

## 난소절제쥐에게 Estrogen을 투여하였을 때 식이 단백질 수준이 Ca 및 골격 대사에 미치는 영향

김 화 영 · 김 미 현  
이화여자대학교 가정과학대학 식품영양학과

### Effect of Estrogen and Dietary Protein Level on Ca and Skeletal Metabolism in Ovariectomized Rats

Kim, Wha Young · Kim, Mi Hyeon

*Department of Food & Nutrition, College of Home Science Ewha Womans University, Seoul, Korea*

#### ABSTRACT

To investigate the effect of estrogen and dietary protein level on Ca metabolism, female rats were undergone ovariectomy or sham-operation. Ovariectomized rats were divided into either estrogen- or vehicle-treated groups. Each treatment group was again divided into 40%-casein(H) or 10%-casein(L) diet groups. All experimental diets contained 0.2% Ca, 0.4% P and fed to rats for 8 weeks.

Apparant Ca absorption and Ca balance were not affected by dietary protein level and ovariectomy, however they were increased by estrogen injection and this effect was even higher in low protein groups. Urinary Ca excretion were higher in high protein groups.

GFR was not affected by dietary protein level, ovariectomy, or by estrogen injection. Urinary protein excretion was higher in high protein groups, which implies that the kidney funtion was deteriorated by high protein diet, and this may account partly for the higher urinary Ca in high protein groups. Ovariectomy or estrogen treatment had no effect on urinary protein excretion

Urinary hydroxyproline was higher in ovariectomized rats and increased in high protein groups. Elevated value of ovariectomized rats was lowered by estrogen injection, especially in low protein group. Alkaline phosphatase tended to increase in ovariectomized groups and lowered with estrogen treatment. but this difference was not statistically significant. Serum PTH was not affected by ovariectomy and dietary protein level. Therefore the increased hydroxyproline excretion does not seem to be attributed to PTH.

Dietary protein level, ovariectomy and estrogen treatment did not affect the weights and components of femur, scapular, and 4th vertebra. Ash/wt ratio of femur was, however, lower in ovariectomized rats and increased with estrogen treatment. Therefore, among the bones studied, femur seemed to be the most vulnerable. The results of this study shows that estrogen

treatment may alleviate or reduce bone loss in postmenopausal women somewhat, especially for those people with low protein diet.

**KEY WORDS :** ovariectomy · estrogen injection · protein level · urinary protein · urinary hydroxyproline · urinary Ca · bone mineral.

## 서 론

노인의 중요한 건강 문제로 대두되고 있는 골다공증(osteoporosis)은 장기간에 걸친 골격 대사 변화의 결과이며, 이러한 골격 손실은 특히 폐경기 이후의 여성에게서 심각하다<sup>1)2)</sup>. 미국의 경우 45세 이상의 인구중 1500~2000만명이 골다공증에 이환되고 이로 인한 골절 환자가 1년에 130만명에 달한다고 한다<sup>3)</sup>. 우리나라에서는 골다공증 이환율에 대한 보고는 없으나 한국 여성의 골밀도치가 백인 여성보다 낮다고 보고되고 있다<sup>4)</sup>. 30~39세의 한국여성의 요추 골밀도치는 1.24g/cm<sup>2</sup>로 미국여성의 골밀도치인 1.26g/cm<sup>2</sup>보다 낮았으며, 45세이후부터 10년당 골밀도치 감소율도 백인 여성이 9%인 반면 한국여성은 13%의 감소 추이를 보이고 있다. 또한 골다공증은 동양 여성에게서 높기 때문에 우리나라 여성의 골다공증의 발생 빈도는 높을 것으로 예상된다<sup>5)</sup>.

여러가지 골다공증의 원인 중 영양의 중요성이 강조되고 있다<sup>6)7)</sup>. 골격 유지와 관련이 있는 여러 식이인자중 과다한 단백질 섭취는 뇨 Ca 배설을 증가시키며<sup>8)9)</sup> 이에 따라 혈액 내 Ca 수준을 일정하게 유지하기 위한 보상 기전으로 골격으로부터 Ca 재흡수(resorption)를 유도하여 결국 골격 약화를 초래한다. 그러므로 지속적인 고단백식은 노년기의 골다공증의 한 원인이 될 수 있다고 보겠다. 또한 Ca 섭취량이 부족할 때 골격 손실이 증가하며, 인의 과잉 섭취는 Ca의 흡수를 방해하고 부갑상선 호르몬(PTH) 분비를 촉진시켜 골격의 Ca 재흡수를 증가시킨다<sup>10)</sup>. 그러므로 식이내 Ca/P 비율이 낮을때 secondary hyperparathyroidism을 일으키고 점진적인 골손실을 초래하게 된다<sup>11)</sup>.

골다공증의 발생율이 폐경 후 여성에게서 높은 것은 폐경에 의한 혈청내 estrogen 함량의 급격한 감소에 기인하는 것으로 본다. Estrogen 감소는 Ca 이용율을

저하시키고 PTH에 의한 골격 Ca 재흡수를 증가시켜 골손실을 유발하게 된다<sup>12)</sup>. 젊어서 난소를 절제한 여성에게서 나이와 상관없이 빠른 속도로 골손실이 일어 났으며<sup>13)</sup>. 폐경이후 여성에게 estrogen을 투여했을 때 골손실을 방지하여 골질량(bone mass)이 유지되었다는 보고와 폐경후 estrogen을 투여받던 여성에게 estrogen투여를 중단하면 골손실이 다시 시작된다는 보고 등<sup>14,15)</sup>은 이러한 주장을 뒷받침한다. 이러한 효과는 골손실을 초래하는 골재흡수(bone resorption)를 estrogen이 억제하기 때문으로 본다<sup>16)</sup>. 동물 실험에서도 이러한 estrogen의 효과가 관찰되고 있다. 난소를 절제한 흰쥐에게 estrogen을 투여하면 경골의 trabecular bone volume과 척추및 대퇴골의 밀도가 증가하는 등 골격 대사의 변화를 관찰할 수 있었다<sup>17)</sup>.

