

고령 암컷 흰쥐에서 달팽이 추출물이 활성산소종에 미치는 영향

손기호^{1*} · 김태희²

¹경성대학교 약학대학, ²주네이처텍 연구기획팀

Effect of Snail(*Fruticiola sieboldiana*) Extract on Reactive Oxygen Species(ROS) in Old Female Rats

Kieho Sohn^{1*} and Taehee Kim²

¹College of Pharmacy, Kyungsoong University, 309, Suyeong-ro, Nam-gu, Busan 48434, Republic of Korea

²Naturetech, 29-8, Yongjeong-gil, Chopyeong-myeon, Jincheon-gun, Chungcheongbuk-do 31257, Republic of Korea

Abstract – This study was performed to investigate the effect of 8 weeks administration of snail extract on free radical formation in old female rats (27 weeks). Rats administrated orally with snail extract at the dose of 100 mg/kg, 200 mg/kg, chondroitin sulfate 10 mg/kg and 0.9% saline (control) for 8 weeks. Hematologic profiles and hepatic enzymes were all normal. Results of analysis on snail extract were naicin, Na, protein, sugar, beta-carotene, vitamin (A, B1, B2, B6, C, E), folic acid, phosphorus, lipid, K, cholesterol, chondroitin. Hepatic lipid peroxidase content was decreased, aldehyde oxidase was decreased, glutathione peroxidase and glutathione-S transferase were not changed, but xanthine oxidase, catalase and superoxidase activities were significantly increased in snail extract fed group ($p < 0.001$). Therefore, as the result of this study, it could be expected that the administration of snail extract for 8weeks is the potential to be use as a hepatic anti-oxidative agent.

Keywords – Snail, *Fruticiola sieboldiana*, Reactive oxygen species (ROS)

현재 동아시아에서 일본의 경우 고령인구의 비율이 약 26%로 이미 초고령 사회에 접어들었고 한국을 포함한 나머지 국가들도 고령화 사회에 진입하였으며, 아직 개발경제 수준에 머무는 중국 또한 고령인구 비율이 약 9.5%로 고령화 사회에 진입하였다.¹⁾ 현재의 인구 추이가 앞으로 계속 된다고 가정한다면 2030년에는 동아시아에서 중국을 제외한 모든 국가가 초 고령화 사회가 될 것으로 예측할 수 있으며, 특히 고령화 문제에 일찍 봉착한 일본의 경우 총인구의 약 30%, 나머지 국가들은 20% 이상이 고령자로 구성될 전망이다.¹⁾ 또한, 통계청 자료에 따르면 2019년에는 우리나라가 고령화 사회(aging society)에서 고령사회(aged society)로 바뀔 것으로 예상하며, 최근 조사는 그 시기가 앞으로 당겨질 것으로 나타내고 있다.²⁾ 특히 고령에서 삶의 질을 좌우하는 인자 중 대표적인 것이 골다공증으로 인한 골절로 알려져 있다.³⁾

임상적 골다공증의 치료는 골 흡수를 억제하거나 골 형성을 촉진하여 손실된 골량을 회복시키는 것으로 나누어지는데

전자의 경우는 estrogen요법, calcitonin요법, 칼슘보충제, 비타민 D 유도체 요법 등이고, 후자의 경우는 sodium fluoride, parathyroid hormone(PTH) 요법 등이 있다. 현재 골다공증의 예방 및 치료에 가장 많이 이용되는 방법은 estrogen요법과 calcitonin요법, phosphonate요법등으로 보고되며 특히 폐경기 여성의 골다공증 치료에는 에스트로겐을 투여하는 호르몬 요법이 효과적인 치료법으로 인식되고 있으나, 여러 가지 부작용과 투여시기를 조절하기 어렵고 유방암, 자궁암, 간질환 등의 특정 환자들은 사용하지 못해 적용에 있어 어려움이 따른다.⁴⁾

이러한 이유로 최근에는 에스트로겐 투여에 따른 부작용을 최소화하기 위해 골 손실은 최소화하면서 골 형성을 촉진할 수 있는 천연물의 활성 성분을 이용한 다양한 연구가 진행되고 있다.⁵⁻⁷⁾ 뿐만 아니라 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)이 과골세포 생성의 신호전달에 관여하여 과골세포의 생성을 촉진한다는 연구 결과를 고려해 볼 때^{8,9)} 항산화 활성을 지닌 천연물 성분이 골 형성과 흡수 기전에 긍정적인 효과를 제시할 것으로 사료된다.

식용달팽이(*Fruticiola sieboldiana*)는 나선형의 외각을 가지는 유폐복족류로 세계도처에 분포되어 고급 식품원료로

*교신저자(E-mail): khosohn@ks.ac.kr
(Tel): 051-663-4887

서 뿐만 아니라 황산콘드로이틴 존재로 인하여 강장 및 강정식으로 널리 이용되고 있다.¹⁰⁻¹²⁾ 황산콘드로이틴은 D-glucuronic acid, N-acetyl-D-glucosamine, 그리고 sulfate가 등량의 몰수로 구성되어 있는 다당류로서 동물 등의 세포간 조직, 연골조직 및 신경조직 등에 존재하며, 대부분 다른 glycosaminoglycan과 함께 단백질에 공유 결합하여 proteoglycan으로 존재하며, 식용달팽이의 점질 다당체의 주성분으로 알려져 있다.¹³⁻¹⁵⁾

달팽이의 주성분인 chondroitin sulfate의 경우 주로 연골이 석회화 될 때 작용하는 연구가 많으나, 생체 내에서의 기능은 거의 알려져 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 달팽이를 시료로 사용하여 노령기 암컷 rat을 사용한 *in vivo* 실험을 통하여 조골세포에 미치는 직접적인 영향을 검토하기에 앞서 우선 간장의 활성 산소계에 미치는 영향을 확인하였기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 기구 - 시약 중 thiobarbituric acid, reduced glutathione, oxidized glutathione, NADPH, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, cytochrome C, sodium xanthine는 Sigma 사로부터 구입하였으며 sulfosalicylic acid, sodium azide는 Katayama사, sodium dihydrogenphosphate, disodium hydrogenphosphate는 Junsei사, malondialdehyde는 Aldrich사로부터 구입하였으며 Kit 시약으로는 ALP, ALB, ALT, AST, Total cholesterol 및 Total protein은 Roche로부터 공급받아 사용하였다.

