

골다공증 모델동물, SAMP6의 특성 연구

김은주[†] · 김양범 · 송창우 · 한상섭

한국화학연구소 안전성연구센터

Studies of SAMP6 as an Animal Model for Human Osteoporosis

Eun-Joo Kim[†], Yang-Beom Kim, Chang-Woo Song and Sang-Seop Han

Toxicology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology P.O. Box 107,
Deaduk Danji, Taejeon, Korea 305-600

Abstract

In order to establish basic data of SAMP6 as an animal model for osteoporosis, present study has been designed to concentrate on the various biological aspects of SAMP6 such as growth index, hematology, blood biochemistry, biochemical characteristics, and bone and cortical thickness. Investigation period was for 15 months (3 months to 18 months of age) and biological characteristics have been examined throughout the study period.

The results were summarized as follows :

Decreased body weight of male SAMP6 was noticed from 7 months of age compared to from 18 months of age in female. Although there were no significant differences in organ weights, generally those of male mice were greater than those of females, especially in liver, kidney and lung. According to the analysis of blood biochemistry and hematology, the number of leukocytes in male mice was greater than that of female mice. There was a decrease in bone thickness in both male and female mice starting around from 7 months of age. Peak cortical thickness index was noticed at 5 months of age in both sexes. In femur, the highest Ca^{2+} content for both sexes was noticed at 5 months of age, whereas the highest P^{3+} content was noted at the age of 5 and 7 months in male and female mice, respectively. The contents of both elements were gradually decreased with age after peaks for both sexes.

In summary, SAMP6 mice in KRICT colony show osteoporotic characteristics starting from 5 to 7 months of age, suggesting that at least 5 months of old animals should be used for studying the mechanism of osteoporosis or screening anti-osteoporosis drugs. This study also suggests that the cortical index thickness, Ca^{2+} and P^{3+} contents, and alkaline phosphatase activities can be used as indexes for drug screening.

Key words – SAMP6, Osteoporosis,

[†] Corresponding author

서 론

노화촉진마우스 (senescence-accelerated mouse; SAM)는 Takeda 등에 의해 개발된 노화의 모델동물로서 AKR계 마우스에서 유래된 것이다[22]. 대조 계통인 SAMR계 (senescence-accelerated resistant mouse)에 비해 SAMP계 (senescence-accelerated prone mouse)는 활동성저하, 탈모, 피모 광택감퇴, 피모조잡, 안 주위 병변, 백내장, 척추 만곡증가, 면역 반응 저하, 수명단축과 같은 특징을 나타낸다[7,22]. SAMP계는 SAMP1에서 SAMP11까지 개발되었으며, SAMR계는 SAMR1에서 SAMR5까지 개발되었으나 SAMP4, SAMP5 및 SAMR3은 근교계 육종이 되지 않았다. 같은 SAMP계라도 각 계통마다 특성이 매우 다르다. SAMP1, SAMP2는 노인성 아밀로이드 침착증, SAMP8은 학습능력과 기억력 감소, SAMP9는 백내장이 특징이다. 특히 SAMP6은 노인성 골다공증이 나타나는 특징을 가지고 있다.

골다공증은 뼈의 대사성질환중에서 흔히 나타나는 것으로 다양한 원인에 의해 뼈의 화학적 조성에는 변함이 없이 단위용적내의 골량이 감소하는 질환이다[1,2,4]. 이로 인해 경미한 충격에 의해서도 골절이 동반되는데, 특히 고령의 환자에서 심각한 문제를 초래하게 된다. 우리나라도 고령인구가 증가함에 따라 노인에게 흔히 나타나는 합병증인 골다공증이 사회적으로 큰 문제로 대두되고 있다. 골 밀도나 골절발생에 대한 인종간의 차이[13,19,21]와 1관성 혹은 2관성 쌍둥이[18]에서의 골 밀도에 대한 연구를 통하여 유전적 요인과 환경적 요인 모두가 골다공증에 대한 감수성과 골 밀도에 관여한다고 하였다. 또한 골다공증에 대한 많은 연구가 진행되어, 골다공증 모델동물을 만들기 위해 어린 동물에서의 난소적출[8,17]이나 영양분 조절[20,23]에 의해서 골다공증 다발상태의 모델동물을 만들었으나, 노화에 의해서 자연적으로 나타나는 골다공증에 비해 급격하게 골 밀도가 감소되어, 골다공증에 대한 모델동물로서는 적절하지 않다. SAMP6은 인위적인 투여나 적출에 의하여 만들어진 골다공증 모델동물에 비해, 특히 골 밀도 감소가 급격하지 않는 등 적절한 모델동물이라는 보고가 있다[9,11].

호르몬과 세포 mechanism 그리고 임상적인 특징에 따라서 골소실을 2가지 형태로 분류하였다. 하나는 나이가 들

어감에 따라 생기는 점진적인 골소실로 이것은 Newton-John의 가설과 동일한 것이며(Type B), 다른 것은 폐경에 의한 estrogen 결핍에 의해 빠르게 나타나는 골소실로 분류하였다(Type A)[13,14,15]. 노인성 골다공증은 조골세포의 기능저하와 활성 비타민D의 생성부전이 가장 중요한 원인이며[12], 주로 대퇴골이나 척추 같은 신체를 지지하고 있는 부위에 골절을 일으켜 치명적인 결과를 초래한다. 최근 들어 고령인구의 증가로 노인성 질환이 큰 사회적 문제로 대두되고 있으며, 이에 관한 많은 연구가 진행되고 있다. 이중 골다공증에 대한 효율적인 연구를 위한 모델동물을 개발하기 위해, 난소적출, glucocorticoid투여, 당뇨유발, 운동억제, heparin투여, 영양분 조절을 통하여 골다공증 모델동물을 개발하고 있다. 정상적으로 24개월된 rat에서 노화성 골다공증이 관찰되었고, Matsushita 등은 노인성 질환에 대한 모델동물로 개발된 SAM의 substrain의 하나인 SAMP6가 최초의 Type B osteoporosis의 자연 발생 모델동물이 될 수 있다고 보고하였다[11].

본 연구의 목적은 노화촉진 마우스 (SAM)중에서 본 연구실에서 생산된 골다공증 모델 동물인 SAMP6의 특성을 규명하여 향후 골다공증 치료약제의 개발시 약효검색연구에 활용하고자 하였다. 즉 암,수컷 동물 및 가령별 SAMP6 동물에서의 골다공증상의 특성연구를 통하여 약효검색에 가장 적합한 모델동물의 조건을 정하고자 하였다.

재료 및 방법

공시동물 및 사육환경

본 실험에 사용된 동물은 Takeda로부터 분양 받은 SAMP6 마우스를 한국화학연구소 실험동물 육종실에서 SPF (specific pathogen-free) 조건하에서 형매교배를 통해 육종, 번식시키고 있는 동물로 암수 각각 3, 5, 7, 18개월령으로 균을 나누어 실험에 사용하였다.

