

랫드를 이용한 헛개나무과병 열수추출물 투여가 운동에 의한 피로회복과 운동수행능력에 미치는 기전 규명

나천수 · 김희경 · 김진범 · 노현정 · 엄나나 · 노혜지 · 나대승* · 동미숙* · 홍철이#

(주)생명의나무, *고려대학교 생명공학원

(Received August 22, 2013; Revised October 22, 2013; Accepted October 23, 2013)

The Effects of *Hovenia dulcis* Fruit Hot Water Extracts on Anti-fatigue and Improvement of the Exercise Performance in SD Rats

Chun-Soo Na, Hee Kyung Kim, Jin Beom Kim, Hyun Jeong Roh, Na-Na Um, Hae-Ji Noh, Dae-Seung Na*, Mi-Sook Dong* and Cheol Yi Hong#

Lifetree Biotechnology Institute, Lifetree Bitotech Co. LTD., Gyeonggi-do 441-813, Korea

*School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract — The present study investigated the effects of *Hovenia Dulcis* (HD) fruit extract powder on the improvement of physical activity, especially exercise capacity. Forty mice were divided into 4 groups including normal controls, negative controls, 100 (HD-100) and 200 (HD-200) mg/kg HD fruit extract powder groups for 5-times exercises using treadmill. Normal control did not performed treadmill running but others did 5-times for 10 days. HD fruit extract powders were administered orally one-times per day for 10 days before treadmill exercise and normal and negative controls were fed with excipient water. After 5-times exercise, blood biochemical analysis showed that aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH) and creatine phosphokinase (CK) activities and blood lactate concentration were statistically increased in negative controls than in normal controls. They were decreased in HD fruit extract powder groups, compared with negative controls. These results were considered as the effects of HD fruit extract powders on reduced tissue damages during exercise. Other measured indices did not reveal remarkable differences. All together, these results suggest that HD fruit extract powders may enhance the exercise performance by recovering the exercise-fatigue via blood lactate concentration by reducing blood LDH activity and via reduction of blood CK and AST activity.

Keywords □ *Hovenia Dulcis* Thunb. fruit extract, running exercise, LDH, lactate, CK

세계적으로 생물자원에 대한 관심이 커지고 천연물질에서 유래한 생리활성 물질의 산업적 이용성이 증대되고 있다. 천연물질에서 생리활성 물질을 찾는 연구는 오랜 시간 동안 여러 연구자들에 의해 이루어 졌으며 질병에 대한 치료제 및 예방책 또는 건강보조제로서 식물을 널리 이용 하였다. 또한 경제성장과 국민소득의 증대로 건강식품 및 무공해 식품에 대한 국민들의 관심도의 급증과 약용 식물에 대한 여러 생리활성 기능이 밝혀짐에 따라 이들을 추출 정제하여 기능성 소재를 개발하는 연구가 많은 관심을 가져오고 있다.^{1,2)}

한편 현대사회의 극심한 스트레스와 운동부족으로 인한 각종

질병 등의 예방을 위해 운동 및 운동의 효과를 극대화시키기 위해 다양한 식이요법들과 근육의 양과 크기를 증대시킬 목적에 운동능력향상 보조제를 섭취하고 있으며, 운동능력향상 보조제의 또 다른 흥미로운 역할은 피로물질에 대한 내성을 키우거나 감소시키고, 지질과산화물을 증가시키는 것이다.^{3,4)}

장시간 지속적인 운동 중 경기 후반기에 운동수행능력을 증가시키기 위해서는 체내에 저장되어 있는 glycogen 소모를 최소화할 필요가 있다. 그 이유는 저혈당이나 glycogen 고갈이 피로의 원인 중 하나이기 때문이며 따라서 운동보조제의 성분을 구성할 때에는 glycogen 보충도 고려하여야 한다. 가장 흡수가 빠른 glucose를 운동 전 섭취하면 근수축의 지속시간을 증가시키고 근피로를 지연시킬 수 있으며,⁵⁾ 운동 중 glucose 투여는 운동 중 혈당의 증가와 회복기에서 혈중 lactate의 급격한 감소를 야기하여 운동수행능력과 운동피로의 회복에 효과가 있다.⁶⁾ 한편, 운동

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 031-291-1158 (팩스) 031-292-1158
(E-mail) cyhong@hanmail.net

수행 시 필요로 하는 에너지를 생성하기 위하여 근육 내에서 대사과정의 수행 시 효소의 작용은 매우 중요한 역할을 담당한다. 체내 효소활성도의 변화는 트레이닝 수행에 따른 심폐기능과 관련성이 높은 것으로 알려져 왔으며,⁷⁾ 운동수행 시 효소 활성도의 변화는 트레이닝 효과의 분석, 트레이닝 정도 및 운동수행의 강도조절을 위한 지표로 이용되기도 한다.⁸⁾

혈청 AST(Aspartate amino-transferase)와 ALT(Alanine-transferase)는 SGOT(Serum glutamic oxalate transaminase)와 SGPT(Serum glutamic pyruvate transaminase)로도 불리우며 이러한 amino-transferase는 keto acid와 amino acid간의 amino 기의 교환을 촉매하는 효소로서 심근경색증, 전염성 단핵구증, 전염성 간염, 기타 간질환의 marker로서 유용하게 쓰이고, 특히 ALT는 장기간의 격렬한 운동 시에 glutamate의 amino acid를 pyruvate로 전이 시키는 반응을 촉진시켜 단백질이 에너지로 사용될 수 있도록 작용하기도 한다고 한다.⁹⁾ AST, ALT는 거의 모든 장기에 존재하고 특히 AST는 심장, 간장, 골격근에 많이 존재하며 ALT는 간장에 많이 존재하는데 혈청에는 각각 소량 존재하지만 과도한 운동 후에는 AST값의 상승을 가져오고 식사에 의한 영향은 거의 받지 않는 것으로 알려져 있다. 혈청 AST와 ALT값의 증가는 근육조직에서 분비된 것이 아니라, 간장과 다른 기관으로부터 유래된 것이라 한다.¹⁰⁾ 운동훈련은 지속적인 Training으로 혈청효소의 증가를 막고, 정상 혈청 내 동일 효소의 출현을 막는다. 특히 혈중 젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase: LDH)를 비롯한 그 동위효소 분포 비의 변화는 운동수행 후 피로현상과 조직손상을 분석하기 위한 지표로서 활용되는 것으로 보고되었다.¹¹⁾ 최근에 일반적인 수축 형태와 비교해서 고강도의 저항운동과 내리막 달리기와 같은 이심성 수축의 운동 형태에서 근육 손상의 간접적인 지표로 이용되고 있는 근육세포 효소인 혈중에서의 creatine kinase(CK)의 농도 증가와 근육 손상 발생 및 지연 효과에 관하여 많은 결과들이 보고 되고 있다.¹²⁻¹⁵⁾ Lovlin 등¹⁶⁾은 최대 산소섭취량의 40%와 70% 강도에서 운동시 혈장 과산화지질이 감소하는 반면 최대 산소섭취량 100%의 수준에서 운동 후 지질과산화는 증대하였다고 보고하고 있다. Criswell 등¹⁷⁾도 운동강도와 비례하여 활성산소가 증가되는 양상을 보인다고 하였다. 운동으로 야기된 산화성 스트레스가 클수록 이에 대항하는 항산화 효소의 활성도가 증가하며, 이는 LDH와 반응하여 총 활성산소 생성과 근육 손상으로 인한 염증에도 일부 관여하는 것으로 보고하였으나, 운동자극이나 운동강도에 따른 유의한 변화가 없다는 보고들이 제시되고 있다.¹⁸⁾

