

## 흰쥐에서 난소제거술로 유발시킨 골다공증시 osteocalcin, bone-specific alkaline phosphatase, estrogen, IGF-I, Ca<sup>2+</sup>, P와 bone density의 변화

김남수 · 유유순 · 강창원 · 최인혁

전북대학교 수의과대학  
(2000년 10월 24일 게재승인)

## The changes of osteocalcin, bone-specific alkaline phosphatase, estrogen, IGF-I, Ca<sup>2+</sup>, P and bone mineral density on osteoporosis induced by ovariectomy in rats

Nam-soo Kim, You-soon You, Chang-won Kang, In-hyuk Choi

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, 561-756, Korea

(Accepted by October 24, 2000)

**Abstract :** The aim of this investigation was to examine the effects of osteocalcin, bone-specific alkaline phosphatase, estrogen, insulin-like growth factor-I (IGF-I), Ca, P and bone mineral density on osteoporosis induced by ovariectomy in rats. Female Sprague-Dawley 30 rats of three-fourth's birth, weighing 215±10 g, were divided into two groups including the sham operation group(5 heads) and ovariectomy group(25 heads). They were fed normal diets for 2 weeks before the experimental operation and for 8 more weeks after operation. The level of osteocalcin, TALP, BALP, estrogen, bone mineral density and IGF-I were increased in experimental group, but a little increased in sham operation group at same period. The change of rates of osteocalcin, TALP, BALP, estrogen, bone mineral density and IGF-I were significantly higher in experimental group than sham operation group. Ca<sup>2+</sup> was not changed between two groups and P was significantly decreased in experimental group and Ca/P ratio was higher in experimental group than sham operation group. Body weights were increased in all two groups and growth rate per day was higher in experimental group than sham operation group. However, femur weight/body weight ratio was lower in experimental group than sham operation group.

**Key words :** rat ovariectomy, postmenopausal osteoporosis, osteocalcin, bone mineral density, IGF-I

### 서 론

연령이 증가함에 따라 모든 생체는 구조적 변형이 나타나게 되는데 골에 있어서도 다른 기관과 마찬가지로 노화 현상이 불가피하다. 평균 수명의 연장과 함께 노인성 질환에 대한 관심이 증가되면서 많은 연구의 대상이 되고 있는 골다공증은 동일 연령과 성별의 정상인에 비하여 골량(단위 부피당 골질량)이 현저하게 감소된 상태를 말하는데 그 발병 원인으로는 내분비학적, 영양학적, 유전학적 인자들이 관여하고 있는 것으로 알려져 있

다<sup>1,2,3,4</sup>. 특히 여성의 경우 폐경과 함께 골밀도의 감소 현상이 더욱 심하여 골다공증에 대한 유병율이 남성보다 현저히 높은 것으로 알려져 있어 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>5,6</sup>. 골다공증을 일으키는 요인이나 치료제들이 모두 골 재형성을 변화 시키므로써 작용하게 되는데 골의 재형성은 성장이 끝난 골에서 일어나는 골 조직 보충기전으로서, 파골 세포에 의해 미세 손상을 받은 골을 제거하고 골아 세포에 의하여 새로운 골 조직으로 대체함으로 골의 생체 기계적 능력(biomechanical competence)을 유지하게 되는 것으로 알려져 있다<sup>2,4,7,8</sup>.

이러한 골 재형성은 전신성 호르몬과 국소인자에 의해 조절되는데 오랫동안 전신성 호르몬이 골 대사 조절에 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있었으나 최근 들어 전신성 호르몬보다는 국소인자가 더욱 중요한 역할을 함이 밝혀지고 있다.

폐경기 후 골다공증의 표본으로는 난소 제거술로 골다공증을 유발시킨 흰쥐가 주로 이용되고 있는데<sup>9,10,11</sup> 지금까지의 연구는 그 대부분이 혈액검사 및 혈청화학검사, 조직학적 방법 그리고 부분적인 호르몬 검사 등을 이용한 것들로, 국소인자(Local factor)나 골 교체의 생화학적 지표 그리고 방사선화학적 검사 등에 관해서는 그 보고가 드물어 골다공증의 진행되는 정도를 예민하게 가늠하기에는 여러 가지 어려움이 있다. 실험 동물 모델로서 흰쥐의 난소 적출술 후 골다공증의 유발 여부의 확인과 그 진행 정도에 따른 민감도와 특이도를 확인할 수 있는 방법의 확립은 골다공증 치료 효과에 대한 신속한 판정과 그에 따른 치료 방법 및 예방의 효율성을 증대시킬 수 있는 중요한 요건일 것이다.

따라서 이 실험에서는 랫트 난소 제거술을 실시하여 골다공증을 유발시킨 후 혈청의 osteocalcin, bone specific alkaline phosphatase, estrogen, insulin-like growth factor-I(이하 IGF-I),  $Ca^{2+}$ , P와 대퇴골 골밀도 및 체중, 대퇴골 무게를 측정하므로써 충분히 유발된 골다공증시 이들의 민감도와 특이도를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 동물

전북대학교 생체안전성연구소 실험동물실에서 분양 받은 3-4회 출산 경력이 있는 성숙한 암컷 흰쥐(Sprague-Dawley, B.W 200-230 g) 30마리를 이용하였다. 전 실험기간 동안 동일한 온도와 습도의 사육실에서 사료는 랫트용 펠레트형 고형 압축 사료(삼양식품사 제조)를 사용하였고 식수는 자유로이 섭취할 수 있도록 하였다.

