난소절제로 유도한 노화쥐에서 chondroitin sulfate에 의한 산화 스트레스의 감소효과

이진영[1] · 하배진*

신라대학교 공과대학 생명공학전공, [1]인제대학교 의과대학 의학과 생화학전공

Received October 29, 2003 / Accepted February 14, 2004

Reduction of Oxidative Stress by Chondroitin Sulfate in the Ovariectomy-Induced Aging Rat. Jin Young Lee and Bae Jin Ha*. *Department of Bioscience and Biotechnology, College of Engineering, Silla University, SAN 1-1, Gwaebop-Dong, Sasang-Gu, Busan 617-736, Korea, [1]Department of Biochemistry, College of Medicine, Inje University, 633-165, Gaegum-Dong, Busanjin-Gu, Busan 614-735, Korea* – The ovarian hormone-deficiency induced ovariectomy rat is widely used as an aging model due to its practicality, convenience, and cost effectiveness. The surgically ovariectomized rat induces reactive oxygen species (ROS) generation like aging phenomena. Free oxygen radicals have been proposed as important causative agents of aging. The purpose of this study was to investigate the effect of chondroitin sulfate (CS) to prevent ovariectomy (OVX)-induced oxidative stress. The OVX rats were given intraperitoneally CS at doses of 100 mg/kg and 200 mg/kg daily for fifteen weeks. Malondialdehyde (MDA) levels were determined as well as the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), reduced-glutathione (GSH), oxidized-glutathione (GSSG), glutathione peroxidase (GPx) in the liver. The liver antioxidative enzyme activity was elevated while MDA concentration decreased in all CS treated animals. The results demonstrated that CS reduced oxidative stress in a dose dependent manner. These results suggest that CS might be a useful candidate for antioxidative reagent.

Key words – Chondroitin sulfate, Reactive oxygen species, Ovariectomy, Malondialdehyde, Antioxidative stress

현대는 건강에 있어서 식품을 구성하는 성분들의 기능성에 대한 관심사가 날로 높아지고 있으며, 그 유효 성분의 해명이 진전되고 있다. 특히, 우리가 섭취하는 영양소들 중에는 과산화로 인한 손상으로부터 신체를 보호하는 영양소들이 있는데, 이들에 대한 효능이 여러 연구자들에 의해 검증되고 실용화하려는 움직임들이 조성되고 있는 가운데, 이미 비타민 C, E, 그리고 β-carotene 등의 물질들은 그 효능이 입증되고 있다.

이러한 연구들의 연장선상에서 특히 인체가 가장 많이 섭취하고 에너지 대사에서 필수적으로 작용하는 polysaccharide에 대해 많은 관심이 집중되고 있다. Proteoglycan은 중심 단백질과 glycosaminoglycan (GAG) 사슬이 한 개 이상 공유결합한 복합 거대분자이다. GAG는 복합 polysaccharide로서 heparan sulfate, keratan sulfate, and chondroitin sulfate (CS) 등을 포함한다. 이 중 CS는 세포 내외에 존재하며, 일반적으로 세포질 과립의 내부나 세포막에 직접적으로 붙어서 세포 표면에 존재하기도 한다. 또한, bone marrow stromal cell 혹은 bone marrow 세포외 기질의 주요 성분이기도 하다. 그 중요한 기능으로는 조직의 강도와 탄력, (거대)분자들의 확산, 세포 이동, 세포의 성장과 분화에 영향을 미치는 등 여러 가지 기능을 조절한다[6,14,15,24]. CS는 glucuronosyl→N-acetyl-D-galactosamine dissacharide의 반복단위가 glucuronosyl→galactosyl→xylosyl 결합을 통해 중심 protein에 붙어있는 중합체에서 생성된다[17]. 이러한 초기 생합성 물질은 여러 가지 성숙 반응을 거쳐서 결국 CS로 된 것이다. 일반적인 CS의 구조는 uronic acid (β-D-glucuronic)의 황산화된 잔기와 α-D-N-acetylgalactosamine이 β-(1→3) 결합에 의해 반복적으로 결합하고 있는 heteropolysaccharide이다[29]. 이 물질은 특히 관절염의 치료제로 사용되고 있으며, 연골의 CS함량의 감소는 노년층에서 관절 질환의 위험인자로 간주되고 있다[13]. 하지만, 노화와 관련한 CS의 효능을 검증하는 다른 연구는 부족한 실정이며, CS의 여러 가지 특성으로 보아 반드시 노화로 인한 여러 가지 지표들에 변이가 있을 것이고 이러한 변이들을 보호하거나 개선 시켜줄 수 있을 뿐만 아니라, CS는 중성 pH에서 안정하므로[14] 인체에 응용하기에 적합한 물질이라고 생각되어진다.

