

## ddY 마우스를 이용한 골다공증 모델에 대한 비교연구: 난소적출 및 신경절단 모델

이형식\* · 홍포원 · 구세광<sup>1</sup> · 이재현<sup>2</sup> · 함태수<sup>3</sup>

대구한의대학교 한방생명자원학과  
<sup>1</sup>동화약품(주) 중앙연구소 약리독성연구실  
<sup>2</sup>경북대학교 수의과대학 조직학교실  
<sup>3</sup>영남대학교 자연자원대학 생물자원학부  
(게재승인: 2004년 9월 15일)

### A comparative study on the osteoporotic animal models in ddY mouse: ovariectomized and neurectomized models

Hyeung-sik Lee\*, Pyo-one Hong, Sae-kwang Ku<sup>1</sup>, Jae-hyun Lee<sup>2</sup> and Tae-su Ham<sup>3</sup>

Department of Herbal Biotechnology, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea  
<sup>1</sup>Pharmacology & Toxicology Lab., Central Research Laboratories, Dong-Wha Pharm. Ind. Co., Anyang 430-017, Korea  
<sup>2</sup>Department of Histology, College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea  
<sup>3</sup>College of Natural Resources, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea  
(Accepted: September 15, 2004)

**Abstract :** In order to compare the induced time of osteoporosis between ovariectomized and neurectomized models in ddY mice. Experimental groups were divided into Sham, ovariectomized (OVX group) and neurectomized (NX group) group. The changes of body weight, tibia weight and histomorphometry of epiphyseal regions of tibia that were generally used as criteria index in osteoporosis, were evaluated at 2 and 4 weeks after operations with other generally used index-changes of serum osteocalcin. Also, calcium and phosphorus levels in the ash tibia were demonstrated with their ratio (Ca/P ratio). From the result of this study, evidences which reflect osteoporotic states of animals such as decrease of absolute and relative tibia weight, histomorphometrical index of epiphyseal region of tibia including trabecular bone volume %, and calcium and phosphorous contents in tibia, were generally detected from 4 weeks after ovariectomy and 2 weeks after neurectomy with increase of serum osteocalcin levels. In conclusion, it is considered that more rapid and favorable osteoporosis was induced in neurectomized model compared to that of ovariectomized model.

**Key words :** Ovariectomy, neurectomy, ddY mouse, osteoporosis, comparative study

## 서 론

골다공증은 동일 연령과 성별의 정상인에 비하여 골의 중량이 현저히 감소된 상태로 골의 구성 성분의 양적 감소를 주된 병변으로 하는 대사성 골 질환으로 그 기전은 골 형성과 골 흡수의 불균형에 의한 것이며 [2], 그 원인으로서서는 내분비학적, 영양학적, 물리학적, 유전

학적 원인이 예상되고 있으며, estrogen 결핍, 활성형 vitamine D 결핍, calcitonin 결핍, PTH 과다분비, calcium 섭취부족 및 장관으로부터의 calcium 흡수 능력의 저하 등이 선행 인자로 알려져 있고 [3], 최근에 들어서는 progesterone의 감소 [13], follicular-stimulating hormone의 증가 [12] 등의 요인 역시 원인으로 생각되고 있다. 현재 골다공증의 치료는 주로 estrogen, calcium, vitamin

\*Corresponding author: Hyeung-sik Lee  
Department of Herbal Biotechnology, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Korea  
[Tel: +82-53-819-1436, Fax: 82-53-819-1574, E-mail: endohist@dhu.ac.kr]

D, bisphosphonates, fluoride, coherence treatment 등의 치료 방법이 행해지고 있으나, 골다공증의 완벽한 예방과 이미 진행된 골량의 감소가 있는 경우 회복에 한계가 있고 치료제에 대한 부작용 등의 문제점을 나타내기도 한다고 알려져 있다 [2, 4]. 따라서 현재에도 다양한 기전을 가지는 골다공증 치료제의 개발이 진행되고 있다. 따라서 이들 신약 후보 물질 등을 평가할 실험동물 모델의 중요성이 부각되고 있다.

현재까지는 대부분 랫트를 이용한 실험동물 모델이 이용되어 왔으나, 후보 약물의 사용량과 장기 반복 구조투여의 어려움으로 인해 근래에 들어서는 랫트에 비해 비교적 체중이 작고 약물의 장기 투여가 용이한 마우스를 이용한 실험모델의 사용이 증가되고 있는 실정이다 [25, 26]. 한편 골다공증 모델에 사용되는 마우스에 있어서도 계통(strain)에 따른 차이가 현저한 것으로 알려져 있으며, 특히 Kodama 등 [18, 19]은 C3H/HeJ 마우스와 C57BL/6J 마우스에서 신경절단에 의한 골다공증의 유발 시기 및 정도가 매우 차이 나는 것으로 보고하였으며, 이중 C57BL/6J 마우스가 C3H/HeJ 마우스보다 초기에 골다공증이 초래되며, 더욱 현저한 골다공증이 초래된다고 하였다. 또한 Yamashita 등 [34]은 Klotho 유전자가 결핍된 마우스에서는 좌골신경 절단에 의한 골다공증의 유발이 매우 어렵다고 보고하였다. ddY 마우스는 대표적인 inbred 마우스의 일종으로 1953년 일본에서 중앙 이식 모델의 하나로 개발되었으나, 현재에는 골다공증의 모델로 빈번히 이용되고 있는 실험동물이다 [28].