실험에 사용된 기구로는 glass teflon homogenizer(대한과학, Korea), UV-spectrophotometer(Shimadzu UV-1201, Japan), high centrifuge(Hanil HMR-1610V, Korea), 생화학 분석 장비(Roche Ltd, Switzerland), ultra centrifuge(Hitachi 695-7, Japan), water bath(Jeio tech Co., Korea), medical freezer(Sanyo, Japan), microplate Reader(Bio-TEK, USA)를 사용하였다.

실험 재료 - 본 실험에 사용한 달팽이(*F.sieboldiana*) 시료는 천호식품에서 구입하여 열처리 및 가수분해한 것을 사용하였는데 이는 달팽이와 정제수를 각각 1:3 비율로 넣고, 40°C에서 protease로 4시간 동안 효소 분해 한 후, 95°C에서 5분 실험 시킨 뒤 동결 건조한 것이며 최종 수율은 15% 였다.

노령 쥐와 성장 쥐의 확인 - 노령 쥐와 성장 쥐를 확인하기 위하여 SD-rat female 12주령 및 27주령의 혈액학적 분석 및 혈청의 Ca과 Mg 농도를 살펴보았다. 혈액 분석은 Ca 및 Mg 농도의 경우 rat 전용 elisa kit(Mybiosource, USA)을 이용하여 분석하였다.

달팽이 추출물의 영양성분분석 및 chondroitin sulfate 함량분석

영양성분분석 - 달팽이 추출물을 한국기능식품연구원(성남, 한국)에 의뢰하여 식품공전을 기초하여 영양성분을 분석하였다.

Chondroitin sulfate 함량 분석 - 영양성분 분석과 마찬가지로 달팽이 추출물을 한국기능식품연구원(성남, 한국)에 의뢰하여 chondroitin sulfate를 분석하였다. 분석법은 건강기능식품공전 뮤코다당단백 시험법을 참조하였으며, 시험항목으로는 chondroitin sulfate, 단백질과 콘드로이틴황산의 비율, 조단백질을 분석하여 이들의 비율을 계산하여 농도를 계산하였다.

달팽이 추출물을 섭취한 흰쥐의 기본 혈액검사

실험동물 - 실험동물(효창사이언스(주), 대구, 한국)은 고품 사료와 물을 자유공급하면서 (주)동남의화학연구원 동물사(부산, 한국)에서 일정한 조건(온도: 22 ± 1°C, 습도: 55 ± 3%, 명암: 12 시간 light/ dark cycle)으로 1주일간 적응시킨 후 식이를 투여하였다.

성장기 모델의 경우 12주령 SD-rat female를, 노령기 모델은 27주령 SD-rat female로 8주간 시료 물질을 처리하여 실험시간 전 24 시간 동안 물만 주고 절식 하였다. 이때 효소 활성의 일증변동을 고려하여 실험동물을 일정시간(오전 10:00-12:00) 내에서 처치하였다. 본 연구는 (주)동남의화학연구원 동물실험위원회(SEMI, Institutional Animal Care and Use Committee)의 방침 및 법규에 따라 진행되었다(윤리승인번호: SEMI-14-12).

동물실험 디자인 및 처치 - 실험동물 군 구성은 female SD-rat으로 성장 쥐인 4주령, 8주령, 12주령 및 노령 쥐 27주령으로 구성하였으며, 8주간 아래와 같이 시료 물질을 경구투여 하였다(Table I).

실험디자인은 27주령 female SD-rat에 saline만 투여한 normal군(saline 0.9%), 달팽이 추출물 100 mg/kg 투여군(Snail 100), 달팽이 추출물 200 mg/kg 투여군(Snail 200), chondroitin sulfate 10 mg/kg투여군(chondroitin 10)으로 구성하였다. Chondroitin sulfate는 달팽이 100 g에 존재하는 chondroitin sulfate의 용량을 참고하여 설정하였다.

시험물질의 조제 및 투여 - 투여 당일에 시험물질을 시험물질 투여군의 투여량에 맞게 칭량하여 주사용 멸균 증류수에 용해하여 조제하였으며, 시료는 위내에 강제 경구투여 방법으로, 각 개체별로 각각 56일(8주) 투여하였다.

관찰 및 검사항목

체중측정 - 시험에 사용된 모든 동물에 대하여 투여 개시 직전(1일)과 투여 후 일주일마다 체중 변동을 측정하였다.

혈청 생화학적 분석 - 실험동물을 CO₂로 마취시켜 복부

Table I. Design of experimental group

	시험동물	군 구성	처치	마리수
1	SD-rat 4주령, female	4W	Saline 0.9%	6
2	SD-rat 8주령 female	8W	Saline 0.9%	6
3	SD-rat 12주령 female	12W	Saline 0.9%	6
4		Normal	Saline 0.9%	6
5		Snail extract 100 mg/kg	달팽이추출물 100 mg/kg 투여군	6
6	SD-rat 27주령 female	Snail extract 200 mg/kg	달팽이 추출물 200 mg/kg 투여군	6
7		Chondroitin sulfate 10 mg/kg	chondroitin sulfate 10 mg/kg 투여군	6

대동맥으로부터 채혈하였다. 얻어진 혈액은 약 30 분간 실온에서 방치시킨 후 3,000 rpm에서 15 분간 원심 분리하여 혈청을 얻어 혈청생화학분석에 사용하였다. 분리된 혈액 상층 액은 혈청생화학기(Roche Ltd., Basel, Switzerland)로 AST, ALT, ALP, total cholesterol, total protein, Albumin의 농도를 측정하였다.

