

홍삼 복합 추출물의 AMPK 활성화를 통한 고지혈증 개선

정하진 · 오승택 · 류천봉 · 최유라 · 이성미 · 전송희

전남대학교 의과대학 의파학과

Red Ginseng Alters Lipid Metabolism through AMPK Activation in Liver and Adipose Tissues of High-Fat Diet-Fed Mice

Ha Jin Jeong, Seung Tack Oh, Quan Feng Liu, Yura Choi, Seoungmi Lee, and Songhee Jeon

Department of Biomedical Sciences, Chonnam National University

ABSTRACT Hyperlipidemia is known as a glucose and lipid metabolism-related disorder that is increasing in incidence in modern society. Red ginseng (RG) is a natural herb candidate with a positive effect on regulation of cholesterol and lipids. To observe the effects of RG on regulation of lipids, cholesterol, glucose, and oxidative stress, we examined the *in vitro* and *in vivo* effects of Chamdahan RG on differentiated 3T3-L1 adipocytes and high-fat diet-fed mice. RG (50 µg/mL) significantly inhibited lipid synthesis in 3T3-L1 cells. In addition, a low concentration of RG (880 mg/kg/d) resulted in the lowest total blood cholesterol level. Moreover, high density lipoprotein-cholesterol quantity increased in RG-treated groups, consequently lowering the cardiovascular risk factor and atherosclerosis index. Moreover, RG increased activity of AMP-activated protein kinase, as a regulator of lipid and cholesterol synthesis, in adipose and liver tissues. Cumulatively, this paper suggests that RG has a positive effect on reducing the amounts of cholesterol and lipids and may be a good candidate for treating hyperlipidemia.

Key words: red ginseng, hyperlipidemia, AMPK, high density lipoprotein-cholesterol

서 론

현대인들의 운동 부족, 식습관, 음주, 비만 등으로 인한 잘못된 생활습관으로 인해 최근 대사성 질환을 가진 사람들이 급증하고 있으며, 특히 심혈관계 질환은 수십 년간 지속해서 증가하여 의학 및 영양학적 측면에서 큰 이슈가 되고 있다(1-3).

대사증후군은 동맥경화증, 심장병 및 고혈압과 같은 심혈관 질환의 발병률과 사망률을 증가시키며(1,3), 주요 요인 중 하나인 고지혈증은 저밀도 지단백(low density lipoprotein, LDL) 농도의 증가, 고밀도 지단백(high density lipoprotein, HDL)의 감소, 중성지방의 증가, 지질 분해의 감소, 리포단백질의 증가와 같은 지방의 생화학 대사과정에 이상이 생겼을 때 발생한다(4).

고지혈증의 경우 죽상동맥경화증 등을 포함하는 심혈관 질환의 위험 요인이며, LDL-콜레스테롤 레벨이 증가하고 고콜레스테롤혈증의 결과가 발생한다(5). 이러한 질병들을 치료하는 목적으로 약물을 장기 복용하게 되는데 이에 따른

여러 가지 부작용이 발생하고 있다. 따라서 천연물 개발이 많은 각광을 받고 있는 추세이다(6,7).

홍삼은 수삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)을 찌서 말릴 때 손실되는 수삼진액을 다중제어시스템을 사용함으로써 유효성분을 보존하여 건조 후에는 붉은색보다는 흑갈색 진액의 색을 띤다. 실험에 사용한 홍삼은 세포벽(cellulose)을 깨는 초미세분말기술을 사용하여 세포벽 안에 있던 유효성분의 흡수율을 높임으로써 유효성분의 함유량이 높다. 찌서 말리는 과정에서 생산되는 ginsenoside 중 Rg2는 혈중 콜레스테롤 수치 저하, 배설 촉진, 고콜레스테롤혈증으로 인하여 발생하는 동맥경화의 개선 효과가 보고된 바 있다(8). 이 뿐만 아니라 홍삼의 유효성분인 ginsenoside는 지방이나 콜레스테롤의 흡수, 이동속도를 촉진시키고, 혈청 콜레스테롤 증가를 억제한다는 연구 결과(9,10)와 LDL 수용체의 합성 억제를 완화시켜 콜레스테롤을 저하시킨다는 보고가 있다(11).

AMP-activated protein kinase(AMPK)는 에너지 고갈에 의해 활성화되어 주요한 에너지 조절인자로서 작용한다. AMPK는 과도한 탄수화물을 지방산으로 전환시키는 *de novo* lipogenesis를 조절하는 주요한 전사인자인 sterol regulatory element binding protein-1(SREBP-1) 단백질량을 감소시켜 지방산 합성을 감소시킨다. 따라서 AMPK는 대사증후군의 치료 표적으로 대두되었고, 실제로 AMPK 활

Received 26 May 2017; Accepted 28 July 2017

Corresponding author: Songhee Jeon, Department of Biomedical Sciences, Center for Creative Biomedical Scientists, Chonnam National University, Gwangju 61469, Korea
E-mail: jsong0304@jnu.ac.kr. Phone: +82-61-379-2862

성인자는 대사증후군과 제2형 당뇨병에 치료 효과를 보인다 (12,13).

이에 본 연구는 고지방 식이를 먹이는 마우스에 홍삼을 저, 중, 고농도로 3달간 투여하여 혈중, 간, 내장지방에서 지질, 콜레스테롤, 당 농도, 산화스트레스 정도 및 지질대사 관련 유전자 발현 등에 미치는 영향을 조사하여 홍삼의 고지혈증의 치료효능을 밝히고 그 작용기전을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 추출

실험에 사용한 홍삼 음료는 대동인삼(Busan, Korea)에서 공여 받았으며, 홍삼 음료 제품의 구성 원재료는 증금속 및 미생물 검사를 수행하여 품질의 안전성을 확보하였다. 시료의 주재료인 홍삼은 수삼을 최적화 온도(110~115°C)에서 일정한 시간(3~10시간)으로 증삼과 건조를 반복하여 제조하였으며, 제조 후 이를 $30\ \mu\text{m}$의 직경으로 초미세분말화한 분말을 첨가하여 사용하였다. 초미세 분말을 얻기 위하여 Jet Mill 공법을 사용한 시료를 제공받았다. 이후 이를 정제수에 분산시켜 고형분 6%인 홍삼분말액을 제조한 다음 홍삼분말액 77.67%(w/w), 홍삼농축액(홍삼 성분 함량 70 mg/g) 4.33%(w/w), 식물혼합농축액[숙지황 35.89%(w/w), 백복령 14.10%(w/w), 두충 13.19%(w/w), 구기자 12.28%(w/w), 대추 12.27%(w/w), 건생강 12.27%(w/w)] 10%(w/w), 자일리톨 8%(w/w)를 첨가하여 최종 시료를 제작하였다. 각 실험에 사용된 시료는 모두 동일한 원료 및 함량비로 제조하여 사용하였다. 최종 홍삼 시료는 동결건조 후 지방세포 분화실험과 동물실험에 사용하였다.

