운동강도의 차이가 고령 골감소증 여성의 골대사지표 및 RANKL/RANK/OPG 시스템 사이토카인에 미치는 영향

김창선¹, 김호진¹, 김지연¹, 김지원¹, 박동호², 임승택³, 민석기^{4*}

¹동덕여자대학교 체육학과, ²인하대학교 스포츠과학과, ³동아대학교 건강증진연구실, ⁴한국스포츠개발원 스포츠과학실

The Effects of Exercise Intensity Difference on Bone Metabolic Markers and Cytokines of the RANKL/RANK/OPG System in Korean Osteopenia Elderly Women

Chang-Sun Kim¹, Hyo-Jin Kim¹, Ji-Yeon Kim¹, Ji-Won Kim¹, Dong-Ho Park², Seung-Taek Lim³, Seok-Ki Min^{4*}

¹Department of Physical Education, Dongduk Women's University, Seoul; ²Department of Kinesiology, Inha University, Incheon; ³Lab of Health Promotion Research Team, Dong-A University, Busan; ⁴Department of Sport Science, Korea Institute of Sport Science (KISS), Seoul, Korea

PURPOSE: Regular exercise augments the bone mineral density in postmenopausal elderly women. However, its acute effects by different intensities on bone metabolic markers and cytokines of the RANKL/RANK/OPG system have not been determined. Our aim was to investigate the effects exercise intensity difference on these markers and RANKL/RANK/OPG system in Korean osteopenia elderly women.

METHODS: Twelve osteopenia elderly women (T-score -2.46 ± 0.48 ; aged 68.17 ± 3.04 years) examined these markers and RANKL/RANK/OPG system responses to acute high (80% VO_{2max} ; HIGH group), low (40% VO_{2max} ; LOW group) intensity with a cycle ergometer, and sedentary rest (CON group) in a randomized, cross-over repeated measures design. The concentrations of bone metabolic markers and cytokines measured before, immediately after and then recovery 60 minutes after exercise. mRNA expressions of RANKL & OPG from PBMC were also measured at same times.

RESULTS: There were no significant changes in the serum CTx and RANKL, and mRNA expression of RANKL, indicating bone resorption (NS). On the other hand, although the serum OPG showed significant change in high intensity ($p = .027$; group $\times$ time), the serum OC showed significant change in low intensity ($p = .044$; group $\times$ time), indicating bone formation, respectively.

CONCLUSIONS: These results suggest that a single bout exercise might effect on bone formation alone with OPG responds to high intensity, OC responds to low intensity. Additional studies are needed on the difference in change between OC and OPG due to exercise intensity.

Key words: Intensity, Osteopenia, OC, CTx, RANKL, RANK

서론

골밀도는 운동[1]과 영양[2] 등의 환경에 크게 영향을 받는다. 즉, 뼈는 외부의 화학적 및 기계적인 자극에 반응하여 변화가 일어난다. 그 중에서도 운동에 의한 자극은 다양한 대상자들의 골밀도 개선에 큰

역할을 하고 있다. 그러나 그러한 자극에는 역치점이 있는 것이 예로부터 알려져 왔다[3]. 운동이 역치점에 이를 정도로 충분할 때에는 골밀도 변화에 긍정적인 영향을 미치지만, 불충분할 때에는 전혀 영향이 없을 수도 있다. 따라서 운동의 형태, 강도, 시간, 빈도에 따라서 골밀도에 미치는 영향이 다를 수 있는 것이다. 지금까지의 연구에서는 운동

Corresponding author: Seok-Ki Min Tel +82-2-970-9555 Fax +82-2-970-9555 E-mail minseokki@kspo.or.kr

*이 연구는 2012년 정부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(NRF-2012S1A5A2A01017977).

Keywords 운동강도, 골감소증, OC, CTx, RANKL, RANK, OPG

Received 17 Jan 2017 **Revised** 31 Jan 2017 **Accepted** 6 Feb 2017

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

의 형태에 대한 연구가 많이 이루어지고 있으며, 운동에 의한 골밀도 향진설과는 달리 운동을 실시하고 있는데도 불구하고 골밀도가 변하지 않거나 감소하는 현상도 보고되고 있다. 장거리육상 운동선수에게 있어서 골량감소에 따른 피로골절을 운동성 골량감소라고 정의하는 연구[4]로부터 장거리 달리기 선수의 저골량[5], 각종 대학 운동선수들의 골밀도를 조사한 결과 수영선수의 골밀도가 가장 낮았다[6]라는 보고까지 운동의 부정적인 효과가 보고되고 있다. 이러한 운동 효과에 대한 다양한 스펙트럼은 여러 가지 원인에 의하여 발생할 수 있으나, 가장 먼저 고려되어야 할 것이 운동 강도이다. 그러나 이러한 운동강도의 차이가 골밀도에 미치는 영향을 검토한 연구는 매우 부족한 실정이다. 과거 연구들을 보면 단일 운동 강도 설정으로 운동효과를 검토하는 연구가 대부분이고[7], 운동강도를 몇 단계로 나누어 검토하는 연구에도 운동강도가 다르더라도 운동시간을 동일하게 부하하고 있어 실제로는 전체 운동량의 차이가 발생하고 있다. 예를 들어 Chen et al. [8]의 논문에서는 동물을 대상으로 한 실험에서 저, 중, 고의 운동강도로서 8 m/min, 12 m/min, 18 m/min의 속도를 설정하고 있으나, 운동시간은 20분간으로 동일하게 설정하고 있어, 실제로는 운동강도의 차이보다는 운동량의 차이에 의한 효과를 보고 있다고 할 수 있다. 따라서 운동량을 동일하게 부하하면서 운동강도만을 달리하여 운동 강도의 효과를 검토할 필요가 있다.

