

## 골다공증 동물 모델에서 알파 리포산이 골 대사에 미치는 작용

울산대학교 의과대학 서울아산병원 내과학교실, 아산생명과학연구소<sup>1</sup>

고정민 · 이희숙<sup>1</sup> · 김덕재 · 김기수

### Effects of alpha-Lipoic Acid on Bone Metabolism in Rats with Low Bone Mass

Jung-Min Koh, Hee-Sook Lee<sup>1</sup>, Duk Jae Kim, Ghi Su Kim

Department of Internal Medicine, Asan Medical Center,  
University of Ulsan College of Medicine, Asan Institute for Life Science<sup>1</sup>

#### ABSTRACT

**Background:** Growing evidence has shown a biochemical link between increased oxidative stress and reduced bone density. In our previous study,  $\alpha$ -lipoic acid ( $\alpha$ -LA), a thiol antioxidant, suppressed both osteoclastogenesis and bone resorption, and also prevented TNF- $\alpha$ -induced apoptosis of osteoblast lineages. The effects of  $\alpha$ -LA were investigated on bone metabolism in rats with a low bone mass.

**Methods:** An ovariectomy (OVX) or Talc injection (inflammation-mediated osteopenia, IMO) was performed in 12 week old female Sprague-Dawley rats. Diets containing either 0.3%, 0.5% or 1.0%  $\alpha$ -LA were administered to the OVX rats for 16 weeks, and to the IMO rats for 21 days. The bone mineral densities (BMD) of the anterior-posterior lumbar spine and total femur were measured using dual-energy X-ray absorptiometry (Hologic QDR 4500-A), with small animal software. The plasma bone specific alkaline phosphatase activity (BSAP) and urinary free deoxypyridinoline concentration (DPD) were determined using enzyme immunoassay methods.

**Results:** The body weights were significantly decreased in the OVX rats on the diets containing 0.3 and 0.5%  $\alpha$ -LA than in the OVX control. No significant differences in the BMD at either site were noted between rats administered the diets with or without  $\alpha$ -LA. However, the administration of various doses of  $\alpha$ -LA noticeably decreased the level of urinary DPD in both the OVX and IMO rats. High doses of  $\alpha$ -LA (0.5% and/or 1.0%) also decreased the levels of plasma BSAP in both models.

**Conclusion:** Although no increase in BMD was demonstrated by the administration of  $\alpha$ -LA, these results suggest that  $\alpha$ -LA suppresses the rates of bone turnover in rats with a low bone mass (J Kor Soc Endocrinol 20:476~487, 2005).

**Key Words:** Oxidative stress, Antioxidants,  $\alpha$ -Lipoic acid, Bone Density, Osteoporosis, Rats

#### 서 론

산화 스트레스는 노화, 동맥경화, 염증성 질환, 당뇨병,

파킨슨씨 병 등 여러 가지 질환의 발생에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[1]. 최근에는 골다공증의 발생에도 산화 스트레스의 증가가 관여한다는 사실이 보고되고 있는데, 산화 스트레스 표지자인 malondialdehyde[2]와 8-iso-prostaglandin F2 $\alpha$ [3]가 골다공증 환자들의 혈액에서 높게 측정되

접수일자: 2004년 8월 2일

통과일자: 2005년 9월 14일

책임저자: 김기수, 서울아산병원 내분비내과

\* 이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-2004-003-E00096).

고, 항산화 표지자인 혈중 비타민 C와 비타민 E, superoxide dismutase, glutathione peroxidase는 감소되어 있다고 보고된 바 있다[2,4]. 또한, 비타민 C, 비타민 E, N-아세틸시스테인 등의 항산화제가 골다공증 발생을 억제하며[5~7], 산화 스트레스가 증가되어 있는 흡연 폐경 여성에서는 비타민 C와 비타민 E를 충분히 공급함으로써 고관절 골절의 위험을 3배 가량 감소시킬 수 있다고 하여 관심을 끌기도 하였다[8].

산화 스트레스가 골다공증을 일으키는 기전이 무엇인지는 명확하지 않지만, 직접 파골 계열세포에 작용하여 분화와 활성을 증가시킴으로써 골 흡수를 촉진하는 것이 주 기전으로 해석되고 있으며[9,10], 인터류킨-1 (interleukin-1)이나 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 등에 의한 파골세포의 활성화에도 산화 스트레스가 관여한다고 알려져 있다[11]. 더불어, 몇몇 연구들은 산화 스트레스가 조골 계열세포의 세포자멸사를 유도하고[12~15] 조골세포의 분화를 억제함으로써[15~17] 골형성을 억제하기도 한다고 보고되고 있다.

한편, 알파 리포산은 미토콘드리아 내의 여러 효소에 대한 보조 인자로 작용하는 티올계 항산화제로서, 생체 내에서 디하이드로 리포산(dihydrolipoic acid)으로 전환되어 수용성 및 지용성 환경 모두에서 산화 스트레스를 감소시키는 강력한 항산화제이다[18,19]. 현재 임상에서는 허혈-재관류 손상[20], 당뇨병[21~23], 신경변성 질환[24] 등 산화 스트레스의 증가와 관련된 여러 가지 질환에 널리 사용되고 있는데, 성인의 복용량이 하루 600 mg인데 반해 LD50가 400~500 mg/kg인 매우 안전한 약제이다[18]. 저자들은 최근 골세포에 대한 알파 리포산의 작용을 연구하여 이를 보고한 바 있는데, 알파 리포산은 파골세포의 분화를 억제하여 골 흡수를 감소시킬 뿐만 아니라[25], 내인성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ 에 의해 유발된 조골 계열세포의 세포자멸사도 억제하였다[26]. 이는 알파 리포산이 골흡수는 억제하고 골형성은 촉진할 수 있음을 보고한 최초의 연구 결과로서, 알파 리포산을 골다공증 치료제로도 개발 가능할 것임을 시사한다. 이에 본 연구는 세포 수준에서 확인한 알파 리포산의 작용이 생체에서도 일어나는지 알아보고자 기획되었다. 이를 위해 본 연구에서는 난소를 절제하거나 전신적으로 염증을 유발하여[27] 골다공증을 일으킨 백서에 다양한 농도의 알파 리포산을 투여한 후 골밀도와 생화학적 골 표지자를 측정하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 실험 동물

10주령의 암컷 Sprague Dawley 백서를 오리엔트사(경기, 대한민국)로부터 구입하여, 실험 종료 시까지 온도( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ )와 명암(12시간 주기)을 조절한 환경에서 사육하였

으며, 특별한 언급이 없는 한 물과 표준식을 제한 없이 공급하였다.

### 2. 난소 절제 동물 모델 실험

Fig. 1A에 실험 프로토콜을 정리하여 도식화하였다. Sprague Dawley 백서를 12주령에 가짜수술(sham operation, 가짜 수술 군,  $n=7$ ) 및 난소 절제를 시행하였다. 난소를 절제한 백서들은 네 군으로 나누었는데, 표준식을 투여한 군(난소절제 대조군,  $n=7$ ), 0.5% 알파 리포산(리포에이, 다림 양행, 서울, 대한민국) 투여군과 같은 양의 표준식을 투여한 군(먹이섭취 제한군,  $n=7$ ), 표준 식이에 0.3%의 알파 리포산을 섞어 투여한 군(0.3% 알파 리포산 투여군,  $n=7$ ), 표준 식이에 0.5%의 알파 리포산을 섞어 투여한 군(0.5% 알파 리포산 투여군,  $n=7$ )이었다. 치료 식이는 수술 후 1주일 뒤(13주령)부터 시작하였으며, 이때부터 먹이량을 매일 측정하였고, 체중은 수술 시부터 1주일 간격으로 측정하였다. 골밀도는 수술 1주 전과 치료 시작 후 4주, 10주, 16주에 ketamine (48 mg/kg)과 xylazine (5.6 mg/kg)을 섞은 마취제를 복강 내로 주입하여 마취시킨 상태에서 측정하였으며, 마지막 골밀도를 측정할 때에 심장 천자를 하여 희생시켰다. 희생 시 자궁 위축의 발생을 관찰함으로써 난소 절제가 성공적으로 이루어졌음을 확인하였다.

