

만성신부전 모델쥐에서 인의 함량은 같고 단백질 수준이 다른 식이가 신기능과 골격 대사에 미치는 영향

이 현 숙[§] · 김 화 영

이화여자대학교 가정과학대학 식품영양학과

Effect of Dietary Protein Level on Renal Function and Bone Metabolism in Rats with Reduced Renal Mass When Dietary P Level is Equal

Lee, Hyun Sook[§] · Kim, Wha Young

Department of Food & Nutrition, College of Home Science, Ewha Womans University, Seoul 120-749, Korea

ABSTRACT

Studies were carried out to explore the influence of dietary protein level on bone metabolism in uninephrectomized rat (experimental renal failure model) when dietary Ca and P contents were equal. Male rats were uninephrectomized or sham operated and fed 8%, 15% and 40% casein diets for 24 weeks. Ca and P contents of the all diet were 0.4% and 0.6% respectively. The results are summarized as follows. We did not found any significant difference in PTH and Ca level of the serum, Ca intake and Ca excretion among the experimental groups. There was significant positive correlation between the PTH and phosphate level. There was significant inverse correlation between serum Ca and creatinine level. The effect of the dietary protein level and renal mass loss on density and Ca contents of the bone were small and different according to the kinds of the bone. Low protein diet was associated with a significant enhancement of scapular density. Femur and vertebra density, however, were not influenced by dietary protein level and uninephrectomy. Light microscopic examination showed several calcified foci in the kidney in all experimental groups. Low protein diets have been used for a long time in the conservative management of chronic renal failure as they have a beneficial effect in preventing the appearance of symptoms. This study elucidated that part of beneficial effects of the low protein diet related to the suppression of the hyperphosphatemia. And these results represent, even though uninephrectomized rats fed high protein diet, the secondary hyperparathyroidism is suppressed by the regulation of the P level. Therefore this study emphasized the need to pay more attention to the regulation of dietary P level as well as dietary protein content in chronic renal failure. (*Korean J Nutrition* 34(4) : 359~366, 2001)

KEY WORDS: uninephrectomy, dietary protein level, glomerular filtration rate, secondary hyperparathyroidism, Ca & bone metabolism.

서 론

세포외액의 칼슘 농도는 일정한 농도로 유지된다. 여기에는 부갑상선호르몬(PTH)과 활성화된 1,25-dihydroxyvitamin D(1,25(OH)₂D)가 주로 관여한다. 이 호르몬들의 표적 기관은 골격, 신장, 소장이다. 혈중 칼슘 이온 농도가 감소하면 부갑상선에서 PTH가 분비되고 이것은 뼈에 작용하여 칼슘을 용출시켜 세포외액으로 방출한다. 또한 신장 윌리세뇨관

에서의 칼슘 재흡수를 촉진하여 혈청 칼슘 농도가 정상이 되도록 해준다. 1,25(OH)₂D는 소장에서 칼슘 흡수를 도우며 신장은 비타민 D를 활성화시키는 기관이다. 이와 같이 신장, 골격, 소장, 세포외액의 전체적인 유기적 관계하에서 세포외액의 칼슘 이온 농도가 유지되는 것이다.¹⁻³⁾

만성신부전 환자에서는 뼈질환이 흔하다. 장기간 투석환자,^{4,7)} 뇨독증 환자^{8,9)} 등 만성 신부전 환자에서는 신성 골이영양증(renal osteodystrophy), 골연화증, 골다공증을 비롯한 골질환 발생빈도가 높으며, 신성 골이영양증으로 인한 골손실이 혈액투석환자의 주요 사망원인으로 보고되었다.¹⁰⁾ 이것의 원인으로는 신부전으로 인한 속발성 부갑상선기능항진증, 1,25(OH)₂D 결핍, 면역억제제 투여, 만성 산독증,

접수일 : 2001년 2월 6일

채택일 : 2001년 5월 14일

[§]To whom correspondence should be addressed.

2차적인 무월경상태, 만성 알루미늄 중독, 헤파린에의 노출 등이 거론되고 있다.^{4,11-13)}

만성신부전과 관련해서 부갑상선의 세포증식이 일어나고 골격손상이 일어나는 것은 1930년대부터 거론되어졌다.¹⁴⁾ 근래에 방사선 동위원소를 이용한 분석기술의 발달로 만성 신부전 초기단계에서도 PTH 수준이 높아지는 것과 골격질환이 생기는 것을 관찰할 수 있었다.¹⁵⁾ 부갑상선 세포증식과 2차적인 부갑상선기능항진증을 유발시키는 원인은 인의 보유, 저칼슘혈증, 혈중 1,25(OH)₂D의 감소 등이 포함된다. Bricker 등¹⁶⁾은 혈중 인 농도가 점차 증가함에 따라 칼슘 이온 농도가 낮아지는 결과를 낳고 이것이 PTH의 분비를 증시킨다는 “trade-off” 가설을 제안하였다. PTH 수준이 증가하면 세뇨관에서 인의 재흡수를 감소시키고 뇨로 배설시켜 혈중 칼슘과 인은 정상농도를 유지하게 된다. 정상인과 중 정도의 신부전환자를 대상으로 한 연구¹⁷⁾에서 인 섭취를 제한한 경우 1,25(OH)₂D의 생성률이 증가하고 PTH 수준이 감소하였다. 그러나 심한 신부전 환자는 신조직의 감소로 1,25(OH)₂D의 생성이 제한되어 이런 결과를 보이지 않았다.

신부전 시에 보편적으로 나타나는 부갑상선기능항진증을 방지하기 위한 치료방법 또는 식이요법에 대한 연구들은 꾸준히 진행되어 식이 단백질 수준의 변화,¹⁸⁾ 단백질 급원 식품의 변형,¹⁹⁾ 식이제한,²⁰⁾ 저인식이²¹⁾ 등이 연구되어졌다.