3T3-L1 지방세포 분화 분석

3T3-L1 지방세포를 6-well 기준 0.8×10^5 cells/well로 seeding 해준 후 48시간 동안 100% confluency로 키우고, 세포분열을 막기 위하여 다시 48시간 보관하였다. 그 후 지방세포 differentiation media(1 μM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 10 $\mu\text{g/mL}$ insulin and DMEM complete media)를 72시간 처리하고, 분화 배지를 제거한 후 지방세포 maturation media(DMEM complete media and 10 $\mu\text{g/mL}$ insulin)로 교체하였다. Maturation media는 2일에 한 번 갈아주며, 총 27일 동안 처리하였다. 최종 분화는 아래와 같이 Oil Red O 염색법을 통해 확인하였다. 6-well에 있는 미디어를 제거하고 PBS로 washing 하였으며, 10% formalin으로 5분간 상온에서 고정(fixation)시켰다. Formalin을 제거하고 새 formalin으로 교체하여 파라필름(parafilm) 및 호일로 덮어 1일 보관하였다. Formalin을 제거한 후 60% isopropanol로 washing 해주고 기건(air dry)시켰다. Oil Red O working solution을 넣고 10분간 상온에서 보관한 후, 증류수로 4번 washing 해준 뒤 사진을 촬영하고 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

실험동물

실험동물은 5주령 된 ICR종 수컷 마우스를 (주)코아텍 (Seoul, Korea)으로부터 구입하여 1주일간 일반사료로 적응시켰다. 그런 다음 실험군마다 평균 체중이 약 30 g이 되도록 각 군당 10마리씩 5개 군으로 나누어 5마리씩 분리 사육하였다. 실험동물 사육실의 온도는 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도는 $50 \pm 5\%$ 로 유지하였으며 명암은 12시간 주기로 조절하였다. 홍삼의 처리는 70 kg 성인이 하루에 홍삼 50 mL를 복용하는 것을 기준(0.714 mL/kg)으로 했으며 이를 마우스로 환산하면 8.806 mL/kg이다(14). 홍삼 50 mL를 동결건조하면 약 10.3 g(수득율 20.6%; 0.2 g/mL)을 얻고 이를 적용하면 1.76 g/kg이며 이것을 기준으로 홍삼 중농도 투여군(RG-M)으로 하였다. 본 동물실험에서 실험군의 분류는 고지방대조군(Sham)은 high-fat diet(HFD) 식이, 홍삼 저농도 투여군(RG-L)은 HFD 사료에 홍삼 880 mg/kg/d, 홍삼 중농도 투여군(RG-M)은 HFD 사료에 홍삼 1,760 mg/kg/d, 홍삼 고농도 투여군(RG-H)은 HFD 사료에 홍삼 3,520 mg/kg/d, 양성대조군(Pravastatin)은 HFD 사료에 pravastatin 40 mg/kg/d를 섞어 자유롭게 섭취하도록 군을 설정하였다. 본 동물실험은 동국대학교 동물실험윤리위원회 승인(IACUC-2016-026-1) 하에 진행되었다.

식이섭취량, 식이효율 및 체중 측정

식이섭취량과 체중은 일주일에 한 번 일정한 시간대에 측정하였으며, 실험기간의 체중증가량을 같은 기간의 총 식이섭취량으로 나누어 식이효율(%)을 산출하였다.

실험동물의 처리

13주간 실험사육 후 최종일에 12시간 절식시킨 다음 25 mg/kg 졸레틸로 마취시켜 심장 채혈하였으며, 채혈된 혈액은 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 시켜 혈청을 분리하여 -70°C 에 보관하고 분석 시에 사용하였다. 실험동물의 간, 지방 및 뇌는 채혈 후 즉시 분리시켰으며, 생리식염수로 혈액을 씻은 다음 흡수지로 물기를 제거한 후 중량을 측정하였고, -70°C 에 보관하면서 분석용 시료로 사용하였다.

경구당부하 검사 및 혈당반응면적

실험 12주째 실험동물을 12시간 절식시킨 후 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하고, ACCU-CHEK Active 혈당기(한국로슈진단, Mannheim, Germany)를 이용하여 공복혈당을 측정하였다. 50% glucose 용액(0.2 g glucose/100 g)을 경구투여 후 30분, 60분 및 120분에 정맥혈의 혈당을 측정하여 혈당 농도의 변화를 관찰하였다. 경구당부하 검사의 결과는 혈당반응면적(area under the curve, AUC)으로 나타내었다.

고밀도 지단백 콜레스테롤 측정

혈중 HDL-콜레스테롤 함량 측정은 면역화학검사시약법

(아산셋트 에취디엘 콜레스테롤 성분 정량검사시액, Asan Pharm. Co., Seoul, Korea)에 따라 혈청 20 μ L와 분리시액 20 μ L를 잘 혼합하여 10분간 실온에 방치 후, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 시켰다. 상층액 10 μ L를 따서 효소시액 300 μ L와 잘 혼합하여 5분간 방치한 후 60분 이내에 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

과산화지방질 측정

혈중 과산화지방질(malondialdehyde, MDA) 양을 분석하기 위하여 과산화지방질 비색분석법(BioVision Lipid Peroxidation Colorimetric Assay Kit, BioVision Inc., Mountain View, CA, USA)에 따라 혈청샘플 10 μ L를 42 mM 황산 500 μ L와 잘 혼합한 후 13,000 $\times g$ 에서 10분간 원심분리 하였다. 125 μ L phosphotungstic acid 용액을 넣고 vortex 한 후 5분간 상온에서 방치한 다음, 13,000 $\times g$ 에서 3분간 원심분리 하였다. 펠렛을 수집하여 얼음 위에서 100 μ L 증류수(2 μ L BHT 포함)와 재혼합하였다. 증류수로 최종 부피를 200 μ L에 맞춰주고 2 mM 표준액을 0, 2, 4, 6, 8, 10 μ L씩 넣은 후 증류수로 200 μ L 부피를 맞춘 다음, 600 μ L TBA 시약을 넣고 60분간 95°C에서 반응하였다. 얼음에서 10분간 방치하여 온도를 떨어뜨린 뒤에 샘플 흡광도를 532 nm에서 측정하였다.

중성지방 측정

혈중 중성지방(triglyceride, TG)의 측정은 효소법(아산셋트 중성지방 측정용시액, Asan Pharm. Co.)의 방법에 따라 혈청 20 μ L를 효소용액 3 mL와 잘 혼합하여 37°C에서 10분간 방치한 후 60분 이내에 550 nm에서 증류수를 대조로 흡광도를 측정하였다.

