

난소절제로 유발된 골다공증 시 흰쥐 갑상샘에 대한 조직학적 및 면역조직화학적 연구

구세광 · 김대영¹ · 이형식* · 이재현 · 장인호
경북대학교 수의과대학, *경산대학교 자연과학대학 생물학과

Histological and Immunohistological Studies of the Thyroid Glands of the Osteoporotic Rats Induced by Ovariectomy

Sae-kwang Ku, Dae-young Kim¹, Hyeung-sik Lee*, Jae-hyun Lee and In-ho Chang
College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University
*Department of Biology, College of Natural Science, Kyungsan University

ABSTRACT : In order to investigate the histological and immunohistochemical changes of thyroid glands, and serum osteocalcin, estradiol, progesterone, follicular-stimulating hormone (FSH), and calcium levels in the osteoporotic rats induced by ovariectomy, normal (sham-operated group) and experimental groups (ovariectomized group) were divided. The experimental groups were subdivided to 5, 10, 15, and 20 weeks after ovariectomized groups. The histological structure of the thyroid gland were observed in normal structure throughout all experimental periods but the calcitonin-immunoreactive cells in the experimental groups were significantly decreased compared with normal groups and degranulations of calcitonin-immunoreactive cells were observed. These numbers were decreased with time after ovariectomy. However, the serum osteocalcin and FSH levels of experimental groups were significantly increased compared with normal groups and these levels were increased along with time after ovariectomy, but serum estradiol, progesterone and calcium levels of experimental group were significantly decreased compared with normal groups and these levels were decreased with time after ovariectomy.

Key words : thyroid, ovariectomy, histology, immunohistology, calcitonin-immunoreactive cell

서 론

골다공증은 동일 연령과 성별에 비하여 골의 중량이 현저히 감소된 상태로 골의 구성성분의 양적 감소를 주된 병변으로 하는 대사성 골 질환이며, 골다공증의 유발기전은 골 형성과 골 흡수의 불균형으로 알려져 있고¹, 그 원인으로서는 내분비학적, 영양학적, 물리적, 유전학적 원인을 예상하고 있고, 특히 estrogen 결핍, 활성형 vitamine D 결핍, calcitonin 결핍, PTH 과다분비, calcium 섭취부족 및 장관으로부터의 calcium 흡수 능력의 저하 등이 선행인자로 알려져 있다². 또한 최근에 들어서는 이 외에도 progesterone의 감소³, follicular-

stimulating hormone(FSH)의 증가⁴ 역시 원인으로 생각되고 있다.

한편 Erben 등³은 흰쥐에서 난소절제 후 약 2-4주에 골다공증이 유발된다고 하였으며, Sarma 등⁵, Bagi 등⁶ 및 Thomsen 등⁷은 난소를 절제한 흰쥐에서 대퇴골의 조직학적 변화에 대하여 보고하는 등 골다공증 시 골 조직의 변화에 대한 보고는 다수 찾아볼 수 있으며, 골다공증 시 혈중 호르몬 및 calcium level의 변화에 대한 보고 역시 다수 존재하나^{3,4,8-13}, 이들 혈중 농도의 변화를 장기간동안 단계별로 관찰한 보고는 극히 드물고, 혈중 calcium 농도를 저하시키는 것으로 알려진 calcitonin을 생산하는 갑상샘에 대한 조직학적 보고는 거의 찾아볼 수 없는 바, 본 실험에서는 흰쥐의 난소를 절제하여 인위적으로 골다공증이 유발된 흰쥐에서 혈청 중 osteocalcin, estradiol, progesterone, follicular-stimulating hormone(FSH), 및 calcium level의 변화와

*본 연구는 한국학술진흥재단의 1996년도 자유공모과제 연구비지원에 의하여 수행되었음.

¹Corresponding author.

갑상샘의 조직학적 변화를 관찰하고, 갑상샘에 존재하는 calcitonin 산생세포의 수적 및 형태적 변화를 면역조직화학적으로 관찰하였다.

재료 및 방법

실험동물

건강한 Sprague-Dawley 계 암컷 흰쥐(SPF, 대한실험동물센터, 서울)를 구입하여 사용하였으며, 구입 후 2주간의 실험실 적응기간을 동안 고형사료(Pellet, 삼양유지사, 서울)와 수도수를 충분히 공급하였다. 실험동물은 체중 180 g 내외일 때 난소절제를 실시하였다. 실험동물은 난소절제를 실시하지 않고 단순히 개복수술만을 실시한 정상군과 복강을 개복한 후 양쪽 난소를 절제한 실험군으로 구분하였다. 실험동물은 정상군은 난소절제 후 5주에 희생하였으며, 실험군에서는 난소절제 후 5주, 10주, 15주 및 20주에 각각 6마리씩 희생하여 실험에 사용하였다.

