

홍어 콜라겐 펩타이드의 산화적 스트레스 완화를 통한 항염증효과

정갑섭 · 노정숙[†]

동명대학교 식품영양학과

(2018년 11월 26일 접수: 2018년 12월 18일 수정: 2018년 12월 23일 채택)

Anti-inflammatory Effect of Skate Collagen Peptide through Attenuation of Oxidative Stress

Kap Seop Jeong · Jeong Sook Noh[†]

Department of Food Science & Nutrition, Tongmyong University, Busan 48520, Korea

(Received November 26, 2018; Revised December 18, 2018; Accepted December 23, 2018)

요 약 : 홍어 껍질 유래 콜라겐 펩타이드를 한외여과막을 이용하여 분자량의 크기를 1,000 Da 이하와 1,000 Da 이상으로 분리하고 그 효과를 비교하고자 하였다. 각각의 시료를 비만 유발 실험동물인 *db/db* mice에 체중당 200 mg의 콜라겐 펩타이드를 8주간 투여하였다. 본 연구의 결과는 콜라겐 펩타이드를 투여한 군에서 비만대조군에 비해 체중 증가량의 감소, 혈액 및 간조직의 활성산소 농도의 감소, 간조직의 산화적 스트레스가 완화된 것으로 나타났다. 또한 콜라겐 투여군에서 염증반응과 관련된 간조직의 핵전사인자(NF- κ B) 및 효소(COX2, iNOS), 염증성 사이토카인(IL-6)발현이 비만대조군에 비해 유의적으로 감소하였다. 분자량의 크기에 따라 약간의 차이가 나타났지만, 전반적으로는 유의적이지 않았다. 따라서 홍어 콜라겐 펩타이드의 비만에 의해 유발된 염증반응이 억제되었는데, 이는 콜라겐의 산화적 스트레스 완화작용에 기인한 것으로 사료된다.

주제어 : 홍어 콜라겐 펩타이드, 비만, 활성산소, 산화적 스트레스, 항염증작용

Abstract : The purpose of this study was to investigate the effect of skate skin collagen peptide (SCP) according to its molecular weight (<1,000 Da or >1,000 Da) which was divided using the ultrafiltration method. The 200 mg/kg collagen peptide was administrated to obesity-induced *db/db* mice for 8 weeks. As the results, in collagen peptide-treated groups, body weight gain was decreased, the plasma and hepatic concentration of reactive oxygen species decreased and oxidative stress was alleviated. In addition, SCP-treated group showed the significant reduction of the protein expressions of nuclear transcription factors(NF- κ B), enzymes(COX2, iNOS), and inflammatory cytokine(IL-6) in hepatic tissue, compared with those of the obese control group. There was a slight difference

[†]Corresponding author
(E-mail: jsnoh2013@tu.ac.kr)

depending on the molecular weight of collagen peptide, but overall it was not significant. Therefore, SCP effectively inhibited the obesity-induced inflammatory response through attenuation of oxidative stress in the liver.

Keywords : Skate collagen peptide, obesity, reactive oxygen species, oxidative stress, anti-inflammatory effect

1. 서론

비만 및 당뇨 등과 같은 만성질환은 조직 내 산화적 스트레스의 증가와 관련이 깊다[1,2]. 체내에 지질 또는 혈당의 증가는 이들의 대사과정이 활성화되며, 이러한 과정 중 활성산소(reactive oxygen species, ROS)의 생성이 크게 증가한다. 이러한 활성산소종은 생체에 치명적인 산소독성을 일으키며 세포막 분해, 단백질 분해, 지질 산화, DNA 변성 등을 초래하여 세포의 기능장애를 유발하고 암을 비롯한 뇌졸중, 파킨슨 병 등의 뇌질환과 심장질환, 동맥경화, 염증, 노화 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다[3-5]. 과도한 활성산소의 생성이 이를 제거하는 항산화 시스템의 작용보다 클 경우, 산화적 스트레스가 발생하게 된다. 또한 활성산소종의 하나인 peroxynitrite (ONOO⁻)는 염증 반응 시 대식세포 호중구 및 다른 면역 세포들의 면역반응으로 인해 다량 생성되며, 이때 ROS도 같이 다량 생성된다[6]. 염증 반응 중 많은 양의 염증유도 cytokines, nitric oxide (NO), 그리고 prostaglandin E₂ (PGE₂)가 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해 생성되며, 이들 효소들은 핵전사인자인 nuclear factor kappa B (NF- κ B)에 의해 조절되어 진다. 따라서 이러한 만성질환을 예방하기 위해, 활성산소의 제거 및 염증인자 발현의 억제 효과를 가지는 다양한 생리활성성분들의 탐색이 활발히 이루어지고 있다.

