

성장기 동안 저칼슘식을 섭취한 흰쥐에서 난소절제 및 칼슘 섭취량이 골격대사에 미치는 영향*

이 연 숙 · 김 은 미**

서울대학교 생활과학대학 식품영양학과, 한양대학교 생활과학대학 식품영양학과**

Effect of Ovariectomy and Dietary Calcium Levels on Bone Metabolism in Rats Fed Low Calcium Diet during Growing Period

Lee, Yeon Sook · Kim, Eun Mi**

Department of Food and Nutrition, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
*Department of Food and Nutrition, Hanyang University,** Seoul 133-791, Korea*

ABSTRACT

This study explored the effect of calcium levels and/or ovariectomy on bone metabolism using female Sprague-Dawley weanling rats as a model. Rats received a low(0.1%) calcium diet for 8 weeks. The rats were then divided into two groups, ovariectomy and sham groups, which were each randomly divided into three subgroups that were fed 0.1%, 0.5% and 1.5% calcium diets for 8 weeks after operation. The results of this experiment indicate that body weight gain was higher in ovariectomy groups than in sham groups regardless of calcium level and food intake. Serum Ca and P concentrations were of normal level regardless of calcium level and ovariectomy. Estrogen concentration was low in the ovariectomized group. Serum alkaline phosphatase activity and urinary hydroxyproline have been used as markers of bone formation and resorption. These values were increased in ovariectomized groups. The weight, length and breaking force of femur were not significantly different between the groups. Ash, Ca, P and total lipid contents in femur and lumbar were decreased in the groups fed low calcium. Mg content was decreased in the ovariectomy and total protein content was not affected by calcium level and ovariectomy. The effect groups of ovariectomy on calcium contents of bone was more prominent in lumbar than in femur. In conclusion, though low calcium intakes during growth period may retard the attainment of peak bone mass, calcium supplementation after this period increased bone growth and mineral contents, but not significant effect in three calcium levels. Furthermore, calcium intake was shown to have a greater influence on the mineral contents of femur than of lumbar, and removal of endogenous estrogen production by ovariectomy was shown to be more deleterious on the ash and calcium contents of the lumbar than of femur. (*Korean J Nutrition* 31(3) : 279~288, 1998)

KEY WORDS : calcium · ovariectomy · femur · lumbar.

채택일 : 1998년 3월 30일

*This research was supported by grants from Korea Science and Engineering Foundation grant(941-0600-022-2).

서 론

노년기에 있어서 골격손실은 폐경 후 여성에서 성호르몬의 부족과 불충분한 칼슘 섭취, 비타민 D 결핍, 운동부족등 여러가지 원인에 기인하며 이러한 골격손실 결과로 발생하는 골다공증의 심각성은 골격성장기에 도달하는 최대골질량(peak bone mass)에 원인을 두고 있다¹⁾.

성인의 최대골질량 도달에는 사춘기 동안의 저칼슘 섭취가 제한 요인이 된다^{2,3)}고 하였으며, Abrams등⁴⁾은 골격형성과 무기질화에 사용되는 칼슘의 보유량이 사춘기 전과 초기에 증가하므로 이 시기의 칼슘 섭취량이 골격형성에 중요하다고 하였다. 이와같이 성장기 동안의 저칼슘 섭취는 각 개인의 유전적인 잠재력 내에서 최대골질량을 형성하는데 제한점이 된다고 할 수 있다.

우리나라의 경우 1인 1일 칼슘 섭취량은 531mg으로 권장량의 75.4%수준에 머무르고 있으며, 아직도 권장량의 75%미만의 칼슘을 섭취하는 가구수가 58.7%에 달하는 실정이다⁵⁾. 또한 한국인의 칼슘권장량은⁶⁾ 사춘기의 남녀 각각 900mg과 800mg으로 미국 NIH⁷⁾의 권장량인 1200mg에 못 미치고 있는 실정이다.

따라서 본 실험은 성장기 동안의 칼슘 부족이 성장 이후의 칼슘 보충에 의해 얼마나 회복될 수 있는가? 골격 무기질화의 catch-up작용이 발생하는가? 최대골질량이 이루어지는 초기단계동안 골격성장과 발육에 칼슘 결핍이 미치는 영향을 비교하기 위해 저칼슘식이(0.1%)를 성장기 동안 급여시키므로써 낮은 골질량을 가진 모델을 설정하여⁸⁾ 골격성장과 골격대사 관련인자들에 대한 칼슘 섭취 수준과 난소절제의 영향을 체계적으로 규명하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험설계 및 실험동물 식이

1) 실험설계의 동물사육

갓이유한 3주령의 암컷 흰쥐(Sprague-Dawley rats, female : 서울대학교 실험동물 사육장) 60마리에게 8주 동안 저칼슘(0.1%)식을 급여한 후 6마리를 먼저 희생하였으며(Control group), 나머지는 1군당 9마리씩 임의로 6군으로 나누어 sodium pentobarbital(30~50mg/kg BW)로 마취한 후 3군은 양쪽 난소를 절제하는 수술(ovariectomy group : OVX)을 하였고, 나머지 3군은 동일한 수술 절차를 받았으나 난소를 절제

하지 않았다(sham-operation group : SHAM). OVX 및 SHAM 수술 흰쥐들에게 각각 칼슘함량을 달리한 3종류의 실험식이, 저(0.1%), 정상(0.5%), 고(1.5%)칼슘 식이를 8주간 더 급여하였다. 즉, 6실험군은 ① OVX-High Ca(OH) ② OVX-Medium Ca(OM) ③ OVX-Low Ca(OL) ④ SHAM-High Ca(SH) ⑤ SHAM-Medium Ca(SM) ⑥ SHAM-Low Ca(SL)이다.

실험동물들은 Shoe-Box cage에서 분리 사육하였으며 사육실의 환경은 일정하게 유지하였다(온도 : 22±2℃, 상대습도 : 65±5%, 조명 : AM6 : 00 - PM6 : 00). 실험식사와 탈이온수는 완전 자유급식(ad libitum)형태로 공급하였으며, 대사 cage와 사육에 필요한 모든 기구는 무기질의 오염을 방지하기위해 0.4% EDTA로 씻은 후 증류수로 행구어 사용하였다. 실험기간 동안의 식이 섭취량과 체중은 1주일에 2번 일정시간에 측정하였다.