현재까지 가장 많이 사용되어 오고 있는 실험동물의 골다공증 모델은 난소적출 모델과 신경절단에 의한 immobilization 모델의 크게 두 가지로 구분될 수 있다. 이중 난소적출에 의한 골다공증 모델은 전형적인 estrogen 결핍성 모델로 알려져 있으며 [25], 주로 폐경기 후 초래되는 여성의 골다공증에 중점을 둔 치료제의 개발에 적용된다. 또 신경절단 모델은 불용성 위축에 의해 유발되는 골다공증 모델로 알려져 있으며, 신경절단 모델은 주로 골절이나 인대 및 신경 손상에 의해 초래되는 불용성 골다공증에 중점을 둔 치료제의 개발에 적절하다고 할 수 있으나 [26], 이들 두 모델 모두 골다공증이라는 질병에 대한 치료의 목적으로 사용되고 있으므로 기전이 유사한 약물의 개발에 이용되고 있다고 할 수 있다. 따라서 약물의 적용에 대한 연구보다는 골다공증이 초래되는 시기 및 그 정도가 더욱 중요하다고 할 수 있다. 그러나 동일한 동물 중에서 이들 두 모델을 동시에 비교한 연구는 거의 찾아볼 수 없다.

본 연구에서는 골다공증 모델에 가장 빈번히 이용되고 있는 ddY 마우스를 이용하여 신경절단 및 난소적출

두 모델에서 충분한 정도의 골다공증이 초래되는 시기를 비교 관찰하기 위하여, 실험기간 동안의 체중의 변화, 골 중량의 변화, 경골(tibia)의 조직학적 변화, 지주골량(trabecular bone volume, TBV)의 변화, 혈중 osteocalcin 농도의 변화, 경골 내의 칼슘(Calcium, Ca)과 인(Phosphorus, P) 함량 및 이들 함량의 비율(Ca/P ratio)의 변화를 비교 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

총 60마리의 암컷 ddY 마우스(SLC, Japan)를 본 실험에 사용하였다. 체중 25-27 g의 6주령 ddY 마우스를 사육상자에 10마리씩 수용하여, 주위 환경에 약 1주일간 순화(acclimatization) 시킨 후 사용하였으며, 온도 약 22-25°C, 습도 20-60%, 명암주기 12:12 hr로 조절된 실험동물 사육실에서 사육하였고, 실험 전 기간 동안 고품사료(삼양사, 서울) 및 수도수를 자유롭게 공급하였다. 동물은 picric acid를 이용하여 식별하였으며, 모든 실험동물은 Institute of Laboratory Animal Resources의 "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals"(1996, USA)에 준하여 취급하였다.

### 군 분리

한 그룹에 10마리씩 6개의 군으로 구분하였다. Sham 군은 난소적출 또는 신경절단을 실시하지 않고 복강을 개복한 후 봉합하였다. Sham2 군은 수술 2주 후 희생시켰으며, Sham4 군은 수술 4주 후 희생시켰다. OVX 군은 난소를 적출한 실험군으로 OVX2 군은 난소적출 2주 후 희생시켰으며, OVX4 군은 난소적출 4주 후 희생시켰다. 한편 NX 군은 신경절단을 실시한 실험군으로

**Table 1.** Experimental design in this study

Group	No. of animals	Operation	Day of Sacrifice
Sham2		Laparotomy	14 days after laparotomy
Sham4			28 days after laparotomy
OVX2	10	Ovariectomy	14 days after ovariectomy
OVX4			28 days after ovariectomy
NX2		Neurectomy	14 days after neurectomy
NX4			28 days after neurectomy

Remarks: operation was conducted after overnight fast (water was not restricted) and ovariectomy was conducted after laparotomy. Neurectomy was conducted at hind leg of right side (sciatic nerve)

NX2 군은 신경절단 2주 후에, NX4 군은 신경절단 4주 후에 각각 희생하였다. 각각의 실험 군에서 5마리는 체중의 변화, 및 경골의 무게와 조직병리학적 관찰에 이용하였으며, 5마리는 혈 중 osteocalcin 및 뼈내 Ca과 P 함량 변화의 관찰에 이용하였다.

**난소적출**

실험동물은 1주일간의 적응기간을 거친 후, Xylazine hydrochloride(Yuhan Corp., Korea) 0.2 mg/kg을 근육 주사하여 진정시키고, Ketamine hydrochloride(Yuhan Corp., Korea) 1 mg/kg을 근육 주사하여 마취시킨 다음, Sham 군에서는 단순히 복부 정중 절개를 실시한 후 복강을 폐쇄하고 피부를 봉합하였으며, OVX 군에서는 복부 정중 절개(median section)를 실시하여 양쪽 난소의 위치를 확인한 다음 난소의 앞쪽과 뒤쪽에 이중 결찰을 실시한 후 절단하여 난소를 제거하였다. 난소제거 후 실험동물은 일반적인 외과적 방법에 준하여 복강을 폐쇄시키고 피부를 봉합하였고, 수술 10일 후 모든 실험동물의 피부 봉합사를 제거하였다.

**신경절단**

실험동물은 1주일간의 적응기간을 거친 후, 마취시킨 다음, NX 군에서는 오른쪽 둔부(엉덩이 부분; gluteal region)를 절개하여 천둔근(얇은 엉덩이근육; superficial gluteal muscle)을 노출시킨 다음 천둔근의 가운데부분을 다시 절개하여 천둔근의 중앙을 지나가는 좌골신경(Sciatic nerve)을 노출시켰다. 이후 노출된 좌골신경을 약 1 mm 정도 절제한 일반적인 외과적 방법에 준하여 피부와 근육을 동시에 봉합하였다. 수술 10일 후 모든 실험동물의 피부 봉합사를 제거하였다.

**체중의 변화**

수술 28일에 희생시킨 Sham4, OVX4 및 NX4 군을 중심으로 관찰하였으며, 수술 전 1일, 수술 당일, 수술 후 1일에 각각의 체중을 기록하였으며, 이후 일주일에 1회씩 체중의 변화를 측정하였다. 투여 당일과 희생일에는 사료 섭취로 인한 체중의 변화를 줄이기 위해 overnight fast를 실시하였다.