달팽이 추출물이 간 조직 효소활성에 미치는 영향

효소원의 조제 - 간을 적출하여 생리식염수로 씻은 다음 여지로 조직에 남아있는 혈액 및 기타 이물질을 제거한 다음 간 조직은 1g당 4배량의 0.1 M Sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 가하고 빙냉 상에서 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄액은 homogenate 분획으로 하였으며, 이 분획을 냉장 원심분리기로 600xg에서 10분간 원심 분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 상층 액을 고속원심분리기로 10,000xg에서 20분간 원심분리 한 후, 간조직의 침전물은 동량의 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.4) 용액을 가하여 현탁 시킨 시료 액을 다시 10,000x g에서 30 분간 재 원심 분리하여 mitochondria 분획을 얻었으며, 상층 액은 다시 105,000 × g에서 60분간 초원심분리하여 얻은 상층 액을 cytosol 분획으로 다시 일련의 과정을 거쳐 microsomal 분획을 얻었다.

간 조직 중 효소활성의 측정

lipid peroxide 함량의 측정 - Ohkawa 등의 방법¹⁶⁾을 변경하여 뇌 조직 1g당 10배량의 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 마쇄하고 이 10% 마쇄액에 동일한 buffer를 동량 가하여 3시간 preincubation 시킨 후 8.1% sodium dodecyl sulfate와 20% acetate buffer(pH 3.5) 및 발색의 목적으로 0.8% thiobarbituric acid를 가한 후 95°C에서 1시간 동안 반응시켜 실온에서 냉각 후에 n-BuOH:Pyridine(15 :1)을 첨가하여 15분간 원심 분리하여 생성된 홍색의 n-BuOH:Pyridine 층을 취하여 파장 532 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선에서 그 함량을 뇌조직 1g 당 malondialdehyde nmole로 표시하였다.

Xanthine oxidase 활성의 측정 - Stripe와 Della의 방법¹⁷⁾에 준하여 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5) 3.0 μL 가하여 37°C에서 반응시킨 후 20% trichloroacetic acid를 가하여 제 단백 시키고 상층 액을 취한 후 생성된 uric acid를 파장 292 nm에서 흡광도를 측정하고 표준 검량 선에 근거하여 1분당 1 mg protein이 생성하는 uric acid의 양을 nmole로 나타내었다.

Aldehyde oxidase 활성의 측정 - Rajagopalan 등의 방법¹⁸⁾에 준하여 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)에 기질인 NMN(n-1-methyl nicotinamide chloride)와 효소 액을 가해 반응시킨 후 생성물인 2-pyridone을 파장 300 nm에서 흡광도의 변화를 읽고 검량 선에 준해 활성도를 산정하였다. 효소의 활성도는 분당 mg protein이 생성하는 2-pyridone을 nmole로 표시하였다.

Glutathione S-transferase(GST) 활성의 측정 - Habig 등의 방법¹⁹⁾에 준하여 0.1M potassium phosphate buffer(pH 6.5)에 40 mM reduced glutathione 75μL를 가한 후 효소액 10 μL를 넣고 25°C에서 5분간 preincubation한 뒤 기질로서 2,4-dinitrochlorobenzene 25 μL를 가하여 2분간 반응시킨 후 20% trichloroacetic acid를 가하여 반응을 완료시키고 원심 분리하여 얻은 상층 액을 파장 340 nm에서 흡광도를 측정한 후 2,4-dinitrochlorobenzene의 mole 흡광계수 9.6 mM⁻¹cm⁻¹을 이용하여 활성도를 산정하였다.

Glutathione determination(GD) 함량의 측정 - 뇌 조직 중 glutathione 함량 측정은 Ellman의 방법²⁰⁾에 준하여 간장 조직 homogenate 0.5 mL에 4% sulfosalicylic acid 0.5 mL를 가하고 2500 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층 액 0.3 mL을 취하여 disulfide reagent 2.7 mL를 넣고 20분간 방치 후 412 nm에서 흡광도를 측정하고 표준 검량 선에 준하여 산정하였다.

Glutathione peroxidase(GPx) 활성의 측정 - 35%의 H₂O₂, glutathione 및 6 mM NADPH가 함유된 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.2) 중에서 homogenized 효소 액을 첨가하여 파장 330~340 nm에서 흡광도를 측정하고 표준선을 기준으로 하여 활성도를 측정하였다. 효소 활성의 단위는 1분간 nmole

NADPH를 oxidized 시키는 효소의 양으로 표시하였다. 측정법은 Pagila와 Valentine의 방법²¹⁾을 기준으로 하여 측정하였다.

Superoxide dismutase(SOD)활성의 측정 - Marklund의 방법²²⁾에 준하여 0.2 M potassium phosphate buffer(200 μ M cytochrome C, 100 μ M EDTA 함유 pH 8.6) 1.0 ml에 효소액 0.2 mL를 가하여 ice bath상에서 20분간 방치하고 test에는 alkaline dimethyl sulfoxide(DMSO)용액 0.5 mL, blank에는 non-alkaline DMSO 용액 0.5 mL를 각각 가하고 37°C에서 30분간 반응시키고 파장 550 nm에서 감소되는 cytochrome C의 흡광도를 측정하였다. SOD 1unit는 측정계에서 생성되는 Superoxide dismutase에 의해 50% 저해될 경우의 반응액 증의 검체량을 나타내었다.

Catalase 활성의 측정 - Aebi의 방법²³⁾에 준하여 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)중에 기질인 10 mM H₂O₂의 환원되는 정도를 파장 240 nm에서 흡광도의 변화를 읽고 분자 흡광계수 0.041 mM⁻¹cm⁻¹을 이용하여 활성도를 산정하였다. 효소활성의 단위는 1분당 1 mg protein이 분해하는 hydrogen peroxide의 양을 μ mole로 표시하였다.

단백질 정량 - 단백질의 함량은 Lowry 등의 방법²⁴⁾에 준하여 bovine serum albumin(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. USA)을 표준으로 하여 측정하였다.

통계학적 방법 - 통계적 검정은 SPSS통계 프로그램을 이용하여 수행하였으며, $p < 0.05$ 이하일 경우 통계적으로 유의한 것으로 검정하였다. 각 항목에 대한 유의한 차이를 나타내는지의 비교분석은 student's t-test one-way ANOVA (Duncan's multiple comparison test)를 이용하여 통계적 유의성을 검증하였다.

