

최 종  
연구보고서

농산물 및 가공식품으로부터  
내분비계 장애물질에 대한 억제물질의 탐색 및 이를  
이용한 기능성 식품개발

Development of Functional Foods Using  
Inhibitory Substances against Endocrine Disrupters

2003. 8

연구기관  
서울대학교

농림부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “농산물 및 가공식품으로부터 내분비계 장애물질에 대한 억제 물질의 탐색 및 이를 이용한 기능성 식품개발에 관한 연구” 과제 (세부과제 “내분비계 장애물질에 대한 억제물질의 생체 내에서의 기전연구에 관한 연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 8 월 7 일

주관연구기관명: 서울대 수의과대학

총괄연구책임자: 강 경 선

세부연구책임자: 김 대 용

연 구 원: 정 지 원

연 구 원: 양 세 란

연 구 원: 박 준 석

연 구 원: 황 재 응

협동연구기관명: 한국식품개발연구원

협동연구책임자: 홍 희 도

연 구 원: 김 성 수

연 구 원: 김 주 환

# 요 약 문

## I. 제 목

농산물 및 가공식품으로부터 내분비계 장애물질에 대한 억제 물질의 탐색 및 이를 이용한 기능성 식품개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 기술적 측면

1960년대 미국에서 침묵의 봄(Silent Spring)이 발간된 이후 독성물질에 대한 관심이 고조되었다. 이에 따라 독성물질을 관리하기 위한 여러 가지 대책 수립에 미국을 중심으로 선진 각국에서는 다방면으로 노력을 기울여 왔었던 것은 주지의 사실이다. 최근 우리나라에서도 사회, 경제, 문화적 발전과 더불어 안전한 삶의 질을 추구하기 시작하면서, 환경에 대한 관심이 최고조로 다다르고 있다. 더욱이, 1996년 “Our stolen future” 라는 책이 발간된 이후 선진국을 중심으로 내분비계 장애물질에 대한 관심이 높아지고 있으며, 우리나라에서도 내분비계 장애물질의 규명과 이들에 의한 피해를 최소화하기 위한 여러 가지 대응 방안 마련 노력이 학계를 중심으로 일고 있다.

환경호르몬으로 잘 알려져 있는 내분비 장애물질은 생물의 여성화뿐만 아니라 응성화, 행동의 방해, 암 촉진 등 다양한 영향을 일으키는 외부 물질로써, 최근의 많은 연구자들에 의해 야생생태계에 영향을 주는 것으로 관찰되고 있으며, 따라서 인간에게도 비슷한 영향을 줄 가능성이 있음이 가설로 제안되고 있다. 이러한 내분비계 장애물질의 대부분은 여성호르몬인 에스트로젠 유사 활성으로 인하여 극히 미량으로도 독성이 나타나므로 환경 중의 외인성 에스트로젠 혹은 environmental estrogens라고도 불린다. 우리나라를 비롯한

세계 각국에서 다양한 종류의 내분비계 장애물질이 플라스틱, 알루미늄 깡통의 내부 코팅 물질, 컵라면 용기, 세제의 분해물, 소각로 배기가스, 농약 등에서 광범위하게 검출되고 있으며, 이들의 환경 중 배출량은 극미량이지만 하나 높은 지용성 물질로써 환경중의 안정성이 매우 높고 특히, 이러한 특성을 기반으로 하여 환경 매체간 이동 및 먹이사슬을 통해 생체농축현상을 일으키는 것이 밝혀지면서 더욱 문제가 되고 있다. 특히, 내분비계 장애물질 중 가장 주목을 받고 있는 물질은 PCBs나 다이옥신 같은 할로겐화 방향족 탄화수소류(Halogenated aromatic hydrocarbons)로써, 이들은 같은 작용기전에 의해 유사한 독성을 나타낸다고 알려져 있다.

우리나라에서도 다양한 유기염소계 농약류의 사용과 폐기물의 소각처리량이 증가하면서, 이러한 내분비계 장애물질에의 노출 가능성이 점점 증가되고 있다. 특히, PCBs와 DDT가 일반 환경 중에서 검출된 바 있으며, 다이옥신류의 경우에도 극미량이지만 하나 토양 중에서 검출되었으며, 일부 우리나라 사람의 지방조직 및 모유에서도 PCBs, DDT 및 다이옥신류가 검출되고 있어 이에 대한 국민들의 관심이 더욱 증대되고 있다. 그러나 현재 전세계적으로 큰 문제가 되고 있는 내분비계 장애물질의 경우 물질의 분류나 정성, 정량 분석에 대한 연구는 상당히 진행되고 있으나 이러한 내분비계 장애물질의 피해로부터 사람을 보호하려는 노력은 일부 포장재의 사용금지나 병제품으로의 대체 등 매우 소극적인 방법이 이외에는 거의 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 내분비계 장애물질의 탐색법을 응용하여 이들 물질이 체내에서의 작용을 억제하는 활성물질을 다양한 식품소재나 이를 이용한 가공식품중에서 탐색, 동정하여 환경호르몬의 피해를 최소화시키는 보다 적극적인 방법을 모색해 보고자 한다.

## 2. 경제 · 산업적 측면

국내 농산물과 인삼제품 등과 같은 기존의 가공제품 중에 존재하는 환경호르몬 억제물질을 탐색, 확인함으로써 그 기능성을 부각하고 소비와 수출을 촉진하고, 또한 기존 가공제품의 기능성을 강화시키거나 새로운 형태의 건강보조식품, 가공식품 등을 개발하여 원료농산물의 새로운 수요를 창출함으로써 재배농가의 소득증대에 기여할 수 있을뿐만 아니라 제품생산과 관련하여 고용창출효과도 클 것으로 기대된다.

### 3. 사회·문화적 측면

내분비계 장애물질에 대한 국민의 관심이 날로 고조되고 있으며 이들 물질이 일상생활과 밀접하게 연관되어있기 때문에 본 연구결과를 통해 내분비계 장애물질에 대한 국민의 이해가 증가되어 공중의 환경 보호 의식의 발달을 가져올 수 있다. 또한 내분비계 장애물질에 대한 방어식품의 개발과 이에 의한 영향에 대한 과학적 근거가 제시되므로 국민생활의 안정을 유도하게 된다. 이는 곧 사회·문화적 발달을 초래하며, 역으로 내분비계 장애물질의 환경기준 설정에 있어서도 사회, 문화적 가치관들이 반영되기 때문에, 궁극적으로 환경문화 발달을 초래한다.

결국 이러한 환경문화의 발달은 내분비계 장애물질의 노출로 인한 인체 피해를 최소화하여 공중보건을 크게 향상시킬 수 있는 계기가 될 수 있다. 또한, 21세기를 맞이하여 인류의 재앙이라고도 불리는 환경 호르몬으로부터의 피해를 최소화시킴으로서 농산물과 같은 천연물 소재 및 다양한 가공식품류를 대상으로 내분비계 장애물질을 억제할 수 있는 물질을 탐색하고 이러한 내분비계 장애물질에 대한 억제활성을 나타내는 소재를 이용하여 기존 가공제품의 기능성을 강화시키거나 새로운 형태의 가공식품 등을 개발한다면 원료농산물의 새로운 수요를 창출함은 물론이고 국민의 안전한 식생활에도 크게 기여할 수 있을 것이라 생각되어진다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구의 연구개발 내용 및 범위는 다음과 같다.

1. 천연물 소재 및 그 가공식품으로부터 내분비계 장애물질에 대한 억제물질의 추출
2. 유효물질의 분리, 정제 및 정제 단계별 내분비계 장애물질에 대한 억제효과 검토
3. 유효물질 추출물의 가공 특성 구명
4. 유효물질 추출물의 중간소재화
5. 내분비계 장애물질에 대한 억제효과가 강화된 기능성 식품 개발
6. 새로운 형태의 기능성 음료제품 개발

\*\* 연차별 연구개발 내용 및 범위

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 ( 2000 )	국내 농산물 및 가공식품으로부터 내분비계장애물질 저해 활성물질을 탐색	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 농산물 및 원료 농산물의 내분비계장애물질 억제물질의 추출</li> <li>□ 유전자재조합 Yeast를 이용한 내분비장애물질 억제효과 탐색</li> <li>□ MCF-7 세포를 이용한 내분비장애물질 억제 활성물질 탐색</li> </ul>
2차 년도 ( 2001 )	내분비계 장애물질의 억제물질의 분리, 정제 및 식품소재화	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 유효물질의 분리, 정제 및 정제 단계별 내분비계장애물질 억제효과 확인</li> <li>□ 생체실험을 통한 활성측정</li> <li>□ 유효물질의 소재화 및 가공 특성 구명</li> </ul>
3차 년도 ( 2002 )	내분비계 장애물질에 대한 억제물질의 이화학적 특성, 기작 규명 및 제품화	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 유효물질의 이화학적 특성 구명</li> <li>□ 유효물질의 사람유방암 세포에서 기작 구명</li> <li>□ 유효물질의 사람전립선암 세포에서 기작 구명</li> <li>□ 내분비계장애물질 억제효과가 있는 유효성분 및 중간소재를 이용한 기능성식품 개발</li> </ul>

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 1. 연구개발 결과

#### (1) 농산물 및 원료 농산물에서 내분비계장애물질 억제물질 선정 및 추출

내분비계 장애물질에 대한 억제물질을 추출하기 위한 시료로 현미 등 곡류 7종, 대두 등 두류 6종, 고구마와 감자와 같은 감자 및 전분식품류 2종, 사과 등 과실류 11종, 상추 등 채소류 21종, 후추 등 향신료 6종, 썩 등 야생식품류 4종, 영지 등 버섯류 5종, 매실 등 약용작물류 40종, 수삼 등 인삼류 3종, 베가모트 등 허브류 14종, 녹차 등 차류 6종, , 효모 식품 등 건강보조식품류 10종, 호도 등 견과류 4종, 북한산 도토리 등 북한산 식품 또는 가공제품 7종, 중국산 차제품 2종 등 총 148 종의 천연물 소재 및 가공식품류를 수집하여 시료로 사용하였다.

각 시료로부터 에탄올 추출물을 제조한 후 건물 기준으로 살펴본 추출수율은 곡류는 1.5~8.0%, 두류는 8.8~17.3%, 감자 및 전분식품류는 8.1~14.6%, 과실류는 41.2~73.2%, 채소류는 4.3~69.1%, 향신료는 15.5~34.4%, 야생식물류는 7.4~50.9%, 버섯류는 5.6~65.4, 약용식물류는 2.5~69.2%, 인삼 및 인삼 가공제품류는 16.7~41.2%, 허브류는 14.7~26.7%, 차류는 14.1~52.4%, 건강보조식품류는 14.8~60.7%, 견과류는 13.6~32.0%, 북한산 식품류는 3.8~48.4%, 중국산 차류의 경우 약 56% 정도의 추출 수율을 나타내었다.

#### (2) 내분비장애물질에 대한 억제활성 검색

앞서 제조된 148 종의 천연물 소재 추출물의 활성을 검색해 본 결과, 우선 recombinant yeast assay의 경우 약콩, 감초, 결명자, 초두구, 대두, 정향피, 감잎, 황기, 팔 등이 estrogenic activity를, 감초, 정향피, 밤 등이 androgenic activity를 가진 것으로 판명되었으며 두가지 활성을 모두 나타낸 천연물 소재로는 감초와 정향피 등이 있었으며 초두구의 경우에도 비교적 높은 활성을 나타내었다.

따라서 이들 3종의 생약재를 선정한 후 대량 추출물을 조제하고 MCF-7 proliferation assay 및 동물시험을 거친 결과, 이들 3종의 생약재 중에서도 감초가 가장 우수한 내분비계 장애물질에 대한 억제효과가 있는 천연물소재임이 판명되었다.

따라서 본 연구에서는 이후 감초를 중심으로 적정추출, 정제조건, 추출물 조제 및 가공성을 검토하였으며 이를 이용한 가공제품 개발을 위한 연구를 수행하였다. 각 연구단계별 활성평가는 recombinant yeast assay를 통한 estrogenic activity 측정 및 MCF-7 cell을 이용한 proliferation assay를 이용하였다.

### (3) 내분비장애물질에 대한 억제활성 물질의 기전

Recombinant yeast assay 결과, 쥐눈이콩, 감초, 결명자, 초두구, 대두, 정향피, 감잎, 황기, 팔 등이 estrogenic activity를, 감초, 정향피, 밤 등이 androgenic activity를 나타내었다. 이들 활성을 가진 소재를 대상으로 MCF-7 proliferation assay 및 동물시험을 수행한 결과 감초, 정향피, 초두구 3종의 생약재가 유방암의 세포사멸 능력과 에스트로젠성을 동시에 가지고 있는 등 가장 높은 활성을 나타내는 것으로 판명되었다. 실제 내분비계장애물질인 BPA를 이용한 Uterotrophic assay에서 두가지 시료 감초, 정향피는 내분비계장애물질의 저해 능이 *in vivo*에서도 있음이 확인되었다. 내분비계 장애물질에 대한 억제효과의 감초 Hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, 70% MeOH 과 정향피 DW 추출물의 경우 생체내 메카니즘은 유방암 세포에서 세포사멸 메카니즘과 동일하게 일어나는 것이 관찰되었고 유일하게 감초 80% EtOH 추출물은 시간별로 약간의 차가 보였다. 이러한 연구결과를 통하여 가장 우수한 활성을 나타낸 감초의 적정추출조건을 확립하였다.

### (4) 내분비장애물질에 대한 억제활성 물질의 식품소재화와 제품화

이러한 연구결과를 통하여 가장 우수한 활성을 나타낸 감초의 적정추출조건을 확립하였으며 흡착 크로마토그래피 등을 이용하여 정제된 활성분획을 조제하였다.

MWCO가 5000인 한외여과막을 이용한 여과시에는 5000이상의 분자량을 가진 분획에서 활성을 나타내었다. 감초로부터 정제한 활성분획의 경우 산성 pH 조건에서 다소 활성이 감소하였으며 121°C에서 15분가열처리시 대부분이 활성이 소실되는 것으로 나타났다. 반면 95°C에서는 15~30분 가열처리시에도 활성에 큰 차이를 나타내지 않았다. 또한 60°Bx 까지 농축시에도 농축공정중의 활성 변화는 거의 없었다. 감초농축물(67°Bx)을 경우 주스, 농차, 라면스프 등에 0.01~0.02% 수준 정도로 첨가시에는 관능적 품질에 영향을 미치지 않았다. 감초 농축액을 0.1% 수준으로 희석한 후 당류, 산, 향 등의 부재료를 첨가하여 음료제품을 제조하고 관능평가한 결과, 전반적으로 비교적 우수한 관능적 품질을 나타내었



다.

## 2. 활용에 대한 건의

현재 전세계적으로 큰 문제가 되고 있는 내분비계 장애물질의 경우 물질의 분류나 정성, 정량 분석에 대한 연구는 상당히 진행되고 있으나 이러한 내분비계 장애물질의 피해로부터 사람을 보호하려는 노력은 일부 포장재의 사용금지나 병제품으로의 대체 등 매우 소극적인 방법이 이외에는 거의 전무한 실정이다. 따라서 국내 농산물 및 가공식품으로부터 내분비계장애물질에 대한 저해활성 물질을 추출, 분리, 정제하고 그 가공적성을 검토하여 식품에 첨가할 수 있는 중간 식품소재 및 이를 이용한 가공식품을 개발해보고자 하였다.

