

In vitro에서 미색류 껍질로부터 추출한 콘드로이틴황산의 기능성 화장품 소재로서의 가능성

김영림¹ · 안삼환² · 최병대² · 강석중² · 신기욱¹ · 오명주³ · 정태성^{1†}

¹경상대학교 수의과대학 동물의학연구소

²경상대학교 해양생물이용학부/해양산업연구소

³여수대학교 수산생명의학과

In vitro Examination of Chondroitin Sulfates Extracted Midduck (*Styela clava*) and Munggae Tunics (*Halocynthia roretzi*) as a Cosmetic Material

Yong-Rim Kim¹, Sam-Hwan Ahn², Byeong-Dae Choi², Seok-Joong Kang²,
Gee-Wook Shin¹, Myung-Joo Oh³ and Tae-Sung Jung^{1†}

¹Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

²Division of Marine Bioscience/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University,
Tongyeong 650-160, Korea

³Dept. of Aquatic Life Medicine, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea

Abstract

With the aim of using a cosmetic material, chondroitin sulfates extracted from midduck tunics (*Styela clava*) and munggae tunics (*Halocynthia roretzi*) were examined *in vitro* with two cell lines for cell toxicity, collagen synthesis, cell growth and recovery ability after U.V. irradiation. Cell toxicity test with A 431 and CCD 1108Sk was able to observe high activity between 400 and 600 µg/m while standard chondroitin sulfate (CS) purchased from Sigma was showed at 80 µg/mL. Even fraction 1 and 2 collected from chondroitin sulfates originated from midduck appeared having the highest activity between 600 and 1000 µg/mL, but slightly lower compared to crude chondroitin sulfates from both mideduck and munggae. In cell growth examination, it was not able to find significant differences between chondroitin sulfates used. Both crude chondroitin sulfates were exhibited the highest activity for two cell lines except that of mideduck which was showed activity for CCD 1108Sk. CS, fraction 1 and 2 from midduck were not able to demonstrate a significant activity in collagen synthesis. On the contrary, crude chondroitin sulfates from both munggae and midduck were showed the highest activity at 100 and 50 µg/mL with only CCD 1108Sk. The recovery ability after U.V. irradiation with crude chondroitin sulfates from both munggae and midduck were showed high activity at 400 µg/mL with CCD 1108Sk and A 431. But there were no activity observed in fractions examined. As a consequence, the crude chondroitin sulfates from both munggae and midduck might not only be available as a cosmetic material but also useful for increasing some activity by blending properly.

Key words: midduck tunics (*Styela clava*), munggae tunics, chondroitin sulfates, cell toxicity, collagen synthesis, cell growth, recovery ability

서 론

Glycosaminoglycans(GAGs)은 인간의 각막, 연골, 피부, 혈관벽, 인대 등 점성을 가지는 조직에 존재하고 있으며, 사슬 내 고농도의 SO_4^{2-} 혹은 COO^- 를 함유하여 음전하로 하전하게 되면 수분을 끌어당기는 힘이 생겨 보습효과 및 점성을 나타내므로 관절조직의 윤활제로서 이상적인 역할을 한다. 이와 같은 생화학적 특성 때문에 연골조직에 가해진 압력을 흡수하거나 분산시켜 기계적인 손상으로부터 관절조직을 보

호하게 된다. 또한 GAGs는 생체 내에서 단백질과 결합된 proteoglycan(PG) 구조로 인체 관절연골의 27~43% 정도 존재하고 있어 무기질의 이동과 조절, 인산칼슘의 침착, 신체 조직의 보수, 항응혈능, 각막보호, 세균감염 등에 관여한다. 하지만, 노화로 인한 GAGs의 감소는 안구건조, 관절의 퇴행성 질환, 관절통과 관절염의 발병, 상습적인 요통과 주름의 형성을 야기시킨다(1).

콘드로이틴황산의 주원료로 상어연골(2), 포유동물의 각막 및 코뼈(3), 관절(4-6), 내장(7,8) 등이 사용되고 있었으나,

[†]Corresponding author. E-mail: jungts@nongae.gsnu.ac.kr
Phone: 82-55-751-5822, Fax: 82-55-751-5803

최근 상어의 멸종위기로 인한 포획금지, 지느러미 내 methylmercury축적에 의한 독성유발(9), 포유동물의 광우병 확산에 따른 자원확보가 어려운 실정이다. 이러한 자원 문제의 해결을 위해서는 새로운 원료탐색과 새로운 원료로부터 GAGs의 추출 및 정제기술의 개발이 뒤따라야 한다. 이러한 연구의 일부로 Gandra 등(10)이 미색류로부터 당단백질의 생화학적 특성에 관한 연구를 수행하고 있음이 보고되었다. 또한 유럽의 경우 임상실험을 통하여 콘드로이틴황산의 기능성화장품 및 식품의 역할에 따른 노화방지효과가 인정되어 의사의 처방을 통한 관절염 치료제(11) 및 화장품(로션, 스킨, 에센스, 팩, 립스틱, 주름개선제 등)에 이용되고 있다.

