

성장기 동안 고칼슘 식이를 섭취한 흰쥐의 골격대사에 난소절제 및 칼슘 섭취 수준이 미치는 영향*

김은미** · 이연숙 · 장유경**

서울대학교 생활과학대학 식품영양학과, 한양대학교 생활과학대학 식품영양학과**

Effect of Ovariectomy and Dietary Calcium Levels on Bone Metabolism in Rats Fed High Calcium Diet during the Growth Period

Kim, Eun Mi** · Lee, Yeon Sook · Chang, Yu Kyung**

Department of Food and Nutrition, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Department of Food and Nutrition, ** Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

ABSTRACT

This study explored the effects of dietary calcium levels and/or ovariectomy on bone formation, bone composition and calcium metabolism using female Sprague-Dawley weanling rats(mean body weight \pm SEM : 232.3 \pm 6.7g) as a model. Rats received high(1.5%) calcium diets for eight weeks during the growth period and were randomly assigned to ovariectomy and sham groups. The two groups were then each randomly divided into three sub-groups and fed 0.1%, 0.5% and 1.5% calcium diets for eight weeks after operation. The results indicate that body weight gain was higher in ovariectomy groups than sham groups regardless of dietary calcium levels and food intakes. Serum Ca concentration was decreased in low Ca groups after operation and serum P concentration increased in ovariectomy groups. Serum alkaline phosphatase activity was increased in ovariectomy groups and was not influenced by dietary calcium levels after operation. Urinary hydroxyproline decreased in high Ca intake groups regardless of whether rats had received an ovariectomy or not. The weight, length and breaking force of the femur were not significantly different in all groups. Ash, calcium, phosphate and magnesium contents in the femur and lumbar were not significantly different regardless of ovariectomy operation and dietary calcium levels. But high/normal calcium intake after ovariectomy and sham operation increased the weight and calcium content in bone. Therefore, high calcium intake influenced the formation of peak bone mass during the growth period and calcium levels and calcium levels continued to influence bone growth and composition after ovariectomy. (*Korean J Nutrition* 32(2) : 150~157, 1999)

KEY WORDS : bone mass · calcium intake · ovariectomy · femur · lumbar.

서 론

골다공증의 예방에 있어서 가장 중요한 요인으로는 최대 골질량을 들고 있다. 최대골질량은 주로 성장기에 형성되며, 유전, 칼슘섭취량, 운동 등 여러 요인에 의해서 영향을 받는다.¹⁾ 그 중 칼슘 섭취량은 주로 골질량 형성에 크게 영향을 미치며, 골질량 손실에 대한 영향은 아직 논란의 여지를 남기고 있다.²⁾ 골질량 형성에 대한 칼슘의 섭취 효과가 특히 사춘기 이전에 더욱 현저하다는 보고도 있다.³⁾ 성장기 동안에 충분한 칼슘 섭취에 따라 최대골질량이 형성되었을

경우 골절이 예방될 수 있다는 견해⁴⁾에서도 충분한 칼슘 섭취가 일생동안 지속되어야 함이 강조되고 있다. 동물실험의 경우⁵⁻⁷⁾ 골다공증 모델 흰쥐에서 칼슘 섭취 수준에 따라 골질량은 크게 영향을 받았다.

이와 같이 골격질환의 예방과 치료에 칼슘 보충이 중요하다고 인식되는 시점에서 성장기 동안의 고칼슘 섭취에 의한 골질량 증가시 폐경 또는 칼슘섭취량의 변동이 골질량 및 골격대사에 어떤 영향을 미칠 것인가에 대한 규명은 매우 중요한 과제라고 본다. 따라서 본 연구에서는 선행연구⁸⁾를 토대로 요구량의 3배인 1.5%의 고칼슘 식이를 성장기 동안 급여함으로써 높은 골질량을 확보할 경우, 난소절제와 칼슘 섭취 수준(0.1%, 0.5%, 1.5%)을 달리했을 때 노화와 폐경으로 인한 골격손실에 대한 보호효과를 규명하고자 하였다.

채택일 : 1998년 12월 24일

*This research was supported by grants(941-0600-022-2) from Korea Science and Engineering Foundation.

재료 및 방법

1. 실험설계

1) 동물사육

갓 이유한 3주령의 암컷 흰쥐(Sprague-Dawley rats, female : 서울대학교 실험동물 사육장) 60마리에게 8주 동안 고칼슘(1.5%) 식이를 급여한 후 6마리를 먼저 희생하였으며(control group), 나머지는 1군당 9마리씩 6군으로 나누어 sodium pentobarbital(30~50mg/kg BW)로 마취한 후 3군은 양쪽 난소를 절제하는 수술(ovariectomy group : OVX)을 하였고, 나머지 3군은 동일한 수술 절차를 받았으나 난소를 절제하지 않았다(sham-operation group : SHAM). OVX 및 SHAM 수술 흰쥐들에게 각각 칼슘함량을 달리한 3종류의 실험식이, 저(0.1%), 정상(0.5%), 고(1.5%)칼슘 식이를 8주간 더 급여하였다. 즉, 6실험군은 ① OVX-High Ca(OH), ② OVX-Medium Ca(OM), ③ OVX-Low Ca(OL), ④ SHAM-High Ca(SH), ⑤ SHAM-Medium Ca(SM), ⑥ SHAM-Low Ca(SL)으로 구성되었다.

