

## 비타민 K<sub>2</sub> 첨가 식이가 난소절제쥐의 골밀도에 미치는 영향

최 미 자<sup>§</sup> · 김 미 성

계명대학교 식품영양학과

### Effect of Dietary Vitamin K<sub>2</sub> Supplementation on Bone Mineral Density in Ovariectomized Rats

Choi, Mi-Ja<sup>§</sup> · Kim, Mi-Seong

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

#### ABSTRACT

Vitamin K has been suggested to play a role in bone metabolism. The objective of this study was to determine whether vitamin K<sub>2</sub> supplementation is related to bone mineral density, bone formation markers, and bone resorption in ovariectomized (OVX) rats. Forty Sprague-Dawley female rats (body weight, 200 ± 10 g) were divided into four groups: a sham group fed a control diet, a sham group fed a vitamin K<sub>2</sub> supplemented diet, OVX fed a control diet, and OVX fed a vitamin K<sub>2</sub> supplemented diet (3.5 mg vitamin K<sub>2</sub>/kg diet). All rats were fed the experimental diets for 6 weeks, and deionized water was provided *ad libitum*. Serum alkaline phosphatase activity (ALP), osteocalcin, and urinary deoxypyridinoline crosslink values were measured as markers of bone formation and resorption. Bone mineral density (BMD) and bone mineral content were measured in the spine and femur using PIXImus (GE Lunar Co., Madison, WI, USA). No significant differences in body weight gain, food intake, or food efficiency ratio were observed between the control and experimental groups. Serum ALP, osteocalcin, and urinary crosslink values were not significantly different between the vitamin K<sub>2</sub> supplemented groups. No significant differences were observed for any of the variables in the sham group. Spine BMD values were significantly lower in the OVX than those in the sham groups. Spine and femur BMD per weight of vitamin K<sub>2</sub> tended to be higher than the control diet group within the OVX group, but no significant differences were observed. In conclusion, dietary vitamin K<sub>2</sub> supplementation may have a beneficial effect on spine and femur BMD in OVX rats. Further research is needed to understand the potential benefits of vitamin K<sub>2</sub> on bone loss in OVX rats. (Korean J Nutr 2011; 44(3): 189 ~ 195)

**KEY WORDS:** vitamin K<sub>2</sub>, BMD, BMC, ovariectomized rats.

## 서 론

비타민 K는 골아세포 형성을 촉진시키고 골파괴세포를 감소시켜 골형성은 돕고 골흡수는 막아주는 역할을 한다고 보고되었다.<sup>1)</sup> 뼈에 존재하는 osteocalcin은 일명 Bone Gla (γ-carboxyl glutamic acid) protein이라고 불리는 단백질로서 칼슘과 결합할 수 있는 Gla를 3개 포함하고 있는데 비타민 K에 의하여 카르복실화 되어야 칼슘과 결합할 수 있으며<sup>2)</sup> 비타민 K의 결핍으로 인하여 카르복실화되지 않은 osteocalcin은 under-carboxylation된 상태로 혈액으로 흘러나오게 된

다. 그러므로 혈액 중에 under-carboxylated osteocalcin의 증가는 비타민 K 결핍증의 가능성을 시사한다.<sup>3)</sup>

혈중 비타민 K 농도와 골밀도와의 관계에서 성장기의 경우 평균 9.8세의 여자 아동에서 전형적인 미국의 서구 식사를 하는 경우 비타민 K 섭취가 높을수록 골형성이 높아 성장기에 비타민 K의 섭취는 권장된다고 보고하였고<sup>4)</sup> 폐경기의 경우 평균 59세 여성에서 비타민 K 섭취가 높은 군이 낮은 군보다 골밀도가 높았고,<sup>5)</sup> Kanai 등<sup>6)</sup>은 폐경 여성에서 혈청 비타민 K<sub>1</sub>과 K<sub>2</sub>의 농도가 낮을수록 골밀도가 낮았고, 비타민 K 섭취가 높은 군이 골밀도가 높았고, 골절 위험은 낮았다고 보고하였다.

Orimo 등<sup>7)</sup>의 선행연구에서 골다공증 환자 80명을 대상으로 하루 90 mg의 비타민 K<sub>2</sub>를 2년간 복용시킨 결과 골밀도가 2.2% 증가하였고, 골다공증 여성을 대상으로 하루 45 mg의 비타민 K를 2년간 섭취시킨 결과<sup>7)</sup> 척추 골밀도가 유의적

접수일: 2011년 5월 11일 / 수정일: 2011년 6월 9일

채택일: 2011년 6월 12일

<sup>§</sup>To whom correspondence should be addressed.

E-mail: choimj@kmu.ac.kr

으로 증가하였다. 그러나 Iwamoto 등<sup>8)</sup>은 폐경 여성에게 하루 45 mg의 비타민 K를 1년간 보충시켰을 때 골밀도의 유의적인 증가를 보이지 않았으며 Hong & Choue<sup>9)</sup>의 연구에서도 폐경여성에서 비타민 K 섭취량과 골밀도 간의 유의적인 상관관계가 없다고 보고하였다.