### 3. 염증 유발 동물 (inflammation-mediated osteopenia, IMO) 모델 실험

Fig. 1B는 IMO 모델에서의 실험 프로토콜을 정리한 그림이다. 12 주령의 Sprague Dawley 백서를 이미 보고된 방법[27]에 따라 전신 염증을 유발시켰다. 요약하면, 멸균된 뜨거운 생리식염수로 마그네슘 규산염(magnesium silicate, Talc, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 녹인 후, 각 백서의 배부에 16 mg/g body weight의 양이 되도록 1 mL 주사기를 이용하여 8~12회 피하 주사하였다. 같은 양의 생리 식염수를 피하 주사하여 생리 식염수 대조군( $n=6$ )을 만들었으며, IMO 군은 표준식을 투여한 군(IMO 대조군,  $n=8$ ), 표준 식이에 0.3%의 알파 리포산을 섞어 투여한 군(0.3% 알파 리포산 투여군,  $n=8$ ), 표준 식이에 0.5%의 알파 리포산을 섞어 투여한 군(0.5% 알파 리포산 투여군,  $n=8$ ), 표준 식이에 1.0%의 알파 리포산을 섞어 투여한 군(0.1% 알파 리포산 투여군,  $n=8$ )으로 나누었다. 치료 식이는 IMO 제작 2일 뒤부터 시작하였으며, 이때부터 먹이량을 매일 측정하였고, 체중은 Talc 주입 시부터 1주일 간격으로 측정하였다. 골밀도는 IMO 제작 1주전과 3주의 치료 기간이 끝난 뒤 위에 기술한 방법과 동일하게 마취한 상태에서 측정하였으며, 두 번째 골밀도를 측정할 때에 심장 천자를 하여 희생시켰다. 희생 시 비장의 무게를 측정하여 생리 식염수 투여군에 비해 IMO 군의 비장 무게가 증가되어있음을 관찰함

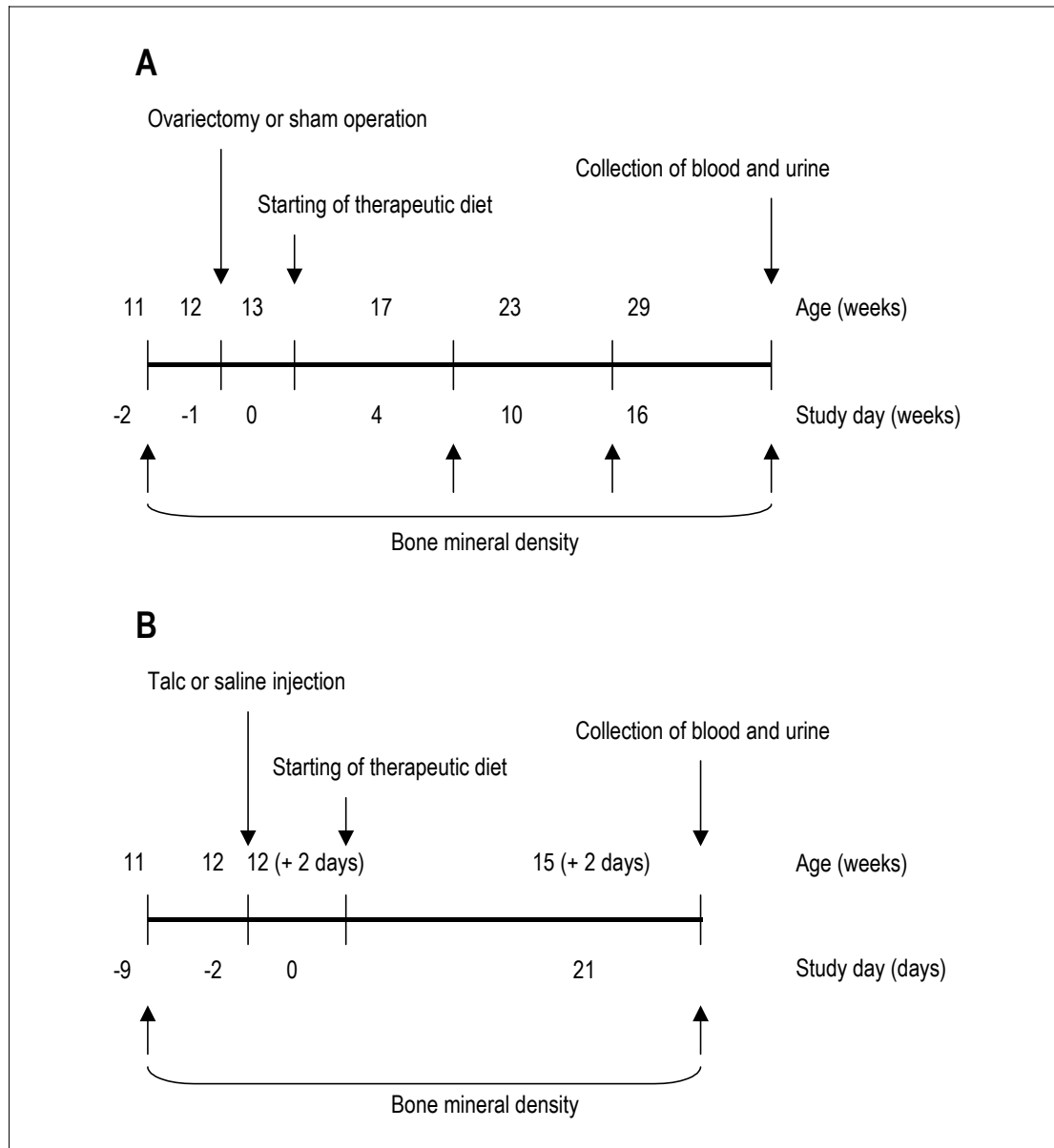


Fig. 1. Experimental protocols in ovariectomized rats (A) and inflammation-mediated osteopenia model (B).

으로써 성공적으로 IMO 모델이 만들어졌음을 확인하였다.

