

두충 열수추출물 급여에 의한 갱년기 유도 모델 흰쥐의 지질, 당질 및 항산화 대사 개선에 미치는 영향

이상철 · 정수임¹ · 강미영^{1,*}

경북대학교 응용생명화학부, ¹경북대학교 식품영양학과

Water extracts of *Eucommia ulmoides* improve lipid, glucose, and antioxidant metabolism in ovariectomized rats

Sang Chul Lee, Soo Im Chung¹, and Mi Young Kang^{1,*}

College of Agriculture and Life Sciences, Kyungpook National University,

¹Department of Food Science and Nutrition, Kyungpook National University

Abstract In postmenopausal women, estrogen deficiency can be associated with metabolic diseases, such as obesity, diabetes, and cardiovascular diseases. The purpose of this study was to investigate factors related to lipid, glucose and antioxidant metabolism. Sprague-Dawley female rats were subjected to either bilateral ovariectomy or sham operation and randomly divided into 3 dietary groups, ($n=8$) sham-operated fed with normal diet (SHAM), ovariectomized fed with normal diet (OVX), and ovariectomized fed with normal diet supplemented with *Eucommia ulmoides* extract (OVX-EU). The OVX-EU group showed significantly lower body weight, triacylglycerol, and total cholesterol than that showed by the OVX group. In addition, the OVX-EU group showed improved lipogenesis, glucose-regulating enzyme activities, adipokine and antioxidant enzyme activities. These findings demonstrate that extracts from *E. ulmoides* extract can be used as a functional food.

Keywords: *Eucommia ulmoides*, metabolic disease, menopause, antioxidant, ovariectomized rat

서 론

초고령화 사회로 접어들면서 갱년기 이후의 삶의 질 향상과 건강 증진에 관한 관심은 고조되고 있으나, 여성들의 경우 폐경에 따른 에스트로겐 감소로 인한 혈중 지질 조성의 변화 등으로 심혈관계 질환의 발병률이 높아지게 된다(1). 이러한 갱년기 이후의 건강 관련 문제점을 감소시키기 위한 기능성 소재로서 감태(2), 대황(3) 등 식이섬유소가 풍부하고 골다공증에도 효과가 기대되는 해조류 추출물의 활용에 관한 연구들이 진행되고 있다.

두충나무의 수피인 두충은 관절염에 효능이 있다고 알려져 있는 생약으로(4,5) 약리효능을 나타내는 성분으로는 이리도이드 유도체와(6-9) 리그닌 배당체(10-14) 등이 있으며, 이들 성분들이 나타내는 생리활성 효능으로는 콜라겐합성 증진작용(15), 혈당저하 효과(16,17), 혈압 강하효과(18,19) 및 파골세포의 분화에 미치는 효과(20) 등 건강 기능성 식품 소재로 다양하게 보고되고 있다. 최근에는 두충의 열수 추출물로부터 에스트로겐의 성질을 가지는 성분인 aucubin, woginin, baicalein 등의 플라보노이드 화합물 유도체에 관한 연구들도 진행되어(21), 갱년기 이후의 골대사를

포함하여 지질 및 당질대사 개선 효능도 기대할 수 있을 것으로 판단된다. 실제로 두충 열수 추출물을 흰쥐에게 보충 급여한 결과, 고지질식이에 의해서 유도되는 고지혈증 및 비만 억제 효과가 있었다(22).

이에 본 연구에서는 난소 절제에 의해서 갱년기를 유도한 흰쥐에게 두충 열수추출물을 보충 급여함에 따른 지질, 당질대사 및 항산화 대사 관련 지표를 분석함으로써 노화에 따른 대사성 질환의 예방효과를 기대할 수 있는 건강 증진용 식음료 소재로서의 가능성을 검토하고자 한다. 갱년기 유도 모델 동물은 난소 절제술을 시행함으로써 에스트로겐의 생성을 저하시켜 인위적으로 폐경을 유도하는 것이므로 폐경이후 노화에 따른 지질 및 당질대사 및 항산화 대사의 생화학적 지표 분석을 통한 연구에 광범위하게 활용되고 있다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 두충은 경북 김천에서 재배된 것으로 대구 약령시에서 구입하였다. 이후 이물질 제거를 위해 수회 세척을 한 후 100 부피의 증류수를 가하여 3시간 30분 동안 열수 추출을 진행하였고, 원물과 용매 분리는 거름종이(filter paper, Whatman No. 1, Clifton, NY, USA)를 이용하였다. 추출물은 동결건조(FreezeZone 6 Liter Benchtop Freeze Dry Systems, Labconco Corp., Kansas City, MO, USA) 후 -70°C 에서 보관하였다. 실험에 사용된 분석용 시약은 Merck KGaA (Darmstadt, Germany)와 Sigma Aldrich (Steinheim, Germany)에서 구입 후 사용하였다.

