

흑마늘 추출물이 근육세포의 대사활성에 미치는 영향

박 덕 배, 이 영 기

제주대학교 의학전문대학원 조직학교실

Abstract

Metabolic functions of the black garlic (*Allinum sativum* L) extracts in muscle cells

Deokbae Park, Youngki Lee

부록사 사

Department of Histology, Jeju National University School of Medicine, Jeju, Korea

The present study investigated the metabolic functions of the three different garlic (normal, black, fermented black) extracts in L6 muscle cells. Each extract significantly enhanced the ROS-scavenging activity in cells treated with H_2O_2 , showing the higher potentials with the black- and the fermented black garlic extracts the normal. H_2O_2 -induced LDH leakage and the reduction in MTT activity were effectively suppressed by the black- and the fermented black extracts, suggesting the potent protective function of those extracts against ROS-induced cytotoxicity. The basal- or insulin-induced glucose consumption was marginally enhanced with the garlic extracts. Moreover, the black- and the fermented black garlic extracts stimulated phosphorylations of AMPK and ACC which serve to block the intracellular lipid accumulation. Activities of the ethanol-metabolizing enzymes (ADH and ALDH) were also stimulated by the black- and the fermented black extracts. Taken together, extracts of the black- and the fermented black garlic might have metabolically beneficial functions including the ROS-scavenging activity, the suppression of lipid accumulation, and the hydrolysis of excessive ethanol. (J Med Life Sci 2009;6:303-307)

Key Words : Black garlic extract, ROS scavenging activity, Lipid Metabolism, Ethanol metabolism

서 론

의학의 발달과 함께 암이나 면역질환 등 주요 질환의 진단과 치료의 범위가 증대되고 있으나 반대로 환경의 변화, 사회심리적 스트레스, 과영양 또는 왜곡된 영양섭취로 인한 새로운 질환군들 역시 매우 빠르게 커지고 있다. 즉, 질병의 예방이나 치료의 보조수단으로서 식품의 중요성이 강조되고 있는데 다양한 종류의 건강보조식품이나 건강기능식품들의 적용범위는 혈압, 지질대사, 혈당조절, 노화억제 등 급격히 넓어지고 있다¹⁾. 이러한 기능성 식품군들은 주로 전래부터 사용되어 오면서 안전성이 확인된 것들이 대부분으로서 한약재소재인 약용식물²⁾, 버섯류³⁾, 음용차 식물류⁴⁾ 등이 있다. 이들 중 마늘(*Allinum sativum* L.)은 백합과(*Lilliaceae*) 파속(*Allinum*)에 속하는 일년생 식물로서 각종 생리활성물질들을 함유하고 있고 우리나라 식생활에서 없어서는 안될 중요한 향신소재 및 건강소재로서 그 활용범위가 넓다⁵⁾.

최근의 연구들에 의하면 마늘은 항균 및 항산화, 지질 및 혈압 강하, 종양세포 성장 억제등과 같은 생리활성이 알려지면서 건강

보조식품 및 의약품 소재로서의 위상이 높아지고 있다⁶⁾. 그러나 경우에 따라 기관지수축, 구토, 설사, 저혈당 등의 부작용을 일으킬 수 있으며⁷⁾ 강한 냄새와 향, 매운 맛으로 인해 섭취의 경로와 양들이 일부 제한적일 수 있다. 이를 극복하기 위한 한 가지 방법으로 고열처리를 통해 위와 같은 자극적인 요인들을 제거할 수 있다⁸⁾. 최근 가열 및 숙성의 과정을 거친 흑마늘이 생산되고 있으나 흑마늘의 효능을 원소재인 마늘의 효능과 비교한 연구는 아직 알려지지 않았다. 본 연구에서는 새로운 가공소재인 흑마늘과 이를 다시 발효시킨 발효흑마늘을 재료로 하여 항산화활성, 대사활성 및 에탄올 가수분해에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에서는 껍질을 제거한 생마늘 및 가열 및 숙성과정을 거친 흑마늘, 이를 다시 발효하여 얻은 발효흑마늘을 재료로 하였다. 동일 중량의 재료들을 분쇄 건조하여 80% 에탄올로 추출한 뒤 동결건조한 뒤, -20℃에서 냉동보관하였고 이들 추출물을 증류수로 희석하여 실험에 사용하였다.

