

약용식물 첨가 발효홍삼 추출물의 Streptozotocin 유발 당뇨쥐에 대한 항산화 효과

김현정¹ · 이성규^{2,3} · 박성진² · 유미희² · 이은주³ · 이삼빈^{1,2} · 이인선^{2*}

¹계명대학교 전통미생물자원개발 및 연구산업화 센터, ²계명대학교 식품가공학과, ³(주)NUC전자 바이오연구소

Antioxidant Effects of Extracts from Fermented Red Ginseng Added with Medicinal Herbs in STZ-induced Diabetic Rats

Hyun-Jeong Kim¹, Sung-Gyu Lee^{2,3}, Sung-Jin Park², Mi-Hee Yu², Eun-Ju Lee³, Sam-Pin Lee^{1,2}, and In-Seon Lee^{2*}

¹The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University

²Department of Food and Technology, Keimyung University

³Bio Research Institute, NUC Electronics Co. Ltd.

Abstract Antioxidant and anti-hyperglycemic activities of fermented red ginseng added with 5 kinds of medicinal herbs (FRGM) were investigated *in vitro*. Total polyphenol and total flavonoid contents in FRGM extracts were 22.41±3.51 and 16.80±4.22 µg/mg, respectively. FRGM extracts were capable of directly scavenging DPPH free radicals (RC₅₀=95.57±7.40 µg/mL), and then showed higher inhibitory activities for α-glucosidase. This study was also conducted to evaluate the effects of FRGM extracts in streptozotocin (STZ)-induced diabetic (DM) rats. The activities with regards to serum aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase were significantly decreased by FRGM extracts compared to those from the STZ group. The hepatic glutathione content depleted by STZ was significantly increased by FRGM extracts, but elevation of lipid peroxide content induced by STZ was significantly decreased by FRGM extracts. The decreased activities of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase after STZ-treatment were increased through the treatment of FRGM extracts. These results indicated that fermented red ginseng added with medicinal herbs can protect against STZ-induced diabetic rats through its antioxidant properties.

Keywords: fermented red ginseng, medicinal herb, streptozotocin, antioxidant

서 론

최근 우리나라는 잘못된 생활습관이나 식습관, 비만 인구의 급격한 증가로 당뇨병환자가 매년 증가하고 있으며, 특히 소아 당뇨병환자도 급격하게 증가하고 있어 사회적인 문제로 대두되고 있다(1,2). 인슐린 분비가 부족하거나, 인슐린에 대한 저항성의 증가로 인해 당질대사 이상을 초래하는 당뇨병(Diabetes mellitus)은 고혈당의 지속과 및 만성화로 인한 포도당의 당화과정에서 생성된 자유라디칼에 의해 체내 지질과산화 촉진 및 산화적 스트레스를 증가시켜 세포조직의 손상을 초래하고 나아가 고혈압, 동맥경화증, 고지혈증 등의 각종 당뇨 합병증을 일으킨다(3-5). 특히 당뇨병환자의 경우 활성산소의 생성과 산화의 방어기전 사이의 불균형으로 인해 산화적 손상이 더 잘 발생되고, 또한 자유 라디칼은 인슐린을 생성하고 분비하는 β-cell을 파괴시키는 인자로 알려져 있다(6,7).

Superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT)와 같은 항산화 효소

계 및 glutathione(GSH)과 같은 내인성 제거제와 식품 중에 존재하는 vitamin A, C, E, flavonoid 계열 및 polyphenol류 등의 생리활성 물질들이 활성 산소에 의한 조직손상을 막아 산화적 스트레스에 의한 조직손상을 막고 체내 항산화 방어체계를 증가시킨다는 많은 보고가 되고 있다(8-10). 따라서 산화스트레스를 줄일 수 있는 항산화제의 강화는 당뇨병의 예방과 완화에 관여할 수 있다.

한편 상엽(Mulberry leaves, *Morus alba* L.)은 소장에서 α-glucosidase의 활성을 억제하여 고혈당을 예방하고, 상엽의 fagomine 성분이 인슐린분비를 촉진하여 혈당강하를 유도하고(11), 상백피(*Mori radice cortex*)는 rat의 장에서 maltase와 sucrase 활성을 억제하여 혈중으로 포도당 유입을 차단해 고혈당을 예방한다고 알려져 있다(12). 또한 당귀(*Angelica gigas* N.) 및 백복령(*Poria cocos*)은 항산화 및 혈당강하효과가 있으며(13,14), 총목피(*Araria elata cortex*)는 당뇨유발 흰쥐와 토끼에서 혈당강하작용이 보고되었고(15), 인삼 및 홍삼도 면역증진, 고지혈증 및 당뇨병 예방 등의 약리효능이 알려져 왔다(16-19).

홍삼은 발효하면 사포닌의 대사물질들인 Rb1, Rb2, Rc, Rd 등 30종의 성분들이 장내미생물에 의해 인체가 흡수할 수 있도록 compound K 등의 화학성분으로 변화되고, compound K는 항당뇨, 면역증진 등의 효능이 보고되었다(20,21). 특히 유산균인 *Lactobacillus fermentum* NUC-C1으로 발효시킨 발효홍삼은 홍삼보다 항산화능이 증가하고, 항당뇨 활성이 알려진 Rg3, Rh2의 함

*Corresponding author: In-Seon Lee, Department of Food and Technology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea
Tel: 82-53-580-5538
Fax: 82-53-580-6447
E-mail: inseon@kmu.ac.kr
Received February 24, 2012; revised March 29, 2012;
accepted March 30, 2012

량이 크게 증가하며, 또한 streptozotocin(STZ)로 유발된 당뇨 흰쥐에 대해 항당뇨 활성이 있음을 확인하였다(22,23).