1992년 보고에 의하면 우리나라 여성의 평균 수명은 75세로 과거에 비해서 상당히 증가되었고 65세 이상의 노년여성이 전 인구의 4.7%를 차지하고 있으며 이는 앞으로 더욱 증가될 것으로 예상된다[5,9]. 따라서 여성은 인생의 1/3을 폐경기 후 인생을 보내게 되나 폐경 후에는 estrogen의 생성저하로 인하여 여러 가지 질병의 발병률이 높은 것으로 보고된 바 있다. 특히 여성의 생식기계 질환을 치료할 목적으로 시행되는 난소절제술은 estrogen의 생성을 저하시켜서 인위적인 폐경을 야기하므로 이로 인한 심혈관계 질환의 발병에 관

*Corresponding author
Tel : +82-51-309-5466, Fax : +82-51-309-5684
E-mail : bjha@silla.ac.kr

심이 집중되고 있다. 여성은 폐경 전 수년 동안 체내호르몬 생성의 점진적인 변화에 의해 월경주기가 불규칙해지고 결국에는 정지된다. FSH는 폐경이후 1년 이내에 증가하기 시작하여 약 10년 후에는 최고치를 나타내었으며 이와 함께 혈청 내 estradiol량이 급속히 감소됨을 보고 하였다[11,12,16, 22]. 그 증상 중의 하나로 급격한 노화가 진행되는데 각 세포는 저밀도지단백의 상승으로 인하여 고지혈증을 일으켜 과산화 지질 형성을 촉진하며 따라서 각 효소의 유리기 소거기능을 저하시켜 과산화지질 증가를 더욱 조장한다. 이 때 유리기 소거기전에 관여하는 것으로 항산화 효소가 있는데 이는 노화를 막는 역할을 한다. 주로 불포화 지방산의 산화과정에 참여하게 되는데 지방이 과산화 되면 세포막의 유동성이 감소되고 막 투과성에 변화가 오며, 세포막에 붙어 있는 효소들의 작용을 변화시키는 결과를 가져온다[8-10,25,28]. 산소 유리기는 산소를 이용하는 세포에서 생성되는 독성이 강한 물질로서 세포막의 지질 및 단백질 등을 손상시키며 세포의 노화를 촉진 시킨다.

정상적인 세포는 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)으로부터 스스로를 보호하기 위하여 수많은 효소적-비효소적 방어시스템을 가진다. 그러한 효소들의 예로는 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) 등이 존재한다. 이들 효소는 빠른 속도로 superoxide anion free radical O_2^-, hydrogen peroxide H_2O_2 and hydroxyl free radical OH과 같은 ROS를 제거한다. SOD는 $\cdot O_2^-$를 H_2O_2로 바꾸고, H_2O_2 는 CAT와 GPx에 의해 산소분자와 물로 되면 비로소 활성산소종의 독성이 없어지게 된다. 게다가, GPx는 GSH를 산화형 glutathione (GSSG)으로 산화시키면서 H_2O_2를 제거하고, 산화된 GSSG는 Glutathione reductase에 의해 NADPH를 소모하면서 다시 GSH로 환원되므로 glutathione은 GSH와 GSSG의 두 가지 형태로 균형을 이루면서 존재하게 된다. 세포내의 독성 또는 산화적 손상이 일어난 경우에는 GSSG가 서서히 증가하게 되어 GSH/GSSG의 불균형을 초래함으로써 방어기전으로서의 역할이 소실된다. 따라서 GSH는 SOD와 더불어 산소유리기에 의한 세포손상을 방지하고 세포내 해독작용을 담당하는 중요한 물질로 여겨지고 있다[10,11,16]. 하지만 이러한 메카니즘에서 어떠한 형태로든 노화가 진행되면 이러한 생체내 시스템의 균형이 깨어지게 되고 체내의 항산화 효소만으로 세포막의 polyunsaturated fatty acid (PUFA)를 공격하는 ROS의 생성을 완벽하게 제거하지는 못한다.

