소절제 대조군 SHAM군과 비교해 유의적으로 증가하였으나 이에 반해 난소절제 후 블레기말 추출물을 200 mg/kg bw(OVX-CS200) 투여하였을 때 유의적으로 감소하는 결과를 나타내

**Table 3.** Effects of *Colpomenia sinuosa* on weight of liver, heart, lung, spleen, adrenal, kidney, and uterus in ovariectomized rats (g, fresh wt)

	Group <sup>1)</sup>			
	SHAM	OVX-CON	OVX-CS50	OVX-CS200
Liver	8.08±1.01 <sup>NS2)3)</sup>	8.48±1.03	8.18±1.04	8.16±0.64
Heart	1.14±0.12 <sup>NS</sup>	1.45±0.25	1.36±0.26	1.34±0.11
Lung	1.82±0.24 <sup>NS</sup>	1.90±0.25	1.9±0.10	1.98±0.28
Spleen	0.65±0.08 <sup>NS</sup>	0.78±0.06	1.00±0.90	0.78±0.16
Adrenal	0.14±0.05 <sup>NS</sup>	0.14±0.07	0.14±0.05	0.12±0.04
Kidney	1.90±0.13 <sup>NS</sup>	1.80±0.07	2.12±0.25	2.12±0.22
Uterus	0.78±0.08 <sup>a4)</sup>	0.23±0.12 <sup>b</sup>	0.28±0.05 <sup>b</sup>	0.22±0.16 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>Refer the legend to Table 1.

<sup>2)</sup>Values are mean±SD.

<sup>3)</sup>NS: data in the same row are not significantly different.

<sup>4)</sup>Means with different letters in the same row are significantly different at  $P<0.05$  by Duncan's multiple range test.

**Table 4.** Effects of *Colpomenia sinuosa* extracts on serum total cholesterol (T-CHO), triglyceride (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in ovariectomized rats

	Group <sup>1)</sup>			
	SHAM	OVX-CON	OVX-CS50	OVX-CS200
T-CHO (mg/dL)	85.28±11.84 <sup>b3)4)</sup>	110.6±6.65 <sup>a</sup>	107.75±12.68 <sup>a</sup>	87.33±5.50 <sup>b</sup>
TG (mg/dL)	58.75±10.96 <sup>b</sup>	101.25±12.52 <sup>a</sup>	62.50±12.81 <sup>b</sup>	61.33±25.89 <sup>b</sup>
HDL-C (mg/dL)	65.00±1.41 <sup>a</sup>	56.00±0.00 <sup>b</sup>	56.00±7.93 <sup>b</sup>	63.00±2.82 <sup>ab</sup>
LDL-C <sup>2)</sup> (mg/dL)	32.03±12.62 <sup>b</sup>	74.85±9.16 <sup>a</sup>	64.25±7.31 <sup>a</sup>	36.6±7.85 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>Refer the legend to Table 1.

<sup>2)</sup>LDL-C=T-CHO - (HDL-C - TG/5).

<sup>3)</sup>Values are mean±SD.

<sup>4)</sup>Means with different letters in the same row are significantly different at  $P<0.05$  by Duncan's multiple range test.

었다. 중성지질 함량 또한, 난소절제에 의해 유의적으로 증가하는 결과가 나타났으나, 난소절제 후 불레기말 추출물을 50 및 200 mg/kg bw(OVX-CS50 및 OVX-CS200) 투여하였을 때 유의적으로 감소하는 결과가 나타났다. 혈청 중의 HDL-콜레스테롤의 경우 폐경 후 변화가 없거나 감소하는 것으로 알려졌다(42), 본 연구에서도 난소절제로 인한 인위적인 갱년기 유도도 OVX-CON군이 SHAM군보다 감소하는 결과를 나타내었다. 반면, 난소절제 후 불레기말 추출물을 200 mg/kg bw(OVX-CS200) 투여한 경우 OVX-CON군보다 HDL-콜레스테롤 농도가 증가하는 경향을 나타내었다. 한편 혈청 중 LDL-콜레스테롤 함량은 난소절제군인 OVX-CON군은 비 난소절제군인 SHAM군보다 유의적으로 증가하였으나 불레기말 추출물을 200 mg/kg bw(OVX-CS200) 투여에 의해 유의적으로 감소하는 결과가 나타났다.

