

미토콘드리아 생합성 촉진을 통한 신선초와 홍삼 복합물의 운동수행능력 증가 효과

김창희 · 김미보 · 이승호¹ · 김예진¹ · 황재관*
연세대학교 생명공학과, ¹(주)카인즈 바이오텍스 R&BD팀

Ashitaba and red ginseng complex stimulates exercise capacity by increasing mitochondrial biogenesis

Changhee Kim, Mi-Bo Kim, Seung-Ho Lee¹, Ye-Jin Kim¹, and Jae-Kwan Hwang*

Department of Biotechnology, Yonsei University

¹Team of R&BD, KINDS BIOTIX Inc.

Abstract Mitochondrial biogenesis—a process that leads to an increment in the number and density of mitochondria, improves physical performance and body health by enhancing exercise capacity. In the present study, we investigated the stimulatory effect of Ashitaba and red ginseng complex (ARC) on exercise capacity in L6 skeletal muscle cells and mice. In L6 skeletal muscle cells, ARC increased the mitochondrial contents and ATP production by activating AMP-activated protein kinase (AMPK), sirtuin 1 (SIRT1), and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha (PGC-1 α) and up-regulating the mRNA expression of nuclear respiratory factor-1 (NRF-1) and mitochondrial transcription factor A (TFAM). In the animal experiments, mice treated with ARC showed an increment in exercise capacity as compared with mice treated with Ashitaba extract or red ginseng extract alone. These studies indicate that ARC might serve as a potential natural candidate for enhancing exercise capacity by stimulation of mitochondrial biogenesis.

Keywords: Ashitaba; Exercise capacity; Mitochondrial biogenesis; Red ginseng

서 론

인간의 부족한 신체활동은 현대사회에 발생하는 대사성 질환을 야기하는 주요 원인이다. 극심한 스트레스, 서구화된 식습관, 불규칙한 생활리듬 등에 의한 신체 활동의 저하는 체력을 떨어뜨리고 비만, 당뇨, 고혈압, 우울증, 근감소증 등을 야기하여 삶의 질을 악화시킨다(1). 최근, 이러한 대사성 질환 및 피로가 운동에 의해 완화된다는 연구결과가 발표되어 건강한 삶을 위해 규칙적인 운동이 요구되고 있다(2,3). 이에 따라, 운동 효과를 증가시키기 위한 다양한 식이요법이 제시되고 있으며, 운동능력향상 보조제 및 기능성 식품 등이 개발되고 있다(4).

근육은 우리 몸의 40-50% 구성하는 기관으로 대사작용과 신체활동에 가장 크게 기여 한다(5,6). 근육 세포 안의 미토콘드리아(mitochondria)는 신체활동에 필요한 에너지 아데노신 삼인산(adenosine triphosphate, ATP)을 생산 및 공급하는 세포소기관(organelle)으로 미토콘드리아 생합성(mitochondrial biogenesis)을 통한 수와 밀도의 증가는 ATP의 생산을 높여 운동수행능력을 향상시킨다(7,8). 미토콘드리아는 지방과 당의 분해로 인해 생성되

는 부산물로 ATP를 생성하기 때문에 미토콘드리아의 수 및 활성의 증가는 비만 및 당뇨의 치료 타겟으로 적용할 있다(9). 따라서 미토콘드리아 생합성은 운동수행능력 증가와 더불어 신체활동 부족으로 발생하는 대사성 질환을 개선시킬 수 있다.

운동은 AMP-activated protein kinase (AMPK)와 sirtuin 1 (SIRT1)을 근육에서 활성화시켜 미토콘드리아 생합성에 관여하는 주요 단백질 peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 α)의 활성을 조절한다(7,10). 이때, AMPK는 PGC-1 α 를 인산화(phosphorylation)시키고, SIRT1은 인산화된 PGC-1 α 에 있는 아세틸(acetyl)기를 제거하여 이의 역할을 촉진시킨다(7). PGC-1 α 는 전사인자 nuclear respiratory factor-1 (NRF1)와 함께, mitochondrial transcription factor A (TFAM)의 발현을 촉진하여 미토콘드리아 생합성에 가장 밀접한 미토콘드리아 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)의 전사(transcription) 및 복제(replication)를 증가시킨다(11). 운동으로 인해 이러한 인자들의 일련의 세포 신호 전달 체계의 촉진으로 미토콘드리아 생합성이 증가되며, 따라서 이러한 인자들의 활성을 증가시키는 생리활성 물질의 탐색 및 발굴은 미토콘드리아 생합성 촉진을 통한 운동수행능력을 증가시키는 하나의 전략이 될 수 있다.

홍삼(Red ginseng)은 인삼(*Panax ginseng*)을 말리기 전의 수삼을 98-180°C로 증자하고 건조시킨 것이다. 홍삼은 홍색 내지 갈색을 띠며, 진세노사이드(ginsenoside) Rb1, Rg1, Rg3를 포함한 다량의 진세노사이드를 함유하고 있다(12). 현재까지 밝혀진 홍삼의 생리활성 성으로 면역 증진, 중성지방의 분해, 피로 개선, 산화방지 등이 있다(13-17). 아시타바(Ashitaba)라 불리는 신선초

*Corresponding author: Jae-Kwan Hwang, Department of Biotechnology, Yonsei University, Seoul 03722, Korea
Tel: +82-2-2123-5881
Fax: +82-2-362-7265
E-mail: jkhwang@yonsei.ac.kr
Received July 21, 2017; revised September 14, 2017;
accepted September 24, 2017

(*Angelica keiskei*)는 명일엽, 선삼초, 신립초 등으로도 불리며 아열대 지방에서 자생한다(18). 신선초에 대한 항비만 및 항당뇨, 산화방지, 항암 등의 효능이 검증된 바 있으나(19-22), 아직까지 신선초의 운동능력 향상효과에 대해서는 밝혀진 바가 없다. 공통적으로 홍삼과 신선초는 항비만 등의 대사성 질환 개선 및 산화방지 효능이 있는 것으로 보고된 바 있다. 따라서 본 연구에서는 세포실험과 강제 수영 및 트레이닝을 이용한 동물실험을 통해 신선초 추출물(Ashitaba extract, AE)과 홍삼 추출물(red ginseng extract, RGE) 그리고 신선초와 홍삼 복합물(Ashitaba and red ginseng complex, ARC)의 운동능력향상 효과를 평가하고, 운동능력향상 및 신체 활동 부족으로 인한 대사성 증후군을 개선 할 수 있는 자연 소재로의 가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

시약

본 연구에서는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 소태아 혈청(fetal bovine serum), 말 혈청(horse serum)을 Hyclone Laboratories Inc. (Logan, UT, USA)에서 구입하여 사용하였다. AMPK, p-AMPK, SIRT1, α -tubulin 항체는 Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA, USA)에서, PGC-1 α 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 또한 Trizol과 MitoTracker Green FM (MitoTracker)은 Invitrogen Ltd. (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하여 실험을 진행하였다.

