

저칼슘 식이로 유발한 성장 저하 흰쥐에 대한 칼슘, 비타민 D 및 난황 펩타이드의 투여가 장골 길이 성장에 미치는 영향

김명규^{1#}, 김혜경², 임강현^{1*}

1 : 세명대학교 한의과대학 본초학교실, 2 : 한서대학교 식품생물공학과

Effects of Calcium, Vitamin D and Egg Yolk Peptide Treatment on the Retardation of Longitudinal Bone Growth Induced by Low-Calcium Diets

Myung-Gyou Kim^{1#}, Hye Kyung Kim², Kang-Hyun Leem^{1*}

1 : College of Korean Medicine, Semyung University, Jechon, 390-711

2 : Dept. of Food & Biotechnology, Hanseo University, Seosan, 356-706

ABSTRACT

Objectives : Egg yolk is composed of various important chemical substances for human health. A calcium shortage causes the growth retardation on the body growth. In this study, we examined the therapeutic effects of calcium, vitamin D and egg yolk peptide (EYP) treatment on the retardation of the longitudinal bone growth induced by low-calcium diet in adolescent rats.

Methods : Low calcium diets were administrated for 15 days. During the last five days, calcium and/or vitamin D and/or EYP were administrated. The body weights, longitudinal bone growth rates, the heights of growth plates, and bone morphogenetic protein (BMP)-2 and insulin-like growth factor (IGF)-1 expressions were measured using histochemical analysis.

Results : Low calcium diets caused the significant reduction in body weight gains and the longitudinal bone growth. The heights of growth plates and the expressions of BMP-2 and IGF-1 showed the impairment of body growth as well. Calcium and/or vitamin D administration could not significantly increase the longitudinal bone growth. However, calcium, vitamin D, and EYP administration significantly increased the bone growth, the growth plate height, and BMP-2 and IGF-1 expressions.

Conclusions : These results suggest that EYP enhances the longitudinal bone growth in the calcium and/or vitamin D deficiency and it could be a promising agent for the treatment of children suffering from malnutrition.

Key words : Egg yolk peptide, Bone, Growth plate, Bone morphogenetic protein-2(BMP-2), Insuline like growth factor-1(IGF-1)

서론

계란은 영양학적으로 매우 우수한 식품으로 양질의 단백질과 불포화 지방산, 철분, 비타민 A, B, D, E, K 등 풍부한 영양소를 함유하고 있다¹⁾. 계란은 크게 난백 (56~60%)과 난황 (28~32%), 난각 (10~14%)의 세 부분으로 구성되어 있으

며 주로 난백과 난황이 식용으로 사용되고 있다. 난백은 약 90%의 수분과 10%의 단백질로 구성되어 있으며 계란 전체 단백질의 약 57%를 함유하고 있다. 이중 50% 정도 차지하는 알부민과 약 10% 차지하는 오보뮤코이드가 알레르기를 일으키는 단백질로 알려져 있다. 난황은 탄수화물이 거의 없고 지

*Corresponding author : Kang-Hyun Leem, College of Korean Medicine, Semyung University, Jechon, 390-711
· Tel : +82-43-649-1341 · E-mail : lkh@semyung.ac.kr

#First author : Myung-Gyou Kim, College of Korean Medicine, Semyung University, Jechon, 390-711

· Tel : +82-43-649-1341 · E-mail : kimmyunggyou@gmail.com

· Received : 19 August 2014 · Revised : 18 September 2014 · Accepted : 18 September 2014

방과 단백질이 풍부하여 칼로리가 높다. 그리고 비타민과 미네랄의 종류와 양도 비교적 많이 포함하고 있어 비타민 C를 제외한 모든 비타민을 함유하고 있으며 철분, 인, 유황, 동, 칼륨, 나트륨, 마그네슘, 칼슘, 염소 및 망간 등 필수 광물질이 함유되어 있다. 단백질을 제외한 대부분의 영양소가 난황에 들어 있으며 특히 비타민 A, D, E는 난황에만 있다고 알려져 있다. 대표적인 영양소는 레시틴으로 약 8.6%를 함유하고 있다. 이렇듯 계란은 영양학적으로 뛰어난 식품이나 레시틴 및 오보뮤코이드에 의해 유발되는 알레르기와 높은 콜레스테롤에 의해 그 섭취가 제한되고 있다. 이에 난백과 난황을 분리하여 난황만을 섭취하거나 아예 계란의 섭취를 포기하기도 한다. 예로부터 난황을 이용하여 마요네즈나 샐러드 드레싱이 만들어져왔으며, 현재는 난황 레시틴을 이용한 건강식품 및 유산균 음료, 소시지, 건조 제품 등 난황을 이용한 새로운 제형으로의 개발이 활발히 진행되고 있다^{2,3)}.

전통적으로 난황은 식품 뿐 아니라 치료약으로도 사용되어 왔다. 동의보감에 따르면 난황은 오랜 학질과 옷이 올라 허는 것[漆瘡]과 이질을 치료한다고 하였으며 탕액편에는 음(陰)이 부족(不足)할 때 혈(血)을 보(補)하려면 난황(雞子黃)을 써야 한다고 하였다⁴⁾. 본초강목에 따르면 난황은 맛은 달고 따뜻하며, 독이 없다고 하였으며 음혈을 보하고 열독을 풀어 주며 하리를 치료한다고 하였다⁵⁾. 현대적인 연구에 따르면 난황 레시틴은 항산화 기능 및 우수한 노화 방지 기능을 가지고 있으며 난황인지질은 혈중 콜레스테롤을 낮추고 혈압강화 작용을 가지고 있다고 알려져 있다. 또한 포스파티딜콜린 중 콜린 염기는 아세틸 콜린의 전구체로서 작용하여 뇌기능을 활성화에도 도움이 될 것으로 생각되고 있다⁶⁾.