이에 본 연구에서는 항당뇨 활성이 알려진 약용식물을 첨가하여 발효홍삼을 제조하여 항당뇨 활성이 증가되는지를 검토해 보았다. 즉 항당뇨 활성이 알려진 5종의 약용식물의 추출물을 제조한 후 이들 추출물을 홍삼액에 첨가하여 *Lactobacillus fermentum* NUC-C1으로 발효시킨 다음, *in vitro*에서의 항산화능 및 α -glucosidase 저해활성을 검토해 보고, 또한 STZ로 유발된 당뇨 흰쥐에서 간 내 항산화 효소 활성에 미치는 영향을 검토해 보았다.

재료 및 방법

시료 조제

5종의 약용식물인 상엽(*Morus alba* L.), 상백피(*Mori radices cortex*), 당귀(*Angelica gigas* N.), 백복령(*Poria cocos*), 총목피(*Araria elata cortex*)는 경동시장에서 유통되는 건조된 형태의 국내산 한약규격품을 구입하여, 각 100 g에 10배의 증류수를 첨가하여 엔유씨 전자 약탕기(NUC Electronics Co., Daegu, Korea)를 사용하여 98°C에서 2시간 동안 추출하였으며 이를 2회 반복한 후 추출물을 획득하였다. 각각의 추출물은 여과지(Whatman No. 3)로 여과한 후 여액을 회전진공농축기(Eyela, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 농축하였다. 각 농축물은 동결건조하여 분말화 하였다.

또한 인삼은 금산농협에서 구입한 6년근 백삼건삼 300 g에 정제수 2 L를 넣고 엔유씨 발효홍삼액제조기(NUC Electronics Co.)를 사용하여 24시간 증숙한 후 4 L의 정제수를 더 첨가하여 90°C, 48시간 숙성시켜 홍삼액을 제조하였다. 제조한 홍삼액 그대로 또는 홍삼액에 상엽, 상백피, 당귀, 백복령, 총목피 추출물을 30:20:20:10:10 (v/v)의 배합비로 첨가한 다음, 유산균 스타터(*Lactobacillus fermentum* NUC-C1 KCCM10929P)를 각각 0.3% 접종 후 40°C에서 5일간 발효시켰다. 발효 후 감압농축, 동결건조하여 발효홍삼추출물(FRG) 또는 약용식물첨가 발효홍삼 추출물(FRGM)을 각각 제조하였다.

α -Glucosidase 저해활성 측정

α -Glucosidase 저해 활성은 nitrophenol 분석법을 응용하여 측정하였다(24). α -Glucosidase 효소액 0.2 U/mL(Sigma-Aldrich Chem. Co., St. Louis, MO, USA) 50 μ L, 12 mM *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside(Sigma-Aldrich Chem. Co.) 100 μ L, 시료 50 μ L 및 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.8) 50 μ L와 혼합하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후 0.1 M NaOH 100 μ L를 가하여 반응을 정지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 활성 비교를 위하여 acarbose를 사용하였다. 효소활성의 저해 정도는 다음 식에 의하여 산출하였다.

α -Glucosidase 저해활성(%)

$$= [1 - (\text{시료처리구의 흡광도} / \text{대조구의 흡광도})] \times 100$$

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법을 응용하여 측정하여 tannic acid를 이용한 표준곡선으로부터 총 폴리페놀 함량을 구하였다(25). 총 플라보노이드 함량은 Nivea 등의 방법에 의해 측정하였다(26). 즉 시료 100 μ L를 80% ethanol 900 μ L에 희석한 후 100 μ L를 취하여 10% aluminum nitrate와 1 μ M potassium acetate를 함유하는 80% ethanol 4.3 mL에 혼합하여 실온에서 40분간 방치

한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 flavonoid 함량은 quercetin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

α - α -Diphenyl- β -picrylhydrazyl(DPPH) radical 소거활성

시료의 free radical 소거활성은 stable radical인 DPPH에 대한 환원력을 측정하는 것으로 99% 메탄올에 각 시료를 녹여 농도별로 희석한 희석액 800 μ L와 메탄올에 녹인 0.15 mM DPPH 용액 200 μ L를 가하여 실온에 30분 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 추출물의 유리라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC_{50} 값으로 나타내었다.

실험동물의 당뇨유발

실험동물은 체중 180 \pm 10 g의 SD(Sprague-Dawley)계 수컷 rat (Orient Co., Seongnam, Korea)를 구입하여 실험하였다. 사육실의 환경은 온도 23 \pm 2°C, 습도 60 \pm 5%, 명암주기 12시간으로 일정하게 유지하였고, 1주일간 rat용 고형사료와 물을 충분히 공급하여 환경에 적응시킨 후 3주간 실험을 실시하였다. 실험군은 1개의 정상대조군(NC)과 3개의 당뇨유발군으로 나누었고, 당뇨유발군은 당뇨대조군(DM), 약용식물첨가 발효홍삼 투여군(FRGM100, FRGM200)으로 분류하여 3주간 사육하였다. 실험 식이는 NC군과 DM군은 일반 식이만을 공급하였고, FRGM군은 100 mg/kg 및 200 mg/kg의 FRGM 추출물을 물에 녹여 매일 일정한 시간에 경구 투여하였다. 이들 시료의 농도는 예비 실험 조건으로 결정하였으며, 실험기간 중 식이와 물은 자유롭게 섭취시키고 명암주기는 12시간 간격으로 유지하였다.

