

난소절제와 칼슘 섭취수준이 흰쥐의 지질패턴과 항산화능에 미치는 영향

최미경* · 강명화** · 김미현***§

청운대학교 식품영양학과,* 호서대학교 식품영양학과,** 강원대학교 식품영양학과***

Effects of Ovariectomy and Calcium Intake on Lipid Profile and Antioxidant Capacities in Rats

Choi, Mi-Kyeong* · Kang, Myung-Hwa** · Kim, Mi-Hyun***§

Department of Human Nutrition & Food Science,* Chungwoon University, Hongseong 350-701, Korea

Department of Food and Nutrition,** Hoseo University, Cheonan 336-776, Korea

Department of Food and Nutrition,*** Kangwon National University, Samcheok 245-711, Korea

ABSTRACT

The purpose of this research was to investigate the effect of the calcium intake on lipid profile and antioxidant capacities in ovariectomized (OVX) rats. Rats were divided into 3 groups and fed diet with different levels of calcium (low 0.1%, adequate 0.5%, high 1.5%) for 4 weeks. The half of rats in each group was ovariectomized and the others were sham-operated. And rats were fed same diets for 8 weeks after operation. Feed intake and weight gain were significantly higher in OVX group than those in sham-operated. Serum HDL-cholesterol was the highest in high-calcium group of OVX. Hepatic triglyceride of low-calcium group in sham-operated was the highest, while that of high-calcium group in OVX was the highest. Hepatic activities of glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GSH-Px), and catalase were significantly decreased by increasement of calcium intake. Hepatic TBARS level was the lowest in high-calcium group of OVX. And hepatic level of TBARS induced by AAPH was significantly decreased by increasement of calcium intake. These results may indicate that the high calcium intake have the potential role to improve lipid profiles and antioxidant capacities in OVX rats. (Korean J Nutr 2008; 41(4): 299~306)

KEY WORDS: calcium intake, ovariectomized rat, lipid profile, antioxidant capacity.

서 론

최근 한국인 사망원인 통계에 의하면 순환기계 질환으로 인한 사망률이 남성의 경우 20.2%, 여성의 경우 26.8%이며 전체 평균 23.1%로 높은 비율을 차지하고 있다.¹⁾ 이러한 순환기계 질환의 주요 발병 요인으로는 유전적 요인 외에 비만, 고지혈증, 고혈압 및 당뇨, 담배와 술, 운동부족, 스트레스, 잘 못된 식습관 등이 알려져 있다.²⁾ 특히 고지혈증은 순환기계 질환의 위험인자로 알려져 있고, 그 농도 조절에 식이 요인이 크게 관여함이 밝혀지고 있다.³⁾ 식이요인

중 열량이나 지방, 당질의 섭취 이외에 칼슘, 마그네슘, 붕소 등의 미량 무기질이 혈중 지질농도 조절에 관여한다는 연구들이 보고되고 있다.⁴⁻⁷⁾ 이들 중 칼슘은 2가 양이온으로서 장내 지방산과 불용성 비누를 형성하기 때문에 식이 지방의 흡수를 억제하며, 담즙산과 결합하고, 식물성 스테롤의 콜레스테롤 저하 효과를 촉진시킨다.⁸⁻¹⁰⁾ 따라서 칼슘 섭취량이 증가하면 혈액 내의 콜레스테롤, 중성지방, 인지질 등이 저하된다고 보고되었다.^{7,11,12)} 난소절제쥐를 이용한 동물실험에서는 저칼슘과 적정칼슘섭취시 저칼슘섭취군의 동맥경화지수와 심혈관질환위험지수, 간 조직중의 총 지질 함량이 적정칼슘군에 비하여 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다.⁵⁾ 또한, 칼슘과 마그네슘을 많이 함유하고 있는 경수 (hard water)를 음용하는 지역의 주민들이 연수 (soft water)를 마시는 지역의 주민들보다 고혈압과 순환기계 질환으로 인한 사망률이 낮았다는 역학연구 결과가 있다.¹³⁾

접수일 : 2008년 5월 13일 / 수정일 : 2008년 6월 3일

채택일 : 2008년 6월 16일

§To whom correspondence should be addressed.

E-mail : mhkim1129@kangwon.ac.kr

한편 2005년 우리나라 국민건강·영양조사 보고서¹⁴⁾에 의하면 전국 평균 칼슘섭취량은 권장섭취량에 대비 76.3%로 나타났다. 성별로 보면 여자는 69.8%, 남자는 82.6%로 여자는 남자에 비하여 현저하게 낮게 섭취하고 있었으며, 특히 50~64세와 65세 이상 성인 여성의 평균 칼슘 섭취량이 각각 권장섭취량의 67.2%와 57.1% 수준으로 매우 낮았고, 평균 필요량에 미달되게 섭취하는 비율도 각각 65.8%와 73.6%로 나타나 50대 이상 여성의 칼슘 섭취 부족이 매우 심각한 것으로 나타났다.

여성의 경우 50세를 전후로 폐경을 맞이하게 되면서 에스트로겐 합성과 분비가 저하되어 혈중 지질대사의 변화로 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤이 증가하기 때문에 심혈관계질환의 발병률이 증가한다.¹⁵⁻¹⁷⁾ 실제로 2005년 국민건강·영양조사¹⁸⁾에 나타난 한국인의 고지혈증(고콜레스테롤혈증) 분포를 살펴보면, 남성의 경우 30대에 6.0%, 40대에 8.5%, 50대에 8.5%, 60대에 9.1%를 보이며 증가하다가 70대 이후에는 4.0%로 나타났고, 여성의 경우 30대에 1.8%, 40대에 5.8%의 낮은 유병률을 보이다가 50대 14.6%의 급격한 증가를 보이면서, 60대에 18.2%, 70대 이상에서 13.9%로 50대 이후에는 남성에 비하여 현격한 증가를 보이고 있다. 이와 같이 폐경과 칼슘의 지속적인 결핍으로 인해 폐경 후 여성은 심혈관계질환의 고위험군으로 분류될 수 있다.

