J Korean Soc Food Sci Nutr
39(12), 1769~1775(2010)

한국식품영양과학회지
DOI: 10.3746/jkfn.2010.39.12.1769

곰피가 갱년기 장애 유도 흰쥐의 골 대사 지표물질의 변화에 미치는 영향

김영경 · 김미향†
신라대학교 식품영양학과

Effect of *Ecklonia stolonifera* Extracts on Bone Turnover Markers in Ovariectomized Rats

Young Kyoung Kim and Mihyang Kim†
Dept. of Food and Nutrition, Silla University, Busan 617-738, Korea

Abstract

Menopause is often associated with the incidence of several chronic diseases including osteoporosis, cardiovascular disease, and obesity. The purpose of this study was designed to evaluate the possibility of osteoporosis prevention in postmenopausal women. In this study, we investigated the effects of *Ecklonia stolonifera* (ES) extracts on bone turnover markers in ovariectomized rats. For this study, the following four groups of 9-week-old Sprague-Dawley rats were evaluated over 6 weeks: normal rats (SHAM), ovariectomized rats (OVX-CON) and ovariectomized rats that were treated with ES extracts. We measured the osteocalcin and C-telopeptide of collagen cross-links (CTx) content, enzyme ALP activity in serum and collagen content in the cartilage, bone, skin and lungs. We found that the levels of indicators of bone metabolism such as alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin and CTx were lower in rats in the ES extract group than the OVX-CON group. In addition, the collagen contents in the bone, cartilage, skin and lungs decreased in response to ovariectomy, but the levels of collagen were greater in the bone of rats that were treated with ES extract than in the bone of rats in the OVX-CON group. These results suggest that the ES may be an effective functional food to prevent osteoporosis in postmenopausal women.

Key words: *Ecklonia stolonifera*, ALP, osteocalcin, CTx, collagen, ovariectomized rats

서 론

현재 우리나라에서 보고되고 있는 여성의 평균 수명은 83.3세로, 폐경 연령이 50세 내외라고 할 때 폐경 후 삶은 전 인생의 1/3 이상에 해당하는 긴 기간이다(1). 여성은 폐경을 맞이하면서 여성 호르몬의 분비 불균형 및 감소로 인해 혈관계, 근골격계, 비뇨생식기계 및 뇌신경 등 신체 전반에 걸쳐 변화가 일어난다. 이러한 변화로 인하여 안면 홍조, 발한, 두통, 관절 통증, 요실금, 성교통, 어지러움증, 불안, 과민성, 기억 장애와 같은 다양한 갱년기 증상을 경험하게 된다(2). 갱년기로 인한 에스트로겐 결핍은 일차적으로 골 대사를 증가시켜 파골세포의 활동력 증가, 골 재흡수의 증가로 인한 골 손실을 급속하게 유발하고, 이차적으로는 골 형성 능력이 감소하게 되어 서서히 골 손실이 일어나는 것으로 보고되고 있으며(3), 폐경 후 20년간 골 손실의 75% 이상은 에스트로겐 결핍에서 기인한다(4).

실험동물에서 난소절제는 혈중 에스트로겐 농도를 감소시키는 대표적인 방법으로서 골다공증의 연구에서 광범위하게 이용되고 있으며 골다공증에서 나타나는 골 손실을 유발시키는 인자규명 및 골 손실을 방지하는 요인에 관한 연구가 다양하게 이루어지고 있다. Kimble 등(5)은 흰쥐에서 난소를 절제하면 골의 교환(turnover)이 가속되고 골의 밀도가 현저하게 감소된다고 하며, 연골 또는 골 등의 결합조직을 구성하고 있는 collagen은 난소절제 시 그 함량이 감소하는 것으로 알려져 있다(6). 이러한 골의 손실과정에는 interleukin-1과 interleukin-1의 매개물질이 밀접하게 관련된다고 주장하였으며, Kimble 등(7)은 난소절제 후 초기에 골 손실을 유발하는 인자로 interleukin-1과 tumor necrosis factor(TNF)가 가장 중요하다고 하였다. 또한 Dempster(8)는 난소를 절제한 흰쥐에서 해면골(cancellous bone)의 소실이 유발되었으며 이는 에스트로겐의 감소가 파골세포의 활성을 촉진시키고 다시 골 조직의 연결을 약화시키기 때문이라고 하였다.

