J. Fd Hyg. Safety 14(1), 45 - 54(1999)

Chondroitin Sulfate가 Collagen 성숙과 노화에 미치는 영향

하배진† · 김미향*
*신라대학교 신소재생명공학부, *생명관리학과군*

Effect of Chondroitin Sulfate on Collagen Maturity and Aging

Bea-Jin Ha† and Mi-Hyang Kim*
Division of New Materials and Biotechnology
**Section of Child Care and Human Nutrition, Silla University, Pusan 617-736, Korea*

ABSTRACT — The purpose of this study was to examine the increased bone loss caused by ovariectomy through monitoring the concentrations of the collagen and the pyridinoline crosslinks of collagen. The ovariectomized rats treated for 8 weeks, were divided at random into two or three groups of 10. Ovariectomies were carried out from the saline-treated group (Ovx), the estrogentreated group (Ovx+ES) and chondroitin sulfate-treated group (Ovx+CS). Sham operations were performed on the sham-operated group (Sham). Ovx+ES and Ovx+CS groups showed the remarkably increased collagen and pyridinoline amount in the bone and cartilage compared to Ovx group. And as the result of the measurement of SOD, Catalase and GPx which are antioxidant enzyme, SOD and Catalase activities in Ovx group were much higer than in Sham group. But they were significantly decreased in Ovx+CS group. Based on these results, it is supposed that estrogen and condroitin sulfate can enhance collagen synthesis and affect the pyridinoline formation in collagen fibrils through stimulating lysyl oxidase activity. And it is also thought that chondroitin sulfate can inhibit aging by reducing antioxidant enzyme.

Key words □ Ovariectomy, Chondroitin sulfate, Antioxidant, Collagen, Pyridinolino

여성의 생식기계 질환을 치료할 목적으로 시행되는 난소절제술은 estrogen의 생성을 저하시켜서 인위적인 폐경을 야기하므로 이로 인한 심혈관계질환의 발병과 여러 가지의 질병의 발병률이 높은 것으로 보고된 바 있다.[1] 여성은 폐경전 수년동안 체내 호르몬 생성의 점진적인 변화에 의해 월경주기가 불규칙해지고 결국에는 월경주기가 정지된다. 한 조사에 의하면 FSH는 폐경이후 1년 이내에 증가하기 시작하여 약 10년 후에는 최고치를 나타내었으며 이와 함께 혈청내 estradiol량이 급속히 감소됨을 보고하였다.[2]

노령화 현상과 더불어 조직 실질 세포수는 감소하고 그 결과 고령기에 대부분의 조직 중량이 감소한다.[3] 이러한 감소현상은 심장, 폐, 뇌와 같은 개체의 생명유지에 직접 관계있는 조직보다 골, 연골, 골격근, 피부 등 개체의 생활 활동에 중요한 역할을 하는 조직에 현저하다. 연골 또는 골 등의 결합조직을 구성하고 있는 collagen은 연령과 함께 변화하며, 특히 collagen 가교 형성은 결합조직의 강도를 유지하기 위하여 필요하다.[4-12] 인간의 골 밀도는 노령화 현상에 따라 감소하는 경향이 있고, 특히 여성들에게는 폐경기 이후에 급격히 감소하여 소위 폐경기 골다공증이 매우 심각한 건강 문제로 대두되고 있다.[13-15]

내분비선에 의하여 합성, 분비되어지는 스테로이드 호르몬은 유전자 표현을 자극함으로서 표적조직 내부에 생화학적 반응을 일으키는 물질로 collagen 생합성능에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다.[16,17] 피부섬유아세포 중의 collagen은 estrogen에 의하여 생성량이 증가한다는 연구보고도 있으나,[17] 연령과 함께 나타나는 골기질량의 감소와 collagen 변화에 관해서는 불명확한 점이 많다. Pyridinoline은 골, 연골 collagen의 성숙 가교물질로서 골, 연골 이외의 다른 결합조직에는 거의 존재하지 않으므로 골흡수의 지표로서 사용되고 있으며,[18-21] 특히 폐경기 이후

† Author to whom correspondence should be addressed.

의 여성에 있어서 뇨 중의 pyridinoline 배설량은 증가한다는 것이 보고되고 있어, pyridinoline은 노화현상과 관련이 깊은 물질로 알려져 있다.[22-24]

또한 세포에 유해한 산소유리기가 너무 지나치게 되면 노화와 관련한 세포손상을 초래하게 된다. 이러한 산소유리기를 제거하는데 필요한 방어기전에는 superoxide dismutase(이하 SOD로 약함), catalase, glutathione peroxidase 등의 항산화효소들과 환원형 glutathione(이하 GSH로 약함), uric acid 등 여러 가지 비효소항산화물질들이 존재한다. 이 중 SOD는 superoxide radical(O_2)을 H_2O_2와 O_2로 전환시키는 역할을 하고, 이때 생성된 H_2O_2는 catalase와 glutathione peroxidase에 의해 제거되는데, glutathione peroxidase는 GSH를 산화형 glutathione(이하 GSSG로 약함)으로 산화시키면서 H_2O_2를 제거하게 된다. 산화된 GSSG는 glutathione reductase에 의해 NADPH를 소모하면서 다시 GSH로 환원되므로 glutathione은 GSH와 GSSG의 두 가지 형태로 균형을 이루면서 존재하게 되는데 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.[25]

Chondroitin sulfate는 생체 내 피부, 혈액, 골 등에 존재하고, 신경 및 연골조직을 이루는 구성성분으로 주로 단백질과 결합하여 proteoglycan의 형태로 존재하고 있다. 특히, chondroitin sulfate는 연령이 증가함에 따라 감소하며 노화에 의해 보여지는 결합조직의 탄성손실에 관여하고 있으며, 부족시 각 생체 조식 세포의 손상을 초래하게 되는 이유로 강장 강정식으로 알려지고 있고, 질병에 대한 저항력을 높이는 것으로 알려져 있다.