그러므로 본 연구에서는, 난소를 절제하여 ROS가 유도된 쥐에 CS를 투여 했을 때 어떠한 효과가 있는지를 알아보기 위하여 생리활성효소 및 항산화 효소 활성을 연구하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 식이

실험동물은 체중 160±10 g의 female rat를 구입하여 본 실험실에서 1 주일간 고형사료와 물을 자유 급식시켜 실험실에서 적응시킨 후 다음과 같이 나누었다. 동물의 체중에 따라 각각 7마리씩 4군으로 나누어 난소절제를 하지 않은 군(Sham)은 0.9% saline을 투여하였고, 3개의 OVX군은 각각 0.9% saline, CS를 용량별로 투여하였다. 난소절제 후 물질투여군은 매일 쥐 무게 kg당 100 mg과 200 mg의 CS를 D.D.W.에 용해시켜 난소 절제 이틀 후부터 복강 내로 주입하였다. 15주째에 모든 쥐를 에테르 마취 후 해부하여 혈액과 간을 채취하였다.

혈액 및 장기 채취

실험 종료 후 실험동물을 에테르 마취 후 개복하여 심장에서 채혈하여 30분 후 3000×g에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였으며, 간은 적출하여 0.9% saline으로 세척하여 vial에 담아 -70℃ 냉동고에 보관하였다.

간 조직중의 과산화지질 정량

과산화지질 정량은 간 1 g을 취하여 무게의 5배 용량인 5 ml의 0.05M phosphate buffer (pH 7.4)에 균질화 시켜 마개가 있는 시험관에 0.5 ml씩 3배수로 취하였다. TBA 변법[23]으로 7% SDS로 가용화시켜 여기에 0.67% TBA + Acetic acid (1:1) 2 ml를 가하여 95℃ 수욕상에서 50분간 가온 후 즉시 급냉시켜 butanol 5 ml로 3000×g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취해 535 nM에서 흡광도를 측정하였다.

혈청 aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT)의 활성측정

혈청 AST, ALT활성도는 Reitman-Frankle method[27]를 이용해 다음과 같이 실시하였다.

1) AST 측정

AST기질액 1.0 ml를 시험관에 취하여 37℃에서 3분간 가온하였다. 여기에 0.2 ml의 혈청을 가하여 섞은 후 37℃에서 60분간 반응시킨 뒤, 1 ml의 발색액을 가하여 잘 혼합한 후 505 nM에서 D.D.W.를 대조로 하여 흡광도를 측정하였다.

2) ALT 측정

ALT 측정은 ALT 기질액을 사용하였고, 혈청과 혼합 후 37℃ 항온조에서 반응시간이 30분인 것을 제외하고는 AST 측정법과 동일하다.

간 조직 중의 단백질 함량 분석(Protein Assay)

단백질의 정량은 Lowry[19]의 방법에 의하여 측정하였고, bovine serum albumin (BSA)을 표준으로 하여 단백질 함량을 계산하였다.

간 조직 중의 SOD의 활성[4]측정

SOD활성 측정은 Beauchamp와 Fridovich의 방법[4]에 따

라 실시하였다. 0.2M K-phosphate buffer를 672 μl, 1mM xanthine 100 μl, 1% sodium deoxychlorate (DOC) 30 μl, 0.2 mM cytochrome C 150 μl를 넣고 sample 5 μl를 섞은 후, xanthine oxidase 원액을 10 μl를 넣고, 550 nM에서의 흡광도 감소를 2분 동안 측정하였다. Sample의 효소활성도를 알아보기 위한 표준물질로서는 superoxide dismutase (Sigma)를 사용하였다.

간조직 중의 CAT의 활성측정

CAT 활성 측정은 Aebi에 의해 고안된 방법[1]을 이용해 다음과 같이 실시하였다. Phosphate Buffer 1.9 ml에 간 조직 sample 0.1 ml와 과산화수소 용액 1 ml을 혼합하여 240 nM에서 1분 30초 동안 흡광도 감소를 측정하였다.

간조직 중의 GSH 및 GSSG의 정량

간 조직 중 glutathione 정량은 각각 Elman[7]과 Racker [26]의 방법으로 실시하엿다. 간 homogenate 100 μl에 25% HPO_3 25 μl를 섞어 4℃, 12000×g에서 10분간 원심 분리하여 sample을 준비하였다.

