韓國營養學會誌 39(1) : 11~17, 2006

카제인포스포펩티드의 수준별 섭취가 난소절제 흰쥐의 골대사에 미치는 영향*

양다움[1] · 이진우[2] · 박홍주[3] · 김선희[1] · 장문정[1]§

국민대학교 식품영양학과,[1] 단국대학교 치의학과,[2] 농촌지원개발연구원[3]

Effect of Dietary Caseinphosphopeptide Levels on Bone Metabolism in Ovariectomized Rats*

Yang, Daum[1] · Lee, Jin-Woo[2] · Park, Hong Joo[3] · Kim, Sun Hee[1] · Chang, Moon-Jeong[1]§

Department of Food and Nutrition,[1] Kookmin University, Seoul 136-702, Korea
Department of Dentistry,[2] Dankook University, Cheonan 330-714, Korea
Rural Resources Development Institute,[3] Suwon 441-707, Korea

ABSTRACT

The effect of the level of casein phosphopeptide (CPP) on mineral (Ca and P) bioavailabilties and bone biomarker of aged ovariectomized (OVX) Sprague-Dawley rats were studied as a model for postmenopausal bone loss. Forty five Spargue dawley rats, 220 – 230 g of body weight were fed a control diet (AIN 93M) or containing different level of CPP diet for 7 weeks: 0% (sham control; SC, OVX control; OC), 1% (OVX low CPP diet; OL), 2% (OVX medium CPP diet; OM), 3% (OVX high CPP diet; OH) Ca absorption was unaffected by increasing CPP content from 0 to 3%. Urinary Ca excretion was increased by OVX, and decreased by CPP significantly ($p < 0.05$) with no evident dose-relationship. The urinary P excretion was increased by CPP intake in OVX rats. The fecal excretion of P given CPP decreased in OVX with dose dependent manner. Ca and P contents of femur significantly increased by adding 2 or 3% of CPP when compared with OC group and OL group ($p < 0.05$). There were no significant differences in serum alkaline phosphatase activity and c-terminal telopeptide excretion in experimental groups. Although ovariectomy induced the increase in urinary c-terminal telopeptide excretion, 2 or 3% of CPP in the diet decreased urinary c-terminal telopetide excretion significantly. These finding suggest the usefulness of CPP in the prevention of postmenopausal bone loss by decreasing urinary Ca excretion and bone resorption. Over 2 percent of CPP in the diet was effective to prevent postmenopausal bone loss. (*Korean J Nutrition* 39(1): 11~17, 2006)

KEY WORDS : casein phophopeptides, calcium, phosphorus, bone biomarkers, ovariectomized rats.

서 론

폐경기 이후 발생하는 골다공증은 대사성 질환으로 골 칼슘 대사의 불균형으로 인해 발병율이 증가하는 데, 여성의 경우 특히 폐경이나 폐경기 이후 20~30%의 해면골과 5~10%의 피질골의 감소가 일어난다.[1] 골다공증은 골의 화학적 조성은 크게 변하지 않으나 골질량 또는 골밀도가 감소하고, 골조직의 미세구조의 퇴행적 변화로 인해 쉽게 골절을 초래하는 특징을 갖는다.[2,3] 폐경기 이후나 난소절제로 유발한 골소실과 무월경증에서 에스트로겐 호르몬 결핍이 골다공증 발생의 주요 원인이다.[4] 에스트로겐은 골흡수를 유발하는 사이토카인 (cytokines)의 생성과 기타 다른 인자들의 생성을 조절한다.[5] 또한 식품을 통한 적절한 칼슘의 섭취, 운동이 골소실을 예방할 수 있는 주요 인자들이다.[6,7]

에스트로겐 대체요법은 골소실을 감소시키나, 암과 심혈관계질환의 발병위험도를 높이는 부작용이 있어 최근에는 장기간의 임상치료로는 사용하지 않으며,[8] 칼시토닌과 bisphosphonate와 같은 골다공증 치료약도 부작용과 경제적인 면에서 일상적으로 사용하기 어려운 단점을 갖고 있다.

접수일 : 2005년 12월 29일
채택일 : 2006년 1월 12일
*This research was supported by a 2003 research grant of Bioreen 21 (Project No.1005520030101000-1).
§To whom correspondence should be addressed.
E-mail : cmoon@koomin.ac.kr

© 2006 The Korean Nutrition Society

따라서 식사섭취를 통한 골대사 개선이 약의 부작용 없이 골 건강을 유지하기 위해 장기간 지속할 수 있는 경제적인 방법이다.

칼슘과 인은 골을 형성하는 중요한 성분으로 골무기질의 형성을 통해 골 건강에 중요한 영향을 줄 수 있다. 칼슘 섭취가 부족하거나 흡수 불량일 때는 신경과 근육의 정상적인 기능을 수행하기 위해 골에 저장되어 있는 칼슘을 사용해야 하기 때문에 골로부터 구성성분의 분해가 일어나며, 특히 폐경이 되면 폐경 전에 비해 칼슘의 흡수가 저하되고 소변을 통한 배설량이 증가하여 골다공증의 가능성이 커진다.[9] 질병을 예방하고 최적 건강을 유지하는 데 있어서 결정적인 영향을 미치는 식사와 영양의 역할이 최근 더욱 강조되고 있는 데, 칼슘의 생체 이용률 증가를 위한 방안 모색은 골다공증 예방과 관련된 영양학적 연구에서 가장 중요한 과제이다.