결 과

노령 쥐와 성장 쥐의 구분 - 실험에 사용하는 노령 쥐의 기준을 설정하기 위해 12주령과 27주령 female SD-rat의 혈액검사 및 혈청 Mg, Ca 검사를 실시한 결과 Table II 및 Table III과 같았다. 혈액검사결과 12주령에 비하여 특히 혈액 중 칼슘 및 마그네슘의 농도 경우 1.5배 감소한 것을 확인할 수 있었다(Table III). 이는 폐경기 이후 여성에게 칼슘 및 마그네슘의 농도가 낮아진다는 보고²⁵⁾와도 일치하는 결과였다. 아울러, Misawa Ishii등²⁶⁾에 따르면, 23주령 이상이 되는 SD-rat의 경우 생식력 및 발정주기가 감소하고, 폐경기에 이른다는 보고에 따라 본 실험에서는 성장기 모델을 4주, 8주 및 12주로 설정하였으며, 27주령 모델을 폐경된 노령 쥐로 설정하여 실험을 실시하였다.

Table II. Hematology historical control data from SD-rats (female)

TEST(unit)	12 weeks		27 weeks	
	Mean	Range	Mean	Range
Erythrocytes, 10 ⁸ /ul	7.96	7.77-8.19	8.46	8.08-8.83
Hematocrit, %	43.93	41.20-47.30	47.65	47.00-48.30
Hemoglobin, g/dl	15.07	14.40-16.00	15.70	15.40-16.00
MCHC, %	34.38	32.70-35.70	32.90	31.70-34.10
MCH, pg	18.96	18.30-20.00	18.55	18.20-18.90
MCV, fl	55.17	53.00-59.50	56.55	53.20-18.90
Leukocytes, 10 ³ /ul	11.57	10.09-14.01	9.75	9.40-10.10
Neutrophils, %	9.89	8.20-14.50	17.85	17.60-18.09
Neutrophils, 10 ³ /ul	1.18	0.91-1.70	1.72	1.70-1.74
Lymphocytes, %	84.39	80.20-86.00	75.93	74.20-77.66
Lymphocytes, 10 ³ /ul	9.79	8.50-12.10	7.25	7.20-7.30
Monocytes, %	2.58	2.10-3.40	2.02	1.90-2.13
Monocytes, 10 ³ /ul	0.28	0.10-0.46	0.20	0.00-0.20
Eosinophils, %	1.20	1.00-1.50	2.02	0.90-2.70
Eosinophils, 10 ³ /ul	0.13	0.10-0.16	0.15	0.10-0.20
Basophils, %	0.48	0.30-1.00	0.10	0.00-0.20
Basophils, 10 ³ /ul	0.05	0.00-0.10	0.05	0.00-0.10
Large Unstained cells, %	1.68	1.10-2.80	1.68	1.30-1.72
Large Unstained cells, 10 ³ /ul	0.18	0.14-0.27	0.19	0.12-0.21
Platelets, 1000/mm ³	792.00	379-967	958.00	885-1031

Table III. Analysis of serum-Calcium, Magnesium (mg/dL)

TEST	Calcium		Magnesium	
	12 weeks	27 weeks	12 weeks	27 weeks
Range of variation	10.70-13.79	10.29-13.16	4.01-6.89	3.30-5.24
Mean value	12.23	11.92	5.36	4.43
Standard deviation of the mean	±0.14	±0.16	±0.12	±0.16

Table IV. Analysis of snail extract (100 g)

Nutritional contents	Content
Niacin	1.10 mg
Na	270.00 mg
Protein	13.90 g
Sugar	2.00 g
Retinol	-
beta-carotene	26.00 µg
Vitamin A	4.000 µg
Vitamin B ₁	0.01 mg
Vitamin B ₂	0.17 mg
Vitamin B ₆	0.17 mg
Vitamin C	7.30 mg
Vitamin E	1.00 mg
Dietary fiber	-
Zinc	2.66 mg
Folic acid	0.00 µg
Phosphorus	121.00 mg
lipid	0.80 g
Iron	1.30 mg
Potassium	267.00 mg
Calcium	52.00 mg
Cholesterol	106.00 mg
Ash	1.30 g

달팽이 추출물 성분분석

영양성분 분석 - 달팽이 추출물을 영양성분 분석한 결과 Table IV로 나타났다. 칼륨, 칼슘 및 인의 영양성분이 많이 나타났으며 나트륨도 상대적으로 많아 짠맛을 내는 것으로 사료된다.

Chondroitin sulfate 함량 분석 - 달팽이 추출물의 chondroitin sulfate의 분석은 건강기능식품공전 뮤코다당단백 시험법 참조하여 콘드로이친황산, 단백질과 콘드로이친황산의 비율, 조단백질 항목을 분석하였다. 분석결과는 Table V와 같이 콘드로이친황산의 함량이 10.45%로 측정되었다.

달팽이 추출물 섭취한 흰쥐의 기본 혈액 검사 - 4주, 8주, 12주 및 노령 쥐(27주)에 시료를 8주간 투여한 후 각 실험군의 serum에서 기본 생화학 검사(AST, ALT, ALP, ALB, total cholesterol, total protein)의 결과를 Table VI-Table VII에 나타내었다.

기본 생화학 검사 결과 달팽이 시료를 8주간 투여함에도 간 기능 손상지표(AST, ALT, ALP) 및 총콜레스테롤, 총단백질 함량에 크게 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다.

달팽이 추출물의 간 조직 효소활성에 미치는 영향

지질 과산화 함량에 미치는 영향 - MDA는 지질의 과산화 정도를 측정하는 방법으로 활성산소에 의해 세포막을 형성하는 주성분인 지질에 과산화현상을 일으켜 인체 내 산화적 손상을 가져오는 것으로 알려져 있다.²⁷⁾ 노화뿐만 아

Table V. Analysis of chondroitin sulfate concentration of snail extract

	Chondroitin sulfate (%)	Ratio of protein and chondroitin	Crude protein (%)
Snail extract	10.45	4.78	49.96

Table VI. Effect of serum level fed snail extract for 8 weeks

Group	ALP	ALB	ALT	AST	Total cholesterol	Total protein	
	U/L	g/dL	U/L	U/L	mg/dL	g/dL	
4 W	135.47±38.38	45.10±1.65	41.80±8.86	117.07±48.94	130.20±17.28	6.03±0.112	
8 W	139.97±9.23	45.85±1.38	42.13±11.46	85.40±27.15	85.08±9.25	6.23±0.23	
12 W	154.80±25.69	45.03±1.58	63.87±20.55	139.50±33.12	126.06±23.67	6.08±0.42	
27 W	saline 0.9%	86.05±12.42*	41.75±3.15	43.50±8.89	70.62±15.34*	131.33±53.66	5.62±0.22
	Snail 100	107.92±33.63	43.06±4.04	55.38±17.77	73.70±15.55*	146.94±58.34	5.65±0.16
	Snail 200	76.93±15.90*	43.84±3.31	49.07±11.94	93.21±16.30	136.23±15.96	5.78±0.64
	chondroitin 10	87.22±21.26*	42.15±1.56	52.15±19.93	86.28±22.53	138.54±23.13	5.70±0.22

¹⁾Values are expressed mean ± S.D. for groups of six experiments.

