

## 과도 운동에 의해 유발되는 피로 및 골격근 산화적 손상에 대한 황기 다당체의 효과

고은지\* · 이한나\* · 박현수\* · 김수진\* · 박영철\*\* · 성은수\*\*\* · 유창연\*\*\*\* · 임정대\*†

\*강원대학교 생약자원개발학과, \*\*대구가톨릭대학교 GLP센터,  
\*\*\*수원여자대학교 약용식물과, \*\*\*\*강원대학교 생물자원과학부

### Effect of Polysaccharides from *Astragalus membranaceus* on Exercise-Induced Fatigue and Oxidative Damage in Skeletal Muscle in Exhaustive Exercise Animal Models

Eun Ji Go\*, Hannah Lee\*, Hyun Su Park\*, Soo Jin Kim\*, Yeong Chul Park\*\*,  
Eun Soo Seong\*\*\*, Chang Yeon Yu\*\*\*\* and Jung Dae Lim\*†

\*Department of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok 25949, Korea.

\*\*GLP Center, Catholic University of Daegu, Keongsan 38430, Korea.

\*\*\*Department of Medicinal Plant, Suwon Women's University, Suwon 16632, Korea

\*\*\*\*Division of Bioresource Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea.

#### ABSTRACT

**Background:** *Astragalus membranaceus* is a well known oriental medicinal herb. The polysaccharides of the aboveground parts (AMA) and the radix (AMR) of *A. membranaceus* are the most important functional constituents.

**Methods and Results:** The aim of this study was to determine the effects of AMA and AMR on the oxidative damage induced in the skeletal muscle of rats subjected to exhaustive exercise. Sprague-Dawley rats were randomly divided into exercise and non-exercise groups; in the groups receiving the test compounds, AMA and AMR were administered orally for 30 days. Skeletal muscle samples were collected from each rat after running to exhaustion on a treadmill to determine the activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), and catalase (CAT) and the concentration of malondialdehyde (MDA). The antioxidant enzyme activities of SOD and GSH-Px of skeletal muscle of AMA- and AMR-treated groups were significantly higher than those of the control and commercial sports drink (SPD)-treated groups in exhaustive exercise rats. In addition, MDA concentrations in the skeletal muscle of the AMA- and AMR-treated groups were significantly lower than those of the control and SPD-treated groups. In the present study, the effects of AMA and AMR on exercise endurance capacity were also evaluated in mice subjected to a swimming exercise test. AMA and AMR supplementation prolonged the swimming time of mice and enhanced exercise endurance capacity. AMA and AMR possess the ability to retard and lower the production of blood lactate, and prevent the decrease of serum blood glucose.

**Conclusions:** These results showed that, AMR and AMA exerted beneficial effect in mice, increasing the activity of the antioxidant systems and inhibiting oxidative stress induced by exhaustive exercise. The compounds improved exercise performance and showed anti-fatigue effects against exhaustive exercise.

**Key Words:** *Astragalus membranaceus* Bunge, Aboveground Parts, Exhasutive Exercise, Fatigue, Oxidative Damage, Polysaccharide, Radix

†Corresponding author: (Phone) +82-33-540-3323 (E-mail) ijdae@kangwon.ac.kr

Received 2018 July 4 / 1st Revised 2018 July 24 / 2nd Revised 2018 August 3 / 3rd Revised 2018 August 9 / Accepted 2018 August 9

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 서 언

불규칙적이고 과도하게 장시간 지속하는 일회성 한계운동은 근력을 유지할 수 없는 근·골격계의 성능 저하로 이어지고, 피로 상태를 지속되게 하는 만성피로로 이어질 뿐만 아니라 (Mehta and Agnew, 2012) 이러한 만성적인 육체 피로는 근육 작용에 의해 발생하는 말초신경 피로 (peripheral fatigue)에 의해 근·골격계 기능의 성능저하를 나타내기도 한다 (Ament and Verkerke, 2009).

물리적 피로의 발생은 산화적 스트레스에 의한 손상과 에너지 고갈 이론으로 설명할 수 있는데 (Coombes *et al.*, 2002) 물리적인 운동이 진행되는 동안 골격근에서의 산소의 흐름이 증가하여 활성산소종 (reactive oxygen specie, ROS)과 자유 라디칼 생성이 증가한다고 알려져 있으며 (Chiaradia *et al.*, 1998) 이러한 활성산소를 비롯한 자유 라디칼의 과도생성이 생체 내에서 작용하는 내인성의 항산화 방어 시스템을 압도하는 수준으로 생성되는 것을 일반적으로 산화적 스트레스에 노출된 것으로 판단하고 있다 (Bloomer *et al.*, 2006; Goldfarb *et al.*, 2007).

규칙적인 운동은 건강에 유익한 효과가 있으나 급작스럽고 과도한 운동은 산화 스트레스의 유도를 통해 지질, 단백질 및 DNA와 같은 세포 내 생체 분자에 유해영향을 미치고 조직의 손상을 초래 한다 (Niu *et al.*, 2008). 또한 에너지 고갈 이론에 의한 물리적 피로의 발생은 에너지로 사용할 수 있는 원천의 결핍과 에너지 사용에 따른 대사산물의 과도 축적에 기인한다고 보고되고 있다 (You *et al.*, 2011).

과도하거나 갑작스러운 운동은 근육에 산화적 손상을 유발할 수 있는 ROS 생산을 증가시킬 수 있으며 근육 세포의 상태 및 근육의 수축 및 이완 기능을 손상시키는 결과를 가져올 수 있는데 이러한 산화적 손상의 정도는 근육세포를 포함한 신체가 ROS 생산을 방어 할 수 있는 능력에 크게 좌우된다 (Hao and Wang, 2010). 이러한 신체의 산화적 손상에 대한 방어능력은 종합적으로 항산화 시스템으로 평가되며 효소 및 비효소적 항산화제의 복용을 통해 이러한 항산화 시스템 능력이 증가될 수 있다고 보고되어지고 있다 (Urso and Clarkson, 2003).

외인성 영양 보충제가 운동으로 인한 신체적 피로를 감소시킬 수 있다고 보고되어지고 있기 때문에 (Yeh *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012) 에너지 사용에 의해 과도 발생하는 산물의 생산을 줄이거나 에너지의 사용을 효율적으로 향상시킬 수 있는 특정 영양소나 보조제의 연구가 필요하다.

황기 (*Astragalus membranaceus* Bunge)는 콩과에 속하는 다년생 초본으로 뿌리를 생약으로 이용하고 있는 가장 인기 있는 건강기능성 약용작물 중 하나로 2000년 이상 약초로 사용되어왔다 (Auyeung *et al.*, 2016). 이러한 황기의 뿌리와

지상부에는 생리학적 기능 활성화에 기여하는 astragalosides와 같은 steroid saponin glycoside와 isoflavonoid, polyphenol 화합물, 정유 성분 및 다당체 (polysaccharide) 등이 있다고 보고되고 있기에 (He and Findlay, 1991; Ganzera *et al.*, 2000) 뿌리는 제약 및 식품원료로 사용되어지고 있으며 지상부는 식품 원료로 이용되고 있다.

이 중 황기의 중요한 생리활성물질로 황기 뿌리로부터 분리된 다당체 (*A. membranaceus* polysaccharides, APS)는 혈당 강하, 항고혈압 활성, 항바이러스 활성, 항산화 활성, 항노화 방지 활성, 항암활성 및 과도 운동 후 감소되는 면역능에 대한 회복 효과를 나타냄이 보고되어지고 있다 (Yuan *et al.*, 2008; Mao *et al.*, 2007, 2009).