성장 장애의 원인은 크게 선천적 및 후천적으로 나누어지며, 유전적 장애나 자궁 내 성장 발육 지연 등은 선천적 원인으로 분류되고 후천적 원인으로는 영양 불균형, 비만, 스트레스, 수면부족 및 만성질환 등이 분류되어 있다. 이에 치료 방법으로 충분한 수면 및 규칙적인 운동, 그리고 영양 균형 및 식습관 관리가 기본이며, 특히 칼슘 및 단백질이 풍부한 식품 및 비타민 D 등 칼슘 이용률을 높이는 식품을 섭취하도록 권고하고 있다⁷⁻⁹⁾. 한의학적인 관점에서 청소년기의 성장은 先天之精과 後天之精의 충만으로써 이야기 된다. 先天之精은 부모에게 물려받은 것으로 腎臟이 그 근본이 되고(腎爲先天之本), 後天之精은 호흡과 섭식으로 형성되는 것으로 脾臟이 그 근본이 된다(脾爲後天之本)¹⁰⁾. 腎과 脾는 성장의 원동력을 제공하는 요소로서 虛損하게 되면 성장부진의 증상들이 나타나게 되며 대표적으로 五遲, 五軟, 疳症등이 그 예이다¹¹⁾. 五遲는 소아의 立遲, 行遲, 髮遲, 齒遲, 語遲로 발육이 지연되어 행동이나 언어 및 치아성장의 장애를 말하고, 五軟은 頭軟, 項軟, 手腳軟, 肌肉軟, 口軟으로 대개 선천적인 체질의 허약, 조산 혹은 후천적인 濡養不足으로 인해 대뇌발육부진 등의 성장장애를 말한다. 이들 증상은 모두 虛症으로 분류되어 이에 대한 치료도 虛를 補하는 개념으로 진행되며, 상용하는 약물도 대부분 補益法을 위주로 구성되게 된다¹²⁾.

인체 내에서 칼슘은 체중의 약 1.5~2.2%를 차지하며 99% 이상이 뼈와 치아를 구성하고 나머지는 혈액, 근육 등에 분포되어 체내 대사 및 생리조절에 관여하고 있다. 칼슘 섭취 부족은 골다공증 및 골연화증 같은 골격 질환 뿐 아니라 순환기 계질환, 고혈압, 동맥경화, 고지혈증 등 질환이 생길 수 있다

고 알려져 있다. 식품으로부터 섭취된 칼슘은 소화기관내의 용해도에 따라 10~40% 정도가 흡수되며 나머지는 대소변을 통하여 배설된다. 식이섬유, 인, 포화지방 등은 칼슘과 결합하여 칼슘의 흡수를 저해하며, 고단백 음식 및 비타민 D, 비타민 C, 유당 등은 칼슘의 체내 흡수를 촉진한다. 특히 비타민 D는 혈중 칼슘의 수준을 유지하고 뼈의 대사에 관여하는데, 간에서 calcidiol로, 신장에서 calcitriol로 전환된 후 소장에서 칼슘의 흡수를 촉진하고 신장에서 칼슘의 재흡수를 촉진한다¹³⁻¹⁵⁾.

본 연구진의 선행연구에서는 난황 펩타이드를 이용하여 골다공증 및 성장에 대한 효과를 확인한 바 있다. 난소적출 모델을 이용한 골 기능 평가에서 난황 펩타이드가 골다공증을 완화시키는 것을 확인하였으며¹⁶⁾, 최근 일본에서 진행된 연구에서는 난황 펩타이드가 임상에서도 골다공증에 좋은 효과를 나타내었다고 보고되었다¹⁷⁾. 또한 다른 연구에서는 성장기 흰쥐에게 난황 펩타이드를 투여함으로써 성장에 대한 효능을 확인한 결과 통계적으로 유의한 성장 효과가 나타났음을 보고한 바 있다¹⁸⁾. 그러나 이러한 실험들은 정상 식이 섭취시 성장에 대한 효능을 평가한 것으로, 저칼슘식이의 이상식으로 유발한 성장 저하 상태에서 칼슘 및 비타민 D 투여 치료에 따른 골 길이 성장에 대한 난황의 효능을 검증한 연구는 확인할 수 없었다.

이에 본 실험에서는 저칼슘 식이로 유발된 성장 저하 흰쥐의 칼슘 및 비타민 D 치료 모델에서 난황 단백질을 단백질 가수분해 효소인 프로테아제를 이용하여 가수분해한 시료를 함께 투여하여 성장에 대한 효과를 확인하고자 하였다. H. Chen 등은 저칼슘 식이 흰쥐의 경우 정상 식이 흰쥐에 비해 장골의 무게가 56% 정도로 감소하였다고 보고한 바 있어¹⁹⁾ 성장 저하 모델로 저칼슘 식이를 사용하기로 하였으며, 칼슘 및 칼슘의 흡수를 증가시키는 비타민 D²⁰⁾의 투여군과 난황 펩타이드를 투여한 실험군으로 분류하여 본 실험을 진행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험에 사용한 동물은 3주령, 80 ± 10 g의 Sprague-Dawley 계 수컷 흰쥐를 샘타코로부터 구입하였다. 실험동물은 사료와 물을 충분히 공급하며 7일간 실험환경에 적응시킨 다음 실험에 사용하였으며 24 시간 20 ± 3 °C 에서 적응시켰다.

2. 시료 및 저칼슘 사료 조제

계란으로부터 난황 100 g을 취한 후 100% 에탄올로 추출하여 난황 단백질을 제조하였다. 이후 본 단백질을 분획하여 물에 녹는 부분을 취한 뒤 가수분해 효소인 프로테아제로 60 °C 에서 3시간 처리한 후 동결건조한 시료를 파마푸즈 (Kyoto, Japan)로부터 제공받아 사용하였다 (EYP, 수율 3.4%).

