

## 자생식물 혼합 추출물이 SD 흰쥐에서의 행동양상 및 항산화 체계에 미치는 영향

서보영<sup>1</sup> · 김민정<sup>1</sup> · 김현수<sup>2</sup> · 박해룡<sup>3</sup> · 이승철<sup>3</sup> · 박은주<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>경남대학교 식품영양학과

<sup>2</sup>한국국제대학교 제약공학과

<sup>3</sup>경남대학교 식품생명학과

### Effect of Natural Plant Mixtures on Behavioral Profiles and Antioxidants Status in SD Rats

Bo-Young Seo<sup>1</sup>, Min-Jung Kim<sup>1</sup>, Hyun-Su Kim<sup>2</sup>, Hae-Ryong Park<sup>3</sup>,  
Seung-Cheol Lee<sup>3</sup>, and Eunju Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food and Nutrition, Kyungnam University, Gyeongnam 631-701, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Pharmaceutical Engineering, International University of Korea, Gyeongnam 660-759, Korea

<sup>3</sup>Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Gyeongnam 631-701, Korea

#### Abstract

Caffeine, a psychoactive stimulant, has been implicated in the modulation of learning and memory functions due to its action as a non-selective adenosine receptors antagonist. On the contrary, some side effects of caffeine have been reported, such as an increased energy loss and metabolic rate, decrease DNA synthesis in the spleen, and increased oxidative damage to exerted on LDL particles. Therefore, the aim of this study was to develop a safe stimulant from natural plants mixture (*Aralia elata*, *Acori graminei* Rhizoma, *Chrysanthemum*, Dandleion, Guarana, Shepherd's purse) that can be used as a substitute for caffeine. Thirty SD rats were divided into three groups; control group, caffeine group (15.0 mg/kg, i.p.), and natural plants mixture group (NP, 1 mL/kg, p.o.). The effect of NP extract on stimulant activity was evaluated with open-field test (OFT) and plus maze test for measurement of behavioral profiles. Plasma lipid profiles, lipid peroxidation in LDL (conjugated dienes), total antioxidant capacity (TRAP) and DNA damage in white blood, liver, and brain cells were measured. In the OFT, immobility time was increased significantly by acute (once) and chronic (3 weeks) supplementation of NP and showed a similar effect to caffeine treatment. Three weeks of caffeine treatment caused plasma lipid peroxidation and DNA damage in liver cells, whereas there were no changes in the NP group. NP group showed a higher plasma HDL cholesterol concentration compared to the caffeine group. The results indicate that the natural plants mixture had a stimulant effect without inducing oxidative stress.

**Key words:** stimulant effect, behavior profile, antioxidant, caffeine, natural plants

#### 서 론

현대사회는 산업이 발달함에 따라 교대근무에 따른 생활 패턴의 불규칙, 시차적응, 업무시간의 증대, 사회 및 가족의 요구에 의한 수면시간 단축이 불가피하게 되었다(1). 이로 인해 수면장애가 유발되며 특히, 주간졸음증은 불면증 못지 않게 일상생활에서 생리적 기능에 지장을 초래하는 낮에 느끼는 극심한 졸음증으로써 업무수행 능력을 감소시키고 행동에 영향을 미쳐 사고의 위험을 증가시키는 것으로 보고되었다(2). 2009년 도로교통안전공단의 보고에 따르면 고속도로 교통사고의 약 24%가 졸음관련 사고였으며, 운전자의 83%가 졸음운전을 경험한 것으로 나타났다(2,3).

커피는 전 세계적으로 가장 널리 이용되는 음료로써 정신

적 스트레스를 완화시키고, 자살충동 및 우울증의 감소 등 특정 효과가 있는 것으로 보고된 바 있으며 졸음을 억제하기 위한 수단으로 주로 이용된다. 이는 커피에 다량 함유되어 있는 카페인에 의한 것으로 추정된다(4-7). 카페인의 각성 효과는 locomotor activity 분석과 open field test 등을 이용한 동물의 행동학적 양상 변화를 통해 밝혀진 바 있다(8,9).

카페인은 전 세계적으로 널리 이용되는 식물성 알칼로이드계의 약물 중 하나로써 흥분제와 각성제로 알려져 있다(10). 우리가 쉽게 섭취하는 커피, 녹차 및 각종 음료수 등에 함유되어 있으며 커피 1잔(237 mL)에는 137 mg, 녹차 1잔에는 47 mg, 초콜릿(28.4 g)에는 7 mg, 콜라 1캔(233 mL)에는 46 mg의 카페인이 들어있다(11). 일반적으로 카페인은 중추 신경계와 내분비계를 자극하여 집중력을 높이고 반응시간

\*Corresponding author. E-mail: pej@kyungnam.ac.kr  
Phone: 82-55-249-2218, Fax: 82-55-244-6504

감소 및 피로의 지연 등에 효과가 있는 것으로 보고되어 있다(12). 그러나 하루 300 mg 이상의 카페인을 섭취하면 산소 소모의 증가, 체내 에너지 손실 및 대사율 증가를 초래할 뿐만 아니라 비장의 DNA 합성 감소, 위액 분비 증가 및 위장 질환 유발, 점막의 비대를 초래하는 등의 각종 기형학적 변화를 가지고 올 수 있다(13-15). 단기간의 카페인 섭취는 인슐린 민감성을 증가시키는 긍정적인 효과를 가지지만 만성적으로 카페인을 섭취할 경우 제2형 당뇨병 발생을 촉진시킨다고 보고된 바 있다(16).

