

저 칼슘 및 수산을 첨가한 식이가 난소절제한 흰쥐에서 조직의 칼슘 침착과 골격대사에 미치는 영향*

이미린 · 박미나 · 문지영 · 이연숙[§]

서울대학교 식품영양학과 · 생활과학연구소

Effects of a Low Calcium Diet and Oxalate Intake on Calcium Deposits in Soft Tissues and Bone Metabolism in Ovariectomized Rats*

Lee, Mi-Rin · Park, Mi-Na · Mun, Ji-Young · Lee, Yeon-Sook[§]

Department of Food and Nutrition/Research Institute of Human Ecology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

ABSTRACT

It is controversial whether low calcium intake, commonly associated with osteoporosis, results in calcium accumulation in soft tissues. This study was conducted to investigate the effects of low calcium (Ca) and oxalate (ox) intake on soft-tissue Ca deposits and bone metabolism in ovariectomized (ovx) rats. Eight week old female Sprague-Dawley rats were ovariectomized and divided into four groups. The rats were fed experimental diets containing low (0.1%, w/w) or normal (0.5%, w/w) Ca with or without sodium oxalate (1%, w/w); Sham/NCa, Ovx/NCa, Ovx/LCa, Ovx/NCa-ox, Ovx/LCa-ox for 6 weeks. All ovx rats showed a remarkable increase in body and tissue weight, glutamic oxaloacetic transaminase, glutamic pyruvic transaminase, blood urea nitrogen, alkaline phosphatase, and decreases in weight, ash, and Ca contents, as well as bone breaking force compared to those in sham rats. Serum Ca concentration was not significantly affected by dietary Ca levels or ox intake. Kidney Ca, ox acid content, and microscopic Ca deposition increased remarkably in the Ovx/LCa-ox group compared to those in the other groups. Ca content in the spleen and aorta also increased significantly, but the weight contents, Ca, bone breaking force, and Ca and oxalic acid in feces decreased significantly in the Ovx/LCa-ox group. Serum parathyroid hormone levels were not significantly different among the groups. These results indicate that low Ca intake decreased bone mineral content and increased Ca deposits in soft tissues, which was aggravated by ox intake in ovx rats. Thus, high ox intake may result in a kidney disorder in patients with osteoporosis who eat a low Ca diet. (*Korean J Nutr* 2011; 44(2): 101 ~ 111)

KEY WORDS: soft tissue Ca deposit, Low Ca intake, oxalate intake, ovariectomy, calcification.

서 론

2009년 국민건강영양조사 결과에 따르면 우리나라 국민의 1일 평균 칼슘섭취량은 칼슘 권장섭취량의 70% 이하로서 모든 연령층에서 가장 부족한 영양소로 평가되고 있다.¹⁾ 칼슘 섭취 부족에 따른 대표적인 증상은 골다공증으로 알려져 있다. 칼슘은 성장기 최대 골질량 형성에 필수 영양소로 작

용하며, 최대 골질량은 골다공증 유발에 직접적인 영향을 미친다.²⁾ 또한, 칼슘 섭취 부족은 골다공증뿐만 아니라 여러 가지 만성질환과 관련하여 조직에 칼슘이 침착되는 문제가 최근 이슈화되고 있다. 즉, 여러 연구에 따르면 골다공증 환자에서 뼈 이외 조직인 혈관과 신장조직에 칼슘함량이 높게 평가되고 있고, 저 칼슘섭취에 따라 폐, 간, 뇌조직 등의 연조직에서도 칼슘함량 증가가 보고되고 있다.^{3,4)}

최근 임상 연구에서, 폐경 후 골다공증이나 노인성 골다공증 환자의 뼈 조직에서 칼슘이 용해되지만 혈중 칼슘 및 인은 정상수준을 유지하며, 체내의 칼슘균형을 조절하는 부갑상선 호르몬과 비타민 D의 혈중 농도 또한 뚜렷하게 변하지 않는다고 보고하였다.⁵⁾ 이러한 결과를 근거로, 뼈에서 용해된 칼슘의 행방에 대한 의문이 제기되었고, 뼈 이외의 조직 내에서 석회화 현상이 임상적 결과로 나타났다.²⁾ 조직 내

접수일: 2011년 1월 4일 / 수정일: 2011년 4월 5일
채택일: 2011년 4월 6일

*This research was supported by Basic Science Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology in 2010 (NRF-2010-0010246).

[§]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: lysook@snu.ac.kr

칼슘침착은 칼슘대사 이상뿐만 아니라 그 조직의 고유 기능 및 대사에 영향을 미친다.²⁾ 예를 들어, 칼슘침착이 비교적 잘 나타나는 신장조직의 경우 칼슘침착은 신장과 요도를 손상시키는 원인이 되며 신부전과 신우를 확장시키고, 요관의 흐름을 저해한다. 이러한 칼슘 섭취 부족에 따른 연조직의 칼슘 침착 현상은 칼슘 파라독스 (calcium paradox)라고 불린다.⁶⁾

골다공증 환자에서 나타나는 신장조직의 칼슘침착 원인으로 첫째, 에스트로겐 결핍과 저 칼슘식으로 저하된 체내 칼슘농도를 유지하기 위한 항상성 조절로 필요 이상의 칼슘이 뼈 속에서 혈액으로 용출되고 이 칼슘이 다시 뼈에 침착되거나 배설되는 것이 아니라 혈관이나 기타 조직의 세포로 단순 이동하여 칼슘침착과 세포의 사멸을 초래할 수 있다는 가설이 있다.⁵⁾ 둘째, 골다공증과 더불어 발생하는 연조직 내 조골세포 (osteoblast) 분화로 인한 골화 현상이 일어난다는 가설⁷⁾과 셋째, 수산과 같은 식이 성분 또는 체내 대사 물질이 뼈의 칼슘 용해를 가속화시키고 신장을 포함한 기타 연조직 내 칼슘 침착을 촉진한다는 가설⁸⁾이 있지만 아직 명확한 결론을 내리지 못하고 있는 실정이다. 특히, 신결석의 주요 화합물로서 수산칼슘이 알려지면서 수산 섭취는 신장 내 칼슘 침착과 밀접한 관련이 있을 것으로 예측된다.⁹⁾ 또한, 대사적으로 칼슘은 수산 흡수를 결정짓는 가장 중요한 요소로서 신결석을 형성함에 있어 수산 섭취의 독단적인 영향보다 칼슘의 섭취 수준에 따라 수산의 흡수율 및 배출량이 달라질 수 있다.¹⁰⁾

따라서, 본 연구는 난소절제술로 에스트로겐이 결핍된 성숙 흰쥐를 이용하여 식이칼슘 수준에 따른 골격대사와 연조직의 칼슘침착 정도를 비교하고자 하였다. 또한, 수산 섭취가 칼슘 섭취 수준에 따라 신장조직 내 칼슘침착에 어떠한 차이를 나타내는지 알아보려고 하였다.

연구 방법

실험 설계 및 실험동물

실험동물은 체중 약 180 g의 7주령 Sprague Dawley rats 중 암컷 흰쥐를 오리엔트바이오사 (Seongnam, Korea)로부터 구입하여 서울대학교 실험동물자원관리원 사육장에서 사육하였다. 실험동물의 구입과 사육의 전 과정은 서울대학교 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee; IACUC) 승인을 받고 규정에 따라 수행되었다. 실험동물을 일주일간 적응 시킨 후 8주령 (체중 200~205 g)일 때, 난소절제술과 sham수술을 실시하였다. 난소절제술은 난소를 절제한 다음날부터 실험 식이에 따라 4군

으로 나누어 각 군당 7마리씩 임의배치 시키고, 각각 정상칼슘 식이 (Normal Ca; Ovx/NCa), 저칼슘 식이 (Low Ca; Ovx/LCa), 정상칼슘과 수산 식이 (Normal Ca & sodium oxalate; Ovx/NCa-ox), 저칼슘과 수산 식이 (Low Ca & sodium oxalate; Ovx/LCa-ox)를 6주간 급여시켰다. Sham군은 난소적출 과정만 제외한 동일한 과정의 수술을 실시한 후, 정상칼슘 식이 (Sham/NCa)를 급여하여 정상대조군 (control)으로 했다. 6주 후에 모든 군의 동물들을 희생 시켰다.

