

黃精과 蒸熟 黃精의 항산화, 항피로 효능 비교 연구

김정수^{1#}, 이아름^{2#}, 노성수², 권오준³, 서영배^{1*}

1: 대전대학교 한의과대학 2: 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학 교실,
3: 대경지역사업평가원 경북지역산업평가단.

Antioxidant and Anti-physical fatigue Effects of Polygonati Rhizoma and steamed Polygonati Rhizoma

Jeong-Soo Kim^{1#}, AhReum Lee^{2#}, Seong-Soo Roh², OJun Kwon³, Young-Bae Seo^{1*}

1: College of Korean Medicine, Daejeon University, Republic of Korea

2: College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Republic of Korea

3: Gyeongbuk Regional industry Evaluation, Daegyong Institute for Regional Program Evaluation,
Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : Polygonati Rhizoma (PR) has containing the bioactive compounds such as poly sccharide A,B,C, oligosaccharide, amino acid, it has reported to anti-diabetes and hypertension, atherosclerosis. In this study, we were evaluates antioxidant and anti-physical fatigue effects of PR and steamed PR.

Methods : The sample was divided into 5 groups-PR0 (PR without steaming process), PR1 (PR with once steaming process), PR3 (PR with third steaming process), PR6 (PR with sixth steaming process), PR9 (PR with ninth steaming process). We measured anti-oxidant activity through contents of polyphenol, flavonoid and DPPH, ABTS free radical scavenging capacity. And, anti-physical fatigue effect was evaluated using the swimming test, and the AMPK protein expressions in soleus muscle.

Results : As a result, polyphenol, flavonoid, DPPH, ABTS free radical scavenging capacity of PR were increased as steaming times. Anti-physical fatigue effects by swimming test, PR0 have significantly increased, but steamed PR groups were decreased. The AMPK protein expressions of PR0 and PR1 groups were increased comparing with PR3, PR6 and PR9. All groups had effects on decreasing TG, creatine in blood serum, but had no effects on TC in blood serum.

Conclusions : In conclusion, PR with 9 steaming process was more excellent than not-processed PR in anti-oxidant effect such as DPPH, ABTS radical scavenging activity and contents of polyphenol, flavonoid, but, not-processed PR increased swimming times than processed PR. These results suggest that processed PR has anti-oxidant effect as steaming times, and not-processed PR may be a novel potential anti-physical fatigue agents than processed PR.

Key words : Polygonati Rhizoma, Steamed Polygonati Rhizoma, Anti-oxidant, Anti-physical fatigue.

*Corresponding author : Young-Bae Seo,

College of Korean Medicine, Daejeon University, 62, Daehak-ro, Dong-gu, Daejeon, 34520, Republic of Korea
· Tel : +82-42-280-2625 · E-mail : genin@dju.ac.kr

#First author : Jeong-Soo Kim,

College of Korean Medicine, Daejeon University, 62, Daehak-ro, Dong-gu, Daejeon, 34520, Republic of Korea
· Tel : +82-42-280-2625 · E-mail : cerilrangrei@empas.com

AhReum Lee,

College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.
· Tel : +82-53-770-2258 · E-mail : rmi2222@naver.com

· Received : 26 April 2016 · Revised : 6 May 2016 · Accepted : 16 May 2016

I. 서론

黃精은 나리과 (Liliaceae)에 속한 다년생 초본인 층층갈고리등굴레 (*polygonatum sibiricum* Redoute)의 근경으로 《神農本草經》에 '黃精,味甘,平,無毒,主補中益氣,除風濕,安五臟,久服輕身,延年不飢'¹⁾라 기재되어 있어 補陰藥으로 쓰이며, 菟竹, 鹿竹, 重樓 등의 異名이 있다²⁾.

黃精의 效能에 대하여 《名醫別錄》³⁾에서는 '主補中益氣,除風濕,安五臟'이라 하였고, 『大明』⁴⁾은 '補五勞七傷,助筋骨,耐寒暑,益脾胃,潤心肺'라 하였으며, 《本草綱目》⁵⁾에는 '補諸虛,止寒熱,填精髓,下三尸蟲'라 기재되어 있어 한방임상에서 補氣養陰,健脾,潤肺益腎 하는 효능으로 陰虛肺燥,乾嗽少痰,肺腎陰虛,勞嗽久咳,脾胃虛弱,腎精虧虛,內熱消渴 등의 치료에 응용되고 있다.

黃精의 성분으로는 polysaccharide A, B, C, oligosaccharide, amino acid 등이 보고 되었으며^{6,7)}, 약리작용으로는 관상동맥의 혈류량을 증가시켜서 혈압 강하 작용이 있으며, 동시에 혈중 지질을 낮추어서 죽상 관상동맥 경화를 예방하는 작용⁸⁾, 항산화 및 항노화 작용이 있다⁹⁾. 이러한 약리작용에 따라 현대 의학적으로 죽상동맥경화증, 관상동맥 질환, 만성 간염, 백일해, 만성 기관지염, 발기부전, 고지혈증 등의 치료에 사용되고 있다^{10,11)}.

九蒸九曝은 약재를 찌통이나 시루 속에 넣어 隔水하고 가열함으로써 水熱과 증기를 이용하여 약재를 蒸製하는 방법인 蒸製法을 9번 반복 시행하는 것으로 그 목적은 약성을 변화시켜 치료효과를 높이거나, 가공, 절편 및 저장에 편리하도록 하는 데 있다. 九蒸九曝하는 대표적인 약재들로 人蔘, 熟地黃, 何首烏 등이 있으며¹²⁾, 黃精의 경우에는 蒸熟 후에 항산화 활성이 증가한다는 보고가 있다¹³⁾.

따라서 본 연구는 生乾 黃精과 蒸熟 黃精의 약리적 차이점을 알아보고자 *in vitro* 및 세포실험을 활용하여 항산화 효능의 변화를 살펴보고, 동물모델을 이용한 黃精의 항피로 실험을 통해 補益 작용의 변화를 연구하였으며 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시료

실험에 사용된 黃精 (Polygonati Rhizoma : PR)은 충북 음성군에서 재배된 5년생 층층갈고리등굴레의 뿌리를 구입하여 시료 제조에 사용하였다. 이 시료를 대전대학교 본초학교실에서 가공하여 실험에 사용하였다.

2) 실험 세포

마우스 대식 세포주인 RAW 264.7 세포는 american type culture collection (ATCC, Rockville, U.S.A)로부터 구입하여 사용하였다. Raw 264.7 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)를 첨가한 DMEM을 이용하여 5% CO₂, 37℃에서 배양하였다.

