

고지방고콜레스테롤식이를 섭취한 흰쥐에서 식물성식품의 혼합물 첨가로 인한 체내 항산화능 증가 효과*

곽충실^{1)§} · 김미연²⁾ · 이미숙³⁾

서울대학교 의학연구원 체력과학노화연구소, ¹⁾ 이화여자대학교 식품영양학과, ²⁾ 한남대학교 식품영양학과³⁾

Antioxidative Effect of Plant Food Mixtures in Rat Fed on High Fat-High Cholesterol Diet*

Kwak, Chung Shil^{1)§} · Kim, Mee Yeon²⁾ · Lee, Mee Sook³⁾

Aging and Physical Culture Research Institute, ¹⁾ Medical college of Seoul National University, Seoul 110-810, Korea
Department of Food and Nutrition, ²⁾ Ewha Woman's University, Seoul 120-750, Korea
Department of Food and Nutrition, ³⁾ Hannam University, Daejeon 306-791, Korea

ABSTRACT

The previous extensive *in vitro* studies on the antioxidative activities of a number of Korean grains, vegetables, seaweeds and mushrooms, and the various combinations of these food source exhibited a wide range of antioxidative activities, and four food mixtures composed of 5 kinds of foods (5A, 5B, 5C and 5D) were designed from 16 selective foods showing high antioxidant effect, *in vitro*, to find the good combinations for the meal planning. Mixture 5B or 5C contained very high levels of total flavonoid and polyphenol, and ethanol extract from 5A, 5B or 5C showed very strong inhibitory effects against *in vitro* Fe²⁺-induced lipid peroxidation and ethanol extract from 5B or 5C showed remarkable DPPH radical scavenging effect and lipid peroxide-protein conjugation inhibition effect. And *in vivo* study was also carried out with two mixtures (5B, 5C). Powders (P5B, P5C) or ethanol extracts (E5B, E5C) of these mixtures were supplemented to Sprague-Dawley rats fed on high fat (15%)-high cholesterol (1%) semipurified diet for 5 weeks. The total antioxidant power in serum was significantly higher in P5B, P5C, E5B and E5C groups than in high fat control group, and ascorbate-Fe²⁺-induced TBARS was significantly lowered by E5B supplementation in rat liver. In liver tissue, Cu, Zn-SOD activity was significantly higher in P5B and E5B groups than in high fat control group, while catalase or GSH-peroxidase (GPx) activity was not changed by any supplementations. In kidney, Cu, Zn-SOD activity was significantly higher in P5B group than in high fat control group, while GPx activity was not changed by any supplementations. Taken together, mixture 5B and 5C showed very strong antioxidative effects both *in vitro* and *in vivo*. Therefore, the ingredient Korean foods of 5B and 5C could be recommended to take a lot together for prevention from age-related chronic diseases. (*Korean J Nutrition* 38(5): 352~363, 2005)

KEY WORDS : food mixture, ethanol extract, total antioxidant power, ascorbate-Fe²⁺-induced TBARS, lipid peroxide-protein conjugation.

서 론

자유라디칼에 의한 세포 및 조직의 산화적 손상은 노화

의 생체학적 변화 과정과 많은 노인성질환들의 병태학적 변화 과정에 깊은 관련을 갖고 있는 것으로 잘 알려져 있다. 과도한 산화적 스트레스 상태가 지속될 경우 심혈관질환, 당뇨, 암, 신경질환과 같은 만성퇴행성질환 및 노화를 촉진하는 것으로 밝혀졌으며,¹⁻³⁾ 여러 역학적 조사연구나 임상연구 결과 항산화영양소가 많은 채소 및 과일류의 섭취가 많을수록 노화로 인한 기능저하 및 만성질환의 발병이 낮은 것으로 보고되었다.⁴⁻⁷⁾ 또한 Cutler⁸⁾는 포유동물에서 수명과 체내 항산화수준과 정의 상관관계가 있으며, 특히 superoxide dismutase (SOD)와 carotenoid, α-tocopherol,

접수일 : 2005년 2월 4일

채택일 : 2005년 5월 23일

*This work was supported by the grants from Agricultural R & D Promotion Center through the Aging and Physical Culture Research Institute, and Korea Science and Engineering Foundation (R II-2002-001-01-001) through the Aging and Apoptosis Research Center at Seoul National University.

§To whom correspondence should be addressed.

E-mail : kwacs@snu.ac.kr

uric acid가 체내 항산화시스템에 매우 중요한 역할을 한다고 하였다.

근래 들어 다양한 채소류 및 허브 등에 많이 들어 있는 phytochemical의 다양한 생리활성효능이 속속 밝혀짐에 따라 전 세계적으로 자국에서 상용하는 식물들에 대한 관심과 연구가 증폭 되고 있다.⁹⁻¹²⁾ 콩에 많이 함유되어 있는 isoflavone은 에스트로젠과 유사한 효능을 갖고 있어 여성의 갱년기 증세를 완화하고 골다공증을 예방하는 것으로 잘 알려져 있으며,¹³⁾ 포도의 resveratrol은 강한 항산화물질로 항암 및 심장병 예방효과를 나타내고,¹⁴⁻¹⁶⁾ 고추의 매운 맛을 내는 capsaicin도 항산화능이 있으며 비만억제효과, 항염작용 및 항암작용을 보이고,^{17,18)} 녹차의 항산화 물질인 epigallocatechin gallate (EGCG)는 혈청지질저하효과와 항암효과를,¹⁹⁾ tumeric에 함유되어 있는 curcumin²⁰⁾과 생강의 gingerol 등²¹⁾은 항암효과를 나타내는 것으로 보고 되었다.

우리나라는 지난 20~30년간 식생활의 급격한 서구화로 곡류와 채소류를 비롯한 식물성 식품의 섭취는 감소하는 대신 동물성식품의 섭취는 크게 증가하였으며, 자연식품의 섭취는 감소한 반면 가공 및 인스턴트 식품의 섭취가 크게 증가함에 따라 비만 및 만성퇴행성질환이 급격하게 증가하고 있어 심각한 사회문제로 대두되고 있다.²²⁾ 그러나, 최근 고령화시대를 맞이하여 건강하게 오래살 수 있는 생활방식에 대한 관심이 매우 높아지면서 곡류, 채소, 과일 등에 대한 섭취가 증가하고 있는 추세이다.

이에 최근에는 밥, 국, 김치를 기본으로 하는 식물성식품 위주의 우리나라 전통적인 식단이 매우 훌륭한 건강식이라는 사실을 새삼 깨닫게 되었고, 이에 따라 관습적으로 섭취해오던 우리의 먹거리들에 대한 생리활성을 과학적으로 밝히려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 지금까지의 국내 보고들은 마늘, 생강, 고추와 같은 향신료²³⁻²⁷⁾나 산채를 비롯한 채소류,^{26,28,30)} 버섯류,^{31,32)} 차,^{33,34)} 김치^{35,36)} 등에 의한 항산화, 항돌연변이 및 항암, 항당뇨, 혈청콜레스테롤저하효과 등에 대한 연구가 대부분을 차지하고 있으며, 이들 식품에 함유되어 있는 항산화 영양소들과 각종 알칼로이드, 사포닌, 배당체, polyphenol 성분들, 섬유소 등이 특징적인 생리학적 기능을 나타내는 것으로 알려져 있다.³⁷⁾ 본 연구진도 예비실험을 통하여 채소류, 곡류, 해조류, 버섯류 중에서 한국인들이 일상적으로 널리 섭취하는 식품들과 몇 가지 솔잎이나 영지버섯과 같이 건강보조식품으로 섭취하는 식품 40여종에 대하여 *in vitro* 항산화효과를 측정하였고, 양념류³⁸⁾ 및 채소류,³⁹⁾ 곡류,⁴⁰⁾ 해조류⁴¹⁾에 대한 결과를

일부 보고한 바 있다.

그런데, 우리의 식생활 형태는 곡류를 주식으로 여러 가지 부식을 함께 섭취하는 것이 기본이기 때문에 식품 하나 하나의 특성도 중요하지만 여러 가지 식품을 어떻게 구성하여 섭취하느냐 하는 것 또한 매우 중요할 것으로 생각된다. 따라서 본 연구진은 식단 작성에 도움을 줄 수 있는 우수한 식품배합을 찾고자, 예비실험에서 *in vitro* 항산화효과가 뛰어난 16종 (생강, 쑥갓, 솔잎, 돌나물, 깻잎, 쑥, 풋고추, 파슬리, 돌미나리, 톳, 파래, 표고, 영지, 메밀, 수수, 울무)의 식품 중에서 곡류 1종, 채소류 2종, 해조류 1종, 버섯류 1종을 랜덤하게 배치하여 구성된 혼합식품시료에 대하여 *in vitro* 항산화효과를 측정하였다. 본 연구에서는 그 중에서 효과가 가장 우수했던 4가지 혼합식품시료 (5A, 5B, 5C, 5D)를 선정한 후 그 중 총 flavonoid 및 polyphenol 함량이 많은 2가지 혼합식품시료 (5B, 5C)만을 선택하여 흰쥐에게 섭취시켜 *in vivo* 항산화효과를 확인하였다.