난소절제

실험동물은 2주간의 적응기간을 거친 후 체중 180 g 내외일 때 Rompun(xylazine, 유한양행) 0.2 mg/kg을 근육주사하여 진정시키고, ketalar(Ketamine, 유한양행) 1 mg/kg을 근육주사하여 마취시켰다. 정상군에서는 단순히 복부 정중 절개를 실시한 후 복강을 폐쇄하고 피부를 봉합하였으며, 실험군에서는 복부 정중 절개를 실시하여, 양쪽 난소의 위치를 확인한 다음 난소의 앞쪽과 뒤쪽에 이중 결찰을 실시한 다음 절단하여 난소를 제거하였다. 난소제거 후 실험동물은 일반적인 외과적 방법에 준하여 복강을 폐쇄시키고 피부를 봉합하였다. 수술 10일 후 모든 실험동물의 피부 봉합사를 제거하였다. 수술 후 실험 전 기간 동안 모든 실험동물은 고형사료와 수도물을 충분히 공급하였다.

조직표본의 제작

갑상샘을 절취고, Bouin 액에 24시간 이상 고정하였으며 ethanol 계열로 탈수시킨 후 통상적인 방법으로 paraffin 포매를 실시하여 5-10 μ m의 연속절편을 제작한 후 hematoxylin-eosin(H-E) 염색을 실시하였다.

면역조직화학적 염색

갑상샘에서 calcitonin 산생세포를 관찰하기 위하여 calcitonin의 항혈청을 이용하여 peroxidase anti-peroxidase (PAP)법¹⁴로 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

면역조직화학적 염색을 실시하기 위하여 먼저 파라핀 조직을 제거한 후 조직절편을 100% methanol과 0.1% 과산화수소에 각각 30분간 침적하여 내인성 peroxidase를 억제시킨 후 phosphate buffer saline(PBS, 0.01 M, pH 7.4) 용액으로 30분간 3회 세척하였다. 이어서 비특이적인 면역 globulin의 결합을 방지하기 위하여 normal goat serum(1:100)으로 실온에서 1시간 전처리 후, calcitonin 항혈청(BioGenex, Cat No. PU0360694, 1:40)에 4°C에서 24시간 반응시키고, PBS로 30분간 3회 세척하였다. 이후 anti-rabbit IgG goat serum(Hokkaido Univ., Faculty of Vet. Pharmacology, 1:100)으로 실온에서 1시간 반응시킨 후 PBS로 3회 세척하였다. PAP complex(Sigma, 1:200)로 역시 상온에서 1시간 방치 후 PBS로 30분간 3회 세척하였다. DAB 용액(3,3'-diaminobezidine tetrahydrochloride containing 0.01% H₂O₂ in Tris-HCl buffer)으로 발색시킨 후 Mayer's hematoxylin으로 가볍게 핵염색을 실시한 후 광학현미경하에서 관찰하였다.

Calcitonin 면역반응세포의 수적변동은 각 군별로 10개 부위를 산정하여 1 mm²당 면역반응세포의 수를 평균±표준편차(Mean±S.D.)로 계산하였으며, Student's t-test로 유의성을 검증하였다.

혈청성분의 변화

체혈 전 하루동안 절식시킨 다음 심장체혈을 실시하였다. 체혈한 혈액은 실온에서 24시간 이상 방치시킨 후 3000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청 중 osteocalcin, estradiol, progesterone 및 FSH의 level은 automated gamma counter(미국 ICN Co., HE model)로 측정하였으며, 혈청 중의 calcium level은 flame photometer(1L-943, Italy)를 이용하여 Light source: HCl, Wave length: 422.7 nm, Flame type: N₂O/acetylene, Fuel flow: 4.2 l/minute의 조건하에서 측정하였다. 모든 수치는 Student's t-test로 유의성을 검증하였다.

