

갈근 에탄올 추출물이 흰쥐의 항산화계에 미치는 영향

이 옥 희[§]

용인대학교 식품영양학과

Effects of Supplementation of *Puerariae Radix* Ethanol Extract on the Antioxidative Defense System in Rats

Lee, Okhee[§]

Department of Food Science and Nutrition, Yongin University, Yongin 449-714, Korea

ABSTRACT

This study was performed to investigate the effect of *Puerariae radix*-ethanol extracts rich in isoflavone on the antioxidative system of rats. For this purpose, first, *Puerariae radix* was extracted with ethanol, and its total isoflavone and puerarin contents were analysed. Second, female Sprague Dawley rats were fed for 6 weeks with four diets which were based on AIN96G diet and supplemented with *Puerariae radix*-ethanol extracts to contain isoflavone. The isoflavone contents of four experimental diets were 0 mg, 500 mg, 1,000 mg, 2,000 mg per kg diet, respectively (control, P0.05%, P0.1%, P0.2%). Liver and erythrocyte activities of antioxidative enzyme such as superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GSHpx) were measured. Also, plasma and liver malondialdehyde (MDA) concentrations, liver glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) concentrations were measured. The total isoflavone content of *Puerariae radix*-ethanol extract was 3067.6 mg per 100 g extract and the content of puerarin was 2557.4 mg per 100 g extract. The erythrocyte activities of GSH-Px and catalase were higher in group P0.1% and P0.2%. But SOD activity of erythrocyte did not show any difference by the *Puerariae radix*-ethanol extract supplementation in diet. The activity of SOD in liver increased significantly by the supplementation of extract, showing highest level in P0.1% group. The liver GSH concentration increased significantly in group of P0.05%, P0.1%, and P0.2% compared with control group ($p < 0.05$). The GSSG concentration in liver showed no difference by the supplementation of *Puerariae radix* extract from the control group, except P0.2% group. The plasma MDA concentration did not show any significant differences by the extract supplementation. But the liver MDA concentration decreased by the extract supplementation, showing the lowest level in P0.1% diet group. These results suggest that the supplementation of *Puerariae radix*-ethanol extract can inhibit lipid peroxidation in liver and enhance the antioxidative defense competence of rats. (*Korean J Nutrition* 37(10) : 872~880, 2004)

KEY WORDS : *Puerariae radix*, isoflavone, antioxidative system, lipid peroxidation.

서론

각종 만성적 질병의 주요 원인 중 하나는 세포의 산화적 손상이며 이러한 산화적 손상은 신체 내의 유산소적인 대사과정 내에서 생성된 자유기 (free radical)에 의해 일어난다. 인체는 자유기를 제거시켜 생체를 보호하는 방어시스템을 갖고 있으나, 여러 가지 요인에 의해 자유기 생성과 항산화 방어계의 균형이 깨져 조직이 과산화되어 산화적 손

상이 일어나고 이는 만성적 질병 발생의 원인이 된다. 그러므로 생체 조직의 산화적 손상으로부터 보호하기 위해 계속적인 항산화 영양소나 항산화 물질 섭취가 필요하다. 그리하여 최근에는 만성 퇴행성 질병의 예방과 노화를 억제하기 위해 항산화능을 가진 기능성 생리 활성물질에 대해 연구가 집중되고, 특히 isoflavone 등 phytochemical compound에 대해 많은 연구가 제시되고 있다. 이러한 연구의 일환으로 최근에는 콩이나 전통식품을 중심으로 많은 연구가 진행이 되고 있으며 그 중 칩에 대한 관심도 증가하고 있다.

칩 (*Pueraria thunbergiana* BENTH)은 다년생 콩과식물로 우리나라 각지의 산 양지쪽이나 골짜기 같은데 흔히 자

접수일 : 2004년 9월 24일

채택일 : 2004년 11월 25일

[§]To whom correspondence should be addressed.

란다. 쑤의 뿌리 (갈근, 葛根)와 꽃 (갈화, 葛花)은 옛적부터 식용으로 쑤차, 쑤죽, 미숫가루 등에 사용되었고, 약용으로 갈근은 (*Pueraria radix*) 감기, 머리 아픈 데, 땀이 잘 나지 않고 가슴이 답답하고 해갈하는데, 당뇨병, 설사, 이질 등에 약으로 쓰이며, 갈화는 열을 내리고 가래를 잘 나오게 하며 술독을 푸는 데 쓰여 왔다.¹⁾ 그리하여 한방에서 갈근은 고혈압과 관상동맥경화증, 협심증, 노인성 당뇨, 숙취 제거 등에 이용되었다.²⁾ 학술적 연구에서 혈압강화작용, 항염작용, 항산화작용, 알콜해독 및 보간작용 등의 특성이 알려져 있다.³⁻⁸⁾ 갈근의 건강 향상효과에 대한 연구로서 Cho 등,⁹⁾ Kim과 Cho는¹⁰⁾ 에탄올 섭취 흰쥐에서 열수 추출물에 의한 간 손상 지표의 억제 및 알코올 대사 효소의 활성 감소, Glutathione S-transferase (GST) 활성 증가 등을 보고하였다. 그리고 Zheng 등¹¹⁾은 난소 절제된 흰쥐에게 갈근 추출 아이소플라본을 투여하여 혈청 콜레스테롤 저하효과를 관찰하였다. 나이가 낡 중독이나 사염화탄소 투여 동물에서 갈근 열수 추출물 투여에 대한 간 손상지표의 저하나 카테킨 분획에 의한 간장 과산화물 저하 효과가 알려져 있는데,^{6,12)} 갈근에 대한 생리활성 효과에 대한 이러한 연구들은 모두 열수 추출물을 이용한 수용성 추출물의 투여 효과였다.

갈근은 생리활성 물질로 flavonoids 유도체를 많이 갖고 있으며 대부분의 콩과식물처럼 isoflavone을 많이 함유하고 있다. 그러나 갈근 아이소플라본에는 쑤 고유의 아이소플라본인 puerarin이 다량 함유되어 있어^{5,13)} 대두와 아이소플라본 구성에서 차이를 보일 뿐 아니라 함량에서도 차이를 보인다. 일반적으로 식품의 flavonoids나 아이소플라본과 같은 생리활성 물질의 함량이나 구성은 추출 방법에 많은 영향을 받으므로,^{5,14,15)} 추출물의 체내 생리 활성 효과도 추출 방법에 따라 차이를 보일 것이다. 아이소플라본의 경우 estrogenic effect와 항산화능, 혈중 지질수준 저하, 발암억제 가능성 등 다양한 생리활성 특성 및 주요 아이소플라본 성분에 따른 섭취효과가 많이 발표되었는데 대부분의 이러한 연구 결과가 주로 콩을 에탄올이나 메탄올로 추출한 아이소플라본을 사용한 것이었다. 일반적으로 아이소플라본은 ethanol이나 methanol에 용해성이 높아서,¹⁵⁾ 콩의 아이소플라본은 주로 이런 방법으로 추출하지만, 갈근의 경우 아직까지 아이소플라본을 이런 유기용매를 사용하여 추출한 경우는 드물다. 나이가 이 방법을 사용하여 갈근에서 아이소플라본이 풍부한 추출물을 획득하여 투여하여 생리적 효과를 본 연구로는 외국연구에서 알콜 해독효과와 in vitro 상에서 항산화 효과가 알려져 있으나,^{8,13,16)} 실제 식이로 투여하여 체내 항산화 효과를 평가한 연구는 드문 편이다.

