

## Complete Freund's Adjuvant 투여로 골다공증이 유발된 흰쥐에서 1 $\alpha$ ,25 Dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub>가 골흡수에 미치는 영향

김주영 · 강성수\* · 김소섭 · 최석화 · 배춘식<sup>1\*</sup>

충북대학교 수의과대학, \*전남대학교 수의과대학

### Effect of 1 $\alpha$ ,25 Dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> on Bone Resorption in Complete Freund's Adjuvant-induced Osteoporotic Rats

Ju-Young Kim, Seong-Soo Kang\*, So-Seob Kim, Seok-Hwa Choi and Chun-Sik Bae<sup>1\*</sup>

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University

\*College of Veterinary Medicine, Chonnam National University

**Abstract :** Vitamin D is one of important factors involved in the regulation of bone metabolism. In osteoporosis, the therapeutic effect of vitamin D on the healing process has still been controversial. To conform the effect of 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> on osteoporosis, the change of serum calcium, serum phosphorus, serum alkaline phosphatase, bone mineral density and bone mineral content of osteoporotic tibia were examined comparatively in normal control group(positive control), CFA control(negative control), CFA+1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> 0.01  $\mu$ g/kg group and CFA+1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> 0.1  $\mu$ g/kg group after osteoporosis was induced by single injection of complete Freund's adjuvant(CFA) in rats. In change of serum calcium, the significantly increased value was shown on 2nd and 5th week(P<0.05) after treatment in 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> 0.01  $\mu$ g/kg group and on 3rd week(P<0.05) after treatment in 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> 0.1  $\mu$ g/kg group than CFA control. In change of serum phosphorus, the significantly increased value was shown on 2nd week(P<0.05) after treatment in 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> 0.01  $\mu$ g/kg group and on 3rd and 4th week(P<0.05) after treatment in 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> 0.1  $\mu$ g/kg group than CFA control. The value of bone mineral density and bone mineral content of tibia was increased in both 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> 0.01  $\mu$ g/kg group and 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> 0.1  $\mu$ g/kg group than CFA control, and the increase rate of that was higher in 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> 0.1  $\mu$ g/kg group than 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> 0.01  $\mu$ g/kg group. Considering above findings collectively, it was considered that 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> was effective in preventing the complete Freund's adjuvant-induced osteoporotic decrease of bone mass.

**Key words :** 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub>, osteoporosis, complete Freund's adjuvant, bone mineral density, bone mineral content

## 서 론

골다공증은 가장 일반적인 골의 대사성 질환으로 같은 성별이나 연령층에 비하여 골밀도가 감소하고 골질의 감수성이 증가된 상태로 정의할 수 있으며<sup>1</sup>, 낮은 골밀도는 골다공증으로 발전될 수 있는 가장 중요한 위험인자로 인식되고 있다<sup>2</sup>.

사람에 있어서 골다공증은 폐경후 골다공증, 노인성 골다공증 및 부신피질 호르몬의 투여, 당뇨병, 임신, 수유, 음주 등에 따른 속발성 골다공증 등으로 분류되며 다양한 원인에 의해 발생하는데<sup>2</sup>, 이 중에서 폐경후 골다공증은 가장 흔한 유형의 하나로서 여성호르몬인 estrogen 결핍이 그 원인으로 생각되어 지고 있다<sup>3</sup>.

동물에서는 고양이와 Dachshund에서 선천적으로 발생하는 경우가 있으나<sup>17</sup>, 가축에 발생하는 예는 적으며 비특이적인 원인으로 발생하는 것으로 식이성, 노령성 및 불용성에 의해

서 골다공증이 발생한다. 가축에서는 영양부족상태가 장기간 지속하면 골의 동화작용의 감퇴로 골다공증이 발생하는 것으로 알려져 있으며, 어린 면양에서는 구리 결핍에 의한 골아세포의 활동성 장애와 만성 납중독으로 인한 유골형성 장애로 골다공증이 발생된다<sup>7</sup>.

골다공증에 이환된 경우에는 가벼운 외상이나 충격에도 쉽게 뼈가 부러지게 되는데, 척추 압박골절과 고관절골절이 대표적인 예이다<sup>8</sup>. 골다공증성 골질의 예방과 치료를 위하여 작용기전이 서로 다른 약제들인 calcium, calcitonin, estrogen, bisphosphonate, vitamin D 등을 사용하고 있으나, 이들의 효과에 대해서는 서로 일치하지 않으며 상반되는 견해도 있다<sup>3,12,33,36,48</sup>.

Vitamin D의 활성형은 vitamin D-25 hydroxylase에 의해 간에서 vitamin D<sub>3</sub>의 hydroxylation에 의해 얻어지고, 또한 신장에서 25-hydroxyvitamin D-1 $\alpha$ -hydroxylase에 의해 얻어진 1,25 dihydroxycholecalciferol이다<sup>11,30</sup>. Vitamin D는 장에서 칼슘과 인의 흡수를 촉진하고 신장의 원위세뇨관에서 칼슘의 재흡수를 증가시킴으로써 골흡수를 억제하는데<sup>8,26</sup> 이

<sup>1</sup>Corresponding author.

E-mail : csbae210@chonnam.ac.kr

에 대해서는 상당한 효과가 있었다는 보고<sup>19,21</sup>와 치유 효과가 전혀 없었다는 상반되는 주장도 있어서<sup>10,37</sup>, vitamin D의 치료효과에 대한 논란은 아직도 끊이지 않으나 최근에는 vitamin D의 효과를 입증하는 보고가 많아지고 있다.