1) GSH

형광 분석기(Fluorimeter, Jenway 6200)로 sample 상등액 80 μl와 phosphate buffer 1600 μl와 OPT (O-phthalaldehyde) 80 μl를 넣고 15분 shaking 후 Fluorimeter (Jenway, Jenway 6200)로 Ex.350/Em.420에서 측정하였다.

2) GSSG

형광 분석기(Fluorimeter)로 sample 상등액 200 μl와 NEM (N-Ethyleneamide) 80 μl를 섞은 후 20분 방치하고, 0.14N NaOH 1,720 μl를 가하여 혼합 한 후 앞에서 혼합한 sample 200 μl와 OPT (O-phthalaldehyde) 80 μl를 15분 흔든 후 Ex.350/Em.420에서 측정하였다.

간조직 중 GPx의 활성측정

간 조직 중 GPx의 활성도는 Lawrence[18]등의 방법으로 다음과 같이 실시하였다. 0.1M Phosphate buffer 400 μl, 0.01 M NaN_3 70 μl, 0.01M GSH 70 μl, 1.5 mM NADPH 70 μl, H_2O 360 μl, GSSH-reductase 20 μl, sample 10 μl를 혼합하여 상온에서 1분간 방치한 후 2 mM의 H_2O_2 100 μl를 가해 잘 섞은 후 340 nm에서 1분30초간 흡광도 감소 측정을 하였다.

통계처리

본 실험에 대한 모든 실험 결과는 평균치와 표준편차로 나타내었고, 통계적 유의성은 Student's *t*-test에 의해 검정하였다.

결과 및 고찰

혈청 중 AST와 ALT의 활성도 변화

포유동물의 간은 아미노산 감소의 중요한 위치를 차지한다. 많은 아미노산의 α-amino group은 glutathione을 형성하기 위하여 α-ketoglutarate에 옮겨진 뒤에 산화되어 NH_4^+가 생기게 되는 탈아미노화 반응이 일어난다. Aminotransferase는 α-amino acid에서 α-keto acid 까지 α-amino group의 전달에 촉매작용을 한다. 또한 transaminase라고 불리는 이 효소는 일반적으로 NH_4^+로 전환하기 위해 여러 가지 아미노산에서 α-ketoglutarate로 α-amino group들을 보낸다. AST는 α-ketoglutarate에 aspartate의 amino group을 전달하는 촉매작용을 한다. 포유류에서 많이 작용하는 ALT는 α-ketoglutarate에 alnine의 아미노기를 전달하는 촉매 작용을 한다. 대부분의 육지 척추동물들의, NH_4^+는 요소로 바뀌어 배설된다[20]. 각 group의 혈청 AST와 ALT 활성도를 Table 1에 나타내었다. OVX 군의 AST 활성이 Sham 군에 비해 약 2.1배 증가 하였다. OVX+CS100과 OVX+CS200 군은 OVX에 따른 증가를 각각 47%와 73% 억제하였다. 간세포 손상 시 막 투과성이 항진되어 혈중으로 유출되어 나오는 AST와 ALT 수치가 시간이 경과됨에 따라 증가된 것으로 보아 노화로 인한 간 조직의 손상으로 인한 결과로 볼 수 있다. AST의 급격한 상승에 비해 ALT는 정상수치를 크게 벗어나지 않았고, 각 시료투여군은 높아진 AST 활성치가 현저히 낮아진 것으로 보아 난소 절제로 인한 세포막 손상이 CS 투여로 인해 회복된 것으로 사료된다.

간 조직중의 과산화지질이 미치는 영향

지질과산화는 산소 유리기에 의해서 불포화 지방산에서 일어나는 연쇄반응으로, oxygen radicals의 직접적인 작용보다는 철 이온 존재하에 superoxide와 H_2O_2의 상호작용에서 형성되는 hydroxyl radical에 의해 간접적으로 일어나며, 이의 주된 손상장소가 DNA나 세포막으로 알려져 있다. 이와 같은 지질과산화 반응은 여러 가지 독성 화합물이나 약물에

Table 1. Effect of CS on AST and ALT

Experimental group	n*s	AST	ALT
		unit/ml	unit/ml
Sham	7	48.61±3.31	30.45±2.85
OVX	7	102.38±4.26	29.05±3.07
OVX + CS100	7	79.28±3.78[a]	34.21±3.89[a]
OVX + CS200	7	66.72±4.87[a]	33.8±2.97[a]

All values are mean±S.D.
Sham : Normal Control.
OVX : Ovariectomy control.
OVX + CS100 : Ovariectomy + chondroitin sulfate (100 mg/kg body weight, i.p.).
OVX + CS200 : Ovariectomy + chondroitin sulfate (200 mg/kg body weight, i.p.).
Significantly different from the value of OVX group at *p<0.01.
n* is the number of experimental rats.