따라서 본 연구에서는 노화 및 만성적 퇴행성 질병의 위

험인자로 알려진 자유기를 제거하고 조직의 산화스트레스를 억제할 수 있는 활성 물질을 함유한 전통 식품을 찾기 위해 먼저 갈근을 에탄올로 추출하여 아이소플라본 함량을 분석하고, 그 아이소플라본 함량을 기초로 네가지 수준의 추출물을 식이에 첨가하여 흰쥐의 체내 항산화 효소계에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료 및 갈근추출물 분석

본 실험에 사용한 쑤은 서울시 동대문구 제기동에 소재한 한약 재료상에서 코르크피를 제거하여 절편으로 만들어 건조시킨 국산 쑤뿌리를 구입하여 분말화하였다. 분말화 한 쑤가루 50 g에 10배의 80% ethanol을 가하여 100°C에서 1시간 환류 추출하고 이를 원심분리 (8000 rpm, 20 min, Hanil Mega21R, Korea)한 후 상층액을 취하였다. 이 상층액으로 화학식 증발기 (BUCHI, R-124)를 이용하여 에탄올을 제거하여 아이소플라본이 다량 함유된 가루를 얻었다.

갈근 추출물의 아이소플라본 함량 분석은 Wang과 Murphy의¹⁷⁾ 방법을 보완하여 HPLC를 이용하여 분석하였으며, 이때 isoflavone 표준품 (Fujicco, Koyoto Japan)과 puerarin 표준품 (Sigma, USA)을 사용하였다. 즉 위의 갈근추출물 0.1 g을 정확히 칭량하여 0.1% acetic acid를 포함한 70% 에탄올 수용액 0.5 ml을 가하여 교반한 후 실온에서 24시간 방치하여 추출하였다. 이 상층액을 취하여 membrane filter (0.45 μm, Whatman, Germany)로 여과한 후 HPLC (Young-lin, Korea)로 분석하였다. 이때 column은 ODS A303 (4.6 × 250 mm, YMC, U.S.A)을 사용하고, UV detector 254 nm에서 측정하였고 flow rate는 1.0 ml/min이었다. Solvent 조건은 Table 1과 같다.

2. 실험동물 및 식이

실험동물은 생후 3주 된 Sprague-Dawley 중 암컷 흰쥐를 실험시작 전 1주일동안 고형배합사료 (샘타코, 한국)

Table 1. HPLC solvent system for the determination of isoflavone content of *Puerariae radix* ethanol extract

Time (min)	Solvent composition (%)	
	Solvent A ¹⁾	Solvent B ²⁾
0	15	85
50	35	65
55	35	65
60	100	0
75	15	85

1) Solvent A: 0.1% acetic acid in acetonitrile

2) Solvent B: 0.1% acetic acid in water

Table 2. Composition of experimental diets (g/kg diet)

Ingredients	Experimental groups ¹⁾			
	Control	P0.05%	P0.1%	P0.2%
Cornstarch	529.486	527.316	525.15	520.81
Casein	200	200	200	200
Sucrose	100	100	100	100
Soybean oil	70	70	70	70
Cellulose	50	50	50	50
Mineral mixture ²⁾	35	35	35	35
Vitamin mixture ³⁾	10	10	10	10
L-cystine	3	3	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5
Tert-butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014	0.014
Isoflavone	0	0.5	1.0	2.0

1) Control group, P0.05% group (500 mg isoflavone/kg diet), P0.1% group (1000 mg isoflavone/kg diet), P0.2% group (2000 mg isoflavone/kg diet):

2) Mineral mixture: AIN-96G mineral mixture (g/kg Mix)

3) Vitamin mixture: AIN-96G vitamin mixture (g/kg Mix)

로 적응시킨 후 체중에 따라 난괴법 (randomized complete block design)에 의해 7마리씩 4군으로 나누었다 (Table 2). 실험 시작시 실험동물의 평균체중은 82.6 g 이었다. 실험동물은 한 마리씩 stainless steel cage에 격리하여 사육하였으며 사육실의 온도는 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 조명은 12시간 주기 (07:30~19:30)로 조절하였다. 실험동물은 AIN-96G diet를 기본으로 아이소플라본 함량이 각각 식이 1 kg 당 0 mg, 500 mg, 1000 mg, 2000 mg 되도록 갈근 에탄올 추출물 가루를 첨가한 네가지 실험 식이를 (Control, P0.05%, P0.15, P0.2%) 사용하여 (Table 2) 6주간 사육하였고, 식이와 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

3. 실험동물의 희생 및 장기 채취

실험동물의 혈액은 실험기간 종료 전 12시간 절식시킨 실험동물을 ethyl ether로 마취후 개복하여 주사기로 복부 대동맥에서 혈액을 채취하였다. 채취된 혈액은 EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetate)가 들어있는 원심분리관에 담아 4°C , 3000 rpm에서 20분간 원심분리 (Universal 16R, Hettich, Germany) 하였고, 간은 희생직후 분리하여 생리 식염수에 세척한 후 무게를 측정후 분석 때까지 -30°C 에 냉동보관 하였다.

4. 시료의 생화학적 분석

1) 항산화효소 측정

(1) 적혈구

적혈구의 항산화효소 활성은 적혈구를 적혈구와 동량의

saline으로 두 번 세척한 적혈구 현탁액 100 μl 을 사용하였다.

Glutathione peroxidase (GSH-Px) 활성은 Tappel의 방법을¹⁸⁾ 이용하여 측정하였다. 적혈구 현탁액 100 μl 에 1 mM phosphate buffer 900 μl 를 가하여 희석 한 것을 100 μl 취하여 1.5 ml stock solution (0.25 mM GSH, 0.12 mM NADPH, 1 unit glutathione reductase per milliliter; prepared in Tris buffer)을 가하여 잘 섞은 후 37°C water bath에서 5분간 incubation하였다. 그 후 50 μl 의 Cumene hydroperoxide (1.0 mg/ml)를 넣어 섞은 다음 spectrophotometer (HP 8452, Germany) 340 nm에서 enzyme kinetics를 이용하여 산화형 글루타치온 형성에 따른 NADPH 감소에 따라 흡광도가 감소되는 속도를 3분 동안 측정하였다.

