

식이 칼슘량이 난소 절제된 흰쥐에서 골대사 지표에 미치는 영향

최 미 자

계명대학교 가정대학 식품영양학과

The Effect of Dietary Calcium Level on Biochemical Variables of Bone Metabolism in Ovariectomized Female Rats

Mi-Ja Choi

Department of Food and Nutrition, College of Home Economics, Keimyung University

ABSTRACT

This study was done to evaluate the effectiveness of dietary calcium level(a diet which met 100% or twice the calcium level in AIN-76 diet) on preventing bone loss in ovariectomized rats.

Forty female Sprague-Dawley rats(body weight $200 \pm 5g$) were divided into two groups. One group were ovariectomized(Ovx) while the others received sham operation(Sham). Thereafter, each rat group was further divided into normal calcium diet(NCD, 0.52%) and high calcium diet(HCD, 1.04%) sub-groups. All rats were fed on experimental diet and deionized water ad libitum for 8 weeks. Urinary pyridinoline & creatinine and serum estradiol, luteinizing hormone, calcium, phosphate, total protein, albumin, alkaline phosphatase and osteocalcin were determined.

There were no significant differences in serum calcium, total protein and albumin in the two groups(Ovx vs Sham) of rats. Ovariectomized rats had significantly lower estradiol than sham operated rats. There was a highly significant correlation between total bone mineral density(TBMD) and overall level of esteradiol($r=0.59$, $p<0.05$).

Total bone mineral density did not correlate significantly with ALP or osteocalcin, although a negative trend was evident. However, the rats fed high calcium diet had a lower crosslinks value and osteocalcine than the rats fed normal calcium diet. An increased rate of bone turnover is usually associated with a decrease in bone mass because bone formation at each remodeling site is never as great as resorption. Ovariectomized rats fed high calcium diet had a lower crosslink value and osteocalcin; it means high calcium diet decreased bone turnover rate.

The findings from the present study demonstrated that bone loss due to ovarian hormonal deficiency can be partially prevented by a high calcium diet. Futhermore, these findings support the strategy of the use of a high calcium diet in the prevention of estrogen depletion bone loss (postmenopausal osteoporosis).

Key words: Bone metabolism, Dietary calcium level, Pyridinoline, Osteocalcin, ALP.

I. 서 론

골격대사의 변화로 인한 질병중 골다공증(osteoporosis)은 골격의 화학적 조성에는 변화가 없고 단위용적당 질량이 감소되어 척추, 요골 및 대퇴부의 골질을 쉽게 초래하는 질병이다^{1,2)}. 1991년 보사부 통계에 의하면 우리나라 국민의 평균수명은 70.8세로 남자 66.9세, 여자 75세로 발표되었다. 이는 20년 전보다 7.6세 증가된 것으로 앞으로도 경제성장 및 의학의 발달로 평균수명은 점차 늘어날 것으로 보이며 따라서 노인성 질환의 증가가 예상된다.

여성에서 폐경은 골격의 급격한 변화를 가져오며 특히 estrogen 분비 감소로 인한 골격손실이 크게 나타난다고 알려져 있다. 폐경후 여성은 폐경기간이 길수록 골밀도가 유의하게 낮았고³⁾, 폐경기에 골격손실이 많은 것으로 보고 되었다⁴⁾. 또한 estrogen 결핍을 골다공증의 내인성 인자로 보고한 여러 연구도 있다⁵⁻⁸⁾.

영양소 중 골밀도와 가장 관련이 깊은 것은 칼슘으로 평생을 통한 식이 칼슘 섭취량의 중요성이 보고 되었다⁹⁻¹¹⁾. Heaney 등¹²⁾과 Sandler 등¹³⁾은 칼슘의 보충으로 골격 손실을 개선할 수 있다고 하였다. 또한 폐경후 여성의 연구¹⁴⁾에서 칼슘섭취와 골격상태는 양의 상관관계가 있었고, 배 등¹⁵⁾의 연구에서는 1일 500mg의 칼슘 보충급여로 골손실을 억제할 수 있다고 하였다.

골다공증에 대한 동물실험¹⁶⁻¹⁸⁾에 대한 연구에서도, 난소절제 및 칼슘결핍 동물에게는 골밀도가 감소한다고 보고하였고¹⁶⁾, 골다공증 실험모델 동물에게 식이칼슘을 요구량 이상 급여하면 저하된 칼슘 이용성이 개선되거나¹⁸⁾ 혹은 칼슘 섭취수준이 높은 동물들의 골밀도가 정상칼슘 섭취군의 골밀도 보다 높게 나타났다¹⁹⁾.

골다공증의 진단 및 측정은 일반적으로 생화학적 검사에 의한 진단과 더 정확한 골밀도 측정기를 이

용한 방법이 있으나 골밀도 측정은 일반인들이 사용하기에는 비용이 많이 들어 보편화가 되지 못하고 있는 실정이다. 인체의 골격은 고정된 기관이 아니고 끊임없이 골흡수와 골형성이 반복적으로 일어나는 활발한 대사기관이다. 골격의 골흡수와 형성이 되풀이 되는 과정을 골재형성(bone remodeling)이라 하며 그 단계를 보면 활성화(activation), 흡수(resorption), 역전(reversal), 형성(formation)으로 이루어진다^{3,20)}. 이러한 과정은 평균 3~4개월을 주기로 하며 개인마다 그 시기가 달라 빠른 주기를 갖는 것을 high turn-over, 느린 주기를 low turn-over 라고 하며, 이러한 과정을 알기 위하여 골대사 지표 물질을 이용한 생화학적 검사를 한다²¹⁾.

생화학적 골대사 지표물질로는 골형성 지표 및 골흡수 지표가 있다. 골형성 지표에는 serum alkaline phosphatase, serum osteocalcin(bone gla protein, BGP), type I collagen propeptide 등이 있고, 골흡수의 생화학적 지표로는 urinary calcium, urinary hydroxyproline 검사가 많이 사용되고 있으며, 최근에는 보다 예민한 pyridinoline과 deoxypyridinoline 검사법 등이 개발되어 있다^{3,20,21)}.