결 과

갑상샘의 조직학적 및 면역조직화학적 변화

조직학적으로 갑상샘은 정상군과 실험군에서 별다른 변화없이 관찰되었으나, 갑상샘에 존재하는 calcitonin 면역반응세포는 정상군에서는 치밀한 과립을 함유한 원형 또는 타원형의 세포들이 갑상샘 소포 주위와 소포 사이에서 다수 관찰되었으며, 갑상샘 소포 사이에서는 집단적으로 존재하는 세포들 역시 관찰되었다

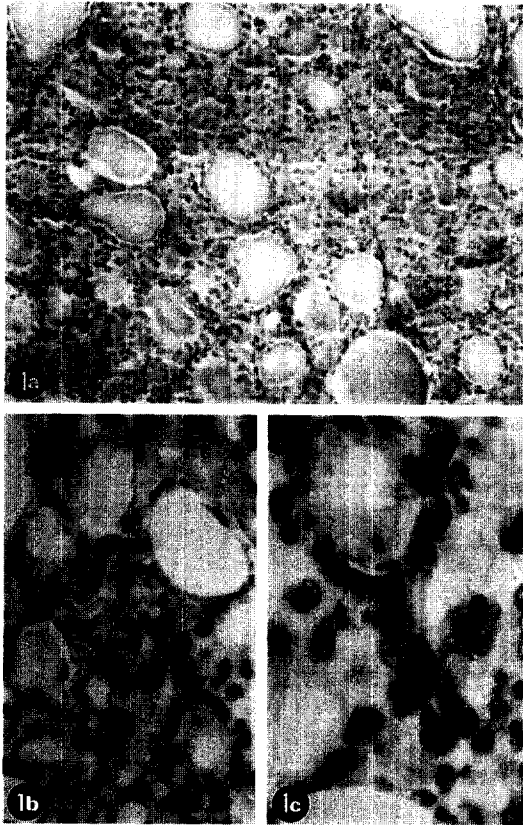


Fig 1. Histological and immunohistochemical profiles of thyroid glands of the normal groups. a. H-E stains, $\times 150$; b, c. calcitonin-immunoreactive cells, PAP methods, $\times 150$ (b), $\times 300$ (c).

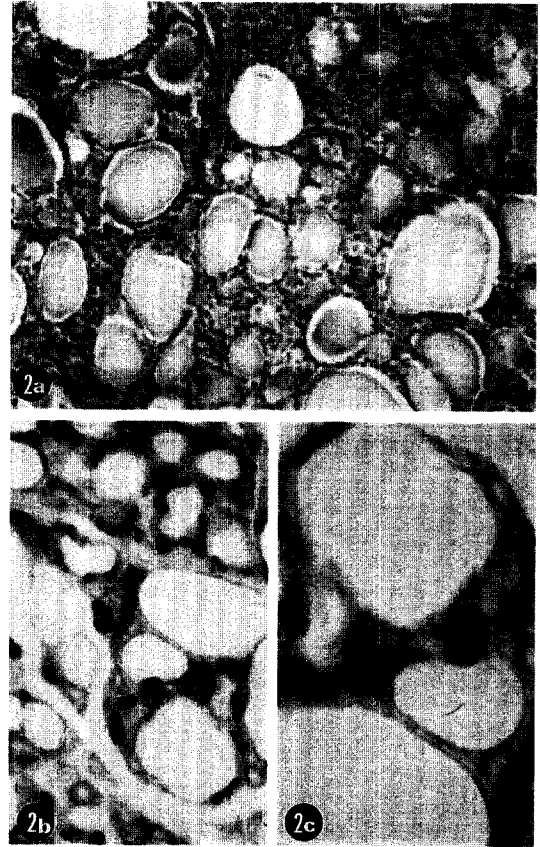


Fig 2. Histological and immunohistochemical profiles of thyroid glands of ovariectomized rats after 5 weeks. a. H-E stains, $\times 150$; b, c. calcitonin-immunoreactive cells, PAP methods, $\times 150$ (b), $\times 300$ (c).

(Fig 1a-c). 실험군에서는 정상군에 비하여 세포들의 수가 현저히 감소하였으며, 반응세포들은 심한 탈과립 현상(degranulation)을 나타내는 것으로 관찰되었고, 특히 갑상샘 소포 주위의 반응세포들이 현저히 감소되어 반응세포들은 소포 사이에서만 소수 관찰되었다(Fig 2-5a-c).

이들 calcitonin 면역반응세포의 수는 정상군에서 $112.38 \pm 46.78/\text{mm}^2$ 개로 관찰되었으나, 난소를 절제한 실험군에서는 절제 후 5주, 10주, 15주 및 20주에서 각각 $36.75 \pm 18.86/\text{mm}^2$ 개, $25.38 \pm 9.98/\text{mm}^2$ 개, $22.35 \pm 11.27/\text{mm}^2$ 개, 및 $18.31 \pm 9.27/\text{mm}^2$ 개로 정상군에 비해 유의성 있는($p < 0.01$) 감소가 관찰되었다(Table 1).

