

## 고콜레스테롤혈증 ApoE Knockout 마우스에서 기능성 수정과의 지질과산화 및 산화적 DNA 손상 억제 효과

박은주<sup>1</sup> · 백아란<sup>2</sup> · 김미정<sup>2</sup> · 이선우<sup>1</sup> · 이은지<sup>1</sup> · 최미주<sup>1</sup> · 이지현<sup>2</sup> · 송영옥<sup>2</sup>

<sup>1</sup>경남대학교 식품영양학과  
<sup>2</sup>부산대학교 식품영양학과 및 김치연구소

### Inhibitory Effects of Functional *Sujeonggwa* (Cinnamon Drink) on Lipid Peroxidation and DNA Damage in Diet-Induced Hypercholesterolemic ApoE Knockout Mice

Eunju Park<sup>1</sup>, Aran Baek<sup>2</sup>, Mijeong Kim<sup>2</sup>, Seon Woo Lee<sup>1</sup>, Eunji Lee<sup>1</sup>,  
Mi-Joo Choi<sup>1</sup>, Jeehyun Lee<sup>2</sup>, and Yeong Ok Song<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Kyungnam University

<sup>2</sup>Department of Food Science and Nutrition & Kimchi Research Institute, Pusan National University

**ABSTRACT** The recipe for *sujeonggwa*, a Korean traditional sweet drink containing cinnamon, ginger, sugar, or honey, was modified by replacing sugar with alternative sweeteners [stevia or short-chain fructooligosaccharide (scFOS)] in order to improve the health functionality of *sujeonggwa*. The aim of this study was to evaluate the effects of modified *sujeonggwa* on lipid peroxidation and oxidized DNA damage in diet-induced hypercholesterolemic ApoE knockout mice. Hypercholesterolemia was induced in 6-week-old male mice by administration of a high cholesterol diet (1.25% cholesterol, 0.5% cholic acid, and 10% coconut oil) for 4 weeks, after which mice were divided into five groups: sucrose solution-fed control group, *sujeonggwa* containing sucrose group, sucrose+stevia group, sucrose+stevia+scFOS group, and commercially available *sujeonggwa* group as a positive control. After 6 weeks, *sujeonggwa* supplementation resulted in reduced hepatic thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), regardless of sweetener type. However, reduction of hepatic TBARS by commercially available *sujeonggwa* was insignificant. Both endogenous and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage in hepatocytes and splenocytes were significantly reduced only in the *sujeonggwa* containing stevia group compared to the sucrose-fed control group. There were no significant effects of *sujeonggwa* supplementation on total radical trapping potential, lipid peroxidation, or DNA damage in blood. These results suggest that *sujeonggwa* has protective effects against hepatic lipid peroxidation and DNA damage in hepatocytes or splenocytes from diet-induced hypercholesterolemic ApoE knockout mice, and the type of sweetener should be modified to improve the health benefits of *sujeonggwa*.

**Key words:** *sujeonggwa*, stevia, short-chain fructooligosaccharide, oxidized DNA damage, ApoE knockout mice

## 서 론

고콜레스테롤혈증은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 발생을 촉진하여 산화적 스트레스 상태를 유발함으로써 동맥경화를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 고콜레스테롤혈증으로 인한 산화적 스트레스는 동맥내벽의 부착인자의 발현을 촉진하고, 동맥내피세포의 투과성을 높여 대식세포 및 LDL 콜레스테롤의 이동을 촉진하여 지방병변을 일으킴으로써 병의 진행을 촉진한다(1,2). 또한 동맥경화의 발병은 나이가 들수록 증가하는데, 이는 노화에 따라 활

성산소종에 의한 생체분자(단백질, 지질 및 DNA 등)의 산화를 억제하는 항산화 체계 및 repair system의 활성이 저하되기 때문이라고 보고되었다(3,4).

수정과 제조에 사용하는 계피, 생강 및 후추는 방향, 건위, 혈액순환 촉진, 식욕증진, 소화촉진 등의 약리 효과가 알려져 있다. 계피(*Cinnamomum cassia*)는 계수나무 껍질로 활성 성분인 cinnamaldehyde와 cinnamic acid의 지질저하 효과(5,6)를 포함한 기능성 연구가 널리 진행되어 왔다. 생강(*Zingiber officinale*)은 아시아에서 널리 사용되어 온 약용식물로 관절염, 근육통, 후두염, 변비, 구토, 고혈압, 및 감염성 질환 등의 다양한 질병 치유에 사용되어 왔다(7). 생강의 유효성분인 gingerol, zingerone 그리고 shogaol의 항산화 효과는 많은 연구를 통해 잘 알려져 있으며, 특히 6-shogaol의 유리기 소거 효과가 높은 것으로 알려져 있다(8). 최근에는 항염증, 항궤양 및 항암, 항당뇨 및 콜레스테롤 저

Received 14 July 2014; Accepted 25 July 2014

Corresponding author: Yeong Ok Song, Department of Food Science and Nutrition & Kimchi Research Institute, Pusan National University, Busan 609-735, Korea  
E-mail: yosong@pusan.ac.kr, Phone: +82-51-510-2847

하 효과 등이 보고되고 있다(9-11).

비만은 만성 질환의 원인으로 알려져 있으며 현대인의 경우 당 함량이 높은 음료의 섭취가 비만의 원인으로 지적되고 있어 최근 세계 음료시장은 단맛은 느껴지나 저칼로리인 음료 그리고 카페인이 함유되어 있지 않은 기능성 음료 형태로 시장이 확대되고 있다. ‘수작의궤(受爵儀軌)’(1765) 및 ‘조선요리법(朝鮮料理法)’(1936)에 기록된 전통 수정과 제조법에 의하면 수정과의 단맛을 내는 급원으로 꿀 또는 설탕을 사용하고 있어 수정과 섭취 시 상당량의 칼로리가 얻어지고 이는 콜라나 사이다 등의 청량음료 섭취로부터 얻어지는 칼로리와 유사한 것으로 조사되었다(시판 수정과 44 kcal/100 mL, 코카콜라 44 kcal/100 mL).