인체는 수면부족과 같은 스트레스에 노출되게 되면 스트레스와 관련된 catecholamine계 호르몬 및 스테로이드 호르몬을 분비할 뿐만 아니라 이차적인 스트레스에 대비하기 위해 생체 내 에너지 대사가 증진되며 산소소모량이 증대된다(17). 이 과정에서 발생하는 산소는 유기호흡을 하는 생물에 있어 필수적이지만 에너지 대사과정 중 불완전한 환원에 의해 발생하는 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)은 세포막 지질을 과산화 시키고 생체 내에서 DNA를 손상시켜 암을 유발할 뿐만 아니라 세포노화, 세포막분해, 지방산화 등 심각한 생리적 장애를 초래한다(18-20). 이러한 이유에서 방어체계와 관련하여 인간의 노화억제라는 관점에서 연구되어 오던 항산화제 연구는 합성 항산화제의 독성과 같은 안전성 문제와 천연 항산화물의 약한 활성이 지적되면서 약용식물로부터 활성물질을 찾는 연구가 활발히 진행되고 있다(20,21). 우리나라에 자생하는 약용식물은 약 900여종에 달하며 생약으로 사용할 경우보다 식물 내 활성화합물을 탐색하여 신물질로 개발하게 된다면 천연물의 경제적 이용가는 더욱 높아질 것으로 기대된다(21).

따라서 본 연구에서는 약용식물 또는 자생식물로부터 카페인을 대체할 수 있는 행동학적 각성 효능이 있으면서도 독성이 없는 재료를 탐색하고자 국화(*Chrysanthemum*), 민들레(*Dandelion*), 두릅(*Aralia elata*), 냉이(*Shepherd's purse*), 석창포(*Acori graminei Rhizoma*), 과라나(*Guarana*) 등의 혼합 추출물을 실험에 사용하였다.

### 재료 및 방법

#### 시료 추출물 및 처리

민들레 추출물 분말은 Bioland Ltd.(Chunan, Korea)에서 구입하였으며 과라나 분말은 Xi'an HuaRui Bio-Engineering Co., Ltd.(Shaanxi, China)에서 제공받았다. 냉이, 두릅, 국화, 석창포는 Kungang Pharm. Co.(Changwon, Korea)에서 제공 받아 100°C에서 10분간 열수추출 하였으며 여과(Whatman No. 1)한 후 동결건조(Freeze Dryer FD 5512, (주)일신랩, Yangju, Korea) 하였다. 추출물은 Table 1과 같은 조성으로 제조하여 경구투여 하였다. 본 연구에 이용한 시약들은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

Table 1. Formula for the preparation of natural plants

Components	Weight (mg)
<i>Aralia elata</i> extract	1250
<i>Acori graminei</i> Rhizoma extract	1250
<i>Chrysanthemum</i> extract	6250
<i>Dandelion</i> extract powder	6250
<i>Guarana</i> extract powder	833.3
<i>Shepherd's purse</i> extract	7500
Water	100 mL

#### 동물사육 및 식이

5주령의 SD계 수컷 흰쥐 30마리를 (주)코아텍사(Pyung-tack, Korea)로부터 구입하여 1주일간 lab-chaw 식이(5057, (주)에그리브랜드 퓨리나 코리아, Sungnam, Korea)를 제공하면서 적응시킨 후 체중에 따라 난괴법에 의하여 대조군, 카페인군, NP (Natural plants, NP)군으로 나누었다. 실험동물은 동물실험실에서 개개의 케이지에서 사육하였으며 3주 동안 lab-chaw 식이와 증류수를 자유로이 섭취하도록 하였다. 카페인군은 Kwon 등의 결과(22)를 바탕으로 매일 15 mg/kg의 카페인을 복강 내 주사하였고, 자생식물 혼합추출물 음료는 1 mL/kg으로 매일 경구투여 하였다. 정상대조군과 NP군은 카페인군과 동일한 스트레스를 유발하기 위해 카페인과 같은 양의 생리식염수를 복강 내 주사하였으며 정상대조군과 카페인군은 NP군과 같은 양의 생리식염수를 경구투여 하였다. 사육기간 동안 사육실의 온도는 20°C, 습도는 55%를 유지하였으며 명암은 12시간(08:00~20:00)을 주기로 자동 조절하였다. 식이섭취량은 매일 기록하였고 7일마다 체중을 측정 한 후, 사육일지의 자료를 분석하였다.

#### 행동학적 분석

**Open field test(OFT):** 안정화시킨 쥐를 25구역으로 나누어진 상자(40×40×40 cm)에 넣고 30초간 적응시킨 후 5분간 각 칸마다의 방문횟수를 측정하였다. 이때 머리, 몸 그리고 네 다리가 모두 한 칸에 들어간 것을 기준으로 측정하였으며 단회 투여와 장기투여 후의 효과를 알아보기 위하여 1회 투여 시와 3주간 투여 후 동일한 방법으로 시행하였다(23).

**Plus maze test(PMT):** 중앙에서 7.5 cm×7.5 cm의 사각 플랫폼이 있고, 그 플랫폼을 둘러싸고 길이 40 cm, 폭 8 cm의 네 개의 통로가 십자모양으로 붙어있는 상자를 이용하였다. 서로 마주하고 있는 두 개의 통로를 28.5 cm 높이의 벽으로 막힌 폐쇄형 공간으로 설계하였고 나머지 마주하는 두 개의 통로는 동물이 떨어지지 않도록 1 cm 높이의 턱이 있는 개방형 공간으로 설계하였다. 바닥에서 50 cm 높이에 위치하도록 한 기구에 동물을 중앙의 플랫폼에서 개방형 통로 쪽을 향하게 놓은 후 개방형 통로에 출입한 횟수와 머문 시간을 5분간 기록하였다. 분석은 1회 투여 시와 3주간 투여하였을 때 각각 측정하였다(23).