뿐만 아니라 최근 연구에 의하면 황기 뿌리에 포함되어진 다당체와 다른 골격 구조를 가진 arabino-3,6-galactan 계열의 다당체가 황기 지상부로부터 분리된 것이 보고 되었으며 (Lim *et al.*, 2016), 이러한 황기 지상부로부터 분리되어진 다당체가 장관 peyer's patch를 매개로 하여 전신면역계를 활성화 시킬 뿐 아니라 백신에 대한 보조효과가 있음이 보고되었다 (Choi *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2016).

또한 황기 추출물은 과도한 운동으로 인한 발생하는 다양한 종류의 생리학적 상해를 예방하거나 인체의 물리적인 힘을 강화시킬 수 있다고 보고하였으며 (Lü *et al.*, 2004) 황기 지상부 및 지하부 다당체의 과도한 운동에 의해 유발된 면역저하에 대하여 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>의 세포수를 증대시키고 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio를 일정하게 유지시켜주며 cytokine의 농도 변화를 통하여 Th1/Th2 반응의 균형을 유지시켜 면역능을 회복시킬 수 있음이 확인된 바 있다 (Lee *et al.*, 2018).

따라서 본 연구에서는 황기 지상부 및 황기 뿌리 다당체가 천연의약품 및 식품원료로서의 적용을 통하여 물리적 피로를 개선하고 피로와 관련된 대사 물질을 제거하며 운동 능력을 향상시킬 수 있는 소재로 활용될 수 있을 것으로 생각되어 황기 지상부 및 황기 뿌리 다당체의 식이에 따른 과도 운동 동물의 근·골격근의 산화적 손상에 미치는 영향을 조사하였으며 황기 지상부 다당체 및 황기 뿌리 다당체 투여 후 한계유영운동 시간을 측정하여 운동 내구성 용량 (exercise endurance capacity)에 미치는 영향을 조사하여 이들이 항피로 소재로서 활용될 수 있는지의 여부를 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

과도 운동에 의해 유발되는 골격근 산화적 손상에 대한 황기 (*Astragalus membranaceus* Bunge) 지상부 및 뿌리 다당체의 효과 검정에서는 6 주령의 수컷 Sprague-Dawley rat을 대한 바이오 링크 (Daehan Biolink Co., Ltd., Eumseong,

Korea)에서 2014년 5월 22일에 입수하여 사용하였으며 과도 운동에 의해 유발되는 피로 및 운동능력에 대한 황기 지상부 및 뿌리 다당체의 효과 검정을 위해서는 4 주령의 수컷 ICR 마우스를 바이오 링크에서 2014년 4월 15일에 입수하여 사용하였다.

실험동물은 7 일간 사육환경에 적응시킨 후, SPF 실험동물 실 내 사육실에서 온도  $23.0 \pm 3.0^\circ\text{C}$ , 상대습도  $50.0 \pm 20.0\%$ 를 유지하여 자동 명암 사이클 시스템에서 사육하며 실험에 사용하였다.

동물실험은 실험동물 관리규정을 준수하였으며 대구가톨릭대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 진행하였다 (승인 번호: 14-CRO-001).

## 2. 황기 지상부 및 뿌리로부터 다당체의 제조

황기 지상부와 뿌리는 3 년생 황기 (막협황기)를 정선군농업기술센터로부터 공급받아 사용하였으며 (지상부; 2013. 7. 21, 뿌리; 2013. 11. 21) 다당체를 얻기 위하여 Hao와 Wang (2010)의 방법을 변형하여 사용하였다.

구체적으로 음지에서 자연 상태로 건조된 황기 지상부와 뿌리, 각 1 kg에 대해 20 배 부피의 증류수를 가하여 2 시간 동안  $90^\circ\text{C}$ 에서 2 회 가열 추출하고 filter paper (No. 2, Whatman Co., Maidstone, England)로 여과 하였으며 여과액을 모아 감압농축 (N-1110S, EYELA, Tokyo, Japan)기로 전체 추출액이 1 l가 될 때까지 농축하여 열수 추출물을 제조하였다.

농축된 황기 지상부 및 뿌리 열수 추출물 전체 부피에 약 5 배의 에탄올을 천천히 첨가하였고  $4^\circ\text{C}$ 에서 하루 동안 방치하여 침전시킨 후  $4^\circ\text{C}$ 에서 30 분간 7,000 rpm으로 원심 분리하여 상층액과 잔사로 분리하였으며 상층액을 제거한 잔사를 동결 건조하여 황기 지상부 다당체 분획 (AMA, 19.42 g, 수율; 1.942%)과 황기 뿌리 다당체 분획 (AMR, 62.41 g, 수율; 6.241%)을 획득하였다.

## 3. 과도 운동에 의해 유발되는 골격근 산화적 손상에 대한 황기 지상부 및 뿌리 다당체의 효과 검정을 위한 경구투여

과도 운동에 의해 유발되는 골격근 산화적 손상에 대한 황기 지상부 및 뿌리의 다당체의 효과 검정을 위해 6 주령의 수컷 Sprague-Dawley rat을 운동계열 (E)과 비운동계열 (NE)로 나누고 1.5 ml의 sterile normal saline (vehicle) 투여군 (C), 황기 지상부 다당체 투여군 (AMA, 500 mg/ml, rat에 경구투여 시 hamolytic activity를 나타내지 않는 최대 농도, Yang *et al.*, 2016), 황기 뿌리 다당체 투여군 (AMR, 10 mg/ml, 경구투여 시 면역증대 효과를 나타내는 최소 농도, 자료 미제시)으로 처리군으로 분류하였고 각 처리군의 실험동물 마리 수는 8 마리로 구성하였다.

실험동물에 대한 각 시료를 투여액량 10 ml/kg을 기준으로 주 1 회 제조하여 30 일 동안 하루에 2-3 회 경구 투여하였고 당을 고함유한 스포츠 음료 투여군 (SPD)과 비교하였으며 SPD의 경우 액체 상태이므로 원재료 그대로 투여액량에 맞게 준비하여 경구투여 하였다.

## 4. Treadmill을 이용한 운동검사

시료 투입 및 한계운동 검사 전에 수컷 Sprague-Dawley rat을 대상으로 하여 운동에 적응하도록 treadmill (PBC47700 treadmill device; Coulbourn Instruments, LLC., Holliston, MA, USA)을 이용하여 7 일 동안 15 m/min으로 15 분 동안 운동시켰으며 treadmill에는 전기충격장치를 부착하여 운동 동기를 부여할 수 있도록 하였다 (Ji *et al.*, 1991).

한계운동 검사당일에 treadmill의 경사를  $10^\circ$ 로 기울이고 분당 30 m로 최대운동을 수행하게 하였다 (Brooks and White, 1978, 최대  $\text{O}_2$  소비의 약 70-75% 수준, 최대  $\text{O}_2$  소비는 실험동물이 treadmill에서 더 이상 유지할 수 없을 때의 산소소비량).

## 5. 수컷 SD rat으로부터 skeletal muscle homogenates의 제조 및 skeletal muscle homogenates에서의 SOD, GSH-Px, CAT, MDA의 측정

각 실험동물군에서 skeletal muscle homogenates의 제조를 위하여 exercise test가 완료된 수컷 Sprague-Dawley rat을 thiopentone sodium (50 mg/kg)으로 마취시키고 골격근 (skeletal muscle)을 즉시 절제하여 생리 식염수에 침지시켰다.