3) 실험 동물

Sprague-Dawley 웅성쥐 5주령을 효창사이언스에서 66마리 구입을 하였다. 사육실 온도는 23±2℃, 상대습도는 50±10%, 사료와 물은 자유급여를 하였다. 1주일간 적응시킨 후 무작위로 11마리씩 6그룹으로 군 분리하였다.

4) 시약

AMPK, p-AMPK, Ripa buffer (10X)는 Cell signaling (U.S.A) 제품을 구입하여 사용하였고, DMSO, gallic acid, picric acid, Griss reaction는 Sigma aldrich (St. Louis, MO, U.S.A)에서 구입하였다. Diethylene glycol, DMEM, Fetal Bovine Serum (FBS)는 Gibco (Rockville, MD, U.S.A)에서 구입하였고, NO colorimetric assay kit, PGE2 ELISA kit, TNF- α , IL-1 β 및 IL-6 cytokine ELISA kit는 R&D System Inc (Minneapolis, U.S.A)에서 구입하여 본 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

黃精 추출물은 생것, 1蒸, 3蒸, 6蒸, 9蒸으로 제조하여 분쇄기로 분쇄한 다음 시료 5 g에 distilled water 50 ml를 넣고, 100℃에서 3시간씩 추출하였다. Kimble-filtering flask에 funnel을 장착하고 여과지 (Whatman No.2)를 사용하여 추출물을 여과한 뒤 여과액을 미리 항량된 수기에 넣어 45~50℃의 수온에서 rotary vacuum evaporator (JP/N-1000X, EYELA)를 사용하여 감압농축 후 동결건조 (FD5508, IIShin) 하였다. 얻어진 분말가루를 *in vivo* 실험에 사용하였고, 이것을 DMSO에 녹여 200 mg/ml의 stock 용액으로 제조한 뒤 -20℃에 보관하여 *in vitro* 실험에 사용하였다.

2) 黃精 물 추출물의 세포 독성 측정

시료의 세포독성을 측정하기 위해 cell counting kit-8을 이용하였다. 96 well plate에 세포를 seeding 한 후 蒸熟시료를 정해진 농도로 처리한 후 24hr 동안 배양하여 CCK-8 용액을 처리하고 37℃ incubator에서 30분동안 반응시켰다. CCK-8 측정은 ELISA (multiscan spectrum, thermo scientific)를 이용하여 분석하였다.

3) Polyphenol 및 flavonoid 함량 분석

총 Polyphenol 함량은 Folin-Denis법¹⁴⁾을 이용하였다. 각 시료 25 μ l (1 mg/ml)과 10% Folin-Ciocalteu's phenol reagent 500 μ l를 혼합하여 실온에서 5분간 반응시킨다. 그 후 10% Sodium carbonate 500 μ l를 더하여 30℃ incubator에서 90분 동안 반응시킨 후 725 nm에서 흡광도 (multiscan spectrum, thermo scientific)를 측정하였다. 총 페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 이와 같은 방법으로 측정하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

총 flavonoid의 함량 측정은 Davis법¹⁵⁾을 변형한 방법에 따라 측정하였다. 추출한 시료 300 μ l에 Diethylene glycol 600 μ l를 잘 섞어준 후, 이 혼합물에 1 N NaOH 6 μ l를 가하여 37℃에서 1시간 동안 방치한 후 420 nm에서 흡광도를

측정하였다. 이때 총 flavonoid 함량은 rutin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

4) DPPH free radical 및 ABTS radical 소거활성 측정

추출한 시료의 free radical 소거능 활성의 측정을 위해 DPPH법¹⁶⁾을 이용하였다. 각 시료를 농도별로 희석한 용액 100 μ l와 0.2 mM DPPH 용액 100 μ l를 혼합하여 37°C에서 30분간 暗所상태에서 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH free radical 활성은 시료를 첨가하지 않은 대조군과 시료 첨가구의 흡광도 차를 백분율로 표시하였다.

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 Re 등의 방법¹⁷⁾을 이용하여 측정하였다. 7 mM ABTS 용액과 2.4 mM의 potassium persulfate을 혼합하여 실온의 암소 상태에서 약 16시간이상 방치하여 ABTS+을 형성시킨 후 734 nm에서 흡광도 값이 0.70(\pm 0.02)이 되게 100% ethanol로 희석하였다. 희석된 용액 900 μ l에 시료 100 μ l를 가하여 1분 동안 방치한 후 흡광도를 측정하였다.

5) 동물모델을 이용한 黃精의 항피로실험

동물모델을 활용하여 黃精의 항피로실험을 진행하였다. 실험군은 다음과 같이 분류 하였다.

- 가. 대조군 : 증류수를 투여한 그룹 [11마리]
- 나. 黃精 生乾군 : 蒸熟하지 않고 건조한 黃精 시료를 500 mg/kg로 투여한 그룹 [11마리]
- 다. 黃精 1蒸군 : 黃精 1蒸 시료를 500 mg/kg로 투여한 그룹 [11마리]
- 라. 黃精 3蒸군 : 黃精 3蒸 시료를 500 mg/kg로 투여한 그룹 [11마리]
- 마. 黃精 6蒸군 : 黃精 6蒸 시료를 500 mg/kg로 투여한 그룹 [11마리]
- 바. 黃精 9蒸군 : 黃精 9蒸 시료를 500 mg/kg로 투여한 그룹 [11마리]

약물은 500 mg/kg 용량으로 경구 투여한 후, 1시간이 경과한 시점에서 체중의 5%의 납줄을 꼬리에 달아 고정하였고, 120×70 cm의 원형 투명 수조에 D,W를 25 cm까지 채우고 20°C를 유지하고 수영을 시켰다. 수영 종료는 코가 수면 아래로 잠길 정도의 수영이 5초간 진행되어 가라앉게 될 때를 수영 가능시간으로 설정하여 측정한 후, 종료하였다. 실험 종료 후, 개복하여 복대동맥에서 채혈하였고, Soleus muscle조직을 적출하였다.

6) 혈청검사

복대동맥에서 채혈 한 후, 3,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 얻어진 혈청으로 creatine, triglycerides (TG), total cholesterol (TC)를 측정하였다.