본 연구과제에서 선발된 감초, 정향피의 추출물을 연구결과에 따른 적정 추출 조건에 의해 식품에 첨가하여 단순하게 식품을 섭취함으로써 현대인이 노출되기 쉬운 내분비계 장애물질의 대사를 억제할 수 있는 효과를 활용할 수 있을 것으로 생각된다. 그리고 이와 같이 감초와 정향피의 유효물질 추출 기술과 그를 활용한 식품에서의 첨가로 감초와 정향피의 표준화 연구가 이루어지면, 그냥 약재로만 사용되던 두 시료가 대량으로 생산할 수 있게 됨으로서, 농가소득에 기여할 뿐만 아니라 국제적인 수출 촉진에도 활용될 수 있다.

또한 본 과제에서 연구한 사람의 유방암과 전립선암에서의 감초와 정향피 추출물 억제기전은 이전 연구의 화학적 암예방 효과에서 한 단계 진행시킨 것으로서, 이 방법을 기타 내분비계 관련 암을 비롯한 질병에 적용하면 특별한 약물의 투여가 아니라 평소에 섭취하게 되는 식품을 사용한 치료가 되어 부작용이 거의 없는 약물로써 의약품화로의 활용이 가능하다.

# SUMMARY

(영문 요약문)

## I. Title

Development of functional foods using inhibitory substances against endocrine disrupters

## II. Goal and Importance of the research

### 1. Goal of the research

The inhibitory activities against endocrine disrupters were examined with the extracts prepared from natural products. The active fractions were purified from natural products and then their physicochemical and processing properties were investigated. And we researched mechanism of active fraction from human breast and prostate cancer.

Finally, the optimum conditions of addition to general food products like juice, tea bag-type green tea and instant *lamyeon* were determined and beverage products were developed using concentrate of active natural products.

### 2. Importance of the research

Endocrine disrupter is an exogenous chemical substance or mixture that alters the structure or function of the endocrine system and causes adverse effects at the level of the organism, its progeny, populations, or subpopulations of organisms, based on

scientific principles, data, weight-of-evidence, and the precautionary principle.

Most attention is focused on ones which mimic the action of the sex hormone oestrogen, which are generated, for example, by breakdown products of PCBs and DDT. They are under suspicion of causing breast cancer, reducing sperm counts, causing early puberty in girls, reducing the intelligence of children, and of interfering with foetal development. A major problem with discovering the truth is that large doses of the disrupters have little effect, because the body detects them and brings defences to bear; the danger comes from minute quantities which slip through the body's defences, quantities so small that they are hard to detect and even harder to experiment with.

In this study, we researched the natural products using inhibitory substances against endocrine disrupters and processed functional foods

### **III. Research Contents and Scope**

#### **1. Screening of the natural products using inhibitory substances against endocrine disrupter**

- (1) Collection of several natural products by referances
- (2) Examination of estrogenic activity of natuarl products by yeast assay
- (3) Examination of proliferation assay of natuarl products by MCF-7 cells
- (4) Selection of the natural products being estrogenic activity
- (5) Selection of the natural products being anti-proliferation ability in MCF-7 cells

#### **2. Purification and isolation of inhibitory substances against endocrine disrupter**

- (1) Extraction and screening of inhibitory substances against endocrine disrupters

from natural products

- (2) Purification and isolation of inhibitory substances against endocrine disrupters and activity examinations of purified fractions Identification of lactic acid bacteria by using MIS
- (3) Development of adding method
- (4) Decision of optimal the natural product fractions

### **3. Research of inhibitional mechanism and development of the functional foods**

- (1) Research of inhibitional mechanism in human breast cells
- (2) Research of inhibitional mechanism in human prostate cells
- (3) Processing suitability of active natural products extracts
- (4) Preparation of active fractions from natural products
- (5) Addition of active fractions or natural products extracts to general food products
- (6) Development of beverage products using inhibitory substances against endocrine disrupters

## **IV. Results and their applications**

### **1. Screening of the natural products using inhibitory substances against endocrine disrupter**

The 80% ethanol extract were prepared from 150 of natural products like cereals, pulses, fruits, et.al. and their inhibitory activities against endocrine disrupters were examined. The result of recombinant yeast assay, *Jwinuni kong*, *Gamcho*, *Gyeolmteongja*, *Chodugu*, soybean, *Jeonghyangpi*, persimmon leaf, *Hwanggi*, small red

bean were showed estrogenic activities and *Gamcho*, *Jeonghyangpi*, chest nuts were showed androgenic activities. Finally, *Gamcho* were ascertained most active natural products by MCF-7 proliferation assay and *in vivo* assay.

## **2. Purification and isolation of inhibitory substances against endocrine disrupter**

The most highest activity and extraction yield of *Gamcho* extracts were showed when extracted with 80% ethanol at 80°C for 3~6 hrs with refluxing apparatus. The result of solvent fractionation with *Gamcho* extract, ethylacetate fraction was the highest active and the activities of polar fractions were relatively higher than non polar fraction. Two active fractions were purified on Sephadex LH-20 and the eluted fraction with 80~100% ethanol was active on adsorption chromatography using Diaion HP-20. The estrogenic activity of *Gamcho* extracts was decreased by heating at 121°C for 15min but not changed at 95°C for 15~30min. The estrogenic activity of *Gamcho* extracts was decreased at acidic pH condition but not effected by concentration process.

## **3. Research of inhibitional mechanism and development of the functional foods**

### (1) Research of inhibitional mechanism in human breast and prostate cancer cell

*Gamcho* inhibit cell proliferation in human breast cancer cell and human prostate cancer cell. *Gamcho* is a botanical, a shrub native to southern Europe and Asia, the roots of which have primarily desirable qualities such as sweetening and herbal medicine. By a cell proliferation assay, we demonstrated that *Gamcho* reduced the proliferation in a dose- and time-dependent manner in MCF-7 cells and PC-3 cells. The extracts were fractionated in CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, Hexane, 80% EtOH and 70% MeOH,

and these fractionated extracts of *Gamcho* induced DNA fragmentation demonstrated by Hoechst 33258 staining. These results were associated with specific cleavage of PARP and regulation of anti-apoptotic protein Bcl-2 and pro-apoptotic protein Bax demonstrated by Western blotting.

## (2) Development of the functional foods

The inhibitory activities against endocrine disrupters were examined with the extracts prepared from natural products. The active fractions were purified from natural products and then their physicochemical and processing properties were investigated. Finally, the optimum conditions of addition to general food products like juice, tea bag-type green tea and instants *lamyeon* were determined and beverage products were developed using concentrate of active natural products.

The Addition of *Gamcho* extract of 0.01~0.02% was not effected on sensory properties of orange juice, tea bag type-green tea and instant *Lamyeon*. For the development of *Gamcho* beverage products, kinds or optimum contents of *Gamcho* concentrate, sugars, organic acid, fruits concentrate. flavors, et. al. were determined and final products showed comparatively good sensory properties.

# CONTENTS

(영 문 목 차)

Abstract -----	1
Summary -----	8
Chapter 1. Introduction -----	17
Chapter 2. The Present Technical State -----	46
Chapter 3. Materials and Results -----	49
1st Screening of the natural products using inhibitory substances against endocrine disrupter-----	49
2nd Purification and isolation of inhibitory substances against endocrine disrupter -----	53
3rd Research of inhibitional mechanism and development of the functional foods -----	94
Chapter 4. Object achievement -----	137
Chapter 5. Applications -----	142

Chapter 6. Technical Information of foreign countries ----- 143

Chapter 7. Reference ----- 145



## 목 차

요 약 문 -----	1
영 문 요 약 서 -----	8
제1장 연구개발과제의 개요 -----	17
제2장 국내외 기술개발 현황 -----	46
제3장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	49
제1절 국내 농산물 및 가공식품으로부터 내분비계 장애물질 저해 활성물질을 탐색 -----	49
제2절 내분비계 장애물질의 억제물질의 분리, 정제 및 식품소재화 -----	53
제3절 내분비계 장애물질에 대한 억제물질의 이화학적 특성, 기작 규명 및 제품화 -----	94
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	137
제5장 연구개발결과의 활용계획 -----	142

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ----- 143

제7장 참고문헌 ----- 145

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 1차년도 연구개발과제의 개요

### 1. 농산물 및 원료 농산물의 내분비계 장애물질에 대한 억제 물질의 추출

#### (1) 대상 시료

내분비 장애물질에 대한 억제물질을 검색하기 위한 천연물 시료는 주로 식품공전에서 식품원료로 사용 가능한 것으로 등재된 것 또는 일상적으로 널리 식품으로 이용되는 식물성 원료 및 그 가공제품 100여종이상을 선정하고 이들을 시중에서 구입하여 사용하였으며 실험에 사용된 시료, 생산년도, 생산지, 및 형태 등은 Table 1에 정리하여 나타내었다.

Table 1. 농산물 및 원료 농산물의 내분비계 장애물질에 대한 억제물질의 검색

#### 1-1. 곡류(Cereals)

Korean name	English name	Production year & producer
현미	brown rice	1999년 하남, 가루형태
쌀	rice	1999년 경기포천 가산농업협동조합
보리	barley	2001년 풍미(국내산), 가루형태
옥수수	corn	2001년 풍미(국내산), 가루형태
메밀	buckwheat	2000년 풍미(국내산), 가루형태
울무	job's tears	1999년 충남서산, 가루형태
수수	sorghum	2001년 풍미(국내산), 가루형태

1-2. 두류(Pulses)

Korean name	English name	Production year & producer
대두	soybeans	2001년 품미(국산), 날콩가루
적두	small red beans	2001년 품미(국산), 가루
녹두	mungbeans	2001년 품미(국산), 가루
강낭콩	kidney beans	2001년 국내산, 깐강낭콩
작두콩	horse beans	98년산. 충북진천
쥐눈이콩	<i>Jwinuni kong</i>	2000년 전북정읍, 가루형태

1-3. 서류(감자류 및 전분식품류, Potatoes and starches)

Korean name	English name	Production year & producer
고구마	sweet potato	2001년 해남
감자	potato	2001년 강원

1-4. 과실류(Fruits)

Korean name	English name	Production year & producer
사과	apple	2000년 경북, 홍로
배	pear	2000년 국내산
감귤	citrus	2000년 제주 하우스감귤
감	persimmon	2000년 제주
복숭아	peach	2000년 국내산, 백도
포도	grape	2000년 국내산, 캠벨
참다래	kiwi	칠레산
매실	Japanese apricot	2000년 국내산, 냉동매실
대추	jujube	2000년 국내산
모과	chinese quince	2000년 국내산
레몬	lemon	수입산

1-5. 채소류(Vegetables)

Korean name	English name	Production year & producer
상추	lettuce	2001년 경기남양주와부농업협동조합
시금치	spinach	2001년 풍미(국내산), 가루
아욱	mallow	2001년 국내산
파	welsh onion	2001년 국내산, 대파
붉은무	red radish	2001년 국내산
무	radish	2001년 용인유통, 무말랭이형태
당근	carrot	2000년 풍미(국내산), 가루형태
우엉	burdock	2001년 대구반야월산
미나리	water dropwort	2001년 국내산
신선초(명일엽)	<i>Myeongilyeop</i>	2001년 국내산
브로콜리	broccoli	2001년 용인유통, 무말랭이형태
파슬리	parsley	2000년 풍미(국내산), 가루
케일	kale	2001년 대구반야월산
오이	cucumber	2001년 풍미(국내산), 동결건조
호박	pumpkin	2001년 풍미(국내산), 동결건조
양배추	cabbage	2001년 국내산
배추	korean chinese cabbage	2001년 대관령태백산
취나물	<i>Chwinamul</i>	2001년 국내산
고구마줄기	sweet potato ,stalks	2001년 용인유통, 무말랭이형태
토란줄기	taro, stalks	2000년 풍미(국내산), 가루
고사리	bracken	2001년 대구반야월산

1-6. 향신료(condiment plants)

Korean name	English name	Production year & producer
후추	pepper powder	2002년 오투기(말레이시아 65%, 인도네시아 35%). 가루형태
겨자	mustard	2002년 대상(캐나다산),가루형태
마늘	garlic	2002년 삼양(국내산). 가루형태
생강	ginger	2002년 삼양(미얀마산). 가루형태
고추	red pepper	2001년 사임당식품(국내산). 가루형태
계피	cinnamon	2000년 중국산



1-7. 야생식물류(wild plants)

Korean name	English name	Production year & producer
쭈	mugwort	2001년 풍미(국내산), 가루형태
마	yam	2001년 풍미(국내산), 가루형태
도라지	<i>Doraji</i>	2001년 풍미(국내산), 가루형태
더덕	<i>Deodeok</i>	2001년 황성

1-8. 버섯류(Mushrooms)

Korean name	English name	Production year & producer
영지	<i>Yeongji</i>	2001년 국내산
표고	<i>Pyogo</i>	2001년 품미(국산), 가루형태
느타리	<i>Neutari</i>	2001년 국내산
양송이	<i>Yangsongi</i>	2001년 충남부여
새송이	<i>Saeyangsongi</i>	2001년 국내산

1-9. 약용식물류(medicinal plants)

Korean name	English name	Production year & producer
감초	<i>Gamcho</i>	2000년 중국산
당귀	<i>Danggwi</i>	2000년 국내산
산수유	<i>Sansuyu</i>	2000년 국내산
오미자	<i>Omija</i>	2000년 중국산
결명자	<i>Gyeolmyeongja</i>	2000년 중국산
둥굴레	<i>Dunggulre</i>	2000년 중국산
계지	<i>Gyeji</i>	2000년 중국산
몰약	<i>Molyak</i>	2000년 중국산
육두구	<i>Yukdugu</i>	2000년 중국산
정향피	<i>Jeonghyangpi</i>	2000년 중국산
죽엽	<i>Jukyeop</i>	2000년 중국산
초두구	<i>Chodugu</i>	2000년 중국산
감국	<i>Gamguk</i>	2000년 중국산
산조인	<i>Sanjoin</i>	2000년 중국산
지구자씨	<i>Jiguja seed</i>	2000년 중국산
오가피	<i>Ogapi</i>	2000년 중국산
진피(귤껍질)	<i>Jinpi</i>	2000년 중국산
백모초(백모근)	<i>Baekmocho</i>	2000년 중국산
박하	<i>Bakha</i>	2000년 중국산
음양곽	<i>Eumyanggwak</i>	20001년 정선농협

---

길경	<i>Gilgyeong</i>	2001년 정선농협
홍화씨	<i>Honghwa seed</i>	2000년 중국산
황기	<i>Hwanggi</i>	2000년 중국산
단삼	<i>Dansam</i>	2000년 중국산
구기자	<i>Gugija</i>	2000년 중국산
어성초	<i>Eoseongcho</i>	2000년 중국산
상엽	<i>Sangyeop</i>	2001년 국내산
상심자(오디)	<i>Sangsimja</i>	2001년 중국산
구절초	<i>Gujeolcho</i>	2000년 중국산
회침	<i>huichim</i>	2000년 중국산
소엽	<i>Soyeop</i>	2000년 중국산
석창포	<i>Seochangpo</i>	2000년 중국산
향유	<i>Hyangyu</i>	2000년 중국산
편축	<i>Pyeonchuk</i>	2000년 중국산
세신	<i>Sesin</i>	2000년 중국산
목단	<i>Moldan</i>	2000년 중국산
초피	<i>Chopi</i>	2000년 중국산
석곡	<i>Seokgok</i>	2000년 중국산
측백잎	<i>Cheukbaek leaves</i>	2000년 중국산
방기	<i>Banggi</i>	2000년 중국산

---

1-10. 인삼 및 인삼가공제품(Ginseng and ginseng processed products)

Korean name	English name	Production year & producer
수삼	fresh ginseng	2000년 국내산
백삼	white ginseng	2000년 국내산
홍삼	red ginseng	2000년 한국담배인삼공사(국내산)

1-11. 허브류(Herbs)