최근 해조류가 육상식물과는 달리 물질대사의 경로가 특이하고 새로운 구조를 갖는 생리활성물질을 생산할 수 있다는 기대로 생리활성물질 탐색(9), 항 종양성 및 항 virus성,

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

항 혈액응고, 면역력 증강에 관한 연구(10) 등 다양한 기능이 밝혀지고 있다. 이러한 해조류는 식이성 섬유소인 복합다당류를 다량 함유하고 있을 뿐 아니라 여러 비타민과 무기질이 비교적 풍부하고 그 독특한 맛과 향기가 우수한 알칼리성 기호식품으로서 가치가 높은 것으로 알려져 있다(11). 또한 많은 해조류가 전 세계 다양한 지역에서 전통 약제, 식재료, 건강 보조식품으로 사용되고 있다. 특히, 아시아에서는 식재료, 민간요법 재료 등으로 사용되어 왔으며, 서양에서는 주로 식품이나 의약품에 사용할 polysaccharides(agar, alginates, carageenans)의 원료로 사용되고 있다(12). 최근 해조류의 다양한 생리 · 화학적 효과가 검증되면서 해조류로부터 분리한 생리활성물질에 관심이 고조되었고, 이에 관한 연구가 활발히 진행 중이다(13,14).

본 실험에 사용한 곰피(*Ecklonia stolonifera*)는 다시마목(*Laminariales*) 다시마과(*Laminariaceae*)에 속하는 다년생 갈조류로 한국, 일본 등지에 분포하고 있으며, 우리나라에서는 동해안 특산종으로 부산, 통영, 금호, 월성, 추자도, 거제도, 울릉도, 영일만 등에 서식한다(15). 곰피에 대한 선행연구로는 곰피로부터 분리한 phloroglucinol이 흰쥐의 아세트아미노펜 대사효소활성에 미치는 영향(10) 및 곰피 메탄올 추출물의 xanthine oxidase 저해작용(16)을 들 수 있다. 또한 곰피 메탄올 추출물의 아질산염 소거활성, 항산화 활성에 대한 연구(17)뿐만 아니라, 곰피 에탄올 추출물의 항균활성(18), 항돌연변이 활성(19)에 대한 연구결과도 보고되어 있다. 이와 같이 곰피에 대한 *in vitro* 활성 연구는 선행되어 왔으나 갱년기 장애 시 나타날 수 있는 골 손실에 대한 영향은 연구된 바가 없다.

본 연구에서는 곰피 추출물을 시료로 하여 *in vivo* 실험을 통하여 갱년기 장애 시 나타날 수 있는 골 손실 개선효과를 검토하기 위하여 골 형성 지표인 alkaline phosphatase(ALP) 활성 및 osteocalcin 농도와 골 용해 지표인 C-telopeptide of collagen cross-links(CTx) 및 결합 조직 중의 collagen 함량을 측정하였다.

재료 및 방법

추출물의 제조

본 실험에서 사용한 곰피는 2009년에 전라도에서 채취된 것을 구입하여 물로 8~9회 씻어 염분과 불순물을 제거하고, 동결 건조시켜 분쇄하여 분말화하여 실험에 사용하였다. 건조된 곰피에 80% ethanol 2 L를 가해 3회 열 추출하여 감압농축기로 농축하고 동결 건조한 ethanol 추출물을 증류수에 녹인 후 동물실험에 사용하였다.

실험동물, 사육조건 및 식이조성

평균 몸무게 200 g인 9주령의 Sparaque-Dawley계 암컷 흰쥐를 (주)오리엔트에서 분양 받아 1주일간 적응시킨 후 난소절제 수술을 하였고 비 난소절제 대조군에게는 sham-operation을 실시하였다. 수술 후 1주일간 고형 사료를 주어 상처가 회복되면, 난괴법(randomized complete block design)에 의해 4군으로 나누었다. 즉 실험동물은 난소절제는 하지 않고 같은 수술의 스트레스를 준 비 난소절제 대조군(sham), 난소를 절제한 대조군(OVX-CON), 난소절제 후 곰피 추출물 50 mg/kg 투여군(OVX-ES50), 난소절제 후 곰피 추출물 200 mg/kg 투여군(OVX-ES200)으로 각 7마리씩 4군으로 나누어 1 mL의 시료를 매일 경구 투여하며 6주간 사육하였다(Table 1). 실험기간 동안 식이섭취량과 체중은 매일 일정한 시간에 측정하였다. 동물실험실의 사육조건은 온도 24±2°C, 습도 50~55%를 유지시켰고, 물과 식이는 제한 없이 제공하였다.

Table 1. Experimental design of animals

Group (No)[1)]	Treatment
SHAM (7)	Operated rats
OVX-CON (7)	Ovariectomized rats
OVX-ES50 (7)	Ovariectomized rats supplemented *Ecklonia stolonifera* ethanol extract 50 mg/kg bw/day
OVX-ES200 (7)	Ovariectomized rats supplemented *Ecklonia stolonifera* ethanol extract 200 mg/kg bw/day

[1)]No: Number of rats.

혈액 및 장기 채취

혈액은 실험동물을 해부 전 24시간 절식시킨 후 에테르 마취하에 개복한 후 복대동맥에서 채취하였고, 실온에서 30분간 방치한 후 3,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하여 실험 시까지 -70°C에 보관하였다. 늑골과 연골은 경계면에서 분리하였으며 피부는 털을 잘라내고 표피 위의 지방을 제거하여 무게를 잰 후 실험 시까지 -70°C에 보관하였다.