혈청성분의 변화

Osteocalcin level은 정상군에서 $0.26 \pm 0.03 \text{ ng/ml}$ 로 관찰되었으나, 실험군에서는 난소절제 후 5주 및 10주

에는 $0.28 \pm 0.11 \text{ ng/ml}$ 과 $0.29 \pm 0.19 \text{ ng/ml}$ 로 다소 증가되었으나, 유의성은 인정되지 않았다. 그러나 난소절제 후 15주와 20주에는 $0.34 \pm 0.15 \text{ ng/ml}$ 및 $0.35 \pm 0.27 \text{ ng/ml}$ 로 정상군에 비하여 유의성 있는($p < 0.01$) 증가가 인정되었다(Table 2). Estradiol level은 정상군에서는 $18.66 \pm 5.19 \text{ ng/ml}$ 로 관찰되었으나, 난소절제 후 5주, 10주, 15주 및 20주의 실험군에서는 $13.67 \pm 6.29 \text{ ng/ml}$, $12.65 \pm 9.97 \text{ ng/ml}$, $10.38 \pm 7.53 \text{ ng/ml}$ 및 $9.15 \pm 7.31 \text{ ng/ml}$ 로 정상군에 비해 유의성 있게($p < 0.05$, $p < 0.01$) 감소되었으며(Table 2), Progesteron level은 정상군에서는 $65.31 \pm 23.43 \text{ ng/ml}$ 로 관찰되었으나, 난소절제 후 5주, 10주, 및 15주의 실험군에서는 $41.51 \pm 21.09 \text{ ng/ml}$, $40.38 \pm 21.59 \text{ ng/ml}$, 및 $38.15 \pm 21.31 \text{ ng/ml}$ 로 정상군에 비해 유의성 있는($p < 0.05$) 감소가 인정되었고, 특히 난소절제 후 20주의 실험군에서는

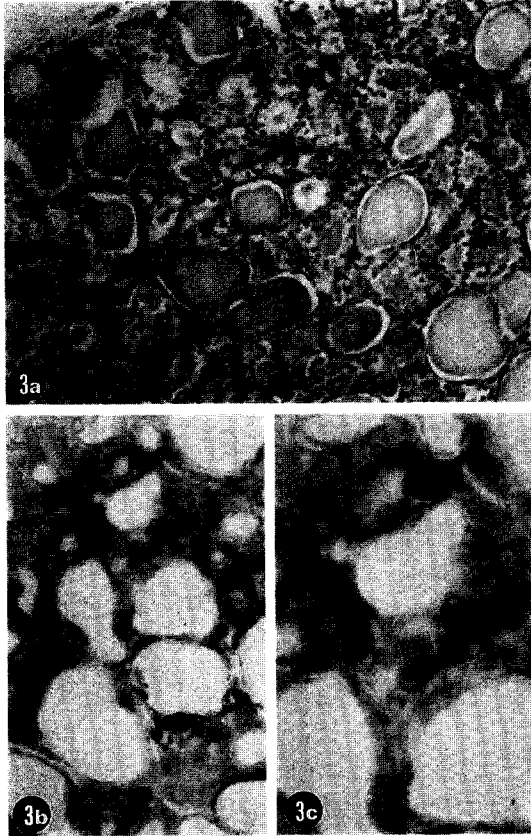


Fig 3. Histological and immunohistochemical profiles of thyroid glands of ovariectomized rats after 10 weeks. a. H-E stains, $\times 150$; b, c. calcitonin-immunoreactive cells, PAP methods, $\times 150$ (b), $\times 300$ (c).

37.33 \pm 22.51 ng/ml로 정상군에 비해 유의성 있게($p < 0.01$) 감소되었으며, 실험군 중 가장 낮은 수치를 나타내었다(Table 2). 한편 FSH level은 정상군에서 280.33 \pm 161.26 ng/ml로 관찰되었으나, 난소절제 후 5주의 실험군에서는 292.15 \pm 116.38 ng/ml로 다소 증가되었으나 유의성은 인정되지 않은 반면, 난소절제 후 10주, 15주 및 20주에서는 각각 380.44 \pm 216.31 ng/ml, 400.35 \pm 211.87 ng/ml, 및 401.27 \pm 119.36 ng/ml로 관찰되어 정상군에 비해 유의성 있게($p < 0.05$, $p < 0.01$) 증가되었다(Table 2). Calcium level은 정상군에서 14.57 \pm 10.38 ng/ml로 관찰되었으나, 난소절제 후 5주의 실험군에서는 13.04 \pm 5.27 ng/ml로 다소 감소되었으나, 정상군에 비해 유의성은 관찰되지 않은 반면, 난소절제 후 10주, 15주 및 20주에서는 각각 11.35 \pm 8.80 ng/ml, 10.82 \pm 9.90 ng/ml, 및 9.27 \pm 5.35 ng/ml로