폐경 이후 여성에서의 급격한 혈중 지질 증가로 인한 질환 발생을 크게 높이기 때문에 식이로서 체내 지질과 과산화물을 조절하기 위한 많은 연구들^{19,20)}이 진행되고 있다.

또한 칼슘과 관련하여 세포내 칼슘은 세포반응을 매개하는 중요한 생리전달신호로 병리적 조건에서는 세포내 칼슘이 과다하게 증가되면서 여러 형태의 세포손상이 온다는 연구가 있고,^{21,22)} 세포내 칼슘의 증가는 세포막의 투과성을 증가시키고 세포골격체 변성을 일으켜 세포 손상을 유발하고 free radical과 염증산물들을 생성하여 손상을 연속적으로 진행시킨다는 보고도 있다.^{23,24)} 이와 같은 선행연구들을 고려할 때 칼슘의 섭취수준은 혈중 지질 농도와 함께 지질산화에도 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각되지만, 지금까지 지질 변화만을 살펴본 연구가 대부분이며, 이와 동시에 지질산화에 미치는 영향을 살펴본 연구는 매우 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 난소절제 흰쥐에 칼슘 섭취수준을 저, 적정, 고로 나누어 공급하였을 때 혈중 지질패턴과 항산화능에 미치는 영향을 살펴봄으로써 폐경 후 여성에게 심혈관계질환을 중심으로 하는 만성질환의 예방과 치료를 위한 칼슘의 효과를 규명하여 영양관리 방안을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 체중 약 150 g의 6주령 Sprague Dawley종 암컷 흰쥐 (대한바이오링크, 충북)를 이용하였다. 60마리의 실험동물을 임의배치법으로 20마리씩 3군으로 나눠 저, 적정, 고의 칼슘 수준으로 조합한 실험식으로 4주간 사육하였다. 각 군별 체중에 따라 난괴법에 의해 받은 난소절제수술을 하였고 나머지 받은 대조군으로서 sham-operation을 실시한 후 다시 각 실험식으로 8주간 사육하였다.

실험 식이와 탈이온수는 자유급식방법으로 급여하였다. 사육 및 실험에 사용한 모든 기구들은 무기질의 오염을 방지하기 위하여 EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) 용액에, 초자기구일 경우에는 질산원액에 24시간 이상 담갔다 탈이온수로 3번 이상 세척하고 건조기에서 습기를 제거한 다음에 사용하였다. 사육실의 환경은 온도 $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $60 \pm 5\%$ 로 유지하였고, 명암은 12시간 주기로 조절하였다.

실험 식이

실험 식이는 정제식이로서 조성은 AIN-93²⁵⁾을 참고로 하였으며, 배합 구성은 Table 1과 같다. 실험 식이 조성 중 무기질은 칼슘과 인을 제외한 혼합물을 조제하여 사용하였으며, 칼슘은 저 (0.1%), 적정 (0.5%), 고 (1.5%)의 3수준으로 하였다. 칼슘의 급원으로는 인의 함량을 조정하기 위하여 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 와 CaCO_3 를 사용하였으며, 인과 포타

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

Ingredients	Low Ca ¹⁾	Adequate Ca	High Ca
Corn starch	517.1504	507.2597	475.3273
Casein	200.0000	200.0000	200.0000
Sucrose	100.0000	100.0000	100.0000
Soybean oil	70.0000	70.0000	70.0000
Cellulose	50.0000	50.0000	50.0000
Mineral mixture (Ca/P free) ²⁾	35.0000	35.0000	35.0000
Vitamin mixture ³⁾	10.0000	10.0000	10.0000
L-Cystine	3.0000	3.0000	3.0000
Choline bitartrate	2.5000	2.5000	2.5000
T-butylhydroquinone	0.0140	0.0140	0.0140
Calcium phosphate	3.4000	6.8770	33.3040
Calcium carbonate	0.0000	7.4200	12.9254
Potassium phosphate	2.7156	0.0000	0.0000
Potassium citrate	6.2200	7.9293	7.9293

1) Low Ca: 0.1% Ca, 0.3% P; Adequate Ca: 0.5% Ca, 0.3% P; High Ca: 1.5% Ca, 0.9% P

2) AIN-93 mineral mixture (Ca/P free)

3) AIN-93 vitamin mixture

습의 비율을 기준에 맞추기 위하여 potassium phosphate와 potassium citrate를 사용하였다. 갈습과 인의 함량 비율은 약 1.67 : 1로 하였고 저칼습식에서는 인의 결핍을 배제하기 위하여 인의 함량을 0.3%로 하였다.

시료 채취

식이섭취량과 체중은 매주 1회 일정 시각에 측정하였으며, 식이섭취량에 대한 오차를 최소한으로 줄이기 위하여 허실량도 측정하여 보정하였다. 12주간의 사육 종료 후 12시간을 절식시키고 ethyl ether로 마취시킨 후 heart puncture에 의해 혈액과 간을 채취하였다. 채취한 혈액은 혈청을 분리하고 간장과 함께 분석할 때까지 -70°C에서 보관하였다.

시료의 분석

일반 성분 및 지질함량 분석

혈청 총콜레스테롤, 중성지질, HDL-콜레스테롤 함량은 효소법에 의한 kit를 이용하여 측정하였으며, LDL-콜레스테롤은 Friedwald 법²⁶⁾에 의해 계산하였다. 혈청 총콜레스테롤과 HDL-콜레스테롤 함량을 이용하여 동맥경화지수를 산출하였다. 간은 Folch법²⁷⁾에 따라 지질을 추출하여 총지질 함량을 측정하였고, 추출한 지질 중의 콜레스테롤과 중성지질 함량을 혈청 지질 분석과 같은 방법으로 측정하였다.