Lee 등(43)의 연구에 따르면 폐경 후 여성에서 나타나는 중성지방과 LDL-콜레스테롤 농도의 증가는 내장지방 면적의 증가와 관련이 있으며, HDL-콜레스테롤 농도의 감소는 내장지방 면적보다는 폐경으로 인한 에스트로겐 농도의 감소와 관련이 있을 것으로 보고되고 있다. 본 연구 결과 불레기말 추출물의 투여는 갱년기 유도도 인해 혈청 중에 높아진 총콜레스테롤, 중성지질 및 LDL-콜레스테롤을 감소시키며, HDL-콜레스테롤은 대조군보다 증가시킴으로써 갱년기에 일어날 수 있는 고지혈증 예방에 도움이 될 것으로 기대된다.

### 항혈소판 응집에 미치는 영향

관상동맥 질환 및 뇌혈관 질환을 포함한 순환계 질환은

우리나라 사람의 사망원인 대부분을 차지한다. 심혈관계 질환은 남성과 마찬가지로 여성들에 있어서도 주요한 사망원인으로 작용하고 있으며, 특히 폐경 후에는 폐경 전보다 심혈관계 질환의 위험성이 두 배 이상 증가할 수 있다고 보고되어 있다(44). 이는 여성호르몬이 혈액 응고와 관련하여 섬유소 용해를 촉진하고 플라스미노겐 활성화 억제제-1(plasminogen activator inhibitor-1)을 감소시켜 이롭게 작용하지만 이와는 독립적인 경로로 혈액응고를 활성화하는 작용이 있어 역효과를 보이는 것이다(45). 혈소판은 혈전증과 지혈증에서 중요한 역할을 담당하고 있는 인자로서 혈관 내 병적 이상으로 인한 과도한 혈전의 생성은 뇌·심혈관계 질환의 중요한 유발인자로 작용하므로 뇌·심혈관계 질환이나 항고지혈증을 연구하는 데 유용하게 이용되고 있다(46).

본 연구에서는 난소를 절제한 흰쥐의 혈액을 채취한 후 washed platelet을 분리하여 콜라겐 2 µg으로 혈소판 응집을 유도하고, amplitude, slop 및 leg time의 3가지 인자의 분석을 통하여 불레기말 추출물의 항혈소판 응집능을 검토하였다(Table 5). Amplitude(%)는 각 실험동물의 혈에서 정제된 혈소판만을 분리하여 여기에 콜라겐 2 µg/mL를 넣었을 때 일어나는 최대 응집 정도를 나타내는 것으로 난소절제를 한 OVX-CON군이 난소절제를 하지 않은 SHAM군과 비교하여 증가하였으며, 불레기말 열수 추출물 투여에 따라 감소하는 경향을 나타내었으나 유의적인 결과는 나타나지 않았다. Slop(Ω/min)은 응집 유도물질인 콜라겐을 넣은 직후부터 1분 동안의 응집곡선의 기울기를 말하며, 이는 혈소판이 콜라겐에 대한 민감성을 나타내는 것이다. 이때 응집의 진행과 함께 혈소판이 platinum electrodes에 부착됨으로

**Table 5.** Effects of *Colpomenia sinuosa* extracts against collagen induced platelet aggregation

	Group <sup>1)</sup>			
	SHAM	OVX-CON	OVX-CS50	OVX-CS200
Amplitude (%)	8.42±4.03 <sup>NS3)4)</sup>	17.37±8.79	10.00±7.07	10.25±10.53
Slope <sup>2)</sup> (Ω/min)	31.66±20.34 <sup>NS</sup>	40.00±19.12	32.87±6.53	33.54±13.39
Lag time (s)	1:08±0:14 <sup>a5)</sup>	0:10±0:01 <sup>c</sup>	0:38±0:16 <sup>b</sup>	0:19±0:01 <sup>bc</sup>

<sup>1)</sup>Refer the legend to Table 1.