콜라겐(collagen)은 결합조직의 주성분이며 주로 뼈와 피부에 존재하고, 그 외에 관절, 각 장기의 막 등 동물조직 전체에 분포되어 있는 성분이며, 최근 식품과 의약품 소재로 널리 사용되고 있다[7]. 생리 기능성을 가지는 활성 콜라겐 펩타이드는 단백질 분해효소에 의해 가수분해하여 얻어진다. 최근 해양생물 유래 콜라겐의 추출 및 분리에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 특

히 해양생물 유래 콜라겐 및 콜라겐 펩타이드는 인체 콜라겐의 구조와 유사하고 안전성이 검증되었으며, 위장 내벽에 대한 높은 생리기능성이 있어 기능성 식품 또는 식이보충제, 의료 및 미용 소재로서 다양하게 이용되고 있다[8-10]. 콜라겐 펩타이드는 상대적으로 낮은 분자량과 높은 흡수율 때문에 항고혈압, 항산화, 피부 미백작용 등 광범위한 기능성을 가진다[11-13]. 또한 피부의 주요 기질 단백질로서의 콜라겐에 대한 피부 기능 개선 효과뿐만 아니라 당뇨환자에서의 당 및 지질 대사 개선, 비만쥐에서의 지질대사 개선, 초기 알코올성 간 장애의 개선효과 등이 보고되고 있다[14-16]. 그러나 비만과 당뇨가 동시에 진행되는 대사성 질환모델에서의 홍어껍질 유래 콜라겐 펩타이드의 항산화작용에 대한 연구는 미흡하다. 따라서 본 연구에서는 비만에 의해 유발되는 2형 당뇨 동물모델에서 간조직의 산화적 스트레스 및 염증작용에 대한 콜라겐 펩타이드의 억제효과에 대해 살펴보고자 한다.

2. 실험방법

2.1. 재료

본 연구에 사용된 홍어 콜라겐 펩타이드는 (주)영산홍어(Naju, Korea)에서 공급받았다. 콜라겐 펩타이드 제조과정을 간단히 언급하면 홍어껍질을 열수 추출한 다음 단백질 가수분해 효소인 alcalase와 flavourzyme (Novozyme, Denmark)을 이용하여 효소가수분해를 한 후, 여과, 농축을 거쳐 동결건조하였다[17]. 가수분해가 완료된 후, 한외여과장치를 이용하여 분자량 1,000 Da를 기준으로 cut-off를 실시하여, 분자량이 1,000 Da 미만을 low-molecular collagen peptide (LCP)와 1,000 Da 이상을 high-molecular collagen peptide (HCP)로 나누어 시료로 사용하였다. 이때 한외여과장치 통과 전 시료를 skate collagen

peptide (SCP)로 명명하여 실험에 사용하였다. 시험에 쓰인 시료의 평균분자량은 SCP가 1,015 Da, HCP가 1,426.5 Da, LCP가 879.7 Da 정도였다.

2.2. 실험동물 및 실험식이

고혈당 및 비만에 의한 산화적 스트레스를 유발하기 위해 유전형질 변형 제2형 당뇨 동물모델인 C57BL/KsJ *db/db* 마우스를 사용하였다. 7주령의 *db/db* mice와 정상대조군으로 *m/m* 마우스를 Japan SLC Inc. (Shizuoka, Japan)에서 공급받았다. 1주일 적응 기간 후 체중과 혈당을 기준으로 난괴법에 의해 *db/db* 마우스를 4군으로 나누었다. 실험군은 양성대조군(CON group)과 각각의 시료를 체중 당 200 mg 경구투여한 LCP group, HCP group, SCP group으로 하였다. *m/m* 마우스는 정상대조군(NOR group)으로 비교하였다. 일반 고형식이(Envigo Korea Co., Seoul, Korea)를 모든 실험동물에게 공급하였으며, 그 조성은 탄수화물 44.2%, 조단백질 18.6%, 지방 6.2% 이었다. NOR과 CON group은 증류수를 vehicle로 투여하였고, 분자량별 콜라겐 시료는 체중 kg 당 200 mg을 증류수에 녹여 8주 동안 1일 1회 경구투여하였다. 본 연구를 위한 동물실험은 부산대학교 동물실험윤리위원회의 심의 및 승인을 거쳐 수행되었다(PNU-2016-1354).

2.3. 혈액분리 및 장기 채취

8주간의 사육이 끝난 후 12시간 동안 공복을 유도한 마우스를 CO₂가스로 마취하고 개복하여 심장에서 채혈하였다. 전혈은 실온에 30분 정도 방치 후 원심분리(3,000 rpm, 20 min)하여 혈청을 분리하였고 바로 ROS 및 peroxynitrite radical을 측정하였다. 혈액 채취 후 간을 적출하여 차가운 생리식염수에 세척하여 표면의 혈액을 제거하고 물기를 닦아 무게를 측정한 다음 액체 질소로 급속 냉동 후 -70°C에 보관하였다.