Chondroitin은 달팽이의 주성분으로 달팽이는 천식, 치질, 장기, 소갈, 구강염, 후두염 등에 효과가 있는 것으로 본초강목 등에 알려져 있다.[26-28] 이와 같은 이유로 민간요법으로 사용하던 달팽이를 대상으로 본 연구실에서 실제적 실험동물로 확인한 바 긍정적인 효과를 나타내었다.

이에 본 연구에서는 스테로이드 호르몬의 분비 및 chondroitin sulfate가 미치는 골기질의 영향을 검토하기 위하여, 흰쥐를 사용하여 난소절제 시술을 한 후, estrogen 투여와 무투여에 의한 연골 · 골 중의 collagen 생합성량 및 collagen 분자의 성숙 지표로서 collagen 가교 물질인 pyridinoline 함량을 측정하였고, collagen 섬유 형성의 촉진에 관여하는 chondroitin sulfate를 투여하여 collagen 생합성량과 collagen 섬유의 안정화를 위해 절대적으로 필요한 화합물인 pyridinoline 생성량의 변화를 관찰하였다. 또한 chondroitin sulfate를 투여하여 과산화지질 및 항산화 효과를 알아보기 위해 SOD, Catalase, 총 glutathione량과 GPx의 활성도를 분석하여 노화에 따르는 세포의 구조물질의 상호작용을 확인하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

Estrogen과 Achilles Tendon collagen은 Sigma Chemical Company(U.S.A.)로부터 구입하였다. Pyridinoline standard의 정제는 Fujimoto와 Moriguchi의 방법[29]에 의해 다음과 같이 실시하였다. Achilles Tendon collagen을 110°C에서 24시간 가수분해한 후 농축하여, H_2O와 0.5 M HCl 용액으로 농도 기울기에 의해 p-cellulose column으로 분획 추출하였다. 같은 방법으로 2번 추출한 후 sephadex G-10 column을 사용하여 0.5 M acetic acid로 정제하였다. Acetic acid를 제거한 후 0.1 M HCl에 용해하여 pyridinoline standard로 사용하였다. Chondroitin sulfate와 그외 모든 실험에 사용된 시약은 Sigma-Aldrich Co.로부터 구입하였다.

실험동물 수술 및 식이

실험 동물은 체중 150±10 g의 female rat을 실험실에서 1주일간 적응시킨 후 Table 1과 같이 난소를 절제하지 않은 Sham군과 노화모델로서 난소를 절제한 Ovx군, 난소를 절제한 뒤 Estrogen을 투여한 Ovx+ES군, 난소를 절제한 뒤 chondroitin을 투여한 Ovx+CS군의 4군으로 나누었다. 실험동물의 수술은 ether 마취 후 Sham 수술군은 하복부를 절개하였다가 그대로 봉합하였으며, 난소절제군, 난소절제 후 호르몬과 chondroitin sulfate 투여군은 난소를 적출한 후 봉합하였다. 식이는 고형사료를 사용하고 물은 자유롭게 섭취하도록 하며 3일 후부터 난소를 절제하지 않은 Sham군과 난소를 절제한 Ovx군은 0.9% saline, 난소를 절제한 Ovx+CS군에 kg당 100 mg의 chondroitin sulfate를 200 g당 0.5 ml씩 이틀에 한 번 두달간 복강내로 투여하였고, 난소 절제한 Ovx+ES군에는 estrogen 호르몬을 10 μg/day 복강내로 같은 방법으로 투여하였다.

혈액 및 장기 적출

실험 종료 후 실험 동물을 ether 마취 하에서 개복한 후 심장에서 채혈하여 30분 후 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였으며, 간장은 적출하여 0.9% 생리식염수용액으로 세척하여 vial에 담아 -70°C Defreezer에 보관하였다.

Table 1. Classification of experimental group

Experimental group	Injection sample (mg/kg)	Injection dose (ml/200 g of body wt.)
Sham (10마리)	0.9% saline	0.5 ml/200 g
Ovx (10마리)	0.9% saline	0.5 ml/200 g
Ovx+ES (10마리)	10 μg	0.5 ml/200 g
Ovx+CS (10마리)	100 mg/kg chondroitin sulfate	0.5 ml/200 g

All means are value±SD
Sham: nonovariectomized group
Ovx: ovariectomized group
Ovx+ES: ovariectomized estrogen group
Ovx+CS: ovariectomized chondroitin sulfate group

분석 시료의 조제 및 분석 방법

시료의 전처리—연골, 골은 분리 후 생리적 식염수로 세정한 후 methanol:chloroform(1:2)으로 탈 지화 한다. 전 처리한 시료는 110℃에서 24시간 가수분해한 후 농축하였다.

Collagen 함량 분석—조직중 collagen량은 조직 가수분해물 중의 hydroxyproline 함량을 측정한 후(0.11 mol의 hydroxyproline이 collagen 1 mol에 해당되므로) 산출한다. 가수분해 물 2 ml을 취한 후 구연산완충액(pH 6)을 1 ml 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후, 19% perchlorate를 1 ml 첨가하여 5분간 방치하고 Dimethylaminebenzaldehyde 1 ml 첨가하 여 60°C에서 20분간 가온하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Pyridinoline 함량 분석—Pyridinoline 표준물질은 Fujimoto에 의한 방법[29]에 따라 소의 Achilles Tendon collagen으로부터 추출한다. 조직 가수분해물 중의 pyridinoline 함량은 형광검출기를 사용하여 고속 액체 chromatograpy로 측정하였다 (Table 2).

간조직 중의 과산화지질 정량

과산화지질의 정량은 간 1 g을 취하여 간무게의 5배 용량인 5 ml의 1/20 M phosphate buffer(pH 7.4)에 homogenation 시켜 마개 있는 시험관에 0.5 ml씩 triple로 취하였다. TBA(Thiobarbituric acid)변법[30]으로 7% SDS로 가용화시켜 여기에 0.67%(동량의 Acetic acid 혼합 시약) 2 ml를 가하여 95°C 수욕상에서 50분간 가온 후 즉시 급냉시켜 Butanol 5 ml로 추출하고 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 Elisa를 이용하여 535 nm에서 흡광도를 측정하였다.