인을 조절하는 방법은 인 결합제와 칼슘칼슘제제를 투여하는 방법이 많이 사용되고 인의 섭취를 제한함으로써 인을 조절하는 방법에 대해서도 많이 연구되어졌다. 식이 인을 제한하는 가장 일반적인 방법은 저단백식을 이용하는 것이다. 이와 같이 저단백식은 혈청 요소농도를 낮추어 신부전으로 인한 노독증 등을 경감시켜 신부전의 진행속도를 늦추고 골질환을 예방할 수 있다는 장점 때문에 만성 신부전 환자에게 보편적으로 처방되어져 왔다. 그런데 최근 만성신부전 환자에게 저단백식을 주는 것이 고인산혈증 예방외에는 노독증 경감 효과도 없고 오히려 만성영양불량만 가중시키므로 저단백식을 권장할 필요가 없다는 연구결과²²⁾가 보고되었다. 그러므로 저단백식의 유용성에 대한 재평가가 필요하며 식이 단백질과 인의 섭취량과 신기능과 골격대사와의 관계를 종합적으로 살펴볼 필요가 있다.

따라서 본 연구는 한쪽 신장을 절제하여 점진적 사구체손상을 유도하여 만성 신부전 모델로 만든 흰쥐에게 인의 섭취량은 같게 조정하고 식이 단백질 수준을 달리한 식이를 장기간 먹었을 때 신기능의 변화와 칼슘과 골격대사와의 관계를 살펴봄으로써 신부전 환자의 식이지침의 기초자료를 제시하고자 수행되었다.

재료 및 방법

1. 실험 동물의 사육 및 식이

본 연구에서는 12주령의 평균체중 338 ± 5.7 g인 Sprague-Dawley종 수컷 흰 쥐를 130마리는 좌측 신장절제술(uninephrectomy; UNx)을 행하고 60마리는 대조군으로써 sham-operation(SNx)을 실시하여 그 후 4주 동안 회복시킨 후 식이내 casein 함량이 8%, 15%, 40%인 식이로 24주 동안 사육하였다. 그러므로 실험군은 40% casein 식이-신장절제군(UNx-H, 37마리), 40% casein 식이-대조군(SNx-H, 17마리), 15% casein 식이-신장절제군(UNx-M, 37마리), 15% casein 식이-대조군(SNx-M, 17마리), 8% casein 식이-신장절제군(UNx-L, 37마리), 8% casein 식이-대조군(SNx-L, 17마리) 등 6군이였다.

각 식이의 칼슘과 인의 함량은 모두 0.4%와 0.6%가 되도록 조정하였다. 탄수화물 급원은 옥수수 전분(풍원)을, 지방 급원은 옥수수 기름(백설표)을 사용하였다. 실험식이의 구성은 이미 보고된 바와 같다.²³⁾ 실험기간 동안 흰쥐는 한 마리씩 분리하여 사육하였고 물과 식이는 제한없이 공급하였다.

2. 시료의 채취 및 생화학적 분석

1) 시료의 채취

노와 번은 실험 동물을 희생하기 2~3일 전에 대사장에서 24시간 동안 채취하였다. 실험기간이 끝난 후 12시간 동안 굶긴 동물을 에틸에테르로 마취한 다음 개복하여 3.8% 구연산 나트륨(sodium citrate)으로 처리한 주사기로 심장에서 혈액을 채취하여 혈청을 얻어 분석 시까지 냉동 보관하였다. 골격 중 체중의 영향을 받는 뼈로서 대퇴골과 4번째 척추뼈 그리고 체중의 영향을 받지 않는 뼈로서는 견갑골을 때 내어 분석에 사용하였다. 뼈의 밀도는 Archimedes의 원리²⁴⁾를 이용하여 측정하였다.

신조직 검사를 위하여 각 실험군에서 무작위로 5마리씩을 선정하여 이 쥐들에서 오른쪽 신장의 일부를 떼어낸 후 10% 중성 포르말린에 고정하고 파라핀에 포매하여 microtome으로 4μ 두께로 연속 절편한 후 hematoxylin-eosin과 periodic acid-Schiff stain을 시행하였다.

2) 생화학적 분석

Alkaline phosphatase(ALP)는 아산제약의 kit를 사용하여 측정하였다. 혈청의 PTH는 혈청 100μl에 ¹²⁵I PTH를 200μl를 넣어 20~25℃에서 2시간 동안 incubation시킨 후 2300rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 완전히 제

거한 다음 γ -Scintillation counter를 이용하여 침전물의 방사능을 측정하였다.

뇨와 혈청의 칼슘은 기질의 간섭을 줄이기 위해 각각 0.5%와 0.1% lanthanum chloride 용액으로 희석하여 Atomic Absorption Spectrometer(Perkin Elmer Co. 2380)로 422.7nm(Slit 0.7nm)에서 분자흡광도를 측정하였다. 변과 뼈의 칼슘 함량은 회화시킨 후 1N HCl로 녹인 다음 0.5% lanthanum chloride 용액으로 희석하여 뇨와 혈청에서와 같이 흡광도를 측정하였다.

