

장기간의 고·저단백식이섭취가 난소절제쥐의 Ca 및 골격대사에 미치는 영향

김화영 · 문경원 · 김정희

이화여자대학교 가정과학대학 식품영양학과

A Study on the Long-Term Effects of Dietary Protein Level on Ca and Skeletal Metabolism in Ovariectomized Rats

Kim, Wha Young · Moon, Kyoung Won · Kim, Jeoung Hee

Department of Food & Nutrition, College of Home Science, Ewha Womans University, Seoul, Korea

ABSTRACT

This study was performed to investigate the effect of dietary protein level on the metabolic changes of Ca and skeletons in postmenopausal women, using ovariectomized rats as an animal model. The female rats of 200~250g were fed either 8%(L) or 50%(H) casein diet for 15 weeks (1st experiment). At 15th week, the rats of each diet group were undergone ovariectomy or sham-operation and they were continued to feed the same experimental diet for 9 more months(2nd experiment). Ca metabolism, kidney function and bone composition were determined at the end of 1st experiment, 3rd and 9th month of 2nd experiment.

After 1st experiment, high protein group showed higher urinary Ca and protein excretion, however, there was no difference in GFR and urinary hydroxyproline excretion. The weights, ash and Ca content of femur, scapular and vertebra tended to be higher in high protein groups which tells that high protein promoted skeletal growth.

In 2nd experiment, high protein group showed higher urinary Ca and protein excretion and lower Ca absorption and balance. GFR was not affected by dietary protein and ovariectomy but increased with time, as well as kidney weight which shows the continuous development of kidney at this age of 15 month in rats. There were no difference in urinary hydroxyproline, serum ALP, and PTH among experimental groups. The weights of femur, scapular, 4th vertebra increased with time, showing the skeleton continues to grow at this age in rats. However, Ca contents, Ca/wt, Ca/ash were decreased with time and tended to be lower in high protein group

especially in femur.

In conclusion, prolonged feeding of high protein diet deteriorated Ca metabolism and induced bone loss as time after menopause is extended.

KEY WORDS : ovariectomy · protein level · GFR · urinary Ca · urinary hydroxyproline · bone mineral.

서 론

중년 이후의 중요한 건강 문제로 대두되고 있는 골다공증은 Ca 대사의 불균형으로 인해 골질량이 감소되며 척추, 요골 및 대퇴골의 골절을 쉽게 초래하는 질병으로서 특히 폐경 이후의 여성에게서 심각하다¹⁾²⁾. 골다공증은 여러가지 식이 인자의 영향을 받는데 그 중 단백질은 신장 기능의 변화를 통해 체내 Ca과 골격 대사에 영향을 미친다. 즉, 성장기부터 고단백 식이를 먹으면 신장의 구조 및 기능에 영향을 주어 뇨 Ca 배설이 증가되고 이에 따라 혈액내 Ca 수준을 일정하게 유지하기 위해 골격으로부터의 Ca 재흡수를 증가시킨다는 것이 동물³⁾ 및 사람⁴⁾⁵⁾을 대상으로 한 여러 연구들에서 보고되어 왔다.

한편 폐경으로 인한 estrogen의 감소는 1,25-dihydroxycholecalciferol의 혈청 수준을 감소시켜 Ca 흡수율을 저하시키며 골격의 PTH에 대한 예민도를 증가시켜 골격의 Ca 재흡수를 촉진시키게 되므로 결국 골다공증을 유발한다⁶⁾. 폐경기 이후 여성들의 골다공증 예방 및 치료에 관한 여러 방안이 연구되어 왔으나 식이 내용이 폐경 이후 여성들의 골격 대사에 미치는 영향에 대한 연구는 적었으며 특히 단백질 섭취가 폐경 이후 여성들의 골다공증 발병에 미치는 영향에 대한 연구는 거의 없었다. 최근 우리나라에서도 단백질 섭취량이 점점 증가하여 권장량을 상회하는 수준이므로 본 연구에서는 과다한 단백질을 섭취한 경우 폐경 이후 여성들의 Ca 및 골격 대사 변화에 대하여 살펴보고자 하였으며, 이를 연구하기 위해 동물모델로써 난소를 절제시킨 흰 쥐를 택하였다. Kalu⁷⁾는 흰 쥐의 골격량이 일생동안 비교적 일정하지만 성 호르몬 부족을 유발했을 때 여러가지 면에서 폐경 이후 여성에게서 나타나는 골격 손실과 비슷한 특징을 보인다고 하였다. 즉, 난소를 절제시킨 흰 쥐에서 1) bone turnover rate이 증가되는데 형성보다 재

흡수가 더 증가하고, 2) 초기에는 골격 손실이 빠르게 일어나다가 점점 속도가 느려지며, 3) cortical bone보다 cancellous bone의 손실이 더 컸으며 4) 장내 Ca 흡수가 감소하였고, 5) 비만에 의해 골격 손실에 대한 보호작용이 존재하며 6) estrogen, PTH, calcitonin, 운동과 같은 치료에 대한 골격 반응이 폐경후 여성에게서 나타나는 반응과 비슷한 특징을 나타내므로 난소 절제 흰 쥐는 폐경과 Ca 대사와의 관계를 연구하는데 적합한 모델로써 인정된다.

한편 선행 연구에서 고단백질 수준을 36%¹⁰⁾와 40%¹¹⁾로 하여 각각 5주, 혹은 3개월간 사육한 결과 고단백식이 골격 대사에 미치는 효과가 뚜렷하지 않았으므로 본 연구에서는 고단백 식이가 골격 대사에 미치는 기전을 규명하기 위해 고단백 식이수준을 50%로 높이고 실험기간을 총 1년으로 연장하였다. 또한 저단백 식이는 지속적인 성장을 보여주는 수준인 8%를 택하였고, 폐경 전부터 계속해서 일정한 수준의 단백질을 섭취하였을 때 식이 단백질 수준이 폐경 후 여성들의 Ca 및 골격 대사에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험 식이로 15주간 사육한 뒤 난소 절제 및 대조군으로 나누어 그 후 같은 식이로 9개월을 더 사육하여 총 1년 동안 관찰하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험 동물의 사육 및 식이

본 연구는 150~200g된 Sprague-Dawley 종 암컷 흰쥐를 구입하여 고형 사료로 5일간 적응시킨 후, 체중에 따라 난피법에 의해 고단백군(H군)과 저단백군(L군)으로 나누어 15주간 사육하였다(제1 실험기). 실험 식이로 사육한 15주 후, 각 군에서 8마리씩 임의 추출하여 15주간의 식이 효과를 관찰하였다. 각 군의 나머지는 난소 절제 효과를 보기 위해 난소 절제 수술 혹은 대조군으로써 sham수술을 실시하여 식이 단백질 수준 및

수술 여부에 따라 고단백-난소절제군(HO군), 고단백-대조군(HS군), 저단백-난소절제군(LO군), 저단백-대조군(LS군)등 4군을 형성하였으며, 수술 후 3개월째 일부를 희생, 분석하고 나머지를 6개월간 더 사육하였다(제2실험기).

