

대황 추출물이 갱년기 유도 흰쥐의 골 조직에 미치는 영향

박용수 · 강민숙 · 김보경 · 김미향[†]

신라대학교 식품영양학과

The Effect of *Eisenia bicyclis* Extracts on Bone Tissues in Ovariectomized Rats

Yong Soo Park, Min Suk Kang, Bo Kyung Kim, and Mihyang Kim[†]

Dept. of Food and Nutrition, Silla University, Busan 617-738, Korea

Abstract

Menopause is often associated with several chronic diseases, including osteoporosis, cardiovascular disease, and obesity. In this study, we investigated the ability of *Eisenia bicyclis* (EB) to prevent bone loss in ovariectomized rats, a model for postmenopausal osteoporosis. Extracts from EB obtained using ethanol or hot water were analyzed for total polyphenol content and osteoporosis effects *in vivo*. Total polyphenol content was higher with extraction by hot water compared to ethanol extraction. Fifty 8-week-old female Sprague-Dawley rats were randomly assigned to four groups: the group were sham-operated rats (SHAM), ovariectomized rats (OVX-CON), and ovariectomized rats that were treated with EB at 50 mg/kg body weight (OVX-EB50) and 200 mg/kg body weight (OVX-EB200), respectively. The diets were fed to rats for 6 weeks after their operation. We found that the alkaline phosphatase (ALP) activity was lower in the EB extract group compared to the OVX-CON group. Collagen and pyridinoline content, in bone and cartilage, were reduced by ovariectomy, but the supplemented EB extract groups exhibited higher concentrations in their bones. These results suggest that EB can be used for the industrial development of foods with therapeutic functions.

Key words: *Eisenia bicyclis*, ALP, collagen, pyridinoline, ovariectomized rats

서 론

갱년기로 인한 일차적 estrogen 결핍은 bone turnover 증가 및 파골세포(osteoclast)의 활동력 증가, 골재흡수(bone resorption)의 증가로 인한 골 손실을 급속하게 유발하고, 이차적으로는 폐경기 여성에 있어 골 형성 능력이 감소하게 되어 서서히 골 손실이 일어나는 것으로 보고되고 있다(1). 또한 폐경 후 20년간 골 손실의 75% 이상은 estrogen 결핍에서 기인하는 것으로 알려져 있다(2). 골다공증은 다양한 발생 원인에 기인되고 그에 따라 서로 다른 여러 종류의 병인이 관련되어 있어 그 원인을 간단히 이해하기에는 어려운 질환에 해당한다. 그러나 골다공증 발생에 영향을 미치는 주요 인자들 중에서 골밀도가 직접적인 요인이 되고 있다. 골밀도는 성장과정에서 점진적으로 증가하다가 사춘기를 통하여 급속하게 증가되어 약 25세경에 최대 골밀도 치에 도달한 후 35~49세까지 유지되고, 그 이후부터는 노화와 더불어 골 손실이 진전되며 남녀 모두 3~5%의 비율로 손실되고 여성의 경우는 폐경 이후 45~74세 사이에 평균 감소율이 9%에 이른다(3). 골다공증의 원인 규명을 위한 학자들의 연구는 최근 많은 발전을 보이고 있으며, 골밀도는 폐경기간

따라 차이가 있으며 폐경기간이 길수록 골밀도가 점차로 감소한다고 보고하고 있다(4). 실험동물에서 난소절제는 혈중 estrogen 농도를 감소시키는 대표적인 방법으로서 골다공증의 연구에서 광범위하게 이용되고 있으며, 골다공증에서 나타나는 골 손실을 유발시키는 인자규명 및 골 손실을 방지하는 요인에 관한 연구가 다양하게 이루어지고 있다. Kimble 등(5)은 흰쥐에서 난소를 절제하면 골의 교환(turnover)이 가속되고 골의 밀도가 현저하게 감소된다고 하며, 연골 또는 골 등의 결합조직을 구성하고 있는 콜라겐은 난소절제 시 그 함량이 감소하는 것으로 알려져 있다. 또한 Dempster(6)는 난소를 절제한 흰쥐에서 해면골(cancellous bone)의 소실이 유발되었으며 이는 estrogen의 감소가 파골세포의 활성을 촉진시키고 다시 골 조직의 연결을 약화시키기 때문이라고 하였다. 한편 연골 또는 골 등의 결합조직을 구성하고 있는 콜라겐은 연령과 함께 변화하며, 특히 콜라겐 가교 형성은 결합조직의 강도를 유지하기 위하여 필요하다(7-11). 피부 섬유아세포 중의 콜라겐은 estrogen에 의하여 생성량이 증가한다는 연구보고도 있으나(12), 연령과 함께 나타나는 골기질량의 감소와 콜라겐 변화에 관해서는 불명확한 점이 많다. Pyridinoline은 골과 연골에 주로 존재하기 때문에

[†]Corresponding author. E-mail: mihkim@silla.ac.kr
Phone: 82-51-999-5620, Fax: 82-51-999-5457

파골세포에 의한 골질 파괴 시 소변으로 유리되는 성질을 가지고 있으며, 이는 골대사의 변질, bone cancer, 골다공증과 같은 각각의 병리형태에서 골분해의 평가를 위한 bio-maker로서 임상에 이용되고 있다(13). 또한 ALP는 폐경 시 estrogen의 결핍으로 인하여 뼈 전환이 증가하기 때문에 폐경 후 여성의 골다공증에서 증가하는 양상을 보이며(14), 성인기 여성에서는 골절과의 관련성을 보여 폐경 전후 여성에게 있어 뼈 형성 지표로써 널리 사용되고 있다(15).