설탕이 함유된 콜라 등과 같은 청량음료의 섭취는 최근 청소년 비만의 가장 큰 원인으로 지적되고 있어 세계 음료시장은 단맛은 유지하면서 칼로리는 낮은 음료를 개발하기 위해 설탕대체제를 사용하고 있다. 천연 감미료인 stevia는 설탕의 50~300배의 감미를 지니고 있지만(12) 칼로리는 거의 없어 상업용으로 사용되고 있으나 쓴맛이 제품에 남아 기호를 떨어뜨린다고 지적되고 있다(13). Stevia는 간에서 지방산의  $\beta$ -oxidation에 관여하는 효소인 acyl-CoA oxidase(ACO), acyl-CoA synthetase(ACS), carnitine palmitoyltransferase(CPT)-I의 발현을 증가시켜 혈중 지질 농도를 낮추는 효과가 보고되고 있다(12). 또한 stevia는 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ 의 농도를 감소시키는 항염증 효과가 있음이 보고되었다(14). 새로운 감미료로 소개되고 있는 short chain fructo-oligosaccharide(scFOS)는 fructose가 3분자 정도 결합하고 있는 비소화성 탄수화물로 단맛은 설탕의 25% 정도로 약하나 pre-biotics로써 역할이 보고되고 있다(15). scFOS는 bifidobacteria의 증식을 초래하며(16) 단쇄지방산의 생성을 촉진하여 혈중 지질을 저하하는 효과가 보고되고 있는데, 이는 지방산 합성효소(17)나 콜레스테롤 합성효소의 발현을 억제하기(18) 때문이라고 보고되고 있다.

본 연구에서는 전통 음청류인 수정과의 세계화 일환으로 대체 당을 사용하여 관능성이 탁월한 기능성 수정과 음료를 개발한 후, 개발된 수정과 음료의 항산화 및 산화적 DNA 손상 억제 효능을 살펴보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 수정과 시료 제조

고문헌에 의거하여 전통 수정과 제조법을 재현하고 꿀을 설탕으로 대체하는 일반 수정과 레시피를 개발하였다. 이후 수정과의 단맛을 일정하게 유지하면서 칼로리를 낮추기 위하여 설탕의 일부를 stevia 또는 scFOS로 대체한 기능성 수정과 음료(sujeonggwa drink) 레시피를 개발하였다. 껏감은 수정과의 기호에 영향을 미치지 않는다는 선행도 조사 결과를 바탕으로(19) 본 연구에서는 껏감을 수정과 레시피

에서 제외하였다. 통계피를 3 cm 길이로 자른 후 17배(w/v)의 물로, 그리고 생강(3 mm 두께)은 10배(w/v)의 물을 넣고 전기레인지(Swiss Military Electric Range, Gyeonggi, Korea) 화력 2,000(550°C)에서 10분간 끓인 후 화력 1,600(400°C)에서 50분간 끓여 열수 추출하였다. 추출물은 여과지로 걸러 잔사를 제거한 후 1:1(v/v)로 혼합하여 수정과 음료의 기본 base로 사용하였고 감미를 맞추었다. 기능성 수정과 제조를 위해 사용한 설탕 대체원은 stevia(그린비아 스위트, 전원식품, Gyeonggi, Korea)와 scFOS(#71920, Allergy Research Group, Alameda, CA, USA)이다. 대체당의 첨가량은 제조사의 성분을 바탕으로 산술적으로 계산한 다음 첨가하여 기능성 수정과를 제조하고 관능검사로 평가한 후 Table 1에 나타난 바와 같이 최종으로 첨가량을 확정하였다.

### 실험식이 및 동물사육

고콜레스테롤 식이를 제조하기 위하여 분말 chow diet (2018S Teklad global 18% protein rodent diet, provided by Harlan Teklad, Madison, WI, USA)를 구입하여 여기에 cholesterol 1.25%, cholic acid 0.5% 그리고 coconut oil 10%(w/w)를 중량비로 첨가하였다. 실험기간 중 사료와 물은 제한 없이 공급하였으며 매일 식이섭취량을 기록하였고 체중은 7일 단위로 측정하였다.

본 연구에서는 고콜레스테롤혈증이 유발된 쥐에 다양한 수정과를 경구로 투여하여 수정과 및 기능성 수정과의 항유전독성 효과를 확인하고자 하였다. 6주령의 수컷 apolipoprotein E knockout(ApoE KO) 마우스(SLC Inc., Hamamatsu, Japan) 35마리를 구입하여 1주일간 적응시킨 후 1마리씩 개별 케이지에 넣어 사육하였다. 사육실의 온도는 22±1°C, 습도는 55±5%로 유지하였고, 조명은 12시간 주기로 조절하였다. 콜레스테롤 식이를 4주간 섭취시켰을 때 혈장 콜레스테롤 농도가 1,000 mg/dL 이상으로 모든 동물에서 고콜레스테롤혈증이 유발되었음(20)을 꼬리 채혈을 통해 확인하였다. 수정과의 효과를 확인하기 위하여 각 군의 콜레스테롤 농도가 동일하게 5군의 실험군으로 나누었다. 본 연구에 사용된 실험군은 대조군인 설탕물 섭취군(sucrose solution fed group, Control), 설탕 첨가 수정과 음료 섭취군(sujeonggwa containing sucrose, Sucrose), 스티비아 첨가 수정과 음료 섭취군(sujeonggwa containing sucrose+stevia, Stevia), scFOS 첨가 수정과 음료 섭취군(sujeonggwa containing sucrose+stevia+scFOS, scSFO), 그리고 양성대조군으로 시판 수정과를 섭취시킨 군(Vilac sujeonggwa drinks, Positive control)이다.

매일 동일한 시간에 수정과와 설탕물을 준대를 사용하여 6주간 경구 투여하였다. 식이는 콜레스테롤 식이를 계속 공급하였다. 수정과 투여량은 성인 1일 음료 섭취량(21)을 기준으로 산출하였다. 사람과 동물의 차이를 보정하여(보정계수 10) 산출하였을 때 마우스의 하루 수정과 섭취량은 약

500 µL/25 g이었다. 경구로 투여할 수 있는 최대 용량인 100 µL로 만들기 위하여 진공 농축기(Rotavapor R-200, Büchi, Flawil, Switzerland)에서 수정과를 농축하였다. 시료의 당도를 측정하여(당도계, AR 200, Reichert, Inc., Depew, NY, USA) 농축한 수정과의 당의 함량에 변화가 없음을 확인하였다. 대조군에 투여할 설탕물은 일반 수정과의 설탕 농도와 동일하게 제조하였다. 긍정대조군은 시판되고 있는 캔 수정과(Vilac *sujeonggwa*, Paldo, Naju, Korea)를 사용하였다(Table 1).