### 혈액 및 각종 장기의 채취

3주간의 사육 후 실험동물들을 12시간 동안 절식시킨 다음 마취 후 복부하대정맥으로부터 혈액을 채취하였다. 혈액은 lithium-heparinic polystyrene tube에 담아 당일에 alkaline comet assay를 실시하도록 하였다. 남은 혈액은 3000 rpm에서 30분간 원심분리 하여 혈장을 분리하였다. 분리한 혈장은  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동보관 한 후 분석에 이용하였다. 간, 신장, 심장, 비장, 뇌, 부신, 흉선 등의 조직을 적출하여 남아 있는 혈액 및 기타 부착물질을 생리식염수로 제거하고 수분 제거 후 무게를 측정하였으며 간과 뇌는 comet assay를 위하여 HBSS buffer(136.89 mM NaCl, 5.37 mM KCl, 0.33 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.44 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4.17 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 5.55 mM glucose, 20.14 mM HEPES)에 보관하였다.

### 혈중 지질 농도 분석

총콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤은 비씨에스 진단 kit(Bioclinal system, Anyang, Korea)를 이용하여 비색 측정 방법을 이용하였다. LDL-콜레스테롤은 Friedewald 공식(24)을 이용하여 산출하였다.

### 혈장 내 총항산화능(total radical antioxidant potential, TRAP) 측정

혈장 중 총항산화력(TRAP)은 Rice-Evans and Miller의 inhibition assay법에 따라 분석하였다(25). ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate), 150 mM]와 metmyoglobin(2.5 mM)을  $\text{H}_2\text{O}_2$ (75 mM)로 활성화시킴으로써 생성된 ferryl myoglobin radical species와의 상호 작용에 의해 형성된 ABTS radical cation의 흡광도의 발색 억제 정도는 sample(0.84% plasma)에 들어 있는 antioxidant capacity에 비례하게 된다. Sample 측정은 UV/VIS spectrometer(UV 1601, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 8분 동안  $30^{\circ}\text{C}$ 에서 740 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 혈장의 TRAP 농도는 trolox의 calibration curve를 이용하여 계산하였으며 TEAC(Trolox equivalent antioxidant capacity, mM)로 표현하였다.

### 혈장 내 과산화지질(conjugated dienes, CD) 측정

CD는 혈장을 trisodium citrate와 heparin으로 처리하여 원심분리한 뒤 LDL-cholesterol을 분리하였다. LDL-cholesterol로부터 지질을 추출하기 위해 chloroform-methanol을 처리한 뒤 하층액을 분리한 뒤 cyclohexane으로 녹여서 234 nm에서 그 흡광도를 측정하였다(26).

### 백혈구 DNA 손상의 측정을 위한 comet assay

전혈 10  $\mu\text{L}$ 을 채취하여 75  $\mu\text{L}$ 의 0.7% low melting agarose gel(LMA)과 섞은 후, 0.5% normal melting agarose(NMA)가 precoating된 fully frosted slide 위로 전혈과 LMA의 현탁액이 골고루 분산되게 한 후 cover glass로 덮어  $4^{\circ}\text{C}$  냉장고에 보관하였다. Gel이 굳으면 cover glass를

벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75  $\mu\text{L}$ 로 한 겹 더 덮었다. 각 샘플 당 슬라이드는 총 2개를 제작하였으며 미리 준비해 둔 차가운 alkali lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 10 mM tris)에 사용 직전에 1% Triton X-100을 섞은 후 slide를 담가 저온, 암실에서 1시간 동안 침지시켜 DNA의 이중가닥을 풀어주었다. Lysis가 끝난 후, 슬라이드를 전기영동 수조에 배열하고  $4^{\circ}\text{C}$ 의 차가운 electrophoresis buffer(300 mM NaOH, 10 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,  $\text{pH}>13$ )를 채워 20분 동안 unwinding 시켰으며 DNA의 alkali labile sites가 드러나게 한 후 25 V/300 $\pm$ 3 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동 하였다. 빛에 의해 DNA가 부가적으로 손상되는 것을 방지하기 위해 위의 과정은 어두운 암실 조건에서 처리하였다. 전기영동이 끝난 후 0.4 M tris buffer( $\text{pH}$  7.4)에 5분씩 담가 세척하는 과정을 3회 반복하여 slide를 건조시키고 20  $\mu\text{L}/\text{mL}$  농도의 ethidium bromide로 핵을 염색하여 cover slip으로 덮은 뒤 형광현미경(LEICA DMLB, Wetzlar, Germany) 상에서 관찰하였다. CCD camera(Nikon, Tyoko, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 image는 Komet 5.0 comet image analyzing system(Kinetic Imaging, Komet 4.0, Liverpool, UK)이 설치된 컴퓨터를 통해 분석하였다. DNA 손상 정도는 핵으로부터 이동한 tail length에 tail 내 함유된 % DNA를 곱해준 tail moment(TM) 값을 측정하여 나타내었다(27).