한편, 골대사와 면역대사에 있어서 다양한 제어인자들을 공유하고 있으며, 네트워크를 형성하여 정밀하게 제어되고 있다. 최근 이러한 것들이 골대사 조절의 핵심인자로서 역할을 하고 있다는 것이 밝혀지고 있다. 그 중에서도 세포간 전달물질인 사이토카인은 각 세포의 분화와 기능 등을 조절하는 생리활성물질로서 골수를 포함한 다양한 세포로부터 생성되어 골대사 및 면역작용을 조절하는 것으로 알려져 있다[9]. 그 중 골대사 조절 사이토카인으로 인터루킨(interleukin; IL)-1 [10] 및 IL-6 [11], 종양 괴사 인자(tumor necrosis factor, TNF)- α [12], 인터페론(interferon; IFN)- γ [13,14] 등이 알려져 있다. 지금까지 운동의 영향을 밝히기 위하여 다양한 운동 조건에서의 이러한 사이토카인들의 변화를 검토해 왔지만 명확한 결과를 밝히지 못하고 있다[15-18].

최근, Osteoprotegerin (OPG)와 Receptor Activator of Nuclear factor-Kappa B Ligand (RANKL)은 TNF의 상위범주(superfamily)와 TNF receptor로 분류되는 사이토카인으로, 파골세포의 분화와 증식에 관여하여 골 항상성과 칼슘 대사를 총체적으로 조절하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다[19]. RANKL은 조골세포 계통[20]과 T 림프구[21], B 림프구[22] 등의 골수기질세포의 표면에서 발현되며, 전구파골세포에서 발현되는 RANK와 결합하여 파골세포로의 분화와 증식, 활성화에 강력하게 영향을 미치는 것이 알려져 있다. OPG는 RANKL의 유인(decoy) 수용체로서 RANKL과 RANK 간의 결합을 방해하여 파골세포의 분화 및 증식을 억제하는 것이 in vitro 및 in vivo 실험 모두에서

입증되고 있다[23]. 이처럼, 뼈의 항상성과 칼슘(calcium) 대사는 RANKL과 RANK, OPG 등의 사이토카인의 국지적인 농도의 밸런스를 통해서 유지되고 있을 가능성이 높다. 즉, 골다공증을 포함한 골량감소는 OPG 기능 부전 또는 RANKL 신호전달경로의 잘못된 조절 작용을 통해 유발될 가능성이 크며, 운동에 의한 골흡수 억제는 이러한 RANKL 신호전달경로를 개선하는 것에 의하여 일어날 가능성이 있고, 이러한 RANKL 신호전달경로는 운동강도에 따라 변할 수 있으나 이에 대한 연구는 전무한 실정이다.

또한, 전형적인 골대사 표지자(bone metabolic markers)로 알려진 osteocalcin (OC)과 C-telopeptide of collagen cross-link (CTX)는 각각 골형성과 골흡수의 표지자로 알려져 있다. OC는 Bone-Glaprotein (BGP)라고도 불리는 단백질로, 전체 단백질의 약 2%를 차지하며, 조골세포의 활성화에 의해 생성되며[24], 골형성 과정에서 혈액으로 방출되어 나오므로 골형성 지표로 알려져 있다[25]. 또한 CTX는 골흡수 시 type I collagen의 분해효소인 cathepsin K에 의하여 생성되는 파골세포의 대사산물로서[26], 폐경 후 골대사 회전(bone metabolic turnover)의 증가와 함께 CTX도 증가하는 것이 밝혀져 있다[27]. 최근 OC와 CTX의 혈중농도의 비율과 RANKL과 RANK, OPG 등의 발현에 관련성이 있는 것으로 밝혀지고 있으나[28], 운동 강도의 의한 OC와 CTX 비율에 대한 연구는 거의 찾아볼 수 없다.

따라서, 본 연구에서는 골흡수 촉진 상태인 골량감소증 환자를 대상으로 1회성 운동을 부하하여, 운동 강도에 의한 골대사의 변화를 기존의 골대사 표지자와 함께 RANKL/RANK/OPG 시스템 사이토카인의 변화를 검토하는 것을 목적으로 한다. 운동 강도는 저강도(40% VO_2max)와 고강도(80% VO_2max)로 나누어 검토하면서, 운동량을 통일 시키기 위하여 운동강도별 운동시간을 조정하였다. 또한, 운동 전, 직후, 회복 60분 후의 혈액을 채취하여 혈청 중의 골대사 표지자 및 RANKL, OPG의 농도를 검토하고, 혈액으로부터 말초혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)를 분리 배양하여 PBMC로부터 발현되는 RANKL/RANK/OPG 시스템 사이토카인의 mRNA의 변화를 분자생물학적으로 검토하였다.

연구 방법

1. 연구대상자 선정 및 절차

65세 이상의 좌업 고령여성을 대상으로 사전검사로 건강검사 및 골밀도를 측정하여 골다공증 5명을 포함한 골감소증 환자 12명을 선별하였다. 골밀도는 이중에너지 X레이 흡수법(dual energy X-ray absorptiometry, DEXA)의 골밀도 측정장비(DPX-L, LUNAR, USA)를 이용하여 전신의 골밀도를 측정하였다. 골감소증은 세계보건기구(WHO)에서 제시하는 T-Score를 기준으로 골감소증($-1 \text{ SD} < \text{T score} < -2.5 \text{ SD}$)

과 골다공증(T-score < -2.5 SD)으로 판정하였다[29]. 대상자들의 신체적 특징은 Table 1과 같다. 또한, 피험자에게 D대학교의 실험에 대한 규정에 따라, 실험내용 및 피해점, 실험중지의 자유 등에 대하여 자세히 설명한 후 각 피험자로부터 동의를 얻었다.

한편, 실험의 정도를 높이기 위하여 단일집단 반복측정으로 디자인하여 진행하였다. 즉, 실험시작 2주일 전에 실험실에 도착하여 신장, 체중 등의 신체적 특성 및 골밀도를 측정하였으며, 최종 선정된 피험자들은 다시 1주일 후에 운동부하실험실에 도착하여 최대산소섭취량을 측정하였다. 다음 1주일 후에 피험자들은 실험실 도착한 후 의자에 앉아서 안정 시에 채혈한 진행하는 비운동 대조 집단(CON집단) 실험을 진행하였다. 다시 1주일 후에는 40% VO₂max 운동(LOW집단) 실험, 다시 1주일 후에 80% VO₂max 운동(High집단) 실험을 실시하였다. 즉, 1주일 간격으로 총 5번 실험실에 방문하였으며, 실험 전 48시간부터 격한 운동이나 지나친 과식, 음주 등을 삼가도록 하였다.