적혈구의 superoxide dismutase (SOD) 활성은 Flohe 등¹⁹⁾의 방법을 사용하여 측정하였다. 적혈구 현탁액 100 μl 에 900 μl 의 1 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)로 희석한 후, 이 중 500 μl 를 취하여 chloroform : ethanol의 부피비가 5 : 3인 용액을 200 μl 넣어 잘 섞은 다음 증류수 100 μl 를 첨가하고 다시 잘 섞어 hemoglobin을 침전시킨 후 11,000 rpm, 4°C 에서 30분간 원심분리 (Universal 16R, Hettich, Germany)하여 그 상등액을 취하여 효소원으로 사용하였다. 그 다음 효소원 50 μl 에 xanthine (Sigma Aldrich)과 cytochrome c (Fe+++)(Sigma Aldrich)가 들어있는 25°C 로 유지된 65 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8) 2 ml를 가하고, 사용 직전에 xanthine oxidase (Sigma Aldrich) 용액을 제조하여 50 μl 첨가시켜 ferricytochrome c의 환원이 방해되는 정도를 spectrophotometer (HP 8452, Germany) 550 nm에서 enzyme kinetics를 이용하여 측정하였다. SOD의 분당 활성 정도는 ferricytochrome c의 환원을 50% 방해하는 SOD의 양을 1 unit으로 나타내었다.

Catalase 활성은 Johansson과 Hankan의 방법을²⁰⁾ 이용하여 spectrophotometer (HP 8452, Germany) 240 nm에서 enzyme kinetics를 이용하여 측정하였다. 적혈구 현탁액 100 μl 에 900 μl 1 mM phosphate buffer로 희석하여 이 중 10 μl 를 취하여 석영 cell에 넣고 50 mM phosphate buffer 660 μl (pH 7.0)와 30 mM buffered H_2O_2 340 μl 를 넣고 잘 섞어 spectrophotometer (HP 8452, Germany) 240 nm에서 enzyme kinetics를 이용하여 측정하였다. 효소의 활성은 1분 동안 1 μmol 의 H_2O_2 를 분해시키는 효소의 양을 1 unit으로 하였다.

(2) 간

GSHpx, SOD와 catalase 활성은 각각 간장조직 0.5 g을 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) 4.5 ml을 넣어 균질화 한 후 2,200 rpm, 4°C에서 10분 원심분리 한 후 상등액을 취하여 다시 9,000 rpm, 4°C 20분 원심분리 (Universal 16R, Hettich, Germany)한 상등액을 효소원으로 사용하여 적혈구와 같은 방법으로 enzyme kinetics를 이용하여 측정하였다.

2) 적혈구, 간의 단백질 정량

적혈구와 간의 총 단백질 분석은 alkaline biuret 시약 (아산제약)을 사용하여 구리 이온이 단백질을 착염하여 형성시킨 청자색을 spectrophotometer (HP 8452, Germany) 540 nm에서 비색정량 하였다.

3) 간조직의 Glutathione 함량 측정

간조직의 환원형 glutathione 함량과 산화형 glutathione 함량의 측정은 Griffith의²¹⁾ 방법에 따라 실시하였다. 간조직 0.5 g에 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) 4.5 ml을 넣어 균질화 시킨 후 3000 g에서 20분간 원심분리 (Universal 16R, Hettich, Germany)하여 단백질이 제거된 상등액을 취하여 시료로 사용하였다. 전체 GSH량 측정에는 상등액을 그대로 시료로 사용하였으며, GSSG량 측정에는 상등액에 2-vinylpyridine를 넣고 잘 섞은 후 1시간동안 방치한 후 시료로 사용하였다. 반응은 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5), 0.2 mM NADPH, 5 mM EDTA, 0.6 mM DTNB 용액에 GSH나 GSSG 시료를 잘 섞은 후 Glutathione reductase 용액을 넣고 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. GSH와 GSSG량은 각각의 표준시료 (Sigma, USA)를 사용하여 standard curve를 만들어 계산하였다.

4) 혈장과 간의 지질과산화물 정도 측정

혈장과 간의 지질과산화물 함량은 Buckingham법²²⁾을 변형하여 malondialdehyde (MDA) 함량을 측정하였다. 혈장 100 µl를 취해 8.1% SDS (Sodium dodecyl sulfate), 20% acetic acid solution, 0.8% 2-thiobarbituric acid (TBA) solution과 증류수를 취하여 잘 섞은 다음 95°C waterbath (BUCHI B-481, Switzerland)에서 60분간 끓인 후 5분간 냉각 후 N-butanol : pyridine의 부피율이 15 : 1인 용액을 2.5 ml 넣어 30초간 격렬히 섞은 후에 3,000 rpm 상온에서 10분간 원심분리 (Universal 16R, Hettich, Germany) 한 다음 10분간 상온에서 안정한 후에 그 상등액을 spectrophotometer (HP 8452, Germany) 532 nm

Table 3. Isoflavone content of *Puerariae radix* ethanol extract analyzed by HPLC (unit: mg/100 g)

Isoflavone	Puerarin	Daidzin	Daidzein	Others	Total
<i>Puerariae radix</i> ethanol extract	2557.4	382.8	23.5	103.7	3067.4

에서 비색정량 하였다. 표준곡선은 1,1,3,3-tetramethoxypropane, (TMP, Sigma Aldrich)를 표준용액으로 반응하여 얻은 곡선을 사용하여 계산하였다. 간의 MDA은 각 각 0.5 g을 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) 4.5 ml을 가하여 균질화시킨 후, 시험관에 이 중 100 µl 취하여 혈장과 같은 방법으로 비색 정량하였다.