연구방법

1. 식품재료 및 에탄올추출물의 제조

한국산 생강, 쑥갓, 솔잎, 돌나물, 깻잎, 쑥, 풋고추, 파슬리, 돌미나리, 톳, 파래, 표고, 영지, 메밀, 수수, 울무를 동결건조한 후 분쇄하여 -20℃에서 냉동보관하면서 시료로 사용하였다. 식생활에서는 양념은 곡류나 채소에 비하여 적은 양을 섭취하며, 솔잎이나 영지버섯은 일상적으로 섭취하는 식품이 아니지만 본 연구에서는 단순화시켜 혼합식품 구성시 모두 동일한 비율로 혼합하였다. 5종의 식품으로 구성된 혼합시료 5A (생강, 쑥갓, 울무, 파래, 표고), 5B (솔잎, 돌나물, 깻잎, 메밀, 톳)와 5C (쑥, 풋고추, 수수, 파래, 표고), 5D (파슬리, 돌미나리, 영지, 기장, 톳)를 준비하여 분말상태로 사용하거나, 에탄올 추출물을 얻기 위하여 혼합시료 100 g에 2 L의 95% 에탄올 (Ducksan, Korea)을 가하여 실온에서 stirring 하면서 24시간 동안 2회 반복 추출하여 Whatman 종이 (No. 6)로 여과한 후 여과액을 40℃에서 Rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan)로 감압농축하여 냉동보관 하였다가 사용하였다.

2. *in vitro* 항산화효과 검색

1) 지질과산화 억제효과 측정

Antonella 등⁴²⁾과 Gotteried와 Dunkley의 방법⁴³⁾에 따라 Fe²⁺에 의해 유도된 linoleate의 과산화에 대한 억제활성을 TBA (Thiobarbituric acid, Sigma, USA)로 발색시

켜 측정하였다. DMSO에 녹인 에탄올추출시료를 농도별로 희석하여 20 μ l와 10 ml의 10 mM linoleic acid 용액을 섞은 후 37°C에서 1시간 동안 shaking incubation 시켰다. 여기에 0.05 M FeSO₄ · 7H₂O 20 μ l를 넣고 37°C에서 2시간 동안 shaking하여 과산화물을 유발시킨 후, 800 μ l를 취하여 4°C에서 10분간 tempering시키고 400 μ l의 TBA reagent를 첨가한 다음 boiling water bath에서 15분간 가열한 후 냉각시켰다. 생성된 지질과산화물을 n-butanol로 추출하여 spectrophotometer (SpectraMax 340 pc, Molecular Devices, USA)로 535 nm에서 흡광도를 측정한 후 시료에 의한 과산화지질 생성 억제율을 계산하였으며, 시료농도와 억제율 간의 관계를 나타내는 방정식을 구한 후 50% 억제율을 나타내는 시료의 농도 (IC₅₀)를 계산하였다.

억제율 (%) =

$$\frac{(\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 처리군의 흡광도})}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

2) DPPH 라디칼 제거 효과 측정

시료의 DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거효과는 DPPH에 대한 환원력으로 측정하였다.⁴⁴⁾ 에탄올 추출물을 DMSO에 녹여 농도별로 희석한 시료 10 μ l와 에탄올에 녹인 200 μ M DPPH (Sigma, USA) 190 μ l를 섞은 후, 37°C에서 30분 동안 반응시킨 다음 ELISA reader (SpectraMAX 340pc, Molecular devices, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군에 비하여 감소된 흡광도로부터 라디칼 제거율을 계산하였고, IC₅₀의 시료 농도를 계산하였다.

3) 지질과산화물과 단백질의 결합 억제효과

본 연구팀은 Park⁴⁵⁾의 방법에 따라 이미 생성된 지질과산화물이 세포내 단백질과 결합하는 반응을 억제하는 효과를 알아보기 위하여 malondialdehyde (MDA)와 bovine serum albumin (BSA, Sigma)를 이용하는 전기영동 방법을 개발하였다. 간단히 설명하면 BSA (2 mg/ml) 100 μ l, MDA (20 mM) 100 μ l에 0.1 M PBS와 추출시료를 여러 농도로 혼합한 후 37°C에서 24시간 반응시킨 다음, 혼합액 500 μ l를 Centricon (Centricon YM-10, Amicon)에 넣고, 1,400 × g에서 2시간 동안 원심분리하여 MDA-BSA 결합물을 분리한 후, 여분의 염을 제거하기 위하여 증류수 700 μ l를 넣고 다시 1,400 × g에서 2시간 동안 원심분리하였다. 증류수로 3회 반복 세척한 후 시료를 0.1 M PBS에 녹여 Bradford 방법⁴⁶⁾으로 단백질 정량하고 12% acrylamide gel에 일정량의 단백질을 동일하게 loading 한

후 (running buffer) 120 V에서 2시간 30분간 전기영동 (SDS-PAGE)한 다음 gel을 꺼내 1시간 동안 Coomassie 염색하여 MDA-BSA 결합물의 band를 densitometer (BIO-1D Image Analysis, Vilber Lourmat, Germany)로 정량함으로써 지질과산화물과 단백질의 결합억제율을 계산하였다. MDA는 Gomez-Sanchez⁴⁷⁾의 방법에 따라 실험실에서 직접 제조하여 사용하였다.

3. 혼합시료의 총 Flavonoid와 polyphenol 함량 측정

식품시료의 총 Flavonoid와 polyphenol 함량을 측정하기 위하여 Lee 등의 방법⁴⁸⁾에 따라 동결건조한 건시료 1 g에 50 ml의 75% 에탄올을 가하고 18시간 동안 교반한 후 추출액을 Whatman paper로 여과한 다음 75% 에탄올로 50 ml까지 맞춘 후 즉시 측정하였다. 총 flavonoid 함량 측정은 Davis법을 변형한 방법⁴⁹⁾에 따라 시행하였다. 에탄올 추출 검액 400 μ l에 90% diethylene glycol 4 ml를 첨가하고, 다시 1N NaOH를 40 μ l를 넣고 37°C water bath에서 1시간 동안 incubation한 후 spectrophotometer로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로는 rutin (Sigma, USA)을 사용하였다. 총 polyphenol 함량은 Singleton 등의 방법에 따라⁵⁰⁾ 에탄올 추출 검액 400 μ l에 50 μ l의 Folin-ciocalteau, 100 μ l의 sodium carbonate (Na₂CO₃) 포화용액을 넣고 실온에 1시간 방치한 후 spectrophotometer로 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로는 tannic acid (Sigma, USA)를 사용하였다.

4. 실험동물 및 실험식이

4주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 (주)샘타코로부터 공급받아 1주일간 적응시킨 후 체중을 측정하여 평균무게가 비슷하도록 하여 7마리씩 6개 군으로 분리한 후 각각의 실험식이를 만들어 5주간 공급하였다 (Table 1). 즉 실험동물은 ① 저지방식이군 (LF: 10% fat Kcal), ② 고지방고콜레스테롤식이군 (HFHC: 30% fat Kcal), ③ 고지방고콜레스테롤식이 + 혼합분말시료5B 식이군 (P5B), ④ 고지방고콜레스테롤식이 + 혼합분말시료5C 식이군 (P5C), ⑤ 고지방고콜레스테롤식이 + 에탄올추출물5B 식이군 (E5B), ⑥ 고지방고콜레스테롤식이 + 에탄올추출물5C 식이군 (E5C)으로 분리되었으며, 저지방식은 2.5% 옥수수기름 + 2.5% 라드를 함유하고, 고지방고콜레스테롤식은 2.5% 옥수수기름 + 12.5% 라드 + 1% 콜레스테롤을 함유하도록 만들었으며, 고지방고콜레스테롤식이를 기본으로 P5B군과 P5C군 식이는 혼합분말시료를 그대로 식이무게의 5%를 섞어 만들었으며, E5B군과 E5C군 식이는 5% 중량의 혼합분말시료로부터 얻은 에탄올추출물을 농축하여 Table 1과 같

Table 1. Diet composition (g/kg)

	LF	HFHC	P5B	P5C	E5B	E5C
Corn starch	575	475	425	425	475	475
Sucrose	100	100	100	100	100	100
Casein	180	180	180	180	180	180
Corn oil	25	25	25	25	25	25
Lard	25	125	125	125	125	125
α -cellulose	40	40	40	40	40	40
dl-methionine	3	3	3	3	3	3
AIN vitamin mixture	10	10	10	10	10	10
AIN mineral mixture	40	40	40	40	40	40
Choline chloride	2	2	2	2	2	2
Cholesterol	-	10	10	10	10	10
5B, powdered	-	-	50	-	-	-
5C, powdered	-	-	-	50	-	-
5B, EtOH extracted	-	-	-	-	3.8 ¹⁾	-
5C, EtOH extracted	-	-	-	-	-	3.3 ²⁾
Energy (Kcal/kg)	3870	4370	4170	4170	4370	4370
Fat energy (Kcal%)	11.6	30.9	32.4	32.4	30.9	30.9

LF: low fat diet (5%), HFHC: high fat (15%) & high cholesterol (1%) diet, P5B: HFHC + powdered 5B, P5C: HFHC diet + powdered 5C, E5B: HFHC + EtOH extracted 5B, E5C: HFHC diet + EtOH extracted 5C.

