

## 난소절제쥐에서 Arginine 첨가 식이가 골밀도 및 골대사에 미치는 영향\*

최 미 자<sup>§</sup>

계명대학교 식품영양학과

### Effects of Arginine Supplementation on Bone Mineral Density and Bone Markers in OVX Rats\*

Choi, Mi-Ja<sup>§</sup>

Department of Food and Nutrition, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

#### ABSTRACT

As far as we know, there were no studies of the effect of L-arginine on bone metabolism in post-menopausal women or ovariectomized rats. The primary objective of the current study was to determine whether arginine supplementation was associated with alterations in femoral and spinal bone mineral density (BMD) and bone markers in ovariectomized (Ovx) rats. Forty female Sprague-Dawley rats were divided into two groups, Ovx and sham groups, which were each randomly divided into two subgroups that were fed control and arginine supplemented diet. All rats were fed on experimental diet and deionized water ad libitum for 9 weeks. Bone formation was measured by serum osteocalcin and alkaline phosphatase (ALP) concentrations. Bone resorption was measured by deoxypyridinoline (DPD) crosslinks immunoassay and corrected for creatinine. Serum osteocalcin, growth hormone, insulin-like growth factor-1 (IGF-1), parathyroid hormone (PTH) and calcitonin were analyzed using radioimmunoassay kits. Bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) were measured using PIXImus (GE Lunar Co, Wisconsin, USA) in spine and femur. The serum and urine concentrations of Ca and P were determined. The plasma was analyzed for arginine. Diet did not affect weight gain, mean food intake, and plasma arginine concentration. Urinary Ca excretion was decreased by arginine supplementation in Ovx rats, but statistically not significant. The Ovx rats fed arginine-supplemented diet were not significantly different in ALP, osteocalcin, crosslinks value, PTH, calcitonin and IGF-1 compared to those fed control diet. The arginine-supplemented group had significantly higher serum Ca and growth hormone than control group. Spine and femur BMD were significantly increased by arginine supplementation on 5th and 9th weeks after feeding. Our findings indicate that dietary L-arginine supplementation decreased bone mineral density loss in Ovx rats. Therefore, dietary arginine supplementation may represent a potentially useful strategy for the management of osteoporosis. (Korean J Nutr 2009; 42(4): 309~317)

**KEY WORDS** : arginine, BMD, GH, IGF-1, PTH, bone markers, ovariectomized rat.

#### 서 론

콩 단백질의 풍부한 이소플라본과 아미노산 조성은 골다공증 예방에 유리하다고 보고되고 있는데, 이소플라본이 골대사에 유리하다고 보고한 연구는 사람과 동물을 대상으로 상당 수 있다.<sup>1-4)</sup> 콩 단백질의 아미노산 조성이 골 대사에 유리한 이유는 동물성 단백질에 비해 콩의 함황 아미노산 함량이 낮아 요 중 칼슘 배설이 적어 유리하다는 보고와,<sup>5)</sup>

콩 단백질에 풍부한 arginine이 성장 호르몬의 분비를 증가시키고<sup>6)</sup> 성장 호르몬은 골밀도 증가에 유리하다는 연구가 있다.<sup>7)</sup> 성장호르몬의 분비량이 연령 증가에 따라 감소되는데 골다공증 여성 노인에게 성장 호르몬을 투여한 결과 골밀도 감소가 줄었다고 보고하였다.<sup>8)</sup>

성장 호르몬이 골밀도의 감소를 줄이고, 콩 단백질의 풍부한 arginine이 성장 호르몬의 분비를 증가시켜 골 대사에서 유리할 수 있다는 선행연구에<sup>6,7)</sup> 근거하여 Choi<sup>9)</sup>는 성장기 암컷 쥐를 대상으로 arginine 첨가 식이가 골밀도에 미치는 영향을 연구한 결과 골밀도 형성에 유익한 것으로 사료된다고 보고하였다. 그러나 성호르몬 분비가 부족한 난소절제 쥐에서 arginine 첨가 식이가 골밀도에 미치는 효과에 대한 연구는 없다. 따라서 본 연구는 여성호르몬이 부족

접수일 : 2009년 4월 6일 / 수정일 : 2009년 4월 15일  
채택일 : 2009년 6월 10일

\*The present research has been conducted by the Bisa Research Grant of Keimyung University in 2006.

<sup>§</sup>To whom correspondence should be addressed.  
E-mail : choimj@kmu.ac.kr

한 난소절제쥐에서 선행연구의<sup>9)</sup> 성장기 암컷 쥐에 첨가한 동량의 arginine 첨가 식이가 골 대사에 미치는 효과를 알아보았다.

## 연구방법

### 실험동물 및 실험식이

Sprague-Dawley 암컷 쥐를 (체중  $180 \pm 10$  g, 8주령) 주식회사 대한 동물 사육 센터로 부터 분양받아 1주일간의 적응기간 동안 고품사료 (rat chow, 삼양사)로 사육한 후 Ovx군과 Sham군으로 나누고 다시 실험 식이에 따라 대조식이군과 arginine 첨가식이군으로 나누어 각 군 당 10마리씩 9주간 실험 식이를 공급하였다. 실험동물은 stainless steel wire cage에서 한 마리씩 분리 사육하였으며, 사육실의 온도는  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도는  $63 \pm 5\%$ 로 유지하였고 매일 광주기, 암주기를 12시간이 되도록 조절하였다. 실험 기간 동안 식이와 물은 자유롭게 섭취케 하였으며 물은 모두 2차 이온교환수를 사용하였다. 본 연구에서 사용한 arginine (L-Arginine: Sigma A8094, Japan)의 첨가량은 선행연구의<sup>9)</sup> 성장기 암컷 쥐에서 AIN-93 식이의 단백질 급원인 casein을 콩 단백질로 대체시키는 경우 콩 단백질에 함유된 arginine의 함량과 동량 (6.6 g/kg diet)으로 첨가한 선행연구와 같이 하였다. 식이의 기본조성은 AIN-93G에 기준하여 조제하였다.<sup>10)</sup> 실험식이의 조성은 Table 1과 같다.

### 실험분석

#### 식이 섭취량 및 체중 측정

식이 섭취량은 이틀에 한 번씩, 체중은 1주일에 한 번씩

**Table 1.** Composition of experimental diets (g/100 g of diet)

Ingredients	Control	Arginine
Casein <sup>1)</sup>	20	20
Corn starch	53	52.34
Sucrose	10	10
Soybean oil	7	7
Cellulose	5	5
Min-mix <sup>2)</sup>	3.5	3.5
Vit-mix <sup>3)</sup>	1.0	1.0
L-cystine	3.0	3.0
Choline	0.25	0.25
Terf-butyl hydroquinone	0.0014	0.0014
Arginine <sup>4)</sup>	-	0.66

1) Casein, Maeil Dairy Industry Co. Ltd. 480 Gagok-Ri, Jinwi-Myun, Pyung taek-city, Kyunggi-Do, Korea

2) AIN-93G-MX, Teklad Test Diets, Medison, Wisconsin, USA

3) AIN-93G-VM, Teklad Test Diets, Medison, Wisconsin, USA

4) L-Arginine: Sigma A8094, Japan

Calorie % of diet-carbohydrate : protein : fat = 64 : 19 : 17

일정한 시간에 측정하였다.

