

난소절제 쥐에서 칼슘섭취수준에 따른 망간의 보충이 골격상태 및 칼슘평형에 미치는 영향*

배윤정¹⁾ · 손은화²⁾ · 김병철³⁾ · 서동완⁴⁾ · 김미현^{5)§}

숙명여자대학교 식품영양학과,¹⁾ 강원대학교 생약자원개발학과,²⁾ 강원대학교 생화학과,³⁾ 강원대학교 분자생명과학과,⁴⁾ 강원대학교 식품영양학과⁵⁾

The Effects of Manganese Supplementation on Bone Status and Calcium Balance in Ovariectomized Rats according to the Calcium Intake Levels *

Bae, Yun-Jung¹⁾ · Sohn, Eun-Wha²⁾ · Kim, Byung-Chul³⁾ · Seo, Dong-Wan⁴⁾ · Kim, Mi-Hyun^{5)§}

Department of Food and Nutrition,¹⁾ Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea
Department of Herbal Medicine Resource,²⁾ Kangwon National University, Samcheok 245-711, Korea
Department of Biochemistry,³⁾ Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
Department of Molecular Bioscience,⁴⁾ Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
Department of Food and Nutrition,⁵⁾ Kangwon National University, Samcheok 245-711, Korea

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the effect of manganese (Mn) supplementation on bone status and calcium balance in ovariectomized rats according to the calcium intake levels. Total of 50 Sprague Dawley female rats (6 weeks) were divided into 5 groups and bred for 12 weeks: sham operated control group (SACa), OVX Ca deficiency group (OLCa) with Ca deficiency diet (0.1% Ca modified AIN-93N diet), OVX Ca deficiency & Mn supplement group (OLCaMn), OVX adequate Ca group (OACa; 0.5% Ca AIN-93N diet) and OVX adequate Ca & Mn supplement group (OACaMn). BMD (bone mineral density) of the femur was increased by Mn supplementation in OVX adequate Ca group. However, BMDs of spine, femur and tibia were lowered in OLCa compared to the OLCaMn group. Bone strength of tibia in OLCaMn group was significantly lower than OLCa group. Serum ALP (alkaline phosphatase) and CTx (C-telopeptide of collagen cross-links) levels were significantly higher in ovariectomized rats than those in the sham group, but they were not changed by Mn supplementation. Ca retention rate and Ca absorption rate did not differ among the experimental groups. Urinary Ca excretion was increased by Mn supplementation in Ca deficiency rats. In summary, Mn supplementation resulted in positive effects on bone mineral density ovariectomized rats with which intake adequate Ca. However, Mn supplementation on Ca deficiency ovariectomized rats resulted in decrement of BMD and bone strength by increasing Ca excretion. Therefore, it is encouraged to consider calcium intake levels in supplementation of manganese in order to prevent postmenopausal osteoporosis and to keep bone healthy. (Korean J Nutr 2008; 41(3): 206~215)

KEY WORDS : manganese supplementation, bone mineral density, bone strength, calcium balance, ovariectomy.

서론

노령 인구의 증가는 전세계적인 현상이며, 65세 이상 노

인 중 남성의 비율이 39.8%인데 비해 여성 노인의 비율은 60.2%로 두배 가량 더 높아, 여성 노인의 삶과 건강에 대한 관심이 증가되고 있다.¹⁾ 여성의 경우 특히 50세를 전후로 폐경을 경험하게 되면서 골다공증, 심혈관계질환, 당뇨병 등 다양한 만성질환에 노출되는 비율이 증가된다.²⁾ 이중 조골세포와 파골세포의 불균형으로 인해 뼈의 양이 줄어들어 경미한 충격에도 골절이 생기기 쉬운 골다공증 및 그에 따른 합병증으로 빈번하게 초래되는 골절 등이 삶의 질 저하는 물론 사회경제적인 문제를 야기시킬 수 있다.^{3,4)}

접수일 : 2008년 2월 26일

채택일 : 2008년 4월 17일

*This work was supported by Inter-Campus Research Funds from Kangwon National University (2006).

§To whom correspondence should be addressed.

E-mail : mhkim1129@kangwon.ac.kr

따라서 골다공증의 예방과 치료에 대한 올바른 영양관리의 필요성이 요구되고 있다.

뼈는 무기질 염을 상당량 함유하고 있는 결체조직으로, 주요성분인 칼슘과 인, 마그네슘 이외에도 불소, 아연, 구리, 망간, 철, 보론 등과 같은 다양한 미량 영양소들이 골대사에 관여한다.^{5,6)} 골격건강을 위한 무기성분으로는 칼슘이 중요하나, 현재까지 보고된 국민건강영양조사 보고서에 의하면 칼슘의 섭취는 지속적으로 부족한 것으로 나타나고 있다.⁷⁾ 또한 칼슘 급원식품이 우유 및 유제품과 뼈째 먹는 생선 등으로 매우 제한적이고, 2005년 국민건강영양조사 보고서에 의하면 그 섭취량이 폐경 이후인 50~64세와 65세 이상 여성에서 각각 권장 섭취량의 67.2%와 57.1%로 나타나 폐경으로 인한 호르몬 결핍과 함께 골격건강을 더욱 위협하는 생활요인으로 지적된다.⁷⁾ 그러나 골다공증의 예방을 위하여 칼슘의 영양만을 강조하는 것은 한계점을 지니고 있어 골격 건강을 위해 칼슘을 보완할 수 있는 영양소의 발굴과 작용기전의 규명이 필요하다.

Strause 등⁸⁾은 폐경기 여성을 대상으로 한 실험에서 칼슘 단독 보충군보다 칼슘과 망간, 아연, 구리를 조합하여 보충한 군에서 위약군에 비하여 유의적으로 골감소가 줄어들었다고 보고함으로써, 골격건강에 있어 칼슘의 역할을 보완한 미량영양소 보충의 중요성을 제시하였다. 그 중 망간은 골격 형성과 아미노산, 콜레스테롤 및 탄수화물 대사에 관여함으로써 인체의 성장과 발달에 필수적인 영양소로 알려져 있다.⁹⁾ 또한 망간은 식품 중 견과류, 채소, 과일 및 해조류 등에 많이 함유되어 있는데, 이는 식물성 식품의 섭취가 높은 우리나라 식생활에서 섭취가 용이한 무기질 영양소임을 의미한다.