의한 간 손상 발생의 가장 중요한 기전으로 알려져 있고, 이는 세포내 산화적 스트레스의 증가, 즉 유리기 생성의 증가 및 항산화적 방어력의 감소에 의해 야기된다고 볼 수 있다[2,3,12,25,28]. Table 2는 인위적으로 난소 절제한 흰 쥐의 간을 분쇄하여 간의 과산화지질 함량 변화에 대한 CS의 효과를 보여준다. OVX 군에서의 MDA량은 Sham 군에 비해서 약 1.4배 증가하였다. OVX+CS100과 OVX+CS200 군은 MDA량이 OVX에 따른 증가를 각각 31%와 38% 억제시켰다. 인위적인 난소절제로 노화가 유도된 쥐에서 산소 유리기에 의한 간 조직 손상에 의해서 과산화지질 함량이 높게 나타났으며, 이는 난소가 절제된 쥐의 간 조직이 산소 유리기의 공격을 더 많이 받았으며 이로 인해서 과산화지질이 많이 축적되어진 결과로 보여 진다. 한편, 유리기에 의해 손상 받은 간 조직 세포막을 어느 정도 회복시켜 지질 과산화의 축적을 지연시킨 결과로 MDA 함량이 유의한 수준으로 억제됨을 관찰할 수 있었다.

간 조직 중의 SOD와 CAT의 활성도 변화

체내에 축적된 과량의 활성산소는 암을 발생시키거나 노화를 촉진하는 등 유해한 영향을 미친다. 이러한 활성 산소는 과식, 과도한 스트레스 및 흡연, 지나친 운동으로 야기되는 과호흡 등에 의해 그 양이 증가하는데, 이러한 활성산소를 분해 시키는 역할을 하는 효소가 바로 SOD인 것이다. SOD라는 효소는 25세까지는 체내에서 자연적으로 생성되므로 별 문제가 없지만 25세 이후부터는 SOD 발생량이 줄어들어서 신체는 점점 노화되어 간다. SOD는 생체내의 항산화 방어기구 중에서 효소적 방어계의 하나로 superoxide radical을 환원시켜 H_2O_2로 전환시킴으로써 산소독으로부터 생체를 보호한다. 또 다른 생체내 항산화 방어체계인 CAT는 microsome에서 합성되며 골지체로 이동 부착되어 세포내 peroxisome에 존재하는 내인적으로 생성된 H_2O_2를 H_2O와 O_2로 바꾸는 역할을 한다[1,30]. 간 조직중의 SOD와 CAT의 활성변화를 Table 3에 나타내었다. OVX 군에서의 SOD 활성수치는 Sham 군에 비해 상당히 낮게 나타났다. OVX+CS100과 OVX+CS200 군은 각각 8%와 9%로 크게 상승되지는 않았으나, 난소절제로 인해 회복이 불가능할 정도로 급격하게 저하된 SOD량에 비하면 CS 투여로 인한 약간의 SOD 활성도의 증가는 흥미로운 결과라 할 수 있다. 그리고, Table 3에서 보면 OVX 군에서의 CAT 활성치는 Sham 군과 비교했을 때 31% 감소를 보였다. 즉, OVX 군에서의 CAT활성은 Sham 군 보다 낮아졌음을 알 수 있다. 반면, OVX+CS100 과 OVX+CS200 군의 경우 CAT활성이 OVX에 따른 감소를 각각 19%, 23% 증가시킴을 관찰 할 수 있었다. 이는 물질투여군에서 지질과산화도가 감소하여 막 손상 정도가 완화된 것이 역시 물질 투여로 인한 이들 효소활성의 증가가 ROS로부터의 공격을 완충해 주는 역할을 한 결과라 생각된다.

