

## 랫드에서 $1\alpha,25$ dihydroxycholecalciferol의 골다공증성 골절 치유효과

배 춘 식

전국대학교 축산대학 수의학부 외과학교실  
(1999년 7월 20일 접수)

### Therapeutic effects of $1\alpha,25$ dihydroxycholecalciferol on osteoporotic fracture in a rat model

Chun-sik Bae

*Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Konkuk University*  
(Received Jul 20, 1999)

**Abstract** : Osteoporosis is defined as a decrease in bone mass that leads to an increased risk of fracture. The therapeutic effect of  $1\alpha,25$  dihydroxycholecalciferol, the hormonal form of vitamin D<sub>3</sub> that mediates calcium translation in intestine and bone, on the healing process of fracture has still been controversial.

These studies were designed to understand the healing process of normal fibular fracture, the osteoporotic changes after ovariectomy, and the therapeutic effects of  $1\alpha,25$  dihydroxycholecalciferol on the osteoporotic fracture in rats.

The simple transverse fractures of rat fibulae were produced with a rotating diamond saw. The changes of the biochemical and mechanical indices of rats were investigated.

The mechanical study based on bending test revealed the healing of the fibular fracture in the 5th week after simple transverse fracture. The osteoporosis impaired more the healing of osteoporotic fibular fracture than normal non-osteoporotic fibular fracture. The healing process of osteoporotic fracture was facilitated by the treatment with  $1\alpha,25$  dihydroxycholecalciferol, however, was delayed more than the healing process of normal fracture. The bone strength based on the bending test also confirmed this tendency. The bone strengths in the 5th week after fracture of normal bone, osteoporotic bone, and  $1\alpha,25$  dihydroxycholecalciferol-treated osteoporotic bone were 75%, 41%, and 67%, respectively, in comparison with those of intact bone.

In conclusion,  $1\alpha,25$  dihydroxycholecalciferol was effective in promoting the osteoporotic fracture healing.

**Key words** : fracture, osteoporosis,  $1\alpha,25$  dihydroxycholecalciferol, bending test.

## 서 론

골다공증은 가장 일반적인 골의 대사성 질환으로 골형성의 감소 및 골흡수의 증가로 인하여 같은 성별이나 연령층에 비하여 골밀도가 감소하고 골질의 감수성이 증가된 상태로 정의할 수 있으며<sup>1</sup> 크게 원발성 골다공증과 속발성 골다공증으로 분류되며 원발성 골다공증에는 폐경후 골다공증과 노인성 골다공증이 대부분이고<sup>2</sup> 속발성 골다공증은 폐경이나 노령을 제외한 원인인자들에 의한 골다공증을 의미하며 갑상선 기능항진증<sup>3</sup>, 부갑상선 기능항진증<sup>4</sup>, 쿠싱증후군<sup>5</sup>, 당뇨병<sup>6</sup> 등의 내분비질환, Homocysteinaemia<sup>7</sup>, Marfan 증후군<sup>8</sup> 등의 교원성 질환, 크론병<sup>9</sup>, 위장관 절제술<sup>10</sup>, 폐하린<sup>11</sup>, 갑상선호르몬제<sup>12</sup>, 알코올<sup>3</sup> 및 류마티스성 관절염<sup>13</sup> 등이 주요원인이다.

폐경후 골다공증은 여성에서 폐경직후부터 진행되는 점으로 미루어 난소에서 생산되는 에스트로젠 결핍이 주된 원인으로 알려져 있으며<sup>14</sup> 에스트로젠 결핍 이후에 발생하는 일차적인 변화는 골격 밖으로 칼슘의 운반이 증가하는 것이다. 가속화된 골소실에 의해 부갑상선 호르몬의 분비와 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol의 생산이 감소되고 이에 따라 장내 칼슘흡수의 효율이 감소하고 체내의 칼슘과 골의 칼슘이 소실된다<sup>15</sup>. 그러나 Lindgren과 DeLuca<sup>16</sup>는 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol의 감소와 부갑상선 호르몬에 대한 감수성의 증가는 골다공증 발생과 관계가 없다고 하였다.

또한 에스트로젠 결핍으로 골흡수를 촉진하는 cytokine인 interleukin(IL)-1, IL-6의 생산이 촉진되고<sup>17</sup> 골형성을 촉진하는 성장인자인 insulin-like growth factor(IGF)-1과 transforming growth factor(TGF)- $\beta$ 의 생산은 억제된다<sup>18</sup>.

골다공증에 이환된 경우에는 가벼운 외상이나 충격에도 쉽게 뼈가 부러지게 되는데 척추 압박골절과 고관절 골절이 대표적인 예이다<sup>19</sup>.

골다공증성 골절의 예방과 치유를 위하여 작용기전이 서로 다른 약제들인 calcium, calcitonin, estrogen, bisphosphonate, vitamin D 등을 사용하였으나<sup>5,20</sup> 이들의 효과에 대해서는 일치하지 않았으며 오히려 상반되는 견해도 있었다.

Vitamin D는 간에서 25-hydroxycholecalciferol로 대사되고 이것이 다시 신장에서 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol로 대사되어 장관세포의 세포질내 수용체와 결합하여 핵내

로 이동, 유전자의 transcription을 촉진함으로써 칼슘결합 단백질의 합성을 증가시켜 궁극적으로 장관에서 칼슘과 인의 흡수를 촉진하고 신장의 원위세뇨관에서 칼슘의 재흡수를 증가시킨다<sup>21</sup>. 또한 부갑상선 호르몬의 매개에 의한 골흡수를 억제함으로써 골다공증 환자에게 효과가 있으며<sup>22</sup> 이 약제의 효과에 대해서 상당한 치유 효과가 있었다는 보고<sup>23,24</sup>에 반해서 치유효과가 전혀 없었다는 상반되는 주장<sup>25,26</sup>도 있어서 vitamin D의 치료효과에 대한 논란은 아직도 끊이지 않으나 최근에는 vitamin D의 효과를 입증하는 보고가 많아지고 있다.