²⁾*p<0.05 vs. 27W saline 0.9%.

Table VII. Normal range of serum level of female SD-rat

항목	ALP	ALB	ALT	AST	Total cholesterol	Total protein
	U/L	g/dL	U/L	U/L	mg/dL	g/dL
Normal range	80-190	40-50	17-97	54-298	20-154	5~7

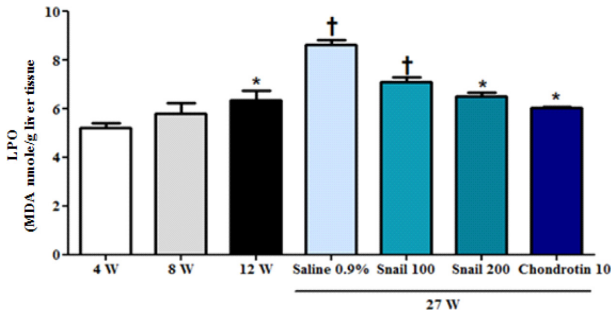


Fig. 1. Effect of hepatic lipid peroxide content fed snail extract for 8 weeks.

- 1) Values are expressed mean \pm S.D. for groups of six experiments
- 2) * p <0.05 vs. 27W saline 0.9%, † p <0.001 vs. 27W saline 0.9%

나라 대부분의 퇴행성 질환의 발병과정에서 활성산소가 생성되고 이로 인한 산화적 스트레스가 질병의 직접 또는 간접적인 위험인자로 보고되고 있으며, 노화에 따른 골다공증 또한 역시 세포의 산화적 손상과 연관되어 있다.²⁸⁾ Fig. 1은 간 조직 중 지질 과산화의 함량의 변화를 관찰한 결과이다. 노화가 진행이 가장 많이 된 27주령(해부 시 35주령)의 N군에서 8.87 ± 1.23 MDA nmole/g of tissue로 지질 과산화 정도가 가장 높게 나타났으며, 달팽이 투여에 의해 각각 농도별로 7.03 ± 0.98 MDA nmole/g of tissue, 6.90 ± 0.53 MDA nmole/g of tissue로 나타났으며 특히 chondroitin sulfate 10 mg/kg 투여군의 경우 12주령의 간조직의 Lipid peroxide 값과 비슷한 수준으로 lipid peroxide의 함량이 감소하는 것을 살펴 볼 수 있었다.

활성산소 생성계에 미치는 영향 - Fig. 2는 간 조직 활성산소 생성계에 달팽이 추출물이 미치는 영향을 관찰한 결과이다. Xanthine oxidase(XO)는 분자상의 산소를 수소 전자수용체로 이용하여 xanthine을 uric acid형으로 산화하는 반응을 촉매 하는 효소로 노화가 진행될수록 18.64 ± 2.30 uric acid nmole/mg protein/min 이었으며, 달팽이 100 mg/kg, 달팽이 200 mg/kg 투여군 각각 14.15 ± 2.83 , 12.12 ± 1.32 uric acid nmole/mg protein/min로 효소활성을 나타나 N군 수준으로 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (p <0.001).

Aldehyde oxidase(AO)도 XO와 같은 경향을 보였다(Fig. 3). 노화가 진행된 27주령(해부 시 35주령) 58.57 ± 3.57 2-pyridine nmole/mg protein/min로 xanthine oxidase와 같이 효소 활성이 증가하였으나, 8주간 시료투여로 AO 값은 각각 42.49 ± 2.87 ,

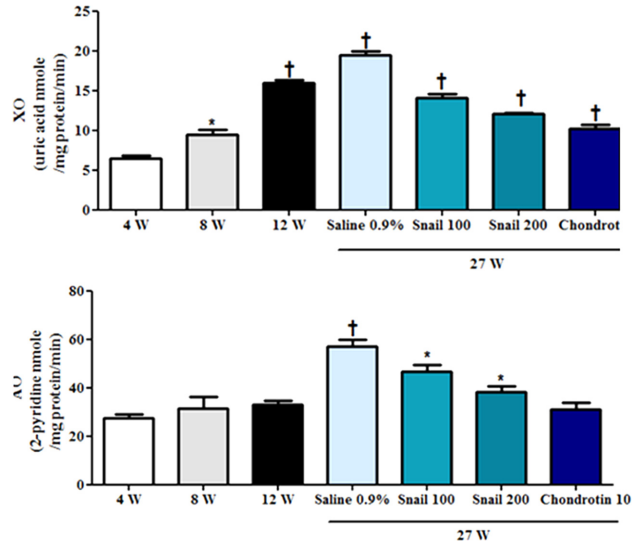


Fig. 2. Effect of hepatic xanthine oxidase and aldehyde oxidase activity fed snail extract for 8 weeks.

- 1) Values are expressed mean \pm S.D. for groups of six experiments
- 2) * p <0.05 vs. 27W saline 0.9%, † p <0.001 vs. 27W saline 0.9%

39.44 ± 2.68 2-pyridine nmole/mg protein/min로 효소활성이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

Glutathione 효소계에 미치는 영향 - 달팽이 추출물을 8주간 투여하고서 간 조직 중 glutathione 농도에 미치는 영향을 관찰하였다(Fig. 3). Glutathione peroxidase(GPx), glutathione-S transferase(GST), glutathione concentration(GC) 모든 결과에서 27주령 노령쥐에서는 glutathione농도 및 각 효소의 활성이 줄어들었음을 확인할 수 있었다. 한편 달팽이 시료를 8주간 투여함에도 불구하고 앞서 활성산소 생성계나 활성산소 해독계에 미치는 효과와는 달리 유의적인 차이가 없었다. 이는 달팽이 성분에는 앞서 분석한 데이터와 같이 glutathione을 생성하는 -SH 계열의 영양성분이 없기에 따라 glutathione 생성 및 조절계에는 영향을 미치지 않는 것으로 해석된다(Fig. 3).