2. 세포배양

흰쥐의 근육세포인 L6 myocyte를 한국세포주은행(서울)로부터

Address for correspondence : Deokbae Park
Department of Histology, Jeju National University School of
Medicine, 66 Jejudaehakno, 690-756, Jeju, Korea
E-mail : parkdb@jejunu.ac.kr

공여받아 사용하였다. 세포는 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 10% 우태아혈청(fetal bovine serum)이 포함된 Dulbecco's Minimal Essential Medium(D-Mem) 액에서 5% CO₂ 및 37℃가 유지되는 배양기에서 배양되었다. 세포는 T75 배양용기에서 배양된 후 우태아혈청이 제거된 serum-free 배양액에서 일정시간동안 전배양(serum-starvation)하고 난 뒤 시료의 처리실험에 사용하였다.

3. 세포내 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS)의 측정

ROS의 측정을 위해서 세포막 투과성 ROS 탐색자인 2',7-dichlorofluorescein diacetate (H2DCFDA)를 사용하여 세포질 내 ROS의 생성과 축적을 측정하였다⁹⁾. 배양이 끝난 세포를 PBS로 세척한 후 10 mM의 H2DCFDA를 함유한 PBS에서 37℃, 10분간 배양한 후 multiwell 형광측정기(Tecan, Austria)를 이용하여 485 nm / 535 nm의 파장에서 형광의 강도를 측정하였다.

4. Lactate dehydrogenase (LDH) 활성도 측정

세포에 대한 비특이적 상해의 지표가 되는 LDH 활성도를 측정하여 시료가 배양세포에 독성을 나타내는 지를 조사하였다. 시료처리가 끝난 세포배양액과 LDH assay reagent (Takara, Japan)를 각각 0.1 mL씩 섞어 10분간 상온에서 반응시킨 뒤 492 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이때 기저흡광도는 배양에 사용하지 않은 배양액으로부터 측정하였고 각 실험군의 흡광도로부터 기저흡광도를 제한값을 실제 LDH 활성도로 계산하였다.

5. MTT assay

세포독성 또는 세포의 생존능은 mitochondria의 활성을 측정하기 위하여 MTT 측정법을 사용하였다¹⁰⁾. 시료의 처리가 끝난 뒤 세포배양액과 동량의 MTT reagent (1 mg/mL in D-Mem)를 섞어 37℃에서 30분 동안 더 배양한 후 상층액을 제거하고 200µl isopropanol을 넣어 발색반응을 유도하였으며 흡광도는 570-690nm에서 측정하였다.

6. 전기영동 및 Western blot 분석

배양이 끝난 세포를 직접 5%의 2-mercaptoethanol을 포함한 cell lysis buffer¹¹⁾에 녹여 균질화시켰다. 70℃에서 10분간 가열하고 4-12%의 polyacrylamid gel에 전기영동하고 poly vinylidene difluoride (PVDF)에 흡착시켰다. PVDF membrane을 blocking buffer (Tris-buffered saline-0.1%(w/v) Tween-20)(TBS-T)으로 상온에서 1시간동안 반응시키고 난 뒤 여러 가지 1차항체(1:1000-1:3000)가 들어있는 TBS-T에서 1시간(25℃) 또는 16시간(4℃)동안 반응시켰다. TBS-T로 3회 세척하고 HRP-conjugated 2차 항체와 상온에서 30분 반응시킨 뒤 Enhanced Chemiluminescence (ECL) 방법으로 각 band의 영상을 얻었다.

