

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001327-01

보안과제( ), 일반과제(○)

# 자생종승마의 아메리카승마 대체소재로서의 활용성 제고를 위한 여성호르몬 유사활성 연구 및 기능성 소재 개발

Development of dietary supplements for  
post-menopausal women with Asian *Cimicifuga* species

연 구 기 관  
한 국 식 품 연 구 원

농 립 수 산 식 품 부



# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “자생종승마의 아메리카승마 대체소재로서의 활용성 제고를 위한 여성호르몬 유사활성 연구 및 기능성 소재 개발에 관한 연구” 과제

(제 1 세부과제 “자생종 승마의 혈관계에 미치는 여성호르몬 유사활성 연구”  
제 1 협동과제 “자생종 승마의 세포수준에서의 여성호르몬 유사활성 연구”  
제 2 협동과제 “자생종 승마 추출물 제조 조건 확립 및 시제품개발  
위탁과제 “자생승마속 식물의 대량증식·재배연구”)의 보고서로 제출합니다.

2012 년 4 월 9 일

주관연구기관명 : 한국식품연구원  
주관연구책임자 : 류미라  
세부연구책임자 : 류미라  
연구위원 : 김이슬  
연구위원 : 손희진  
연구위원 : 류지현  
연구위원 : 이보은  
연구위원 : 김은아  
연구위원 : 김세화  
협동연구기관명 : 세종대학교  
협동연구책임자 : 이영주  
연구위원 : 임원청  
연구위원 : 유광희  
연구위원 : 심명준  
연구위원 : 박준우  
연구위원 : 박초아  
협동연구기관명 : 바산고려홍삼(주)  
협동연구책임자 : 송래섭  
연구위원 : 황병환  
연구위원 : 문중영  
연구위원 : 송주황  
연구위원 : 문영준  
위탁연구기관명 : 한국자생식물원  
위탁연구책임자 : 김영철  
연구위원 : 채현정  
연구위원 : 윤정원



# 요 약 문

## I. 제 목

자생종승마의 아메리카승마 대체소재로서의 활용성 제고를 위한 여성호르몬 유사 활성 연구 및 기능성 소재 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 활용도가 낮은 자생종 승마 속 식물의 여성호르몬 유사활성 연구를 통해 현재 식물성여성호르몬 소재로 수입, 활용되고 있는 아메리카승마(black cohosh) 대체소재로서의 용도를 창출하고 이를 활용한 호르몬 결핍증상 개선용 기능성 소재개발을 목표로 하였다.

한국여성 사망 제 1 원인은 심혈관계 질환으로 특히, 폐경 이후 그 위험성이 급증하며 주요 원인은 노화로 인한 여성호르몬결핍으로 지적되고 있다. 현재 호르몬결핍증의 예방 및 치료에 호르몬대체요법(Hormone Replacement Therapy; HRT)이 적용되고 있으며 특히, 여성호르몬 장기복용으로 폐경 후 심혈관질환 위험이 반감되는 것으로 보고되고 있다. 그러나 약제의 신체적, 정신적 부작용으로 현재 폐경 후 여성이 호르몬치료를 받는 비율 및 순응도는 매우 낮아 부작용 없는 '호르몬 대체제'가 필요시되고 있다. 최근 식물성여성호르몬에 대한 효능이 과학적으로 입증되고 있어 이를 활용한 기능성식품소재의 개발이 필요시 된다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

여성호르몬 결핍에 따른 주요 후유증의 하나인 혈관기능 저하 증상을 중점 연구 대상으로 한국 자생종 승마의 아메리카승마 대체 활성 구멍 및 승마함유 복합추출물을 이용한 여성호르몬 대체 기능성소재 개발을 위해, 각 승마 및 승마함유 복합추출물의 rat 대동맥에 대한 혈관확장작용 및 그 작용기전을 분석함과 동시에 호르몬결핍 모델동물에 대한 혈중 지질조성 개선 효능을 평가하였다. 한편 활성 자생종 승마의 국내 재배면적 확보를 위해 자생종승마 재배면적 확보를 위한 증식법 연구를 수행하였다.

자생승마의 여성호르몬 유사활성 평가를 위해 에스트로젠 수용체에 대한 특이적 활성 및 항스트레스 효과를 측정하고 활성 기전을 세포수준에서 증명하였다. 한편 여성호르몬의 유방암 유발에 대한 부작용이 보고되고 있어, 자생승마 추출물의 활성 검색과 동시에 유방암 세포 증식에 대한 영향, 항혈관신생효과 등을 검색하였다. 연구결과를 토대로 단계별로 활성농축물을 제조하였다.

#### IV. 연구개발결과

한반도에 자생하는 승마속(*Cimicifuga* L.) 식물 중 세잎승마, 촛대승마, 눈빛승마를 채집하여 추출물을 제조하고 아메리카 승마 임상추출물의 지표물질인 27-deoxyactein 함량을 분석하였다. 모든 자생종 승마에서 아메리카승마와 동일한 지표성분이 확인되었으며 세잎승마에서 가장 많은 양이 측정되었다(아메리카승마 함량비교, 아메리카승마 24.1mg/4mL, 세잎승마 21.7mg/4mL, 촛대승마 21.9mg/4mL으로). 각 자생종 승마 추출물은 적출한 rat 대동맥에 대해 혈관내피 의존성 혈관확장작용을 나타내었으며, 이는 혈관내피에서 유래된 대표적 혈관확장물질 nitric oxide가 혈관평활근세포의 guanylate cyclase를 활성화시켜 cGMP 형성을 증가시킴으로 유도되는 것으로 확인되었다. 이러한 작용은 현재 임상적으로 사용되고 있는 아메리카승마와 동일하였으며 자생종 승마 중, 특히 한국 고유종인 세잎승마의 활성이 높게 나타났다. 난소절제 호르몬 결핍성 동물모델에 대한 세잎승마의 효능은 아메리카승마가 주로 St John's wort (SJW)와의 복합물형태로 사용되고 있는데 착안하여 세잎승마와 SJW 복합물을 4주간 투여한 결과 체중증가 및 혈중 지질 조성 개선 효과를 나타내었으며 그 효과는 아메리카승마와 유사하였다. 한편 SJW를 자생종인 물레나물로 대체한 세잎승마/물레나물 혼합물의 난소 절제 rat에 대한 체중증가억제 및 혈중 TG 농도 저하 효능은 아메리카승마/SJW 혼합물과 유사한 수준이었다. 각 식물추출물을 4주간 투여한 폐경모델쥐 대동맥의 혈관운동성은 세잎승마/물레나물 혼합물을 섭취한 경우 acetylcholine 및 SNAP의 혈관이완작용을 개선시키는 것으로 나타났으며 이 효과는 아메리카승마/SJW 혼합물과 유사하였다. 따라서 세잎승마 및 물레나물은 현재 폐경 후 증상 완화용 일반 의약품 원료로 수입 활용되고 있는 아메리카승마 및 St John's wort 대체제로서의 활용가능성이 제시되었다.

자생종 승마의 에스트로젠 활성 효과가 직접적인 에스트로젠 수용체 활성 기전에 의해 의해서라기 보다 간접적인 경로를 통해 에스트로젠 수용체를 분해하여 자생종 승마의 에스트로젠 유사 활성은 직접적인 에스트로젠 수용체 작용 기전에 의해서라기 보다는 간접적인 경로 즉 에스트로젠 수용체 분해와 같은 경로를 통해 에스트로젠 수용체 신호 전달 기전을 자극하는 것으로 나타났다. 자생종 승마에서 유방세포의 비이상적 증식과 간조직과 자궁조직에 대한 유의적인 부작용은 관찰되지 않았다. 승마 추출물은 혈관 평활근 세포의 사멸을 유도하였으며 종에 따른 유의한 차이는 관찰하기 어려웠지만, 승마 추출물의 처리는 대조군에 비해 ROS 생성을 유의하게 감소시켰다. 이러한 결과는 국내 자생종 승마에 의한 산화 스트레스 감소를 통하여 혈관 평활근 세포 증식 억제 효과가 나타남을 보여주었다. 또한 승마의 에스트로젠성 성질에 기인하여 에스트로젠 수용체 신호 전달 기전을 통하여 혈관평활근 증식의 억제가 관여함도 확인하였다.

한반도에 자생하는 세잎승마의 산업적활용을 위해서는 안정적인 근경생산이 필요하며 인공증식을 통한 대량 재배 및 재배지 확대에 필요한 기초자료를 확보하였다. 즉, 유묘생산 후 2년차의 근경은 100g 내외이나 1년간의 추가관리를 통해 200~400g의 근경 생산조건을 확보하였다. 세잎승마는 비교적 척박한 토양에서도 생장이 양호한 식물로 생산을 위한 비용이 비교적 적게 소요될 것으로 예상되며 현재와 같은 상황에서 강원도 영월, 평창, 정선의 농가에서는 단위면적당 4,000원 ~ 6,000원의 수익이 보장될 경우 충분하게 재배면적 확대를 기대할 수 있다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

### 1. 연구성과 활용계획 및 기대성과

- 연구결과의 홍보를 통해 기술이전과 개발기술의 산업적 활용 유도
- 세잎승마 및 물레나물의 관련 일반의약품(210억/년)에의 아메리카승마 및 St John's wort 대체소재로 활용을 통한 외화절감
- 세잎승마 재배유도를 통한 유희지 활용 및 농가 수익증대
- 여성호르몬 결핍 개선용 기능성식품소재 개발을 통한 국가 사회적 의료비 절감

## 2. 연구성과

### 1) SCI급 학술지 게재완료 (9 편)

- A. Song, J.In, Y.Lee, M. Rhyu. J. Plant Biol. 52: 518-523(2009).
- E. Kim, J. Kim, M. Rhyu. J. Ethnopharmacol. 33: 1360-1363 (2010).
- E. Kim, M. Rhyu. J. Ethnopharmacol. 130: 545-551 (2010).
- E. Kim, I. Baek, M. Rhyu. J. Ethnopharmacol. 134: 668-675(2011).
- Y. Park, H. Kwon, M. Shim, M. Rhyu, Y. Lee. Pharmazie. 66: 450-453(2011).
- E. Kim, Y. Lee, M. Rhyu. J. Ethnopharmacol. 18: 537-542(2011).
- JW Park, DH Kim, H. Ahn, Y. Song, Y. Lee, J. Ryu. BIOMOL THER. 20: 183-188 (2012).
- YH Kang, WJ Oh, K Park, DY Lee, DS Choi, DK Kim, YJ Lee, MR Rhyu, BK Yoon J Korean Medicine Science (2012).
- JW Park, M.K Shim, M. Rhyu, Y. Lee. Pharmazie. (2012, accepted).

### 2) 비SCI급 학술지 게재완료(3편)

- M. Shim, Y. Lee. J. Ginseng Res. 33: 89-92(2009).
- E. Kim, K. Lee, D. Kim, M. Rhyu. J. Food Sci. & Nutr. 15: 189-195 (2010).
- YH Kang, DY Lee, DS Choi, DK Kim, BK Yoon, YJ Lee, MR Rhyu. J Korean Medicine Science (2012).

### 3) 국내 학회발표(7건)

- A. Song, S. Kim, E. Kim, M.Rhyu. The Annual Meeting of the Korean Society of Food Science and Nutrition (2009.11).
- M.K Shim, JW Park, CA Park, YJ Lee. The Korea-Japan Chromatin & Epigenetics joint Symposium (2010.01).
- K. Ryu, J. Bahn, J. Park, YJ Lee. The Convention of the Korean Society of Applied Pharmacology (2010.05).
- E. Kim, K. Lee, A. Song, H. Son, K. Park, M. Rhyu. Annual Meeting of the Kor. Soc. Food Science and Technology (2010.06).
- A. Song, E. Kim, H. Son, B. Lee, K. Park, M. Rhyu. The Annual Meeting of the Kor. Soc. Food Science and Nutrition (2010.10).



- J. Park, M. Rhyu, C. Park, Y. Lee. Annual Meeting of the Kor. Soc. Applied Pharmacology (2010.11).
- H. Son, A. Song, B. Lee, J. Ryu. E. Kim, M. Rhyu. Annual Meeting of the Kor. Soc. Food Science & Technology (2010.06).

**4) 특허출원 (1건)**

**발명의 명칭: 지방대사질환, 폐경기 질환 또는 심혈관질환 개선용 조성물  
(출원번호: 10-2011-0064994)**



## SUMMARY

### Research on estrogen-like activity of Asian *Cimicifuga* spp. in vascular system

*Cimicifuga racemosa*, known as black cohosh (CR), a perennial plant native to North America, has been used to treat menopausal symptoms. In East-North Asia, *Cimicifuga simplex* (CS), *Cimicifuga heracleifolia* var. *bifida* (CH), *C. davurica* (CD), *C. japonica* (CJ), are commonly used for the treatment of menopausal hot flashes. To evaluate the potential estrogen-like effect of Asian *Cimicifuga* species, this study examined determined the vascular relaxation and its possible mechanisms in isolated rat aortic rings precontracted with norepinephrine. CH induced significant endothelium-dependent relaxation, which was virtually abolished by endothelial ablation and pretreatment with L-NNA. L-Arginine fully reversed the action of L-NNA. Methylene blue significantly attenuated the relaxation, suggesting increased formation of nitric oxide might contribute to the endothelium-mediated relaxation. We also determined the effect of CH or CR on high-fat diet induced body weight gain and plasma lipid metabolism in ovariectomized (OVX) rats. Females SD rat 250±30g were studied for 5 weeks. The rats were divided into five groups: (I) "sham" non-ovariectomized rats treated with vehicle, (II) "control" ovariectomized rats treated with vehicle, (III) ovariectomized rats treated with 0.5 mg/kg 17 $\beta$ -estradiol, (IV) ovariectomized rats treated with 23 mg/kg CH, and (V) ovariectomized rats treated with 23 mg/kg CR. Both of CH and CR prevented diet- and OVX-induced weight gain and significant reductions of plasma total (T)- and low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol (P<0.05) and increment in high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol compared to OVX control rats, suggesting that *Cimicifuga heracleifolia* var. *bifida* is a potential candidate to replace *Cimicifuga racemosa* in targeting postmenopausal symptoms.

## **Development of dietary supplements for post-menopausal women with Asian *Cimicifuga* species**

We aimed to develop Korean black cohosh extracts to treat female reproductive disorders. We examined the possible estrogen receptor (ER) effects of *Cimicifuga heracleifolia* var. *bifida* ethanol extract (C-Ex), which has been used traditionally in Asia, in MCF-7 cells. The activity of C-Ex was characterized in a transient transfection system, using ER $\alpha$  and estrogen-responsive luciferase plasmids in HEK 293 cells and endogenous target genes were studied in MCF-7 cells. C-Ex failed to activate ER $\alpha$  and at a concentration of 0.005-0.5 mg/ml as examined by reporter activity. In addition, no statistically significant antiestrogenic activity was observed. However, to our interest, C-Ex enhanced expression of VEGF at 0.5 mg/ml concentration and repressed ER $\alpha$  both at the mRNA and protein levels in MCF-7 cells. These results suggested that C-Ex does not activate or inactivate ER $\alpha$  in a direct manner, but the extracts may affect factors in ER signal transduction pathway.

## CONTENTS

<b>Chapter 1. Introduction of the research project</b> .....	<b>17</b>
<b>Chapter 2. Art status of domestic and abroad</b> .....	<b>19</b>
<b>Chapter 3. Results of the research project</b> .....	<b>21</b>

<b>Research on estrogen-like activity of Asia <i>Cimicifuga</i> spp. in vascular system (Korea Food Research Institute)</b> .....	<b>23</b>
---	-----------

Section 1. Introduction .....	25
Section 2. Materials and methods .....	28
1. Samples and extraction methods .....	28
2. Vasorelaxant effect .....	28
3. Effects on cardioprotective effects in ovariectomized rats .....	29
4. Statistical analysis .....	33
Section 3. Results and discussion .....	34
1. Vasorelaxant mechanism of Asia <i>Cimicifuga</i> spp. ....	34
2. Effects of Asia <i>Cimicifuga</i> spp. mixed St John's wort on OVX rat .....	51
3. Effects of <i>C. heracleifolia</i> and Giant St John's wort on OVX rat .....	60
References .....	69

<b>Development of dietary supplements for post-menopausal women with Asian <i>Cimicifuga</i> species (Sejong University)</b> .....	<b>73</b>
--	-----------

Section 1. Introduction .....	75
Section 2. Materials and methods .....	76
Section 3. Results and discussion .....	80
1. Analysis of estrogen receptor activation by cimicifuga extracts .....	80
2. Analysis of modulation of estrogen receptor signaling pathway of cimicifuga extracts .....	89

3. Effects of cimicifuga extracts on PAI-1 expression on Cultured Vascular Smooth Muscle Cells .....	96
4. Effects of cimicifuga extracts on inhibition of apoptosis and its mechanism cell growth regulation on Cultured Vascular Smooth Muscle Cells .....	99
References .....	105
<b>Standardization of extracts of <i>Cimicifuga</i> species (BASAN Co. Ltd) .....</b>	<b>107</b>
Section 1. Introduction .....	109
Section 2. Results and discussion .....	110
1. Extraction method development .....	110
2. Active fraction development .....	111
3. Mixture of <i>Cimicifuga racemosa</i> and St John's wort .....	111
4. Screening of active <i>Cimicifuga</i> species .....	112
5. Fractionation of active fraction by HP-20 column chromatography .....	113
6. Analysis of 27-deoxyactein .....	115
<b>A study for the distributions and the cultural characteristics of <i>Cimicifuga</i> L. in the korean peninsula (KOREA BOTANIC GARDEN) .....</b>	<b>131</b>
<b>Chapter 4. Accomplished degree of Purpose and Contributory degree in related fields .....</b>	<b>164</b>
<b>Chapter 5. Applicatory plans of results .....</b>	<b>166</b>

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	1
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	2

세부연구과제 : 자생종 승마의 혈관계에 미치는 여성호르몬 유사활성 연구 .....

제 1 절 서론 .....	25
제 2 절 실험재료 및 방법 .....	28
1. 시료 및 추출 .....	28
2. 혈관이완작용 측정 .....	28
3. 호르몬결핍 모델쥐에 대한 효능분석 .....	29
가. 혈중 지질농도 측정 .....	32
나. 혈관운동성 측정 .....	32
다. 골밀도 측정 .....	32
라. 경동맥의 형태학적 측정 .....	32
4. 통계분석 .....	33
제 3 절 결과 및 고찰 .....	34
1. 자생종 승마의 혈관이완작용 기전분석 .....	34
가. 자생종 승마 4종의 혈관이완작용 .....	34
나. 세잎승마의 혈관이완작용 .....	36
다. 세잎승마 활성획분의 혈관이완작용 및 호르몬결핍 모델쥐에 대한 효능분석 .....	43
2. 자생종 승마의 St John's wort와의 복합물에 대한 효능 .....	51
가. 혈관이완작용 측정 .....	51
나. 호르몬결핍 모델쥐에 대한 효능분석 .....	52
3. 세잎승마와 물레나물 복합물의 시제품에 대한 대체효능 .....	60
가. 호르몬결핍 모델쥐에 대한 효능 .....	60
나. 혈관운동성에 미치는 영향 .....	65
다. 경동맥에 미치는 영향 .....	67
참고문헌 .....	69

**제 1 협동과제 : 자생종 승마의 세포수준에서의 여성호르몬 유사활성 연구 .....1**

제 1 절 서론 ..... 75  
제 2 절 실험재료 및 방법 ..... 76  
제 3 절 결과 및 고찰 ..... 80  
1. 승마의 여성호르몬 수용체에 대한 활성 분석 ..... 80  
2. 승마 함유 복합 추출물의 여성호르몬 수용체에 대한 작용 및 기전 분석 ..... 89  
3. VSMC에서의 PAI-1 발현에 미치는 영향분석 ..... 96  
4. VSMC 고사 억제 작용 및 기전 분석 ..... 99  
참고문헌 ..... 105

**제 2 협동과제 : 자생종 승마 추출물 제조 조건 확립 및 시제품개발 .....1**

제 1 절 서론 ..... 109  
제 2 절 연구개발수행 내용 및 결과 ..... 110  
1. 승마 종별 각종 추출물의 제조 ..... 110  
2. 활성추출물의 적정 추출법 확립 ..... 111  
3. 아메리카 승마와 St John's wort 복합물 대체 복합물 제조 ..... 111  
4. 혈관확장 실험을 통한 활성 추출물 탐색 ..... 112  
5. HP-20 을 이용하여 활성획분 분리 ..... 113  
6. 자생종 승마 및 아메리카 승마의 지표물질 분석 ..... 115  
7. 활성 농축물 및 시제품 개발 ..... 128

**위탁연구과제 : 자생승마속 식물의 대량증식·재배연구 .....1**

제 1 절 서론 ..... 133  
제 2 절 실험재료 및 방법 ..... 140  
제 3 절 결과 및 고찰 ..... 150  
1. 증식연구 ..... 150  
2. 세잎승마와 눈빛승마의 생산성 평가 및 비교 ..... 153  
참고문헌 ..... 163



제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....6

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....6



## 제 1 장 연구개발과제의 개요

한국여성 사망 제 1 원인은 심혈관계 질환으로 특히, 폐경 이후 그 위험성이 급증하며 주요 원인은 노화로 인한 여성호르몬(estrogen)결핍으로 지적되고 있다. 현재 호르몬결핍증의 예방 및 치료에 호르몬대체요법(Hormone Replacement Therapy; HRT)이 사용되고 있으며 특히, 장기복용으로 폐경 후 심혈관질환 위험이 반감되는 것으로 보고되고 있다. 그러나 2002년 7월 HRT의 estrogenic 및 gestagenic 화합물 복합처방의 장기 실시에 따른 심혈관질환 및 유방암 위험 증가 가능성이 제기되면서 HRT의 많은 장점에도 불구하고 이에 대한 소비자의 우려가 높아졌으며, National Institutes of Health (NIH)에서는 대안의 하나로 non-estrogenic 비처방 요법, 즉 식물유래 isoflavone, black cohosh, red clover 및 buttercup 등의 식물성호르몬 사용을 권고하고 있으나 효능에 대한 기초 및 임상연구 불충분으로 HRT의 대안으로 확립되지는 못하고 있는 실정이다.

Selective estrogen receptor modulators (SERMs)는 뼈와 심혈관계질환에는 비호르몬성 estrogen agonist, 자궁내막과 유방조직에는 비호르몬성 estrogen antagonist 효과를 나타내므로(Jordan VC et al., 2001) estrogen의 부작용이 동반되지 않는 긍정적인 효과를 나타낼 잠재성을 가진 것으로 관심이 증가하여 왔다. SERMs 즉, triphenylethilyn (tamoxifen)이나 benzothiophene (raloxifene) 유도체의 화학구조는 estrogen의 구조와 다르나 SERMs은 estrogen receptor (ER)에 강력한 친화성으로 결합하는 nonsteroidal 분자로 ER이 coregulator proteins과 상호작용하는 능력을 조절하는 ER ligand-binding domain의 구조변화를 유도한다. SERMs의 하나인 raloxifene은 골밀도를 증가시키고 척추골절 위험도를 감소시킬 뿐 아니라 유방암의 위험도와 심혈관계 질환의 위험도를 감소시키는 것으로 알려져 있으며(Steven RC et al., 1999), 자궁에는 자극 및 억제 작용을 보이지 않으므로 자궁내막의 증식이나 질출혈의 위험도를 증가시키지 않는다는 것이 발표되었다(Joly EE et al., 2003). 또한 nitric oxide (NO)-endothelin(ET)-1 비율을 증가시킴으로써 적절한 내피세포의 기능과 혈관이완에 기여하며, 표적세포에 따라 배치되는 결과는 나타내기도 하나 혈관벽 내피세포 기능과 혈관이완에 기여하고, 그와 혈관 평활근에 직접 작용하여 혈관 L-type  $Ca^{2+}$  channels의 억제 및 large-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channel 활성화 기작을 매개로 하는 nongenomic 기작을 나타내는 것이 보고되었다.

승마속(*Cimicifuga* L.)은 미나리아재비과에 속하는 식물로 전 세계적으로 20여종이 분포하는 것으로 보고되어 있으며(이현우&박종욱, 1994), 한반도에는 왜승마(*C. japonica* (Thunb.) Spreng.), 개승마(*C. biternara* (Siebold & Zucc.) Miquel), 눈빛승마(*C. dahurica* (Turcz. ex Fischer & Meyer) Maxim.), 황새승마(*C. foetida* L.), 승마(*C. heracleifolia* Komarov), 촛대승마(*C. simplex* (Mormsk. ex DC.) Turcz.)와 변종인 세잎승마(*C. eracleifolia* var. *bifida* Nakai)가 분포하는 것으로 보고되어있다(이현우, 2000).

한반도 승마속 식물에 대한 연구는 대부분 한약재로 사용되는 승마의 약리학적 연구, 성분분석, 생리활성물질의 탐색 등이 주를 이루고 있으며 한반도에 인접한 중국, 일본, 러시아(극동)등의 연구 또한 약리학적연구, 생리활성물질 탐색이 주를 이루고 있다. 이러한 승마 속 식물에 대한 생리활성물질의 탐색과 연구, 약재로의 사용은 북아메리카에서도 이루어지며 이 경우는 *C. racemosa* (L.) Nutt.(아메리카승마)가 주 대상이 되고 있다. 아메리카승마는 black cohosh로 알려져 있으며 전통적으로 폐경기 여성의 폐경관련 증상완화에 사용되어왔고, 다양한 임상적 연구 결과들에 따라 여성호르몬 대체제로서 유럽 및 북미에서 활용이 증가하였다. 또한, 이제까지 black cohosh의 효과는 주로 여성호르몬 결핍에 의해 나타나는 hot flushes나 우울감의 완화 등에 초점이 맞추어져 왔으나(Foster S, 1999; Borrelli F&Ernst E, 2002), 최근 들어 이의 여성호르몬으로서의 기능이 없다는 연구보고들이 증가하고 있어 그 효능에 대한 논란이 일고 있다(Kennelly EJ et al., 2002; Liske E et al., 2002; Pineau B et al., 2009). 그러나, 일부에서는 아메리카 승마 추출물이 폐경기 여성의 여러 가지 증상에 효과적으로 작용을 나타내어 폐경기 여성의 중요한 문제 중 하나인 심혈관질환에 영향을 미칠 수 있는 혈중 지질 농도의 개선이나, 복부지방 축적의 억제 등이 보고되고 있다(Seidlova-Wuttke D et al., 2003; Rachon D et al., 2008). 국내에서는 이러한 효능을 나타내는 것으로 보고된 black cohosh(아메리카승마)를 수입하여 여성호르몬 대체제를 제조, 판매하고 있으며 그 시장이 1년에 약 386억원에 이르고 있다. 그러나, 우리나라에서도 black cohosh와 같은 *Cimicifuga* 종 식물이 자생하고 있으며, 이의 효과가 black cohosh와 유사한 경우 자생종 승마의 재배를 통한 black cohosh의 대체가 가능하여 아메리카승마 수입 대체를 통한 외화절감과 더불어 자생승마 재배유도를 통한 농가 수익증대도 기대할 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 폐경기 여성의 여성호르몬 결핍에 따른 주요 후유증의 하나인 혈관기능 저하에 대한 효과를 black cohosh와 자생종 승마 추출물을 이용, 비교한 후 난소를 절제한 폐경유도 모델동물에서 자생종 승마 및 black cohosh 추출물의 투여가 혈중지질농도에 미치는 효과를 비교하여 자생종 승마의 black cohosh 대체제로서의 개발가능성을 확인하였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### ○ 국내 제품생산 및 시장 현황

- 아메리카승마는 단독 또는 다른 식물소재와의 복합제로 사용되고 있으며, 승마원료의 경우 전량 원료(근경 및 추출물) 또는 제품 형태의 수입에 의존하고 있음
- 2008년 승마 근경 원료 수입량 (건조한약제+추출물): 10만\$ (한국관세무역개발원 무역통계)
- 승마함유 관련 일반의약품(훼라민 큐 등 8종) 판매량은 34억('04), 42억('05)...210억('11년) (한국제약협회 의약품 등 생산 실적표)
- 국내 다수 업체에서 Soy product을 중심으로 인삼(홍삼) 등을 혼합한 제품 및 복합 허브제품 등의 수입제품을 갱년기 여성 건강용 일반 건강식품형태로 다종 판매 중
- 아시아 승마를 이용한 관련 제품은 없음
- 호르몬제제 시장규모는 국내 386억원/년, 세계시장 3.8bil.\$('01 추정치, International Medical Statistics)이며, 미국 폐경여성의 48%가 폐경증후군 완화를 위해 관련 건강보조식품을 복용하는 것으로 보고되어 있어 관련 기능성식품 시장은 막대한 산업성을 내재하고 있음

### ○ 국외 제품생산 및 시장 현황

- 아메리카승마 추출물인 *Cimicifuga racemosa* extract Remifemin<sup>®</sup>를 독일 Schaper & Bromer사에서 제조하여 유럽, 북미지역을 중심으로 판매하고 있으며 이 제품의 미국시장 공급자는 Glaxo Smith Kline이다. 아메리카 승마 추출물은 현재 북미, 유럽 시장을 중심으로 가장 널리 쓰이는 갱년기 증상 완화용 식이보충제로 우리나라에도 다량 수입되어 판매되고 있음
- 그의 다수 업체에서 유사한 추출물을 식이보충제의 하나로 제조판매하고 있음

국내 및 국외시장 분석결과 아메리카승마 추출물 또는 이를 함유하는 관련 제품 등의 생산 및 판매가 이루어지고 있으며, 앞으로도 그 시장은 더욱 성장할 것으로 예상된다. 따라서 본 연구에서는 아메리카승마 대신 아시아 승마 종을 함유하는 활성 복합 추출물을 개발하고자하며 특히, 혈관기능 개선 특이적인 활성추출물을 개발하는 방향으로 연구를 추진하여 “중장년여성용 혈관기능저하 증상 개선 기능성 식품 소재” 등을 생산하여 국내 및 국외에 판매하고자 한다.



## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과





**세부연구과제명 :**  
**자생종 승마의 혈관계에 미치는 여성호르몬**  
**유사활성 연구**

주관연구기관 : 한국식품연구원  
연구책임자 : 류 미 라



## 제 1 절 서론

과학과 문명의 발달로 점차 인간의 평균 수명이 연장되어 노년층 인구의 증가와 함께 중년 이후의 삶이 길어지고 실질적으로 여성의 갱년기는 인간 수명이 연장됨으로 인해 삶 중에서 1/3을 차지한다는 것이 문제점으로 대두되고 있다. 이러한 상황으로 인하여 폐경 후 여성의 건강과 삶의 질에 대한 관심이 높아지고 있으며, 이는 궁극적으로 폐경기 여성의 건강관리가 의학적, 사회적 측면에서도 중요한 관심사임을 알 수 있다. 폐경 후 증후군은 다른 원인들도 복합적으로 작용하는 것으로 알려지고 있으나, 주로 여성 호르몬인 estrogen 부족이 중요한 원인이라고 알려지고 있다(Campbell S et al., 1982). 폐경기 증상은 estrogen 분비 감소의 발현시기에 따라 달리 나타나는데, 급성증상은 혈관 운동장애로 인한 안면홍조, 야간 발한, 불면증 등이 나타나고, 신경내분비계 증상으로는 정서의 변화, 기억장애, 집중장애 등이 심리적인 문제와 동반하여 나타난다. 만성 후유증으로는 골다공증, 고지혈증 및 치매 등을 들 수 있다(Yoon BG et al., 2003). 이러한 만성질환은 한번 발생하면 치명적이거나 장기적으로 영향을 미치고, 노년기 삶의 질에도 영향을 주므로 중년기 여성의 건강관리는 매우 중요하다(Back SS, 1998). 관상동맥질환은 고혈압, 고지혈증, 당뇨, 흡연 등의 위험 요소와 관련된 질환으로 폐경 이후 관상동맥질환은 급격히 증가하며, 수술에 의한 그 위험도는 2.5배 이상 크다. 이러한 폐경기 이후 문제를 감소시키기 위하여 합성 estrogen을 포함한 호르몬대체요법(hormone replacement therapy, HRT)이 사용되어 왔다. 호르몬 보충요법은 안면홍조 등과 같은 폐경기 증상의 완화와 골다공증의 치료와 예방에 효과가 있으며, 심혈관계 질환을 30-50% 감소시키는 것으로 보고된 바 있다(Stampfer MH et al., 1991). 그러나 미국 국립보건원(NIH)의 연구를 비롯한 장기간의 추적연구에서 호르몬 보충요법이 유방암, 정맥혈전색전증 뿐 아니라 관상동맥질환, 뇌졸중 등을 오히려 증가시킨다는 보고는 호르몬요법의 위험성을 경고하였다(Writing group for the WHI investigators. 2002).

승마속(*Cimicifuga* L.)은 미나리아재비과에 속하는 식물로 전 세계적으로 20여종이 분포하는 것으로 보고되어 있다(이현우&박종욱, 1994). 본 속에 속하는 식물들은 삼출복엽, 원추상 또는 총상의 꽃차례에 많은 꽃이 달리는 점, 열매인 골돌과의 형태적 차이를 통해 미나리아재비과내 다른 속과 구별된다(이현우&박종욱, 1994). 본 속에 속하는 식물들은 인도의 캐시미르(Kashmir)에서부터 동쪽으로 히말라야, 중국, 만주, 아무르, 한반도, 일본을 거쳐 캄차카, 시베리아의 알타이, 바이칼, 치타에 이르는 아시아 지

역과 북아메리카의 동부와 서부의 일부 지역, 그리고 독일, 헝가리, 폴란드, 루마니아, 우크라이나를 포함하는 동부 유럽 등 북위 25°에서 60°사이의 북반구 온대지역에 분포하는 것으로 알려져 있다(박종욱, 1994). 한반도에는 왜승마[*C. japonica* (Thunb.) Spreng.], 개승마[*C. biternara* (Siebold & Zucc.) Miquel], 눈빛승마[*C. dahurica* (Turcz. ex Fischer & Meyer) Maxim.], 황새승마(*C. foetida* L.), 승마(*C. heracleifolia* Komarov), 좃대승마[*C. simplex* (Mormsk. ex DC.) Turcz.]와 승마의 변종인 세잎승마(*C. eracleifolia* var. *bifida* Nakai)가 분포하는 것으로 보고되었으나(이현우, 2000), 이 중 개승마는 한반도에 분포하지 않고, 황새승마는 한반도 북부의 고산지대에 분포하는 식물로 알려져 있어 휴전선 이남에는 분포하지 않는 것으로 알려져 있다.

한반도 승마속 식물에 대한 연구는 대부분 한약재로 사용되는 승마의 약리학적 연구, 성분분석, 생리활성물질의 탐색 등이 주를 이루고 있으며 한반도에 인접한 중국, 일본, 러시아(극동)등의 연구 또한 약리학적연구, 생리활성물질 탐색이 주를 이루고 있다. 이러한 승마 속 식물에 대한 생리활성물질의 탐색과 연구, 약재로의 사용은 북아메리카에서도 이루어지며 이 경우는 *C. racemosa* (L.) Nutt.(아메리카승마)가 주 대상이 되고 있다. 아메리카승마는 black cohosh로 알려져 있으며 전통적으로 폐경기 여성의 폐경관련 증상완화에 사용되어왔고, 다양한 임상적 연구 결과들에 따라 여성호르몬 대체제로서 유럽 및 북미에서 활용이 증가하였다. 또한, 이제까지 black cohosh의 효과는 주로 여성호르몬 결핍에 의해 나타나는 hot flushes나 우울감의 완화 등에 초점이 맞추어져 왔으나(Foster S, 1999; Borrelli F&Ernst E, 2002), 최근 들어 이의 여성호르몬으로서의 기능이 없다는 연구보고들이 증가하고 있어 그 효능에 대한 논란이 일고 있다(Kennelly EJ et al., 2002; Liske E et al., 2002; Pineau B et al., 2009). 그러나, 일부에서는 아메리카 승마 추출물이 폐경기 여성의 여러 가지 증상에 효과적으로 작용을 나타내어 폐경기 여성의 중요한 문제 중 하나인 심혈관질환에 영향을 미칠 수 있는 혈중 지질 농도의 개선이나, 복부지방 축적의 억제 등이 보고되고 있다(Seidlova-Wuttke D et al., 2003; Rachon D et al., 2008). 국내에서는 이러한 효능을 나타내는 것으로 보고된 black cohosh(아메리카승마)를 수입하여 여성호르몬 대체제를 제조, 판매하고 있으며 그 시장이 1년에 약 386억원에 이르고 있다. 그러나, 우리나라에서도 black cohosh와 같은 *Cimicifuga* 종 식물이 자생하고 있으며, 이의 효과가 black cohosh와 유사한 경우 자생종 승마의 재배를 통한 black cohosh의 대체가 가능하여 아메리카승마 수입 대체를 통한 외화절감과 더불어 자생승마 재배유도를 통한 농가 수익증대도 기대할 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 폐경기 여성의 여성호르몬 결핍에 따른 주요 후유증의 하나인 혈관기능 저하에 대한 효과를 black cohosh와 자생종 승마

추출물을 이용, 비교한 후 난소를 절제한 폐경유도 모델동물에서 자생종 승마 및 black cohosh 추출물의 투여가 혈중지질농도에 미치는 효과 등을 비교하여 자생종 승마의 black cohosh 대체제로서의 개발가능성을 확인하고자 한다.

## 제 2 절 실험재료 및 방법

### 1. 시료 및 추출

실험에 사용한 black cohosh와 St John's wort (*Hypericum perforatum* L.)는 동국 제약으로부터 제공받았고 그 외 각종 승마 추출물 및 물레나물(*Hypericum ascyron* L) 추출물은 참여기업인 바산고려홍삼(주)로부터 제공받아 사용하였으며, 추출법은 다음과 같다.

자생종 승마 4종 (세잎승마 *Cimicifuga heracleifolia* var. *bifida*, CH; 촛대승마 *C. simplex*, CS; 눈빛승마 *C. davurica*, CD; 왜승마 *C. japonica*, CJ)은 승마 시료의 20배에 해당하는 water, methanol, 80% ethanol 및 40% 2-propanol을 추출 용매로 하여 원심 분리 한 후 37°C에서 농축, 동결건조하여 powder 형태의 추출물을 제조하였고, 활성승마 종의 유효성분 분리를 위해 Diaion HP-20 resin 흡착법을 이용하여 flavonoid rich fraction의 분획을 실시하였다. Column 체적의 8배 이상의 증류수로 resin에 흡착되지 않는 비흡착획분을 분리한 후, 흡착된 flavonoid rich fraction은 column 체적의 4-6배 양의 85% ethanol을 사용하여 분리하였으며, 분리한 흡착 및 비흡착획분은 37°C에서 농축, 동결건조하여 고형분으로 제조한 후 실험에 사용하였다. 물레나물의 추출은 시료의 20배에 해당하는 80% methanol을 가하여 원심분리 한 후 37°C에서 농축, 동결건조하여 powder 형태의 추출물을 제조하였으며, 모든 시료는 -80°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

### 2. 혈관이완작용 측정

Sprague-Dawley rats(230-250 g)을 기절시킨 후 즉시 방혈하고 하행흉부대동맥(thoracic aorta)을 분리하여 길이 약 2-3 mm의 ring 형태로 잘라 3 mL physiological salt solution (PSS, NaCl 136.9, KCl 5.4, CaCl<sub>2</sub> 1.5, MgCl<sub>2</sub> 1.0, NaHCO<sub>3</sub> 23.8, glucose 5.5, EDTA 0.01 mM) 용액이 포함된 organ bath에 현수 시킨 후 1 g 장력으로 60분간 평형화시키고 72 mM KCl 및 PSS용액을 번갈아 투여하여 혈관수축반응을 안정화시켰다. 혈관의 수축반응이 안정화되면 300 nM의 norepinephrine (NE)를 투여하여 혈관수축을 유도한 후 최대 수축상태에서 시료를 투여하였다. Organ bath의 용액은 37°C, pH 7.5, 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> mixture 통기상태로 유지시켰으며, 혈관의 장력은 force-displacement transducer (FT3, Grass, RI, USA)가 연결된 polygraph system (RPS212, Grass, RI, USA)과 computer analyser (Power Lab 400, MacLab system,

Castle Hill, Australia)로 측정하였다.

내피의존성 혈관이완 효능 기전 분석을 위하여 내피가 온전한 혈관에 endothelium-derived relaxing factor (EDRF)에 대한 각종 inhibitor, 즉 nitric oxide(NO) synthase inhibitor L-NNA(1  $\mu$ M), prostacyclin 생성 억제제 indomethacin(1  $\mu$ M), 및 guanylate cyclase inhibitor methylene blue(1  $\mu$ M)을 NE로 혈관의 수축을 유도하기 약 20분전에 organ bath에 투여하고, 혈관수축 유도 후 시료를 투여하여 이들의 혈관확장 저해작용을 분석, EDRF 방출기전을 확인하였다.

내피세포 의존성 혈관이완작용의 estrogen receptor (ER) 매개활성 확인을 위하여 ER specific antagonist인 ICI182,720을 NE에 의한 혈관 수축 유도 20분전에 organ bath에 투여한 후 혈관수축을 유도하고 시료를 투여하여 그 영향을 분석하였다.

내피세포 비의존성 혈관이완 효능 기전 분석을 위하여 적출한 혈관 내부를 면봉으로 부드럽게 문질러 내피를 제거한 혈관을 실험에 사용하였다. 혈관평활근  $K^+$  channel 매개 동맥확장 기전 확인을 위해 각종  $K^+$  channel inhibitor를 KCl로 내피를 제거한 혈관의 수축 유도 20분전에 organ bath에 투여하고, 혈관수축 유도 후 시료를 투여하였다. ATP-sensitive  $K^+$  channel blocker로 glybenclamide (3  $\mu$ M), voltage-dependent  $K^+$  channel blocker로 4-aminopyridine (1 mM), inward rectifier  $K^+$  channel blocker로 barium chloride (20  $\mu$ M), small-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel blocker로 apamin (10 nM)을 사용하였다.

혈관평활근  $Ca^{2+}$  channel 매개 혈관이완 기전확인에는  $CaCl_2$  농도증가에 따른 혈관의 반응을 측정하여 확인하였다. 즉, 내피를 제거한 혈관을 1 mM EGTA를 함유한  $Ca^{2+}$  free medium을 이용하여 10분 간격으로 3회 washing한 후  $Ca^{2+}$  free high KCl medium으로 자극시키고 0.3 - 10 mM의  $CaCl_2$ 를 순차적으로 organ bath에 투여하면서  $Ca^{2+}$ 농도 증가에 따른 수축을 유도, 수축반응을 관찰하였다. 이때 시료는  $Ca^{2+}$  free high KCl medium 첨가 후 곧바로 첨가하고 시료를 첨가하지 않은 혈관의 수축정도와 비교하여  $Ca^{2+}$ 에 의해 유도되는 혈관수축에 대한 저해율을 측정하였으며, L-type  $Ca^{2+}$  channel blocker인 nifedipine을 positive control로 사용하였다.

### 3. 호르몬결핍 모델 쥐에 대한 효능분석

Sprague-Dawley (SD)계 암컷 쥐를 ketamine (70 mg/kg)과 xylazine (10 mg/kg) 복합제제를 근육주사하여 마취시키고 복부를 절개한 후 난소를 절제한 ovariectomized (OVX) group과 난소절제 없이 절개부분을 봉합한 sham-operated control group 및

각각의 시료 투여군으로 나누었으며, 실험은 모두 3개의 세트로 구성하였다.

첫 번째 세트는 8주령의 SD rat을 사용하여 난소를 절제한 후 2주간 회복시키고, 고 콜레스테롤 식이를 섭취시키면서 매일 같은 시간에 1% carboxymethylcellulose (CMC)에 녹인  $17\beta$ -estradiol (E2, 0.5 mg/kg/day), 각각의 승마(23 mg/kg/day)와 St John's wort (280 mg/kg/day, SJW\_Hp)의 복합물을 경구투여로 공급하면서 10일간 사육하며 체중의 변화를 측정하고, 10일이 경과 후 희생시켜 OVX후 시료의 투여에 의한 자궁위축에 미치는 영향과 체지방량, 골밀도를 측정하였으며, 혈액을 채취하여 혈청 지질의 함량을 측정, 혈중 지질에 미치는 영향을 분석하였다(Fig 1A).

두 번째 세트는 12주령의 SD rat을 사용하여 난소를 절제한 후 1주간 회복시키고, 고 콜레스테롤 식이를 급이하였으며, 난소 절제 후 2주부터 매일 같은 시간에 1% CMC에 녹인 raloxifene (Rf, 2.5 mg/kg/day), 세잎승마 (CH, 23 mg/kg/day), 세잎승마 흡착흡분 저농도 (CH-AD-L, 2.5 mg/kg/day) 및 세잎승마 흡착흡분 고농도 (CH-AD-H, 23 mg/kg/day)를 경구투여로 공급하면서 5주간 사육하며 체중과 자궁무게, 혈중 지질 농도 및 혈관운동성에 미치는 영향을 측정하였다(Fig 1B).

세 번째 세트는 12주령의 SD계 흰쥐의 난소를 절제하여 폐경을 유도하여 1주간 회복시킨 뒤 고콜레스테롤 식이를 급이하였고, 완전한 자궁의 퇴화가 일어났다고 판단되는 3주 뒤부터 1% CMC 용액에 녹인 raloxifene (Rf, 2.5 mg/kg/day),  $17\beta$ -estradiol (E2, 0.5 mg/kg/day), CH (23 mg/kg/day)와 SJW\_Ha (280 mg/kg/day)복합물 및 BC (23 mg/kg/day)와 SJW\_Hp (280 mg/kg/day)복합물을 경구투여하였으며, 5주간 사육하며 식이섭취량 및 체중의 변화를 측정하고, 5주경과 후 희생시켜 자궁무게, 골밀도, 혈중지질 및 혈관운동성, 경동맥에 미치는 영향을 형태학적으로 측정하였다(Fig 1C).



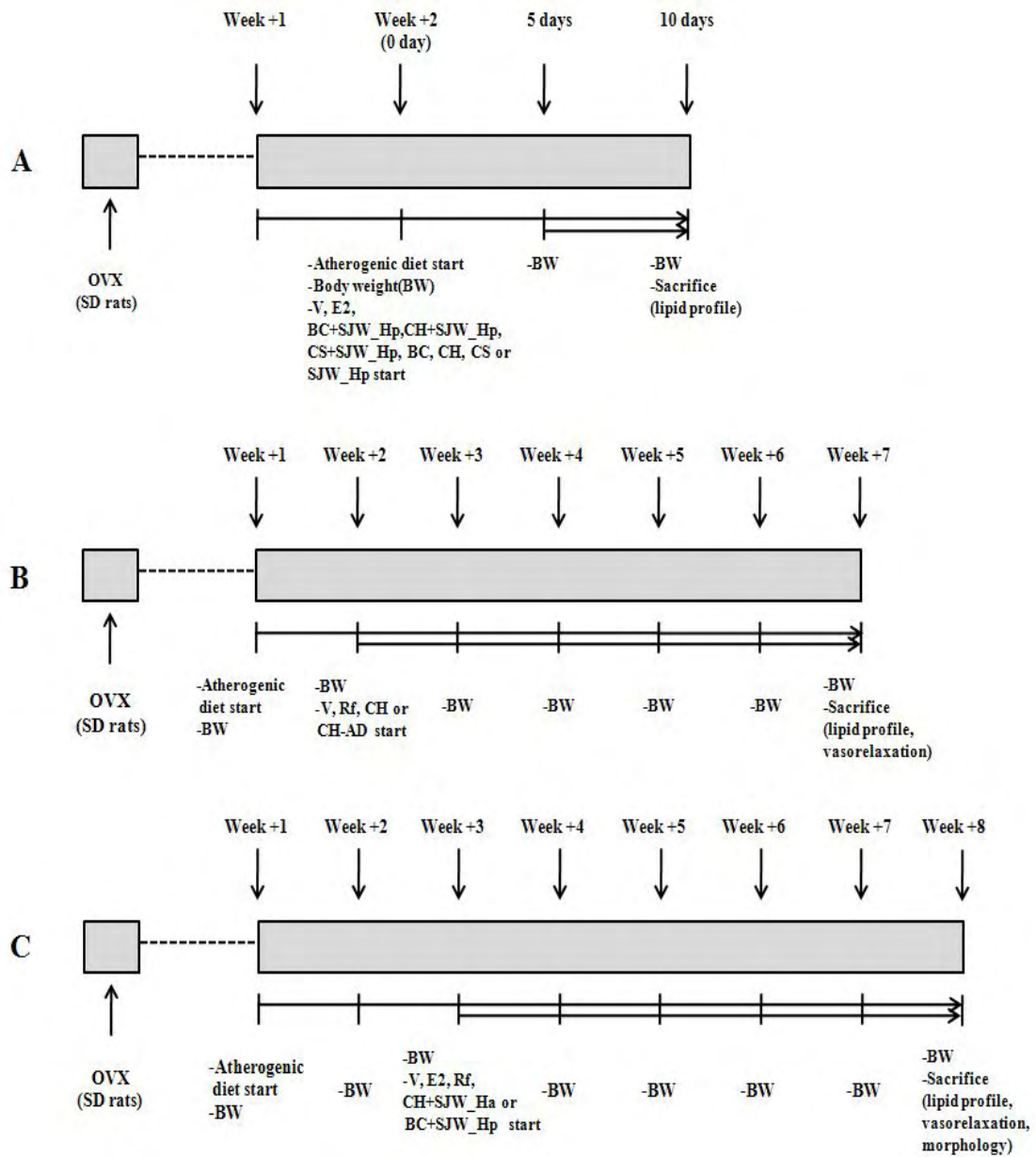


Figure 1. Experimental design of the study. SD rats were either sham-operated ovariectomized and then samples were orally injected.

