

## 난소절제 쥐에서 카페인 첨가식이 골밀도 및 골함량에 미치는 영향\*

최 미 자<sup>§</sup> · 이 주 영

계명대학교 식품영양학과

### Effects of Caffeine on Bone Mineral Density and Bone Mineral Content in Ovariectomized Rats\*

Choi, Mi-Ja<sup>§</sup> · Lee, Jooyoung

Department of Food and Nutrition, Keimyung University, Deagu 704-701, Korea

#### ABSTRACT

The purpose of this study was to examine the effects of dietary caffeine supplementation on bone mineral density and bone mineral content in ovariectomized rats. Twenty eight female Sprague-Dawley rats (body weight  $210 \pm 5$  g) were divided into two groups, ovariectomy (OVX) and Sham groups, which were each randomly divided into two subgroups that were fed control and control supplemented with caffeine diets (caffeine 0.03% diets). All rats were fed on experimental diet and deionized water ad libitum for 6 weeks. Bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) were measured using PIXImus (GE Lunar Co, Wisconsin) in spine and femur. Serum alkaline phosphatase activity (ALP) and osteocalcin and urinary DPD crosslinks value were measured as markers of bone formation and resorption. The results of this study indicate that body weight gain and food intake were higher in OVX groups than in Sham groups regardless of diets. There were no differences weight gain between the control and caffeine groups in both OVX and Sham groups. Within the OVX group, serum Ca concentration was lower in rats fed caffeine than in rats fed the control diet. Serum ALP, osteocalcin, urinary Ca, and phosphate were not different in each group. Spine BMD, spine BMD/weight, and spine BMC/weight, femur BMD/weight and femur BMC/weight of ovariectomy groups were significantly lower than Sham groups. Within the OVX group, there were no differences in spine BMD and BMC and femur BMD and BMC. These results indicate that no significant differences in spine and femur BMD were found due to 0.03% caffeine intakes in diet in OVX rats for 6 weeks. No negative effect of caffeine in 0.03% diet on bone mineral density were found in the present study. Further investigation of the relation between caffeine and bone mineral density are warranted. (Korean J Nutr 2008; 41(3): 216~223)

KEY WORDS : caffeine, BMD, BMC, ovariectomized rats.

#### 서 론

의학기술의 발달로 평균수명이 길어져 전 세계적으로 노인 인구의 비율이 증가하고 있는 추세이다. 노인 인구의 비율은 전 세계적으로 매년 2.4%씩 증가되고 선진국에서는 65세 이상 노인인구가 12~13%를 차지하고 있다. 우리나라 국민의 평균수명도 2005년 남자 75.4세, 여자 81.1세로 2005년 우리나라 총 인구가운데 65세 이상의 노인인구 차지비율이 9.1%로 고령화 사회에 들어선 데이

어 2020년에는 노인인구의 비율이 15.7%를 넘어 고령화 사회가 될 것으로 전망<sup>1)</sup>하고 있다.

노인 인구의 증가와 더불어 노인기에 삶의 질을 높이기 위해 질병의 예방 및 관리는 매우 중요하게 대두되었다. 골다공증은 칼슘대사의 불균형으로 인해 골격의 조성이 변화되어 골량 (bone mass)이 감소되어 척추 및 요골, 대퇴부의 골절을 쉽게 초래하는 질병<sup>2)</sup>이다. 골다공증의 위험요인은 여러 가지가 있는 것으로 보고되고 있다. 유전적인 요인, 연령이 많을수록, 신장이 작을수록, 비만도가 낮을수록, 학력이 낮을수록, 경제상태가 낮을수록, 체중부하 운동량이 적을수록 골다공증에 이환될 우려가 높다고 보고<sup>3)</sup>되고 있다. 또한 호르몬과 단백질, 지방산과 같은 다량 영양소를 비롯하여 칼슘, 인, 마그네슘, 불소, 철, 구리, 망간 등의 미네랄과 비타민 D, 비타민 K, 비타민 A, 비타민 C 등의 미

접수일 : 2008년 3월 6일

채택일 : 2008년 4월 16일

<sup>§</sup>To whom correspondence should be addressed.

E-mail : choimj@kmu.ac.kr

량 영양소들과 기능성 성분인 이소플라본을 포함한 phytoestrogens 등의 식이인자는 골밀도와 밀접한 관계가 있다고 보고<sup>3)</sup> 되고 있으며, 근래에는 카페인의 섭취가 골밀도에 부정적인 영향을 주는 것으로 보고<sup>2,4)</sup> 되고 있다.

우리나라의 경우 성인들의 카페인 소비량은 개인에 따라 1일 50 mg 이하로 카페인을 거의 섭취하지 않고 있는 사람에서부터 250 mg 이상을 습관적으로 매일 섭취하고 있는 사람까지 그 소비량에 있어 다양한 분포를 나타내었는데 1인당 하루 평균 소비 카페인량은 평균 128.8 mg으로 보고되었고, 카페인 섭취 범위는 5~100 mg을 섭취하는 사람이 32%로 가장 많았고, 50 mg 이하가 7%, 100~150 mg이 14%, 150~200 mg 이상이 11% 이었다. 이는 카페인의 1일 평균섭취량이 오스트리아의 240 mg, 미국의 206 mg에 비해 적은 편이다.<sup>5)</sup>

카페인은 우리 몸에 영양소로서 작용하는 물질은 아니나, 체내 대사 작용과 관련하여 중추신경계를 자극하여 정신을 맑게 하고, 소화관이나 평활근(smooth muscle)을 이완시키며 심장기능을 촉진, 위산분비 자극, 이뇨제 역할 등 여러 가지 약리적인 효과를 가진 자극제로 알려져 있다.<sup>6)</sup>