### 난소제거술

총 30마리의 흰쥐 중 25마리를 대상으로 양측 난소 적출술을 시행하였다. Thiopental sodium(펜토탈소디움 중의제약) 25 mg/kg을 복강내 주입하여 전신 마취 시킨 다음, 양측 배복부의 털을 삭모한 후 복와위에서 10% betadine 용액으로 수술부위를 소독하고 무균조작하에 수술을 시행하였다. 한쪽 측배부 아래쪽에서 약 1.5 cm 피부 및 근육과 복막까지 절개한 후 난소를 노출시킨 다음 난관을 silk로 결찰한 후 난소를 절제하고 silk를 사용하여 복막, 근육 그리고 피부를 봉합하였다. 반대측에

대해서도 동일한 방법으로 접근하여 난소를 적출하였다. 나머지 5마리에 대해서는 복막까지만 같은 방법으로 접근하고 난소는 적출하지 않은 채로 다시 봉합하는 가장수술(sham operation)을 시행하여 이를 대조군으로 사용하였다.

### 조직학적 검사

골 표본을 10% 중성 포르말린 용액에 고정한 다음 무기질의 탈석회화를 위해 10% nitric acid에 6시간 동안 침적한 후 탈수과정과 파라핀 포매를 한 다음 근위 경골부에서 조직절편을 만들었다. 통상적인 방법으로 Hematoxylin-Eosin 염색을 실시한 다음 현미경 관찰을 하였다.

### Osteocalcin(BGP)의 측정

혈청 중 osteocalcin의 함량은 osteocalcin RIA (Osteocalcina, Radim co. Italy) kit를 사용하여 방사면역 측정법(radioimmunoassay)에 따라 측정하였으며  $\gamma$ -counter(Cobra, Packard co. U.S.A)로 계측한 방사능은 내장된 컴퓨터의 4-Parameters RIA의 프로그램에 의해 osteocalcin 값을 산출하였다.

### BALP-TALP 및 B/T의 측정

TALP의 측정은 p-nitrophenylphosphate를 기질로 하여 ALP의 발색 정도를 보는 Bessey-Lowry 법에 따랐으며 alkaline phosphatase의 isoenzymes 중에서 bone alkaline phosphatase의 침전은 wheat germ agglutinin이 혈청내 BALP의 N-actylglucosamin과 결합하는 성질을 이용한 Rosalki와 Ying Foo의 방법<sup>12</sup>과 그것을 개선시킨 Behr와 Barnert의 방법<sup>13</sup>에 따랐다.

### Estrogen 측정

혈청 중 estradiol 함량은 estradiol RIA kit(DPC co. USA)를 사용하여 방사면역측정법에 따라  $\gamma$ -counter로 측정하였다.

### IGF-I의 측정

혈청내의 IGF-I농도는 <sup>125</sup>I-IGF-I과 polyclonal anti-IGF-I 항체를 이용한 방사면역 측정법을 이용하였다. IGF-I RIA 완충액으로 0.5% BSA, 0.12 M NaCl, 0.1% Na azide를 함유한 0.04 M 인산완충액(pH 7.4)을 사용하였다. IGF-I standard와 시료에 1500배 희석시킨 polyclonal anti-IGF-I 50  $\mu$ l를 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 각각의 시험관에 <sup>125</sup>I-IGF-I 15,000 cpm을 첨가하여 4°C에서 18시간 동안 반응시켰다. 그 후 horse serum 50  $\mu$ l와 20% polyethylene glycol(PEG) 1 ml

를 첨가하여 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 시켜 radioligand의 bound form의 방사능을  $\gamma$ - counter를 이용하여 측정하였다.

**대퇴골 골밀도의 측정(Bone density)**

수술 전, 수술 후 8주째 되는 날 대퇴골의 골밀도(bone mineral density, 이하 BMD)를 small animal total body option을 가지고 있는 dual energy x-ray absorptiometry (이하 DEXA : Lunar<sup>®</sup> DPX-L, USA)를 이용하여 측정하였다.

**Ca<sup>2+</sup>와 P의 측정**

Ca와 P의 측정은 항응고제를 처리하지 않은 튜브에 채혈한 다음 원심 분리하여 얻은 혈청을 측정 시액 (Sigma chem. co. U.S.A.)과 분광광도계(Spetronic 601, Milton roy co. U.S.A.)를 사용하여 비색법으로 분석하였다.

**체중 및 대퇴골의 무게 측정**

수술 시작 전 가장수술군 및 실험군의 체중 측정과 수술 시행 8주 후 체중 측정을 하였으며, 대퇴골 무게 (wet weight)의 측정은 수술 8주에 희생시켜 양측 대퇴골을 골막 분리 후 측정하였다. 이후 체중에 대한 대퇴골 무게의 비율은 계산에 의하여 산출하였다.

**자료 분석**

실험 결과는 Mean±SD로 표시하였고 두 군간의 통계처리는 Student's t-test를 하였으며 p 값이 0.05 이하인 경우를 유의한 차이로 간주하였다.