혈중 lactate 농도는 운동 동안 무산소성 대사 정도를 측정하는데 유용한 지표로 탈진정도를 측정하는데 사용된다.¹⁹⁾ 혈중 lactate가 근육 내 lactate 생산 정도를 반영하는 지는 불분명하지만,²⁰⁾ 근육 내 lactate는 간으로 이동되어 glucose로 전환되며 이는 다시 근육으로 이동하여 glycogen으로 전환된다.²¹⁻²³⁾ 또한, 미토콘

드리아 Krebs 회로 효소인 citrate synthase(CS)는 에너지 대사에 중요한 역할을 하는 효소로 산화적 호흡능력을 평가하는 대사 지표이다.²⁴⁾ 골격근 내 미토콘드리아 호흡은 운동으로 인해 생성되는 대부분의 산화스트레스-원인이 된다. Holloszy 등²⁵⁾은 운동 후 골격근에서 산화효소 활성이 증가하는 것을 보고했다.

헛개나무(*Hovenia dulcis* Thunb)는 갈매나무과의 교목으로 일명 지구자나무 또는 피조라고도 한다. 나천수 등²⁶⁾은 헛개나무과 병추출물이 간 손상과 관련된 ALT와 AST를 감소시키는데 탁월한 효과가 있다는 것을 밝혔다. 최근에 헛개나무과병추출물을 투여한 마우스가 투여하지 않은 마우스보다 수영시간이 현저히 증가함으로써 지구성 운동능력을 향상시킨다는 효능이 밝혀졌다.²⁷⁾ 이 연구는 헛개나무과병추출물이 마우스의 수영시간을 약 2.7배 이상 증가시켰으며 이의 기전에 대한 연구 결과 혈중 LDH Level과 lactate 농도가 대조군보다 낮은 경향을 보였다. 한편, triglyceride가 fatty acid로 전환을 촉진하였고, 특히 탈진운동이 항산화 효소를 감소시키며²⁸⁾ 지질과산화가 증가한다는 보고²⁹⁾에 근거해, 과격한 운동 후에 생성된 산소 자유기들(oxygen radicals)의 제거가 헛개나무과병추출물의 투여로 인한 catalase 활성의 증가와 지질과산화 생성량의 감소로 수영시간의 증가를 야기한 것으로 사료되었다. 그러나 측정 지표는 마우스가 지쳐서 물위로 나오지 못할 때까지 수행한 연구로부터 유래한 결과 값으로 수영이 아닌 다른 운동 및 적정운동 수행 후 지표의 변화를 관찰할 필요성이 대두되었다. 그러므로, 본 연구에서는 헛개나무의 과병을 열수 추출하여 분말화하고 이를 옹성 SD 랫드에 투여한 후 트레이닝 운동을 수행하고 혈액생화학적 검사 및 조직 내 생화학적 검사를 수행하여 운동능력 향상과 관련된 바이오마커들의 효과를 평가하였다.

재료 및 방법

실험동물의 사육 및 군의 분류

실험동물은 5주령 Rat, Cri:CD(SD), specific pathogen free (SPF)로 사용하였으며(ORIENTBIO Inc., Korea), 수컷 랫드를 구입하여 체중을 측정하고 1주일간 순화시킨 후 사용하였으며, 평균체중이 균등하도록 군당 9마리씩 Normal control군, Negative control군, 헛개나무과병추출분말 100 mg/kg(LHDE) 투여군, 헛개나무과병추출분말 200 mg/kg(HHDE) 투여군 등 총 4군으로 나누었다. 사육조건으로는 2~3마리씩 사육하였으며, 온도는 20.0~25.0°C, 상대습도는 41.2~58.5%, 조도는 150~300 Lux로 오전 7시부터 오후 7시까지 12시간 명암주기(조명시간)로 사육하였으며, 바이오톡스텍의 사육가이드라인을 준수하여 사육하였다.

헛개나무과병추출분말 제조 및 경구투여

헛개나무과병을 물과 1:10(W/V)의 비율로 95°C에서 4시간

동안 추출하고 추출물을 고형분의 함량을 40%가 되게 농축하였다. 고형분 40%의 농축액과 텍스트린을 6:4의 비율로 혼합하여 분무건조(spray-dry)하여 헛개나무과병추출분말을 얻었다. 헛개나무과병추출분말은 실온에서 보관하고 본 실험의 재료로 사용하였다.

헛개나무과병추출분말의 지표성분인 Quercetin의 량은 Tosoh ODS column(4.6×150 mm, 5µm)을 이용하여 Agilent Technologies 1200 Series HPLC system(Model Agilent Technologies 1200 Series DAD SL G1315C. USA)를 이용하여 분석하였으며, 측정 파장은 350 nm이며, 2% 초산-45% 아세트나이트릴과 2%초산-증류수를 사용하였다. 본 실험에 사용된 헛개나무과병추출분말의 Quercetin의 함량은 7.6 µg/g으로 측정되었다.

추출물은 경구투여 하였으며, 운동시작일부터 조직 적출일까지 강제 달리기운동 직전에 1일 1회, 10일간 10일간 총 10회 반복 강제투여 하였으며, 투여용량은 100 mg/kg, 200 mg/kg으로 주사용수(1차 증류수)에 현탁하여 투여하였으며, 투여액량은 10 ml/kg으로 산출하였다. Normal control군과 Negative control군은 부형제인 주사용수를 투여하였다.

식이 및 체중측정

사료는 실험동물용 고형사료(Rodent diet 2918C; Harlan Teklad, Indianapolis, IN, USA)이며, 식이와 음료는 자유급식을 하였다. 체중측정은 운동시작일부터 조직 적출일까지 주 1회 측정하였다.

