

# 腸管内 칼슘흡수 실험방법에 관한 연구

李 連 淑

서울대학교 농과대학 농가정학과  
(1983년 2월 18일 수리)

## An Experimental Method of Calcium Absorption in Rat Small Intestine - *in situ* Closed Gut Segment Technique -

Yeon Sook Lee

Dept. of Home Economics, College of Agriculture,  
Seoul National University  
(Received February 18, 1983)

### Abstract

The method of intestinal Ca absorption in rats was studied by injecting the test solution of  $^{45}\text{Ca}$  into ligated ileal loops (*an in situ closed gut segment technique*).

The amount of Ca absorbed was measured in regard to the amount of soluble  $^{45}\text{Ca}$  and  $^{45}\text{Ca}$  which disappeared from the ligated ileal loops for 30min, and appeared portal blood for 15min after the injection.

The 15~20cm ligated segment of mid ileum and the test solution containing  $0.2\sim 0.5\mu\text{Ci } ^{45}\text{Ca}/0.5\text{ml}$ , pH 7.0,  $37^\circ\text{C}$  are appropriate for this *in situ* closed gut segment technique which turn out to be highly available for study of Ca absorption.

The rats fed casein diet absorbed more Ca by 2~5 times than the rats fed egg albumin diet.

### 序 論

지금까지 小腸에서의 칼슘(Ca) 흡수에 관한 많은 연구가 보고되어 왔으며, 그 실험목적에 따라 실험 방법이 매우 다양하다. 즉, *in vivo* 실험에서는 古典적인 Ca出納試驗에 의한 Ca의 体内保留량을 측정하는 방법이<sup>1)</sup> *in vitro* 실험에서는 everted gut sacs<sup>2,3)</sup> 또는 腸切片을<sup>4)</sup> 사용하여 腸粘膜에서 漿膜측에의 Ca의 移動량을 측정하는 방법이<sup>2,3,4)</sup> *in situ* 실험에서는 全小腸 또는 小腸loop를 perfusion하는 infused gut segment법<sup>5,6)</sup> 또는 ligated intestinal loop내에 직접 試驗物을 注入하는 closed gut segment법<sup>7,8)</sup>을 이용하여 全小腸 또는 小腸 loop로부터의 Ca의 消失량을 측정하는 방법이 주로 이용되어 왔다.

그러나 위의 실험방법에는 각각 長短點이 있으며, 不完全하여 실제로 動物의 食餌條件 및 生理的 條件

에 따른 Ca의 흡수량의 變動을 측정하기 위한 適合한 方法을 選定하기란 매우 어렵다.

最近 著者は<sup>9,10)</sup> 正常的인 食餌條件 및 生理的 條件下에 있는 動物의 腸管内 Ca흡수량을 측정하기 위하여, 動物에게 食後 短時間내에  $^{45}\text{Ca}$ 을 絲口投与하고 一定時間後 腸管을 ligation하는 *in vivo* closed gut segment법의 하나를 개발 보고하였으며, 또한 Ca의 흡수량을 腸管으로부터의  $^{45}\text{Ca}$  또는  $^{45}\text{Ca}$ 의 消失量 뿐 아니라, 門脈血中の  $^{45}\text{Ca}$  出現量으로 측정할 수 있는 새로운 試法을 해 왔다.<sup>11)</sup>

본 실험에서는 食餌條件이 다른 種의 腸管에 ligated loop를 만들고 그 loop내에  $^{45}\text{Ca}$ 을 직접 注入한 후, 腸loop로부터  $^{45}\text{Ca}$  또는  $^{45}\text{Ca}$ 의 消失量 또는 門脈血中  $^{45}\text{Ca}$ 의 出現量에 의해서 Ca흡수량을 측정 비교할 수 있는 *in situ* closed gut segment 법의 하나를 개발 확립하였다.

\*본 연구는 한국과학재단 연구비 지원으로 이루어진 것임.