실험식이와 3차 탈 이온수는 자유 급여법 (ad libitum)으로 급여하였다. 실험동물들은 한 마리씩 분리 사육하였으며 2일마다 일정한 시간에 체중과 식이섭취량을 측정하였다. 실험동물 사육실 환경은 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $66 \pm 5\%$ 로 유지하였고, 명암은 12시간 주기 (7 : 00~19 : 00)로 조절하였다.

실험 식이

실험 식이는 기본적으로 AIN-93M 정제식이 조성을 따랐다. 식이는 칼슘수준과 수산첨가 유무에 따라 4가지 종류의 식이를 만들어 매일 제공하였다. 칼슘 섭취 수준에 따라 정상칼슘군은 전체 식이량의 0.5% (w/w), 저칼슘군은 Kim 등과 Choi 등의 연구결과를 근거로 하여 0.1% (w/w)을 함유하도록 제조하였다.¹²⁾¹³⁾ 수산 섭취군은 David 등의 연구결과를 근거로 하여 수산나트륨 (sodium oxalate)을 수산 급원으로 사용하였다.¹⁴⁾ 수산나트륨은 신결석 모델 및 수산뇨를 측정하기 위한 동물실험 식이에서 가장 많이 이용되며 칼슘의 흡수율과 이용성을 연구하는데 보편적으로 이용되고 있다. 예비실험을 통해서 성장 및 생리기능에 영향을 주지 않고 독성반응이 나타나지 않은 1% (w/w)를 수산 첨가 수준으로 정하고 이를 칼슘수준 (저 or 정상)에 따라 제조하였다 (Table 1). 식이 중 비타민 급원으로는 AIN-93 vitamin mixture를 구입 (G-bio Co. Ltd., Gwacheon, Korea)하여 사용하였다. 무기질은 칼슘을 제외한 혼합물을 AIN-93M-MX 조성으로 대체하여 사용하였으며, 칼슘 급원으로 CaCO_3 를 사용하였다.

시료 수집

실험 최종일에 실험동물을 14시간 절식시킨 후 0.1% Zoletil (Virbac, Carros, France)을 체중 100 g당 0.04 mL씩 근육 내 주사하여 마취시킨 뒤 시료를 채취하였다. 혈액은 경동맥에서 채취하였으며, 4°C 에서 2~3시간 방치 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 혈청을 분리하였다. 이 혈청은 분석 전까지 -80°C 에서 냉동 보관하였다. 혈액 채취 후 간, 신장, 비장, 대동맥을 적출하여 장기에 부착되어 있

Table 1. Composition of the experimental diets

Diet composition (g/kg)	(g/kg diet)			
	NCa Ca 0.5%	LCa Ca 0.1%	NCa-ox Ca 0.5%	LCa-Ox Ca 0.1%
Cornstarch	608.20	618.20	598.19	608.19
Protein (casein)	140.00	140.00	140.00	140.00
Sucrose	100.00	100.00	100.00	100.00
Soybean oil	40.00	40.00	40.00	40.00
Fiber (α-cellulose)	50.00	50.00	50.00	50.00
Vit. mix (AIN-93) ¹⁾	10.00	10.00	10.00	10.00
Min. mix (Ca free) ²⁾	35.00	35.00	35.00	35.00
CaCO ₃	12.50	2.50	12.50	2.50
Sodium oxalate ³⁾	.	.	10.00	10.00
L-Cystine	1.80	1.80	1.80	1.80
Choline bitartrate	2.50	2.50	2.50	2.50
Tert-butylhydroquinone	0.01	0.01	0.01	0.01
	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0

1) AIN-93 vitamin mixture 2) AIN-93M mineral mixture (Ca free): Cornstarch was substituted for Ca in mineral mixture 3) 1% sodium oxalate (w/w diet): KAN S0800, Japan

는 지방이나 근육을 깨끗이 제거하고 생리식염수 (0.9% NaCl)에 조직을 잘 세척하여 여과지로 물기 제거한 후 생 조직의 무게를 측정하였다. 양쪽 대퇴골과 요추 (L2~L5)는 적출한 후 근육, 지방, 인대 등 부착물을 모두 제거한 다음, 무게를 측정하였다. 분변은 실험 종료 전 4일간 매일 일정한 시간에 총량을 수집하였으며, 이물질 제거한 뒤 중량을 재고 냉동 건조 (Freeze-drier, Labconco, Kansas, USA)하였다. 모든 시료는 분석 전까지 -80℃에서 냉동 보관하였다.

시료 분석

혈청 지표 분석

혈청 칼슘 및 alkaline phosphatase (ALP) 활성과 간 기능 지표 [glutamate oxalacetate transferase (GOT), glutamate pyruvate transferase (GPT)] 및 신장기능 지표 [blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cre), uric acid (UA)] 분석은 혈액 자동분석기 (fully automated dry chemistry system: SPOTCHEM, Daiichi Kagaku Co., Kyoto, Japan)를 이용하여 측정하였다. 혈청 인 농도는 몰리브덴 색소법의 원리¹⁵⁾를 이용한 효소시약 kit (BCS Inorganic Phosphorus kit, Bio Clinical System, Anyang, Korea)을 사용하여 650 nm에서 spectrophotometer (Beckman DU-530, Life Science UV/Vis, Fullerton, California, USA)로 비색 정량하였다. 혈청 에스트로겐의 측정은 단일클론성 항체¹⁶⁾를 이용한 rat estrogen (E) ELISA kit (Cusabio Biotech, Wuhan, China), 혈청 부갑상선 호르몬 (Parathyroid Hormone; PTH) 농도¹⁷⁾는 rat intact Parathyroid Hormone (PTH) ELISA Kit (Usen

life Science and Technology Co., MO, USA)을 이용하여 각각 microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 450 nm에서 측정하였다.

조직의 칼슘 함량 측정

장기조직 (간, 신장, 비장, 대동맥), 뼈 조직 (대퇴골, 요추골) 및 분의 회분과 무기질량을 측정하기 위해 일정량을 취하여 회화하였다. 즉, 550~600℃의 회화로에서 약 2시간 동안 회화시킨 다음, 식혀서 질산용액 (65% HNO₃)을 넣어 재차 회화과정을 거쳐 회분을 측정하였다. 회화된 회분은 6 N HCl에 용해한 후, 0.2% LaCl₃·H₂O로 희석하여 원자흡광계 (Atomic Absorption Spectrophotometer, 210 VGP, Buck Scientific, Inc., California, USA)를 이용하여 Ca를 422.7 nm에서 측정하였다.¹⁸⁾ 분석에 사용한 모든 초자기구는 10% HCl 용액에 12시간 이상 담갔다가 3차 증류수로 세척하여 건조시킨 후 사용하였다.

뼈의 강도 측정

대퇴골 파단력 (breaking force) 및 요추골의 굽힘강도 (flexural strength)는 materials-testing machine (Zwick Z010; Zwick GmbH, Ulm, Germany)을 이용하여 측정하였다.¹⁹⁾ 측정조건은 하중속도 1 mm/min, 지간거리는 13.89 mm으로 고정하여 뼈의 중심 부위에서 일정하게 측정하였다.

신장의 병리학적 검사

병리조직학적 검사를 위하여 오른쪽 신장을 10% 중성완충 포르말린에 3일간 충분히 고정시킨 다음, 일반적인 조직 처리 과정을 거쳐 파라핀 포매기 (Reichert-Jung)를 이용하

여 포매하였다. 포매한 조직을 마이크로톰으로 4 μm 로 박 절한 후 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 실시하여 광학현미경하에서 병리조직학적 변화를 관찰하였다.²⁰⁾ 광학 현미경 200배에서 결석 침착 정도에 따라 등급을 정하였다. 즉, 결석 침착 빈도에 따라 순차별로 3등분 하였는데 결석이 2~5개 관찰된 것을 약함 (mild)로, 6~8개를 보통 (moderate), 11~31개를 심함 (severe)으로 하여 구분하였다.