그리고 당뇨를 유발시키기 위해 1주일간 적용시킨 rat을 12시간 이상 절식시킨 후 streptozotocin을 0.01 M citrate buffer(pH 4.5)에 녹인 후 60 mg/kg bw으로 복강주사 하였고, NC군의 경우 동량의 생리식염수를 복강주사 하였다. 당뇨유발의 확인은 48시간 후 미정맥에서 채혈하여 공복 시 혈당 농도가 300 mg/dL 이상인 동물을 실험에 사용하였다.

효소원 조제

Rat을 도살하기 12시간 전에는 식이 공급을 중단하였고, 마취한 후 개복하여 복부대동맥으로 채혈하였으며, 채혈 후 약 30분 동안 방치한 뒤 원심분리(L-70, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) 하여 그 상등액을 취하여 얻은 혈청은 aminotransferase 활성을 측정하였다. 그리고 간은 생리식염수로 관류하여 간 조직에 남은 혈액을 제거하여 적출한 뒤 간 조직 1 g당 4배량의 0.1 M 인산완충액(pH 7.4)를 가하여 균질기로 마쇄시킨 후, 4°C 이하에서 600 \times g로 10분간 원심분리한 다음 microsomal 분획을 분리하였다. 이를 10,000 \times g에서 20분간 원심분리하여 mitochondria 분획을 얻고, 분리된 상등액은 다시 105,000 \times g에서 1시간 동안 초원심분리하여 cytosol 분획을 취하여 각 효소 활성에 사용하였다.

글루타치온 및 지질과산화물 함량 측정

간 조직중의 글루타치온 함량은 Ellman의 방법에 의하여 비단백성 sulfhydryl group을 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid로 발색시켜 412 nm에서 비색정량한 다음, 그 함량은 간 조직 1 g당 μ mole로 나타내었다(27). 그리고 지질과산화물의 함량은 Ohakawa 등의 방법에 의한 TBA법을 이용하여 생성된 malondialdehyde(MDA) 양을 측정하여 간 조직 1 g당 생성된 MDA μ mole로 표시하였다(28).

효소 활성도 측정

혈청 중 aminotransferase의 활성도는 Reitman과 Frankel의 방법으로 측정하였고(29), 간내 superoxide dismutase(SOD)의 활성 측정은 Marklund와 Marklund의 방법에 준하여 cytochrome C를 50% 억제하는 enzyme량을 1 unit로 산정하였고(30), catalase(CAT)의 활성은 Aebi의 방법으로 기질인 10 mM 과산화수소용액 및 효소액을 가하여 25에서 반응시켜 240 nm에서 소실되는 과산화수소의 양을 측정하였다(31). 또한 glutathione peroxidase(GP)의 활성은 Paglia와 Valentine의 방법에 준하여 NADPH, hydrogen peroxide 및 산화형 글루타치온이 NADPH에 의해 환원될 때 NADPH의 감소량을 340 nm에서 흡광도를 측정하여 나타냈으며(32), glutathione reductase(GR)의 활성은 Mize와 Langdon의 방법에 준하여 산화형 glutathione, NADPH 및 효소액을 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)에 가하여 25°C에서 10분간 반응시켜 감소되는 NADPH의 양을 340 nm에서 측정하였다(33). 효소 활성도는 1분당 1 mg 단백질이 생성하는 글루타치온의 양을 nmole로 표시하였다. 그리고 단백질의 정량은 Lowry 등의 방법에 준하여 bovine serum albumin(Sigma-Aldrich Chem. Co.)을 표준품으로 하여 측정하였다(34).

통계 처리

실험결과를 통계 처리하여 평균치와 표준편차를 계산하였으며, 각 실험군 간의 유의성 검정은 SAS program을 이용하여 5% 수준에서 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계분석 하였다.

결과 및 고찰

약용식물첨가 발효홍삼(FRGM)의 α -glucosidase 저해활성

FRGM의 제조는 먼저 홍삼액에 5종의 약용식물 추출물의 첨가량을 달리하여 즉 홍삼액, 상엽, 상백피, 당귀, 백복령, 총목피를 15, 15, 15, 15, 15 또는 50, 10, 10, 10, 10 또는 30, 20, 20, 10, 10, 10 (v/v)로 각각 제조한 후 5일간 발효시켜 α -glucosidase 활성을 검토하였다. 그 결과, Fig. 1과 같이 홍삼액 30%, 상엽 20%, 상백피 20%, 당귀 10%, 백복령 10%, 총목피 10%로 혼합하여 발효하였을 경우 α -glucosidase 활성 저해능이 제2형 당뇨치료제로 쓰이는 양성대조구인 acarbose보다 유의적으로 높게 나타났고, 이때 발효 전, 후 pH는 4.9에서 4.3으로 변화하였고, 유산균수는 접종초기 3×10^7 에서 2×10^9 cells/mL이었다(data not shown). 따라서 FRGM제조에는 α -glucosidase 활성 저해능이 가장 높게 나타난 홍삼액, 상엽, 상백피, 당귀, 백복령, 총목피 추출물을 30, 20, 20, 10, 10 (v/v)의 배합비로 첨가한 조건으로 다음 실험을 진행하였다.