2) 실험식이

실험에 사용된 식이조성은 AIN-76 정제식이(semipurified diet)로 조성은 Table 1과 같다. 실험식이의 원료로 정제된 카제인(casein : 매일유업(주)), 옥수수 전분(미원식품(주)), 옥수수 기름(동방유량(주))과 비타민 혼합물(AIN-76 pattern : Oriental 효모공업(주), Japan)을 사용하였으며, 칼슘과 인을 제외한 무기질 혼합물(AIN-76)을 조제하여 사용하였다. 칼슘 급여원으로는 인의 함량을 조정하기 위해 CaHPO₄·2H₂O와 CaCO₃를 사용하였으며, 칼슘과 인의 함량 비율은 약 1.25 : 1로, 저칼슘 식이에서는 인의 결핍을 배제하기 위해 인의 함량을 0.4%로 하였으며, 고칼슘 식이에서는 칼슘과의 함량비를 고려하여 0.8%로 하였다⁹⁾.

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

Ingredient	Low(0.1%)	Normal(0.5%)	High(1.5%)
Casein	200	200	200
Methionine	3	3	3
Corn starch	581.06	574.9	541.94
Cellulose	50	50	50
Corn oil	100	100	100
Min. mix. ¹⁾	35	35	35
Vit. mix ²⁾	10	10	10
Choline chloride	2	2	2
CaHPO ₄ ·2H ₂ O	1.72	12.02	37.74
CaCO ₃	1	5	15
KH ₂ PO ₄	16.22	8.08	5.32

1) AIN-76(Ca & P free)

2) AIN-76

2. 시료수집 및 분석방법

1) 시료수집

저칼슘 식이를 섭취한 8주후(Control)와 실험식을 섭취한 16주에 쥐를 희생하여 시료를 수집하였으며, 희생시키기전 하룻밤 절식시킨 후, ethyl ether로 마취한 후 경동맥혈을 채취하였다. 채취한 혈액은 냉장고(4℃)에서 하룻밤 동안 방치한 후 3000rpm에서 20분간 원심분리(Sorvall, GLC-2B)하여 혈청을 얻었으며 분석 전까지 냉동보관 하였다.

혈액 채취 후 즉시 대퇴골 및 요추(L1-L4)를 각각 적출하였다. 요추의 경우는 16주 동안의 실험식을 섭취한 군에서만 적출되었다. 대퇴골과 요추는 뼈조직에 부착되어 있던 근육, 지방, 인대 등을 전부 제거하였고, 요추의 경우는 척수도 제거하였다. 습중량을 측정하고, 길이는 vernier caliper에 의해 대전자(greater trochanter)와 내측과(medial condyle)사이를 측정하였으며, 뼈의 파단력을 측정 한 후 냉동건조(Freeze-Dryer 18, Labconco)하여 건중량을 측정 한 다음 모든 시료는 분석 전 까지 냉동 보관하였다. 뼈의 중량 뿐 아니라 갈슘, 인, 마그네슘, 총지질과 총단백질의 함량은 양쪽 뼈에서 측정하였고, 이들의 평균값으로 제시하였다.

2) 시료분석

혈청 칼슘은 원자흡광광도계(Atomic absorption spectrometer : Hitachi Z-6000, 422.7nm)로 측정하였으며, 인의 함량은 Fisk-Subbarow Method¹⁰⁾(Spectrophotometer : Shimadzu UV-200s)로 정량하였다.

뼈형성(bone formation)과 관련이 깊은 것으로 알려져 있는 alkaline phosphatase(Alpase)활성은 Kind King의 비색법을 이용한 Kit(영동제약주식회사)를 사용하여 측정하였다. 혈액중의 estrogen 함량은 RSL total estrogen kit(ICN Biomedicals, Inc.)에 의해 unconjugated 17 β -estradiol과 estrone의 농도를 측정하였다.

노의 hydroxyproline(OHP)함량은 Bergman과 Loxley의 방법¹¹⁾(spectrophotometer : 559nm)으로 비색 정량 하였다.

대퇴골과 요추는 550~600℃회화로에서 6~8시간 회화하여 얻은 회분을 HCl(1N)용액으로 용해한 후 LaCl₂의 최종 농도가 1%가 되도록 희석하여 원자흡광광도계로 갈슘과 마그네슘(285.2nm) 함량을 측정하였다. 인의 함량은 1% LaCl₂대신 이온제거수로 희석하여 Fisk-Subbarow Method¹⁰⁾로 정량하였다. 총단백질의 함량은 Micro-kjeldahl 방법을 이용한 자동질소분석기(Nitrogen Autoanalyzer, Büchi, Swiss)를

이용하여 측정하였으며, 총지질 함량은 Folch¹²⁾의 방법으로 측정하였다.

대퇴골의 파단력(breaking force)은 Instron(Tensilon/UTM-4-100, TOYO BALDWIN Co.LTD : Crosshead speed 10mm/min, Loadcell 100kg)에 의해 길이의 중심부위에서 일정하게 측정하였다.

3) 통계분석

실험결과는 평균과 표준오차로 나타내었으며, 각 군들간의 유의적 차이($\alpha=0.05$)에 대한 검증, 수술 후 칼슘섭취에 따른 효과의 검증과 수술전 섭취한 식이에 의한 효과는 Tukey's multiple comparison test를 실시하였다.

성장기 8주 동안의 대조군(control)과 수술 후 식이 변화를 가진 16주의 6군과의 유의성 검증은 student t-test를 실시하였다(본 연구에서 대부분의 결과가 유의적인 차이를 보였으므로 표에 결과를 제시하지 않았다).

난소절제 유무와 칼슘 섭취 수준에 따른 영향을 보기 위해 ANOVA(analysis of variance)를 사용하여 유의성을 검증하였다.

칼슘 섭취량, estrogen농도, 골격대사와 대퇴골과 요추의 뼈조직 형태, 뼈의 성장, 무기질 및 유기질 함량과의 상관관계는 Pearson correlation coefficient를 이용하여 분석하였다¹³⁾.

결과 및 고찰

1. 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율

성장기 8주 동안 0.1% 칼슘을 함유한 식이를 섭취한 후(Control) 난소절제(OVX) 또는 절제하지 않은 수술(SHAM)을 받았고, 수술 후 칼슘 섭취 수준이 다른 3종(0.1%, 0.5%, 1.5%)의 실험식을 8주간 섭취시킨 흰쥐의 체중 변화 및 식이효율은 Table 2와 같다.