시료 제조

강원도 횡성에서 구매한 신선초를 착즙 후 수분을 제거하였다. 수분을 제거한 신선초와 80% 에탄올을 1:9 (w/v)의 비율로 80°C에서 14시간 동안 1차 추출하여 추출액을 회수한 뒤, 남은 잔여물을 30% 에탄올로 80°C에서 24시간 동안 2차 추출하였다. 1차, 2차 추출액을 혼합하여 고형물의 함량이 60%가 될때까지 감압 농축하였으며, AE에 함유된 잔토안제롤(xanthoangelol)의 함량은 0.6442%였다. 충남 금산에서 구매한 홍삼과 30% 에탄올을 1:10의 비율로 75°C에서 10시간씩 4회 반복 추출 후, 추출액을 고형물 함량이 60%가 되도록 감압 농축하였으며, RGE에 포함된 Rb1, Rg1, Rg3의 함량은 각각 1.922, 0.321, 0.056%였다. ARC는 AE와 RGE를 동량 비율(1:1)로 혼합하여 제조하였다.

세포 배양

American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입한 렛트 유래 L6 근원세포(myoblast)를 10% 소태아혈청이 함유된 DMEM을 사용하여 5% CO₂와 37°C의 환경 조건에서 배양하였다. L6 근원세포(myotube)로 분화시키기 위해 기존의 배지를 제거한 후, 2일에 한번씩 시료와 2% 말 혈청이 함유된 DMEM을 6일 동안 처리하였다. 이 때 양성 대조군으로 레스베라트롤(resveratrol, Res, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하였다.

미토콘드리아 양 측정

분화가 완료된 L6 근관세포에 50 nM MitoTracker이 함유된 DMEM를 처리하고, 5% CO₂ 환경 조건에서 40분 동안 배양하였다. 40분 뒤, DMEM를 제거하고 흡수 파장 490 nm과 방출 파장 516 nm에서 형광도를 GloMax-Multi Detection System (Promega Co., Madison, WI, USA)으로 미토콘드리아에 붙은 MitoTracker의 양을 측정하고, 아무것도 처리하지 않은 대조군과 비교하여 백분

율(%)로 나타내었다.

웨스턴 블롯팅(Western blotting) 분석

분화가 완료된 L6근관세포에 NP-40 세포용해완충용액(lysis buffer, Elpis-Biotech. Inc., Daejeon, Korea)을 처리하여 세포를 용해시킨 후, 16,500×g, 10분 동안 원심분리하여 세포막 성분들을 제거하였다. 원심 분리하여 얻은 단백질을 Bradford법(23)을 이용하여 정량하였으며, 동량의 단백질을 10% SDS-폴리아크릴아마이드 젤(polyacrylamide gel)에 전기이동하였다. 단백질을 gel에서 나이트로셀룰로스 막(nitrocellulose membrane)으로 110 V에서 1시간 동안 transfer한 뒤, membrane을 트리스완충용액식염수(tris-buffer saline Tween 20, TBST)에 녹인 5% skim milk에 30분 동안 반응시켜 background를 제거하였다. 3회 세척한 후, p-AMPK, AMPK, SIRT1, PGC-1 α , α -tubulin 항체를 2.5% 소혈청알부민(bovine serum albumin, Bioworld Co., Dublin, OH, USA)에 1:1000의 비율로 희석하여 16시간 동안 4°C에서 membrane과 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 후, TBST로 membrane을 10분간 3회 세척하고 각 1차 항체를 인지하는 2차 항체(Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX, USA)를 2.5% 소혈청알부민(Bioworld Co.)에 1:5000이 되도록 희석하여 2시간 동안 4°C에서 반응시켰다. 2차 항체의 반응이 끝난 후 다시 TBST로 10분간 3회 세척하였고, 웨스턴 블롯팅 검출시약(Western blotting detection reagent, Amersham Biosciences Corp., Little Chalfont, UK)를 이용하여 G:BOX EF imaging system (Syngene Ltd., Cambridge, UK)으로 단백질 밴드 확인 및 정량 처리하였다.

세포 내 ATP 함량 측정

ATP determination kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 제조사의 프로토콜에 따라 사용하여 세포내의 ATP 양을 측정하였다. ATP 생성에 따른 발광(luminescence)의 밝기는 MicroLumatPlus LB 96V luminometer (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Germany)를 사용하여 측정하였고, 아무것도 처리하지 않은 대조군과 비교하여 백분율(%)로 나타내었다.

강제수영

생후 6주된 수컷 ICR 쥐를 DooYeol Biotech, Inc. (Seoul, Korea)에서 구입하여 온도 19-20°C, 습도 52-58%, 12시간 명암주기(light/dark cycle)의 조건에서 사육하였다. 1주 순화 후, 대조군(Normal), 신선초 추출물 100 mg/kg/day 처리군(AE100), 홍삼 추출물 100 mg/kg/day 처리군(RGE100), 신선초 추출물과 홍삼 추출물 혼합물 100 mg/kg/day 처리군(ARC100)으로 군 당 7마리씩 총 4군으로 분류하였다. 각 시료는 1회/1일 총 3주간 경구 투여하였으며, 대조군은 시료 대신 생리식염수를 투여하였다. 본 동물 사육은 Laboratory Animal Resource of the National Research Council과 (주)폴무원 Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)의 지침에 준하여 진행하였다(IACUC number: PMO20130727-B).

3주간의 시료 투여 후, 강제수영을 통해 운동수행 능력을 측정하였다. 아크릴 플라스틱 수조(70 cm×70 cm×60 cm)에 25°C 물을 70% 채운 뒤, 수영을 하게 하여 운동시간을 측정하였다. 운동 시간은 수영 시작부터 탈진하여 더 이상 움직임이 없는 상태를 종료 시점으로 설정하였다.

젖산 발생량

혈액 내의 젖산 함량을 측정하기 위해서 수영 시작 전, 수영

직후, 회복기 10분 및 30분 총 4회 쥐의 꼬리에서 채혈을 하였으며, Lactate Pro™ LT-1710 (Arkray Inc., Kyoto, Japan)을 이용하여 젖산 함량을 측정하였다.

산화방지 효소 함량 측정

강제 수영 후, 희생된 실험동물로부터 적출된 근육 무게의 5배가 되는 cold assay buffer에 근육을 넣고 균질기(homogenizer)를 처리하였다. 처리 후 10,000×g, 15분 간 원심분리하여 상층액을 수거하였다. 카탈라아제(catalase) 분석 키트(K773-100, Biovision Inc., Mountain View, CA, USA)와 글루타싸이온 과산화효소 (glutathione peroxidase, GPx) 분석 키트 (K762-100, Biovision Inc.)을 사용하여 상층액으로부터 카탈라아제와 GPx 활성을 각각 측정하였다.

