

최 종  
연구보고서

GA0623-0000

유방암 억제능이 있는 Phytoestrogen 소재 및  
갱년기 대응 기능성 식품 개발

Study on phytoestrogen having anti-cancer activity against breast  
cancer and development of functional foods for menopausal or  
hormonal disorder

연 구 기 관  
한국식품연구원

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “유방암 억제능이 있는 Phytoestrogen 소재 및 갱년기 대응 기능성 식품 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006. 7.

주관연구기관명 : 한국식품연구원

총괄연구책임자 : 김 성 란

연 구 원 : 하 태 열

연 구 원 : 홍 희 도

연 구 원 : 안 지 윤

연 구 원 : 성 기 승

연 구 원 : 한 찬 규

연 구 원 : 임 선 혜

연 구 원 : 김 지 선

연 구 원 : 최 선 영

협동연구기관명 : 서울대학교 수의대

협동과제책임자 : 강 경 선

연 구 원 : 조 은 혜

위탁연구기관명 : 경북대학교 의대

위탁과제책임자 : 이 원 정

연 구 원 : 김 경 순

# 요 약 문

## I. 제 목

유방암 억제능이 있는 Phytoestrogen 소재 및 갱년기 대응 기능성 식품 개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

- 에스트로겐 활성을 지니면서 부작용이 없을 뿐만 아니라 유방암 억제효능을 지닌 천연 phytoestrogen 소재를 발굴하고 이를 이용한 식품소재 및 기능성 가공제품을 개발하고자 함.
- Phytoestrogen 소재의 생리 활성성분을 효율적으로 활용할 수 있는 기술과 효능평가 기술, 작용기전에 근거를 둔 활성평가법을 확립하며 질환 모델에 대한 효능을 입증하여 기능성 식품 소재로서의 근거를 명확히 제시하고자 함.

## III. 연구개발 내용 및 범위

### 1. 유용소재 탐색 및 소재화를 통한 기능성 제품 개발

- Phytoestrogen 소재 탐색 및 효능 소재 선별
- Phytoestrogen의 소재화를 위한 대량 분리 및 유효물질의 특성 구명
- 유방암 억제 효능과 천연 phytoestrogen 효능을 지닌 기능성 제품 개발

### 2. Phytoestrogen의 활성평가 및 유방암 억제 기능 연구

- 신속, 정확한 호르몬검색법을 이용한 phytoestrogen의 활성평가

- *in vivo, in vitro* 검색법을 이용한 유방암억제 물질탐색
- 유효성을 가진 물질의 유방암억제관련 기전연구

### 3. Phytoestrogen계 소재의 갱년기 개선 효능평가

- 갱년기 개선에 관한 생체 효능 평가를 위한 동물모델 및 biomarker 확립
- 선발 소재 추출물의 갱년기 개선 효능 평가
- 유효 소재의 호르몬대체요법으로의 효능 평가
- 골아세포 증식과 골대사에 미치는 효능 평가

## IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

### 1. 에스트로겐 활성과 유방암 억제능이 있는 소재 선발 및 효능 평가

Phytoestrogen 소재 탐색을 위해 문헌 고찰을 토대로 1차 시료 65종, 2차 시료 56종을 선발하여 에탄올 추출물을 제조하였으며 효모재조합검색시험법, 유방암세포인 MCF-7세포의 증식 평가법(E-screen), 에스트로젠 리셉터와 Luciferase 리포터유전자가 도입된 HepG2 cell line을 이용한 측정법으로 에스트로젠 활성을 분석하였다. 또한 쥐의 골육종 세포주인 ROS 17/2.8 세포의 증식에 미치는 영향을 평가하고 식물에서 추출한 화합물이 골아세포의 분화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Alkaline Phosphatase (ALP) 활성도를 측정하였다.

추출물 중 감초, 경포부자, 대황, 백화사설초, 상백피, 파고지, 구지뽕 추출물은 에스트로젠 활성이 매우 높았으며 양성 대조군인 E2에 근접하는 에스트로젠 활성을 나타내었다. 또한, 경포부자, 어성초, 복분자, 상백피, 원지, 은행, 홍화도 유의적으로 높은 흡광도를 나타내어 에스트로젠성이 관찰되었다. 강황, 구아바, 상황버섯, 석류의 경우 실험한 농도에서 대조군의 약 5% 수준인 미약한 에스트로젠 활성이 검출되었다.

여러 가지 시험물질 가운데 강황, 민들레, 발아현미, 복령, 상황버섯, 석류, 손바닥 선인장줄기, 손바닥 선인장 열매, 울금, 파고지, 황련, 홍화, 감초 등이 유의적으로 유방암 세포의 증식을 억제시켰으며 느릅잎, 들깨박, 일본삼백초

은 반대로 세포의 성장을 유도하는 것으로 나타났다. 이 결과로부터 에스트로젠 성이 우수하고 유방암 억제 효능이 있는 파고지와와 감초를 선발하였으며 이들을 대상으로 *in vivo*, *in vitro* 검색법을 이용하여 유방암억제 효과를 시험하고 동물실험을 통한 갱년기 개선 효능 평가를 실시하였다.

후보 식물 추출물을 5~100 µg/ml의 농도로 골아세포에 처리했을 때, 1차 선정시료에서는 감초 시료가 세포독성이 적고 골아세포 증식 효과가 우수한 것으로 나타났다. ALP 활성도는 한국상백피, 민들레추출물에 의해서도 유의하게 증가되었었고, 백화사설초와 국산홍석류와 승마에 의해서도 증가되는 경향을 나타내었다. 2차 시료 중에서는 상백피와 파고지가 우수한 것으로 판단되었다. 파고지추출물은 가장 큰 효과를 보였는데, 2.5 µg/ml 낮은 농도에서도 골아세포 증식을 유의하게 증가시켰고, 5 µg/ml에서는 150%의 증가를 보였다. 그러나 10 µg/ml 에서부터 cytotoxicity를 유발하기도 하였다.

## 2. Phytoestrogen 유효소재의 유방암 억제 관련 기전 연구

파고지와 감초 시료에서 우수한 에스트로젠 활성이 관찰되어 이 두 물질을 phytoestrogen 유효소재로 선발하고, *in vivo*, *in vitro* 검색법을 이용하여 유방암억제 효능을 시험하였다.

파고지와 감초의 에탄올 추출물은 모두 시간과 농도 의존적으로 사람의 유방암 세포주인 MCF-7과 MDA-MB-231세포에서 에스트로젠 리셉터의 유무에 상관없이 암세포의 성장을 억제하는 것으로 나타났다. 이 결과는 한 종의 개체의 기관·조직·세포를 다른 종의 개체에 이식하는 방법인 xenograft assay에서도 동일하게 관찰되었다. 시험 결과 유방암 세포를 주사한 4주 동안 대조군, 감초 추출물 투여군, 파고지 추출물 투여군의 체중은 유의적인 변화가 관찰되지 않았지만 유방암 세포의 종양형성은 대조군에 비해 감초 추출물 투여군과 파고지 추출물 투여군의 종양형성 비율이 현저하게 늦어지는 것으로 관찰되었다.

이러한 시험결과를 바탕으로 감초, 파고지 추출물이 어떠한 기전에 의해 유방암의 증식을 억제하는 지 시험해 보았다. 파고지의 추출물은 MCF-7과 MDA-MB-231세포 모두에서 apoptosis를 유도하였는데 이는 pro-apoptotic

단백질인 bax 또는 bad를 증가시키고 anti-apoptotic 단백질인 bcl-2를 감소시켜 실질적으로 apoptosis를 유발시키는 단백질분해효소인 caspase 7의 증가 및 apoptosis를 시작하는 단백질인 PARP의 활성화를 유도하여 발생하는 기전인 것으로 확인되었다.

감초의 추출물도 MCF-7세포에서 pro-apoptotic 단백질인 bax의 증가와 anti-apoptotic 단백질인 bcl-2의 감소 및 그로 인한 caspase 7의 증가와 apoptosis를 시작하는 단백질인 PARP이 활성화에 의해 apoptosis가 유도되는 것으로 확인되었다. 또한 감초 추출물은 Flow cytometry결과에서 세포의 G1기를 조절함으로써 유방암 세포의 증식을 억제시키는 것으로 판단되었는데 시간 의존적으로 세포주기 관련 단백질인 p53, p21, E2F-1, cdk2 과 cyclin E을 순차적으로 조절함으로써 이러한 현상을 유도하는 것으로 밝혀졌다.

### 3. 소재화 및 유효물질의 특성 구명

유효소재로 나타난 감초와 파고지를 대상으로 추출조건을 검토하여 동물 실험용 대량 추출을 실시하였다. 에탄올 농도를 달리하여 단계별 추출을 하였을 때 수율 증가가 일어나 산업화 시 인삼 농축액 제조공정에서 이용되는 단계적 추출법 적용도 고려해 볼 가치가 있을 것으로 사료되었다. 한편 파고지 시료의 경우 감초 에탄올 추출물의 경우와는 달리, 동결건조를 위한 전처리로 evaporation의 과정을 거치게 되면, 즉 에탄올 층이 날아가고 물 층이 남게 될 경우 끈적이는 점성이 급격히 증가하여 다루기 힘든 점액질 물질로 변하는 성질이 있었다. 따라서 이 끈적이는 성질의 원인을 제거할 수 있는지의 여부를 용매 washing, 분자량 분획 등을 적용하여 살펴보았다.

추출물의 분획별 에스트로젠 활성을 측정하고 polyphenol 조성을 HPLC로 screening 해본 결과 감초 시료의 경우 유효 성분이 EtAC 분획에 집중되어 있고 많은 성분이 관여할 것으로 보이나 PL 시료의 경우 Hexane, Chloroform, EtAC에 대한 친화력이 큰 성분으로 소수의 성분이 관여할 것으로 판단되었으며 유효 성분 관해 실험을 실시하였다. 파고지 ethanol 추출물을 극성별 용매분획하여 재조합 효모의 transactivation 활성을 측정한 결

과 비극성 분획인 hexane, chloroform 분획이 가장 높은 에스트로겐 활성을 보였다. 이 분획으로부터의 에스트로겐 활성을 나타내는 본체를 규명하고자 silicagel column과 sephadex LH를 이용하여 하위분획(subfraction)을 얻어서 활성을 평가한 후, LC-MS, NMR로 확인한 바 bakuchiol로 추정되는 유효성분을 확인하였다.

#### 4. 갱년기 동물 모델에서 유효소재의 효능 평가

난소절제로 유도한 갱년기 동물모델을 대상으로 에스트로겐 감소에 따른 생육 특성, 혈청 및 간의 지질 대사계 변화, 체내 항산화 효소계 변화를 살펴본 결과 체중증가, 난소의 중량, 혈청의 estradiol 농도, 간의 지질, TG, TC 등이 갱년기 호르몬 결핍으로 인한 체내 변화를 추적에 유용한 biomarker로 나타났으며 혈청의 지질대사계와 간 및 신장의 항산화계는 난소절제 처리로 인한 차이가 뚜렷하지 않았다.

6주령 된 Sprague -Dawley(SD)계 암컷 rat을 구입하여 2주일간 적응시킨 후 8주령에 난소적출한 모델을 적용하여 감초추출물의 투여로 인한 효능을 평가한 결과 OVX군에서 나타나는 체중 증가가 둔화되어 감초식이군에서는 Sham군과 유의적 차이가 없었다. Uterus 무게는 ovariectomy에 의해 급격히 위축되어 무게가 감소되나 17 $\beta$ -estradiol의 투여 시에만 자궁 위축이 유도되지 않았고 감초식에 따른 유의적인 차이는 보이지 않았다. 그러나 감초식이군에서 혈청 estradiol의 수치가 증가하였으며, OVX로 유도되는 혈청 지질 지표변화 중 감초식에 의해서 혈청 TG와 total cholesterol, 간 total lipid와 TG, total cholesterol 수치의 유의적인 감소가 일어났다.

갱년기 개선 효능 판별을 위하여 주령이 높은 암컷을 사용하고 난소절제 후 실험식이를 공급하는 군보다 난소절제 전부터 실험식이를 공급하는 것이 식물성 호르몬으로서의 효능 평가에 유리할 것으로 판단되었다. 감초와 파고지 시료의 갱년기 대응 효능평가를 위해, 4주령 쥐를 6주간 사육하고 10주령에 난소절제 후 다시 6주 사육하는 모델을 사용하였다. 실험군은 난소적출 전부터 실험식이를 공급한 군(GL, GH, PL, PH군)과 난소적출 후 파고지시료를 공급한 군(PLII, PHII)으로 구분되었다. 난소절제 후 후반기 6주 사

육동안은 OVX군, GL군, GK군의 체중증가가 가장 컸으며, OE군, PLII, 군이 OVX로 인한 체중증가량이 다소 둔화되어 Sham군과 유의차가 없게 나타났다. 감초 군에서는 난소절제로 인한 자궁위축이 진행되었으나 반면 파고지군에서는 자궁위축 억제 효과가 우수하였고 난소절제 전부터 섭취한 군에서 더 현저하였다. 난소절제로 인하여 혈청과 간의 지질대사 지표 개선효과는 감초군과 파고지 군 모두에서 나타났으며 TG, TC가 뚜렷하게 감소하였고 그 효과도 난소절제 전부터 섭취한 군에서 현저하였다. 한편 꼬리에서 채혈한 혈청을 대상으로 E2 농도변화를 측정한 결과 난소 절제 2주 후인 12주령에 OVX군, 식이군 모두 혈청 estrogen 농도가 급격히 감소되었으나 16주령에서는 감초군들에서 혈청 estrogen 농도가 크게 증가되었고 파고지 군의 경우 감초보다는 효과가 적었으나 OVX 대조군과는 유의적으로 차이가 났다. 경골을 분리하여 조직학적 변화를 관찰한 결과는 Ovx군에서는 소주골(trabecular bone)이 흡수되어 심한 골다공증을 유발되었으나 감초와 파고지 추출물을 섭취한 군에서는 골흡수가 억제되는 경향을 확인 할 수 있었다.

##### 5. 유방암 억제능이 있는 phytoestrogen을 이용한 기능성 제품 개발

호르몬 요법을 대신하여 많은 식물 추출물들이 phytoestrogen으로 제안되고 있지만 유방암, 자궁암 촉진 등 이로 인한 부작용이 문제시 되고 있다. 유효소재로 선정된 감초와 파고지는 에스트로젠 활성이 우수하고 에스트로젠 리셉터와 상관없이 사람의 유방암 세포의 증식을 억제시키는 것이 확인되어 안전하고 유용한 phytoestrogen이라고 할 수 있겠다.

파고지 추출물의 경우 음료 가공이 불가능한 점액질 상태로 분말 제조 후 용해성도 매우 낮으므로 과립과 환 제품으로 가공하였으며 감초는 가장 보편적인 제품인 음료 제품으로 개발하였다. 감초 음료의 경우 과실류와 같은 식이섬유원 또는 phytoestrogen 활성이 높은 것으로 알려져 있는 석류농축액 등을 첨가하여 갱년기 여성을 대상으로 하는 기능성 음료를 개발해보고자 하였으며 제품 형태는 일반 드링크류와는 다소 차별화되는 농축 액상차 형태로 개발하였다.

# C O N T E N T S

SUMMARY .....	
Chapter 1 Introduction .....	
Chapter 2 Research trend and technical demands .....	
Chapter 3 Methods and Results .....	
1. Materials and methods .....	
A. Screening of phytoestrogen sources .....	
B. Analysis of estrogenic activities by yeast transactivation assay .....	
C. Cell proliferation and alkaline phosphatase in osteoblast-like cell .....	
D. Animal studies using menopausal model .....	
E. Extraction and characterization of active phytoestrogen .....	
F. Preventive mechanisms in human breast cancer cell .....	
G. Animal studies for phytoestrogen effect .....	
H. Product development .....	
2. Results and discussions .....	
A. Screening of phytoestrogen source .....	
1) extraction of 1st group .....	
2) extraction of 2nd group .....	
B. Estrogenicity assay and selection of active source in 1st group .....	
1) Yeast transactivation assay .....	
2) E-screen assay using MCF-7 .....	
3) Estrogen activity using HepG2 cell line .....	

C. Estrogenicity assay and selection of active source in 2nd group ..	
1) Estrogen activities from yeast transactivation .....	
2) Antiproliferative effect in human breast cancer cell MCF-7 .....	
D. Anti-cancer effect in MCF-7 or MDA-MB231 xenograft nude mice .....	
E. Effect of extracts on proliferation and ALP activities of osteoblast-like cells .....	
G. Effects of phytoestrogen sources on biomarkers of menopausal animal models .....	
H. Chemopreventive mechanism of phytoestrogen sources in human breast cancer cell .....	
1) Induction of apoptosis .....	
2) Effect of cell cycle .....	
3) Cell signal pathway related in apoptosis and cell cycle arrest .....	
I. Extraction and characterization of active phytoestrogen .....	
1) Extraction conditions .....	
2) Characterization of phytoestrogen extracts and its processing .....	
3) Solvent fractionation and estrogen activity .....	
4) LC/MS analysis .....	
J. Effect of solvent fraction on cell proliferation and ALP activities of osteoblast-like cells .....	
1) Effect of solvent fraction .....	
2) Effect of Sephadex LH fractions .....	
K. Enhancing effect of selected sources on menopausal or hormonal disorder .....	
1) Ovariectomized and menopausal-related animal models .....	

2) Effects of selected source having estrogenic and anti breast cancer activity .....	
L. Development of functional food .....	
1) Pretreatment for deodorization and clarification .....	
2) Granulated powder using <i>P. corylifolia</i> L extract .....	
3) Pill product using <i>P. corylifolia</i> L extract .....	
4) Beverage products using <i>Glycyrrhiza uralensis</i> extract. ....	
<b>Chapter 4 Attainment of Objectives and Contribution .....</b>	
<b>Chapter 5 Application of the Results .....</b>	
<b>Chapter 6 References .....</b>	

## 목 차

요 약 문 .....	
제 1 장 연구개발 과제의 개요 .....	
제 1 절 연구개발의 목적 .....	
제 2 절 연구의 필요성 .....	
제 3 절 연구 범위 .....	
제 2 장 국내외 기술 개발 현황 .....	
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과 .....	
제 1 절 재료 및 방법 .....	
1. Phytoestrogen 소재 탐색 및 효능 소재 선발 .....	
2. 호르몬검색법을 이용한 phytoestrogen의 활성평가 .....	
3. 식물 추출물이 골아세포 증식과 alkaline phosphatase(ALP) 활성도에 미치는 영향 .....	
4. 갱년기 개선 효능 평가를 위한 동물 모델 및 biomarker 확립 .....	
5. 천연 phytoestrogen의 소재화를 위한 대량 분리 및 유효물질의 특성 구명 .....	
6. <i>in vivo, in vitro</i> 검색법을 이용한 유방암억제 물질탐색 .....	
7. 유효소재의 유방암억제관련 기전연구 .....	
8. 선발 소재의 갱년기 개선 효능 평가 .....	
9. 유방암 억제 효능이 부가된 phytoestrogen을 이용한 기능성 제품 개발 .....	
제 2 절 결과 및 고찰 .....	
1. Phytoestrogen 소재 탐색 .....	
가. 1 차 시료 선정 및 활성 평가용 추출물 제조 .....	
나. 2 차 시료의 선정 및 추출물 특성 .....	

2. Phytoestrogen의 활성 평가 및 효능 소재의 선발(1차시료) .....	
가. 재조합 효모transactivation assay를 이용한 phytoestrogen의 활성평가 .....	
나. 유방암세포인 MCF-7세포를 이용한 phytoestrogen의 활성평가 .....	
다. HepG2 cell line을 이용한 phytoestrogen의 활성평가 .....	
3. Phytoestrogen의 활성 평가 및 효능 소재의 선발(2차시료) .....	
가. 재조합 효모transactivation assay를 이용한 phytoestrogen의 활성평가 .....	
나. <i>In vitro</i> 검색법인 MTT assay를 이용한 유방암억제 물질탐색 .....	
4. Nude mice를 이용한 유방암억제 효능 평가 .....	
5. 선발 소재가 골아세포 증식과 ALP 활성도에 미치는 영향 .....	
가. 1차 후보소재가 골아세포(ROS 17/2.8) 증식에 미치는 영향 .....	
나. 1차 후보소재가 골아세포의 ALP 활성도에 미치는 영향 .....	
다. 2차 후보소재가 골아세포 증식에 미치는 영향 .....	
라. 2차 후보소재가 골아세포의 ALP 활성도에 미치는 효과 .....	
6. 동물실험을 통한 갱년기 개선 효능 평가 .....	
가. 체중 및 식이 섭취량 .....	
나. 난소 및 장기 무게 .....	
다. 대퇴골 중량 및 두께 .....	
라. 혈중 중성지방과 콜레스테롤 .....	
마. 간의 지질과 콜레스테롤 .....	
바. 간과 신장의 항산화계 효소활성 .....	
7. Phytoestrogen 유효소재의 유방암 억제 관련 기전 연구 .....	
가. 유효소재에 의한 세포사과정의 관찰 .....	
나. 유효소재가 세포주기에 미치는 영향분석 .....	
다. 세포사 및 세포주기 관련 세포내 신호전달기전 규명 .....	

8. 천연 phytoestrogen의 소재화를 위한 대량분리 및 유효물질의	
특성 구명 .....	
가. 추출조건 검토 및 추출물 대량 제조 .....	
나. 후보 소재의 특성 및 소재화 연구 .....	
다. 과고지 hexane, chloroform 분획물의 활성 성분 측정 .....	
라. 과고지 용매 분획물의 LC/MS 분석 .....	
마. Sephadex LH 20을 이용한 유효성분의 분리정제 .....	
9. 유효소재 분획이 골아세포 증식과 ALP 활성화에 미치는 효과 .....	
가. 용매 분획물이 골아세포 증식에 미치는 효과 .....	
나. Sephadex LH 분획물이 골아세포 증식과 ALP 활성화에 미치는	
영향 .....	
10. 갱년기 동물모델에서 유효소재의 효능 평가 .....	
가. 선발소재의 갱년기 동물 모델 적용 .....	
나. 난소 절제 및 선발 소재 섭취에 의한 효과 .....	
11. 유방암 억제효능이 부가된 phytoestrogen을 이용한 기능성 제품	
개발 .....	
가. 탈색 및 탈취 공정 실험 .....	
나. 과고지를 이용한 과립형 분말 제품 .....	
다. 과고지환 제품 개발 .....	
라. 음료제품 개발 .....	
12. 건강기능식품 개발을 위한 유효소재의 안전성 연구 .....	
제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도 .....	
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	
제 6 장 참 고 문 헌 .....	

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제 1 절 연구개발의 목적

- 에스트로겐 활성을 지니면서 부작용이 없을 뿐만 아니라 유방암 억제효능을 지닌 천연 phytoestrogen 소재를 발굴하고 이를 이용한 식품소재 및 기능성 가공제품을 개발하고자 함.
- Phytoestrogen 소재의 생리 활성성분을 효율적으로 활용할 수 있는 기술과 효능평가 기술, 작용기전에 근거를 둔 활성평가법을 확립하며 질환 모델에 대한 효능을 입증하여 기능성 식품 소재로서의 근거를 명확히 제시하고자 함.

### 제 2 절 연구의 필요성

난소기능이 점차 감소하는 갱년기는 40세 이후부터 서서히 시작되며 여성의 평균수명이 점차 연장됨에 따라 호르몬 결핍기간은 수명의 약 1/3~1/2을 차지하게 되었다. 난소로부터의 여성호르몬의 생성이 줄어들면서 폐경의 유발되고 여러 가지 갱년기 여성호르몬 결핍 증상을 경험하는 여성은 전체 여성의 20%에 달한다. 대부분 급성결핍증상(안면홍조, 빈맥, 발한, 불안)을 경험하고 만성적인 결핍으로 인하여 골다공증, 심혈관질환 등의 만성 질환을 초래하기 때문에 폐경기 여성에 대한 치료의 필요성이 점차 부각되고 있다.

갱년기 여성의 주요 질환에 에스트로겐 감소가 주요원인으로 지목되면서 합성 에스트로겐을 투여하는 호르몬 보충요법(Hormone Replacement Therapy: HRT)이 이용되고 있다. 그러나 이 합성 에스트로겐의 투여는 갱년기 증상 개선에는 효과적이나 오심, 신체 통증, 복부 팽만감, 부종 등 여러 부작용이 따르며 특히 장기간 사용시 유방암, 정맥혈전증, 당뇨병 발생의 위험률이 높아진다고 밝혀졌다. 따라서 보다 안전하고 효과적인 에스트로겐

대체 물질의 필요성이 절실히 제기되고 있다.

최근 미국 FDA는 호르몬 대체요법(HRT)에 쓰이는 에스트로겐. 프로게스틴 등 모든 호르몬 제제에 '복용 후 심장병, 심장마비, 뇌졸중, 유방암에 걸릴 위험이 높아질 수 있다'는 내용의 강력한 경고문을 부착하도록 하였는데 이는 국립보건연구원(NIH)이 2002년 7월 폐경여성들이 자주 복용하는 호르몬 제제인 '프렘프로'가 심장병, 심장마비, 뇌졸중, 유방암의 위험을 증가시킨다는 발표를 한 데 이어 취해진 것이다. 따라서 갱년기 장애 및 호르몬 결핍성 만성질환 예방을 위하여 호르몬 치료를 받아야 하는 환자 및 여성들은 큰 혼란에 빠져 있는 상태이다. 호르몬 대체요법의 대안으로 여러 치료법이 제시되고 있으며 특히 NIH는 여성호르몬 활성을 나타내는 식물유래의 isoflavone, phytoestrogen을 함유하고 있는 black cohosh(승마), buttercup, red clover의 시험사용을 허가하고 있다.

우리나라의 국민건강영양조사에 따르면 45-64세 사람에게서 만성질환이 있는 사람의 비율이 남성 72.7%, 여성 81.6%로 여성들의 만성질환 유병율이 더 높다. 따라서 수명의 반을 차지하는 갱년기 여성건강은 개인적으로나 국가적으로 막대한 경제적 손실이 수반되므로 대책이 필요하다. 식물성 에스트로겐의 이용은 암, 폐경기 증후군, 심혈관계질환과 골다공증을 포함한 호르몬 의존성 질환에 대하여 잠재적인 대체요법을 제공할 수 있을 것이며, 비용이 많이 드는 호르몬 치료법으로 인한 경제적 부담을 줄이는 효과를 창출할 것이다.

Phytoestrogen은 식물에 함유된 페놀화합물로서 구조적으로 에스트로겐과 유사성이 있으며 target site에 따라 에스트로겐 효과 또는 항에스트로겐 효과를 발휘하는 물질이다. Phytoestrogen에는 대두 등에 주로 함유된 isoflavone류 뿐만 아니라 곡류 및 종자류, 과채류에 광범위하게 함유된 lignan 및 coumestan류가 속한다. 아시아권이 즐겨먹는 콩에는 주로 다이드제인과 제니스테인이 함유되어 있으며 인도 등에서 즐겨 먹는 chick pea나 Bengal gram에는 Formomonetin이나 Biochanin이 많이 들어 있다. 태국에서 민방에 사용되는 칩(Pueraria)에는 Pueralin과 Deoxymiroesterol이 들어 있다. 이 외에도 식물 유래의 사포닌(saponin)이나 터페노이드(terpenoid) 계열

물질도 에스트로젠 효과를 갖고 있다. 특히 이들은 Black cohosh나 감초(Licorice)의 에스트로젠 효과를 나타내는 주요 성분이지만 대체적으로 페놀릭 에스트로젠(Phenolic estrogen)보다 자연계에 덜 광범위하게 존재한다. 그 외 flavanones, flavones, dihydrocalchones 등 다양한 화합물에서 활성이 기대되나 관련 연구가 부족한 실정이다. 이들 천연물 유래의 phytoestrogen을 이용한 제제 및 기능성 식품 개발은 부작용의 단점이 없고 약제의 형태가 아닌 기호성이 우수한 식품의 형태로도 이용할 수 있는 장점이 있어 개발의 파급효과가 클 것으로 예상된다.

본 연구에서는 에스트로젠 활성을 지니면서 부작용이 없을 뿐만 아니라 유방암 억제효능을 지닌 천연 phytoestrogen 소재를 발굴하고 제품화함으로써 에스트로젠 치료법이 필요한 여성관련 질병의 예방과 치료에 활용하고자 한다. 이를 위하여 작용기전에 근거를 둔 활성평가법을 적용하고 질환모델에 대한 효능을 입증하여 기능성 식품 소재로서의 근거를 명확히 제시하고자 한다.

건강기능성 식품분야는 현재 세계시장이 급속히 성장 중이고 수년 내에 호르몬 치료의 대체의학 분야와 관련된 주요 및 주변기술들이 확산될 전망이다. 따라서 국제적인 경쟁력을 갖춘 연구결과와 축적과 health-claim의 근거 제시가 필요하다고 하겠다.

호르몬 치료를 받으면 유방암에 걸릴 확률이 높아 질 수 있다는 단점 때문에 일부에서는 유방암 세포의 성장을 촉진하는 에스트로겐의 작용을 억제하는 타목시펜(tamoxifen)을 사용하기도 하나 이 유방암치료제 역시 자궁암과 혈전의 위험을 높이는 심한 부작용을 유발시키는 것으로 나타났다. 한편 일반 유방암 환자에게 적용하는 유방암 치료제는 체내 에스트로젠 생성을 저해하여 환자들은 에스트로젠 결핍으로 인한 우울증 및 제반 증상을 겪게 된다고 보고되었다. 그러므로 에스트로젠 활성을 지니면서 부작용이 없을 뿐만 아니라 유방암 억제효능을 지닌 천연 phytoestrogen 소재의 발굴 및 제품화가 이루어지면 기존의 에스트로젠 치료 분야와 유방암 치료 분야에 각각 동반되던 문제를 해소시킨 것으로 그 가치가 크다고 할 수 있다.

유방암과의 관계가 아직 확립되지 않은 상황에서 여성호르몬의 사용이 정

당화될 수 있는 것은 폐경 이후 발생하는 질환에 의한 사망률(골다공증의 골절, 심질환)이 유방암에 의한 사망율과 비교할 때 더 큰 이득을 얻을 수 있기 때문이다. 그러나 호르몬요법에 의한 치료가 필요함에도 불구하고 부작용 우려와 장기 치료시의 위험성 때문에 지속적인 호르몬 치료를 받는 여성은 국내의 경우 약 5% 미만인 것으로 알려졌고, 외국의 경우에는 영국의 경우 약 10% , 미국은 30%의 여성이 호르몬을 사용하고 있는 것으로 보고 되어 호르몬 치료법은 충분한 대응책의 역할을 하지 못하고 있는 실정이다.

따라서 보다 안전하고 효과가 있는 에스트로겐 대체 물질을 발굴하여 국민 보건 향상에 기여하는 연구가 필요하다. 천연 식물자원 유래의 식물성 여성 호르몬은 갱년기 증상 완화 이외에도 궁극적으로는 혈중 지방질 대사를 개선시키고 심혈관계에 직접 작용하여 동맥경화를 예방하고, 골다공증으로 인한 골절을 예방하는 데 효과가 입증되어야 할 것이다. 이는 갱년기 여성에게 뿐만 아니라 젊은 여성에게서도 일어나는 호르몬 실조 증상에도 응용될 수 있을 것이다.

## 제 3 절 연구범위

### 제 1 세부 : 유용소재 탐색 및 소재화를 통한 기능성 제품 개발 분야

1. Phytoestrogen 소재 탐색 및 효능 소재 선별
2. Phytoestrogen의 소재화를 위한 대량 분리 및 유효물질의 특성 구명
3. 유방암 억제 효능과 천연 phytoestrogen 효능을 지닌 기능성 제품 개발

### 제 2 세부 : Phytoestrogen의 활성평가 및 유방암 억제 기능 연구분야(협동)

1. 신속, 정확한 호르몬검색법을 이용한 phytoestrogen의 활성평가
2. *in vivo*, *in vitro* 검색법을 이용한 유방암억제 물질탐색
3. 유효성을 가진 물질의 유방암억제관련 기전연구

### 제 3 세부 : Phytoestrogen계 소재의 갱년기 개선 효능평가분야

1. 갱년기 개선에 관한 생체 효능 평가를 위한 동물모델 및 biomarker 확립
2. 선별 소재 추출물의 갱년기 개선 효능 평가
3. 유효 소재의 호르몬대체요법으로의 효능 평가
4. 골아세포 증식과 골대사에 미치는 효능 평가(위탁)

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1. Phytoestrogen 연구의 국내외 현황

Phytoestrogen이라는 명칭은 식물유래의 물질들이 포유류의 에스트로젠 수용체에 부분적인 estrogen agonism을 나타내기 때문이며 1954년 에스트로젠 활성을 가진 식물은 53종이 포함되어 있었으나 계속 진행되는 연구를 통하여 1975년에는 300여종 이상으로 확대되었고 현재는 1000여종에 이를 것으로 추정하고 있다. 이중 최근의 관심은 식이에 포함되는 phytoestrogen 급원에 집중되어 있으며 만성질환 예방을 위한 식생활의 중요성을 인식하고 식품 또는 원료소재에 대한 phytoestrogen의 분석 및 database화 연구가 미국, 유럽 등에서 국가의 지원으로 진행되고 있다.

Phytoestrogen은 크게 3 group 즉, isoflavones, coumestans, lignans이 잘 알려져 있다. 자연적으로 존재하는 가장 강력한 에스트로젠인 17 $\beta$ -estradiol과 비교하면 phytoestrogen은 에스트로젠 수용체와의 결합이 충분하도록 17 $\beta$ -estradiol과 구조상의 유사성이 있다. 그러나 결합시간 및 수용체에 대한 친화력은 17 $\beta$ -estradiol과 비교하여 상당히 떨어지며, A환의 OH기 유무만이 차이가 나는 isoflavones인 genistein과 daidzein간에도 차이가 커서 두분자의 생리기능에 매우 큰 영향을 미친다고 보고되었다. coumestrol의 환구조는 이소플라본의 환구조보다 실제 에스트로젠과 유사성이 더 크다. Phytoestrogen이 효과를 발휘하는 기작은 확실히 밝혀지지는 않았으나 많은 연구들을 통하여, 에스트로젠 수용체를 매개로 하는 약한 길항작용이 일련의 세포내 반응을 유도하고 세포주기 활성 조절에 관여한다는 것과, 세포막 수용체를 매개로 한 효능 등 몇가지 가능성들이 제시되었다.

역학연구에 의하면 아시아계 여성은 서양 여성에 비하여 호르몬 관련 암의 발병율이 낮고 호르몬과 연관이 깊은 골다공증, 순환기 질환, 폐경기 증상이 적다고 보고되었다. 이는 아시아권의 콩 섭취와 관련이 있다고 알려져 콩의 이소플라본에 대한 많은 연구를 유도하게 하였다. 많은 역학조사들이 대두의 섭취가 유방암, 대장암, 골다공증, 폐경기 증후군 및 관상심장질환을 포함한 여러 질병의 위험률을 감소시킨다고 밝히고 있다. 대두에 존재하는 이소플라

본인 제니스테인은 약한 에스트로겐 활성과 항에스트로겐 활성을 가지고, 항산화 효과, 토포아이소머레이즈 II와 angiogenesis 억제 효과 및 세포분화를 유도하는 성질을 가지는 것으로 보고되었다.

Lignan류의 phytoestrogen은 심질환 및 골다공증 억제 효과가 연구되었는데 아마씨(flaxseed)의 secoisolariciresinol이 연구되었으며, 국내에서는 홍화 lignan류가 난소절제 쥐에서 뼈조직 보존효과가 우수하였다고 보고되었다. 이 효과는 secoisolariciresinol보다 우수한 것으로 나타났으며 최근 외국의 식물성 에스트로겐 섭취조사에 의하면 lignan류의 섭취가 isoflavone 섭취량보다 거의 같거나 더 높은 것으로 나타나 lignan류의 관심이 증가되고 있다.

한국 여성의 제 1사망원인은 심혈관 질환으로 특히 폐경이후 그 위험이 급증하며 주요원인은 노화로 인한 여성 호르몬 결핍이 지적되고 있다. 호르몬 대체요법은 심혈관질환 예방에 효과가 있으나 자궁내막암과 유방암의 위험을 증가시킬 수 있다는 우려가 크다. Phytoestrogen은 estrogen의 부작용을 최소화 하면서 심혈관계에 대한 장점은 유지할 것으로 기대되고 있다. 지금까지의 연구는 대두 등에 함유된 phytoestrogen이 단백질과 함께 혈중 lipid profile을 개선시켜 혈청 콜레스테롤 함량을 저하시키고 HDL 콜레스테롤을 상승시킨다는 연구에 집중 투자되었다. LDL 수용체 관련 연구, ApoA-1 단백질 및 지단백 리파제와 관련된 기전 연구는 아직 불충분한 실정이다.

체내에서 에스트로겐은 혈관 이완, 혈관세포 증식 억제, 기질 단백질 축적 억제 및 신생혈관 증가에 작용하므로 결핍되면 혈관손상 및 동맥경화가 유도된다. 식물 유래 Phytoestrogen은 혈관 내피세포 확장 및 내피세포 증식을 촉진하는 작용이 있는 것으로 보고되어 있으며 작약의 monoterpene glycoside인 paeoniflorin을 중심으로 일부 보고되어 있다.

## 2. 유방암과 phytoestrogen

유방암은 서구 지역의 여성들에게서 가장 흔한 암이다. 유방암의 위험은 나이가 증가하면서 확실히 증가하나, 발달 양상은 주로 난소의 기능과 관련된 호르몬과 밀접하게 관련되어 있다. antiestrogen인 타목시펜은 실질적으로 2년간 유방암 사망률을 20% 감소시킨다. 유방암 위험이 있는 여성들은 호르

문 요법의 위험이 증가하기 때문에 고려하지 않고 있다. 대체 방법으로 phytoestrogen이 유방암을 실제적으로 예방할 수 있는 가능성이 점차 커지고 있다.

아시아 여성들은 서구여성에 비해 유방암 발병 위험이 유의적으로 감소한다는 역학 조사에서 아시아 여성들이 이소플라본이 풍부한 콩을 많이 섭취해서 발병 차이가 생겨났다는 이론이 생겨났다. 암 위험과 식이를 평가하는 observational 조사에서 섭취, 뇨 배설량과 관련해서, 유방암 발병 위험과 콩 이소플라본 사이에 유의적으로 음의 상관관계가 있음을 밝혀냈다. USA로 이주한 아시아 여성에서 서구 식이를 채택함으로써 유방암 발병 위험이 낮은 것이 없어졌다. 서구 지역으로 이민 간 아시아 여성들이 세대가 지날수록 유방암 발병의 위험이 증가하였다. 적어도 부분적으로 환경적 요인이 암 발생을 줄일 수 있다는 것을 시사한다. 콩은 잠재적으로 antiestrogenic 특성을 가지고 있으며, 연구자들은 아시아인의 식이 성분이 위험요인이 낮은 이유로 설명하고 있다. 이소플라본과 유방암에 관한 인간을 대상으로 한 실험은 없으나, 다양한 역학 조사가 행해졌다. 싱가포르에 있는 중국 여성들은 콩 섭취와 유방암 발생 간에 유의적으로 음의 상관관계를 나타냈다. 폐경 전, 후의 여성을 각각 분석했을 때, 나이가 젊은 그룹에서 유의적으로 효과가 더 나타났다. 폐경기 전인 아시아계 미국 여성은 콩 섭취와 유방암 발병 간에 유의적으로 음의 상관관계를 나타냈다. 이 데이터를 더 분석했을 때, 서구지역에서 태어난 여성 보다는 아시아에서 이주한 사람에게 더 적합했다.

어떤 호주 연구팀은 식이 회상(diet recall)보다는 뇨의 이소플라본 배출을 조사하여, 이것이 이소플라본 섭취와 타당한 관련이 있음을 밝혀냈다. 유방암 발병과 equol 배출 간에 유의적으로 음의 관련성이 있음을 밝혀냈다. phytoestrogen 섭취와 유방암 위험 감소간의 관련성은 폐경기 전 암과 아시아에서 서구로 이주한 사람들을 조사하면 명확해진다. 아시아계 여성들은 수명이 길며, 서구여성보다 낮은 estradiol수준을 갖고 있다. 역학조사 중 phytoestrogen이 유방암을 촉진시킨다는 결과는 없다.

리그난은 또한 관찰된 결과를 토대로 유방암 위험을 감소시키는 것에 대한 기여도로 주목을 받고 있다. 잡식 주의자에 비해 상대적으로 유방암 발병 위

험이 적은 채식주의자는 또한 유의적으로 리그난의 식이 섭취량과 뇨 배설량이 많았다. 뇨의 enterodiol과 enterolactone은 폐경기 유방암 환자에서 유의적으로 낮았다. 게다가, 유방암 위험, 식이 리그난, enterolactone, enterodiol, 총 리그난의 뇨중 농도 뿐 아니라 혈중 enterolactone과 유의적으로 음의 상관관계를 가진다. 이러한 결과와 일치하게 flax와 정제된 리그난의 섭취는 설치류에서 mammary 암의 위험을 줄인다고 한다.

이러한 연구에도 불구하고, phytoestrogen 섭취와 뇨중 배설에 관련된 유방암 위험에 관한 역학 조사는 일치하지 않는다. 유방암 위험은 다인종 미국 여성이 관련된 case-control 조사에서 이소플라본이나 리그난 섭취에 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 마지막으로 폐경기 독일 여성을 대상으로 prospective study에서 뇨중 genistein과 enterolactone과 유방암 사이에 유의적으로 관찰되지 않았다. phytoestrogen이 유방암 감소에 기여하는 잠재적 메커니즘에 대한 실질적 노력이 행해지고 있다. 유방암의 생식 호르몬과의 관련성은 phytoestrogen이 내인성 호르몬과 구조적으로 유사하며, phytoestrogen이 estrogen receptor와 결합할 수 있는 능력은 하나의 가능성으로 phytoestrogen의 hormonal, anti-hormonal 영향의 이론적 근거가 된다. 비록 순환하는 생식 호르몬에 대한 콩 섭취의 영향에 대한 인간의 intervention 조사는 일치하지 않는다. 뇨의 호르몬에 미치는 영향은 콩과 flax를 섭취하면서 유방암 위험 감소, 2-hydroxyestrone과 16 $\alpha$ -hydroxyestrone의 비율의 증가는 에스트로젠 대사물의 유의적 변화가 있음을 나타낸다.

피토에스트로젠이 유방암 위험을 방어하는 다른 잠재적 메커니즘은 에스트로젠 수용체와 무관하다. In vitro 연구는 이소플라본과 리그난 모두 aromatase와 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase를 포함하는, 스테로이드 호르몬 합성에 관련된 호르몬을 억제할 수 있는 것으로 나타났다. genistein은 protein tyrosine kinase, DNA topoisomerase와 angiogenesis를 억제할 수 있으며, 항산화 작용을 발휘한다.

피토에스트로젠이 유방암과 관련된 메커니즘을 측정하는 것은 많은 요인들에 의해 복잡해진다. 그 중 하나는 노출된 나이이다. Lamartiniere et al.에 의

한 동물 실험에서, genistein을 사춘기 전, 그리고 성인기에 다시 노출시킨 성인 rat에서 화학적으로 유방암을 유도했을 때 최대의 방어를 나타내었다. 이러한 결과는 최근의 두 가지 사례, 비교 연구에서 청년기에 이소플라본이 풍부한 콩 식품을 접하면 어른이 되면서 유방암 위험이 감소한다는 것과 연관되어 있다.

### 3. 골다공증 및 폐경기 증상과 phytoestrogen

폐경기 이후 에스트로젠 생산 감소는 주요한 요인으로, 폐경기 이후 여성에게 골건강과 골다공증의 위험과 밀접히 관련되어 있다. 호르몬 대체 요법은 폐경기에서 에스트로젠 감소를 줄일 수 있으며, 식이 대체 요법에 실질적 관심이 있다. 이러한 점에서, 피토에스트로젠은 뼈의 건강과 관련해서 상당한 관심을 끌고 있다. 특히 이소플라본과 관련해서, 합성 이소플라본인 ipriflavone은 폐경기 여성에서 골손실을 효율적으로 줄이는 것으로 나타났다. 피토에스트로젠과 골다공증 위험의 잠재적 관련성이 있다는 것은 아시아 여성이 백인 여성에 비해 엉덩이 골절(hip fracture)의 수가 유의적으로 낮은 관찰에서 기인한다. 피토에스트로젠이 뼈에 미치는 영향에 관한 역학 조사 중 직접적으로 피토에스트로젠 식이 섭취와 골질량, 골질의 연관성에 대해 확인한 바는 없다. 인구에 기초한 접근에서 간접적 방법을 사용하여, 이소플라본이 풍부한 식이와 그와 유사한 피토에스트로젠이 bone parameters에 미치는 잠재적 영향을 측정해 왔다. 폐경기 전과 후의 여성에게 콩을 섭취하는 것과 골질량과 관련해서 많은 관측 결과 일반적으로 유의적으로 양의 상관관계를 갖는 것으로 보고 되었으나, 일부 조사에서는 관련성이 없었다. 관측된 조사로부터의 증거 뿐 아니라, 골질량과 골대사의 biomarker에 대한 phytoestrogen 섭취의 영향을 평가하는 인간 중재 연구(intervention study)가 있다. 골질량에 대한 어떤 연구는 요추(lumbar spine)의 골질량에 특이적으로 콩과 콩 이소플라본이 positive 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다. 골 formation과 resorption의 markers를 평가하는 조사는 다소 일치하지 않는다. 골 건강과 관련해서 유익한 영향을 보고하며, 다른 것은 유의적 영향을 미치지 못하거나, 영향이 임상적 관련성에서 너무 작은 것으로 나타났다.

가장 최근에, 콩 섭취의 영향은 폐경기 여성에서 호르몬 요법은 받은 것과 비교되었다. 콩은 bone turnover를 감소시키는 데 있어서, 호르몬 대체 요법만큼 효과적이지 않았으며, osteoblastic activity를 촉진시켰다.

여러 가지 *in vitro*, 동물 실험은 phytoestrogen이 폐경기 골손실을 예방하는 것으로 나타났다. genistein은 난소절제 쥐에서 뼈에 anabolic 효과를 나타낸다. 66명의 폐경기 여성을 대상으로 6개월간, 이중 맹검(double blind)와 위약 대조(placebo-controlled) 조사를 실시하였다. 90mg의 이소플라본을 함유한 Isolated soy protein은 기존보다 요추 골밀도를 2.2% 증가시켰다. 이 차이는 통계적으로 유의적이었다. 69명의 폐경기에 근접한 여성을 대상으로 매일 식이에서 80mg phytoestrogen을 섭취해서 요추 골 손실을 예방했다. 반면, 플라시보 그룹에서 1.28%의 손실을 보였다.