항산화효소활성 측정

간에 0.1 mM PBS를 가하여 homogenizer로 균질화한 후, 3,500 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이 상등액을 이용하여 Simons와 Johnson의 방법²⁸⁾에 따라 glutathione (GSH) 함량을 측정하였고, Johansson과 Borg법²⁹⁾에 의해 catalase 활성을 측정하였으며, Flohe의 방법³⁰⁾을 이용하여 glutathione peroxidase 활성을 측정하였다. Glutathione-S-transferase (GST) 활성은 원액의 간 균질액을 사용하여 Habig 등의 방법³¹⁾에 의해 측정하였다.

간조직의 지질과산화도 및 산화에 의한 감주성 측정

간조직의 지질과산화물도는 Buege와 Aust의 방법³²⁾에 근거한 2-thiobarbituric acid (TBA) 법을 사용하여 간조직 내 malondialdehyde (MDA) 함량으로 환산하기 위해 표준시약으로 1, 1, 3, 3-tetraethoxypropane을 사용하여 1 mg 단백질의 양에 따라 생성된 TBARS 값으로 나타내었다.

균질화된 간조직의 단백질양³³⁾을 2 mg/mL로 맞춘 후 5 mM AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride) 용액을 가하여 37°C water bath (Mettler Instrument Co., Germany)에서 2시간 동안 반응 시킨 후 Buege와 Aust의 방법³²⁾에 근거한 2-thiobarbituric acid

(TBA)법을 사용하여 간 조직 내 malondialdehyde (MDA) 함량으로 환산하기 위해 표준시약으로 1, 1, 3, 3-tetraethoxypropane을 사용하여 1 mg 단백질의 양에 따라 생성된 TBARS 값으로 나타내었다.

통계분석

본 연구를 통해 얻어진 모든 결과는 SAS program을 이용하여 평균과 표준편차를 구하였다. 난소절제와 갈습의 섭취수준이 종속변수에 미친 영향은 2 × 3 ANOVA test를 실시하였고, 유의한 영향이 나타났을 때 각 군별 차이는 Duncan's multiple range test로 $\alpha = 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결 과

체중증가량, 사료섭취량 및 사료효율

난소절제와 갈습의 섭취수준에 따른 사료섭취량, 체중증가량, 사료효율에 대한 결과는 Table 2와 같다. 사육 전 체중과 난소 절제 전 4주간의 체중증가량은 각 군간 유의한 차이가 없었다. 난소절제 후 체중증가량과 사료섭취량은 난소절제군이 Sham군보다 유의하게 높았으며 (각각 $p < 0.001$), 사료섭취량은 Sham군과 난소절제군 모두 갈습의 섭취수준이 높을수록 높았다 ($p < 0.001$). 사료효율은 난소절제군이 Sham군보다 유의하게 높았다 ($p < 0.001$).

혈청과 간의 지질패턴

난소절제와 갈습의 섭취수준에 따른 혈청 지질패턴에 대한 결과는 Table 3과 같다. 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, 동맥경화지수는 난소절제군이 Sham군보다 유의하게 높았으며 (각각 $p < 0.05$), HDL-콜레스테롤은 난소절제군에서 고칼습군이 저칼습군보다 유의하게 높았다 ($p < 0.05$). 난소절제와 갈습의 섭취수준에 따른 간의 지질패턴에 대한 결과는 Table 4와 같다. 간의 무게는 난소절제군이 Sham군보다 유의하게 높았으며 ($p < 0.01$), 중성지질은 Sham군의 경우 저칼습군이 가장 높았던 반면 난소절제군의 경우에는 고칼습군이 유의하게 높았다 ($p < 0.05$).

간의 항산화효소 활성

간에서 난소절제와 갈습의 섭취수준이 항산화효소 활성에 미치는 영향을 살펴본 결과는 Table 5와 같다. GSH 함량은 난소절제와 갈습의 섭취수준에 따른 각 군간 유의한 차이가 없었다. GST 활성은 난소절제군이 Sham군보다 낮았고 ($p < 0.05$) GST, GSH-Px 및 catalase 활성은 갈습 섭취가 높을수록 유의하게 감소하였다 ($p < 0.001$).

간의 지질과산화도 및 산화에 의한 감주성

난소절제와 칼슘의 섭취수준에 따른 간의 지질과산화물 생성량을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 간의 과산화물의 생성 정도는 난소절제군에서 칼슘 섭취수준이 높을수록 낮은 것으로 나타나 고칼슘군이 가장 낮았다 ($p < 0.05$). AAPH

는 수용성 계열에서 열수 반응에 의해 peroxy radical을 발생하여 과산화지질 생성량을 증가시키는 산화 촉진제이다.³⁴⁾ 칼슘의 섭취수준에 따른 흰쥐의 간을 AAPH로 산화를 유도시킨 후 간에 생성된 과산화물 함량을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. AAPH 유도 산화된 간의 지질과산화물의 생성

Table 2. Body weight gain, feed intake, and feed efficiency ratio of the experimental groups

Groups	Initial body weight (g)	Body weight gain (g/wk, for 4 wks)	Body weight gain (g/wk, for 8 wks)	Feed intake (g/day, for 8 wks)	FER ¹⁾ (for 8 wks)	
Ca (%)						
Sham operation	0.1	125.03 ± 6.34 ²⁾	16.89 ± 2.55	3.80 ± 1.46 ³⁾	12.19 ± 0.17 ¹⁾	0.04 ± 0.02 ^{b)}
	0.5	125.21 ± 5.11	17.78 ± 2.74	4.01 ± 1.35 ^{c)}	12.66 ± 0.08 ^{e)}	0.05 ± 0.01 ^{b)}
	1.5	125.48 ± 5.69	18.34 ± 1.97	4.40 ± 1.01 ^{c)}	13.64 ± 0.23 ^{d)}	0.05 ± 0.01 ^{b)}
Ovariectomy	0.1	124.94 ± 4.71	16.16 ± 2.81	10.38 ± 4.51 ^{b)}	14.35 ± 0.65 ^{c)}	0.10 ± 0.05 ^{a)}
	0.5	124.98 ± 5.26	16.39 ± 2.20	12.94 ± 2.56 ^{a)}	15.07 ± 0.36 ^{b)}	0.12 ± 0.03 ^{a)}
	1.5	125.56 ± 6.17	17.02 ± 3.37	13.34 ± 2.69 ^{a)}	15.94 ± 0.32 ^{a)}	0.12 ± 0.02 ^{a)}
Operation	NS ⁴⁾	NS	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	
Ca	NS	NS	NS	$p < 0.001$	NS	
Operation × Ca	NS	NS	NS	NS	NS	