동물실험은 부산대학교 동물실험윤리위원회(Pusan National University-Institutional Animal Care and Use Committee, PNU-IACUC, Approval Number PNU-2014-0502)의 승인을 받은 후 수행하였다.

**해부 및 시료 채취**

10주간 사육 후 마우스를 12시간 동안 절식시킨 다음 마취하고 해부하였다. 마취제는 zoletile 50(zolazepan과 tiletamine 혼합물, 30 mg/kg bw, Virbac Laboratories, Carros, France)과 xylazine(10 mg/kg bw, Bayer Korea, Seoul, Korea)을 혼합한 용액을 사용하였고 복강으로 주사하였다. 혈액은 하대정맥에서 채취한 후 comet assay를 위해 20 µL를 이용하고 남은 혈액을 3,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리(COMBI-514R, Hanil Science Industry, Incheon, Korea) 하여 혈장을 얻어 -80°C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 채혈 후 냉각시킨 phosphate buffered saline(cold PBS)을 하대정맥을 통해 관류하여 남은 혈액을 제거한 뒤 장기를 적출하여 여러 차례 씻은 후 여과지로 수분을 완전히 제거하고 무게를 측정하였다. 무게를 측정한 장기는 간 1 g과 비장 전체를 comet assay를 위해 사용하였고, 나머지 장기는 액체 질소로 급속 냉동시켜 분석 시까지 -80°C에 보관하였다.

**혈장 총 항산화능(TRAP) 측정**

총 항산화능은 Rice-Evans와 Miller(22)의 방법을 변형하여 실험하였다. 각 시료는 ABTS[2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate), 150 µM]와 metmyoglobin(2.5 µM)을 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(75 µM)로 활성화시켜 형성된 ferryl myoglobin 라디칼종의 상호작용에 의해 생성된 ABTS radical cation의 흡광도를 측정하는 것으로 흡광도의 억제 정도는 혈장에 들어 있는 antioxidant capacity에 비례하게 된다. 유리시험관에 PBS buffer, ABTS, metmyoglobin을 넣고 혼합한 후, plasma를 넣고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 반응시켜 734 nm의 파장에서 UV/VIS spectrophotometer(Shimadzu UV-1601, Kyoto, Japan)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 혈장의 TRAP 농도는 trolox의 calibration curve를 이용하여 계산한 후 TEAC(Trolox equivalent antioxidant capacity, mM)로 나타냈다.

**혈장 및 간 과산화지질(TBARS) 측정**

혈장 및 간의 지질과산화물 농도를 thiobarbituric acid related substances(TBARS)의 함량으로 나타내었다. 혈장 50 µL에 0.05 N HCl 500 µL, 0.67% TBA 용액 167 µL를 넣고 95°C의 water bath에서 30분간 반응시킨 후 얼음물에서 냉각시켰다. 여기에 15% methanol이 함유된 n-butanol 0.7 mL를 첨가한 후 2,500 rpm에서 10분간 원심분리 시켜 얻은 상층액의 흡광도를 540 nm에서 측정하였다. 간의 지질과산화물 농도를 측정하기 위해선 간 조직 균질액 0.1 mL에 1% phosphoric acid 0.6 mL와 0.67% TBA 용액 0.2 mL를 각각 넣고 충분히 혼합한 뒤 95°C의 water bath에서 45분간 반응시킨 후 얼음물에서 냉각시켰다. 반응 종결을 위해 0.8 mL의 n-butanol을 첨가한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 시켜 얻은 상층액의 흡광도를 540 nm에서 측정하였다. 지질과산화물 농도는 malondialdehyde(MDA) 표준곡선을 이용하여 nmol MDA로 나타내었

**Table 1.** Recipe for the various *sujeonggwa* drinks

Ingredient	Control	<i>Sujeonggwa</i> containing			Positive control <sup>5)</sup>
		Sucrose	Sucrose+Stevia	Sucrose+Stevia+scFOS	
Cinnamon extracts <sup>1)</sup> (mL)	—	500	500	500	NA <sup>6)</sup>
Ginger extracts <sup>2)</sup> (mL)	—	500	500	500	NA
Sugar (g)	123.75	123.75	39.38	100.16	NA
Stevia <sup>3)</sup> (g)	—	—	3	14.28	—
scFOS <sup>4)</sup> (g)	—	—	—	0.84	—
kcal/100 mL	49.3	49.3	16.1	40.7	44.1

<sup>1)</sup>Cinnamon sticks and water (1:17, w/v) were boiling for 10 min at 2,000 (equivalent to 550°C) of electric range (Swiss Military Electric Range, Gyeonggi, Korea) followed by boiling for 50 min at 1,400 (equivalent to 400°C).

<sup>2)</sup>Sliced ginger and water (1:10, w/v) were heated for 10 min at 2,000 (equivalent to 550°C) of electric range (Swiss Military Electric Range, Gyeonggi, Korea) followed by heating for 50 min at 1,400 (equivalent to 400°C).

<sup>3)</sup>Stevia product (Steviasweet, Jeonwonfood, Gyeonggi, Korea) used in this study was composed of 25% stevia and 75% glucose which is commercially available on the market.

<sup>4)</sup>scFOS: short-chain fructooligosaccharide (#71920, Allergy Research Group, Alameda, CA, USA).

<sup>5)</sup>Commercially available *sujeonggwa* (Vilac *sujeonggwa*, Vilac, Korea) supplemented group.

<sup>6)</sup>NA: not available.

다(23).

### 산화적 DNA 손상 측정을 위한 간 및 비장 시료 준비

간 1 g을 잘게 자른 후 240 unit collagenase(EC 3.4.24.3, Worthing Biochemical Corp., Freehold, NJ, USA)가 포함된 Hank's balanced salt solution(HBSS) 완충용액에 담가 37°C에서 30분간 처리하였다. 효소 처리 후 427 rpm에서 5분간 원심분리 하여 얻은 상층액을 모아 다시 1,785 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 하층의 cell pellet을 comet assay에 이용하였다.