실험동물들은 Shoe-Box cage에서 분리 사육하였으며 사육실의 환경은 일정하게 유지하였다(온도 : 22±2℃, 상대습도 : 65±5%, 조명 : AM6 : 00~PM 6 : 00). 실험식이와 탈이온수는 완전 자유급식(ad libitum) 형태로 공급하였으며, 대사 cage와 사육에 필요한 모든 기구는 무기질의 오염을 방지하기 위해 0.4% EDTA로 씻은 후 증류수로 행구어 사용하였다. 실험기간 동안의 식이 섭취량과 체중은 1주일에 2번 일정시간에 측정하였다.

2) 실험식이

실험에 사용된 식이조성은 AIN-76을 기본으로 한 정제식이(semi-furified diet)로 조제되었으며 일반 조성은 Table 1과 같다. 실험식이의 원료로 정제된 카제인(casein : 매일유업(주)), 옥수수 전분(미원식품(주)), 옥수수 기름(동방유량(주))과 비타민 혼합물(AIN-76 pattern : Oriental 효모공업(주), Japan)을 사용하였으며, 칼슘과 인을 제외한 무기질 혼합물(AIN-76)을 조제하여 사용하였다. 식이 중 칼슘 급원으로는 CaHPO₄·2H₂O와 CaCO₃를 사용하였으며, 칼슘 함량은 흰쥐의 사양표준(AIN-76)을 기준으로 0.1%, 0.5%, 1.5%의 세 수준으로 하였다. 식이 칼슘과 인의 함량 비율은 약 1.25 : 1로, 저칼슘 식이에서는 인의 결핍을 배제하기 위해 인의 함량을 0.4%로 하였으며, 고칼슘 식이에서는 0.8%로 하였다.⁹⁾

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

Ingredient	Low(0.1%)	Normal(0.5%)	High(1.5%)
Casein	200	200	200
Methionine	3	3	3
Corn starch	581.06	574.9	541.94
Cellulose	50	50	50
Corn oil	100	100	100
Min. mix. ¹⁾	35	35	35
Vit. mix ²⁾	10	10	10
Choline chloride	2	2	2
CaHPO ₄ · 2H ₂ O	1.72	12.02	37.74
CaCO ₃	1	5	15
KH ₂ PO ₄	16.22	8.08	5.32

1) AIN-76(Ca & P free)

2) AIN-76

2. 시료수집 및 분석방법

1) 시료수집

실험동물은 식이섭취 조건을 일정하게 하기 위하여 희생 시키기전 하룻밤 절식시킨 후, ethyl ether로 마취한 후 경동맥혈을 채취하였다. 채취한 혈액은 냉장고(4℃)에서 하룻밤 동안 방치한 후 3000rpm에서 20분간 원심분리(Sorvall, GLC-2B)하여 혈청을 얻었으며 분석 전까지 냉동 보관하였다.

혈액 채취 후 즉시 대퇴골 및 요추(L1~L4)를 각각 적출하였다. 요추의 경우는 8주간의 Control군을 제외한 실험군에서만 적출하였다. 대퇴골과 요추는 뼈조직에 부착되어 있던 근육, 지방, 인대 등을 전부 제거하였으며, 요추의 경우는 척수도 제거하였다. 습중량을 측정하고, 길이는 vernier caliper에 의해 대전자(greater trochanter)와 내측과(medial condyle) 사이를 측정하였으며, 길이의 1/2되는 지점의 둘레를 측정하였다. 뼈의 과단력을 측정 한 후 냉동건조(Freeze-Dryer 18, Labconco)하여 건중량을 측정 한 다음 모든 시료는 분석 전까지 냉동 보관하였다. 칼슘, 마그네슘, 총지질과 총단백질의 함량은 양쪽 뼈의 평균값으로 제시하였다.

2) 시료분석

혈액 칼슘은 원자흡광광도계(Atomic absorption spectrometer : Hitachi Z-6000, 422.7nm)로 측정하였다.

뼈형성(bone formation)과 관련이 깊은 것으로 알려져 있는 alkaline phosphatase(Alpase) 활성은 Kind King의 비색법을 이용한 Kit(영동제약)를 사용하여 측정하였다. 혈액중의 estrogen 함량은 RSL total estrogen kit(ICN Biomedicals, Inc.)에 의해 unconjugated 17β-estradiol과 estrone의 농도를 측정하였다.

노의 Hydroxyproline 함량은 Bergman과 Loxley의 방법¹⁰⁾(spectrophometer : 559nm)으로 비색 정량하였다.

대퇴골과 요추는 550~600°C회화로에서 6~8시간 회화하여 얻은 회분을 1N HCl 용액으로 용해한 후 LaCl₂의 최종 농도가 1%가 되도록 희석하여 원자흡광광도계로 칼슘과 마그네슘(285.2nm) 함량을 측정하였다. 인의 함량은 1% LaCl₂ 대신 이온제거수로 희석하여 Fisk-Subbarow Method¹¹⁾로 측정하였다. 총단백질의 함량은 자동질소분석기(Nitrogen Autoanalyzer, Bchi, Swiss)를 이용하여 측정하였으며, 총지질 함량은 Folch의 방법¹²⁾으로 측정하였다.

