

난소절제 쥐에서 비타민 D 첨가식이 골밀도와 골무기질 함량에 미치는 영향

최 미 자[§] · 김 상 미

계명대학교 식품영양학과

The Effects of Vitamin D Supplementation on Bone Mineral Density and Bone Mineral Content in Ovariectomized Rats

Choi, Mi-Ja[§] · Kim, Sang-Mi

Department of Food and Nutrition, Keimyung University, Deagu 704-701, Korea

ABSTRACT

The effects of vitamin D₃ supplementation on bone mineral density and bone mineral content in ovariectomized rats were investigated. Forty female Sprague-Dawley rats (body weight 180 g) were divided into two groups, ovariectomy and Sham groups, which were each randomly divided into two subgroups that were fed casein and casein supplemented with vitamin D₃ diets. Bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) were measured using PIXImus (GE Lunar Co, Wisconsin, USA) in spine and femur on 6 weeks after feeding. Osteocalcin and urinary DPD crosslinks value were measured as markers of bone formation and resorption. The body weight gain and food efficiency ratio (FER) were higher in OVX groups than in Sham groups regardless of diets. Serum Ca concentration and urinary Ca excretion were higher in vitamin D₃ supplemented group than in casein group in Sham and OVX. Crosslinks values were higher in OVX groups than in Sham groups. Spine BMD and femur BMD of ovariectomy group were significantly lower than Sham groups, however vitamin D₃ supplemented groups were significantly higher than control groups in Sham and OVX. In conclusion, dietary vitamin D₃ supplementation on ovariectomized rats were significantly increased bone mineral density and bone mineral content in spine and femur. (*Korean J Nutr* 2008; 41(2): 127~134)

KEY WORDS : vitamin D₃, bone mineral density, OVX.

서 론

우리나라 2007년 통계에 따르면 65세 이상 인구가 전체 인구의 8.6%였고,¹⁾ 2002년 골다공증 환자는 약 200만 명으로 보고하였고²⁾ 2004년 우리나라 노인의 18.9%가 골다공증인 것으로 보고되었다.³⁾ 그리고 2010년에는 우리나라 노인의 약 27%가 골다공증으로 예상된다고 보고되었다.⁴⁾ 특히 여성은 남성에 비해 골질의 위험도가 2배 높고, 또한 노령에서 골다공증으로 인한 골절은 같은 연령의 남성 보다 6배나 많다.⁵⁾ 미국의 NOF (National Osteoporosis Foundation)의 보고에 의하면⁶⁾ 2002년 당시 미

국의 50세 이상 남녀인구 중 4,400만 명이 골다공증의 위험성이 있었고 이 중 80%가 여성이었으며, 2010년에는 5,200만 명이 2020년에는 6,100만 명의 골다공증의 위험성이 있을 것이라고 추정하였다. 미국의 경우 골다공증이나 이와 관련된 골절로 인한 국가의 경제적 지출은 2001년도에 170억 달러에 이르렀고 그 비용은 점점 더 증가되고 있는 추세이다. 우리나라도 2005년 통계청 자료에 따르면 폐경 여성 비율이 20.2%로 추산되었고 2030년에는 43.3%로 증가할 것으로 추정 하고 있어 폐경 여성의 비율이 급격히 증가 하고 있다.⁷⁾

골다공증은 효과적으로 치료하는 방법이 없으므로 현재로서는 골다공증이 발생하기 전 예방하는 것이 가장 중요하다.⁸⁾ 여성에서 골밀도 감소를 초래하는 주요원인은 폐경 후 에스트로겐 감소로 인해 골 형성과 골 흡수의 균형이 깨져 급격히 골량이 감소함이다. 이러한 빠른 골 소실속도는 폐경 후 5~10년이 가장 두드러지며 그 후는 노화 자

접수일 : 2008년 3월 3일

채택일 : 2008년 3월 18일

[§]To whom correspondence should be addressed.

E-mail : choimj@kmu.ac.kr

체에 의해 서서히 골밀도가 감소한다.⁹⁾ 에스트로겐은 조골세포에 작용하여 파골세포 활성을 억제 하는 물질을 합성함으로써 골격대사에 관여하는데,¹⁰⁾ 에스트로겐이 분비되지 않으면 골 흡수의 증가로 혈중 칼슘 농도가 증가되고, 그로 인해 부갑상선 호르몬 (PTH) 분비가 감소되며 그 결과 신장에서 1,25 (OH)₂D₃ 생성이 저하됨에 따라 장관 내 칼슘흡수가 감소하고 골 형성이 감소된다.

또한 연령이 증가될수록 골밀도가 감소하는데,¹¹⁾ 노인의 경우 골밀도 감소 요인은 칼슘섭취량 부족, 칼슘 흡수율 저하, 요 중 칼슘배설량 증가, 혈중 PTH 수준 증가와 비타민 D와 관련된 요인으로 피부에서 비타민 D 생성의 부족, 신장에서 활성 비타민 D 형성 장애, 장에서 비타민 D 수용체 감소, 비타민 D 섭취 부족 등이 있다. 특히 65세 이후는 20대에 비해 비타민 D 합성량이 25%로 감소한다고 하였다.¹²⁾ 그리고 노화로 인한 퇴행성 질환이 많아 햇볕에 노출이 제한되기 때문인 요인도 있다.¹³⁾

비타민 D는 장관에서 칼슘흡수 뿐만 아니라 경조직의 석회화에 관계되는 지질의 합성에도 영향을 주며, 소장점막상피에 작용하여 칼슘의 흡수를 촉진한다. 따라서 칼슘과 비타민 D의 복용은 칼슘흡수의 감소를 막고, 골회전율을 낮추어 골질의 가능성을 줄이고 골질을 향상시킬 수 있다.¹⁴⁾