**경골 무게의 변화**

수술 14 및 28일 후 실험동물을 희생한 다음 경골을 적출하고 주위 근육 및 연 조직을 제거한 다음 경골의 무게를 측정하였다. 경골의 무게는 절대 중량치와 상대 중량치로 구별하여 측정하였다. 상대 중량치는 체중에 의한 경골 무게의 변화를 줄이기 위해 측정하였으며, 하기의 공식을 이용하여 절대 중량치를 무게 당일의 체중

에 대한 percentage로 계산하였다.

**Relative tibia weight (%)**

$$= (\text{absolute tibia weight/body weight}) \times 100$$

**경골 조직표본의 제작**

모든 실험군 중 5마리씩 수술 후 14 및 28일에 희생하여 경골을 절취하고 절취 즉시 10% 중성 포르말린에 24시간 이상 고정하였으며, 탈회액(24.4% formic acid, and 0.5N sodium hydroxide)에 매일 액을 교환하면서 5일간 탈회하였다. 탈회 완료 후, ethanol 계열로 탈수시키고, 통상적인 방법으로 paraffin 포매를 실시하여, 3-4 μm의 연속절편을 제작하였으며, Hematoxylin-eosin 염색을 실시하고 광학현미경 하에서 조직학적 변화를 관찰하였다.

**경골 지주골량의 측정**

Sakai 등 [25, 26]의 방법에 준하여 경골 내에서 지주골이 차지하는 percentage로 계산하였으며, 자동 조직분석장치(analysis image processing; Soft Image System, Germany)를 이용하여 산출하였다. 또한 Sham 군에 대한 지주골량의 감소율은 아래의 공식을 이용하여 산출하였다.

**Inhibition rate of TVB (%)**

$$= [1 - (\text{mTBV OVX or NX} / \text{mTBV Sham})] \times 100$$

mTBV OVX : mean trabecular bone volume of OVX group

mTBV NX : mean trabecular bone volume of NX group

mTBV Sham : mean trabecular bone volume of Sham group

**혈청성분 분석**

수술 후 14 및 28일에 하루 동안 절식시킨 후 마취하에서 복강을 절개한 후 복대정맥을 노출시킨 후, 2 ml의 혈액을 채취하고, 채혈한 혈액은 실온에서 24시간 이상 방치시킨 다음 3000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청(serum)을 분리하였다. 혈청 중 osteocalcin 함량은 RIA Kit를 사용하여 자동분석장치(automated gamma counter; ICN Co., USA; HE model)를 이용하여 ng/ml 단위로 측정하였다.

**뼈 내 Ca 및 P 함량의 측정**

경골을 적출한 다음, 주위 연조직 및 근육조직을 제거한 다음, 경골을 120°C에서 8시간 동안 건조시킨 후 furnace(한국중합기기제작소, Korea)에서 800°C, 6시간 동안 가열하여 탄화시키고 질산에 완전히 용해시켰다. 이것을 증류수로 적정농도 희석한 다음, 탄화골

무게당 칼슘과 인의 양을 측정하였다. 칼슘량은 ortho-cresolphthalein complexon 발색법(칼슘측정용 kit; ASAN, Korea)을 사용하였으며, 인량은 효소법(무기인 측정용 kit; ASAN, Korea)을 이용하여 mg/g bone 단위로 측정하였다. 또한 칼슘과 인의 비율(Ca/P ratio %)은 아래의 공식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Ca/P ratio (\%)} \\ = (\text{Calcium contents/Phosphorus contents of tibia}) \times 100$$

### 통계분석

모든 수치는 평균±표준 편차로 계산하였으며, Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W test(M-W test)를 이용하여 군간의 유의성을 검사하였고, p value가 0.05 이하일 경우 유의성을 인정하였다. 통계처리는 SPSS for Windows(Release 6.1.2, SPSS Inc., USA)를 사용하였다.

## 결 과

### 체중의 변화

수술 후 1일을 제외한 전 실험 기간 동안 모든 실험 군에서 별 다른 유의성 없이 정상적으로 관찰되었다(Table 2). 수술 후 1일의 경우, Sham 군에서는 30.74±1.92 g로 관찰되었으나, OVX 및 NX 군에서는 각각 27.52±1.73 및 28.38±1.76 g으로 관찰되어 OVX 군에서는 Sham 군에 비해 유의성 있는(p<0.05) 체중의 감소가 인정되었으나, NX 군에서는 Sham 군에 비해 체중의 감소가 관찰되었으나, 유의성은 인정되지 않았다. 또한 실험

**Table 2.** Changes of body weight during experimental periods (Mean±S.D.)

Group ID <sup>a</sup>	Sham	OVX	NX
Day-1	31.22±1.55	31.00±1.41	31.16±2.43
Day 0 <sup>b</sup>	28.36±1.70	28.80±1.74	28.70±2.13
Day 1	30.74±1.92	27.52±1.73*	28.38±1.76
Day 7	34.06±0.98	33.56±1.09	33.22±1.18
Day 14	36.28±1.08	35.56±1.12	35.72±1.18
Day 21	37.60±1.69	37.82±1.54	37.78±0.93
Day 27	39.06±1.38	39.44±0.98	39.56±0.80
Day 28 <sup>c</sup>	37.24±1.47	37.18±1.18	37.38±0.94
Gains <sup>d</sup>	10.70±1.98	10.64±1.41	10.86±2.43

a, Group ID was listed in Table 1; b, At operation after overnight fast; c, Days at sacrifice after overnight fast; d, Body weight gains during experimental periods (Day 0 - Day 27); \*p<0.05 compared to that of Sham (by M-W test)

**Table 3.** Changes of absolute and relative right tibia weight after 14 and 28 days of operation (Mean±S.D.)

Group ID <sup>a</sup>	Absolute weight (g)	Relative weight (%) <sup>b</sup>
Sham2	0.06±0.01	0.22±0.04
OVX2	0.06±0.01	0.21±0.03
NX2	0.05±0.01*	0.16±0.03*
Sham4	0.08±0.01	0.21±0.02
OVX4	0.07±0.01*	0.18±0.02*
NX4	0.06±0.01*	0.15±0.02**

a, Group ID was listed in Table 1; b, Relative weight (%) = (absolute tibia weight/body weight)×100; \*p<0.05 compared to that of Sham (by M-W test); \*\*p<0.01 compared to that of Sham (by M-W test)

전 기간 동안의 증체량 역시 유의성 있는 변화는 인정되지 않았다(Table 2).