신장과 분의 수산함량 측정

왼쪽 신장 조직 일정량에 2 N HCl을 섞어 homogenizer (DAIHAN scientific Co., Ltd, Seoul, Korea)를 이용하여 균질화 한 후, 다시 2 N HCl을 넣어 waterbath (DAIHAN scientific Co., Ltd, Seoul, Korea) 60°C에서 30분 간 shaking 하였다. 시험관을 상온에서 식힌 다음 액을 여과지 (Whatman No. 41)를 이용하여 1차 여과시켰고 이 액을 0.45 μm membrane filter (Supor membrane low-protein-binding non-pyrogenic filter, PALL, Life Sciences)을 이용하여 HPLC로 분석하였다.²¹⁾ 분은 동결 건조한 후 균질화 한 분말을 일정량 취하여, 신장 조직의 전 처리와 동일한 방법으로 측정했다. 수산의 함량은 수산 표준시료 (oxalic acid dihydrate, SHOWA, Japan)의 retention time과 비교하여 총 함량을 구하였다. HPLC의 분석 조건은 0.01 N H₂SO₄를 용매로 하고, Aminex HPX-87H ion exclusion column을 이용하여 UV detector로 210 nm에서 측정하였다.²²⁾

통계분석

실험의 결과는 SPSS 17.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 통계처리 하였다. 모든 결과는 평균과 표준오차 (mean \pm SE)로 나타내었다. 실험군 간의 유의성은 ANOVA test 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검증하였으며 식이 칼슘 및 여러 측정치간의 상관관계는 Pearson's correlation coefficient를 이용하여

검증하였다.

결 과

체중증가량 및 식이섭취량

실험군의 체중 및 식이섭취량은 Table 2에서와 같다. 실험식이 급여 시작 시에 대조군 (Sham) 및 모든 난소절제군 (Ovx)의 체중은 평균 205 g으로 유의적 차이가 없었으나 체중증가량은 Sham군에 비해 Ovx군에서 유의적으로 높게 나타났다. Ovx군에서 식이 칼슘 수준에 의한 체중의 차이는 없었으나 저칼슘 섭취군에서 수산 첨가에 의해 체중이 유의적으로 감소했다. 식이 섭취량은 Sham군에 비해 Ovx군이 유의적으로 증가하였으나, Ovx군에서 칼슘 섭취 수준에 따른 유의적인 차이는 없었고 수산의 첨가로 인해 식이 섭취량이 감소하였다.

혈청 칼슘 및 인의 농도

혈청의 칼슘과 인의 농도는 Table 3에 제시하였다. 혈청 칼슘 농도는 실험군 간 유의적인 차이는 없었으나 혈청 인의 농도는 다른 군들에 비해 Ovx/LCa-ox군이 유의적으로 높게 나타났다.

혈액의 생화학 지표 및 호르몬 농도

간 기능 지표 (GOT, GPT)와 신장기능 지표 (BUN, Cre, UA)의 함량, 혈청 ALP 활성, 혈청 에스트로겐 및 PTH 농도를 Table 3에 제시하였다. 혈액의 생화학 지표는 Sham군에 비해 Ovx군에서 증가하였고, Ovx군에서 정상칼슘 섭취군보다 저칼슘 섭취군에서 증가하였다. 특히, Ovx/LCa-ox군은 Sham군에 비해 모든 생화학 지표가 유의적으로 증가하였고 Ovx/NCa군과 Ovx/NCa-ox군보다 GOT, GPT, BUN, UA함량 및 혈청 ALP활성이 유의적으로 증가하였다. 혈청 에스트로겐 농도는 Sham군에 비해 Ovx군이 유의적으로 낮았고 Ovx군 간의 차이는 없었으나 정상 칼슘 섭취군에 비해 저 칼슘 섭취군이 증가하는 경향을 보였다. 혈 중

Table 2. Body weight, weight gain and food intake of the rats fed experimental diets

Group	Initial weight (g)	Final weight (g)	Weight gain (g/day)	Food intake (g/day)
Sham/NCa	203.1 \pm 8.6 ^{1)NS2)}	274.8 \pm 7.1 ³⁾	1.5 \pm 0.2 ^c	16.6 \pm 0.4 ^a
Ovx/NCa	205.6 \pm 4.4	336.6 \pm 9.6 ^c	2.5 \pm 0.2 ^{bc}	20.0 \pm 0.7 ^c
Ovx/NCa-ox	204.9 \pm 2.9	331.3 \pm 9.1 ^{bc}	2.7 \pm 0.2 ^c	18.9 \pm 0.6 ^{bc}
Ovx/LCa	206.0 \pm 1.9	349.4 \pm 3.2 ^c	2.9 \pm 0.1 ^c	20.8 \pm 1.1 ^c
Ovx/LCa-ox	205.0 \pm 2.9	307.9 \pm 10.1 ^b	2.1 \pm 0.2 ^b	17.7 \pm 0.4 ^{ab}

1) Values are mean \pm SE of 7 rats per group 2) NS: not significantly different among groups 3) Values with the different letters in the same column are significantly different at ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test

Sham/NCa: Sham operation and normal Ca diet (0.5%), Ovx/NCa: ovariectomy operation and normal Ca diet (0.5%), Ovx/NCa-ox: ovariectomy operation and normal Ca (0.5%) with sodium oxalate (1%) diet, Ovx/LCa: ovariectomy operation and low Ca diet (0.1%), Ovx/LCa-ox: ovariectomy operation and low Ca (0.1%) with sodium oxalate (1%) diet

Table 3. Mineral concentrations, biochemical index and hormone in serum of the rats fed experimental diets

Group	Mineral concentrations				Biochemical index					Hormone	
	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)	BUN (mg/dL)	Cre (mg/dL)	UA (mg/dL)	ALP (IU/L)	Estrogen (pg/mL)	PTH (pg/mL)	
Sham/NCa	11.7 ± 0.1 ^{NS(1/2)}	7.3 ± 0.1 ^{NS(3)}	81.1 ± 4.0 ^a	24.8 ± 1.7 ^a	11.8 ± 1.0 ^a	1.0 ± 0.1 ^a	1.8 ± 0.1 ^a	141.7 ± 13.6 ^a	414.4 ± 38.3 ^b	11.3 ± 0.2 ^{NS}	
Ovx/NCa	11.7 ± 0.1	7.6 ± 0.2 ^a	94.3 ± 2.7 ^{ab}	26.1 ± 1.9 ^a	12.8 ± 0.8 ^a	1.1 ± 0.1 ^{ab}	1.9 ± 0.1 ^a	189.6 ± 6.7 ^b	299.1 ± 4.7 ^b	11.6 ± 0.2	
Ovx/NCa-ox	11.7 ± 0.1	7.5 ± 0.2 ^a	96.1 ± 3.8 ^{ab}	21.3 ± 0.6 ^b	14.7 ± 0.4 ^b	1.0 ± 0.1 ^{ab}	1.9 ± 0.1 ^a	214.1 ± 17.6 ^b	285.3 ± 26.5 ^b	11.2 ± 0.2	
Ovx/LCa	11.3 ± 0.1	7.2 ± 0.2 ^a	105.7 ± 5.6 ^{bc}	27.4 ± 3.2 ^a	15.0 ± 0.8 ^a	1.1 ± 0.1 ^{ab}	2.2 ± 0.1 ^b	196.5 ± 15.8 ^b	335.9 ± 32.6 ^c	11.5 ± 0.2	
Ovx/LCa-ox	11.4 ± 0.2	8.3 ± 0.3 ^b	117.8 ± 6.5 ^c	37.0 ± 3.1 ^b	24.9 ± 2.9 ^b	1.2 ± 0.1 ^b	2.1 ± 0.1 ^b	319.6 ± 17.0 ^c	332.5 ± 9.7 ^b	11.1 ± 0.1	

1) Values are mean ± SE of 7 rats per group 2) NS: not significantly different among groups 3) Values with the different letters in the same column are significantly different at (p < 0.05) by Duncan's multiple range test

Sham/NCa: Sham operation and normal Ca diet (0.5%), Ovx/NCa: ovariectomy operation and normal Ca diet (0.5%), Ovx/NCa-ox: ovariectomy operation and normal Ca (0.5%) with sodium oxalate (1%) diet, Ovx/LCa: ovariectomy operation and low Ca diet (0.1%), Ovx/LCa-ox: ovariectomy operation and low Ca (0.1%) with sodium oxalate (1%) diet, GOT: glutamate oxalacetate transferase, GPT: glutamate pyruvate transferase, BUN: blood urea nitrogen, Cre: creatinine, UA: uric acid, ALP: alkaline phosphatase, PTH: parathyroid hormone

PTH 농도는 실험 군간 유의적인 차이가 없었다.