총 콜레스테롤 측정

혈청 중에 존재하는 총 콜레스테롤(total cholesterol, T-CHO)의 양은 면역화학검사시액(아산셋트 총 콜레스테롤 측정용 시액, Asan Pharm. Co.)을 이용한 효소방법에 따라 효소시액 300 μ L와 표준시액, 혈청을 각각 2 μ L 넣고 잘 혼합한 후 37°C에서 5분간 방치한 다음 시약블랭크를 대조로 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

RNA 분리

뇌 조직(hypothalamus)으로부터 RNA를 추출하기 위하여 조직을 추출 시약(Trizol) 300 μ L에 넣고 homogenizer로 균질화한 후 상온에 5분 동안 방치하였다. 이후 chloroform을 200 μ L 넣어 30초간 vortex 하였고, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리를 한 후 상층액을 새로운 튜브에 옮긴 다음 동일량의 phenol : chloroform : isoamyl alcohol(25:24:1) 용액 넣어 30초간 vortex 후에 5분간 12,000 rpm에서 5분간 원심분리를 시행하였다. 상층액을 모아 동량의 isopropanol을 넣어 vortex 후 상온에서 5분간 방치한 다음 12,000 rpm으로 20분간 원심분리 하여 RNA 침전물을 획득하였다. 획득한 침전물은 70% 에탄올 1 mL를 넣어 washing 하여 12,000 rpm으로 20분간 원심분리를 한 후 에탄올을 제거한다. Hood 안에서 pellet을 말려준 후 TE buffer 20 μ L를 넣어준 다음 60°C에서 5분간 끓여준 후 Qubit working solution(Q32852, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 이용하여 RNA 정량을 시행하였다.

실시간 역전사 중합효소 연쇄반응

RNA to cDNA EcoDry™ Premix(Oligo dT; Clontech, Mountain View, CA, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. cDNA를 합성한 후 비만에 관련된 인자인 neuropeptide Y(NPY), cocaine-and amphetamine-regulated transcript(CART), tumor necrosis factor(TNF- α)의 mRNA 발현 정도를 확인하였다. 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(real-time PCR quantification)은 Rotor-Gene SYBR-Green PCR Kit(Qiagen, Hilden, Germany)을 이용하여 증폭하였다. 실험에 사용된 primer의 염기서열과 PCR 조건은 Table 1과 같으며 유전자의 정량분석은 Rotor-Gene Q series Software(Qiagen)를 이용하였다.

간의 과산화지방질 분석

간 조직에서 과산화지방질 양을 분석하기 위하여 과산화지방질 비색분석법(BioVision Lipid Peroxidation Colorimetric Assay Kit, BioVision Inc.)을 실시하였다. 얼음 위에서 간 조직 샘플 10 mg을 분쇄하여 MDA lysis buffer 300 μ L(3 μ L 100X BHT 포함)를 넣고 13,000 $\times g$ 에서 10분

Table 1. PCR primers and condition for real-time PCR

Gene	Forward and reverse primer sequence	Nucleotide sequences	Length of PCR products (bp)	Annealing (°C)
TNF- α	F R	ATGAGCACAGAAAGCATGATCCGC CCAAAGTAGACCTGCCCGGACTC	644	58
NPY	F R	TACTCCGCTCTGCGACACTACA AATCAGTGTCTCAGGGCTGGAT	78	58
Cart	F R	CTGCAATCTTTCCTCTTGAAGTG GGGAATATGGGAACCGAAGGT	68	58
Actin	F R	CAAGAGAGGCCACGGCTGC TCCTTCTGCATCCTGTCCGC	275	60

간 원심분리 하였고, 샘플 상층액 200 μ L를 획득하였다. 2 mM 표준액을 0, 2, 4, 6, 8, 10 μ L씩 넣은 후 증류수로 200 μ L 부피를 맞춘 다음 샘플과 표준액에 600 μ L TBA 시약을 넣고 60분간 95°C에서 incubate 하였다. 얼음에서 10분간 보관하여 온도를 떨어뜨린 뒤에 샘플 흡광도를 532 nm에서 측정하였다.

간의 글루타티온 과산화효소 분석

간 조직에서 글루타티온 과산화효소(glutathione peroxidase) 양을 분석하기 위하여 글루타티온 과산화효소 비색분석법(BioVision Glutathione Peroxidase Activity Colorimetric Assay Kit, BioVision Inc.)을 실시하였다. 0.1 g의 간 조직을 균질화시킨 후 조직 샘플을 0.2 mL의 차가운 assay buffer에 넣고 10,000 \times g에서 15분간 4°C에서 원심분리 하고 상층액을 얼음에 보관하였다. 2~50 μ L의 샘플을 96-well plate에 넣고, assay buffer로 부피를 50 μ L로 맞추었다. 40 mM NADPH 용액 25 μ L를 975 μ L 증류수에 희석하여 1 mM NADPH 용액을 만들어 0, 20, 40, 60, 80, 100 nmol/well 표준용액을 만들었다. 마지막으로 assay buffer로 샘플 및 표준액 총 부피를 각 100 μ L로 맞추고 후 340 nm에서 흡광도를 측정하였다.

간, 지방조직의 단백질 분석

조직 샘플을 액화질소에서 분쇄 후 microcentrifuge tube에 옮긴 뒤에 50 mM Tris-base(pH 7.5), 10 mM Na-pyrophosphate, 1% NP-40, protease inhibitor가 포함된 lysis buffer를 넣었다. 정량 후 30 μ g 조직샘플을 SDS-gel을 사용하여 전기영동시키고 nitrocellulose membrane으로 transfer 시킨 후, 1차 항체 anti-phosphor-AMPK, anti-AMPK, anti- β -actin, anti-CCAAT/enhancer binding protein(C/EBP) α (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), SREBP1(Abcam, Cambridge, UK), peroxisome proliferator-activated receptor gamma(PPAR γ ; Millipore, Billerica, MA, USA)를 16시간 동안 반응시켰다. 1 \times TBST buffer에서 washing을 3번 한 뒤 anti-rabbit 및 anti-mouse 2차 항체를 2시간 불인 후 1 \times TBST buffer에서 4번 washing 하였다. 항체 발현도는 Imager ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 획득하였으며, Image Lab TM software version 2.0.1(Bio-Rad)을 통하여 분석하였다.

통계 분석

모든 분석 자료는 결과는 SPSS 23(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였으며, 통계적 유의성 검정은 $P < 0.05$ 수준일 때를 기준으로 하고 평균 \pm 표준오차(mean \pm SE)로 나타내었다. 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 한 후, 각 시료 간의 통계적 유의성은 Tukey's multiple comparison test 또는 Dunnett's test를 이용하여 사후검증을

하였다.