저칼슘 사료는 H. Chen 등이 실험에 사용한 저칼슘 사료 조성(Table 1)을 사용하여¹⁶⁾ 두열 바이오텍 (Seoul, Korea)에 의뢰, 제작하였다.

Table 1. Composition of Normal Ca Food and Low Ca Food (g/100 g)

INGREDIENT	NORMAL	LOW
Casein	24.5	24.5
Corn oil	6	6
Cornstarch	37.5	39.87
Potatostarch	1	1
Sucrose	15.5	15.5
Cellulose	5	5
Vitamin mix ^a	1	1
Mineral mix ^b	7	7
CaCO ₃	2.5	0.13

^a: vitamin mix contains (per 100 g) vitamin A 1517 IU, vitamin D3 250 IU, vitamin E 7.0 mg, vitamin B1 1.7 mg, vitamin B2 1.3 mg, vitamin B6 1.2 mg, vitamin B12 3.4 mg, vitamin C 19 mg, pantothenic acid 3.7 mg, niacin 16.7 mg, folic acid 0.2 mg, choline 195 mg, biotin 48.4 mg, nicotinic acid 549 mg.

^b: mineral mix contains (mg/100 g) KH₂PO₄ 1730, NaCl 600, FeC₆H₅O₇·5H₂O 190, 5ZnO·2CO₂·4H₂O 6, CuSO₄·5H₂O 1.26, CoCl₂·6H₂O 0.4, Ca(IO₃)₂ 1.54, MnSO₄·4H₂O 15.4, MgSO₄·7H₂O 800, Na₂HPO₄ 1240.

3. 실험군의 설정 및 시료 투여

실험동물은 8 마리씩 5개의 군으로 나누어 10일간 정상 사료를 섭취시켰으며 11일부터 실험종료일인 25일까지는 정상군을 제외한 4개 군의 사료를 저칼슘 사료로 교체하였다. 대조군을 제외한 3개의 군에는 칼슘을 별도로 경구투여 (CaCO₃, 250 mg/kg/day) 하였으며, 그 중 두 개의 군에는 비타민 D₃ (100 IU/day)를 같이 투여하였으며, 그 중 한 군에 EYP (100 mg/kg/day)를 투여하였다. 실험 종료 1일 전 각 실험 동물에게 calcein (10 mg/kg)을 복강주사하여 형광 표식을 하여 추후 장골의 길이 성장을 확인할 수 있도록 하였다.

4. 조직표본 제작

실험 25일째에 각 동물을 chloral hydrate (純正化學, Japan, 35.0 mg/kg, i.p.)로 마취시켜 개흉한 다음, 우심을 절개하고 needle (No. 18)을 좌심실에 주입한 후 폐파린 처리된 5% sodium nitrite (Sigma, U.S.A.) 생리식염수를 심장에 관류시키고, 이어서 0.1 M phosphate buffer에 녹인 pH 7.4의 4.0% formalin 고정액으로 관류시켰다. 그 후 흰쥐의 좌우 족경골 (tibia)를 떼어내어 2시간 동안 0.1 M phosphate buffered formalin 고정액에 후고정시킨 다음, 50 mM EDTA에 2-3일 동안 방치하여 탈회 후, 동결에 대한 보호를 위해 30% sucrose에 담가 4 °C에서 하룻밤동안 유지하였다. 고정된 골조직을 동결한 후 sliding microtome (HM440E, Zeiss, Germany)을 사용하여 족경골 (tibia) 근위 (proximal part)부의 시상절편 (sagittal section)을 매 40 μm씩 수집하였다.

5. 골성장 측정 및 성장판 관찰

매 40 μm로 수집된 족경골 근위부 시상절편을 슬라이드 글라스 위에 올리고 건조한 후 형광현미경을 이용하여 자외선조사에 따른 골 조직 내 테트라사이클린의 침착으로 형성된 선과 성장판 하단 사이의 길이를 측정하여 1일간의 골 성장 지표로 사용하였다. 길이 측정 후 cresyl violet 염색한 다음

성장판 내의 증식부와 성숙부 및 비대부의 연골세포를 관찰하고, 각 부위의 높이를 측정하였다.

6. 면역조직염색

상기와 같이 40 μm로 준비된 조직절편을 사용하였다. 면역염색에 사용된 1차 항체는 BMP-2 antibody (Santa Cruz Biotech., U.S.A.)와 IGF-1 antibody (Santa Cruz Biotech., U.S.A.)를 사용하였고, secondary antibody로는 각각 anti-goat antibody (Vector Lab, U.S.A.)와 anti-rabbit antibody (Vector Lab, U.S.A.)를 사용하였고, Vectastatin elite ABC kit (Vector Lab, U.S.A.)를 사용하였다. 실험방법은 조직절편들을 0.1M PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.2)에 5분 동안 담그고, Triton-X 100 용액 (Sigma, U.S.A.)에서 15분간 2회, 0.1M PBS + 0.5% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma, U.S.A.)에서 15분간 2회 씻어낸 다음, 1차 항체와 함께 상온에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 다음날 15분간 2회 0.1 M PBS + 0.5% BSA에서 행군 다음 그 section을 60분간 secondary antibody와 함께 반응시키고, 다시 0.1 M PBS + 0.5% BSA로 15분간 2회 행군 후 60분 동안 ABC (avidin-biotin-peroxidase) 복합체를 1:50의 농도로 첨가하여 상온에서 반응시켰다. 각 조직절편들을 0.1 M PB로 15분간 2회 수세한 다음 최종적으로 0.05%의 DAB (3,3-diaminobenzidine, Sigma, U.S.A.)과 0.03% 과산화수소가 있는 0.1 M PB에 반응시켰다. 발색된 후 0.1 M PB에 각 조직절편을 넣어 반응을 중지한 뒤 슬라이드표본으로 제작하여 관찰하였다.