또한 FRGM 추출물과 약용식물이 첨가되지 않은 발효홍삼(FRG) 추출물과의 α -glucosidase 저해활성을 비교한 결과, Fig. 2와 같이 FRG추출물에 비해 FRGM추출물은 높은 α -glucosidase 저해활성을 보였으며, 특히 FRGM 추출물 200 μ g/mL 및 1000 μ g/mL의 처리시 FRG의 동일 농도군에 비해 유의적으로 증가된 α -glucosidase 저해활성을 나타내었다. 또한 FRGM추출물의 경우 처리 농도가 증가할수록 α -glucosidase 저해활성이 증가하여, 1000 μ g/mL의 처리에서 가장 높은 α -glucosidase 저해 활성을 보였다. α -Glucosidase는 소장점막의 미세 융모막에 존재하며 탄수화물을 단당류로 분해하여 탄수화물의 소화와 흡수에 필수적인 효소로, α -glucosidase 활성이 저해되면 다당류의 분해가 억제되어 소장에서 glucose의 흡수를 지연시켜주어 식후 혈당의 상승을 막아줄 수 있다(12). 상백피와 상엽에는 α -glucosidase 저해활성을 갖는

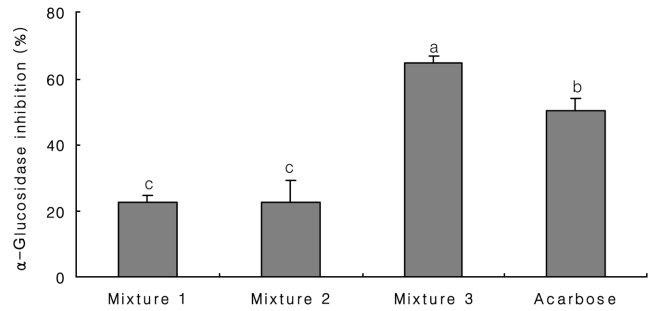


Fig. 1. α -Glucosidase inhibitory activities of mixtures of fermented red ginseng added with medicinal herbs. Mixture 1; Red ginseng : *Morus alba* L. : *Mori radices* Cortex : *Angelica gigas* N. : *Poria cocos* : *Araria elata* Cortex = 15 : 15 : 15 : 15 : 15 : 15 (v/v), Mixture 2; Red ginseng : *Mori folium* : *Mori radices* Cortex : *Angelica gigas* N. : *Poria cocos* : *Araria elata* Cortex = 50 : 10 : 10 : 10 : 10 : 10 (v/v), Mixture 3; Red ginseng : *Mori folium* : *Mori radices* Cortex : *Angelica gigas* N. : *Poria cocos* : *Araria elata* Cortex = 30 : 20 : 20 : 10 : 10 : 10 (v/v). The inhibitory activities of each sample were measured at the concentration of 1000 μ g/mL. Each value is mean \pm SD (n \geq 3). Different superscripts in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$).

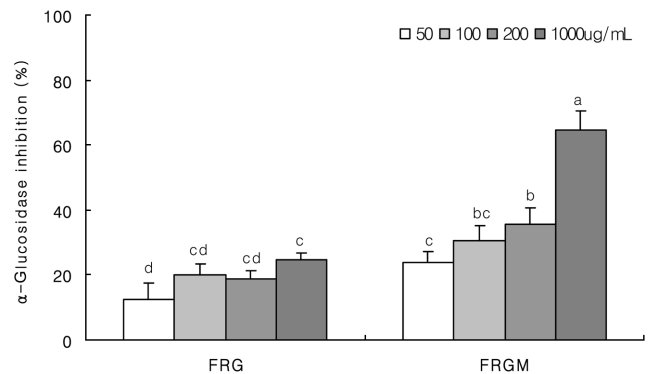


Fig. 2. α -Glucosidase inhibitory activities of water extracts from fermented red ginseng (FRG) and fermented red ginseng added with medicinal herbs (FRGM). Each value is mean \pm SD (n \geq 3). Different superscripts in the column indicate significant differences ($p < 0.05$).

1-deoxyojirimycin(DNJ) 및 여러 종류의 알칼로이드가 함유되어 있으며(35,36), 200 μ g/mL의 상백피 및 상엽의 열수추출물은 각각 56.62 \pm 2.17%, 45.16 \pm 2.71%의 α -glucosidase 저해율, 당귀 추출물도 25.22 \pm 6.61%의 α -glucosidase 저해율을 확인한 바 있다(37). 또한 발효홍삼은 STZ 유도 당뇨 쥐에서 이당류 분해효소활성을 억제하여 혈당을 낮추어, 발효홍삼에 상엽, 상백피, 백복령 등이 첨가됨으로써 발효홍삼보다 α -glucosidase 저해활성이 더 증가된 것으로 생각된다(22).

FRGM의 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 함량 및 DPPH free radical 소거활성

FRG 및 FRGM 추출물에 존재하는 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량은 각각 tannic acid, quercetin을 기준물질로 하여 측정하였다. 그 결과 Table 1과 같이, FRG 추출물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량은 각각 17.14 \pm 2.00 μ g/mg, 18.42 \pm 3.97 μ g/mg이었고, FRGM 추출물은 각각 22.41 \pm 3.51 μ g/mg, 16.80 \pm 4.22 μ g/mg으로 FRG 추출물과 유의적인 차이는 보이지 않았다.

Table 1. Total polyphenol and total flavonoid contents and α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl radicals (DPPH) scavenging activity of water extracts from fermented red ginseng (FRG) and fermented red ginseng added with medicinal herbs (FRGM)

Sample	Total polyphenols ¹⁾ ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Total flavonoids ²⁾ ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	DPPH RC_{50} ³⁾ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
FRG	17.14 \pm 2.00	18.42 \pm 3.97	259.47 \pm 16.71
FRGM	22.41 \pm 3.51	16.80 \pm 4.22	95.57 \pm 7.40

^{1,2)}Micrograms of total polyphenol and total flavonoid contents/mg of plants based on tannic acid and quercetin as standard, respectively. ³⁾Concentration required for 50% reduction of DPPH· at 30 min after starting the reaction. Each value is mean \pm SD (n \geq 3).