7) AMPK western blot

실험 종료 후, 적출한 Soleus muscle조직을 100mM Tris-HCl(pH 7.4), 5 mMTris-HCl(pH 7.5), 2 mM MgCl₂, 15 mM CaCl₂, and 1.5 M sucrose, and then 0.1 M DTT

and protease inhibitor cocktail을 첨가한 buffer A를 넣고 tissue grinder (Bio Spec Product, USA)로 분쇄한 후 10% NP-40 용액을 첨가하였다. 아이스 위에서 20분간 정지시킨 후 12,000 rpm으로 2분간 원심분리 하여 세포질을 포함하고 있는 상층액을 분리하였다. 핵을 얻기 위해 10% NP-40가 더해진 buffer A에 두 번 헹구고 100 μ l의 buffer C (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF and 10% glycerol)를 첨가해 재부유 시킨 뒤 10분마다 vortex을 3번 하였다. 4°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리한 후 핵을 포함하고 있는 상층액을 얻어 -80°C에서 각각 냉동 보관하였다. 근육 조직의 p-AMPK 및 AMPK 단백질의 발현을 측정하기 위해 10 μ g의 단백질을 8~15% SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기연동 후, acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 준비된 membrane에 각각의 1차 anti body를 처리하여 4°C에서 overnight 시킨 다음 PBS-T로 6분마다 5회 세척하고, 각각 처리된 1차 항체에 사용되는 2차 항체 (PBS-T로 1:3000로 희석해서 사용)를 사용하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, PBS-T로 6분마다 5회 세척하였다. 그리고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액을 GE Healthcare (Arlington Heights, IL, USA)에 노출시킨 후, Sensi-Q2000 Chemidoc (Lugen Sci Co, Ltd, Seoul, Korea)에 감광시켜 단백질 발현을 확인한 후, 해당 band를 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)프로그램을 사용하여 정량하였다.

8) 통계처리

모든 측정 결과는 평균과 표준편차로 나타내었으며, 실험군간의 차이는 Student's t-test를 사용하여 통계적으로 유의성을 나타내었고, p<0.05 값인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판단하여 결과분석 하였다.

III. 결 과

1. 黃精 물 추출물의 세포 독성 시험

黃精 물 추출물에 대한 세포독성 여부를 확인하기 위해 CCK-8 assay를 이용한 세포독성 실험결과이다. RAW 264.7 세포에 黃精 生乾, 1蒸, 3蒸, 6蒸, 9蒸의 물 추출물을 200 μ g/ml로 24시간동안 처리한 후 세포사멸을 확인한 결과로, 모든 처리군에서 세포 생존력이 100% 이상인 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 따라서 生乾 黃精과 蒸熟 黃精 모두 세포 독성은 없었다.

2. Polyphenol 및 flavonoid 함량 분석

Polyphenol은 우리의 식생활에 풍부한 미량 영양소들로, 암과 심혈관 질환과 같은 퇴행성 질환의 방지에서 중요한 역할을 하며¹⁸⁾ 식품, 약물에서 추출된 polyphenol의 항산화 작용에 대한 연구가 다양하게 이루어지고 있다¹⁹⁻²³⁾. 黃精의 蒸熟에 따른 항산화 활성을 알아보기 위해 polyphenol 함량을 측정할 결과로 黃精 生乾과 黃精 1蒸의 경우에는 polyphenol 함량이

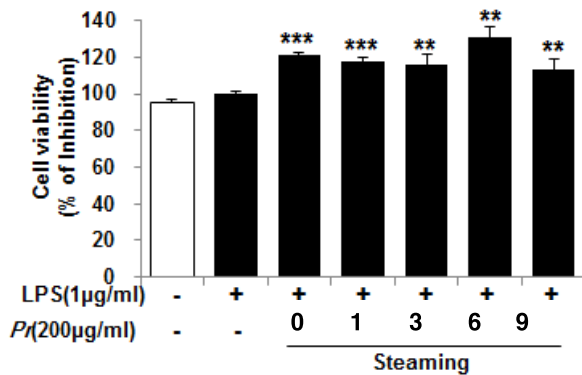


Fig. 1. Cytotoxicity of water extracts from Polygonati Rhizoma on RAW 264.7 cells line.

0: Polygonati Rhizoma without steaming process;
 1: Polygonati Rhizoma with once steaming process;
 3: Polygonati Rhizoma with third steaming process;
 6: Polygonati Rhizoma with sixth steaming process;
 9: Polygonati Rhizoma with ninth steaming process.
 Significance : **p(0.01, ***p(0.001 vs. polygonati rhizoma without steaming process.

없는 것을 확인할 수 있었다. 이에 비해 3蒸부터 6蒸, 9蒸은 蒸熟 횟수가 증가함에 따라 polyphenol 함량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2 (A)). 따라서 黃精은 蒸熟 횟수가 증가할수록 polyphenol 함량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

Flavonoid는 과일, 야채, 뿌리, 줄기, 꽃, 넝쿨, 곡식, 차, 와인 등에서 발견되는 변하기 쉬운 폐놀 구조를 가진 자연적인 물질의 총칭이다. Flavonoid 중에서도 일부 물질이 특히 효율적이라는 점이 발견되기 전부터 이 천연물들은 건강에 유익한 것으로 알려져 왔다. Flavonoid는 심장 질환 사망률을 낮추고, 관상 동맥 심질환으로부터 보호해 주며, flavonoid 섭취는 노화를 늦추는 데 효과가 있다고 보인다.

Flavonoid는 직접적인 radical 소거능이 있으며, 백혈구를 고정시키고, 다른 효소 체계와 상호 작용²⁴⁾을 한다. Flavonoid 또한 다양한 방면에서 연구가 이루어지고 있다²⁵⁻²⁸⁾.

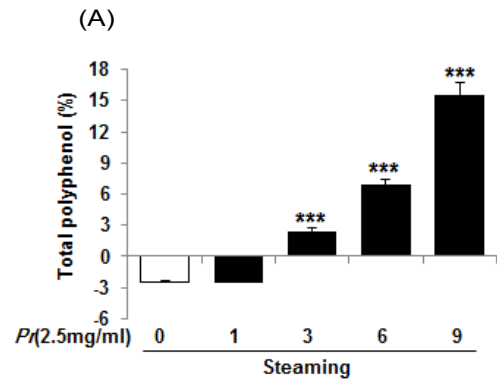
蒸熟 黃精의 flavonoid 함량을 측정한 결과 黃精 生乾에 비해 1蒸 黃精은 -0.1%, 3蒸 黃精은 1.0%, 6蒸 黃精은 2.0%, 9蒸 黃精은 5.3%로 나타나 蒸熟횟수에 비례하게 증가하였다 (Fig. 2 (B)).