### 간 및 뇌 조직 DNA 손상의 측정을 위한 comet assay

HBSS buffer에 담아 급속냉동 시켜 보관한 간 조직 1 g을 해동시킨 후 8등분 하여 150 units collagenase가 든 HBSS buffer로 옮겨  $37^{\circ}\text{C}$  shaking incubator에서 10분간 배양하였다. 40 g에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 다시 10분간 700 $\times g$ 에서 원심분리한 후 얻은 하층액을 precoated slide에 0.7% LMA과 골고루 분산시켜 cover glass로 덮어  $4^{\circ}\text{C}$  냉장고에 보관하였다. 뇌 조직은 0.2 g 정량하여 1 mL HBSS에 담아  $37^{\circ}\text{C}$  shaking incubator에서 10분간 배양하였다. 그 후 조직을 균질화 하여 40 $\times g$ , 5분간 원심분리 하고 상층액을 700 $\times g$ 에서 10분간 원심분리 하였다. 하층액을 precoated slide에 0.7% LMA과 골고루 분산시켜 cover glass로 덮어  $4^{\circ}\text{C}$  냉장고에 보관하였다. 이후의 과정은 백혈구의 comet assay 과정과 동일하게 실시하였다.

### 통계처리

모든 자료의 처리는 SPSS-PC+ 통계 package(SPSS Inc, Chicago, IL, USA)를 사용하여 처리하였다. 각 항목에 따라 백분율과 평균치 $\pm$ 표준오차(SE)를 구하고 각 군 간의 평균 차이에 대한 유의성 검정을 위해 one-way 분산분석(ANOVA)을 시행하여 Duncan's multiple range test를 이용하였으며 통계적 유의성은 5% 수준에서 평가하였다.

**Table 2.** Variation in weight gain and relative organ weight after chronic supplement (3 weeks) with NP and caffeine in SD rats<sup>1)</sup>

	Control	Caffeine	NP
Weight gain (g)	60.2±4.2 <sup>ns2)</sup>	54.6±3.3	55.6±3.6
Liver (g/kg BW)	2.84±0.04 <sup>ns</sup>	2.88±0.07	3.16±0.20
Brain (g/kg BW)	0.51±0.03 <sup>ns</sup>	0.51±0.01	0.48±0.03
Adrenal (g/kg BW)	0.017±0.003 <sup>ns</sup>	0.017±0.005	0.025±0.004
Spleen (g/kg BW)	0.19±0.01 <sup>ns</sup>	0.193±0.01	0.19±0.01
Heart (g/kg BW)	0.36±0.02 <sup>ns</sup>	0.33±0.02	0.33±0.01
Thymus (g/kg BW)	0.14±0.01 <sup>ns</sup>	0.145±0.003	0.17±0.01
Kidney (g/kg BW)	0.68±0.02 <sup>ns</sup>	0.71±0.02	0.72±0.02

<sup>1)</sup>Values are mean±SE for 10 animals in each group. Control: saline i.p., p.o., Caffeine: 15 mg/kg of caffeine i.p., saline p.o., NP: saline i.p., 1 mg/kg of NP p.o.

<sup>2)</sup>ns: not significant.

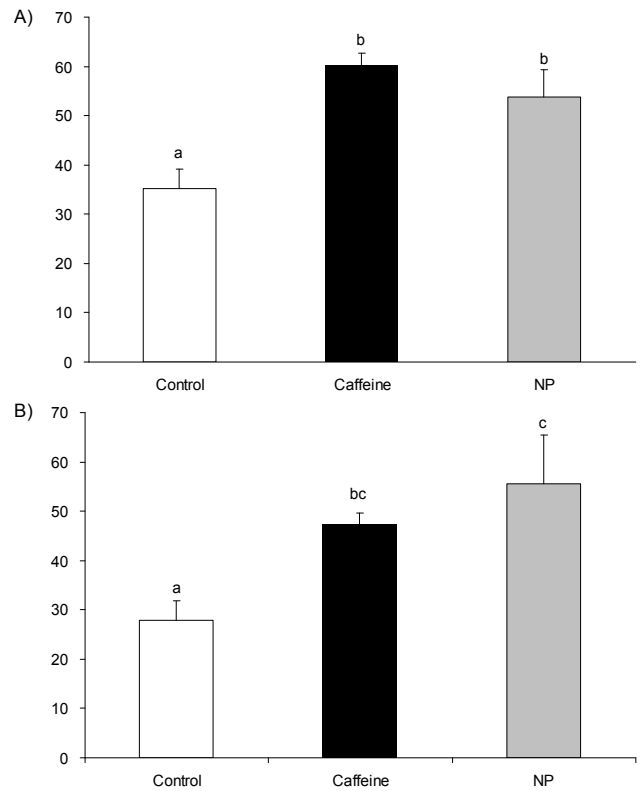
### 결과 및 고찰

#### 체중증가량 및 장기 무게에 미치는 영향

자생식물(NP)의 보충섭취에 따른 체중증가량 및 장기 무게의 변화는 Table 2에 제시하였다. 대조군과 카페인군, NP군 사이의 체중변화는 유의적 차이를 보이지 않았다. 체중증가량 대비 간, 뇌, 부신, 비장, 흉선, 신장 등의 장기 무게는 유의적 차이가 없었다.