각 실험군간에 체중변화나 식이섭취량에는 통계적 유의차가 인정되지 않았으나, 난소절제에 따라 체중증가량 및 식이효율이 유의적으로 높게 평가되었다. 칼슘 섭취수준에 따라서는 거의 차이가 없었으나 저칼슘식이 섭취에 의해서 체중은 약간 감소경향을 보였다. 그러나 저칼슘 식이라 할지라도 OVX의 경우는 체중증가량이 높았다.

Thomas등¹⁴⁾, Morris등¹⁵⁾이 난소절제시 식이섭취량은 동일하지만 체중이 증가하였다고 보고하였으며, 본 실험 결과에서도 난소절제를 한 경우 체중이 증가한 것은 식이섭취량의 증가때문이 아니라 난소절제에 의한 estrogen분비 저하에 기인하는 것으로 해석된다. 또한

Arjmandi등¹⁶⁾은 난소절제를 하고 estrogen(17β-estradiol)을 주사하였을 때 식이섭취량에 변화없이 체중 증가를 방지 하였으나, Kalu등¹⁷⁾은 난소절제를 할 경우 과식(hyperphagia)하여 체중이 증가되었다고 하였다.

2. 골격대사와 관련인자

1) 혈청 칼슘, 인, estrogen농도 및 alkaline phosphatase활성

혈청의 칼슘, 인, estrogen농도 및 alkaline phosphatase(Alpase)활성은 Table 3과 같다.

혈청 칼슘 농도는 난소절제의 유무에 따라 유의적인 차이가 없었으며, 저칼슘 섭취에 따라 낮은 경향을 보일 뿐 모두 정상수준(7.2~13.9mg/dl)¹⁸⁾을 나타내었다. Donahue등¹⁹⁾이 개에게 난소절제 후 0.02%, 1.0%의 칼슘을 8주 동안 공급 했을 때 혈청 칼슘 농도에 차이가 없었으며, Hietala²⁰⁾도 3개월된 Wistser rats에게 난소절제 후 칼슘 수준이 정상인 식이를 10주 동안 공급하였을 때 난소절제 유무에 따른 혈청 칼슘 농도는

phatase(Alpase)활성은 Table 3과 같다.

Table 2. Body weight, weight gain, food intake and food efficiency ratio

Group ¹⁾	Initial weight g	Final weight g	Weight gain g/d	Food intake g/d	FER
Control	77.0±6.0	210.40± 7.77	2.38±0.11	14.6±0.7	0.17±0.01
OH	213.8±7.6 ^{2)NS3)}	309.1 ±17.1 ^{NS}	1.7 ±0.3 ^b	16.6±1.0 ^{NS}	0.10±0.01 ^b
OM	219.4±5.7	300.1 ±21.9	1.4 ±0.3 ^{ab}	16.2±0.9	0.08±0.02 ^b
OL	211.5±5.8	299.8 ±14.8	1.6 ±0.2 ^b	17.9±0.7	0.09±0.01 ^b
SH	218.7±4.3	261.4 ± 5.5	0.8 ±0.1 ^{ab}	15.4±0.7	0.05±0.01 ^a
SM	220.1±9.1	264.6 ± 1.9	0.8 ±0.0 ^{ab}	15.2±0.3	0.05±0.01 ^a
SL	220.3±8.1	257.1 ±14.7	0.7 ±0.1 ^a	15.7±0.8	0.04±0.01 ^a
OVX ³⁾	NS	**	**	NS	**
Ca	NS	NS	**	NS	**
OVX*Ca	NS	NS	NS	NS	NS

1) Control : 0.1% Ca diet for 8 weeks

OH : 0.1% Ca diet for 8weeks+ovariectomy+1.5% Ca diet for 8weeks after ovariectomy

OM : 0.1% Ca diet for 8weeks+ovariectomy+0.5% Ca diet for 8weeks after ovariectomy

OL : 0.1% Ca diet for 8weeks+ovariectomy+0.1% Ca diet for 8weeks after ovariectomy

SH : 0.1% Ca diet for 8weeks+sham operation+1.5% Ca diet for 8weeks after sham operation

SM : 0.1% Ca diet for 8weeks+sham operation+0.5% Ca diet for 8weeks after sham operation

SL : 0.1% Ca diet for 8weeks+sham operation+0.1% Ca diet for 8weeks after sham operation

2) Mean±SEM of 8rats per group

3) Values with different superscript within the column are significantly different at p<0.05 by Tukey's multiple range test (NS : not significant)

4) Statistical significance was evaluated at the α=0.05 level by 2-way analysis of variance(*p<0.05, **p<0.01, NS : not significant)

OVX : Main effect of ovariectomy

Ca : Main effect of Ca level after ovariectomy

OVX*Ca : Interaction between ovariectomy and Ca level

Table 3. Serum calcium, phosphate, estrogen concentration, alkaline phosphatase activity and urinary hydroxyproline excretion

Group	Serum			Urine	
	Ca mg/dl	P mg/dl	Estrogen pg/ml	Alpase KA unit	OHPr µg/d
Control	8.66±0.13	6.56±0.34	95.6±14.1	11.50±1.06	119.8±8.6
OH	8.16±0.15 ^{1)NS2)}	5.39±0.16 ^{bc}	76.6± 3.5 ^{ab}	7.06±0.35 ^b	81.9±5.0 ^{NS}
OM	7.85±0.29	6.13±0.21 ^c	60.5± 4.3 ^a	6.51±0.37 ^b	71.6±7.1
OL	7.79±0.07	5.13±0.17 ^b	67.7± 1.7 ^a	7.09±0.45 ^b	84.9±6.8
SH	8.26±0.06	5.29±0.28 ^{bc}	128.6±12.6 ^c	3.20±0.24 ^a	59.4±5.3
SM	8.17±0.14	3.95±0.27 ^a	101.7± 2.6 ^{bc}	2.32±0.11 ^a	66.0±4.8
SL	7.73±0.19	3.98±0.16 ^a	108.6± 4.6 ^c	3.66±0.23 ^a	84.8±9.5
OVX ³⁾	NS	**	**	**	*
Ca	NS	NS	NS	NS	*
OVX*Ca	NS	NS	NS	NS	NS

see Table 2

차이가 없었다. 그러나 이유한 쥐¹⁴⁾ 또는 노령쥐¹⁷⁾를 이용하여 0.1%의 저칼슘 섭취와 난소절제 효과를 보면 혈청 칼슘 농도는 저칼슘 식이를 섭취한 난소 절제군과 SHAM군에서 차이가 없었으나, 난소절제 및 정상칼슘 섭취군에서 오히려 감소경향을 보였다. 본실험 결과에서 4주간의 저칼슘식이 섭취군(Control)에 비해 16주간의 저칼슘 섭취군(OL, SL)에서 혈청 칼슘 농도가 상당히 저하되었는데 이것은 장기간의 칼슘 섭취 부족으로 인한 흡수량 감소에 따른 결과라고 해석될 수 있다²¹⁾. 그러나 난소절제 및 정상 수준의 칼슘 섭취군(OM)의 경우에도 혈청 칼슘 농도가 감소되었는데 이것은 estrogen 결핍시 1, 25-dihydroxy Vitamine D합성이 감소되어 소장에서의 칼슘 흡수가 감소되었기 때문이라고 생각된다²²⁾.