리그난과 뼈의 건강의 관련성에 관한 이용 가능한 데이터는 적다. 한국 폐경기 여성에서 뇨의 enterolactone과 골질량 사이에 유의적으로 positive 관련성을 보여주는 역학 연구 결과에도 불구하고, 중재 연구에서는 3개월 간 flaxseed 섭취로 bone turnover marker에 어떠한 유의적 영향을 미치지 못했고, 건강한 미국 폐경기 여성에서 골 미네랄 조성의 유의적 증가가 일어나지 않았다.

화끈거림과 같은 폐경기와 관련된 증상을 완화시키는 phytoestrogen의 가능성은 활발한 분야이며, 호르몬 대체 요법의 식이 대체요법으로서, 이소플라본이 풍부한 콩이나 이소플라본 보충의 효능과 관련된다. 아시아 여성들은 서구 여성들보다 상대적으로 낮은 폐경기 증후군을 가지며, 이러한 차이는 특히 이소플라본 같은 높은 피토에스트로젠 섭취 때문으로 생각되고 있다. 콩 섭취는 아시아 여성의 cross-sectional, prospective study에서 안면 홍조(hot flush)의 수와 유의적으로 음의 상관성을 갖는 것으로 나타났다. 폐경기 근처, 폐경 후 여성을 대상으로 한 중재 연구에서, 콩 섭취를 함으로써 안면 홍조가 감소함을 보고하였다. 그러나, 많은 조사에서, 관찰된 대조군에 비해, 유의적으로 큰 감소를 나타내지 않았다. 확연히 강한 위약 효과(placebo effect)는 진실한 위약 효과와 시간이 지나면서 자연적으로 일어나는 혈관운동 감소 때문으로 생각된다. 이러한 것에도 불구하고 일부 빈도에서, 플라시

보에 비해 콩을 섭취한 그룹의 화끈거림의 빈도와 중증의 유의적 감소를 발견해 냈다. 비록, 관측된 일부 변화의 임상적 변화는 논란의 여지가 있다. 많은 중재 연구 결과는 또한 이소플라본 추출물을 사용하여, 일관되지 않는 결과를 나타낸다. 일부 조사는 유의적으로 적은 화끈거림을 보고하였으나, 다른 보고는 확실한 위약 효과에 부차적으로 어떤 유의적 영향을 보이지 않았다.

화끈거림에 대한 리그난의 영향은 널리 조사되지 않았다. Dalais et al 은 flaxseed를 중재 연구에서 처리군으로 포함하여 피토에스트로젠의 영향을 평가하였으며, 이것이 화끈거림을 감소시킨다는 것을 발견하였다. 콩과 밀 그룹간의 유의적인 차이는 있지 않았다. Flaxseed는 또한 Brzezinski et al에 의해 중재(intervention)의 한 부분으로 포함되었다. 통계적으로 화끈거림의 유의적 감소가 관찰되었으나, 콩 제품과 혼합하여 섭취했으므로 flaxseed에 직접적으로 기인함은 아니다.

이외에, phytoestrogen은 약한 estrogen agonist로 작용하며, 낮은 에스트로젠 농도에서 가장 강력한 영향을 미친다. phytoestrogen으로 폐경기 여성의 hypoestrogenic symptom을 극복할 수 있는 지 많은 시도가 있었다. 12주간 콩단백을 보충했을 때, 화끈 거림은 45% 감소되는 것으로 나타났다. casein protein 대조군으로 얻은 30%감소보다 유의적으로 더 컸다. 여성의 주관적인 질 건조증(vaginal dryness)의 인식은 식이로 콩제품을 섭취했을 때, 유의적으로 향상되는 것으로 나타났다.

#### 4. 현 기술 상태의 취약부분

현재까지의 연구에서 식물성 에스트로젠은 대두 isoflavone 류만이 강조되어 왔으며 대두외 많은 식물 자원 및 식이급원에 함유된 식물성 에스트로젠 급원들로 확대 연구가 필요하다. 우수한 phytoestrogen이 다량 함유된 고유 작물을 계속 발굴하고 그 생리작용 기전을 규명하여 호르몬 의존성 질환 및 만성 교령화 질환 예방 및 치료를 위한 기능성 식품으로 활용하는 연구가 시급히 필요하다. 특히 국내에는 민간요법과 한방에 근거한 식이치료의 빈도가 높으므로 과학적인 효능을 뒷받침하는 연구가 필요하다.

유방암의 경우 유전요인은 10-15%만이 관여하는 것으로 알려져 있으므로,

화학물질, 영양, 생활습관 등 환경요인이 여성의 유방암 발병에 중요한 역할을 할 것으로 여겨지고 있다. 그러나 유방암의 경우 다른 만성질환과 달리 식품을 통하여 방어해 보려는 연구는 거의 없는 실정이므로 이에 대한 연구가 필요하다.

한편, 외인성 에스트로젠 혹은 environmental estrogens으로 알려진 내분비계 교란물질과 일부 phytoestrogen이 여성호르몬인 에스트로젠 유사 활성을 지닌 채 생식기 독성을 비롯한 여러 부작용 및 유방암 유발한다고 보고되기도 하므로 식물성 에스트로겐의 안전성 확보를 위한 심층 연구가 필요하다. 이를 위하여 정확한 활성평가법과 부작용 검출법을 적용하고 질환모델에 대한 효능을 입증하며 작용기전 연구가 뒷받침되어야 할 것이다.

## 제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

### 제 1 절 재료 및 방법

#### 1. Phytoestrogen 소재 탐색 및 효능 소재 선별

##### 가. 대상 시료

Phytoestrogen 소재를 검색하기 위한 천연물 시료는 주로 식품공전에서 식품원료로 사용 가능한 것으로 등재된 것 또는 일상적으로 널리 식품으로 이용되는 식물성 원료와 민간에서 여성활력 증진 효과가 있다고 알려진 원료 중에서 선정하였다. 문헌 고찰을 토대로 1차 시료 65종, 2차 시료 56종을 선별하여 영동약업사(성남), 하나로마트(성남)에서 건조된 형태의 규격품을 구입하였다. 시료의 종류는 결과 및 고찰 항의 Table 1, 2에 제시하였으며 시료 표면에 잔류할 수 있는 농약류 등에 의한 에스트로젠 활성 간섭을 배제시키기 위해 3회 초음파 세척 후 다시 건조시켰다.

##### 나. 활성평가를 위한 추출물 제조

시료 15g을 정확히 칭량하여 추출용기에 옮기고 80% 에탄올 150ml을 첨가한 후 환류 냉각장치를 이용하여 80℃에서 4시간 추출하였다. 각 시료의 에탄올 추출물은 여과지(whatman #2)상에서 여과한 후 감압농축하여 에탄올을 제거하고 동결건조하였으며 초기 시료무게를 기준으로 추출수율을 계산하였다.

##### 다. 유효소재의 특성 및 성분 분석

총 폴리페놀 정량을 위하여 동결 건조한 시료는 10mg을 취하여 70% 메탄올 10ml에 녹여 검액으로 사용하였다. 검액 100 $\mu$ l를 취해 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2ml와 잘 혼합하고, 2분간 반응시킨 후 50% folin 시약 100 $\mu$ l를 넣어 다시 30분간 반응시킨 다음 UV spectrophotometer(JASCO V-530)로 750nm에서 정량하였

다. (+)-catechin을 표준물질로 하여 환산하였다.

HPLC에 의한 후보식물군 추출물의 phytochemical compounds 분석을 위하여 estrogenic activity가 보고된 성분을 중심으로 YMC ODS C18 column, water/acetonitril, UV 254nm 조건과  $\mu$ -bondapak C18 column, 0.1% phosphoric acid/methanol, UV 280nm 조건으로 분석을 실시하였으며 HPLC chromatogram 비교를 통한 후보식물 추출물의 특성을 screening하였다.

## 2. 호르몬검색법을 이용한 phytoestrogen의 활성평가

가. 효모재조합검색시험법을 이용한 phytoestrogen의 활성평가

에스트로젠 수용체와 리포터 유전자인  $\beta$ -galactosidase가 도입된 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* ER+ LYS 8127(YER)를 성장배지에 넣은 후, shaking incubator (300rpm)에서 증식시켰다. 이 효모는 각각 CUP1 metallothionine promoter와 hER 유전자를 포함하는 vector와 리포터시스템으로 estrogen response element,  $\beta$ -gal 유전자를 안정적으로 발현한다. *S. cerevisiae* ER+ LYS 8217은 3.35g/ml yeast nitrogen base, 2% dextrose, 30 $\mu$ g/ml L-lysine-HCl, 35 $\mu$ g/ml L-histidine-HCl를 포함하는 성장배지에서 유지하였고, 성장배지에 20% glycerol 를 첨가하여 -80 $^{\circ}$ C 이하에서 보존하였다.

효모가 증식하면 신선한 배지로 적정 희석한 후 500 $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>를 첨가한 다음, 50ml 튜브에 적정량을 분주하였다. 각각의 물질을 처리하여 shaking incubator에서 18시간배양한 후, 신선한 배양액을 동일한 농도로 희석한 후 96-well plate에 100 $\mu$ l씩 분주하였다. 각 well에 Z buffer를 100 $\mu$ l씩 분주하고 20분 후 발색정도를 microplate ELISA reader를 이용하여 420nm와 590nm를 이용하여 측정하였다. 모든 자료의 통계는 SAS를 이용하여 ANOVA 분석 후, Dunnett't test를 유의수준 5%에서 분석하였다. 재조합 효모 검색법의 개략도는 다음과 같다.

*Saccharomyces cerevisiae* ER + LYS 8127

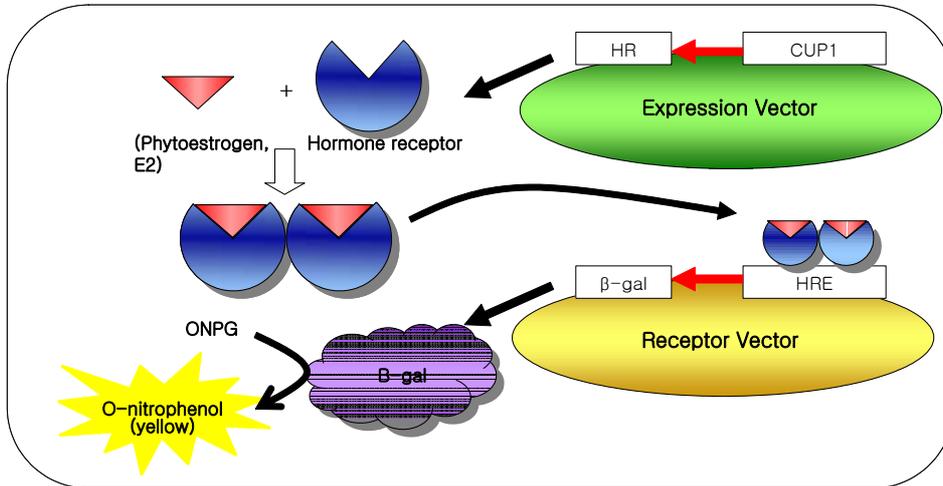


Fig. 1. Yeast ER transactivation assay ( $\beta$ -galactosidase assay).

나. 유방암세포 MCF-7을 이용한 phytoestrogen의 활성평가

5% Fetal Bovine Serum (FBS)과 1%의 PS antibiotic mixture가 첨가된 Phenol red-free D-media를 공급하여 유방암세포인 MCF-7세포를 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하였다.

시험에 사용되는 세포는 6-well culture plate에서 배양하고, 물질처리 시, 5% dextran-coated charcoal-stripped FBS와 1% PS antibiotic mixture에 물질을 원하는 농도로 희석하여 3일간 배양하였다. 그 기간동안 시험물질이 포함된 배지를 한번 교체해주고, 처치 3일째, NaOH를 처리하여 DNA content를 spectrophotometer를 이용하여 OD<sub>260nm</sub>값을 측정하였다.

다. HepG2 cell line을 이용한 phytoestrogen의 활성평가

에스트로젠 리셉터와 Luciferase 리포터유전자가 도입된 HepG2 human hepatoma cell은 5% dextran-coated charcoal-stripped FBS(fetal bovine serum)을 공급한 minimum essential medium Eagle (Sigma)에서 배양하였다.

HepG2 cell을 phenol red가 없고 5% dextran-coated charcoal-stripped FBS(fetal bovine serum)을 공급한 minimum essential medium Eagle (Sigma)에 5.0 X 10<sup>4</sup>/well의 밀도로 24well plate에 seeding한다. Cells을 37°C, 5% CO<sub>2</sub>상태의 incubator안에서 24시간 incubation시켰다. 그런 다음, 1.0µg C3-LUC, 0.5µg 에스트로젠리셉터 유전자와 함께 Superfect procedure (Qiagen)을 이용하여 5시간동안 transfection시켰다. Transfection된 cells을 phosphate buffered saline을 가지고 세척한 후, 처치물질을 신선한 배지에 첨가하여 처치하였다. 24시간 후, Reporter Lysis Buffer (Promega)로 cells을 용해시킨 후, 용해된 cell debris를 가지고 dual luciferase reporter assay system (Promega)을 이용하여 에스트로젠 활성을 측정하였다.

### 3. 식물 추출물이 골아세포 증식과 alkaline phosphatase(ALP) 활성도에 미치는 영향

#### 가. 세포 배양

쥐의 골육종 세포주인 ROS 17/2.8 세포는 10% FBS와 1% antibiotic-antimycotic (Gibco. BRL)이 함유된 D-MEM배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에 배양하였다.

Calvaria cell은 태어난 지 24시간 이내의 mouse를 이용하여 primary culture한 후 10% FBS와 1% antibiotic-antimycotic (Gibco. BRL)이 함유된  $\alpha$ -MEM배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에 배양하였다.

#### 나. MTT assay

후보식물 추출물이 골아세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolin bromide, MTT)의 대사 환원에 근거한 MTT assay를 이용하였다. ROS 17/2.8 세포는 well당  $4 \times 10^3$  개의 세포를 96 well 조직 배양 접시에 접종하였으며, calvaria 세포는 well당  $5 \times 10^3$  개의 세포를 96 well 조직 배양 접시에 접종하였다.

세포가 바닥에 부착하면 0.5% FBS가 함유된 배지로 갈아주어 24시간 동안 세포의 증식을 정지시켰다. 2.5% FBS가 함유된 배지에 phytoestrogen 화합물들은  $10^{-8} \sim 10^{-6}$  M의 농도로, 후보소재 추출물물은 2.5 ~ 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 48시간 동안 처리하고, 마지막 4시간 동안 50  $\mu\text{l}$  MTT (1.1 mg/ml) 용액을 각 well에 첨가하여 37°C에서 반응시켰다. MTT에 의해 형성된 보라빛의 침전물인 formazan crystal은 dimethyl-sulfoxide (DMSO) 150  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 녹인 다음 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 다. Alkaline Phosphatase (ALP) activity

식물에서 추출한 화합물이 골아세포의 분화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Alkaline Phosphatase (ALP) 활성도를 측정하였다. ROS 17/2.8 세포는 well 당  $5 \times 10^5$  개의 세포를 12 well 조직 배양 접시에 접종하였으며,

Calvaria 세포는 well당  $6 \times 10^5$ 개의 세포를 12 well 조직 배양 접시에 접종하였다. 세포가 바닥에 부착하며 .05% FBS가 함유된 배지로 갈아주어 24시간 동안 세포의 증식을 정지시켰다. 3% FBS가 함유된 배지에 식물 추출물들은 25 $\mu$ g/ml의 농도로 24시간 동안 처리하고, PBS로 씻어낸 후 well당 protein lysis buffer를 100 $\mu$ l를 첨가하였다. cell scraper로 긁어모은 후 centrifuge를 이용하여 protein을 모은 후에 각 protein 3 $\mu$ l 에 dH<sub>2</sub>O를 (297 $\mu$ l)를 넣고 5 mM의 PNPP(500 $\mu$ l), 5 mM MgCl<sub>2</sub> (100 $\mu$ l), 1M Tris-HCl (500 $\mu$ l)를 넣고 37°C에서 30분간 incubation 시켰다. 이 때 PNPP가 PNP로 바뀌어 노란색이 발색되는 것을 1N NaOH로 반응을 정지시킨 후 ELISA reader로 410 nm 에서 측정하였다.

#### 4. 갱년기 개선 효능 평가를 위한 동물 모델 및 biomarker 확립

##### 가. 실험동물의 사육 및 식이

생후 6주령된 Sprague-Dawley(SD)계 암컷 rat을 구입하여, 2주일간 적응시킨 후 체중에 따라 난괴법에 의해 군을 나누어 난소를 적출하였다. 대조군으로 난소를 제거하는 대신 복강절제만을 한 후 그대로 봉합한 sham군(n=10)을 두었다. 완전한 난소제거를 체외에서 확인하기 위해서 수술 후 2주 동안 질구검사(vaginal smear)를 실시하였으며, 발정기(estrous cycle)를 보이지 않는 개체만을 선별하여 실험에 사용하였다. 각 처리군은 sham(n=10), OVX(n=10), 1차 후보소재 GK 0.5% 투여군(n=8), GK 1% 투여군(n=8)으로 배치하였다.

실험식은 AIN93M식을 기준으로 하였으며, 80% 에탄올 추출물인 감초분말을 식이에 0, 0.5, 1% 함유된 3가지 식이(control, KL, KH)를 제조하여 실험동물을 6주간 사육하였다. 실험식의 성분조성은 Table 1과 같으며 Sham군과 OVX군은 control식을 주었으며, GK 0.5% 투여군은 KL식을, 감초 1% 투여군은 KH식을 주었다.

모든 실험동물은 부검일까지 주 1회 체중과 사료섭취량을 일정한 시간에 측정하였다. 식이효율(food efficiency ratio: FER)은 사육기간동안의 체중증가

량을 같은 기간동안 섭취한 식이량으로 나누어 산출하였다.

**Table 1. Composition of experimental diets(g/kg diet)**

Ingredient	AIN93M		
	control (g/kg)	KL (g/kg)	KH (g/kg)
Plant ext.		5	10
Casein	140	140	140
Sucrose	100	100	100
Corn starch	620.7	615.7	610.7
Soybean oil	40	40	40
Cellulose	50	50	50
Min-mix(AIN93)	35	35	35
Vit-mix(AIN93)	10	10	10
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5
L-Cystine	1.8	1.8	1.8

나. 시료의 채취

6주동안의 사육기간이 끝난 실험동물들을 24시간 절식(fasting) 시킨 후, 안구에서 혈액을 채취하고, 간장·신장·자궁·대퇴골을 적출하였다. 혈액은 3000rpm에서 10분간 원심분리(Hanil, microspin)하여 혈청을 분리하여 -70℃ deep freezer에 보관하였다. 적출된 간과 신장은 trimming 후 생리식염수에 세척하여 여과지로 표면의 수분을 제거한 후 무게를 측정하였으며, 자궁은 trimming 후 여과지로 표면의 수분을 제거한 뒤 무게를 측정(uterus weight) 하고, 자궁내 수분을 완전히 제거한 후의 무게(blotted weight)와 50℃에서 1시간 건조시킨 후 무게(dry weight)를 측정하였다. 간과 신장은 바로 -70℃ deep freezer에 보관하여 항산화 효소 활성과 지질 과산화물 측정에 사용하였으며, 대퇴골은 trimming하여 무게와 길이, 각 3군데(대퇴골두 아래 소전자부분의 가로, 대퇴골체 가로, 대퇴골체의 세로)의 두께를 측정하였다.

다. 혈액과 간의 중성지방, 총 콜레스테롤 농도 분석

혈청 시료와 간의 중성지방, 총 콜레스테롤, HDL, free cholesterol 농도를 측정하였다. 또한 혈청 내 estradiol concentration의 측정을 위해 Elisa test kit를 이용하였다.

라. 간과 신장에서의 Malondialdehyde 함량 분석

분석을 위하여 간 조직 1g당 9ml의 0.25M sucrose/0.5M EDTA buffer를 가하여 병냉하에 homogenizer로 분쇄하였으며, 이때 얻은 균질액을 600g에서 10분간 원심분리(Rotary vacuum evaporator R-144, Swiss)하여 상층액을 Thiobarbituric acid 함량 측정을 위한 효소원으로 사용하였다. 신장 조직은 0.5g당 5ml의 1.15M KCl buffer를 가하여 병냉하에 homogenizer로 분쇄하여, 600g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 분취하였다. 모든 효소원은 -70°C에서 보관하였다.

추출한 간과 신장의 효소원에 대한 malondialdehyde 함량은 Ohkwa법에 따라 532nm에서 정량하였으며, 이 때 농도범위는 2.5~20nmole의 1,1,3,3-tetramethoxy propane 표준용액을 사용하여 얻은 표준곡선으로부터 혈청의 MDA함량을 계산하였다.

마. 간 조직의 항산화 효소 분석

Catalase는 Abei의 방법에 준하여 측정하였으며 SOD는 Marklunds의 방법에 준하여 측정하였다. GPx는 Lawrence의 방법에 준하여 측정하였다. 간의 Catalase와 SOD/GPx 활성을 계산하는 데에 필요한 효소원의 단백질 함량은 Lowry법에 의하여 정량하였다.

## 5. 천연 phytoestrogen의 소재화를 위한 대량 분리 및 유효물질의 특성 구명

### 가. 추출조건 검토 및 추출물 대량 제조

유효소재로 나타난 GK 시료와 PL시료를 대상으로 동물실험 및 소재화를 위한 대량 추출을 실시하였다.

추출용매는 80% ethanol을 사용하였으며 추출시간별 수율 및 에탄올 농도를 변화시켜 40-60-80%로 단계적으로 1시간씩 추출했을 때의 수율을 비교하였다.

### 나. 용매 분획물의 제조 및 에스트로겐 활성 측정

동결 건조시킨 파고지 추출물을 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, aqueous로 연속 추출하여 농축, 동결 건조시켜 각각의 용매 분획물을 제조하였으며 수율을 계산하였다. 또한 재조합 효모 transactivation assay를 이용하여 에스트로겐 활성을 측정하였다.

### 다. TLC에 의한 분획

TLC에 의한 파고지 추출물의 분리 확인은 silica gel F254 plate(1010, 0.25mm, Merck, Germany)를 사용하였으며, 전개 용매는 chloroform 분획은 petroleum ether/ethylacetate (100:30), hexane 분획은 hexane/ethylacetate (100:25)의 혼합 용매를 사용하여 전개한 후 254 nm와 365 nm의 UV light하에서 관찰하여 Rf값을 구하여 spot을 구분하였다.

### 라. 실리카 겔과 Sephadex LH-20을 이용한 분획 및 유효 성분 확인

추출 과정에서 얻은 파고지 에탄올 추출물과 용매 분획을 Sephadex LH-20 column과 실리카 겔(silica gel 60, 70-230 mesh, Merck, Germany)을 주입한 open column (3\*15, OMG, Korea)에 각각 주입하고 순차적 용매 분획법(stepwise gradient elution)으로 얻은 분획을 모아서 에스트로겐 활성을 분석하였고 HPLC 분석을 실시하였다.

마. HPLC를 이용한 유효성분 분석

과고지 추출물 및 분획물을 대상으로 Zhao *et al.*(2005)의 방법을 응용한 조건에서 HPLC를 이용하여 분석하였다. HPLC 분석 조건은 Table 2와 같다.

바. LC/MS를 이용한 성분 분석

에스트로겐 활성을 나타낸 미지 peak의 확인을 위해 LC/MS로 분석하였다. LC/MS의 분석 조건은 Table 3과 같다.

**Table. Operating condition of HPLC**

Instrument	HP 1090 series II(Hewlett Packard)
	Solvent A ; water : acetic acid =100:0.1(v/v)
	Solvent B; acetonitrile
Solvent	0 min 60% A ~15min 50% A ~35min 40% A ~45min 30% A ~55min 20% A 55~60min maintain 20% A
Column	Nova-Pak C 18 (particle size 4 $\mu$ m, 3.9 $\times$ 150mm(i.d.))
Detector	UV detector, 245 nm
Flow rate	1.0 mL/min
injection volume	20 $\mu$ l

**Table . Condition of LC/MS for peak identification**

Instrument	Quattro LC triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometer	
Tuning parameters	ES+	
Source page(EESI)	Capillary	3.70 kVolts
	Cone	30 Volts
	Extractor	3 Volts
	RF lens	0.51 Volts
	Source block Temp.	80 $^{\circ}$ C
	Desolvation Temp.	200 $^{\circ}$ C
Flow	Neb Gas Flow	91 lit/hr
	Desol Gas Flow	473 lit/hr

## 6. *in vivo*, *in vitro* 검색법을 이용한 유방암억제 물질탐색

가. *in vitro* 검색법인 MTT assay를 이용한 유방암억제 물질탐색

5% Fetal Bovine Serum (FBS)과 1%의 PSN antibiotic mixture가 첨가된 Phenol red-free D-media를 공급하여 유방암세포인 MCF-7세포를 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하였다.

시험에 사용되는 세포는 96-well culture plate에서 배양하고, 물질처리 시, 5% dextran-coated charcoal-stripped FBS와 1% PSN antibiotic mixture에 시험물질을 원하는 농도로 희석하여 3일간 처리 배양한다. 그 기간동안 시험물질이 포함된 배지를 한번 교체해주고, 처리 3일째, MTT solution을 포함한 희석액으로 교체한 후 차광하여 5시간동안 incubation시킨다. 용액을 제거한 후 DMSO를 넣어 ELISA reader로 540 nm 에서 측정하였다.

나. Nude mice를 이용한 유방암억제 물질탐색

실험동물로는 6주령의 누드 마우스를 사용하였다. 실험동물이 준비되면 7일 동안 순화기관을 거친 후 *in vitro* 시험법에서 가장 유방암 억제효과가 있었던 시험물질을 2개 선정하여 투여하였다. 시험물질 투여 일주일 후 10<sup>7</sup> cells/0.1ml의 사람의 유방암세포를 각 마우스에 0.3ml (3×10<sup>7</sup> cells)을 주입한다. 60일간 관찰 하고 그 동안 일주일에 두 번씩 종양의 부피와 체중, 사료량을 측정하였으며 시험이 종료된 후 부검하였다. 부검 시, 종양에 있는 액체나, 지방을 깨끗이 분리한 다음, 무게를 측정하고, 10 % 포르말린에 고정한 다음 통상적인 방법을 거쳐 조직표본을 작성하고 병리조직학적검사를 실시하였다. 시험 중 측정된 시험동물의 체중 등에 관한 자료의 통계학적 분석을 위하여 one-way ANOVA를 실시하여 p=0.05 수준에서 군간 유의성을 검정하였고 유의성이 인정되면, Dunnett's t-test를 실행하여 대조군과 시험군간의 통계학적 유의성을 검정하였다 (p<0.05).

## 7. 유효소재의 유방암억제관련 기전연구

가. 유효물질에 의한 세포사과정의 관찰

유효활성이 확인된 물질의 증식억제 기전을 규명하기 위해서 유방암 세포인 MCF-7세포를 이용하고, 세포는 5% fetal bovine serum(FBS)를 공급한 Phenol red-free D-media에서 배양하였다. 세포의 사멸 형태 중 가장 빈번히 발생하는 핵의 손상과 사멸을 알아보기 위한 방법으로 대표적인 Hoechst 33258 staining과 DNA ladder assay를 실시하여 세포사멸을 관찰하였다.

(1) Hoechst 33258 staining : 유효물질을 처리한 MCF-7 유방암 세포와 PC-3 전립선암세포에 PBS로 3회 세척하고 4% formaldefyde(formalin)에 20분간 고정하였다. PBS로 3회 세척 후 Hoechst 33258 용액을 1 ug/ml이 되도록 처리한 후 15분간 incubation 시켰다. 다음 PBS로 2회 세척하고 형광 현미경 UV filter로 DNA fragmentation을 관찰하였다.

(2) DNA ladder assay : 유효물질을 처리한 MCF-7 유방암 세포와 PC-3 전립선암 세포에 PBS로 2회 세척하고 세포를 수거한후 lysis buffer(10 mM tris-HCl pH 7.5, 10mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.4% SDS, proteinase K (final concentration 100ug/ml))이용하여 lysis 시켰다. 50℃에서 overnight 시킨다음 phebol : chloroform : isoamylalcohol = 25 : 24 : 1의 비율로 400 ul씩 첨가하여 12,000 rpm에서 5분간 원심분리시키 후 상층액만 수거하는 과정을 3회 되풀이하고 isopropanol을 섞어 DNA 균주가 보일때까지 섞고 -20℃에서 1시간동안 보관하였다. Isopropanol을 완전히 제거한 후 DNA pellet에 100% alcohol을 첨가한 후 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하는 과정을 3회 되풀이하였다. 충분히 건조시킨 DNA pellet을 1X Agarose gel loading buffer와 RNase A를 첨가하여 용해시킨다음 Agarose gel에 전기영동시켜 EtBr에 20분간 담근후 세척하여

GelDoc을 이용하여 촬영하여 세포사 과정후 발현하는 사다리모양의 밴드를 관찰하였다.

#### 나. 유효물질의 세포주기에 미치는 영향분석

DNA content와 flow cytometry를 이용하여 세포의 세포주기를 분석하였다. 먼저 세포를 배양하여 물질을 처치한 후, trypsin을 이용하여 부착한 MCF-7 세포를 플라스크에서 띄어내어 single cell로 부유시켰다. 부유한 세포에 1ml의 차가운 citrate buffer를 첨가시키고, 1800rpm, 5min 원심분리한다. 0.1ml citrate buffer로 세포를 재부유시킨 후, 0.4ml의 PI solution과 5ul의 RNase A를 첨가한 다음, 부드럽게 혼합하였다. 어두운 곳에서 상온, 15분간 방치시킨 뒤, 염색 후 3시간 안에 샘플을 분석하였다.

#### 다. 세포사 및 세포주기 관련 세포내 신호전달기전 규명

세포사멸에 대한 종양억제 단백질인 p53 단백질과 세포내 항산화 단백질인 bcl-2의 변화를 관찰하였다. 또한 세포사멸에 의해 cytochrome C가 핵에서 세포질로 방출되고 이렇게 방출된 cytochrome C에 의해 caspase-3가 활성화된다는 사실을 Western blotting을 통하여 관찰하였고 인산화 정도의 차이에 따른 band의 변화 등을 관찰하였다. Signal transduction과 관련한 MPAK kinase, PI3K등의 경로와 관련한 단백질 발현을 확인하였으며, 세포주기와 관련한 cyclin D등의 단백질의 변화를 알아보았다. 이때 whole protein extract제조 및 Western blotting은 다음과 같이 실시하였다. 배양한 세포를 군에 따라 물질 처치를 실시하고 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 1uM leupetin, 1uM antipain, 0.1 uM sodium orthovanadate, 5mM sodium fluoride이 포함된 20% SDS를 이용하여 10초씩 6번 sonication을 실시하고 DC protein kit(Bio-Rad)를 이용하여 단백질을 정량하였다. 단백질을 12.5% SDS polyacrylamide gels에 200V에서 1시간동안 분리하고 100V, 350mA에서 PVDF membranes에 1시간동안 transfer 시켰다. 이 membrane은 5% dried skim milk가 포함된 T-PBS를 이용하여 washing한다. primary antibody와 secondary

antibody를 1시간동안 차례로 incubation하고 각 단계마다 T-PBS를 이용하여 4회씩 washing 해주었다. 또한 ECL chemiluminiscenct detection reagent를 이용하여 detection하고 membrane은 X-ray film에 15초에서 1분간 상태에 따라 노출시켰다.

## 8. 선발 소재의 갱년기 개선 효능 평가

### 가. 실험동물의 사육 및 식이

생후 4주령 된 Sprague-Dawley(SD)계 암컷 rat을 구입하여, 3일간 적응시킨 후 체중에 따라 난괴법에 의해 9군(sham, OVX, OE, GL, GH, PL, PH, PLⅡ, PHⅡ)으로 나누어 난소적출 이전부터 실험 식이를 공급하였다. 식이 공급 6주째에 난소를 적출하였으며, 완전한 난소제거를 체외에서 확인하기 위해서 수술 후 열흘 동안 질구검사(vaginal smear)를 실시하였으며, 발정기(estrus cycle)를 보이는 개체는 선별해 내고 실험에 사용하였다.

실험식은 AIN93M식을 기준으로 하였으며, 80% 에탄올 추출물인 GK 추출분말, PL 추출분말을 식이에 0, 0.5, 1% 함유된 5가지 식이(control, GL, GH, PL, PH)를 제조하여 실험동물을 총 12주간 (난소절제 전 6주, 절제 후 6주) 사육하였다.

실험식의 공급은 난소적출 전부터 12주 동안 계속적으로 공급한 군(GL, GH, PL, PH군)과 난소적출시기까지 일반식이(control식이)를 공급하다가 질구검사에 의해 선별된 후, PL 시료식을 공급한 군(PLⅡ, PHⅡ)으로 구분하였다. 그 외 Sham군과 OVX군 그리고 OE군은 control식을 주었으며, OE군은 난소적출 후 질구검사를 통해 선별된 개체에게만 control diet와 함께 17 $\beta$ -estradiol 20 $\mu$ g/kg를 주 7회 같은 시각에 피하주사하였다.

Table 4. Composition of experimental diets(g/kg diet)

Ingredient	AIN93M		
	Control	GL/PL	GH/PH
GK / PL powder		5	10
Casein	140	140	140
Sucrose	100	100	100
Corn starch	620.7	615.7	610.7
Soybean oil	40	40	40
Cellulose	50	50	50
Min-mix <sup>1)</sup>	35	35	35
Vit-mix <sup>2)</sup>	10	10	10
Choline biartrate	2.5	2.5	2.5
L-Cystine	1.8	1.8	1.8

1) Mineral mixture(per kg): Calcium carbonate, 357g; monopotassium phosphate, 196g; Potassium citrate, 70.78g; Sodium chloride, 74g; Magnesium oxide, 24g; Ferric citrate, 6.06g; Zinc carbonate, 1.65g; Manganous carbonate, 0.63g; Cupric carbonate, 0.30g; Potassium iodate, 0.01g; Ammonium paramolybdate, 0.00785g; Powdered sucrose, 269.56215g

2) Vitamin mixture(per kg): Nicotinic acid, 3.0g; Ca Pantothenate, 1.6g; Pyridoxine HCl, 0.7g; Thiamin HCl, 0.6g; Riboflavin, 0.6g; Folic acid, 0.2g; D-Biotin, 0.02g; Vitamin B<sub>12</sub>, 2.5g; Vitamin E, 15.0g; Vitamin A, 0.8g; Vitamin D<sub>3</sub>, 0.25g; Vitamin K, 0.075g; Powdered sucrose, 974.655g

#### 나. 시료의 채취

난소적출 후 6주 동안의 사육기간이 끝난 실험동물들을 24시간 절식(fasting) 시킨 후, 복부대정맥에서 혈액을 채취하고 혈청 중 지질대사 지표물질을 측정하였다. 간장·신장·자궁·대퇴골을 적출하여, 간과 신장은 trimming 후 생리식염수에 세척하여 여과지로 표면의 수분을 제거한 후 무게를 측정하였으며, 자궁은 trimming 후 여과지로 표면의 수분을 제거한 뒤 무게를 측정(uterus weight)하고, 자궁 내 수분을 완전히 제거한 후의 무게(blotted weight)와 50℃에서 만 하루동안 건조시킨 후 무게(dry weight)를 측정하였다. 간과 신장은 항산화 효소 활성과 지질 과산화물 측정에 사용하였다.

다. 혈액과 간의 중성지방, 총 콜레스테롤 농도 분석  
4의 다항과 같이 측정하였다.

라. 간과 신장에서의 Molondialdehyde 함량 분석  
4의 라항과 같이 측정하였다.

마. 간 조직의 항산화 효소 분석  
4의 마항과 같이 측정하였다.

바. 골밀도 및 뼈의 조직학적 변화 측정

대퇴골은 trimming하여 무게와 길이, 각 3군데(대퇴골두 아래 소전자부분의 가로, 대퇴골체 가로, 대퇴골체의 세로)의 두께를 측정하였으며 골밀도 측정기로 골밀도를 측정하였다. 골의 조직학적 분석을 위하여 경골(tibia)을 분리하여, 골조직은 하루정도 3% formalin 용액에 담귀 고정시킨 다음 3주간 decalcification 용액에서 흔들어주면서 탈회시켰다. 탈회가 끝난 골조직은 파라인 포매하여 5  $\mu$ l 단위로 잘라 슬라이드에 붙인 후 hematoxylin-eosin (H & E) 염색을 실시하였다.

## 9. 유방암 억제 효능이 부가된 phytoestrogen을 이용한 기능성 제품 개발

가. 탈색 및 탈취 공정 실험

선발소재 추출물 중 과고지 시료의 경우 색이 매우 진하고 특유의 향이 존재하여 가공 및 제품화에 제한 요인으로 작용하므로 탈색 및 탈취공정을 적용하고자 활성탄(activated carbon) 6종, 백토(clay) 4종을 처리하여 유효성분의 제거 여부를 확인하면서 가공적성을 높이고자 실험하였다.

Activated carbon은 No. 8556, No. 8557, No. 8544, No. 8545, 탈색·탈취용 활성탄, 탈색용 활성탄 (MSC. Co., Ltd)을 사용하였다. Clay는 Fuller's Earth No. 16068-02, 산성백토, Clay acid (Japanese acid clay) No.

881393, Japanese acid clay (19725/1310), Clay activated (19828/1309)를 사용하였다.

#### 나. 선발 소재를 이용한 기능성 제품 개발

##### (1) 음료의 제조

감초농축액(55°Bx), 배(69°Bx), 사과(65°Bx), 포도(65°Bx) 등 과실농축액과 대추 농축액(65°Bx) 등의 농축액은 대안상사(한국) 제품을, 석류농축액(65°Bx)은 동일산업(한국) 제품을, 고과당은 대상(한국) 제품을, 구연산 및 비타민 C는 대홍약품(한국)의 식품 첨가물급을, 레몬향은 보락(한국) 제품을 구입하여 사용하였다.

감초농축액과 고과당을 이용하여 적정 감초 첨가량을 결정하고 첨가하는 과실농축액의 종류에 따른 음료제품을 관능적 품질을 평가하여 적정 과실농축액을 선정하였다. 이후 음료제품의 맛, 향에 대한 관능적 품질개선과 살균 처리를 위한 산미료 및 향의 종류 및 첨가량을 결정하였다. 음료의 제조공정은 최종배합비에 따라 주재료 및 부재료 들을 배합하고 살균, 병입하는 일반적인 음료제조공정에 따랐다.

##### (2) 과립의 제조 및 관능 검사

주정으로 추출한 시료추출물을 농축한 농축물과 부재료를 이용하여 과립형 분말 제품을 제조하고자 하였다. 과립의 물성을 부여하기 위한 농축액의 적정 첨가량 및 반죽의 수분함량을 구하기 위하여 농축액 농도를 달리하여 포도당과 혼합하고 과립 분말을 제조한 후 관능검사를 7점 척도법으로 실시하였다. 각각의 시료는 동일한 용기에 동량으로 담아 상온에서 제공하였다. 하나의 시료를 먹고 나면 반드시 물로 입안을 행균 후 다른 시료를 시식하고 평가하도록 하였다. 평가 항목은 맛, 향, 색, 전반적인 기호도이고 9점 평점법에 의해 평가하였다. 색, 향, 맛, 텍스처는 1점에서 7점까지 수치가 커질수록 특성강도가 강해지는 것이며, 기호도는 '매우 싫어한다'부터 '매우 좋아한다'까지 7점 척도로 하였다.

관능 검사 결과의 분석은 SAS Package Program을 이용하였다. 과립의

제조 최적 조건을 얻고자 유효소재 추출물의 배합 성분을 독립성분으로 하고 반응 변수인 관능검사 결과와의 상관관계를 다중회귀분석방법을 이용하여 구하였다. 각 추출물의 농도를 달리한 배합비의 관능적 특성을 알아보기 위하여 각 항목에 대한 평균값을 구하고 분산분석을 실시하였으며 Duncan's multiple range test에 의해 유의성을 검증하였다.

### (3) 환 제품의 개발

환의 제조를 위하여 22°Brix인 주정 추출물을 이용하였다. 시료추출물에 분말 부원료와 꿀, 밀가루풀 등을 함께 혼합 반죽한 다음 성형, 자환, 제환, 정환 및 코팅, 건조공정을 거쳐 제조하였다. 특히, 환의 상품성을 높이기 위하여 코팅제를 달리하여 제조하였다. 코팅제는 gelatin, 설탕, 한천, 물엿, 아라비아검 등을 이용하여 환을 제조하였다.

## 제 2 절 결과 및 고찰

### 1. Phytoestrogen 소재 탐색

#### 가. 1 차 시료 선정 및 활성 평가용 추출물 제조

천연 phytoestrogen 소재 탐색 및 효능 소재 선발을 위한 시료는 주로 식품공전에서 허가된 것 또는 민간전승적으로 널리 이용되는 식물성 원료 및 그 가공제품 중 100여종 이상을 선정하고 이중 65종을 대상으로 활성평가용 추출물(1차)을 제조하였다. 실험에 사용된 시료와 추출수율은 Table 5에 정리하여 나타내었다.

**Table 5. Phytoestrogen 소재 탐색 및 활성 평가용 시료(1차)**

#### 1-1. 두류

물질명	수율	물질명	수율
대두	17.3	완두	9.0
팥	8.8	작두콩	10.4
녹두	11.3	약콩	17.0
강남콩	11.0		

#### 1-2. 약용식물

물질명	수율	물질명	수율
계피(육계)	2.5	계지	4.8
참 1	24.5	물약	3.0
감잎	20.6	육두구	14.4
산조인	55.8	감초	30.1
모과	35.7	정향피	8.4
지구자씨	6.2	황기	16.8
홍화씨	14.3	죽엽	11.2
당귀	47.1	초두구	13.2
산수유	66.7	백화사설초	8.3
오미자	47.7	어성초	13.6
결명자	14.9	감국	43.5
천마	24.2	섬오가피	6.8
음양곽	19.7	상백피	6.6
단삼	43.5	오가피	9.8
길경	27.4	구기자	56.9
구지뽕	18.8	진피	43.9
황정	53.61	백모초	35.4

1-3. 채소류 및 기타

물질명	수율	물질명	수율
쭈	15.2	도라지	50.9
매실	57.8	대추	69.2
마	7.3	더덕	31.5
잎새버섯	26.1	모로헤야	14.1
비파잎	17.6		

1-4. 허브류

물질명	수율	물질명	수율
박하	21.0	peppermint	19.2
begamot	5.9	lemon balm	14.6
spearmint	19.4	camomile	23.6
catnip	20.0	sage	26.7
labender	25.8	yellow pepper	21.4
rosemary	23.7	basil	13.2
thyme	15.3	oregano	22.6
Hyssop & ginger	16.9		

나. 2차 시료의 선정 및 추출물 특성

(1) 대상시료

2차 시료로 곡류 2종, 목이버섯 등 버섯류 2종, 민들레와 같은 야생식물 8종, 강황 등 약용식물 20종, 참깨 등 유지류 4종, 복분자 씨 등 종자류 2종, 감초 등 차류 17종, 그리고 채소류인 부추 등 총 56종을 선정하였으며 Table 6과 같다.

각 시료의 건물 기준으로 살피본 추출수율은 곡류는 1.00~4.77%, 버섯류는 2.92~4.63%, 야생식물류는 1.80~35.47%, 약용식물류는 0.44~21.33%, 유지류는 3.27~17.82%, 종자류는 3.20~3.59%, 차류는 1.93~39.02%, 채소류는 26.60%의 수율을 나타내었다.

(2) 시료 중 총 폴리페놀 정량

2차 선정 시료의 총 폴리페놀 함량을 정량한 결과 총 폴리페놀 함량이 10-100 mg/g (catechin eq).범위인 시료는 손바닥 선인장, 산약, 민들레, 뽕

있 등 다수의 시료가 속하였다. 100-200mg/g (catechin eq).범위인 시료는 작약, 승마, 홍화, 발아메밀이었으며, 복분자가 380mg/g, 복분자씨가 371mg/g로 매우 높았다. 석류는 착즙액을 주로 섭취하므로 착즙액을 동결건조 시켜 폴리페놀을 정량한 결과 산지별로 2.52-7.88mg/g (catechin eq.)로 낮은 함량을 나타내었다. 1,2차 시료 중 총 폴리페놀은 초두구가 594.7 mg/g catechin eq.으로 가장 높았으며 플라보노이드 함량은 강황이 약 394.9 mg/g naringin eq.으로 가장 높았다.

**Table 6. Phytoestrogen 소재 탐색 및 활성 평가용 시료(2차)**

2-1. 곡류

물질명	수율
발아현미	1.00
아마란스	4.77

2-2. 버섯류

물질명	수율
목이버섯	4.63
상황버섯	2.92

2-3. 야생식물

물질명	수율
민들레	25.72
비름	6.52
석창포	3.64
속새	1.80

물질명	수율
손바닥선인장 줄기	12.86
손바닥선인장 열매	35.47
씀바귀	11.60
구아바	13.75

2-4. 약용식물

물질명	수율
강황	5.20
경포부자	2.85
사상자	6.06
산약	10.65
삼칠근	4.13
속단	13.69
승마	6.91
원지	21.33
해동피	5.29
울금	11.31

물질명	수율
작약	5.93
황련	3.96
천마	7.97
시호	10.25
토사자	2.27
파고지	14.14
하수오	11.13
홍화	2.87
대황	27.35
복령	1.33

2-5. 유지류

물질명	수율	물질명	수율
참깨	4.47	들깨	3.27
참깨박	17.82	들깨박	5.34

2-6. 종자류

물질명	수율
복분자씨	3.20
은행	3.59

2-7. 차류

물질명	수율
감초	3.08
감초(일본산)	7.06
느릅 뿌리	1.93
느릅 줄기	3.60
느릅 잎	9.47
당귀	11.65
두충	7.63
복분자	11.27
뽕잎	

물질명	수율
삼백초	6.50
석류과육(홍석류, 국산)	37.87
석류과육(이란산)	27.33
석류과육(우즈베키스탄산)	33.82
석류착즙액(홍석류, 국산)	39.02
석류착즙액(홍석류, 국산)	37.70
석류착즙액(이란산)	31.81
석류착즙액(우즈베키스탄산)	31.38

2-8. 채소류

물질명	수율
부추	26.60

## 2. Phytoestrogen의 활성 평가 및 효능 소재의 선발(1차시료)

### 가. 재조합 효모transactivation assay를 이용한 phytoestrogen의 활성평가

에스트로젠 수용체와 리포터 유전자인  $\beta$ -galactosidase가 도입된 효모 재조합검색시험법을 이용한 phytoestrogen의 활성평가 결과는 Fig. 2~6과 같다. Recombinant yeast assay에서 시험물질을 1mg/ml, 100 $\mu$ g/ml로 처리한 결과 양성대조물질로 사용된 17 $\beta$ -estradiol(E2))과 비교하여 보았다. 양성대조물질인 17 $\beta$ -estradiol(E2)와 비교하여 보았을 때 감초, 한국산상백피, 중국산상백피, 백화사설초, 구지뽕에서 높은 estrogenicity가 관찰되었다.