7. 통계처리

약물의 효과를 판정하기 위해 one-way ANOVA test를 수행하였고, 사후 검정을 위해 대조군과 비교하는 Dunnett's post hoc test를 사용하였다. 프로그램은 SPSS 8.0 (IBM, USA)을 사용하였으며 결과는 mean ± S.E.M으로 나타내었다. 통계학적 유의성은 $p < 0.05$ 이하인 것으로 하였다.

결 과

1. 난황 펩타이드 섭취에 따른 체중 변화

난황 펩타이드의 저칼슘 식이 유발 성장 저하 흰쥐의 체중 변화에 대한 영향을 확인하기 위하여 흰쥐에게 저칼슘 식이를 제공하여 성장 저하를 유발한 후, 칼슘 및 비타민 D, 난황 펩타이드를 투여하였다. 그 결과 초반 10일 정상 식이를 섭취하는 동안에는 실험군 간의 체중 차이는 없었으며, 20일째 되는 날에는 정상 식이를 섭취한 실험군의 체중은 192.4 ± 3.8 g의 체중을 나타내었으며 저칼슘 식이를 섭취한 실험군은 133.5 ± 5.4 g의 체중을 나타내어 통계적으로 유의한 성장 저하가 유발되었다. 칼슘 및 비타민 D, 난황 펩타이드를 처리한 군은 각각 123.1 ± 6.6 g, 129.4 ± 2.8 g, 132.2 ± 6.3 g의 체중을 나타내어 저칼슘 식이를 섭취한 실험군에 비해 통계적으로 유의한 차이는 확인할 수 없었다. 25일째 되

는 날에는 정상 식이를 섭취한 실험군의 체중은 203.5 ± 3.3 g의 체중을 나타내었으며 저칼슘 식이를 섭취한 실험군은 143.2 ± 6.0 g의 체중을 나타내었으며, 칼슘 및 칼슘과 비타민 D, 그리고 칼슘, 비타민 D와 난황 펩타이드를 모두 처리한 군은 각각 128.5 ± 6.1 g, 139.8 ± 4.2 g, 143.3 ± 6.5 g의 체중을 나타내어 저칼슘 식이를 섭취한 실험군에 비해 통계적으로 유의한 차이는 확인할 수 없었다(Fig. 1).

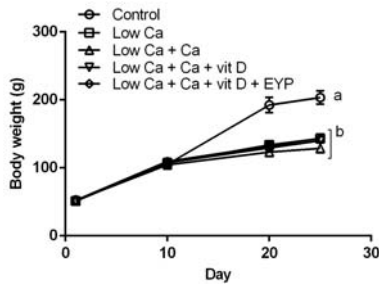


Fig 1. Effects of EYP on body weight change in low calcium diet fed rats.

Control: Normal calcium diet.
 Low Ca : Low calcium diet.
 Low Ca + Ca: Low calcium diet with calcium supplement.
 Low Ca + Ca + vit D: Low calcium diet with calcium and vitamin D supplement.
 Low Ca + Ca + vit D + EYP : Low calcium diet with calcium, vitamin D supplement, and EYP.
 The treatments sharing common alphabet are not statistically significant ($p < 0.05$).

2. 저칼슘 식이 유발 성장 저하 흰쥐의 골 길이 변화에 대한 영향

난황 펩타이드의 저칼슘 식이 유발 성장 저하 흰쥐의 골 길이 변화에 대한 영향을 확인한 결과 정상 식이를 섭취한 실험군은 $634.2 \pm 51.5 \mu\text{m}$ 의 골길이 성장을 나타내었으며 저칼슘 식이를 섭취한 실험군은 $302.0 \pm 40.7 \mu\text{m}$ 의 골길이 성장을 나타내었다. 칼슘 및 비타민 D, 난황 펩타이드를 처리한 군은 각각 $340.0 \pm 30.8 \mu\text{m}$, $398.6 \pm 58.6 \mu\text{m}$, $462.9 \pm 43.2 \mu\text{m}$ 의 골길이 성장을 나타내었다. 칼슘 투여군 및 칼슘과 비타민 D 투여군은 저칼슘 식이만 섭취한 실험군에 비해 약간 증가하는 경향은 있었으나 통계적으로 유의한 차이는 확인할 수 없었으며, 칼슘 및 비타민 D와 난황 펩타이드를 함께 처리한 실험군은 저칼슘 식이만 섭취한 실험군에 비해 통계적으로 유의한 골길이 성장효과가 있었다(Fig. 2).

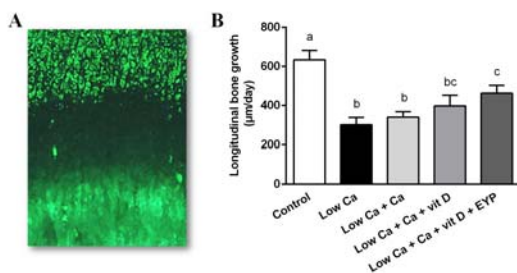


Fig 2. Effects of EYP on longitudinal bone growth in low calcium diet fed adolescent rats. A : photograph of fluorescent line formed by calcein on proximal tibias. B: graph of longitudinal

bone growth by measuring the gap between fluorescent line and the epiphyseal end line of the growth plate.

Control: Normal calcium diet.
 Low Ca : Low calcium diet.
 Low Ca + Ca: Low calcium diet with calcium supplement.
 Low Ca + Ca + vit D: Low calcium diet with calcium and vitamin D supplement.
 Low Ca + Ca + vit D + EYP : Low calcium diet with calcium, vitamin D supplement, and EYP.
 The treatments sharing common alphabet are not statistically significant ($p < 0.05$).