3. 자료 처리 및 분석

본 연구의 결과는 SAS(statistical analysis system) 통계모델을 이용하여 분석하였다. 각 실험군의 결과를 평균치와 표준오차로 나타내었고 각 실험군간의 비교는 ANOVA로 분석 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의수준 $\alpha = 0.05$ 에서 유의성을 검증하였다. 신장절제와 식이단백질 수준 사이의 교호 작용은 $\alpha = 0.05, 0.01, 0.001$ 수준에서 two-way ANOVA에 의해 분석하였다. 신장기능(사구체여과율, 혈청 크레아티닌)과 혈중 골격대사 지표들, 골밀도 사이의 관계를 보기 위하여 Pearson 상관계수를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 칼슘과 골격 대사

칼슘의 섭취량, 대변을 통한 배설량, apparent 칼슘 흡수율 및 균형은 Table 1에서 보는 바와 같이 각 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다. 요칼슘 배설량은 UNx-H군

(40% 단백질 식이-신장절제군)이 가장 높았으며 그 다음 UNx-M(15% 단백질 식이-신장절제군), UNx-L(8% 단백질 식이-신장절제군), SNx-H군(40% 단백질 식이-대조군)이 같은 수준으로 높았고 SNx-M(15% 단백질 식이-대조군)과 SNx-L군(8% 단백질 식이-대조군)이 가장 낮았다. 단백질 섭취량이 많을수록 뇨로 배설되는 칼슘의 양이 증가하는 것은 이미 보고되어진 바^{25,26)}와 같다. 그런데 신장절제에 의한 주효과도 있어 신장절제군에서 뇨 칼슘 배설량이 증가하는 것을 볼 수 있었고 이것은 신장절제에 의해 신조직의 감소와 기능퇴화로 칼슘 대사를 조절할 수 있는 기능이 감소하였음을 의미하는 것으로 보여진다.

Table 2의 혈중 칼슘 농도는 SNx-M군이 가장 높았으며 그 다음 SNx-L, UNx-H > UNx-M > UNx-L > SNx-H 순이었다. 이 결과에서 보면 UNx-H군을 제외하고는 요로 배설되는 칼슘량이 많았던 군에서 혈중 칼슘 농도가 낮은 경향을 볼 수 있다. UNx-H군이 이렇게 의외의 결과를 보이는 이유 중의 하나는 선행연구²⁵⁾에서도 밝힌 바와 같이 이 군의 사망률이 매우 높았으며 신조직(renal mass)이 감소하고 고단백 식이를 먹으면 초기에 사망할 확률이 높으나 일단 살아남은 쥐는 이 모든 조건에 적용하기 때문인 것으로 보인다. 혈중 인 농도는 SNx-L > UNx-L, SNx-H, UNx-H > UNx-M군 순이었으며 식이 단백질 수준이 높을수록 혈중 인 농도는 감소하는 경향($p < 0.05$)이었다. 혈청 칼슘과 인의 농도가 각 군간에 차이가 있었음에도 불구하고 혈중 PTH 농도는 각 군간에 유의적인 차이가 없었다. ALP 활성도 각 군간에 유의적인 차이는 없었다(Table 2). 이런 결과는 혈청 칼슘과 인의 농도가 비록 각 군간에 유의적인 차이를 보인다 하더라도 그 수준이 정상상을 유지할 때

Table 1. Ca intake, excretion, absorption, and balance

Groups ¹⁾	Ca intake (mg/day)	Fecal Ca (mg/day)	Urinary Ca (mg/day)	Apparent Ca absorption(%)	Ca balance (mg/day)	
UNx-H	97.28 ± 7.50	69.62 ± 8.07	4.60 ± 0.46 ^a	28.81 ± 5.47	29.15 ± 4.77	
UNx-M	99.08 ± 3.89	62.17 ± 7.50	4.27 ± 0.28 ^{ab}	44.26 ± 5.97	47.45 ± 3.78	
UNx-L	109.35 ± 3.93	72.95 ± 5.54	4.30 ± 0.27 ^{ab}	40.65 ± 2.96	42.22 ± 5.21	
SNx-H	109.35 ± 14.95	65.63 ± 4.06	3.66 ± 0.33 ^{ab}	34.67 ± 7.37	45.41 ± 18.17	
SNx-M	108.44 ± 7.65	66.47 ± 8.79	3.42 ± 0.32 ^b	44.96 ± 10.57	56.47 ± 19.26	
SNx-L	90.33 ± 3.27	65.85 ± 9.79	3.46 ± 0.22 ^b	32.56 ± 7.31	30.80 ± 7.81	
F-value ²⁾	S	NS	NS	<0.01	NS	NS
	P	NS	NS	NS	NS	NS
	C	NS	NS	NS	NS	NS

Each value is mean ± standard error.

Values bearing different superscripts are significantly different among experimental groups($p < 0.05$).

1) UNx-H: uninephrectomized-40% protein diet, UNx-M: uninephrectomized-15% protein diet, UNx-L: uninephrectomized-8% protein diet, SNx-H: sham-40% protein diet, SNx-M: sham-15% protein diet, SNx-L: sham-8% protein diet group

2) Determined by two-way ANOVA procedure for main effect and interaction

S: Main effect of nephrectomy

P: Main effect of dietary protein level

C: Interaction effect of nephrectomy and dietary protein level

NS: Not significant

는 PTH의 측정이 예민한 지표가 아님을 나타내주는 결과로 볼 수 있다. 또한 ALP의 경우 최근 혈중 총 ALP의 측정정보는 bone ALP의 측정이 골격대사의 지표로 더 예민함이 보고²⁷⁾되고 있어 앞으로의 연구에서는 고려해야 할 사항으로 사료된다.

PTH, ALP, GFR 등과 혈액생화학적 지표, 그리고 뼈 밀도와 뼈 칼슘 함량들과의 상관관계를 Table 3에 나타내었다. 이 때 GFR과 혈청 크레아티닌 농도는 선행연구의 값²⁸⁾을 사용하였다. PTH는 혈중 인 농도와 유의적인($p < 0.01$)

양의 상관관계를 보였다. GFR은 혈청 크레아티닌 농도와 음의 상관관계($p < 0.01$)를 보였다. 혈청 크레아티닌 농도가 높을수록 혈청 칼슘 농도는 유의적($p < 0.001$)으로 낮았고, 척추뼈 밀도는 높았으며($p < 0.05$), 대퇴골 칼슘 함량은 낮았다($p < 0.05$). 각 뼈들의 밀도와 칼슘 함량 사이에는 유의적인 상관관계가 없는 것으로 나타났다. 혈중 칼슘 농도가 낮고 인 농도가 높을수록 PTH가 높아짐으로써 뼈의 칼슘이 용출되고 그로 인해 뼈의 칼슘 함량의 감소가 기대된다. 그런데 본 연구에서는 혈중 칼슘 농도와 PTH 사이에는 유의