Treadmill을 이용한 강제 달리기운동

Normal control군은 달리기운동을 수행하지 않았으며, Negative control군, 헛개나무과병추출분말 100 mg/kg투여군, 헛개나무과병추출분말 200 mg/kg 투여군은 Murase 등³⁰⁾의 방법을 변형하여, 1~3차 운동은 속도 18 m/min, 기울기 5°, 전기 자극 1 mA 이하로 30분간 강제달리기 운동을 수행하였고 4~5차 운동은 속도 20 m/min, 기울기 5°, 전기자극 1mA 이하로 60분간 강제달리기 운동을 수행하였다. 기울기 및 시간의 운동조건을 달리하여 10일간 2일 간격으로 5회의 강제달리기 운동을 수행하였다.

혈액채취 및 조직적출

각 군별로 마지막 강제 달리기운동 종료 후, isoflurane으로 마취하여 개복하고, 복대동맥에서 혈액을 채취하였다. 혈액을 채취한 후, 간 및 양쪽 뒷다리의 근육조직을 적출하고, 중량을 측정하였다. 중량을 측정한 간 및 근육 조직은 액체질소를 이용하여 급속동결 시키고 초저온고(-80~-60°C)에서 보관하였다. 측정된 간 및 근육조직의 중량은 체중에 대한 상대장기중량으로 환산하였다.

혈액생화학적 검사

채취한 혈액은 serum-separating tube 및 heparinized tube에서 혈장 및 혈청으로 각각 원심분리(3,000 rpm, 10분, Smart R17, Hanil Science Ind., Korea) 하였다. 혈청은 혈액생화학분석기(7080, Hitachi, Japan)를 이용하여 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase(AST), glucose, creatinine, blood urea nitrogen(BUN), lactate dehydrogenase(LDH) 및 creatine phosphokinase(CK)를 측정하였다.

혈액 및 조직 내 Lactic acid, Citrate synthase 및 항산화 분석

혈액 내 lactic acid(LA) 농도는 Bioassay System사(U.S.A.)의 분석 Kit ECLC-100를 이용하고 근육조직 내 citrate synthase (CS) 활성도는 Sigma-Aldrich사(USA)의 citrate synthase assay kit를 이용하여 제조사의 권장 프로토콜에 따라 각각 측정하였다. 조직 내 항산화 활성 분석은 Cell Biolabs사(USA)의 OxiSelect™ superoxide dismutase activity assay kit를 이용하여 액체질소로 급속 동결시킨 근육조직 시료에서, 혈장 내 malondealdehyde (MDA) 농도는 Cell Biolabs사(USA)의 OxiSelect™ TBARS assay kit를 이용하여 제조사의 권장 프로토콜에 따라 각각의 활성을 측정하였다.

통계분석

실험결과는 SAS(Statistical Analysis System, Version 8.20, USA)를 사용하여 평균과 오차(mean SD)를 제시하였다. 정상대조군과 음성대조군 간에 Folded-F 검정법을 실시하여 등분산성을 검정하였다(유의수준: 0.05). 등분산성인 경우 Student t-test를 실시하였고(유의수준: 양측 0.05 및 0.01), 등분산성이 기각되면 Aspin-Welch t-test를 실시하였다(유의수준: 양측 0.05 및 0.01). 음성대조군과 시험물질투여군간에는 Bartlett's test를 실시하여 등분산성을 검정하였다(유의수준: 0.05). 등분산인 경우 One-way analysis of variance(ANOVA)를 실시하였고(유의수준: 0.05), 유의성이 관찰되지 않아 Dunnett's t-test의 다중검정을 실시하지 않았다. 비등분산성인 경우, Kruskal-Wallis test를 실시하였고(유의수준: 0.05), 유의성이 관찰되지 않아 Steel's test의 다중검정을 실시하지 않았다(유의수준: 단측 0.05 및 0.01).

실험결과

체중 및 장기무게 변화

정상대조군의 체중은 투여 0일부터 마지막 투여일까지 209.6±4.4~282.4±10.1 g의 변동을 나타냈다. 음성대조군의 체중은 투여 0일부터 마지막 투여일까지 209.3±3.5~277.4±9.4 g의 변동을 나타내었으며, 정상대조군과 비교하여 통계학적으로

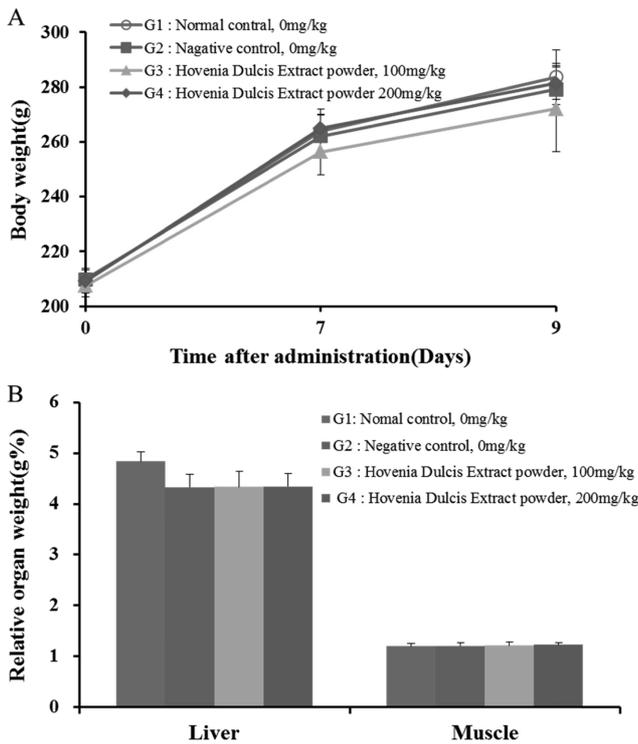


Fig. 1 – Effects of *Hovenia dulcis* Peduncle Hotwater Extract (HD) on body weight and organ weights in mice. A) body weights were measured in mice fed HD 100 mg/kg (HD-100) or HD 200 mg/kg (HD-200) at 0, 7 and 9 day as described in materials and methods. B) organ weights were measured in liver and a hind legs after blood collection as described in materials and methods. Values are mean±S.D. of 8 mice in each group.

유의한 차이가 나타나지 않았다. HD-100 및 HD-200 시험물질 투여군의 체중은 투여 0일부터 마지막 투여일까지 각각 208.1±4.1~272.0±15.8 g 및 209.0±2.7~282.0±5.8 g의 변동을 나타내었으며 음성대조군과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다(Fig. 1A). 간의 무게는 100 g당 무게로 환산하였을 때, 정상대조군(4.84±0.19 g%)에 비해 음성대조군(4.33±0.25 g%)에서 통계적으로 유의하게 감소하였으나(p=0.0002), HD-100(4.33±0.31 g%)과 HD-200(4.34±0.25 g%)의 음성대조군과 사이에 통계적인 유의성을 보이지 않았다(Fig. 1B). 근육의 무게는 100 g당 무게로 환산하였을 때, 정상대조군(1.20±0.06 g%)과 음성대조군(1.20±0.07 g%) 사이에 통계적인 유의성을 나타내지 않았으며, HD-100(1.22±0.70 g%)과 HD-200(1.22±0.05 g%)군도 음성대조군과 통계적인 유의성을 나타내지 않았다(Fig. 1B).