골다공증이 있는 여성은 골다공증 치료를 위해 활성형 비타민 D제 (calcitriol)와 같은 약물이 사용될 수 있으나, 골다공증의 예방을 위해서는 식이 요인으로 칼슘이 중요하지만 비타민 D의 섭취량도 크게 작용하므로 부족한 비타민 D의 보충이 요구된다.¹⁵⁾ 우리나라 경우 혈중 비타민 D₃ 농도가 20 ng/dl 이하인 경우를 부족상태로 인정하는데 한국 여성의 90.1%가 비타민 D 결핍상태로 대다수의 한국 폐경 여성은 부가적인 비타민 D의 보충이 필요하다고 했다.¹⁶⁾ 또한 미국의 경우 현재 비타민 D의 권장섭취량은 만약 햇빛의 노출이 없다면 부족하다고 하였으며, 최소한 일일 1,000 IU 비타민 D는 건강한 혈중 25 (OH)D 농도를 유지하기 위하여 필요하다고 하였다.¹⁷⁾ 그리고 아프리카계 15~49세 미국 여성의 경우 42%가 겨울철에는 혈중 25 (OH)D가 40 nmol/L 이하로 비타민 D 결핍상태로 보고하였다.¹⁸⁾

비타민 D 보충이 골 대사에 미치는 연구에서 사람의 경우 덴마크의 9,605명을 대상으로¹⁹⁾ 10 μg/day 비타민 D와 1,000 mg/day Ca 동시 보충은 골절율을 16% 감소시킨다고 했다. 또한 Trivedi 등²⁰⁾은 65세 이상 노인에게 20 μg/day 비타민 D를 5년간 추가 섭취 시켰을 때 골절 예방효과가 있었다고 보고하였다. 그러나 Meyer 등²¹⁾의

노인에게 10 μg/day 비타민 D₃ 단독 추가 섭취나, Jackson 등²²⁾의 10 μg/day 비타민 D₃와 칼슘 1,000 mg/day 동시 보충이나, 비타민 D₃ 20 μg/day 추가 섭취 시 골절 예방에 효과가 없었다는 보고가 있다.²³⁾ Vieth 등의 연구²⁴⁾에서 4개월 동안 평균 40세의 남녀 노인에게 비타민 D₃를 강화하지 않은 대조군, 25 μg/day 섭취하는군, 100 μg/day 섭취하는 군을 비교한 결과, 대조군은 40.7 ± 15.4 nmol/L 이었고, 25 μg/day 섭취하는 모든 성인에게 25 (OH)D₃가 68.7 ± 16.9 nmol/L로 증가했고, 100 μg/day 섭취하는 모든 성인에게 25 (OH)D₃가 96.4 ± 14.6 nmol/L로 증가했다. 골절위험을 줄이기 위한 25 (OH)D₃ 수준을 고려해 100 μg/day 비타민 D가 안전하다고 보고하였다. 한국인 영양섭취기준 (Dietary Reference Intakes: DRI)에서는 비타민 D 상한섭취량 (UL)을 성인의 권장섭취량 5 μg의 12배인 60 μg/day²⁵⁾로 정하였고, 미국의 경우 비타민 D의 상한섭취량을 50 μg/day 정하였다.²⁶⁾ 그러나 비타민 D를 250 μg/day 섭취한 경우 고칼슘혈증이 없었고, 51~70세의 충분섭취량인 10 μg/day의 25배까지 안전하다고 발표하였다.²⁷⁾

실험동물의 경우 Iwamoto 등²⁸⁾은 암컷 쥐에게 비타민 D를 100g 식이에 25 μg 첨가시킨 경우 대퇴골밀도와 혈청 1,25 (OH)₂D₃의 증가 효과를 보고 하였다. 그러나 Meier 등의 연구에 의하면 칼슘 섭취량이 충분하지 않은 경우 비타민 D와 골 질량과는 상관관계가 없었고, 칼슘 보충을 중단하면 PTH 농도가 증가했다고 하였다.²⁹⁾

이상의 선행연구를 종합하면 칼슘 강화 여부와 상관없이 비타민 D 강화 섭취가 골밀도에 미치는 효과는 다르게 보고되고 있다. 따라서 본 연구는 칼슘은 추가 없이 충분히 섭취하는 조건에서 비타민 D₃를 권장량의 3배 식이로 섭취시켰을 때, 비타민 D₃ 첨가식이 난소절제 쥐에서 골 대사에 미치는 효과를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 실험식이

실험동물

Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐 (180~185 g) 40마리를 난괴법 (randomized complete block design)을 이용하여 난소절제 (OVX)군과 난소절제는 하지 않고 같은 수술의 스트레스를 준 Sham군으로 나누었다. 그 후 식이 조성에 따라 각각 대조군 식이군과 비타민 D₃ 첨가군으로 나누어 각 군당 10마리씩 총 4군으로 하여 6주간 실험 식이

를 공급하였다. 실험동물은 stainless steel wire cage에서 한 마리씩 분리 사육하였으며, 사육실의 온도는 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도는 $63 \pm 5\%$ 로 유지하고 매일 광주기, 암주기를 12시간이 되도록 자동 조절 (light 6:00~18:00)하였다. 실험 기간 동안 식이와 물은 자유롭게 섭취토록 하였으며 물은 모두 2차 이온교환수를 사용하였다.

실험 식이

실험식은 AIN-93G의 기본 조성에 기준하여 대조군인 Control군과 (비타민 D₃ 100%)과 실험군인 비타민 D군은 AIN-93에 권장되는 비타민 D₃ 량인 0.0025 g/kg 식이의 2배인 0.005 g/kg 비타민 D₃를 식이에 더 첨가하여 비타민 D₃의 섭취량이 대조군의 300%가 되게하여 공급하였다 (Table 1).