간 조직 중 단백질 함량 분석

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법[31]에 의해서 750 nm에서 흡광도를 측정하고 표준단백 시료를 Bovine serum Albumin(BSA)으로하여 같은 방법으로 측정하여 단백질량을 계산하였다.

Table 2. Chromatographic conditions for pyridinoline analysis

Apparatus	: Shimadzu LC-6A
Detector	: Fluorescence HPLC Monitor RF-535
Column	: Inertsil ODS-2 5 μm (250×4.6 mm id.)
Eluent	: Acetonitrile/0.1 M Sodium Phosphate Buffer, pH 3.5 (25:75) containing SDS and Na_2EDTA
Flow rate	: 1.0 ml/min
Excitation wavelength	: 295 nm
Emission wavelength	: 395 nm

간 조직중의 Superoxide Dismutase(SOD)의 활성측정

SOD 활성도는 Oyanagui법[32]에 준하여 0.2 M K-phosphate buffer(pH 7.4)를 672 μl, 1 mM Xanthine 100 μl, 1% Sodium Deoxychlorate(DOC) 30 μl, 1.5 mM KCN 30 μl, 0.2 mM cytochrome C 150 μl를 넣은 mixture에 sample 5 μl를 넣고, xanthine oxidase 원액을 10 μl를 넣어 mixing한 후 U.V visible spectroscopy를 이용하여 550 nm에서의 흡광도 변화를 2분동안 측정하였다. sample의 효소활성도를 알아보기 위한 표준액으로서는 Sigma사의 superoxide Dismutase standard를 사용하였다.

간 조직 중 Catalase의 활성 측정

Catalase 활성도는 Chance법[33]에 준하여 phosphate buffer (0.05 M pH 7.0) 1.9 ml에 sample(간 homogenate를 3000 rpm에서 20분간 원심분리하고 그 상등액 100 μl를 buffer로 80배 희석) 0.1 ml와 과산화수소 용액 1 ml를 혼합하여 240 nm에서 1분 30초 동안 흡광도 감소측정을 했다.

간 조직 중 GSH, GSSG의 정량

GSH—Glutathione reductase는 Carlberg법[34]에 준하여 homogenate 100 μl에 25% HPO_3 25 μl를 섞어 4°C, 12000 rpm에서 10분간 원심분리하고 96well에 상등액 10 μl와 phosphate buffer(1 mM EDTA 함유, pH 7.4) 200 μl와 OPT (o-phthalaldehyde) 10 μl를 넣어 15분 shaking 후 360 nm에서 Elisa로 형광측정했다.

GSSG—Homogenate 100 μl에 25% HPO_3 25 μl를 섞어 4°C, 12000 rpm에서 10분간 원심분리하여 microtube에 상등액 50 μl와 NEM(N-ethylmalemide) 20 μl를 섞은 후 20분 방치하고 0.1 N NaOH 430 μl를 가하여 혼합한 후 96well

에 앞에서 혼합한 sample 200 μl와 OPT 10 μl를 섞어 15분간 shaking 후 360 nm에서 Elisa로 형광측정했다

간 조직 중 GPx(GSH-peroxidse)의 활성 측정

0.1 M PB(4 mM EDTA) 400 μl+0.01 M NaN_3 70 μl+0.01 M GSH 70 μl+1.5 mM NADPH 70 μl+H_2O 360 μl+GSSG-reductase(1.8 u/ml) 20 μl+sample(20% H 원액) 10 μl를 혼합하여 상온에서 1분간 방치한 후 2 mM의 H_2O_2 100 μl를 가해 잘 섞은 후 340 nm에서 1분 30초간 흡광도 감소 측정을 하였다.

혈청 Aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase 활성 측정

혈청 AST, ALT 활성도는 Reitman-Frankel method를 이용해 다음과 같이 실시했다.

AST 측정—AST substrate 1.0 ml를 시험관에 취하여 37 °C water bath에서 3분간 방치한다. 여기에 0.2 ml의 혈청을 가하여 섞은 후, 37°C water bath에서 60분간 반응시킨다. 시간이 되면 1 ml의 color reagent를 가하여 잘 혼합한 후 20분간 실온에 방치한다. 0.4 N-NaOH 10 ml를 가하여 5~10분간 방치시킨 후 파장 505 nm에서 증류수를 blank로 하여 흡광도를 구한 후 표준 곡선을 이용하여 측정하였다.

ALT 측정—ALT측정은 ALT substrate를 사용하고, 혈청과 혼합 후 37°C 수조 내에서의 반응 시간이 30분인 것을 제외하고는 AST 측정법과 동일하다.

통계처리

본 연구에 대한 모든 실험결과는 평균치와 표준편차로 나타내었고, 통계적 유의성은 student's t-test를 이용하여 상호비교하였다.

결과 및 고찰

연골, 골 중의 Collagen 함량의 변화

연골조직중의 collagen 함량의 변화는 Table 3과 Fig. 1과 같다. 내분비선에 의하여 합성, 분비되어지는 스테로이드 호르몬은, 유전자 표현을 자극함으로서 표적조직 내부에 생화학적 반응을 일으키는 물질로서 collagen 생합성능에 관여하고 있는 것으로 알려져 있고,[16,17] 피부섬유아세포 중의 collagen은 estrogen에 의하여 생성량이 증가한다는 연구보고도 있다.[17]

본 실험결과에서 연골 중의 collagen 함량은 난소절제한 군에서 61.28 mg/g이었고 이에 비해 절제 후 호르몬 투여군과 chondroitin 투여군에서는 각각 80.36 mg/g과 85.68 mg/g으로 증가하는 경향을 보였고, sham군에 있어서도 대조군 보다 증가하였다.