혈액내 에너지원 분석

운동수행 중의 에너지원 중에 하나인 glucose를 분석한 결과(Fig. 2), 혈중 glucose level은 정상대조군에서 170±25 mg/dl, 음성대조군에서 191±27 mg/dl로 증가하는 경향을 보였으나 통계

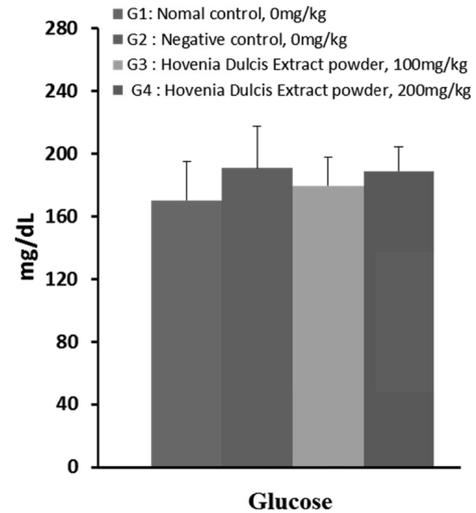


Fig. 2 – Effects of *Hovenia dulcis* Peduncle Hotwater Extract (HD) on the change of blood glucose level in mice. Mice were fed with HD at doses of 100 mg/kg (HD-100) and 200 mg/kg (HD-200) for 10 days. Blood levels of glucose in mice were determined as described in materials and methods. Values are mean±S.D. of 8 mice in each group.

적으로 유의하지는 않았다. HD-100 군의 혈중 glucose level은 180±18 mg/dl이었으며, HD-200 군은 189±15 mg/dl로 음성대조군과 비교 시 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다(Fig. 2).

혈액 생화학적 지표 분석

달리기 운동 후 혈액생화학적 지표로서 ALT, AST, BUN, Creatinine 농도를 측정된 결과, 운동에 의한 ALT 변화는 정상대조군(47.2±5.7 U/l)에 비해 음성대조군(43.5±4.3 U/l)에서 감소하는 경향은 있지만 통계적으로 유의한 차이가 없었으며, HD-100과 HD-200 시험물질 투여군에서 각각 43.1±7.1 U/l과 44.0±5.3 U/l로 음성대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이가 없었다(Fig. 3A). AST 농도는 정상대조군(78.4±4.4 U/l)에 비해 음성대조군(92.8±14.8 U/l)에서 통계적으로 유의하게 증가하였으며 (p=0.02), HD-100군에는 86.1±10.6 U/l로 음성대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았고, HD-200군에서는 80.3±4.4 U/l로 음성대조군에 비해 통계적으로 유의하게 감소(p=0.04)하였다(Fig. 3A). 한편, 헛개나무과병추출분말의 신장에 미치는 영향을 보기 위한 지표인 BUN과 creatinine의 운동 후 혈액 내 농도는 BUN의 경우 정상대조군(15.3±1.2 mg/dl)과 음성대조군(13.4±2.0 mg/dl) 사이에서 통계적으로 유의하게 감소하였으나 (p=0.03), HD-100과 HD-200군에서 각각 13.1±2.2 mg/dl와 12.5±1.2 mg/dl로 음성대조군과 비교해 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았지만 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 3B). Creatinine의 경우 정상대조군(0.37±0.02 mg/dl)과 음성대조군

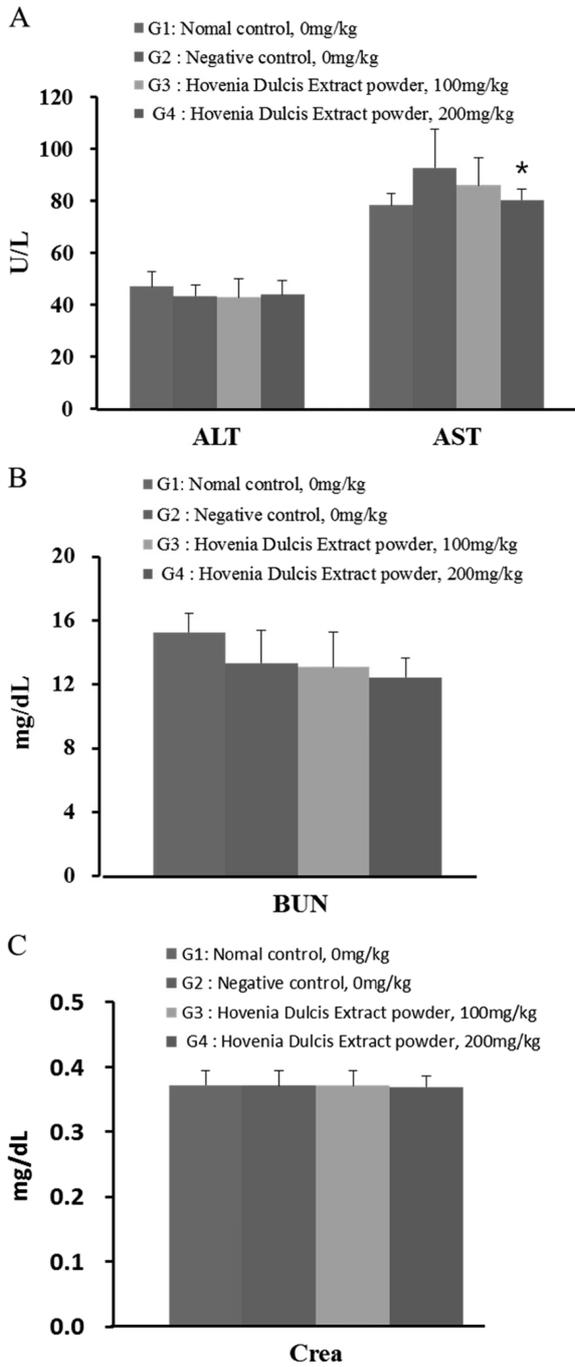


Fig. 3 – Effect of *Hovenia dulcis* Peduncle Hotwater Extract (HD) on serum ALT, AST, BUN and Creatinine in mice. Mice were fed with HD at doses of 100 mg/kg (HD-100) and 200 mg/kg (HD-200) for 10 days. Blood levels of A) ALT and AST, B) BUN and C) Creatinine in mice were determined as described in materials and methods. Values are mean±S.D. of 8 mice in each group. * p<0.05, significance difference between the control and samples.