반면에 다량의 카페인 섭취는 요 중 칼슘 배설량을 증가시키고, 대퇴부 골절률을 증가시키며,<sup>7)</sup> 골질량을 낮추고 골다공증을 유발시킨다는 연구들도 있다.<sup>8,9)</sup> Massey와 Whiting<sup>10)</sup>은 성인여성과 폐경기 여성이 350 mg의 카페인을 섭취하였을 경우 요 중 칼슘배설량이 증가하였고, Lloy 등<sup>11)</sup>은 폐경기 여성이 하루 1400 mg 카페인을 섭취하였을 경우 골밀도에 부정적 영향을 주지 않았으며, Harris<sup>12)</sup>는 성인이 하루 450 mg을 섭취하였을 때 칼슘섭취량이 하루 800 mg이하인 그룹에서만 척추골밀도에 부정적 영향을 미치고 골소실이 증가했다고 보고하였다.

카페인 섭취가 골대사에 미치는 영향에 대한 동물실험연구를 보면 Wink 등<sup>13)</sup>은 어린 쥐를 대상으로 4 mg/body weight. 카페인을 7주 동안 섭취시킨 경우 골발달이 지연되었고, Choi와 Lee<sup>9)</sup>는 성장기 암컷 흰쥐와 수컷 흰쥐에서 0.03%의 카페인 함유 식이(카페인 3.5 mg/100 g body weight)를 3주간 섭취시킨 경우 요 중 칼슘 배설량은 증가하였으나 단위 경골당 회분함량은 차이가 없다고 보고하였다. 또한 난소절제쥐에서 Ohta 등<sup>14)</sup>은 13주간 2 mg/100 g body weight. 카페인을 공급하였을 때 골의 칼슘과 인의 함량이 저하되어 골소실에 영향을 미친다고 하였다.

그러나 선행연구들은 모두 생화학적 지표를 이용하여 골밀도를 간접 측정하였다. 골대사의 판단으로 골밀도를 직접 측정하는 것이 가장 정확한 방법임을 고려할 때<sup>3)</sup> 직접 골밀도를 측정 연구하는 것이 필요하다고 사료된다.

따라서 본 연구는 0.03%의 카페인 함유 식이를 폐경모델인 난소절제 쥐에게 섭취시켜 골밀도와 골부기질 함량에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

## 연구방법

### 실험동물 및 식이

#### 실험동물

평균체중이 약 200 g 인 Sprague-Dawley 암컷 쥐 난소절제군(OVX)과 Sham군으로 나누어 다시 각각 control 군과 caffeine첨가군으로 나누어 6주간 stainless steel wire cage에서 한 마리씩 분리 사육하였다. 사육실의 온도는 22 ± 2°C, 습도는 65 ± 5%를 유지하여 광주기와 암주기를 12시간(6:00~18:00) 간격으로 자동조절장치를 이용하여 조절하였다. 식이와 물은 자유롭게 섭취(ad libitum)하도록 하였고, 이때 사용된 물은 모두 2차 이온교환수를 사용하였다.

#### 실험식이

실험 식이는 기본적으로 AIN-93M 조성을 따랐으며, 단백질 공급원으로 casein을 공급하였으며, 카페인의 효과를 알아보기 위해 대조군(Control) 식이에 카페인 0.334 g/kg diet을 첨가하였다. 카페인 첨가량은 선행연구에서 성장기 쥐에서 0.03%의 카페인식이는 골밀도에 영향을 미치지 않았다고 하였으므로<sup>9)</sup> 생리상태가 다른 난소절제쥐에서 동량의 카페인 식이는 어떻게 영향을 미치는지 알아보려고 하였다(Table 1).

### 실험 방법

#### 체중 측정 및 식이 섭취량

체중은 1주일 단위로 일정한 시간에 측정하였고, 식이 섭취량은 이틀에 한 번씩 일정한 시간에 측정하였다.

#### 혈액 채취 및 분석

실험동물은 에테르로 마취한 상태에서 복부를 절개하여 대동맥에서 혈액을 채취하였으며, 채취한 혈액은 상온에서 30분간 방치한 이후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다.

혈청 칼슘과 인은 TECHNICON CHEN<sup>TM</sup> SYSTEM을 이용하여 자동분석기(automatic chemical analyzer)를 측정하였으며, alkaline phosphatase (ALP)는 TECHNICON CHEN<sup>TM</sup> SYSTEM을 이용하여 효소법에 의해 405 nm에

서 비색정량하여 자동분석기로 측정하였고, 혈청 내 Osteocalcin은 Osteocalcin Kit (Nichols Institute, IMMUTOPICS, INC)를 이용하여 gamma counter로 radioactivity를 측정 하였다.

#### 요 채취 및 분석

6주간 사육한 실험동물은 대사케이지에서 12시간 동안, 식이에 의해 시료가 오염되는 것을 막기 위하여 식이는 공급하지 않고, 물만 공급하여 요를 채취하였다. 시료 채취에 사용되는 모든 기구는 2차 이온교환수로 헹구어 사용하였다. 채취한 요는  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동 보관하였다가 성분분석 하였다.