*Corresponding author: Mi Young Kang, Department of Food Science and Nutrition, Brain Korea 21 Plus, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

Tel: 82-53-950-6235

Fax: 82-53-950-6235

E-mail: mykang@knu.ac.kr

Received June 23, 2016; revised July 25, 2016;

accepted August 12, 2016

In vitro 항산화 활성 분석

두충 추출물의 항산화 활성분석은 동결건조 된 분말을 10 mg/mL 의 농도로 dimethylsulfoxide (DMSO)에 녹여 분석에 사용하였고, 총항산화력(ABTS, [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] 측정은 Choi 등(23)의 방법을 참고 하였다. 라디칼 소거능은 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)용액을 이용하여 다음 식에 의해 산출되었으며 As는 시료첨가군, Ac는 DPPH 무첨가군의 흡광도 값을 대입하였다(24).

$$EDA (\%) = (1 - (As - Ac) / control) \times 100$$

환원력(reducing power)은 Oyaizu(25)방법에 따라 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

동물실험 설계

두충 추출물의 식이 섭취가 폐경 및 노화 이후의 대사 개선에 미치는 영향을 확인하기 위해 (주)중앙동물실험(Seoul, Korea)에서 평균 240-250 g인 Sprague-Dawley 암컷 24마리를 구입하여 1주간 적응시킨 후, 폐경을 유도하기 위해 난소절제 수술을 시행하였고, 비난소절제 대조군은 sham-operation을 진행하였다. 수술 후 1주일간의 회복기간이 지난 후 난괴법(randomized complete block design)에 의해 군을 나누었다. 실험동물은 AIN 76 식이를 기본으로 하여, 비 난소절제 대조군(SHAM), 난소절제 대조군(OVX) 그리고 난소절제 및 두충 추출물 섭취군(OVX-EU, 100 mg/kg/day)으로 각 8마리씩 3군으로 나누어 사육하였다. 실험식은 펠릿 형식으로 만들어 총 8주간 공급하였으며, 동물 사육실 환경은 항온(25±2°C) 및 항습(50±5%) 조건을 유지하였고, 조명(light and dark cycle)은 6:00에서 18:00까지 일정하게 조절하였으며, 개개의 stainless cage안에서 사육하였다. 8주후 실험동물을 12시간 절식시킨 후 Zoletil (Virbac, Carros, France; 25 mg/kg, 복강투여)로 마취하여, 혈액 및 장기조직(간, 지방, 신장)을 채취하였다. 혈액은 혈장을 분리하기 위하여 600×g에서 10분간 원심분리하였고, 간, 지방 그리고 신장조직은 효소원 분리를 위해 Hulcher 등(26)의 방법을 일부 수정하여 적용하였다. 즉, 실험동물의 동일 간엽에서 취한 간조직 0.3 g을 완충용액(0.1 M triethanolamine, 0.2 M ethylenediamine tetracetate (EDTA), pH 7.4), 0.002 M dithiothreitol (DTT)으로 균질화시킨 후 600×g (4°C)에서 15분간 원심분리, 9,500×g (4°C)에서 20분간 재원심분리 하였다. 이 후 얻은 침전물은 미토콘드리아 분획으로 완충용액을 첨가, 원심분리한 후 침전물을 재현탁시켜 CPT (Carnitine palmitoyl transferase) 활성도 측정에 사용하였고, 이때 얻어진 상층액은 세포질 분획으로 GK (glucose kinase), PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxy kinase), SOD (superoxide dismutase) GR (glutathione reductase) 활성도 측정에 사용되었다. 마이크로솜 분획은 상층액의 세포질 분획과 분리된 침전물로 완충용액을 첨가하여 50,000×g (4°C)에서 한 시간 동안 다시 원심분리한 후 침전물을 1 mL 완충용액에 녹여 FAS (fatty acid synthase), ME (malic enzyme), PON (paraoxonase) 활성도 분석에 사용하였으며, 지방 및 신장조직 효소원은 간 효소원 분리 방법과 동일하게 진행하였다. 본 동물실험은 경북대학교 동물실험 윤리위원회에서 정해진 메뉴얼에 따라 동물실험을 진행하였다(승인번호 KNU 2014-0113).

혈장 지질농도 분석

두충 추출물 섭취에 의한 폐경을 유도한 흰 쥐의 중성지방, 총콜레스테롤, HDL 콜레스테롤은 측정용 키트(Asan Pharmaceutical, Seoul, Korea), LDL 콜레스테롤은 Friedewald 등(26)의 방법을 통

해 산출되었으며 총콜레스테롤 및 유리지방산은 측정용 키트(Bioassay systems, Hayward, CA, USA)를 사용하여 정량하였다. 간세포 손상여부를 나타내는 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) 및 glutamic pyruvic transaminase (GPT) 수준은 측정용 키트(Asan Pharmaceutical)를 통해 측정하였다. 또한, 동맥경화지수(Atherogenic Index, AI)와 총 콜레스테롤 농도에 대한 HDL-콜레스테롤의 비율은 총콜레스테롤과 HDL 콜레스테롤 농도 값으로 산출하였다.

지질대사 활성도 측정

Fatty acid synthase (FAS) 활성도 측정은 10 mM EDTA, 10 mM β-mercaptoethanol, 33 μM acetyl-CoA, 100 μM malonyl-CoA, 100 μM NADPH가 되도록 제조한 후 100 μL의 세포질 분획을 섞어 2분간 30°C에서 반응시킨 다음 흡광도 감소량을 측정하였으며(27), Malic enzyme (ME)활성도 측정은 0.4 M triethanolamine, 30 mM malic acid, 0.12 M MgCl₂를 혼합 한 용액에 3.4 mM NADP⁺ 200 μL와 cytosol을 첨가하여 1분 동안 NADPH를 생성시켜 발생하는 흡광도 변화를 340 nm에서 측정하였다(28), Carnitine palmitoyl-CoA transferase (CPT) 활성도는 116 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1.1 mM EDTA, 2.5 mM L-carnitine, 0.5 mM DTNB, 75 mM palmitoyl-CoA, 0.2% Triton X-100 반응액에 미토콘드리아 분획 50 μL를 넣어 측정하였다(29).