칼슘의 주요 급원인 우유에는 카제인과 유청단백질외에 기능성펩티드나, 크기가 작은 단백질이 들어있는 데 이 펩티드들은 단백질에 포함되어 있을 때는 생리적으로 활성이 없으나 위장관내에서 소화되는 과정이나 식품을 가공하는 과정에서 단백질 소화효소에 의해 방출되면서 생리활성을 갖게 된다.[10] 카제인 포스포펩티드 (casein phosphopeptide, CPP)는 위장관내의 단백질 소화효소에 의해 카제인이 분해될 때 생성되는 펩티드로 다양한 생리적 기능을 갖고 있는 것으로 알려져 있다.[11,12] CPP는 돼지나 흰쥐에서 식이를 통해 섭취한 카제인으로부터 소화작용 중 자연적으로 생성되어 소장에 존재하며,[13,14] 상업적으로 판매되는 CPP는 우유 카제인중 α_{s1}-카제인, α_{s2}-카제인과 β-카제인에 단백질 분해효소인 트립신을 작용시켜 제조하고 있다. In vitro 실험에서 CPP는 인산칼슘 형성으로 인한 침전을 억제하고, 가용성 염을 형성하여 회장내에서 칼슘의 수동적 흡수를 증진시키는 것으로 보고되었다.[15-17] 카제인을 함유한 식이를 쥐에게 급여 했을 때, 소장 하부의 가용성 칼슘 비율이 다른 단백질을 섭취한 동물군에 비하여 현저하게 증가되었고, 이는 카제인의 소화 과정 중 형성되는 CPP에 기인하며, 소장에서 인이 존재할 때 칼슘의 흡수는 CPP의 농도와 비례하여 증가하는 것으로 보고되었다.[18] CPP 또는 amino acid mixture를 흰쥐에게 공급했을 때 칼슘의 장 흡수율은 CPP를 공급한 흰쥐에게서 높았으며 이는 CPP섭취군의 가용성 Ca의 양이 증가하기 때문인 것으로 보고하였다.[19] 카제인 식이를 공급한 쥐의 소장에서 가용성 칼슘과 인 함량이 계란 알부민, 아미노산 혼합물 또는 대두분리단백을 포함한 식이를 공급했을 때 보다 증가하였으며, 불용성 칼슘의 양은 가장 작았다.[20] 최근 연구에서 Ferraretto 등은 우유 카제인으로부터 분리한 CPP 혼합물이 사람의 소장으로부터 분리한 HT-29 세포에서 세포내액의 칼슘이온의 농도를 증가시켰음을 보고하였으며,[12] 모유를 먹는 흰쥐를 이용한 실험에서 CPP의 첨가는 칼슘의 생체이용율을 유의하게 증가시켰다.[22] 그러나 in vivo에서 CPP의 섭취가 돼지에서 Ca^{2+}의 흡수에 영향을 미치지 않는다는 연구결과[23]가 있었으며 Li 등[24]은 in vitro 실험에서 쥐의 회장 점막쪽에 CPP의 첨가가 무기인산과 같은 칼슘의 흡수를 방해하는 물질이 없을 때에도 칼슘의 흡수를 감소시켰다고 보고하였으며, 대두단백에 CPP의 첨가한 식이는 0.15%의 칼슘을 섭취했을 때 쥐에서 칼슘의 흡수율과 이용성에 명확한 효과를 나타내지 않았다는 연구결과도 발표되었다.[25]

CPP와 칼슘의 생체이용률과의 상관성에 관한 선행연구들은 대부분 in vitro이며, in vivo 연구의 경우 정상동물을 사용하여 식이에 단일 수준의 CPP의 첨가후 장관내에서의 효과를 본 연구가 대부분[12,15-17,25]이며, 폐경기에 CPP의 섭취효과에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 난소절제를 통해 폐경기를 유도한 흰쥐에게 CPP의 첨가수준을 달리한 식이를 공급하여 CPP가 칼슘, 인 대사및 골대사 지표물질에 미치는 영향을 살펴보고자 하였으며, 섭취수준에 의한 영향을 평가하여 유효섭취수준을 설정하기 위한 기초 자료를 확보하고자 하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험동물의 사육

평균체중 220~240 g, 9주령 Sprague-Dawley종 암컷 흰쥐 45마리를 구입하여 온도 23 ± 1℃, 상대습도 65 ± 5%, 12시간의 낮 밤주기로 조절된 환경에서 물과 실험 식이를 자유급식으로 공급하였다. 이때 물은 모두 1차 이온교환수를 사용하였다. 1주일의 적응 기간동안 고형사료 (CJ 주식회사)로 사육한 후 난소절제수술을 하였고 대조군은 sham 수술을 시행하였다. 수술 후 1주간 회복기간을 두었고 난소절제군은 난괴법에 의해 9마리씩 4군으로 나누어서 물과 실험 식이를 자유급식으로 공급하면서 7주간 사육하였다.

2. 실험동물의 수술

실험동물은 sham 수술과 난소절제로 나누어서 12시간 절식을 시킨 다음 ketamin (12.5 mg/체중100 g, 유한양행)을 사용하여 복강에 주입하여 마취시킨 후 수술하였다. Sham 수술은 복막절개까지만 난소절제와 동일한 방법으로 시행하고 난소를 적출하지 않은 채로 다시 봉합하였으며, 난소절제군은 난소를 적출후 봉합하였다.