1) Feed efficiency ratio = body weight gain (g/day) / feed intake (g/day)
 2) Mean ± standard deviation
 3) Values with different superscripts within a column are significantly different at $\alpha = 0.05$ by Duncan's multiple range test
 4) Not significant

Table 3. Serum lipids of the experimental groups (unit: mg/dL)

Groups	Total cholesterol	Triglyceride	HDL-cholesterol	LDL-cholesterol	AI ¹⁾	
Ca (%)						
Sham operation	0.1	83.20 ± 28.72 ^{2)ab}	54.00 ± 10.56	48.00 ± 14.25 ^{ab}	24.40 ± 21.91 ^{ab}	0.74 ± 0.37 ^{b)}
	0.5	82.20 ± 21.14 ^{ab}	47.00 ± 7.21	52.00 ± 10.44 ^{ab}	20.80 ± 21.94 ^{b)}	0.61 ± 0.42 ^{b)}
	1.5	68.60 ± 23.18 ^{b)}	43.33 ± 4.55	40.00 ± 15.38 ^{b)}	18.24 ± 7.39 ^{b)}	0.67 ± 0.19 ^{b)}
Ovariectomy	0.1	97.42 ± 18.14 ^{ab}	58.67 ± 18.13	39.00 ± 13.30 ^{b)}	46.68 ± 18.53 ^{a)}	1.68 ± 0.91 ^{a)}
	0.5	99.00 ± 26.93 ^{ab}	58.00 ± 18.75	46.40 ± 17.11 ^{ab}	41.00 ± 16.36 ^{ab}	1.23 ± 0.57 ^{ab}
	1.5	102.17 ± 20.45 ^{a)}	47.83 ± 12.32	65.83 ± 25.84 ^{a)}	26.77 ± 16.42 ^{ab}	0.67 ± 0.44 ^{b)}
Operation	$p < 0.05$ ³⁾	NS	NS	$p < 0.05$	$p < 0.05$	
Ca	NS	NS	NS	NS	NS	
Operation × Ca	NS	NS	$p < 0.05$	NS	NS	

1) Atherogenic index = (total cholesterol - HDL-cholesterol) / HDL-cholesterol
 2) Mean ± standard deviation
 3) Not significant

Table 4. Hepatic lipid profiles of the experimental groups

Groups	Liver weight (g)	Total lipid (g/g)	Total cholesterol (mg/g)	Triglyceride (mg/g)	
Ca (%)					
Sham operation	0.1	4.14 ± 0.25 ^{1)c2)}	0.32 ± 0.14	11.69 ± 2.55	115.91 ± 23.16 ^{ab}
	0.5	4.40 ± 0.40 ^{bc}	0.31 ± 0.02	9.63 ± 1.36	41.88 ± 5.74 ^{c)}
	1.5	4.91 ± 0.54 ^{ab}	0.34 ± 0.19	11.45 ± 3.03	77.93 ± 40.31 ^{bc}
Ovariectomy	0.1	5.23 ± 0.68 ^{a)}	0.54 ± 0.31	9.82 ± 1.43	49.50 ± 15.25 ^{c)}
	0.5	5.02 ± 0.29 ^{ab}	0.37 ± 0.10	10.89 ± 2.18	85.97 ± 34.06 ^{bc}
	1.5	5.04 ± 0.63 ^{ab}	0.35 ± 0.31	12.25 ± 2.33	144.90 ± 51.46 ^{a)}
Operation	$p < 0.01$	NS ³⁾	NS	NS	
Ca	NS	NS	NS	$p < 0.05$	
Operation × Ca	NS	NS	NS	$p < 0.001$	

1) Mean ± standard deviation
 2) Values with different superscripts within a column are significantly different at $\alpha = 0.05$ by Duncan's multiple range test
 3) Not significant

Table 5. Glutathione content and antioxidative enzyme activities in hepatic cytosol of the experimental groups

Groups	Ca (%)	GSH ($\mu\text{g/mL}$)	GST (mU/mg protein/min)	GSH-Px (nmol/NADPH oxidized/min)	Catalase (mU/mg protein)
Sham operation	0.1	340.00 \pm 11.03 ¹⁾	0.07 \pm 0.01 ^{a2)}	12.03 \pm 0.83 ^{ab}	272.41 \pm 22.35 ^a
	0.5	315.90 \pm 35.04	0.05 \pm 0.01 ^b	8.96 \pm 1.25 ^c	192.70 \pm 37.86 ^c
	1.5	347.91 \pm 31.24	0.02 \pm 0.01 ^c	10.76 \pm 0.64 ^b	211.30 \pm 22.04 ^{bc}
Ovariectomy	0.1	353.08 \pm 34.66	0.06 \pm 0.01 ^a	12.78 \pm 1.11 ^a	272.02 \pm 33.89 ^a
	0.5	325.38 \pm 13.09	0.04 \pm 0.01 ^b	11.38 \pm 0.93 ^b	251.37 \pm 40.98 ^{ab}
	1.5	316.28 \pm 21.02	0.02 \pm 0.01 ^c	9.16 \pm 0.73 ^c	201.20 \pm 23.15 ^c
Operation		NS ³⁾	p < 0.05	NS	NS
Ca		NS	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001
Operation \times Ca		NS	NS	p < 0.001	p < 0.05

- 1) Mean \pm standard deviation
- 2) Values with different superscripts within a column are significantly different at $\alpha = 0.05$ by Duncan's multiple range test
- 3) Not significant

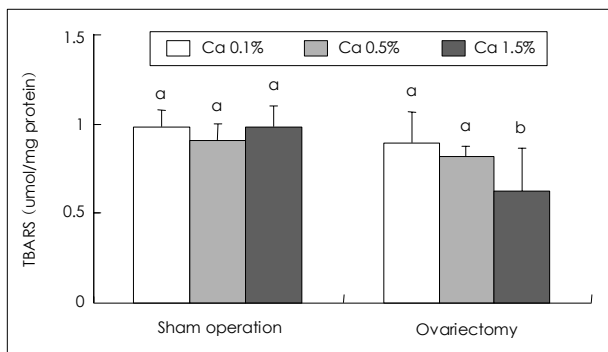


Fig. 1. Effect of calcium supplementation on hepatic lipid peroxidation in ovariectomized rats. Different alphabets in bars are significantly different at $\alpha = 0.05$ by Duncan's multiple range test.