이와같이 폐경이나 식이가 골손실에 미치는 영향에 대한 보고는 있으나 폐경기 여성의 식이 내용에 따른 골격 변화에 대한 연구는 많지 않다. 조성연 등<sup>9)</sup>은 과다한 단백질 섭취가 폐경이후 여성들의 Ca 및 골격대사에 미치는 영향을 조사하고자 난소를 절제한 흰쥐를 식이 단백질 수준을 달리하여 사육한 결과 난소를 절제한 쥐의 뇨 Ca 배설량이 증가하였는데 그 영향은 고단백군에서 두드러져서 폐경 전후의 여성들이 장기적으로 고단백식을 할 경우 골격 손실이 증가할 것이라고 시사하였다. 또한 이들은 이와 같은 뇨 Ca 배설량의 증가 원인을 신장 기능의 퇴화로 설명하고 있다. 우리나라에서 단백질 섭취량은 계속 증가하고 있으므로 장기간에 걸친 고단백식이 골격대사에 미치는 영향을 연구할 필요가 있다고 생각되며 이러한 영향은 특히 폐경후의 여성에서 검토되어야 한다.

폐경이후 나타나는 골격 대사 변화가 estrogen투여에 의해 호전됨이 여러 연구에서 보고되었으므로 본 연구에서는 폐경이후 여성의 estrogen 복용의 효

과가 식이 단백질 수준에 따라 영향을 받는지를 규명해 보고자 난소를 절제한 흰쥐를 사용하여 estrogen과 식이 단백질 수준이 Ca 및 골격 대사에 미치는 영향을 알아 보았다. 식이 단백질 수준에 의한 영향을 조사하기 위해 고단백식이로 40% casein식이와 저단백식이로 10% casein 식이를 사용하였다. 또한 식이 Ca 함량이 높을 때 골격 손실을 유도하기 어려웠으므로<sup>18)</sup> 본 실험에서는 골다공증이 유발되기 쉬운 조건으로 Ca/P 비율을 낮춰서 Ca은 0.2% 수준으로, P는 0.4% 수준으로 식이를 조성하였다. 폐경에 의한 골격 대사를 연구하기 위한 동물 모델로는 난소를 절제한 흰쥐를 이용하였다.

### 실험재료 및 방법

#### 1. 실험 동물의 사육 및 식이

본 연구는 250~500g된 Sprague-Dawley 종의 암컷 흰쥐를 구입하여 체중에 따른 Randomized completely block design으로 나누어서 난소 절제 수술(ovariectomy)과 대조군으로 Sham-operation을 실시 하였다. 수술후 상처 회복을 위해 10일간 고형 사료로 적응 시킨 다음, 난소 절제한 쥐들을 estrogen을 투여하는 군과 estrogen을 투여하지 않는 처리군으로 나누었다. 이들 각 처리 군들을 다시 저단백군과 고단백군으로 나누었다. 그러므로 식이 단백질 수준과 난소 절제 여부 및 estrogen투여에 따라 총 6군으로 나누어 8주간 사육하였다. 즉 고단백-대조군(SHV: 6마리), 저단백-대조군(SLV: 7마리), 고단백-난소절제군(OHV: 6마리), 저단백-난소절제군(OLV: 8마리), 고단백-estrogen투여군(OHE: 6마리), 저단백-estrogen투여군(OLE: 6마리)의 6군으로 나누었다. Estrogen투여군외의 나머지 군에는 주사 투여 여부에 따른 오차를 없애기 위해 용매(vehicle, V)를 투여하였다. 수술은 본 실험실에서 행하였으며 흰쥐는 한마리씩 분리하여 사육하였고 물과 식이는 제한없이 공급하였으며, 물은 2차 증류수를 사용하였다. 실험 식이는 10% casein을 함유한 저단백 식이와 40%의 casein을 함유한 고단백 식이로 나누었다. 각 식이의 Ca과 P의 함량을 같게 하기위해 미리 casein을 분석한 후 식이에 Ca 0.2%와 P 0.4%가 포함되도록 무기질 함량을 조

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

	10% Casein diet	40% Casein diet
Corn starch	745.86	448.02
Casein	100.00	400.00
Corn oil	100.00	100.00
Salt mixture <sup>1)</sup>	14.72	14.72
Vitamin mixture <sup>2)</sup>	10.00	10.00
CaCO <sub>3</sub>	4.89	4.59
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	19.53	17.67
Choline chloride	2.00	2.00
D-methionine	3.00	3.00

1) Salt mixture(mg/kg diet) : MgCO<sub>3</sub> 6900, ZnCO<sub>3</sub> 96, FeSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 124, MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 150, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 20, KI 1.3, NaCl 2300, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1600, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 3530, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 0.22

2) Vitamin mixture(mg/kg mixture) : Thiamine · HCl 600, Riboflavin 600, Pyridoxine · HCl 700, Nicotinic acid 3000, D-Calcium pantothenate 1600, Folic acid 200, Vitamin B<sub>12</sub> 1, Retinyl palmitate(Vit. A) 120, DL- $\alpha$ -Tocopheryl acetate(Vit.E) 5000, Cholecalciferol(Vit.D<sub>3</sub>) 2.5, Menadion(Vit.K) 5.0, D-Biotin 20, Sucrose finely powdered to make 1000g

절하였다(Table 1). Estrogen(안식향산 에스트라디올 주사액, 삼일제약)은 95% corn oil과 5% benzyl alcohol을 섞어 만든 용매 0.1cc에 체중 Kg당 10 $\mu$ g의 양을 녹여 매일 근육 주사를 놓았다.

실험 식이로 사육하면서 희생하기 2~3일 전에 대사에서 24시간 동안의 뇨와 변을 채취하였다. 뇨와 변을 채취할 때 식이에 의해 시료의 성분이 오염되는 것을 막기위해 식이 그릇을 대사장에 넣어 두지 않고 이미 보고된 방법<sup>19)</sup>으로 뇨와 변을 채취하였다. Ca 섭취량은 평상시 Ca 섭취량을 반영하기 위해서 뇨와 변을 받기 전 1주일간의 평균량으로 계산하였다. Apparent Ca absorption은 Ca 섭취량에서 변 Ca 배설량을 뺀 다음 Ca 섭취량으로 나누어 계산하였다.

