

김 추출물이 갱년기 유도 흰쥐의 Collagen 가교형성에 미치는 영향

한희선 · 배송자 · 김미향[†]

신라대학교 식품영양학과 및 마린 바이오 기능성 소재 산업화 지원센터

Effects of *Porphyra tenera* Extracts on Formation of Collagen Cross-link in Ovariectomized Rats

Hee-Sun Han, Song-Ja Bae and Mihyang Kim[†]

Dept. of Food Science and Nutrition, Silla University, and Marine Biotechnology Center for Bio-Functional Material Industries, Busan 617-736, Korea

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effects of *Porphyra tenera* (PT) extracts on formation of collagen cross-link in ovariectomized rats. From day 3 until 42 after the ovariectomy, Sprague-Dawley female rats were randomly assigned to the following groups: sham-operated rats (Sham), ovariectomized control rats (OVX-control), ovariectomized rats supplemented with PT at 50 mg/kg bw/day (OVX-PT50), 200 mg/kg bw/day (OVX-PT200). The PT ethanol extracts were orally administered 1 mL per day. Body weight gain, food intake and food efficiency ratio were significantly different among the groups. The change of collagen content was studied in lung, bone, cartilage and skin of ovariectomized rats. The effects of PT extracts on the amount of collagen were examined by measuring the hydroxyproline, which is a specific amino acid existing in collagen. Pyridinoline is pyridinium cross-link formed in the mature form of collagen from lysine and hydroxylysine residues. Pyridinoline content was analyzed by HPLC. Pyridinoline content in bone collagen was decreased by ovariectomy but supplementation with the PT extracts was similarly increased to Sham. These results suggest that the PT supplementation could decrease bone loss in postmenopausal women.

Key words: *Porphyra tenera*, collagen, pyridinoline, ovariectomized rat

서 론

의학 기술의 발달과 경제 수준의 향상으로 인간의 수명이 길어져서 전 세계적으로 노인 인구가 증가하고 있는 추세이다. 따라서 노인 인구의 비율은 전 세계적으로 매년 2.4% 증가되고 있고 선진국에서는 65세 이상 노인 인구가 총 인구의 12~13%를 차지하고 있어(1), 여러 연구 분야에서 노인의 건강과 삶의 질 향상을 위해 다양한 연구와 노력을 기울이고 있다. 노화 현상의 하나로 알려진 여성의 갱년기는 노인 수명이 연장됨으로 인해 일생의 1/3 이상을 차지한다는 점이 문제점으로 대두되고 있다(2). 난소기능의 감퇴로 야기된 시상하부-뇌하수체-난소로 이어지는 성선 축의 기능실조가 원인이 되고 이로 인하여 성호르몬, 지질 및 지단백질 변화와 골 대사 등의 신체 및 정신적인 변화가 나타난다(3,4). 갱년기의 시작은 폐경과 더불어 시작되며 폐경기의 에스트로겐 변화로 발생하는 건강 문제 중 심혈관계질환은 우리나라 사망원인 중 제 3순위를 차지하고 있어, 그 발생률이 계속 증가하리라는 예측과 함께 그에 대한 관심 또한 더욱 높아지고

있다(5). 폐경과 지질대사 관계에 있어서 폐경이나 난소 절제 시 estrogen의 감소는 HDL-cholesterol(high density lipoprotein cholesterol) 및 apolipoprotein A-I의 감소를 초래하고 LDL-cholesterol(low density lipoprotein cholesterol)은 증가하여 심혈관계질환의 발병률이 증가한다고 한다(5,6). 폐경기 여성에 문제되는 또 다른 질환은 골 대사 이상에 따른 골다공증이다. 골다공증은 동일 연령과 성별의 정상인에 비해 골량(단위 부피 당 골 질량)이 현저히 감소된 상태로 골의 구성 성분의 양적 감소를 주 병변으로 하는 대사성 골 질환이다(7). 노년기에 있어서 골격손실은 골 형성과 골흡수의 불균형에 의한 것이며 또한 그 원인은 명확하지 않지만 내분비학적, 영양학적, 유전학적 인자들이 관여하고 있는 것으로 알려지고 있다(8). Estrogen결핍에 의한 골다공증은 골절이 쉽게 일어날 수 있는 조건이 되며, 이 경우의 estrogen 투여는 골의 무기질 성분의 증가와 함께 교원섬유의 조성에도 영향을 미쳐서 골질의 예방에 효과를 지닌다고 보고되고 있다(9,10). 인체를 구성하는 성분 중 가장 많은 요소 중의 하나인 교원섬유는 진피, 인대, 건, 뼈, 연골, 근막, 혈관 등의

[†]Corresponding author. E-mail: mihkim@silla.ac.kr
Phone: 82-51-999-5620, Fax: 82-51-999-5687