**결 과**

**조직학적 변화**

Fig 1에 나타난 바와 같이 정상골 조직에 비해 난소 적출술로 골다공증을 유발시킨 쥐의 골조직에서 현저하게 많은 골소실의 소견을 보였다(Fig 1).

**Osteocalcin(BGP)치의 변화**

골형성 지표중의 하나인 osteocalcin은 수술 전  $0.277 \pm 0.04(\text{ng/ml})$ 에서 수술 후 8주째, 가장수술군에서는  $0.329 \pm 0.036(\text{ng/ml})$ 로, 난소 적출 실험군은  $0.308 \pm 0.068(\text{ng/ml})$ 로 나타나 같은 시기 가장수술군이 골다공증을 유발시킨 실험군에 비하여 유의성 있게 높게 나타났다 (Table 1)

**TALP치, BALP치 및 B/T 비율**

Total ALP의 활성도는 시술 전  $21.4 \pm 0.56(\text{IU/L})$ 에서 시술 8주 후, 가장수술군은  $27.8 \pm 0.63(\text{IU/L})$ 으로, 실험군은  $29.1 \pm 1.27(\text{IU/L})$ 로 약 40.9% 증가되었으며, TALP와 함께 골로부터 유리되는 ALP에만 특이하게 반응하는 원리를 이용한 BALP는 시술 전  $12.1 \pm 0.07(\text{IU/L})$ 에서 시술 8주 후 가장수술군은  $14.3 \pm 0.35(\text{IU/L})$ 로, 실험군은  $13.1 \pm 0.78(\text{IU/L})$ 로 나타나 오히려 약간 감소된 경향을 보였다. TALP 치에 대한 BALP 치의 비율의 변화는 시술 전 56.5%에서 시술 8주 후 가장수술군이 51.4%로, 실험군이 45.0%로 나타나 TALP 치나 BALP 치 각각의 경우와는 조금 다른 양상을 보였으며 같은 기간 가장수술군에 비하여 골다공증 유발군의 B/T 치가 현저한 감소를 나타내고 있었다(Table 1).

**Fig 1.** Histological changes of the proximal tibia before and after ovariectomy. (Hematoxylin & Eosin Staining, x 40 except)  
 A. Before experiment, trabecular pattern of the osteoid is condense and well preserved in both the epiphysis and metaphysis.  
 B. 8 weeks after ovariectomy, trabecular portion was reduced and the cellular and vacuolar portion of marrow.

**Table 1.** The changes of osteocalcin, TALP, BALP, estrogen, IGF-I, bone density, Ca<sup>2+</sup> and P before and after 8 weeks experiment in rats

Group/Item	osteocalcin (ng/ml)	TALP (U/L)	BALP (U/L)	B/T <sup>†</sup> (%)	Estrogen (ng/ml)	IGF-I (ng/ml)	bone density (g/cm <sup>2</sup> )	ca (mg/dl)	p (mg/dl)
Before	0.277±0.04	21.4±0.56	12.1±0.07	56.5	43.02±4.32	194.95±15.56	0.272±0.01	11.4±0.11	5.1±1.67
After 8weeks									
Sham op	0.329±0.04	27.8±0.63	14.3±0.35	51.4	48.55±5.29	214.11±27.59	0.280±0.01	11.5±0.25	4.7±1.13
Experiment	0.308 ±0.07*	29.1 ±1.27*	13.1 ±0.78*	45.0	16.03 ±4.17**	199.15 ±15.06**	0.251 ±0.01	11.4 ±0.41	2.8 ±0.72*

<sup>†</sup>B/T : Percentage of BALP values to TALP.

\* p<0.05, \*\* p<0.01

### Estrogen치의 변화

시술 전 43.02±4.32(ng/ml)에서 시술 후 8주에 가장 수술군은 48.55±5.288(ng/ml)로 약간 증가한 반면 실험군은 16.033±4.168(ng/ml)로 약 168.3%의 현저한 감소를 보였으며, 이는 실험군이 시술전과 가장수술군 모두에 비하여 통계적으로 매우 유의성(p<0.01) 있는 결과이다(Table 1).

### IGF-I의 측정치의 변화

시술 전 194.95±15.56(ng/ml)에서 시술 후 8주에 가장수술군은 214.108±27.59(ng/ml)로 9.8% 증가한 반면 실험군은 199.15±25.06(ng/ml)로 2.1% 증가한 것으로 나타났지만 같은 시기 가장수술군과의 비교에서는 오히려 약 7.5%가 매우 유의성 있게(p<0.01) 감소하는 경향을 보였다(Table 1).

### 골밀도의 측정(Bone density)의 변화

시술 전 0.272±0.01(g/cm<sup>3</sup>)에서 시술 후 8주에 가장수술군은 0.280±0.012(g/cm<sup>3</sup>), 실험군은 0.251±0.011(g/cm<sup>3</sup>)로, 가장 수술군은 약간 증가한 반면 실험군은 오히려 약간 감소하는 경향을 보였다. 그러나 군 전체적으로는 실험군이 가장수술군에 비하여 약간 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의성 있는 차이는 아니었다(Table 1).