실험 식이는 Table 1과 같이 8% casein을 함유한 저단백 식이와 50% casein을 함유한 고단백 식이로 나누었다. 각 식이의 Ca과 P의 함량을 같게 하기 위해 미리 casein을 분석한 후 식이에 Ca 0.6%와 P 0.4%를 포함하도록 무기질 함량을 조절하였다. 실험 동물은 한 마리씩 분리하여 사육했고, 물과 식이는 제한없이 공급했다.

Table 1. Composition of experimental diet (g/kg diet)

| | 8% casein diet | 50% casein diet |
|--------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------|
| Corn starch | 768.61 | 351.06 |
| Casein | 80.00 | 500.00 |
| Corn oil | 100.00 | 100.00 |
| Salt mixture ¹⁾ | 14.72 | 14.72 |
| Vitamin mixture ²⁾ | 10.00 | 10.00 |
| CaCO ₃ | 8.57 | 9.83 |
| Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O | 16.10 | 12.39 |
| Choline chloride | 2.00 | 2.00 |

1) Salt mixture(mg/kg diet) : MgCO₃ 6900, ZnCO₃ 96, FeSO₄·7H₂O 124, MnSO₄·H₂O 150, CuSO₄·5H₂O 20, KI 1.3, NaCl 2300, Na₂CO₃ 1600, K₂CO₃ 3530, Na₂SeO₃ 0.22

2) Vitamin mixture(mg/kg mixture) : Thiamin-HCl 600, Riboflavin 600, Pyridoxin-HCl 700, Nicotinic acid 3000, D-calcium pantothenate 1600, Folic acid 200, Vitamin B₁₂ 1, Retinyl palmitate(Vit. A) 120, DL- α -tocopherol acetate(Vit. E) 5000, Cholecalciferol(Vit. D₃) 2.5, Menadione(Vit. K) 5.0, D-Biotin 20, Sucrose finely powdered to make 1,000g

2. 시료의 채취

고·저단백식이로 사육하면서 15주째, 그리고 난소절제 수술 후 3개월 및 9개월째, 이와 같이 3번에 나누어 실험 동물을 희생하였는데 뇨와 변은 실험 동물을 희생하기 2-3일 전에 대사장에서 24시간 동안 채취하였다. 이 때 식이에 의하여 시료의 성분이 오염되는 것을 막기 위해 식이 그릇을 대사장에 넣지 않았고 이미 보고된 방법¹²⁾과 같이 뇨를 채취하였다.

실험 동물은 12시간 동안 굶긴 다음 ethyl ether로 마취시킨 후 단두에 의해 희생시키고 혈액과 대퇴골, 4번

째 척추뼈, 건갑골 등의 골격을 채취하였다. 뼈의 밀도는 Archimedes의 원리¹³⁾에 의해 측정하였다. 골격은 젖은 무게를 쟀 후 일정한 무게가 될 때까지 105±5℃의 drying oven에서 건조시켜 마른 무게를 재고, 800℃의 전기 회화로에서 3-4일간 회화시켜 각 뼈 건조 무게당 회분 함량을 측정하였다.

3. 생화학적 분석

뇨와 혈중 creatinine 함량은 Folin and Wu의 방법¹⁴⁾에 의해 분석하였다. Creatinine clearance(GFR)은 뇨와 혈청의 creatinine 농도로 부터 계산하였으며, Lowry 방법¹⁵⁾을 이용하여 뇨 중 단백질을 정량하였다. 뇨중 hydroxyproline은 Blumenkrantz와 Asboehansen방법¹⁶⁾에 의해 측정하였다. 뇨와 혈청의 Ca 함량은 일정량을 취해 La₂O₃ 용액으로 희석한 후 Atomic Absorption Spectrophotometer(AAS)로 422.7 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 변과 뼈의 Ca 및 뼈의 Mg 함량은 회화시킨 변과 뼈를 1N HCl에 녹인 후 0.5% La₂O₃ 용액으로 희석하고 AAS를 사용하여 Ca은 422.7nm에서, Mg은 285.2nm에서 흡광도를 측정하여 각 뼈 및 변 무게 당 함량을 측정하였다. 혈청의 alkaline phosphatase는 kind-king법을 이용한 kit(아산제약)를 사용하여 분석하였고, 혈청 부갑상선호르몬(PTH)은 INSCTAR의 PTH-MM Assay Procedure를 이용하였다. 뼈의 Mg, 혈청 PTH, alkaline phosphatase는 수술 후 9개월째 희생시킨 실험동물의 시료에서만 분석하였다.

4. 자료의 처리

실험 분석 결과는 각 실험군의 평균치와 표준 오차를 계산하였다. 식이 단백질 수준을 달리하여 15주간 사육하여 얻은 자료는 student's t-test로 두 군간의 차이를 검정하였고 15주째 수술 후 다시 같은 식이로 각각 3개월, 9개월간 사육된 4군의 자료는 식이 단백질 수준의 영향(A), 식이 단백질 수준이 난소절제 수술 여부에 영향을 주어서 생기는 효과(B(H), B(L)), 수술 후 3개월과 9개월의 사육기간에 의한 차이(C)에 대해 검정하기 위해 3요인-nested design으로 분산 분석(ANOVA for three-factor nested design)하여 $\alpha=0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결 과

Fig. 1에는 전 실험 기간을 통한 하루 식이 섭취량과 체중 변화를 제시하였다. 하루 식이 섭취량을 기간별로 살펴보면 각 군 모두 8개월까지는 증가하다가 그 이후부터는 전반적으로 감소되는 경향을 보였다. 체중은 각 군에서 모두 지속적으로 증가하였으며 체중 증가량이 고단백군에서 더 높은 경향을 보였고, 난소 절제군의 체중 증가량이 유의적으로 높았다.

고·저단백식으로 15주간 사육한 후인 제1 실험기의 결과와 그 후 난소 절제를 행하고 같은 실험 식이로 계속 사육하여 3개월과 9개월 후에 얻은 제2 실험기의 결과는 다음과 같다.