활성산소 해독계에 미치는 영향 - Fig. 4는 간 조직의 활성산소 해독계인 superoxidase dismutase(SOD) 및 catalase 효소 활성에 달팽이 추출물이 노령 쥐에 미치는 영향을 관찰한 결과이다. 노화가 진행됨에 따라 SOD와 Catalase 활성 수치가 감소되었으며, 달팽이 추출물 8주 투여로 해독계 효소 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 SOD 및 catalase 효소활성의 경우, 달팽이 투여군에서 27주령과

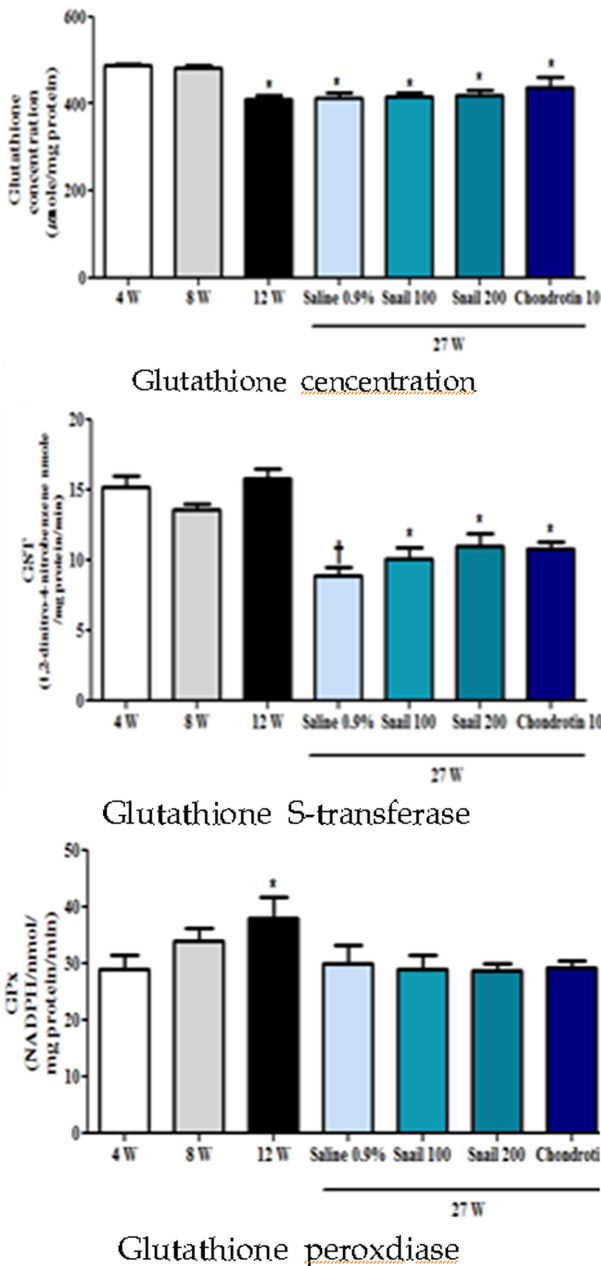


Fig. 3. Effects of hepatic glutathione concentration, glutathione-S transferase and glutathione peroxidase activities fed snail extract for 8 weeks.

1) Values are expressed mean ± S.D. for groups of six experiments
 2) * $p < 0.05$ vs. 27W saline 0.9%, † $p < 0.001$ vs. 27W saline 0.9%

대비하여 각각 $p < 0.001$, $p < 0.05$ 유의수준으로 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

고찰

여성의 골다공증은 폐경에 의한 에스트로겐 부족, 칼슘 및 마그네슘 부족으로 인하여 그 유병률은 증가하고 있으

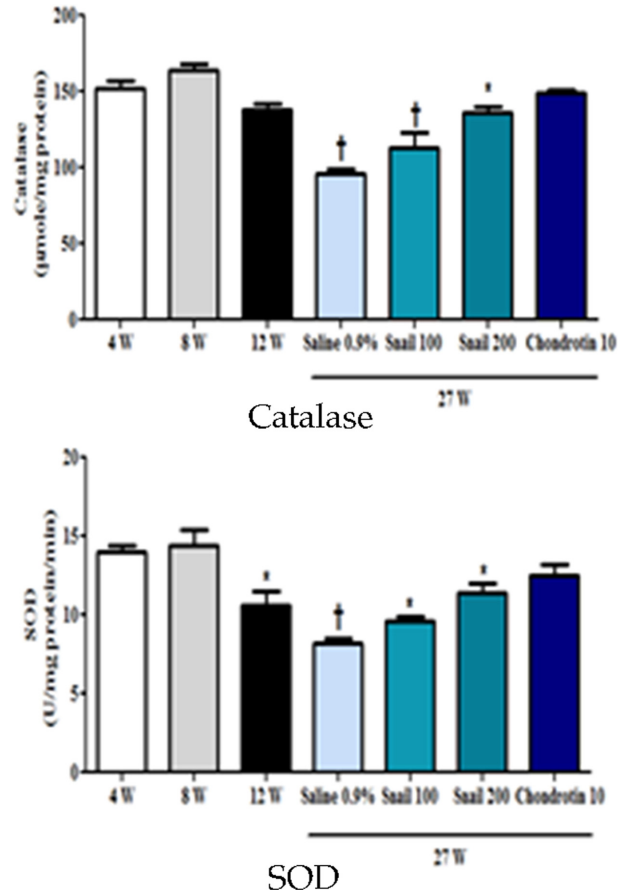


Fig. 4. Effect of hepatic catalase and SOD in snail extract for 8 weeks.