### 경골 증량의 변화

난소를 적출한 OVX 군의 경우, OVX2 군에서는 Sham2 군과 유사한 수치를 나타내었으나, OVX4 군에서는 경골의 절대 증량치가 Sham4 군에 비해 유의성 있게(p<0.05) 감소되는 것으로 관찰되었다. 한편 좌골신경을 절단한 NX 군에서는 NX2 및 NX4 군에서 각각 Sham 군에 비해 유의성 있는(p<0.05) 절대 증량치의 감소가 인정되었다(Table 3). 상대 증량치의 경우, OVX2 군에서는 Sham2 군과 유사한 수치를 나타내었으나, OVX4 군에서는 경골의 상대 증량치가 Sham4 군에 비해 유의성 있게(p<0.05) 감소되는 것으로 관찰되었고, 좌골신경을 절단한 NX 군에서는 NX2 및 NX4 군에서 각각의 Sham 군에 비해 유의성 있는(p<0.05 또는 <0.01) 상대 증량치의 감소가 인정되었다(Table 3).

### 경골 조직의 변화

Sham 군에서는 비교적 잘 발달한 지주골이 성장판에서부터 골수강 내로 길게 신장되어 관찰되었으며, 이러한 소견은 Sham2 및 Sham4 군에서 유사한 것으로 관찰되었다. OVX2 군의 경우에는 비교적 잘 발달된 지주골의 골수강 내로의 신장이 정상군과 유사하게 관찰되었으나, 길이가 Sham 군에 비해 감소된 지주골 역시 동시에 관찰되었고, 4주가 경과된 OVX4 군에서는 이러한 지주골의 길이가 급격히 감소되는 것으로 관찰되었으며, 일부 골수강내로 길게 신장된 지주골의 두께가 Sham 군에 비해 현저히 감소된 것으로 관찰되었다. 한편 NX 군에서는 신경절단 수술 2주가 경과된 NX2 군에서부터

이들 지주골의 길이가 현저히 감소되어 관찰되었으며, 일부 골수강 내로 길게 신장된 지주골 역시 동시에 관찰되었으나, 그 두께가 Sham 군에 비해 현저히 감소되어 관찰되었다. 또한 NX4 군의 경우에는 NX2 군에 비해 지주골 길이의 감소가 더욱 증가되어, NX2 군에서 일부 관찰되었던 골수강 내로 신장된 지주골이 거의 관찰되지 않았다.

**경골의 지주골량(TBV)의 변화**

난소를 적출한 OVX 군의 경우 OVX2 군에서는 Sham2 군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 감소가 관찰되었으며, OVX4 군에서는 경골의 TBV가 OVX2 군에 비해 더욱 현저히 감소되어, Sham4 군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 감소를 나타내었다. 또한 좌골신경을 절단한 NX 군에서는 NX2 및 NX4 군에서 각각의 Sham 군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 경골 TBV의 감소가 인정되었고, 수술 경과 시간에 따라 더욱 감소되는 것으로 관찰되었다(Table 4). 한편 Sham 군에 대하여 OVX2 군에서는 지주골량이 22.71% 감소되었으며, NX2 군에서는 50.79%로 감소되어 NX2 군에서 더욱 현저한 지주골량의 감소가 초래되었다. 또한 OVX4 군에서는 경골 지주골량이 Sham 군에 비해 50.79% 감소되었으며, NX 4군에서는 이 보다 더 현저히 감소하여 67.72%를 나타내어, OVX 및 NX 군에서 수술후 시간이 경과함에 따라 지주골량의 감소가 더욱 심해지는 것으로 관찰되었다(Table 4).

**Table 4.** Changes of trabecular bone volume (TBV) of right tibia after 14 and 28 days of operation (Mean±S.D.)

Group ID <sup>a</sup>	TBV (%) <sup>b</sup>	Inhibition rate of TVB <sup>c</sup>
Sham2	55.98±4.04	NDd
OVX2	43.27±4.55*	22.71
NX2	24.57±3.25*	50.78
Sham4	55.99±5.57	ND
OVX4	27.45±3.39*	50.97
NX4	18.07±0.84*	67.72

a, Group ID was listed in Table 1; b, TBV (%) was calculated by analysis image processing (Soft Image System, Germany); c, Inhibition rate of TVB (%)=[100-(mTBV OVX or NX/mTBV Sham)]×100, mTBV OVX : mean trabecular bone volume of OVX group, mTBV NX : mean trabecular bone volume of NX group, mTBV Sham: mean trabecular bone volume of Sham group; d, not detected; \*p<0.01 compared to that of Sham (by M-W test)

**Table 5.** Changes of serum osteocalcin levels after 14 and 28 days of operation (Mean±S.D.)

Group ID <sup>a</sup>	Serum osteocalcin levels (ng/ml)
Sham2	22.24±5.60
OVX2	27.64±7.40
NX2	41.76±2.08*
Sham4	22.44±5.23
OVX4	39.30±6.33**
NX4	43.02±5.02*

a, Group ID was listed in Table 1; \*p<0.01 compared to that of Sham (by M-W test); \*\*p<0.05 compared to that of Sham (by M-W test)

**혈중 osteocalcin 함량의 변화**

난소를 적출한 OVX 군의 경우 OVX2 군에서는 Sham2 군에 비해 다소 증가되었으나, 유의성은 인정되지 않은 반면, OVX4 군에서는 혈중 osteocalcin 함량이 OVX2 군에 비해 더욱 증가되어, Sham4 군에 비해 유의성 있는(p<0.05) 증가를 나타내었다. 또한 좌골신경을 절단한 NX 군에서는 NX2 및 NX4 군에서 각각 Sham2 및 Sham4 군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 혈중 osteocalcin 함량의 증가가 인정되었다(Table 5).