2.4. ROS 및 peroxynitrite radical 측정

혈청 및 간조직의 ROS 측정은 Ali 등의 방법으로 하였다[18]. 시료와 25 mM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 혼합한 후, 형광광도계(FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Ortenberg, Germany)를 이용하여 0분부터 매 5

분씩 30분간 emission 530 nm와 excitation 485 nm에서 측정하여 산출된 값을 계산하였다.

Peroxynitrite radical은 각 샘플을 pH 4.7의 rhodamin buffer와 5 mM dihydrorhodamine 123과 섞은 후 5분간 37°C에서 흔들어 준 후 5분씩 30분간 emission 535 nm와 excitation 480 nm에서 측정하여 산출된 값을 계산하였다[19].

2.5. TBARS 및 GSH 측정

간조직의 지질 과산화 농도는 지질의 최종 과산화물인 malondialdehyde (MDA)를 Ohkawa 등[20]의 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)법을 이용하여 측정하였다. 간 조직액의 10% 균질액 0.1 mL, sodium deoxyl sulfate용액 0.2 mL, 20% acetic acid (pH 3.5) 1.5 mL와 0.8% TBA 용액 1.5 mL를 혼합하여 95°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 즉시 냉각시키고, *n*-butanol과 pyridine 혼합용액 (15:1, v/v)을 가하여 vortex를 이용하여 1분간 혼합시킨 다음 원심분리(4,000 rpm, 10분)하여 얻은 상등액의 흡광도를 microplate reader (M200PRO; Tecan, Salzburg, Austria)를 이용하여 532 nm에서 측정하였고, MDA 표준검량선으로 정량하였다.

Glutathione (GSH)는 간 조직액의 10% 균질액 0.2 mL에 증류수 0.3 mL, 4% sulfosalicylic acid용액 0.5 mL를 넣고 섞어 준 후, 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상층액 0.3 mL에 0.1 mM 5, 5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) 발색시약 2.7 mL를 넣고 실온에서 20분간 방치한 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 조직 g당 GSH의 농도는 GSH 표준검량선을 이용하여 정량하였다.

2.6. Western blot

Western blot assay 시료로 whole cell 추출물을 사용하였다. 즉 간 조직에 nonidet-P40 (NP-40) lysis buffer [50 mM Tris (pH 8.0), 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM D,L-dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride]와 protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA, 100:1, v/v)을 혼합하여 첨가 후 균질화하였다. 균질액을 1시간 동안 얼음에 방치 후 4°C에서 12,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 얻은 상층액을 조직 단백질 추출액으로 사용하였다. 추출

단백질 농도는 단백질 정량시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 측정하였고 β -mercaptoethanol을 섞어 일정 단백질 농도로 조정하여 western blot 분석용 시료로 사용하였다.

단백질 발현을 확인하기 위해 시료를 8-10% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel에 loading 한 후 90 V 전압으로 2시간 동안 전기영동하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 nitrocellulose membrane (0.45 μ m pore size, Whatman, Dassel, Germany)으로 이동시킨 후 5% skim milk (w/v)에서 1시간 동안 blocking 하였다. 1차 항체인 NF- κ B, iNOS, COX2, TNF- α , IL-6, α -tubulin을 5% skim milk에 희석한 후 membrane에 분주하여 4°C에서 over-night시킨 후 TBST buffer를 이용하여 세척하고, 2차 항체를 반응시킨 후 다시 세척하였다. 도출된 밴드의 동정은 enhanced chemiluminescence 용액으로 발색시켜 CAS-400SM (Davinch-K, Seoul, Korea)으로 촬영하였다. 단백질 발현 정도는 Image J software (Image J, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 측정하였고, α -tubulin에 대한 비율로 보정하여 표시하였다.

2.7. 통계처리

모든 실험 결과 값은 SPSS/PC package 20 (IBM, New York, NY, USA)을 사용하여 평균과 표준편차를 구하였고, one-way ANOVA

analysis를 실시한 후 Duncan's multiple range test로 신뢰수준은 $P<0.05$ 에서 유의차를 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 홍어껍질 콜라겐 펩타이드 투여가 비만쥐의 체중증가량 및 식이섭취효율에 미치는 영향

실험 0주의 초기 체중, 8주 후의 최종 체중, 체중증가량 및 식이섭취 효율을 Table 1에 나타내었다. 초기체중에서는 *db/db* 마우스 그룹 간 유의성이 나타나지 않았으나 최종 체중에서는 NOR군보다 CON군에서 48.8% 유의적 증가가 나타나 비만 유도를 확인할 수 있었다($P<0.05$). 그러나 콜라겐을 투여한 모든 그룹에서 유의적으로 감소하였고, 콜라겐 분자량에 따른 차이는 나타나지 않았다.