<sup>2)</sup>Initial slope is ohm change for the first on minute.

<sup>3)</sup>Values are mean±SD.

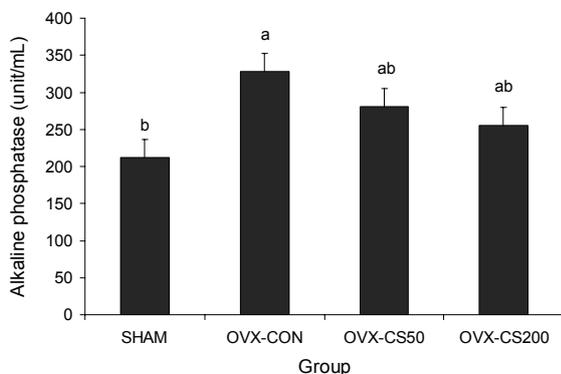
<sup>4)</sup>NS: data in the same low are not significantly different.

<sup>5)</sup>Means with different letters in the same low are significantly different at  $P<0.05$  by Duncan's multiple range test.

써 발생하는 전기저항(impedance, Ω)의 크기를 혈소판 응집치로 나타낸다. 난소절제로 인해 OVX-CON군이 비 난소절제군인 SHAM군과 비교하여 slop이 증가하였으나 블레기말 추출물 투여군에서 감소하는 경향을 나타내었다. 응집시간을 나타내는 lag time(s)의 경우 난소절제에 의해 반응이 일어나는 시간이 짧아졌다. 이는 응집제 첨가에 대한 응집 효과가 빨리 나타나 난소절제에 의해 응집 효과가 더욱 촉진된 것으로 생각된다. 이에 반해 블레기말 추출물 투여군인 OVX-CS50 및 OVX-CS200군에서 OVX-CON군과 비교하여 유의적으로 응집시간이 지연되었다. 녹차 및 조릿대 분말을 투여하여 혈중 지질 및 혈소판 응집능을 측정할 결과에 따르면 난소절제 후 식이에 녹차 분말을 10% 첨가하여 4주간 투여한 결과 혈중 중성지질 함량이 감소하였으나 혈소판 응집에서는 유의적인 결과가 나타나지 않았다고 보고되고 있다(47). 본 연구 결과 블레기말 추출물 투여로 혈중 중성지질 함량 감소뿐만 아니라 혈소판 응집저해 결과가 나타나 혈행 개선 효과를 기대할 수 있으며 향후 투여량의 범위 조절 등에 관한 추가적인 연구가 필요할 것이라 생각된다.

**혈청 중의 ALP 활성에 미치는 영향**

ALP는 체내의 여러 조직에 존재하고 다양한 종류의 세포에서 발견되는 당단백(glycoprotein)으로 이루어진 세포 외 효소(ectoenzyme)이다. 건강한 성인의 경우 전체 ALP의 약 95%는 뼈(골수)와 간에서부터 만들어지며, 조골세포에 존재하여 국소의 뼈 무기질의 침착을 향진시키고 골세포 분화 유도 시 그 발현이 증가하기 때문에 골 형성 시스템에서 골아세포 분화의 초기 표지자로 알려졌다(48). 특히 폐경기 골다공증 환자에서는 ALP 활성이 현저히 증가하고 골 흡수 억제제 사용 시 감소하는 것으로 알려졌다. 혈청 중 ALP 농도는 Fig. 1에 나타내었다. SHAM군(212.43±23.62 unit/mL)보다 난소절제군인 OVX-CON군(328.67±10.50 unit/mL)은 혈청 중 ALP의 활성이 증가한 반면, 블레기말 추출