요 중 칼슘과 인은 TECHNICON CHEN<sup>TM</sup> SYSTEM을 이용하여 자동분석기 (automatic chemical analyzer)를 측정하였다. 요중 deoxypyridinoline, creatinine의 측정은 collagen crosslink<sup>TM</sup> Kit (Metra Biosystems Inc. U.S.A)을 이용하여 ELISA (enzyme-linked immuno

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

Ingredient	SHAM		OVX	
	Control	Caffeine	Control	Caffeine
Corn starch	529.5	529.5	529.5	529.5
Sucrose	100	100	100	100
Caseine <sup>1)</sup>	200	200	200	200
Soybean oil	70	70	70	70
Cellulose <sup>2)</sup>	50	50	50	50
Mineral-Mix <sup>3)</sup>	35	35	35	35
Vitamine-Mix <sup>4)</sup>	10	10	10	10
L-Cystein <sup>5)</sup>	3.0	3.0	3.0	3.0
Choline <sup>6)</sup>	2.5	2.5	2.5	2.5
TBHQ <sup>7)</sup>	0.014	0.014	0.014	0.014
Caffeine <sup>8)</sup>	-	0.334	-	0.334

1) Caseine, Maeil dairy industry Co. Ltd. 480 Gagok-Ri, Jinwi-Myun Pyungtaek-City, Kyunggi-Do.

2)  $\alpha$ -Cellulose, supplied by SIGMA Chemical company.

3) Mineral-Mix, AIN-93G-MX, Teklad Test Diets, Medison, Wisconsin, USA

4) Vitamine-Mix, AIN-93VX, Teklad Test Diets, Medison, Wisconsin, USA

5) L-Cystein, Sigma Chemical Co., ST. Louis, MO, USA

6) Choline bitartrate, Sigma Chemical Co., ST. Louis, MO, USA

7) Tert-butyl Hydroquione, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA

8) Caffeine, ACROS ORGANICS, 1-800-ACROS-01 New Jersey, USA

**Table 2.** Body weight change of experimental rats

Group	Sham		OVX	
	Control	Caffeine	Control	Caffeine
Initial body weight (g)	197.3 $\pm$ 32.4 <sup>1)2)</sup>	201.5 $\pm$ 6.4 <sup>a</sup>	213.1 $\pm$ 5.4 <sup>a</sup>	204.5 $\pm$ 8.2 <sup>a</sup>
Final body weight (g)	274.6 $\pm$ 23.7 <sup>b</sup>	270.8 $\pm$ 15.0 <sup>b</sup>	328.6 $\pm$ 30.7 <sup>a</sup>	327.9 $\pm$ 31.6 <sup>c</sup>
Weight gain (g)	79.2 $\pm$ 23.0 <sup>b</sup>	69.3 $\pm$ 14.7 <sup>b</sup>	111.6 $\pm$ 23.0 <sup>a</sup>	123.4 $\pm$ 27.7 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup> Mean  $\pm$  SD

<sup>2)</sup> Values with different superscripts within the row are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test

solvent assay)법에 의하여 분석하였고 deoxypyridinoline과 creatinine의 crosslinks value를 구하였다.

#### 골밀도 및 골무기질 함량 측정

실험동물은 척추 (spine) 및 대퇴골 (femur)의 골밀도 (bone mineral density: BMD)와 골무기질함량 (bone mineral content: BMC)를 측정하였다. 골밀도 측정기로는 LUNAR사의 PIXImus (Dual energy x-ray absorptiometry, DEXA)를 사용하여 측정하였으며, 측정 시 실험동물은 마취제 Ketamin (유한양행, 0.25 ml/100 mg)을 근육 주사하여 충분한 마취가 된 상태에서 골밀도를 측정하였다.

#### 자료 처리 및 통계

실험한 결과의 통계처리는 SAS package를 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차를 구하였으며, 각 군의 비교는 One-Way-ANOVA test를 하였고 군 간의 통계적 유의성은 Duncan's multiple range test를 이용하여 분석하였다. 그리고 난소절제의 상태와 식이의 교호작용이 있는지는  $2 \times 2$  Way-ANOVA test를 하여 검증하였다.

## 결 과

#### 체중변화

실험기간 동안 대조군과 실험군 식이를 섭취한 동물의 체중변화를 Table 2에 나타내었다. 실험시작 시에는 Sham군과 난소절제군 사이에 몸무게의 차이가 없었으나 실험 6주 후는 난소절제군이 Sham군에 비해 체중이 유의적으로 증가하였다.

#### 평균 식이섭취량과 식이효율

식이섭취량과 식이효율을 Table 3에 나타내었다. 평균 식이섭취량은 난소절제군이 Sham군에 비해 유의적으로 높았다.

#### 혈청 분석

##### 혈중 칼슘 및 인의 농도

혈중 칼슘 및 인의 농도는 Table 4에 나타내었다. 혈중

**Table 3.** Food intake and FER in experimental rats

Group	Sham		OVX	
	Control	Caffeine	Control	Caffeine
Food intake (g/day)	17.59 ± 1.092 <sup>1)ab2)</sup>	15.80 ± 1.056 <sup>b</sup>	19.41 ± 2.087 <sup>a</sup>	19.40 ± 2.323 <sup>a</sup>
FER	0.105 ± 0.031 <sup>ab</sup>	0.093 ± 0.016 <sup>b</sup>	0.131 ± 0.031 <sup>a</sup>	0.135 ± 0.023 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> Mean ± SD

<sup>2)</sup> Values with different superscripts within the row are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test

**Table 4.** Serum calcium and phosphorus concentrations

Group	Sham		OVX	
	Control	Caffeine	Control	Caffeine
Serum Ca (mg/dl)	9.14 ± 0.45 <sup>1)ab2)</sup>	9.23 ± 0.29 <sup>a</sup>	9.71 ± 0.16 <sup>b</sup>	9.08 ± 0.30 <sup>a</sup>
Serum P (mg/dl)	7.74 ± 0.85 <sup>a</sup>	7.08 ± 0.75 <sup>ab</sup>	8.11 ± 0.92 <sup>a</sup>	6.60 ± 1.21 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> Mean ± SD

<sup>2)</sup> Values with different superscripts within the row are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test