### 시료 수집

실험동물은 9주간 사육 후 12시간 동안 절식시킨 후 ether 마취하에 복부를 절개하여 대동맥에서 혈액을 채취 하였으며, 채취한 혈액은 상온에서 30분간 방치한 후 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈장과 혈청을 분리한 후  $-70^\circ\text{C}$ 에서 냉동 보관하였다. 혈장은 arginine 분석에 사용하였고 혈청은 골형성 지표와 호르몬 분석에 사용하였다.

### 혈청 칼슘과 인의 농도 및 뇨 중 칼슘과 인의 배설량

9주간 사육한 실험동물은 대사케이지에서 12시간 동안, 식이에 의해 시료가 오염되는 것을 막기 위하여 식이는 공급하지 않고, 물만 공급하여 12시간 동안의 요를 채취하였다. 시료 채취에 사용되는 모든 기구는 2차 이온교환수로 헹구어 사용하였다. 채취한 요는  $-70^\circ\text{C}$ 에서 냉동 보관하였다가 성분분석 하였다. 요 중 및 혈 중 칼슘과 인은 TECHNICON CHEN<sup>TM</sup> SYSTEM을 이용하여 자동분석기 (automatic chemical analyzer)를 측정하였다.

### 혈장 Arginine 농도 측정

혈장 arginine 농도는 ion-exchange chromatography에 입각한 아미노산 전용분석기 (Biochrom 20, Pharmacia Biotech, Cambridge, England)를 사용하여 측정하였다.

### 골형성 및 골용해 지표 및 호르몬 측정

골 형성 지표로 혈청 alkaline phosphatase (ALP)의 측정은 TECHNICONCHEN<sup>TM</sup> SYSTEM을 이용하여 자동 분석기 (automatic chemical analyzer)로 측정하였고, osteocalcin의 측정은 one-step solid phase를 이용한 competitive radioimmuno-assay<sup>11)</sup>에 기초한 OSTEOCALCIN MYRIA kit (Techno genetics, Italia)으로 radioimmuno-assay를 한 후<sup>12)</sup> gamma-counter를 이용하여 항원 항체 결합 정도를 측정하였다. 골 용해 지표로 요 중 deoxypyridinoline (DPD), creatinine, crosslinks value collagen crosslinks<sup>TM</sup> kit (Metra Biosystems Inc. U.S.A.)을 이용하여 ELISA (enzyme-linked immuno sorvent assay)법에 의해 분석하였다. 골대사와 관련된 호르몬의 측정으로 calcitonin, parathyroid hormone (PTH), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), growth hormone (GH) 분석은 시험관에 부착된 항체와 125-I로 표식 된 항체를 함께 사용하여 항원과 항체 간에 'sandwich'를 형성하게 하는 non-competitive radioimmuno-assay<sup>13)</sup>을 이용한 DSL-7700 ACTIVETM Calcitonin IRMA kit, DSL-8000 ACTIVETM Intact PTH IRMA kit (Diagnostic System Laboratories Inc, USA), HGH IRMA CT kit (Radim, Roma, Italia),

IGF-1 IMRA kit (Radim, Roma, Italia)로 radioimmunoassay를 한 후<sup>14)</sup> gamma-counter를 이용하여 항원 항체 결합 정도를 측정하였다.

**골밀도 및 골함량 측정**

실험동물은 5주째와 9주째에 마취제 ketamine hydrochloride (유한양행, 50 mg/mL)를 사용하여 체중 1 kg당 75 mg의 용량으로 근육주사한 후 LUNAR사의 small animal 전용 골밀도 측정기인 PIXImus를 이용하여 척추 (spine)와 대퇴골 (femur)의 골밀도 (bone mineral density, BMD)와 골무기질함량 (bone mineral content, BMC)을 측정하였다.

**통계처리**

본 실험에서 얻은 결과는 SAS package (version 9.1: Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 분석하였다. ANOVA test를 통해 각 실험군의 변수들은 평균과 표준편차를 구하였으며 각 군 간의 통계적 유의성은  $\alpha = 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검증하였다.

**결 과**

**체중 증가량, 식이섭취량 및 식이효율(FER)**

Table 2에서 체중을 나타내었다. 이들 각 군은 실험 시작 시에 체중은 유의적인 차이가 없었으나 9주 후는 Ovx군의 체중이 유의적으로 높았고 ( $p < 0.05$ ), Ovx군이나 Sham군내에서 arginine 첨가에 의한 체중의 차이는 없었다. 평균 식이 섭취량은 Sham군에 비하여 Ovx군이 유의적으로 높았으며 ( $p < 0.05$ ) Sham군과 Ovx군내에서 arginine 첨가에 의한 유의적인 차이는 없었다. 식이효율도 Sham군에

비하여 Ovx군이 유의적으로 높았고 ( $p < 0.05$ ) arginine 첨가에 의한 차이는 각 군 내에서 없었다.

**혈청 칼슘과 인의 농도**

Table 3에서 혈 중 칼슘과 인의 농도를 나타내었다. 혈 중 칼슘과 인의 농도는 정상 범위 내에 있었다. 각 군내에서 비교하였을 때 Sham군내에서는 대조군과 arginine군이 각각  $11.3 \pm 0.4$  mg/dL와  $11.5 \pm 0.2$  mg/dL로서 두군 간에 차이가 없었다. 그러나 Ovx군내에서 대조군의 혈청 칼슘 농도는  $10.1 \pm 0.3$  mg/dL로서 arginine군의  $11.0 \pm 0.4$  mg/dL에 비하여 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 낮았다.

Table 4에서는 난소절제쥐에서 arginine의 첨가가 노 중 칼슘과 인의 배설에 미치는 영향을 나타내었다. Sham군과 Ovx군에서 arginine군은 대조군에 비하여 요 중 칼슘 배설량이 약간 낮은 경향을 보였으나 통계적 유의성이 없었다. 인의 배설량도 각 군 간에 유의적인 차이가 없었다.

**혈장 Arginine 농도**

Arginine 첨가 식이 (6.6 g/kg diet)가 혈 중 arginine 농도에 미치는 영향을 측정한 결과 (Table 5) Sham군과 Ovx군 모두에서 arginine 첨가 식이는 혈장 arginine 농도에 유의적인 영향을 미치지 않았다.