이에 저자는 랫트의 양측 난소를 적출한 후 난소적출이 골다공증 발생에 미치는 영향과 정상 골질의 치유과정을 이해하고 난소적출후 골다공증성 골질의 치유과정과 난소적출후 골다공증성 골질의 치유에 미치는 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol의 영향을 알아보고 골다공증성 골질 치료제로서의 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol의 유용성을 확인하여 수의임상에서 골절 및 골다공증성 골질의 치료에 효율적으로 응용하고자 본 실험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

**실험동물 및 실험군의 설정** : 정상 비골골절의 치유과정을 살펴보기 위해서는 12주령 암컷 Sprague-Dawley 랫트(222.8 $\pm$ 3.6g) 35마리를 비골의 골절유발후 매주 7마리씩 배정하여 5주까지 골질의 치유과정을 관찰하였으며 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol의 골다공증성 골질 치유효과를 살펴보기 위해서는 12주령 암컷 Sprague-Dawley 랫트(229.0 $\pm$ 7.5g) 28마리를 양측 난소적출후 7주에 비골의 골절을 유발하였다. 골절이 된 랫트는 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol 투여군(이하 OFD)과 대조군(이하 OF)으로 나누고 각각 14마리씩 배치를 하였으며 각 군은 3주, 5주마다 7마리씩 배정하여 5주까지 골질의 치유과정을 관찰하였다. 각 군의 실험동물은 12시간의 명암주기가 교대로 유지되는 실내에서 사육하였으며 실험기간 동안 매일 일정한 시간에 체중, 사료섭취량 및 음수량의 변화를 측정하였다. 사료섭취량과 음수량은 전날 공급한 양에서 당일 측정된 양을 뺀 값을 이용하였다.

**난소적출 및 비골의 골절유발** : Ketamin hydrochloride (유한양행(株)) 15mg/100g를 복강내 주사하여 전신마취를 유발하였다. 마취된 랫트는 난소를 노출시켜 난관을 silk

사로 결찰한 후 난소를 적출하였으며 비골의 골절유발을 위해서는 마취가 된 랫트의 비골을 노출시켜 회전하는 dental polisher의 마이크로 모터 handpiece에 diamond disk를 부착한 후 생리식염수를 떨어뜨려 주면서 횡골절을 유발하였다.

1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol의 투여 : 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol(Sigma Chemical Co, USA)을 propylene glycol(Merck, Germany)에 녹여 증류수에 희석한 후 처음 2주일 동안은 20ng, 나머지 기간은 10ng을 피하주사를 하였다<sup>27</sup>.

혈액검사 : Ketamin hydrochloride(유한양행(주)) 15mg/100g를 복강내 주사하여 전신마취를 유발한 후 심장에서 혈액 5ml를 채취하여 4℃에서 3,000rpm으로 15분간 원심분리를 실시하여 혈청을 분리하였다. Calcium(Ca)은 Hitachi 7150(Japan)을 이용하여 OCPC법, phosphate(P)와 alkaline phosphatase(ALP)는 Hitachi 7150(Japan)을 이용하여 colorimetry, Estradiol(E<sub>2</sub>)은 Packard II Cobra(USA)를 이용하여 RadioImmunoAssay에 의하여 분석하였다.

방사선 촬영검사 : 마취가 된 랫트의 비골을 X-ray App. Animal(E-7239-X 형, 東芝(株), Toshiba)을 이용하여 노출 시간은 0.25sec, 전류의 세기는 50mA, 전압은 40kV의 조건으로 촬영하였다.

Bending Test : 적출한 비골에서 근육을 완전히 제거한 후 종합 물성측정장치인 Sun Rheometer® Compact-100(Sun scientific Co, LTD., Japan)을 이용하여 parameter를 test type은 breaking, adaptor type은 rectangle, adaptor area(cm<sup>2</sup>)는 0.01, sample type은 h-round, sample width(mm)는 20.00, sample height(mm)는 1.00, sample moves(mm)는 10.00 및 table speed(mm/min)는 30으로 설정을 한 후 maximum weight(10<sup>2</sup>g)와 bending strength(g/cm<sup>2</sup>)를 측정하였다. Maximum weight는 비골에 하중이 걸렸을 때 비골이 부러지는 순간의 최대의 용력을 말하며 bending strength는 부러지는 힘으로 다음의 공식에 의하여 구하였다.

$$F = \frac{ocrR^3}{L}$$

(단, F: 부러지는 힘, oc: 부러지는 용력,

R: 뼈의 반경, L: 지지점 사이의 빔의 거리)

통계처리 : 본 실험에서 얻어진 자료에 대한 각 군간의 통계학적 유의성은 SAS package의 General Linear Model (GLM) Procedure(SAS ver. 6.12, SAS Institute, 1996)를 이

용하여 Duncan's multiple range test에 의하여 검정하였으며 p < 0.05 이하의 유의성만을 각 군간의 통계학적 차이로 인정하였다.

## 결 과

### 정상 비골골절의 치유과정 :

Body weight : 실험을 시작할 때에는 222.8±3.6g이었으며 골절유발후 2일까지는 수술에 의한 스트레스작용으로 약간 감소하였으나 1, 2, 3, 4 및 5주에는 각각 227.9±1.5, 235.3±1.8, 243.6±2.1, 250.6±2.1 및 255.8±2.5g로 변하여 정상적인 성장에 따른 점차적인 체중의 증가를 나타내었다(p < 0.05).

Food intake : 실험을 시작할 때에는 14.6±0.2g이었으며 골절유발후 2일까지는 수술에 의한 스트레스작용으로 감소하였으나 1, 2, 3, 4 및 5주에는 각각 14.1±0.4, 15.2±0.8, 14.9±0.6, 15.2±0.4 및 15.8±0.6g로 변하였다.

Water intake : 실험을 시작할 때에는 29.3±0.6ml이었으며 골절유발후 2일까지는 수술에 의한 스트레스작용으로 감소하였으나 1, 2, 3, 4 및 5주에는 각각 30.9±1.0, 31.5±1.6, 31.6±1.2, 30.3±0.8 및 31.1±1.3ml로 변하였다.

Calcium(Ca) : 실험을 시작할 때에는 10.50±0.12mg/dl이었으나 골절유발후 1, 2, 3, 4 및 5주에는 각각 10.27±0.10, 10.36±0.14, 10.58±0.11, 10.46±0.14 및 10.48±0.18mg/dl로 변하여 시간이 경과함에 따라 점점 증가하는 추세였으나 3주 이후에서는 변화의 추세가 적었으며 이러한 변화는 모두 정상적인 생리범위 내에서의 변화였다.

Phosphate(P) : 실험을 시작할 때에는 6.88±0.21mg/dl이었으나 골절유발후 1, 2, 3, 4 및 5주에는 각각 7.34±0.11, 7.29±0.14, 7.18±0.11, 7.27±0.13 및 7.22±0.14 mg/dl로 변하여 골절직후 증가하였다가 시간이 경과함에 따라 처음의 수준으로 복귀하는 경향이 있었으며 이러한 변화는 정상적인 생리범위 내에서의 변화였다.

Alkaline phosphatase(ALP) : 실험을 시작할 때에는 142.8±5.6U/l이었으나 골절유발후 1, 2, 3, 4 및 5주에는 각각 203.8±13.8, 199.0±7.1, 164.4±9.5, 149.0±9.9 및 140.2±4.6 U/l로 변하여 2주까지는 유의성 있게 증가하였다(p < 0.05) 시간이 경과하면서 골절의 치유와 더불어 서서히 감소하여 정상적인 범위로 회복되었다.

