

난소적출 랫트 비골의 시간경과에 따른 골다공증성 변화

배 춘 식*, 박 창 현¹, 엄 창 섭^{2,3}

건국대학교 축산대학 수의학부 외과학교실

¹고려대학교 의과대학 전자현미경실, ²해부학교실, ³유전병연구소

Time Course of Fibular Osteoporosis in Ovariectomized Rats

Chun Sik Bae*, Chang Hyun Park¹ and Chang-Sub Uhm^{2,3}

Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Konkuk University

¹Electron Microscope Laboratory, College of Medicine, Korea University

²Department of Anatomy and ³Institute of Medical Genetics, Korea University

(Received August 1, 1999)

ABSTRACT

Osteoporosis means a deficiency in the amount of bone tissue in the skeleton or part of the skeleton. Osteoporosis is a lesion, not a specific disease.

“Osteoporotic” describes the state of a bone or skeleton at a given time.

Osteoporosis may be diagnosed subjectively by visual appraisal, or objectively by measurement of radiographs, sawn bones, or microscopic sections.

This study was carried out to make clear of the influence of ovariectomy on time course of fibular osteoporosis in rats. Seven weeks after ovariectomy, osteoporosis was evident, when the size of the bone marrow cavities significantly increased and the width from the bone marrow cavity and cortex significantly decreased than normal.

Key words : Osteoporosis, Ovariectomy, Fibula, Bone marrow cavity, Rat

서 론

골다공증은 같은 성별이나 연령층에 비하여 골밀도가 감소하고 골질의 감수성이 증가된 상태로 정의할 수 있으며 (Bemben, 1999), 크게 원발성 골다공증과 속발성 골다공증으로 분류되며 원발성 골다공증

에는 제I형(폐경후 골다공증)과 제II형(노인성 골다공증)이 대부분이고 (Åkesson et al., 1997), 속발성 골다공증은 폐경이나 노령을 제외한 다른 원인인자들에 의한 경우가 해당된다 (Gennari et al., 1998).

폐경후 골다공증은 여성에서 폐경직후부터 진행되는 점으로 미루어 난소에서 생산되는 에스트로젠 결핍이 주된 원인으로 알려져 있으며 (Ohta et al., 1992),

* Correspondence should be addressed to Dr. Chun Sik Bae, Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul, Korea. E-mail: surgery@kkucc.konkuk.ac.kr
Copyright © 1999 Korean Society of Electron Microscopy

생리불순이나 인위적인 난소적출에서는 조기발생이 가능하다(Brunelli와 Einhorn, 1998).

최대골밀도가 적은 사람일수록 골다공증 및 그에 따른 골절율이 높다는 것은 널리 알려진 사실이다(Melton et al., 1998). 골밀도는 성장과정에서 점진적으로 증가하여 최대골밀도치에 도달한 후 정상적으로 일정기간 동안 골밀도가 유지되나 여성의 경우에는 30대 이후부터 골소실이 시작되고 폐경후에는 매년 2%의 골소실이 진행된다(Lane과 Nydick, 1999). 남성에 있어서도 30~40대 후반부터 골소실이 시작되며 골소실의 정도는 여성처럼 심하지 않다(Nordin, 1997).

이와같이 성인에서 연령증가에 따른 생리적인 골소실이 여성에서 더욱 심하게 일어나며 그 정도는 유전인자, 내분비인자 및 고단백식과 고염식(Lewis와 Modlesky, 1998), 흡연(Krall과 Dawson-Hughes, 1999), 과음(Ebeling, 1998) 등의 환경인자에 의해 결정된다.

이에 저자는 랫트의 양측 난소를 적출한 후, 시간의 경과에 따른 난소적출이 골다공증 발생에 미치는 영향을 이해하기 위하여 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 실험군 배정

임상적으로 건강하다고 인정되는 11주령 암컷 Sprague-Dawley rats (227.4±8.7 g)를 난소적출군, sham-operation군 및 12주령 정상 대조군으로 나누고, 각 군마다 각각 35, 35 및 5마리씩 배정하여 총 75마리를 사용하였다. 각 군의 실험동물은 12시간의 명암주기가 교대로 유지되는 실내에서 사육하였다.

2. 난소적출

양측 난소적출을 위하여 ketamin hydrochloride(유한양행(주)) 15 mg/100 g를 복강내 주사하여 전신마취를 유발하였다. 마취된 랫트는 측외위로 보정을 한 후 일측의 하 측배부에서 1 cm 정도 피부, 복근 및 복막을 절개하고, 난소를 노출시켜, 난관을 silk사로 결찰한 후 난소를 절제하고, 봉합을 하였다. 반대측에 대해서도 동일한 방법으로 난소를 적출하였다.

Sham-operation은 난소적출군과 동일한 방법으로 난소를 노출시켰다가 원위치로 원상회복을 시킨 후 봉합을 실시하였다.

12주령 정상 대조군은 실험당일 아무런 처치도 하지 않은 상태에서 비골의 샘플을 채취하였다.