Table 2. Outcome of serum parameters in uninephrectomized and sham-operated rats fed diets containing different protein level

Groups ¹⁾	Serum Ca(mg/dl)	Serum P(mg/dl)	PTH(pg/ml)	Alkaline Phosphatase
UNx-H	8.68 ± 0.21 ^{ab}	3.59 ± 0.21 ^{ab}	8.13 ± 0.82	1.33 ± 0.06
UNx-M	7.88 ± 0.53 ^{bc}	3.37 ± 0.22 ^b	8.83 ± 1.39	1.21 ± 0.08
UNx-L	7.37 ± 0.32 ^c	3.92 ± 0.24 ^{ab}	7.19 ± 1.09	1.33 ± 0.09
SNx-H	6.44 ± 0.13 ^d	3.71 ± 0.16 ^{ab}	9.56 ± 2.00	1.28 ± 0.08
SNx-M	8.98 ± 0.13 ^a	3.74 ± 0.31 ^{ab}	8.15 ± 1.85	1.14 ± 0.06
SNx-L	8.75 ± 0.20 ^{ab}	4.38 ± 0.45 ^a	6.72 ± 2.19	1.18 ± 0.09
F-value ²⁾	S NS P NS C NS	NS $p < 0.05$ NS	NS NS NS	NS $p < 0.05$ $p < 0.01$

Each value is mean ± standard error.

Values bearing different superscripts are significantly different among experimental groups($p < 0.05$).

1) See the legends of Table 1.

2) Determined by two-way ANOVA procedure for main effect and interaction

S: Main effect of nephrectomy

P: Main effect of dietary protein level

C: Interaction effect of nephrectomy and dietary protein level

NS: Not significant

Table 3. Pearson's correlation coefficients for biochemical parameters of Ca and bone metabolism

	Parathyroid hormone	Alkaline phosphatase	Glomerular filtration rate	Serum creatinine	Serum Ca	Serum P	Femur density	Scapular density	Vertebra density	Femur Ca	Scapular Ca
Parathyroid hormone											
Alkaline phosphatase	0.0887										
Glomerular filtration rate	-0.2046	-0.0723									
Serum creatinine	-0.0225	0.1521	-0.5225**								
Serum Ca	0.0371	-0.2632	0.2253	-0.7259***							
Serum P	0.4821**	-0.1814	-0.0289	-0.1535	0.0495						
Femur density	0.0478	-0.0860	-0.0222	-0.2154	0.1939	-0.0118					
Scapular density	-0.0555	-0.1337	0.1575	0.1416	-0.1320	-0.0382	-0.1829				
Vertebra density	-0.0214	-0.0555	0.0061	0.3575*	-0.2840	-0.1682	-0.1959	0.5118**			
Femur Ca	0.0131	-0.4265	0.2489	-0.4063*	0.2739	0.1853	-0.1483	-0.2453	-0.4418*		
Scapular Ca	-0.0255	0.1693	-0.1384	0.2116	-0.1997	-0.0699	-0.2658	-0.1520	-0.3361*	0.1435	
Vertebra Ca	0.0249	0.4596	0.2358	-0.1632	-0.0014	-0.0614	-0.1169	-0.2453	-0.1599	-0.3461	-0.0757

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ by Pearson correlation.

적인 상관관계가 없었다. 혈청 크레아티닌 농도의 증가는 사구체여과율의 감소 등 신기능의 감소를 의미하는 것으로서 따라서 신기능이 감소와 혈청 칼슘 농도 감소가 양의 상관관계가 있는 것으로 볼 수 있다. 혈청 크레아티닌 농도의 증가와 혈청 칼슘 농도가 낮고 PTH가 높을수록 대퇴골의 칼슘 함량은 낮았지만, 척추뼈의 밀도는 오히려 높아 뼈의 종류에 따라서 결과에 차이가 있었다.

신절제를 하여 만성신부전을 유발시킨 쥐에서 식이 단백질 수준이 골격 대사에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 대퇴골, 척추골, 견갑골의 무게, 밀도, 칼슘과 회분 함량을 측정하였으며, 그 결과는 Table 4에 나타내었다. 대퇴골의 젓은 무게, 밀도, 길이, 칼슘과 회분 함량은 각 군간에 유의적인 차이가 없었다. 그런데 칼슘과 회분 함량은 신절제에 의한 주효과가 유의적($p < 0.05$)이어서 신절제군이 sham

처리군보다 대퇴골의 칼슘과 회분 함량이 더 높은 경향이였다. 쥐의 경우 다리뼈는 식이 단백질에 의한 영향을 거의 안 받는 것으로 보인다. Whiting의 연구²⁸⁾에서도 성숙한 수컷 흰쥐를 10달 동안 고단백식이와 정상식이로 사육한 후 대퇴골과 경골(tibia)의 무게, 회분, 칼슘, 밀도가 고단백식에 의한 영향을 받지 않았다.

견갑골의 무게와 부피는 각 군간에 유의적인 차이가 없었다. 밀도는 SNx-L군이 가장 높고 UNx-H군이 가장 낮았다. 또한 식이 단백질 수준에 따른 주효과도 유의적($p < 0.05$)이어서 식이 단백질 수준이 낮을수록 밀도가 높은 경향이였다. 견갑골의 칼슘과 회분 함량은 UNx-L군이 가장 높았고 UNx-M과 SNx-H군이 가장 낮았다.