**Table 1.** Changes of body weight, food intake, water intake, Ca, P, and ALP after fracture

Item	n	Baseline	Post-fracture				
			1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks	5 weeks
BW(g)	5	222.8±3.6 <sup>d</sup>	227.9±1.5 <sup>d</sup>	235.3±1.8 <sup>e</sup>	243.6±2.1 <sup>b</sup>	250.6±2.1 <sup>a</sup>	255.8±2.5 <sup>a</sup>
FI(g)	5	14.6±0.2	14.1±0.4	15.2±0.8	14.9±0.6	15.2±0.4	15.8±0.6
WI(ml)	5	29.3±0.6	30.9±1.0	31.5±1.6	31.6±1.2	30.3±0.8	31.1±1.3
Ca(mg/dl)	5	10.50±0.12	10.27±0.10	10.36±0.14	10.58±0.11	10.46±0.14	10.48±0.18
P(mg/dl)	5	6.88±0.21	7.34±0.11	7.29±0.14	7.18±0.11	7.27±0.13	7.22±0.14
Ca/P Ratio	5	1.53±0.06	1.40±0.03	1.42±0.03	1.46±0.02	1.44±0.03	1.45±0.03
ALP(U/l)	5	142.8±10.0 <sup>b</sup>	203.8±13.8 <sup>a</sup>	199.0±7.1 <sup>a</sup>	164.4±9.5 <sup>ab</sup>	149.0±9.9 <sup>b</sup>	140.2±4.6 <sup>b</sup>

BW: body weight, FI: food intake, WI: water intake, Ca: calcium, P: phosphate, Ca/P Ratio: calcium/phosphate ratio, ALP: alkaline phosphatase. Values are expressed as mean±SEM.

abcd Means with different superscripts are significantly different within the same row(p < 0.05).

Mean size: a > b > c > d.

방사선 촬영검사 : 골절부위는 비골의 골간에 유발을 하였으며(Fig 1a), 골절유발후 1주에서는 골절선의 윤곽이 명확하였으며(Fig 1b), 2주에서는 골절단이 아직도 완전히 연결되지 않았으며 골절부위를 중심으로 넓게 전가골조직이 형성되었다(Fig 1c). 3주에서는 골절단이 거의 융합되어 골절선의 윤곽이 불분명하며 가골조직이 넓게 분포하고 있었다(Fig 1d). 4주에서는 골절선의 윤곽이 없었고 가골조직의 두께가 많이 줄어들었으며 정상상태의 골과 밀도차이가 많이 줄어들어 있었다(Fig 1e). 5주에서는 4주보다 두드러진 변화는 없었으며 정상상태의 골과 거의 같은 골밀도를 나타내었다(Fig 1f).

Bending test : Maximum weight(×10<sup>2</sup>g)는 실험을 시작할 때에는 8.47±0.25이었으나 골절유발후 1, 2, 3, 4

및 5주에 FX는 각각 0.96±0.03, 2.46±0.17, 3.64±0.16, 4.95±0.16 및 6.48±0.27로 변하여 정상비골을 100%로 하였을 때 각각 11, 29, 43, 58 및 76%의 수치를 나타내어 매주 유의성 있게 증가를 하였으며(p < 0.01), CON은 각각 8.52±0.31, 8.83±0.12, 8.94±0.30, 8.74±0.17 및 8.95±0.26으로 변하였다. Bending strength(g/cm<sup>2</sup>)는 실험을 시작할 때에는 0.33±0.01이었으나 골절유발후 1, 2, 3, 4 및 5주에 FX는 각각 0.04±0.01, 0.10±0.01, 0.14±0.01, 0.19±0.01 및 0.25±0.01로 변하여 정상비골을 100%로 하였을 때 각각 12, 30, 42, 57 및 75%의 수치를 나타내어 유의성 있는 변화를 보였으며(p < 0.01), CON은 각각 0.33±0.01, 0.35±0.01, 0.35±0.01, 0.34±0.01 및 0.35±0.01로 변하였다(Table 2).

**Table 2.** Bending test after fracture

Item	Group	n	Post-fracture					
			Baseline	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks	5 weeks
Maximum Weight (10 <sup>2</sup> g)	FX	5	8.47±0.25 <sup>a</sup>	0.96±0.03 <sup>f</sup>	2.46±0.17 <sup>c</sup>	3.64±0.16 <sup>d</sup>	4.95±0.16 <sup>c</sup>	6.48±0.27 <sup>b</sup>
	CON	5	8.47±0.25	8.52±0.31	8.83±0.12	8.94±0.30	8.74±0.17	8.95±0.26
Bending Strength (g/cm <sup>2</sup> )	FX	5	0.33±0.01 <sup>a</sup>	0.04±0.01 <sup>f</sup>	0.10±0.01 <sup>c</sup>	0.14±0.01 <sup>d</sup>	0.19±0.01 <sup>c</sup>	0.25±0.01 <sup>b</sup>
	CON	5	0.33±0.01	0.33±0.01	0.35±0.01	0.35±0.01	0.34±0.01	0.35±0.01

FX: fractured right fibula, CON: contralateral control. Values are expressed as mean±SEM.

abcdef Means with different superscripts are significantly different within the same row(p < 0.05).

Mean size: a > b > c > d > e > f.

\*p < 0.05 compared with control at each time points.

**골다공증성 골절의 치유과정 :**

Body weight : 실험을 시작할 때에는 229.0±7.5g이었으나 OFD는 난소적출후 7주에는 316.4±5.4g이었으며 골절유발후 3주 및 5주에는 각각 325.9±6.1과 324.8±5.5g로 변화하였다. OF는 난소적출후 7주에는 318.7±4.3g이었으며 골절유발후 3주 및 5주에는 각각 328.0±4.2와 329.0±3.5g로 변하여 실험기간동안 군간에 체중의 변화는 통계학적으로 유의성이 없었다.

Food intake : 실험을 시작할 때에는 13.5±0.3g이었으나 OFD는 난소적출후 7주에는 15.5±0.4g가 되었으며 골절유발후 3주 및 5주에는 각각 15.4±0.5와 15.7±0.5g로 변화하였으며 OF는 난소적출후 7주에는 15.0±0.3g가 되었으며 골절유발후 3주 및 5주에는 각각 15.8±0.5 및

15.8±0.3g로 변화하였다.

Water intake : 실험을 시작할 때에는 26.4±0.7ml이었으나 OFD는 난소적출후 7주에는 32.8±0.8ml가 되었으며, 골절유발후 3주 및 5주에는 각각 30.1±0.4 및 31.2±1.1ml로 변화였고 OF는 난소적출후 7주에는 31.6±0.7ml가 되었으며 골절유발후 3주 및 5주에는 각각 29.8±1.0 및 31.3±1.5ml로 변화하였다.