골격근 조직을 급속 동결하고 ice bath에서 천천히 해동하여 10 ml의 homogenization buffer [150 mM KCl, 5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 20 mM Mops (pH 7.00), protease inhibitor cocktail 1:50, 0.1 mM PMSF]를 첨가하고 균질화하였으며, 1,500 rpm (5415C, Eppendorf, Hamburg, Germany)과 20,000 rpm (Avanti J20 XP, Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA)으로 2 단계 원심 분리를 수행하여 얻은 상등액을 대상으로 SOD, GSH-Px, CAT 효소활성을 검정하였고 MDA 수준을 검정하였다.

### 1) Superoxide dismutase (SOD) 활성 측정

Superoxide dismutase 활성은 superoxide dismutase activity assay kit (Abnova, Taipei City, Taiwan)을 이용하여 분석하였다.

96 well plate에 sample과 blank 2의 각 well에 sample 20  $\mu\text{l}$ 씩을 분주하고 blank 1과 blank 3 각 well에 ddH<sub>2</sub>O 20  $\mu\text{l}$ 씩 분주한다. 위의 모든 well에 WST-1 용액 {[1-(4-indophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-(0157)]tetrazolium, monosodium salt}을 200  $\mu\text{l}$ 씩 분주한 뒤, blank

2와 3에 buffer 20  $\mu\text{l}$  씩 분주하고 sample과 blank 1에 xanthine oxidase 용액을 20  $\mu\text{l}$  씩 첨가하여 plate mix한 후, 37°C에서 20 분간 반응시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 superoxide anion radical inhibition rate(%) = [(Abs<sub>blank1</sub> - Abs<sub>blank3</sub>) - (Abs<sub>sample</sub> - Abs<sub>blank2</sub>) / (Abs<sub>blank1</sub> - Abs<sub>blank3</sub>) × 100]의 계산식을 활용하여 %로 계산하고, SOD 효소 활성은 상용화된 SOD를 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 U/ml 농도로 작성된 표준곡선을 작성하여 U/mg protein으로 환산하였다.

### 2) Glutathione peroxidase (GSH-Px) 활성 측정

Glutathione peroxidase는 과산화수소를 물로 환원시키는데 관여하는 효소로서 효소의 측정은 sample 20  $\mu\text{l}$ 에 3.5 mM glutathione reduced form 120  $\mu\text{l}$ , 0.5 U/ml glutathione reductase를 첨가한 후, 2.5 mM NADPH를 추가로 첨가한다. 여기에 30 mM tert-butyl hydroperoxide를 넣어 반응시킨 후 340 nm에서 1 분 간격으로 4 분 동안 흡광도를 측정하여 계산식에 대입하여 값을 측정하였다.

$$\text{GSH-Px activity (Unit/ml)} = \frac{\Delta\text{Abs}_{340}/\text{min (sample)}}{\epsilon\text{mM}} \times \frac{0.2 \text{ ml}}{\text{Venz (ml)}} \times \text{DF}$$

$\epsilon\text{mM}$  ( $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ); extinction for NADPH at 340 nm ( $6.22 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), Venz (ml); the volume of the sample, DF; Dilution factor

### 3) Catalase (CAT) 활성 측정

과산화수소를 물과 산소로 변화시키는 catalase 활성은 Aebi (1984)의 spectrophotometric method로 분석하였다.

96 well plate를 준비하고, 조직액 10  $\mu\text{l}$ 에 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액 290  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 microplate reader (Model 550, Bio-Rad, Richmond, CA, USA)의 kinetic method를 이용하여 3 분간 240 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. catalase 효소의 활성은 U/mg protein으로 환산하였다.

$$\text{CAT activity (Unit/mg)} = \frac{\Delta\text{Abs}_{240}/\text{min (sample)} \times \text{DF} \times \text{V (ml)}}{\epsilon\text{mM} \times \text{Venz (ml)}}$$

$\epsilon\text{mM}$  ( $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ); extinction coefficient for hydrogen peroxide at 240 nm ( $0.0241 \text{ mM}^{-1}$ ), Venz (ml); the volume of the sample, DF; Dilution factor, V; total volume

### 4) Malondialdehyde (MDA)의 활성 측정

Malondialdehyde의 측정은 조직의 지질과산화 정도를 측정

하기 위한 것으로 500  $\mu\text{l}$ 의 시료에 250  $\mu\text{l}$ 의 15% TCA를 첨가, 3,000 rpm에서 10 분간 원심분리하였다. 그 후 상층액 500  $\mu\text{l}$ 를 새 튜브에 옮기고 500  $\mu\text{l}$ 의 0.38% TBA를 첨가하였다. 이를 잘 섞어준 후 100°C에서 30 분 동안 끓이고, 10 분간 cooling한 후 3,000 rpm에서 10 분간 원심분리하였다 (5415C, Eppendorf, Hamburg, Germany). 535 nm에서 흡광도를 측정하고, 아래의 계산식에 대입하여 MDA값을 측정하였다.

$$\text{MDA (nmole/mg protein)} = \frac{\Delta\text{Abs}_{535} \times \text{DF}}{\Delta\text{Abs}_{535} (1 \text{ nmole}) \times \text{V (ml)}}$$

DF; Dilution factor, V; total volume

## 6. 과도운동에 의해 유발되는 피로 및 운동능력에 대한 황기 지상부 및 뿌리 다당체의 효과 검정을 위한 경우투어

운동에 의해 유발되는 피로 및 운동능력에 대한 황기 지상부 및 뿌리 다당체의 효과 검정에서는 4 주령의 ICR 웅성마우스를 대상으로 비운동 계열에서의 대조군 (nonexercise control, NE-C), 황기 지상부 다당체 단독 투여군 (nonexercise AMA, NE-AMA), 황기 뿌리 다당체 단독 투여군 (nonexercise AMR, NE-AMR), 황기 지상부 다당체와 뿌리 다당체 혼합 투여군 (nonexercise AMA 1 g/kg/day, AMR 1 g/kg/day, NE-AMA 0.5 g/kg/day + AMR 0.5 g/kg/day)으로 하였고 운동계열에서는 운동대조군 (exercise control, E-C) 및 황기 지상부 다당체 단독 투여군 (exercise AMA, E-AMA), 황기 뿌리 다당체 단독 투여군 (exercise AMR, E-AMR), 황기 지상부 다당체 및 뿌리 다당체 혼합 투여군 (exercise AMA 0.5 g/kg/day, AMR 0.5 g/kg/day, E-AMA 0.5 g/kg/day + AMR 0.5 g/kg/day)으로 그룹화하였다.

황기 지상부 다당체 단독 또는 황기 뿌리 다당체 단독 투여군은 1 g/kg/day의 양으로, 황기 지상부 다당체 및 뿌리 다당체의 혼합처리의 경우에는 최종 적용양이 단독처리와 동일한 양이 되도록 0.5 g/kg/day으로 조정하였다. 투여는 30 일 동안 매일 동일 시간에 경구 투여하였고, 대조군은 동일 부피의 증류수를 사용하였다.

대조군, 황기 지상부 다당체 단독 투여군, 황기 뿌리 다당체 단독 투여군, 황기 지상부 및 뿌리 다당체 혼합 투여군에 30 일 동안 경구 투여하면서 14 일과 28 일에 각각 식이양과 체중을 측정하였으며 경우투어 7, 14, 21, 28 일에 각각 한계치 수영 운동검사를 실시하였다.