당질대사 활성도 및 혈장 사이토카민 농도 분석

Glucokinase (GK) 활성도는 83.33 mM Hepes-NaOH에 1 M KCl 100 μL, 2.5 mM DTE (Dithioerythritol) 100 μL, 10 mg/ml BSA 50 μL, 50 mM NAD⁺ 10 μL, 1 M glucose 10 μL에 세포질 분획을 첨가하여 측정하였으며(30), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) 활성도는 Bentle and Lardy(31)의 방법에 준하여 측정하였다. 76.92 mM Hepes-NaOH 650 μL에 10 mM DTT 100 μL, 25 mM NADH 10 μL를 첨가하고 L-malate dehydrogenase, IDP (inosine-5'-diphosphate), PEP (phosphoenolpyruvate)를 7.2 unit, 1, 2 mM의 농도가 되도록 각각 첨가한 다음 세포질 분획 10 μL를 넣고 25°C에서 2분간 반응시킨 뒤, 340 nm에서의 흡광도 변화를 측정하여 나타내었다. 혈장 leptin, TNF-α, adiponectin 농도는 각각 leptin ELISA Kit (Cayman, Ann Arbor, MI, USA), TNF alpha RAT ELISA Kit (Abcam, Cambridge, MA, USA), Rat High Molecular weight Adiponectin ELISA Kit (Shibayagi, Shibukawa, Gunma, Japan)를 사용하여 측정하였다.

항산화대사 활성도 측정

Superoxide dismutase (SOD) 활성도는 superoxide dismutase assay kit (Cayman), catalase (CAT) 활성도는 50 mM potassium phosphate buffer (KH₂PO₄:K₂HPO₄=1:1.55, pH 7.4)에 미토콘드리아 분획을 넣고 25°C에서 5분간 반응 시킨 후 340 mM H₂O₂용액을 첨가하여 25°C에서 5분간 추가로 반응시켜 240 nm에서의 흡광도 변화를 측정하였다(32). Glutathione reductase (GR) 활성도는 1 mM EDTA, 1 mM GSSG, NADPH 0.1 mM를 포함하는 potassium phosphate buffer (pH 7.4)에 세포질을 첨가한 후 25°C에서 2분 간 흡광도 감소량을 340 nm에서 측정하였다(33). Paraonase (PON) 활성도는 Mackness 등(34)의 방법을 수정 및 보완하여 측정하였다.

통계처리

본 실험 결과에 대한 통계분석은 SPSS (Ver. 22, Chicago, IL,

USA) 통계 프로그램을 이용하여 다군 간의 차이에 대한 유의성을 Tukey's test에 의한 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였으며, 그 결과는 $\text{mean} \pm \text{SE}$ (standard error)로 표시하였다.

결과 및 고찰

두충 추출물의 *in vitro* 항산화 활성 분석

동물실험의 선행연구로서 두충의 항산화 활성을 비교한 결과는 Table 1에 나타내었다. 체내 적당한 양의 활성산소는 체내 생체방어 작용을 하는 등의 유익한 기능도 있지만, 비만 및 대사장애에 의한 과도한 양의 활성산소는 세포를 손상 시킬 수 있다. ABTS를 산화시켜 생성된 proton radical인 ABTS⁺과 항산화제와의 반응 후 감소된 라디칼 양을 측정하여 나타낼 수 있는데(35), 본 실험결과 총항산화력은 32.63 mg ascorbic acid equivalent per 100 g sample (AEAC)로 이는 두충 100 g 당 ascorbic acid 32.63 mg과 동일한 항산화능이 있음을 의미한다. 전자공여능은 활성 산소에 전자를 공여하여 지방산화 및 체내에서 대사 작용으로 생성된 활성산소를 억제 시킨다. DPPH는 양성자 라디칼이 소거되면서 탈색되는 특징이 있어 항산화 활성 평가에 폭넓게 이용되고 있다(35). 두충 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 62.36%로 나타났다. 환원력의 수치는 그 시료 자체의 환원력을 나타내므로 항산화능을 볼 수 있는 지표중의 하나이다(36). 두충의 환원력은 0.79로 대조군보다 유의적으로 높게 나타났고, Xu 등(37)의 두충 에탄올 추출물 항산화 활성에서 환원력이 대조군보다 높게 나타난 연구결과와 유사한 경향을 보였다.

체중 변화 및 식이효율

일반적으로 에너지 섭취와 소비의 불균형으로 인한 대사 이상은 비만을 야기 시키는데, 여성의 경우 폐경으로 인한 에스트로겐 저하는 체내 에너지 저장용의 증가가 비만인 원인이 될 수 있다(38). 두충추출물을 급여에 따른 폐경이 유도된 흰 쥐의 체중 변화 및 식이 효율을 Table 2에 나타내었다. 8주 동안의 실험식이 급여 종료 후의 체중은 난소절제군인 OVX군이 가장 높은 증가량을 보였으며, 하루 식이섭취량과 식이효율 역시 23.01 g, 0.08로 유의적으로 높게 나타났다. 난소절제 흰쥐 모델의 에스트로겐 대체물질을 급여한 연구에서, 과도한 양의 에너지 저장을 억제하여 체내 에너지 효율을 증가시킨다는 보고가 있었는데(39), 본 실험결과 OVX-EU군이 OVX군보다 유의적으로 체중이 감소하여 두충이 에스트로겐 대체물질로서의 긍정적인 효과가 있을 것으로 판단된다.