Korean name	English name	Production year & producer
베가몬트	bergamot	2000년 허브나라(국내산)
스피아민트	spiamint	2000년 허브나라(국내산)
캐트닙	catnip	2000년 허브나라(국내산)
라벤더	labender	2000년 허브나라(국내산)
로즈마리	rosemary	2000년 허브나라(국내산)
페파민트	peppermint	2000년 허브나라(국내산)
레몬밤	lemon balm	2000년 허브나라(국내산)
캐모마일	chamomile	2000년 허브나라(국내산)
세이지	sage	2000년 허브나라(국내산)
야로페파민트	yarrow peppermint	2000년 허브나라(국내산)
바실	basil	2000년 허브나라(국내산)
타임	thyme	2000년 허브나라(국내산)
마시멜로우	mashmallow	2000년 허브나라(국내산)
오레가노	oregano	2000년 허브나라(국내산)

1-12. 차류(Tea products)

Korean name	English name	Production year & producer
녹차	green tea	2002년 충북진천
동규자차	<i>Donggyuja</i> tea	2001년 국제식품
치커리	chicory	2000년 풍미(국내산)
상엽차	muberry leaves tea	2002년 초당농산(국내산)
두충차	eucommia bark tea	2002년 화개농협(국내산)
솔잎	pine leaves	2001년 강원도 그리존농원

1-13. 건강보조식품류(Health supplement food products)

Korean name	English name	Production year & producer
효모식품	Yeast products	2001년 내추럴하우스
화분가공	pollen processed food	2002년 금산농원
키토산	chitosan	2001년 영덕키토산
클로렐라	chlorella	2002년 세모
로얄젤리	royal jelly	2002년 세모
스쿠알렌	squalene	2002년 세모
알콕시글리세롤	alkoxy glycerol	2002년 세모
포도씨유	grape seed oil	2002년 이탈리아(코스타도르)
알로에	aloe foods	국내산
프로폴리스	propolis foods	국내산



1-14. 견과류(Nuts and Seed)

Korean name	English name	Production year & producer
호두	walnuts	2001년 국내산
밤	chestnuts	2000년 풍미(국내산), 가루형태
호박씨	pumpkin seed	2001년 중국산
해바라기씨	sunflower seed	2001년 중국산

1-15. 북한산 식품류(Foods from north korea)

Korean name	English name	Production year & producer
도토리	acorns	2000년 북한산
발효도토리	fermented acorns	2000년 북한산
가시오가피분말	<i>Gasiogapi</i> , powder	2000년 북한산
가시오가피농축액	<i>Gasiogapi</i> , ext.	2000년 북한산
오가피	<i>Ogapi</i>	2000년 북한산
당귀유	<i>Danggyu</i> oil	2000년 북한산
송침유	<i>Songchim</i> oil	2000년 북한산

1-16. 중국산 차류(Chinese tea products)

Korean name	English name	Production year & producer
본초청형차 1	<i>Bonchocheonhyeong</i> tea 1	2001년 중국 건조티백차(금은화, 오매, 구기자, 국화)
본초청형차 2	<i>Bonchocheonhyeong</i> tea 2	2001년 중국 건조티백차(산사, 연밥중심, 구기자, 항백국, 오동열매)

(2) 환류냉각장치를 이용한 80% 메탄올 추출물 제조

(3) 분석용 시료의 조제

가. 시약

추출용 용매로 주로 이용된 에탄올의 경우 1급 시약(동양화학)을 주로 사용하였으며 estrogenic activity 측정시 zymolase는 Seikagaku, corp(Japan)사의 것을, 그밖에 배지 및 z-buffer 제조를 위한 시약류는 Sigma 사(USA) 것을 이용하였다. 활성물질 정제를 위한 Sephadex LH-20과 diaion HP-20, HP-20MG, Amberlite XAD-4와 XAD-7 등의 수지류는 Sigma사(USA)것을 사용하였으며 한외여과용 UF filter kit는 Satorius사(Germany)의 Sartocou Micro(MWCO 5K)을 사용하였다. 그 밖의 시약류는 1급 또는 특급시약을 사용하였다.

나. 시료

시료 약 5 g에 80% 에탄올 100 ml를 첨가하고 환류냉각장치를 이용하여 80℃에서 3시간 동안 추출한 후 여과지(Whatman No 2)로 여과한 다음 감압농축하여 농축물을 제조하거나 농축물을 동결건조하였다. 동결건조된 시료를 100 mg/ml 농도로 증류수에 녹인 후 10000×g 에서 5분간 원심분리하여 얻은 상등액을 내분비 장애물질에 대한 억제효과를 검색하기 위한 시료로 사용하였다.

## 2. In vitro방법에 의한 내분비계 장애물질에 대한 억제효과 탐색

### (1) 유전자 재조합 Yeast를 이용한 식품의 유효활성 성분 검색

#### 가. Recombinant yeasts

*Saccharomyces cerevisiae* ER+ LYS 8127(YER), *S. cerevisiae* AR+ 8320(YAR)은 미국 CIIT(Cheical Industry Institute of Toxicology, USA)의 Kevin W. Gaido박사에게 공여받았다. 이 효모는 각각 CUP1 metallothionine promoter와 hER, hAR 유전자를 포함하는 vector와 reporter system으로 estrogen/androgen response element,  $\beta$ -gal 유전자를 안정적으로 발현한다. *S. cerevisiae* ER+ LYS 8127은 3.35g/ml yeast nitrogen base (Difco, USA), 2% dextrose (Gibco, USA), 30 $\mu$ g/ml L-lysine-HCl(Sigma, USA), 35 $\mu$ g/ml L-histidine-HCl(Gibco, USA)를 포함하는 growth media에서 유지하였으며, *S. cerevisiae* AR+ 8320은 3.35g/ml yeast nitrogen base (Difco, USA), 2% dextrose (Gibco, USA), 30 $\mu$ g/ml L-lysine-HCl(Sigma, USA), 35 $\mu$ g/ml L-histidine-HCl(Gibco, USA), 40 $\mu$ g/ml L-tryptophan(Sigma, USA), 40 $\mu$ g/ml adenine sulfate(Gibco, USA)를 포함하는 media에서 유지하였다. 각 효모는 각각의 growth media에 20% glycerol(Sigma, USA)를 첨가하여 -80 $^{\circ}$ C 이하에서 보존한다.

#### 나. Estrogenicity and androgenity assay

각 yeast를 growth media에 넣은 후 shaking incubator(200rpm)에서 증식시킨다. 각 yeast를 media에 적정 희석한 후 500 $\mu$ M의 CuSO<sub>4</sub>(Sigma, USA)를 첨가한 후 50ml conical tube에 적정량을 분주한 후 YER와 YAR에는 각각 물질을 0.1%로 처치하였으며 용매대조군으로 dimethyl sulfoxide(Sigma, USA)를 사용한다. 18시간 shaking incubator (200rpm)에서 배양후 각 tube의 배양액을 동일한 농도로 희석한 후 96 well microtiter plate(Nunc, Netherlands)에 100 $\mu$ l씩 분주한다. 각 well에 2mg/ml o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (Sigma, USA), 0.1% lauryl sulfate (Sigma, USA), 50mM  $\beta$ -mercaptoethanol (BDH chemical LTD, England), 200U/ml oxalyticase (Enzogenetics, USA)를 포함하는 Z buffer를 100 $\mu$ l씩 분주하고 20분후 발색정도를 microplate reader의 420nm와 590nm를 이용하여 측정한다.

## (2) MCF-7 유방암세포를 이용한 식품의 유효활성 성분 검색

지름 10cm dish에 80%이상 꽉찬 세포를 배지 (MEM)를 제거하고 새로운 배지 일정량을 가해 주어 3-5개의 dish를 한 군으로 하여 다음과 같이 여러 물질을 투여한다. 대조군은 ethanol 또는 DMSO를 투여하고, estradiol 과 기타화학물질은 DMSO 또는 ethanol에 녹여 투여한다. 이런 다양한 물질을 투여한 후 5일간 배양후 coulter counter를 이용하여 세포 수를 측정한다. Estradiol의 농도를 0.1nM에서 0.1uM까지 증가시켰을 때 농도 의존적으로 세포수는 대조군에 비하여 126%정도의 세포증식 효과를 관찰한다.

이는 pH 지시액으로 배지에 넣어 사용하는 phenol red가 estrogen처럼 작용함으로써 MEM에서 배양한 MCF-7 세포의 증식은 Estradiol에 대하여 민감하게 반응하지 않음을 알 수 있다. Phenol red free MEM에서 배양된 MCF-7 세포는 phenol red포함한 배지에서 배양된 세포보다 doubling time은 길지만 Estradiol의 농도를 10 nM에서 0.1 uM까지 증가시켰을 때 농도 의존적으로 세포수는 증가하여 대조군에 비하여 12배 정도의 세포증식 효과를 관찰한다. 한편, 식품의 유효활성 성분을 확인하기 위해서 위에서 기술한 방법에 식품의 유효성분을 첨가하여 세포 증식억제등을 확인하여 식품의 유효활성성분을 확인한다.

## 제 2절 2차년도 연구개발과제의 개요

### 1. 유효물질의 분리 및 정제

(1) 대상 : 1차년도에서 활성이 입증된 2~3종

(2) 적정 추출조건 검토

가. 추출용매에 따른 추출수율 및 활성

일정량의 시료를 취하여 추출용기에 옮긴 후 추출용매를 0, 20, 40, 60, 80 및 100% 에탄올 용액으로 달리하여 시료중량의 20배 되게 첨가하고 환류냉각장치를 이용하여 3시간 동안 추출하였으며 각 추출물은 여과한 후 감압농축하여 에탄올을 제거하고 증류수를 이용하여 일정량으로 적용한 후 고형물량, brix 및 활성 측정을 위한 시료로 사용하였다.

나. 추출방법 및 추출시간별 추출수율 비교

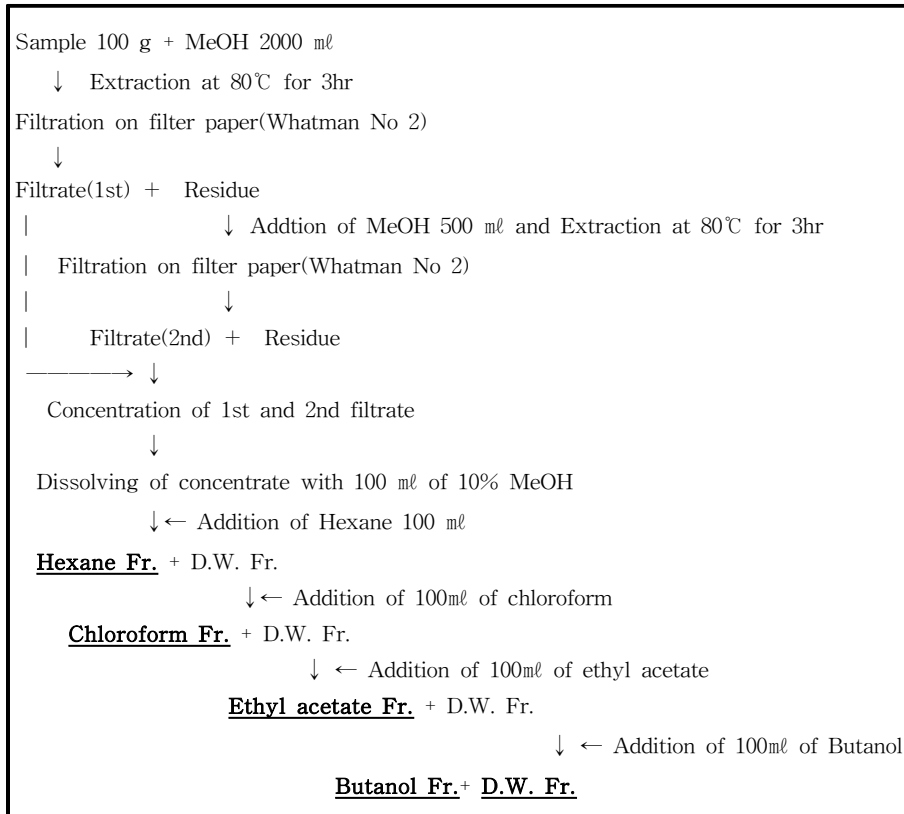
일정량의 시료를 취하여 추출용기에 옮긴 후 추출용매로 80% 에탄올 용액을 시료중량의 20배 되게 첨가하고 환류냉각장치를 이용하여 추출하거나 상온에서 교반기를 이용하여 추출하면서 추출시간에 따른 추출수율을 비교하였다.

다. 가용성고형물량(Brix) 및 고형물 함량 측정

시료용액의 brix(가용성 고형물량)는 상온에서 디지털 당도계(ATAGO, USA)를 이용하여 측정하였으며 고형물량의 경우 시료 5~10 ml를 정확하게 취한 후 증발접시에 옮기고 증탕으로 가열처리하여 수분을 제거한 후 105℃ 건조기에 옮겨 1시간동안 완전히 수분을 제거하였다. 이후 증발접시중에 남은 잔사량을 계산하여 시료용액중의 고형물 함량으로 나타내었다.

(2) 용매 분획법에 의한 정제

시료 추출물중의 활성물질을 극성별로 분획하기 위한 용매분획법은 다음과 같은 방법으로 수행하였다.



(3) Gel filtration을 이용한 정제

Sephasex LH-20 수지를 80% 에탄올에 현탁시킨 후 컬럼에 50ml 정도 충전한 후 동일 용매에 녹인 추출물 시료를 2ml를 주입하고 동일용매로 용출시켰다. 용출액은 10ml 씩 분획하였으며 이를 estrogenic activity 측정을 위한 시료로 사용하였다.

(4) 흡착크로마토그래피를 이용한 정제

흡착크로마토그래피용 수지로 Diaion HP-20과 Amberite XAD-4를 선정하고 이를 각각 메탄올과 80% 에탄올로 순차적으로 세척한 후 증류수에 현탁시켜 컬럼에 충전하였다. 증류수를 이용하여 10%Bx 수준으로 희석한 감초추출, 농축물을 주입한 후 증류수로 흡착되지



않은 물질들을 세척하였다. 이후 에탄올 함량이 다른 용매를 이용하여 순차적으로 용출시킨 후 증류수 세척액 및 각 용출액 중의 고형물량 및 estrogenic activity를 측정하였다.

(5) 한외여과(Ultrafiltration)를 이용한 정제

한외여과 장치(MWCO 5000)를 이용하여 분자량에 따른 분획을 조제하고 분자량 5000 이상과 이하 분획의 수율 및 estrogenic activity를 각각 측정하였다.

## 2. Dioxin 유전자가 도입된 HepG2 cell line을 이용한 유효물질의 활성확인

(1) Cell culture maintenance and growth

HepG2 human hepatoma cell은 5% dextran-coated charcoal-stripped FBS(fetal bovine serum)을 공급한 minimum essential medium Eagle (Sigma)에서 배양한다. (단, 어떠한 항생제도 첨가하지 않는다.)

(2) Transient transfection assays

HepG2 cell을 phenol red가 없고 5% dextran-coated charcoal-stripped FBS(fetal bovine serum)을 공급한 minimum essential medium Eagle (Sigma)에  $5.0 \times 10^4$ /well의 밀도로 24well plate에 seeding한다. Cells를 37°C, 5% CO<sub>2</sub>상태의 incubator안에서 24시간 incubation시킨다. 그런 다음, 1.0µg C3-LUC, 0.5µg dioxin 유전자와 함께 Superfect procedure (Qiagen)를 이용하여 5시간동안 transfection시킨다. Transfection된 cells를 phosphate buffered saline을 가지고 세척한 후, dioxin의 활성을 억제할 수 있을 것으로 사료되는 유효물질을 신선한 배지에 첨가하여 처치한다. 24시간 후, Reporter Lysis Buffer (Promega)로 cells를 용해시킨 후, 용해된 cell debris를 가지고 dual luciferase reporter assay system (Promega)을 이용하여 dioxin과 관련된 활성을 측정한다.