## 7. 유영 수조를 이용한 한계치 수영 운동검사

한계치 수영 운동검사는 유영 수조 (90 × 45 × 45 cm)를 이용하여 운동능력 측정 시에는 높이 35 cm까지 물을 채운 후 수온을 34°C로 유지하여 실험한다. 운동부하는 물표면의 유속으

로 조절하며, 표면유속은 water flowmeter (type F45500, Blue White Co., Westminster, CA, USA)를 이용하여 물의 순환을 통해 조절하였다.

본 실험 시작하기 전 1 주간의 예비 사육기간 중 수영에 적응시키기 위하여 2 번의 적응 수영을 하게 한 후 (7 l/min, 15 min), 2 번의 지구적 운동 능력을 측정하여 (7 l/min, 15 min) 운동계열의 평균 유영 시간이 같도록 하였다.

한계치 수영운동검사 3 시간 전부터 금식시키고, 한계치 수영운동검사 시행 2 시간 전 마지막 시료를 경구 투여하였다. 모든 유영운동 능력 측정시간은 오후 1 시부터 5 시까지 실시하며, 지구적 운동 능력의 측정은 한계치 수영, 즉 마우스가 물 표면으로 7 초간 올라오지 못하는 시점을 한계점으로 하여 마우스 수영 시작 시점부터 한계점까지의 총시간을 측정하였다.

### 8. 황기 지상부 및 뿌리 다당체 투여에 따른 한계유영운동 동안의 동물의 젖산 및 혈당 측정

ICR 웅성마우스를 대상으로 한계유영 운동 전, 운동 15 분 후, 운동 한계시간, 휴식 15 분 후, 휴식 60 분에 꼬리 정맥혈에서 혈액을 채취하였으며 3,000 rpm에서 원심분리 (5415C, Eppendorf, Hamburg, Germany) 하여 혈청만 분리하였다. 혈청은 -70°C 냉동고에 즉시 보관하여 실험에 이용하였으며 혈당 (glucose)과 젖산 (lactate)을 젖산 및 혈당 측정기 (ARKRAY, Kyoto, Japan)를 이용하여 측정하였다.

### 9. 통계처리

모든 실험결과들은 평균치 ± 표준편차 (means ± SD)로 나타내었으며 각 실험군 간의 통계학적 분석은 Statistical Analysis System (SAS v9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 One-way analysis of variance (ANOVA)을 실시하고 처리 간에 차이가 있을 경우 5% 유의수준에서 Duncan's Multiple Range Test (DMRT)로 분석하였다 ( $p < 0.05$ ). 또한 Student's *t*-test를 실시한 후 유의성을  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ 의 수준에서 각각 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 과도운동에 의한 skeletal muscle의 산화적 손상에 대한 황기 지상부 및 뿌리 다당체의 영향

SOD는 반응성이 높으며 독성을 유발하는 라디칼인 superoxide anion radical을 과산화수소로 dismutation시키는 역할을 담당하는 매우 효과적인 항산화 효소이다 (Jenkins and Goldford, 1993).

이러한 대표적인 세포 내 산화적 손상에 대한 방어시스템 중 하나인 SOD 활성에 대하여 황기 (*Astragalus membranaceus* Bunge) 지상부 다당체 및 뿌리 다당체를 경구투여에 따른 근

육조직에서의 효소활성을 검정한 결과 vehicle 처리군의 경우 비 운동계열에서 188.65 U/mg을 나타낸 반면 운동계열에서 99.27 U/mg을 나타내어 운동에 의해 형성되어진 활성산소종의 발생과 이를 무독화 하기 위한 SOD 효소가 근육조직 내에서 소모됨에 따라 SOD 효소의 활성이 절반정도의 수준으로 감소하였다는 결과를 얻을 수 있었다.

반면 황기 지상부 다당체 투여군 및 황기 뿌리 다당체 투여군의 경우 비운동 계열에서 vehicle과 통계적으로 큰 차이를 나타내지 않지만 운동계열에서는 vehicle 대조군의 SOD 활성 99.27 U/mg를 나타내는데 반하여 황기 지상부 다당체 및 뿌리 다당체를 경구투여하는 경우 각각 134.83 U/mg, 175.76 U/mg를 나타내 황기 지상부 다당체 및 뿌리 다당체를 경구투여하는 경우 과도한 운동에 의해 감소된 SOD 효소 활성을 회복시킬 수 있는 것으로 확인되었다 (Table 1).

체내 활성 산소종을 제거하는 데 중요한 효소인 GSH-Px의 경우에는 비 운동계열이라 할지라도 황기 지상부 다당체 투여군 및 황기 뿌리 다당체 투여군에서 효소활성이 통계적으로 증가하는 경향을 나타내었으며 운동계열의 경우에서도 감소된 GSH-Px 효소활성이 회복되는 것을 확인하였다 (Table 1).

반면 CAT (catalase)의 경우 운동과정에서 발생하는  $O_2^-$ 로 인해 생성되는  $H_2O_2$ 는 GSH뿐만 아니라 세포 내 catalase에 의해서도 조절되어지며 라디칼 생산이 과도할 경우 catalase 활성은 억제될 수 있다는 보고 (Hollosay and Booth, 1976)와 유사하게 전반적으로 비 운동계열의 모든 투여군에 비하여 운동계열의 모든 투여군에서 감소하는 결과를 나타내었으나 황기 지상부 다당체 및 황기 뿌리 다당체 투여에 따른 효소활성의 회복은 확인되지 않았다 (Table 1).

기존 사용되고 있는 스포츠 음료 처리군 (SPD)의 경우 SOD, GSH-Px, catalase의 효소 활성에 변화를 나타내지 않아 과도운동에 의한 발생하는 근육조직 및 세포의 산화적 손상에 대한 보호 효과는 관찰되지 않았다 (Table 1).

Catalase 활성 변화에 대한 유의미한 수준의 영향을 나타낼 수 있는 유산소 운동의 강도에 대한 기준 설정과 평가가 추가적으로 진행되어야 할 것으로 생각되며 운동에 대한 산화적 스트레스에 대한 효소계 항산화제의 작용에 있어서 hydrogen peroxide를 water로 변화하도록 촉매 하는 catalase보다는 공통의 기능을 수행하는 GSH의 반응을 매개하는 GSH-Px 효소의 반응이 우선적으로 작용할 것이라고 예측되었다.

상기 결과를 통하여 황기 지상부 다당체 및 황기 뿌리 다당체 투여에 따라 과도한 운동 상태에서 발생할 수 있는 근육조직 및 세포의 산화적 손상을 막거나 경감시킬 수 있을 것으로 생각된다.

운동이 진행되어지는 동안 많은 양의 산소를 필요로 할 뿐만 아니라 운동을 하고 있는 근육조직으로 산소를 운송하는 과정 중에 세포막의 polyunsaturated fatty acids가 손상되어지

**Table 1.** Effect of polysaccharide from aboveground parts (AMA) and radix (AMR) in *Astragalus membranaceus* on activities of antioxidant enzymes in rat skeletal muscle tissues.