동물에 있어서 망간 결핍시 성장이 지연되고 생식기능 저하, 당불내증을 비롯하여 탄수화물 및 지질대사의 변화를 초래하며 특히 골격발달을 저해하는 것으로 알려져 있고, 골다공증 환자의 경우 혈액 내 망간 농도가 감소하며 보충제로 칼슘과 망간을 함께 투여했을 때 골밀도가 개선되었다는 보고가 있다.¹⁰⁾ 또한 Rico 등¹¹⁾이 난소절제 쥐에게 망간을 보충시킨 결과 비보충군에 비하여 골밀도가 유의적으로 높아졌다고 보고하여 망간이 골대사에 긍정적인 역할을 할 수 있음이 제시되었다. 그러나 이와 관련된 후속 연구가 이루어지지 않음으로써 아직까지 망간이 골격에 미치는 영향이 규명되지 못하고 있다. 이에 본 연구에서는 칼슘의 섭취가 부족한 우리나라의 식생활을 고려하여 난소절제된 쥐에서 칼슘의 섭취수준에 따른 망간의 보충여부가 골밀도를 포함한 골격상태 및 칼슘 평형에 미치는 효과에 대해 알아보고자 난소절제 쥐를 이용하여 칼슘섭취 수준

(결핍과 적정)을 달리하여 망간 보충 식이를 12주간 공급한 후, 골밀도, 골무기질 함량, 골면적, 골격크기 등의 골격상태와 칼슘 평형 및 골대사지표를 살펴보았다.

연구방법

실험동물 및 식이

실험동물은 6주령의 Sprague Dawley종 암컷 흰쥐 (오리엔탈, 경기)를 이용하였으며, 50마리의 실험동물을 임의 배치법으로 10마리씩 5군으로 나누었다. 각군별 체중에 따라 난괴법에 의해 4군은 난소절제 수술을 한 후 칼슘결핍식이 (OLCa: 난소절제저칼슘군), 칼슘적정식이 (OACa: 난소절제적정칼슘군), 칼슘 결핍과 망간 보충식이 (OL CaMn: 난소절제저칼슘망간보충군), 칼슘 적정과 망간 보충 (OACaMn: 난소절제적정칼슘망간보충군)의 실험식이로, 나머지 1군은 대조군으로서 sham-operation (비절제군)을 실시한 후 적정식이로 12주간 사육하였다.

실험식이와 탈이온수는 자유급식방법으로 급여하였다. 사육 및 실험에 사용한 모든 기구들은 무기질의 오염을 방지하기 위하여 EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) 용액에, 초자기구일 경우에는 질산원액에 24시간 이상 담갔다가 탈이온수로 3번 이상 세척하고 건조기에서 습기를 제거한 다음 사용하였다. 사육실의 환경은 온도 $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $60 \pm 5\%$ 로 유지하였고, 명암은 12시간 주기로 조절하였다. 실험식이는 정제식이로서 조성은 AIN-93¹²⁾을 참고로 하였으며, 배합구성은 Table 1과 같다. 실험식이 조성 중 무기질과 비타민은 전체 식이 성분 중 3.5%와 1%가 되도록 하였으며, 실험식이 조성 중 칼슘은 저 (0.1%)와 적정 (0.5%)의 2수준, 망간은 적정 (0.001%), 고 (0.01%)의 2수준으로 하였다. 무기질은 저칼슘식이인 경우 칼슘을 제외한 무기질 mixture에 칼슘 급원으로 calcium carbonate (CaCO₃; Dyets Co., USA)를 혼합하여 사용하였고, 적정칼슘식이인 경우 칼슘이 혼합된 무기질 mixture를 사용하였다. 망간 보충시 무기질 mixture에 MnCO₃ (Dyets Co., USA)를 급원으로 추가하여 사용하였으며, 보충량은 Rico 등의 연구¹¹⁾에서 120 mg/kg feed로 망간의 섭취를 증가시켰을 때 골밀도의 증가 효과를 보인 결과를 고려하여 결정하였다.

실험동물의 사육 및 시료 채취

식이 섭취량과 체중은 매주 1회 일정 시각에 측정하였다. 대변과 소변을 채취하기 위하여 실험 11주에 대사장 (metabolic cage)에 옮겨 1일간의 적응기를 거친 후 24시간 동

Table 1. Formulation of experimental diets (g/kg diet)

Experimental group	LCa ¹⁾	LCaMn	ACa	ACaMn
Corn starch	465.692	465.692	465.692	465.692
Casein	140	140	140	140
Dextrinized cornstarch	155	155	155	155
Sucrose	97.51	97.312	100	99.802
Soybean oil ²⁾	40	40	40	40
Fiber	50	50	50	50
Mineral mixture	-	-	35	35
Mineral mixture (Ca free)	35	35	-	-
Vitamin mixture	10.000	10.000	10.000	10.000
L-Cystine	1.800	1.800	1.800	1.800
Choline bitartrate	2.500	2.500	2.500	2.500
Tert-butylhydroquinone	0.008	0.008	0.008	0.008
Calcium carbonate	2.490	2.490	-	-
Manganous carbonate	-	0.198	-	0.198

1) LCa: low Ca · adequate Mn diet; 0.1% Ca, 0.001% Mn, LC-AMn: low Ca · supplement Mn diet; 0.1% Ca, 0.01% Mn, ACa: adequate Ca · adequate Mn diet; 0.5% Ca, 0.001% Mn, ACa-Mn: adequate Ca · supplement Mn diet; 0.5% Ca, 0.01% Mn

2) Butylated hydroxytoluene as antioxidant was added 0.0125%/kg diet

안 대변과 소변을 각각 수집하였다. 그리고 12주간의 사육 종료 후 12시간을 절식시키고 ethyl ether로 마취시킨 후 복대동맥에서 혈액을 채취하여 1시간 정도 방치한 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리시켜 혈청을 얻어 분석시까지 -70°C에서 냉동보관하였다. 또한 요추 (spine)와 오른쪽 대퇴부 (femur) 및 경골 (tibia)을 채취하여 생리식염수로 씻어낸 후 -20°C에서 냉동보관하였다.

시료의 분석

골밀도, 골무기질 함량 및 골면적을 측정하기 위해 오른쪽 대퇴부, 경골 및 요추 (2~5번) 부위를 사용하였다. 먼저 85°C 수조에서 잠시 방치시켜 골격의 연조직을 제거하였으며,¹¹⁾ DEXA (dual energy x-ray absorptiometry) 법을 이용하여 동물전용골밀도 측정기 (PIXImus 2.0, LUNAR, USA)로 요추, 대퇴부, 경골의 골밀도, 골무기질 함량 및 골면적을 측정하였다. 골밀도, 골무기질 함량 및 골면적 측정의 CV (coefficients of variation)는 15마리의 요추, 대퇴부 및 경골을 2~3일 간격으로 3번 측정한 결과 각각 0.10%, 0.05%, 0.10%로 나타났다. 골격 강도는 직경 3 mm의 탐침이 부착된 Universal testing machine (CR-100D, Sun Scientific Co., Japan)을 이용하여 three-point bending 방법으로 측정하였다.