**경골 내 calcium(Ca) 함량의 변화**

난소를 적출한 OVX 군의 경우 OVX2 군에서는 Sham2 군과 유사하게 관찰되었으나, OVX4 군에서는 경골 내 Ca 함량이 Sham4 군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 감소를 나타내었다. 또한 좌골신경을 절단한 NX 군에서는 NX2 및 NX4 군에서 각각 Sham2 및 Sham4 군에 비해

**Table 6.** Changes of Ca, P and Ca/P ratio in tibia after 14 and 28 days of operation (Mean±S.D.)

Group ID <sup>a</sup>	Levels in tibia (mg/g bone)		Ca/P ratio (%) <sup>b</sup>
	Ca levels	P levels	
Sham2	65.08±5.17	35.20±4.53	187.68±32.45
OVX2	61.86±3.22	34.06±5.05	185.61±34.91
NX2	42.72±4.30*	24.93±3.91*	176.11±43.29
Sham4	64.61±6.64	35.24±3.99	185.06±25.63
OVX4	43.81±4.61*	25.12±2.44*	176.21±30.04
NX4	41.78±4.56*	24.35±3.83**	174.85±31.82

a, Group ID was listed in Table 1; b, Ca/P ratio (%) = (Calcium contents/Phosphorus contents of tibia)×100; \*p<0.01 compared to that of Sham (by M-W test); \*\*p<0.05 compared to that of Sham (by M-W test)

유의성 있는( $p < 0.01$ ) 경골 내 Ca 함량의 감소가 인정되었다(Table 6).

#### 경골 내 phosphorous(P) 함량의 변화

난소를 적출한 OVX 군의 경우 OVX2 군에서는  $34.06 \pm 5.05$  mg/g bone으로 관찰되어 Sham2 군과 유사하게 관찰되었으나, OVX4 군에서는  $25.12 \pm 2.44$  mg/g bone으로 관찰되어, 경골 내 P 함량이 OVX2 군에 비해 더욱 감소되었으며, Sham4 군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$ ) 감소를 나타내었다. 또한 좌골신경을 절단한 NX 군에서는 NX2 및 NX4 군에서 각각  $24.93 \pm 3.91$  및  $24.35 \pm 3.83$  mg/g bone으로 관찰되어, 두 군이 유사한 수치를 나타내었으며, 두 군 모두 각각 Sham2 및 Sham4 군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) 경골 내 P 함량의 감소가 인정되었다(Table 6).

#### 경골 내 Ca과 P 비율(Ca/P ratio)의 변화

난소를 적출한 OVX 군의 경우 OVX2 및 OVX4 군에서 각각 Ca/P 비율은 Sham 군과 유사하게 관찰되었고, 좌골신경을 절단한 NX 군에서도 NX2 및 NX4 군에서 각각 Sham에 비해 다소 감소되었으나, 유의성은 인정되지 않았다(Table 6).

## 고 찰

골다공증은 최근 우리나라에서도 인구의 고령화에 따라 임상에서 흔히 접하게 되었고 그에 따른 치료와 예방 및 사회 보건학적 관심이 증가되고 있다 [1, 5]. 또한 흑인여성의 골밀도는 백인 여성보다 높으며 동양 여성은 백인 여성보다 더 낮다고 보고되어 있으며, 특히 60대 이후부터의 한국 여성은 백인 여성이나 일본 여성에 비하여 더 현저히 감소되는 경향을 보이고 있다. 따라서 우리나라 여성의 골밀도는 젊을 때의 최고치는 그다지 낮지 않으나 폐경 후 감소가 심하기 때문에 폐경 후 여성을 대상으로 예방책이 절실히 요구되고 있는 상황이다. 골다공증의 발병 기전은 골 형성과 골 흡수의 불균형에 의한 것이다 [14].

한편 실험동물의 체중은 난소적출 후 현저한 증가를 나타내는 것으로 알려져 있으나 [9, 20, 21], 본 실험의 결과 ddY 마우스에서는 난소적출 후 전 실험기간동안 별 다른 체중의 증가가 관찰되지 않아 이전의 보고들 [9, 20, 21]과 다소 차이를 나타내었으며, 이는 종간의 차이로 생각된다. 또한 신경절단 수술 후 실험 동물의 체중은 별 다른 변화가 없다고 보고되어 있으며 [22, 26, 35] 본 실험의 결과에서도 이와 유사하게 신경절단 후 별다른 체중의 변화가 인정되지 않았다. 따라서 ddY 마

우스의 경우, 난소적출 및 신경절단 모델 모두에서 체중의 변화는 없는 것으로 생각되며, 골다공증의 진행성을 평가하는 판단 기준으로 체중의 증가 또는 감소를 이용할 수 없을 것으로 생각된다.

난소적출 수술 후 초래되는 골 중량의 감소에 대해서는 이미 잘 알려져 있으며 [27, 33, 36], 본 실험에서도 오른쪽 경골의 중량이 난소적출 4주 후 Sham 군에 비해 현저히 감소되었으나, 난소적출 2주 후에는 Sham 군과 유사한 수치를 나타내었다. 한편 난소적출 모델에서와 유사하게 신경절단 수술 후에도 현저한 골 중량의 감소가 초래된다고 알려져 있다 [15, 18, 30, 31, 37]. 그러나 이러한 골 중량의 감소가 초래되는 시기는 사용한 실험동물의 종 및 계통에 따라 현저한 차이를 나타내고 있다 [18, 30, 31, 37]. 본 실험의 결과 ddY 마우스에서는 신경절단 2주 후부터 Sham 군에 비해 유의성 있는 경골의 상대 및 절대 중량 치의 감소가 초래되었으며, 이러한 경골 중량의 감소는 4주 후에까지 지속되었다.