3. 광학 및 주사전자현미경적 관찰

절취된 비골을 10% neutral formalin에 담가 12시간 고정시키고, 수돗물에 수세한 후, 10% nitric acid로 12시간 동안 탈회하였다. 탈회된 조직은 흐르는 수돗물로 수세하고, 상등농도의 알코올로 탈수를 실시하고, xylene으로 1시간씩 3회 투명시켜, paraffin에 1시간씩 3회 침투를 실시한 다음 paraffin에 포매하였다. 포매된 조직은 microtome으로 길이 방향으로 5µm 두께의 절편을 만들어 hematoxylin-eosin (HE)으로 염색하여 광학현미경으로 관찰·촬영하였다.

또한, 적출한 비골에서 근육 및 결합조직을 완전히 제거하고 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.3)에 희석한 2.5% glutaraldehyde (Merck, Germany) 용액으로 4시간 동안 실온에서 고정하고, 동일 완충액으로 15분씩 2회 세척 후, 동일 완충액으로 완충된 1% osmium tetroxide (Merck, Germany) 용액으로 2시간 동안 후고정 하였다. 고정된 비골은 탈수를 한 후 HMDS (hexamethyldisilazane, Sigma Chemical Co., USA)로 15분씩 2회 치환하여 대기 중에서 건조하여 알루미늄 표본대에 붙여 ion coater (IB-5, Eiko)를 사용하여 20 nm 두께의 gold coating을 시행한 후 Hitachi S-450 주사전자현미경으로 20 kV의 가속전압하에서 관찰·촬영하였다.

결 과

1. 골단 (Epiphysis)

정상 대조군의 골단은 골 단위가 명확히 보였다 (Fig. 1a). 정상 대조군에 비하여 난소적출군의 주사전자현미경의 소견을 살펴보면 1주에서는 골 단위 사이의 갈라진 틈새 같은 공간이 증가되었으며 (Fig. 2a), 3주에서는 구불구불한 골소강이 존재하고 있었다 (Fig. 3a). 5주에서는 골소강의 숫자와 크기가 증가하여 골소강 사이의 식별할 수 있는 골 단위들이 적

었으며 (Fig. 4a), 7주에서는 골소강이 대부분의 골 면적을 차지하고 있었다 (Fig. 5a).

2. 골간 (Diaphysis)

정상 대조군의 골간은 골밀도가 치밀하며 골수의 잔존물을 함유하고 있는 공간이 있었다 (Fig. 1b). 정상 대조군에 비하여 난소적출군의 주사전자현미경의 소견을 살펴보면 1주에서는 치밀골 부위에 큰 골소강이 존재하고 있으며 골수강의 크기는 정상 대조군과 비교하여 커다란 변화가 없었으며 (Fig. 2b), 3주에서는 골수강이 매우 커지고 골소강까지 연속되고 있으며 골수강에서 피질골까지의 간격이 조금 줄어들었다 (Fig. 3b). 5주에서는 골수강이 하나의 커다란 구멍처럼 보이며 골수강과 피질골 사이의 간격이 매우 줄어들었으며 (Fig. 4b), 7주에서는 5주와 비교해서 두드러진 차이는 없었다 (Fig. 5b).

고 찰

골다공증은 골량의 감소로 인하여 골절이 쉽게 일어날 수 있게 된 상태를 말하며 남성과 여성 모두에서 일어나고 있으며 특히 여성에서는 폐경후에 많이 발생하고 있다 (Li et al., 1997). 이러한 폐경후 골다공증을 인위적으로 유발하기 위하여 랫트의 양측 난소적출술을 많이 이용하였으며 실험에 사용한 랫트의 연령은 10주령 (Erben et al., 1992), 12주령 (Peng et al., 1997), 13주령 (Bagi et al., 1992) 및 6개월령 (Erben et al., 1998)으로 주로 12~13주령의 랫트가 많이 이용되었다. 본 실험에서도 12주령의 랫트를 이용하였는데 그 이유는 랫트의 성 성숙이 이루어지는 시기가 6~11주령이기 때문에 그 이후의 연령을 사용하기 위한 목적이었다.

난소적출에 의하여 에스트로젠이 결핍됨으로써 골의 소실이 증가하기 시작하며 이러한 골소실은 주로 난소적출 후 5주나 6주부터 두드러지게 증가하기 시작하여 골다공증이 유발되었다고 하였는데 본 실험에서도 난소적출 후 5주부터 골소실이 두드러지게 증가하기 시작하여 7주에서는 매우 커져 확실히 골다공증이 유발된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 다른 연구자들과 (Walsh et al., 1997; Bagi et al.,

1992) 유사한 경향을 보이는 것으로 사료된다.

또한 골수강의 크기는 점점 커졌으며 골수강에서 피질골까지의 두께는 점점 감소하였는데 이러한 결과는 Peng 등 (1997)과 유사한 경향을 나타내고 있다.