해조류는식이성 섬유소인 복합다당류를 다량 함유하고 있을 뿐 아니라 여러 비타민과 무기질이 비교적 풍부하고 그 독특한 맛과 향기가 우수한 알칼리성 기호식품으로서 가치가 높은 것으로 알려져 있다(16). 특히 갈조류에는 중성 다당류인 laminaran과 황산기를 함유한 산성 다당류가 다량 함유되어 있으며, 그 대표적인 것이 합황 산성 다당류인 fucoidan과 alginate이고, fucoidan은 항산화 활성, 항 혈액응고 작용 이외에 면역 등의 활성이 있다는 보고가 있다(17-20). 우리나라 울릉도 부근에 주로 분포되어 있는 대황(*Eisenia bicyclis*)은 다시마목(Laminariales) 미역과(Alariaceae)에 속하는 다년생 식물로 연안 수심 10 m 내외에서 서식하고 있으며, 줄기는 원기둥 모양이고 뿌리는 수지상이고 길이는 1~2 m에 달하며 지름은 2~3 cm로 중앙부가 좀 굵고 실질이다(21). 대황은 다른 갈조류의 알긴산이나 fucoidan과 달리 합황당류인 laminaran을 함유하고 있으며, 대황 성분들의 항고지혈증(22,23), 항산화 및 항당뇨 기능도(24) 보고된 바 있다. 최근 일본에서는 기능성 신소재로 각광을 받고 있으나 국내에서는 아직까지 대황의 기능성 성분 분석 및 그를 이용한 가공식품의 개발에 관한 연구는 미비한 실정이다.

본 연구에서는 대황 추출물을 시료로 하여 *in vivo* 실험을 통하여 갱년기 장애 시 나타날 수 있는 골 손실 개선효과를 검토하고자 하였다. 우선 대황을 열수 및 에탄올로 추출하여 항산화 성분인 polyphenol 함량이 많이 포함된 추출물을 선택하여 동물실험에 이용하였다. 실험동물에 인위적으로 폐경을 야기하여 estrogen 분비가 저하되었을 때 대황 추출물을 투여하여 골 형성 지표인 alkaline phosphatase(ALP) 활성 및 결합조직 중의 콜라겐 합성량 및 콜라겐 성숙가교인 pyridinoline 함량을 측정하였다.

재료 및 방법

추출물의 제조

본 실험에 사용한 대황(*Eisenia bicyclis*)은 2010년 4월 울릉도 해안일대에서 채취된 것을 구입하여 물로 7~8회 씻어 염분과 불순물을 제거하고 동결건조 후 분쇄하여 실험에 사용하였다. 건조된 대황은 추출방법에 따른 최적 추출조건을 선정하기 위해 각 건조된 시료 100 g을 80% 에탄올로 80°C에서 추출하였고, 동량의 증류수로 같은 방법으로 추출하

였다. 위의 과정을 2회 반복하여 얻은 추출물을 감압 하에 건조하여 각각의 폴리페놀 함량을 측정하였고, 동물실험은 체중 kg 당 투여량 1 mL 중 50 mg 및 200 mg 되도록 용해하여 사용하였다.

총폴리페놀 함량 측정

총 페놀함량은 Folin-Denis법(25)으로 측정하였다. 시료 1 mL에 95% 에탄올 1 mL, 정제수 5 mL 및 50% Folin-Ciocalteu reagent(Sigma, St. Louis, MO, USA) 0.5 mL를 혼합하여 5분간 방치한 후 5% Na₂CO₃ 1 mL를 첨가하여 교반한 다음 1시간 동안 암소에 둔 후 catechin을 표준시약으로 사용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다.

실험동물 사육조건

체중이 200~205 g인 7주령의 암컷(Sprague-Dawley) 쥐 40마리를 (주)오리엔트바이오(Seongnam, Korea)에서 분양받아 1주일간 적응시킨 후, 난소절제 수술(ovariectomy)을 하였고 비 난소절제 대조군에게는 sham-operation을 실시하였다. 수술 후 1주일간 고형 사료를 주어 상처가 회복되면, 난괴법(randomized complete block design)에 의해 군을 나누었다(Table 1). 즉 실험동물은 비 난소절제 대조군(SHAM), 난소절제 대조군(OVX-CON), 난소절제 후 대황 추출물 50 mg/kg 투여군(OVX-EB50), 난소절제 후 대황 추출물 200 mg/kg 투여군(OVX-EB200)으로 각 10마리씩 4군으로 나누어 1 mL의 시료를 매일 경구 투여하며, 6주간 사육하였다. 실험기간 동안 식이 섭취량과 체중은 매일 일정한 시간에 측정하였다. 동물실험실의 사육조건은 온도 24±2°C, 습도 50~55%를 유지시켰고 물과 식이는 제한을 두지 않고 제공하였으며, 실험 시료는 증류수로 용해하여 대조군은 동일 용량의 증류수를 투여하였다.