Group	SOD (U/mg)	GSH-Px (U/mg)	CAT (U/mg)
Non-exercise			
NE-C	188.65±8.56	15.65±0.64	5.14±1.11
NE-AMA	191.32±7.11	17.88±0.89**	5.46±1.76
NE-AMR	201.21±5.21**	19.47±0.75**	4.98±0.89
NE-SPD	183.14±9.29	14.65±1.21	5.22±1.86
Exercise			
E-C	99.27±5.32	7.28±0.54	4.67±0.89
E-AMA	134.83±6.34**	12.97±1.18**	4.46±0.76
E-AMR	175.76±8.24**	16.29±0.55**	4.75±0.65
E-SPD	101.33±4.12	5.28±0.87**	4.66±0.34

Eight rats were observed and tested for each group during the experimental period. \*Value marked by different letters in each column are significantly different by Student's *t*-test (\*\**p* < 0.01) compared the non-exercise or exercise control group.

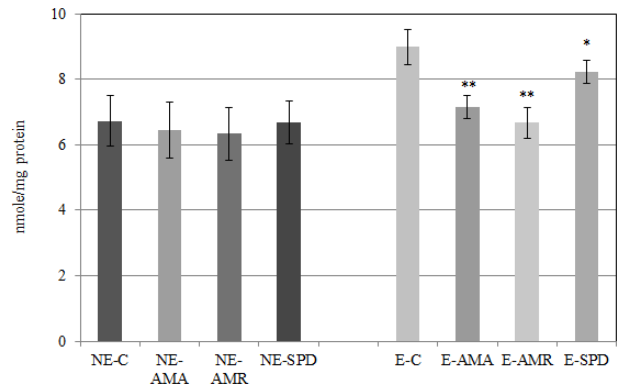
는 과정을 겪게 되는데 이러한 과정을 통해 과도한 운동은 지질과산화 생성의 결과로 나타난다고 보고되어지고 있다 (Alessio and Goldfarb, 1988).

활성산소 중 hydroxyl radical이 근육세포 막의 unsaturated fatty acid와 반응하는 경우 lipid peroxyl radical이 형성되며 산소의 존재 하에 새로운 활성 산소종은 지질과산화의 연쇄반응을 유도하고 지질과산화는 세포의 막에서 막의 유동성 및 이온경사의 유지를 파괴하고 세포를 변형시키고 조직에 염증을 유발하게 된다 (Margaritis *et al.*, 2003). 이 과정 중에 malondialdehyde (MDA)는 polyunsaturated fatty acids의 산화의 주요한 최종 산물이 종종 *in vivo* 상태에서의 지질과산화의 지표로 측정되어진다. 많은 연구에서 한계운동이 조직에서 MDA의 농도 증가를 유도하는 것으로 알려져 있다 (Killian *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015)

황기 지상부 및 뿌리 다당체를 투여한 실험동물에서 한계운동 후 근육조직에서의 MDA의 농도를 측정하여 비교한 결과 비 운동계열에서 vehicle 투여군의 MDA 농도가 약 6.73 nmole/mg을 나타내는데 반하여 황기 지상부 및 뿌리 다당체 투여군은 각각 6.45, 6.34 nmole/mg를 나타내었으며 스포츠 음료 투여 처리구의 경우 6.67 nmole/mg로 나타나 vehicle 투여군 보다 감소하였으나 통계적으로 유효한 수준은 아니었다 (Fig. 1).

반면 운동계열에서는 vehicle 투여군에서 운동에 의해 근육조직 내에서 MDA 함량이 운동에 의해 약 2.25 nmole/mg 수준으로 증가하여 8.98 nmole/mg을 나타낸 반면 황기 지상부 다당체 투여군의 경우 7.15 nmole/mg로 나타나 황기 지상부 다당체 투여에 의해 근육조직 내에 축적되는 MDA의 함량이 감소되는 것을 확인하였다.

또한, 황기 뿌리 다당체 투여 처리구의 경우 MDA의 농도가 6.67 nmole/mg로 나타나 황기 지상부 다당체 보다 더 높은



**Fig. 1.** Effect of isolated polysaccharide from aboveground parts (AMA) and radix (AMR) in *Astragalus membranaceus* on MDA concentration in rat skeletal muscle tissues. Eight rats were observed and tested for each group during the experimental period. Data express the means ± SE. Values with an asterisk above the bar are significantly different by Student's *t*-test (\**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01) compared the non-exercise or exercise control group.

MDA 축적 저해 효과를 가지는 것으로 확인되었다.

반면 기존 스포츠 음료의 경우 운동계열에서 vehicle 투여군에 비해 약간의 MDA 축적 감소효과를 나타내었으나 99% 신뢰수준 (*p* < 0.01)에서는 통계적 유의성을 나타내지 않았고 95% 범위 내에서는 유효한 수준이었다 (*p* < 0.05).

이러한 결과를 통하여 황기 지상부 및 뿌리 다당체 투여는 rat의 근육조직에서 산화적 손상을 막을 수 있는 lipid peroxidation을 감소시킬 수 있는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

## 2. 피로 회복 및 운동능력 개선에 대한 황기 지상부 및 뿌리 다당체의 효과

### 1) 황기 지상부 및 뿌리 다당체 투여에 따른 동물의 체중 변화

실험기간 동안 대조군과 비교하여 황기 뿌리 다당체 투여한 군은 운동 유무의 상관없이 14 일, 28 일 모두에서 체중의 유의적 감소를 나타내지 않은 반면 황기 지상부 다당체 투여를 병행한 군에서 역시 운동 유무에 관계없이 14 일, 28 일 모두에서 체중에 유의적인 감소를 나타내었다. 또한 황기 지상부 다당체의 투여와 운동이 지속됨에 따라 운동에 따른 체중 감소 효과가 더욱 증가함을 확인할 수 있었다 (Table 2).

황기 지상부 및 뿌리 다당체를 혼합하여 경구투여한 군에서도 통계적으로 유의한 수준의 체중 감소효과를 확인하였는데 이러한 결과는 황기 지하부가 β-glucan 계열의 polysaccharide로 구성되어 있다는 결과 (McKenna *et al.*, 2002)와 weanling pigs를 대상으로 하여 황기 지하부로부터 분리한 β-glucan 계열의 polysaccharide를 경구투여 하였을 때 어떠한 weight

**Table 2.** Changes in weight gain and food intake of experimental mice.

Group		Weight gain (g)		Food intake (g)	
		Day 14	Day 28	Day 14	Day 28
Nonexercise	Control	2.23±0.66	5.12±0.76	43.45±3.78	92.43±3.22
	AMA	1.38±0.14**	1.56±0.59**	47.62±4.11	90.64±4.57
	AMR	2.58±0.61	5.08±0.81	46.11±5.63	94.65±3.35
	AMA0.5+AMR0.5	1.94±0.53**	2.44±0.65**	42.45±7.78	91.87±4.12
Exercise	Control	2.23±0.68	4.43±0.87	45.33±4.23	94.76±4.65
	AMA	0.98±0.22**	1.00±0.34**	48.21±5.75	96.77±5.87
	AMR	2.65±0.37	4.89±0.67	49.43±5.43	97.87±6.56
	AMA0.5+AMR0.5	1.56±0.51**	1.67±0.43**	45.64±3.44	94.35±3.41

\*Value marked by different letters in each column are significantly different by Student's *t*-test (\*\**p* < 0.01) compared the non-exercise or exercise control group.

gain과 feed gain 비율에 영향을 미치지 못하였다는 결과 (Mao *et al.*, 2005)를 고려하여 볼 때 체중 감소의 원인이 물질이 황기 지상부 다당체에 기인한다는 사실을 확인하였다.