비만에 의한 2형 당뇨병동물모델인 *db/db* 마우스는 렙틴 수용체의 유전적 변이로 인해 식욕억제중추의 이상으로 과도한 식이섭취로 비만과 고혈당이 유발되며, 혈액 중 고렙틴혈증과 고인슐린혈증이 나타나고 인슐린 저항성이 큰 특징을 가지고 있다[21]. 본 연구 결과, *db/db* 마우스를 8주간 사육한 결과 정상군(NOR)의 체중증가량은 0.3 g인 반면, 비만대조군(CON)에서는 4.5 g 증가하여 정상군에 비해 15배 높은 체중증가 정도를 확인하였다($P<0.05$). 그러나 콜라겐을 투여한 군(LCP, HCP, SCP)에서 대조군에 비해 체중증

Table 1. Effect of skate collagen peptide on body weight gain and food efficiency ratio in obese *db/db* mice

Group ¹⁾	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Body weight gain (g/8 weeks)
NOR	25.3 \pm 3.0 ^b	27.3 \pm 0.8 ^c	0.3 \pm 0.6 ^b
CON	45.0 \pm 1.1 ^a	53.3 \pm 3.0 ^a	4.5 \pm 3.3 ^a
LCP	43.7 \pm 3.4 ^a	49.8 \pm 2.2 ^b	2.3 \pm 2.7 ^{ab}
HCP	44.3 \pm 2.3 ^a	47.4 \pm 2.6 ^b	0.6 \pm 2.1 ^b
SCP	44.2 \pm 6.9 ^a	49.7 \pm 3.5 ^b	1.6 \pm 1.9 ^{ab}

NOR, m/m mice; CON, vehicle-treated *db/db* mice; LCP, low-molecular weight collagen-treated *db/db* mice; HCP, high-molecular weight collagen-treated *db/db* mice; SCP, skate collagen peptide-treated *db/db* mice. Data are mean \pm SD (n=10 each group). ^{a-c}Data with different letters are significantly different according to one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple-range test at $P<0.05$.

가량이 각각 48.3%, 87.3%, 63.8% 감소한 것으로 나타나 콜라겐의 비만억제 효과를 관찰할 수 있었다.

3.2. 홍어껍질 콜라겐 펩타이드 투여가 혈청

ROS 및 peroxynitrite 농도에 미치는 영향

비만대조군에서의 혈청 ROS 농도는 정상군에 비해 2.7배 정도 유의적으로 증가하여, 비만에 의해 ROS 생성이 크게 증가하였음을 확인할 수 있었다($P<0.05$). 콜라겐을 투여한 결과 분자량이 낮은 콜라겐을 투여한 LCP 그룹과 한외여과막을 통과하지 않은 콜라겐을 투여한 SCP 그룹에서 각각 유의적으로 60.4%와 57.4% 정도 낮아졌다($P<0.05$, Fig. 1). 또한 혈청의 활성질소종인 ONOO⁻의 농도를 측정된 결과 비만대조군에서 정상군에 비해 1.7배 증가하였으나, 콜라겐 투여군에서는 그 농도가 다소 낮아졌으나 유의적이지 않았다.

비만은 지방세포의 과도한 증식을 특징으로 하는데, 이러한 지방세포의 분화과정에서 NADPH 산화효소와 같은 oxidant enzyme의 발현이 증가하게 되어 활성산소종(ROS)을 생성하여 산화적 스트레스가 유발하게 된다고 알려져 있다[22]. 이러한 활성산소종이 증가하게 되면 단백질 변성, 지질과산화물 생성 및 DNA 변이를 일으켜 노화 및 암, 만성질환을 유발시키게 된다[23]. 본 연구의 결과 비만쥐에서 정상쥐에 비해 ROS 및 ONOO⁻의 농도가 크게 증가하여 산화적 스트레스가 유발된 것으로 나타났으며, 콜라겐의 경구투여로 인해 활성산소종의 농도가 감소하여, 홍어

콜라겐 펩타이드는 비만에 의해 유발된 활성산소종의 농도를 효과적으로 낮추는 것으로 사료된다.

3.3. 홍어 껍질 콜라겐 펩타이드의 투여가

간조직의 oxidative stress 관련 인자에

미치는 영향

간조직에서의 산화적 스트레스 관련 인자인 ROS 및 peroxynitrite, 지질과산화물(TBARS)과 항산화물질인 GSH의 농도를 측정하여 Fig. 2에 나타내었다. ROS 및 peroxynitrite, TBARS농도 모두 정상군에 비해 비만대조군에서 유의적으로 크게 증가하였다($P<0.05$). 특히, ROS 및 peroxynitrite 농도가 콜라겐을 투여한 모든 군에서 유의적으로 감소하였다($P<0.05$). 세포의 항산화 물질로 알려진 GSH 농도는 정상군에 비해 대조군에서 56.5% 감소하였으나, 콜라겐을 투여한 군에서 대조군에 비해 증가하였고, LCP군 1.7배, HCP군 1.5배 증가하였다($P<0.05$).