3. 실험식이

실험식이는 American Institute of Nutrition (AIN-93 M) 식이를 기준으로 카제인 대신 CPP를 실험군에 따라 단백질 조성을 달리하여 각기 CPP 0% (0 g CPP/kg diet, control; C), 1% (10 g CPP/kg diet, low: L), 2% (20 g CPP/kg diet, medium; M), 3% (30 g CPP/kg diet, high; H)를 공급하였다. CPP의 첨가량은 평균 BMI 25인 폐경기 여성을 대상으로 선행연구[26]에서 200 mg의 CPP를 섭취케 하였기에 이를 고려하여 체중 kg으로 환산하였고, 사용한 CPP제품의 순수 CPP 함량을 고려하여 본 연구에서 CPP를 1% 첨가하기로 결정하였고 이 섭취량의 각각 2배 및 3배를 첨가한 실험식이를 사용하였다. 실험식이에 사용한 CPP는 Arla Foods Ingredients (Denmark)의 LACPRODAN DI-2021이었다. 옥수수전분은 대상주식회사 (Seoul, Korea), 카제인은 Junsei Chemical (Tokyo, Japan) 제품을, 설탕은 CJ 주식회사 (Inchon, Korea), 대두유는 대상주식회사제품 (Seoul, Korea)이며, cellulose, choline bitartrate, tert-butylhydroquinone는 Sigma (St. Louis, USA), vitamin mixture와 mineral mixture는 Harlean Teklad (Madison, USA) 제품을 구입하여 사용하였다.

식이 섭취량은 2일에 한번씩 측정하였으며 체중은 실험기간동안 1주일에 한번씩 일정한 시간에 측정하였다. 체중은 식이 섭취에서 오는 갑작스러운 체중의 변화를 막기 위해 밥그릇을 빼고 2시간 후에 측정하였다.

식이효율 (Food efficiency ratio; FER)은 일정기간의 체중증가량을 동일 기간 섭취한 식이량으로 나누어 산출하였다. 그 식은 다음과 같다.

식이효율 (FER) =

체중 증가량 (Body weight gain, g) / 식이 섭취량 (Food intake, g)

4. 시료수집 및 전처리

소변과 대변의 수집은 실험식이 급여 6주째에 실험동물들을 대사장에 1마리씩 옮겨서 72시간 동안 수집하였다. 소변은 cage에 묻은 시료를 증류수로 씻고 총 부피 100 ml로 희석한 후 분석전까지 -50℃에서 냉동보관 하였고, 대변은 털과 이물질을 제거한 후 무게를 측정하고 분석전까지 냉동 보관하였다.

채혈과 대퇴골의 적출은 실험 식이를 7주간 공급 후 각각 실시하였다. 실험동물은 희생시키기 전 12시간 절식시키고, ethyl ether로 마취시킨 후 개복하여 심장으로부터 혈액을 채취한 후 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 얻은 후 분석 전까지 -50℃에 냉동 보관하였다.

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredients (g/kg diet)	Control	L[1)]	M	H
Corn starch	465.692	465.692	465.692	465.692
casein	150	140	130	120
casein phosphopeptide	0	10	20	30
Sucrose	100	100	100	100
Dextrinized cornstarch	155	155	155	155
Soybean oil	40	40	40	40
Fiber	50	50	50	50
Mineral mixture[2)] (AIN-93M-MX)	35	35	35	35
Vitamin mixture[3)] (AIN-93VX)	10	10	10	10
L-cystine	1.8	1.8	1.8	1.8
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5
Tert-butylhydroquinone	0.008	0.008	0.008	0.008

1) L; low casein phosphopeptide intake, M; medium casein phosphopeptide intake, H; high casein phosphopeptide intake
2) Mineral mixture provides calcium carbonate, 12.5 g; sodium chloride, 2.59 g; potassium citrate, 2.48 g; potassium phosphate, 6.86 g; potassium sulfate, 1.63 g; magnesium oxide, 0.85 g; manganous carbonate 0.02 g; ferric citrate, 0.21 g; zinc carbonate, 0.06 g; cupric carbonate, 0.01 g; potassium iodate, 0.00035 g; sodium selenite, 0.00036 g; chromium potassium sulfate, 0.01 g; ammonium paramolybdate, 0.0003 g; sodium meta-silicate, 0.05 g; lithium chloride, 0.0006 g; boric acid, 0.003 g; sodium flouride, 0.002 g; nickel carbonate, 0.001 g; ammonium vanadate, 0.0002 g; sucrose finely powdered, 7.73 g
3) Vitamin mixture provides thiamin HCl, 0.006 g; riboflavin, 0.006 g; pyridoxine HCl, 0.007 g; nicotinic acid, 0.03 g; calcium pantothenate, 0.016 g; folic acid, 0.002 g; D-biotin, 0.0002 g; vitamin B_{12}, 0.025 g; vitamin A palmitate, 0.008 g; DL-alpha tocopheryl, 0.15 g; vitamin D_3 0.002 g; vitamin K, 0.00075 g; sucrose finely ground, 9.75 g

대퇴골은 양쪽을 떼어내어 지방, 근육 등을 제거한 후 길이와 무게를 측정한 후 분석 전까지 -50℃에 냉동 보관하였다.