### 3. Uterotrophic assay를 이용한 유효물질의 내분비장애물질 억제효과 확인

#### (1) 실험동물

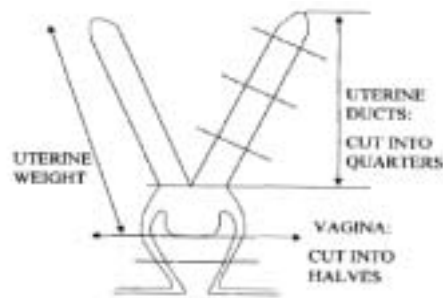
- Sprague-Dawley rat(생후 18일의 immature rat or 8주령의 난소적출 rat이용)
- AIN-76A diet

#### (2) 실험방법

실험동물로는 생후 18일의 immature rat을 사용한다. 만약 8 주령의 rat을 사용할 경우에는 난소적출술을 실시한다. 실험동물이 준비되면 3일 동안 Bisphenol A와 유효물질을 피하경로로 동시 처치한 후, 마지막 투여일로부터 24시간 후에 체중을 측정하고 경추 탈골한다. 부검 시, 자궁에 있는 액체나, 지방을 깨끗이 분리한 다음, 무게를 측정하고, 10 % 포르말린에 고정한 다음 통상적인 방법을 거쳐 조직표본을 작성하고 병리조직학적검사를 실시한다. 특히, 현미경을 통해 luminal epithelium의 높이를 측정하고, 질상피세포에 대해 주의깊게 관찰한다.

#### (3) 통계학적 방법

시험 중 측정된 시험동물의 체중 등에 관한 자료의 통계학적 분석을 위하여 one-way ANOVA를 실시하여  $p=0.05$  수준에서 군간 유의성을 검정하였고 유의성이 인정되면, Dunnett's t-test를 시행하여 대조군과 시험군간의 통계학적 유의성을 검정한다 ( $p<0.05$ ).



조직병리학적 검사를 위한 자궁 및 질의 절개 위치

#### 4. 정제단계별 내분비계장애물질 억제효과 확인

##### (1) MCF-7 proliferation Assay

5% fetal bovine serum(FBS)과 3ml/l 의 PSN antibiotic mixture가 첨가된 phenol red-free D-media를 공급한 MCF-7cell을 5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 100% humidity, 37°C가 유지되는 incubator에서 배양하였다. 시험에 사용되는 cells (5\*10<sup>4</sup>/ml)는 6-well culture plate에서 plate 시키고 24시간동안 attach시킨 후 phenol red-free D-media배지에서 24시간 incubation한다. 24시간 후 medium을 제거하고 모든 compounds는 5% dextran-coated charcoal-stripped FBS(DCC\_FBS ;Hyclone, USA)와 3ml PSN antibiotic mixture(test media)/1L Medium에 희석하여 공급한 배지에서 37°C, 3일동안 incubation한다. 그 기간동안 test medium은 한번 교체해주고 수거한 cell은 spectrophotometer OD<sub>260nm</sub>에서 DNA content를 측정한다

##### (2) Recombinant Yeast Assay

각 yeast를 growth media에 넣은 후 shaking incubator(200rpm)에서 증식시킨다. 각 yeast를 media에 적정 희석한 후 500µM의 CuSO<sub>4</sub>(Sigma, USA)를 첨가한 후 50ml 튜브에 적정량을 분주한 후 YER와 YAR에는 각각 물질을 0.1%로 처치하였으며 용매대조군으로 dimethyl sulfoxide(Sigma, USA)를 사용한다. 18시간 shaking incubator (200rpm)에서 배양후 각 tube의 배양액을 동일한 농도로 희석한 후 96 well microtiter plate(Nunc, Netherlands)에 100µl씩 분주한다. 각 well에 2mg/ml o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (Sigma, USA), 0.1% lauryl sulfate (Sigma, USA), 50mM β-mercaptoethanol (BDH chemical LTD, England), 200U/ml oxalyticase (Enzogenetics, USA)를 포함하는 Z buffer를 100µl씩 분주하고 20분 후 발색정도를 microplate reader의 420nm와 590nm를 이용하여 측정한다. 모든 data는 통계프로그램인 SAS를 이용하여 ANOVA분석 후 Dunnett't test를 유의수준 P<0.05에서 분석한다.

## 5. 유효물질 추출물의 가공 특성 구명

### (1) pH 안정성 검토

추출물중의 pH를 citrate buffer 또는 glycine-NaOH buffer를 이용하여 각각 3.0, 6.0, 9.0으로 조정한 후 4℃에서 24시간 정도 방치한 후 estrogenic activity 변화를 살펴보았다.

### (2) 열안정성 검토

천연물소재 추출, 농축물을 증류수로 5~10°Bx 되게 희석한 후 95℃에서 15분, 30분 가열처리하거나 121℃에서 15분간 가압살균 처리한 후 estrogenic activity 변화를 보았다.

### (3) 농축정도에 따른 활성 변화 측정

천연물소재 추출물을 각각 10, 30, 60°Bx 되게 농축한 후 농축단계별 estrogenic activity 변화를 -18℃, 4℃, 20℃에 저장시 저장기간에 따라 살펴보았다.

## 제 3절 3차년도 연구개발과제의 개요

### 1. 유효물질의 작용기작 규명

#### (1) 유방암과 전립선암의 성장 억제 기작 규명

MCF-7 유방암세포와 PC-3 전립선암세포를 이용한 식품의 유효활성 성분 검색 2차년도에서 검색된 감초와 정향피 등을 비롯한 유효물질을 MCF-7 유방암 세포에 가장 유효한 시간동안 처치한 후 수거하여 유방암 억제를 위한 여러 가지 실험에 사용하며 MCF-7 유방암 세포는 2차년도와 마찬가지로 5% fetal bovine serum(FBS)을 공급한 D-media에서 배양한다.

#### (2) 유효물질에 의한 세포사과정의 관찰

세포의 사멸 형태 중 가장 빈번히 발생하는 핵의 손상과 사멸을 알아보기 위한 방법으로 대표적인 Hoechst 33258 staining과 Cell cycle analysis를 실시하여 세포사멸을 관찰한다.

##### 가. Hoechst 33258 staining

유효물질을 처치한 MCF-7 유방암세포와 PC-3 전립선암세포에 PBS로 3회 세척하고 4% formaldehyde(formalin)에 20분간 고정한다. PBS로 3회 세척 후 Hoechst 33258 용액을 1 ug/ml이 되도록 처치한후 15분간 incubation 시킨다. 다음 PBS로 2회 세척하고 형광 현미경 UV filter로 DNA fragmentation을 관찰한다.

##### 나. Cell cycle analysis

DNA ladder assay와 같이 세포 사멸의 정도를 관찰할 수 있고 더해서 세포주기의 arrest 또한 관찰이 가능한 FACScan cell cycle analysis 시험법을 DNA ladder assay 대신에 수행하였다. 유효물질을 처치한 MCF-7 유방암 세포와 PC-3 전립선암 세포에 PBS로 2회 세척하고 Trypsin처리하여 세포를 수거한 다음, ice-cold PBS를 이용하여 2회 세척해준 후 70% ethanol로 -20℃에서 30분 이상 고정시킨다. 고정된 세포들은 다시 ice-cold PBS로 세척해주고, 50ug/ml의 propidium iodide를 100ug/ml의 RNase A와 함께 30분 동안 incubation시킨다. FACSCalibur를 이용하여 세포주기를 측정하여 세포사멸과

세포주기의 arrest 여부를 확인한다.

(3) 세포주기관련 유전자와 세포내 신호전달경로 규명

세포사멸에 대한 종양억제 단백질인 p53 단백질과 세포내 항산화 단백질인 Bcl-2의 변화를 관찰한다. 또한 세포사멸에 의해 cytochrome C가 핵에서 세포질로 방출되고 이렇게 방출된 cytochrome C에 의해 caspase-3이 활성화된다는 사실을 Western blotting을 통하여 관찰한다. 또한 gap junction 단백질은 인산화 단백질이므로 connexin 43 단백질처럼 본 방법에 의해 각기 인산화 정도의 차이에 따른 band의 변화 등을 관찰한다. Signal transduction과 관련한 MPAK kinase, PI3K등의 경로와 관련한 단백질 발현을 확인하며, 세포주기와 관련한 cyclin D등의 단백질의 변화를 알아본다.

- Whole protein extract and Western blotting

배양한 세포를 균에 따라 물질 처치를 실시하고 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 1uM leupetin, 1uM antipain, 0.1 uM sodium orthovanadate, 5mM sodium fluoride이 포함된 20% SDS를 이용하여 10초씩 6번 sonication을 실시하고 DC protein kit(Bio-Rad)를 이용하여 단백질을 정량한다. 단백질을 12.5% SDS polyacrylamide gels에 200V에서 1시간동안 분리하고 100V, 350mA에서 PVDF membranes에 1시간동안 transfer 시킨다. 이 membrane은 5% dried skim milk가 포함된 T-PBS를 이용하여 washing한다. primary antibody와 secondary antibody를 1시간동안 차례로 incubation하고 각 단계마다 T-PBS를 이용하여 4회씩 washing 해준다. 또한 ECL chemiluminiscenet detection reagent를 이용하여 detection하고 membrane은 X-ray film에 15초에서 1분간 상태에 따라 노출시킨다.

**2. 유효물질 추출물의 중간소재화**

- 농축된 액상 중간소재 제조공정 확립
- 동결건조 등을 통한 분말소재 제조공정 확립
- Tablet 형태의 제제화 시험을 통한 중간소재화

**3. 환경호르몬 억제효과가 강화된 기능성 식품 개발**

- 기존 가공식품류에 첨가효과 검토
- : 대상가공식품 : 차류, 과일주스류, 기능성 음료 제품

- 활성물질 첨가량에 따른 관능적 품질 변화 검토
- 살균처리 전후의 활성변화 검토

#### 4. 유효물질 추출물의 중간소재화

- 농축된 액상 중간소재 제조공정 확립
- 동결건조 등을 통한 분말소재 제조공정 확립
- Tablet 형태의 제제화 시험을 통한 중간소재화

#### 5. 내분비 장애물질에 대한 억제효과가 강화된 기능성 식품 개발

- 기존 가공식품류에 첨가효과 검토
  - : 대상가공식품 : 차류, 과일주스류, 기능성 음료 제품
- 활성물질 첨가량에 따른 관능적 품질 변화 검토
- 살균처리 전후의 활성변화 검토

#### 6. 새로운 형태의 기능성 음료제품 개발

- 활성물질의 첨가량에 따른 관능적 품질 변화 검토
- 당류, 산미료, 향등의 적정 첨가량 결정
- 포장 형태 및 포장형태에 따른 살균 공정 확립
- 살균전후의 이화학적 특성 및 미생물 검토
- 살균처리 전후의 활성물질 변화 검토

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1절 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황

미국국립연구평의회 및 국립과학아카데미(National Research Council/National Academy of Science)는 환경 중의 호르몬 관련 독성 물질에 관한 위원회에서 문헌을 검토하고 연구의 필요성을 제시하며 권고 사항을 정리, 그밖에 국립과학기술평의회(National Science and Technology Council)의 환경 및 자연자원 위원회의 내분비계 장애물질 연구 분과에서 연방 정부의 연구 활동을 총 정리하여 인터넷 데이터베이스를 만들고 1996년 11월에는 학계, 산업계, 공공 대표자들 등이 참여하는 워크숍을 조직하였다. 미국의 민간 업계에서는 화학 산업 독성학 연구소(Chemical Industry Institute of Toxicology)와 듀폰(DuPont)에서 각각 150만불, 250만불을 연구비로 조성하여 내분비 독성학을 연구하고 있다.

유럽 연합에서는 1996년 12월 런던에 모여 유럽의 과학자들 200 여명이 참여하는 유럽 내분비계 장애물질 연구단(European Endocrine Disrupters Research Inventory)을 조직하였고 민간 기구로는 유럽화학산업연합(European Chemical Industry Association)이 9 백만~1 천 2 백만 불을 3년간의 기초 연구를 위해 사용하고, 유럽 과학재단과 함께 향후 3년간 남성 생식 보건의 문제 여부를 결정하였다.

일본 과학 기술청은 환경청, 후생청과 공동으로 1998년부터 내분비계 장애 물질에 관한 종합적인 연구를 시작하기로 한다. 일본 정부는 약 7억~8억엔의 연구비를 투입, 생물에 대한 영향을 측정하는 방법을 개발하고 위험 물질이 환경에 확산되지 않도록 규제 할 수 있는 근거 자료를 마련할 방침. 이 연구에는 국립연구기관, 대학, 민간 연구소가 합동으로 참여하는데 (1) 환경 호르몬의 계측법과 생물에 미치는 농도 평가 방법의 개발, (2) 체내에서 이상을 일으키는 기전의 해명, (3) 야생 생물에 대한 영향과 인간의 정자 감소 실태 등 3 항목에 걸쳐 이루어진다. 일본 NEDO (The New Energy and Industrial Technology Development Organization)의 좌고맹 주임연구원 그룹은 강한 독성을 갖고, 내분비계 장애 물질로서의 오염이 문제시되고 있는 다이옥신류를 거의 완전히 분해, 제거하는 기술이 실용화 단계에 이르렀는데, 고온, 고압하의 "초임계수"를 사용하는 하이테크기술을 응용한 것이다. 다이옥신류는 자연계에서는 대단히 분해가 어렵고 먹이사슬에 의해 최후에는 인체에 고농도로 축적된다. 좌고맹 연구그룹은 400℃, 300기압의 "초임계수"와 압축공기를 혼합한



것에 이 소각로의 재를 반응시켜 실험실 단계에서는 97.4%의 다이옥신류를 약 30분이라는 단시간에 분해하는 것에 성공했다. 현재 다이옥신의 제거기술은 고온의 가스로 완전 연소시키는 방법과 자외선을 조사하여 분해하는 방법이 개발되어 있다. 단, 두 가지 방법 모두 장치가 고가이거나 완전분해에 장시간이 걸리는 장단점이 있다. 그러나, 초임계수를 사용한 방법은 단시간에 분해할 수 있고 다른 장치에 비해 소형이며 저가이일 뿐 아니라 환경에 악영향을 주는 물질을 사용하지 않는 등의 잇점이 있다. 더욱이 압축공기 대신에 과산화수소를 사용하면 분해율이 99.7%까지 올라가는 것도 알게 되어, 현시점에서는 가장 유망한 기술이라고 할 수 있다.

위와 같이 70년대 초부터 선진 각국마다 국민들 고유의 체질, 식생활, 연령별, 성별에 따른 따라 병원연구소, 의과대학 및 관련 의료산업계를 중심으로 내분비계 장애물질의 프로필을 설정하기 시작하여 동 분야에 대한 연구는 안정화 단계에 이미 들어가 실제 임상에 적용하여 성공적으로 응용하고 있는 상황이며 이러한 데이터를 바탕으로 다성분 screening이 가능한 진단 marker의 개발에도 관련의료산업계에서 심혈을 기울여 본 연구 기술을 사용하고 있고 실제 암 및 중양 등의 내분비질환의 진단, 치료에 있어서도 반드시 필요한 기술로 인식되어 실용화되고 있다.