Table 1. Free radical scavenging activities of water extracts from *Eucommia ulmoides*

Antioxidant activity		
ABTS radical scavenging activity (mg AAeq/100 g extract)	<i>Eucommia ulmoides</i>	32.63±1.24
DPPH radical scavenging activity (%)	BHA	89.26±2.21 ^{b1)}
	<i>Eucommia ulmoides</i>	62.36±1.98 ^a
Reducing power (O.D. at 700 nm)	BHA	0.51±0.01 ^a
	<i>Eucommia ulmoides</i>	0.79±0.01 ^b

¹⁾Values are means±SE (n=3). Means in the column row not sharing a common superscript are significantly different at $p < 0.05$.

혈장 지질 농도 변화

두충급여에 따른 난소제거 흰쥐의 혈장 지질농도에 미치는 영향을 Table 3에 나타내었다. 중성지질은 SHAM군에서 2.99±0.09 mmol/L을 나타낸 반면 OVX 군에서는 4.34±0.27 mmol/L로 유의하게 증가하여 폐경 이후 여성호르몬 분비 감소로 인한 비만이 유도되었음을 확인 하였고, 두충 추출물을 섭취한 OVX-EU군은 3.24±0.08 mmol/L로 중성지방의 수준이 감소한 것을 알 수 있었다. 총콜레스테롤 함량도 OVX-EU군이 8.87±0.09 mmol/L인 반면 OVX군은 9.65±0.39 mmol/L로 두충의 보충 급여군에서의 수치가 유의적으로 낮아졌다. 비만과 당뇨 유발 인자중의 하나인 LDL 콜레스테롤은 Friedewald 등(24)의 방법에 따라 산출하였는데, OVX-EU군이 3.14±0.03 mmol/L로 OVX군(4.31±0.14 mmol/L)보다 약 20% 감소되었으며, 유리지방산 역시 OVX-EU군에서 약 33% 감소한 것으로 나타났다. 폐경이후 estradiol-17β의 농도 변화가 총콜레스테롤, 중성지질 LDL 콜레스테롤을 증가시킬 뿐만 아니라 HDL 콜레스테롤 수치를 감소시켜 혈관 손상을 일으키는

Table 2. Body weight and food efficiency ratio in ovariectomized rats fed supplemented with *Eucommia ulmoides* extracts

	SHAM ¹⁾	OVX	OVX-EU
Initial Body weight (g)	247.58±2.24 ^{a3)}	246.60±3.95 ^a	247.66±3.42 ^a
Final Body weight (g)	284.69±3.01 ^a	345.21±4.25 ^c	305.63±3.53 ^b
Weight gain (g)	36.82±1.05 ^a	98.32±2.25 ^c	57.58±2.02 ^c
Feed intake (g/day)	15.06±0.79 ^a	23.01±0.54 ^c	18.79±0.77 ^b
FER ²⁾	0.04±0.00 ^a	0.08±0.00 ^c	0.05±0.00 ^b

¹⁾SHAM: Sham operated rats fed with normal control diet, OVX: Ovariectomized rats fed with normal control diet, OVX-EU: OVX + *Eucommia ulmoides*

²⁾FER: Food efficiency ratio=body weight gain/feed intake

³⁾Values are means±SE (n=8). Means in the same row not sharing a common superscript are significantly different at $p < 0.05$.

Table 3. Plasma lipid profile levels in ovariectomized rats fed supplemented with *Eucommia ulmoides* extracts

	SHAM ¹⁾	OVX	OVX-EU
Triacylglycerol (mmol/L) ²⁾	2.99±0.09 ^{a3)}	4.34±0.27 ^c	3.24±0.08 ^b
Total Cholesterol (mmol/L)	8.10±0.38 ^a	9.65±0.39 ^c	8.87±0.09 ^b
HDL-C (mmol/L)	4.28±0.25 ^b	3.34±0.09 ^a	4.23±0.12 ^b
LDL-C (mmol/L)	2.44±0.07 ^a	4.31±0.14 ^c	3.14±0.03 ^b
Free fatty Acid (mmol/L)	2.68±0.09 ^a	4.01±0.11 ^b	2.71±0.14 ^a
GOT (karman/mL)	38.21±0.99 ^a	48.25±0.94 ^b	40.26±1.53 ^a
GPT (karman/mL)	29.98±1.27 ^a	42.35±0.64 ^b	30.49±1.03 ^a
AI	0.89±0.07 ^a	1.89±0.14 ^c	1.09±0.03 ^b
HTR	0.59±0.07 ^b	0.35±0.14 ^a	0.49±0.03 ^b

¹⁾SHAM: Sham operated rats fed with normal control diet, OVX: Ovariectomized rats fed with normal control diet, OVX-EU: OVX + *Eucommia ulmoides*

²⁾TG: Triacylglycerol, TC: Total cholesterol, HDL-C: High density lipoprotein cholesterol, LDL-C: Low density lipoprotein cholesterol, AI, atherogenic index: (TC-HDL-C)/HDL-C HTR: HDL-C/TC, GOT: glutamic oxaloacetic transaminase, GPT: glutamic pyruvic transaminase

³⁾Values are means±SE (n=8). Means in the same row not sharing a common superscript are significantly different at $p < 0.05$.