흰쥐에서 complete Freund's adjuvant(CFA)에 의해 유발된 골다공증은 후지의 발바닥에 *Mycobacterium butyricum*을 주입하여 유발된 골다공증으로 관절의 종창, 연골과 뼈의 미란이 특징이다<sup>4</sup>. CFA를 투여하여 유발된 골다공증은 면역병리의 연구와 새로운 비스테로이드 항염증 소염제와 항류마토이드 약물의 선별법에 수년간 사용되고 있다<sup>6</sup>.

이에 저자들은 CFA 투여에 의해 유발된 흰쥐의 골다공증에 미치는 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub>의 유용성을 확인하여 수의임상에서 응용하고자 본 실험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물 및 실험군의 설정

한국화학연구소 실험동물안전성연구센터에서 분양받은 체중 180 g 내외의 건강한 암컷 Sprague-Dawley 흰쥐 100마리를 2주간 실험환경(실내온도 24 $\pm$ 1°C, 상대습도 50 $\pm$ 5%)에 적응시켜 사육한 후 실험에 사용하였다.

실험동물은 정상 대조군, CFA를 투여하여 골다공증을 유발한 CFA 투여 대조군, CFA 투여 후 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> 0.01  $\mu$ g/kg 투여군 및 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> 0.1  $\mu$ g/kg 투여군의 4개군으로 나누고 각각 25마리씩 배치를 하였으며 각 군은 매주 5마리씩 배정하여 5주까지 골다공증에 미치는 영향을 관찰하였다.

### 골다공증 유발

Takagi 등<sup>49</sup>의 방법으로 1 ml의 liquid paraffin에 0.6 mg의 heat-killed *Mycobacterium butyricum*(Difco Laboratories, Detroit, MI)을 녹인 후 121°C에 15분간 autoclave하였다. 이 현탁액을 0.1 ml씩 흰쥐의 오른쪽 후지 발바닥에 피하 주사하여 골다공증을 유발하였다.

### 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub>의 투여

1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub>(Peptide Institute Inc., Osaka, Japan)는 0.2% ethanol과 0.01% Tween 20을 포함하는 phosphate buffer saline에 용해시켰으며<sup>13</sup>, 투여용량에 따라 하루에 한번씩 3주간 경구투여 하였다.

정상 대조군과 CFA 투여 대조군은 생리식염수를 0.1 ml씩 경구투여 하였다.

### 골밀도와 골함유량 측정

Bone mineral density(BMD)와 bone mineral content(BMC)는 골농도계(bone densitometer)를 이용하여 dual energy X-ray apparatus(Norland Medical System Inc., USA)로 측정하였다. 흰쥐를 xylazine HCl(0.1 mg/kg, 한국바이엘)과 ketamine HCl(0.2 mg/kg, 유한양행)을 근육주사하여

마취시킨 후 photone beam에 수평으로 옆으로 보정한 후, 경골의 근위부, 골간부 및 원위부를 20 mm/sec 속도와 1 mm 길이로 스캔을 실시하였다.

### 혈액학적 검사

흰쥐를 에테르로 흡입 마취시켜 복강동맥에서 각각 10 ml씩 채혈하였다. 채혈한 혈액은 원심분리기(2,000 rpm, 15분)로 혈청을 분리한 후 자동 혈청 화학 분석기 (IDEXX, USA)로 calcium과 phosphorus, alkaline phosphatase 치를 분석하였다.

### 통계 처리

본 실험에서 얻어진 자료에 대한 실험군간의 통계학적 유의성을 검정하기 위하여 one way ANOVA/SPSS를 이용하였다.

## 결 과

### 혈액 검사

**Calcium(Ca).** 정상 대조군의 혈청 Ca치는 크게 변하지 않았으나 CFA 투여 대조군에서는 CFA 투여 전에는 10.52 $\pm$ 0.56 mg/dl이었고 CFA 투여 후 2주, 4주, 및 5주에는 각각 9.95 $\pm$ 0.72 mg/dl, 9.56 $\pm$ 0.79 mg/dl, 및 9.40 $\pm$ 0.95 mg/dl로 점차 감소하였다. 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> 0.01  $\mu$ g/kg 투여군은 CFA 투여 전에는 10.31 $\pm$ 0.93 mg/dl이었고, CFA 투여 후 2주와 5주에 10.80 $\pm$ 0.63 mg/dl와 10.88 $\pm$ 0.93 mg/dl로 변하여 CFA 투여 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였으며(p<0.05), 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> 0.1  $\mu$ g/kg 투여군에서는 CFA 투여 전에는 10.12 $\pm$ 1.21 mg/dl이었으나 CFA 투여 후 5주에는 10.90 $\pm$ 1.64 mg/dl로 약간 증가하였다. 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> 투여군 모두 CFA 투여 대조군에 비해 증가된 것을 볼 수 있었으나 정상 대조군에 비해서는 낮은 수치임을 볼 수 있었다(Table 1).

**Phosphorus(P).** 정상 대조군의 혈청 P치는 주령이 증가함에 따라 증가하는 경향이였다. CFA 투여 대조군에서는 CFA 투여 전에는 6.59 $\pm$ 2.31 mg/dl이었고, CFA 투여 후 2주, 4주, 및 5주에는 각각 6.66 $\pm$ 0.27 mg/dl, 7.16 $\pm$ 3.01 mg/dl, 및 7.61 $\pm$ 0.65 mg/dl로 증가하였다. 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> 0.01  $\mu$ g/kg 투여군에서는 CFA 투여 전에는 6.47 $\pm$ 1.32 mg/dl이었는데 CFA 투여 후 5주에 7.68 $\pm$ 1.25 mg/dl로 증가하였으며, 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> 0.1  $\mu$ g/kg 투여군에서는 CFA 투여 전과 CFA 투여 후 5주에 각각 6.51 $\pm$ 0.92 mg/dl과 7.70 $\pm$ 1.33 mg/dl를 나타내었다. 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> 0.01  $\mu$ g/kg 투여군은 CFA 투여 후 2주에, 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> 0.1  $\mu$ g/kg 투여군은 CFA 투여 후 3주와 4주에 CFA 투여 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 보였으나(p<0.05) CFA 투여 후 5주에는 CFA 투여 대조군과 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> 투여군은 유사한 변화를 나타내었다(Table 2).