결과 및 고찰

홍삼 추출물의 3T3-L1 지방세포 독성 측정

홍삼 추출물의 세포 독성을 측정하기 위해 3T3-L1 세포를 96-well plate에 2 \times 10⁴ cells/well로 배양한 후 홍삼 추출물을 10, 20, 50, 100, 200, 250, 500 μ g/mL의 농도로 처리하였다. 24시간 후에 MTT 용액을 이용하여 세포독성을 측정한 결과 홍삼 추출물에 의한 세포독성은 나타나지 않았다(Fig. 1).

홍삼 추출물의 지방분화 억제 효능 평가

지방세포 분화에 미치는 영향을 관찰하기 위해 20, 50, 100 μ g/mL의 농도로 지방세포 분화 시에 처리한 후 Oil Red O 염색법을 통하여 세포 내 지방 함량을 분석한 결과 대조군 대비 홍삼을 처리한 모든 군에서 유의하게 지방 함량이 저해되었는데 저농도(20 μ g/mL, 84.25 \pm 7.1%) 및 고농도(100 μ g/mL, 85.01 \pm 6.0%) 처리군에 비해 홍삼 중농도(50 μ g/mL, 58.25 \pm 7.5%) 처리군이 양성대조군인 pravastatin(30.5 \pm 8.5%)과 유사하게 감소하였다(Fig. 2). 이는 지방세포에서 50 μ g/mL까지는 농도 의존적으로 홍삼이 지방세포 분화를 억제하나 그 이상의 농도에서는 오히려 그 효과가 감소하는 것을 보여주고 있다.

식이섭취량, 식이효율 및 체중

ICR 5주령 마우스에 고지방식이와 첨가 수준을 달리한 홍삼 식이를 13주간 급여한 각 군의 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율은 Table 2와 같다. 체중증가량은 고지방대조군에 비해 홍삼 중농도 섭취군, 고농도 섭취군 그리고 양성대조군은 약간 증가하는 경향을 보였고, 홍삼 저농도 섭취군만이 감소하였으나 유의성은 없었다. 식이섭취량은 모든 군이 유사한 경향을 보였다. 식이효율은 고지방대조군에 비

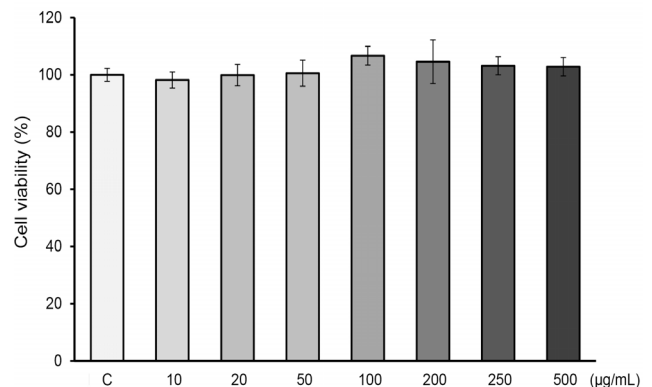


Fig. 1. Cell viability of red ginseng (RG) extract on 3T3-L1 cells. Cells were treated with various concentrations of RG (10, 20, 50, 100, 200, 250 or 500 μ g/mL) for 24 h. Cell viability was determined by the MTT assay. Values are mean \pm SE (n=6).

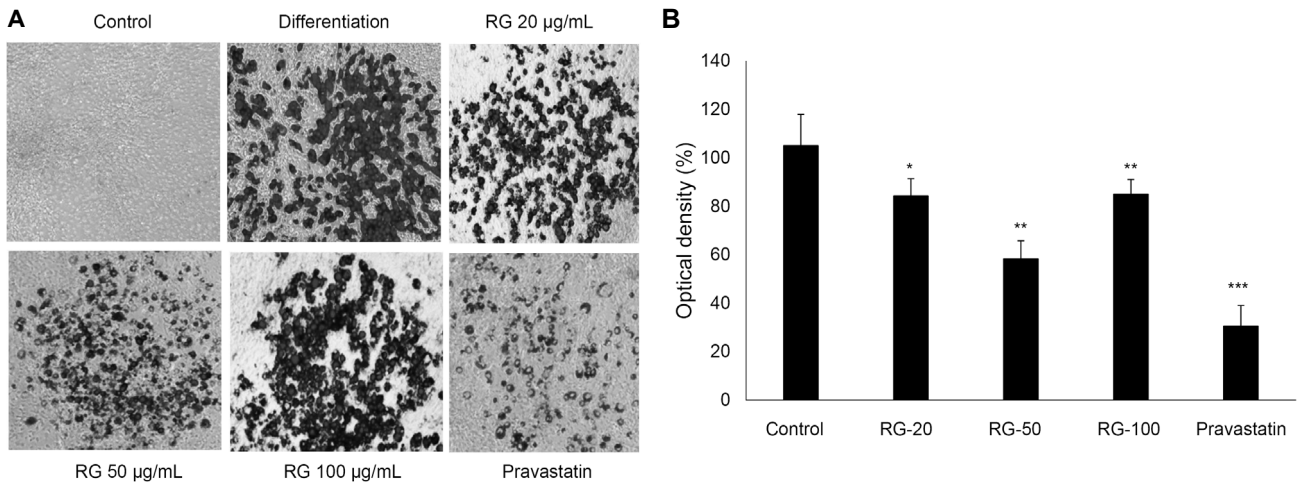


Fig. 2. Oil Red O staining in 3T3-L1 adipocytes. Cells were treated with different concentrations RG (20 µg/mL, 50 µg/mL, and 100 µg/mL) or pravastatin (10 µg/mL) for 27 days. (A) Oil Red O stained cells were captured. (B) The optical density of stained lipid was measured. Values are mean±SE (n=6). **P*<0.05 vs Control, ***P*<0.01 vs Control, ****P*<0.001 vs Control.

Table 2. Effects of red ginseng (RG) on body weight, food intake, and food efficiency ratio in ICR mice fed a HFD for 13 weeks

Groups	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Body weight gain (g)	Body weight gain (g/d)	Food intake (g/d)	Food efficiency ratio
Sham	30.88±0.81	54.02±2.86	23.14±2.47	0.21±0.02	6.29±0.10	4.06±0.47
RG-L	30.44±0.37	52.34±2.80	21.90±2.62	0.24±0.03	6.96±0.22	3.44±0.35
RG-M	30.74±0.59	56.10±3.11	25.36±2.56	0.33±0.02	6.20±0.12	4.50±0.46
RG-H	30.48±0.39	56.22±1.49	25.74±3.44	0.25±0.03	7.20±0.29	3.98±0.38
Pravastatin	30.30±0.75	54.30±2.66	24.00±0.53	0.29±0.01	6.43±0.18	4.10±0.05

Sham: high fat diet group, RG-L: red ginseng (880 mg/kg/d) contained HFD group, RG-M: red ginseng (1,760 mg/kg/d) contained HFD group, RG-H: red ginseng (3,520 mg/kg/d) contained HFD group, Pravastatin: Pravastatin (40 mg/kg/d) contained HFD group. Values are mean±SE (n=6).