적출한 비장 전체를 RPMI 1640 배양액(Gibco, Grand Island, NY, USA)으로 씻은 다음 멸균 유리병으로 분쇄하여 세포를 유리시킨 후, 세포 현탁액을 100 µm nylon cell strainer(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)에 통과시켜 배양액으로 2번 세척하고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 적혈구를 제거하기 위해 RBC lysis buffer 10 mL를 넣고 5분간 실온 방치 후 954 rpm에서 10분간 원심분리 하여 얻은 cell pellet을 comet assay에 이용하였다.

### 백혈구, 간, 비장의 산화적 DNA 손상 측정

DNA 손상을 측정하기 위해 Singh 등(24)의 방법을 변형하여 comet assay를 실시하였다. 백혈구, 간, 비장의 DNA 손상 정도를 확인하기 위해 전혈, 간세포 및 비장세포 현탁액을 각각 0.7% low melting agarose(LMA)와 섞은 후, 1% normal melting agarose gel(NMA)이 pre-coating 된 슬라이드 위에 고르게 분주한 후 커버글래스로 덮어 4°C 냉장고에 보관하였다. 각 샘플당 두 개의 슬라이드를 제작하여 한 개의 슬라이드는 산화적 스트레스 무처리용(PBS 처리)으로 사용하고, 다른 한 개의 슬라이드는 DNA에 산화적 스트레스를 가하기 위해 백혈구는 400 µM, 간과 비장세포는 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액에 슬라이드를 담가 5분간 처리한 뒤 PBS로 세척하였다. 4°C 냉장고에서 젤이 굳으면 커버글래스를 벗기고 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 100 µL로 한 겹 더 덮었다. Cell lysis를 위해 미리 준비해 둔 차가운 alkali lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris)에 사용 직전 1% Triton X-100을 섞은 후 슬라이드를 담가 4°C, 암실 조건에서 1시간 동안 침지시켰다. Lysis가 끝난 슬라이드를 전기영동 수조에 배열하고 4°C 차가운 electrophoresis buffer(300 mM NaOH, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA)를 채워 20분간 unwinding 시킨 후 25 V/300±3 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝나고 0.4 M Tris 완충용액(pH 7.5)으로 충분히 세척하고 ethidium bromide로 핵을 염색하여 형광현미경(Leica, Wetzlar, Germany)에서 관찰하고 CCD camera(Nikon, Tokyo, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 이미지는 comet image analyzing system(Kinetic Imaging, Komet 4.0, Liverpool, UK)이 설치된 컴퓨터상에서 분석하였다. 각 세포의 내재적 DNA 손상도와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 산화적 DNA 손상

도는 핵으로부터 이동한 DNA 손상 정도(% Tail DNA)를 정량하여 측정하였다.

### 통계처리

모든 자료의 처리는 SPSS-PC+ 통계 package Ver. 21 (IBM, Chicago, IL, USA)을 사용하여 처리하였다. 각 항목에 따라 평균치±표준편차(SD)를 구하고, 군별 유의성 검증을 위해서는 one-way 분산분석(ANOVA)을 시행하여 F 값을 구한 뒤, Duncan's multiple range test를 이용하여 각 군 간의 유의성 차이(P<0.05)를 검증하였다. 또한 각 항목에 대하여 Pearson 상관분석을 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 저칼로리 기능성 수정과 레시피 개발

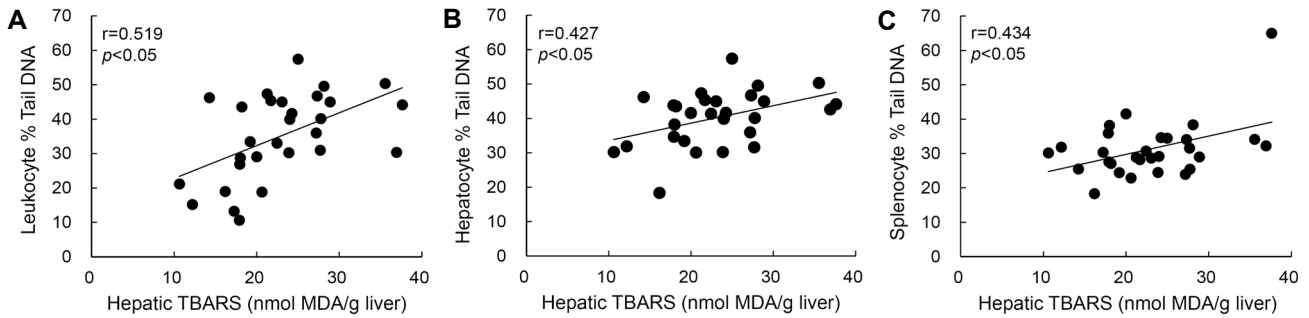
관능평가에 의하면 계피, 생강, 통후추, 꽃감, 꿀을 사용해 제조한 전통 수정과는 감미가 너무 높았고, 특히 서양인과 중국인은 너무 맵다고 표현하여 후추의 매운 맛에 대한 거부감이 높았다. 꽃감의 첨가 유무에 대한 차이는 Seo 등(19)의 연구와 마찬가지로 나타나지 않았다(data not shown). 기능성 수정과의 단맛은 일반 수정과와 비슷하나 칼로리는 일반 수정과에 비해 stevia 첨가 수정과는 약 33%, 그리고 scFOS 첨가 수정과는 85%의 칼로리를 내었다. 순수한 stevia는 칼로리가 거의 없는 장점이 있는 반면 뒷맛이 쓰게 느껴지는 단점이 보고되고 있으며(13), 본 연구에서도 설탕의 일부만 stevia로 대체하였음에도 불구하고 약간의 쓴맛이 느껴졌다. 한편 scFOS는 장운동을 촉진하는 기능이 있어 첨가할 수 있는 양이 제한되어 있으므로 수정과의 단맛을 유지하기 위해 설탕, stevia 그리고 scFOS를 복합적으로 첨가하였다. scFOS를 첨가한 기능성 수정과는 설탕 또는 stevia로 제조한 수정과와 유사한 단맛을 내었으며 내국인뿐만 아니라 외국인을 대상으로 한 관능평가에서 좋은 점수를 받았다(data not shown).