분석방법

골격 형성 지표인 serum alkaline phosphatase 활성은 측정용 kit를 사용하여 자동생화학분석기 DRY CHEM 3600i (Fujii, Tokyo, Japan)를 사용하여 분석하였다. 혈청 osteocalcin은 rat전용 osteocalcin ELISA kit(Biomedical Technologies Inc., Stoughton, MA, USA)를 이용하여 ELISA reader로 분석하였다. 골 용해 지표인 혈청 중 콜라겐 가교 C-terminal telopeptide(CTx) 농도는 RatLaps ELISA kit (Nordic Bioscience Diagnostics, South Tyneside, England)를 이용하여 측정하였으며 원리는 Type I collagen의 C-terminal telopeptide α1 사슬에 특징적인 polyclonal antibody의 항원 biotinylated EKSQDGGR에 대한 경쟁적 결합을 기본으로 하였다. 결합조직 중의 collagen 함량 측정을 위하여 골, 연골, 피부 및 폐 조직은 각각 200 mg씩 취하여 가수분해(6 N HCl, 110°C, 20 hr)하고 여과, 농축하여 증류수로 시료를 녹인 후 정용하여 실험에 사용하였다. 시료 중의 collagen은 Woessner(20)의 방법으로 colorimetric

method로 hydroxyproline(Hyp)량을 측정한 후, collagen의 아미노산 조성으로부터 collagen량을 환산하였다. Collagen 중의 Hyp의 비율은 평균 110잔기/ 1000잔기이므로 조직 중의 collagen량은 다음의 식에 따라 산출하였다.

$$\text{Collagen } (\mu g/mL) = 100/11 \times \text{Hyp } (\mu g/mL)$$

통계처리

본 실험에 대한 모든 실험의 결과는 mean±SD치로 나타내었고, 통계적 유의성은 SPSS version 17.0 통계 프로그램을 사용하여 하위그룹 각각의 기술 통계치를 산출하였다. 집단 간의 차이는 one-way ANOVA를 이용하여 분석하였고, Duncan's multiple range test를 이용하여 유의수준은 $p<0.05$의 범위에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

실험동물의 체중증가량, 식이섭취량 및 장기중량

난소절제 및 곰피추출물의 투여에 따른 체중변화와 식이섭취량은 Table 2와 같다. 난소절제에 의한 estrogen 분비감소가 체중 증가를 가져온 여러 보고와 마찬가지로(21-23), 본 실험에서도 난소를 절제한 OVX-CON군이 난소를 절제하지 않은 SHAM군에 비해 체중이 증가하였다. 일반적으로 난소절제로 인한 estrogen 분비 부족은 지방조직의 지 단백리파아제(lipoprotein lipase) 활성을 증가시켜 체지방 축적을 억제한다고 알려져 있다(24,25). OVX-CON군이 SHAM군에 비해 체중이 증가하는 것은 여성호르몬 부족으로 인한 체내 지방조직의 증가에 의한 것이며, 또한 지방조직에서도 여성호르몬을 생성할 수 있는 기능을 가지고 있기 때문에, 지방조직에서 난소의 기능을 대체하고자 하는 체내의 비상대책으로 여겨진다. Turner 등(26)은 흰쥐에서 난소를 제거하면 성장속도가 증가하여 체중이 증가된다고 하였고, Mueller와 Hsiao(27) 및 Mook 등(28)의 연구에서도 일치된 결과를 볼 수 있었다. 한편 난소절제 후 곰피 추출물의 영향을 검토한 결과에서, OVX-ES50 및 OVX-ES200군의 체중 증가량을 SHAM군과 비교하였을 때 난소절제에 의해 증가한 체중이 곰피 추출물 투여에 의해 감소하는 경향은 나타나지 않아 곰피 추출물이 체중 감소에는 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. Table 3은 실험동물의 장기 중량을 나타낸 것으로, 자궁 무게의 경우 난소 절제한 OVX-CON군은 SHAM군과 비교해 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 난소절제로 인한 자궁의 퇴화로 인한 것으로 추측되며, 곰피 추출물을 투여한 군도 OVX-CON군과 비슷한 결과를 나타내어 곰피 추출물이 자궁의 무게 변화에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 다른 장기 무게는 각 군 간의 차이를 보이지 않았다.