난소절제시술

1주일 동안 주위환경에 적응시켜 체중에 따라 난괴법에 의해 군을 나누어 난소절제 수술을 실시하였다. 수술은 에테르로 마취하여 심마취기에 이르면 복부를 절개하여 난소를 제거하고 절개부는 봉합하였다. 수술 후 일주일간 일반 식이로 상처를 회복시킨 후 각 추출물 시료를 증류수에 용해하여 경구 투여하였다. 또한 대조군 설정을 위하여 비 난소절제군은 복막 절개까지 난소절제 수술과 같은 방법으로 시행하고,

Table 1. Experimental design of animals

Group (No.) ¹⁾	Treatment
SHAM (10)	sham-operated rats
OVX-CON (10)	ovariectomized rats
OVX-EB50 (10)	ovariectomized rats supplemented <i>Eisenia bicyclis</i> ethanol extracts at 50 mg/kg bw/day
OVX-EB200 (10)	ovariectomized rats supplemented <i>Eisenia bicyclis</i> ethanol extracts at 200 mg/kg bw/day

¹⁾No: Number of rats.

양측의 난소를 노출하였다가 절제하지 않고 복막 속으로 다시 넣어 난소절제와 같은 스트레스를 주고 다시 봉합하는 모의수술(sham operation)을 시행하여, 이들을 대조군으로 사용하였다.

혈액 및 조직 채취

혈액은 실험동물을 해부 전 24시간 절식시킨 후 에테르 마취하에 개복한 후 복대동맥에서 채취하여 혈류 측정을 위해 헤파린 처리된 튜브를 사용하고, 혈액응고 실험을 위해 3.2% sodium citrate를 1:9의 비율로 혼합하여 분석에 사용하였다. 또한 혈액의 생화학적 분석을 위해 상온에서 30분간 방치한 후, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 혈청을 분리하여 사용하였다. 늑골과 연골은 경계면에서 분리하였으며 피부는 털을 잘라내고 표피 위의 지방을 제거하여 무게를 잰 후 실험 시까지 -70°C에 보관하였다.

혈청 중의 alkaline phosphatase 활성 분석

골격 형성 지표인 혈청 중 alkaline phosphatase(ALP) 활성은 측정용 kit(FUJIFILM Co., Tokyo, Japan)를 사용하였다. FUJI DRI-CHEM SLIDE 위에 분리한 혈청 10 µL를 점착하여 DRY CHEM(3600i, Fuji Co, Asaka, Japan)을 사용하여 500 nm의 파장에서 분석하였다.

결합조직 중의 콜라겐 함량 측정

적출한 결합조직 골 및 연골에 6 N HCl 10 mL를 첨가하여 110°C에서 20시간 가수분해한 후 여과 농축하여 증류수로 5배 희석한 후 시료용액으로 하였다. 결합조직의 콜라겐 함량은 Woessner법(26)을 이용하여 분석하였다. Hydroxyproline의 정량분석을 위해 조제한 시료를 다시 증류수로 일정량 희석한 후 실험에 사용하였다. 반응액은 UV spectroscopy(Ultrospec 2100 pro, GE Healthcare Bioscience, Uppsala, Sweden)를 이용하여 흡광도 560 nm에서 측정하였다. 표준 곡선을 이용하여 hydroxyproline 양을 구한 다음 콜라겐 양으로 환산하였다. 골 및 연골 콜라겐의 아미노산 조성으로부터 콜라겐 중의 hydroxyproline 비율은 평균 110 잔기/1000잔기이므로 콜라겐 양의 환산은 일반적으로 다음 식에 준한다.

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

HPLC를 이용한 pyridinoline 함량 측정

콜라겐 중의 가교물질인 pyridinoline 함량 측정은 위의 방법에서 얻어진 콜라겐 분석시료를 0.45 µm disc filter를 이용하여 여과시킨 후, Arakawa 등의 방법(27)에 의해 HPLC(Shimadzu LC, Kyoto, Japan)를 이용하여 분석하였다. HPLC 분석은 Table 2에서 나타낸 바와 같이 고정상으로 Inertsil ODS-2 column을 사용하였고, 이동상은 SDS와 Na₂EDTA를 함유하는 acetonitrile와 0.1 M 인산완충액(pH 3.5, 25:75)을 이용하여 Ex 295 nm 및 Em 395 nm에서 수행하였다. 결과에 관한 분석은 standard의 peak를 이용하여

Table 2. Instrumental conditions for pyridinoline analysis by HPLC

Item	Conditions
Apparatus	Shimadzu LC
Detector	Fluorescence HPLC RF
Column	Inertsil ODS-25 µm (250×4.6 mm id)
Fluent	Acetonitrile / 0.1 M sodium phosphate buffer pH 3.5 (25:75) containing SDS and Na ₂ EDTA
Flow rate	0.5 mL/min
Excitation wavelength	295 nm
Emission wavelength	395 nm

pyridinoline의 peak를 파악한 후 standard area % 농도와 시료의 area % 농도를 계산하여 pyridinoline/collagen으로 나타내었다.

통계처리

연구결과 얻어진 자료를 SPSS(statistical package for social science, version 12.0, Raleigh, NC, USA) 통계 프로그램을 사용하여 통계 분석하였다. 실험군당 평균±표준오차로 표시하였고, 통계적 유의성 검정은 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 한 후 p<0.05 수준에서 Tukey's test를 이용하여 상호 검정하였다.