국내에서는 환경부, 노동부, 식품의약품안전청, 농촌진흥청, 등 내분비계 장애물질 유관 기관들은 올해 「내분비계 장애물질 대책협의회」를 열고 올해 내분비계 장애물질 실태조사 및 연구사업에 모두 25억원의 예산을 투입하기로 확정하고, 현재 환경부에서는 상반기 중 전국의 토양·수질·대기 등의 내분비계 장애물질 잔류 실태조사를 실시할 예정이어서 정부차원의 내분비계 장애물질 대응작업이 본격화되고 있다. 식약청의 내분비계 장애물질 조사대상에는 쇠고기와 닭고기, 어패류 등 각종 식품의 중금속 뿐 아니라 링거팩 내의 가소제, 수입한약재의 농약, 표백제도 포함되어 있다. 하지만 이러한 물질들은 강한 독성을 가지고 있으면서 식품중에서 매우 극미량으로 존재할 뿐 아니라 복잡한 전처리 과정과 고가의 장비 및 숙련된 기술 부족으로 연수 수행에 상당한 어려움이 따를 것으로 예상된다.

## 제 2절 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

현재 의학과 또는 관련학계에서 연구되거나 시험되고 있는 본 대상 물질들의 미량 분석 기술에 대한 연구는 전무하며, 일부 외국의 특정 연구자들에 의해 시도되고 있으나 실제 동양인의 경우에 전반적인 데이터는 전혀 없고 또한 임상적으로 적용한 경우는 전무하다. 향후 임상연구에 있어서도, 미지의 알려지지 않은 수많은 질병들의 확인 및 병인에 대한 지속적인 연구를 수행하여 국내의료진과의 공동연구를 통해 각종 질환에 적용함으로써 진단 효율의 향상과 더불어 치료 및 예방에 확대 실시되어야 하는 실정이다. 생체내에서의 내분비계 장애물질의 검정 및 그에 대한 독성실험과 빠른 분석법에 대한 풍부한 경험이 조속한 내분비계 장애물질의 검정시험기술의 정착을 위해 선결되어야 할 것으로 판단된다. 이러한 국내외의 광범위한 연구에도 불구하고 이들 물질을 식품을 통하여 방어해 보려는 연구는 거의 없는 실정이다.

미국의 경우 의료보험을 통해 연간 공식적으로 지불되는 전체 의료수가와 같은 수준으로 기능성 식품에 미국인들이 투자하는 것으로 미국의 FDA는 보고하고 있다. 따라서 미국 FDA의 경우 기능성식품에 관한 연구에 엄청난 예산을 투입할 예정이다. 21세기는 암, 당뇨병, 환경오염에 의한 피해에 의한 난치병 및 성인병을 고치기 위해 대체의학으로서 식품 등으로부터 유효성분에 대한 연구가 전세계적으로 붐을 이루고 있는 실정이다. 따라서 본 연구를 통하여 기능성 식품에 대한 전세계적인 필요와 상품에 대한 시장은 과히 상상을 초월하는 수준일 것으로 예상된다.

따라서 이번 과제를 통해 개발된 추출방법과 조건을 통해 감초와 정향피의 기능성 식품을 개발한다면 내분비계에 관련된 여러 난치병과 성인병을 치료하는 목적으로 사용할 수 있을 뿐만 아니라 이러한 식품을 통해 사전에 예방할 수 있는 프로그램을 만들어 활용할 수 있을 것이다. 더하여 이러한 추출물을 계속하여 정제하는 과정을 거쳐 주요 유효활성을 가진 단일 물질을 타블렛화 시켜 기능성 보조식품 또는 의약품으로 상업화한다면 많은 수요가 있을 것이라고 예상된다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1절 국내 농산물 및 가공식품으로부터 내분비계 장애물질 저해 활성물질을 탐색

<제 1세부과제>

유전자재조합 Yeast를 이용한 내분비장애물질 억제효과 탐색

#### 1. 반응을 나타낸 자연물질 명칭

감초 (*Glycyrrhiza uralensis*)

약콩

결명자 (*Cassia obtusifolia*)

초두구

대두 (*Glycine max*)

팥 (*Phaseolus angularis*)

정향피 (*Eugenia caryophyllata*)

밤 (*Castanea crenata*)

감잎 (*Diospyros kaki*)

동규자잎 (*Malva verticillata*)

황기 (*Astragalus membranaceus*)

## 2. Estrogenicity test

Recombinant yeast assay에서 시험물질을 1mg/ml, 100 $\mu$ g/ml로 처치한 결과 양성대조물질로 사용된 17 $\beta$ -Estradiol(E2)과 testosterone(T)과 비교하여 볼 때 유의적인 차이를 나타내었다. 양성대조물질인 17 $\beta$ -Estradiol(E2)와 비교하여 보았을 때 약콩, 감초, 결명자, 초두구, 대두, 정향피, 감잎, 동규자잎, 황기 그리고 팔에서 높은 Estrogenicity가 관찰되었다. 한편 양성대조물질인 testosterone(T)과 비교하여 보았을 때 감초, 정향피 그리고 밤에서 비교적 높은 androgenicity가 관찰되었다. 감초와 정향피의 경우 높은 Estrogenicity와 androgenicity를 나타내었으며 이 중 감초는 한 단계 낮은 농도인 100 $\mu$ g/ml에서 더 높은 Estrogenicity를 나타내었다 .

<제 2세부과제>

MCF-7 세포를 이용한 내분비장애물질 억제 활성물질 탐색

1. 반응을 나타낸 자연물질 명칭

현미, 보리, 옥수수, 메밀, 흑미, 대두, 고구마, 감초, 당귀, 오미자, 정향피, 죽엽, 초두구, 오가피, 백모근, 지구자씨, 홍화씨

단독 처치한 감초, 당귀, 죽엽, 오미자의 경우 단독 처치하거나 BPA와 함께 처치하였을 때 세포의 증식수준은 non-treated수준보다 훨씬 적은치를 나타내었다. 또한 정향피, 초두구, 오가피의 경우 최고농도 1mg/ml에서는 세포의 증식이 억제되지 않았으나 그 아래 농도인 100 ug/ml에서 세포의 증식이 감소되고 또한 BPA와 함께 처치하였을 때 감소하는 경향을 나타내었다. 반대로 백모근의 경우 단독처치군에서는 영향이 나타나지 않았으나 BPA와 함께 처치하였을 때 세포의 증식을 억제하는 경향을 나타내었다. 오가피, 지구자씨, 홍화씨, 현미, 보리, 옥수수, 메밀, 수수, 흑미의 경우 최고농도에서 억제하는 결과가 나타났으나 100 ug/ml이나 BPA와 함께 처치하였을 때 BPA단독 처치군과 별다른 차이를 보이지 않았다.

## <협동과제>

### 농산물 및 원료 농산물의 내분비계 장애물질에 대한 억제 물질의 추출

#### 1. 대상 시료의 선정

내분비계 장애물질에 대한 억제물질을 추출하기 위한 시료로 현미 등 곡류 8종, 대두 등 두류 7종, 고구마와 감자와 같은 서류 2종, 사과 등 과실류 8종, 상추등 채소류 21종, 후추등 향신료 7종, 썩 등 야생식품류 4종, 영지 등 버섯류 5종, 매실 등 약용작물류 29종, 배가모트등 허브류 14종, 녹차 등 차류 6종, 수삼 등 인삼류 3종, 효모식품 등 11종, 호도 등 견과류 4종, 북한산 도토리 등 북한산 식품 또는 가공제품 8종 등 총 137 종의 농산물 또는 그 가공식품류를 선정하였다.

특히 이중에서 생약류의 경우 현재 식품공진상 식품원료로 수재되어 있거나 식품의약품안전청장이 안정하다고 확정한 생약류를 주로 대상으로 하였다.

#### 2. 에탄올 추출물 제조

시료 5g 가량을 정확히 칭량하여 추출용기에 옮기고 80% 에탄올 100ml을 첨가한 후 환류 냉각장치를 이용하여 80℃에서 180분 추출하였다. 각 시료의 에탄올 추출물은 여과지(whatman # 2)상에서 여과한 후 감압농축하여 에탄올을 제거하고 동결 건조하여 제조하였으며 초기 시료무게를 기준으로 추출수율 계산하였다.

그 결과 각 시료의 건물 기준으로 살펴본 추출수율은 곡류는 1.48~8.01%, 두류는 8.83~17.25%, 서류는 8.06~14.63%, 과실류는 41.19~73.22%, 채소류는 4.26~69.07%, 향신료는 15.54~34.40%, 야생식품류는 7.36~50.93%, 버섯류는 5.59~65.42, 약용식품류는 2.46~69.17%, 허브류는 14.65~26.66%, 차류는 14.04~52.40%, 인삼 및 그 가공제품류는 16.65~41.19%, 14.77~60.65%, 견과류는 13.61~32.04%, 북한산 식품 및 그 가공제품류는 3.76~48.37%의 수율을 나타내어 동일한 종류내에서도 시료의 종류의 따라 수율에 있어 큰 차이를 나타내었다.

#### 3. 분석시료의 조제

동결건조된 에탄올 추출물을 각각 100mg씩 정확히 칭량한 후 1ml의 에탄올에 녹이고 10,000×g에서 5분간 원심분리한 후 상정액을 취하여 이를 내분비계 장애물질에 대한 억제 물질 검색을 위한 시료로 사용하였다.

## 제 2절 내분비계 장애물질의 억제물질의 분리, 정제 및 식품 소재화

### <주관연구기관-1>

#### 다이옥신 유전자가 도입된 HepG2 cell line을 이용한 유효물질의 활성확인

다이옥신 유전자를 도입한 사람 간종양세포(HepG2 cell)에서 다이옥신과 80% EtOH로 정제한 각 유효물질 fraction을 처치하여 음성대조군과 양성대조군인 다이옥신 처치군과의 반응정도를 비교 측정하였다. 측정결과, 148(갈근), 156(한국산상백피)에서 XRE와 반응하여 다이옥신과 같은 활성을 나타냈으며, 다이옥신과 동시 처치했을 때, 유의적으로 다이옥신의 활성억제현상을 관찰할 수 있었고, 142(비파잎-2), 144(hyssop&ginger), 145(음양곽), 146(길경), 147(아가리쿠스), 149(누에), 150(백화사설초), 152(어성초)에서는 HepG2 cell line을 이용한 검색법에서 어떠한 반응도 유도되지 않았다. 하지만, 실험을 실시한 그 외의 물질에서는 세포독성이 관찰되었다.

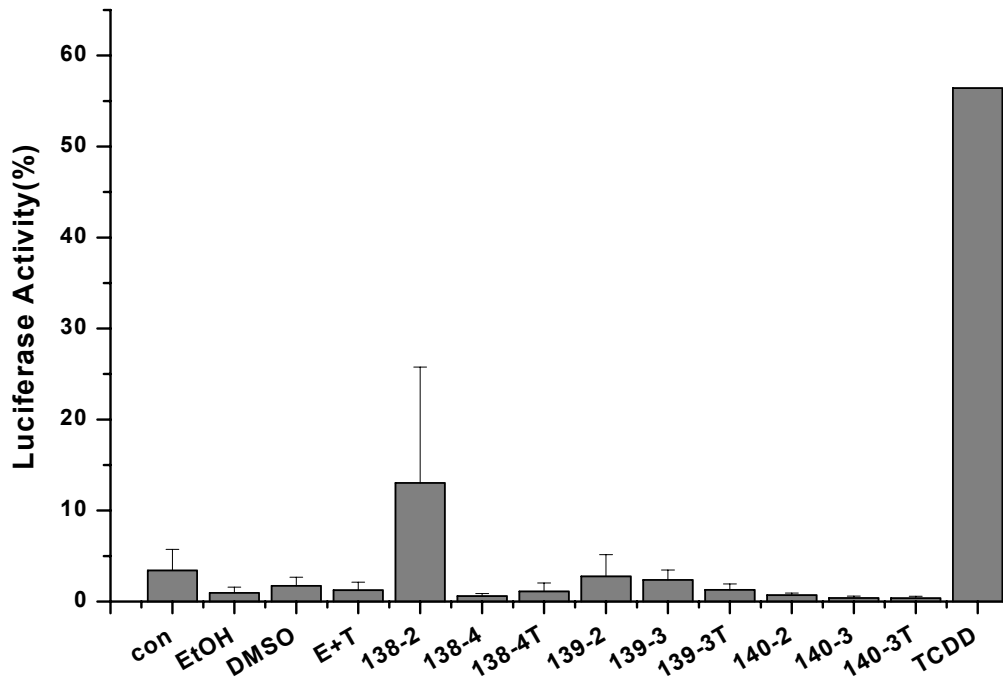


Figure1-1. 다이옥신 유전자를 도입한 사람 간종양세포에서 천마(138), 잎새버섯 (139), 모로훼야(140) 처치시 활성반응



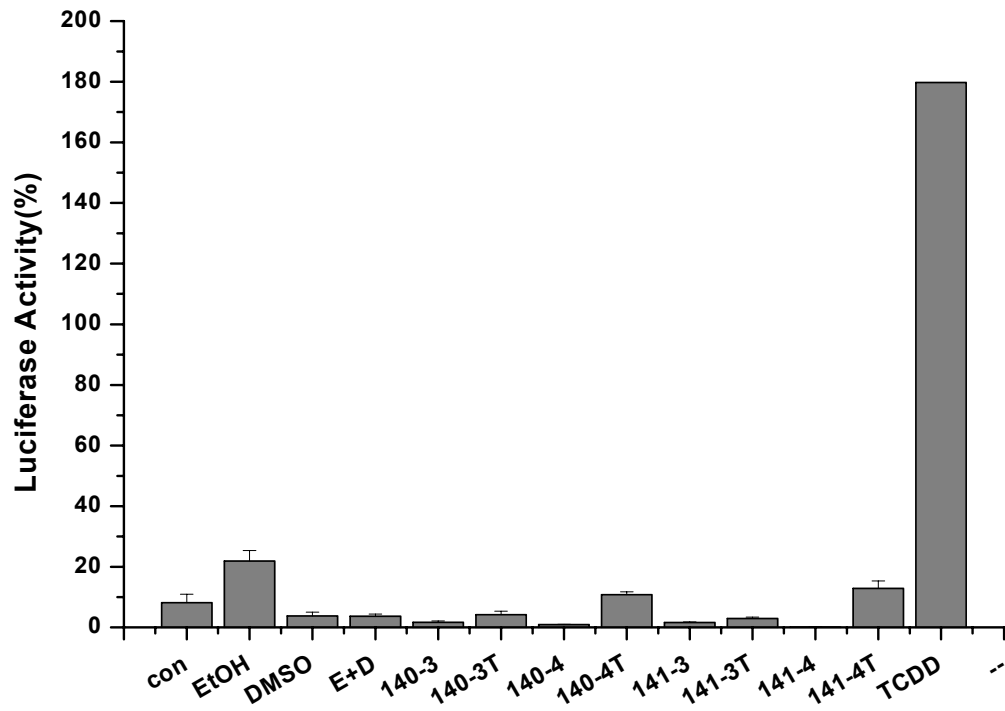


Figure1-2. 다이옥신 유전자를 도입한 사람 간종양세포에서 모로헨야(140), 비파알-1(141) 처리시 활성반응

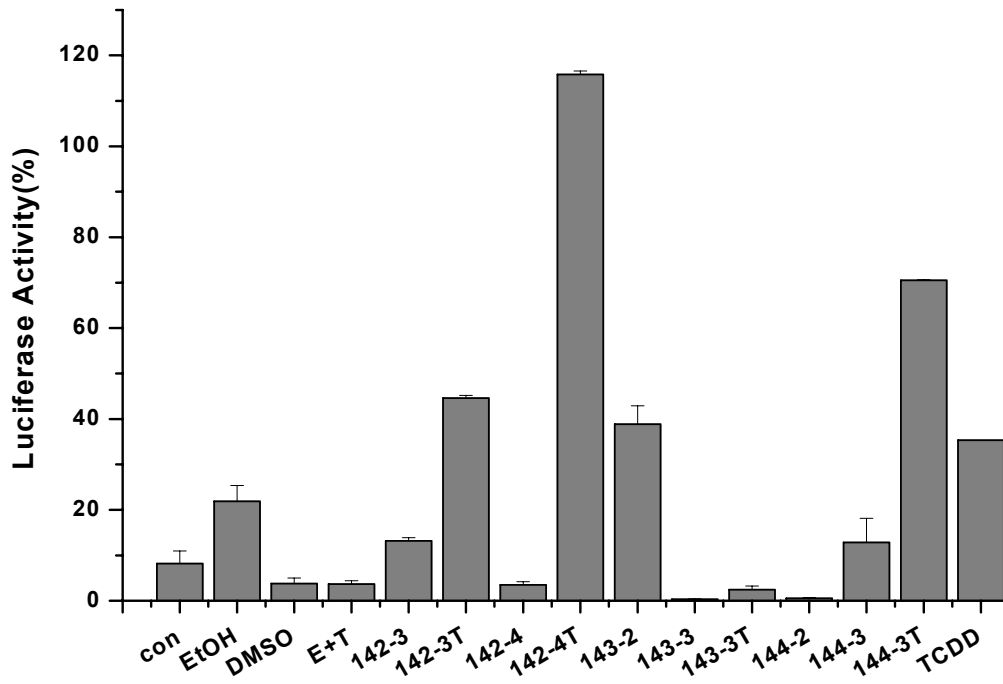


Figure1-3. 다이옥신 유전자를 도입한 사람 간종양세포에서 비파잎-2(142), oregano(143), hyssop&ginger(144) 처치시 활성반응