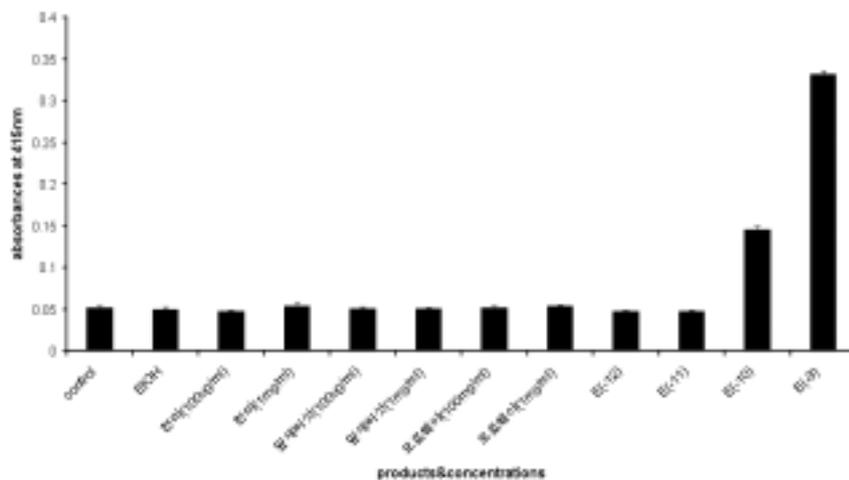


Fig. 2. Effects of various plants on the yeast expressing human estrogen receptor. (\*,p<0.05)

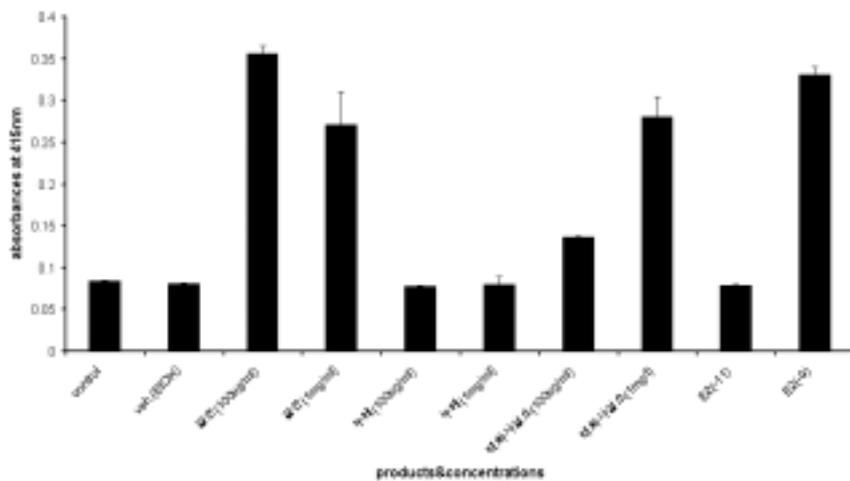


Fig. 3. Effects of various plants on the yeast expressing human estrogen receptor. (\*, p<0.05)

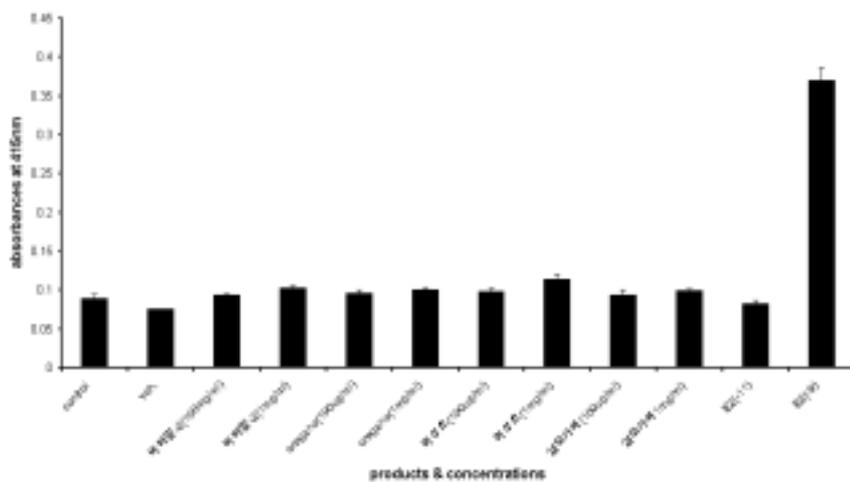


Fig. 4. Effects of various plants on the yeast expressing human estrogen receptor. (\*, p<0.05)

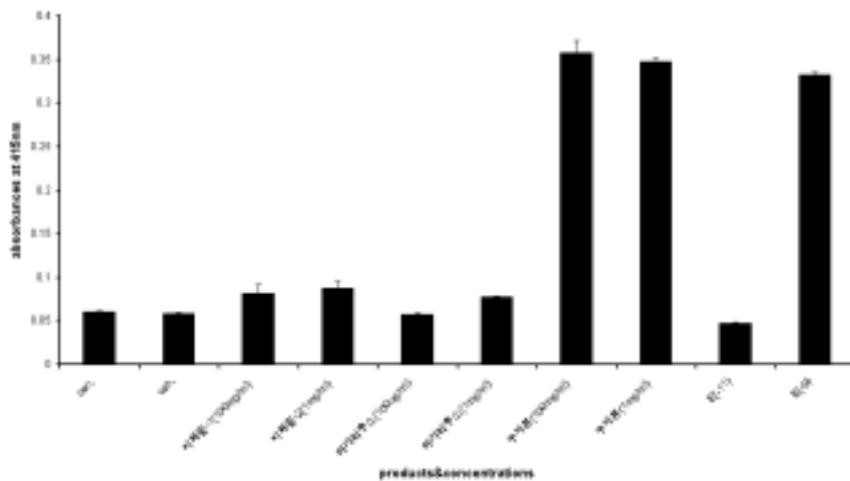


Fig. 5. Effects of various plants on the yeast expressing human estrogen receptor. (\*, p<0.05)

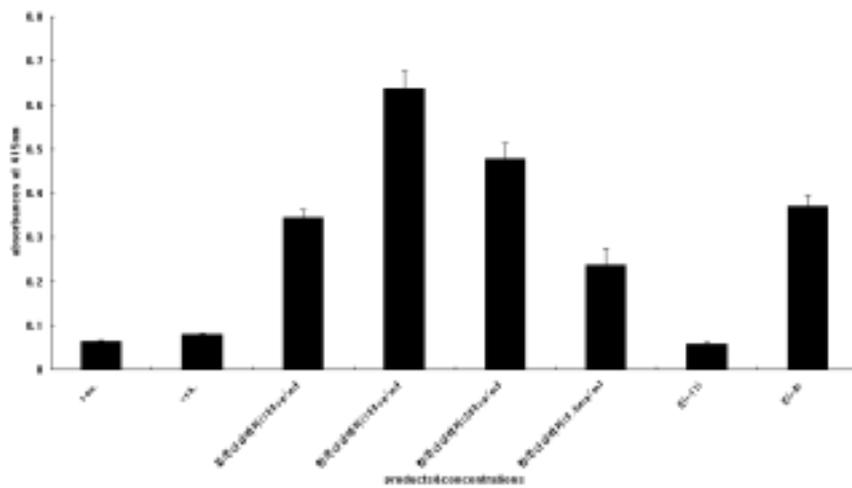


Fig. 6. Effects of various plants on the yeast expressing human estrogen receptor. (\*, p<0.05)

그 중 1mg/ml, 100 $\mu$ g/ml 농도 모두에서 에스트로젠성이 E2와 비슷하거나 오히려 높게 관찰되었던 한국산상백피(CT)와 구지뽕(CM)을 대상으로 더 다양한 농도에서 에스트로젠성을 시험하였을 때 대조군에 비하여 모든 농도에서 유의적인 에스트로젠성을 나타내었다(Fig. 7).

이상과 같이 *Saccharomyces cerevisiae* ER+LYS 8127 (YER 효모)를 이용한 에스트로젠 성 검출시험에서 구지뽕과 한국산상백피는 높은 에스트로젠성을 나타냈으며, 구지뽕은 용량 의존적이었다. 나머지 물질은 대조군과 용매대조군에 비하여 유의적인 에스트로젠성이 나타나지 않았다.

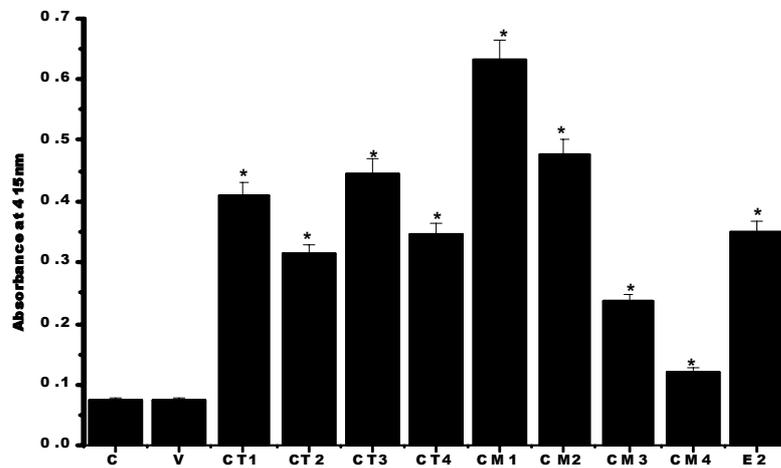


Fig.7. Effects of various concentrations of CT and CM extracts on the yeast expressing human estrogen receptor. C, control; V, EtOH 1%; CT1&CM1, 1g/ml; CT2&CM2, 2 g/ml; CT3&CM3, 5 g/ml; CT4&CM4, 10g/ml; E2, 17-estradiol 10<sup>-9</sup>M. (\*, p<0.05).

나. 유방암세포인 MCF-7세포를 이용한 phytoestrogen의 활성평가

사람의 유방암 세포인 MCF-7 세포를 사용하여 시험물질의 에스트로젠성을 확인하고 항암작용 활성의 유무를 확인해 보았다. 시험결과 구지뽕과 당근에서 에스트로젠성을 확인할 수 있었고 한국산상백피와 중국산상백피, 백화사설초는 유방암세포의 증식을 억제 시켰다.

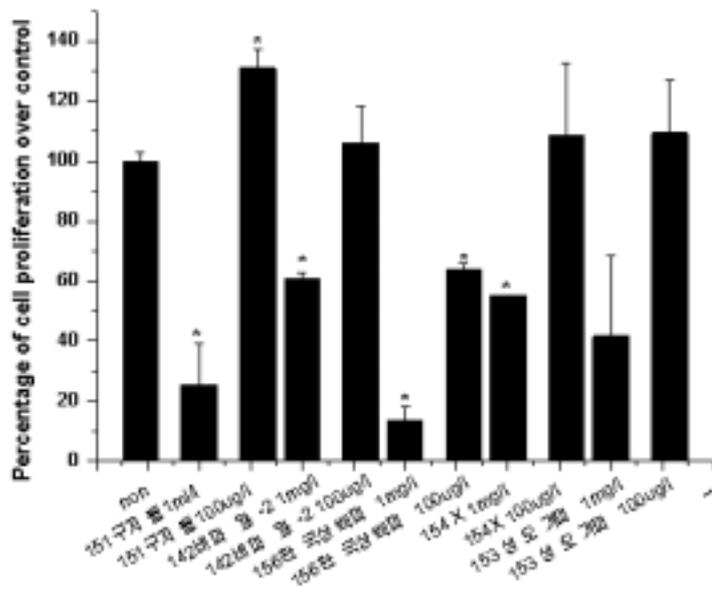


Fig. 8. Effects of various extracts on the proliferation of MCF-7 human breastcancer cells. (\*,  $p < 0.05$ ).

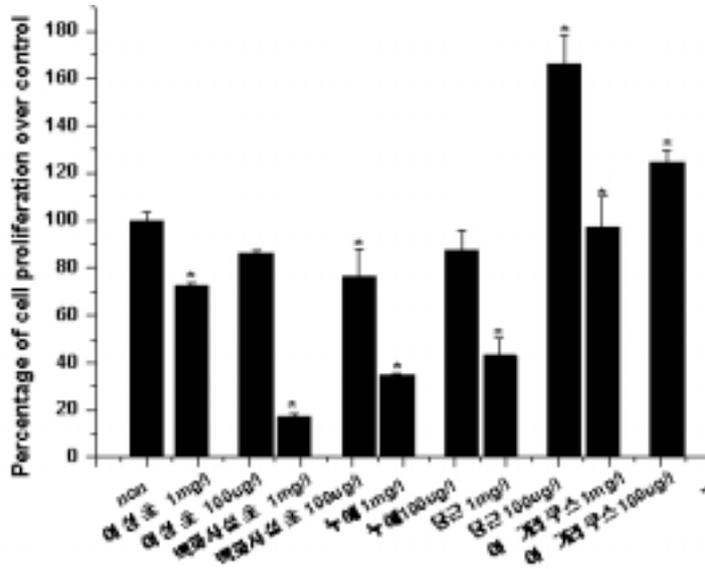


Fig. 9. Effects of various extracts on the proliferation of MCF-7 human breastcancer cells. (\*,p<0.05).

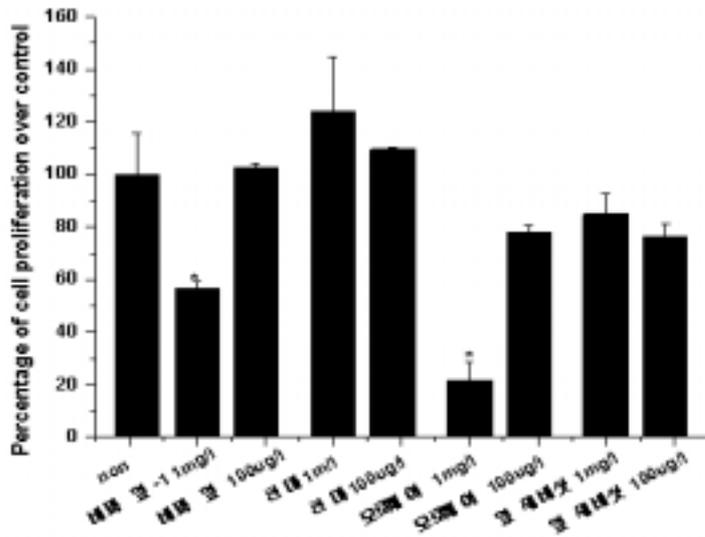


Fig. 10. Effects of various extracts on the proliferation of MCF-7 human breastcancer cells. (\*,p<0.05).

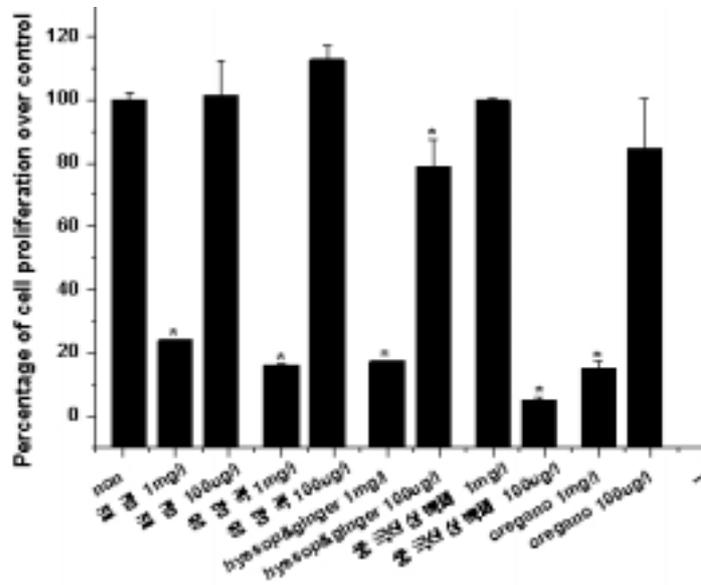


Fig. 11. Effects of various extracts on the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells. (\*, p < 0.05).

다. HepG2 cell line을 이용한 phytoestrogen의 활성평가

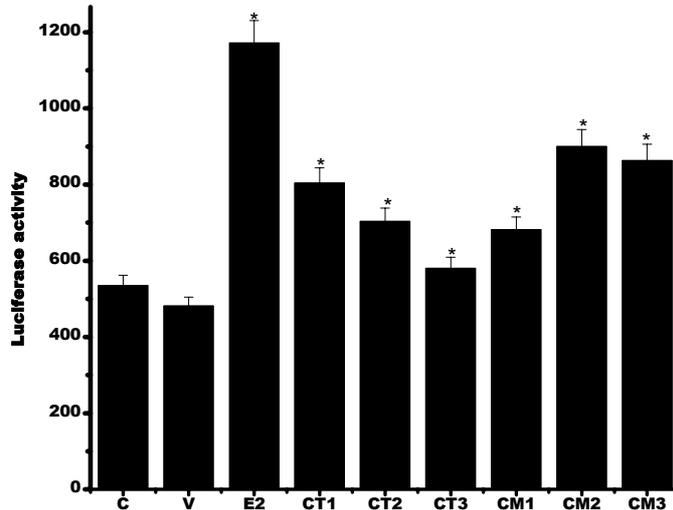


Fig. 12. Effects of CT(구지뽕) and CM(한국산상백피) extracts on HepG2 human hepatoma cells. C, control; V, EtOH 0.1%; E2,  $10^{-8}$ M 17-estradiol; CT1&CM1,20ng/ml; CT2&CM2,50ng/ml,CT3&CM3,100ng/ml. (\*,p<0.05)

에스트로젠 리셉터와 Luciferase 리포터유전자가 도입된 HepG2 cell line을 이용한 phytoestrogen의 활성평가를 한국산상백피(CT)와 구지뽕(CM)을 대상으로 실시한 결과는 Fig. 12와 같다. 여러 농도에서 에스트로젠성을 시험하였을 때 대조군에 비하여 모든 농도에서 유의적인 에스트로젠성을 나타내었다.

### 3. Phytoestrogen의 활성 평가 및 효능 소재의 선발(2차시료)

#### 가. 재조합 효모transactivation assay를 이용한 phytoestrogen 활성평가

1차시료 중 후보소재와 2차로 추가된 시료 추출물을 대상으로 1 mg/mL 과 100 µg/mL의 두 가지 농도에서 에스트로젠 활성을 측정하였다. E2 및 에스트로젠성 물질은 재조합 효모(Saccharomyces cerevisiae ER + Lys 8127) 내로 유입되어 expression vector에 의해 발현된 호르몬 수용체와 결합하고 이는 다시 receptor vector에서 β-galactosidase의 발현을 유도하게 된다. 에스트로젠 활성은 β-galactosidase의 발현 여부 즉, ONPG가 β-galactosidase에 의해 전환되는 o-nitrophenol의 황색 발색으로 검출된다. 양성 대조군으로 사용한 E2는 10<sup>-9</sup> M에서 최대 활성을 나타내었으며, 이 농도에서 E2 활성과 시료추출물의 에스트로젠 활성을 비교한 결과는 Fig. 13과 같다.

추출물 중 감초(러시아산, GU1), 경포부자(AC), 대황(RU), 백화사설초(HD), 상백피(중국산, MA2), 파고지(PC) 추출물은 에스트로젠 활성이 매우 높았으며, 특히 감초와 대황은 양성 대조군인 E2에 근접하는 에스트로젠 활성(> 95%)을 나타내었다. 또한, 경포부자(AC), 어성초(HC), 복분자(RC), 상백피(MA2), 원지(PT), 은행(GB), 홍화(CT)도 유의적으로 높은 흡광도를 나타내어 에스트로젠성이 관찰되었다. 강황(CL), 구아바(GA), 상황버섯(PL), 석류(PG)의 경우 실험한 농도에서 대조군의 약 5% 수준인 미약한 에스트로젠 활성이 검출되었으며, Fig. 13에 제시하지 않은 식물들은 에스트로젠 관련 반응을 유도하지 않았다. 활성을 보인 식물은 농도 의존적으로 대체로 100 µg/mL 보다 고농도인 1 mg/mL에서 높은 활성을 보였으나, 이 중 감초, 대황, 파고지는 한 단계 낮은 농도인 100 µg/mL의 농도에서 더 높은 에스트로젠 활성을 나타내었으나, 이 보다 낮은 농도인 50, 10 µg/mL의 농도에서는 미약한 에스트로젠 활성을 보였다.

한편 복분자와 느릅의 결과를 볼 때 식물의 에스트로젠 활성은 부위에 따라 다소 다른 양상을 보이는 것을 알 수 있었다.

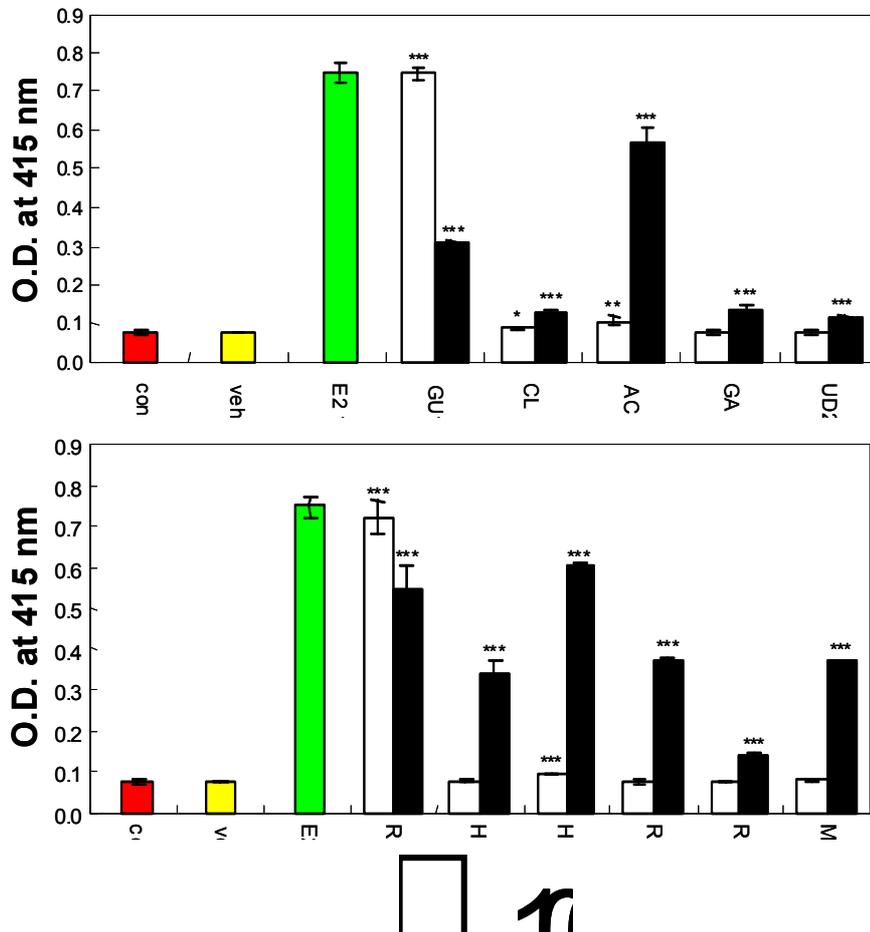


Fig. 13. Comparison of estrogenic activity of medicinal plant extracts determined by transactivation assay.

Asterisks indicate significant difference from the vehicle at  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*), and  $p < 0.001$  (\*\*\*)

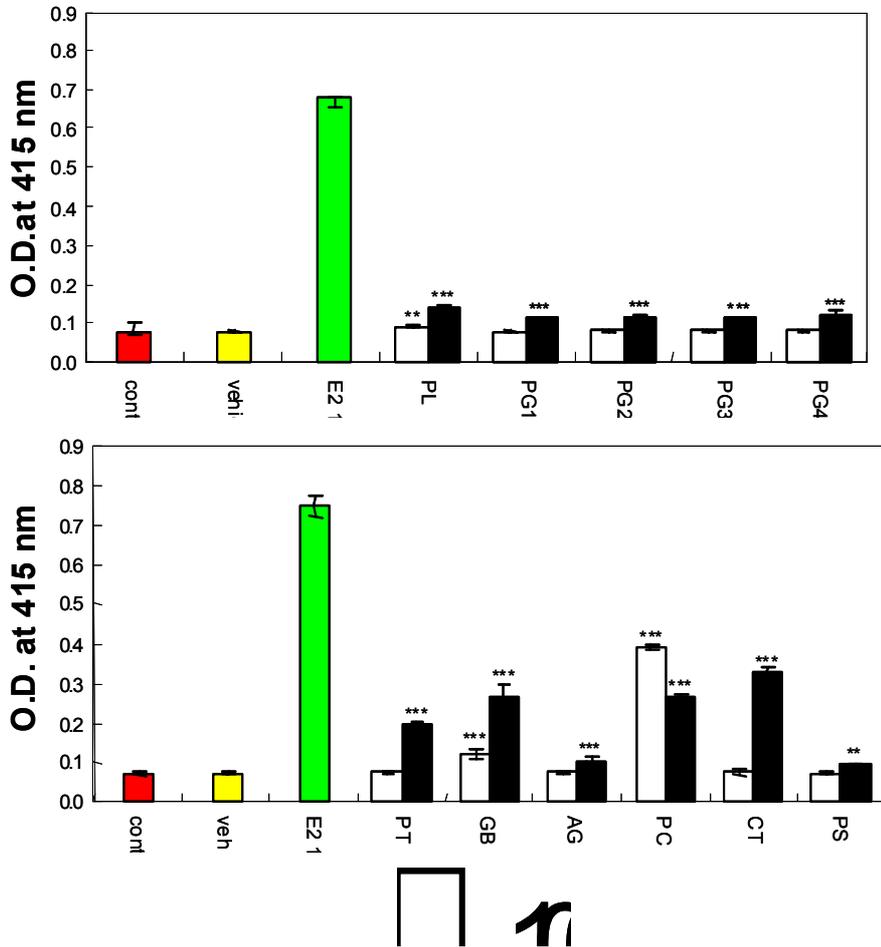


Fig. 13. Continued

Asterisks indicate significant difference from the vehicle at  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*), and  $p < 0.001$  (\*\*\*)

#### 나. *In vitro* 검색법인 MTT assay를 이용한 유방암억제 물질탐색

여러 가지 천연 추출물에서 phytoestrogen의 활성을 측정하기 위해서 추출액을 동결건조시켜 분말로 조제하여 100% 에탄올, 용매에 1mg/ml의 일정한 농도로 시험물질을 준비하였다. 이 시험물질을 사용하여, 용매대조군으로 사용되어도 세포의 성장에 영향을 미치지 않는 농도인 세포 배양액의 1/100로 희석하여 모든 천연물을 사람의 유방암 세포인 MCF-7세포에 10 $\mu$ g/ml으로 처리하였다.

Fig. 14의 결과를 보면 대조군에 비해 강황이 유의적으로 유방암 세포의 증식을 억제시키는 것으로 관찰되었고, 느릅잎은 반대로 세포의 성장을 유도하는 것으로 사료되었다. 그 외의 나머지 천연 추출물들은 어떠한 유의적인 결과가 관찰되지 않았다.

그외의 다른 천연 추출물도 MCF-7 유방암 세포에서 10 $\mu$ g/ml의 농도로 72 시간동안 처리한 결과, 민들레, 발아현미, 복령, 상황버섯, 석류즙 (국산황석류), 석류과육 (우즈베키스탄), 석류과육 (이란산), 손바닥 선인장줄기, 손바닥 선인장 열매, 울금, 파고지, 황련, 홍화, 일본감초가 대조군에 비하여 유방암 세포의 성장을 억제하는 것으로 관찰되었다. 그러나 특이적으로 들깨박, 일본삼백초는 오히려 유방암 세포의 증식을 유도하였다(Fig. 15-21).

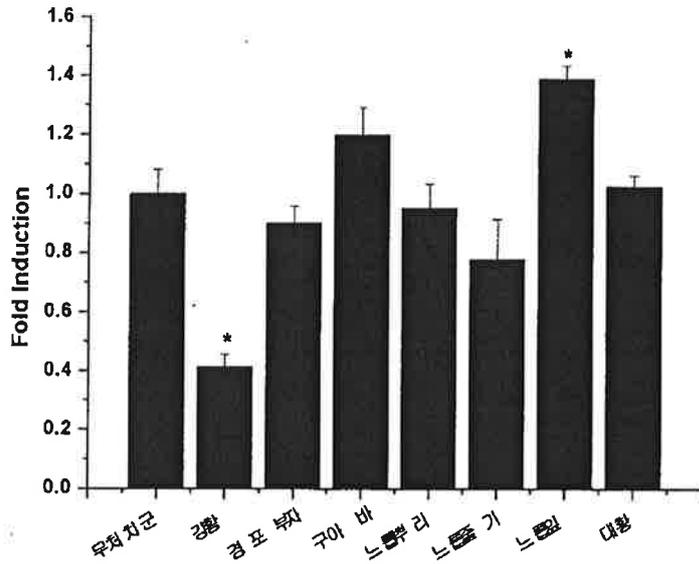


Fig. 14. Effects of various extracts on the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells (\*,  $P < 0.05$ )

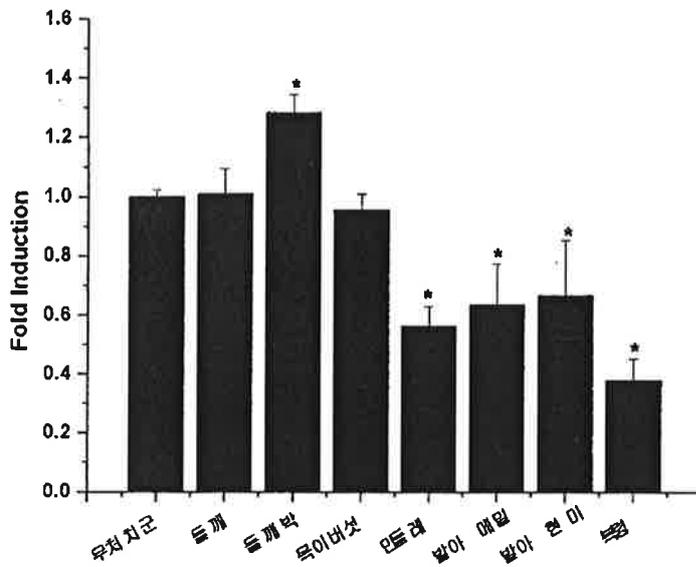


Fig. 15. Effects of various extracts on the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells (\*,  $P < 0.05$ )

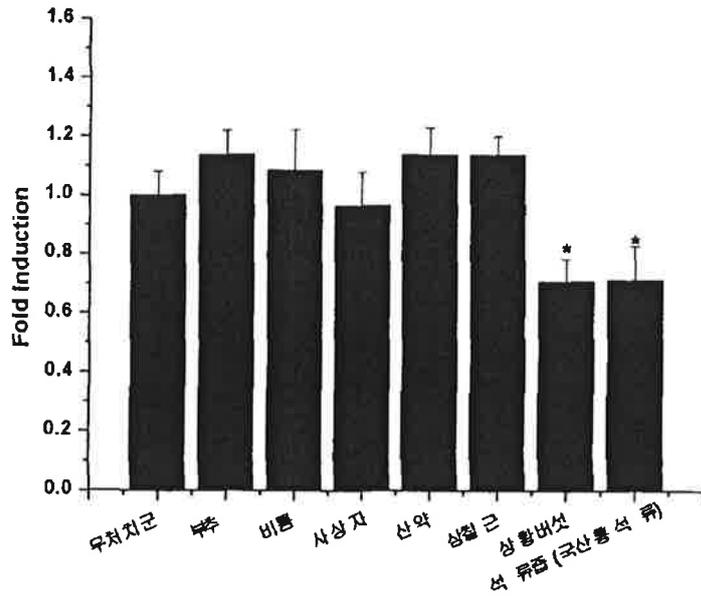


Fig. 16. Effects of various extracts on the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells (\*,  $P < 0.05$ )

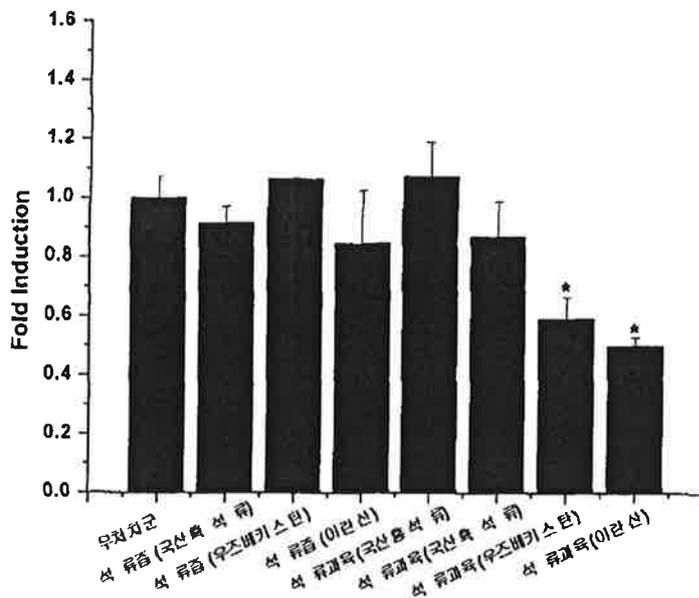


Fig. 17. Effects of various extracts on the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells (\*,  $P < 0.05$ )

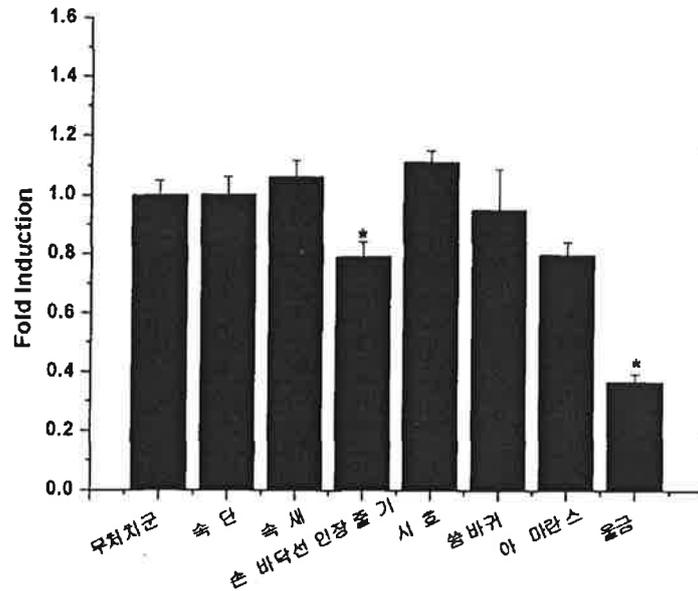


Fig. 18. Effects of various extracts on the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells (\*,  $P < 0.05$ )

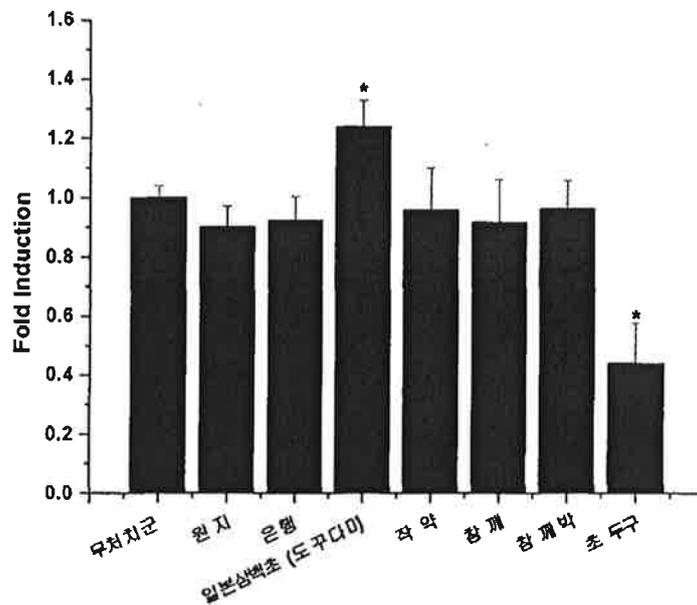


Fig. 19. Effects of various extracts on the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells (\*,  $P < 0.05$ )

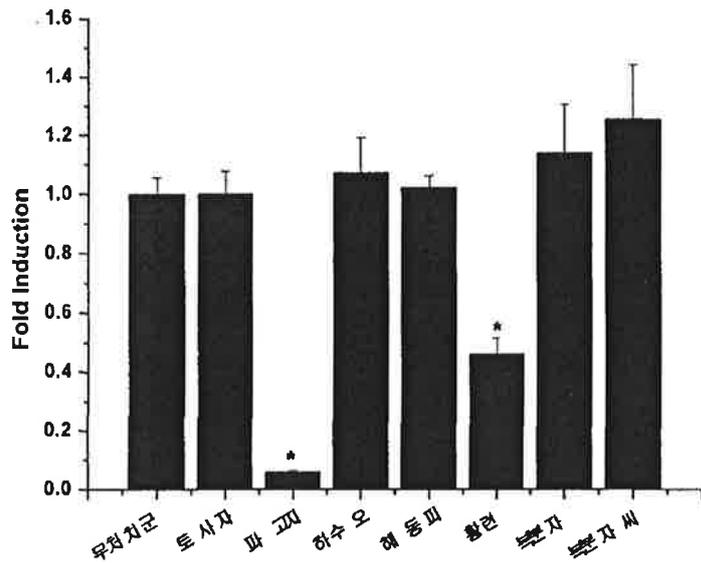


Fig. 20. Effects of various extracts on the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells (\*,  $P < 0.05$ )

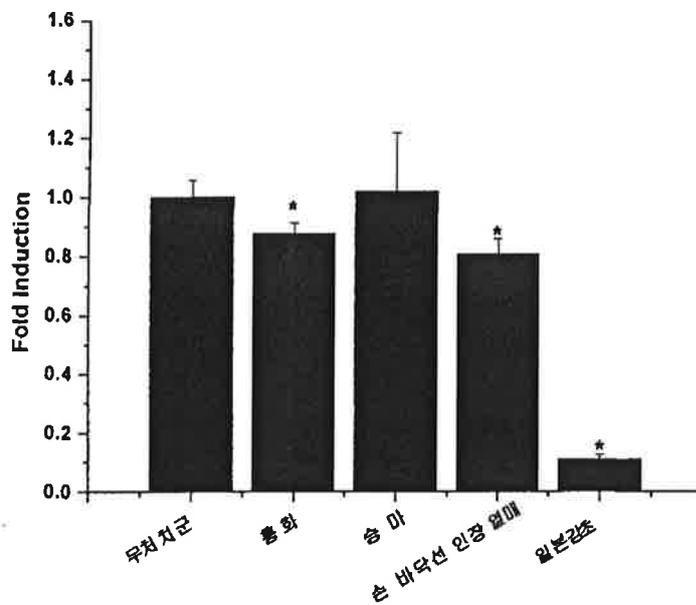


Fig. 21. Effects of various extracts on the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells (\*,  $P < 0.05$ )

이상의 결과를 바탕으로 유방암 억제능이 있는 phytoestrogen의 활성을 평가하기 위하여 유방암 세포를 유의적으로 감소시키는 위의 천연 추출물의 에스트로젠성을 제조합 효모 검색법을 이용하여 확인하였다. 추출물의 phytoestrogen의 활성을 평가하기 위하여 MTT를 이용한 유방암 억제 물질 탐색 시험법에서 사용한 농도인  $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 시험한 결과 Fig. 22와 같이 파고지와 일본감초가 양성대조물질인  $17\beta\text{-estradiol(E2)}$ 와 비교하여 보았을 때 높은 에스트로젠성이 관찰되었다. 나머지 물질은 용매대조군에 비하여 유의적인 에스트로젠성이 나타나지 않았다.

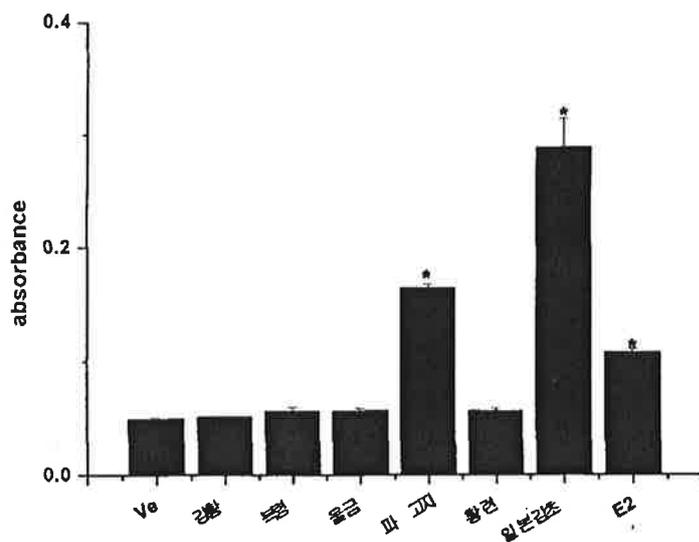


Fig. 22. Estrogenicity of various extracts on two hybrid yeast assay (\*,  $P < 0.05$ )

따라서, 1차시료에서 우수한 phytoestrogen소재로 평가되었던 감초와 2차시료에서 유방암 억제능이 우수하고 에스트로젠 활성이 높은 phytoestrogen으로 평가된 파고지 두가지 물질에 대하여 다양한 농도와 처치시간에서 MTT assay를 이용하여 유방암 세포의 성장 억제능을 평가하였다. 2차 시료

중에 파고지와 함께 phytoestrogen으로서의 활성이 확인되었던 일본감초는 재배종과 원산지는 1차시료로 사용된 감초와 같고 재배지만 일본으로 확인되었으며 두 시료 모두 동일한 활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

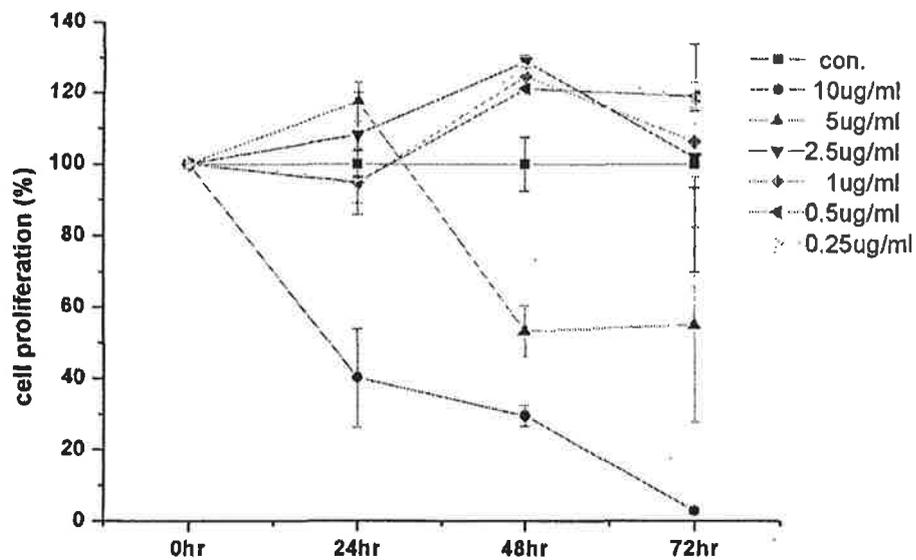


Fig. 23. Effects of the nut of *Psoralea corylifolia* L. on the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells (\*, $P < 0.05$ )

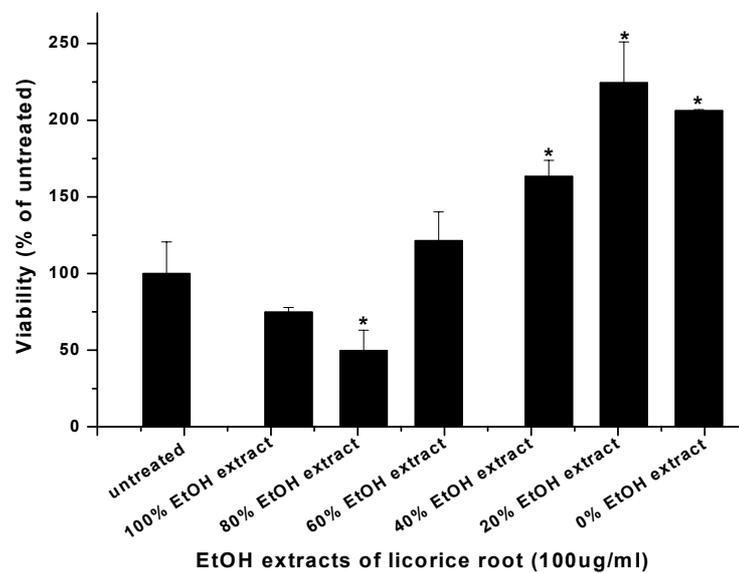


Fig. 24. Effects of extracts of licorice root on the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells (\*, $P < 0.05$ )

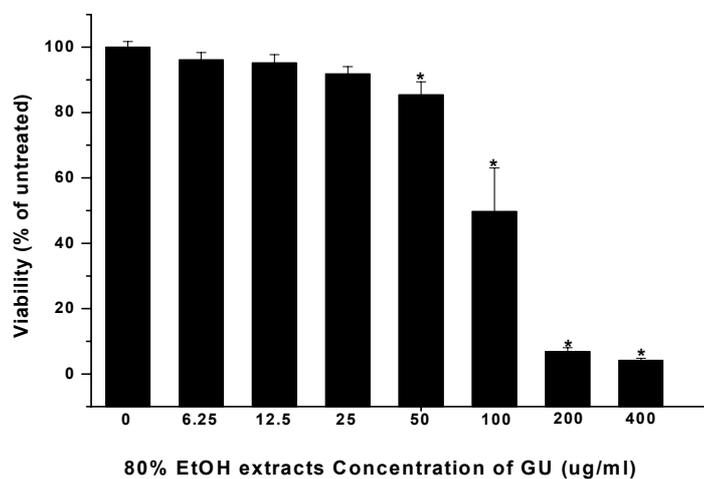


Fig. 25. Effects of the 80% EtOH extract of licorice root on the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells (\*, $P < 0.05$ )

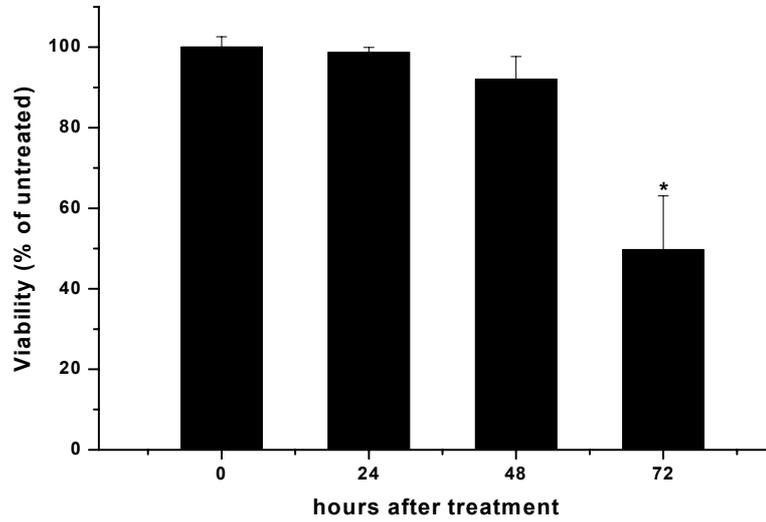


Fig. 26. Effects of the 80% EtOH extract of licorice root on the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells (\*, $P < 0.05$ )

파고지와 감초의 EtOH 추출물의 사람의 유방암 세포에서 미치는 영향을 다양한 농도와 시간에서 평가한 결과 감초와 파고지 모두 시간, 농도 의존적으로 사람의 유방암 세포주인 MCF-7 세포에서 암세포의 성장을 억제하는 것으로 관찰되었다. 특히 감초의 경우 다양한 농도의 EtOH를 이용하여 추출해 보았는데 80% EtOH 감초 추출물이 가장 유방암의 성장을 저해하는 효과가 있는 것으로 사료되었다.