뼈 무기질 함량과 골격대사

대퇴골과 요추골 (L2~L5)의 중량, 칼슘함량 및 강도를 Table 4에 제시하였다. 체중 100 g 당 대퇴골 및 요추골의 중량과 회분량은 Sham군에 비해 Ovx군에서 감소하였고 Ovx/NCa군보다 Ovx/LCa군에서 감소하였다. 수산 섭취에 의해서도 유의적으로 감소하였는데 특히, Ovx/LCa-ox군은 Sham군에 비해 회분량이 대퇴골은 36%, 요추골은 50% 가량 감소하였다.

뼈의 칼슘 함량 및 대퇴골의 파단력 (breaking force)과 요추골의 굽힘 강도 (flexural strength)는 뼈의 중량과 비슷한 경향을 보여, Sham군에 비해 Ovx/LCa-ox군에서 대퇴골의 칼슘함량이 37%, 요추골은 65% 정도 유의적으로 감소하였다.

조직의 무게와 칼슘 및 수산 함량

간, 비장, 신장의 무게 및 칼슘 함량은 Table 5와 6에 제시하였다. 간의 체중 100 g 당 무게는 군간 유의적인 차이가 없었고 비장과 신장의 경우 다른 군에 비해 Ovx/LCa-ox군에서 유의적으로 증가하였다.

간을 제외한 대부분 조직의 칼슘함량은 Sham군보다 Ovx군에서 증가하는 경향을 보였다. 대동맥의 경우 Ovx/NCa군보다 Ovx/LCa군에서 칼슘함량이 유의적으로 증가하였다. 비장과 신장의 칼슘함량은 정상 칼슘보다 저 칼슘과 수산섭취에 의해 증가하였고 특히, 다른 군에 비해 Ovx/LCa-ox군에서 유의적으로 증가했다. 신장의 총 수산함량 (total oxalic acid)을 측정된 결과 Ovx/LCa-ox군에서만 1.71 µg/g 검출되었다 (Table 6).

신장의 병리조직학적 검사

신장조직의 칼슘침착을 광학현미경으로 관찰한 결과를 Fig. 1과 Table 7에 제시하였다. Sham군을 제외한 Ovx군에서 다양한 석회침착이 관찰되었으며, 석회침착 빈도 및 정도가 실험 군별로 차이를 나타냈다. 모든 군에서 조직 내 석회화된 빈도에 따라 등급을 구분한 결과 정상칼슘 섭취군은 대부분 석회침착이 없었고, Ovx/NCa군의 30%는 mild한 수준을, Ovx/NCa-ox군의 30%는 moderate한 수준의 석회화를 나타냈다. 그러나 저칼슘 섭취군은 대부분 석회침착이 나타났고 40% 이상이 moderate한 수준이었다. 특히, Ovx/LCa-ox군은 모든 개체에서 석회침착이 나타났으며 이군의 72% 가량이 severe한 수준이었다.

분 중 칼슘 및 수산 배설량

분 중 칼슘 및 수산 배설량을 Table 8에 제시하였다. 칼슘

배설량은 Sham군에 비해 Ovx군 중 정상칼슘 섭취군에서 유의적으로 증가하였으나, 저칼슘 섭취군에서 현저하게 감소하였다. 분 중 수산 배설량은 다른 군에 비해 수산 섭취군에서 유의적으로 증가하였으나, Ovx/NCa-ox군보다 Ovx/LCa-ox군에서 유의적으로 감소하였다.

조직의 무게와 칼슘대사의 상관관계

대퇴골과 신장의 무게, 신장과 동맥의 칼슘함량과 ALP의

상관관계를 Table 9에 제시하였다. 대퇴골의 무게와 신장 및 대동맥의 칼슘함량은 각각 음의 상관관계 ($r = -0.501$, $p < 0.05$; $r = -0.667$, $p < 0.05$)를 나타냈다. 신장의 무게와 칼슘함량은 양의 상관관계 ($r = 0.772$, $p < 0.01$)를 나타냈다. 혈청 ALP는 대퇴골의 무게와 음의 상관관계 ($r = -0.667$, $p < 0.01$)를 나타낸 반면, 신장의 무게, 신장 및 대동맥의 칼슘함량과 양의 상관관계 ($r = 0.551$, $p < 0.05$; $r = 0.883$,

Table 4. Weight, breaking force, ash and Ca contents in bone of the rats fed experimental diets

Group	Femur*				Lumbar†			
	Weight (mg/100 g B.W.)	Ash (mg/g wet wt)	Ca (mg/g wet wt)	Breaking force (kg)	Weight (mg/100 g B.W.)	Ash (mg/g wet wt)	Ca (mg/g wet wt)	Flexural strength (kg)
Sham/NCa	304.5 ± 1.8 ^{c1)2)}	441.0 ± 3.0 ^d	111.3 ± 0.8 ^d	12.6 ± 0.7 ^c	490.4 ± 15.0 ^c	300.1 ± 6.6 ^d	88.6 ± 2.9 ^c	19.1 ± 1.0 ^d
Ovx/NCa	259.3 ± 12.1 ^b	428.2 ± 4.2 ^d	104.1 ± 1.4 ^c	12.5 ± 0.3 ^c	415.3 ± 2.3 ^{ab}	275.5 ± 2.6 ^c	84.5 ± 1.1 ^c	15.6 ± 1.0 ^c
Ovx/NCa-ox	248.8 ± 4.4 ^b	410.3 ± 3.4 ^c	99.8 ± 1.3 ^c	11.1 ± 0.5 ^b	430.9 ± 8.3 ^b	247.5 ± 4.3 ^b	75.6 ± 1.1 ^b	13.2 ± 0.6 ^b
Ovx/LCa	243.1 ± 3.9 ^{ab}	394.7 ± 6.4 ^b	92.5 ± 2.3 ^b	11.1 ± 0.3 ^b	392.5 ± 9.5 ^a	239.7 ± 5.1 ^b	71.1 ± 2.5 ^b	12.8 ± 0.7 ^b
Ovx/LCa-ox	227.4 ± 5.0 ^a	282.8 ± 5.7 ^a	70.3 ± 2.1 ^a	6.1 ± 0.4 ^a	408.9 ± 10.2 ^{ab}	149.7 ± 2.2 ^a	46.1 ± 0.9 ^a	7.1 ± 0.2 ^a

1) Values are mean ± SE of 7 rats per group 2) Values with the different letters in the same column are significantly different at ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test

Sham/NCa: Sham operation and normal Ca diet (0.5%), Ovx/NCa: ovariectomy operation and normal Ca diet (0.5%), Ovx/NCa-ox: ovariectomy operation and normal Ca (0.5%) with sodium oxalate (1%) diet, Ovx/LCa: ovariectomy operation and low Ca diet (0.1%), Ovx/LCa-ox: ovariectomy operation and low Ca (0.1%) with sodium oxalate (1%) diet

*: Average values of femurs

†: Lumbar No.2-5

Table 5. Weight and Ca contents of liver, spleen and aorta in rats fed experimental diets

Group	Liver		Spleen		Aorta
	Wt (g/100 g B.W.)	Ca (ug/g wet wt)	Wt (g/100 g B.W.)	Ca (ug/g wet wt)	Ca (ug/g wet wt)
Sham/NCa	2.86 ± 0.07 ^{NS1)2)}	91.24 ± 8.62 ^{abc3)}	0.19 ± 0.01 ^a	80.92 ± 2.39 ^a	170.10 ± 21.81 ^a
Ovx/NCa	2.74 ± 0.23	105.15 ± 5.00 ^c	0.18 ± 0.01 ^a	79.17 ± 6.71 ^a	395.49 ± 36.19 ^b
Ovx/NCa-ox	2.48 ± 0.09	84.06 ± 3.91 ^{ab}	0.18 ± 0.01 ^a	84.85 ± 4.48 ^a	205.08 ± 30.94 ^a
Ovx/LCa	2.76 ± 0.12	78.35 ± 2.15 ^a	0.19 ± 0.01 ^a	82.51 ± 11.20 ^a	819.71 ± 11.31 ^d
Ovx/LCa-ox	2.58 ± 0.06	95.44 ± 5.58 ^{bc}	0.27 ± 0.02 ^b	119.46 ± 2.54 ^b	627.70 ± 57.89 ^c