알라닌 아미노기전달효소 함량 측정

강제 수영 후, 혈청을 분리하였다. 알라닌 아미노기전달효소 (alanine aminotransferase, ALT)의 함량을 측정하기 위하여 Reitman-Frankel 법(24)에 따라 AM 101-K kit (Asan Pharm. Co. Ltd., Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다.

지구력 측정

5주된 수컷 C57BL/6J 쥐를 DooYeol Biotech, Inc. 에서 구입하여 온도 20-25°C, 습도 41.0-55.5%, 12시간 명암주기(light/dark cycle)의 조건에서 사육하였다. 구입 후 1주일간 순화시키고 대조군(Normal), 신선초 추출물 200 mg/kg/day 처리군(AE200), 홍삼 추출물 200 mg/kg/day 처리군(RGE200), 신선초 추출물과 홍삼 추출물 혼합물 200 mg/kg/day 처리군(ARC200) 등 총 4군으로 나누었다. 1회/1일 총 8주간 시료를 경구 투여하였으며, 이 때 대조군은 시료 대신 생리식염수를 투여하였다. 본 동물 사육은 Laboratory Animal Resource of the National Research Council과 (주) 풀무원 IACUC의 지침에 준하여 진행하였다(IACUC number: PMO20150705-01-A).

8주간의 시료 경구 투여 후에 트레드밀을 이용하여 지구력을 측정하였다. 지구력 측정 방법은 Kim 등(25)의 방법을 변형하여 진행하였다, 지구력 측정 전날, 트레드밀 달리기 적응시키기 위

해 경사도 10°에서 10 m/분 속도로 15분 동안 운동을 수행시켰다. 24시간 후, 지구력 테스트를 진행하였다. 경사도 10°에서 10 m/분 속도로 10분간 진행 후, 1 m/분씩 10 m/분에서 15 m/분까지 속도를 높여 60분간 진행하였으며 60분 이후 20 m/분까지 속도를 올려 운동을 수행하도록 하였다. 1 mA 전기 자극에서 2초 이상 머무는 것이 3회 이상인 경우 또는 5초간 연속적인 전기 자극에도 불구하고 움직임이 없는 경우 측정에서 제외하였다.

Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

지구력 측정 후, 희생하여 적출한 뒷다리 근육 조직 및 분화가 종료된 L6 근관세포에 Trizol용액 1 mL 처리하여 세포를 용해하였다. 조직 또는 세포에 chloroform 200 µL을 넣고 16,500×g, 10분 간 원심분리하여 RNA를 추출하였으며, 추출된 RNA를 NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 정량 후 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA와 표적 유전자 프라이머(primer) 염기서열(Table 1)을 PCR-premix (Elpis)에 넣고 94°C에서 5분간 전처리를 한 뒤, denaturation을 위해 94°C에서 30초, annealing을 위해 50-60°C에서 1분, extension을 위해 72°C에서 1분, 총 2분을 1 cycle로 하여 25-30 cycle의 조건으로 Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA)을 사용하여 PCR을 실시하였다. PCR 반응 산물을 1.5% agarose gel을 이용하여 분리한 후, G:BOX EF imaging system (Syngene Ltd.)을 이용하여 유전자 발현 정도를 확인 및 정량 처리하였다.

통계처리

모든 실험은 3번 반복하여 실시하였으며, 실험결과는 SPSS 21.0 통계 패키지(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 통해 분석하여 평균±표준편차로 표시하였다. 세포실험의 경우 일원배치분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA)으로 비교한 후, Scheffe's test로 p<0.05와 p<0.01 수준에서 유의성을 검정하였다. 동물실험 및 ATP 측정 실험은 각 시료에 따른 차이를 ANOVA로 비교한 후, 유의성을 p<0.05 수준에서 Duncan 다중범위 분석에 의해 검정하였다. 레스베라트롤의 경우 Student's t-test로 유의성을 확인하였다.

Table 1. Primer sequences used in RT-PCR

Origin	Gene	Direction	Sequence (5'-3')
Rat	PGC-1α	Forward	ATG TGT CGC CTT CTT GCT CT
		Reverse	ATC TAC TGC CTG GGG ACC TT
	NRF-1	Forward	TGG ACC CAA GCA TTA CGG AC
		Reverse	GGT CAT TTC ACC GCC CTG TA
TFAM	Forward	GCT TCC AGG AGG CTA AGG AT	
	Reverse	CCC AAT CCC AAT GAC AAC TC	
β-Actin	Forward	AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC	
	Reverse	CTC TCA GCT GTG GTG CTG AA	
Mouse	PGC-1α	Forward	GTC CTT CCT CCA TGC CTG AC
		Reverse	GAC TGC GGT TGT GTA TGG GA
	NRF-1	Forward	CTT CAT GGA GGA GCA CGG AG
		Reverse	ATG AGG CCG TTT CCG TTT CT
	TFAM	Forward	ATA GGC ACC GTA TTG CGT GA
		Reverse	CTG ATA GAC GAG GGG ATG CG
β-Actin	Forward	CCA CCA TGT ACC CAG GCA TT	
	Reverse	AGG GTG TAA AAC GCA GCT CA	

결과 및 고찰

ARC의 미토콘드리아 생합성 증가 활성

ARC의 운동능력향상 효과를 검증하기 위해 ARC를 처리한 L6 근육 세포에서 미토콘드리아의 양을 MitoTracker로 측정했다. ARC를 처리했을 때, 미토콘드리아의 양이 대조군에 비해 농도 의존적으로 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 1A). 운동은 AMPK와

SIRT1의 활성을 증가시켜 NRF1과 결합하여 TFAM의 발현양을 조절하는 PGC-1 α 의 축진을 통해 미토콘드리아 생합성을 활성화한다(7,10). ARC의 미토콘드리아 생합성 촉진 활성과 관련된 생체지표의 변화를 RT-PCR과 웨스턴 블롯팅 기법으로 확인하였다. ARC가 미토콘드리아 생합성에 관한 유전자 PGC-1 α , NRF1, TFAM의 mRNA의 발현양을 농도 의존적으로 증가시켰으며(Fig. 1B) 그 상위 생체지표인 AMPK와 SIRT1의 단백질 발현양이 ARC