#### 4. Nude mice를 이용한 유방암억제 효능 평가

*In vitro* 검색법인 MTT assay를 이용한 유방암억제 물질탐색에서 phytoestrogen으로서의 활성이 확인되었던 감초와 파고지를 각각 0.5%씩 에스트로젠 성분이 배재된 사료인 AIN-76A diet에 MCF-7세포와 MDA-MB-231 세포의 xenograft assay를 실시하였다.

사람의 유방암 세포인 MCF-7 세포와 MDA-MB231 세포를 이용하여 한 종의 개체의 기관·조직·세포를 다른 종의 개체에 이식하는 방법인 xenograft assay (이종이식)를 실시하였다. 이종(xenogenic)동물 유방암 모델인 사람 유방암 세포를 피하 주사한 BALB/c 누드 마우스 (nude mice)에서 감초와 파고지가 *in vitro* 시험의 결과와 마찬가지로 유방암 세포의 성장과 종양형성 억제력을 연구하여 사람 유방암에 대한 화학적 암 예방 효과의 가능성을 생체 내에서 측정할 수 있는 체계를 확립하고자 하였다. 시험 결과 유방암 세포를 주사한 4주 동안 대조군, 감초 추출물 투여군, 파고지 추출물 투여군의 체중은 유의적인 변화가 관찰되지 않았다. 그러나 유방암 세포의 종양형성을 매주 측정된 결과 대조군에 비해 감초 추출물 투여군과 파고지 추출물 투여군의 종양형성 비율이 상대적으로 늦어지는 것으로 관찰되었다. 따라서 사람의 유방암 세포를 이식한 누드 마우스의 종양형성이 *in vitro* 시험과 동일하게 억제되는 것으로 사료되었다.

이러한 시험결과를 바탕으로 감초, 파고지 EtOH 추출물이 어떠한 기전에 의해 유방암의 증식을 억제하는지를 구명하여 두 물질의 phytoestrogen으로서의 우수성을 평가하였다.

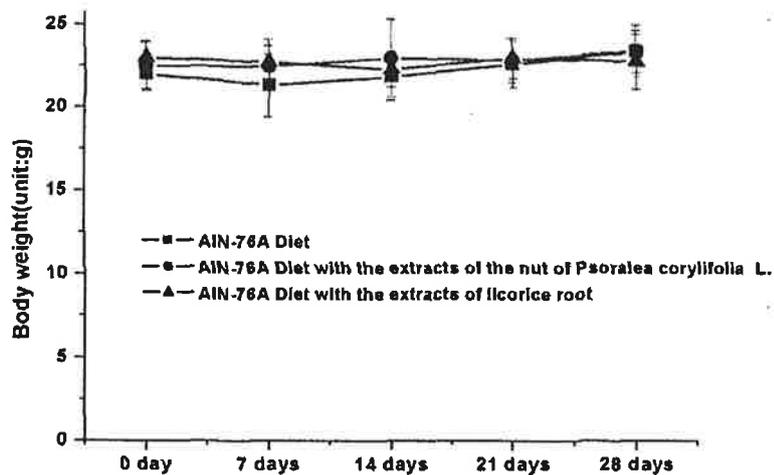


Fig. 27. Change of body weights for 4 weeks after implantation

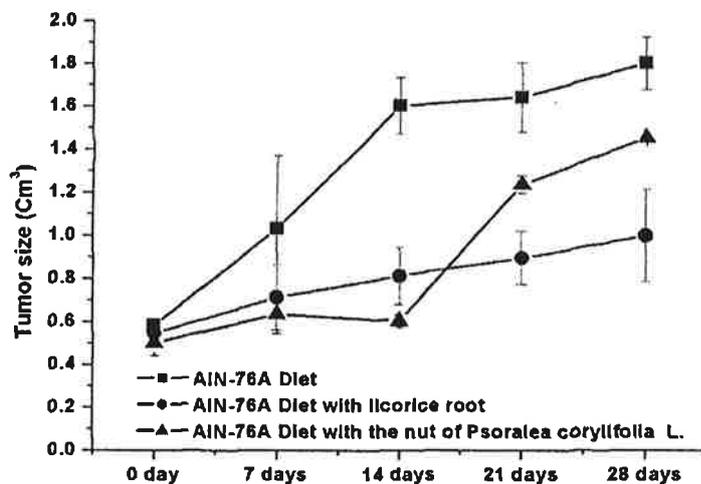


Fig. 28. Effects of licorice root and the nut of *Psoralea corylifolia L.* in MCF-7 xenograft nude mice

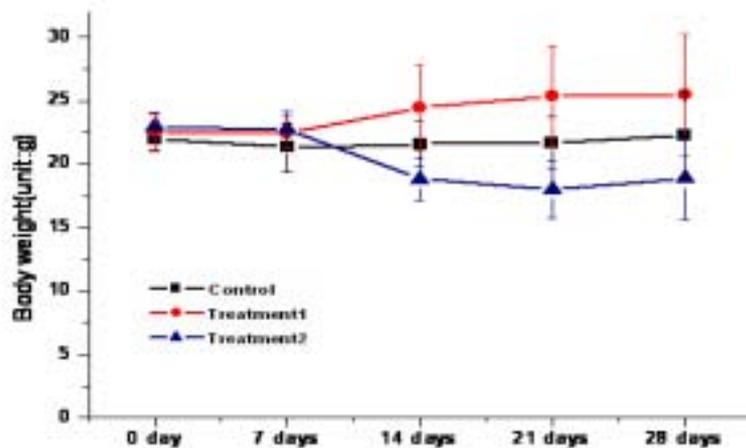


Fig. 29. Change of body weights for 4 weeks after MDA-MB-231 implantation (Treatment1:licorice root, Treatment2:*Psoralea corylifolia L.*)

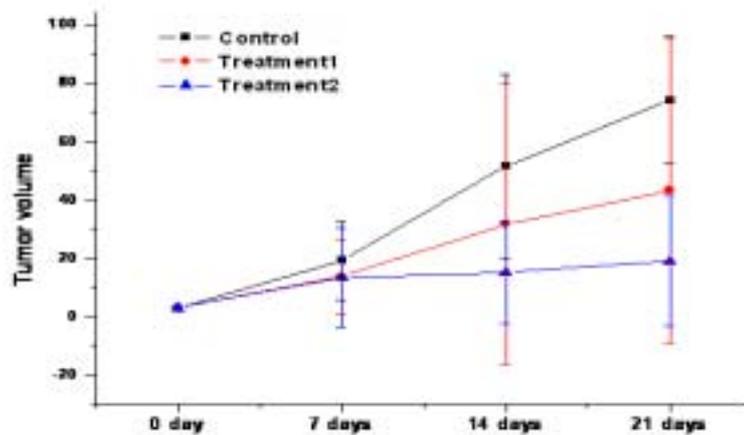


Fig. 30. Effects of licorice root and the nut of *Psoralea corylifolia L.* in MDA-MB-231 xenograft nude mice (Treatment1:licorice root, Treatment2:*Psoralea corylifolia L.*)

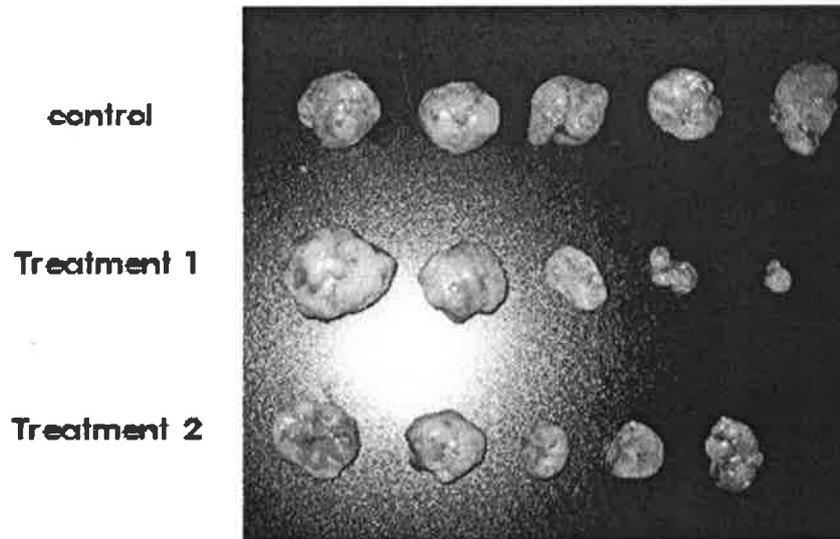


Fig. 31. Tumor size after treatment in MDA-MB-231 xenograft nude mice(Treatment1: licorice root, Treatment2: *Psoralea corylifolia L.*)

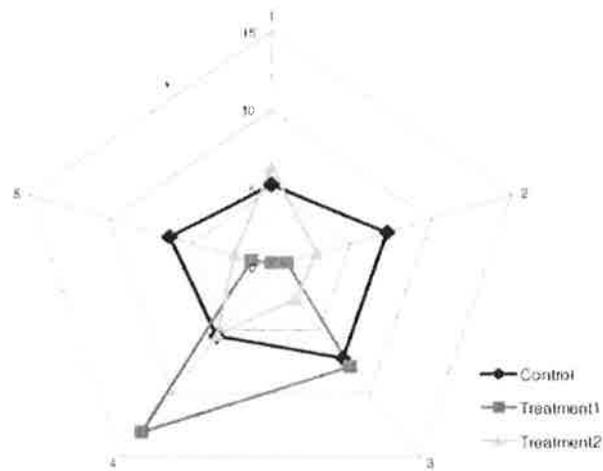


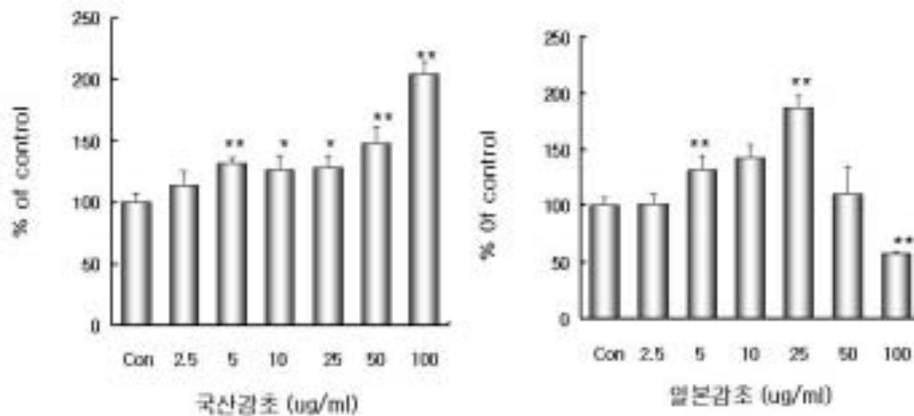
Fig. 32. Tumor weight after treatment in MDA-MB-231 xenograft nude mice(Treatment1:licorice root, Treatment2: *Psoralea corylifolia L.*)

## 5. 선발 소재가 골아세포 증식과 ALP 활성도에 미치는 영향

### 가. 1차 후보소재가 골아세포(ROS 17/2.8) 증식에 미치는 영향

감초, 정향초, 초두구 추출물이 골아세포 (ROS 17/2.8) 증식에 미치는 영향을 실험하였으며 결과는 Fig 과 같았다. 국산감초 추출물은 2.5 ~ 100  $\mu$ g/ml의 범위에서 농도 의존적으로 골아세포의 증식을 증가하였다. 그러나 일본감초 추출물은 5 ~ 25  $\mu$ g/ml 까지는 골아세포 증식을 증가하였으나, 50  $\mu$ g/ml 에서는 대조치 정도로 증식을 감소시켰고 100  $\mu$ g/ml 에서는 대조치의 50% 수준으로 감소시켰다. 또한 일본감초는 50  $\mu$ g/ml 이상의 농도에서 세포독성이 나타났으나 국산감초는 고농도에서 독성이 없었다.

그림 2

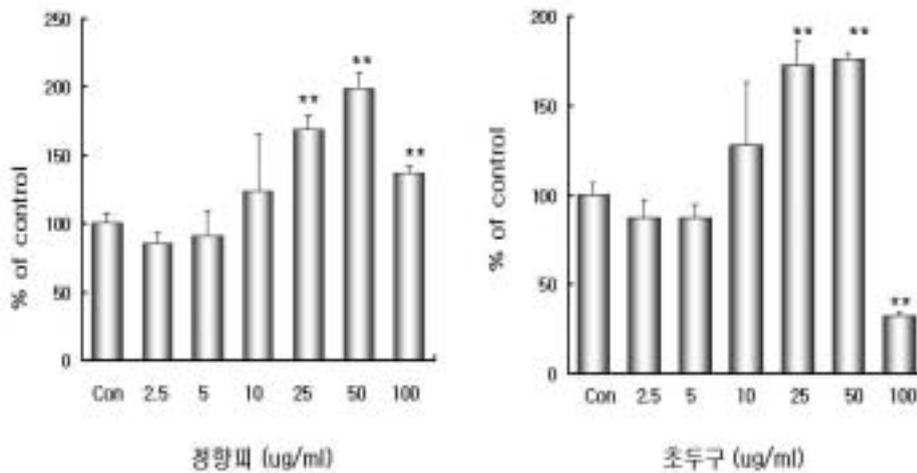


Dose-dependent effects of *methanol extracts* on proliferation of ROS17/2.8 osteoblast-like cells. Cell proliferation was determined by MTT assay. Results are expressed as percentage of control and values represent mean  $\pm$  SEM of 6 experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , vs. control.

Fig. 33. Dose-dependent effects of methanol extracts on proliferation of ROS17/2.8 osteoblast-like cells.

정향피와 초두구 추출물은 2.5와 5  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 골아세포 증식에 영향을 없었으나, 10 ~ 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 범위에서는 농도 의존적으로 골아세포 증식을 증가시켰다. 그러나 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 골아세포 증식을 감소시켰는데, 특히 초두구 추출물은 대조치의 25% 정도로 감소시켰다. 세포독성 효과는 초두구>일본감초>정향피의 순이었다.

그림 3.



Dose-dependent effects of *methanol extracts* on proliferation of ROS17/2.8 osteoblast-like cells. Cell proliferation was determined by MTT assay. Results are expressed as percentage of control and values represent mean  $\pm$  SEM of 6 experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , vs. control.

Fig. 34. Dose-dependent effects of methanol extracts on proliferation of ROS17/2.8 osteoblast-like cells.

후보 식물 추출물을 5 ~ 100 µg/ml의 농도로 골아세포에 처리했을 때, 특히 승마와 한국상백피 추출물은 100 µg/ml까지 농도 의존적으로 골아세포의 증식을 증가하였다. 그러나 국산 홍석류 추출물은 5 ~ 50 µg/ml까지는 골아세포 증식을 증가하였으나, 100 µg/ml에서는 대조치 정도로 증식을 감소시켰고, 국산 흑석류 추출물은 10 µg/ml에서 골아세포 증식이 30%정도 증가하였으나, 25 µg/ml 보다 높은 농도에서는 대조치 정도로 증식을 감소시켰다.

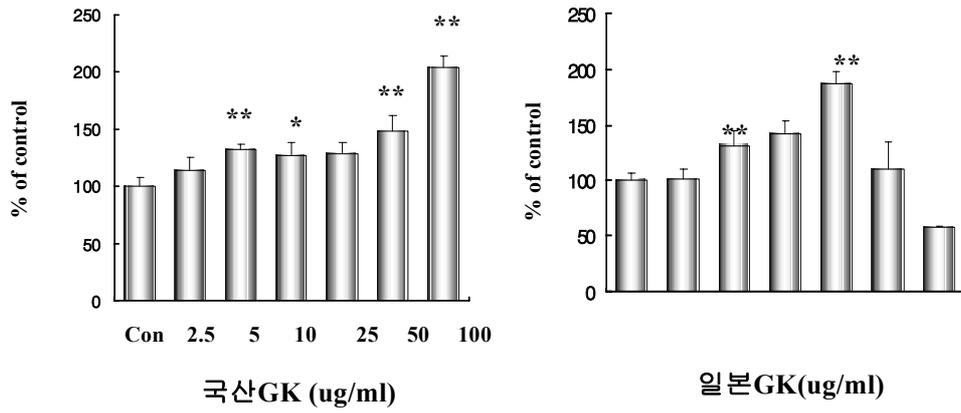
복분자씨, 백화사설초와 민들레 추출물은 골아세포 증식에 영향이 없었고, 100 µg/ml의 농도에서도 독성효과는 나타나지 않았다.

#### 나. 1차 후보소재가 골아세포의 ALP 활성도에 미치는 영향

감초(GK), 정향피, 초두구를 대상으로 골아세포의 ALP 활성도에 미치는 영향을 측정하였다. 각 소재가 골아세포의 ALP 활성도에 미치는 영향은 골아세포 증식결과와 상관성이 매우 높았다. 국산 감초 추출물은 2.5 ~ 100 µg/ml의 범위에서 농도 의존적으로 골아세포의 ALP 활성도를 증가시켰다. 그러나 일본GK 시료 추출물은 5 ~ 25 µg/ml까지는 골아세포 ALP 활성을 증가시켰으나, 50 µg/ml에서는 대조치 정도로 증식을 감소시켰고 100 µg/ml에서는 대조치의 50% 수준으로 감소시켰다. 정향피와 초두구 추출물은 2.5와 5 µg/ml 농도에서는 골아세포 ALP 활성 증가에 영향이 없었으나, 10 ~ 50 µg/ml의 범위에서는 농도 의존적으로 골아세포 ALP 활성을 증가시켰다. 그러나 100 µg/ml에서는 골아세포 ALP 활성을 감소시켰는데, 특히 초두구 추출물은 대조치의 25% 정도로 감소시켰다 (Fig. 3-8).

1차 선정시료인 초두구, 감초, 정향피 소재 중 감초 시료가 세포독성이 적고 골아세포 증식 효과가 우수한 것으로 판단되었다.

ROS 17/2.8 ALP activity



ROS 17/2.8 ALP activity

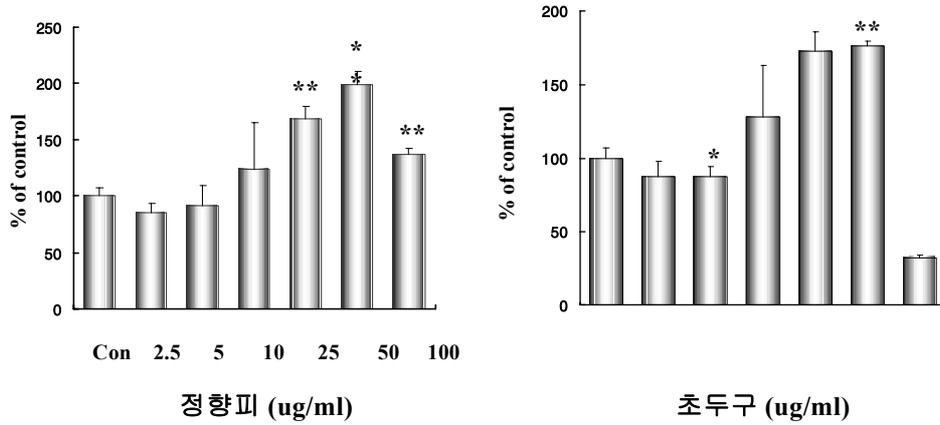


Fig. 35. Effects of the EtOH extract of some plants on ALP activity of ROS 17/2.8 osteoblast-like cells. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , vs.control.

#### 다. 2차 후보소재가 골아세포 증식에 미치는 영향

1차년도에 골아세포 증식효과를 비교해 본 추출물 중, 국산 감초는 100  $\mu$ g/ml 까지 농도-의존적으로 골아세포 증식을 증가시켰다. 반면에 일본 감초는 50  $\mu$ g/ml 이상의 농도에서 세포독성이 나타났고, 정향피 및 초두구는 50  $\mu$ g/ml 까지 농도-의존적으로 골아세포 증식을 증가시켰지만 100  $\mu$ g/ml 에서는 골아세포 독성이 나타났다.

2차년도에는 제 1세부과제에서 추출한 2차 추출물을 대상으로 하여 골아세포 각 식물추출물을 5 ~ 100  $\mu$ g/ml의 농도로 골아세포에 처리했을 때 세포증식에 미치는 효과를 실험하였다. Fig. 36과 같이 승마와 한국상백피 추출물은 100  $\mu$ g/ml까지 농도 의존적으로 골아세포의 증식을 증가시켰다. 그러나 국산 홍석류 추출물은 5 ~ 50  $\mu$ g/ml 까지는 골아세포 증식을 증가시켰으나, 100  $\mu$ g/ml 에서는 대조치 정도로 증식을 감소시켰고, 국산 흑석류 추출물은 10  $\mu$ g/ml에서 골아세포 증식이 30%정도 증가하였으나, 25  $\mu$ g/ml 보다 높은 농도에서는 대조치 정도로 증식을 감소시켰다. 복분자씨, 백화사설초와 민들레 추출물은 골아세포 증식에 영향이 없었고, 100  $\mu$ g/ml의 농도에서도 독성효과는 나타나지 않았다. 한편, 파고지 추출물을 대상으로 ROS 17/2.8 cell에 2.5 ~ 100  $\mu$ g/ml의 농도로 처리하여 골아세포 증식에 미치는 효과를 비교해 보았다. 파고지의 Ethanol 추출물은 2.5  $\mu$ g/ml 낮은 농도에서도 골아세포 증식을 유의하게 증가시켰고, 5  $\mu$ g/ml에서는 150%의 증가를 보였다.

#### 라. 2차 후보소재가 골아세포의 ALP 활성도에 미치는 효과

각 식물추출물을 25  $\mu$ g/ml의 농도로 골아세포에 처리했을 때, Fig. 36과 같이 한국상백피, 민들레추출물이 ALP 활성도를 유의하게 증가시켰고, 백화사설초와 국산홍석류와 승마도 증가시키는 경향을 나타내었다.

골아세포에서 추출물의 효과를 비교해 본 결과를 정리하면 다음과 같다. 한국상백피는 골아세포 증식과 ALP 활성도를 모두 유의하게 증가시키는 효과가 우수했다. 승마는 세포증식효과는 가장 크게 나타났으나, ALP 활성도 증가효과는 한국상백피보다 약하게 나타났다. 국산홍석류는 승마와 비슷한 골아세포 촉진효과를 나타냈는데, 100  $\mu$ g/ml의 농도에서는 골아세포 증식을

억제하였다. 고농도에서 독성효과를 나타내는지에 대해서는 앞으로 더 확인해 보아야 할 것이다. 민들레는 10  $\mu\text{g/ml}$  낮은 농도에서만 골아세포 증식효과가 나타났는데, ALP 활성도를 높이는 효과가 우수하였다. 복분자씨, 국산 흑석류, 백화사설초는 골아세포 촉진효과가 나타나지 않았다. 2차년도 선정시료 중에서는 상백피가 우수한 것으로 판단되었다.

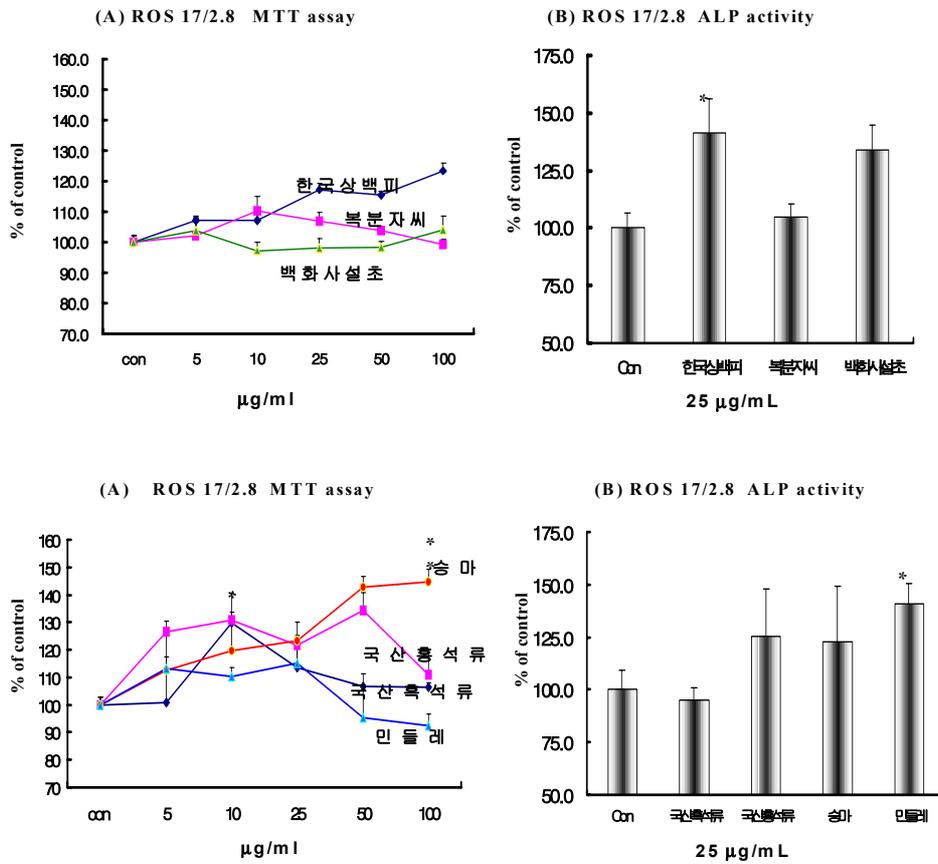


Fig. 36. Effects of the 80% EtOH extract of some plants on the proliferation and ALP activity of ROS 17/2.8 osteoblast-like cells.

## 6. 동물실험을 통한 갱년기 개선 효능 평가

본 세부과제에서는 갱년기 동물모델 유도 및 에스트로겐 감소에 따른 체내 항산화 체계 상태변화, 지질 대사계 변화를 분석하여 갱년기 호르몬 결핍으로 인한 체내 변화를 추적하고 2차로 선발 소재 추출물 투여 및 동물실험에서 효율적으로 효능을 평가하기 위하여 biomarker를 도출하고자 하였다.

문헌 조사와 주령별 예비실험에 근거하여 동물 모델은 6주령 된 Sprague-Dawley(SD)계 암컷 rat을 구입하여 2주일간 적응시킨 후 8주령에 난소적출한 모델을 적용하였다. 난소 절제 후 2주 동안 질구검사(vaginal smear)를 실시하였으며, 발정기(estrous cycle)를 보이는 3마리를 제외한 나머지 개체만을 선별하여 실험에 사용하였다. 각 처리군은 sham(n=10), OVX(n=10), 1차 후보소재인 감초(GK) 0.5% 투여군(n=8), GK 1% 투여군(n=8)으로 배치하였다. 각 처리군에서의 체중, 식이섭취량, 생화학 지표, 항산화계 효소 등을 분석한 결과는 아래와 같았다.

### 가. 체중 및 식이 섭취량

실험 시작 당시의 체중은 약 257g으로 실험군간의 차이가 없었으나 6주 동안 실험식이의 섭취로 OVX군의 체중증가가 51g으로 가장 커서 최종 체중이 유의적으로 증가하였다. 체중증가와 식이섭취량, 식이효율 모두 sham군에 비해 OVX군에서 증가를 나타내었으며, OE군은 오히려 감소하는 경향을 보였으며, 감초식이군에서는 Sham군에 비해 증가량이 컸으나 유의적 차이는 나타내지 않았다(Table 7).

Table 7. Body weight gain and food intake of rats fed experimental diets for 6weeks

	Sham	OVX	OE	KL	KH
<b>Weight gain (g/6weeks)</b>	4.37±11.14 <sup>b</sup>	51.23±11.31 <sup>a</sup>	-5.61±6.22 <sup>b</sup>	15.56±14.90 <sup>ab</sup>	12.86±19.66 <sup>b</sup>
<b>Food intake (g/6weeks)</b>	568.22±22.55 <sup>b</sup>	604.03±31.19 <sup>a</sup>	528.70±16.98 <sup>b</sup>	510.44±36.89 <sup>ab</sup>	514.70±39.3 <sup>b</sup>
<b>FER<sup>3)</sup></b>	0.0017±0.02 <sup>ab</sup>	0.0765±0.02 <sup>a</sup>	-0.01±0.01 <sup>b</sup>	0.0226±0.03 <sup>ab</sup>	0.0083±0.04 <sup>ab</sup>

1) Values are mean ± standard error

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at 0.05 by Duncan's multiple range test.

3) FER: food efficiency ratio

OVX: ovariectomy, OE: ovariectomy + 17 $\beta$ -estradiol(s.c. inj), KL: 0.5% licorice root administer, KH: 1% licorice root administer

## 나. 난소 및 장기 무게

Uterus와 Blotted uterus, Dried uterus 무게가 sham과 비교하였을 때, ovariectomy에 의해 유의적으로 감소되었으며 ovariectomy군에 17 $\beta$ -estradiol의 투여에 의해 무게가 유의적으로 증가하는 경향을 보였다(Table 8). 그러나 감초식이에 따른 차이는 보이지 않았다. 간과 신장은 군 간에 차이가 없었다. 그러나 장기의 무게를 체중당으로 계산한 경우에 간과 신장의 무게는 sham에 비해 OVX에서 감소되었으며, OE군과 감초 식이군에서 OVX군에 비해 유의적으로 증가하였다. 또한 Uterus와 Blotted uterus, Dried uterus 무게는 absolute 결과와 동일한 경향으로 나타났다.

**Table 8. Uterus and organ weights(g) of rats fed experimental diets for 6weeks**

	Liver		Kidney		Uterus		Blotted Uterus		Dried Uters	
	Absolute	Relative	Absolute	Relative	Absolute	Relative	Absolute	Relative	Absolute	Relative
Sham	5.93 ±0.13 <sup>ab</sup>	2.28 ±0.07 <sup>ab</sup>	1.49 ±0.03 <sup>ns</sup>	0.57 ±0.04 <sup>ab</sup>	0.57 ±0.08 <sup>a</sup>	0.213 ±0.03 <sup>a</sup>	0.47 ±0.04 <sup>a</sup>	0.174 ±0.01 <sup>a</sup>	0.09 ±0.008 <sup>a</sup>	0.0334 ±0.002 <sup>a</sup>
OVX	6.17 ±0.10 <sup>ab</sup>	2.05 ±0.08 <sup>b</sup>	1.58 ±0.04	0.52 ±0.04 <sup>b</sup>	0.18 ±0.04 <sup>c</sup>	0.06 ±0.01 <sup>b</sup>	0.16 ±0.03 <sup>b</sup>	0.053 ±0.01 <sup>b</sup>	0.04 ±0.007 <sup>b</sup>	0.013 ±0.002 <sup>b</sup>
OE	6.05 ±0.19 <sup>ab</sup>	2.43 ±0.06 <sup>a</sup>	1.51 ±0.03	0.61 ±0.05 <sup>a</sup>	0.44 ±0.02 <sup>b</sup>	0.16 ±0.01 <sup>a</sup>	0.40 ±0.01 <sup>a</sup>	0.15 ±0.01 <sup>a</sup>	0.09 ±0.004 <sup>a</sup>	0.033 ±0.003 <sup>a</sup>
KL	5.80 ±0.31 <sup>b</sup>	2.11 ±0.06 <sup>b</sup>	1.54 ±0.04	0.56 ±0.07 <sup>ab</sup>	0.13 ±0.003 <sup>c</sup>	0.05 ±0.002 <sup>b</sup>	0.12 ±0.004 <sup>b</sup>	0.043 ±0.002 <sup>b</sup>	0.03 ±0.001 <sup>b</sup>	0.01 ±0.001 <sup>b</sup>
KH	6.65 ±0.41 <sup>a</sup>	2.50 ±0.13 <sup>a</sup>	1.50 ±0.05	0.57 ±0.03 <sup>ab</sup>	0.17 ±0.02 <sup>c</sup>	0.07 ±0.01 <sup>b</sup>	0.16 ±0.02 <sup>b</sup>	0.065 ±0.01 <sup>b</sup>	0.04 ±0.004 <sup>b</sup>	0.017 ±0.04 <sup>b</sup>
F value	1.68	4.75 <sup>**</sup>	0.73	2.95 <sup>*</sup>	14.80 <sup>***</sup>	11.97 <sup>***</sup>	23.31 <sup>***</sup>	16.01 <sup>***</sup>	21.47 <sup>***</sup>	12.80 <sup>***</sup>

- 1) Absolute : absolute weights of organ(g), Relative : relative weights of organ(g/100g body weight)
- 2) Values are mean  $\pm$  standard error
- 3) Values with different alphabet within the column are significantly different at 0.05 by Duncan's multiple range test
- 4) *B.U.*: blotted uterus, *D.U.*: dried uterus
- 5) NS : Not significant

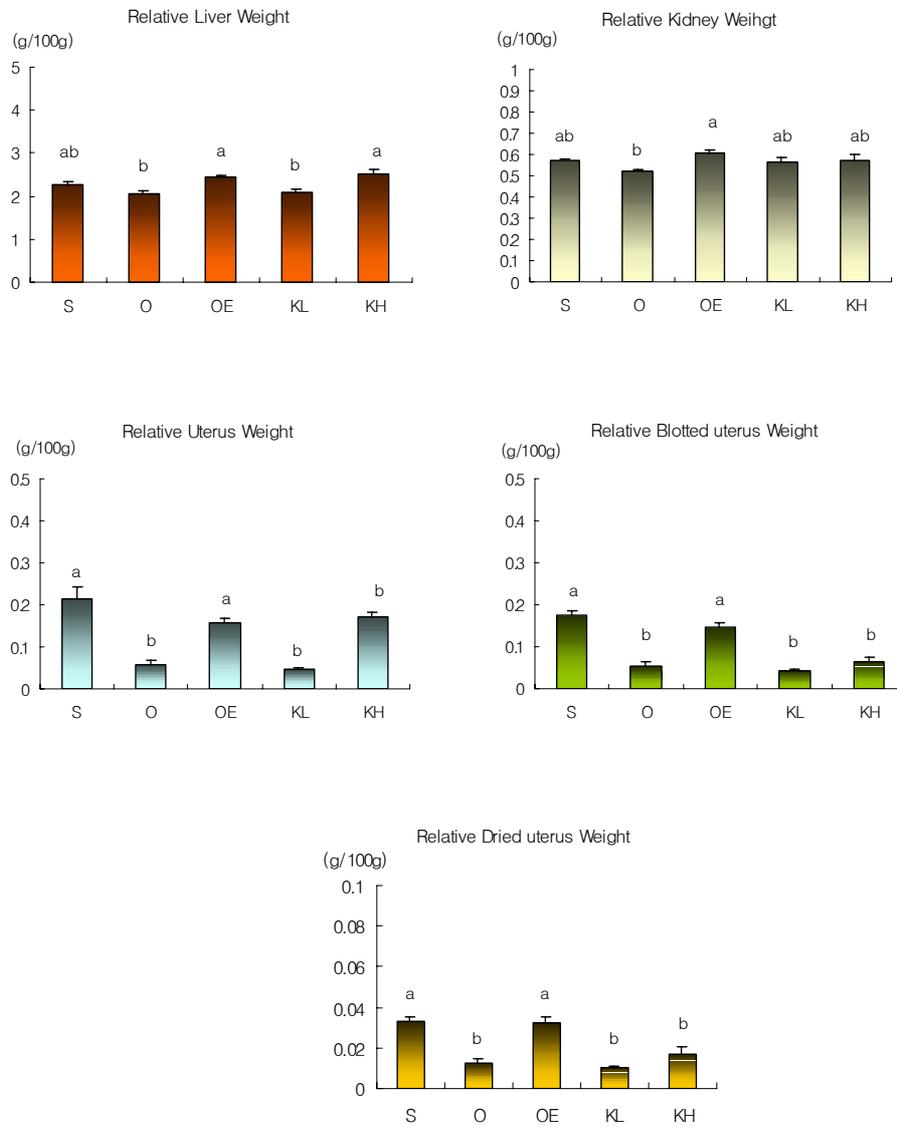


Fig. 37. Relative uterus and organ weights(g/100g bw) of rats fed experimental diets for 6weeks

#### 다. 대퇴골 중량 및 두께

난소절제 후 6주간 실험식이를 섭취한 Rat의 좌·우 대퇴골의 무게와 길이, 두께(대퇴골두 아래 소전자부분의 가로, 대퇴골체 가로, 대퇴골체의 세로)를 측정하였다(Table 9). OVX 대퇴골의 무게와 길이, 두께가 sham군보다 오히려 증가하는 경향을 나타내었으며, 17 $\beta$ -estradiol의 투여시 sham군과 비슷한 수치를 보였다. 또한 유의적으로 감초 고식이군의 경우 sham군 보다도 무게가 낮게 나타났으며, 그 외 길이와 두께의 경우 감초식이에 의하여 농도의존적으로 감소하는 경향을 보였다.

**Table 9. Bone weight, length and thickness of female rats fed a experimental diets for 6 weeks**

	Weight		Length		Thickness A		Thickness B		Thickness C	
	Left	Right	Left	Right	Left	Right	Left	Right	Left	Right
sham	0.77 ±0.04 <sup>ab</sup>	0.74 ±0.06 <sup>ab</sup>	36.08 ±0.36 <sup>bc</sup>	36.04 ±0.35 <sup>bc</sup>	5.05 ±0.22 <sup>ns)</sup>	5.00 ±0.24 <sup>ns)</sup>	3.87 ±0.14 <sup>abc</sup>	3.92 ±0.16 <sup>c</sup>	3.19 ±0.09 <sup>c</sup>	3.22 ±0.08 <sup>b</sup>
OVX	0.79 ±0.08 <sup>a</sup>	0.77 ±0.07 <sup>a</sup>	37.21 ±0.62 <sup>a</sup>	37.05 ±0.64 <sup>a</sup>	5.22 ±0.29	5.22 ±0.20	3.99 ±0.11 <sup>a</sup>	4.05 ±0.12 <sup>ab</sup>	3.30 ±0.09 <sup>ab</sup>	3.36 ±0.15 <sup>a</sup>
OE	0.71 ±0.06 <sup>bc</sup>	0.69 ±0.07 <sup>b</sup>	35.67 ±0.73 <sup>c</sup>	35.64 ±0.84 <sup>c</sup>	5.10 ±0.21	5.05 ±0.15	3.81 ±0.09 <sup>c</sup>	3.93 ±0.09 <sup>bc</sup>	3.24 ±0.07 <sup>bc</sup>	3.18 ±0.10 <sup>b</sup>
KL	0.74 ±0.07 <sup>ab</sup>	0.73 ±0.05 <sup>ab</sup>	36.40 ±0.88 <sup>ab</sup>	36.36 ±0.89 <sup>ab</sup>	5.25 ±0.23	5.16 ±0.30	3.94 ±0.15 <sup>ab</sup>	4.05 ±0.08 <sup>a</sup>	3.33 ±0.08 <sup>a</sup>	3.32 ±0.08 <sup>a</sup>
KH	0.69 ±0.08 <sup>c</sup>	0.68 ±0.11 <sup>b</sup>	36.37 ±1.34 <sup>bc</sup>	36.28 ±1.19 <sup>abc</sup>	5.18 ±0.25	5.05 ±0.16	3.89 ±0.14 <sup>bc</sup>	3.95 ±0.17 <sup>c</sup>	3.35 ±0.13 <sup>a</sup>	3.29 ±0.13 <sup>a</sup>
F value	4.56 <sup>**</sup>	3.08	5.07 <sup>**</sup>	4.50 <sup>**</sup>	1.43	2.36	3.52 <sup>*</sup>	4.02 <sup>**</sup>	5.58 <sup>**</sup>	5.20 <sup>***</sup>

1) Values are mean ± standard error

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at 0.05 by Duncan's multiple range test.

3) *Thickness A*: neck of femur, *Thickness B*: transverse section of femur body, *Thickness C*: sagittal section of femur body

4) NS: Not significant

라. 혈중 중성지방과 콜레스테롤

혈청을 분석한 결과, OVX의 estradiol 농도는 sham보다 유의적인 감소를 보였으며, 17 $\beta$ -estradiol 투여에 의해 증가하였으나 그 수치는 sham군에 미치지 못하였다(Table 10). 또한 감초식이군에서 농도의존적으로 estradiol의 수치가 증가하였으며, 감초고농도식이군에서 17 $\beta$ -estradiol 투여군과 비슷한 수치를 나타내었다.

Sham과 비교했을때, TG를 제외하고 OVX의 total cholesterol과 HDL, Free cholesterol은 증가하는 경향을 보였으며 TG는 유의적으로 감소하였다. 17 $\beta$ -estradiol 투여에 의해서 TG와 total cholesterol은 가장 높은 값을 보였으며, TG는 OVX와 비교했을때 유의적인 증가를 보였다. 감초식이에 의해 농도의존적으로 TG와 total cholesterol의 유의적인 감소를 나타내었다.

Table 10. TG, total cholesterol, HDL and free cholesterol concentrations in serum of ovariectomized rats fed experimental diets for 6weeks

	TG <sup>3)</sup> (mg/dl)	TC (mg/dl)	HDL (mg/dl)	FC (mg/dl)	Estradiol (pg/ml)
Sham	45.88±2.81 <sup>b</sup>	55.41±2.24 <sup>b</sup>	51.68±3.74 <sup>b</sup>	28.30±1.21 <sup>ab</sup>	33.45±3.18 <sup>a</sup>
OVX	43.40±1.87 <sup>b</sup>	62.74±1.71 <sup>a</sup>	66.45±3.99 <sup>a</sup>	30.18±0.88 <sup>ab</sup>	17.58±1.71 <sup>b</sup>
OE	57.90±5.55 <sup>a</sup>	64.21±1.29 <sup>a</sup>	59.81±2.01 <sup>ab</sup>	31.93±0.64 <sup>a</sup>	21.15±1.10 <sup>b</sup>
KL	38.38±4.39 <sup>b</sup>	64.53±1.84 <sup>a</sup>	58.86±5.19 <sup>ab</sup>	32.17±2.09 <sup>a</sup>	19.09±1.67 <sup>b</sup>
KH	36.11±2.72 <sup>b</sup>	58.16±5.25 <sup>ab</sup>	64.10±4.17 <sup>a</sup>	26.29±2.77 <sup>b</sup>	21.31±1.98 <sup>b</sup>
<b>F value</b>	5.16 <sup>**</sup>	3.31 <sup>*</sup>	2.12	2.54	9.54 <sup>***</sup>

1) Values are mean ± standard error

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at 0.05 by Duncan's multiple range test.

3) TG; triglyceride, TC; Total cholesterol, HDL; high-density lipoprotein, FC; free cholesterol

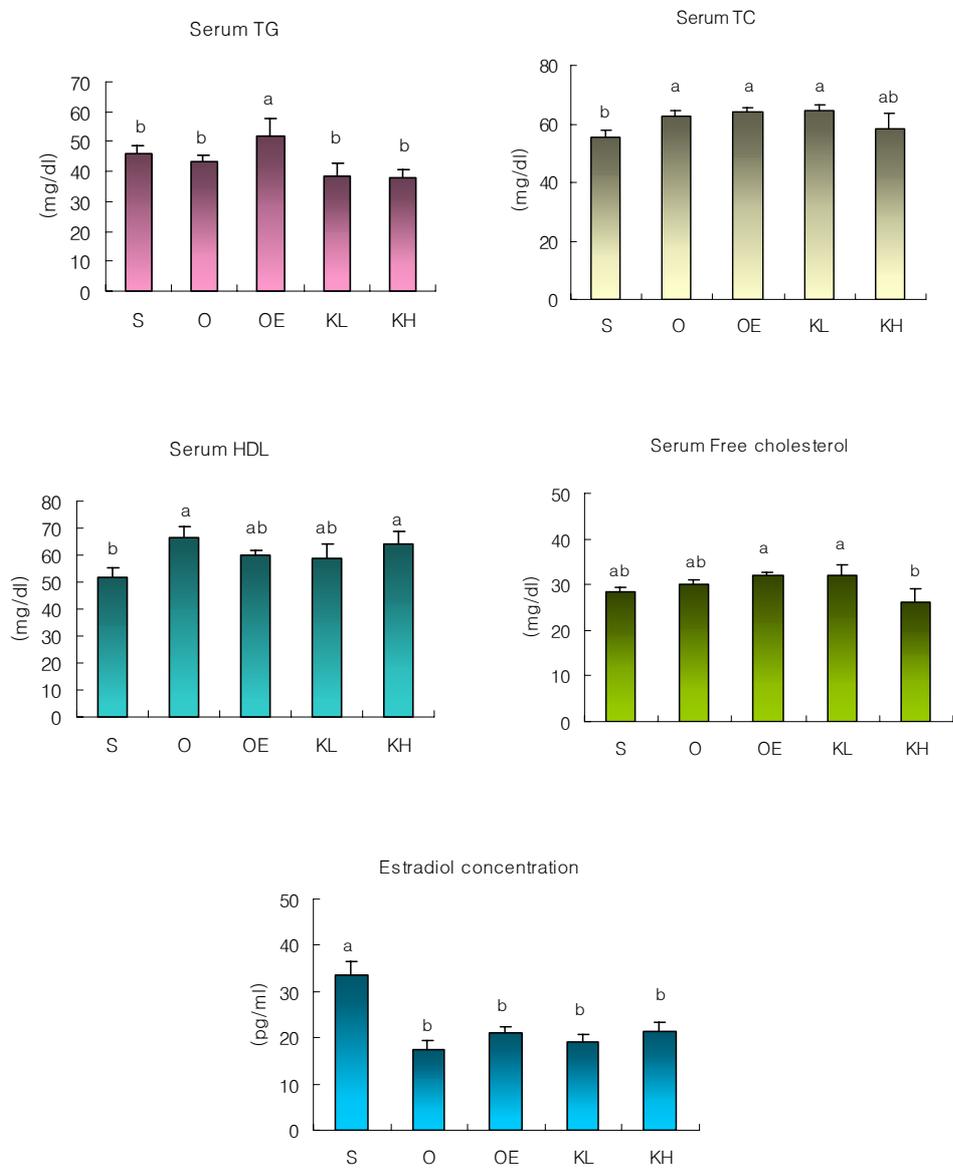


Fig. 38. TG, total cholesterol, HDL and free cholesterol concentrations in serum of ovariectomized rats fed experimental diets for 6weeks

마. 간의 지질과 콜레스테롤

실험 rats의 간에서 total lipid와 TG, total cholesterol의 농도를 분석한 결과, ovariectomy에 의해 간 내 total lipid의 양과 TG, total cholesterol의 값이 모두 유의적으로 증가하였다(Table 11). 그러나 17 $\beta$ -estradiol의 투여한 결과 그 수치들은 모두 sham군과 비슷한 수치를 나타내었으며, 감초식이에 의해서도 이와 같은 효과를 보였으며, 고농도의 감초식이군에서 그 효과는 더 크게 나타났다.