1) Ethanol extract weight from 50 g of powdered mixture 5B

2) Ethanol extract weight from 50 g of powdered mixture 5C

은 조성으로 조제하여 냉동하였다가 1~2 일마다 새롭게 공급되었다. 실험동물들에게 식이와 물은 자유급식 되었으며, 사육기간 동안 1주일마다 체중을 측정하였다. 사육환경은 22~25°C, 습도 50~60%, 12시간 dark/light cycle을 유지하였다.

5. 시료수집 및 전처리

5주간의 실험기간 종료일 밤 동안 급식을 중단한 후 다음날 오전에 단두하여 혈액을 얻은 후 즉시 회복하여, 간과 신장을 적출하여 차가운 생리식염수에 씻어 혈액을 제거하고, 여과지로 물기를 제거한 후 무게를 측정하고, 얼음 위에서 작게 잘라 액체질소로 급속 냉동시킨 뒤 -70°C에 보관하였다. 혈액은 실온에 1시간 정도 방치한 후 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 얻은 혈청을 eppendorf tube에 분주하여 -70°C에 보관하였다. 한편, 냉동보관 하였던 간과 신장은 1 g에 차가운 homogenizing buffer (1.15% KCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) 10 ml 넣어 Teflon homogenizer (S63C, Tri-R, Instruments, USA)로 4°C에서 균질화한 후, 4°C, 800 × g에서 10분간 원심분리 하여 상층액 (S1 분획)을 얻어 일부는 -70°C에 냉동하였고, 일부는 다시 4°C, 12,000 × g에서 30분간 원심분리하여 상층액 (S2 분획)과 하층액 (mitochondria 분

획)을 각각 -70°C에 aliquot하여 냉동보관 하였다.

6. in vivo 항산화효과 검색

1) 혈청 총항산화능 측정

체내 총항산화능은 산성 조건에서 ferric ion이 ferrous 로 환원되면 TPTZ (2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine)과 결합하여 ferrous-tripyridyltriazine의 발색물질을 생성하는 성질을 이용한 Benzie 등의 방법⁵¹⁾에 따라 혈청에서 측정하였다. 표준시약으로 trolox를 이용하였고 항산화능은 trolox equivalent로 표시하였다.

2) TBARS 측정

혈청과 간 및 신장 조직에서의 지질과산화 정도는 ascorbate-Fe²⁺ 존재 하에 촉진된 비효소적 지질과산화 반응을 통해 생성되는 지질과산화물의 농도를 Miller의 방법에 따라⁵²⁾ 측정하였다. 혈청 또는 조직의 S1 분획 100 μ l에 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) 250 μ l를 넣은 후 37°C 수조에서 5분간 두었다가 50 μ M FeCl₃ 50 μ l와 0.1 mM ascorbic acid 50 μ l를 넣은 후 37°C 수조에서 60분간 두어 과산화를 유도하였다. 20 mM EDTA 50 μ l를 넣은 후 혼합액의 100 μ l을 취하고, 여기에 1.2% TBA 500 μ l, 8.1% SDS 100 μ l, 20% acetic acid 750 μ l, DW 550 μ l를 넣은 후 100°C 수조에서 30분간 두었다가 냉수에서 식힌 후 532 nm에서 TBARS (thiobarbituric acid reactive substance)에 의한 흡광도를 측정하였다. 표준 시약으로 malondialdehyde (MDA)를 사용하여 표준 곡선을 구하였고, 조직은 S1 분획의 단백질 농도를 Lowry 방법⁵³⁾으로 측정하여, 시료의 TBARS의 농도를 혈청은 nmole MDA/ml, 조직시료는 nmole MDA/mg protein으로 표시하였다.

3) 항산화효소 활성 측정

Catalase 활성은 간과 신장 조직의 mitochondria 분획에서 Aebi의 방법⁵⁴⁾에 따라 240 nm에서 1분간 H₂O₂를 제거하는 속도를 측정하여 nmol H₂O₂/min/mg protein 으로 표시하였다. GPx (Glutathione peoxidase)와 GST (Glutathione S-transferase) 활성은 간과 신장 조직의 S2 분획에서 각각 Tappel의 방법⁵⁵⁾ 및 Habig 등의 방법⁵⁶⁾을 이용하여 측정하였다. GPx 활성 측정은 0.1 mM EDTA를 포함한 50 mM Tris buffer (pH 7.6)에 0.25 mM GSH, 0.12 mM NADPH, 1 unit의 GSH-reductase 혼합액에 1 mg 단백질을 포함하는 S2분획을 넣고, 37°C에서 5분간 반응시킨 뒤 cummen hydroperoxide를 넣자마자 340 nm에서 흡광도의 변화를 2분간 측정하였다. GPx의 활성은

nmole NADPH/min/mg protein으로 표시하였다. GST 활성 측정은 1 mM GSH 1 ml과 1 mM DCNB (3, 4-dichloronitrobenzene) 1 ml을 섞은 후 25°C 수조에서 2분간 두었다가 0.1 M potassium phosphate beffer (pH 6.5) 450 µl와 S2 분획 50 µl을 가한 후 spectrophotometer로 340 nm에서 2분간 흡광도를 측정하여 1분 동안의 흡광도의 변화로부터 nmole CDNB/min/mg protein의 단위로 표시하였다. Cu, Zn-SOD (Superoxide dismutase) 활성은 간과 신장 조직의 S2 분획에서 superoxide dismutase의 활성을 Misra와 Fridovich 등의 방법⁵⁷⁾을 이용하여 측정하였다. 약 2 mg protein/ml의 농도로 희석시킨 S2 분획 50 µl에 0.05 M sodium carbonate buffer (pH 10.2) 1.4 ml을 넣어 30°C 수조에서 3분간 두었다. 여기에 0.01 M dl-epinephrine/0.01 M HCl (pH 2) 50 µl을 넣은 후, spectrophotometer로 480 nm, 30°C에서 4분간 흡광도를 측정하여 흡광도의 변화를 계산한 후 epinephrine의 자동산화율 50% 억제시킬 때를 1 unit로 하여 계산하였다. 간 조직에서의 XO (Xanthine oxidase)활성은 Stirpe와 Della Corte의 방법⁵⁸⁾에 따라 xanthine을 기질로 하여 30°C에서 10분간 반응시켜 생성된 uric acid를 292 nm에서 흡광도를 측정하여 간조직의 단백질 1 mg이 1분간 반응하여 기질로부터 생성된 uric acid의 양을 nmole 농도로 표시하였다. 조직시료의 단백질 분석은 Lowry의 방법⁵⁹⁾으로 측정하였다.

7. 통계처리 및 분석

연구결과는 SAS 프로그램을 이용하여 평균치와 표준오차로 나타내었고, 각 실험군 간의 비교는 ANOVA-test/Duncan-test를 실시하여 평균값들의 유의한 차이를 검증하였다.

결 과

1. 에탄올추출물의 in vitro 항산화효과

3가지 방법으로 검색한 항산화 효과 결과들로부터 계산

Table 2. IC₅₀ of ethanol extracts for in vitro antioxidative effects

Sample	Lipid peroxidation inhibition		DPPH radical scavenging effect		MDA-BSA conjugation inhibition	
	95% EtOH ext. (µg/assay)	dry wt. (mg)	95% EtOH ext. (µg /assay)	dry wt. (mg)	80% EtOH ext. (mg/assay)	dry wt (g)
5A	66.44	0.49	182.33	1.34	116.88	0.77
5B	113.74	0.68	148.76	0.90	34.40	0.23
5C	192.33	1.15	79.97	0.48	20.06	0.09
5D	1487.97	9.71	6797.83	44.37	320.01	2.09

5A: mixture of dried Ginger, Crown daisy, Job's tears, Sea lettuce and Lentinus edodes, 5B: mixture of dried Pine needles, Sedum, Perilla leaves, Buckwheat and Seaweed fusiform, 5C: mixture of dried Mugwort, Green pepper, Sorghum, Sea lettuce and Lentinus edodes, 5D: Parsley, small water dropwort, Youngzee mushroom, Prosomillet and Seaweed fusiform

된 에탄올 추출물의 IC₅₀ 값과 그에 해당하는 건조무게는 Table 2와 같다. 지질과산화억제효과 측정 결과 에탄올 추출물의 IC₅₀는 5A 66.44 µg/assay, 5B 113.74 µg/assay, 5C 192.33 µg/assay, 5D 1487.97 µg/assay로 5A가 가장 좋은 억제효과를 보였고, 그 다음이 5B, 5C의 순이었고, 5D는 가장 효과가 낮았다. 또한, DPPH 라디칼 제거효과에 대한 IC₅₀는 5A 182.33 µg/assay, 5B 148.76 µg/assay, 5C 79.97 µg/assay, 5D 6797.83 µg/assay로 5C가 가장 효과적이었고, 그 다음이 5B, 5A의 순이었고, 5D는 가장 효과가 낮았다. MDA-BSA 결합억제효과는 5A 116.88 mg/assay, 5B 34.40 mg/assay, 5C 20.06 mg/assay, 5D 320.01 mg/assay로 5B와 5C의 효과가 매우 우수하였고, 그 다음이 5A, 5D 순이었다. 지질과산화물이 단백질과 결합하는 반응에 대한 결과는 Fig. 1에서 볼 수 있듯이 4가지 혼합시료 모두 투여 농도가 증가할수록 MDA-BSA의 결합 밴드가 약해짐을 확인할 수 있었다.