### 체중 증가량, 식이 섭취량, 식이효율

콜레스테롤 식이를 4주간 섭취로 고콜레스테롤혈증(>1,000 mg/dL)이 유발된 마우스에 다양한 종류의 수정과를 6주 동안 경구 투여하였을 때 설탕물을 섭취한 control group, 시판 수정과를 섭취한 positive group, 그리고 설탕만 사용하여 제조한 일반 수정과를 섭취한 sucrose group에서 체중 증가량이 다소 높았으나 전 실험군간 유의적인 차이가 없었다. 식이 섭취량 및 식이효율 역시 군간 유의적인 차이가 없었다(data not shown).

### 수정과 음료의 항산화 및 지질산화 억제 효과

TBARS는 free radical에 의해 체내 막 불포화지방산이 산화되어 생성된 지질과산화물이며(25), 노화 및 심혈관 질환, 암 등 각종 질병의 원인이 되기도 한다(26). 고콜레스테



**Fig. 1.** Correlation between hepatic TBARS and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced DNA damage of leukocyte (A), hepatocyte (B), and splenocyte (C) in hypercholesterolemic ApoE KO mice. The correlation coefficients (r) and the correspondent significance values (P) are indicated.

를 식이에 의해 유도된 고콜레스테롤혈증은 간, 혈장, 적혈구, 심장 등의 조직에서 지질과산화물 TBARS의 생성을 증가시키며(27), 지질과산화 과정의 여러 단계에서 DNA의 손상을 일으킨다(28). 본 연구 결과에서도 간의 TBARS 함량이 높을수록 백혈구, 간, 비장세포의 산화적 DNA 손상도 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 반면 항산화 활성을 가진 비타민 E, C, ferulic acid 등은 고콜레스테롤혈증에 의해 증가한 TBARS 농도를 낮추는 것으로 보고되었다(29,30). 본 연구에서 ApoE KO 마우스에 고콜레스테롤혈증 유발 후 6주간 수정과 음료를 섭취시켜 체내 지질 산화에 미치는 효과를 살펴보았을 때 간 TBARS 농도는 설탕물을 섭취한 대조군에 비해 수정과 음료군인 sucrose군, stevia 첨가군, 그리고 scFOS 첨가군의 TBARS 농도는 각각 28%, 33.9%, 31.6%로 유의적으로 감소하여 수정과 의 지질과산화 억제 효과를 확인할 수 있었다(Table 2). 그러나 지질과산화 억제에 대해서 대체감미료 사용의 추가적인 감소 효과는 없는 것으로 나타났다. 따라서 수정과 의 간 TBARS 감소 효과는 주재료인 계피와 생강에 의한 것으로 사료된다. Azab 등(31)은 감마 방사선에 의해 산화적 손상이 유발된 쥐에서 계피 추출물 섭취에 의해 간의 TBARS 농도가 32% 정도 유의적으로 감소되었다고 보고하였다. 또한 54명의 건강한 성인을 대상으로 계피차를 10일간 섭취시켰을 때 혈장 TBARS 농도가 유의적으로 감소된 것으로 보고하였다(32). 생강의 경우 살충제 lindane에 의해 산화적 스트레스가 유발된 흰쥐에서 4주간의 생강 섭취는 혈장 TBARS를 유의적으로 감소시키는 반면 glutathione peroxidase 등의 항산화 효소의 활성을 조절하는 것으로 보고되었다(33).

시판 수정과 섭취군의 경우 간 TBARS 농도는 대조군에 비해 19% 정도 감소하는 경향을 보였으나 유의적이지 않았다. 혈장 TBARS의 경우 설탕물을 섭취한 대조군에 비해 시판 수정과 를 제외한 수정과 음료 섭취군에서 감소하는 경향을 보여주었으나 유의성은 없었으며, 혈장 총 유리기 포집 항산화능(TRAP)도 실험군 간의 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다(Table 2).

이상의 결과로 동일한 설탕을 섭취함에도 불구하고 이를 수정과 의 형태로 섭취할 경우 지질과산화 억제 효과를 나타냄

**Table 2.** Effect of functional *sujeonggwa* drink on total antioxidant capacity and lipid peroxidation in hypercholesterolemic ApoE KO mice<sup>1)</sup>

Group <sup>2)</sup>	Plasma TRAP (mM)	Plasma TBARS (nmol MDA/mL)	Hepatic TBARS (nmol MDA/g liver)
Control	0.78±0.08 <sup>NS</sup>	34.7±3.0 <sup>NS</sup>	31.0±5.7 <sup>a</sup>
Sucrose	0.72±0.07	25.4±7.1	22.2±5.7 <sup>b</sup>
Stevia	0.66±0.11	22.4±8.1	20.5±4.9 <sup>b</sup>
scFOS	0.68±0.20	22.9±8.6	21.2±7.9 <sup>b</sup>
Positive control	0.72±0.04	32.5±11.2	25.1±6.8 <sup>ab</sup>

Data are means±SD (n=7).

<sup>1)</sup>Plasma cholesterol concentration of ApoE KO mice reached over 1,000 mg/dL after 4 weeks of 1.25% cholesterol diet consumption with mean value of 1,077.3±164.0 mg/dL (n=35). Mean value of plasma triglyceride concentration of ApoE KO mice (n=35) at 4th weeks was 163.0±39.9 mg/dL in the range of 154.4 to 167.1 mg/dL.

<sup>2)</sup>Control: sucrose solution fed control group, Sucrose: *sujeonggwa* containing sucrose supplemented group, Stevia: *sujeonggwa* containing sucrose+stevia supplemented group, scFOS: *sujeonggwa* containing sucrose+stevia+scFOS supplemented group, Positive control: commercially available *sujeonggwa* (Vilac *sujeonggwa*, Vilac, Korea) supplemented group.