1. 제 1 실험기

식이 단백질 수준이 Ca대사, 신장기능 및 골격 구성에 미치는 영향은 Table 2, 3, 4에 수록하였다. Table 2에서 보듯이 이 기간동안의 Ca 섭취량은 식이 단백질 수준에 의해 영향받지 않았으며, Ca 흡수율과 Ca balance가 저단백군에서 유의적으로 높았다. 뇨 Ca배설량은 유의적인 차이는 없었으나 고단백군이 높은 경향을 보였다.

신장의 총무게는 고단백군에서 유의적으로 높았으며 신장 기능을 반영하는 지표인 GFR은 두 군간에 차이가

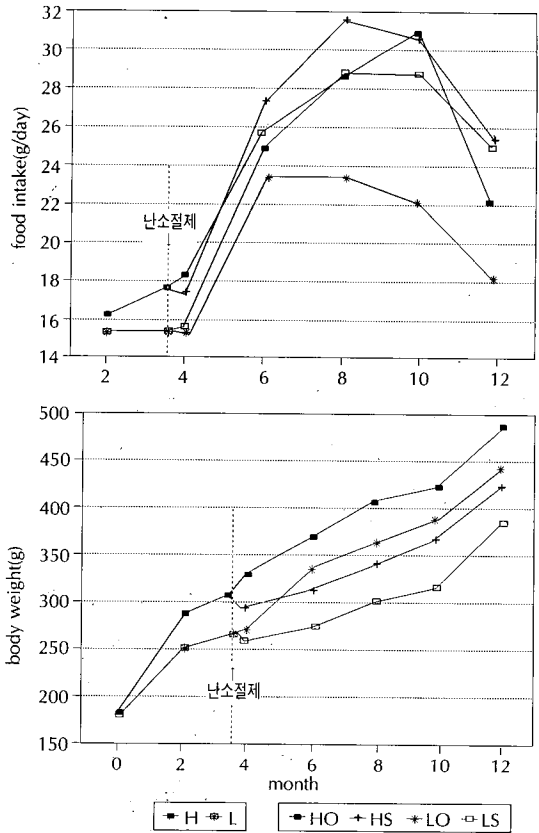


Fig. 1. Food intake and body weight during experiment.

Table 2. Ca metabolism in 1st experiment

| | Ca intake (mg/day) | Fecal Ca (mg/day) | Urinary Ca (mg/day) | Apparant Ca Absorption(%) | Ca balance (mg/day) |
|-----------------|--------------------------|-------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|
| H ¹⁾ | 99.7 ± 7.9 ²⁾ | 86.9 ± 7.3* | 1.3 ± 0.2 | 11.5 ± 6.3* | 11.5 ± 6.0* |
| L | 97.5 ± 5.1 | 63.7 ± 4.5 | 0.8 ± 0.2 | 33.0 ± 4.6 | 33.0 ± 5.8 |

1) H ; group fed 50% casein diet for 15 weeks

L ; group fed 8% casein diet for 15 weeks

2) Mean ± S.E

* significantly different between two groups at $\alpha=0.05$ level by student's t-test

Table 3. Kidney function and urinary hydroxyproline in 1st experiment

| | Total kidney wt. (g) | GFR (ml/min) | Urinary protein (mg/day) | Urinary hydroxyproline (μ g/day) |
|---|-----------------------------|--------------|--------------------------|---------------------------------------|
| H | 2.02 ± 0.07 ¹⁾ * | 0.26 ± 0.02 | 8.38 ± 1.41* | 166.7 ± 7.2 |
| L | 1.46 ± 0.09 | 0.23 ± 0.02 | 4.70 ± 0.41 | 165.2 ± 15.1 |

1) Mean ± S.E

* significantly different between two groups at $\alpha=0.05$ level by student's t-test

Table 4. Composition of 3 bones in 1st experiment

| | | H | L |
|----------------------------------|----------|----------------------------|--------------|
| Wet wt. (mg) | Femur | 733.2 ± 26.0 ¹⁾ | 668.4 ± 22.6 |
| | Scapular | 128.1 ± 5.7 | 120.9 ± 5.5 |
| | Vertebra | 240.3 ± 12.4 | 209.1 ± 13.4 |
| Dried wt. (mg) | Femur | 522.5 ± 22.1 | 441.0 ± 33.3 |
| | Scapular | 108.0 ± 4.5 | 98.8 ± 4.6 |
| | Vertebra | 149.8 ± 8.8 | 122.7 ± 8.8 |
| Density (mg/cm ³) | Femur | 2.76 ± 0.07 | 2.99 ± 0.17 |
| | Scapular | 2.17 ± 0.08 | 2.18 ± 0.08 |
| | Vertebra | 3.21 ± 0.15 | 3.20 ± 0.09 |
| Ash (mg) | Femur | 329.1 ± 14.5 | 282.7 ± 17.3 |
| | Scapular | 78.5 ± 4.0 | 76.6 ± 3.4 |
| | Vertebra | 100.5 ± 5.1 | 81.7 ± 6.3 |
| Ca (mg) | Femur | 118.4 ± 16.5 | 83.5 ± 6.5 |
| | Scapular | 24.9 ± 1.1 | 22.8 ± 1.1 |
| | Vertebra | 40.5 ± 2.4 | 34.7 ± 2.4 |
| Ca/ash ratio (%) | Femur | 35.0 ± 3.5 | 29.5 ± 1.1 |
| | Scapular | 32.3 ± 2.1 | 30.4 ± 2.2 |
| | Vertebra | 40.5 ± 1.9 | 43.0 ± 2.2 |
| Ca/ wet wt. ratio (%) | Femur | 16.1 ± 2.1 | 12.4 ± 0.7 |
| | Scapular | 19.5 ± 0.4 | 18.5 ± 0.6 |
| | Vertebra | 16.8 ± 0.3 | 16.6 ± 0.8 |

1) Mean ± S.E

* significantly different between two groups at $\alpha=0.05$ level by student's t-test

없었고 뇨단백질 배설량은 고단백군에서 유의적으로 높았다. 그러나 골재흡수의 지표인 뇨 hydroxyproline 배설량은 두 군간에 유의적 차이를 보이지 않았다(Table 3).

또한 Table 4에서 보듯이 3가지 골격의 무게는 유의적인 차이는 없었으나 모두 고단백군에서 더 무거운 경향을 보였으며 척추뼈의 건조 무게는 유의적 차이를 보였다. 골격의 밀도는 3가지 골격 모두에서 식이에 의한 차이가 없었으며 대퇴골의 회분 함량, Ca 함량, Ca/ash비 및 Ca/wt비는 고단백군이 저단백군에 비해 높은 경향을 보였다. 척추뼈의 회분 함량은 고단백군에서 유의적으로 높았으나 Ca 함량, Ca/ash비, Ca/wt 비 등에서는 유의적 차이가 없었다. 견갑골의 구성은 식이 단백질에 의한 영향을 가장 적게 받는 것으로 나타났다.