척추골의 무게와 부피는 신절제를 하여 만성신부전을 유도한 쥐보다 sham 처리군에서 더 높은 경향($p < 0.001$)이

Table 4. Bone composition

Groups ¹⁾	Wet wt(g)	Volume(ml)	Density(mg/cm ³)	Length(mm)	Ca(mg)	Ash(mg)
Femur						
UNx-H	1.30 ± 0.04	0.44 ± 0.02 ^a	2.96 ± 0.07	41.40 ± 0.31	140.35 ± 4.33	501.70 ± 35.49
UNx-M	1.26 ± 0.03	0.44 ± 0.01 ^a	2.88 ± 0.04	41.47 ± 0.26	140.94 ± 3.95	518.13 ± 14.07
UNx-L	1.22 ± 0.06	0.39 ± 0.03 ^{ab}	3.26 ± 0.20	41.10 ± 0.20	144.09 ± 5.33	475.86 ± 18.43
SNx-H	1.17 ± 0.02	0.38 ± 0.01 ^b	3.20 ± 0.16	40.67 ± 0.38	131.41 ± 4.32	454.80 ± 15.54
SNx-M	1.20 ± 0.03	0.41 ± 0.01 ^{ab}	2.95 ± 0.06	40.61 ± 0.39	132.44 ± 4.15	468.47 ± 12.22
SNx-L	1.20 ± 0.07	0.38 ± 0.02 ^{ab}	3.14 ± 0.12	40.44 ± 0.69	131.11 ± 8.01	446.31 ± 25.23
F-value ²⁾	S	NS	$p < 0.05$	NS	$p < 0.05$	$p < 0.05$
	P	NS	NS	NS	NS	NS
	C	NS	NS	NS	NS	NS
Scapular						
UNx-H	0.31 ± 0.01	0.13 ± 0.01	2.48 ± 0.07 ^b		30.60 ± 0.75 ^{ab}	124.04 ± 4.05 ^{ab}
UNx-M	0.32 ± 0.01	0.12 ± 0.01	2.78 ± 0.12 ^{ab}		25.68 ± 3.35 ^b	124.04 ± 5.00 ^b
UNx-L	0.31 ± 0.01	0.11 ± 0.00	2.76 ± 0.08 ^{ab}		36.57 ± 6.26 ^a	124.46 ± 6.93 ^a
SNx-H	0.28 ± 0.01	0.11 ± 0.01	2.63 ± 0.08 ^{ab}		27.72 ± 0.90 ^b	108.05 ± 3.81 ^b
SNx-M	0.31 ± 0.02	0.10 ± 0.01	3.03 ± 0.25 ^{ab}		29.42 ± 0.74 ^{ab}	111.30 ± 4.03 ^{ab}
SNx-L	0.31 ± 0.02	0.10 ± 0.01	3.19 ± 0.35 ^a		28.68 ± 1.36 ^{ab}	110.79 ± 7.28 ^{ab}
F-value	S	NS	NS	NS	NS	$p < 0.001$
	P	NS	NS	$p < 0.05$	NS	NS
	C	NS	NS	NS	NS	NS
Vertebra						
UNx-H	0.37 ± 0.03 ^{bc}	0.10 ± 0.01 ^{abc}	3.89 ± 0.27		20.93 ± 0.72 ^{ab}	125.23 ± 6.23 ^{ab}
UNx-M	0.38 ± 0.03 ^{abc}	0.09 ± 0.01 ^{bc}	4.54 ± 0.38		21.32 ± 0.85 ^{ab}	126.28 ± 6.15 ^{ab}
UNx-L	0.30 ± 0.02 ^c	0.06 ± 0.01 ^c	4.86 ± 0.46		18.72 ± 1.18 ^b	100.88 ± 7.22 ^b
SNx-H	0.51 ± 0.05 ^a	0.13 ± 0.01 ^a	4.21 ± 0.51		22.59 ± 1.26 ^{ab}	136.14 ± 11.21 ^a
SNx-M	0.49 ± 0.05 ^{ab}	0.11 ± 0.01 ^{ab}	4.65 ± 0.44		23.68 ± 2.13 ^a	135.10 ± 10.39 ^a
SNx-L	0.47 ± 0.05 ^{ab}	0.12 ± 0.01 ^{ab}	4.03 ± 0.31		20.91 ± 1.59 ^{ab}	124.74 ± 13.01 ^{ab}
F-value	S	$p < 0.001$	$p < 0.001$	NS	NS	NS
	P	NS	NS	NS	NS	NS
	C	NS	NS	NS	NS	NS

Each value is mean ± standard error.

Values bearing different superscripts are significantly different among experimental groups($p < 0.05$).

1) See the legends of Table 1.

2) Determined by two-way ANOVA procedure for main effect and interaction

S: Main effect of nephrectomy

P: Main effect of dietary protein level

C: Interaction effect of nephrectomy and dietary protein level

NS: Not significant

었다. 척추골의 무게, 부피, 칼슘, 회분 함량은 UNx-L군이 다른 군들에 비해 가장 낮았다.

위의 결과로 볼 때 식이 내 인의 함량을 낮은 수준으로 같게 해주고 식이 단백질 수준만 변화시켰을 때 고단백식이 뼈의 밀도와 무기질 함량에 악영향을 미치지 않는 것으로 보인다. 또한 척추골에서는 신절제를 하고 저단백식을 먹인 군의 골밀도와 무기질 함량이 낮은 값을 보여 뼈에 따라서는 신부전시 저단백식을 먹이는 것이 골격대사에 오히려 나쁜 영향을 미칠 가능성을 보였다.