결과 및 고찰

추출물의 수율 및 총폴리페놀 함량

폴리페놀성 물질은 활성 프리라디칼(reactive free radical)에 수소원자를 제공하여 안정한 비 라디칼(non-radical)을 만들어 줌으로써 항산화효과를 나타내며, 해조류 중의 polyphenol성 물질은 estrogen의 활성이 있는 것으로 보고된 바 있다(28). 폴리페놀 함량이 높은 추출 방법을 이용하는 것이 estrogen의 활성이 높을 것으로 예상되어 본 연구에서는 용매에 따른 폴리페놀 함량을 측정하였다. 대황의 열수와 에탄올 두 용매를 이용하여 추출한 결과는 Table 3과 같다. 열수를 이용하여 추출한 경우 에탄올보다 수득율은 높았으나 총 폴리페놀 함량은 에탄올 추출에서 더 높은 것으로 나타났다. 따라서 수득율은 열수에 비해 낮지만 폴리페놀 함량이 더 높은 대황 에탄올 추출물을 동물 실험의 시료로 사용하였다.

체중 증가량, 식이 섭취량 및 장기 중량

폐경 후 여성의 비만은 독특한 생리적 현상으로 실제로

Table 3. Yields and total polyphenol contents of *Eisenia bicyclis* extracts (%)

Samples	Yields	Total polyphenol contents
H ₂ O ex.	34.5	6.9±0.7 ^a
EtOH ex.	21.6	10.5±1.2 ^b

¹⁾Values with different alphabets are significantly different at p<0.05 using Tukey's test.

Table 4. Body weight gain, food intake and food efficiency ratio of rats supplement with *Eisenia bicyclis* ethanol extracts for 6 weeks

Group ¹⁾	Final body weight (g)	Body weight gain (g/day)	Food intake (g/day)	Food efficiency ratio (FER) ²⁾
SHAM	267.8±15.6 ^{3)b4)}	3.24±1.37 ^{NS5)}	14.38±1.56 ^b	0.22±0.14 ^{NS}
OVX-CON	334.4±12.6 ^a	5.37±3.68	21.35±4.29 ^a	0.25±0.19
OVX-EB50	327.1±18.3 ^a	5.13±4.34	22.18±3.78 ^a	0.23±0.18
OVX-EB200	331.8±20.4 ^a	5.39±4.28	21.78±3.52 ^a	0.25±0.16

¹⁾Refer the legend to Table 1. ²⁾FER: Body weight gain/ Food intake.

³⁾Values are mean±SD (n=10). ⁴⁾Values with different alphabets are significantly different at p<0.05 using Tukey's test.

⁵⁾Not significantly different.

Table 5. Organ weight of rats on supplementation of *Eisenia bicyclis* ethanol extracts

Group ¹⁾	Liver	Heart	Lung	Spleen	Adrenal	Uterus
SHAM	8.81±1.47 ^{2)NS3)}	0.94±0.08 ^{NS}	1.10±0.17 ^{NS}	0.58±0.14 ^{a4)}	0.07±0.04 ^{NS}	0.54±0.15 ^b
OVX-CON	8.46±0.88	1.01±0.21	1.14±0.11	0.67±0.13 ^{ab}	0.04±0.02	0.08±0.01 ^a
OVX-EB50	8.99±1.71	0.99±0.19	1.16±0.11	0.66±0.10 ^{ab}	0.06±0.02	0.08±0.03 ^a
OVX-EB200	8.83±1.62	1.09±0.21	1.28±0.12	0.72±0.71 ^b	0.06±0.03	0.07±0.02 ^a

¹⁾Refer the legend to Table 1.

²⁾Values are mean±SD (n=7). ³⁾Not significantly different.

⁴⁾Values with different alphabets are significantly different at p<0.05 using Tukey's test.

폐경 후의 여성이나 난소를 제거한 동물의 경우 음식물 섭취가 촉진되고, 몸무게와 지방조직이 증가되는 것으로 알려져 있다(29-31). 난소절제 및 대황 추출물의 투여에 따른 체중 변화와 식이 섭취량은 Table 4와 같다. 실험 종료 시 체중은 난소를 절제한 군(OVX)이 난소를 절제하지 않은 군(SHAM)에 비하여 높은 경향을 보였다. 이는 흰쥐에서 난소를 제거하면 성장속도가 증가하여 체중이 증가하는 것이며, 체중 증가의 대부분은 체내 지방의 축적에 기인하는 것으로 보인다. 한편 난소절제 군에서의 체중 증가는 여러 연구 결과가 보고되어 있는데, 특히 Gale와 Sclafani(32)는 난소절제는 식이 섭취량과 식이효율을 증가시켜 과식증(hyperphagia)과 비만을 야기한다고 보고하였으며, Lee 등(33)은 난소 절제한 쥐들의 체중과 체지방 무게의 증가를 보고하였다. 본 연구에서도 난소절제 후 대황 추출물을 투여한 모든 군에서 정상군인 SHAM군과 비교해 높은 체중 증가량을 보였다. 이는 SHAM군에 비해 난소절제 군의 사료섭취량 증가로 인해 체중 증가를 초래한 것으로 추측된다. Table 5는 각 실험동물의 장기 중량을 나타낸 것이다. 간, 심장, 폐, 비장 및 부신의 무게는 난소절제의 유무와 관계없이 각 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다. 일반조직은 난소 절제에 의해 중량 변화와 같은 영향을 받지 않는 것으로 알려져 있으나, 자궁의 경우 체내 estrogen의 작용 여부를 잘 나타내주는 것으로, 난소를 절제한 OVX-CON군과 난소를 절제한 후 대황 추출물을 투여한 OVX-EB50 및 OVX-EB200군에서 SHAM군에 비해 유의적으로 감소하였다. 이는 난소 절제로 인한 자궁의 퇴화에 의한 것으로 보이며, 대황 추출물의 투여가 자궁의 무게 변화에는 영향을 미치지 않았다.