#### 행동학적 변화에 미치는 영향

본 연구에서는 카페인과 NP의 섭취가 각성에 어떠한 영향을 미치는지를 행동학적 측면에서 알아보기 위하여 open field test(OFT)의 분석을 통해 동물의 활동성의 변화를 분석하였다(Fig. 1). OFT는 동물의 각 칸의 방문횟수를 측정함으로써 각성효과를 분석하는 방법으로 1회 투여 시 NP군(53.8±5.6회)에서 카페인 투여군(60.2±2.5회)과 같은 수준의 각성 효과를 나타내었으며, 3주간의 만성적 투여 후에도 대조군(27.8±4.2회)에 비해 NP(55.6±9.8회)군에서 유의적인 증가 효과(p<0.05)를 보였으며, 이는 카페인 투여군(47.2±2.4회)과 같은 수준임을 알 수 있었다. 카페인은 기저전뇌 아데노신 수용체의 작용을 차단함으로써 수면을 억제하고 피질에서 서파 활동의 감소를 야기하는 것으로 알려져 있으며(28), Kwon 등(22)의 연구에서는 카페인의 투여가 각성 기간, 특히 활동 각성 기간의 증가와 수면 기간의 감소에 영향을 미치며 이는 카페인 용량에 의존적이라는 연구 결과를 보고한 바 있다. 과라나에는 소량의 카페인을 함유하고 있으며 theophylline, theobromine, methylxanthin 그리고 다량의 tannin을 함유하고 있다(29). 과라나에 함유되어 있는 methylxanthin 성분은 adenosine과 adenosine receptor와의 결합을 방해하고, phosphodiesterase 작용을 억제하여 nor-adrenaline의 활성을 향상시킴으로써 각성효과를 나타내는 것으로 보고된 바 있으나(22,29) Otobone 등(23)의 연구에서는 카페인 및 과라나 추출물을 투여 후 open field test 결과, 카페인을 투여한 군에서 대조군에 비해 방문횟수가 유의적



**Fig. 1.** Effect of NP or caffeine supplement on open field test in SD rats. Values are mean±SE for 10 animals in each group. Control: saline i.p., p.o., Caffeine: 15 mg/kg of caffeine i.p., saline p.o., NP: saline i.p., 1 mg/kg of NP p.o. A: acute supplementation, B: chronic supplementation for 3 weeks. Values not sharing the same letter are significantly different from one another (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

으로 증가한 반면 과라나 추출물을 투여한 군에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그러나 본 연구에서는 단회 투여 뿐만 아니라 3주간의 NP의 투여가 대조군에 비해 활동 정도가 증가하고, 카페인의 투여와 같은 수준의 효과를 나타냄으로써 각성효과에 탁월한 효과를 나타내는 것으로 나타났다. 이는 과라나가 가지는 각성효과를 나타내는 물질들이 여러 가지 자생물질의 함유로 인해 시너지효과를 나타내는 것으로 사료된다.

또한 불안감(anxiety)을 분석하는 방법으로 plus-mazed test를 이용하였다. Plus-mazed test는 신경 안정제의 불안감을 해소하는 효과를 검증하는 분석법으로, diazepam을 쥐에게 0.5 mg/kg 투여 시 open arms에 머무는 시간 및 방문 횟수가 많아지며 따라서 정신적으로 안정할 경우, open arms에 머무는 시간과 방문 횟수가 증가한다는 것이 밝혀진 바 있다(30). 본 연구의 결과, open arms에 출입한 빈도수와 머문 시간을 측정한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같이 1회 투여와 3주간의 만성적 투여 모두 각 그룹간의 유의성은 나타나지 않았다. 수면부족은 우울증을 유발하는 가장 주된 원인이 되며 이에 의해 불안감이 조성되어 closed arms에 방문하는 시간이 길어지는 반면 항우울제 투여 시는 open

Table 3. Effect of NP or caffeine supplement on the entries and time spent in the open arms in plus maze test

	Control	Caffeine	NP
Effect of acute supplementation			
% of entries in open/total arms	27.6±11.1 <sup>ns2)</sup>	44.0±9.1	34.0±8.8
% of time spent in open/total arms	19.3±3.1 <sup>ns</sup>	27.3±7.0	20.5±3.3
Effect of chronic (3 weeks) supplementation			
% of entries in open/total arms	26.9±10.9 <sup>ns</sup>	18.2±4.4	17.0±6.5
% of time spent in open/total arms	20.7±5.5 <sup>ns</sup>	34.2±5.6	29.3±7.5

<sup>1)</sup>Values are mean±SE for 10 animals in each group. Control: saline i.p., p.o., Caffeine: 15 mg/kg of caffeine i.p., saline p.o., NP: saline i.p., 1 mg/kg of NP p.o.

<sup>2)</sup>ns: not significant.

arms에 방문하는 횟수 및 방문시간이 길어지는 결과를 보이는 것으로 보고된 바 있다(28). 본 연구에서는 이러한 행동양상의 차이를 보이지 않음으로써 상기 open field test의 결과로 나타난 활동적인 행동 양상은 조성물의 투여로 인한 각성 효과는 불안감이 증가시키지 않는다는 것을 알 수 있다. 따라서 본 연구의 결과, 자생식물을 함유한 음료의 복용은 단기 및 장기적 복용 후에 각성효과에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다.