Calcium(Ca) : 실험을 시작할 때와 난소적출후 7주에는 각각 10.50±0.12와 11.18±0.19mg/dl이었으며 골절유발후 3주와 5주에 OFD는 각각 11.21±0.21과 11.32±0.22mg/dl로 변하여 실험을 시작할 때와 비교하여 증가하였으며(p < 0.05) OF는 11.27±0.21과 11.22±0.18mg/dl로 변하여 실험전 보다 높은 수치를 나타내었으나(p < 0.

**Table 3. Changes of body weight, food intake, water intake, Ca, P, ALP and Estradiol after osteoporotic fracture**

Item	Group	n	Baseline	Post-ovariectomy	Post-osteoporotic fracture	
				7 weeks	3 weeks	5 weeks
BW(g)	OFD	5	229.0±7.5 <sup>ab</sup>	316.4±5.4 <sup>a</sup>	325.9±6.1 <sup>a</sup>	324.8±5.5 <sup>a</sup>
	OF	5	229.0±7.5 <sup>b</sup>	318.7±4.3 <sup>a</sup>	328.0±4.2 <sup>a</sup>	329.0±3.5 <sup>a</sup>
FI(g)	OFD	5	13.5±0.3 <sup>b</sup>	15.5±0.4 <sup>a</sup>	15.4±0.5 <sup>a</sup>	15.7±0.5 <sup>a</sup>
	OF	5	13.5±0.3 <sup>b</sup>	15.0±0.3 <sup>a</sup>	15.8±0.5 <sup>a</sup>	15.8±0.3 <sup>a</sup>
WI(ml)	OFD	5	26.4±0.7 <sup>b</sup>	32.8±0.8 <sup>a</sup>	30.1±0.4 <sup>a</sup>	31.2±1.1 <sup>a</sup>
	OF	5	26.4±0.7 <sup>b</sup>	31.6±0.7 <sup>a</sup>	29.8±1.0 <sup>a</sup>	31.3±1.5 <sup>a</sup>
Ca(mg/dl)	OFD	5	10.50±0.12 <sup>b</sup>	11.18±0.19 <sup>a</sup>	11.21±0.21 <sup>a</sup>	11.32±0.22 <sup>a</sup>
	OF	5	10.50±0.12 <sup>b</sup>	11.18±0.19 <sup>a</sup>	11.27±0.21 <sup>a</sup>	11.22±0.18 <sup>a</sup>
P(mg/dl)	OFD	5	6.88±0.21 <sup>b</sup>	7.40±0.24 <sup>ab</sup>	7.54±0.21 <sup>ab</sup>	7.75±0.17 <sup>a</sup>
	OF	5	6.88±0.21	7.40±0.24	7.37±0.19	7.43±0.21
Ca/P Ratio	OFD	5	1.53±0.06	1.53±0.06	1.49±0.05	1.46±0.04
	OF	5	1.53±0.06	1.53±0.06	1.53±0.04	1.52±0.07
ALP (U/l)	OFD	5	142.8±10.0 <sup>b</sup>	326.0±8.4 <sup>a</sup>	353.0±14.4 <sup>a</sup>	311.4±19.5 <sup>a</sup>
	OF	5	142.8±10.0 <sup>b</sup>	326.0±8.4 <sup>a</sup>	349.2±14.5 <sup>a</sup>	302.8±15.4 <sup>a</sup>
Estradiol (pg/ml)	OFD	5	50.59±2.7 <sup>a</sup>	20.62±1.0 <sup>b</sup>	27.0±1.5 <sup>b</sup>	22.8±2.1 <sup>b</sup>
	OF	5	50.59±2.7 <sup>a</sup>	20.62±1.0 <sup>b</sup>	21.8±2.5 <sup>b</sup>	25.6±3.2 <sup>b</sup>

OFD : osteoporotic fracture + 1α,25 dihydroxycholecalciferol, OF : osteoporotic fracture, BW : body weight, FI : food intake, WI : water intake, Ca : calcium, P : phosphate, Ca/P Ratio : calcium/phosphate ratio, ALP : alkaline phosphatase.

Values are expressed as mean±SEM.

<sup>ab</sup> Means with different superscripts are significantly different within the same row(p < 0.05).

Mean size : a > b.

05) 군간에는 통계학적으로 유의성이 없었다.

Phosphate(P) : 실험을 시작할 때와 난소적출후 7주에는 각각  $6.88 \pm 0.21$ 과  $7.40 \pm 0.24 \text{mg/dl}$ 이었으며 골절유발후 3주와 5주에 OFD는 각각  $7.54 \pm 0.21$ 과  $7.75 \pm 0.17 \text{mg/dl}$ 로 변하여 점차적인 증가를 보였으며( $p < 0.05$ ) OF는  $7.37 \pm 0.19$ 과  $7.43 \pm 0.21 \text{mg/dl}$ 로 변하였다.

Alkaline phosphatase(ALP) : 실험을 시작할 때와 난소적출후 7주에는 각각  $142.8 \pm 10.0$ 과  $326.0 \pm 8.4 \text{U/l}$ 이었으며 골절유발후 3주와 5주에 OFD는 각각  $353.0 \pm 14.4$ 와  $311.4 \pm 19.5 \text{U/l}$ 로 변하였으며 OF는  $349.2 \pm 14.5$ 와  $302.8 \pm 15.4 \text{U/l}$ 로 변하여 실험을 시작할 때와 비교하여 유의성 있게 증가하였으나( $p < 0.05$ ) 군간에는 통계학적으로 유의성이 없었다.

Estradiol( $E_2$ ) : 실험을 시작할 때와 난소적출후 7주에는 각각  $50.59 \pm 2.7$ 과  $20.62 \pm 1.0 \text{pg/dl}$ 이었으며 골절유발후 3주와 5주에 OFD는 각각  $27.0 \pm 1.5$ 와  $22.8 \pm 2.1 \text{pg/dl}$ 로 변하였으며 OF는  $21.8 \pm 2.5$ 와  $25.6 \pm 3.2 \text{pg/dl}$ 로 변하여 실험을 시작할 때와 비교하여 유의성 있게 감소하였으나( $p < 0.05$ ) 군간에는 통계학적으로 유의성이 없었다.

방사선 촬영검사 : 골절유발후 3주에서 실험군은 골절선의 윤곽이 대조군에 비하여 불명확하였으나(Fig 2a) 대조군은 골절선의 윤곽이 뚜렷하며 가골조직의 두께가 두꺼웠다(Fig 2b). 5주에서 실험군은 골절선의 윤곽이 없으며 골절부위의 가골의 두께가 얇았으며(Fig 3a) 대조군은 골절선의 윤곽이 없지만 가골의 두께가 두꺼웠다

(Fig 3b).