GSH는 glutathione peroxidase와 함께 superoxide radical이 superoxide dismutase에 의하여 환원되어 생성된 H₂O₂를 H₂O로 전환시키는데 필요한 물질로 항산화적 방어계의 기질로 이용된다[24]. 그러나 지질과산화물은 세포 내 활성산소종의 농도가 증가하게 되면 세포막의 구성성분인 다가불포화지방산이 과산화된 것으로 GSH와 지질과산화물은 생체의 산화-항산화계의 지표로 잘 알려져 있다[25]. 여러 자극에 의해 생성된 ROS는 다가불포화지방산을 공격하여 지질과산화물을 생성하며, 이들은 쉽게 분해되어 aldehyde, ketone 및 alcohol류 등을 생성하여 인

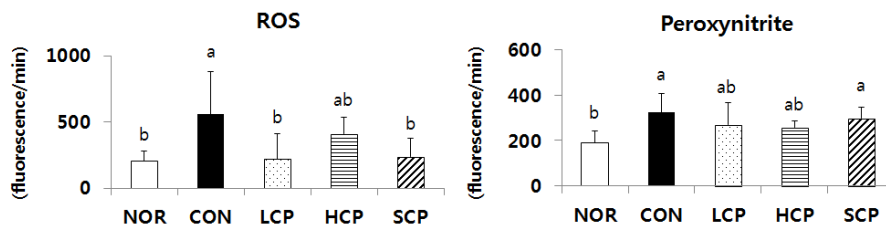


Fig. 1. Effect of collagen peptide of skate skin on serum ROS and peroxynitrite levels. NOR, m/m mice; CON, vehicle-treated *db/db* mice; LCP, low-molecular weight collagen-treated *db/db* mice; HCP, high-molecular weight collagen-treated *db/db* mice; SCP, skate collagen peptide-treated *db/db* mice. Data are mean \pm SD (n=10 each group). ^{a,b}Data with different letters are significantly different according to one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple-range test at $P<0.05$.

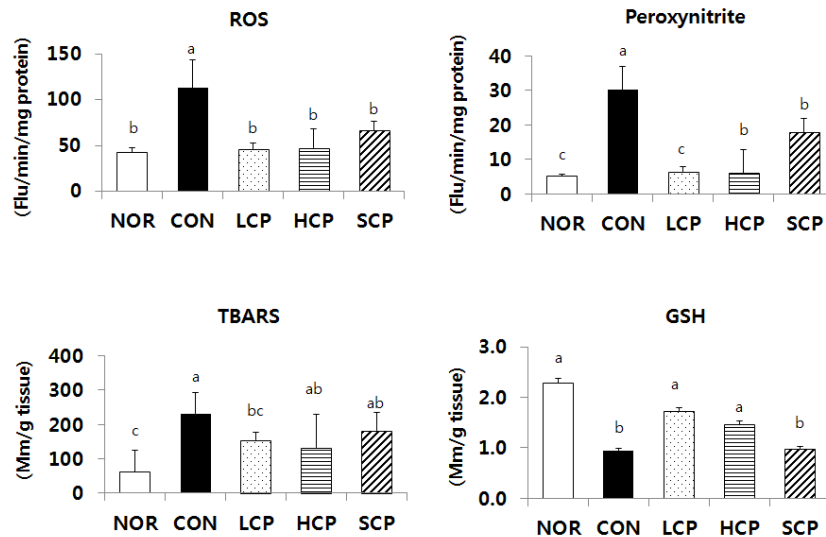


Fig. 2. Effect of collagen peptide of skate skin on oxidative stress-related factors in the hepatic tissue.

NOR, m/m mice; CON, vehicle-treated *db/db* mice; LCP, low-molecular weight collagen-treated *db/db* mice; HCP, high-molecular weight collagen-treated *db/db* mice; SCP, skate collagen peptide-treated *db/db* mice. Data are mean \pm SD ($n=10$ each group). ^{a-c}Data with different letters are significantly different according to one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple-range test at $P<0.05$.

체의 각 세포조직은 손상시키거나 노화를 촉진하므로 지질과산화물의 함량은 생체막의 손상 정도를 나타내는 지표로도 알려져 있다[26]. 본 연구의 결과, *db/db* 마우스의 간조직에서 ROS, ONOO⁻, 지질과산화물의 증가와 항산화 물질인 GSH의 감소의 결과로 비만에 의해 산화적 스트레스가 증가되었음을 확인하였다. 그러나 홍어 콜라겐 펩타이드의 섭취로 인해 산화적 스트레스의 촉진인자의 농도를 감소시켰고 또한 항산화 물질의 농도를 증가시켜 비만에 의한 산화적 스트레스가 감소되었음을 확인하였다.