2. 혼합건조시료의 총 flavonoid와 polyphenol 함량

식물성 식품의 중요한 항산화물질로 알려진 총 flavonoid

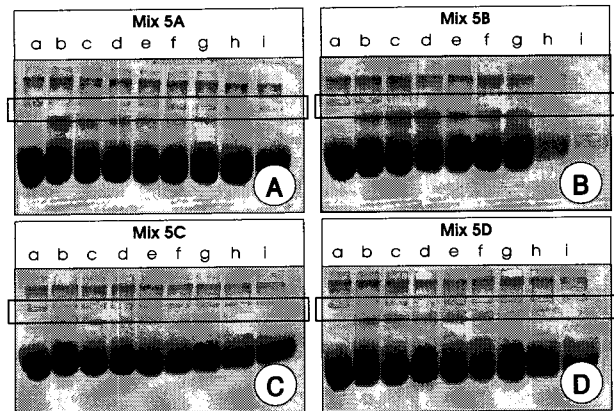


Fig. 1. Coomassie staining of 12% acrylamide gel from SDS-PAGE of 4 mixed food extracts with MDA and BSA. BSA and MDA were loaded 0.2 mg/lane and 2 µmole/lane, respectively. a: BSA, b: BSA + MDA, c: BSA + MDA + extract 1.25 mg, d: BSA + MDA + extract 2.5 mg, e: BSA + MDA + extract 5 mg, f: BSA + MDA + extract 10 mg, g: BSA + MDA + extract 20 mg, h: BSA + MDA + extract 40 mg, i: BSA + MDA + extract 80 mg.

와 polyphenol의 함량을 측정된 결과는 Table 3과 같다. 5A, 5B, 5C, 5D의 총 flavonoid 함량은 건조 무게 g당 각각 1.23 ± 0.23 mg, 5.39 ± 0.53 mg, 6.59 ± 0.95 mg, 6.17 ± 0.38 mg으로 5A가 가장 낮았고, 5B, 5C, 5D는 비슷한 수준이었다. 5A, 5B, 5C, 5D의 총 polyphenol 함량은 각각 9.29 ± 0.52 mg, 43.49 ± 1.08 mg, 35.84 ± 1.57 mg, 9.33 ± 0.50 mg으로 5A와 5D가 비슷하게 낮았고, 5B와 5C가 비슷하게 높은 수준이었다. 4가지 혼합시료를 비교해 보면, 5B와 5C는 flavonoid와 polyphenol 함량이 모두 비슷하게 높았으나, 5A는 flavonoid와 polyphenol 함량이 모두 매우 낮았고, 5D는 flavonoid 함량은 5C와 비슷하게 높으나 polyphenol 함량은 5A와 비슷한 수준으로 낮은 특징을 보였다.

이상의 *in vitro* 실험 결과 3가지 면에서의 항산화효과가

Table 3. Total flavonoid and polyphenol contents in mixed samples

	Total flavonoid content (mg/g dry wt)	Total polyphenol content (mg/g dry wt)
5A	1.23 ± 0.23	9.29 ± 0.52
5B	5.39 ± 0.53	43.49 ± 1.08
5C	6.59 ± 0.95	35.84 ± 1.57
5D	6.17 ± 0.38	9.33 ± 0.50

5A: mixture of dried Ginger, Crown daisy, Job's tears, Sea lettuce and Lentinus edodes, 5B: mixture of dried Pine needles, Sedum, Perilla leaves, Buckwheat and Seaweed fusiform, 5C: mixture of dried Mugwort, Green pepper, Sorghum, Sea lettuce and Lentinus edodes, 5D: Parsley, small water dropwort, Young-zee mushroom, Prosomillet and Seaweed fusiform

Table 4. Body weight gain for 5 weeks and liver and kidney weights

	BW gain (g)	Liver wt (g)	Liver/BW (%)	Kidney wt (g)	Kidney/BW (%)
LF	206.1 ± 13.1^{NS}	12.4 ± 0.6^b	3.39 ± 0.10^b	2.72 ± 0.30^{NS}	0.75 ± 0.09^{NS}
HFHC	221.0 ± 20.9	18.4 ± 2.3^a	4.83 ± 0.46^a	2.75 ± 0.13	0.72 ± 0.04
P5B	224.2 ± 10.6	18.2 ± 1.4^a	4.75 ± 0.76^a	2.79 ± 0.21	0.73 ± 0.05
P5C	216.2 ± 13.5	18.8 ± 1.3^a	5.01 ± 0.24^a	2.82 ± 0.26	0.75 ± 0.02
E5B	207.2 ± 19.0	18.3 ± 1.3^a	4.91 ± 0.20^a	2.69 ± 0.25	0.75 ± 0.05
E5C	218.1 ± 16.0	17.5 ± 2.6^a	4.76 ± 0.50^a	2.69 ± 0.12	0.72 ± 0.05

NS: no significantly different among groups.

a,b: means with different letter within the same column are significantly different from each other by ANOVA, Duncan's multiple range test at $p < 0.001$

모두 우수한 동시에 총 flavonoid와 polyphenol 함량이 많은 5B와 5C를 선정하여 동물실험을 통한 항산화효과를 확인하고자 하였다.

3. 실험동물의 체중변화 및 간과 신장무게

실험기간 5주 동안의 체중증가는 실험군 간에 유의한 차이가 없었다 (Table 4). 또한 간 무게 및 체중에 대한 간 무게 비율은 저지방식군 (LF)에 비하여 고지방고콜레스테롤식이군 (HFHC)에서 유의하게 컸으나, 고지방고콜레스테롤식이에 혼합건조시료 또는 에탄올추출시료를 섞어 먹인 경우에도 HFHC군과 비교하여 유의한 차이는 없었다 (Table 4).

신장무게와 체중에 대한 신장무게 비율은 실험군 간에 유의한 차이가 없었다 (Table 4).

4. 혈중 지질과산화물 생성량 및 총항산화능

혈청 중 ascorbate- Fe^{+2} 에 의하여 비효소적으로 생성되는 지질과산화물은 LF군에 비하여 HFHC군에서 유의하게 높았다 ($p < 0.05$). 그러나, 혼합분말시료나 에탄올추출시료의 섭취로 인한 유의한 변화는 없었다 (Fig. 2A). 한편, 혈액에서 측정된 총항산화능은 LF군에 비하여 HFHC군에서 유의하게 감소함을 보였는데 ($p < 0.001$), 이는 고지방식이의 섭취가 체내에서 지질과산화를 크게 증가시켰고 이로 인한 산화적 스트레스로부터 신체를 보호하기 위하여 체내 항산화물질의 소모가 증가되었기 때문으로 보인다. 또한,

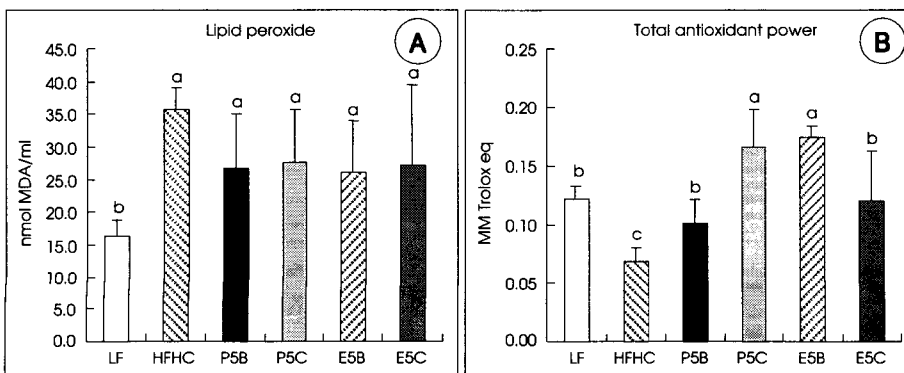


Fig. 2. Nonenzymatic Lipid peroxide level (A) and total antioxidant power (B) in rat serum. a-c: means with different letter are significantly different from each other by ANOVA, Duncan's multiple range test at $p < 0.05$ (A) or $p < 0.001$ (B).

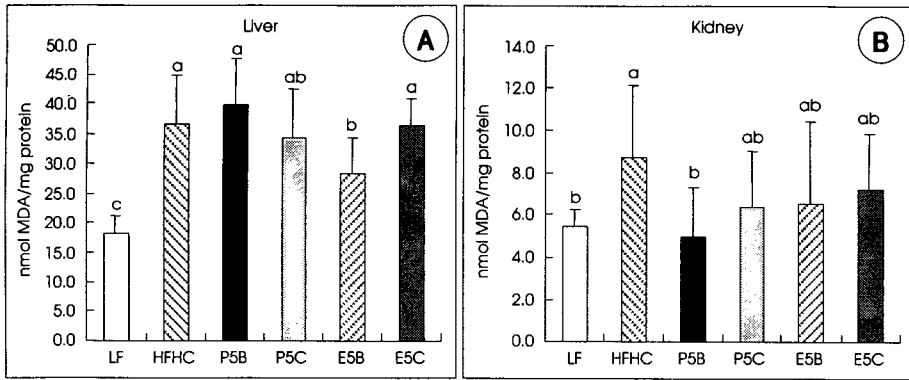


Fig. 3. Nonenzymatic ascorbate-Fe²⁺ induced lipid peroxide level in rat liver (A) and kidney (B). a-c: means with different letter are significantly different from each other by ANOVA, Duncan's multiple range test at p<0.001 (A) or p<0.05 (B).