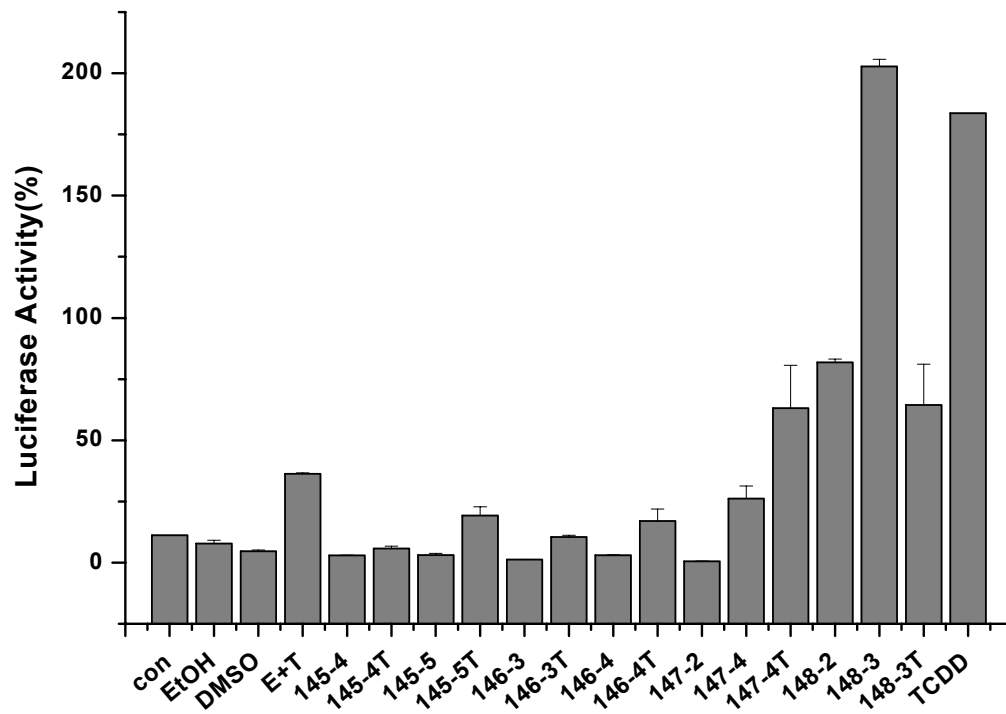


Figure1-4. 다이옥신 유전자를 도입한 사람 간종양세포에서 음약콧(145), 길경 (146), 아가리쿠스(147), 갈근(148) 처치시 활성반응

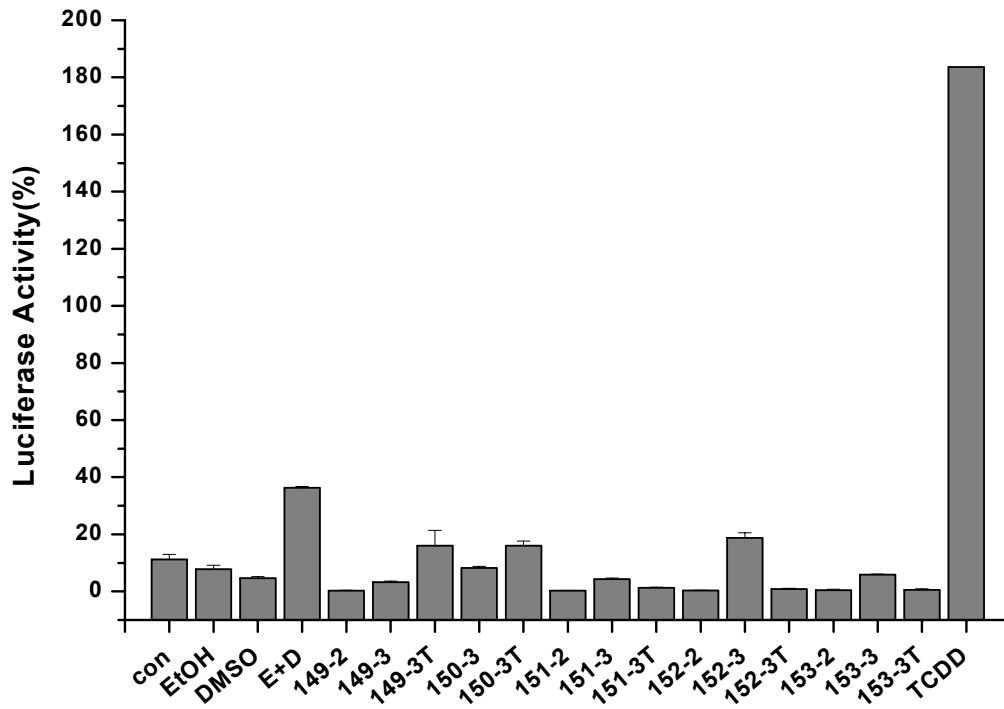


Figure1-5. 다이옥신 유전자를 도입한 사람 간종양세포에서 누에(149), 백화사설초(150), 구지뿔(151), 어성초(152), 성오가피(153) 처치시 활성반응

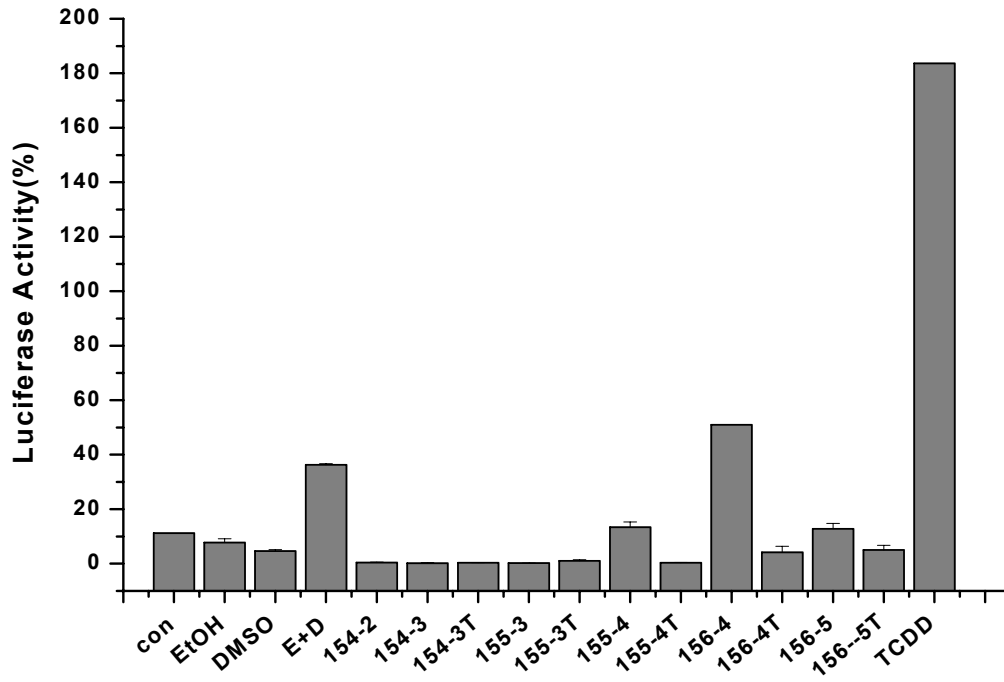


Figure1-6. 다이옥신 유전자를 도입한 사람 간종양세포에서 X(154), 중국산상백피 (155), 한국산상백피(156) 처치시 활성반응

## <주관연구기관-2>

### Uterotrophic assay를 이용한 유효물질의 내분비장애물질 억제효과 확인

내분비장애물질으로서 에스트로젠성을 가지고 있다고 알려진 BPA를 미성숙 암컷 랫드에 3일간 피하투여한 결과, 시험 전기간동안 체중증가율은 정상적으로 나타났으나, (Table 1) 절대중량측정에서 무처치군에 비하여 BPA 투여군에서 질과 자궁, 난소 모두 농도의존적으로 증가하는 것으로 나타났으며 자궁의 경우 400mg/kg에서 유의적으로 증가하였다 (Table 2). Yeast recombinant yeast assay에서 에스트로젠성을 나타내었으며 MCF-7 proliferation assay MCF-7 cell의 증식을 억제하였던 물질 감초, 정향피, 초두구를 BPA와 동시처치하여 immature uterotrophic assay를 실시한 결과, 시험전기간동안 체중증가율은 정상적으로 나타났으나 (Table 3) 절대중량장기무게는 BPA 투여군과 비교하여보았을 때 초두구, 정향피에서는 억제효과가 나타나지 않았고, 감초에서는 BPA에 대한 억제효과가 있는 경향이 나타나나, 통계적상 유의적인 억제효과는 보이지 않았다 (Table 4). 조직병리학적 결과, 자궁상피세포와 질상피세포를 관찰하였는데, 무처치군에 비해 BPA 투여군에서 상피세포의 두께가 커지는 것을 확인할 수 있었고, 감초를 동시처치하였을 때, 10mg/ml 및 50mg/ml에서 농도의존적으로 BPA에 의한 상피세포 증식효과를 억제하는 것으로 나타났다 (Figure 2-1, 2).

Table 2. 3일 동안 BPA 투여후 체중변화

Dose(mg/kg)	Start weight(g)	Weight after 1day(g)	Weight after 2days(g)	Final weight(g)
Vehicle control	34.7±1.0 <sup>a)</sup>	38.9±1.3	43.1±1.0	48.7±2.1
8	37.1±4.6	41.5±5.7	47.8±5.3	51.5±7.1
40	35.6±4.3	42.7±4.6	46.0±5.6	53.3±6.0
160	35.1±0.5	38.5±0.6	43.5±0.9	48.7±2.2
400	33.4±2.7	36.5±2.4	40.1±2.7	44.4±3.1

<sup>a)</sup>, Values shown are mean ±SD

**Table 3. 3일동안 BPA 투여후 절대장기중량**

	Dose(mg/kg)				
	Vehicle control	8	40	160	400
Vagina(mg)	10.47±6.38 <sup>a)</sup>	25.50±7.52*	21.87±7.79	10.83±1.17	17.53±3.63
Uterus(mg)	31.63±13.07	38.23±5.52	38.87±8.48	47.33±13.25	70.30±14.99*
Lt. ovary(mg)	2.53±0.32	3.83±0.55	4.87±0.72	4.13±1.33	6.97±1.24
Rt. ovary(mg)	2.40±0.10	4.13±2.22	5.33±1.36*	5.57±1.72*	6.23±0.97*

<sup>a)</sup>, Values shown are mean ±SD

\*Significantly different from control at p<0.05



**Table 4. 3일동안 BPA와 감초, 정향피, 초두구 투여 후 체중변화**

Dose(mg/kg)	Start weight(g)	Weight after 1day(g)	Weight after 2days(g)	Final weight(g)
Vehicle control	38.7±2.0 <sup>a)</sup>	42.6±2.8	46.6±2.4	52.1±2.6
BPA 400	43.7±1.9	47.3±2.2	50.0±2.1	53.5±2.5
감초50+BPA400	40.0±2.8	40.3±1.5	44.1±2.3	49.8±3.6
감초10+BPA400	42.3±2.3	43.6±2.9	46.2±3.3	49.0±3.8
정향피50+BPA400	43.3±1.8	44.8±1.6	48.4±1.5	51.3±1.5
정향피10+BPA400	40.6±1.5	40.6±1.3	43.3±1.8	46.5±2.3
초두구50+BPA400	42.4±2.5	44.7±4.0	47.2±4.0	49.9±3.3
초두구10+BPA400	40.7±2.3	42.2±2.4	45.4±2.6	49.1±2.8

<sup>a)</sup>, Values shown are mean ±SD

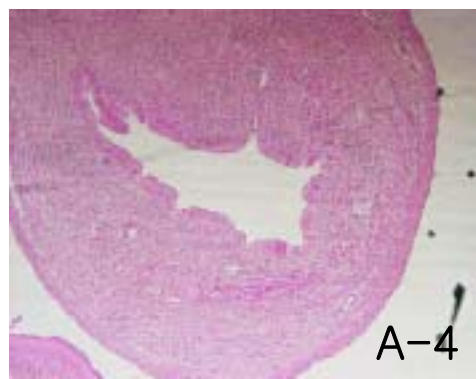
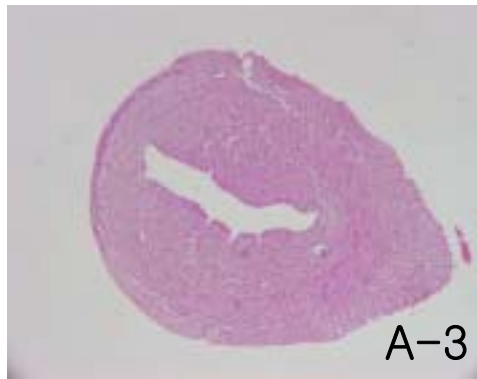
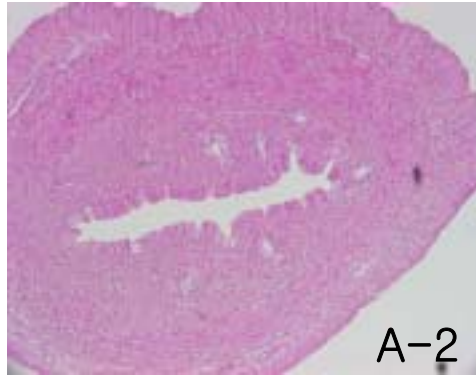
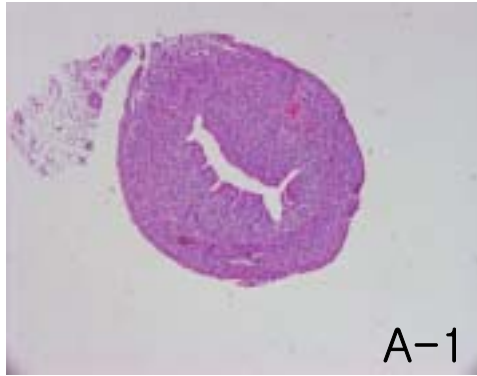
**Table 5. 3일동안 BPA와 감초, 정향피, 초두구 투여후 절대장기중량**