대퇴부와 경골의 길이 (length), 넓이 (width) 및 깊이 (depth)는 버니어 캘리퍼 (Vernier caliper, Mitutoyo, Ja-

pan)를 이용하여 0.01 mm 수준까지 측정하였다. 길이는 골격 head 부분 중앙의 정점과 말단 부분 끝 등근 돌기의 정점까지 측정하였으며, 넓이와 깊이로는 골간의 중심 부분에서 중외측 (mediolateral)과 전후방향 (anteroposterior)을 측정하였다.¹³⁾

혈청 알칼라인 포스파타아제 (alkaline phosphatase; ALP)는 알칼라인 포스파타아제 측정용 kit (Boeringer Mannheim, Germany)를 사용하여 자동생화학분석기 (HITACHI 747, Japan)로 분석하였다. 혈청 중 CTx (C-telopeptide of collagen cross-links)는 rat 전용 CTx 측정용 kit (Nordic Bioscience Diagnostics, Denmark)를 이용하였으며, 혈청 OPG (osteoprotegerin)도 rat 전용 osteoprotegerin ELISA kit (Biomedica, Germany)를 사용하여 ELISA (Sunrise, Ecan, Australia)로 분석하였다. 혈청 칼슘은 칼슘이 OCPC (O-Cresolphthalein complexone)와 알칼리 용액에서 보라색의 화합물이 형성하는 원리를 기본으로 kit (Daiichi pure chemicals, Tokyo, Japan)를 이용하여 자동생화학분석기 (HITACHI 747, Japan)로 측정하였다.

대변과 소변은 Microwave digestion system (Ethos touch control, Milestone Inc., Italy)으로 분해하여 검액을 만든 후, ICP (Vista-PRO, Varian, Australia)를 이용하여 칼슘의 정량분석을 실시하였다. 칼슘의 보유량과 보유율, 소화율은 칼슘의 섭취량과 분석한 대변과 소변 중 배설량을 이용하여 다음의 식에 의거하여 산출하였다.

칼슘의 보유량 (mg) = 칼슘의 섭취량 (mg) - 대변과 소변으로의 칼슘 배설량 (mg)

칼슘의 보유율 (%) = {[칼슘 섭취량 (mg) - 대변과 소변으로의 칼슘 배설량 (mg)]/칼슘 섭취량 (mg) × 100}

칼슘의 소화율 (%) = {[칼슘 섭취량 (mg) - 대변으로의 칼슘 배설량 (mg)]/칼슘 섭취량 (mg) × 100}

통계분석

본 연구를 통해 얻어진 모든 결과는 SAS program (ver. 9.1)을 이용하여 평균과 표준편차를 구하고, 1원 배치 분산분석을 하였으며, 유의한 영향이 나타났을 때 각 군별 차이는 Duncan's multiple range test로 $\alpha = 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결 과

체중변화와 식이효율

실험동물의 식이 섭취량, 체중변화와 식이효율에 대한 결

과는 Table 2와 같다. 식이 섭취량은 난소비절제 정상대조군이 난소절제군보다 유의하게 높았고, 난소절제군 내에서는 적정칼슘군이 저칼슘군보다 유의적으로 높게 나타났다 ($p < 0.001$). 초기 체중은 군간에 유의한 차이를 보이지 않았지만, 최종 체중은 난소절제군이 정상대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났다 ($p < 0.001$). 체중 증가량과 식이효율에서는 난소절제군이 정상대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났다 ($p < 0.001, p < 0.001$).

골격상태

실험동물의 골밀도, 골무기질 함량, 골면적 및 골강도에 대한 결과는 Table 3과 같다. 요추, 대퇴부 및 경골의 골밀도는 난소절제군이 정상대조군에 비해 유의하게 낮았고, 난소절제군 내에서는 적정칼슘군이 저칼슘군에 비해 유의적으로 높게 나타났다 ($p < 0.001, p < 0.001, p < 0.001$). 난소절제쥐에서 망간보충에 따른 골밀도의 변화를 살펴보

면, 적정 칼슘식이에서는 대퇴부의 골밀도가 망간보충시 증가되는 경향을 보였고, 저칼슘식이에 망간 보충시에는 요추, 대퇴부, 경골의 골밀도 모두가 감소하는 경향을 보였다.

대퇴부 및 경골의 골무기질 함량은 난소절제와 칼슘 결핍여부 및 망간 보충에 따른 실험군간 유의한 차이를 보이지 않았으나, 요추 골무기질 함량은 난소절제저칼슘식이군이 정상대조군과 난소절제적정칼슘식이군에 비하여 유의적으로 낮게 나타났다 ($p < 0.05$). 요추와 대퇴부 및 경골의 골면적은 군간 유의한 차이를 보이지 않았다.

골강도의 경우 대퇴부에서는 실험군간 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 경골에서는 난소절제저칼슘식이시 적정칼슘군에 비하여 유의적으로 골강도가 낮았으며, 난소절제저칼슘식이군 내에서는 망간 보충시 유의적인 골강도의 감소가 나타났다 ($p < 0.001$).

실험군의 골격 크기에 대한 결과는 Table 4와 같다. 대

Table 2. Feed and manganese intake, body weight gain and feed efficiency ratio (FER) of experimental rats

	Sham	Ovx-Lca ¹⁾	Ovx-LCaMn	Ovx-ACa	Ovx-ACaMn	Significance
Feed intake (g/day)	20.20 ± 0.43 ^{2) a3)}	17.79 ± 0.44 ^c	17.32 ± 0.26 ^d	18.13 ± 0.21 ^{bc}	18.46 ± 0.54 ^b	p < 0.001
Initial weight (g)	229.52 ± 14.37	229.75 ± 22.04	234.07 ± 22.39	228.60 ± 20.16	229.15 ± 17.64	NS ⁴⁾
Final weight (g)	328.82 ± 36.28 ^b	405.52 ± 43.82 ^a	386.60 ± 31.71 ^a	389.55 ± 47.34 ^a	393.60 ± 21.77 ^a	p < 0.001
Body weight gain (g/wk)	7.52 ± 2.32 ^b	14.12 ± 3.57 ^a	11.52 ± 2.84 ^a	12.91 ± 3.68 ^a	12.97 ± 2.29 ^a	p < 0.001
FER	0.05 ± 0.02 ^b	0.11 ± 0.03 ^a	0.10 ± 0.02 ^a	0.10 ± 0.03 ^a	0.10 ± 0.02 ^a	p < 0.001

1) See footnote of Table 1

2) Mean ± standard deviation

3) Values with different superscripts within a row are significantly different at $\alpha = 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test