흰쥐는 실험 시작 후 8주에 희생시켰는데 12시간 동안 굶긴 후 ethyl ether로 마취시켜 단두로 희생시키고 혈액과 골격을 채취하였다. 골격은 대퇴골, 4번째 척추뼈와 견갑골을 선택하였다. 골격은 젖은 무게를 잰 후 일정한 무게가 될 때까지 105 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C의 drying oven에서 건조시켜 마른 무게를 재고, 800 $^{\circ}$ C의 전기

회화로에서 24~48시간 동안 회화시켜 회분 함량을 측정하였다.

2. 생화학적 분석

노의 creatinine함량은 Folin의 방법<sup>20)</sup>에 의해, 혈청의 creatinine함량은 Folin and Wu의 방법<sup>21)</sup>을 이용하여 정량하였다. 이로부터 creatinine clearance를 계산하여 사구체 여과율(GFR)을 구하였다<sup>20)</sup>.

노중 단백질 배설량은 Lowry방법<sup>22)</sup>을 이용하였고, 노중 hydroxyproline은 BlumenKrantz와 Asboe-hansen 방법<sup>23)</sup>에 의해 측정하였다. 노, 혈청, 변 및 골격의 Ca 함량은 이미 보고된 방법대로 일정량의 시료를 취해서 각각 0.5% 및 0.1%의 La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 용액으로 희석하여 Atomic Absorption Spectrophotometer(PerKin Elemer Co. 2380)로 422.7nm에서 흡광도를 측정하여 구하였다<sup>24)</sup>.

혈청의 alkaline phosphatase는 Kind-King법을 이용한 Kit(아산제약)를, PTH는 Nichols Institute의 C/MM PTH Kit를, estrogen은 ICN의 ESTROGEN Kit를 사용하여 각각 측정하였다.

3. 자료의 처리

본 연구의 실험 분석 결과는 각 실험군 간의 평균치와 표준 오차를 계산하였다. 모든 결과는 난소 절제에 의한 영향을 관찰하기 위하여 난소 절제군과 Sham군을 비교하였으며, 난소 절제 수술을 한 쥐에

estrogen을 투여한 영향을 조사하고자 난소 절제한 쥐 중 estrogen투여군과 vehicle투여군을 비교하였다. 난소 절제 효과(A)와 식이 단백질 수준에 의한 영향(B)을 검정하기 위해 분산분석(two-way ANOVA)을 하여  $\alpha=0.05$  수준에서 유의성 검정을 하였다. 또한 estrogen투여(C)와 식이 단백질 수준(D)에 의한 차이도 two-way ANOVA로 분석하였다. 모든 통계 분석은 SAS package를 이용하였다.

결 과

8주의 실험기간 동안 식이 섭취량과 체중 증가량은 난소 절제 수술과 식이 단백질 수준 및 estrogen 투여에 의한 영향을 받지 않았고, 단백질 섭취량은 고단백군이 저단백군에 비해 유의적으로 많았다.

본 연구의 결과는 난소절제에 의한 영향과 estrogen 투여 효과를 나누어서 논하고자 한다.

1. 난소절제에 의한 영향

1) Ca과 골격대사

실험 종료시 노와 변을 받기전 1주일 동안의 Ca 섭취량과 변으로 배설된 Ca량은 난소 절제와 식이 단백질 수준에 의한 차이가 없었다(Table 2). 노 Ca배설량은 난소절제군에서 낮았고 식이에 의한 차이를 보여 고단백군에서 높았다. 이로 부터 계산한

Table 2. Effect of ovariectomy and dietary protein level on Ca metabolism

	Ca intake (mg/day)	Fecal Ca (mg/day)	Urinary Ca (mg/day)	Apparant Ca absorption (%)	Ca balance (mg/day)
OHV	34.69±3.64 <sup>1))</sup>	22.90±5.08	0.49±0.15	34.82±10.5	11.31±4.31
OLV	42.46±3.28	24.77±3.10	0.46±0.03	42.02±5.47	17.24±2.42
SHV	45.43±6.80	17.84±4.08	1.08±0.18	62.39±7.02	26.52±4.53
SLV	45.10±4.21	27.32±2.47	0.44±0.10	38.58±7.71	17.09±5.11
S · F <sup>2)</sup>	NS	NS	A B AB	NS	NS

1) Mean±S.E. 2) Significant Factor

A : Effect of ovariectomy was significant at  $\alpha=0.05$  level by F-test

B : Effect of dietary protein level was significant at  $\alpha=0.05$  level by F-test

AB : Interaction between A&B was significant at  $\alpha=0.05$  level by F-test

NS : Not significant at  $\alpha=0.05$  level by F-test

OHV : ovariectomized, 40% casein diet fed, vehicle injected

OLV : ovariectomized, 10% casein diet fed, vehicle injected

SHV : sham-operated, 40% casein diet fed, vehicle injected

SLV : sham-operated, 10% casein diet fed, vehicle injected

**Table 3.** Effect of ovariectomy and dietary protein level on serum alkaline phosphatase, PTH and estrogen level, and urinary hydroxyproline excretion

	Alkaline phosphatase(K-A)	PTH(pg/ml)	ESTROGEN(pg/ml)	Urinary hydrpxyproline(μg/day)
OHV	28.65± 6.44 <sup>1)</sup>	52.00± 3.23	31.5± 2.7	200.68± 9.23
OLV	19.00± 1.55	63.78± 2.39	34.5± 4.4	132.92± 8.17
SHV	18.41± 8.12	63.67± 5.37	101.7± 48.4	127.86± 4.86
SLV	13.09± 2.58	59.24± 7.05	76.8± 6.2	104.93± 3.21
S · F <sup>2)</sup>	NS	NS	A	A B AB

1) Mean± S.E. 2) Significant Factor

A : Effect of ovariectomy was significant at α=0.05 level by F-test

B : Effect of dietary protein level was significant at α=0.05 level by F-test

AB : Interaction between A&B was significant at α=0.05 level by F-test

NS : Not significant at α=0.05 level by F-test

Ca 흡수율과 Ca balance는 각 군간에 유의적인 차이는 없었으나 고단백-대조군(SHV)에서 가장 높은 값을 보였다(Table 2).