Table 4. Lipid-regulating enzyme activities in ovariectomized rats fed supplemented with *Eucommia ulmoides* extracts

	SHAM ¹⁾	OVX	OVX-EU
Hepatic enzyme activity (nmol/min/mg protein)			
FAS ²⁾	1.53±0.11 ^{a3)}	6.85±0.24 ^c	3.52±0.55 ^b
ME	17.24±0.95 ^a	34.58±1.64 ^c	29.16±1.22 ^b
CPT	21.22±1.27 ^a	24.53±1.14 ^b	23.18±1.15 ^b
Adipocyte enzyme activity (μmol/min/mg protein)			
FAS	20.54±1.25 ^a	36.87±2.42 ^b	32.18±1.88 ^b
ME	200.14±5.62 ^a	232.51±6.75 ^c	204.25±8.27 ^b
CPT	2.52±0.22 ^c	0.99±0.01 ^a	1.56±0.09 ^b

¹⁾SHAM: Sham operated rats fed with normal control diet, OVX: Ovariectomized rats fed with normal control diet, OVX-EU: OVX + *Eucommia ulmoides*

²⁾FAS: fatty acid synthase, ME: malic enzyme, CPT: carnitine palmitoyl transferase

³⁾Values are means±SE (n=8). Means in the same row not sharing a common superscript are significantly different at p<0.05.

원인이 될 수 있다는 연구 결과가 있었는데(40), 본 실험 결과 두충 추출물의 생리활성 물질이 호르몬 변화로 심혈관계에 지질성 물질 즉, 플라크로 인해 발생할 수 있는 혈관 질환에 긍정적인 역할을 할 것으로 판단된다. Park 등(41)은 두충 열수 추출물을 섭취한 생쥐에서 총콜레스테롤을 비롯한 중성지방, 유리지방산 농도가 감소하였고, HDL 콜레스테롤 수치가 증가한 결과를 보여주었는데, 본 실험결과와 일치하였다. 두충의 섭취가 간독성 여부를 확인하기 위해 측정된 GOT와 GPT 결과는 OVX군이 유의적으로 높았으며 OVX-EU군과 SHAM군에서는 유의적인 차이를 보이지 않아 두충이 GOT, GPT 활성의 상승을 억제하는 것으로 판단된다. 한편, 총콜레스테롤에 대한 HDL 콜레스테롤 비율은 OVX군이 유의적으로 낮았으며 SHAM군과 OVX-EU군은 유의적인 차이가 없었으며, 동맥경화 지수(Atherogenic Index, AI)는 OVX군이 OVX-EU군에 비해 약 43% 감소하여, 두충 추출물은 폐경 유도된 심혈관계 질환에 도움이 될 것이라 판단된다.

지질대사 개선효과

두충 추출물의 섭취가 폐경이 유도된 흰 쥐의 간조직과 지방 조직의 지질대사에 미치는 영향을 Table 4에 나타내었다. 많은 양의 열량 섭취 및 높은 식이효율은 체내 과다한 에너지와 지방을 연속적으로 축적하고, 체내에서 이용되는 지방산의 상당량은 식이지방을 통해 공급되므로 이는 대사 조절에 영향을 미칠 수 있다(39). 지방산 합성관련 효소인 FAS에 의해 지방산의 길이가 연장되고, ME는 지방산 합성에 필요한 조효소인 NADPH를 공급하는 역할을 하는데, 본 실험결과 간조직의 경우 FAS와 ME는 OVX-EU군이 OVX군보다 각각 45, 16% 활성이 억제되었으며, 지방조직에서는 ME 활성도에서만 13% 감소한 것으로 나타났다. CPT는 지방산 합성의 시작단계 조효소인 malonyl-CoA를 억제하는 효소로 간조직에서는 OVX군들 간의 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 지방조직에서는 약 1.58배 활성이 증가되었다. 이로써 난소절제 이후 감소된 여성호르몬으로 인해 변화되는 지질대사 관련 효소들이 두충 추출물에 의해 지방 생합성 증가와 산화를 조절할 수 있는 효과가 있는 것으로 판단된다.

당질대사 개선효과

GK는 간에서의 혈당 조절에 직접 관여하는 효소로 활성이 높을 때 당신생합성 조절 관련 효소인 PEPCK를 억제시킬 수 있다

Table 5. Glucose-regulating enzyme activities and plasma adipokine concentrations in ovariectomized rats fed supplemented with *Eucommia ulmoides* extracts

	SHAM ¹⁾	OVX	OVX-EU
Hepatic enzyme activity (nmol/min/mg protein)			
GK ²⁾	1.15±0.15 ^{b3)}	0.23±0.04 ^a	0.19±0.01 ^a
PEPCK	2.89±0.19 ^a	5.91±0.14 ^b	5.54±0.35 ^b
Plasma concentration (ng/ml)			
Leptin	144.22±8.17 ^a	165.02±6.25 ^c	150.21±5.65 ^b
TNF-α	3.29±0.13 ^a	5.75±0.22 ^b	3.49±0.14 ^a
Adiponectin	17.26±1.65 ^c	11.06±0.89 ^a	13.12±1.01 ^b

¹⁾SHAM: Sham operated rats fed with normal control diet, OVX: Ovariectomized rats fed with normal control diet, OVX-EU: OVX + *Eucommia ulmoides*.

²⁾GK: glucokinase, PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase.

³⁾Values are means±SE (n=8). Means in the same row not sharing a common superscript are significantly different at p<0.05.