본 실험의 결과 이들 보고들 [7, 16, 25]과 유사하게 난소적출 수술 후 Sham 군에 비해 유의성 있는 지주골량의 감소 및 조직학적 변화가 2주 쯤부터 관찰되었으나, Sham 군에 비해 지주골량 역시 22.71%의 감소를 보여 충분한 골다공증이 유발되지 않은 것으로 관찰되었다. 그러나 4주군에서부터는 지주골의 길이 및 폭이 현저히 감소되었으며, Sham 군에 비해 지주골량이 50.97% 정도 감소되는 것으로 관찰되어, ddY 마우스에서는 난소적출 후 4주정도가 경과되어야 골다공증 모델이 확립되는 것으로 관찰되었다. 한편 신경을 절단한 ddY 마우스에서는 수술 2주 후부터 지주골의 길이 및 폭이 현저히 감소했으며, Sham 군에 비해 지주골량이 50.79%의 감소를 보여 신경절단 2주 후부터 골다공증 모델이 확립되는 것으로 관찰되었고 4주군에서는 더욱 현저한 지주골의 길이 및 폭의 감소가 초래되었고 지주골량의 감소 역시 Sham 군에 비해 67.72%의 감소를 보여 수술 후 시간의 경과에 비례하여 골다공증이 더욱 심해지는 것으로 관찰되었다. 이러한 변화는 야생 마우스에서 신경절단 수술 4주 후 경골의 지주골량이 약 30% 정도 감소된다는 보고 [34] 미루어 보아, 현저한 골다공증이 ddY 마우스에서 초래될 것으로 생각된다. 이러한 차이는 같은 마우스 종 내에서도 계통에 따라 신경절단 후 초래되는 경골의 변화가 차이 날 수 있다는 보고 [19]로 미루어 보아 동물 계통의 차이에서 기인한 것으로 생각된다.

Osteocalcin은 칼슘과 결합하는 Vit K 의존성  $\alpha$ -carboxyglutamic acid 단백질로서 [6], 뼈모세포의 활성을 나타내는 데에 가장 민감하고 특이하다고 알려져 있으며, 골아세포에 의해 생성된다 [5]. 골의 재형성 시 골아

세포의 활성이 증가하며, 혈청 중 osteocalcin level이 높아지므로 골생성의 지표로 이용할 수 있다고 알려져 있다 [6, 5]. 한편 난소적출 시 혈중 osteocalcin 함량의 증가는 골다공증을 평가하는 하나의 중요한 지표로 알려져 있으며 [5, 8, 11, 12], 본 실험의 결과 ddY 마우스에서 난소적출 4주 후에 현저한 혈중 osteocalcin 함량의 증가가 인정되었다. 난소적출 모델에서와는 달리 신경적출 모델에 있어서 혈중 osteocalcin 함량의 변화는 실험동물에 따라 다양한 차이를 나타낸다 [18, 19, 24, 32]. 본 실험의 결과 신경절단 ddY 마우스에서는 수술 2주 후부터 현저한 혈중 osteocalcin 함량의 증가가 관찰되었으며, 이러한 증가는 수술 4주 후까지 지속되는 것으로 관찰되어, Verhaeghe 등 [32]의 보고와 유사한 소견을 나타내었으나, Kodama 등 [18, 19]과 Notoya 등 [24]의 보고와는 다소 차이를 나타내었다.

연령이 증가함에 따라 장관에서 calcium의 흡수가 감소하고, 골다공증이 있는 경우에는 장관에서 calcium의 흡수율이 더욱 감소하여 체내에 calcium이 부족하게 되고 calcium 섭취가 일정수준 이하로 떨어지면 골 소실이 발생하게 되며 [4], 이러한 calcium과 골다공증의 관계는 이미 잘 알려져 있다 [10, 17, 23]. 본 실험의 결과, Broulik [10]의 보고와 유사하게, ddY 마우스의 경우 난소적출 4주 후부터 Sham 군에 비해 유의성 있는 경골 내 칼슘 함량의 감소가 초래되었다. 한편 Tarvainen 등 [30]은 신경절단 rat에서 수술 7주 후 경골 내 칼슘의 함량이 현저히 감소하는 반면, 혈중 칼슘 함량은 증가된다고 보고하였고, Tuukkanen 등 [31]은 좌골신경 절단에 의해 골다공증이 초래된 rat에서 뼈 내 칼슘 함량의 현저한 감소가 인정된다고 보고하였다. 본 실험의 결과 신경절단 ddY 마우스에서는 수술 2주 후부터 Sham 군에 비해 유의성 있는 경골 내 칼슘함량의 감소가 초래되어 이전의 보고들 [30, 31]과 유사하게 관찰되었고 이러한 일련의 변화는 수술 후 4주까지 지속되는 것으로 관찰되었다. Phosphorous는 뼈의 무기질 구성성분의 하나로 골아세포 수를 증가시켜 뼈의 형성을 자극하는 것으로, 난소적출에 의해 유발된 골다공증 마우스에서 뼈 내 인량의 감소가 초래되는 것으로 알려져 있으며 [10], 신경절단에 의해 유발된 rat 골다공증 시에도 경골 내 인 함량의 감소가 초래된다고 알려져 있다 [30]. 한편 본 실험의 결과, ddY 마우스의 경우, 난소적출 모델에서는 수술 후 4주부터, 신경절단 모델에서는 수술 후 2주부터 경골 내 인 함량의 감소가 인정되어 이전의 보고들 [10, 30]과 유사하게 관찰되었다. 한편 경골 내 칼슘과 인 함량의 비율(Ca/P ratio)은 본 실험의 결과, ddY 마우스의 경우, 난소적출 및 신경절단 모델에서 전 실험 기간동안 별다른 변화 없이 관찰되어 이전의 보고들 [29, 30] 에

서와 같이 골다공증의 진행 및 유발 정도를 평가하는 지표를 사용할 수 없을 것으로 생각되었다.