### 材料 및 方法

動物에게 20% casein食을 급여 후, 短時間 內에 小腸下部의 여러 부위를 ligation하여 腸loop를 만들어 *in situ* closed gut segment법의 실험조건을 검토한 예비실험의 내용과 결론은 다음과 같다.

#### 1) 腸管의 ligation 방법

腸管으로부터 30분간의 Ca 消失量을 측정하기 위해서는 回腸의 중앙부 10~20cm가 적당하였으며, ligated loop 以外의 부위에서의 주사액의 漏出을 막기 위해서는 絹糸로 二重 ligation하여야 한다.

#### 2) <sup>45</sup>Ca의 注射方法

注射液은 <sup>45</sup>Ca (New England Nuclear, <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub> in water, initial Sp.Act. 26.8mCi/mg ca)과 CaCl<sub>2</sub> 표준액 (Wako Pure Chemicals, Japan) 및 물로 희석하여 pH7.0, 온도37°C에 조정하였으며, 腸loop 및 門脈血中の <sup>45</sup>Ca으로부터 Ca흡수량을 측정하기 위해서는 1회 주사량중 방사능이 0.1μCi 이상 포함되어야 한다. 주사량은 0.1ml, 0.5ml, 1ml를 가지고 검토한 결과 腸loop내용물과 균일하게 혼합하고, 腸loop 내를 생리적으로 유지하는 데에는 0.5ml가 가장 적당하였다. 주사침은 정맥용 1/8~3/8을 사용했을 때 腸管 및 血管의 손상이 없었다.

#### 3) 측정시간

*in situ* 실험에서는 일반적으로 마취하에 있는 동물이 될 수 있는 한, 生理的 기능을 유지하면서 흡수량의 변동을 평가할 수 있는 측정시간을 결정하는 것이 중요하다. 腸loop로부터의 Ca 消失量을 측정하기 위한 시간을 결정하기 위해서 흰쥐에게 Ca을 腸loop內에 직접 투여한 후, 15분, 30분, 1시간, 1시간 30분에서 腸loop 내용물을 검토한 결과 1시간 이상의 마취하에서는 동물이 생리적 상태를 정상으로 유지하기가 어려웠으며, 적어도 30분간의 측정시간이면 적당하였다. 또한 30분간의 측정시간

으로는 <sup>45</sup>Ca이 순환계를 경유하여 小腸上部로 재분비된 양이 투여한 방사능의 약 0.2%로 무시될 수 있었다. 門脈血中の <sup>45</sup>Ca농도로서 Ca흡수량을 측정하기 위한 시간을 결정하기 위해 흰쥐 5마리에게 0.5ml의 <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub> 용액 (0.3μCi / 5μg Ca / 0.5ml, 846×10<sup>3</sup> cpm, pH 7.0, 37°C)을 腸loop內에 직접 注射한 후 주사직 후(0분), 5분 후, 10분 후, 15분 후에 연속적으로 0.5ml씩 門脈血을 채혈하였다. 혈장을 얻어, Scintillater를 사용 liquid scintillation counter (Aloka LSC 651)에 의해서 방사능을 측정한 결과, 門脈血中 <sup>45</sup>Ca의 比較射能(Specific radioactivity)은 0분 26.9±10.2, 5분 33.8±5.5, 10분 44.1±1.0, 15분 51.0±10.1(×10<sup>3</sup> cpm/mg Ca)으로서 經時的으로 直線的인 증가를 나타내었다. 이 결과로서 門脈血中 <sup>45</sup>Ca 측정에 의해서도 Ca 흡수량을 평가 비교할 수 있음이 명백해졌으며, 채혈 시간으로는 <sup>45</sup>Ca 注入 후 15분간이 적당하였다.

이상의 예비실험결과를 토대로 다음과같은 본 실험을 행하였다.