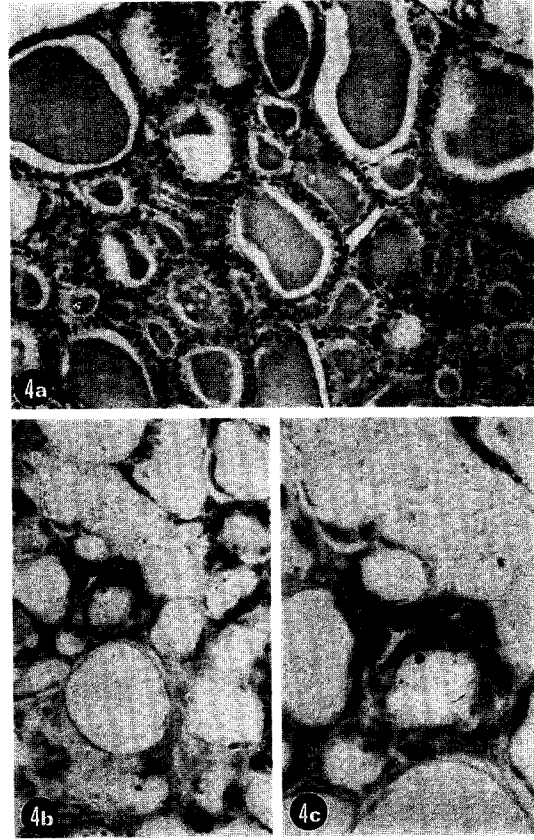


Fig 4. Histological and immunohistochemical profiles of thyroid glands of ovariectomized rats after 15 weeks. a. H-E stains, $\times 150$; b, c. calcitonin-immunoreactive cells, PAP methods, $\times 150$ (b), $\times 300$ (c).

관찰되어 정상군에 비해 유의성 있게($p < 0.05$, $p < 0.01$) 감소되었다(Table 2).

고 찰

Calcitonin은 갑상샘 소포 주위에 분포하는 paraneuron 형태의 내분비세포인 소포결세포(parafollicular cell 또는 C cell)에서 분비하는 호르몬으로써 부갑상샘 호르몬과 길항적으로 작용하여, 골 용해를 억제하여 혈중 칼슘농도를 낮추는 기능을 한다고 알려져 있고^{15,16}, 골다공증의 치료제로 유용하다고 알려져 있다¹⁷. 또한 각종 동물의 갑상샘에서 이들 calcitonin 산생세포의 존재에 대해서도 잘 알려져 있으나¹⁸, 골다공증 시 이들 내분비세포의 변화에 대한 보고는 극히 드물다. 그러나 혈중 calcitonin level이 골다공증 시 상승된다는 보

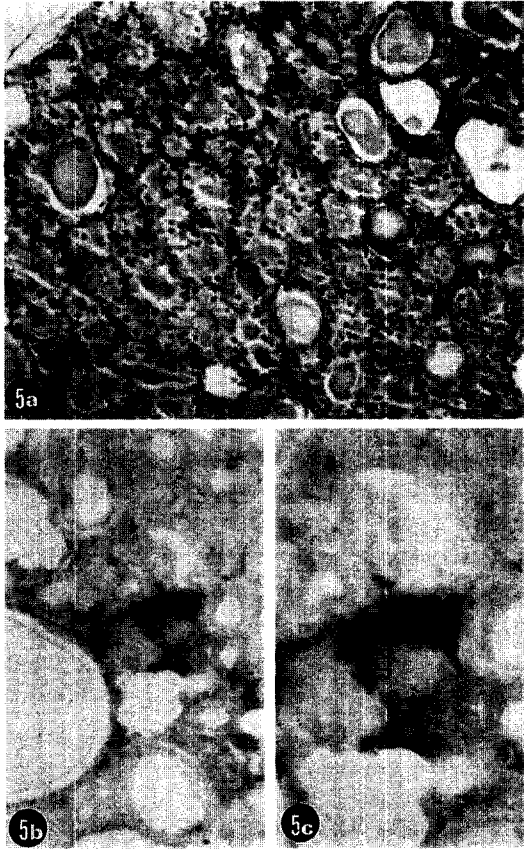


Fig 5. Histological and immunohistochemical profiles of thyroid glands of ovariectomized rats after 20 weeks. a. H-E stains, $\times 150$; b, c. calcitonin-immunoreactive cells, PAP methods, $\times 150$ (b), $\times 300$ (c).