대퇴골의 파단력(breaking force)은 Instron(Tensilon/UTM-4-100, TOYO BALDWIN Co.LTD : Crosshead speed 10mm/min, Loadcell 100kg)에 의해 길이의 중심부위에서 일정하게 측정하였다.

3) 통계분석

실험결과는 평균과 표준오차로 나타내었으며, 각 군들간의 유의적 차이(a=0.05)에 대한 검증, 수술 후 칼슘섭취에 따른 효과의 검증과 수술 전 섭취한 식이에 의한 효과는 Tukey's multiple comparision test를 실시하였다.

난소절제 유무와 칼슘 섭취 수준에 따른 영향을 보기 위해 ANOVA(analysis of variance)를 사용하여 유의성 여부를 검증하였다.

칼슘 섭취량, estrogen농도, 골격대사와 대퇴골과 요추의 뼈조직 형태, 뼈의 성장, 무기질 및 유기질 함량과의 상관관계는 Pearson correlation coefficient를 이용하여 분석하였다.

성장기 동안 저칼슘을 섭취한 선행결과¹³⁾와 본 실험의 결과는 3-way ANOVA에 의해 유의차를 검증하였다.¹⁴⁾

결과 및 고찰

1. 체중증가량과 식이섭취량

성장기 8주 동안 1.5% 칼슘을 함유한 실험식이를 섭취한 후(control), 난소절제(OVX) 또는 절제하지 않은 수술(SHAM)을 받고 칼슘 섭취 수준이 다른 3종의 실험식이를 8주간 섭취한 흰쥐의 체중 변화와 식이섭취량은 Table 2와 같다. 모든 실험군에서 성장기(control)에 비해 체중증가율은 감소되었다. 체중 변화를 보면 칼슘 섭취량에 상관없이 난소절제에 의해서 유의적으로 증가하였는데 이것은 다른 연구¹⁵⁾¹⁶⁾에서와 같이 식이섭취량이나 칼슘 섭취수준 또는 골질량과 관계없이 난소절제로 인한 estrogen 감소로 체중

이 증가하였다고 볼 수 있다.

또한 식이섭취량은 칼슘 섭취 수준과 난소절제 유무에 따라서 차이가 없었다.

2. 골격대사와 관련인자

1) 혈중 칼슘, estrogen농도 및 alkaline phosphatase활성
혈청의 칼슘, estrogen농도 및 alkaline phosphatase (Alpase)활성은 Table 3과 같다.

혈청 칼슘 농도는 난소절제에 관계없이 저칼슘을 섭취한 군(SL, OL군)에서 유의적으로 낮았다.

Estrogen 농도는 난소절제에 따라 유의적으로 감소효과를 나타냈으며, 칼슘 섭취 수준에 따라서는 영향을 받지 않았다.

Alpase 활성은 성장기(control)에 비해 그 이후의 칼슘 섭취 수준에 관계없이 감소되었으며, 난소 절제시에는 SHAM

Table 2. Body weight, weight gain, food intake and food efficiency ratio

Group ¹⁾	Final weight g	Weight g/d	Food intake g/d	FER
Control	229.7±9.7	2.7±0.1	10.9±2.0	0.28±0.05
OH	307.0±21.5 ^{2)ab3)}	1.3±0.6 ^{bc}	14.5±0.9 ^{NS}	0.08±0.02 ^{ab}
OM	335.8±12.5 ^b	1.8±0.2 ^c	15.5±0.6	0.12±0.01 ^b
OL	329.8±14.5 ^b	1.7±0.2 ^c	15.2±0.7	0.10±0.01 ^{ab}
SH	257.1±9.6 ^a	0.5±0.1 ^a	14.8±0.3	0.04±0.01 ^a
SM	282.8±8.0 ^{ab}	0.8±0.1 ^{ab}	14.9±0.6	0.05±0.01 ^a
SL	246.0±17.9 ^a	0.6±0.1 ^a	14.8±0.9	0.05±0.02 ^a
OVX ⁴⁾	**	**	NS	**
Ca	NS	NS	NS	NS
OVX*Ca	NS	NS	NS	NS

1) Control : 1.5% Ca diet for 8 weeks during growing period
OH : 1.5% Ca diet for 8weeks+ovariectomy+1.5% Ca diet for 8weeks after ovariectomy

OM : 1.5% Ca diet for 8weeks+ovariectomy+0.5% Ca diet for 8weeks after ovariectomy

OL : 1.5% Ca diet for 8weeks+ovariectomy+0.1% Ca diet for 8weeks after ovariectomy

SH : 1.5% Ca diet for 8weeks+sham operation+1.5% Ca diet for 8weeks after sham operation

SM : 1.5% Ca diet for 8weeks+sham operation+0.5% Ca diet for 8weeks after sham operation