결합조직에 광범위하게 분포하고 있는데, 교원성분의 주성분은 collagen이라고 하는 경섬유 단백질이다(11). 노령화됨에 따라 피부, 뼈 등은 탄력성을 잃어 가고 근육보다 질겨지는데 이러한 현상은 노령화됨에 따라 collagen의 분자간 또는 분자 내 교차 결합수는 증가하고 불안정한 환원성 교차결합 형태에서 안정한 비 환원성 교차결합의 형태로 변화되어 점차 유연성을 잃어가기 때문인 것으로 해석되고 있다(12). 피부 섬유아세포중의 collagen은 estrogen에 의하여 생성량이 증가한다는 연구보고도 있으나(13), 연령과 함께 나타나는 골 기질량의 감소와 collagen변화에 관해서는 불명확한 점이 많다(14). 하지만 골 다공 및 연골조직의 노화 골관절염 병인에 연골조직의 collagen이 손상되고, 피부 collagen에 영향을 받으며 난소 절제 시 collagen의 구조가 비정상적으로 변한다고도 보고되고 있다(15,16).

한편 collagen 중에 포함되어 있는 아미노산인 hydroxylysine은 collagen 특유의 아미노산으로 존재하고 있는데, collagen의 최종단계인 섬유의 숙성 즉 가교의 형성에 중요한 역할을 하고 있다. Hydroxylysine에 파생된 pyridinoline은 collagen의 성숙한 가교물질로써 골대사의 지표로 이용되고 있다. Pyridinoline과 deoxypyridinoline은 파골세포에 의한 골질 파괴 시 소변으로 유리되어 배설되며 이들은 골과 연골에 주로 존재하기 때문에 이는 골 대사 변질, bone cancer, 골다공증과 같은 각가지 병리형태에서 골 분해의 평가를 위한 확실한 biomaker로서 임상에 이용되고 있다(17).

Estrogen은 인체 내 유익한 효과를 가지는 반드시 필요한 물질로써, estrogen 손실은 심혈관계 및 골 대사에 불균형을 가져오기 때문에 최근 이러한 갱년기장애가 가져오는 부작용을 줄이기 위한 호르몬 대체요법(hormone replacement therapy)이 개발되어 사용되고 있고, 최근에는 일상적으로 섭취하는 자연 식품으로부터 체내 지질 및 갱년기 장애에 개선효과가 있는 성분을 찾으려는 노력이 활발하다. 자연식품 중의 식물성 phytoestrogen은 생식 호르몬 유사물로서 폐경기 여성에게 estrogen 대체 작용을 할 수 있는 것으로 알려져 있다(18).

해조류는 소화 흡수율이 낮아 영양적인 측면에서 관심을 끌지 못하였으나 최근 해조류에 함유된 탄수화물이 혈관 내 콜레스테롤 침착 방지 및 장관운동을 원활히 하고 증금속 배출을 촉진시키며 고지혈증의 개선에 유효하다는 등 식용 해조류로부터 생리 활성 물질의 확인 및 기능성 식품개발에 관심이 모아지고 있다(19). 본 실험에 사용된 김은 홍조류에 속하는 해조류로써 주로 우리나라와 일본 등지에서 많이 애용되고 있으며, 영양소가 풍부하여 탄수화물에는 주로 mannan, xylan이라는 난용성 섬유와 수용성 다당류인 porphyrin이 차지하고 있다. 각종 비타민, 무기질이 다량 함유되어 있으며, 혈액을 맑게 하는 ω -3 지방산인 eicosapentaenoic acid(EPA)와 혈중 콜레스테롤을 낮추는 작용을 하는 taurine이 풍부하다(20). 또한 해조류로부터의 식이성 항산화제

는 유리기 제거 기능을 통하여 노화와 다른 질병을 예방한다고 알려져 있으며(21), 김에도 항산화 물질, polyphenol이 함유되어 있음이 보고되고 있다(22,23). 김의 인체 내의 여러 가지 생리 활성에 관한 많은 연구가 선행되어져 오고 있으나, 본 실험에서는 estrogen 분비 감소로 인한 골 질환 관계에 있어서 김 추출물이 결합조직의 collagen 함량 및 collagen 성숙가교인 pyridinoline 함량 변화에 어떠한 영향을 미치는지 그 효과를 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에서 사용된 김(*Porphyra tenera*, PT)은 2002년 세화수산에서 구입하였으며, 80% ethanol로 추출하여 감압 농축기로 농축한 후 동결 건조하여 powder 상태로 만든 후 동물실험에 시료로 사용하였다.

실험동물

실험동물은 체중이 평균 180 g(7 weeks) 되는 Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐를 효창 사이언스(대구)로부터 구입하여 본 실험실에서 고형사료(삼양유지사료)로 사육하였고, 실험 시작 전 1주일 동안 대조군 식이로 적응시킨 후 동물의 체중에 따라 각 군의 평균 체중을 192.9 ± 1.9 g이 되도록 6~7마리씩 4군으로 나누었다. 즉 실험동물은 난소절제 대조군(OVX-control), 비 난소절제 대조군(Sham), 김 추출물 50 mg/kg 투여군(OVX-PT50) 및 200 mg/kg 투여군(OVX-PT200)으로 나누어 6주간 실험하였다.