#### 4) 動物 및 食餌

체중 120~130g의 Wistar系 흰쥐 수컷에게 20% casein食을 급여하여 약 2주간 meal-feeding법에 훈련시킨 후, 2群으로 나누어 20% casein食 또는 20% egg albumin食을 2日間 급여하였다. 각 실험식이의 조성은 前報告와 같다.<sup>12)</sup>

#### 5) 試料採取

실험당일 각각의 실험식이를 1.5시간 급여한 1시간 후 sodiumpentobarbital (50mg/kg body weight)의 복강내 주사에 의해 마취, 開腹하고 Fig. 1과 같이 처리하였다. 즉 맹장으로부터 약 10cm떨어진 곳에서 회장의 중앙부 15~20cm를 ligation하여 腸管loop를 만들었다. 그 腸loop의 先端에 <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub>용액 0.5ml (0.2μCi/5μg Ca/0.5ml, 515×10<sup>3</sup>cpm, pH 7.0, 37°C)를 注入시켰다. 注入後, 각 食餌群에서 4마리

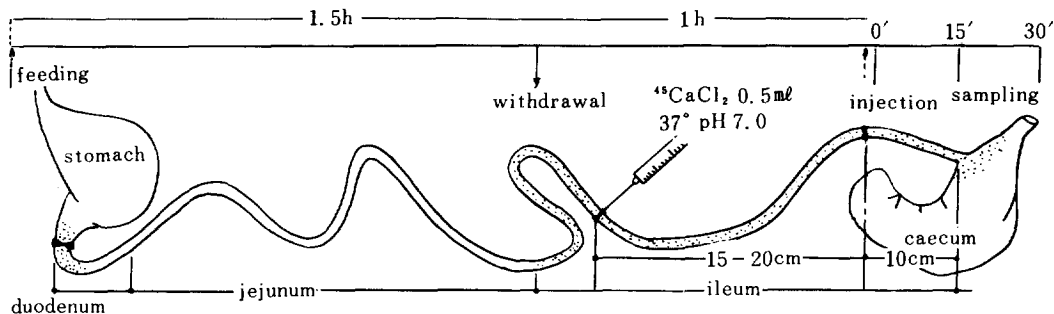


Fig. 1 Experimental procedure of *in situ* closed gut segment technique

씩 0분, 15분, 30분에 腸loop 내용물과 門脈血을 採取하였다.

6) 試料의 分析

腸loop 내용물은 氷冷生理食鹽水로 씻어내어, 얼음속에서 Polytron homogenizer로 균질화하고 10ml에 fill up 하고 원심분리에 의해 (3000r. p. m. ×20min) 可溶性劃分을 얻었다. 門脈血은 원심분리에 의해 剷장을 얻었다.

腸内容物の 可溶性劃分과 門脈血中 Ca量은 O-cresolphthalein complexone법<sup>13)</sup>에 따라, <sup>45</sup>Ca의 放射能은 Scintil later법<sup>14)</sup>에 따라 측정하였다.

結果 및 考察

Table 1에는 腸loop内的 가용성 <sup>40</sup>Ca 및 <sup>45</sup>Ca의

全放射能과 比放射能을 나타냈다. casein 食群에서는 腸loop로부터 <sup>40</sup>Ca 및 <sup>45</sup>Ca이 經時的으로 消失하였으며, egg albumin食群에 비해 가용성 <sup>40</sup>Ca 량이 약 2배의 높은 값을 나타냈으며, 30분간의 消失量은 약 5배, 흡수효율은 약 2배의 높은 값을 나타냈다.

<sup>45</sup>Ca의 全放射能의 腸loop로부터의 消失量은 食餌에 따라 유의차를 나타내지 않았으나, casein 食群에서 높은 경향을 보였다. <sup>45</sup>Ca의 比放射能은 30분간 一定하였으며, casein食에 의해 egg albumin食의 1/2 값을 나타냈다. 따라서 腸loop内的 比放射能을 고려하여 <sup>45</sup>Ca의 消失量으로 Ca흡수량을 평가할 경우, casein食에 의해 2배 이상의 높은 값을 나타냈다.