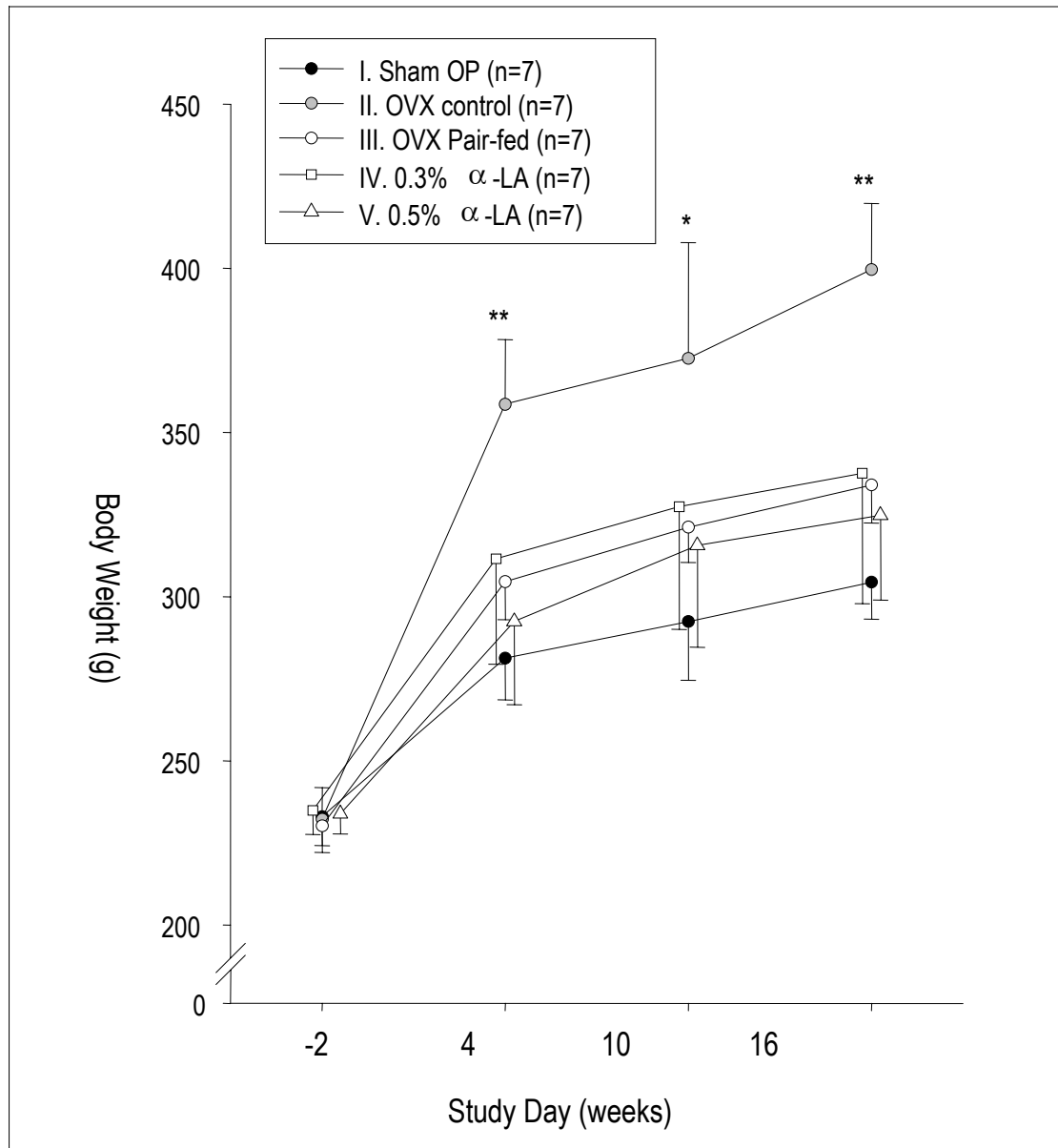
#### 4. 시료의 채취와 생화학적 골 표지자의 측정

희생 하루 전 오후 6시부터 다음날 오전 9시까지 배설된 소변을 항생제 (penicillin G, 1 mg/mL; streptomycin 1 mg/mL; amphotericin B, 0.25 mg/mL)가 포함된 수집통에 채취하였고, 혈액은 심장 천자 시 EDTA tube에 채취한 후 혈장을 분리하였다. 모든 시료는 측정 전  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 골형성 표지자로 혈장에서 골특이 알칼리성 인산화 효소 활성도 (bone specific alkaline phosphatase activity, BSAP)를 측정하였다. BSAP는 효소 면역분석법 (enzyme immunoassay)을 이용한 상용화된 키트 (METRA™ BAP EIA kit, Quidel Corp., San Diego, CA, USA)로 제조사의 프로

토콜에 따라 측정하였다. 골흡수 표지자로는 소변에서 유리 테옥시피리딘올린 (deoxypyridioline, DPD)을 상용화된 키트 (METRA™ total DPD EIA kit, Quidel Corp)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 효소 면역분석법으로 측정하였다. DPD 농도는 소변에서의 크레아티닌 (creatinine) 농도를 효소 면역분석법 (METRA™ Creatinine Assay, Quidel Corp.)으로 측정한 후 보정하여 nmol DPD/mmol creatinine으로 표시하였다. 모든 측정값은 2회 반복 측정하여 그 평균값을 취하였다.

#### 5. 골밀도의 측정

골밀도는 요추 4~5번과 왼쪽 대퇴골의 골밀도를 Hologic 사 (Waltham, USA)에서 제공한 소동물용 소프트웨어를 사



**Fig. 2.** Change in body weights during the experiment with ovariectomized rats. Study groups consist of sham operated rats with standard diet (I), ovariectomized rats with standard diet (II), ovariectomized rats with diet containing 0.3%  $\alpha$ -lipoic acid ( $\alpha$ -LA) (IV), and ovariectomized rats with diet containing 0.5%  $\alpha$ -LA (V). The OVX pair-fed control (III) was ovariectomized rats given the same amount of standard diet as that consumed by 0.5%  $\alpha$ -LA group. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.001$  vs. sham OP control.

용하여 이중에너지 흡수 계측기(QDR-4500A)로 측정하였다. 본 실험에 사용한 골밀도 측정기의 변이 계수(coefficient of variation)는 세 마리의 백서에서 열번씩 각 부위의 골밀도를 측정함으로써 계산하였는데, 요추와 대퇴골에서의 변이 계수는 각각 2.59%와 1.75%였다.

## 6. 통계학적 분석

모든 측정의 결과는 평균  $\pm$  표준편차로 표시하였고, 각 군 간의 측정 변수의 차이는 one way analysis of variance (ANOVA) 및 Tukey's multiple comparison test를 이용하

여 분석하였으며, 체중에 대한 보정은 선형회귀분석을 이용하였다.  $P$ -value가 0.05 이하인 경우 통계적인 유의성이 있는 것으로 간주하였으며, SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) version 11.0.1 통계 패키지를 사용하였다.

## 결 과

### 1. 난소 절제 동물 모델 실험

체중은 수술 전 모든 군에서 유사하였으나, 연구 종료 시점에서 가짜 수술군의  $304.4 \pm 11.3$  g에 비해 난소 절제 대

**Table 1.** Plasma Bone Specific Alkaline Phosphatase (BSAP) and Urinary Deoxypyridinoline/Creatinine Ratio (DPD) at 16 weeks of Study day in Sham Controls, Ovariectomized (OVX) Controls, OVX Pair-Fed Controls, and OVX rats Treated with Diets Containing 0.3% and 0.5%  $\alpha$ -lipoic acid ( $\alpha$ -LA)

	Sham operation (n=7)	OVX control (n=7)	OVX Pair-fed (n=7)	0.3% $\alpha$ -LA (n=7)	0.5% $\alpha$ -LA (n=7)
BSAP (U/L)	15.7 $\pm$ 1.1	17.3 $\pm$ 0.5*	17.2 $\pm$ 1.5	17.1 $\pm$ 0.7	15.3 $\pm$ 0.8* <sup>†</sup>
DPD (nmol/mmol)	24.9 $\pm$ 2.0	40.0 $\pm$ 11.9	54.0 $\pm$ 18.0**	23.9 $\pm$ 6.2 <sup>†</sup>	36.8 $\pm$ 7.1

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. sham OP, <sup>†</sup>  $P < 0.01$  vs. OVX Pair-fed group

조군은  $400.6 \pm 20.2$  g으로 유의하게 증가되어 있었다(모두  $P < 0.001$ , Fig. 2). 난소를 절제한 백서에 알파 리포산을 투여한 경우 난소 절제 대조군에 비해 체중이 감소하였는데, 치료 식이 16주 후 0.3% 알파 리포산 투여군의 체중은  $337.6 \pm 39.7$  g, 0.5% 알파 리포산 투여군의 체중은  $324.7 \pm 25.8$  g으로, 난소 절제 대조군에 비해 현저하게 감소되어 있었다(모두  $P < 0.001$ ). 그러나, 가짜 수술군, 먹이 섭취 제한군, 0.3% 알파 리포산 투여군 및 0.5% 알파 리포산 투여군은 모두 치료 기간 내내 유의한 체중 차이를 보이지 않았다.