### Ca치, P치 및 Ca/P 비율의 변화

Ca 치는 시술 전 11.4±0.11(mg/dl)에서 시술 8주 후

가장수술군 11.5±0.25(mg/dl), 실험군 11.36±0.41(mg/dl)로 통계적 차이가 없었으나 P 치의 경우 시술 전 5.1±1.67(mg/dl)에서 시술 8주 후 가장수술군은 4.7±1.13(mg/dl)으로 통계적 차이가 없었으나 실험군은 2.80±0.72(mg/dl)로 감소하는 경향을 보였다. Ca/P의 비율의 변화에 있어서는 시술 전 2.44%에서 시술 8주 후 가장수술군은 2.61%로 통계적 차이가 없었으나 실험군은 4.1%로 감소하는 경향을 보였다(Table 1).

### 체중 및 대퇴골의 무게

실험 시작 전 가장수술군의 체중은 219.5±10.0(g), 난소를 적출한 실험군은 220.0±13.2(g)으로 두 군간의 통계적 차이는 없었으나 수술 8주 후의 체중은 가장수술군 279.6±6.7(g)으로 약 27.4% 증가했으며, 실험군은 362.0±28.96(g)로 약 64.5%의 매우 높은 증가를 보였는데 이는 통계적으로도 유의성 있는 차이를 보였다. 특히 1일 체중 증가율에 있어서 가장수술군이 0.85(g)인데 비하여 난소를 절제한 실험군에서는 2.03(g)으로 매우 높은 증체율을 나타내었다(Table 2). 시술 8주 후 희생시켜 측정된 대퇴골의 무게는 가장수술군이 2.046±0.132(g), 실험군이 2.325±0.330(g)으로 실험군이 가장수술군에 비하여 유의성 있게 높게 나타났다. 그러나 체중에 대한 대퇴골의 무게의 비율은 가장수술군이 73.1%, 실험군이 64.6%로 실험군이 가장수술군에 비하여 유의성 있게 낮게 나타났다(Table 2).

**Table 2.** The changes of on body weight, growth rate, femur weight and femur/body weight in each group

Group	Weights		Growth rate (g/day)	Femur weight (g)	Femur/B.W (%)
	Start(g)	Final(g)			
Sham-op	219.5±10.0	279.6±6.7	0.85±0.1	2.046±0.132	0.731±0.038
Ovariectomy	220.0±13.2	362.0±28.96**	2.03±0.2*	2.325±0.330	0.646±0.103*

\*p<0.05, \*\* p<0.01

## 고 찰

골다공증은 골 구성성분의 양적 감소가 주된 병변으로 나타나는 대사성 골질환이며 그 발병 기전으로는 골형성과 골흡수의 불균형에 의한 것으로 알려져 있다.<sup>1,3,4,9,14</sup> 골다공증의 여러 유형 중 폐경기 이후 골다공증에 대해서는 estrogen 결핍이나 난소의 호르몬에 대한 작용 변화가 골아세포(osteoblast)의 기능적 결여와 관련 된다고 알려져 왔는데 Gurkan 등<sup>9</sup>은 난소를 제거한 쥐에서 골밀도가 감소하고 골에서 칼슘과 Hydroxyproline의 함량이 감소하는 것을 관찰하여, 이것이 골다공증의 유효한 표본이 될 수 있음을 제시하였다. 지금까지 국내외 여러 연구자들이 난소 적출술로 골다공증을 유발시킨 결과들을 보고하였으나<sup>15,16,17,18</sup> 그 대부분의 측정 방법은 조직학적 방법, 부분적인 골밀도의 측정 그리고 estrogen 등과 같은 일부 호르몬 측정 등으로 골다공증이 진행되는 정도나 치료 효과에 대한 신속한 판정시 절대적으로 필요한 예민성 면에서는 여러 가지 문제점들이 있어 왔다. 골다공증의 평가 방법에 있어서도 골교체의 생화학적 지표 검사나 국소인자들에 관한 구체적인 연구들은 드물었다. 골다공증의 표본을 확립하는 것은 향후 골다공증의 연구에 있어서 매우 중요하며, 난소 적출술로 골다공증 자체는 유발되지만, 골다공증 유발 정도를 예민하게 표지할 수 있는 표지자가 필요하다.

Kalu 등<sup>19</sup>에 의하면 쥐의 피질골에는 하버시안 관(Haversian canal)이 없고 층판골(lamellar bone)을 형성하지 못하기 때문에 골재형성에 있어서 매우 제한된 능력 밖에 없다고 하였다. 그러나 흰쥐의 골다공증 모델은 현재까지 다른 실험 모델이 알려져 있지 않으며 실험동물을 얻기 용이하고, 여러 가지 시술 및 조작이 간편하다는 점과 사육이 쉽고 일반화되어 있으며 성장 및 대사가 빨라서 골에 일어나는 대사 변화를 신속하게 볼 수 있다는 장점이 있어 현재까지 가장 많이 사용되고 있는 실정이다. 이 실험에 있어서도 Sprague-Dawley Rat을 사용하였다.