혈청 중 alkaline phosphatase 활성

Alkaline phosphatase(ALP)는 phosphomonoesterase, phosphodiesterase, phophoric anhydrase 등으로 분류될 수 있는데 phosphomonoesterase의 경우 십이지장이나 장의 점막에 상당히 많은 양이 있으나, 신장, 고등동물의 선(gland), 뼈, 정상적인 혈액에서는 적은 농도로 존재하고 있다. 이와 같이 ALP는 조직 중 다양하게 분포하고 있으며, 세포 외에서 세포 내로의 기질 운반에 관여하고 있다. 조골세포는 ALP를 생성하여 조골 세포막의 소포에 저장하는데, 이중 일부가 혈액 내로 유리되어 나온다(29). 따라서 조직에 이상이 생기거나 골육종(osteosarcoma)의 경우 혈청 내에서 ALP의 활성도가 증가하게 된다(30). ALP는 폐경 시 에스트로겐의 결핍으로 인하여 골 전환이 증가하기 때문에 폐경 후 여성의 골다공증에서 증가하는 양상을 보이며, 성인기 여성에서는 골절과의 관련성을 보여(31) 폐경 전후 여성에게 있어 골 형성의 지표로써 널리 사용되고 있다. Table 4는

Table 2. Body weight gain, food intake and food efficiency ratio of rats supplemented with *Ecklonia stolonifera* ethanol extracts for 6 weeks

Group[1)]	Final body weight (g)	Body weight gain (g/day)	Food intake (g/day)	Food efficiency ratio (FER)[2)]
SHAM	304.0±31.8[3)NS]	4.13±3.09[NS]	18.31±1.56[NS]	0.23±1.53[NS]
OVX-CON	333.0±28.6	5.34±4.41	20.95±2.49	0.25±2.46
OVX-ES50	355.9±17.8	5.02±5.41	21.02±1.83	0.24±1.83
OVX-ES200	358.2±18.3	4.99±3.13	21.25±1.54	0.23±1.56

[1)]Refer to Table 1. [2)]FER: Body weight gain/ Food intake. [3)]Values are mean±SD (n=7).
[NS]Not significantly different.

Table 3. Organ weight of rats on *Ecklonia stolonifera* ethanol extracts supplementation

Group[1)]	Liver	Heart	Lung	Spleen	Adrenal	Kidney	Uterus
SHAM	8.37±0.86[2)NS]	0.93±0.11[NS]	1.18±0.08[NS]	0.50±0.07[a3)]	0.07±0.03[NS]	1.81±0.13[NS]	0.60±0.15[b]
OVX-CON	8.06±0.41	1.01±0.12	1.42±0.14	0.57±0.05[ab]	0.06±0.02	1.74±0.11	0.11±0.01[a]
OVX-ES50	8.32±1.29	0.97±0.10	1.55±0.50	0.59±0.10[ab]	0.07±0.02	1.70±0.11	0.12±0.03[a]
OVX-ES200	7.86±0.63	1.03±0.14	1.42±0.32	0.66±0.13[b]	0.07±0.03	1.77±0.10	0.10±0.02[a]

[1)]Refer to Table 1. [2)]Values are mean±SD (n=7).
[3)]Values with different alphabets are significantly different at $p<0.05$ using Duncan's multiple range test.
[NS]Not significantly different.

Table 4. Effect of *Ecklonia stolonifera* ethanol extracts on serum alkaline phosphatase activities in ovariectomized rats

Group[1)]	ALP[2)] (U/L)
SHAM	299.3±130.6[3)a4)]
OVX-CON	668.7±141.0[b]
OVX-ES50	425.1±193.7[a]
OVX-ES200	324.7±35.0[a]

[1)]Refer to Table 1.
[2)]Alkaline phophatase.
[3)]Values are mean±SD (n=7).
[4)]Values with different alphabets are significantly different at $p<0.05$ using Duncan's multiple range test.

Table 5. Biochemical values of serum indicators of the bone metabolism of rats

Group[1)]	Osteocalcin (ng/mL)	CTx[2)] (ng/mL)
SHAM	18.35±0.80[3)a4)]	17.89±0.30[a]
OVX-CON	20.93±0.32[c]	19.95±0.44[b]
OVX-ES50	20.20±0.65[bc]	19.90±0.38[b]
OVX-ES200	19.68±0.52[b]	18.69±0.51[a]

[1)]Refer to Table 1.
[2)]C-telopeptide of collagen cross-links.
[3)]Values are mean±SD (n=7).
[4)]Values with different alphabets are significantly different at $p<0.05$ using Duncan's multiple range test.

곰피 추출물이 혈청 ALP의 활성에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 난소절제 시 에스트로겐 결핍으로 bone turnover가 증가되어 비 난소절제군에 비해 혈장 중의 ALP 활성이 증가되었으나, 난소 절제 후 곰피 추출물을 투여한 군에서는 그 활성이 유의적으로 감소하는 경향이 나타났다. 이것은 난소절제 후 에스트로겐의 분비가 감소되는 반해 곰피 추출물 투여가 에스트로겐 대체 작용을 함으로써 난소절제로 인한 골 손실 정도를 완화시켜준 것으로 추측되어진다.