**골형성 및 골용해 지표**

난소절제쥐에서 arginine 첨가식이 골 형성 지표인 ALP 농도와 osteocalcin 농도에 미치는 영향을 Table 6에 나타내었다. Sham군내에서 혈청 ALP 농도는 대조군이  $34.2 \pm 9.1$  IU/l, arginine군이  $39.2 \pm 7.1$  IU/l로 유의적인 차이가 없었고, Ovx군에서 대조군이  $49.5 \pm 9.6$  IU/l arginine 첨가군이  $61.0 \pm 19.4$  U/l로 높은 경향을 보였다. 그러나

**Table 2.** Body weight change and food intake of experimental rats

Group	Sham		OVX	
	Control (n = 10)	Arginine (n = 10)	Control (n = 10)	Arginine (n = 10)
Initial body weight (g)	206.2 ± 12.5 <sup>1)a2)</sup>	212.4 ± 10.9 <sup>a</sup>	209.7 ± 13.7 <sup>a</sup>	213.0 ± 8.2 <sup>a</sup>
Final body weight (g)	274.8 ± 42.6 <sup>a</sup>	281.0 ± 37.2 <sup>a</sup>	330.7 ± 33.6 <sup>b</sup>	334.3 ± 36.7 <sup>b</sup>
Food intake (g/d)	14.6 ± 1.80 <sup>1)b2)</sup>	14.4 ± 1.21 <sup>b</sup>	17.4 ± 1.11 <sup>a</sup>	16.6 ± 1.88 <sup>a</sup>
FER	0.092 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.084 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.120 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.120 ± 0.03 <sup>a</sup>

1) Mean ± SD  
2) Value with different superscripts within the row are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test

**Table 3.** Serum calcium and phosphorus of rats fed experimental diets

Group	Sham		OVX	
	Control	Arginine	Control	Arginine
Ca (mg/dL)	11.3 ± 0.4 <sup>1)a2)</sup>	11.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	10.1 ± 0.3 <sup>b</sup>	11.0 ± 0.4 <sup>a</sup>
P (mg/dL)	8.5 ± 2.50 <sup>a</sup>	6.9 ± 0.62 <sup>a</sup>	8.5 ± 0.40 <sup>a</sup>	7.8 ± 0.87 <sup>a</sup>

1) Mean ± SD  
2) Value with different superscripts within the row are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test

혈청 osteocalcin 농도는 Sham군내에서 대조군이  $4.4 \pm 0.4$  ng/mL, arginine 첨가군이  $4.3 \pm 0.2$  ng/mL로 두 군 간에 유의적인 차이가 없었고, Ovx군내에서도 대조군이  $4.9 \pm 0.9$  ng/mL와 arginine 첨가군이  $4.9 \pm 0.3$  ng/mL로서 유의적인 차이가 없었다.

Table 7에서는 arginine 첨가 식이가 골 용해 지표인 DPD와 crosslink value에 미치는 효과를 나타내었는데 crosslink value는 Ovx군이 Sham군에 비하여 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 높았다. Sham군에서는 대조군 식이에 비하여 arginine군의 골용해 지표가 낮은 경향을 보였고, Ovx군내에서 대조군과 arginine군 간에 유의적인 차이가 없었다.

**골 대사 관련 호르몬에 미치는 영향**

난소절제쥐에서 arginine 첨가 식이가 혈 중 부갑상선호르몬 (parathyroid hormone; PTH)과 calcitonin 농도에 미치는 효과를 Table 8에 제시하였다. 혈 중 PTH 농도는

Sham군에서는 대조군 식이군이  $19.1 \pm 6.7$  pg/mL, arginine군이  $23.4 \pm 8.8$  pg/mL로 실험군 간에 유의적인 차이는 없었고 Ovx군내에서도 대조군식이군은  $19.5 \pm 8.7$  pg/mL, arginine 첨가군이  $20.4 \pm 4.2$  pg/mL로 유의적인 차이가 없었다. 혈 중 calcitonin 농도는  $3.03$  pg/mL에서  $3.53$  pg/mL 범위로 Sham군과 Ovx군 간에 또한 각 군 내에서 식이에 따른 차이는 없었다.

Arginine 첨가식이 성장호르몬 분비와 인슐린 유사 성장인자 (insulin-like growth factor-1; IGF-1) 농도에 미치는 효과를 Table 9에 나타내었다. 여성호르몬의 분비가 왕성한 Sham 군에서는 대조군과 arginine 첨가군의 성장호르몬의 농도가 각각  $0.19 \pm 0.02$  ng/mL  $0.19 \pm 0.01$  ng/mL로 유의적인 차이가 없었고, Ovx군내에서는 대조군과 arginine 첨가군이 각각  $0.18 \pm 0.01$  ng/mL  $0.20 \pm 0.01$  ng/mL로 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 높았다. IGF-1의 경우 Sham 군에서는 arginine 첨가군이 대조군에 비하여 높

**Table 4.** Effect of arginine supplementation on urinary calcium and phosphate excretion in Ovx rats

Group	Sham		OVX	
	Control	Arginine	Control	Arginine
Ca (mg/day)	$0.67 \pm 0.32^{1)2)}$	$0.60 \pm 0.31^a$	$0.53 \pm 0.23^a$	$0.49 \pm 0.26^a$
P (mg/day)	$8.90 \pm 0.73^a$	$9.36 \pm 2.94^a$	$9.79 \pm 3.06^a$	$10.01 \pm 3.23^a$

1) Mean  $\pm$  SD  
2) Value with different superscripts within the row are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test

**Table 5.** Effect of arginine supplementation on plasma arginine concentration in Ovx rats

Group	Sham		OVX	
	Control	Arginine	Control	Arginine
Arginine ( $\mu$ mol/L)	$65.34 \pm 19.31^{1)2)}$	$70.30 \pm 18.40^a$	$69.93 \pm 22.30^a$	$73.4 \pm 21.10^a$

1) Mean  $\pm$  SD  
2) Value with different superscripts within the row are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test

**Table 6.** Serum ALP and osteocalcin of rats fed experimental diets

Group	Sham		OVX	
	Control	Arginine	Control	Arginine
ALP (IU/L)	$34.2 \pm 9.1^{1)2)}$	$39.2 \pm 7.1^b$	$49.5 \pm 9.6^{ab}$	$61.0 \pm 19.4^a$
Osteocalcin (ng/mL)	$4.4 \pm 0.4^a$	$4.3 \pm 0.2^a$	$4.9 \pm 0.9^a$	$4.9 \pm 0.3^a$

1) Mean  $\pm$  SD  
2) Value with different superscripts within the row are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test  
ALP: alkaline phosphatase

**Table 7.** Creatinine, DPD and crosslink value of rats fed experimental diets

Group	Sham		OVX	
	Control	Arginine	Control	Arginine
Creatinine (nM)	$3.19 \pm 1.61^{1)2)}$	$7.94 \pm 3.74^a$	$4.44 \pm 2.21^a$	$5.54 \pm 6.13^a$
DPD (mM)	$573.2 \pm 402.1^a$	$1087.4 \pm 493.2^a$	$1064.9 \pm 328.6^a$	$1021.4 \pm 628.2^a$
Crosslink value (nM/mM)	$170.1 \pm 33.6^{ab}$	$141.7 \pm 34.6^b$	$262.7 \pm 66.7^a$	$256.5 \pm 99.0^a$

1) Mean  $\pm$  SD  
2) Value with different superscripts within the row are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test  
DPD: deoxypyridinoline

은 경향을 보였으나, Ovx군 내에서는 유의적인 차이가 없었다.