해 큰 차이를 보이지 않았고, 홍삼 저농도 섭취군은 유의적인 차이는 없었으나 고지방대조군에 비해 약 15% 감소하였다.

혈액 성분 분석

고지방식이와 첨가 수준을 다르게 한 홍삼 식이를 급여한 각 군의 중성지방, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 심혈관 위험지수(cardiac risk factor, CRF) 및 동맥경화지수(atherogenic index, AI)는 Table 3과 같다. 혈청 중 중성지방 함량은 고지방대조군에 비해 모든 실험군이 증가하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 혈청 중 총 콜레스

테롤의 양은 고지방대조군에 비해 다른 모든 실험군에서 감소하는 경향을 보였고, 특히 홍삼 저농도 섭취군에서 많은 감소를 나타내어 유의성 있는 차이를 보였다(*P*<0.01). 또한, 혈청 중 HDL-콜레스테롤은 고지방대조군에 비해 홍삼 저농도 섭취군, 중농도 섭취군 및 양성대조군에서 유의적으로 증가하는 경향을 보였다. 이에 따른 심혈관위험지수와 동맥경화지수 역시 고지방대조군에 비해 다른 모든 군에서 유의적으로 감소하는 경향을 보였으며, 특히 홍삼 저농도 섭취군이 가장 크게 감소하는 결과를 보였다(*P*<0.001). 이는 홍삼이 고지방식으로 증가된 총 콜레스테롤을 낮춰주고,

Table 3. Effects of red ginseng (RG) on body weight, food intake, and food efficiency ratio in ICR mice fed a HFD for 13 weeks

Groups	Triglyceride (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	HDL-cholesterol (mg/dL)	CRF (cardiac risk factor)	AI (atherogenic index)
Sham	110.20±9.66	88.00±2.83	17.38±1.86	5.23±0.43	4.23±0.43
RG-L	154.40±12.01	64.48±3.25**	37.66±3.64**	1.75±0.10***	0.75±0.10***
RG-M	134.94±10.52	77.58±2.58	45.66±5.50**	1.77±0.15***	0.77±0.15***
RG-H	136.90±13.12	71.70±3.29	30.44±3.89	2.45±0.19***	1.45±0.42***
Pravastatin	132.83±12.26	77.46±6.47	40.34±3.17**	1.93±0.10***	0.93±0.10***

Groups are the same as Table 2.

Values are mean±SE (n=6).

P*<0.01 vs Sham, *P*<0.001 vs Sham.

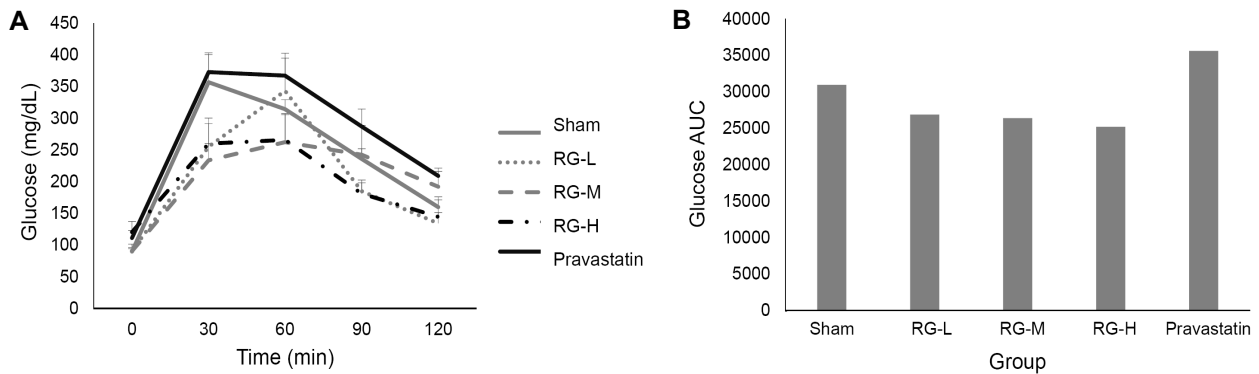


Fig. 3. Oral glucose tolerance test (OGTT) in ICR mice fed a HFD with RG for 13 weeks. (A) Blood samples were taken at 0, 30, 60, 90, and 120 min. All values are expressed as mean±SE (n=10); (B) Area under the curve of glucose.

특히 HDL-콜레스테롤을 증가시킴으로써 심혈관위험지수 및 동맥경화지수를 낮춰주어 혈중 지질 개선 효과와 심혈관계 질환의 개선에 도움을 주는 것으로 여겨진다.

경구당부하 검사, 혈당반응 면적

전혈의 공복 혈당 수준은 고지방대조군에 비해 홍삼 고농도 섭취군과 양성대조군에서 높게 나왔으나 유의적이지 않았다. 포도당 투여 후 혈당의 변화는 고지방대조군과 양성대조군에서는 포도당 투여 30분 후에 가장 높은 혈당 수준을 보인 후 감소하였으나, 홍삼을 섭취한 군은 포도당 투여 60분 후에 가장 높은 혈당 수준을 보인 후 감소하였고, 시간대별 유의적인 차이는 보이지 않았다(Fig. 3A). 또한, 혈당반응 면적 역시 고지방대조군에 비해 유의한 차이는 보이지 않았지만, 홍삼을 섭취한 군이 14~18% 정도 낮은 경향을 보였다(Fig. 3B).

뇌 시상하부에서 NPY 발현 변화

뇌의 시상하부를 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 통하여 식이조절과 에너지 섭취 관련인자인 NPY, 식욕에 관련되었다고 알려진 Cart와 면역반응에 관련된 인자인 TNF-α를 확인하였다(15,16). 그 결과 고지방대조군에 비해 홍삼

중농도, 고농도 섭취군 및 양성대조군에서 NPY의 mRNA 발현량이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 4). 이 결과는 각 군의 체중증가량 및 식이효율과 유사한 경향을 보이며, 홍삼 추출물이 NPY를 통하여 식이조절에 연관되어 있음을 시사한다.

간 조직 단백질 분석

AMPK는 대사성 스트레스나 운동으로 세포 내의 에너지가 감소하는 경우 에너지를 소비하는 과정인 지방산 합성과 콜레스테롤 합성을 억제하고 에너지를 생산하는 지방산 산화를 촉진한다(17). 또한, AMPK는 지방합성 및 콜레스테롤 합성에 필요한 효소인 acetyl-CoA carboxylase(ACC)를 인산화 및 불활성화시킴으로써 malonyl-CoA 양을 감소시키고 carnitine palmitoyltransferase-1α를 활성화하는 것으로 보고되었으며, ACC의 억제에 의한 acetyl-CoA 및 malonyl-CoA 생산의 감소가 지방산화를 촉진하고 지방 및 콜레스테롤 합성을 저하시키는 것으로 알려져 있다(18,19). 간 조직에서 지방 대사 관련 단백질인 AMPK 발현을 측정할 결과, 고지방대조군에 비해 홍삼 저농도 섭취군에서 AMPK 발현이 현저하게 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 5, P<0.01). 이처럼 홍삼 저농도 섭취군에서의 AMPK 발현 증가는 지방산화 증가와 지방 및 콜레스테롤 합성 감소 현상을 시사한다.