체중은 실험 사육 기간 중 격일로 오전 중에 측정하고, 식이 섭취량은 매일 식이 잔량을 측정하여 산출하였다. 동물실험실의 사육조건은 온도 $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 55~60%를 유지시키며 물과 식이는 자유 공급하였고, 실험 시료는 0.9% 생리 식염수로 용해하여 매일 1 mL씩 경구 투여하였고, 대조군(OVX-control, sham)은 동일 용량의 0.9% 생리 식염수를 투여하였다.

난소 절제 기술

1주일 동안 주위환경에 적응시켜 체중에 따라 난피법(randomized complete block design)에 의해 군을 나누어 난소 절제 수술을 실시하였다. 수술은 ether 마취 후 심마취기에 이르면 복부를 절개하여 난소를 제거하고 절개부는 봉합하였다.

혈청 분리 및 장기 적출

실험동물을 해부 전 24시간 절식시킨 후 ether 마취 하에서 개복한 후 정맥에서 채혈하고 실온에서 30분간 방치한 후 3000 rpm, 4°C 에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였고, 실험 시까지 -70°C 에 보관하였다. 혈청 분리 후 0.9% 생리 식염수 용액으로 관류시킨 후 폐는 적출하여 주위의 지방과 물기를 제거하였고, 늑골과 연골은 경계면에서 분리하였으

며 피부는 털을 잘라내고 표피 위의 지방을 제거하여 무게를 잰 후 실험 시까지 -70°C 에 보관하였다.

분석 시료의 조제 및 분석 방법

분리한 혈청의 ALP 활성은 Kind-King(24)의 개변법에 준하여 시료를 조제한 후 UV visible spectroscopy를 이용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

적출한 결합조직 패, 골, 연골, 피부는 6 N HCl 10 mL을 첨가하여 110°C 에서 20시간 산 가수분해 후 여과 농축하여 시료 용액으로 하였다. 결합조직 중의 collagen 양은 Woessner법에 의하여 hydroxyproline 양을 측정 후 collagen 양으로 환산하였다(25). Collagen의 아미노산 조성으로부터 collagen 중의 hydroxyproline 비율은 평균 110잔기/1000잔기 이므로 collagen 양의 환산은 일반적으로 다음 식에 준한다.

$$\text{Collagen } (\mu\text{g}) = 9.09 \times \text{hydroxyproline } (\mu\text{g})$$

결합 조직 중의 pyridinoline 함량은 collagen 측정시 사용된 시료 중 골, 연골 시료를 0.2 μm membrane filter로 여과한 후 HPLC를 이용하여 pyridinoline 함량 분석에 임하였고, 분석조건은 Table 1과 같다.

통계처리

실험 결과는 SAS 8.2 프로그램을 이용하여 평균치와 표준편차로 표시하였고, ANOVA test 후 Duncan's multiple range test하여 실험군 사이의 유의한 차이를 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

Table 1. Instrumental conditions for pyridinoline analysis by HPLC

Item	Conditions
Apparatus	Shimadzu LC
Detector	Fluorescence HPLC RF
Column	Inertsil ODS-25 μm (250 \times 4.6 mm id)
Fluent	Acetonitrile / 0.1 M sodium phosphate buffer pH 3.5 (25 : 75) containing SDS and Na_2EDTA
Flow rate	0.5 mL/min
Excitation wavelength	295 nm
Emission wavelength	395 nm

Table 2. The body weight gain, food intake and food efficiency ratio on supplementation of *Porphyra tenera* ethanol extracts diets for 6 weeks

Group ¹⁾ (N)	Final body weight (g)	Body Weight gain (g/day)	Food intake (g/day)	Food efficiency ratio (FER) ²⁾
Sham (6)	243.17 \pm 15.52 ^{3)a4)}	3.13 \pm 2.34 ^a	13.56 \pm 1.25 ^a	0.216 \pm 0.13 ^a
OVX-control (7)	305.67 \pm 20.78 ^b	5.26 \pm 3.84 ^b	15.61 \pm 1.47 ^b	0.364 \pm 0.24 ^b
OVX-PT50 (6)	310.50 \pm 8.38 ^b	5.97 \pm 3.56 ^b	16.59 \pm 1.50 ^c	0.345 \pm 0.18 ^b
OVX-PT200 (6)	306.00 \pm 16.29 ^b	5.85 \pm 3.78 ^b	16.08 \pm 1.69 ^{bc}	0.365 \pm 0.17 ^b

¹⁾Sham: Sham-operated rats, OVX-control: ovariectomized rats, OVX-PT50: ovariectomized rats supplemented *Porphyra tenera* at 50 mg/kg bw/day, OVX-PT200: ovariectomized rats supplemented *Porphyra tenera* at 200 mg/kg bw/day.