Table 5. Catalase, superoxide dismutase, glutathione-peroxidase and xanthine oxidase activities in liver

	Catalase (nmol/min/mg protein)	Cu, Zn-SOD (unit/min/mg protein)	GPx (nmol/min/mg protein)	XO (nmol/min/mg protein)
LF	174.8 ± 23.1 ^a	29.0 ± 7.7 ^a	170.3 ± 17.1 ^{NS}	11.20 ± 2.92 ^{ab}
HFHC	149.3 ± 24.7 ^b	14.9 ± 4.4 ^c	169.7 ± 42.5	10.93 ± 2.81 ^{ab}
P5B	145.8 ± 15.8 ^b	21.8 ± 7.2 ^b	153.4 ± 16.2	13.36 ± 3.30 ^a
P5C	149.9 ± 20.2 ^b	17.5 ± 2.7 ^{bc}	174.8 ± 23.9	13.34 ± 2.65 ^a
E5B	130.4 ± 22.9 ^b	22.4 ± 5.7 ^b	157.8 ± 35.4	9.70 ± 3.58 ^b
E5C	135.1 ± 13.2 ^b	19.6 ± 2.4 ^{bc}	161.1 ± 22.3	9.07 ± 2.67 ^b

NS: no significantly different among groups.

a-c: means with different letter within the same column are significantly different from each other by ANOVA, Duncan's multiple range test at p<0.05

P5B군에서는 HFHC군에 비하여 총항산화능이 평균 47% 정도 상승하였으며, P5C, E5B, E5C군에서는 HFHC군에 비하여 각각 143%, 154%, 76%씩 유의하게 상승하여, 고지방식이에 혼합식품 5B와 5C를 보충섭취한 경우 고지방식으로 인한 혈청 총항산화능의 감소를 억제하는 효과를 넘어 저지방식이군보다 더 높은 수준을 나타내기도 하였다 (Fig. 2B).

5. 간과 신장에서의 지질과산화물 생성 수준

간 조직에서 ascorbate-Fe²⁺로 유도된 지질과산화물의 생성은 HFHC군이 LF군의 2배 정도로 높았으며 (p < 0.001), 혼합식품첨가군 중 E5B군만이 HFHC군에 비하여 평균 23% 유의하게 감소되는 효과를 보였다 (Fig. 3A). 신장에서도 ascorbate-Fe²⁺로 유도된 지질과산화물의 생성은 HFHC군이 LF군에 비하여 62%나 높았으나 (p < 0.001), 혼합식품을 첨가한 P5B군은 HFHC군에 비하여 지질과산화물 농도가 43% 감소하는 효과를 보였다 (p < 0.001). 그리고, P5C, E5B, E5C군들도 HFHC군에 비하여 유의하지는 않았으나 약 20~40% 정도 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 3B).

6. 간 조직에서의 항산화효소의 활성 및 Xanthine oxidase 활성

간에서의 catalase 활성은 HFHC군이 LF군에 비하여 유의하게 (p < 0.01) 감소되었으나, 혼합식품시료를 첨가한 실험

Table 6. Superoxide dismutase and glutathione-peroxidase activities in kidney

	Cu, Zn-SOD (unit/min/mg protein)	GPx (nmol/min/mg protein)
LF	25.2 ± 2.4 ^a	157.1 ± 32.4 ^{NS}
HFHC	21.0 ± 2.4 ^b	189.1 ± 31.6
P5B	24.3 ± 3.9 ^a	199.0 ± 34.0
P5C	22.1 ± 2.3 ^{ab}	166.8 ± 39.8
E5B	22.5 ± 2.2 ^{ab}	146.3 ± 34.8
E5C	22.9 ± 2.4 ^{ab}	192.5 ± 18.1

a-b: means with different letter within the same column are significantly different from each other by ANOVA, Duncan's multiple range test at p<0.05.

NS: no significantly different among groups

식이군은 모두 HFHC군과 차이가 없었다 (Table 5). Cu, Zn-SOD 활성 또한 HFHC군이 LF군보다 유의하게 낮았으나, P5B, E5B군은 HFHC군보다 각각 46%, 60%가 증가하여 유의하게 높아진 변화를 보였고 (p < 0.05), P5C와 E5C군은 HFHC군과 유의한 차이가 없었다. Glutathione peroxidase (GPx) 활성은 모든 식이군 간에 유의한 차이가 없었고, xanthine oxidase (XO) 활성은 HFHC와 비교 시 혼합분말시료나 에탄올추출시료의 섭취에 의한 유의한 변화는 없었으나, 5B, 5C 모두 에탄올 추출시료 섭취군이 분말시료를 그대로 섭취한 군보다 유의하게 낮은 활성을 보였다 (Table 5).

7. 신장조직에서의 항산화효소활성

신장조직에서 Cu, Zn-SOD의 활성은 간에서와 같이 HFHC군이 LF군에 비하여 유의하게 낮았으나 ($p < 0.05$), P5B군은 HFHC군에 비하여 유의하게 높아져 LF군과 동일한 수준을 보였다. P5C, E5B, E5C군은 HFHC군에 비하여 높은 경향은 보였으나 통계적으로 유의한 수준은 아니었다 (Table 6). 한편, 신장에서의 GPx 활성은 간 조직에서와 마찬가지로 식이군 간에 유의한 차이가 없었다 (Table 6).

고 찰

식품의 항산화효과를 검색하는 방법으로 일반적으로 널리 이용되는 지질과산화억제효과 및 DPPH 라디칼 소거능 이외에 본 연구에서 추가된 또 하나의 방법은 이미 생성된 지질과산화물이 단백질과 결합하는 반응을 억제하는 효과를 알아보는 것이었다. 대표적인 지질과산화 산물인 malondialdehyde (MDA)는 두 개의 aldehyde기를 갖고 있어 매우 불안정하여 주변의 단백질 내부의 아미노산 잔기들 사이에서 뿐 만 아니라 외부 단백질분자의 잔기 사이에서도 교차결합 (cross-linking)을 일으킬 수 있다는 것은 이미 잘 알려져 있으며, 체내에서 생성된 지질과산화물이 어떤 효소와 결합한다면 그 효소의 활성을 저하시키거나 변화시킴으로써 질병을 유도할 수 있고, 만일 DNA변이를 교정하는 작용과 같은 보호기능에 관여하는 효소에 손상을 준다면 암을 유발할 수도 있다고 알려져 있다.⁵⁹⁾ 이에 본 연구에서는 이미 생성된 지질과산화물이 단백질과 반응 결합하는 것을 4종의 혼합시료로부터 얻은 에탄올 추출시료가 억제시킬 수 있는지를 *in vitro*에서 측정하기 위하여 일정량의 MDA와 bovine serum albumin (BSA)에 시료를 농도별로 첨가하여 전기영동 후 MDA-BSA 결합물의 생성을 얼마나 감소시키는지 Coomassie 염색을 통하여 확인하였다. 연구 결과 지질과산화를 억제하는 효과는 5A가 가장 높았으나, 이미 생성된 지질과산화물이 단백질과 결합하는 반응을 억제하는 효과는 5C가 가장 높은 차이를 보였다.

혼합식품시료 5A, 5B, 5C, 5D로부터 얻은 에탄올추출물에 의한 Fe^{+2} 로 유도된 *in vitro* 지질과산화 저해효과는 IC_{50} 를 기준으로 볼 때 5A가 가장 좋았으나, 5A는 총 flavonoid 함량과 polyphenol 함량이 5B 및 5C에 비하여 훨씬 낮았으므로, 5A의 우수한 지질과산화억제효과는 flavonoid나 polyphenol이 아닌 다른 항산화물질에 의한 영향이 크게 작용한 것으로 생각된다. 전 실험보고에 따르면³⁸⁾ 항산화효과가 좋았던 16종의 식품 중에서도 생강은 flavonoid나 polyphenol 함량이 낮으면서도 그 에탄올추출물에

의한 지질과산화억제효과가 가장 좋았던 점으로 미루어 보아 5A의 뛰어난 지질과산화 저해효과의 상당부분은 생강에 의한 것으로 생각된다. 한편, DPPH 라디칼소거효과와 MDA-BSA 결합억제효과는 flavonoid와 polyphenol 함량이 높았던 5B와 5C가 5A 및 5D보다 훨씬 좋았다. 따라서 DPPH 라디칼 소거효과와 지질과산화물의 단백질과의 반응성을 억제하는 효과는 phytochemical의 함량과의 관련성이 있을 것으로 예상된다. 광충실 등⁴⁰⁾은 곡류의 DPPH 라디칼소거효과가 flavonoid 함량과 통계적으로 유의하게 상관성이 높았다고 보고한 바 있다.