이러한 경향은 골조직 중의 collagen 함량 변화에서도 관찰되었다(Table 4, Fig. 2).

난소절제군에서 67.18 mg/g이었고, hormone 투여군과 chondroitin투여군은 각각 75.85 mg/g과 72.04 mg/g으로 증가되었다. 이러한 결과는, collagen 생합성에 estrogen이 관여하고 있음을 시사하고 있다. 한편, chondroitin sulfate는 신경 및 연골 조직을 이루는 구성성분으로 연령의 증가와 함께 감소하며, 노화에 따르는 결합조직의 탄성손실에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. 난소절제 후, chondroitin sulfate의 투여가 collagen 합성에 어떠한 영향을 주는지를 검토한 결과, chondroitin sulfate는 collagen 생합성에 확실히 영향을 주는 것으로 나타났다.

Collagen과 chondroitin sulfate는 각 조직의 단단함, 유연성 등의 물리적 성질을 결정하며, 그 결과 조직 구축, 생체방어, 암의 전이, 상처치유, 노화 등의 다양한 생명 활동에 관여하고 있다. 이와 같이 세포의 결합조직의 구성 성분으로서의 역할이 유사한 점으로 미루어, 구조물질의 상호 관

Table 3. The effect of estrogen and chondroitin sulfate on collagen in cartilage of ovariectomized rats

Group	Collagen (mg/g)
Sham(8week)	89.89± 6.80
Ovx	61.28±19.59
Ovx+ES	80.36±15.81
Ovx+CS	85.68±30.14

All means are value±SD
Sham: nonovariectomized group
Ovx: ovariectomized group
Ovx+ES: ovariectomized estrogen group
Ovx+CS: ovariectomized chondroitin sulfate group

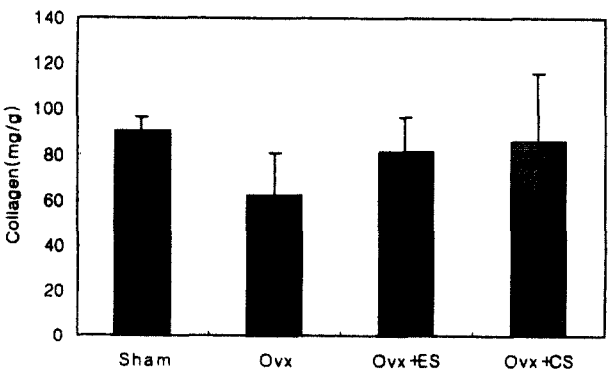

Fig. 1. Concentration of collagen in cartilage of rats.

Table 4. The effect of estrogen and chondroitin sulfate on collagen in bone of ovariectomized rats

Group	Collagen (mg/g)
Sham (8week)	73.71±10.75
Ovx	67.18±17.98
Ovx+ES	75.85±12.62
Ovx+CS	72.04± 6.81

All means are value±SD
Sham: nonovariectomized group
Ovx: ovariectomized group
Ovx+ES: ovariectomized estrogen group
Ovx+CS: ovariectomized chondroitin sulfate group

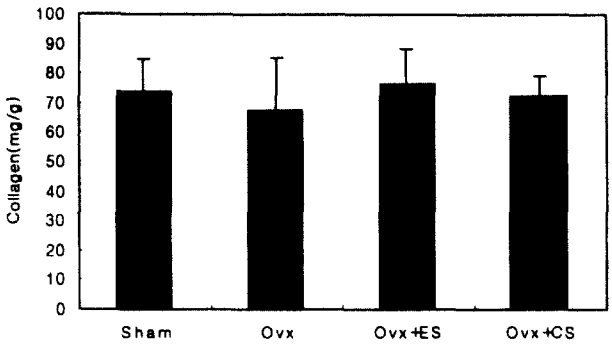

Fig. 2. Concentration of collagen in bone of rats.

련성을 추측할 수 있고, 본 실험결과에서도 상호 영향을 주는 것으로 확인되었다.

Collagen의 생합성에는 비타민 C가 필수적으로 관여하는 것으로 알려져 있으므로, 앞으로의 연구에는 비타민 C가 chondroitin sulfate의 생체내 함량에 미치는 영향을 검토함으로서 비타민 C의 새로운 역할에도 주목해 볼만한 것으로 사료된다.

연골, 골조직 중의 pyridinoline 함량의 변화

노화에 의한 결합조직의 변화는 섬유 구성성분의 주체인 collagen의 안정성의 증가이며, 이러한 안정성은 collagen을 구성하는 collagen 분자간 가교의 증가에 의한 것이다.[35] Pyridinoline은 collagen의 성숙 가교물질로서 주로 골, 연골의 collagen 중에 존재하며, hydroxylysine 1분자와 생체내에서 lysyl oxidase에 의해 합성되어진 hydroxyallysine 2분자가 결합하여 생성된다.[36-38] 본 실험에서 난소절제 후 4주간 estrogen과 chondroitin을 투여한 결과, 연골 collagen 중의 pyridinoline 함량이 난소절제군에 비해 증가하는 경향을 나타내었다(Table 5, 6, Fig. 3, 4).

Pyridinoline 생성은 사람에 있어서 성장기에 급격히 증가하며, 성숙 후에는 점차 감소하는 것으로 알려져 있다. 이것은 pyridinoline이 동물의 성장기에 collagen 섬유의 안정화에 필요하기 때문에 일어나는 현상으로 볼 수 있다. 한편, 성숙 후 pyridinoline 감소의 원인에 대해서는 확실히 밝혀진 바가 없으나, 가교에 의해 안정화된 연골의 collagen 섬유는 pyridinoline 감소에 의해 collagen 섬유 구축에 이상을 나타내어 노화가 진행되는 것으로 추측된다. 본 실험에서 노화의 한 모델로서 난소절제라는 수단을 사용하여 노화시 일어나는 collagen 가교물질의 변화에 대해 관찰한 결과, 호르몬 투여에 의해 가교물질이 sham군 이상으로 증가하였음은 pyridinoline 생성량이 노화와 확실한 상관관계가 있음을 시사하였고, 세포의 결합조직의 구성성분으로서 역할이 유사한 chondroitin sulfate도 영향을 주는 것으로 관찰되어졌다. 이러한 경향은 골조직 collagen중의 pyridinoline 함량 변화에서도 관찰되었다.