²⁾FER: Weight gain (g/day) / food intake (g/day).

³⁾Values are means \pm SD.

⁴⁾Means with different alphabets are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

결과 및 고찰

실험동물의 체중 증가량, 식이 효율

Table 2는 실험기간 동안 실험동물의 체중 증가량 및 식이 효율을 나타낸 것이다. 난소 절제에 의한 estrogen 분비 감소가 체중 증가를 가져온 여러 보고와 마찬가지로(26-28), 본 실험에서도 난소를 절제한 OVX-control이 난소를 절제하지 않은 Sham에 비해 체중이 증가하였다. 일반적으로 난소 절제로 인한 estrogen 분비 부족은 지방조직의 지단백 리파아제(lipoprotein lipase)의 활성을 저하시키고 호르몬 민감성 리파아제(hormone sensitive lipase) 활성을 증가시켜 체지방 축적을 억제한다고 알려져 있다(29,30). OVX-control이 Sham군에 비해 유의적으로 체중이 증가하였고, 김 추출물을 투여한 모든 군에서도 Sham군에 비해 체중이 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 이것은 여성호르몬 부족으로 인한 체내 지방조직의 증가이며, 또한 지방조직에서도 여성호르몬을 생성할 수 있는 기능을 갖고 있기 때문에, 지방조직에서 난소의 기능을 대체하고자 하는 체내의 보상대책으로 여겨진다. 또한 식이 효율면에서도 Sham군에 비해 유의적으로 높아졌는데 식이 섭취에 따라서 체중이 증가한 것으로 사료된다. 차후 연구에서는 실험군의 열량섭취를 동일하게 하는 pair-fed 방법이 요망된다.

혈청중의 alkaline phosphatase (ALP) 활성

ALP(alkaline phosphatase)는 phosphomonoesterase, phosphodiesterase, phosphoric anhydrase 등으로 분류할 수 있는데 phosphomonoesterase의 경우 십이지장이나 장의 점막에 상당히 많은 양이 있으나 신장, 고등동물의 선(gland), 뼈, 정상적인 혈액에서는 적은 농도로 존재하고 있다. 따라서 이러한 정상적인 조직에서 이상이 생기거나 osteocarcoma의 경우 혈청 내에서 ALP 활성이 증가하게 된다(31,32). 일반적으로 흰쥐의 ALP 활성도는 16~48 U/L이라고 알려져 있으며(33,34), 본 실험에서도 모든 군에서 16~48 U/L의 정상범위에 속하였고, 김 추출물 투여에 의한 영향은 나타나지 않았다(Table 3).

결합조직 중의 collagen 함량

골은 개체의 평생을 통하여 지속적으로 흡수(resorption)

Table 3. Effect of *Porphyr*a tenera ethanol extracts on serum alkaline phosphatase activities in ovariectomized rats

Group ¹⁾	ALP (U/L)
Sham	36.51 ± 0.32 ^{2)NS3)}
OVX-control	37.22 ± 1.03
OVX-PT50	35.26 ± 1.94
OVX-PT200	36.31 ± 1.17

¹⁾See the legend of Table 1.

²⁾Values are means ± SD.

³⁾NS: not significant.

및 재형성(reformation)의 과정을 반복하여 연속성을 유지하며, 여러 가지 호르몬과 cytokine은 파골세포(osteoclast)와 골모세포(osteoblast)의 기능적 활성화에 직접적인 영향을 끼쳐서 골의 흡수 및 형성의 균형유지에 기여하고 있다. 이와 관련된 대표적인 질환인 골다공증(osteoporosis)은 골의 균형이 파괴되는 모든 조건에서 유발될 수 있으나 여성에서 폐경에 의한 혈중 estrogen의 감소가 가장 일반적인 원인으로 알려져 있다(35).

Estrogen의 부족은 골질이 쉽게 일어날 수 있는 조건이 되며, 이 경우 estrogen 투여는 골의 무기질 성분의 증가와 함께 교원 섬유소의 조성에도 영향을 끼쳐서 골질의 예방에 효과를 지닌다고 보고되고 있다(36). Collagen은 인체 각 결합 조직에 분포하는 중요한 단백질로서 골의 비무기질 부분은 주로 type I collagen으로 이루어져 있고(37), 피부 섬유 아세포 중의 collagen은 estrogen에 의하여 생성량이 증가한다고 알려져 있으며(13), 조직 내 collagen의 손상은 연골조직의 노화와 골 관절염, 골다공증 병인의 원인이 된다고 한다(15).