Table 3에서 보는바와 같이 골격 형성의 지표로 측정된 혈청 alkaline phosphatase는 각군 사이에 유의적인 차이는 없었으나 난소 절제군이 sham 군에 비하여 30% 정도 더 높았고 고단백군이 저단백군에 비해 30% 더 높은 값을 보였다. 골격 재흡수에 관여하는 부갑상선 호르몬은 각군간에 차이가 없었고, 혈청 estrogen수준은 난소 절제군이 낮았으나 식이 단백질에 의한 차이는 없었다. 골재흡수의 지표로 측정된 뇨 hydroxyproline 배설량은 난소 절제 수술과 식이 단백질 수준에 의한 영향을 받아 난소 절제군이 대조군에 비해 유의적으로 높았으며, 고단백군이 저단백군에 비해 더 높았다. 뿐만 아니라 난소절제와 식이단백질의 상호작용도 있어 난소를 절제하고 고단백 식이를 공급 받는 경우에 가장 높았다(Table 3).

### 2) 신장 기능

Table 4에는 사구체 여과율과 뇨중 creatinine, 단백질 배설량을 수록하였다. 뇨 creatinine 배설량은 난소 절제와 식이 단백질 수준에 의한 유의적인 차이가 없었으며, creatinine clearance로 측정된 사구체 여과율도 난소절제와 식이 단백질 수준의 영향을 받지 않았다. 뇨단백질 배설량도 각군간에 유의적인 차이는 없었으나 고단백군이 저단백군에 비하여 2배 이상 높은 값을 보였다(Table 4).

### 3) 골격의 무게 및 무기질 함량

Table 5에서 보는 바와 같이 대퇴골, 견갑골, 4번째

**Table 4.** Effect of ovariectomy and dietary protein level on GFR and urinary protein

	Urine Cr (mg/day)	Ccr(=GFR) (ml/min)	Urinary protein (mg/day)
OHV	5.70± 0.72 <sup>1)</sup>	0.14± 0.04	9.30± 3.97
OLV	7.12± 1.17	0.17± 0.04	4.79± 1.51
SHV	5.13± 0.94	0.14± 0.04	10.44± 5.48
SLV	6.36± 0.76	0.18± 0.07	3.62± 0.96
S · F <sup>2)</sup>	NS	NS	NS

1) Mean± S.E.

2) Significant Factor

NS : Not significant at α=0.05 level by F-test

척추뼈의 무게와 무기질 함량 및 Ca 함량은 난소 절제와 식이 단백질 수준에 따른 차이가 없었다. 회분내의 Ca 비율도 실험군에 따른 차이가 없었으나 대퇴골의 경우 회분 함량을 골격무게에 대한 비율로 환산한 ash/bone wt ratio는 난소절제군에서 유의적으로 낮았고 척추에서도 난소절제군에서 p<0.1 수준에서 유의적인 차이를 보였다.

대퇴골과 4번째 척추뼈의 회분과 Ca 함량이 난소 절제 수술에 의하여 다소 낮아지는 경향을 보였는데 특히 난소를 절제하고 고단백식으로 사육된 쥐들의 4번째 척추 뼈의 Ca 함량은 15% 정도 낮아졌다(Table 5).

### 2. Estrogen 투여에 의한 영향

난소를 절제한 쥐에서 나타난 현상이 estrogen 부족에 의한 결과인가를 규명하기 위하여 한 군의 난소를 절제한 쥐에게 매일 estrogen을 투여하여 그 결과를 관찰하였다.

1) Ca과 골격 대사

Table 6에서 보는 바와 같이 Ca 섭취량은 estrogen투여에 의한 유의적인 영향은 없었으나 용매만 투여 받은 vehicle군에 비해 15% 정도 높은 경향을 보였고 저단백군의 Ca섭취량이 고단백군에 비해 유의적으로 높았다. 변 Ca 배설량은 estrogen투여에

의하여 감소하여 vehicle군과 유의적인 차이를 보였고 노 Ca 배설량은 각 군간에 유의적인 차이가 없었으나 estrogen 투여군에서 높은 경향을 보였다. Ca 흡수율은 estrogen투여군에서 유의적으로 더 높았고 식이에 의한 차이는 없었으나 Ca balance 는 estrogen 투여군에서 높았고 저단백군에서 높았다(Table 6). 혈청 alkaline phosphatase는 estrogen 투여군이 ve-

**Table 5.** Effect of ovariectomy and dietary protein level on bone composition

		Wet Wt (mg)	Dried Wt (mg)	Ash (mg)	Ca (mg)	Ca/ash ratio(%)	ash/wt ratio(%)	Ca/wt ratio(%)
Femur	OHV	763.9±43.4 <sup>1)</sup>	511.1±30.2	318.6±19.4	179.1±11.9	56.1±0.4	41.8±0.6	23.4±0.4
	OLV	767.8±37.3	513.2±20.1	316.1±13.9	178.2±12.5	56.7±3.4	41.3±0.3	23.4±1.4
	SHV	764.3±49.4	521.8±40.5	330.8±27.1	181.0±19.4	54.0±2.0	42.9±0.9	23.3±1.2
	SLV	809.0±45.0	545.0±34.6	345.8±22.3	198.0±14.4	56.6±0.8	43.8±0.7	24.5±0.7
	S · F <sup>2)</sup>	NS	NS	NS	NS	NS	A**	NS
Scapular	OHV	220.4±19.4 <sup>1)</sup>	155.4±11.6	87.3±5.8	40.5±3.2	46.4±1.9	40.2±1.8	18.5±0.5
	OLV	214.6±9.4	150.5±6.0	88.4±3.6	39.5±2.0	44.6±0.5	41.3±1.0	18.4±0.5
	SHV	215.0±14.6	149.6±10.8	88.6±6.6	41.3±4.1	46.2±1.3	41.1±0.7	19.0±0.8
	SLV	234.2±15.3	152.8±11.5	89.2±7.0	41.1±3.9	45.8±1.0	38.2±1.8	17.5±1.0
	S · F <sup>2)</sup>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4thvertebra	OHV	286.6±33.7 <sup>1)</sup>	156.5±15.7	77.2±8.2	35.4±3.9	45.9±0.7	27.3±1.0	12.5±0.6
	OLV	339.5±23.4	196.2±11.8	94.9±7.1	44.9±3.7	47.2±0.7	27.9±0.3	13.2±0.2
	SHV	315.3±19.4	180.1±12.4	91.0±7.6	41.4±4.1	45.1±0.8	28.8±1.6	13.0±0.9
	SLV	311.9±28.3	179.1±19.4	93.8±9.6	43.2±4.9	45.7±0.9	29.8±0.9	13.6±0.5
	S · F <sup>2)</sup>	NS	NS	NS	NS	NS	A*	NS