미더덕은 미색류로 분류학상 무척추동물에 속하며, 전세계에 널리 분포하고 있다. 가늘고 긴 몸에 자루가 있고 그 끝이 바위에 붙어 있다. 전체길이는 5~10 cm로서 황갈색을 띠며 외피는 섬유질과 같은 물질로 되어 있고 딱딱하다. 한국의 전연안에서 서식하고 있는데, 특히 패류 양식장과 배 밑에 많이 부착해 있다. 우리나라에는 80년대 중반 이후 본격적인 양식으로 어민들의 소득 증대에 기여하고 있으며, 진해만을 중심으로 양식되어 연중 4월부터 7월 사이에 가장 많은 생산량을 보이며 2001년에는 약 15,000 ton이 생산되었지만, 생산량 증가에 따른 미더덕 껌질의 처리에 따른 어려움을 겪고 있다.

폐기되는 미더덕 껌질로부터 GAGs를 추출할 수 있다면 원료 수급에 따른 문제점을 해결할 수 있을 뿐만 아니라, 껌질 폐기에 따른 환경오염을 줄일 수 있을 것이다. 미색류 껌질을 이용한 황산다당류의 연구가 발생생물학(12), 면역화학(13) 분야에서 활발히 진행되고 있으나, 미더덕 껌질을 이용한 황산다당류에 관한 연구는 거의 없다. 본 연구에서는 미더덕으로부터 추출한 콘드로이틴황산을 이용하여 기능성 화장품으로서의 가능성을 세포를 이용하여 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

세포주 및 배양방법

사람의 정상적인 피부세포에서 유래한 Fibroblast 계통의 CCD 1108Sk를 ATCC로부터 구입하여 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)에 10% Fetal Bovine Serum(FBS)을 첨가하여 계대하였고, 사람으로부터 유래한 Epidermal 계통의 A 431 주화세포를 한국세포주 은행으로부터 구입하여 Eagle's Minimum Essential Medium(EMEM)에 10% FBS을 첨가하여 계대하였다.

콘드로이틴황산의 추출 및 정제

깨끗이 세척한 미더덕 및 명계 껌질 1000 g씩 취하여 약 10배량의 중류수를 가하고, 105°C에서 3시간 가열하여 얻어진 추출액을 농축한 다음(Brix 9~11), 5.0% trichloroacetic acid(TCA)를 첨가하여 하룻밤 방치하여 단백질을 제거하였다. 95% ethanol 3배량으로 3회 반복하여 탈색하고 원심분

리(10,000 rpm, 20분)하여 침전물을 얻은 다음 동결건조하였다. Mauro 등(14)의 방법을 참고하여, 미더덕 추출물을 0.5 M acetate buffer(pH 6.0)로 평형화된 DEAE-sepharose CL-6B column(1.6×33 cm)에서 0~1.5 M NaCl로 농도구배를 주어 유속 1 mL/min로 254 nm에서 6 mL씩 분취하였다. 회분된 시료는 metachromasia(sulfated glycosaminoglycans)와 carbazole assay(hexouronic acid)로 확인하고, chromatography하여 2개의 fraction을 얻었다.

그리고 positive control로서는 Porcine Intestinal Mucosa 유래의 chondroitin sulfate(CS, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. 표준 콘드로이틴황산, 미더덕으로부터 추출한 Fraction 1과 2(MDD F1과 F2)는 5, 10, 20, 40 그리고 60 µg/mL로서 회석하였고, 미더덕과 명계로부터 추출한 crude 상태의 콘드로이틴황산은 50, 100, 200 그리고 400 µg/mL로서 회석 후 시험하였다. 단 최초로 세포독성 시험을 수행할 때는 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 400, 600 그리고 1000 µg/mL 범위로 수행하였다.

콘드로이틴황산에 대한 세포독성 측정

2가지 주화세포를 이용한 세포 생존능력 실험(cell viability test)의 *in vitro* 검사는 Kanoh 등(15-17)의 방법을 변형하여 실시하였다. 간단히 설명하면, CCD 1108Sk를 96 well plate에 1×10^4 cells/mL 넣어서 24시간 배양한 다음 FBS가 포함되어 있지 않은 신선한 배지로서 2번 세척하였다. 세척 후 0.5% FBS가 포함된 배지에 콘드로이틴황산을 회석하여 각 well에 첨가 후 5일간 더 배양하였다. 이렇게 배양된 세포에 MTT 용액을 배양액의 10% 첨가한 다음 3~4시간 더 반응시켜서 MTT formazan crystals 형성시킨 후 MTT 용매 100 µg/mL을 첨가하여 570 nm에서 측정하였다. A 431 세포를 이용한 세포증식율 측정은 CCD 1108Sk를 이용한 방법에 준하여 실시하였다. 이러한 세포를 이용한 *in vitro* 실험은 최소 3회 반복 실험을 한 후 평균값으로서 결과를 정리하였다.

세포증식효율을 통한 검정

세포증식율(cell growth)은 CCD 1108Sk를 24 well plate (1×10^4 cells/mL)을 이용하여 배양한 다음 3일 후에 FBS가 포함되어 있지 않은 신선한 배지로서 2번 세척한 다음 0.5% FBS가 포함된 배지에 콘드로이틴황산을 회석하여 각 well 당 2 mL씩 첨가하였다. 5일간 배양 후 세포 성장을 측정하였다. 세포성장을 측정은 배양된 세포를 PBS로 두번 세척 후 0.25 mL의 trypsin-EDTA 용액을 첨가하여 5분 동안 반응시킨 후 0.2 mg의 RNase, 25 µg/mL의 EDTA 그리고 2 mg/mL의 protease 첨가 후 강하게 수차례 피펫팅을 하였다. 피펫팅 내용물을 Eppendorf tube에 옮긴 후 0.5 mL의 5 µg/mL의 ETBr을 첨가한 다음 10~20 min 동안 sonication시킨 다음 50°C에서 하룻밤 반응시킨 후 590 nm에서 DNA의 양을 측정하였다. A 431 세포를 이용한 세포증식율 측정은 CCD 1108Sk를 이용한 방법에 준하여 실시하였다. 단, 세포는 콘

콘드로이틴황산 희석액을 넣기 전 4일 동안 배양하였고 콘드로이틴황산 희석액에 FBS를 첨가하지 않았다.