4) Not significant

Table 3. Bone status of rats

	Sham	Ovx-LCa ³⁾	Ovx-LCaMn	Ovx-ACa	Ovx-ACaMn	Significance
BMD¹⁾						
Spine (mg/cm ²)	190.17 ± 11.36 ^{4) a5)}	167.95 ± 11.03 ^{bc}	157.95 ± 9.23 ^c	175.29 ± 13.20 ^b	171.24 ± 15.15 ^b	p < 0.001
Femur (mg/cm ²)	205.87 ± 15.85 ^a	184.21 ± 11.59 ^{bc}	180.80 ± 9.71 ^c	190.06 ± 13.25 ^{bc}	195.61 ± 10.23 ^{ab}	p < 0.001
Tibia (mg/cm ²)	176.22 ± 12.74 ^a	160.20 ± 9.94 ^{bc}	151.56 ± 12.95 ^c	163.00 ± 6.33 ^b	162.49 ± 5.77 ^b	p < 0.001
BMC²⁾						
Spine (mg)	533.75 ± 75.96 ^a	446.46 ± 70.67 ^b	470.36 ± 80.64 ^{ab}	527.82 ± 66.68 ^a	495.25 ± 60.28 ^{ab}	p < 0.05
Femur (mg)	454.44 ± 64.75	408.75 ± 41.37	417.90 ± 44.06	428.11 ± 46.06	451.50 ± 50.52	NS ⁶⁾
Tibia (mg)	358.70 ± 28.52	338.20 ± 20.39	321.56 ± 46.93	344.44 ± 24.52	350.36 ± 13.82	NS
Area						
Spine (cm ²)	2.70 ± 0.39	2.66 ± 0.40	2.97 ± 0.41	3.03 ± 0.41	2.89 ± 0.18	NS
Femur (cm ²)	2.20 ± 0.16	2.22 ± 0.17	2.31 ± 0.14	2.25 ± 0.16	2.30 ± 0.18	NS
Tibia (cm ²)	2.04 ± 0.12	2.12 ± 0.15	2.11 ± 0.15	2.11 ± 0.11	2.16 ± 0.09	NS
Bone strength						
Femur (kg)	11.71 ± 0.89	11.78 ± 0.41	12.13 ± 0.70	11.45 ± 0.54	12.07 ± 0.90	NS
Tibia (kg)	10.50 ± 0.99 ^a	9.95 ± 0.41 ^b	9.09 ± 0.41 ^c	10.64 ± 0.26 ^a	10.79 ± 0.24 ^a	p < 0.001

1) Bone mineral density

2) Bone mineral content

3) See footnote of Table 1

4) Mean ± standard deviation

5) Values with different superscripts within a row are significantly different at $\alpha = 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test

6) Not significant

퇴부와 경골의 길이는 난소절제 및 칼슘 결핍 여부와 망간 보충에 따른 구간 유의한 차이를 보이지 않았으며, 대퇴부와 경골의 넓이와 깊이 역시 실험군간 유의한 차이를 보이지 않았다.

혈청 칼슘 및 골대사지표

혈청의 칼슘 및 골대사지표에 대한 결과는 Table 5와 같다. 혈청 칼슘은 난소절제군이 비절제군에 비해 유의하게 낮게 나타났다 ($p < 0.001$). 혈청 ALP는 난소절제군이 비절제군에 비해 유의적으로 높게 나타났으며 ($p < 0.001$), 혈청 CTx는 난소절제 저칼슘군이 난소절제 적정칼슘군과 정상대조군에 비하여 유의하게 높은 수준을 보였다 ($p < 0.001$).

혈청 OPG은 난소절제군이 정상대조군에 비해 유의하게 높게 나타났다 ($p < 0.01$).

칼슘 평형

칼슘 평형에 대한 결과는 Table 6과 같다. 대변으로의 칼슘 배설량과 칼슘 보유량은 난소절제군이 정상대조군에 비해 유의하게 낮게 나타났으며, 난소절제 저칼슘식이군이 난소절제 적정칼슘식이군에 비해 유의적으로 낮은 결과를 보였다 ($p < 0.001$, $p < 0.001$). 또한 소변 중 칼슘 배설량은 정상대조군이 난소절제군에 비해 유의하게 높게 나타났으며, 난소절제군에서는 저칼슘군이 적정칼슘군에 비해 유의적으로 낮은 소변 중 칼슘 배설량을 보였다 ($p < 0.001$).

Table 4. Bone length, width and depth of rats

	Sham	Ovx-Lca ¹⁾	Ovx-LCaMn	Ovx-ACa	Ovx-ACaMn	Significance
Femur						
Length (mm)	36.07 ± 0.77 ²⁾	36.95 ± 1.45	36.13 ± 0.71	36.46 ± 0.58	37.24 ± 0.69	NS ³⁾
Width (mm)	3.92 ± 0.19	4.02 ± 0.03	4.06 ± 0.18	4.04 ± 0.30	4.10 ± 0.16	NS
Depth (mm)	3.02 ± 0.38	3.32 ± 0.14	3.01 ± 0.45	3.30 ± 0.15	3.32 ± 0.03	NS
Tibia						
Length (mm)	40.56 ± 1.01	41.47 ± 1.10	41.46 ± 1.08	41.32 ± 0.78	41.67 ± 0.56	NS
Width (mm)	3.52 ± 0.20	3.76 ± 0.33	3.70 ± 0.15	3.65 ± 0.29	3.61 ± 0.26	NS
Depth (mm)	2.38 ± 0.06	2.44 ± 0.20	2.41 ± 0.20	2.45 ± 0.11	2.37 ± 0.13	NS

1) See footnote of Table 1

2) Mean ± standard deviation

3) Not significant

Table 5. Serum parameters of bone turnover

	Sham	Ovx-Lca ⁴⁾	Ovx-LCaMn	Ovx-ACa	Ovx-ACaMn	Significance
ALP ¹⁾	85.88 ± 31.80 ^{5)ab6)}	137.50 ± 28.97 ^a	143.63 ± 21.67 ^a	137.00 ± 29.10 ^a	127.11 ± 23.20 ^a	$p < 0.001$
CTx ²⁾	28.83 ± 5.25 ^b	46.46 ± 14.28 ^a	53.09 ± 8.66 ^a	22.19 ± 9.57 ^b	27.91 ± 5.32 ^b	$p < 0.001$
OPG ³⁾	31.42 ± 11.68 ^b	38.98 ± 10.17 ^{ab}	47.10 ± 18.41 ^a	50.63 ± 10.11 ^a	48.33 ± 9.26 ^a	$p < 0.01$
Serum Ca (mg/dl)	11.01 ± 0.47 ^{1)ab2)}	10.03 ± 0.42 ^b	10.17 ± 0.29 ^b	10.08 ± 0.47 ^b	10.08 ± 0.48 ^b	$p < 0.001$

1) Alkaline phosphatase

2) C-telopeptide of collagen cross-links

3) Osteoprotegerin

4) See footnote of Table 1

5) Mean ± standard deviation

6) Values with different superscripts within a row are significantly different at $\alpha = 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test