**적주 및 대퇴 골밀도와 골함량**

Arginine 첨가 식이가 척추 골밀도에 미치는 효과를 식이 섭취 후 5주째 본 결과 (Table 10) Sham 군에서는 arginine군이 대조군에 비해 높은 경향을 보였으나 유의적으로 차이는 없었다. 그러나 Ovx군의 경우 arginine군의 척추 골밀도는  $0.149 \pm 0.002 \text{ g/cm}^2$ 로 대조군의  $0.134 \pm 0.010 \text{ g/cm}^2$ 에 비하여 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 높았다. 척추 골함량은 Sham군과 Ovx군 모두에서 arginine 첨가에 따른 유의적인 차이는 없었다.

Arginine 첨가 식이가 대퇴 골밀도에 미치는 효과를 식이 섭취 후 5주째 본 결과 Sham군의 경우 arginine 첨가 시 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 높은 경향을 보였다. 난소절제쥐에서도 arginine군이 대조군에 비하여 대퇴골밀도가 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 높았다. 대퇴골함량은 Sham군내에서 arginine군과 대조군 간에 차이가 없었으며, Ovx군에서는 arginine군이 대조군 보다 높은 경향을 보였다.

Arginine의 첨가 식이가 척추 골밀도에 미치는 효과를 식이 섭취 후 9주째 본 결과 (Table 11) Sham군내에서는 arginine군이 5주째와 같이 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. Ovx군내에서는 arginine군의 척추골밀도가  $0.157 \pm 0.008 \text{ g/cm}^2$ 로 대조군의  $0.132 \pm 0.013 \text{ g/cm}^2$  보다 유

**Table 8.** The effect of arginine on parathyroid hormone and calcitonin in Ovx rats

Group	Sham		OVX	
	Control	Arginine	Control	Arginine
PTH (pg/mL)	$19.1 \pm 6.7^{1) a2)}$	$23.4 \pm 8.8^a$	$19.5 \pm 8.7^a$	$20.5 \pm 4.2^a$
Calcitonin (pg/mL)	$3.12 \pm 1.07^a$	$3.03 \pm 1.11^a$	$3.21 \pm 0.95^a$	$3.53 \pm 1.11^a$

1) Mean  $\pm$  SD  
 2) Value with different superscripts within the row are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test

**Table 9.** The concentrations of GH and IGF-1 of rats fed experimental diets

Group	Sham		OVX	
	Control	Arginine	Control	Arginine
GH (ng/mL)	$0.19 \pm 0.02^{1) a2)}$	$0.19 \pm 0.01^a$	$0.18 \pm 0.01^a$	$0.20 \pm 0.01^b$
IGF-1 (ng/mL)	$300.2 \pm 102.2^b$	$414.3 \pm 72.0^{ab}$	$494.6 \pm 44.6^a$	$487.4 \pm 75.6^a$

1) Mean  $\pm$  SD  
 2) Value with different superscripts within the row are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test  
 GH: growth hormone, IGF-1: insulin-like growth factor-1

**Table 10.** Effect of arginine supplementation on spine and femur BMD and BMC of rats fed experimental diets at 5 week

Group	Sham		OVX	
	Control	Arginine	Control	Arginine
SBMD ( $\text{g/cm}^2$ )	$0.177 \pm 0.023^{1) a2)}$	$0.187 \pm 0.006^a$	$0.134 \pm 0.010^c$	$0.149 \pm 0.002^b$
SBMC (g)	$0.433 \pm 0.069^a$	$0.464 \pm 0.028^a$	$0.354 \pm 0.013^b$	$0.365 \pm 0.025^b$
FBMD ( $\text{g/cm}^2$ )	$0.181 \pm 0.010^{1) b2)}$	$0.201 \pm 0.007^a$	$0.161 \pm 0.007^c$	$0.174 \pm 0.007^b$
FBMC (g)	$0.448 \pm 0.030^a$	$0.459 \pm 0.047^a$	$0.371 \pm 0.019^{ab}$	$0.406 \pm 0.021^b$

1) Mean  $\pm$  SD  
 2) Value with different superscripts within the row are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test  
 BMD: bone mineral density, BMC: bone mineral content

**Table 11.** Spine and femur BMD and BMC of rats fed experimental diets at 9 week

Group	Sham		OVX	
	Control	Arginine	Control	Arginine
SBMD ( $\text{g/cm}^2$ )	$0.190 \pm 0.007^{1) a2)}$	$0.207 \pm 0.008^a$	$0.132 \pm 0.013^c$	$0.157 \pm 0.008^b$
SBMC (g)	$0.491 \pm 0.021^a$	$0.519 \pm 0.030^a$	$0.401 \pm 0.012^b$	$0.414 \pm 0.034^b$
FBMD ( $\text{g/cm}^2$ )	$0.193 \pm 0.012^{1) b3)}$	$0.211 \pm 0.009^a$	$0.159 \pm 0.008^d$	$0.171 \pm 0.011^c$
FBMC (g)	$0.481 \pm 0.049^a$	$0.489 \pm 0.035^a$	$0.393 \pm 0.026^b$	$0.402 \pm 0.024^b$

1) Mean  $\pm$  SD  
 2) Value with different superscripts within the row are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test  
 BMD: bone mineral density, BMC: bone mineral content

의적으로 ( $p < 0.05$ ) 높았다. 그리고 arginine 식이는 Ovx 군에서 노출 기간에 따라 척추 골밀도에 미치는 영향은 다르게 나타났는데 식이노출 5주째는 대조군 식이에 비해 척추 골밀도가 11.2% 높았으나 ( $0.149 \pm 0.002 \text{ g/cm}^2$  vs  $0.134 \pm 0.010 \text{ g/cm}^2$ ) 9주째는 척추 골밀도가 18.9% ( $0.157 \pm 0.008 \text{ g/cm}^2$  vs  $0.132 \pm 0.013 \text{ g/cm}^2$ ) 높았다. 그러나 난소절제쥐에서 척추 골밀량은 5주째와 같이 식이군 간에 유의적인 차이가 없었다.