콜라겐 합성능을 통한 검정

CCD 1108Sk를 96 well Plate에 1×10^4 cells/mL 되게끔 넣은 후 3일간 배양한 다음, FBS가 포함되어 있지 않은 신선한 배지로서 배양세포를 2번 세척하였다. 세척된 각 well에 0.5% FBS가 포함된 배지에 콘드로이틴황산을 희석하여 첨가 후 5일간 배양한 다음, 상층액을 제거한 다음 세포를 0.5 mL의 cold ethanol : methanol(1 : 1) 첨가하여 4°C에서 30분 반응시켰다. 고정된 세포를 PBS로서 3번 세척 후, Blocking buffer로서 30분 반응시킨 다음 Type II 또는 Type IX collagen을 1 : 3,000으로 희석시킨 Mmonoclonal antibodies로서 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 그 후 Avidin-Biotin complex(ABC) kit로서 반응시킨 다음 450 nm에서 콜라겐 합성능을 측정하였다. A 431 세포를 이용한 세포증식율 측정은 CCD 1108Sk를 이용한 방법에 준하여 실시하였다. 단, 세포는 콘드로이틴황산 희석액을 넣기 전 4일 동안 배양하였고 콘드로이틴황산 희석액에 FBS를 첨가하지 않았다.

자외선 손상에 대한 회복능을 통한 검정

세포활성의 측정에 사용한 같은 CCD 1108Sk와 A431에 자외선을 조사하여 손상회복 미치는 콘드로이틴황산의 영향을 조사하였다. 24 well에 분주한 세포가 50~60%의 monolayer를 형성하도록 배양 후 PBS로 2번 세척한 다음 0.1 mL의 PBS를 남기고 제거하였다. 여기에 50분 동안에 2.5 mW/cm² 양의 자외선을 조사한 다음 PBS를 제거 후, FBS 와 0.1% BSA가 포함된 콘드로이틴황산 희석액을 넣고 2시간 배양하였다. 배양 후 총 LDH의 측정은 well 당 배양액의 1/10 양의 lactate dehydrogenase assay lysis 용액을 넣고, 45분간 더 배양시킨 후, 250×g에서 4분간 원심분리한 다음 균일한 측정기를 얻기 위하여 flat-bottom plate(96 well)에 옮긴 후 효소측정을 실시하였다. 배양액 속으로 배출된 LDH 측정은 배양액을 24 well plate로부터 제거한 다음, 250×g에서 4분간 원심분리하고 이것은 flat-bottom plate(96 well)에 옮긴 후 효소측정을 실시하였다. 효소 측정은 lactate dehydrogenase assay mixture(lactate dehydrogenase assay substrate solution : enzyme solution : dye solution=1 : 1 : 1)를 배양액의 1/2 양만큼 넣고, aluminum foil로 덮은 다음 실온에서 20~30분간 반응 후, 1/10 양의 1 N HCl을 넣어서 반응을 정지시켜 490 nm에서 LDH 양을 측정하였다(15).

결과 및 고찰

세포독성시험(Cell viability)

콘드로이틴황산에 대한 세포독성 측정은 2가지 주화세포를 이용하여 2가지 범위에서 실시하였다. 먼저 10~1,000 µg/mL 범위에 대하여 CCD 1108Sk 주화세포를 사용하여 조사한 결과(Fig. 1, 2), 콘드로이틴황산으로 반응시키기 전과 비

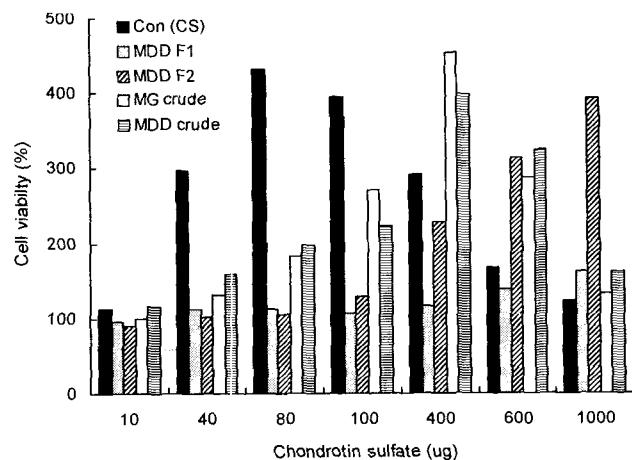


Fig. 1. MTT test using CCD1108Sk to evaluate cell toxicity. MG crude and MDD crude were showed the highest survival percentage from 400 to 600 µg/mL. CS, chondroitin sulfate from Sigma; MDD F1 & MDD F2, fractions from crude chondroitin sulfates of mideduk tunics; MG, crude chondroitin sulfate of munggae tunics; MDD, crude chondroitin sulfate of mideduk tunics.