동물실의 사육환경조건은 온도 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 10\%$, 소음 60 phone 이하, 취기 20 ppm 이하, 조도 150~300 Lux, 조명시간 12 시간 명암 cycle, 환기횟수 10~20 회/시간으로 GLP(의약품 안전성 관리기준)에 적합한 환경조건하에서 사육하였다. 사육상자는 polycarbonate cage (260W × 200D × 130H)를 사용하여 1상자당 1마리씩 사육하였으며, 깔짚은 칠레산 육송을 깎아 만든 실험동물 전

용 깔짚을 사용했고, 주 1회 사육상자를 교환하였다. 동물 실내에서 사용되는 모든 기자재 및 깔짚의 멸균은 고압증기 멸균 (121℃, 20분) 후 사용했다.

사료는 마우스, 랫트용 실험동물 고형사료(제일사료)를 구입한 후 방사선 조사(⁶⁰Co, 2.0Mrad, 그린피아)로 멸균하여 자유급여 시켰다. 사료중 칼슘과 인의 함량은 각각 1.1%와 0.7%였다. 음수는 상수도를 filtering 시킨 후 자외선 유수멸균기(Dynamics M600)를 통하여 살균시켜 자유급수 시켰다.

시약 및 사용기기

시약은 칼슘측정용 kit(아산셋트 칼슘 측정용시액, ASAN, Korea) 및 무기인 측정용 kit(아산셋트 무기인 측정용시액, ASAN, Korea)를 구입하여 사용하였고 기기는 animal balance (Satorius, MCI), clinical chemistry analyzer (Shimadzu 7200, Japan), automatic cell counter (T-540, Coulter Electronics), 전기가마니 (한국종합기계제작소), soft X-ray 측정기(HA-80, Hitex Co. Japan)를 사용하였다.

단축용어

WBC (white blood cell), RBC (red blood cell), Hgb (hemoglobin), Hct(hematocrit), MCV (mean corpuscular volume), MCH (mean corpuscular hemoglobin) MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration), PLT (platelet), GOT(glutamic oxaloacetic transaminase), GPT(glutamic pyruvic transaminase), BUN(blood urea nitrogen), CRN(creatinine), GLU(glucose), TCHO(total cholesterol), TG(triglyceride), TP(total protein), ALB(albumin), TBIL (total bilirubin)등 이다.

혈액학 및 혈액 생화학

s채혈 전에 약 16~18시간 동안 절식시켰으며, ethyl ether로 흡입 마취시킨 뒤 1ml 용량의 1회용 주사기를 사용해 후대정맥으로부터 채혈하였다. 혈액검사를 위한 채혈용기는 EDTA-2K가 처리된 병(CBC bottle, 녹십자, Korea)을 사용하여 응고를 방지했고, 채혈 후 20분 이내에 혈액검사를 하였다. 혈액생화학적 검사를 위해서 혈청분리관(polyethylene tube)을 사용하여 채혈 후 40분 이내에 원심분리기로 3000rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등 액

인 혈청을 microtube에 담아 -80℃에 냉동 보관한 후 4개월 이내에 Clinalyzer (Shimadzu 7200, Japan)를 이용하여 분석하였다.

체중변화

3, 5, 7, 18개월령의 SAMP6 암수의 체중을 오전 9:00에 측정하였다.

장기 중량 측정

3, 5, 7, 18개월령에 체중을 측정한 후, 오전 9:00~11:00 사이에 ethyl ether를 사용해 흡입 마취시켜 부검을 실시하였다. 부검 전 16~18시간 동안 절식시켰다. 뇌, 뇌하수체, 비장, 심장, 폐, 간, 신장(좌, 우), 부신(좌, 우), 정소(좌, 우), 난소(좌, 우), 흉선을 적출하여 각 장기의 중량을 측정하였다.

대퇴골 및 경골 적출

3, 5, 7, 18개월령에 희생시켜, 혈액과 장기를 제거한 즉시 대퇴골과 경골을 적출하였다. 적출된 골은 근육 등을 깨끗하게 제거한 다음, 실험에 사용하였으며, 좌측과 우측의 대퇴골과 경골은 각기 측정항목을 달리하였다. 우측 대퇴골과 경골은 soft x-ray 촬영을 위하여 사용하였으며, 좌측은 비중, 부피, 칼슘, 인등의 정량을 위해 사용하였다.

골두께 측정

골두께는 soft x-ray를 이용하여 대퇴골 및 경골의 측면을 다음과 같은 조건하에서 촬영하였다. 초점과 필름(Fuji, Rx, Japan)과의 거리는 50cm, 100V, 2.5mA, 40kVp로 1분간 노출시켰다. 노출후 필름은 일반적인 방법으로 현상하였다. 골두께 측정을 위해, 현상된 x-ray film을 over head project에 투사시켜, 확대된 상의 중간부위의 크기를 측정하였다. 치밀골의 두께는 골의 지름에서 골내면 지름을 뺀 값을 2로 나누어 구했다. 골의 mineral mass와 matrix mass를 나타내는 지표로 cortical thickness index (CTI=(D-d)/D)를 구하였다[11](Fig. 1).

골의 탄화중량 측정

대퇴골과 경골의 탄화중량을 측정하기 위해 전기가마니에 넣어, 800℃, 8시간 동안 가열한 후 중량을 측정하였다.

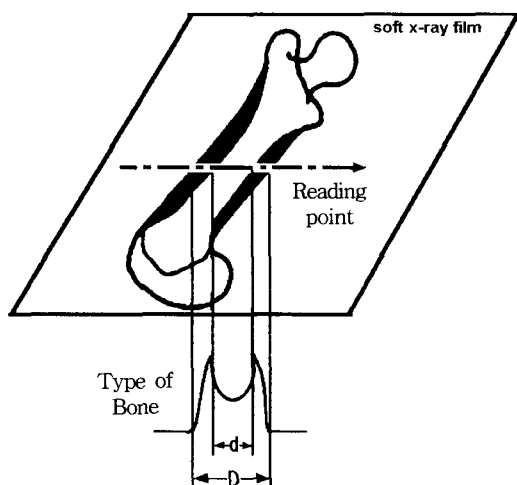


Fig. 1. Roentgenologic assay of the bone mass of the shaft of long bone.
The density of the X-ray film is projected and M-shaped bone pattern is gained. D, diameter of the shaft; d, diameter of the medullary canal.

탄화 골의 중량/부피 비율은 탄화중량을 골의 부피로 나눈 값으로 하였다. 골의 부피는 골을 적출한 뒤, 건조되지 않은 상태에서 Archimedes의 원리를 이용하여 측정하였다.

골의 비중 측정

골의 비중측정은 Saviller과 Smith의 방법에 따라 실시하였다[16]. 건조된 골의 비중을 측정하는 것은 골의 크기에 대한 직접적인 골량의 연관을 알아보기 위해 측정하였다. 부피를 측정한 골을 120℃에서 8시간 가열하여 건조시켰다. 건조된 골의 중량을 건조되지 않은 상태에서 Archimedes의 원리를 이용하여 측정하고 골의 부피로 나눈 값을 골의 비중이라 하였다.