3. 저칼슘 식이 유발 성장 저하 흰쥐의 성장판 길이 생장에 대한 영향

난황 펩타이드의 저칼슘 식이 유발 성장 저하 흰쥐의 성장판 길이 생장에 대한 영향을 확인한 결과 정상 식이를 섭취한 실험군은 $591.7 \pm 28.7 \mu\text{m}$ 의 성장판 길이 생장을 나타내었으며 저칼슘 식이를 섭취한 실험군은 $312.9 \pm 16.6 \mu\text{m}$ 의 성장판 길이 생장을 나타내었다. 칼슘 및 비타민 D, 난황 펩타이드를 처리한 군은 각각 $321.7 \pm 38.6 \mu\text{m}$, $434.8 \pm 42.7 \mu\text{m}$, $524.2 \pm 27.7 \mu\text{m}$ 의 성장판 길이 생장을 나타내었다. 칼슘 투여군 및 칼슘과 비타민 D 투여군은 저칼슘 식이만 섭취한 실험군에 비해 약간 증가하는 경향은 있었으나 통계적으로 유의한 차이는 확인할 수 없었으며, 칼슘 및 비타민 D와 난황 펩타이드를 함께 투여한 실험군은 저칼슘 식이만 섭취한 실험군에 비해 통계적으로 유의한 성장판 길이 생장 효과가 있었으며 정상 식이를 섭취한 투여군과 통계적으로 큰 차이를 나타내지 않아 저칼슘 식이로 인한 성장판의 성장 저해를 정상군에 근접하게 극복하는 것으로 나타내었다(Fig. 3).

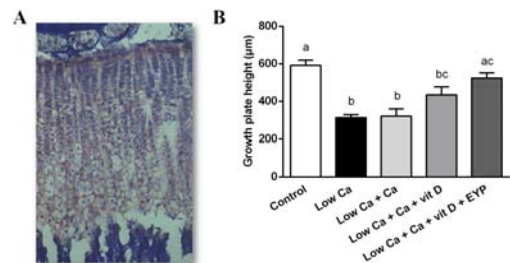


Fig 3. Effects of EYP on growth plate heights in low calcium diet fed adolescent rats. A : photograph of cresyl violet staining on growth plate. B: graph of hight of the growth plate.

Control: Normal calcium diet.
 Low Ca : Low calcium diet.
 Low Ca + Ca: Low calcium diet with calcium supplement.
 Low Ca + Ca + vit D: Low calcium diet with calcium and vitamin D supplement.
 Low Ca + Ca + vit D + EYP : Low calcium diet with calcium, vitamin D supplement, and EYP.
 The treatments sharing common alphabet are not statistically significant ($p < 0.05$).

4. 저칼슘 식이 유발 성장 저하 흰쥐의 조직내 BMP-2의 발현에 대한 영향

난황 펩타이드의 저칼슘 식이 유발 성장 저하 흰쥐의 조직내 BMP-2의 발현에 대한 영향을 확인한 결과 정상 식이를 섭취한 실험군은 $100.0 \pm 5.7\%$ 의 조직내 BMP-2 발현 양상을 나타내었으며 저칼슘 식이를 섭취한 실험군은 $46.0 \pm$

9.2%의 조직내 BMP-2 발현 양상을 나타내었다. 칼슘 및 비타민 D, 난황 펩타이드를 처리한 군은 각각 $51.6 \pm 10.8\%$, $65.7 \pm 8.3\%$, $81.1 \pm 7.2\%$ 의 조직내 BMP-2 발현 양상을 나타내었다. 칼슘 투여군 및 칼슘과 비타민 D 투여군은 저칼슘 식이만 섭취한 실험군에 비해 조직내 BMP-2 발현 양상이 약간 증가하는 경향은 있었으나 통계적으로 유의한 차이는 확인할 수 없었으며, 칼슘, 비타민 D와 난황 펩타이드를 함께 처리한 실험군은 저칼슘 식이만 섭취한 실험군에 비해 통계적으로 유의한 조직내 BMP-2 발현 양상 증가 양상을 나타내었다(Fig. 4).

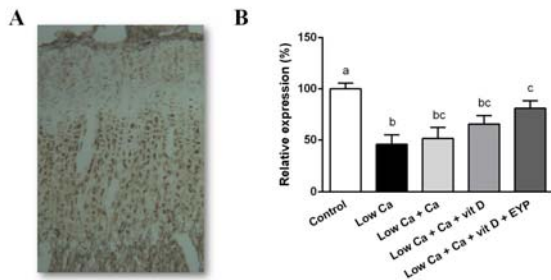


Fig 4. Effects of EYP on BMP-2 expressions in low calcium diet fed adolescent rats. A : photograph of immunohistochemical staining of BMP-2 in the growth plate. B: graph of the BMP-2 expression ratio. Control: Normal calcium diet, Low Ca : Low calcium diet, Low Ca + Ca: Low calcium diet with calcium supplement, Low Ca + Ca + vit D: Low calcium diet with calcium and vitamin D supplement, Low Ca + Ca + vit D + EYP : Low calcium diet with calcium, vitamin D supplement, and EYP. The treatments sharing common alphabet are not statistically significant ($p < 0.05$).

5. 저칼슘 식이 유발 성장 저하 흰쥐의 조직내 IGF-1의 발현에 대한 영향

난황 펩타이드의 저칼슘 식이 유발 성장 저하 흰쥐의 조직내 IGF-1의 발현에 대한 영향을 확인한 결과 정상 식이를 섭취한 실험군은 $100.0 \pm 8.7\%$ 의 조직내 IGF-1 발현 양상을 나타내었으며 저칼슘 식이를 섭취한 실험군은 $51.2 \pm 11.6\%$ 의 조직내 IGF-1 발현 양상을 나타내었다. 칼슘 및 비타민 D, 난황 펩타이드를 처리한 군은 각각 $56.2 \pm 10.1\%$, $75.7 \pm 8.4\%$, $85.1 \pm 11.2\%$ 의 조직내 IGF-1 발현 양상을 나타내었다. 칼슘 투여군 및 칼슘과 비타민 D 투여군은 저칼슘 식이만 섭취한 실험군에 비해 조직내 IGF-1 발현 양상이 약간 증가하는 경향은 있었으나 통계적으로 유의한 차이는 확인할 수 없었으며, 칼슘, 비타민 D와 난황 펩타이드를 함께 처리한 실험군은 저칼슘 식이만 섭취한 실험군에 비해 통계적으로 유의한 조직내 IGF-1 발현 양상 증가양상을 나타내었으며, 정상 식이를 섭취한 투여군과 통계적으로 큰 차이를 나타내지 않아 저칼슘 식이로 인한 성장판의 성장 저해를 정상군에 근접하게 극복하는 것으로 나타내었다(Fig. 5).