2. 운동 강도와 시간 결정 및 운동부하 방법

목표 운동 강도 및 운동 시간 결정을 위하여 자전거 에르고미터(헬마스, Combi 75XL II)를 이용하여 최대하 운동부하법으로 VO₂max를 추정하였다. 측정은 먼저 피검자를 편안한 자세로 자전거 에르고미터 안장에 앉게 하여 안장의 높이를 조절하고 상체는 전향자세를 취하게 하였다. 심박수 감지 센서를 귓불에 부착한 후, 심박수가 안정될 때까지 휴식을 취한 후 1분 동안 페달 회전수가 50바퀴를 유지하는 속도로

준비운동을 시켰다. 운동은 최대심박수의 70%에 도달하게 하였고, 이때의 운동부하와 심박수로부터 회귀직선식을 구해 최대산소섭취량(mL/kg/min) 및 최대심박수(beat/min)를 추정하였다(Table 1). 그 후, VO₂max를 토대로 저강도(40% VO₂max) 및 고강도(80% VO₂max)에 상응하는 목표심박수(bpm)를 구하여 각각의 % VO₂max에 대한 운동강도로 설정하였다. 또한 이때 추정된 VO₂max는 칼로리 소비의 측정을 위한 지표로 사용하였다. 본 실험에 있어 산소 1 L 당 5 kcal의 열량을 소비하는 것으로 가정하여 각 강도별로 200 kcal의 열량소비 운동시간(min)을 계산하고, 이에 의하여 각 피험자별로 운동강도와 운동시간을 부하하였다(Table 2) [15]. 운동부하는 자전거에르고미터를 이용하였으며, 페달링 속도는 50 rpm으로 고정하여 각 강도별로 동일하게 200 kcal의 운동을 수행하였다(Fig. 1). 각 운동 강도의 유지는 그에 상응하는 HR (within ±5%)를 기준으로 하였으며, 200 kcal 소모에 필요한 각자의 운동시간에 맞추어 운동을 수행하였다.

3. 채혈 및 혈액 처리 방법

연구대상자들은 12시간 이상의 공복상태에서 실험실에 도착한 후 30분간 안정을 취하고 나서 상완 정맥에 카테터를 꽂고 안정 시 혈액(before)을 채혈하였다. 그 후 정해진 운동 강도와 시간으로 운동을 수행하고, 운동 종료 직후(after), 회복 60분 후(recovery)에 각각 10 mL의 혈액을 채혈하였다(Fig. 1). 대조집단은 일상과 같은 안정된 상태에서 동일 시간대에 샘플링하였다. 채혈된 혈액으로부터 일부는 PBMC를 분리 추출하여 RANKL신호전달 사이토카인의 mRNA 발현을 분석하였다. 나머지는 혈청을 분리하였으며, OC와 CTx는 전문혈액분석회사에 의뢰하여 각각 IRMA법(OSTEO-RIA CT, CIS bio, France)과 ECLIA법(CTx kit, Roche, Germany)으로 농도를 분석하였다. 혈청 OPG와 RANKL 농도는 전용의 ELISA 측정 키트(Human OPG ELISA kit, Fine Test, China; Human TNFSF11/RANKL ELISA kit, Fine Test)을 이용하

Table 1. The characteristics of the subjects

Valuables (n = 12)	
Age (year)	68.17 ± 3.04
Height (cm)	151.19 ± 2.81
Weight (kg)	54.38 ± 4.95
BMI (kg/m ²)	23.79 ± 1.99
BMD T-score (score)	-2.46 ± 0.48
VO ₂ max (mL/kg/min)	23.97 ± 5.14
HRmax (beat/min)	151.83 ± 3.04
Rest HR (beat/min)	70.00 ± 8.15

Values are mean ± SD.

BMI, body mass index; BMD, bone mineral density; VO₂max, maximal oxygen consumption; HRmax, maximum heart rate; Rest HR, resting heart rate.

Table 2. The target HR and running time according to the each intensity for 200 Kcal energy expenditure

Group	%VO ₂ max (%)	target HR (bpm)	running time (min)	target energy expenditure (kcal)
CON	Sedentary	-	-	-
LOW	40%	102.7 ± 5.1	62.7 ± 8.6	200
HIGH	80%	135.5 ± 3.0	36.9 ± 5.6	200

Values are mean ± SD.

Fig. 1. The diagram of exercise loading and blood sampling time. Blood collected three times; baseline (B) and immediately after exercise (A), and recovery of 60 minutes after the exercise (R).

여 측정하였다.

4. PBMC로부터의 RNA 추출 및 real-time (RT)-PCR 분석

PBMC 분리는 Pacifici et al. [30]의 방법을 이용하여 Lymphoprep™ (Axis-Shield, Norway)를 이용한 중층 원심분리법으로 분리 채취하였다. Chomczynski & Sacchi [31]의 방법을 이용하여 RNAzol Kit (TEL TEST INC., USA)을 이용하여 총 RNA를 분리 추출한 후, AccuPower RocketScript™ Cycle RT PreMix (Bioneer, KR)를 사용하여 역전사 반응법으로 Complementary DNA (cDNA) 합성하였다. cDNA의 합성 여부를 확인하기 위하여 DNA 농도를 전용의 측정기(ASP-2680, CellTA Gen, KR)를 이용하여 분석하였다. RANKL신호전달 사이토카인의 mRNA 발현은 실시간 증합효소 연쇄반응(real-time quantitative polymerase chain reaction, Real-time PCR)을 이용하였으며, 그 때 사용한 forward와 reverse primer의 nucleotide sequence는 다음과 같다. OPG: 5'-AGT CCC TGG ACT GAA CTA AAG-3'와 5'-ACC CCT GGT ATC ATT CAG GGC-3'. RANK: 5'-CTG ACT CTT CGA GAT CAT TT-3'와 5'-CTA GGT CTT GGA CGT AAT AC-3'. RANKL: 5'-TTA TAA CGA CCT GCA AGG TTA-3'와 5'-TCC GGG CTT ACG ACG TAC CCT-3'. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): 5'-CAA CGA CCA CTT TGT CAA GC -3'와 5'-GGT GGT CCA GGG GTC TTA CT -3'. 각각의 primer는 Primer Express™ (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)을 이용하여 nucleotide sequence를 설계하였다. Real-time PCR 측정 시에는 전용의 측정기(CFX96 Real-Time PCR Detection System, BIO-RAD, USA)를 사용하였으며, 하우스키핑 유전자인 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA에 대한 상대량으로 정량하였다. 구체적인 반응 조건은, 전 처리(pre-denaturation)를 95°C에서 5분간 한 후, 95°C에서 15초간 변성(denaturation)을 진행한 후, 59-60°C에서 60초 동안의 결합(annealing)과정을 총 40회 반복하였으며, 최종적으로 Melt curve를 위하여 65-95°C에서 각