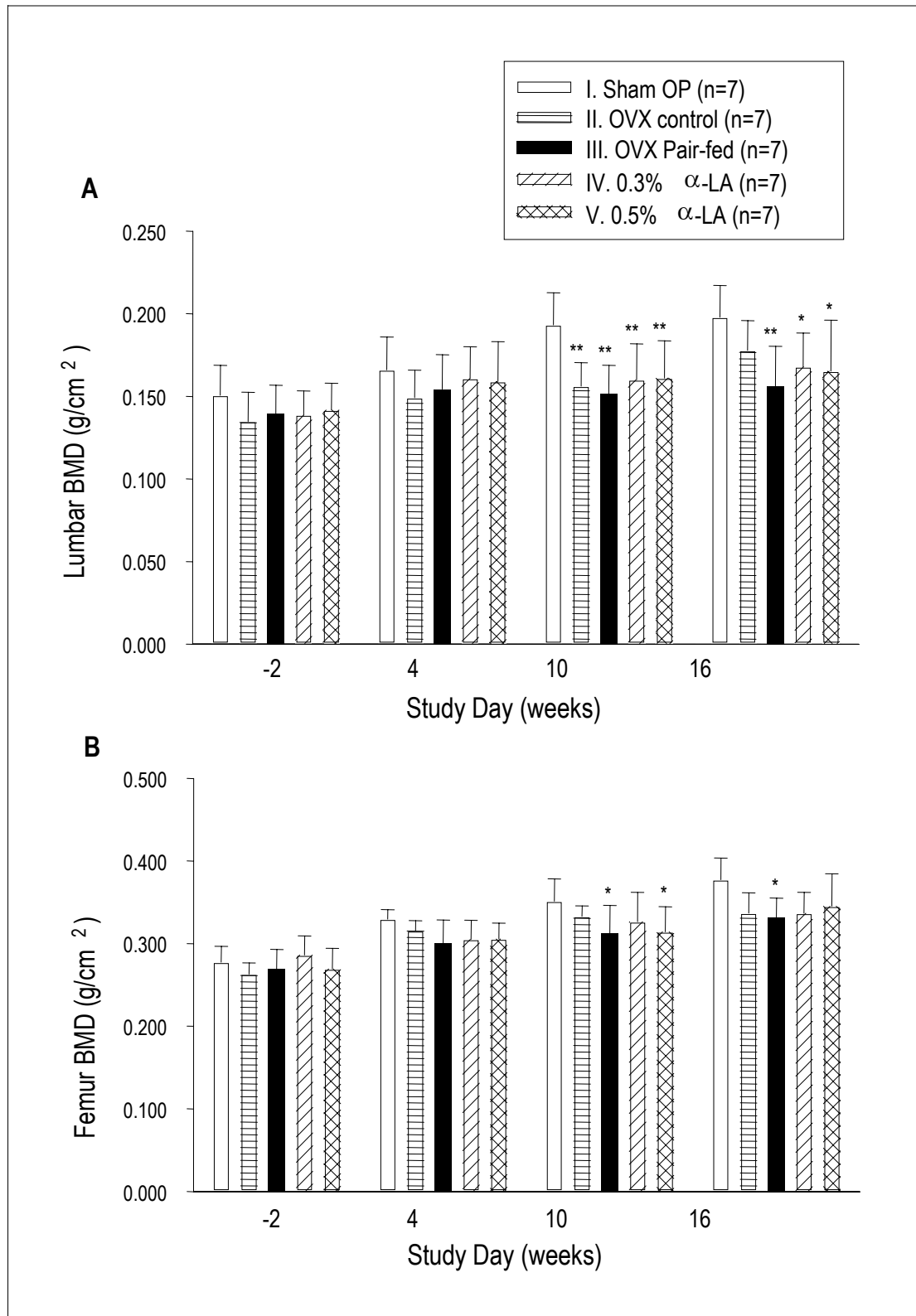
요추 골밀도는 가짜 수술군에 비해 난소 절제 대조군에서 감소되어 있었는데, 연구 기간 10주에 가짜 수술군의 요추 골밀도는  $0.193 \pm 0.020$  g/cm<sup>2</sup>이었고 난소 절제 대조군은  $0.156 \pm 0.014$  g/cm<sup>2</sup>으로 통계적으로 유의한 차이를 보였으며 ( $P < 0.01$ ), 먹이 섭취 제한군에서는 더욱 현저하게 요추 골밀도가 낮았다(Fig. 3A). 대퇴 골밀도도 가짜 수술군에 비해 난소 절제 대조군에서 낮은 경향을 보였지만 통계적으로 유의하지는 않았고, 먹이 섭취 제한 군에서는 연구 기간 10주 및 16주에서 가짜 수술군의  $0.351 \pm 0.027$  g/cm<sup>2</sup> 및  $0.377 \pm 0.026$  g/cm<sup>2</sup>에 비해  $0.326 \pm 0.023$  g/cm<sup>2</sup> 및  $0.331 \pm 0.025$  g/cm<sup>2</sup>으로 유의한 감소를 보였다(모두  $P < 0.05$ , Fig. 3B). 그러나, 0.3% 및 0.5% 알파 리포산 투여군들은 난소절제 대조군과 먹이섭취 제한군에 비해 연구 기간 내내 두 부위 모두에서 유의한 골밀도 차이를 보이지 않았다(Fig. 3A와 3B). 선형회귀분석을 이용하여 체중을 보정하였을 때에도, 0.3% 와 0.5%의 알파 리포산 투여군 모두 난소절제 대조군에 비해 유의한 요추(각각,  $\beta = -0.011$ ,  $P = 0.494$ 와  $\beta = -0.002$ ,  $P = 0.896$ ) 및 대퇴골 골밀도(각각,  $\beta = 0.009$ ,  $P = 0.620$ 와  $\beta = 0.014$ ,  $P = 0.478$ )의 차이를 보이지 않았다.

알파 리포산 투여 16주후 채취한 혈장과 소변에서 생화학적 골 표지자를 측정하였다(Table 1). 혈장 BSAP는 가짜 수술군에 비해 난소 절제 대조군에서 유의한 증가를 보였고, 0.5% 알파 리포산 투여군에서는 먹이 섭취 제한 군에 비해 감소되어 있었다. 요중 DPD 농도는 난소 절제 대조군에서 가짜 수술군에 비해 증가하는 경향을 보이기는 하였으