골의 수분함량, 유기물함량 측정

골의 수분함량 및 유기물함량 측정을 위하여 Haruzo 등의 방법에 따라 다음과 같은 공식을 사용하였다 [6].

$$\text{수분함량}(\%) = \frac{\text{비건조골중량} - \text{건조골무게중량}}{\text{비건조골중량}} \times 100$$

$$\text{유기물함량}(\%) = \frac{\text{건조골중량} - \text{탄화골중량}}{\text{비건조골중량}} \times 100$$

골의 화학적 분석

골의 칼슘과 인량 측정을 Haruzo 등의 방법에 따라 실시하였다[6]. 골을 120℃에서 8시간동안 건조시킨 후, 전기가마에서 800℃, 6시간 가열하여 탄화시킨 후 질산에 완전히 용해시켰다. 이것을 deionized water로 적정농도로 희석한 다음, 탄화골 무게당 칼슘과 인의 양을 측정하였다. 칼슘량은 Ortho-cresolphthalein complexone발색법, 인량은 효소법을 이용하여 측정하였으며, Haruzo 등의 방법에 따라 다음과 같은 공식을 사용하였다[6].

$$\text{칼슘 함유량}(\%) = \frac{\text{칼슘량 (mg)}}{\text{생골중량 (g)}} \times 100$$

$$\text{인 함유량}(\%) = \frac{\text{인 량 (mg)}}{\text{생골중량 (g)}} \times 100$$

통계처리

통계 처리는 Turkey-karmer multiple comparisons test를 이용하여 각군간의 유의성을 검색하였다.

결과 및 고찰

체중

Fig 2에서 볼 수 있듯이 SAMP6 동물은 암, 수컷 모두에서 생후 7개월까지 완만한 체중증가가 나타났으나 그 후에는 체중이 감소하는 경향을 보였다. 암컷이 수컷에 비해 체중이 낮다가 7개월령 이후는 거의 비슷하거나 높아지는 경향을 보였다.

장기중량

SAMP6의 가령에 따른 장기중량의 변화는 Table 1과 같다. 뇌중량은 암, 수컷 모두에서 가령에 따른 유의성이 관찰되지 않았으며, 뇌하수체는 3개월령에 비해 5, 7개월령에 유의성있는 증가가 나타났다(p<0.05). 비장은 18개월령에 수컷에서 유의성있는 증가를 보였다(p<0.01). 간, 신장, 심장, 폐의 중량은 전월령에서 수컷이 암컷보다 높게 나타났으나, 흉선은 암컷이 수컷보다 높게 나타났다.

혈액학 및 혈액생화학적 검사

SAMP6 암, 수컷의 혈액학적 수치는 Table 2에 나타났다. 수컷은 백혈구치를 제외하고는 5, 7개월령에서 3개월

Table 1. The change of absolute organ weights of SAMP6 with age

Items (mg)	Age(months)									
	Male					Female				
	3	5	7	18	3	5	7	18		
Brain	407.00 ± 25.00	410.00 ± 18.00	421.00 ± 23.00	408.00 ± 22.00	410.00 ± 20.00	410.00 ± 15.00	414.00 ± 10.00	413.00 ± 14.00		
Hypophysis	1.50 ± 0.30	2.00 ± 1.00*	2.00 ± 0.50*	1.60 ± 0.40	1.50 ± 0.60	2.80 ± 0.70**	2.40 ± 0.40**	1.90 ± 0.80		
Adrenal gland										
Left	2.60 ± 0.40	2.70 ± 0.60	2.60 ± 0.40	2.40 ± 0.20	2.50 ± 0.30	2.80 ± 0.50	2.70 ± 0.40	2.40 ± 0.70		
Right	2.60 ± 0.40	2.80 ± 0.60	2.40 ± 0.50	2.30 ± 0.30	2.30 ± 0.40	2.80 ± 0.50	2.50 ± 0.50	2.60 ± 0.40		
Liver	1,685.00 ± 176.00	1,676.00 ± 182.00	1,757.00 ± 225.00	1,888.00 ± 122.00	1,142.00 ± 110.00	1,261.00 ± 104.00	1,358.00 ± 165.00	1,229.00 ± 65.00		
Spleen	200.00 ± 69.00	116.00 ± 37.00	12.00 ± 64.00	412.00 ± 176.00**	70.00 ± 11.00	66.00 ± 7.00	65.00 ± 13.00	67.00 ± 9.00		
Kidney										
Left	198.00 ± 15.00	204.00 ± 24.00	212.00 ± 37.00	212.00 ± 37.00	127.00 ± 22.00	143.00 ± 8.10	152.00 ± 16.00**	145.00 ± 12.00		
Right	212.00 ± 19.00	214.00 ± 21.00	202.00 ± 65.00	213.00 ± 30.00	136.00 ± 12.00	148.00 ± 9.00	158.00 ± 15.00	148.00 ± 6.00		
Heart	144.00 ± 8.00	151.00 ± 13.00	157.00 ± 8.00*	144.00 ± 7.00	109.00 ± 9.00	118.00 ± 6.00	119.00 ± 10.00	119.00 ± 10.00		
Thymus	21.00 ± 6.00	28.00 ± 5.00	16.00 ± 8.00	19.00 ± 5.00	49.00 ± 6.50	48.00 ± 7.00	33.00 ± 7.00	46.00 ± 11.00		
Lung	170.00 ± 2.00	181.00 ± 10.00	177.00 ± 7.00	196.00 ± 21.00	135.00 ± 15.00	158.00 ± 18.00	161.00 ± 14.00	153.00 ± 10.00		
Testis										
Left	73.00 ± 6.00	66.00 ± 6.00	66.00 ± 5.00	62.00 ± 6.00	7.80 ± 2.60	8.00 ± 1.40	6.70 ± 1.70	7.03 ± 2.90		
Right	77.00 ± 6.00	71.00 ± 4.00	69.00 ± 5.00	64.00 ± 5.00	7.90 ± 2.80	8.30 ± 1.60	7.00 ± 1.95	8.80 ± 5.85		

Each value represents the mean ± S.D. (n=8~10)
 Significant difference from 3 month group (*P<0.05 ; **P<0.01)

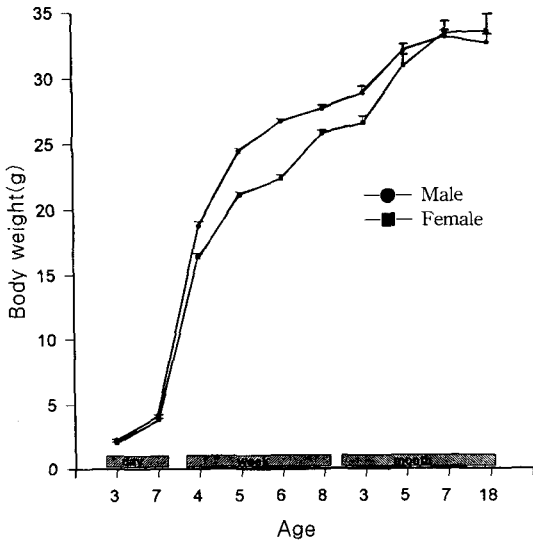


Fig. 2. The changes of body weight of SAMP6 with age. Each point represents the mean \pm S.D. (n=8~10)

령에 비해 유의성있는 증가를 나타내었으나, 암컷은 HGB, HCT, MCV, MCH에서 5, 7개월령 동물에서 3개월령에 비해 유의성있는 증가를 나타내었다.