**Table 5.** Alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin concentrations in rats

Group	Sham		OVX	
	Control	Caffeine	Control	Caffeine
ALP (U/l)	169.4 ± 41.3 <sup>1)ab2)</sup>	213.2 ± 13.5 <sup>ab</sup>	214.8 ± 27.9 <sup>ab</sup>	230.5 ± 45.1 <sup>b</sup>
Osteocalcin (ng/mg)	0.31 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.33 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.06 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> Mean ± SD

<sup>2)</sup> Values with different superscripts within the row are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test

**Table 6** Urinary calcium and phosphorus concentrations in experimental rats

Group	Sham		OVX	
	Control	Caffeine	Control	Caffeine
Urinary Ca (mg/d)	0.25 ± 0.21 <sup>1)ab2)</sup>	0.35 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.34 ± 0.26 <sup>a</sup>	0.26 ± 0.17 <sup>a</sup>
Urinary P (mg/d)	8.23 ± 4.43 <sup>a</sup>	10.22 ± 3.56 <sup>a</sup>	9.82 ± 4.59 <sup>a</sup>	10.42 ± 1.91 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> Mean ± SD

<sup>2)</sup> Values with different superscripts within the row are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test

칼슘 농도는 같은 대조식에서 Sham군에 비해 난소절제군에서 유의적으로 높았으며, 난소절제군내에서 카페인첨가 식이군은 대조군에 비하여 혈중 칼슘 농도가 유의적으로 낮아 Sham군의 농도와 비슷한 수준으로 낮아졌다. 카페인 섭취량은 칼슘 흡수와는 음의 상관관계, 요 중 칼슘 배설량과는 양의 상관관계를 나타내어 뼈 손실을 초래하므로 카페인 섭취에 의한 지속적인 혈청 칼슘 수준의 저하는 골다공증을 유발하는 원인<sup>9)</sup>이 될 수 있다. 그러나 실험군 모두 혈중 칼슘 농도는 흰쥐의 혈청 칼슘농도의 정상수준(7.2~13.0 mg/dl)<sup>25)</sup>에 포함되어 Lee 등,<sup>8)</sup> Choi 등<sup>9)</sup>과 Sakamoto 등<sup>15)</sup>의 연구결과와 유사하였다.

혈중 인의 농도는 실험군 간에 유의적인 차이가 나타나지 않았으며 모두 정상수준(3.11~11.0 mg/dl)<sup>25)</sup>내에 포함되어 Lee 등<sup>8)</sup>과, Sakamoto 등<sup>26)</sup>의 연구결과와 일치하였다. Kim<sup>22)</sup>의 연구에서 혈청인은 난소절제에 의한 변화

보다는 식이칼슘에 차이에 따른다고 제시하였고, Kang<sup>23)</sup>의 연구에서도 혈청 인이 난소절제 시에 영향을 받지 않는다고 하여 본 연구 결과와 일치하였다.

**혈청 ALP와 osteocalcin 함량**

혈청 Alkaline phosphatase (ALP)와 Osteocalcin의 함량을 Table 5에 나타내었다. 본 실험에서 혈청 ALP는 Sham군에 비하여 난소절제군이 높은 경향을 보였다.

**요 분석**

**요 중 칼슘 및 인의 배설량**

실험기간 동안 요 중으로 배설되는 칼슘 및 인의 양은 Table 6에 나타내었다. 요 중 칼슘은 Sham군과 난소절제군 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았고, 카페인 첨가식이군은 Sham군과 난소절제군내에서 두군 모두 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

**요 중 Deoxypyridinoline (DPD), Creatinine, Crosslink value**

요 중 Deoxypyridinoline (DPD), creatinine, crosslinks value를 Table 7에 나타내었다. 요 중 Deoxypyridinoline (DPD)과 crosslinks value는 Sham군과 난소절제군, 그리고 각 군내에서 카페인 섭취 여부에 따라 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

**골밀도와 골무기질 함량**

**척추골밀도와 척추골무기질 함량**

척추골밀도와 척추골무기질 함량은 Table 8에 나타내었다. 척추골밀도는 Sham군에 비해 난소절제군이 유의적으로 낮았고, 체중으로 나누었을 때에도 Sham군에 비해 난소절제군에서 유의적으로 낮았다.

**대퇴골밀도와 대퇴골무기질 함량**

대퇴골밀도와 대퇴골무기질 함량은 Table 9에 나타내었다. 대퇴골밀도는 난소절제 수술에 따라 큰 차이를 보이지

않았는데 이것은 난소절제군의 체중이 현저하게 높았기 때문으로 사료되며 체중이 골밀도에 미치는 영향을 고려하여 체중으로 나누었을 때 대퇴골밀도는 Sham군에 비해 난소절제군이 유의적으로 낮았다. 그리고 Sham군의 대퇴골밀도는 카페인 섭취시 유의적인 차이가 없었다. 대퇴골무기질 함량은 난소절제군과 Sham군과 유의적인 차이를 나타내지 않았고, 각 군내에서 식이에 따른 차이도 없었다. 대퇴골무기질 함량을 체중으로 나누었을 때 Sham군에 비해 난소절제군이 유의적으로 낮게 나타났으며 식이에 의한 차이는 없었다.