3. DPPH free radical 및 ABTS radical 소거 활성 측정

DPPH는 안전한 유리기로 cysteine, glutathione, ascorbic acid, aromatic amine, BHT, BHA, trolox, α -tocopherol 등에 의해 환원되어 보라색에서 옅은 노란색으로 탈색되므로 항산화 물질의 항산화능 측정에 사용된다.

黃精의 蒸熟 횟수에 따른 DPPH 소거율 측정을 확인한 결과 대조군에 비해 1, 3, 6, 9蒸 모두에서 각각 1.1%, 6.1%, 14.2%, 23.3%로 DPPH 소거능 활성이 증가하는 것을 보였다 (Fig. 3 (A)). 이는 앞선 polyphenol과 flavonoid 함량 측정 결과와 일치하는 결과이다.

항산화 활성을 측정하는 또 다른 방법인 ABTS radical 소거능을 측정한 결과, 黃精 生乾에 비해 蒸熟을 했을 때 ABTS



(B)

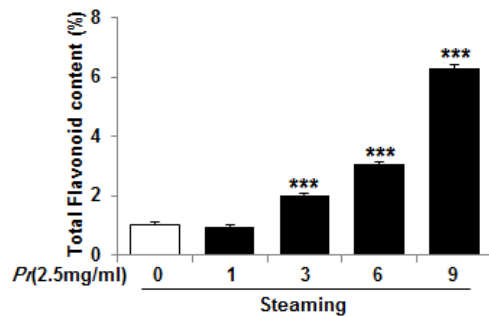


Fig. 2. Total polyphenol contents and flavonoid contents of Polygonati Rhizoma water extracts depending on steaming process.

(A); Total polyphenol contents of Polygonati Rhizoma water extracts depending on steaming process.
 (B); Total flavonoid contents of Polygonati Rhizoma water extracts depending on steaming process.
 0: Polygonati Rhizoma without steaming process;
 1: Polygonati Rhizoma with once steaming process;
 3: Polygonati Rhizoma with third steaming process;
 6: Polygonati Rhizoma with sixth steaming process;
 9: Polygonati Rhizoma with ninth steaming process.
 Significance: ***p(0.001 vs. polygonati rhizoma without steaming process.

radical 소거능이 1蒸은 黃精 生乾과 별 차이를 보이지 않았으며, 3蒸은 0.8%, 6蒸은 1.2%, 9蒸은 2.3%로 높게 나타났다. 黃精의 ABTS free radical 소거능은 蒸熟 횟수가 증가함에 따라 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3 (B)).

4. 黃精이 강제수영시간에 미치는 영향

정상군의 수영시간은 14:36 ± 1:379 (분:초)였고, 生乾 黃精 투여군의 수영시간은 18:09 ± 3:46 (분:초)로 유의성 있게 수영시간이 증가되었다. 그러나 1蒸 蒸熟 黃精 투여군의 수영시간은 14:33 ± 1:20 (분:초)으로 生乾 黃精 투여 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었고, 3蒸 蒸熟 黃精 투여군의 수영시간은 13:23 ± 1:13 (분:초)로 生乾 黃精 투여 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었으며, 6蒸 蒸熟 黃精 투여군의 수영시간은 13:34 ± 0:52 (분:초)로 生乾 黃精 투여 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었고, 9蒸 蒸熟 黃精 투여군의 수영시간은 12:23 ± 0:56 (분:초)으로 生乾 黃精 투여 대조군뿐만 아니라, 정상군의 수영시간보다 유의성 있게 감소되었다 (Fig. 4).

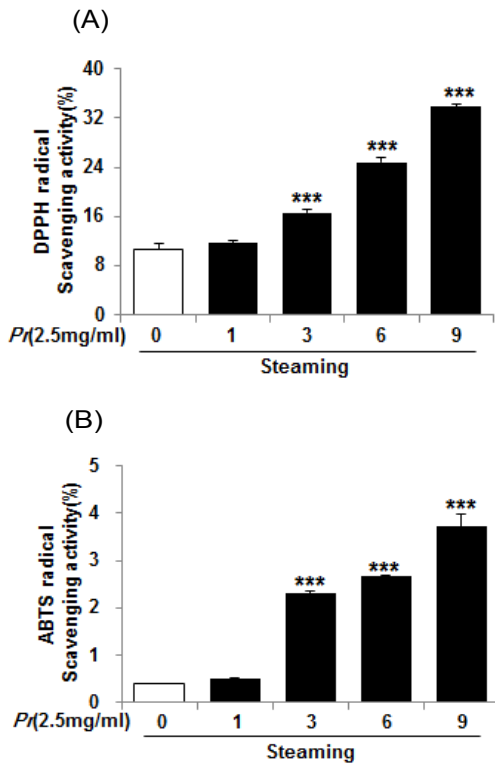


Fig. 3. DPPH free radical and ABTS radical scavenging activity of Polygonati Rhizoma water extracts depending on steaming process.
 (A) ;DPPH free radical scavenging activity
 (B) ;ABTS radical scavenging activity.
 0: Polygonati Rhizoma without steaming process;
 1: Polygonati Rhizoma with once steaming process;
 3: Polygonati Rhizoma with third steaming process;
 6: Polygonati Rhizoma with sixth steaming process;
 9: Polygonati Rhizoma with nieth steaming process.
 Significance: ***p<0.001 vs. polygonati rhizoma without steaming process.

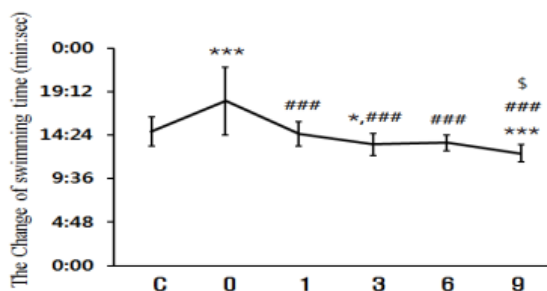


Fig. 4. The effects of forced swimming times.
 C : Normal rats,
 0 : Rats treated with dried Polygonati Rhizoma without steaming process,
 1 : Rats treated with dried Polygonati Rhizoma one time steamed with water,
 3 : Rats treated with dried Polygonati Rhizoma three times steamed with water,
 6 : Rats treated with dried Polygonati Rhizoma six times steamed with water,
 9 : Rats treated with dried Polygonati Rhizoma nine times steamed with water.
 The data was compared to normal control group and significant value was *p<0.05, ***p<0.001. The data was compared to 0 control group and significant value was ###p<0.001. The data was compared to 1 control group and significant value was \$p<0.05.