#### 가. 혈중 지질농도 측정

시료가 난소를 절제한 쥐의 혈중 지질농도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 혈액을 채취하여 7,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 실험 전 까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였으며, total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) 및 low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C)을 Enzymatic colorimetric assay로 측정하였다.

#### 나. 혈관운동성 측정

시료투여 후 희생시킨 쥐의 하행흉부대동맥을 분리하여 동맥이완 작용 측정과 동일한 방법으로 혈관수축반응을 안정화시킨 후 혈관운동성을 force-displacement transducer (FT3, Grass, RI, USA)가 연결된 polygraph system (RPS212, Grass, RI, USA)과 computer analyser (Power Lab 400, MacLab system, Castle Hill, Australia)를 사용하여 측정하였다.

혈관수축작용은 phenylephrine (PE,  $10^{-9}$ - $10^{-6}$  M)을 농도별로 처리하였을 때 수축이 일어나는 정로로 확인하였고, 혈관이완작용은 50 mM 또는 30 mM KCl에 의한 수축이 최대치에 이르렀을 때 acetylcholine (Ach,  $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M)과 S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP,  $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M)의 농도별 처리에 의한 이완작용을 측정하였으며, 혈관 수축 및 이완작용의 크기는 50 mM 또는 30 mM KCl에 의한 수축도에 대한 백분율로 계산하였다.

#### 다. 골밀도 측정

시료가 난소를 절제한 쥐의 골밀도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 희생시킨 쥐의 다리 뼈를 분리하여 조직을 제거한 후 골밀도[bone mineral density( $\text{g}/\text{cm}^2$ )]를 측정하였다. 골밀도는 pDEXA Sabre와 Sabre Research software (Norland Medical Systems Inc., Fort Atkinson, Wisconsin, USA)를 사용하였으며, tibia 와 femur로 나누어 측정하였다.

#### 라. 경동맥의 형태학적 측정

5주간의 시료 투여가 난소를 절제한 쥐의 경동맥에 미치는 영향을 알아보기 위하여 경동맥의 내경과 내막의 면적을 측정하였다. 희생시킨 쥐의 왼쪽 경동맥을 분리하여 10% formalin 용액으로 고정시킨 뒤 hematoxylin-eosin (H&E) 염색 후 광학현미경으로 경동맥의 형태를 관찰하였다.

#### 4. 통계분석

5모든 실험결과는 평균±표준오차로 표기하였다. 실험에서 서로 다른 쥐로부터 얻어진 혈관의 수 및 동일 실험군에 해당하는 쥐의 수를 n으로 표기하였다. 혈관이완작용은 NE에 의해 유도되는 최대수축에서의 감소정도로 표시하였다. 실험결과는 SAS program을 이용하여 분산분석(one-way ANOVA)을 수행, 유의차를 검증하였고, 분산분석에 의해 차이가 유의적인 경우 LSD post-hoc test로  $\alpha=0.05$  수준에서 검정하였다.

## 제 3 절 결과 및 고찰

### 1. 자생종 승마의 혈관이완작용 기전분석

#### 가. 자생종 승마 4종의 혈관이완작용

내피가 온전한 쥐의 대동맥을 norepinephrine (NE)으로 최대 수축을 유도한 후 자생종 승마 4종(세잎승마 *Cimicifuga heracleifolia* var. *bifida*, CH; 촛대승마 *C. simplex*, CS; 눈빛승마 *C. daurica*, CD; 왜승마 *C. japonica*, CJ)의 용매별 추출물을 투여하여 승마의 혈관확장 작용을 검색하였다. 4종의 자생종 승마 추출물은 모두 내피가 온전한 혈관에서는 추출물 투여 직후 나타나는 순간이완작용(acute relaxation)이 관찰된 반면 내피를 제거한 혈관에서는 acute relaxation이 나타나지 않았으며, 대표적으로 세잎승마의 결과만 나타내었다(Fig. 2A, 2B).

추출용매를 달리한 자생종 승마 4종은 종에 관계없이 모든 종에서 혈관확장작용을 나타내었으며, 이들의 추출에 사용한 용매에 의해서는 영향을 받아 물 추출물의 경우 촛대승마는 이완작용을 나타내지 않았으며 80% ethanol은 촛대승마와 눈빛승마에서 활성을 나타내지 않았다. 반면 methanol과 40% 2-propanol 추출물의 경우 높은 활성을 나타내었으며, 특히 우리나라에서만 자생하는 것으로 알려진 세잎승마는 methanol 추출물이 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 3).

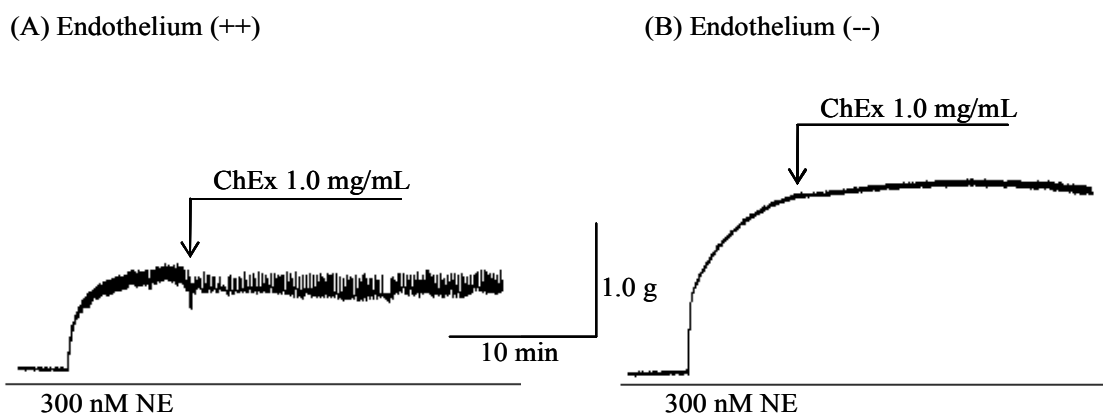


Figure 2. Vasorelaxant effect of *cimicifuga heracleifolia* extract (1.0 mg/mL) on endothelium-intact aorta (A) and endothelium-denuded aorta (B). The rings were contracted with NE and then ChEx was added (n = 3-8).

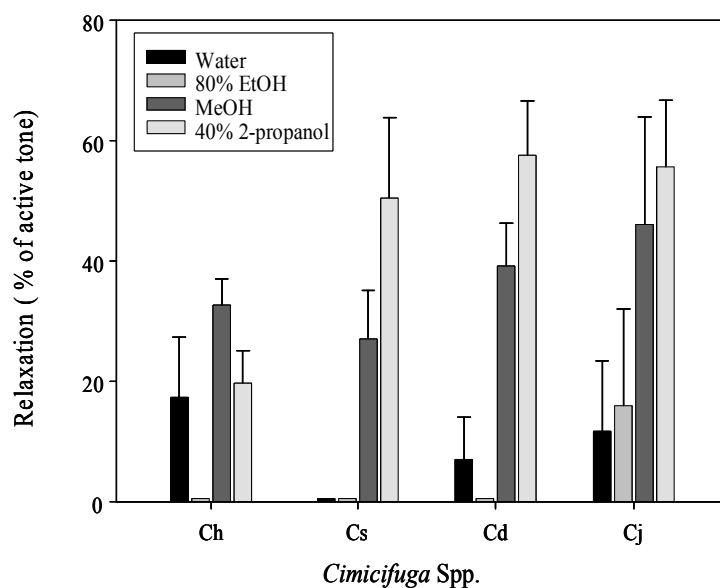


Figure 3. Comparison of vasorelaxant effect of crude extract derived from different *Cimicifuga* spp., which were extracted using various extract solvents(n=4-7).

#### 나. 세잎승마의 혈관이완작용

현재 식물성 여성호르몬 소재로 수입, 활용되고 있는 아메리카승마(black cohosh)의 clinical extract와 세잎승마 추출물의 혈관확장활성을 비교한 결과 낮은 농도에서는 세잎승마 추출물이 아메리카승마에 비해 활성이 낮았으나 농도를 증가함에 따라 활성의 차이가 유의적으로 감소하였다(Fig. 4). 이러한 차이는 아메리카 승마 추출물은 임상적으로 사용가능한 clinical extract인 것에 반해 자생종 승마 추출물은 laboratory extract인 것에 따라 나타나는 것으로 추정되며, 그럼에도 불구하고 농도를 0.3 mg/mL에서 1.0 mg/mL로 증가 시 유의적 차이가 감소되는 것으로부터 자생종 승마 또한 아메리카 승마와 비견할 만한 활성을 나타낼 수 있을 것으로 사료되었다. 따라서 우리나라 자생종이며 활성이 높은 세잎승마의 methnol 추출물을 활성 추출물로 선정, 혈관확장작용 기전에 대한 실험을 수행하였다.

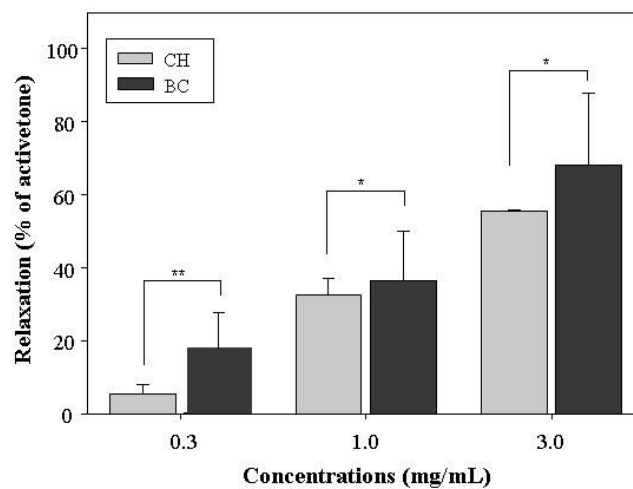


Figure 4. The concentration-dependency and comparison of Ch-MeEx and black cohosh extract (0.3-3.0 mg/mL) in the endothelium-intact rat aorta(n= 4-7).

## (1) 내피세포 의존적 혈관이완작용

### (가) NO-cGMP계 혈관이완작용 분석

내피세포의존성 혈관이완작용의 주요 경로 중 하나로는 내피세포로부터 분비되는 내피세포의존성 혈관확장물질(endothelium-derived relaxing factor; EDRF)가 알려져 있으며, 다양한 EDRF 중 가장 대표적인 것이 nitric oxide (NO)이다(Vanhoutte PM, 2004). NO는 혈관내피세포에서 분비된 후 혈관의 평활근세포에 확산되어 guanylate cyclase를 활성화시켜 cGMP의 형성을 증가시킴으로 인해 혈관의 이완작용을 나타내는 것으로 알려져 있다. 따라서 내피가 온전한 혈관에 NO 합성 억제제인 L-NNA(1  $\mu$ M), L-NNA와 함께 NO 합성의 전구체인 L-arginine 및 soluble guanylate cyclase 억제제인 methylene blue(1  $\mu$ M)를 각각 첨가 후 NE로 혈관수축을 유도하고 Ch-MeEx를 투여, 내피세포 의존적인 혈관이완작용의 NO-cGMP계 관련성을 분석하였다. Ch-MeEx의 내피세포의존성 혈관이완작용은 L-NNA에 의해 유의적으로 감소하였고 L-NNA와 arginine을 동시 처리 시 이완억제효과는 나타나지 않아 내피세포 의존적 혈관이완작용에 NO가 관여하는 것으로 나타났다. Methylene blue 또한 Ch-MeEx의 혈관이완작용을 유의적으로 억제시켜 Ch-MeEx는 NO-cGMP계의 작용에 의한 혈관이완작용을 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 5A).

### (나) Prostaglandin I<sub>2</sub> 방출작용 분석

내피의존적 혈관이완작용의 또 다른 기전이 prostacycline 생성증가와의 관련성 확인을 위하여 cyclooxygenase 저해제 indomethacin(1  $\mu$ M)으로 preincubation 후 NE로 수축, Ch-MeEx를 투여한 결과 Ch-MeEx의 내피세포의존적 혈관이완작용이 indomethacin 전처리에 유의적으로 저해되어 Ch-MeEx의 혈관이완작용에 NO와 더불어 관련성이 있을 것으로 사료되었다(Fig. 5B).

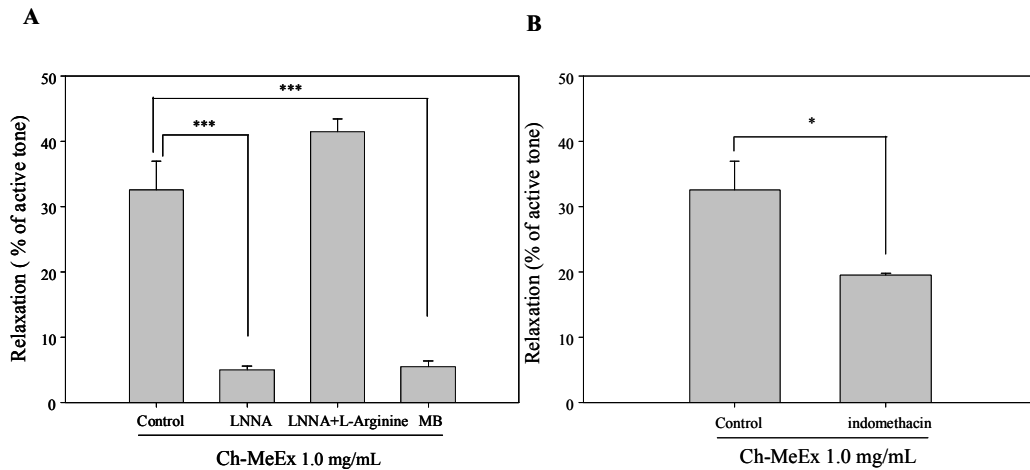


Figure 5. Comparison of the response to Ch-MeEx on endothelium-intact and inhibitors pretreated rat aortas (A), and effect of cyclooxygenase inhibitor on the response to Ch-MeEx-induced endothelium-dependent relaxation (B).

(다) Estrogen receptor (ER) 의존성 분석

내피의존성 혈관이완작용의 estrogen receptor 매개활성 확인을 위해 ER specific antagonist ICI182,780를 동일한 방법으로 전처리하여 그 영향을 분석하였다. Ch-MeEx의 내피세포의존성 순간이완작용은 ICI182,780 전처리로 유의적 변화를 나타내지는 않아 estrogen receptor를 매개하지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 6).

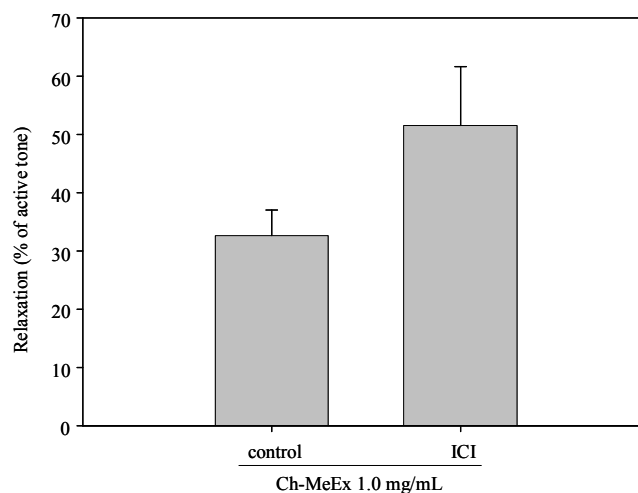


Figure 6. Effect of estrogen receptor specific antagonist on the response to Ch-MeEx-induced endothelium-dependent relaxation.



(라) 세포막 수용체와의 관련성

CH-MeEx의 혈관이완작용이 내피에서 유래된 NO가 혈관평활근세포의 guanylate cyclase를 활성화, cGMP 형성을 유도하는 것으로 확인 된 바 내피세포에서 NO의 발생을 유도하는 것으로 보고되어있는 내피세포 막 수용체와의 관련성을 측정하였다. 내피가 온전한 혈관에 selective muscarinic receptor antagonist, atropin(100 nM), substance P receptor antagonist, [D-Pro<sup>2</sup>, D-Trp<sup>7,9</sup>]substance P(5 μM), β-adrenergic receptor antagonist, propranolol(1 μM) 및 selective histamin H<sub>1</sub>-receptor antagonist, diphenhydramine(10 μM)를 preincubation하고 NE로 혈관수축 후 Ch-MeEx를 투여한 결과 atropin, diphenhydramin이 유의적으로 혈관의 이완작용을 억제한 반면, [D-Pro<sup>2</sup>, D-Trp<sup>7,9</sup>]substance P와 propranolol의 혈관이완작용 억제효과가 나타나지 않았다(Fig. 7). 따라서 Ch-MeEx의 내피세포 의존적 혈관이완작용은 세포 내의 muscarinic 또는 histamin-H<sub>1</sub> 수용체를 경유한 NO의 형성에 의하여 유발되는 것으로 추정되었다.

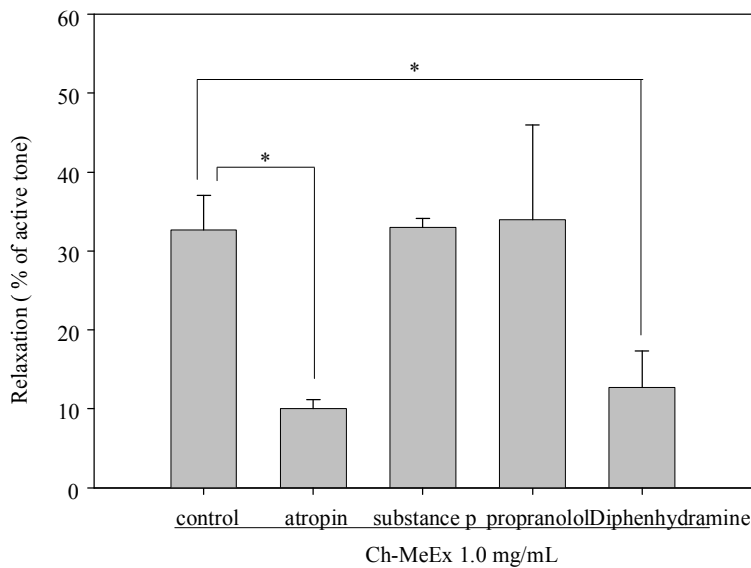


Figure 7. Effect of membrane receptor antagonist on the response to Ch-MeEx-induced endothelium-dependent relaxation.

## (2) 내피세포 비의존적 혈관이완작용

### (가) CH-MeEx의 $K^+$ channels 조절 효능 평가

혈관의 이완은 내피세포 뿐 아니라 평활근세포에 의해서도 나타나며 이 경우 혈관의 이완에 영향을 미치는 것으로 membrane potential이 대표적이고, 이러한 membrane potential의 조절에는 potassium channel이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 평활근 의존적인 이완작용이 나타나는 것으로 나타난 Ch-MeEx의 potassium channel과의 관련성을 아메리카 승마 추출물과 비교 측정하였다.

세포내 potassium channel은 여러 가지가 알려져 있으며, 본 연구에서는 ATP-sensitive potassium channel 저해제인 glibenclamide, voltage-dependent potassium channel 저해제인 4-aminopyridine, small conductance  $Ca^{2+}$ -activated potassium channel 저해제인 apamin, large conductance  $Ca^{2+}$ -activated potassium channel 저해제인 charybdotoxin 및 inward rectifier potassium channel 저해제인 barium chloride를 전처리한 결과 barium chloride에 의해 Ch-MeEx의 혈관이완작용이 저해되는 것으로 여겨지나 유의적인 차이는 없었고, 다른 potassium channel 저해제는 효과가 없었다(Fig. 8A). 따라서 Ch-MeEx는 inward rectifier potassium channel에 의해 어느 정도 혈관이완작용에 관여할 수 있는 것으로 사료되었다. 아메리카 승마 추출물 또한 barium chloride에 의해서만 유의적으로 혈관의 이완이 억제되었고 나머지 저해제에 의해서는 효과가 없어 재래종 승마 추출물과 차이가 거의 없는 것으로 나타났다(Fig. 8B).

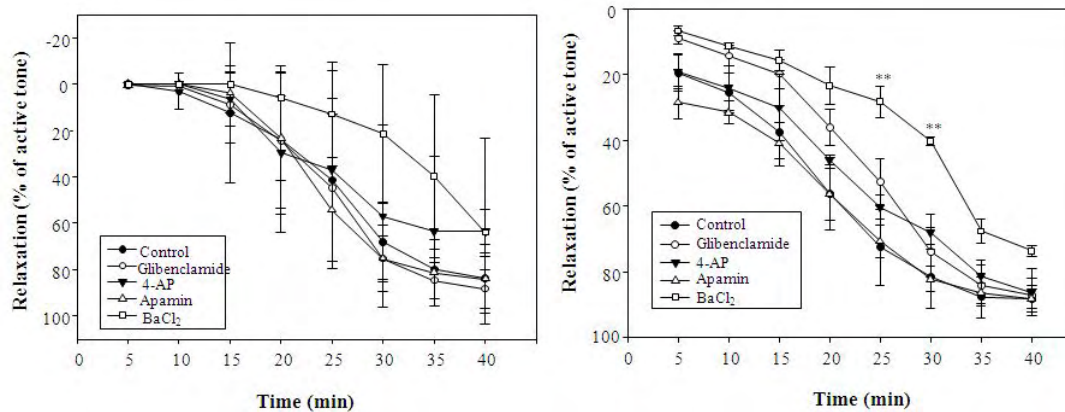


Figure 8. Comparison of the responses to Ch-MeEx (1.0 mg/mL; A) and black cohosh extract (1.0 mg/mL; B) in control conditions during incubation with K<sup>+</sup> channel blockers. The quiescent preparations were pretreated with glibenclimide(3  $\mu$ M), an ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel blocker; 4-amino-pyridine(1 mM), a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel blocker; and apamin (10nM), a small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel blocker; charybdotoxin (100 nM), a large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel blocker; barium chloride(20  $\mu$ M), an inward rectifier K<sup>+</sup> channel blocker, for 20 min. Then, Ch-MeEx and black cohosh extract were added (n=3-5).

(나) Calcium channel과의 관련성

평활근 세포에 의한 혈관의 수축은 혈관평활근 세포 표면 수용체의 활성화에 의해 세포 내  $Ca^{2+}$  channel이 개통되어 세포내  $Ca^{2+}$  유입이 증가함으로써 일어난다. 따라서  $Ca^{2+}$  free medium에서  $Ca^{2+}$  농도 증가에 따라 유도되는 수축에 대한 승마추출물의  $Ca^{2+}$  channel antagonistic 효능을 측정하였다. 내피를 제거한 혈관을 1mM EGTA를 함유한  $Ca^{2+}$  free medium으로 10분 간격으로 3회 washing하여 평형화시키고  $Ca^{2+}$  free high KCl medium으로 자극하고 평형화된 상태에서 추출물을 첨가한 후,  $CaCl_2$  농도를 0.3 ~ 10.0 mM로 변화시키며 수축을 유도하였다. 추출물을 첨가하지 않은 혈관의 수축률에 대한 수축 저해율을 측정하였으며, L-type  $Ca^{2+}$  channel blocker인 nifedipine을 positive control로 사용하였다. 이전의 연구들에 의하면 혈관 이완 및 수축에서 calcium의 influx는 매우 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 calcium을 함유하지 않은 high-potassium depolarization medium에서 calcium의 투여시 혈관이완에 Ch-MeEx가 미치는 영향을 측정된 결과, Ch-MeEx 1.0-3.0 mg/mL을 첨가 시  $CaCl_2$ 로 유도된 혈관수축을 유의적으로 억제하지 않는 것으로 나타나 (Fig. 9A) 이의 활성물질의 특성이 보다 hydrophobic 한 것으로 추정되었으며 아메리카 승마 추출물 또한 0.3 - 3.0 mg/mL의 농도에서 모두  $CaCl_2$ 에 의해 유도되는 수축 저해작용을 나타내지 않아 유사한 결과를 보였다(Fig. 9B).

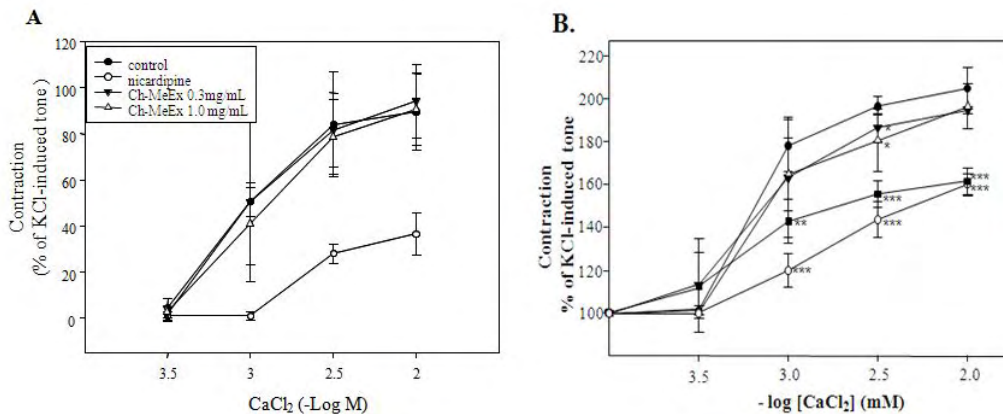


Figure 9. The effects of Ch-MeEx (A) and black cohosh extract (B) on the calcium concentration-dependent contraction curves in rat thoracic aorta without endothelium, compared with the effects of nifedipine (10 nM). Data are expressed as a percentage of the maximum contraction induced by  $Ca^{2+}$  in controls (n=3-6).

결과적으로 재래종 승마 추출물은 혈관이완작용을 나타내며, 이는 특히 내피세포 의존적인 형태로 나타남을 알 수 있었다. 또한 재래종 승마 추출물의 내피세포 의존적 혈관이완작용은 주로 혈관의 대표적 이완작용물질로 알려진 nitric oxide를 매개하여 cGMP의 생성에 관여하는 것으로 나타났으며, 내피세포 비의존적인  $K^+$  channel이나  $Ca^{2+}$  channel과는 관련성이 크지 않았다. 또한 이 추출물의 혈관이완작용은 현재 식물성 여성호르몬 소재로 수입, 활용되고 있는 아메리카승마 (black cohosh)의 clinical extract와 비교 시 전혀 뒤지지 않는 것으로 나타나 향후 아메리카승마 대체소재로서의 활용가능성이 매우 클 것으로 사료되었다.

#### 다. 세잎승마 활성획분의 혈관이완작용 및 호르몬결핍 모델쥐에 대한 효능 분석

##### (1) 내피세포 의존적 혈관이완작용

세잎승마 추출물의 활성획분 분리를 위하여 Diaion HP-20 resin을 이용하여 흡착(CH-AD) 및 비흡착(CH-NAD)으로 분리한 각 획분의 혈관이완 작용을 측정하였다. 비흡착획분에서는 혈관 이완작용이 나타나지 않은 반면(Fig.10), 흡착획분은 시료투여 직후 나타나는 acute relaxation이 나타났다. 특히 이 작용 앞의 세잎승마 추출물 1.0 mg/mL에서의 활성(35.3±4.41%)과 비교 시 CH-AD가 53.2±7.9%로 유의적으로 높은 활성을 나타내어 이를 활성획분으로 하였다.

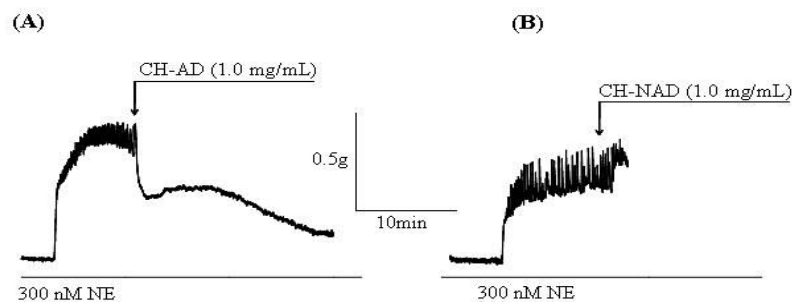


Figure 10. HP-20에 의하여 분획한 세잎승마 분획물의 혈관이완작용

Acute relaxation이 나타난 세잎승마 활성획분(CH-AD)의 혈관이완작용은 농도 의 존적으로 나타났으며 log EC<sub>50</sub>은 0.1028이었다(Fig. 11).

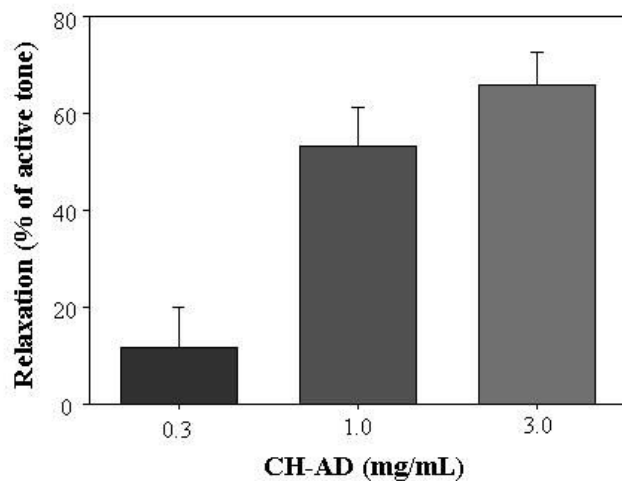


Figure 11. 세잎승마 활성획분의 농도에 따른 혈관이완 작용

내피세포 의존적 혈관이완작용이 나타난 CH-AD의 혈관이완작용기전 확인을 위하여 세잎승마 추출물의 활성기전으로 나타난 NO-cGMP계 활성증강 작용분석을 하였다. 즉, 내피가 온전한 혈관에 NO 합성 억제제인 L-NNA(1  $\mu$ M), L-NNA와 함께 NO 합성의 전구체인 L-arginine 및 soluble guanylate cyclase 억제제인 1H-[1,2,3]oxadiazole [4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ, 1  $\mu$ M)를 각각 첨가 후 NE로 혈관수축을 유도하고 CH-AD를 투여하여 내피세포 의존적인 혈관확장작용의 NO-cGMP계 관련성을 분석하였다. 실험결과 L-NNA와 ODQ 는 유의적으로 CH-AD에 의한 혈관이완작용을 감소시켰으며, L-NNA와 함께 L-arginine을 투여시 혈관이완작용의 저해가 나타나지 않았다(Fig. 12). 또한 cyclooxygenase inhibitor인 indomethacin (10  $\mu$ M) 투여에 의해서는 영향을 받지 않아 CH-AD의 내피의존적 혈관이완작용은 NO-cGMP계 활성증강 작용에 의한 것임을 알 수 있었고, 이는 세잎승마 추출물의 결과와 일치하였다.

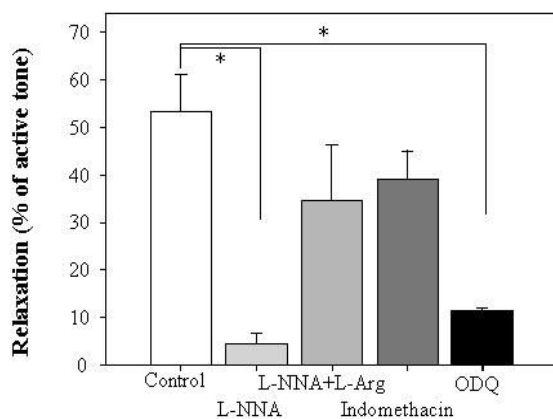


Figure 12. 세잎승마 활성획분의 내피세포 의존적 혈관이완작용 기전

CH-AD의 혈관이완작용이 내피에서 유래된 NO가 혈관평활근세포의 guanylate cyclase를 활성화, cGMP 형성을 유도하는 것으로 확인되었으므로 내피세포에서 NO의 발생을 유도하는 것으로 보고되어있는 내피세포 막 수용체와의 관련성을 측정하였다. 내피가 온전한 혈관에 selective muscarinic receptor antagonist, atropin(100 nM), substance P receptor antagonist, [D-Pro<sup>2</sup>, D-Trp<sup>7,9</sup>]substance P(5 μM), β-adrenergic receptor antagonist, propranolol(1 μM) 및 selective histamine H<sub>1</sub>-receptor antagonist, diphenhydramine(10 μM)를 preincubation하고 NE로 혈관수축 후 CH-AD를 투여한 결과 atropin과 diphenhydramin이 혈관의 확장작용을 억제하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다(Fig. 13).

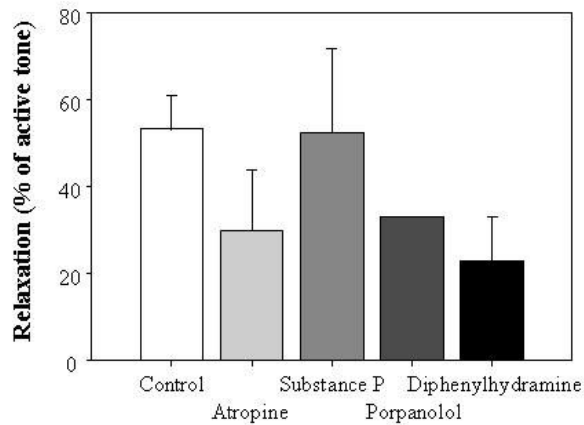


Figure 13. 세잎승마 활성획분의 세포막 수용체와의 관련성



## (2) 호르몬결핍 모델 쥐에 대한 효능 분석

난소가 성숙하여 임신이 가능한 12주령의 Sprague-Dawley (SD)계 암컷 흰쥐 (평균체중  $250 \pm 280$  g)를 사용하여 난소적출술 (ovariectomy, OVX)을 하였고 sham 대조군은 실험군과 동일한 스트레스를 주기 위해 난소를 절제하지 않고 개복수술만 실시한 후 실험하였다. 실험에 사용된 쥐들을 1주간 회복시킨 후 고 콜레스테롤 식이를 급여하였으며, 난소 절제 후 2주부터 매일 같은 시간에 1% CMC에 녹인 raloxifene (Rf, 2.5 mg/kg/day), 세잇승마 (CH, 23 mg/kg/day), 세잇승마 흡착획분 저농도 (CH-AD-L, 2.5 mg/kg/day) 및 세잇승마 흡착획분 고농도 (CH-AD-H, 23 mg/kg/day)를 경구투여로 공급하면서 5주간 사육하며 체중의 변화를 측정하였다.

### (가) 체중 및 자궁무게에 미치는 영향

7주의 실험기간동안 모든 실험군에서 체중의 증가가 나타났으나 난소를 절제하지 않은 sham군에서는 체중증가 폭이 적었으며, 특히 고농도의 세잇승마 흡착 획분 (CH-AD-H) 투여군은 control에 비하여 체중의 증가폭이 유의적으로 낮아 Rf 투여군과 유사한 수준이었다(Fig. 14A). 체중의 변화를 단계별로 나타낸 결과 난소를 절제 하고 시료를 투여하지 않은 기간 동안은 sham군을 제외한 모든 실험군에서 체중이 유사한 수준으로 증가하였으나, 시료를 투여하는 기간 동안의 체중은 CH-AD-H 투여군에서 유의적으로 낮아 control과의 차이를 보였다. 특히 CH-AD-H 투여군은 총 체중 증가량에서 선택적 estrogen 수용체 조절약물 중의 하나로, 폐경기 여성에서 증가하는 골다공증의 예방 및 치료에 사용되고 있는 Rf 투여군과 유사한 수준을 보였으므로 폐경 후 나타나는 급격한 체중증가를 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 생각된다(Fig. 14B). 시료투여 5주경과 후 희생시킨 쥐의 자궁무게는 sham군을 제외한 모든 실험군에서 유의적인 차이를 나타내지 않아 난소 절제 후 자궁위축에 대한 보호효과는 미미한 것으로 판단되었다(Fig. 15).

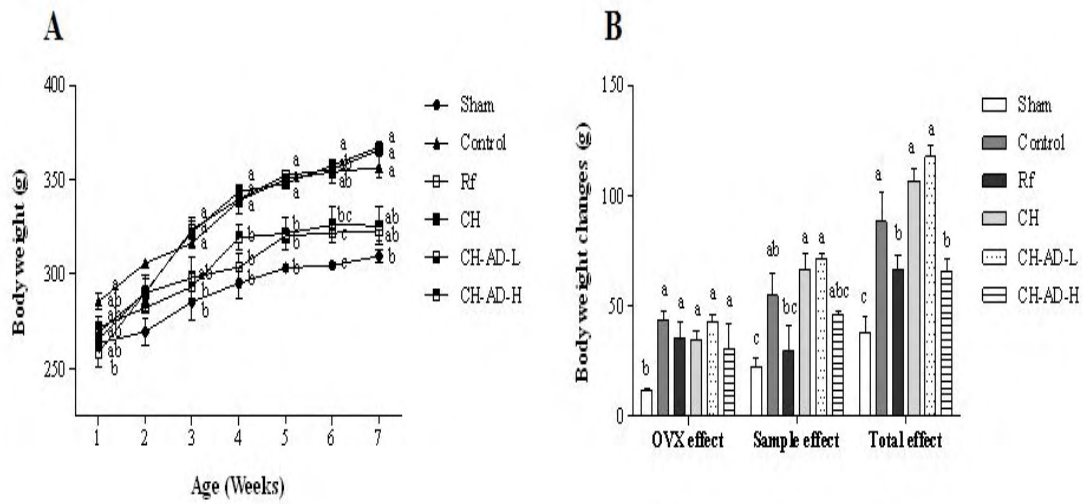


Figure 14. Effect of orally injected of CH and CH-AD (2.5 or 23 mg/kg/day) on body weight in OVX SD rats. Values not followed by the same alphabetical letter are significantly different ( $P < 0.05$ ,  $n = 5-7$  in each group).

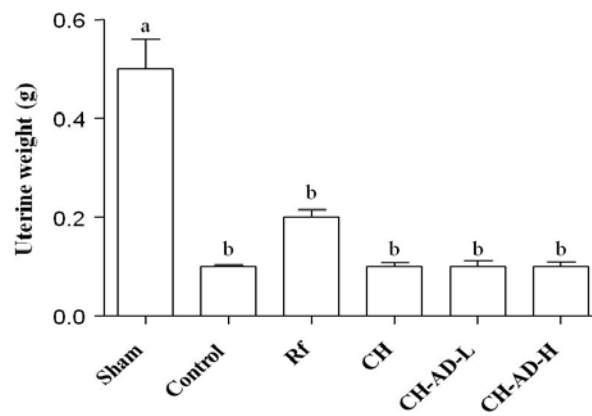


Figure 15. Effect of orally injected of CH and CH-AD (2.5 or 23 mg/kg/day) on uterine weight in OVX SD rat. Values not followed by the same alphabetical letter are significantly different ( $P < 0.05$ ,  $n = 6-7$  in each group).

(나) 혈중 지질농도에 미치는 영향

여성은 폐경 후 관상동맥질환의 발병율이 증가하는데, 이는 혈중 지질 농도의 변화를 초래하는 estrogen으로부터 기인하는 것으로 알려져 있다(Barrett-Connor 등, 1991). Estrogen의 감소는 total cholesterol (TC), triglyceride (TG), LDL cholesterol (LDL-C)를 증가시키고 HDL cholesterol (HDL-C)을 감소시킴으로써 심혈관질환을 증가시키는 것으로 보고되어 있는데(Haddock et al., 2000), 본 연구에서도 난소 절제군이 sham군에 비해 TC와 LDL-C 함량이 높아 폐경에 따른 혈중 지질 상승을 확인할 수 있었다. CH-AD의 투여는 저농도 (CH-AD-L)와 고농도 (CH-AD-H) 모두에서 Rf 투여군과 유사한 수준으로 TC의 감소를 나타내었다. LDL-C 또한 TC에서와 유사한 경향이었으나 TG에서는 실험군간에 차이를 보이지 않았다(Fig. 16). Cholesterol 농도의 분포에서, 건강한 젊은 여성의 경우 같은 나이의 남성에게 비해 TC, LDL-C 및 TG의 농도는 낮고, HDL-C농도는 상대적으로 높으나 폐경에 이르게 되면 TG와 HDL-C농도는 대체로 변화가 없고 TC과 LDL-C이 증가되어 폐경기 이후 혈관관련 질환의 발병률이 높아지는 원인으로 작용하고 있다(Mendelsohn et al., 1994). 따라서 본 연구의 활성추출물인 CH-AD는 난소 절제에 의해 estrogen의 분비가 저하된 상태에서 지질대사에 유익한 영향을 주어 심혈관계 질환 개선에 도움을 줄 것으로 기대된다.

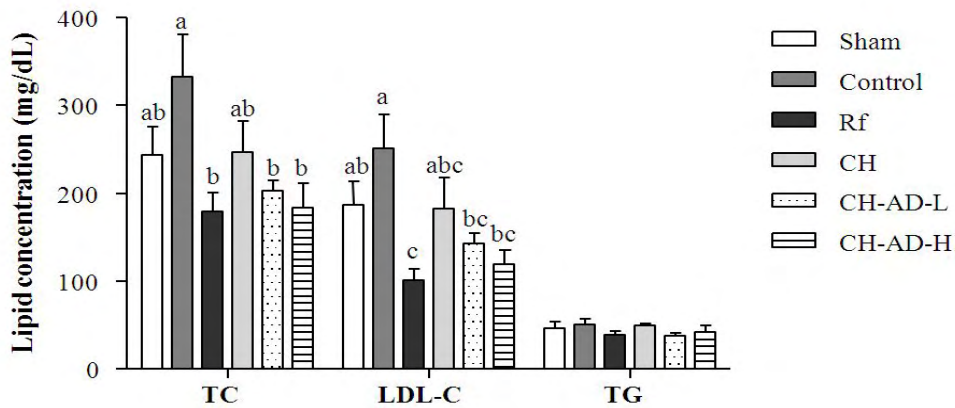


Figure 16. Effect of orally injected of CH and CH-AD (2.5 or 23 mg/kg/day) on serum lipid profiles in OVX SD rats compared to their corresponding controls. Values not followed by the same alphabetical letter are significantly different ( $P < 0.05$ ,  $n = 5-6$  in each group).

(다) 혈관운동성에 미치는 영향

시료투여 5주경과 후 희생시킨 쥐의 하행흉부대동맥을 분리하여 길이 약 2-3 mm의 ring 형태로 절단하였으며 37°C, pH 7.5, 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> mixture 통기상태를 유지하며 3 mL physiological salt solution (PSS)을 organ bath에 현수시켰다. 실험 전에 1 g의 장력을 부하하고 매 20분마다 신선한 PSS를 바꿔주면서 60분간 평형화시킨 후 72 mM KCl로 혈관의 수축을 유도하여 크기를 확인하였으며 시료의 투여가 혈관운동성에 미치는 영향을 확인하였다. 혈관수축작용은 phenylephrine (PE, 10<sup>-9</sup>-10<sup>-6</sup> M)을 농도별로 처리하였을 때 수축이 일어나는 정로로 확인하였고, 혈관이완작용은 30 mM KCl에 의한 수축이 최대치에 이르렀을 때 acetylcholine (Ach, 10<sup>-9</sup>-10<sup>-4</sup> M)와 S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP, 10<sup>-9</sup>-10<sup>-4</sup> M)의 농도별 처리에 의한 이완작용을 측정하였으며, 혈관 수축 및 이완작용의 크기는 30 mM KCl에 의한 수축도에 대한 백분율로 계산하였다.

PE에 의한 혈관의 수축과 Ach 및 SNAP에 의한 이완작용은 모든 실험군간에 유의적인 차이를 보이지 않았는데(Fig. 17), 난소 절제 후 완전한 자궁의 퇴화가 초래되지 않은 상태에서 시료의 투여는 쥐의 혈관에까지 영향을 미치지 못한 것으로 판단되어 차후의 실험은 완전한 자궁의 퇴화를 유도한 후 시료를 투여하기로 계획하였다.

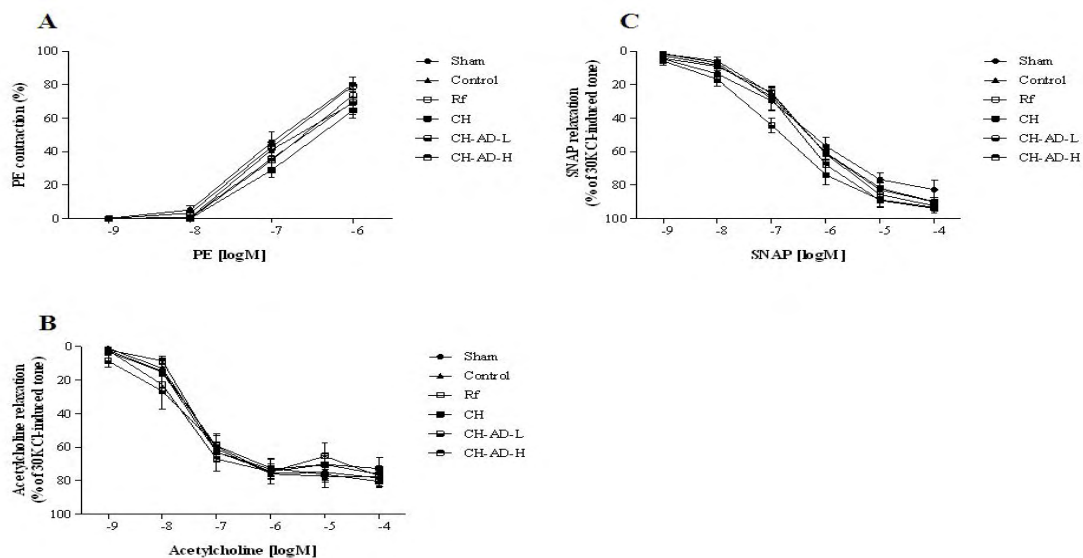


Figure 17. Effects of CH and CH-AD (2.5 or 23 mg/kg/day) on vascular responses concentrationin-response curve for phenylephrine (A), acetylcholine (B) and SNAP (C). Values not followed by the same alphabetical letter are significantly different ( $P < 0.05$ ,  $n = 5-6$  in each group).

## 2. 자생종 승마의 St John's wort와의 복합물에 대한 효능

### 가. 혈관이완작용 측정

세잎승마(*Cimicifuga heracleifolia* var. *bifida*, CH) 와 쫄대승마(*C. simplex*, CS) 및 아메리카승마(*Cimicifuga racemosa*, black cohosh, BC)를 St John's wort (SJW\_Hp)추출물과 혼합, 복합물을 제조하여 각 복합물의 혈관이완작용을 측정하였다. 각 승마와 SJW 추출물의 혼합비율은 현재 사용하고 있는 여성호르몬 대체제의 혼합비율에 준하여 결정하였다. SJW\_Hp 및 복합물은 내피세포가 완전한 쥐의 혈관에서 혈관이완작용을 나타내었으며 농도 의존적이었다 (0.001-0.03 mg/mL). 각 복합물의  $-\log EC_{50}$  값은 SJW 추출물(SJW\_Hp)이 1.43, 아메리카승마와 SJW 복합물(BC+SJW\_Hp)이 1.81, 세잎승마와 SJW 복합물(CH+SJW\_Hp)이 2.31, 쫄대승마와 SJW 복합물(CS+SJW\_Hp)이 1.96으로 SJW\_Hp 단독사용 시 보다 복합물의 효과가 더 높았고, 특히 세잎승마의 활성이 가장 강하였다. 이들 SJW\_Hp 및 복합들의 투여 농도를 증가 시 (0.3 mg/mL) acute relaxation이 80%이상 일어났으나 NE의 재수축이 유도되지 않았다. 따라서 보다 정확한 기전의 확인을 위하여 각 복합물을 물 및 butanol 획분으로 분획을 수행중이다.

## 나. 호르몬결핍 모델쥐에 대한 효능 분석

### (1) 체중, 자궁무게 및 골밀도에 미치는 영향

자생종 승마 중 혈관이완 활성이 높았던 세잎승마 (CH)와 촛대승마 (CS), 및 현재 사용되고 있는 아메리카 승마 (BC)와 이들의 St John's wort (SJW\_Hp)와의 복합물을 난소를 절제하여 폐경을 유도하며, 고 콜레스테롤 식이를 섭취시킨 쥐에 대하여 미치는 효과를 분석하였다. 8주령의 SD rat을 사용하여 난소를 절제한 후 2주간 회복시키고, 고 콜레스테롤 식이를 섭취시키면서 매일 같은 시간에 각각의 승마(23 mg/kg/day)와 SJW\_Hp (280 mg/kg/day)의 복합물을 경구투여로 공급하면서 10일간 사육하며 체중의 변화를 측정하고, 10일이 경과 후 희생시켜 체지방량, 자궁위축 및 골밀도를 측정하였다.