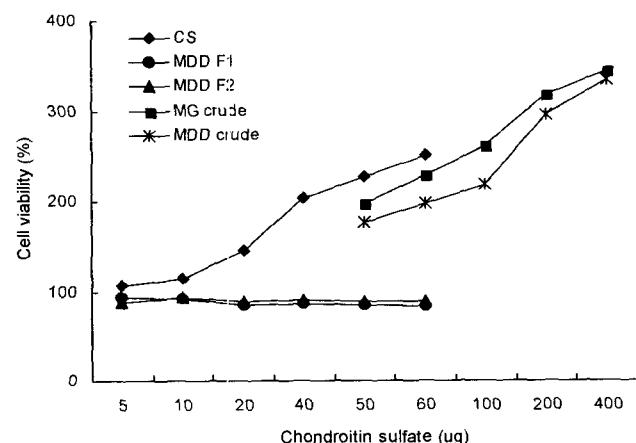


Fig. 2. MTT test using CCD1108Sk to know cell toxicity. No activities were observed from MDD F1 and F2. CS, chondroitin sulfate from Sigma; MDD F1 & MDD F2, fractions from crude chondroitin sulfates of mideduk tunics; MG, crude chondroitin sulfate of munggae tunics; MDD, crude chondroitin sulfate of mideduk tunics.

교하여 control로서 사용한 Sigma사 제품은 80 µg/mL에서 최고의 활성을 보였고, 미더덕과 멍계에서 추출한 crude 콘드로이틴황산의 경우는 400~600 µg/mL 사이에서 최고 활성을 나타내었다. 그러나 MDD F2는 1,000 µg/mL에서 활성이 증가하는 모습을 나타내었고, MDD F1은 약하게 증가하는 모습을 보였다. 또 다른 범위에서는 control로서 사용한 Sigma사 제품, MDD F1과 F2를 5~60 µg/mL 범위에서 조사한 결과, Sigma사 제품은 60 µg/mL에서 최고의 활성을 보였으나, MDD F1과 F2는 활성을 보이지 않았다. 미더덕과 멍계에서 추출한 crude 콘드로이틴황산의 경우는 400 µg/mL에서 활성이 증가함을 보였다. A 431 주화세포를 이용한 실험에서는(Fig. 3, 4) Sigma사 제품과 미더덕과 멍계에서 추출한

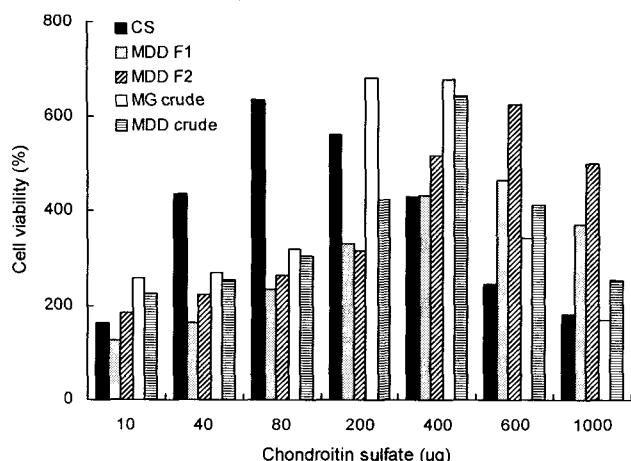


Fig. 3. MTT test using A 431 to find cell toxicity.
MG crude and MDD crude were showed the highest survival percentage from 400 to 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
CS, chondroitin sulfate from Sigma; MDD F1 & MDD F2, fractions from crude chondroitin sulfates of mideduk tunics; MG, crude chondroitin sulfate of munggae tunics; MDD, crude chondroitin sulfate of mideduk tunics.

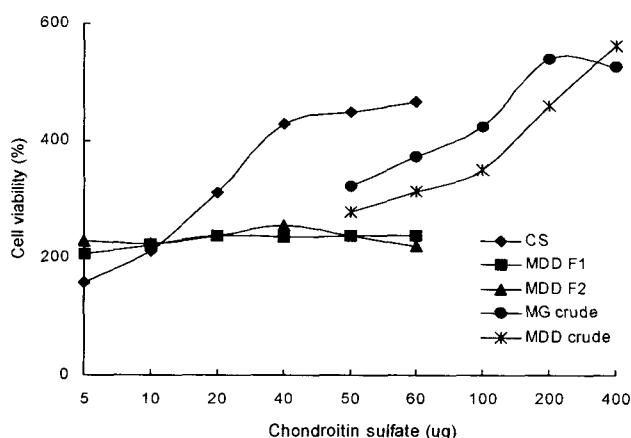


Fig. 4. MTT test using A 431 to know cell toxicity.
No activities were observed from MDD F1 and F2.
CS, chondroitin sulfate from Sigma; MDD F1 & MDD F2, fractions from crude chondroitin sulfates of mideduk tunics; MG, crude chondroitin sulfate of munggae tunics; MDD, crude chondroitin sulfate of mideduk tunics.

crude 콘드로이틴황산의 경우는 CCD 1108Sk에서 보여준 결과와 비슷하였으나, MDD F1과 F2는 600~1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 최고의 활성을 보였으나 crude 콘드로이틴황산보다 낮은 활성을 보였다. 명계에서 추출한 crude 콘드로이틴황산의 경우는 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 최고의 활성을 나타내었고, 미더덕에서 추출한 crude 콘드로이틴황산의 경우는 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 계속 증가하고 있음을 보였다. 상기의 결과와 같이 대부분의 경우에 있어서 세포에 대한 독성효과보다는 세포에 자극을 줌으로서 세포성장능력을 촉진하는 효과를 보이고 있음을 알 수 있었다.