백혈구 수는 측정된 모든 개월령(5, 7, 18)에서 3개월령에 비해 수컷이 암컷보다 높은 수치를 나타내었으나, 적혈구치에서는 낮게 나타났다. HGB치는 수컷에서는 5, 7개월령에서 유의성있는 증가($p < 0.01$)를 나타낸 반면, 암컷에서는 5, 7, 18개월령에서 유의성있는 감소를 나타내었다($p < 0.05$, $p < 0.01$). 혈소판수의 경우 수컷에서 3개월령에 비해, 유의성있는 감소를 나타내었으나, 암컷에서는 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다.

혈액생화학적 검사결과는 Table 3에 나타내었다. GOT는 수컷의 5, 7, 18개월령에서 암컷보다 높게 나타났으며, BUN은 전개월령에서 수컷이 암컷보다 높게 나타났으나 유의성은 없었다. alkaline phosphatase는 Fig. 3에 나타낸 것과 같이 암, 수컷에서 모두 나이가 들어감에 따라 유의성있게 감소($p < 0.001$)됨이 관찰되었다.

골두께

SAMP6 암컷, 수컷의 골두께를 측정한 결과는 Fig. 4, 5와 같다. 3개월령에서는 대퇴골(Fig. 4)에서 수컷이 암컷보다 골두께가 컸지만, 5개월령부터는 암컷이 수컷보다 골두

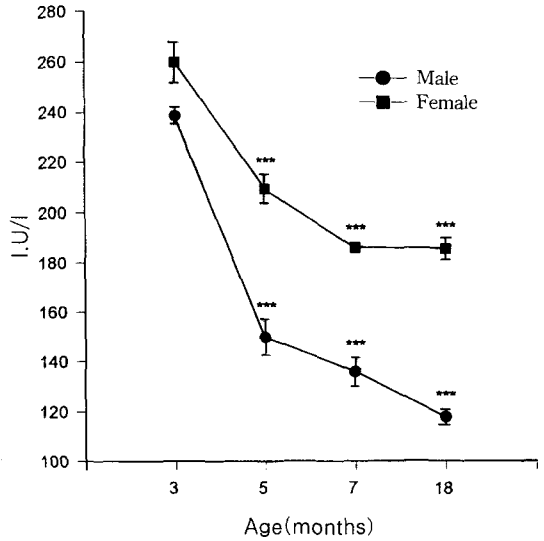


Fig. 3. The changes of alkaline phosphatase activities in SAMP6 with age. Each point represents the mean \pm S.D. (n=8~10) Significant difference from 3 month group (***) $p < 0.001$

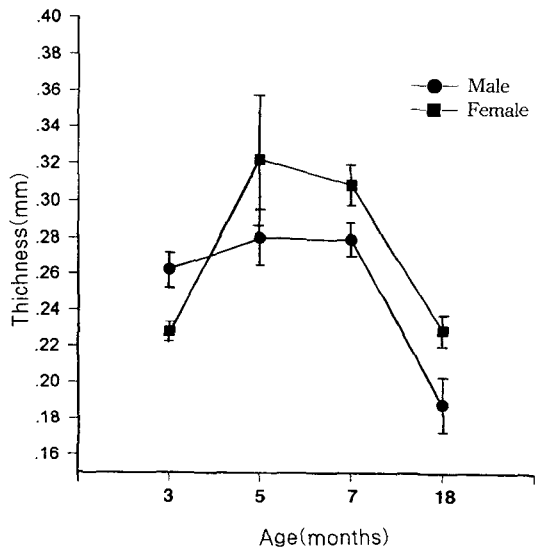


Fig. 4. The changes of femur thickness of SAMP6 with age. Each point represents the mean \pm S.D. (n=8~10)

께가 크게 나타났다. 골두께는 5개월령까지는 증가했으나 그 후부터는 암, 수컷 모두 골두께가 감소되는 경향을 보

Table 2. The change of hematological values of SAMP6 with age

Items	Age(months)							
	Male			Female				
	3	5	7	18	3	5	7	18
WBC($10^3/mm^3$)	16.59 ± 8.74	12.95 ± 3.64	10.30 ± 3.62	24.38 ± 1.18	8.36 ± 2.40	7.07 ± 1.73	6.10 ± 1.30	6.93 ± 1.66
RBC($10^6/mm^3$)	7.71 ± 0.77	9.70 ± 0.49**	9.59 ± 0.66**	8.41 ± 0.64	9.62 ± 3.31	10.28 ± 0.21	10.24 ± 0.18	10.36 ± 0.20
HGB(g/dl)	11.97 ± 1.13	14.23 ± 0.70**	14.24 ± 0.68**	12.45 ± 1.18	16.07 ± 0.44	14.87 ± 0.23**	14.83 ± 0.28**	15.24 ± 0.34*
HCT(%)	40.40 ± 3.72	46.26 ± 2.13**	44.84 ± 2.63**	41.85 ± 3.71	53.15 ± 1.56	47.44 ± 10.40**	47.00 ± 0.81**	50.47 ± 1.26
MCV(fl)	52.45 ± 1.56	47.28 ± 1.31**	46.79 ± 1.19**	49.73 ± 1.58**	50.06 ± 0.28	46.16 ± 0.23**	45.89 ± 0.29**	48.73 ± 0.83**
MCH(pg)	15.55 ± 0.44	14.70 ± 0.44**	14.88 ± 0.76*	14.80 ± 0.63*	15.12 ± 0.12	14.46 ± 0.17*	14.49 ± 0.15*	14.71 ± 0.41
MCHC(g/dl)	29.63 ± 0.57	30.80 ± 0.78*	31.83 ± 1.40**	29.77 ± 1.14	30.21 ± 0.28	31.34 ± 0.41	31.58 ± 0.24	30.21 ± 0.37
PLT($10^3/mm^3$)	1,384.50 ± 196.50	1,079.90 ± 89.68**	961.40 ± 89.01**	1,205.60 ± 223.20*	946.90 ± 68.43	962.70 ± 58.63	949.40 ± 74.49	837.40 ± 338.70

Each value represents the mean ± S.D. (n=8~10)

Significant difference from 3 month group (*P<0.05 ; **P<0.01)

Table 3. The change of blood biochemical values of SAMP6 with age.