1) Mean±S.E. 2) Significant Factor

A : Effect of ovariectomy was significant by F-test at \*α=0.1, \*\*α=0.05

NS : Not significant at α=0.05 level by F-test

**Table 6.** Effect of estrogen injection and dietary protein level on Ca metabolism in ovariectomized rats

	Ca intake (mg/day)	Fecal Ca (mg/day)	Urinary Ca (mg/day)	Apparant Ca absorption (%)	Ca balance (mg/day)
OHE	40.48±4.87 <sup>1)</sup>	14.89±3.14	0.71±0.18	62.05±7.80	24.88±4.45
OLE	50.68±3.97	14.28±3.58	0.58±0.10	71.71±6.34	35.82±4.72
OHV	34.69±3.64	22.90±5.08	0.49±0.15	34.82±10.50	11.31±4.31
OLV	42.46±3.28	24.77±3.10	0.46±0.03	42.02±5.47	17.24±2.42
S · F <sup>2)</sup>	D	C	NS	C	C D

1) Mean±S.E. 2) Significant Factor

C : Effect of Estrogen was significant at α=0.05 level by F-test

D : Effect of dietary protein level was significant at α=0.05 level by F-test after estrogen injection

NS : Not significant at α=0.05 level by F-test

OHE : ovariectomized, 40% casein diet fed, estrogen injected

OLE : ovariectomized, 10% casein diet fed, estrogen injected

OHV : ovariectomized, 40% casein diet fed, vehicle injected

OLV : ovariectomized, 10% casein diet fed, vehicle injected

**Table 7.** Effect of estrogen injection and dietary protein level on serum alkaline phosphatase, PTH and estrogen level and urinary hydroxyproline excretion in ovariectomized rats

	Alkaline phosphatase(K-A)	PTH(pg/ml)	ESTROGEN(pg/ml)	Urinary hydrpxyproline(μg/100ml)
OHE	14.13 ± 2.82 <sup>1)</sup>	45.62 ± 6.79	212.7 ± 23.8	128.27 ± 5.37
OLE	15.44 ± 2.08	55.07 ± 7.32	291.6 ± 25.8	98.86 ± 3.08
OHV	28.65 ± 6.44	52.00 ± 3.23	31.5 ± 2.7	200.68 ± 9.23
OLV	19.00 ± 1.55	63.78 ± 2.39	34.5 ± 4.4	132.92 ± 8.17
S · F <sup>2)</sup>	C	D	C D CD	C D CD

1) Mean ± S.E. 2) Significant Factor

C : Effect of ovariectomy was significant at α=0.05 level by F-test

D : Effect of dietary protein level was significant at α=0.05 level by F-test

CD : Interaction between A&B was significant at α=0.05 level by F-test

NS : Not significant at α=0.05 level by F-test

**Table 8.** Effect of estrogen injection on GFR and Urinary protein in ovariectomized rats

	Urine Cr (mg/day)	Ccr(=GFR) (ml/min)	Urinary protein (mg/day)
OHE	4.57 ± 0.79 <sup>1)</sup>	0.13 ± 0.05	11.43 ± 3.08
OLE	5.06 ± 0.64	0.19 ± 0.07	8.69 ± 2.66
OHV	5.70 ± 0.72	0.14 ± 0.04	9.30 ± 3.97
OLV	7.12 ± 1.17	0.17 ± 0.04	4.79 ± 1.51
S · F <sup>2)</sup>	NS	NS	NS

1) Mean ± S.E.

2) Significant Factor

NS : Not significant at α=0.05 level by F-test

vehicle군보다 낮았으나 식이 단백질 수준에 의한 영향이 없었다(Table 7). 혈청 PTH수준은 estrogen투여에 의한 유의적인 차이는 없었으나 estrogen투여군에서 13% 정도 낮은 경향을 보였고, 식이에 의한 영향으로 저단백군에서 높았다. 혈청 estrogen 수준은 estrogen을 투여함에 따라 증가하였고, 저단백군이 고단백군보다 높았다. 뇨 hydroxyproline 함량은 estrogen의 영향을 받아 estrogen 투여군(OHE, OLE)에서 감소하였고, 저단백군에서 감소하여서 저단백-estrogen투여군(OLE)이 가장 낮은 값을 보였다(Table 7).

### 2) 신장기능

뇨 creatinine 배설량은 estrogen을 투여했을 때 감소하는 경향을 볼 수 있었으나 유의적인 차이는 없었고 식이에 의한 영향은 없었다(Table 8). 사구체 여과율도 estrogen 투여에 의한 변화가 없었고 식이의 영향도 없었다. 뇨단백질 배설량은 각군간에 차이가 없었으나 estrogen 투여군에서 높은 경향을 보였다

(Table 8).

### 3) 골격의 무게 및 무기질 함량

대퇴골, 견갑골, 4번째 척추뼈의 무게와 무기질 함량도 estrogen투여에 의하여 영향 받지 않았으며 식이 단백질 수준에 의한 변화도 없었다(Table 9). 다만 대퇴골의 골격 무게에 대한 회분 함량은 estrogen을 투여함에 따라 높아져서 vehicle군에 비하여 유의적인 차이를 보였고 또한 고단백군에서 높았는데 이러한 단백질의 영향은 estrogen을 투여 받았을 때 더욱 현저하였다. 본 연구에서 조사한 여러가지 골격의 구성 성분이 estrogen 투여에 의하여 유의적인 차이를 보이고 있지 않으나 대퇴골과 4번째 척추뼈에서는 다소 estrogen의 영향을 관찰할 수 있었다고 보겠다. 대퇴골과 4번째 척추뼈의 회분함량, Ca함량, 회분의 Ca 비율, 골격의 회분 비율등은 5~8% 정도의 증가를 볼 수 있었으나 견갑골에서는 전혀 차이를 발견할 수 없었다(Table 9).