Bending test : Maximum weight( $\times 10^2 \text{g}$ )는 실험을 시작할 때와 난소적출후 7주에는 각각  $8.47 \pm 0.25$ 와  $9.51 \pm 0.37$ 이었으나 골절유발후 3주와 5주에 정상상태의 왼쪽 비골은 각각  $8.90 \pm 0.19$  및  $8.86 \pm 0.18$ 로 변하여 실험을 시작할 때와 비슷한 수치를 보였다. OFD의 골절된 오른쪽 비골은 각각  $2.75 \pm 0.11$ 과  $5.80 \pm 0.15$ 로 변하여 정상상태의 비골의 30%와 65%를 나타내었으며( $p < 0.05$ ), OF의 골절된 오른쪽 비골은 각각  $1.93 \pm 0.08$ 과  $3.54 \pm 0.12$ 로 변하여 정상상태의 비골의 21%와 40%를 나타내어( $p < 0.05$ ) OFD는 OF 보다 유의성 있는 효과를 나타내었다. Bending strength( $\text{g/cm}^2$ )는 실험을 시작할 때와 난소적출후 7주에는 각각  $0.33 \pm 0.01$ 과  $0.35 \pm 0.02$ 이었으나 골절유발후 3주와 5주에 정상상태의 왼쪽 비골은 각각  $0.35 \pm 0.01$ 과  $0.34 \pm 0.01$ 로 변하였다. OFD의 골절된 오른쪽 비골은 각각  $0.11 \pm 0.01$ 과  $0.23 \pm 0.01$ 로 변하여 정상상태의 비골의 31%와 67%를 나타내었으며( $p < 0.05$ ), OF의 골절된 오른쪽 비골은 각각  $0.08 \pm 0.01$ 과  $0.14 \pm 0.01$ 로 변하여 정상상태의 비골의 22%와 41%를 나타내어( $p < 0.05$ ) OFD는 OF보다 유의성 있는 효과를 나타내었다 (Table 4).

## 고 찰

Meller *et al*<sup>28</sup>에 의하면 개에 골절을 유발했을 때 Ca은

Table 4. Bending test after osteoporotic fracture

Item	Group	n	Baseline	Post-ovariectomy		
				7 weeks	3 weeks	5 weeks
Maximum Weight ( $10^2 \text{g}$ )	CON	5	$8.47 \pm 0.25^a$	$9.51 \pm 0.37$	$8.90 \pm 0.19$	$8.86 \pm 0.18$
	OFD	5			$2.75 \pm 0.11^{*c}$	$5.80 \pm 0.15^{*b}$
	OF	5			$1.93 \pm 0.08^{*c}$	$3.54 \pm 0.12^{*c}$
Bending Strength ( $\text{g/cm}^2$ )	CON	5	$0.33 \pm 0.01^a$	$0.35 \pm 0.02$	$0.35 \pm 0.01$	$0.34 \pm 0.01$
	OFD	5			$0.11 \pm 0.01^{*c}$	$0.23 \pm 0.01^{*b}$
	OF	5			$0.08 \pm 0.01^{*c}$	$0.14 \pm 0.01^{*c}$

CON: contralateral control of osteoporotic fracture, OFD: osteoporotic fracture + 1 $\alpha$ , 25 dihydroxycholecalciferol. OF: osteoporotic fracture.

Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.

<sup>abc</sup> Means with different superscripts are significantly different within the same row( $p < 0.05$ ).

Mean size: a) b) c).

\* $p < 0.05$  compared with control at each time points.

<sup>⊗</sup>  $p < 0.05$  compared with OFD at each time points.

골절직후에는 크게 감소를 하였다가 시간이 지남에 따라 정상수준으로 회복이 되었으며 P는 골절직후에는 증가를 하였다가 시간이 지남에 따라 정상수준으로 회복이 되어 골절직후에는 Ca/P의 비율이 감소하였다가 시간이 경과함에 따라 정상수준으로 되돌아왔는데 이러한 결과는 사람이나 동물에서 골절 혹은 화상이나 연부조직의 수술과 같은 외상의 급성기에는 발견이 된다고 하였다. ALP는 조골세포에 의한 골형성을 활성화시키는 것으로 추정되며 가골형성에서 중요한 역할을 하는데 골절직후부터 증가하여 10일까지 유지가 되었으며 20일 후에는 정상수준으로 회복이 되었다. 랫트의 경골과 비골에 골절을 유발하고 시간대별로 Ca의 대사과정을 살펴봤을 때 골절후 1~2일은 Ca의 매일 섭취량이 두드러지게 감소하였다가 시간이 경과함에 따라 골절후 1주, 2주에는 정상상태의 수준으로 회복이 되었으며 이러한 현상은 골절직후에는 사료의 섭취량이 감소하는데 이에 따라 섭취되는 Ca의 양이 감소하는 것과 상관이 있는 것 같으며 혈중의 Ca의 수치에는 주요한 변화가 없었다고 하였다<sup>29</sup>.

본 실험에서도 랫트의 비골에 골절을 유발하였을 때 골절후 2일까지는 체중, 사료섭취량 및 음수량이 감소하였으며 그 이후로는 정상적인 성장에 따른 체중의 증가를 보였으나 사료섭취와 음수량에 있어서 큰 변화는 없었다. Ca과 P의 변화를 살펴보면 시간이 경과함에 따라 Ca은 정상수준으로 증가를 하였으며 P는 점점 감소하는 추세였으나 시간대별로 유의성이 없는 변화였으며 ALP는 골절후 2주까지는 크게 상승하였다가 서서히 정상수준으로 회복이 되어 Meller *et al*<sup>28</sup>과 유사한 치유경향을 보였다.

Hiltunen *et al*<sup>30</sup>에 의하면 마우스 경골의 골절의 치유과정에서 골절편은 골절후 4주에 방사선학적으로 외부가골에 의하여 유합이 이루어졌으며 방사선학적으로 가골의 크기, 가골의 횡단면적, 가골의 양은 골절후 2주에 최고에 도달한 후 점점 감소하였는데 본 실험에서도 골절후 방사선촬영 결과에 의하면 2주에서 가골의 크기가 최대가 되었으며 그 이후로 점점 감소하여 5주에서는 정상골과 거의 같은 두께로 감소가 되었으며 3주에서는 가골에 의하여 유합이 일어나 골절선의 윤곽이 불분명하여 Hiltunen *et al*<sup>30</sup>과 유사한 치유과정을 나타내었다.