Table 2. Effect of FRGM extracts on the activities of serum AST and ALT in STZ-induced rats

Group ¹⁾	AST	ALT
	Karmen unit/mL of serum	
NC	47.43 \pm 5.20 ^{c,2,3)}	75.16 \pm 4.83 ^c
DM	135.83 \pm 11.21 ^a	123.68 \pm 10.71 ^a
FRGM100	98.07 \pm 7.15 ^b	94.04 \pm 7.44 ^b
FRGM200	87.42 \pm 6.52 ^b	80.46 \pm 8.11 ^{bc}

¹⁾NC, normal control group; DM, diabetic mellitus group; FRGM100, diabetic group fed with 100 mg/kg of fermented red ginseng added with medicinal herbs; FRGM200, diabetic group fed with 200 mg/kg of fermented red ginseng added with medicinal herbs. ²⁾Mean \pm SD. ³⁾Different superscripts in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$).

또한 FRG 추출물 및 FRGM 추출물의 DPPH 소거 활성에 대한 RC_{50} 값은 각각 259.42 \pm 16.71 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 95.57 \pm 7.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 FRGM에서 DPPH 소거능이 증가함을 확인하였다.

상엽, 상백피, 총목피 열수추출물 내에는 58-75 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 의 총 폴리페놀 함량이, 당귀, 백복령 열수추출물에도 약 20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 의 총 폴리페놀 함량이 존재하고, 상엽, 상백피, 당귀 및 총목피 열수추출물은 10-26 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 의 총 플라보노이드 함량이 존재하였다(37). 특히 총목피, 상엽 및 상백피 열수추출물의 DPPH 소거 활성에 대한 RC_{50} 값은 각각 28.04 \pm 0.74 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 32.78 \pm 9.82 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 64.50 \pm 2.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 높은 DPPH 소거능이 있음이 보고되었다(37). 즉 항산화 활성을 가진 이들 약용식물을 첨가하여 발효홍삼을 제조한 FRGM추출물은 FRG 추출물보다 총 폴리페놀 함량이 약간 증가하고 총 플라보노이드 함량은 감소되었지만 DPPH 소거능은 크게 증가하였다. 이는 홍삼을 발효하면 많은 ginsenoside의 종류가 존재하고, 그 중 Rg2, Rg3, Rh2 함량이 크게 증가되어 항산화 활성이 증가한다는 보고에 기인하여 DPPH 소거능이 크게 증가한 것으로 보인다(22,23).

혈액내의 aminotransferase의 활성 변화

STZ로 당뇨 유발된 쥐에 FRGM 추출물을 경구투여하면서 3주간 사육한 동물의 혈중 간 지표효소인 aspartate aminotransferase (AST) 및 alanine aminotransferase(ALT)의 활성을 측정하였다. 혈청 내 AST와 ALT의 활성은 Table 2와 같이 정상(NC)군에 비해 STZ를 투여한 당뇨유발(DM)군에서 유의적으로 증가하다가, FRGM 추출물 투여 시 이들 효소의 활성이 유의적으로 감소되었으나, FRGM 추출물의 투여농도에 의한 유의적인 차이는 보이지 않았다. 이는 본 실험과 동일한 조건으로 약용식물의 첨가 없이 홍삼만을 발효하여 제조한 발효홍삼 추출물을 100, 200 mg/kg으로 처리한 결과와 유사한 경향으로(23), STZ 투여로 증가된 ALT 및

Table 3. Effects of FRGM extracts on glutathione (GSH) and lipid peroxide contents in liver of STZ-induced rats

Group ¹⁾	GSH content ($\mu\text{moles}/\text{g}$ tissue)	Lipid peroxide content (MDA $\mu\text{moles}/\text{g}$ tissue)
NC	63.74 \pm 6.15 ^{a2,3)}	117.89 \pm 6.01 ^b
DM	44.54 \pm 2.22 ^b	140.57 \pm 5.45 ^a
FRGM100	56.58 \pm 3.79 ^a	97.49 \pm 5.29 ^c
FRGM200	57.87 \pm 4.16 ^a	94.72 \pm 5.27 ^c

¹⁾NC, normal control group; DM, diabetic mellitus group; FRGM100, diabetic group fed with 100 mg/kg of fermented red ginseng added with medicinal herbs; FRGM200, diabetic group fed with 200 mg/kg of fermented red ginseng added with medicinal herbs. ²⁾Mean \pm SD. ³⁾Different superscripts in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$).

AST의 활성이 감소됨을 알 수 있었다. 따라서 FRGM 추출물을 투여하면 STZ 투여에 의해 증가된 AST와 ALT의 활성이 감소하므로, FRGM 추출물은 aminotransferase의 활성을 감소시켜 STZ에 의한 간 손상에 대한 보호 효과를 보인다고 사료된다.

간 조직 중 글루타치온(GSH)과 지질과산화물의 함량 변화

간 조직중의 GSH의 함량 변화는 Table 3과 같이, DM군이 NC군에 비해 유의적으로 감소되었다가, FRGM 추출물의 투여 시 GSH 함량이 유의적으로 증가하였다. 이는 STZ가 체내로 흡수되면서 조직에 산화적 스트레스 환경을 유발하여 이를 해독하기 위한 GSH의 소모로 GSH 함량이 감소되었다가, FRGM 추출물 투여 시 체내 GSH의 소모를 덜어주어 그 함량이 증가된 것으로 보인다.