5. 시료의 칼슘과 인 측정

혈청내 칼슘과 인의 함량은 혈청 10 ul를 취해 0.01N HCl용액을 넣어 최종 부피를 3 ml로 맞춘 후 Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS, Aglient 7500a, USA)으로 분석하였다. 대변에 함유되어 있는 칼슘과 인의 분석은 대변을 건조시켜 600℃ furnace에서 12시간 회화시킨 다음 3 M HCl을 첨가하여 12시간 용해시킨 다음 여과시켜 ICP-MS를 사용하여 분석하였다. 대퇴부와 실험식이도 대변과 동일한 방법으로 칼슘과 인을 분석하였다. 시료의 분석에 사용한 모든 기구는 산 용액에 담군 후 이온제거수로 헹궈 무기질 오염을 최대한 방지하였다. 소변에 함유된 칼슘과 인의 분석은 냉동 보관된 소변을 상온에서 녹인 후 2,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 0.01N HCl에 희석시켜 ICP-MS에서 분석하였다.

6. 골대사 지표 측정

혈청의 alkaline phosphatase (ALP) 농도는 Kind-King 변법에 따른 alkaline phosphatase kit (소망제약)을 사용하여 측정하였다. 혈청과 소변의 C-terminal telopeptide 농도는 RatLaps ELISA kit (Nordic bioscience diagnostics, Herlev, Denmark)를 이용하여 측정하였다.

7. 통계 처리

실험 결과의 자료는 실험군별 평균과 표준오차로 나타내었고, CPP 섭취수준에 따른 각 실험군간의 비교는 one way ANOVA로 분석한 후 Duncan's multiple range test로 $p<0.05$수준에서 검정하였다.

연구 결과 및 고찰

1. 식이 섭취량, 체중 증가량 및 식이효율

실험동물의 7주간의 체중변화, 식이 섭취량 및 식이효율은 Table 2에 제시하였다. 실험 시작시 모든 실험동물의 체중은 각 실험군 간의 유의적인 차이가 없었다. 그러나 실험 종료시 난소 절제군과 sham 수술군간의 유의적인 차이가 있어 난소절제군의 체중이 높았다. 이는 난소절제군의 식이섭취량이 sham 수술군에 비해 유의적으로 높았던 것에 기인한다. 식이 내 CPP의 첨가량에 따른 실험군간의 식이섭취량의 차이는 나타나지 않았으나, OH군이 OM군에 비해 최종 체중이 유의하게 높았으며 식이효율도 OM군에 비해 OH군이 유의적으로 더 높았다. 본 연구 결과는 폐경기 이후 여성의 체중이 증가한다는 보고[27]와 일치하며 Kalu 등[28]의 연구에서도 sham수술과 난소 절제시 식이 섭취량이 비슷하였음에도 불구하고 체중의 증가는 난소절제의 경우가 더 높은 경향을 가진다고 보고 하였다. 본 실험에서도 난소절제시 식이효율이 높아 선행 연구결과와 같은 경향을 보였다.

Table 2. Effect of specific diets on initial body weight, final body weight, total food intake and food efficiency ratio (FER) in sham and ovariectomized rats

Group	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Food intake (g)	FER
SC[2)]	243 ± 3	305 ± 5[b2)]	718 ± 15[a]	0.09 ± 0.05[a]
OC	239 ± 4	359 ± 13[bc]	787 ± 21[b]	0.13 ± 0.02[bc]
OL	239 ± 4	367 ± 6[bc]	838 ± 19[b]	0.15 ± 0.00[c]
OM	240 ± 3	340 ± 13[b]	784 ± 26[b]	0.12 ± 0.01[b]
OH	244 ± 4	374 ± 8[c]	842 ± 28[b]	0.15 ± 0.01[c]

1) SC: Sham Control (CPP 0% kg diet), OC: Ovariectomized Control (CPP 0% kg diet) OL: Ovariectomized Low CPP (CPP 1% kg diet), OM: Ovariectomized Medium CPP (CPP 2% kg diet), OH: Ovariectomized High CPP (CPP 3% kg diet)
2) Values are means ± SEM (n = 9). Mean values for same column not sharing a common superscript letter are significantly different among the groups by Duncan's multiple range test at $p<0.05$

2. 칼슘의 생체 이용성

24시간 식이를 통한 칼슘의 섭취량, 대변 배설량, 장관을 통한 흡수량은 모두 실험군간의 유의적인 차이가 없었으며 흡수량은 유의적이지는 않지만 난소절제에 의해 감소하는 경향을 보였다 (Table 3). 난소절제시 CPP 1% 첨가군인 OL군이 OC, OM, OH군에 비해 흡수량이 높고 2~3% 첨가시 흡수율이 감소하는 경향이었다. 일부 연구에서 CPP가 장관내에서 칼슘과 chelate를 형성하여 침전을 억제하므로서 용해도를 증가시켜 흡수를 촉진시킨다고 보고하였다.[15-17] 소장을 이용한 in vitro 실험에서 CPP는 장관내 CPP/칼슘의 비율에 따라 이 비율이 5~15 범위내에서는 칼슘의 흡수가 증가하고 반면 20에서는 흡수율이 감소하여 CPP와 칼슘의 비율이 중요한 인자임이 보고되었다.[29] Bennett 등은 생후 9주령 쥐를 이용한 실험에서 식이 1 kg당 0~100 g의 CPP를 첨가하였을 때 칼슘의 흡수에 영향을 주지 않았으며 200 g 이상 첨가시 오히려 흡수율이 감소하였다고 보고[30]하여 본 연구결과는 이와 유사한 경향이었다. Saito 등[31]은 식이 1 kg당 0.7~3.5 g의 CPP 첨가시 식이내 칼슘의 양에 따라 달라져 칼슘의 섭취가 약간 부족할 때 (marginal condition) 칼슘의 흡수가 증가한다고 보고하여 본 연구결과와 다른 결과를 보였으며 이 차이는 본 연구에서 제조하여 사용한 식이 내 칼슘의 양은 충분한 양이었던 것에 기인하는 것으로 사료된다. Heaney 등[32]은 폐경기 여성에서 CPP의 첨가는 칼슘을 보충시켰을 때 흡수율을 증가시킨다고 보고한 점으로 보아 CPP 첨가로 인한 칼슘의 흡수는 장관내 CPP/칼슘의 적정 비율유지가 중요하다고 본다.