이처럼 선행연구에서 동량의 45 mg/day의 비타민 K를 보충한 경우 대상자가 골다공증인 경우 2년의 노출기간은 효과가 있었으나<sup>2)</sup> 대상자가 건강한 폐경여성인 경우 1년의 노출기간은 효과를 나타내지 않아<sup>7)</sup> 이렇게 상이한 결과는 비타민 K 노출기간 때문인지 생리적 상태의 차이 때문인지 추후 검증이 요구된다.

동물 실험에서는 Iwamoto 등<sup>10)</sup>은 칼슘 결핍 식이를 한 6주령 암컷 쥐를 대상으로 비타민 K (30 mg/100 g diet)와 비타민 D (25 mg/100 g diet)를 동시에 보충하여 10주간 섭취시켰을 때 대조군에 비하여 비타민 K와 비타민 D의 보충군의 골밀도가 유의적으로 증가하였다. 최근 human osteoblasts를 배양한 연구에서 vitamin K<sub>2</sub>는 Gla osteocalcin의 축적과 비타민 D<sub>3</sub>에 의해 유도되는 osteocalcin 생성을 촉진시킨다<sup>11)</sup>고 보고하였다. 또한 6주령의 성장기 암컷쥐를 대상으로 10주간 비타민 K<sub>2</sub> (30 mg/100 g diet)를 단독으로 보충시켰을 때에도 정상 칼슘군과 저칼슘군의 경우 모두 골밀도가 증가하였다.<sup>12,13)</sup> 그리고 10주령 수컷 쥐를 대상으로 스테로이드 물질인 prednisolone을 체중 kg 당 3 mg과 30 mg을 각각 사용하여 골소실을 유도한 후 8주간 체중 kg 당 비타민 K<sub>2</sub> 15 mg을 함유하는 식이를 섭취시킨 결과 prednisolone 30 mg으로 골소실을 유도한 경우는 골소실을 낮추었으나 prednisolone 3 mg으로 골소실을 유도한 경우는 골소실 지연에 영향을 미치지 않았는데 이것은 prednisolone의 용량이 적어 골소실이 많이 일어나지 않았기 때문으로 추론하였다.<sup>14)</sup> 이처럼 비타민 K<sub>2</sub>는 골소실의 상태 정도에 따라 미치는 영향이 다르게 나타났다.

한편 난소 절제 쥐에서 체중 kg 당 50 mg의 매우 많은 양의 phyloquinone ormenaquinone-4 (882 mg phyloquinone ormenaquinone-4/kg diet), menatetrenone-4 (882 mg menatetrenone-4/kg diet)를 함유하는 식이로 12주간 섭취시킨 결과 골밀도와 혈청 osteocalcin 농도에 차이가 없다고 보고하였다.<sup>15)</sup> 비타민 K는 체내에서 대사되는 속도가 다른 지용성 비타민에 비하여 매우 빨라 독성을 잘 나타내지 않으며, 인체 보충 실험에서도 한 달간 체중 kg 당 하루 10 g까지 보충시켰으나 유해적인 영향을 보이지 않았다고 하나 선행연구에서<sup>15)</sup> 사용한 비타민 K 양은 약물처방처럼 고단위를 첨가하여 동물에게 권장되는 양의 50배의 수준이므로 장기 섭취 시 안전성에 대한 문제는 여전히 남는다. 따라서 본 연구

에서는 실험동물에서 비타민 K<sub>2</sub> 권장량의 5배 수준인 비타민 K<sub>2</sub> 첨가 식이가 (3.5 mg/kg diet) 난소 절제 쥐에서 골밀도에 미치는 효과를 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물 및 실험식이

평균 체중이 약 200 g 정도인 9주령 Sprague-Dawley 암컷 쥐 40마리를 난소절제 (Ovx)군과 난소절제는 하지 않고 수술의 스트레스만 준 Sham군으로 나누어 수술을 한 후, 다시 각 군내에서 대조 식이군과 비타민 K<sub>2</sub> 식이군으로 나누어 6주 동안 실험식이를 공급하였다. Stainless-steel wire cage에서 한 마리씩 분리하여 사육하였으며 사육실 온도는 22 ± 2℃, 습도는 63 ± 5%로 유지하며, 매일 광주기, 암주기를 12시간 (6:00~18:00)간격으로 자동조절장치를 이용하여 조절하였다. 실험 기간 동안 식이와 물은 자유롭게 섭취 (ad libitum)하게 하였고, 이때 물은 모두 2차 이온 교환수를 사용하였다. 실험 식이는 AIN-93G의 기본 조성에 기준하였고 비타민 K<sub>2</sub> 첨가군의 비타민 K<sub>2</sub> 양은 대조군의 5배 수준으로 (3.5 mg/kg diet) 하였다 (Table 1). 비타민 K<sub>2</sub> 첨가수준은 미국 영양학회의 실험동물 (rat)을 위한 표준식이 조성인 AIN-93 diet에 함유된 비타민 K량을 근거로 하여 비타민 K<sub>2</sub>가 골격에 유의한 효과를 나타낸 선행연구<sup>16)</sup>의 첨가수준을 참고로 하였다.