혈청 중 alkaline phosphatase 활성

Alkaline phosphatase(ALP)는 간 이외에도 뼈, 소장, 신장, 태반 등 조직 중에 다양하게 분포하고 있으며, 세포 외에

서 세포 내로의 기질 운반에 관여하고 있다(34). 조골세포는 ALP를 생성하여 조골 세포막의 세포에 저장하는데, 이 중 일부가 혈액 내로 유리되어 나온다(35). 따라서 조직에 이상이 생기거나 골육종(osteosarcoma)의 경우 혈청 내에서 ALP의 활성도가 증가하게 된다(36). ALP는 폐경 시 estrogen의 결핍으로 인하여 뼈 전환이 증가하기 때문에 폐경 후 여성의 골다공증에서 증가하는 양상을 보이며(14), 성인기 여성에서는 골절과의 관련성을 보여 폐경 전후 여성에게 있어 뼈 형성 지표로써 널리 사용되고 있다(15). Table 6의 ALP 활성 결과에서 난소를 절제한 OVX-CON군이 난소를 절제하지 않은 SHAM군에 비해 ALP 활성이 유의적으로 증가하는 경향을 보였으나, 대황 추출물의 투여 군에서는 OVX-CON군에 비해 감소하는 경향을 보였다. 이것은 난소 절제 후 estrogen의 분비가 감소되는 것에 반해 대황 추출물의 투여가 estrogen 대체 작용을 함으로써 난소절제로 인한 골 손실 정도를 완화시켜준 것으로 추측되어 대황 추출물의 골 흡수 저해 효과가 기대된다.

결합조직 중의 콜라겐 함량

인체의 정상 골은 파골세포(osteoclast)에 의한 골 흡수와

Table 6. Effect of *Eisenia bicyclis* ethanol extracts on serum alkaline phosphatase activities in ovariectomized rats

Group ¹⁾	ALP ²⁾ (U/L)
SHAM	401.9±121.1 ^{3)b4)}
OVX-CON	581.9±166.2 ^a
OVX-EB50	458.0±179.1 ^b
OVX-EB200	522.9±137.1 ^{ab}

¹⁾Refer the legend to Table 1.

²⁾Alkaline phosphatase.

³⁾Values are mean±SD (n=7).

⁴⁾Values with different alphabets are significantly different at p<0.05 using Tukey's test.

Table 7. Effect of *Eisenia bicyclis* ethanol extracts on collagen content in cartilage and bone of ovariectomized rats

Group ¹⁾	Cartilage (mg/g)	Bone (mg/g)
SHAM	119.1±17.2 ^{2)bs3)}	134.8±17.6 ^{bc}
OVX-CON	103.6±15.4 ^a	116.9±10.4 ^a
OVX-EB50	102.3±16.8 ^a	119.1±10.9 ^{ac}
OVX-EB200	107.7±13.4 ^{ab}	122.4±10.1 ^c

¹⁾Refer to comment in Table 1.

²⁾All values are mean±SD.

³⁾Values with different alphabets are significantly different at p<0.05 using Tukey's test.

그에 따른 조골세포(osteoblast)에 의한 새로운 골 기질 형성 과정이 끊임없이 반복적으로 일어난다. 폐경 후 estrogen의 감소에 의해 파골세포에 의한 골 흡수가 폐경 전에 비해 매우 많아져 1~5%의 빠른 골 손실을 초래한다고 한다(37). 이와 관련된 대표적인 질환인 골다공증(osteoporosis)은 골의 균형이 파괴되는 모근 조건에서 유발될 수 있으나 여성에서 폐경에 의한 혈중 estrogen의 감소가 가장 일반적인 원인으로 알려져 있다(38). Estrogene 결핍에 의한 골다공증은 골질이 쉽게 일어날 수 있는 조건이 되며, 이 경우의 estrogen 투여는 골의 무기질성분 증가와 함께 교원섬유의 조성에도 영향을 미쳐서 골질의 예방에 효과를 지닌다고 보고되고 있다(39). 본 연구에서는 난소절제로 인하여 estrogen이 결핍되었을 때 콜라겐 생성 변화에 있어 대황 추출물의 영향에 대하여 검토하였다(Table 7). 연골의 경우 비 난소절제군인 SHAM군에 비해 난소절제군인 OVX-CON군의 콜라겐 함량이 유의적으로 감소하여, 난소절제로 인한 estrogen 결핍으로 콜라겐 생성량이 감소한 것으로 나타났다. 난소절제 후 대황 추출물을 200 mg/kg/day 투여한 OVX-EB200군의 경우 대조군인 OVX-CON군에 비해 증가하는 경향을 나타내었으나 유의적인 수준은 아니었다. 골 조직에서 또한 난소를 절제한 OVX-CON군이 난소를 절제하지 않은 SHAM군과 비교해 유의적으로 감소하는 결과가 나타났다. 한편 난소를 절제한 후 대황 추출물을 50 mg/kg/day 투여한 OVX-EB50군에서 대조군에 비해 콜라겐 함량이 증가하는 경향이 나타났으며, 200 mg/kg/day 투여한 OVX-EB200군의 경우 유의적으로 증가하였다. 따라서 골 조직의 콜라겐 합성에는 추출물의 양을 50 mg/kg/day 정도로는 부족하여 적어도 200 mg/kg/day 정도는 투여해야 할 것으로 추측된다. 한편 여성호르몬인 estrogen은 피부 진피층의 섬유아세포를 자극하며 섬유아세포 중의 콜라겐은 estrogen에 의하여 생성량이 증가한다고 알려져 있다(12). 또한 아울러 콜라겐의 대사에 관여하는 분해효소 matrix metalloproteinase-1(MMP-1)의 발현을 조절하여 콜라겐의 분해를 억제하며, estrogen이 결핍되면 비정상적으로 골재형성과정에서 촉진되고 조직 내의 콜라겐 손상은 연골 조직의 노화와 골 관절염, 골다공증 병인의 원인이 된다고 한다(40). 이상의 실험 결과, 연골보다 골 조직에서 난소 절제로 인하여 감소된 콜라겐의 함량이 대황 추출물을 투여함으로써 회복되는 경향을 보였다.