**Table 1.** Changes of serum calcium in rats with adjuvant-induced osteoporosis after  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  administration

Treatment	Days after CFA injection					
	0	7	14	21	28	35
Normal	10.71±0.65	11.14±1.05	11.33±0.51	11.47±1.05	11.36±0.98	11.23±1.49
CFA	10.52±0.56	10.82±1.00	9.95±0.72	9.90±0.86	9.56±0.79	9.40±0.95
Vit D <sub>3</sub> L	10.31±0.93	10.74±0.72	10.80±0.63*	10.02±1.68	10.37±0.81	10.88±0.93*
Vit D <sub>3</sub> H	10.12±1.21	10.96±0.91	11.00±0.75	10.98±0.84*	11.04±1.35	10.90±1.64

Normal : Non-adjuvant injection.

CFA : Adjuvant injection.

Vit D<sub>3</sub>L :  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  0.01  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ , orally.

Vit D<sub>3</sub>H :  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ , orally.

Values represent mean  $\pm$  S.D.(n = 5, respectively).

Significant differences from the Vit D<sub>3</sub>L and Vit D<sub>3</sub>H are shown as \* $p < 0.05$ .

**Table 2.** Changes of serum phosphorus in rats with adjuvant-induced osteoporosis after  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  administration

Treatment	Days after CFA injection					
	0	7	14	21	28	35
Normal	6.49±0.25	6.94±1.13	7.01±0.37	7.35±0.91	7.50±0.48	7.60±0.41
CFA	6.59±2.31	6.64±0.75	6.66±0.27	7.08±0.78	7.16±3.01	7.61±0.65
Vit D <sub>3</sub> L	6.47±1.32	6.96±1.09	7.35±2.32*	7.53±1.01	7.43±1.15	7.68±1.25
Vit D <sub>3</sub> H	6.51±0.92	6.54±1.35	7.51±0.96	7.92±0.69*	7.86±0.66*	7.70±1.33

Normal : Non-adjuvant injection.

CFA : Adjuvant injection.

Vit D<sub>3</sub>L :  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  0.01  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ , orally.

Vit D<sub>3</sub>H :  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ , orally.

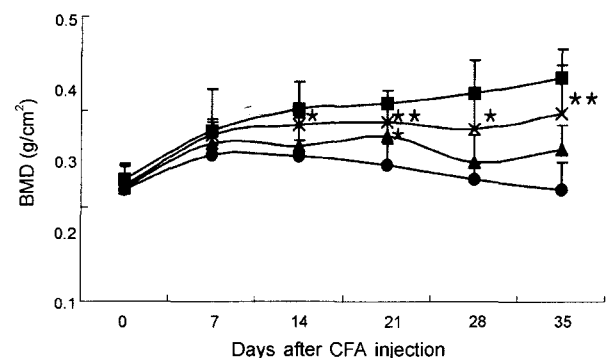
Values represent mean  $\pm$  S.D.(n = 5, respectively).

Significant differences from the VitD<sub>3</sub>L and VitD<sub>3</sub>H are shown as \* $p < 0.05$ .

**Alkaline phosphatase(ALP).** 정상 대조군의 혈청 ALP치는 주령이 증가함에 따라 큰 변화는 없었다. CFA 투여 대조군에서는 CFA 투여 전에는  $198.5 \pm 71.21$  mg/dl이었는데 CFA 투여 후 2주, 4주, 및 5주에는 각각  $348.6 \pm 62.17$  mg/dl,  $355.0 \pm 46.96$  mg/dl, 및  $348.2 \pm 47.54$  mg/dl로 증가하였다.  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  0.01  $\mu\text{g}/\text{kg}$  투여군에서는 CFA 투여 전에는  $179.3 \pm 32.43$  mg/dl이었고 CFA 투여 후 5주에는  $357.8 \pm 59.64$  mg/dl로 증가하였으며,  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  투여군에서는 CFA 투여 전에는  $185.9 \pm 62.37$  mg/dl이었는데 CFA 투여 후 5주에는  $385.0 \pm 90.80$  mg/dl로 증가하였다.  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  투여군 모두 CFA 투여 대조군에 비해 다소 증가되었으나 유의성은 없었다.

#### 골밀도(bone mineral density)

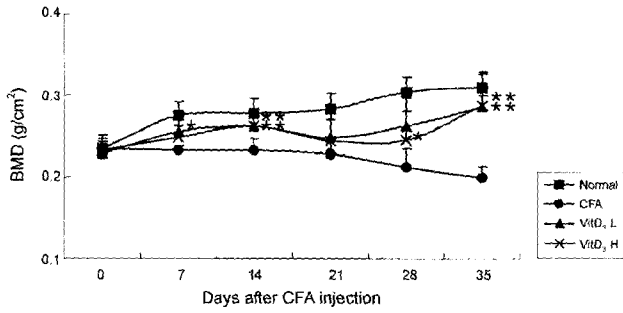
경골 근위부의 골밀도는 정상 대조군은 골밀도가 계속 증가하였지만, CFA 투여대조군은 CFA 투여 후 1주부터 골밀도가 계속 감소되었다.  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  투여군은 CFA 투여 후 2주부터 CFA 투여 대조군에 비해 골밀도가 유의성 있게 증가하였으나( $p < 0.05$ ),  $1\alpha,25$