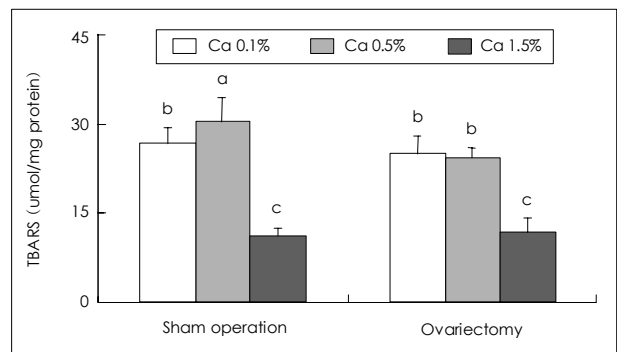


Fig. 2. Effect of calcium supplementation on hepatic lipid peroxidation induced by AAPH in ovariectomized rats. Different alphabets in bars are significantly different at $\alpha = 0.05$ by Duncan's multiple range test.

은 칼슘 섭취수준 증가에 따라 감소하였으며 특히, 고칼슘군이 저칼슘군이나 적정군보다 유의하게 낮았다 ($p < 0.05$).

고 찰

체중증가량, 사료섭취량 및 사료효율

사육 전 체중과 난소절제 전 4주간의 체중증가량은 각 군간 유의한 차이가 없었으나 난소절제 후 체중증가량과 사료섭취량, 사료효율은 난소절제군이 Sham군보다 유의하게 높았다. Kalu 등³³⁾은 난소절제 후 체중증가량과 사료섭취량의 변화를 살펴보았을 때 난소절제시 과식하여 체중이 증가하였다고 보고하였으며, 난소절제로 인한 에스트로겐 분비 저하는 식이섭취량 변화 없이 체중증가 자체를 유도한다는 보고^{36,37)}도 있다. 본 연구에서는 성장기의 6주령 쥐를 4주간 사육하였을 때 군별 차이 없이 주별 16~18 g의 급격한 체중증가를 보이다가 성장이 완만해지는 10주령이 되는 4주 이후에 Sham군은 주별 4 g 정도의 체중증가를 보인 반면, 난소절제군은 12 g의 큰 체중증가를

보였다. 또한 사료섭취량도 난소절제군에서 유의하게 높은 결과를 보여 난소절제로 인한 식이섭취 증가와 에스트로겐 분비 감소로 인한 체지방의 축적으로 인하여 체중이 증가한 것으로 보인다.

칼슘의 섭취수준이 식이섭취량, 체중증가량 및 식이효율에 미치는 영향은 많은 이견을 보이고 있지만, 저칼슘 섭취는 체중감소를 초래하고, 칼슘 보충은 식이섭취량 증가에 따라 체중증가를 초래한다고 보고하고 있다.³⁸⁾ 본 연구에서는 칼슘 섭취가 증가하면서 식이섭취가 유의적으로 증가하였고 체중은 Sham군에서는 유의적인 수준은 아니었으나 칼슘 섭취수준에 따라 증가하는 경향을 보였고, 난소절제군에서는 저칼슘군에 비하여 정상과 고칼슘군이 유의적으로 높게 나타났다. 이와 같이 칼슘 부족에 따른 체중감소 현상은 난소절제군에서 더 뚜렷히 나타났다.

혈청과 간의 지질패턴

여성은 폐경 후 관상동맥질환 발병율이 증가하는데, 이는 혈중 지질 농도의 변화를 초래하는 에스트로겐으로부터 기

인하는 것으로 알려져 있다.³⁹⁾ 에스트로겐의 감소는 총콜레스테롤, 중성지질, LDL-콜레스테롤을 증가시키고 HDL-콜레스테롤을 감소시킴으로써 심혈관질환을 증가시키는 것으로 보고되었다.⁴⁰⁾ 본 연구에서도 난소 절제군이 Sham군보다 총콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤 함량이 높고, 그에 따른 동맥경화지수가 높아 폐경에 따른 혈중 지질 상승을 확인할 수 있었다.

칼슘 섭취수준이 혈중 지질수준에 미치는 영향에 대한 연구에서 Reid 등⁴¹⁾은 폐경기 여성을 대상으로 1년간 칼슘 1,000 mg을 매일 섭취시켰을 때 HDL 콜레스테롤이 증가하였다고 하며, Jacqmain 등⁴²⁾은 Quebec인 중 많은 양의 칼슘을 섭취한 그룹에서 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤이 유의하게 낮았다고 보고하였다. Lee와 Shin⁴³⁾은 흰쥐를 대상으로 고지방식과 함께 고수준의 칼슘을 섭취시켰을 때 유의적으로 혈청 총 지질, 총 콜레스테롤이 감소하였다고 하며, 이와 같은 칼슘의 혈청 지질 감소 효과는 소화관에서 칼슘이 담즙산과 결합하여 담즙산을 배설시킴으로써 체내 콜레스테롤 pool 감소와 식이 지방의 흡수감소를 가져오기 때문인 것으로 설명하고 있다.⁴⁴⁾ 본 연구에서는 특히 HDL-콜레스테롤이 난소 절제군에서 칼슘 섭취수준이 증가할수록 높아 고칼슘군이 저칼슘군보다 유의하게 높았다. 이와 같은 결과는 난소절제 후 저칼슘식이로 3주간 사육한 다음 본 실험과 동일한 칼슘 수준으로 나눠 3주간 사육했을 때 칼슘 수준이 높을수록 혈청 HDL-콜레스테롤이 유의하게 높아 난소를 절제한 쥐에게 칼슘 공급은 혈청 지질 양상을 개선하여 심혈관계 질환을 줄일 수 있는 가능성을 시사한 Jang과 Chyun의 연구⁴⁵⁾와 일치하였다. 이와 같이 일부 사람과 본 연구를 포함한 동물실험에서 칼슘의 보충 섭취가 혈청의 LDL과 HDL-콜레스테롤의 변화시키는 것으로 나타나, 이에 대한 정확한 기전을 밝힐 수 있는 기전 연구가 요구된다.