3.4. 홍어 껍질 콜라겐 펩타이드가 간조직의 염증반응 관련 인자에 미치는 영향

비만 쥐의 간조직에서의 염증반응을 비교하였고, 또한 홍어 껍질 유래 콜라겐 펩타이드를 투여한 결과 그 활성의 변화에 대해 Fig. 3에 나타내었다. 먼저 염증반응을 촉진하는 것으로 알려진 핵전사인자인 NF- κ B와 효소인 iNOS 및

COX2의 단백질 발현은 정상군에 비해 비만대조군에서 유의적으로 모두 상승하였다($P<0.05$). 그러나 콜라겐 펩타이드를 투여한 결과 그 분자량의 크기와 상관없이 모두 유의적으로 염증반응과 관련된 단백질의 발현이 감소하였다($P<0.05$). 염증세포와 관련하여 염증반응을 매개하는 사이토카인인 TNF- α 와 IL-6의 단백질 발현 정도가 비만대조군에서 모두 유의적으로 크게 증가하였으나 콜라겐 투여군에서 감소하는 경향을 나타냈으며, 한외여과막을 통과하지 않은 콜라겐군인 SCP군에서 IL-6 발현이 유의적으로 감소하였다($P<0.05$).

비만이 되어 지방세포가 활성화되면 면역세포와 같이 많은 면역 사이토카인을 분비하면서 염증반응이 활성화된다는 많은 연구가 보고되고 있다[27,28]. 비만에 의해 증가된 지방세포는 단순한 지방 저장 세포로서의 기능 외에 50여종의 다양한 사이토카인을 생산 분비하는 세포로 알려져 있다[29]. 지방세포가 분비하는 사이토카인은

TNF- α , IL-6과 면역세포인 대식세포를 유도하는 케모카인인 MCP-1이 있는데, 특히 IL-6는 전신 염증 유발에 중심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다[30]. 이러한 염증반응을 유발 또는 촉진하는 사이토카인은 핵전사인자인 NF- κ B과 염증효소인 COX2, iNOS의 발현 증가와의 관련성이 크다[31]. 또한, 많은 연구에서 체내 산화적 스트레스를 증가시키는 활성산소의 생성 증가는 직접적인 염증반응을 활성화시키며, 사이토카인의 분비를 촉진시키는 것으로 나타났다[32]. 본 연구에서 콜라겐 펩타이드는 간조직의 활성 산소 및 질소종의 농도를 정상군의 수준까지 낮추었는데, 이러한 결과가 비만에 의해 증가된 간의 염증반응 관련 단백질 발현의 감소에 기여한 것으로 사료된다. 따라서 본 연구결과, 홍어 콜라겐 펩타이드의 8주간 경구투여는 비만에 의해 유발된 간조직의 염증반응을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다으며, 이는 간조직의 산화적 스트레스 완화에

의한 것으로 사료된다.

4. 결론

홍어 껍질 유래 콜라겐 펩타이드를 한외여과막을 이용하여 분자량 1,000 Da 이하와 1,000 Da 이상으로 분리하여 그 효과를 비교하고자 하였다. 비만 유발실험동물인 *db/db* 마우스에 콜라겐 펩타이드 200 mg/kg를 8주간 경구투여한 결과는 다음과 같다.

1. 콜라겐 펩타이드 투여군에서 최종 체중은 비만대조군에 비해 낮았으며, 체중 증가량이 감소하였다.
2. 혈액 및 간조직의 활성산소종(ROS) 및 활성질소종(ONOO⁻)의 농도는 콜라겐 펩타이드

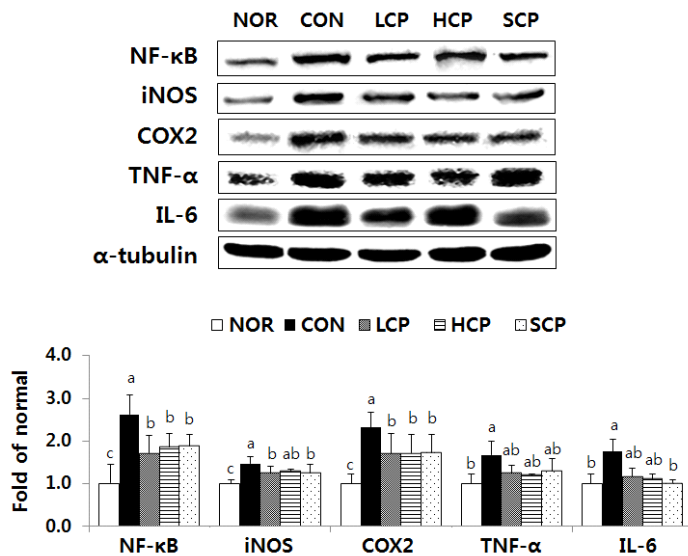


Fig. 3. Effect of collagen peptide of skate skin on inflammatory factors in the hepatic tissue.