Hiltunen *et al*<sup>30</sup>에 의하면 마우스 경골골절의 치유과정에서 골절편의 최대굴곡하중은 시간이 경과함에 따라

증가하여 골절후 4주에는 정상적인 경골의 74%에 이르렀으나 본 실험에서는 골절편의 bending test를 실시하여 maximum weight와 bending strength를 살펴본 결과 골절후 5주에 각각 정상적인 비골의 76%와 75%를 나타내어 경골에 비해서 치유과정이 다소 느린 경향이였다. Aro와 Chao<sup>31</sup>에 의하면 골절치유의 기계적 환경을 결정하는 주요한 인자들은 선택된 고정장치의 견고함, 골절의 형태, 골절정복의 정확성, 기능적 활동과 골절편 공간의 하중에 의하여 골절단의 끝에 발생하는 스트레스의 양과 종류라고 하였는데 본 실험결과 비골의 치유과정이 경골의 치유과정에 비하여 다소 느린 경향을 보이는 것은 경골은 비골에 비하여 신체를 지지하는 역할이 크지만 비골은 해부학적인 이유로 인하여 골절후 골절편에 체중이 실리거나 어떤 기계적인 자극이 적기 때문에 골절치유를 촉진하는 자극요인의 부족으로 골의 형성이 적은 것에 기인하는 것으로 사료된다.

White *et al*<sup>32</sup>은 torque-angle 곡선과 방사선학적 소견을 근거로 하여 토끼의 경골 골절치유를 4개의 생역학적 단계로 정의하였는데 다음과 같다. 1단계는 골절이 낮은 강도를 지니고 원래의 골절부위를 통하여 일어나며 2단계는 골절이 높은 강도를 지니고, 원래의 골절부위를 통하여 일어난다. 3단계는 골절이 높은 강도를 지니고, 일부는 원래의 골절부위, 일부는 본래대로의 골을 통하여 일어나며 4단계는 골절이 높은 강도를 지니고 전적으로 본래대로의 골을 통하여 일어난다고 하였다.

본 실험에서도 시간이 경과함에 따라 골절편이 부러지는 양상도 변하여 골절후 2주까지는 1단계, 3주에서는 2단계, 4주와 5주에서는 각각 3단계와 4단계의 양상을 보이는 골절이 일어났는데 이러한 결과는 다른 연구자들<sup>30, 32</sup>과 유사한 치유경과를 보이고 있는 것으로 사료된다.

이상의 결과를 살펴볼 때 랫트의 비골 골절은 골절후 5주에 완전히 유합이 이루어진 것으로 사료된다.

골다공증에 이환되면 골량의 감소로 인하여 외부의 충격에 의하여 쉽게 골절이 일어나며 이러한 골절의 치유는 특수한 창상치유 반응의 형태로 골의 재생에 의해서 골격을 본래의 모습으로 복구시킨다. 골절치유의 촉진을 위한 생물학적 촉진방법이나 생물 물리학적 촉진 방법으로 골편의 이식, 전기자극, 초음파자극 등 여러가지 방법들과<sup>33</sup> anabolic steroids, estrogen, vitamin D 등 약물이 이용되고 있다<sup>34</sup>. Vitamin D는 장에서 칼슘과 인의 흡수를 촉진하고 신장의 원위세뇨관에서 칼슘의 재흡수

를 증가시키며 부갑상선 호르몬의 매개에 의한 골흡수를 억제함으로써 골절의 치유를 촉진시키며 골다공증 환자에 있어서는 골량의 감소를 억제하고 골절의 예방 치유효과를 나타낸다<sup>21,22</sup>.

Vitamin D는 골량의 감소를 억제하거나<sup>35-37</sup> 골절의 빈도를 감소시켜서<sup>35,38</sup> 골다공증의 치료 예방효과를 보인 반면에 골량의 감소와 골절의 빈도가 증가되거나 골절 치유 효과가 없었다는 보고<sup>25,39</sup>도 있어서 vitamin D의 골다공증 치료효과는 단정을 짓기가 어렵다.

Vitamin D는 건강한 guinea pig<sup>40</sup>, 토끼<sup>41</sup>, 닭<sup>42</sup>, 랫트<sup>43,44</sup>의 골절의 치유를 촉진시켰으며 Vukicevic *et al*<sup>45</sup>과 Haneji *et al*<sup>46</sup>에 의하면 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol은 alkaline phosphatase의 활성을 증가시켜 새로운 골형성에 영향을 미친다고 하였으나 Ramp와 Baker<sup>47</sup>는 오히려 감소시킨다고 하였다.

Malluche *et al*<sup>48</sup>에 의하면 개의 ovariohysterectomy를 실시한 후 1 $\alpha$ , 25 dihydroxycholecalciferol을 투여한 실험군과 대조군의 체중의 변화를 살펴본 결과 모든 군에서 유의성 있는 체중의 증가가 일어났으나 그룹간에는 유의성 있는 변화가 없었다고 하였다. 본 실험에서도 랫트의 양측 난소를 적출하고 7주가 지난 후 비골의 골절을 유발하고 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol을 투여한 실험군(OFD)과 대조군(OF)의 체중의 변화를 살펴보면 실험을 시작할 때와 비교했을 때에는 모두 유의성 있게 체중이 증가를 하였으나( $p < 0.05$ ) 구간에는 변화의 유의성이 없어서 Malluche *et al*<sup>48</sup>과 유사한 경향을 보이고 있다.

폐경후 여성에 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol을 투여하였을 때 Martinez *et al*<sup>49</sup>과 Gallagher *et al*<sup>24</sup>에 의하면 혈청의 Ca, P 및 ALP의 변화는 없었으며 Christiansen *et al*<sup>50</sup>은 P와 ALP는 변화가 없었으나 Ca는 적지만 유의성 있게 증가되었다고 하였다. 또한 Malluche *et al*<sup>48</sup>에 의하면 ovariohysterectomy를 실시한 개에 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol을 투여하였을 때 혈청의 Ca와 P의 변화는 없었으며 Ca/P ratio의 변화도 없었다.

본 실험에서 골다공증성 골절유발후 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol을 투여하였을 때 혈청의 Ca, P 및 ALP와 Ca/P의 비율의 변화가 없었으며 이러한 결과는 선인들의 연구보고<sup>48,49</sup>와 유사한 경향을 보이는 것으로 사료된다.

Walsh *et al*<sup>51</sup>과 Hill *et al*<sup>52</sup>에 의하면 난소적출후 6주에 골다공증을 유발한 실험군과 정상대조군의 골절 치유과정에서 bending test와 torsion test를 실시한 결과 골

다공증은 골절의 치유를 지연시키며 이것은 조직형태학적 소견에 의해서도 확증되었다.