2. 제 2 실험기

제 2 실험기의 각 실험 기간 종료 1주일 전에 측정된

Ca 섭취량, 변 및 뇨 Ca 배설량 등 Ca 대사를 Table 5에 제시하였다. Ca 섭취량은 고단백군에서 높았으며, 난소 절제 후 3개월군(이하 3개월군)이 난소 절제 후 9개월군(이하 9개월군)에 비해 유의적으로 높아 실험기간이 지남에 따라 감소하였다. 변 Ca 배설량과 뇨 Ca 배설량도 고단백군이 저단백군에 비해 높았으며 기간이 지남에 따라 감소하였다. 특히 뇨 Ca 배설량은 난소 절제 수술의 효과도 나타나서 고단백군에서 난소 절제시 유의적으로 높았다. Ca 흡수율과 Ca balance는 난소 절제나 기간에 의한 차이는 보이지 않았으나 단백질 수준에 의한 차이를 보여 저단백군이 유의적으로 더 높았으며 특히 고단백-난소절제군(HO)의 값이 낮은 경향을 보였다.

혈청 alkaline phosphatase(ALP)와 부갑상선호르몬(PTH) 수준은 난소 절제 후 9개월에만 측정하였다(Table 6). 골격 형성의 지표로 측정된 혈청 ALP수준은 식이 단백질 수준과 난소 절제에 의한 영향이 나타나

난소절제쥐에서 식이단백질 수준과 Ca 대사

지 않아 각 군간에 유의적 차이가 없었으나 고단백-대조군(HS)군에서 가장 높은 값을 보였다. 혈청 PTH수준도 ALP와 같은 경향을 보여 각 군간에 유의적 차이를 보이지 않았다. 한편, 골재흡수의 지표로 측정된 뇨 hydroxyproline배설량도 각 군간에 유의적 차이를 보이지 않았으나 9개월군의 경우 고단백-대조군(HS)이 가장

높은 값을 나타내었다.

Table 7에 제시하였듯이 신장의 총무게는 고단백군에서 더 무거웠으나 난소 절제에 의한 차이는 없었고 9개월군이 유의적으로 높았다. Creatinine clearance로 측정된 GFR은 실험 기간이 경과함에 따라 증가하였고, 뇨단백질 배설량은 고단백군에서 많았으며 난소 절제 및

Table 5. Ca metabolism in 2nd experiment

| | Ca intake (mg/day) | Fecal Ca (mg/day) | Urinary Ca (mg/day) | Apparant Ca Absorption(%) | Ca balance (mg/day) |
|--------------------|---------------------------|----------------------|------------------------|------------------------------|------------------------|
| HO 3 | 147.9 ± 7.8 ¹⁾ | 120.3 ± 12.0 | 2.1 ± 0.4 | 19.4 ± 5.2 | 25.5 ± 7.0 |
| HS 3 | 148.3 ± 8.3 | 90.8 ± 8.3 | 2.0 ± 0.3 | 37.7 ± 7.2 | 55.6 ± 12.6 |
| LO 3 | 125.9 ± 4.9 | 41.3 ± 5.7 | 1.6 ± 0.3 | 67.1 ± 3.4 | 82.5 ± 4.2 |
| LS 3 | 133.8 ± 2.8 | 35.7 ± 1.7 | 1.3 ± 0.1 | 72.8 ± 1.0 | 97.1 ± 1.8 |
| HO 9 | 115.6 ± 5.7 | 64.6 ± 4.7 | 1.7 ± 0.1 | 42.5 ± 5.1 | 49.2 ± 7.4 |
| HS 9 | 146.0 ± 10.6 | 63.4 ± 7.8 | 0.9 ± 0.1 | 53.5 ± 6.6 | 81.6 ± 14.4 |
| LO 9 | 103.6 ± 5.9 | 46.7 ± 4.0 | 1.2 ± 0.1 | 53.1 ± 4.9 | 55.7 ± 7.6 |
| LS 9 | 138.5 ± 11.2 | 54.0 ± 4.5 | 1.3 ± 0.2 | 58.4 ± 5.9 | 83.1 ± 14.4 |
| S.F. ²⁾ | A, C | A, C | A, B(H), C | A | A |

1) Mean ± S.E

2) Significant factor

A ; Effect of dietary protein level was significant at $\alpha=0.05$ level by F-test.

B(H) ; Effect of ovariectomy in high protein group was significant at $\alpha=0.05$ level by F-test.

C ; Effect of experimental period was at $\alpha=0.05$ level by F-test.

*HO 3(HO 9) ; 50% casein diet fed group sacrificed at 3mo.(9mo.) after ovariectomy

HS 3(HS 9) ; 50% casein diet fed group sacrificed at 3mo.(9mo.) after ovariectomy

LO 3(LO 9) ; 8% casein diet fed group sacrificed at 3mo.(9mo.) after ovariectomy

LS 3(LS 9) ; 8% casein diet fed group sacrificed at 3mo.(9mo.) after ovariectomy

Table 6. Serum ALP, PTH, urinary hydroxyproline in 2nd experiment

| | ALP (K-A) | PTH (p mol/L) | Urinary hydroxyproline (µg/day) |
|--------------------|--------------------------|------------------|------------------------------------|
| HO 3 | NM ¹⁾ | NM | 210.9 ± 13.2 |
| HS 3 | NM | NM | 211.5 ± 10.5 |
| LO 3 | NM | NM | 209.9 ± 17.1 |
| LS 3 | NM | NM | 199.7 ± 15.7 |
| HO 9 | 1.92 ± 0.3 ²⁾ | 37.9 ± 3.5 | 142.3 ± 14.3 |
| HS 9 | 2.72 ± 0.5 | 78.8 ± 21.3 | 216.4 ± 36.9 |
| LO 9 | 2.16 ± 0.4 | 70.9 ± 18.9 | 160.7 ± 30.4 |
| LS 9 | 1.48 ± 0.2 | 54.5 ± 10.1 | 170.2 ± 26.3 |
| S.F. ³⁾ | NS | NS | NS |

1) NM ; not measured

2) Mean ± S.E

3) Significant factor

Effect of dietary protein level was significant at $\alpha=0.05$ level by F-test.

NS ; not significant

기간에 의해서는 유의적 차이를 보이지 않았다.