Table 1. Calcium content, total radioactivity, specific radioactivity, and the net absorption of <sup>40</sup>Ca and <sup>45</sup>Ca in the soluble fraction of ligated ileal contents

Diet	20% Casein	20% Egg albumin
Sampling time #		
	Soluble <sup>40</sup> Ca (mg)	
0'	1.54±0.22 <sup>1</sup>	0.66±0.07*
15'	1.32±0.06	0.66±0.04*
30'	1.22±0.07	0.60±0.02*
Differ. ##	0.32(20.7)*	0.06(9.1)
	Total radioactivity (cpm×10 <sup>3</sup> )	
0'	396±8	379±22
15'	355±14	333±14
30'	308±27	317±20
Differ.	88 (22.2)	62 (16.3)
	Specific radioactivity (cpm×10 <sup>3</sup> /mg Ca)	
0'	266±32	588±76*
15'	256±23	516±50*
30'	253±8	529±53*

<sup>1</sup> Results are means±SEM of four rats per group

\* Number in parentheses are the percentage of initial <sup>40</sup>Ca and <sup>45</sup>Ca(the value at 0'): Efficiency of <sup>40</sup>Ca and <sup>45</sup>Ca absorption

# Sampling time indicates the time after injection of <sup>45</sup>Ca.

## Net absorption of <sup>40</sup>Ca and <sup>45</sup>Ca, calculated by subtracting the value at 30' from that at 0'

Significant difference between the casein diet and the egg albumin diet. \* p<0.05

The rats were injected directly into the ligated ileum by syring 0.5ml of a solution containing 0.2μCi (515×10<sup>3</sup>cpm) of <sup>45</sup>Ca

Table 2.에는 門脈血中の <sup>40</sup>Ca의 농도 <sup>45</sup>Ca의 放射能 및 腸loop 유래의 門脈血中 Ca량(%)을 나타냈다.

門脈血中 <sup>40</sup>Ca의 농도는 식이에 따라, 또는 측정시간에 따라 거의 변화가 없었다. 門脈血中 <sup>45</sup>Ca의 全放射能 및 比放射能은 egg albumin食에 의해 약 1.5배의 높은 값을 보였다. 이때 이미 前報告<sup>10), 11)</sup>에서 설명한대로 門脈血中の 放射能으로 Ca흡수량을 평가할 경우, 腸管内의 比放射能을 고려하여야 한다. 따라서 腸loop内的 比放射能을 (Table

1) 고려하여 腸loop 유래의 門脈血中 칼슘량을 계산하면 [Table 2의 ligated ileal origin(%)] <sup>45</sup>Ca注射後 15분에서 最高値를 나타냈으며, casein 食에 의해 약 1.7배의 유의적으로 높은 값을 나타냈다.

1) 실험방법에 관하여

Ca흡수 실험에는 여러 가지 방법이 이용되고 있지만, 그 어느 것도 完全하다고는 할 수 없다. 예를 들면 *in vivo*의 Ca出納試驗法은 가장 生理的이라 할 수 있으나 장기간의 실험기간이 필요하며 소

**Table 2.** Calcium concentration, total radioactivity, and specific radioactivity in portal venous blood

Diet	20% Casein	20% Egg albumin
Sampling time #	<sup>45</sup> Ca concentration(mg/100ml plasma)	
0'	9.7±0.5 <sup>1</sup>	10.0±1.0
15'	9.7±0.3	10.2±0.5
30'	10.2±0.3	10.1±0.6
	Total radioactivity (cpm×10 <sup>3</sup> /100ml plasma)	
0'	101±18	167±50
15'	144±13	205±27
30'	115±8	184±14
	Specific radioactivity(cpm×10 <sup>3</sup> /mg Ca)	
0'	10.1±1.1	17.5±6.7
15'	14.9±1.5	20.0±2.0
30'	11.3±0.8	18.6±2.3*
	Ligated ideal origin(%) ##	
0'	3.9±0.5	2.8±0.2
15'	6.3±0.6	3.8±0.3*
30'	4.7±0.5	3.6±0.3

<sup>1</sup> Results are means±SEM of four rats per group.