이러한 변화는 estrogen 부족으로 인한 골 손실에 대황 추출물이 유의한 영향을 줄 가능성이 있는 것으로 보이며, 대황 추출물 중의 phytoestrogen 및 항산화 물질 등이 복합적으로 작용하였을 것으로 사료되어진다.

콜라겐의 성숙가교인 pyridinoline 함량

콜라겐 성숙은 섬유의 숙성, 즉 가교의 형성에 중요한 역할을 하고 있다(9). 콜라겐 성숙은 가교의 증가를 의미하나, 콜라겐 가교는 연령과 함께 단순하게 증가하는 것이 아니라 질적으로 변화하는 것으로, 출생 시에는 동물의 콜라겐에 다량으로 함유되어 있으나 성장과 함께 감소하는 미숙가교, 성숙과 함께 증가하는 성숙가교, 그리고 노화와 함께 나타나는 노화가교가 있다(8). Lysine 및 hydroxylysine 잔유물로부터 형성된 pyridinoline은 deoxypyridinoline과 함께 콜라겐 가교를 형성하는 콜라겐의 성숙가교로 알려져 있다(10, 11). 이 교차 화합물의 합성은 콜라겐의 성숙도에 의존적으로 일어나기 때문에 정상적인 골조직의 형성과 흡수 시에 지속적으로 합성된다. Table 8은 결합조직인 골 및 연골 콜라겐 중의 pyridinoline 함량을 나타낸 것이다. 연골 및 골 조직 모두 비 난소절제군인 SHAM군에 비해 난소절제군인 OVX-CON군의 pyridinoline 함량이 유의적으로 감소하여, 난소절제로 인한 estrogen 결핍으로 콜라겐 성숙가교 형성이 제대로 이루어지지 않았음을 나타내었다. 연골의 경우 난소절제 후 pyridinoline 함량은 대조군에 비해 회복된 결과를 나타내지 않아 콜라겐 함량의 경우와 유사한 결과를 나타내었다. 한편 골 조직 중의 pyridinoline 함량은 난소절제로 인하여 감소하였으나, 난소 절제 후 대황 추출물을 투여한 군에서 pyridinoline 함량이 증가하는 경향을 나타내어 콜라겐 성숙가교 형성에도 대황 추출물이 영향을 주는 것으로 나타났다. Holland 등(41)은 폐경기 골다공증 환자에게 피하 estradiol 이식술을 시행한 결과 요추와 대퇴골의 근위부에서 골밀도의 현저한 증가와 함께 성숙된 가교가 증가되고 교원섬유는 감소되었으며, 이러한 성숙된 교원섬유의 증가는 골질의 위험을 감소시킬 것 이라고 주장하였다. 이상의 실험 결과 대황 추출물 투여에 의해 난소 절제로 인해 감소되었던 골 조직 중의 pyridinoline 함량이 증가하여 대황이 콜라겐 성숙가교 형성에 유의한 효과를 주는 것으로 사료되며, 본 실험에서는 조직 내 콜라겐 중의 pyridinoline의 생성

Table 8. Effect of *Eisenia bicyclis* ethanol extracts on pyridinoline content in cartilage and bone of ovariectomized rats

Group ¹⁾	Cartilage (mg/g)	Bone (mg/g)
SHAM	5.53±0.64 ^{2)bs3)}	1.17±0.07 ^b
OVX-CON	4.88±0.48 ^a	0.98±0.07 ^a
OVX-ES50	4.57±0.43 ^a	1.10±0.08 ^{bc}
OVX-ES200	4.83±0.55 ^a	1.06±0.1 ^{ac}

¹⁾Refer to comment in Table 1.

²⁾All values are mean±SD.

³⁾Values with different alphabets are significantly different at p<0.05 using Tukey's test.

량을 측정하였으나 정확한 골 분해 평가를 위해 향후 소변 중의 pyridinoline 함량 측정 또한 수행하고자 한다.