혈청 인의 농도는 난소절제에 따라 유의적으로 높은 값을 보였으나 모두 정상범위(3.11~11.0mg/dl)¹⁸⁾를 나타내었다. 이와 같은 본실험의 결과는 난소절제 유무와 칼슘 수준에 따라 혈청 인의 농도에 변화가 없었다고 한 결과¹⁴⁾²¹⁾와 다른 경향을 보였으나, Donahue¹⁹⁾이 난소절제시 혈청 인의 농도가 증가되었다는 결과와 일치하였다.

Estrogen농도는 난소절제시 평균 농도가 68.3pg/ml로 SHAM군보다 유의적으로 낮았으며 칼슘 섭취 수준과는 무관하였다. Finkelman²³⁾이 rats에게 난소절제 후 6주 동안 estrogen을 투여한 실험에서 혈청 17β-estradiol의 농도는 난소절제군에 비해 SHAM군

에서 높았으며 본실험의 결과와 비슷한 경향을 보였으며, estrogen의 농도가 본실험에서 높게 측정된 것은 혈중 estrogen농도로서 unconjugated 17β-estradiol과 estrone 농도의 합으로 측정되었기 때문이다.

Alpase활성은 흰쥐의 주령에 따라 8주 급여군에서 16주 급여군에 비해 높았다. 칼슘의 섭취 수준보다 난소절제한 군에서 SHAM군에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 이와 같이 난소절제로 인한 Alpase활성 증가는 Arjmandi²⁴⁾과 Raisz²⁵⁾에 의해서도 보고되었으며, 난소절제로 인한 estrogen결핍으로 bone turnover가 증가했기 때문이라고 하였다.

2) 뇨중 hydroxyproline함량

뇨중 Hydroxyproline(OHPr)배설량(Table 3)은 8주(Control)에 비해 16주에서 감소되었으나, 난소절제군과 저칼슘 섭취에 따라 높았다. 김화영 등²⁶⁾은 난소절제군에서는 OHPr농도가 증가하였으나 난소절제군에 estrogen을 투여했을 때 OHPr농도가 감소되었다는 결과를 보였다. 즉 본실험 결과에서도 난소절제시 estrogen결핍으로 인해 bone turnover가 증가되었고, 칼슘 섭취 부족시 골격분해가 항진되기 때문에 이들 경우에 OHPr배설량이 증가되었다고 본다.

3. 골격형성과 관련인자

1) 대퇴골의 중량, 길이 및 파단력

대퇴골의 중량, 길이 및 파단력은 Table 4와 같다.

Table 4. Wet and dry weight, length and breaking force of femur

Group	Wet weight ⁴⁾ mg	Dry weight ⁴⁾ mg	Wet wt/BW mg/100g	Length ⁵⁾ mm	Breaking force ⁶⁾ kg
Control	537.3 ± 16.9	313.3 ± 9.1	256.5 ± 9.5	32.48 ± 0.48	6.41 ± 0.94
OH	728.9 ± 13.9 ^{1)NS2)}	497.3 ± 5.3 ^{NS}	244.5 ± 7.9 ^{NS}	36.10 ± 0.46 ^{NS}	8.50 ± 0.27 ^{NS}
OM	780.2 ± 38.7	487.7 ± 23.8	270.4 ± 9.9	36.55 ± 0.58	9.26 ± 0.26
OL	728.4 ± 22.5	460.9 ± 17.9	248.9 ± 8.2	35.91 ± 0.41	8.50 ± 0.32
SH	721.2 ± 13.3	483.2 ± 8.9	276.2 ± 4.7	35.02 ± 0.21	8.79 ± 0.38
SM	734.5 ± 8.9	490.5 ± 7.5	277.6 ± 2.7	35.78 ± 0.36	9.07 ± 0.34
SL	694.7 ± 27.8	462.3 ± 14.0	271.9 ± 7.2	35.59 ± 0.39	8.83 ± 0.25
OVX ³⁾	NS	NS	**	*	NS
Ca	NS	NS	NS	NS	NS
OVX*Ca	NS	NS	NS	NS	NS

1) Mean ± SEM of 8rats per group

2) NS : not significant

3) Statistical significance was evaluated at the α=0.05 level by 2-way analysis of variance(*p<0.05, **p<0.01, NS : not significant)

OVX : Main effect of ovariectomy

Ca : Main effect of Ca level after ovariectomy

OVX*Ca : Interaction between ovariectomy and Ca level

4) Mean weight of left and right femur

5) Mean length of left and right femur

6) Mean breaking force of left and right femur

습증량과 건증량은 난소절제 유무 및 칼슘 섭취 수준에 관계 없이 실험군간에 차이가 없었으며, 8주(Control)에 비해 많은 증가를 보였다. 체중 100g당의 습증량은 SHAM군에서 난소절제군보다 더 높았다. 특히 난소절제군의 경우 칼슘의 부적절한 섭취군(OH, OL)에서 적정 섭취군에 비해 낮았다.

대퇴골의 길이는 칼슘 수준에 따른 차이는 없었으나 난소를 절제 했을 때 다소 증가하였다. 이는 Thomas 등²⁷⁾이 6주된 쥐에게 난소를 절제 한 후 3주 동안 0.5%의 칼슘을 공급했을 때 난소절제군에서 장골의 성장율이 높았다는 결과와 Blanusa 등²⁸⁾이 4개월된 흰쥐에게 난소절제 한 후 0.35%, 1.0%의 칼슘을 2, 4, 6개월 동안 공급하였을 때 난소절제시 길이가 증가하였으나 칼슘 섭취 수준과는 무관하였다는 결과와도 일치하였다.