실험기간동안 모든 군에서 체중의 증가가 나타났으나, 난소를 절제하지 않은 sham 군에서는 체중증가 폭이 적었다(Fig. 18A). 특히 체중의 변화를 단계별로 비교 시 난소를 절제하고 시료를 투여하지 않은 기간 동안은 sham을 제외한 모든 실험군에서 체중이 증가하였으나, 시료를 투여하는 기간 동안의 체중은 CH 및 CS와 SJW\_Hp 혼합물을 투여한 군이 BC와 SJW\_Hp 혼합물 군에 비하여 체중 증가의 폭이 적었고, 특히 CH와 SJW\_Hp 혼합물군은 E2 투여군과 유사한 수준으로 체중이 증가하여 control과 차이를 나타내었다(Fig. 18B). 시료 투여 10일 경과 후 희생시킨 쥐의 체지방의 양은 BC와 SJW\_Hp 혼합물군이 가장 낮은 경향을 나타내었으나 자생종 승마 혼합물과 유의적인 차이는 없었고, control에 비하여는 지방이 양이 적은 경향을 나타내었다(Fig. 19A). 또한, 자궁 무게에서도 control에 비하여 높은 값을 나타내어 각 승마와 SJW\_Hp 혼합물의 투여가 난소절제 후 자궁위축에 대한 보호효과를 가질 수 있을 것으로 사료되었으며, 특히 세잎승마 혼합물 군에서 유의적이지는 않으나 높은 효과를 나타낼 수 있을 것으로 나타났다(Fig. 19B).

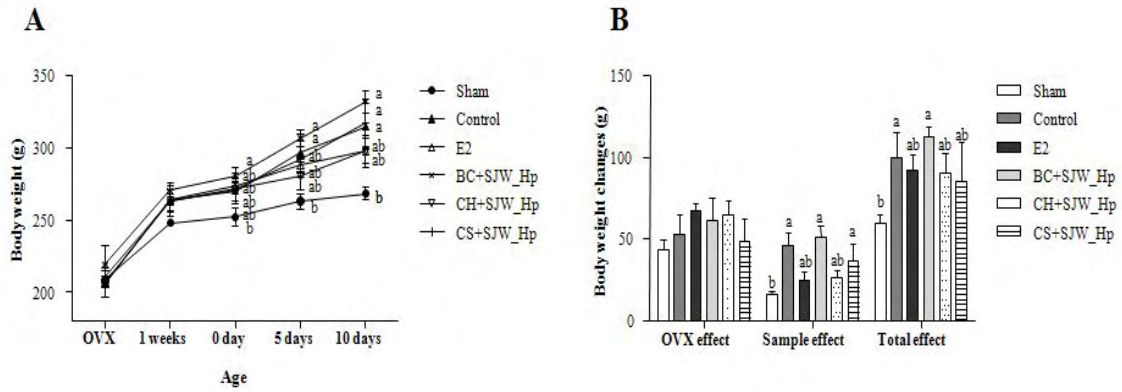


Figure 18. 자생종 승마 복합물 투여가 난소를 절제한 쥐의 체중증가에 미치는 영향

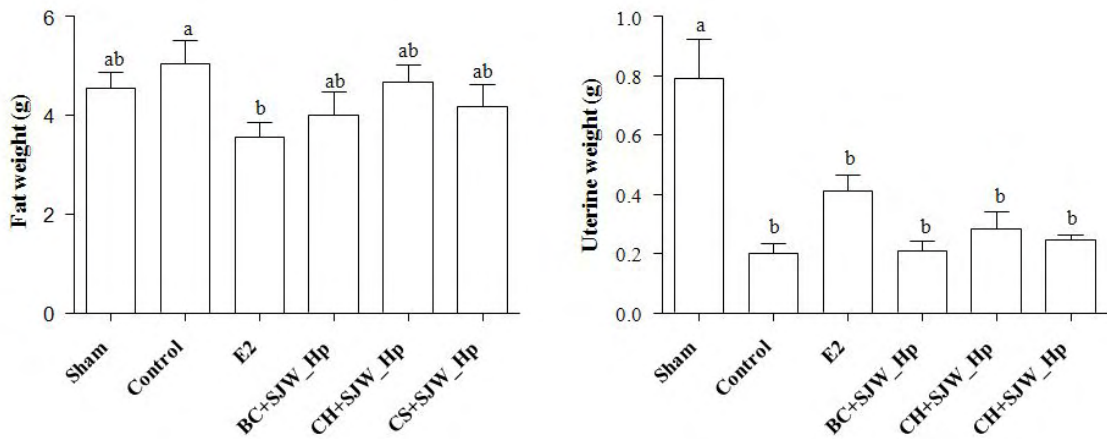


Figure 19. 자생종 승마 복합물 투여가 난소를 절제한 쥐의 지방 및 자궁무게에 미치는 영향.

난소절제 후 10일간 시료를 투여하며 사육시키고 희생시킨 쥐의 양쪽 다리 뼈를 분리하여 측정된 골밀도는 모든 실험군에서 차이가 없었으며 이는 실험기간이 짧아서 나타나는 것으로 사료되었다(Fig. 20).

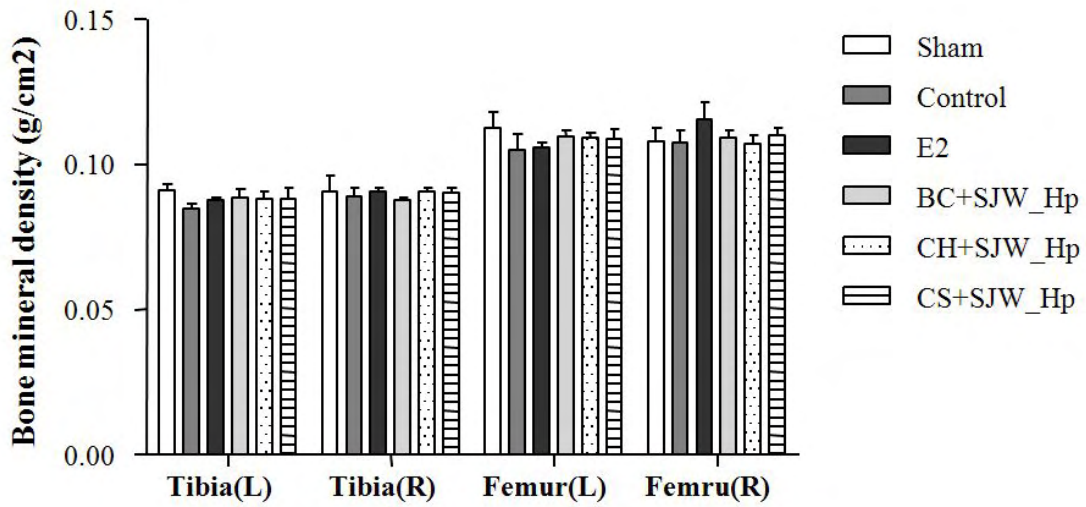


Figure 20. 자생종 승마 복합물 투여가 난소를 절제한 쥐의 골밀도에 미치는 영향

(2) 혈중 지질농도에 미치는 영향

자생종 승마 복합물의 투여가 난소를 절제한 쥐의 혈중 지질농도에 미치는 영향을 측정된 결과 total cholesterol (TC)과 LDL cholesterol (LDL-C)의 감소를 나타내었다. 그러나, 복합물 중 BC와 SJW 복합물이 가장 효과가 높아 이 복합물은 TC와 LDL-C의 감소뿐 아니라 혈중 triglyceride (TG)의 농도는 낮추고 HDL cholesterol (HDL-C)의 농도는 높이는 것으로 나타났다(Fig. 21). 그러나 자생종 승마와 SJW\_Hp 복합물 또한 TC와 LDL-C를 낮추고 HDL-C를 높이는 경향을 나타내어 이들 복합물도 현재 사용되고 있는 BC와 SJW\_Hp 복합물에 비견될 수 있을 것으로 사료되었다.



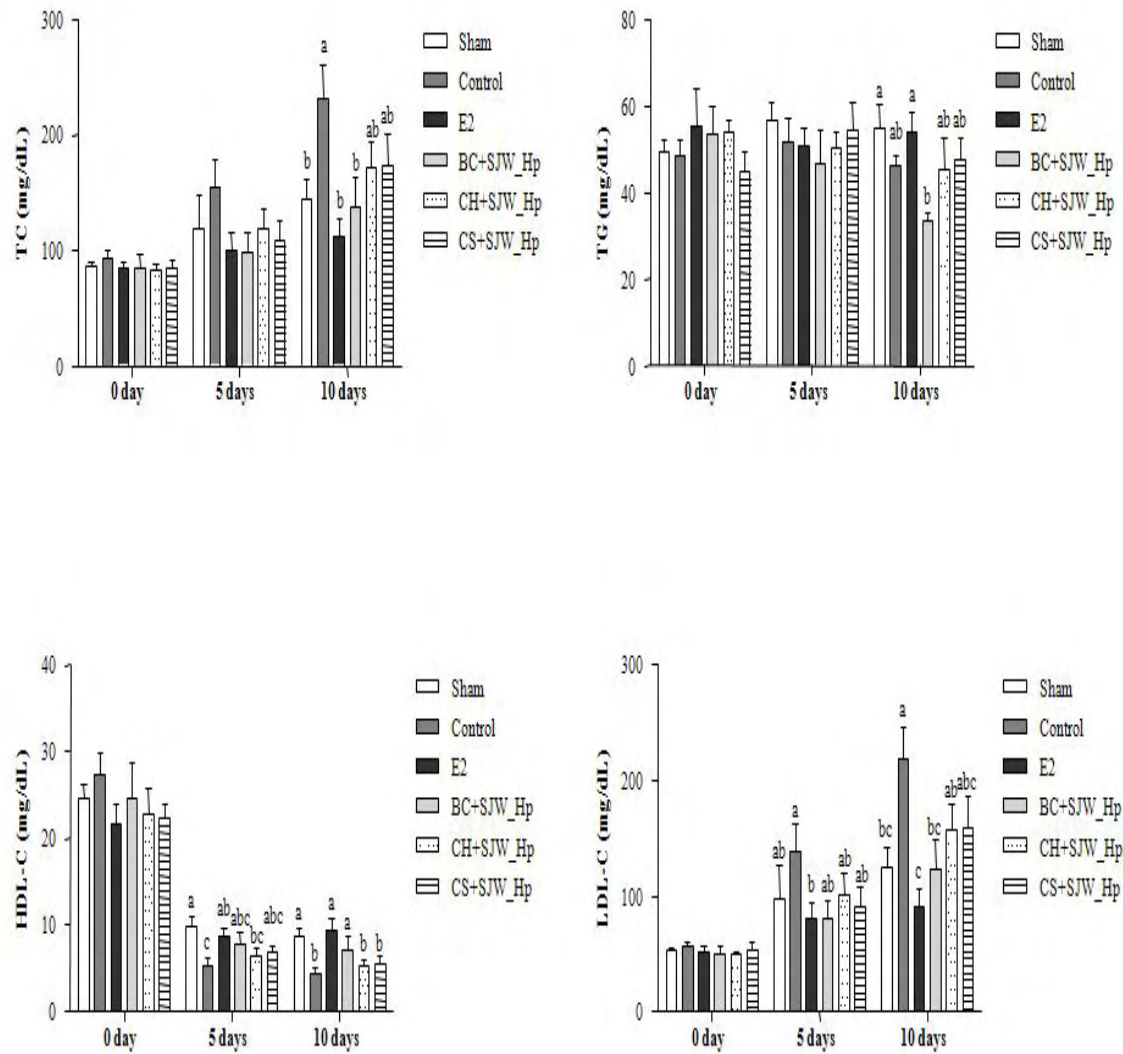


Figure 21. 자생종 승마 복합물 투여가 난소를 절제한 쥐의 혈중 lipid profile에 미치는 영향

혈관실험결과 승마함유 복합물이 혈관이완작용을 나타내었으나 복합물 투여후 내피의 손상이 우려되는 NE 재수축이 일어나지 않는데 반해, 승마 추출물의 활성획분은 그러한 효과가 없고 NO-cGMP계의 활성증강에 의한 혈관이완작용을 나타냄을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 승마 함유 복합물 중 가장 효과가 좋은 것으로 나타난 BC와 SJW 복합물과 각 승마종 및 SJW단독 추출물을 동물모델에 투여 시 나타나는 효과를 비교하였다. 실험법은 승마함유 복합물 투여 시와 동일하였다.

CH, CS 및 BC와 SJW 추출물을 단독 또는 아메리카승마와 SJW 복합물의 투여에 따른 쥐의 체중변화를 측정된 결과 난소를 절제하고 시료를 투여하지 않은 기간 동안은 모든 군에서 유사하게 체중이 증가한 반면 CH 추출물의 투여군에서는 시료를 투여하는 기간 동안 체중증가가 가장 낮았다(Fig. 22). 특히 이 효과는 BC와 SJW 복합물보다도 낮아, CH는 복합물 뿐 아니라 단독사용에 의해서도 효과를 나타낼 수 있을 것으로 사료되었다.

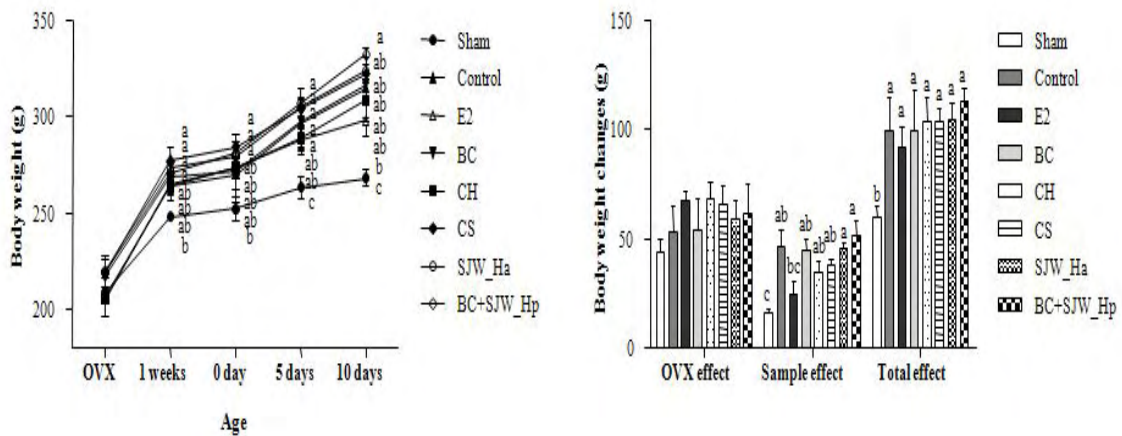


Figure 22. 승마 추출물 및 아메리카 승마와 SJW 복합물의 투여가 쥐의 체중변화에 미치는 영향

또한 각 군의 쥐의 체지방량과 자궁무게를 비교한 결과 승마 및 SJW 단독 투여 군 중에서는 CH 투여군의 체지방량이 가장 낮아 체중증가 억제 경향과 일치하였고 (Fig. 23A), BC와 SJW 복합물 투여군보다는 높았으나 유의적인 차이는 없었다. 자궁 무게는 BC 투여군에서 가장 높은 경향을 보였으나 역시 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Fig. 23B).

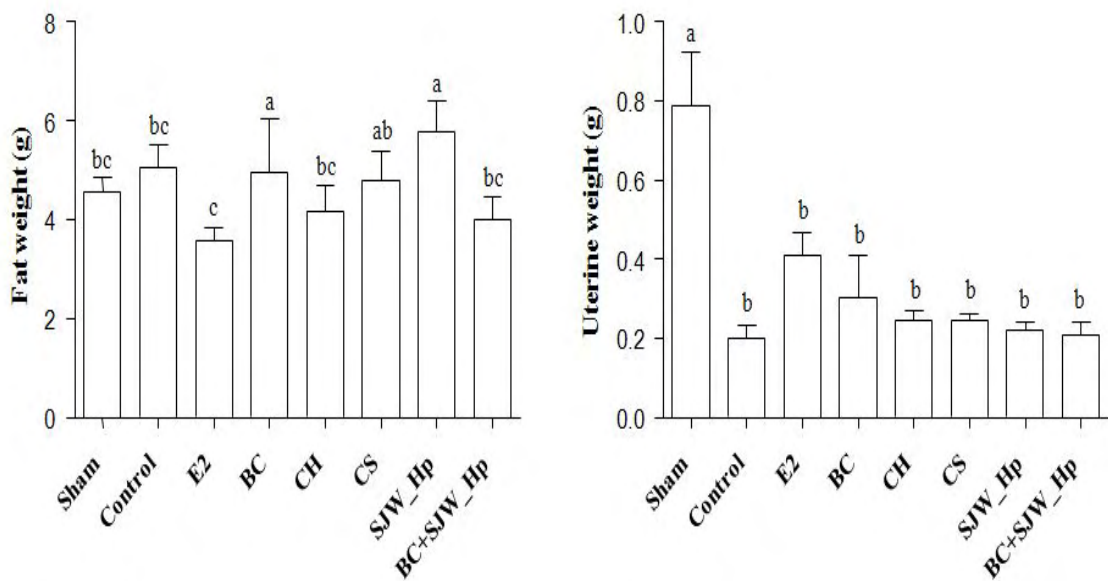


Figure 23. 승마 추출물 및 아메리카 승마와 SJW 복합물의 투여가 쥐의 체지방 및 자궁무게에 미치는 영향.

각 실험군의 쥐에서 분리한 다리뼈의 골밀도 또한 실험군간에 유의적인 차이가 없었다(Fig. 24). 난소를 절제한 후 estrogen의 투여는 골밀도의 증가를 나타낸다는 연구결과들도 보고되고 있으나, 본 연구는 실험기간이 짧아 시료의 투여가 골밀도에까지 영향을 미치지 못하는 것으로 생각되며, 향후 좀 더 장기간의 투여실험을 통하여 확인이 필요할 것으로 사료되었다.

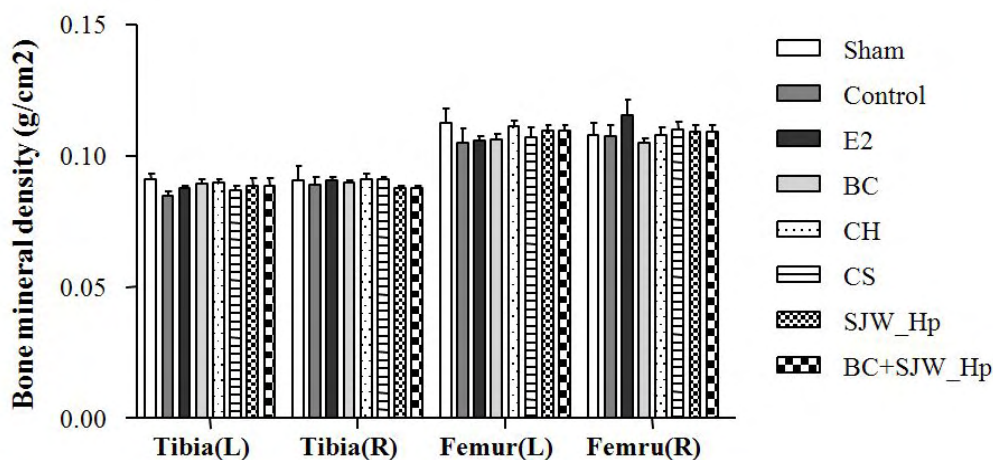


Figure 24. 승마 추출물 및 아메리카 승마와 SJW 복합물의 투여가 쥐의 골밀도에 미치는 영향

또한, 각 승마 추출물의 투여가 혈중 lipid profile에 미치는 효과를 측정된 결과 CH 추출물은 TC 및 LDL-C에서 모든 군 중 가장 낮은 수치를 나타내어 BC와 SJW 혼합물보다도 낮았다(Fig. 25). CH 추출물은 TG의 감소와 HDL-C의 증가에서도 BC와 SJW 복합물에 유사한 수준으로 나타나 단독 투여만으로도 혈중 lipid profile의 개선에 서는 효과가 있는 것을 알 수 있었다.

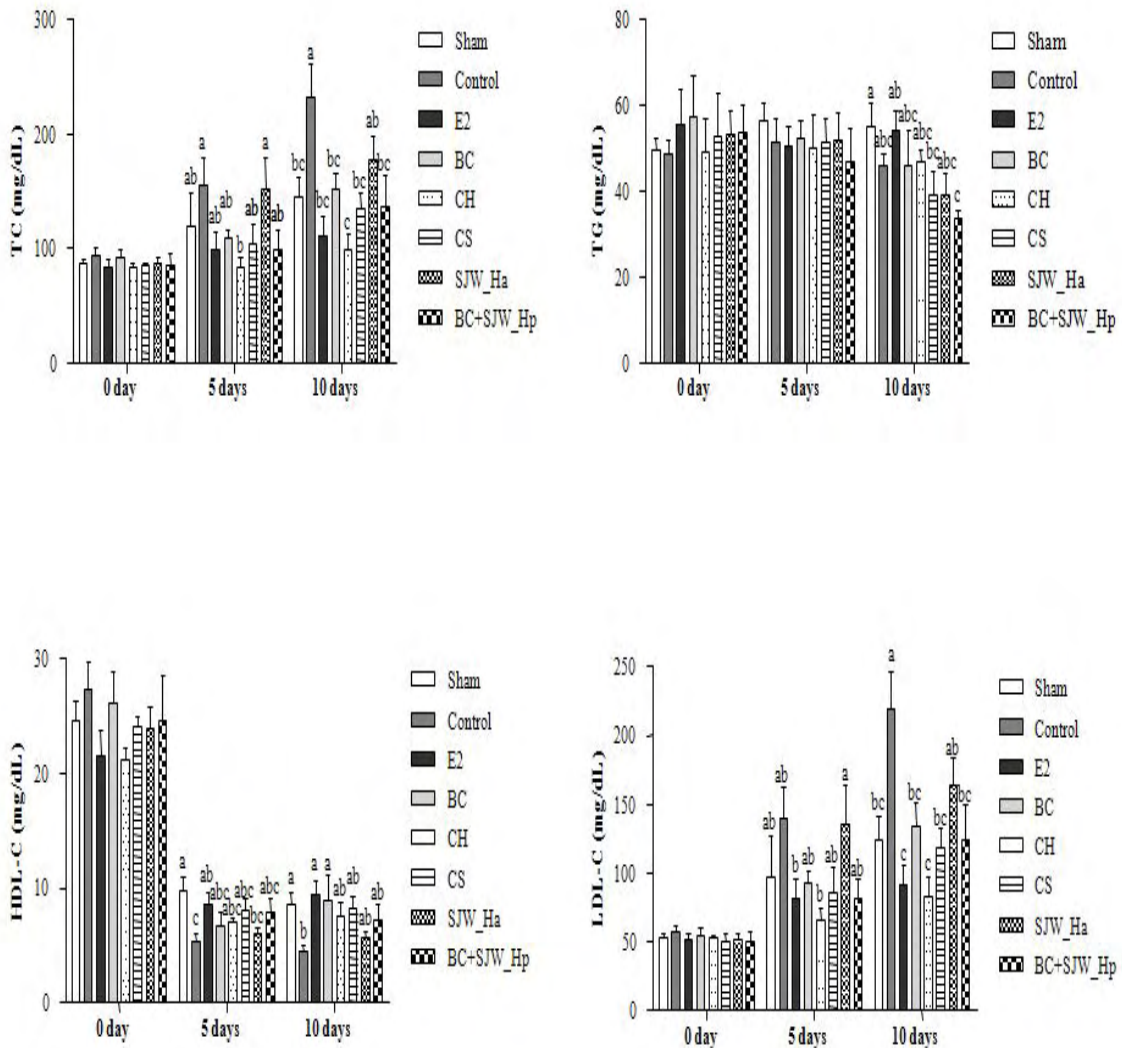


Figure 25. 승마 추출물 및 아메리카 승마와 SJW 복합물의 투여가 쥐의 혈중lipid profile에 미치는 영향

결론적으로 자생종 승마 중 세잎승마는 혈관이완작용이 높고 난소를 절제한 모델 동물에서 아메리카승마와 SJW 복합물과 같은 복합물의 투여에 의해서 체중증가 및 혈중 lipid profile에도 좋은 효과를 나타내었으며, 특히 단독으로 투여 시는 아메리카승마와 SJW 복합물보다도 좋은 효과를 가지는 것으로 나타나 아메리카승마 대체제로서 가능성이 제시되었다.

### 3. 세잎승마와 물레나물 복합물의 시제품에 대한 대체효능

현재 시판되고 있는 호르몬 대체제로서 아메리카 승마 (black cohosh, BC)와 St John's Wort (*Hypericum perforatum* L., SJW\_Hp)의 혼합물 (BC+SJW\_Hp)이 사용되고 있으며, 이는 단독사용시보다 혼합물의 투여가 더 높은 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 아메리카승마와 그의 혼합제제 제조에 사용되는 St John's Wort의 대체제로서 세잎승마 (CH)와 물레나물 (*Hypericum ascyron* L., Giant St John's Wort, SJW\_Ha) 혼합물 (CH+SJW\_Ha)의 활용가능성을 알아보고 시제품과의 활성을 비교하고자 하였다.

12주령의 SD계 흰쥐의 난소를 절제하여 폐경을 유도하여 1주간 회복시킨 뒤 고 콜레스테롤 식이를 급이하였고, 완전한 자궁의 퇴화가 일어났다고 판단되는 3주 뒤부터 1% CMC 용액에 녹인 raloxifene (Rf, 2.5 mg/kg/day), 17 $\beta$ -estradiol (E2, 0.5 mg/kg/day), CH (23 mg/kg/day)와 SJW\_Ha (280 mg/kg/day)복합물 및 BC (23 mg/kg/day)와 SJW\_Hp (280 mg/kg/day)복합물을 경구투여하였으며, 5주간 사육하며 식이섭취량 및 체중의 변화를 측정하고, 5주경과 후 희생시켜 자궁무게, 골밀도 및 혈중지질농도를 측정하였다. 또한 혈관운동성과 경동맥에 미치는 영향을 분석하였다.

#### 가. 호르몬결핍 모델쥐에 대한 효능 분석

##### (1) 체중변화와 식이효율에 미치는 영향

실험기간동안 난소를 절제하지 않는 sham군에 비해 난소절제군의 체중증가 폭이 높은 경향을 보였으며(Fig. 26A), 이는 난소를 제거 시 흰쥐의 체중을 증가시키므로서 체중 지탱능력을 키우고 estrogen 생성이 가능한 체지방을 증가시키려는 기전이라는 보고가 있다(Stampfer et al., 1991). 체중의 변화를 단계별로 나타낸 결과 난소절제술을 하고 시료를 투여하지 않은 기간 동안은 sham군을 제외한 모든 실험군에서 체중이 증가하였으나 시료를 투여하는 기간 동안의 체중은 Rf 군이 가장 낮았으며 CH+SJW\_Ha과 BC+SJW\_Hp 투여군은 sham군과 유사한 수준으로 증가하여 control과 차이를 나타내었다(Fig. 26B).

실험사육 8주간의 총 체중증가량 (g)을 실험일수로 나누어 1일 평균 체중증가량을 산출하였으며, 체중증가량 (g)에 대한 총 식이섭취량 (g)의 백분율로 식이효율 (food efficiency ratio, FER)을 구하였다. 식이효율은 공식에서 의미하는 바와 같이 사료를 섭취하는 양이 많음에도 불구하고 체중의 증가가 적다는 것은 비만조절 효과가 있는 것으로 생각할 수 있으므로, 비만을 나타내는 하나의 척도로 사용할 수 있고 이

의 수치가 적을수록 비만조절 효과가 있는 것으로 볼 수 있다. Kalu (1991)등은 sham 수술과 난소절제 시 식이 섭취량이 비슷하였음에도 불구하고 체중의 증가는 난소절제의 경우가 더 높은 경향을 가진다고 보고하였으며, 본 연구의 CH+SJW\_Ha과 BC+SJW\_Hp 투여군의 식이효율은 control에 비해 유의적으로 낮은 반면 E2군과 유사한 수준이었다(Table 1).

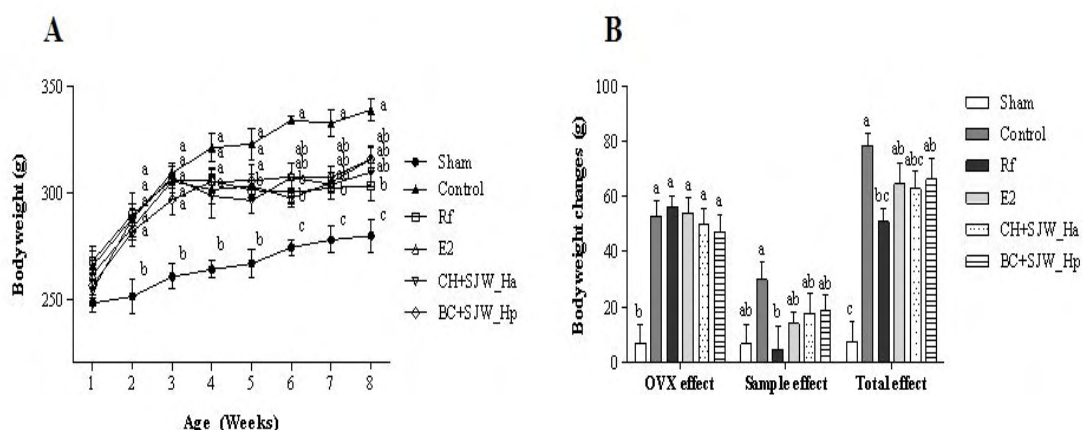


Figure 26. Effect of orally injected of CH+SJW\_Ha and BC+SJW\_Hp on body weight in OVX SD rats. (Values not followed by the same alphabetical letter are significantly different ( $P < 0.05$ ,  $n = 5-7$  in each group)).

이전의 많은 연구에 의해 난소를 절제한 쥐에게서 체중이 증가되는 것이 밝혀졌으며 (Zou et al., 2005; Wu et al., 2008), 본 연구의 난소를 제거한 모든 군에서 sham 군에 비해 현저한 체중증가를 보였다. 이러한 체중 증가의 원인은 estrogen 결핍에 의한 혈중 estrogen 농도의 저하에 따른 지방의 대사 및 흡수에 영향을 미치기 때문으로 보고되고 있다(Wu et al., 2008). 한편, 난소 절제에 의한 체중증가는 에스트로겐 투여에 의해 억제되는데(Zou et al., 2005; Wu et al., 2008; Guo et al., 2009), 본 연구의 E2 투여군에서도 유사한 결과를 나타내었으며, CH+SJW\_Ha 및 BC+SJW\_Hp 투여군은 E2 투여군과 유사한 수준으로 체중증가가 억제되어, 폐경 후 estrogen결핍에 의해 나타나는 급격한 체중 증가를 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 1. Effect of orally injected of CH+SJW\_Ha and BC+SJW\_Hp on body weight gain, food intake and food efficiency ratio (FER) in OVX SD rats. rats induced by hypercholesterolemic diet for 8 weeks

Group	Total body weight gain (g/8 weeks)	Food intake (g/day)	Total food intake (g/8 weeks)	FER (%)
Sham	37.89±7.30 <sup>1)c2)</sup>	17.44±0.65	122.08±3.65	30.12±4.99 <sup>c</sup>
Control	78.52±4.30 <sup>a</sup>	16.74±0.54	117.18±3.28	65.50±4.00 <sup>a</sup>
Rf	50.95±4.83 <sup>bc</sup>	16.66±0.82	116.60±3.06	43.24±4.29 <sup>bc</sup>
E2	64.54±7.49 <sup>ab</sup>	17.27±0.77	120.88±3.04	52.65±6.04 <sup>ab</sup>
CH+SJW_Ha	62.80±6.29 <sup>abc</sup>	17.10±0.95	119.68±3.92	53.19±5.25 <sup>ab</sup>
BC+SJW_Hp	66.08±7.39 <sup>ab</sup>	17.03±0.80	119.23±2.54	56.08±6.43 <sup>ab</sup>

<sup>1)</sup>Values are mean±SE.

<sup>2)</sup>Values not followed by the same alphabetical letter are significantly different ( $P<0.05$ , n= 5-7 in each group).

## (2) 자궁무게와 골밀도에 미치는 영향

난소절제 후 5주간 시료를 투여하며 사육한 뒤 희생시킨 쥐의 자궁무게는 Fig. 27A에 나타낸바와 같다. 자궁의 무게는 체내 estrogen의 작용 여부를 나타내는 것으로 난소절제를 하지 않은 sham군에 비해 난소절제를 시행한 군은 자궁이 현저하게 축소되었다. Lepescheux 등 (2001)은 난소를 절제한 흰쥐에게 E2 (10 µg/kg/day, 5 days per week for 6 months)를 피하로 투여하였을 경우 자궁이 정상중량으로 유지되었다고 보고하였으며, Li 등 (2011)은 E2 (5 µg/kg/2days for 6 weeks)를 복강투여 하였을 때 자궁의 무게는 0.25±0.04 g으로 sham군 (0.83±0.20 g)에 다소 낮았다고 보고하였는데, 이는 본 연구의 결과와 유사하였다. Estrogen이나 estrogen 대사산물은 난소를 절제한 쥐의 자궁 위축에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 그러나 estrogen 요법의 대체물질로 사용가능성이 연구되고 있는 SERMs나 phytoestrogen들이 자궁위축에 미치는 영향에 대하여 연구들이 수행되었으나 크게 영향을 미치지 않는 것으로 보고되고 있으며(Sutherland et al., 2003), 본 연구결과 또한 이에 상응하는 것으로 사료된다. 한편, 시판되고 있는 BC+SJW\_Hp은 control과 유의적인 차이를 나타내어 난소절제 후 자궁위축에 대한 보호효과를 가질 수 있을 것으로 생각된다.



난소를 절제한 쥐의 오른쪽 다리뼈를 분리하여 측정된 골밀도 (bone mineral density)는 모든 실험군에서 차이를 보이지 않았다(Fig. 27B). Kimble 등(1994)은 흰쥐의 난소를 절제할 경우 골의 교환과 골밀도의 저하가 현저하게 가속화된다고 하였으며, 연골 및 골 등의 결합조직을 구성하고 있는 collagen은 난소 절제 시 그 함량이 감소하는 것으로 알려져 있다(Lee et al., 2008). Raloxifene은 난소를 절제한 쥐의 자궁에 대해서 estrogen antagonist의 성격을 가짐과 동시에(Black et al., 1983), 뼈와 혈중지질에서는 agonist의 성격을 가진 물질이라고 보고되어 있으며, 난소를 절제한 쥐에게 5주간 0.1-10 mg/kg의 raloxifene을 경구투하였을 때의 골밀도는 sham 군의 88-90%를 유지하였으며 control에 비해 현저하게 높았다고 보고하였다(Black et al., 1994).

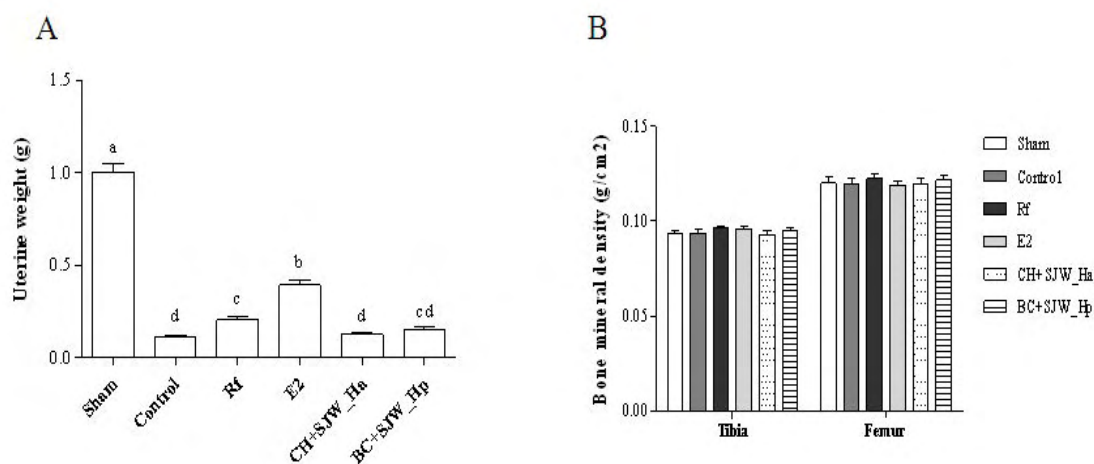


Figure 27. Effect of orally injected of CH+SJW\_Ha and BC+SJW\_Hp on (A) uterine weight and (B) bone mineral density in OVX SD rats. The differences of uterine weight and bone mineral density at the end of experiments. Values not followed by the same alphabetical letter are significantly different ( $P < 0.05$ ,  $n = 5-7$  in each group).

(3) 혈중지질 농도에 미치는 영향

세잎승마 혼합물 및 시제품의 투여가 난소를 절제한 쥐의 혈중 지질농도에 미치는 영향을 측정한 결과는 Fig. 28과 같다. Triglyceride (TG)에서 시제품인 BC+SJW\_Hp 투여군은 E2 투여군과 유사한 수준으로 control에 비해 낮은 결과를 나타내었다. 특히 CH+SJW\_Ha 투여군의 TG농도는 Rf 투여군과 유사하였으며, BC+SJW\_Hp 투여군에 비해 유의적으로 감소되었다. 따라서 CH+SJW\_Ha 는 난소를 절제한 쥐의 지질대사에 대한 영향이 시제품에 비견될 수 있을 것으로 사료되며 심혈관계 질환 개선에 도움을 줄 것으로 기대된다.

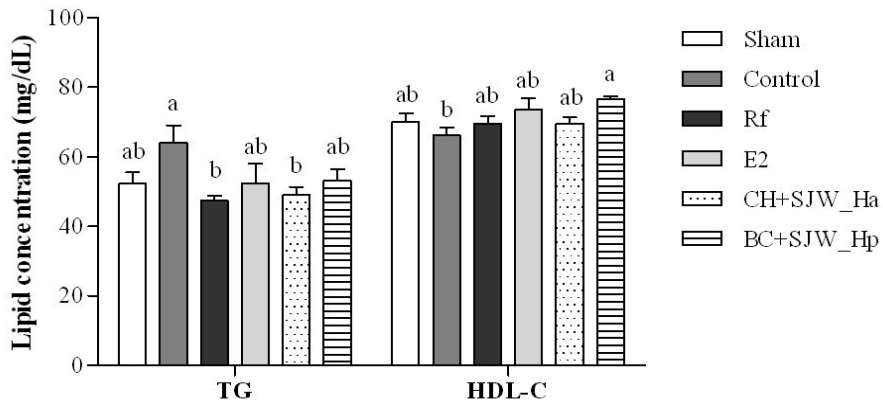


Figure 28. Effect of orally injected of CH+SJW\_Ha and BC+SJW\_Hp on serum lipid profiles in OVX SD rats compared to their corresponding controls. Values not followed by the same alphabetical letter are significantly different ( $P < 0.05$ ,  $n = 7$  in each group).

#### 나. 혈관운동성에 미치는 영향

쥐의 하행흉부대동맥에 대한 세잎승마 혼합물 (CH+SJW\_Ha)과 시제품 (BC+SJW\_Hp)의 영향을 알아보았다. 실험방법은 전과 동일하게 하였으며, 혈관수축작용은 PE ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M)을 농도별로 처리하였을 때 수축이 일어나는 정로로 확인하였고, 혈관이완작용은 30 mM KCl에 의한 수축이 최대치에 이르렀을 때 Ach ( $10^{-9}$ - $10^{-6}$  M)와 SNAP ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M)의 농도별 처리에 의한 이완작용을 측정하였으며, 혈관 수축 및 이완작용의 크기는 50 mM KCl에 의한 수축도에 대한 백분율로 계산하였다.

PE에 의한 혈관수축작용은 시료를 투여한 모든 실험군에서 sham 군과 유사하여 control과의 통계적인 유의적인 차이를 나타내었다. 특히 CH+SJW\_Ha 투여군의 혈관수축작용은  $10^{-5}$  M의 농도에서 가장 높은 경향을 나타내었지만 유의적인 차이는 없었다(Fig. 29A). 50 mM KCl에 의해 유도된 혈관수축에 대한 Ach의 이완작용을 측정한 결과 CH+SJW\_Ha 투여군은  $10^{-6}$  M에서 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 29B). CH+SJW\_Ha은 SNAP에 의한 이완에서 가장 높은 활성을 보였지만 유의적인 차이는 없었으며 ( $10^{-5}$ - $10^{-4}$ ), BC+SJW\_Hp와 유사한 활성을 보였으므로(Fig. 29C), CH+SJW\_Ha의 난소를 절제한 쥐에게서 혈관운동성에 대한 영향이 시제품에 비견될 수 있을 것으로 사료되며 심혈관질환 방어효과를 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다.

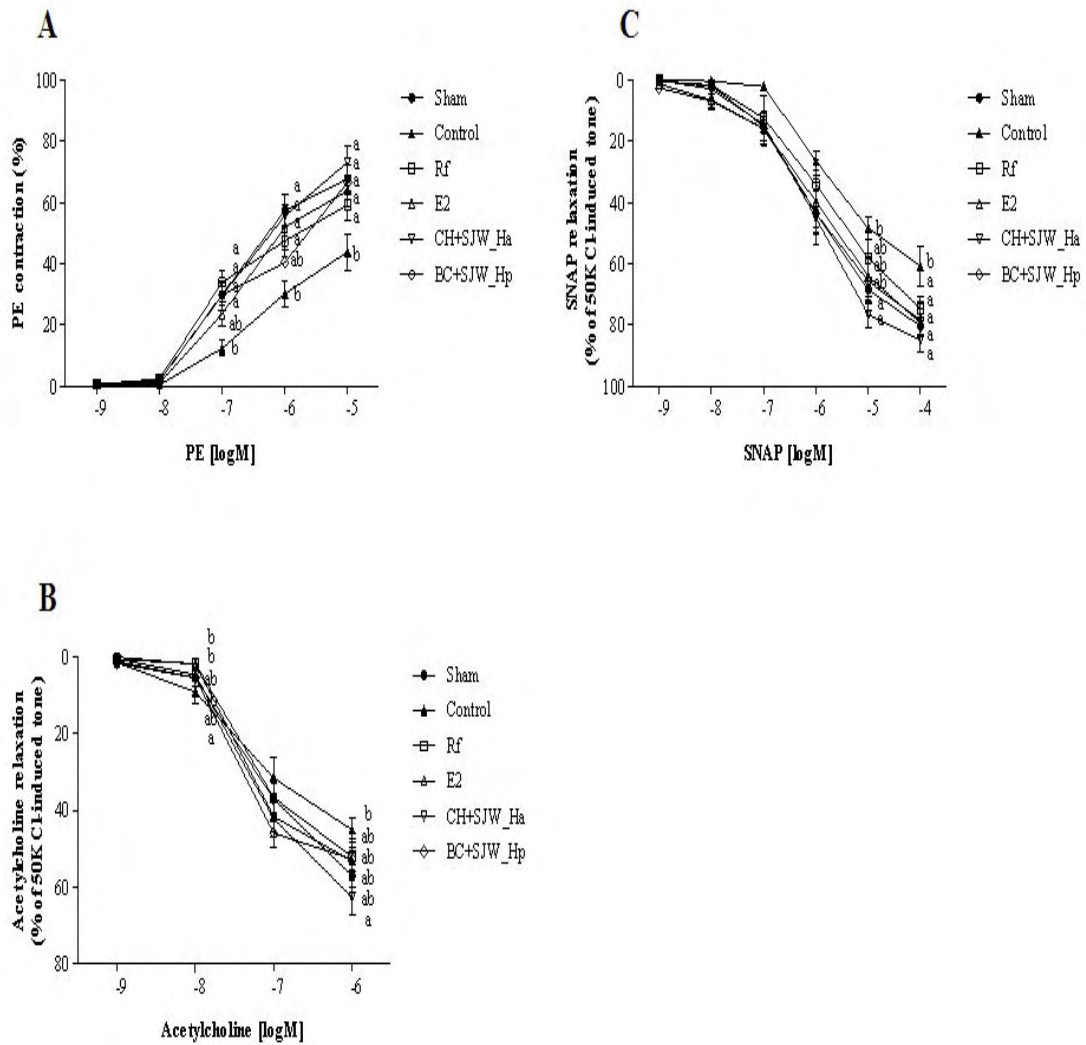


Figure 29. Effects of CH+SJW\_Ha and BC+SJW\_Hp on vascular responses concentration-response curve for phenylephrine (A), acetylcholine (B) and SNAP (C). Values not followed by the same alphabetical letter are significantly different ( $P < 0.05$ ,  $n = 7$  in each group).

#### 다. 경동맥 내막손상에 미치는 영향

세잎승마 혼합물과 시제품의 투여가 경동맥 내막손상에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험종료시점에서 쥐의 왼쪽 경동맥을 분리하여 내막을 광학현미경으로 관찰하였다. 경동맥의 내경과 내막의 면적은 모든 실험군에서 차이를 보이지 않았으며, 신생내막의 형성을 동반하지 않았다(Fig. 30, 31).

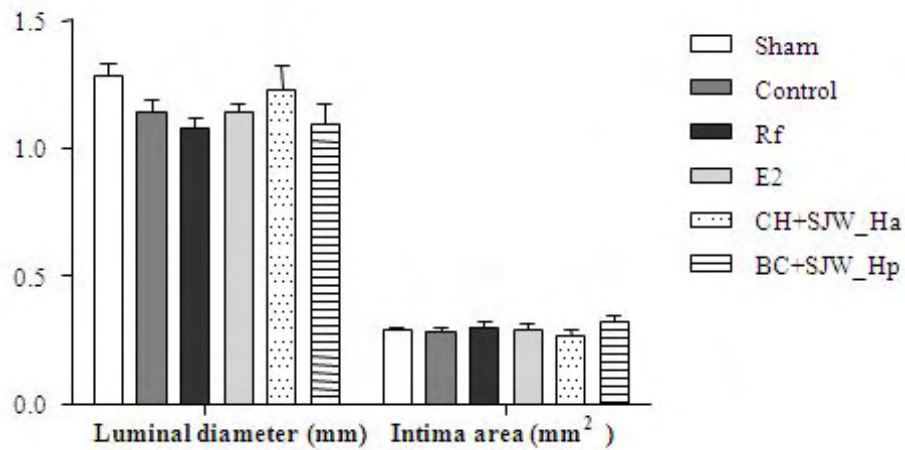


Figure 30. Effect of CH+SJW\_Ha and BC+SJW\_Hp on luminal diameter and intima area compared th the corresponding control of OVX SD rat carotid artery.

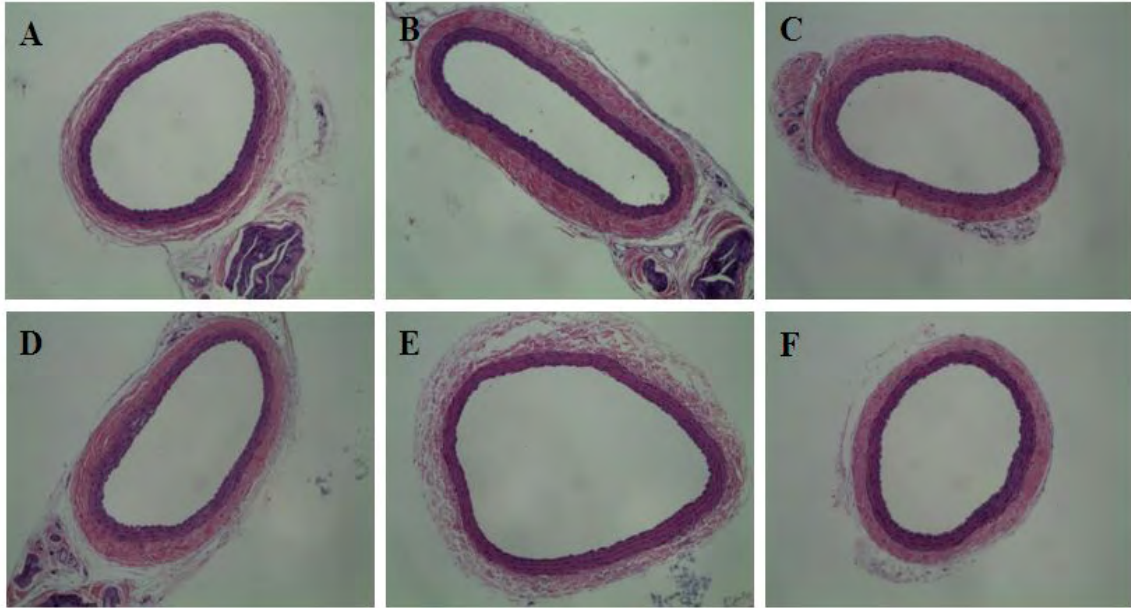


Figure 31. Representative histological photographs of OVX SD rat carotid artery.  
 (A) sham, (B) control, (C) Rf, (D) E2, (E) CH+SJW\_Ha, (F) BC+SJW\_Hp.