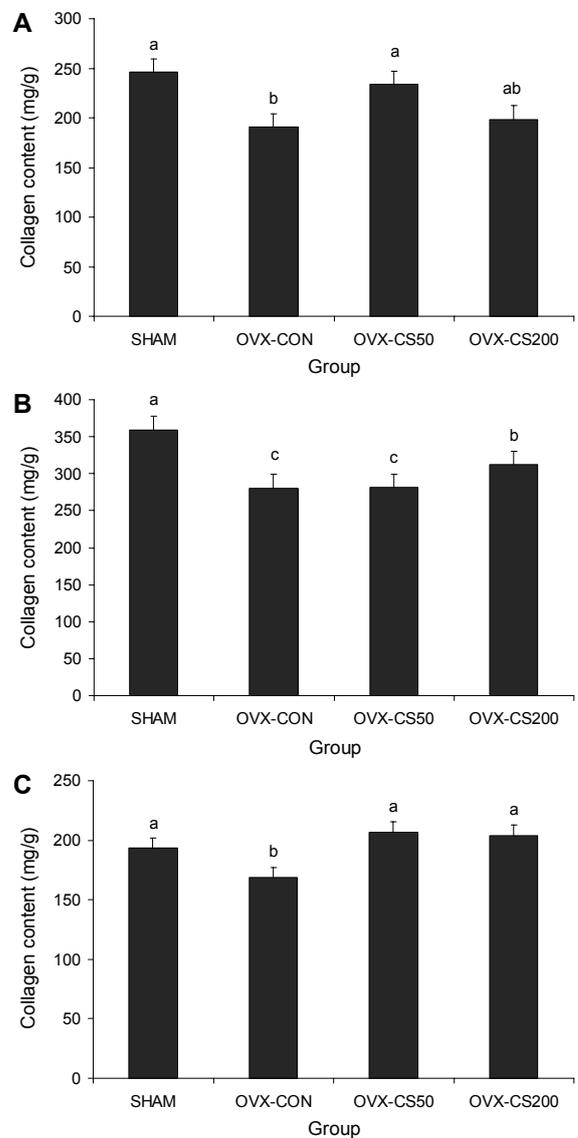


**Fig. 1.** Effects of *Colpomenia sinuosa* extracts on serum alkaline phosphatase in ovariectomized rats. See the legend of Table 1 for experimental groups. Means with different letters (a,b) above the bars are significantly different at  $P<0.05$  by Duncan's multiple range test.

물 50 mg/kg bw 및 200 mg/kg bw 투여군에서는 각각 280.50±87.06 unit/mL, 255.67±26.05 unit/mL로 OVX-CON군보다 감소하는 결과를 나타내었다. 블레기말과 같이 해조류에 속하는 고리매 열수 추출물을 투여한 난소절제군의 ALP 활성은 감소하였고(35), 본 연구에서의 블레기말 추출물을 투여한 경우에 있어서도 OVX-CON군보다 혈청 중 ALP 농도가 감소하는 경향을 나타내었다.

**결합 조직 중의 collagen 함량**

Collagen은 각 결합 조직에 분포하는 중요한 단백질로서 골의 nonlinear 부분은 주로 type I collagen으로 이루어져 있고(43), 피부 섬유아세포 중의 collagen은 에스트로겐에



**Fig. 2.** Effects of *Colpomenia sinuosa* extracts on collagen content in cartilage (A), bone (B), and skin (C) of ovariectomized rats. See the legend of Table 1 for experimental groups. Means with different letters (a-c) above the bars are significantly different at  $P<0.05$  by Duncan's multiple range test.

의하여 생성량이 증가한다고 알려졌으며, 조직 내 collagen의 손상은 연골조직의 노화와 골 관절염, 골다공증 병인의 원인이 된다고 한다(49,50).