SL : 1.5% Ca diet for 8weeks+sham operation+0.1% Ca diet for 8weeks after sham operation

2) Mean±SEM of 8 rats per group

3) Values with different superscript within the column are significantly different at p<0.05 by Tukey's multiple range test(NS : not significant)

4) Statistical significance was evaluated at the a=0.05 level by 2-way analysis of variance

(*p<0.05, **p<0.01, NS : not significant)

OVX : Main effect of ovariectomy

Ca : Main effect of Ca level after ovariectomy

OVX*Ca : Interaction between ovariectomy and Ca level

군보다 높았다. 또한 성장기 동안 저칼슘을 섭취한 선행실험¹³⁾(11.50±1.06 KA unit)보다도 낮았다. Tobias등¹⁷⁾은 3개월된 숫쥐에게 17일 동안 estrogen을 주사한 결과 Al-pase활성이 증가하였다고 하였는데, 그것은 조골세포(osteoblast)활성을 증가시키는 bone isoenzyme의 분비를 자극하기 위해 증가된 것으로 보인다. 그러나 본 실험과 일치하지 않는 것은 고칼슘 섭취의 식이기간 및 동물의 적응능력의 차이 때문으로 생각된다.

2) 뇨중 hydroxyproline배설량

Hydroxyproline(OHPr) 배설량은 Table 3과 같이 난소절제에 따른 차이는 없었으나 고칼슘 섭취군이 정상이나 저칼슘군보다 감소하였으며, 성장기 동안 저칼슘을 섭취한 실험¹³⁾(119.8±8.6µg/dl)보다 감소하였다. 이로 보아 고칼슘 섭취에 따라 골격의 bone turnover가 떨어지는 것으로

생각된다.

3. 골격성장

1) 대퇴골의 중량, 길이 및 파단력

대퇴골의 중량, 길이 및 파단력은 Table 4와 같다. 대퇴골의 습중량과 건중량 및 길이는 성장기(control)에 비해 그 후 모든 군에서 증가하였으며 난소절제 유무와 칼슘 섭취 수준에 따라 유의적인 차이가 없었다. 체중 100g당 뼈중량을 보면 난소 절제시 감소하였고 특히 저칼슘 섭취군에서 난소 절제에 따른 효과가 더 크게 나타났다. 성장기 동안 고칼슘 섭취한 Control의 경우는 같은 기간 동안 저칼슘을 섭취한 선행 실험결과(731.3±20.8mg)¹³⁾보다 뼈의 습중량이 증가하는 경향을 보였다.

길이는 칼슘 섭취 수준이나 난소절제 유무에 의한 유의적

Table 3. Serum calcium, phosphate, estrogen concentration and alkaline phosphatase activity and urinary hydroxyproline excretion

Group	Serum			Urine
	Ca mg/dl	Estrogen pg/ml	Alpase KA unit	OHPr mg/d
Control	7.25±0.07	113.2± 1.9	9.71±1.69	52.7±10.1
OH	8.93±0.16 ^{1)ab2)}	69.1± 7.8 ^{ab}	5.69±0.60 ^{abc}	55.9±3.9 ^{NS}
OM	8.81±0.20 ^b	48.0±16.3 ^a	6.60±0.41 ^{bc}	72.8±4.7
OL	6.77±0.31 ^a	52.8± 4.1 ^a	7.40±0.53 ^c	80.8±7.1
SH	8.86±0.21 ^b	102.2± 4.6 ^{ab}	3.63±0.45 ^a	55.7±8.4
SM	8.89±0.30 ^b	96.9± 5.7 ^{ab}	4.54±0.86 ^{ab}	75.9±6.7
SL	7.61±0.21 ^a	120.9±27.4 ^b	4.61±0.80 ^{ab}	60.2±4.9
OVX ³⁾	NS	**	**	NS
Ca	**	NS	NS	*
OVX*Ca	NS	NS	NS	NS

1) Mean±SEM of 8 rats per group

2) Values with different superscript within the column are significantly different at p<0.05 by Tukey's multiple range test(NS : not significant)

3) Statistical significance was evaluated at the a=0.05 level by 2-way analysis of variance(*p<0.05, **p<0.01, NS : not significant)

OVX : Main effect of ovariectomy

Ca : Main effect of Ca level after ovariectomy

OVX*Ca : Interaction between ovariectomy and Ca level

Table 4. Wet and dry weight, length and breaking force of femur

Group	Wet weight ²⁾	Dry weight ³⁾	Wet wt/BW	Length ⁴⁾	Breaking force ⁵⁾
	mg	mg	mg/100g	mm	kg
Control	694.4±28.5	456.7±19.6	302.9± 7.6	33.4±0.4	10.2±0.1
OH	773.8±10.9 ^{1)NS2)}	519.5±12.9 ^{NS}	266.4±13.5 ^{ab}	35.7±0.7 ^{NS}	10.7±0.2 ^{NS}
OM	770.4±17.9	521.5± 8.4	234.9± 3.5 ^a	36.6±0.4	10.6±0.1
OL	762.3±19.1	515.9±12.2	244.9±11.6 ^a	36.6±0.4	10.5±0.2
SH	777.6±17.5	534.0±14.2	304.3±8.2 ^b	35.6±0.3	10.7±0.1
SM	778.4±14.3	522.8±14.8	276.4±7.4 ^{ab}	36.1±0.3	10.6±0.2
SL	721.4±22.0	489.8±22.8	310.4±17.7 ^b	35.6±0.6	10.4±0.1

1) Mean±SEM of 8 rats per group

2) Values with different superscript within the column are significantly different at p<0.05 by Tukey's multiple range test(NS : not significant)

3) Mean weight of left and right femur

4) Mean length of left and right femur

5) Mean breaking force of left and right femur

인 차이는 없었으며, 성장기 동안 저칼슘을 섭취한 실험결과(35.8±2.4mm)¹³⁾와의 차이도 없었다.