Table 6. Antioxidant enzyme activity in ovariectomized rats fed supplemented with *Eucommia ulmoides* extracts

	SHAM ¹⁾	OVX	OVX-CS
Hepatic enzyme activity (nmol/min/mg protein)			
SOD ²⁾	0.77±0.06 ^{b3)}	0.69±0.03 ^a	0.64±0.02 ^a
CAT	0.79±0.05 ^b	0.52±0.03 ^a	0.57±0.02 ^a
GR	12.36±0.15 ^c	9.15±0.09 ^a	11.54±0.10 ^b
PON	1.01±0.09 ^c	0.42±0.04 ^a	0.75±0.05 ^b
Nephritic enzyme activity (nmol/min/mg protein)			
SOD	1.03±0.05 ^c	0.61±0.05 ^a	0.83±0.04 ^b
CAT	0.51±0.04 ^c	0.23±0.01 ^a	0.36±0.03 ^b
GR	0.52±0.03 ^b	0.24±0.01 ^a	0.45±0.02 ^b

¹⁾SHAM: Sham operated rats fed with normal control diet, OVX: Ovariectomized rats fed with normal control diet, OVX-EU: OVX + *Eucommia ulmoides*.

²⁾SOD: superoxide dismutase, CAT: catalase, GR: glutathione reductase, PON: paraoxonase.

³⁾Values are means±SE (n=8). Means in the same row not sharing a common superscript are significantly different at p<0.05.

(41). Table 5에는 폐경이 유도된 흰쥐에서의 당질대사 관련 효소 활성 및 adipokine 농도를 나타내었는데, GK와 PEPCK 활성도는 난소절제군들 간에는 유의적인 차이가 없었다. 렙틴은 지방에서 분비되는 호르몬으로 식욕조절, 에너지소비 및 성선숙과도 관련이 있으며, 폐경 이후 골 손상 방지에도 도움을 줄 수 있다(42). 폐경이 유도된 흰 쥐의 렙틴 농도는 OVX군이 유의적으로 낮은 결과를 보였는데, Chu 등(42)은 에스트라디올이 지방조직에서의 렙틴 분비를 유도하여 정상적인 수준을 유지하지만, 초기폐경 이후 급속하게 저하된 호르몬으로 인해 렙틴 농도가 감소하고, 중기가 지나면서 식이섭취 및 체중 증가 등으로 축적된 많은 양의 지방에서의 렙틴 분비량이 증가한다. 그러나 비만으로 인한 렙틴 수용체의 감수성 저하 때문에 렙틴의 역할을 제대로 할 수 없게 된다고 보고 하였다. 본 실험결과에서는 렙틴 농도가 OVX군이 유의적으로 높은 수준을 나타내었는데, 이는 초기폐경이 지난 중기 이후로서 체중 증가로 인한 렙틴 분비량도 증가되고 있는 것으로 판단된다. 두충 추출물의 생리활성 물질인 이리도이드 배당체의 aucubin, catalpol, 그리고 geniposide는 COX-2, NF-κB 그리고 TNF-α 활성을 억제한다는 연구결과가 있었는데(43), 본 실험 결과 TNF-α는 OVX군이 유의적으로 높았으며, OVX-EU군이 정

상군(SHAM)의 수준까지 감소된 것으로 나타나 두충 추출물의 급여는 항염증 활성에도 효과가 있는 것으로 판단된다. 또한, 인슐린 민감성을 향상시켜 당질 및 지질대사 조절에 중요한 역할을 하는 아디포넥틴의 농도는 OVX-EU군이 OVX군보다 약 19% 향상된 것으로 나타났다.

항산화대사 개선 효과

활성 산소종은 노화 및 성인병을 비롯한 여러 대사 장애의 주요 원인중의 하나인데, 이런 산화적 대사물을 조절 할 수 있는 항산화제가 주목을 받고 있다. 두충 추출물 급여에 의한 간조직과 신장조직의 체내 항산화 활성도 비교를 Table 6에 나타내었다. SOD와 CAT 활성도는 간조직에서는 난소 절제군들 간의 유의적 차이를 보이지 않았으나, 신장조직에서는 OVX-EU군에서 OVX군보다 각각 36%, 56% 증가하였으며, 또한 GR 경우 간조직과 신장조직 모두 활성이 증가한 것으로 나타났다. Yen과 Hsieh의 연구에서는 두충 추출물의 항산화 활성은 폴리페놀과 밀접한 관련이 있으며, 특히 플라보노이드와 이리도이드 등의 생리활성 물질들이 자유 라디칼 및 자유 라디칼 반응을 억제하는 것으로 보고 하였다(44). 한편, PON은 HDL 콜레스테롤과 결합된 에스테르 분해효소로서 항산화작용 뿐만 아니라 혈액순환에 도움을 주는 효소라 할 수 있는데, 두충 추출물 급여군인 OVX-EU군에서 OVX군보다 약 1.8배 증가한 것을 확인할 수 있었고, 혈장 HDL 콜레스테롤 수치 결과와도 유사한 경향을 나타내었다. 두충의 급여가 폐경 이후 비만이 야기되면서 생성된 활성산소들을 억제할 뿐만 아니라 이것으로 인해 발생하는 성인병질환 뿐만 아니라 노화를 억제 할 수 있는 항산화제로서의 가능성을 보여주었다.