Items(unit)	Age(months)							
	Male			Female				
	3	5	7	18	3	5	7	18
GOt(IU/ℓ)	47.11 ± 1.02	75.81 ± 4.79	168.31 ± 21.47	105.77 ± 2.13	57.74 ± 1.11	54.74 ± 1.88	63.50 ± 2.79	73.97 ± 3.34
GPT(IU/ℓ)	31.31 ± 1.83	36.64 ± 5.23	68.03 ± 1.04	24.21 ± 2.19	27.16 ± 0.89	26.70 ± 0.96	45.00 ± 2.73	47.73 ± 3.45
BUN(mg/dℓ)	31.54 ± 0.78	27.86 ± 0.81	26.03 ± 1.04	26.91 ± 1.09	29.34 ± 0.95	20.91 ± 0.51	21.73 ± 0.44	23.57 ± 1.24
CREA(mg/dℓ)	0.44 ± 0.02	0.49 ± 0.05	0.37 ± 0.02	0.52 ± 0.02	0.55 ± 0.02	0.46 ± 0.02	0.54 ± 0.02	0.15 ± 0.02
GLU(mg/dℓ)	249.44 ± 3.28	174.43 ± 4.28	117.00 ± 8.78	129.46 ± 5.28	226.89 ± 2.59	228.20 ± 6.68	245.91 ± 3.89	233.39 ± 6.17
TCHO(mg/dℓ)	113.99 ± 2.19	93.60 ± 3.19	105.21 ± 3.29	40.17 ± 4.54	84.63 ± 0.98	69.70 ± 2.65	77.94 ± 3.56	73.30 ± 1.96
TBLI(mg/dℓ)	0.07 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.12 ± 0.07	0.06 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.00
TP(g/dℓ)	4.78 ± 0.02	5.01 ± 0.13	5.30 ± 0.12	5.82 ± 0.12	5.01 ± 0.04	5.15 ± 0.04	5.31 ± 0.06	5.46 ± 0.06
ALB(g/dℓ)	3.19 ± 0.01	2.99 ± 0.05	2.95 ± 0.04	2.88 ± 0.05	3.52 ± 0.04	3.51 ± 0.02	3.54 ± 0.03	3.59 ± 0.03
CPK(IU/ℓ)	37.54 ± 1.59	70.75 ± 4.28	59.80 ± 6.6	46.29 ± 2.26	38.49 ± 2.22	34.09 ± 2.59	45.09 ± 3.40	46.37 ± 3.98
TC(mg/dℓ)	243.86 ± 11.54	121.94 ± 9.77	147.46 ± 31.05	144.74 ± 10.09	169.31 ± 15.50	131.23 ± 16.94	168.37 ± 17.00	124.71 ± 11.12
CA(mmol/ℓ)	9.64 ± 0.08	9.26 ± 0.05	9.34 ± 0.08	9.48 ± 0.11	9.64 ± 0.05	9.45 ± 0.09	9.60 ± 0.73	9.78 ± 0.06
IP(mg/dℓ)	7.12 ± 0.27	6.19 ± 0.09	6.20 ± 0.15	6.07 ± 0.09	6.61 ± 0.22	6.87 ± 0.23	6.76 ± 0.25	5.32 ± 0.32
PL(mg/dℓ)	248.61 ± 3.42	221.43 ± 6.52	238.07 ± 6.73	127.26 ± 14.85	173.05 ± 3.06	169.99 ± 4.11	191.36 ± 6.20	167.41 ± 5.68
A/G ratio	2.05 ± 0.03	1.44 ± 0.07	1.31 ± 0.06	0.93 ± 0.022	8.70 ± 0.94	2.17 ± 0.04	2.09 ± 0.06	2.01 ± 0.05
CL(mmol/ℓ)	113.01 ± 0.24	113.17 ± 0.37	115.50 ± 0.38	115.79 ± 0.38	115.40 ± 0.68	117.66 ± 0.53	115.61 ± 0.23	118.89 ± 0.52

Each value represents the mean ± S.D. (n=8~10)

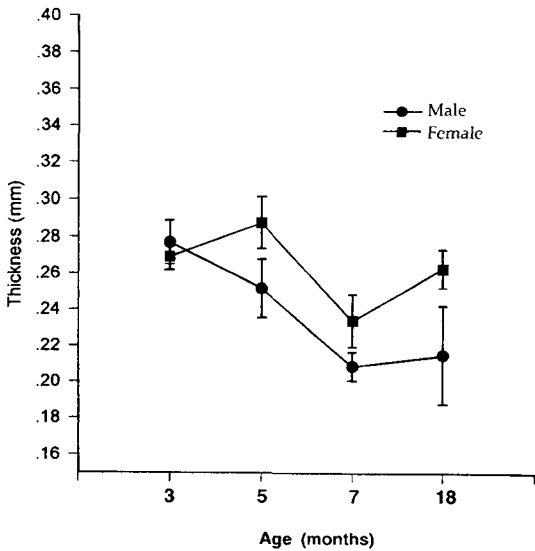


Fig. 5. The changes of tibia thickness of SAMP6 with age.

Each point represents the mean \pm S.D. (n=8~10)

였으며, 7개월령부터는 골두께의 급격한 감소가 관찰되었다. 그러나 유의성있는 차이는 나타나지 않았다.

경골(Fig. 5)에서 골두께를 관찰한 결과, 수컷 동물에서 골두께가 계속 감소되는 경향을 보였으나, 18개월령에서는 약간 증가하였다. 암컷에서도 수컷과 비슷한 양상을 나타내었으며, 유의성있는 차이는 관찰되지 않았다. SAMP6 암, 수컷의 골의 mineral mass와 matrix mass를 알아보기 위해 cortical thickness index를 나타낸 것이 Fig. 6, 7 이다. 대퇴골(Fig. 6)에서는 5개월령에서 암수 모두 최고치에 다다랐으며, 이후 계속 감소하였으며, 암컷이 수컷보다 높은 수치를 나타내었다. 경골(Fig. 7)에서는 암, 수 모두 3개월령부터 7개월령까지는 감소하였으나, 7개월령부터는 증가하는 경향을 보였으며, 수컷이 암컷보다 낮은 수치를 나타내었다.

골 지름의 가령에 따른 변화는 Fig. 8, 9와 같다. 대퇴골(Fig. 8)에서는 수컷이 암컷보다 외곽과 내면 지름의 수치가 높았으며, 암, 수컷 모두 3개월에서 5개월 사이에 지름이 감소하였으나, 그후 증가하는 경향을 나타내었다. 경골(Fig. 9)에서는 대퇴골과는 반대로, 7개월령까지 증가하는 경향을 나타내었으나, 그후 지름이 감소하였다. 골의 지름

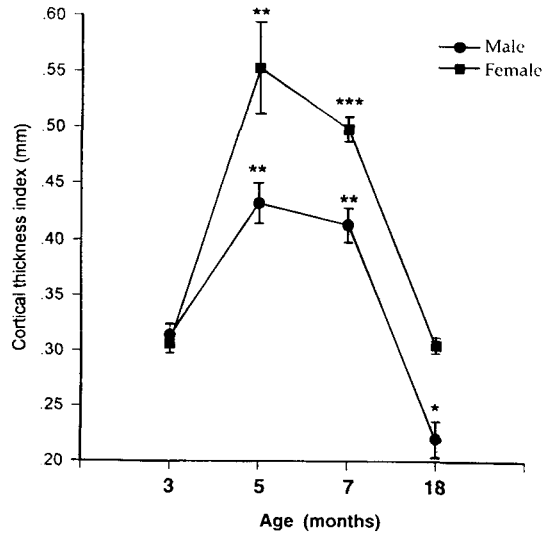


Fig. 6. The changes of cortical thickness index of SAMP6's femur with age.