Table 4는 난소 절제한 흰쥐에 김 추출물을 투여하여 각 결합조직의 collagen 함량을 나타낸 것이다. 연골의 경우, 난소를 절제하지 않은 Sham군에 비해 난소를 절제한 OVX-control은 난소 절제에 의해 collagen 함량이 낮아 졌으나, 난소 절제 후 김 추출물을 투여함으로써 유의적이지는 않으나 증가하는 경향을 보였다. 골 조직에서도 난소를 절제하지 않은 Sham군(189.16 ± 30.55 mg/g)에 비해 난소를 절제한 OVX-control(164.54 ± 6.87 mg/g)군이 감소하는 경향을 보였다. 난소를 절제한 후 김을 200 mg/kg 투여한 군(OVX-PT200)에서 OVX-control군에 비해 유의적이지는 않으나 다소 증가하는 경향을 보였다. 피부 조직에서 또한 난소 절

제로 인하여 OVX-control군은 난소를 절제하지 않은 Sham군에 비교해 유의적으로 감소하는 경향을 보였고(p<0.05), 난소 절제 후 김을 농도별 투여한 각 군에서 증가하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다. 폐 조직에서의 collagen 함량은 난소를 절제하지 않은 Sham군, 난소를 절제한 OVX-control군, 김 추출물 투여군 간의 차이는 보이지 않았다. 흰쥐에 난소를 절제하면 골의 교환(turnover)이 가속되어 골의 밀도가 현저하게 감소하고, 해면골(cancellous bone)의 손실이 초래되는데 이는 estrogen의 감소가 파골 세포의 활성을 촉진시키고 이는 다시 골 조직의 연결을 약화시키기 때문인 것으로 알려져 있다(38-40). 한편 난소 절제 후 estrogen의 투여는 골 손실의 억제에 효과적인 것으로 알려져 있는데, Jerome 등(41)은 난소를 절제한 원숭이에 estrogen을 투여한 결과 골의 재형성이 증가되었다고 하였으며, Oursler 등(42)은 골 형성에 관여하는 골아세포 및 파골세포가 estrogen에 대한 수용체를 지니며 골의 유지에 있어서 estrogen과 밀접한 관련을 지닌다고 주장하였다. 골 손실의 억제는 estrogen 투여가 효과적인 것으로 알려져 있으며, 그 이외의 collagen 합성에 보조인자로 관여하는 ascorbic acid, α-ketoglutaric acid, 산소 그리고 칼슘, 인 등이 있다(11).

본 실험을 통하여 난소 절제로 인한 estrogen감소가 collagen 합성량의 감소를 초래하였으나 김 추출물을 투여함으로써 유의적이지는 않으나 증가하는 경향을 나타내었다. 이러한 변화는 collagen함량 손실에 김 추출물이 유익한 효과를 가지는 것으로 보이며, 이는 김에 함유되어 있는 phytoestrogen, 칼슘, vitamin, polyphenol 등이 복합적으로 작용하였을 것으로 사료된다.

Collagen의 성숙 가교인 pyridinoline 함량

Collagen 합성의 여러 단계 중 마지막 단계에 이루어지는 교차결합은 collagen의 결합조직의 강도를 유지하기 위하여 필요한 과정으로 알려져 있다. Collagen의 아미노산 조성은 glycine이 전체 아미노산의 1/3, hydroxyproline이 1/10, hydroxylysine이 약 1/100을 차지하고 있다. Hydroxylysine은 collagen내의 다른 아미노산에 비해 양적으로 적으나 collagen 특유의 아미노산으로 존재하고 있으며, collagen 합성의 최종단계인 섬유소의 숙성 즉 가교의 형성에 중요한 역할을 하고 있다(43). Lysine 및 hydroxylysine 잔유물로부터

Table 4. Effect of *Porphyr*a tenera ethanol extracts on collagen content in cartilage, bone, skin and lung of ovariectomized rats

Group ¹⁾	Cartilage (mg/g)	Bone (mg/g)	Skin (mg/g)	Lung (mg/g)
Sham	154.64 ± 17.99 ^{2)NS3)}	189.16 ± 30.55 ^{NS}	224.22 ± 4.59 ^{b4)}	21.99 ± 3.08 ^{NS}
OVX-control	145.21 ± 19.55	164.54 ± 6.87	185.32 ± 16.89 ^a	20.62 ± 2.43
OVX-PT50	158.85 ± 22.63	162.98 ± 24.06	203.43 ± 23.06 ^b	21.74 ± 2.04
OVX-PT200	167.80 ± 19.77	166.75 ± 13.49	205.36 ± 26.14 ^b	21.44 ± 7.10

¹⁾See the legend of Table 1.

²⁾Values are means ± SD.

³⁾NS: not significant.

⁴⁾Means with different alphabets are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 5. Effect of *Porphyra tenera* ethanol extracts on pyridinoline content in cartilage and bone of ovariectomized rats

Group ¹⁾	Cartilage (mg/g)	Bone (mg/g)
Sham	0.073±0.018 ^{2)a3)}	0.019±0.003 ^{b3)}
OVX-control	0.097±0.006 ^b	0.015±0.003 ^a
OVX-PT50	0.071±0.010 ^a	0.017±0.004 ^b
OVX-PT200	0.070±0.002 ^a	0.024±0.003 ^b

¹⁾See the legend of Table 1.