실험 분석

식이 섭취량 및 체중 측정

식이섭취량은 이틀에 한 번씩 일정한 시간에 측정하였고, 체중은 1주일에 한 번씩 일정한 시간에 측정하였다.

골밀도 측정

실험동물은 척추와 대퇴골의 골밀도 (bone mineral density, BMD)와 골함량 (bone mineral content, BMC)을 측정하였다. 골밀도 측정기기는 동물 전용 골밀도 측정기인 LUNAR사의 PIXImus (Dual energy x-ray absorptiometry, DEXA)를 이용하여 측정하였다.

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

Ingredients	Control	Vitamin D
Casein ¹⁾	200	200
Corn starch	529.5	529.5
Sucrose	100	100
Soybean oil	70	70
α -Cellulose ²⁾	50	50
Min-mix ³⁾	35	35
Vit-mix ⁴⁾	10	10
L-Cystine ⁵⁾	3	3
Choline ⁶⁾	2.5	2.5
Tert-bulyl hydroquinone ⁷⁾	0.014	0.014
Vitamin D ₃	.	0.005

¹⁾Casein high protein (total protein 85%), Teklad Test Diets, Madison, Wisconsin, USA

²⁾ α -Cellulose, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA

³⁾AIN-93G-MX, Teklad Test Diets, Madison, Wisconsin, USA

⁴⁾AIN-93G-VM, Teklad Test Diets, Madison, Wisconsin, USA

⁵⁾L-Cystine, Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA

⁶⁾Choline bitartate, Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA

⁷⁾Tert-bulyl hydroquinone, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA

⁸⁾Vitamin D₃, ICN Biomedicals, RCN, Pharmaceutical Co., USA

생화학적 분석

요 채취 및 분석. 6주간 사육한 실험동물은 대사케이지에서 식이에 의해 시료가 오염되는 것을 막기 위하여 식이는 공급하지 않고, 식수만 공급하여 12시간 후 요를 채취하였다. 채취한 요는 -70°C 에서 냉동보관 하였다. 요 중 칼슘과 인은 TECHNICON CHENTM SYSTEM을 이용하여 자동분석기 (automatic chemical analyzer)로 측정하였고, 요 중 deoxypyridinoline, creatinine의 측정은 collagen crosslinksTM Kit (Metra biosystems Inc. U.S.A)을 이용하여 ELISA (enzyme-linked immuno sorvent assay) 법에 의하여 분석하여 deoxypyridinoline과 creatinine의 crosslinks value를 구하였다.

혈액 채취 및 분석. 실험동물은 에테르로 마취한 상태에서 복부를 절개하여 대동맥에서 혈액을 채취하였으며, 채취한 혈액은 상온에서 30분간 방치한 후 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청은 분석할 때까지 -70°C 에서 냉동보관 하였다. 혈청 칼슘과 인의 측정은 TECHNICON CHENTM SYSTEM을 이용하여 자동분석기 (automatic chemical analyzer)로 측정하였으며, 혈청내 Osteocalcin은 Osteocalcin kit (Techno genetics, Italia)를 이용하여 gamma counter로 radioactivity를 측정하였다.

통계 분석

본 실험에서 얻은 결과는 SAS package (version 8.2: SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 통계 분석하였다. 각 실험군의 변수들은 평균과 표준편차를 구하여 나타내었으며 각 군의 비교는 One-Way ANOVA test를 하였고, 군 간의 통계적 유의성은 $\alpha = 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검증하였다.

결 과

체중 증가량

실험 시작 시와 종료 시의 체중과 체중 증가량은 Table 2에 나타내었다. 실험 시작 시 체중은 Sham군과 난소절제군 간에 차이가 없었으나 종료 시의 체중과 체중증가량은 난소절제군에서 모두 증가하였다.

식이 섭취량 및 식이효율 (FER)

식이 섭취량과 식이효율 (Food Efficiency Ratio: FER)은 Table 3에 나타내었다. 식이섭취량은 실험군간에 유의적인 차이는 없었으나 식이효율 (FER)은 Sham군에 비해 난소절제군이 유의적으로 높게 나타났다.

혈청 분석

혈청 칼슘 및 인의 농도

혈청 내 칼슘과 인의 농도는 Table 4에 나타내었다. 혈청 칼슘농도는 Sham 군과 난소절제한 대조군들 사이에 유의적인 차이는 없었으나 Sham군과 난소절제군내에서 대조군과 비타민 D군을 비교하여 비타민 D군들이 대조군들보다 유의적으로 높았다. 혈청 인의 농도는 난소절제군이 Sham군에 비해 유의적으로 높았고, 난소절제군과 Sham군 내에서 대조군과 비타민 D군은 유의적인 차이를 보이지 않았다.

혈청 오스테오칼신 농도

혈청 오스테오칼신 농도는 (Table 5) Sham과 난소절제군 간에 유의적인 차이가 없었으나 Sham군에 비해 난소절제군이 낮은 경향을 보였다. 그리고 혈중 오스테오칼신 농도는 Sham군과 난소절제군 내에서 비타민 D군과 대조군은 유의

적인 차이는 없었으나 비타민 D군이 낮은 경향을 보였다.

요 분석

요 중 칼슘 및 인의 배설량

요 중 칼슘 배설량은 난소절제군과 Sham군내에서 비타민 D군들은 대조군들에 비하여 유의적으로 높게 나타났다. 요 중 인의 배설은 유의적인 차이가 없었다.

요 중 Crosslinks value

Crosslinks value는 Sham군에 비해 난소절제군이 높은 경향을 나타내었고, 각 군내에서 비타민 D의 첨가에 의한 유의적인 차이는 없었다 (Table 6, 7).