파단력은 난소절제 유무나 칼슘 섭취 수준에 의해 유의적인 차이가 없었으며, 개를 대상으로 한 Morris 등¹⁵⁾의 실험에서도 대퇴골의 강도는 칼슘 섭취 수준이나 난소절제 유무에 따라 유의적인 차이가 없었다고 한 결과와 비슷하였다.

2) 대퇴골의 회분 및 칼슘함량

대퇴골의 회분과 칼슘 함량은 Table 5와 같다. 대퇴골의 회분 함량은 8주(Control)에 비해 16주에서 크게 증가되었다. 그러나 난소절제 유무와 관계없이 저칼슘 식이를 16주간 섭취한 OL, SL군에서 특히 감소하였고, 정상 및 고칼슘 식이를 섭취하였을 때는 차이가 없었다. Ash/Length함량은 저칼슘군이 정상이나 고칼슘을 섭취한 군보다 감소하였으며, 이것은 칼슘 섭취 수준에 따라 대퇴골의 길이(Table 4)에는 차이가 없었으나 회분의 함량(Table 5)이 저칼슘을 섭취 했을 때 감소하였기 때문으로 볼 수 있다. Donahue 등¹⁹⁾이 10~11개월된 흰쥐에게 0.02%, 1.0%의 칼슘 식이를 8주 동안 공급하여 난소절제를 하였을 때 1.0% 칼슘수준에

서 대퇴골의 회분 함량이 더 증가되었다는 결과와 비슷하였다.

칼슘 함량, Ca/Ash, Ca/Length함량은 저칼슘 섭취 수준 일 때 가장 낮았고, 정상, 고칼슘 섭취시에는 대퇴골의 칼슘 함량이 비슷하였으며, 난소절제 유무와 관련이 없었다. 이는 Kalu 등¹⁷⁾과 Donahue 등¹⁹⁾의 칼슘 섭취가 증가할 수록 대퇴골의 칼슘 함량이 증가하였다는 결과와 일치하였다. 또한 Blanusa 등²⁸⁾이 흰쥐에게 난소절제와 칼슘 섭취 수준의 영향을 검토한 결과 대퇴골의 칼슘과 회분 함량은 난소절제와 관계없이 저칼슘을 섭취하였을 때 감소하였다는 연구와도 일치하였다.

3) 대퇴골의 인, 마그네슘, 중단백질 및 중지방 함량

대퇴골의 인, 마그네슘, 단백질 및 지방 함량은 Table 6에 제시하였다.

인의 함량은 8주(Control)때보다 16주때 증가하였으며 난소절제에 따른 차이는 없었으나 저칼슘 섭취에 따라 유의적으로 감소하였다. 이것은 Donahue 등¹⁹⁾이 난소절제에 의한 대퇴골의 인 함량에는 변화가 없었다는 결과와 오주환 등²¹⁾이 난소절제 유무와는 상관없이 저칼슘을 섭취한 군에서 대퇴골의 인함량이 감소하였다는 결과와 비슷하였다

마그네슘 함량은 수술 후 저칼슘을 섭취한 군(OL, SL)을 제외하고 난소절제시 유의적으로 감소하였다. Donahue 등¹⁹⁾은 대퇴골의 마그네슘 함량은 난소절제 유무에 따라 효과가 없었으나, 칼슘 섭취 증가에 따라 증가되었다고 하였다. 그러나 본실험에서는 칼슘 섭취 수준에 따른 증가 효과는 난소절제시에만 나타났다.

중단백질 함량은 난소절제 유무와 칼슘 섭취 수준에 따라서 유의적인 차이가 없었다. 중지방의 함량은 난소절제 유무와 칼슘 섭취 수준에 따른 효과를 보면 OH군이 유의적으로 높은값을 보였다.

골격조직은 hydroxyapatite mineral, 단백질, 수

Table 5. Ash and calcium contents in femur

Group	Ash mg/g wet wt	Ash/Length mg/mm	Ca mg/g wet wt	Ca/Ash %	Ca/Length mg/mm
Control	286.7 ± 9.5	4.74 ± 0.16	138.9 ± 5.4	48.5 ± 1.0	2.29 ± 0.07
OH	401.6 ± 7.3 ¹⁾⁶²⁾	8.31 ± 0.12 ^{NS}	218.0 ± 3.6 ^b	54.3 ± 0.5 ^b	4.51 ± 0.05 ^b
OM	371.4 ± 8.4 ^{ab}	8.13 ± 0.42	200.4 ± 5.6 ^b	53.9 ± 0.9 ^b	4.39 ± 0.26 ^b
OL	351.7 ± 11.6 ^a	7.23 ± 0.32	167.1 ± 5.2 ^a	47.6 ± 0.8 ^a	3.44 ± 0.15 ^a
SH	394.5 ± 5.6 ^b	8.12 ± 0.16	210.4 ± 3.1 ^b	53.3 ± 0.6 ^b	4.33 ± 0.07 ^b
SM	395.9 ± 3.4 ^b	8.13 ± 0.13	211.4 ± 4.1 ^b	53.4 ± 0.8 ^b	4.34 ± 0.11 ^b
SL	375.8 ± 5.2 ^{ab}	7.33 ± 0.29	170.9 ± 2.9 ^a	45.5 ± 0.6 ^a	3.33 ± 0.09 ^a
OVX ³⁾	NS	NS	NS	NS	NS
Ca	**	**	**	**	**
OVX*Ca	NS	NS	NS	NS	NS

see Table 2

Table 6. Phosphate, magnesium, protein and lipid contents in femur

Group	P	Mg	Protein	Lipid
	mg/g wet wt	mg/g wet wt	mg/g wet wt	mg/g wet wt
Control	27.62±2.12	0.36±0.02	218.60±5.63	8.90±0.21
OH	51.07±2.42 ^{1b21}	3.21±0.146 ^{ab}	200.91±3.6 ^{0NS}	14.23±0.92 ^b
OM	48.82±1.73 ^b	2.87±0.06 ^a	185.44±6.17	11.86±0.83 ^a
OL	42.91±2.07 ^{ab}	4.14±0.17 ^c	199.53±5.46	11.76±0.40 ^a
SH	50.85±1.64 ^b	4.23±0.12 ^c	186.75±2.62	12.07±0.23 ^a
SM	48.81±3.44 ^b	4.11±0.15 ^{bc}	203.39±6.44	11.97±0.47 ^a
SL	35.19±1.85 ^a	4.72±0.09 ^c	181.60±4.66	11.18±0.29 ^a
OVX ³¹	NS	**	NS	*
Ca	**	**	NS	**
OVX*Ca	NS	NS	**	NS