세포증식효율(Cell proliferation examination)

전통적으로 알려지지 않은 물질에 대한 세포독성 및 세포

성장을 측정하는 방법으로서는 염색후 viable cell의 숫자를 세는 것과, radioisotope를 삽입하여 DNA 합성 정도를 보는 것, 자동화 기계로 세포를 세는 것 등으로 염색물질과 세포 활성을 근거하여 측정한다. MTT test는 살아있는 세포의 미토콘드리아의 dehydrogenase 활성을 측정함으로써 세포성장을 알 수 있다. 또한 최소 26종류 이상의 collagen이 포유동물에서는 발견되었고, 세개의 α 체인으로 이루어져 있으며 collagen type에 따라 특이한 구조를 갖고 있다. 이러한 collagen을 검출하는데 monoclonal antibodies를 사용함으로써 특이성을 갖고 쉽게 검출 가능하였다. 또한 세포증식율을 측정함에 있어서 radioisotope를 이용하는 대신에 DNA양의 측정은 에치디움브로마이드(EtBr)를 이용하여 실시하였다. LDH의 조사는 세포질 속의 전체 LDH양을 측정하여 세포 숫자를 측정하는 것과 배지속에 배출된 LDH양을 측정하여 세포막의 상태를 측정하여 세포독성을 측정하는 방법이다.

세포증식효율을 검사한 결과 모든 물질들이 세포증식에는 유의차 있는 증식을 나타내지는 않았다. 그러나 명계에서 추출한 crude 콘드로이틴황산의 경우 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 두 종류의 주화세포에서 최고의 활성을 보였으나, 미더덕에서 추출한 crude 콘드로이틴황산의 경우는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 주화세포 A 431에서만 높은 활성을 보였다(Fig. 5, 6).

Collagen 합성능(Synthesis of collagen)

Collagen 합성은 control로서 사용한 Sigma사 제품, 미더덕으로부터 분리한 fraction 1과 2는 조사 범위에서는 특이 활성을 보이지 않았지만, 명계에서 추출한 crude 콘드로이틴황산의 경우 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서, 미더덕에서 추출한 crude 콘드로이틴황산의 경우 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 CCD 1108Sk 세포를 이용한 실험에서 각각 최고의 활성을 보였으나, A 431 세포에서

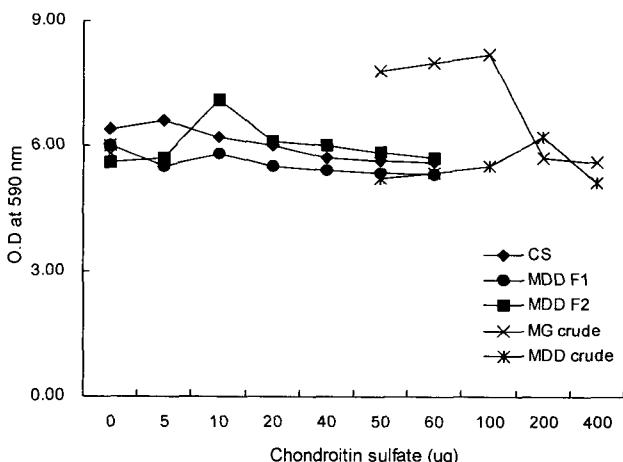


Fig. 5. Examination of cell proliferation by measuring the amount of CCD1108Sk cell DNA.

There were no significant differences between subsatances tested. CS, chondroitin sulfate from Sigma; MDD F1 & MDD F2, fractions from crude chondroitin sulfates of mideduk tunics; MG, crude chondroitin sulfate of munggae tunics; MDD, crude chondroitin sulfate of mideduk tunics.

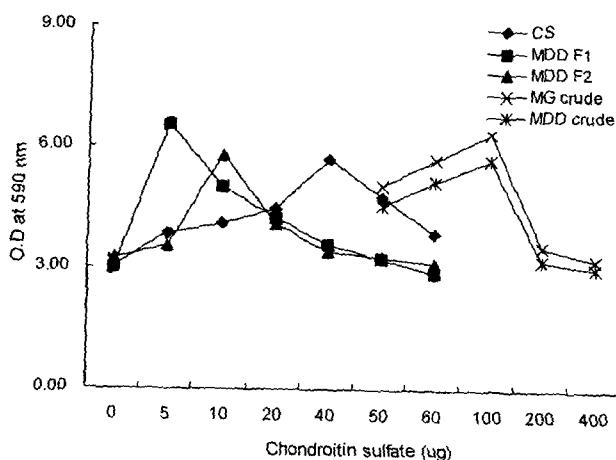


Fig. 6. Examination of cell proliferation by measuring the amount of A431 cell DNA.

No significant differences were observed between materials tested. CS, chondroitin sulfate from Sigma; MDD F1 & MDD F2, fractions from crude chondroitin sulfates of mideduk tunics; MG, crude chondroitin sulfate of munggae tunics; MDD, crude chondroitin sulfate of mideduk tunics.