Arginine의 첨가 식이가 대퇴 골밀도에 미치는 효과를 식이 섭취 후 9주째 본 결과 Sham군에서는 arginine군이 대조군에 비하여 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 높았고 ( $0.193 \pm 0.012 \text{ g/cm}^2$  vs  $0.211 \pm 0.009 \text{ g/cm}^2$ ) OvX군 내에서도 arginine군이 대조군 보다 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 높았다 ( $0.159 \pm 0.008 \text{ g/cm}^2$  vs  $0.171 \pm 0.011 \text{ g/cm}^2$ ).

## 고 찰

Arginine은 비필수 아미노산으로 분류되지만 nitric oxide, ornithine, creatine, polyamines 등의 전구체로 이용되며 여러 가지 중요한 기능을 가지고 있어 여러 질병의 경우는 보충해야 하고,<sup>15)</sup> 면역능력 향상과,<sup>16)</sup> 상처의 회복을 돕는다는 기능이 보고되었다.<sup>17)</sup> 그러나 arginine과 골대사와 관련한 연구보고는 거의 없는 실정이다. 최근 성장기 암컷 쥐에서 arginine 첨가식을 섭취시켰을 때 골 형성에 유리한 것으로 보고되었다.<sup>9)</sup> 성장기의 암컷 쥐는 성호르몬의 분비가 미약하다가 점점 성호르몬의 분비가 왕성해지는 시기인데 성호르몬의 분비가 부족한 난소절제쥐에서는 arginine의 첨가식이 골밀도에 유리한 효과를 나타내는지 검증된 바 없다. 따라서 성장기 암컷쥐에게 섭취시킨 동량의 arginine첨가식을 난소절제쥐에게 섭취 시켜 골밀도와 골대사 관련 지표 및 호르몬에 미치는 효과를 알아보았다.

Arginine 첨가식이 체중에 미치는 영향을 본 결과 Sham군과 OvX군 모두 유의적인 영향을 미치지 않았는데 이것은 arginine 첨가식이 성장기 쥐에서 체중에 영향을 미치지 않았다는 선행연구 결과와,<sup>9)</sup> 또한 본 연구와 몸무게가 비슷한 9주령 Sprague-Dawley 수컷 쥐에서 arginine 첨가식이 (0.64% arginine)를 섭취 시킨 경우 체중에 영향을 미치지 않았다고 보고한 연구 결과와<sup>18)</sup> 일치하였다.

그러나 최근 Sprague-Dawley 수컷 쥐에서 arginine의 섭취는 체중 증가를 낮춘다는 보고가 있었는데<sup>18)</sup> 이것은 본 연구 결과와 다르다. 그러나 그 이유는 본 연구에서 실험동물이 섭취한 arginine의 양은 체중 1 kg 당 약 0.5~0.6 g으로 선행연구에서 실험동물이 arginine을 섭취한 양인 체중 1 kg 당 1.4 g의 약 30~40% 수준에 달하므로 arginine의

섭취 수준이 다르므로 추후 연구가 요망된다.

Arginine 첨가 식이가 식이 섭취량에 미치는 영향은 Sham군과 OvX군 모두에서 유의적인 차이는 없었으며 식이 Sham군은 평균 14.5 g/d로서 약 300 g의 수컷 쥐에서 arginine을 첨가시킨 경우 하루 평균 섭취량이 17.0 g (혹은 56.7 g/kg.d)으로 보고 한 것<sup>18)</sup>에 비하여 낮은 편인데 이것은 성별의 차이로 보인다.

Arginine 첨가 식이가 혈 중 칼슘 농도에 미치는 영향을 본 결과 Sham군과 OvX군 모두 혈 중 칼슘 농도는 정상 범위 내에 있었지만 ( $7.2 \sim 13.0 \text{ mg/dL}$ )<sup>19)</sup> 대조군 식이 시 OvX군의 혈 중 칼슘도 Sham군에 비하여 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 낮았다. 그러나 난소절제쥐에서 대조군의 혈 중 칼슘 농도는  $10.1 \pm 0.3 \text{ mg/dL}$ 이었으나 arginine군은  $11.0 \pm 0.4 \text{ mg/dL}$ 로 arginine 첨가 식이는 혈 중 칼슘 농도를 높여 Sham군의 대조군의 혈 중 칼슘 농도  $11.3 \pm 0.4 \text{ mg/dL}$ 와 비슷한 수준을 유지하였다. 혈 중 인의 농도는 실험군 간에 유의적인 차이가 나타나지 않았으며  $6.9 \text{ mg/dL}$ 에서  $8.5 \text{ mg/dL}$  범위로 모두 정상 수준 ( $3.11 \sim 11.0 \text{ mg/dL}$ ) 내에 포함되었고<sup>19)</sup> 이들의 농도는 선행연구 결과와<sup>20-23)</sup> 유사하였다.

Arginine 첨가 식이가 뇨 중 칼슘 배설에 미치는 영향을 본 결과 Sham군과 OvX군 모두에서 arginine군은 대조군에 비하여 요 중 칼슘 배설량이 약간 낮은 경향을 보였으나 통계적 유의성이 없었다. 이것은 성장기 암컷 쥐에서 요 중 칼슘 배설량이 대조군 0.73 mg/day이고 arginine 첨가식이군 0.39 mg/day로 arginine 첨가식이군이 대조군보다 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 낮았다는 보고와<sup>9)</sup> 차이가 있다. 따라서 뇨 중 칼슘의 배설을 유의적으로 낮추기 위하여 난소절제쥐는 성장기 쥐에 비하여 arginine의 첨가 함량이 더 필요한지 추후 연구가 요망된다.

단백질 급원을 casein에서 콩단백질로 대체하는 경우에 콩단백질에 함유한 arginine 함량 만큼 첨가한 arginine 첨가식이 (6.6 g arginine/kg diet)의 혈 중 arginine 농도에 미치는 영향을 알아본 결과 Sham군과 OvX군 모두 arginine의 첨가 식이는 혈장 arginine의 농도에 통계적으로 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 이 결과는 혈중 arginine 농도가  $65.3 \pm 19.3 \mu\text{mol/L}$ 로 Sprague-Dawley 쥐를 대상으로 혈 중 아미노산을 측정한 연구결과와<sup>18,24,25)</sup> 비교하였을 때 혈 중 arginine의 농도는 Choi 등<sup>24)</sup>의 연구  $56.2 \mu\text{mol/L}$ 와 비슷하고, Lee 등<sup>25)</sup>의 연구결과  $109.9 \mu\text{mol/L}$  보다는 낮은 농도이다.