see Table 2

분, 지질로 구성이 되며, collagen은 hydroxyapatite가 축적된 기질 단백질(matrix protein)의 주요 부분이다. 또한 2~7%의 non-collagenous protein도 존재하는데 주로 결합조직 세포와 합성되어 있다²⁹⁾. Robey등³⁰⁾은 뼈의 유기물질은 collagens, proteoglycans, glycoprotein과 같은 단백질을 포함하며 조골세포에 의해 생성되는 골기질(bone matrix)의 축적율은 성장, 물리적 힘(physical forces)의 외인성 인자와 세포 증식 단계(cell cycle), 성숙단계 및 발육단계와 같은 내인성 인자에 의해 조절되며, 치아나 골격의 중앙이나 골다공증과 같은 골격손실의 상황에서 유기물질이 더 많은 것으로 평가 된다고 하였다.

본 실험 결과에서는 뼈의 골격손실을 나타낸다고 볼 수 있는 유기물질인 총단백질 함량은 저칼슘군을 제외하고 난소절제에 따라 감소하였고, 총지질 함량은 난소 절제를 하고 고칼슘을 섭취한 경우 증가함을 보여 골격 대사에 좋지않은 영향을 시사하였다.

4) 요주(Lumbar1-4)의 중량, 회분 및 칼슘함량

요주의 습중량, 건중량, 회분 및 칼슘 함량은 Table 7과 같다. 습중량은 실험군간에 유의적인 차이는 없었으며, 건중량은 난소절제 유무에 따라 유의적인 영향을

받지 않았으나 저칼슘 섭취에 따라 낮았다.

회분의 함량은 난소절제 유무와는 상관없이 저칼슘 섭취군에서 유의적으로 낮았다. 이는 Mosekildoe등³¹⁾은 4개월된 minipig의 요추 회분 함량이 난소절제후 저칼슘을 섭취하였을 때 유의적으로 감소하였다는 결과와 비슷하였다.

칼슘 함량은 난소절제 및 저칼슘 섭취시 대퇴골에서와 같이 유의적으로 감소하였다. 대퇴골과 비교할 때 중량에 비해 칼슘 함량이 훨씬 낮았는데 이것은 척추가 폐경에 따라 급격히 손실되는 부위이며³²⁾, 사춘기 동안 저칼슘을 섭취한 것이 성인이 되었을 때 최대골밀도를 도달하는데 제한 요소가 되며, 특히 요추에서 그 변화가 더 심하였기 때문으로 본다³³⁾. 그리고 Kalu등¹⁷⁾도 난소를 절제하고 저칼슘을 섭취한 경우 요추의 칼슘 함량이 유의적으로 감소되었다는 결과를 보고하였다.

5) 요추의 인, 마그네슘, 총단백질 및 총지질 함량

요추의 인, 마그네슘, 총단백질 및 총지질 함량은 Table 8과 같다.

인함량은 난소절제나 칼슘 섭취 수준에 따라 유의적인 차이는 없었으나 저칼슘군에서 다소 감소하는 경향을 보였다. 마그네슘 함량은 난소절제에 따라 유의적으

Table 7. Wet weight, dry weight, ash and calcium contents in lumbar

Group	Wet weight	Dry weight	Ash	Ca	Ca/Ash
	mg	mg	mg/g wet wt	mg/g wet wt	%
OH	1094.7±44.4 ^{1NS21}	617.9±27.9 ^{ab}	265.6±9.2 ^{bc}	78.6±2.6 ^b	29.6±0.5 ^a
OM	1178.7±62.5	656.9±35.2 ^b	255.6±6.5 ^{bc}	77.6±2.2 ^b	30.4±0.3 ^a
OL	1100.2±47.9	568.7±26.0 ^{ab}	222.4±4.3 ^a	67.6±1.9 ^a	30.4±0.5 ^a
SH	1020.5±18.9	588.5±11.2 ^{ab}	273.7±2.9 ^c	85.7±2.2 ^{bc}	31.3±0.7 ^a
SM	1083.7±21.9	608.9±11.1 ^{ab}	265.4±4.3 ^{bc}	91.4±3.2 ^c	34.4±0.8 ^b
SL	1012.6±35.5	546.9±19.2 ^a	242.5±6.2 ^{ab}	89.0±2.0 ^c	36.8±0.7 ^b
OVX ³¹	NS	NS	*	**	**
Ca	NS	*	**	*	**
OVX*Ca	NS	NS	NS	*	**

see Table 2

로 감소하였으며 칼슘 섭취 수준에 따른 차이는 없었다.

총단백질 함량은 난소절제 유무와 칼슘 섭취 수준에 따라 차이가 없었으며, 총지질 함량은 난소절제 유무와 관계없이 저칼슘 섭취군이 유의적으로 낮았다.

4. 골격 대사 및 형성 지표와 뼈의 성분 및 형태적 변화와의 상관관계

1) 대퇴골

칼슘섭취량, estrogen농도, Alpase활성, 뇨의 OHPr 배설량, 대퇴골의 중량 및 길이와 대퇴골의 성분 및 형

태적 변화와의 상관관계는 Table 9와 같다.

칼슘 섭취 수준은 대퇴골의 무기질 성분인 칼슘과 유기질인 총지질 함량과는 유의적인 양(+)의 상관관계를 보였다. 난소절제에 따른 estrogen농도, Alpase활성과 OHPr배설량은 대퇴골의 성분 및 형태적 변화와 유의적인 상관관계를 보이지 않았다.

습중량 및 건중량은 마그네슘을 제외한 측정된 모든 뼈조성과 양의 상관관계를 나타내었다.