Rix 등²⁹⁾은 투석전 환자에서 신부전이 심할수록 PTH가 증가하며 PTH가 높을수록 혈청 인과 크레아티닌 농도가 증가하고 칼슘 이온 농도는 감소한다고 하였다. Miller 등³⁰⁾은 5/6 신절제쥐에서 칼슘과 인 수준이 다른 식이를 12~14주 먹인 후 부갑상선 조직이 80~90% 비대해지고 PTH 농도가 2.3~7.7배 증가했다고 보고했다. 본 연구에서는 한쪽 신장을 절제하고 고단백식을 먹여 신부전을 유도한 신절제군 쥐에서도 PTH 농도 증가현상을 볼 수 없었으며 PTH와 다른 요인들과의 상관관계를 보아도 GFR, 혈중 칼슘, 혈청 크레아티닌 농도와 관계를 보이지 않았으며 다만 PTH 농도가 높을수록 혈중 인 농도가 높은 경향이였다. 선행 연구들과 본 연구 결과의 이러한 차이점은 식이 단백질 수준을 변화시켜도 칼슘과 인의 섭취수준을 같게 해준 경우 신기능 또는 혈액 지표들이 달리 영향 받음을 증명해 주는 것이라 볼 수 있다. 즉 식이 단백질 수준 변화시의 신기능 변화와 이로 인한 칼슘 골격 대사의 변화는 식이 단백질 수준 변화에 따른 인 섭취 수준의 차이에 의한 것이라는 주장을 확인해 주는 것이다. 따라서 고단백식을 해도 인의 섭취량을 제한한 경우 부갑상선기능항진증을 방지할 수 있고 이로 인한 2차적 골질환을 막을 수 있는 것으로 보인다. 또한 저단백식이 뼈의 종류에 따라서는 만성신부전시 골밀도와 무기질 함량이 유의적으로 감소할 가능성이 있으므로

골질환의 위험성이 있는 만성신부전환자에게는 저단백식이 처방시 주의해야 할 것으로 보인다. 또한 이들 환자에게 적절한 단백질 권장 수준을 찾기 위한 후속 연구가 계속 진행되어야 할 것으로 사료된다.

2. 신조직 검사

광학 현미경으로 신조직의 칼슘 축적 현상을 관찰한 결과 Table 5에서와 같이 모든 실험군에서 일부 쥐들의 신장에 칼슘이 침착된 것이 관찰되었으나 각 군 간에 유의적인 차이가 없이 모든 군에서 같은 경향을 보였다. Fig. 1은 UNx-H군의 신조직에 칼슘이 침착된 상태를 보여주고 있다.

말기신부전시 신장에 칼슘이 축적되는 현상(renal calcification 또는 nephrocalcinosis)은 사람과 동물³¹⁾ 모두에서 보고되어졌다. 이것은 칼슘과 인의 대사가 비정상적으로 되어서 혈액 속의 PTH 농도가 증가하는 현상과 함께 일어나며, 그 결과 신조직의 간질(interstitium)에 칼슘과 인이 축적된다고 한다. 신부전 환자에서 혈중 PTH 농도가 높아지는 이유는 인의 보유로 인한 저칼슘혈증이 원인인 것으로 추정된다. 고인산혈증이 신기능을 악화시키는 기전은 'precipitation-calcification hypothesis'로 설명된다. 즉 신부전 환자에서 고인산혈증시 남아있는 네프론의 배설 능력보다 더 많은 인산이 여과되면 세뇨관강, 세뇨관 주변조직, 모세혈관, 간질(interstitium)에 인산칼슘이 침착되고, 그 결과 만성적인 세뇨관간질성 염증반응이 초래됨으로써 세포경화와 괴사를 이끌어 점진적인 기능퇴화를 유도하고 신부전이 더욱 진행된다는 가설이다.³²⁾ 즉 고인산혈증은 남아있는 네프론의 해부학적, 기능적 완전성을 감소시킨다.

Klahr 등³³⁾은 인 제한식을 할 경우 신장에 칼슘의 침착이 감소되었다고 하였다. Haut 등³⁴⁾의 연구에서는 한쪽 신

Table 5. Light microscopic findings in uninephrectomized- and sham-operated rats fed diets containing different protein level

Groups ¹⁾	Nephrocalcinosis				
	- ²⁾	±	+	++	+++
UNx-H	4 ³⁾	0	0	1	0
UNx-M	2	0	1	1	1
UNx-L	2	0	2	1	0
SNx-H	3	0	2	0	0
SNx-M	2	0	3	0	0
SNx-L	2	0	2	1	0

1) See the legends of Table 1.

2) degree of histological change: -, normal; ±, minimal; +, mild; ++, moderate; +++, marked

3) Values are number of rats.

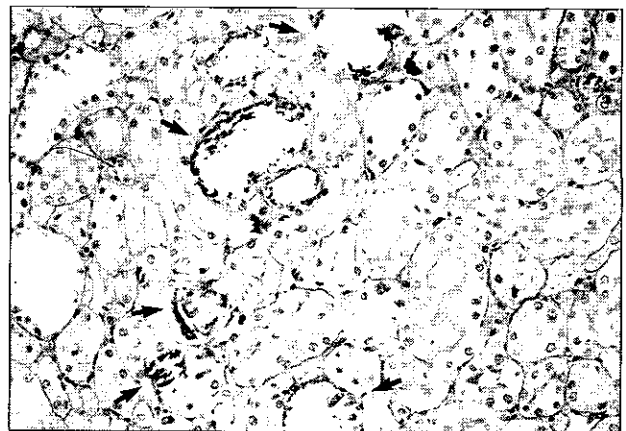


Fig. 1. Photomicrographs of kidney sections in uninephrectomized rat fed a 40% casein diet. Several calcified foci are seen(arrows)(X 200).

장을 절제한 쥐에게 0.5%, 1%, 2%인 함유식이 먹인 결과 0.5%의 저단백식을 먹인 쥐들은 정상이었으나 1% 이상의 인식을 먹인 쥐에서 신장에 칼슘이 축적되고 조직학적 변화를 보인 것으로 나타났다. 이와 같이 인과 관련된 신장 손상은 신장에 인산칼슘이 축적되는 것과 관련 있으며 신장의 칼슘축적은 혈중 인 농도보다는 기능할 수 있는 신조직 단위 당 부과되는 인 배설량과 관련이 있는 것으로 보여진다. 즉 신조직이 감소하면 인에 의한 신장 독성이 증가한다는 것이다. 인은 대부분 단백질 식품에 포함되어 있으므로 고단백식이 신장기능의 쇠퇴를 촉진시키는 이유 중의 일부는 인과도 관련 있을 것이라는 가설이 이런 맥락에서 제시되었다.