Table 6. Calcium balance of rats

	Sham	Ovx-Lca ³⁾	Ovx-LCaMn	Ovx-ACa	Ovx-ACaMn	Significance
Calcium intake (mg/day)	100.97 ± 2.18 ^{3)ab3)}	17.79 ± 0.44 ^d	17.32 ± 0.26 ^d	90.63 ± 1.07 ^c	92.28 ± 2.70 ^b	$p < 0.001$
Fecal Ca (mg/day)	38.12 ± 12.84 ^a	5.47 ± 1.42 ^c	4.60 ± 1.86 ^c	32.82 ± 13.95 ^{ab}	25.80 ± 9.47 ^b	$p < 0.001$
Urinary Ca (mg/day)	0.77 ± 0.15 ^a	0.16 ± 0.10 ^d	0.30 ± 0.11 ^{cd}	0.36 ± 0.30 ^{bc}	0.49 ± 0.25 ^b	$p < 0.001$
Ca retention (mg/day)	62.08 ± 14.39 ^a	12.16 ± 1.38 ^b	12.42 ± 1.78 ^b	57.44 ± 13.30 ^a	65.97 ± 9.44 ^a	$p < 0.001$
Ca retention rate (%)	61.31 ± 13.26	68.37 ± 7.62	71.83 ± 11.03	63.46 ± 14.96	71.51 ± 10.29	NS ⁴⁾
Ca absorption (%)	62.07 ± 13.21	69.27 ± 7.94	73.52 ± 10.46	63.86 ± 15.11	72.04 ± 10.36	NS

1) See footnote of Table 1

2) Mean ± standard deviation

3) Values with different superscripts within a row are significantly different at $\alpha = 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test

4) Not significant

또한 소변 중 칼슘 배설량은 난소절제저칼슘군에서 망간 보충시 2배 가량 증가되었다. 칼슘 보유율과 칼슘의 소화율은 실험군간 유의한 차이를 보이지는 않았다.

고 찰

체중변화와 식이효율

본 연구에서 식이 섭취량은 난소를 절제한 군이 비절제군에 비해 낮았으나, 체중 증가량과 식이효율에서는 난소절제군이 비절제군에 비해 유의하게 높았다. Kalu 등¹⁴⁾은 폐경 후 체중증가 현상을 관찰하기 위해 난소절제 후 체중 증가량과 식이 섭취량의 변화를 살펴본 결과 난소절제시 과식하여 체중이 증가한다고 보고하였다. 또한 난소절제시 에스트로겐 분비저하가 발생하고 이때 체중지탱능력 (weight bearing activity)을 키우고 에스트로겐 생성이 가능한 체지방을 증가시키려는 기전으로 인하여 난소절제시 체중이 증가할 수 있다는 보고도 있다.¹⁵⁾ 본 연구에서는 난소를 절제한 군이 비절제군에 비해 식이 섭취량은 낮았으나, 체중은 증가하여 식이효율이 증가하였는데 이는 에스트로겐 분비 감소에 따른 체지방 축적으로 인하여 체중이 증가한 것으로 생각된다. 또한 체중의 경우 골격 전체에 기계적인 하중을 주어 골밀도 및 골무기질 함량의 변화에 영향을 미친다고 보고되고 있다.¹⁶⁾ 본 연구에서는 난소절제군이 비절제군에 비해 최종 체중이 유의적으로 높은 것으로 나타났기 때문에 체중이 골격에 미치는 효과를 고려하여 부위별 체중당 골무기질 함량 및 골밀도를 분석한 결과 난소절제군이 비절제군에 비해 유의하게 낮았으며, 칼슘 수준 및 망간 보충에 따른 차이를 보이지 않아 결과를 제시하지는 않았다.

한편 칼슘의 섭취수준이 식이섭취량에 미치는 영향에 대하여 많은 이견을 보이고 있지만, 낮은 칼슘의 섭취가 체중 증가량에 미치는 영향에 대한 연구에서 Viperman 등¹⁷⁾은 칼슘 부족군에서 식욕감퇴, 쇠약 및 체중감소를 초래한다고 보고하여 저칼슘군이 적정칼슘군보다 유의하게 낮은 식이섭취량을 보인 본 연구결과와 일치하였다.

골격상태

폐경 후 여성의 경우 에스트로겐 분비 감소로 골형성보다 골용해가 우세하기 때문에 골량의 손실 속도가 증가하게 되어 골다공증의 위험이 증가한다.¹⁸⁾ 특히 난소절제 수술은 쥐에서 골손실을 야기시키며,¹⁹⁾ 4개월된 흰쥐를 대상으로 난소절제를 실시한 후 4주 안에 50%의 골량이 손실되었다는 보고가 있다.²⁰⁾ 본 연구에서도 난소를 절제한 군이 비절제군에 비해 요추 및 대퇴부와 경골의 골밀도가 유

적으로 낮게 나타났다.

난소절제쥐에서는 저칼슘식이군이 적정칼슘식이군에 비하여 요추, 대퇴부, 경골의 골밀도가 모두 낮아 여성호르몬의 감소와 칼슘의 섭취부족이 골다공증의 위험을 가속화시킴을 확인할 수 있었다. 또한 저칼슘식이군의 골밀도가 비절제군에 비해 유의하게 낮게 나타났는데, 이는 난소절제된 쥐에서 저칼슘식을 장기(24주) 공급한 연구에서 난소절제 저칼슘식이군의 피질골 골량이 일반대조군과 난소절제 정상칼슘식이군에 비해 유의하게 낮았다는 연구결과²¹⁾와 유사한 양상을 보여 칼슘의 섭취부족과 여성호르몬의 결핍이 상승적으로 골다공증의 위험을 증가시키는 것을 알 수 있었다.

본 연구는 칼슘의 섭취가 부족한 우리나라 폐경 후 여성의 식생활을 고려하여 실험군에 저칼슘과 정상칼슘을 정하고 각각 망간의 보충을 실시하였는데, 적정 칼슘식에서 대퇴부의 골밀도가 망간 보충시 증가되었으나 유의적인 수준은 아니었으며, 요추와 대퇴부의 골밀도에 있어서도 유의적인 변화를 나타내지 않았다. 그러나, 골다공증 환자에서 보충제로 칼슘과 망간을 함께 투여했을 때 골밀도가 개선되었다는 보고가 있으며,¹⁰⁾ Rico 등¹¹⁾은 난소절제쥐를 이용하여 망간을 120 mg/diet kg의 수준으로 30일간 섭취시킨 결과 대퇴부 골밀도가 유의적으로 증가하였다고 보고하여 망간의 보충이 폐경 후 골다공증을 예방하는 효과가 있는 것으로 나타나고 있다. 이는 본 연구에서의 망간 보충 수준 (100 mg/diet kg) 및 기간과 차이가 있어, 유효한 보충 수준과 기간에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 보여진다. 한편, 저칼슘식에 망간 보충시 요추, 대퇴부, 경골의 골밀도가 모두 감소를 나타내어, 칼슘이 결핍된 상황에서 망간의 보충이 오히려 골밀도에 부정적인 영향을 미침을 알 수 있었다.