### 고찰 및 결론

본 연구는 폐경 후 여성이 estrogen을 복용했을 때 골격대사에 미치는 효과가 식이 단백질 수준에 의해 영향을 받는지를 살펴보고자 난소를 절제한 흰쥐를 사용하여 estrogen과 식이 단백질 수준이 Ca 및 골격 대사에 미치는 영향을 알아 보았다. 여성의 혈청 estrogen수준은 주기에 따라 61~394pg/ml의 범위에 있고 폐경이 되면 40pg/ml이하가 된다<sup>16)</sup>. 흰쥐를 난소를 절제하면 estrogen 수준이 저하되다가 estradiol을

**Table 9.** Effect of estrogen injection and dietary protein level on bone composition in ovariectomized rats

		Wet Wt (mg)	Dried Wt (mg)	Ash (mg)	Ca (mg)	Ca/ash ratio(%)	ash/wt ratio(%)	Ca/wt ratio(%)
Femur	OHE	745.2± 37.6 <sup>1)</sup>	519.3± 21.4	333.9± 12.3	183.7± 7.8	55.0± 0.5	45.1± 0.7	24.7± 0.4
	OLE	810.7± 48.1	544.6± 38.0	342.2± 20.7	192.4± 11.9	56.3± 1.4	42.2± 0.9	23.8± 0.9
	OHV	763.9± 43.4	511.1± 30.2	318.6± 19.4	179.1± 11.9	56.1± 0.4	41.8± 0.6	23.4± 0.4
	OLV	767.8± 37.3	513.2± 20.1	316.1± 13.9	178.2± 12.5	56.7± 3.4	41.3± 0.3	23.4± 1.4
	S · F <sup>2)</sup>	NS	NS	NS	NS	NS	C D	NS
Scapular	OHE	209.6± 12.1 <sup>1)</sup>	147.3± 6.5	85.5± 3.6	38.7± 1.8	45.3± 0.8	41.0± 1.3	18.6± 0.5
	OLE	217.5± 10.7	152.0± 11.1	92.2± 7.7	41.6± 3.3	45.3± 0.9	42.1± 1.7	19.0± 0.7
	OHV	220.4± 19.4	155.4± 11.6	87.3± 5.8	40.5± 3.2	46.4± 1.9	40.2± 1.8	18.5± 0.5
	OLV	214.6± 9.4	150.5± 6.0	88.4± 3.6	39.5± 2.0	44.6± 0.5	41.3± 1.0	18.4± 0.5
	S · F <sup>2)</sup>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
4thvertebra	OHE	310.9± 26.5 <sup>1)</sup>	183.5± 12.1	98.5± 7.5	41.6± 6.5	42.0± 5.3	32.1± 2.0	14.3± 0.5
	OLE	317.5± 30.4	177.6± 20.5	88.3± 9.8	42.2± 5.4	47.4± 0.8	27.8± 1.2	13.2± 0.7
	OHV	286.6± 33.7	156.5± 15.7	77.2± 8.2	35.4± 3.9	45.9± 0.7	27.3± 1.0	12.5± 0.6
	OLV	339.5± 23.4	196.2± 11.8	94.9± 7.1	44.9± 3.7	47.2± 0.7	27.9± 0.3	13.2± 0.2
	S · F <sup>2)</sup>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

1) Mean±S.E. 2) Significant Factor

C : Effect of ovariectomy was significant at α=0.05 level by F-test

D : Effect of dietary protein level was significant at α=0.05 level by F-test

NS : Not significant at α=0.05 level by F-test

투여하면 증가한다고 Wronski<sup>25)</sup>는 보고하였다. 본 실험에서도 혈청 estrogen 수준은 난소 절제군에서 현저하게 감소하였다가 estrogen을 투여함에 따라 뚜렷하게 증가하여 Wronski의 보고와 같은 결과를 보이고 있으며, 또한 폐경 전 후의 여성에게서 보이는 값과 같은 양상을 보였으므로 본 연구에서 사용한 흰쥐 모델이 폐경후 여성에서 estrogen 복용 효과를 관찰하기에 적합하다고 사료된다.

난소 절제와 식이 단백질 수준은 Ca 대사에 영향을 미친다고 보고되고 있다<sup>26)</sup>. 본 연구에서는 뇨 Ca 배설량이 고단백군에서 높았으나 Ca흡수율에는 유의적 차이가 없었으므로 뇨 Ca배설량 증가가 소장내 Ca 흡수 증가에 의한 것은 아님을 알수있다. 그러나 난소절제 쥐에게 estrogen을 투여하면 뇨 Ca 배설량이 감소하고 흡수율이 증가하였다. 이는 폐경후 여성의 Ca 흡수율이 감소하는데 estrogen을 복용함에 따라 fractional Ca absorption이 증가하였다는 Gallagher<sup>27)</sup>의 보고와 일치하며 Ca의 흡수는 estrogen 상태에 영향 받음을 알수 있다.

본 연구에서 뇨 Ca배설량은 난소절제군에서 높지

않았으며 estrogen 투여에 의하여 감소하지도 않았다. 이는 난소 절제에 의해 뇨 Ca 배설량이 증가하고<sup>26)</sup> estrogen을 투여하면 hypercalciuria 현상을 완화시킨다는 보고와는<sup>28)</sup> 일치하지 않았다. 본 연구에서는 신장 기능이 난소 절제와 estrogen 투여에 의해 영향을 받지 않았으므로 뇨 Ca 배설량에 차이가 없었던 것으로 생각된다.