1) Values are mean ± SE of 7 rats per group 2) NS: not significantly different among groups

3) Values with the different letters in the same column are significantly different at ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test

Sham/NCa: Sham operation and normal Ca diet (0.5%), Ovx/NCa: ovariectomy operation and normal Ca diet (0.5%), Ovx/NCa-ox: ovariectomy operation and normal Ca (0.5%) with sodium oxalate (1%) diet, Ovx/LCa: ovariectomy operation and low Ca diet (0.1%), Ovx/LCa-ox: ovariectomy operation and low Ca (0.1%) with sodium oxalate (1%) diet

Table 6. Weight, Ca and total oxalic acid contents of kidney in rats fed experimental diets

Group	Weight* (g/100 g B.W.)	Ca* (ug/g wet wt)	Total oxalic acid†	
			(ug)	(ug/g wet)
Sham/NCa	0.31 ± 0.01 ^{a1)2)}	49.23 ± 2.84 ^a	ND	ND
Ovx/NCa	0.27 ± 0.01 ^a	50.07 ± 2.68 ^a	ND	ND
Ovx/NCa-ox	0.27 ± 0.01 ^a	63.10 ± 3.22 ^a	ND	ND
Ovx/LCa	0.27 ± 0.00 ^a	50.23 ± 11.49 ^a	ND	ND
Ovx/LCa-ox	0.42 ± 0.03 ^b	3913.90 ± 386.00 ^b	2.06 ± 0.29 ^b	1.71 ± 0.18 ^b

1) Values are mean ± SE of 7 rats per group 2) Values with the different letters in the same column are significantly different at ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test

Sham/NCa: Sham operation and normal Ca diet (0.5%), Ovx/NCa: ovariectomy operation and normal Ca diet (0.5%), Ovx/NCa-ox: ovariectomy operation and normal Ca (0.5%) with sodium oxalate (1%) diet, Ovx/LCa: ovariectomy operation and low Ca diet (0.1%), Ovx/LCa-ox: ovariectomy operation and low Ca (0.1%) with sodium oxalate (1%) diet. ND: not detected

*: Average wet weight of kidneys

†: Left kidney

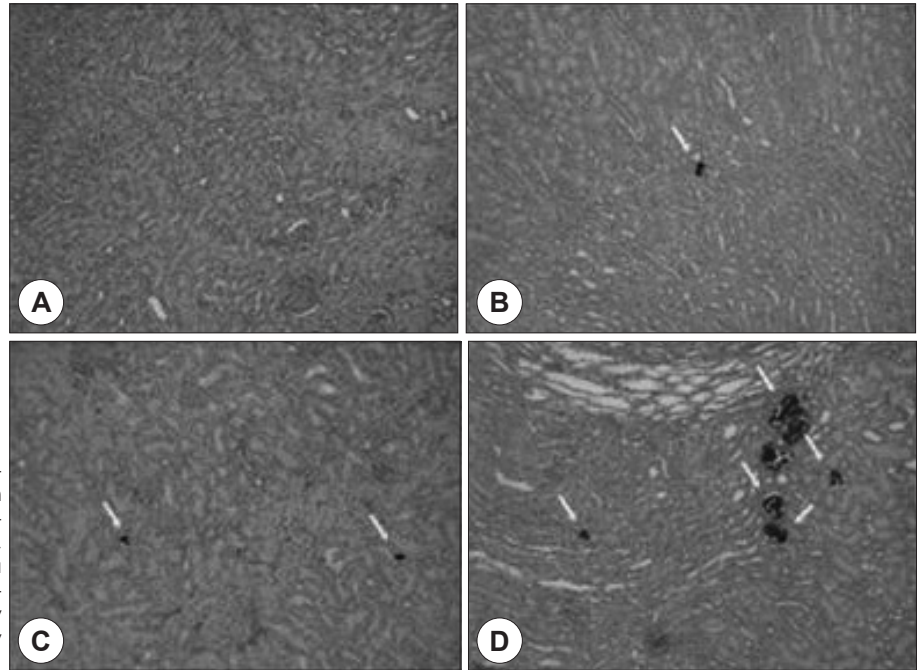


Fig. 1. Microscopic finding of calcium deposition in kidney of sham and ovariectomized rats fed experimental diets for 6 weeks H & E, $\times 200$ [A: None (control), B: Mild Ca deposits, C: Moderate Ca deposits, D: Severe Ca deposits], arrow represent mineralization in kidney tissue.

Table 7. Mineralization in kidney¹⁾ of ovariectomized rats fed experimental diets N (%)

Group	Ca depositions			
	None	Mild	Moderate	Severe
Sham/NCa (n = 6)	3 (50)	2 (33)	1 (17)	0 (0)
Ovx/NCa (n = 7)	3 (43)	2 (29)	1 (14)	1 (14)
Ovx/NCa-ox (n = 7)	3 (43)	1 (14)	2 (29)	1 (14)
Ovx/LCa (n = 7)	1 (14)	2 (29)	3 (43)	1 (14)
Ovx/LCa-ox (n = 7)	0 (0)	1 (14)	1 (14)	5 (72)

1) Right kidney

Sham/NCa: Sham operation and normal Ca diet (0.5%), Ovx/NCa: ovariectomy operation and normal Ca diet (0.5%), Ovx/NCa-ox: ovariectomy operation and normal Ca (0.5%) with sodium oxalate (1%) diet, Ovx/LCa: ovariectomy operation and low Ca diet (0.1%), Ovx/LCa-ox: ovariectomy operation and low Ca (0.1%) with sodium oxalate (1%) diet, Mineralization grade (count): None(0), Mild (2-5), Moderate (6-8), Severe (11-31)

$p < 0.05$; $r = 0.613$, $p < 0.05$)를 나타냈다.

고 찰

체중증가량 및 식이섭취량은 Sham군에 비해 Ovx군에서 유의적으로 증가하였다. 여러 연구에서 난소절제에 의한 체중 증가 현상을 보고한 바 있으며,^{23,24)} 이는 에스트로겐이 배아세포에서 지방세포의 분화를 억제하는 작용을 하는데 난소 절제에 에스트로겐이 결핍되면 지방세포의 분화를 활성화시켜 지방 조직의 축적을 증가시키는 것으로 예상된다. 또한, Kalu 등은 난소절제 한 후 에스트로겐과는 독립적으로 식이를 많이 섭취하기 때문에 체중이 증가한다고 보고하였다.²⁵⁾ 본 연구 결과, Ovx군은 난소절제에 따라 에스트로겐의 분비 감소로 인한 지방 축적과 함께 식이 섭취량도 유

의적으로 증가하여 체중이 증가하는 것으로 사료된다. 칼슘 섭취 수준이 체중증가량에 미치는 영향은 많은 이견이 보이고 있는데, 다수의 연구에서 저 칼슘 섭취에 따라 체중증가 현상을 보고하였으며,²⁶⁾ 이는 본 연구에서 Ovx군내의 정상 칼슘 섭취군보다 저 칼슘 섭취군의 체중증가가 유의적이진 않지만 증가하는 경향을 나타내어 유사한 결과를 나타냈다. 다만, Ovx/LCa-ox군의 체중증가량이 낮은 것은, 수산 첨가에 따른 식이 섭취량의 감소와 함께 저 칼슘과 수산올 함께 섭취함으로써 영양상태의 불균형이 초래되고 이에 따라 체내 생리기능이 유지되지 못했기 때문으로 생각된다. 이는 수산이 저 수준의 칼슘섭취를 할 때 대조군에 비해 체중이 유의적으로 감소하고²⁷⁾ 신장결석이 증가할수록 체중증가량이 감소한 연구결과와 유사하였다.