7. ADH 및 ALDH 활성 측정

ADH/ALDH 활성의 측정은 식품의약품안전청에서 발행한 건강기능식품 시험법가이드(2004)의 숙취관련기능성시험의 방법에 따라 실시하였다. 이때 효소원으로는 동결건조된 S9 rat liver homogenate (MOLTOX Co., USA)를 0.1% bovine serum albumin 용액 8 ml에 녹여 0.45µm에 여과 후 사용하였으며 각각의 반응용액에서 반응시킨 후 340nm 에서의 흡광도를 NADH의 생성지표로 삼았고 이때, 시료를 첨가하지 않은 것을 대조군으로 하였으며 시료의 활성은 대조군에 대한 상대활성으로 표시하였다.

8. 통계

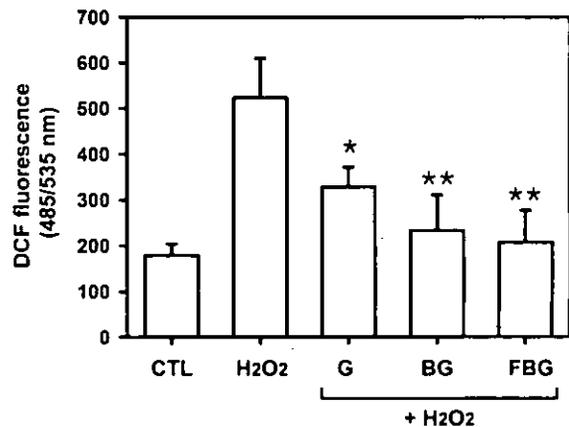
대조군과 비교군 사이의 통계적 유의성은 student's t-test를 사용하여 검정하였고 p<0.05를 유의성의 기준으로 하였다.

결과 및 고찰

최근의 연구¹²⁾에서 흑마늘의 항산화 활성이 보였으나 수행된 실험방법이 DPPH 라디칼 소거능 측정이나 전자공여능, hydroxy 라디칼 소거능들과 같이 배양세포를 대상으로 하지 않은 cell-free 시험관 측정실험이므로, 실제 살아있는 생체시료인 배양세포에서의 항산화활성이 반복재현되는 지에 대한 여부는 불분명하다. 따라서 본 연구에서는 배양중인 L6 세포에 1 mM 농도의 과산화수소(hydrogen peroxide, H₂O₂)를 처리하여 세포내 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 농도를 증가시킨 뒤 각각의 마늘시료 추출물을 처리하여 활성산소종의 제거 정도를 비교하였다(Fig. 1). 세포내 ROS의 표지자인 H₂DCFDA는 ROS 존재

Figure 1. ROS scavenging activity of the garlic extract. Confluent L6 muscle cells were serum-starved for 3 h and then pretreated with 1 mM H₂O₂ for 30 min before addition of the garlic extract. After 30 min, the intensity of DCF fluorescence was measured. *p<0.05, **p<0.01 compared to the H₂O₂-alone.

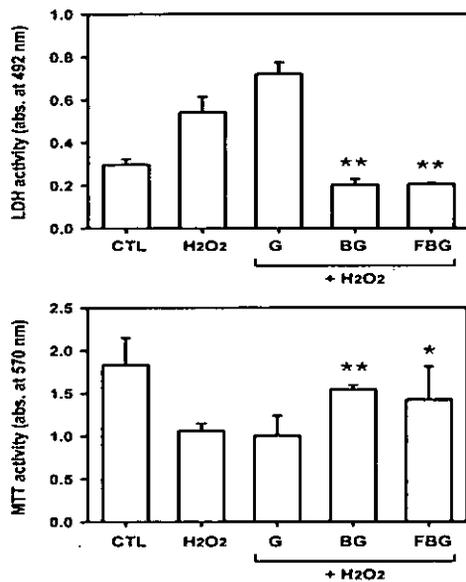
G, garlic extract (250µg/ml); BG, extract of black garlic (250µg/ml); FBG, extract of fermented black garlic (250µg/ml)