본 연구에서는 hydroxyproline(Hyp) 양을 측정한 후, collagen의 아미노산 조성으로부터 collagen 양을 환산하여 난소절제에 의하여 여성호르몬인 에스트로겐이 결핍되었을 때 collagen 생성 변화에 있어 불레기말 추출물이 어떠한 영향을 주는지 검토하였다(Fig. 2). 연골의 경우(Fig. 2A) 비 난소절제군인 SHAM군보다 난소절제군인 OVX-CON군의 콜라겐 함량이 유의적으로 감소하였으나, 난소절제 후 불레기말 추출물 50 mg/kg bw를 투여한 군에서 유의적으로 증가하는 결과가 나타났다. 골조직(Fig. 2B)에서는 난소를 절제한 OVX-CON군이 난소를 절제하지 않은 SHAM군과 비교해 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었고, 난소절제 후 불레기말 추출물 200 mg/kg bw 투여로 인해 콜라겐 함량이 유의적으로 증가하는 결과가 나타났다. 피부 조직의 경우(Fig. 2C) 불레기말 50 및 200 mg/kg bw 투여군 모두에서 대조군보다 유의적으로 콜라겐 함량이 증가하는 결과가 나타났다. 피부조직보다 연골 및 골조직의 collagen 대사가 느린 것으로 보아 콜라겐 합성에는 추출물의 양을 50보다 200 mg/kg/d 정도는 투여해야 할 것으로 추측된다. 이상의 결과로부터 불레기말 추출물이 연골 및 골조직에서 난소절제에 의하여 감소한 결합조직 중의 collagen 함량을 증가시키는 것으로 나타났다. 갈조류 중에는 중성다당류인 laminaran과 함황 산성다당류인 fucoidan과 alginate가 함유되어 있는데, fucoidan은 heparin과 같은 혈액응고 활성, 항암 및 항AIDS 등의 활성이 있다고 보고되어 있다(51,52). 또한, L-fucose와 황 에스테기를 포함하는 수용성 다당류인 후코이단(53)은 골 형성, 항혈전, 항종양 활성이 있는 것으로 알려졌다(54,55). 따라서 본 연구에서 사용된 불레기말 수용성 추출물의 갱년기 증상 완화 작용은 후코이단 등 다당류의 작용으로 인한 결과라고 예측되며, 불레기말 수용성 추출물은 갱년기 장애 개선 식품 소재로서의 이용 가능성이 매우 높을 것으로 생각된다.

## 요 약

본 연구에서는 갱년기 장애를 유발한 흰쥐의 혈중 지질 농도, 항혈소판 응집능, 혈중 alkaline phosphatase(ALP) 활성 및 collagen 함량 검토를 통하여 갈조류인 불레기말 추출물의 효과를 검토하고자 하였다. 9주령 흰쥐를 각 군당 6마리씩 난소절제 모의 수술군(SHAM군), 난소절제군(OVX-CON군), 난소절제 후 불레기말 추출물 50 mg/kg bw 투여군(OVX-CS50군) 및 200 mg/kg bw 투여군(OVX-CS200군)의 4군으로 나누어 시술 후 6주간 추출물을 투여하며 사육하였다. 혈청 중 총콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤의 경우 난소절제군이 비 난소절제군과 비교해 증가하는 경향을 나타내었으나, 난소절제 후 불레기말 추출물 200 mg/kg