Each point represents the mean \pm S.D. (n=8~10)

Significant difference from 3 month group (* p<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001)

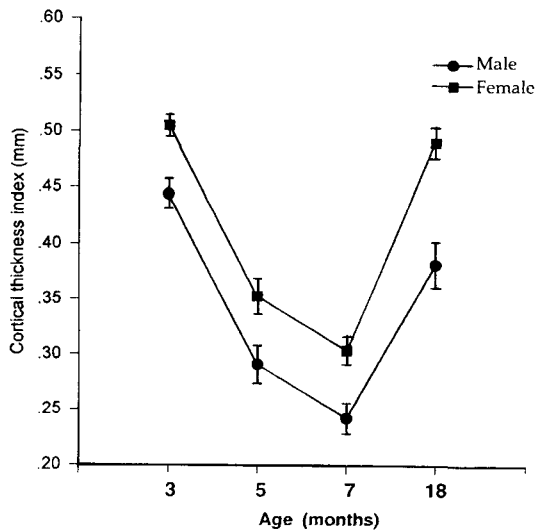


Fig. 7. The changes of cortical thickness index of SAMP6's tibia with age.

Each point represents the mean \pm S.D. (n=8~10)

은 모두 수컷이 암컷보다 크게 나타났다.

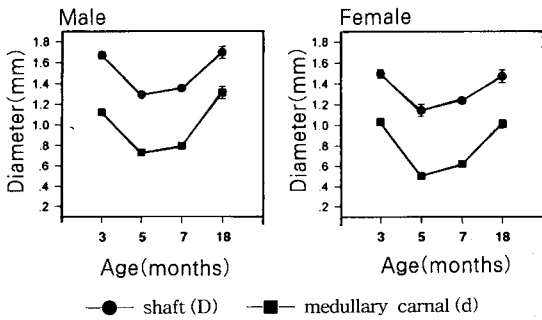


Fig. 8. Age-related changes of the diameter of the shaft(D) and the medullary canal(d) of femur. Each point represents the mean \pm S.D. (n=8~10)

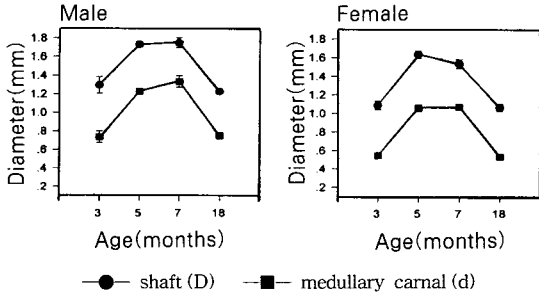


Fig. 9. Age-related changes of the diameter of the shaft(D) and the medullary canal(d) of tibia. Each point represents the mean \pm S.D. (n=8~10)

수분 및 유기물 함량 및 비중

SAMP6 암, 수컷의 대퇴골 및 경골의 수분함량, 유기물 함량, 탄화물량, 생골중량, 건조골중량을 측정 한 결과는 Table 4, 5와 같다. 암, 수컷 동물 및 전 개월령간의 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다. 비중에서도 경골 및 대퇴골 모두에서 암, 수컷 동물의 전 개월령에서 3개월령 동물과 비교하여 유의성 있는 차이는 나타나지 않았다.

화학적 분석

골의 칼슘과 인량 측정결과와 Fig. 10, 11과 같다. 칼슘량(Fig. 10)은 대퇴골에서는 암, 수컷 모두 5개월령에 최고치를 나타내었으며, 그후 감소하였다. 경골에서는 암컷에서는 유의성있는 변화가 관찰되지 않았으나, 수컷에서 18개월령에 유의성있는 감소가 관찰되었다.

인량은 Fig. 11에 나타난 바와 같이, 대퇴골에서 수컷은 5개월령에, 암컷은 7개월령에 최고치를 나타내었으며, 그

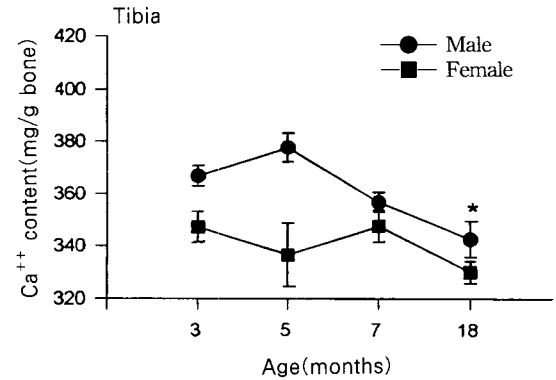
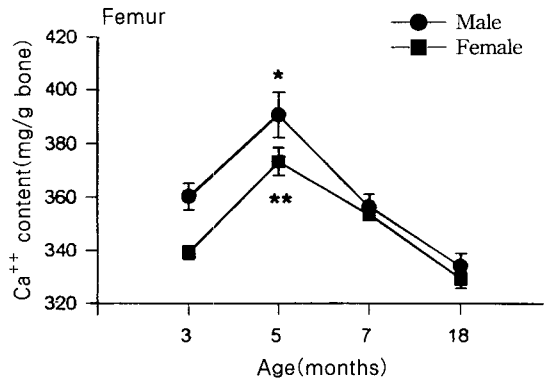


Fig. 10. The changes in calcium content of the bone in SAMP6. Each point represents the mean \pm S.D. (n=8~10). Significant difference from 3 months group (* P<0.05; ** P<0.01)

후 감소하였다. 경골에서의 인량은유의성있는 변화가 관찰되지 않았다.

본 실험에서 구해진 결과를 살펴보면 체중, 장기중량, 혈액화 및 혈액생화학적 결과는 암, 수컷 및 가령에 따라 특성있게 변화되는 경향은 관찰되지 않았다.

그러나 골다공증의 일환으로 발생하는 증상인 골두께 및 골크기의 감소, 골내 칼슘과 인량 감소, alkaline phosphatase 활성의 감소는 암,수컷 동물 및 가령에 따라 특성있게 변화함이 관찰되었다.

즉, 대퇴골 및 경골두께 측정시험 결과 수컷동물에서 암컷동물보다 더욱 급격하게 감소되었고 대퇴골의 칼슘량도 수컷동물에서 암컷동물보다 감소폭이 더 컸다. Alkaline

Table 4. Age related change of bone parameters of male SAMP6.