NOR, m/m mice; CON, vehicle-treated *db/db* mice; LCP, low-molecular weight collagen-treated *db/db* mice; HCP, high-molecular weight collagen-treated *db/db* mice; SCP, skate collagen peptide-treated *db/db* mice. Data are mean \pm SD (n=10 each group). ^{a-c}Data with different letters are significantly different according to one-way ANOVA, followed by Duncan's multiple-range test at $P < 0.05$.

드 투여군에서 비만대조군과 비교하였을 때, 감소하였으며, 간조직의 과산화지질 농도가 감소하였고, 항산화물질인 GSH 농도가 증가하여 산화적 스트레스가 완화되었음을 확인하였다.

3. 콜라겐 펩타이드를 8주간 투여하였을 때, 비만에 의해 증가된 간조직의 염증반응과 관련된 핵전사인자(NF- κ B) 및 효소(COX2, iNOS), 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-6)의 발현이 감소하였다.

감사의 글

이 논문은 2018학년도 동명대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 연구되었음(2018F071).

References

1. P. Manna, S. K. Jain, "Obesity, oxidative stress, adipose tissue dysfunction, and the associated health risks: causes and therapeutic strategies", *Metab. Syndr. Relat. Disord.*, Vol.13, No.10 pp. 423-444 (2015).
2. B. S. Karam, A. Chavez-Moreno, W. Koh, J. G. Akar, F. G. Akar, "Oxidative stress and inflammation as central mediators of atrial fibrillation in obesity and diabetes", *Cardiovasc. Diabetol.*, Vol.16, No.1 pp. 120 (2017).
3. J. P. Kehrer, L. O. Klotz, "Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for health", *Crit. Rev. Toxicol.*, Vol.45, No.9 pp. 765-798 (2015).
4. R. Singh, S. Devi, R. Gollen, "Role of free radical in atherosclerosis, diabetes and dyslipidaemia: larger-than-life", *Diabetes Metab. Res. Rev.*, Vol.31, No.2 pp. 113-126 (2015).
5. M. Valko, K. Jomova, C. J. Rhodes, K. Kuča, K. Musilek, "Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease", *Arch. Toxicol.*, Vol.90, No.1 pp. 1-37 (2016).
6. B. Knoop, V. Argyropoulou, S. Becker, L. Ferte, O. Kuznetsova, "Multiple roles of peroxiredoxins in inflammation", *Mol. Cells*, Vol.39, No.1 pp. 60-64 (2016).
7. K. Sato, "The presence of food-derived collagen peptides in human body-structure and biological activity", *Food Func.*, Vol.8, No.12 pp. 4325-4330 (2017).
8. J. Y. Exposito, U. Valcourt, C. Cluzel, C. Lethias, "The fibrillar collagen family", *Int. J. Mol. Sci.*, Vol.11, No.2 pp. 407-426 (2010).
9. J. Liang, X. Pei, Z. Zhang, N. Wang, J. Wang, Y. Li, "The protective effects of long-term oral administration of marine collagen hydrolysate from chum salmon on collagen matrix homeostasis in the chronological aged skin of Sprague-Dawley male rats", *J. Food Sci.*, Vol.75, No.8 pp. H230-H238 (2010).
10. M. Senevirathne, S. K. Kim, "Development of bioactive peptides from fish proteins and their health promoting ability", *Adv. Food Nutr. Res.*, Vol.65, pp. 235-248 (2012).
11. K. Iwai, T. Hasegawa, Y. Taguchi, F. Morimatsu, K. Sato, Y. Nakamura, A. Higashi, K. Yasuhiro, Y. Nakabo, K. Ohtsuki, "Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates", *J. Agric. Food Chem.*, Vol.53, No.16 pp. 6531-6536 (2005).
12. Y. Zhuang, L. Sun, "Preparation of reactive oxygen scavenging peptides from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin: optimization using response surface methodology", *J. Food Sci.*, Vol.76, No.3 pp. C483-C489 (2011).
13. S. Morimura, H. Nagata, Y. Uemura, A. Fahmi, T. Shigematsu, K. Kida, "Development of an effective process for