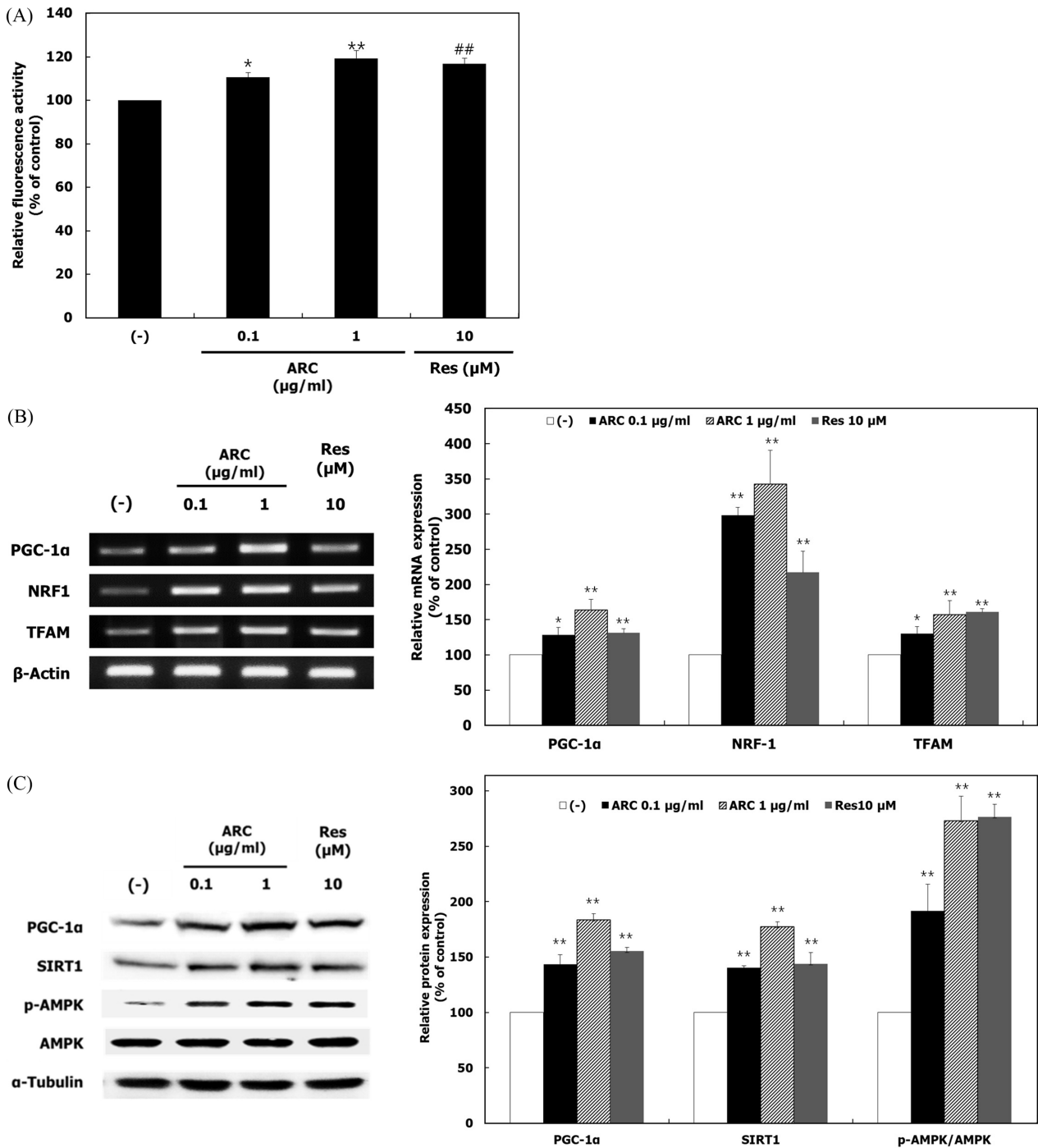


Fig. 1. Effect of ARC on mitochondrial biogenesis. L6 cells were cultured with the differentiation medium containing ARC (0.1 and 1 $\mu\text{g/mL}$) for 6 days. (A) Mitochondrial contents were measured using Mitotracker. (B) The mRNA expression of PGC-1 α , NRF-1, and TFAM was detected by RT-PCR. (C) The protein levels of p-AMPK, SIRT1, and PGC-1 α were evaluated by Western blotting. β -Actin for RT-PCR and α -tubulin for Western blotting were used as controls. Results are expressed as mean \pm standard deviation. Res (10 μM) was used as positive control. # p <0.01 and ** p <0.01 (control vs. sample-treated cells)

Table 2. ATP contents in L6 cells by AE, RGE, and ARC treatments

Group	Relative luminescence activity (% of control)
Control	100.00±0.57 ^a
RGE 25 µg/mL	132.90±0.10 ^c
AE 25 µg/mL	129.26±1.06 ^b
ARC 25 µg/mL	141.40±2.15 ^d
Res 10 µM	133.82±0.27 ^c

^{a-d}values are significantly different at $p < 0.05$.

에 의해 유의적으로 증가하였다(Fig. 1C). 이는 Kim 등(23)의 핑거루트 추출물과 Jung 등(26)의 겨우살이 추출물의 미토콘드리아 생합성 증가 관련 분자적 기전 연구 결과와 유사함을 보여준다. 또한, 본 연구의 ARC의 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 세포신호전달 축진은 양성 대조군으로 사용한 레스베라트롤(27)의 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 세포신호전달 기전에 의한 미토콘드리아 생합성 증가와 동일한 결과 나타내었다. 이러한 결과는 ARC가 일련의 신호전달체계를 촉진하여 미토콘드리아의 양을 증가시키는 것을 의미한다.

ARC의 ATP생산 증가 활성

미토콘드리아는 ATP를 생산하는 세포소기관으로 운동은 미토콘드리아 생합성을 촉진하여 ATP생산을 증가시킨다(7,8). L6근육 세포에 AE, RGE, ARC를 각각 처리한 결과, 모든 실험군에서 ATP 양이 대조군에 비해 증가하였으며, 특히 ARC에 의한 ATP 생산의 증가는 RGE와 AE 처리에 비해 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다(Table 2). ATP생산의 증가는 PGC-1 α 에 의한 mitochondrial DNA복제를 담당하는 단백질 TFAM의 발현양 증가로부터 기인된 것이다(11). 따라서, ARC의 ATP증가는 앞서 언급한 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 신호전달체계 촉진에 의한 미토콘드리아 생합성으로부터 기인한 것이다. 홍삼에 주요 생리활성물질인 Rg1과 Rg3는 근육 세포에서 운동능력을 조절하는 주요 단백질 AMPK를 증가시켰으므로(28,29), 이들의 복합으로 인해 홍삼 추출물의 ATP생산 증가 효과가 나타난 것으로 해석된다. 반면, 신선초의 주된 생리활성물질인 4-hydroxyderricin과 잔토안제롤은 근육에서 AMPK 촉진 활성이 없으므로(30) 신선초 추출물에 존재하는 isobavachalcone, laserpitin 등의 생리활성물질(22)에 의해 ATP를 촉진시키는 것으로 판단된다. 복합물에서 더 많은 ATP가 생산된 것처럼 진세노사이드와 isobavachalcone 및 laserpitin의 생리활성물질의 복합에서도 상승(synergy) 효과를 기대할 수 있으나 추가적인 검증이 필요하다. 따라서, 신선초와 홍삼에 들어있는 이러한 생리활성물질의 복합으로 인하여 단일 추출물에 비해 신선초와 홍삼 복합물에서 더 많은 양의 ATP를 생산하는 것으로 생각된다.