뇨중 칼슘 배설량은 sham군에 비해 난소절제 카제인 섭취군에서 증가하였다. 그러나 난소절제군 내에서 CPP의 첨가량이 많을수록 뇨중 칼슘 배설량은 유의적으로 감소하였다. OC군에 비해 OL군의 뇨중 칼슘 배설량이 감소하였으

Table 3. Effect of casein phosphopeptide content on calcium bioavailability in sham and ovariectomized rats

Group	Ca intake (mg/d)	Fecal Ca (mg/d)	Apparent Ca absorption (mg)	Urinary Ca (mg/d)
SC	123.7 ± 4.2	41.3 ± 2.8	247.2 ± 11.6	1.2 ± 0.1[ab1)]
OC	119.7 ± 8.9	44.0 ± 4.2	227.1 ± 25.1	1.6 ± 0.2[b]
OL	120.6 ± 9.9	40.6 ± 1.7	240.0 ± 32.8	1.2 ± 0.0[ab]
OM	118.0 ± 4.7	42.1 ± 3.1	227.8 ± 10.6	1.1 ± 0.1[a]
OH	117.3 ± 4.4	41.8 ± 3.7	226.6 ± 15.4	1.1 ± 0.1[a]

1) Values are means ± SEM (n = 9). Mean values for same column not sharing a common superscript letter are significantly different among the groups by Duncan's multiple range test at $p<0.05$

며, OL군에 비해 OM, OH군의 칼슘배설량이 더 감소하였다. 폐경기 여성의 신장에서 칼슘의 재흡수가 감소되고 이에 따라 뇨 칼슘 배설량이 증가하는 것으로 보고되고 있으며,[33,34] 이 결과는 본 연구에서 난소 절제군에서 뇨중 칼슘 배설량이 sham 수술군에 비해 유의적으로 높았던 결과와 부합한다. 이런 기전이 폐경 후 골흡수 증가로 인한 골다공증 발생의 한 원인으로 생각되고 있다.

3. 인의 생체이용성

Table 4에 제시된 바와 같이 인의 식이 섭취량은 실험군간의 유의적인 차이가 없었으며 대변중 배설량은 난소절제시 sham 수술군에 비해 유의적이지는 않으나 증가하는 경향이었다. 난소절제군에서 CPP의 첨가수준이 증가할 수록 대변을 통한 인의 배설량이 감소하여 0% 첨가군인 OC군에 비해 OH군이 유의적으로 감소하였다 ($p<0.05$). 따라서 인의 체내 흡수량은 난소절제에 따른 감소가 있었으며 CPP의 첨가로 인해 인의 흡수량이 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. Pointillart와 Guegen[35]은 돼지에서 5%의 CPP 첨가식이가 인의 흡수량에 큰 영향을 주지 않는다고 보고하였으며 이는 본 연구 결과와 유사하였다.

뇨중 인 배설량은 SC군과 OC군간에 유의적인 차이가 없었으나 CPP의 첨가수준이 증가할 수록 높아져 OH군의 인 배설량이 가장 높았다. Tsuchita 등[36]의 연구에서는 난소절제군과 sham 수술군의 소변을 통한 인 배설량의 차이가 없었으며 CPP섭취시 인 배설량이 감소하였다고 보고하였다. 본 연구에서 CPP 섭취가 뇨를 통한 인배설을 증가시킨 기전은 명확하지 않으나 선행연구와 본 연구에서 사용된 동물모델의 차이에 기인할 가능성이 있다. Tsuchita 등[36]은 최대 골질량에 도달하기 전인 생후 3주령의 흰쥐에 난소절제를 통해 폐경을 유발하였으며, 본 연구는 최대 골질량에 근접하게 도달한 시기인 생후 9주령에 폐경을 유발시켰고 이로 인해 인 대사의 차이가 나타났을 것으로 사료되며 특히 이 시기에 인이 다량 들어 있는 CPP의 흡수증가가 뇨중 인 배설을 촉진시켰을 가능성이 있다. 폐경 후 5년이 경과한 여성을 대상으로 한 연구에서 인 배설량이 유의하게 증가하였다는 결과도 보고된 바 있다.[37]

4. 대퇴골 분석

CPP의 섭취수준에 의한 대퇴골에 미치는 영향을 Table 5에 제시하였다. 대퇴골의 길이와 무게는 난소절제에 의해 유의적으로 감소되었으나 난소절제군에서 7주간 CPP섭취는 골 길이와 무게를 증진시키는 효과가 있었으며 OM군이 OH군에 비하여 유의하게 높았다. 대퇴골의 칼슘과 인의 축적량은 난소절제에 의한 영향으로 SC군에 비해 OC군에서 유의적으로 낮았으며 CPP의 섭취량이 증가할 수록 높아져 2, 3%의 CPP를 섭취한 OM군, OH군의 대퇴골 칼슘과 인 축적량은 OC군, OL군에 비해 유의적으로 함량이 높아져 sham군의 수준으로 회복되었다.