5. 통계처리

본 연구의 모든 분석 결과는 SAS program을 이용하여 각 군의 평균과 표준 오차를 계산하였다. 같은 추출물의 급여에 따른 차이의 유의성 검정은 p < 0.05 수준에서 one-way ANOVA와 Duncan의 다중비교법에 의해 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 갈근 에탄올 추출물의 아이소플라본 함량

갈근에탄올 추출물의 아이소플라본 함량은 Table 3에 나타난 바와 같이 에탄올 추출물 100 g당 3067.6 mg을 나타내었다. 그 중 갈근 특유의 아이소플라본인 puerarin 함량은 에탄올 추출물 고형성분 100 g당 2.6% (2557.4 mg)으로 총 아이소플라본 함량의 83.4%나 되어 가장 높은 비율을 나타내었고, daidzin은 추출물 100 g 당 0.38%, daidzein은 0.02%로 나타내어 genistein, daidzein이 주성분인 콩의 아이소플라본 구성과는 많은 차이를 보였다. 한편 한국산 갈근에 대한 아이소플라본 분석 결과를 보면 Oh 등⁵⁾의 연구에서는 갈근을 메탄올로 추출하여 감압농축하고 왁스 성분을 제거한 아이소플라본의 경우 추출물 당 puerarin 0.39%, daidzin 0.45%, daidzein 0.03%의 농도를 관찰하였으며, Kim과 Park은¹⁴⁾ 한국산 갈근 중 daidzin 0.66%, daidzein 0.08%라고 하여 본 연구결과와 많은 차이를 보였다. 이는 재배 품종, 기후조건, 생육시기 등의 요인에 기인된 것으로 생각되며, 특히 분석 방법 및 추출방법에 의해서 성분 함량이 크게 영향을 받았기 때문으로 사료된다.

2. 재중 및 장기의 무게

갈근 추출물 섭취에 따른 간과 신장의 무게는 Table 4에 나타내었다. 갈근 첨가 식이로 6주간 사육한 동물의 최종 체중은 대조군에 비해 낮았고, 갈근 추출물 첨가 수준증가에 따라 최종 체중이 낮았으나, 실험군 간에 유의적 차이는

Table 4. Effects of *Puerariae radix* ethanol extract supplementation on the liver, and kidney weight of rats

Group	Body weight (g)	Liver ¹⁾		Kidney ¹⁾	
		Absolute	Relative	Absolute	Relative
Control	204.9 ± 21.1 ^{ns}	6.46 ± 0.95 ²⁾³⁾	3.15 ± 0.31 ^{ns4)}	1.45 ± 0.15 ^a	0.71 ± 0.03 ^{ns}
P0.05%	193.4 ± 18.6	5.69 ± 0.77 ^{ab}	2.94 ± 0.19	1.31 ± 0.10 ^b	0.68 ± 0.04
P0.1%	192.0 ± 12.3	5.59 ± 0.50 ^b	2.91 ± 0.15	1.35 ± 0.08 ^{ab}	0.71 ± 0.07
P0.2%	187.1 ± 16.4	5.59 ± 0.46 ^b	3.00 ± 0.20	1.30 ± 0.10 ^b	0.70 ± 0.05

1) Absolute: absolute weights of organ (g), Relative: relative weights of organ (g/100 g body weights)

2) Mean ± Standard Deviation

3) Means with different letters within a column are significantly different from each other at p < 0.05

4) NS: not significant at p < 0.05

보이지 않았다. 장기중 간의 무게는 갈근 추출물 섭취에 의해 유의적으로 감소하여 P0.1%, P0.2%군에서 대조군에 비해 유의적으로 낮았으며 (p < 0.05), 신장의 경우에도 갈근 추출물 섭취에 의해 유의적으로 감소하여 P0.2%군에서 가장 낮았다 (p < 0.05). 그러나 체중 100 g당 간과 신장의 무게는 대조군과 유의적 차이를 보이지 않아 성장에는 별다른 영향을 주지 않음을 보였다. 이러한 결과는 갈근 열수 추출물에 의해 식이 섭취량이 낮아 총 체중증가가 낮으나 체중 100 g당 간과 신장의 무게가 대조군과 차이를 보이지 않았던 Lee 등²³⁾의 결과나 아이소플라본 함량이 높을수록 식이 섭취량이 낮아 대조군에 비해 최종 체중 및 간, 신장 등의 장기 무게가 낮았으나 체중에 대한 상대적 장기 무게는 차이를 보이지 않았던 Jung 등²⁴⁾의 연구와 유사한 결과로 이는 갈근 에탄올 추출물 섭취가 성장에 큰 영향없이 체중 감소에 효과적임을 나타낸다. 그러나 Jung의 연구에서 아이소플라본 함량을 식이 1 kg 당 5.0 g, 10.0 g, 20.0 g 수준으로 투여하였지만, 본 연구에서는 식이 1 kg 당 0.5 g, 1 g, 2 g을 첨가하여 Jung 등²⁴⁾의 연구보다 1/10의 낮은 투여 수준이었으며, 추출물의 양으로 비교하여도 훨씬 낮은 투여 수준이어서, 갈근 에탄올 추출물 섭취가 콩의 아이소플라본 섭취보다 체중 감소에 더 효과적이라고 할 수 있었다. 본 연구의 갈근 추출물의 이러한 체중 감소 효과는 puerarin의 효과, 추출물에 함유된 총 아이소플라본과 다른 생리 활성 물질에 의한 복합적 효과, 또는 갈근 추출물 첨가에 따른 식이의 관능 차이 등 다양한 원인에 기인할 것으로 보이나 정확한 유추를 위해서는 갈근 추출물의 각 성분을 분리하여 섭취 효과를 평가하는 연구가 더 필요하다.

3. 갈근 추출물 첨가에 따른 항산화 효소 활성 변화

적혈구의 항산화 효소 활성은 Table 5에 제시하였다. 적혈구의 단백질 1 g당 GSH-Px와 catalase 활성은 갈근 추출물 첨가에 따라 증가하여 P0.1%과 P0.2% 식이군에서 대조군에 비해 유의적으로 높았다 (p < 0.05). 그러나 SOD

Table 5. Effects of *Puerariae radix* ethanol extract supplementation on antioxidative enzyme activities in erythrocyte of rats

Group	SOD	GSH-Px	Catalase
	(U/mgprotein)	(U/mgprotein)	(IU/mgprotein)
Control	12.4 ± 2.4 ^{ns1)3)}	0.42 ± 0.08 ^{b2)}	64.3 ± 18.1 ^{c2)}
P0.05%	14.0 ± 3.3	0.49 ± 0.09 ^{ab}	81.5 ± 23.9 ^{bc}
P0.1%	14.9 ± 2.5	0.54 ± 0.07 ^a	119.1 ± 24.2 ^a
P0.2%	12.4 ± 2.1	0.53 ± 0.08 ^a	91.7 ± 27.2 ^b

1) Mean ± Standard Deviation

2) Means with different letters within a row are significantly different from each other at p < 0.05

3) NS: not significant at p < 0.05

Table 6. Effects of *Puerariae radix* ethanol extract supplementation on antioxidative enzyme activities in liver of rats

Group	SOD	GSH-Px	Catalase
	(U/mgprotein)	(U/mgprotein)	(IU/mgprotein)
Control	7.5 ± 1.6 ^{b1)2)}	0.070 ± 0.011 ^{ns3)}	16.4 ± 4.1 ^{ns}
P0.05%	7.9 ± 1.5 ^{ab}	0.072 ± 0.007	18.7 ± 4.2
P0.1%	9.3 ± 1.0 ^a	0.074 ± 0.007	20.2 ± 4.0
P0.2%	8.6 ± 1.5 ^{ab}	0.074 ± 0.006	19.2 ± 3.7

1) Mean ± Standard Deviation

2) Means with different letters within a row are significantly different from each other at p < 0.05

3) NS: not significant at p < 0.05

활성은 갈근 첨가에 의해 증가하는 경향을 보여 P0.1%식이군에서 가장 높았으나, 대조군과 유의적인 차이는 보이지 않았다.