ARC의 운동수행능력 증진 활성

ARC의 운동수행능력 증진 효과를 확인하기 위해 3주간의 시료를 쥐에게 경구 투여 후, 강제수영을 통한 수영시간을 측정하였다. 실험결과, 대조군에 비해 모든 실험군에서 수영시간이 증가하였으며, 동일한 농도 조건 하에 ARC100군이 AE100군과 RGE100군에 비해 수영시간이 유의적으로 약 2배 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 2A). 이러한 결과는 근육 세포에서 ARC의 ATP 증가 결과와 일치하며, 신선초와 홍삼 복합물이 단일 추출물 처리에 비해 운동수행능력 향상효과가 뛰어난 것을 의미한다. 강제 수

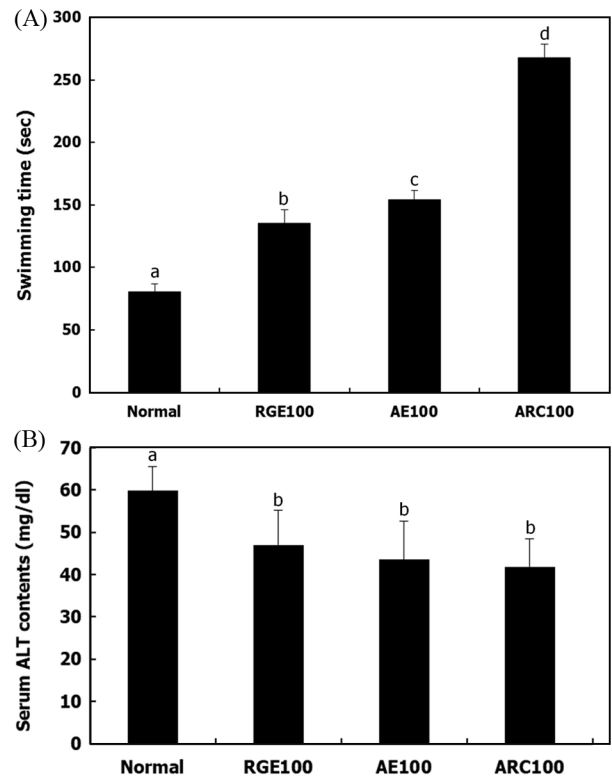


Fig. 2. Effects of ARC on swimming test and hepatotoxicity. AE, RGE, or ARC at the dose of 100 mg/kg/day was orally administrated to ICR mice for 3 weeks. (A) Swimming test was performed and swimming time was measured. (B) ALT from serum was measured. Results are expressed as mean±standard deviation ($n=8$). For each treatment, ^{a-d}values are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

영 종료 후, 독성 물질에 의해 손상된 간으로부터 혈액으로 누출되는 간독성 평가 지표 중 하나인 ALT의 함량을 측정하고, 대조군과 비교하여 모든 실험군에서 ALT 수치가 유의적으로 낮았으나 실험군 간에는 차이가 없었다(Fig. 2B). Park 등(31)의 연구에서 4주간 홍삼의 경구 투여에 따른 독성 및 부작용이 실험동물에서 관찰되지 않았다. 본 연구결과와 마찬가지로, Nagata 등(32)은 신선초를 실험동물에 4주간 경구투여함에 따라 ALT, 아스파르산 아미노기전달효소(aspartate aminotransferase), 알칼리성 인산가수분해효소(alkaline phosphatase)가 대조군과 비교하여 농도 의존적으로 감소하였음을 발표하였다. 따라서, 홍삼 추출물과 신선초 추출물, 신선초와 홍삼 복합물 모두 실험동물에 대해 독성이 없는 것으로 판단된다.

ARC의 항피로 효과

신선초와 홍삼 복합물이 운동으로 인한 피로에 미치는 효과를 알아보기 위하여 혈중 젖산 농도 및 산화방지 효소 활성을 측정하였다. 운동으로 인해 생성되는 젖산은 포도당 분해 과정인 해당과정(glycolysis)를 통해 생성되며 근육에는 손상을 주지 않으나, 운동으로 인해 과다 축적될 경우 해당과정을 방해하여 탈진에 이르게 한다(33). 수영하기 전에 비해 수영 직후 젖산 농도가 모든 군에서 증가하였으나, ARC100군에 젖산 발생량이 가장 낮았다(Fig. 3A). 수영 30분 후 모든 군에서 젖산 발생량이 감소하였으며, 특히 ARC100군에서의 젖산 함량은 운동 전과 거의 비슷한 수준으로 떨어졌다(Fig. 3A). 활성산소종으로 인한 산화스트

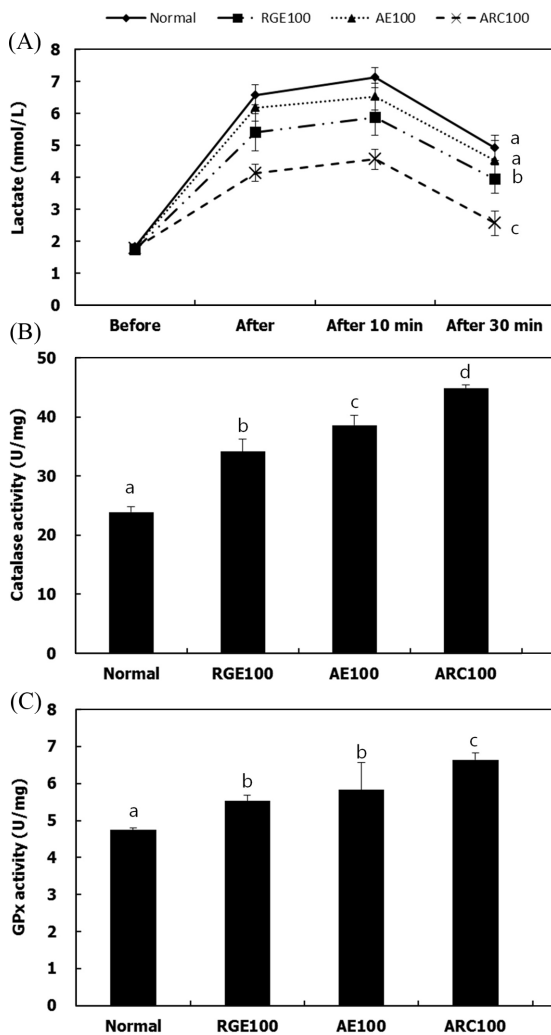


Fig. 3. Effect of ARC on fatigue. AE, RGE, or ARC at the dose of 100 mg/kg/day was orally administrated to ICR mice for 3 weeks. (A) Lactate concentration from blood was measured. (B) Catalase activity and (C) GPx activity were measured from muscle. Results are expressed as mean±standard deviation ($n=8$). For each treatment, ^{a-d} values are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