과단력은 칼슘 섭취 수준이나 난소절제 유무에 의한 유의적인 차이가 없었으나, 성장기 동안 저칼슘을 섭취한 실험결과(8.83±0.26kg)¹³⁾에 비하면 증가하였다.

이와 같이 성장기 동안 고칼슘을 섭취한 8주(control)의 뼈 중량이 성장기 동안 저칼슘을 섭취한 8주(control)의 뼈 중량보다 150mg 정도 증가하였고, 난소절제 후 8주째인 16주의 뼈 중량, 과단력이 저칼슘을 섭취하였을 때보다 증가하였다. 따라서 성장기 동안의 칼슘 섭취량뿐 아니라 그 이후의 칼슘 섭취량이 골격 성장에 중요한 요인임을 알 수 있다.

2) 대퇴골의 회분, 무기질, 총단백질 및 총지질 함량

대퇴골의 회분, 무기질, 총단백질 및 총지질 함량은 Table 5와 같다. 회분 함량은 난소절제 유무나 칼슘 섭취

수준에 영향을 받지 않았다. 이는 최대골질량이 형성되는 성장기 동안 충분한 양의 칼슘 섭취로 최대골질량이 형성되었으므로 난소절제나 칼슘 섭취수준에 따라 크게 변화하지 않았던 것으로 생각된다.

칼슘 함량은 난소절제 유무에 따라 유의적인 차이를 보이지 않았지만 저칼슘을 섭취할 경우 정상이나 고칼슘을 섭취하였을 때보다 다소 낮았다. 이는 성장기 동안 고칼슘 식이를 섭취하였다 할지라도 그 이후의 칼슘 섭취량에 따라 어느 정도 영향을 받는 것으로 볼 수 있다. Peterson 등⁵⁾이 성장기가 완료되기 이전의 칼슘 섭취 증가는 뼈의 용출을 보호하고 뼈형성과 무기질화를 더 증가시키지만 성장기가 지난 이후 1.0%의 고칼슘을 섭취하였을 때는 사춘기 이전에 1.0%의 고칼슘을 섭취한 것 만큼 효과가 없었다고 하였다.

인, 마그네슘 함량은 난소절제 유무에 따라서는 유의적인 차이가 보이지 않았으나, 칼슘 섭취수준에 따라 영향을 받

Table 5. Ash, mineral, protein and lipid contents in femur (wet weight basis)

Group	Ash mg/g	Ca mg/g	P mg/g	Mg mg/g	Protein mg/g	Lipid mg/g
Control	394.9 ± 5.8	165.1 ± 2.9	84.25 ± 0.53	0.49 ± 0.03	191.42 ± 2.41	10.00 ± 0.13
OH	420.5 ± 9.6 ^{1)NS2)}	179.8 ± 3.2 ^{NS}	71.96 ± 2.18 ^{ab}	4.18 ± 0.14 ^a	193.84 ± 1.85 ^{bc}	11.34 ± 0.30 ^c
OM	417.9 ± 7.3	178.5 ± 3.3	70.65 ± 1.54 ^{ab}	4.30 ± 0.12 ⁱ	198.24 ± 3.76 ^c	10.47 ± 0.26 ^{bc}
OL	414.5 ± 4.2	174.1 ± 3.6	72.76 ± 2.52 ^{ab}	4.48 ± 0.18 ^{ab}	184.10 ± 4.05 ^{abc}	10.05 ± 0.30 ^{ab}
SH	435.3 ± 7.5	184.1 ± 2.2	69.44 ± 2.42 ⁱ	4.31 ± 0.18 ^{ab}	177.69 ± 1.92 ^a	10.39 ± 0.21 ^{abc}
SM	430.81 ± 4.1	186.3 ± 5.1	78.21 ± 2.66 ^b	4.33 ± 0.11 ^{ab}	181.12 ± 6.67 ^{ab}	9.80 ± 0.25 ^{ab}
SL	419.4 ± 10.3	173.5 ± 4.2	67.96 ± 2.64 ⁱ	4.93 ± 0.11 ^b	168.77 ± 3.71 ^a	9.28 ± 0.29 ⁱ
OVX ³⁾	NS	NS	NS	NS	**	**
Ca	NS	*	NS	**	**	**
OVX*Ca	NS	NS	*	NS	NS	NS

1) Mean ± SEM of 8 rats per group

2) Values with different superscript within the column are significantly different at p < 0.05 by Tukey's multiple range test(NS : not significant)