갈근 에탄올 추출물 급여에 따른 간의 항산화 효소 활성의 변화는 Table 6에 제시하였다. 간 조직의 SOD 활성은 갈근 에탄올 추출물 첨가에 의해 증가하여, P0.1% 식이군의 경우 대조군에 비해 가장 높은 수준을 보였다. 그러나 간의 GSH-Px와 catalase 활성은 갈근에탄올을 추출물 첨가 시 대조군에 비해 증가하여 P0.1% 식이군에서 높은 경향을 보이거나 유의적 차이는 보이지 않았다. 이러한 결과는 Zang과 Fang의 연구에서²⁵⁾ 갈근 추출 아이소플라본을 투여시 in vitro 상에서 간조직의 SOD 활성이 증진된 것과 일치하는 결과이다.

생체 내에는 superoxide radical (O₂⁻), hydrogen pe-

roxide (H₂O₂), hydroxyl radical (OH⁻), singlet oxygen (-O₂), triplet oxygen (3O₂) 및 peroxy radical (ROO⁻) 등 여러 자유기가 에너지 대사 과정 등을 통해 생성되며,^{26,27)} 이들은 결국 인체의 세포막과 세포핵을 공격하여 지질과산화와 DNA 손상을 일으키고, 미토콘드리아 기능의 변화, 독성물질의 형성, 세포내 항산화계 대사의 변화 등을 가져올 수 있다.²⁸⁾ 또한 자유라디칼은 암, 치매 (Alzheimer's disease), 죽상경화증과 같은 질병과 노화를 일으키는 원인으로 알려져 있다.²⁹⁾

이러한 자유 라디칼로 부터 세포를 보호하는 물질로서 체내에는 항산화 효소계 및 항산화물질이 존재하며 이에 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px)와 catalase, 글루타치온, 비타민 E와 C, Zn, Se 등이 있다. 항산화효소인 superoxide dismutase (SOD)는 미토콘드리아와 cytosol에 위치하여 thiol기가 disulfide bonds로 산화됨으로서 발생하는 자유기를 제거한다. 즉 superoxide 유리기가 과산화수소와 분자 상태의 산소로 전환되는 반응을 촉매한다.³⁰⁾ SOD에 의해 형성된 과산화수소는 catalase에 의해서 물과 분자상태의 산소로 분해되어 제거된다. GSH-Px는 세포질과 세포의 미토콘드리아, 혈장 등에 체내 여러 곳에서 발견되며 환원형 글루타치온을 산화시키거나 지질 hydrogen peroxide를 hydroxy acid로 전환시키면서 hydrogen peroxide를 제거하여 지질 뿐 아니라 지질이 아닌 과산화물 감소에도 중요한 역할을 한다. GSH-Px와 catalase 두 효소 모두 과산화수소를 억제하는 역할을 하지만, GSH-Px는 catalase보다 낮은 농도의 과산화수소에 대해서 더 큰 친화성을 가지고 있다. 이 두 효소는 적혈구 내에 과산화수소 축적을 억제하여 hemoglobin이 methemoglobin으로 빨리 산화되는 것과 세포막이 손상되는 것을 막아 적혈구 수명을 유지하게 한다. 또한 이러한 항산화 효소는 자유기에 의한 손상을 회복시키거나 다른 항산화 영양소를 재생시키는데 특히 세포막의 손상된 지방을 대사시켜 다른 지방산으로 대체시키거나 비타민 E나 C를 재생시키는 것을 촉진한다.³¹⁾ 본 연구 결과는 Zhang과 Fang의 연구에서²⁵⁾ 토끼에게 chacolone으로 뇌 조직 손상을 유도하여 생긴 뇌와 혈액의 SOD 활성 감소가 갈근 아이소플라본 투여에 의해 회복되며 이때 갈근 아이소플라본 투여에 따른 회복은 투여 용량에 의존하였던 결과와 유사하다. 그리고 에탄올 투여한 흰쥐에 씹 열수 추출물을 급여하였을때 뇌조직 SOD와 GST 활성이 증가한 연구결과나, 씹에서 추출한 카테킨이 사염화탄소를 투여한 흰쥐의 간장 과산화물가의 형성을 유의하게 감소한 결과 등 이미 제시한 여러 선행연구 결과와^{6,10)} 유사하였다. 한편 본 연구 결과는 적절한

식이를 섭취하고 있는 상태에서도 아이소플라본이 다량 함유된 갈근에탄올 추출물 첨가는 적혈구와 간의 항산화 효소 활성을 촉진하고 혈장의 지질과산화물을 억제할 수 있음을 보였다. 이러한 갈근 추출물의 건강한 동물의 항산화 효소 활성에 대한 섭취효과는 조직에 따라 차이를 보여 적혈구의 경우 hydrogenperoxide, 간조직의 경우 superoxide radical 억제에 효과적임을 보였다. 이러한 사실은 Lee 등⁷⁾의 연구에서 건강한 동물에 갈근 열수 추출물을 투여시 간의 SOD와 GSHpx 활성에는 영향주지 않았지만 catalase 활성은 증가한 결과와 차이를 보인다. Lee 등⁷⁾의 결과는 이미 제시한 바와 같이 갈근의 열수추출물을 사용하였고, 섭취량도 평균식이 섭취량이 11.88 g일 때 갈근 열수추출물 (고형분) 평균 2.4 g으로 식이 섭취량의 16.8%나 되는 많은 양의 열수 추출물 섭취에 따른 효과이나, 본 연구에서는 식이 1 kg 당 갈근 추출물 섭취 수준이 2.17 g (P0.05%), 4.34 g (P0.1%), 8.68 g (P0.2%)의 훨씬 낮은 수준이었지만 SOD 활성이 유의적으로 증가하였고 catalase 및 GSHpx 활성도 증가하는 경향을 보였다. 따라서 갈근 열수 추출물 섭취 보다는 갈근 에탄올 추출물 섭취가 간조직의 항산화방어능 증가에 더 효과적이며, 특히 간의 superoxide radical 제거에 더 효과적인 것으로 사료된다. 이는 본 연구에서 갈근 에탄올 추출물을 사용하므로써 갈근 특유의 아이소플라본이 많이 함유된 점이 반영된 것으로 추정되나, 그 기전은 본 연구로써는 유추하기 어려우며 더 심도 깊은 연구가 필요하다.