혈청 중의 osteocalcin

뼈에서는 조골세포에 의한 골 형성과 파골세포에 의한 골 용해가 반복적으로 발생하고 있으며, 이러한 현상을 통해 끊임없이 뼈의 오래된 부분이 새로운 부분으로 교체되는 재형성(bone remodeling)과정이 활발히 일어난다(32). 최근 골다공증의 임상적 판정을 위한 골 교체의 생화학적 지표인 osteocalcin은 골 기질의 비교원성 단백질 중 15~20%를 차지하고 골 조직에서만 발견되고 골 대사 조절에 관여하는데, 골과 조골세포에서 주로 합성된 후 30%가 골 기질과 결합하며 골 교체에 따른 골 양의 감소를 반영하였다(33). 일반적으로 폐경기 여성에서는 골 교체율이 증가하면서 혈청 osteocalcin 농도가 약 2배 정도 증가한다(34). 본 실험 결과 osteocalcin은 난소를 절제한 OVX-CON군의 경우 난소를 절제하지 않은 SHAM군에 비해 높은 경향을 나타내어 상대적으로 골 중의 osteocalcin 함량이 줄어들었음을 의미하고 있다. 한편 곰피 추출물을 투여한 경우 OVX-CON군보다 혈중 osteocalcin 농도가 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었으나, 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Table 5). 한편, Park 등(35)은 폐경 후 여성에게 있어 혈중 osteocalcin 농도는 40%, deoxypyridinoline은 80%까지 증가하는데, 이는 골 대사에서 골 흡수가 골 형성에 비해 상대적으로 더욱 증가한 것을 의미하며, 따라서 전체적인 골 형성은 노화에 의해 그 비율이 줄어들어 골 중의 osteocalcin은 감소한 것으로 보고하였다. 혈중 osteocalcin은 골 대사가 균형을 유지할 때에는 골 대사 표지자로서 작용하여 폐경 후 증가하는 것으로 나타나고 골 대사가 불균형 시에는 골 형성 표지자로서 작용하여 증가 또는 감소하는 것으로 나타나 폐경 후 혈중 osteocalcin의 증감에 대한 해석이 다르게 나타날 수 있으므로 보다 많은 연구가 추가적으로 이루어져야 할 것으로 생각된다.

C-telopeptide of collagen cross-links(CTx)

혈청 CTx는 골 용해 과정 시 Type I collagen의 분해효소인 cathepsin K에 의해 매개되는 파골세포의 대사산물이다(36). Garnero 등(37)은 폐경 후 여성을 대상으로 한 연구에서 대퇴골 골 밀도를 보정한 후에도 CTx 생성량이 높을 경우 대퇴골의 골절 위험도가 증가하였으며, 특히 폐경 후 골다공증 여성에서 정상군보다 높은 혈청 CTx 수준을 보고하여(29), 혈청 CTx가 골절 위험에 대한 예측인자로도 유용한 지표라 하였다. 본 연구에서도 난소절제군이 비 난소절제군에 비해 높은 CTx 수준을 보여 난소절제군에 있어 골 용해가 증가되었음을 나타내었다(Table 5). 한편 곰피 추출물 50 mg/kg bw/day 투여한 군의 경우 OVX-CON군보다 낮은 CTx 함량을 나타내었으나 유의성이 없는 반면, 200 mg/kg bw/day 투여군의 경우 혈중 CTx 함량이 유의적 감소하였고, 정상군인 SHAM군과 거의 비슷한 결과를 나타내었다. 따라서 이는 난소절제로 인해 bone turnover가 증가된 상태에서 곰피 추출물 투여로 인해 CTx 함량이 점진적으로 감소한 결과로써 곰피의 골 흡수 저해 효과에 의한 것으로 추정된다.

결합조직 중의 collagen 함량

Collagen은 세포 간 결합조직의 주된 구성성분인 경단백질로서 생체 전체 단백질의 50% 이상을 차지하며 생체 내 광범위하게 분포한다. 최소 19종류 이상이 밝혀져 있고 조직이나 장기의 보호 및 생체 조절 기능을 하며, 특히 피부, 연골, 뼈 등 결합조직의 주요한 구성성분으로 전 collagen 양의 40%는 피부, 20%는 뼈와 연골, 그 외 혈관과 내장 등 전신에 넓게 분포하고 있다(38). 여성호르몬인 에스트로겐은 피부 진피층의 섬유아세포를 자극하며 섬유아세포 중의 collagen은 에스트로겐에 의하여 생성량이 증가한다고 알려져 있다(39). 또한 아울러 collagen의 대사에 관여하는 분해효소 matrix metalloproteinase-1(MMP-1)의 발현을 조절하여 collagen의 분해를 억제하며, 에스트로겐이 결핍되면 비정상적으로 골재형성과정이 촉진되고 조직 내의 collagen 손상은 연골 조직의 노화와 골 관절염, 골다공증 병인의 원인이 된다고 한다(40). 본 연구에서는 난소절제로 인하여 에스

Table 6. Effect of *Ecklonia stolonifera* ethanol extracts on collagen content in cartilage, bone, skin and lung of ovariectomized rats

Group[1)]	Cartilage (mg/g)	Bone (mg/g)	Skin (mg/g)	Lung (mg/g)
SHAM	135.51±20.22[2)bc3)]	160.56±19.44[bc]	127.90±27.01[b]	22.46±3.35[b]
OVX-CON	113.88±18.14[a]	146.35±10.74[a]	105.50±30.84[a]	18.32±1.13[a]
OVX-ES50	130.20±23.05[b]	154.87±13.93[ab]	123.40±25.06[ab]	22.14±1.65[b]
OVX-ES200	150.59±12.54[c]	169.08±11.69[c]	139.23±34.22[b]	23.21±1.36[b]

[1)]Refer to Table 1. [2)]Values are mean±SD.
[3)]Values with different alphabets are significantly different at $p<0.05$ using Duncan's multiple range test.