3) Statistical significance was evaluated at the a = 0.05 level by 2-way analysis of variance(*p < 0.05, **p < 0.01, NS : not significant)

OVX : Main effect of ovariectomy

Ca : Main effect of Ca level after ovariectomy

OVX*Ca : Interaction between ovariectomy and Ca level

Table 6. Ash, mineral, protein and lipid contents in lumbar (wet weight basis)

Group	Ash mg/g	Ca mg/g	P mg/g	Mg mg/g	Protein mg/g	Lipid mg/g
OH	314.6 ± 5.2 ^{NS}	102.5 ± 1.8 ⁱ	55.6 ± 1.8 ^{NS}	0.85 ± 0.01 ^{NS}	213.6 ± 5.2 ^{NS}	7.5 ± 0.2 ^{NS}
OM	307.0 ± 11.5	108.8 ± 5.2 ^a	53.7 ± 3.8	0.91 ± 0.04	216.71 ± 0.8	7.7 ± 0.4
OL	303.9 ± 3.5	107.6 ± 0.9 ^a	56.9 ± 2.3	0.90 ± 0.01	205.5 ± 1.6	7.7 ± 0.2
SH	322.9 ± 17.8	112.8 ± 2.6 ⁱ	55.8 ± 2.9	0.87 ± 0.04	206.0 ± 12.4	7.5 ± 0.4
SM	345.2 ± 5.8	141.3 ± 2.9 ^b	60.5 ± 2.3	0.94 ± 0.02	192.2 ± 5.1	7.9 ± 0.2
SL	324.7 ± 10.5	134.8 ± 3.9 ^b	70.8 ± 5.7	0.92 ± 0.03	219.7 ± 4.9	7.7 ± 0.3
OVX ³⁾	*	**	NS	NS	NS	NS
Ca	NS	**	NS	NS	NS	NS
OVX*Ca	NS	*	NS	NS	NS	NS

See Table 5

았다.

총단백질과 총지질의 함량은 난소절제 유무와 칼슘 섭취 수준에 따라 영향을 받았다. 특히 난소절제군이 증가의 경향을 보여 폐경 이후 나쁜 골격대사의 경향을 보여주는 지표로 이용할 수 있으리라 생각된다.¹⁸⁾

3) 요추(Lumbar 1-4)의 회분, 무기질, 총단백질 및 총지질 함량

요추의 회분, 무기질, 총단백질 및 총지질 함량은 Table 6과 같다.

회분 함량은 칼슘 섭취 수준에 영향을 받지 않았으나 난소절제군이 다소 감소의 경향을 보였다.

칼슘 함량은 요구량의 3배가 되는 1.5%의 고칼슘을 16주 동안 섭취한 OH, SH의 경우 요추의 칼슘 함량이 OM이나 OL군과는 차이가 없었고, SM보다 유의적으로 감소하였다. 이것은 칼슘이 역치 영양소이므로 역치 이상의 양은 골격량에 영향을 미치지 못하기 때문에 16주 동안 고칼슘을 섭취하여도 칼슘 함량이 정상이나 저칼슘을 섭취한 군과 차이가 없었다고 생각된다.¹⁸⁾¹⁹⁾ 그러나 성장기와 난소절제 후 16주 동안 계속 저칼슘을 섭취한 경우¹³⁾ 요추의 회분과 칼슘 함량은 성장기 8주동안 고칼슘을 섭취하고 난소 절

제후 8주동안 저칼슘을 섭취한 OL, SL군보다 회분의 경우 80mg/g정도, 칼슘은 40~45mg/g정도 감소하였음을 볼 수 있다. 이 결과로 보아 성장기 동안의 칼슘 섭취량이 성장기 이후나 난소절제 후의 뼈에 있어서 칼슘의 축적율이나 보유량에 영향을 미침을 알 수 있다.

요추의 인, 마그네슘, 총단백질 및 총지질 함량은 난소절제 유무나 칼슘 섭취 수준에 따라 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이 결과는 성장기 동안 저칼슘을 섭취한 실험¹³⁾보다 증가하였으며, 군간에 차이를 보이지 않은 것은 역시 성장기 동안 섭취한 고칼슘에 의한 결과로 충분한 골질량을 형성하였기 때문으로 생각된다.

이와 같이 성장기 동안 정상 수준 이상의 고칼슘 식이를 섭취하므로써 최대골질량을 유지할 경우 그 이후의 칼슘 섭취 수준과 estrogen농도에 따라 대퇴골과 요추의 크기, 무기질 및 유기질 성분에 영향을 미치지 않았으나 장기간의 고칼슘을 섭취하였을 때는 오히려 감소하였다. 이것은 폐경에 따른 골격손실이 급격히 발생하는 해면골이 사춘기인 출생 후 12주 동안의 칼슘 섭취와 관련이 있고 그 이후는 칼슘 섭취량과 무관하기 때문이라 해석되며,⁶⁾ Heaney¹⁹⁾와 Cooper등²⁰⁾은 칼슘이 역치(threshold) 영양소이므로 역치