칼슘 섭취의 증가는 소화관에서 지방산 및 담즙산과 결합하여 배설시킴으로써 식이 지방의 흡수를 막아 간으로 이동하는 지방량을 감소시키기 때문에 간의 지질 개선효과가 있는 것으로 보고되고 있다.^{46,47)} 본 연구에서 간의 총지질과 콜레스테롤 함량은 칼슘 섭취수준에 따라 유의한 차이가 없었으나 중성지질은 난소 절제를 하지 않은 경우 저칼슘군이 적정 칼슘군보다 유의하게 높았던 반면, 난소 절제군의 경우에는 고칼슘군이 적정 칼슘군보다 유의하게 높아 서로 다른 결과를 보였다. 이와 같은 결과는 Sham군의 경우 칼슘의 섭취 증가에 따른 지방의 간으로의 이동 감소의 효과가 잘 나타난 반면, 난소절제군의 경우 고 칼슘군의 식이 섭취량과 체중 증가가 뚜렷이 높아 칼슘섭취에 따른 효과가 희석되어졌을 가능성이 있는 것으로 생각된다. 또한 sham

군과 난소절제군에서 공통적으로는 적정 칼슘의 섭취가 바람직하다는 것을 제시하여 주는 결과라고도 생각되어진다. 한편 지질대사는 실험동물의 종이나 사육기간에 따라 달라질 수 있기 때문에 다양한 요소를 고려한 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것이다.

간의 항산화효소 활성

폐경 후 여성의 관상동맥성 질환의 발병율이 증가하는 것은 혈중 지질의 변화와 함께 LDL 산화가 중요한 인자로 알려져 있으며, 이와 같은 결과는 폐경 후 여성에게 호르몬 투여⁴⁸⁾나 식물성 에스트로겐이라 불리는 이소플라본을 투여했을 때^{19,49)} 혈액 중 지질함량이 개선되었으며 LDL 산화가 저하되었다는 연구를 통해 입증되었다. 본 연구에서도 난소 절제 시 간조직의 GST 활성이 감소하였는데, 이는 산화적 손상으로 발생한 지질과산화물과 GSH의 결합을 촉진시키는데 사용되어 낮아졌거나 궁극적으로 난소 절제로 인한 에스트로겐 생성 저하가 항산화능을 저하시킨 것으로 사료된다. 따라서 폐경 후 여성에서 혈중 지질 함량이나 항산화능을 개선할 수 있는 적극적인 대처나 이에 대한 연구가 요구된다.

세포내 칼슘의 증가는 세포막의 투과성을 증가시키고 세포골격체 변성을 일으키며 세포 손상을 유발하고 free radical과 염산산물들을 생성하여 손상을 연속적으로 진행시킨다는 보고도 있다.^{23,24)} 그러나, 식이 칼슘의 섭취수준에 따른 세포내 칼슘 농도의 변화에 대해서는 정확하게 규명되어 있지 않은 상태이다. 본 연구에서 칼슘의 섭취수준이 높을수록 항산화에 관여하는 GST, GSH-Px 및 catalase 활성이 감소하는 것으로 나타나 칼슘 섭취수준 증가에 따라 세포내 칼슘이 증가하고 그에 따른 효소활성 저하를 생각할 수 있으나 본 연구에서 간세포의 칼슘 농도를 측정하지 않았기 때문에 정확한 결론을 내리기 어려운 상태이다. 한편, 난소절제군의 경우 고칼슘군의 사료섭취량과 체중증가량이 높고 또한 간의 중성지질 함량이 다른 군에 비하여 유의적으로 증가되었다. 간의 지질 증가에 따라 지질의 과산화를 막기 위한 기전으로 항산화 효소들이 많이 소모되어짐으로써 이들의 활성이 감소하는 결과가 타났을 가능성도 있을 것으로 생각된다.

간의 지질과산화도 및 산화에 의한 감주성

본 연구에서는 칼슘 섭취수준 증가에 따른 항산화효소 활성의 저하가 산화물질의 생성량과 관련이 있는지를 살펴봄으로써 칼슘 섭취수준이 항산화에 미치는 영향을 보다 정확하게 설명하기 위해서 간조직의 지질과산화도를 살펴보았다. 이미 언급한 바와 같이 칼슘 섭취수준 증가에 따른 GST,

GSH-Px 및 catalase 활성 저하에도 불구하고 이러한 효소에 의존적인 항산화물질인 GSH의 농도는 유의한 차이가 없었으며 과산화물의 생성은 오히려 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 칼슘 섭취수준이 높을수록 본 연구에서 측정된 GST, GSH-Px 및 catalase 활성 이외에 다른 기전에 의해 지질과산화물이 감소하는 항산화효과가 있는 것으로 해석된다. 특히 관상동맥성 질환의 발병율이 증가하여 이에 대한 적극적인 관리가 요구되는 폐경 이후로 해석할 수 있는 난소절제군에서 이와 같은 효과가 뚜렷한 것으로 나타났다. 또한 AAPH 유도 산화된 상태에서는 난소 비절제와 절제군 모두 고칼슘군에서 지질과산화물의 생성이 유의하게 감소하여 보다 높은 산화상태에서는 고농도의 칼슘 섭취가 지질과산화물 생성에 대한 억제효과를 더욱 크게 갖는 것으로 보여진다.