**고찰**

난소절제가 체중에 미치는 영향에 대한 연구 결과에서는 Sham군과 난소절제군 사이에 몸무게의 차이가 없었으나 6주 후는 난소절제군이 Sham군에 비해 유의적으로 증가하였다. 이것은 난소절제시 체중이 증가하였다고 보고한 Lee 등,<sup>8)</sup> Choi 등,<sup>9)</sup> Sakamoto 등,<sup>15)</sup> Wronski 등<sup>16)</sup>의 선

**Table 7.** Urine Deoxypyridinoline, creatinine and crosslinks value in rats

Group	Sham		OVX	
	Control	Caffeine	Control	Caffeine
Deoxypyridinoline (nM)	1139.8 ± 409.4 <sup>1)2)</sup>	613.0 ± 350.8 <sup>a</sup>	763.1 ± 435.4 <sup>a</sup>	1139.8 ± 409.4 <sup>a</sup>
Creatinine (mM)	4.20 ± 1.71 <sup>a</sup>	3.91 ± 1.27 <sup>a</sup>	3.84 ± 2.08 <sup>a</sup>	5.97 ± 1.45 <sup>b</sup>
Crosslinks value (nM/mM)	156.0 ± 25.4 <sup>a</sup>	205.2 ± 19.8 <sup>a</sup>	155.9 ± 70.4 <sup>a</sup>	186.6 ± 28.9 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> Mean ± SD

<sup>2)</sup> Values with different superscripts within the row are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test

**Table 8.** Spine bone mineral density and bone mineral content in rats

Group	Sham		OVX	
	Control	Caffeine	Control	Caffeine
SBMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.15 ± 0.01 <sup>1)2)</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.13 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.14 ± 0.01 <sup>ab</sup>
SBMD/Wt (kg)	1.81 ± 0.001 <sup>a</sup>	1.71 ± 0.002 <sup>ab</sup>	1.46 ± 0.001 <sup>b</sup>	1.51 ± 0.000 <sup>ab</sup>
SBMC (g/cm <sup>2</sup> )	0.49 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.47 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.484 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.49 ± 0.03 <sup>a</sup>
SBMC/Wt (kg)	1.77 ± 0.002 <sup>a</sup>	1.72 ± 0.003 <sup>ab</sup>	1.48 ± 0.001 <sup>b</sup>	1.51 ± 0.001 <sup>ab</sup>

<sup>1)</sup> Mean ± SD

<sup>2)</sup> Values with different superscripts within the row are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test

**Table 9.** Femur bone mineral density and bone mineral content in rats

Group	Sham		OVX	
	Control	Caffeine	Control	Caffeine
FBMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.20 ± 0.01 <sup>1)2)</sup>	0.19 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.01 <sup>a</sup>
FBMD/Wt (kg)	7.11 ± 0.001 <sup>a</sup>	7.11 ± 0.000 <sup>a</sup>	6.12 ± 0.000 <sup>b</sup>	6.11 ± 0.001 <sup>b</sup>
FBMC (g/cm <sup>2</sup> )	0.39 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.380 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.38 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.39 ± 0.03 <sup>a</sup>
FBMC/Wt (kg)	1.76 ± 0.001 <sup>a</sup>	1.75 ± 0.000 <sup>a</sup>	1.41 ± 0.001 <sup>b</sup>	1.41 ± 0.000 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup> Mean ± SD

<sup>2)</sup> Values with different superscripts within the row are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test

행연구 결과와 일치하였다. Wronski 등<sup>16)</sup>은 난소절제 시 체중증가는 피하지방을 증가시켜 지방조직으로부터 에스트로젠 분비를 증가시킴으로써 혈중 에스트로젠 농도를 증가시키려는 적응기전이라고 하였다. Williams 등<sup>17)</sup>은 난소절제수술에 의한 골감소증에 대하여 부분적인 보호 작용으로써 체중이 증가할 수도 있다고 보고하였다. 카페인의 섭취가 체중에 미치는 영향에 대한 연구 결과에서는 Sham군과 난소절제군 모두에서 카페인 섭취에 따른 체중증가량의 차이는 나타나지 않았다. 이러한 결과는 난소절제쥐에서 매일 체중 100 g당 2 mg과 4 mg의 카페인을 각각 13주, 7주간 공급했을 때 체중증가가 대조군과 유의한 차이가 없었다는 Ohta 등<sup>18)</sup>의 보고와 일치하였다. 그러나 Nakamoto 등<sup>19)</sup>은 체중 100 g당 2 mg의 카페인을 쥐에게 15일간 공급하였을 때 7일째부터 체중증가량이 대조군보다 유의하게 낮았다고 하였으며, Cheung 등<sup>20)</sup>의 연구에서도 카페인이 흰쥐의 체중을 감소시켰다고 하였는데, 이는 카페인이 지방분해 증가로 저장지방 감소를 초래하고 에너지 소비증가로 체중증가를 억제하기 때문이라고 하였다.

식이섭취량과 식이효율도 난소절제쥐에서 유의적으로 높았는데, 이것은 선행연구에서 난소절제시에 식이 섭취량이 증가하였다고 보고한 Chung 등,<sup>21)</sup> Kim 등,<sup>22)</sup> Kang 등,<sup>23)</sup> Jang 등<sup>24)</sup>의 연구결과와 일치하였다. 카페인은 식이섭취량과 식이효율에 유의적인 영향을 미치지 않았다. 이 결과는 Bukowiecki 등<sup>4)</sup>이 암컷쥐에게 카페인 0.057%와 0.2% 포함된 식이를 9주간 자유롭게 공급했을 때 식이섭취량이 카페인섭취군과 대조군간에 유의적인 차이가 없었다고 한 결과와 유사하였다. Jang 등<sup>24)</sup>의 연구에서 난소절제군의 식이효율이 Sham군 보다 더 높게 나타났고 이것은 난소절제 후 체중증가와 식이효율의 증가는 난소절제로 인한 estrogen 분비감소와 식이섭취량의 증가에 따른 것으로 나타났다고 보고 하였다.