간조직 중의 과산화지질 함량의 변화

지질과산화 반응은 여러 가지 독성화합물이나 약물에 의한 간손상 발생의 가장 중요한 기전으로써 인정되어지고 있고, 이러한 기전은 세포내 산화적 스트레스의 증가, 즉

Table 5. The effect of estrogen and chondroitin sulfate on pyridinoline/collagen in cartilage of ovariectomized rats

Group	Pyridinoline/collagen (mg/g)
Sham (8week)	0.72±0.19
Ovx	0.66±0.12
Ovx+ES	0.77±0.08
Ovx+CS	0.75±0.11

All means are value±SD
Sham: nonovariectomized group
Ovx: ovariectomized group
Ovx+ES: ovariectomized estrogen group
Ovx+CS: ovariectomized chondroitin sulfate group

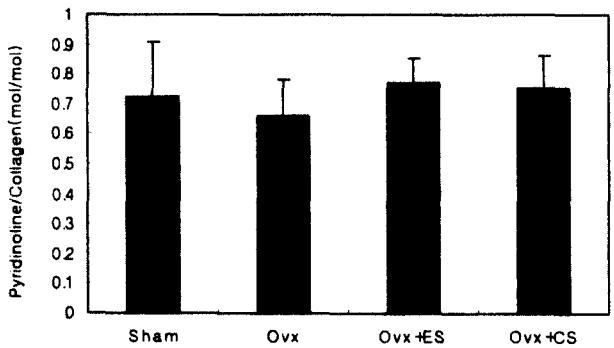

Fig. 3. Concentration of pyridinoline in collagen from cartilage of rats.

Table 6. The effect of estrogen and chondroitin sulfate on pyridinoline/collagen in bone of ovariectomized rats

Group	Pyridinoline/collagen (mg/g)
Sham (8week)	0.66±0.05
Ovx	0.56±0.06
Ovx+ES	0.65±0.17
Ovx+CS	0.59±0.09

All means are value±SD
Sham: nonovariectomized group
Ovx: ovariectomized group
Ovx+ES: ovariectomized estrogen group
Ovx+CS: ovariectomized chondroitin sulfate group

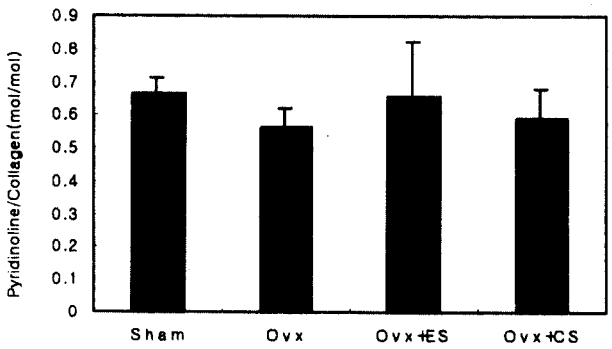

Fig. 4. Concentration of pyridinoline in collagen from bone of rats.

free radical 생성의 증가 및 항산화적 방어력의 감소에 의해 야기된다고 볼 수 있다.

간, 신장 조직중 과산화 지질량을 비교해 보면 Table 7과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 간의 경우 난소를 제거한 군의 과산화 지질량은 18.43 nmol로 난소를 제거하지 않은 군의 과산화지질량인 10.35 nmol 보다 1.74배 높게 나타났고, 난소를 절제하고 chondroitin sulfate를 투여한 군에서는 12.54 nmol로 정상군으로 회복되는 경향을 보였다. 이는 난소 존재시 작용하던 호르몬이 절제됨으로써 그에 따른 여러 기능이 상실되어 과산화지질량이 증가된 것으로 보인다.

간조직 중 Superoxide dismutase(SOD)활성도의 변화

SOD 활성변화는 Table 8과 Fig. 6에서와 같이 난소를 제거한 군은 간의 SOD 활성치가 1.32 unit/mg으로 난소를 제거하지 않은 군의 간 SOD 활성수치인 0.25 unit/mg보다 약 5.3배 높게 나타났으며, 이는 난소절제군에서 훨씬 더 많은 free radical 의 생성으로 인하여 간에서의 항산화 효소 활성이 활발하게 나타난 것으로 추정할 수 있겠다. 노화군(Ovx)의 간에서 항산화 효소의 활성이 높았으며, 이는 노화군에

Table 7. The effect of chondroitin sulfate on lipidperoxide values in rat liver homogate

Group	MDA (nmol/100 mg wet wt.)
Sham	10.35±1.48
Ovx	18.43±2.99
Ovx+CS	12.00±1.76

All means are value±SD
Sham: nonovariectomized group
Ovx: ovariectomized group
Ovx+CS: ovariectomized chondroitin sulfate group

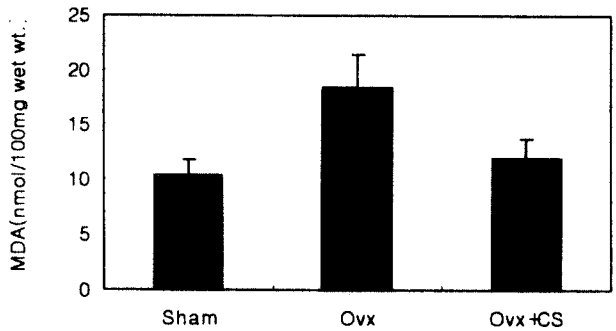

Fig. 5. Variation of MDA values in rat liver homogenate.