하에 세포내 esterase에 의해 가수분해되어 형광을 내는 산물인 DCF를 생성한다. 1 mM의 과산화수소 처리는 세포내 ROS 의존적 형광의 강도를 약 3배 정도 증가시키는데, 정상마늘추출물, 흑마늘추출물, 발효흑마늘 추출물 모두는 이를 억제하였다. 특히 흑마늘 및 발효흑마늘 추출물은 60% 이상의 ROS 의존적 형광을 감소시켰다. 체내 항산화활성의 증가는 혈장 및 세포의 지질 과산화물 형성을 억제한다. 그 외에도 체내에서의 항산화활성은 과도한 산화스트레스로 유발되는 세포의 손상, 유전자의 변이 등을 효과적으로 제어하므로 노화를 방지하고 세포 및 조직의 항상성을 유지하는 것으로 알려져 있다. 또한 H₂O₂ 처리에 의해 배양세포는 산화적 손상을 받고 세포괴사의 표지인 lactate dehydrogenase (LDH)의 배양액내 농도가 증가하는데, 흑마늘 및 발효흑마늘 추출물의 처리는 모두 LDH의 농도 증가를 완벽하게 억제하였다 (Fig. 2). 이러한 세포보호 효과의 결과, 세포생존능의 지표인 MTT 활성 또한 흑마늘 및 발효흑마늘 추출물의 처리로 H₂O₂ 처리군에 비해 유의하게 증가하였다(Fig. 2). 따라서 이전 및 본 연구의 결과 입증된 마늘 추출물들의 견고한 항산화활성은 생물체의 생명유지 및 보호에 중요한 도움 요인이 될 수 있을 것으로 사료된다.

마늘은 또한 항산화활성을 통해 인슐린비존형 당뇨병 실험 동물 모델에서 합병증의 예방에 도움을 줄 수 있는 것으로 보고된 바 있다¹³. 그러나 마늘 추출물 성분이 직접 혈중 포도당

Figure 2. Cytoprotective activity of the garlic extract against H₂O₂-induced oxidative stress. Confluent L6 muscle cells were serum-starved for 3 h and then pretreated with 1 mM H₂O₂ for 30 min before addition of the garlic extract. Assays for the leaked LDH in the culture medium and MTT activity of cells were measured after overnight (16h) incubation with H₂O₂ and different garlic extracts. *p<0.05, **p<0.01 compared to the H₂O₂-alone. G, garlic extract (250µg/ml); BG, extract of black garlic (250 µg/ml); FBG, extract of fermented black garlic (250µg/ml)



수준을 낮추는 지에 대해서는 명확하지 않다¹⁴. 본 연구에서는 배양중인 L6 근육세포에서 마늘 추출물의 단독, 또는 인슐린과의 동시투여가 세포의 포도당 흡수에 영향을 미치는 지에 대하여 조사하였다. 정상 마늘추출물의 처리는 근육세포의 기저포도당 흡수 및 인슐린의존적 포도당 흡수를 더욱 증진시켰고 흑마늘과 발효흑마늘 추출물은 인슐린의존적 포도당 흡수를 증진시키는 경향을 나타내었다(Fig. 3). 그러나 마늘 추출물들의 처리가 인슐린의존적 포도당 수송에 중요한 역할을 하는 세포내 신호전달체인 phosphatidyl inositol 3' kinase (PI3K) - protein kinase B (PKB) 활성에 영향을 미치지 않았다(Fig. 4). 대신 흑마늘 및 발효흑마늘 추출물 처리는 AMP-activated protein kinase

Figure 3. Effects of the garlic extracts on glucose consumption. Confluent L6 muscle cells were serum-starved for 3 h and treated with insulin (100nM) and/or garlic extracts. After overnight incubation, the concentrations of glucose in the culture medium was measured. *p<0.05 compared to the control. G, garlic extract (250µg/ml); BG, extract of black garlic (250µg/ml); FBG, extract of fermented black garlic (250µg/ml)