Table 7. Correlation coefficients between Ca intake, estrogen, alkaline phosphatase, hydroxyproline, weight and length and femur growth index and femur compositions

	Ca intake	Estrogen	Alpase	OHP	Wet wt	Dry wt	Length
Wet weight	0.1351	0.2636	-0.0993	0.1778		0.7851***	0.5594***
Dry weight	0.1026	0.1011	-0.1869	-0.0277	0.7851***		0.4841**
Ash	0.2132	0.2243	-0.2914*	0.0439	0.6987***	0.9158***	0.4170**
Calcium	0.2740	0.2957	-0.1258	0.0598	0.7159***	0.8779***	0.6166***
Phosphate	0.0458	-0.0922	-0.0684	0.3011*	0.4155**	0.5997***	0.4566***
Magnesium	-0.1147	0.4702*	0.0910	-0.0241	0.3932**	0.5236***	0.5002***
Protein	0.3266*	-0.0587	0.1596	0.2393	0.6596***	0.7507***	0.5939***
Lipid	0.3491*	0.0373	-0.0222	-0.0165	0.6776***	0.7027***	0.5034***
Length	-0.1660	0.3010	0.2890*	0.3662*	0.5594***	0.4841**	
Breaking force	-0.0463	0.0945	-0.2905*	0.0390	0.5279***	0.2449	0.0880

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Table 8. Correlation coefficients between Ca intake, estrogen, alkaline phosphatase, hydroxyproline and weight and lumbar compositions

	Ca intake	Estrogen	Alpase	OHP	Wet wt	Dry wt
Wet weight	0.1632	0.4998*	-0.0181	0.3975*		0.7190***
Dry weight	-0.0474	0.2610	-0.1500	0.2581	0.7190***	
Ash	0.0385	0.3898	-0.3223*	0.1929	0.6775***	0.9489***
Calcium	-0.2484	0.6267**	-0.4048**	0.2626	0.4192**	0.7154***
Phosphate	-0.2013	0.5588**	-0.2081	-0.2096	0.2479*	0.5428***
Magnesium	-0.2016	0.5593**	-0.2087	-0.2100	0.2481*	0.5428***
Protein	0.0602	0.2209	0.0087	0.0261	0.5854***	0.8481***
Lipid	0.0183	0.1120	-0.0632	0.2430	0.5206***	0.8937***

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

이상의 양은 골질량 증가에 영향을 미치지 않는다고 한 결과와 일치하였다.

4. 골격대사 지표와 대퇴골, 요추의 성분 및 형태적 변화간의 상관관계

1) 대퇴골

칼슘섭취량, estrogen농도, Alpace활성, 뇨의 OHPr배설량, 대퇴골의 중량 및 길이와 대퇴골의 성분 및 형태적 변화와의 상관관계는 Table 7과 같다.

칼슘 섭취 수준은 대퇴골의 유기질인 총단백질, 총지질 성분과 양의 상관관계를 보였으며, 난소절제에 따른 estrogen농도는 마그네슘 함량과 양의 상관관계를 보였다.

Alpace활성은 대퇴골의 길이와 양의 상관관계를 보였으며, 회분, 파단력과는 음의 상관관계를 보였다. OHPr배설량은 인의 함량과 대퇴골의 길이와 양의 상관관계를 보였다.

습중량은 모든 뼈조성과 양의 상관관계를 나타내었으며, 건중량과 대퇴골의 길이는 파단력을 제외한 측정된 뼈의 조성과 양의 상관관계를 나타내었다.

2) 요 추

칼슘섭취량, estrogen농도, Alpace활성, 뇨의 OHPr배설량 및 요추의 중량과 요추의 성분과의 상관관계는 Table 8과 같다.

요추의 경우 칼슘 섭취량은 요추의 성분과 유의적인 상관관계를 보이지 않았고, estrogen농도는 습중량, 칼슘, 인, 마그네슘과 양의 상관관계를 보였다. Alpace활성은 회분, 칼슘과 음의 상관관계를 보였으며, OHPr배설량은 습중량과 양의 상관관계를 보였다.

습중량과 건중량은 측정된 무기성분 및 유기성분과 양의 상관관계를 나타내었다.

이상의 결과와 같이 칼슘 섭취는 대퇴골의 조성에는 상관관계가 인정되지만 요추에는 상관관계가 인정되지 않았다. 성장기에 고칼슘을 섭취한 동물이라 할지라도 난소절제에 따른 혈중 estrogen농도는 대퇴골에서의 무기질 함량과 무관한 반면, 요추에서의 무기질 함량(Ca, P, Mg)과 양의 상관관계를 보였다. Alpace활성은 뼈의 회분 및 무기질 성분과 음의 상관관계를 보임을 알 수 있다. 또한 뼈의 중량은 무기질, 유기질 함량과 길이 및 파단력과 많은 양의 상관관계가 있음을 볼 수 있다.