Malluche 등<sup>15</sup>과 Durbridge 등<sup>16</sup>은 각각 조직 형태 측정법(histomorphometry technique)을 이용하여 쥐의 골을 정량적으로 분석하여 보고한 바 있는데 Faugere 등<sup>17</sup>의 연구에 의하면 쥐의 난소 적출술 후 해면골(cancellous bone)과 피질골(cortical bone)의 골 양이 감소하였고, 무기질화 된 골과 비 무기질화 된 골 사이의 비율이 감소하였다고 했으며, 또한 이 실험 모델에 calcitriol을 투여한 결과 최소한 부분적으로 골 소실이 교정되었고 감소된 무기질화 된 골과 비무기질화 된 골 사이의 비율이 정상화 되었다고 보고한 바 있다.<sup>18,19</sup> 이 실험에 있어서도 골다공증이 유발된 것을 확인하기 위하여 조직학적

으로 확인한 결과 정상골에 비하여 현저하게 골 소실이 일어나고 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 이 실험에서는 유발된 골다공증에 실험적으로 다른 약물 투여 등은 실시하지 않았다.

Bone gla-protein으로 알려져 있는 osteocalcin은 골의 구조에서 hydroxyapatite 및 칼슘과 단단하게 결합되어 있는데 새로운 골 형성시 골아세포 활성을 간접적으로 반영하는 골형성 지표로 알려져 있다.<sup>5,6</sup> 그 기전으로는 골의 대사에서 골흡수의 증가로 인해 골밀도가 감소하는 경우, 이차적으로 골아세포 활동이 증가하게 되는데 이때 골아세포에서 osteocalcin 합성이 증가되는 것으로 보고되고 있다.<sup>5,6,20,21</sup> 이러한 점은 골다공증시 골아세포 감소에 따른 파골세포 활성도를 예민하게 감지할 수 있을 것으로 생각되었으며 이 실험에서 가장수술군에 비하여 골다공증이 유발된 군에서 감소된 소견을 보여 그 동안의 여러 연구자들의 보고<sup>22,23,24</sup>와 일치하는 결과를 보였으나 통계학적으로 현저히 높은 유의성은 인정되지 않았다. 이러한 결과는 osteocalcin이 관여하는 세포가 골아세포이므로 실제 골다공증시 문제가 되는 파골세포에 대한 예민도가 떨어진 것으로 생각된다.

포유동물 및 가끔 등에서 성장을 조절하는 성장 호르몬은 말초조직에서 IGF-I을 통하여 세포의 분화와 성장을 촉진하는 것으로 잘 알려져 있다.<sup>7,24,25</sup> 또한 IGF-I은 간장 및 신장을 포함한 골격조직과 연부 조직 등 여러 조직에서 합성되며 혈중에서는 대부분 결합 단백질(IGF-binding protein, IGF-BPs)과 결합된 상태로 존재하는 것으로 알려져 있는데 특히 혈중에 증가된 IGF-I은 골격 조직에 있어서 골아세포의 분화와 파골세포의 활성을 촉진에 관여하는 것으로 보고된 바 있다.<sup>7,26,27,28,29</sup> 현재까지 알려진 쥐의 난소 적출술 후 유발된 골다공증에 대한 IGF-I의 보고들은 골다공증 후 IGF-I이 증가된다는 보고와 감소된다는 두 가지 상반된 보고가 있어 논란의 되고 있으나 이 실험에 있어서는 가장수술군에 비하여 감소된 것으로 나타나 Riggs 등<sup>26,27,28</sup>의 골다공증이 유발된 쥐의 혈청에서 측정된 결과와 일치하였다. 또한 Kalu 등<sup>7,15</sup>의 보고에서의 IGF-I 분비억제 효과는 사용한 쥐의 연령이 95일령으로 성장이 활발하게 진행되고 있어, 3-4산의 출산 경력을 지닌 쥐를 사용한 이 실험과는 실험동물의 연령의 차이가 있었다. 또한 측정시기에 있어서도 이들은 난소적출 직후부터 30일 동안 측정된 결과이며, 이 실험에서는 난소 적출술 후 56일이 지난 다음 측정한 관계로 충분히 골다공증이 발현된 것으로 생각된다. 이러한 관점에서 보면 IGF-I 치는 측정하는 실험동물의 연령 및 난소적출술 후 측정하는 시기 등과 매우 깊은 연관이 있는 것으로 생각되며 이 점은 향후 진행되는 실험에 있어서 충분히 고려되어야 할 사항으로

사료된다.

ALP 치는 혈중 ALP의 약 50% 정도만이 골로부터 유리되므로 TALP의 활성도가 골의 미세한 대사 변화를 구체적으로 반영하기에는 미흡한 점이 많다. 최근에 주목을 받고 있는 BALP는 골에서 유리된 ALP에만 특이적으로 작용하는 효소를 이용함으로써 bone ALP의 활성도만을 측정할 수 있게 되어 골형성지표로서 이용될 수 있다는 보고가 많다<sup>12,13,29,30,31,32</sup>. 특히 BALP 치에 대한 TALP 치의 비율(B/T)는 TALP가 단순히 전체적인 ALP의 량만을 나타내고 있는데 반해 측정된 TALP에서 Bone ALP가 차지하는 비율을 산출함으로써 보다 구체적인 ALP의 활성도를 알 수 있다. 김 등<sup>31</sup>은 개에 있어서 여러 가지 골 형성지표를 측정하되 BALP 치가 유용하다고 보고하면서 특히 골형성 지표로서 B/T 치가 단순한 TALP 치나 BALP 보다 더 높은 신뢰성이 있는 것을 밝혀 B/T 치의 임상적 유용성을 제시한 바 있다. 이 실험에서도 가장수술군에 비하여 실험군이 TALP 치는 약간 증가한 것으로 보이며 BALP 치는 오히려 약간 감소한 것처럼 보이지만 B/T 치에 있어서는 가장수술군이 51.4%, 골다공증 유발군이 45.0%로 나타났다. 이는 골다공증 유발군이 TALP 치에서 BALP 치가 차지하는 비율이 상대적으로 적게 나타나고 있어 그 만큼 골아세포의 활성도가 낮은 것을 알 수 있었다.