Table 11. Total lipid, TG and total cholesterol concentrations in liver of ovariectomized rats fed experimental diets for 6weeks

	(mg/g liver)		
	Total lipid	TG <sup>3)</sup>	TC
Sham	61.81±3.09 <sup>b</sup>	3.91±0.25 <sup>b</sup>	0.97±0.03 <sup>b</sup>
OVX	78.48±3.11 <sup>a</sup>	5.60±0.21 <sup>a</sup>	1.06±0.02 <sup>a</sup>
OE	58.44±2.59 <sup>b</sup>	3.12±0.15 <sup>bc</sup>	0.81±0.02 <sup>c</sup>
KL	59.49±2.64 <sup>b</sup>	3.54±0.42 <sup>b</sup>	0.98±0.04 <sup>ab</sup>
KH	51.91±4.35 <sup>b</sup>	2.59±0.36 <sup>c</sup>	0.85±0.02 <sup>c</sup>
<b>F value</b>	8.64 <sup>***</sup>	20.21 <sup>***</sup>	13.93 <sup>***</sup>

1) Values are mean ± standard error

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at 0.05 by Duncan's multiple range test.

3) TG; triglyceride, TC; Total cholesterol, HDL; high-density lipoprotein, FC; free cholesterol

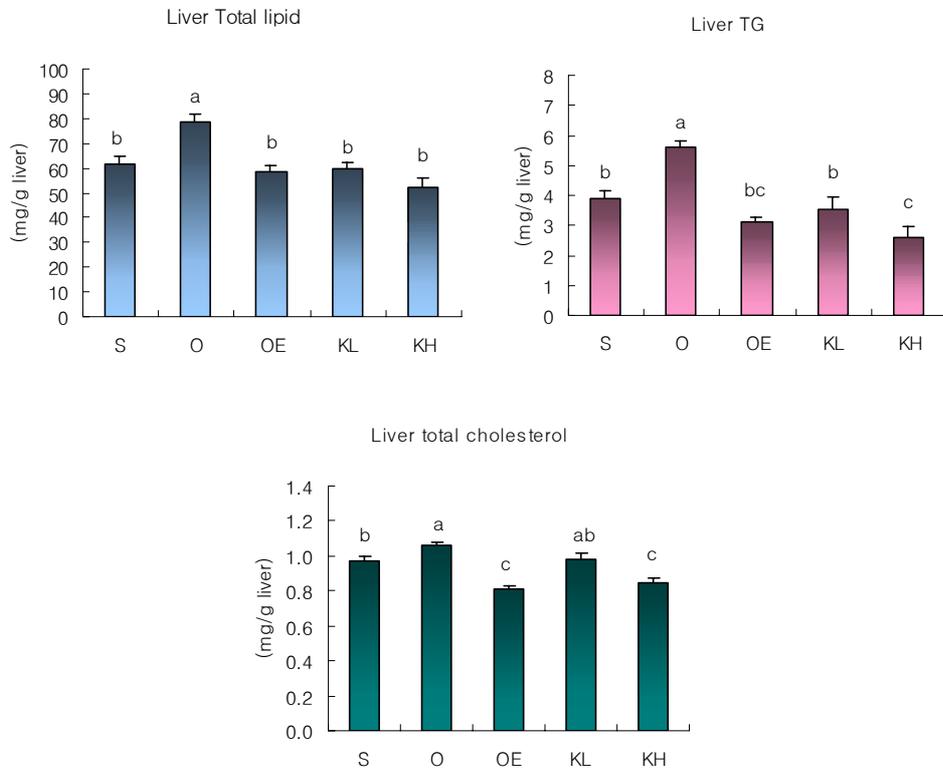


Fig. 39. Total lipid, TG and total cholesterol concentrations in liver of ovariectomized rats fed experimental diets for 6weeks

**바. 간과 신장의 항산화 효소활성**

간 내 항산화 효소를 분석한 결과, OVX군의 MDA와 catalase는 sham에 비해 감소하였으며, SOD와 GPx는 증가하는 결과를 보였다(Table 12). 17 $\beta$ -estradiol의 투여로 MDA는 유의적으로 감소하였으나, 감초식은 ovariectomy의 MDA 수치와 비슷한 값을 나타내었다. 그리고 SOD와 GPx는 OVX군에 비해 17 $\beta$ -estradiol의 투여와 감초식에 의해 유의적인 증가를 보였다.

또한 신장 내 MDA 수치를 분석한 결과, sham군보다 OVX군에서 감소하는 결과를 나타냈으며, 17 $\beta$ -estradiol의 투여와 감초식에 의해 증가하는 양상을 보였다.

**Table 12. Antioxidant enzymes activities in liver and kidney of ovariectomized rats fed experimental diets for 6weeks**

	Liver				Kidney
	MDA (nmol/g liver)	Catalase (unit/min.mg ptotein)	SOD (unit/min.mg protein)	GPx (nmole/min. mg protein)	MDA (nmol/g liver)
<b>Sham</b>	147.81±5.46 <sup>a</sup>	5.68±1.40 <sup>ab</sup>	38.02±0.14 <sup>b</sup>	550.72±24.88 <sup>b</sup>	60.69±2.53 <sup>bc</sup>
<b>OVX</b>	131.72±6.16 <sup>ab</sup>	5.33±0.93 <sup>b</sup>	40.30±0.15 <sup>b</sup>	602.52±35.99 <sup>b</sup>	55.86±2.19 <sup>c</sup>
<b>OE</b>	123.66±5.23 <sup>b</sup>	5.82±4.10 <sup>a</sup>	47.97±0.15 <sup>a</sup>	656.32±42.00 <sup>ab</sup>	59.38±1.48 <sup>c</sup>
<b>KL</b>	135.31±8.87 <sup>ab</sup>	5.44±1.08 <sup>ab</sup>	50.02±0.14 <sup>a</sup>	729.86±45.32 <sup>a</sup>	67.38±1.45 <sup>a</sup>
<b>KH</b>	132.17±6.63 <sup>ab</sup>	5.88±1.94 <sup>a</sup>	52.09±0.16 <sup>a</sup>	768.33±46.54 <sup>a</sup>	65.54±2.05 <sup>ab</sup>
<b>F value</b>	2.69 <sup>*</sup>	2.52 <sup>*</sup>	6.97 <sup>***</sup>	5.32 <sup>***</sup>	5.08 <sup>**</sup>

1) Values are mean ± standard error

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at 0.05 by Duncan's multiple range test.

3) TG; triglyceride, TC; Total cholesterol, HDL; high-density lipoprotein, FC; free cholesterol

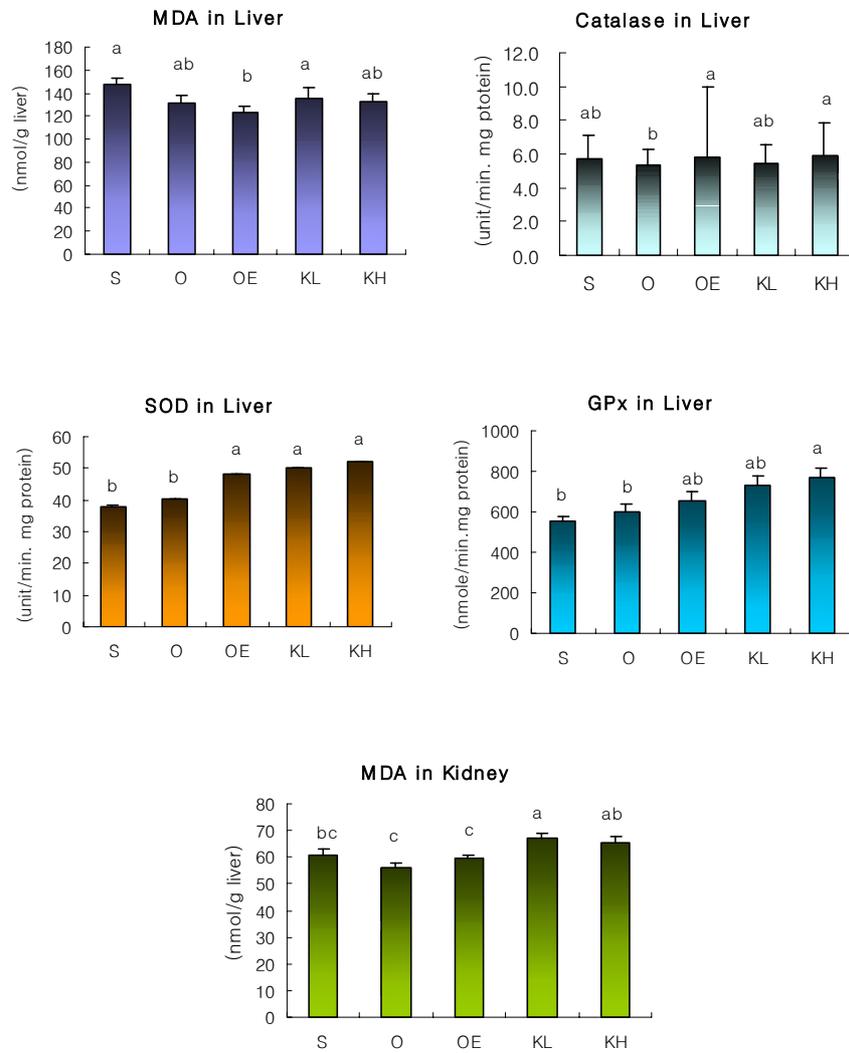


Fig. 40. Antioxidant enzymes activities in liver and kidney of ovariectomized rats fed experimental diets for 6weeks

난소절제로 유도한 갱년기 동물모델을 대상으로 에스트로겐 감소에 따른 생육 특성, 혈청 및 간의 지질 대사계 변화, 체내 항산화 효소계 변화를 살펴본 결과 체중증가, 난소의 중량, 혈청의 estradiol 농도, 간의 지질, TG, TC 등이 갱년기 호르몬 결핍으로 인한 체내 변화를 추적에 유용한 biomarker로 나타났으며 혈청의 지질대사계와 간 및 신장의 항산화계는 난소절제 처리로 인한 차이가 뚜렷하지 않았다.

전반적인 결과로 보아 암컷 rat을 난소적출할 모델은 일반적으로 6-8주령을 사용하고 있으나 갱년기 개선 효능 판별을 위하여 주령이 높은 암컷이 요구될 것으로 판단되었다. 한편 난소절제 후 실험식이를 공급하는 군보다 난소절제 전부터 실험식이를 공급 할 경우 폐경전 섭취군 및 폐경 후 섭취군간 식물성 호르몬으로서의 효능 평가를 비교할 수 있을 것으로 판단되었다.

## 7. Phytoestrogen 유효소재의 유방암 억제 관련 기전 연구

### 가. 유효소재에 의한 세포사과정의 관찰

과고지 소재에서 확인된 ER+ 유방암 세포인 MCF-7에서의 성장 억제 작용을 ER- 유방암 세포인 MDA-MB-231세포에서도 확인하였다. 위의 시험 결과에서처럼 과고지는 MCF-7세포 뿐만 아니라 에스트로젠 리셉터의 존재 여부와는 상관없이 MDA-MB-231세포에서도 세포의 성장을 시간 및 농도 의존적으로 감소시키는 것이 확인되었다. 따라서 에스트로젠활성이 존재하면서도 유방암세포의 증식을 억제시키는 것이 확인된 감초와 과고지의 추출물이 세포사 및 세포주기 관련 세포내 신호전달에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Hoechst 33258 staining, DNA ladder assay, Flow cytometry 및 Western blotting을 실시하였다.

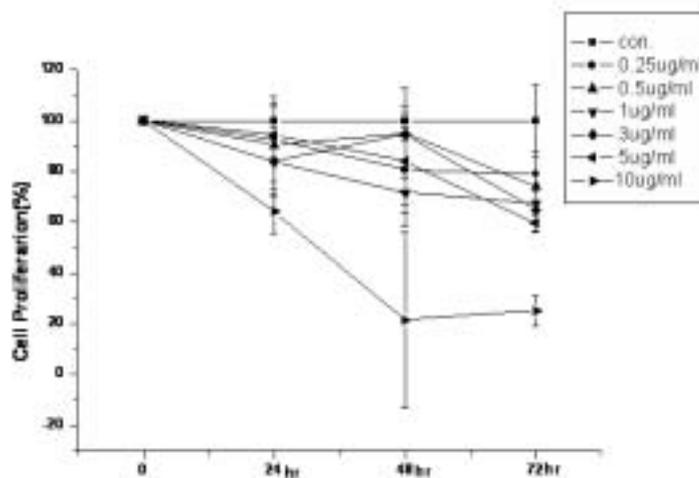


Fig. 41. Effects of extract of nut of *Psoralea corylifolia* L. on the proliferation of MDA-MB-231 human breast cancer cells

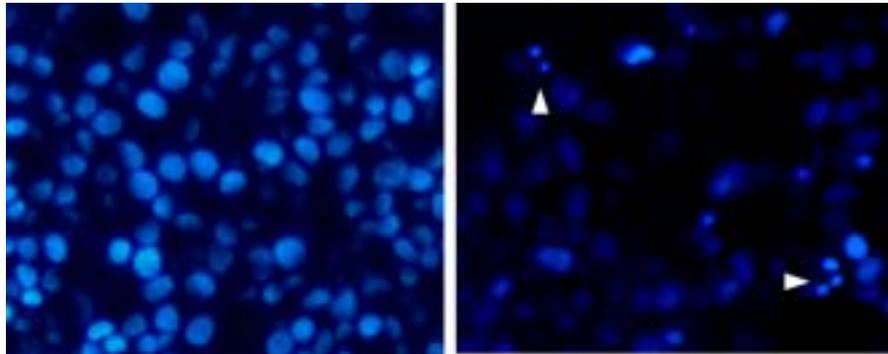


Fig. 42. Detection of apoptotic morphological changes in MCF-7 cells treated with extract of *Psoralea corylifolia L.*

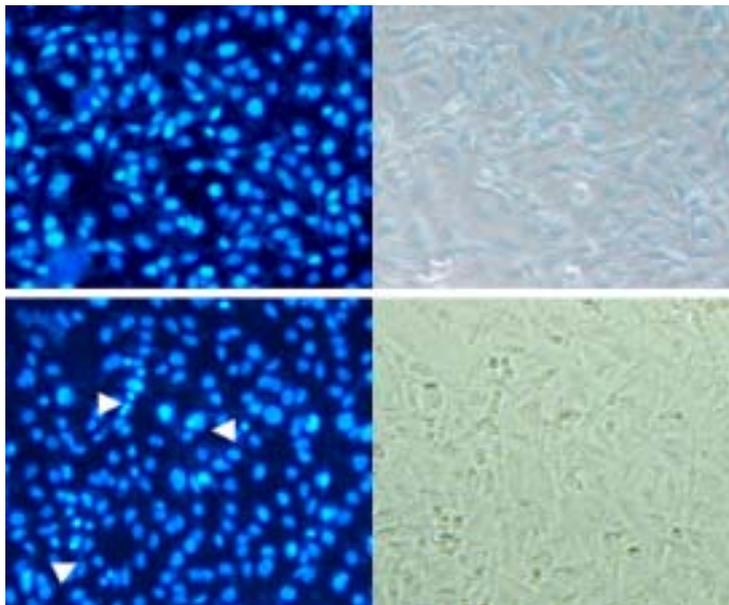


Fig. 43. Detection of apoptotic morphological changes in MDA-MB-231 cells treated with extract of *Psoralea corylifolia L.*

파고지의 에탄올 추출물이 MCF-7과 MDA-MB-231세포에서 성장을 저해하는 결과를 확인한 후 그 영향이 세포사에 의한 세포수의 감소인지 세포 주기를 조절하여 성장을 저해한 것인지 시험하였다. Hoechst 33258 staining 시험법을 사용하여 파고지 추출물에 노출된 사람의 유방암세포를 현광현미경으로 관찰한 결과, 화살표 표시된 그림처럼 세포핵의 분절과 응집을 확인할 수 있었다. 이는 파고지 추출물이 MCF-7과 MDA-MB-231세포 모두에서 apoptosis를 유도하는 것으로 판단할 수 있으며 다음의 시험에서 그 기전을 연구하였다.

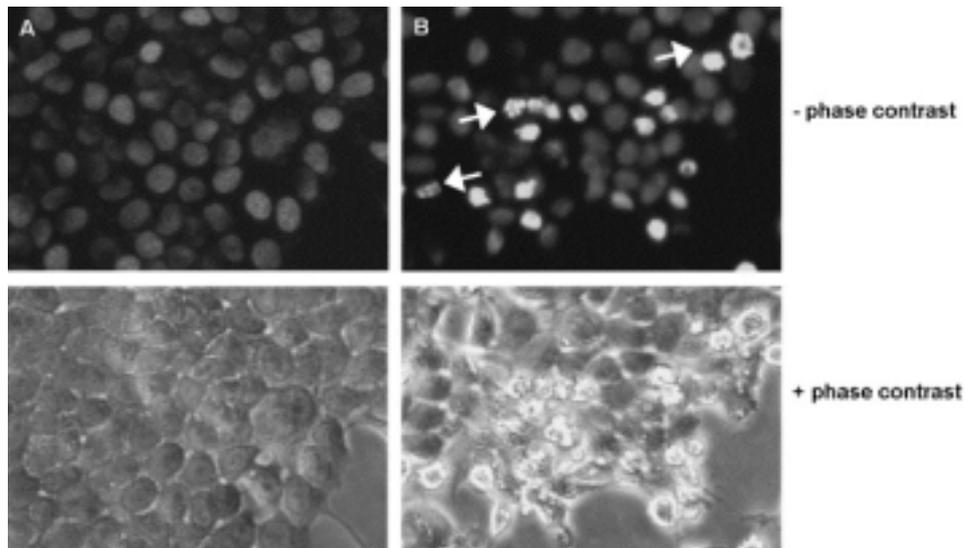


Fig. 44. Detection of apoptotic morphological changes in MCF-7 cells treated with the 80% ethanol extract of licorice root at concentration 100  $\mu$ g/ml.

파고지 추출물과 같이 감초 추출물을 MCF-7 세포에서 48시간동안 처리하였을때, apoptosis가 유도되는 세포들은 세포핵의 단편화와 응집이 관찰되어 세포사멸이 일어났음을 보여주고 있다. 나머지 apoptosis가 유도되지 않은 세포들은 대조군과 유의적인 차이가 없었으며 이는 정상 사람의 유방 세포에서도 관찰할 수 있었다. 따라서 감초추출물은 특이적으로 사람의 유방암 세포의 사멸을 유도함으로써 세포의 증식을 억제하는 것으로 판단할 수 있었다. 이와 관련된 일련의 세포 내 기전들은 다음의 연구들을 통하여 진행하였다.

#### 나. 유효소재가 세포주기에 미치는 영향분석

감초와 파고지 추출물이 사람의 유방암 세포에서 세포사멸을 유도하는 것을 확인하고 그 이외의 세포주기를 조절함으로써 세포의 성장을 억제하는 가능성을 확인하기 위하여 Flow cytometry를 실시하여 세포 DNA analysis를 실시해 보았다.

파고지의 경우 시간이 지남에 따라 sub-G1의 세포, 즉 apoptosis가 유도되어 핵의 절편이 형성된 세포의 수가 현저하게 증가하는 것을 확인할 수 있었지만, 세포 주기의 변화는 관찰할 수 없었다. 그러나 감초의 경우 48시간 노출되었을 때 세포의 sub-G1의 세포, 즉 apoptosis 세포도 증가하지만, 24시간 노출되었을 때 세포사멸보다는 G1세포의 증가를 관찰할 수 있었다. 이는 감초의 유방암 세포 성장 억제가 세포사 뿐만 아니라 세포성장 조절을 통해 유방암 세포의 증식을 억제하는 것으로 생각할 수 있다.

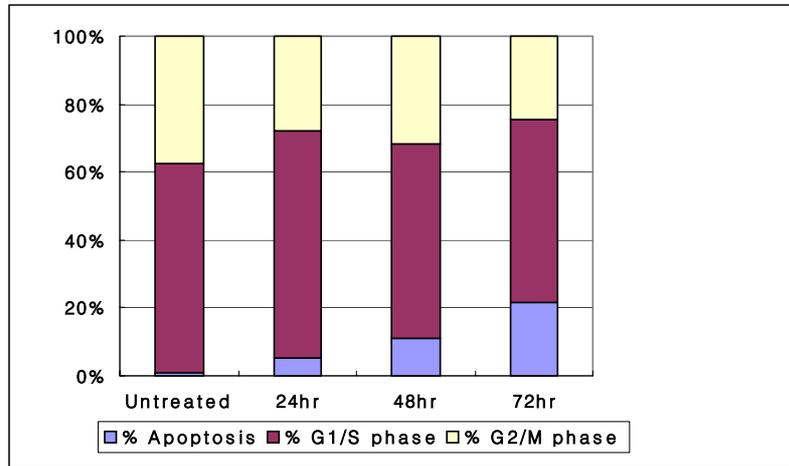


Fig. 45. Cell viability and DNA profiles of MCF-7 cells after exposure to 50 µg/ml of *Psoralea corylifolia L.*

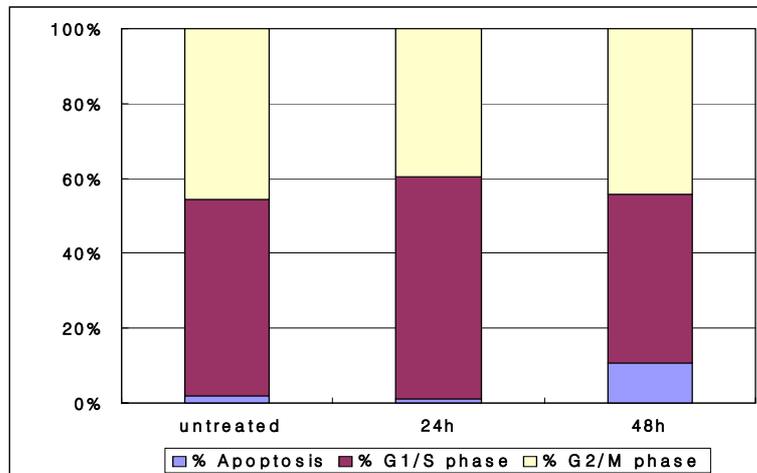


Fig. 46. Cell viability and DNA profiles of MCF-7 cells after exposure to 50 µg/ml of licorice root

다. 세포사 및 세포주기 관련 세포내 신호전달기전 규명

(1) Whole protein extract and Western blotting

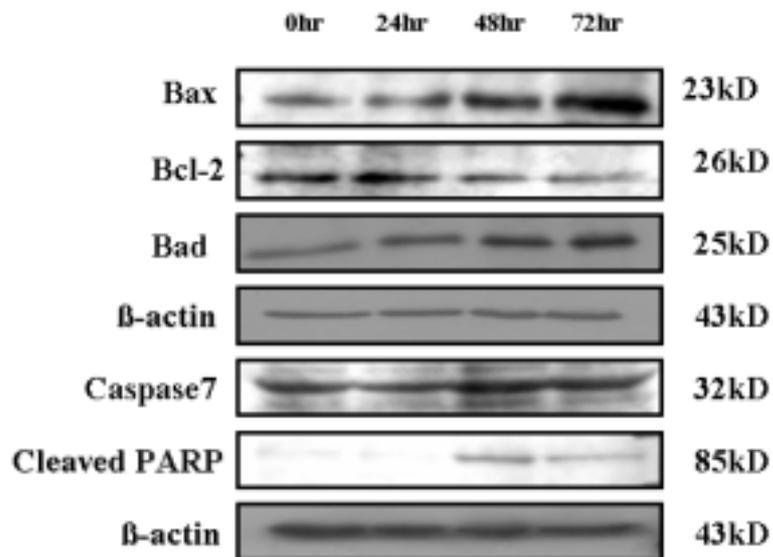


Fig. 47. Effects of *Psoralea corylifolia* L. on expression of Bcl-2 family, caspase and PARP in MCF-7 cells.

과고지의 추출물이 MCF-7세포에서 성장의 저해 일으키는 기전에 어떠한 단백질이 관여하는 지 알아보기 위해 western blotting 시험법으로 시험하였다. 먼저 세포사멸과 관련된 단백질의 변화를 시간의 변화에 따라 어떻게 변하는지 알아보았다.

시간이 증가함에 따라 세포사멸 과정에서 중요한 인자로 작용하는 pro-apoptotic 단백질인 bax와 bad의 증가가 관찰되며 anti-apoptotic 단백질인 bcl-2의 감소가 뚜렷이 확인되었으며, 실질적으로 apoptosis를 유발시키는 단백질분해효소인 caspase 7의 증가와 apoptosis를 시작하는 단백질인 parp이 활성화되면서 잘려진 분절이 48시간부터 명확히 관찰되는 것을 확인할 수 있었다.

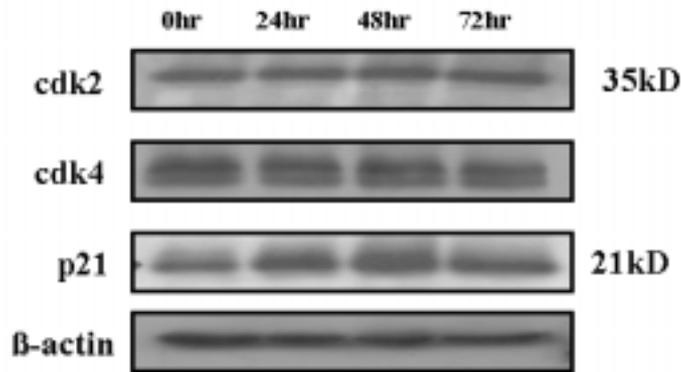


Fig. 48. Effects of *Psoralea corylifolia* L. on expression of p21 and cdk2/cdk4 in MCF-7 cells.

다음은 파고지 추출물을 MCF-7세포에 시간에 따라 처리하였을 때 세포 주기의 조절에 관련된 단백질이 어떻게 변하는지 western blotting 시험법을 이용하여 시험하였다.

위에 보이는 결과와 같이 세포 분열에 관여하는 단백질인 cyclin을 인산화시키는 효소인 cdk2, cdk4와 이 cdk의 작용을 억제하는 단백질의 합성을 유도하는 단백질인 p21 모두 시간에 따른 변화가 관찰되지 않았다.

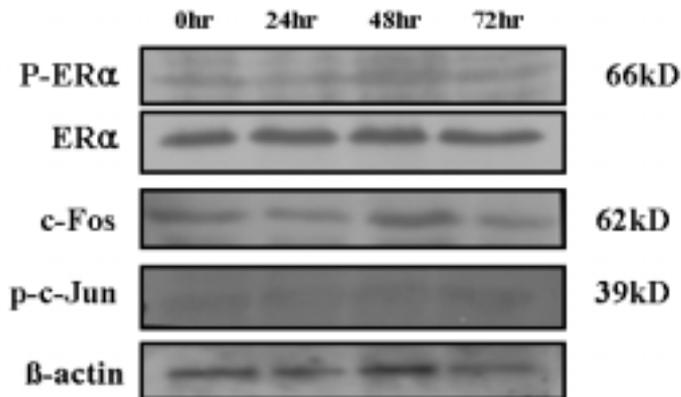


Fig. 49. Effects of *Psoralea corylifolia* L. on expression of ERα, c-Fos and c-Jun in MCF-7 cells.

MCF-7 세포는 에스트로겐 수용체를 가지는 세포주로서 2차년도 보고서에 포함된 효모를 이용한 증식시험에서 확인된 바와 같이 저농도에서 에스트로겐성이 확인되었기 때문에 물질처치가 에스트로겐 수용체의 활성화에 어떤 영향을 미치는지 또한 에스트로겐 수용체와 관련 단백질인 c-fos와 c-jun의 발현수준을 알아보았다. Fig. 49에서 보는바와 같이 시간에 따라 발현정도의 차이가 없는 것으로 확인되었다.

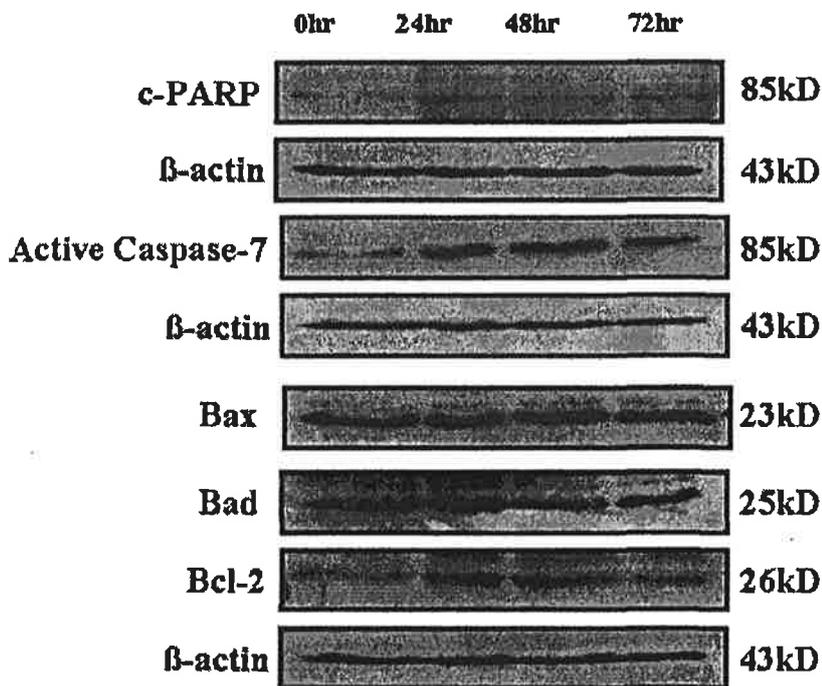


Fig. 50. Effects of *Psoralea corylifolia L.* on expression of Bcl-2 family, caspase and PARP in MDA-MB-231 cells.

파고지의 추출물이 MDA-MB-231세포에서 성장의 저해 일으키는 기전에 어떠한 단백질이 관여하는 지 알아보기 위해 western blotting 시험법으로 시험하였다. 먼저 MCF-7세포에서와 같이 세포사멸과 관련된 단백질을 시간의 변화에 따라 시험하였다.

먼저 세포사멸을 시작하는 단백질이 활성화되어 잘려진 형태의 c-parp이 관찰되었으며 실제로 세포사멸을 일으키는 단백질분해효소인 caspase 7이 물

질처지에 의해 활성화된 것이 관찰되었다.

그러나 MCF-7과 달리 pro-apoptotic 단백질인 bax의 발현은 변화가 없었으며 세포사멸을 촉진시키는 단백질인 bad의 변화도 관찰되지 않았다. 그러나 bax, bad와 반대 기능을 하는 pro-apoptotic 단백질인 bcl-2는 시간이 지남에 따라 감소하는 양상을 보였다.

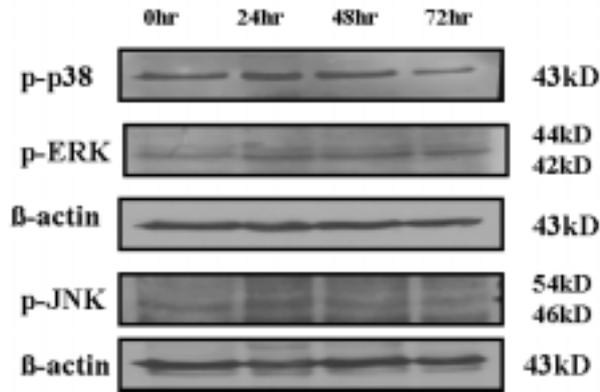


Fig. 51. Effects of *Psoralea corylifolia* L. on expression of MAPKs in MDA-MB-231 cells.

다음은 파고지 추출물을 MDA-MB-231세포에 시간에 따라 처치하였을 때 MAPK의 발현 양상에 어떤 변화를 일으키는지에 대해 western blotting 방법을 사용하여 시험하였다. 그림에서 보이는 바와 같이 시간에 따른 물질 처치에도 p38, ERK, JNK의 발현수준이 변하지 않는 것을 확인하였다.

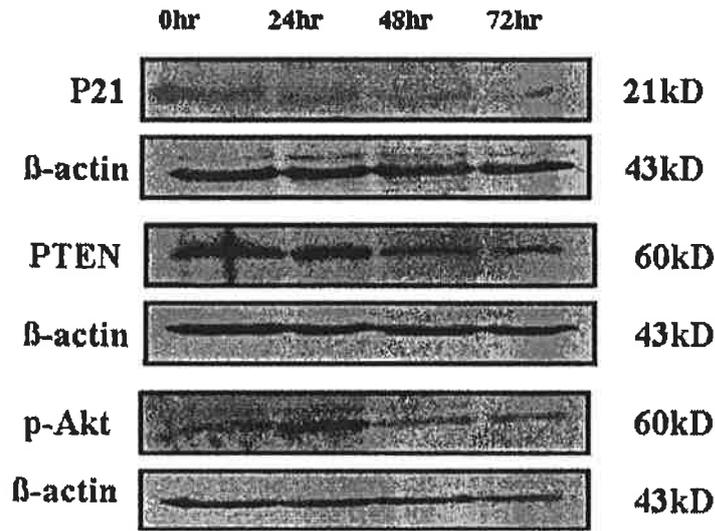


Fig. 52. Effects of *Psoralea corylifolia* L. on expression of PTEN and Akt in MDA-MB-231 cells.

MDA-MB-231세포에 파고지 추출물을 처치하였을 때 주기의 조절에 관련된 단백질인 P21에는 시간에 따른 변화가 관찰되지 않았다. 파고지 추출물이 암억제 단백질인 PTEN과 PTEN의 하위 단계인 akt의 활성 정도에 미치는 영향에 대해 시험하였다. PTEN은 시간에 지남에 따라 감소하는 양상을 보였으나 akt의 활성화에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

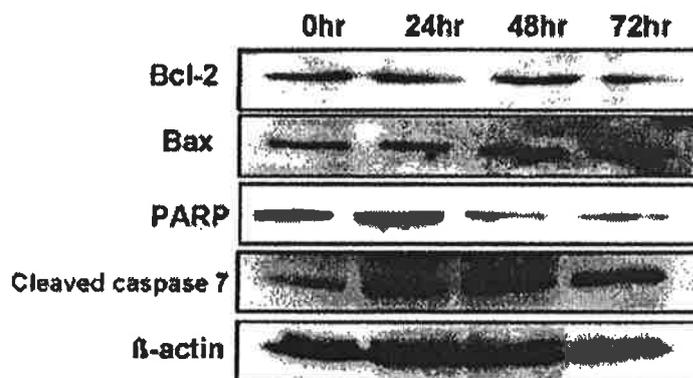
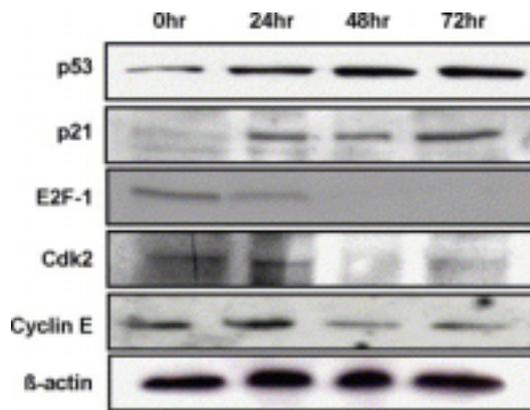


Fig. 53. Effects of the 80% ethanol extract of licorice root on expression of Bcl-2, Bax, PARP and caspase-7 proteins.

감초의 추출물이 MCF-7세포에서 성장의 저해 일으키는 기전에 어떠한 단백질이 관여하는 지 알아보기 위해 western blotting 시험법으로 시험하였다. 먼저 세포사멸과 관련된 단백질의 변화를 시간의 변화에 따라 어떻게 변하는지 알아보았다.

시간이 증가함에 따라 세포사멸 과정에서 중요한 인자로 작용하는 pro-apoptotic 단백질인 bax의 증가가 관찰되며 anti-apoptotic 단백질인 bcl-2의 감소가 뚜렷이 확인되었으며, 실질적으로 apoptosis를 유발시키는 단백질분해효소인 caspase 7의 증가와 apoptosis를 시작하는 단백질인 PARP이 활성화되면서 잘려진 분절이 24시간부터 명확히 관찰되는 것을 확인할 수 있었다.



**Fig. 54. Effects of the 80% ethanol extract of licorice root on expression of p53, p21, E2F-1, cdk2 and cyclin E in MCF-7 cells.**

또한 감초 추출물은 Flow cytometry결과에서 세포의 G1기를 조절함으로써 유방암 세포의 증식을 억제시키는 것으로 판단되었다. 세포는 세포분열을 통하여 증식되어지는데, 세포주기는 분열기와 간기로 이루어져 있다. 분열기는 세포의 분열이 일어나는 기간으로 전기, 중기, 후기, 말기, 세포질 분열로 나뉘어지며, 간기는 세포의 분열이 일어나지 않는 기간으로 세포성장기인 G1기, DNA 복제시기인 S기, 분열전단계로 분열준비기인 G2기로 나뉘어져 있다. G1기는 딸세포가 어미세포로 성장되는 기간으로 DNA 복제에 필요한

물질을 합성하는 기간이다. 따라서 감초 추출물이 유방암 세포의 G1기를 조절한다는 것은 세포의 성장과 직접적인 관련이 있다는 것을 시사한다.

그리고, G1기는 cyclin과 cdk(cyclin dependent kinase)의 신호를 받아 세포 분열을 할 것인지에 대한 결정의 시기인데 위의 결과에서처럼 감초 추출물은 시간 의존적으로 세포주기 관련 단백질인 p53, p21, E2F-1, cdk2 과 cyclin E 을 순차적으로 조절함으로써 이러한 현상을 유도하는 것으로 밝혀졌다.

## 8. 천연 phytoestrogen의 소재화를 위한 대량분리 및 유효물질의 특성 구명

### 가. 추출조건 검토 및 추출물 대량 제조

1차 후보소재로 50종, 2차 후보소재로 56종을 선별하여 phytoestrogen의 활성을 평가한 결과 유효소재로 나타난 감초 GK 시료와 파고지 PL시료를 대상으로 동물실험용 대량 추출을 실시하였다.

추출용매는 1차년도 실험에 따라 80% ethanol을 사용하였으며 PL시료의 경우 추출시간이 1시간에서 3시간으로 증가되면 수율이 12.81%에서 13.48%로, 4시간 추출시 17.12%로 증가되었다. 이때 ethanol 농도가 40% 이상에서 유용성분의 추출이 일어나는 것으로 나타났으므로 단계별 추출에 의한 변화를 살펴본 결과 Fig. 55와 같이 80% ethanol 3시간 추출시 보다 40-60-80%로 단계적으로 1시간씩 추출했을 때 2%의 수율 증가가 일어나 산업화 시 인삼 농축액 제조공정에서 이용되는 단계적 추출법 적용도 고려해 볼 가치가 있을 것으로 사료되었다.

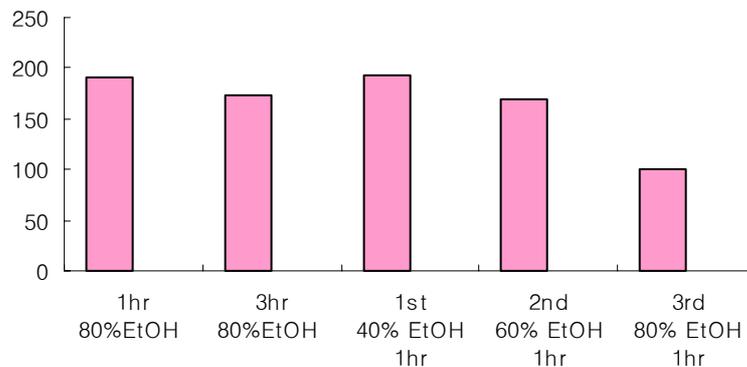


Fig. 55. PL 시료의 추출시간 및 단계적 추출에 의한 페놀성 물질 변화

본 실험에서는 80% 에탄올을 용매로 4시간 환류추출하였으며 동결건조시켜 실험에 사용하였다. 두 소재의 대량 추출시 수율 및 폴리페놀 함량은 GK

시료가 20.35%, 60.41mg/g 이었고 PL 시료가 17.12%, 110.08mg/g 였으며 이를 제 2세부과제의 동물실험 시료로 사용하였다.

#### 나. 후보 소재의 특성 및 소재화 연구

한편 PL 시료의 경우 GK 에탄올 추출물의 경우와는 달리, 동결건조를 위한 전처리로 evaporation의 과정을 거치게 되면, 즉 에탄올 층이 날아가고 물 층이 남게 될 경우 끈적이는 점성이 급격히 증가하여 다루기 힘든 점액질 물질로 변하는 성질이 있었다. 따라서 이 끈적이는 성질의 원인을 제거할 수 있는지 여부를 살펴보았으며, 또한 이 성질의 제거시 PL 시료 내 유효성분의 변화가 있는지를 측정해 보았다.

##### (1) ethanol washing처리

용매 washing으로 활성성분과 끈적이는 성분을 분리하고자 PL 추출건조물을 대상으로 에탄올 농도를 80%까지 변화시키면서 한 시간 동안 재추출(washing 처리)했을 때 건조시료의 성상을 비교하였고 wash 액 중에 침출되어 나오는 polyphenol 성분을 측정하였고 YER assay로 침출액 중의 estrogen 활성을 측정하였다. Fig56과 같이 washing액 중의 폴리페놀 성분은 에탄올 농도가 증가할수록 증가하였으며, 그 농도는 추출시 에탄올 농도를 달리했을 경우와 유사한 경향이었다. 또한 Fig 1-3과 같이 washing 용매의 에탄올 농도가 40% 이상일 때 에스트로젠 활성에 효과적인 성분들이 함유되는 것으로 나타났다. 그러나 이들 침출액 중에 유효성분과 끈적이는 성분이 같이 나오는 것으로 나타나 ethanol과는 극성이 차이가 나는 chloroform 및 ethylacetate의 용매 washing을 적용하였다.

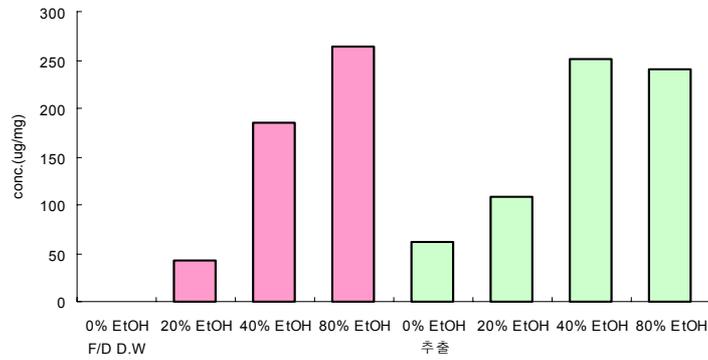


Fig. 56. PL 건조시료에 대한 washing 효과(좌, pink) 및 추출 용매의 에탄올 농도에 따른 폐놀성 물질 함량(우, green)

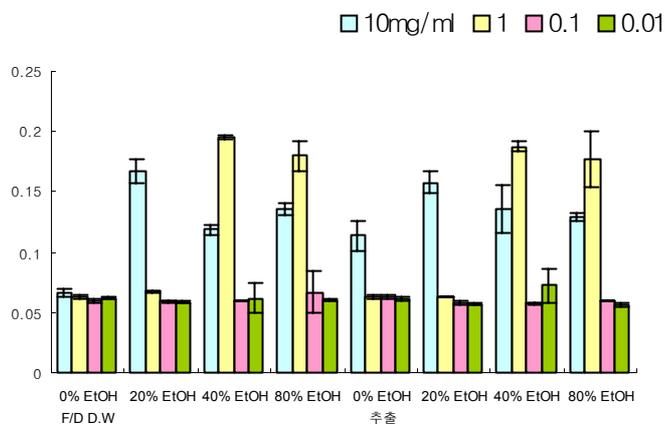


Fig. 57. PL 건조시료의 용매 washing액(좌) 및 추출 용매별 추출액의 에스트로젠 활성(우)

## (2) Chloroform 및 ethylacetate 처리

PL 시료의 80% 에탄올 추출물을 감압농축하여 에탄올을 제거한 후 동량의 chloroform 및 ethylacetate 용매로 처리하였을 때 Fig 58과 같이 chloroform액으로 상당량의 페놀성 물질이 이행되는 것으로 나타났고 에스트로젠 활성은 4 분획에서 골고루 검출되었다. 끈적이는 물성은 chloroform 처리한 PL에서 나타나지 않았으며 chloroform 액 중에 포함되는 물질인 것으로 판단되었고 ethylacetate 처리로는 목적으로 하는 효과가 미미하였다. 따라서 소재화시 끈적이는 물성이 저해가 된다면 chloroform washing처리를 일부 응용할 수는 있을 것이나 이는 일부 활성물질의 소실도 초래할 뿐만 아니라 산업화시 문제가 있을 것으로 사료되어 Sephadex LH 20에 의한 분자량별 분획을 적용하였다.