bw의 투여로 인해 유의적으로 감소하는 결과를 나타내었다. 또한, 난소절제에 의해 증가한 중성지질 함량은 불레기말 추출물의 투여로 인해 OVX-CS50군 및 OVX-CS200군 모두에서 유의적으로 감소하는 결과가 나타났다. 항혈소판 응집력을 검토한 결과 난소절제에 의해 혈소판 응집력이 증가하였으나 불레기말 추출물 50 mg/kg bw 투여로 인해 응집시간이 지연되는 결과를 나타내었다. 한편 골아세포 분화의 초기 표지자인 혈중 ALP 활성은 난소절제에 의해 증가하였으나, 불레기말 추출물을 투여한 결과 감소하는 경향이 나타났다. 결합조직 중의 collagen 함량은 연골, 뼈, 피부에서 난소절제에 의해 감소한 콜라겐 함량이 불레기말 추출물 투여로 인해 유의적으로 증가하였다. 이상과 같이 불레기말 추출물을 이용하여 난소절제에 갱년기를 유발한 동물에 대한 지질변화 및 골 형성에 대한 영향을 검토한 결과 불레기말 추출물이 지질 및 혈소판 응집능에 개선 효과를 나타내었으며, 결합조직 중 콜라겐 합성을 촉진하는 결과가 나타났으므로 이를 활용하여 식품 소재 및 기능성 식품 개발에 접목해 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

## 감사의 글

이 논문(저서)은 2013년 교육부와 한국연구재단의 지역혁신인력양성사업의 지원을 받아 수행된 연구(NRF-2013 H1B8A2032201) 결과의 일부로 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Phang H, Lee D. 2015. Population aging and changes of labour market in East Asia. *Korea J Population Studies* 38(4): 1-32.
2. Hwang MJ, Jung SH. 2011. The ageing society of Korea and the population estimate. *Korea J Population Studies* 34(2): 113-133.
3. Poehlman ET, Toth MJ, Gardner AW. 1995. Changes in energy balance and body composition at menopause: a controlled longitudinal study. *Ann Intern Med* 123: 673-675.
4. Toth MJ, Tchernof A, Sites CK, Poehlman ET. 2000. Menopause-related changes in body fat distribution. *Ann N Y Acad Sci* 904: 502-506.
5. Zamboni M, Armellini F, Milani MP, De Marchi M, Todesco T, Robbi R, Bergamo-Andreis IA, Bosello O. 1992. Body fat distribution in pre- and post-menopausal women: metabolic and anthropometric variables and their inter-relationships. *Int J Obes Relat Metab Disord* 16: 495-504.
6. Carr MC. 2003. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 2404-2411.
7. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. 2002. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults. *JAMA* 287: 356-359.
8. Ministry of Health & Welfare. 2010. *National nutrition survey*. Seoul, Korea.
9. Kim YS, Kim YS, Park YM, Lee JI. 2015. Relationship between serum lipid profile and bone mineral density in postmenopausal Korean women: The 4<sup>th</sup> (2008~2009) and 5<sup>th</sup> (2010~2011) Korea Health and Nutrition Examination Surveys (KNHANES IV & V). *Korean J Fam Pract* 5:

- 150-157.
10. Rodan GA, Martin TJ. 2000. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 289: 1508-1514.
  11. Anderson JJ, Garner SC. 1998. Phytoestrogens and bone. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 12: 543-557.
  12. Tsai JN, Uihlein AV, Lee H, Kumbhani R, Siwila-Sackman E, McKay EA, Burnett-Bowie SA, Neer RM, Leder BZ. 2013. Teriparatide and denosumab, alone or combined, in women with postmenopausal osteoporosis: the DATA study randomised trial. *Lancet* 382: 50-56.
  13. Catalano A, Morabito N, Basile G, Brancatelli S, Cucinotta D, Lasco A. 2013. Zoledronic acid acutely increases sclerostin serum levels in women with postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 98: 1911-1915.
  14. Lim S, Leem JY, Lee CS, Jang YJ, Park JW, Yoon S. 2007. Antioxidant and cell proliferation effects of *Acanthopanax senticosus* extract in human osteoblast-like MG-63 cell line. *Korean J Food Sci Technol* 39: 694-700.
  15. Park YS. 2011. Effects of *Eisenia bicyclis* extracts on lipids and bone turnover in ovariectomized rats. *MS Thesis*. Silla University, Busan, Korea.
  16. Cha SH, Ahn GN, Heo SJ, Kim KN, Lee KW, Song CB, Cho SK, Jeon YJ. 2006. Screening of extracts from marine green and brown algae in Jeju for potential marine angiotensin- I converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 307-314.
  17. Kim DS, Lee DS, Cho DM, Kim HR, Pyeon JH. 1995. Trace components and functional saccharides in marine algae: 2. Dietary fiber contents and distribution of the algal polysaccharides. *J Korean Fish Soc* 28: 270-278.
  18. Kim KI, Seo HD, Lee HS, Jo HY, Yang HC. 1998. Studies on the blood anticoagulant polysaccharide isolated from hot water extracts of *Hijikia fusiforme*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 1204-1210.
  19. Lee YP. 2005. New records of marine algae from Jeju Island, Korea. *J Fish Sci Technol* 8: 97-108.
  20. Kang SR, Kim MH. 2009. The effect of *Ecklonia cava* extracts on bone turnover markers in ovariectomized rats. *J Life Sci* 19: 1841-1846.
  21. Kim YK, Kim MH. 2010. Effect of *Ecklonia stolonifera* extracts on bone turnover markers in ovariectomized rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1769-1775.
  22. Park YS, Kang MS, Kim BK, Kim M. 2013. The effect of *Eisenia bicyclis* extracts on bone tissues in ovariectomized rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 33-39.
  23. Kim CS, Kim YS, Choi HG, Nam KW. 2014. Variations of seaweed community structure and distribution of crustose coralline algae at Gallam, Samchuk, eastern coast of Korea. *Korean J Environ Ecol* 28: 10-23.
  24. Shin DB, Han EH, Park SS. 2014. Cytoprotective effects of phaeophyta extracts from the coast of Jeju Island in HT-22 mouse neuronal cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 224-230.
  25. Kimble RB, Vannice JL, Bloedow DC, Thompson RC, Hopper W, Kung VT, Brownfield C, Pacifici R. 1994. Interleukin-1 receptor antagonist decreases bone loss and bone resorption in ovariectomized rats. *J Clin Invest* 93: 1959-1967.
  26. Schiele F, Henny J, Hitz J, Petitclerc C, Gueguen R, Siest G. 1983. Total bone and liver alkaline phosphatases in plasma: biological variations and reference limits. *Clin Chem* 29: 634-641.
  27. Raisz LG. 1988. Local and systemic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *N Engl J Med* 318: 818-828.
  28. Woessner JF. 1961. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* 93: 440-447.
  29. 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.
  30. Kalu DN, Arjmandi BH, Liu CC, Salih MA, Birnbaum RS. 1994. Effects of ovariectomy and estrogen on the serum levels of insulin-like growth factor- I and insulin-like growth factor binding protein-3. *Bone Miner* 25: 135-148.
  31. 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.
  32. Mueller K, Hsiao S. 1980. Estrus- and ovariectomy-induced body weight changes: evidence for two estrogenic mechanisms. *J Comp Physiol Psychol* 94: 1126-1134.
  33. Okazaki 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)  $\alpha$  or  $\beta$ . *Endocrinology* 143: 2349-2356.
  34. 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.
  35. Kim SY. 2015. Effects of *Scytosiphon lomentaria* extracts on bone formation *in vivo* and *in vitro* test. *MS Thesis*. Silla University, Busan, Korea. p 61.
  36. Sontas HB, Dokuzeylu B, Turna O, Ekici H. 2009. Estrogen-induced myelotoxicity in dogs: A review. *Can Vet J* 10: 1054-1058.
  37. Wu Q, Zhao Z, Sun H, Hao YL, Yan CD, Gu SL. 2008. Oestrogen changed cardiomyocyte contraction and beta-adrenoceptor expression in rat hearts subjected to ischaemia-reperfusion. *Exp Physiol* 93: 1034-1043.
  38. Ross RK, Paganini-Hill A, Mark TM, Henderson BE. 1989. Cardiovascular benefits of estrogen replacement therapy. *Am J Obstet Gynecol* 160: 1301-1306.
  39. Coulam CB, Ryan RJ. 1979. Premature menopause. *Am J Obstet Gynecol* 133: 639-643.
  40. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. 1977. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 62: 707-714.
  41. Namkung J, Kim JH, Jo HH, Oh EK, Cheon KY, Kwon DJ, Lew YO, Kim EJ, Hwang SJ, Song JY, Kim MJ, Kim MR. 2010. Comparison of the effects of hormone replacement therapy on bone mineral density, lipid profiles, and biochemical markers of bone metabolism. *J Korean Soc Menopause* 16: 107-115.
  42. Yu CK. 2003. Serum lipid profile and body weight changes after hormone replacement therapy in postmenopausal women. *MS Thesis*. Dongduk Women's University, Seoul, Korea. p 56.
  43. Lee JH, Baik IK, Kim HS, Cha BS, Lee HC, Huh KB. 1997. Body fat distribution and serum levels of lipids and hormones in pre- and post-menopausal women. *Korean J Lipidology* 7: 155-164.
  44. Jae SY, Park WH. 1998. The relationship of cardiopulmonary fitness to plasma fibrinogen, plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1), and lipoprotein (a) [LP(a)] in healthy postmenopausal women. *Korean J Sports Med* 16: 282-291.