Estrogen이 결핍된 쥐에서 골 형성의 감소와 골 흡수의 증가가 있다고 Urist 등<sup>10</sup> 들은 이미 보고한 바 있다. Linda 등<sup>1</sup>은 난소절제 후, 폐경기 전 후 여성들의 각 부위의 골밀도를 비교한 바 난소절제군과 폐경후 군의 각 부위의 골밀도 감소폭이 비슷하게 나타나고 있음을 보고하면서 estrogen의 결핍이 골 손실의 주요 원인이라고 하였다. Chow 등<sup>11</sup>은 estrogen이 골량 형성을 촉진시킬 뿐만 아니라 골의 흡수를 억제할 수 있다고 밝혔다. 이처럼 혈중 estrogen 농도와 골다공증의 발생과는 밀접한 관계가 있으므로 Gauley 등<sup>13</sup>은 혈중 estrogen 치는 폐경 이후 골다공증을 예견하는 지표로 사용할 수 있다고 보고하였다. 이 실험에 있어서도 estrogen 치는 가장수술군에 비하여 골다공증 유발군에서 현저하게 감소하여 여러 연구자들<sup>1,10,11,13</sup>과 같은 결과를 얻었다. 이러한 결과는 estrogen의 분비가 난소와 직접 관련이 있는 것을 확인할 수 있었다.

골밀도를 측정하는 방법은 여러 가지 방법이 이용되어 왔으나 그 중 1988년에 개발된 dual energy X-ray absorptiometry(DPX)는 주사시간(走査時間)이 짧고 방사선 노출이 적으면서도 골밀도를 정확하고 예민하게 측정할 수 있다고 알려져 있다<sup>8,26,27,33</sup>. 이 실험에 있어서도 DPX- $\alpha$ (Lunar, USA)를 이용하여 측정하였다. 골다공증에서 골절이 잘 일어나는 부위는 흉추, 요추, 대퇴경부,

전자간 및 말단 요골 부위인 것으로 알려져 있으며 Riggs 등<sup>26,27</sup>의 보고에 의하면 사람에서 일생동안 골조직은 척추골인 경우 여자는 47%, 남자는 14%가 그리고 요골의 경우 30-39% 정도가 각각 자연 감소한다고 하였다. 이 실험에서 골밀도의 측정은 골밀도가 가장 심하게 감소하는 특정 부위를 취하지 못한 이유로 실험군의 골밀도가 현저하게 변화를 보이지는 않았다. 이러한 점에서 대퇴골 골밀도의 측정은 상대적으로 측정은 용이한 반면, 예민하지 못한 부분이 있어 향후 고려되어야 할 것으로 생각된다.

혈중 칼슘 농도는 내적, 외적 변화에 대해 항상성을 유지하므로 실험 요인을 변화시켜도 칼슘 농도는 보통 정상 범위 내에 있는 것으로 보고<sup>34,35</sup> 되어 있는데, 이 실험에서도 가장수술군과 실험군 모두 혈장 칼슘 농도는 통계적으로 차이를 나타내지 않았다. 그러나 P 치에 있어서는 가장 수술군에 비하여 골다공증 유발군이 감소되는 경향을 보였으며 특히 칼슘치와의 비율에 있어서도 4:1 정도의 낮은 결과를 나타내었다. 일반적으로 골대사 회전에서 혈장 칼슘농도가 높으면 골흡수가 감소되지만, 혈장 인 농도가 정상수준보다 높으면 골흡수가 감소됨과 동시에 골형성 또한 활발해진다고 보고된 바 있다. 그러나 칼슘치와 인치 각각의 수치보다는 이들 두 변수의 비율이 더욱 중요한 지표로 알려져 있다.

흰쥐에서 난소를 제거하면 체중이 증가한다는 여러 연구자들의 보고<sup>7,19,36,37</sup>가 있는데, 이 경우 난소 절제 후 estrogen을 투여하면 체중의 증가가 억제된다고 하였다<sup>7,37</sup>. 이 실험에 있어서도 이미 3-4 산의 경향이 있는 성숙한 쥐였음에도 난소제거로 골다공증을 유발시킨 실험군의 체중이 가장 수술군에 비하여 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다.