대퇴골의 길이는 인과 마그네슘 함량을 제외하고 중량, 회분, 칼슘, 총단백질, 총지질, 파단력과 양의 상관

Table 8. Phosphate, magnesium, protein and lipid contents in lumbar

Group	P	Mg	Protein	Lipid
	mg/g wet wt	mg/g wet wt	mg/g wet wt	mg/g wet wt
OH	51.12 ± 2.67 ^{1)NS2)}	0.60 ± 0.04*	203.17 ± 6.58 ^{NS}	7.21 ± 0.31 ^c
OM	46.90 ± 2.83	0.55 ± 0.02*	204.41 ± 4.45	6.92 ± 0.14 ^{bc}
OL	45.82 ± 3.34	0.55 ± 0.01*	205.79 ± 4.18	5.88 ± 0.09 ^a
SH	53.33 ± 1.86	0.72 ± 0.02 ^b	202.20 ± 4.59	7.26 ± 0.08 ^c
SM	52.94 ± 1.91	0.71 ± 0.02 ^b	206.83 ± 6.67	7.11 ± 0.26 ^{bc}
SL	46.59 ± 4.08	0.69 ± 0.02 ^b	210.87 ± 3.48	6.37 ± 0.14 ^{ab}
OVX ³⁾	NS	**	NS	NS
Ca	NS	NS	NS	**
OVX*Ca	NS	NS	NS	NS

see Table 2

Table 9. Correlation coefficients between Ca intake, estrogen, alkaline phosphatase, hydroxyproline, weight and length and femur growth index and femur compositions

	Ca intake	Estrogen	Alpase	OHPr	Wet wt	Dry wt	Length
Wet weight	0.1115	-0.3082	0.2224	-0.0620		0.8112**	0.7837**
Dry weight	0.2710	-0.0864	0.1027	-0.1182	0.8112**		0.5854**
Ash	0.3381	0.0308	-0.0758	-0.1487	0.7775**	0.8979**	0.5790**
Calcium	0.5296**	0.0128	-0.0545	-0.2053	0.6801**	0.7946**	0.4561**
Phosphate	0.2569	0.0557	-0.0510	-0.2560	0.3903*	0.4990**	0.2495
Magnesium	0.1106	0.2789	-0.1222	0.0818	0.1003	0.2814	0.1051
Protein	0.1022	-0.2786	0.1723	-0.1143	0.7538**	0.8497**	0.5612**
Lipid	0.4023*	-0.2438	0.2989	-0.0077	0.6240**	0.7428**	0.4735**
Length	0.0543	-0.3345	0.2675	0.1242	0.7837**	0.5854**	
Breaking force	0.0347	0.1850	0.0809	0.0138	0.5363**	0.5302*	0.3966*

*p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001

Table 10. Correlation coefficients between Ca intake, estrogen, alkaline phosphatase, hydroxyproline and weight and lumbar compositions

	Ca intake	Estrogen	Alpase	OHPr	Wet wt	Dry wt
Wet weight	-0.0171	-0.3707*	0.2177	0.1196		0.8833**
Dry weight	0.2037	-0.1743	0.0267	0.2325	0.8833**	
Ash	0.2796	0.0233	-0.1505	-0.2486	0.7445**	0.9315**
Calcium	0.0704	0.3133	-0.5088**	-0.2349	0.5212**	0.7348**
Phosphate	0.1536	0.1021	-0.1153	-0.0719	0.3828*	0.5707*
Magnesium	0.1543	0.1021	-0.1149	-0.0724	0.3823*	0.5703**
Protein	-0.0953	-0.3287	0.1907	0.1122	0.8867**	0.8586**
Lipid	0.3550*	-0.0511	-0.0775	-0.2662	0.7387**	0.9099**

*p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001

관계를 나타내었다.

2) 요 주

칼슘섭취량, estrogen농도, Alphase활성, 뇨의 OHPr 배설량 및 요추의 중량과 요추의 성분과의 상관관계는 Table 10과 같다.

요추의 경우 칼슘 섭취량은 요추의 지질함량과 유의적인 양의 상관관계를 나타낼 뿐 뼈의 중량이나 무기질 조성은 무관하였다. Estrogen농도는 중량과 음(-)의 관계를 보였으며, Alphase활성은 요추의 칼슘함량과 음의 상관관계를 나타내었다. 이로 볼 때 칼슘의 섭취가 부족⁶⁾되거나 난소절제로 뼈의 칼슘함량이 저하되었을 경우²⁴⁾²⁵⁾ 골격형성의 지표³²⁾로 사용되는 Alphase의 활성이 더 증가되는 것을 볼 수 있다.

OHPr은 요추의 성분과 유의적인 상관관계를 보이지 않았다.

습중량 및 건중량은 측정된 무기성분 및 유기성분 모두와 양의 상관관계를 나타내었다.

요약 및 결론

본 연구는 성장기 동안 저칼슘 섭취로 최대골질량이 낮을 경우 난소절제로 인한 폐경과 칼슘 섭취 수준(0.1, 0.5, 1.5%)이 흰쥐의 골격형성과 골격대사에 미치는 영향을 알아보고자 각 이유한 3주령 암컷 흰쥐에게 8주간 동안 저칼슘 식이(0.1%)를 섭취시킨 후, 난소절제군과 SHAM군으로 나누고 각각을 다시 3군씩 나누어 칼슘 섭취 수준(저 0.1% ; 중 0.5% ; 고 1.5%)을 달리 하여 8주간 사육하였다.

그 결과를 종합해 보면 다음과 같다.

- 1) 체중은 난소절제를 한 후 더 증가하였는데 이는 식이섭취량의 증가 때문이라기 보다는 estrogen의 감소에 기인하는 것으로 보였다.
- 2) 혈액 중 칼슘과 인의 농도는 난소절제 유무나 칼슘 섭취 수준의 변화에 관계없이 항상성을 유지하였다.
- 3) Estrogen농도는 난소절제군에서 낮았고, 골격형성 지표인 Alphase활성과 골격분해 지표인 OHPr배설량은 난소절제군에서 높았다.
- 4) 성장기 동안 저칼슘 식이를 섭취하므로써 낮은 골질량을 가지고 있을 경우, 난소절제 유무나 칼슘 섭취 수준에 따라 뼈의 크기나 파단력은 크게 영향을 받지 않고 거의 같은 수준으로 증가하였다.
- 5) 골격의 회분 함량은 난소절제 유무 보다 저칼슘 섭취시 감소하였으며, 뼈의 조성면에서는 저칼슘 식이를 계속할 경우 대퇴골과 요추의 칼슘, 인, 총지질 함량

이 감소되었고, 마그네슘 함량은 난소절제시 감소하였으며, 총단백질 함량은 변화가 없었다. 또한 요추의 경우 칼슘 함량이 대퇴골 보다 매우 낮아졌다는 것은 특기할 만하다.