골격의 크기 (size)는 골절에 영향을 미친다고 보고되고 있다.²²⁾ Silvia & Gibon의 연구²³⁾에 의하면 골격의 크기가 증가했을 때 골무기질 함량이 증가된다고 보고되고 있으며, 같은 수준의 골밀도에서도 골격의 크기가 작은 경우 요추 골절을 경험하는 비율이 더 높았다는 보고²⁴⁾도 있다. 이와 같이 골격의 크기와 골무기질 함량과의 관련성이 높지만, 본 연구에서는 대퇴부와 경골의 골면적과 골무기질 함량의 경우 군간 차이를 보이지 않았으며, 이는 본 연구에서 사용한 쥐가 6주령으로 계속적으로 골격의 크기가 증가하는 성장기에 속하였기 때문에 난소절제에 따른 골격크기의 감소 결과를 보이지 않은 것으로 생각된다. 또한 대퇴부의 경우 골무기질 함량과 골면적에 있어 군간 유의한 차이를 보이지 않은 반면, 골밀도는 난소절제 적정칼슘군에서 망간 보

층시 증가하는 양상을 보였는데, 이는 골밀도에 관여하는 인자인 골무기질 함량의 망간보충에 따른 증가폭이 골면적의 증가폭에 비해 컸기 때문이라고 사료된다. 한편 유의적인 차이를 보이지는 않으나 난소절제 저칼슘식이시 난소절제 적정칼슘식이군에 비해 대퇴부와 경골의 낮은 골면적과 골무기질 함량의 경향을 보여 적정칼슘의 지속적인 섭취가 골격건강에 중요할 것으로 생각된다.

일부 연구에 의하면 골밀도는 그 자체로는 골절의 예측에 충분하지 않는데, 그 이유는 골절 발생을 예측시 독립적인 변수로 골밀도만 사용시, 성별 요인, 골전환률의 상승, 낮은 체중, 연령 등 몇몇 골격건강에 관련된 생리적인 요인이 배제되기 때문이라고 한다.²⁵⁾ 따라서 골밀도 이외에 다양한 골절 발생 관련 요인 등을 포함한 좀더 포괄적인 지표를 통해 전반적인 골격건강 연구에 접근하는 것이 필요하다. 이에 최근 많이 사용되고 있는 지표는 골강도로, 골강도는 골전환율의 영향을 받아 형성되기 때문에 골의 질 (bone quality)을 의미하며, 전반적인 골격의 건강을 나타낼 수 있는 지표로 보고되고 있다.²²⁾ 골의 질량에 영향을 미치는 요인으로는 골격을 구성하고 있는 섬유주 (trabecular) 및 피질 (cortical)의 두께와 유공성 (porosity)을 들 수 있으며,²⁶⁾ 이 섬유주와 피질의 구성은 연령, 골격의 부위, 영양 섭취상태 및 골전환율 등의 요인에 의해 다양하게 나타나고, 골강도에도 영향을 미친다고 한다.²²⁾ 본 연구에서 난소절제 저칼슘식이군에 망간을 보충한 결과 망간 비보충군에 비해 유의적으로 낮은 골강도를 보여 골밀도의 결과와 같은 경향을 나타내었다. 따라서 폐경 여성에서 골밀도의 감소와 골절을 예방하기 위한 망간의 보충은 반드시 칼슘 섭취량과의 관계를 고려하여 적절한 칼슘 섭취를 유지하면서 이루어져야 할 것으로 생각된다.

혈청 칼슘과 골대사지표

혈청 칼슘은 정적인 상태가 아니라 끊임없는 내·외적 변화에 대응하는 동적상태로 항상성을 유지한다고 알려져 있으며, 난소절제가 칼슘 흡수에 미치는 영향에 대해서는 아직까지 많은 이견이 있지만,²⁷⁾ 난소절제시 혈청 칼슘의 항상성의 변화가 유발된다는 결과가 주로 보고되고 있다.^{28,29)} 본 연구에서도 난소절제된 쥐의 경우 비절제된 쥐에 비해 혈청 칼슘의 농도가 낮은 것으로 나타나, 난소절제에 의하여 칼슘 항상성 유지의 변화가 야기된 것으로 사료된다.

혈청 ALP는 조골세포에서 만들어져 조골세포막의 소포에 저장되고 있으며, 이 중 일부가 혈액 내로 유리되어 나오기 때문에 조골세포의 활성을 의미한다.³⁰⁾ 또한 폐경 후 골다공증 여성에서 증가하는 양상을 보이고, 성인기 여성에

서 골절과의 관련성을 보였다는 연구가 보고되고 있어,³¹⁾ 본 연구에서 난소절제군의 혈청 ALP가 비절제군에 비해 유의하게 높은 결과를 뒷받침해주고 있다.

혈청 CTx는 골용해 과정시 type I collagen의 분해효소인 cathepsin K에 의해 매개되는 파골세포의 대사산물이다.³²⁾ 본 연구에서도 난소절제군이 비절제군에 비해 유의하게 높은 혈청 CTx 수준을 보여 난소절제군에 있어 골용해가 증가되었음을 알 수 있었으며, 특히 난소절제시 저칼슘군이 적정칼슘군에 비해 유의적으로 높은 CTx 수준을 나타내 골격건강에 있어 적절한 칼슘 섭취의 중요성을 알 수 있었다.

OPG는 골수 기질세포에서 분비되는데, 파골세포의 형성 및 활성을 조절하는 RANKL (Receptor activator of NF- κ B ligand)과 결합하여 RANKL과 RANK (Receptor activator of NF- κ B)간의 상호작용을 방해하는 역할을 통해 파골세포의 형성과 파골세포에 의한 골용해를 억제할 수 있다.³³⁾ 또한 OPG는 *in vitro* 실험에서 파골세포 전구체의 분화, 생존 및 용해를 억제하며 성숙파골세포로의 활성화를 차단하고, 파골세포의 세포사멸을 유도하는 것으로 보고되고 있다.³⁴⁾ 기존의 동물실험 결과를 살펴보면 OPG knock-out mice에서 극심한 골다공증이 조기에 발현되었고, 파골세포의 생성이 증가되었으며, 척추 골절을 포함한 다발성 골절로 인해 치사율이 증가한다고 하였다.³⁵⁾ 또한 OPG/RANKL 농도비의 증가는 골용해 측면의 대사를 저해하는 효과가 있으며, 이는 조골세포에서의 OPG와 RANKL 비율의 증대에 의한 것이라는 보고가 있다.³⁶⁾ 본 연구에서는 난소를 절제한 군이 비절제군에 비해 혈청 OPG가 유의하게 높아, 난소절제 후 빠른 골교체율의 현상을 보인 것으로 생각된다.

망간은 뼈에 있는 glycosaminoglycan의 합성에 관여하는 glycosyltransferase의 활성을 조절하는 것으로 알려져 있다.³⁷⁾ 성인 쥐에서 망간결핍은 골형성과 골용해 활성을 모두 저해하였다고 하였다.³⁸⁾ 그러나 난소절제쥐에서 칼슘의 섭취수준에 따른 망간의 보충을 실시한 본 연구에서는 망간의 보충 여부에 따라 골대사지표에 유의적인 변화를 나타내지 않았다. 칼슘의 섭취수준에 따른 망간의 보충이 골밀도의 변화를 초래한 본 연구의 결과를 고려할 때, 망간의 보충이 칼슘과의 상호작용을 통하여 골대사에 영향을 주는 것으로 보여지므로 관련 기전을 밝힐 수 있는 후속연구가 지속적으로 필요하다고 생각된다.