45. Lee YA, Kim M. 2008. The effect of sea tangle extract on serum lipid level in ovariectomized rats. *J Life Sci* 18: 249-254.
46. Park GH, Seo BS, Son DJ, Park YH, Jang SK 2003. Study on inhibition of platelet aggregation of bioactive constituents from *Paeonia lactiflora*. *J Korea Acad Industr Coop Soc* 4: 357-360.
47. Ryou SH 2008. Effects of ovariectomy or feeding green tea or sasa borealis bamboo after ovariectomy on plasma lipids, platelet aggregation, erythrocyte Na efflux and bone density in rats. *MS Thesis*. Jeju National University, Jeju, Korea. p 38.
48. Khandwala HM, Mumm S, Whyte MP. 2006. Low serum alkaline phosphatase activity and pathologic fracture: case report and brief review of hypophosphatasia diagnosed in adulthood. *Endocr Pract* 12: 676-681.
49. Lubec G, Labudova O, Seebach D, Beck A, Hoeger H, Hermon M, Weninger M. 1995. Alpha-methyl-proline restores normal levels of bone collagen type I synthesis in ovariectomized rats. *Life Sci* 57: 2245-2252.
50. Tiku ML, Allison GT, Naik K, Karry SK. 2003. Malondialdehyde oxidation of cartilage collagen by chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 11: 159-166.
51. Kim DS, Park YH. 1985. Uronic acid composition, block structure and some related properties of alginic acid. *Bull Korean Fish Soc* 18: 29-36.
52. Collic S, Fischer AM, Tapon-Brethaudiere J, Boisson C, Durand P, Jozefonvicz J. 1991. Anticoagulant properties of a fucoidan fraction. *Thromb Res* 64: 143-154.
53. Koo JG, Jo KS, Do JR, Woo SJ. 1995. Isolation and purification of fucoidans from *Laminaria religiosa* and *Undaria pinnatifida* in Korea. *J Korean Fish Soc* 28: 227-236.
54. Chizhov AO, Dell A, Morris HR, Haslam SM, McDowell RA, Shashkov AS, Nifant'ev NE, Khatuntseva EA, Usov AI. 1999. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydr Res* 320: 108-119.
55. Kim BS, Kang HJ, Park JY, Lee J. 2015. Fucoidan promotes osteoblast differentiation via JNK- and ERK-dependent BMP2-Smad 1/5/8 signaling in human mesenchymal stem cells. *Exp Mol Med* 47: e128.