Table 8, 9, 10에는 대퇴골, 견갑골, 4번째 척추뼈의 구성성분에 대한 결과를 나타내었다. 대퇴골 및 견갑골의 젖은 무게와 마른 무게는 모두 기간이 경과함에 따라 증가하였으며 특히 견갑골의 젖은 무게는 식이의 영향도 받아서 고단백군이 유의적으로 더 무거웠다. 반면, 척추뼈의 무게는 식이, 난소절제 및 기간에 의한 유의적 차이를 나타내지 않았다(Table 8). Table 9에서 보는 바와 같이 회분함량은 3가지 골격 모두에서 각 군간에 유의적

차이를 보이지 않았다. 견갑골과 척추뼈의 Ca함량은 난소 절제 후 9개월군이 3개월군에 비해 감소하였으나, 대퇴골의 경우는 식이 단백질 수준, 난소 절제 여부 및 기간에 따른 영향을 보이지 않았다. Mg함량은 3가지 골격 중 견갑골만이 식이 단백질 수준에 의한 유의적 차이를 보여 고단백군이 높았으며 대퇴골과 척추뼈는 식이 및 난소 절제에 의한 영향이 없는 것으로 나타났다. Ca/wt비, Ca/ash 비를 보면(Table 10), 3가지 골격 모두 이 두 비가 기간이 경과함에 따라 낮아졌다. 특히 대퇴골

Table 7. Kidney function in 2nd experiment

| | Total kidney wt. (g) | GFR (ml/min) | Urinary protien (mg/day) |
|--------------------|---------------------------|--------------|--------------------------|
| HO 3 | 2.39 ± 0.11 ¹⁾ | 0.31 ± 0.04 | 30.2 ± 10.4 |
| HS 3 | 2.58 ± 0.09 | 0.34 ± 0.03 | 37.3 ± 12.9 |
| LO 3 | 1.59 ± 0.13 | 0.27 ± 0.02 | 14.6 ± 4.1 |
| LS 3 | 2.05 ± 0.10 | 0.22 ± 0.03 | 8.9 ± 2.7 |
| HO 9 | 2.48 ± 0.07 | 1.24 ± 0.28 | 16.2 ± 6.5 |
| HS 9 | 3.11 ± 0.17 | 0.86 ± 0.07 | 50.8 ± 16.6 |
| LO 9 | 1.92 ± 0.06 | 0.94 ± 0.14 | 4.2 ± 1.0 |
| LS 9 | 2.05 ± 0.14 | 0.63 ± 0.11 | 6.0 ± 1.8 |
| S.F. ²⁾ | A, C | C | A |

1) Mean ± S.E

2) Significant factor

A ; Effect of dietary protein level was significant at $\alpha=0.05$ level by F-test.

C ; Effect of experimental period was at $\alpha=0.05$ level by F-test.

not significant

Table 8. Wet and dried weight of 3 bones in 2nd experiment

| | Wet wt. (mg) | | | Dried wt. (mg) | | |
|--------------------|----------------------------|-------------|--------------|----------------|-------------|--------------|
| | Femur | Scapular | Vertebra | Femur | Scapular | Vertebra |
| HO 3 | 800.2 ± 34.5 ¹⁾ | 161.1 ± 6.3 | 226.2 ± 10.2 | 544.7 ± 17.0 | 119.3 ± 2.0 | 148.8 ± 5.7 |
| HS 3 | 805.6 ± 14.8 | 178.9 ± 4.3 | 237.8 ± 10.0 | 523.9 ± 12.8 | 137.2 ± 3.3 | 154.2 ± 5.4 |
| LO 3 | 706.1 ± 21.7 | 140.7 ± 5.2 | 192.9 ± 19.1 | 488.5 ± 16.6 | 110.4 ± 4.2 | 129.5 ± 11.6 |
| LS 3 | 785.0 ± 32.4 | 159.5 ± 9.0 | 222.6 ± 8.1 | 527.9 ± 18.4 | 124.5 ± 6.8 | 151.6 ± 5.5 |
| HO 9 | 856.4 ± 33.9 | 188.8 ± 8.6 | 234.9 ± 11.9 | 586.4 ± 25.9 | 142.6 ± 7.1 | 148.9 ± 8.7 |
| HS 9 | 839.0 ± 28.9 | 194.0 ± 8.0 | 237.0 ± 10.8 | 573.7 ± 20.0 | 140.8 ± 5.6 | 148.7 ± 7.1 |
| LO 9 | 816.8 ± 24.4 | 190.0 ± 8.0 | 236.1 ± 9.1 | 580.9 ± 16.8 | 145.1 ± 5.2 | 153.1 ± 6.4 |
| LS 9 | 796.7 ± 24.7 | 179.0 ± 4.4 | 229.7 ± 15.8 | 556.3 ± 24.8 | 131.9 ± 3.8 | 147.7 ± 10.8 |
| S.F. ²⁾ | C | A, C | NS | C | C | NS |

1) Mean ± S.E

2) Significant factor

A ; Effect of dietary protein level was significant at $\alpha=0.05$ level by F-test.

C ; Effect of experimental period was at $\alpha=0.05$ level by F-test.

not significant

난소절제쥐에서 식이단백질 수준과 Ca 대사

Table 9. Ash, Ca and Mg contents of 3 bones in 2nd experiment

| | Ash (mg) | | | Ca (mg) | | | Mg (mg) | | |
|--------------------|----------------------------|-------------|------------|--------------|------------|------------|------------------|-------------|-------------|
| | Femur | Scapular | Vertebra | Femur | Scapular | Vertebra | Femur | Scapular | Vertebra |
| HO 3 | 348.1 ± 10.9 ¹⁾ | 91.4 ± 14.0 | 91.3 ± 3.6 | 106.0 ± 7.9 | 34.7 ± 0.9 | 38.9 ± 1.6 | NM ²⁾ | NM | NM |
| HS 3 | 358.6 ± 10.3 | 80.4 ± 5.2 | 98.7 ± 3.5 | 130.7 ± 7.3 | 38.9 ± 1.5 | 41.5 ± 1.8 | NM | NM | NM |
| LO 3 | 307.0 ± 10.0 | 85.0 ± 3.2 | 77.8 ± 5.7 | 98.1 ± 4.2 | 32.1 ± 1.8 | 34.2 ± 3.0 | NM | NM | NM |
| LS 3 | 344.0 ± 10.9 | 82.0 ± 3.3 | 93.0 ± 3.2 | 145.6 ± 11.7 | 35.0 ± 2.2 | 42.1 ± 1.3 | NM | NM | NM |
| HO 9 | 352.6 ± 16.0 | 90.1 ± 4.8 | 85.1 ± 5.2 | 111.5 ± 5.6 | 27.8 ± 1.7 | 27.0 ± 3.1 | 1.9 ± 0.1 | 0.52 ± 0.03 | 0.30 ± 0.02 |
| HS 9 | 364.4 ± 13.9 | 89.7 ± 3.7 | 88.0 ± 4.6 | 114.7 ± 4.9 | 28.0 ± 1.4 | 27.3 ± 1.4 | 2.0 ± 0.1 | 0.53 ± 0.03 | 0.33 ± 0.02 |
| LO 9 | 338.5 ± 11.4 | 91.5 ± 3.1 | 82.0 ± 4.1 | 112.5 ± 3.7 | 28.2 ± 1.1 | 25.4 ± 1.4 | 1.7 ± 0.1 | 0.49 ± 0.02 | 0.28 ± 0.02 |
| LS 9 | 354.0 ± 17.5 | 83.1 ± 2.7 | 88.1 ± 6.1 | 114.2 ± 6.6 | 24.9 ± 0.8 | 27.1 ± 2.0 | 1.8 ± 0.1 | 0.45 ± 0.01 | 0.30 ± 0.02 |
| S.F. ³⁾ | NS | NS | NS | NS | C | C | NS | A | NS |