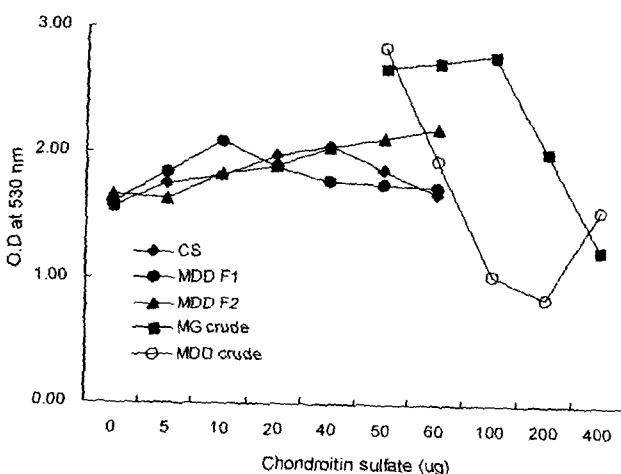


Fig. 7. Assessment of collagen synthesis with CCD1108Sk. MG crude and MDD crude was influenced the syntheses of collagen at 100 and 50 µg/mL, respectively.

CS, chondroitin sulfate from Sigma; MDD F1 & MDD F2, fractions from crude chondroitin sulfates of mideduk tunics; MG, crude chondroitin sulfate of munggae tunics; MDD, crude chondroitin sulfate of mideduk tunics.

는 검사한 모든 물질에 대하여 특이 반응을 확인할 수 없었다 (Fig. 7, 8). Kanoh 등(15)이 진주조개 glycogen을 이용한 실험에서도 crude 혼분이 정제획분보다 collagen 합성능이 21~61% 높다고 하여 정제에 따른 비용을 줄일 수 있다고 하였다.

자외선 손상에 대한 회복능(Recovery ability after U.V light irradiation)

자외선 손상에 대한 회복능 조사는 세포 상층액(Fig. 9, 10)에 있는 LDH 측정과 세포 자체가 생성한 LDH 측정치를 조사한 결과(Fig. 11, 12), 명계와 미더덕에서 추출한 crude 콜드

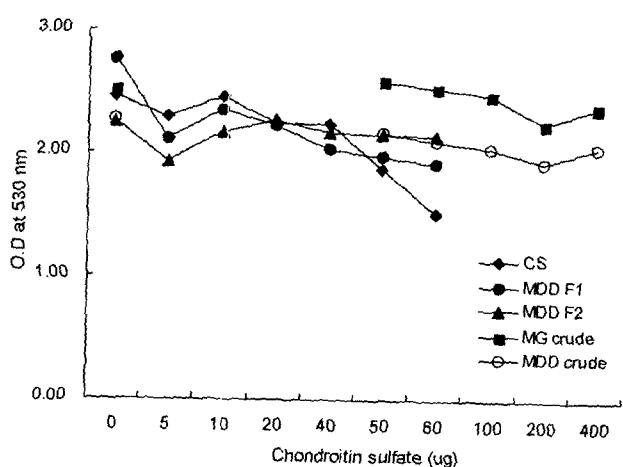


Fig. 8. Assessment of collagen synthesis with A431.

No specific reactions were observed at the range tested. CS, chondroitin sulfate from Sigma; MDD F1 & MDD F2, fractions from crude chondroitin sulfates of mideduk tunics; MG, crude chondroitin sulfate of munggae tunics; MDD, crude chondroitin sulfate of mideduk tunics.

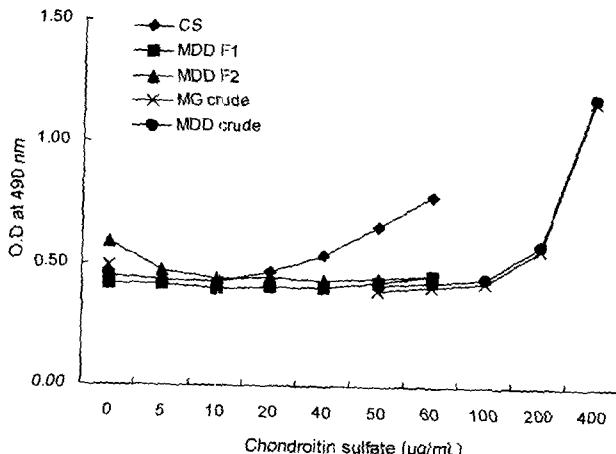


Fig. 9. Examination of recovery ability by measuring LDH from supernatants of CCD1108Sk after U.V light irradiation, supernatants treated with MG crude and MDD crude with 400 µg/mL were only showed high LDH values.

CS, chondroitin sulfate from Sigma; MDD F1 & MDD F2, fractions from crude chondroitin sulfates of mideduk tunics; MG, crude chondroitin sulfate of munggae tunics; MDD, crude chondroitin sulfate of mideduk tunics.

로이틴황산의 경우는 400 µg/mL에서 CCD 1108Sk 세포의 상층액에서 높은 LDH를 보였으나, 다른 물질의 경우 조사범위에서는 반응을 보이지 않았다. CCD 1108Sk 세포가 생성한 LDH의 경우 60 µg/mL에서 Sigma사 제품은 다소 높은 활성을 보였고, 미더덕으로부터 분리한 fraction 2는 10 µg/mL에서는 활성을 보이다가 농도가 높아짐에 따라서 활성이 없어짐을 보였다. A 431 세포를 이용한 조사결과 명계와 미더덕에서 추출한 crude 콜드로이틴황산의 경우는 400 µg/mL에서 높은 LDH를 보였으나, 다른 물질에서는 특이 반응이 나타나지 않았다. 세포 자체에서도 LDH는 조사 물질간 큰 차이를 나타내지는 않았다.