본 연구에서는 한쪽 신장을 절제하여 신부전을 유발하고 장기간 고단백식을 먹인 쥐에서도 수술이나 식이에 따른 renal calcification 현상을 볼 수 없었다. 이것은 본 연구에서 실험에 사용한 모든 식이 내에 칼슘과 인의 함량을 동일하게 조정해 주었기 때문에 나타난 결과라고 추정된다. 또한 본 연구에서 실험군에 관계없이 일부 쥐에서 관찰된 renal calcification 현상은 나이 증가에 따른 자연현상 중의 하나로 사료된다. 따라서 본 연구 결과 식이 단백질 수준을 달리해도 칼슘과 인 함량이 동일한 경우 혈중 PTH의 농도와 신조직의 칼슘 축적 현상에는 영향을 미치지 않는 것으로 보아 고단백식으로 인한 신기능 퇴화의 원인 중 일부는 고단백식으로 인한 고농도의 인 섭취와 관련이 있다는 가설을 뒷받침해 주는 것으로 볼 수 있겠다.

요약 및 결론

본 연구는 한쪽 신장을 절제하여 만성신부전을 유도한 흰 쥐에게 칼슘과 인의 섭취량은 같게 조절하고 식이 단백질 수준이 다른 식이를 먹었을 때 신기능과 골격대사의 변화를 살펴보기 위해 수행되었다. 생후 12주에 한쪽 신장을 절제하거나 sham 처리 수술을 한 후 4주 동안 회복시킨 다음 칼슘과 인 수준은 0.4%와 0.6%로 같게 조정하고 단백질 함량을 8%, 15%, 40%로 달리한 식이로 24주간 사육하였다.

칼슘 섭취량과 배설량, 흡수율, 혈중 칼슘 농도, 혈중 PTH 농도는 식이 단백질 수준 또는 신절제에 따른 차이가 없었다. 혈중 인 농도는 신절제 여부는 상관없이 저단백식이군에서 높았다. 혈중 PTH 농도는 혈중 인 농도와 양의 상관관계($p < 0.01$)가 있었으며, 혈중 칼슘 농도와 혈청 크레아티닌 농도와는 음의 상관관계($p < 0.001$)가 있었다.

칼슘과 인의 섭취량을 같게 하고 식이 단백질 수준을 달리했을 때 골격에 미친 영향을 보기 위하여 대퇴골, 견갑골, 척

추골의 무게, 밀도, 칼슘과 회분 함량을 조사한 결과 대퇴골의 젓은 무게, 밀도, 길이, 칼슘과 회분 함량은 각 군간에 유의적인 차이가 없었다. 그런데 칼슘과 회분 함량은 신절제에 의한 주효과가 유의적($p < 0.05$)이어서 신절제군이 sham 처리군보다 대퇴골의 칼슘과 회분 함량이 더 높은 경향이였다. 견갑골의 무게와 부피는 각 군간에 유의적인 차이가 없었고 밀도는 SNx-L군이 가장 높고 UNx-H군이 가장 낮았다. 척추골의 무게와 부피는 신절제군이 sham 처리군에서 더 높은 경향($p < 0.001$)이었다. 척추골의 무게, 부피, 칼슘, 회분 함량은 UNx-L군이 다른 군들에 비해 가장 낮았다. 이와 같이 식이 내 인의 함량을 낮은 수준으로 같게 하고 식이 단백질 수준만 변화시켰을 때 고단백식을 장기간 섭취시켜도 뼈의 밀도와 무기질 함량에 악영향을 미치지 않은 것을 볼 수 있다. 또한 척추골에서는 신절제를 하고 저단백식을 먹인 군의 골밀도와 무기질 함량이 낮은 값을 보여 일부 뼈에서는 저단백식을 먹이는 것이 오히려 나쁜 영향을 미칠 가능성을 보였다. 신조직의 칼슘 축적 현상은 실험군 간에 유의적인 차이 없이 각 군에서 모두 발견되었다.

위의 결과로 볼 때 고단백식을 칼슘 인의 섭취수준을 같게 정상수준으로 섭취시킨 경우에는 PTH의 증가와 이로 인한 골손실 또는 골질환을 방지할 수 있는 것으로 보인다. 따라서 신조직 감소 또는 신부전 환자의 이차적 골질환 예방을 위하여 이들의 식이요법에서 식이 단백질 수준뿐만 아니라 인과 칼슘의 섭취수준 조절도 고려되어야 할 것으로 보인다. 또한 신기능의 유지를 위하여 관습적으로 처방되는 저단백식이 일부 뼈의 밀도와 무기질 함량을 감소시키는 것으로 나타났으므로 신기능 유지와 골질환 예방을 위해 적절한 단백질 수준을 찾기 위한 후속 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Literature cited

- 1) Kurokawa K. Calcium regulating hormones and the kidney. *Kidney Int* 32(5): 760-771, 1987
- 2) Yamamoto M, Kawanobe Y, Takahashi H. Vitamin D deficiency and calcium transport in the rat. *J Clin Invest* 74(2): 507-513, 1984
- 3) Kurokawa K. The kidney and calcium homeostasis. *Kidney Int* 44 Suppl: S97-S105, 1994
- 4) Sherrard DJ, Hercz G, Pei Y, Maloney N, Greenwood C, Manuel A, Saiphoo C, Fenton SS, Segre GV. The spectrum of bone disease in end-stage renal failure-an evolving disorder. *Kidney Int* 43(2): 436-442, 1993
- 5) Torres A, Lorenzo V, Hernandez A, De Bonig E, Darias E, Gonzales-Posada JM, Losada M, Rufino M, Felsenfeld AJ, Rodriguez M. Bone disease in predialysis, hemodialysis, and CAPD patients: evidence of a better bone response to PTH. *Kidney Int* 47(5): 1434-1442, 1995
- 6) Sherrard DJ. Renal osteodystrophy. *Semin Nephrol* 6(1): 56-67, 1986