1) Mean ± S.E

2) NM ; not measured

3) Significant factor

A ; Effect of dietary protein level was significant at $\alpha=0.05$ level by F-test.

C ; Effect of experimental period was at $\alpha=0.05$ level by F-test.

NS ; not significant

Table 10. Ca/wet wt. and Ca/ash ratio of 3 bones in 2nd experiment

| | Ca/wet wt. ratio(%) | | | Ca/ash ratio(%) | | |
|--------------------|--------------------------|------------|-------------|-----------------|------------|------------|
| | Femur | Scapular | Vertebra | Femur | Scapular | Vertebra |
| HO 3 | 13.4 ± 1.2 ¹⁾ | 21.7 ± 0.8 | 17.3 ± 0.7 | 30.4 ± 2.0 | 42.0 ± 5.7 | 42.8 ± 1.4 |
| HS 3 | 16.3 ± 0.9 | 21.7 ± 0.6 | 17.8 ± 0.7 | 36.5 ± 1.7 | 49.5 ± 3.8 | 42.1 ± 0.8 |
| LO 3 | 13.9 ± 0.2 | 22.8 ± 0.6 | 18.0 ± 0.9 | 31.9 ± 0.7 | 37.9 ± 2.4 | 43.7 ± 1.1 |
| LS 3 | 18.5 ± 1.1 | 22.0 ± 0.5 | 19.0 ± 0.4 | 42.0 ± 2.14 | 42.9 ± 2.9 | 45.4 ± 0.8 |
| HO 9 | 13.0 ± 0.2 | 14.6 ± 0.4 | 11.3 ± 0.3 | 31.6 ± 0.2 | 30.7 ± 0.6 | 31.6 ± 1.0 |
| HS 9 | 13.6 ± 0.2 | 14.4 ± 0.4 | 11.5 ± 0.2 | 31.4 ± 0.2 | 31.1 ± 0.5 | 31.1 ± 0.5 |
| LO 9 | 13.8 ± 0.2 | 14.9 ± 0.3 | 10.8 ± 0.31 | 33.2 ± 0.1 | 30.7 ± 0.4 | 31.3 ± 0.4 |
| LS 9 | 14.3 ± 0.5 | 13.9 ± 0.4 | 11.8 ± 0.3 | 33.2 ± 0.7 | 29.9 ± 0.2 | 30.7 ± 0.3 |
| S.F. ²⁾ | A, C | C | C | A, C | A, C | C |

1) Mean ± S.E

2) Significant factor

A ; Effect of dietary protein level was significant at $\alpha=0.05$ level by F-test.

C ; Effect of experimental period was at $\alpha=0.05$ level by F-test.

의 경우는 식이 단백질 수준의 영향도 받아서 Ca/wt비, Ca/ash비 모두 저단백군이 고단백군에 비해 유의적으로 높았으나 견갑골의 Ca/ash비는 대퇴골의 경우와 다른 양상을 보여서 고단백군이 저단백군에 비해 더 높았다.

고찰

본 연구는 식이 단백질 수준이 폐경 후 여성들의 Ca

과 골격 대사 및 신장 기능에 미치는 영향을 조사하기 위해 동물모델로써 흰쥐를 고·저단백식으로 15주간 사육하다가 난소 절제 수술을 실시하고 그 후에도 계속 같은 식이로 9개월을 더 사육하여 총 1년의 실험을 통해 식이 단백질 수준의 효과를 살펴보았다.

1년의 전 실험 기간을 통해 체중은 저단백군보다 고단백군에서 더 많이 증가됨을 알 수 있었고, 전반적으로 대조군(sham수술군)의 식이 섭취량이 많은 경향을 보여 난소 절제로 인해 식이 섭취량이 증가된다는 연구¹⁷⁾와는

다른 결과를 보였다. 그러나, 고·저단백군 모두에서 대조군보다 난소 절제군의 체중 증가량이 유의적으로 많아 난소 절제로 인해 비만이 초래된다는 선행 연구들¹⁸⁾¹⁹⁾과 같은 경향을 보였다.

식이 단백질 수준을 달리하여 15주간 사육한 후의 체중 증가량과 골격의 무게, 회분 및 Ca 함량이 전반적으로 고단백군에서 높은 경향을 보여 성장기의 흰 쥐들은 50% casein식이에 의하여 성장이 촉진됨을 확인할 수 있었다. 그러나, 뇨 Ca 배설량이 고단백군에서 높은 경향을 보였고, 이에 따라 Ca balance가 이 군에서 낮은 경향을 보여 고단백 식이가 Ca 대사에 좋지 않은 영향을 준다고 생각된다. 이런 경향은 신장 기능에서도 보여져 고단백군의 뇨단백질 배설량이 저단백군보다 유의적으로 높아 고단백 식이에 의해 신장 기능의 손상이 일어남을 볼 수 있었다.