서 훨씬 더 많은 free radical의 생성으로 설명될 수 있다. 한편 난소를 절제하고 chondroitin sulfate을 투여한 군에서는 SOD 활성치가 0.36 unit/mg로 80% 이상 억제 효과를 나타남을 관찰할 수 있었다.

간조직 중 Catalase의 활성도 변화

Catalase 활성도는 Table 9와 Fig. 7에서 보는 바와 같이 난소를 제거한 군의 간 Catalase 활성도는 27.89 mu/mg protein으로 난소를 제거하지 않은 군의 간 Catalase 활성도인 17.68 mu/mg protein에 비해 1.58배 정도 높게 나타났다.

이 Catalase 효소는 microsome에서 합성되어 골지체로 이동하여 부착되며 세포내의 peroxisome에 존재하여 내인적으로 생성된 H_2O_2를 H_2O와 O_2로 분해하는 역할을 한다.

Table 8. The effect of chondroitin sulfate on SOD values in rat liver homogenate

Group	SOD (nmol/100 mg wet wt.)
Sham	0.25±0.07
Ovx	1.32±0.54
Ovx+CS	0.36±0.03

All means are value±SD
Sham: nonovariectomized group
Ovx: ovariectomized group
Ovx+CS: ovariectomized chondroitin sulfate group

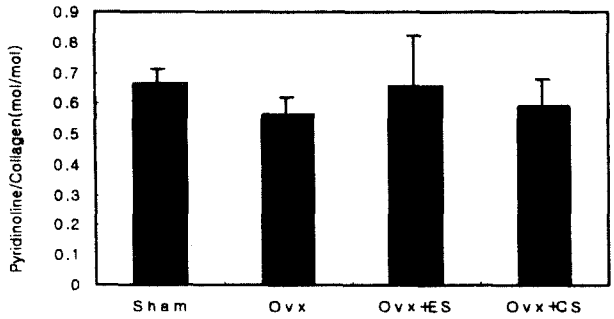

Fig. 6. Variation of SOD values in rat liver homogenate.

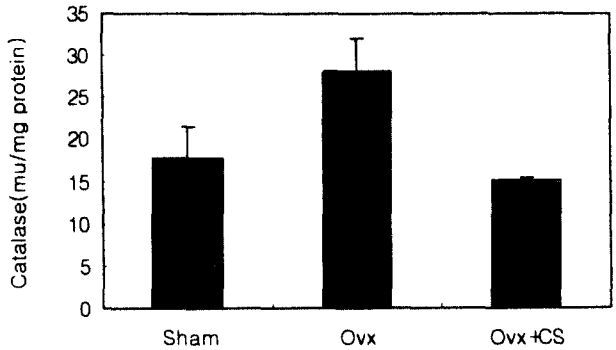

Fig. 7. Variation of catalase values in rat liver homogenate.

특히 난소절제술 시행후 Chondroitin sulfate를 투여한 군에서 탁월한 감소효과를 보인 것은 생체내 free radical생성을 억제함으로써 항산화 효소인 Catalse 활성도를 낮춘 것으로 사료된다.

간 조직 중 Glutathione reduced form(GSH), Glutathione oxidized form(GSSG)의 정량 및 GSH-peroxidase의 활성도 변화

Glutathione은 reduced-glutathione(GSH)과 oxidized-glutathione(GSSG)의 두 가지형이 있는데, Glutathion을 이용해서 H_2O_2나 lipid peroxide 같은 여러 peroxide들을 제거시키는 glutathion peroxidase(이하 GPx로 약함)와 glutathione reductase에 의해서 조절된다.

Table 9. the effect of chondroitin sulfate on catalase values in rat liver homogenate

Group	Catalase (mu/mg protein)
Sham	17.68±3.68
Ovx	27.89±4.07
Ovx+CS	14.83±0.50

All means are value±SD
Sham: nonovariectomized group
Ovx: ovariectomized group
Ovx+CS: ovariectomized chondroitin sulfate group

본 연구에서는 Table 10에서 보는 바와 같이 간조직중의 총 glutathione량은 난소를 절제한 군의 1.28 μmol/mg protein에 비해 난소를 절제하지않은 군은 1.56 μmol/mg protein으로, 난소절제군에서 감소하는 경향을 보였고 chondroitin sulfate 투여군에서는 정상군으로의 회복을 나타내었다.

이는 생체막에 다량 존재하는 다불포화 지방산에 대해 chain-breaking antioxidant로서 작용하여 세포막의 소기관들을 과산화로부터 보호함으로써 효소활성의 최적구조를 유지시켜 주는데 기여하기 때문으로 생각된다. 간조직중 reduced-glutathione(GSH) 함량 또한 chondroitin sulfate 투여로 인해 체내 free radical 생성이 감소되어, GSH 소모가 감소된 결과라고 할 수 있겠다.

Glutathione은 GSH와 GSSG의 두 가지 형태로 균형을 이루면서 존재하게 되는데 세포내의 독성 또는 산화적 손상이 일어난 경우에는 GSSG가 서서히 증가하게 되어 GSH/GSSG의 불균형을 초래하게되어 방어기전으로서의 역할이 소실된다.