# Sampling time indicates the time min after injection of <sup>45</sup>Ca.

## Ligated ileal Ca contribution to portal venous blood Ca: (Plasma Spec. Act./Ligated ileal Spec. Act.) x100  
For details, see Table 1.

\* P<0.05

화율 이상의 정보를 얻기 어렵다. *in vitro*의 everted gut sacs 또는 小腸切片을 이용하는 방법은 복잡한 흡수 과정을 단순화하는 이점이 있으나, 血液의 공급이 차단된 상태에서 측정하는 점, 에너지 공급이 흡수의 津速단계라는 점, 흡수된 물질이 腸上皮조직 또는 漿膜側に 정체되어 있는 점 등이 生体 조건과는 현저하게 다르다. *in situ*에서의 infused gut segment 법이나 closed gut segment법은 *in vitro*의 문제점을 해결할 수 있으나 사용되는 perfusion液 또는 注入試驗物의 내용이 특히 Ca의 농도가 生理的 범위내에 있는가가 문제이다.

지금까지 *in situ* closed gut segment法<sup>8)</sup>을 이용한 Ca흡수 실험에서는 ligation한 腸loop내에 시험물을 注入하기 전에 動物을 絶食시키거나 또는 腸loop内容物を 씻어내어 腸loop内容物を 완전히 제거한 다음 Ca를 포함한 시험물을 주입시켰다.

본 실험이 종래의 방법과 크게 다른점은 腸内容物이 食後 그대로 存在하고 있는 상태에서 <sup>45</sup>Ca 만을 腸loop내에 注入하는 것으로, 動物이 食餌섭취 후, 腸管内의 生理的 상태를 비교적 정상적으로 유지하는 점과, 腸loop内の Ca농도가 食餌섭취를 그대로 반영하는 점의 특징을 가지는 것이다.

## 2) Ca흡수량의 측정에 대하여

종래의 많은 연구에서 Ca흡수량을 평가하기 위해서 주로 体内 Ca保留量<sup>1)</sup>, 뼈에의 <sup>45</sup>Ca incorporation<sup>15)</sup>, 腸管으로부터의 <sup>45</sup>Ca 또는 <sup>45</sup>Ca의 消失量이<sup>8)</sup> 측정되어 왔다. 그러나 血中 Ca농도로부터 Ca 흡수량을 추정할 연구는 거의 없었다.

본 실험에서는 <sup>45</sup>Ca 注入後 腸loop로부터의 <sup>45</sup>Ca 및 <sup>45</sup>Ca의 消失量뿐 아니라 門脈血中 <sup>45</sup>Ca 농도에 의해서도 Ca흡수량을 평가하였다. 이와 같이 <sup>45</sup>Ca만을 注入하는 방법에서는 식이섭취 및 腸内容物의 상태에 따라 腸管内 <sup>45</sup>Ca의 比放射能이 변화하기 때문에 <sup>45</sup>Ca消失量 또는 門脈血中 <sup>45</sup>Ca농도만으로는 직접 비교가 되지않고, 腸loop내 <sup>45</sup>Ca의 比放射能으로 보정할 필요가 있다. 본 실험법을 이용하여 얻어진 성적중 casein食에 의한 Ca흡수의 우수성에 대해서는 이미 다른 실험법을 이용한 성적<sup>9, 10, 12)</sup>과도 일치하였으며, 그 원인에 대해서는 수편의 前報告에서 설명되었다<sup>9, 10, 11, 12)</sup>.

본 실험법에서는 30분간의 마취하에서 動物의 Ca흡수량을 측정하였는데, 이때 마취하에서도 정상적인 상태에서의와 같이 흡수가 일어나고 있는지에 대해서는 의문이 남아 있다. 또한 腸loop가 폐쇄되

이기 때문에 정상상태에 있는 腸管의 개방계와 같은 보장은 없다. 그러나 정상적인 생리상태에 따른 Ca흡수의 絶對량을 평가하는 것이 아니고, 相對的 比較値로서 평가 해석하는데는 충분히 유효한 것으로 보며, 다른 실험법과 병행하면 더욱 정확한 값을 얻을 것으로 본다.