step당 1-5초간 반응시켰다.

5. 자료분석 및 통계방법

모든 자료는 SPSS 21.0 통계 프로그램을 이용하여 요인별 평균과 표준편차, 표준오차를 산출하였다. 통계처리는 이원변량반복측정분산 분석(2-way repeated measure ANOVA)을 실시하여 운동 강도(3가지 강도: 비운동 시 및 40%, 80% VO₂max)에 따른 시기간(3시기: 운동 전, 운동 직후 및 회복 시)의 차이(3 by 3)를 분석하였다. ANOVA 검사 후 주효과에 유의한 차이가 있을 경우, 집단 간에는 unpaired t-test를, 시기간에는 paired t-test를 통해 사후검사를 실시하였다. 통계적 유의 수준은 $p < .05$ 로 설정하였다.

연구 결과

1. 혈청 OC 및 CTx 농도, OC/CTx ratio 변화

Table 3에는 세 집단 간의 운동 전 안정 시(before) 및 운동 직후(after), 60분간 회복기(recovery)의 OC와 CTx의 혈청 농도 변화와 OC/CTx ratio를 나타냈다. 혈청 OC에서는 상호작용(집단×시기)에서 유의한 차이가 나타나($p = .044$), CON 집단에서 운동직후 및 회복기에 점차 감소하는 경향을 보인 반면, LOW 집단에서는 점차 증가하는 경향을 보여, 회복기에는 안정 시에 비교하여 약 27% 증가하는 경향을 보였다. 그러나 HIGH 집단에서는 변화하지 않고 정체되는 경향을 보였다. 한편, 혈청 CTx 농도 및 OC/CTx ratio에 있어서는 상호작용 효과 및 집단, 시기에 따른 주효과 모두 유의한 변화는 없었다.

2. 혈청 RANKL 및 OPG 농도, OPG/RANKL ratio 변화

혈청 OPG에서는 상호작용에서 유의한 차이가 나타나($p = .027$), CON 집단과 LOW 집단에서는 운동 직후에 약간 증가했다가 회복기에 다시 감소하는 경향을 보인 반면, HIGH 집단에서는 점차 감소하는 경향을

Table 3. The change of serum bone metabolic markers after a bout exercise of different intensity

	Intensity	Before	After	Recovery	Source	F (p)
OC (ng/mL)	CON	18.0±2.6	16.5±2.1	14.6±2.3	G	5.570 (.053)
	LOW	13.5±3.8	13.9±4.7	17.2±4.8	T	.292 (.758)
	HIGH	13.3±3.3	12.8±3.4	11.7±3.3	G×T	10.008 (.044)
CTx (ng/mL)	CON	0.241±0.072	0.283±0.104	0.167±0.037	G	3.054 (.136)
	LOW	0.235±0.068	0.238±0.094	0.149±0.034	T	1.995 (.231)
	HIGH	0.267±0.082	0.303±0.096	0.218±0.069	G×T	1.299 (.432)
OC/CTx (ratio)	CON	117.2±24.9	138.6±43.6	176.4±71.3	G	1.804 (.257)
	LOW	107.5±44.0	158.2±93.9	182.5±89.4	T	1.919 (.241)
	HIGH	93.7±32.8	144.2±66.9	158.9±97.0	G×T	2.442 (.245)

Mean ± SE.

CON, Control group; LOW, 40% VO₂max exercise group; HIGH, 80% VO₂max exercise group; OC, Osteocalcin; Ctx, C-telopeptide of collagen cross-link; G, Group; T, Time; G×T, Group×Time.

Table 4. The change of serum concentration and mRNA expression of RANK/RANKL/OPG after a bout exercise of different intensity

	Intensity	Before	After	Recovery	Source	F (p)
Serum concentration						
RANKL (pg/mL)	CON	66.6±40.9	28.5±9.0	66.7±27.5	G	.184 (.837)
	LOW	60.5±26.7	46.4±16.6	16.4±7.7	T	2.494 (.177)
	HIGH	89.0±35.3	36.1±13.7	8.8±8.4	G×T	1.561 (.372)
OPG (pg/mL)	CON	68.1±6.2	81.4±8.2	72.2±6.7	G	3.786 (.100)
	LOW	85.0±4.9	105.9±14.6	93.3±8.1	T	4.661 (.072)
	HIGH	107.5±11.7	105.8±8.2	95.4±10.9	G×T	14.159 (.027)
OPG/RANKL (ratio)	CON	1.43±0.27	1.96±0.11	0.84±0.08	G	.735 (.550)
	LOW	2.08±0.62	2.37±0.80	2.55±0.18	T	1.760 (.312)
	HIGH	0.97±0.19	3.80±0.78	2.67±2.84	G×T	1.996 (.482)
mRNA expression						
RANK (ratio ^a)	CON	2.16 ±0.46	2.34±0.59	1.92±0.62	G	2.991 (.378)
	LOW	1.34±0.62	2.15±0.56	1.13±0.32	T	.360 (.763)
	HIGH	0.49±0.18	1.41±0.75	0.49±0.12	G×T	.276 (.796)
RANKL (ratio ^a)	CON	0.66±0.15	0.70±0.30	0.60±0.23	G	14.044 (.002)
	LOW	0.59±0.19	0.46±0.06	0.52±0.24	T	.228 (.801)
	HIGH	0.09±0.03	0.10±0.05	0.12±0.03	G×T	.778 (.578)
OPG (ratio ^a)	CON	1.16±0.32	1.81±0.78	0.95±0.28	G	17.048 (.001)
	LOW	0.95±0.25	0.90±0.23	0.55±0.10	T	2.378 (.155)
	HIGH	0.21±0.07	0.31±0.15	0.26±0.06	G×T	1.611 (.286)
OPG/RANKL mRNA (ratio)	CON	2.35±0.68	2.82±0.91	2.25±0.52	G	.153 (.861)
	LOW	1.83±0.33	1.94±0.42	2.58±1.12	T	.118 (.891)
	HIGH	2.30±0.13	2.25±0.21	2.40±0.32	G×T	.659 (.646)