1) Values are expressed mean ± S.D. for groups of six experiments
 2) * $p < 0.05$ vs. 27W saline 0.9%, † $p < 0.001$ vs. 27W saline 0.9%

며 현대 중요한 공중보건문제로 대두하고 있다.²⁹⁾ 골다공증 환자는 고령화의 영향으로 꾸준히 늘어 2016년까지 5년 동안 31% 증가하였으며, 전체 환자 가운데 93%가 여성일 정도로 여성비중이 월등히 크다.

현재 골다공증 예방 및 치료에 사용되고 있는 치료제는 대부분 골 흡수 억제 기전과 관련되어 손상된 골 조직을 완전히 회복시킬 수 없으며 호르몬 요법인 에스트로겐 요법은 폐경기 여성의 골다공증 치료에 효과적이지만 여러 가지 부작용과 특정 환자에 대한 제한성으로 인해 적용하기 불편한 단점이 있다.³⁰⁾

이에 최저의 골 손실과 최대의 골 형성을 촉진할 뿐 아니라 에스트로겐 투여에 의한 위험성을 최소화하기 위해 상대적으로 부작용이 적은 천연물의 활성성분에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

노화는 나이가 증가함에 따라 생식력의 감퇴, 각 기관의 기능상실로 정의할 수 있다. 노화 뿐 아니라 대부분의 퇴행성 질환은 발병과정에서 활성산소가 생성되고 이로 인한 산화 스트레스가 질병의 직·간접적인 위험인자로 보고되고 있다.

체내 활성산소가 증가할 경우 조골세포 활성화에 관여하는 fibronectin이 손상을 입게 되어 조골세포 증식 및 골 형성 과정에 부정적인 영향을 초래 하며³¹⁾ NF- κ B연관 신호전달 체계를 통하여 파골세포를 활성화시킴으로 골 흡수를 촉진 한다는 결과가 보고된 바 있다.³²⁾ 이러한 연구보고는 우수한 항산화 활성을 가진 달팽이 추출물이 전체적인 골대사에 긍정적인 영향을 미치는 가능성을 제시해 준다.

Lipid peroxidation은 활성산소의 산화 과정에서 고도의 불포화지방산이 수소를 탈취당하면서 이를 보상하기 위하여 일어나는 타 전하와의 연쇄적인 반응을 통하여 생성되는 반응이다. Lipid peroxidation은 노화를 촉진하며, 동맥경화, 백내장, 류마티스 관절염, 신경퇴행성 장애 등과 연관이 있다.³³⁾ 인체 내 lipid peroxidation을 측정하는 표준적 방법은 없으나 중간 대사물인 MDA를 측정 하여 lipid peroxidation의 농도를 측정 하는 방법이³⁴⁾ 현재 가장 많이 사용되는 방법이다.

달팽이 추출물 8주 투여가 간 조직의 항산화 효소 기전에 미치는 효과를 확인하기 위하여 활성산소 생성계, 환원계 관련 효소를 측정하였다. 우선 간 조직의 lipid peroxidase 실험 결과, 달팽이 추출물 투여 용량 의존적으로 MDA의 수치가 낮아지는 것을 관찰하였다. 이는 노화주의 각 기관에서 LPO함량이 높아짐을 보여주었던 연구³⁵⁾ 와도 일치하는 결과이다.

또한 활성산소 생성계인 AO 및 XO 효소 활성에서 달팽이 추출물 급여로 AO, XO 활성이 감소하여 27주 정상군(8주 saline 투여) 대비하여 유의적인 활성을 확인하였으며, 활성산소 환원계인 SOD 및 Catalase 활성의 경우 달팽이 추출물 투여로 인하여 용량 의존적으로 활성이 증가됨을 확인할 수 있었다. SOD는 superoxide anion radical을 hydrogen peroxide로 변환시켜 산화적 손상에 대한 세포의 방어에 일차적으로 관여하는 효소라면^{36,37)} hydrogen peroxide는 다시 catalase 작용에 의하여 물로 변하거나 glutathione peroxide의 매개로 glutathione과 결합하여 물로 변하게 된다.³⁸⁾ 지속적인 항산화 작용을 나타내기 위해서는 glutathione의 지속적인 회수 및 이용을 고려해야 한다.³⁹⁾ 따라서 glutathione 함량과 glutathione을 기질로 하여 체내 생성된 과산화물을 환원시키고 산화형 glutathione을 만드는 GSH-Px, GST의 활성은 장기간 지속적 항산화 효과를 내기위해 중요한 인자라 볼 수 있다. 그러나 glutathione 관련 효소계의 경우, 달팽이 성분의 -SH계열이 없기에 실험결과 활성과는 무관한 것을 확인할 수 있었다.

결 론

달팽이 추출물을 사용하여 노령기(27주령) female SD-rat을 사용한 실험을 통하여 달팽이 추출물의 조성과 간 효소 활

성에 미치는 영향을 살펴본 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

즉, 달팽이 추출물의 chondroitin sulfate 함량은 10.45%로 나타났고, 단백질과 chondroitin sulfate의 비율은 4.78%, 조단백질은 49.96%로 나타났다. 또한 비록 골세포에 대해서는 간접적인 인자이지만 간 조직의 활성산소의 생성계와 환원계 효소를 조절함을 확인할 수 있었다. 따라서 이러한 결과를 기반으로 조골세포에 대한 좀 더 직접적인 효과인 serum에서 성장관련 호르몬(IGFBP-3, IGF-1)과 대부분의 성장 판에 미치는 영향을 살펴보아서 달팽이 추출물의 골세포 성장에 미치는 직접적인 효과를 확인해 볼 필요가 있는 것으로 사료된다.