5. 혈중 TG 함량 변화

수영종료 직후 마취하여 복강정맥에서 혈액을 채취하였고, 이를 원심분리한 후 혈청내 TG를 분석한 결과, 정상군의 혈청내 TG 함량은 85.2 ± 16.60 mg/ml이었고, 生乾 黃精 투여 대조군은 66.8 ± 15.12 mg/ml로 정상군에 비해 유의성 있게 감소되었다. 1蒸 蒸熟 黃精 투여군은 49.8 ± 8.76 mg/ml이었고, 3蒸 蒸熟 黃精 투여군은 71.8 ± 12.34 mg/ml이었으며, 6蒸 蒸熟 黃精 투여군은 54.0 ± 3.32 mg/ml이었고, 9蒸 蒸熟 黃精 투여군은 62.2 ± 21.74 mg/ml로 나타났다 (Fig. 5).

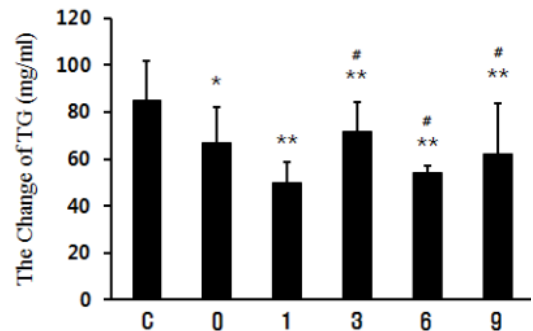


Fig. 5. The effects of TG in serum on forced swimming test.
 C : Normal rats,
 0 : Rats treated with dried Polygonati Rhizoma without steaming process,
 1 : Rats treated with dried Polygonati Rhizoma one time steamed with water,
 3 : Rats treated with dried Polygonati Rhizoma three times steamed with water,
 6 : Rats treated with dried Polygonati Rhizoma six times steamed with water,
 9 : Rats treated with dried Polygonati Rhizoma nine times steamed with water.
 The data was compared to normal control group and significant value was *p<0.05, **p<0.01. The data was compared to 0 control group and significant value was #p<0.05.

6. 혈중 creatine 함량에 대한 영향

혈청내 creatine을 분석한 결과, 정상군의 혈청내 creatine 함량은 0.572 ± 0.028 mg/ml이었고, 生乾 黃精 투여 대조군은 0.448 ± 0.084 mg/ml로 정상군에 비해 유의성 있게 감소되었다. 1蒸 蒸熟 黃精 투여군은 0.476 ± 0.009 mg/ml이었고, 3蒸 蒸熟 黃精 투여군은 0.500 ± 0.048 mg/ml이었으며, 6蒸 蒸熟 黃精 투여군은 0.474 ± 0.022 mg/ml이었고, 9蒸 蒸熟 黃精 투여군은 0.484 ± 0.024 mg/ml로 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다 (Fig. 6).

7. 혈중 TC 함량에 미치는 효과

수영종료 직후 마취하여 복강정맥에서 혈액을 채취하였고, 이를 원심분리한 후 혈청내 총 콜레스테롤을 분석한 결과, 정상군의 혈청내 콜레스테롤 함량은 115.8 ± 16.62 mg/ml이었고, 生乾 黃精 투여 대조군은 121.8 ± 10.11 mg/ml로 정상군에 비해 유의적 차이는 보이지 않았다. 1蒸 蒸熟 黃精 투여군은 117.2 ± 15.70 mg/ml이었고, 3蒸 蒸熟 黃精 투여군은 114.2 ± 8.41 mg/ml이었으며, 6蒸 蒸熟 黃精 투여군은 104.4 ± 5.13 mg/ml이었고,

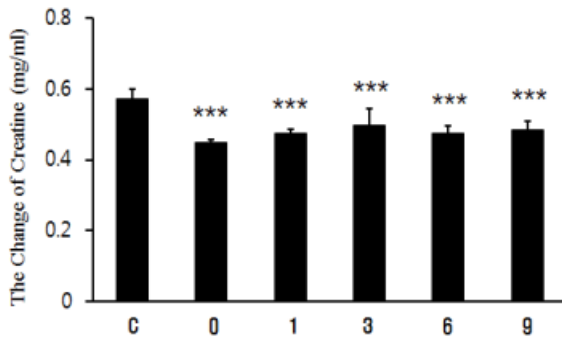


Fig. 6. The effects of creatine in serum on forced swimming test.

C : Normal rats,
 0 : Rats treated with dried Polygonati Rhizoma without steaming process,
 1 : Rats treated with dried Polygonati Rhizoma one time steamed with water,
 3 : Rats treated with dried Polygonati Rhizoma three times steamed with water,
 6 : Rats treated with dried Polygonati Rhizoma six times steamed with water,
 9 : Rats treated with dried Polygonati Rhizoma nine times steamed with water.
 The data was compared to normal control group and significant value was ***p(0.001).

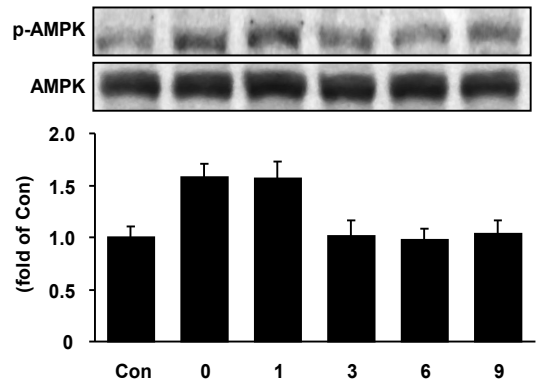


Fig. 8. The AMPK protein expression in soleus muscle on forced swimming test.

C : Normal rats,
 0 : Rats treated with dried Polygonati Rhizoma without steaming process,
 1 : Rats treated with dried Polygonati Rhizoma one time steamed with water,
 3 : Rats treated with dried Polygonati Rhizoma three times steamed with water,
 6 : Rats treated with dried Polygonati Rhizoma six times steamed with water,
 9 : Rats treated with dried Polygonati Rhizoma nine times steamed with water.