골밀도 및 골 무기질 함량

척추 골밀도 (BMD)와 척추 골무기질 함량 (BMC)

척추 골밀도는 Sham군 보다 난소절제군이 낮았고, Sham

Table 2. Body weight change of experimental rats

Group	Sham		OVX	
	Control (n = 10)	Vitamin D (n = 10)	Control (n = 10)	Vitamin D (n = 10)
Initial weight (g)	182.9 ± 3.68 ¹⁾	184.9 ± 5.16	181.0 ± 7.76	181.2 ± 9.09
Final weight (g)	243.7 ± 4.91 ²⁾	247.4 ± 6.27 ^a	302.6 ± 21.77 ^b	288.6 ± 11.51 ^b
Weight gain (g)	60.8 ± 7.14 ^a	62.5 ± 9.14 ^a	121.6 ± 23.39 ^b	107.4 ± 15.20 ^b

¹⁾Mean ± SD

²⁾Values with different superscripts within the row are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test

Table 3. Food intake and FER in OVX rats fed vitamin D supplementation

Group	Sham		OVX	
	Control	Vitamin D	Control	Vitamin D
Food intake (g/day)	15.52 ± 1.07 ¹⁾	15.23 ± 0.46	16.59 ± 1.48	16.33 ± 0.91
FER ³⁾	0.091 ± 0.006 ²⁾	0.095 ± 0.01 ^a	0.170 ± 0.027 ^b	0.153 ± 0.021 ^b

¹⁾Mean ± SD

²⁾Values with different superscripts within the row are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test

³⁾FER: weight gain (g)/food intake (g)

Table 4. Effects of vitamin D on serum calcium and phosphorus in OVX rats

Group	Sham		OVX	
	Control	Vitamin D	Control	Vitamin D
Ca (mg/dl)	9.70 ± 0.412 ^{a1)2)}	11.40 ± 0.447 ^b	10.07 ± 0.704 ^{ab}	11.66 ± 0.711 ^b
P (mg/dl)	5.30 ± 0.982 ^a	6.02 ± 0.217 ^{ab}	6.86 ± 0.986 ^{bc}	7.86 ± 0.983 ^c

¹⁾Mean ± SD

²⁾Values with different superscripts within the row are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test

Table 5. Osteocalcin concentration in OVX rats fed Vitamin D₃ supplementation

Group	Sham		OVX	
	Control	Vitamin D	Control	Vitamin D
Osteocalcin (ng/mg)	5.43 ± 1.56 ^{NS1)2)}	3.84 ± 1.86	4.47 ± 2.73	3.24 ± 2.46

¹⁾Mean ± SD

²⁾NS

군과 난소절제군내에서는 대조군들보다 비타민 D군들이 유의적으로 높게 나타났다. 척추 골함량은 Sham 대조군이 난소절제 대조군에 비하여 높았다. 두 군내에서는 대조군보다 비타민 D군이 유의적으로 높게 나타났다.

대퇴 골밀도 (BMD)와 대퇴 골무기질 함량 (BMC)

대퇴 골밀도는 Sham군보다 난소절제군이 낮았고, 두 군내 대조군보다 비타민 D군이 유의적으로 높게 나타났다. 대퇴골 함량은 Sham군 보다 난소절제군이 낮았고 Sham군과 난소절제군 모두에서 비타민 D 첨가군에서 유의적으로 높게 나타났다 (Table 8, 9).

고 찰

난소절제군은 Sham군에 비하여 유의적으로 체중이 증가하였는데 이것은 선행연구에서 난소절제주는 Sham 수

술한 쥐에 비하여 체중이 유의적으로 증가하였다는 결과³⁰⁾와 일치하였다. 난소절제쥐가 체중이 증가하는 이유는 에스트로겐 결핍으로 인한 것을 보충하기 위하여 에스트로겐 생성이 가능한 체지방을 증가시켜 뼈에 가하는 힘을 부과 시킴으로써 체중지탱능력 (weight bearing activity)을 키우기 위한 방어기전으로 보고하였다.³¹⁾

본 실험동물의 혈청 칼슘농도는 9.6~11.7 mg/dL으로 정상수준인 7.2~13.9 mg/dL³²⁾ 범위에 속하였다. 비타민 D의 첨가는 혈청 칼슘 농도를 유의적으로 증가시켰는데, 선행연구에서 난소절제 쥐에게 1,25 (OH)₂D₃를 첨가 섭취 시켰을 때 대조군에 비해 혈청 칼슘이 유의적으로 증가하였다고 보고한 것^{32,34)}과 일치하였다. 혈중 인의 농도 또한 선행연구에서 난소절제 쥐에게 1,25 (OH)₂D₃ 첨가 식이인 혈청 인이 증가하는 경향을 나타냈다고 보고 한³³⁾ 것과 일치하였다.

Table 6. Urinary calcium and phosphorus in OVX rats fed vitamin D supplementation

Group	Sham		OVX	
	Control	Vitamin D	Control	Vitamin D
Ca (mg/d)	0.84 ± 0.41 ^{a 1)2)}	6.11 ± 1.98 ^b	0.61 ± 0.27 ^a	3.77 ± 3.02 ^b
P (mg/d)	7.46 ± 1.36	8.46 ± 4.92	9.79 ± 5.11	4.46 ± 3.29

¹⁾Mean ± SD

²⁾Values with different superscripts within the row are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test

Table 7. Urine DPD, creatinine and crosslinks value

Group	Sham		OVX	
	Control	Vitamin D	Control	Vitamin D
DPD (nM)	344.7 ± 132.8 ¹⁾	407.2 ± 248.3	541.1 ± 257.1	556.6 ± 246.4
Creatinine (mM)	50.35 ± 7.15	44.50 ± 15.8	48.48 ± 14.8	34.28 ± 14.0
Crosslinks value (nM/mM)	76.10 ± 17.7 ^{a2)}	100.8 ± 46.0 ^a	140.8 ± 17.3 ^b	154.6 ± 21.0 ^b