결론적으로 경골 중량의 변화, 조직소견의 변화, 지주골 량의 변화, 혈중 osteocalcin 함량의 변화 및 경골 내 칼슘과 인 함량의 변화는 ddY 마우스의 경우 난소적출 및 신경절단 모델에서 골다공증의 유발정도를 평가할 수 있는 하나의 중요한 지표가 될 것으로 생각되며, 신경절단 모델이 난소적출 모델보다 더 신속하고, 더 심한 골다공증이 초래될 것으로 생각된다.

### 결 론

골다공증 모델에 가장 빈번히 이용되고 있는 ddY 마우스를 이용하여 신경절단 및 난소적출 모델에서 충분한 정도의 골다공증이 초래되는 시기를 비교하고 골다공증 지표를 확립하기 위하여, 실험동물을 Sham 군, 난소적출 군 및 신경절단 군으로 구분하고, 수술 후 2주 및 4주 후, 체중의 변화, 골 중량의 변화, 경골의 조직학적 변화, 지주골량의 변화, 혈중 osteocalcin 농도의 변화, 경골 내의 칼슘과 인 함량의 변화 및 이들 칼슘과 인 함량 비율의 변화를 관찰하였다. 본 실험의 결과, 경골 중량의 감소, 지주골량의 감소, 조직학적 변화, 경골 내 칼슘 및 인 함량의 감소, 혈중 osteocalcin 농도의 증가와 같은 골다공증을 의미하는 지표들이 난소적출 군의 경우 일반적으로 수술 4주 후부터 관찰되었으며, 신경절단 군에서는 수술 2주 후부터 관찰되었다. 따라서 신경절단 모델이 난소적출 모델보다 더 신속하고, 더 심한 골다공증이 초래되는 것으로 관찰되어 마우스 신경절단 모델이 골다공증 치료 신약 후보물질 등의 약효 검색에 매우 유용할 것으로 기대된다.

### 참고문헌

1. 고석봉, 이광희, 박양수, 이두진, 박윤기, 이승호. 폐경기증상과 양측 난소제거술이 골밀도에 미치는 영향. 대한산부인과학회지. 1994, 37, 2037-2046.
2. 김남현, 최종혁, 이환모. 흰쥐의 난소제거후 발생한 골다공증에 대한 홍삼 사포닌의 효능. 대한정형외과학회지. 1995, 30, 808-816.
3. 이환모, 박병문, 김남현. 백서의 난소제거후 발생한 골다공증에 대한 Calcitonin, NaF 및 Tamoxifen의 효과. 대한정형외과학회지. 1993, 28, 2273-2280.
4. 하승우. 골다공증의 치료: 골흡수억제제. 경북대학교 내분비-대사내과 골다공증 논문집. 1995, 51-55.
5. 한병권, 박원근, 최태환, 신현우, 김선우. 한국인 갱년기 여성의 골밀도 및 호르몬 변화에 대한 연구. 대한내분비학잡지. 1989, 4, 21-28.
6. Abadjieva, D. K. and 강성길. 녹용약침 자극이 난소적출 흰쥐의 지질 및 골대사에 미치는 영향. 대한한