- 7) Salusky IB, Coburn JW, Bill J, Feley J, Slatopolsky E, Fine RN, Goodman WG. Bone disease in pediatric patients undergoing dialysis with CAPD or CCPD. *Kidney Int* 33(5): 975-982, 1988
- 8) Lindberg JS, Moe SM. Osteoporosis in end-stage renal disease. *Semin Nephrol* 19(2): 115-122, 1999
- 9) Mehls O, Ritz E, Gilli G, Wingen AM. Osteodystrophy in experimental uremia. *Contr Nephrol* 60: 207-213, 1988
- 10) Gabay C, Ruedin P, Slosman D, Bonkour J-P, Leski M, Rizzoli R. Bone mineral density in patients with end-stage renal failure. *Am J Nephrol* 13(2): 115-123, 1993
- 11) Mawer EB, Backhouse J, Taylor CM. Failure of formation of 1,25-dihydroxy-cholecalciferol in chronic renal insufficiency. *Lancet* 1: 626-628, 1973
- 12) Stein MS, Packham DK, Ebeling PR, Wark JD, Becker GJ. Prevalence and risk factors for osteopenia in dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 28(4): 515-522, 1996
- 13) Atsumi K, Kushida K, Yamazaki K, Shimizu S, Ohmura A, Inoue T. Risk factors for vertebral fractures in renal osteodystrophy. *Am J Kidney Dis* 33(2): 287-293, 1999
- 14) Albright F, Baird PC, Cope O. Studies on the physiology of the parathyroid glands. IV. Renal complications of hyperparathyroidism. *Am J Med Sci* 287: 49-65, 1934
- 15) Madulluche HH, Ritz E, Lange HP. Bone histology in incipient and advanced renal failure. *Kidney Int* 9(4): 355-362, 1976
- 16) Bricker NS, Slatopolsky E, Reiss E. Calcium, phosphorus and bone in renal disease and transplantation. *Arch Intern Med* 123(5): 543-553, 1969
- 17) Sakhaee K, Gonzalez GB. Update on renal osteodystrophy: pathogenesis and clinical management. *Am J Med Sci* 317(4): 251-260, 1999
- 18) Fiaschi E, Maschio G, D'Angelo A, Bonucci E, Tessitore N, Piergiorgio M. Low protein diets and bone disease in chronic renal failure. *Kidney Int* 13 suppl: S79-82, 1978
- 19) Kalu DN, Masoro EJ, Yu BP, Hardin RR, Hollis BW. Modulation of age-related hyperparathyroidism and senile bone loss in Fisher rats by soy protein and food restriction. *Endocrinology* 122(5): 1847-1854, 1988
- 20) Giovanetti S. Dietary treatment of chronic renal failure: why is not used more frequently? *Nephron* 40: 1-12, 1985
- 21) Zeller KR. Effects of dietary protein and phosphorous restriction on the progression of chronic renal failure. *Am J Med Sci* 294(5): 328-340, 1987
- 22) Mehtrota R, Nolph KD. Low protein diets are not needed in chronic renal failure. *Miner Electrolyte Metab* 25(4-6): 311-316, 1999
- 23) Kim WY, Lee HS, Jeong HJ. Effect of dietary protein level on renal functions and structure in uninephrectomized aging model in rat. *Kor J Nutr* 29(10): 1059-1071, 1996
- 24) Bray DL, Briggs GM. Decrease in bone density in young male guinea pig fed diet high levels of ascorbic acid. *J Nutr* 114(5): 920-928, 1984
- 25) Howe JC, Beecher GR. Dietary protein and phosphorus metabolism in bone, blood and muscle of rat. *J Nutr* 113(10): 2185-2195, 1983
- 26) Hegsted M, Schutte SA. Urinary calcium and calcium balance in young men as affected by level of protein and phosphorus intake. *J Nutr* 111(3): 553-562, 1981
- 27) Jarava C, Armas JR, Salgueira M, Palma A. Bone alkaline phosphatase isoenzyme in renal osteodystrophy. *Nephrol Dial Transplant* 11 suppl 3: 43-46, 1996
- 28) Whiting SJ, Draper HH. Effect of chronic high protein feeding on bone composition in the adult rat II. *J Nutr* 111(10): 178-183, 1981
- 29) Rix M, Anderson H, Eskildsen P, Langdahl B, Olgaard K. Bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in patients with predialysis chronic renal failure. *Kidney Int* 56(3): 1084-1093, 1999
- 30) Miller MA, Chin J, Miller SC, Fox J. Disparate effects of mild, moderate, and severe secondary hyperparathyroidism on cancellous and cortical bone in rats with chronic renal insufficiency. *Bone* 23(3): 257-266, 1998
- 31) Ibels AC, Alfrey AC, Hutter WE. Calcification in end-stage kidneys. *Am J Med* 71(1): 33-37, 1981
- 32) Hruska KA, Teitelbaum SL. Renal osteodystrophy. *New Eng J Med* 333(3): 166-174, 1995
- 33) Klahr S, Buerkert J, Purkerson ML. Role of dietary factors in the progression of chronic renal disease. *Kidney Int* 24(5): 579-587, 1983
- 34) Haut LL, Alfrey AC, Guggenheim S, Buddington B, Schrier N. Renal toxicity of phosphate in rats. *Kidney Int* 17(6): 722-731, 1980