또한 본 연구팀에 의한 연구결과 황기 지상부로부터 분리된 다당체가 arabinogalactan 계열로서 장관면역활성을 나타낸다는 연구결과 (Choi *et al.*, 2014)와 diet-induced-obese (DIO) mice에서 백신과 arabinogalactan 계열의 polysaccharide를 경구투여한 경우 경구투여 3-4 일 경과 후부터 체중 감소효과를 나타낸다는 연구결과 (Haffer, 2012)와 비교하여 볼 때 황기 지상부로부터 분리된 다당체 arabinogalactan 계열의 다당체가 체중 감소효과가 있음을 확인할 수 있었다.

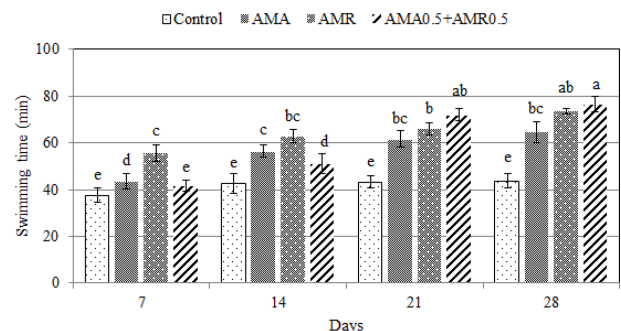
각 처리군에서의 평균 식이섭취량을 실험기간 동안 섭취식량을 측정하여 평가한 결과 평균 식이섭취량에서는 대조군과 비교하여 모든 군에서 유의적 차이를 나타내지 않았다 (Table 2).

### 2) 황기 지상부 및 뿌리 다당체 투여에 따른 동물의 지구적 유영 능력 향상

황기 지상부 및 뿌리 다당체의 마우스 경구투여 후 무산소성 역치 이하의 운동 강도를 나타내는 유속 7 l/min의 운동 강도 하에서 운동을 시작시켜 유영 한계치까지의 운동시간을 측정하였다.

그 결과 Fig. 2에 나타난 바와 같이 실험기간 동안 운동능력 향상능은 대조군과 비교하여 황기 뿌리 다당체 단독 투여군 (AMR)에서 운동 14, 21, 28 일에 각각 46%, 52%, 68% (20.0 min, 22.7 min, 29.8 min)의 한계치 운동시간의 증대 나타내었으며 황기 지상부 다당체 단독 투여군 (AMA)에서는 각각 56%, 61%, 64% (13.7 min, 18.4 min, 20.8 min)의 수준으로 한계치 운동시간이 향상되어짐을 알 수 있었으며 황기 지상부 및 뿌리 다당체의 투여가 운동능력 향상에 유의한 영향을 미치는 것을 확인하였다 (Fig. 2).

또한 동일한 투여량을 기준으로 황기 지상부와 뿌리 다당체



**Fig. 2.** Endurance exercise capacities of isolated polysaccharide from radix (AMR) and aboveground parts (AMA) of *Astragalus membranaceus* in experimental mice. Eight mouse were observed and tested for each group during the experimental period. Data express the means ± SE. \*Values with a different letters above the bar are significantly different by Duncan's Multiple Range Test (*p* < 0.05).

를 혼합하여 투여한 군 (AMR0.5 + AMA0.5)에서는 운동 14 일 까지는 황기 뿌리 다당체 단독 투여군 보다 낮은 운동능력 향상 효과를 나타내었으나 21 일 이후부터 증가하여 최종 28 일에는 동일 기간 내 황기 뿌리 다당체 단독 투여군의 운동능력 향상 비율 68%에 비해 황기 지상부 및 뿌리 다당체 혼합 투여군은 75%의 운동능력 향상 비율을 나타내어 황기 지상부 및 뿌리 다당체 혼합투여를 장기적으로 적용하는 경우 더 효과적인 운동능력 향상 효과를 나타낼 것으로 판단된다.

### 3) 황기 지상부 및 뿌리 다당체 투여에 따른 한계유영운동 동안의 동물의 젖산 및 혈당 측정

젖산은 피루브산이 환원되어 생성된 혐기성 해당 반응의 종말대사체로 운동 중 체액에서의 그 농도가 증가하게 되고, 이 젖산이 증가하여 체내에 피로를 유발시킨다 (Bonen and Belcastro, 1976).

운동 전, 운동 15 분 후, 운동 한계시간, 휴식 15 분 후, 휴식 60 분 후의 혈액 내 젖산과 glucose의 수준을 제시하였다. 아무것도 투여 되지 않은 대조군의 경우 정맥혈에서 운동 15 분 후, 운동 한계시간까지 젖산 농도의 수준은 급격히 증가하고 운동 후 휴식 15 분 후 까지 지속적으로 증가하다가 휴식 60 분 후에는 원래 수준으로 감소하였다 (Fig. 3).

모든 처리군에서 운동 15 분 후까지는 대조군의 수준과 유사하게 젖산 농도가 증가하나 황기 지상부 다당체를 단독으로 경구투여 하는 경우 운동한계 시간 및 운동 후 휴식 15 분에 이르기 까지 운동 대조군에 비해 젖산의 수준이 20% 낮게 나타나는 효과를 나타내었으며 젖산 농도를 운동 15 분 후 수준으로 유지하는 효과를 나타내었다 (Fig. 3).

이러한 효과는 동일한 투여양을 기준으로 황기 지상부와 뿌리 다당체를 혼합하여 투여한 군 (AMR0.5 + AMA0.5)에서도 유사한 경향을 나타내었으나 운동 후 휴식 15 분에서는 황기 뿌리 다당체 단독 투여가 황기 지상부 다당체 단독 투여군보다 더 낮은 젖산 축적을 나타내었다 (Fig. 3).

황기 뿌리 다당체 단독 투여군 (AMR), 황기 지상부 다당체 단독 투여군 (AMA)의 경우 유영운동 시간이 유지되었음에도 혈중 내 젖산 농도의 축적이 상대적으로 감소하는 현상을 보였고, 이는 황기 지상부 및 뿌리 다당체가 항피로인자로서의 효능을 가지고 있기 때문으로 추정된다.

이는 황기 뿌리로부터의 추출된 수용성 추출물이 rat에 대한 경구투여에 의해 간의 GST (glutathione S-transferase) 효소를 활성화하고 간 기능을 향상시킴으로써 diethylnitroamine에 의해 유도되는 간암을 효과적으로 억제하고 지연시킬 수 있음이 보고 (Cui *et al.*, 2003) 되어진 것처럼 황기 지상부 및 황기 뿌리 다당체의 경우 젖산 농도의 증가를 억제 및 조절하거나, 간 기능이 향상시켜 젖산을 효율적으로 제거함으로

써 유산소 운동의 증진이 있어 젖산 생성을 감소시킬 수 있을 것으로 생각된다.

안정 시 근육은 유리 지방산을 주 에너지원으로 사용하나, 운동이 시작되면 포도당을 주로 이용한다. 따라서 운동 중인 근육은 근육 내에 존재하는 당원의 분해를 통해 생산된 포도당과 혈중 포도당을 필요한 에너지원으로 사용한다. 따라서 운동 시에는 혈중 glucose 양이 줄어들게 되는데 한계시점에서 감소되는 glucose의 수준은 운동시간이 길어질수록 근육에서 더 많은 glucose를 소모하게 되고, 결과적으로 간과 근육에 있는 글리코겐이 glucose로 활발히 분해된다.