신체내 산화방어기전에는 ascorbic acid, vitamin E, carotene, Se, glutathion, phytochemical 등의 비효소계 항산화물질과 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase 등의 효소 등이 있으나, 독성물질, 약물, 흡연, 환경오염, 피로 등 어떤 산화적 스트레스 조건하에서 증가된 ROS와 유리라디칼은 세포내 구조 단백질, 효소, 세포막을 이루는 지방산, RNA, DNA 등을 공격하여 산화 및 cleavage, cross-linking, modification 등을 유도하여 기능 이상, 조직 손상 및 항상성의 파괴를 초래하게 된다.⁶⁰⁾ 생체막에서 지질과산화가 지나치게 증가 되면 막의 유동성과 membrane potential을 잃게 되고, 이온 투과성이 증가되어 결국 세포가 죽게 되며, 혈중 저밀도 지단백 (LDL)이 산화되면 동맥경화가 유발되기 때문에 지질과산화를 억제하는 것은 매우 중요하다.^{60,61)} 본 연구에서는 혼합식품섭취에 의한 체내 지질과산화 억제효과를 확인하기 위하여 흰쥐의 혈청이나 조직시료에 ascorbate- Fe^{+2} 를 첨가하여 ascorbate에 의하여 빠르게 자동산화 된 Fe^{+3} 가 지질과산화 반응을 촉진시키는 과정을 통하여 생성된 TBARS 양을 측정하였다. 실험결과 고지방고콜레스테롤식이 섭취에 의하여 혈청과 간 조직, 신장 조직 모두에서 지질과산화물이 저지방식이군에 비하여 유의하게 증가함을 다시 한번 확인하였고, 이로써 점차 서양식 고지방식에 익숙해져 가고 있는 우리의 식습관을 생각할 때 앞으로 특히 젊은 세대들의 건강이 심히 우려되지 않을 수 없다. 또한, 간에서의 TBARS 농도 및 XO (xanthin oxidase) 활성 결과를 보면 혼합분말시료 섭취보다 에탄올추출물 섭취 시 더 좋은 항산화효과를 나타낸 것을 알 수 있다. 이러한 차이에 대한 이유를 설명하기 위해서는 각 시료에 대한 정확한 성분분석 등을 비롯한 보다 세밀한 연구가 필요하겠으나, 에탄올추출물 상태가 분말상태에서보다 일부 항산화물질의 체내 흡수성이나 이용도 및 활성도가 높기 때문이 아닌가 생각된다. 김성경 등도⁶²⁾ 녹차잎을 이용하여 쥐 실험을 한 결과 에탄올추출물 섭취군이 건분섭

취군보다 간 조직이나 적혈구내의 항산화효소 활성 증가가 더 높은 경향을 보였으며, 이에 대하여 에탄올 추출물에 많은 비극성 flavonoid가 건분에 존재하는 flavonoid의 구조에 비하여 체내에서 더 효과적인 항산화작용을 하는 것 같다고 설명한 바 있다.

일반적으로 산화적 스트레스가 증가하면 이를 방어하기 위하여 체내 항산화물질들의 소모가 증가하여 혈액 내 이들의 농도는 점차 감소하게 된다. 따라서 혈중 항산화물질의 농도변화는 건강 및 질병상태에서 산화적 스트레스의 지표로 사용되기도 하는데, 최근에는 간단하게 혈액의 전체적인 항산화능을 측정하는 방법들이 개발되어 이용되고 있다.^{51,63} 혈중에 존재하는 대표적인 항산화물질로는 bilirubin, uric acid, ascorbic acid, α -tocopherol, carotene, thiol-protein 등을 함유하며, 또한 철분을 산화반응으로부터 차단하는 ceruloplamin, transferrin, Fe-scavenging protein 등이 있다.⁶⁴ 본 연구에서는 혈청시료가 Fe^{+3} 를 Fe^{+2} 로 얼마나 효율적으로 환원시키는가를 측정하는 방법⁵¹을 이용하여 체내 총항산화능을 평가하였다. 실험결과 5B와 5C를 분말상태든 에탄올추출물상태든 섭취 시 혈중 총항산화능이 유의하게 증가하였는데, 이들 혼합식품들에 많이 함유되어 있는 flavonoid와 polyphenol이 크게 작용했을 것으로 생각되며 지속적으로 이 식품들을 섭취한다면 체내 항산화력을 크게 증진시킬 수 있을 것으로 기대된다.

한편, 생체 내에서 라디칼을 생성하는 반응계 중의 하나에 관여하는 xanthine oxidase는 purine, pyrimidine, aldehyde 및 heterocyclic compound 등의 대사에 관여하는 비특이적 효소로서 생체 내에서는 주로 purine의 대사산물인 hypoxanthine을 xanthine으로 전환시키고, 또 다시 xanthine을 uric acid로 전환시켜 요산을 생성하는 반응을 촉매하는 작용을 하는데 그 과정에서 라디칼이 생성된다. 이 효소는 특이하게도 xanthine dehydrogenase (XD)와 xanthine oxidase (XO)의 2가지 형태로 존재하며 환경에 따라 서로 변환이 가능하며,⁶⁴ 정상상태에서는 거의 대부분 XD의 형태로 존재하나 산화적 스트레스가 증가하는 조건에서는 XD가 XO로 변환됨으로써 많은 라디칼을 생성케 한다.⁶⁶ 여러 보고에 의하면^{67,68} flavonoids는 XO의 활성을 저해한다고 알려져 있는데, 본 실험에서도 에탄올추출물을 섭취시킨 E5B와 E5C군에서는 간에서의 XO 활성이 유의하게 감소되었으나, P5B와 P5C군에서는 감소되지 않았다. 에탄올추출로 섭취한 경우 원시료인 분말상태로 섭취한 경우보다 총 flavonoid와 polyphenol 함량을 더 많이 함유하지는 않았을 것으로 생각되기 때문에 에탄올추출물내의 일부 항산화물질들의 신체 내 이용도나 그

활성도가 분말시료상태보다 더 높았거나, 또는 분말시료에 항산화물질의 흡수나 작용을 방해하는 물질이 존재할 가능성도 있다.

Cu, Zn-SOD는 세포의 cytosol에서 superoxide radical을 환원시켜 H_2O_2 로 전환시키는 작용을 하며, H_2O_2 는 catalase의 작용에 의하여 H_2O 로 전환됨으로써 신체를 산소라디칼에 의한 손상으로부터 보호하는 것으로 잘 알려져 있다. 여러 보고에서 정상 쥐³⁴나 당뇨환자에게⁶⁹ 녹차나 catechin을 장기간 먹었을 때 간 또는 적혈구에서 SOD의 활성이 증가되었다고 하였다. Glutathion peroxidase (GPx)는 생체내에서 H_2O_2 와 glutathione (GSH)으로부터 H_2O 와 산화형 glutathione (GSSG)을 생성하는 반응과 기타 과산화물 (ROOH)로부터 알코올 (ROH)과 H_2O 를 생성케 함으로써 산화적 스트레스를 감소시키는 작용을 한다.⁷⁰ 본 실험에서 흰 쥐에게 고지방고콜레스테롤식을 섭취시킨 경우 저지방식을 섭취한 쥐와 비교해서 간과 신장조직에서의 Cu, Zn-SOD의 활성이 감소하였으나, P5B와 E5B식을 섭취시켰을 때에는 감소하지 않아 특히 5B의 섭취는 산화적 스트레스가 증가되는 조건하에서도 SOD활성을 지속적으로 유지하도록 하는 우수한 항산화효과를 보였다. 반면, GPx의 활성은 고지방고콜레스테롤 식이나 실험 식이에 의한 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 보고에 의하면⁸ 매우 중요한 장수인자의 하나로 작용하는 SOD는 노화와 함께 대부분의 조직에서 그 활성과 발현이 감소하는 반면, GPx의 활성과 발현은 변화가 없었다고 하였다.^{71,72}

갯잎의 에탄올 추출물은 특히 SOD유사활성도가 높으며 그 효능물질은 사포닌이나 알칼로이드 계통의 물질로 추정된다고 보고 되었으며,⁷³ 과산화지질생성 억제효과가 있는 것으로 알려져 있다.⁷⁴ 솔잎은 분말을 흰쥐에게 섭취시켰을 때 혈청과 간에서 지질과산화를 감소시키는 효과가 있었으며,⁷⁵ 그 에탄올 추출물은 DPPH 라디칼 억제효과가 우수하였고,⁷⁶ 부탄올 및 아세톤 추출물은 흰쥐에서 간의 SOD 활성을 상승시켰다는 보고가 있었다.^{77,78} 본 동물 실험에서 항산화효과가 가장 뛰어났던 5B의 구성식품인 갯잎과 솔잎의 총 flavonoid와 polyphenol 함량을 분석한 결과 갯잎은 건조무게 1 g 당 각각 34.29 mg와 52.51 mg, 솔잎은 각각 14.99 mg와 57.71 mg의 매우 높은 phytochemical의 함량을 나타내어 P5B군과 E5B군에서 나타난 우수한 항산화효과에 갯잎과 솔잎이 기여한 바가 클 것으로 생각된다.

한편, 본 연구에서 혼합식품 첨가군의 체중증가는 기대와 달리 고지방고콜레스테롤 식이를 먹인 대조군에 비하여 감소하지 않았는데, 이는 그 첨가량이 5%로 체중에 영향을

줄 만큼의 충분한 양이 아니었던 것으로 생각된다.