Arginine 첨가식이 난소절제쥐에서 골 형성 지표에 미치는 영향을 본 결과 arginine 첨가식이군은 대조군 보다 alkaline phosphatase (ALP) 농도가 높은 경향을 보였으나

통계적인 유의성이 없었고 ( $49.5 \pm 9.6$  mg/dL vs  $61.0 \pm 19.4$  mg/dL) 혈 중 osteocalcin 농도는 유의적인 차이가 없었는데 이것은 성장기 암컷 쥐에서도 혈중 ALP와 osteocalcin 농도에도 유의적인 차이가 없었다는 결과와<sup>26)</sup> 일치하였다.

골 용해지표를 보면 Sham군내에서는 arginine 첨가 시 낮은 경향을 보였고, Ovx군내에서는 arginine 첨가에 의한 crosslink value가 유의적인 차이가 없었다. 이것은 선행연구에서 성장기 쥐를 대상으로 연구하였을 때 arginine이 풍부한 콩 단백질 군과 casein 식이군 간에 crosslink value는 차이가 없다고 보고한 것과<sup>26)</sup> arginine을 첨가한 경우에도 crosslink value는 차이가 없었다고 보고한 것과<sup>9)</sup> 일치한다. 난소절제쥐에서도 arginine 첨가식은 골 형성 지표와 골 용해 지표에 유의적인 영향을 미치지 않았다.

혈 중 PTH는 Sham군내에서 대조군 19.1 pg/mL, arginine 첨가군 23.4 pg/mL 그리고 Ovx군내에서 대조군 19.5 pg/mL, arginine 첨가군은 20.5 pg/mL로 군 간에 유의적인 차이는 없었다. 혈중 PTH 농도는 연령 증가와 함께 증가하였다고 보고하였는데 늙은 수컷 쥐의 경우<sup>27)</sup> 콩 단백질이 연령 증가로 인한 부갑상선기능항진(hyperparathyroidism)을 감소시켜 골 손실을 부분적으로 예방해 줄 수 있다고 제안하였다. 그러나 본 연구의 경우 PTH 농도가 유의적으로 낮지 않았는데 그 이유는 콩단백질 섭취 대신 casein에 arginine을 첨가한 것과 동물의 성별과 주령 차이와 콩단백질의 아미노산 조성 외 다른 성분의 기능이 역할을 하는 것으로 사료되어 더욱 연구가 필요하다.

혈중 calcitonin 농도는 Sham군내에서 대조군식이와 arginine 첨가군의 농도는 각각 3.12 pg/mL와 3.03 pg/mL, Ovx군내에서 대조군 식이와 arginine 식이군은 각각 3.21 pg/mL, 3.53 pg/mL로 군간에 유의적인 차이는 없었다. 이 결과는 Choi 등<sup>28)</sup>의 연구에서 콩 단백질의 섭취 시 혈중 calcitonin 농도에 유의적인 차이가 없었다고 보고한 것과 일치한다.

성장호르몬은 골밀도에 긍정적 영향을 미치는데 arginine이 풍부한 콩단백질 섭취 시 혈 중 성장 호르몬의 농도가 높았고,<sup>28)</sup> 성장기 쥐에서도 arginine 첨가식이 섭취 시 혈 중 성장호르몬의 농도가 arginine 첨가군이 대조군에 비하여 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 높았다.<sup>9)</sup> 또한 성장 호르몬이 부족한 성인 남성에게 성장 호르몬을 5년간 장기 투여 한 결과 골밀도가 증가되었으며 trabecular bone 보다는 cortical bone에 더 영향을 미친다고 보고 하였다.<sup>29)</sup> 난소절제쥐에서 arginine 첨가가 혈 중 성장 호르몬농도에 미치는 효과를 본 결과 대조군 식이군과 arginine 첨가 식이군의 성장 호르몬 농도가 각각 0.18 pg/mL와 0.20 pg/mL로 유의적

으로 ( $p < 0.05$ ) 높은 경향을 보였다. 이 결과는 arginine 첨가식이 시 성장 호르몬 분비가 증가하였다는 선행연구와 같은 결과를 나타내었다.<sup>9)</sup> Arginine이 somatostatin 분비를 억제시켜 성장 호르몬의 분비가 증가한다고 보고되었으나 그 기전에 대하여 확실히 규명된 것이 없다.<sup>30,31)</sup> 성장 호르몬은 연령 증가에 따른 신체기능 저하와 골격 성장과 골다공증의 병인과 관련이 있는 것으로 알려져 있는데<sup>32)</sup> 특히 arginine은 성장기 쥐에서 성장호르몬의 분비에 영향을 주어 골 형성에 유리한 것으로 보고되었다.<sup>33)</sup>

Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)은 합성 펩타이드로서 골밀도와 상관성이 있고 연령이 증가할수록 혈 중 IGF-1 농도는 감소되고 골밀도도 감소한다.<sup>34)</sup> Arginine 첨가식이 혈 중 인슐린 유사 성장인자 IGF-1 농도에 미치는 효과를 본 결과 Sham 군내의 IGF-1 농도는 arginine 첨가식이 섭취 시 높은 경향을 보였으나 난소절제쥐의 경우는 실험 군 간에 유의적인 차이는 없다. 혈중 IGF-1은 또한 IGF-BP-3 (IGF-binding protein-3)과 함께 골합량을 유지하는데 매우 중요하여 골다공증환자에서 골절과 관련하여 골다공증의 심각성을 예견하는 임상적 지표로서도 이용이 가능하다고 보고 하였다.<sup>35)</sup> 혈중 IGF-1의 농도는 성인 남성에서 척추와 대퇴부의 골밀도와 양의 상관성이 있었다고 보고하였다.<sup>36)</sup> 본 연구결과에서 여성호르몬의 분비가 왕성한 Sham군에는 arginine의 첨가가 IGF-1의 농도가 높아져서 IGF-1의 분비에 더 상승효과를 나타내는 것으로 보이나 여성호르몬의 분비가 거의 없는 경우 그 효과가 없었다. 따라서 난소절제쥐에서는 IGF-1의 농도에 영향을 미치는 arginine 섭취량이 더 필요한지 추후 연구가 요망된다.

사람의 경우 여성호르몬의 결핍 상태는 현저한 골밀도 감소를 가져오는데 특히 폐경 후 처음 몇 년 동안 골밀도 감소가 더욱 현저하다는 것을 고려하여<sup>34)</sup> 폐경 여성 모델인 난소절제쥐를 실험식이 노출기간에 따라 5주째와 9주째의 골밀도를 측정하여 여성호르몬 결핍 노출 기간에 따른 arginine의 골밀도에 미치는 효과를 측정하였다.