한반도 자생종 승마와 아메리카승마의 혈관이완활성 및 폐경을 유도한 동물모델에서의 혈중 지질농도 및 혈관운동성 등의 개선효과를 비교한 결과 자생종 승마 중 특히 한반도에서만 자생하는 것으로 알려진 세잎승마 추출물이 현재 임상적으로 사용되고 있는 아메리카 승마 추출물과 유사한 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 특히, 혈중 지질 개선효과에서는 세잎승마 추출물 투여 시 폐경기여성의 호르몬 대체제로서 사용되고 있는 아메리카승마와 St. John's wort 혼합물보다도 높은 활성을 나타내어 효능면에서 자생종승마의 아메리카 승마 대체 가능성이 대두되었다. 또한 세잎승마와 물레나물 복합물의 폐경을 유도한 동물모델에서의 혈중 지질농도 및 혈관운동성 미치는 영향은 현재 식물성 여성호르몬 소재로 수입 및 활용되고 있는 아메리카승마 (black cohosh)의 clinical extract와 비교 시 전혀 뒤지지 않는 것으로 나타나 향후 아메리카 승마와 그의 복합물에 대한 대체소재로서의 활용가능성이 매우 클 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Jordan VC, Gapstur S, Morrow M. 2001. Selective estrogen receptor modulation and reduction in risk of breast cancer, osteoporosis, and coronary heart disease. *J Natl Cancer Inst.* 93: 1449-1457.
2. Steven RC, Stephen E, Kathryn AK, Deborah G, Trevor JP, Jane AC. 1999. The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women. Results from the MORE randomized trial *JAMA* 281: 2189-2197.
3. Joly EE, Bjarnason NH, Patrick N, Leo P, Johnston CC, Watts SD. 2003. Prevention of osteoporosis and uterine effects in postmenopausal women taking raloxifene for 5 years. *Menopause.* 10: 337-344.
4. 이현우, 박종욱. 1994. *Cimicifuga foetida* L. Complex 및 근연종(미나리아재비과)에 대한 분류학적 연구. *한국식물학회지*, 37: 111-124.
5. 이현우. 2000. 승마속(미나리아재비과)식물의 유전적 분기. 서울대학교 대학원 생명과학부 박사학위 논문
6. Foster S. 1999. Black cohosh: *Cimicifuga racemosa*. A literature review. *Herbalgram*, 45: 35-50.
7. Borrelli F, Ernst E. 2002. *Cimicifuga racemosa*: a systemic review of its clinical efficacy. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 58: 235-241.
8. Kennelly EJ, Baggett S, Nuntanakorn P, Ososki AL, Mori SA, Duke J, Coletton M, Kronenberg F. 2002. Analysis of thirteen populations of black cohosh for formononetin. *Phytomedicine*, 9: 4671-467.
9. Liske E, Hanggi W, Henneicke-von Zeplin HH, Boblitz N, Wustenberg P, Rahlfs VW. 2002. Physiological investigation of a unique extract of black cohosh (*Cimicifuga racemosa* rhizome): a 6-month clinical study demonstrates no systemic estrogenic effect. *Journal of Womens Health Gender-Based Medicine*, 11: 163-174.
10. Pinea B, Garcia-Perez MA, Vazques F, Juia MD, Tarin JJ, Hermenegildo C, Cano A. No effect of *Cimicifuga racemosa* extract on serum interleukin-6 levels and prostacyclin production by human endothelial cells. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 144: 93-94.
11. Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Becker T, Christoffel V, Wuttke W. 2003. Pharmacology of *Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055 in rats: bone, fat and

- uterus. *Maturitas*, 137: S39-S50.
12. Rachon D, Vortherms T, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W. Effects of black cohosh extract on body weight gain, intra-abdominal fat accumulation, plasma lipids and glucose tolerance in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Maturitas*, 60: 209-215.
  13. 박종욱. 1994. 세계산 승마속 식물의 계통과 진화:비교형태학적, 세포학적 및 화학적 접근. 과학재단 용역과제 보고서.
  14. Campbell S, Whitehead MI. 1982. Potency and hepatocellular effects of estrogens. Lancaster, England. MTP Press. 103-125.
  15. Yoon BG, Kim DK, Kim JW, Choi DS, Bae DS, Na DL. 2003. Association between osteoporosis and alzheimer's disease in women. *J Korean Menopause* 9: 20-24.
  16. Back SS. 1998. An analysis of the relationship of menopausal symptoms of midlife women between urban area and rural area. *Korean J. Women Health Nurs.* 4: 332-347.
  17. Stampfer MH, Colditz GA. 1991. Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence. *Prev. Med.* 20: 47-63.
  18. Writing group for the WHI investigators. 2002. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. *J. American Med. Association* 288: 321-333. Barrett-Connor E, Bush TL. 1991. Estrogen and coronary heart disease in women. *J Am Med Assoc* 265: 1861-1867.
  19. Vanhoutte PM. 2004. Endothelium-dependent hyperpolarizations: the history. *Pharmacological Research*, 49: 503-508.
  20. Haddock BL, Hopp HP, Mason JJ, Blix G. 2000. The effect of hormone replacement therapy and exercise on cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women. *Sports Medicine* 29: 39-49.
  21. Mendelsohn ME, Karas RH. 1994. Estrogen and the blood vessel wall. *Curr Opin Cardiol* 9: 619-626.
  22. Stampfer MJ, Colditz GA. 1991. Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence. *Prev Med* 20: 47-63.



23. Kalu DN, Lin CC, Salerno E, Hollis BW, Echon R, Ray M. 1991. Skeletal response of ovariectomized rats to low and high doses of 17 $\beta$ -estradiol. *Bone Miner* 14: 174-187.
24. Zou W, Noh SK, Owen KQ, Koo SI. 2005. Dietary L-carnitine enhances the lymphatic absorption of fat and alpha-tocopherol in ovariectomized rats. *J Nutr* 135: 753-756.
25. Wu Q, Zhao Z, Sun H, Hao YL, Yan CD, Gu SL. 2008. Osteotens changed cardiomyocyte contraction and beta-adrenoceptor expression in rat hearts subjected to ischaemia-reperfusion. *Exp Physiol* 93: 1034-1043.
26. Guo HY, Jiang L, Ibrahim SA, Zhang L, Zhang H, Zhang M, Ren FZ. 2009. Orally administered lactoferrin preserves bone mass and microarchitecture in ovariectomized rats. *J Nutr* 139: 958-964.
27. Lepescheux L, Secchi J, Gaillark-Kelly M, Miller P. 2001. Effects of 17 $\beta$ -estradiol and trimegestone alone, and in combination, on the bone and uterus of ovariectomized rats. *Gynecol Endocrinol* 15: 12-320.
28. Li X, Song QS, Wang JY, Leng HJ, Chen ZQ, Liu ZJ, Dang GT, Song CL. 2011. Simvastatin induces estrogen receptor-alpha expression in bone, restores bone loss, and decreases ER $\alpha$  expression and uterine wet weight in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab* 29: 396-403.
29. Sutherland MK, Brady H, Gayo-Fung LM, Leisten J, Lipps SG, McKie JA, O'Leary E, Patnaik N, Anderson DW, Bhagwat SS, Stein B. 2003. Effects of SP500263, a novel selective estrogen receptor modulator, on bone, uterus, and serum cholesterol in the ovariectomized rat. *Calcif Tissue Int* 72: 710-716.
30. Kimble RB, Vannice JL, Bloodworth DC. 1994. Interleukin-1 receptor antagonist decreases bone loss and bone resorption in ovariectomized rats. *J Clin Invest* 93: 1959-1967.
31. Lee YA, Kim M. 2008. Effects of sea tangle extract on formation of collagen and collagen cross-link in ovariectomized rats. *J Life Sci* 18: 1578-1583.
32. Black LJ, Jones CD, Falcone F. 1983. Antagonism of estrogen action with a new benzothiophene derived antiestrogen. *Life Sci* 32: 1031-1036.
33. Black LJ, Sato M, Rowley ER, Magee DE, Bekele A, Williams DC et al. 1994. Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *J Clin Invest* 93: 63-69.



**제 1 협동연구과제명 :**  
**자생종 승마의 세포수준에서의 여성호르몬**  
**유사활성 연구**

위탁연구기관 : 세종대학교  
연구책임자 : 이 영 주



## 제 1 절 서론

- 남성에서는 암이 가장 중요한 질환이나, 한국여성 사망 제 1 원인은 심혈관질환(50세 이상 여성 사인의 34%)으로 특히 폐경 이후 그 위험이 급증하며 주요 원인은 노화로 인한 여성호르몬 감소이다.
- 여성호르몬인 에스트로젠은 스테로이드 호르몬으로 난소에서 생성되어 혈관을 통해 표적 세포에 도달하여 단순 확산에 의해 표적세포내로 들어가, 표적세포의 핵내에 존재하는 전사인자인 에스트로젠 수용체를 통하여 표적 유전자의 전사 활성도에 영향을 미침으로써 그 기능을 나타낸다. 에스트로젠은 항산화 작용으로 알츠하이머등으로 발생하는 뇌손상을 막아주는 역할을 담당하기도 하며, 세포 증식에도 관여한다.
- 여성호르몬 결핍 증상은 초기, 중기, 후기로 나눌 수 있으며 심혈관질환을 비롯한 골다공증, 치매 등이 후기증상으로 분류된다. 심혈관질환의 병태생리는 아직 완전히 밝혀지지 않은 상태이나 동맥경화증, 혈전증 그리고 혈관수축이 중요하다. 산화변성된 저밀도 지단백 콜레스테롤이 전 과정에서 중추적인 역할을 한다.
- 현재 호르몬결핍증의 예방 및 치료에는 호르몬대치요법(HRT: hormone replacement therapy)이 사용되고 있으며 특히 폐경초기 여성에서 심혈관질환 위험이 반감되는 것으로 보고 되고 있다.
- 임상적으로 사용되는 호르몬요법의 주요 작용기전은 혈중 lipid profile을 개선시키며, 고혈압환자에 대해서는 혈압을 낮출 수 있고 동맥혈전증의 독립된 위험인자인 혈중 fibrinogen, Lp(a) 및 plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1) 농도를 낮추며 혈소판응집을 억제시키며 관상동맥을 확장시키며 내피세포의 NO와 prostacycline의 생성증가에 의한 내피세포 의존성확장 및 평활근세포의  $Ca^{2+}$  channel과 평활근세포에 대한 endothelin-1의 작용억제로 내피세포 비의존성확장이 유도된다. 또한 혈관평활근세포의 이동과 증식을 억제하며 collagen 생성을 감소시키고 내피세포에 직접 작용하여 혈관형성과 손상 후 내피회복을 촉진시키며 내피세포의 apoptosis와 cell adhesion 분자의 발현을 억제한다.
- 미국과 유럽 선진국에서는 국가차원에서 천연물 유래 의약품을 개발하려는 노력이 매우 활발히 진행되고 있다. 선진국에서의 이러한 대체 요법은 일차 서구 의료 시술 못지않게 중요한 역할을 하고 있으며 20-60%의 환자가 대체 요법에 의존하고 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 호르몬 대체제 개발이 매우 활성화되어 있다.
- 환자가 대체요법에 기대를 하는 이유는 치료에 대한 개인의 의지를 향상시키고, 부작용이 적고, 가격이 상대적으로 저렴하고, 현대 서구 의료 시술의 시저지 효과 기대할 수 있기 때문이다. 폐경증상 완화의 목적으로 많이 사용되는 승마의 국산대체제 개발 및 효능에 대한 과학적 근거 마련을 위한 기초연구는 계속적으로 필요하다고 생각한다.

## 제 2 절 실험재료 및 방법

### 1. Reverse transcription-PCR

MCF-7 세포를 Trizol Reagent (Molecular Research Center, Inc.) 를 이용해서 모은 다음에 RNA 추출하는 방법에 따라 실험을 한 후 RNA의 spectroscopy으로 A260/A280를 측정하여 확인된 것을 사용해 정량화 하였다. 최초cDNA를 합성하기 위해서, 3 ug RNA는, 0.5 ul의 Random hexamer와 DEPC로 볼륨 11ul 를 만든후 70°C에서 5분간 반응 시킨다.

5X M-MLV RT(reaction) buffer 4ul, M-MLV reverse transcriptase (promega, Madison, WI, USA) 의 0.5 ul, 2.5 mM dNTPs 4ul을 혼합한 다음에 상온에서 5분간 반응후 37 °C incubator 에 1시간 반응, 마지막으로 70 도씨에서 8분간 반응시킨다. RTC-200 Peltier Thermal Cycler (MANUFACTURED MJ Research, Inc. USA) 이용해 94°C 에서 5분 반응후 (94°C에서 45초, 55°C에서 45초, 72°C에서 45초)를 22번 반응 시키고 72°C에서 5분간 반응 시킨다. The primers used were : ER sense primer, 5'-CATAACGACTATATGTGTCCAGCC-3'; antisense primer, 5'-AACCGAGATGATGTAGCCAGCAGC-3'.  $\beta$ -actin sense promoter, 5'-CCTGACCCTGAAGTACCCCA-3'; antisense primer, 5'-CGTCATGCAGCTCATAGCTC-3'.

### 2. Real Time-PCR

적은 샘플 양을 Real-time PCR 정량화에 의해 25 $\mu$ l 볼륨으로 구성하였다. iQTM SYBR Green Supermix 6ul ( The primer used were: ER sense primer, 5'-ACGACTATATGTGTCCAGCC-3' antisense primer, 5'-GGCGCTTGTGTTTCAACATT-3' PR sense primer, 5'-CCATGTGGCAGATCCCACAGGAGTT-3'; antisense primer 5'-TGGAAATTCAACACTCAGTGCCCGG-3'; pS2 sense primer, 5'-CATGGAGAACAAGGTGATCTG-3'; antisense primer 5'-CAGAAGCGTGTCTGAGGTGTC-3'.), dH2O 8ul을 잘 섞어주고 cDNA 9ul 추가한다. 95°C에서 5분간 변성시키고 95°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초를 40번 반복적으로 반응. 시킨다.

### 3. Western blot

단백질을 추출하기 위하여 세포에 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% NP40, 1 mM aprotinin, 0.1 mM leupeptin, 1 mM pepstatin이 함유된

용액을 첨가한 후 분쇄한 후 얼음에서 1시간동안 반응시킨다. 그리고 4 °C에서 13,000 rpm으로 25분 동안 원심분리한 후 상등액을 취한다. 그리고 Bradford 방법을 사용하여 단백질을 정량한다. 위에서 분리된 단백질을 50 µg씩 8% SDS-PAGE에서 전기 영동한 후 PVDF membrane으로 단백질을 전이하기 위해 power supply basic (Bio-rad)을 이용하여 350mA에서 1시간 동안 blotting한 후 단백질이 전이된 membrane을 5% non-fat dry milk에 넣고 1시간 반응한다. Blocking buffer를 제거하고 membrane을 1차항체 (ERα 1:1000, b-actin 1:4000)를 5% non-fat dry milk와 TBST로 만든 buffer에 섞은 다음 16시간 반응한다. TBST에 5분씩 3번 washing 후 2차 항체 (Invitrogen, USA, dilution 1:2500) or anti-mouse (Invitrogen, USA, dilution 1:5000)가 첨가된 5% non-fat dry milk 에서 1시간 반응하고 TBST로 비특이성 결합을 제거하고 ECL kit (Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK)로 단백질의 발현을 관찰한다.

유방암세포주인 MCF-7 세포는 10%FBS RPMI1640에 배양한뒤 각 제법대로 추출한 승마추출물과(500ug/ml), 17β-estradiol(E2, 10nM)을 24시간 처리한뒤, ERα, PR, ps2 mRNA를 real time RT-PCR을 통해 분석하였다.

#### 4. MTT assay

96well plate에 MCF-7 세포 부유액을 0.5×10<sup>4</sup>cell/well농도로 넣어준다. 하루 동안 incubation을 시킨 후 배지를 교환한 후 약물 500µg/ml을 처리한다. 약물 처리 3일 후 배지를 제거한 후 WST-1 10µl/well 를 처리한다. 1시간 incubation 후에 ELISA leader(450-630nm)에서 수치를 측정한다.

#### 5. Luciferase 활성 측정

세포에 플라스미드를 transfection 후 약물처리가 끝난 세포를 PBS로 세척하고 lysis buffer (125mM Tris pH 7.8, 10mM CDTA, 10mM DTT, 50% glycerol, 5% Triton X-100)를 넣고 -70°C에서 30분간 방치한 후 빠르게 37°C 항온수조에 띄워 세포를 파괴한 후 상층액을 취하여 Bradford assay 방법을 사용하여 단백질 양을 정량한다. Luciferase 활성 측정은 20µl의 cell extract에 5µl의 luciferase assay substrate를 혼합하여 AutoLumaat LB953 luminometer를 사용하여 10초간 측정한다.

#### 6. 혈관평활근세포의 분리

3개월된 Sprague-Dawley rat에서 흉부 대동맥을 제거하여 혈관평활근세포를 분리하였다. 혈관에서 주위의 loose connective tissue를 없애고 enzyme dissociation mixture (Weymouth's M13 752/1 medium, 1 mg/ml type 2 collagenase, 0.25 mg/ml elastase, 1 mg/ml soybean trypsin inhibitor, 2 mg/ml BSA)에 담가 37°C에서 10분간

반응시킴으로써 혈관내벽세포를 제거하고 adventitia와 media의 분리를 용이하게 하였다. 해부현미경하에서 fine forceps을 이용하여 adventitia를 박리한 후 2-3 mm의 크기로 잘게 잘랐다. Medial tissue를 다시 enzyme dissociation mixture에 담아 gyratory shaker내에서 37°C에서 60분간 반응시켰다. 혈관평활근세포가 분리되어 enzyme dissociation mixture가 현탁해지면 fetal bovine serum을 최종 농도가 20%가 되도록 첨가하여 효소를 비활성화 시킨 후 소독된 gauze로 걸러 digestion되지 않은 찌꺼기를 제거 하였다. 4°C에서 1000rpm으로 5분간 원심분리 후 세포배양액(DMEM/F12 supplemented with 10% FBS, 100mg/ml penicillin, 0.1mg/ml streptomycin)에 재부유시켜 25cm<sup>2</sup> 세포배양 flask에 2~5×10<sup>3</sup> 세포/cm<sup>2</sup>의 농도로 plating하였다. 세포는 37°C humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% air 환경에서 키우며 24~48시간 후 첫 배양액을 교환하여 주고 그 후로는 48~72시간 간격으로 배양액을 교환해주었다. 세포들을 1:3~1:5의 비율로 계대 배양하였으며 5~10번 계대한 후의 세포를 실험에 사용하였다.

#### 가. BrdU cell proliferation assay

DNA 합성을 조사하기 위하여 BrdU cell proliferation assay kit (calbiochem, La Jolla, CA)를 사용하여 BrdU의 흡수 및 DNA로의 incorporation을 조사하였다. 96 well plate에 혈관평활근세포를 배양한 후 12가지 승마 함유 복합 추출물을 100ug/ml과 300ug/ml 농도로 각각 24시간 동안 처리하였다. BrdU는 승마 함유 복합 추출물 처리 시간 24시간 중 마지막 4시간 전에 첨가하였다. Excitation 320 nm (wavelength)와 emission 460 nm (wavelength)에서 fluorometer로 세포들의 BrdU incorporation 정도를 정량화 하였다.

#### 나. 세포내 ROS 생성의 측정

3.5 mm 세포배양접시에 80% 가량 자랐을 때 12가지 승마 함유 복합 추출물을 각각 300ug/ml 농도로 24시간 동안 처리한 후 10uM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H2DCFDA; calbiochem)을 첨가하여 30분간 배양하였다. Flow Cytometry Caliber(FACS)를 이용하여 세포내 ROS 생성을 정량화 하였다.

### 7. PI staining

12 well plate에서 배양된 세포를 Trypsin-EDTA를 이용하여 cell pellet을 얻었다. Pellet을 1mM EDTA가 함유된 PBS로 희석한 70% 에탄올에 고정 시켰다. 일정 시간 4°C에서 보관 후 3500 rpm에서 5분간 원심 분리 하고 100 µg/ml RNase A, 100 µg/ml propidium iodide (PI)가 PBS/EDTA에 30분간 상온에서 반응 시킨 후 FACS를 이용하여 세포의 수와 DNA 양의 상관관계를 분석하였다.



## 8. H&E staining

9주된 Sprague-Dawley rat을 7주 동안 경구투여 한 후 간, 자궁 조직을 50ml tube에 넣고 어느 조직인지 기록한 후, 10% formalin에 넣는다. Tap water를 이용하여 약 2~4시간 정도 washing를 하며 물의 흐름을 약하게 하고 조직에 직접 닿지 않도록 주의 하였다. clearing 작업으로 xylene II for 30min at RT, xylene I for 30min at RT 후에 60°C oven에서 액체 paraffin 용기에 조직을 넣고 잘 흔들어 기포를 제거한 후, 약 1시간 정도 넣어 둔다. mold에 원하는 section 부위가 바닥을 향하게 심고 paraffin 이 중간에 굳지 않도록 빠르게 진행하며, 4°C 냉각판에 놓고 잘 식힌다.

50% 알코올을 묻힌 slide glass에 올려 온수(43°C)에 띄운 후 paraffin 절편의 주름을 펴고, 이를 새 slide glass에 붙인다. 조직에 관한 정보를 labeling하고 실온에서 잘 말린다. 말린 slide glass를 60°C oven에 넣어 약 하루 정도 deparaffin을 행한다. 60°C oven에서 꺼낸 slide를 실온으로 식힌후에 xylene에 약 5분 정도 넣어둔다.(2회) Hydration 과 Staining 작업이 끝난후, Dehydration and Clearing 한다.

마지막으로 Canada balsam 용액을 xylene에 섞어 slide glass위에 한 방울 떨어 뜨리고 cover glass를 덮어 실온에서 약 2일 정도 말린다.

### 제 3 절 결과 및 고찰

#### 1. 승마의 여성호르몬 수용체에 대한 활성 분석

##### 1) 세포수준에서의 에스트로젠/항에스트로젠 활성 분석

###### · Luciferase assay를 이용한 ER 활성 분석

세포주를 RPMI+5% ST-FBS하에서 배양한다. 에스트로젠 수용체 벡터와 Luciferase reporter plasmid를 transfection 후에 약물을 처리하여 활성을 검색하였다. 각각의 승마를 제법에 따라 500 $\mu$ g/ml을 처리하고 24 시간 후에 Luciferase assay를 수행하여 에스트로젠 수용체 알파 억제 물질을 검색 하였다.

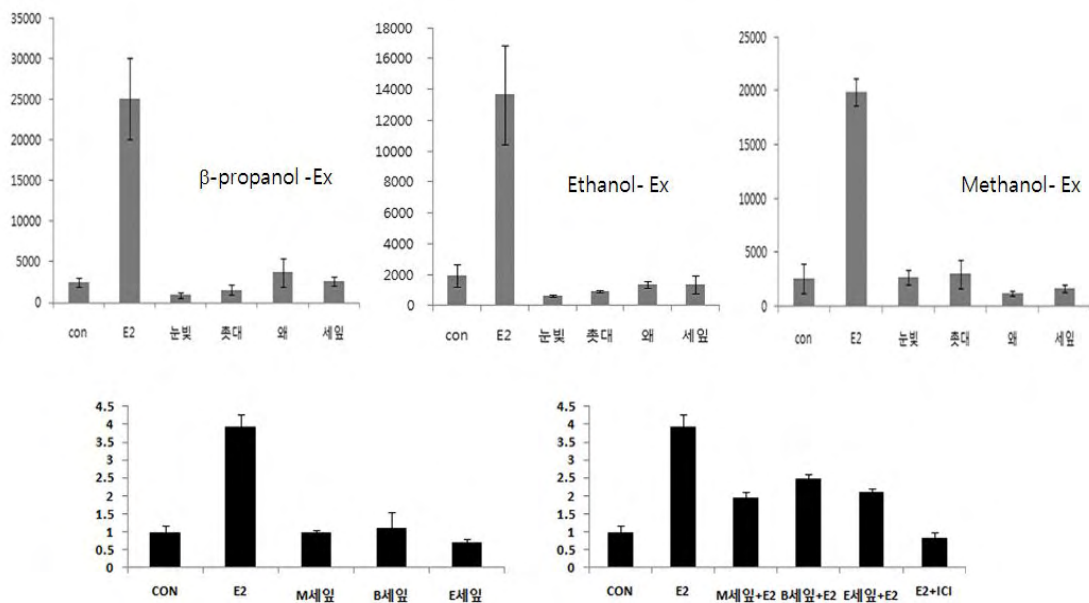


Figure 1. 자생종 승마의 estrogen 활성분석 및 E2와의 비교

E2와 승마를 같이 처리했을 때의 변화를 체크 한 결과 세잎승마에서 항에스트로젠 활성이 있음을 관찰하였다.

제1세부인 식품연구원에서 2차년도 연구를 위한 새로운 샘플을 사용하여 다음과 같은 실험을 수행함. 세포주를 RPMI + 5% ST-FBS 하에서 배양한다. 에스트로젠 수용체 벡터와 Luciferase reporter plasmid를 transfection 후에 약물을 처리하여 활성을

검색하였다. 승마 추출물을 농도에 따라 처리하고 24 시간 후에 Luciferase assay를 수행하여 에스트로젠 수용체 알파 억제 물질을 검색하였다. Luciferase 활성 측정은 100 $\mu$ l의 cell extract에 10 $\mu$ l의 luciferase assay substrate를 혼합하여 AutoLumaat LB953 luminometer를 사용하여 10초간 측정하였다.

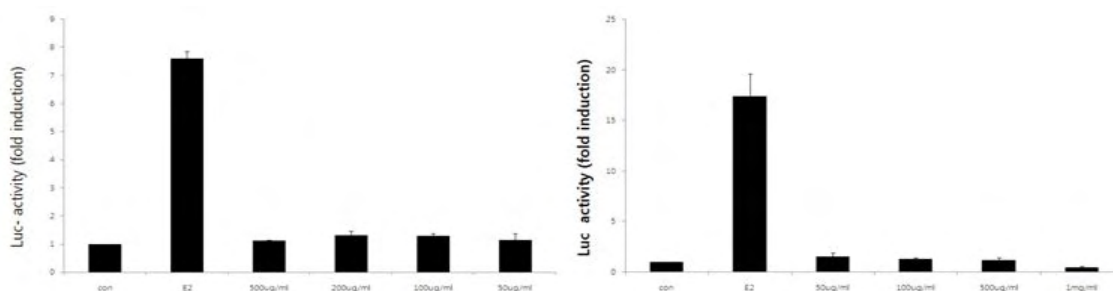


Fig 2. 승마 추출물이 사용한 농도 범위 내에서는 에스트로젠 수용체 알파와 베타의 활성에는 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다.

#### 첨가물이 함유된 승마 추출물의 활성분석

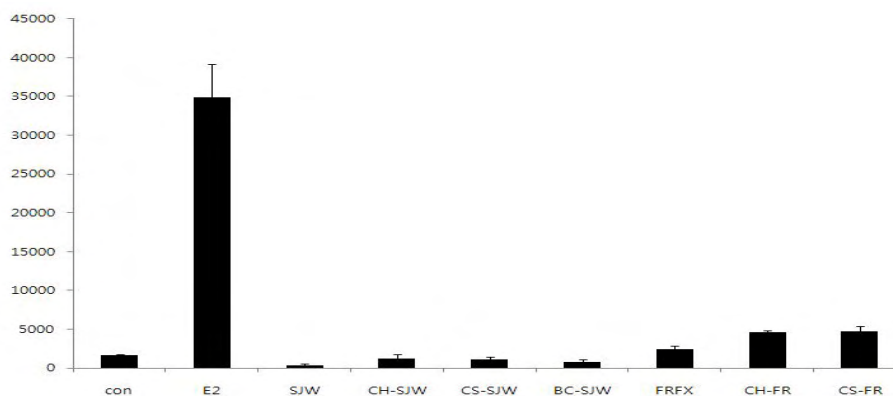


Fig 3. St John's Wort 가 포함된 승마에서는 에스트로젠 수용체 알파의 변화를 주지 못하였고, FR(Flavonoid Rich Fraction)이 포함된 승마 추출물은 대략 2배 정도의 증가가 관찰되었다.  
 BC : 아메리카 승마, CH : 세잎 승마, CS : 촛대 승마,  
 SJW : St John's Wort, FR : Flavonoid Rich Fraction

3차년도부터 받은 승마 함유 복합 추출물의 여성호르몬 수용체에 대한 작용분석을 통해서 여성 호르몬 수용체 알파와 베타를 통한 직간접 활성 규명을 위해서 리포터 활성을 측정 하였다.

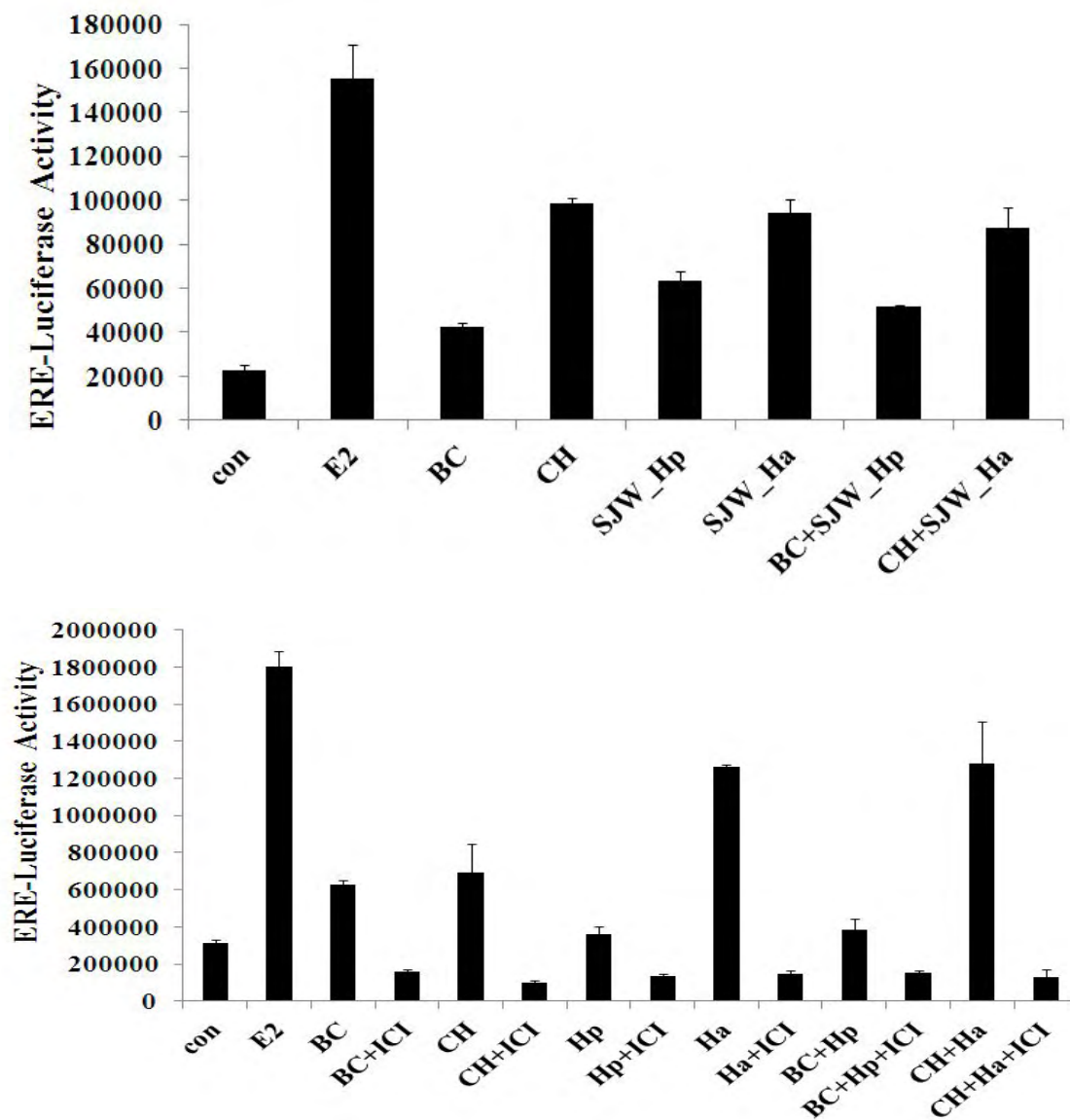


Fig 4. MCF-7 세포에 ERE-luc 0.5 ug 씩 trnasfection후에 각각의 승마 함유 복합 추출물샘플들을 300ug/ml 씩 처리하여, 24h 후에 전사활성을 측정하였다. BC: 아메리카 승마, CH: 세잎승마, Hp: St John's wort, Ha: 물레나물 BC(or CH) 9.2mg +SJW\_Hp(or SJW\_Ha) 112mg 섞어서 사용

또한 승마 함유 복합 추출물에서는 에스트로젠 수용체 알파의 변화를 주었으며, 승마 추출물은 대략 2배 이상의 증가가 관찰되었다. 또한 Estrogen receptor (ER) antagonist인 ICI 182,780을 처리하였다. 세잎승마인 BC 와 St John's wort 인 Hp를 같이 처리한 샘플과 Hp: St John's wort, Ha: 물레나물을 각각 처리했을 때 E2와 비슷한 전사활성을 보여주었다.

#### · 에스트로젠 수용체 단백질 발현의 변화

자생종 승마 추출물의 4개를 분획에 대해 일차적으로 리포터 분석을 수행하였다. MCF-7 세포주를 RPMI + 5% ST-FBS 하에서 배양한다. 18-24시간이 흐른뒤 추출물을 처리하여 활성을 검색한다. 추출물은 500ug/ml 을 처리하고 24시간 후에 protein preparation 을 수행하고 western analysis 로 분석 하였다.

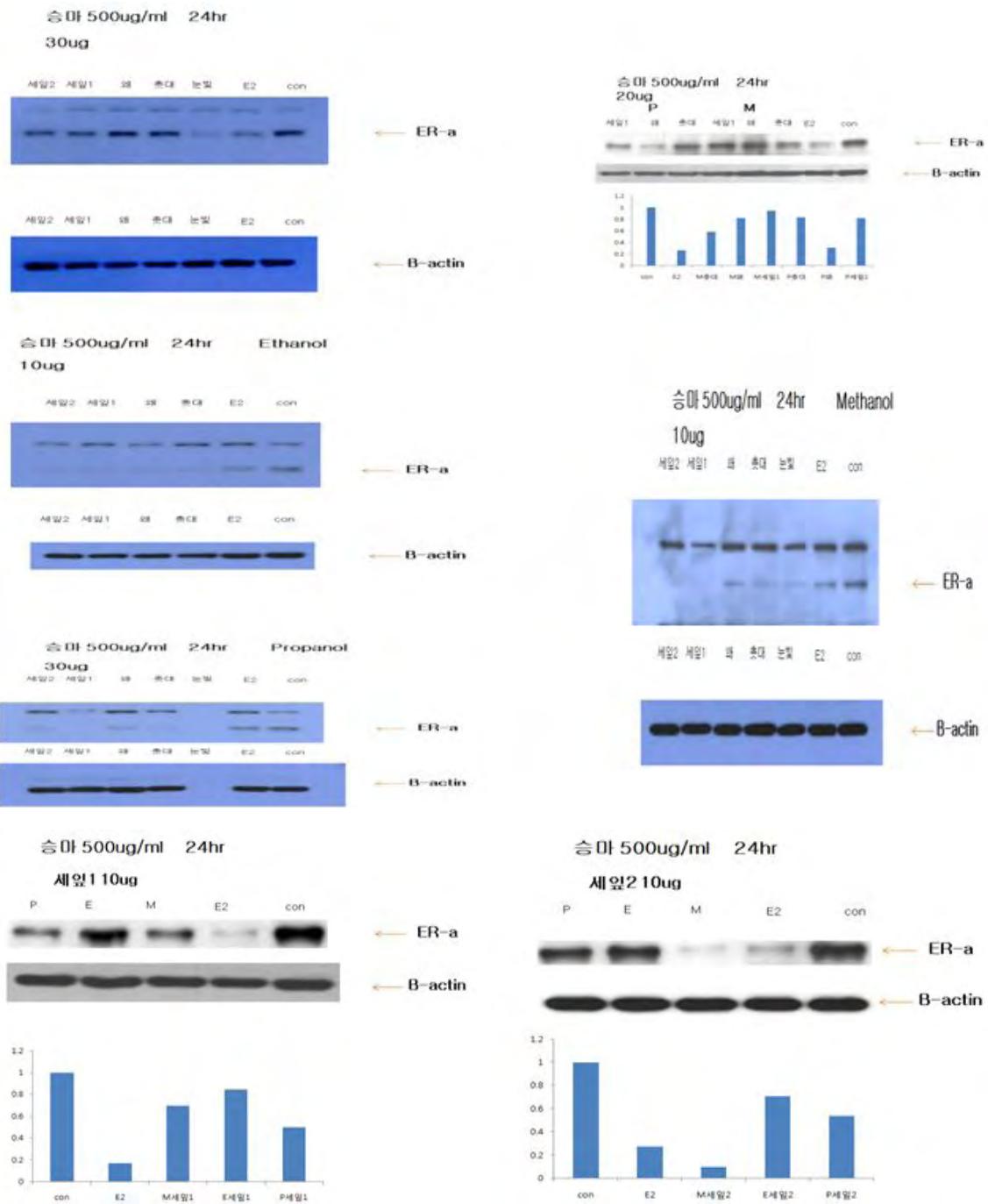


Fig 5. 모든 승마에서 E2 보다 더 감소되었으며, 눈빛 승마를 처리 시 세포가 많이 떨어지는 성향으로 죽는 패턴을 보였다. 따라서 눈빛 승마를 제외한 다른 승마 실험을 한 결과 세잎1승마, 세잎2승마 반응이 다른 승마에 비해서 4차 제법을 통해서도 일정하게 변화되는 모습을 보여주고 있어 이 2개를 중점적으로 실험을 한 결과를 그림으로 나타내었다.

세잎승마는 control에 비하여 에스트로젠 수용체 알파의 단백질 발현량이 감소 하였으며, methanol 세잎2에서 E2 보다 더 많은 감소를 나타내었다. CON 에 비해 methanol 세잎2의 감소는 E2 보다 절반가량 더 많은 감소로 인해 10배의 감소를 보여 주고 있으며, Ethanol(E),  $\beta$ -propanol(P) 의 세잎 2도 평균적으로 절반 정도의 감소를 나타내었다. 세잎 1 도 세잎2 보다는 감소량이 적지만 비슷한 성향으로 감소되는 패턴 을 나타내었다.

에스트로젠 수용체의 활성은 에스트로젠 수용체 단백질의 양과 비례하며, 일시적 인 에스트로젠 수용체의 소실과도 깊은 연관이 있다. 또한 장기적인 측면에서도 에스 트로젠 수용체의 양은 에스트로젠 신호 전달체계에 영향을 미친다. 이러한 이유로, 승 마 추출물이 에스트로젠 수용체 자체의 단백질 농도에 미치는 영향을 분석하였다.

MCF-7 세포주를 RPMI + 5% ST-FBS 하에서 배양한다. 18-24시간이 흐른뒤 식품 연구원으로부터 전달 받은 승마 추출물을 처리하고 24시간 후에 protein preparation 을 수행하고 western analysis 로 분석 하였다.

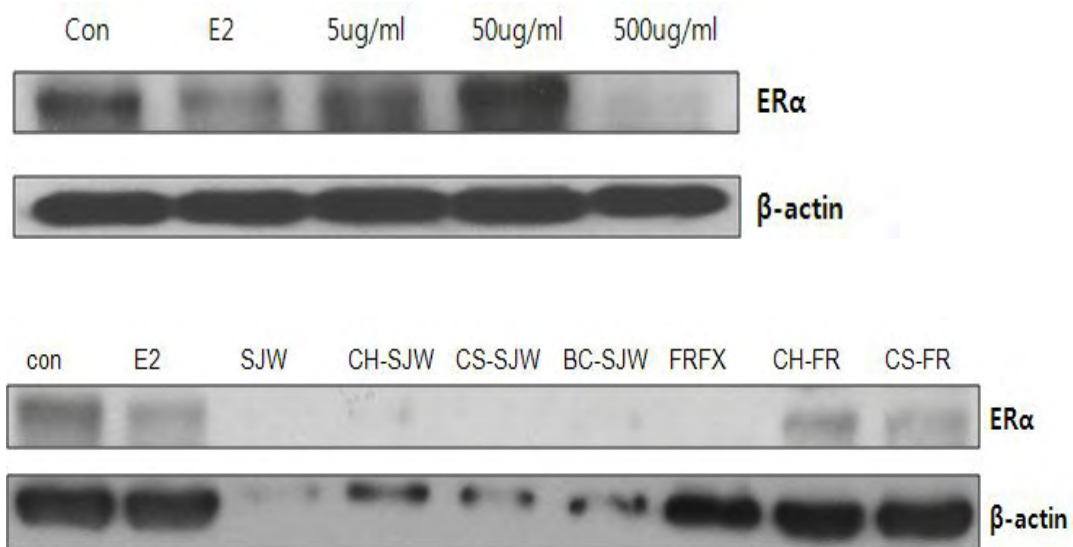


Fig 6. BC : 아메리카 승마 CH : 세잎 승마 CS : 좃대 승마 SJW : St John's Wort, FR : Flavonoid Rich Fraction: St John's Wort 는 세포사멸 효과가 나타나 단백질이 충분히 회수되지 못하였고, Flavonoid Rich Fraction이 포함된 승마 추출물은 E2 와 유사하게 에스트로젠 수용체를 분해하는 효과를 나타내었다.

2) 각 추출물의 유방암세포에 미치는 부작용 평가

- 유방암 세포 증식에 대한 평가 및 간과 자궁에 대한 조직 변화 검사
- 유방암 세포증식에 대한 평가

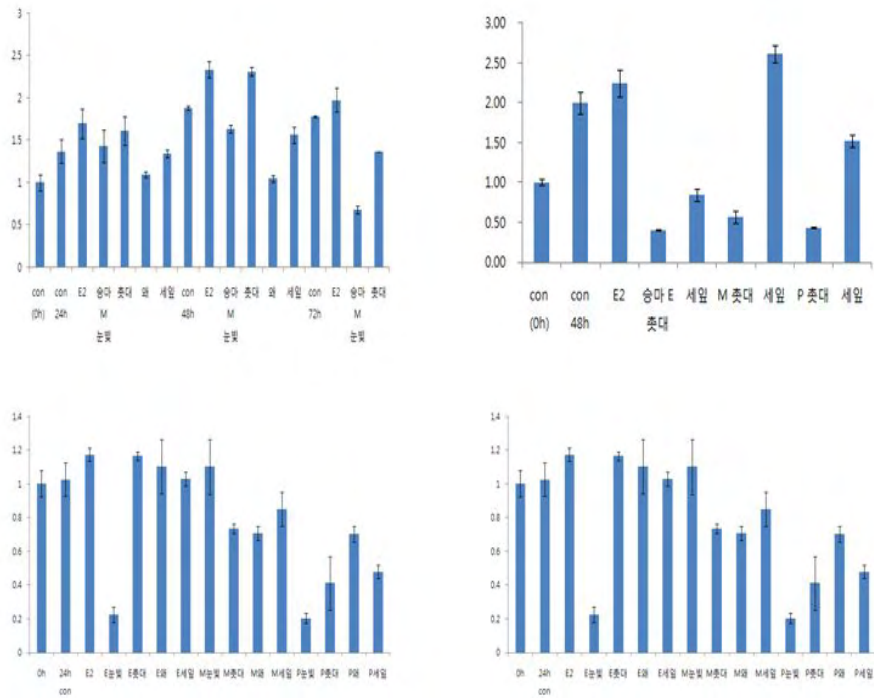


Fig 7. MTT assay 수행결과 control에 비해 세포증식을 이상적으로 증식시키는 분획은 없는 것으로 판단되었다.



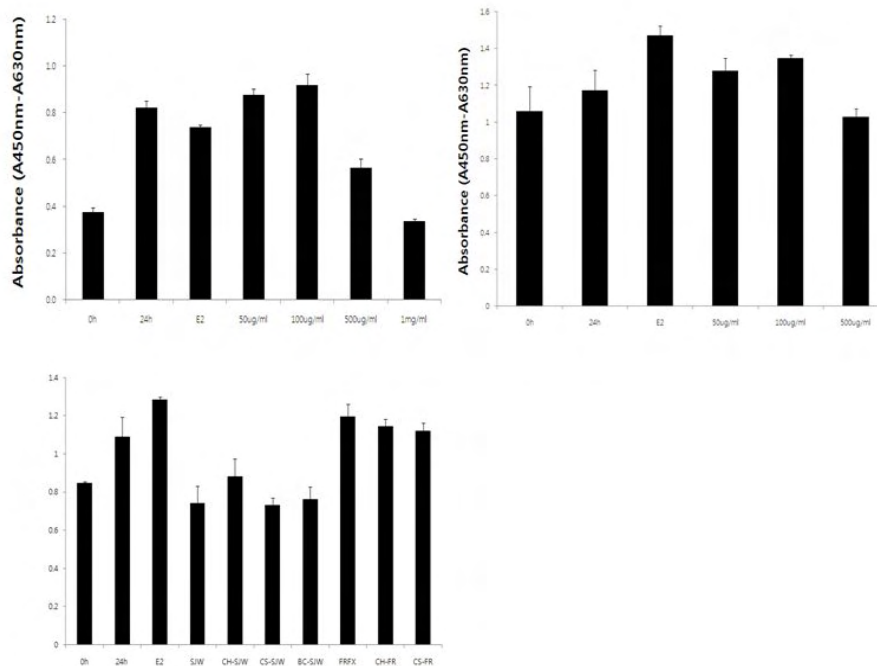
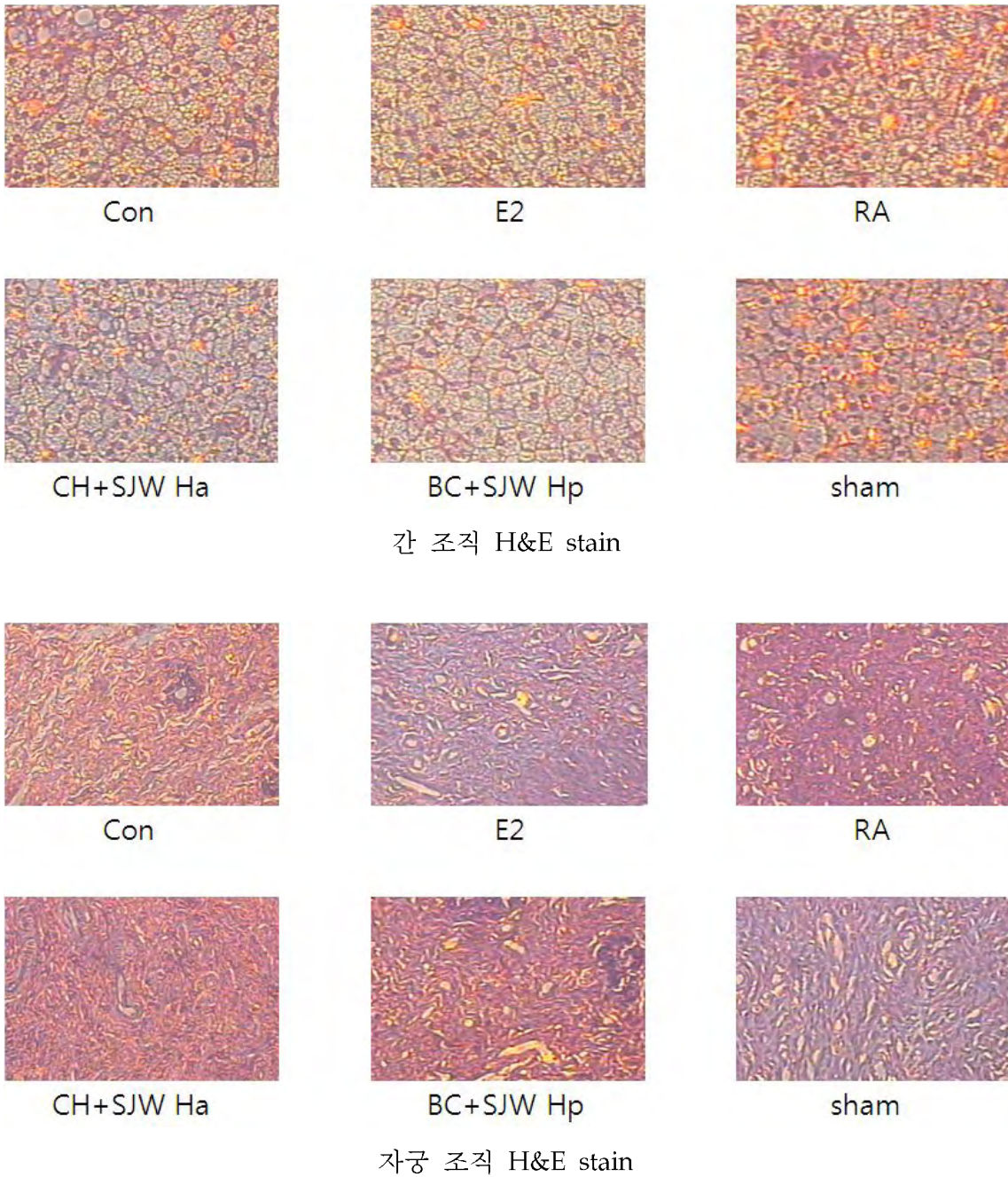


Fig 8. 96well plate에 MCF-7 세포 부유액을  $0.5 \times 10^4$  cell/well 농도로 넣어준다. 하루 동안 incubation을 시킨 후 배지를 교환한 후 약물  $500 \mu\text{g/ml}$ 을 처리한다. 약물 처리 3일 후 배지를 제거한 후 WST-1  $10 \mu\text{l/well}$  를 처리한다. 1시간 incubation 후에 ELISA leader(450-630nm)에서 수치를 측정한다.

MCF-7 세포의 cell growth를 본 결과 승마 추출물을 고 농도로 처리하였을 경우, 세포사멸을 유도하였다. St. John's wart추출물은 세포사를 유발하였고, flavonoid rich fraction은 세포사를 유도하지 않았다.