식품의 개별적인 생리효능의 구명 연구는 기본적으로 매우 필요한 일이나, 실생활에서는 수많은 식품들을 동시에 섭취하고 있는 것을 감안해 볼 때 한 끼의 식사나 하루의 식사구성을 어떻게 하여 섭취하느냐에 따라 신체 내에서의 효능은 다소 달라질 수도 있을 것으로 생각된다. 이미 한 방이나 민간요법에서는 식품궁합이라는 말을 사용하여 이러한 개념이 활용되고 있지만 많은 경우 과학적으로 충분한 설명이 이루어지지 않고 있다. 따라서, 각 식품에 대한 지식을 바탕으로 식품 상호간의 과부족한 영양소나 생리활성효과를 보완하여 보다 바람직한 효과를 얻을 수 있는 식품구성에 대해서도 보다 큰 관심을 가져 볼 필요가 있다. 다만, 여러 가지 식품을 혼합하여 수행한 연구의 한계점은 본 연구에서와 같이 실험 결과를 해석하는데 있어서 매우 큰 어려움이 있다는 것이다. 이 부분에 대하여는 앞으로 보다 체계적이고 과학적인 연구모델이 개발되어야 하며 이를 위하여 많은 연구자들의 관심과 시도가 요구된다.

요약 및 결론

한국산 상용식품 중 항산화효과가 우수한 16종의 식품들 중에서 곡류, 채소류, 해조류, 버섯류가 골고루 함유하도록 하는 5종의 식품으로 구성된 4가지 혼합식품 (5A, 5B, 5C, 5D)에 대하여 지질과산화억제능, DPPH 라디칼 소거능, 지질과산화물과 단백질의 결합 억제능 등의 *in vitro* 항산화효과를 측정하여 효과가 우수하며 flavonoid와 polyphenol 함량이 높은 5B와 5C만을 선정하여 *in vivo* 동물실험을 시행하였다. Sprague-Dawley종 흰쥐를 이용하여 고지방고콜레스테롤식이 (30% fat Kcal)를 기본으로 5% (w/w)의 혼합분말식품을 섞어 주거나 (P5B, P5C), 동일한 양으로부터 추출한 에탄올 추출물을 식이에 섞어 (E5B, E5C) 5주간 자유급식 하였다. 그 결과 에탄올 추출물의 *in vitro* 지질과산화억제효과는 5A, 5B, 5C 순으로 우수하였고, 5D는 매우 낮았다. DPPH 라디칼 제거효과와 지질과산화물과 단백질과의 결합억제효과는 5C, 5B, 5A 순으로 우수하였고, 5D는 매우 낮았다. 혼합건조시료의 총 flavonoid 함량은 5C, 5D, 5B, 5A 순으로 각각 6.59 ± 0.95 mg/g, 6.17 ± 0.38 mg/g, 5.39 ± 0.53 mg/g, 1.23 ± 0.23 mg/g 이었으며, 총 polyphenol 함량은 5B, 5C, 5D, 5A의 순으로 각각 43.49 ± 1.08 mg/g, 35.84 ± 1.57 mg/g, 9.33 ± 0.50 mg/g, 9.29 ± 0.52 mg/g 이었다.

한편 *in vivo* 항산화효과 실험 결과 혈액에서의 총항산화능은 고지방고콜레스테롤식이군이 저지방식이군의 48% 수

준으로 매우 낮았으나, 혼합식품 첨가군인 P5B, P5C, E5B, E5C군 모두 이 같은 총항산화능의 저하를 억제하여 저지방식이군과 같거나 더 높은 수준을 갖도록 하였다. 혈청에서 ascorbate-Fe⁺²에 의해 유도된 지질과산화물의 생성량은 혼합식이 섭취에 의한 유의한 변화가 없었던 반면, 간에서의 지질과산화물 농도는 E5B군에서 유의하게 감소하였으며, Cu, Zn-SOD 활성이 P5B와 E5B군에서 유의하게 증가하였다. 신장에서는 P5B군만이 지질과산화를 효과적으로 억제시키는 동시에 Cu, Zn-SOD 활성을 증가시켰다. 이들 동물실험 결과를 토대로 종합해 보면 혼합식품 5B와 5C 모두 항산화효과가 우수하였으나 5B가 5C보다 약간 더 우수한 경향을 보인다고 할 수 있다. 따라서, 5B의 구성식품인 솔잎, 돌나물, 갯잎, 메밀, 톳과 5C의 구성식품인 쑥, 풋고추, 수수, 파래, 표고를 함께 섭취할 수 있는 실제적인 방법을 강구하여 꾸준히 섭취한다면 체내 항산화능을 증강시킬 수 있을 것으로 기대된다.

■ 감사의 글

본 연구는 2003년 농림부 농림기술개발연구과제 연구비와 서울대 노화 및 세포사멸연구센터에 지원된 한국과학기술재단의 연구사업비의 일부 지원으로 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

Literature cited

- 1) Ceruti PA. Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227: 375-381, 1985
- 2) Sohal RS, Sohal BH, Brunk UT. Relationship between antioxidant defenses and longevity in different mammalian species. *Mech Aging Dev* 53: 217-227, 1990
- 3) Tappel AL. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed Proc* 32: 1870-1974, 1973
- 4) Block G, Patterson B, Subar A. Fruit, vegetables and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer* 18: 1-29, 1992
- 5) Parfitt VJ, Rubba P, Bolton C, Marotta G, Hartog M, Mancini M. A comparison of antioxidant status and free radical peroxidation of plasma lipoproteins in healthy young persons from Naples and Bristol. *Eur Heart J* 15: 871-876, 1994
- 6) Visioli F, Bogani P, Grande S, Galli C. Mediterranean food and health: Building human evidence. *J Physiol Pharmacol* 56(s1): 37-49, 2005
- 7) Tucker KL, Hallfrisch J, Qiao N, Muller D, Andres R, Fleg JL. The combination of high fruit and vegetable and low saturated fat intakes is more protective against mortality in aging men than is either alone: The Baltimore longitudinal study of aging. *J Nutr* 135: 556-561, 2005
- 8) Cutler RG. Antioxidants and aging. *Am J Clin Nutr* 53 (1suppl): 373s-379s, 1991