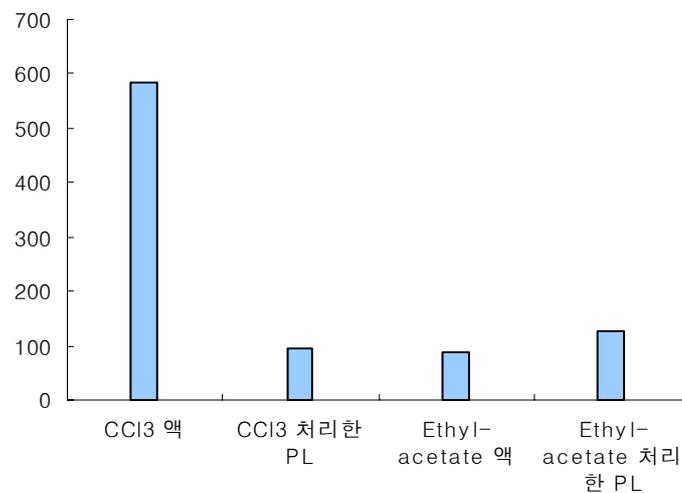


Fig. 58. PL 추출시료의 용매 washing액 및 분획 중 페놀성 물질 함량

### (3) Sephadex LH 20에 의한 전처리

80% 에탄올로 추출한 PL추출액(22 °Bx)을 column(2.5×30cm)에 주입하고 80% ethanol로 용출시켰다. 용출액은 10ml 씩 분획하였으며 각 분획의 수율, 페놀성 물질 함량, 에스트로겐 활성, 점성 여부를 측정하였다. 그 결과는 Fig 59, 60, 61과 같으며 점성은 획분 4,5에서 나타났고 페놀성 함량은 획분 5,6 이, 활성은 획분 5,6,7에서 높았으며 수율은 3,4,5,6 에서 높았다. 따라서 산업화 시 column size, 용리조건을 조정하여 점성과 활성분획을 구분할 수 있는 가능성이 있는 것으로 나타났다.

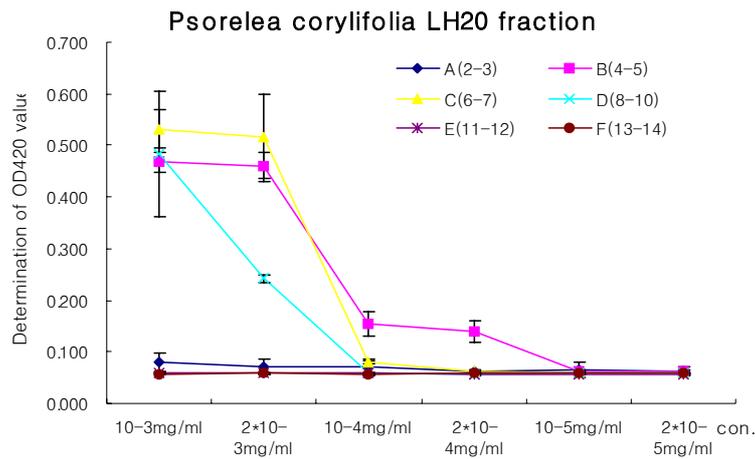


Fig. 59. PL 추출시료의 Sephadex LH 20 분획의 에스트로겐 활성

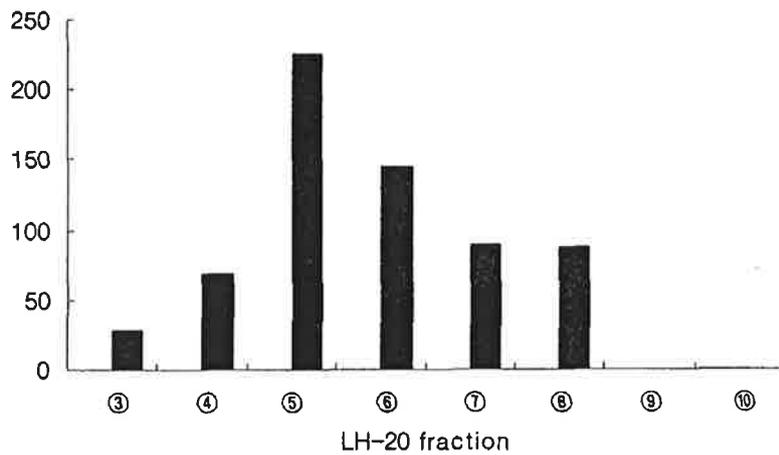


Fig. 60. PL 추출시료의 Sephadex LH 20 분획의 페놀성 물질 함량

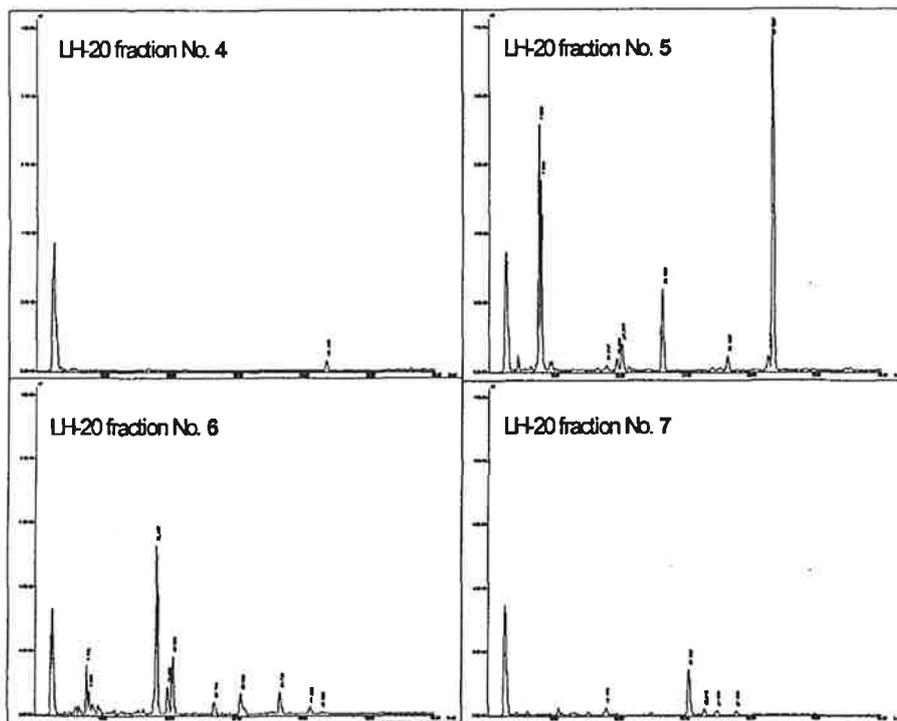


Fig. 61. PL 추출시료의 Sephadex LH 20 분획의 HPLC 분석

(3) 유효소재의 특성 평가 및 분획물의 제조

유효소재로 나타난 GK와 PL 시료를 각 150 g을 세척하여 추출 용기에 넣고 80%의 ethanol 용액을 시료 량에 대하여 10배의 비율로 첨가하고 환류 냉각하면서 4시간 동안 추출하였다. 추출액을 여과 후 감압 농축하여 ethanol 을 제거한 추출물을 n-hexane, chloroform, ethylacetate, n-butanol 및 water 층으로 계통 분획하여 분획물을 얻었다. 각각의 전처리별로 얻어진 추출액은 40℃ 이하에서 감압 농축시켜 *in vitro* 활성 분석을 실시하였다. 각 분획별 수율과 특성은 Table 13과 같고 YER assay로 에스트로겐 활성을 측정된 결과는 Fig 62, 63과 같다.

Table 13. GK와 PL 추출물의 용매 분획 및 분획물의 특성

G K				
Fraction	수율(%)	Polyphenol (mg/g)	Flavonoid (mg/g)	YER activity
Hexane	3.42	51.8	31.1	-
Chloroform	11.00	126.9	85.2	+
Ethylacetate	13.36	120.0	362.1	+++
Butanol	27.39	65.0	208.8	-
Water	44.76	20.4	8.5	-
P L				
Fraction	수율(%)	Polyphenol (mg/g)	Flavonoid (mg/g)	YER activity
Hexane	3.23	129.7	33.0	++
Chloroform	38.26	117.7	349.2	++
Ethylacetate	7.59	114.9	252.9	++
Butanol	15.80	32.3	48.7	-
Water	9.32	19.7	8.6	-

1) Folin-Danis법, catechin 기준

2) Diethylene glycol 비색, naringine 기준

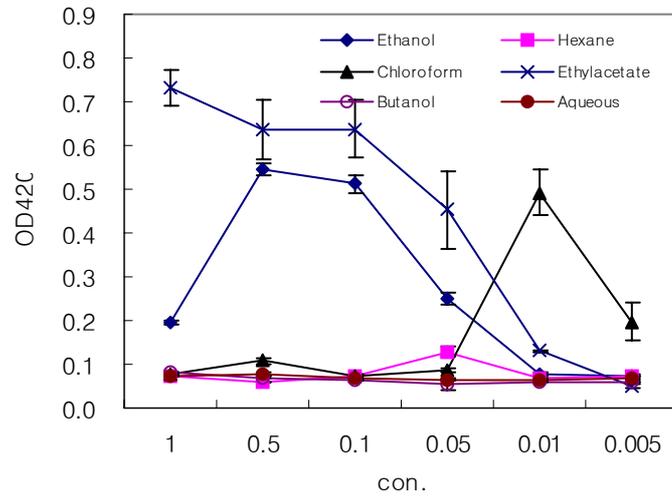


Fig. 62. GK 추출물 용매분획의 에스트로겐 활성

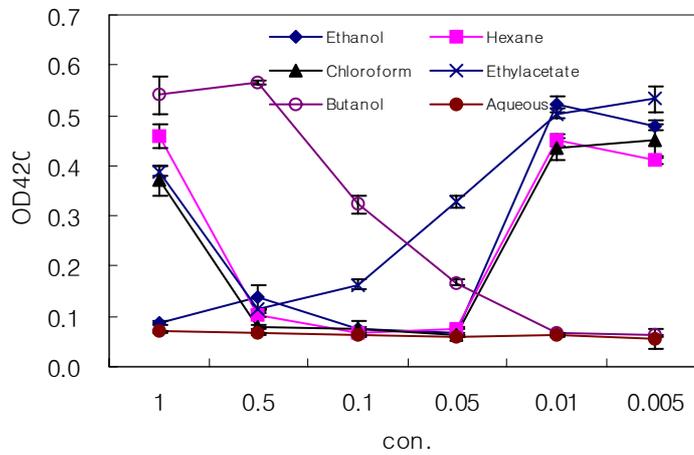


Fig. 63. PL추출물 용매분획의 에스트로겐 활성

GK 추출물의 경우 water 층에서 가장 많은 44.76%의 고형물이 분획되었으며 butanol 획분이 두 번째로 높은 27.39%의 고형물량을 나타내었다. 페놀성 물질은 ethylacetate 분획과 chloroform 분획에서, flavonoid성 물질은 ethylacetate 분획과 butanol 분획에서 높았다. 그러나 에스트로젠 활성은 ethylacetate 분획에서 매우 높게 나타났다.

PL 추출물의 경우 GK와는 달리 chloroform 분획에서 가장 많은 38.26%의 고형물이 분획되었으며 butanol 획분이 두 번째로 높은 15.80%의 고형물량을 나타내었고 water층과 ethylacetate 층의 수율이 낮은 편이었다. 페놀성 물질은 hexane분획, chloroform 분획, ethylacetate 분획에서 높은 편이었으며, flavonoid성 물질은 chloroform 분획과 ethylacetate 분획에서 높았다. PL 추출물의 에스트로젠 활성은 hexane 분획, chloroform 분획과 ethylacetate 분획에서 높게 나타났다.

추출물의 분획별 polyphenol 조성을 HPLC로 screening 해본 결과 GK 시료의 경우 후보 성분이 EtAC 분획에 집중되어 있고 많은 성분이 관여할 것으로 보이나 PL 시료의 경우 Hexane, Chloroform, EtAC에 대한 친화력이 큰 성분으로 소수의 성분이 관여할 것으로 판단되었으며 유효 성분에 관한 실험을 실시하였다.

#### **다. 파고지 hexane, chloroform 분획물의 활성 성분 측정**

에스트로젠 활성이 높은 파고지 hexane, chloroform 분획의 유효 활성 성분을 규명하고자 silica gel을 사용하여 분리, 정제하였으며 그 과정은 Fig. 64에 나타난 바와 같다. 파고지 chloroform 분획을 silica gel column과 petroleum ether/ethylacetate (100:30)의 전개 용매로 하여 6개의 분획을 얻었다. 각 분획물은 TLC(silica gel F254 plate, 10\*10, 0.25mm, Merck, Germany)를 사용하여 분리하였다. 분리 농축된 6개의 각 농축물의 발색 정도는 Figure 65와 같았고, 노란색에서 갈색까지 다양하게 나타났다. 용출되는 분리대를 기준으로 대략 6개의 분획으로 나누었다. subfraction 1~6번까지의 수율은 1번 (0.613g), 2번 (0.035g), 3번 (0.024g), 4번 (0.089g), 5번 (0.246g), 6번 (0.776g)으로 다양하였다. 파고지 hexane 분획은 subfraction(subfr.)으로 대략

2개의 분획인 1번 (0.169g), 2번 (0.039g)으로 나누었다.

Hexane, chloroform 8개의 분획은 재조합 효모법을 이용하여 에스트로겐 활성을 측정해 보았으며, E2  $10^{-9}$ M을 양성 대조군으로 사용하여 subfr.의 농도를 1.0mg/mL, 0.5mg/mL, 0.1mg/mL, 0.05mg/mL, 0.01mg/mL 5가지 농도에서 효모의 transactivation 활성을 측정한 결과 chloroform subfr. 4번, hexane subfr. 2번을 제외한 모든 분획에서 유의적인 에스트로겐 활성을 나타내는 것으로 나타났다. 특히 chloroform subfr. 1번, hexane subfr. 1번에서 1mg/mL보다 낮은 농도인 0.5mg/mL에서 더 높은 활성을 나타내는 것으로 나타났다. 특히 chloroform subfr.의 경우 이보다 낮은 농도인 0.1mg/mL에서도 상당히 높은 에스트로겐 활성을 나타내었다. 따라서, 두 subfr.의 유효 성분을 HPLC로 분석하여 활성 성분을 규명하고자 하였다. Chloroform subfr.의 경우 34분대에서 높은 활성을 갖는 peak가 나왔고, hexane subfr.의 경우는 34분대 외에도, 3분대에도 큰 peak가 2개 나왔고, 그 외에도 다수의 peak가 검출되었다.

대부분의 물질은 정제를 하면 할수록 특성 및 효능이 증가하는 것이 일반적이거나 본 연구에서는 silica gel chromatography를 통한 정제를 통해 얻은 subfr. 보다 용매 분획을 통한 분획이 더 낮은 농도에서도 에스트로겐 활성을 나타내었다. 최근 논문에서는 순수 정제된 하나의 물질보다는 이 물질을 포함한 분획물 혹은 식품 자체가 다양한 질환 모델에서 더욱 효과적으로 기능을 발휘한다고 보고되고 있다. 암 억제 실험에서 녹차에 함유된 EGCG(Epigallocatechingallate)의 하나의 물질보다는 녹차 가루를 먹는 것이 더욱 효과적으로 암을 억제하였다는 보고도 있다(Hirota et al., 2002). 따라서, 본 연구도 완전히 정제과정을 거치지 않은 용매 분획이 에스트로겐 활성이 더 높게 나타난 것은 다양한 phytoestrogen 성분의 상승작용이라고 생각된다.

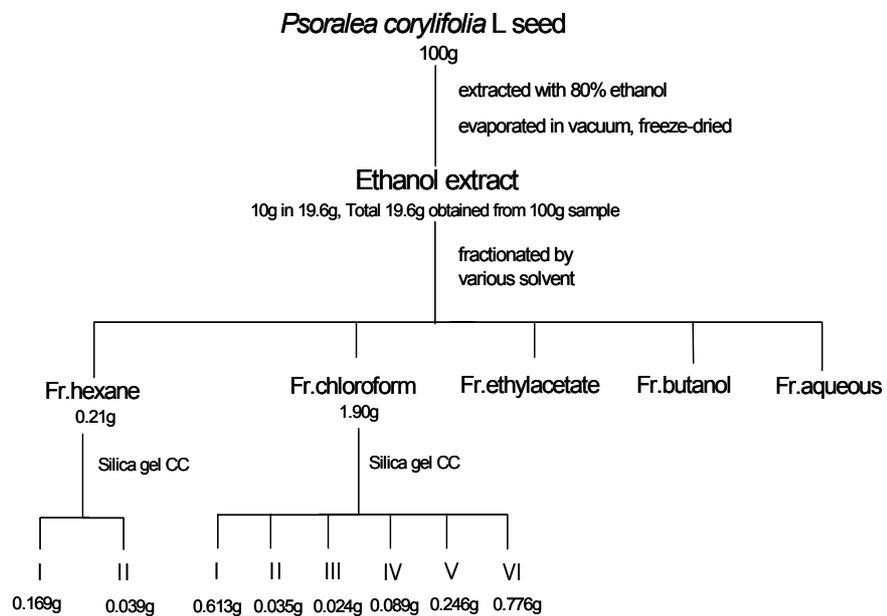


Fig. 64. Flow sheet for fractionation of PL(*P.corylifolia* L.)

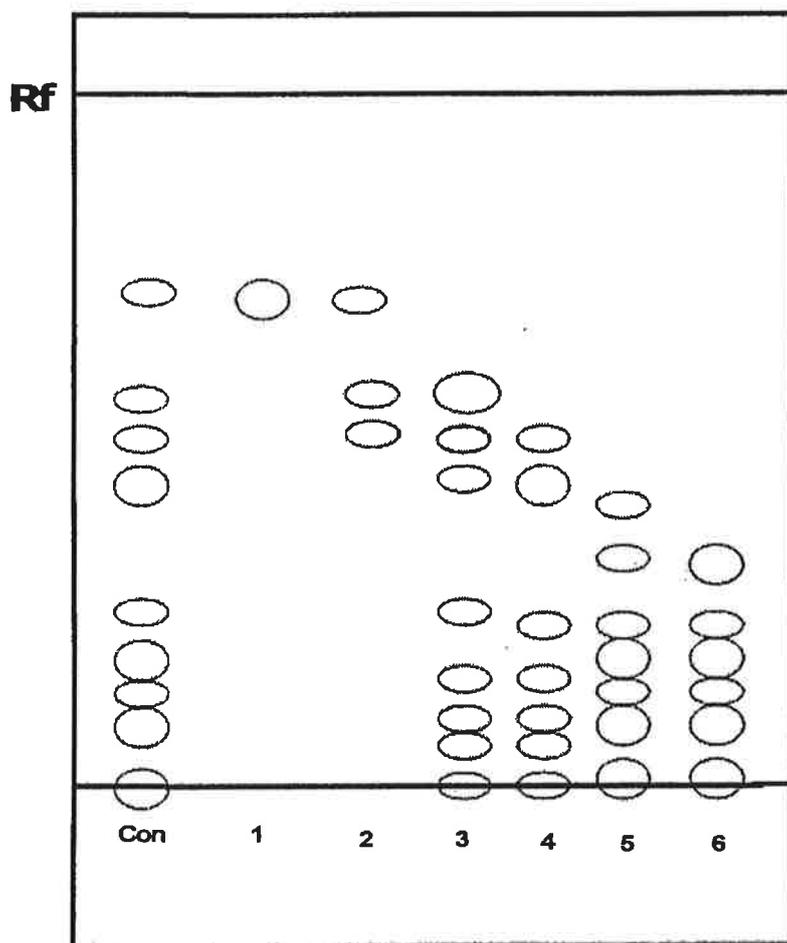


Fig. 65. Thin-layer chromatogram on silica gel of *P.corylifolia* L chloroform fraction

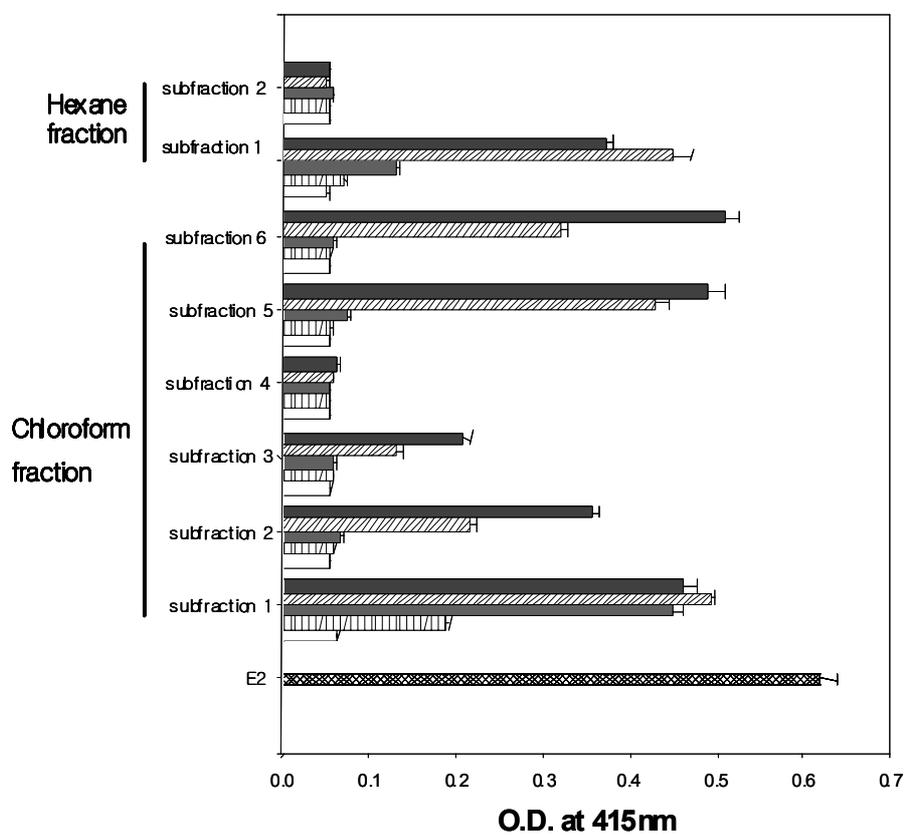


Fig. 66. Estrogenic activity of subfractions of hexane and chloroform fractions determined by transactivation assay

#### 라. 파고지 용매 분획물의 LC/MS 분석

여러 용매 분획 중 에스트로겐 활성이 가장 크게 나타난 파고지 hexane, chloroform 분획을 silica gel을 충전한 open 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 6개의 분획을 얻었고, 이 분획의 활성 성분을 규명하고자 LC/MS를 시행하였다. 확인된 peak는 Table 14와 같이 14개의 성분이었고, 이 중 정성 분석 결과 3개의 성분은 알려지지 않은 성분이었다. 분획물은 소수의 peak를 보였으나, LC-MS 분석은 해석할 수 없이 많은 m/z가 나타났다.

Wang et al.(2001)에 의하면, 파고지의 ethylacetate 분획 중 osteoblastic proliferation을 일으키는 주요 성분을 activity-guided 분획법을 이용하여 분리 확인하여, corylin과 bavachin을 규명하였다. 본 연구에서는 RT 6.85분에는 m/z, 325.7인 bavachin과 RT 8.95분에는 m/z, 321.7인 corylin으로 사료되는 peak가 나타났다. RT 33.8분대에는 기존의 보고와 달리 미지의 peak가 존재하였는데, 주요 fragment ion이 m/z 257.3으로 분자량 256.3인 bakuchiol로 판단되었으며, <sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz)의 결과는 Fig. 79에 제시된 바와 같다. 1.19 (3H, s, 15-CH<sub>3</sub>), 1.50 (2H, m, 5-CH<sub>2</sub>), 1.58(3H, s, 1-CH<sub>3</sub>), 1.67(3H, s, 18-CH<sub>3</sub>), 1.94(2H, m, 4-CH<sub>2</sub>), 5.02(2H, m, 17-H), 5.11 (1H, m, 3-H), 5.88 (1H, dd, 16-H), 6.05 (1H, d, 7-H), 6.25(1H, d, 8-H), 6.77 (2H, 11, 13-H), 7.25(2H, 10, 14-H)으로 나타났다. 이 외에 RT 18.4, 19.7, 27.8분에는 각각 m/z, 391.8, 323.3, 389.8인 지금까지 보고되지 않은 세 가지 화합물이 검출되었다.

특히, hexane subfr. 1, chloroform subfr. 1의 주요 활성 물질의 LC/MS 결과 활성 성분은 bakuchiol로 추정되었으며, hexane 분획의 경우 이외에 많은 성분이 존재하였으며, 기존의 에스트로겐 활성이 보고된 성분인 bavachin, corylin 등 여러 성분이 복합적으로 작용하여 에스트로겐 활성을 나타내는 것으로 판단되었다. 이들 성분은 구조면에서 기존의 E2와 비교시 유사성이 있어, 이러한 특성으로 높은 에스트로겐 활성을 보인 것으로 사료되었다.

Table 14. LC-MS identification of main peaks in active fraction from *P. corylifolia* L

RT (min)	Mass data	Identification
3.06	187.0	Psoralen
3.21	187.0	Isopsoralen
5.80	323.6	Neobavaisoflavone
6.85	325.7	Bavachin
8.95	321.7	Corylin
9.22	323.7	Bavachromene
10.53	337.6	Psoralidin
13.75	325.5	Isobavachalcone
16.06	339.0	Bavachinin
18.41	391.8	Unknown substance
19.73	323.3	Unknown substance
25.69	339.3	Bavachalcone
27.79	389.8	Unknown substance
33.88	256.3	Bakuchiol

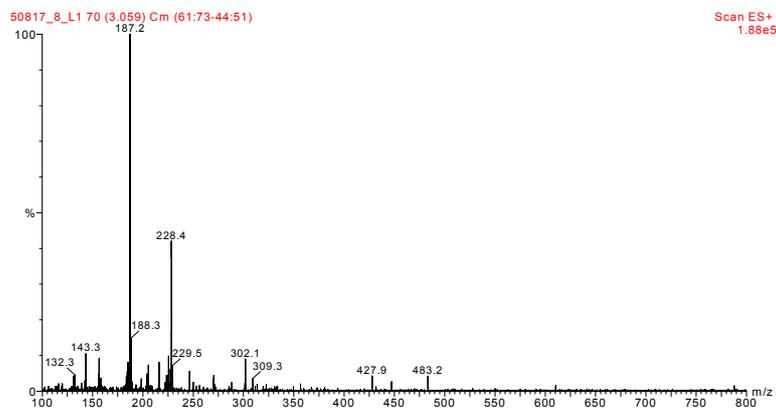


Fig. 67. The mass spectrum of unknown substance separated in HPLC by LC-MS analysis (psoralen,  $m/z=187$ ).

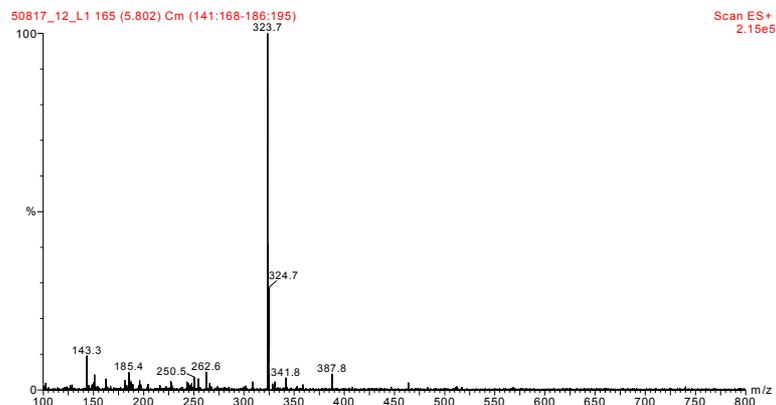


Fig. 68. The mass spectrum of unknown substance separated in HPLC by LC-MS analysis (neobavaisoflavone,  $m/z=323$ ).

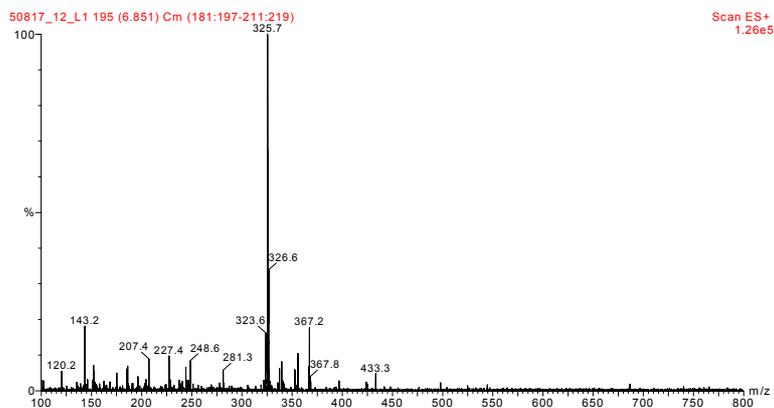


Fig. 69. The mass spectrum of unknown substance separated in HPLC by LC-MS analysis (bavachin,  $m/z=325$ )

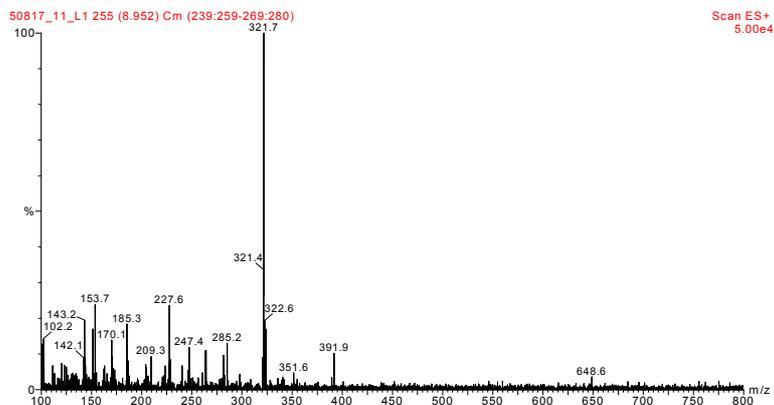


Fig. 70. The mass spectrum of unknown substance separated in HPLC by LC-MS analysis (corylin,  $m/z=321.7$ )

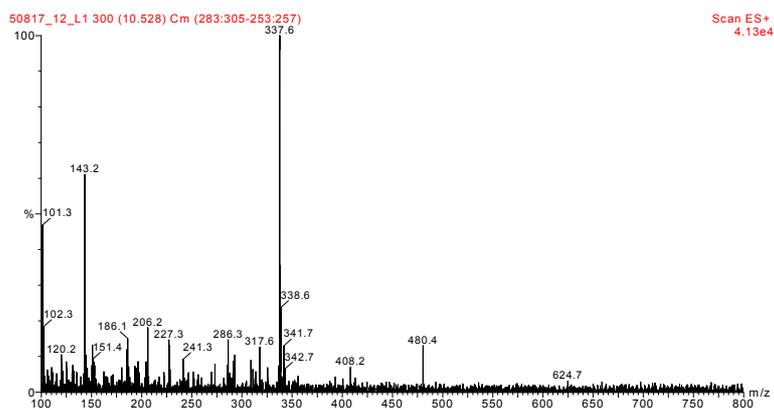


Fig. 71. The mass spectrum of unknown substance separated in HPLC by LC-MS analysis (psoralidin,  $m/z=337$ )

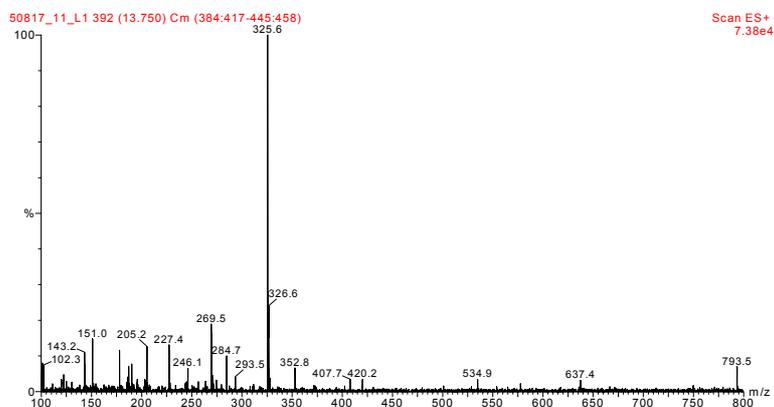


Fig. 72. The mass spectrum of unknown substance separated in HPLC by LC-MS analysis (isobavachalcone,  $m/z=325$ )

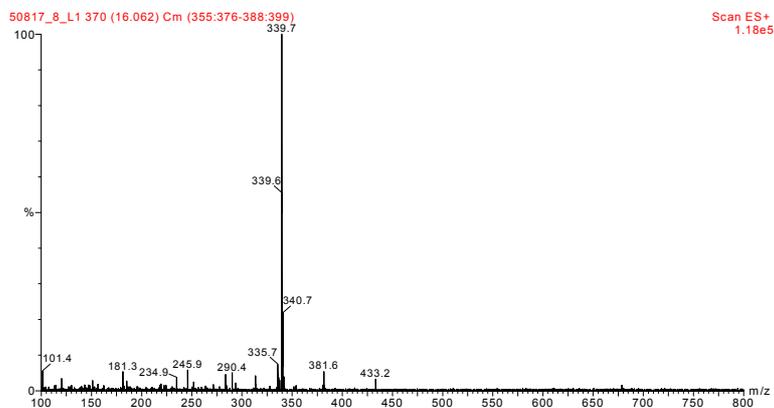


Fig. 73. The mass spectrum of unknown substance separated in HPLC by LC-MS analysis (bavachinin, m/z=339)

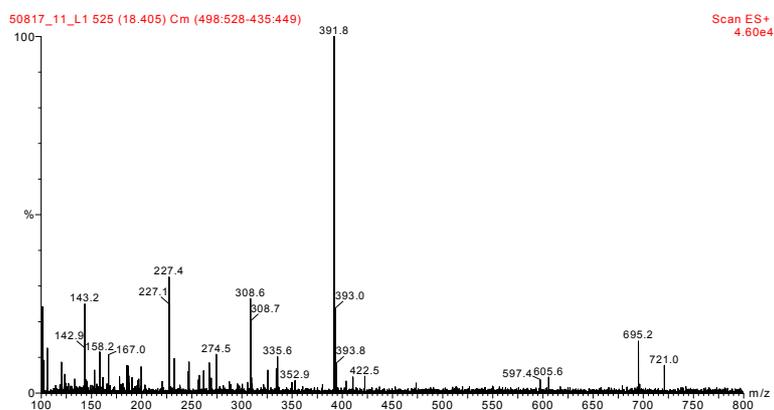


Fig. 74. The mass spectrum of unknown substance separated in HPLC by LC-MS analysis (unknown substance, m/z=391)

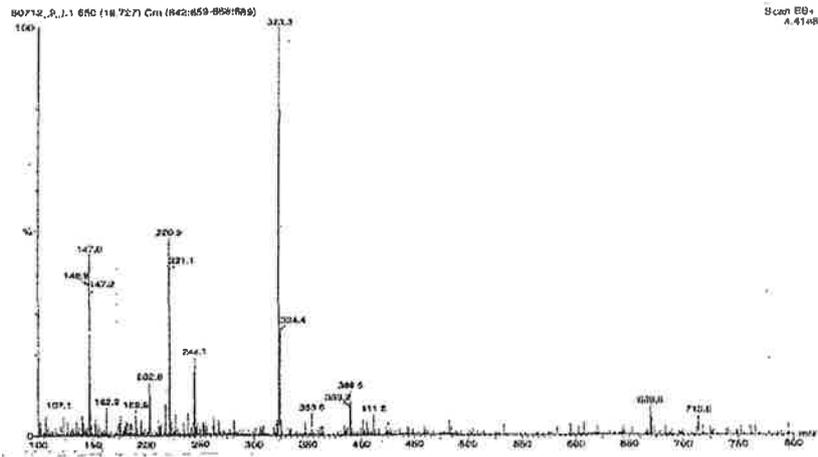


Fig. 75. The mass spectrum of unknown substance separated in HPLC by LC-MS analysis(unknown substance,  $m/z=323$ ).

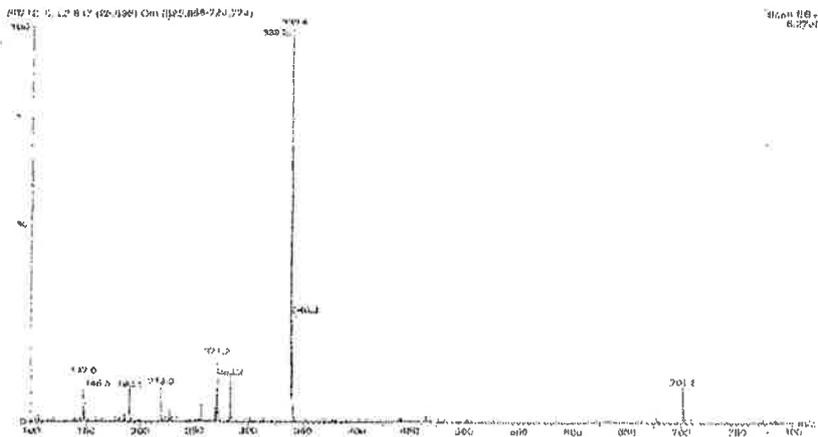


Fig. 76. The mass spectrum of unknown substance separated in HPLC by LC-MS analysis (Bavachalcone,  $m/z =339.0$ ).

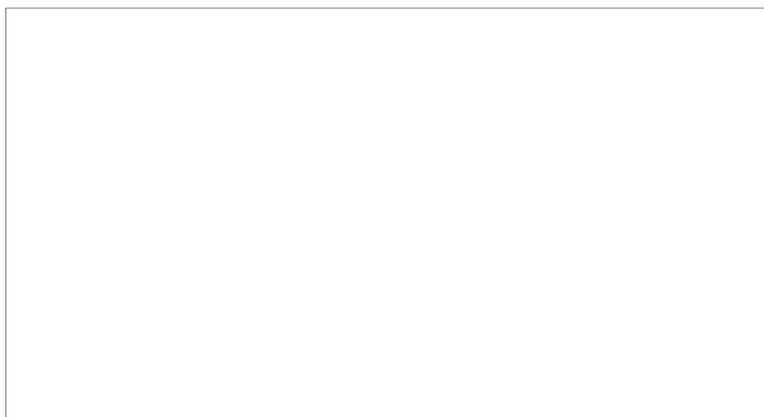


Fig. 78. The mass spectrum of unknown substance separated in HPLC by LC-MS analysis (Bakuchiol,  $m/z=257.3$ )

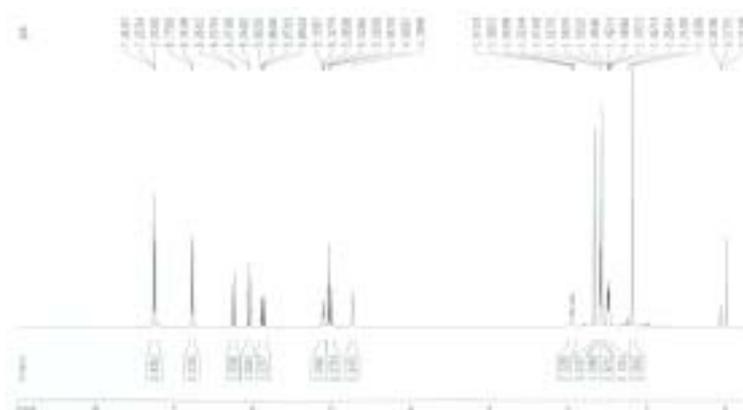


Fig. 79.  $^1\text{H}$  NMR of subfraction 1 of *Psoralea corylifolia* L. (CDCl<sub>3</sub>, 600MHz)

마. Sephadex LH 20을 이용한 유효성분의 분리정제

Silica gel 외에 Sephadex LH 20을 이용하여 유효성분을 분리해 보고자 하였다. 1.5×120cm의 column을 준비하고, column 용적에 따라 필요한 LH-20을 채운 후 파고지 80% 에탄올 추출물 1ml을 loading하여, 5ml/20min의 속도로 각각의 fraction을 얻었다. 총 93개의 fraction을 얻을 수 있었으나, No. 1~17와 No. 83~93은 고형분 함량이 없는 것으로 나타나 No. 18부터 짝수번의 fraction을 가지고 에스트로젠 활성을 측정하였고 활성 분획을 대상으로 HPLC 분석을 실시하였다.

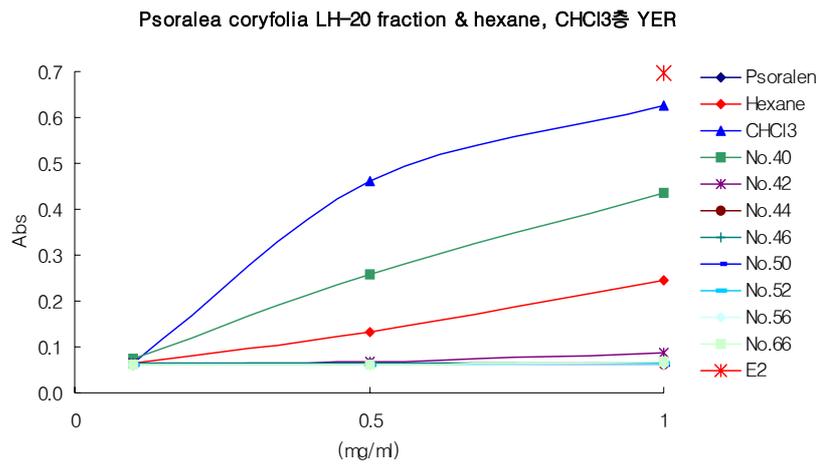


Fig. 80. Estrogenic activity of Sephadex LH subfractions and solvent fractions from PL ethanol extract determined by transactivation assay

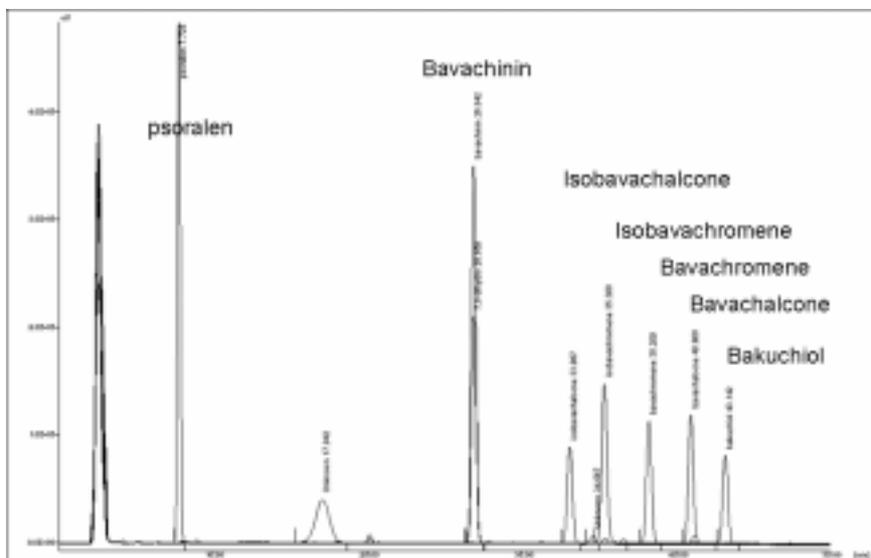


Fig. 81. HPLC chromatograms of compounds isolated from PL ethanol extract

Table 15 . Concentration of effective compound( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) of Sephadex LH subfractions from PL ethanol extract determined by HPLC analysis

Compound	FractionNumber											
	40	42	44	46	48	50	52	56	60	66	68	
psoralen	—	—	39.8	66.8	—	—	—	—	—	—	—	
bakuchiol	540.9	383.0	17.2	—	—	—	—	—	—	—	—	
bavachinin	—	1.8	41.3	8.0	—	—	—	—	—	—	—	
bavachalcone	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
isobavachalcone	—	—	—	—	—	—	41.4	165.8	—	—	—	
bavachromene	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
isobavachromene	—	—	—	6.7	—	—	—	—	—	—	—	

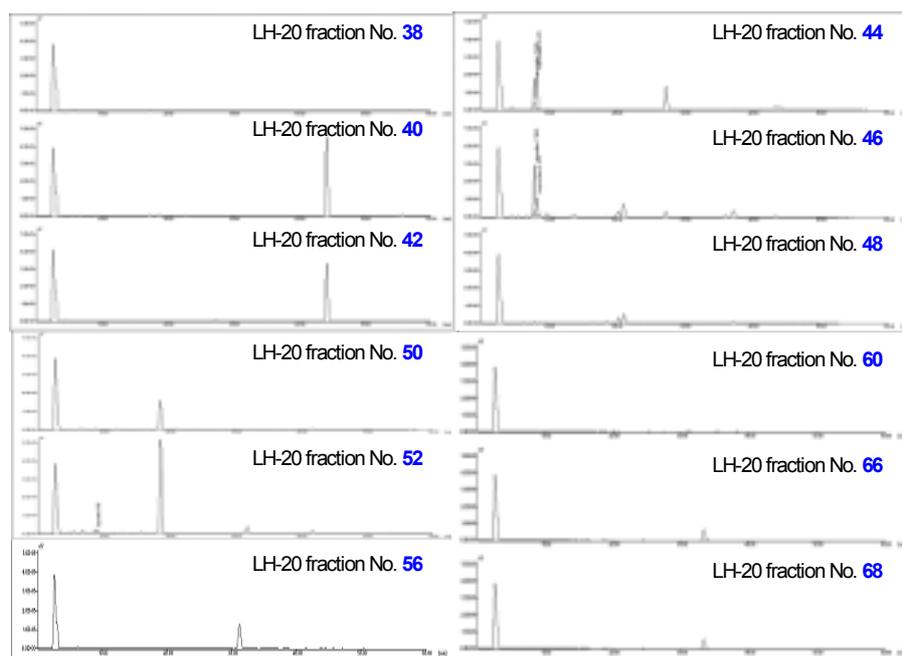


Fig. 82. HPLC chromatograms of Sephadex LH subfractions from PL ethanol extract

HPLC 분석과 에스트로겐 활성 분석의 결과로 볼 때 Fraction No. 40의 경우 단일 성분으로 분획되었고 에스트로겐 활성도 가장 우수하였으므로 HPLC spike test 와 Mass 분석을 실시하여 bakuchiol 인 것으로 확인되었다.