(0.37±0.02 mg/dL) 사이에서 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았으며, HD-100과 HD-200군에서 각각 0.37±0.02 mg/dL와

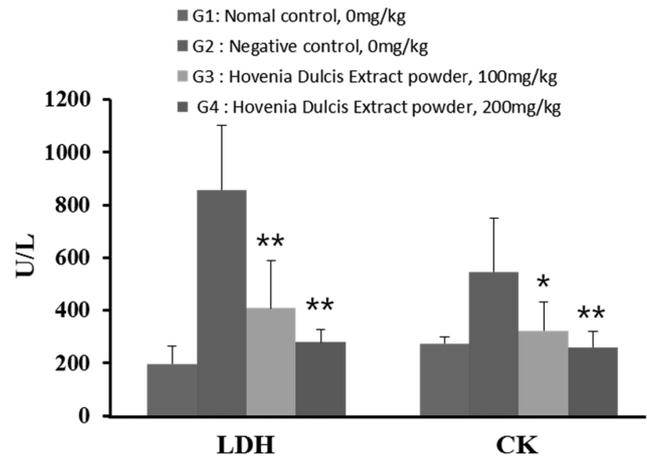


Fig. 4 – Effect of *Hovenia dulcis* Peduncle Hotwater Extract (HD) on serum LDH and CK activity of mice. Mice were fed with HD at doses of 100 mg/kg (HD-100) and 200 mg/kg (HD-200) for 10 days. The activities of blood LDH and CK were measured as described in materials and methods. Values are mean±S.D. of 8 mice in each group. * p<0.05 and **p<0.01, significance difference between the control and samples.

0.37±0.02 mg/dL로 음성대조군과 비교해 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 3C).

흥미롭게도, 운동 수행 후 피로회복과 조직손상의 지표인 LDH는 정상대조군(197±68 U/l)에 비해 음성대조군(857±245 U/l)에서 통계적으로 유의하게 증가하였으며(p=0.003), HD-100과 HD-200군에서 각각 408±181 U/l(p=0.01)와 278±50 U/l(p=0.01)로 음성대조군에 비해 통계적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 4). 근육 손상 발생 및 지연에 관한 지표인 CK는 정상대조군(273±25 U/l)에 비해 음성대조군(546±203 U/l)에서 통계적으로 유의하게 증가하였으며(p=0.01), HD-100군에서 322±109 U/l(p=0.03), HD-200군에서 260±60 U/l(p=0.01)로 음성대조군과 비교해서 통계적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 4).

근육조직 내 Citrate synthase 활성도 및 혈청 lactate 농도 분석

근육조직 내 미토콘드리아의 산화스트레스에 대한 지표인 CS 활성은 정상대조군(17.08±0.54 U)과 음성대조군(16.82±0.55 U)에서 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았으며, HD-100과 HD-200군에서 각각 16.94±0.78 U, 16.91±0.22 U로 음성대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 5A). 혈중 lactate 농도는 정상대조군(3.98±0.47 mM)과 음성대조군(3.84±0.55 mM) 사이에 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았지만, HD-100군에서 3.30±0.37 mM(p=0.04), HD-200군에서 3.13±0.32 mM(p=0.01)로 음성대조군과 비교해서 통계적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 5B).

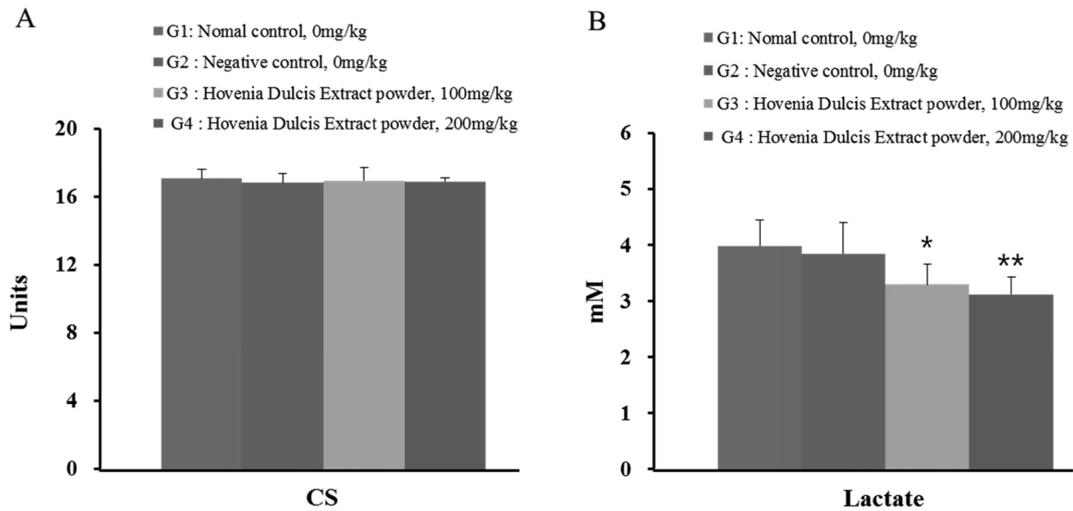


Fig. 5 – Effect of *Hovenia dulcis* Peduncle Hotwater Extract (HD) on the levels of muscle CS activity and serum lactate of mice. Mice were fed with HD at doses of 100 mg/kg (HD-100) and 200 mg/kg (HD-200) for 10 days. A) CS activity in muscle and B) serum lactate levels of mice were determined as described in materials and methods. Values are mean±S.D. of 8 mice in each group. * p<0.05 and **p<0.01, significance difference between the control and samples.