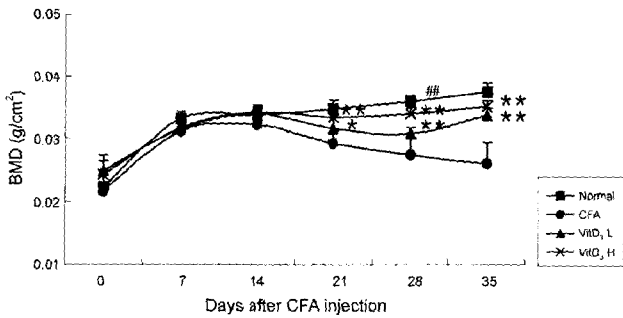
**Fig 1.** Time course of in bone mineral density of the proximal region of the tibia in the normal (■), CFA (●), Vit D<sub>3</sub>L (▲) and Vit D<sub>3</sub>H (X) groups(n = 5, respectively). Significant difference from the Vit D<sub>3</sub>L and Vit D<sub>3</sub>H are shown as \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

dihydroxy-vitamin  $D_3$  0.01  $\mu\text{g}/\text{kg}$  투여군은 CFA 투여 후 3주에서만 유의성 있는 변화를 나타내었다( $p < 0.05$ ) (Fig 1).

경골 골찬부의 골밀도는 정상 대조군은 골밀도가 계속 증가하였지만, CFA 투여 대조군은 CFA 투여 후 1주부터 골



**Fig 2.** Time course of in bone mineral density of the middle region of the tibia in the normal (■), CFA (●), Vit  $D_3$ L (▲) and Vit  $D_3$ H (X) groups(n = 5, respectively). Significant difference from the Vit  $D_3$ L and Vit  $D_3$ H are shown as \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01.



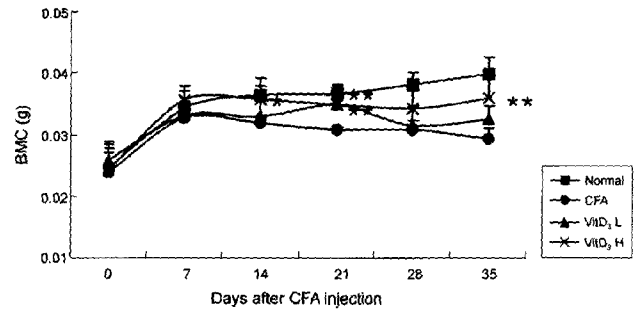
**Fig 3.** Time course of in bone mineral density of the distal region of the tibia in the normal (■), CFA (●), Vit  $D_3$ L (▲) and Vit  $D_3$ H (X) groups(n = 5, respectively). Significant difference from the Vit  $D_3$ L and Vit  $D_3$ H are shown as \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01. Significant difference between Vit  $D_3$ L and Vit  $D_3$ H are shown as ## $p$ <0.01.

다공증이 유발되면서 골밀도가 계속 감소하였다.  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  투여군 모두 CFA 투여 후 2주와 5주에는 CFA 투여 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였으나( $p$ <0.01),  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  투여군간에는 큰 차이가 없었다(Fig 2).

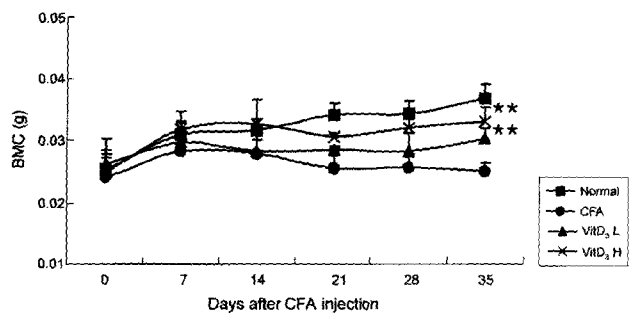
경골 원위부의 골밀도는 정상 대조군은 골밀도가 계속 증가하였지만, CFA 투여 대조군은 CFA 투여 후 2주 쯤부터 골다공증이 유발되면서 골밀도가 현저히 감소되었다.  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  투여군 모두 CFA 투여 후 3주부터 CFA 투여 대조군에 비하여 골밀도가 유의성 있게 증가하였으며( $p$ <0.01) CFA 투여 후 4주에서는  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  0.1  $\mu$ g/kg 투여군이  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  0.01  $\mu$ g/kg 투여군과 비교하여 유의성 있는( $p$ <0.01) 변화를 나타내었다(Fig 3).

**골함유량(bone mineral content)**

경골 근위부의 골함유량은 정상 대조군은 시간이 경과함에 따라 골함유량이 증가하였지만, CFA 투여 대조군은 CFA



**Fig 4.** Time course of in bone mineral content of the proximal region of the tibia in the normal (■), CFA (●), Vit  $D_3$ L (▲) and Vit  $D_3$ H (X) groups(n = 5, respectively). Significant difference from the Vit  $D_3$ L and Vit  $D_3$ H are shown as \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01.

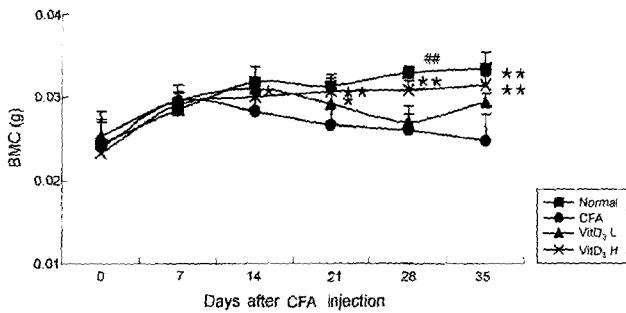


**Fig 5.** Time course of in bone mineral content of the middle region of the tibia in the normal (■), CFA (●), Vit  $D_3$ L (▲) and Vit  $D_3$ H (X) groups(n = 5, respectively). Significant difference from the Vit  $D_3$ L and Vit  $D_3$ H are shown as \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01.