요 약

본 연구는 폐경 이후 여성에 대한 두충 추출물의 효과를 확인하고자, *in vitro* 항산화 활성 분석 및 암컷 쥐의 난소를 절제한 후 폐경을 유도하여, 두충 열수추출물 보충 급여에 따른 지질, 당질대사 및 항산화 대사 관련 지표를 분석하였다. *In vitro* 항산화 활성분석 결과 환원력은 0.79(O.D. at 700 nm)로 대조군인 BHA (0.51, O.D. at 700 nm) 보다 유의적으로 높게 나타났다. 동물실험 분석결과로는 난소절제군에 비해서 난소절제 후 두충 추출물 급여군이 체중 감소경향을 보였으며, 혈장 지질농도 및 동맥경화지수도 유의적으로 낮은 것으로 나타났다. 간조직의 지방합성 효소활성도에는 OVX-EU군에서 활성이 억제되었으며, 지방조직에서는 유의적차이가 없었다. 지방산화 효소 활성은 지방조직에서 OVX-EU군의 활성이 높은 것으로 나타났다. 간조직의 당질대사 관련 효소 활성은 난소절제군들간의 유의적인 차이가 없었으며, 혈장 adipokine 중 OVX군은 렙틴과 아디포넥틴 수준이 유의적으로 낮게 나타났으며, TNF- α 는 높게 측정되었다. 항산화 효소 활성은 OVX-EU군이 간조직에서 GR과 PON, 신장조직에서 SOD, CAT, GR 활성이 OVX군보다 높게 나타났다. 본 실험의 결과들은 폐경이후 에스트로겐 결핍으로 인해 발생하는 비만관련 대사장애의 개선 및 예방소재로서 두충의 기능성 소재 개발도 가능 할 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 농촌진흥청 차세대바이오그린 21사업 지원을 받아 수행된 사업임(세부과제번호: PJ011089).

References

- Rosen C, Bilezikian JP. Editorial: Evolving toward a new paradigm for prevention of osteoporosis-The time is upon us. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82: 2782-2783 (1997)
- Kang SR, Kim MH. The effect of *Eclonia cava* extracts on bone turnover makers in ovariectomized rats. *J. Life Sci.* 19: 1841-1846 (2009)
- Park YS, Kim MH. The effect of *Eisenia bicyclis* extracts on antioxidant activity and serum lipid level in ovariectomized rats. *J. Life Sci.* 22: 1407-1414 (2012)
- Hayman AR, Jones SJ, Boyde A, Colledge WH, Carlton MB, Evans MJ, Cox TM. Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis. *Development* 122: 3151-3162 (1996)
- Chung MH, Park CW. Studies on the development of antihypertensive agents from Korean curd drug I, II, III. *Korean J. Pharmacogn.* 6: 29-32 (1975)
- Jurisi R, Debeljak Z, Vladimirov-Knezevi S, Vukovi J. Determination of Aucubin and Catalpol in *Plantago* Species by Micellar Electrokinetic Chromatography. *Z. Naturforsch. C Biosci.* 59: 27-31 (2004)
- Deyama T, Ikawa T, Kitagawa S, Nishibe S. The constituents of *Eucommia ulmoides*. Olive. IV. Isolation of a new sesquiterpene glycoside and iridoids. *Chem. Pharm. Bull.* 34: 4933-4938 (1986)
- Takamura C, Hirata T, Ueda T, Ono M, Miyashita H, Ikeda T. Iridoids from the green leaves of *Eucommia ulmoides*. *J. Nat. Prod.* 70: 1312-1316 (2007)
- Takamura C, Hirata T, Ueda T, Ono M, Miyashita H, Ikeda T. Studies on the chemical constituents of green leaves of *Eucommia ulmoides* Olive. *J. Nat. Prod.* 71: 220-221 (2007)
- Takeshi D. The constituents of *Eucommia ulmoides*. Olive. I. Isolation of (+)-medioresinol di-O- β -D-glucopyranoside. *Chem. Pharm. Bull.* 31: 2993-2997 (1983)
- Takeshi D, Takako I, Sansei N. The constituents of *Eucommia ulmoides*. Olive. II. Isolation and structure of three new lignan glycosides. *Chem. Pharm. Bull.* 33: 3651-3657 (1985)
- Takeshi D, Takako I, Shizuka K, Sansei N. The constituents of *Eucommia ulmoides*. Olive. III. Isolation and structure of new lignan glycosides. *Chem. Pharm. Bull.* 34: 523-527 (1986)
- Takeshi D, Takako I, Shizuka K, Sansei N. The constituents of *Eucommia ulmoides*. Olive. V. Isolation of dihydroxydehydrodicoumaroyl alcohol isomers and phenolic compounds. *Chem. Pharm. Bull.* 35: 1785-1789 (1987)
- Takeshi D, Takako I, Shizuka K, Sansei N. The constituents of *Eucommia ulmoides*. Olive. VI. Isolation of new sesquiterpene and neolignan glycosides. *Chem. Pharm. Bull.* 35: 1803-1807 (1987)
- Ha HK, Ho JY, Shin SM, Kim HJ, Koo SJ, Kim IH. Effects of *Eucommia Cortex*. on osteoblast-like cell proliferation and osteoclast inhibition. *Arch. Pharm. Res.* 26: 929-936 (2003)
- Hong ND, Rho YS, Won DH, Kim NJ, Cho BS. Studies on the anti-diabetic activity of *Eucommia ulmoides*. Olive. *Korean J. Pharmacogn.* 18: 112-117 (1987)
- Park SA, Choi MS, Jung UJ, Kim MJ, Kim DJ, Park HM. *Eucommia ulmoides*. Olive. leaf extract increases endogenous antioxidant activity in type 2 diabetic mice. *J. Med. Food.* 9: 474-479 (2006)
- Kawasaki T, Uezono K, Nakazawa Y. Antihypertensive mechanism of food for specified health use: *Eucommia* leaf glycoside and its clinical application. *J. Health. Sci.* 22: 29-36 (2006)
- Kwan CY, Zhang WB, Deyama T, Nishibe S. Endothelium-dependent vascular relaxation induced by *Eucommia ulmoides*. Olive. bark extract is mediated by NO and EDHF in small vessels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 369: 206-211 (2004)
- Jung YT, Choi YH, Song JH, Lee CH, Lee MS, Jang SJ, Cho HJ, Kwak HB, Oh JM. Effect of water extract of *Eucommia Cortex*. in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Korean J. Orient. Physiol. Pathol.* 23: 613-618 (2009)
- Wang H, Li MC, Yang J, Yang D, Su YF, Fan GW, Zhu Y, Gao