### 要 約

본 연구는 食後 短時間内に 腸内容物이 存在하고 있는 腸loop내에  $^{45}\text{Ca}$ 을 직접 注入한 후, 腸loop로부터의  $^{45}\text{Ca}$  및  $^{40}\text{Ca}$ 의 消失量, 또는 門脈血中  $^{45}\text{Ca}$ 의 出現量에 의해 Ca흡수량을 측정 비교할 수 있는 *in situ* closed gut segment法의 하나를 確立하고자 行하여 졌다. 성장기 흰쥐에게 casein食을 급여하고 검토한 결과, *in situ* closed gut segment法의 실험 最適條件은 ligation부위는 회장중양부 15-20cm, 注入液의 組成은 0.2~0.5  $\mu\text{Ci}/5\mu\text{g Ca}/0.5\text{ ml}$ , pH 7.0, 37°C, 腸loop로부터  $^{45}\text{Ca}$  및  $^{40}\text{Ca}$ 의 消失量 測定은  $^{45}\text{Ca}$ 注入後 30분간, 門脈血中の  $^{45}\text{Ca}$ 농도 측정은 15분간이었다. 이상의 실험조건에서 흰쥐에게 casein食과 egg albumin食을 급여하고 Ca흡수량을 비교한 결과, casein食에 의해 2~5배의 높은 Ca흡수효과를 보였으며, 문맥혈중  $^{45}\text{Ca}$ 농도로 부터의 평가는 腸loop로부터의 평가보다 과소평가되지만 비교연구에는 충분히 유효함을 보였다.

### 文 獻

1. Lengemann, F. W., Comer, C. L. and Wasserman, R. H. : *J. Nutr.*, **61**, 571 (1957)
2. Schachter D., Dowdle, E. B. and Schenker, H. : *Am. J. Physiol.*, **198**, 263 (1960)
3. Armerbrecht, H. J., Zensen, T. V., Bruns, M. E. H. and Davis, B. B. : *Am. J. physiol.*, **236**, 769 (1979)
4. Kimberg, D. V., Schachter, D. and Schenker, H. : *Am. J. Physiol.*, **200**, 1256 (1961)
5. Younoszai, M. K. and Schedl, H. P. : *Gastroenterology*, **62**, 565 (1972)
6. Petith, M. M and Schedl, H. P. : *Am. J. Physiol.*, **231**, 865 (1976)
7. Zornitzer, A. E. & Bronner, F. : *Am. J. physiol*, **220**, 1261 (1971)
8. Lengemann, F. W. : *The Transfer of Calcium and Strontium Across Biological Membranes*, 85, ed, Wasserman, R. H., Acad. press, New York and London (1963)
9. Lee, Y. S., Noguchi, T. and Naito, H. : *Agric. Chem. Biol.*, **43**, 2009 (1979)
10. Lee, Y. S., Noguchi, T. and Naito, H. : *Br. J. Nutr.* in press (1983)
11. 李連淑, 内藤博 : 한국영양학회지, **15**, 1 (1982)
12. Lee, Y. S., Noguchi, T. and Naito, H. : *Br. J. Nutr.*, **43**, 457 (1980)
13. Ray Sarker, B. C. and Chauhan, U. P. S. : *Anal. Biochem.*, **20**, 155 (1967)
14. Kawakami, M., Mashima, R. and Shimura, K. : *Isotope News*, **5**, 16 (1972)
15. Wasserman, R. H., Comer, C. L., Schooley, J. C. and Lengemann, F. W. : *J. Nutr.*, **62**, 367 (1957)
16. Mykkanen, H. M. and Wasserman, R. H. : *J. nutr.*, **110**, 2141 (1980)