혈청 칼슘 농도는 Sham군에 비해 Ovx군이 감소하는 경

Table 8. Calcium and total oxalic acid excretions in feces of the rats fed experimental diets

Group	Ca (mg/day)	Total oxalic acid	
		(ug/day)	(ug/g dry)
Sham/NCa	53.60 ± 6.30 ^{c(12)}	0.04 ± 0.01 ^a	0.17 ± 0.05 ^a
Ovx/NCa	64.12 ± 3.33 ^d	0.03 ± 0.01 ^a	0.11 ± 0.01 ^a
Ovx/NCa-ox	71.03 ± 4.59 ^d	2.90 ± 0.14 ^c	8.96 ± 0.34 ^c
Ovx/LCa	2.03 ± 0.22 ^a	0.03 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.03 ^a
Ovx/LCa-ox	17.03 ± 1.56 ^b	1.75 ± 0.03 ^b	5.15 ± 0.18 ^b

1) Values are mean ± SE of 7 rats per group 2) Values with the different letters in the same column are significantly different at ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test

Sham/NCa: Sham operation and normal Ca diet (0.5%), Ovx/NCa: ovariectomy operation and normal Ca diet (0.5%), Ovx/NCa-ox: ovariectomy operation and normal Ca (0.5%) with sodium oxalate (1%) diet, Ovx/LCa: ovariectomy operation and low Ca diet (0.1%), Ovx/LCa-ox: ovariectomy operation and low Ca (0.1%) with sodium oxalate (1%) diet

Table 9. The relationships among several variables

	Femur wt	Kidney wt	Kidney Ca	Aorta Ca
Femur wt				
Kidney wt	-0.158			
Kidney Ca	-0.501*	0.772**		
Aorta Ca	-0.529*	0.144	0.428	
ALP	-0.667**	0.551*	0.883**	0.613*

Femur wt, Kidney wt (g/100 g B.W.), Kidney Ca ($\mu\text{g/g}$ wet wt), Aorta Ca ($\mu\text{g/g}$ wet wt), ALP (IU/L)

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ by Pearson's correlation coefficient
ALP: alkaline phosphatase

향을 나타냈으나 모두 정상범위 (7.2~13.0 mg/dL) 내에 있었고,²⁹⁾ 칼슘 섭취수준에 따른 유의적인 차이는 없었다. 다양한 연구에서 골다공증 모델 흰쥐에게 식이 칼슘수준을 달리하여 급여한 경우 혈청 칼슘농도가 차이 없음이 보고된 바 있으며,³⁰⁾³¹⁾ 이는 칼슘의 항상성이 부갑상선 호르몬 및 칼시토닌 등의 칼슘 대사 호르몬 분비에 의해서 조절되고 유지되기 때문이다. 혈중 인의 농도는 정상 수준 (3.1~11.0 mg/dL) 내에 포함되었으나¹¹⁾ 대부분의 Ovx군에서 Sham군보다 높은 경향을 보였는데 이는 다른 연구결과와 일치하였다.³²⁾³³⁾ 특히, Ovx/LCa-ox군의 농도가 유의적으로 증가한 것은 골손실로 인해 혈 중으로 유리된 인의 영향으로 생각된다.

대퇴골 및 요추골의 무게 (체중 100 g 당 무게) 및 칼슘함량은 Sham군에 비해 Ovx군에서 유의적으로 감소하였다. 난소절제로 인한 에스트로겐의 결핍이 간접적으로 파골세포 (osteoclast)의 기능을 조절하여 골 흡수를 증가시킨 것으로 생각된다.³⁴⁾ 대퇴골의 무게와 칼슘함량은 칼슘 섭취 수준에 영향을 받아 정상칼슘 섭취군보다 저칼슘 섭취군에서 유의적으로 감소하였고 특히, Ovx/LCa-ox군은 Sham군에 비해 대퇴골의 무게는 25%, 칼슘함량은 37% 감소하였는데 이것은 저 칼슘과 수산을 함께 섭취하면 칼슘의 체내 흡수를 방해하기 때문에 대퇴골의 용해가 증가하여 무게가 감소된 것으로 사료된다. 그러나 대퇴골과 달리 요추골의 무게는 칼슘 수준에 따라 군간 통계적 차이를 보이지 않았는

데 요추골은 에스트로겐의 결핍으로 인해 골 대사가 많이 변하지만, 칼슘 섭취 수준에는 크게 영향을 받지 않는다는 보고와 일치하였다.³⁵⁾ 골격대사 지표로서 혈청 PTH와 ALP를 측정된 결과 PTH는 실험군 간에 차이를 보이지 않았으나, 뼈 형성 지표인 혈청 ALP 활성은 Sham군에 비해 Ovx/LCa-ox군이 126% 증가하여 정상 수준 (14.7~ 217.3 IU/L) 보다 높게 나타났다.²¹⁾ ALP는 대퇴골의 무게와 음의 상관관계 ($r = -0.667$, $p < 0.01$)를 나타냈는데 (Table 10), 이는 골밀도가 감소할수록 유의적으로 ALP 활성이 증가함으로써 골격 및 칼슘 대사를 조절한다는 연구 결과와 일치하였다.³⁶⁾ 이런 결과로 부터, 에스트로겐이 결핍된 상태에서 저 칼슘 섭취는 골격 손실을 일으키고 수산의 첨가는 뼈의 용해를 가속화시켜 두 식이요인이 골격 대사에 부정적인 영향을 미치는 것으로 생각된다.

신장, 비장 조직 및 대동맥 조직의 칼슘함량은 칼슘 섭취 수준에 영향을 받아 저 칼슘 섭취 시 증가하는 경향을 보였다. 대동맥의 석회화가 칼슘과 인의 광범위한 침착현상과 관계가 있다는 전제에서 볼 때,³⁷⁾ 본 실험의 대동맥의 칼슘 함량과 대퇴골의 무게가 음의 상관관계 ($r = -0.529$, $p < 0.05$)를 가짐으로써 유사한 결과를 나타냈다 (Table 10). 신장과 비장의 경우, 다른 군에 비해 Ovx/LCa-ox군의 조직의 무게와 칼슘함량이 현저히 증가하였고 특히, 신장의 칼슘함량은 Sham군에 비해 80배 증가하여 조직의 칼슘 침착 가능성을 분명하게 제시했다. Itokawa 등³⁸⁾은 칼슘 섭취 수준에 따라 흰쥐의 신장 칼슘 함량을 관찰한 결과, 칼슘 결핍이 신장 칼슘 농도를 증가시킨다고 보고하였는데 이는 본 연구 결과와 일치하였다. 신장 칼슘함량의 상한선 (upper limit)이 1.0 mg/g wet wt임을 고려할 때,³⁹⁾ 본 연구 결과 Sham군은 0.05 mg/g wet wt로 정상범위 내에 있었으나 저 칼슘과 수산을 급여한 경우에는 정상 수준보다 높은 칼슘침착 (3.9 mg/g wet wt)을 나타냈다. 신장의 칼슘 함량은 대퇴골의 무게와 음의 상관관계 ($r = -0.501$, $p <$

0.05)를, 신장의 무게와 양의 상관관계 ($r=0.772$, $p<0.01$)를 보였다 (Table 10). 이런 결과로부터 저 칼슘 식이 또는 저 칼슘과 수산의 동시 섭취는 골 손실을 증가시키고, 이에 따라 혈중에 유리된 칼슘이 조직 내로 들어가 칼슘 침착을 일으키고 조직의 무게를 증가시킨 것으로 사료된다. 실험식이에 따른 석회화 정도를 알아보기 위해 신장 조직을 광학 현미경으로 관찰한 결과, 정상칼슘 섭취군에 비해 저칼슘 섭취군의 조직 한 절편에서 1~8개의 다양한 석회화가 나타났다. 특히 Ovx/LCa-ox군은 72%가 severe한 석회화 수준을 나타내며 동시에 칼슘 함량도 증가하였는데 이것은 저칼슘 식이로 인해 장에서 수산의 흡수가 증가되어 신장 조직 내 칼슘과 수산이 침착된 것으로 보인다. 또한, 이 군에서 신장 내 수산이 1.71 $\mu\text{g/g}$ 검출됨에 따라 저 칼슘식이에 수산섭취는 신석회를 유발시키는 중요 요인으로 사료된다. 신장의 수산칼슘 축적과 뇨의 수산 배출은 직접적인 관계에 있는데 Bernhard 등의 연구에 의하면, 가족력이 없고 칼슘 및 인 대사에 문제가 없는 건강한 14명의 남성 (22~44세)이 고 수산 식이 (2,220 mg/day)를 정상칼슘 (1,211 mg/day)과 고 칼슘 (3,858 mg/day)으로 섭취한 결과 뇨 량과 뇨 중 수산함량이 고 칼슘 수준일 때 유의적으로 감소하였다.⁴⁰⁾ 즉, 고 수산 식품을 섭취할 때 칼슘의 수준이 증가할수록 식이성 고수산뇨증 (hyperoxaluria)과 신장의 수산칼슘 결석을 감소시켰다. 이것은 본 실험에서, 수산을 저 칼슘과 함께 섭취 할 때 보다 정상 칼슘과 섭취 할 때 신장 내 수산의 함량이 감소한 결과와 유사하였다. 최근에 많은 연구에 의하면 골다공증, 동맥경화, 만성신부전증 등과 같은 특정 질환에 노출되면 연조직 세포가 칼슘을 축적하는 조골세포로 분화되어 석회화 병변을 보일 수 있다고 한다.^{41,42)} 또한, 칼슘 섭취 부족은 뼈에서 많은 양의 칼슘을 용해시키지만 이 칼슘은 연조직 세포의 정상적 대사과정에 이용되지 못하고, 동시에 체외로 배출이 제대로 이루어지지 않아 세포 내에 축적하는 것으로 생각된다. 본 실험의 결과 에스트로겐의 결핍과 동시에 저 칼슘 및 수산의 섭취는 뼈에서 파골세포 (osteoclast)의 분화를 촉진하여 칼슘 용해를 증가시키고, 유리된 칼슘이 연조직 내에 축적한 것으로 보인다. 또한 본 실험으로 확인되지 않았지만 연조직 내에서 세포가 비정상적으로 조골세포로 분화되어 골 형성과 같은 석회화 현상을 보인 것으로 예상된다.