요 약

갱년기 여성에는 여러 폐경 증후들이 나타나는데, 특히 estrogen의 감소로 인하여 급격한 골 소실로 골다공증의 위험성이 높아 이에 대한 예방 및 치료에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 본 연구에서는 갈조류인 대황 에탄올 추출물을 시료로 하여 *in vivo* 실험을 통하여 갱년기 장애 시 나타날 수 있는 골 손실 개선효과를 검토하기 위하여 골 형성 지표인 alkaline phosphatase(ALP) 활성, 결합조직 중의 콜라겐 함량 및 pyridinoline 함량을 측정하였다. 폴리페놀 함량이 높은 추출물을 이용하는 것이 estrogen의 활성이 높을 것으로 예상되어, 대황의 열수와 에탄올 두 용매를 이용하여 추출한 결과 총 폴리페놀 함량은 에탄올 추출에서 더 높은 것으로 나타나, 동물 실험의 시료로 사용하였다. ALP는 폐경 시 estrogen의 결핍으로 인하여 골 전환이 증가하므로 골 형성의 지표로서 널리 사용되고 있다. 난소절제 시 estrogen 결핍으로 bone turnover가 증가되어 비 난소절제군에 비해 혈장 중의 ALP 활성이 증가되었으나, 난소 절제 후 대황 추출물을 투여한 군에서는 그 활성이 유의적으로 감소하는 경향이 나타났다. 이것은 난소절제 후 estrogen의 분비가 감소되는데 반해 대황 추출물이 estrogen 대체 작용을 함으로써 난소절제로 인한 골 손실 정도를 완화시킨 것으로 추측되어진다. 대황 추출물이 골 손실 회복에 미치는 영향을 검토하기 위해 연골 및 골 조직의 콜라겐 함량 및 콜라겐 성숙가교인 pyridinoline 함량을 측정하였다. 연골 및 골조직의 경우 비 난소절제군인 SHAM군에 비해 난소절제군인 OVX-CON군의 콜라겐 및 pyridinoline 함량이 유의적으로 감소하여, 난소절제로 인한 estrogen 결핍으로 그 생성량이 감소한 것으로 나타났다. 대황 추출물 투여에 의한 영향을 검토한 결과, 연골조직의 콜라겐 함량은 200 mg/kg/day 투여한 OVX-EB200군의 경우 대조군인 OVX-CON군에 비해 증가하는 경향을 나타내었으나 유의적인 수준은 아니었다. 반면 골 조직의 콜라겐 함량의 경우, 난소를 절제한 후 대황 추출물을 50 mg/kg/day 투여한 OVX-EB50군에서 대조군에 비해 콜라겐 함량이 증가하는 경향이 나타났으며, 200 mg/kg/day 투여한 OVX-EB200군의 경우 유의적으로 증가하는 결과가 나타났다. 또한 콜라겐 성숙가교인 pyridinoline 함량을 HPLC로 분석한 결과, 골 조직의 pyridinoline 함량이 난소절제 후 감소하였으나, 대황 추출물을 투여한 군(OVX-EB50)에서 대조군인 OVX-CON군과 비교하여 증가하는 결과가 나타났다. 이상의 실험 결과는 estrogen 부족 시 일어날 수 있는 골 손실에 대한 예방 소재로서 갈조류인 대황의 활용 가능성을 시사하고 있으며, 이를 활용한 기능성 소재 개발도 가능할 것으로 기대된다.

문 헌

- Johnston CC Jr, Hui SI, Witt RM, Appledorn R, Baker RS, Longcope C. 1985. Easex steroids. *J Clin Endocrinol Metab* 61: 905-911.
- Richelson LS, Wahner HW, Melton LJ 3rd, Riggs BL. 1984. Relative contributions of aging and estrogen deficiency to postmenopausal bone loss. *N Engl J Med* 311: 1273-1275.
- Smith DM, Nance WE, Kang KW, Chrastian JC, Johnstone CC Jr. 1973. Genetic factors in determining bone mass. *J Clin Invest* 52: 2800-2808.
- Kim SY, Chang SY, Oh HJ. 1997. Comparison of bone mineral density and lipid profiles in pre and postmenopausal women. *J Korean Acad Fam Med* 18: 910-917.
- Kimble RB, Vannice JL, Bloedowl DC, Thompson RC, Hopfer W, Kung VT, Brownfield C, Pacifici R. 1994. Interleukin-1 receptor antagonist decreases bone loss and bone resorption in ovariectomized rats. *J Clin Invest* 93: 1959-1967.
- Dempster DW, Birchman R, Xu R, Lindsay R, Shen V. 1995. Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy. *Bone* 16: 157-161.
- Fujimoto D, Hiram M, Iwa T. 1982. Histidinoalanine, a new crosslinking amino acid, in calcified tissue collagen. *Biochem Biophys Res Commun* 104: 1102-1106.
- 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 (Tokyo)* 40: 95-103.
- Kuboki Y, Mechanic GL. 1982. Comparative molecular distribution of cross-links in bone and dentin collagen. Structure-function relationships. *Calcif Tissue Int* 34: 306-308.
- Robins SP, Bailey AJ. 1977. The chemistry of the collagen cross-links. Characterization of the products of reduction of skin, tendon and bone with sodium cyanoborohydride. *Biochem J* 163: 339-346.
- Seigel RC. 1976. Collagen cross-linking. Synthesis of collagen cross-links in vitro with highly purified lysyl oxidase. *J Biol Chem* 251: 5786-5792.
- Noda M, Roodon GA. 1989. Transcriptional regulation of osteopontin production in rat osteoblast-like cells by parathyroid hormone. *J Cell Biol* 108: 713-718.
- Ninomiya Y, Showater AM, Olsen BR. 1984. *The role of extracellular matrix in development*. Alan R Liss Inc., New York, NY, USA. p 225.
- Schiele F, Henny J, Hitz J, Petittlerc C, Gueguen R, Siest G. 1983. Total bone and liver alkaline phosphatases in plasma: biological variations and reference limits. *Clin Chem* 29: 634-641.
- Raisz LG. 1988. Local and systemic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *N Engl J Med* 318: 818-828.
- Sung JH, Ha S, Im MH, Im JG, Kang KS. 2002. Seaweed and health. In *Foods and Health*. Hyungseol Press Co., Seoul, Korea. p 190.
- So MJ, Kim BK, Choi MJ, Kim KY, Rhee SH, Cho EJ. 2007. Protective activity of fucoidan and alginate against free radical-induced oxidative stress under *in vitro* and cellular system. *J Food Sci Nutr* 12: 191-196.
- Hang D, Choi HS, Kang SC, Kim KR, Sohn ES, Kim MH, Pyo S, Son E. 2005. Effects of fucoidan on NO production and phagocytosis of macrophages and the proliferation of neuron cells. *J Food Sci Nutr* 10: 344-348.
- Haroun-Bouhedja F, Ellouali M, Sinquin C, Boisson-Vidal C. 2000. Relationship between sulfate groups and biological activities of fucans. *Thromb Res* 100: 453-459.
- Collic S, Fischer AM, Tapon-Breaudiere J, Boisson C,