본 실험에서 혈청 ALP는 Sham군에 비하여 난소절제군이 높은 경향을 보여 8주령의 난소절제쥐를 9주간 사육시의 Choi와 Jung<sup>27)</sup>의 연구결과와 일치하였다. 일반적으로 난소절제 수술은 골형성의 생화학적 지표인 혈청 ALP의 증가를 유도하고, 난소절제시 ALP활성의 증가는 estrogen 결핍으로 bone turnover가 증가되었기 때문이라고 보고되고 있다.<sup>27)</sup> Sham군과 난소절제군내에서 카페인 첨가식은 대조군에 비해 혈청 ALP가 높은 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다.

혈청 ALP의 활성은 골생성 (bone formation)의 지표로 가장 흔하게 사용되며 조골세포의 활성을 반영한다. 혈청 ALP 활성은 성장초기에 높은 값을 유지하나 성숙기가 되

면 오히려 떨어지고,<sup>28)</sup> 성인에서 연령이 증가함에 따라 혈청 ALP 활성도 함께 증가하며 특히 폐경기 이후의 여성에서 증가한다고 보고<sup>29)</sup> 되었다.

Bone gla-protein 이라고도 불리는 Osteocalcin은 골재형성시 조골세포에 의해 합성되며 뼈의 extracellular matrix에 결합된다. Osteocalcin의 혈청 중 함량의 증가는 젊은 연령층에서는 골형성의 증가를 의미함으로 긍정적이나, 폐경 후 여성에서 골밀도와는 음의 상관관계를 나타내어 골교체의 증가를 의미한다<sup>30)</sup> 하였다. 본 실험에서 혈청 Osteocalcin은 Sham군과 난소절제군 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았고, 카페인 첨가식은 Sham군과 난소절제군내에서 식이에 의한 차이도 나타나지 않았다.

요 중 칼슘은 Sham군과 난소절제군 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았고, 카페인 첨가식이군은 Sham군과 난소절제군내에서 모두 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 이 결과는 동물실험인 난소절제쥐를 대상으로 카페인 섭취량을 0.03%로 섭취시킨 경우 요 중 칼슘 배설량은 차이가 없었다고 보고한 Lee 등<sup>9)</sup>의 결과와 유사하였다. 또한 섭취량이 상당히 높은 13.6 g/kg diet를 약 20주 동안 공급한 Sakamoto 등<sup>15)</sup>의 연구결과에서도 요 중 칼슘배설량은 대조군의 요 중 칼슘배설량과 차이가 없어 본 연구 결과와 일치하였다. 반면에 Choi 등<sup>9)</sup>의 연구에서는 성숙 쥐에게 하루 체중 100 g당 7.5 mg 카페인을 공급하였을 때 카페인군에서 요 중 칼슘 배설량이 증가하였다. Massey 등<sup>10)</sup>의 임상연구에서 카페인군에서 요 중 칼슘배설량이 증가하였다고 상반된 연구결과를 보이고 있어 더 많은 연구가 필요한 것으로 사료된다.

요 중 인의 배설량은 실험군 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았고 성인 하루 400 mg 해당하는 카페인의 양을 수컷 쥐에게 6주 동안 섭취 시킨 경우 요 중 인의 배설량은 차이가 없었다고 보고한 Lee 등<sup>9)</sup>의 연구결과와 일치하였다. 반면에 Sakamoto 등<sup>15)</sup>의 연구에서 수컷 쥐에게 20주 동안 1 kg식이 중 13.6 g의 카페인을 공급하였을 경우 인의 요 중 배설량이 대조군에 비해 높게 나왔다고 한다. 이는 본 실험보다 10배 이상의 카페인 공급량에 의한 것으로 사료된다.

척추골밀도와 척추골무기질 함량은 Table 8에 나타내었다. 척추골밀도는 Sham군에 비해 난소절제군이 유의적으로 낮았고, 체중으로 나누었을 때에도 Sham군에 비해 난소절제군에서 유의적으로 낮았다. 이것은 Choi와 Jung 등<sup>27)</sup>과, Kang<sup>23)</sup>의 연구에서 8주령 암컷 흰쥐의 난소절제시에 각각 대퇴골 및 요추골에서 골손실이 일어났으며 난소절제군에서 척추골밀도가 낮았다고 보고한 것과 일치하였다.

또한 Sham군내에서 카페인첨가에 따른 척추골밀도의 차이는 없었으나 난소절제군 내에서는 카페인군이 대조군보다 척추골밀도가 높은 경향을 보였다. Harris 등<sup>12)</sup>의 임상연구에서 하루 800 mg 이상의 칼슘을 섭취하는 성인여성에서는 하루 6잔 정도에 해당하는 450 mg 카페인을 척추골밀도에 부정적 영향을 주지 않았다는 연구결과와 유사하였다. Greger 등<sup>31)</sup>도 이유 쥐의 식이에 6.6% 인스턴트커피를 첨가하여 22일 동안 공급하였을 때 뼈의 길이나 칼슘 함량에서 유의한 변화가 없었고, Glajchen 등<sup>32)</sup>은 수컷 쥐에게 체중 100 g당 2.5 mg과 10 mg의 카페인을 8주간 투여하였을 때 뼈의 교체 (bone turnover)가 다소 증가하였지만 뼈의 형태는 변하지 않았다고 보고하면서 카페인이 골다공증에 직접적인 병인요소가 아니라고 하였다.

그러나 Ohta 등<sup>14,33)</sup>은 난소절제 쥐에게 체중 100 g당 2 mg과 4 mg의 카페인을 각각 13주와 7주를 공급한 결과 골의 칼슘, 인, 마그네슘의 함량이 대조군에 비해 낮았다고 보고하면서 카페인의 장기간의 섭취가 골밀도 및 골질량의 저하가 촉진될 수 있음을 시사하였다. 이와 같이 카페인의 섭취가 골밀도와 골무기질함량 변화에 미치는 영향에 대하여는 학자에 따라 상반된 결과들을 제시하고 있는 실정이다.