황기 지상부 및 뿌리 다당체를 단독 투여 및 혼합 투여 후 혈액 중 glucose의 농도를 검정한 결과 대조군에서는 운동 한계시간부터 운동 후 휴식 15 분 후 까지 혈액 중 급격한 glucose의 농도 감소가 발생하였고 황기 지상부 다당체 단독 투여군 (AMA), 황기 뿌리 다당체 단독 투여군 (AMR)의 경우에서도 동일한 양상을 나타내었으나 운동 한계시간에는 glucose 농도 감소 수준이 대조군에 비하여 약 50% 수준으로 낮았고 운동 후 휴식 15 분 후의 glucose 농도 감소 수준은 대조군과 유사하였다 (Fig. 4).

이는 황기 지상부 다당체 및 황기 뿌리 다당체가 운동 한계 시간까지 혈액 중 감소되는 glucose의 비율을 낮추는 기능을 하거나 황기 지상부 및 뿌리 다당체 투여에 따라 운동 한계에 있어 에너지원으로 glucose보다 다른 에너지원을 이용하게 하는 것을 유도하였을 것으로 추정할 수 있다.

**4) 황기 지상부 및 뿌리 다당체 투여에 따른 한계유영운동 동안의 non-esterified fatty acid 측정**

혈청 중의 유리지방산 (NEFA)은 알부민과 결합하여 말초조직의 중요한 에너지원이 된다. 혈청 중의 NEFA 농도는 지방 조직으로부터의 방출과 간 외 말초조직으로부터 섭취와의 밸

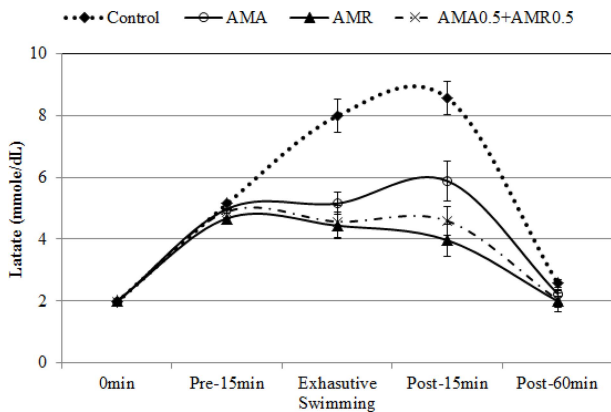


Fig. 3. Effect of isolated polysaccharide from radix (AMR) and aboveground parts (AMA) of *Astragalus membranaceus* on serum lactate concentration during consecutive endurance exercise and recovery term. Data express the means  $\pm$  SD.

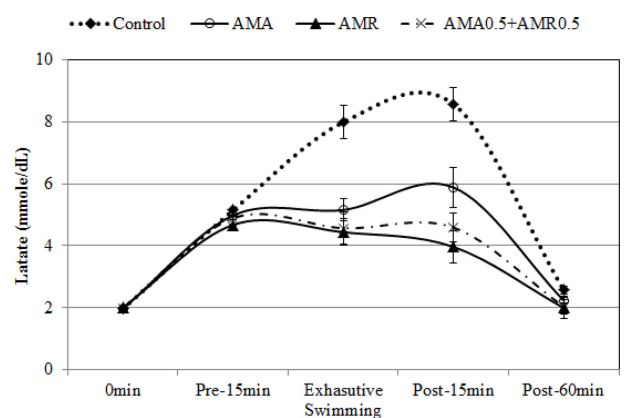


Fig. 4. Effect of isolated polysaccharide from radix (AMR) and aboveground parts (AMA) of *Astragalus membranaceus* on blood glucose level during consecutive endurance exercise and recovery term. Data express the means  $\pm$  SD.



린스에 의해 결정되며 운동에 의해 증가한다.

본 실험에서 사용된 황기 지상부 다당체 투여군 (AMA), 황기 뿌리 다당체 투여군 (AMR), 황기 지상부와 뿌리 다당체를 혼합하여 투여한 군 (AMR0.5 + AMA0.5)에서의 유리지방산 NEFA 농도는 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다 (자료 미제시). 이러한 결과를 통해 황기 지상부 및 뿌리 다당체의 단독 투여 및 혼합 투여가 어떠한 영양학적 부작용이나 스트레스를 유발하지 않는다는 것을 확인하였다.

상기 결과는 양 (sheep)을 대상으로 피로회복과 스트레스 회복에 일반적으로 사용하는 3 가지의 한약재 혼합추출물 (55% 황기 뿌리, 27% 당귀뿌리, 18% 창출 뿌리)의 투여 후 혈장에서 아미노산 및 유리지방산을 검정한 결과 한약재 혼합추출물을 투여하지 않은 대조군과 비교하여 NEFA 농도에는 큰 영향을 미치지 않았다는 결과 (Liang *et al.*, 2013) 와 유사하였다.

황기 지상부 및 뿌리 다당체 투여는 효과적인 항산화적 잠재력을 가지고 있으며 다양한 체내 효소적 항산화 작용메카니즘의 성능을 향상시킬 수 있고 과도한 운동 상태에서 발생할 수 있는 근육조직 및 세포의 산화적 손상을 막거나 경감시키는 중요한 역할을 할 수 있음을 확인하였다. 또한 황기 지상부 및 뿌리 다당체 투여는 한계운동에 대한 지구력 향상을 통해 운동능력 향상에 유의한 영향을 미칠 수 있고 혈중 젖산 농도의 축적이 상대적으로 감소시킴으로써 운동능력을 강화할 수 있는 것으로 확인되었다. 뿐만 아니라 황기 지상부 다당체의 경우 체중조절 효과도 있음을 확인하였고 황기 지상부 다당체와 황기 뿌리 다당체의 혼합처리는 이러한 운동능력 강화에 더 큰 효능을 나타낼 수 있음을 확인하였다.

비록 황기 지상부 다당체와 뿌리 다당체의 상세한 운동능력 향상 및 항피로 작용기전은 밝혀지지 않았지만, 본 연구의 결과를 통하여 황기의 섭취가 지구력 향상과 항피로 활성을 가지게 한다는 전통적인 주장을 뒷받침하는 과학적 근거를 제공할 수 있을 것으로 생각되고 황기 지상부 및 황기 뿌리 다당체는 운동능력 향상 및 항피로 소재로서 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

### 감사의 글

본 연구는 2017년도 강원대학교 대학회계 학술연구조성비 (관리번호: 620170120)와 중소기업기술정보진흥원 산학협력 기업부설연구소 설치 지원사업(과제번호: C0564917)의 연구비 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

**Aebi H.** (1984). *Catalase in vitro*: In Packer L. (ed.), *Methods in Enzymology*, Academic Press. New York, NY, USA. p.121-126.

**Alessio HM and Goldfarb AH.** (1988). Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: Adaptive response to training. *Journal of Applied Physiology*. 64:1333-1336.

**Ament W and Verkerke GJ.** (2009). Exercise and fatigue. *Sports Medicine*. 39:389-422.

**Auyeung KK, Han QB and Ko JK.** (2016). *Astragalus membranaceus*: A review of its protection against inflammation and gastrointestinal cancers. *American Journal of Chinese Medicine*. 44:1-22.

**Brooks GA and White TP.** (1978). Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *Journal of Applied Physiology: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology*. 45:1009-1015.