요약 및 결론

본 연구는 성장기 동안 고칼슘 섭취로 골질량이 높은 경

우 난소절제로 인한 폐경과 칼슘 섭취 수준(0.1, 0.5, 1.5%)이 흰쥐의 골격형성과 골격대사에 미치는 영향을 알아보고자 갖 이유했던 3주령의 암컷 흰쥐에게 8주간 고칼슘 식이(1.5%)를 섭취시킨 후 난소절제(OVX)군과 위장수술(SHAM)군으로 나누고 각각을 다시 3군으로 나누어 칼슘 섭취 수준을 각각 0.1%(Low), 0.5%(Normal), 1.5%(High)으로 달리하여 8주간 더 사육하였다.

결과를 종합해 보면 난소절제시 체중이 증가되며, 혈액 중의 칼슘 농도는 수술 후 저칼슘을 섭취한 군에서 낮았다. 또한 Alpace 활성은 난소절제시 다소 높았으며, OHPr은 고칼슘 섭취시 감소하였다. 성장기 동안 정상 수준 이상의 고칼슘 식이를 섭취하므로서 유전적 범위내에서 최대골질량을 유지할 경우 그 이후의 칼슘 섭취 수준과 estrogen농도는 대퇴골과 요추의 크기, 무기질 및 유기질 성분에 유의적인 영향을 미치지 않았으나, 난소절제 수술 후 정상 수준 이상의 칼슘 섭취는 뼈의 크기와 무기질 함량을 증가시켰다. 이로 볼 때 칼슘 섭취는 성장기 뿐 아니라 성숙기 또는 폐경 이후에도 지속적으로 골격성장, 골격성분 및 골격대사에 영향을 미치므로 지속적인 섭취가 필요하다고 볼 수 있다.

Literature cited

- 1) Heaney RP. The role of nutrition in prevention and management of osteoporosis. *Clin Obste Gynecol* 50 : 833-846, 1987
- 2) Nilas L. World review of nutrition and dietetics. vol.73 In : Calcium intake and osteoporosis. pp.1-26, Karger, New York, 1993
- 3) Johnston CC, Miller JZ, Slemenda CW, Reister TK, Hui S, Christian JC, Peacock M. Calcium supplementation and increases in bone mineral density in children. *N Engl J Med* 327 : 82-87, 1992
- 4) Sandler RB, Slemenda C, Laporte RE. Postmenopausal bone density and milk consumption in children and adolescence. *Am J Clin Nutr* 42 : 270-274, 1985
- 5) Peterson CA, Eurell Jo Ann C, John W, Erdman JR. Alterations in calcium intake on peak bone mass in the female rat. *J Bone Miner Res* 10 : 81-95, 1995
- 6) O JH, Lee YS. Effects of dietary calcium levels on the reduction of calcium availability in ovariectomized osteoporosis medel rats. *Korean J Nutrition* 26(3) : 277-285, 1993
- 7) Kim KH, Choi MJ, Lee IK. The effect of dietary calcium level on bone mineral density and bone mineral content in ovariectomized female rats. *Korean J Nutrition* 29(6) : 590-596, 1996
- 8) Lee YS, Park MN, Kim EM. Effect of dietary calcium levels on peak bone mass formation in growing female rats. *J Korea Sco Food Sci Nutr* 26(3) : 480-487, 1997
- 9) Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Commitee on standards for nutritional studies. *J Nutr* 107 : 1340-1348, 1977
- 10) Bergman I, Roy Loxley. Two improved and simplified methods for the spectrometric determination of hydroxyproline. *Anal Chem* 35 : 1961-1965, 1963
- 11) Folch J, M Lees, GH Sloanestanley. A simple method for the isola-

- tion and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 220 : 497-509, 1957
- 12) Fisk CH, Y Subbarow. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 66 : 375, 1925
 - 13) Lee YS, Kim EM. Effect of ovariectomy and dietary calcium levels on bone metabolism in rats fed low calcium diet during growing period. *Korea J Nutrition* 31(3) : 279-288, 1998
 - 14) Chae SL, Kim BJ. Statistical analysis method for SPSS/PC+. Bum Moon sa. 1988
 - 15) Thomas ML, Simmons DJ, Kidder L, Ibarra MJ. Calcium metabolism and bone mineralization in female rats fed diets marginally sufficient in calcium : effects of increased dietary calcium intake. *Bone Miner* 12 : 1-14, 1991
 - 16) Morris HA, Porter SJ, Durbridge TC, Moore RJ, Need AG, Nordin BEC. Effects of oophorectomy on biochemical and bone variables in the rat. *Bone Miner* 18 : 133-142, 1992
 - 17) Tobias JH, Chow J, Colston KW, Chambers TJ. High concentrations of 17 β -estradiol stimulate trabecular bone formation in adult female rats. *Endocrinology* 128 : 408-412, 1991
 - 18) Robey PG, Fedarko NS, Hefferan TE, Bianco P, Vetter UK, Grzesik W, Friedenstein A, Plujim GVD, Mintz KP, Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM. Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *J Bone Miner Res* 8(supple 2) : S483-S487, 1993
 - 19) Heaney RP. Nutritional factors in osteoporosis. *Ann Rev Nutr* 13 : 287-316, 1993
 - 20) Cooper C, Cawley M, Bhalla A, Egger P, Ring F, Morton L, Barker D. Children growth, physical activity and peak bone mass in women. *J Bone Min Res* 10 : 940-947, 1995