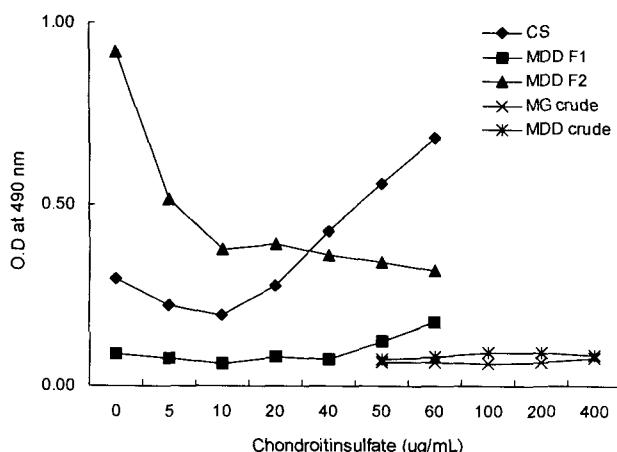


Fig. 10. Examination of recovery ability by measuring LDH from cells of CCD1108Sk after U.V light irradiation, cells treated with chondroitin sulfate from bovine trachea with 60 µg/mL was only showed high LDH values.

CS, chondroitin sulfate from Sigma; MDD F1 & MDD F2, fractions from crude chondroitin sulfates of mideduk tunics; MG, crude chondroitin sulfate of munggae tunics; MDD, crude chondroitin sulfate of mideduk tunics.

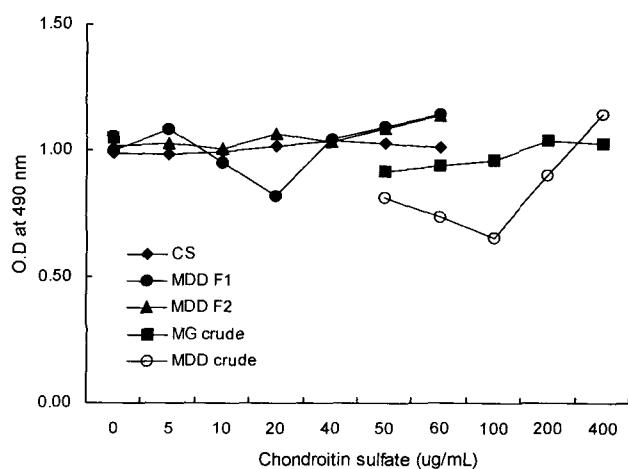


Fig. 12. Examination of recovery ability by measuring LDH from cells of A431 after U.V light irradiation, no significant differences were observed from the range tested.

CS, chondroitin sulfate from Sigma; MDD F1 & MDD F2, fractions from crude chondroitin sulfates of mideduk tunics; MG, crude chondroitin sulfate of munggae tunics; MDD, crude chondroitin sulfate of mideduk tunics.

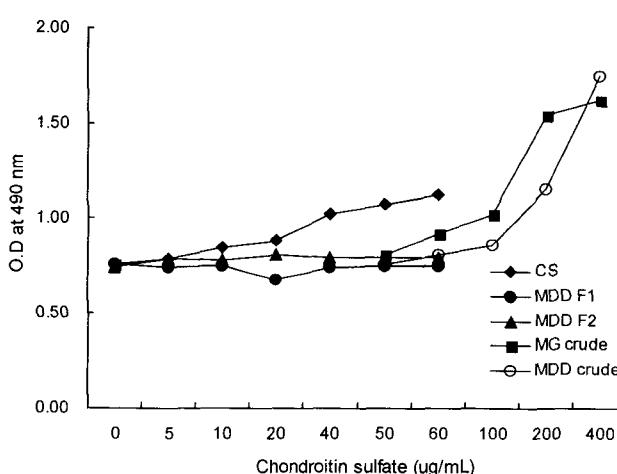


Fig. 11. Examination of recovery ability by measuring LDH from supernatants of A431 after U.V light irradiation, supernatants treated with MG crude and MDD crude with 400 µg/mL were only showed high LDH values.

CS, chondroitin sulfate from Sigma; MDD F1 & MDD F2, fractions from crude chondroitin sulfates of mideduk tunics; MG, crude chondroitin sulfate of munggae tunics; MDD, crude chondroitin sulfate of mideduk tunics.

요 약

CCD 1108Sk 를 이용한 세포 활성을 조사한 결과 Sigma사 제품(Bovine Trachea에서 얻어진 콘드로이틴황산)은 80 µg/mL에서 높은 활성을 보였으나, 미더덕 및 멍게로부터 추출한 콘드로이틴황산은 400~600 µg/mL에서 높은 활성을 보였다. 이러한 활성의 차이는 순도의 차이에 기인하거나 서로 다른 구조에 기인한다고 여겨졌다. 그러나 MDD F1은 1,000 µg/mL에서 활성이 증가하는 모습이 보였지만 MDD F2는 미