레스의 증가는 근육의 피로를 증가시키는 동시에 운동수행능력을 감소시킨다(34). 산화방지 효소인 카탈라아제와 GPx 활성을 평가한 결과, 대조군, AE100, RGE100군에 비해 ARC100군에서 유의적으로 증가한 것을 확인하였다(Fig. 3B, 3C). Kwon 등(21)은 신선초가 H_2O_2 로부터 세포를 보호했으며 이는 신선초 추출물의 산화방지 활성에 의한 것으로 규명하였다. Ramesh 등(17)의 연구에 따르면 홍삼은 카탈라아제, GPx, 초과산화물 제거효소(superoxide dismutase), 글루타싸이온 환원효소(glutathione reductase) 등의 산화방지 효소 활성 증가를 통해 산화적 스트레스를 감소시켰다. 특히, 인삼에서 추출한 다당류의 경우, 11-12주령된 수컷 ICR 쥐에 15일간 경구 투여 시 항피로 효과 있는 것으로 발표된 바 있다(35). 또한, 인삼은 운동으로 인한 근육 손상 및 염증을 억제 효과를 지니는 것으로 보고된 바 있다(16). 이러한 결과를 기반으로 본 연구의 신선초와 홍삼 복합물의 산화방지 효과는 홍삼과 신선초 각각의 산화방지 효과로부터 기인된 것으로 생각된다. 또한 홍삼과 신선초 단독처리와 비교하면 복합물에서

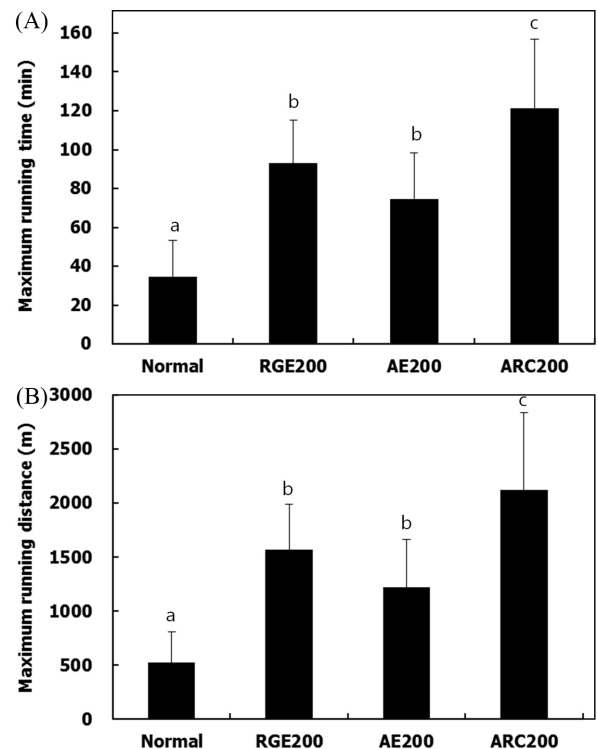


Fig. 4. Effect of ARC on exercise endurance. AE, RGE, or ARC at the dose of 200 mg/kg/day was orally administrated to C57BL/6J mice for 8 weeks. (A) Exercise time and (B) exercise distance were measured with treadmill test. Results are expressed as mean±standard deviation ($n=5$). For each treatment, ^{a-c} values are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

뛰어난 산화방지 효과와 젖산 감소효과를 나타냈으므로 복합물은 홍삼과 신선초 각각에 비해 뛰어난 항피로 효과를 제공한다. 따라서, 신선초와 홍삼 복합물의 운동시간의 증가는 낮은 젖산 발생량과 뛰어난 산화방지 효과로부터 기인된 것으로 해석된다.

ARC의 지구력 증진 효과

ARC의 지구력 증진 효과를 확인하기 위해 8주간의 경구 투여 후, treadmill을 이용하여 운동거리 및 운동시간을 측정했다. Lee 등(36)의 연구에 따르면, 임상시험에서 10% 진세노사이드가 함유된 100 mg/day UG0712 (10 mg/day 진세노사이드)의 복용이 대조군과 비교하여 운동수행능력에 유의한 효과가 없었다. Reagan-Shaw 등(37)이 제시한 방법에 근거하여, 피실험자에게 투여한 10 mg/day 진세노사이드는 2.06 mg/kg/day 진세노사이드를 쥐가 투여 받는 것으로 환산되며 이는 본 연구에서의 100 mg/kg의 홍삼 추출물에 함유되어 있는 2.299 mg/kg 진세노사이드와 농도적인 측면에서 큰 차이가 없다. 따라서, 임상시험을 위한 농도 설정으로 인해 100 mg/kg/day가 아닌 200 mg/kg/day로 시료를 실험동물에 경구 투여하여 지구력을 측정하였다. 측정 결과, 대조군에 비해 모든 실험군의 운동수행능력이 증가하였으며, 동일한 농도 조건에서 AE200군과 RGE200군에 비해 ARC200군에서 운동시간 및 운동거리가 유의적으로 증가하였다(Fig. 4A,B). 이러한 결과는 Kim 등(23)의 핑거루트 추출물, Kim 등(25)의 trans-10와 cis-12 conjugated linoleic acid, Jung 등(26)의 겨우살이 추출물, Jeong 등(38)의 chitooligosaccharide의 운동능력 향상 효과와 일치하였다. 또한, 운동시간 및 운동거리의 증가가 신선초와 홍삼을 단일 투

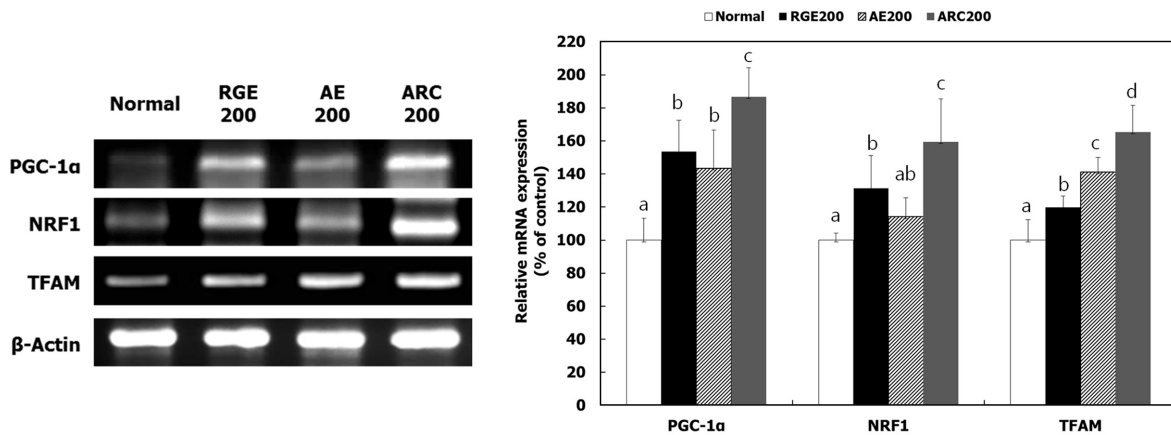


Fig. 5. Effect of ARC on the expression of mitochondrial biogenesis-related markers. AE, RGE, or ARC at the dose of 200 mg/kg/day was orally administrated to C57BL/6J mice for 8 weeks. Hindlimb muscles were used to measure the expression of mitochondrial biogenesis-related markers. The mRNA expression of PGC-1 α , NRF-1, and TFAM was evaluated by RT-PCR. β -Actin was used as a control. Results are expressed as mean \pm standard deviation ($n=5$). For each treatment, ^{a-d}values are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