**Bloomer RJ, Goldfarb AH and McKenzie MJ.** (2006). Oxidative stress response to aerobic exercise: Comparison of antioxidant supplements. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 38:1098-1105.

**Bonen A and Belcastro AN.** (1976). Comparison of self-selected recovery methods on lactic acid removal rate. *Medicine and Science in Sports*. 8:176-178.

**Chiaradia E, Avellini L, Rueca F, Spaterna A, Porciello F, Antonioni MT and Gaiti A.** (1998). Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 119:833-836.

**Choi RN, Park YC, Lee JS, Kim JW, Kim JB, Choi YS, Kim KK, Lee JG, Yu CY, Kim SH, Chung IM, Kim JK and Lim JD.** (2014). Isolation of polysaccharides modulating intestinal immune system and single oral dose toxicity test in *Astragalus membranaceus* aboveground parts. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 22:276-288.

**Coombes JS, Rowell B, Dodd SL, Demirel HA, Naito H, Shanely RA and Powers SK.** (2002). Effects of vitamin E deficiency on fatigue and muscle contractile properties. *European Journal of Applied Physiology*. 87:272-277.

**Cui R, He J, Wang B, Zhang F, Chen G, Yin S and Shen H.** (2003). Suppressive effect of *Astragalus membranaceus* Bunge on chemical hepatocarcinogenesis in rats. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 51:75-80.

**Ganzer M, Bedir E, Calis I and Khan IA.** (2000). Separation of *Astragalus* saponins by reversed phase high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. *Chromatographia*. 53:131-134.

**Goldfarb AH, McKenzie MJ and Bloomer RJ.** (2007). Gender comparisons of exercise-induced oxidative stress: Influence of antioxidant supplementation. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 32:1124-1131.

**Haffer KN.** (2012). Effects of novel vaccines on weight loss in diet-induced-obese(DIO) mice. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 3:21. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-3-21> (cited by 2018 Jan 6).

**Hao S and Zhaoboa W.** (2010). Effect on exercise endurance capacity and antioxidant properties of *Astragalus membranaceus* polysaccharide(APS). *Journal of Medicinal Plants Reserach*. 4:982-986.

**He ZQ and Findlay JA.** (1991). Constituents of *Astragalus membranaceus*. *Journal of Natural Product*. 54:810-815.

- Hollosay JO and Booth FW.** (1976). Biochemical adaptation to endurance exercise in muscle. *Annual Review of Physiology*. 38:273-291.
- Huang CC, Hsu MC, Huang WC, Yang HR and Hou CC.** (2012). Triterpenoid-rich extract from *Antrodia camphorata* improves physical fatigue and exercise performance in mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012: 364741. <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2012/364741/abs/> (cited by 2017 June 14).
- Jenkins RR and Goldfarb A.** (1993). Introduction: Oxidant stress, aging, and exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 25:210-212.
- Ji LL, Dillon D and Wu E.** (1991). Myocardial aging: Antioxidant enzyme systems and related biochemical properties. *American Journal of Physiology*. 261:386-392.
- Killian ML, Haut RC and Haut Donahue TL.** (2014). Acute cell viability and nitric oxide release in lateral menisci following closed-joint knee injury in a lapine model of post-traumatic osteoarthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 15:297. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4246489/pdf/12891\\_2013\\_Article\\_2316.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4246489/pdf/12891_2013_Article_2316.pdf) (cited by 2017 March 14).
- Lee SY, Lee H, Go EJ, Park YC, Choi SK, Yu CY and Lim JD.** (2018). Effect of *Astragalus membranaceus* polysaccharides on improves immune response after exhaustive exercise rats. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 26:72-81.
- Li XD, Sun GF, Zhu WB and Wang YH.** (2015). Effects of high intensity exhaustive exercise on SOD, MDA, and NO levels in rats with knee osteoarthritis. *Genetics and Molecular Research*. 14:12367-12376.
- Liang X, Yamazaki K, Kamruzzaman M, Bi X, Panthee A and Sano H.** (2013). Effects of Chinese herbal medicine on plasma glucose, protein and energy metabolism in sheep. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 4:51-58.
- Lim JD, Yu CY, Kim SH and Chung IM.** (2016). Structural characterization of an intestinal immune system-modulating arabinoside-3,6-galactan-like polysaccharide from the aboveground part of *Astragalus membranaceus*(Bunge). *Carbohydrate Polymers*. 136:1265-1272.
- Lü H, Guo WD, Yang J, Bao H and Yu B.** (2004). Experimental study against exercise fatigue with compound huangqi extract. *Journal of Shandong Institute of Physical Education and Sports*. 20:48-50.
- Mao XF, Piao XS, Lai CH, Li DF, Xing JJ and Shi BL.** (2005). Effects of  $\beta$ -glucan obtained from the Chinese herb *Astragalus membranaceus* and lipopolysaccharide challenge on performance, immunological, adrenal, and somatotrophic responses of weanling pigs. *Journal of Animal Science*. 83:2775-2782.
- Mao XQ, Wu Y, Wu K, Liu M, Zhang JF, Zou F and Ouyang JP.** (2007). *Astragalus* polysaccharide reduces hepatic endoplasmic reticulum stress and restores glucose homeostasis in a diabetic KKAY mouse model 1. *Acta Pharmacologica Sinica*. 28:1947-1956.
- Mao XQ, Yu F, Wang N, Wu Y, Zou F, Wu K, Liu M and Ouyang JP.** (2009). Hypoglycemic effect of polysaccharide enriched extract of *Astragalus membranaceus* in diet induced insulin resistant C57BL/6J mice and its potential mechanism. *Phytomedicine*. 16:416-425.
- Margaritis I, Palazzetti S, Rousseau AS, Richard MJ and Favier A.** (2003). Antioxidant supplementation and tapering exercise improve exercise-induced antioxidant response. *Journal of the American College of Nutrition*. 22:147-156.
- McKenna DJ, Hughes K and Jones K.** (2002). *Astragalus*. *Alternative Therapies in Health and Medicine*. 8:34-42.
- Mehta RK and Agnew MJ.** (2012). Influence of mental workload on muscle endurance, fatigue, and recovery during intermittent static work. *European Journal of Applied Physiology*. 112:2891-2902.
- Niu AJ, Wu JM, Yu DH and Wang R.** (2008). Protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on oxidative damage in skeletal muscle of exhaustive exercise rats. *International Journal of Biological Macromolecules*. 42:447-449.
- Urso ML and Clarkson PM.** (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*. 189:41-54.
- Yang SJ, Lee SY, Lee H, Park YC, Choi SK, Yu CY, Chung IM and Lim JD.** (2016). Adjuvant effect of polysaccharides from aboveground parts of *Astragalus membranaceus*. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 24:408-419.
- Yeh TS, Chan KH, Hsu MC and Liu JF.** (2011). Supplementation with soybean peptides, taurine, *Pueraria* isoflavone, and ginseng saponin complex improves endurance exercise capacity in humans. *Journal of Medicinal Food*. 14:219-225.
- You L, Zhao M, Regenstein JM and Ren J.** (2011). *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* anti-fatigue effect of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) peptides prepared by papain digestion. *Food Chemistry*. 124:188-194.
- Yuan C, Pan X, Gong Y, Xia A, Wu G, Tang J and Han X.** (2008). Effects of *Astragalus* polysaccharides(APS) on the expression of immune response genes in head kidney, gill and spleen of the common carp, *Cyprinus carpio* L. *International Immunopharmacology*. 8:51-58.