Items	Age(months)											
	Femur				Tibia				Tibia			
	3	5	7	13	3	5	7	13	3	5	7	13
wet weight(g)	0.0596±0.0030	0.0554±0.0040	0.0525±0.0150	0.0645±0.0070	0.0494±0.0025	0.0436±0.0080	0.0547±0.0093	0.0506±0.0036	0.0407±0.0010	0.0365±0.0067	0.0496±0.0086	0.0379±0.0041
volume(ml)	0.0507±0.0027	0.0535±0.0071	0.0532±0.0117	0.0482±0.0029	0.0461±0.0026	0.0371±0.0074	0.0474±0.0078	0.0389±0.0026	0.0461±0.0026	0.0371±0.0074	0.0474±0.0078	0.0389±0.0026
dry weight(g)	1.0518±0.0459	0.9024±0.1188	0.8588±0.1081	0.9487±0.0826	1.1349±0.0658	1.0218±0.11642	0.9629±0.0995	1.0331±0.1045	0.0238±0.0023	0.0283±0.0022	0.0249±0.0064	0.0303±0.0016
gravity	10.7113±0.8797	16.4480±3.2692	14.2863±1.3093	29.0340±3.6300	6.5605±1.3649	18.1386±8.1730	15.4489±7.2458	23.0578±3.8130	0.0265±0.0037	0.0234±0.0043	0.0248±0.0013	0.0269±0.0012
ashed weight(g)	49.2031±4.4411	34.8285±3.2669	39.8732±5.9069	23.3274±6.9783	39.4346±9.4545	31.2008±5.3852	40.4498±7.5876	23.5235±5.3957	54.0049±9.0780	53.7717±1.9730	46.4365±7.1249	53.4187±5.2693
water content	40.0856±4.9732	51.1090±2.4780	47.6367±5.8242	47.6386±7.4204								
organic content												
ashed content												

Each value represents the mean±S.D. (n=8~10)

Table 5. Age related change of bone parameters of female SAMP6.

Items	Age(months)											
	Femur				Tibia				Tibia			
	3	5	7	13	3	5	7	13	3	5	7	13
wet weight(g)	0.0546±0.0040	0.0510±0.0024	0.0504±0.0133	0.0552±0.0058	0.0441±0.0045	0.0434±0.0035	0.0492±0.0064	0.0430±0.0046	0.0360±0.0037	0.0333±0.0066	0.0415±0.0058	0.0305±0.0057
volume(ml)	0.0463±0.0029	0.0472±0.0057	0.0535±0.0138	0.0425±0.0036	0.0410±0.0039	0.0377±0.0030	0.0433±0.0055	0.0372±0.0036	1.0399±0.0607	1.1588±0.1777	1.0478±0.0814	1.2447±0.1734
dry weight(g)	0.0485±0.0031	0.0446±0.0019	0.0444±0.0115	0.0446±0.0038	0.0249±0.0037	0.0238±0.0017	0.0237±0.0016	0.0240±0.0018	7.0155±0.8797	15.1102±3.2692	13.6154±1.3093	13.5160±3.6300
gravity	1.0481±0.0508	0.9527±0.0928	0.8417±0.1372	1.0500±0.0016	0.0267±0.0023	0.0266±0.0016	0.0236±0.0057	0.0272±0.0016	36.3302±8.0079	31.7068±4.8683	39.2317±4.9636	30.2697±6.5384
ashed weight(g)	11.1429±1.3986	14.5473±1.1952	13.2784±1.7000	19.0834±1.8605	56.6543±8.0126	55.1963±5.3992	48.7872±5.1239	56.2143±6.9237				
water content	39.7465±4.2708	35.1782±2.7115	40.6882±6.1438	31.1470±4.8029								
organic content	49.1106±4.7814	52.1305±3.3427	47.6079±6.6595	49.7696±6.1679								
ashed content												

Each value represents the mean±S.D. (n=8~10)

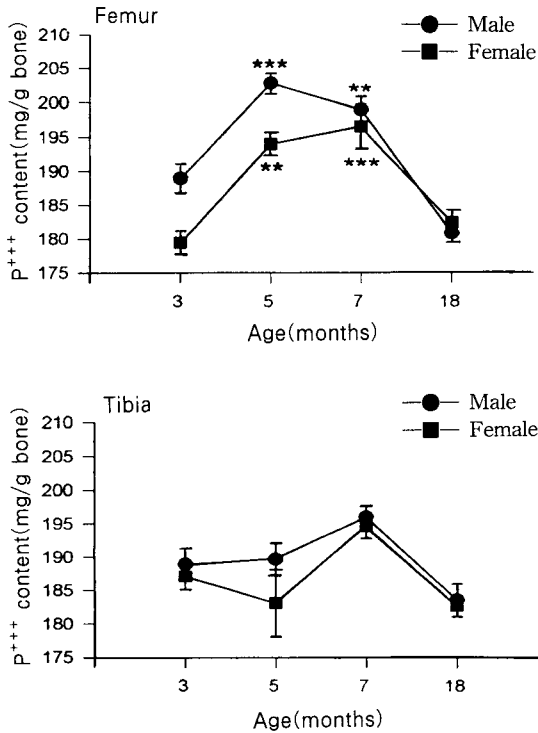


Fig. 11. The changes in phosphorus content of the bone in SAMP6.

Each point represents the mean \pm S.D. (n=8~10)
 Significant difference from 3 months group (** P<0.01; *** P<0.001)

phosphatase 활성의 감소도 수컷동물이 암컷동물보다 더 현저하게 감소하는 경향을 보였다. 또한 상기 증상의 가령에 따른 특성적인 변화는 3개월령 동물에 비하여 5개월령까지는 증가되는 현상이 나타났으나 그 이후에는 7개월을 기준으로 하여 감소되는 경향이 나타났다. 이렇게 암,수컷 동물에서 나타난 실험결과는 사람에게서 보고되어지는 결과와는 상반되고 있다. 사람의 경우에는 골밀도 및 insulin-like growth factor-I (IGF-I)등의 함량이 남성에서 보다 여성에서 더욱 현저히 감소되며[3] 가령이 증가함에 따라 발생하는 골다공증상도 폐경기 이후 여성에게서 주로 발현되고 있음이 잘 알려져 있다[5,10,24].

상기 실험결과를 종합하여 볼 때 본 연구실에서 생산된 골다공증 모델 동물인 SAMP6의 특성발현은 5개월이후 동물에서, 암, 수컷동물 모두에서 골다공증상이 발현됨을 알

수 있었고 또한 앞으로 SAMP6동물의 대조동물인 SAMR1 동물에서의 실험을 수행하여 SAMP6에서 나타난 결과와 비교, 분석 함으로서 적절한 골다공증 모델동물의 기준을 정할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

SAMP6의 성별 및 가령에 따른 생물학적인 특성을 알아보기 위하여 3, 5, 7, 18개월령의 SAMP6 암컷, 수컷의 체중, 장기중량, 혈액학적 및 혈액생화학적 수치, 골의 무게, 비중, 두께 및 골의 화학적 분석을 위해 인과 칼슘을 측정하였다.