여에 비해 신선초와 홍삼 복합물에서 훨씬 뛰어났다. 이러한 결과는 신선초와 홍삼 추출물의 복합이 상승 효과를 제공한다는 것을 의미한다. 이전에 보고된 임상시험에 따르면, 홍삼 또는 신선초의 투여에 따른 신체 내의 독성 및 특이한 부작용은 없었으며 (39,40), 따라서 신선초와 홍삼 복합물에 대한 독성 및 부작용은 없을 것으로 판단되나, 인체적용시험을 통한 운동수행능력에 대한 효능 및 안정성 검증 이 필요하다.

ARC의 생체 근육 세포 내 미토콘드리아 생합성 관련 유전자 조절 활성

ARC의 운동수행능력 증가 효과가 근육조직 내 미토콘드리아 생합성에 의한 영향인지를 평가하기 위해 적절한 뒷다리 근육에서 미토콘드리아 생합성 관련 유전자의 발현양을 RT-PCR을 통해서 확인하였다. ARC200군의 근육조직에서 앞선 세포실험과 마찬가지로 미토콘드리아 생합성 관련 유전자의 발현양이 유의적으로 증가하였다(Fig. 5). 이러한 결과는 생체내로 흡수된 신선초와 홍삼 복합물이 흡수 및 대사를 통해 근육조직 내의 PGC-1 α , NRF1, TFAM의 발현을 조절하여 미토콘드리아 생합성을 증가시키고, 일련의 세포신호전달을 통해 생산된 ATP로 인하여 운동수행능력이 증진되었음을 의미한다.

요 약

극심한 스트레스, 서구화된 식습관, 불규칙한 생활리듬 등에 의한 부족한 신체활동은 체력을 약화시키고 비만, 당뇨, 고혈압, 우울증, 근감소증 등을 야기한다. 본 연구에서는 ARC가 운동능력 증진에 미치는 효능을 세포 및 동물실험을 통해 검증하였다. ARC를 처리함에 따라 근육 세포 내에서 p-AMPK와 SIRT1 단백질, PGC-1 α , NRF1, TFAM mRNA 발현양과 미토콘드리아 양이 증가하였다. 세포실험에서 ARC는 RGE와 AE단독으로 처리에 비해 ATP 생성을 더 많이 하였으며, 동물실험에서도 RGE군과 AE군에 비해 ARC군에서 운동수행능력이 더 향상시켰다. 세포 실험과 마찬가지로 ARC는 동물의 근육 조직 내에서 미토콘드리아 생합성에 관련된 유전자의 발현을 증가시켰으며, 젖산 발생량 감소 및 산화스트레스 억제로 인해 운동으로 인한 피로를 쉽게 회복시켰다. 따라서, 신선초와 홍삼 복합물에 대한 인체수준에서 과

학적인 증거 및 안전성이 확보될 경우, 운동수행능력 향상을 위한 기능성 소재로서의 산업적인 활용이 확대될 것으로 기대된다.

References

- Booth FW, Roberts CK, Laye MJ. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. *Compr. Physiol.* 2: 1143-1211 (2012)
- Golbidi S, Mesdaghinia A, Laher I. Exercise in the metabolic syndrome. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012: 349710 (2012)
- Na C, Hong CY, Na D, Kim JB, Yoon SY, Lee S, Dong M. Hot-water extract of *Hovenia dulcis* peduncle improves exercise performance and anti-fatigue effects in mice. *Korean J. Pharmacogn.* 44: 83-90 (2013)
- Na C, Kim HK, Kim JB, Roh HJ, Um NN, Noh H, Na D, Dong M, Hong CY. The effects of *Hovenia dulcis* fruit hot water extracts on anti-fatigue and improvement of the exercise performance in SD rats. *J. Pharm. Soc. Korea* 57: 348-356 (2013)
- Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat. Rev. Endocrinol.* 8: 457-465 (2012)
- Egan B, Zierath JR. Exercise metabolisms and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab.* 17: 162-184 (2013)
- Scarpulla RC, Vega RB, Kelly DP. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* 23: 459-466 (2012)
- Safdar A, Little JP, Stokl AJ, Hettinga BP, Akhtar M, Tarnopolsky MA. Exercise increases mitochondrial PGC-1 α content and promotes nuclear-mitochondrial cross-talk to coordinate mitochondrial biogenesis. *J. Biol. Chem.* 286: 10605-10617 (2011)
- Bruce CR, Thrush AB, Mertz VA, Bezaire V, Chabowski A, Heigenhauser GJ, Dyck DJ. Endurance training in obese humans improves glucose tolerance and mitochondrial fatty acid oxidation and alters muscle lipid content. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291: E99-E107 (2006)
- Cantó C, Auwerx J. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr. Opin. Lipidol.* 20: 98-105 (2009)
- Kim B. The effects of endurance training on mitochondrial Tfam and PGC-1 α mRNA in GK rats. *Korean J. Sport Sci.* 17: 863-872 (2008)
- Kim SN, Ha YW, Shin H, Son SH, Wu SJ, Kim YS. Simultaneous quantification of 14 ginsenosides in *Panax ginseng* C.A. Meyer (Korean red ginseng) by HPLC-ELSD and its application to quality control. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45: 164-170 (2007)
- Byeon SE, Lee J, Kim JH, Yang WS, Kwak YS, Kim SY,