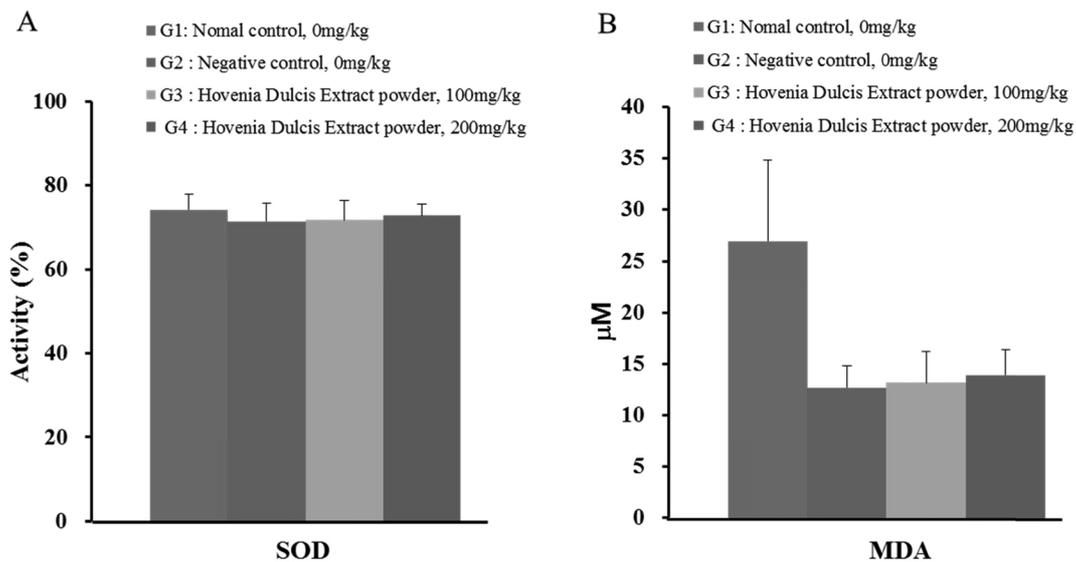


Fig. 6 – Antioxidant enzymes effect of *Hovenia dulcis* Peduncle Hotwater Extract (HD) in mice. Mice were fed with HD at doses of 100 mg/kg (HD-100) and 200 mg/kg (HD-200) for 10 days. A) SOD activity in muscle and B) serum MDA levels of mice were determined as described in materials and methods. Values are mean±S.D. of 8 mice in each group.

근육조직 내 superoxide dismutase 활성도 및 혈장 malondealdehyde 농도 분석

운동 후 생성된 산소 자유기들의 제거가 운동 능력의 향상에 중요하므로 근육 내 SOD 활성을 분석한 결과, 정상대조군(74.21±3.60%)과 음성대조군(71.43±4.33%) 사이에 통계적으로 유의한 차이가 없었으며, HD-100(71.77±4.60%)과 HD-200(72.81±2.74%)의 음성대조군의 비교 시에도 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 6A). 혈장 MDA 농도는 정상대조군(26.93±7.88 µM)에 비해 음성대조군(12.73±2.12 µM)에서 통

계적으로 유의하게 감소하였으나(p=0.001), HD-100(13.16±3.03 µM)과 HD-200(13.93±2.41 µM)의 음성대조군과 사이에는 통계적인 유의성을 나타내지 않았다(Fig. 6B).

고찰 및 결론

지구자라 불리우는 헛개나무는 최근 알코올성 간손상 보호 효능으로 식품의약품안정처로부터 개별인정을 받아 현재 건강기능 식품으로 널리 이용되고 있다. 흥미롭게도 최근 연구에서 헛개

나무과병추출물을 투여한 생쥐의 강제유영운동에서 혈중 스트레스 호르몬인 Cortisol 및 ACTH 가 감소하고 조직 내 항산화 바이오마커인 TBARS 수준이 감소하고 SOD 활성이 증가함으로써 피로 회복 능력이 향상되고³¹⁾ 그로 인한 운동능력이 현저하게 증가되었다고 보고하였다.²⁷⁾ 이 연구를 통해 헛개나무과병추출물이 피로회복과 운동수행능력 향상에 영향을 미치며 이를 통해 운동시간에 미치는 영향에 대해 좋은 결과를 보여 준 반면, 탈진운동을 기반으로 한 강제유영 운동에서 운동시간의 향상과 생체기전의 연관성을 설명하기에는 연구모델이 적합하지 않았다. 그러므로 본 연구는 헛개나무과병추출물의 운동능력 향상에 미치는 생체기전을 밝히기 위해 음성 SD 랫트에 시험물질인 헛개나무과병추출분말을 반복 경구투여하면서, treadmill을 이용한 강제 달리기운동을 10일간 5회 실시하게 한 후, 혈액생화학적 검사 및 근육을 수행하여 운동능력 향상과 관련된 바이오마커를 평가함으로써 헛개나무과병추출물이 지구성 운동능력의 향상에 어떻게 영향을 미치는지 조사하였다.

과도한 신체활동으로 발생하는 피로는 근육의 감소뿐만 아니라 자기 조절 능력과 무기력에 빠지게 되는 증상을 야기하는데 신체활동의 강도와 시간에 따라 근육의 피로 정도는 달라지는데, 근육의 피로는 무산소성 해당과정 중 산소가 충분히 공급되지 못하였을 때 근육 내에 존재하는 에너지의 고갈과 함께 피로물질로 알려진 젖산이 과다하게 축적되어 나타난 현상으로 더 이상 신체활동 기능을 어렵게 한다. 근 피로의 원인이 되는 과도한 젖산 축적현상은 결과적으로 ATP 이용과 근 수축을 저해하며 피로화된 근육은 빈번하게 수축시간이 연장되고 긴장이 발생하는 속도의 최고점을 감소시킨다.³²⁾ 혈중 Lactate에 대한 많은 연구들이 Lactate는 간으로 이동 후 glucose로 전환되어 근육에서 glycogen으로 전환된다고 주장하는 연구²¹⁻²³⁾와 상당량의 근육 lactate가 근육에서 glycogen으로 전환되기도 하고,³³⁾ 많은 양이 산화되어진다³⁴⁾는 연구가 상반된다. 또한 운동 후 sampling 시간과 방법에 따라 lactate 농도가 다르다는 주장도 있다.³⁵⁾ 그럼에도 불구하고 혈중 lactate 농도는 운동 동안 무산소성 대사 정도를 측정하는 지표로서 탈진 정도를 측정하는 지표로 사용된다.¹⁹⁾ 한편 LDH는 근 활동 중 근세포에서 lactate의 형성과 전환을 조절하는데, 주로 근육과 간에 분포되어 근육에서 무산소성 대사과정 중 pyruvate를 감소시켜 lactate의 형성을 조절하는 효소로 알려져 있다. LDH는 혈액 내 특이성 효소로 각종 운동 상황에서 동원되는 에너지 시스템을 평가할 수 있는 지표로서 에너지 대사과정 중 대사기능의 적응 정도의 평가와 운동 강도, 운동지속시간, 근육경직, 피로회복 및 과도한 트레이닝과 근육의 조직학적 손상 분석 및 체력을 평가하는 데 활용된다.¹¹⁾ 그러므로 헛개나무과병추출물이 운동에 의해 증가된 혈중 LDH 활성을 감소시킴으로써(Fig. 4) 혈중 lactate 농도를 감소시키고(Fig. 5B), 이러한 기전을 통해 헛개나무과병추출물이 운동 시에 필요한 에

너지의 고갈을 막아주고 그로 인해 피로물질의 과다 축적을 감소시킴으로써 근육의 피로를 경감시키는 것으로 사료된다.

혈청효소수준은 인간이나 동물이 지속적인 운동을 행하였을 때 상승하는 것으로 알려져 있는데,^{36,37)} 혈청효소 증가는 운동시작 후 2시간 이내에 지방화가 나타나기 전에 발견되고, 기관내의 지방화가 사라질 때까지 지속된다.¹⁰⁾ Garbus는 과도한 혈청효소의 증가는 근육조직에서 분비된 것이 아니라, 심장과 다른 기관으로부터 유래된 것이라 한다. 운동 훈련은 지속적인 트레이닝으로 인한 혈청효소의 증가를 막고, 정상 혈청 내 동일 효소의 출현을 막는다. 과도한 혈청효소의 증가는 조직학적 변화는 없지만 세포투과성이 변화되어 있고 지방화보다 더 오래 지속되는 세포에서 주로 분비된다고 추측 되어진다.