골 소실과 골 대사회전률의 증가가 난소절제 쥐에서 일어나며,[38] 노령화된 쥐에서 난소절제는 대퇴골에서 골밀도가 감소된다고 보고되어[39] 이는 본 연구결과와 일치한다. Tsuchita 등[40]은 성장기 흰쥐에서 칼슘이 강화된 우유 1 mL에 1.0 mg의 CPP를 첨가하여 섭취후 48시간이내에 대조군에 비해 대퇴골과 경골의 칼슘 축적을 증가시켰다고 보고하였으며 본 연구결과에서도 CPP의 섭취가 난소절제로 인한 골소실을 억제하였다. 선행연구에서 CPP는 위장관내에서 칼슘의 용해도를 높여 흡수율을 증가시켜 골 건강에 유익한 효과를 준다고 보고하였으나 본연구에서 CPP의 첨가는 장관내에서의 칼슘의 흡수에는 영향을 주지 않고, 소변을 통한 칼슘의 배설을 억제하므로서 골 칼슘 축적을 증진하는 것으로 나타났으며, 이는 폐경으로 인한 골다공증 예방 및 진행속도 지연에 영향을 미칠 것으로 사료된다.

Table 4. Effect of casein phosphopeptide content on phosphorus bioavailability in sham and ovariectomized rats

Group	Dietary intake (mg/d)	Fecal P (mg/d)	Apparent P absorption (mg/d)	Urinary P (mg/d)
SC	34.4 ± 1.2	9.4 ± 0.4$^{ab1)}$	25.0 ± 1.1	1.7 ± 0.4^{a}
OC	33.3 ± 2.6	10.5 ± 1.7^{b}	22.3 ± 2.4	1.8 ± 0.4^{a}
OL	33.5 ± 2.8	9.1 ± 0.7^{ab}	24.4 ± 3.1	3.3 ± 0.2^{b}
OM	32.8 ± 1.3	8.2 ± 0.7^{ab}	24.7 ± 1.0	3.3 ± 0.2^{b}
OH	32.6 ± 1.3	7.5 ± 0.8^{a}	25.1 ± 1.2	4.8 ± 0.5^{c}

1) Values are means ± SEM (n = 9). Mean values for same column not sharing a common superscript letter are significantly different among the groups by Duncan's multiple range test at $p<0.05$

Table 5. Effect of casein phosphopeptide content on femur in sham and ovariectomized rats

Group	Femur wet weight (mg/100 g bw)	Femur length (mm/100 g bw)	Femur Ca (mg/g)	Femur P (mg/g)
SC	234 ± 3$^{d1)}$	11.4 ± 0.2^{d}	292.9 ± 17.4^{b}	141.7 ± 8.6^{b}
OC	204 ± 7^{ab}	9.9 ± 0.4^{ab}	217.4 ± 21.8^{a}	105.9 ± 10.6^{a}
OL	219 ± 4^{c}	9.6 ± 0.4^{a}	211.2 ± 26.3^{a}	101.5 ± 12.2^{a}
OM	215 ± 6^{bc}	10.4 ± 0.4^{b}	318.2 ± 14.5^{b}	153.1 ± 6.7^{b}
OH	195 ± 3^{a}	9.5 ± 0.1^{a}	325.4 ± 16.4^{b}	158.3 ± 6.7^{b}

1) Values are means ± SEM (n = 9). Mean values for same column not sharing a common superscript letter are significantly different among the groups by Duncan's multiple range test at $p<0.05$

Table 6. Effect of casein phosphopeptide content on bone biomarker in serum or urine in sham and ovariectomized ratse

Group	Serum alkaline phosphatase (K-A)	Serum c-terminal telopeptide	Urinary c-terminal telopeptide
SC	10.7 ± 1.3	6.4 ± 1.1	11.8 ± 0.5[a1)]
OC	10.9 ± 1.0	7.9 ± 1.2	14.9 ± 1.0[b]
OL	9.5 ± 0.6	9.1 ± 1.2	15.8 ± 1.2[b]
OM	9.3 ± 0.9	7.6 ± 0.7	11.2 ± 0.0[a]
OH	11.8 ± 1.3	8.3 ± 1.1	12.7 ± 0.3[a]

1) Values are means ± SEM (n = 9). Mean values for same column not sharing a common superscript letter are significantly different among the groups by Duncan's multiple range test at $p<0.05$

5. 혈청과 뇨의 골대사 지표

혈청내 bone alkaline phosphatase (ALP) 활성은 Table 6에 제시하였다. 본 연구에서 난소절제나 CPP의 첨가가 혈청의 ALP 활성에 미치는 영향은 유의적인 차이가 없었다. 난소절제는 조골세포와 파골세포의 활성을 동시에 증가시켜 골대사 회전율을 증가시키고, 파골세포의 활성이 더욱 증가하므로서 골소실을 초래한다.[41] ALP는 골형성 지표로서 대사성 골질환 및 골재형성시 조골세포의 활동이 증가되어 골 교체율이 빠를 때 혈청 내 농도가 증가된다고 알려져 있으며, 특히 성장기에 조골세포의 활성이 파골세포 보다 높은 시기에 활성이 증가된다.[42]