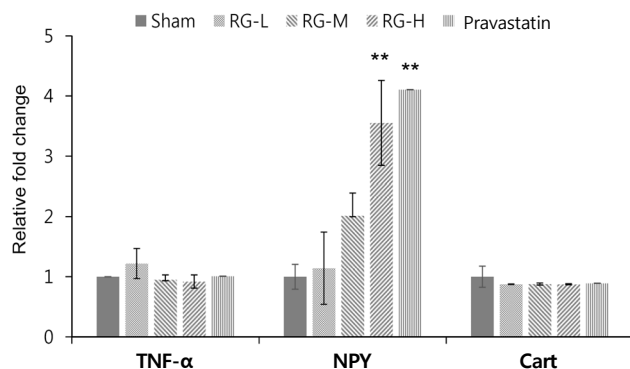


Fig. 4. Effect of RG on mRNA levels of TNF-α, NPY, Cart gene in RG dieted hypothalamus. Real-time PCR was analyzed in the cDNA. Values are expressed as mean±SE (n=4). **P<0.01 vs Sham.

간 조직에서의 과산화지방질 분석

MDA는 막 지질 단백질이나 불포화지방산이 자유라디칼 (free radicals)로 인하여 산화적 스트레스를 받게 될 때 발생하는 산화물질인데, 특히 고지방식이 섭취 동물 모델에서 많이 발견된다고 하는 발표가 있다(20). 간 조직에서 자동산화 및 활성산소 등에 의해 과산화 반응을 일으킨 과산화지질을 측정하였는데, 고지방대조군, 홍삼 섭취군 및 양성대조군에서 모두 과산화지질의 양은 변화가 없음을 확인하였으며 (Fig. 6), 이는 홍삼 및 양성대조군 모두 과산화지질 조절기능과는 관련이 없음을 알려준다.

간의 글루타티온 과산화효소 분석

글루타티온 과산화효소는 산화스트레스로부터 유기체를

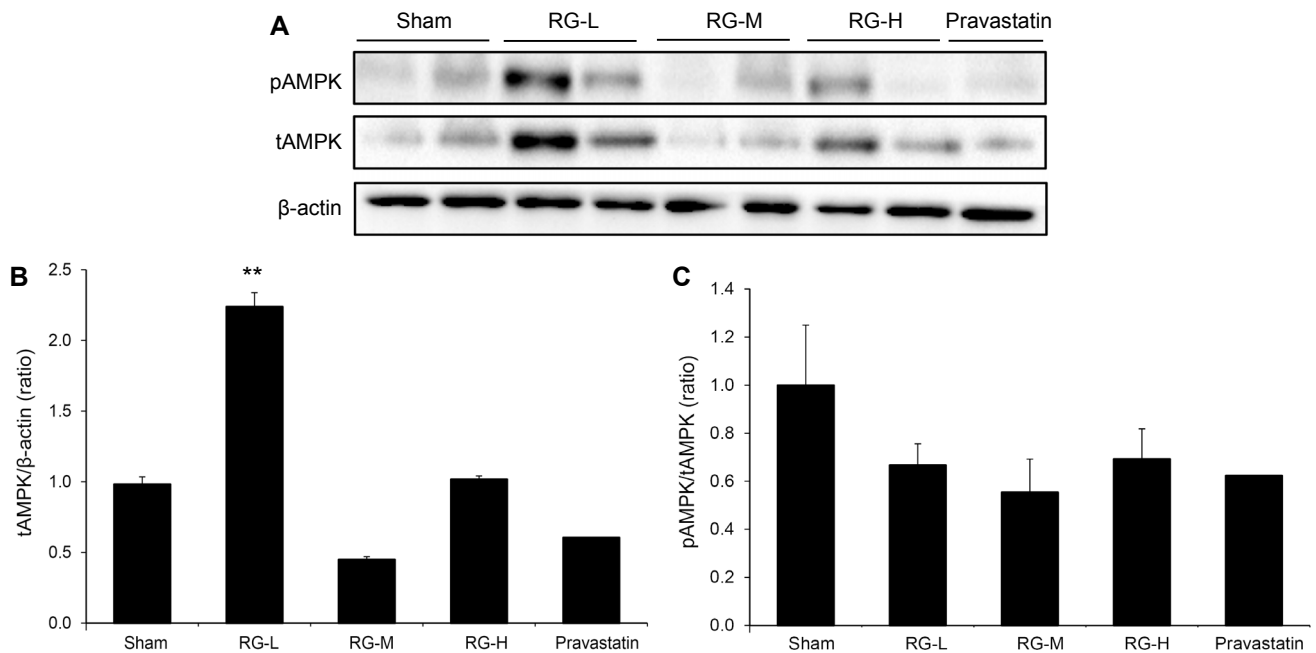


Fig. 5. Expression and phosphorylation levels of AMPK. (A) Liver tissue lysates were electrophoresed and immunoblotted with each antibody. (B) Total AMPK levels were normalized to β -actin. (C) Phospho-AMPK levels were normalized to total AMPK. All values are expressed as mean \pm SE (n=6). ** P <0.01 vs Sham.

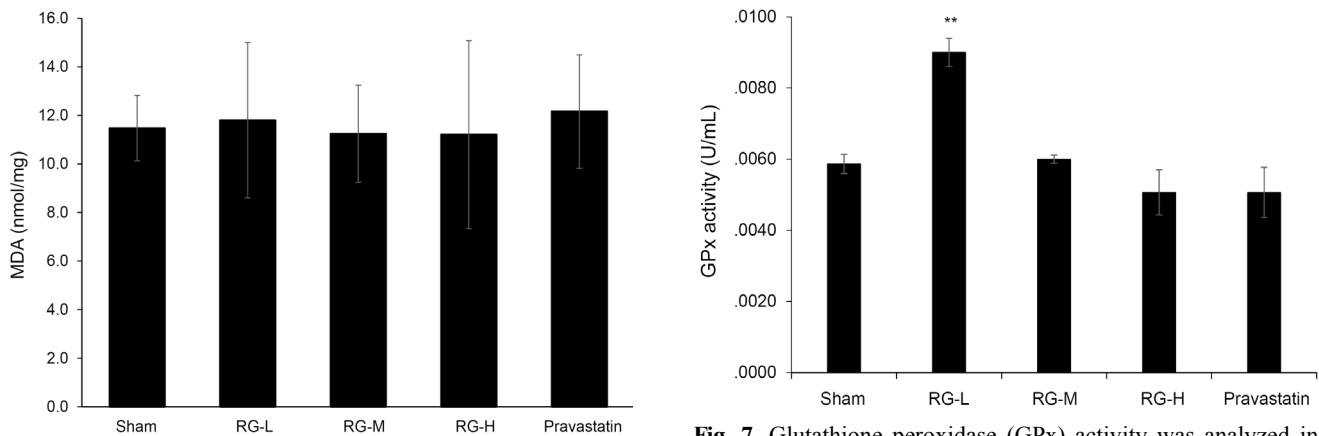


Fig. 6. Lipid peroxidation (MDA) analysis. The end-products of lipid peroxidation (malondialdehyde) were assessed using 96-well ELISA microplate. The intensity of color change was quantified using spectrophotometer. All values are expressed as mean \pm SE (n=6).