- Choung ES, Rhee MH, Cho JY. Molecular mechanism of macrophage activation by red ginseng acidic polysaccharide from Korean red ginseng. *Mediat. Inflamm.* 2012: 732860 (2012)
14. Kim JH, Hahm DH, Yang DC, Kim JH, Lee HJ, Shim I. Effect of crude saponin of Korean red ginseng on high-fat diet-induced obesity in the rat. *Journal of pharmacological sciences. J. Pharmacol. Sci.* 97: 124-131 (2005)
 15. Choi KT. Botanical characteristics, pharmacological effects and medicinal components of Korean *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Acta Pharmacol. Sin.* 29: 1109-1118 (2008)
 16. Cabral de Oliveira AC, Perez AC, Merino G, Prieto JG, Alvarez AI. Protective effects of *Panax ginseng* on muscle injury and inflammation after eccentric exercise. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 130: 369-377 (2001)
 17. Ramesh T, Kim SW, Hwang SY, Sohn SH, Yoo SK, Kim SK. *Panax ginseng* reduces oxidative stress and restores antioxidant capacity in aged rats. *Nutr. Res.* 32: 718-726 (2012)
 18. Kim TH, Son YK, Hwang KH, Kim M. Effects of *Angelica keiskei* Koidzumi and turmeric extract supplementation on serum lipid parameters in hypercholesterolemic diet or P-407-induced hyperlipidemic rat. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37: 708-713 (2008)
 19. Zhang T, Yamashita Y, Yasuda M, Yamamoto N, Ashida H. Ashitaba (*Angelica keiskei*) extract prevents adiposity in high-fat diet-fed C57BL/6 mice. *Food Funct.* 6: 135-145 (2015)
 20. Enoki T, Ohnogi H, Nagamine K, Kudo Y, Sugiyama K, Tanabe M, Kobayashi E, Sagawa H, Kato I. Antidiabetic activities of chalcones isolated from a Japanese herb, *Angelica keiskei*. *J. Agric. Food Chem.* 55: 6013-6017 (2007)
 21. Kwon D, Yoon S, Carter O, Bailey GS, Dashwood RH. Antioxidant and antigenotoxic activities of *Angelica keiskei*, *Oenanthe javanica* and *Brassica oleracea* in the Salmonella mutagenicity assay and in HCT116 human colon cancer cells. *Biofactors* 26: 231-244 (2006)
 22. Akihisa T, Tokuda H, Ukiya M, Iizuka M, Schneider S, Ogasawara K, Mukainaka T, Iwatsuki K, Suzuki T, Nishino H. Chalcones, coumarins, and flavanones from the exudate of *Angelica keiskei* and their chemopreventive effects. *Cancer Lett.* 201: 133-137 (2003)
 23. Kim T, Kim MB, Kim C, Jung HY, Hwang JK. Standardized *Boesenbergia pandurata* extract stimulates exercise endurance through increasing mitochondrial biogenesis. *J. Med. Food* 19: 692-700 (2016)
 24. Lee GS, Lee KM, Kim SH, Jeong NJ, Kim YJ, Jung JY, Kang TJ. Protective effects of SAPP, a novel herbal complex, in acute hepatotoxic mouse model. *Nat. Prod. Sci.* 19: 173-178 (2013)
 25. Kim JH, Kim J, Park Y. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid enhances endurance capacity by increasing fatty acid oxidation reducing glycogen utilization in mice. *Lipids* 47: 855-863 (2012)
 26. Jung HY, Lee AN, Song TJ, An HS, Kim YH, Kim KD, Kim IB, Kim KS, Han BS, Kim JB. Korean Mistletoe (*Viscum album coloratum*) extract improves endurance capacity in mice by stimulating mitochondrial activity. *J. Med. Food* 15: 621-628 (2012)
 27. Price NL, Gomes AP, Ling AJ, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ, Agarwal B, Ye L, Ramadori G, Teodoro JS, Hubbard BP, Varela AT, Davis JG, Varamini B, Hafner A, Moaddel R, Rolo AP, Coppari R, Palmeira CM, de Cabo R, Baur JA, Sinclair DA. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab.* 15: 675-690 (2012)
 28. Yuan HD, Huang B, Quan HY, Chung SH. Ginsenoside 20(R)-Rg3 stimulates glucose uptake in C2C12 myotubes via CaMKK-AMPK pathways. *Food Sci. Biotechnol.* 19: 1277-1282 (2010)
 29. Lee HM, Lee OH, Kim KJ, Lee BY. Ginsenoside Rg1 promotes glucose uptake through activated AMPK pathway in insulin-resistant muscle cells. *Phytother. Res.* 26: 1017-1022 (2012)
 30. Kawabata K, Sawada K, Ikeda K, Fukuda I, Kawasaki K, Yamamoto N, Ashida H. Prenylated chalcones 4-hydroxyderricin and xanthoangelol stimulate glucose uptake in skeletal muscle cells by inducing GLUT4 translocation. *Mol. Nutr. Food Res.* 55: 467-475 (2011)
 31. Park SJ, Lim KH, Noh JH, Jeong EJ, Kim YS, Han BS, Lee SH, Moon KS. Subacute oral toxicity study of Korean red ginseng extract in Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Res.* 29: 285-292 (2013)
 32. Nagata J, Morino T, Saito M. Effects of dietary *Angelica keiskei* on serum and liver lipid profiles, and body fat accumulations in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 53: 133-137 (2007)
 33. Lee IH, Kim MJ, Park SW, Park YE, Kim HM, Lew JH. Ergogenic effect of *Cervi Cornu* and CoenzymeQ10 complex. *J. Int. Korean Med.* 36: 297-307 (2015)
 34. Kim K, You Y. Stimulatory Effects of extracts of inner bark from *Tabebuia avellanedae* on exercise endurance capacity. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 43: 1937-s1941 (2014)
 35. Wang J, Li S, Fan Y, Chen Y, Liu D, Cheng H, Gao X, Zhou Y. Anti-fatigue activity of the water-soluble polysaccharides isolated from *Panax ginseng* C. A. Meyer. *J. Ethnopharmacol.* 130: 421-423 (2010)
 36. Lee ES, Yang YJ, LEE JH, Yoon YS. Effect of high-dose ginsenoside complex (UG0172) supplementation on physical performance of healthy adults during a 12-week supervised exercise program: A randomized placebo-controlled clinical trial. *J. Ginseng Res.* in press (2017)
 37. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 22: 659-661 (2008)
 38. Jeong HW, Cho SY, Kim S, Shin ES, Kim JM, Song MJ, Park PJ, Sohn JH, Park H, Seo DB, Kim WG, Lee SJ. Chitoooligosaccharide induces mitochondrial biogenesis and increases exercise endurance through the activation of Sirt1 and AMPK in rats. *PLoS One* 7: e40073 (2012)
 39. Park KS, Park KI, Kim JW, Yun YJ, Kim SH, Lee CH, Park JW, Lee JM. Efficacy and safety of Korean red ginseng for cold hypersensitivity in the hands and feet: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Ethnopharmacol.* 158: 25-32 (2014)
 40. Noh HM, Ahn EM, Yun JM, Cho BL, Paek YJ. *Angelica keiskei* Koidzumi extracts improve some markers of liver function in habitual alcohol drinkers: A randomized double-blind clinical trial. *J. Med. Food* 18: 166-172 (2015)