투여 후 1주부터 골다공증이 유발되면서 골함유량은 감소하였다.  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  0.1  $\mu$ g/kg 투여군은 CFA 투여 후 2주( $p$ <0.05), 3주( $p$ <0.01) 및 5주( $p$ <0.01)에 CFA 투여 대조군과 비교하여 유의성 있는 변화를 나타내었으며,  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  0.01  $\mu$ g/kg 투여군은 CFA 투여 후 3주에만 유의성 있는( $p$ <0.01) 변화를 나타내었다(Fig 4).

경골 골간부의 골함유량은 정상 대조군에서는 경시적으로 골함유량이 계속 증가하였지만, CFA 투여 대조군은 CFA 투여 후 1주부터 골다공증이 유발되면서 골함유량이 계속 감소되었다.  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  투여군 모두 CFA 투여 후 5주에서만 CFA 투여 대조군에 비해 유의성 있는( $p$ <0.01) 증가를 나타내었다(Fig 5).

경골 원위부의 골함유량은 정상 대조군에서는 경시적으로 골함유량이 계속 증가하였지만, CFA 투여 대조군은 CFA 투여 후 1주부터 골다공증이 유발되면서 골함유량이 계속 감소되었다.  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  0.1  $\mu$ g/kg 투여군은 CFA 투여 후 2주에 유의성 있는( $p$ <0.05) 변화를 나타내기 시작하여 3주, 4주 및 5주에도 유의성 있는( $p$ <0.01) 증가를



**Fig 6.** Time course of in bone mineral content of the distal region of the tibia in the normal (■), CFA (●), Vit D<sub>3</sub>L (▲) and Vit D<sub>3</sub>H (X) groups (n = 5, respectively). Significant difference from the Vit D<sub>3</sub>L and Vit D<sub>3</sub>H are shown as \*p<0.05, \*\*p<0.01. Significant difference between Vit D<sub>3</sub>L and Vit D<sub>3</sub>H are shown as ##p<0.01.

나타내었다. 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> 0.01  $\mu$ g/kg 투여군은 CFA 투여 후 3주(p<0.05)와 5주(p<0.01)에 유의성 있는 변화를 나타내었다. 또한, 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> 0.1  $\mu$ g/kg 투여군은 CFA 투여 후 4주에 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> 0.01  $\mu$ g/kg 투여군과 비교하여 유의성 있는(p<0.01) 변화를 나타내었다(Fig 6).

## 고 찰

골다공증은 골량의 감소로 인하여 골절이 쉽게 일어날 수 있게된 상태를 말하며 골다공증의 원인 인자들 중에서 골밀도가 직접적인 요인으로 가장 중요한 역할을 하고 있으며 이러한 골밀도는 성장과정에서 완성되는 최대 골밀도 및 성인에서 발생하는 골 소실의 정도에 따라 결정된다. 최대 골밀도가 적은 사람일수록 골다공증 및 그에 따른 골절률이 높다는 것은 널리 알려진 사실이며<sup>40</sup> 골다공증에 이환되면 골절의 발생이 증가되고 그 호발 부위는 척추, 골반 및 대퇴골이다<sup>42</sup>.

골다공증은 크게 원발성 골다공증과 속발성 골다공증으로 분류되며 원발성 골다공증에는 제1형(폐경 후 골다공증)과 제2형(노인성 골다공증)이 대부분이고<sup>1</sup>, 속발성 골다공증은 폐경이나 노령을 제외한 다른 원인인자들에 의한 경우가 해당된다<sup>22</sup>.

일반적으로 폐경 후 골다공증의 치료에는 estrogen, vitamin D 등을 많이 사용하는데 estrogen 치료에 따른 부작용으로 유방암과 자궁내막암의 유발이 증가될 수 있다<sup>14,44</sup>.

노인성 골다공증의 치료에는 1 $\alpha$ , 25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub> 0.5  $\mu$ g/day<sup>47</sup>, 칼슘(600 mg/day), gamma-linolenic acid와 eicosapentaenoic acid<sup>33</sup>가 효과적이었다.

속발성 골다공증은 폐경이나 노령을 제외한 원인 인자들에 의한 골다공증을 의미하며 갑상선 기능항진증<sup>22</sup>, 부갑상선 기능항진증<sup>41</sup>, 쿠싱증후군<sup>12</sup>, 당뇨병<sup>34</sup> 등의 내분비 질환, Homocysteinaemia<sup>9</sup>, Marfan 증후군<sup>2</sup> 등의 교원성 질환, 크론

병<sup>46</sup>, 위장관 절제술<sup>50</sup>, 헤파린<sup>43</sup>, 갑상선 호르몬제<sup>38</sup>, 알코올<sup>22</sup> 및 류마티스성 관절염<sup>23</sup> 등이 주요 원인이다.

Vitamin D의 역치는 0.5  $\mu$ g/kg/day이며 역치 이상으로 과용량 복용시 고칼슘혈증, 고칼슘노증, 골밀도 소실 등의 부작용이 있다<sup>4</sup>. 본 실험에서 1 $\alpha$ ,25 dihydroxy-vitamin D<sub>3</sub>의 용량은 뼈의 무기질 강화에 효과가 있었으며 고칼슘혈증 등의 부작용은 나타나지 않아서 Erben 등<sup>14</sup>과 서로 일치되는 소견이었다.