Mean ± SE.

CON, Control group; LOW, 40% VO₂max exercise group; HIGH, 80% VO₂max exercise group; RANK, Receptor Activator of Nuclear factor-Kappa B; RANKL, RANK Ligand; OPG, Osteoprotegerin; G, Group; T, Time; G×T, Group×Time.^aratio from the amount of GAPDH mRNA.

보여, 회복기에는 안정 시에 비교하여 약 11% 감소하는 경향을 보였다 (Table 4). 한편, 혈청 RANKL 농도 및 OPG/RANKL ratio에 있어서는 상호작용 효과 및 집단, 시기에 따른 주효과 모두 유의한 차이는 없었다.

3. RANKL 및 RANK, OPG mRNA, OPG/RANKL mRNA ratio 변화

RANK 및 RANKL, OPG mRNA에 있어서는 상호작용 효과 및 집단, 시기에 따른 주효과 모두 유의한 차이는 나타나지 않았다 (Table 4). RANKL 및 OPG mRNA 분산분석 결과에서 집단 간에 유의차가 있는 것으로 나타났으나, unpaired t-test로 사후검사 결과 유의한 차이는 없는 것으로 나타났다. OPG/RANKL mRNA ratio에 있어서는 상호작용 효과 및 집단, 시기에 따른 주효과 모두 유의한 차이는 없었다.

논 의

RANK는 성숙골세포[32]는 물론, 전구골세포와 순환 단핵세포[33] 및 몇몇 암세포[34] 등의 세포 표면에 발현되며, RANKL과 결합하게 되면 TNF receptor associated factor 5 (TRAF5)와 TRAF6를 매개하

여 파골세포의 형성 및 활성화에 직접적으로 관여한다. RANKL은 주로 조골세포와 면역세포[35,36]에서 생산되며, 전구파골세포의 파골세포로의 분화[37] 및 증식[35], 활성화[36] 등을 강력하게 조절한다. 예를 들어, 에스트로겐이 부족한 초기의 폐경 후 여성을 대상으로 조사한 결과, RANKL의 증가가 골흡수를 촉진시키고 있는 것이 보고되고 있다[38]. 한편, OPG는 사이토카인 수용체의 하나로 RANKL과 RANK 간의 결합을 방해하여 파골세포생성 억제 인자(osteoclastogenesis inhibitory factor, OCIF)로 알려져 있다[23]. 즉, RANKL은 RANK와 결합하여 파골세포의 분화와 성숙에 관여하여 골흡수를 촉진하고, OPG는 이들의 결합을 방해하여 골흡수를 억제하는 것으로 밝혀져 있다. 따라서 이들을 RANKL/RANK/OPG 시스템 사이토카인이라 부르며 골흡수에 있어 열쇠 역할을 하고 있다고 알려져 있다.

본 연구에서는 골감소증 고령여성을 대상으로 저장도와 고강도의 1 회성 운동을 부하하여 운동강도의 차이가 RANKL/RANK/OPG 시스템 사이토카인의 혈중 생성량과 PBMC에서 생성되는 mRNA의 발현에 미치는 영향을 검토하였다. 그 결과 RANKL과 RANK에서는 혈중 농도 및 mRNA 발현에 어떠한 영향을 미치지 않으나, 혈중 OPG 농도에 있어서 대조집단과 저장도일 때는 시간 경과에 따라 증가하였다가

어느 정도 유지되는 경향을 나타낸 반면, 고강도에 있어서는 운동직후에 증가하지 않았으며, 회복기에는 운동전보다 감소하는 경향을 나타냈다. 이러한 결과로부터 1회성 운동에 의해서는 RANKL과 RANK의 변화는 일어나지 않지만, 혈중 OPG는 1회성 운동의 영향을 받을 가능성이 시사되었다.

RANKL은 IL-1이나 TNF- α 와 같은 다양한 사이토카인[39]이나 PTH와 1,25dihydroxyvitamin D₃ (1,25 D₃)와 같은 칼슘조절 호르몬[40]의 자극에 의하여 생성되는 것으로 알려져 있다. 고령여성을 대상으로 1회성 운동부하를 한 연구결과 TNF- α 와 IL-6, IL-1 β 등의 골흡수성 사이토카인이 변화하지 않았다는 결과와 같이[15], 본 연구 결과에서도 1회성의 운동은 강도와 관계 없이 RANKL의 생성에도 영향을 미치지 않을 가능성이 시사된 것이다. 한편, RANK는 순환 단핵세포[33]에서 발현되고, RANKL은 주로 조골세포 계통에서 발현되고 있으나, T 림프구[21], B 림프구[22] 등의 골수기질세포의 표면에서도 발현되는 것이 보고되고 있어 본 연구에서는 PBMC로부터의 mRNA의 발현을 검토하였다. 그 결과 RANK 및 RANKL의 mRNA에서도 유의미한 변화는 발견할 수 없었다. PBMC는 혈액의 단핵세포들로 T 림프구와 B 림프구 등을 포함하고 있으며, 골수환경을 반영[41]하고 있어 골대사 연구에 많이 이용되고 있다. Olivier et al. [42]은 골감소증을 가지고 있는 만성 간질환 환자들을 대상으로 PBMC에서 전구파골세포로부터 파골세포로 발달하는 기전을 검토한 결과, 건강한 대조집단에 비교하여 환자들의 순환 단핵세포들이 더 많이 파골세포로 발달해 나가는 것을 밝혔다. 또한, Bashir et al. [43]도 17명의 폐경여성을 대상으로 estrogen과 raloxifene을 처치하여 PBMC로부터의 OPG/RANKL/RANKL의 mRNA의 발현을 검토한 결과, 6개월 후에 OPG/RANKL/RANKL의 mRNA의 발현이 유의하게 감소하는 것을 보고하고 있다. Stuss et al. [44]은 89명의 폐경여성을 대상으로 ibandronate와 strontium ranelate (SR)을 6개월간 처치하여 PBMC로부터의 OPG/RANKL/RANKL의 mRNA의 발현을 검토한 결과, 골흡수 대사에 영향을 미치지 않는 것을 보고하였다.