1. 체중은 수컷에서 7개월령부터 감소를 나타내었으나, 암컷은 18개월령부터 체중이 감소되기 시작했다. 장기중량을 보면, 간, 신장, 폐의 중량은 수컷이 암컷보다 무거웠으며, 흉선은 암컷이 수컷보다 무겁게 나타났다.

2. 혈액학적 및 혈액생화학적 검사결과 백혈구수가 수컷이 암컷보다 높게 나타났으며, 적혈구수는 암컷이 높게 나타났다. GOT는 5, 7개월령에, BUN은 전체개월령에서 수컷이 암컷보다 높게 나타났다. alkaline phosphatase 활성은 3개월령과 비교하여, 전체 개월령에서 유의성있는 감소가 관찰되었다.

3. 골두께를 측정된 결과 대퇴골에서 암수 모두 7개월령부터 골두께의 급격한 감소가 나타났다. Cortical thickness index를 측정된 결과 대퇴골에서 암수 모두 5개월령에서 최고치에 다다랐으며, 이후 계속 감소하였다.

4. 골의 칼슘량을 측정된 결과, 대퇴골에서 암수 모두 5개월령에 칼슘량이 최고치에 달했으며, 이후 계속 감소하였고, 인량은 수컷에서 5개월령, 암컷에서는 7개월령에 최고치에 달하였고, 이후 계속 감소하였다.

결론적으로 본 실험에서 사용한 골다공증 모델동물인 SAMP6의 특성발현은 5개월 이후 동물에서 나타나고 있으며 따라서 이들 동물을 골다공증 약물 개발을 위한 약효검색에 이용할 때에는 5개월령 이후 7개월령의 동물을 사용하는 것이 바람직하며 본 실험에서 유의성 있는 특성발현이 나타난 골 두께 및 골의 칼슘과 인량, alkaline phosphatase 활성 측정등을 약효 검색에 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문의 발표를 위해 자문 등을 통하여 도움을 주신 실험동물연구팀의 양승돈 박사께 감사의 뜻을 표하는 바입니다.

참고 문헌

1. Avioli, L., Krane, S. M. 1989. *Metabolic Bone Disease* 2nd Ed. Philadelphia. W.B.Saunders Co.
2. Avioli, L. V. 1984. Calcium and osteoporosis. *Annu. Rev. Nutr.* **4**, 471.
3. Barrett-Connor E, Goodman-Gruen D. 1998. Gender differences in insulin-like growth factor and bone mineral density association in old age. *J. Bone Miner. Res.* **13(8)**, 1343~9
4. Garn, S. M, Rohmann, C. G. 1967. Bone loss as a general phenomenon in man. *Fed. Proc.* **26**, 1726-1736
5. Hansen, K. A., Tho, S. P. 1998. Androgens and bone health. *Semin. Reprod. Endocrinol.* **16(2)**, 129~134
6. Haruzo Iida, Satoshi Fukuda. 1993. Age-related changes in bone weights and their components in rats. *Exp. Ani.* **42(3)**, 349~356
7. Hosokawa M, Kasai R, Higuchi K, Takeshita S, Shimizu K, Hamamoto H, Honma A, Irino M, Toda K, Matsumura A, Matsushita M, Takeda T. 1984. Grading score system: A method for evaluation of the degree of senescence in Senescence Accelerated Mouse (SAM). *Mech. Ageing Dev.* **26**, 91-102
8. Kalu, D. N. 1984. Evaluation of the pathogenesis of skeletal changes in ovariectomized rats. *Endocrinology* **115**, 507-512
9. Kawase M, Tsuda M, Matsuo T. 1989. Accelerated bone resorption in senescence-accelerated mouse (SAM-P/6). *J. Bone. Miner. Res* **4**, 359~364
10. Labrie, F., Belanger, A., Van, L. T., Labrie, C., Simard, J., Cusan, L., Gomez, J. L., Candas, B. DHEA and intracrine formation of androgens and estrogens in peripheral target tissues. 1998. its role during ageing. *Steroids* **63(5-5)**, 322~328
11. Matsushita, M., Tsuboyama, T., Kasai, R., et al. 1986. Age-related changes in bone mass in the senescence-accelerated mouse(SAM): SAM-R/3 and SAMP6 as new murine model for senile osteoporosis. *Am. J. Pathol.* **125**, 276~283
12. Mazes, R. B. 1982. On aging bone loss. *Clin. Orthop.* **165**, 239-252
13. Nordin, BEC. 1971. Clinical significance and pathogenesis of osteoporosis. *Br. Med. J.* **1**, 571-576
14. Parfitt, A. M. 1984. Age-related structural changes in trabecular and cortical bone; Cellular mechanism and biomechanical consequence. *Calcif Tissue Int.* **36**, 123-128
15. Riggs, B. L, Melton, L. J. 1983. Evidence for two distinct syndromes of involuntional osteoporosis. *Am. J. Med.* **75**, 899-901
16. Saville, P. D, Smith, R. 1966. Bone density, Breaking force and leg muscle mass as function of weight in bipedal rat. *Am. J. Phys. Anthropol.* **25**, 35~40
17. Saville, P. D. 1969. Changes in skeletal mass and fragility with castration in the rat: A model of osteoporosis. *J. Am. Geriat Soc.* **17**, 155-166
18. Smith, D. M., Nance, W. E., Kang, K., Christian, J. C., Johnston, C. C. 1973. Jr. Genetic factors in determining bone mass. *J. Clin. Invest.* **52**, 2800-2808
19. Smith, R. W., Jr, Pizek, J. 1996. Epidemiologic studies of osteoporosis in women of Puerto Rico and Southeastern Michigan with special reference to age, race, national origin and to other related or associated findings. *Clin. Orthop.* **45**, 31-48
20. Shah, B. G., Krishnarao, G. V. G., Draper, H. H., 1967. The relationship of Ca and P nutrition during adult life and osteoporosis in aged mice. *J. Nutr.* **92**, 30-42
21. Solomon, L. 1979. Bone density in ageing Caucasian and African populations. *Lancet* **29**, 326-1329
22. Takeda, T. R., Hosokawa, M., Takeshita, S., Irino, M., Higuchi, K., Matsushita, T., Tomita, Y., Yasuhira, K., Shimizu, K., Ishii, M., Yamamuro, T. 1981. A new murine model of accelerated senescence. *Mech. Ageing Dev.* **17**, 183-194
23. Weinstein, R. S., Underwood, J. L., Hutson, M. S., DeLuca, H. F. 1984. Bone histomorphometry in vitamin D-deficient rat infused with calcium and phosphorus. *Am. J. Physiol.* **246**, 499-505
24. Ziegler, R., Scheidt-Nave, C., Scharla, S., Pathophysiology of osteoporosis. 1995. unresolved problems and new insights. *J. Nutr.* **125** (7 Suppl.), 2033~2037