골재흡수의 지표로 측정된 뇨 hydroxyproline 배설량은 난소를 절제 했을 때 증가하였다. 그러나 estrogen을 투여하였을 때 감소하였다. 그러므로 골재 흡수는 estrogen이 부족하면 촉진됨을 시사하였다. 난소절제시 뇨 hydroxyproline의 증가는 조성연 등<sup>9)</sup>의 연구에서도 보고된 바 있다. 그러나 혈청 PTH수준은 난소 절제에 의한 영향을 받지 않았으므로 난소절제군에서 나타난 뇨 hydroxyproline 배설량의 증가는 PTH에 의한 영향은 아닌것으로 생각된다. 난소를 절제한 쥐에게 estrogen을 투여했을 때 PTH의 수준에 유의적인 차이는 없었으나 13% 정도 낮은 값을 보였고 또한 estrogen 농도가 증가하였다. 그러므로 PTH와 estrogen의 상호 작용에 의하여 난소를



절제한 쥐에게 estrogen을 투여하면 골재흡수가 감소하는 것이라고 사료된다. 이러한 estrogen 투여의 영향은 식이 단백질 수준에 따라 달라서 저단백식이 공급함과 동시에 estrogen을 투여해 줄때 노 hydroxyproline 배설량이 감소됨을 알수있다. 그러므로 난소절제한 흰쥐의 증가된 골재흡수는 estrogen에 의해서 완화될 수 있고 이러한 영향은 저단백군에서 그 효과가 더욱 뚜렷하였다.

골격형성의 지표로 사용될 수 있는 혈청 alkaline phosphatase는 여러 연구에서 난소 절제군에서 높다고 보고<sup>17)</sup>되는 바와 같이 본 연구에서도 유의적 차이는 없었지만 난소 절제군이 높은 경향을 보였으며, estrogen투여에 의해 감소하였다. 그러므로 estrogen 투여가 골격 형성을 촉진하지는 않는 것으로 보인다.

이러한 변화의 원인이 신장 기능의 변화에 기인하는가를 알아보기 위하여 사구체여과율과 노단백질 배설량을 측정하였다. 사구체 여과율은 본 실험 결과 난소 절제와 식이 단백질 수준의 영향을 받지 않았으며 estrogen 투여 후에도 변화가 없었다. 이는 난소 절제를 했을 때 GFR이 대조군에 비해 50% 증가하였다가 estrogen을 투여한 후에 감소하였다는 보고와는 다른 결과를 나타냈다<sup>17)</sup>. 그러므로 본 연구에서는 난소절제군의 사구체 여과율이 증가하지 않았으므로 노 Ca 증가도 없었던 것으로 보인다.

또한 고단백식이로 사육했을 때 사구체 여과율이 증가하는 것이 관찰되었던 선행 연구<sup>29)</sup>와도 다른 결과를 보이고 있는데 선행 연구는 6개월에 걸친 연구였으므로 8주간의 실험기간은 이 변화를 보기에는 부족한 것으로 추측되며 기간이 더 연장된다면 아마도 estrogen 투여에 의한 효과도 나타날 것으로 사료된다. 그러므로 본 연구에서 나타난 노 Ca이나 hydroxyproline 배설량의 변화는 사구체 여과율의 증가에 기인하는 것이 아님을 알수 있다.

단백뇨는 신장 기능 퇴화의 지표로 사용되는데 나이가 증가함에 따라 나타나고 여러가지 요인의 영향을 받는다<sup>30)</sup>. 본 실험에서도 노 중 단백질 배설량이 고단백군에서 증가하여서(P<0.1) 고단백식이 신장 기능의 퇴화를 촉진하였고 이것이 노 Ca 배설량 증가의 부분적인 원인으로 사료된다. 그러나 이러한 노 Ca과 hydroxyproline 배설량의 증가는 골격의 무게나

구성 성분에는 비교적 영향을 미치지 않았다. 골격의 종류에 따라 다르기는 하지만 난소절제군의 골격량이 저조한 경향을 보였으며 estrogen을 투여해 주었을 때 이러한 영향이 완화됨을 볼 수 있었다. 본 연구에서 조사한 대퇴골, 견갑골, 4번째 척추뼈등 3가지 골격중 식이나 난소절제의 영향은 대퇴골에서 가장 현저하였다고 볼 수 있는데 대퇴골의 성분은 estrogen을 투여 하였을 때도 가장 민감한 반응을 보였다고 보겠다. 대퇴골의 골격무게에 대한 회분 함량비(ash/wt ratio)는 난소 절제군에서 유의적으로 낮았고 마른무게, 회분함량, Ca함량도 난소절제에 의하여 다소 낮아지는 경향을 보였다. 특히 이러한 경향은 난소를 절제하고 저단백 식이로 사육된 쥐(OLV)에서 현저하여 마른무게, 회분함량, Ca함량은 대조군-저단백 식이군(SLV)의 94%, 91%, 86.%에 달 하였다. 그러나 estrogen을 투여 하면 이 값들이 대조군과 같아졌다. 이와 비슷한 결과가 4번째 척추뼈에서도 나타났으나 견갑골에서는 이러한 경향을 찾아볼 수 없어 골격에 따라 받는 영향이 다를 수 있었다. 이러한 결과는 선행 연구에서도 같은 경향을 보이고 있다. 그러나 본 연구에서 전반적으로 3가지 골격의 무게나 구성 성분이 난소 절제와 식이 및 estrogen 투여에 의한 영향을 받지 않은 것은 실험 동물의 골격이 성장기에 있었기 때문이라고 생각된다. 실제로 난소 절제나 식이에 의한 영향을 시도한 다른 연구에서도 골격 구성 성분의 변화를 관찰하지 못한 경우가 많이 보고되고 있다<sup>31)</sup>. 6개월된 흰쥐를 난소 절제한 후 6개월간 관찰한 연구에서도 난소 절제에 의한 골격 무게에 변화가 없음이 보고되었다<sup>27)</sup>. 그러나 Wronski<sup>25)</sup>는 3개월된 암컷 흰쥐를 난소 절제 수술을 한 후 estrogen을 투여했을 때 trabecular bone volume이 증가하였다고 보고하였다. 3개월된 암컷 흰쥐를 난소 절제 후 estrogen을 투여하여 1년간 사육한 Cruess<sup>32)</sup>의 실험에서 3개월이 경과된 후부터 노 hydroxyproline 배설량, hexosamine 및 collagenolytic activity등이 감소한 것으로 미루어 8주의 실험 기간은 이러한 변화를 보기에는 짧은 것으로 생각되며, 적절한 estrogen 투여량에 대한 실험도 행해져야 할 것으로 사료된다.