OPG는 RANKL의 작용을 방해하여 골흡수를 억제한다. 재조합 OPG를 투여한 마우스 또는 OPG를 과발현시킨 형질전환 마우스에서는 골밀도가 비정상적으로 높아진 골석회증(osteopetrosis)이 유발되는 반면, OPG 유전자가 제거된 knock-out 마우스에서는 골다공증과 혈관내 칼슘침착(vascular calcification)이 발생하는 것이 알려져 있다[45]. 또한, Chmielnicka et al. [46]은 부작용으로 골다공증을 일으키는 것으로 알려진 코르티코스테로이드 치료 환자를 대상으로 혈중 OPG와 RANKL 농도를 측정한 결과, 건강한 대조집단에 비교하여 각각 16.5%, 26.9% 높은 것을 보고하면서, 골흡수도 증가하고 그에 따라 골흡수 억제도 증가하는 골대사항진 상태임을 밝히고 있다. 본 연구 결과 PBMC에서 생성되는 RANKL과 RANK의 mRNA의 발현과 마찬가지로

지로 1회성 운동에 따라서 OPG mRNA의 발현에도 운동에 대한 영향은 나타나지 않았지만, OPG의 혈중 생성량이 변화하는 것이 밝혀졌으며, 운동 강도에 따라서 다르게 나타날 가능성이 시사되었다. 즉, 고강도의 운동은 파골세포의 활성을 억제시키는 OPG의 혈중 농도를 유지시키고 있을 가능성이 시사된 것이다. 단, 본 연구에서 나타난 대조집단이나 저강도에서는 시간의 흐름에 따라 변화하는 양상을 보이지만, 고강도 운동 집단에서는 운동직후에 변화하지 않는 원인에 대해서는 추후 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단되었다.

또 하나의 골대사의 지표로서 혈중 RANKL과 OPG의 비율(OPG/RANKL ratio)이 이용되고 있다. OPG/RANKL ratio의 균형은 골대사의 적절한 균형 유지에 중요한 역할을 하고 있으며, OPG/RANKL ratio의 downregulation은 골흡수를 촉진하는 것으로 판단할 수 있다[47,48]. Munoz-Calvo et al. [49]과 Ostrowska et al. [50]은 신경성 식욕부진증을 가지고 있는 여학생을 대상으로 OPG/RANKL ratio를 검토한 결과, 골흡수를 예측하는 지표로 각각의 지표보다 더 유용하다는 것을 보고하고 있다. 본 연구에 있어서 혈중 농도 및 PBMC로부터의 mRNA 발현의 OPG/RANKL ratio를 검토하였으나, 어떤 것에서도 유의미한 변화를 찾을 수 없었다. 본 연구와 같은 1회성의 운동으로는 OPG/RANKL ratio의 변화를 야기시키지 않을 가능성이 시사되었다.

한편, 본 연구 결과 혈중 CTx 농도에는 어떠한 영향을 미치지 않으나, 혈중 OC 농도에 있어서 고강도일 때는 어느 정도 유지되는 경향을 나타낸 반면, 저강도에 있어서는 운동 직후에 증가하지 않았으며, 회복기에는 운동 전보다 증가하는 경향을 나타냈다. 이러한 결과로부터 1회성 운동에 의해서는 CTx의 변화는 일어나지 않지만, 혈중 OC는 1회성 운동의 영향을 받을 가능성이 시사되었다. CTx는 골대사의 비율을 나타내는 혈청 생화학 지표로써[26], 고령 여성의 폐경 후와 같이 대사성 골질환에서 골흡수가 촉진될 때 증가하는 것이 알려져 있다[27]. 골량감소증 여성을 대상으로 1회성의 저항성 운동과 걷기 운동을 부하하여 CTx의 변화를 대조집단과 비교한 연구에서 걷기운동에서는 차이가 없는 것이 보고되고 있다[51]. 또한, 젊은 여성 10명을 대상으로 전신 진동 운동(Whole-body vibration)을 본 연구와 유사하게 단일집단 반복측정으로 디자인하여 1회성으로 부하한 연구에 있어서는 CTx의 어떠한 변화도 없었던 것이 보고되고 있다[52]. 이처럼 1회성 운동의 경우에는 골흡수 지표인 CTx에는 영향을 미치지 않는 것이 시사되었다.