한편, 신장은 노화에 따라 그 기능의 퇴화가 현저하며 식이 단백질의 영향을 받는 장기로 알려져 있으며²⁰⁾, GFR은 신장 기능의 지표로써 신장이 성숙함에 따라 증가하다가 신장이 노화함에 따라 감소하게 되고 결국 신장은 노폐물의 여과를 효과적으로 할 수 없게 된다. 성장기부터 고단백 식이를 먹이면 신장의 성숙이 빨라지고 GFR도 크게 증가되지만²¹⁾ 이렇게 어려서부터 계속된 GFR의 증가로 인한 hyperfiltration은 신장의 노화 역시 촉진시켜 glomerulosclerosis와 같은 신장 기능의 퇴화를 빨리 초래할 수 있다고 본다²²⁾²³⁾. 본 연구 결과 GFR의 경우 식이 단백질 수준이나 난소 절제에 의한 영향은 받지 않았지만 기간에 의한 영향이 나타나 9개월군의 GFR이 더 높았다. 이러한 경향은 조성연 등²⁴⁾의 연구와도 같은 경향을 보이는데, 4개월된 흰 쥐를 난소 절제시켜 그 후 8주, 16주간 사육한 결과 8주보다는 16주의 GFR이 더 증가됨을 보고하고 있다. 그러므로 본 연구 결과 쥐의 나이가 14~15개월까지는 신장의 성숙이 계속적으로 이루어지고 있으며 GFR의 감소가 일어나지 않는 것으로 보인다. 그러나 신장 기능의 퇴화 정도를 반영하는 뇨단백질 배설량의 경우는 기간에 상관없이 고단백군에서 유의적으로 높아 장기적인 고단백 식이는 신장 성숙을 빠르게 함과 동시에 퇴화 역시 빠르게 한다고 생각할 수 있겠다.

제 1, 제 2의 전 실험기간을 통해 뇨 Ca 배설량이 고단

백군에서 높은 경향을 보였고 이에 따라 Ca balance도 고단백군에서 유의적으로 낮았는데 이것은 고단백 식이에 의해 유발된 hypercalciuria현상이 Ca balance를 악화시켰다는 여러 보고들²⁵⁾²⁶⁾과 일치하는 것이다. 또한, 뇨 Ca 배설량은 난소 절제에 의한 영향도 받아 고단백-난소 절제군(HO)의 값이 고단백-대조군(HS)의 값보다 높게 나타났고 Ca balance는 낮은 경향을 보여 고단백 식이와 난소 절제가 함께 이루어질 경우 Ca 대사에 좋지 않은 영향을 미칠 것으로 생각된다. 난소 절제에 의해 뇨 Ca 배설량이 증가하는 등 Ca 대사가 변하게 되는 현상은 estrogen 부족으로 인해 신장 기능이 변화되기 때문이라고 보고되고 있다. Nordin²⁷⁾은 폐경 전후의 여성들을 대상으로 한 연구에서 폐경 후 여성들의 뇨 Ca 배설량이 유의적으로 높았음을 관찰하였으며 이것은 폐경후 Ca의 세뇨관 재흡수가 감소했기 때문이라고 보고하였다. 따라서 고단백-대조군에 비해 고단백-난소 절제군의 뇨 Ca 배설량이 현저하게 증가된 이유는 이 군에서의 GFR의 증가 뿐만아니라 estrogen의 부족으로 인하여 여과된 Ca를 적절히 재흡수하지 못했기 때문이라고 풀이되며, 이런 Ca의 손실은 결국 골격에 영향을 주었을 것이라고 생각된다.

Bone matrix의 대부분을 차지하는 collagen의 turnover를 재기 위한 지표로 이용되는 뇨 hydroxyproline 배설량²⁸⁾의 경우, 고단백 식이를 섭취한 수컷 흰 쥐에서 증가되며¹¹⁾ 난소를 절제한 암컷 흰 쥐에서도 증가된다는 보고¹⁹⁾가 있으나 본 연구에서는 각 실험군간에 유의적인 차이가 없었다. 또한 골형성의 지표로 사용될 수 있는 혈청의 alkaline phosphatase도 난소 절제군에서 유의적으로 높았다는 보고¹⁹⁾²⁹⁾가 있으나 본 실험 결과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 혈청 부갑상선호르몬(PTH)은 골격에 작용하여 Ca 재흡수를 증가시키고 골격 손실을 촉진하므로 뇨 hydroxyproline 배설량과 함께 골격 재흡수의 지표로써 사용될 수 있는데 난소 절제가 혈청 PTH 수준에 영향을 주지 않았다는 Ismail의 보고³⁰⁾와 같이 본 연구에서도 혈청 PTH 수준은 각 실험군간에 유의적인 차이가 없었다. 그러므로 고단백-난소절제군의 증가된 뇨 Ca 배설량은 골재흡수의 증가에 기인하는 것이 아니라 신장 기능 변화에 의한 것임을 알 수 있다.

본 연구에서 조사한 대퇴골, 견갑골, 척추뼈 등 3가지 골격의 무게는 실험 식이 제공 후 15주까지는 저단백군보다 고단백군에서 더 높은 경향을 보였는데 이것은 고단백 식이가 초기의 골격 성장을 촉진하였기 때문인 것으로 생각된다. 이러한 결과는 어린 쥐의 경우 고단백 식이로 인해 뇨 Ca 배설량이 증가했는데도 골격 성장이 촉진되었다는 안³¹⁾의 결과와 일치된 것이다. 그러나 실험 기간이 경과함에 따라 식이 단백질의 영향은 적어짐을 알 수 있었다. 또한, 1년간의 실험기간동안 3가지 골격의 무게는 계속 증가하여 제 2 실험기의 9개월군의 골격 무게가 3개월군의 것보다 더 무거웠다. 이를 통해 골격이 계속 성장하고 있었다는 것을 알 수 있으며 이것은 암컷 흰 쥐의 골격 성장이 12개월까지 계속되고 24개월까지 유지된다는 Liu³²⁾의 보고와 일치하였다. 3가지 골격의 회분함량의 경우 제 1 실험기에는 고단백군에서 높았으나 난소 절제 후 이러한 식이의 영향은 나타나지 않았다. 그러나 무게, 회분함량 등과 같은 골격 구성의 절대량과 달리 Ca함량과 골격 무게에 대한 Ca함량비(Ca/wt ratio), 회분 함량에 대한 Ca 함량비(Ca/ash ratio) 등은 기간에 의한 영향이 나타나서 3개월군보다 9개월군의 값이 유의적으로 낮아 전체 골격, 회분함량에 비해 Ca함량의 감소가 더 심각함을 알 수 있었다. 본 실험에서 식이나 난소 절제로 인한 골격 구성의 절대량 손실을 제대로 관찰할 수 없었던 것은 실험 동물이 성장기에 있었고, 실험식이 정상 수준의 Ca(0.6%)을 포함하고 있었으며 또한 골격 대사가 완전히 이루어지므로 고단백 식이나 난소 절제의 영향이 감추어진 것으로 생각된다.