- XM, Paoletti R. Estrogenic properties of six compounds derived from *Eucommia ulmoides*. Olive. and their differing biological activity through estrogen receptors α and β . *Food Chem.* 129: 408-416 (2011)
22. Hirata T, Kobayashi T, Ueda T, Fujikawa T, Miyashita H, Ikeda T, Tsukamoto S, Nohara T. Anti obesity compounds in green leaves of *Eucommia ulmoides*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21: 1786-1791 (2011)
 23. Choi Y, Lee SM, Chun J, Lee HB, Lee J. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food. Chem.* 99: 381-387 (2006)
 24. Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH. Free radical method. *LWT-Food Sci. Technol.* 30: 609-615 (1997)
 25. Oyaizu M. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr. Diet.* 44: 307-315 (1986)
 26. Friedewald WT, Levyand RI, Fredrickson DS. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18: 499-502 (1972)
 27. Gibson DM, Hubbard DD. Incorporation of malonyl CoA into fatty acids by liver in starvation and alloxan-diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3: 531-535 (1960)
 28. Ochoa S. Malic Dehydrogenase from Pig Heart. Academic Press, New York, NY, USA. pp. 735-739 (1955)
 29. Bieber LL, Abraham T, Helmraht T. A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase. *Anal. Biochem.* 50: 509-518 (1972)
 30. Davidson AL, Arion WJ. Factors underlying significant underestimations of glucokinase activity in crude liver extracts: Physiological implications of higher cellular activity. *Arch. Biochem. Biophys* 253: 156-167 (1987)
 31. Bentle LA, Lardy HA. Interaction of anions and divalent metal ions with phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Biol. Chem.* 251: 2916-2921 (1976)
 32. Aebi H. Catalase. Academic Press, New York, NY, USA. pp. 673-684 (1974)
 33. Mize CE, Langdon RG. Hepatic glutathione reductase. I. purification and general kinetic properties. *J Biol. Chem.* 237: 1589-1595 (1952)
 34. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 286: 152-154 (1991)
 35. Lissi EA, Modak B, Torres R, Escobar J, Urzua A. Total antioxidant potential of resinous exudates from heliotropium species, and a comparison of the ABTS and DPPH methods. *Free. Radic. Res.* 30: 471-477 (1999)
 36. Ferreira IC, Queiroz MJ, Vilas-Boas M, Estevinho LM, Begouin A, Kirsch G. Evaluation of the antioxidant properties of diarylamines in the benzo[b]thiophene series by free radical scavenging activity and reducing power. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16: 1384-1387 (2006)
 37. Xu Z, Tang M, Li Y, Liu F, Li X, Dai R. Antioxidant properties of du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) extracts and their effects on color stability and lipid oxidation of raw pork patties. *J. Agr. Food. Chem.* 58: 7289-7296 (2010)
 38. Picard F, Deshaies Y, Lalonde J, Samson P, Labrie C, Belanger A, Labrie F, Richard D. Effects of the estrogen antagonist EM-652.HCl on energy balance and lipid metabolism in ovariectomized rats. *Int. J. Obes.* 24: 830-840 (2000)
 39. Wade GN, Gray JM, Bartness TJ. Gonadal influences anadiposity. *Int. J. Obes.* 9: 83-92 (1985)
 40. Spencer CP, Godsland IF, Stevenson JC. Is there a menopausal metabolic syndrome?. *Gynecol. Endocrinol.* 11: 341-355 (1997)
 41. Park SA, Choi MS, Kim MJ, Jung UJ, Kim HJ, Park KK, Noh HJ, Park HM, Park YB, Lee JS, Lee MK. Hypoglycemic and hypolipidemic action of Du-zhong (*Eucommia ulmoides* Oliver) leaves water extract in C57BL/KsJ-db/db mice. *J. Ethnopharmacol.* 107: 412-417 (2006)
 42. Chu SC, Chou YC, Liu JY, Chen CH, Shyu JC, Chou FP. Fluctuation of serum leptin level in rats after ovariectomy and the influence of estrogen supplement. *Life Sci.* 61: 2299-2306 (1999)
 43. Kim BH, Park KS, Chang IM. Elucidation of anti-inflammatory potencies of *Eucommia ulmoides* bark and *Plantago asiatica* seeds. *J. Med. Food.* 12: 764-769 (2004)
 44. Yen GC and Hsieh CL. Antioxidant Activity of Extracts from du-zhong (*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models *in vitro*. *J. Agr. Food Chem.* 46: 3952-3957 (1998)