골대사 지표물질의 생화학적 검사는 침습적이 아니기 때문에 여러번 반복할 수 있다는 장점이 있다. 그러나 측정의 정확성, 예민성 등이 확립되어 있지 않고 동일한 사람에서 하루중에 측정치의 변화가 있다^{3,22,23)}는 단점이 있어 골조종증 진단 그 자체보다는 골교체(bone turn-over) 속도에 대한 지표로 부이 타당하다고 한다^{3,21)}.

따라서 폐경한 여성의 실험모델을 난소 절제한 암컷 쥐로 설정하여 식이칼슘량이 골형성 지표와 골흡수 지표 등 생화학적 요인들에 미치는 영향을 알아 보고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험동물 및 식이

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

Ingredient	Dietary group	
	Normal Ca diet	High Ca diet*
Casein ¹⁾	20.00	20.00
Dextrin ²⁾	32.85	32.85
Corn starch ³⁾	32.85	32.85
Corn oil ⁴⁾	5.00	5.00
Cellulose ⁵⁾	3.80	3.80
Min. Mix. ⁶⁾	3.50	3.50
Vit. Mix. ⁷⁾	1.80	1.80
Choline ⁸⁾	0.20	0.20

· Gross energy, kcal / g : 3.878

* High Ca diet : Modified mineral mixture · CaHPO₄ at 200% level

- 1) Casein, high protein, Supplied by U. S. CORNING Laboratory Services Company, TEKLAD TEST DIETS, Madison, Wisconsin, Biological Test Material No. 160030.
- 2) Dextrin, Supplied by U. S. CORNING Laboratory Services Company, TEKLAD TEST DIETS, Madison, Wisconsin, Biological Test Material No. 50740.
- 3) Corn starch, Supplied by U. S. CORNING Laboratory Services Company, TEKLAD TEST DIETS, Madison, Wisconsin, Biological Test Material No. 160170.
- 4) Corn oil, Dongbangryang Co. Youngdungpogu, Yangpyungdong 4-2, Seoul
- 5) Cellulose, Supplied by U. S. CORNING Laboratory Services Company, TEKLAD TEST DIETS, Madison, Wisconsin, Biological Test Material No. 160390.
- 6) Mineral mixture, Supplied by U. S. CORNING Laboratory Services Company, TEKLAD TEST DIETS, Madison, Wisconsin, Biological Test Material NO. 170915.
- 7) Vitamin mixture, Supplied by U. S. CORNING Laboratory Services Company, TEKLAD TEST DIETS, Madison, Wisconsin, Biological test Material No. 40077.
- 8) Choline bitartate, Supplied by U. S. CORNING Laboratory Service Company, TEKLAD TEST DIETS, Madison, Wisconsin, Biological test Material No. 30190.

평균 체중이 약 50g인 Sprague-Dawley 암컷 쥐

40마리를 한국생명공학센터로부터 구입하여 고품 사료(rat chow)로 사육하다가 평균 체중이 약 200g에 도달하였을 때 각 군당 20마리를 난소절제수술 여부에 따라 난소절제군(ovariectomized group, Ovx군)과 난소절제하지 않고 개복수술만 한군(Sham-operated group, Sham군)으로 나누었다. 수술은 마취제 ketamine hydrochloride(유한양행, 50mg/ml)를 사용하여 체중 1kg당 75mg의 용량으로 근육주사한 후 실시하였다. Ovx군과 Sham군의 실험동물은 식이칼슘량에 따른 실험식이에(Table 1) 따라 다시 2군으로 나누었다. 정상칼슘식이(normal calcium diet : NCD)는 American Institute of Nutrition(AIN)-76 Mineral Mix (TEKLAD TEST DIET(Cat # 170915), Madison, Wisconsin, USA)내에 포함되어 있는 Ca량을(CaHPO₄)를 기준으로 하였다. 고칼슘(high calcium diet : HCD) 식이는 정상칼슘 식이의 칼슘(CaHPO₄)량의 200%를 포함한 식이로 하고 AIN-76 mineral mix에 들어있는 칼슘 급원인 CaHPO₄(SIGMA, USA)를 100% 더 첨가하여 제조하였다. 실험동물은 각기 5주 또는 8주 동안 stainless-steel wire cage에서 한마리씩 분리 사육하였다. 사육실의 온도는 25±2℃, 습도는 63±5%로 유지하였고, 매일 광주기, 암주기를 12시간이 되도록 조절하였다. 식이 섭취량은 이틀에 한번씩, 체중은 1주일에 한번씩 일정시간에 측정하였다.

2. 실험분석

1) 뇨 채취 및 분석

8주간의 실험기간 중 5주째와 8주째에 대사장에 옮겨 12시간 절식시키고 24시간 동안 요를 채취하였다. 채취한 요는 분석할 때까지 냉동 보관하였다. 요 중 pyridinoline, creatinine, crosslinks value의 측정은 Collagen Crosslinks™ Kit(cat. No : 8001, Metra Biosystems Inc. U. S. A)을 이용하여 ELISA(Enzyme-Linked Immuno Solvent Assay) 법에 의해 분석하였다.

2) 혈액 채취 및 분석

실험기간 5주째와 8주째에 12시간 절식시킨 후에 대정맥으로 부터 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 상온에서 30분간 방치하였다가 3,000rpm에서 20분간 원심분리시켜서 혈청을 얻은 후 분석할 때까지 -20°C 에서 냉동 보관하였다. 혈청내의 estradiol은 IMMUCHEM DIRECT ESTRADIOL-17 β kit(ICN Biomedicals, Inc)을 이용하였고, 혈청중 황체형성호르몬은 LH 100T Kit(Nichols Institute, IMMUTOPICS, INC)을 이용하였고, osteocalcin은 osteocalcine kit(Nichols Institute, IMMUTOPICS, INC)을 이용하여 Gamma Counter로 Radioimmunoassay를 하였다.