결론적으로 폐경으로 인해 유발되는 골손실은 estrogen을 투여함으로써 완화시킬 수 있으며 이러한

estrogen투여의 효과는 식이 단백질의 영향을 받을 수 있었다. 따라서 폐경 전부터 저단백식을 하면서 폐경 직후 바로 estrogen을 투여한다면 폐경 후 일어나는 골손실을 완화 혹은 방지할 수 있을 것으로 본다. 또한 본 실험에서는 매일 계속되는 주사로 인한 stress때문에 골격 대사에 대한 estrogen투여 효과에 영향을 주었을 수도 있을 것으로 추측된다. 따라서 실험기간이 좀 더 연장되고, estrogen투여량과 주사 횟수를 적절히 한다면 estrogen을 투여함으로써 골격대사의 차이를 볼 수 있으리라 사료된다.

Literature cited

- 1) 김화영. 골다공증과 식이인자. *한국영양학회지* 27 : 636-645, 1994
- 2) 김숙희. 한국인의 Ca 영양과 골다공증. *한국영양학회지* 26 : 203-212, 1993
- 3) Chrischilles EA, Butler CD, Davis CS, Wallace RB. A model of lifetime osteoporosis impact. *Arch Intern Med* 151 : 2026-2032, 1991
- 4) 양승오 · 이병식 · 광철은 · 김성연 · 이명철 · 조보연 · 이홍규 · 고창순. 양광자 감마선 측정법을 이용한 한국인의 정상 골밀도치. *대한의학협회지* 32 : 634-640, 1989
- 5) 조수현. 폐경과 골다공증. *대한의학협회지* 35 : 587-598, 1993
- 6) 김혜경 · 윤진숙. 한국 노년기 여성의 골격 상태에 영향을 미치는 요인에 관한 연구. *한국영양학회지* 24 : 30-39, 1991
- 7) Einhorn TA, Lerine B, Michel P. Nutrition and bone. *Orthopedic Clin North Am* 21 : 43-50, 1990
- 8) 안주원 · 김화영. 나이가 다른 흰쥐에서 식이단백질 수준이 신장 기능 및 Ca 대사에 미치는 영향. *한국노화학회지* 3 : 39-44, 1993
- 9) 조성연 · 장영애 · 이현숙 · 김화영. 난소를 절제한 흰쥐에서 식이 단백질 수준이 체내 Ca 및 골격 대사에 미치는 영향. *한국영양학회지* 26(8) : 915-924, 1993
- 10) Yates JA, Oretto ROC, Mayor K & Mundy GR. Inhibition of bone resorption by inorganic phosphate is mediated by both reduced osteoclast formation and decreased activity of mature osteoclast. *J Bone Miner Res* 6 : 473-478, 1991
- 11) Calvo MS. Dietary phosphorus, calcium metabolism and bone. *J Nutr* 123 : 1627-1633, 1993
- 12) Hdund LR, Gallagher JC. The effect of age and menopause on one mineral density of the proximal femur. *J Bone Mineral Res* 4 : 639-642, 1989
- 13) Richelson LS, Wahner HW, Melton LJ III, Riggs BL. Relative contributions of aging and estrogen deficiency to postmenopausal bone loss. *N Engl J Med* 311 : 1273-1275, 1984
- 14) Lindsay R, Hart DM, Clark DM. The minimum effect dose of estrogen for prevention of postmenopausal bone loss. *Obstet Gynecol* 63 : 759, 1984
- 15) 김도형 · 김동규 · 이병석 · 박기현. 성선기능 부전증 환자에서 에스트로겐 증가가 Ca 대사에 미치는 영향. *대한산부인과학회지* 10 : 1410-1415, 1991
- 16) 이진용. 폐경의 치료. *대한의학협회지* 35 : 599-604, 1993
- 17) Morris HA, Porter SJ, Durbridge TC, Moore RJ, Need AG, Nordin BEC. Effect of oophorectomy on biochemical and variables in the rat. *Bone and Mineral* 18 : 133-142, 1992
- 18) 김소향. 식이단백질과 Ca 수준이 암컷 흰쥐의 체내 Ca 및 골격 대사에 미치는 영향. 이화여자대학교 석사학위논문. 서울 1992
- 19) 이정아 · 장영애 · 김화영. 나이가 다른 단계에서 식이단백질 수준이 흰쥐의 Ca 대사에 미치는 영향. *한국영양학회지* 25(7) : 569-577, 1992. 72, 1988
- 20) 이귀녕 · 김진규. 임상의학 서울, 의학출판사 P72, 1988
- 21) Oser B.L. Hawk's Physiological Chemistry. 4th edition New York, McGraw-Hill Book. pp.1040-1232, 1965
- 22) Lowry OH, Resebrough NJ, Farr AC, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265-275, 1951
- 23) Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. A quick and specific assay hydrpxyproline. *Anal Biochem* 55 : 288-291, 1973
- 24) Peterson GL. *Anal Biochem* 83 : 346-356, 1977
- 25) Wronski TJ, Cintron M, Doherty AL, and Dann LM. Estrogen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized Rats. *Endocrinology* 123 : 681-686, 1988
- 26) Nordin BEC, Need AG, Morris HA. Evidence for

난소절제 쥐에서 ESTROGEN 투여와 식이 단백질 수준과 CA 대사

- a renal calcium leak in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 72 : 401-407, 1991
- 27) Gallagher JC, Riggs BL, Della HF. Effect of estrogen on calcium absorption and serum vitamin D metabolites in postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endo Meta* 51 : 1359-1364, 1980
- 28) Yendt ER, Cohamin, Jarzylo S. Reduced glomerular filtration and a renal tubular calcium leak in women with primary osteoporosis. *J Bone Mineral Res* 4(suppl) : p253, 1989
- 29) 김정희. 고·저 단백질 식이로 사육하면서 난소절제를 한 흰쥐의 체내 Ca 및 골격대사에 관한 연구. 이화여자대학교 석사학위논문, 서울 1993
- 30) Hoster TH, Meyer TW, Rennke HG, Brenner BM. Chronic effects of dietary protein in the rat with intact and reduced renal mass. *Kidney Int* 30 : 509-517, 1986
- 31) Ismail F, Epstein S, Fallon MD. Serum bone Gla protein and the Vitamin D endocrine system in the oophorectomized rats. *Endocrinology* 122 : 624-630, 1988
- 32) CRUESS RL and HONG KC. The effect of long term estrogen administration on bone metabolism in the female rat. *Endocrinology* 104 : 1188-1193, 1979