이상의 결과는 성장기에 저칼슘 섭취로 골질량이 낮을 경우에도 이후의 칼슘 보충에 따라 뼈의 성장이나 무기질 함량이 증가하였지만, 이때 칼슘 섭취량의 차이에 따른 뚜렷한 효과는 크지 않음을 시사하였다. 또한 칼슘 섭취량은 요추보다는 대퇴골의 무기질 조성에 더 크게 영향을 미치며, 난소절제로 인한 estrogen 부족이 대퇴골보다는 요추의 골격에 좋지 않은 영향을 미침을 시사하였다.

Literature cited

- 1) Heaney RP. Nutritional factors in bone health in elderly subjects : methodological and contextual problems. *Am J Clin Nutr* 50 : 1182-1189, 1989
- 2) Cooper C, Cawley M, Bhalla A, Egger P, Ring F, Morton L, Barker D. Children growth, physical activity and peak bone mass in women. *J Bone Min Res* 10 : 940-947, 1995
- 3) Sentipal JM, Wardlaw GM, John Mahan, Velimir Matkovic. Influence of calcium intake and growth indexes on vertebral bone mineral density young females. *Am J Clin Nutr* 54 : 425-428, 1991
- 4) Abrams SA, Stuff JE. Calcium metabolism in girls : current dietary intakes lead to low rates of calcium absorption and retention during puberty. *Am J Clin Nutr* 60 : 739-743, 1994
- 5) Ministry of Health and Welfare. '95National Nutrition Survey Report, 1997
- 6) Recommended dietary allowances for Koreans, 6th revision. The Korean Nutrition Society, Seoul, 1995
- 7) Potter DV. Washing update : NIH consensus development conference statement optimal calcium intake. *Nutrition Today* 29 : 37-40, 1994
- 8) Lee YS, Park MN, Kim EM. Effect of dietary calcium levels on peak bone mass formation in growing female rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26(3) : 480-487, 1997
- 9) Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on standards for nutritional studies. *J Nutr* 107 : 1340-1348, 1977
- 10) Fisk CH, Y Subbarow. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 66 : 375, 1925
- 11) Bergman I, Roy Loxley. Two improved and simplified methods for the spectrometric determination of hydroxyproline. *Anal Chem* 35 : 1961-1965, 1963
- 12) Folch J, M Lees, GH Sloanestanley. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal

- tissues. *J Biol Chem* 220 : 497-509, 1957
- 13) Chae SI, Kim BJ. Statistical analysis method for SPSS/PC+. Bum moon sa. 1988
 - 14) Thomas ML, Simmons DJ, Kidder L, Ibarra MJ. Calcium metabolism and bone mineralization in female rats fed diets marginally sufficient in calcium : effects of increased dietary calcium intake. *Bone Miner* 12 : 1-14, 1991
 - 15) Morris HA, Porter SJ, Durbridge TC, Moore RJ, Need AG, Nordin BEC. Effects of oophorectomy on biochemical and bone variables in the rat. *Bone Miner* 18 : 133-142, 1992
 - 16) Arjmandi BH, Salih MA, Herbert DC, Sims SH, Kalu DK. Evidence for estrogen receptor-linked calcium transport in the intestine. *Bone Miner* 21 : 63-74, 1993
 - 17) Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, Hollis BW. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology* 124 : 7-16, 1989
 - 18) Mitruka BM, Rawnsley HM. Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and normal humans. 2ed, pp160, Masson, New York, 1987
 - 19) Donahue HJ, Mazzeo RS, Horvath SM. Endurance training and bone loss in calcium deficient and ovariectomized rats. *Metabolism* 37 : 741-744, 1988
 - 20) Hietala EL. The effect of ovariectomy on periosteal bone formation and bone resorption in adult rats. *Bone Miner* 20 : 57-65, 1993
 - 21) O JH, Lee YS. Effects of dietary calcium levels on the reduction of calcium availability in ovariectomized osteoporosis model rats. *Korean J Nutrition* 26(3) : 277-285, 1993
 - 22) Kalu DN, Hardin RR, Cockerhan R. Evaluation of the pathogenesis of skeletal changes in ovariectomized rats. *Endocrinology* 115 : 507-512, 1984
 - 23) Finkelman RD, Bell NH, Strong DD, Demers LM, Baylink DJ. Ovariectomy selectively reduces the concentration of transforming growth factor β in rat bone : Implications for estrogen deficiency-associated bone loss. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 : 12190-12193, 1992
 - 24) Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Sapuntzakis MS, Guo P, Kukreja SC. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Nutr* 126 : 161-167, 1996
 - 25) Raisz LG. Local and systemic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *N Eng J Med* 318 : 818-828, 1988
 - 26) Kim WY, Moon KW, Kim JH. A study on the long-term effects of dietary protein level on Ca and skeletal metabolism in ovariectomized rats. *Korean J Nutrition* 28(5) : 415-425, 1995
 - 27) Thomas ML, Hope WG, Ibarra J. The relationship between long bone growth rate and duodenal calcium transport in female rats. *J Bone Miner Res* 3 : 503-508, 1988
 - 28) Blanuša M, Matkovic V, Kostial K. Kinetic parameters of calcium metabolism and femur morphometry in rats. *Pflügers Arch* 375 : 239-244, 1978
 - 29) Peterson CA, Eurell JAC, Erdman JW. Bone composition and histology of young growing rats fed diets of varied calcium bioavailability : spinach, nonfat dry milk or calcium carbonate added to casein. *J Nutr* 122 : 137-144, 1992
 - 30) Robey PG, Fedarko NS, Hefferan TE, Bianco P, Vetter UK, Grzesik W, Friedenstein A, Pluijm GVD, Mintz KP, Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM. Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *J Bone Miner Res* 8(suppl. 2) : S483-S487, 1993
 - 31) Mosekilde L, Weisbrode SE, Safron JA, Stillis HF, Jankowsky ML, Ebert DC, Danielsen CC, Søgaard CH, Franks AF, Stevens ML, Paddock CL, Boyce RW. Evaluation of the skeletal effects of combined mild dietary calcium restriction and ovariectomy in sinclair S-1 minipigs : a pilot study. *J Bone Miner Res* 8 : 1311-1321, 1993
 - 32) Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover I : Theoretical consideration and clinical use in osteoporosis. *Am J Med* 95(Supple 5A) : 11S-16S, 1993