척추골함량은 실험군 간에 차이가 없었다. 체중은 골밀도와 골함량에 매우 중요한 인자이므로<sup>34)</sup> 체중 당 척추골밀도와 체중 당 척추골무기질의 함량은 Sham군에 비해 난소절제군이 낮은 경향을 보여 Choi와 Jung 등<sup>27)</sup>과 Kang 등<sup>23)</sup>의 연구 결과와 일치하였고, 난소절제군내에서 카페인 첨가군이 대조군보다 높은 경향을 보였다. 그러나 폐경여성을 대상으로 하루에 카페인 섭취가 171 mg 이하인 경우와 181~419 mg의 카페인을 섭취하는 집단으로 나누어 골밀도에 미치는 효과를 본 결과 연구대상자 중 칼슘섭취가 중앙값 (744 mg/d) 이상으로 섭취하는 폐경여성은 카페인 섭취에 영향을 받지 않았으나 하루에 칼슘 섭취가 450 mg 이하인 경우 카페인 섭취가 적은군과 많은군 간에 매우 유의적인 차이를 나타내어<sup>12)</sup> 칼슘의 섭취량에 따라 차이를 나타내었다.

대퇴골밀도는 난소절제 수술에 따라 큰 차이를 보이지 않았는데 이것은 난소절제군의 체중이 현저하게 높았기 때문으로 사료되며 체중이 골밀도에 미치는 영향을 고려하여 체중으로 나누었을 때 대퇴골밀도는 Sham군에 비해 난소절제군이 유의적으로 낮았다. 그리고 Sham군의 대퇴골밀도는 카페인 섭취시 유의적인 차이가 없었다. 대퇴골무기질 함량은 난소절제군과 Sham군과 유의적인 차이를 나타내지 않았고, 각 군내에서 식이에 따른 차이도 없었다. 대퇴골무기질 함량을 체중으로 나누었을 때 Sham군에 비해

난소절제군이 유의적으로 낮게 나타났으며 식이에 의한 차이는 없었다.

Choi 등<sup>35)</sup>과 Kang<sup>23)</sup>의 연구에서 난소절제쥐는 Sham군에 비해 대퇴 골밀도 및 골함량이 감소하였다고 보고하여 본 연구와 일치하였다. 이는 Lee 등<sup>8)</sup>의 연구에서 카페인의 섭취가 대퇴부의 칼슘과 인의 함량의 차이가 없었다는 연구결과와 유사하였다. Lloyd 등<sup>11)</sup>과 Harris 등<sup>11)</sup>은 성인 여성과 폐경여성을 대상으로 한 임상연구에서 카페인 섭취가 대퇴골밀도에 영향을 주지 않았다고 하여 본 연구결과와 유사하였다.

## 요 약

본 연구는 0.03%의 카페인 함유 식이를 폐경모델인 난소절제쥐에서 6주간 섭취시켜 골밀도와 골무기질함량에 미치는 영향을 아래와 같이 요약하였다.

- 1) 체중증가량은 난소절제군이 Sham군에 비해 유의적으로 높았으며 각 군내에서 카페인 섭취에 따른 차이는 없었다.
  - 2) 혈 중 칼슘 농도는 난소절제군내에서 카페인군이 대조군보다 유의적으로 낮게 나타났다.
  - 3) 혈 중 ALP는 Sham군과 난소절제군 모두에서 카페인군이 대조군보다 높은 경향을 나타내었다. 혈 중 Osteocalcin은 Sham 군과 난소절제군, 그리고 각 군내에서 카페인 섭취여부에 따라 유의적인 차이를 나타내지 않았다.
  - 4) 요 중 칼슘 및 인의 농도, 요 중 Deoxypyridinoline (DPD)와 crosslinks value는 Sham 군과 난소절제군, 그리고 각 군내에서 카페인 섭취여부에 따라 유의적인 차이를 나타내지 않았다.
  - 5) 척추골밀도는 Sham군에 비해 난소절제군이 유의적으로 낮았고, 난소절제군내에서 카페인 첨가군과 대조군 간에 차이가 없었다.
  - 6) 대퇴골밀도와 대퇴 골무기질 함량은 Sham군과 난소절제군 간의 차이는 없었고, 각 군내에서 식이에 따른 차이도 없었다.
- 따라서 카페인 0.03% caffeine 섭취는 난소절제쥐에서 6주간 섭취 시킨 경우 척추와 대퇴골밀도에 부정적 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

## Literature cited

- 1) Korea National Statistical Office, Life Expectancy, Seoul; 2005
- 2) Lee HJ, Lee HO. A study on the bone mineral density and