생체 내 과산화물 생성의 원인이 여러 가지 독성화합물과 약물에 의한 간 손상 때문이라는 학설이 인정되고 이러한 것들은 세포내 산화 스트레스, 즉 free radical 생성 증가 및 항산화 효과의 감소에 의한 것으로 보고되고 있다.⁵⁰⁾ 특히 지질은 Fe²⁺ 등과 같은 금속이온의 존재 하에서 peroxy radical 또는 alkoxy radical로 산화 또는 환원되는 과정에서 지질과산화물을 증가시키는 요인으로 지적되고 있다.⁵⁰⁾ 본 연구에서는 칼슘섭취수준이 높을수록 지질과산화물 생성이 감소하여 항산화효과가 있는 것으로 나타났다. 그러나 이에 대한 기전을 설명하기 위해서는 보다 다양한 항산화 효소 활성을 측정하고 칼슘 섭취에 따른 세포내 칼슘 농도를 변화를 관찰하는 생체외 실험 등 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

요 약

난소절제 흰쥐에 있어 칼슘의 섭취수준이 혈중 지질패턴과 항산화체계에 미치는 영향을 살펴보고자 6주령의 암컷 흰쥐를 저 (0.1%), 적정 (0.5%), 고 (1.5%)의 칼슘 섭취수준에 따라 4주간 사육하고 난소절제 후 다시 8주간 사육한 후 혈청과 간장의 지질패턴, 간장의 항산화효소 활성 및 지질과산화물 생성과 산화에 의한 감주성을 비교, 분석한 결과는 다음과 같다. 난소 절제 전 4주간의 체중증가량은 각 군간 유의한 차이가 없었으나 난소절제 후 체중증가량과 사료섭취량은 난소 절제군이 Sham군보다 유의하게 높았다 (각각 p < 0.001). 혈청 HDL-콜레스테롤은 난소절제군에서 고칼슘군이 저칼슘군보다 유의하게 높았으며 (p < 0.05), 간장의 중성지질은 Sham군의 경우 저칼슘군이 가장 높았던 반면 난소 절제군의 경우에는 고칼슘군이 유의하게

높았다 (p < 0.05). 간장의 GSH 함량은 난소절제와 칼슘의 섭취수준에 따른 각 군간 유의한 차이가 없었으나 GST, GSH-Px 및 catalase 활성은 칼슘 섭취가 높을수록 유의하게 낮았다 (p < 0.001). 간 조직의 과산화물의 생성정도도 난소절제군에서 칼슘 섭취수준이 높을수록 낮은 것으로 나타나 고칼슘군이 가장 낮았다 (p < 0.05). AAPH 유도 산화된 간조직의 지질과산화물의 생성은 칼슘 섭취수준 증가에 따라 유의하게 감소하였다 (p < 0.05).

이상의 연구결과를 종합할 때 난소절제한 흰쥐에서 적정 수준의 3배의 칼슘섭취는 혈청 HDL-콜레스테롤을 증가시키고 간조직의 과산화물의 생성을 저하시켜 부분적인 지질개선과 항산화효과가 있는 것으로 보여진다.

Literature cited

- 1) National Statistical Office. Death and death rate by Causes; 2006
- 2) Cardiovascular disease risk factors: new areas of research, World Health Organization, Geneva; 1994
- 3) Williams SR. 1993. Diseases of heart, blood vessels and lungs. In: Nutrition and diet therapy. Mosby-Year Book Inc; 1993. p. 616-620
- 4) Lee YS, Koh JS. Effects of dietary soy protein and calcium on blood and tissue lipids in rats fed fat-enriched diet. *Korean J Nutr* 1994; 27(1): 3-11
- 5) Bae YJ, Kim MH, Sung CJ. The effects of Ca and Mg supplementation on serum and liver lipid parameters in ovariectomized rats. *Korean J Nutr* 2007; 40(7): 616-623
- 6) Choi MK, Kang MH. Effects of boron supplementation on lipid profiles and antioxidant capacities in the ovariectomized rats. *Korean J Nutr* 2005; 38(9): 698-705
- 7) Vaskonen T. Dietary minerals and modification of cardiovascular risk factors. *J Nutr Biochem* 2003; 14(9): 492-506
- 8) Govers MJ, Van der Meet R. Effects of dietary calcium and phosphate on the intestinal interactions between calcium, phosphate, fatty acids, and bile acids. *Gut* 1993; 34(3): 365-370
- 9) Appleton GV, Owen RW, Williamson RC. The effect of dietary calcium supplementation on intestinal lipid metabolism. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 42(3-4): 383-387
- 10) Newmark HL, Wargovich MJ, Bruce WR. Colon cancer and dietary fat, phosphate, and calcium: a hypothesis. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72(6): 1323-1325
- 11) Lee YS, Koh JS, Jung KH, Kang HS. Effects of dietary calcium levels on lipid metabolism in rats fed high fat diet with or without supplemental cholesterol. *Korean J Rural Living Science* 1993; 4(2): 75-81
- 12) Choi MK. Effects of calcium intake on lipid contents and enzyme activity in rats of different ages. *J East Asian Soc Dietary Life* 1998; 8(1): 9-19
- 13) Schroeder HA. Relation between mortality from cardiovascular disease and treated water supplies: variations in states and 163 largest municipalities of the United States. *J Am Med Assoc*