- 의학회지. 1996, **17**, 168-177.
7. **Bain, S. D., Bailey, M. C., Celino, D. L., Lantry, M. M. and Edwards, M. W.** High-dose estrogen inhibits bone resorption and stimulates bone formation in the ovariectomized mouse. *J. Bone Miner. Res.* 1993, **8**, 435-442.
  8. **Blanke, R., Cottreaux, C. and Gardner, C. R.** Increases in osteocalcin after ovariectomy are amplified by LPS injection: strain differences in bone remodeling. *Gen. Pharmacol.* 1998, **30**, 51-56.
  9. **Bray, G. A.** Genetic, hypothalamic and endocrine features of clinical and experimental obesity. *Prog. Brain Res.* 1992, **93**, 333-341.
  10. **Broulik, P. D.** Tamoxifen prevents bone loss in ovariectomized mice. *Endocr. Regul.* 1991, **25**, 217-219.
  11. **Chikazu, D., Shindo, M., Iwasaka, T., Katagiri, M., Manabe, N., Takato, T., Nakamura, K. and Kawaguchi, H.** A novel synthetic triazolotriazepine derivative JTT-606 inhibits bone resorption by down-regulation of action and production of bone resorptive factors. *J. Bone Miner. Res.* 2000, **15**, 674-682.
  12. **Durador, E. B., De-Falco, V., Chahade, W. H., Cossermelli, W. and Yoshinari, N. H.** Hormonal and biochemical parameters in postmenopausal osteoporosis. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao. Paul.* 1997, **52**, 60-62.
  13. **Erben, R. G., Harti, G. and Graf, H.** Ovariectomy dose not alter CD4+/CD8+ ratio in peripheral blood T-lymphocytes in the rat. *Horm. Metab. Res.* 1998, **30**, 50-54.
  14. **Govan, A. D. T., Macfalane, P. S. and Callander, R.** Pathology illustrated. p. 818, 2nd ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1986.
  15. **Huuskonen, J., Arnala, I., Olkkonen, H. and Alhava, E.** Pamidronate increases trabecular bone mineral density in immobilization osteopenia in male rats. *Ann. Chir. Gynaecol.* 2001, **90**, 37-42.
  16. **Jee, W. S., Mori, S., Li, X. J. and Chan, S.** Prostaglandin E2 enhance cortical bone mass and activates intracortical bone remodeling in intact and ovariectomized female rats. *Bone.* 1990, **11**, 253-266.
  17. **Kalu, D. N. and Chen, C.** Ovariectomized murine model of postmenopausal calcium malabsorption. *J. Bone Miner. Res.* 1999, **14**, 593-601.
  18. **Kodama, Y., Dimai, H. P., Wergedal, J., Sheng, M., Malpe, R., Kutilek, S., Beamer, W., Donahue, L. R., Rosen, C., Baylink, D. J. and Farley, J.** Cortical tibial bone volume in two strains of mice: effects of sciatic neurectomy and genetic regulation of bone response to mechanical loading. *Bone.* 1999, **25**, 183-190.
  19. **Kodama, Y., Umemura, Y., Nagasawa, S., Beamer, W. G., Donahue L. R., Rosen, C. R., Baylink, D. J. and Farley, J. R.** Exercise and mechanical loading increase periosteal bone formation and whole bone strength in C57BL/6J mice but not in C3H/HeJ mice. *Calcif. Tissue Int.* 2000, **66**, 298-306.
  20. **Kurachi, H., Adachi, H., Ohtsuka, S., Morishige, K., Amemiya, K., Keno, Y., Shimomura, I., Tokunaga, K., Miyake, A. and Matsuzawa, Y.** Involvement of epidermal growth factor in including obesity in ovariectomized mice. *Am. J. Physiol.* 1993, **265**, E323-331.
  21. **Lorden, J. F. and Caudle, A.** Behavioral and endocrinological effects of single injections of monosodium glutamate in the mouse. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 1986, **8**, 509-519.
  22. **Murakami, H., Nakamura, T., Tsurukami, H., Abe, M., Barbier, A. and Suzuki, K.** Effects of tiludronate on bone mass, structure, and turnover at the epiphyseal, primary, and secondary spongiosa in the proximal tibia of growing rats after sciatic neurectomy. *J. Bone Miner. Res.* 1994, **9**, 1355-1364.
  23. **Nordin, B. E.** Calcium and osteoporosis. *Nutrition.* 1997, **13**, 664-686.
  24. **Notoya, K., Yoshida, K., Tsukuda, R., Taketomi, S. and Tsuda, M.** Increase in femoral bone mass by ipriflavone alone and in combination with 1 alpha-hydroxyvitamin D3 in growing rats with skeletal unloading. *Calcif. Tissue Int.* 1996, **58**, 88-94.
  25. **Sakai, A., Nishida, S., Okimoto, N., Okazaki, Y., Hirano, T., Norimura, T., Suda, T. and Nakamura, T.** Bone marrow cell development and trabecular bone dynamics after ovariectomy in ddY mice. *Bone.* 1998, **23**, 443-451.
  26. **Sakai, A., Sakata, T., Ikeda, S., Uchida, S., Okazaki, R., Norimura, T., Hori, M. and Nakamura, T.** Intermittent administration of human parathyroid hormone (1-34) prevents immobilization-related bone loss by regulating bone marrow capacity for bone cells in ddY mice. *J. Bone Miner. Res.* 1999, **14**, 1691-1699.
  27. **Sandstedt, J., Tornell, J., Norjavaara, E., Isaksson, O. G. and Ohlsson, C.** Elevated levels of growth hormone increase bone mineral content in normal young mice, but not in ovariectomized mice. *Endocrinology.*



- 1996, **137**, 3368-3374.
28. **Tajima, Y.** Standardized nomenclature for inbred strains of mice. *Experimental animals in cancer research*. Jpn. Cancer Assoc. Gann. Monograph. 1968, **5**, 123-128.
  29. **Tanaka, S., Shimizu, M., Debari, K., Furuya, R., Kawawa, T. and Sasaki, T.** Acute effects of ovariectomy on wound healing of alveolar bone after maxillary molar extraction in aged rats. *Anat. Rec.* 2001, **262**, 203-212.
  30. **Tarvainen, R., Arnala, I., Olkkonen, H., Lappalainen, R., Nevalainen, T. and Alhava, E.** Clodronate prevents immobilization osteopenia in rats. *Acta. Orthop. Scand.* 2001, **65**, 643-646.
  31. **Tuukkanen, J., Jalovaara, P. and Vaananen, K.** Calcitonin treatment of immobilization osteoporosis in rats. *Acta. Physiol. Scand.* 1991, **141**, 119-124.
  32. **Verhaeghe, J., Thomsen, J. S., van Bree, R., van Herck, E., Bouillon, R. and Mosekilde, L.** Effects of exercise and disuse on bone remodeling, bone mass, and biomechanical competence in spontaneously diabetic female rats. *Bone.* 2000, **27**, 249-256.
  33. **Yamamoto, M., Fisher, J. E., Gentile, M., Sedor, J. G., Leu, C. T., Rodan, S. B. and Rodan, G. A.** The integrin ligand echistatin prevents bone loss in ovariectomized mice and rats. *Endocrinology.* 1998, **139**, 1411-1419.
  34. **Yamashita, T., Sekiya, I., Kawaguchi, N., Nashimada, K., Nifuji, A., Nabeshima, Y. I. and Noda, M.** Klotho-deficient mice are resistant to bone loss induced by unloading due to sciatic neurectomy. *J. Endocrinol.* 2001, **168**, 347-351.
  35. **Yonezu, H., Ikata, T., Takata, S. and Shibata, A.** Effects of sciatic neurectomy on the femur in growing rats: application of peripheral quantitative computed tomography and Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Bone Miner. Metab.* 1999, **17**, 259-265.
  36. **Yoshitake, H., Rittling, S. R., Denhardt, D. T. and Noda, M.** Osteoponin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999, **96**, 8156-8160.
  37. **Zeng, Q. Q., Jee, W. S., Bigornia, A. E., King, J. G. Jr., D'Souza, S. M., Li, X. J., Ma, Y. F. and Wechter, W. J.** Time response of cancellous and cortical bones to sciatic neurectomy in growing female rats. *Bone.* 1996, **19**, 13-21.