Table 1. Changes of the numbers of calcitonin-immunoreactive cells in the osteoporotic rats induced by ovariectomy (mean \pm S.D./mm²)

	Normal group	Experimental groups			
		5*	10	15	20
Calcitonin cells	112.38 \pm 46.78	36.75 \pm 9.98 ^a	25.38 \pm 9.98 ^a	22.35 \pm 11.27 ^a	18.31 \pm 9.27 ^a

*The weeks after ovariectomy

^ap<0.01 compared with normal group.

고들^{19,21}로 미루어 보아 갑상샘에 존재하는 calcitonin 산생세포는 혈중으로 대부분의 과립을 분비할 것으로 생각되므로, 그 숫자는 현저히 감소될 것으로 생각되며, 본 실험의 결과에서도 정상군에서는 치밀한 과립을 함유한 원형 또는 타원형의 세포들이 갑상샘 소포

주위와 소포 사이에서 다수 관찰되었으나, 실험군에서는 심한 탈과립 현상(degranulation)을 나타내는 것으로 관찰되었고, 특히 갑상샘 소포 주위의 반응세포들이 현저히 감소되어 반응세포들은 소포 사이에서만 소수 관찰되었다. 이들 calcitonin 면역반응세포의 수는 정상군에서 $112.38 \pm 46.78/\text{mm}^2$ 개로 관찰되었으나, 난소를 절제한 실험군에서는 난소절제 후 5주, 10주, 15주 및 20주에서 각각 $36.75 \pm 9.98/\text{mm}^2$ 개, $25.38 \pm 9.98/\text{mm}^2$ 개, $22.35 \pm 11.27/\text{mm}^2$ 개, 및 $18.31 \pm 9.27/\text{mm}^2$ 개로 정상군에 비해 현저히 감소되는 것으로 관찰되었다.

Osteocalcin은 칼슘과 결합하는 Vit K 의존성 alpha-carboxyglutamic acid 단백질로서²¹, 뼈모세포의 활성을 나타내는데에 가장 민감하고 특이하다고 알려져 있으며, 골아세포에 의해 생성된다⁸. 골의 재형성시 골아세포의 활성이 증가하며, 혈청중 osteocalcin level이 높아지므로 골생성의 지표로 이용할 수 있다고 알려져 있다^{8,9}. 본 실험의 결과 혈청 중 osteocalcin level은 정상군에 비해 모든 실험군에서 증가되어 관찰되었으며, 특히 난소절제 후 15주부터 유의성 있는 증가가 인정되어 이전의 보고들^{8,9}과 일치되는 결과를 나타내었다. Estradiol은 estrone, estriol과 함께 난포 호르몬 작용을 가진 스테로이드 호르몬으로서 이들 호르몬은 난소, 황체, 태반, 부신 및 고환 등에서 생산되며, 분비는 간뇌-뇌하수체계와 feed back 기구를 매개하여 조절되고, 여성에게서는 성주기와 임신에 동반하여 현저한 변동을 나타낸다고 알려져 있다¹⁵. 또한 Erben 등³과 Durador 등⁴은 각각 난소절제로 유발된 골다공증과 폐경 후 유발된 골다공증시 혈중 estradiol의 현저한 감소가 관찰된다고 보고하였고, Genant 등²²은 폐경 후 유발된 골다공증 환자에 저용량의 esterified estrogen을 투여했을 경우, 감소되었던 혈중 estradiol이 다소 상승된 바 어느 정도 치료효과가 나타난다고 보고하였다. 본 실험에서는 혈청 중 estradiol level은 정상군에 비해 실험군에서 현저히 감소되어 이전의 보고들^{3,4,22}과 유사하게 관찰되었다. Progesteron은 황체와 자궁에서 생산, 분비되는 임신지속 호르몬으로, 임신 지속을 위해 필수적인 호르몬으로 알려져 있다²³. 골다공증시 progesteron의 변화에 대해 Erben 등³은 난소절제 후 2주부터 혈중 progesteron level이 현저히 낮아진다고 하였으며, Heersche 등¹⁰은 난소 이상에 의해 초래된 골다공증의 원인으로 estrogen 뿐만 아니라 progesteron도 중요한 역할을 하며, progesteron 투여로 어느 정도 치료효과를 볼 수 있다고 하였다. 또한 Csermely 등¹¹은 oligomenorrhea와 이차성 amenorrhea를 보이는 골

Table 2. Changes of the serum levels in the osteoporotic rats induced by ovariectomy (mean \pm S.D.ng/ml)