OC는 조골세포에서 생성되어 골기질에 결합하는 비콜라겐성 단백질의 주요 성분으로[24], 골형성지표로 사용되고 있다[25]. OC는 특히 운동에 대한 최적의 적응 지표로서, 일회성의 지구성 운동에 의하여 혈중 수준이 증가하는 것으로 보고되고 있다[53]. 그러나, 95%HRpeak의 고강도 운동을 1회성을 부하한 연구에서는 총 OC가 변화하지 않는 것으로 보고되고 있다[54]. 본 연구에서 고강도에서는 변화하지 않고 저강도에서 증가하는 경향을 보이는 것은 운동강도에 대한 반응의 차

이 때문에 발생할 가능성이 시사되었다. 앞서 같은 골형성 지표인 OPG의 반응에서는 고강도에서 운동 후 회복기에 감소하는 경향을 나타낸 것과는 대조적인 것이다. 이러한 OC와 OPG의 반응의 차이에 대해서는 추가 검토가 필요할 것으로 사료되었다. 최근 연구에 의하면 혈중 OC와 CTx의 비율(OC/CTx ratio)이 이용되고 있으며, OC/CTx ratio의 upregulation은 골형성을 촉진하는 것으로 판단할 수 있다[55,56]. 본 연구에 있어서 혈중 농도의 OC/CTx ratio에서도 유의미한 변화가 없었으며, 1회성의 운동으로는 OC/CTx ratio의 변화를 야기시키지 않을 가능성이 시사되었다. 또한 본 연구의 대상자들은 평소 운동 습관이 없는 고령의 골감소증 여성을 대상으로 하고 있어, 건강한 여성들과는 운동에 대한 반응이 다르게 나타날 가능성도 상정된다. 추후 다양한 대상자를 통한 검토가 필요할 것으로 사료된다.

결론

골감소증 고령 여성을 대상으로 1회성의 저강도(40% VO₂max)와 고강도(80% VO₂max) 운동에 따른 혈중 골대사 표지자 및 RANKL/RANK/OPG 시스템 사이토카인을 검토하였다. 그 결과 골흡수를 나타내는 혈중 CTx, RANKL 및 RANKL, RANK mRNA에서는 유의한 변화가 나타나지 않았지만, 골형성을 나타내는 혈중 OC는 저강도에서, 혈중 OPG는 고강도에서 변화하는 것이 밝혀져, 1회성 운동은 골형성을 자극할 가능성이 시사되었다. 단, 운동강도에 따른 OC와 OPG의 변화에 대해서는 추후 검토가 필요할 것으로 사료되었다.

REFERENCES

- Kim JE, Moon H, Jin HM. The effects of exercise training and type of exercise training on changes in bone mineral density in Korean postmenopausal women: a systematic review. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry* 2016;20(3):7-15.
- Woźniak-Holecka J, Sobczyk K. Nutritional education in the primary prevention of osteoporosis in perimenopausal and postmenopausal women. *Prz Menopauzalny* 2014;13(1):56-63.
- Morris HS, Leroy SL, Michael IS. Piezoelectric Effect in Bone. *Nature* 1963;197(4862):81.
- Voss LA, Fadale PD, Hulstyn MJ. Exercise-induced loss of bone density in athletes. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 1998;6(6):349-357.
- Bilanin JE, Blanchard MS, Russek-Cohen E. Lower vertebral bone density in male long distance runners. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 1989;21(1):66-70.
- Risser WL, Lee EJ, LeBlanc A, Poindexter HB, Risser JM, et al. Bone short-term step aerobics exercise on bone metabolism and functional fitness in postmenopausal women with low bone mass. *Osteoporosis International* 2016 Sep 9. [Epub ahead of print]
- Wen HJ, Huang TH, Li TL, Chong PN, Ang BS. Effects of short-term step aerobics exercise on bone metabolism and functional fitness in postmenopausal women with low bone mass. *Osteoporos Int.* 2016 Sep 9. [Epub ahead of print]
- Chen X, Li L, Guo J, Zhang L, Yuan Y, et al. Treadmill running exercise prevents senile osteoporosis and upregulates the Wnt signaling pathway in SAMP6 mice. *Oncotarget* 2016;7(44):71072-71086.
- Yamamoto T, Kita M, Kimura I, Oseko F, Terauchi R, et al. Mechanical stress induces expression of cytokines in human periodontal ligament cells. *Oral disease* 2006;12(2):171-175.
- Xiong Y, Donovan KA, Kline MP, Gornet MK, Moon-Tasson LL, et al. Identification of two groups of smoldering multiple myeloma patients who are either high or low producers of interleukin-1. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2006;26(2):83-95.
- Giannini S, Nobile M, Sella S, Dalle Carbonare L. Bone disease in primary hypercalciuria. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2005;42(3):229-248.
- Inanir A, Ozoran K, Tutkak H, Mermerci B. The effects of calcitriol therapy on serum interleukin-1, interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha concentrations in post-menopausal patients with osteoporosis. *Journal of International Medical Research* 2004;32(6):570-582.
- Cheng J, Liu J, Shi Z, Jules J, Xu D, et al. Molecular mechanisms of the biphasic effects of interferon-γ on osteoclastogenesis. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2012;32(1):34-45.
- Kotake S, Nanke Y, Mogi M, Kawamoto M, Furuya T, et al. IFN-γ-producing human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes via the expression of RANKL. *European Journal of Immunology* 2005;35(11):3353-3363.
- Kim CS, Kim HJ, Kim JY, Kim JW, Lim SG, et al. The effects of low intensity single bout exercise on bone metabolic cytokines in osteopenia women. *Exercise Science* 2016;25(4):274-281.
- Kim HJ, Kim JY, Kim CS. The effects of pilates exercise on lipid metabolism and inflammatory cytokines mRNA expression in female undergraduates. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry* 2014; 18(3):267-276.
- Kim CS, Kim HJ, Kim JY. The effects of a single bout pilates exercise on mRNA expression of bone metabolic cytokines in osteopenia women.