따라서 이 실험에서 난소 적출 후 8주에 나타난 혈중 osteocalcin, bone specific alkaline phosphatase, estrogen, IGF-I, Ca<sup>2+</sup>, P 등의 변화와 대퇴골 골밀도 그리고 체중 등의 변화의 관찰 결과, 완전한 골다공증의 양상을 확인할 수 있었다. 그러나 골다공증의 특성상 점진적으로 일어나는 골의 변화를 단정적으로 판단하기는 어려웠으며 활발하게 골다공증이 유발되는 시기와 충분히 유발된 이후의 혈중 여러 가지 측정 항목의 변화 양상은 다소 차이가 있는 것으로 생각되며, 이 실험의 자료는 향후 estrogen 결핍이 골다공증을 유발시키는 기전 혹은 골다공증이 유발된 골의 생화학적 특성이나 역학적 특성 등의 연구에 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 결 론

3-4회 출산 경력이 있는 랫트에 난소 제거술을 실시

하여 골다공증을 유발시킨 후 혈청의 osteocalcin, bone specific alkaline phosphatase, estrogen, IGF-I, Ca<sup>2+</sup>, P 등의 측정과 대퇴골 골밀도 그리고 체중 등을 측정하여 골다공증시 이들의 변화를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 혈청내의 osteocalcin과 TALP, BALP, B/T, estrogen, IGF-I 등은 실험 전 측정치에 비하여 수술 8주 후, 가장 수술군은 약간 증가한 반면 통계적 유의성은 없었으며, 난소적출로 골다공증을 유발한 실험군에서는 유의성 있는(p<0.05) 감소를 보였다. 같은 시기 가장 수술군에 대한 실험군 사이의 비교에 있어서도 실험군의 현저한 감소(p<0.05)가 나타났으며, 특히 estrogen과 IGF-I의 경우 매우 높은 통계적 유의성(p<0.01)을 보였다.
2. 대퇴골 골밀도에 있어서도 가장수술군은 약간 증가한 반면 실험군은 감소하는 경향을 보였으며, 실험 8주 후의 두 군 사이에서도 실험군이 가장수술군에 비하여 대퇴골 골밀도가 저하되는 경향을 나타내고 있었지만 통계적 유의성은 없었다.
3. Ca<sup>2+</sup>은 혈청검사에 있어서 전체적으로 특별한 변화를 인지할 수 없었으나 P의 경우 실험군에 있어서 현저한 저하를 보였다. 이것은 골다공증을 유발시킨 실험군의 Ca<sup>2+</sup>와 P의 비율에 영향을 주어 가장수술군에 비하여 실험군의 Ca/P ratio가 높게 나타났다.
4. 체중은 가장수술군과 실험군 모두 증가되었으며, 1일 증체율에 있어서도 실험군의 경우 매우 높은 통계적 유의성을 보였다. 대퇴골 무게의 경우 가장수술군에 비하여 실험군이 높게 나타났지만 체중 대비 대퇴골 무게에 있어서는 오히려 실험군이 낮게 나타났다.

## 참고 문헌

1. Linda S, Richelson, Heinz W, Wahner LJ, et al. Relative contributions of aging and estrogen deficiency to postmenopausal bone loss. *N Engl J Med*, 311:1273-1275, 1984.
2. Gauley JA, Gutai JP, Sandler RB, Laporte RE, Kuller LH, Sashin DT. Relationship of endogenous estrogen to bone density and bone area in normal postmenopausal women. *Am J Epidemiol*, 124:752, 1986.
3. 임승길. Bone turnover marker의 임상적의의와 응용. 대한골대사학회지. 1:1-11, 1994.
4. 민현기. 골조송증, 대한내과학회지. 34(4):442-443, 1988.
5. Duda RJ, O'Brien JF, Katzmann JA. Concurrent assays of circulating bone-gla protein and alkaline phosphatase: Effects of sex, age, and metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol metab*, 66:951-957, 1988.
6. Bowles SA, Kurdy N, Davis AM, France MW, Marsh DR. Serum osteocalcin, total and bone-specific alkaline phosphatase following isolated tibial shaft fracture. *Ann Clin Biochem*, 33:196-200, 1996.
7. Kalu DN, Liu CC, Arjmandi BH, Liu CC, Salih MA, Birnbaum RS. Effects of ovariectomy and estrogen on the serum levels of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3. *Bone and Mineral*, 25:135-148, 1994.
8. Dresner-Pollak R, Mayer M, Hochner-Celiniker D. The decrease in serum bone-specific alkaline phosphatase predicts bone mineral density response to hormone replacement therapy in early postmenopausal women. *Calcif Tissue Int*. 66:104-107, 2000.
9. Gurkan L, Ekland A, Gautvik KM, Langelland N, Roenningen H and Solheim LF. Bone changes after castration in rats.: A model for osteoporosis. *Acta Orthopædica Scandinavica*, 57:67-70, 1986.
10. Urist MR, Budy AM, McLean FC. Species differences in the reaction of the mammalian skeleton to estrogens. *Proc. Biol*, 69:324-326, 1948.
11. Chow J, Tobias JH, Colston KW, Chambers TJ. Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone resorption but also by stimulation of bone formation. *J Clin Invest*, 89:74-78, 1992.
12. Rosalki SB, Foo AY. Two new methods for Separating and quantifying bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes in plasma. *Clin. chem*. 7:1182-1186, 1984.
13. Behr W, Barnert J. Quantification of bone alkaline phosphatase in serum by precipitation with wheat-germ lectin: a simplified method and its clinical plausibility. *Clin. Chem*. 10:1960-1966, 1986.
14. Lindsay R. Estrogen therapy in prevention and management of osteoporosis. *Am J Obster Gynecol*, 156:1347-1351, 1987.
15. Malluche HH, Sherman D, Meyer W, Massry SG. A new semiautomatic method for quantitative static and dynamic bone histology. *Calcified Tissue International*, 34:439-448, 1987.
16. Durbridge TC, Morris HA, Parson AM, Parkinson IH et al. Progressive cancellous bone loss in rats after adrenalectomy and oophorectomy. *Calcified Tissue International*, 47:383-387, 1990.
17. Faugere MC, Okamoto S, DeLuca HF, Malluche HH. Calcitriol corrects bone loss induced by oophorectomy in rats. *American Physiological society*. E35-E38, 1986.
18. Eastell R, Delmas PD, Hodgson SF. et al. Bone formation rate in older normal women: Concurrent assesment with bone histomrphometry, calcium kinetics, and biochemical markers. *J. of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 67:741-748, 1988.
19. Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, Hollis BW. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology*, 124:7-16, 1989.
20. Bouman AA, Scheffer PG, Ooms ME, et al. Two bone alkaline phosphatase assays compared with osteocalcin as a marker of bone formation in healthy elderly women.