- 9) Halvorsen BL, Holte K, Myhrstad MCW, Barikmo I, Hvattum E, Remberg SF, Wold AB, Haffner K, Baugerod, Anderson LF, Moskang JO, Jacobs DR, Blomhoff RB. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *J Nutr* 132: 461-471, 2002
- 10) Ninfali P, Mea G, Giorgini S, Rocchi M, Bacchiocca M. Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. *Br J Nutr* 93(2): 257-266, 2005
- 11) Jelodar GA, Kaleki M, Motadayen MH, Sirus S. Effect of fenugreek, onion and garlic on blood glucoses and histopathology of pancreas of alloxan-induced diabetic rats. *Indian J Med Sci* 59(2): 64-69, 2005
- 12) Suzuki F, Kobayashi M, Komatsu Y, Kato A, Pollard RB. Keishika-kei-to, a traditional Chinese herbal medicine, inhibits pulmonary metastasis of B16 melanoma. *Anticancer Res* 17: 873-878, 1997
- 13) Uesugi T, Fukui Y, Yamori Y. Beneficial effects of soybean isoflavone supplementation on bone metabolism and serum lipids in postmenopausal Japanese women: a four-week study. *J Am Coll Nutr* 21(2): 97-102, 2002
- 14) Rifici VA, Schneider SH, Khachadurian AK. Lipoprotein oxidation mediated by J774 murine macrophage is inhibited by individual red wine polyphenols but not by ethanol. *J Nutr* 132: 2532-2537, 2002
- 15) Miller NJ, Rice-Evans CA. Antioxidant activity of resveratrol in red wine. *Clin Chem* 41: 1789, 1995
- 16) Surh YJ, Hurh YJ, Kang JY, Lee E, Kong G, Lee SJ. Resveratrol, an antioxidant present in red wine, induces apoptosis in human promyelocyte leukemia (HL-60) cells. *Cancer Letters* 140: 1-10, 1999
- 17) Kogure K, Goto S, Nishimura M, Yasumoto M, Abe K, Ohiwa C, Sassa H, Kusumi T, Terada H. Mechanism of potent antioxidative effect of capsaicin. *Biochim Biophys Acta* 1573(1): 84-92, 2002
- 18) Lee JS, Chang JS, Lee JY, Kim JA. Capsaicin-induced apoptosis and reduced release of reactive oxygen species in MBT-2 murine bladder tumor cells. *Arch Pharm Res* 27(11): 1147-1153, 2004
- 19) Lin YL, Cheng CY, Lin YP, Lau YN, Juan IM, Lin JK. Hypolipidemic effect of green tea leaves through induction of antioxidant and phase II enzymes including superoxide dismutase, catalase and glutathione S-transferase. *J Agric Food Chem* 46: 1893-1899, 1998
- 20) Rao CV, Rivenson A, Simi B, Reddy BS. Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. *Cancer Res* 55: 259-266, 1995
- 21) Katiyar SK, Agarwal R, Mukhtar H. Inhibition of tumor promotion in SENCAR mouse skin by ethanol extract of Zingiber officinale rhizome. *Cancer Res* 56: 1023-1030, 1996
- 22) Report on 2001 National Health and Nutrition Survey. Ministry of Health and Welfare, 2002
- 23) Im KJ, Lee SK, Park DK, Rhee MS, Lee JK. Inhibitory effects of garlic extracts on the nitrosation. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 43(2): 110-115, 2000
- 24) Jo HJ, Choi MJ. Effect of 1% garlic powder on serum and liver lipid and plasma amino acid concentration in rats fed cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31(1): 98-103, 2002
- 25) Sheo HJ. The antibacterial action of garlic, onion, ginger and red pepper juice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 18(1): 94-99, 1999
- 26) Cho SY, Han YB, Shin KU. Screening for antioxidant activity of edible plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30(1): 133-137, 2001
- 27) Sohn HE, Lee JY, Kim DC, Hwang WI. Enhancement of anti-cancer activity by combination of garlic (*Allium Sativum*) extract and Vitamin C. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30(2): 372-376, 2001
- 28) Park JC, Ha JO, Park KY. Antimutagenic effect of flavonoids isolated from *Oenanthe javanica*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25: 588-592, 1996
- 29) Kang JO. Antioxidative activity of Mugwort extract on human low density lipoprotein. *Kor J Soc Food Sci* 16(6): 623-628, 2000
- 30) Kwak HJ, Kwon YJ, Jeong PH, Kwon JH, Kim HK. Physiological activity and antioxidative effect of methanol extract from Onion (*Allium cepa* L). *Korean J Nutr* 29(2): 349-355, 2000
- 31) Bae JT, Chang JS, Lee KR. Effect of *Saecodon asparatus* extract on expression of cell cycle-associated proteins in HepG2 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31(2): 329-332, 2002
- 32) Hwang YJ, Nam HK, Chang MJ, Noh GW, Kim SH. Effect of *Lentinus edodes* and *Pleurotus eryngii* extracts on proliferation and apoptosis in human colon cancer cell lines. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32(2): 217-222, 2003
- 33) Jung SW, Kim MK. Effect of dried powdered of Chamomile, Sage and Green tea on antioxidative capacity in 15-month-old rats. *Korean J Nutr* 36(7): 699-710, 2003
- 34) Kim ES, Kim MK. Effect of dried leaf powders and ethanol extracts of Persimon, Green tea and Pine needle on lipid metabolism and antioxidative capacity in rats. *Korean J Nutr* 32(4): 337-352, 1999
- 35) Park KY, Cho EJ, Rhee SH. Increased antimutagenic and anti-cancer activities of Chines cabbage Kimchi by changing and levels of sub-ingredient. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27(4): 625-632, 1998
- 36) Kim HJ, Lee IS, Lee KR. Antimutagenic and anticancer effects of *Ramaria botrytis* Rick extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28(6): 1321-1325, 1999
- 37) Kim YD, Yang WM. Research on component of wild plant. *Korean J Food Sci Technol* 15(4): 10-16, 1991
- 38) Lee MS, Lim SJ, Kim SA, Woo MK, Kwak CS, Park SC. Antimutagenic and antioxidative effects of ethanol extracts from Garlic, Ginger, Green onion and Red pepper. *Kor J Gerontology* 13(1): 8-16, 2003
- 39) Oh SI, Lee MS. Screening for antioxidative and antimutagenic capacities in 7 common vegetables taken by Korean. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32(8): 1344-1350, 2003
- 40) Kwak CS, Lim SJ, Kim SA, Park SC, Lee MS. Antioxidative and antimutagenic effects of Korean Buckwheat, Sorghum, Millet and Job's tears. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33(6): 921-929, 2004
- 41) Kim SA, Kim J, Kwak CS, Lee MS. Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extracts from five kinds of seaweeds. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34(4): 451-458, 2005
- 42) Antonella S, Mario S, Maria L, Daniela M, Francesco B, and Francesco C. Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes. *Free Rad Bio Med* 19(4):

- 481-486, 1995
- 43) Gotterid H and Dunkley WL. Ascorbic acid and copper in linoleate oxidation: Measurement of oxidation by ultraviolet spectrophotometry and the thiobarbituric acid test. *J Lipid Res* 10: 555-560, 1969
 - 44) Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable radical. *Nature* 26: 1199-1200, 1958
 - 45) Park YH. Effect of polyamine on modification of biomodics by aldehydes. Ph. D thesis. Seoul National University, 2000
 - 46) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976
 - 47) Gomez-Sanchez A, Hermonsin I, Mayo I. Cleavage and oligomerization of malondialdehyde under physiological conditions. *Tetrahedron Letters* 28: 4077-4080, 1990
 - 48) Lee YC, Hwang KH, Han DH, Kim SD. Compositions of *Opu-mtia fiscus-medica*. *Korean J Food Sci Technol* 29(5) : 847-853, 1997
 - 49) Chae SK, Kang GS, Ma SJ, Bang KW, Oh MW, Oh SH. Standard Food Analysis. Jigu-moonwha Sa, pp. 381-382, 2002
 - 50) Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16: 144-158, 1965
 - 51) Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant power": The FRAP Assay. *Anal Biochem* 239: 70-76, 1996
 - 52) Miller DM, Aust SD. Studies of ascorbate-dependent, iron-catalyzed lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 271: 113-120, 1989
 - 53) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Rndall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
 - 54) Aebi. Catalase in vitro. In: *Methods in Enzymology* 105: 121-126, 1984
 - 55) Tappel AL. Glutathione peroxidase and hydroperoxides. *In methods in Enzymology* 52: 506-513, 1978
 - 56) Habig WH, Pabst MJ and Jakoby WB. Glutathion S-transferase. *J Biol Chem* 249: 7130-7139, 1974
 - 57) Misra HP and Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247: 3170-3175, 1972
 - 58) Stirpe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* 244(14) : 3855-3863, 1969
 - 59) Otamari T and Sjudahl R. Increased lipid peroxidation in malignant tissues of patients with colorectal cancer. *Cancer* 64: 422-425, 1989
 - 60) Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarker of tissue damage. *Clin Chem* 41 (pt 2) : 1819-1826, 1995
 - 61) Mattson MP. Mother's legacy: mitochondrial DNA mutations and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 20: 373-280, 1997
 - 62) Kim SK, Lee HJ, Kim MK. Effect of water and ethanol extracts of persimmon leaf and green tea different conditions on lipid metabolism and antioxidative capacity in 12-month-old rats. *Korean J Nutr* 34(5) : 499-512, 2001
 - 63) Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Miller A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 84: 407-412, 1993
 - 64) Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human plasma. *Acad Sci USA* 85: 9748-9752, 1988
 - 65) Terada LS, Leff A, Repine JE. Measurement of xanthine oxidase in biological tissues. In: *Methods in Enzymology*. vol 186, Academic Press, pp.651-652, 1990
 - 66) Huh K, Shin US, Lee SI. Effect of heat-treated ceruloplasmin on the hepatic xanthine oxidase activity and type conversion. *Arch Pharm Rec* 18(1) : 56-59, 1995
 - 67) Hayashi T, Sawa K, Kawasaki M, Arisawa M, Shimisu M, Morita M. Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *J Natural Products* 51: 345-348, 1988
 - 68) Ra KS, Chung SH, Suh HJ, Son JY, Lee HK. Inhibitor of xanthine oxidase from onion skin. *Korean J Food Sci Technol* 30(3) : 697-701, 1998
 - 69) RLee SJ, Choi JH. Effects of green tea catechins on the superoxide dismutase, glutathione peroxidase and xanthine oxidase activities of kidney in diabetic rats. *Korean J Nutr* 34(7) : 734-740, 2001
 - 70) Bompert GJ, Prevot DS, Bascands JL. Rapid automated analysis of glutathione reductase, peroxidase and S-transferase activity: application to cisplatin-induced toxicity. *Clin Biochem* 23(6) : 501-504, 1990
 - 71) Mo JQ, Hom DG, Anderson JK. Decreases in protective enzymes correlates with increased oxidative damage in the aging mouse brain. *Mech Aging Dev* 81: 73-80, 1995
 - 72) Azhar S, Cao L, Reaven E. Alteration of adrenal antioxidant defence system during aging in rats. *J Clin Invest* 96: 1414-1420, 1995
 - 73) Hyun KW, Kim JH, Song KJ, Lee JB, Jang JH, Kim YS, Lee JS. Physiological functionality in Geumsan perilla leaves from greenhouse and field cultivation. *Korean J Food Sci Technol* 35(5) : 975-979, 2003
 - 74) Lee KI, Rhee SK, Park KY, Kim JO. Antimutagenic compounds identified from perilla leaf. *Korean J Soc Food Nutr* 21: 302-307, 1992
 - 75) Lee E. Effects of powdered pine needle on serum and liver lipid composition and antioxidative capacity in rats fed high oxidized fat. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 32(6) : 926-930, 2003
 - 76) Park CS, Kwon CJ, Choi MA, Park KS, Choi KH. Scavenging activities of mugwort and pine needle extracts. *Kor J Food Preserv* 9(2) : 248-252, 2002
 - 77) Kim HY, Lee JH, Choi JH, Kim DI, Park SH, Baik SJ, Cho WG. Effects of butanol fraction of pine needle on oxygen radical and their scavenging enzymes in liver of SD rats. *Kor J Nutr* 35(3) : 292-295, 2002
 - 78) Kang YH, Park YK, Ha TY, Moon KD. Effects of Pine needle extracts on serum and liver lipid contents in rats fed high fat diet. *J Korean Soc food Nutr* 25(3) : 367-373, 1996