본 실험에서도 난소를 절제한 군에서의 GSSG량이 난소를 절제하지 않은 군에 비하여 높았으며, chondroitin sulfate 투여군에서는 감소경향을 보였다. 난소절제군에서는 GSH/

Table 10. The effect of chondroitin sulfate on GSH, GSSG, GPx, GSH+GSSG, GSSG/GSH+GSSG values in rat liver homogenate

Group	Sham	Ovx	Ovx+CS
reduced-glutathion (GSH) μmol/mg protein	1.00±0.12	0.65±0.02	0.69±0.07
oxidized-glutathion(GSSG) μmol/mg protein	0.56±0.08	0.63±0.09	0.59±0.10
GSH-peroxidase(GPx) μmol/mg protein	0.16±0.03	0.18±0.02	0.17±0.02
GSSG+GSH μmol/mg protein	1.56±0.20	1.28±0.11	1.28±0.17
GSSG/(GSSG+GSH)	0.35	0.49	0.46

All means are value±SD
Sham: nonovariectomized group
Ovx: ovariectomized group
Ovx+CS: ovariectomized chondroitin sulfate group

Table 11. The effect of chondroitin sulfate on AST · ALT values in rat serum

Group	AST (unit/ml)	ALT (unit/ml)
Sham	58.61±4.49	23.64±1.42
Ovx	91.93±8.72	22.61±1.63
Ovx+CS	40.60±6.21	21.90±2.07

All means are value±SD
Sham: nonovariectomized group
Ovx: ovariectomized group
Ovx+CS: ovariectomized chondroitin sulfate group

GSSG 비율의 불균형으로 GSH/GSSG+GSH 비율이 높았으나 chondroitin sulfate 투여군에서는 다소 정상군으로의 회복경향은 있었으나 유의적인 변화는 없었다. GPx의 활성도도 그다지 유의한 변화를 나타내지 않았다.

혈청중 Asparateaminotransferase(AST) 및 Alaninaminotransferase(ALT) 활성도 변화

혈청중 AST, ALT의 활성 변화는 Table 11에서 보는 바와 같이 난소를 제거한 군의 혈청 AST 효소활성이 91.93 unit/ml로 난소를 제거하지 않은군의 혈청 AST 효소활성인 58.61 unit/ml에 비해 1.56배 높게 나타났으며, 혈청 ALT의 경우 난소를 절제한 군의 혈청 ALT 효소활성과 난소를 제거하지 않은 군의 혈청 ALT 효소활성은 거의 비슷하게 나타났다. AST 효소활성의 경우 chondroitin sulfate 투여군에서는 유의성 있게 감소하였지만 ALT 효소활성의 경우는 모두 정상 범위에 있어 난소 유무에 큰 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

결 론

본 연구에서는 스테로이드 호르몬의 분비가 저해되었을 때 나타나는 골기질의 감소를 검토하기 위하여, 흰쥐를 사용하여 난소절제 시술을 한 후, estrogen 투여와 무투여에 의한 연골 · 골 중의 collagen 생합성량 및 collagen 분자의 성숙 지표로서 collagen 가교 물질인 pyridinoline 함량을 측정하였고, 세포의 결합조직의 구성성분으로서 그 역할이 유사한 chondroitin sulfate를 투여하여 collagen 생합성량의 변화를 관찰하였다.

그 결과, 난소절제 후 호르몬 투여군에서 연골 중의 collagen 함량은 대조군에 비해 절제 후 호르몬 투여군에서 증가하는 경향이 보였고, sham군에 있어서도 대조군보다 증가하였다. 난소절제 후 호르몬을 투여하지 않았을 때 연골 또는 골 등의 결합조직을 구성하고 있는 collagen이 감소하였고, collagen의 가교물질인 pyridinoline 생성량에도 변화를 주는 것으로 미루어 보아, estrogen은 collagen 생합성에 관여하고 있는 것으로 나타났다.

한편, chondroitin sulfate 투여군에 있어서도 난소절제 후 collagen 생합성에 영향을 주는 것으로 확인 되었으므로, 결합조직의 구성성분으로서의 역할이 유사한 물질로서 상호 관련성을 가지고 있음을 나타내었다.

연골, 골 조직 중의 pyridinoline 함량의 변화에서 호르몬 투여에 의해 가교물질이 sham군 이상으로 증가하였음은 pyridinoline 생성량이 노화와 확실한 상관관계가 있음이 시사되었고 세포의 결합조직의 구성성분으로서의 역할이 유사한 chondroitin sulfate의 투여에 의해 pyridinoline이 증가하였으므로, chondroitin sulfate는 collagen 섬유 형성의 촉진에도 관여하는 것으로 밝혀졌다.

또한, 노화의 효소지표로써 SOD, Catalase, GPx를 측정한 결과, 간조직 중 SOD활성도는 난소를 제거한 군이 난소를 제거하지 않은 군보다 5.3배 높게 나타났고, chondroitin sulfate를 투여한 군에서 SOD 활성도를 80% 억제효과를 보였다.

간조직 중 Catalase 활성도는 난소를 절제한 군이 난소를 절제하지 않은 군보다 1.58배 정도 높게 나타났고, chondroitin sulfate를 투여한 군에서 Catalase 활성도를 현저하게 억제하였다.

간조직중의 총 glutathione량은 난소를 절제한 군의 1.28 μmol/mg protein에 비해 난소를 절제하지않은 군은 1.56 μmol/mg protein으로, 난소절제군에서 감소하는 경향을 보였고 chondroitin sulfate 투여군에서는 정상군으로의 회복을 나타내었다. 그러나, GPx의 활성 수치는 그다지 유의한 변화를 나타내지 않았다.

이상의 실험 결과로부터 Estrogen, chondroitin sulfate는 collagen 생합성능에 관여하고 있고 골단백질의 성숙을 조절하고 있으며 노화의 촉진을 억제하는 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 1997년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 지방대육성과제 연구비에 의하여 수행되었기에 이에 감사드리는 바입니다.