간과 신장 기능 지표를 측정된 결과 Sham군에 비해 Ovx/LCa-ox군의 GOT 함량은 정상 범위 내에 있었지만 (59.0~173.8 IU/L) 45% 이상 증가하였고, GPT는 정상 수준 (19.6~94.2 IU/L)을 벗어나 간 기능 저하의 가능성을 제시하였다.⁴³⁾ 또한, 이 군에서 혈청 BUN은 정상 범위 내에 있었지

만 (11.6~25.6 mg/dL) Sham군보다 102% 증가하였고, creatinine은 18% 증가하여 정상 범위 (0.22~1.01 mg/dL)을 벗어났다.²⁴⁾ 정상 칼슘을 단독 섭취하거나 수산과 함께 섭취한 군의 간 및 신장 기능은 정상범위에 속했고 신장조직의 석회화가 심각하지 않음으로써 저 칼슘 또는 저 칼슘과 수산을 함께 섭취한 군과 다른 결과를 보였다. 위의 결과로 보아, 저 칼슘과 수산 섭취를 병행할 때 간 기능과 신장 기능을 저하시키는 것으로 사료된다.

본 중 칼슘 배설량은 Sham군에 비해 저 칼슘 섭취군에서 68~96% 정도 유의적으로 감소하였고 수산 배설량은 수산 섭취군에서 유의적으로 증가하였으나, Ovx/NCa-ox군보다 Ovx/LCa-ox군이 40% 감소하였다. 칼슘의 섭취가 부족하고 수산 섭취가 증가하면, 체내 칼슘 흡수율이 높아지기 때문에 수산과 결합 할 수 있는 칼슘이 감소되고 수산의 흡수가 촉진된다. 이에 따라 칼슘 및 수산의 배설량은 감소하고 신장 내 수산칼슘 형성이 증가되는 것으로 생각된다. Marshall 등⁴⁴⁾의 연구에 의하면, 수산과 칼슘의 섭취를 각각 단독으로 제한하여 결석 형성에 미치는 영향을 연구한 결과, 식이 수산만의 제한은 신장 내 수산칼슘 함량을 유의적으로 변화시키지 않았지만 식이 칼슘제한 (< 250 mg/day)은 결석 형성을 증가시켰다. 그러므로 칼슘의 제한은 칼슘의 음의평형을 초래하여 신장결석을 증가시키고 골 손실을 더욱 가속화시키기 때문에 골다공증 및 신장결석 위험 요인을 가진 사람들은 수산의 섭취를 제한하고, 적정 수준의 칼슘을 섭취함으로써 신장결석의 위험을 낮추는 동시에 골 손실을 예방하는 것이 바람직할 것이다.

요약 및 결론

본 연구는 난소절제 흰쥐에서 저, 정상 칼슘 식이와 수산 첨가 식이가 흰쥐의 조직의 칼슘 침착 및 골격대사에 미치는 영향을 검토하고자 하였다. 8주령 된 암컷 흰쥐에게 칼슘의 수준을 저 (LCa, 0.1%), 정상 (NCa, 0.5%)으로 설정하고 각 칼슘 수준에 수산 (1%)을 첨가하여 조합한 4종의 실험 식이를 6주간 급여하고 분석한 결과를 요약하면 다음과 같다.

체중 증가량 및 식이 섭취량은 난소절제에 의해 Ovx군에서 증가하였고 저 칼슘 식이 섭취 시 증가하는 경향을 보였다. 그러나 수산을 첨가 했을 때 유의적으로 감소하였다.

혈청 칼슘 농도는 실험 군간 유의적 차이가 없었으나, 인의 농도는 저 칼슘과 수산을 함께 섭취할 때 유의적으로 증가하였다.

혈청 GOT, GPT, BUN, Cre, UA 함량 및 혈청 ALP의 활성은 난소절제에 의해 증가하였고 저 칼슘 식이와 수산 섭

취군에서 증가하였다.

대퇴골 및 요추골의 중량, 칼슘함량 및 파단력은 난소절제에 의해 감소하였고 저 칼슘과 수산을 함께 섭취할 때 유의적으로 감소하였다.

신장 및 비장의 조직 무게 및 칼슘 함량은 Ovx군에서 저 칼슘 식이에 영향을 받아 증가하는 경향을 보였고 저 칼슘과 수산을 함께 섭취할 때 유의적으로 증가하였다. 대동맥은 저칼슘 섭취군에서 유의적으로 증가하였다.

신장 조직 내 수산은 저 칼슘과 수산을 함께 섭취 했을 때만 검출되었다.

신장조직을 광학현미경으로 관찰한 결과 Ovx군에서 다양한 석회침착이 관찰되었고 정상 칼슘 보다 저칼슘 섭취군에서 증가하였으며 저 칼슘과 수산을 함께 섭취할 때 현저하게 증가하였다.

분의 칼슘 배설량은 저칼슘 섭취군에서 유의적으로 감소하였다. 수산 배설량은 수산 섭취군에서 유의적으로 증가하였고, 정상 칼슘보다 저 칼슘과 수산을 함께 섭취했을 때 유의적으로 감소하였다.

혈 중 에스트로겐의 농도는 Ovx군에서 유의적으로 감소하였고, 혈 중 PTH는 실험군 간 유의적 차이가 없었다.

이상의 결과로부터 폐경 후 골다공증에 있어 저 칼슘 및 수산섭취는 골의 손실을 초래하고 연 조직에 칼슘을 침착하여 기능을 저하시킬 수 있는 것으로 나타났다. 특히, 저 칼슘의 단독 섭취 보다는 수산과 함께 섭취 할 때 신장조직에 많은 양의 칼슘을 축적하고 결석을 형성함으로써 조직이 손상되고 기능이 저하되었다. 하지만 난소절제 후 정상 칼슘 식이를 섭취 했을 때는 조직의 칼슘 함량 및 생리기능에 유의적인 차이를 나타내지 않았고 수산 첨가에 따라 크게 영향을 받지 않았다. 따라서 골다공증의 경우 추가적인 골 손실과 신장을 포함한 기타 연조직의 석회화 및 결석을 예방하기 위해 수산 섭취를 제한하고 특히, 칼슘 섭취가 부족할 때 수산 섭취가 위험수준을 현저히 증폭시키기 때문에 적정수준의 칼슘 섭취와 수산 제한이 함께 권장된다.