칼슘 평형

칼슘의 흡수율은 증가시에는 골용해를 억제하며,³⁹⁾ 감소

시에는 신경과 근육 등의 신체 내 정상적인 대사기능을 유지하기 위해 골격 중 저장되어 있던 칼슘을 사용하므로 골격건강에 부정적이다. 난소절제된 쥐에서는 칼슘 흡수율이 감소되고 대퇴골 말단의 골밀도가 감소했다는 연구보고가 있다.⁴⁰⁾ 그러나, 본 연구에서는 난소절제군과 비절제군간에 칼슘 흡수율에 차이를 보이지 않았다. 난소절제와 칼슘 흡수율과의 관계를 살펴 본 Kalu 등⁴¹⁾은 6개월된 고령쥐를 대상으로 난소절제 후 6개월 동안 칼슘 흡수율을 분석한 결과 2주에서 3개월 사이에만 난소절제군이 비절제군에 비해 유의적으로 칼슘 흡수가 낮았다고 보고하여, 난소절제 경과기간과 난소절제시의 연령 등에 따라 칼슘 흡수율에 약간의 차이를 보이는 것으로 생각된다.

소변 칼슘 배설량은 골용해의 지표로도 사용되는데,⁴²⁾ 난소절제쥐에서 저칼슘식이에 망간 보충시 망간 비보충군에 비하여 2배 가량 증가되었다. 소변의 칼슘 배설량이 소량이기 때문에 소변으로의 칼슘 배설 감소에도 불구하고, 칼슘의 보유률에 직접적인 영향을 미치지 못하는 듯하였으나, 저칼슘식이에 망간보충시 소변으로의 칼슘배설 증가를 골밀도와 골강도의 감소결과와 연결하여 고려하여 보면, 칼슘의 섭취가 부족한 상황에서 망간의 보충섭취는 칼슘의 배설을 증가시킴으로써 오히려 골격건강에 좋지 않은 영향을 줄 수 있는 가능성이 있음을 제시하여 준다.

요약 및 결론

본 연구에서 난소절제 쥐에서 칼슘 섭취수준에 따른 망간의 보충이 골격 상태 및 칼슘 평형에 미치는 효과에 대해 알아보고자 난소절제 쥐를 이용하여 칼슘 섭취수준 (적정, 결핍)에 따른 망간 보충 식이를 12주간 공급한 후 골밀도, 골무기질 함량 및 골강도와 같은 골격상태와 골대사 지표, 칼슘 평형을 살펴본 결과를 요약하면 다음과 같다.

체중 증가량과 식이효율에서는 난소절제군이 정상대조군에 비해 유의적으로 높았고 ($p < 0.001$, $p < 0.001$), 난소절제군에서 칼슘의 섭취수준이나 망간의 보충여부에 따른 차이를 보이지 않았다. 오추, 대퇴부 및 경골의 골밀도는 난소절제군이 정상대조군에 비해 유의하게 낮았고, 난소절제군 내에서는 적정칼슘군이 저칼슘군에 비해 유의적으로 높았다 ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$). 난소절제쥐에서 대퇴부, 경골의 골밀도 모두 저칼슘식이에 망간 보충시 감소하는 경향을 보였고, 적정 칼슘식에서는 망간보충시 대퇴부의 골밀도가 증가되는 경향을 보였다. 골강도는 대퇴부에서는 실험군간 유의한 차이를 보이지 않았으나 난소절제저칼슘식에서 망간 보충시 비보충군에 비해 골강도가 유의

적으로 감소하였다 ($p < 0.001$). 혈청 칼슘은 난소절제군이 비절제군에 비해 유의하게 낮았다 ($p < 0.001$). 혈청 ALP와 CTx는 난소절제저칼슘군이 난소절제적정칼슘군과 정상대조군에 비하여 유의하게 높은 수준을 보였고 (각각 $p < 0.001$), 칼슘 섭취수준 및 망간의 보충여부에 따른 차이는 보이지 않았다. 대변으로의 칼슘 배설량과 칼슘 보유량은 난소절제군이 정상대조군에 비해 유의하게 낮았으며, 난소절제군에서는 저칼슘식이군이 적정칼슘식이군에 비해 유의적으로 낮았다 ($p < 0.001$, $p < 0.001$). 또한 소변 중 칼슘 배설량은 정상대조군이 난소절제군에 비해 유의하게 높았으며, 난소절제군에서는 저칼슘군이 적정칼슘군에 비해 유의적으로 낮았다 ($p < 0.001$). 또한 소변 중 칼슘 배설량은 난소절제저칼슘군에서 망간 보충시 비보충군에 비해 높게 나타났다. 칼슘 보유율과 칼슘의 소화율은 실험군간 유의한 차이를 보이지는 않았다.

이상의 결과에서 난소절제쥐에서 망간의 보충은 적정칼슘식에서는 유의적인 변화를 나타내지 않았으나, 저칼슘식에서 망간의 보충은 소변으로의 칼슘 배설을 증가시키고 골밀도와 골강도의 감소를 초래하는 부정적인 결과를 나타내었다. 따라서 폐경 후 골격건강을 위한 망간의 보충은 칼슘의 섭취수준과의 관계를 고려하여 이루어져야 할 것으로 생각되며, 망간의 적절한 보충 수준과 골대사에 미치는 기전을 밝힐 수 있는 지속적인 연구가 필요하다고 보여진다.

Literature cited

- 1) Korea National Statistical Office. <http://kosis.nso.go.kr:7001/ups/hapterRetrieve.jsp?pubcode=MA&seq=48&pub=3>; 2005
- 2) Kannel WB, Larson M. Long-term epidemiologic prediction of coronary disease. The Framingham experience. *Cardiology* 1993; 82(2-3): 137-152
- 3) Abbott TA 3rd, Lawrence BJ, Wallach S. Osteoporosis: the need for comprehensive treatment guidelines. *Clin Ther* 1996; 18(1): 127-149
- 4) Ribot C, Trémollières F. Hormone replacement therapy in the management of postmenopausal osteoporosis and prevention of fracture risk. *Presse Med* 2006; 35(10 Pt 2): 1557-1563
- 5) Relea P, Revilla M, Ripoll E, Arribas I, Villa LF, Rico H. Zinc, biochemical markers of nutrition, and type I osteoporosis. *Age Ageing* 1995; 24(4): 303-307
- 6) Dawson-Hughes B, Harris SS, Krall EA, Dallal GE. Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older. *N Engl J Med* 1997; 337(10): 670-676
- 7) Ministry of Health & Welfare. Report on 2005 National Health and Nutrition Examination Survey-Health behavior of adults. Ministry of Health & Welfare, Seoul, South Korea; 2006