또한 간 조직중의 지질과산화물의 함량은 DM군이 NC군에 비하여 유의적인 증가를 보였고, FRGM 추출물 투여군은 STZ만 투여한 군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었으나, FRGM 추출물의 처리 농도별에 따른 유의적인 차이는 보이지 않았다. 이는 당뇨발생 시 산화적 스트레스의 증가로 인하여 조직내의 과산화물이 증가하며, 간 조직에서 MDA 함량이 증가했다는 보고처럼, STZ로 당뇨를 유도한 쥐에서 간의 지질과산화 함량이 증가되었다고 생각된다(38,39). 또한 NC군에 비해 FRGM 추출물 투여군에서 지질과산화물 함량이 유의적으로 감소되었다. 이는 FRGM 추출물의 경우 높은 DPPH 소거능을 가지고(Table 1), 홍삼의 발효로 Rg2, Rg3, Rh2와 같은 많은 ginsenoside의 증가로 인해 항산화 활성이 증가하여 NC군보다 지질과산화물 함량이 더 감소된 것으로 여겨진다(22,23). 또한 인삼 잎에 존재하는 폴리페놀 화합물의 직접적인 라디칼 소거능에 의해 당뇨 쥐의 혈중 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 농도가 감소되었다는 결과와도 일치하는 경향이었다(40). 따라서 FRGM 추출물의 처리로 간 조직의 지질과산화물이 감소되는 것은 생체 내에서 지질과산화물 생성 반응이 자유라디칼 제거능을 가진 약용식물을 첨가하여 발효한 홍삼추출물의 항산화 방어계의 작용에 의해 억제된 것으로 생각된다.

항산화 효소의 활성

당뇨병환자에서는 항산화 효소의 활성도가 감소한다고 알려져 있다(9). 당뇨병 환자에서 항산화 효소의 활성도가 감소되는 것은 효소의 당화현상과 산소자유기에 의한 소진 때문으로, 고혈당 상태에서 항산화 효소가 비효소적으로 당화될 경우 효소의 입체구조 및 기능에 변화가 초래되어 활성도가 감소된다(10).

먼저 SOD는 산화적 스트레스에 대한 세포의 방어에 일차적으

Table 4. Effect of FRGM extracts on the activities of super oxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GP) and glutathione reductase (GR) in STZ-induced rats

Group ¹⁾	SOD (Unit ²⁾ /mg protein)	CAT (decreased H ₂ O ₂ μmoles/mg protein/min)	GP (nmoles/mg protein/min)	GR (nmoles/mg protein/min)
NC	15.74±3.22 ^{bc2,3)}	17.87±2.21 ^a	37.11±3.14 ^a	17.32±3.21 ^{ab}
DM	13.91±2.34 ^c	10.01±2.25 ^b	32.35±2.01 ^b	14.47±3.07 ^b
FRGM100	32.99±5.81 ^a	15.06±2.66 ^a	36.79±1.82 ^a	26.54±3.26 ^a
FRGM200	20.61±1.67 ^b	15.49±1.37 ^a	36.80±1.93 ^a	24.02±3.05 ^a

¹⁾NC, normal control group; DM, diabetic mellitus group; FRGM100, diabetic group fed with 100 mg/kg of fermented red ginseng added with medicinal herbs; FRGM200, diabetic group fed with 200 mg/kg of fermented red ginseng added with medicinal herbs. ²⁾Mean±SD. ³⁾Different superscripts in the same column indicate significant differences ($p<0.05$).

²⁾Unit; 1 unit of SOD activity was defined as which inhibited the oxidation of pyrogallol by 50%.

로 관여하는 효소로서 superoxide anion을 과산화수소로 전환시키는데 관여한다. SOD 효소의 활성은 Table 4와 같이, DM군이 NC군에 비하여 감소하였으나 유의적인 차이는 없었으며, FRGM 투여군은 DM군에 비해 유의적인 증가를 보여 이들 추출물의 투여로 SOD 활성 증가로 자유 라디칼 생성이 억제된 것으로 생각되었다. 또한 FRGM 추출물 100 mg/kg의 투여군은 NC군 및 FRGM 추출물 200 mg/kg의 투여군보다 SOD 활성이 유의적으로 증가하였다. 즉 FRGM 100투여군에서 항산화 활성성분이 더 많이 함유된 FRGM 200투여군보다 더 큰 SOD 활성을 보이고 심지어 NC군보다도 더 큰 SOD 활성을 보인 것은, 쥐의 간에서 대사되는 FRGM 추출물의 최적의 농도가 100 mg/kg이기 때문인 것으로 생각된다.

생체 내에서 생성된 superoxide radical은 SOD에 의하여 제거되어 O₂와 H₂O₂로 전환되어, 자유라디칼에 의해 유발되는 생체 독성을 감소시킬 수 있다. CAT는 여기서 생성된 H₂O₂를 H₂O로 전환시켜 활성산소에 의한 산화적 손상으로부터 생체를 보호하게 하는 효소이다(30). CAT의 활성은 DM군에서 NC군에 비해 유의적으로 감소하였다가, FRGM 추출물 투여로 DM군에 비해 유의성 있게 증가하였다. 이러한 결과는 SOD의 작용에 의해 생성된 과산화수소를 분해하기 위하여 CAT의 활성이 증가된 것으로 생각된다. 그러나 FRGM 추출물의 처리농도에 따른 CAT 활성에서의 차이는 보이지 않았다.

그리고 GP는 생체내 존재하는 항산화제인 GSH를 기질로 하여 과산화지질과 H₂O₂의 분해를 촉매시키는 효소로서 조직세포의 산화성 손상으로 부터 세포막을 보호하는 역할을 한다(41). GP의 활성은 NC군에 비하여 DM군에서 유의성 있게 감소하였고, FRGM 추출물 투여군은 유의성 있게 증가되었다. 그러나 FRGM 추출물의 처리농도에 따른 GP 활성에서의 차이는 보이지 않았다.

또한 GR는 GP에 의해 생성된 산화형 글루타치온(GSSG)을 NADPH로 소모하면서 GSH로 환원시키는 역할을 하고, 이 산화 환원 반응을 통해 세포내 GSH pool을 환원상태로 유지함으로써 간접적으로 세포 보호 및 항상성 유지에 기여한다(42). 간 조직 중의 GR 활성의 변화는 NC군에 비하여 DM군에서 감소하였다가, FRGM 추출물 투여한 군에서는 DM군에 비해 GR 활성이 유의적으로 증가하였다.