- en. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry* 2014;18(1):69-78.
18. Kim CS. Expression of bone-resorbing cytokines according to aerobic exercise intensities. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry* 2011; 15(3):131-139.
  19. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell Press* 1998;93(2):165-176.
  20. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/ osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 1998;95(7): 3597-3602.
  21. Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N. Estrogen-deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF- α . *Journal of Clinical Investigation* 2000;106(10):1229-1327.
  22. Kanematsu M, Sato T, Takai H, Watanabe K, Ikeda K, et al. Prostaglandin E2 induces expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand /osteoprotegerin ligand on pre-B cells: implications for accelerated osteoclastogenesis in estrogen deficiency. *Journal of Bone and Mineral Research* 2000;15(7):1321-1329.
  23. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell Press* 1997;89(2):309-319.
  24. Power MJ, Fottrell PF. Osteocalcin: diagnostic methods and clinical applications. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 1991; 28(4):287-335.
  25. Christenson RH. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clinical Biochemistry* 1997;30(8):573-593.
  26. Bonde M, Garnero P, Fledelius C, Qvist P, Delmas PD, et al. 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. *Journal of Bone and Mineral Research* 1997; 12(7):1028-1034.
  27. Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy MC, Delmas PD. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research* 1996;11(3):337-349.
  28. Gołabek K., Ostrowska Z., Ziara K, Oświęcimska J, Świętochowska E, et al. Association between omentin-1, bone metabolism markers, and cytokines of the RANKL/RANK/OPG system in girls with anorexia nervosa. *Endokrynologia Polska* 2015;66(6):514-520.
  29. Kanis JA, Melton LJ 3rd, Christiansen C, Johnston CC, Khaltaev N. The diagnosis of osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research* 1994;9(8):1137-1141.
  30. Pacifici R, Carano A, Santoro SA, Rifas L, Jeffrey JJ, et al. Bone matrix constituents stimulate interleukin-1 release from human blood mononuclear cells. *Journal of Clinical Investigation* 1991;87(1):221-228.
  31. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 1987;162(1):156-159.
  32. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999;397:315-323.
  33. Mosheimer BA, Kaneider NC, Feistritz C, Djanani AM, Sturn DH, et al. Syndecan-1 is involved in osteoprotegerin-induced chemotaxis in human peripheral blood monocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2005;90(5):2964-2971.
  34. Kim NS, Kim HJ, Koo BK, Kwon MC, Kim YW, et al. Receptor activator of NF-Kappa B ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2. *Molecular and Cellular Biology* 2006;26(3):1002-1013.
  35. Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* 2007;40(2):251-264.
  36. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends in molecular medicine* 2006;12(1):17-25.
  37. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nature reviews Immunology* 2007;7(4):292-304.
  38. Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, et al. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *Journal of Clinical Investigation* 2003;111(8): 1221-1230.
  39. Hofbauer LC, Heufelder AE. Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: new concepts of the pathogenesis and therapy of metabolic bone diseases. *Dtsch MedWochenschr* 2001;126(6):145-150.
  40. O'Brien EA, Williams JH, Marshall MJ. Osteoprotegerin is produced when prostaglandin synthesis is inhibited causing osteoclasts to detach from the surface of mouse parietal bone and attach to the endocranial membrane. *Bone* 2001;28(2):208-214.
  41. Pacifici R, Carano A, Santoro SA, Rifas L, Jeffrey JJ, et al. Bone matrix constituents stimulate interleukin-1 release from human blood mononuclear cells. *Journal of Clinical Investigation* 1991;87(1):221-228.

42. Olivier BJ, Schoenmaker T, Mebius RE, Everts V, Mulder CJ, et al. Increased osteoclast formation and activity by peripheral blood mononuclear cells in chronic liver disease patients with osteopenia. *Hepatology* 2008;47(1):259-267.
43. Bashir A, Mak YT, Sankaralingam S, Cheung J, McGowan NW, et al. Changes in RANKL/OPG/RANK gene expression in peripheral mononuclear cells following treatment with estrogen or raloxifene. *Steroids* 2005;170(13):847-855.
44. Stuss M, Rieske P, Ceglowska A, Stępien-Kłos W, Liberski PP, et al. Assessment of OPG/RANK/RANKL gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) after treatment with strontium ranelate and ibandronate in patients with postmenopausal osteoporosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2013;98(5):E1007-1011.
45. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *Journal of Molecular Medicine* 2001;79(5-6):243-253.
46. Chmielnicka M, Woźniacka A, Torzecka JD. The influence of corticosteroid treatment on the OPG/RANK/RANKL pathway and osteocalcin in patients with pemphigus. *Postepy Dermatol Alergol* 2015;31(5):281-289.
47. Kearns AE, Khosla S, Kosteniuk PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocrine Reviews* 2008;29(2):155-192.
48. Silva I, Branco JC. RANK/RANKL/OPG: Literature review. *Acta Reumatol Port* 2011;36(3):209-218.
49. Munoz-Calvo MT, Barrios V, Garcia de Alvaro MT, Mendez-Davila C, Argente J, et al. Maintained malnutrition produces a progressive decrease in OPG/RANKL ratio and leptin levels in patients with anorexia nervosa. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 2007;67(4):387-393.
50. Ostrowska Z, Ziora K, Oświęcimska J, Świętochowska E, Szapska B, et al. RANKL/RANK/OPG system and bone status in females with anorexia nervosa. *Bone* 2012;50(1):156-160.
51. Gombos GC, Bajsz V, Pék E, Schmidt B, Sió E, et al. Direct effects of physical training on markers of bone metabolism and serum sclerostin concentrations in older adults with low bone mass. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2016;17(254):1-8.
52. Vanessa D Sherk, Carmen Chrisman, Jessica Smith, Kaelin C. Young, Harshvardhan Singh, et al. Acute Bone Marker Responses to Whole-Body Vibration and Resistance Exercise in Young Women. *Journal of Clinical Densitometry* 2013;16(1):104-109.
53. Mera P, Laue K, Ferron M, Confavreux C, Wei J, et al. Osteocalcin Signaling in Myofibers Is Necessary and Sufficient for Optimum Adaptation to Exercise. *Cell Metabolism* 2016;23(6):1078-1092.
54. Levinger I, Jerums G, Stepto NK, Parker L, Serpiello Fr, et al. The effect of acute exercise on undercarboxylated osteocalcin and insulin sensitivity in obese men. *Journal of Bone and Mineral Research* 2014;29(12):2571-2576.
55. Hotta M, Shibasaki T, Sato K, H Demura. The importance of body weight history in the occurrence and recovery of osteoporosis in patients with anorexia nervosa: evaluation by dual x-ray absorptiometry and bone metabolic markers. *European Journal of Endocrinology* 1998;139(3):276-283.
56. Weinbrenner T, Zittermann A, Gouni-Berthold I, Stehle P, Berthold H K. Body mass index and disease duration are predictors of disturbed bone turnover in anorexia nervosa. A case-control study. *European Journal of Clinical Nutrition* 2003;57(10):1262-1267.