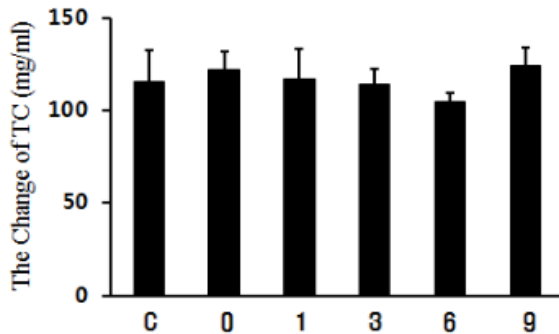


Fig. 7. The effects of total cholesterol in serum on forced swimming test.

C : Normal rats,
 0 : Rats treated with dried Polygonati Rhizoma without steaming process,
 1 : Rats treated with dried Polygonati Rhizoma one time steamed with water,
 3 : Rats treated with dried Polygonati Rhizoma three times steamed with water,
 6 : Rats treated with dried Polygonati Rhizoma six times steamed with water,
 9 : Rats treated with dried Polygonati Rhizoma nine times steamed with water.

9蒸 蒸熟 黄精 투여군은 124,0±10,02 mg/ml로 대조군의 콜레스테롤과 유의성 있는 차이점은 보이지 않았다 (Fig. 7).

8. 근육내 AMPK 활성화도

수영 종료 직후 마취하여 측정하였을 때, 정상군의 근육 내 AMPK 단백질 발현량에 비해 生乾 黄精 투여군의 AMPK 단백질 발현량이 증가되었으며, 이는 1蒸 蒸熟 黄精의 발현량과 유사하였다. 그러나 3蒸, 6蒸 및 9蒸 AMPK 단백질 발현량은 生乾 黄精 및 1蒸 蒸熟 黄精에 비해 발현량이 감소되었다 (Fig. 8).

IV. 고찰

生升熟降은 韓藥 약리효능 변화 특성중 하나로, 莱菔子를 生用하게 되면 升하고, 熟用하면 降하게 되어 전형적인 生升熟降이라 할 수 있다. 또한 柴胡는 生品은 升舉陽氣하며, 醋制후에는 疏肝解鬱止痛하게 된다. 또한 香附子를 生用하게 되면 上行胸膈하고, 外达肌肤이고, 熟用하면 下走肝肾이며, 腰足を 관통한다. 또한 黄连, 黄芩은 酒制후에 上行력이 증가되어, 머리와 눈에서 清热작용이 일어난다.

生猛熟緩 측면에서, 한의약물 生品の 작용은 猛烈하나 制熟 후에는 크게 緩와된다. 大黃의 生品은 功下작용은 매우 강하고, 制熟 瀉下작용은 緩和작용이 명백하여 胃를 상하지 않게 한다. 枳實은 生用하면 破氣작용이 强하고 麩炒후 맹렬성질이 매우 완화되고 正氣의 상함을 면할 수 있다²⁹⁾.

따라서, 生품 한약은 陽性的의 효능을 가지고 있고, 熟用 한약은 陰性的의 효능을 가지고 있다고 보고 있으며, 黄精은 補氣와 補陰의 효능을 동시에 가진 한의약물로서 응용되고 있다. 이에 生黄精의 補氣를 통한 항피로 효능과 蒸熟黄精의 항피로 효능에 차이가 있을 것으로 판단되어 본 연구를 진행하였다.

黄精을 生乾 黄精으로 사용하지 않고 일반적으로 九蒸九曝하여 사용한다는 문헌적 고찰을 통해서, 黄精의 補陰藥으로써의 효능을 증강시키기 위해 炮製하였고, 또한 黄精 내의 성분에도 변화가 있으리라 유추해 볼 수 있었다.

黄精의 효능과 관련된 최근 연구 동향은 주로 항산화와 지질 분해 측면에서 이루어지고 있으며 피부조직에 미치는 항산화 효과³⁰⁾ 및 고지혈증을 완화시키는 효과³¹⁾가 있다고 하였고, 뇌경색에 의한 허혈성 졸중풍에 유의한 효과³²⁾가 보고되었다. 黄精의 유효 성분에 관한 연구는 많이 진행 되었지만 문헌에서 고찰한 것처럼 九蒸九曝을 통해 만들어지는 蒸製 黄精에 대한 연구나 蒸製에 따른 성분 변화, 효능 변화에 대한 연구는 미비한

실정이다. 그래서 補陰藥, 補益藥으로서의 黃精을 사용 시 蒸熟 여부에 따른 그 차이에 대한 구분이 필요하다고 생각이 되어, 항산화 활성성분 및 항산화 효능, 항피로 실험을 통해 生乾과 蒸熟의 정도에 따른 차이를 비교 분석하였다.

黃精 물 추출물에 대한 세포독성 여부를 확인하기 위해 CCK-8 assay를 이용한 세포독성을 실험하였다. RAW 264.7 세포에 黃精 生乾, 1蒸, 3蒸, 6蒸, 9蒸의 물 추출물을 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 24시간동안 처리한 후 세포사멸을 확인한 결과로, 모든 처리군에서 세포 생존률이 100% 이상인 것을 확인할 수 있었다.

黃精의 蒸熟 횟수에 따른 polyphenol, flavonoid 함량 변화를 관찰한 결과, 黃精 生乾과 黃精 1蒸의 경우에는 polyphenol 함량이 없었지만 3蒸부터 6蒸, 9蒸은 蒸熟 횟수가 증가함에 따라 polyphenol 함량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. Flavonoid 함량을 측정된 결과 역시 生乾 黃精에 비해 1蒸 -0.1%, 3蒸 1.0%, 6蒸 2.0%, 9蒸 5.3%로 증가하였다. 따라서 黃精은 蒸熟 횟수가 증가할수록 polyphenol과 flavonoid의 함량이 증가하는 것을 확인할 수 있다.

黃精의 蒸熟 횟수에 따른 DPPH 소거율 측정을 확인한 결과 대조군에 비해 1, 3, 6, 9蒸 모두에서 각각 1.1%, 6.1%, 14.2%, 23.3%로 DPPH 소거능 활성이 증가하는 모습으로 polyphenol과 flavonoid의 함량 증가와 유사한 패턴을 보였다. 또 다른 방법인 ABTS radical 소거능을 측정된 방법에서는 黃精 生乾에 비해 蒸熟을 했을 때 ABTS radical 소거능이 1蒸은 黃精 生乾과 별 차이를 보이지 않았지만, 3蒸은 0.8%, 6蒸은 1.2%, 9蒸은 2.3%로 높게 나타났다. 이를 보았을 때 黃精의 ABTS radical 소거능도 蒸熟 횟수가 증가함에 따라 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

따라서, 黃精의 蒸熟 횟수가 증가될수록 항산화 성분이 증가되며 아울러 *in vitro* 항산화 효능도 증강된다고 생각할 수 있다.