흥미롭게도, 현재의 연구에서 혈청 ALT는 정상대조군과 음성대조군 사이에 큰 차이가 없는 것으로 나타났으며 헛개나무과병추출물의 투여군에서 음성대조군과 유의한 차이가 없었으나, 혈청 AST는 운동 전과 운동 후 사이에 통계적으로 유의한 수준의 증가하였으며 고농도(HD-200)의 헛개나무과병추출물 투여군에서 음성대조군에 비해 통계적으로 유의한 수준으로 감소하였다(Fig. 3A). 이는 혈청효소인 ALT와 AST가 운동에 의해 같은 수준으로 감소되는 것이 아니며, 헛개나무과병추출물이 운동에 의해 증가된 혈청효소를 감소시킬 수 있다는 것을 의미한다.

ATP를 합성하는 데 일차적으로 이용되는 저장연료는 크레아틴인산이다. 근육수축활동 중 ATP가 ADP와 Pi로 분해되는 것과 거의 동시에 크레아틴인산이 CK에 의해 분해된다. 크레아틴과 인산의 결합이 분해되면서 방출되는 에너지는 ADP와 Pi를 결합시켜 ATP를 합성하는데 이용된다. 크레아틴인산이 크레아틴과 인산으로 분해되면서 발생하는 에너지는 ATP가 분해되면서 발생하는 에너지 양보다 크다.³⁸⁾ 운동수행에 따른 혈청 CK 활성도의 변화는 운동수행에 따른 신체적 자극에 의한 조직의 손상을 비롯한 피로현상에 대한 지표로 간주될 수 있고, 이러한 효소의 근육 내 활성도는 근육 내에서의 무산소성 대사과정에 작용하며, 이러한 효소가 혈중으로 방출됨에 따라 대사과정의 간접적 지표로 간주될 수 있다.³⁹⁾ 운동 수행 후 회복기의 혈청 CK 회복은 운동선수가 비운동선수보다 유의하게 빠른 회복력을 보였다⁴⁰⁾가 있으므로 혈청 CK의 안정 시 활성화와 운동부하 후 빠른 회복이 운동에 더 적합한 신체 상태라고 할 수 있다.

본 실험에서 혈청 CK 활성도는 운동을 하지 않을 때에 비해 운동 수행 후 상승하였으며 헛개나무과병추출물의 투여에 의해 상승된 CK 활성도가 감소하였다(Fig. 4). 이는 선행연구에서 주장한 바와 같이 헛개나무과병추출물에 의해 혈청 CK의 빠른 회복이 피로회복을 통해 운동수행능력에 도움을 주었다고 생각된다.

Glucose는 탄수화물을 운동에너지원으로 사용하는 것에 대한 것을 알아보기 위한 실험이었다. 흥미롭게도, 이전 연구에서 생

취의 탈진 수영운동 실시 시 glucose는 헛개나무과병추출물 투입과 함께 2주에서 감소되었으며, 4주 운동시에는 변화가 없었지만,²⁷⁾ 탈진 운동이 아닌 본 연구에서는 운동하지 않은 정상대조군과 운동을 수행한 음성대조군 사이에 유의한 차이가 없었으며 더욱이 헛개나무과병추출물을 투여한 군에서 음성대조군에 비해 유의한 차이가 없었다(Fig. 2). 흥미롭게도 수영운동 시 운동수행능력과 피로개선에 관련된 연구에서는 total cholesterol과 TG가 3주 운동 시에 유의하게 감소하였다.³¹⁾ 이는 헛개나무과병추출물 섭취가 운동 시에 탄수화물을 에너지원으로 이용하지 않고 유리지방산(Free fatty acid)을 에너지원으로 이용할 수 있다⁴¹⁾는 것을 암시한다.

이상의 결과를 종합해 보면 5회 강제달리기 운동 시 헛개나무과병추출물 섭취가 운동에 의해 증가된 혈중 AST 활성을 감소시키고, 혈중 LDH 활성을 감소시킴으로써 혈중 lactate 농도를 감소시키며, 혈중 CK 활성을 감소시킴으로써 운동으로 인한 빠른 피로회복을 유도하고 운동수행능력을 증가하는 것으로 사료된다.

감사의 글

바이오톡스텍의 기술적 지원에 깊은 감사를 드립니다. 본 연구는 산림청 산림과학기술개발사업 연구비(과제번호 S121011L070110)의 지원에 의하여 이루어진 것이며 이에 사의를 표합니다.

참고문헌

- 1) Rubin, H. : Cancer as a dynamic developmental disorder. *Cancer Res.* **45**, 2935 (1985).
- 2) Aeschbacher, H. U. and Wurzner, H. P. : An evaluation of constant and regular coffee in the Ames mutagenicity test. *Toxicol. Letter* **5**, 139 (1980).
- 3) 임윤택, 김영옥, 이철원 : 태권도선수를 위한 경기력 향상 보조물(에르고제닉에이드) 고찰. *코칭능력개발지* **9**, 3 (2007).
- 4) 이하영, 백일영, 우진희 : Pyruvate 투여가 장시간 운동 시 혈중 피로물질과 지질성분에 미치는 영향. *체육과학연구* **16**, 18 (2005).
- 5) Pruet, E. D. : Glucose and insulin concentrations during prolonged work stress in men living on different diets. *J. Appl. Physiol.* **28**, 199 (1970).
- 6) Hargreaves, M., Costill, D. L., Coggan, A., Fink, W. J. and Nishibata, I. : Effect of carbohydrate feedings on muscle glycogen utilization and exercise performance. *Med. Sci. Sports. Exerc.* **16**, 219 (1984).
- 7) Holloszy, J. O. and Booth, F. W. : Biochemical adaptation to endurance exercise in muscle. *Annu. Rev. Physiol.* **38**, 273 (1976).
- 8) 최은택, 조성봉 : 심폐기능이 최대 및 최대하 운동 시 혈청 젓

산탈수소효소 활성도 및 동위효소 분포 비의 변화에 미치는 영향. *한국체육학회지* **33**, 355 (1994).