Vitamin D는 간에서 25-hydroxycholecalciferol로 대사되고 이것이 다시 신장에서 1 $\alpha$ ,25 dihydroxycholecalciferol로 대사되어 장관세포의 세포질내 수용체와 결합하여 핵내로 이동, 유전자의 복사(transcription)를 촉진함으로써 칼슘결합 단백질의 합성을 증가시켜 궁극적으로 장관에서 칼슘과 인의 흡수를 촉진하고 신장의 원위세뇨관에서 칼슘의 재흡수를 증가시킨다<sup>26</sup>. 또한 부갑상선 호르몬의 매개에 의한 골흡수를 억제함으로써 골다공증 환자에게 효과가 있으며 cholecalciferol, calcitriol, alphacalcidol이 일반적으로 사용되고 있다<sup>8</sup>.

골다공증의 진단으로는 X-ray, BMD, CT, MRI 등을 사용하고 있으나 단순 X-ray 촬영은 골무기질이 30% 이상이 소실되어야 발견되어 조기진단이 어려우며 골절이 동반되어야 진단 가능한 경우가 많다. 그러나 dual energy X-ray apparatus를 이용한 골밀도 측정의 정밀도와 해상도가 높으며 1%의 골 소실만 있어도 측정이 가능하며 방사선 노출도 적다는 점에서 현재 가장 널리 쓰이고 있다.

Vitamin D(1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>)는 골 형성의 감소를 동반하지 않고 골다공증과 같은 다양한 대사성 골질환의 치료에서 활성 vitamin D 약물의 역할 이해를 위해 중요한 물질이다<sup>13</sup>. Vitamin D는 장으로부터 칼슘과 인의 흡수를 촉진하고 원위세뇨관에서 칼슘의 재흡수를 증가시키며 부갑상선 호르몬의 매개에 의한 골 흡수를 억제함으로써 골다공증성 환자에 있어서는 골량의 감소를 억제하고 골절의 예방 치유효과를 나타낸다<sup>8,26</sup>. 또한 노중 칼슘 배출량과 혈중 칼슘 수치를 증가시키고, 골 형성을 촉진함으로써 칼슘과 인의 밸런스에서 긍정적인 효과가 있다<sup>13</sup>.

그러나 Ca 또는 Vitamin D는 보조적 치료제로써 단독으로는 폐경 후의 초기 골소실의 치료제로 사용하지 않지만 폐경 후의 후반에는 좀 더 두드러진 역할을 한다<sup>42</sup>. 또한 폐경 후 골다공증 여성에 있어서 척추와 대퇴경의 골밀도 측정 결과 etidronate만 사용한 것 보다 여기에 vitamin D를 복합 사용한 경우에 더 높은 골밀도를 나타내지만<sup>39</sup>, 폐경 후의 골다공증 여성에 있어서 vitamin D가 골밀도를 향상시키지 않거나 반대 효과에 관여한다는 상반된 보고도 있다<sup>24</sup>. 그러나 청년기는 빠른 골격 형성을 특징으로 하고 높은 골밀도를 요구하는데 장의 칼슘과 인의 흡수에 있어서 vitamin D의 촉진적인 효과는 잘 알려져 있지만 골 발달의 효과는 아직 명확하지 않다. 그러나 vitamin D는 성장기동안 골밀도 측정에 있어서 골량의 축적에 상당한 관련이 있다<sup>28</sup>. 인의에서 부위에 따른 치료반응은 상당한 차이가 있는데 특히 대퇴부와 척

추보다 전완 부위가 가장 효과적인 부위이다.<sup>32</sup>

Vitamin D는 골량의 감소를 억제하거나<sup>15,16,19,45,47</sup> 골절의 빈도를 감소시켜서<sup>19,21,45</sup>, 골다공증의 치료 예방효과를 보인 반면에 골량의 감소와 골절의 빈도가 증가되거나 골절치유에 효과가 없었다는 보고<sup>10,18,29</sup>도 있어 vitamin D의 골다공증 치료효과를 단정짓기가 어렵다.

본 실험의 혈액학치에서는 Ca치는 정상 대조군에서는 큰 변화가 없었으나 CFA 투여 대조군에서 Ca치는 감소하였고,  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  투여군은 CFA 투여 대조군에 비해 감소치가 억제된 것을 볼 수 있었다. 이러한 경향은 CFA 투여 대조군과  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  투여군에서 Ca의 뇨 배출량도 커지기 때문에 이러한 결과를 나타낸 것으로 사료되며 Bae<sup>3</sup>는 정상군의 Ca치는 큰 변화가 없었으나  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  투여군과 CFA 투여 대조군에서는 Ca치가 증가하였고, Binderup<sup>5</sup>는 정상 대조군의 Ca치와 CFA 투여 대조군의 Ca치가 비슷하였으나  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  투여군에서의 Ca치가 좀 더 높다고 하여 서로 상반된 결과를 보였다.

본 실험에서 P치는 정상대조군과 CFA 투여 대조군,  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  투여군에서 큰 차이는 없었으나 Bae<sup>3</sup>에 의하면 정상 대조군의 P치는 시간이 지남에 따라 큰 변화는 없었으나  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  투여군과 CFA 투여 대조군의 P치가 정상군보다 다소 증가되었고  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  투여군의 P치가 CFA 투여 대조군보다 좀 더 높게 나왔다. Binderup<sup>5</sup>의 보고에서 정상 대조군의 P치에 비해 CFA 투여 대조군과  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  투여군의 P치가 낮아졌음을 볼 수 있었으며 CFA 투여 대조군의 P치가  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  투여군 보다 낮다고 보고하여 서로 상반된 결과를 나타내었다.

본 실험에서의 ALP치는 정상 대조군에서 큰 변화가 없었으나 CFA 투여 대조군과  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  투여군의 ALP치가 증가되었음을 볼 수 있었으며  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  투여군이 CFA 투여 대조군에 비해 좀더 높은 ALP치를 나타내었다. 이는 Bae<sup>3</sup>의 보고와 유사한 경향을 나타내었다.