	Normal group		Experimental groups							
			5*		10		15		20	
Osteocalcin	0.26 \pm 0.13		0.28 \pm 0.11		0.29 \pm 0.19		0.34 \pm 0.15 ^b		0.35 \pm 0.27 ^b	
Estradiol	18.66 \pm 5.19		13.67 \pm 6.29 ^a		12.65 \pm 9.97 ^b		10.38 \pm 7.53 ^b		9.15 \pm 7.31 ^b	
Progesteron	65.31 \pm 23.43		41.51 \pm 21.09 ^a		40.38 \pm 21.59 ^a		38.15 \pm 21.32 ^a		37.33 \pm 22.51 ^b	
FSH	280.33 \pm 161.26		292.15 \pm 116.38		380.44 \pm 216.31 ^a		400.35 \pm 211.87 ^b		401.27 \pm 119.26 ^b	
Calcium	14.57 \pm 10.38		13.04 \pm 5.27		11.35 \pm 8.80 ^a		10.82 \pm 9.90 ^b		9.27 \pm 5.35 ^b	

*The weeks after ovariectomy

^ap<0.01 compared with normal group.

다공증이 있는 환자에서 혈중 progesteron치가 현저히 저하된다고 보고하였다. 본 연구에서도 혈청 중 progesteron level은 정상군에 비해 실험군에서 현저히 감소되어 이전의 보고들^{3,10,11}과 일치하였다. 난포 자극호르몬(Follicular-stimulating hormone; FSH)은 황체형성호르몬과 함께 성선자극호르몬으로도 불리며, 성선의 기능을 유지시키는 작용이 있는 분자량 30,000 정도의 당단백질이다²³. 이들 호르몬은 여성에 있어서 난포의 초기발육을 자극하고, 난포의 성숙을 완성시킨다. 또한 여성에서는 정세관에 존재하는 세르톨리 세포에 작용해서 정자형성을 유지한다고 알려져 있다¹⁵. 골다공증시 혈중 FSH는 증가된다고 알려져 있으며¹¹, 특히 Durador 등⁴은 폐경 후 유발되는 골다공증시 골밀도의 저하는 혈중 FSH의 상승과 estrogen의 하강과 관련이 있다고 보고하여, 골다공증의 진단에 유용하다고 하였다. 본 실험에서도 혈청 중 FSH level은 정상군에 비해 실험군에서 현저히 증가되어 Durador 등⁴의 보고와 일치하였다. 한편 Nordin¹²은 calcium의 부족은 결국 골다공증을 유발한다고 보고하였으며, Arjimandi 등¹³은 난소절제로 유발된 골다공증시 혈중의 calcium level은 현저히 감소된다고 하였다. 본 실험의 결과 혈청 중 calcium level은 정상군에 비해 실험군에서 현저히 감소되어 이전의 보고들^{12,13}과 일치하였다. 그러나 본 실험의 결과 osteocalcin과 FSH level은 난소절제 후의 기간에 비례하여 증가되는 것으로 관찰되었으며, estradiol, progesteron 및 calcium level은 난소절제 후의 기간에 비례하여 감소되는 것으로 관찰되었으나, 이들 혈청치의 변화를 난소절제 후 일정기간 동안의 단계별로 관찰한 보고는 찾아볼 수 없는 바 비교하기 곤란하다.

결 론

원위의 난소를 절제하여 인위적으로 골다공증이 유

발된 흰쥐에서 혈청 중 osteocalcin, estradiol, progesteron, follicular-stimulating hormone(FSH), 및 calcium level의 변화와 갑상샘의 조직학적 변화를 관찰하고, 갑상샘에 존재하는 calcitonin 산생세포의 수적 및 형태적 변화를 면역조직화학적으로 관찰하였던 바, 갑상샘의 조직학적 구조는 모든 실험군에서 정상적으로 관찰되었으나, 면역조직화학적 염색의 결과 갑상샘에 존재하는 calcitonin 면역반응세포는 실험군에서 현저히 감소되었으며, 심한 탈과립 현상이 관찰되었다. 이들 calcitonin 면역반응세포는 난소절제 후 시간에 비례하여 감소되는 것으로 관찰되었다. 한편 혈청 중 osteocalcin과 FSH level은 난소절제 후 현저히 증가되는 것으로 관찰되었으며, 이들의 수치는 난소절제 후의 기간에 비례하여 증가되는 것으로 관찰되었으나, estradiol, progesteron 및 calcium level은 난소절제 후 현저히 감소되었고, 이들 수치는 난소절제 후의 기간에 비례하여 감소되는 것으로 관찰되었다.