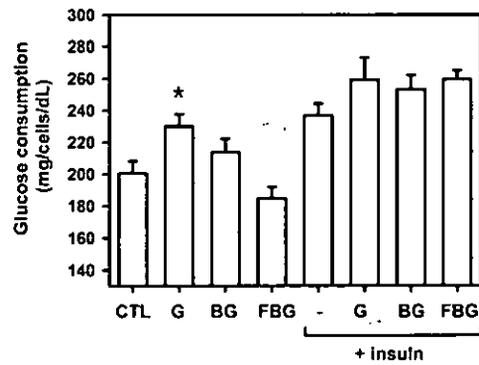
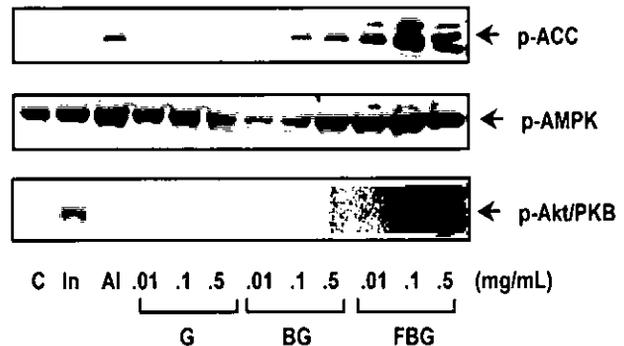


Figure 4. Effects of the garlic extracts on the phosphorylation patterns of different enzymes, related with metabolic functions. Confluent L6 muscle cells were serum-starved in the culture medium containing high (33mM) glucose overnight and further treated with the compounds or the garlic extracts for 3 h. Cells were harvested, homogenized for the analysis of phosphoproteins by the immunoblot analysis.



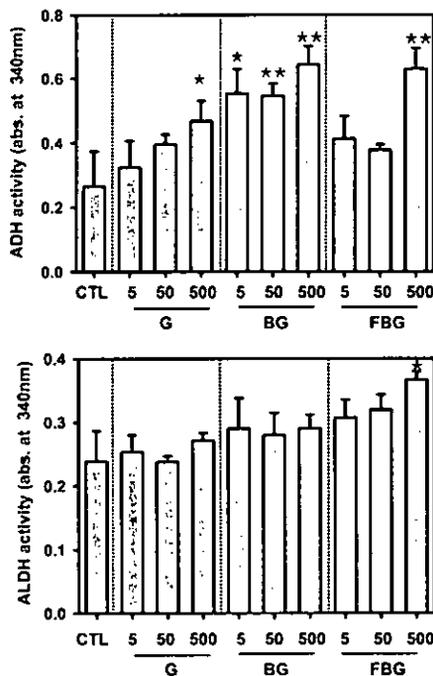
(AMPK) 및 acetyl CoA carboxylase (ACC)의 인산화를 자극하였다 (Fig. 4). 특히 발효흑마늘 추출물의 효과가 가장 뚜렷하였다. MPK의 인산화는 AMPK의 활성 증가를 의미하며 활성화된 AMPK는 다시 ACC의 인산화를 유도하여 반대로 ACC의 활성을 저해한다. ACC의 활성 저하는 세포내 중성지방 합성의 억제로 이어진다¹⁵⁾. 본 실험의 결과로부터, 흑마늘 및 발효흑마늘 추출물은 인슐린-PI3K-PKB 경로와는 독립적으로 AMPK-의존적인 경로¹⁶⁾를 통해 근육세포에서 포도당의 흡수를 야기할 수 있는 것으로 보여진다. 또한 세포내 지질의 축적 억제에도 기여할 수 있음을 의미하는 것이다.

마늘 추출물이 간세포에서의 알코올대사에 영향을 미치는지를 조사하였다. 체내로 흡수된 알코올(에탄올)은 주로 간에서 대사되는데 이 대사과정에는 alcohol dehydrogenase (ADH)와 aldehyde dehydrogenase (ALDH)의 두 효소가 중추적인 역할을 담당한다¹⁷⁾. 세가지 마늘추출물 모두 농도의존적으로 ADH와 ALDH의 활성을 증가시켰는데, 정상마늘 추출물보다는 흑마늘과 발효흑마늘 추출물의 효과가 현저하였다(Fig. 5).