본 실험에서도 12주령 랫트의 난소적출후 7주에 비골의 골절을 유발한 후 3주와 5주에 bending test를 실시했을 때 정상상태의 골절에 비해서 시간적으로 약 1주일 이상 뒤지는 상당히 낮은 bending test 결과를 나타내어 Walsh *et al*<sup>51</sup>과 Hill *et al*<sup>52</sup>과 유사한 경향을 보였으나 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol을 투여한 실험군의 bending test 결과는 정상상태의 골절의 치유경과와 거의 유사한 소견을 나타내어서 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol은 골다공증으로 인해 지연된 골절의 치유를 촉진하였으며 이것은 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol은 alkaline phosphatase의 활성을 증가시켜 조골세포에 의한 새로운 골형성에 영향을 미쳤다는 다른 연구자<sup>45</sup>와 비슷한 결과를 나타내어 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol은 골다공증으로 인하여 지연된 골절의 치료제로서 효과가 있는 것으로 사료된다.

## 결 론

12주령 랫트의 정상 비골골절의 치유과정을 이해하고, 난소적출후 비골의 골다공증성 골절의 치유과정과 난소적출후 비골의 골다공증성 골절의 치유에 미치는 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol의 영향을 알아보고, 골다공증성 골절치료제로서의 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol의 유용성을 확인하고자 실험을 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

비골의 골절 치유과정에서 체중은 성장에 따른 점진적인 증가를 보였으나 사료섭취량과 음수량은 변화가 없었다. Ca와 P의 변화는 유의성이 없었으나 ALP는 골절 초기에는 유의성 있게 증가하였다가 골절이 치유됨에 따라 원래 수준으로 회복이 되었다( $p < 0.05$ ). 비골의 골절은 골절유발후 5주에 방사선학적으로 완전한 유합을 이루었으며 bending strength는 정상 비골의 75%에 이르렀다( $p < 0.01$ ).

난소적출후 골절의 치유는 정상골절의 치유보다 지연되었다. 난소적출후 골절의 치유과정에서 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol 투여는 체중, 사료섭취량, 음수량, 혈청의 Ca, P 및 ALP의 변화에 영향이 없었다. 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol 투여결과 골절유발후 5주에 bending strength는 정상 비골의 67%에 이르러 정상상태의 골절



과 비슷하게 치유가 되었다.

이상의 결과를 종합해보면 랫트의 난소를 적출하여 여성호르몬의 결핍을 유발하면 난소적출후 5주부터 시작하여 7주에는 골다공증이 발생되고 골다공증은 정상상태의 골절에 비하여 약 1주일 이상 골절의 치유를 지

연시켰으며  $1\alpha,25$  dihydroxycholecalciferol을 투여하였을 경우 정상상태의 골절치유와 비슷한 경과를 나타내어  $1\alpha,25$  dihydroxycholecalciferol은 골다공증성 골절의 치료에 있어서 효과적인 치료제라는 결론을 내릴 수 있었다.

## Legends for figures

- Fig 1.** Lateral radiographs of rat fibula ; 0 week(a), 1 week(b), 2 weeks(c), 3 weeks(d), 4 weeks(e), and 5 weeks(f) after fracture. The fracture site is marked on fig. a. Fracture line is seen up to 2 weeks(arrowhead in b and c). Thickened callus is present up to 5 weeks(short arrows in d, e, and f).
- Fig 2.** Lateral radiographs of fibula of rat administered  $1\alpha,25$  dihydroxycholecalciferol(a) and control(b) 3 weeks after osteoporotic fracture. The fracture line is still apparent after 3 weeks(arrows).
- Fig 3.** Lateral radiographs of fibula of rat administered  $1\alpha,25$  dihydroxycholecalciferol(a) and control(b) 5 weeks after osteoporotic fracture. The fracture line is not seen, however, the width of visible callus is thinner after  $1\alpha,25$  dihydroxycholecalciferol treatment.

## 참 고 문 헌

1. Lane JM, Nydick M. Osteoporosis : current modes of prevention and treatment. *J Am Acad Orthop Surg*, 7(1):19-31, 1999.
2. Kesson K, Lau KHW, Baylink DJ. Rationale for active vitamin D analog therapy in senile osteoporosis. *Calcif Tissue Int*, 60(1):100-105, 1997.
3. Gennari C, Martini G, Nuti R. Secondary osteoporosis. *Aging(Milano)*, 10(3):214-224, 1998.
4. Miller MA, Chin J, Miller SC, Fox J. Disparate effects of mild, moderate, and severe secondary hyperparathyroidism on cancellous and cortical bone in rats with chronic renal insufficiency. *Bone*, 23(3):257-266, 1998.
5. Di Somma C, Colao A, Pivonello R, et al. Effectiveness of chronic treatment with alendronate in the osteoporosis of Cushing's disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 48(5):655-656, 1998.
6. Kumeda Y, Inaba M, Nishizawa Y. Secondary osteoporosis and its treatment-diabetes mellitus. *Nippon Rinsho*, 56(6):1579-1586, 1998.
7. Browner WS, Malinow MR. Homocyst(e)inaemia and bone density in elderly women. *Lancet*, 338(8780):1470, 1991.
8. Anderson JK. Marfan's syndrome. *Crit Care Nurse*, 11(4):69-72, 1991.
9. Robinson RJ, Iqbal SJ, Al-Azzawi F, Abrams K, Mayberry JF. Sex hormone status and bone metabolism in men with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 12(1):21-25, 1998.
10. Treves R, Louer V, Bonnet C, et al. Male osteoporosis. *Presse Med*, 27(32):1647-1651, 1998.
11. Nelson-Piercy C. Heparin-induced osteoporosis. *Scand J Rheumatol*, Suppl 107:68-71, 1998.
12. Masiukiewicz US, Insogna KL. The role of parathyroid hormone in the pathogenesis, prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Aging (Milano)*, 10(3):232-239, 1998.
13. Gough A, Sambrook P, Devlin J, et al. Osteoclastic activation is the principal mechanism leading to secondary osteoporosis in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 25(7):1282-1289, 1998.
14. Ohta H, Masuzawa T, Ikeda T, et al. Which is more osteoporosis-inducing, menopause or oophorectomy? *Bone Miner*, 19:273-285, 1992.
15. Nordin BE, Need AG, Steurer T, et al. Nutrition, osteoporosis, and aging. *Ann NY Acad Sci*, 854:336-351,