#### 혈중 지질 농도에 미치는 영향

혈중 지질 함량에 대한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다. 총콜레스테롤과 중성지방, LDL-콜레스테롤 농도의 경우 각 군 간의 유의적 차이가 나타나지 않았다. 그러나 HDL-콜레스테롤 농도의 경우 카페인군에서 34.7 mg/dL인데 반해 NP군에서는 42.1 mg/dL로 유의적으로 높은 수준을 보였다( $p<0.05$ ). 비카페인군과 카페인군(3.5, 5, 7 mg 카페인/100 g BW) 사이에 총콜레스테롤 농도를 분석한 Kim 등의 연구(11)에서도 카페인 섭취가 혈중 총콜레스테롤 수치에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났으며, 이는 본 연구 결과와 일치한다. 쥐의 사료에 카페인과 콜레스테롤 첨가 시 혈청 유리지방산의 농도를 높이고 혈중 콜레스테롤과 인지질 등의 농도가 증가한다는 보고(31,32)가 있으나, 이와 반대로 커피나 카페인의 섭취는 지방대사에 영향을 주지 않는다는 보고(33)가 있어 카페인의 혈중 지방 수준에 미치는 효과에 관해서는 여전히 논란의 여지가 있다. 본 연구에서 HDL-콜레스테롤의 농도가 카페인 투여군과 NP투여군 모두 대조군

Table 4. Effect of 3 weeks of caffeine or NP supplement on the lipid profiles in SD rats<sup>1)</sup> (mg/dL)

	Control	Caffeine	NP
Total-cholesterol	95.3±5.5 <sup>ns2)</sup>	102.6±8.2	98.6±2.3
Triglyceride	82.1±8.3 <sup>ns</sup>	70.9±5.4	68.9±0.7
HDL-cholesterol	37.2±1.7 <sup>ab3)</sup>	34.7±2.7 <sup>a</sup>	42.1±2.4 <sup>b</sup>
LDL-cholesterol <sup>4)</sup>	41.7±6.6 <sup>ns</sup>	53.7±9.8	42.7±2.9

<sup>1)</sup>Values are mean±SE for 10 animals in each group. Control: saline i.p., p.o., Caffeine: 15 mg/kg of caffeine i.p., saline p.o., NP: saline i.p., 1 mg/kg of NP p.o.

<sup>2)</sup>ns: not significant.

<sup>3)</sup>Values in the same row that do share a common superscript are significantly different at the  $p<0.05$  level.

<sup>4)</sup>LDL-cholesterol (Friedewald's analysis)=TC-(HDL+TG/5).

에 비해 유의적인 차이를 보이지 않은 것으로 인체에 무해하나 카페인 투여군에 비해 NP군에서 유의적으로 높은 수치를 보임으로써 카페인보다 NP의 섭취가 체내 지질대사에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 사료된다.

#### 총 항산화력 및 지질과산화에 미치는 영향

혈장의 총 항산화력(total radical trapping antioxidant potential, TRAP) 분석과 지질과산화(conjugated dienes, CD) 분석 결과는 Table 5에 나타내었다. TRAP 측정법은 혈장 내  $\alpha$ -tocopherol, ascorbate, urate, protein sulfhydryl groups 등의 항산화제들의 복합 활성을 측정하여 혈장의 총 유리기 포집 항산화능을 측정하는 방법(25)으로 본 연구에서는 각 그룹간의 유의적 차이를 나타내지 않았다. CD는 산화적 스트레스로 인한 혈장 내 초기 과산화 상태에서 생성되는 물질로써 대표적인 지질과산화물이다(26). 3주간의 카페인 투여 후의 혈장 CD 농도가 대조군에 비해 2배 정도의 유의적 차이를 보임으로써 카페인 장기 투여에 의해 산화적 스트레스가 증가함을 확인할 수 있었다( $p<0.05$ ). 반면 NP 투여군의 경우 대조군과 비슷한 수준의 혈장 CD의 농도를 보였다. 카페인을 투여한 흰쥐의 간에서 과산화지질 농도를 측정한 Sung 등의 연구(34)에서 간의 지질과산화물(TBAR)을 측정한 결과, 대조군( $198.63\pm33.32$  nmol/g liver)에 비해 30 mg/100 mL의 카페인 투여군( $237.96\pm21.75$  mol/g liver)에서 19.80% 증가하는 결과를 확인하였으며 이는 본 연구의 혈장 CD 측정 결과와 같은 경향이었다. 따라서 카페인 장기간 복용 시 각성효과와 함께 부작용이 수반될 가능성이 높은 반면 NP의 장기투여 시에는 체내 산화적 스트레스에 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

Table 5. Effect of 3 weeks of caffeine or NP supplement on lipid peroxidation (CD) and total antioxidant capacity (TRAP) in SD rats<sup>1)</sup>

	Control	Caffeine	NP
CD ( $\mu$ M)	5.6±0.8 <sup>a2)</sup>	11.7±1.3 <sup>b</sup>	6.4±0.3 <sup>a</sup>
TRAP (mM)	1.12±0.05 <sup>ns3)</sup>	1.06±0.04	1.04±0.02

<sup>1)</sup>Values are mean±SE for 10 animals in each group. Control: saline i.p., p.o., Caffeine: 15 mg/kg of caffeine i.p., saline p.o., NP: saline i.p., 1 mg/kg of NP p.o.

<sup>2)</sup>Values in the same row that do share a common superscript are significantly different at the  $p<0.05$  level.

<sup>3)</sup>ns: not significant.

Table 6. Effect of 3 weeks of caffeine or NP supplement on leukocytes, hepatocytes and brain cell DNA damage in SD rats<sup>1)</sup>

	Control	Caffeine	NP
White blood cells	3.0±0.6 <sup>ns2)</sup>	3.2±0.3	3.2±1.4
Liver cells	18.4±2.1 <sup>ab3)</sup>	23.8±3.1 <sup>b</sup>	15.9±1.7 <sup>a</sup>
Brain cells	20.4±2.7 <sup>ns</sup>	17.0±1.0	19.9±3.2

<sup>1)</sup>Values are mean±SE for 10 animals in each group. Control: saline i.p., p.o., Caffeine: 15 mg/kg of caffeine i.p., saline p.o., NP: saline i.p., 1 mg/kg of NP p.o.