- 9) Wilmore, H. J. : Exercise and Sport Science Review. *Academic Press*, New York, **1**, 18, 71 (1973).
- 10) Garbus, J., Highman, B. and Altland, P. D. : Serum enzymes and lactic dehydrogenase isoenzymes after exercise and training in rats. *Am. J. Physiol.* **207**, 467 (1964).
- 11) Agner, E., Kelbaek, H., Fogh-Anderson, N. and Morck, H. I. : Coronary and skeletal muscle enzyme changes during a 14km run. *Acta. Med. Scand.* **224**, 183 (1988).
- 12) Munjal, D. D., McFadden, J. A., Matix, P. A., Coffman, K. D. and Cattaneo, S. M. : Changes in serum myoglobin, total creatine kinase, lactate dehydrogenase, and creatine kinase MB levels in runners. *Clin. Biochem.* **16**, 195 (1983).
- 13) Nosaka, K. and Clarkson, P. M. : Influence of previous concentric exercise on eccentric exercise-induced muscle damage. *J. Sports. Sci.* **15**, 477 (1997).
- 14) Gleeson, M., Blannin, A. K., Walsh, N. P., Field, C. N. and Pritchard, J. C. : Effect of exercise-induced muscle damage on the blood lactate response to incremental exercise in humans. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **77**, 292 (1998).
- 15) Horita, T., Komi, P. V., Nicol, C. and Kyrolainen, H. : Effect of exhausting stretch-shortening cycle exercise on the time course of mechanical behavior in the drop jump: possible role of muscle damage. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **79**, 160 (1999).
- 16) Lovlin, R., Cottle, W., Pyke, I., Kavanagh, M. and Belcastro, A. N. : Are inducers of free radical damage related to exercise intensity. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **6**, 313 (1987).
- 17) Criswell, D., Powers, S., Dodd, S., Lawler, J., Edwards, W., Renshler, K. and Grinton, S. : High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. *Med. Sci. Sports. Exerc.* **25**, 1135 (1993).
- 18) Salminen, A. and Vihiko, V. : Endurance training reduces the susceptibility of mouse skeletal muscle to lipid peroxidation in vitro. *Acta. Physiol. Scand.* **117**, 109 (1983).
- 19) Astrand, P. O., Hallback, I., Hedman, R. and Saltin, B. : Blood lactates after prolonged severe exercise. *J. Appl. Physiol.* **18**, 619 (1963).
- 20) Graham, T. E. : Oxygen delivery and blood and muscle lactate changes during muscular activity. *Canad. J. Appl. Sport. Sci.* **3**, 153 (1978).
- 21) Krebs, H. A. : Gluconeogenesis. *Proc. Roy. Soc. (Lond).* **159**, 545 (1964).
- 22) Krebs, H. A. and Woodford, M. : Fructose 1,6-diphosphatase in striated muscle. *Biochem. J.* **94**, 436 (1965).
- 23) Opie, L. H. and Newsholme, E. A. : The activities of fructose 1,6 diphosphatase, phosphorfructokinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase in white and red muscle. *Biochem. J.* **103**, 391

- (1967).
- 24) Spina, R. J., Chi, M. M., Hopkins, M. G., Nemeth, P. M., Lowry, O. H. and Holloszy, J. O. : Mitochondrial enzymes increase in muscle in response to 7~10 days of cycle exercise. *J. Appl. Physiol.* **80**, 2250 (1996).
 - 25) Holloszy, J. O., Oscai, L. B., Don, I. J. and Mole, P. A. : Mitochondrial citric acid cycle and related enzymes: adaptive response to exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **40**, 1368 (1970).
 - 26) 나천수, 정남철, 양규환, 김세현, 정하숙, 동미숙 : 헛개나무 (*Hovenia dulcis* var. *koreana*) 과병 열수추출물의 간보호 및 혈중 알코올 저하 작용. *약학회지* **48**, 34 (2004).
 - 27) 나천수, 홍철이, 나대승, 김진범, 윤순영, 이상범, 동미숙 : 헛개나무 열매 열수추출물 투여에 의한 생쥐의 지구력 운동 수행 능력 향상 및 피로개선 효과. *생약학회지* **44**, 1 (2013).
 - 28) Ohno, H., Yamashita, H., OoKawara, T. and Saitog, D. : Training effects on centration of immunoreactive SOD isoenzymes in human plasma. *TogoKu. J. Exp. Med.* **167**, 301 (1992).
 - 29) Alessio, H. M. and Goldfarb, A. H. : Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise : adaptative response to training. *J. Appl. Physiol.* **64**, 1333 (1988).
 - 30) Murase, T., Haramizu, S., Shimotoyodome, A., Tokimitsu, I. and Hase, T. : Green tea extract improves running endurance in mice by stimulating lipid utilization during exercise. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **290**, R1550 (2006).
 - 31) Na, C. S., Yoon, S. Y., Kim, J. B., Na, D. S., Dong, M. S., Lee, M. Y. and Hong, C. Y. : Anti-fatigue activity of *Hovenia dulcis* on a swimming mouse model through the inhibition of stress hormone expression and antioxidation. *Am. J. Chin. Med.* **41**, 945 (2013).
 - 32) Wilmore, J. H. and Costill, D. L. : Training for sport and activity: The physiological basis of the conditioning process. *Wm C Brown Publication. Dubuque. USA*, 32 (1988).
 - 33) Hermansen, L. and Vaage, O. : Lactate disappearance and glycogen synthesis in human muscle after maximal exercise. *Am. J. Physiol.* **233**, 422 (1977).
 - 34) Keul, J., Doll, E. and Keppler, D. : Muskelstoffwechsel. *Munchen.* 247 (1969).
 - 35) Asmussen, E. : Pyruvate and lactate content of the blood during and after muscular work. *Acta. Physiol. Scand.* **20**, 125 (1949).
 - 36) Aetland, P. D. and Highman, B. : Effect of exercise on serum enzyme values and tissues and tissues on serum enzyme values and tissues of rat. *Am. J. Physiol.* **201**, 393 (1961).
 - 37) Fowler, W. M., Chowdhury, S. R., Pearson, C. M., Gardner, G. and Bratton, R. : Changes in serum enzyme levels after exercise in trained and untrained subjects. *J. Appl. Physiol.* **17**, 943 (1962).
 - 38) 윤진환, 정일규. 휴면 퍼포먼스와 운동생리학(전정판). *대경북스*, 서울, pp. 86, 120, 280, 347, 349-350 (2011).
 - 39) Janssen, G. M., Kuipers, H., Willems, G. M., Does, R. J., Janssen, M. P. and Geurten, P. : Plasma activity of muscle enzymes: quantification of skeletal muscle damage and relationship with metabolic variables. *Int. J. Sports. Med.* **10**, 160 (1989).
 - 40) 윤진환, 지용석, 우도영 : 카누선수의 암에르고미터 운동시 혈중 젖산, LDH와 CPK 활성변화. *한국체육교육학회지* **7**, 70 (2002).
 - 41) Jeukendrup, A. E., Saris W. H. M. and Wagenmakers, A. J. M. : Fat metabolism during exercise: A Review. *Int. J. Sports. Med.* **19**, 231 (1998).