간과 자궁에 대한 조직변화



BC: 아메리카 승마, CH: 세잎승마, Hp: St John's wort, Ha: 물레나물  
 BC(or CH) 9.2mg +SJW\_Hp(or SJW\_Ha) 112mg 섞어서 사용

Fig 9. 각 시료를 백서에 투여후 자궁과 간조직을 검사한 결과임

## 2. 승마 함유 복합 추출물의 여성호르몬 수용체에 대한 작용 및 기전 분석

### 1) 에스트로젠수용체 표적유전자의 변이 및 혈관신생 효능 분석

#### ER $\alpha$ mRNA의 발현 분석

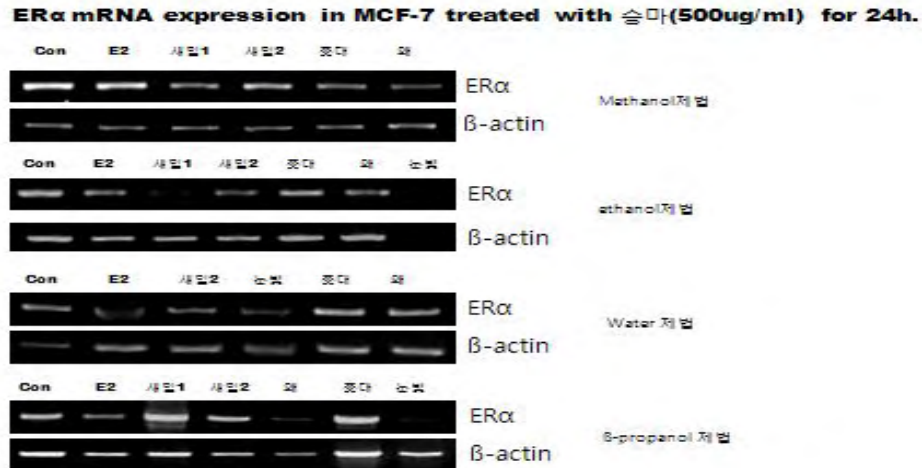


Fig 10. 유방암세포주인 MCF-7 세포는 10%FBS RPMI1640에 배양한뒤 각 제법대로 추출한 승마추출물과(500ug/ml), 17 $\beta$ -estradiol(E2, 10nM)을 24시간 처리한뒤, ER $\alpha$ , PR, ps2 mRNA를 real time RT-PCR을 통해 분석하였다. 우선 ER $\alpha$  mRNA 4가지 제법을 이용해서 실험을 한 결과 승마의 제법에서 E2가 감소하는 결과를 보여주며 특히 눈빛 승마에서는 세포가 떨어지는 패턴을 보이면서 죽는 성향을 나타내어 ER $\alpha$  mRNA 의 발현이 감소하는 것으로 나타났다.

### 에스트로젠 수용체 관련 표적 유전자의 발현에 미치는 영향 분석

Real time RT-PCR을 이용해서 MCF-7 에 각각종류의 승마를 제법에 따라 처리할 때 E2와의 비교를 확인하였다.

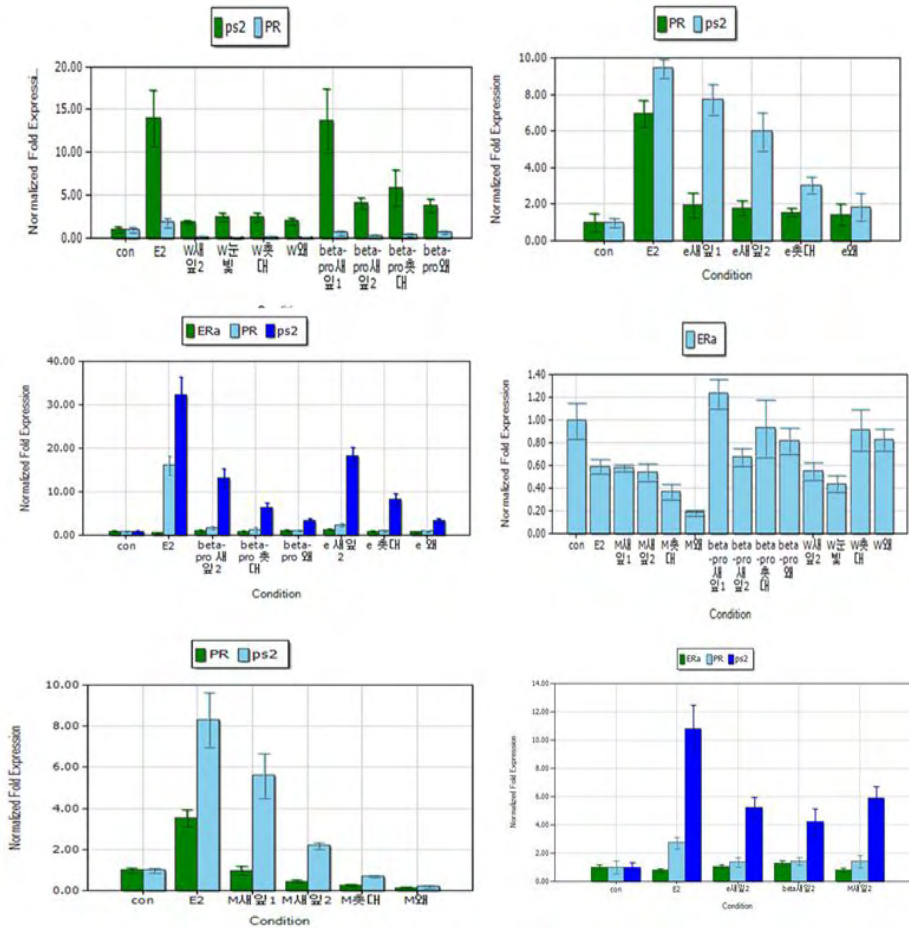


Fig 11. Real-time PCR 결과 PR, PS2를 같이 처리한 결과 E2와 승마에 증가하는 패턴을 보여주었다. E2 만큼의 변화를 보이지 않으나 그중에서 세잎 승마에서 다른 것에 비해 증가율이 큰 것을 알 수 있었다. 에스트로젠에 의해 발현이 조절되는 발현량의 변화를 확인하기 위해서 승마의 종류 중 가장 변화가 좋은 세잎 승마를 중점으로 제법에 따라 Era, PR 그리고 PS2를 처리 시 이전의 실험과 같이 PR, PS2 유전자의 발현이 승마처리에 의해 높은 증가율을 보여 주었다.

### 에스트로젠수용체 표적유전자의 변이 분석

유방암 세포주인 MCF-7 세포를 5% ST-FBS RPMI1640 에 배양하여 17 $\beta$ -estradiol(E2) 10nM, 승마추출물 50, 100, 500ug/ml을 24시간 처리하여 ER $\alpha$ , PR, pS2, VEGF mRNA 수준을 real-time PCR로 분석하였다.

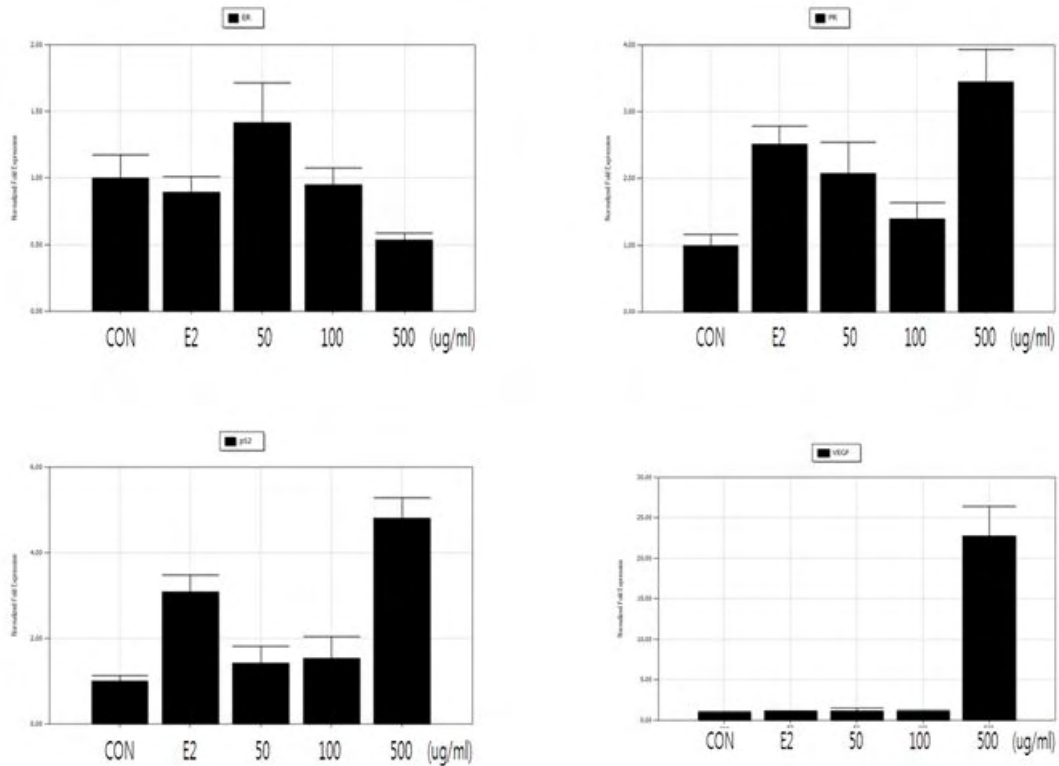


Fig 12. 승마 추출물에 의한 pS2, PR, VEGF, ER 유전자 발현의 변화

ESR1 유전자 실험 결과 승마추출물 500ug/ml 농도를 처리하였을 때 ESR1 유전자 감소가 나타났으며, PR의 mRNA 수준은 승마추출물 50, 100, 500ug/ml 처리한 모든 농도에서 증가를 보였다.

pS2는 승마추출물 50, 100ug/ml 농도에서는 효과를 잘 볼 수 없었지만 500ug/ml 농도에서 pS2 발현의 증가를 볼 수 있었다. VEGF는 승마추출물 50, 100ug/ml 농도에서는 효과가 나타나지 않았으나 500ug/ml 농도에서 VEGF의 발현이 증가함을 볼 수 있었다. 이러한 표적 유전자 발현은 승마 추출물이 비록 직접적으로 에스트로젠 수용체를 활성화시키지는 못하여도 간접적으로 에스트로젠 수용체 신호전달체계에 있는 활성인자를 자극하여 에스트로젠 수용체 표적 유전자의 발현을 조절한다고 여겨진다.

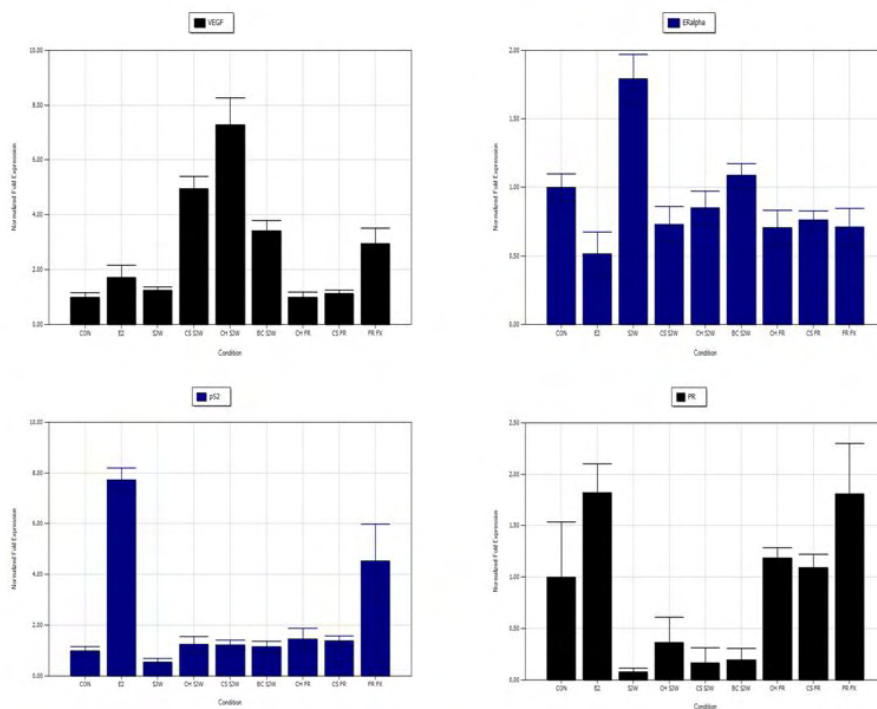
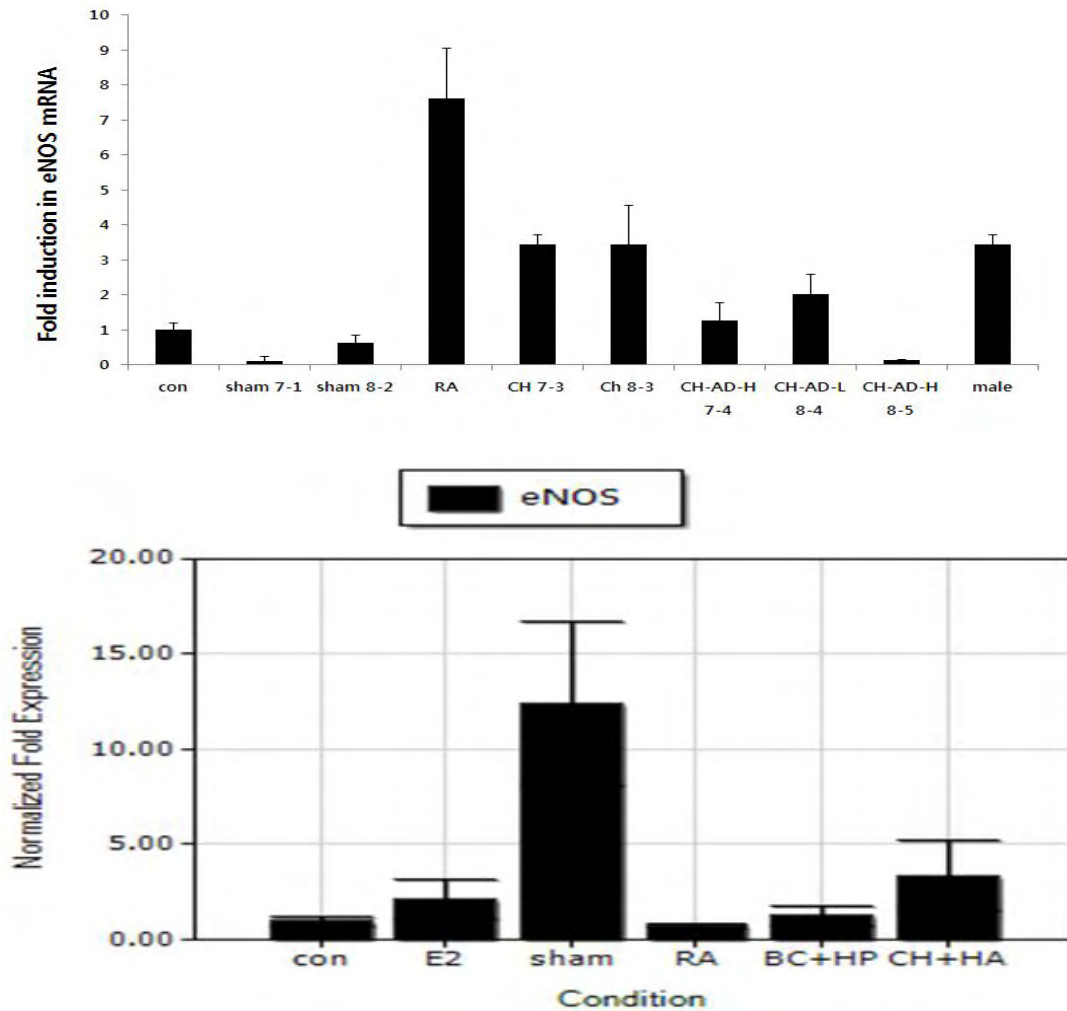


Fig 13. 각 추출물이 함유된 승마 혼합물에 의한 ER, VEGF, PR, pS2 유전자 발현의 변화 (BC : 아메리카 승마, CH : 세잎 승마, CS : 쫓대 승마, SJW : St John's Wort, FR : Flavonoid Rich Fraction)

PR mRNA level은 CON대비 SJW와 SJW 혼합 승마에서는 감소하는 것으로 나타났고 CH FR, CS FR, FR FX 처리했을때는 발현의 증가가 보이지 않았다. pS2 발현은 FR FX 처리하였을 때 증가함을 볼 수 있었습니다. ERalpha 발현은 CS SJW, CH SJW, CH FR, CS FR, FR FX에서 약간 감소함을 보였다. VEGF mRNA level은 CS SJW, CH SJW, BC SJW, FR FX에서 증가함을 보였다.

여성호르몬 기전을 통한 혈관신생 관련 유전자에 대한 작용 분석



Sham = 수술 스트레스

RA = Raloxifene (2.5mg/kg/day)

CH = 세잎승마 40%-2-propanol (23mg/kg/day)

CH-AD-H = 세잎승마 flavonoid rich fraction (23mg/kg/day)

CH-AD-L = 세잎승마 flavonoid rich fraction (2.5mg/kg/day)

Male 시료를 넣지 않음.

Fig 14. 승마 함유 복합 추출물을 먹인 후 9주된 Sprague-Dawley rat을 7주 동안 경구 투여를 한후 흉부 대동맥을 분리해서 eNOS RT-PCR을 하였다.

$\beta$ -actin sense primer, 5'-CCTGACCCTGAAGTACCCCA-3'; antisense primer, 5'-CGTCATGCAGCTCATAGCTC-3',

eNOS sense primer, 5'-TTCTGGCAAGACCGATTACACGAC-3'; antisense primer 5'-AAAGGCGGAGAGGACTTGTCCAAA-3

혈관확장을 본 결과 난소를 제거한 rat 에서의 E2와 비슷한 영향을 주는 CH+HA(CH: 세잎승마, , Ha: 물레나물)로 볼 수 있다.

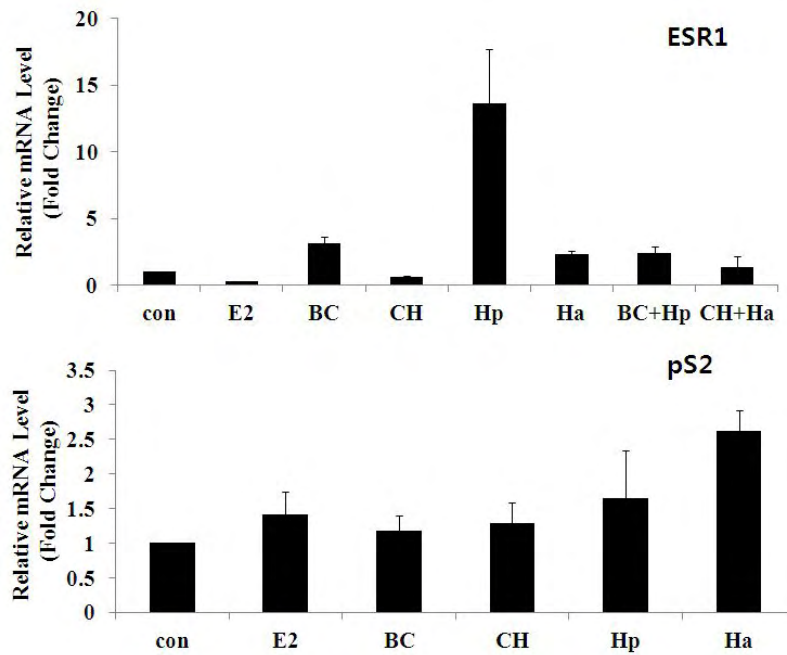


Fig 15. Real-time PCR 결과 ESR1, PS2를 같이 처리한 결과 E2와 승마 함유 추출물에 변화되는 mRNA level을 본 결과다. E2 만큼의 변화를 보이지 않으나 ESR1에서 세잎 승마(CH)에서 다른 것에 비해 E2와 비슷한 영향을 준것으로 알 수 있었다. 에스트로젠에 의해 발현이 조절되는 발현량의 변화를 확인하기 위해서 승마 함유 추출물의 mRNA 수준에서 본 결과다.

( $\beta$ -actin sense primer, 5'-CCTGACCCTGAAGTACCCCA-3'; antisense primer, 5'-CGTCATGCAGCTCATAGCTC-3',

pS2 sense primer, 5'-CATGGAGAACAAGGTGATCTG-3'; antisense primer 5'-CAGAAGCGTGTCTGAGGTGTC-3',

ESR1 sense primer, 5'-ACGACTATATGTGTCCAGCC-3' antisense primer, 5'-GGCGCTTGTGTTTCAACATT-3.)



## 혈관신생 효능 분석

### VEGF 활성 측정

24well plate에 MCF-7 세포 부유액을  $0.5 \times 10^4$  cell/well 농도로 넣어준다. 하루 동안 incubation을 시킨 후 배지를 교환한 후 승마추출물을 농도별로 처리한다. 약물 처리 24h 후 배지를 모은 후 Quantikine; R&D Systems 제품을 이용해 Human VEGF Immuniassay 를 측정한다. RD1W 를 50ul씩 각각의 well에 넣고 모와 둔 배지 및 Standard, control 을 200ul 씩 넣고 커버를 씌우고 2시간 동안 상온에 대기한다. Wash Buffer 를 이용해서 400ul 씩 3번 세척을 한 다음 VEGF 를 각각 200ul 씩 넣고 다시 커버를 씌우고 2시간 상온에서 대기한다. 다시 Wash Buffer 를 이용해서 400ul 씩 3번 세척을 하고 Substrate Solution 을 200ul 씩 넣고 20분 대기한다. 마지막으로 Stop Solution 을 50ul씩 넣고 ELISA leader(450-540nm)에서 수치를 측정하였다.

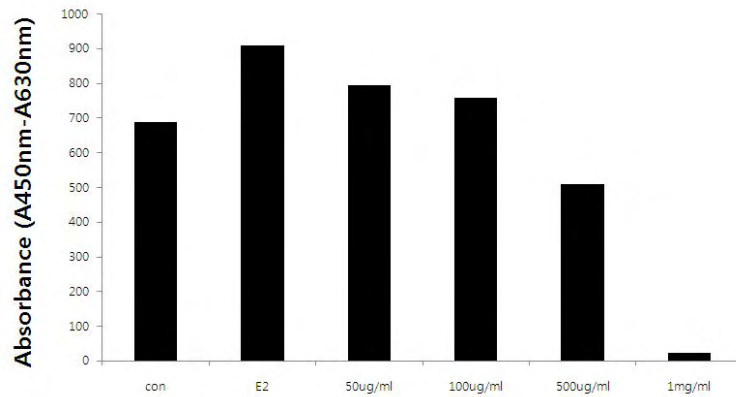


Fig 16. MCF-7 세포의 단백질 분비량을 본 결과 승마 추출물을 높은 농도로 처리하였을 경우, 승마 추출물을 500ug/ml 이상으로 처리하였을 경우 분비량이 거의 없다. 저농도에서는 VEGF 분비가 증가되는 현상을 관찰하였다.

### 3. VSMC에서의 PAI-1 발현에 미치는 영향분석

#### 1) RT-PCR을 이용한 PAI-1 발현에 미치는 영향분석

##### 혈관평활근세포의 분리

3개월된 Sprague-Dawley rat에서 흉부 대동맥을 제거하여 혈관평활근세포를 분리한다. 혈관에서 주위의 loose connective tissue를 없애고 enzyme dissociation mixture (Weymouth's M13 752/1 medium, 1 mg/ml type 2 collagenase, 0.25 mg/ml elastase, 1 mg/ml soybean trypsin inhibitor, 2 mg/ml BSA)에 담가 37°C에서 10분간 반응시킴으로써 혈관내벽세포를 제거하고 adventitia와 media의 분리를 용이하게 한다. 해부현미경하에서 fine forceps을 이용하여 adventitia를 박리한 후 2-3 mm의 크기로 잘게 자른다. Medial tissue를 다시 enzyme dissociation mixture에 담아 gyratory shaker내에서 37°C에서 60분간 반응시킨다. 혈관평활근세포가 분리되어 enzyme dissociation mixture가 현탁해지면 fetal bovine serum을 최종 농도가 20%가 되도록 첨가하여 효소를 비활성화 시킨 후 소독된 gauze로 걸러 digestion되지 않은 찌꺼기를 제거한다. 4°C에서 1000rpm으로 5분간 원심분리 후 세포배양액(DMEM/F12 supplemented with 10% FBS, 100mg/ml penicillin, 0.1mg/ml streptomycin)에 재부유시켜 25cm<sup>2</sup>세포배양 flask에 2~5×10<sup>3</sup>세포/cm<sup>2</sup>의 농도로 plating한다. 세포는 37°C humidified 5% CO<sub>2</sub>/95%air환경에서 키우며 24~48시간 후 첫 배양액을 교환하여 주고 그 후로는 48~72시간 간격으로 배양액을 교환한다. 세포들을 1 : 3~1 : 5의 비율로 계대 배양하며 5~10번 계대한 후의 세포를 실험에 사용한다. 100 mm dish에 분주된 세포들이 confluence 상태에 도달하면 defined serum-free medium(DSF ; DMEM/F12 medium containing insulin 5×10<sup>-7</sup> M, transferrin 5mg/ml, ascorbic acid 0.2mM)로 배양액을 교환 후 48시간 배양하여 quiescent 상태로 만든 후, 세잎 승마 (Flavonoid rich fraction)를 처리한다. Vitamin E (sigma), ICI 182, 780 (Tocris)는 세잎 승마 처리 30분 전에 전처리 한다.

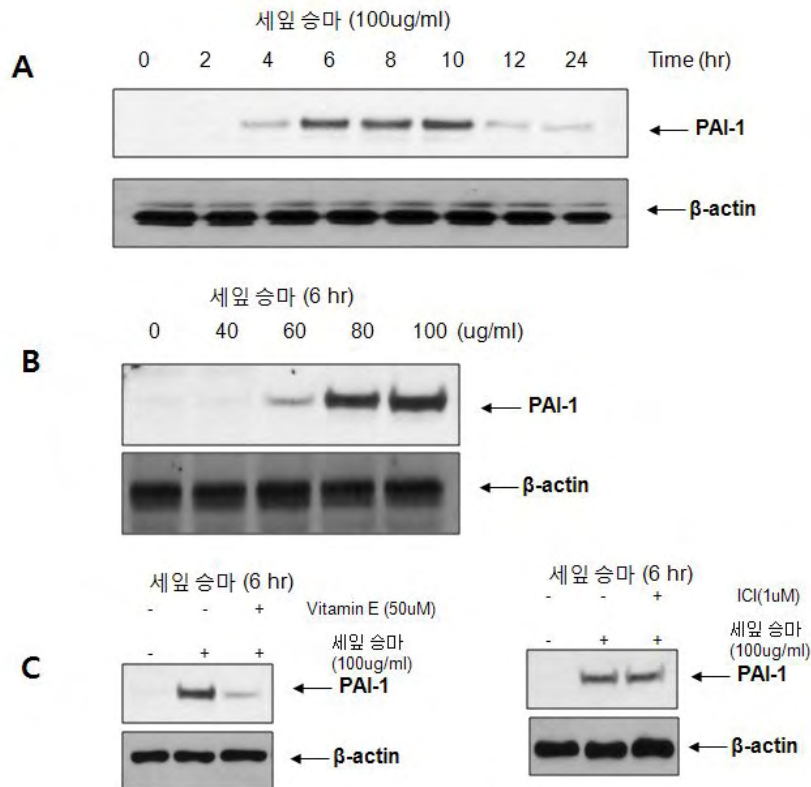


Fig 17. (A) 혈관평활근세포에 세잎 승마(Flavonoid rich fraction) 추출물 100 $\mu$ g/ml 처리한 후 PAI-1 발현의 시간에 따른 변화를 Western blot을 통해 확인 하였다. 그 결과 4시간 이후부터 발현이 증가 되어 12시간 이후에 감소하는 양상을 나타내었다. (B) 세잎 승마 추출물의 처리가 PAI-1 발현에 농도 의존성이 있음을 확인 하였다. (C) ROS inhibitor인 Vitamin E (50 $\mu$ M)는 세잎 승마 추출물에 의해서 유도된 PAI-1의 발현을억제 시킬 수 있었다. Estrogen antagonist ICI 182, 780 (1 $\mu$ M)은 아무런 영향을 미치지 않았다.

2) fibrin overlay/reverse fibrin overlay zymography에 의한 t-PA/PAI-I 활성화 측정

#### Reverse fibrin overlay Zymography

PAI-1의 활성도를 측정 하기 위해 samples를 SDS loading buffer에 혼합하여 10% polyacrylamide gel에 전기영동 시킨 후, gel을 2.5% Triton X-100로 washing 한다. 0.17 IU/mL bovine thrombin (calbiochem), 25 $\mu$ g/mL humanplasminogen (Sigma), 0.05IU/mL urokinase (calbiochem), 1.0%agarose, 2.3mg/mL humanfibrinogen (Sigma)이 포함된 1.0% agarose gel에 polyacrylamide gel을

overlay 한다. 37°C에서 2-4 시간 반응 시킨다. Gel doc의 White-light transilluminator를 이용하여 cleared background에서 dark band를 확인한다.

### Fibrin overlay Zymography

tPA의 활성도는 0.17 IU/mL bovine thrombin (calbiochem), 25 $\mu$ g/mL human plasminogen (Sigma), 1.0% agarose, 2.3mg/mL human fibrinogen (Sigma)이 포함된 1.0% agarose gel에 overlay 한다. 37°C에서 Light band가 보이도록 24-36시간 반응 시킨다.

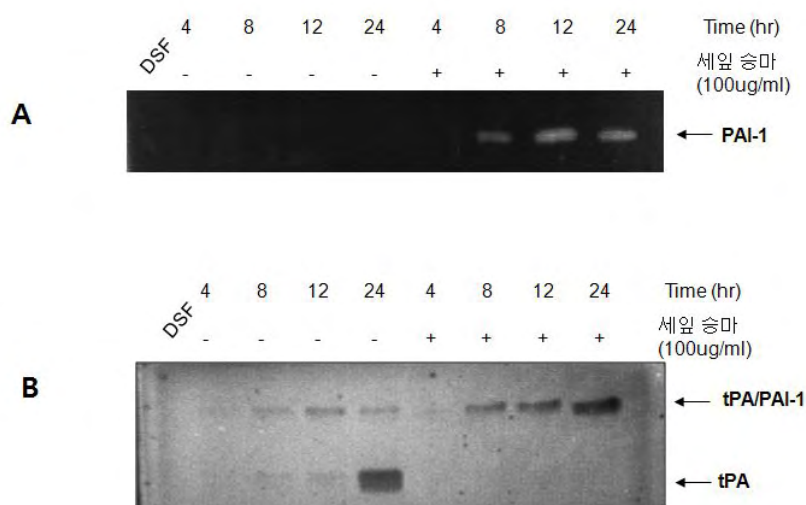


Fig 18. (A) 세잎 승마 추출물에 의해 PAI-1의 활성도가 조절 되는지 알아보하고자 Reverse fibrin overlay Zymography를 수행하였다. PAI-1의 활성도가 세잎 승마 추출물을 처리 했을 때 처리하지 않은 실험군에 비해 현저하게 증가 되는 것을 관찰 할 수 있었다. (B) 세잎 승마 추출물이 tPA의 활성도에 미치는 영향을 조사해 보고자 Fibrin overlay Zymography를 수행하였다. 세잎 승마 추출물을 처리하지 않은 실험군에서는 시간에 따라 tPA의 single form이 증가한 반면 세잎 승마 추출물을 처리 했을 때는 tPA의 single form은 현저하게 감소하고 tPA/PAI-1 complex form이 증가 하였다.

#### 4. VSMC 고사 억제 작용 및 기전 분석

##### 1) 세포내 ROS에 대한 영향

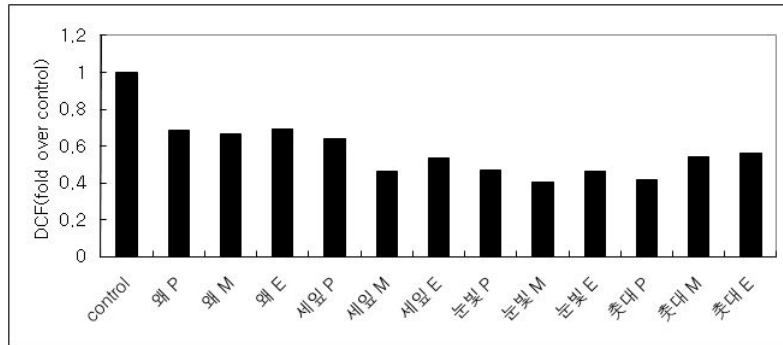


Fig 19. Luciferase assay를 이용한 활성분석

혈관평활근세포의 세포내 ROS 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 10uM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H2DCFDA; calbiochem) 염색을 통해 세포 내의 ROS 발현을 측정하였다. 12가지 승마 함유 복합 추출물의 처리는 대조군에 비해 ROS 생성을 크게 감소시켰다. 처리한 후 세포의 증식 정도를 BrdU incorporation assay 통하여 확인하였다. 12가지 승마 함유 복합 추출물을 각각 300 ug/ml의 농도로 처리된 세포에서 23%에서 31%까지 세포 증식이 억제 되었다. 또한 100 ug/ml의 농도에서도 14%에서 24%가량의 세포 증식이 억제 되었다.

##### VSMC 증식억제 활성 및 작용기전 분석

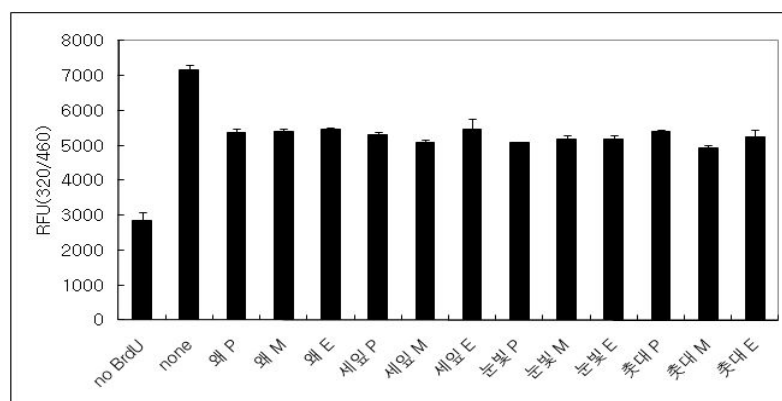


Fig 20. 12가지 승마 함유 복합 추출물이 각각 혈관평활근세포의 증식에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 12가지 승마 함유 복합 추출물을 각각 100ug/ml과 300ug/ml의 농도로 24시간 처리한 실험이다.

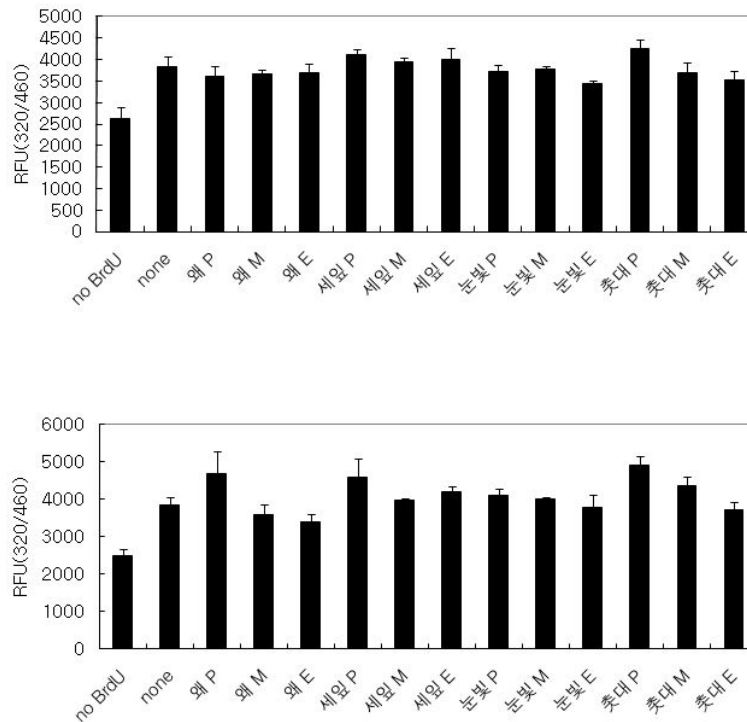


Fig 21. 96 well plate에 혈관평활근세포를 배양한 후, 세포들이 70% confluence 상태에 도달하면 defined serum-free medium (DSF; DMEM/F12 medium, 50uM insulin, 5mg/ml transferrin, 0.2mM ascorbic acid)로 배양액을 교환 후 48시간 배양한 다음 12가지 승마 함유 복합 추출물을 100ug/ml 과 300ug/ml 농도로 각각 24시간 처리한 결과 quiescent 상태에 있는 혈관평활근세포의 증식에는 일부 세포의 세포증식이 증가 하였으나 대부분의 세포들에서는 아무런 영향을 미치지 못했다.

## 2) LysoPC에 의한 VSMC 고사 억제 효능 평가

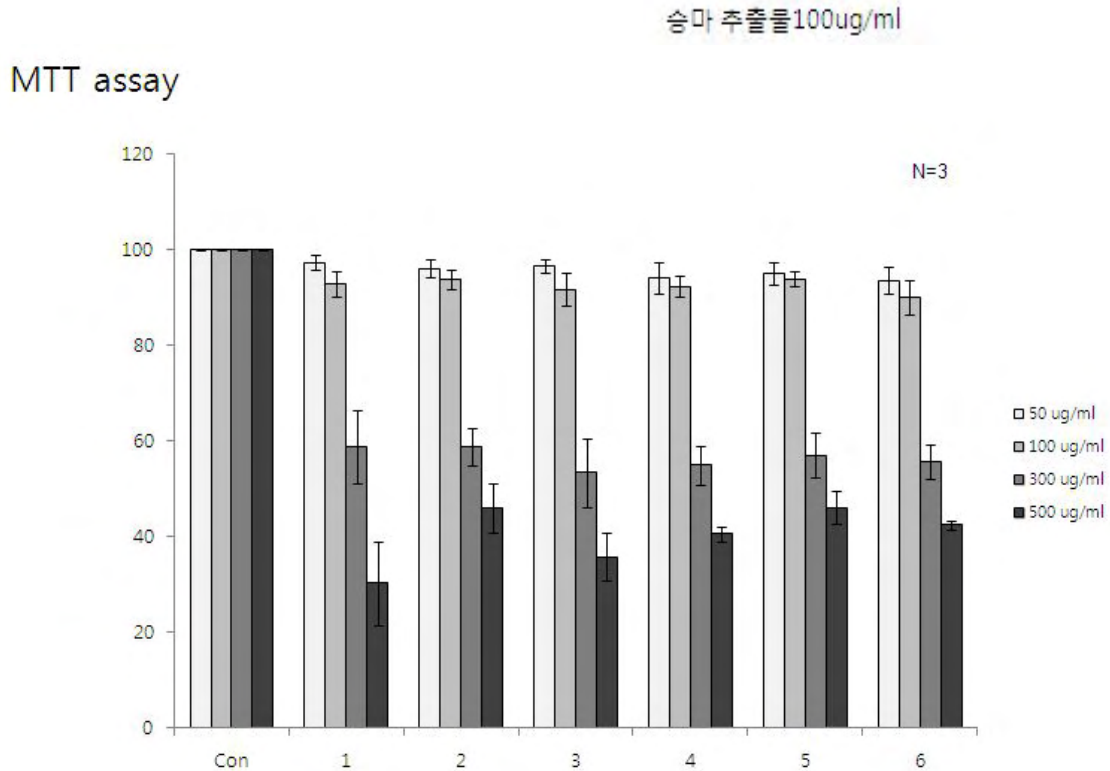


Fig 22. 승마 추출물이 LysoPC에 의한 혈관평활근세포 사멸에 미치는 영향과 기전 분석  
 Con: Control, 1: Black cohosh, 2: 세잎 승마 3: SJW, 4: 물레나물, 5: (1+3), 6: (2+4)

6가지 승마 추출물(Black cohosh, 세잎 승마, St john's wort, 물레나물, black cohosh+SJW, 세잎승마+물레나물)을 처리 후 혈관 평활근세포의 생존율을 알아 보고자 MTT assay를 수행하였다. 혈관 평활근세포에 50, 100, 300, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 승마 추출물을 처리 하고 24시간 후 세포의 생존율을 분석 하였다. 그 결과 승마 추출물을 처리한 세포군에서 농도 의존적으로 세포 생존율이 감소 되었음을 확인할 수 있었다.

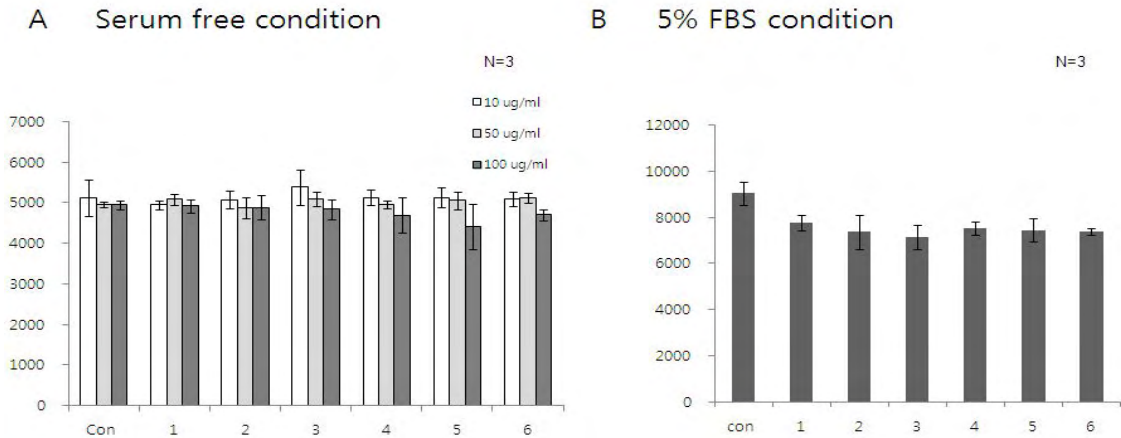


Fig 23. Con: Control, 1: Black cohosh, 2: 세잎 승마 3: SJW, 4: 물레나물, 5: (1+3), 6: (2+4)

6가지 승마 추출물이 각각 혈관평활근세포의 증식에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 각각 10, 50, 100 µg/ml의 농도로 24시간 처리한 후 세포의 증식 정도를 BrdU incorporation assay 통하여 확인하였다. Serum free 조건에서는 거의 영향을 미치지 않았지만 (A), 5% FBS가 첨가된 조건에서는 100 µg/ml의 승마 추출물 처리 세포군에서 세포 증식이 억제되었다(B).

Cell death : PI staining

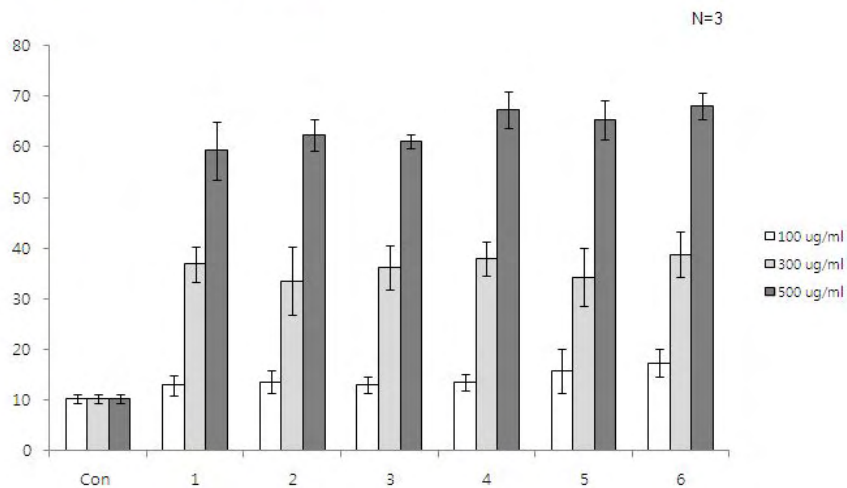


Fig 24. 6가지 승마 추출물이 혈관 평활근세포의 사멸에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 PI staining을 수행하였다. 그 결과 6가지 승마 추출물을 처리한 세포군에서 모두 농도 의존적 세포 사멸이 유도되었음을 확인할 수 있었다.



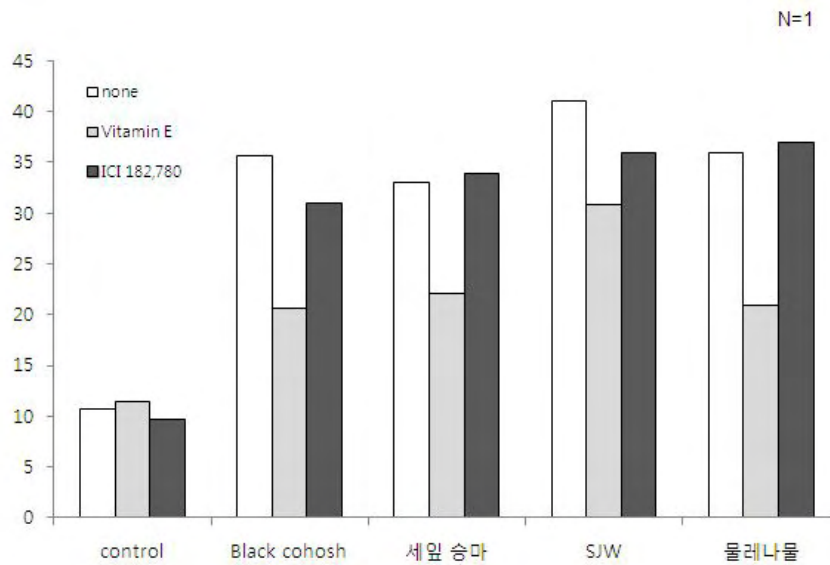


Fig 25. Effect of Vitamin E, ICI on 승마 추출물 induced cell death

승마 추출물에 의한 혈관 평활근세포의 사멸에 ROS와 estrogen receptor가 관련이 있는지 알아보려고 Vitamin E (ROS inhibitor) 또는 ICI 182, 780(estrogen receptor antagonist)를 함께 처리 하여 FACS를 이용한 PI staining을 수행하였다. 실험 결과 Vitamin E (ROS inhibitor)를 처리 했을 경우 LysoPC에 의해 유도된 혈관 평활근세포의 사멸이 감소됨을 볼 수 있었으나 ICI 182, 780(estrogen receptor antagonist)를 처리 했을 경우에는 Black cohosh 와 SJW를 함께 처리한 세포군에서는 감소를 관찰 할 수 있었지만 세잎 승마, 물레나물을 처리한 세포군에서는 아무런 영향이 없었다.

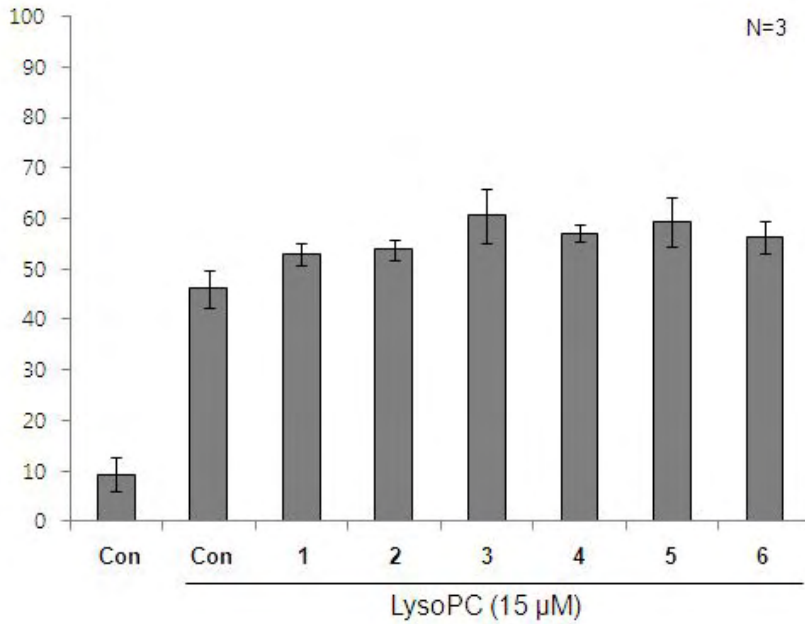


Fig 26. Con: Control, 1: Black cohosh, 2: 세잎 승마 3: SJW, 4: 물레나물, 5: (1+3), 6: (2+4)

LysoPC에 의한 혈관평활근세포의 사멸에 승마 추출물이 어떠한 영향을 미치는지 알아보려고 PI staining을 수행하였다. 승마 추출물은 세포 사멸을 유도하지 않는 100ug/ml 농도로 처리 하였다. 그 결과 승마 추출물은 LysoPC에 의해 유도된 세포 사멸에 아무런 영향을 미치지 않았다.

6가지 승마 추출물(Black cohosh, 세잎 승마, St john's wort, 물레나물, black cohosh+SJW, 세잎승마+물레나물) 모두 LysoPC에 의한 혈관평활근세포 사멸 억제 효과가 보이지 않았다. 추출물 종류에 따른 차이도 관찰 할 수 없었다.