간조직중의 GSH · GSSG, GPx의 활성도 변화

Glutathione은 산화적인 손상으로부터 red cell을 보호한다. 그것은 disulfide bond에 의해서 연결된 두개의 tripeptide에 의해서 환원된 형태(GSH)와 산화된 형태(GSSG) 사이를 순환한다. GSSG는 NADPH를 사용하는 flavoprotein인 glutathione reductase에 의해서 GSH로 환원된다. glutathione은 유산소 생활에서 해로운 부산물인 hydrogen peroxide와 organic peroxide와 함께 반응함으로써 해독작용에서 중요한 역할을 수행한다[10]. 이 반응에서 촉매 효소인 glutathione peroxidase는 selenium (Se)원자에 부착되어 공

Table 2. Effect of CS on lipid peroxidation in ovariectomy induced rat liver homogenates

Experimental Group	n*	MDA contents in the liver homogenate (nmol/mg protein)	Increase (% of Sham)
Sham	7	6.32±0.53	100
OVX	7	9.10±1.56	144
OVX + CS100	7	7.19±0.49[a]	113
OVX + CS200	7	6.72±0.71[a]	106

All values are mean±S.D.
Sham : Normal Control.
OVX : Ovariectomy control.
OVX + CS100 : Ovariectomy + chondroitin sulfate (100 mg/kg body weight, i.p.).
OVX + CS200 : Ovariectomy + chondroitin sulfate (200 mg/kg body weight, i.p.).
Significantly different from the value of OVX group at *p< 0.01.
n* is the number of experimental rats.

Table 3. Effect of CS on superoxide dismutase and catalase activities in ovariectomy-induced rat liver homogenate

Experimental group	n*	SOD	CAT
		U/mg protein	U/mg protein
Sham	7	35.41±11.60	415.61±24.20
OVX	7	0.16±0.01	317.03±0.01
OVX + CS100	7	2.95±0.81[b]	376.31±119.69[b]
OVX + CS200	7	3.17±1.63[b]	392.17±104.89[b]

All values are mean±S.D.
Sham : Normal Control.
OVX : Ovariectomy control.
OVX + CS100 : Ovariectomy + chondroitin sulfate (100 mg/kg body weight, i.p.).
OVX + CS200 : Ovariectomy + chondroitin sulfate (200 mg/kg body weight, i.p.).
Significantly different from the value of OVX group at *p< 0.05.
n* is the number of experimental rats.

Table 4. Effect of CS on GSH, GSSG, GSH + GSSG contents, and GSH/(GSH + GSSG) values in ovariectomy-induced rat liver homogenates

Experimental group	n*	GSH	GSSG	GSH + GSSG	GSH
		nmol/mg protein	nmol/mg protein	nmol/mg protein	GSH+GSSG
Sham	7	23.25±0.01	2.84±0.48	26.09±0.25	0.89
OVX	7	18.19±1.29	3.41±0.32	21.6±0.81	0.84
OVX + CS100	7	20.58±3.53[a]	3.12±0.01[a]	23.71±1.77	0.87
OVX + CS200	7	22.99±1.10[a]	3.05±0.14[a]	26.04±0.62	1.15

All values are mean±S.D.
Sham : Normal Control.
OVX : Ovariectomy control.
OVX + CS100 : Ovariectomy + chondroitin sulfate (100 mg/kg body weight, i.p.).
OVX + CS200 : Ovariectomy + chondroitin sulfate (200 mg/kg body weight, i.p.).
Significantly different from the value of OVX group at *p<0.01.
n* is the number of experimental rats.

Table 5. Effect of CS on GSH-peroxidase value in ovariectomy-induced rat liver homogenates

Experimental group	n*	GPx
		U/mg protein
Sham	7	162.3±11.79
OVX	7	136.09±6.13
OVX + CS100	7	143.74±10.18[a]
OVX + CS200	7	159.44±10.26[a]

All values are mean±S.D.
Sham : Normal Control.
OVX : Ovariectomy control.
OVX + CS100 : Ovariectomy + chondroitin sulfate (100 mg/kg body weight, i.p.).
OVX + CS200 : Ovariectomy + chondroitin sulfate (200 mg/kg body weight, i.p.).
Significantly different from the value of OVX group at *p< 0.01.
n* is the number of experimental rats.