약하게 증가하는 모습을 보여 fraction들간에 차이가 있음을 보였다. A 431 주화세포를 이용한 실험에서는 Sigma사 제품과 미더덕과 멍게에서 추출한 crude 콘드로이틴황산의 경우는 CCD 1108Sk에서 보여준 결과와 비슷하였으나, MDD F1과 F2는 모두 600~1,000 µg/mL 사이에서 최고의 활성을 보였다. Collagen 합성에 있어서는 bovine trachea, MDD F1과 F2는 조사 범위에서는 특이 활성을 보이지 않았다. 그러나 멍게에서 추출한 콘드로이틴황산의 경우는 100 µg/mL에서, 미더덕에서 추출한 콘드로이틴황산의 경우는 50 µg/mL에서 CCD 1108Sk 세포에서 각각 최고의 활성을 보였다. 그러나, A 431 세포에서는 검사한 모든 물질에 대하여 특이 반응을 확인할 수 없었다. 자외선 손상에 대한 회복능 조사는 세포 상층액과 세포 자체가 생성한 LDH를 조사한 결과, 멍게와 미더덕에서 추출한 콘드로이틴황산의 경우는 400 µg/mL에서 CCD 1108Sk 세포의 상층액에서 높은 LDH를 보였으나, 다른 물질의 경우 조사범위에서는 반응을 보이지 않았고, 세포 자체에서도 LDH는 조사 물질간 큰 차이를 나타내지는 않았다. 멍게와 미더덕에서 추출한 crude 콘드로이틴황산의 경우는 400 µg/mL에서 최고의 활성을 보였다. 전체적으로 멍게에서 추출한 콘드로이틴황산이 미더덕에서 추출한 콘드로이틴황산의 경우보다 세포활성이 높게 나타났다. 그렇지만 두 해양생물로부터 추출한 콘드로이틴황산은 화장품 원료로서의 사용이 가능함이 판명되었다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 벤처 및 중소기업기술개발지원(과제번호 02-PJ1-PG11-VN02-SV05-001)으로 수행된 과제의 일부로 연구비 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Volk E. 2003. Connective tissue Part 4: Glycosaminoglycans. //www. thinkmuscle.com/article/volk/connective04.htm.
2. Holger JM, Torben MP, Damsgaard TE, Poulsen JH. 1995. Demonstration of immunogenic keratan sulphate in commercial chondroitin 6-sulphate from shark cartilage. Implications for ELISA assays. *Clinica Chimica Acta* 236: 195-204.
3. Inge A, Heinegard D. 1975. Fractionation of proteoglycans from bovine corneal stroma. *Biochem J* 145: 491-500.
4. Shannon EM, Ilic MZ, Handley CJ. 2002. Highly sulfated glycosaminoglycans inhibit aggrecanase degradation of aggrecan by bovine articular cartilage explant cultures. *Matrix Biology* 21: 429-440.
5. Brown SA, Anastassiades TP. 1987. "Matrigenin" activity from bovine bone-II. Effects on the glycosaminoglycans of bovine articular cartilage in culture. *Comp Biochem Physiol* 88B: 535-540.
6. Stephens C, Craigie AP, Anastassiades TP. 1987. "Matrigenin" activity from bovine bone-III. Effects on glycosaminoglycans and proteoglycans of human synovial cells in culture. Comparative *Comp Biochem Physiol* 88B: 541-545.
7. David AP, Kumar S, Wang MJ, Hunter RD. 1994. Irradiation of bovine aortic endothelial cells enhances the synthesis and secretion of sulphated glycosaminoglycans. *Biochimica et Biophysica Acta* 1220: 266-276.
8. Bhandaru RNJ, Berenson GS. 1986. Organization of glycosaminoglycan chains in a chondroitin sulfate-dermatan sulfate proteoglycan from bovine aorta. *Biochimica et Biophysica Acta* 882: 85-96.
9. Omaye ST. 2001. Shark-fin soup and methylmercury: To eat or not to eat. *Food Tech* 55: 26.
10. Ganda M, Cavalcar te MC, Pavao MSG. 2000. Anticoagulant sulfated glycosaminoglycans in the tissues of the primitive chordate *Styela plicata* (Tunicate). *Glycobiology* 10: 1333-1340.
11. Hungerford D. 2003. The role of chondroitin sulfate in the management of osteoarthritis. //www.slackinc.com/bone/ortoday/supp/0603/symposium.htm.
12. Luebbering B, Nishikata T, Goffinet G. 1992. Initial stages of tunic morphogenesis in the ascidian *Halocynthia*, a fine structure study. *Tissue-Cell* 24: 121-130.
13. Ohtsuka Y, Nakae H, Abe H, Obinata T. 1994. Immunochemical studies of an actin-binding protein in ascidian body wall smooth muscle. *Zool Sci* 11: 409-412.
14. Mauro SGP, Mourao PAS, Barbara M, Douglas MT. 1995. A unique dermatan sulfate-like glycosaminoglycans from ascidian. *J Biol Chem* 270: 31027-31036.
15. Kanoh S, Aoyama M, Watanabe M, Mae M, Takagi K, Shimomura K, Niva E. 2001. Possible utilization of the peal oyster *Pinctada fucata* glycogen as a cosmetic material. *Nippon Suisan Gakkaishi* 67: 90-95.
16. Saravanan BC, Sreekumar C, Bansal GC, Ray D, Rao JR, Mishra AK. 2003. A rapid MTT colorimetric assay to assess the proliferative index of two Indian strains of *Theileria annulata*. *Vet Parasitology* 113: 211-216.
17. Wang YY, Zheng XX. 2002. A flow cytometry-based assay for quantitative analysis of cellular proliferation and cytotoxicity *in vitro*. *J Immunological Methods* 268: 179-188.

(2003년 9월 5일 접수; 2004년 3월 11일 채택)