### 체중 및 식이섭취량 측정

실험동물의 체중은 실험 식이를 시작한 날을 기준으로, 1

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

Ingredients	Control	Vitamin K <sub>2</sub>
Casein <sup>1)</sup>	200	200
Corn starch	529.5	529.5
Sucrose	100	100
Soybean oil	70	70
$\alpha$ -Cellulose <sup>2)</sup>	50	50
Min-mixture <sup>3)</sup>	35	35
Vit-mixture <sup>4)</sup>	10	10
L-cystein <sup>5)</sup>	3	3
Choline <sup>6)</sup>	2.5	2.5
Tert-butyl hydroquinone <sup>7)</sup>	0.014	0.014
Vitamin K <sub>2</sub> <sup>8)</sup>	-	0.0028

1) Casein, Maeil Dairy Indstry CO. Korea 2)  $\alpha$ -Cellulose, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA 3) AIN-93G-MX, Teklad Test Diets, Medison, wisconsin, USA 4) AIN-93G-VX, Teklad Test Diets, Medison, wisconsin, USA 5) L-Cystein, Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA 6) Choline bitartate, Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA 7) Tert-butyl hydroquinone, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA 8) Vitamin K<sub>2</sub>: Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA

주일 단위로 일정한 시간에 체중을 측정하였다. 실험식이 섭취량은 이틀에 한 번씩 일정한 시간에 측정하였다.

### 골밀도 측정

LUNAR사의 mouse 전용 골밀도 측정기인 PIXImus를 이용하여 척추 (spine)와 대퇴골 (femur)의 골밀도 (Bone mineral density, BMD)와 골무기질함량 (Bone mineral content, BMC)을 측정하였다. 골함량은 g으로 골밀도는 g/cm<sup>2</sup>로 나타내었다.

### 골형성 지표 및 골용해 지표 분석

혈청 및 요 중 칼슘과 인의 측정은 TECHNICON CHEN<sup>TM</sup> SYSTEM을 이용하여 자동분석기 (automatic chemical analyzer)로 측정하였다. 골형성 지표로 혈청 alkaline phosphatase (ALP)는 TECHNICON CHEN<sup>TM</sup> SYSTEM을 이용하여 효소법에 의해 405 nm에서 비색 정량하여 자동분석기로 측정하였고, osteocalcin은 kit (Nichols Institute, INC)를 이용하여 gamma counter로 radioactivity를 측정하였다.

골용해 지표로 요 중 deoxypyridinoline, creatinine의 측정은 collagen crosslinks<sup>TM</sup> Kit (Metra Biosystem Inc. U.S.A.)를 이용하여 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)법에 의하여 분석하였고 deoxypyridinoline과 creatinine의 crosslinks value를 구하였다.

### 통계처리

SAS package (version 9.12: Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차를 구하였으며, ANOVA test 후 각 실험 군 간의 비교는 Duncan's multiple range test를 이용하여 분석하였다.

## 결 과

### 체중 및 식이섭취량

체중 증가량과 식이 섭취량 및 식이효율을 Table 2에 나타내었다. 실험시작 시 체중은 각 군 간에 유의적인 차이가 없었고, 실험 6주 후에도 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다. 식이 섭취량, 식이 효율 또한 Ovx군과 Sham군 간에 유의적인 차이가 없었고, 비타민 K<sub>2</sub> 첨가 식이에 따른 유의적인 차이를 보이지 않았다.

### 혈액 분석

혈청 칼슘 농도는 실험군 모두가 쥐의 정상 칼슘 수준인 7.2~13.0 mg/dL 사이에 포함되었으며 실험군 간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 혈청 인의 농도는 Sham군과 Ovx군 모두 정상 범위 (3.11~11.0 mg/dL)에 속하였으며 실험군 간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

혈청 ALP의 농도는 각 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았고, 혈청 osteocalcin 농도 또한 실험군 간의 유의적인 차이를 나타내지 않았다 (Table 3).