- related factors in korean postmenopausal women. *Korean J Nutr* 1999; 32(2): 197-203
- 3) Lee YS. Micronutrients and osteoporosis. *Korean J Osteoporosis* 2005; 3: 206-230
  - 4) Bukowiecki LJ, Lupien J, Folla N, Jahjah L. Effect of sucrose, caffeine, and cola beverages on obesity, cold resistance, and adipose tissue cellularity. *Am J Physiol* 1983; 244: R500-R507
  - 5) Yoon MH, Lee MJ, Hwang SI, Moon SK, Kim JK, Jeong LH, Yim JR. A evaluation of caffeine contents in commercial foods. *J Fd Hyg Safety* 2001; 16(4): 295-299
  - 6) Lee HW. A study on caffeine containing foods and the effect of caffeine in humans. *Kor J Culinary Res* 2000; 6(3): 343-355
  - 7) Hernandez-Avila M, Colditz GA, Stamter MJ, Rosner B, Speizer FE, Willett WC: Caffeine, moderate alcohol intake, and the risk of the hip and forearm in middle-aged women. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 157-163
  - 8) Lee JS, Hong HO, Yu CH. A study on the effect of caffeine intake on calcium and phosphorus metabolism in ovariectomized rats. *Korean J Nutr* 1996; 29(9): 950-957
  - 9) Choi MK, Lee YS, Sung CJ. Effects of caffeine intake on calcium utilization in rats of different age and sex. *Korean J Nutr* 1997; 30(8): 911-919
  - 10) Massey KL, Whiting SJ. Caffeine, urinary calcium, calcium metabolism and bone. *J Nutr* 1993; 123(9): 1161-1164
  - 11) Lloyd T, Rollings N, Douglas FE, Keselhorst, VM Chinchilli. Dietary caffeine intake and bone status of postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 1826-1830
  - 12) Harris SS, Dawson-Hughes B. Caffeine and bone loss in healthy postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 1994; 60: 573-578
  - 13) Wink Cs, Rossowska MJ, Nakamoto T. Effects of caffeine on bone cells and bone development in fast-growing rats. *Pub Med* 1996; 246(1): 30-39
  - 14) Ohta M, Check G, Ide K, Cheuk S, Wink CS, Falster AU, Simmons WB, Nakamoto T. Effects of caffeine on the bones of aged, ovariectomized rats. *Ann Nutr Metab* 1999; 43: 52-59
  - 15) Sakamoto W. Effect of coffee consumption on bone metabolism. *Bone* 2001; 28(3): 332-336
  - 16) Wronski TJ, Cinton M, Doherty AL, Donn LM. Estrgen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized rats. *Endocrinol* 1988; 123: 681-688
  - 17) Williams JP, Jordan SE, Barnes S, Blair HC. Tyrosine Kinase inhibitor effects on avian osteoclastic acid transport. *Am J Clin Nutr* 1998(6s): 1369-1374
  - 18) Ohta M, Cheuk G, Thomos KA, Kamagata-Kiyouraa Y, Wink CS, Yazdania M, Falster AU, Simmonds WB, Nakamoto T. Effects of caffeine on bones of aged, ovariectomized rats. *Ann Nutr Metab* 1999; 43: 52-59
  - 19) Nakamoto T, Shaye R. Effects of caffeine on growth of mandible and long bone in protein-energy malnourished newborn rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1984; 177: 56-61
  - 20) Cheung WT, Lee CM, Ng TB. Potentiation of the antilipolytic effect of 2-chloroadenosine after chronic caffeine treatment. *Pharmacol* 1988; 36: 331-339
  - 21) Chung LW, Gleave ME, Hsi JT, Hong SJ, Zhou HE. Reciprocal mesenchymal epithelial interaction affecting prostate tumor growth and hormonal responsiveness. *Cancer Survey* 1991; 11: 91-121
  - 22) Kim MS. Beneficial effect of soy isoflavone on bone loss and hyperlipidemia in ovariectomized rat. Dissertation of Ph. D. Seoul: Seoul National University; 1999
  - 23) Choi MJ, Kang YJ. Effect of isoflavones on bone mineral density and bone mineral content in ovariectomized rats. *Korean J Nutr* 2006; 39: 236-243
  - 24) Jang HR. The effect of soy isoflavone supplementation on the factors relating to vascular disease in ovariectomized and hyperlipidemic rats. MS Thesis. Seoul: Seoul National University; 2002
  - 25) Mituka BM, Rawnsley HN. Clinical biochemical and hemotological reference value in normal experimental animals and normal humans. 2nd edition, Masson, New York. 1987; p.160
  - 26) Kim WY, Choi HK, Lee HS. The effects of dietary calcium levels on calcium and skeletal metabolism in ovariectomized rats of different ages. *Korean J Nutr* 1998; 31(4): 55-62
  - 27) Choi MJ, Jung JW. Effect of soybean protein on BMD and BMC in ovariectomized rats. *Korean J Nutr* 2005; 38(4): 279-288
  - 28) Zapata CLV, Donangelo CM, Woodhouse LR, Abrams SA, Spencer EM, King JC, et al. Calcium homeostasis during pregnancy and lactation in Brazilzn women with low calcium intakes: a longitudinal study. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 417-422
  - 29) Gallagher SK. Biochemiccal makers of bone metabolism as they relate to osteoporosis. *Medical Lab Observer* 1997; 29: 50-56
  - 30) Liu G, Peacock M. Age-related changes in serum undercarboxylated osteocalcin and its relationships with bone density, bone quality, and hip fracture. *Calci Tissue Int* 1998; 62: 286-289
  - 31) Greger JL, Emery SM. Mineral metabolism and bone strength of rats fed coffee and decaffeinated coffee. *J Agric Food Chem* 1987; 35: 551-556
  - 32) Glajchen N. The effect of chronic caffeine administration on serum makers of bone metabolism and bone histomorphometry in the rat. *Calcif Tissue Int* 1988; 43: 277-280
  - 33) Ohta M, Ide K, Cheuk G, Yazdani M, Nakamoto T, Thomas KA. A caffeine diet can alter the mechanical properties of bones of young ovariectomized rats. *Ann Nutr Metab* 2002; 46: 108-113
  - 34) Ried IR, Ibbertson HK. Calcium supplements in prevention of steroid- induced osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 1986; 44: 287-290
  - 35) Choi MJ, JO HJ. Effect of soy protein and isoflavones on bone mineral density and bone mineral content in growing female rats. *Korean J Nutr* 2003; 36: 359-367