¹⁾Mean ± SD

²⁾Values with different superscripts within the row are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test

Table 8. Spine bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC)

Group	Sham		OVX	
	Control	Vitamin D	Control	Vitamin D
SBMD (g/cm ²)	0.1428 ± 0.011 ^{a1)2)}	0.1598 ± 0.005 ^b	0.1315 ± 0.007 ^c	0.1522 ± 0.008 ^b
SBMC (g/cm ²)	0.4590 ± 0.040 ^b	0.5194 ± 0.046 ^a	0.4333 ± 0.05 ^c	0.5000 ± 0.045 ^{ab}

¹⁾Mean ± SD

²⁾Values with different superscripts within the row are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test

Table 9. Femur bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC)

Group	Sham		OVX	
	Control	Vitamin D	Control	Vitamin D
FBMD (g/cm ²)	0.1972 ± 0.005 ^{ac1)2)}	0.2121 ± 0.004 ^b	0.1915 ± 0.006 ^c	0.2041 ± 0.008 ^a
FBMC (g/cm ²)	0.3502 ± 0.012 ^a	0.3936 ± 0.012 ^b	0.3550 ± 0.019 ^a	0.3836 ± 0.031 ^b

¹⁾Mean ± SD

²⁾Values with different superscripts within the row are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test

오스테오칼신은 뼈에 매우 특이한 단백질로써 조골세포의 활성성을 평가하고 골 형성 정도를 반영하는 가장 좋은 단일 지표로 보고되었다.³⁵⁾ 혈청 오스테오칼신의 농도는 성, 연령, 폐경 여부에 따라 급격한 차이를 보인다. 유아나 아동에게서 오스테오칼신 농도가 높은 것으로 나타난 것은 골 형성이 어린 시기에 많이 일어나고 있음을 알 수 있다.³⁶⁾ 남성은 모든 연령대에서 서서히 증가하는데 대부분 정상 성인에게 있어 폐경 전인 경우에는 여성보다 남성이 오스테오칼신 농도가 더 높다.³⁷⁾ 폐경기 여성은 골 교체율이 증가하여 혈청 오스테오칼신 농도가 약 2배 정도 증가한다.¹¹⁾ 혈청 오스테오칼신 농도 증가는 젊은 연령층에서는 골 형성의 증가를 의미하는 긍정적인 면으로 해석되지만 폐경 후에는 골밀도와 음의 상관관계를 갖는 것으로 보고되어 골 교체율의 증가를 의미한다.³⁸⁾ 선행연구에서 난소절제쥐에 1,25 (OH)₂D₃ 첨가 시 혈중 오스테오칼신 농도가 유의적으로 낮아졌는데,³⁴⁾ 본 연구에서도 낮아지는 경향을 보였으나 통계적으로 유의성을 나타내지는 않았다.

요 중 칼슘 배설은 골 용해 지표로써 식이와 에스트로겐 호르몬의 상태가 영향을 받게 되며 골다공증환자에서 배설량이 증가하고 결핍 시 골밀도의 감소와 관련성이 있는 것으로 보고되어 골다공증 치료효과를 판정하는 지표로서 제시되고 있다.³⁹⁾ 특히 폐경 후 여성의 요 중 칼슘농도는 폐경 전에 비해 유의적으로 증가하였다고 보고되었다.⁴⁰⁾ 실험동물을 대상으로 한 선행연구에서도⁴¹⁾ 유의적이지 않았으나 난소절제군은 Sham군에 비해 요 중 칼슘 농도가 높은 경향을 나타내었다. 그리고 일반적으로 요 중 칼슘배설량은 골소실율과 양의 상관관계,⁴²⁾ 골밀도와 음의 상관관계가 있다고 보고하였다.⁴³⁾ 그러나 본 연구에서 비타민 D의 첨가식은 요 중 칼슘배설을 유의적으로 증가시켰는데 이것은 비타민 D의 첨가로 칼슘의 흡수율이 높고 혈중 칼슘의 농도가 높아졌기 때문으로 사료된다. 그리고 인은 주로 신장을 통해 소변으로 배설되며 인의 사구체 여과율이 혈중 인의 농도에 따라 달라지기 때문에 인의 배설량은 0.1~20%까지 그 범위가 넓다. 따라서 혈청 인의 농도가 신장에서 인의 재흡수를 조절하는 주요 요소가 된다. 신장에서 인의 재흡수를 조절하는데 부갑상선 호르몬의 영향이 크며, 혈청 내 부갑상선 호르몬의 농도와 인의 배설량 간에는 양의 상관관계가 있다.¹³⁾ 본 실험에서 인의 배설량도 비타민 D의 첨가에 따라 증가하는 경향을 보였으나 칼슘처럼 현저하지는 않았다.

골 용해 지표는 요 중 deoxypyridinoline (DPD)을 많이 사용하는데, DPD는 세포외의 기질에서 교차화합물을 형성하여 콜라겐 사슬을 안정화 시키는 작용을 한다. 이들

은 과골세포에 의해 콜라겐이 분해되면서 유리되며 특이도가 높아 골 용해를 반영하는 우수한 생화학적 지표이다.⁴⁴⁾ 소변 내 DPD는 거의 골 용해로부터 생성된 것으로 보는데 이 이유는 양적인 면에서 뼈에 존재하는 양이 연골에 존재하는 량보다 많고 연골의 골 전환율은 매우 낮기 때문에 골 용해 지표로써 매우 민감하다고 인정된다.^{34,36)} 따라서 DPD는 특이도가 높아 골 흡수를 반영하는 생화학적 지표로 이용된다.⁴⁵⁾

요 중 DPD는 성인보다 어린이에게서 높게 나타나며 폐경 후 여성인 경우 50~100%가 증가하며 노인 여성의 골 반골절 위험을 예측할 수 있다고 보고하였다.⁴⁶⁾ 요중 DPD crosslink value는 폐경 여성이 폐경 전 여성보다 많이 상승되며 골 용해의 생화학적 지표가 된다. 선행연구에서³³⁾ 난소절제 쥐는 DPD 배설이 증가하였다. 폐경이 되면 소변으로 crosslinks value가 50~100% 증가한다고 했다.⁴⁶⁾ 본 연구에서도 난소절제 쥐는 crosslinks value가 Sham군에 비하여 증가하였으나 비타민 D 첨가에 의한 유의적인 변화는 없었다.