### 요 분석

요 중 칼슘 배설량은 Sham군과 Ovx군내에서 비타민 K<sub>2</sub> 섭취에 따른 유의적인 차이가 없었다. 요 중 인의 배설량은 Sham군 내에서 대조군 9.88 mg/day, 비타민 K<sub>2</sub>군 8.45 mg/day, Ovx군 내에서 대조군 10.34 mg/day, 비타민 K<sub>2</sub>군은 9.60 mg/day으로 실험군 간의 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

요 중 deoxypyridinoline과 creatinine, crosslink value는

**Table 2.** The effect of diets on body weight, weight gain, food intake and food efficiency ratio (FER) in rats

Group	Sham		Ovx	
	Control (N = 10)	Vitamin K <sub>2</sub> (N = 10)	Control (N = 10)	Vitamin K <sub>2</sub> (N = 10)
Initial weight (g)	204.7 ± 6.0 <sup>1)</sup>	211.8 ± 7.2	215.1 ± 6.3	216.4 ± 7.1
Final weight (g)	280.3 ± 16.9	263.9 ± 41.3	317.4 ± 19.1	300.2 ± 54.0
Weight gain (g)	73.7 ± 10.4	61.4 ± 21.6	106.3 ± 41.4	96.9 ± 471.0
Food intake (g)	17.9 ± 1.17	16.3 ± 2.9	19.1 ± 2.0	19.2 ± 3.4
FER <sup>2)</sup>	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.03	0.13 ± 0.04	0.12 ± 0.05

1) Mean ± SD 2) FER: Food efficiency ratio

**Table 3.** The effect of diets on serum Ca, P, alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin in rats

Group	Sham		Ovx	
	Control (N = 10)	Vitamin K <sub>2</sub> (N = 10)	Control (N = 10)	Vitamin K <sub>2</sub> (N = 10)
Ca (mg/dL)	9.2 ± 0.5 <sup>1)</sup>	9.7 ± 0.5	10.1 ± 0.4	9.7 ± 0.7
P (mg/dL)	7.7 ± 0.9	6.8 ± 0.8	8.2 ± 0.7	6.9 ± 0.9
ALP <sup>2)</sup> (u/L)	192.3 ± 45.7	303.7 ± 42.7	209.4 ± 22.7	276.4 ± 49.3
Osteocalcin (ng/mL)	4.0 ± 0.9	4.2 ± 1.9	3.6 ± 0.4	5.8 ± 0.9

1) Mean ± SD 2) ALP: Alkaline phosphatase

**Table 4.** The effect of diets on urinary Ca, P, and DPD crosslink value in rats

	Sham		Ovx	
	Control (N = 10)	Vitamin K <sub>2</sub> (N = 10)	Control (N = 10)	Vitamin K <sub>2</sub> (N = 10)
Ca (mg/day)	0.29 ± 0.16 <sup>1)</sup>	0.28 ± 0.19	0.25 ± 0.12	0.39 ± 0.14
P (mg/day)	9.88 ± 2.05	8.45 ± 2.56	10.34 ± 3.29	9.60 ± 2.67
Deoxypyridinoline (nM)	794.5 ± 387 <sup>a</sup>	825.8 ± 267.2	790.6 ± 467.4	757.0 ± 581.2
Creatinine (mM)	4.02 ± 1.85	4.57 ± 0.99	4.00 ± 2.05	3.70 ± 2.53
Crosslink value (nM/mM)	197.5 ± 26.8	180.8 ± 38.6	201.1 ± 64.2	198.1 ± 56.9

1) Mean ± SD

**Table 5.** The effect of diets on spine BMD and BMC in rats

Group	Sham		Ovx	
	Control (N = 10)	Vitamin K <sub>2</sub> (N = 10)	Control (N = 10)	Vitamin K <sub>2</sub> (N = 10)
SBMD <sup>3)</sup> (g/cm <sup>2</sup> )	0.150 ± 0.014 <sup>1)az)</sup>	0.144 ± 0.009 <sup>a</sup>	0.133 ± 0.010 <sup>b</sup>	0.136 ± 0.007 <sup>b</sup>
SBMD/wt (kg)	0.54 ± 0.06 <sup>ab</sup>	0.57 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.42 ± 0.07 <sup>c</sup>	0.46 ± 0.08 <sup>bc</sup>
SBMC <sup>4)</sup> (g)	0.492 ± 0.073 <sup>a</sup>	0.479 ± 0.051 <sup>a</sup>	0.460 ± 0.052 <sup>a</sup>	0.477 ± 0.056 <sup>a</sup>
SBMC/wt (kg)	1.77 ± 0.27 <sup>ab</sup>	1.91 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.48 ± 0.28 <sup>bc</sup>	1.61 ± 0.21 <sup>b</sup>

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) SBMD: Spine bone mineral density 4) SBMC: Spine bone mineral content

**Table 6.** The effect of diets on femur BMD and BMC in rats

Group	Sham		Ovx	
	Control (N = 10)	Vitamin K <sub>2</sub> (N = 10)	Control (N = 10)	Vitamin K <sub>2</sub> (N = 10)
FBMD <sup>3)</sup> (g/cm <sup>2</sup> )	0.195 ± 0.007 <sup>1)az)</sup>	0.189 ± 0.016 <sup>a</sup>	0.189 ± 0.010 <sup>a</sup>	0.186 ± 0.011 <sup>a</sup>
FBMD/wt (kg)	0.70 ± 0.03 <sup>ab</sup>	0.75 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.60 ± 0.09 <sup>c</sup>	0.63 ± 0.07 <sup>bc</sup>
FBMC <sup>4)</sup> (g)	0.388 ± 0.020 <sup>a</sup>	0.378 ± 0.034 <sup>a</sup>	0.374 ± 0.013 <sup>a</sup>	0.372 ± 0.035 <sup>a</sup>
FBMC/wt (kg)	1.39 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.49 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.20 ± 0.12 <sup>b</sup>	1.26 ± 0.13 <sup>b</sup>

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) FBMD: Femur bone mineral density 4) FBMC: Femur bone mineral content

Sham군과 Ovx군, 그리고 각 군 내에서 비타민 K<sub>2</sub> 섭취에 따라 나타났다.  
 른 유의적인 차이를 나타내지 않았다 (Table 4).