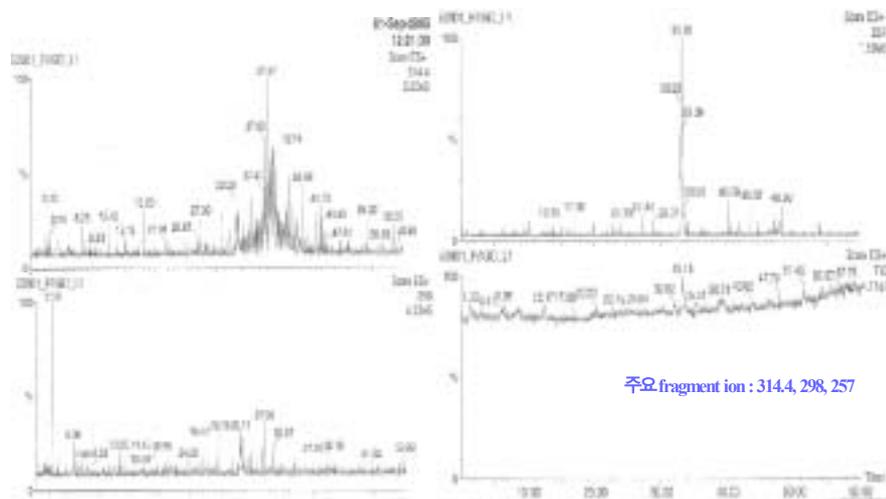
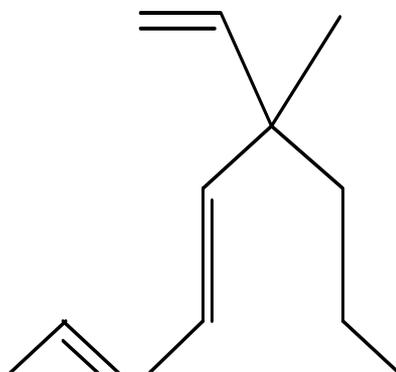


Fig. 83. Mass spectrum of Sephadex LH subfractions No 40 from PL ethanol extract



Bakuchiol

Fig. 84. Chemical structure of active compound isolated from *P. corylifolia* L.

## 9. 유효소재 분획이 골아세포 증식과 ALP 활성화에 미치는 효과

### 가. 용매 분획물이 골아세포 증식에 미치는 효과

PL 추출물과 그 분획물을 대상으로 ROS 17/2.8 cell에 2.5 ~ 100 µg/ml의 농도로 처리하여 골아세포 증식에 미치는 효과를 비교해 보았다. Fig. 85와 같이 분획전 Ethanol 추출물이 가장 큰 효과를 보았는데, 2.5 µg/ml 낮은 농도에서도 골아세포 증식을 유의하게 증가시켰고, 5 µg/ml에서는 150%의 증가를 보였다. 그러나 10 µg/ml 에서부터 아주 강한 독성을 나타내었다. Chloroform 추출물도 2.5 µg/ml 낮은 농도에서도 골아세포 증식을 160% 증가시켰다. 그러나, 5 µg/ml에서 부터는 세포증식 효과가 대조치 정도로 낮아졌다. Butanol 추출물은 유의성은 없었지만 약한 증식 촉진효과를 보였다. Ethylacetate 추출물은 낮은 농도에서는 효과가 없었고, 50 µg/ml에서만 증식 촉진효과를 보였다. Aqueous 추출물은 효과가 없었다.

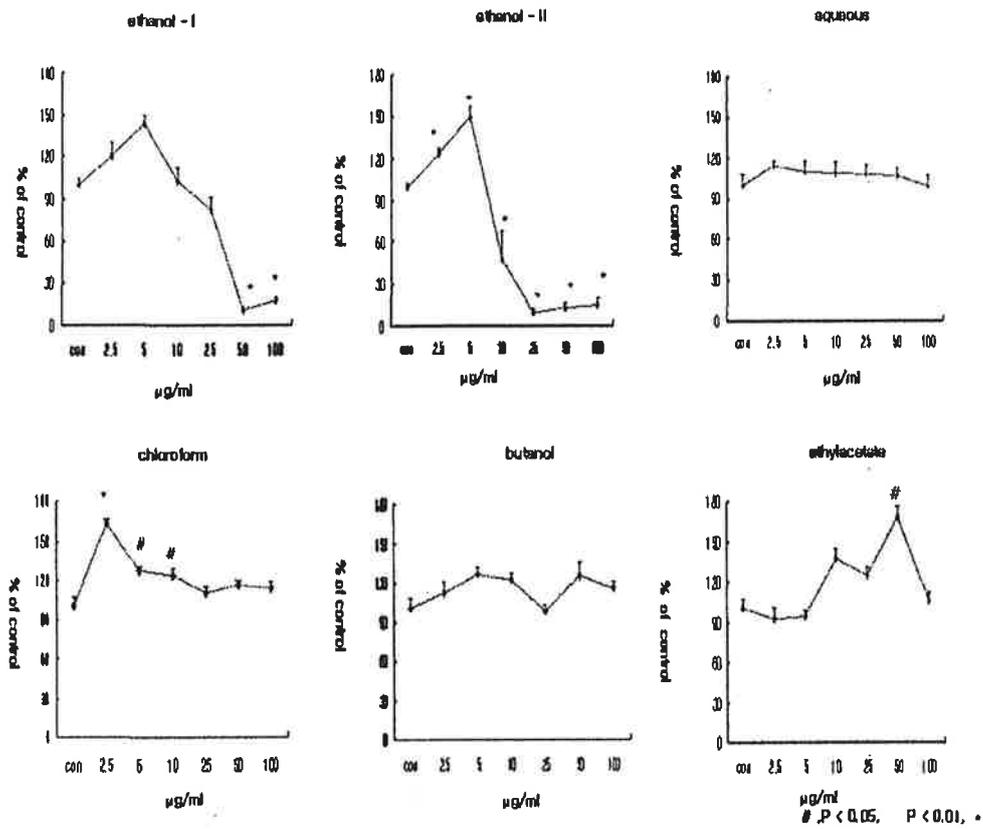


Fig. 85. Effects of the extract of PL and its solvent fractions on the proliferation of ROS 17/2.8 osteoblast-like cells. Cell proliferation was determined by MTT assay. Results are expressed as percentage of control and values represent mean SEM of 6 experiments. #, P<0.05, \*, P<0.01 vs. control.

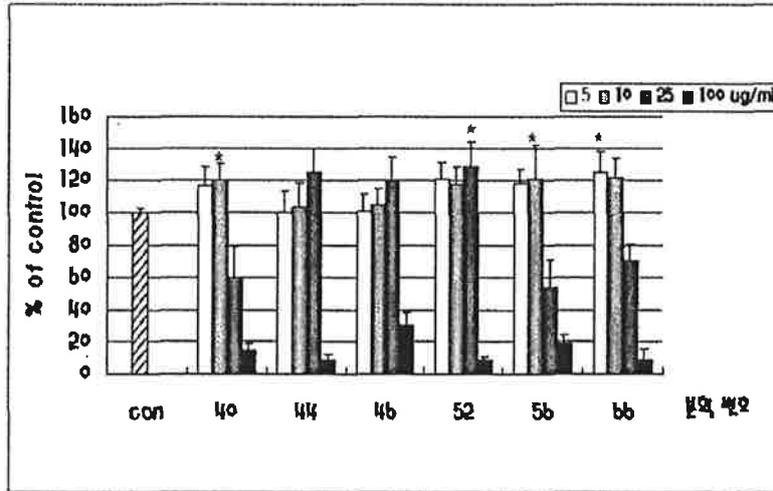
#### 나. Sephadex LH 분획물이 골아세포 증식과 ALP 활성화에 미치는 영향

한편 파고지 에탄올 추출물을 Sephadex LH로 분획하여 그 분획이 골아세포 증식과 ALP 활성화도에 미치는 영향을 분석하였다. Calvaria cell은 태어난 지 24시간 이내의 mouse를 이용하여 primary culture한 것으로 파고지 에탄올 추출물 분획 6종 각각을 5 ~ 100 µg/ml의 농도로 Calvaria cell에 처리했을 때, 분획 40, 52, 56, 66은 5 µg/ml 와 10 µg/ml에서 120% 까지 골아세포의 증식을 증가시켰다. 25 µg/ml 의 농도에서는 분획 44, 46, 52 가 골아세포 증식을 증가시켰으나, 100 µg/ml 에서는 모든 분획들이 40% 정도로 증식을 감소시켰다.

분획 6종 각각을 5와 25 µg/ml의 농도로 골아세포에 처리했을 때, 44, 52 두 분획물이 5 µg/ml 농도에서 160%에 가까운 ALP 활성도를 보여주었으나 다른 분획물과 이들 각각의 분획물들이 25 µg/ml 농도에서는 대조값 또는 대조값 이하의 값을 보여주었다.

골아세포에서 파고지 에탄올 추출물 분획 6종의 효과를 비교해 본 결과, 52번 분획물이 골아세포 증식과 ALP 활성도를 증가시키는 효과가 있었다.

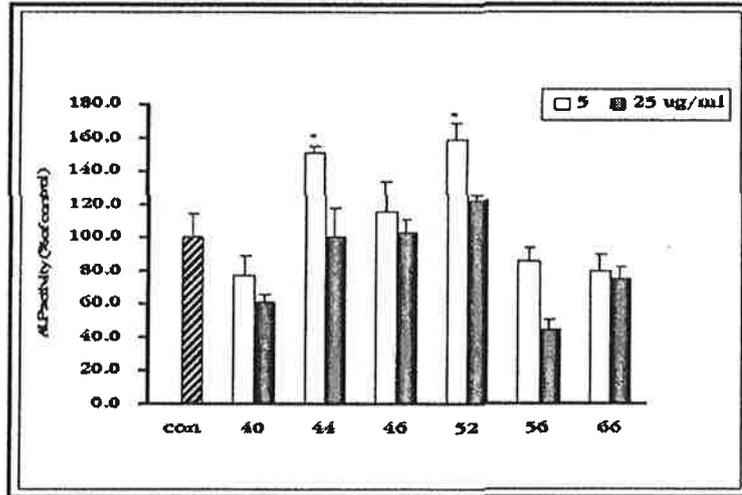
그림 7.



Dose-dependent effects of *ethanol extracts* on proliferation of calvaria cells. Cell proliferation was determined by MTT assay. Results are expressed as percentage of control and values represent mean  $\pm$  SEM of 6 experiments. \* $P < 0.05$  vs. control.

Fig. 86. Effects of the subfractions of PL extract on the proliferation of clavaria cells.

그림 8.



Effects of *ethanol extracts* on ALP activity of calvaria cells. Results are expressed as percentage of control and values represent mean  $\pm$  SEM of 6 experiments. \*  $P < 0.05$  vs. control.

Fig. 87. Effects of the subfractions of PL extract on ALP activity of calvaria cells.

## 10. 갱년기 동물모델에서 유효소재의 효능 평가

### 가. 선발소재의 갱년기 동물 모델 적용

1차 시료 중에서 선정된 감초 GK 시료와 2차 시료 중에서 선정된 파고지 PL시료의 갱년기 대응 효능평가를 위한 동물 실험을 진행하였다. 난소절제는 일반적으로 6주 혹은 8주에 실시하고 있어 1차년도 동물모델에서는 8주차에 난소절제시킨 모델을 사용하였다. 그러나 갱년기 모델로서 주령이 더 높은 쥐를 사용할 필요성이 제기되었고 난소절제 후 실험식이를 공급하는 군과 난소절제 전부터 실험식이를 공급한 처리를 비교할 필요성이 제기됨에 따라 주령을 조정하였다. 2차년도에는 4주령 쥐를 6주간 사육하고 10주령에 난소절제 후 다시 6주 사육하는 모델을 사용하였다.

실험군은 난소적출 전부터 12주 동안 계속적으로 실험식이를 공급한 군(GL, GH, PL, PH군)과 난소적출 전 질구검사기간까지 일반식이(control식이)를 공급하다가 질구검사에 의해 선별된 후, PL 시료식이를 공급한 군(PLⅡ, PHⅡ)으로 구분되었다. 그 외 Sham군과 OVX군 그리고 OE군은 control식이를 주었으며, OE군은 control diet와 함께 17 $\beta$ -estradiol 20 $\mu$ g/kg를 주 7회 같은 시각에 피하주사하였다.

### 나. 난소 절제 및 선발 소재 섭취에 의한 효과

#### (1) 체중 및 식이효율에 미치는 영향

실험 시작 당시의 체중은 86.12 $\pm$ 3.57g으로 실험군간의 차이가 없었으며 난소절제 전 6주 사육기에 PL 시료를 섭취한 PL, PH군의 체중증가가 적었고 다른 군은 유사하였다. 이는 PL 첨가로 인한 사료의 향 때문에 사료섭취량이 다소 적은 데 기인한 것으로 판단되었으며 formula를 대상으로 한 실험시 이를 고려해야 할 것으로 사료되었다. 난소절제 후 후반기 6주 사육동안은 OVX군, GL군, GK군의 체중증가가 가장 컸으며, OE군, PLⅡ, 군이 OVX로 인한 체중증가량이 다소 둔화되어 Sham군과 유의차가 없게 나타났다. GK 군이 OVX와 유의차가 없었던 것과는 달리 PL 시료를 섭취한 군은 다른

군에 비해 유의적으로 체중이 낮은 경향을 보였으며 특히 투여량과 투여기간이 높은 PL 시료군(PL, PH, PHII)에서 뚜렷한 차이를 보였다.

**Table 16. Body weight and food intake of rats fed experimental diets for 12 weeks**

	Sham	OVX	OE	GL	GH	PL	PH	PL II	PH II
<b>Body Weight (12wks)</b>	305.01 ±4.39 <sup>b</sup>	358.98 ±7.89 <sup>a</sup>	296.64 ±5.21 <sup>bc</sup>	368.50 ±8.12 <sup>a</sup>	366.55 ±7.38 <sup>a</sup>	263.83 ±5.15 <sup>de</sup>	243.50 ±6.19 <sup>e</sup>	305.94 ±8.07 <sup>b</sup>	273.88 ±9.96 <sup>cd</sup>
<b>Body weight gain</b>	217.55 ±4.20 <sup>b</sup>	273.70 ±8.27 <sup>a</sup>	209.89 ±5.72 <sup>b</sup>	280.14 ±8.95 <sup>a</sup>	280.16 ±7.31 <sup>a</sup>	176.39 ±4.97 <sup>cd</sup>	156.67 ±7.14 <sup>d</sup>	221.03 ±8.16 <sup>d</sup>	184.79 ±8.62 <sup>c</sup>
<b>FER</b>	0.16 ±0.01 <sup>c</sup>	0.21 ±0.01 <sup>a</sup>	0.19 ±0.01 <sup>ab</sup>	0.19 ±0.01 <sup>ab</sup>	0.19 ±0.00 <sup>ab</sup>	0.17 ±0.00 <sup>bc</sup>	0.14 ±0.01 <sup>d</sup>	0.19 ±0.005 <sup>a</sup>	0.17 ±0.005 <sup>bc</sup>

1) Values are mean ± standard error

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at 0.05 by Duncan's multiple range test

(\*\*\*, \*\*, \* : 0.0001, 0.005, 0.001)

3) FER; food efficiency ratio

OVX ; ovariectomy, OE ; ovariectomy + 17β-estradiol(s.c. inj), GL ; 0.5% GK ext, GH ; 1% GK extr, PL ; 0.5%; PL ext, PH ; 1% PL ext

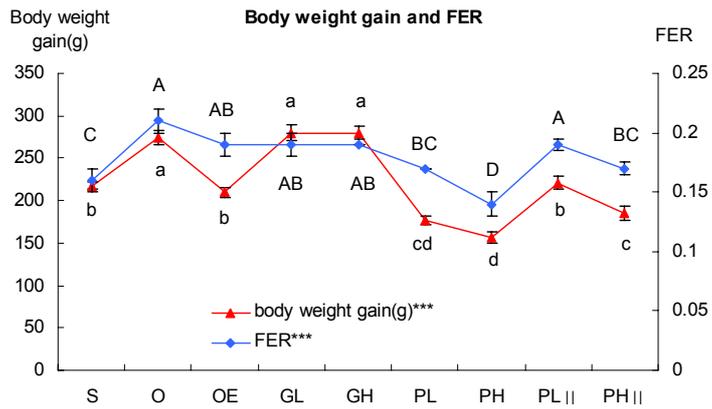
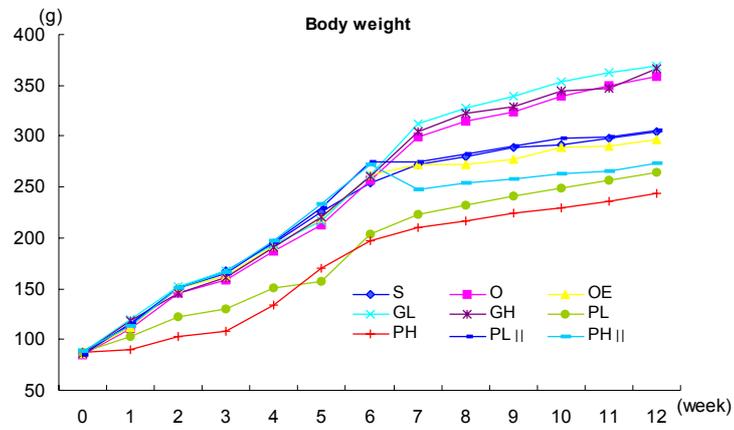


Fig. 88. Body weight changes and food efficiency ratio of rats fed experimental diets for 12 weeks

## (2) 장기무게 및 자궁위축에 미치는 영향

난소절제 전 6주 사육 및 난소절제 후 6주 사육 총 12주 사육 후 간과 신장의 무게는 Table 17과 같다. 체중 100g당 간 무게는 일정한 경향을 도출할 수는 없었으나 Sham군, PH, PH II,에서 높았다. 체중 100g당 신장의 무게는 체중 증가가 컸던 OVX와 GH군, GL군, PL II에서 낮았다. 해부시 관찰한 장기의 성상은 GK 군과 PL 군에 모두 양호하였으며 특히 PL군이 더 건강한 상태인 것으로 나타났다.

선발소재의 섭취가 난소절제로 인한 자궁위축에 미치는 영향을 자궁의 무게를 측정하여 비교한 결과(Table 17, Fig. 89), OVX군에서는 자궁의 무게가 크게 감소되었는데 반면 난소절제 후 E2를 주사한 OE군에서는 자궁위축이 일어나지 않아 자궁무게는 Sham군과 유의차가 없었다. GK 실험식이를 먹은 군에서는 난소절제로 인한 자궁위축이 진행되었으며 GL, GH군 모두 OVX군과 유의차가 없는 것으로 나타났다. 반면 PL군에서는 OVX군과 비교하였을 때 자궁위축 억제 효과를 보였으며, 이는 OE군과도 비슷한 효과를 보였다. PL섭취군 중 난소절제 전부터 PL 시료를 섭취한 군과 난소절제 후부터 PL 시료를 섭취한 군 간의 자궁 무게 차이가 나타났으며, 난소절제 전부터 PL 시료를 섭취한 군에서 자궁무게가 더 큰 것을 알 수 있었고 이 차이는 blotted uterine weight에서 더 현저하였다.

**Table 17. Uterus and organ weights of rats fed experimental diets for 12 weeks**

	Liver		Kidney		Uterus		Blotted Uterus		Dried Uterus	
	Absolute	Relative	Absolute	Relative	Absolute	Relative	Absolute	Relative	Absolute	Relative
Sham	8.52 ±0.4 <sup>a</sup>	2.80 ±0.07 <sup>bc</sup>	1.76 ±0.06 <sup>ab</sup>	0.58 ±0.02 <sup>a</sup>	0.53 ±0.03 <sup>a</sup>	0.175 ±0.01 <sup>a</sup>	0.48 ±0.01 <sup>a</sup>	0.160 ±0.008 <sup>a</sup>	0.103 ±0.002 <sup>a</sup>	0.034 ±0.001 <sup>a</sup>
OVX	7.72 ±0.3 <sup>ab</sup>	2.15 ±0.07 <sup>de</sup>	1.67 ±0.02 <sup>abc</sup>	0.47 ±0.01 <sup>b</sup>	0.15 ±0.04 <sup>de</sup>	0.043 ±0.01 <sup>d</sup>	0.15 ±0.04 <sup>de</sup>	0.040 ±0.01 <sup>d</sup>	0.035 ±0.009 <sup>c</sup>	0.0098 ±0.002 <sup>e</sup>
OE	7.99 ±0.26 <sup>ab</sup>	2.70 ±0.08 <sup>bc</sup>	1.73 ±0.09 <sup>ab</sup>	0.58 ±0.03 <sup>a</sup>	0.48 ±0.02 <sup>a</sup>	0.16 ±0.007 <sup>a</sup>	0.38 ±0.06 <sup>b</sup>	0.136 ±0.02 <sup>b</sup>	0.103 ±0.007 <sup>a</sup>	0.035 ±0.002 <sup>a</sup>
GL	7.78 ±0.35 <sup>ab</sup>	2.11 ±0.06 <sup>e</sup>	1.85 ±0.05 <sup>a</sup>	0.50 ±0.01 <sup>b</sup>	0.11 ±0.006 <sup>e</sup>	0.030 ±0.001 <sup>d</sup>	0.01 ±0.01 <sup>def</sup>	0.028 ±0.001 <sup>de</sup>	0.029 ±0.001 <sup>c</sup>	0.008 ±0.0004 <sup>e</sup>
GH	7.98 ±0.33 <sup>ab</sup>	2.18 ±0.07 <sup>de</sup>	1.64 ±0.06 <sup>bc</sup>	0.45 ±0.01 <sup>b</sup>	0.10 ±0.004 <sup>e</sup>	0.027 ±0.001 <sup>d</sup>	0.10 ±0.004 <sup>ef</sup>	0.026 ±0.001 <sup>de</sup>	0.026 ±0.001 <sup>c</sup>	0.007 ±0.0005 <sup>c</sup>
PL	6.54 ±0.16 <sup>c</sup>	2.48 ±0.05 <sup>cd</sup>	1.15 ±0.05 <sup>cd</sup>	0.57 ±0.02 <sup>a</sup>	0.19 ±0.02 <sup>cd</sup>	0.071 ±0.009 <sup>c</sup>	0.18 ±0.02 <sup>cd</sup>	0.068 ±0.008 <sup>c</sup>	0.040 ±0.01 <sup>c</sup>	0.015 ±0.001 <sup>d</sup>
PH	8.03 ±0.45 <sup>c</sup>	3.32 ±0.21 <sup>a</sup>	1.45 ±0.05 <sup>d</sup>	0.60 ±0.02 <sup>a</sup>	0.27 ±0.02 <sup>b</sup>	0.111 ±0.01 <sup>b</sup>	0.25 ±0.02 <sup>c</sup>	0.105 ±0.01 <sup>b</sup>	0.060 ±0.004 <sup>b</sup>	0.025 ±0.001 <sup>b</sup>
PL II	6.97 ±0.29 <sup>bc</sup>	2.27 ±0.05 <sup>de</sup>	1.62 ±0.04 <sup>bcd</sup>	0.53 ±0.01 <sup>b</sup>	0.13 ±0.01 <sup>de</sup>	0.042 ±0.003 <sup>d</sup>	0.03 ±0.002 <sup>f</sup>	0.01 ±0.001 <sup>e</sup>	0.030 ±0.002 <sup>c</sup>	0.0098 ±0.0007 <sup>e</sup>
PH II	7.92 ±0.59 <sup>ab</sup>	2.91 ±0.23 <sup>b</sup>	1.61 ±0.06 <sup>bcd</sup>	0.59 ±0.03 <sup>a</sup>	0.25 ±0.02 <sup>bc</sup>	0.090 ±0.01 <sup>bc</sup>	0.06 ±0.007 <sup>f</sup>	0.020 ±0.02 <sup>de</sup>	0.056 ±0.007 <sup>a</sup>	0.020 ±0.002 <sup>c</sup>

- 1) Absolute : absolute weights of organ(g), Relative : relative weights of organ(g/100g body weight)
- 2) Values are mean ± standard error
- 3) Values with different alphabet within the column are significantly different at 0.05 by Duncan's multiple range test  
(\*\*\*, \*\*, \* ; 0.001, 0.005, 0.01)
- 4) *B.U.*: blotted uterus, *D.U.*: dried uterus

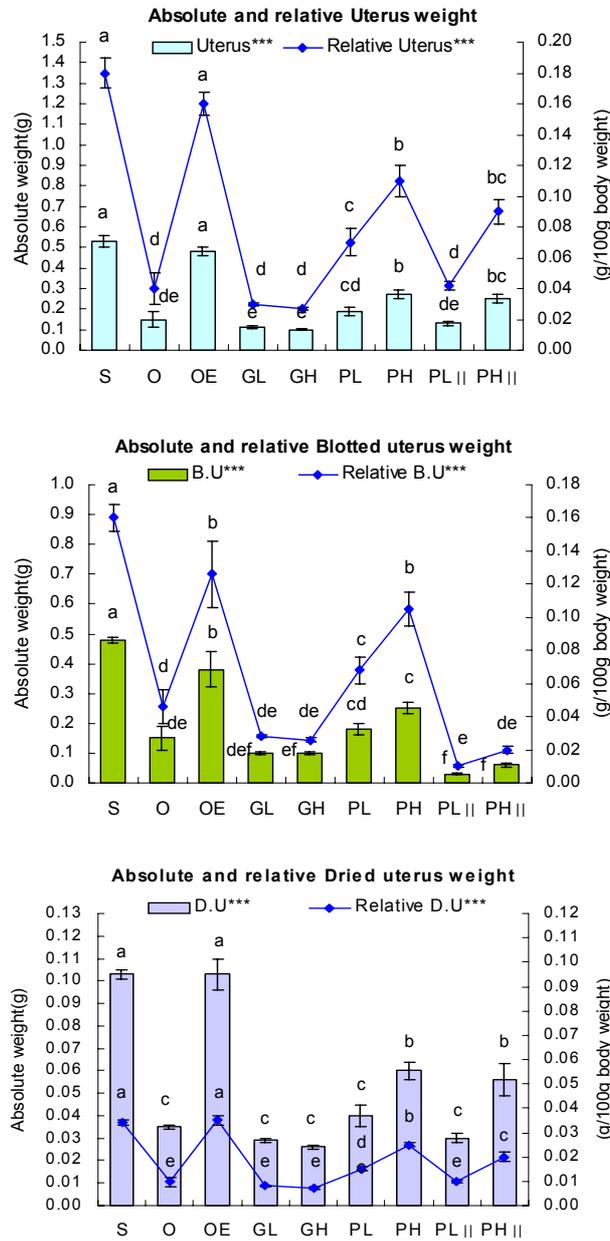


Fig. 89. Changes of uterus weights of rats fed experimental diets for 12 weeks

### (3) 혈청 지질대사 지표와 estradiol 농도에 미치는 영향

난소절제로 인하여 지질대사 측면에서는 혈청의 TC는 큰 변화가 없으나 TG와 Fatty acid가 증가하고 HDL 농도가 감소되는 경향이었는데, E2 주사 군인 OE에서는 HDL, fatty acid 수치는 개선되나 TG 수치는 개선효과가 관찰되지 않았다. GK 섭취군들에서는 Fig. 90과 같이 지질관련 지표들이 개선되는 효과가 있었고 fatty acid 에서만 OVX군과 유의차가 없었다. PL 시료군(PL, PH)에서는 TG, TC가 뚜렷하게 감소하였고 그 효과는 난소절제 전부터 섭취한 군에서 현저하였으며, 다만 HDL 경우 GK 섭취군에서 모두 감소하는 것으로 나타난 것이 특이하였다.

GPT와 GOT 수치는 Table 18과 같으며 GK와 PL 섭취군들에서 대체적으로 높은 수치를 보였으나, 이는 모두 정상수치(GPT;5~30 karmen, GOT; 8~40 karmen) 내에 속하였다. 그러나 고농도의 GK 식이는 투여량을 조정할 필요가 있을 것으로 보이며 간 독성 여부에 대한 실험이 필요할 것으로 판단되었다.

한편 쥐 주령 8주(사육 4주), 12주령(사육 8주), 16주령(사육 12주)째에 꼬리에서 채혈한 혈청을 대상으로 E2 농도변화를 측정하였으며 결과는 Fig. 91과 같다. 난소절제는 쥐 주령 10주(사육 6주) 실시하였으므로 12주령에서는 급격히 감소된 estrogen 농도를 확인할 수 있었다. 17- $\beta$  estradiol 피하주사는 난소절제로 유발되는 estrogen 농도 저하가 일어나지 않고 Sham 군보다도 오히려 높은 혈청 estrogen 농도를 나타내었다. 난소절제 2주 후인 12주령에 OVX 수술 군들에서는 혈청 estrogen 농도가 급격히 감소되었으나 16주령에서는 감초군들에서 혈청 estrogen 농도가 크게 증가되었고 파고지 군의 경우 감초보다는 효과가 적었으나 OVX 대조군과는 유의적으로 차이가 났다. 또한 난소절제전부터 섭취한 군(PL, PH)에서 난소절제 후 섭취한 군(PLI, PL II)보다 효과가 우수하였다. .

**Table 18. TG, total cholesterol, HDL and fatty acid concentrations in serum of rats fed experimental diets for 12 weeks**

	TG <sup>3)</sup> (mg/dl)	TC (mg/dl)	HDL (mg/dl)	fatty acid (uEq/l)	GPT (karmen/ml)	GOT (karmen/ml)
Sham	67.32 ±7.44 <sup>b</sup>	95.45 ±4.47 <sup>ab</sup>	73.76 ±6.06 <sup>a</sup>	664.7 ±63.29 <sup>ab</sup>	19.26 ±0.85 <sup>cd</sup>	15.34 ±1.64 <sup>d</sup>
OVX	81.74 ±3.31 <sup>ab</sup>	99.83 ±3.82 <sup>a</sup>	64.72 ±3.82 <sup>abc</sup>	786.8 ±21.54 <sup>a</sup>	20.69 ±0.55 <sup>bcd</sup>	18.38 ±0.77 <sup>d</sup>
OE	88.47 ±3.89 <sup>a</sup>	85.64 ±6.49 <sup>bc</sup>	71.53 ±4.65 <sup>a</sup>	525.5 ±37.99 <sup>b</sup>	16.70 ±0.86 <sup>d</sup>	15.09 ±0.66 <sup>d</sup>
GL	69.03 ±6.73 <sup>b</sup>	75.01 ±2.25 <sup>c</sup>	70.49 ±2.78 <sup>ab</sup>	756.2 ±61.14 <sup>a</sup>	20.09 ±0.88 <sup>bcd</sup>	37.89 ±2.56 <sup>ab</sup>
GH	65.83 ±3.90 <sup>bc</sup>	73.98 ±1.83 <sup>c</sup>	77.09 ±3.51 <sup>a</sup>	783.0 ±40.37 <sup>a</sup>	31.31 ±3.26 <sup>a</sup>	43.44 ±1.54 <sup>a</sup>
PL	37.58 ±3.92 <sup>d</sup>	57.11 ±5.36 <sup>d</sup>	53.42 ±3.43 <sup>c</sup>	715.0 ±58.20 <sup>ab</sup>	25.67 ±1.04 <sup>b</sup>	37.83 ±2.11 <sup>ab</sup>
PH	45.71 ±8.93 <sup>d</sup>	53.73 ±4.51 <sup>d</sup>	58.53 ±2.76 <sup>bc</sup>	302.8 ±85.51 <sup>c</sup>	24.74 ±1.81 <sup>bc</sup>	36.13 ±2.22 <sup>b</sup>
PL II	49.59 ±5.88 <sup>bc</sup>	75.43 ±5.40 <sup>c</sup>	56.87 ±2.63 <sup>c</sup>	609.1 ±103.56 <sup>ab</sup>	22.13 ±0.98 <sup>bcd</sup>	27.07 ±1.99 <sup>c</sup>
PH II	43.84 ±6.79 <sup>d</sup>	85.57 ±3.56 <sup>bc</sup>	64.67 ±5.09 <sup>abc</sup>	611.3 ±132.36 <sup>ab</sup>	24.20 ±1.44 <sup>bc</sup>	26.49 ±2.36 <sup>c</sup>

1) Values are mean ± standard error

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at 0.05 by Duncan's multiple range test.

3) TG: triglyceride, TC: Total cholesterol, HDL: high-density lipoprotein,

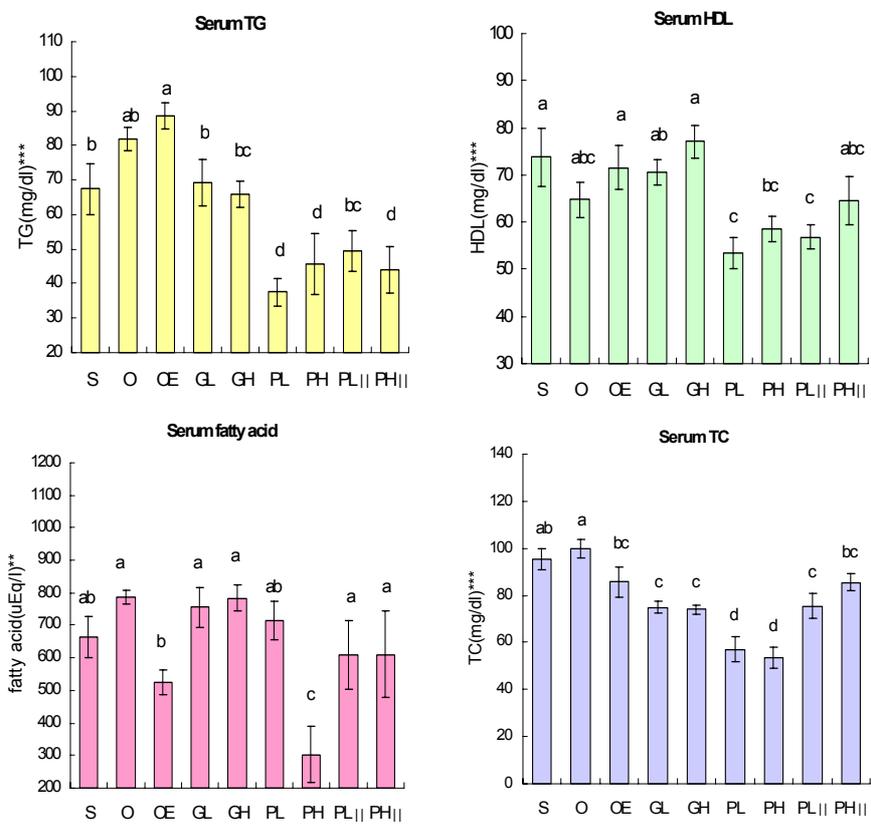


Fig. 90. TG, total cholesterol, HDL, fatty acid in serum of rats fed experimental diets for 12 weeks

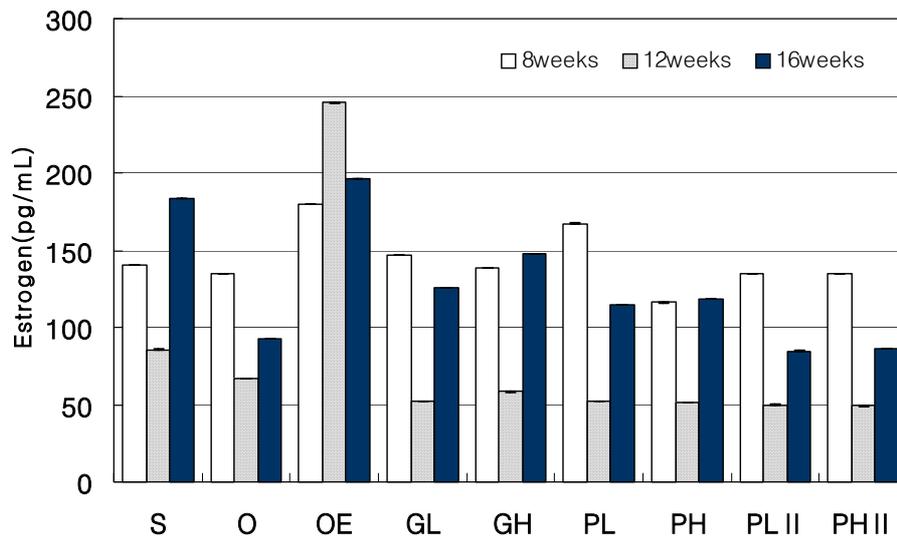


Fig. 91. Levels of serum estrogen of rats fed experimental diets for 12 weeks. The rat were OVX or sham-operated at 10weeks age and killed at 6 weeks after surgery.

#### (4) 간 지질대사 지표에 미치는 영향

간에서 total lipid와 TG, total cholesterol의 농도를 분석한 결과, 난소절제에 의해 간 내 total lipid의 양과 TG, total cholesterol의 값이 모두 유의적으로 증가하였다(Fig. 92). 그러나 난소절제 후 E2를 피하주사한 군에서는 난소절제로 유도되는 이들 수치들의 상승이 억제되는 효과를 나타내었다. GK 섭취군의 경우 간 지질함량과 TG가 증가하였으며 TG 또한 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 GK 시료식을 섭취한 개체들의 큰 체중증가에 의해서 간 내 지질의 함량이 증가한 것으로 유추된다. 이에 비해 PL 시료군에서는 간 내 지질함량뿐 아니라 TG, TC 모두 유의적인 감소를 나타내었다.

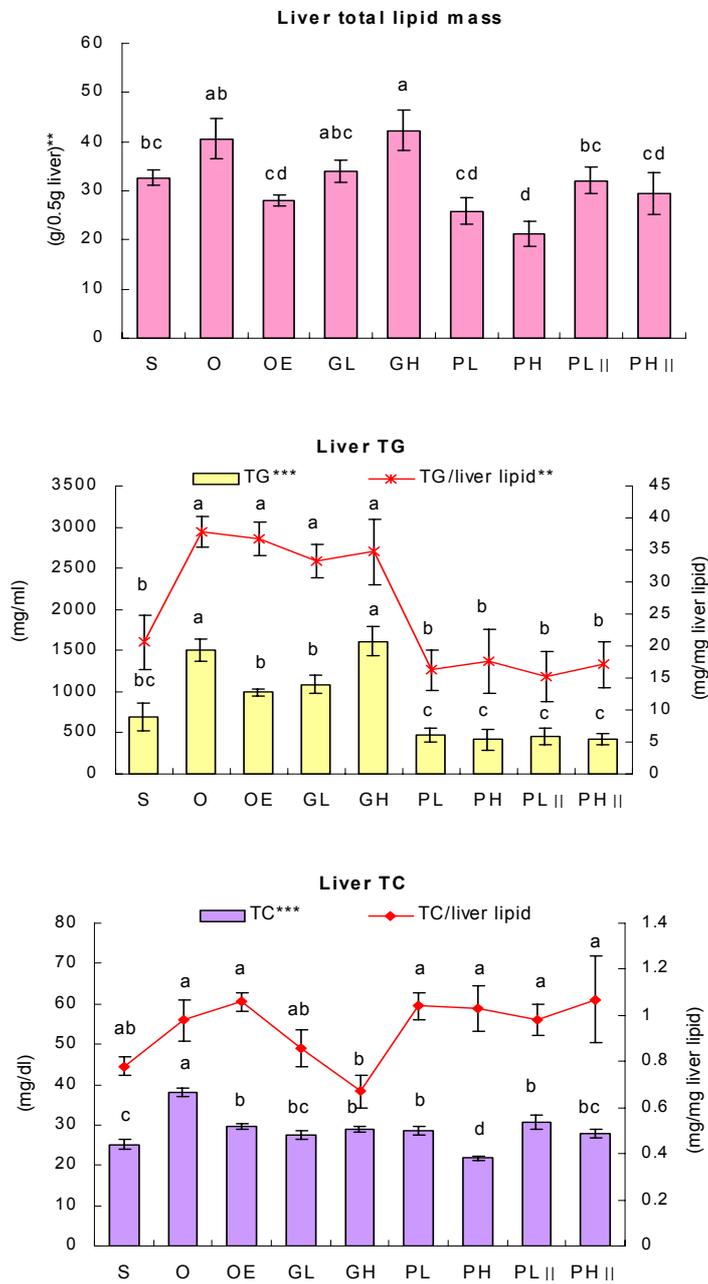


Fig. 92. Total lipid, TG and total cholesterol in liver of rats fed experimental diets for 12weeks

### (5) 항산화 지표에 미치는 영향

간의 항산화 효소계를 분석한 결과, OVX군에서는 의해 MDA의 생성이 증가하였으며, catalase, SOD, activity가 sham에 비해 유의적으로 크게 감소되었고 GPx의 경우는 유의적인 차이가 없었다(Fig.93). 난소절제 후 E2의 주사군인 OE에서는 catalase, SOD가 상승되는 효과가 있었고 MDA, level에는 OVX군과 차이가 없었다. GK와 PL소재는 섭취한 군들에서는 OVX군에 비하여 간 내 MDA 생성이 유의적으로 감소하였으며, SOD 활성이 증가 되었으나 catalase와 GPx에서는 일정한 경향을 도출하기가 어려웠다. 간 catalase와 SOD의 경우 GK 시료보다 PL 시료군에서 유의적인 증가를 보였으며, 이는 저농도보다 고농도에서 뚜렷하게 나타났다.

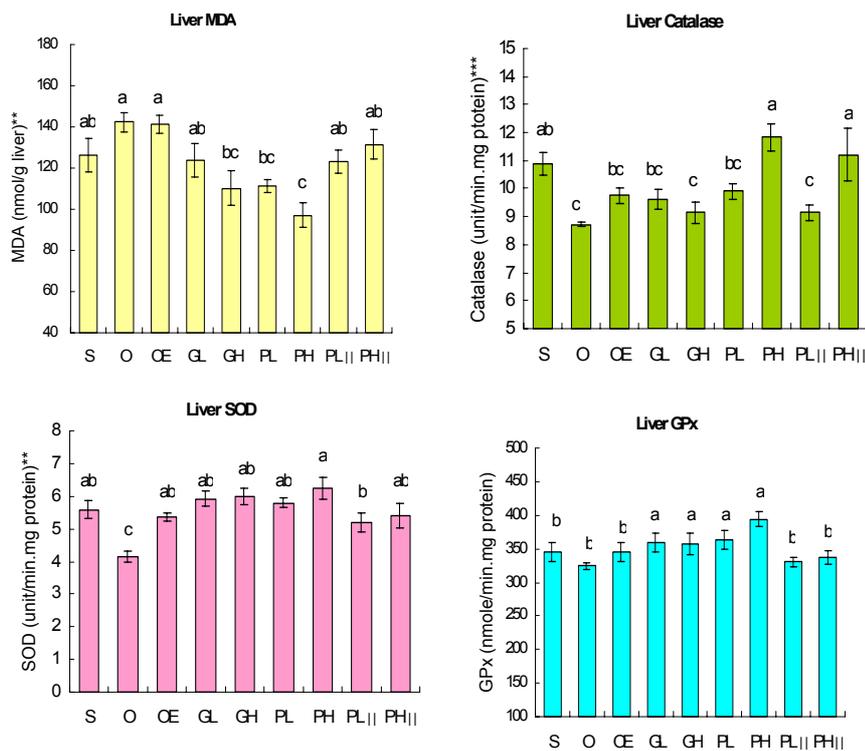
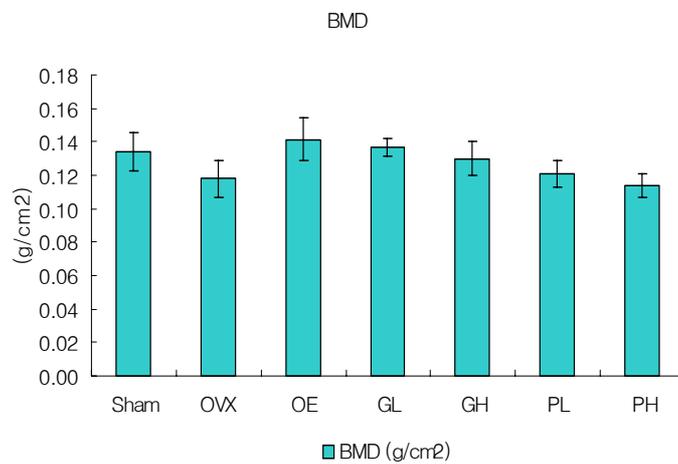


Fig. 93. Effect on malondialdehyde level and antioxidant enzymes of rat livers fed experimental diets for 12weeks

### (6) 골밀도에 미치는 영향

실험식이를 난소절제 전 6주, 난소절제 후 6주 동안 먹인 다음 골밀도 측정기로 대퇴골의 골밀도를 1차 측정 한 결과는 Fi.g. 94와 같다. OVX 군에서 유의적으로 골밀도가 낮았으며 estradiol 주사군의 경우 Sham군보다도 높은 골밀도를 나타내었다. 실험식이인 GK 투여군은 OVX로 인한 골손실 억제 효과가 나타났으나 PL 투여군에서는 골손실 억제 효과가 나타났으며 두군 모두 농도의존적인 효과는 보이지 않았다.

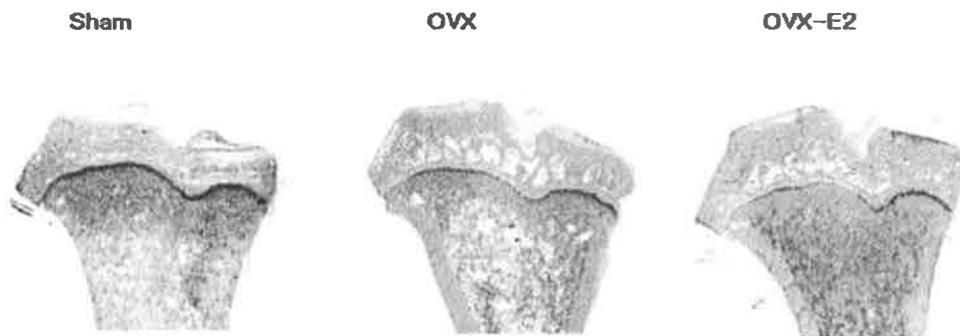


**Fig. 94. Effect on bone density of rat femur fed experimental diets for 12weeks**

반면 경골 (tibia)을 분리하여, 골조직은 하루정도 3% formalin 용액에 담귀 고정시킨 다음 3주간 decalcification 용액에서 흔들어주면서 탈회시킨 후 hematoxylin-eosin (H & E) 염색을 실시하고 조직학적 변화를 관찰한 결과는 Fig. 95-97과 같다. 난소 제거 (Ovx)로 estrogen이 부족해지면 경골 (tibia) 내의 소주골 (trabecular bone)이 흡수되어 심한 골다공증을 유발하는 것으로 나타났다. 그러나 난소 제거 후 17 $\beta$ -estradiol을 주사한 군에서는 난소 제거에도 불구하고 골흡수가 억제되어 Sham군과 비슷한 정도의 골밀도를 유지하였

다 (Fig. 95).

그림 9.