난소절제쥐에서 척추 골밀도는 대조군보다 비타민 D군이 유의적으로 높게 나타났다. 척추 골 함량도 비타민 D군이 유의적으로 높게 나타났다. 또한 대퇴 골밀도와 대퇴골무기질 함량도 난소절제쥐에서 비타민 D 첨가 시 유의적으로 높게 나타났다. 따라서 난소절제쥐에서 칼슘이 권장량 수준으로 충분하게 섭취될 때 비타민 D₃의 강화만으로 척추와 대퇴골밀도와 골 함량이 유의적으로 높게 나타나 골밀도 감소 지연효과를 확인하였고 골다공증 예방을 위하여 비타민 D₃의 강화를 고려할 수 있다고 판단된다.

사람을 대상으로 한 연구에서 Bess 등⁴⁷⁾은 65세 이상 노인에게 3년 동안 17.5 $\mu\text{g/day}$ 의 비타민 D를 공급한 결과 골밀도가 증가하였다. Adams 등⁴⁷⁾은 비타민 D₂를 12개월 동안 17.5 $\mu\text{g/day}$ 를 공급한 결과 혈청 PTH 농도가 감소하였고 척추와 대퇴골 골밀도가 12개월 동안 모두 4~5%정도로 증가하였다고 보고하였다. 그리고 1,25 (OH)₂D₃의 첨가식은 척추 골절과 대퇴골 골절의 위험도를 감소시켰다고 보고하였다.⁴⁹⁾ 골다공증이 있는 여성에서 비타민 D의 추가 투여가 대퇴골 골밀도의 증가에 더욱 도움이 된다고 보고하였다.⁵⁰⁾ Chapuy 등⁵¹⁾은 평균 84세 노인에게 18개월 동안 비타민 D₃를 20 $\mu\text{g/day}$ 와 칼슘 1,200 mg/day를 섭취시켰을 때 대퇴골절이 23.0% 감소하였다고 보고하였다.

실험동물의 경우 Adams 등⁴⁸⁾은 5주 동안 비타민 D 50,000 IU (약 90 $\mu\text{g/day}$)를 난소절제 쥐에게 1주에 2번 공급한 결과 척추와 대퇴골 골밀도가 4~5%정도로 증

가하였으며, 암컷 흰쥐에서 정상 칼슘식이에 10주간 비타민 D 11.25 $\mu\text{g}/100\text{g}$ diet 섭취시켰을 때, 대퇴골 골밀도가 증가하는 경향을 보였다고 보고하였다.²⁸⁾ Shiraishi 등³³⁾의 연구에서 alfacalcidol (1 α (OH) D_3)를 난소절제 쥐에 0.05, 0.1, 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight 첨가시켜 7달 후 대조군과 비교하였을 때 대퇴골밀도, 대퇴골 강도가 유의적으로 증가하였는데 alfacalcidol의 첨가가 많을수록 골밀도가 더 증가하였다고 보고하였다. 특히 estradiol은 골 흡수를 저해하여 골회전율을 감소시켜 골밀도 감소를 지연시키는 것에 반하여 비타민 D는 골 형성과 골 흡수 저해에 동시에 작용하여 골밀도 감소를 지연시킨다고 하였다. 특히 비타민 D_3 는 17 β -estradiol 보다 뼈의 골밀도를 높이는데 더 효과적이라 하였다.³³⁾ 또한 최근에는 유사 비타민 D_3 인 ED-71, 2 β -(3-hydroxypropoxy)-1 α , 25-dihydroxyvitamin D_3 를 이용하여³⁴⁾ 난소절제 쥐에 각각 0.05, 0.1, 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight 당 주 5회 섭취하게 한 결과 3개월 후 척추골밀도가 증가되었고 골 부피, 해면골 두께가 유의적으로 증가하였다고 보고하여 유사 비타민 D의 골다공증 치료제로서의 이용에 대한 자료를 제공 하고 있다.

그러나 Meier 등은 칼슘 섭취량이 불충분한 경우 비타민 D와 골 질량과는 상관관계가 없었고, 칼슘 보충을 중단하면 PTH 농도가 증가했다고 하였으므로,²⁹⁾ 칼슘의 섭취가 낮은 경우에도 비타민 D의 강화효과가 나타나는지 추후 연구가 요망된다.

요약 및 결론

난소절제 쥐에 비타민 D_3 를 AIN-93의 권장량의 300%를 함유한 식이를 6 주간 섭취시킨 결과 골 대사에 미치는 효과는 혈중 칼슘농도는 비타민 D군이 유의적으로 높게 나타났고 혈중 osteocalcin은 비타민 D_3 강화 시 유의적인 차이는 없었으나 비타민 D 군이 낮은 경향을 보였다. 요 중 칼슘 농도는 두 군내 비타민 D군에서 유의적으로 증가하였다. Crosslinks value는 난소절제군이 유의적으로 높게 나타났고, 비타민 D군은 유의적인 차이는 없었다. 척추골밀도는 난소절제군이 Sham군보다 유의적으로 낮았고, 비타민 D_3 첨가 시 난소절제쥐에서 척추골밀도와 척추 골 함량이 유의적으로 높았다. 대퇴골밀도 (FBMD)는 난소절제군이 낮은 경향을 보였고, 비타민 D_3 첨가 시 대퇴골밀도와 대퇴골함량이 유의적으로 높았다.