²⁾Values are means±SD.

³⁾Means with different alphabets are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

형성된 pyridinoline은 deoxypyridinoline과 함께 collagen 가교를 형성하는 collagen의 성숙가교로 알려져 있다(43-47).

Table 5는 난소를 절제한 흰쥐에 김 추출물을 투여하여 골, 연골의 collagen 중의 pyridinoline 함량을 나타낸 것이다. 골에서 pyridinoline 함량은 난소를 절제하지 않은 Sham (0.019±0.003 mg/g)군이 OVX-control(0.015±0.003 mg/g)군에 비해서 유의적으로 높은 값을 나타냈고($p<0.05$), 난소 절제 후 김 추출물을 농도별로 투여한 군(OVX-PT50 및 OVX-PT200)에서 0.017±0.004 mg/g, 0.024±0.003 mg/g으로 OVX-control에 비해 유의적으로 높은 값을 나타내어($p<0.05$), 난소 절제 시 소실되는 pyridinoline 생성량을 회복시켰다. 연골에서의 pyridinoline 생성량을 보면 골에서의 pyridinoline 함량과 다른 pattern으로 검출되었는데, 난소를 절제하지 않은 Sham(0.073±0.018 mg/g)군은 난소를 절제한 OVX-control(0.097±0.006 mg/g)에 비해 낮은 함량을 나타내었다($p<0.05$). 난소 절제 후 김을 농도별로 투여한 군(OVX-PT50, OVX-PT200)의 pyridinoline 함량은 0.071±0.010 mg/g 및 0.070±0.002 mg/g으로 Sham군과 유사한 경향을 나타내어($p<0.05$) OVX-control에 비해 유의성 있게 감소하였다.

Collagen 성숙은 가교의 증가를 의미하나, collagen 가교는 연령과 함께 단순하게 증가하는 것이 아니라 질적으로 변화하는 것으로, 출생 시에는 동물의 collagen에 다량으로 함유되어있으나 성장과 함께 감소하는 shiff 염기형인 미숙가교, 성숙과 함께 증가하는 성숙가교, 그리고 노화와 함께 나타나는 노화가교가 있다. 또한 collagen 가교 형성은 결합조직의 강도를 유지하기 위하여 필요한 가정이나 가교가 생리적으로 범위를 초월하여 증가하면, 세포와 혈관 중에 영양물이나 노폐물의 이동이 원활하지 않게 되고, 그로 인하여 세포의 활동이 약해져서 조직 전체에 노화를 일으키는 것으로 알려져 있다(48). 본 실험에서는 골과 연골의 pyridinoline 생성량이 서로 반대되는 결과로 나타났는데, collagen의 성숙가교인 pyridinoline은 결합조직의 강도를 유지하기 위해 생성되는 것(48)으로, 강도가 중시되는 골(49)에서는 김 추출물의 투여에 의해 골 손실이 억제되었으나, 연골에서는 김 추출물의 투여가 연골 탄력 유지(50)를 위해 가교생성을 오히려 억제하는 효과로 나타난 것으로 추측되어진다. 따라서

collagen 성숙가교인 pyridinoline 함량은 노화되는 시기에 따라 단순한 증가가 아니라 질적인 변화로 그 생성량에 영향을 끼치는 것으로 사료된다.

본 실험의 결과는 난소를 절제한 후 김을 투여한 군이 골과 연골에서의 pyridinoline 함량이 난소를 절제하지 않은 Sham군과 비슷한 수치로 회복되어 김이 난소 절제 시 collagen 가교 변화에 유익한 효과를 주는 것으로 사료되며, 본 실험에서는 조직 내 collagen중의 pyridinoline의 생성량을 측정하였으나 정확한 골 분해 평가를 위해서 앞으로 urine의 pyridinoline 함량 측정 또한 병행하고자 한다.

요 약

난소 절제시술 및 폐경으로 인한 여성 호르몬인 estrogen의 감소는 지속되는 골 손실 가속화 등으로 인한 골 질환의 문제점을 가지고 있다. 그러므로 본 연구에서 흰쥐의 난소를 절제하여 인위적인 폐경을 유도하여 골 손실의 정도를 결합조직 중의 collagen 함량 및 collagen 성숙가교인 pyridinoline 함량을 측정하여 그 효과를 검토하였다. 난소 절제 후 결합조직 중의 collagen 함량은 연골과 피부에서 난소를 절제하지 않은 Sham군에 비하여 낮았으며, 김 추출물 투여군에서 유의적이지는 않으나 높은 경향을 나타내었다. 골 중 collagen 성숙가교인 pyridinoline 함량은 난소절제에 의해 감소하였으나 골에서는 김 추출물 투여에 의해 난소를 절제하지 않은 Sham군과 비슷한 수준으로 증가하였고, 연골에서는 김 추출물 투여에 의해 Sham군과 비슷한 수준으로 감소하는 경향을 나타내어 pyridinoline 생성에 유익한 효과를 나타내었다. 김 추출물이 collagen 합성 및 성숙가교인 pyridinoline 생성을 회복시킨 본 실험의 결과로 보아 폐경기 여성에게 김 추출물의 섭취는 폐경으로 인한 골 손실을 감소시켜 줄 것으로 사료되어지며, 이러한 작용을 나타낸 김의 성분 및 그 기전에 대해서는 앞으로 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