- 1960; 172: 1902-1908
- 14) Ministry of Health & Welfare. Report on 2005 national health and nutrition examination survey- Nutrition survey, Seoul: 2006
 - 15) Qiao X, McConnell KR, Khalil RA. Sex steroids and vascular responses in hypertension and aging. *Gen Med* 2008; 5(SA): S46-64
 - 16) Kannel WB. Metabolic risk factors for coronary heart disease in women: perspective from the Framingham Study. *Am Heart J* 1987; 114(2): 413-419
 - 17) Preuss HG. Nutrition and diseases of women: cardiovascular disorders. *J Am Coll Nutr* 1993; 12(4): 417-425
 - 18) Ministry of Health & Welfare. The third Korea health and nutrition survey (KNHANES III), 2005-summary, Seoul: 2006
 - 19) Kim DY, Jung SH, Lee JH, Park JY, Yoon S, Yang JY, Kang HS, Ann ES. Effects of a combined treatment of isoflavone diet and aerobic exercise on blood lipids profiles, nitric oxide, and paraoxonase in ovariectomized rats. *Korean J Exercise Nutrition* 2004; 8: 355-360
 - 20) Kim WY, Kim MH. The change of lipid metabolism and immune function caused by antioxidant material in the hypercholesterolemic elderly women in Korea. *Korean J Nutr* 2005; 38: 67-75
 - 21) Mirabelli F, Salis A, Vairetti M, Bellomo G, Thor H, Orrenius S. Cytoskeletal alterations in human platelets exposed to oxidative stress are mediated by oxidative and Ca²⁺ dependent mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 1989; 270(2): 478-488
 - 22) Exton JH. Signaling through phosphatidyl choline breakdown. *J Biol Chem* 1990; 265(1): 1-4
 - 23) Kramer HJ, Meyer-Lehnert H, Mohaupt M. Role of calcium in the progression of renal disease: Experimental evidence. *Kidney Int* 1992; 36: S2-S7
 - 24) Bellomo G, Fulceri R, Albano E, Gamberucci A, Pompella A. Ca²⁺ dependent and independent mitochondrial damage in hepatocellular injury. *Cell Calcium* 1991; 12: 335-341
 - 25) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1991; 123: 1939-1951
 - 26) Friedwald WT, Levy RT, Fridrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without the use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502
 - 27) Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226: 497-509
 - 28) Simons SS, Johnson DF. Reaction of O-phthalaldehyde and thiols with primary amines: Fluorescences properties of 1-alkyl (and aryl) rho-2-alkylisoindoles. *Ann Biochem* 1978; 90: 705-725
 - 29) Johansson LH, Borg LA. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem* 1988; 174: 331-336
 - 30) Flohe L. Determination of glutathione peroxidase. CRC Handbook of free radicals and oxidations in biomedicine, CRC press; 1992. p.281-286
 - 31) Habig WH, Pabst MP, Jakoby WB. Glutathione S-transferase. *J Biol Chem* 1974; 249: 7130-7139
 - 32) Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 1978; 52: 302-306
 - 33) Winster AL, Minchin FR. Modification of the Lowry assay to measure proteins and phenols in covalently bound complexes. *Anal Biochem* 2005; 346: 43-48
 - 34) Kang MH, Katsuzaki H, Osawa T. Inhibition of 2, 2'-azobis (2, 4-dimethylvaleronitrile) -induced lipid peroxidation by sesaminols. *Lipids* 1998; 33: 1031-1036
 - 35) Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, Hollis BW. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology* 1989; 124: 7-16
 - 36) Lee YS, Kim EM. Effect of ovariectomy and calcium intake on femur and lumbar compositions and bone related factors in adult rats. *Korean J Nutr* 2001; 34: 532-540
 - 37) OLoughlin PD, Morris HA. Oophorectomy acutely increases calcium excretion in adult rats. *J Nutr* 2003; 133: 2277-2280
 - 38) Vipperman PE Jr, Preston RL, Kintner LD, Pfander WH. Role of calcium in the nutritional etiology of a metabolic disorder in ruminants fed a high grain ration. *J Nutr* 1969; 97(4): 449-462
 - 39) Barrett-Connor E, Bush TL. Estrogen and coronary heart disease in women. *J Am Med Assoc* 1991; 265: 1861-1867
 - 40) Haddock BL, Hopp HP, Mason JJ, Blix G. The effect of hormone replacement therapy and exercise on cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women. *Sports Medicine* 2000; 29: 39-49
 - 41) Reid IR, Mason B, Horne A, Ames R, Clearwater J, Bava U, Orr-Walker B, Wu F, Evans MC, Gamble GD. Effects of calcium supplementation on serum lipids concentrations in normal older women: a randomized controlled trial. *Am J Med* 2002; 112(5): 343-347
 - 42) Jacqmain M, Doucet E, Despres JP, Bouchard C, Tremblay A. Calcium intake, body composition, and lipoprotein-lipid concentrations in adults. *Am J Clin Nutr* 2003; 77(6): 1448-1452
 - 43) Lee YS, Shin DM. Effect of dietary calcium and sodium level on lipid metabolism in hyperlipidemic/hypercholesterolemic rats. *Korean J Nutr* 2000; 33(4): 403-410
 - 44) Denke MA, Fox MM, Schulte MC. Short-term dietary calcium fortification increases fecal saturated fat content and reduces serum lipids in men. *J Nutr* 1993; 123(6): 1047-1053
 - 45) Jang SE, Chyun JH. Effects of dietary calcium level and Hijikia fusiforme supplementation on bone indices and serum lipid levels in ovariectomized rats. *Korean J Nutr* 2007; 40(5): 419-427
 - 46) Lee YS, Shin DM. Effect of dietary calcium and sodium level on lipid metabolism in hyperlipidemic/hypercholesterolemic rats. *Korean J Nutr* 2000; 33(4): 403-410
 - 47) Denke MA, Fox MM, Schulte MC. Short-term dietary calcium fortification increases fecal saturated fat content and reduces serum lipids in men. *J Nutr* 1993; 123(6): 1047-1053
 - 48) Min YK, Jang HC, Lee KW, Han IK, Kim CJ. The effect of hormone replacement therapy for 2 months on serum lipids and apolipoprotein (a) levels in postmenopausal women. *Korean J Intern Med* 1993; 44: 238-247
 - 49) Lee JM, Hong SJ, Lee MJ, Yoon S. The effects of isoflavone supplementation on serum PSA, lipid profile, antioxidant and immune system in prostate cancer patients. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2004; 33: 1294-1301
 - 50) Rulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing antioxidant power assay. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 3396-3402