혈관평활근세포에서 6가지 승마 추출물을 처리한 세포군에서 모두 농도 의존적 세포 사멸이 유도되었음을 확인할 수 있었다. 작용 기전으로 ROS가 관여 한다는 것을 알 수 있었고 Black cohosh 와 SJW를 처리한 세포군에서는 estrogen receptor가 관련 되었다는 것을 알 수 있었다.

## 참고문헌

1. The impact of the Women's Health Initiative on discontinuation of postmenopausal hormone therapy: the Minnesota Heart Survey (2000-2002). Barber CA, Margolis K, Luepker RV, Arnett DK. *J Womens Health (Larchmt)*. 13(9):975-85 (2004)
2. Phytoestrogens: recent developments. Cos P, De Bruyne T, Apers S, Vanden Berghe D, Pieters L, Vlietinck AJ. *Planta Med*. 69(7):589-99 (2003)
3. A prospective population-based study of menopausal symptoms. Dennerstein L, Dudley EC, Hopper JL, Guthrie JR, Burger HG. *Obstet Gynecol*. 96(3):351-8 (2000)
4. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E. *JAMA*. 280(7):605-13 (1998)
5. Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life. Setchell KD, Zimmer-Nechemias L, Cai J, Heubi JE. *Am J Clin Nutr*. 68:1453S-1461S (1998)
6. Complementary and alternative medicine for menopausal symptoms: a review of randomized, controlled trials. Kronenberg F, Fugh-Berman A. *Ann Intern Med*. 137(10):805-13 (2002)
7. The Herbal Alternatives for Menopause (HALT) Study: background and study design. Newton KM, Reed SD, Grothaus L, Ehrlich K, Guiltinan J, Ludman E, Lacroix AZ. *Maturitas*. 52(2):134-46 (2005)
8. Improved lipid profile in ovariectomized rats by red ginseng extract. Park Y, Kwon HY, Shimi MK, Rhyu MR, Lee Y. *Pharmazie*. 66(6):450-3 (2011)
9. Black cohosh increases metastatic mammary cancer in transgenic mice expressing c-erbB2. Davis VL, Jayo MJ, Ho A, Kotlarczyk MP, Hardy ML, Foster WG, Hughes CL. *Cancer Res*. 68(20):8377-83 (2008)
10. Efficacy and safety of isopropanolic black cohosh extract for climacteric symptoms. Osmers R, Friede M, Liske E, Schnitker J, Freudenstein J, Henneicke-von Zepelin HH. *Obstet Gynecol*. 105(5):1074-83 (2005)

11. Complementary and alternative medicine for menopausal symptoms: a review of randomized, controlled trials. Kronenberg F, Fugh-Berman A. *Ann Intern Med.* 137(10):805-13(2002)
12. Black cohosh does not exert an estrogenic effect on the breast. Ruhlen RL, Haubner J, Tracy JK, Zhu W, Ehya H, Lamberson WR, Rottinghaus GE, Sauter ER. *Nutr Cancer.* 59(2):269-77 (2007)
13. Estrogen-like effect of a *Cimicifuga racemosa* extract sub-fraction as assessed by in vivo, ex vivo and in vitro assays. Bolle P, Mastrangelo S, Perrone F, Evandri MG. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 107(3-5):262-9 (2007)
14. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. Routledge EJ, Sumpter JP. *Environ Toxicol Chem.* 15:241 - 248 (1996)
15. Antiestrogenic activities of *Cimicifuga racemosa* extracts. Zierau O, Bodinet C, Kolba S, Wulf M, Vollmer G. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 80(1):125-30 (2002)
16. Isopropanolic extract of black cohosh stimulates osteoprotegerin production by human osteoblasts. Viereck V, Gründker C, Friess SC, Frosch KH, Raddatz D, Schoppet M, Nisslein T, Emons G, Hofbauer LC. *J Bone Miner Res.* 20(11):2036-43 (2005)
17. Physiological investigation of a unique extract of black cohosh (*Cimicifugae racemosae rhizoma*): a 6-month clinical study demonstrates no systemic estrogenic effect. Liske E, Hänggi W, Henneicke-von Zepelin HH, Boblitz N, Wüstenberg P, Rahlfs VW. *J Womens Health Gend Based Med.* 11(2):163-74 (2002)

**제 2 협동연구과제명 :**  
**자생종 승마 추출물 제조 조건 확립 및**  
**시제품개발**

위탁연구기관 : 부산고려홍삼(주)

연구책임자 : 송 래 섭



## 제 1 절 서론

아메리카 승마의 여성호르몬 대체제로서의 활용은 유럽 및 북미에서 시작되어 최근에는 급격히 증가하고 있으나, 전통적 한방 용도로부터 아메리카승마와 동일한 효능을 나타낼 것으로 예상되는 동속 식물 아시아승마에 대한 인지도 및 활용도가 매우 낮은 실정으로 아시아 자생종 승마의 여성호르몬 유사활성에 대한 연구가 필요한 실정이다. 최근 아메리카승마는 단일 추출물 보다 Saint John's Wort 등 다른 식물과의 복합추출물 형태로 사용할 경우 보다 효능이 개선되는 것으로 보고되고 있으며, 한편 아시아 승마의 경우 한방에서는 이미 복합 추출물형태로 사용되어 온 다양한 자료가 존재하므로 본 연구에서는 이를 적극 활용하여 연구 목표에 도달하고자 한다. 한편, 우리나라 중북부 산간지역에는 끼떨가리, 눈뵈승마, 황새승마, 쫓대승마 등의 유사종 뿐 아니라 한국 자생종 '세잎승마(*C. heracleifolia* Kom. var. *bifida*.)가 강원도 정선의 석회암 지대를 중심으로 널리 자생하고 있을 뿐 농가재배는 이루어지지 않는 실정으로 승마원료의 경우 원료(근경 및 추출물) 또는 제품 형태로 전량 수입에 의존하고 있다. 2008년 승마근경 원료(건조한약제 및 추출물)의 수입량은 약 10만 달러에 이르며 승마함유 관련 일반의약품(훼라민 Q 등 8종)의 판매량은 2004년 34억, 2005년 42억 및 2011년 210억으로 급격히 증가하는 추세로 보아 앞으로도 그 시장은 더욱 성장할 것으로 예상된다. 국내의 다수 업체에서는 Soy product를 중심으로 인삼(또는 홍삼) 등을 혼합한 제품이나 복합허브제품 등의 수입제품을 갱년기 여성 건강용 일반 건강식품형태로 다종 판매 중이지만 아시아 승마를 이용한 관련 제품은 없는 것으로 보고되는 바, 이미 형성된 유사 제품 시장에서 전량 수입에 의존하는 원료의 대체제로서의 역할은 매우 의미있을 것으로 사료된다.

따라서 본 연구에서는 각종 약용작물의 추출물 제조에 축적된 다년간의 경험을 바탕으로 각 승마 종 추출물 및 복합추출물 소재를 활용한 추출물 및 승마 함유 활성 농축물 제조 조건을 확립하여 시제품을 개발하고 아시아승마 활용 가능성에 대해 모색하고자 한다.

## 제 2 절 연구개발수행 내용 및 결과

### 1. 승마 종별 각종 추출물의 제조

자생종 승마 4종(세잎승마 *Cimicifuga heracleifolia* var. *bifida*, CH; 쫓대승마 *C. simplex*, CS; 눈빛승마 *C. davurica*, CD; 왜승마 *C. japonica*, CJ)의 활성 추출물 제조 조건을 확립하기 위하여 water, methanol, 80% ethanol 및 40% 2-propanol을 추출 용매로 하여 추출물을 제조하였다. 최적의 활성물질 추출을 위하여 전분 등의 물질을 제거하기 위해 4℃에서 원심분리를 하였으며, 감압건고 시 열에 의한 활성물질의 변성을 막기 위하여 40℃이하의 온도에서 수행하는 것으로 결정하였다. 또한, 반복에 의한 추출 수율의 변화를 막고, 수분으로 인한 저장 중의 변화를 예방하기 위하여 동결건조를 수행, powder 형태의 추출물을 제조하는 방법으로 결정하였다. 최종적으로 결정된 추출물 제조 공정은 Fig. 1에 나타내었다.

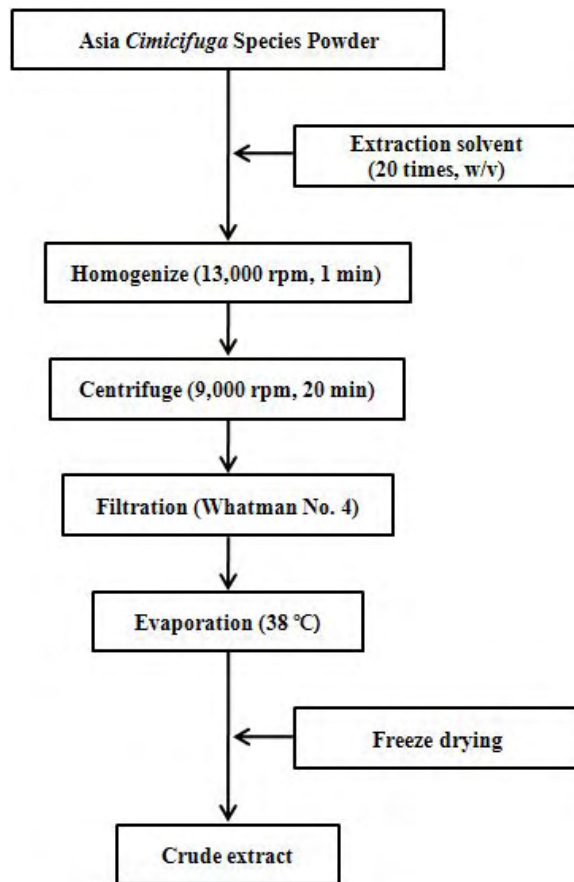


Figure 1. 승마 추출물 제조공정



## 2. 활성추출물의 적정 추출법 확립

Fig.1의 조건으로 재래종 승마 추출물을 제조, 활성을 비교한 결과 승마 종간에 따른 추출 수율의 차이는 크게 없었고, 모든 승마종에서 40% 2-propanol 추출물의 수율이 가장 높았다(Table 1).

Table 1. 자생종 승마 추출물 수율

	세잎승마 ( <i>C. heracleifolia</i> )	눈빛승마 ( <i>C. davurica</i> )	쫄대승마 ( <i>C. simplex</i> )	왜승마 ( <i>C. japonica</i> )
Water	24.6	20.4	22.4	28.6
Methanol	16.4±5.2	20.5±6.6	15.1±4.7	29.8±9.4
80% Ethanol	16.6±3.3	17.4±3.3	18.0±3.6	27.5±8.2
40% 2-Propanol	24.8±7.9	21.2±9.9	25.9±7.9	41.3±13.9

## 3. 아메리카 승마와 St John's wort 복합물 대체 복합물 제조

### 가. 아메리카 승마 대체소재 탐색을 위한 복합물 제조

1차년도 실험결과 자생종 승마를 함유하는 혼합추출물이 아닌 아메리카승마 대체소재인 자생종 승마 탐색을 하기로 결정하고, 현재 임상적으로 사용되고 있는 아메리카 승마와 복합물을 이루는 St John's wort와 자생종 승마 복합물을 제조하기로 하였다. 복합물 제조는 현재 사용되는 약재의 배합비율과 동일하게 하였다. 자생종 승마 및 아메리카승마와 St John's wort의 혼합비율은 St John's wort 1g 당 자생종 승마 82 mg으로 하였고, 제조한 복합물을 식품연구원에서 혈관이완작용 및 동물실험을 통한 활성을 측정하였다.

### 나. St John's wort 대체소재 탐색

아메리카승마를 대체하기 위한 자생승마종을 결정하면서 사용한 복합물 제조에는 현재 시판되는 아메리카승마 함유약재에 포함되는 St John's wort (*Hypericum perforatum*)추출물을 사용하였다. 따라서 St John's wort 또한 자생종 약재로 대체하기 위하여 대체소재를 탐색한 결과 물레나물(Giant St John's wort, *Hypericum ascyron* L.)이 대체가능한 소재로 대두되었다. *Hypericum ascyron* L.은 쌍떡잎식물 측막태좌목 물레나물과의 여러해살이풀로 우리나라, 시베리아 동부, 중국 및 일본 등지에 분포하며 산기슭이나 벌이 잘 드는 물가에서 자란다. 한방에서는 뿌리를 제외한 식물체 전체를 홍한련(紅旱蓮)이라는 약재로 쓰며, 간기능 장애로 인한 두통과 고혈압에 효과가 있으며

지혈작용을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 현재까지 물레나물에 대해서는 물레나물 중에 함유된 phenolic 물질의 양 및 그에 따른 항산화활성 등이 연구되었다. 따라서 본 과제에서는 St John's wort의 대체소재로 물레나물을 결정하고 식물원 및 약재상 등을 통해 국산 물레나물을 확보하기 위한 노력을 수행중이다.

#### 4. 혈관확장 실험을 통한 활성 추출물 탐색

##### 가. 활성승마 종의 농축물 제조 및 활성 탐색

1차년도 실험결과 활성을 나타낼 수 있는 승마종으로 제안된 쫄대승마(CS)와 세잎승마(CH)의 대량 추출 및 수율 증가를 위하여 농축물의 제조 가능성을 검토하기 위하여, 활성승마 종 중 하나인 쫄대승마를 이용, 쫄대승마 1 kg에 70% ethanol인 주정을 8배량으로 가하고 80°C에서 4시간 추출 후 수율이 20%가 되도록 농축하여 농축물을 제조하였다. 이 경우 제조수율은 1차 년도의 18% 보다 높았으나, 식품연구원에서 이 농축물로 혈관이완 활성을 측정한 결과, 1차년도 추출법으로 추출한 추출물에 비하여 활성이 낮아(31.3% : 20% in 1.0 mg/mL) 승마 농축물 보다는 활성획분의 분리를 수행하기로 결정하였다.

##### 나. 활성승마 종의 분획조건 확립

자생종 승마의 아메리카 승마 대체 가능성을 확인하기 위하여 승마와 St John's wort 복합물의 식품연구원실험결과 혈관이완활성은 있으나 내피손상의 우려가 나타나 이를 용매별로 분획하기 위한 조건을 확립하였다(Fig. 2). 승마 및 St John's wort 복합물을 증류수에 녹인 후 증류수 양의 1/4의 butanol을 섞어준 후 상등액을 수거 butanol 용해성 획분으로 하고, 남은 증류수에 다시 butanol을 가하고 상등액을 수거하여 butanol 용해성 획분에 추가하는 조작을 반복하여 첨가하는 butanol에 용해되는 성분이 없을 때까지 분획을 실시하였다. 모이지 butanol 용해성 획분과 증류수 중에 남아 있는 수용성 획분은 농축, 동결건조하여 분말형태로 얻었다. 이 때 수용성획분의 회수량은 Table 2에 나타내었다.

Table 2. 자생종 승마함유 복합물의 용매별 분획물 수율 (%)

	SJW	BC+SJW	CH+SJW	CS+SJW
Water-soluble fraction	67.12	73.48	72.05	75.45

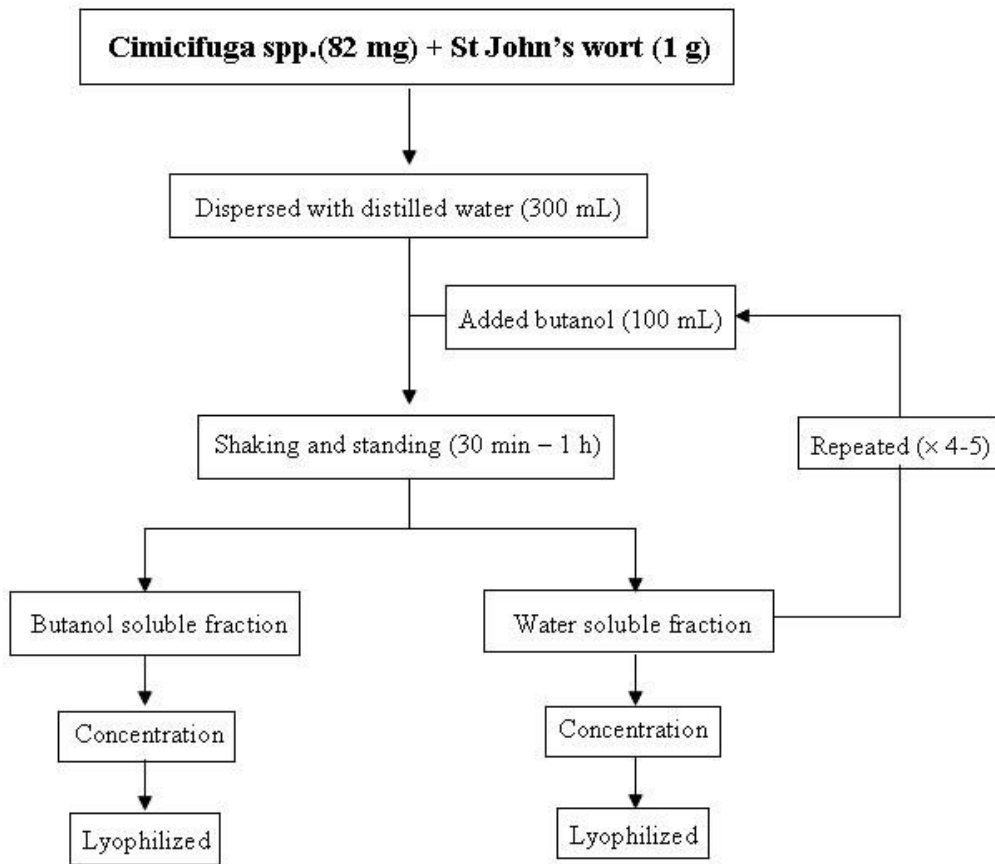


Figure 2. 자생종승마 함유 복합물의 분획법

## 5. HP-20을 이용하여 활성획분 분리

### 가. HP-20을 이용한 승마 활성획분 분리조건 확립

활성승마 종의 유효성분을 분리하기 위하여 Diaion HP-20 resin 흡착법을 이용, flavonoid rich fraction의 분획을 실시하였다(Fig. 3). 즉, Diaion HP-20 resin(Supelco, USA)을 100% methanol 및 물을 이용하여 활성화 시킨 후 glass column( $\phi 2.1 \times 10$  cm)에 충전하였다. Resin을 충전 후 전체 체적의 약 2배 이상을 증류수를 흘려주어 안정화 시킨 후 각 승마 추출물을 1g씩 loading하였다. Column 체적의 8배 이상의 증류수로 resin에 흡착되지 않는 비흡착획분을 분리한 후, 흡착된 flavonoid rich fraction은 column 체적의 4-6배 양의 85% ethanol을 사용하여 분리하였다. 분리한 흡착 및 비흡착획분은 37°C에서 농축, 동결건조하여 고형분으로 제조한 후 실험에 사용하였다.

각 승마추출물에서 HP-20 흡착획분(AD)은 34-38%, 비흡착획분(NAD)은 39-41%로 약 73-79%의 회수율을 나타내었으며, 승마 종에 관계없이 AD에 비하여 NAD의 함량이 조금 더 많았다(Table 3). 분리한 각 획분을 이용하여 식품연구원에서 혈관이완활성을 측정된 결과 비흡착획분은 활성이 거의 없었고, 흡착획분에서는 활성이 나타나 향후 실험에 사용하기 위하여 흡착획분을 활성획분으로 결정, 제조하였다.

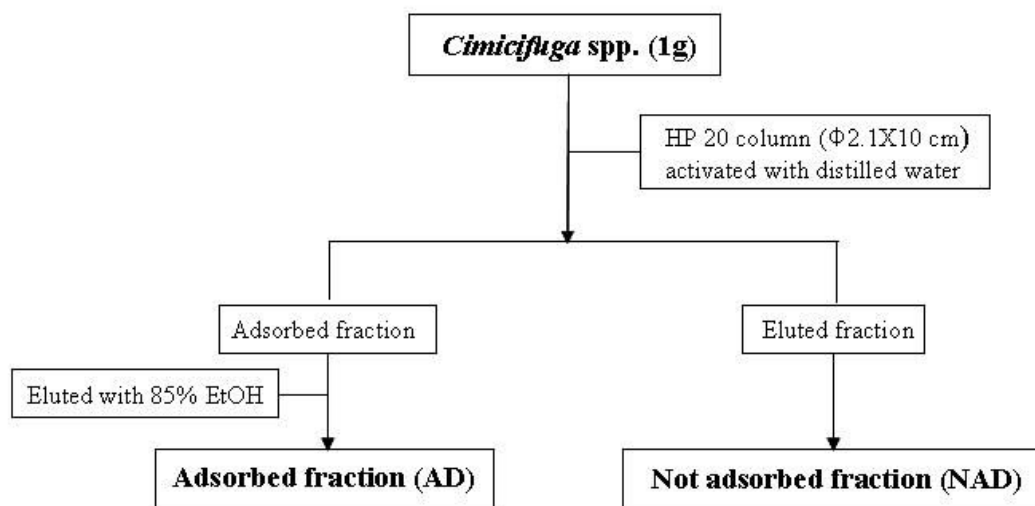


Figure 3. 자생종승마 추출물의 활성획분 분리법

Table 3. 자생종 승마 추출물의 활성획분 함량 및 분리 수율 (%)

회수량 g/1g	세잎승마	쫄대승마	눈빛승마	왜승마
AD	0.34±0.01	0.38±0.01	0.35	0.34
NAD	0.39±0.01	0.41±0.01	0.41	0.39
회수율(%)	73	79	76	73

## 6. 자생종 승마 및 아메리카 승마의 지표물질 분석

### 가. HPLC를 이용한 분석

현재 사용되는 아메리카 승마 임상 추출물의 지표물질은 triterpene glycoside의 하나인 27-deoxyactein로 알려져 있다. 따라서 자생종 승마의 아메리카 승마 대체가능성을 확인하기 위하여 전년도 실험한 자생종승마 4종류(세잎승마, CH; 촛대승마, CS; 눈빛승마, CD; 및 왜승마, CJ) 추출물과 아메리카승마(Black cohosh, BC) 추출물의 27-deoxyactein 함량을 분석하기 위하여 1차적으로 HPLC를 이용하였다. Standard 27-deoxyactein은 1 mg/mL의 농도로 100% methanol에 용해시켜, 0.45  $\mu$ m filter를 통과시켜 준비하였고, 각 승마종 추출물은 75% methanol에 분산시킨 후 30분간 sonication하여 30 mg/mL의 농도로 완전히 용해시킨 후 0.45  $\mu$ m filter를 통과시켜 준비하였다. Thermo BDS hypersil C18 column ( $\phi$ 4 × 250 mm)을 사용하여 1% formic acid를 함유한 acetonitrile 용액(A)과 1% formic acid를 함유한 증류수(B)를 이동상으로 하며 gradient는 A가 50분동안 0-80%까지 증가하도록 하였다. Flow rate는 1 mL/min, injection volume는 20  $\mu$ L로 하였고 UV 203 nm에서 검출하였다.

분석결과 분석 약 30 분경에 standard에서 peak가 관찰되기는 하였으나 (Fig. 4), peak의 크기가 작고, 각 승마종에서는 noise도 많아 HPLC를 이용해서 정확한 분리가 어려울 것으로 나타나 Mass spectrometry를 이용한 분석을 시도하기로 하였다.

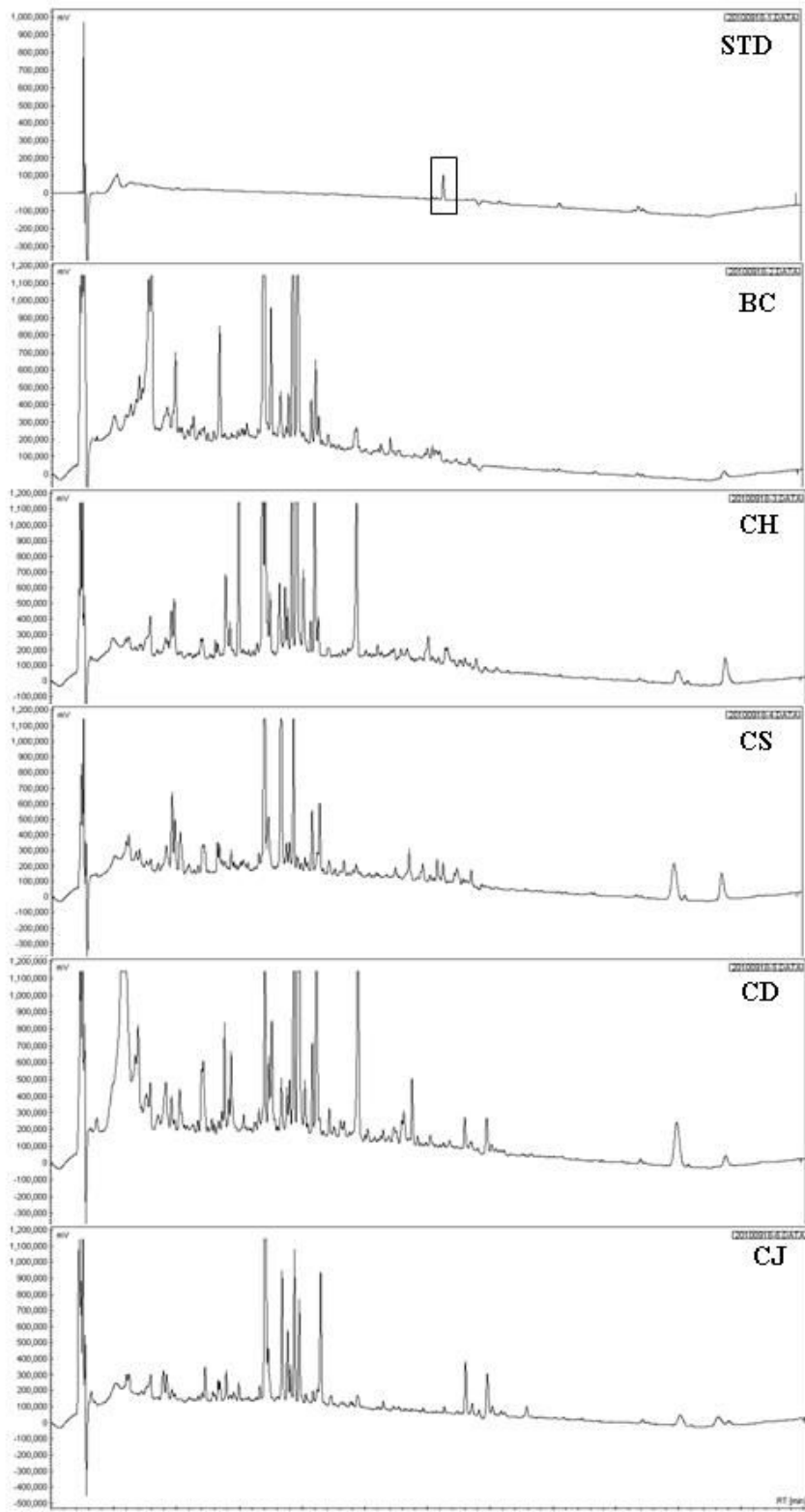


Figure 4. HPLC를 이용한 승마종의 지표물질 분석

#### 나. Mass spectrometry를 이용한 분석

HPLC를 이용한 27-deoxyactein의 분석결과 UV detector 상에서는 peak가 작게 나타나 정확한 양의 측정이 어려워서 Mass spectrometry를 이용한 분석을 수행하였다. 분석 Mass의 조건은 Table 4와 같았고, 실험결과 standard에서 27-deoxyactein이 검출되었으며(Fig. 5) 자생종 승마에서는 일부 검출이 되는 듯이 보이나 직접 injection에 따른 복합물의 형성이 가능하다 하여 정확한 수치를 알기가 어려웠다.

Table 4. Mass spectrometry 분석조건

Positive voltage	POS	Lens voltage	7.75 kV
polarity		Linear detector voltage	2.591 kV
PIE dealy	100 ns	Deflection on	true
Ion source voltage 1	25 kV	Deflection mass	100 Da
Ion source voltage 2	22.45 kV		

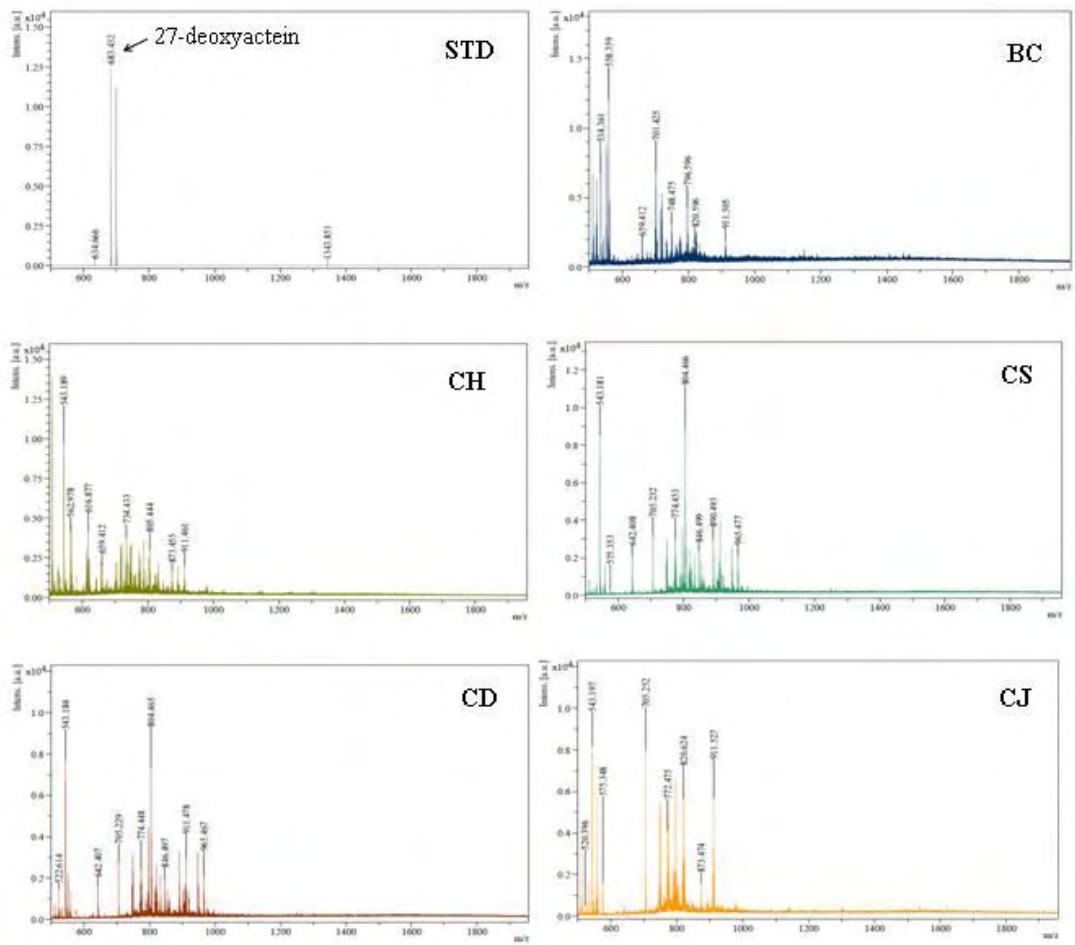


Figure 5. Mass spectrometry를 이용한 승마종의 지표물질 분석



#### 다. UPLC-Q-TOF Mass Spectrometry를 이용한 27-deoxyactein 분석법 확립

HPLC 및 Mass spectrometry 단독 분석에서 27-deoxyactein의 정확한 분석에 어려움이 있어 다음 단계로 UPLC-Q-TOF Mass Spectrometry를 이용하여 분석을 수행하였다. 이때 각 승마 추출물을 100% methanol에 녹인 후 12,000 rpm으로 15분간 원심 분리하고 0.22  $\mu\text{m}$  filter로 filtration 후 분석하였다. UPLC 분석 시 ACQUITYM 1.7  $\mu\text{m}$  C<sub>18</sub> column( $\phi$  2.1 mm  $\times$  10 cm)을 사용하였고, 분석온도는 40°C로 하였다. 이동상은 0.1% formic acid를 함유한 물과 acetonitrile 혼합물 gradient로 사용하였으며 (acetonitrile 40% - 100% for 8 min) flow rate는 0.3 mL/min, injection volume는 5  $\mu\text{L}$ 였고 203 nm에서 detect하였다. Mass spectrometry 분석은 atmospheric pressure electrospray positive ion(ESI+) mode로 수행하였으며, capillary와 sampling cone은 3000과 100 V로 detector 는 1900 V로 하였고 scan range는 100-1000Da (scan time: 0.2 sec., inter-scan delay는 0.02 sec.)으로 하였다.

#### 라. UPLC-Q-TOF Mass Spectrometry를 이용한 각 승마종의 27-deoxyactein 함량

분석조건에 따라 27-deoxyactein standard와 BC 및 자생종승마(CH, CS, CD, CJ)를 UPLC로 분석한 결과 약 2.9분에서 27-deoxyactein peak가 나타났으며, BC의 함량이 가장 많았고, CH, CS 및 CD에는 2.9분에 peak가 관찰되었으나 CJ는 거의 없었다(Fig. 6).

이를 다시 Mass spectrometry로 분석한 결과 UPLC의 결과와 같이 BC에의 함량이 가장 많았으며(Fig. 7), 자생종 승마 중에서는 CH의 함량이 가장 높고, 그다음으로 CS, 그리고 CD와 CJ의 함량은 낮았다. 특히, CH는 BC의 27-deoxyactein 함량과 유의적인 차이가 없는 것으로 나타나 아메리카승마 대체제로서의 사용가능성이 높을 것으로 사료되었다. Standard 및 각 승마 종을 0.5 mg/mL의 농도로 분석한 결과 Mass spectrometry에서의 측정 intensity는 Table 5에 나타내었다.

Table 5. 27-Deoxyactein standard 및 각 승마종의 Mass spectrometry 분석 intensity

	27-Deoxyactein	BC	CH	CS	CD	CJ
Intensity	$3.1 \times 10^4$	810 $\pm$ 219	522 $\pm$ 82	61 $\pm$ 1	17 $\pm$ 9	17 $\pm$ 7

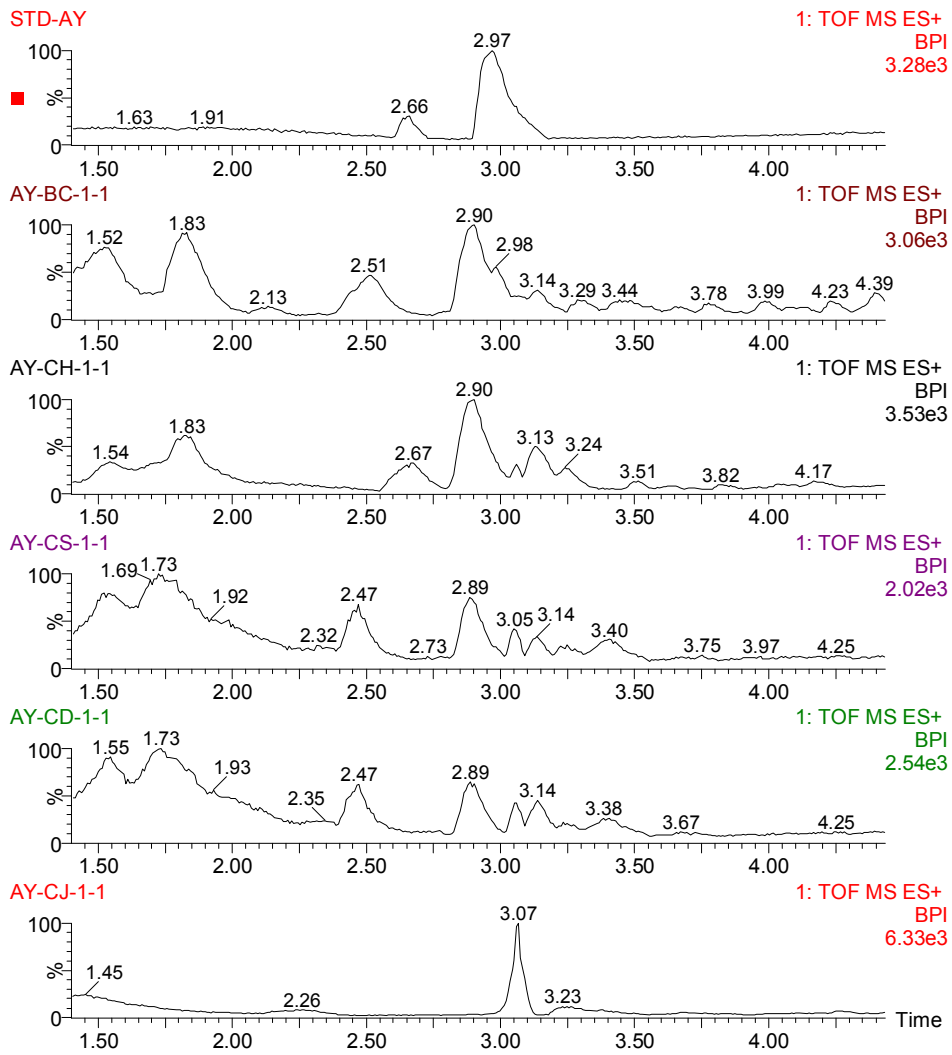


Figure 6. 27-Deoxyactein 및 각 승마종의 UPLC 분석 결과

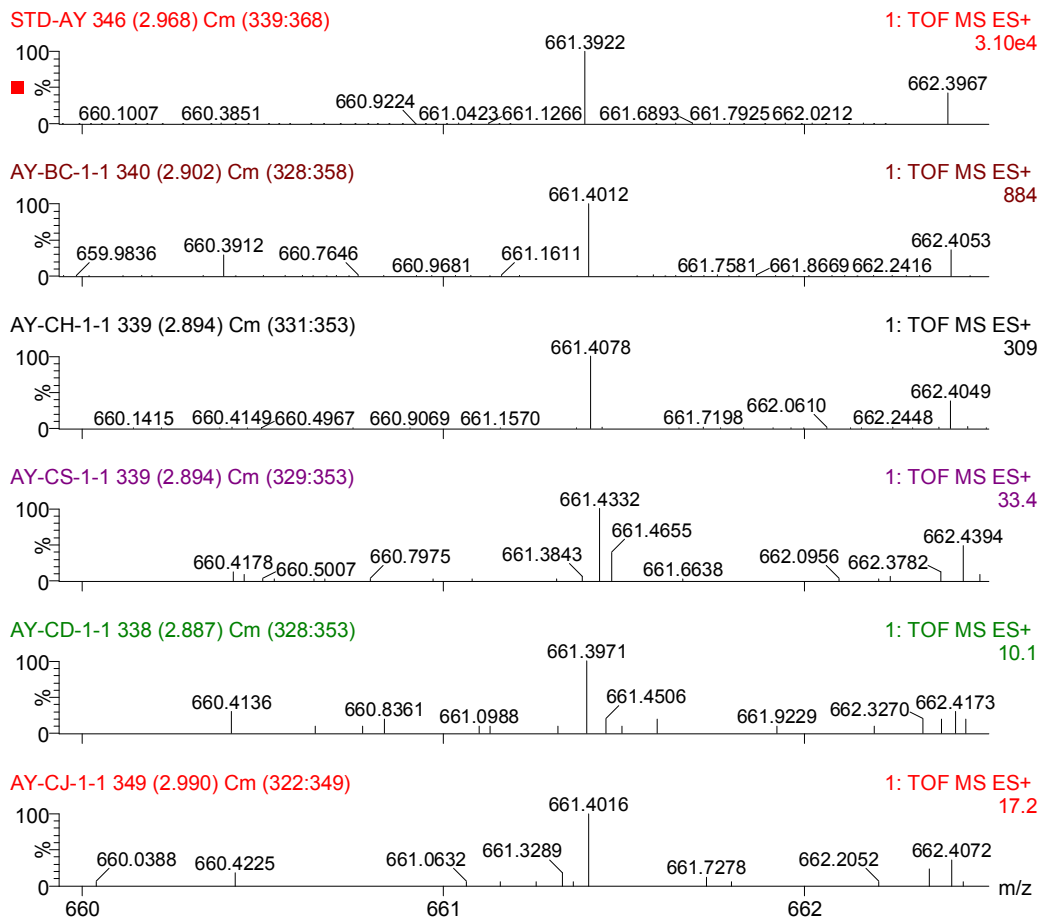


Figure 7. 27-Deoxyactein 및 각 승마종의 Mass spectrometry 분석결과

**마. UPLC-Q-TOF Mass Spectrometry를 이용한 27-deoxyactein 분석법 재확립**

앞서 수행한 UPLC-Q-TOF Mass Spectrometry를 통한 분석을 통하여 각 승마종에 포함된 활성성분 27-deoxyactein을 정량적(ng/mg)으로 나타내기 위하여 분석 조건을 변형하여 재분석하였다. Table. 5에서 표기한 intensity는 27-deoxyactein과 일치하는 peak의 반응세기로 이해될 수 있으며 이를 정량적으로 해석하기 위하여 다음과 조건에서 분석하였다. 이때 각 승마 추출물을 100% methanol에 녹인 후 12,000 rpm으로 15분간 원심분리하고 0.22 µm filter로 filtration 후 분석하였다. UPLC(Waters Synapt G2 HDMS) 분석 시 Waters Acquity HSS T3 C18 (1.8µm, 100\*2.1 mm id) column을 사용하였고, 이동상은 10 mM Ammonium acetate in water와 10 mM Ammonium acetate in water gradient로 사용하였으며 ESI source는 Cap Voltage (kV) : 0.5, Cone

Voltage : 25, Mass range : m/z 50 ~1200 조건에서 분석하였다. 또한 Waters의 TargetLynx를 활용하여 정량화하였다.

**바. UPLC-Q-TOF Mass Spectrometry를 이용한 각 승마종의 27-deoxyactein 함량**

분석조건에 따라 27-deoxyactein standard와 BC 및 자생종승마(CH, CS, CD, CJ)를 UPLC-Q-TOF Mass Spectrometry로 분석한 결과 CD, CJ에서는 27-deoxyactein가 detect되지 않았으며 BC 1.59 ng/mg, CH 40.32 ng/mg, CS 3.19 ng/mg으로 CH에서 가장 많은 지표물질이 측정되었다.

Fig. 8은 UPLC-Q-TOF Mass Spectrometry를 통하여 확인된 지표물질 27-deoxyactein 및 BC, CH 등의 각 승마종에 대한 base peak intensity chromatogram을 나타낸 것이며 이를 Mass spectrometry를 통해 분석한 결과는 Fig. 9-12와 같다.