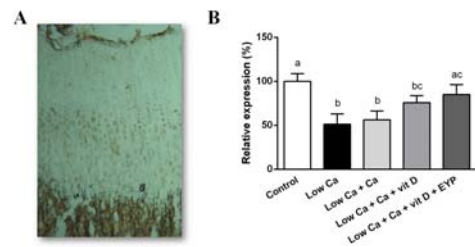


Fig 5. Effects of EYP on IGF-1 expressions in low calcium diet fed adolescent rats. A : photograph of immunohistochemical staining of IGF-1 in the growth plate. B: graph of the IGF-1 expression ratio. Control: Normal calcium diet, Low Ca : Low calcium diet, Low Ca + Ca: Low calcium diet with calcium supplement, Low Ca + Ca + vit D: Low calcium diet with calcium and vitamin D supplement, Low Ca + Ca + vit D + EYP : Low calcium diet with calcium, vitamin D supplement, and EYP. The treatments sharing common alphabet are not statistically significant ($p < 0.05$).

고찰

신장 증가의 가장 큰 요인은 골격의 성장이다. 신체의 뼈대를 이루는 골격이 성장함에 따라 인체 다른 조직의 성장도 이루어진다. 인체의 뼈가 생성되는 메커니즘은 총 3가지가 있는데, 즉 膜內骨化 (intramembranous ossification), 軟骨內骨化 (endochondral ossification), 異所骨化 (heterotopic ossification)가 그것이다. 특히 신장 증가에 가장 큰 영향을 주는 장골의 길이 성장은 軟骨內骨化이다²¹⁾. 軟骨內骨化는 포유류의 골격계를 발달시키는 주요한 방법 중의 하나로 장골의 형성²²⁾은 물론 장골의 길이 성장을 담당한다²³⁾. 장골은 먼저 그 내부에 一次 骨形成 中心 (primary centre of ossification)을 형성한다. 一次 骨形成 中心에서는 연골세포 (chondrocyte)의 증식이 일어나 비후화되고, 혈관과 신경이 침입하여 영양을 공급한다. 연골세포가 증식되어 연골이 형성되고 연골에 조골세포가 들어와 골화를 시작하여 연골을 경골로 교체한다. 골화가 진행됨에 따라 장골의 끝부분은 영구히 연골로 남아 관절 연골을 형성하고 一次 骨形成 中心和 장골 말단 사이에 남은 연골조직에 二次 骨形成 中心이 형성되면서 장골의 길이는 지속적으로 성장한다. 이때 二次 骨形成 中心和 그 주변의 연골조직을 성장판 (growth plate) 또는 골단판 (epiphyseal plate)이라고 하며 이것은 청소년기에 장골의 길이 성장을 담당하다가 성인기에 들어서면 점차 완전히 골화되어 골단선 (epiphyseal line)으로 흔적만 남게 된다²⁴⁾. 이처럼 성장판은 청소년기 길이 성장의 가장 중요한 부분으로 성장판의 길이 증가는 곧 장골의 총 길이 증가에 큰 영향을 미친다.

IGF-1은 성장호르몬 (growth hormone)과 관련 깊은 성장인자로 성장호르몬의 자극을 받은 뇌하수체 전엽에서 분비된다. IGF-1은 특히 성장판에서의 연골세포 증식에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다²⁵⁾. 또한 성장호르몬의 발현 기제에도 관여하여 성장호르몬의 발현과정을 조절하며 인체 대부분의 장소에서 세포의 분화 (differentiation)와 증식 (proliferation), 성숙 (maturation)을 조절한다²⁶⁾.

BMP-2는 Transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily에 속해 있는 성장인자로서 뼈 형성에 중요한 영

향을 미친다²⁷⁾. 특히 retinoid라는 연골세포 증식을 담당하는 물질을 조절하는 것으로 알려져 있으며^{28,29)} noggins라는 골형성 억제인자를 억제하여 골형성을 촉진시키기도 한다²⁷⁾.