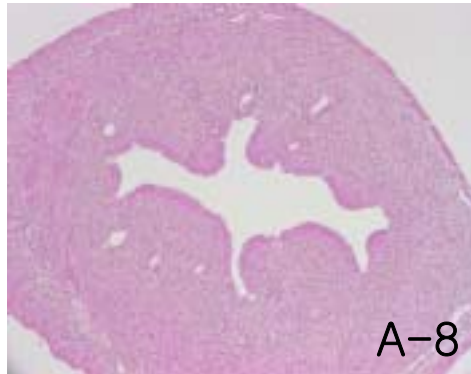
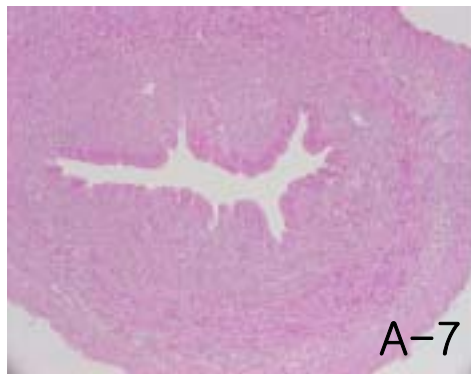
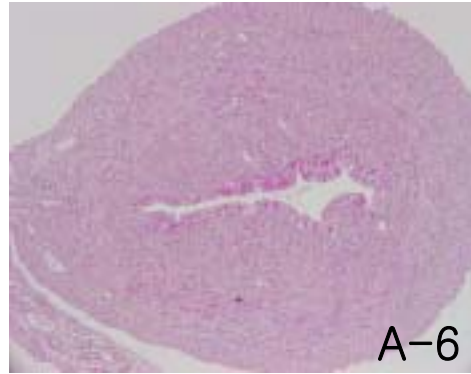
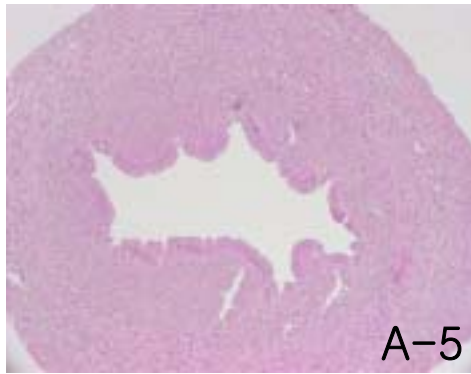
Dose(mg/kg)	Vagina	Uterus	Left ovary	Right ovary
Vehicle control	23.85±11.85 <sup>a)</sup>	25.40±7.01	5.93±3.92	6.40±3.43
BPA 400	33.40±15.07	81.73±10.03*	6.38±1.60	5.15±0.53
감초50+BPA400	17.83±4.12	79.10±32.22*	5.03±1.26	5.10±2.31
감초10+BPA400	34.45±6.81	63.73±10.10*	5.25±1.21	5.73±2.25
정향피50+BPA400	47.88±9.49**	81.65±13.23*	5.33±1.73	5.93±1.07
정향피10+BPA400	47.13±9.63**	70.48±17.56*	5.25±2.80	4.28±0.94
초두구50+BPA400	49.50±17.03**	88.53±21.14*	5.20±1.80	5.98±0.95
초두구10+BPA400	45.25±14.60**	75.35±13.01*	5.45±1.44	5.30±0.76

<sup>a)</sup>, Values shown are mean ±SD

\*Significantly different from vehicle control at p<0.05

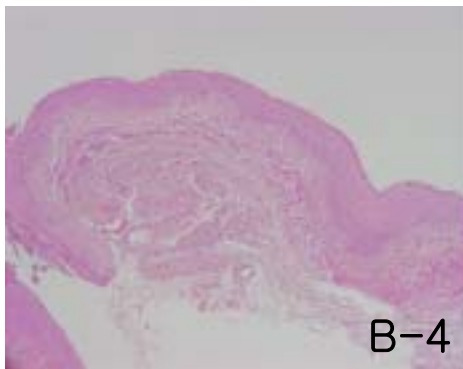
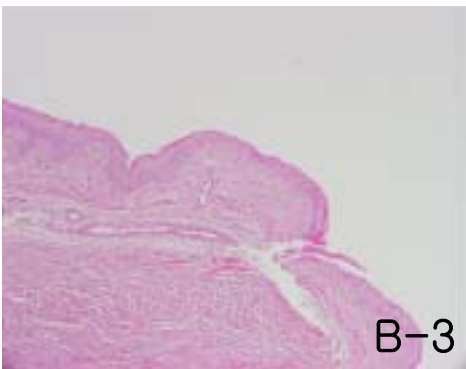
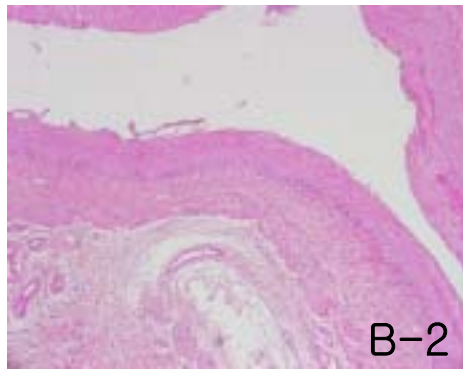
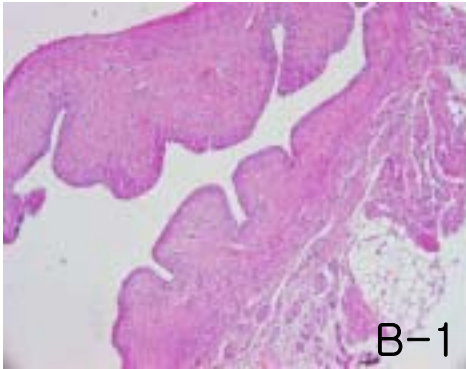
\*\*Significantly different from positive control at p<0.05

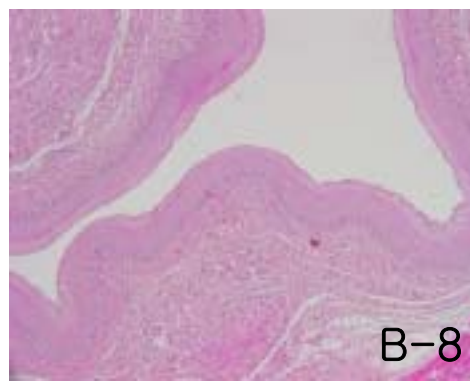
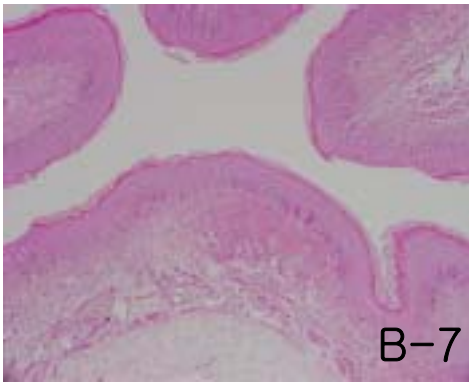
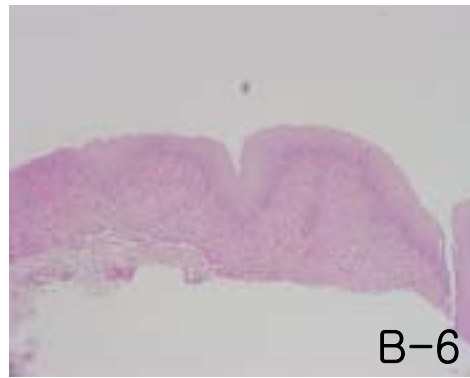
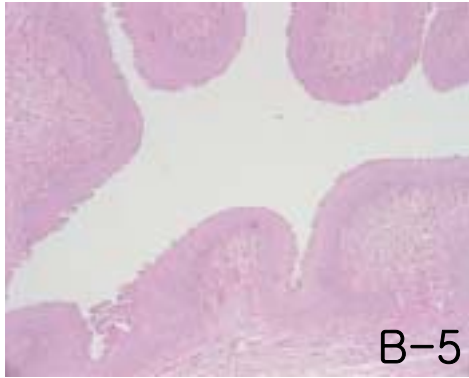




**Figure 2-1. 자궁상피세포의 조직사진**

(A1; 무처리군, A2; Bisphenol A 투여군, A3; 감초 50mg/kg+BPA 투여군, A4; 감초 10mg/kg+BPA 투여군, A5; 정향피 50mg/kg+BPA 투여군, A6; 정향피 10mg/kg+BPA 투여군, A7; 초두구 50mg/kg+BPA 투여군, A8 초두구 10mg/kg+BPA 투여군)





**Figure 2-2. 질상피세포의 조직사진**

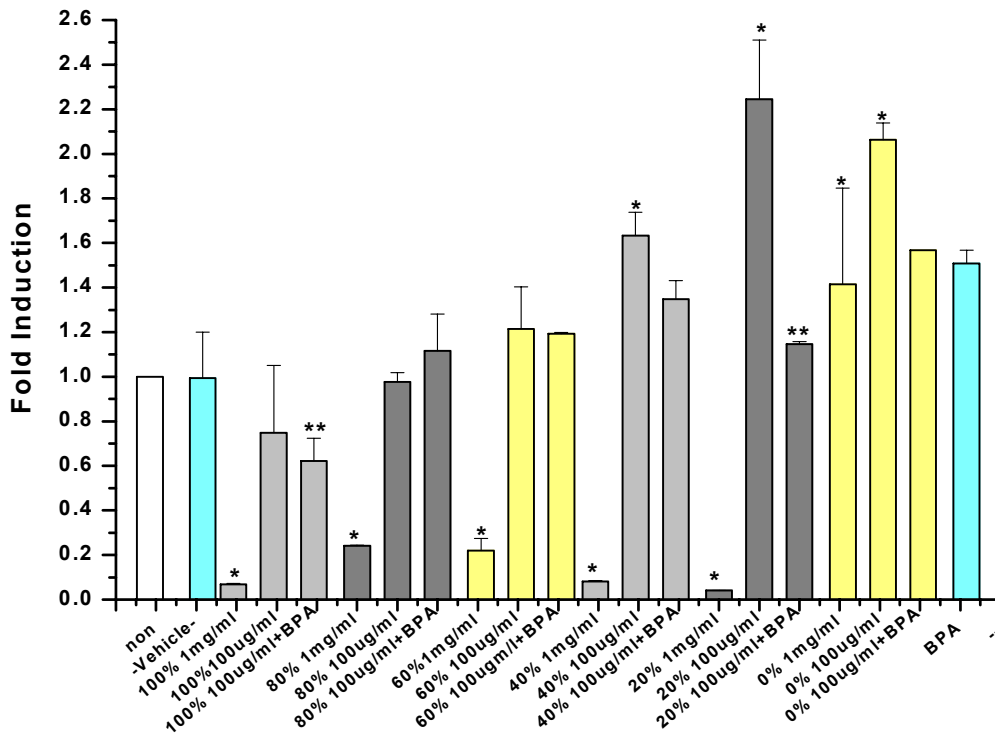
(A1; 무처치군, A2; Bisphenol A 투여군, A3; 감초 50mg/kg+BPA 투여군, A4; 감초 10mg/kg+BPA 투여군, A5; 정향피 50mg/kg+BPA 투여군, A6; 정향피 10mg/kg+BPA 투여군, A7; 초두구 50mg/kg+BPA 투여군, A8 초두구 10mg/kg+BPA 투여군)

<주관연구기관-3>

정제단계별 내분비계장애물질 억제효과 확인

1. 감초 추출물의 MCF-7 breast cancer cell과 Bisphenol A 억제효과

추출용매인 EtOH를 함량에 따라 다르게 분획하였을 때 EtOH 100%, 80%, 60%,40%, 20%에서의 감초 fraction을 희석해서 배양한 MCF-7 cell은 추출용매의 농도의존적으로 억제효과가 감소하였다. 예외적으로 유기용매가 0%인 EtOH0% 감초 fraction은 BPA와 동시 처치를 제외하고는 모두 유의적인 증가가 발견되었다(Figure 3-1).

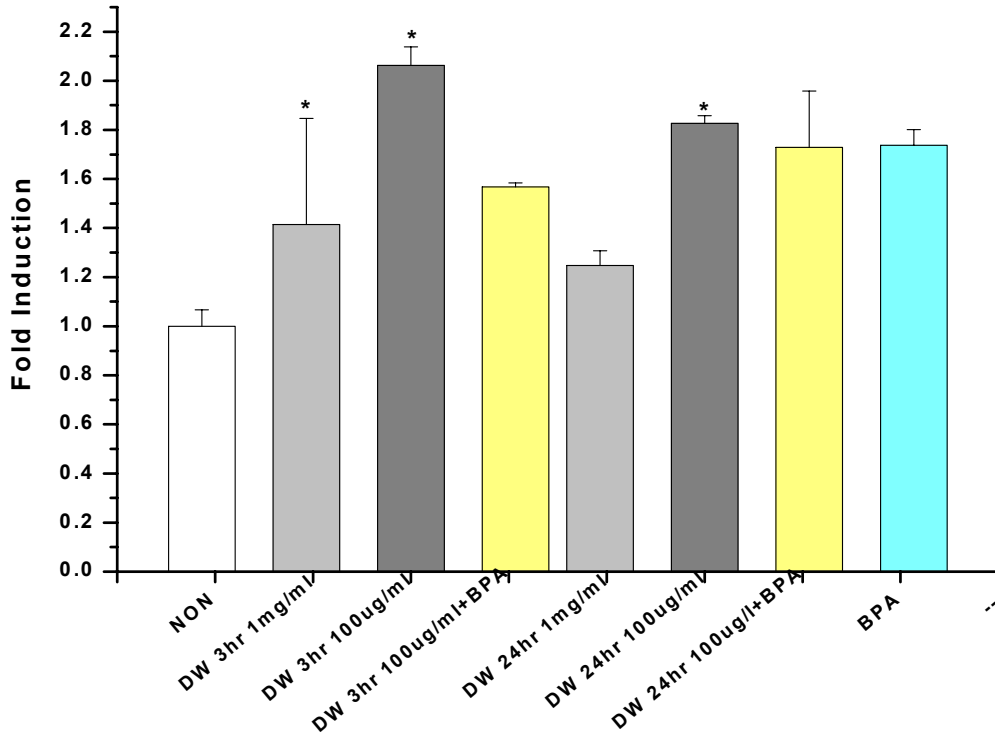


\* Significant difference at p<0.05 level compared with the negative control group.

\*\* Significant difference at p<0.05 level compared with the positive control group.

Figure 3-1. 농도별 EtOH로 추출한 감초의 MCF-7 breast cancer cell과 Bisphenol A 억제효과

무기용매인 DW만을 추출용매로 사용하여 추출시간별 감초 fraction의 MCF-7 cell과 BPA 억제효과를 보았다. 24시간동안 DW로 감초를 추출하였을 때 1mg/ml를 제외하고는 오히려 MCF-7 cell이 증가하였다. BPA를 동시 처치 하였을 때는 유의적인 현상을 보이지 않았다(Figure 3-2).