10 ug/ml -> 6ul injection

T3\_NH4COOH\_27\_Deoxyactein\_STD\_003

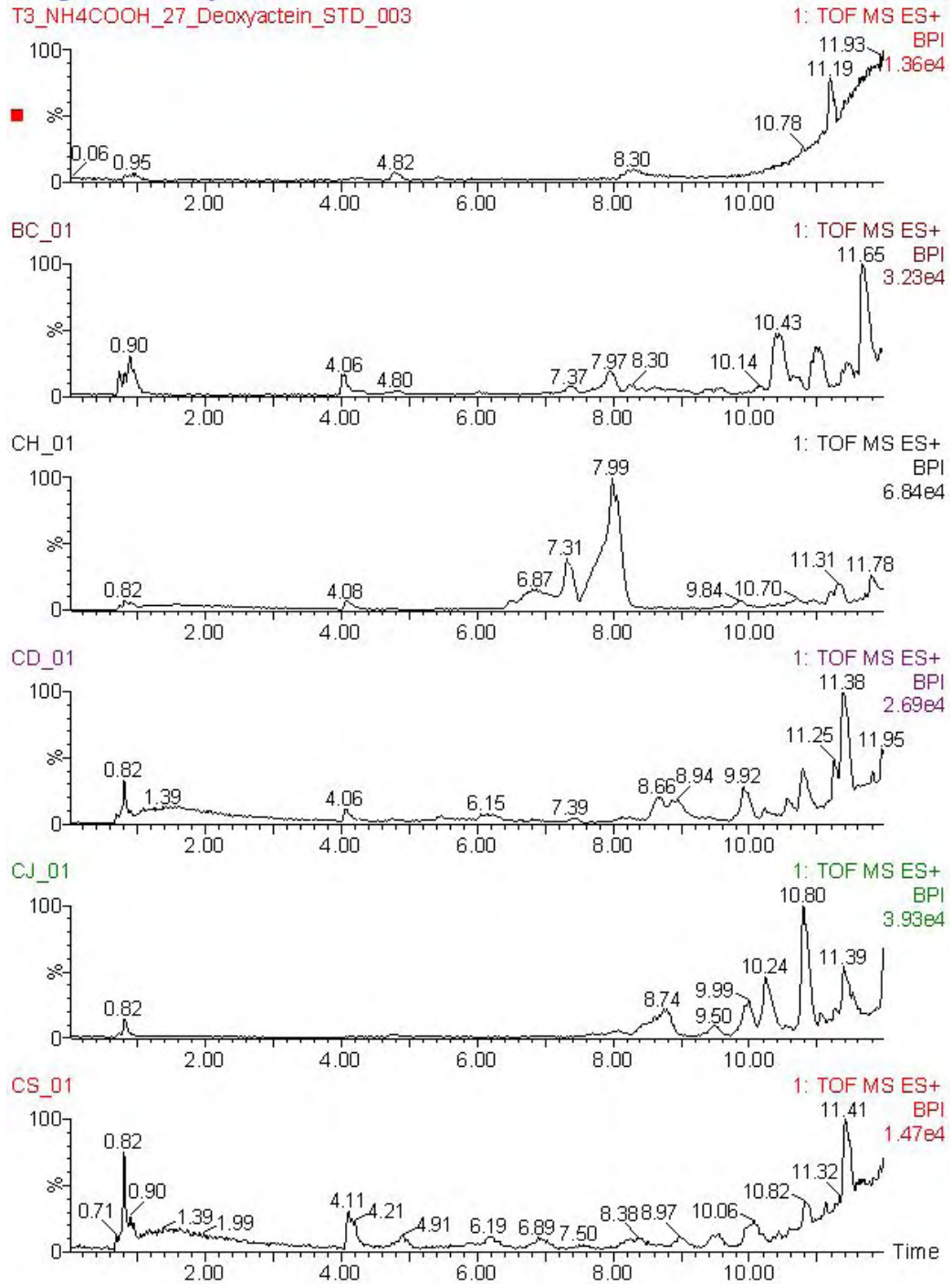


Figure 8. 27-Deoxyactein 및 각 승마종의 UPLC 분석 결과

10 ug/ml -> 6ul injection

T3\_NH4COOH\_27\_Deoxyactein\_STD\_003

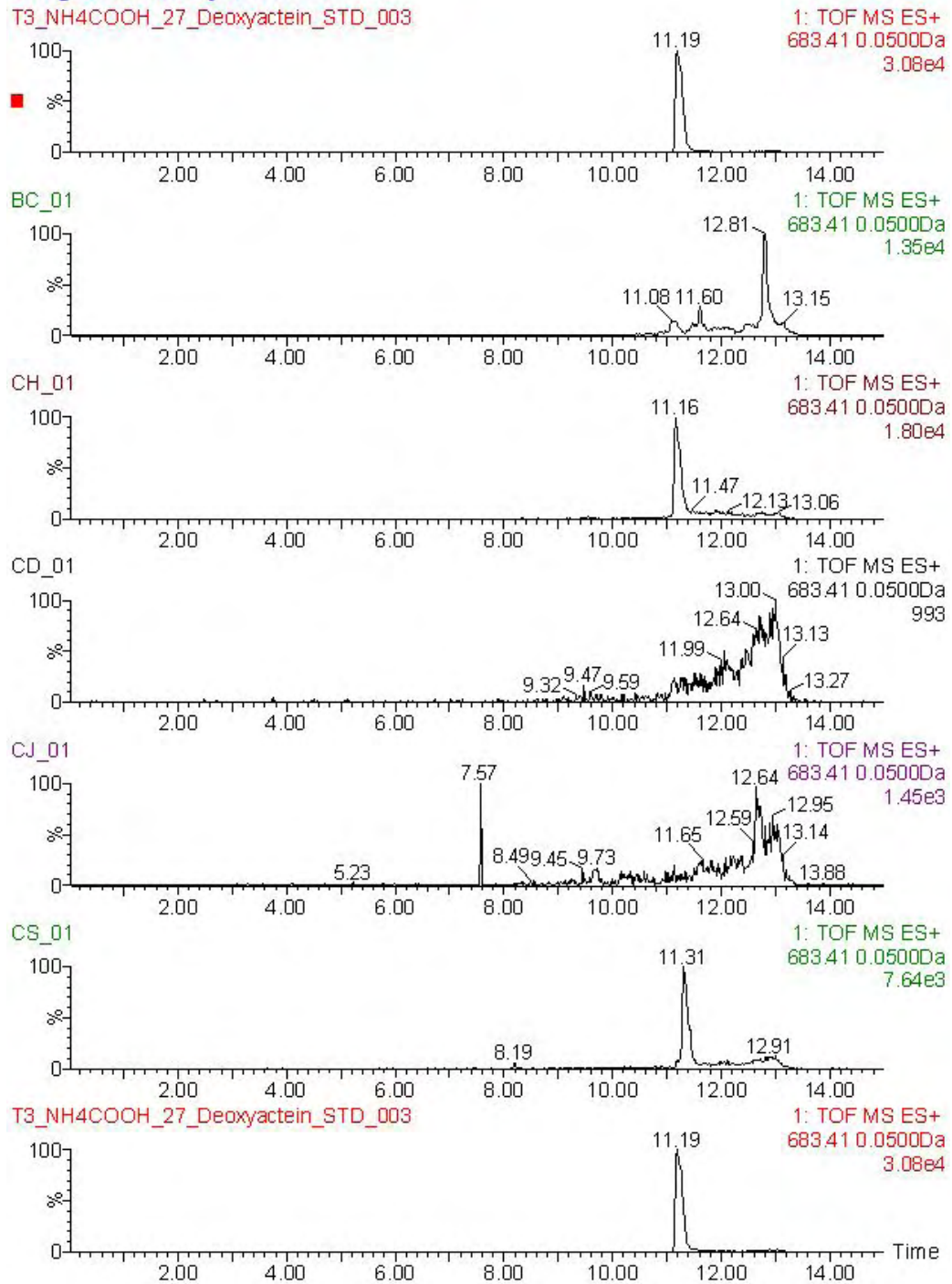
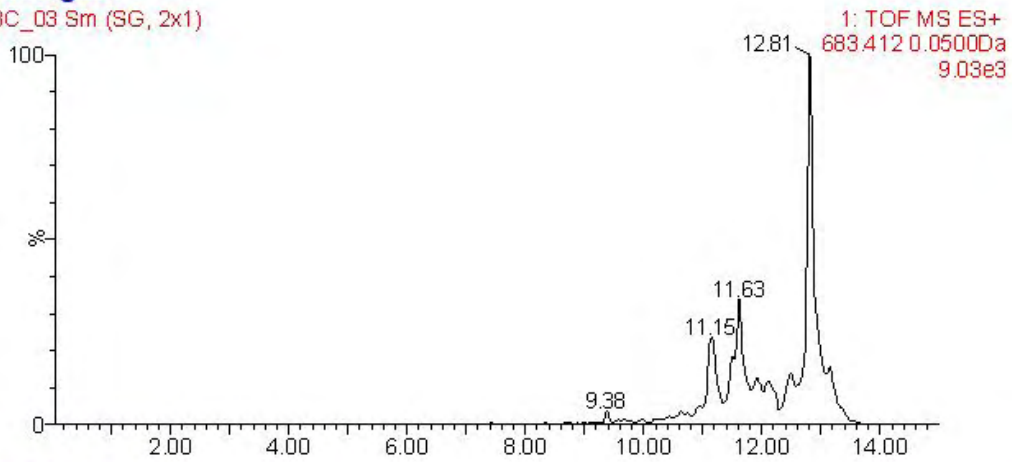


Figure 9. 27-Deoxyactein 및 각 승마종의 UPLC-Q-TOF Mass Spectrometry 분석 결과

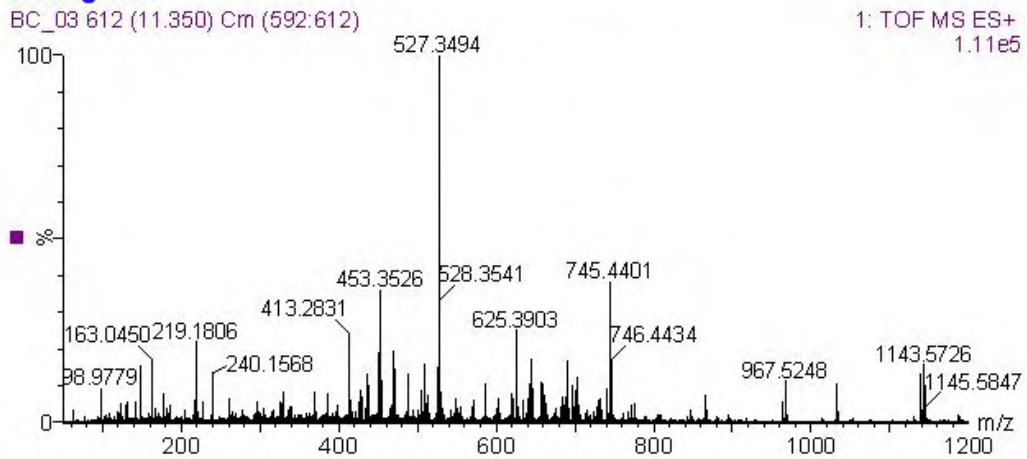
25.1mg/4ml

BC\_03 Sm (SG, 2x1)



25.1mg/4ml

BC\_03 612 (11.350) Cm (592:612)



25.1mg/4ml

BC\_03 612 (11.350) Cm (592:612)

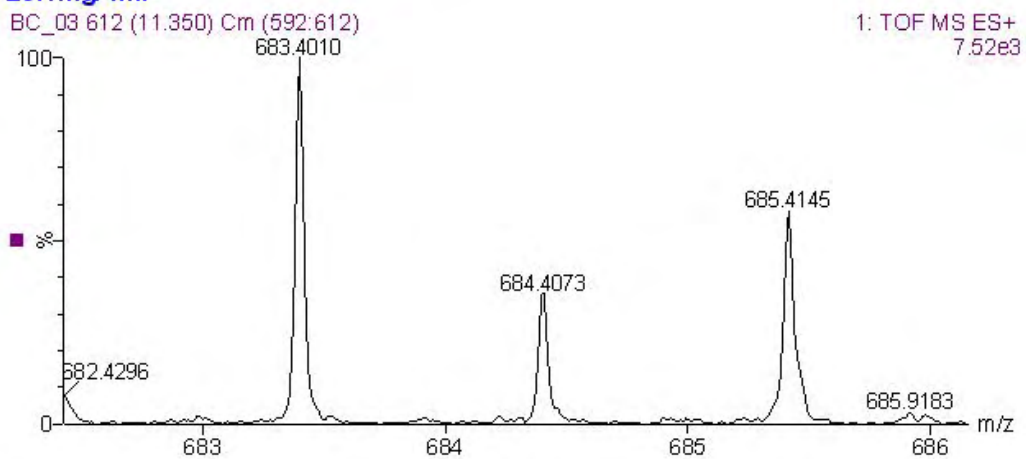
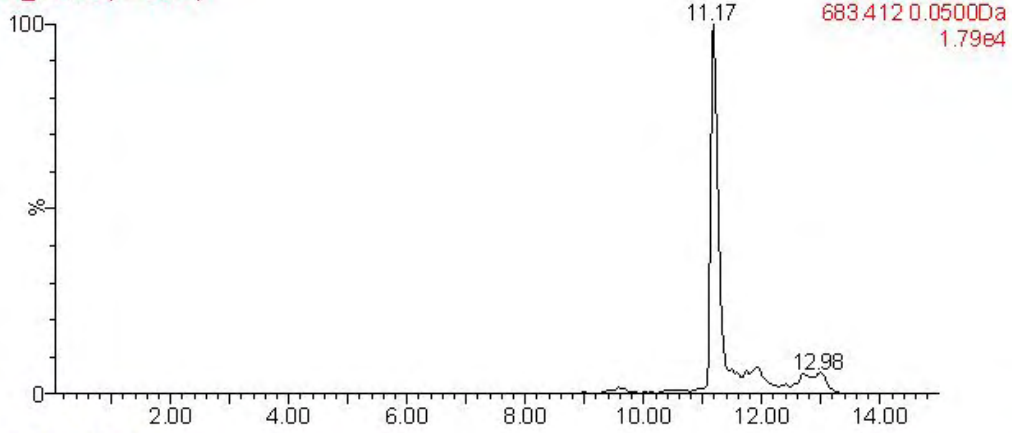


Figure 10. BC 의 UPLC-Q-TOF Mass Spectrometry 분석 결과

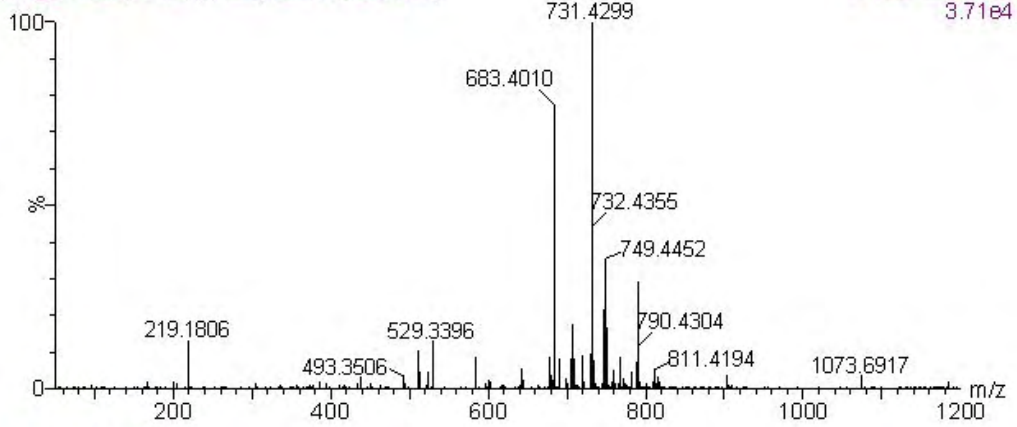
21.7mg/4ml

CH\_03 Sm (SG, 2x1)



21.7mg/4ml

CH\_02 606 (11.243) Cm (600:606-609:617)



21.7mg/4ml

CH\_02 606 (11.243) Cm (600:606-609:617)

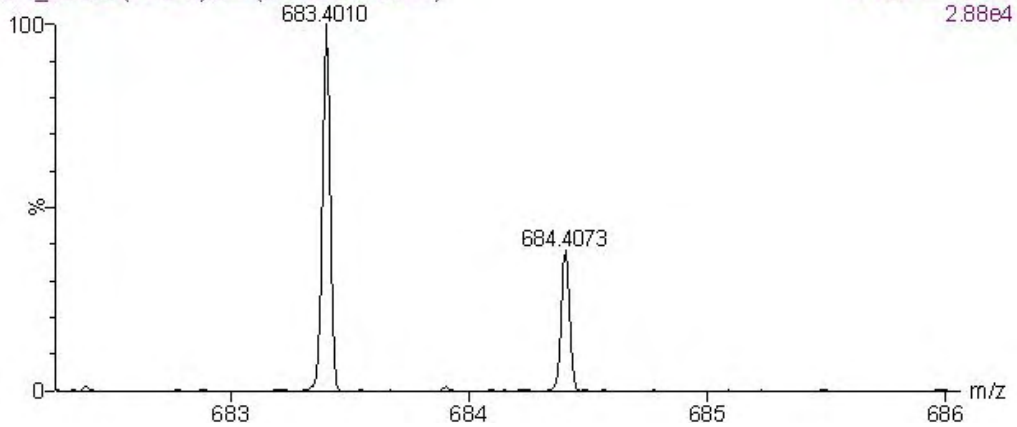


Figure 11. CH 의 UPLC-Q-TOF Mass Spectrometry 분석 결과



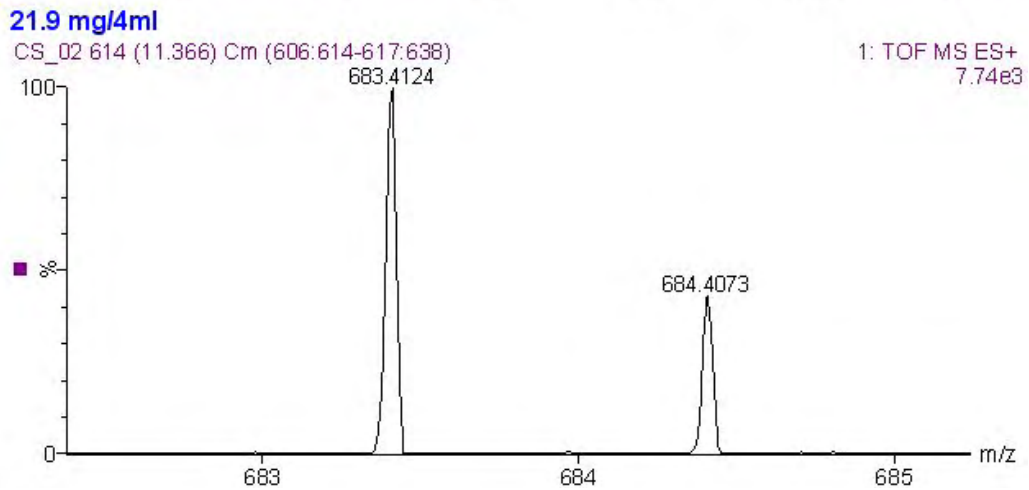
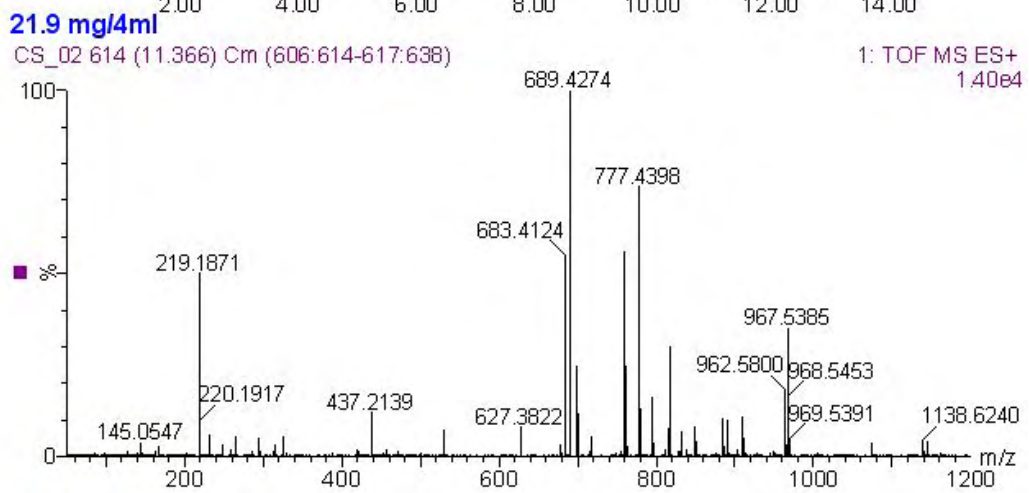
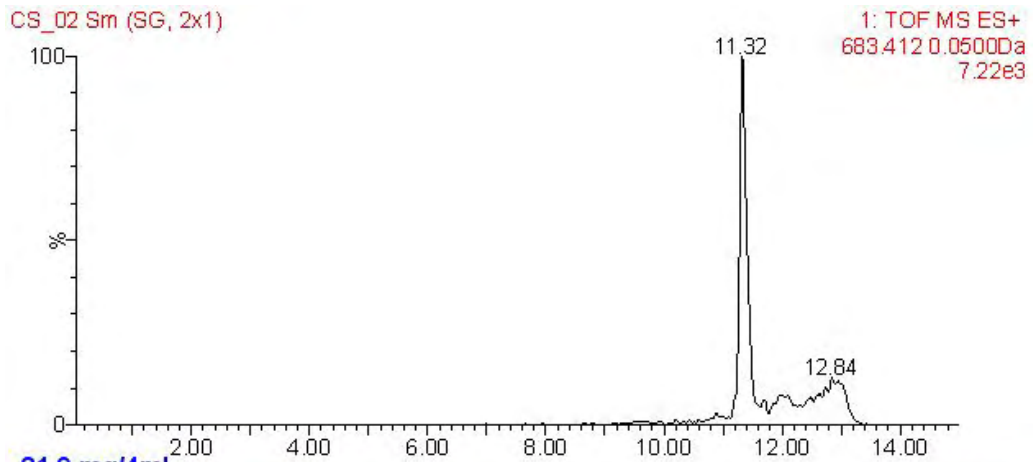


Figure 12. CS 의 UPLC-Q-TOF Mass Spectrometry 분석 결과

## 7. 활성 농축물 및 시제품 개발

### 가. St John's wort 복합물 대체 복합물 제조

#### 물레나물 추출

아메리카승마 함유약재에 포함되는 추출물인 St John's wort 에 대응하는 자생종 약재로 선정된 물레나물(Giant St John's wort, *Hypericum ascyron* L.)은 현재 사용되는 약재와 동일한 용매를 사용하여 추출물을 제조하였다. 최적의 활성물질 추출을 위하여 전분 등의 물질을 제거하기 위해 4℃에서 원심분리를 하였으며, 감압건고 시 열에 의한 활성물질의 변성을 막기 위하여 40℃이하의 온도에서 수행하였다. 또한, 반복에 의한 추출 수율의 변화를 막고, 수분으로 인한 저장 중의 변화를 예방하기 위하여 동결 건조를 수행, powder 형태의 추출물을 제조하였다(Fig. 6). 물레나물 추출물의 수율은 19.12±0.22%였다.

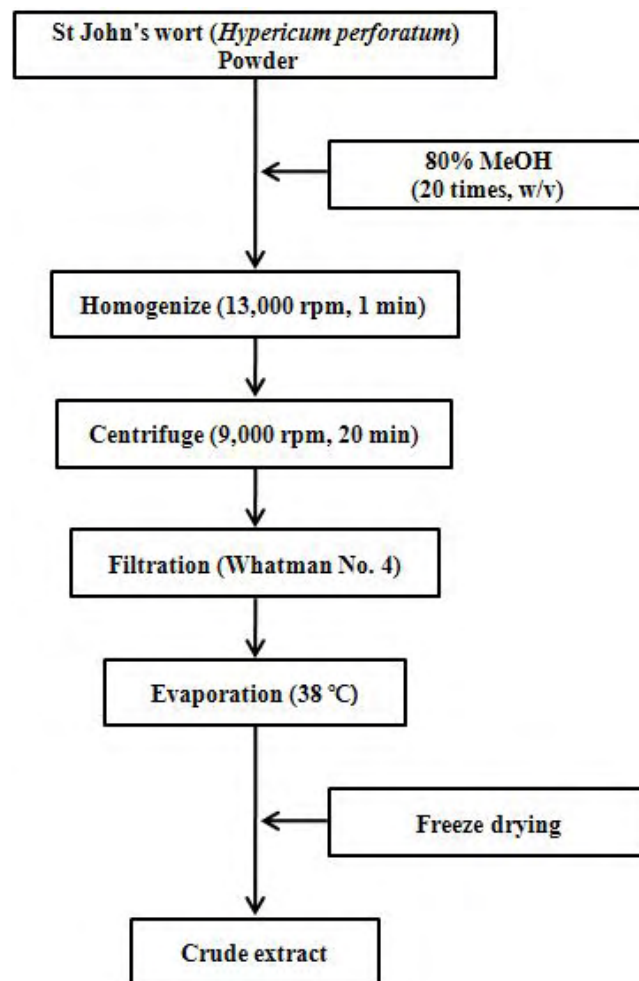


Figure 11. 물레나물 추출물 제조과정

#### 나. 승마 농축물 제조

시제품을 개발하기 위하여 아메리카승마에 대응하는 약재로 선정된 승마를 현재 사용되는 약재와 동일한 용매를 사용하여 추출물을 제조하였다. 승마 330 g을 칭량하여 승마의 8 배수인 40%- $\beta$ -propanol 을 2640 mL 을 넣어 8 시간 동안 추출한다. 추출된 승마추출액을 최적의 활성물질 추출을 위하여 전분 등의 물질을 제거하기 위해 원심분리하였으며 이 전분 제거한 승마추출액을 감압 농축한다. 이 때 승마의 농축액량은 53 g (33 brix) 로 수율은 16.06% 이었다.



Figure 12. 승마 농축물 제조과정



**위탁연구과제명 :**  
**자생승마속 식물의 대량증식·재배연구**

위탁연구기관 : 한국자생식물원  
연구책임자 : 김 영 철



## 제 1 절 서론

승마속(*Cimicifuga* L.)은 미나리아재비과에 속하는 식물로 전 세계적으로 20여종 (Table 1)이 분포하는 것으로 보고되어 있다(이 등, 1994). 본 속에 속하는 식물들은 삼출복엽, 원추상 또는 총상의 꽃차례에 많은 꽃이 달리는 점, 열매인 골돌과의 형태적 차이를 통해 미나리아재비과내 다른 속과 구별된다.(이 등, 1994) 본 속에 속하는 식물들은 인도의 캐시미르(Kashmir)에서부터 동쪽으로 히말라야, 중국, 만주, 아무르(Amur), 한반도, 일본을 거쳐 캄차카(Kamchatka), 시베리아(Siberia)의 알타이(Altai), 바이칼(Baikal), 치타(Chita)에 이르는 아시아 지역과 북아메리카의 동부와 서부의 일부 지역, 그리고 독일, 헝가리, 폴란드, 루마니아, 우크라이나를 포함하는 동부 유럽 등 북위 25°에서 60°사이의 북반구 온대지역에 분포하는 것으로 알려져 있다.(박, 1994)

한반도에는 왜승마(*C. japonica* (Thunb.) Spreng.), 개승마(*C. acerina* (Siebold & Zucc.) Miquel), 눈빛승마(*C. dahurica* (Turcz. ex Fischer & Meyer) Maxim.), 황새승마(*C. foetida* L.), 승마(*C. heracleifolia* Komarov), 좃대승마(*C. simplex* (Mormsk. ex DC.) Turcz.)와 승마의 변종인 세잎승마(*C. heracleifolia* var. *bifida* Nakai)가 분포하는 것으로 보고되고 있으며(이, 2000) 학자에 따라서 학명의 사용, 국명의 사용에 이견이 있는 것으로 나타나고 있다. 이러한 문제점을 보완하여 한반도에 분포하는 승마속 식물에 대한 최근의 분류학적 검토 보고서(박, 1994)에 의하면 한반도에는 위에서 분포하는 것으로 나타난 분류군 중 개승마(*C. biternata* (Siebold & Zucc.) Miquel), 황새승마(*C. foetida* L.)는 한반도에 분포하지 않는 것으로 보고하였다.

한반도 승마속 식물에 대한 연구는 대부분 한약재로 사용되는 승마(升摩)의 약리학적 연구, 성분분석, 생리활성물질의 탐색 등이 주를 이루고 있으며 이와 박(1994)의 '*Cimicifuga foetida* L. Complex 및 근연종(미나리아재비과)에 대한 분류학적 연구'와 이(2000)의 '승마속 식물(미나리아재비과)의 유전적 분기', 이와 박(1998)의 '한국산 승마속 식물(미나리아재비과)의 핵형분석'에서 한반도에 분포하는 승마속 식물의 분류학적 검토가 이루어진 것이 전부이다.

한반도에 인접한 중국, 일본, 러시아(극동)의 승마속 식물에 대한 연구 또한 대부분이 승마속 식물의 약리학적 연구, 생리활성물질의 탐색이 주를 이루고 있으며 이와 더불어 분류학적 연구를 통한 신종 또는 신변종, 신품종의 보고가 이루어지고 있는 것으로 나타나고 있다. 특히, 일본의 경우 *C. japonica*(왜승마)와 *C. biternata*(개승마)를 동일 분류군으로 인식하거나 종의 기재에 있어서 서로 반대되는 특징으로 설명하고

있는 것으로 나타나기도 하였다. 중국 및 러시아(극동)등에서는 약재로 사용되는 광의의 약재 승마(升麻)에 있어서도 식물명 승마(*C. heracleifolia*)보다는 촛대승마(*C. simplex*), 눈빛승마(*C. dahurica*), 황새승마(*C. foetida*)가 연구의 대상이 되고 있으며 특히, 중국에서는 *Cimicifuga dahurica* (Turcz.) Maxim.(한국명:눈빛승마)를 興安升麻(xing an sheng ma) *Cimicifuga simplex* Wormsk.(한국명:촛대승마)를 單穗升麻(dan sui sheng ma)로 *Cimicifuga heracleifolia* Komarov(한국명:승마)를 大三叶升麻(da san ye sheng ma)로 *Cimicifuga japonica* (Thunberg) Sprengel(한국명:왜승마)를 小升麻(xiao sheng ma)로 *Cimicifuga foetida* L.(한국명:황새승마)를 升麻(sheng ma)로 기록하고 있어 우리나라와 차이가 있는 것으로 나타나고 있다.

승마속 식물에 대한 생리활성물질의 탐색과 연구, 약재로의 사용에 있어서도 북아메리카에서는 *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt.(Black Black cohosh)와 *Cimicifuga americana* Michx. (아메리카승마)가 대상이 되고 있으며 중국 및 러시아에 있어서는 *Cimicifuga foetida* L.이 약재로 주로 이용되는 것으로 나타나고 있다. 이는 약재 및 생리활성물질의 탐색에 이용되는 근경의 크기에 기인하는 것으로 근경이 비대해지는 종을 중심으로 연구가 이루어진 결과라고 할 것이다. 또한 각각의 종이 가지는 분포 범위와 개체수를 바탕으로 하여 쉽게 이용할 수 있는 근경의 수집이 가능한 종을 우선적으로 이용한 결과일 것이다.

본 연구는 한반도에 자생하는 승마속(*Cimicifuga* L.) 식물 중 ‘자생종승마의 아메리카승마 대체소재로서의 활용성 제고를 위한 여성호르몬 유사활성 연구 및 기능성 식품 소재 개발’의 소재가 되는 식물의 한반도내 분포현황과 분포 특성을 조사하고 본 연구의 주요 재료로 선정한 한반도 특산식물인 세잎승마(*C. heracleifolia* var. *bifida* Nakai)와 가장 분포 범위가 넓으며 개체수가 많은 눈빛승마(*C. dahurica* (Turcz. ex Fischer & Meyer) Maxim.)의 증식기술 개발 및 생산성 확보를 위한 방안에 대해 연구하며 이를 바탕으로 본 연구의 결과로 탐색이 이루어진 생리활성물질의 대량 생산과 산업화에 따르는 시료 제공의 기초를 제공하는데 목표를 두었다.



Table 1. 전세계에 분포하는 승마속(*Cimicifuga* L.) 식물

Scientific Name	Proposed Name <sup>1</sup>	Synonyms	Distribution
<i>Cimicifuga arizonica</i> S. Watson	<i>Actaea arizonica</i> (S. Watson) J. Compton		Northern and central Arizona
<i>Cimicifuga heracleifolia</i> var. <i>bifida</i> Nakai - 세잎승마	<i>Actaea bifida</i> (Nakai) J. Compton		S. Korea (Kongwon)
<i>Cimicifuga biternata</i> (Siebold & Zucc.) Miq.	<i>Actaea biternata</i> (Siebold & Zucc.) Prantl	<i>Pityrosperma obtusifolium</i> Siebold & Zucc., <i>Cimicifuga obtusiloba</i> (Siebold & Zucc.) Miq., <i>C. japonica</i> var. <i>biternata</i> (Siebold & Zucc.) Maxim. ex Makino, <i>C. japonica</i> var. <i>obtusiloba</i> (Siebold & Zucc.) Yatabe, etc.	Japan (Honshu)
<i>Cimicifuga brachycarpa</i> P. K. Hsiao	<i>Actaea brachycarpa</i> (P. K. Hsiao) J. Compton	<i>Cimicifuga lancifoliolata</i> X. F. Pu & M. R. Jia	China (Henan, Hubei, Shanxi, Sichuan)
<i>Cimicifuga foetida</i> L. - 황새승마	<i>Actaea cimicifuga</i> L.		Europe
<i>Cimicifuga rubifolia</i> Kearney	<i>Actaea cordifolia</i> DC.	<i>Cimicifuga cordifolia</i> (DC.) Torr. & A. Gray [non Pursh 1814, nom. illeg.], <i>Thalictrodes cordifolia</i> (DC.) Kuntze, <i>Cimicifuga racemosa</i> var. <i>cordifolia</i> (DC.) A. Gray	Illinois, North Carolina, Pennsylvania, Tennessee, Virginia
<i>Cimicifuga dahurica</i> (Turcz. ex Fish. & C. A. Mey.) Maxim. - 눈빛승마	<i>Actaea dahurica</i> (Turcz. ex Fish. & C. A. Mey.) Franch.	<i>Actinospora dahurica</i> Turcz. ex Fisch. & C. A. Mey.	China (Hebei, Heilongjiang, Henan, Nei Monggol, Jilin, Shaanxi, Shanxi), Korea, Eastern Siberia, Russian Far East
<i>Cimicifuga elata</i> Nutt.	<i>Actaea elata</i> (Nutt.) Prantl	<i>Thalictrodes elata</i> (Nutt.) Kuntze	British Columbia, Oregon, Washington

Scientific Name	Proposed Name <sup>1</sup>	Synonyms	Distribution
<i>Cimicifuga europaea</i> Schipcz.	<i>Actaea europea</i> (Schipcz.) J. Compton		Europe (Northern Austria, Czech Republic, Southern Germany, Hungary, Poland, Romania, Russia (Kaliningrad), Slovak Republic, Ukraine)
<i>Cimicifuga frigida</i> Royle	<i>Actaea frigida</i> (Royle) Prantl	<i>Cimicifuga foetida</i> var. <i>longibracteata</i> P. K. Hsiao, <i>Cimicifuga foetida</i> var. <i>bifida</i> W. T. Wang & P. K. Hsiao, etc.	Bhutan, China (Sichuan, Yunnan), India (Uttar Pradesh, Darjeeling), Myanmar, Sikkim, Tibet
<i>Cimicifuga heracleifolia</i> Kom. - 승마	<i>Actaea heracleifolia</i> (Kom.) J. Compton		China (Heilongjiang, Nei Monggol, Jilin, Liaoning), North Korea, South Korea, Russian Far East (Primorsk)
<i>Cimicifuga japonica</i> (Thunb.) Spreng. - 왜승마	<i>Actaea japonica</i> Thunb.	<i>Actaea acerina</i> Prantl, <i>Cimicifuga acerina</i> Tanaka, <i>Pityrosperma acerinum</i> Siebold & Zucc., etc.	China (Gansu, Guizhou, Hainan Island, Henan, Hubei, Shanxi, Sichuan, Yunnan), Japan (Honshu, Kyushu), S. Korea (Cheju-do)
<i>Cimicifuga kashmiriana</i> J. Compton & Hedd.	<i>Actaea kashmiriana</i> (J. Compton & Hedd.) J. Compton		India (Kashmir) W. Tibet, and northeast Pakistan
<i>Cimicifuga mairei</i> H. Lév.	<i>Actaea mairei</i> (H. Lév.) J. Compton	<i>Cimicifuga foetida</i> L. var. <i>foliolosa</i> P. K. Hsiao, etc.	China (Gansu, Hubei, Shansi, Sichuan, Yunnan), E. Tibet
<i>Cimicifuga foetida</i> var. <i>matsumurae</i> Nakai	<i>Actaea matsumurae</i> (Nakai) J. Compton & Hedd.	<i>Cimicifuga foetida</i> f. <i>femina</i> Huth, <i>C. foetida</i> var. <i>leiogyna</i> H. Takeda	Japan (Honshu)
<i>Cimicifuga americana</i> Michx.	<i>Actaea podocarpa</i> DC	<i>Cimicifuga cordifolia</i> Pursh, <i>Cimicifuga podocarpa</i> (DC.) Elliot, etc.	Georgia, Kentucky, Maryland, N. Carolina, Pennsylvania, South Carolina, Tennessee, Virginia, W. Virginia
<i>Cimicifuga acerina</i> f. <i>purpurea</i> Hsiao	<i>Actaea purpurea</i> (P. K. Hsiao) J. Compton	<i>Cimicifuga purpurea</i> (P. K. Hsiao) C. W. Park & H. W. Lee, <i>Cimicifuga acerina</i> f. <i>strigulosa</i> P. K. Hsiao, etc.	China (Anhui, Gansu, Guizhou, Hebei, Henan, Jiangxi, Shanxi, Shaanxi, Sichuan)

Scientific Name	Proposed Name <sup>1</sup>	Synonyms	Distribution
<i>Cimicifuga racemosa</i> (L.) Nutt.	<i>Actaea racemosa</i> L.	<i>Cimicifuga serpentaria</i> Pursh; <i>Botrophis serpentaria</i> Raf., <i>Botrophis actaeoides</i> Fisch. & C. A. Mey; <i>Thalictrodes racemosa</i> (Kl.) Kuntze	Eastern North America: Alabama, Arkansas, Connecticut, Delaware, Georgia, Illinois, Indiana, Kentucky, Maryland, Massachusetts, Maine, Missouri, New Jersey, New York, North Carolina, Ohio, Ontario, Pennsylvania, South Carolina, Tennessee, Virginia, W. Virginia
<i>Cimicifuga racemosa</i> var. <i>dissecta</i> A. Gray	<i>Actaea racemosa</i> var. <i>dissecta</i> (A. Gray) J. Compton		Rare variety, in Delaware, along Brandywine Creek near Rockland; Pennsylvania, Upper Darby
<i>Cimicifuga foetida</i> var. <i>simplex</i> (DC.) G. Don. - 쫓대승마	<i>Actaea simplex</i> (DC.) Wormsk. ex Prantl	<i>Cimicifuga simplex</i> (DC.) Wormsk. ex Trucz., <i>C. foetida</i> var. <i>intermedia</i> Regel, <i>C. dahurica</i> , var. <i>tschonokii</i> Huth, <i>C. foetida</i> f. <i>hermaphrodita</i> Huth, <i>C. dahurica</i> var. <i>candollei</i> Huth, etc.	Russian Far East (Kamachatka), Japan (Honsu), S. Korea,
(new species), related to the N. American <i>A. laciniata</i>	<i>Actaea taiwanensis</i> J. Compton, Hedd. & T. Y. Yang		Taiwan
<i>Cimicifuga simplex</i> var. <i>yesoensis</i> Nakai	<i>Actaea yesoensis</i> (Nakai) J. Compton & Hedd.	<i>C. yesoensis</i> (Nakai) Kudo, <i>Cimicifuga simplex</i> f. <i>villosa</i> Nakai	Russian Far East, Sakhalin
<i>Cimicifuga yunnanensis</i> Hsiao	<i>Actaea yunnanensis</i> (P. K. Hsiao) J. Compton		China (Gansu, Sichuan, Yunnan), Tibet
<i>Cimicifuga nanchuanensis</i> P. K. Hsiao in W. T. Wang & P. K. Hsiao			

Table 2. 한반도에 분포하는 승마속(*Cimicifuga* L.) 식물

Scientific Name*	Proposed Name <sup>1</sup>	Synonyms*	Distribution
<i>Cimicifuga japonica</i> (Thunb.) Spreng. - 왜승마	<i>Cimicifuga japonica</i> (Thunb.) Spreng. 왜승마	- <i>Actaea acerina</i> (Siebold & Zucc.) Prantl - <i>Actaea japonica</i> Thunb. - <i>Cimicifuga acerina</i> (Siebold & Zucc.) Tanaka - <i>Cimicifuga acerina</i> var. <i>intermedia</i> Hara - <i>Cimicifuga acerina</i> var. <i>macrophylla</i> (Koidz.) Hara - <i>Cimicifuga acerina</i> var. <i>peltata</i> (Makino) Hara - <i>Cimicifuga chinensis</i> Koidz. - <i>Cimicifuga japonica</i> var. <i>acerina</i> (Siebold & Zucc.) Huth - <i>Cimicifuga japonica</i> var. <i>macrophylla</i> (Koidz.) Hara - <i>Cimicifuga macrophylla</i> Koidz. - <i>Cimicifuga peltata</i> (Makino) Koidz.	제주도 중산간 지역의 상록침엽수림, 남부 도서지역 (거제도)
<i>Cimicifuga biternata</i> (Siebold & Zucc.) Miq. - 개승마	<i>Cimicifuga acerina</i> (S. et Z.) Tanaka 개승마	- <i>Actaea biternata</i> (Siebold & Zucc.) Prantl - <i>Cimicifuga japonica</i> var. <i>acutiloba</i> Hara - <i>Cimicifuga japonica</i> var. <i>biternata</i> (Siebold & Zucc.) Finet & Gagnep - <i>Cimicifuga japonica</i> var. <i>obtusiloba</i> (Siebold & Zucc.) Huth	한반도에 분포하지 않음. (왜승마에 포함)
<i>Cimicifuga dahurica</i> (Turcz. ex Fisch. & C.A.Mey.) Maxim. - 눈빛승마	<i>Cimicifuga dahurica</i> (Turcz. ex Fisch. & C.A.Mey.) Maxim. 눈빛승마	- <i>Actaea dahurica</i> (Turcz.) Franch. ex Fisch. & C.A.Mey. - <i>Actaea ptersperma</i> Turcz. ex Fisch. & C.A.Mey. - <i>Cimicifuga dahurica</i> for. <i>mascula</i> (Regel) Huth - <i>Cimicifuga dahurica</i> var. <i>fertilis</i> Regel - <i>Cimicifuga dahurica</i> var. <i>mascula</i> Regel	전국의 높은 산지에 흔하게 분포, 주로 경기 북부와 강원도, 경상북도, 충청북도에 분포
<i>Cimicifuga foetida</i> L. - 황새승마	<i>Cimicifuga foetida</i> L. 황새승마	- <i>Actaea cimicifuga</i> L. - <i>Cimicifuga mairei</i> H.Lev.	한반도 북부지역에 분포 (백두산)
<i>Cimicifuga heracleifolia</i> Kom. - 승마	<i>Cimicifuga heracleifolia</i> Kom. 승마		한반도 서부지역 특히, 안면도, 태안, 강화 등지와 서해 도서지역에 분포

Scientific Name*	Proposed Name <sup>1</sup>	Synonyms*	Distribution
<i>Cimicifuga heracleifolia</i> var. <i>bifida</i> Nakai - 세잎승마	<i>Cimicifuga heracleifolia</i> var. <i>bifida</i> Nakai 세잎승마		강원도(인제, 양양, 삼척, 홍천, 춘천, 평창, 영월, 정선, 태백) 일원에 분포
<i>Cimicifuga simplex</i> (DC.) Turcz. - 췌대승마	<i>Cimicifuga simplex</i> (DC.) Turcz. 췌대승마	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Actaea cimicifuga</i> var. <i>simplex</i> DC.</li> <li>- <i>Cimicifuga dahurica</i> var. <i>candollei</i> Huth</li> <li>- <i>Cimicifuga dahurica</i> var. <i>tschonokii</i> Huth</li> <li>- <i>Cimicifuga foetida</i> var. <i>intermedia</i> Regel</li> <li>- <i>Cimicifuga foetida</i> var. <i>matsumurai</i> Nakai</li> <li>- <i>Cimicifuga foetida</i> var. <i>simplex</i> (DC.) Regel</li> <li>- <i>Cimicifuga simplex</i> var. <i>matsumurai</i> (Nakai) Nakai</li> <li>- <i>Cimicifuga simplex</i> var. <i>tschonokii</i> (Huth) Matsum. &amp; Nakai</li> <li>- <i>Cimicifuga simplex</i> var. <i>yesoensis</i> Nakai</li> <li>- <i>Cimicifuga taquetii</i> H.Lev.</li> <li>- <i>Cimicifuga ussuriensis</i> Oett.</li> <li>- <i>Cimicifuga yesoensis</i> (Nakai) Kudo</li> </ul>	강원도 높은 산지와 경기 북부, 경상북도 높은 산지에 분포

## 제 2 절 실험재료 및 방법

한반도에 분포하는 승마속(*Cimicifuga* L.)식물은 승마(*C. heracleifolia*), 눈빛승마(*C. dahurica*), 초대승마(*C. simplex*), 왜승마(*C. japonica*)와 승마의 변종으로 알려진 세잎승마(*C. heracleifolia* var. *bifida*)와 북한지역에 분포하는 황새승마(*C. foetida* L.)를 포함하여 총 7분류군에 해당하는 것으로 알려져 있다(Table 2).

한반도에 분포하는 승마()속 식물에 대한 연구는 대부분 분류학적 연구()이며 재배와 약재로서의 가치, 생리활성물질의 탐색 등에 관한 연구는 이루어진 바 없다. 이 뿐만 아니라 승마속(*Cimicifuga* L.) 식물 중 한반도에만 분포하는 한반도 특산 분류군인 세잎승마(*C. heracleifolia* var. *bifida*)와 우리나라 전국에 걸쳐 단일 구계에서만 분포하며 분포 면적이 좁고 개체수가 많지 않아 식물구계학적 특정식물 중 V등급에 해당하는 승마(*C. heracleifolia*)에 대한 세부적인 분포조사와 생육현황에 관한 조사 등이 이루어진 바 없다. 이러한 점은 자생식물 자원을 이용한 천연물 탐색이나 본 연구와 같은 생리활성물질을 탐색하는 연구에 있어서 걸림돌이 될 수 있을 것이다. 이와 더불어 다양한 문헌에서 본 연구의 대상이 되는 승마속(*Cimicifuga* L.)식물에 대한 조사에서 눈빛승마(*C. dahurica*), 세잎승마(*C. heracleifolia* var. *bifida*), 승마(*C. heracleifolia*), 왜승마(*C. japonica*)를 혼동하거나 인접분류군으로 오동정하는 사례가 많은 것으로 나타나고 있어 전국적인 분포 현황을 평가하는데 어려움이 있는 것으로 나타나고 있다.

본 연구에서는 연구의 대상이 되는 분류군으로 한반도 특산식물인 세잎승마(*C. heracleifolia* var. *bifida*)와 분포 범위가 넓고 개체수가 많은 눈빛승마의 강원도 일원 분포지에 대한 조사를 수행하여 그 특성을 비교하였으며 이와 더불어 세잎승마의 기본종에 해당하는 승마(*C. heracleifolia*)의 분포 실체와 분포지에 대한 조사를 추가하였다.

### 1. 연구대상 종

#### 가. 세잎승마 (*C. heracleifolia* var. *bifida*)

세잎승마는 미나리아재비과(*Ranunculaceae*)의 다년생초본식물로 기본종인 승마(*C. heracleifolia*)와는 달리(2회 삼출) 잎이 1회 3출엽이며 꽃잎의 끝부분이 2개로 갈라져 있는(*bifida*) 특징을 나타낸다. 식물체 전체에 털이 없고 다소 윤기가 있으며 키는 개화 시 1.5m이상 자라기도 한다. 꽃은 주로 8~9월에 총상의 꽃차례에 많은 꽃이 달리며 보통 흰색이거나 연한 노랑색이다. 열매는 삭과이며 종자에는 인편이 달려 있으며 10월에 익는다. 세잎승마는 비교적 건조한 산지의 숲이나 숲 가장자리에 분포하며 특

히, 식생이 발달하지 않고 비교적 배수가 양호한 경사면에 분포한다. 건조한 곳에 자라는 식물임에도 뿌리가 크게 발달하지 않는 경향이 있으며 지역에 따라 개체의 크기와 잎의 크기에서 차이가 있다.



그림 1. 세잎승마의 형태적 특성(개화 개체, 꽃, 골돌과, 종자)

세잎승마(*C. heracleifolia* var. *bifida*)는 1909년 Nakai가 강원도에서 채집된 것을 최초 기록하였으며 이후 그 실체가 알려지지 않았으며 이(2000)의 연구를 통해 한반도 분포가 보고되었으며 그 이전까지는 승마, 개승마, 왜승마로 기록한 것으로 나타나고 있다. 그 이후에도 세잎승마의 한반도내 분포에 대해서는 잘 알려지지 않았으며 이

때문에 환경부의 식물구계학적 특정식물종 V 등급에 포함되기도 하였다. 그러나 본 연구과정에서 강원도 일원의 본 분류군에 대한 분포조사를 실시한 결과 강원도 대부분의 지역에서 비교적 흔하게 관찰되는 종에 해당하였으며 개체수 또한 비교적 많은 것으로 나타났다. 주요 분포지로는 한반도의 중부지방을 관통하는 대석회암층에 해당하는 영월, 정선, 평창, 삼척에 이르는 넓은 지역으로 이 지역의 북쪽에 인접한 경사면의 산지에서 비교적 흔하게 관찰되는 경향이 있었다. 또한 석회암 지역이 아닌 지역에서는 주로 숲 가장자리의 식생이 발달하지 않은 산지의 경사면에 분포하였는데, 강원도 고성군 일원, 인제, 춘천, 홍천, 평창, 횡성에서 연속적인 분포가 관찰되었다. 따라서 세잎승마의 한반도내 분포지는 주로 강원도 이북에 해당하며 개체수와 개체군 수는 비교적 많았다. 다만, 세잎승마의 경우 지역적으로 개체의 키, 잎의 넓이 등에서 편차가 큰 것으로 나타났으며 특히, 강원도 동해안의 고성, 양양 등지에 분포하는 세잎승마의 경우 개체의 크기와 잎의 면적이 다른 지역에 분포하는 것에 비해 2배 이상에 이르는 것으로 나타났다.

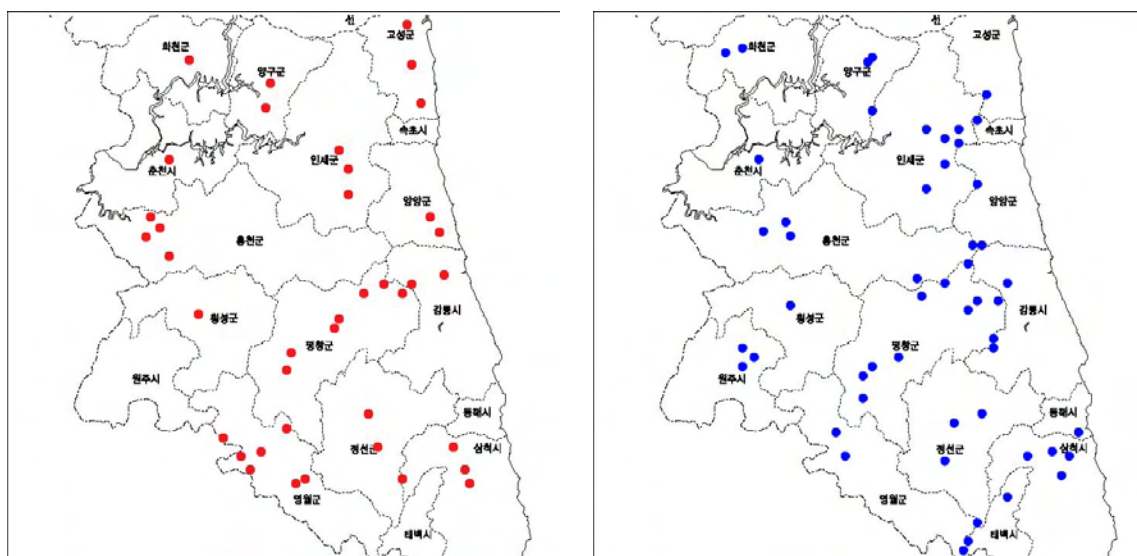


그림 2. 강원도 일원 세잎승마(*C. heracleifolia* var. *bifida*)(우) 와 눈빛승마(*C. dahurica*) 분포 현황

#### 나. 눈빛승마 (*C. dahurica*)

눈빛승마는 미나리아재비과(Ranunculaceae)의 다년생초본식물로 지리산, 덕유산, 계룡산, 주왕산 등의 높은 산지와 중부 이북의 산지에서 자라며 키는 개화시에 1.5m에 이르기도 한다. 보통 암수딴그루로(자웅이주)이며 꽃은 주로 8월에 피며 줄기 끝의 총



상 꽃차례에 여러 개의 흰색 꽃이 달린다. 열매는 9~10월에 성숙하기 시작하여 11월 경에 익어 그 안에 있는 종자가 떨어지며 종자의 표면은 인편으로 덮여 있다.

주요 생육지는 산지의 경사면으로 토양의 비옥도가 높고 습기가 유지되며 상층식 생이 발달한 지역에 해당한다. 우리나라 전국에 걸쳐 분포하며 개체 수 또한 비교적 많은 것으로 알려져 있다. 위의 세잎승마와 같이 백두대간을 중심으로 서쪽과 석회암 지대에 분포하는 눈빛승마는 식물체의 키가 2.5m에 이르기도 하며 근계가 대단히 크게 발달하는 경향이 있다.

#### 다. 승마(*C. heracleifolia*)

본 연구의 주요 재료가 되는 세잎승마(*C. heracleifolia* var. *bifida*)의 기본종에 해당하는 식물로 한반도에서는 그 실체가 잘 알려져 있지 않은 식물이며 세계적으로도 중국의 동쪽(서해안(황해) 연안)에 제한적으로 분포한다고 알려져 있다.([www.eflora.org](http://www.eflora.org)) 흔히 한약제로 사용하는 승마(升摩)는 본 분류군을 지칭하는 것이 아니며 이는 이 식물의 분포가 매우 제한적이며 개체수 또한 많지 않아 약제로서의 활용 가능성이 낮은 원인이 있는 것으로 보인다. 결과적으로 한약제로 사용되는 승마(升摩)는 앞서서도 언급한 바와 같이 *Cimicifuga foetida* L.(황새승마)를 주로 이용하며 우리나라에서는 동의 보감에서 중국의 약제를 대응할 수 있는 대응으로 동일한 부류에 속하는 눈빛승마(*C. dahurica*), 승마(*C. heracleifolia*) 등을 사용하였던 것으로 생각되었다. 황새승마는 한반도 북부지방과 중국 북부지방에 널리 분포하는 식물로 중국에서는 이용이 쉬웠을 것이나 한반도 중부 이남에서는 이를 이용하기 위해서는 비용이 많이 필요했기 때문일 것이다.