## 골밀도 및 골무기질함량

### 척추 골밀도 (BMD)와 골무기질함량 (BMC)

척추 골밀도와 골무기질 함량은 Table 5에 나타내었다. 척추 골밀도는 Ovx군이 Sham군에 비해 유의적으로 낮았으며, Ovx군과 Sham군 내에서 비타민 K<sub>2</sub> 첨가 식이 섭취에 따른 유의적인 차이는 보이지 않았다. 체중 당 척추 골밀도는 Ovx군이 Sham군에 비해 유의적으로 낮았고, Sham군 내에서 대조군은 0.54 g/cm<sup>2</sup>/kg, 비타민 K<sub>2</sub> 첨가 식이군은 0.57 g/cm<sup>2</sup>/kg으로 나타났으며 Ovx군 내에서는 대조군 0.42 g/cm<sup>2</sup>/kg, 비타민 K<sub>2</sub> 첨가 식이군 0.46 g/cm<sup>2</sup>/kg으로 나타났다. 척추 골무기질 함량은 실험군 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 체중 당 척추 골무기질 함량은 Ovx군이 Sham군에 비해 유의적으로 낮았고, Sham군 내에서 대조군은 1.77 g/kg, 비타민 K<sub>2</sub> 첨가 식이군은 1.91 g/kg으로 나타났으며 Ovx군 내에서는 대조군 1.48 g/kg, 비타민 K<sub>2</sub> 첨가 식이군 1.61 g/kg으로

### 대퇴 골밀도 (BMD)와 골무기질함량 (BMC)

대퇴 골밀도와 골무기질 함량은 Table 6에 나타내었다. 대퇴 골밀도와 대퇴 골무기질 함량은 Sham군과 Ovx군 사이에 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 비타민 K<sub>2</sub> 섭취에 의한 유의적인 차이도 나타나지 않았다. 체중 당 대퇴 골밀도는 Ovx군이 Sham군에 비해 유의적으로 낮았고, Sham군 내에서 대조군은 0.70 g/cm<sup>2</sup>/kg, 비타민 K<sub>2</sub> 첨가 식이군은 0.75 g/cm<sup>2</sup>/kg으로 나타났으며 Ovx군 내에서는 대조군 0.60 g/cm<sup>2</sup>/kg, 비타민 K<sub>2</sub> 첨가 식이군 0.63 g/cm<sup>2</sup>/kg으로 나타났다. 체중 당 대퇴 골무기질 함량은 Ovx군이 Sham군에 비해 유의적으로 낮았고, 비타민 K<sub>2</sub> 첨가 식이에 따른 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

## 고 찰

비타민 K<sub>2</sub> 첨가 식이는 Sham군과 Ovx군 모두에서 체중과 식이효율에 영향을 미치지 않았는데 이 결과는 실험동물에



서<sup>15-17)</sup> 비타민 K 첨가식은 체중증가에 영향을 미치지 않았다는 선행 보고<sup>10,12,13,18,19)</sup>와 난소절제쥐<sup>15)</sup>나 암컷쥐 등에서도<sup>10,13)</sup> 비타민 K 섭취는 식이 섭취량과 식이 효율에 영향을 미치지 않았다는 연구 결과와 일치하였다.

혈청 칼슘과 인의 농도는 실험군 모두 칼슘의 경우 정상수준 7.2~13.0 mg/dL, 인의 경우 정상수준 3.11~11.0 mg/dL<sup>20)</sup> 내에 포함되었다. 혈청 칼슘의 농도는 비타민 K<sub>2</sub> 섭취에 따른 유의적인 차이가 보이지 않았는데 이것은 쥐를 대상으로 한 여러 선행연구<sup>10,12,14,16,17,19-21)</sup>와 일치하였다. 혈청 인의 농도 또한 Sham군과 Ovx군 내에서 비타민 K<sub>2</sub>군과 대조군 간의 유의적인 차이를 보이지 않아 암컷 쥐를 대상으로 한 Iwamoto 등<sup>10,13)</sup>과 같은 결과를 나타내었다.

혈청 ALP의 농도는 각 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이것은 비타민 K 식이를 섭취한 난소절제쥐<sup>16)</sup>나 수컷 흰쥐<sup>14,21)</sup>에서 혈청 ALP의 농도에는 차이가 없었다는 보고와 일치하였다. 또한 폐경 여성<sup>22)</sup>에서도 비타민 K 보충 시 혈 중 ALP 농도는 유의적인 차이가 없었다고 보고하였다.