트로겐이 결핍되었을 때 collagen 생성 변화에 있어 곰피 추출물의 영향을 검토하였다(Table 6). 각 결합조직 중의 collagen 함량은 난소절제에 의해 감소하는 경향을 나타내었다. 연골의 경우 난소절제에 의해 감소한 collagen 함량이 난소절제 후 곰피 추출물을 투여한 군에서 증가하였고, 특히 곰피 추출물 200 mg/kg bw/day 투여군인 OVX-EC200군에서 유의적으로 증가하는 결과가 나타났다. 이러한 결과는 폐 조직에서도 비슷한 경향을 나타내었다. 한편 골 및 피부 조직에서도 난소절제에 의해 감소한 collagen 함량이 곰피 추출물 투여에 의해 증가하였고, 정상군인 SHAM군 수준 이상으로 증가하는 결과가 나타났다. 골다공증은 골무기질과 골량이 저하된 상태로 골조직의 미세구조가 변화되거나 그것으로 인하여 골이 유약해져 골절이 되기 쉬운 상태로써 에스트로겐 결핍에 의한 골다공증은 특히 골절이 쉽게 일어날 수 있는 조건이 된다고 한다(41). 이 경우의 에스트로겐 투여는 골의 무기질성분의 증가와 함께 교원섬유의 조성에도 영향을 미쳐서 골절의 예방에 효과를 지닌다고 보고되고 있다(3,4). 이상의 실험 결과 난소절제로 인해 결합 조직 중의 collagen 함량이 감소되었으나 곰피 추출물의 투여에 의해 정상군 수준으로 회복되는 경향을 나타내었다. 이는 estrogen 부족 시 일어날 수 있는 골 손실에 대한 예방 소재로써 곰피의 활용 가능성을 시사하고 있으며, 이를 활용한 기능성 소재 개발도 가능할 것으로 기대된다.

요 약

갱년기 여성에는 여러 폐경 증후들이 나타나는데, 특히 에스트로겐의 감소로 인한 혈중 지질 조성의 변화 등으로 심혈관계 질환의 발병율이 급격히 증가하는 경향을 보이고 있으며, 또한 급격한 골 소실로 인한 골다공증의 위험성이 높아 이에 대한 예방 및 치료에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 본 연구에서는 갈조류인 곰피 추출물을 시료로 하여 *in vivo* 실험을 통하여 갱년기 장애 시 나타날 수 있는 골 손실 개선효과를 검토하기 위하여 골 형성 지표인 alkaline phosphatase(ALP) 활성 및 osteocalcin 농도와 골 용해 지표인 C-telopeptide of collagen cross-links(CTx) 및 결합조직 중의 collagen 함량을 측정하였다. ALP는 폐경 시 에스트로겐의 결핍으로 인하여 골 전환이 증가하므로 골 형성의 지표로써 널리 사용되고 있다. 난소절제 시 에스트로겐 결핍으로 bone turnover가 증가되어 비 난소절제군에 비해 혈장 중의 ALP 활성이 증가되었으나, 난소 절제 후 곰피 추출물을 투여한 군에서는 그 활성이 유의적으로 감소하는 경향이 나타났다. 이것은 난소절제 후 에스트로겐의 분비가 감소되는데 반해 곰피 추출물이 에스트로겐 대체 작용을 함으로써 난소절제로 인한 골 손실 정도를 완화시킨 것으로 추측되어진다. 혈중 osteocalcin은 난소를 절제한 OVX-CON군의 경우 난소를 절제하지 않은 SHAM군에 비해 높은 경향을 나타내어 상대적으로 골 중의 osteocalcin 함량은 줄어들었음을 나타내었다. 곰피 추출물을 투여한 경우 OVX-CON군보다 혈중 osteocalcin 농도가 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었으나, 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 혈중 osteocalcin은 골 대사가 균형을 유지할 때에는 골 대사 표지자로서 작용하여 폐경 후 증가하는 것으로 나타나고 골 대사가 불균형 시에는 골 형성 표지자로서 작용하여 증가 또는 감소하는 것으로 나타나 폐경 후 혈중 osteocalcin의 증감에 대한 해석이 다르게 나타날 수 있으므로 보다 많은 연구가 추가적으로 이루어져야 할 것으로 생각된다. 한편, 골 용해 지표인 혈액 중의 CTx는 난소절제군이 비 절제군에 비해 높은 수준을 보여 난소절제군에 있어 골 용해가 증가되었음을 나타내었다. 반면 곰피 추출물의 투여로 인해 CTx 함량이 감소하였으며, ES200군의 경우 SHAM군보다 높은 수준으로 나타났다. 이는 난소절제로 인해 bone turnover가 증가된 상태에서 곰피 추출물의 투여로 인해 CTx 함량이 점진적으로 감소한 결과로써 곰피의 골 흡수 저해 효과에 의한 것으로 추정된다. 결합조직 중의 collagen 함량은 난소절제로 인하여 감소하였으나, 곰피 추출물의 투여에 의해 회복되는 경향을 나타내었다. 특히 연골 및 폐 조직에서는 난소 절제에 의해 감소한 collagen 함량이 난소 절제 후 곰피 추출물을 투여한 군에서 증가하였고, 곰피 추출물 200 mg/kg bw/day 투여군인 OVX-EC200군에서 유의적으로 증가하는 결과가 나타났다. 한편 골 및 피부조직에서도 난소 절제에 의해 감소한 collagen 함량이 곰피 추출물 투여에 의해 증가하였고, 정상군인 SHAM군 수준 이상으로 증가하는 결과가 나타났다. 이상의 실험 결과는 estrogen 부족 시 일어날 수 있는 골 손실에 대한 예방 소재로써 곰피의 활용 가능성을 시사하고 있으며, 이를 활용한 기능성 소재 개발도 가능할 것으로 기대된다.