4. 간의 Glutathione 함량 및 GSH/GSSG 비율

간조직의 환원형 글루타치온인 GSH, 산화형 글루타치온인 GSSG 함량과 두 물질간의 몰 농도비는 Table 7에 나타내었다. 간조직 1 g당 GSH함량은 대조군에 비해 P0.05%, P0.1%와 P0.2% 식이군에서 유의적으로 높아, 갈근의 에탄올 추출물 섭취가 환원형 글루타치온에 영향줄 수 있음을 보였다. 간장 조직의 산화형 글루타치온인 GSSG농도는 대조군에 비해 갈근 추출물 섭취시 P0.2% 식이군에서만 유의적으로 높았고 다른 첨가 수준은 대조군과 차이를 보이지 않았다. 일반적으로 조직의 GSH수준은 몇 가지 효소에 의해 조절되며 GSHpx에 의해 산화형 글루타치온 (GSSG)이 되고 GSSG는 glutathione reductase (GSHrx)에 의해 GSH로 환원된다. 이와 같이 간장 GSSG 수준은 GSHpx 활성에 의존하므로 P0.2% 식이군에서 높은 GSSG 수준은 본 실험에서 조사한 항산화효소 활성 결과판으로 설명하기 어렵다. 본 결과는 다만 건강한 식이를 섭취하는 동물에서 과다한 갈근 에탄올 추출물 섭취는 산화형 글루타치온 생성을

Table 7. Effects of *Puerariae radix* ethanol extract supplementation on GSH and GSSG concentration in liver of rats fed experimental diets

Group	GSH (umol/g liver)	GSSG (umol/g liver)	GSH/GSSG
Control	10.59 ± 7.86 ^{a1)2)}	2.09 ± 0.65 ^c	5.11 ± 1.43 ^{ns3)}
P0.05%	13.55 ± 3.45 ^b	2.32 ± 0.50 ^{ab}	5.22 ± 0.92
P0.1%	14.14 ± 1.74 ^b	2.83 ± 0.72 ^{ab}	5.92 ± 1.08
P0.2%	17.99 ± 2.89 ^c	2.96 ± 0.61 ^a	6.22 ± 0.97

1) Mean ± Standard Deviation

2) Means with different letters within a row are significantly different from each other at $p < 0.05$ 3) NS: not significant at $p < 0.05$

증가시킬 수 있음을 보여 주는 것으로 사료된다. 간 조직의 GSH와 GSSG의 몰 농도비는 갈근 추출물 섭취에 의해 대조군과 유의적 차이를 보이지 않았지만 증가하는 경향을 보였다.

조직의 글루타치온 (GSH)은 비효소적 항산화 방어기구의 하나로 유전자 발현, DNA와 단백질 합성, 세포 증식 및 apoptosis, 세포신호전달체계, cytokine 생산과 면역반응, 효소활성 조절, 활성 산소나 자유기에 의한 세포손상 예방, 약 대사물 해독화 등에 직간접으로 관여한다.³²⁻³⁴⁾ 조직의 GSH 수준은 항산화 상태와 산화적 스트레스의 영향을 나타내고,³⁵⁾ GSH 함량이 낮을 경우 산화스트레스를 초래하여 세포손상 및 독성에 대한 민감도가 높아지게 되므로, 체내 GSH 함량의 감소는 노화를 촉진할 뿐 아니라, 간질환, AIDS 및 당뇨병, Alzheimer, 암, heart attack 등 각종 질병의 발병에 관여한다고 알려져 있다.^{32,34,36)} 나이가 글루타치온의 환원형과 산화형 (GSH/GSSG)은 동물 세포의 주요 redox couple로써 redox potential 조절에 중요한 역할을 하며,³⁷⁻³⁹⁾ GSH/GSSG 몰비는 세포의 항산화 방어능을 나타낸다.⁴⁰⁾ 세포의 GSH 수준과 GSH/GSSG농도 비는 NF- κ B에 영향 주는 세포신호전달체계를 구성하여 각종 cytokine이나 adhesion molecule형성과 염증반응에 영향을 주므로,⁴⁰⁾ 항산화 방어능을 증가시키기 위해서는 GSH 수준과 GSH/GSSG 농도 비 증가가 필요하다. 본 연구에서 갈근 추출물 투여에 의해 건강한 실험군에서 간의 산화형과 환원형 글루타치온의 농도비는 유의적으로 증가하지 않은 점은 간의 항산화 효소계 항상 효과나 간의 환원형 글루타치온 (GSH) 수준의 증가와 일치하지는 않으나, 비슷한 경향을 보이는 점은 건강한 식이에 갈근 에탄올 추출물 섭취는 간의 항산화방어능을 향상시킬 것으로 추정되지만 명확하게 증가시킨다고 할 수는 없었다.

5. 갈근 추출물 급여에 따른 MDA 함량

아이소플라본이 풍부한 갈근 추출물 섭취에 의한 지질

Table 8. Effects of *Pueraria radix* ethanol extract supplementation on MDA concentrations in plasma and liver of rats

Group	Plasma (nmol/ml)	Liver (nmol/g)
Control	24.7 ± 1.8 ^{a1)2)}	64.4 ± 3.7 ^a
P0.05%	22.9 ± 0.6 ^b	63.6 ± 4.0 ^a
P0.1%	23.4 ± 0.8 ^b	55.6 ± 2.9 ^b
P0.2%	22.2 ± 0.5 ^b	56.7 ± 4.9 ^b

1) Mean ± Standard Deviation

2) Means with different letters within a row are significantly different from each other at $p < 0.05$

과산화를 억제하는 효과를 평가하기 위해 각 실험 식이군의 혈장과 간의 MDA수준을 측정하였다 (Table 8). 혈장 MDA농도는 대조군의 24.7 nMol/ml에 비해 갈근 추출물 섭취에 의해 유의적으로 감소하여 P0.2% 식이군에서 가장 낮은 수준을 보였다. 간조직 1 g당 MDA 수준은 갈근 추출물 섭취에 의해 유의적으로 감소하여 대조군에서 64.4 nMol/g을 나타낸 반면에, P0.1% 식이군에서는 55.6 nMol/g을 나타내어, 간 조직 지질과산화물 수준이 약 14% 정도 차이를 보였다.