유적으로 결합하는 것이 주목할 만 하다. total glutathione은 환원된 형태(GSH)와 산화된 형태(GSSG)로 구성되어 있다. GPx와 glutathione reductase는 glutathione에 의해서 H_2O_2와 lipid peroxidase의 다양한 종류들을 조절한다[10,21]. Table 4에서 보면 간 조직 중의 OVX 군은 total glutathione량이 Sham 군에 비해서 약 20% 정도 낮게 나타났다. OVX+CS100과 OVX+CS200 군에서 total glutathione량은 OVX 군에 비해서 각각 9%, 20% 증가시키는 것으로 관찰 되었다. CS 투여군은 total glutathione 량에서도 볼 수 있듯이 결과적으로, 난소절제로 인한 쥐의 간 조직에서 GSH의 역할을 대신하였기 때문에 GSSG의 양적인 변화를 보이지 않는 것으로 생각된다. Table 5에서 GPx 활성은 간 조직 중에서 보면 모든 군에서 유의적인 변화가 없는 것으로 보여 졌다.

요 약

노화과정에 산소라디칼이 관여할 가능성을 난소를 절제한 흰 쥐를 동물모델로 하여 알아보았다. 난소를 절제한 쥐와 난소를 절제하지 않은 정상 쥐에서의 생리활성 및 항산화 효과를 알아보기 위하여 CS를 사용하였다. 난소를 절제한 흰 쥐에 각각 CS를 각 100 mg/kg과 200 mg/kg을 투여하고, 이것과 비교하기 위해 난소를 절제한 대조군과 난소를 절제하지 않은 정상군으로 하여 항산화 효과에 관한 실험방법으로 진행하였다. 노화 유도된 쥐의 각 조직에서 지질 과산화가 증가되었고 유리기 반응이 더 심하게 일어난 간 조직에서 노화 진행이 그만큼 촉진되었음을 알 수 있었다. 산소라디칼 반응이 항진된 원인을 규명코자 간 조직에서 항산화효소의 활성을 조사한 결과, SOD와 GSH의 활성이 감소되었으며, 노화나 지질과산화가 심하게 진행되었던 간 조직에서 이들 항산화효소의 활성감소가 심한 경향을 나타내었다. AST의 활성은 OVX 군이 Sham 군에 비해 2.1배 높게 나타났으며, ALT 활성은 크게 변화하지 않았다. 과산화지질함량은 OVX 군이 Sham 군에 비해 1.4배 높게 나타났으며, CS를 투여한 군에서는 31%-38%의 저해율을 보였다. 항산화 효소들은 Sham 군에 비해 OVX 군에서 낮게 나타났으며, 물질 투여 군에서는 정도의 차이는 있지만 대체로 증가하는 경향을 보였다. 이러한 결과에서 보듯이, 난소절제로 생성된 유리기는 물질 투여로 인한 항산화 효소의 증가를 가져오고 이는 결국 유리기로 손상된 막의 지질과산화 정도를 완화시켜 세포를 보호하는 효과를 가져왔다고 할 수 있다. 따라서 CS는 여러 가지 측면에서 난소절제로 인해 유도된 지질과산화 및 활성산소에 의한 공격으로부터 세포를 보호하고 회복시켜주는 효과가 있다고 사료되어진다.

감사의 글

이 연구는 2001년도 신라대학교 연구비 지원으로 수행되어졌으며, 이에 감사 드립니다.