실험식이 노출 5주째 척추 골밀도와 골무기질 함량을 측정한 결과 척추의 골밀도는 Sham군의 경우는 arginine군의 척추 골밀도가 대조군에 비하여 높은 경향을 보였으나 유의적인 차이가 없었다. 이것은 성장기 암컷 쥐에서 성호르몬이 안정적으로 분비되는 시기인 경우 arginine의 첨가식은 척추 골밀도에 유의적인 차이를 보이지 않았다는 결과와 일치하였다.<sup>9)</sup> 그러나 인위적 성호르몬의 결핍을 유도한 난소절제쥐의 경우 arginine의 첨가 식이에 5주간 노출 시킨 경우 척추 골밀도가 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 증가하였다. 따라서 이것은 성장기 암컷 쥐에서 성호르몬의 분비가 미약한 경우 본 연구에서 사용한 동량의 arginine 첨가

식은 척추 골밀도가 증가되는 경향을 보였다는 보고와 일치하였다.<sup>9)</sup>

Arginine 첨가식이 노출 5주째 대퇴부 골밀도를 측정할 결과 Sham군에서는 arginine군이 높은 경향을 보였다. 그리고 난소절제된 쥐에서 5 주간의 arginine 식이를 섭취시킨 경우 대퇴 골밀도가 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 높았다. 이것은 성장기 암컷 쥐에서 성호르몬의 분비가 왕성하지 않은 시기에 arginine 첨가식을 6주간 섭취시킨 경우 대퇴 골밀도가 유의적으로 높았다고 보고한 것과 비슷하다. 따라서 arginine 첨가 식이는 여성호르몬이 결핍된 상태에서 대퇴골밀도에 유리한 효과를 보였다.

난소절제 기간이 더 길어진 실험식이 노출 9주째에 arginine 첨가식이 골밀도에 미치는 영향을 본 결과 척추골밀도는 Sham 군에서는 역시 유의적인 차이가 없었다. 이것은 성장기 암컷 쥐의 경우에 arginine 식이 섭취 6주째는 척추골밀도가 대조군에 비하여 arginine 군이 높았으나 9주째의 척추골밀도는 유의적인 차이가 없었다고 보고한 것과 일치하는데, 본 연구의 Sham군의 암컷 쥐는 성호르몬의 분비가 안정된 시기이므로 arginine의 효과가 상쇄되었다고 보고한 것과 일치한다.<sup>9)</sup> 그러나 본 연구에서 Ovx군에서는 실험식이 섭취 후 9주째의 척추골밀도는 arginine 군이 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 높았으며 대조군과의 차이는 5주째 보다 더 크게 나타나 장기적인 arginine의 섭취는 더 유리한 것으로 나타났다.

Arginine 첨가 식이가 대퇴 골밀도에 미치는 효과에서 Sham군내에 arginine군이 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 높았다. 이것은 성장기 암컷의 경우에도 성호르몬의 분비량이 왕성한 노출 9주째에도 대퇴골밀도가 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 높은 것과 일치한다. 따라서 대퇴골밀도는 척추골밀도와 달리 성호르몬의 분비가 왕성하여도 arginine의 효과가 나타나 골에 따라 효과가 다르게 나타났다. 최근 연구에서 Sprague-Dawley 흰쥐에서 arginine을 섭취시킨 경우 (1.4 g arginine/kg body weight) 인슐린의 분비 증가로 골격근으로 혈류 증가로 포도당과 아미노산의 흡수량이 증가되었다고 보고하였다.<sup>14)</sup> 그리고 사람의 경우 척추의 골절은 연령이 증가하면서 증가를 보이는데 반하여 대퇴골의 골절은 폐경까지는 서서히 증가하다가 그 때 이후로는 기하급수적으로 증가한다는 보고에 근거하여<sup>32)</sup> 본 연구의 난소절제된 쥐에서 척추골밀도는 arginine 군이 대조군에 비하여 5주째 보다 9주째 유의적인 증가율이 더 높았으나, 대퇴 골밀도는 난소절제 후 5주째는 보다 9주째에 그 증가율이 낮아 여성호르몬이 결핍된 상태에서 대퇴부의 골밀도 감소를 지연시키기 위하여 더 많은 arginine 함량이 요구되는지 추후 연구가 요망된다.

이상의 결과에서 난소절제된 쥐에서 arginine군은 대조군에 비하여 척추 및 대퇴 골밀도가 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 높아 여성호르몬의 분비가 부족한 경우 arginine 첨가 식이는 골밀도 감소지연에 유리함을 확인하였다.

## 요약 및 결론

난소절제된 쥐에서 arginine 첨가 식이가 골밀도에 미치는 영향은 아래와 같다.

- 1) Ovx군에서 체중 증가량, 식이 섭취량, 식이효율은 실험 군 간에 유의적인 차이가 없었다.
- 2) Ovx군에서 혈 중 칼슘의 농도는 arginine군이 대조군에 비하여 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 높았다.
- 3) 칼슘 배설량은 arginine군이 낮은 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다.
- 4) 혈장 아미노산, 혈청 ALP, osteocalcin 농도는 arginine 첨가에 따라 유의적인 차이가 없었다.
- 5) 골 용출 지표인 DPD crosslinks value는 실험 군 간에 유의적인 차이는 없었다.
- 6) 혈 중 PTH, calcitonin, IGF-1 농도는 arginine 첨가에 따라 유의적인 차이가 없었다.
- 7) 난소절제된 쥐에서 성장호르몬 농도는 arginine을 첨가군이 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 높았다.
- 8) Ovx군에서 arginine군은 대조군에 비하여 척추 골밀도와 대퇴 골밀도가 실험식이 노출 5주째와 9주째 모두 유의적으로 ( $p < 0.05$ ) 높았다.

결론적으로, 난소절제된 쥐에서 arginine 첨가식은 성장 호르몬의 분비를 증가시켰고 척추 및 대퇴 골밀도에 유익한 것으로 나타나 골밀도 감소 지연에 유익할 것으로 사료된다.

## ■ 감사의 글

본 연구를 위하여 casein을 공급해 주신 주)매일 유업에 감사를 드립니다.