결론적으로 난소절제 쥐에서 300% 비타민 D_3 강화식은 폐경모델인 난소절제쥐에서 척추와 대퇴의 골밀도 및 골 무기질 함량을 유의적으로 증가시켜 골 대사에 유리하였다.

Literature cited

- 1) Population projection for Korea. Korean National statistical office, Seoul; 2007
- 2) Kim YM, Kim MH. Study of the osteoporosis-related lifestyle and health promotion behavior of university and college female student. *The Journal of Rheumatology Health* 2002; 9(1): 53-67
- 3) Korea Institute for Health and Social Affairs. Survey of the living conditions and Welfare needs of the elderly, Seoul; 2004
- 4) National Health Insurance Statistics. National Health Insurance Corporation; 2003
- 5) Jo EM, Kim JY, Bae SU, Park KH. Analysis of correlation between parameters by QUS (Quantitative Ultrasound) and bone mineral density by DEXA (Dual-energy X-ray absorptiometry). *The Journal of the Korean Society of Menopause* 1997; 3(2): 171-177
- 6) National Osteoporosis Foundation. Osteoporosis Online. <http://www.nof.org/osteoporosis/index.htm>
- 7) Yoon SH, Kim JG. Current treatment of postmenopausal osteoporosis. *Kor J Obst Gyne* 2005; 48(4): 844-856
- 8) Kim KS. Prevention and treatment of osteoporosis. *The Journal of Rheumatology Health* 1996; 3(1): 122-126
- 9) Yoo SW, Jo HH, Yeo KA, Lew YO, Kwon DJ, Chung GW, Kim JH, Kim JH. The effect of vitamin D_3 addition on bone mineral density in postmenopausal hormone replacement. *Kor J Obst Gyne* 2000; 43(6): 992-997
- 10) Mo SM, Lee YS, Ku JO, Son SM, Seo JS, Yoon EK, Lee SK, Kim WK. Dietary therapy. 2nd ed.: Kyomun Press; Seoul; 2003. p.450-478
- 11) Kim SJ. Study on the relationship between osteoporosis-cause factor and bone mineral density, Biochemical Marker. Pukyong National University; 2003
- 12) Need AG, Morris HA, Horowitz M, Nordin BC. Effects of skin thickness, age, body fat, and sunlight on serum 25-hydroxyvitamin D. *Am J Clin Nutr* 1993; 58: 882-885
- 13) Choi HM. 21C Nutrition. 3rd edition, Kyomunsa; 2003. p.200-205, 288
- 14) Kim Brixen, Bo Abrahamsen, Moustapha Kassem. Prevention and treatment of osteoporosis in women. *Kor J Obst Gyne* 2005; 15: 251-258
- 15) Moon SJ, Kim JH. The effect of vitamin D status on bone mineral density of Korea adults. *Korean J Nutr* 1998; 31(1): 46-61
- 16) So JS, Park HM. Relationship between parathyroid hormone, Vitamin D and bone turnover markers in Korean postmenopausal women. *Kor J Obst Gyne* 2004; 47(1): 153-160
- 17) Ichael F Holick. Vitamin D: Importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 2004; 79(3): 362-371
- 18) Nesby-O' Dell S, Scanlon KS, Cogswell ME, Gillespie C, Hollis BW, Looker AC. Hypovitaminosis D prevalence and determinants among African American and white women of reproductive age: third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 187-192
- 19) Erik RL, Leif M, Anders F. Vitamin D and calcium supplementation prevents osteoporotic fractures in elderly community dwelling residents: A pragmatic population-based 3-year intervention study. *J Bone Miner Res* 2004; 19(3): 370-378