黃精은 補中益氣, 滋陰潤肺, 生津止渴 등의 효능이 있어서 脾胃虛弱, 病後虛損, 筋骨衰弱 등의 병증을 치료하는데 사용된다³³⁾. 黃精의 補益 작용에서 착안하여, 蒸熟 횟수에 따른 黃精의 補益 작용 변화와 혈관내 여러 가지 인자들과 골격근에 미치는 영향을 알아보고자 혈청 분석과 동물모델을 이용하여 항피로 실험을 진행하였다. 실험에 사용된 인자들로는 혈중 TG, creatine, TC 등이 있었다.

혈청내 TG를 분석한 결과, 정상군의 혈청 내 TG 함량은 $85.2 \pm 16.6 \text{ mg}/\text{ml}$ 이었고, 生乾 黃精 투여 대조군은 $66.8 \pm 15.12 \text{ mg}/\text{ml}$ 로 정상군에 비해 유의성 있게 감소되었다. 1蒸 蒸熟 黃精 투여군은 $49.8 \pm 8.76 \text{ mg}/\text{ml}$ 이었고, 3蒸 蒸熟 黃精 투여군은 $71.8 \pm 12.34 \text{ mg}/\text{ml}$ 이었고, 6蒸 蒸熟 黃精 투여군은 $54.0 \pm 3.32 \text{ mg}/\text{ml}$ 이었고, 9蒸 蒸熟 黃精 투여군은 $62.2 \pm 21.74 \text{ mg}/\text{ml}$ 로 나타났다.

혈청내 creatine을 분석한 결과, 정상군의 혈청 내 creatine 함량은 $0.572 \pm 0.028 \text{ mg}/\text{ml}$ 이었고, 生乾 黃精 투여 대조군은 $0.448 \pm 0.084 \text{ mg}/\text{ml}$ 로 정상군에 비해 유의성 있게 감소되었다. 1蒸 蒸熟 黃精 투여군은 $0.476 \pm 0.009 \text{ mg}/\text{ml}$ 이었고, 3蒸 蒸熟 黃精 투여군은 $0.500 \pm 0.048 \text{ mg}/\text{ml}$ 이었고, 6蒸 蒸熟 黃精 투여군은 $0.474 \pm 0.022 \text{ mg}/\text{ml}$ 이었고, 9蒸 蒸熟 黃精 투여군은 $0.484 \pm 0.024 \text{ mg}/\text{ml}$ 로 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었다.

혈중 TG나 혈청내 creatine 분석에서 유의성 있는 결과가 나온 것과는 달리 혈청내 TC를 분석한 결과, 정상군의 혈청내 TC 함량은 $115.8 \pm 16.62 \text{ mg}/\text{ml}$ 이었고, 生乾 黃精 투여 대조군은 $121.8 \pm 10.11 \text{ mg}/\text{ml}$ 로 정상군에 비해 유의적 차이는 보이지 않았다. 1蒸 蒸熟 黃精 투여군은 $117.2 \pm 15.7 \text{ mg}/\text{ml}$ 이었고, 3蒸 증숙 黃精 투여군은 $114.2 \pm 8.41 \text{ mg}/\text{ml}$ 이었고, 6蒸 蒸熟 黃精 투여군은 $104.4 \pm 5.13 \text{ mg}/\text{ml}$ 이었고, 9蒸 蒸熟 黃精 투여군은 $124.0 \pm 10.02 \text{ mg}/\text{ml}$ 로 대조군의 콜레스테롤과 유의성 있는 차이점은 보이지 않았다.

항피로 실험에서 대조군에 비해 生乾 黃精 추출물을 먹인 흰쥐의 수영시간이 유의성 있게 증가되었으나, 1蒸 蒸熟 黃精 투여군의 수영시간은 $14:33 \pm 1:20$ (분:초)으로 生乾 黃精 투여 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었으며, 3蒸 蒸熟 黃精 투여군의 수영시간은 $13:23 \pm 1:13$ (분:초), 6蒸 蒸熟 黃精 투여군의 수영시간은 $13:34 \pm 0:52$ (분:초)로 生乾 黃精 투여 대조군에 비해 유의성 있게 감소되었으며, 9蒸 蒸熟 黃精 투여군의 수영시간은 $12:23 \pm 0:56$ (분:초)으로 生乾 黃精 투여 대조군 뿐만 아니라, 1蒸 黃精 투여군의 수영시간보다 유의성 있게 감소되었다.

AMPK (Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase)는 간장의 케톤 생성, 콜레스테롤의 합성, 지질 생성, 트리글리세리드 합성, 지방 함유 세포의 지방 분해, 그리고 골격근의 지방산 산화의 대사 과정을 조절하는 특정 단백질들을 인산화하는 대사 작용의 마스터키로 알려져 있기에³⁴⁾ 강제 수영 실험 직후 마취하여 그 발현량을 측정하였다.

수영종료 직후 마취하여 측정된 근육 내 AMPK 단백질 발현량도 정상군보다 生乾 黃精 투여군의 발현량이 증가되었으며, 1蒸 黃精 투여군 역시 生乾 黃精 투여군과 유사하였다. 그러나 3蒸, 6蒸 및 9蒸 AMPK 단백질 발현량은 오히려 감소되었다. 따라서 生乾 黃精의 항피로 능력이 蒸熟 黃精보다 우수하다고 판단되며, 黃精을 補氣劑로 사용 시에는 生乾 黃精을 응용하는 것이 마땅하다고 판단된다.

따라서 生乾 黃精과 蒸熟 黃精의 생리활성을 *in vivo*, *in vitro* 연구 결과, 黃精은 生乾보다 蒸熟 횟수에 비례하여 항산화 효과는 증가하였으나, 동물 모델을 통한 항피로 실험에서는 生乾 黃精이 더 우수하다는 결과를 얻을 수 있었다. 즉, 黃精은 生乾이나 蒸熟에 따라 항산화, 항피로 효과를 달리 사용할 수 있으며, 補氣劑이자 血流 改善劑로도 응용이 가능할 것이라 사료된다. 하지만 항피로 실험에서 蒸熟 黃精보다 오히려 生乾 黃精에서 더 좋은 결과가 나오는 것을 보았을 때, 추후에 이런 부분에서의 추가 연구가 더 이루어져야 할 것이다.