- utilization of collagen from livestock and fish waste” *Process Biochemistry*, Vol.37, No.12 pp. 1403–1412 (2002).
14. C. F. Zhu, G. Z. Li, H. B. Peng, F. Zhang, Y. Chen, Y. Li, “Treatment with marine collagen peptides modulates glucose and lipid metabolism in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus”, *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, Vol.35, No.6 pp. 797–804 (2010).
 15. H. J. Lee, M. Woo, Y. O. Song, J. S. Noh, “Inhibitory effect of skate skin collagen on hepatic lipid accumulation through regulation of lipid metabolism”, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.47, No.3 pp. 235–242 (2018)
 16. M. Woo, Y. O. Song, K. H. Kang, J. S. Noh, “Anti-obesity effects of collagen peptide derived from skate (*Raja kenoi*) skin through regulation of lipid metabolism”, *Mar. Drugs*, Vol.16, No.9, pp. 306 (2018).
 17. J. M. Baek, K. H. Kang, S. H. Kim, J. S. Noh, K. S. Jeong, “Development of high functional collagen peptide materials using skate skins”, *J. Environ. Sci. Int.*, Vol.25, No.4, pp. 579–588 (2016).
 17. S. F. Ali, C. P. LeBel, S. C. Bondy, “Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity”, *Neurotoxicology*, Vol.13, pp. 637–648 (1992).
 18. N. W. Kooy, J. A. Royall, H. Ischiropoulos, J. S. Beckman, “Peroxynitrite mediated oxidation of dihyrorhodamine 123”, *Free Radic. Biol. Med.*, Vol.16, pp. 149–156 (1994).
 19. H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, “Reaction of linoleic acid hydroperoxide with thiobarbituric acid”, *J. Lipid Res.*, Vol.19, No.8 pp. 1053–1057 (1978).
 20. P. R. Johnson, M. R. Greenwood, B. A. Horwitz, J. S. Stern, “Animal models of obesity: genetic aspects”, *Annu. Rev. Nutr.*, Vol.11, pp. 325–353 (1991).
 21. O. H. Lee, Y. I. Kwon, H. D. Hong, C. S. Park, Y. C. Kim, “Production of reactive oxygen species and changes in antioxidant enzyme activities during differentiation of 3T3-L1 adipocyte”, *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, Vol.52, pp. 70–75 (2009).
 22. M. Valko, D. J. Moncol, T. D., Cronin, M. Mazura, J. Telser, “Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease”, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, Vol.39, pp. 44–84 (2007).
 23. S. C. Campos, D. A. Moreira, T. D. Nunes, P. Colepicolo, M. R. Brigagão, “Oxidative stress in alcohol-induced rat parotid sialadenosis”, *Arch. Oral Biol.*, Vol.50, pp. 661–668 (2005).
 24. J. K. Willcox, L. S. Ash, G. L. Catignani, “Antioxidants and prevention of chronic disease”, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, Vol.44, No.4 pp. 275–295 (2004)..
 25. K. P. Poulianiti, A. Kaltsatou, G. I. Mitrou, A. Z. Jamurtas, Y. Koutedakis, M. Maridaki, I. Stefanidis, G. K. Sakkas, C. Karatzaferi, “Systemic Redox Imbalance in Chronic Kidney Disease: A Systematic Review”, *Oxid. Med. Cell Longev.*, Vol.2016, pp. 8598253 (2016).
 26. D. Kim, B. S. Yang, “Molecular mechanisms underlying the link of obesity to chronic disease”, *J. Obes. Metab. Syndr.*, Vol.15, No.3 pp. 121–128 (2006).
 27. U. J. Jung, M. S. Choi, “Obesity and its metabolic complications: The role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease”, *Int. J. Mol. Sci.*, Vol.15, pp. 6184–6224 (2014).
 28. C. McGown, A. Biredinc, Z. M. Younossi, “Adipose tissue as an endocrine organ”, *Clin. Liver Dis.*, Vol.18, No.1 pp. 41–58 (2014).
 29. A. B. Engin, “Adipocyte-macrophage cross-talk in obesity”, *Adv. Exp. Med. Biol.*, Vol.960, pp. 327–343 (2017).

30. Y. J. Surh, K. S. Chun, H. H. Cha, S. S. Han, Y. S. Keum, K. K. Park, S. S. Lee, "Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation", *Mutat. Res.*, Vol.480-481, pp. 243-268 (2001).
31. A. R. Johnson, J. J. Milner, L. Makowski, "The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity", *Immunol. Rew.*, Vol.249, No.1 pp. 218-238 (2012).
32. A. Fernández-Sánchez, E. Madrigal-Santillán, M. Bautista, J. Esquivel-Soto, A. Morales-González, C. Esquivel-Chirino, I. Durante-Montiel, G. Sánchez-Rivera, C. Valadez-Vega, J. A. Morales-González, "Inflammation, oxidative stress, and obesity", *Int. J. Mol. Sci.*, Vol.12, No.5 pp. 3117-3132 (2011).