- 8) Strause L, Saltman P, Smith KT, Bracker M, Andon MB. Spinal bone loss in postmenopausal women supplemented with calcium and trace minerals. *J Nutr* 1994; 124 (7): 1060-1064
- 9) Underwood EJ. Trace metals in human and animal health. *J Hum Nutr* 1981; 35 (1): 37-48
- 10) Freeland-Graves JH, Turnlund JR. Deliberations and evaluations of the approaches, endpoints and paradigms for manganese and molybdenum dietary recommendations. *J Nutr* 1996; 126 (9 Suppl): 2435S-2440S
- 11) Rico H, Gómez-Raso N, Revilla M, Hernández ER, Seco C, Páez E, Crespo E. Effects on bone loss of manganese alone or with copper supplement in ovariectomized rats. A morphometric and densitometric study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 90 (1): 97-101
- 12) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123 (11): 1939-1951
- 13) Breitman PL, Fonseca D, Cheung AM, Ward WE. Isoflavones with supplemental calcium provide greater protection against the loss of bone mass and strength after ovariectomy compared to isoflavones alone. *Bone* 2003; 33 (4): 597-605
- 14) Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, Hollis BW. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology* 1989; 124 (1): 7-16
- 15) Li M, Wronski TJ. Response of femoral neck to estrogen depletion and parathyroid hormone in aged rats. *Bone* 1995; 16 (5): 551-557
- 16) Douchi T, Yamamoto S, Kuwahata R, Oki T, Yamasaki H, Nagata Y. Effect of non-weight-bearing body fat on bone mineral density before and after menopause. *Obstet Gynecol* 2000; 96 (1): 13-17
- 17) Vipperman PE Jr, Preston RL, Kintner LD, Pfander WH. Role of calcium in the nutritional etiology of a metabolic disorder in ruminants fed a high grain ration. *J Nutr* 1969; 97 (4): 449-462
- 18) Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int* 2005; 16 (Suppl 2): S129-138
- 19) Hara T, Sato T, Oka M, Mori S, Shirai H. Effects of ovariectomy and/or dietary calcium deficiency on bone dynamics in the rat hard palate, mandible and proximal tibia. *Arch Oral Biol* 2001; 46 (5): 443-451
- 20) Yamaura M, Nakamura T, Tsurukami H, Hijioka A, Narusawa K, Ohnishi H, Ohta T, Hosoda K. Local bone turnover in the metaphysis of the proximal tibia and the lumbar vertebra during the early periods after ovariectomy in rats. *Calcif Tissue Int* 1996; 58 (1): 52-59
- 21) Jakubas-Przewlocka, Przewlocki P, Sawicki A. Assessment of changes due to the long-term effect of estrogen and calcium deficiency in trabecular bone structure in rats. *Clin Exp Rheumatol* 2005; 23 (3): 385-388
- 22) Felsenberg D, Boonen S. The bone quality framework: determinants of bone strength and their interrelationships, and implications for osteoporosis management. *Clin Ther* 2005; 27 (1): 1-11
- 23) Silva MJ, Gibson LJ. Modeling the mechanical behavior of vertebral trabecular bone: effects of age-related changes in microstructure. *Bone* 1997; 21 (2): 191-199
- 24) Duan Y, Parfitt A, Seeman E. Vertebral bone mass, size, and volumetric density in women with spinal fractures. *J Bone Miner Res* 1999; 14 (10): 1796-1802
- 25) Melton LJ 3rd. Epidemiology of osteoporosis. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1991; 5 (4): 785-805
- 26) Follet H, Boivin G, Rumelhart C, Meunier PJ. The degree of mineralization is a determinant of bone strength: a study on human calcanei. *Bone* 2004; 34 (5): 783-789
- 27) Kalu DN, Orhii PB. Calcium absorption and bone loss in ovariectomized rats fed varying levels of dietary calcium. *Calcif Tissue Int* 1999; 65 (1): 73-77
- 28) O'Loughlin PD, Morris HA. Oophorectomy in young rats impairs calcium balance by increasing intestinal calcium secretion. *J Nutr* 1994; 124 (5): 726-731
- 29) Mitamura R, Hara H. Prolonged feeding of difructose anhydride III increases strength and mineral concentrations of the femur in ovariectomized rats. *Br J Nutr* 2005; 94 (2): 268-274
- 30) Riis BJ. Biochemical markers of bone turnover. II: Diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 1993; 95 (5A): 17S-21S
- 31) Khandwala HM, Mumm S, Whyte MP. Low serum alkaline phosphatase activity and pathologic fracture: case report and brief review of hypophosphatasia diagnosed in adulthood. *Endocr Pract* 2006; 12 (6): 676-681
- 32) Bonde M, Garnero P, Fledelius C, Qvist P, Delmas PD, Christiansen C. Measurement of bone degradation products in serum using antibodies reactive with an isomerized form of an 8 amino acid sequence of the C-telopeptide of type I collagen. *J Bone Miner Res* 1997; 12 (7): 1028-1034
- 33) Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000; 15 (1): 2-12
- 34) Akatsu T, Murakami T, Nishikawa M, Ono K, Shinomiya N, Tsuda E, Mochizuki S, Yamaguchi K, Kinoshita M, Higashio K, Yamamoto M, Motoyoshi K, Nagata N. Osteoclastogenesis inhibitory factor suppresses osteoclast survival by interfering in the interaction of stromal cells with osteoclast. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 250 (2): 229-234
- 35) Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998; 12 (9): 1260-1268
- 36) Xie F, Wu CF, Zhang Y, Yao XS, Cheung PY, Chan AS, Wong MS. Increase in bone mass and bone strength by *Sambucus williamsii* HANCE in ovariectomized rats. *Biol Pharm Bull* 2005; 28 (10): 1879-1885
- 37) Leach RM Jr, Muenster AM, Wien EM. Studies on the role of manganese in bone formation. II. Effect upon chondroitin sulfate synthesis in chick epiphyseal cartilage. *Arch Biochem Biophys* 1969; 133 (1): 22-28
- 38) Strause L, Saltman P, Glowacki J. The effect of deficiencies of manganese and copper on osteoinduction and on resorption of bone particles in rats. *Calcif Tissue Int* 1987; 41 (3): 145-150
- 39) Zafar TA, Weaver CM, Zhao Y, Martin BR, Wastney ME. Non-

- digestible oligosaccharides increase calcium absorption and suppress bone resorption in ovariectomized rats. *J Nutr* 2004; 134(2): 399-402
- 40) Jung WK, Moon SH, Kim SK. Effect of chitooligosaccharides on calcium bioavailability and bone strength in ovariectomized rats. *Life Sci* 2006; 78(9): 970-976
- 41) Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, Hollis BW. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology* 1989; 124(1): 7-16
- 42) Prabhakara Reddy N, Lakshmana M. Prevention of bone loss in calcium deficient ovariectomized rats by OST-6, a herbal preparation. *J Ethnopharmacol* 2003; 84(2-3): 259-264