혈청내 total protein, albumin, 칼슘, 인, alkaline phosphatase의 측정은 TECHNICON CHEMTM SYSTEM을 이용하여 자동 분석기로 측정하였다.

3) 골밀도측정

Lunar사의 양에너지 골밀도 측정기(DEXA)를 이용하여 Small Animal Software로 골밀도 및 골함량과 골칼슘량을 측정하였다. 골밀도 측정시 실험동물은 마취제 Ketamine hydrochloride(유한양행, 50mg/ml)를 사용하여 체중 1kg 당 75mg의 용량으로 근육 주사하였다.

3. 통계처리 및 분석

통계처리는 SAS package를 이용하여 각 변인마다 평균과 표준편차를 구하였고, Sham군과 Ovx군 간에는 Student's t-test를 하였다. 식이군과 집단 간의 차이는 two-way ANOVA 분석을 하였다. 변수들간의 상관관계는 Pearson's correlation coefficient로 처리하였다.

III. 실험결과 및 고찰

1. 식이 섭취량

식이 섭취량(Table 2)은 실험기간 동안 증가하는 경향을 보였고 난소 절제하지 않은 군(Sham)과 난소 절제군(Ovx)에서 식이 칼슘섭취량의 차이는 볼 수 없었다.

Table 2. Mean food intake and Ca intake of sham-operated and ovariectomized rats during experimental period

		1wk	5wk	8wk	
Food intake (mg/day)	Sham	Control	11.58 \pm 0.44 ^{1a}	13.59 \pm 1.24 ^a	12.70 \pm 1.26 ^b
		High	11.05 \pm 2.08 ^{2b}	13.74 \pm 1.31 ^a	14.53 \pm 0.83 ^a
	Ovx	Control	10.88 \pm 0.63 ^{3a}	13.36 \pm 0.53 ^a	14.45 \pm 1.20 ^a
		High	10.56 \pm 0.92 ^{3b}	14.54 \pm 1.89 ^a	14.87 \pm 1.62 ^a
Ca intake (mg/day)	Sham	Control	57.91 \pm 2.20 ^b	67.96 \pm 6.20 ^b	63.52 \pm 6.32 ^b
		High	110.48 \pm 20.78 ^{1a}	137.40 \pm 13.12 ^{1a}	145.27 \pm 8.34 ^a
	Ovx	Control	54.41 \pm 3.13 ^{3b}	66.81 \pm 2.66 ^b	72.25 \pm 6.00 ^b
		High	105.58 \pm 9.24 ^{2a}	145.38 \pm 18.87 ^{2a}	148.67 \pm 16.27 ^a

1) Mean \pm SD.

Values with different superscripts within the column are significantly different at $p < 0.05$.

2. 체 중

체중(Fig. 1)은 실험 시작에서 1주까지는 양군에서 유의적인 차이를 볼 수 없었으나, 실험 2주째 부터 Sham군에 비해 Ovx군이 유의적으로 높았다. 이것은 여러 선행연구 보고와 일치하였다^{17,24}.

Fig. 2에서는 실험기간동안 Sham군과 Ovx군내에서 식이칼슘량에 따른 체중의 변화를 나타낸 것이다. Sham군과 Ovx군 모두에서 식이에 따른 식이 섭취량의 차이는 없었고, 고칼슘 식이군의 성장률이 정상칼슘 식이군의 성장률보다 높은 경향성을

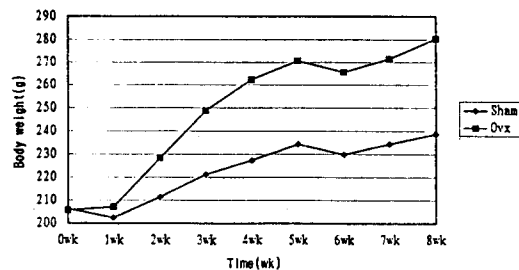


Fig. 1. Changes of body weight in sham and ovariectomized rats during experimental period.

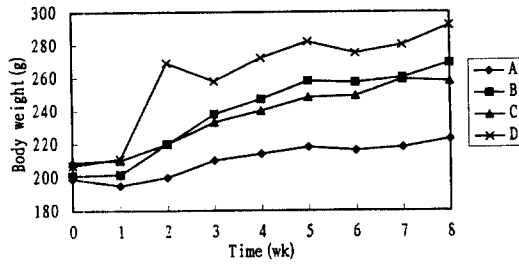


Fig. 2. Changes of body weight on dietary calcium level in sham-operated and ovariectomized rats during experimental period.

나타내었다.

3. 요중 pyridinoline, creatinine 및 crosslinks value

폐경후 골손실은 골교체율과 연관이 있으며 골교체율은 여러 가지의 생화학적인 지표로 추정할 수 있다. 이중 pyridinoline과 deoxypyridinoline은 세포의 기질에 존재하는 crosslinks로서 분해시 소변으로 유리되어 나오며 이들은 골과 연골에만 존재하기 때문에 골흡수의 특이적인 지표로 보고되고 있다^{22,25-28}. 골교체율이 빠를 때 요중 pyridinoline, deoxypyridinoline, crosslinks value가 높아지게 된다. 요중 pyridinoline, deoxypyridinoline, crosslinks value는 요중 creatinine에 대한 비로 나타내며 기존의 골흡수 지표인 hydroxyproline 보다 훨씬 민감하고 정확하다²¹. 본 실험에서의 pyridinoline과 creatinine, crosslinks value를 Table 3에 나타내었다. 요중 pyridinoline 함량은 두 실험군 모두에서 식이에 의한 유의적인 차이는 없었으며 Sham군과 OvX군 사이에서는 통계적으로 유의성은 없었으나 OvX군에서 높게 나타났다.