혈청 osteocalcin 농도도 실험군 간의 유의적인 차이를 나타내지 않았는데, 이 결과는 난소절제쥐<sup>15)</sup>와 수컷쥐에서<sup>14,21)</sup> 비타민 K 보충 시 osteocalcin 농도는 유의적인 차이는 없었다고 보고한 것과 일치하였다. 폐경 여성을 대상으로 한 경우에도 비타민 K를 보충시킨 결과<sup>3,22)</sup> osteocalcin 농도에는 유의적인 영향을 미치지 않았다고 보고하였다.

요 중 칼슘 배설량은 비타민 K<sub>2</sub> 첨가식이 섭취 시 유의적인 차이가 없었는데 이 결과는 Iwamoto 등<sup>13)</sup> 연구에서 성장기 흰쥐에게 비타민 K<sub>2</sub>를 보충시켰을 때 요 중 칼슘의 배설량에 유의적인 차이를 보이지 않았다고 보고한 결과와 일치한다.

요 중 DPD와 creatinine, crosslink value 모두 실험군 간의 유의적인 차이가 없었다. 요 중 DPD의 함량은 Kobayashi 등,<sup>21)</sup> Shiraki 등,<sup>7)</sup> Ushiroyama 등<sup>23)</sup>의 연구와 일치하였으며, 요 중 creatinine 함량은 Hong,<sup>3)</sup> Szulc 등,<sup>24)</sup> Vergnaud 등,<sup>25)</sup> crosslink value는 Douglas 등<sup>22)</sup>의 연구 결과와 일치하였다.

척추 골밀도는 Ovx군이 Sham군에 비해 유의적으로 낮았는데 Arjmandi 등<sup>26)</sup>의 연구에서 난소절제군이 Sham군에 비하여 골밀도가 낮다고 보고한 것과 일치하였다. 체중 당 척추 골밀도, 체중 당 척추 골무기질 함량은 Sham군과 Ovx군 내에서 비타민 K군이 대조군에 비해 더 높은 경향을 나타내었다. Bunyaratavej 등<sup>27)</sup>의 연구에서 비타민 K 섭취에 (45 mg/day)의한 척추 골함량의 증가는 보이지 않았다. 폐경 여성을 대상으로 비타민 K가 골밀도에 미치는 효과에 대한 연구로서 평균 비타민 K<sub>2</sub> 725.8 µg/day 섭취 시 골밀도에 유의적인 영향을 나타내지 않았으며,<sup>9)</sup> 같은 폐경 여성에게 48 주 동안 45 mg/kg의 비타민 K (menatetrenone) 공급 시에

도 유의적인 결과를 보이지 않았다<sup>28)</sup>고 보고하였다.

대퇴 골밀도와 대퇴 골함량은 실험군 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. Kobayashi 등,<sup>21)</sup> Binkley 등<sup>15)</sup>의 연구에서도 비타민 K의 보충 시 유의적인 차이를 보이지 않았다. 체중 당 대퇴 골밀도 또한 Sham군과 Ovx군 내에서 비타민 K<sub>2</sub> 첨가 식이에 따른 유의적인 차이를 나타내지 않았는데 이것은 난소절제쥐에게 체중 kg 당 비타민 K<sub>2</sub> 30 mg을 8주간 섭취시킨 결과 골부피가 유의적으로 증가하였다고 보고한 연구<sup>16)</sup>와 다르게 나타났다.

비타민 K는 골재형성 (bone remodeling) 과정에서 골격의 크기 성장에 영향을 주는 것으로 알려져 있는데<sup>29)</sup> 비타민 K<sub>1</sub>와 비타민 K<sub>2</sub> 모두가 골형성 (bone formation)에 유익한 영향을 주는 것이 증명되었다.<sup>30)</sup> 특히 비타민 K<sub>2</sub>는 골흡수 (bone resorption) 억제 효과에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다.<sup>1)</sup> 흰쥐를 대상으로 한 선행연구에서는 실험식이에 AIN-93 식이의 영양필요량보다 비타민 K 첨가수준을 과도하게 사용하였으므로 비타민 K가 골격대사에 유효한 dose-response 연구의 필요성이 제시되었다.<sup>29)</sup> 본 연구에서는 비타민 K<sub>2</sub>를 식이 kg 당 3.5 mg으로 섭취시켰는데 이것을 실험동물의 체중 kg 당 섭취량으로 환산하면 약 체중 kg당 25 mg에 해당되는 양으로 다른 선행연구에 비해 비타민 K<sub>2</sub>첨가수준이 골대사 지표와 골밀도에 유효한 영향을 미치기에는 부족한 수준인 것으로 사료되어진다. 본 연구는 선행연구<sup>16)</sup>에서 사용한 비타민 K<sub>2</sub>의 양과 난소절제 상태가 비슷하지만 선행연구는 비타민 K<sub>2</sub>첨가가 통계적으로 유의성이 있게 효과가 있는 것으로 나타났다. 그 이유는 본 연구에서는 AIN-93 식이조성에 근거하여 칼슘량이 추천되는 양이었고 선행 연구<sup>16)</sup>에서는 칼슘 결핍식이여서 칼슘의 섭취 수준이 다르고, 또한 본 연구보다 성숙한 13주령의 난소절제 쥐를 이용하여 골격대사가 더 불리한 상태이었기 때문에 비타민 K<sub>2</sub>의 첨가가 유리하게 작용한 것으로 보여진다. 그리고 비타민 K는 칼슘 결핍식이 시 특히 해면골 (trabecular bone)의 소실 지연에 효과적이라 보고하였다.<sup>16)</sup> 난소절제쥐에서 칼슘과 비타민 K<sub>2</sub> 섭취량이 충분조건을 갖출 때 비타민 K<sub>2</sub>를 추천량의 400% 강화시켜도 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타나 골밀도에 가장 큰 효과를 미치는 것은 칼슘의 섭취량이므로<sup>31)</sup> 칼슘섭취 수준이 권장량에 미달될 경우 추후 비타민 K<sub>2</sub>의 강화가 골밀도에 미치는 효과에 대한 검증이 필요하다고 사료되어진다. 따라서 난소절제쥐에서 칼슘의 섭취 수준을 달리한 추후 연구가 요망된다.