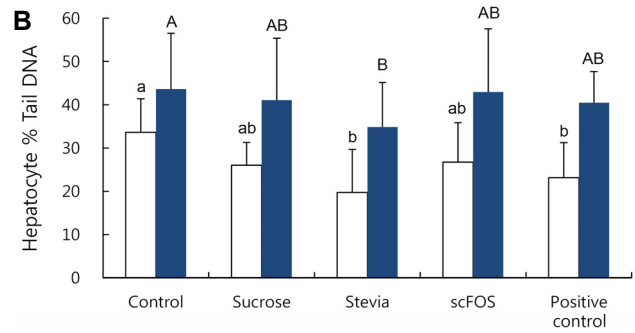
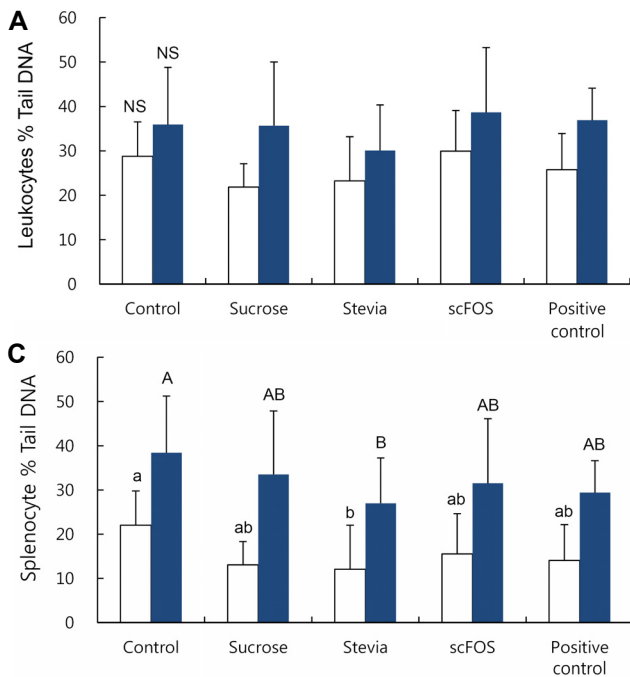
<sup>NS</sup>Data within each column are not significantly different.

<sup>a,b</sup>Data with different letters within the column are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at P<0.05

을 확인할 수 있었으며, 감미료의 종류를 달리하여 설탕의 양을 줄여 제조한 수정과도 지질과산화 억제 효과가 증가함을 확인할 수 있었다.

**기능성 수정과 음료의 백혈구, 간, 비장세포 DNA 손상에 대한 보호 효과**

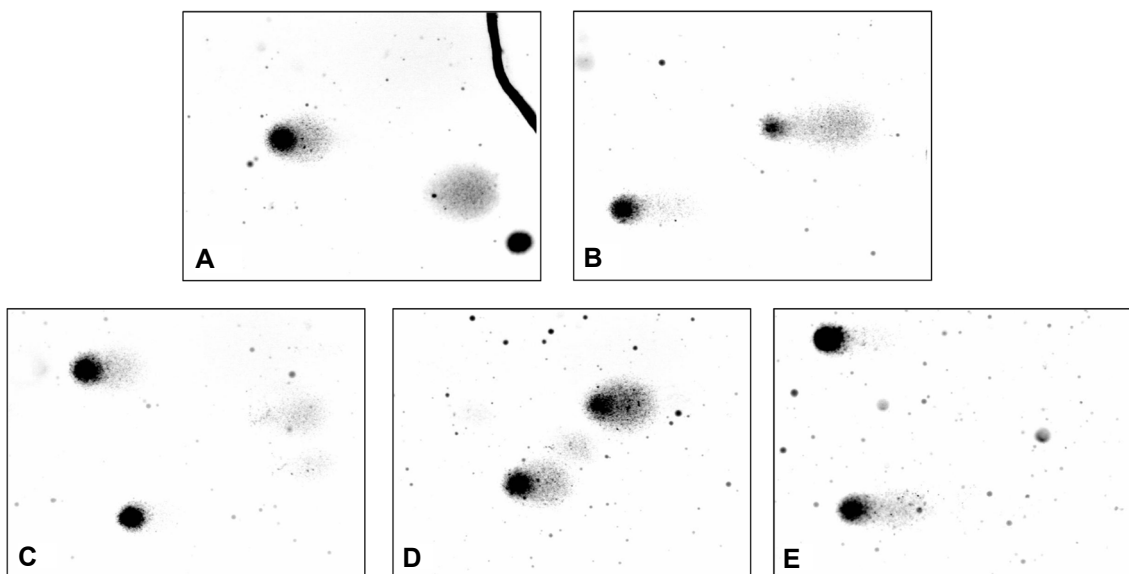
Comet assay는 세포수준의 DNA 손상 정도를 정량적으로 측정 가능한 실험기법이며, Folkmann 등(3)과 Dalboni 등(4)의 보고에 의하면 comet assay를 이용하여 측정된 ApoE KO 마우스의 간, 백혈구 산화적 DNA 손상이 고콜레스테롤혈증 및 노화에 의해 유의적으로 증가한 반면, 포도주스, 스피루리나 같은 항산화물질은 고콜레스테롤에 의해 유도된 DNA 손상을 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났다



**Fig. 2.** Inhibitory effect of functional *sujeonggwa* drink on endogenous or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced DNA damage in leukocyte (A), hepatocyte (B), and splenocyte (C) in hypercholesterolemic Apo E KO mice. Cells were untreated (light shading) or treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated for 5 min on ice (dark shading). Data with different letters above the bars are significantly different with one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at  $P < 0.05$ . NS: Data are not significantly different.

(34,35). 본 연구에서 comet assay를 이용하여 다양한 세포에 대한 기능성 수정과의 DNA 손상 억제 효과를 살펴본 결과(Fig. 2), stevia 첨가 수정과 섭취군이 설탕물만을 섭취한 대조군에 비해 간, 비장세포의 내재적(endogenous) 또는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 산화적 DNA 손상에 대한 억제 효과가 있는 것으로 나타났다. 백혈구의 DNA 손상의 경우 stevia군에서 대조군에 비해 감소하는 경향을 보여주었으나 통계적 유의성은 없었다. 시판 수정과의 경우 간세포의 내재적 DNA 손상만을 억제하는 효능이 있는 것으로 나타났으며(Fig. 1B), 설탕만으로 제조한 수정과나 scFOS가 첨가된 수정과 섭취

군의 경우 내재적 또는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 산화적 DNA 손상이 대조군에 비해 감소하는 경향을 보여주었으나 유의성은 없었다. 계피와 생강은 인체 유래 세포주(HepG2, HCT116 cell)의 DNA 손상에 대해 보호 효과가 있는 것으로 보고되었으나(36,37), 본 연구에서는 계피와 생강만의 DNA 손상 억제 효과는 미미한 것으로 보인다. 반면 설탕을 줄이는 대신 천연감미료인 stevia를 첨가한 수정과의 경우 간과 비장에서 유의한 DNA 손상 보호 효과가 관찰되었는데, 이는 stevia의 항산화 및 산화적 DNA 손상 억제 효능(38)과 관련이 있는 것으로 사료된다. 체내 면역력을 담당하는 비장세포에



**Fig. 3.** Comet image of hepatocyte in hypercholesterolemic ApoE KO mice. A: Control, B: Sucrose, C: Stevia, D: scFOS, E: Positive control group.