노중 crosslinks value 는 Sham군과 OvX군 사이에 유의적 차이를 볼 수 없었다. 그러나 Abbiati 등³⁰은 난소 절제한 여성이 건강한 정상 여성에서 보다 노중 crosslinks value가 높게 나타났다는 보고했으며 Hassager 등²⁷도 폐경후 여성에서 폐경전

Table 3. Pyridinoline, creatinine and crosslinks value in urine of sham-operated and ovariectomized rats

		5wk	8wk
Pyridinoline (nM)	Sham	Control	2819.3 ± 591.8 ¹⁾
		High	3329.8 ± 923.9 ¹⁾
	Ovx	Control	2544.5 ± 1529.1 ²⁾
		High	3438.7 ± 1301.6 ²⁾
Creatinine (mM)	Sham	Control	3373.5 ± 1041.6 ²⁾
		High	3832.5 ± 1444.4 ²⁾
	Ovx	Control	3818.9 ± 2323.0 ²⁾
		High	3487.5 ± 660.9 ²⁾
Crosslinks value (nM/mM)	Sham	Control	8.94 ± 2.07 ²⁾
		High	10.47 ± 2.24 ²⁾
	Ovx	Control	12.21 ± 7.69 ²⁾
		High	13.85 ± 7.21 ²⁾
Crosslinks value (nM/mM)	Sham	Control	8.50 ± 0.93 ²⁾
		High	13.13 ± 9.12 ²⁾
	Ovx	Control	7.29 ± 0.94 ²⁾
		High	13.36 ± 4.69 ²⁾
Crosslinks value (nM/mM)	Sham	Control	320.58 ± 62.28 ²⁾
		High	322.47 ± 799.58 ²⁾
	Ovx	Control	210.40 ± 87.84 ²⁾
		High	265.58 ± 50.15 ²⁾
Crosslinks value (nM/mM)	Sham	Control	398.51 ± 118.75 ²⁾
		High	332.06 ± 66.67 ²⁾
	Ovx	Control	327.47 ± 88.46 ²⁾
		High	262.42 ± 48.19 ²⁾

1) Mean ± SD

2) Values with different superscripts within the column are significantly different at p < 0.05.

여성에서 보다 crosslinks value가 30~50% 더 높았다고 보고하였다. Negoro 등³⁰도 폐경후 여성에서 crosslinks value가 높게 나타났다고 하였다. 이 연구에서는 5주째의 crosslinks value가 OvX군에서 높게 나타나서 위의 연구와 같은 경향성을 나타낸다고 볼 수 있겠으나 8주째에는 이런 경향성을 볼 수 없었다.

Crosslinks value의 식이 칼슘량에 따른 효과는 Sham군에서는 고칼슘식이군이 crosslink value가 낮은 경향을 나타내었고 OvX군에서는 고칼슘식이군의 crosslink value가 유의적으로 낮게 나타났다. 따라서 난소절제한 쥐에 있어서 고칼슘 식이섭취시 정상칼슘 식이섭취시 보다 crosslinks value가 낮게 나타나서 골교체율이 낮음을 볼 수 있었다.

4. 혈청 Estradiol과 황체형성 호르몬(luteinizing hormone:LH) 함량

Estradiol은 주요한 estrogenic hormone으로 estrogen의 가장 중요 활성형이다. Estradiol의 측정 은 사춘기의 지연, 무월경 및 폐경의 경우를 진단하

Table 4. Values of estradiol and luteinizing hormone(LH) in sham-operated and ovariectomized rats

		5wk	8wk	P value 8wk	
Estradiol (pg/ml)	Sham	Control	64.31±20.	79.40±34.14 ^a	
		High	29 ^b	67.27±36.77 ^a	
			83.26±51.46 ^b	* ³⁾	
	Ovx	Control	45.35±14.40 ^a	63.28±40.59 ^a	
		High	45.81±8.31 ^a	54.18±5.80 ^a	
LH (mIU/ml)	Sham	Control	0.30±0.07 ^a	0.32±0.07 ^a	
		High	0.31±0.05 ^a	0.33±0.15 ^a	
					NS ⁴⁾
	Ovx	Control	0.28±0.05 ^a	0.33±0.08 ^a	
		High	0.25±0.07 ^a	0.36±0.08 ^a	

- 1) Mean±SD
- 2) Values with different superscripts within the column are significantly different at p<0.05.
- 3) * : significant different at p<0.05 between sham and ovx by t test
- 4) NS : Not significant between sham and ovx by t test

는데 이용된다. 또한 estradiol 및 estrogen은 골흡수의 억제작용이 있으며 폐경후 estrogen이 감소되면 골흡수가 증가되고, 소화관에서 칼슘 흡수가 저하되어 폐경후 골다공증과 관련된다고 알려져 있다.^{7,12,31,32)}

따라서 본 실험에서 혈청내 estradiol과 황체형성 호르몬(luteinizing hormone) 함량을 측정 한 결과를 Table 4에 나타내었다. Estradiol치는 예상하였던 대로 Sham 군에 비해 Ovx군에서 유의적으로 낮았고 식이에 따른 차이는 볼 수 없었다.