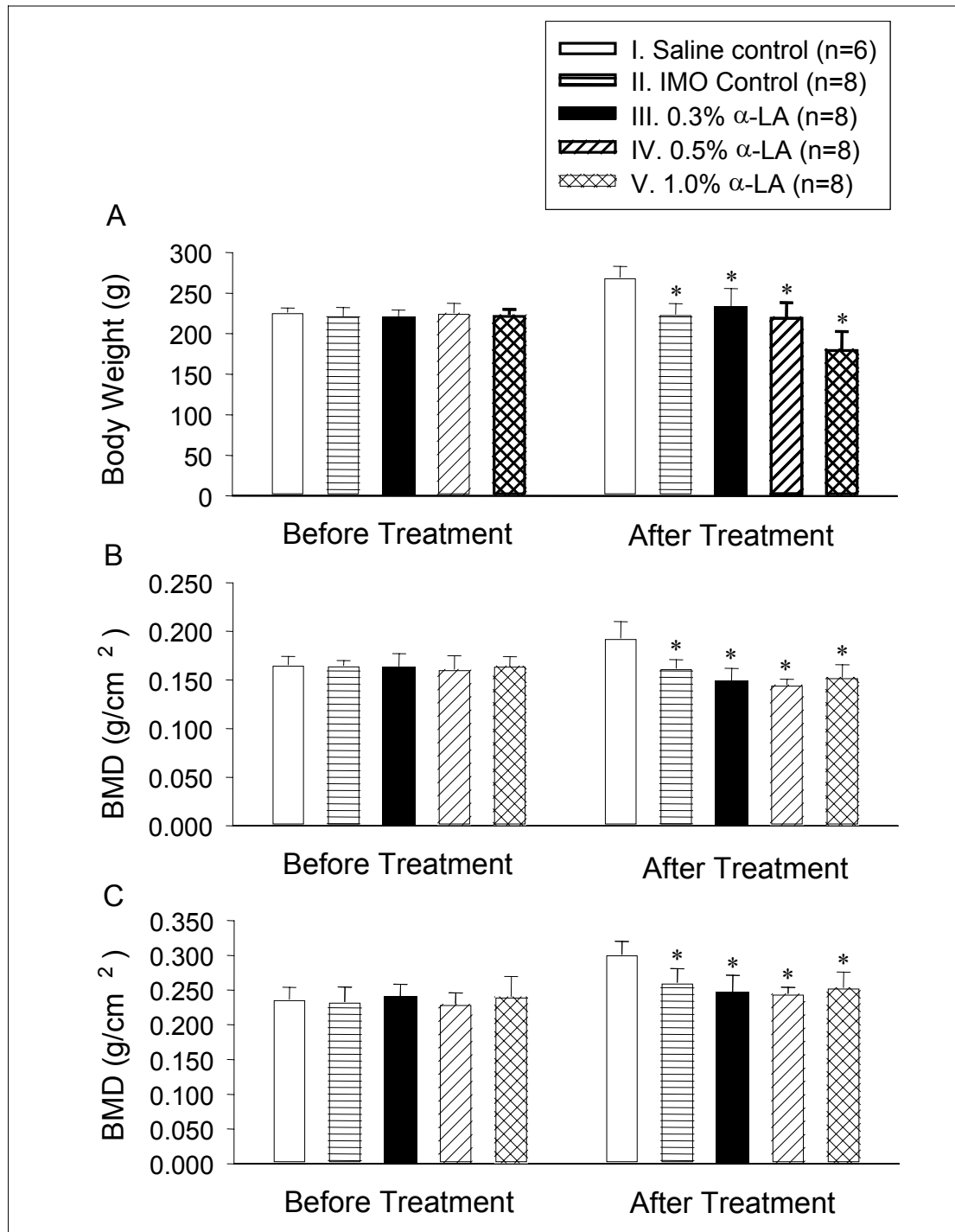
나 통계적으로 유의하지는 않았고, 먹이 섭취 제한군에서는 유의한 증가를 보였다. 알파 리포산 투여군들은 먹이 섭취 제한군에 비해 요중 DPD 농도가 감소하는 경향을 보였는데, 특히 0.3% 알파 리포산을 투여한 경우 유의한 감소를 관찰할 수 있었다. 체중을 보정한 후 난소 절제 대조군에 비해 0.3%와 0.5% 알파 리포산 투여군 모두 BSAP에 유의한 차이를 보이지 않았고(각각,  $\beta = -0.003$ ,  $P = 0.665$ 와  $\beta = -0.012$ ,  $P = 0.875$ ), 요중 DPD 농도는 0.3% 알파 리포산 투여군에서 유의한 감소를 보였다( $\beta = -9.945$ ,  $P = 0.029$ ).

## 2. IMO 모델 실험

연구 종료 후 체중은 생리식염수 대조군의  $269.2 \pm 13.9$  g에 비해 IMO 대조군에서는  $224.0 \pm 13.0$  g으로 현저히 감소되어 있었다( $P < 0.05$ , Fig. 4A). 0.3% 및 0.5%의 알파 리포산을 투여한 군에서는 IMO 대조군에 비해 유의한 체중 감소를 일으키지는 않았으나, 1.0% 알파 리포산 투여군에서는  $180.6 \pm 22.1$  g으로 현저한 감소를 보였다( $P < 0.01$ ). 연구 종료 후 요추 및 대퇴골 골밀도는, IMO 대조군에서  $0.162 \pm 0.009$  g/cm<sup>2</sup> 및  $0.261 \pm 0.021$  g/cm<sup>2</sup>로 측정되어 생리 식염수 투여군의  $0.193 \pm 0.017$  g/cm<sup>2</sup> 및  $0.301 \pm 0.019$  g/cm<sup>2</sup>에 비해 유의한 감소를 보였다(모두  $P < 0.05$ , Fig. 4A와 4B). 그러나, 0.3%~1.0%의 알파 리포산을 투여한 군과 IMO 대조군 사이에 골밀도의 차이는 관찰되지 않았으며, 체중을 보정한 후에도 유의한 차이를 관찰할 수 없었다(자료 생략). 생화학적 골 표지자는 Table 2에 정리하였다. 생리 식염수 대조군에 비해 IMO 대조군에서 혈장 BSAP가 소량 감소하였고 요중 DPD는 현저한 증가를 보였다. 알파 리포산 투여는 난소 절제 동물 실험에서와 유사한 결과를 보여, IMO 대조군에 비해 혈장 BSAP는 0.5% 및 1.0% 알파 리포산 투여 시 감소하였으며, 요중 DPD 농도는 알파 리포산을 투여한 모든 군에서 현저하게 감소되어 있었다. 체중을 보정한 후 혈장 BSAP는 IMO 대조군에 비해 0.3% ( $\beta = -0.060$ ,  $P = 0.019$ ), 0.5% ( $\beta = -0.122$ ,  $P < 0.001$ ) 및 1.0% 알파 리포산 투여군 ( $\beta = -0.065$ ,  $P = 0.027$ ) 모두에서 유의한 감소를 보였으며, 요중 DPD 농도도 0.3%~1.0% 알파 리포산 투여군에서 모두 유의한 감소를 보였다(각각,  $\beta$



**Fig. 3.** Bone mineral density (BMD) at the lumbar spine (A) and total femur (B) during the experiment with ovariectomized rats. Study groups consist of sham operated rats with standard diet (I), ovariectomized rats with standard diet (II), ovariectomized rats with diet containing 0.3%  $\alpha$ -lipoic acid ( $\alpha$ -LA) (IV), and ovariectomized rats with diet containing 0.5%  $\alpha$ -LA (V). The OVX pair-fed control (III) was ovariectomized rats given the same amount of standard diet as that consumed by 0.5%  $\alpha$ -LA group.  
\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. sham OP control.



**Fig. 4.** Body weights (A), and bone mineral density (BMD) at the lumbar spine (B) and total femur (C) during the experiment with inflammation-mediated osteopenia models (IMO). Study groups consist of saline injected rats with standard diet (I), IMO rats with standard diet (II), IMO rats with diet containing 0.3% (III), 0.5% (IV) and 1.0% α-lipoic acid (α-LA) (V). \*  $P < 0.05$ , vs. saline control.

= -10.448,  $P < 0.001$ ;  $\beta = -12.061$ ,  $P < 0.001$ ;  $\beta = -9.074$ ,  $P = 0.006$ ).

## 고 찰

본 연구는 임상에서 광범위하게 사용 중인 알파 리포산

의 골대사 관련 작용을 생체에서 실험한 최초의 연구이다. 본 연구의 결과, 알파 리포산은 난소 절제 후 발생하는 체중의 증가를 가짜 수술군과 유사한 수준으로 회복시켰으며, IMO 동물 모델에서도 고용량 투여하였을 때에는 대조군에 비해 유의한 체중 감소 효과가 있었다. 또한, 난소 절제 및

**Table 2.** Plasma bone Specific Alkaline Phosphatase (BSAP) and Urinary Deoxypyridinoline/Creatinine Ratio (DPD) at 3 weeks of Study day in Saline Controls, Inflammation-Mediated Osteopenia (IMO) Controls, and IMO rats Treated with Diets Containing 0.3 %, 0.5% and 1.0%  $\alpha$ -lipoic acid ( $\alpha$ -LA)

	Saline control (n=6)	IMO control (n=8)	0.3% $\alpha$ -LA (n=8)	0.5% $\alpha$ -LA (n=8)	1.0% $\alpha$ -LA (n=8)
BSAP (U/L)	16.0 $\pm$ 0.7	15.1 $\pm$ 0.4**	14.6 $\pm$ 1.4**	14.0 $\pm$ 0.6** <sup>†</sup>	13.6 $\pm$ 0.6** <sup>††</sup>
DPD (nmol/mmol)	26.3 $\pm$ 6.7	42.2 $\pm$ 5.0*	25.8 $\pm$ 15.0 <sup>†</sup>	20.6 $\pm$ 8.4 <sup>††</sup>	20.0 $\pm$ 9.8 <sup>††</sup>

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. saline control, <sup>†</sup>  $P < 0.05$ , <sup>††</sup>  $P < 0.01$  vs. IMO control

염증 유발에 의해 증가된 요중 DPD 농도를 현저하게 감소시키고 혈장 BSAP도 고농도 투여군에서는 감소함을 보여, 골 교체율(bone turnover rate)을 억제시킴을 확인하였다. 그러나, 두 동물 모델 모두에서 골밀도의 변화는 일으키지 않아 골량을 증가시키는 데에는 한계를 가지고 있는 것으로 판단되었다.