- 20) Hathcock JH, Shao A, Vieth R, Heaney R. Risk assessment for vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2007;85: 6-18
- 21) Meyer HE, Smedshaug GB, Kvaavik E, Falch JA, Tverfal A, Pedersen JI. Can vitamin D supplementation reduce the risk of fracture in the elderly? A randomized controlled trial. *J Bone Miner Res* 2002; 17(4) : 709-715
- 22) Jackson RD, Lacroix AZ, Gass M, Wallace RB, Robbins J, Lewis CE, Bassford T, Beresford SAA, Black HR, Blanchette P, Bonds DE, Brunner RL, Brzyski PG, Caan B, Cauley JA, Chlebowski RT, Cummings SR, Granek I, Hays J, Heiss G, Hendrix SL, Howard BV, Hsia J, Hubbell FA, Johnson KC, Judd H, Kotchen JM, Kuller LH, Langer RD, Lasser ML, Limacher MC, Ludlam S, Manson JE, Margolis KL, McGowan J, Ockene JK, O'Sullivan MJ, Phillips L, Prentice RL, Sarto GE, Stefanick ML, Horn LV, Wende JW, Whitlock E, Anderson GL, Assaf AR, Barad D, For the Women's Health Initiative Investigators. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of fractures. *N Engl J Med* 2006; 354(7) : 669-683
- 23) Grant AM, Anderson FH, Avenell A, Campbell MK, McDonald AM, MacLennan GS, McPherson GC, Anderson FH, Cooper C, Francis RM, Donaldson C, Gillespie WJ, Robinson CM, Torgeron DJ, Wallace WA, Health Services Research Unit, University of Aberdeen, UK. Oral vitamin D₃ and calcium for secondary prevention of low-trauma fractures in elderly people (Randomised evaluation of calcium or vitamin D, RECORD) : a randomised placebocontrolled trial. *Lancet* 2005; 365: 1621-1628
- 24) Vieth R, Chan PCR, MacFarlane GD. Efficacy and safety of vitamin D₃ intake exceeding the lowest observed adverse effect level. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 288-294
- 25) The Korean Nutrition Society, Dietary Reference Intakes for Koreans, Seoul: 2005
- 26) Hathcock JH, Shao A, Vieth R, Heaney R. Risk assessment for vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2007; 85: 6-18
- 27) Heaney RP. Functional indices of vitamin D status and ramifications of vitamin D deficiency. *Am J Clin Nutr* 2004; 80 (suppl) : 1706S-1709S
- 28) Jun I, Tsuyoshi T, Shoichi I, Sato Y, Yeh JK. Differential effect of vitamin K and vitamin D supplementation on bone mass in young rats fed normal or low calcium diet. *Yonsei Med J* 2004; 45(2) : 314-324
- 29) Meier DE, Luckey MM, Wallenstein S, Clemens TL, Orwoll ES, Waslien CI. Calcium, vitamin D and parathyroid hormone status in young white and black women: Association with radical differences in bone mass. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72(3) : 703
- 30) Kim WY, Kim MH. Effect of estrogen and dietary protein level on Ca and skeletal metabolism in ovariectomized rats. *Korean J Nutr* 1995; 28(4) : 298-308
- 31) Li M, Wronski TJ. Response of femoral neck to estrogen depletion and parathyroid hormone in aged rats. *J Bone Miner Res* 1995; 16(5) : 551-557
- 32) Jang SJ. Effects of deer antler extract on bone metabolism and biological activities in growing and osteoporosis model rats [Dissertation]. Seoul: Seoul National University; 2006
- 33) Shiraishi A, Takeda S, Masaki T, Higuchi Y, Uchiyama Y, Kubodera N, Sato K, Ikeda K, Nakamura T, Matsumoto T, Ogata E. Alfacalcidol inhibits bone resorption and stimulates formation in an ovariectomized rat model of osteoporosis: distinct actions from estrogen. *J Bone Miner Res* 2000; 15(4) : 770-779
- 34) Uchiyama Y, Higuchi Y, Takeda S, Masaki T, Shiraishi A, Sato K, Kubodera N, Ikeda K, Ogata E. ED-71, a Vitamin D analog, is a more potent inhibitor of bone resorption than alfacalcidol in an estrogen-deficient rat model of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2002; 30(4) : 582-588
- 35) Johnell O, Oden A, De laet C, Garnero P, Delmas PD, Kanis JA. Biochemical indices of bone turnover and the assessment of fracture probability. *Osteoporos Int* 2002; 13(7) : 523-526
- 36) Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover for the clinical investigation of osteoporosis. *Osteoporos Int* 1993; 3: s81-s86
- 37) Lian JB, Gundberg CM. Osteocalcin biochemical considerations and clinical applications. *Clin Orthop Relat Res* 1998; 226: 267-291
- 38) Liu G, Peacock M. Age-related changes in serum undercarboxylated osteocalcin and its relationships with bone density, bone quality, and hip fracture. *Calcif Tissue Int* 1998; 62: 286-289
- 39) Relea P, Revilla M, Ripoll E, Arribas I, Villa LF, Rico H. Zinc, biochemical markers of nutrition, and Type I osteoporosis. *Age Ageing* 1995; 24(4) : 303-307
- 40) Oh KW, Yun EJ, Oh ES, Kim SW, Lee DC, Chang YK, Roh SI, Do BR, Kang MI. The effect of renal calcium excretion on bone mineral metabolism of postmenopausal women in Korea. *Kor J Medicine* 2002; 63: 402-410
- 41) Choi MJ, Kang YJ. Effect of isoflavones on bone mineral density and bone mineral content in ovariectomized rats. *Korean J Nutr* 2006; 39(3) : 236-243
- 42) Hansen MA, Overgaard K, Riis BJ, Christiansen C. Potential risk factors for development of postmenopausal osteoporosis Examined over a 12-year period. *Osteoporosis Int* 1991; 1(2) : 95-102
- 43) Reid IR, Ames R, Evans MC, S Sharpe S, Gamble G, JT France JT, Lim TM, Cundy TF. Determinants of total body and regional bone mineral density in normal postmenopausal women-A key role for fat mass. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75(1) : 45-51
- 44) Michael K. Biochemical markers of bone remodeling. *Am J Med Sci* 1996; 312(6) : 270-277
- 45) Son GS. Effect of soybean intake on bone mineral density and bone turnover markers in postmenopausal women. *J Korean Acad Nurs* 2006; 36(6) : 933-941
- 46) Delmas PD, Stenner D, Wahner HW, Mann KG, Riggs BL. Increase in serum bone γ -carboxyglutamic acid protein with aging in women. *J Clin Invest* 1983; 71: 1316-1321
- 47) Bess DH, Harris SS, Krall EA, Dallal GE. Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older. *N Engl J Med* 1997; 337(10) : 670-676
- 48) Adams JS, Kantorovich V, Wu C, Javanbakht M, Hollis BW. Resolution of vitamin D insufficiency in osteopenic patients results in rapid recovery of bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(8) : 2729-2730
- 49) Seeman E. Osteoporosis: trials and tribulations. *Am J Med* 1997; 103(2A) : 74s-89s
- 50) Tuppurainen M, Komulainen H, Kröger R, Honkanen J, Jurvelin E, Puntilla AM, Heikkinen, Alhava E, Saarikoski S. Does vitamin D strengthen the increase in femoral neck BMD in osteoporotic women treated with estrogen? *Osteoporosis Int* 1998; 8(1) : 32-38
- 51) Chapuy MC, Arlot EM, Delmas PD, Meunier PJ. Effect of calcium and cholecalciferol treatment for three years on hip fractures in elderly women. *BMJ* 1994; 308: 1081-1082