문 헌

1. Lee HO, Lee HJ. 1999. Effect of early menopause by ovariectomy on bone mineral density. *ChungAng Univ J Life Science* 12: 79-99.
2. Kwon SC. 1998. Effects of continuously added oral progestin (medroxy progesterone acetate) on the levels of serum lipid and lipoprotein during estrogen replacement therapy in postmenopausal women. *Korean Soc Obstetrics & Gynecology* 41: 2442-2446.
3. Kim MY. 2003. The effects of *Sedum sarmentosum bunge* on collagen content of connective tissues in ovariectomized rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 1114-1119.
4. Kim CW. 1996. The study on treatment of climacteric disorder I (osteoporosis). *Wonkwang Univ* 32: 109-136.
5. Ross RK, Pagamm-Hill A, Mark TM, Henderson BE. 1989. Cardiovascular benefits of estrogen replacement therapy.

- Am J Obstet Gynecol* 160: 1301-1306.
6. Campos H, Wilson Peter WF, Jimenez D, Mcnamara JR, Ordovas J, Schaefer EJ. 1990. Differences in apolipoproteins and low density lipoprotein subfractions in postmenopausal women on and off estrogen therapy: Results from the Framingham off spring study. *Metabolism* 39: 1033-1038.
 7. Lee ES, Kang BH. 1997. Biochemical bone markers in postmenopausal women. *Korean Soc Obstetrics & Gynecology* 40: 1450-1457.
 8. Jeffcoat Mk, Chesnut CH. 1993. Systemic osteoporosis and oral bone loss, evidence shows increased risk factors. *Jadas* 124: 49-56.
 9. Holland EF, Studd JW, Mansell JP. 1994. Changes in collagen composition and cross-links in bone and skin of osteoporotic postmenopausal women treated with percutaneous estradiol implant. *Obstet Gynecol* 83: 180-183.
 10. Clark AP, Schuttinga JA. 1992. Targeted estrogen/progesterone replacement therapy for osteoporosis. calculation of health care cost savings. *Osteoporos Int* 2: 195-200.
 11. Park RJ, Seo TS, Jun KH. 2001. Characteristics and reaction of collagen fiber for multiple factors. *J Special Education & Rehabilitation Sci* 40: 167-179.
 12. Kim YH, Hong SP, Yang RY. 1995. Differential scanning calorimetry of skin collagen. *J Kor Food Sci Technol* 27: 571-575.
 13. Kim MH, Otsuka M, Arakawa N. 1994. Age-related changes in the pyridinoline content of guinea pigs cartilage and achilles tendon collagen. *J Nutr Sci Vitaminol* 40: 95-103.
 14. Noda M, Roodon GA. 1989. Transcriptional regulation of osteopontin production in rat osteoblast-like cells by parathyroid hormone. *J Cell Biol* 108: 713.
 15. Tiku ML, Allison GT. 2003. Malondialdehyde oxidation of cartilage collagen by chondrocytes. *Osteo Arthritis and Cartilage* 11: 159-166.
 16. Kafantari H, Kounadi E. 2000. Structural alterations in rat skin and bone collagen fibrils induced by ovariectomy. *Bone* 26: 349-353.
 17. Kim JG, Chae MD. 1995. Urinary excretion of pyridinoline crosslink in post-menopausal women and women with premature ovarian failure. *Korean Soc Obstetrics & Gynecology* 38: 2090-2096.
 18. Liu J, Burdette JE, Xu H, Gu C, Breemen RB, Bhat KPL, Booth N, Constantinou AI, Pezzuto JM, Fong HS, Farnsworth NR, Bolton JL. 2001. Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms. *J Agric Food Chem* 49: 2472-2479.
 19. Ko MS, Shin KM. 2002. Effects of *Hijikia fusiforme* ethanol extract on antioxidative enzymes in ethanol-induced hepatotoxicity of rat liver. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 87-91.
 20. Park CK, Kang TJ. 2000. The nutritional on functional constituents of laver. *Bull Fish Sic Inst, Yosu Nat'l Univ* 9: 133-137.
 21. Yan X, Nagata T, Fan X. 1998. Antioxidative activities in some common seaweeds. *Plants Food Hum Nutr* 52: 253-262.
 22. Lee NH, Oh KL. 2000. Screening of radical scavenging effects from marine algae. *Cheju J Life Science* 3: 95-101.
 23. Lee BH, Choi BW. 1996. Extraction of water soluble antioxidants from seaweeds. *J Korean Ind & Eng Chemistry* 7: 1069-1077.
 24. Kind PRN, King EJ. 1954. Estimation of phosphatase by determination of hydrolyzed phenol with aminoantipyrine. *J Clin Patol* 7: 332-326.