국문요약

난소절제 후 호르몬 투여군(Ovx+ES)과 chondroitin sulfate 투여군(Ovx+CS)에서 괄과연골 중의 collagen과 pyridinoline 함량이 난소절제군(Ovx)보다 증가하는 경향을 보였고 Sham군에 있어서도 Ovx군에서 보다 증가하였다. Ovx군이 Sham군보다 SOD, catalase 활성도가 높게 나타났으며 Ovx+CS군의 Ovx군에 비해 활성도가 낮게 나타났다. 이상의 실험 결과로부터 chondroitin sulfate는 collagen 생합성능에 관여하고 있고 골단백질의 성숙을 조절하고 있으며 노화의 촉진을 억제하는 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Lerner D.J., Kannel, W.B. *et al.*: pattern of coronary disease morbidity and mortality. *Am. Heart. J.*, **111**, 383 (1986).
2. Aabe, T. *et al.*: Carnlatiin between climacteric symptoms and serum level of stradiol, progesterone, follcle-stimulating hormone. *Aam. J. Obset.. Gynecol.*, **129**, 65-67 (1977).
3. 松本俊夫: 骨粗鬆症. 羊士社, p. 16 (1996).
4. Siegel, R.C.: Collagen cross-linking effect of D-penicillamine on cross-links. *Biochem. J.*, **163**, 339 (1977).
5. Robins, S.P. and Baily, A.J.: The chemistry of the collagen cross-links. *Biochem. J.*, **163**, 339 (1977).
6. 藤本大三郎: コラ-ゲン分子の變化とエィヅンク``-老化をくいとめるち法はみつかるか. 現代 化學, **8**, 10 (1982).
7. Fujimoto, D.: Aging and cross-linking in human aorta. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **109**, 1264 (1982).
8. Robins, S.P.: Turnover and cross-linking of collagen. *Collagen in Health and Disease*, **9**, 160 (1982).
9. Kuboki, Y. and Mechanic, G.L.: Comparative molecular distribution of cross-links in bone and dentin collagen. *Calcif. Tissue Int*, **34**, 306 (1982).
10. Yamauchi, M., Woodley, D.T., *et al.*: Aging and cross-linking of skin collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **152**, 898 (1988).
11. Eyre, D.R. *et al.*: Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. *Biochem. J.*, **252**, 495 (1988).
12. Kim, M.H. *et al.*: Age-related changes in the pyridinoline content of guinea pigs cartilage and achilles tendon collagen. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **40**, 95 (1994).
13. Albright, F. *et al.*: Postmenopausal osteoporosis: its clinical features. *J. Am. Med. Ass.*, **116**, 2465 (1941).
14. Hdund, L. R. and Gallagher, J. C.: The effect of age and menopause on one mineral density of the proximal femur. *J. Bone. Mineral Res.*, **4**, 639 (1989).
15. Yanaguchi, A. *et al.*: Recombinant human bone morphogenetic portein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation *in vitro*. *J. Cell Biol.*, **113**, 681 (1991).
16. Noda, M. and Roodon, G.A.: Transcriptional regulation of osteopontin production in rat osteoblast-like cells by parathyroid hormone. *J. Cell Biol.*, **108**, 713 (1989).
17. 永井 裕, 藤本大三郎: コラ-ゲン代謝と疾患. 講談社, p. 155 (1982).
18. Beardsworth, L.J., Eyre, D.R. *et al.*: Changes with age in the urinary excretion of lysyl and hydroxylysylpyridinoline, two new markers of bone callagen turnover. *J. Bone Min. Res.*, **5**, 671 (1981).
19. Black, D. *et al.*: Excretion of pyridinum cross-links of collagen in ovariectomized rats as urinary markers of increased bone resorption. *Calcif. Tissue Int.*, **44**, 343 (1989).
20. Uebelhart, D. *et al.*: Urinary excretion of pyridinium crosslinks : a new marker of bone resorption in metabolic bone disease. *Bone and Mineral*, **18**, 87 (1990).
21. Preedy, V. R. *et al.*: The urinary excretion of the collagen degradation markers pyridinoline and deoxypyridinoline in an experimental rat model of alcoholic bone disease. *Alcohol & Alcoholism*, **26**, 191 (1991).
22. Uebelhart, D. *et al.*: Effect of menopause and hormone replacement therapy on the urinary excretion of pyridinium cross-links. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **72**, 367 (1991).
23. Fujimoto, D. *et al.*: Analysis of pyridinoline, cross-linking compound of collagen fibers, in human urine. *J. Biochem.*, **94**, 1133 (1983).
24. Gunja-Smith, Z. and Boucek, R.J.: Collagen cross-linking compounds in human urine. *Biochem. J.*, **197**, 759 (1981).
25. 장은아, 김성원, 채석래, 차영주: 적혈구내 Reduced Glutathion의 측정, 대한임상병리학회지, **17**, 1997
26. Richard, C.K. *et al.*: two Immunologically and developmentally distinct chondroitin sulfate proteoglycans in embryonic chick brain. *The Journal of Biological Chemistry.*,

267, 12149-12161 (1992).
27. Richard, P.V. *et al.*: Structure of a Fucose-branched chondroitin sulfate from sea Cucumber. *The Jounal of Biological Chemistry.*, **266**, 13530-13536 (1991).
28. A. H. *et al.*: Determination of sulphated disaccharides from chondroitin sulfates by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography.*, **171**, 339-344 (1979).
29. Fujimoto, D. and Moriguchi, T.: Pyridinoline, a nonreducible crosslink of collagen. *J. Biochem.*, **83**, 863 (1978).
30. 하배진: 천연색소 Brazilin 및 Hematoxylin의 항지질과산화활성에 관한 연구. *Kor. J. Food Hygiene.*, **2**, 35-40 (1987)
31. Lowry, O.H. *et al.*: Protein measurement with the folin phenol regent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
32. Oyanagui, Y.: Reevalution of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal Biochem.* **42**, 290-295 (1948).
33. Chance, B. and Maehly, A.C.: Assay of catalase and peroxidase. vol. II Academic Press. pp.764-775 (1955).
34. Carlberg, I. and Mannervik, B.: Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, **250**, 5475 (1975).
35. Moriguchi, T. and Fujimoto, D.: Age-related changes in the content of collagen crosslink, pyridinoline. *J. Biochem.*, **84**, 993 (1978).
36. Fujimoto, D. *et al.*: The structure of pyridinoline, a collagen crosslink. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 52 (1978).
37. Barber, M., Bordoli, R. *et al.*: The structures of pyridinoline. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**, 1041 (1982).
38. Tsuda, M., Ogawa, T. and Kawamishi, Y.: Pyridinoline is a real moiety of collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **104**, 1407 (1982).