Hematoxylin & Eosin stained-tibia sections were gained after 4 weeks from operated rats. Sham-operated (Sham), Ovariectomized (Ovx), Estrogen-Injected (Ovx-E2).

Fig. 95. Scanning electron micrographs of proximal tibial hemisection from sham-operated, ovariectomized rats untreated and treated with 17- $\beta$ -estradiol for 6 weeks.

GK 추출물의 난소제거 쥐 골다공증 진행 억제작용은 Fig. 96과 같다.

난소제거 후 GK 추출물 저농도와 고농도를 먹인 쥐의 정골에서는 골흡수의 억제 경향을 보였지만, 정상 대조군 보다는 소주골밀도가 낮았다.

그림 10. 감초 섭취군

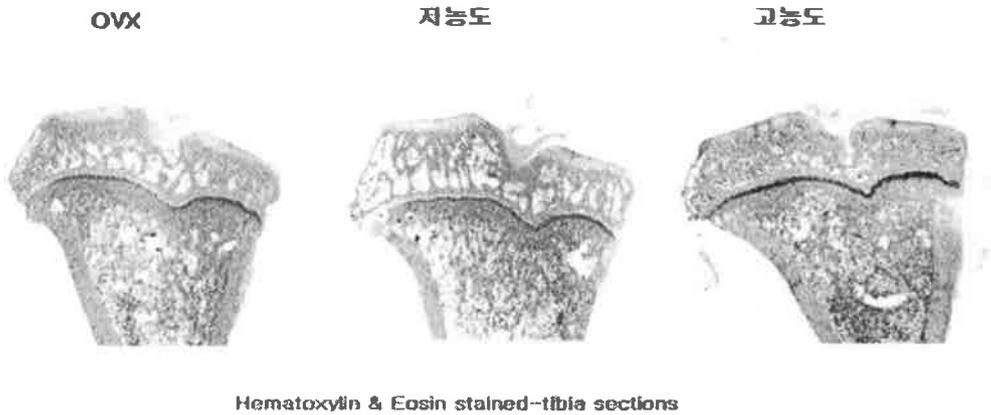


Fig. 96. Scanning electron micrographs of proximal tibial hemisection from ovariectomized rats untreated and treated with GK for 6 weeks.

PL 추출물의 난소제거 쥐 골다공증 진행 억제작용은 Fig. 97과 같다.

난소제거 후 파고지 추출물 저농도와 고농도를 먹인 쥐의 경골에 서는 골 흡수가 유의적으로 억제되어 소주골밀도가 정상대조군과 비슷한 정도를 보였다.

그림 11. 파고지 선취군



Fig. 97. Scanning electron micrographs of proximal tibial hemisection from ovariectomized rats untreated and treated with PL for 6 weeks.

이상의 결과는 경골조직을 H-E 염색하여 각 군의 소주골밀도를 현미경하에서 검토한 것이다. 감초와 파고지는 골아세포 증식과 ALP 활성도를 높이는 효과도 우수하게 나타난 바 있으며, 현미경 하에서 결과를 종합해 볼 때, 난소 제거한 쥐에게 파고지 추출물을 먹인 경우에는 골흡수가 억제되어 거의 정상의 골밀도를 보였고, 저농도와 고농도의 효과도 비슷하게 나타났다. 감초추출물도 골다공 억제효과가 있었지만, 파고지보다 낮았다.

이상의 결과로 볼 때 1차 시료인 GK보다는 2차 시료인 PL시료가 phytoestrogen 으로서의 효능 측면에서 매우 우수한 것으로 나타나 소제화를 및 PL 시료의 유효성분을 대상으로 한 연구가 필요한 것으로 나타났다.

## 11. 유방암 억제효능이 부가된 phytoestrogen을 이용한 기능성 제품 개발

본 연구에서는 에스트로겐 활성을 지니면서 유방암 유발의 부작용이 없을 뿐만 아니라 오히려 유방암 억제효능을 지닌 천연 phytoestrogen 소재로 감초와 파고지를 발굴하였으며 이를 이용한 기능성 제품을 개발하고자 하였다.

파고지 추출물의 경우 음료 가공이 불가능한 점액질 상태로 분말 제조 후 용해성도 매우 낮으므로 과립과 환 제품으로 가공하였으며 감초는 가장 보편적인 제품인 음료 제품으로 개발하였다.

### 가. 탈색 및 탈취 공정 실험

선발소재 추출물 중 파고지 시료의 경우 색이 매우 진하고 특유의 향이 존재하여 가공 및 제품화에 제한 요인으로 작용하므로 탈색 및 탈취공정을 적용하고자 활성탄(activated carbon) 6종, 백토(clay) 4종을 처리하여 유효성분의 제거 여부를 확인하면서 가공적성을 높이고자 실험하였다.

Activated carbon은 No. 8556(A), No. 8557(B), No. 8544(C), No. 8545(D), 탈색·탈취용 활성탄(E), 탈색용 활성탄 (F)을 사용하였다. Clay는 Fuller's Earth No. 16068-02(G), 산성백토(H), Clay acid (Japanese acid clay) No. 881393(I), Japanese acid clay (19725/1310)(J), Clay activated (19828/1309)(K)를 사용하였다. 파고지 주정 추출물(°Brix 22) 100ml에 활성탄(activated carbon) 6종, 백토(clay) 4종을 각각 3g씩 넣고 혼합하여 여과한 결과 색의 흡착과 탈취의 효율이 좋은 activated carbon B, D, E와 clay H, I로 총 5종을 선정하였다.

Table 19는 파고지 추출물 activated carbon B, D, E와 clay H, I으로 처리한 후 %T, 색차계, polyphenol 함량, °Brix를 측정된 것이다.

**Table 19. Effect of activated carbon or clay treatments on qualities of extract**

	Solid (mg/ml)	°Brix	%T	Color	Catechin Conc.(µg/ml)
Untreated	0.90	21.5	3.39	L	7.81
				a	16.09
				b	4.57
activated carbon B	3.40	20.0	70.62	L	18.34
				a	7.25
				b	11.10
activated carbon D	0.45	20.0	86.45	L	18.83
				a	3.43
				b	9.69
activated carbon E	1.00	20.5	29.96	L	6.42
				a	10.82
				b	4.08
clay H	1.41	21.0	17.77	L	1.98
				a	4.28
				b	1.18
clay I	1.49	21.0	18.98	L	2.23
				a	4.58
				b	1.48

탈색 효과는 clay보다 활성탄이 우수하였으며 특히 활성탄 D처리구의 경우 투과도가 매우 증가하였으며 미약한 탈취효과도 나타났다. 그러나 처리 후 용액의 폴리페놀 함량과 고형분 함량 감소가 심하였다. 그러나 고형분 함량이 감소하더라도 bakuchol 등 유효성분의 감소를 동반하지 않는다면 가공적성은 오히려 우수한 것으로 평가되어 HPLC 분석을 실시하였다.

Fig. 98에서와 같이 활성탄 처리구에서 두 지표물질인 Psoralen과 bakuchiol의 함량감소가 컸으므로 Activated carbon B, D, E와 Clay I를 병용처리한 결과 Fig, 99에서와 같이 Activated carbon D와 Clay I 처리구에서 %T 도 86.4%로 높고 끈적이는 물성을 일부 감소시키며 유효성분의 보유력도 우수한 바람직한 처리효과를 얻을 수 있었다.

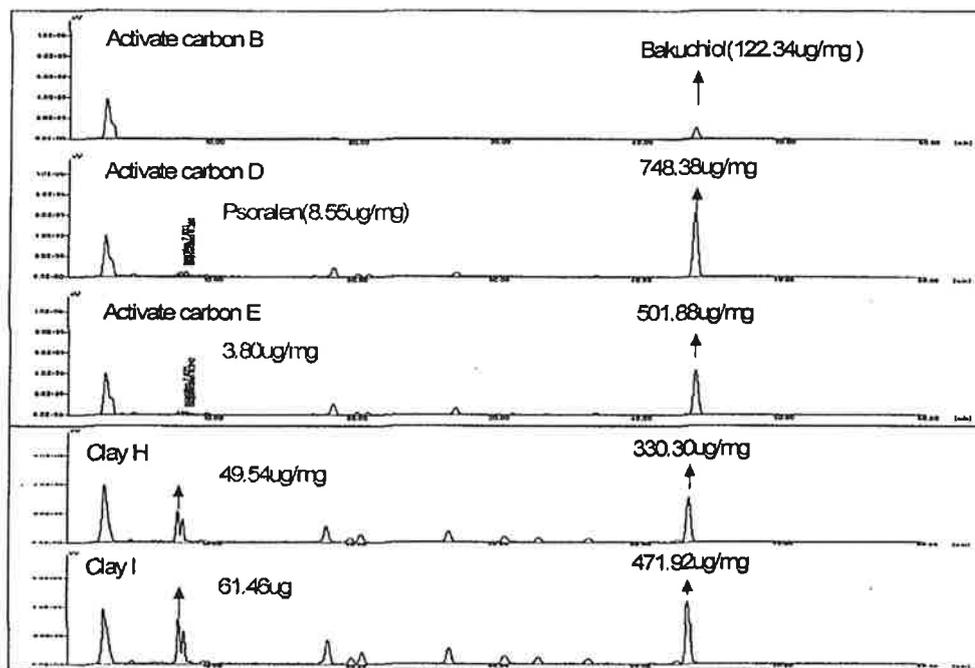


Fig. 98. HPLC analysis of PL extract after treatment of activated carbon or clay

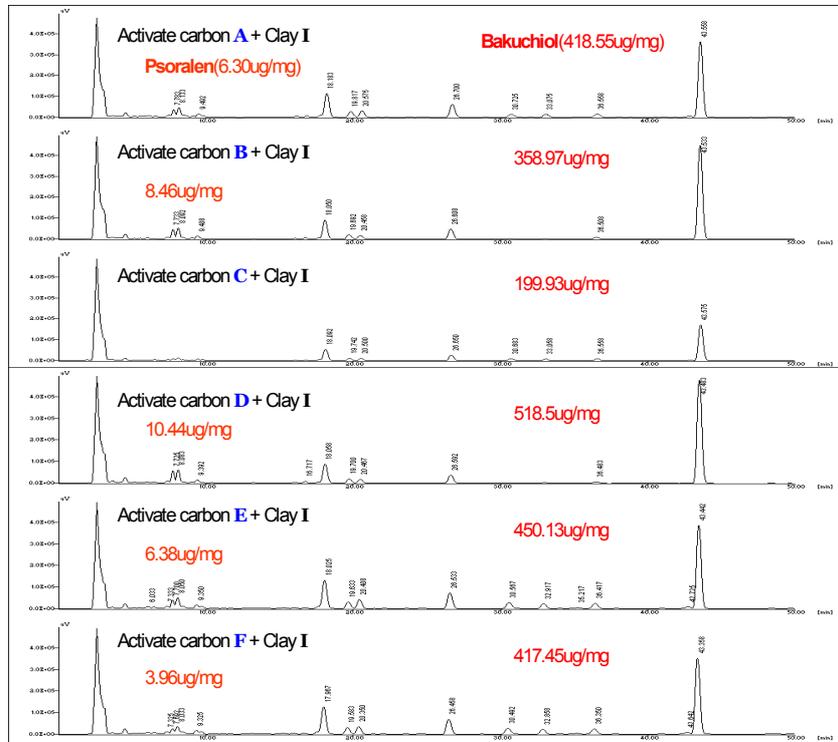


Fig. 99. HPLC analysis of PL extract after treatment of activated carbon and clay

나. 과고지를 이용한 과립형 분말 제품

주정으로 추출한 과고지 추출물 22°Brix를 Activated carbon D와 Clay I 처리구로 전처리 한 후 과립형 분말 제품을 제조하고자 하였다. 과고지 추출물의 농축정도를 높힐 경우 벽에 달라붙는 현상 및 점성이 강하여 가공이 어려운 상태인 것으로 나타나 22°Brix 이상의 농축은 바람직하지 않았으며 저장에 위해서는 최종제품을 고려한 가당 등의 공정이 필요한 것으로 나타났다. 또한 동결건조하여 분말화 시킨 과고지 분말도 과립화 적용이 가능하였다.

과고지 추출물에서 나타나는 특유의 쓴맛과 아린 맛을 완화시켜주기 위하여 부재료로 포도당 외에 스테비오사이드 1.2%, 비타민 C 1.8%, 구연산 2.0%를 첨가하였다. 또한, 갱년기 소재로 주목 받고 있는 대두 isoflavone 분말을 첨가하여 isoflavone의 일일 섭취제한량인 50mg/day을 공급하면서 과고지의 유효성분을 효과적으로 섭취할 수 있도록 제조하였다. Isoflavone 제품은 Fujicco사의 10% isoflavone 제품과 40% isoflavone을 첨가하였다.

Table 20. Formulas for granulated powder using *P. corylifolia* L extract(%)

	배합비 A	배합비 B	배합비 C	배합비 D	배합비 E	배합비 F
과고지 추출물	12	15	20	25	15	15
함수결정포도당	83	80	75	70	75	78
스테비오사이드	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
vitamin C	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
구연산	2	2	2	2	2	2
10% isoflavone	-	-	-	-	5	-
40% isoflavone	-	-	-	-	-	2

과립의 물성을 부여하기 위한 농축액의 적정 첨가량 및 반죽의 수분함량을 결정하기 위하여 Table 20과 같이 농축액 농도와 부재료 첨가량을 달리하여 혼합하고 과립 분말을 제조하였다. Table 20의 배합비로 제조한 과립 처리구를 대상으로 관능검사를 실시한 결과는 Table 21과 같았다.

**Table 21. Sensory characteristics of *Psoralea corylifolia* L. granule by trained panel<sup>1)2)</sup>**

sample	bitterness	sweetness	flavor	color	overall quality
배합비 A	2.71±1.38 <sup>a)</sup>	2.56±0.69	3.00±2.24	2.43±1.13 <sup>b)</sup>	3.71±0.95 <sup>a)</sup>
배합비 B	3.86±1.21 <sup>ab)</sup>	3.86±0.69	4.14±2.04	3.71±1.36 <sup>ab)</sup>	4.00±1.53 <sup>a)</sup>
배합비 C	4.29±1.25 <sup>ab)</sup>	3.57±0.53	4.86±1.07	5.29±0.76 <sup>a)</sup>	3.86±1.35 <sup>a)</sup>
배합비 D	5.29±0.76 <sup>b)</sup>	3.14±1.68	5.00±0.58	5.29±1.11 <sup>a)</sup>	2.43±1.13 <sup>ab)</sup>
배합비 E	3.71±1.70 <sup>ab)</sup>	3.00±1.15	4.86±1.68	3.71±2.14 <sup>ab)</sup>	3.71±2.14 <sup>a)</sup>
배합비 F	4.14±1.77 <sup>ab)</sup>	3.29±0.95	4.29±1.70	2.00±1.29 <sup>b)</sup>	2.00±1.29 <sup>b)</sup>

1) Mean ±SD

2) a, b, c, d, means in the column with different superscripts are significantly different at p<0.05 level

쓴맛과 색도는 파고지 추출물의 농도가 높아질수록 유의하게 수치가 높았으나 단맛과 풍미는 그에 비하여 파고지의 농도에 따른 차이가 크지 않았다. 특히 파고지 추출물 함량이 높은 과립의 풍미 항목이 다른 항목에 비하여 대체로 높아 파고지 자체의 향에 대한 선호도가 좋은 것으로 나타났다. 전체적 기호도는 배합비 B와 배합비 E가 우수하였으며 두 배합비 간의 유의한 차는 나타나지 않았다. 기타 개선사항으로 파고지의 특유의 단맛 외에 감미료의 단맛이 느껴진다는 의견이 있었다. 이는 스테비오사이드에서 유래한 것으로 판단되었다. 과립 제품의 성상은 Fig. 과 같으며 배합비 E가 가장 우수한 것

으로 평가되었다.

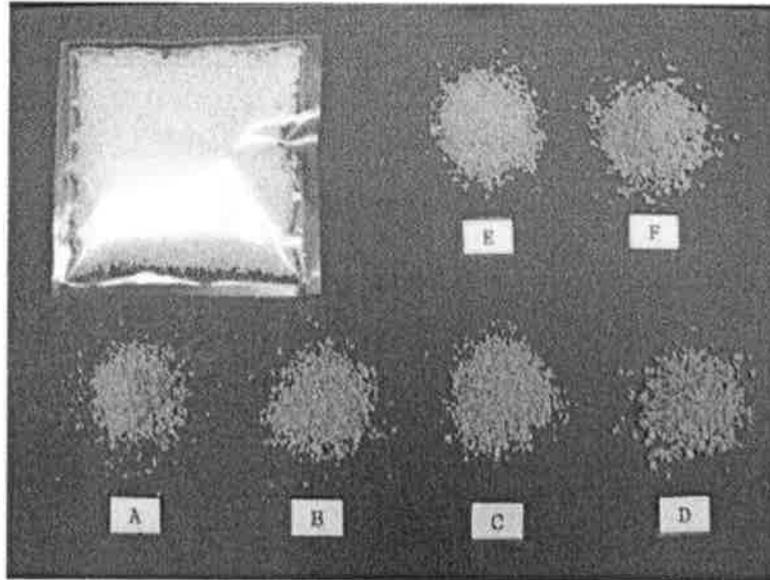


Fig. 100. Granulated powder using extracts of *P. corylifolia* L. and soy isoflavone

과고지 추출물 농도에 따른 과립의 관능적 특성 값을 이용한 상관관계는 Table 22에 나타내었다. 과립 제품의 쓴맛과 풍미가 유의하게 정의 상관관계 ( $p < 0.05$ )를 나타내며, 쓴맛과 풍미가 제품의 색과 유의하게 정의 상관관계 ( $p < 0.05$ )를 나타내는 것으로 나타나, 제품의 색이 쓴맛과 풍미에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 추출물의 농도는 전반적인 기호도에 부의 상관성을 나타내었다.

**Table 22. Pearson's correlation coefficients between *Psoralea corylifolia* L. concentration and sensory characteristics of *P. corylifolia* L. granule**

	bitterness	sweetness	flavor	color	overall quality	<i>psoralea corylifolia</i> L. con.
bitterness	1					
sweetness	-0.28	1				
flavor	0.82*	-0.11	1			
color	0.91*	-0.02	0.90*	1		
overall quality	0.41	0.14	0.62	0.46	1	
<i>Psoralea corylifolia</i> L. con.	0.04	-0.01	0.04	0.07	-0.70	1

Mean ± S.D.

\* ; significant at p<0.05

#### 다. 파고지환 제품 개발

파고지환의 제조를 위하여 22°Brix인 주정 추출물을 Activated carbon D와 Clay I 처리구로 전처리 한 후 이용하였다. 파고지추출물에 분말 부원료와 꿀, 밀가루풀 등을 함께 혼합 반죽한 다음 성형, 자환, 제환, 정환 및 코팅, 건조공정을 거쳐 제조하였다. 특히, 환의 상품성을 높이기 위하여 코팅제를 달리하여 제조하였다. 코팅제는 gelatin, 설탕, 한천, 물엿, 아라비아검 등을 이용하여 환을 제조하였다.

Table 23. Formulas for pill product using *P. corylifolia* L. extract(%).

	배합비 A	배합비 B
파고지 추출물	15	20
꿀	5	5
전분	53	48
밀가루풀	25	25
구연산	2	2

#### (1) 반죽, 자환 및 제환

환을 제조하기 위하여 먼저 분말 원료를 믹서기로 혼합한 다음 파고지 추출물과 꿀, 밀가루풀과 함께 혼합하여 반죽기로 반죽하였다. 이 반죽물을 일정한 모양으로 성형하여 자환기에 내리고 내려진 가락이 서로 달라붙지 않게 밀가루 분말을 뿌려주었다. 자환기에서 국수가닥처럼 내려진 가닥을 절단기에 환 모양으로 절단하여 제환하고 이를 환제틀에 넣고 정환하였다. 정환된 환들을 열풍건조기에 40-65까지 단계적으로 온도를 높여가면서 건조시켰다. 1차로 건조된 환은 코팅을 하고 재건조를 하여 제품으로 하였다.

환 제조시 주의점은 반죽이 가장 중요하며 이때 분말원료와 액기스 및 풀의 배합을 잘 조절하여야한다. 이들을 열풍건조기에 건조시킬 때 처음부터 높은 온도로 건조를 시킬 경우 환 표면이 갈라지게 되므로 낮은 온도에서부터 서서히 올려 건조시켜야 한다.

#### (2) 코팅제제

환의 상품성을 높이기 위하여 코팅제의 보환을 하였다. 코팅제로 gelatin, 설탕, 한천, 물엿, 아라비아검 등을 시험하였다.

젤라틴은 설탕과 함께 시험하였는데, 5% 젤라틴에 10% 설탕을 혼합하여

사용하였다. 코팅용 젤라틴은 가온기를 이용하여 용해시킨 후 60℃를 유지하도록 항온기에 보관하면서 사용하였다.

한천은 각각 1, 3, 5%로 나누어 시험하였으며 열탕에 용해하여 사용하였다. 한천은 쉽게 굳어지고 젤 상태로 쉽게 변하여 환에 스프레이 했을 경우 코팅이 되지 않고 뭉치기만 하였다. 그러나, 건조 후에는 건조전 보다는 매끈해지는 코팅제 역할을 하는 것으로 나타났다.

아라비아검 코팅제는 설탕, 물엿등과 함께 혼합하여 제조하였는데 5% 아라비아검에 10% 설탕과 10% 물엿을 혼합하여 사용하였다.

본 연구를 통하여 개발된 파고지 환 가공제품의 성상은 Fig. 101과 같다.



Fig. 101. Pill product using extracts of *Psoralea corylifolia* L. and different coating materials

## 라. 음료제품 개발

감초의 경우 식품의약품 안전청 식품원료 식품원재료데이터베이스에 감미 식품으로 분류되어 있는 식용가능 생약재로서 강한 단맛을 가지고 있으나 단맛이 지속시간이 너무 긴 단점이 있으며 감초를 다량으로 복용하게 되면 두통, 혈압 상승 등의 부작용이 나타날 수 있으므로 주의가 필요한 것으로 명시되어 있다.

따라서 본 연구에서는 감초자체의 농축액을 주로 하는 음료제품 보다는 과실류와 같은 식이섬유원 또는 phytoestrogen 활성이 높은 것으로 알려져 있는 석류농축액 등에 감초를 첨가하여 갱년기 여성을 대상으로하는 기능성 음료를 개발해보고자 하였으며 제품 형태는 일반농축액보다는 쉽게 용해하여 음용가능하고 일반 드링크류와는 다소 차별화되는 30~40oBx 정도의 액상차 형태의 음료를 개발해 보고자 하였다.

### (1) 감초의 적정 첨가량

감초의 적정 첨가량을 설정하기 위하여 감초 농축액(65°Bx)을 1.5, 4.5, 7.5%(w/w) 농도로 첨가하고 고과당을 이용하여 최종 고형물량을 24 °Bx전후로 조정한 후 관능 평가를 실시하였다. 그 결과 전반적으로 4.5% 이상의 감초 첨가시에는 단맛이 너무 강하고 쓴맛이 강하게 느껴져 음료로서 적절치 못한 것으로 판단되었다. 따라서 이후 실험에서는 감초 농축액을 1.5%(w/w) 첨가한 후 최종 고형물 농도로 조정하여 제조한 것을 기본 음료 베이스로 하여 실험을 수행하였다.

### (2) 적정 과실농축액 및 산미료 첨가량 결정

감초의 쓴맛을 제거하고 기능성을 부여하기 위한 과실농축액으로 사과, 포도, 배, 대추, 석류 농축액을 선정하였으며 이들 과실농축액을 기본 음료베이스의 14%(w/v) 정도 되게 첨가하고 음료의 청량감 및 상업적 살균을 위해 비타민 C 0.04%(w/v), 구연산 0.02%(w/v)을 첨가하여 음료를 제조하고 음료 제품의 관능적 품질을 비교해 보았다.

그 결과 석류를 제외한 대부분의 과실류 농축액의 경우 감초의 강한 단맛

과 쓴맛을 효과적으로 마스킹해주는 것으로 판단되었으나 쓴맛의 경우 대추 농축액에서만 약간 느껴지는 정도였다. 석류의 경우 다른 과실류에 비해 음용시 상큼한 단맛과 신맛의 조화는 없었으나 최근 기능성 소재로 각광받는 점을 고려해 볼 때 감초 액상 음료 제조를 위한 소재로 활용 가능할 것이라 판단되었다. 또한 과실농축액의 첨가는 감초의 강한 단맛과 쓴맛을 효과적으로 잘 마스킹 해주므로 그 첨가량을 약 3배 정도 높여도 큰 문제가 없었으며 5배 정도 높일 경우에는 음용 시 감초 고유의 뒷맛이 다소 느껴지는 문제점이 있었다.

이상의 모든 결과를 종합하여 기본 과실소재로는 배와 석류를 선정하고 감초 액상음료제품의 최종 배합비를 결정하였다.

### (3) 최종 배합비 및 제조공정

감초를 이용한 액상차 형태의 음료제품 최종 배합비는 Table 24와 같으며 제품 형태는 Fig. 102와 같다. 다만, 각 배합비에서 감초 농축액양은 7~21 g까지는 가능할 것으로 판단되며 이 경우 고과당 함량은 270~284 g 첨가하여 음료를 제조할 수 있을 것으로 판단되었다.

Table 24. Final recipe of Gamcho(*Glycyrrhiza uralensis*) beverage products

	Recipe(w/w), Final weight : 1 Kg	
	1	2
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> concentrate(65°Bx)	7.00	7.00
High fructose syrup	284.00	284.00
Pear concentrate(65°Bx)	102.00	-
Pomegranate concentrate(65°Bx)	-	102.00
Pure water	606.77	606.77
Vitamin C	0.15	0.15
Citric acid	0.08	0.08
Lemom flavour	0.10	0.10
Final volume(ml)	880	890
pH	3.01	3.42
°Bx	28.8	28.8



Fig. 102. Beverage products of drink type(up) and concentrated tea type(down) using *Glycyrrhiza uralensis* extract.

## 12. 건강기능식품 개발을 위한 유효소재의 안전성 연구

건강기능식품법에 따른 요건을 갖추기 위하여 아래와 같은 독성시험 및 안전성 평가시험을 GLP 기관에 의뢰하여 수행하였다. 보고서 내용을 요약하면 다음과 같다.

### 가. 단회투여독성시험

시험물질인 파고지 추출물의 단회 경구투여독성을 조사하기 위하여 Sprague Dawley 계통의 랫드에 군당 암수 각각 5마리씩 단회 경구투여한 후 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다. 단회 경구투여시 2000 mg/kg 용량까지 사망개체는 발생하지 않았으며, 관찰기간 동안 암,수 대조군 및 시험물질 투여군에서 특이한 일반 증상이 발견되지 않았고 정상적인 체중 증가가 관찰되었다. 부검결과 특이한 소견이 발견되지 않았다. 따라서 랫드에 있어서 본 시험물질의 단회 경구투여에 의한 개략의 치사량은 2000 mg/kg을 상회하는 것으로 나타났다.

### 나. 복귀돌연변이 시험

시험물질인 파고지 추출물 분말의 복귀돌연변이 유발성 여부를, 히스티딘 요구성 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 균주 및 트립토판 요구성 *Escherichia coli* WP2<sub>uvrA</sub>(pKM010) 균주를 이용하여 비대사 활성화 및 대사활성화인 각각의 경우에 대해 검토하였다.

용량설정시험결과, 대사활성효소계 적용유무에 관계 없이 사용한 모든 균주에서 생육저해가 관찰되었다. 시험물질의 석출은 대사활성화계 적용유무에 관계 없이 사용한 모든 시험 균주에서 1250, 2500, 및 5000 $\mu$ g/plate에서 관찰되었지만 콜로니 계수에는 영향이 없었다. 따라서 본 시험의 용량은 비대사활성화의 TA100, TA1535 균주 및 대사활성화의 TA1535 균주의 경우에는 생육저해가 관찰된 625 $\mu$ g/plate를, 대사활성효소계 적용유무에 관계없이 TA98 균주 및 대사활성화의 TA100, TA1537, WP2<sub>uvrA</sub>(pKM010) 균주의 경우에는 생육저해가 관찰된 1250  $\mu$ g/plate를, 비대사활성화의 TA1535, WP2

uvrA(pKM010) 균주의 경우에는 2500 µg/plate를 최고용량으로 하고, 그 이하 공비 2로 최고용량을 포함한 5용량과 시험물질균과 음성대조균 및 양성대조균으로 실시하였다.

시험결과, 모든 시험균주에서 시험물질에 의한 복귀돌연변이 콜로니 수는 대사활성계의 적용유무에 관계 없이 용량의존적으로 증가되지 않았으며, 음성대조균과 비교하여 2배 이상의 증가를 보이지 않았다. 이상의 결과로부터 시험물질인 파고지 추출분말의 복귀돌연변이 유발성은 음성으로 판정되었다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련 분야에의 기여도

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	달성도 (점수)
1차년도(2003)	○ 활성 탐색 및 측정법의 적합성	35
	○ 선정 자원과 연구결과의 충실성	35
	○ 연구개발 결과의 달성도	30
2차년도(2004)	○ 소재화 기술 분야의 적정성	35
	○ 활성 탐색 및 측정법의 적합성	30
	○ 유효소재의 우수성 규명	35
3차년도(2005)	○ 제품화 기술 분야의 적정성	30
	○ 연구결과의 적합성	35
	○ 효능 및 개발기술의 활용성	29
최종평가	○ 소재화 결과의 충실성	35
	○ 효능 연구결과의 충실성	35
	○ 총 연구개발 결과의 적정성	30

## 제 5 장 연구개발 결과의 활용 계획

### 1. 활용방안

- 본 연구과제의 수행으로 발굴된 에스트로젠 활성을 지니면서 부작용이 없  
을 뿐만 아니라 유방암 억제효능을 지닌 천연 phytoestrogen 소재 및 가공제  
품은 기술이전을 통하여 관련 제품의 생산 및 산업화에 활용할 계획이다.
- 본 연구과제의 수행으로 얻은 기초 연구결과는 학회에 투고하며 다양한  
식·약용 자원의 호르몬 대체 기능성 식품으로 효능 및 유효성을 입증할 수  
있도록 효능자료를 제시하고자 한다.
- 에스트로젠 치료법이 필요한 여성관련 질병의 예방 및 치료에 활용할 수  
있는 안전하고 효과적인 대응책으로 활용할 수 있도록 개발 소재의 특허 출  
원 및 국내 기술력 확보에 주력하고자 한다.

### 2. 활용 실적 및 활용 계획

#### 가. 학술지 게재 3건

1) SCI 논문 : Cancer Letters 230, 235-247, 2005

Chemopreventive properties of the ethanol extract of chinese licorice  
(Glycyrrhiza uralensis) root: induction of apoptosis and G1 cell cycle  
arrest in MCF-7 human breast cancer cells : Eun-Hye Jo, Sung-Hoon  
Kim, Jeong-Chan Ra, Sung-Ran Kim, Sung-Dae Cho, Ji-Won Jung,  
Se-Ran Yang, Joon-Suk Park, Jae-Woong Hwang, Okezie I Aruoma,  
Tae-Yung Kim, Yong-Soon Lee and Kyung-Sun Kang

2) SCI 논문 : International Journal of Agricultural Food Chemistry 2004

Mar 24;52(6):1715-9.

Modulations of Bcl-2/Bax families were involved in the chemopreventive effects of licorice root (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) in MCF-7 human breast cancer cell : Eun-Hye Jo, Hee-Do Hong, Yong-Soon Lee, Kyung-Sun Kang

3) 국내 논문 : 한국식품과학회지 Vol. 37, No. 4, 549-556, 2005

식용 및 약용자원의 에스트로젠 활성과 항산화능 평가 : 최선영, 임선혜, 김지선, 하태열, 김성란, 강경선, 황인경

#### 나. 학술발표 12건

□ 2004년 한국식품과학회 제71차 학술대회

포스터 발표 : Flavonoids 유도체의 구조별 estrogen receptor affinity와 항산화능 평가

발표자 : 김성란, 최선영, 임선혜, 김지선, 안지윤, 하태열,

□ 2004 KFN Annual Meeting and International Symposium

포스터 발표 : Effects of Licorice Root(*Glycyrrhiza uralensis*) Extract of Lipid Metabolism and Antioxidant Enzyme Activities in Ovariectomized Rats

발표자 : Sung-Ran Kim, Sun-Hye Lim, Ji-yoon Ahn, Tae-Youl Ha, Kyung-Sun Kang

□ 2004 춘계 식품위생안전성학회

포스터 발표 : Validation of recombinant yeast and MCF-7 cell proliferation assay for the determination of phytoestrogens in various plants.

발표자 : Eun-Hye Jo, Sung-Ran Kim, Sun Bo, Seong-Hun Lee, Jung-Ran Park, Yong-Soon Lee and Kyung-Sun Kang

□ 2004 춘계 식품위생안전성학회

포스터 발표 : Licorice root (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) Induced Apoptosis and cell cycle Arrest in MCF-7 Breast Cancer Cell

발표자 : Eun-Hye Jo, Hee-Do Hong, Jae-Woong Hwang, Jung-Ran Park, Sunbo, Yong-Soon Lee, Kyung-Sun Kang

□ 2005 International Symposium and Annual Meeting of the Korean Society of Food Science and Nutrition

포스터 발표 : Estrogenic activity and proliferation of human breast cancer cell in some edible and medicinal plants

발표자 : Sun-Hye Lim, Ji-Yoon Ahn, Tae-Youl Ha, Sung-Ran Kim

□ American Association for Cancer research 96th Annual meeting 2005

포스터 발표 : Coactivity of Apoptosis and G1 Arrest by Chinese Licorice Root-Induced Tumor Suppression in Human Breast Cancer in vitro and in vivo

발표자 : Eun-Hye Jo, Sung-Ran Kim, Hee-Do Hong, Sung-Hoon Kim, Yong-Soon Lee, Kyung-Sun Kang

□ 2005 Chemoprevention Working Group Winter Conference

구두 발표 : Chemopreventive properties of the Ethanol Extract of Chinese Licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) Root: Induction of Apoptosis and G1 Cell Cycle Arrest in MCF-7 Human Breast Cancer Cells

발표자 : 조은혜, 김성란, 강경선

□ 2005 춘계 한국독성학회

포스터 발표 : The EtOH extract of nuts of *psoralea corylifolia* L. -induced apoptosis in human MCF-7 cells through modulation of the Bcl-2 family proteins and MAPK pathway

발표자 : Ji-Hye Chung, Eun-Hye Jo, Sung-Ran Kim, Joon-Suk Park,

Jae-Woong Hwang, Sun-Jung Kim, Yong-Soon Lee, Kyung-Sun Kang

□ 2005 춘계 대한수의학회

포스터 발표 : The EtOH extract of nuts of *psoralea corylifolia* L. -induced apoptosis in human MCF-7 cells through modulation of the Bcl-2 family proteins and MAPK pathway

발표자 : Ji-Hye Chung, Eun-Hye Jo, Sung-Ran Kim, Joon-Suk Park, Jae-Woong Hwang, Sun-Jung Kim, Yong-Soon Lee, Kyung-Sun Kang

□ 2005 추계 대한암예방학회

포스터 발표 : The EtOH extract of nuts of *psoralea corylifolia* L. -induced apoptosis in human MCF-7 cells through modulation of the Bcl-2 family proteins and MAPK pathway

발표자 : Ji-Hye Chung, Eun-Hye Jo, Sung-Ran Kim, Joon-Suk Park, Jae-Woong Hwang, Sun-Jung Kim, Yong-Soon Lee, Kyung-Sun Kang

□ 2005 한국식품위생안전성학회

포스터 발표 : The EtOH extract of nuts of *Psoralea corylifolia* L. -induced apoptosis in human MCF-7 cells through modulation of the Bcl-2 family proteins and MAPK pathway

발표자 : Ji-Hye Chung, Eun-Hye Jo, Sung-Ran Kim, Joon-Suk Park, Jae-Woong Hwang, Sun-Jung Kim, Yong-Soon Lee, Kyung-Sun Kang

□ 2006 Korea-China-Japan International Symposium , 한국식품과학회

구두발표 : Evaluation for estrogenic activities of flavonoid derivatives and plant extracts

발표자 : Sun-Young Choi, In-Kyung Hwang, Sung-Ran Kim

#### 다. 특허

1) 감초 특허 1건 (출원)

발명의 명칭 : 감초 추출물을 함유하는 환경호르몬에 의한 방어용 조성

2) 파고지 특허 1건 (출원 예정)

발명의 명칭 : 유방암 억제능과 에스트로젠 활성이 우수한 phytoestrogen 조성물

#### 라. 홍보

1) '암을 이기는 한국인의 음식' 감초

[연합뉴스] 2006-01-18

2) '감초서 女갱년기 증상완화 성분 발견'

[연합뉴스] 2005-07-11

3) '감초에 갱년기 증상 완화 성분'

[식품환경신문] 2005-7-18

#### 마. 인력양성

1) 서울대학교 생활과학대학 이학박사 1인, 2006

2) 서울대학교 수의과 대학 수의학 박사 1인, 2006

3) 고려대학교 식품공학과 석사 1인, 2006

## 제 6 장 참 고 문 헌

1. Kwon SC. Effects of continuously added oral progestin (medroxy-progesterone acetate) on the levels of serum lipid and lipoprotein during estrogen replacement therapy in postmenopausal women. *Korean Soc. Obstetrics & Gynecology* 41 : 2442-2446 (1998)
2. Ettinger B. Overview of estrogen replacement therapy: a historical perspective. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217 : 2-5 (1998)
3. Schafer JM, Lee ES, O'Regan RM, Yao K, Jordan VC. Clin. Rapid development of tamoxifen-stimulated mutant p53 breast tumors (T47D) in athymic mice. *Cancer Res.* 6 : 4373-4380 (2000)
4. Kronenberg F, Fugh-Berman A. Complementary and alternative medicine for menopausal symptoms: a review of randomized, controlled trials. *Ann. Intern. Med.* 137 : 805-813 (2002)
5. Marston A, Hostettmann K. Biological and chemical evaluation of plant extracts and subsequent isolation strategy. pp. 67-80. In: *Bioassay Methods in Natural Product Research and Drug Development*. Bohlin L, Bruhn JG (ed). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands (1999)
6. Farnsworth NR, Bingel AS, Cordell GA, Crane FA, Fong HS. Potential value of plant as sources of new antifertility agents II. *J. Pharm. Sci.* 64 : 717-754 (1975)
7. Mazur W, Adlercreutz H. Overview of naturally occurring endocrine-active substances in the human diet in relation to human health. *Nutrition* 16 : 654-687 (2000)
8. Mazur W, Duke JA, Wahala K, Rasku S, Adlercreutz H. Isoflavonoids and lignans in legumes : Nutritional and health aspects in humans. *J. Nutr. Biochem.* 6 : 193-200 (1998)
9. Tham DM, Gardner CD, Haskell WL. Potential health benefits of

- dietary phytoestrogens : A review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 83 : 2223-2235 (1998)
10. Franke AA, Custer LJ, Cerna CM, Narala KK. Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 42 : 1905-1913 (1994)
  11. Wang X, Wu J, Chiba H, Umegaki K, Yamada K, Ishimi Y. Puerariae radix prevents bone loss in ovariectomized mice. *J. Bone Miner. Metab.* 21 : 268-275 (2003)
  12. Wang JF, Guo YX, Niu JZ, Liu J, Wang LQ, Li PH. Effects of Radix Puerariae flavones on liver lipid metabolism in ovariectomized rats. *World J. Gastroenterol.* 10 : 1967-1970 (2004)
  13. Jeon SM, Han J, Lee HJ, Lee IK, Moon KD, Choi MS. The effects of Korean safflower(*Carthamus tinctorious* L.) seed powder supplementation diet on bone metabolism indices in rats during the recovery of rib fracture. *The Korean Nutrition Society* 31 : 1049-1056 (1998)
  14. Choi YS, Cho SH. Effects of defatted safflower seed powder on intestinal physiology and fecal short-chain fatty acids in ovariectomized female rats fed high cholesterol diets. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30 : 528-534 (2001)
  15. Cho SH, Lee HR, Kim TH, Choi SW, Lee WJ, Choi Y. Effects of defatted safflower seed extract and phenolic compounds in diet on plasma and liver lipid in ovariectomized rats fed high-cholesterol diets. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 50 : 32-37 (2004)
  16. Kim SJ, Park C, Kim HG, Shin WC, Choe SY. A study on the estrogenicity of Korean arrowroot (*Pueraria thunbergiana*). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33 : 16-21 (2004)
  17. Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano

- FO. The E-Screen assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 103 (Suppl. 7) : 113-122 (1995)
18. Park JS, Lee BJ, Kang KS, Tai JH, Cho JJ, Cho MH, Inoue T, Lee YS. Hormonal effects of several chemicals in recombinant yeast, MCF-7 cells and uterotrophic assays in mice. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10 : 293-299 (2000)
  19. Gaido KW, Leonard LS, Maness SC, Hall JM, McDonnell DP, Saville B, Safe S. Differential interaction of the methoxychlor metabolite 2,2-bis-(p-hydroxy phenyl) -1,1,1-trichloroethane with estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 140 : 5746-5753 (1999)
  20. Arcaro KF, Vakharia DD, Yang Y, Gierthy JF. Lack of synergy by mixtures of weakly estrogenic hydroxylated polychlorinated biphenyls and pesticides. *Environ. Health Perspect.* 106 (supplement 4) : 1041-1046 (1998)
  21. Gaido KW, Leonard LS, Lovell S, Gould JC, Babai D, Protier CJ, McDonnell DP. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 143 : 205-212 (1997)
  22. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.* 181 : 1199-1201 (1958)
  23. Ohkawa H, Ohishi N, Yaki K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 35-41 (1979)
  24. Singleton VL, Rossi JA, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144-158 (1965)
  25. NFRI. *Manuals of Quality Characteristic Analysis for Food Quality Evaluation (2)*. National Food Research Institute, Tsukuba, Japan. p. 61 (1990)

26. Tamir S, Eizenberg M, Somjen D, Stern N, Shelach R, Kaye A, Vaya J. Estrogenic and antiproliferative properties of glabridin from licorice in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 60 : 5704-5709 (2000)
27. van der Sluis AA, Dekker M, Vererk R, Jongen WMF. An improved, rapid in vitro method to measure antioxidant activity. Application on selected flavonoids and apple juice. *J. Agric. Food Chem.* 48 : 4116-4122 (2000)
28. Sato M, Ramarathnam N, Suzuki Y, Ohkubo T, Takeuchi M, Ochi H. Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *J. Agric. Food Chem.* 44 : 37-41 (1996)
29. Bors W, Saran M. Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Rad. Res. Comm.* 2 : 289-294 (1987)
30. Fitzpatrick DF, Hirschfiel SL, Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am. J. Physiol.* 265 : H774-H778 (1993)
31. Miksicek RJ. Commonly occurring flavonoids have estrogenic activity. *Mol. Pharm.* 44 : 37-43 (1993)
32. Breinholt V, Larsen JC. Detection of weak estrogenic flavonoids using a recombinant yeast strain and a modified MCF-7 cell proliferation assay. *Chem. Res. Toxicol.* 11 : 622-629 (1998)
33. Collins-Burow BM, Burow ME, Duong BN, McLachlan JA. Estrogenic and antiestrogenic activities of flavonoid phytochemicals through estrogen receptor binding-dependent and -independent mechanisms. *Nutr. Cancer* 38 : 229-244 (2000)
34. Kim SY, Kim JH, Kim SK, Oh MJ, Jung MY. Antioxidant activities of selected oriental herb extracts. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 71 : 633-640 (1994)
35. Kim EY, Baik IH, Kim JH, Kim SR, Rhyu MR. Screening of the

- antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36 : 333-338 (2004)
36. Fujimoto N, Kohta R, Kitamura S, Honda H. Estrogenic activity of an antioxidant, nordihydroguaiaretic acid (NDGA), *Life Sciences*, 74: 1417-1425 (2004)
  37. Hollman PCH, v.d. Gaag M, Mengelers MJB, van Trijp JMP, de Vries JHM, Katan MB. Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radic. Biol. Med.* 21 : 703-707 (1996)
  38. Morito K, Hirose T, Kinjo J, Hirakawa T, Okawa M, Nohara T, Ogawa S, Inoue S, Muramatsu M, Masamune Y. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Biol. Pharm. Bull.* 24 : 351-356 (2001)
  39. Walle T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* 36 : 829-837 (2004)
  40. Adlercreutz H. Phytoestrogens and breast cancer. *Phytoestrogens and breast cancer. J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1803, 1-6 (2003)
  41. Albertazzi P. and Purdie D. W. The nature and utility of the phytoestrogens : a review of the evidence. *Maturitas*, 173-185 (2002)
- Alison M. D., William R. P. and Mindy S. K. Phyto-oestrogens. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, 17(2), 253-271 (2003)
42. Anderson J. J. B. and Garner S. C. The effects of phytoestrogens on bone. *Nutr. Res.* 17(10), 1617-1632 (1997)
  - Arjmandi B. H. and Smith B. J. Soy isoflavones' osteoprotective role in postmenopausal women: mechanism of action. *J. Nutr. Biochem.* 13, 130-137 (2002)
  43. Bazzoli D. L., Hill S. and DiSilvestro R. A. Soy protein antioxidant

- actions in active, young adult women. *Nutr. Res.* 22, 807-815 (2002)
44. Bingham S. A., Atkinson C., Liggins J., Bluck L. and Coward A. Phyto-oestrogens : where are we now?. *Br. J. Nutr.* 79, 393-406 (1998)
45. Carusi D. Phytoestrogen as hormone replacement therapy: An evidence-based approach. *Prim Care Update Ob/Gyns* 7(6), 253-259 (2000)
- Gilani G. S. and Anderson. J. J. B. *Phytoestrogens and Health*. AOCS Press (2002)
46. Ingran D., Sanders K., Kolybaba M., and Lopez D. Phytoestrogens and breast cancer. *Integrative medicine*, 2, 145-146 (1999)
47. Messina M. J. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 439-450 (1999)
48. Pettersson K. and Gustafsson J. Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 165-192 (2001)
49. Somekawa Y., Chiguchi M., Ishibashi T. and Aso T. Soy Intake Related to Menopausal Symptoms, Serum Lipids, and Bone Mineral Density in Postmenopausal Japanese Women. *Obstetrics & Gynecology*, 97(1), 109-115 (2001)
50. Vecchia C. L., Brinton L. A. and McTiernan A. Cancer risk in menopausal women. *Best Practice & Research Clinical Obsterics and Gynaecology*, 16(3), 293-307 (2002)
51. Witold M. and Herman A. Overview of naturally occurring endocrine-active substances in the human diet in relation to human health. *Nutrition*, 654-687 (2000)