혈청의 c-terminal telopeptide (CTx)농도는 난소절제에 의해 증가하였으나 통계적인 유의성은 없었다. 뇨중 CTx 배설은 난소절제에 의해 유의하게 증가하였으며, CPP 첨가로 인해 뇨중 배설량이 감소하여 난소절제군중 2% CPP 첨가군인 OM군의 배설량이 가장 낮았으며 OM군과 OH군의 CTx 배설량은 sham 수술군의 배설량과 유사하였다. Garnero 등[43]과 Guerrero 등[44]은 소변으로 배설된 CTx의 수치가 증가하면 대사적으로 골질환을 유발하는 파골세포의 활성 증가로 골의 흡수가 가속화된다고 보고하였다. 본 실험 결과 뇨중 CTx의 배설량이 OM과 OH군이 다른 난소절제군에 비해 유의하게 낮았으므로 식이 무게당 2% 이상의 CPP 섭취시 시 골흡수가 지연되는 효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다. 이 결과로 볼때 난소절제군에서 CPP는 골형성 보다는 골소실을 억제하며 2% 이상 첨가시 유효하게 골소실을 억제하는 것으로 나타났다.

결 론

본 연구에서는 폐경기를 유도한 난소절제 흰쥐에게 CPP의 섭취 수준을 달리하여 공급한 후 칼슘과 인의 생체 유용성, 대퇴골의 칼슘과 인 축적량, 골대사 지표를 측정하여 골대사에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

난소절제로 인해 대퇴골 길이와 무게는 감소하였으나 CPP의 섭취 시 단위 체중 당 대퇴골 길이와 무게가 증가하였고 특히 CPP를 식이무게의 2% 이상 공급하였을 때 그 효과가 유효하였으며 대퇴골의 칼슘과 인의 축적량도 CPP를 2% 또는 3% 섭취했을 때 다른 섭취군에 비해 유의적으로 높았다. 변증 칼슘 배설량은 각 실험군간 유의적인 차이가 없었다. 뇨중 칼슘과 인 배설량은 난소절제로 인해 증가하였으나 CPP섭취 시 뇨중 칼슘 배설량이 유의하게 감소시켜 대퇴골의 칼슘축적량이 증가시키는 것으로 사료된다. 골 흡수 지표인 뇨중 CTx 배설은 난소 절제로 인해 증가하였으나 CPP를 2% 이상 섭취 시 억제되었다.

따라서 CPP의 섭취가 폐경기 모델의 뇨중 칼슘의 배설을 억제하고 파골세포의 활성을 억제하므로서 골흡수를 지연시키며, 골 무기질량 (칼슘과 인)을 증가시켜 골다공증의 예방 및 진행속도 지연에 효과적인 것으로 나타났으며 CPP의 섭취수준은 2%일 때 가장 효과적인 것으로 나타났다.

Literature cited

1) Lindsay R. Sex steroids in the pathogenesis and prevention of osteoporosis, in: Riggs B, Melton LI (eds.), Osteoporosis: Etiology, Diagnosis and Management, Raven Press, New York, 1988
2) WHO/FAO Expert Consultation diet nutrition and the prevention of chronic diseases. WHO Technical Report Series, pp.916, 2003
3) Prentice A. Is nutrition important in osteoporosis? *Proc Nutr Soc* 56: 357-367, 1997
4) Albright F, Smith PH, Richardson D. Postmenopausal osteoporosis its clinical features. *JAMA* 116: 2465-2474, 1941
5) Bilezikian JP. Estrogens and postmenopausal osteoporosis: was Albright right after all? *J Bone Miner Res* 13: 774-776, 1998
6) Weaver CM. The growing years and prevention of osteoporosis in later life. *Proc Nutr Soc* 59: 303-306,2000
7) Weaver CM, Teegarden D, Lyle RM, McCabe GP, McCabe LD, Proulx W, Kern M, Sedlock D, Anderson DD, Hillberry BM, Peacock M, Johnston CC. Impact of exercise on bone health and contraindication of oral contraceptive use in young women. *Med Sci Sports Exerc* 33: 873-880, 2001
8) Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Johnson KC, Howard BV, Kotchem JM, Ockene J. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the Women' Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288: 321-333, 2002
9) Allen LH. Calcium bioavailability and absorption: a review. *Am J Clin Nutr* 35: 783-808, 1982
10) Meisel H. Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: Potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. *Livest Prod Sci* 50: 125-138, 1997