참 고 문 헌

1. Aebi, H. 1984. Catalase in vitro, Methods. *Enzymology* **105**, 121-126.
2. Albrecht, D. K., H. Kappus and H. Remmer. 1978. Lipid peroxidation and cell damage in isolated Hepatocytes due to bromotrichloromethane. *Toxicol and Appl Pharmacol* **46**, 499-505.
3. Baek, Y. H., K. W. Kim. and T. H. Nam. 1997. Effects of aerobic exercise on hepatic antioxidant enzymes in cholesterol-dietary rats. *Kor J Gerontol* **7**, 55-64.
4. Beauchamp, C. and I. Fridovich. 1971. Superoxide dismutase : improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* **44**, 276-287.
5. Bestetti, G. E., M. J. Reymond, F. Blanc, C. E. Boujon, B. Furrer and G. L. Rossi. 1991. Functional and morphological changes in the hypothalmo-pituitury-gonadal axis of aged female rats. *Biol Reprod* **45**, 221-228.
6. Conte, A., N. Volpi, L. Palmieri and G. Lonca. 1995. Biochemical and pharmakokinetic aspects of oral treatment with chondroitin sulfate. *Arzneimittelfolschung* **45**, 918-925.
7. Ellman, H. L. 1959. Tissue Sulfhydryl groups. *Arch biochem Biophys* **82**, 70-77.
8. Farber, J. L. 1982. Biology of disease : Membrane injury and Calcium Homeostasis in the Pathogenesis of Coagulative Necrosis. *Lab Invest* **47**, 114-123.
9. Finch, C. E., S. G. Kohama and G. M. Pasinetti. 1992. Ovarian steroid and neurotoxin models of brain aging in rodents. *Ann NY Acad Sci* **648**, 119-124.
10. Gambacciani M., A. Spinetti, L. de Simone, B. Cappagli, S. Maffei, F. Taponeco and P. Fioretti. 1993. The relative contributions of menopause and aging to postmenopausal vertebral osteopenia. *J Clin Endocrinol Metab* **77**, 1148-1151.
11. Golden T. R., D. A. Hinerfeld and S. Melov. 2002. Oxidative stress and Aging : beyond correlation. *Aging cell* **1**, 117-123.
12. Horton, A. A. and S. Fayrhurst. 1987. Lipid peroxidation and Mechanisms of Toxicity. *Crit Rev Toxicol* **18**, 27-79.
13. Inoue, H., K. Otsu, S. Suzuki and Y. Nakanishi. 1986. Difference between N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O-sulfotransferases from human serum and squid cartilage in specificity toward the terminal and interior portion of chondroitin sulfate. *J Biol Chem* **261**, 4470-4475.
14. Janusz, M. J. and S. L. Durham. 1997. Inhibition of cartilage degradation in rat collagen-induced arthritis but not adjuvant arthritis by the neutriphil elastase inhibitor MDL. *Inflamm Res* **46**, 503-508.
15. Kakimoto, K., A. Matsukawa, M. Yashinaga and H. Nakamura. 1995. Suppressive effect of a neutrophil elastase inhibitor on the development of collgen-induced arthritis. *Cell Immunol* **165**, 26-32.
16. Kalra, S. P., A. Sahu and P. S. Kalra. 1993. Ageing of the neuropeptidergic signals in rats. *J Reprod Fertil Suppl* **46**, 11-19.
17. Kundson, W., M. W. Gundlach, T. M. Schimid and H. E. Conrad. 1984. Selective hydrolysis of chondroitin sulfates by hyaluronidase. *Biochemistry* **23**, 368-375.
18. Lawrence, R. A. and R. F. Burk. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* **71**, 952-958.
19. Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. S. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein Measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 256-261.
20. Mcphalen, C. A., M. G. Vincent and J. N. Jansonius. 1992. X-ray structure refinement and comparison of three forms of mitochondrial aspartate aminotransferase. *J Mol Biol* **225**, 495-517.
21. Meister, A. and M. E. Anderson. 1983. Glutathione. *Annu Rev Biochem* **52**, 711-760.
22. Nelson, J. F. and L. S. Felicio. 1990. Hormonal influences on reproductive aging in mice. *Ann NY Acad Sci* **592**, 8-12.
23. Ohkawa, H., N. Ohishi and K. Yagi. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* **95**, 351-358.
24. Omata, T., Y. Segawa, Y. Itokazu, N. Inoue and Y. Tanaka. 1999. Effect of chondroitin sulfate-C on bradykinin-induced proteoglycan depletion in rats. *Arzneimittelforschung* **49**, 577-581.
25. Plaa, G. L. and H. Witschi. 1976. Chemicals, drugs, and lipid peroxidation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **16**, 125-141.
26. Racker, E. 1955. Glutathione reductase from bakers' yeast and beef liver. *J Biol Chem* **217**, 855-865.
27. Reitman, S. and S. Frankel. 1957. A colorimetric method for determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pathol* **28**, 56-63.
28. Rossowaa, M. J. and T. Nakamoto. 1994. Effects of chronic caffeine feeding on the activities of oxygen free radical defense enzymes in the growing rat heart and liver. *Experimentia* **50**, 465-468.
29. Suzuki, S. and J. L. Stromiger. 1960. Enzymatic sulfation of mucopolysaccharides in hen oviduct. III. Mechanism of sulfation of chondroitin and chondroitin sulfate A. *J Biol Chem* **235**, 274-276.
30. Tainer, J. A., E. D. Getzoff, J. S. Richardson and D. C. Richardson. 1983. Structure and mechanism of Copper, Zinc superoxide dismutase. *Nature* **306**, 284-287.