## 요약 및 결론

비타민 K<sub>2</sub>첨가 식이가 (3.5 mg/kg diet) 난소절제쥐에서

골 대사 지표 및 골밀도에 미치는 효과에 대한 요약은 아래와 같다.

- 1) 체중 증가량과 식이효율은 각 군 간의 유의적인 차이가 없었다.
- 2) 혈청 칼슘과 인의 농도는 각 군 간의 유의적인 차이가 없었다.
- 3) 혈중 ALP와 Osteocalcin은 각 군 간의 유의적인 차이가 없었다.
- 4) 요 중 칼슘 배설량과 인의 배설량은 각 군 간의 유의적인 차이가 없었다.
- 5) 요 중 crosslink value는 각 군 간의 유의적인 차이가 없었다.
- 6) 척추 골밀도, 척추 골무기질 함량, 대퇴 골밀도, 대퇴 골무기질 함량에서 비타민 K<sub>2</sub> 첨가 식이에 따른 유의적인 차이가 없었다.

따라서 난소절제쥐에서 비타민 K<sub>2</sub>첨가 식이 (3.5 mg/kg diet)에 따른 체중 당 척추 골밀도와 체중 당 척추 골무기질 함량, 체중 당 대퇴 골밀도는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다.

#### Literature cited

- 1) Koshihara Y, Hoshi K, Okawara R, Ishibashi H, Yamamoto S. Vitamin K stimulates osteoblastogenesis and inhibits osteoclastogenesis in human bone marrow cell culture. *J Endocrinol* 2003; 176(3): 339-348
- 2) Orimo H, Shiraki M, Tomita A, Morii H, Fujita T, Ohata M. Effects of menatetreneone on the bone and calcium metabolism in osteoporosis: a double-blind placebo-controlled study. *J Bone Miner Metab* 1998; 16(2): 106-112
- 3) Hong JY, Choue R. The effects of vitamin K supplements on serum osteocalcin carboxylation in postmenopausal women. *Korean J Nutr* 1999; 32(6): 726-731
- 4) Kalkwarf HJ, Khoury JC, Bean J, Elliot JG. Vitamin K, bone turnover, and bone mass in girls. *Am J Clin Nutr* 2004; 80(4): 1075-1080
- 5) Booth SL, Broe KE, Gagnon DR, Tucker KL, Hannan MT, McLean RR, Dawson-Hughes B, Wilson PW, Cupples LA, Kiel DP. Vitamin K intake and bone mineral density in women and men. *Am J Clin Nutr* 2003; 77(2): 512-516
- 6) Kanai T, Takagi T, Masuhiro K, Nakamura M, Iwata M, Saji F. Serum vitamin K level and bone mineral density in post-menopausal women. *Int J Gynaecol Obstet* 1997; 56(1): 25-30
- 7) Shiraki M, Shiraki Y, Aoki C, Miura M. Vitamin K2 (menatetreneone) effectively prevents fractures and sustains lumbar bone mineral density in osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2000; 15(3): 515-521
- 8) Iwamoto I, Kosha S, Noguchi S, Murakami M, Fujino T, Douchi T, Nagata Y. A longitudinal study of the effect of vitamin K2 on bone mineral density in postmenopausal women a comparative study with vitamin D3 and estrogen-progestin therapy. *Maturitas* 1999; 31(2): 161-164
- 9) Hong JY, Choue R. Correlation of dietary vitamin K intakes and bone mineral density in postmenopausal women. *Korean J Nutr* 1997; 30(3): 299-306
- 10) Iwamoto J, Yeh JK, Takeda T, Ichimura S, Sato Y. Comparative effects of vitamin K and vitamin D supplementation on prevention of osteopenia in calcium-deficient young rats. *Bone* 2003; 33(4): 557-566
- 11) Koshihara Y, Hoshi K. Vitamin K2 enhances osteocalcin accumulation in the extracellular matrix of human osteoblasts in vitro. *J Bone Miner Res* 1997; 12(3): 431-438
- 12) Iwamoto J, Takeda T, Ichimura S, 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
- 13) Iwamoto J, Yeh JK, Takeda T, Sato Y. Effects of vitamin K2 administration on calcium balance and bone mass in young rats fed normal or low calcium diet. *Horm Res* 2005; 63(5): 211-219
- 14) Hara K, Kobayashi M, Akiyama Y. Vitamin K2 (menatetreneone) inhibits bone loss induced by prednisolone partly through enhancement of bone formation in rats. *Bone* 2002; 31(5): 575-581