저자들은 조골세포와 파골세포의 공동 배양 체계를 이용하여 알파 리포산이 파골 전구세포에 직접 작용하여 파골세포의 형성을 억제하고 골 흡수능을 떨어뜨림을 보고한 바 있다[25]. 이러한 작용은 알파 리포산이 조골 계열의 세포로부터 파골세포로의 분화에 결정적 인자로 알려진[28] receptor activator of NF $\kappa$ B ligand (RANKL)의 발현과 분비를 증가시키는 현상과 함께 관찰되어, 알파 리포산의 파골세포 형성 억제 작용은 RANKL과 독립적인 것으로 판단되었다. 아직까지 그 기전이 확실하지는 않지만, 산화 스트레스가 파골 계열세포의 NF $\kappa$ B를 활성화시켜 파골세포로의 분화를 촉진한다는 보고[29]가 있어, 항산화제인 알파 리포산은 이 신호전달 경로를 억제하는 것으로 추측된다. 더불어, 알파 리포산은 조골 계열세포의 세포자멸사를 억제함으로써 세포 증식을 촉진하는 작용도 가지고 있었다[26]. 즉, TNF- $\alpha$ 에 의한 조골 계열세포의 세포자멸사를 억제하였는데, 그 주된 기전은 알파 리포산이 TNF- $\alpha$ 에 의한 NF $\kappa$ B와 c-Jun N-terminal kinase의 활성화를 억제하기 때문이었다[26].

폐경과 전신 염증에 의한 골량의 감소는 골 흡수의 증가에 의한 골 교체율의 증가, 그리고 상대적 골 형성의 감소 때문으로 알려져 있다. 또한, 골 형성의 감소는 폐경과 전신적 염증에 의하여 TNF- $\alpha$ 의 생산이 증가하는 것이 주 기전 중 하나이다[30]. 따라서, 저자들은 생체에서도 알파 리포산이 파골세포 형성을 억제하여 골 흡수를 떨어뜨리고 TNF- $\alpha$ 에 의한 조골세포의 세포자멸사를 억제하여 골 형성을 촉진하는 작용을 가지고 있다면 골밀도를 현저히 증가시킬 수 있을 것으로 가정하였었다. 그러나, 본 연구의 결과 알파 리포산은 골 흡수 표지자인 요중 DPD 농도를 감소시킴을 보여 골 흡수를 억제하고 교체율을 감소시키는 효과가 있음을 알 수 있었으나, 골밀도의 유의한 증가는 관찰되지 않아 기대하였던 것과는 상이하였다.

그 원인으로 먼저, 알파 리포산과 Talc의 투여에 의한 심

한 영양 결핍이 본 연구의 결과에 영향 주었을 가능성을 추정해 볼 수 있다. 본 실험에서 난소 절제 동물에 16주 동안 0.3%와 0.5%의 알파 리포산을 투여하였을 때 난소 절제 대조군에 비해 먹이 섭취량이 약 25%~50% 감소하였으며(자료 생략), 체중은 15.7% 및 18.9% 감소하였다(Fig. 2). 또한, IMO 모델에서도 기존의 보고[27]와 마찬가지로 심한 체중의 감소를 보였는데, 약 3주의 기간이 지난 후 생리 식염수 대조군에 비해 16.8%의 체중 감소를 보였으며, 1.0%의 알파 리포산 투여군에서는 체중감소가 더욱 뚜렷하였다. 이는 두 동물 모델 모두에서 현저하게 영양 결핍을 일으켰음을 시사한다.

심한 영양 결핍은 골량을 감소시킴으로써 골다공증을 유발하는 것으로 잘 알려져 있는데, 주로 골 형성을 억제하는 것으로 생각되고 있으며, 그 기전으로는 제1형 인슐린양 성장 인자(insuline-like growth factor I)의 감소[31], 코르티솔(cortisol) 호르몬 분비의 증가[32], 부갑상선 호르몬의 증가[33] 등이 관여한다고 보고되고 있다. 따라서, 알파 리포산과 Talc의 투여로 심한 영양 결핍이 발생한 상태에서는 그 자체로 골 형성 억제가 워낙 강력하여 알파 리포산에 의한 골 형성 촉진 효과가 기대만큼 일어나지 않을 수 있다. 더불어, 영양 결핍이 심한 상태에서는 에스트로겐이나 비스포스포네이트를 투여하는 등 강력하게 골 흡수를 억제하는 것 만으로는 골량을 증가시키는 효과가 없거나 미미하다고 보고되고 있어[34], 알파 리포산으로 골 흡수를 억제하는 것 만으로는 골밀도를 증가시키는 데에는 한계가 있었을 수 있다.

알파 리포산은 골 세포에 대한 직접 작용을 가지고 있는 것만이 아니라 중추신경계를 경유한 간접 작용을 가지고 있을 수도 있다. 중추신경계를 통하여 골대사가 조절된다는 사실은 비교적 최근에 알려지기 시작하였는데, Ducey 등[35]은 식욕 억제 물질로 잘 알려진 랩틴이 중추 신경계를 통해 골량을 감소시킨다고 보고한 바 있고, Takeda 등[36]은 그 기전이 시상하부의 교감신경계가 활성화되어 조골세포의 제2형 베타 아드레날린 수용체가 자극됨으로써 조골세포의 세포자멸사를 촉진하기 때문이라고 하였다. 또한, Eleftheriou 등[37]은 교감 신경계가 활성화되면 조골 계열세포로부터 RANKL 발현을 증가시켜 파골세포로의 분화를 촉진함으로



써 골흡수도 증가시킬 수 있다고 하였다.

최근, 알파 리포산이 중추 신경계에 유의한 작용을 가지고 있다는 사실이 보고된 바 있는데, 알파 리포산을 경구 및 복강 투여하였을 때 시상하부의 AMP-activated protein kinase (AMPK)를 억제시킨다고 하였다[38]. 더불어 시상하부의 AMPK 억제는 교감신경계를 활성화시키는 동물실험에서 확인된 바 있다[39]. 따라서, 알파 리포산은 시상하부의 AMPK 억제를 경유하여 교감신경계를 활성화시킬 수 있을 것으로 생각된다. 교감 신경계의 활성화는 조골 계열 세포에 대하여는 세포자멸사를 유도할 수 있고 이는 알파 리포산이 조골 계열세포에 직접 작용하여 세포자멸사를 억제하는 작용과는 상반된 역할을 수행할 수 있다. 즉, 조골 계열세포에 대한 직접 작용과 중추신경계를 통한 간접 작용 중 어느 것이 강하나에 따라 골 형성을 증가시키거나 억제시키는 것이 둘 다 가능할 것으로 추정할 수 있다. 반면에, 알파 리포산에 의해 교감신경계가 활성화되어 RANKL이 증가하는 것은[37], 이전 저자들의 실험에서 RANKL이 증가하는 상황에서도 알파 리포산이 파골 전구세포에 직접 작용하여 파골세포로의 분화를 강력하게 억제함을 관찰한 바 있어[25], 교감신경계가 활성화되어도 알파 리포산에 의한 골흡수 억제 효과는 지속되었던 것으로 판단할 수 있다.