그림 3. 눈빛승마의 개화개체, 화서, 골돌과, 종자

본 연구에서는 생리활성유사물질의 탐색 대상 식물로 한반도 특산 분류군인 세잎승마(*C. heracleifolia* var. *bifida*)를 대상으로 선정하여 한반도 특산식물을 이용한 신물질 탐색의 사례와 산업화의 기반을 확보하고자 하였다. 그러나 현재까지 승마()에 대한 실체가 불명확한 것으로 나타나고 있으며 이 때문에 승마()와 세잎승마()의 분류학적 위치에 대한 추가적인 검토 또한 이루어지지 않고 있는 것으로 나타나고 있다. 결과적으로 학자에 따라서는 세잎승마()를 승마()의 변종이 아닌 하나의 독립된 분류군으로 취급해야 한다는 견해(현, 2011 Personal communication)와 기존의 이와 박(2000)의 견

해를 따라야 한다는 견해가 존재하나 이 또한 제한적으로 일부 학자들 간의 견해에 불과한 것이다. 따라서 본 연구에서는 연구 대상이 되는 세잎승마()와 승마()와의 분류학적 위치에 대해 향후 추가적인 연구 수행이 불가피할 것으로 판단되었으며 이와 같은 필요성에 따라 승마()에 대한 실체 확인과 식물체의 확보가 필요한 것으로 판단되었다.



그림 4. 승마()의 외부형태와 화서, [www.google.com](http://www.google.com) 검색 자료

승마(*C. heracleifolia*)는 미나리아재비과의 다년생초본식물로 깊은 산 속에서 자란다. 키는 1.2m 정도이며, 뿌리는 굵고 흑자색을 띤다. 잎은 소엽이 3장씩 모여 나고 소엽의 가장자리는 보통 2~3개로 갈라지며 불규칙한 톱니가 있다. 꽃은 8~9월경 원줄기 끝에 뺨뺨이 달린다. 꽃잎은 3~4장으로 흰색이며 수술은 많고 열매는 골돌(蓇葖)로 익는다. 여름철 질푸른 산길에 축제의 폭죽처럼 피어난 흰 꽃들은 화려한 분위기를 자아낸다. 한방에서는 뿌리를 승마라고 하여 해열·해독·두통에 사용한다. 번식은 뿌리나누기나 씨로 한다.(2012, 브리태니커 백과사전) 한반도의 서해안 일원과 중국의 동부 해안지역에서 만주에 이르는 지역에 걸쳐 분포한다. 분포 면적과 개체수가 많지 않은

것으로 나타나고 있으며 이 때문에 본 분류군에 대한 정보 또한 매우 제한적인 것으로 나타나고 있다.

승마(*C. heracleifolia*)와는 잎이 항상 1회 3출 복엽이고 꽃잎의 끝 부분이 2개로 갈라지는 특성을 가지는 분류군을 Nakai가 세잎승마(*C. heracleifolia* var. *bifida*)로 구분하였으며 승마(*C. heracleifolia*)의 변종으로 처리하였다. 한반도에서 승마의 분포는 문헌자료에 의하면 경기도, 강원도, 충청도 일원에 분포하는 것으로 나타나고 있으나 대부분은 눈빛승마, 세잎승마의 오동정으로 추정된다. 현재까지 확인된 승마의 분포지는 연평도, 대청도, 강화도, 석모도, 충청남도 태안, 서산 등지와 경기도 용인에서 소수의 개체가 발견된 바 있는 것으로 나타나고 있다. 결과적으로 승마(*C. heracleifolia*)는 한반도에서 충청남도 이북의 서해안 지역과 서해 도서지역이 주요 분포지에 해당하는 것으로 추정된다.

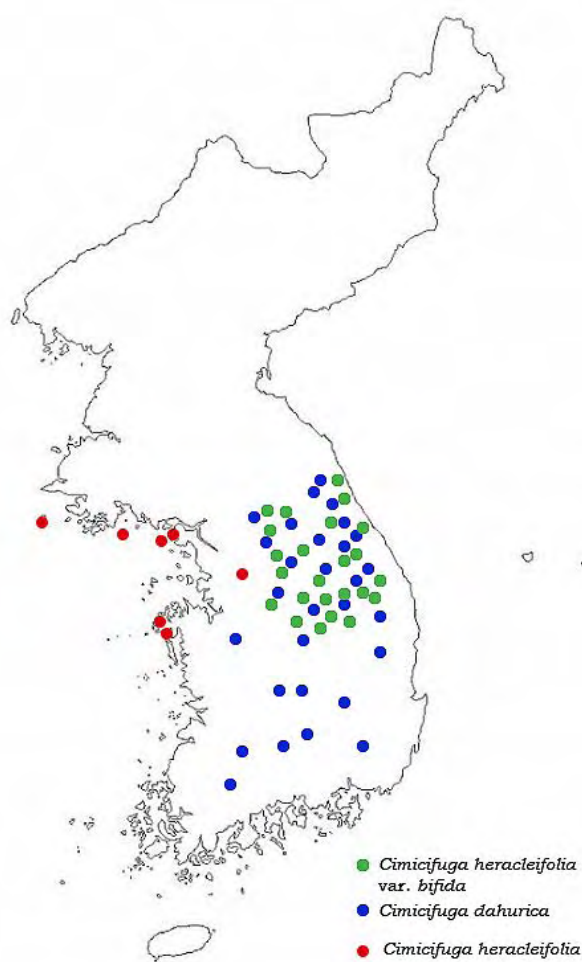


그림 5. 한반도 중부 이남에서 승마, 세잎승마, 눈빛승마 분포도

## 2. 연구방법

### 가. 분포 조사

한반도에 분포하는 승마속 식물에 대한 전국적인 조사 현황은 문헌자료를 참고하였으며 여기에 현장 조사결과를 추가하여 보고한 바 있다. 또한 본 연구의 주요 대상종에 해당하는 세잎승마 그리고 세잎승마와는 분포 범위와 생육지의 특성에서 차이를 보이는 눈빛승마의 생육지 식생 특성을 조사하여 세잎승마의 생육환경의 독특함을 비교평가 한 바 있다. 이와 같은 조사는 현장 조사를 통해 각각의 대상종의 밀도가 높은 지역에 15m x 15m의 방형구를 설치하였으며 Braun-Blanquet의 식물사회학적 식생 조사법을 이용하여 각각의 층위별로 출현종을 조사하고 각각의 피도를 산정하여 기록하였다. 각 종이 출현하는 지역에 대해서는 GPS를 이용하여 위치를 기록하고 분포 범위와 면적 등의 정보를 기록하여 분포도 작성에 이용하였다.

분포조사는 본 연구가 수행되는 동안 지속적으로 이루어졌으며 2011년에는 본 연구의 대상종인 세잎승마(*C. heracleifolia* var. *bifida*)와의 유연관계 검토를 위해 승마(*C. heracleifolia*)에 대한 분포 조사를 추가하였으며 승마에 대한 분포 조사는 일부 지역에 대한 현장조사와 관련연구자에게 문의하는 탐문조사를 병행하였다. 분포 현황에 대한 결과는 대상종의 세부 설명에 포함하였다.

### 나. 생리활성유사물질 탐색과 활력검증을 위한 시료 확보

본 연구는 한반도에 분포하는 승마속 식물 중 한반도 특산 분류군인 세잎승마를 주요 대상으로 생리활성물질의 탐색과 활력검증이 이루어졌다. 본 연구에서 채료가 되는 세잎승마의 근경 확보는 매우 중요하며 이를 위해 세잎승마의 주요 분포지에 대한 사전 조사 자료를 바탕으로 각각의 개체군에 미치는 영향이 크지 않은 범위내에서 시료가 되는 근경의 확보가 이루어졌다. 근경의 확보는 분포지 내에서 소규모 집단 또는 개체군 당 10개체 내외로 제한하였으며 개체군의 크기가 1,000개체 이상으로 판단되는 지역에 대해서는 약 30개체 내외의 근경 수집이 이루어졌다. 수집된 근경은 곧바로 실험을 위해 제공되거나 또는 식물원내의 포장에 옮겨 실험에 사용될 때까지 관리하였다.

세잎승마와 더불어 생리활성 비교 평가를 위해 눈빛승마, 촛대승마 및 교잡종인 세잎승마 x 촛대승마의 근경이 함께 수집 및 제공되었다. 눈빛승마, 촛대승마의 시료 수집 및 제공은 세잎승마와 동일한 방법으로 이루어졌으며 세잎승마 x 촛대승마 교잡종은 식물원내에서 3년이상 관리가 이루어져 근경이 비대해진 식물체를 채취하여 제공되었다.

#### 다. 증식연구

승마속 식물에 대한 증식연구는 보고된 바 없는 것으로 나타나고 있으며 일부 식물원 및 관련 식물 수집가들에 의해 종자의 발아 특성이 제시된 바 있다. 승마류 중 휴면성이 낮은 식물로는 왜승마가 있으며 왜승마는 습윤저온 상태에서 약 60일이 경과하면 발아율이 높게 유지되는 것으로 알려져 있다. 또한 기존의 증식 실험에서도 이와 같은 결과를 나타내었다. 반면에 세잎승마, 눈빛승마, 촛대승마는 2종의 휴면성이 존재하는 것으로 알려져 있으며 이 때문에 정상적인 방법으로 파종할 경우 발아까지 2년이 소요되는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서도 이와 같은 점을 고려하여 2종의 휴면 타파가 가능한 방안을 검토하였으며 이를 위해 다음과 같은 방법으로 실험하였다.

- (1) 종자의 채종 및 정성
- (2) 종자의 침지 및 3~5일간 방치
- (3) 종자 소독 : 60% ethyl alcohol에 30초간 종자 소독
- (4) Petri-Dish에 치상 후 저온(2~8℃)에서 45일간 방치
- (5) 실온에 30일간 방치 (0~25℃)
- (6) 저온(2~8℃)에서 45~50일간 방치
- (7) 실온에 1주일간 방치 후 파종

파종은 파종상자를 이용하였으며 잡초의 종자가 포함되지 않은 마사토에 원예용 상토(peat moss)를 약 80:20으로 혼합하여 사용하였다. 파종상자에 약 3cm의 두께로 조제한 토양을 치상하고 평평하게 고른 다음 그 위에 일정한 간격(약 1cm)으로 종자를 파종하고 0.5~1cm의 두께로 토양을 피복하였다. 파종 직후 관수하였으며 토양이 마르지 않도록 기상 조건에 맞추어 관수하였다. 관수에 사용한 물은 지하수로 수온이 평균 13~15℃였다.

#### 라. 증식관리

발아한 개체는 파종상자에서 본엽이 1~2개 성장할때까지 관리하였으며 이후는 비닐포트(4" 또는 3.5")에 이식하여 성장관리하였다. 성장관리를 토양은 마사토에 원예용 상토를 70:30의 비율로 혼합 조제하여 사용하였다. 승마속 식물 중 본 증식연구의 대상이 되는 세잎승마와 눈빛승마의 그리고 세잎승마 x 촛대승마의 교잡 종은 모두 직사광선에서보다는 약 50%의 차광이 이루어진 즉, 식생이 일부 우거져 있어 전체적인 광량의 50~60%가 차단되는 지역에서 가장 왕성한 정장과 개화 결실이 이루어지는 점을 고려하여 50%의 차광하여 관리하였다.

각각의 증식 식물체는 구별하여 관리가 이루어졌으며 잎의 갈변(defoliation)이 이루어진 후 발아시기와 종별로 별도 관리된 개체 중 각각 30개체를 무작위로 선택하여 지상부를 제거한 후 근경을 수집하고 흐르는 물에 세척하여 토양과 이물질 제거하고 Kimwipes를 이용하여 물기를 제거하고 중량을 측정하였으며 이를 비교하였다.

#### 마. 생산성과 경제성 평가

본 연구는 자생 승마속 식물을 이용하여 여성호르몬 유사활성 연구 및 기능성 식품 소재 개발 하며 이를 이용하여 농가의 소득과 산업화에 따르는 부가가치를 높이는 데 있다. 따라서 본 연구의 목표 달성을 위해서는 여성호르몬 유사활성의 탐색과 소재개발과 더불어 본 연구를 통해 개발된 기술을 이용하여 대량생산을 통한 산업화의 기초를 확보하는 것이 매우 중요하다. 따라서 원료가 되는 승마속 식물의 재배특성과 더불어 생산성과 경제성의 평가는 매우 중요한 과제가 될 것이다.

본 연구의 주요 대상종인 세잎승마와 비교종에 해당하는 눈빛승마에 대한 성장 특성과 생산성 확보가 가능한 기간, 중량, 경제적 가치 등을 평가하였다.

각각의 종에 대한 생산성 평가를 위해서 단위면적당(1m<sup>2</sup>) 재배가능 개체수를 평가하고 최초 정식 후 수확에 이르기까지의 기간, 관리비용, 단위면적당 최소 단가 등에 대해 평가하였다. 승마속 식물의 생산성 평가는 앞의 증식연구에서 나타난 중량 변화 자료를 활용하였으며 여기에 자연상태에서 채취하여 순화 관리 중인 개체의 근계 변화를 비교하여 적정 생산성을 제시하였으며 식물원이 인접한 강원도 평창군, 정선군, 영월군의 주요 작물과 경제성을 비교 평가하였다.

## 제 3 절 결과 및 고찰

### 1. 증식연구

미나리아재비과에 속하는 대부분의 식물들은 적어도 저온에 의한 휴면타파가 이루어지지 않을 경우 발아하지 않는 것으로 관찰된 바 있다. 이 때문에 최초 추파(가을 파종)을 통해 휴면 타파 및 발아여부를 확인하였으나 2년차에 발아하는 특성을 나타냈었다. 따라서 발아기간의 단축이 요구되었으며 이를 위해 2종의 휴면 타파를 위해 저온과 실온 다시 저온 및 실온방치후 파종의 2단계 휴면 타파 실험이 추진되었다. 그 결과 세잎승마는 최종 발아율이 약 86%의 발아율을 보였으며 눈빛승마는 20~60% 까지 발아율에서 편차가 큰 것으로 나타났다.

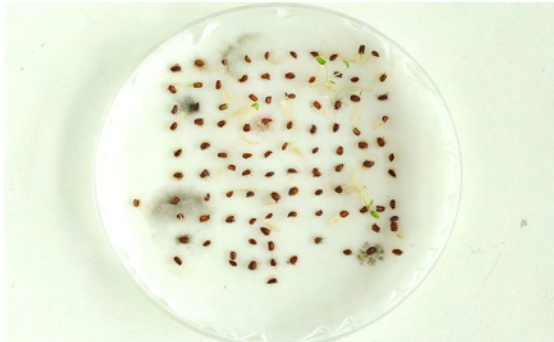




△ 세잎승마 종자



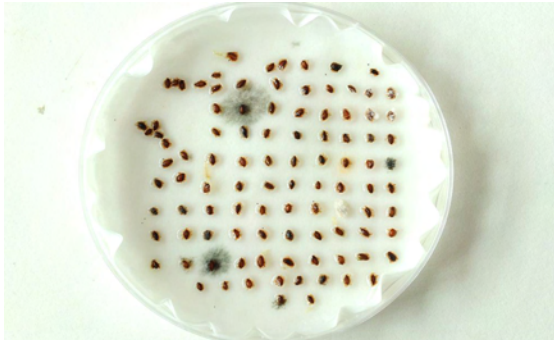
△ 세잎승마 종자(Close-up)



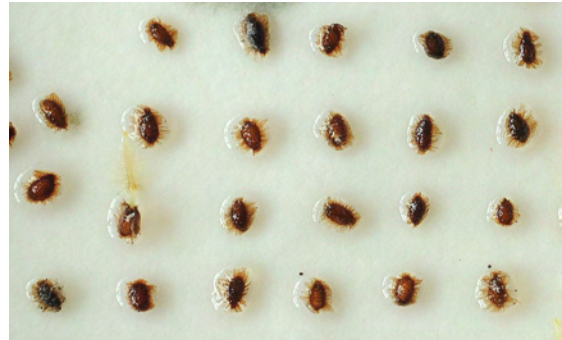
△ 세잎승마 2중 휴면 타파 후 발아,  
03. 09. 2012



△ 세잎승마 2중 휴면 타파 후 발아  
(세부 발아상태)



△ 세잎승마 x 좃대승마 교잡종 종자 발아,  
03. 09. 2012



△ 세잎승마 x 좃대승마 교잡종 종자 발아  
(세부 발아상태)



△ 세잎승마 2중 휴면 타과 후 발아,  
05. 11. 2011



△ 세잎승마 2중 휴면 타과 후 발아,  
05. 11. 2011



△ 세잎승마 발아, 2009년 11월 파종,  
05. 11, 2011



△ 세잎승마 발아, 2009년 11월 파종,  
05. 11, 2011



△ 세잎승마 성장(2011 발아), 포트 이식,  
10. 16, 2011



△ 세잎승마 성장(2010 발아), 포트 이식,  
10. 16, 2011



△ 분빛승마 성장(2010 발아), 포트 이식,  
10. 16, 2011



△ 세잎승마 성장(2011 발아),  
10. 16, 2011

세잎승마와 세잎승마 x 촛대승마 교잡 식물체의 종자에 대해서는 추가적인 발아 특성 연구를 추진하였다. 실험방법은 2중의 휴면 타파를 위한 습육 침지 - 저온 저장 - 실온 방치 - 저온 저장 - 파종의 과정에서 저온과 실온에서의 방치 기간 동안 변온에 노출시켰다. 온도의 변화 범위는 일 주기에 따랐으며 - 4℃ ~ 18℃의 변화폭을 유지하였다. 이와 같이 휴면타파기간 동안 변온에 노출될 경우 휴면타파와 발아가 촉진되는 것으로 나타났다.

발아한 개체의 성장은 포트에 이식할 경우 이식 과정에서의 뿌리 손상에 따라 성장이 일정부분 지연되는 것으로 나타났다. 특히, 포트에 이식할 경우 포트의 크기를 넘어 뿌리가 급격하게 비대해지기 때문에 성장이 지연되었으며 분빛승마의 경우 생육지의 입지 특성이 비교적 습기가 많고, 토양의 유기물 함량이 높으며 유효도가 높은 것으로 나타나 이와 같은 특성에서 생육이 왕성할 것으로 판단되었으나 실제 성장과정에서는 50%내외의 차광에서 성장상태가 우수한 것으로 관찰되었다. 그러나 한반도에 분포하는 승마류 중 왜승마를 제외한 분류군이 분방계인자를 소유하고 있는 점에 따라 차광도와 더불어 온도의 상승에 따른 요인이 또 다른 변수가 될 수 있는 것으로 특히, 여름철 고온의 온실에서 생육이 불량해지거나 뿌리의 일부 썩음이 관찰되어 본래의 증식에 따른 비교와는 다른 결과를 나타내었다.

## 2. 세잎승마와 눈빛승마의 생산성 평가 및 비교

세잎승마와 눈빛승마의 발아 후 초기 성장은 차이가 큰 것으로 나타났다. 발아 후 초기 성장에서 눈빛승마의 성장이 보다 빠른 것으로 나타났으며 반면에 세잎승마의 성장은 비교적 느리며 약제로 사용하는데 필요한 근계의 발달 또한 느린 것으로 나타났다.



△ 세잎승마 1년생, 조기휴면타파 후 성장



△ 세잎승마 1년생, 조기휴면타파 후 성장



△ 세잎승마 1년생, 조기휴면타파 후 성장



△ 세잎승마 1년생, 2009년 파종 후 발아



△ 세잎승마 1년생, 2009년 파종 후 발아



△ 세잎승마 1년생, 2009년 파종 후 발아



△ 세잎승마 2년생, 2010년 발아



△ 세잎승마 2년생, 2010년 발아



△ 눈빛승마 1년생, 2011년 발아



△ 눈빛승마 1년생, 2011년 발아



△ 눈빛승마 2년생, 2010년 발아



△ 눈빛승마 2년생, 2010년 발아

본 연구의 목적은 인공적인 증식을 통해 여성호르몬 유사활성을 나타내는 세잎승마의 근경을 확보하는 데 있다. 따라서 발아기간의 단축과 성장기간의 단축을 통한 생산성의 확보가 중요한 과제가 될 것이다. 앞의 실험을 통해 발아율의 향상이 가능하였으며 발아 후 성장관리를 통해 경제적 가치가 있는 근경의 생산이 가능한 지에 대한 평가가 필요할 것이다.

Table 3은 세잎승마와 눈빛승마의 발아 후 성장상태를 비교한 것이다. 세잎승마는 휴면타과를 통해 4월 초순에 파종하였을 경우 당해의 성장을 통해 근경의 중량(습중량)은 평균 1.21g( $\pm$  0.67g)인 것으로 나타났다. 반면에 눈빛승마는 평균 4.78g( $\pm$  1.70g)으로 나타나 3배 이상 빠른 성장을 나타내는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 50%차광 조건에서 나타난 결과로 일반 경작지의 광 조건에서는 숲 하상에 분포하는 특성을 보이는 눈빛승마는 현저한 성장의 둔화가 예상되는 반면 광에 대한 적응성이 매우 양호한 세잎승마는 보다 왕성한 성장을 보일 것으로 예상되었다. 이러한 점은 세잎승마의 재배 효율성을 높일 수 있는 요인으로 평가할 수 있다.

Table 3. 세잎승마와 눈빛승마 근경 성장 비교

	<i>C. heracleifolia</i> var. <i>bifida</i>			<i>C. dahurica</i>	
	GM-T-2011	GM-NT-2011	GM-NT-2010	GM-NT-2011	GM-NT-2010
AV.	1.21	2.61	4.84	4.78	10.30
SD	0.67	1.35	2.07	1.70	1.70
SE	0.12	0.25	0.38	0.31	0.31
n	30	30	30	30	30

세잎승마의 경우 휴면타과 처리가 이루어지지 않은 자연상태와 동일한 조건으로 발아한 것은 평균 2.61g( $\pm$  1.35g)으로 휴면타과 처리한 개체에 비해 성장상태가 좋은 것으로 평가되었다. 따라서 종자의 채종에서 파종이 이루어지는 시기까지의 기간 설정에서 변경이 필요할 것으로 판단되며 2월 하순에서 3월 초순에 가온하지 않는 온실에서 파종이 가능하도록 전체 휴면타과 일정을 조정할 필요가 있을 것으로 판단되었다.

2년생 세잎승마의 근경 중량은 평균 4.84g( $\pm$  2.07g)으로 나타났는데 이것은 포트(4")에 식재하여 관리한 결과로 판단되며 토양에 정식이 이루어졌을 경우 보다 성장이 왕성하게 이루어지는 것으로 보였다.



△ 세잎승마, 자생지 채취(민둥산), 17.5g



△ 세잎승마, 자생지 채취(민둥산), 12.7g



△ 세잎승마, 자생지 채취 후 순화(유천), 225g



△ 세잎승마, 자생지 채취 후 순화(유천), 145g



△ 세잎승마, 자생지 채취 후 순화(민둥산)



△ 승마, 근경(대안), 18g

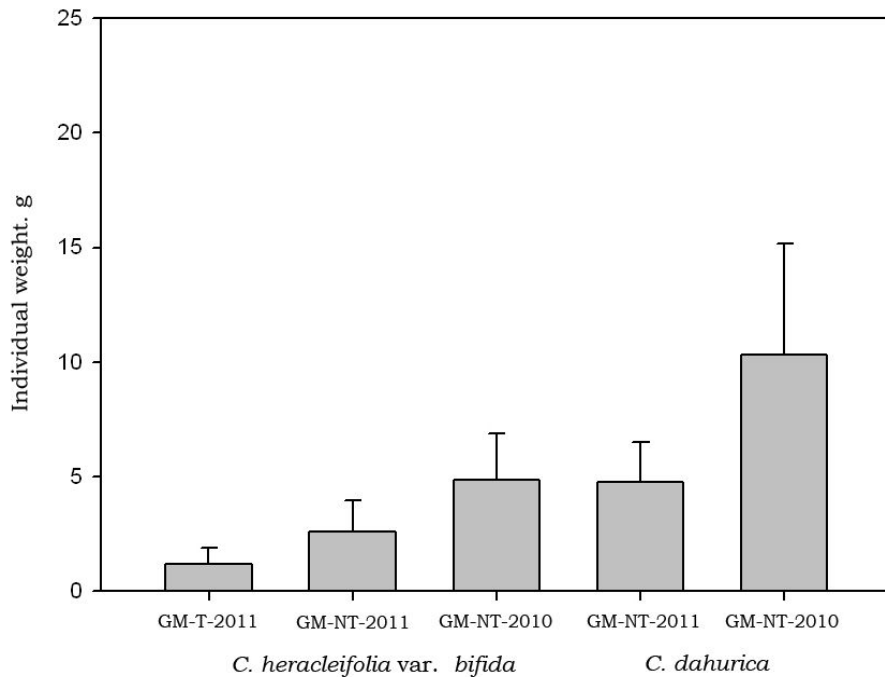


그림 6. 세잎승마()와 눈빛승마 성장 비교 (1년생과 2년생)

세잎승마는 자생지에서 근경의 발달이 비교적 왕성하지 않은 것으로 나타났으며 이는 생육지의 토양 조건에 기인하는 것으로 추정되었다. 즉, 세잎승마의 생육지는 대부분 식생의 발달이 지연되는 지역에 해당하였으며 토양의 유기물 함량 또한 낮은 것으로 추정되었다. 이것은 토양의 유기물층이 발달하지 않은 곳에 주로 분포하는 것으로부터 추정되었다. 이 때문에 자생지에서 채취된 세잎승마의 근경은 20~30g 내외에 해당하였으며 개체의 크기가 작은 것은 12~18g 정도에 불과한 것으로 측정되었다. (위 그림 참조) 반면에 이렇게 채취된 개체를 약 4~5개월간 비교적 토양층이 깊고 배수가 양호하며 유기물의 함량이 비교적 적당한 토양에 식재하여 순화 재배할 경우 근경의 중량이 급격하게 증가하여 140g~230g에 이르는 것으로 관찰되었다. 따라서 본 연구의 목표가 되는 생리활성유사물질 생산을 위한 세잎승마의 근경의 경제성 확보를 위해서는 다음과 같은 과정을 통해 달성될 수 있을 것으로 평가되었다.



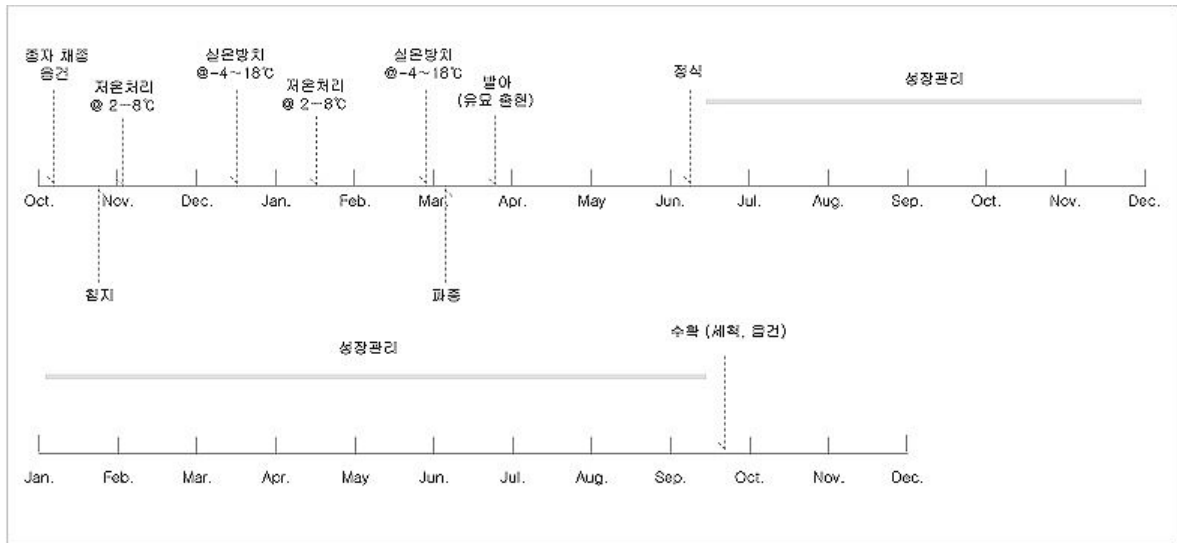


그림 7. 세잎승마 근경 생산 과정 모식, 2년차 수확

그림 7의 모식도에서는 유묘 생산에서 수확까지 2년의 기간을 설정하였다. 이 경우 근경의 생산량에서 차이가 있을 것으로 판단되며 1년간의 추가 성장관리를 통해 수확량의 극대화가 가능할 것으로 판단되었다. 즉, 유묘생산 후 2년차의 근경은 100g 내외가 될 것으로 예상되며 추가적인 관리를 통해 200~400g의 근경 생산이 가능할 것으로 예상된다. 그러므로 세잎승마의 근경 생산량을 극대화 하기 위해서는 위의 그림 7에서 2년차의 가을철에 수확하지 않고 1년을 추가적으로 관리하여 근경의 확대를 통한 생산량 확대가 요구될 것이다.

세잎승마의 분포지는 강원도 일원(춘천, 홍천, 횡성, 인제, 고성, 양양, 강릉, 평창, 영월, 정선)에 해당하며 특히, 주요 분포지로는 석회암 지대인 영월, 정선, 평창을 들 수 있다. 따라서 이 지역의 비교적 척박한 북사면의 경작지가 세잎승마의 생산을 위해 적합한 지역에 해당할 것으로 평가되었다. 즉, 세잎승마는 식생이 발달하지 않은 지역에 분포하며 비교적 척박한 토양에서 생육하지만 급격한 변화가 있는 남향의 경작지에서는 생산성의 저하가 예상되기 때문이다. 이와 같은 지역에서 현재 주로 재배되고 있는 식물(작물)과의 비교를 통해 세잎승마의 근경 생산에 따른 경제성을 평가할 필요가 있으며 이는 향후 산업화에 따른 원재료의 확보를 위해 중요한 부분이 될 것이다. 본 연구의 대상이 되는 세잎승마는 한반도특산식물로 환경부로부터 '국회반출 승인대상종'에 포함되어 있으며 이 때문에 한반도내에서의 생산을 통한 원 재료의 확보가 가능하기 때문이다.

Table 4. 특용작물 및 약용작물의 생산·수익과 세잎승마 예상 생산·수익 비교

작물명	재배기간	수확량/3.3㎡	단가/kg	단가/3.3㎡	초기투자항목	초기투자 및 관리비용/3.3㎡	수익/3.3㎡	비고
참당귀	2년	901g	13,351	12,030	- 종자/종묘 - 유·무기질 비료 - 토지 임차료 - 영농비 (내·외인건비)	4,113	6,725	1년으로 환산
황기	2년	541g	25,216	13,642	- 종자/종묘 - 유·무기질 비료 - 토지 임차료 - 영농비 (내·외인건비)	2,206	5,317	1년으로 환산
더덕	2년	7,500g	1,990	14,990	- 종자/종묘 - 유·무기질 비료 - 토지 임차료 - 영농비 (내·외인건비)	6,303	8,690 (4,344/년)	
인삼	4~5년	2,138g	20,500	43,829	- 종자/종묘 - 유·무기질 비료 - 재료비(가림막 설치 등) - 토지 임차료 - 영농비 (내·외인건비)	18,878	24,961 (6,240/년)	
작약	3년	7,200g	1,625	11,700	- 종자/종묘 - 유·무기질 비료 - 재료비(가림막 설치 등) - 토지 임차료 - 영농비 (내·외인건비)	6,516	5,184 (1,728/년)	

지황	1년	3,910	3,286	12,848	- 종자/종묘 - 유·무기질 비료 - 토지 임차료 - 영농비 (내·외인건비)	8,226	4,623	
감자	1년	7,424g	807	5,991	- 종자비 - 유·무기질 비료 - 재료비(멸칭 등) - 토지 임차료 - 영농비 (내·외인건비)	2,950	3,076 (씨감자 : 평균 5,000/년)	연작
엽연초	1년	766g	8,003	6,130	- 종자/종묘 - 유·무기질 비료 - 재료비(멸칭 등) - 토지 임차료 - 영농비 (내·외인건비)	3,090	3,036	
세잎승마*	3년	8,000g~ 12,000g	1,500 ~ 2,000	12,000 ~ 24,000	- 종자/종묘 - 유·무기질 비료 - 토지 임차료 - 영농비 (내·외인건비)	2,000 ~ 3,000	10,000~ 21,000 (평균 : 16,000 = 5,330/년)	

\* : 경제성 확보를 위해 필요한 수확량, 단가의 예상 범위  
- 40개체/3.3㎡ 재배, 개체당 평균 200g 예상(3년 재배)

강원도농업기술연구원의 농업경영정보를 활용함. 2010년 특용작물 및 약용작물 생산과 수익 및 2011년 특용작물 및 약용작물 생산과 수익 비교 참고

위의 Table 4에 나타난 바와 같이 특용작물 및 약용작물의 생산성에는 편차가 많은 것으로 나타나고 있으며 특히, 수익성이 낮은 작물(예, 작약)은 현저하게 재배 면적이 축소되거나 재배하지 않는 것으로 나타나고 있다. 또한 재배되지 않은 약재나 작물은 수입에 의존하는 것으로 나타나고 있어 농가의 생산 확대와 경제적인 수익을 기대할 수 있는 수준에서의 적당한 생산비 설정이 필요할 것이다. 위의 표에서 나타난 것과 같이 현재 강원도 일원에서는 인삼의 재배면적이 급격하게 증가하고 있는데 이것은 수익성과 관계되는 것으로 판단된다. 즉, 단위면적당 수익성율이 6,000원을 넘기 때문이며 이와 더불어 이러한 수익이 안정적인 점이 강하게 작용하는 것으로 판단된다. 특히, 강원도 일원의 고랭지 채소의 경우 연간 가격 변동의 폭이 크고, 예측 가능하지 않은 문제로 인해 농가의 큰 손실로 이어지는 경우가 많으며 이 때문에 많은 농가에서는 보다 안정적이 수익이 보장되는 작물을 재배하고자 하는 욕구가 있는 것으로 평가된다.

본 연구에서 설정한 목표 중의 하나는 한반도 특산 식물인 세잎승마를 이용하여 생리활성유사물질을 탐색하고 이를 산업화하여 제품을 생산하는데 있으며 이를 위해 원 재료가 되는 세잎승마의 대량 재배와 재배지 확대를 위한 기초를 마련하는데 두었다. 재배면적의 확대와 이를 통한 원 재료의 확보를 위해서는 안정적인 수익의 보장이 될 것이다.

세잎승마는 비교적 척박한 토양에서도 생장이 양호한 식물로 생산을 위한 비용이 비교적 적게 소요될 것으로 예상된다. 많은 작물의 경우 단위 면적당 수익이 높으나 초기 시설비용, 관리비용 등이 높아 전체적인 수익을 낮추는 원인이 되고 있다. 반면에 세잎승마는 이와 같은 초기 비용이 낮고 관리비용 또한 타 작물에 비해 높지 않을 것으로 예상된다. 그러므로 현재와 같은 상황에서 강원도 영월, 평창, 정선의 농가에서는 단위면적당 4,000원 ~ 6,000원의 수익이 보장될 경우 충분히 재배면적의 확대를 기대할 수 있을 것이다.

재배를 통한 재료의 확보는 매우 중요하며 자연상태의 재료 채취를 막는 길이기도 하다. 세잎승마는 넓은 면적에 걸쳐 분포하기는 하나 개체수가 상대적으로 적은 종에 해당하며 자연상태에서의 채취를 통해 산업화에 필요한 원재료의 확보는 불가능할 것이다. 따라서 농가의 재배 확대는 본 연구를 통해 확보된 기술을 적용하여 제품화하는데 있어 필수적인 요소가 될 수 있을 것으로 예상된다.

## 참고문헌

1. 이영노. 2006. 한국식물도감. 교학사
2. 이창복. 1999. 대한식물도감. 향문사
3. 이창복. 2003. 원색대한식물도감. 향문사
4. 현진오, 문순화. 2003. 여름에 피는 우리꽃. 신구문화사
5. 현진오, 문순화. 2004. 가을에 피는 우리꽃. 신구문화사
6. 이우철, 1996 한국식물명고. 아카데미서적
7. 이우철, 1996 원색한국기준식물도감. 아카데미서적
8. 홍문표 · 김영철, 2008 동강유역 생태 · 경관보전지역의 식물상. 원주지방환경청
9. 김영철 · 채현희 · 윤정원, 2009 대암산 은늪 동 · 식물 현황자료집 '환경부지정 습지 보호지역 용늪일원의 식물상', 원주지방환경청
10. 오병운 · 조동광 · 김규식 · 장창기, 2005 한반도 특산 관속식물, 국립수목원
11. www.eFloras.org Flora of China
12. James A. Compton, Alastair Culham and Stephen L. Jury, 1998 Reclassification of Actaea to Include Cimicifuga and Souliea (Ranunculaceae): Phylogeny Inferred from Morphology, nrDNA ITS, and cpDNA trnL-F Sequence Variation, International Association for Plant Taxonomy, Vol. 47, No. 3
13. 이현우 · 박종욱, 1994 Cimicifuga foetida L. Complex 및 근연종(미나리아재비과)에 대한 분류학적 연구, 한국식물학회지, 37(1): 111-124
14. 이현우, 2000 승마속(미나리아재비과)식물의 유전적 분기, 서울대학교 대학원 생명과학부 박사학위 논문
15. 박종욱, 1994 세계산 승마속 식물의 계통과 진화:비교형태학적, 세포학적 및 화학적 접근, 과학재단 용역과제 보고서
16. 이현우 · 박종욱, 1998 한국산 승마속 식물(미나리아재비과)의 핵형분석, 한국식물분류학회지, Vol 28 No. 4 pp 385-398
17. Hyun-Woo Lee and Chong-Wook Park, 2004 New Taxa of Cimicifuga (Ranunculaceae) from Korea and the United States, Novon, Volume 14, Number 2 pp 180-182

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### - 1차년도

연구목표	연구개발 수행내용	달성도
승마의 혈관운동성에 미치는 작용 및 작용기전 분석	- 자생종 승마의 혈관확장 작용 측정 완료 - 혈관확장 작용기전 측정 완료	100%
자생승마 종별 시료확보 및 증식용 종자 저장법 개발	- 한국산 승마 속 식물 활성탐색을 위한 시료 확보 - 분포특성 및 자생지 환경특성연구 완료 - 기확보된 승마 속 종자를 이용한 인공증식 추진 - 대량증식에 필요한 종자확보 및 저온저장법 확립 - 유전자 분석을 위한 시료 확보 완료 - 사업추진에 필요한 식물체 확보 완료	100%
승마의 여성호르몬 수용체에 대한 활성 분석	- 세포수준에서의 에스트로젠 /항에스트로젠 활성 분석 - 각 추출물의 지방암세포에 미치는 부작용 평가	100%
VSMC 증식억제활성 및 작용기전 분석	- Thymidine incorporation test 완료 - 세포내 ROS에 대한 영향 측정 완료	100%
승마종별 각종 추출물 제조	- 4가지 추출용매로 추출물 제조 완료	100%
활성추출물의 적정 추출법 확립	- 활성 추출물 도출	100%
추출수율 및 물성 조사	- 각 승마 추출물의 회수량 측정 완료	100%

### - 2차년도

연구목표	연구개발 수행내용	달성도
승마 함유 복합 추출물의 혈관기능 개선 효능 분석	- 복합추출물의 혈관확장 효능 - 활성추출물의 혈관확장 기전분석	100%
활성 승마 종 대량 증식법 연구	- 활성 승마속 식물종을 대상으로 대량증식 추진 - 사업추진에 필요한 종자 지속 확보 및 저온 저장 - 증식 식물체의 성장상태 관찰 및 생산성 연구 - 분포 특성 및 자생지 환경특성 추가 연구 - 분포 특성을 고려한 재배적지에 대한 연구	100%
승마 함유 복합추출물의 여성호르몬 수용체에 대한 작용 분석	- 여성호르몬 수용체 알파와 베타를 통한 직간접 활성 규명 - VSMC에서의 PAI-1 발현에 미치는 영향분석 - VSMC 증식억제 활성 및 작용기전 분석	100%
각 식물의 배합 추출물제조	- 자생종 승마 함유 복합물 제조 - 배합비 및 활성 비교	100%
적정 배합비 도출		100%
활성 추출물의 적정 추출법 확립	- 혈관확장 실험을 통한 활성추출물 탐색	100%
승마의 유효성분 분석	- HP-20을 이용하여 유효(지표)성분 분리 - 분리한 유효(지표)성분을 HPLC로 분석	80%

- 3차년도

연구목표	연구개발 수행내용	
호르몬결핍 모델쥐에 대한 혈관기능개선 효능 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 활성추출물/시제품의 혈중지질조성 개선효능분석</li> <li>- 활성추출물/시제품의 혈관운동성 개선 효능 분석</li> <li>- 시제품의 혈관확장 효능 평가</li> </ul>	
활성 승마 종 대량 증식, 재배기술 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 활성승마속 식물에 대한 증식 지속 추진</li> <li>- 자생승마속 식물의 성장상태관찰 및 생산성 연구</li> <li>- 재배적지에 대한 지속 연구</li> <li>- 유묘생산 기술 확보</li> <li>- 재배희망 농가에 대한 재배 기술 이전 추진</li> <li>- 증식 식물체의 최적 출하시기에 대한 연구</li> <li>- 교잡종 선발 및 신품종 생리활성 연구지원</li> <li>- 교잡종의 활성 인정 시 대량 증식 연구 지원</li> </ul>	
여성호르몬 수용체에 대한 작용기전 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 혈관신생 관련 유전자 분석 및 변화가 감지된 유전자의 작용기전 분석</li> <li>- 최종 활성 추출물의 자궁 내막에 미치는 부작용 및 유방암 세포 증식에 미치는 영향분석</li> <li>- 활성추출물의 VSMC고사 억제작용 및 기전 분석</li> </ul>	
활성 농축물 및 시제품 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 지표물질의 함량분석 조건 확립</li> <li>- 시제품 개발을 위한 제조조건 확립</li> <li>- 시제품의 식미효과 증진법 개발</li> <li>- 시제품의 유통기한 설정</li> </ul>	

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 연구개발결과의 활용방안

1. 연구결과의 홍보를 통해 관련 업체의 관심을 유도하고, 산업화에 필요한 연구결과 확보를 위한 후속 연구과제를 도출을 추진한다.
2. 국내 관련 일반의약품(210억/년)업체에서 수입하고 있는 아메리카승마는 원료식물 확보에 어려움을 겪고 있어 세잎승마의 대체소재로서의 활용가능성 확보에 따라 국내재배를 통한 유희지 활용 및 농가 수익증대가 가능하다. 따라서 현재 도출된 연구결과를 중심으로 제도적 보완사항을 적극 검토하여 활용가능성 확보를 위해 노력한다.
3. 이를 위해 기존에 도출된 논문, 특허 등의 성과를 관련업체에 Seminar 등을 통해 적극 홍보한다.
4. 동시에, 세잎승마 재배유도를 위해 세잎승마의 기본 개체수를 위탁연구기관(한국자생식물원)에서 유지한다.

### 제 2 절 기대성과

#### 1. 기술적 측면

- 가. 아시아승마의 여성호르몬 유사활성 및 작용기작에 대한 체계적 구명
- 나. 동속 식물 아메리카승마와의 효능 및 작용기전 비교 해석
- 다. 혈관기능 개선 특이적 활성추출물 제조기술 개발을 통한 증상 및 기관 특이적 활성소재 개발

#### 2. 경제적·산업적 측면

- 가. 활용도가 낮은 아시아 승마의 용도창출로 약용작물 재배면적 확대를 통한 농가 수익증대
- 나. 여성호르몬 결핍증상의 예방 및 완화를 통한 국가적 의료비 절감
- 다. 아메리카승마 추출물의 수입대체를 통한 외화절감 및 국내 기능성식품소재 시장 활성화



라. 개별 인정형 기능성식품 개발 기반 마련

마. 시장규모 국내 386억원/년, 세계시장 3.8 bil.\$('01 추정치) ((IMS) data)에 이르는 호르몬제제 시장 및 일반의약품 (훼라민 큐 등 8종, 판매량 210억('11년 예상) (한국제약협회 의약품 등 생산 실적표)) 시장 일부를 대체할 수 있는 기능성식품 소재 개발 가능

### 3. 연구성과

가. 특허출원

## 출원번호통지서

출원일자 2011.06.30  
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
출원번호 10-2011-0064994 (접수번호 1-1-2011-0502840-38)  
출원인명칭 한국식품연구원(3-1998-007755-3)  
대리인성명 양부현(9-1999-000421-2)  
발명자성명 류미라 김현진 김은영 손희진 류지현  
발명의명칭 지방 대사 질환, 폐경기 질환 또는 심혈관질환 개선용 조성물

## 나. 논문게제 성과

게제 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2009	Comparison of endothelium- dependent vasorelaxation of crude Ginsenosides from mountain-grown Ginseng and Red Ginseng	A. Song	M. Rhyu	J.In, Y.Lee	J. Plant Biol.	52	국내	SCI
2009	Ginseng as a complementary and alternative medicine for postmenopausal symptoms	M. Shim	Y. Lee		J Ginseng Res.	33	국내	비 SCI
2010	Endothelium-independent vasorelaxation by <i>Ligusticum wallichii</i> in isolated rat aorta: Comparison of a butanolic fraction and tetramethylpyrazine, the main active component of <i>Ligusticum wallichii</i>	E. Kim	M. Rhyu	J. Kim	Biol. & Pharm. Bull.	33	국외	SCI
2010	Synergistic vasorelaxant and antihypertensive effects of <i>Ligusticum wallichii</i> and <i>Angelica gigas</i>	E. Kim	M. Rhyu		J. Ethnopharmacol.	130	국외	SCI
2010	Vasorelaxant activities of aqueous extracts from twenty medicinal plants used in oriental medicines in isolated rat aorta	E. Kim	M. Rhyu	K.Lee, D.Kim	J. Food Sci. & Nutr.	15	국내	비 SCI
2011	Cardioprotective effects of aqueous <i>Schizandra chinensis</i> fruit extract on ovariectomized and balloon-induced carotid artery injury rat models: effects on serum lipid profiles and blood pressure	E. Kim	M. Rhyu	I. Baek	J. Ethnopharmacol.	134	국외	SCI
2011	Improved Lipid Profile in Ovariectomized Rats by Red Ginseng Extract	Y. Park	Y. Lee	H.Kwon, M.Shim, M.Rhyu	Die Pharmazie	66	국외	SCI
2011	Black cohosh ( <i>Cimicifuga racemosa</i> ) relaxes the isolated rat thoracic aorta through endothelium-dependent and-independent mechanisms	E. Kim	M. Rhyu	Y. Lee	J. Ethnopharmacol.	18	국외	SCI
2012	Activation of Estrogen Receptor by Bavachin from <i>Psoralea corylifolia</i>	J. Park	Y.Lee, J. Ryu	D.Kim, H.Ahn, Y.Song	Biomol. & Therap.	20	국내	SCIE
2012	Estrogen Receptor Mediated Effects of Cimicifuga Extracts on Human Breast Cancer Cells	Joonwoo Park	Yongjoo Lee	M.Shim, M.Rhyu	Pharmazie	67	국외	SCI
2012	Impact of Lysophosphatidylcholine on the Plasminogen Activator System in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells	Y Kang	B Yoon	W Oh, K Park, D Lee, D Choi, D Kim, Y Lee, M Rhyu	J Kor. Medicine Sci.	27	국내	SCIE
2012	Effect of Korean native Cimicifuge species on proliferation of vascular smooth muscle cells	Y Kang	B Yoon	D Lee, D Choi, y Lee, M Rhyu	Kor Soc. Menopause	18	국내	비 SCI

다. 학술발표성과

발표 연도	논문명	저자			학술 대회명	국내 외 구분
		주저자	교신 저자	공동 저자		
2009	Synergistic effects of <i>radix Angelica</i> and <i>Ligusticum wallichii</i> on vasorelaxation of rat aorta and antihypertension of SHR	A. Song	M.Rhyu	S.Kim, E.Kim	The Annual Meeting of the Korean Society of Food Science and Nutrition	국내
2010	Effect of <i>Cimicifuga racemosa</i> extract in MCF-7 human breast cancer cells	M. Shim	Y.Lee	J.Park, C. Park	The Korea-Japan Chromatin & Epigenetics joint Symposium	국내
2010	Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha Represses the Transcription of the Estrogen Receptor Alpha Gene in MCF-7 Human Breast Cancer Cell	K. Ryu	YJ Lee	J. Bahn, J. Park	The Convention of the Korean Society of Applied Pharmacology	국내
2010	Screening of the vasorelaxant effect of nineteen medicinal plants used to manage post-menopausal symptoms in Korean women using isolated rat aorta	E.Kim	M.Rhyu	K.Lee, A.Song, H.Son, K.Park	Annual Meeting of the Kor. Soc. Food Science and Technology	국내
2010	The effects of <i>Schizandra chinensis</i> fruit on serum lipid profile and systolic blood pressure in ovariectomized spontaneously hypertensive rats	A.Song	M.Rhyu	E.Kim, H.Son, B.Lee, K.Park	The Annual Meeting of the Kor. Soc. Food Science and Nutrition	국내
2010	Estrogen Receptor Mediated Effects of <i>Cimicifuga</i> Extracts on Human Breast Cancer Cells	J.Park	Y.Lee	M.Rhyu, C.Park	Annual Meeting of the Kor. Soc. Applied Pharmacology	국내
2011	Black cohosh ( <i>Cimicifuga racemosa</i> (L.)) induces endothelium-dependent relaxation on isolated rat thoracic aorta	H.Son	M.Rhyu	A.Song, B.Lee, J.Ryu, E.Kim	Annual Meeting of the Kor. Soc. Food Science and Technology	국내