이 등³³⁾에 의하면 폐경기 osteopenia 환자군과 동일연령 대조군간의 혈중 estradiol치가 각각 20pg/ml, 23pg/ml로 차이가 없었다고 보고하였으나, 한 등³⁴⁾은 혈중 estradiol치가 정상대조군(126.7pg/ml)에 비해 폐경여성 환자군(36.3pg/ml)이 유의적으로 낮았다고 보고하였다. 주³⁵⁾의 연구에서도 폐경 전 40대군보다 폐경후 50대, 60대군에서 혈중 estradiol치가 유의적으로 낮게 나타났다고 하였는데 특히, 40대의 난소절제수술군에서 50대, 60대군에서의 혈중 estradiol치와 동일하게 나타나 동일연령의 정상 여성과 현저한 차이가 있었다고 하여 본 실험의 결과와 일치함을 보였다. Aloia 등³⁶⁾의 보고에

Table 5. Ca and P concentration in serum of sham-operated and ovariectomized

		5wk	8wk	P value 8wk
Ca /serum (mmol/l)	Sham	Control	2.46±0.20 ^{1)ab}	1.95±0.38 ²⁾
		High	2.69±0.07 ^a	2.09±0.51 ^a
	Ovx	Control	2.38±0.24 ^c	1.73±0.42 ^a
		High	2.67±0.11 ^a	1.86±0.33 ^a
P /serum (mmol/l)	Sham	Control	2.65±0.49 ^a	1.95±0.66 ^c
		High	2.67±0.33 ^a	2.72±0.72 ^a
	Ovx	Control	2.17±0.41 ^b	1.47±0.28 ^b
		High	3.07±0.40 ^a	1.87±0.37 ^{ab}

- 1) Mean±SD
- 2) Values with different superscripts within the column are significantly different at p<0.05.
- 3) NS : Not significant between sham and ovx by t-test
- 4) * : significant different at p<0.05 between sham and ovx by t-test

서도 폐경후 여성에서 혈중 estradiol치가 낮게 나타났다.

폐경후 여성에게서는 난소기능의 퇴화와 estradiol 분비가 감소되면서 황체형성 호르몬의 분비는 증가하는 경향³⁷⁾을 보인다고 한다. 본 실험에서의 혈청내 황체형성 호르몬의 함량은 식이군간, Sham 군과 Ovx군간에 차이를 볼 수 없었다. Aloia 등³⁶⁾의 연구에서도 황체형성 호르몬 함량은 폐경후 골다공증 환자군과 동일 연령 정상대조군 사이에 유의적인 차이가 없었다고 보고한 것과 일치하였다. 한편 한 등³⁷⁾은 폐경 여성에서 황체형성 호르몬의 함량이 유의적으로 높게 나타났다고 하였다.

5. 혈청 칼슘과 인 함량

본 실험에서의 혈청내 칼슘과 인 함량을 Table 5에 나타내었다. Sham군과 Ovx군 모두에서 고칼슘식이군이 정상칼슘식이군에 비해 5주에는 혈청내 칼슘 함량이 유의적으로 높게 나타났고, 8주에는 높은 경향을 보였다. Sham군과 Ovx군간에는 혈청내 칼슘 함량의 차이가 없었다. 실험기간이 경과함에 따라 양군 모두에서 혈청내 칼슘 함량이 감소하는 경향을 나타내었다. 혈청내 인 함량은 Ovx군에서 고칼슘식이군의 5주 8주 모두에서 유의적으로 높게

Table 6. Total protein and albumin content in sham-operated and ovariectomized rats

		5wk		8wk	
Total protein(g/dl)	Sham	Control	7.8±1.19	6.0±2.05	
		High	8.1±0.33	6.4±1.27	
	Ovx	Control	6.8±0.75	5.3±1.62	
		High	8.0±0.34	5.5±1.10	
Albumin (g/dl)	Sham	Control	3.1±0.27	2.5±0.61	
		High	3.7±0.53	2.8±0.36	
	Ovx	Control	2.8±0.18	2.3±0.56	
		High	3.9±0.09	2.8±0.60	

1) Mean±SD

나타났고 Sham군과 Ovx군간에는 5주에서는 유의적인 차이가 없었으나, 8주에 Ovx군에서 낮게 나타났다. 혈청내 칼슘과 인 함량이 Ovx군에서 시간이 경과함에 따라 감소하는 경향을 나타내었다.

식이 칼슘량과 폐경 전후간의 혈청 칼슘 및 인의 농도 수준에는 상반된 보고가 많다. 주의 보고³¹⁾에서는 혈청내 칼슘과 인 함량 모두 폐경전 40대에 비하여 폐경후 50대, 60대에서 높게 나타났다고 하였다. 한편 Aloia 등³⁵⁾은 혈청내 칼슘과 인 함량 모두가 폐경후 골다공증 환자군과 동일 연령 대조군 사이에 유의적 차이가 나타나지 않았다고 보고하였다. 또한 오와 이³⁶⁾의 연구에서는 난소절제하지 않은 쥐에서 정상칼슘 식이군의 혈청 인은 정상 수준을 나타냈으나, 저칼슘 식이군은 난소절제수술 여부에 관계없이 혈중 칼슘 농도가 유의적으로 감소하였다고 보고하였다. 한편 Mary 등²¹⁾은 식이칼슘 수준에 따른 Sham군과 Ovx군간에 혈청내 칼슘과 인 함량에 유의적인 차이가 없었다고 보고하였다.

6. 혈청 total protein과 albumin 함량

혈중 칼슘은 세가지 형태로 존재하는데 이온화 형태 약 50%, 음이온과 결합된 형태 약 10%, 혈장 단백질과 결합된 형태 약 40%로 알려져 있다³⁷⁾. 칼슘의 혈장 단백질과의 결합에서는 혈장 단백질의 약 50%를 차지하는 albumin과 결합하며 따라서 혈장 albumin 농도가 높으면 결합 칼슘의 비율이 높아서 이온화 형태의 칼슘량은 적어진다³⁸⁾. 실제적으로 생리적 기능을 하는 칼슘의 형태는 결합되어 있지 않

Table 7. Alkaline phosphatase(ALP) and osteocalcin content in serum of sham-operated and ovariectomized rats

		5wk		8wk	
ALP1 (U/l)	Sham	Control	83.0±16.48 ^{1a}	90.4±44.91 ^a	
		High	86.0±15.10 ^a	74.0±21.63 ^a	
	Ovx	Control	107.2±15.48 ^a	97.4±41.51 ^a	
		High	112.8±17.68 ^a	80.0±25.94 ^a	
Osteocalcin (ng/ml)	Sham	Control	0.33±0.08 ^a	0.30±0.03 ^a	
		High	0.93±0.59 ^b	0.87±0.52 ^a	
	Ovx	Control	1.88±0.52 ^a	1.10±0.54 ^a	
		High	0.98±0.26 ^b	0.85±0.69 ^a	

1) Mean±SD

2) Values with different superscripts within the column are significantly different at p<0.05.