본 연구의 결과들을 종합하면, 흑마늘과 발효흑마늘 추출물은 근육세포에서 강력한 항산화환성을 통해 세포를 보호하며 인슐린 비의존적인 포도당흡수 증진효과를 가지고, 간세포에서 알코올대사를 활성화하는데 기여하는데 특히 발효흑마늘의 효과가 상대적으로 우월한 것으로 나타났다. 따라서 흑마늘의 제조와 발효과정은 마늘의 생리활성을 더욱 증진하고 맛과 풍미 등 섭취를 보다 용이하게 할 수 있는 효과적인 가공처리방법으로 마늘의

Figure 5. Effects of the garlic extracts on the activities of ADH and ALDH.

*p<0.05, **p<0.01 compared to the control.
G, garlic extract (µg/ml); BG, extract of black garlic (µg/ml); FBG, extract of fermented black garlic (µg/ml)



효용가능성을 더욱 확대시키는 데 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

참고 문헌

- 1) Kim JP, Chon IJ, Cho HK, Han IH, Whang WK. The antioxidant and the antidiabetic effects of ethanol extract from biofunctional foods prescriptions. *Kor J Pharmacogn* 2004;35:98-103.
- 2) Lee SE, Seong NS, Bang JK, Park CG. Antioxidative activities of Korean medicinal plants. *Kor J Medicinal Corp Sci* 2003;11:127-134.
- 3) Lee GD, Chang HG, Kim HK. Antioxidative and nitrite-scavenging activity of edible mushrooms. *Kor J Food Sci Technol* 1997;29:432-6.
- 4) Kim MK, Kim MC, Park JS, Kim JW, Lee JO. The antioxidative effects of the water-soluble extracts of plants used as tea materials. *Kor J Food Sci Technol* 2001;33:12-8.
- 5) Shin JH, Ju JC, Kwen OC, Yang SM, Lee SJ, Sung NJ. Physicochemical and physiological activities of garlic from different area. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2004;17:237-45.
- 6) Hyun SH, Kim MB, Lim SB. Physiological activities of garlic extracts from Daejeong Jeju and major cultivating areas in Korea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2008;37:1542-7.
- 7) Cho SH, Bae EY, Lee CN, You CE, Lee JD. A case of irritant contact dermatitis due to garlic. *Kor J Dermatol* 2003;41:385-7.
- 8) Park HH, Lee YN, Lee KH, Kim TH. *The world of garlic*. Hyoil Publish, Seoul, 2004:91-94.
- 9) Kang SH, Song JH, Kang HK, Kim SJ, Lee YK, Park DB. Insulin can block apoptosis by decreasing oxidative stress via phosphatidylinositol 3-kinase-and extracellular signal-regulated protein kinase-dependent signaling pathways in HepG2 cells. *Eur J Endocrinol* 2003;148:147-55.
- 10) Moon SW, Kang SH, Jin YJ, Park JG, Lee YD, Lee YK, et al. Fermentation of *Citrus unshiu* Marc. and functional characteristics of the fermented products. *Korean J Food Sci Technol* 2004;36:669-6.
- 11) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5.
- 12) Yoo GA. Effect of garlic supplement and exercise on plasma lipid and antioxidant enzyme system in rats. *Kor J Nutr* 2006;39:3-10.

- 13) Lee YM, Gweon OC, Seo YJ, Im J, Kang MJ, Kim MJ, et al. Antioxidant effect of garlic and aged black garlic in animal model of type 2 diabetes mellitus. *Nutr Res Pract* 2009;3:156-61.
- 14) Kock S, Kim GH, Choi K. The antidiabetic effect of onion and garlic in experimental diabetic rats: meta-analysis. *J Med Food* 2009;12:552-60.
- 15) Xue B, Kahn BB. AMPK integrates nutrient and hormonal signals to regulate food intake and energy balance through effects in the hypothalamus and peripheral tissues. *J Physiol* 2006;574:73-83.
- 16) Merry TL, McConell GK. Skeletal muscle glucose uptake during exercise: a focus on reactive oxygen species and nitric oxide signaling. *IUBMB Life*. 2009;61:479-84.
- 17) Theorell H, McKee JS. Mechanism of action of liver alcohol dehydrogenase. *Nature* 1961;192:47-50.