- Clin. Chem.* 41:196-199, 1995.
21. Brown JP, Delmas PD, Malaval L. *et al.* Serum bone Gla-protein: A specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. *The Lancet*. 1091-1093, 1984.
  22. Dura RJ, O'Brien JF, Katzmann JA. *et al.* Concurrent assays of circulating bone gla-protein and bone alkaline phosphatase: effects of sex, age, and methabolic bone disease. *J Clin Endocrinol and Metabol.* 5:951-957, 1988.
  23. Papapoulos SE, Frolich M, Mudde AH. *et al.* Serum osteocalcin in Paget's disease of bone: Basal concentrations and response to bisphosphonate treatment. *J Clin Endocrinology and Metabolism.* 65:89-94, 1987.
  24. Froesch ER, Schmid C, Schwander J, *et al.* Actions of insulin-like growth factors. *Annu Rev physiol.* 47:443-467, 1985.
  25. Hizuka N, Takano I, Shigume K, *et al.* Insulin-like growth factor-I stimulates growth in normal growing rats. *Eur J Pharmacol.* 125:143-146, 1986.
  26. Riggs BL, Wahner HW. Bone densitometry and clinical decision making in osteoporosis. *Ann Int Med*, 108:293-295, 1988.
  27. Riggs BL, Wahner HW, Melton LJ III, Richelson LS, Judd HL, Offord KP. Rates of bone loss in the axial and appendicular skeleton of woman, evidence of substantial vertebral bone loss prior to menopause. *J Clin Invest*, 77:1487-1491, 1986.
  28. Lindgren U, DeLuca HF. Role of parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the development of osteopenia in oophorectomized rats. *Calcif Tissue Int.* 34:510-514, 1982.
  29. Shephard MD, Peake MJ. Quantitative method for determining serum alkaline phosphatase isoenzyme activity I. Guanidine hydrochloride: New reagent for selectively inhibiting major serum isoenzymes of alkaline phosphatase. *J Clin Pathol.* 39:1025-1030, 1986.
  30. Van Straalen JP, Sanders E, Prummel MF. *et al.* Bone-alkaline phosphatase as indicator of bone formation. *Clinical Chimica Acta.* 201:27-34, 1991.
  31. 김남수, 최인혁 골형성 지표로서 Bone alkaline phosphatase(BALP)와 TALP 치에 대한 BALP 치 비율의 응용. *대한수의학회지.* 39(6):1197-1209, 1999.
  32. 조성진, 김남수, 최인혁. 정상적인 개에서의 serum bone alkaline phosphatase의 활성치. *한국임상수의학회지*, 14:65-69, 1997.
  33. Farquharson MJ, Speller RD. Measuring bone mineral density in archaeological bone using energy dispersive low angle X-ray scattering techniques. *Journal of Archaeological science.* 24:765-772, 1997.
  34. Watson RC, Grossman H, Meyers MA. Radiologic findings in nutritional disturbances, In : Shil ME, Olson JA, Shike M. *Modern nutrition in health and disease.* 8th ed. Philadelphia : *Lea and Febiger.* 861-908, 1994.
  35. Jeong HK, Kim JY, Lee HS. The effect of dietary calcium and phosphate levels on calcium and bone metabolism in rats. *The Korean Nutrition Society.* 30(7):813-824, 1997.
  36. Kassem K, Brixen K, Mosekilde L, Blum WF, Flyvbjerg A. Effects of growth hormone treatment on serum levels of insulin-like growth factors(IGFs) and IGF binding proteins 1-4 in postmenopausal women. *Clinical Endocrinology.* 49:747-756, 1998.
  37. Baldock PAJ, Morris HA, Moore RJ, Need AG, Durbridge TC. Prepubertal oophorectomy limits the accumulation of cancellous bone in the femur of growing rats with long-term effects on metaphyseal bone architecture. *Calcif Tissue Int.* 62:244-249, 1998.