결론적으로, 고단백 식이는 뇨단백 현상 등 신장 기능의 퇴화를 촉진하였으며 이로 인해 뇨 Ca 배설량의 증가, Ca 흡수율의 감소 등 Ca balance의 악화를 유발시켰다고 할 수 있다. 난소 절제 후의 기간이 연장됨에 따라 3가지 골격은 더욱 무거워졌으나, 견갑골, 척추뼈의 Ca의 절대량이 기간이 지남에 따라 감소하였고, Ca/wt비, Ca/ash비 등의 골격 구성비는 모두 감소되어서 다른 골격 성분에 비해 Ca 함량의 감소가 심각함을 알 수 있었으며 이런 결과는 대퇴골에서 두드러졌다. 따라서 장기적으로 고단백 식이를 섭취할 경우 폐경 이후의 기간이 지속되면서 Ca 대사가 변화되고 골격 손실이 증

가할 것으로 사료된다.

Literature cited

- 1) 김숙희. 한국인의 Ca 영양과 골다공증. 한국영양학회지 26 : 203-323, 1993
- 2) 김화영. 골다공증과 식이 인자. 한국영양학회지 27 : 636-645, 1994
- 3) Petito SL, Evans JL. Calcium status of the growing rat as affected by diet acidity from ammonium chloride, phosphate and protein. *J Nutr* 114 : 1049-1059, 1984
- 4) Howe JC, Beecher GR. Dietary protein and phosphorus : effect of calcium and phosphorus metabolism in bone, blood and muscle of rat. *J Nutr* 113 : 2185-2195, 1983
- 5) 구재욱. The effect of dietary protein and calcium on urinary calcium in young men. *Kor J Nutr* 15 : 235-241, 1982
- 6) Zemel MB, Schuette SA. Role of the sulfur-containing amino acids in protein-induced hypercalciuria in men. *J Nutr* 111 : 545-552, 1981
- 7) Lutz J, Linkswiller HM. Calcium metabolism in post-menopausal and osteoporotic women consuming two levels of dietary protein. *Am J Clin Nutr* 34 : 2178-2186, 1981
- 8) Ash SL, Goldin BR. Effect of age and estrogen on renal vitamin D metabolism in the female rat. *Am J Clin Nutr* 47 : 694-699, 1988
- 9) Kalu DN. The ovariectomized rat model of post-menopausal bone loss. *Bone & Mineral* 15 : 176-192, 1991
- 10) 김혜영 · 조미숙 · 김화영 · 김숙희. 식이 단백질의 종류와 수준이 연령이 다른 흰쥐에서 뇨 Ca 배설 및 뼈에 미치는 영향. 한국영양학회지 19 : 66-73, 1986
- 11) 조미숙 · 최남순 · 김화영. 식이단백질 수준이 어린 쥐와 나이든 쥐의 골격대사에 미치는 영향. 한국영양학회지 22 : 497-506, 1989
- 12) 이정아 · 장영애 · 김화영. 나이가 다른 단계에서 식이 단백질 수준이 흰쥐의 Ca 대사에 미치는 영향. 한국영양학회지 25 : 569-577, 1992
- 13) Bray DL, Briggs GM. Decrease in bone density in young male guinea pigs fed high levels of as-

- corbic acid. *J Nutr* 114 : 920-928, 1984
- 14) Oser BL. 『Hawk's physiological chemistry』4th ed. New York, McGraw-Hill Book p1040, 1232, 1965
 - 15) Lowry OH, Rosebrough NJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265-275, 1951
 - 16) Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. A quick and specific assay for hydroxyproline. *Anal Biochem* 55 : 288-291, 1973
 - 17) 윤정환 · 이상선. 난소 절제에 의해 유발된 과식 현상이 소장 적응 변화에 미치는 영향. *한국영양학회지* 21 : 182-187, 1988
 - 18) 오주환 · 이현숙. 난소 절제 골다공증 모델 흰쥐의 체내 Ca 이용성 저하에 대한 Ca 섭취 수준의 효과. *한국영양학회지* 26 : 277-285, 1993
 - 19) Morris HA, Poter SJ, Durbridge TC. Effects of oophorectomy on biochemical and bone variables in the rat. *Bone & Mineral* 18 : 133-142, 1992
 - 20) Wiseman MJ, Hunt R, Goodwin A, Gross JL. Dietary composition and renal function in healthy subjects. *Nephron* 46 : 37-42, 1987
 - 21) 이현숙 · 김화영. The effect of level of dietary protein on kidney development and function in growing rats. *Kor J Nutr* 23 : 401-407, 1990
 - 22) Brenner BM, Meyer TW, Hostetter TH. Dietay protein intake and progressive nature of kidney disease. *N Engl J Med* 307 : 652-659, 1982
 - 23) Meyer TW, Anderson S. Dietary protein intake and progressive glomerular sclerosis : The role of capillary hypertension and hyperfusion in the progression of renal disease. *Ann Int Med* 98 : 832-838, 1983
 - 24) 조성연 · 장영애 · 이현숙 · 김화영. 난소를 절제한 흰쥐에서 식이 단백질 수준이 체내 Ca 및 골격대사에 미치는 영향. *한국영양학회지* 26 : 915-924, 1993
 - 25) Schuette SA, Zemel MB, Linkswiler HM. Studies on the mechanism of protein-induced hypercalciuria in older men and women. *J Nutr* 110 : 305-315, 1980
 - 26) Kim YH, Linkswiler HM. Effect of protein intake on calcium metabolism and on parathyroid and renal function in the adult human male. *J Nutr* 109 : 1399-1404, 1979
 - 27) Nordin BEC, Need AG, Morris HA. Evidence for a renal calcium leak in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 72 : 401-407, 1991
 - 28) Dull TA, Henneman PH. Urinary hydroxyproline as an index of collagen turnover in bone. *N Engl J Med* 17 : 132-134, 1963
 - 29) Kalu DN, Liu CC, Salerno E. Skeletal response of ovariectomized rats to low and high doses of 17 β -estradiol. *Bone & Mineral* 14 : 175-188, 1991
 - 30) Ismail F, Epstein S, Fallon MD. Serum bone Gla protein and the vitamin D endocrine system in the oophorectomized rat. *Endocrinol* 122 : 624-630, 1988
 - 31) 안주원 · 김화영. 나이가 다른 흰쥐에서 식이 단백질 수준이 신장 기능 및 Ca 대사에 미치는 영향. *한국노화학회지* 3 : 39-44, 1993
 - 32) Liu CC, Kalu DN, Hardin RR, Hollis BW. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinol* 124 : 7-16, 1989