V. 결 론

黃精의 生乾과 蒸熟에 따른 다양한 효능의 변화를 알아보기 위해 항산화 실험, 항피로 동물실험을 진행한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 黃精 물 추출물의 세포 독성 시험 결과 모든 처리군에서 세포 생존력이 100% 이상인 것을 확인할 수 있었다. 따라서 生乾 黃精과 蒸熟 黃精 모두 세포 독성은 없었다.

2. 黃精은 항산화 실험 결과 각 蒸熟 횡수가 증가할수록 polyphenol과 flavonoid도 증가되었다. 또한 蒸熟 횡수에 따라 DPPH free radical 소거능 활성도 증가하며, 다른 방법인 ABTS free radical 소거능도 蒸熟 횡수가 증가함에 따라 증가하는 것을 확인할 수 있었다.
3. 동물모델을 이용한 黃精의 항피로실험 결과 강제 수영 시간에 미치는 영향 연구에서는 生乾 黃精만이 대조군에 비해 유의성 있게 증가되었고 蒸熟 黃精은 수영시간이 감소하였다.
4. 항피로와 관련된 혈청내 인자 중, triglyceride는 1蒸 黃精 투여군에서 유의성 있게 감소되었고, creatine은 生乾 黃精 투여군에서 유의성 있게 감소되었으며, total cholesterol은 모든 투여군에서 유의성이 없었다.

이상의 연구 결과로서 生乾, 蒸熟 黃精은 항산화 효과가 있으며 蒸熟 횡수가 증가할수록 그 효능도 증가되었다. 항피로 효과는 生乾 黃精에서만 나타나는 것으로 보아 향후 生乾 黃精의 補氣 작용에 대한 연구가 더 진행되어야 한다고 사료된다.

참고문헌

1. Sun XY. Shennongbencaojing. Taipei : China Inter-continental Press, 1985 : 41.
2. The National College of Oriental Medicine, herbalism common materials Compilation Committee. Herbal medicine. Seoul : Younglim publisher, 2005 : 654.
3. Do HK, Myungei-byelgok. Beijing : People's health publisher, 1986 : 23.
4. Sang JG. Ilhwajaboncho chockboncho. Hepei : Anhui Science and Technology Publisher, 2005 : 33.
5. Lee SJ. Compendium of Materia Medica. Beijing : Chinese Medicine Science and Technology Publisher, 2011 : 376.
6. Gang BS. Primary color illustrated oriental medicine book. Daegu : Dong-A munhwasa, 2008 : 1006.
7. Kim JG. Oriental traditional drugs primary color illustrated book. Seoul : Younglim publisher, 1995 : 130-1.
8. Gao HM. Chinese Pharmacy. Beijing : Chinese Medicine publisher, 2006 : 554-5.
9. China Institute of Science and drugs. Chinese Medicine Chi Chapter 2. Beijing : People's health publishing house, 1985 : 57-62.
10. Xiao Pei root master. New Chinese Medicine Chi. Beijing : Chemical Industry Press, 2002 : 902-10.
11. Wang XA. Modern pharmacology. Tianjin : Tianjin Science and Technology Press, 1997 : 1353-6.
12. Ye DJ, Jang SS. Traditional Chinese Medicine and Science. Beijing : Chinese Medicine publisher, 1997 : 71.
13. Kang MW. Studies on the Antioxidant Activity of Steamed Polygonati rhizoma. Joongbu university, 2013.
14. Velioglu YS, Mazza G, Cao L, Oomah BD. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. J. Agric. Food Chem, 1998 ; 46(10) : 4113-7.
15. Chae SK. Standard Food Analysis. Paju : Jigu publisher, 2002 : 381-2.
16. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 1958 ; 26 : 1199-1200.
17. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, & Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free radical biology and medicine. 1999 ; 26(9) : 1231-7.
18. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr. 2004 ; 79(5) : 727-47.
19. Kang GH. Anti oxidative Activity of Phenolic Compounds Isolated from Safflower (Carthamus tinctorius L.) Seeds. Catholic university of daegu, 2001.
20. Choi HJ, Han HS, Park JH, Son JH, Bae JH, Sunn TS, Choi J. Antioxidative, Phospholipase A2 Inhibiting, and Anticancer Effect of Polyphenol Rich Fractions from Panax ginseng C. A. Meyer. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2003 ; 46(3) : 251-6.
21. Kim JH. Effect of Different Part of Mandarin Intake on Anti oxidative Capacity in rats. Ewha womans university, 2003.
22. Oh SH. Study on Anti oxidative Effects of Polyphenols Extracted from Chestnut Inner Shell, Pine Needle, Hop, and Persimmon. Dongkuk university, 2005.
23. Lim SS, Lee YS, Kim EJ, Yoon JH, SHin HK. Rubus coreanus concentrated polyphenol antioxidant and cancer-cell proliferation inhibitory effect of water. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition Industry Symposium, 2005 : 383.
24. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. Am J Clin Nutr. 2001 ; 74(4) : 418-25.
25. Kim SC. Isolation and Antioxidant Activities of Flavonoids from the Root of Scutellaria baicalensis G. Konkuk university, 1995.
26. Lee JS. Antioxidant activity of flavonoids derived in Rhus verniciflua Stokes. Ajou university, 2002.
27. Jung LW. Antioxidant Activity and Radioprotection of Two Flavonoids from Propolis. Journal of the

- Korean Society of Food Science and Nutrition, 2005 ; 34(2) : 162-6
28. Jia tian zhu. Zailunzhongyaoshengshudebianh-dizuoyong. Chinese Tmditional Patent Medicine, 2006 ; 28(7) : 984-86.
 29. Lee SJ, Jung HY, Lee IK, Yoo ID. Isolation and Identification of Flavonoids from Ethanol Extracts of Artemisia vulgaris and Their Anti oxidant Activity. Korean J. Food SCI. Thchnol, 1999 ; 31(3) : 815-22.
 30. Park JM. Antioxidative effects of polygonatum odoratum extracts on rat skin. pukyong national university, 2007.
 31. Roh SW. Effects of Polygonati Rhizoma on the Diet-induced Hyperlipidemia in Rats, 2008 ; 22(5) : 1147-51.
 32. Han SG. Effect s of Rhiz oma Polygonati on the regional Cerebral Blood Flow and Blood Pressure. Wonkwang university, 2002.
 33. Shin MG. Clinical Herbal medicines. Seoul : Younglim publisher, 1992 : 197.
 34. Winder WW, Hardie DG. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. Am, J. Physiol, 1999 ; 227(1) : 1-10.