참 고 문 헌

1. 김남현, 최충형, 이환모. 흰쥐의 난소제거 후 발생한 골다공증에 대한 홍삼 사포닌의 효능. 대한정형외과지 1995; 30: 808-816.
2. 이환모, 박병문, 김남현. 백서의 난소제거후 발생한 골다공증에 대한 Calcitonin, NaF 및 Tamoxifen의 효과. 대한정형외과학회지 1993; 28: 2273-2280.
3. Erben RG, Harti G, Graf H. Ovariectomy dose not alter CD4+/CD8+ ratio in peripheral blood T-lymphocytes in rat. Horm Metab Res 1998; 30: 50-54.
4. Durador EB, De-Falco V, Chahade WH, Cossermelli W, Yoshinari NH. Hormonal and biochemical parameters in postmenopausal osteoporosis. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paul 1997; 52: 60-62.
5. Sarma U, Edwards M, Motoyoshi K, Flanagan AM. Inhibition of bone resorption by 17 beta-stradiol in human bone marrow cultures. J Cell Physiol 1998;

- 175: 99-108.
6. Bagi CM, Ammann P, Rizzolli R, Miller SC. Effect of estrogen deficiency on cancellous and cortical bone structure and strength of the femoral neck in rats. *Calcif Tissue Int* 1997; 61: 336-44.
 7. Thomsen JS, Mosekilde L, Boyce RW, Mosekilde E. Stochastic simulation of vertebral trabecular bone remodeling. *Bone* 1994; 15: 655-666.
 8. 한병권, 박원근, 최태환, 신현우, 김선우. 한국인 갱년기 여성의 골밀도 및 호르몬 변화에 대한 연구. *대한내분비학잡지* 1989; 4: 21-28.
 9. 김광원. 생화학적 표지자의 임상적 이용. *경희대학교 내분비연구소 제2회 골다공증 심포지움 논문집* 1996; 41-50.
 10. Heersche JN, Bellows CG, Ishida Y. The decrease in bone mass associated with aging and menopause. *J Prosthet. Dent* 1998; 79: 14-16.
 11. Csermely T, Halvax L, Schmidt E, Zambo K, Peterfai J, Vadon G, Szabo I. Lower bone density (Osteopenia) in adolescent girls with oligomenorrhea and secondary amenorrhea. *Orv Hetil* 1997; 138: 2735-2741.
 12. Nordin BE. Calcium and osteoporosis. *Nutrition* 1997; 13: 664-686.
 13. Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Stacewicz-Spauntzakis M, Guo P, Kukreja SC. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Nutr* 1996; 126: 161-167.
 14. Sternberger LA. *Immunocytochemistry*. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons. 1979: 479-484.
 15. 김우권, 권종국, 한방근, 이호일, 유창준, 양일석, 김상근, 김천호, 윤영원, 김주현, 박진홍. *가축생리학*. 2판. 서울: 아카데미서적. 1992: 417-458.
 16. Lee JH, Ku SK, Lee HS. Ontogeny of calcitonin-immunoreactive cells in the thyroid glands of Korean native goat. *Korean J Vet Res* 1996; 36: 513-519.
 17. Kapetanios G, Symeonides PP, Dimitriou C, Karakasani K, Potoupanis MA. double blind study of intranasal calcitonin for established postmenopausal osteoporosis. *Acta Orthop Scand* 1997; 275: 108-111.
 18. Blasher S. Immunocytochemical demonstration of calcitonin-containing C cells in the thyroid glands of different mammals. *Cell Tissue Res* 1978; 186: 551-558.
 19. Rong H, Saaf M, Topping O, Sjostedt U, Bucht E. Circulating monomer-like calcitonin in osteoporotic patients. *Osteoporos Int* 1996; 6: 394-398.
 20. Gennari C, Agnusdei D. Calcitonins and osteoporosis. *Br J Clin Pract* 1994; 48: 196-200.
 21. Abadjieva DK, 강성길. 녹용약침 자극이 난소적출 흰쥐의 지질 및 골대사에 미치는 영향. *대한한의학회지* 1996; 17: 168-177.
 22. Genant HK, Lucas J, Weiss S, Akin M, Emkey R, McNaney-Flint H, Downs R, Mortola J, Watts N, Yang HM, Banav N, Brennan JJ, Nolan JC. Low-dose esterified estrogen therapy: effects on bone, plasma estradiol concentrations, endometrium, and lipid levels. *Estratab/Osteoporosis Study Group. Arch Intern Med* 1997; 157: 2609-2615.
 23. McDonald LE, Pineda MH. *Veterinary endocrinology and reproduction*. 4th ed. Philadelphia, London: Lea & Febiger. 1989: 303-354.