는 이온화 형태의 칼슘³⁹⁾이다. 따라서 본 실험에서는 혈청내 total protein과 albumin 함량을 측정하고 Table 6에 그 결과를 나타내었다. 본 실험에서는 난소절제 여부와 식이칼슘량에 따른 혈청내 total protein과 albumin 함량 차이를 볼 수 없었다. 그러나 Morris 등¹⁸⁾은 난소 절제하지 않은 쥐보다 난소 절제한 쥐에서 혈청내 albumin 함량이 낮게 나타났다고 보고하였다. 주의 연구⁵¹⁾에서는 폐경전 40대와 폐경후 50~60대 사이의 중년 여성에서 혈청내 total protein과 albumin 함량이 연령 증가에 따른 큰 변화는 없었다고 보고하였다.

7. 혈청 alkaline phosphatase(ALP)와 osteocalcin 함량

혈청 alkaline phosphatase(ALP)와 osteocalcin은 골형성 지표로서 대사성 골질환 등 골대사 회전이 활발할 때 즉, 골재형성시 조골세포의 활동이 증가되어 골교체를 빠를 때 혈청내 농도가 증가된다^{20,37)}. 따라서 골교체를 알아 보고자 혈청내 alkaline phosphatase(ALP)와 osteocalcin의 함량 측정 결과를 Table 7에 나타내었다. 혈청내 ALP 함량은 난소절제 여부와 식이칼슘량에 따른 차이를 볼 수 없었다. 이것은 현²⁰⁾의 보고에서 폐경전 여성이나 폐경후 여성에서 혈청내 alkaline phosphatase 함량이 유의적인 차이는 없었다고 보고한 것과

일치한다. 그러나 난소절제한 쥐를 대상으로 실험한 Morris 등¹⁸⁾은 혈청내 alkaline phosphatase 함량이 난소절제하지 않은 군에 비해 난소절제군에서 유의적으로 높았다고 보고하였다. 주의 연구⁵⁾에서는 혈청내 alkaline phosphatase는 연령 증가에 따라 활성이 증가하여 폐경전 40대 여성에 비해 폐경 후 50대, 60대 여성에서 직선적인 증가를 보였고 특히, 60대는 40대에 비해 유의적인 증가를 보였다. Aloia 등³⁵⁾의 연구에서도 동일연령 대조군보다 폐경 후 골다공증 환자군에서 혈청내 alkaline phosphatase 함량이 유의적으로 높게 나타나 골질량과 유의 상관관계를 나타내었다고 보고하였다.

혈청내 osteocalcin 함량은 Sham군에 비해 Ovx 군이 정상칼슘 식이시 유의적으로 높게 나타났다. 이것은 난소절제한 쥐를 대상으로 정상 칼슘을 섭취시켜 실험한 Morris 등¹⁸⁾이 osteocalcin 농도는 유의적이지는 않았으나 난소절제군에서 높게 나타났다고 하여서 본 실험의 결과와 일치하였다. 한 등³⁶⁾은 폐경후 여성 환자군이 정상 대조군보다 혈청내 osteocalcin 함량이 유의적으로 높았다고 하였으며, 폐경 이후에 혈청내 osteocalcin 함량이 증가하여 폐경후에 골재형성 과정이 빨라지며 골손실도 증가됨을 알 수 있었다고 하였다. 따라서 정상칼슘 식이시 Ovx군의 osteocalcin 농도가 높게 나타나 Sham 군 보다 Ovx군이 골교체율이 빠르고 골손실이 많았을 것으로 분수 있겠다.

또한 식이 칼슘량에 따른 osteocalcin의 농도의 차이를 보면 Sham군 내에서는 정상식이보다 고칼슘식이 섭취시 높은 경향성을 보였고 Ovx군 내에서는 고칼슘식이군의 osteocalcin 농도가 정상칼슘식이군의 것보다 낮았다. 정상칼슘식이시 Sham군과 Ovx군의 osteocalcin의 농도는 유의적 차이를 보였다($p < 0.05$). Sham군내에서는 고칼슘식이시 osteocalcin의 농도는 높았으나 Crosslink value는 낮게 나타나 골교체율은 많으나 골흡수는 낮은 것으로 간주할 수 있겠다. Ovx군내에서는 고칼슘식이시 정상칼슘식이군보다 골형성지표인 osteocalcin 농도도 낮고 골흡수 지표인 Crosslink value도 낮아서 난소절제 쥐에 있어서 고칼슘식이는 정상 칼슘 식이에 비해 골교체율이 지연됨을 추정할 수 있었다. 보

Table 8. Correlation coefficient of bone mineral density and biochemical bone markers.

	ALP	Osteocalcin	Estradiol	Crosslink value	Blood Ca
TBMD	-0.27	-0.21	0.59**	-0.25*	0.66**
TBMC	-0.14	-0.21	0.46	-0.14	0.59
TBCa	-0.17	-0.22	0.47	-0.22	0.63

*: significant at $P < 0.1$

** : significant at $P < 0.05$

TBMD : Total bone mineral density (g/cm^2)

TBMC : Total bone mineral content (g)

TBCa : Total body calcium (g)

통 골교체율이 빠르면 골재형성 과정에서 골흡수만큼 골형성을 하기가 어렵기 때문에 골밀도가 감소한다고 한다. 따라서 고칼슘식이가 골교체율을 낮추었으므로 골밀도에 유의하리라 본다. 이러한 결과는 DEXA를 이용하여 골밀도를 직접 측정할 수 있는 선행연구 결과인¹⁹⁾ 난소절제쥐에서 고칼슘 섭취가 골밀도에 유의하다는 결과와 일치한다고 보겠다.