본 실험에서 사용한 난소 절제 동물 모델과 IMO 모델이 아니라 산화 스트레스가 증가된 다른 골다공증 동물 모델에서는 알파 리포산의 작용이 극대화되어 골밀도의 현저한 증가가 관찰되었을 수도 있을 것으로 생각된다. 비록 최근에 난소 절제 후 발생하는 골다공증이 골수의 산화 스트레스 증가 때문이라는 보고가 있었지만[40], 산화 스트레스가 증가하는 대표적인 상황은 고령이다[41]. 따라서, 산화 스트레스가 증가되어 있는 고령 골다공증 동물 모델을 확보하여, 이 동물 모델에 알파 리포산을 투여한다면 항산화제인 알파 리포산이 골 대사에 미치는 작용이 더욱 현저하였을 가능성이 있다.

알파 리포산에 의한 체중과 체지방량의 감소가 연구 결과에 영향을 주었을 가능성을 생각해 볼 수 있다. 체중과 체지방량은 골량을 결정하는 가장 중요한 인자 중 하나로, 체중과 체지방량이 낮을수록 골량은 낮아진다[42]. 그 원인은 아직까지 명확하지 않지만 체중 감소에 의한 기계학적 부하의 감소, 에스트로겐, 인슐린 등의 호르몬이나 지방세포에서 분비되는 여러 가지 사이토카인들의 역할 등이 제시되고 있다[42]. 본 연구의 결과에서도 확인되었듯이 알파 리포산은 체중과 체지방량을 감소시키는 것으로 알려져 있는데 [38] 이로 인해 골량의 증가가 현저하지 않았을 수 있다. 그러나, 난소 절제 동물을 대상으로 한 실험에서 관찰하였듯이 0.5% 알파 리포산 투여군과 동일한 양으로 먹이 섭취를 제한한 군과 비교하여도 골밀도의 차이가 관찰되지 않아 이 가능성은 적어 보인다.

한편, 여성들에서 폐경이 된 후 급격하게 체중이 증가하는 잘 알려져 있으며, 이는 폐경 후에 발생이 증가하는 당뇨병, 동맥 경화, 대사성 증후군 등의 주요 원인 중 하나이다[42]. 알파 리포산은 최근 항산화 효과 만이 아니라 항비만 효과가 있음이 보고된 바 있는데, 김 등[38]에 의하면 비만 모델의 백서를 이용하여 0.25~1.0%의 알파 리포산의 경구 투여와 50~100 mg/kg의 복강내 투여로 먹이 섭취량과 체중을 현저히 감소시켰다고 하였다. 그러나, 아직까지 폐경 모델을 대상으로 한 연구 결과는 보고된 바 없다. 본 연구에서는 폐경 모델인 난소 절제 동물에서도 0.3%와 0.5%의 알파 리포산 경구 투여로 치료 기간 내내 체중 증가를 억제하는 작용을 관찰할 수 있었는데 (Fig. 2), 이는 폐경 후에 발생하는 체중 증가에도 효과가 있음을 강력히 시사한다. 따라서, 향후 폐경 여성에서 증가하는 대사 증후군의 치료에 알파 리포산이 효과가 있는지에 대한 임상 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구의 제한점으로는, 먼저 골 조직 형태학적 실험을 실시하지 못한 것을 지적할 수 있다. 특히 본 연구에서 골 대사에 대한 표지자로서 생화학적 골 표지자인 혈장 BSAP와 요중 DPD 농도를 측정하였는데, 이들은 골 형성과 골 흡수에 특이적인 표지자라기 보다는 골 교체율의 표지자로 해석하는 것이 더 적절하다. 따라서, 조직 형태학적 연구를 통해 골 흡수와 골 형성의 양을 비교 관찰하였다면 알파 리포산이 골 대사에 미치는 작용에 대해 좀 더 명확한 결론을 내릴 수 있었을 것으로 생각된다. 둘째, 본 연구에서 측정된 골밀도 측정의 정밀도 오류가 컸다는 점을 지적할 수 있다. 특히 요추 골밀도의 변이 계수는 2.59%로 약 6.7% 이상의 차이만을 알 수 있는 수준이었다. 따라서, 알파 리포산 투여가 골량을 증가시켰다고 하더라도 그 수준이 약 7% 이상이 아니면 이를 발견하기 어려워 본 연구에서 실시한 골밀도 기기만으로는 미세한 골량의 변화를 관찰하는 데에는 한계가 있었을 수 있다. 마지막으로, 다양한 실험 모델을 확보하지 못하였다는 점을 간과할 수 없다. 예를 들면 이미 지적하였듯이 고령 골다공증 동물 모델에서 알파 리포산의 작용을 검증하려는 노력이 있어야 할 것으로 생각된다. 또한, 영양 결핍의 효과를 최소화하기 위해 영양 결핍이 일어나지 않을 정도의 소량의 알파 리포산을 오랜 기간 투여하거나 알파 리포산 투여와 함께 충분히 영양을 공급할 수 있는 체계를 갖추어 실험하는 것을 시도해 볼 수 있을 것으로 생각되며, 중추 신경계를 통한 작용을 검증하기 위해 알파 리포산 투여와 함께 베타 차단제와 같이 교감 신경계를 억제하는 물질을 함께 투여하는 실험이 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로, 본 생체 실험을 통하여 알파 리포산이 골밀도를 증가시키는 것을 관찰하는 것은 실패하였으나, 골 교체율을 떨어뜨리는 것은 확인이 되었다. 향후 다른 동물 모델을 이용한 실험이나 임상 연구를 통해 이에 대한 추가 연

구가 필요할 것으로 사료된다.

## 요 약

**연구배경:** 최근 산화 스트레스가 골 대사에 나쁜 작용을 일으킨다고 알려지고 있다. 저자들은 항산화제인 알파 리포산이 파골세포의 형성 및 골 흡수를 떨어뜨리고 TNF- $\alpha$ 에 의한 조골 계열세포의 세포자멸사를 억제함을 관찰하여 이를 보고한 바 있다. 저자들은 알파 리포산이 생체에서도 이와 같은 작용을 가지고 있는지 보고자 본 실험을 기획하였다.

**방법:** 암컷 Sprague-Dawley 백서를 12주령에 난소 절제와 Talc 주입 (inflammation-mediated osteopenia, IMO)을 하여 골다공증 동물 모델을 만들었다. 표준 식이에 0.3%와 0.5%의 알파 리포산을 섞어 난소 절제 백서에 16주간, 0.3%~1.0%의 알파 리포산을 IMO 백서에 21일간 투여하였다. 투여 종료 후 이중 에너지 흡수 계측기를 이용하여 요추와 대퇴부의 골밀도를 측정하였고, 효소 면역분석법으로 혈장과 소변에서 골특이 알칼리성 인산화 효소 활성도 (BS-AP)와 유리 테옥시피리디놀린 농도 (DPD)를 측정하였다.

**결과:** 난소 절제 백서에 0.3%와 0.5% 알파 리포산을 투여한 경우 난소 절제 대조군에 비해 체중이 유의하게 감소되었다. 골밀도는 두 동물 모델 모두에서 알파 리포산 투여 후 유의한 변화를 보이지 않았다. 그러나, 요중 DPD 농도는 난소 절제 대조군 및 IMO 대조군에 비해 알파 리포산을 투여한 경우 현저한 감소를 보였으며, 혈장 BSAP도 고농도 알파 리포산을 투여하였을 때 유의한 감소를 보였다.