본 연구는 저칼슘 식이에 의한 성장 저하 흰쥐에서의 칼슘 및 비타민 D를 이용한 치료 모델에서의 난황 펩타이드의 성장에 대한 촉진 효과를 관찰하기 위하여 계획되었다. 실험동물에게 저칼슘 식이를 투여하며 칼슘의 별도 투여군과 비타민 D를 함께 투여하는 투여군, 그리고 칼슘, 비타민 D와 함께 난황 펩타이드를 투여하는 투여군으로 나누어 15일간 시료를 투여하였다. 그리고 칼슘과 킬레이트 결합한 후 골형성부에 침착하는 칼세인을 형광현미경을 이용하여 분석한 후 골성장 정도를 측정하였다. 그리고 골길이성장은 주로 성장판의 연골세포대사에 의한 골형성이 주로 관여하므로 연골세포 대사에 중요한 역할을 수행하는 BMP-2와 IGF-1 단백질의 조직내 발현 양상을 관찰하였다. 그 결과 저칼슘 식이를 투여한 모든 실험군은 정상 식이 투여군에 비해 현저한 체중 저하를 나타내었으며 그 중 칼슘만 투여한 실험군은 저칼슘 식이를 투여한 대조군에 비해 장골 길이성장, 성장판 길이 성장, BMP-2 발현양상 및 IGF-1 발현 양상에서 모두 통계적으로 유의한 차이를 확인할 수 없었다. 이러한 결과는 칼슘의 섭취량에 비해 체내에서 흡수되는 양이 낮아 칼슘의 이용에 제한적이었을 것으로 생각된다. 칼슘의 흡수 및 재흡수를 돕는 비타민 D를 칼슘과 같이 투여한 실험군의 경우 대조군에 통계적으로 유의한 차이는 확인할 수 없었으나 대조군에 비해 증가하는 경향성은 볼 수 있었다. 이는 비타민 D가 칼슘의 흡수에 영향을 주었을 것이라고 판단된다. 칼슘과 비타민 D의 투여군에 난황 펩타이드 함께 투여한 경우 장골 길이성장, 성장판 길이 성장, BMP-2 발현양상 및 IGF-1 발현 양상에서 모두 통계적으로 유의한 길이 성장을 확인할 수 있었으며 성장판 길이 및 IGF-1의 발현은 정상군에 근접한 효과를 나타내었다. 이러한 결과에서 난황 펩타이드를 칼슘 및 비타민 D와 함께 투여하는 경우 성장에 더 도움이 될 수 있을 것으로 판단된다.

본 실험의 결과 칼슘 결핍으로 인한 성장 저하를 유발한 성장기 흰 쥐에게 칼슘 및 비타민 D와 함께 난황 펩타이드를 투여하는 것이 칼슘만 투여하거나 칼슘 및 비타민 D를 투여하는 경우에 비해 더 좋은 성장 촉진 효과를 나타내었다. 이는 성장기 영양 불균형 등으로 인한 성장 저하를 일으킨 청소년에게 난황 펩타이드 성분을 함께 투여하는 것이 성장 저하 치료에 칼슘 및 비타민 D 등의 성분만 투여하는 것 보다 도움이 될 수 있을 것으로 생각되는 바이다.

결론

실험동물에게 저칼슘 식이를 투여하며 칼슘의 별도 투여군과 비타민 D를 함께 투여하는 투여군, 그리고 칼슘, 비타민 D와 함께 난황 펩타이드를 투여하는 투여군으로 나누어 15일간 시료를 투여하였다. 그리고 칼슘과 킬레이트 결합한 후 골형성부에 침착하는 칼세인을 형광현미경을 이용하여 분석한 후 골성장 정도를 관찰하였다.

1. 정상 식이를 섭취하는 동안에는 실험군 간의 체중 차이는 없었으며, 저칼슘 식이를 섭취하면서 성장 저하가

유발되어 정상 식이를 섭취한 실험군과 저칼슘 식이를 섭취한 실험군은 통계적으로 유의한 성장 저하가 유발되었다. 칼슘 및 비타민 D, 난황 펩타이드를 처리한 군들은 저칼슘 식이를 섭취한 실험군에 비해 통계적으로 유의한 차이는 확인할 수 없었다.

2. 저칼슘 식이 유발 성장 저하 흰쥐의 골 길이 변화를 확인한 결과 칼슘 투여군 및 칼슘과 비타민 D 투여군은 저칼슘 식이만 섭취한 실험군에 비해 약간 증가하는 경향은 있었으나 통계적으로 유의한 차이는 확인할 수 없었으며, 칼슘 및 비타민 D와 난황 펩타이드를 함께 처리한 실험군은 저칼슘 식이만 섭취한 실험군에 비해 통계적으로 유의한 골길이 성장효과가 있었다.
3. 저칼슘 식이 유발 성장 저하 흰쥐의 성장판 길이 생장을 확인한 결과 칼슘 투여군 및 칼슘과 비타민 D투여군은 저칼슘 식이만 섭취한 실험군에 비해 약간 증가하는 경향은 있었으나 통계적으로 유의한 차이는 확인할 수 없었으며, 칼슘 및 비타민 D와 난황 펩타이드를 함께 투여한 실험군은 저칼슘 식이만 섭취한 실험군에 비해 통계적으로 유의한 성장판 길이 성장 효과가 있었으며 정상 식이를 섭취한 투여군과 통계적으로 큰 차이를 나타내지 않아 저칼슘 식이로 인한 성장판의 성장 저해를 정상군에 근접하게 극복하는 것으로 나타내었다
4. BMP-2 단백질의 조직내 발현 양상을 확인한 결과 칼슘 투여군 및 칼슘과 비타민 D 투여군은 저칼슘 식이만 섭취한 실험군에 비해 조직내 BMP-2 발현 양상이 약간 증가하는 경향은 있었으나 통계적으로 유의한 차이는 확인할 수 없었으며, 칼슘, 비타민 D와 난황 펩타이드를 함께 처리한 실험군은 저칼슘 식이만 섭취한 실험군에 비해 통계적으로 유의한 조직내 BMP-2 발현 양상 증가 양상을 나타내었다.
5. IGF-1 단백질의 조직내 발현 양상을 확인한 결과 칼슘 투여군 및 칼슘과 비타민 D 투여군은 저칼슘 식이만 섭취한 실험군에 비해 조직내 IGF-1 발현 양상이 약간 증가하는 경향은 있었으나 통계적으로 유의한 차이는 확인할 수 없었으며, 칼슘, 비타민 D와 난황 펩타이드를 함께 처리한 실험군은 저칼슘 식이만 섭취한 실험군에 비해 통계적으로 유의한 조직내 IGF-1 발현 양상 증가양상을 나타내었으며, 정상 식이를 섭취한 투여군과 통계적으로 큰 차이를 나타내지 않아 저칼슘 식이로 인한 성장판의 성장 저해를 정상군에 근접하게 극복하는 것으로 나타내었다.