8. 골밀도 및 골함량과 생화학적 골지표와의 상관관계

Table 8에서는 골밀도와 골무기질함량 및 호르몬과 생화학적 골대사 지표와의 상관관계를 나타내었다. 골밀도는 혈중 estradiol 농도와 혈중 칼슘 농도와 유의적 상관관계가 ($r=0.59$, $r=0.66$, $P < 0.05$) 있었다. 이것은 선행연구^{12,13)}에서 estradiol이 높을수록 골밀도가 높다고 한 것과 일치한다. 골지표인 ALP와 osteocalcin은 골밀도와 유의 상관관계는 보였으나 통계적으로 유의하지 않았고 crosslink value는 골밀도와 $p < 0.1$ 에서 $r = -0.25$ 의 유의 상관성을 보였다. 이것은 폐경후 여성에서 crosslink value가 낮게 나타났다고 보고한 것과³⁰⁾ 일치한다.

IV. 결론 및 요약

본 실험은 난소절제한 흰쥐에 있어서 식이 칼슘량이 골대사에 미치는 영향을 알아 보고자 노와 혈청의 생화학적 골대사 지표를 이용하여 연구하였다. 실험동물을 난소 절제하지 않은 군(Sham)과 난소

절제군(Ovx)으로 나누었고 실험식은 식이 칼슘량을 달리한 정상 칼슘(0.52%)과 고칼슘(1.04%) 식이로 하여 8주간 사육하였다. 본 실험의 연구결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 식이 섭취량은 칼슘 함량에 따른 차이는 볼 수 없었으며, 체중 증가는 Ovx군이 Sham군보다 유의적으로 높았다.
2. Crosslinks value는 Sham군과 Ovx군 모두에서 고칼슘식이군에서 낮게 나타났다.
3. 혈청 estradiol의 함량이 Ovx군에 비해 Sham군에서 유의적으로 높았고, 혈청 황체형성 호르몬의 함량은 식이군간이나 수술에 의한 차이는 볼 수 없었다.
4. 혈청 칼슘 함량은 Sham 군과 Ovx군에서 유의한 차이가 없었으며, 혈청 인 함량은 8주에 Ovx 군에서 유의적으로 낮았다. 혈청 total protein과 albumin 함량은 Sham 군과 Ovx군간에 유의적인 차이를 보이지 않았다.
5. 혈청 alkaline phosphatase는 Ovx군과 Sham군 사이에 차이를 볼 수 없었다. 혈중 osteocalcin 함량은 Ovx군이 Sham군보다 높았고 Ovx군 내에서는 고칼슘식이군의 osteocalcin 농도가 정상칼슘 식이군보다 낮았다.
6. 골밀도는 혈중 estradiol 농도와 혈중 칼슘 농도와 유의적인 상관관계를 나타내었고 ALP와 Osteocalcin은 골밀도와 역의 상관관계는 보였으나 통계적으로 유의하지 않았다. Crosslinks value는 골밀도와 $P < 0.1$ 에서 $r = -0.25$ 의 상관성을 보였다.

이상의 결과를 요약하면, 난소 절제한 쥐에서 고칼슘 식이군에서 crosslinks value가 낮게 나타났고 osteocalcin 함량도 낮게 나타나서 고칼슘 식이가 정상칼슘 식이에 비해 골교체율(bone turnover rate)을 지연시켜 골량 유지에 유익함을 유추할 수 있었다. 따라서 본 실험결과를 통해 폐경 여성에게 고칼슘식이가 여성 호르몬 결핍에 따른 골손실을 지연시킬 수 있으리라 본다.

V. 참고문헌

1. Spencer, H. and Kramer, L. : NIH Consensus conference : Osteoporosis, Factors contributing to osteoporosis. J. Nutr., 116:316, 1986.
2. Consensus Conference : Osteoporosis. JAMA., 252:799, 1984.
3. 조수현 : 폐경과 골다공증. 대한의학협회지 35(5):587, 1992.
4. 이보경, 장유경, 조수현 : 폐경후 여성의 골밀도에 대한 환경, 생리적 요인의 영향. 한국영양학회지 25(7):656, 1992.
5. 이희자, 최미자 : 한국여성의 연령별 골밀도와 그에 미치는 영향인자에 관한 연구(I). 한국영양학회지 29(6):622, 1996.
6. Jensen, J., Christiansen, C. and Rodbro, P. : Cigarette smoking, serum estrogen, and bone loss during hormone-replacement therapy early after menopause. N. Engl. J. Med., 313(6):973, 1985.
7. Cauley, J. A., Gutai, J. P., Sandler, R. B., Laporte, R. E., Kuller, L. H. and Sashin, D. : The relationship of endogenous estrogen to bone density and bone area in normal postmenopausal women. Am. J. Epidemiol., 124:752, 1986.
8. Riggs, B. L. and Melton, L. J. : Medical progress : Involutional osteoporosis. N. Engl. J. Med., 314(26):1676, 1986.
9. Nelson, M. E., Fisher, E. C., Dilmanian, F. A., Dallal, G. E. and Evans, W. J. : A 1-y walking postmenopausal women : effects on bone. Am. J. Clin. Nutr., 53:1304, 1991.
10. Nordin, B. E. C. : International patterns of osteoporosis. Clin. Orthop., 45:17, 1966.
11. Kelly, P. J., Pocock, N. A., Sambrook, P. N. and Eisman, J. A. : Dietary calcium, sex hormones and bone mineral density in men.