STZ 투여로 생성된 활성산소종(ROS)의 체내 항산화 효소에 대한 직접적인 공격으로 인해 항산화 효소의 활성이 감소되었다는 보고와 유사하게(43), DM군에서는 SOD, CAT, GP 및 GR 활성이 모두 감소되었다. 이는 당뇨 쥐에서 불포화지방산 함량이 높은 생체막이 산화적 스트레스에 민감하여 지질과산화가 촉진됨으로써 세포 소기관들의 산화적 손상이 가속화되어 효소 활성이 저하된 것으로 보인다(44).

그러나 FRGM 추출물 투여로 이들 항산화 효소 활성이 증가하여, 인삼 잎 추출물이나 발효홍삼 추출물을 당뇨쥐에 투여하면 SOD, CAT 및 GP 활성이 증가되었다는 보고와 일치하는 경향이 있었다(22,40). 특히 발효홍삼 내 존재하는 Rh2와 같은 ginsenoside 등이 항산화 효소의 유전자 발현을 증가시켜 항산화 효소의 활성을 촉진하여 강력한 항산화능이 존재하며(26,41), 또한 5종의 약용식물이 가진 항산화능에 의해 이들 항산화 효소 활성이 증가된 것으로 보인다.

따라서 FRGM은 *in vitro*에서 항산화 활성 및 α -glucosidase 저해활성이 높았으며, 또한 STZ의 투여로 생성된 유해 활성 산소를 소거시키기 위해 항산화계 효소의 활성을 증대시키고, 감소된 GSH 함량을 증가시켜 세포손상으로부터 생체를 보호하는 작용을 하는 것으로 여겨진다.

요 약

5종의 약용식물을 첨가한 발효홍삼(FRGM) 추출물의 항산화 활성 및 α -glucosidase 저해 활성을 *in vitro*에서 검토하였고, 또한 STZ로 당뇨를 유발시킨 흰쥐에서 FRGM 추출물의 효능을 살펴 보았다. 그 결과, FRGM 추출물은 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량이 각각 22.41±3.51 μg/mg, 16.80±4.22 μg/mg으로 존재하였고, DPPH 소거 활성을 가지고(RC₅₀=95.57±7.40 μg/mL), 또한 높은 α -glucosidase 저해 활성을 나타내었다. STZ 투여에 의해 증가된 혈청 내 ALT와 AST의 활성이 FRGM 추출물의 투여로 감소하였으며, 간 조직중의 글루타치온 함량은 STZ 투여군에서는 감소되었다가 FRGM 투여시 유의적인 증가를 보였고, 지질 과산화물 함량은 STZ 투여시 증가되었다가 FRGM 추출물의 투여시 유의적으로 감소되었다. 또한 간 조직중의 SOD, CAT, GP 그리고 GR의 활성도 STZ 투여로 유의적으로 감소되었다가, FRGM 추출물의 투여로 이들 항산화효소 활성이 유의적으로 증가하였다.

감사의 글

본 연구는 지역산업기술개발사업 연구과제(과제번호 70002701) 및 지식경제부 지원 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화 연구센터의 지원으로 수행되었음에 감사드립니다.

문 헌

- Ahn KJ. Westernization of Korean diabetes. Korea Clin. Diabetes 11: 91-94 (2010)
- Georg P, Ludvik B. Lipid and diabetes. J. Clin. Basic Cardiol. 3:

- 159-162 (2000)
3. Sakurai T, Tsuchiya S. Superoxide production from nonenzymatically glycated protein. *FEBS Lett.* 236: 406-410 (2006)
 4. Lones TJ. Oxidized low density lipoproteins: a role in the pathogenesis of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes Med.* 8: 411-419 (1991)
 5. Tai ES, Lim SC, Tan BY, Chew SK, Heng D, Tan CE. Screening for diabetes mellitus: a two-step approach in individuals with impaired fasting glucose improves in detection of those at risk of complications. *Diabetes Med.* 17: 771-775 (2000)
 6. Adeghate E, Parvez SH. Nitric oxide and neuronal and pancreatic beta cell death. *Toxicology* 153: 143-156 (2000)
 7. Laybutt DR, Kaneto H, Hasenkamp W, Grey s, Jonas JC, Sgroi DC, Groff A, Ferran C, Bonner-Weir S, Sharma A, Weir GC. Increased expression of antioxidant and antiapoptotic genes in islets that may contribute to β -cell survival during chronic hyperglycemia. *Diabetes* 51: 413-456 (2002)
 8. Cross EE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL. Oxygen radicals and human disease (clinical conference). *Ann. Intern. Med.* 107: 526-545 (1987)
 9. Kim SK. Evaluation of antioxidant activity. *Safe Food* 4: 35-40 (2008)
 10. West IC. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabetes Med.* 17: 171-180 (2000)
 11. Kimura M, Chen F, Nakashima N, Kimura I, Asano N, Koya S. Antihyperglycemic effects of N-containing sugars derived from mulberry leaves in streptozotocin-induced diabetic mice. *J. Trad. Med.* 12: 214-219 (1995)
 12. Choi HJ, Kim NJ, Kim DH. Inhibitory effects of crud drugs on α -glucosidase. *Arch. Pharm. Res.* 23: 261-266 (2000)
 13. Lee MS, Han MK, Lee KB, Park SS. Effects of Chinese medical material extract on plasma lipids and glucose in male rats. *Korean J. Food Nutr.* 16: 146-151 (2003)
 14. Yang KM, Shin SR, Jang JH. Effect of combined extract of safflower seed with Herbs on blood glucose level and biochemical parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35: 150-157 (2006)
 15. Lee EB, Kim OK. Antihypercemic constituent of *Aratia elata* root bark(1)-Antihypercemic action of the extract and fractions. *Korean J. Pharmacol.* 24: 213-218 (1993)
 16. Attelek AS, Wu JA, Tuan CS. Ginseng pharmacology: Multiple constituents and multiple actions. *Biochem. Pharmacol.* 58: 1685-1693 (1999)
 17. Yun SH, Joo CN. Study on the preventive effect of ginsenoside against hypercholesterolemia and its mechanism. *Korean J. Ginseng Sci.* 17: 1-12 (1983)
 18. Kim US, Koh HK, Kang SK. Study of the effects of different products of ginseng radix aqua-acupuncture on the alloxan-induced diabetic rats. *J. Korean Acupuncture Moxibustion Soc.* 6: 1-13 (1989)
 19. Lee CK, Choi JW, Kim HK, Han YN. Biological activities of acidic polysaccharide of Korean red ginseng. II. Effects on hyperlipidemia I induced by alcohol. *J. Ginseng Res.* 23: 8-12 (1999)
 20. Trinh HT, Han SJ, Kim SW, Lee YC, Kim DH. Bifidus fermentation increases hypolipidemic and hypoglycemic effects of red ginseng. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 1127-1133 (2007)
 21. Kim DH. Metabolism of ginsenosides to bioactive compounds by intestinal microflora and its industrial application. *J. Ginseng Res.* 33: 165-176 (2009)
 22. Kim HJ, Chae IG, Lee SG, Jeong HJ, Lee EJ, Lee IS. Effects of fermented red ginseng extracts on hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Ginseng Res.* 34: 104-112 (2010)
 23. Kim HJ, Lee SG, Chae IG, Kim MJ, Im NK, Yu MH, Lee EJ, Lee IS. Antioxidant effects of fermented red ginseng extracts in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Ginseng Res.* 35: 129-137 (2011)
 24. Matsui T, Ueda T, Oki T, Sugita K, Terahara N, Matsumoto K. α -Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins
 1. Survey of natural pigments with potent inhibitory activity. *J. Agr. Food Chem.* 49: 1948-1951 (2001)
 25. Folin O, Denis W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* 12: 239-249 (1912)
 26. Nivea MMI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. Ethnopharmacol.* 71: 109-114 (2000)
 27. Ellman GL. Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 70-72 (1959)
 28. Ohkawa H, Ohishi N, Yaki K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351-358 (1979)
 29. Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.* 28: 56-63 (1957)
 30. Marklund S, Marklund CT. Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47: 469-474 (1974)
 31. Aebi H. Catalase in *Methods of Enzymatic analysis*. Vol. 2. Bergmeyer HU (ed.). Academic Press, New York, NY, USA. pp.673-698 (1974)
 32. Paglia ED, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70: 158-169 (1967)
 33. Mize CE, Langdon RG. Hepatic glutathione reductase: I. Purification and general kinetic properties. *J. Biol. Chem.* 237: 1589-1595 (1962)
 34. Lowry OH, Rosebrough NH, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951)
 35. Hwang KY, Kim YH, Cho YS, Park YS, Lee JY, Kang KD, Kim K, Joo DK, Ahn DK, Seong SI. Hypoglycemic effect of fermented soybean culture mixed with mulberry leaves on neonatal streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37: 452-458 (2008)
 36. Asano N, Oseki K, Tomioka E, Kizu H, Matsui K. N-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities. *Carbohydr. Res.* 259: 243-255 (1994)
 37. Jeong HJ, Lee SK, Lee EJ, Park WD, Kim JB, Kim HJ. Antioxidant activity and anti-hyperglycemic activity of medicinal herbs extracts according to different extraction methods. *Korean J. Food Sci. Technol.* 42: 571-577 (2010)
 38. Kim DJ, Seug KS, Kim DW, Ko SR, Chang CC. Antioxidative effects of red ginseng saponins on paraquat-induced oxidative stress. *J. Ginseng Res.* 28: 5-10 (2004)
 39. Kim JS, Kim KW, Choi KJ, Kwak YK, Im KS, Lee KH, Chung HY. Screening of antioxidative components from red ginseng saponin. *J. Ginseng Res.* 20: 173-178 (1996)
 40. Park SN, Choi SW, Boo YC, Kim CK, Lee TY. Effects of flavonoids of ginseng leaves on erythrocytes membrane against singlet oxygen caused damage. *J. Ginseng Res.* 14: 191-199 (1990)
 41. Latha M, Pari L. Modulatory effect of *Scoparia dulcis* in oxidative stress-induced lipid peroxidation in streptozotocin diabetic rats. *J. Med. Food* 6: 379-386 (2003)
 42. Kitamura JF, Yamazaki T, Camba EA, Sato K. Change in activities of glutathione reductase during chemical hepatocarcinogenesis. *Gunn.* 74: 649-655 (1983)
 42. Halliwell B, Gutteridge JM. Roles of free radicals and catalytic metal ions in human disease. An overview. *Methods Enzymology*. Vol. 186. Fleischer S, Packer L (eds). Academic Press, New York, NY, USA. pp.1-12 (1990)
 43. Lai DM, Tu YK, Liu IM, Chen PF, Cheng JT. Mediation of beta-endorphin by ginsenoside Rh2 to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. *Planta Med.* 72: 9-13 (2006)
 44. Bompard GJ, Prevot DS, Basacands JL. Rapid automated analysis of glutathione reductase, peroxidase and S-transferase activity: Application to cisplatin induced toxicity. *Clin. Biochem.* 23: 501-504 (1990)