문 헌

1. Korea National Statistical Office. 2008. *Lifetable.* Seoul, Korea.
2. Lee KE, Park YJ, Byun SJ, Yoo EK, Lee ML, Lee YS, Lee HK, Chung ES, Cho OS, Choi ES, Han HS. 1997. *Women Health Nursing.* Hyunmoonsa, Seoul, Korea.
3. Johnston CC, Hui SI, Witt RM, Appledorn R, Baker S, Longcope C. 1985. Early menopausal changes in bone mass and sex steroids. *J Clin Endocrinol Metab* 61: 905-911.
4. Richelson LS, Wahner HW, Melton LJ. 1984. Relative contributions of aging and estrogen deficiency to postmenopausal bone loss. *New Engl J Med* 37: 1273-1278.
5. Kimble RB, Vannice JL, Bloedowl DC. 1994. Interleukin-1 receptor antagonist decreases bone loss and bone resorption in ovariectomized rats. *J Clin Invest* 93: 1959-1967.
6. Lee YA, Kim M. 2008. Effects of sea tangle extract on formation of collagen and collagen cross-link in ovariectomized rats. *J Life Sci* 18: 1578-1583.
7. Kimble RB, Matayoshi AB, Vannice JL. 1995. Simultaneous block of interleukin-1 and tumor necrosis factor is required to completely prevent bone loss in the early postovariectomy period. *Endocrinology* 136: 3054-3061.
8. Dempster DW, Birchman R, Xu R. 1995. Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy. *Bone* 16: 157-161.
9. Lee HS, Jin SH, Kim HS, Ryu BH. 1995. Characteristic properties of fucoidan sulfate purified from Gompi, *Ecklonia stolonifera*. *Korean J Food Sci Technol* 27: 716-723.
10. Park JC, Hur JM, Gwon HJ, Kim HJ, Chun SS, Choi JS, Choi JW. 2000. Effects of phloroglucinol isolated from *Ecklonia stolonifera* on the acetaminophen-metabolizing enzyme system in rat. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 448-452.
11. Sung JH, Ha S, Im MH, Im JG, Kang KS. 2002. Seaweed and health. In *Foods and Health.* Hyungseol Press Co, Seoul, Korea. p 190.
12. Cho KJ, Lee YS, Ryu BH. 1990. Antitumor effect and immunology activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Bull Kor Fish Soc* 23: 345-352.
13. Kim SA, Kim J, Woo MK, Kwak CS, Lee MS. 2005. Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extracts from five kinds of seaweeds. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 451-459.
14. Kwon MJ, Nam TJ. 2006. Effects of Mesangi (*Capsosiphon fulvecens*) power on lipid metabolism in high cholesterol fed rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 530-535.
15. Kang JW. 1966. On the geographical distribution of marine algae Korea. *Bull Pusan Fish Coll* 7: 1-125.
16. Kim OK, Lee TG, Park YB, Park DC, Lee YW, Yeo SG, Kim IS, Park YH, Kim SB. 1996. Inhibition of xanthine oxidase by seaweed extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25: 1069-1073.
17. Park YB. 2005. Determination of nitrite scavenging activity of seaweed. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 1293-1296.
18. Kim JH, Lee DS, Lim CW, Park HY, Park JH. 2002. Antibacterial activity of sea-mustard, *Laminaria japonica* extracts on the cariogenic bacteria, *Streptococcus mutans*. *J Korean Fish Soc* 35: 191-195.
19. Ryu BH, Chi BH, Kim DS, Ha MS. 1986. Desmutagenic effect of extracts obtained from seaweed. *J Korean Fish Soc* 19: 502-508.
20. Woessner JF. 1961. The determination of hydroxyproline in tissue and protein sample containing small proportion of this amino acid. *Arch Biochem Biophys* 93: 440-447.
21. Abe T, Chow JM, Lean JM, Chambers TJ. 1993. Estrogen does not restore bone list after ovariectomy in the rat. *J Bone Miner Res* 8: 831-838.
22. Aitken JM, Armstrong E, Anderson JB. 1972. Osteoporosis after oophorectomy in the mature female rat and the effect of oestrogen and/or progesterone replacement therapy in its prevention. *J Endocrinol* 55: 79-87.