서 stevia 첨가 기능성 수정과의 산화적 DNA 손상 억제 효과에 대한 comet 이미지는 Fig. 3에 제시하였다.

본 연구 결과 stevia 첨가 수정과는 고콜레스테롤혈증 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도되는 산화적 DNA 손상을 효과적으로 억제시키다는 것을 알 수 있었다.

## 요 약

본 연구는 전통 음청류인 수정과의 세계화 일환으로 대체당을 사용하여 관능성이 탁월한 기능성 수정과 음료를 개발한 후, 개발된 수정과 음료의 항산화 및 산화적 DNA 손상 억제 효능을 살펴보고자 하였다. 고콜레스테롤식이 공급으로 고콜레스테롤혈증이 유발된 10주령의 ApoE KO 마우스를 대조군인 설탕물 섭취군(Control), 설탕 첨가 수정과 음료 섭취군(Sucrose), 스티비아 첨가 수정과 음료 섭취군(Stevia), scFOS 첨가 수정과 음료 섭취군(scSFO), 그리고 양성대조군으로 시판 수정과를 섭취시킨 군(Positive control)으로 나누어 실험 식이를 6주간 공급한 후, 혈장 TRAP, 혈장 및 간의 TBARS, 백혈구, 간세포 및 비장세포의 내재적 또는 산화적 스트레스로 인한 DNA 손상 정도를 측정하였다. 모든 군에서 체중 증가량, 식이 섭취량, 조직 무게는 유의적 차이가 없었다. 간 TBARS 농도는 설탕물을 섭취한 대조군에 비해 설탕의 농도를 달리하여 제조한 수정과 음료군인 sucrose군, stevia 첨가군, 그리고 scFOS 첨가군의 TBARS 농도가 유의적으로 감소하여 수정과의 지질과산화 억제 효과를 확인할 수 있었다. 설탕을 줄이는 대신 stevia를 첨가하여 제조한 기능성 수정과 섭취군에서 설탕물만을 섭취한 대조군에 비해 간, 비장세포의 내재적(endogenous) 또는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 산화적 DNA 손상에 대한 억제 효과가 있는 것으로 나타났다. 백혈구의 DNA 손상의 경우 stevia군에서 대조군에 비해 감소하는 경향을 보여주었으나 통계적 유의성은 없었다. 시판 수정과의 경우 간세포의 내재적 DNA 손상만을 억제하는 효능이 있는 것으로 나타났으며, 설탕만으로 제조한 수정과나 scFOS가 첨가된 수정과 섭취군의 경우 내재적 또는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 유도된 산화적 DNA 손상이 대조군에 비해 감소하는 경향을 보여주었으나 유의성은 없었다. 이상 본 연구의 결과, 고콜레스테롤혈증이 유발된 ApoE KO 마우스에서 수정과의 보충 섭취는 간 지질과산화를 개선시키고 stevia 첨가 수정과의 경우 간 및 비장에서 DNA 손상 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 본 연구 결과가 수정과의 세계화에 기여할 수 있기를 기대하며, 향후 본 연구를 기반으로 한 분자생물학적 수준의 기전 연구가 필요하다고 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 한식세계화용역연구사업에 의해 이루어진 것으로 연구비 지원에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Stranahan AM, Cutler RG, Button C, Telljohann R, Mattson MP. 2011. Diet-induced elevations in serum cholesterol are associated with alterations in hippocampal lipid metabolism and increased oxidative stress. *J Neurochem* 118: 611-615.
- Sudhakar V, Kumar SA, Mythili Y, Varalakshmi P. 2007. Remedial effect of lupeol and its ester derivative on hypercholesterolemia-induced oxidative and inflammatory stresses. *Nutr Res* 27: 778-787.
- Folkman JK, Loft S, Møller P. 2007. Oxidatively damaged DNA in aging dyslipidemic ApoE<sup>-/-</sup> and wild-type mice. *Mutagenesis* 22: 105-110.
- Dalboni SP, Campagnaro BP, Tonini CL, Vasquez EC, Meyrelles SS. 2012. The concurrence of hypercholesterolemia and aging promotes DNA damage in apolipoprotein E-deficient mice. *Open J Blood Dis* 2: 51-55.
- Kannappan S, Jayaraman T, Rajasekar P, Ravichandran MK, Anuradha CV. 2006. Cinnamon bark extract improves glucose metabolism and lipid profile in the fructose-fed rat. *Singapore Med J* 47: 858-863.
- Huang B, Yuan HD, Kim DY, Quan HY, Chung SH. 2011. Cinnamaldehyde prevents adipocyte differentiation and adipogenesis via regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-γ (PPARγ) and AMP-activated protein kinase (AMPK) pathways. *J Agric Food Chem* 59: 3666-3673.
- Ali BH, Blunden G, Tanira MO, Nemmar A. 2008. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): a review of recent research. *Food Chem Toxicol* 46: 409-420.
- Dugasani S, Pichika MR, Nadarajah VD, Balijepalli MK, Tandra S, Korlakunta JN. 2010. Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol. *J Ethnopharmacol* 127: 515-520.
- Obboh G, Akinyemi AJ, Ademiluyi AO, Adefegha SA. 2010. Inhibitory effect of aqueous extract of two varieties of ginger on some key enzymes linked to type-2 diabetes *in vitro*. *J Food Nutr Res* 49: 14-20.
- Choudhury D, Das A, Bhattacharya A, Chakrabarti G. 2010. Aqueous extract of ginger shows antiproliferative activity through disruption of microtubule network of cancer cells. *Food Chem Toxicol* 48: 2872-2880.
- Fuhrman B, Rosenblat M, Hayek T, Coleman R, Aviram M. 2000. Ginger extract consumption reduces plasma cholesterol, inhibits LDL oxidation and attenuates development of atherosclerosis in atherosclerotic, apolipoprotein E-deficient mice. *J Nutr* 130: 1124-1131.
- Park JE, Cha YS. 2010. *Stevia rebaudiana* Bertoni extract supplementation improves lipid and carnitine profiles in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *J Sci Food Agric* 90: 1099-1105.
- Choi SY, Jang EG, Hwang IK. 2005. The sensory characteristics and estimation of shelf-life by Q10 values with mixtures of high-intensity sweeteners for beverage during storage. *Korean J Food Cookery Sci* 21: 235-242.
- Cho BO, Ryu HW, So Y, Cho JK, Woo HS, Jin CH, Seo KI, Park JC, Jeong IY. 2013. Anti-inflammatory effect of austroinulin and 6-O-acetyl-austroinulin from *Stevia rebaudiana* in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol* 62: 638-644.
- Bornet FR, Brouns F, Tashiro Y, Duveillier V. 2002. Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications.