Literature cited

- 1) The third Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES III), 2009. Ministry of Health and Welfare, Cheongwon-gun; 2010. p.266
- 2) Jung DW, Lim HS, Kang YH. Mineral imbalance: Bone decalcification and soft tissue calcification. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2009; 38(12): 1815-1819
- 3) Giachelli CM. Ectopic calcification; new concepts in cellular regulation. *Z Kardiol* 2001; 90 suppl(3): 31-37
- 4) Choi BG, Vilahur G. Ovariectomy increases vascular calcification via the OPG/RANKL cytokine signalling pathway. *Eur J Clin Invest* 2008; 38(4): 211-217
- 5) Choi WH. Epidemiology and biological correlation between osteoporosis and atherosclerosis. *J Korean Soc Endocrinol* 2005; 20(6): 535-542
- 6) Persy V, D'Haese P. Vascular calcification and bone disease: the calcification paradox. *Trends Mol Med* 2009; 15(9): 405-416
- 7) Fitzpatrick LA, Turner RT, Ritman ER. Endochondral bone formation in the heart a possible mechanism of coronary calcification. *Endocrinology* 2003; 144(6): 2214-2219
- 8) Massey LK, Roman-Smith H, Sutton RA. Effect of dietary oxalate and calcium on urinary oxalate and risk of formation of calcium oxalate kidney stones. *J Am Diet Assoc* 1993; 93(8): 901-906
- 9) Taylor EN, Curhan GC. Oxalate intake and the risk for nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18(7): 2198-2204
- 10) von Unruh GE, Voss S, Sauerbruch T, Hesse A. Dependence of oxalate absorption on the daily calcium intake. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(6): 1567-1573
- 11) 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* 1993; 123: 1939-1951
- 12) Choi MK, Kim MH, Kang MH. Effect of calcium and boron intakes on calcium balance status in ovariectomized rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2006; 35(1): 48-54
- 13) Kim MS, Lee YS. Effect of dietary calcium and soy isoflavones supplementation on bone metabolism in the ovariectomized rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2005; 34(6): 833-839
- 14) Buskinsky DA, Bashir MA, Riordon DR, Nakagawa Y, Coe FL, Grynpas MD. Increased dietary oxalate does not increase urinary calcium oxalate saturation in hypercalciuric rats. *Kidney Int* 1999; 55(2): 602-612
- 15) Folin O, Wu H. A system of blood analysis. *J Biol Chem* 1919; 38: 81
- 16) Zhaoa MP, Lia YZ, Guob ZQ, Zhanga XX, Chang WB. A new competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of estrogenic bisphenols. *Talanta* 2002; 57(6): 1205-1210
- 17) Krylova SM, Pang PK, Shan J, Lewanczuk RZ, Benishin CG. Quantitative determination of parathyroid hypertensive factor by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Hypertens* 2000; 13(11): 1173-1179
- 18) Mester Z, Angelone M, Brunori C, Cremisini C, Muntau H, Morabito R. Digestion methods for analysis of fly ash samples by atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 1999; 395(1-2): 157-163
- 19) Markus H, Britt W, Lutz C, Stefan K, Michael O, Omid TS, Ulrich H, Anette P, Natalia U, Wolfgang H. Experimental hyperhomocysteinemia reduces bone quality in rats. *Clin Chem* 2007; 53: 1455-1461
- 20) Liu MT, Cheng WT, Li MJ, Liu HN, Yang DM, Lin SY. Identification of chemical compositions of skin calcified deposit by vibrational microspectroscopy. *Arch Dermatol Res* 2005; 297: 231-234
- 21) Kim DJ, Kim HK, Kim MH, Lee JS. Analysis of oxalic acid of various vegetables consumed in Korea. *Food Sci Biotechnol* 2007; 16(4): 650-654
- 22) Lee MH, Han JS, Nobuyuki K, Takahisa M. Physicochemical characteristics of commercial spinach produced in autumn. *J East Asian Soc Diet Life* 2005; 15(3): 306-314
- 23) Lee JW, Kim HJ, Jhee OH, Won HD, Yu YJ, Lee MH, Kim TW, Om AS, Kang JS. Effects of alternative medicine extract on bone mineral density, bone strength and biochemical markers of bone metabolism in ovariectomized rats. *Korean J Food Nutr*

- 2005; 18: 72-80
- 24) Okasaki R, Inoue D, Shibata M, Saika M, Kido S, Ooka H, Tomiyama H, Sakamoto Y, Matsumoto T. Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) α or β . *Endocrinology* 2002; 143: 2349-2356
 - 25) Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, Hollis BW. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology* 1989; 124: 7-16
 - 26) Connie MW, Robert PH. Calcium in human health: New Jersey: Humana Press; 2006. p.327-340
 - 27) Peterson CA, Eurell JA, Erdman JW Jr. Bone composition and histology of young growing rats fed diets of varied calcium bioavailability: spinach, nonfat dry milk, or calcium carbonate added to casein. *J Nutr* 1992; 122(1): 137-144
 - 28) Satoshi Y, John HW, Andrew TH, Linda YH, Gretchen SM, Neil SM. Study of a rat model for calcium oxalate crystal formation without severe renal damage in selected conditions. *Int Urol Nephrol* 2005; 12: 290-298
 - 29) Mituka BM, Rawnsley HN. Clinical biochemical and hematological reference value in normal experimental animals and normal humans. 2nd edition, New York: Masson; 1987. p.160
 - 30) Lee YS, Kim EM, Effect of ovariectomy and dietary calcium levels on bone metabolism in rats fed low Ca: calcium diet during growing period. *Korean J Nutr* 1998; 31(3): 279-288
 - 31) Hietala EL. The effect of ovariectomy on periosteal bone formation and bone resorption in adult rats. *Bone Miner* 1993; 20(1): 57-65
 - 32) Kim EM, Lee YS. Effect of ovariectomy and dietary calcium levels on bone metabolism in rats fed low calcium diet during growing period. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 1998; 31(3): 279-288
 - 33) Choi MJ, Jung SH. The effect of dietary source and sulfur amino acid content on bone metabolism in growing rats. *Korean J Nutr* 2004; 37(2): 100-107
 - 34) Okasaki R, Inoue D, Shibata M, Saika M, Kido S, Ooka H, Tomiyama H, Sakamoto Y, Matsumoto T. Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) α or β . *Endocrinology* 2002; 143: 2349-2356
 - 35) Mizunuma H, Hosoi T, Okano H, Soda M, Tokizawa T, Kagami I, Miyamoto S, Ibuki Y, Inoue S, Shiraki M, Ouchi Y. Estrogen receptor gene polymorphism and bone mineral density at the lumbar spine of pre- and postmenopausal women. *Bone* 1997; 21(5): 379-383
 - 36) Moon SJ, Kim JH, Lim SK. Investigation of risk of low serum 25-hydroxyvitamin D levels in Korean menopausal women. *Korean J Nutr* 1996; 29: 981-990
 - 37) Qunibi WY, Nolan CA, Ayus JC. Cardiovascular calcification in patients with end-stage renal disease: A century-old phenomenon. *Kidney Int Suppl* 2002; 82: S73-S80
 - 38) Itokawa Y, Tanaka C, Fujiwara M. Changes in body temperature and blood pressure in rats with calcium and magnesium deficiency. *J Appl Physiol* 1974; 37: 835-839
 - 39) Shah BG, Belonje B. Prevention of nephrocalcinosis in male and female rats by providing fluoride and additional magnesium in the diet. *Nutr Res* 1983; 3: 749-760
 - 40) Hess B, Jost C, Zipperle L, Takkinen R, Jaeger P. High-calcium intake abolishes hyperoxaluria and reduces urinary crystallization during a 20-fold normal oxalate load in humans. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13(9): 2241-2247
 - 41) Hofbauer LC, Brueck CC, Shanahan CM, Schoppet M, Dobnig H. Vascular calcification and osteoporosis from clinical observation towards molecular understanding. *Osteoporos Int* 2007; 18: 251-259
 - 42) Janzen J, Vuong PN. Arterial calcifications: morphological aspects and their pathological implications. *Z Kardiol Suppl* 2001; 90(3): 6-11
 - 43) Kang BH, Son HY, Ha CS, Lee HS, Song SW. Reference values of hematology and serum chemistry in Ktc: Sprague-Dawley Rats. *Korean J of Lab Ani Sci* 1995; 11(2): 141-145
 - 44) Marshall RW, Cochran M, Hodgkinson A. Relationships between calcium and oxalic acid intake in the diet and their excretion in the urine of normal and renal-stone-forming subjects. *Clin Sci* 1972; 43: 91-99