지질 과산화반응은 생체 조직막의 다가 불포화 지방산이 유리기에 의해 산화적 분해를 일으키는 것으로, 지표로 MDA 수준을 사용하며 이의 증가는 산화 스트레스의 증가를 나타낸다. 이는 결과적으로 생체막의 기능저하, 유동성 감소, 항상성 유지 장애 등을 초래하여 당뇨병, 동맥경화증, 암과 같은 만성적 성인병 발생의 주요한 요인이 되고 있으며 특히 노화과정과 관련성이 알려져 있다. 간의 MDA수준 증가는 여러 가지 독성화합물이나 약물에 의한 간손상 기전으로 세포의 산화적 스트레스로 인한 자유기 증가 및 항산화방어능 감소에 의해 초래된다.⁴¹⁾

Zhang과 Fang에²⁵⁾ 의하면 갈근에서 추출한 아이소플라본을 in vitro 상에서 마우스와 토끼의 조직에 투여하였을 때 간조직의 지질과산화물 생성을 80%나 억제하였고, 추위에 의해 뇌의 손상을 유도하여 증가된 지질과산화물 수준도 감소시킬 수 있음을 보였다. 이미 제시한 바와 같이 본 연구에서 나타난 간 조직의 SOD 활성 증진이나 MDA 농도 감소는 이러한 in vitro 상에서 나타난 항산화 효과와 일치한다. 한편 고지방 식이를 섭취한 흰쥐에게 갈근 열수 추출물을 주었을 때 고지방식이군의 간과 혈청의 지질과산화물의 증가된 지질과산화물 수준 뿐 아니라 정상식이군의 지질 과산화물 수준도 갈근추출물 첨가에 의해 저하시킬 수 있었던 결과와 유사하다.⁷⁾ 그리고 갈근에서 추출한 카테킨이 사염화탄소를 투여한 흰쥐의 간장 과산화물가의 형성을 유의하게 감소한 결과⁶⁾ 등 여러 선행연구들의 결과와 일치하였다. 본 연구에서 갈근 에탄올 추출물 투여에 의해 간의

환원형 글루타치온 수준이 증가한 반면 MDA수준은 감소하였는데 이는 글루타치온 수준 증가와 같이 방어기구가 강화되면 지질과산화 수준은 감소한다는 선행 연구결과와²⁰⁾ 일치한다. 그러나 Lee 등의 연구에서는²⁷⁾ 에탄올에 증독된 식이군에서 갈근 열수 추출물 첨가는 간의 지질과산화물 증가를 낮추었지만 정상 식이군 동물에서는 간조직의 지질과산화물 수준을 감소시키지는 못하였다. 본 연구에서는 이의 연구보다 식이로 에탄올 추출물 섭취수준이 훨씬 낮음에도 간의 MDA 수준이 감소됨을 보였다. 이러한 점은 갈근의 경우 열수 추출물보다 에탄올 추출물이 간의 지질과산화 억제에 더 효과적임을 나타낸다고 사료된다. 갈근에 대한 생리적 활성을 본 대부분의 연구가^{7,9,23)} 주로 열수 추출을 사용하였으나, 본 연구에서 아이소플라본이 잘 용해되는 에탄올을 사용한 추출물을 사용하였으며, 또한 다른 선행 연구와 달리 건강한 식이군에 각각 추출물 수준을 다르게 함으로써 갈근 특유의 아이소플라본이 다량 함유된 추출물의 영향을 수준에 따라 관찰할 수 있었다.

본 연구 결과에 따르면 건강한 실험동물에서 갈근 추출물 투여는 간장의 항산화효소 활성을 증가시키고, 지질과산화를 억제할 수 있어 갈근 에탄올 추출물의 보간 기능과 항산화계에 대한 효과를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 갈근 에탄올추출물에 풍부히 함유된 아이소플라본에 의한 항산화효과가 주요 요인으로 사료되며, 특히 칩 고유의 아이소플라본인 puerarin의 효과가 많이 반영된 것으로 사료된다. 그러나 갈근추출물에는 saponine이나 다른 생리활성 물질도 함유되어 있으므로 이와 같은 유추를 위해서는 추출물의 구성 분석을 얻어 각각의 분석에 따른 효과 비교도 필요하다.

요약 및 결론

본 연구에서는 갈근 에탄올 추출물의 기능성을 평가하기 위해 먼저 갈근을 에탄올로 추출하여 총 isoflavone 함량을 분석한 후, S.D.계 백서를 AIN96G diet를 기본으로 추출물의 첨가수준을 달리한 네 가지 식이로 6주간 사육하였다. 이 때 갈근 추출물 수준은 식이 1 kg당 isoflavone 함량이 0%, 0.05%, 0.1%, 0.2%가 되도록 첨가하여, 적혈구와 간장의 항산화 효소 활성, 간의 글루타치온 함량, 지질과산화에 미치는 영향을 평가하였다.

갈근에탄올 추출물의 isoflavone함량은 추출물 100 g당 3067.6 mg를 나타내었으며, puerarin 함량이 2557.4 mg/100 g로 전체 isoflavone 중 83.4%를 차지하였다. 적혈구의 GSH-Px와 catalase 활성은 대조군에 비해 갈근 추출

물을 첨가한 P0.1%식이군과 P0.2%식이군에서 유의적으로 높았고 SOD 활성은 모든 식이군 간에 유의적 차이를 보이지 않았다. 간의 SOD활성은 갈근 추출물 첨가에 의해 증가하여 P0.1% 식이군에서 가장 높았으며 GSH-Px와 catalase 활성은 갈근 추출물 급여에 유의적 차이를 보이지 않았다. 간의 MDA수준은 갈근 추출물 급여에 의해 감소하였고, 간의 환원형 글루타치온 수준은 갈근 추출물 투여량 증가에 의해 유의적으로 증가하여 항산화 방어능의 증가를 보였다. 결론적으로 본 연구 결과는 puerarin과 아이소플라본을 다량 함유한 갈근 에탄올 추출물의 섭취는 낮은 수준의 갈근 추출물 섭취수준에서도 생체내 항산화 효소의 활성과 내인성 비효소적 항산화계를 증진시킬 수 있음을 보였다.