- Dig Liver Dis* 34: S111-S120.
16. Bouhnik Y, Achour L, Paineau D, Riottot M, Attar A, Bornet F. 2007. Four-week short chain fructo-oligosaccharides ingestion leads to increasing fecal bifidobacteria and cholesterol excretion in healthy elderly volunteers. *Nutr J* 6: 42-48.
  17. Agheli N, Kabir M, Berni-Canani S, Petitjean E, Boussairi A, Luo J, Bornet F, Slama G, Rizkalla SW. 1998. Plasma lipids and fatty acid synthase activity are regulated by short-chain fructo-oligosaccharides in sucrose-fed insulin-resistant rats. *J Nutr* 128: 1283-1288.
  18. Bush RS, Milligan LP. 1971. Study of the mechanism of inhibition of ketogenesis by propionate in bovine liver. *Can J Anim Sci* 51: 121-127.
  19. Seo JH, Sung TH, Kim MR. 2002. Quality characteristics of Sujongkwa. *J East Asian Soc Dietary Life* 12: 370-378.
  20. Kusunoki J, Hansoty DK, Aragane K, Fallon JT, Badimon JJ, Fisher FA. 2001. Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibition reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 103: 2604-2609.
  21. Korean Statistical Information Service. [http://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=117&tblId=DT\\_11702\\_N221&vw\\_cd=&list\\_id=&scrId=&seqNo=&lang\\_mode=ko&obj\\_var\\_id=&itm\\_id=&conn\\_path=K1&path=](http://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=117&tblId=DT_11702_N221&vw_cd=&list_id=&scrId=&seqNo=&lang_mode=ko&obj_var_id=&itm_id=&conn_path=K1&path=) (accessed Jan 2014).
  22. Rice-Evans C, Miller NJ. 1994. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol* 234: 279-293.
  23. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.
  24. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191.
  25. Beltowski J, Wójcicka G, Górný D, Marciniak A. 2000. The effect of dietary-induced obesity on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and total plasma antioxidant capacity. *J Physiol Pharmacol* 51: 883-896.
  26. Junqueira VBC, Barros SBM, Chan SS, Rodrigues L, Giavarotti L, Abud RL, Deucher GP. 2004. Aging and oxidative stress. *Mol Aspects Med* 25: 5-16.
  27. Karbinger MS, Sierra L, Minahk C, Fonio MC, Bruno MP, Jerez S. 2013. The role of oxidative stress in alterations of hematological parameters and inflammatory markers induced by early hypercholesterolemia. *Life Sci* 93: 503-508.
  28. Vaca CE, Wilhelm J, Harms-Ringdahl M. 1988. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mutat Res* 195: 137-149.
  29. Kwon EY, Cho YY, Do GM, Kim HJ, Jeon SM, Park YB, Lee MK, Min TS, Choi MS. 2009. Actions of ferulic acid and vitamin E on prevention of hypercholesterolemia and atherogenic lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice. *J Med Food* 12: 996-1003.
  30. Sádaba LM, Fernández-Robredo P, Rodríguez JA, García-Layana A. 2008. Antioxidant effects of vitamins C and E, multivitamin-mineral complex and flavonoids in a model of retinal oxidative stress: the ApoE-deficient mouse. *Exp Eye Res* 86: 470-479.
  31. Azab KSh, Mostafa AH, Ali EM, Abdel-Aziz MA. 2011. Cinnamon extract ameliorates ionizing radiation-induced cellular injury in rats. *Ecotoxicol Environ Saf* 74: 2324-2329.
  32. Ranjbar A, Ghaseminejad S, Takalu H, Baiaty A, Rahimi F, Abdollahi M. 2008. Anti oxidative stress potential of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) in operating room personnel; a before/after cross sectional clinical trial. *Int J Pharmacol* 3: 482-486.
  33. Ahmed RS, Suke SG, Seth V, Chakraborti A, Tripathi AK, Banerjee BD. 2008. Protective effects of dietary ginger (*Zingiber officinales* Rosc.) on lindane-induced oxidative stress in rats. *Phytother Res* 22: 902-906.
  34. Kim MY, Cheong SH, Lee JH, Kim MJ, Sok DE, Kim MR. 2010. Spirulina improves antioxidant status by reducing oxidative stress in rabbits fed a high-cholesterol diet. *J Med Food* 13: 420-426.
  35. Mercer JR, Yu E, Figg N, Cheng KK, Prime TA, Griffin JL, Masoodi M, Vidal-Puig A, Murphy MP, Bennett MR. 2012. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ decreases features of the metabolic syndrome in ATM<sup>+/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Free Radic Biol Med* 52: 841-849.
  36. King AA, Shaughnessy DT, Mure K, Leszczynska J, Ward WO, Umbach DM, Xu Z, Ducharme D, Taylor JA, Demarini DM, Klein CB. 2007. Antimutagenicity of cinnamaldehyde and vanillin in human cells: global gene expression and possible role of DNA damage and repair. *Mutat Res* 616: 60-69.
  37. Yang G, Zhong L, Jiang L, Geng C, Cao J, Sun X, Liu X, Chen M, Ma Y. 2011. 6-Gingerol prevents patulin-induced genotoxicity in HepG2 cells. *Phytother Res* 25: 1480-1485.
  38. Ghanta S, Banerjee A, Poddar A, Chattopadhyay S. 2007. Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, a natural sweetener. *J Agric Food Chem* 55: 10962-10967.