<sup>2)</sup>ns: not significant.

<sup>3)</sup>Values in the same row that do share a common superscript are significantly different at the p<0.05 level.

DNA 손상에 미치는 영향

세포의 유전독성을 측정하기 위해 comet assay 방법을 이용하여 백혈구, 간 및 뇌세포의 DNA 손상 정도(tail moment, TM)를 분석하였다(Table 6). 그 결과, 백혈구와 뇌세포의 DNA 손상에서는 각 군 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았으나, 간세포의 DNA 손상 정도에서는 카페인 투여군(23.8±3.1)과 NP군(15.9±1.7)을 비교하였을 때 카페인 투여군에서 1.5배 정도 손상이 유의적으로 많은 것을 확인할 수 있었다(p<0.05). 이는 앞서 확인한 카페인 섭취에 의해 증가한 지질과산화물에 의해 세포막의 손상을 초래할 뿐만 아니라 DNA 손상에 영향을 미치는 결과로 보인다. 그에 반해 NP 투여군은 대조군과 유의적 차이를 보이지 않음으로써 장기복용 시에도 DNA 손상에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

따라서 본 연구의 결과, 카페인이 가지는 각성효과는 본 연구에서 이용한 국화(*Chrysanthemum*), 민들레(Dandleion), 두릅(*Aralia elata*), 냉이(Shepherd's purse), 석창포(*Acori graminei* Rhizoma), 과라나(Guarana) 등의 혼합추출물로 대체 가능할 것으로 보인다. 또한 오랜 기간 NP의 섭취는 카페인에 비해 체내 산화적 스트레스 생성에 영향을 미치지 않음으로 독성에 대한 위험을 감소시킨다는 강점을 가질 것으로 사료된다.

요 약

주간졸음증은 업무수행 능력을 감소시키고 사고의 위험을 증가시키는 것으로 보고되어 있으며, 특히 교통사고의 주요 원인이 된다. 카페인은 전 세계적으로 가장 널리 이용되는 커피, 녹차, 콜라 등의 음료에 함유되어 있는 물질로써 정신적 스트레스를 완화시키고, 자살충동 및 우울증의 감소 등 특정 효과가 있는 것으로 보고된바 있으며 졸음을 억제하기 위한 수단으로 주로 이용된다. 그러나 산소 소모의 증가, 체내 에너지 손실 및 대사율 증가뿐 아니라 비장의 DNA 합성 감소, 체내 지질 산화 등의 많은 부작용을 가진다. 따라서 본 연구에서는 국화, 민들레, 두릅, 냉이, 석창포, 과라나 등의 자생식물들을 이용하여 행동학적 분석을 통한 각성 효과뿐만 아니라 인체의 생리활성에 안전한 물질을 탐색하고

자 하였다. Open field test의 결과, 단회 투여 시 대조군에 비해 카페인 투여군에서 활동적인 행동 양상을 나타내었으며 NP군에서 카페인 투여군과 같은 수준의 활동 정도를 나타내었다. 또한 3주간 NP의 투여는 카페인의 투여에 비해 증가한 활동성의 결과를 보였다. 총콜레스테롤과 중성지방, LDL-콜레스테롤 농도의 경우 각 군 간의 유의적 차이가 나타나지 않았으며 HDL-콜레스테롤 농도의 경우 대조군에 비해 카페인군과 NP군에서 유의적 차이는 없었으나 카페인 투여군에 비해 NP 투여군에서 유의적으로 높은 수준을 보였다. 혈중 지질과산화 농도는 대조군(5.6 mM)에 비해 카페인군(11.7 mM)에서 유의적으로 높은 농도를 나타내는데 반해 NP군(6.4 mM)은 대조군과 같은 수준을 나타내었다. 간세포의 DNA 손상정도에서는 대조군(18.4±2.1)에 비해 카페인 투여군(23.8±3.1)에서 유의적으로 손상이 증가한데 반해 NP군(15.9±1.7)은 대조군에 비해 유의적 차이를 보이지 않음으로써 NP의 장기 투여는 DNA 손상에 아무런 영향을 주지 않았다. 본 연구의 결과, 국화, 민들레, 두릅, 냉이, 석창포, 과라나 등의 자생식물 혼합추출물이 카페인과 비슷한 각성효과를 보이면서도 장기복용 시 안전한 것으로 나타나 각성효능이 있는 기능성식품으로서의 가능성이 충분하다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2011년도 경남대학교 학술논문게재연구비 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Dijk DJ, Lockley SW. 2002. Integration of human sleep-wake regulation and circadian rhythmicity. *J Appl Physiol* 92: 852-862.
2. Jeong BJ, Hong YJ, Sin CH. 2003. Comparison of the Factors of day time sleepiness, walking, muscular strength and reaction time in the middle aged. *J Korean Soc Aerobic exercise* 7: 53-60.
3. Traffic Accident Analysis Center. 2010. *Road traffic accident in Korea 2009*. Road traffic authority, Seoul, Korea. p 49-90.
4. Kawachi I, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Speizer FE. 1996. A prospective study of coffee drinking and suicide in women. *Arch Intern Med* 156: 521-525.
5. Yamato T, Yamasaki S, Misumi Y, Kino M, Obata T, Aomine M. 2002. Modulation of the stress response by coffee: An in vivo microdialysis study of hippocampal serotonin and dopamine levels in rat. *Neurosci Lett* 332: 87-90.
6. Yamato T, Aomine M, Koga T, Ohta H. 2005. Relationship between coffee drinking and reduction of mental stress in young women. *Food Sci Technol Res* 11: 395-399.
7. Seo HS, Hirano M, Shibato J, Rakwal R, Hwang IK, Masuo Y. 2008. Effects of coffee bean aroma on the rat brain stressed by sleep deprivation: a selected transcript and 2D gel-based proteome analysis. *J Agric Food Chem* 56: 4665-4673.