**결론:** 비록 알파 리포산 투여 후 골밀도의 증가를 관찰할 수 없었지만, 본 연구의 결과 알파 리포산은 생체에서 골 교체율을 억제하는 작용을 가지고 있는 것으로 판단되었다.

## 참 고 문 헌

1. McCord JM: *The evolution of free radicals and oxidative stress. Am J Med* 108:652-659, 2000
2. Sontakke AN, Tare RS: *A duality in the roles of reactive oxygen species with respect to bone metabolism. Clin Chim Acta* 318:145-148, 2002
3. Basu S, Michaelsson K, Olofsson H, Johansson S, Melhus H: *Association between oxidative stress and bone mineral density. Biochem Biophys Res Commun* 288: 275-279, 2001
4. Maggio D, Barabani M, Pierandrei M, Polidori MC, Catani M, Mecocci P, Senin U, Pacifici R, Cherubini A: *Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of a cross-sectional study.*

- J Clin Endocrinol Metab* 88:1523-1527, 2003
5. Weber P: *The role of vitamins in the prevention of osteoporosis-a brief status report. Int J Vitam Nutr Res* 69:194-197, 1999
6. Hall SL, Greendale GA: *The relation of dietary vitamin C intake to bone mineral density: results from the PEPI study. Calcif Tissue Int* 63:183-189, 1998
7. Patrick L: *Toxic metals and antioxidants: Part II. The role of antioxidants in arsenic and cadmium toxicity. Altern Med Rev* 8:106-128, 2003
8. Melhus H, Michaelsson K, Holmberg L, Wolk A, Ljunghall S: *Smoking, antioxidant vitamins, and the risk of hip fracture. J Bone Miner Res* 14:129-135, 1999
9. Silverton SF, Mesaros S, Markham GD, Malinski T: *Osteoclast radical interactions: NADPH causes pulsatile release of NO and stimulates superoxide production. Endocrinology* 136:5244-5247, 1995
10. Yang S, Ries WL, Key LL Jr: *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in the formation of superoxide in osteoclasts. Calcif Tissue Int* 63:346-350, 1998
11. Garrett IR, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR: *Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. J Clin Invest* 85:632-639, 1990
12. Damoulis PD, Hauschka PV: *Nitric oxide acts in conjunction with proinflammatory cytokines to promote cell death in osteoblasts. J Bone Miner Res* 12: 412-422, 1997
13. Hukkanen M, Corbett SA, Batten J, Kontinen YT, McCarthy ID, Maclouf J, Santavirta S, Hughes SP, Polak JM: *Aseptic loosening of total hip replacement. Macrophage expression of inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2, together with peroxynitrite formation, as a possible mechanism for early prosthesis failure. J Bone Joint Surg Br* 79:467-474, 1997
14. Mogi M, Kinpara K, Kondo A, Togari A: *Involvement of nitric oxide and biopterin in proinflammatory cytokine-induced apoptotic cell death in mouse osteoblastic cell line MC3T3-E1. Biochem Pharmacol* 58: 649-654, 1999
15. Chen RM, Liu HC, Lin YL, Jean WC, Chen JS, Wang JH: *Nitric oxide induces osteoblast apoptosis through the de novo synthesis of Bax protein. J Or-*

- thop Res* 20:295-302, 2002
16. Parhami F, Jackson SM, Tintut Y, Le V, Balucan JP, Territo M, Demer LL: *Atherogenic diet and minimally oxidized low density lipoprotein inhibit osteogenic and promote adipogenic differentiation of marrow stromal cells. J Bone Miner Res* 14:2067-2078, 1999
17. Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL: *Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. Free Radic Biol Med* 31: 509-519, 2001
18. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ: *Alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. Free Radic Biol Med* 19: 227-250, 1995
19. Packer L: *Alpha-Lipoic acid: a metabolic antioxidant which regulates NF-kappa B signal transduction and protects against oxidative injury. Drug Metab Rev* 30:245-275, 1998
20. Roy S, Sen CK, Tritschler HJ, Packer L: *Modulation of cellular reducing equivalent homeostasis by alpha-lipoic acid. Mechanisms and implications for diabetes and ischemic injury. Biochem Pharmacol* 53:393-399, 1997
21. Jacob S, Streeper RS, Fogt DL, Hokama JY, Tritschler HJ, Dietze GJ, Henriksen EJ: *The antioxidant alpha-lipoic acid enhances insulin-stimulated glucose metabolism in insulin-resistant rat skeletal muscle. Diabetes* 45:1024-1029, 1996
22. Henriksen EJ, Jacob S, Streeper RS, Fogt DL, Hokama JY, Tritschler HJ: *Stimulation by alpha-lipoic acid of glucose transport activity in skeletal muscle of lean and obese Zucker rats. Life Sci* 61:805-812, 1997
23. Ziegler D, Reljanovic M, Mehnert H, Gries FA: *Alpha-lipoic acid in the treatment of diabetic polyneuropathy in Germany: current evidence from clinical trials. Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107:421-430, 1999
24. Packer L, Tritschler HJ, Wessel K: *Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. Free Radic Biol Med* 22:359-378, 1997
25. Koh JM, Lee YS, Byun CH, Chang EJ, Kim H, Kim YH, Kim HH, Kim GS: *Alpha-lipoic acid suppresses osteoclastogenesis despite increasing the receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoprotegerin ratio in human bone marrow stromal cells. J Endocrinol* 185:401-413, 2005
26. Byun CH, Koh JM, Kim DK, Park SI, Lee KU, Kim GS: *Alpha-lipoic acid inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in human bone marrow stromal cells. J Bone Miner Res* 20:1125-1135, 2005
27. Minne HW, Pfeilschifter J, Scharla S, Mutschelknauss S, Schwarz A, Krempien B, Ziegler R: *Inflammation-mediated osteopenia in the rat: a new animal model for pathological loss of bone mass. Endocrinology* 115:50-54, 1984
28. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ: *Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell* 93:165-176, 1998
29. Iotsova V, Caamano J, Loy J, Yang Y, Lewin A, Bravo R: *Osteopetrosis in mice lacking NF-kB1 and NF-kB2. Nat Med* 3:1285-1289, 1997
30. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR: *Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. Nature* 319:516-518, 1986
31. Biller BM, Saxe V, Herzog DB, Rosenthal DI, Holzman S, Klibanski A: *Mechanisms of osteoporosis in adult and adolescent women with anorexia nervosa. J Clin Endocrinol Metab* 68:548-554, 1989
32. Lucas AR, Melton LJ III, Crowson CS, O'Fallon WM: *Long-term fracture risk among women with anorexia nervosa: a population-based cohort study. Mayo Clin Proc* 74:972-977, 1999
33. 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* 122:1847-1854, 1988
34. Klibanski A, Biller BM, Schoenfeld DA, Herzog DB, Saxe VC: *The effects of estrogen administration on trabecular bone loss in young women with anorexia nervosa. J Clin Endocrinol Metab* 80:898-904, 1995
35. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G: *Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. Cell* 100: 197-207, 2000
36. Takeda S, Eleftheriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L,

- Parker KL, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G: *Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. Cell 111:305-317, 2002*
37. Eleftheriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, Kondo H, Richards WG, Bannon TW, Noda M, Clement K, Vaisse C, Karsenty G: *Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. Nature 434:514-520, 2005*
  38. Kim MS, Park JY, Namkoong C, Jang PG, Ryu JW, Song HS, Yun JY, Namgoong IS, Ha J, Park IS, Lee IK, Viollet B, Youn JH, Lee HK, Lee KU: *Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. Nat Med 10:727-733, 2004*
  39. Viollet B, Andreelli F, Jorgensen SB, Perrin C, Ge loen A, Flamez D, Mu J, Lenzner C, Baud O, Bennoun M, Gomas E, Nicolas G, Wojtaszewski JF, Kahn A, Carling D, Schuit FC, Birnbaum MJ, Richter EA, Burcelin R, Vaulont S: *The AMP-activated protein kinase alpha2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. J Clin Invest 111:91-98, 2003*
  40. Lean JM, Davies JT, Fuller K, Jagger CJ, Kirstein B, Partington GA, Urry ZL, Chambers TJ: *A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss. J Clin Invest 112:915-923, 2003.*
  41. Sohal RS, Weindruch R: *Oxidative stress, caloric restriction, and aging. Science 273:59-63, 1996*
  42. Carr MC: *The emergence of the metabolic syndrome with menopause. J Clin Endocrinol Metab 88:2404-2411, 2003*