## Literature cited

- 1) Greendale GA, FitzGerald G, Huang MH, Sternfeld B, Gold E, Seeman T, Sherman S, Sowers M. Dietary soy isoflavones and bone mineral density: results from the study of women's health across the nation. *Am J Epidemiol* 2002; 155(8): 746-754
- 2) Ho SC, Chan SG, Yi Q, Wong E, Leung PC. Soy intake and the maintenance of peak bone mass in Hong Kong Chinese women. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 1363-1369
- 3) Setchell, KD, Lydeking-Olsen E. Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from in vitro and in vivo, human observational, and dietary intervention studies. *Am J Clin Nutr*

- 2003; 78: 593S-609S
- 4) Atkinson C, Compston JE, Day NE, Dowsett M, Bingham SA. The effects of phytoestrogen isoflavones on bone density in women: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 326-333
  - 5) Spence LA, Lipscomb ER, Cadogan J, Martin B, Wastney ME, Peacock M, Weaver CM. The effect of soy protein and soy isoflavones on calcium metabolism in postmenopausal women: a randomized crossover study. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 916-922
  - 6) Andreassen TT, Jorgensen PH, Flyvbjerg A, Orskov H, Oxlund H. Growth hormone stimulates bone formation and strength of cortical bone in aged rats. *J Bone Miner Res* 1995; 10: 1057-1067
  - 7) Monson JP, Arake WM, Carroll PV, Weaver JU, Rodriguez-Arnao J, Savage MO. Influence of growth hormone on accretion of bone mass. *Horm Res* 2000; 58 (Suppl)1: 52s-56s
  - 8) Sugimoto T, Kaji H, Nakaoka D, Yamauchi M, Tano S, Sugishita T, Baylink DJ, Mohan S, Chihara K. Effect of low-dose of recombinant human growth hormone on bone metabolism in elderly women with osteoporosis. *Eur J Endocrinol* 2002; 147 (3): 339-348
  - 9) Choi MJ. Effects of arginine supplementation on bone mineral density in growing female rats. *Korean J Nutr* 2007; 40 (3): 235-241
  - 10) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents. *J Nutr* 1993; 123: 1939-1951
  - 11) Xing S, Cekan SZ, Dicafalusy U. Validation of radioimmunoassay for estradiol-17 isotope dilution-mass spectrometry and a test of radiochemical purity. *Clin Chem Acta* 1983; 135: 189-201
  - 12) Guarnero P, Grimaux M, Seguin P, Delmas P. Characterization of immunoreactive forms of human osteocalcin generated in vivo and in vitro. *J Bone Min Res* 1994; 9: 692-698
  - 13) Nanda N, Joshi H, Subbarao SK, Sharma VP. Two-site immunoradiometric assay (IRMA): detection, efficiency, and procedural modifications. *J Am Mosq Control Assoc* 1994; 10: 225-227
  - 14) Guarnero P, Grimaux M, Seguin P, Delmas P. Characterization of immunoreactive forms of human osteocalcin generated in vivo and in vitro. *J Bone Min Res* 1994; 9: 692-698
  - 15) Yvette C. Luiking and Nicolaas E. P. Deutz. Biomarkers of arginine and lysine excess. *J Nutr* 2007; 137: 1662S-1666S
  - 16) Daly JM, Reynolds J, Thom A, Kinsley L, Dietrick-Gallagher M, Shou J, Ruggieri B. Immune and metabolic effects of arginine in the surgical patient. *Ann Surg* 1988; 208: 512-523
  - 17) Chyun JH, Griminger P. Improvement of nitrogen retention by arginine and glycine supplementation and its relation to collagen synthesis in traumatized mature and aged rats. *J Nutr* 1984; 114: 1697-1704
  - 18) Kohli R, Meininger CJ, Haynes TE, Yan W, Self JT, Wu G. Dietary L-arginine supplementation enhances endothelial nitric oxide synthesis in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr* 2004; 134 (3): 600-608
  - 19) Mituka BM, Rawnsley HN. Clinical biochemical and hematological reference value in normal experimental animals and normal humans. 2nd edition, New York: Masson; 1987. p.160
  - 20) Choi MJ. Effects of soy protein on bone mineral content and bone mineral density in growing male rats. *Korean J Nutr* 2002; 35 (4): 409-413
  - 21) Choi MJ, Jo HJ. Effects of soy protein and isoflavones on bone mineral density in growing female rats. *Korean J Nutr* 2003; 36 (4): 359-367
  - 22) Choi MJ, Jung SH. The effect of dietary source and sulfur amino acid content on bone metabolism in growing rats. *Korean J Nutr* 2004; 37 (2): 100-107
  - 23) Choi MJ. Effects of soy and isoflavones on bone markers and hormones in growing male rats. *Korean J Nutr* 2003; 36 (5): 452-458
  - 24) Choi MJ, Kim JH, Chang KJ. The effect of dietary taurine supplementation on plasma and liver lipid concentrations and free amino acid concentrations in rats fed a high-cholesterol diet. *Adv Exp Med Biol* 2006; 583: 235-242
  - 25) Lee YM, Choi MJ, Chang KJ. The effect of dietary taurine supplementation on plasma and urinary free amino acid concentrations in diabetic rats. *Adv Exp Med Biol* 2003; 526: 75-82
  - 26) Choi MJ. Effects of soy and isoflavones on bone markers and hormones in growing male rats. *Korean J Nutr* 2003; 36 (5): 452-458
  - 27) Kalu DN, Masoro EJ, Yu BP, Hardin RR, Hollis BW. Modulation of age related hyperparathyroidism and senile bone loss in fischer rats by soy protein and food restriction. *Endocrinology* 1998; 122: 1847-1854
  - 28) Choi MJ, Cho HJ. Effects of soy and isoflavones on bone metabolism in growing female rats. *Korean J Nutr* 2003; 36 (6): 549-558
  - 29) Bravenboer N, Hoizmann PJ, Matten JC, Stuurman LM, Roos JC, Lips P. Effect of long-term growth hormone treatment on bone mass and bone metabolism in growth hormone-deficient men. *J Bone Miner Res* 2005; 20 (10): 1778-1784
  - 30) Dean HJ, Kellett JG, Bala RM. The effect of growth hormone treatment on somatomedin levels in growth hormone deficient children. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 55: 1167-1173
  - 31) Lely AJ. Growth hormone and aging. *GH & IGF Res* 1999; 9: 117-119
  - 32) Lewinson D, Shenzer P, Hochberg Z. Growth hormone involvement in the regulation of tartrate resistant acid phosphatase positive cells that are active in cartilage and bone resorption. *Calcif Tissue Int* 1993; 52: 216-221
  - 33) Choi MJ. Effects of arginine supplementation on bone markers and hormones in growing female rats. *Korean J Nutr* 2007; 40 (4): 320-326
  - 34) Barret-Connor E, Goodman-Gruen D. Gender differences in insulin-like growth factor and bone mineral density association in old age: the Rancho Bernardo Study. *J Bone Miner Res* 1998; 13 (8): 1343-1349
  - 35) Sugimoto T, Nishiyama K, Kuribayashi F, Chihara K. Serum levels of insulin-like growth factor (IGF) I, IGF binding protein (IGFBP)-2 and IGFBP-3 in osteoporotic patients with and without spinal fractures. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 1272-1279
  - 36) Krassas GE, Papadopoulou PH, Koliakos G. Growth hormone, insulin growth factor-I, and IGF binding protein-3 axis relationship with bone mineral density among healthy men. *Arch Androl* 2003; 49: 191-199