Fig. 7. Glutathione peroxidase (GPx) activity was analyzed in the liver tissue. Glutathione dependent peroxidases were assessed using 96-well ELISA microplate. The intensity of color change was quantified using spectrophotometer. All values are expressed as mean \pm SE (n=6). Significant difference was determined using t -test. ** P <0.01 vs Sham.

보호하는 기능을 하며, 글루타티온 과산화효소의 감소는 자유라디칼로 인한 질병을 발생시킬 수 있다. 간 조직에서 글루타티온 과산화효소 활성도를 분석하기 위하여 글루타티온 과산화효소 비색분석법을 실시하였는데, 그 결과 고지방대조군에 비해 홍삼 중농도, 고농도 섭취군 및 양성대조군에서는 유의하게 변하지 않았으나, 홍삼 저농도 섭취군에서 현저히 증가하였음을 확인하였다(Fig. 7). 따라서 홍삼 저농도 섭취군에서 글루타티온 과산화효소의 증가는 홍삼이 산화스트레스로부터 보호하는 긍정적인 기능을 가지고 있음을 시사하고 있다.

지방조직 단백질 분석

지방조직의 지방세포 분화를 촉진하는 스테로이드계 superfamily 전자인자로 PPAR γ (21)의 발현을 면역블롯으로 확인한 결과 고지방대조군에 비해 홍삼 섭취군 및 양성대조군에서 모두 유의하게 감소하였다(P <0.001). SREBP-1은 adipocyte determination과 differentiation-dependent factor로 알려져 있다. 콜레스테롤 대사 and adipocyte 유전자의 전사조절에 중요한 역할을 하며, 높은 콜레스테롤 상태 일 때는 membrane에 결합되어 있고 비활성화 상태이지만, 콜레스테롤 레벨이 낮을 때는 단백질 가수분해로 인해 절단

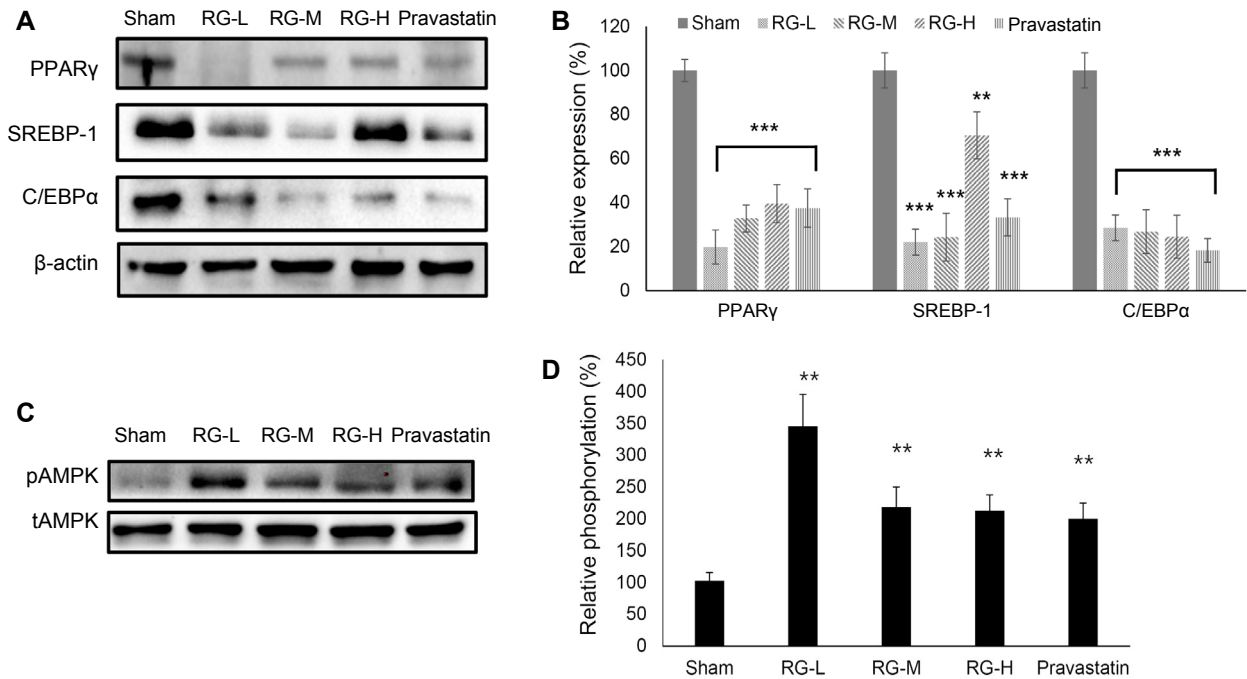


Fig. 8. Anti-adipogenic effect of GR in the HFD-administrated adipose tissue. (A) Adipose tissue lysates were immunoblotted with the indicated antibodies. (B) The intensity of the each band was normalized to β -actin and presented in bar graphs. (C) Adipose tissue lysates were immunoblotted with the phosphorylated or total AMPK antibody. (D) The intensity of the phosphorylated band was normalized to total band and presented in bar graphs. Values are mean \pm SE (n=6). ** P <0.01 vs Sham, *** P <0.001 vs Sham.

되고 활성 전사요인으로 유리된다(22). 홍삼을 투여한 군 모두에서 SREBP-1의 발현이 저해되었는데 그중에서 홍삼 저농도 섭취군에서 가장 발현이 억제되었다(Fig. 8). 그리고 에너지 대사를 포함한 대부분의 adipocyte의 전사에 중요한 역할을 하는 인자인 C/EBP는 지방세포 분화 전에는 C/EBP α , β , δ 모두 낮게 발현하다가 분화 중에 C/EBP β , δ 가 증가하고, 그 후 C/EBP α 의 레벨이 증가한 뒤 성숙한 지방세포가 되면 모두 높은 수준으로 유지된다(23). Fig. 8에서 보는 바와 같이 홍삼을 투여한 모든 실험군에서 C/EBP α 의 레벨이 감소하였다(P <0.001). 이러한 결과는 홍삼이 지방세포 분화에 관여하는 전사인자의 발현을 저해하여 지방세포 분화 및 콜레스테롤 생성을 억제하는 것으로 생각된다. 또한, 에너지 대사에 관여하는 AMPK의 인산화가 저농도의 홍삼을 처리한 군에서 현저하게 증가하였다(Fig. 8C, 8D). 이러한 결과는 홍삼 투여로 인해 지방세포에서도 AMPK의 활성을 통해 지방세포 분화가 억제됨을 시사하며, 진세노이드 Rg3를 3T3-L1 세포에 처리하였을 때 지방세포 분화가 억제되고, 이때 PPAR γ 의 억제도 수반된다는 보고가 있어 이를 뒷받침한다(24).