8. Nehlig A, Daval JL, Debry G. 1992. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Rev* 17: 139-170.
9. Pechlivanova D, Tchekalarova J, Nikolov R, Yakimova K. 2010. Dose-dependent effects of caffeine on behavior and thermoregulation in a chronic unpredictable stress model of depression in rats. *Behav Brain Res* 209: 205-211.
10. Lee HW. 2000. A study on caffeine containing foods and the effect of caffeine in humans. *Culinary Research* 6: 343-355.
11. Kim MH, Kim YR, Lee JW, Park BK, Kim MK, Choi MK, Kim AJ. 2008. The Effects of caffeine on lipid and mineral content in the serum of rats. *Korean J Food Nutr* 21: 336-343.
12. Acheson KJ, Markiewicz BZ, Anantharaman K, Jequier E. 1980. Caffeine and coffee—their influence on metabolic rate and substrate utilization in normal weight and obese individuals. *Am J Clin Nutr* 33: 989-997.
13. Leblanc J, Jobin M, Cote J, Samson P, Labrie A. 1985. Enhanced metabolic response to caffeine in exercise-trained human subjects. *J Appl Physiol* 59: 832-837.
14. Debas HT, Cohen MM, Holubitsky IB, Harrison RC. 1971. Caffeine stimulated gastric acid and pepsin secretion. *Scand J Gastroenterol* 6: 453-457.
15. McCarty MF. 2005. Achlorogenic acid-induced increase in GLP-1 production may mediate the impact of heavy coffee consumption on diabetes risk. *Medical Hypotheses* 64: 848-853.
16. Thong FS, Graham TE. 2002. Caffeine-induced impairment of glucose tolerance is abolished by beta-adrenergic receptor blockade in human. *J Appl Physiol* 92: 2347-2352.
16. Kennett GA, Dickinson SL, Curzon G. 1985. Enhancement of some 5-HT-dependent behavioural responses following repeated immobilization in rats. *Brain Res* 330: 253-263.
17. Halliwell B. 1991. Drug antioxidant effects, a basis for drug selection? *Drug* 42: 569-605.
18. Gardner PR, Fridovich I. 1991. Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* 6-phospho gluconate dehydratase. *J Biol Chem* 266: 1478-1483.
19. Park YK, Jeon EJ, Kang MH. 2003. Protective effect of flavonoids on lymphocyte DNA damage using comet assay. *J Korean Soc Nutr* 127: 125-132.
20. Song JC, Park NK, Baek NI. 2000. Examination and isolation of natural antioxidants from Korean medicinal plants. *Korean J Medicinal Corp Sci* 8: 94-101.
21. Kang JR, Lee MK, Kang SM. 2008. Anti-oxidant property and tyrosinase inhibition activity of various extracts from plants in compositae plants. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 51: 321-328.
22. Kwon DH, Won SH, Kim KM, Chang SM, Kim SH, Lee MG. 2006. Effect of caffeine on sleep and EEG spectra in Rats. *J Korean Soc Biol Ther Psychiatry* 12: 252-267.
23. Otobone FJ, Sanches AC, Nagae R, Martins JV, Sela VR, de Mello JC, Audi EA. 2007. Effect of lyophilized extracts from guaraná seeds [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats. *Phytother Res* 21: 531-535.
24. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499-502.
25. Rice-Evans C, Miller NJ. 1994. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in Enzymology* 234: 279-293.
26. Thelle DS, Arnesen E, Forde OH. 1983. The Tromsø heart study. Does coffee raise serum cholesterol? *N Engl J Med* 308: 1454-1457.
27. Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N, Barale R. 1994. Micro gel electrophoresis assay (comet assay) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat Res* 307: 323-333.
28. Singh A, Kumar A. 2008. Protective effect of alprazolam against sleep deprivation-induced behavior alterations and oxidative damage in mice. *Neurosci Res* 60: 372-379.
29. Nehlig A, Daval JL, Debry G. 1992. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Res Brain Res Rev* 17: 139-170.
30. Soderpalm B, Hjorth S, Engel JA. 1989. Effects of 5-HT1A receptor agonists and L-5-HTP in Montgomery's conflict test. *Pharmacol Biochem Behav* 32: 259-365.
32. Dulloo AG. 1993. Ephedrine, xanthines and prostaglandin inhibitors: actions and interactions in the stimulation of thermogenesis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 17: S35-S40.
32. Carek PJ, Dickerson LM. 1999. Current concepts in the pharmacological management of obesity. *Drugs* 57: 883-904.
33. Callahan MM, Rohovsk MW, Robertson RS, Yesair DW. 1979. The effect of coffee consumption on plasma lipids, lipoproteins and the development of aortic atherosclerosis in rhesus monkeys fed an atherogenic diet. *Am J Clin Nutr* 32: 834-845.
34. Sung JH, Chang CC, Chang YS. 2004. The effect of caffeine on the antioxidative activities of mouse liver. *Korean J Food Nutr* 17: 442-449.

(2011년 4월 20일 접수; 2011년 8월 9일 채택)