 25. Woessner JF. 1961. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* 93: 440-447.
 26. Wronski TJ, Cintron M, Dann LM. 1988. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 43: 179-183.
 27. Abe T, Chow JWM, Lean JM, Chambers TJ. 1993. Estrogen does not restore bone loss after ovariectomy in the rat. *J Bone Miner Res* 8: 831-838.
 28. Aitken JM, Armstrong E, Anderson JB. 1972. Osteoporosis after oophorectomy in the mature female rat and the effect of estrogen and/or progesterone replacement therapy in its prevention. *J Endocrinol* 55: 79-87.
 29. Ramirez ME, McMurry MP, Wiebke GA, Felton KJ, Ren K. 1997. Evidence for sex steroid inhibition of lipoprotein lipase in men: comparison of abdominal and femoral adipose tissue. *Metabolism* 46: 179-185.
 30. Valette A, Meignen KM, Mercier L, Liehr JG, Boyer J. 1986. Effects of 2-fluoroestradiol on lipid metabolism in the ovariectomized rat. *J Steroid Biochem* 25: 575-578.
 31. Park YH, Yoo TM. 2001. The Effect of isoflavone supplementation on bone metabolism in ovariectomized SD rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 657-661.
 32. Kim IG, Kim SB, Kim JG, Kim KC. 1993. Serum enzymes as indicator of radiation exposure in rats. *Korean Association for Radiation Protection* 18: 37-44.
 33. Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH. 1984. *The laboratory rats*. Academic Press Inc, New York. Vol II, p 123-127.
 34. The Association of Korean Clinical Pathology. 1994. *The clinical pathology*. Korea Medicine Co., Seoul. p 40-79.
 35. Odell WD, Heath H. 1993. Osteoporosis pathophysiology, prevention, diagnosis and treatment. *Dis Mon* 39: 789-867.
 36. Clark AP, Schutting JA. 1992. Targeted estrogen/progesterone replacement therapy for osteoporosis: calculation of health care cost savings. *Osteoporosis Int* 2: 195-200.
 37. Lubec G, labudova O. 1995. Alpha-methyl-proline restores normal levels of bone collagen type I synthesis in ovariectomized rats. *Life Sciences* 57: 2245-2253.
 38. Kinble RB, Vannice JL, Bloedow DC. 1994. Interleukin-1 receptor antagonist decreases bone loss and bone resorption in ovariectomized rats. *J Clin Invest* 93: 1959-1967.
 39. Kimble RB, Matayoshi AB, Vannice J. 1995. Simultaneous block of interleukin-1 and tumor necrosis factor is required to completely prevent bone in the early post-ovariectomy period. *Endocrinology* 136: 3054-3061.
 40. Dempster DW, Birchman R, Xu R. 1995. Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy. *Bone* 16: 157-161.
 41. Jerome CP, Carlson CS, Register TC. 1994. Bone functional changes in intact ovariectomized, and ovariectomized, hormone-supplemented adult cynomolgus (Macaca fascicularis) evaluated by serum markers and dynamic histomorphometry. *J Bone Miner Res* 9: 527-540.
 42. Oursler MJ, Lander JP, Riggs BL. 1993. Oestrogen effects on osteoblasts and osteoclasts. *Ann Med* 25: 361-371.
 43. Black D, Duncan A. 1988. Quantitative analysis of the pyridinium cross-links of collagen in urine using ion-paired reversed-phase High-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 169: 197-203.
 44. Ninomiya Y, Showalter AM, Olsen BR. 1984. *The role of extracellular matrix in development*. Alan R. Liss Inc, New York. p 225.
 45. Erick K, David T, Rossi. 2000. Quantitative method for biomarkers of collagen degradation using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 283: 71-76.
 46. Pietro A, Matteo G. 2002. A simple and convenient trans-

- formation of L-lysine into pyridinoline and deoxypyridinoline, two collagen cross-links of biochemical interest tetrahedron. *Asymmetry* 13: 1901-1910.
47. Adamczyk M, Johnson DD, Reddy RE. 2001. Bone collagen cross-links: A convergent synthesis of (+)-deoxypyrrrololine. *J Org Chem* 66: 11-19.
48. Kim MY. 1999. The study of mature cross-link of collagen. *J Nat Sci of Silla Univ* 7: 117-132.
49. 松本俊夫, 中村利孝. 1995. 骨祖鬆症. 羊土社, 東京, p 12-85.
50. 永井 裕, 藤本代三郎. 1982. コラーゲン代謝と疾患. 講談社, 東京. p 206-211.

(2003년 9월 26일 접수; 2004년 1월 30일 채택)