- Durand P, Jozefonvicz J. 1991. Anticoagulant properties of a fucoidan fraction. *Thromb Res* 64: 143-154.
21. Kang JW. 1968. Marine algae. In *Illustrated encyclopedia of fauna & flora of Korea*. Ministry of Education. Vol 8, p 148-151.
 22. Jang YH, Choi SW, Cho SH. 2008. Effect of *Eisenia bicyclis* and its pill on serum status in rats fed high fat diet. *Korean J Nutr* 41: 5-12.
 23. Kim YM, Han CK, Bang SJ, Park JH. 2006. Effects of laminaran from *Eisenia bicyclis* on serum lipids in rats fed high cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 841-846.
 24. Cahyana AH, Shoto Y, Kinoshita Y. 1992. Pyropheophytin a as an antioxidative substance from the marine alga, Arame (*Eisenia bicyclis*). *Biosci Biotech Biochem* 56: 1533-1535.
 25. AOAC. 2005. *Official Method of Analysis*. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA. Vol 45, p 21-22.
 26. Woessner JF Jr. 1961. The determination of hydroxyproline in tissue and protein sample containing small proportion of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* 93: 440-447.
 27. Arakawa N, Kim M, Otsuka M. 1992. An improved high-performance liquid chromatographic assay for the determination of pyridinoline in connective tissues. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 38: 375-380.
 28. Lee S, Jang MK, Kim NY, Jang HJ, Lee DG, Kim M, Kim YY, Kim SG, Yoo BH, Lee SH. 2010. Verification of the fractions with strong estrogenic activities from brown algae. *J Life Sci* 20: 1807-1811.
 29. 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.
 30. Abe T, Chow JM, Lean JM, Chambers TJ. 1993. Estrogen does not restore bone lost after ovariectomy in the rat. *J Bone Miner Res* 8: 831-838.
 31. Jeong SH, Lee HH, Han MY, Ryu CY, Yoon MC. 2002. Effects of fenofibrate on body weight and lipid metabolism in female mice. *Journal of the Institute of Natural Science, Mokwon University* 11: 27-32.
 32. Gale SK, Sclafani A. 1977. Comparison of ovarian and hypothalamic obesity syndromes in the female rat: effect of diet palatability on food intake and body weight. *J Comp Physiol Psychol* 91: 381-392.
 33. Lee SS, Park Yoon JH. 1989. Long-term effect of ovariectomy on body composition. *Korean J Nutr* 22: 102-107.
 34. Park WD, Hwang JS, Hur JW, Ahn SH, Park SK, Kwak CS. 1999. Activities of α -D-mannosidase and β -D-mannosidase in patients with liver diseases. *Korean J Gastroenterol* 33: 211-221.
 35. Riis BJ. 1993. Biochemical markers of bone turnover. II: Diagnosis prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 95: 17S-21S.
 36. Kim IG, Kim SB, Kim JG, Kim KC, Chun KC, Park HK, Lee KS. 1993. Serum enzymes as indicators of radiation exposure in rat. *J Radiation Protection* 18(2): 37-44.
 37. Mcconkey B, Fraser GM, Blich AS, Whiteley H. 1963. Transparent skin and osteoporosis. *Lancet* 281: 693-695.
 38. Odell WD, Heath H 3rd. 1993. Osteoporosis pathophysiology, prevention, diagnosis, and treatment. *Dis Mon* 39: 789-867.
 39. Clark AP, Schuttinga JA. 1992. Targeted estrogen/progesterone replacement therapy for osteoporosis: calculation of health care cost savings. *Osteoporos Int* 2: 195-200.
 40. Tiki ML, Allison GT, Naik K, Karry SK. 2003. Malondialdehyde oxidation of cartilage collagen by chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 11: 159-166.
 41. Holland EF, Studd JW, Mansell JP, Leather AT, Bailey AJ. 1994. Changes in collagen composition and cross-links in bone and skin of osteoporotic postmenopausal women treated with percutaneous estradiol implants. *Obstet Gynecol* 83: 180-183.

(2012년 11월 6일 접수; 2012년 12월 20일 채택)