23. Wronski TJ, Cintron M, Dann LM. 1988. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 43: 179-183.
24. Ramirez ME, McMurry MP, Wiebke GA, Felton KJ, Ren K. 1997. Evidence for sex steroid inhibition of lipoprotein lipase in men; comparison of abdominal and femoral adipose tissue. *Metabolism* 46: 179-185.
25. Valette A, Meignen KM, Mercier L, Liehr JG, Boyer J. 1986. Effect of 2-fluoroestradiol on lipid metabolism in the ovariectomized rat. *J Steroid Biochem* 25: 575-578.
26. Turner RT, Wakley GK, Hannon KS. 1974. Tamoxifen prevents the skeletal effects of ovarian hormone deficiency in rats. *J Bone Mineral Res* 2: 449-459.
27. Muller K, Hsiao S. 1980. Estrus- and ovariectomy-induced body weight changes: evidence for two estrogenic mechanisms. *J Comp Physiol Psychol* 94: 1126-1134.
28. Mook DG, Kenney NJ, Roberts S, Nussbaum AI, Rodier WI. 1972. Ovarian-adrenal interactions in regulation of body weight by female rats. *J Comp Physiol Psychol* 81: 198-211.
29. Pi YZ, Wu XP, Liu SP, Luo XH, Cao XZ, Xie H, Liao EY. 2006. Age-related changes in bone biochemical markers and their relationship with bone mineral density in normal Chinese woman. *J Bone Miner Res* 24: 380-385.
30. Kim IG, Kim SB, Kim JG, Kim KC. 1993. Serum enzymes as indicators of radiation exposure in rat. *J Radiation Protection* 16: 37-44.
31. Khandwala HM, Mumm S, Whyte MP. 2006. Low serum alkaline phosphatase activity and pathologic fracture: case report and brief review of hypophosphatasia diagnosed in adulthood. *Endocr Pract* 12: 676-681.
32. Cecchettin M, Bellomatti S, Cremonesi G, Solomeno LP, Torrim G. 1995. Metabolic and bone effects after administration of ipriflavone and salmon calcitonin postmenopausal osteoporosis. *Biomed Pharmacother* 49: 465-468.
33. Jang JS. 1987. Bone metabolism and its hormonal regulation. *Current Medical Research and Opinion* 30: 11-15.
34. Kim SJ. 2003. Study on the relationship between osteoporosis-cause factor and bone mineral density, Biochemical Marker. *MS Thesis.* Pukyong National University, Busan, Korea.
35. Park HM, Kim TC, Kim TC, Kang KH, Yoon SJ, Hur M. 2000. The predictive value of changes of bone markers for changes of bone mineral density in postmenopausal hormone replacement therapy with or without active vitamin D. *Korean J Obstetrics Gynecology* 43: 268-274.
36. Bonde M, Garnero P, Fledelius C, Qvist P, Delmas PD, Christiansen C. 1997. Measurement of bone degradation products in serum using antibodies reactive with an isomerized from of an 8 amino acid sequence of the C-telopeptide of type Ⅰ collagen. *J Bone Mine Res* 12: 1028-1034.
37. Garnero P, Hausherr E, Chapuy MC, Marcelli C, Garndjean H, Muller C, Cormier C, Breart G, Meunier PJ, Delmas PD. 1996. Markers of bone resorption predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS Prospective Study. *J Bone Miner Res* 11: 1531-1538.
38. Nakamura YN, Iwamoto H, Ono Y, Nishimura S, Tabata

S. 2003. Relationship among collagen amount, distribution and architecture in the *M. Longissimus thoracis* and *M. pectoralis profundus* from pigs. *Meat Sci* 64: 43-50.
39. Kim MH, Otsuka M, Arakawa N. 1994. Age-related change in the pyridinoline content of guinea pigs cartilage and achilles tendon collagen. *J Nutr Sci Vitaminol* 40: 95-103.
40. Tiki ML, Allison GT. 2003. Malondialdehyde oxidation of cartilage collagen by chondrocyte. *Osteo Arthritis Research Soc Int* 11: 159-166.
41. Clark AP, Schuttinga JA. 1992. Targeted estrogen/progesterone replacement therapy for osteoporosis: calculation of health care cost savings. *Osteoporos Int* 2: 195-200.

(2010년 10월 11일 접수; 2010년 12월 7일 채택)