이상의 결과, 칼슘 결핍으로 인한 성장 저하를 유발한 성장기 흰 쥐에게 칼슘 및 비타민 D와 함께 난황 펩타이드를 투여하는 것이 칼슘만 투여하거나 칼슘 및 비타민 D를 투여하는 경우에 비해 더 좋은 성장 촉진 효과를 나타내었음을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업 (과제번호: PJ010533)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

1. Forsythe RH. Eggs and Egg products as functional ingredients. *Bakers Digest*. 1970 ; 8 : 4-46.
2. Korean P. Structure, composition, and formation of egg. *poultry research monthly*. 2004 ; 174 : 54-7.
3. Chris Clarke. The science of ice cream. Cambridge. 1st ed. Eng : Royal Society of Chemistry. 2004 : 49.
4. Heo J. *Donguibogam*, 1st ed. Seoul : Bubin publishers co. 2005 : 1860.
5. SATCM, Zhong Hua Ben Cao vol 9. 1st ed. Shanghai : Shanghai Science and Technology Press. 1999 : 477-8.
6. Hwang KS. Functional properties and commercial application of lecithin. Pusan woman's college theses collection. 1995 ; 17 : 303-19.
7. Bonjour JP, Benoit V, Rousseau B, Souberbielle JC. Consumption of vitamin D-and calcium-fortified soft white cheese lowers the biochemical marker of bone resorption TRAP 5b in postmenopausal women at moderate risk of osteoporosis fracture. *J Nutr*. 2012 ; 142 : 698-703.
8. Fiorito LM, Mitchell DC, Smiciklas-Wright H, Birch LL. Girls' calcium intake is associated with bone mineral content during middle childhood. *J Nutr*. 2006 ; 136 : 1281-6.
9. Matkovic V, Goel PK, Badenhop-Stevens NE, Landoll JD, Li B, Ilich JZ, Skugor M, Nagode LA, Mobley SL, Ha EJ, Hangartner TN, Clairmont A. Calcium supplementation and bone mineral density in females from childhood to young adulthood: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2005 ; 81 : 175-88.
10. Li ZZ, Yi Zong Bi Du. 1st ed. Seoul : Tree and earth press. 2000 : 22-4.
11. Kim DG, Kim YH, Kim JH, Park EJ, Back JH, Lee SH, Lee JY, Jang GT. *Dongui pediatry*. 1st ed. Seoul : Jungdam press. 2002 : 353, 406-7.
12. Leem KH, Kim HH. Effects of Herbal Composition on Longitudinal Bone Growth of Adolescent Rats. *Kor J Herbology*. 2003 ; 18(3) : 181-6.
13. Catharine R, Christine LT, Ann LY, Heather BDV. *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D*. 1st ed. Washington, DC : National Academy Press. 2011 : 35-74.
14. Hollis BW. Assessment of vitamin D nutritional and hormonal status: what to measure and how to do it. *Calcif Tissue Int*. 1996 ; 58(1) : 4-5.
15. Holick MF, Schnoes HK, DeLuca HF, Suda T, Cousins RJ. Isolation and identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol. A metabolite of vitamin D active in intestine. *Biochemistry*. 1971 ; 10(14) : 2799-804.
16. Kim HK, Lee S, Leem KH. Protective effect of egg yolk peptide on bone metabolism. *Menopause*. 2011 ; 18(3) : 307-13.
17. Abdou AM, Watabe K, Yamane T, Isono T, Okamura Y, Kawahito S, Takeshima K, Masuda K, Kim M. Antiosteoporotic effect of orally administered yolk-derived peptides on bone mass in women. *Food Sci Nutr*. 2014 ; 2(3) : 193-9.
18. Leem KH, Kim MG, Kim HM, Kim M, Lee YJ, Kim HK. Effects of egg yolk proteins on the longitudinal bone growth of adolescent male rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2004 ; 68(11) : 2388-90.
19. Chen H, Hayakawa D, Emura S, Ozawa Y, Okumura T, Shoumura S. Effect of low or high dietary calcium on the morphology of the rat femur. *Histol Histopathol*. 2002 ; 17(4) : 1129-35.
20. Choi HJ. New Insight into the Action of Vitamin D. *Korean J Fam Med*. 2011 ; 32 : 89-96.
21. Forriol F, Shapiro F. Bone development: interaction of molecular components and biophysical forces. *Clin Orthop Relat Res*. 2005 ; 432 : 14-33.
22. Frank H Netter. *Musculoskeletal system: anatomy, physiology, and metabolic disorders*. 1st ed. New Jersey : Ciba-Geigy Corporation. 1987 : 130.
23. Brighton CT, Yoichi S, Robert MH. Cytoplasmic structures of epiphyseal plate chondrocytes; quantitative evaluation using electron micrographs of rat costochondral junctions with specific reference to the fate of hypertrophic cells. *J Bone Joint Surg*. 1973 ; 55(4) : 771-84.
24. Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008 ; 40(1) : 46-62.
25. Gerard JT, Sandra RG. *Principles of anatomy & physiology*. 10th ed. USA : Wiley. 2003 : 174.
26. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Vol. II, 7th ed. New York : McGraw-Hill. 1995 : 3023-44.
27. Wang EA, Rosen V, D' Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, LaPan P, Luxenberg DP, McQuaid D, Moutsatsos IK, Nove J, Wozney JM. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Nat Acad Sci*. 1990 ; 87 : 2220-4.
28. Hallahan AR, Pritchard JI, Chandraratna RAS,

- Ellenbogen RG, Geyer JR, Overland RP, Strand AD, Tapscott SJ, Olson JM. BMP-2 mediates retinoid-induced apoptosis in medulloblastoma cells through a paracrine effect. *Nature Med*, 2003 ; 9 : 1033-8.
29. Cancedda R, Descalzi Cancedda F, Castagnola P. Chondrocyte differentiation. *Int Rev Cytol*, 1995 ; 159 : 265-358.