요 약

당 및 지질 대사 조절의 이상으로 인한 대사성 질환 중의 하나인 고지혈증은 현대사회에서 급격하게 증가하고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 부작용이 적은 천연물을 사

용하는 사례들이 급증하고 있는데, 특히 이 연구에서는 초미세 분말을 첨가한 홍삼을 이용하여 지방세포 및 쥐 혈액, 간, 그리고 지방조직에서 지질, 콜레스테롤, 당, 과산화 수치를 확인함으로써 홍삼의 효능을 관찰하였다. 세포 실험 결과, 특정한 홍삼 농도(50 μ g/mL)에서 지질 형성을 미세하게 억제하고 있음을 알 수 있으며, 동물 실험에서도 마찬가지로 저농도의 홍삼을 처리하였을 때 혈중 총 콜레스테롤 수치가 가장 감소하였고 HDL-콜레스테롤 수치 또한 증가하는 것으로 밝혀졌으며, 이는 심혈관위험지수 및 동맥경화지수를 낮춰준다. 그뿐만 아니라 저농도 홍삼 식이법 시행군에서 지질대사 관련 단백질인 AMPK의 발현량이 증가하였는데, 이는 특정 농도의 홍삼이 AMPK 활성화를 높임으로써 지방 및 콜레스테롤 합성 억제를 돕는 것으로 판단된다. 따라서 본 연구는 홍삼이 대사성 질환인 고지혈증 치료 및 예방에 도움을 주는 천연물 후보임을 시사하는 바이다.

감사의 글

본 연구는 참다한 홍삼의 연구비 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Lim S, Shin H, Song JH, Kwak SH, Kang SM, Yoon JW, Choi SH, Cho SI, Park KS, Lee HK, Jang HC, Koh KK. 2011. Increasing prevalence of metabolic syndrome in Ko-

- rea: the Korean National Health and Nutrition Examination Survey for 1998-2007. *Diabetes Care* 34: 1323-1328.
2. MHWK. 2003. *Yearbook of health and welfare statistics*. Report of the Ministry of Health and Welfare, Seoul, Korea. p 35.
 3. Shin MK, Han SH. 2002. Effects of methanol extracts from bamboo (*Pseudosasa japonica Makino*) leaves extracts on lipid metabolism in rats fed high fat and high cholesterol diet. *Korean J Dietary Culture* 17: 30-36.
 4. Moon SJ. 1996. Nutritional problems of Korean. *Korean J Nutr* 29: 371-380.
 5. Xia W, Sun C, Zhao Y, Wu L. 2011. Hypolipidemic and antioxidant activities of Sanchi (*Radix Notoginseng*) in rats fed with a high fat diet. *Phytomedicine* 18: 516-520.
 6. McKenney JM. 2001. Lipid management: tools for getting to the goal. *Am J Manag Care* 7: S299-S306.
 7. Miettinen TA. 2001. Cholesterol absorption inhibition: a strategy for cholesterol-lowering therapy. *Int J Clin Pract* 55: 710-716.
 8. Yokozawa T, Kobayashi T, Oura H, Kawashima Y. 1985. Studies on the mechanism of the hypoglycemic activity of ginsenoside-Rb2 in streptozotocin-diabetic rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 33: 869-872.
 9. Joo CN, Koo JH, Baik TH. 1980. Biochemical study of some pharmacological effects of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Korean Biochem J* 13: 63-80.
 10. Yoon SH, Joo CN. 1993. Study on the preventive effect of ginsenosides against hypercholesterolemia and its mechanism. *Korean J Ginseng Sci* 17: 1-12.
 11. Kang BH, Koo JH, Joo CN. 1986. Effect of saponin fraction of *Panax ginseng* C.A. Meyer on blood serum lipoprotein distribution of cholesterol fed rabbits. *Korean J Ginseng Sci* 10: 114-121.
 12. Lee MS, Kim KJ, Kim D, Lee KE, Hwang JK. 2011. meso-Dihydroguaiaretic acid inhibits hepatic lipid accumulation by activating AMP-activated protein kinase in human HepG2 cells. *Biol Pharm Bull* 34: 1628-1630.
 13. Pu P, Gao DM, Mohamed S, Chen J, Zhang J, Zhou XY, Zhou NJ, Xie J, Jiang H. 2012. Naringin ameliorates metabolic syndrome by activating AMP-activated protein kinase in mice fed a high-fat diet. *Arch Biochem Biophys* 518: 61-70.
 14. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 22: 659-661.
 15. Hagan MM, Rushing PA, Benoit SC, Woods SC, Seeley RJ. 2001. Opioid receptor involvement in the effect of AgRP-(83-132) on food intake and food selection. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280: R814-R821.
 16. Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S, Leibowitz SF. 1986. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* 7: 1189-1192.
 17. Kang BH, Koo JH, Joo CN. 1986. Effect of saponin fraction of *Panax ginseng* C.A. Meyer on blood serum lipoprotein distribution of cholesterol fed rabbits. *Korean J Ginseng Sci* 10: 114-121.
 18. Yang RL, Shi YH, Hao G, Li W, Le GW. 2008. Increasing oxidative stress with progressive hyperlipidemia in human: Relation between malondialdehyde and atherogenic index. *J Clin Biochem Nutr* 43: 154-158.
 19. Yang R, Le G, Li A, Zheng J, Shi Y. 2006. Effect of antioxidant capacity on blood lipid metabolism and lipoprotein lipase activity of rats fed a high-fat diet. *Nutrition* 22: 1185-1191.
 20. Armstrong D, Browne R. 1994. The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Adv Exp Med Biol* 366: 43-58.
 21. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79: 1147-1156.
 22. Wang X, Sato R, Brown MS, Hua X, Goldstein JL. 1994. SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell* 77: 53-62.
 23. Lin FT, Lane MD. 1994. CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 8757-8761.
 24. Hwang JT, Lee MS, Kim HJ, Sung MJ, Kim HY, Kim MS, Kwon DY. 2009. Antiobesity effect of ginsenoside Rg3 involves the AMPK and PPAR- γ signal pathways. *Phytother Res* 23: 262-266.