이상의 결과들을 살펴볼 때 난소적출 후 7주에는 골다공증이 형성되었다고 간주할 수 있는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Åkesson K, Lau KHW, Baylink DJ: Rationale for active vitamin D analog therapy in senile osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 60(1): 100-105, 1997.
- Bagi CM, Miller SC, Bowman BM, Blomstrom GL, France EP: Differences in cortical bone in overloaded and unloaded femurs from ovariectomized rats: comparison of bone morphometry with torsional testing. *Bone* 13: 35-40, 1992.
- Bemben DA: Exercise interventions for osteoporosis prevention in postmenopausal women. *J Okla State Med Assoc* 92(2): 66-70, 1999.
- Brunelli MP, Einhorn TA: Medical management of osteoporosis: fracture prevention. *Clin Orthop Rel Res* 348: 15-21, 1998.
- Ebeling PR: Osteoporosis in men. New insights into aetiology, pathogenesis, prevention and management. *Drugs Aging* 13(6): 421-434, 1998.
- Erben RG, Bromm S, Stangassinger M: Therapeutic efficacy of 1 α , 25 dihydroxyvitamin D₃ and calcium in osteopenic ovariectomized rats: evidence for a direct anabolic effects of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ on bone. *Endocrinology*. 139(10): 4319-4328, 1998.
- Erben RG, Weiser H, Sinowatz F, Rambeck WA, Zucker H: Vitamin D metabolites prevent vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 50(3): 228-236, 1992.
- Gennari C, Martini G, Nuti R: Secondary osteoporosis. *Aging (Milano)* 10(3): 214-224, 1998.
- Krall EA, Dawson-Hughes B: Smoking increases bone loss and decreases intestinal calcium absorption. *J Bone Miner Res* 14(2): 215-220, 1999.
- Lane JM, Nydick M: Osteoporosis: current modes of prevention and treatment. *J Am Acad Orthop Surg* 7(1): 19-

- 31, 1999.
- Lewis RD, Modlesky CM: Nutrition, physical activity, and bone health in women. *Int J Sport Nutr* 8(3): 250-284, 1998.
- Li M, Shen Y, Wronski TJ: Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. *Bone* 20: 55-61, 1997.
- Nordin BE: Calcium and osteoporosis. *Nutrition* 13: 664-686, 1997.
- Melton LJ, Atkinson EJ, O'Connor MK, O'Fallon WM, Riggs BL: Bone density and fracture risk in men. *J Bone Miner Res* 13(12): 1915-1923, 1998.
- Ohta H, Makita K, Suda Y, Ikeda T, Masuzawa T, Nozawa S: Influence of oophorectomy on serum levels of sex steroids and bone metabolism and assessment of bone mineral density in lumbar trabecular bone by QCT-C value. *J Bone Miner Res* 7(6): 659-665, 1992.
- Peng ZQ, Vaananen HK, Zhang HX, Tuukkanen J: Long-term effects of ovariectomy on the mechanical properties and chemical composition of rat bone. *Bone* 20: 207-212, 1997.
- Walsh WR, Sherman P, Howlett CR, Sonnabend DH, Ehrlich MG: Fracture healing in a rat osteopenia model. *Clin Orthop Rel Res* 342: 218-227, 1997.

< 국문초록 >

12주령 랫트의 양측 난소를 적출한 후, 난소적출이 골다공증 형성에 미치는 영향을 이해하고자 본 연구를 시행하였던 바 아래와 같은 결과를 얻었다. 난소적출 후 매주 골소실이 일어나기 시작하였으며 5주부터 시작하여 7주에서는 정상대조군에 비하여 골소실의 증가가 두드러지게 나타났다.

이상의 결과를 종합해보면 랫트의 난소를 적출하여 여성호르몬의 결핍을 유발하면 난소적출 후 5주부터 시작하여 7주에는 골다공증이 발생되었다.

FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** Scanning electron micrographs of epiphysis (a) and diaphysis (b) of normal rat fibula. In the epiphysis, osteons (arrow) are clearly seen. In diaphysis, the bone is compact. Space containing some remnants of bone marrow is seen (*).
- Fig. 2.** Scanning electron micrographs of epiphysis (a) and diaphysis (b) of rat fibula 1 week after ovariectomy. In the epiphysis, slit-like spaces (arrow) between osteons are increased. In the diaphysis, large lacunae (arrowhead) are present in the compact bony parts. The medullary cavity (*) is not much different from the normal control.
- Fig. 3.** Scanning electron micrographs of epiphysis (a) and diaphysis (b) of rat fibula 3 weeks after ovariectomy. In the epiphysis, meandering lacunae (arrow) are present. In the diaphysis, medullary cavity (*) is greatly enlarged and is continuous to the lacunae (arrowhead) in the bony area.
- Fig. 4.** Scanning electron micrographs of epiphysis (a) and diaphysis (b) of rat fibula 5 weeks after ovariectomy. In the epiphysis, the lacunae (arrow) are increased in number and extent leaving just a few identifiable osteons (arrowhead) in between. In the diaphysis, medullary cavity (*) is appeared as a single big cavity and the thickness of bony part is decreased.
- Fig. 5.** Scanning electron micrographs of epiphysis (a) and diaphysis (b) of rat fibula 7 weeks after ovariectomy. In the epiphysis, the lacunae occupies most of the bony area. In the diaphysis, the thickness of remaining bony part (between arrowheads) is decreased with a big medullary cavity (*).