□ 감사의 글

본 연구는 용인대학교 교내 연구비에 의해 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

Literature cited

- 1) Lee SJ. Bonchokungmok, Komunsa Seoul, vol. 18, p.537, 1980
- 2) Huh J. Donguibokam, Mansandong Seoul, vol. 3, p.726, 1984
- 3) Zeng GY, Cheng YS, Fan LL, Zhou YP, Zhang LY. Pharmacologic studies on Radix puerariae: effects of puerariae flavones on coronary circulation, cardiac hemodynamics and myocardial metabolism in dogs. *Chinese Med J* 95(2) : 145-150, 1982
- 4) Huh LH, Kim HC, Lee SJ. Studies on anti-inflammatory activity and its mechanism of daidzein. *J Pharmaceut Soc Kor* 31(1) : 154-163, 1987
- 5) Oh MJ, Lee KS, Son HY, Kim SY. Antioxidative Components of Pueraria Root. *J Kor Soc Food Sci Tech* 22(7) : 793-792, 1990
- 6) Lee CH, Han SH, Min SG. The effects of *Puerariae radix* catechins administration on liver function in carbon tetrachloride-treated rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 24(5) : 713-719, 1995
- 7) Lee JS, Kim ES, Kim SW. Effects of extract of *Puerariae radix* on lipid peroxidation in ethanol-administered rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28(4) : 901-906, 1999
- 8) Lin RC, Guthrie S, Xie CY, Mai K, Lee DY, Lumeng L, Li TK. Isoflavone compounds extracted from *Pueraria lobata* suppress alcohol preference in a pharmacogenetic rat model of alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 20(4) : 659-663, 1996
- 9) Cho SY, Chang JY, Kim MJ. Effects of *Puerariae flos* and *radix* water-extracts on levels of several serum biomarkers in ethanol-treated rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30(1) : 92-96, 2001
- 10) Kim MJ, Cho SY. *Puerariae thubengiana* Benthams extract on brain tissue in alcohol-treated rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29(4) : 669-675, 2000
- 11) Zheng G, Zhang X, Zheng J, Gong W, Zheng X, Chen A. A Hypocholesterolemic effect of total sioflavones from *Pueraria labata* in ovariectomized rats. *Zhong Yao Cai* 25(4) : 273-275, 2002

- 12) Lee JS, Kim MJ, Park YM. Effects of extract of *Puerariae radix* on hematological properties and lead level of the tissue of the Pb-administered rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26(3) : 448-493, 1997
- 13) Guerra MC, Speroni E, Broccoli M, Cangini M, Pasini P, Minghetti A, Crespi-Perellino N, Mirasoli M, Cantelli-Forti G, Paolini M. Comparisons between chinese medical herb *Pueraria lobata* crude extract and its main isoflavone puerarin antioxidant properties and effects on rat liver CYP-catalyzed drug metabolism. *Life Sci* 67(24) : 2997-3006, 2000
- 14) Kim MH, Park SB. Studies on the Content of *Pueraria Radix* in the Tea by HPLC. *J Food Hygiene Safety* 2(3) : 89-95, 1987
- 15) Kim JY, Maeng YS, Lee KY. Antioxidative Effects of Soybean Extracts by using Various Solvents. *J Kor Soc Food Sci Tech* 27(5) : 635-634, 1995
- 16) Keung WM, Vallee BL. Kudzu root: an ancient chinese source of modern antidipsotropic agents. *Phytochemist* 47(4) : 499-506, 1998
- 17) Wang H, Murphy PA. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa. Effects of variety, crop year and location. *J Agric Food Chem* 42: 1674-1677, 1994
- 18) Tappel AL. Glutathione peroxidase and hydroperoxidase. *Methods Enzymol* 52: 506-513, 1978
- 19) Flohe L, Becker R, Brigelius R, Lengfelder E, Otting F. Convenient assays for superoxide dismutase. In: Miquel J, Quintaniha AT, Weber H. eds. CRC Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine, pp.287-288, 1992
- 20) Johansson LH, Hanken Borg LA. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem* 174(1) : 331-336, 1988
- 21) Griffith OW. Metabolites 3: Lipids, Amino acids, and related compounds, In: Bergmeyer, H.U., Bergmeyer J., Grabi M. eds. Method of Enzymatic Analysis, Vol. VIII. Weinheim, Verlag Chemie, 1985
- 22) Buckingham KW. Effect of dietary polyunsaturated/saturated fatty acid ratio and dietary vitamin E on lipid peroxidation in the rat. *J Nutr* 115: 1425-1435, 1985
- 23) Lee JS, Kim KH, Kim JH. Effects of extract of *Puerariae radix* on lipid metabolism in rats fed high fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28(4) : 218-224, 1999
- 24) Jung MY, Bang MH, Seol SM, Kim WK. The effects of isoflavone on lipid metabolism and immune response in SD rats. *Kor J Nutr* 35(6) : 635-642, 2002
- 25) Zhang G, Fang S. Antioxidation of *Pueraria lobata* isoflavones (PLIs). *Zhong Yao Cai* 20(7) : 358-360, 1997
- 26) Ji LL, Fu R. Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. *J Appl Physiol* 72(2) : 549-554, 1992
- 27) Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 75(1) : 139-162, 1994
- 28) Dekkers JC, van Doornen LJ, Kemper HC. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Med* 21(3) : 213-238, 1996
- 29) Sen CK. Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol* 79(3) : 675-686, 1995
- 30) Fridovich I. Superoxide radicals, superoxide dismutases and the aerobic lifestyle. *Photochem Photobiol* 28(4-5) : 733-741, 1978
- 31) Gutteridge JMC, Halliwell B. Antioxidants in nutrition, health, and disease. Oxford, Oxford University Press, 1994
- 32) Leeuwenburgh C, Ji LL. Alteration of glutathione and antioxidant status with exercise in unfed and refed rats. *J Nutr* 126: 1833-1843, 1995
- 33) Jefferies H, Coster J, Khalil A, Bot J, McCauley RD, Hall JC. Glutathione. *ANZ J Surg* 73(7) : 517-522, 2003
- 34) Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134: 489-492, 2004
- 35) Casini AF, Pompella A, Comporti M. Liver glutathione depletion induced by bromobenzene, iodobenzene, and diethylmaleate poisoning and its relation to lipid peroxidation and necrosis. *Am J Pathol* 118(2) : 225-237, 1985
- 36) Guarino MP, Alfonso RA, Raimundo N, Raposo JF, Macedo MP. Hepatic glutathione and nitric oxide are critical for hepatic insulin-sensitizing substance action Am J Physiol Gastrointest. Liver Physiol 284: G588-G594, 2003
- 37) Jones DP, Carison JI, Mody VC, Cai J, Lynn MJ, Sternberg P. Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med* 28(4) : 625-635, 2000
- 38) Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30(1) : 1191-1212, 2001
- 39) Rahman I, MacNee W. Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches. *Free Radic Biol* 28(9) : 1405-1420, 2000
- 40) Exner R, Wessner B, Manhart N, Roth E. Therapeutic potential of glutathione. *Wien Klin Wochenschr* 112(14) : 610-616, 2000
- 41) Thurman RG, Bradford B, Limuro Y, Knecht K, Conner H, Adachi Y, Wall C, Arteeel G, Releigh J, Forman D, Mason RP. Role of kupffer cells, endotoxin and free radicals in hepatotoxicity due to prolonged alcohol consumption: studies in female and male rats. *J Nutr* 127: 903S-906S, 1997
- 42) Yoon YH, Rhee SJ. Effects of Korean green tea, oolong tea and black tea beverage on the antioxidative detoxification in rat poisoned with cadmium. *Kor J Nutr* 27: 1007-1017, 1994