골밀도와 골함유량은 투여용량에 따라 다른 변화를 나타내었는데  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  투여군은 정상 대조군의 골밀도와 골함유량에 근접한 소견을 나타내어  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$ 는 골다공증에 의한 골 소실의 예방과 골절발생의 빈도를 감소시켰다는 다른 연구자들과<sup>16,19,21,45,47</sup> 유사한 경향이었으며 이것은  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$ 가 alkaline phosphatase의 활성을 증가시켜 뼈발생세포에 의한 새로운 골형성에 영향을 미쳤다는 다른 연구자들<sup>25,51</sup>과 비슷한 결과를 나타냄으로써  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$ 가 CFA에 의해 유발된 골다공증에 효과가 있는 것으로 사료된다.

## 결 론

7주령의 SD 흰쥐에 complete Freund's adjuvant(CFA)를

투여하여 유발한 골다공증에  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$ 를 0.01  $\mu\text{g}/\text{kg}$  투여군과 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  투여군으로 분류하여 경구로 3주간 투여하였다. 골다공증의 억제 효과를 알아보기 위하여 calcium, phosphorus, alkaline phosphatase, 골밀도와 골함유량의 변화를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

Calcium과 phosphorus는 CFA 투여 후 시간과 용량에 따라 변화하였지만( $p < 0.05$ ), alkaline phosphatase는 변화가 없었다.

골밀도와 골함유량에서도 용량과 부위에 따라 차이가 있었는데  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  투여군이 CFA 투여 대조군에 비하여 골밀도와 골함유량이 증가하였으며( $p < 0.01$ ),  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$  0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  투여군이 0.01  $\mu\text{g}/\text{kg}$  투여군 보다 효과적이었다.

이상의 결과를 종합해 보면  $1\alpha,25$  dihydroxy-vitamin  $D_3$ 의 투여는 CFA 투여에 의해 유발된 흰쥐의 골다공증 진행을 억제하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Akesson K, Lau KHW, Baylink DJ. Rationale for active vitamin D analog therapy in senile osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 1997; 60(1): 100-105.
2. Anderson FH. Osteoporosis in men. *Int J Clin Pract* 1998; 52(3): 176-180.
3. Bae CS. Therapeutic effects of  $1\alpha,25$  dihydroxycholecalciferol on osteoporotic fracture in a rat model. *Korean J Vet Res* 1999; 39(5): 974-985.
4. Baumgartner WA, Beck FWJ, Whitehouse MW. Adjuvant disease in rats : biochemical criteria for distinguishing several phases of inflammation and arthritis. *Proc Soc exp Biol Med* 1974; 145: 625-630.
5. Binderup L. Bone change in rats with adjuvant arthritis : treatment with  $1\alpha$ -hydroxycholecalciferol. *Acta Phamacol et Toxicol* 1986; 59: 228-235.
6. Binderup L. Decreased T-suppressor cell activity in rats with adjuvant arthritis. *Ann Rheum Dis* 1983; 42: 693-698.
7. Blood DC, Radostits OM, Henderson JA. Diseases of the musculoskeletal system. In: *Veterinary medicine*, 7th ed. London: Bailliere Tindall. 1989: 459-463.
8. Brandi ML. New treatment strategies: ipriflavone, strontium, vitamin D metabolites and analogs. *Am J Med* 1993; 95(suppl 5A): 69-74.
9. Browner WS, Malinow MR. Homocyst(e)inaemia and bone density in elderly women. *Lancet* 1991; 338(8780): 1470.
10. Christiansen C, Christiansen MS, Rødbro P, Hagen C, Transbø I I. Effect of  $1,25$ -dihydroxyvitamin  $D_3$  in itself or combined with hormone treatment in preventing postmenopausal osteoporosis. *Eur J Clin Invest* 1981; 11(4): 305-309.
11. DeLuca HF. Metabolism of vitamin D : current status. *Am J Clin Nutr* 1976; 29: 1258-1270.
12. Di Somma C, Colao A, Pivonello R, Salvatore M, Lombardi G. Effectiveness of chronic treatment with alendronate in the osteoporosis of Cushing's disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998; 48(5): 655-656.
13. Endo K, Katsumata K, Hirata M, Ikeda K, Ogata E.  $1,25$

- dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> as well as its analogue OCT lower blood calcium through inhibition of bone resorption in hypercalcemic rats with continuous parathyroid hormone-related peptide infusion. *J Bone and Mineral Research* 2000; 15(1): 175-181.
14. Erben RG, Bromm S, Stangassinger M. Short-term prophylaxis against estrogen depletion-induced bone loss with calcitriol does not provide long-term beneficial effects on cancellous bone mass or structure in ovariectomized rats. *Osteoporos Int* 1998a; 8: 82-91.
  15. Erben RG, Bromm S, Stangassinger M. Therapeutic efficacy of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and calcium in osteopenic ovariectomized rats : evidence for a direct anabolic effects of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on bone. *Endocrinology* 1998b; 139(10): 4319-4328.
  16. Erben RG, Weiser H, Zucker H. Vitamin D metabolites prevent vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1992; 50(3): 228-236.
  17. Ettinger SJ, Feldman EC. Congenital defects of the dog. In: *Textbook of veterinary internal medicine*, 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co. 1995: 2115-2129.
  18. Falch JA, Ødegaard OR, Finnanger AM, Matheson I. Postmenopausal osteoporosis: no effect of three years treatment with 1,25-dihydroxy-cholecalciferol. *Acta Med Scand* 1987; 221(2): 199-204.
  19. Gallagher JC, Jernbak CM, Riggs BL. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: Short- and long-term effects on bone and calcium metabolism in patients with postmenopausal osteoporosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79(10): 3325-3329.
  20. Gallagher JC, Riggs BL. Action of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on calcium balance and bone turnover and its effect on vertebral fracture rate. *Metabolism* 1990; 39(4 Suppl 1): 30-34.
  21. Gallagher JC, Riggs BL. Calcitriol for postmenopausal osteoporosis. *Ann Intern Med* 1989; 111(7): 621.
  22. Gennari C, Martini G, Nuti R. Secondary osteoporosis. *Aging(Milano)* 1998; 10(3): 214-224.
  23. Gough A, Sambrook P, Devlin J, Nguyen T, Emery P. Osteoclastic activation is the principal mechanism leading to secondary osteoporosis in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1998; 25(7): 1282-1289.
  24. Gurlek A, Bayraktar M, Gedik O. Comparison of calcitriol treatment with etidronate-calcitriol and calcitonin-calcitriol combinations in Turkish women with postmenopausal osteoporosis: a prospective study. *Calcif Tissue Int* 1997; 61(1): 39-43.
  25. Haneji T, Kurihara N, Ikeda K, Kumegawa M. 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> induce alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells derived from newborn mouse calvaria. *J Biochem(Tokyo)* 1983; 94(4): 1127-1132.
  26. Holick MF. Vitamin D and bone health. *J Nutr* 1996; 126(Suppl 4): 1159-1164.
  27. Hough S. Fast and slow bone losers. Relevance to the management of osteoporosis. *Drugs Aging* 1998; 12(Suppl 1): 1-7.
  28. Ilich JZ, Badenhop NE, Nagode LA, Matkovic V. Calcitriol and bone mass accumulation in females during puberty. *Calcif Tissue Int* 1997; 61(2): 104-109.
  29. Jensen GF, Meinecke B, Boesen J, Transbol I. Does 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> accelerate spinal bone loss? A controlled therapeutic trial in 70-year-old women. *Clin Orthop* 1985; 192: 215-221.
  30. Kanis JA. Vitamin D metabolism and its clinical application. *J Bone Joint Surg* 1982; 64B: 542-560.
  31. Kleerekoper M. The role of fluoride in the prevention of osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998; 27(2): 441-452.
  32. Krieg MA, Seydoux C, Sandini L, Thiebaud D, Burckhardt P. Intravenous pamidronate as treatment for osteoporosis after heart transplantation : a prospective study. *Osteoporos Int* 2001; 12(2): 112-116.
  33. Kruger MC, Coetzer H, de Winter R, van Papendorp DH. Calcium, gamma-linolenic acid and eicosapentaenoic acid supplementation in senile osteoporosis. *Aging(Milano)* 1998; 10(5): 385-394.
  34. Kumeda Y, Inaba M, Nishizawa Y. Secondary osteoporosis and its treatment-diabetes mellitus. *Nippon Rinsho* 1998; 56(6): 1579-1586.
  35. Li M, Shen Y, Wronski TJ. Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. *Bone* 1997; 20: 55-61.
  36. Licata AA. Bisphosphonate therapy. *Am J Med Sci* 1997; 313(1): 17-22.
  37. Lindgren JU, Narechania RG, Lange TA, Deluca HF. Effects of 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and calcitonin on fracture healing in adult rats. *Clinical Orthopedics and Related Res* 1981; 160: 304-308.
  38. Masiukiewicz US, Insogna KL. The role of parathyroid hormone in the pathogenesis, prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Aging(Milano)* 1998; 10(3): 232-239.
  39. Masud T, Mulcahy B, Keen RW, Doyle DV, Spector TD. Effects of cyclical etidronate combined with calcitriol versus cyclical etidronate alone on spine and femoral neck bone mineral density in postmenopausal osteoporotic women. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1998; 57(6): 346-349.
  40. Melton LJ, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Riggs BL. Bone density and fracture risk in man. *J Bone Miner Res* 1998; 13(12): 1915-1923.
  41. 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* 1998; 23(3): 257-266.
  42. Morgan SL. Calcium and vitamin D in osteoporosis. *Rheumatic Diseases Clinics of North America* 2001; 27(1): 101-130.
  43. Nelson-Piercy C. Heparin-induced osteoporosis. *Scand J Rheumatol* 1998; (Suppl 107): 68-71.
  44. Netelenbos C. Osteoporosis : intervention options. *Maturitas* 1998; 30: 235-239.
  45. O'Brien KO. Combined calcium and vitamin D supplementation reduces bone loss and fracture incidence in older men and women. *Nutr Rev* 1998; 56(5 Pt 1): 148-150.
  46. Robinson RJ, Iqbal SJ, Al-Azzawi F, Abrams K, Mayberry JF. Sex hormone status and bone metabolism in men with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12(1): 21-25.
  47. Shiraki M, Ito H, Orimo H. The effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on bone mineral content in senile osteoporosis-A dose finding study. *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi* 1989; 65(11): 1253-1263.
  48. Silverman SL. Calcitonin. *Am J Med Sci* 1997; 313(1): 13-16.
  49. Takagi T, Tsao PW, Totsuka R, Takata I. Changes in bone

- mineral density in rat adjuvant arthritis. *Clinical Immunol and Immunopathol* 1997; 84(2): 166-170.
50. Treves R, Louer V, Bonnet C, Vergne P, Bertin P. Male osteoporosis. *Presse Med* 1998; 27(32): 1647-1651.
51. Vukicevic S, Stavljenic A, Bagi C, Winter I. 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> stimulates alkaline phosphatase activity and inhibits soft tissue proliferation in implants of bone matrix. *Clin Orthop* 1985; 196: 285-291.
52. Ziegler R. Drug treatment of osteoporosis. *Ther Umsch* 1998; 55(11): 696-701.