인용문헌

- Phang, H. and Lee D. (2015) Populating aging and changes of labour market in East Asia. *Korea J. Population Studies* **38**(4): 1-32.
- Hwang, M. J. and Jung, S. H. (2011) The ageing society of Korea and the population estimate. *Korea J. Population studie.* **34**(2): 113-133.
- Lee, Y. S. (2001) Effect of isoflavones on proliferation and oxidative stress of MC3T3-E1 osteoblastic like cells. *Korean soybean Digest* **18**: 35-42.
- Abderson, J. J. and Graner, S. C. (1998) Phytoestrogen and bone. *Bailliere Clin. Endoc.* **12**: 543-557.
- Kim, M. R., Yang, C. H. and Seo, B. I. (1998) Effects of safflower seeds on bone mineral density in ovariectomy-induced post menopausal osteoporotic rats. *Korean J. Herbo.* **13**: 37-43.
- Setchell, K. D. R. and Cassidy, A. (1999) Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J. Nutr.* **129**: 758S-767S.
- Lee, H. K. (1999) Effect of black bean samryungbackchylsan on ovariectomy-induced postmenopausal osteoporotic rats. PhD Dissertation. Kyung Hee University, Seoul, Korea.
- Ha, H., Kwak, Lee, H. B., Jin, S. W., Kim, H. M., Kim, H. H. and Lee, Z. H. (2004) Reactive oxygen species mediate RANK signaling in osteoclasts. *Exp. Cell Res.* **301**: 119-127.
- Reddy, S. V. (2004) Regulatory mechanisms operative in osteoclasts. *Crit Rev Eukaryot Gene. Espr.* **14**: 255-270.
- Leftwich, A. W. (1977) A dictionary of zoology. Constable and company limited, London. 450.
- 권오길, 박갑만, 이준상 (1993) 원색한국패류도감. 아카데미서적 177.
- 이경삼 (1992) 식용달팽이 양식과 요리법, 오성 출판사 179.
- Zapsalis, C. and Beck, R. A. (1985) Food chemistry and nutritional biochemistry. *John Wiley and Sons press, New York* 390.
- Krueger R. C., Hennig, A. K. and Schwartz, N. B. (1992) Two immunologically and developmentally distinct chondroitin sulfate proteoglycans in embryonic chick brain. *J.*

- Biological chemistry* 267. 6036.
15. Pieter, D. W. and Vilegenthart, J. F. G. (1992) Structural studies on sulfated oligosaccharides derived from the carbohydrate-protein linkage region of chondroitin 6-sulfate proteoglycans of shark cartilage. *J. Biological Chemistry* 237, 6036.
 16. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**(2): 351-358.
 17. Stirpe, F. and Della Corte, E. (1969) The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J. Biol. Chem.* **244**(14): 3855-3863.
 18. Rajagopalan, K. V., Fridovich, I. and Handler, P. (1962) Hepatic aldehyde oxidase. I. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* **237**: 922-928.
 19. Habig W. H., Pabst M. J. and Jakoby, W. B. (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**(22): 7130-7139.
 20. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. and Featherstone, R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Bio. chem. Pharmacol.* **7**: 88-95.
 21. Paglia, D. E. and Valentine, W. N. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* **70**(1): 158-169.
 22. Marklund, S. and Marklund, G. (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**(3): 469-474.
 23. Aebi, H. (1974) Catalase in "Method of enzymatic analysis" (H.U. Bergmeyer, ed.). *Academic press* **2**: 673.
 24. Lowry, O. H. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**(1): 265-75.
 25. Park, J. Y., Choi, M. Y., Lee, S. H., Choi, Y. H. and Park, Y. K. (2011) The association between bone mineral density, bone turnover markers, and nutrient intake in pre- and postmenopausal women. *Korean J. Nutr.* **44**(1): 29-40.
 26. Misawa, I., Toshiaki, Y., Kiyoshi, M., Gen, W., Kazuyoshi, T. and Fumio, C. (2012) Maternal age and reproductive function in female Sprague-Dawley rats. *J. Toxicol. Sci.* **37**(3): 631-638.
 27. Casado, A., Encarnación, L. M., Concepcion, C. M. and de La, T. R. (2008) Lipid peroxidation: Mechanism, inhibition and antioxidant enzyme activities in vascular and Alzheimer dementias. *Neurochem. Res.* **33**(3): 450-458.
 28. Ji, S. H., Ahn, D. H. and Jun, M. R. (2010) Effects of *Petasites japonicus* and *Momordica charantia* L. extracts on MC3T3-E1 osteoblastic cells. *J. Korean Soc. Food sci. Nutr.* **39**(2): 203-209.
 29. Ministry of Health & Welfare (2010) National nutrition survey. Seoul, Korea.
 30. Lee, J. and Lee, I. (2004) Effect of *Rubus coreanus* M. extract on the activity and differentiation of MC3T3-E1 osteoblastic cell. *J. Life Sci.* **14**: 967-974.
 31. Suzuki H., Hayakawa, M., Kobayashi, K., Takiguchi, H. and Abiko, Y. (1997) H₂O₂-derived free radicals treated fibronectin substratum reduced the bone nodule formation of rat calvarial osteoblast. *Mech. Aging Dev.* **98**: 113-125.
 32. Hall, T. J., Schaeublin, M., Jeker, H., Fuller, K. and Chambers, T. J. (1995) The role of reactive oxygen intermediates in osteoclastic bone resorption. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **207**: 280-287.
 33. Etsuo, N., Yasukazu, Y., Yoshiros, S. and Noriko, N. (2005) Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical research communications* **338**(1): 668-676.
 34. Little, R. E. and Gladen, B. C. (1999) Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. *Reprod. toxicol.* **13**(5): 347-352.
 35. Lee, J. Y. and Ahn, T. W. (2010) Anti-oxidative effect Seungyangikki-tang detection in spleen, pancreas and stomach cells of SD rats. *J. of Sasang constitutional medicine* **22**(2): 82-92.
 36. Casado, A., Encarnació, L. M., Concepció, C. M. and de La, T. R. (2008) Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in vascular and Alzheimer dementias. *Neurochem. Res.* **33**(3): 450-458.
 37. 승금란 (2006) CCl₄ 간손상에 대한 온청음과 Curcumin의 보호효과. 덕성여자대학교 박사학위논문.
 38. Ho, Y. S. and Crapo, J. D. (1998) Isolation and characterization of complementary DNAs encoding human manganese-containing superoxide dismutase. *FEBS Lett.* **229**(2): 256-260.
 39. Comporti, M., Poli, G., Albano, E. and Dianzani, M. U. (1993) Lipid peroxidation: An overview. In: Free radicals: From Basic Science to Medicine (Molecular and cell biology updates). *Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.* 65-79.
- (2017. 11. 4 접수; 2017. 11. 22 심사; 2017. 12. 1 게재확정)