- 1998.
16. Lindgren U, DeLuca HF. Role of parathyroid hormone and 1.25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in the development of osteopenia in oophorectomized rats. *Calcif Tissue Int*, 34(5):501-504, 1982.
  17. Keen RW, Woodford-Richens KL, Lanchbury JS, et al. Allelic variation at the interleukin-1 receptor antagonist gene is associated with early postmenopausal bone loss at the spine. *Bone*, 23(4):367-371, 1998.
  18. Rosen CJ, Donahue LR. Insulin-like growth factors and bone: the osteoporosis connection revisited. *Proc Soc Exp Biol Med*, 219(1):1-7, 1998.
  19. Brunelli MP, Einhorn TA. Medical management of osteoporosis: fracture prevention. *Clin Orthop Rel Res*, 348:15-21, 1998.
  20. Kruger MC, Coetzer H, de Winter R, et al. Calcium, gamma-linolenic acid and eicosapentaenoic acid supplementation in senile osteoporosis. *Aging(Milano)*, 10(5):385-394, 1998.
  21. Holick MF. Vitamin D and bone health. *J Nutr*, 126 (4Suppl):1159S-1164S, 1996.
  22. Brandi ML. New treatment strategies: ipriflavone, strontium, vitamin D metabolites and analogs. *Am J Med*, 95 (suppl 5A):69S-74S, 1993.
  23. Gallagher JC, Riggs BL. Calcitriol for postmenopausal osteoporosis. *Ann Intern Med*, 111(7):621, 1989.
  24. Gallagher JC, Jerpbak CM, Jee WSS, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: short- and long-term effects on bone and calcium metabolism in patients with postmenopausal osteoporosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79(10):3325-3329, 1982.
  25. Falch JA, degaard OR, Finnanger AM, et al. Postmenopausal osteoporosis: no effect of three years treatment with 1,25-dihydroxycholecalciferol. *Acta Med Scand*, 221(2):199-204, 1987.
  26. Lindgren JU, DeLuca HF, Mazess RB. Effects of 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on bone tissue in the rabbit: studies on fracture healing, disuse osteoporosis, and prednisone osteoporosis. *Calcif Tissue Int*, 36:591-595, 1984.
  27. Lindgren JU, Narechania RG, Mcbeath AA, Lange TA, DeLuca HF. Effects of 1.25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and calcitonin on fracture healing in adult rats, *Clin Orthop Rel Res*, 160:304-308, 1981.
  28. Meller Y, Kestenbaum RS, Mozes M, Mozes G, Yagil R, Shany S. Mineral and endocrine metabolism during fracture healing in dogs. *Clin Orthop Rel Res*, 187: 289-295, 1984.
  29. Lemaire RG. Calcium metabolism in fracture healing. An experimental kinetic study in rats, using Ca<sup>45</sup>. *J Bone Joint Surg*, 48-A(6):1156-1170, 1966.
  30. Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT. A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res*, 11(2):305-312, 1993.
  31. Aro HT, Chao EY. Bone-healing patterns affected by loading, fracture fragment stability, fracture type, and fracture site compression. *Clin Orthop*, 293:8-17, 1993.
  32. White AA, Panjabi MM, Southwick WO. The four biomechanical stages of fracture repair. *J Bone Joint Surg*, 59-A(2):188-192, 1977.
  33. Einhorn TA. Current concepts review enhancement of fracture healing. *J Bone Joint Surg*, 77-A(6):940-956, 1995.
  34. Reginster JY. Miscellaneous and experimental agents. *Am J Med Sci*, 313(1):33-40, 1997.
  35. O'Brien KO. Combined calcium and vitamin D supplementation reduces bone loss and fracture incidence in older men and women. *Nutr Rev*, 56(5 Pt 1):148-150, 1998.
  36. Erben RG, Bromm S, Stangassinger M. Therapeutic efficacy of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and calcium in osteopenic ovariectomized rats: evidence for a direct anabolic effects of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on bone. *Endocrinology*, 139(10):4319-4328, 1998.
  37. Shiraki M, Ito H, Orimo H. The effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on bone mineral content in senile osteoporosis-A dose finding study. *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi*, 65(11): 1253-1263, 1989.
  38. Gallagher JC, Riggs BL. Action of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on calcium balance and bone turnover and its effect on vertebral fracture rate. *Metabolism*, 39(4 Suppl 1):30-34, 1990.
  39. Jensen GF, Meinecke B, Boesen J, et al. Does 1,

- 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> accelerate spinal bone loss? A controlled therapeutic trial in 70-year-old women. *Clin Orthop*, 192:215-221, 1985.
40. Ömeroglu S, Erdogan D, Ömeroglu H. Effects of single high-dose vitamin D<sub>3</sub> on fracture healing. An ultrastructural study in healthy guinea pigs. *Arch Orthop Trauma Surg*, 116:37-40, 1997.
  41. Ömeroglu H, Ates Y, Akkus O, et al. Biomechanical analysis of the effects of single high-dose vitamin D<sub>3</sub> on fracture healing in a healthy rabbit model. *Arch Orthop Trauma Surg*, 116(5):271-274, 1997.
  42. Brumbaugh PF, Speer DP, Pitt MJ. 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. A metabolite of vitamin D that promotes bone repair. *Am J Pathol*, 106(2): 171-179, 1982.
  43. Blahos J, Babicky A, Porsova I, Kolar J. Effects of 1, 25 dihydroxycholecalciferol on fracture healing and on general posttraumatic skeletal response in rats. *Endocrinol Exp*, 23:287-294, 1989.
  44. Andreen O, Larsson SE. Effects of 1,25-dihydroxycholecalciferol on fracture healing. Calcium, phosphate, and zinc in callus and serum. *Arch Orthop Trauma Surg*, 103:257-262, 1984.
  45. Vukicevic S, Stavljenic A, Bagi C, et al. 1 $\alpha$ ,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> stimulates alkaline phosphatase activity and inhibits soft-tissue proliferation in implants of bone matrix. *Clin Orthop*, 196:285-291, 1985.
  46. Haneji T, Kurihara N, Ikeda K, et al. 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> induce alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells derived from newborn mouse calvaria. *J Biochem (Tokyo)*, 94(4):1127-1132, 1983.
  47. Ramp WK, Baker RL. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> decreased alkaline phosphatase activity in cultures of embryonic chick tibiae. *Proc Soc Exp Biol Med*, 178(3): 437-442, 1985.
  48. Malluche HH, Faugere MC, Friedler RM, Fanti P. 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> corrects bone loss but suppresses bone remodeling in ovariectomized beagle dogs. *Endocrinology*, 122(5):1998-2006, 1988.
  49. Martinez J, Olmos JM, Amado JA, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptors in peripheral blood mononuclear cells from patients with postmenopausal osteoporosis. *Bone Miner*, 23(3): 207-212, 1993.
  50. Christiansen C, Christiansen MS, Rødbro P, et al. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in itself or combined with hormone treatment in preventing postmenopausal osteoporosis. *Eur J Clin Invest*, 11(4): 305-309, 1981.
  51. Walsh WR, Sherman P, Howlett CR, et al. Fracture healing in a rat osteopenia model. *Clin Orthop Rel Res*, 342:218-227, 1997.
  52. Hill EL, Kraus K, Lapierre KP, et al. Ovariectomy impairs fracture healing after 21 days. *Trans Orthop Res Soc*, 20:230, 1995.