- 15) Binkley N, Krueger D, Engelke J, Crenshaw T, Suttie J. Vitamin K supplementation does not affect ovariectomy-induced bone loss in rats. *Bone* 2002; 30(6): 897-900
- 16) Mawatari T, Miura H, Higaki H, Moro-Oka T, Kurata K, Murakami T, Iwamoto Y. Effect of vitamin K2 on three-dimensional trabecular microarchitecture in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 2000; 15(9): 1810-1817
- 17) Akiyama Y, Hara K, Ohkawa I, Tajima T. Effects of menatetreneone on bone loss induced by ovariectomy in rats. *Jpn J Pharmacol* 1993; 62(2): 145-153
- 18) Iwamoto J, Takeda T, Yeh JK, Ichimura S, Toyama Y. Effect of vitamin K2 on cortical and cancellous bones in orchidectomized young rats. *Maturitas* 2003; 44(1): 19-27
- 19) Onodera K, Takahashi A, Sakurada S, Okano Y. Effects of phenytoin and/or vitamin K2 (menatetreneone) on bone mineral density in the tibiae of growing rats. *Life Sci* 2002; 70(13): 1533-1542
- 20) Mitruka BM, Rawnsley HM. Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and normal humans, 2nd edition, New York: Masson; 1987. p.160
- 21) Kobayashi M, Hara K, Akiyama Y. Effects of vitamin K2 (menatetreneone) and alendronate on bone mineral density and bone strength in rats fed a low-magnesium diet. *Bone* 2004; 35(5): 1136-1143
- 22) Douglas AS, Robins SP, Hutchison JD, Porter RW, Stewart A, Reid DM. Carboxylation of osteocalcin in post-menopausal osteoporotic women following vitamin K and D supplementation. *Bone* 1995; 17(1): 15-20
- 23) Ushiroyama T, Ikeda A, Ueki M. Effect of continuous combined therapy with vitamin K(2) and vitamin D(3) on bone mineral density and coagulofibrinolysis function in postmenopausal women. *Maturitas* 2002; 41(3): 211-221
- 24) Szulc P, Chapuy MC, Meunier PJ, Delmas PD. Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture in elderly women. *J Clin Invest* 1993; 91(4): 1769-1774
- 25) Vergnaud P, Garnero P, Meunier PJ, Breart G, Kamihagi K, Delmas PD. Undercarboxylated osteocalcin measured with a specific immunoassay predicts hip fracture in elderly women: the EPIDOS Study. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(3): 719-724
- 26) Arjmandi BH, Getlinger MJ, Goyal NV, Alekel L, Hasler CM, Juma S, Drum ML, Hollis BW, Kukreja SC. Role of soy protein with normal or reduced isoflavone content in reversing bone loss induced by ovarian hormone deficiency in rats. *Am J Clin Nutr* 1998; 68(6 Suppl): 1358S-1363S
- 27) Bunyaratavej N, Penkitti P, Kittimanon N, Boonsangsom P, Bonjongsat A, Yuno S. Efficacy and safety of Menatetreneone-4

- postmenopausal Thai women. *J Med Assoc Thai* 2001; 84 Suppl 2: S553-S559
- 28) Ozuru R, Sugimoto T, Yamaguchi T, Chihara K. Time-dependent effects of vitamin K2 (menatetrenone) on bone metabolism in postmenopausal women. *Endocr J* 2002; 49(3): 363-370
- 29) Sogabe N, Maruyama R, Baba O, Hosoi T, Goseki-Sone M. Effects of long-term vitamin K(1) (phylloquinone) or vitamin K(2) (menaquinone-4) supplementation on body composition and serum parameters in rats. *Bone* 2011; 48(5): 1036-1042
- 30) Koshihara Y, Hoshi K. Vitamin K2 enhances osteocalcin accumulation in the extracellular matrix of human osteoblasts in vitro. *J Bone Miner Res* 1997; 12(3): 431-438
- 31) Peters BS, Martini LA. Nutritional aspects of the prevention and treatment of osteoporosis. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2010; 54(2): 179-185