11) Meisel H, Frister H. Chemical characterization of bioactive peptides from in vivo digest of casein. *J Dairy Res* 56: 343-349, 1989
12) Shah NP. Effects of milk-derived bioactives: an overview. *Br J Nutr* 84: S3-S10, 2000
13) Meisel H, Frister H. Chemical characterization of a caseinophosphopeptide isolated from in vivo digests of a casein diet. *Biol Chem Hoppe Seyler* 369: 1275-1279, 1988
14) Kasai T, Iwasaki R, Tanaka M, Kiriyama S. Caseinphosphopeptides (CPP) in feces and contents in digestive tract of rats fed casein and CPP preparations. *Biosci Biotechnol Biochem* 59 (1): 26-30, 1995
15) Berrocal R, Chanton S, Juillerat MA, Pavillard B, Scherz JC, Jost R. Tryptic phosphopeptides from whole casein II. Physicochemical properties related to the solubilization of calcium. *J Dairy Res* 56: 335-341, 1989
16) Sato R, Shindo M, Gunshin H, Noguchi T, Naito H. Characterization of phosphopeptide derived from bovine β-casein: an inhibitor to intra-intestinal precipitation of calcium phosphate. *Biochem Biophys Acta* 1077: 413-415, 1991
17) Sato R, Noguchi T, Naito H. Casein phosphopeptide (CPP) enhance calcium absorption from ligated segment of rat small intestine. *J Nutr Sci Vitam* 32: 67-76, 1986
18) Mykkanen HM, Wasserman RH. Enhanced absorption of calcium by casein phosphopeptide in rachitic and normal chikcs. *J Nutr* 110:2141-2148, 1980
19) Lee YS, Noguchi T, Naitio H. Intestinal absorption of calcium in rats given diets containing casein or amino acid mixture: the role of casein phosphopeptides. *Br J Nutr* 49: 67-76, 1983
20) Lee YS, Noguchi T, Naito H. Phosphopeptides and soluble calcium in the small intestine of rats given a casein diet. *Br J Nutr* 43: 457-67, 1980
21) Ferraretto A, Gravaghi C, Fiorilli A, Tettamanti G. Casein-derived bioactive phosphopeptides: role of phosphorylation and primary structure in promoting calcium uptake by HT-29 tumor cells. *FEBS Lett* 551: 92-98, 2003
22) Hansen M, Sandstrom B, Lonnerdal B. The effect of casein phosphopeptides on zinc and calcium absorption from high phytate infant diets assessed in rat pups and Caco-2 cells. *Pediatr Res* 40: 547-52, 1996
23) Scholz-Ahrens KE, Kopra N and Barth C.A. Effect of casein phosphopeptides on utilization of calcium in minipigs and vitamin-D-deficient rats. *Z Ernahrungswiss* 29: 295-298, 1990
24) Li Y, Tome D, Deesjeuz JF. Indirect effect of casein phosphopeptide on calcium absorption in rat ileum in vitro. *Reprod Nutr Dev* 29: 227-233, 1989
25) Yuan YV, Kitts DD. Confirmation of calcium absorption and femoral utilization in spontaneously hypertensive rats fed casein phosphopeptide supplemented diets. *Nutr Res* 11: 1257-1272, 1991
26) Narva M, Karkkainnen M, Poussa T, Lamberg-allardt C, Korpela R. Caseinphosphopeptides in milk and fermented milk do not affect calcium metabolim acutely in postmenopausa women. *J Am Coll Nutr* 22: 88-93, 2003
27) Pasquali R, Casimirri F, Labate AM, Tortelli O, Pascal G, Anconetani B, Flamia R, Capelli M, Barbbara L. Body weight, fat distribution and menopausal status in women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 18: 614-621, 1994
28) Kalu DN, Lin CC, Salerno E, Hollis BW, Echon R, Ray M. Skeletal response of ovariectomized rats to low and high doses of 17 β-estradiol. *Bone Miner* 14: 175-187, 1991
29) Erba D, Ciappellano S, Testolin G. Effect of the ratio of casein phosphopeptides to calcium (w/w) on passive calcium transport in the distal small intestine of rats. *Nutr* 18: 743-746, 2002
30) Bennett T, Desmond A, Harringon M, McDonagh D, FitzGerld R, Flynn A, Cashman KD. The effect of high intakes of casein and casein phosphopeptide on calcium absorption in the rat. *Br J Nutr* 83: 673-680, 2000
31) Saito Y, Lee YS, Kimura S. Minimum effective dose of casein phophopeptides (CPP) for enhancement of calcium absorption in growing rats. *Int J Vit Nutr Res* 68: 335-340, 1998
32) Heaney RP, Saito Y, Orimo H. Effect of casein phosphopeptides on absorbability of co-ingested calcium in normal postmenopausal women. *J Bone Min Metabol* 12: 77-81, 1994
33) Sakhaee K, Nicar MJ, Class K, Pak CY. Postmenopausal osteoporosis as a manifestation of renal hypercalciuria with secondary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 61: 368-373, 1985
34) Nordin BE, Need AG, Morris HA, Horowitz M, Robertson WG. Evidence for a renal calcium leak in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 72: 401-407, 1991
35) Pointillart A, Gueguen L. Absence of effect of the incorporation of a milk phosphopeptide on the utilization of calcium and phosphorus in young pig. *Repro Nutr Dev* 29: 477-486, 1989
36) Tsuchita H, Goto T, Shimizu T, Yonehara Y, Kuwata T. Dietary casein phophopeptides prevent bone loss in aged ovariectomized rats. *J Nutr* 126: 86-93, 1996
37) Lee HJ, Lee HO. Calcium metabolism of menopausal women. *Bulletin Home Culture* 10: 145-169, 1997
38) Wronski TJ, Cintron M, Dann LM. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 43: 179-183, 1988
39) Kalu DK, Liu CC, Hardin R, Hollis BW. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology* 124: 7-16, 1989
40) Tsuchita H, Suzuki T, Kuwata T. The effect of casein phosphopeptides on calcium absorption from calcium-fortified milk in growing rats. *Br J Nutr* 85: 5-10, 2001
41) Wronski TJ, Walsh CC, Ignaszewski LA. Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Bone* 7: 119-123, 1986.
42) Watkins BA, Reinwald S, Li Y, Seifert MF. Protective actions of soy isoflavones and n-3 PUFA on bone mass in ovariectomized rats. *J Nutr Biochem* 16: 479- 88. 2005
43) Garnero P, Gineyts E, Riou JP, Delmas PD. Assessment of bone resorption with a new marker of collagen degradation in patients with metaolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 780-785, 1994
44) Guerrero R, Diaz Martin MA, Diaz Diego EM, Disla T, Rapado A, de la Piedra C. New biochemical markers of bone resorption derived from collagen breakdown in the study of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 6: 297-302, 1996