- Br. Med. J., 300:1361, 1990.
12. Heaney, R. P., Recker, R. R. and Saville, P. D. : Calcium balance and calcium requirements in middle-aged women. *Am. J. Clin. Nutr.*, 30:1603, 1977.
 13. Sandler, R. B., Slemenda, C. W., Laporte, R. E., Cauley, J. A., Schramm, M. M., Barresi, M. L. and Kriska, A. M. : Postmenopausal bone density and milk consumption in childhood and adolescence. *Am. J. Clin. Nutr.*, 42:270, 1985.
 14. 문수재, 최은정, 이명희, 임승길, 허갑범 : 폐경 이후 여성의 영양섭취 및 활동상태와 골밀도의 상관관계에 관한 연구. *연세생활과학논집* 7:27, 1993.
 15. 배영란, 유춘희, 김유리, 김현숙 : 에어로빅 운동과 칼슘보충이 폐경이후 여성의 칼슘대사에 미치는 영향. *한국영양학회지* 24(2):114, 1991.
 16. Donahue, H. J., Mazzeo, R. S. and Horvath, S. M. : Endurance training and bone loss in calcium-deficient and ovariectomized rats. *Metabolism*, 38 (8):741, 1988.
 17. Morris, H. A., Porter, S. J., Durbridge, T. C., Moore, R. J., Need, A. G. and Nordin, B. E. C. : Effects of oophorectomy on biochemical and bone variables in the rat. *Bone and Mineral.*, 18:133, 1992.
 18. 오주환, 이연숙 : 난소절제 골다공증 모델 흰쥐의 체내 칼슘 이용성 저하에 대한 칼슘섭취 수준의 효과. *한국영양학회지* 26(3):277, 1993.
 19. 김경희, 최미자, 이인규 : 난소 절제한 흰쥐에서 식이 칼슘량이 골밀도에 미치는 영향. *한국영양학회지* 29(6):590, 1996.
 20. 한인권 : 한국인 여성의 골밀도 측정 및 Bone Marker. 제44차 대한내과학회 추계학술대회 심포지움 37, 1992.
 21. 장준섭 : 골조송증의 진단과 치료. *대한의학협회지* 35(1):101, 1992.
 22. Fincato, G., Leonardis, de V., Abbiati, G., Brandi, M. L. and Bartucci, F. : Urinary excretion of pyridinoline and deoxypyridinoline : Circadian rhythm. *Bone and Mineral Supplement* 1. 17:232, 1992.
 23. Nielsen, H. K., Risteli, J., Brixen, K., Risteli, L., Charles, P., Eriksen, E. F. and Mosekilde, L. : Circadian variation in new biochemical bone makers in normals. *Bone and Mineral Supplement* 1. 17:234, 1992.
 24. Mary, L. T., David, J. S., Louis, K. and Michael, J. I. : Calcium metabolism and bone mineralization in female rats fed diets marginally sufficient in calcium : effects of increased dietary calcium intake. *Bone and Mineral.*, 12:1, 1991.
 25. 최응환, 장성열, 정성수, 이인홍, 배상철, 유대현, 김성운, 김태화, 김목현 : 골흡수 지표로서 소변내 Pyridinoline crosslinks의 측정. *대한골대사학회 제5차 추계학술대회 초록집* 7, 1993.
 26. Kotowicz, M. A., Jones, J. D., O'Fallon, W. M., Eriksen, E., Eastell, R. and Riggs, B. L. : Total 24-hour pyridinium crosslink excretion correlates with cancellous bone resorption rate. *Bone and Mineral Supplement* 1. 17:258, 1992.
 27. Hassager, C., Colwell, A., Assiri, A. M. A., Eastell, R., Russell, R. G. G., Schlemmer, A. and Christiansen, C. : Urinary excretion of pyridinium cross-links during menopause studied longitudinally. *Bone and Mineral Supplement* 1. 17:291, 1992.
 28. Seyedin, S., Zuk, R., Kung, V., Danilov, Y. and Shepard, K. : An immunoassy to urinary collagen crosslinks. *Bone and Mineral Supplement* 1. 17:534, 1992.
 29. Abbiati, G., Fincato, G., Galimberti, S., Rigoldi, M., Vadala, A., Pitto, G., Stasi, M., Ghia, M. and Castiglioni, C. : Measurement of the cross linking compounds pyridinoline and deoxypyridinoline in urine as an index of collagen degradation in patients suffering

- from surgical menopause. *Bone and Mineral Supplement 1*, 17:233, 1992.
30. Negoro, Y., Tomita, A., Watanabe, K., Masahashi, T. and Nakanishi, M. : Bone mineral density and biochemical markers in postmenopausal osteoporosis. *Bone and Mineral Supplement 1*, 17:260, 1992.
 31. 임승길, 정현철, 이미경, 김현만, 이현철, 허갑범, 김남현, 박병문 : 한국 여성골조종 증환자들에서 보인 골조종증 위험인자(예보). *대한내과학회잡지 34(4):444*, 1988.
 32. Mazess, R. B. : On aging bone loss. *Clin. Orthop.*, 165:239, 1982.
 33. 이동기, 임승길, 이현철, 허갑범, 조용제 : 한국 폐경기 osteopenia 환자의 칼슘섭취 및 장내 칼슘흡수에 관한 연구. *대한내과학회잡지 35(6):752*, 1988.
 34. 한인권, 박원근, 최태환, 신현호, 김선우 : 한국인 갱년기 여성의 골밀도 및 호르몬 변화에 관한 연구. *대한내분비학회지 4(1):21*, 1989.
 35. Aloia, J. F., Cohn, S. H., Vaswani, A., Yeh, J. K., Yuen, K. and Ellis, K. : Risk factors for postmenopausal osteoporosis. *Am. J. Med.*, 78:95, 1985.
 36. Radioisotopic assay LH-luteinizing hormone. Nichols institute dia-agnostics.
 37. 김구자, 황애란 : 생리학. *고려의학 1986*.
 38. Montgomery, R., Dryer, R. L. and Conway, T. M. : *Biochemistry : A case-oriented approach*. Third edition.