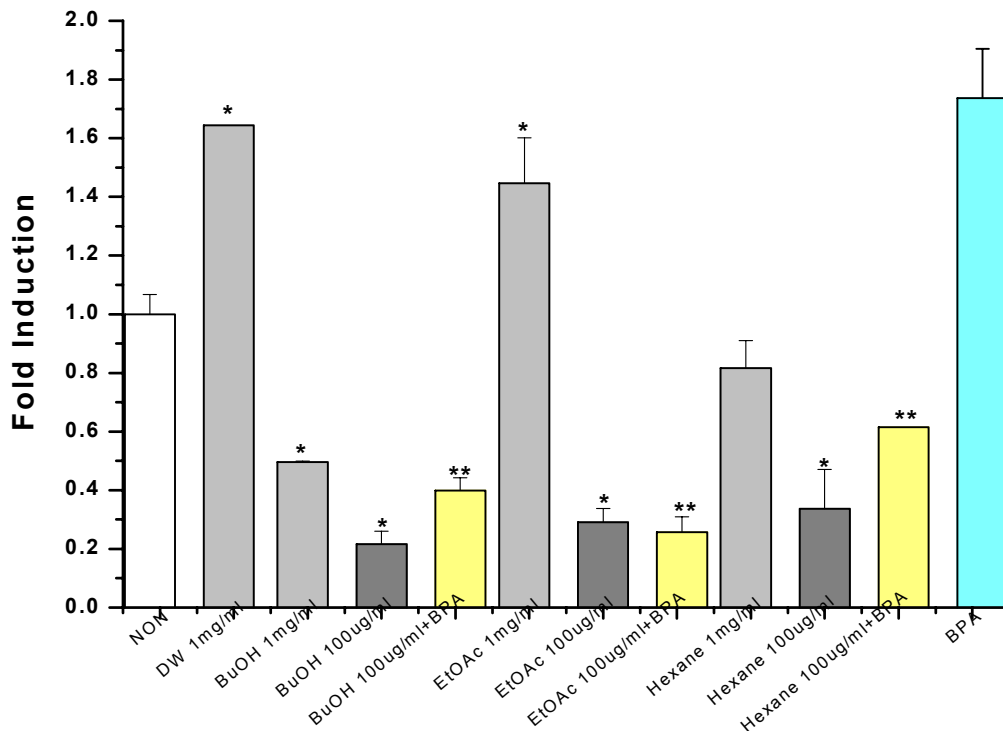
\* Significant difference at  $p < 0.05$  level compared with the negative control group.

\*\* Significant difference at  $p < 0.05$  level compared with the positive control group.

Figure 3-2. 추출시간별로 본 DW-감초 fraction의 MCF-7 cell과 Bisphenol A 억제효과



DW, BuOH, EtOAc, Hexane을 추출용매로 사용하여 추출한 감초 fraction을 100배 1000배 희석하여 MCF-7 cell과 BPA의 억제효과를 시험하였다. DW의 경우 무기용매라서 vehicle로 사용한 100% EtOH에 희석이 잘되지 않아 100배 희석한 경우만 시험하였다. Hexane 1mg/ml의 감초 fraction을 제외한 나머지 물질들은 모두 유의적인 효과를 보였으나, DW, 1mg/ml과 EtOAc 1mg/ml의 경우 양성의 유의성을 나타내어 오히려 MCF-7 cell의 증가를 유도하였다(Figure3-3).

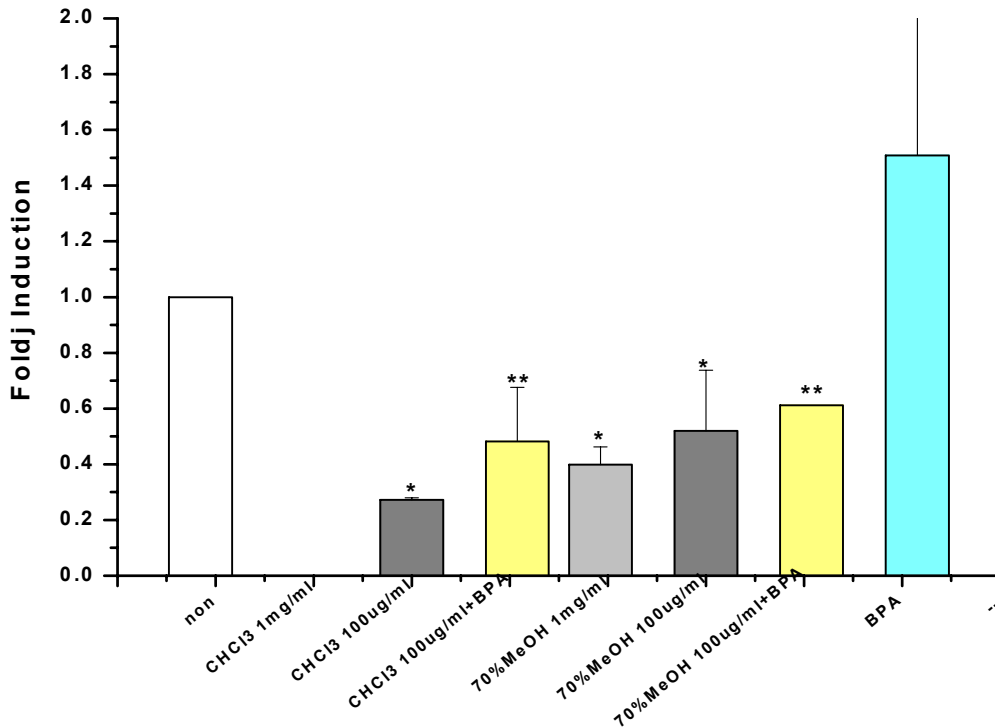


\* Significant difference at  $p < 0.05$  level compared with the negative control group.

\*\* Significant difference at  $p < 0.05$  level compared with the positive control group.

Figure 3-3. 용매에 따른 감초fraction의 MCF-7 breast cancer cell과 Bisphenol A 억제효과

CHCl<sub>3</sub>, 70%MeOH을 추출용매로 사용하여 추출한 감초 fraction을 100배 1000배 희석하여 MCF-7 cell과 BPA의 억제효과를 시험하였다. CHCl<sub>3</sub> 1mg/ml의 경우 감초 fraction의 background가 너무 진하여서 OD<sub>260nm</sub>의 흡광도로 측정하는 것이 불가능하였다. 이 물질은 Trypan blue staining시험법에 의한 cell counting법으로 아래의 결과를 참고할 수 있다. CHCl<sub>3</sub>, 70%MeOH로 추출한 감초 추출물1mg/ml, 100μg/ml은 모두 유의적인 결과를 보였다(Figure3-4).

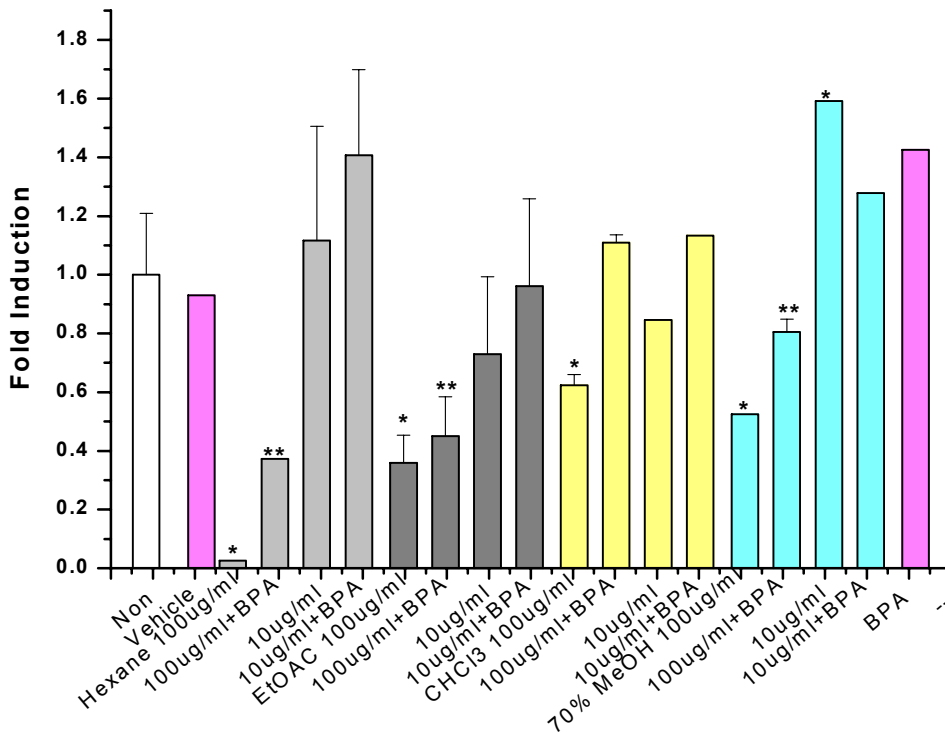


\* Significant difference at p<0.05 level compared with the negative control group.

\*\* Significant difference at p<0.05 level compared with the positive control group.

Figure 3-4. 용매에 따른 감초fraction의 MCF-7 breast cancer cell과 Bisphenol A 억제효과

Hexane, EtOAc, CHCl<sub>3</sub>, 70%MeOH를 추출용매로 사용하여 추출한 감초 fraction을 10<sup>3</sup> 배 10<sup>4</sup>배 희석하여 MCF-7 cell과 BPA의 억제효과를 시험하였다. 여기서 시험한 물질들은 100배와 1000배에서 cell의 morphology가 변하는 등의 cytotoxic한 경향을 보여 10<sup>4</sup>배 희석한 시험물질을 사용하게 되었다. Hexane, 70%MeOH의 감초 추출물10μg/ml의 경우 MCF-7 cell의 증가를 보였지만 EtOAc, CHCl<sub>3</sub>의 감초 추출물10μg/ml는 감소하는 경향을 나타내었다(Figure3-5).



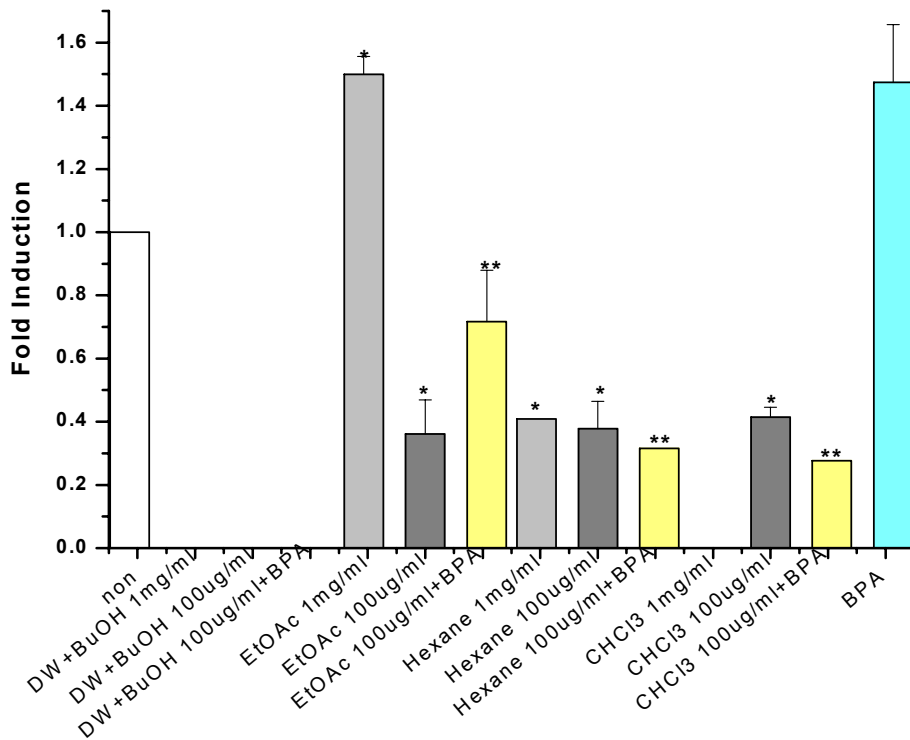
\* Significant difference at p<0.05 level compared with the negative control group.

\*\* Significant difference at p<0.05 level compared with the positive control group.

Figure 3-5. 용매에 따른 감초fraction의 MCF-7 breast cancer cell과 Bisphenol A 억제효과

## 2. 초두구 fraction의 MCF-7 breast cancer cell과 Bisphenol A 억제효과

DW+BuOH, EtOAc, Hexane, CHCl<sub>3</sub>을 추출용매로 사용하여 추출한 초두구 fraction을 100배 1000배 희석하여 MCF-7 cell과 BPA의 억제효과를 시험하였다. DW+BuOH를 추출용매로 사용한 초두구 추출물 또한 background가 진하여 측정이 불가능하였다. 이 시험물질은 아래의 Figure. 6에 결과가 보고되어있다. EtOAc 초두구 fraction을 제외한 나머지 시험물질에서 음의 유의성을 보여 MCF-7 cell과 BPA의 억제효과를 보여주었다(Figure4-1).

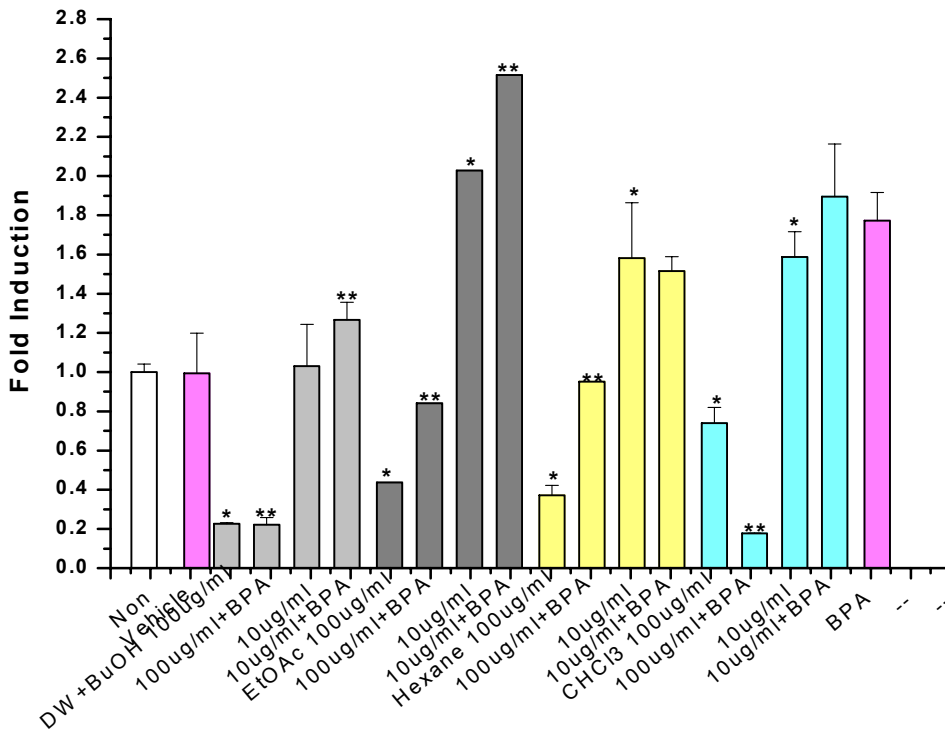


\* Significant difference at  $p < 0.05$  level compared with the negative control group.

\*\* Significant difference at  $p < 0.05$  level compared with the positive control group.

Figure 4-1. 용매에 따른 초두구fraction의 MCF-7 breast cancer cell과 Bisphenol A 억제효과

Figure4-1에서 세포의 변형이 일으켰던 DW+BuOH, EtOAc, Hexane, CHCl<sub>3</sub>을 추출용매로 사용하여 추출한 초두구 fraction을 10<sup>3</sup>배 10<sup>4</sup>배 희석하여 MCF-7 cell과 BPA의 억제효과를 시험하였다. DW+BuOH 10 $\mu$ g/ml, Hexane 10 $\mu$ g/ml와 BPA 동시처치군, CHCl<sub>3</sub> 10 $\mu$ g/ml와 BPA 동시처치를 제외한 나머지 10<sup>4</sup>배 희석물질에선 오히려 MCF-7 cell 증가 현상을 보였다(Figure4-2).



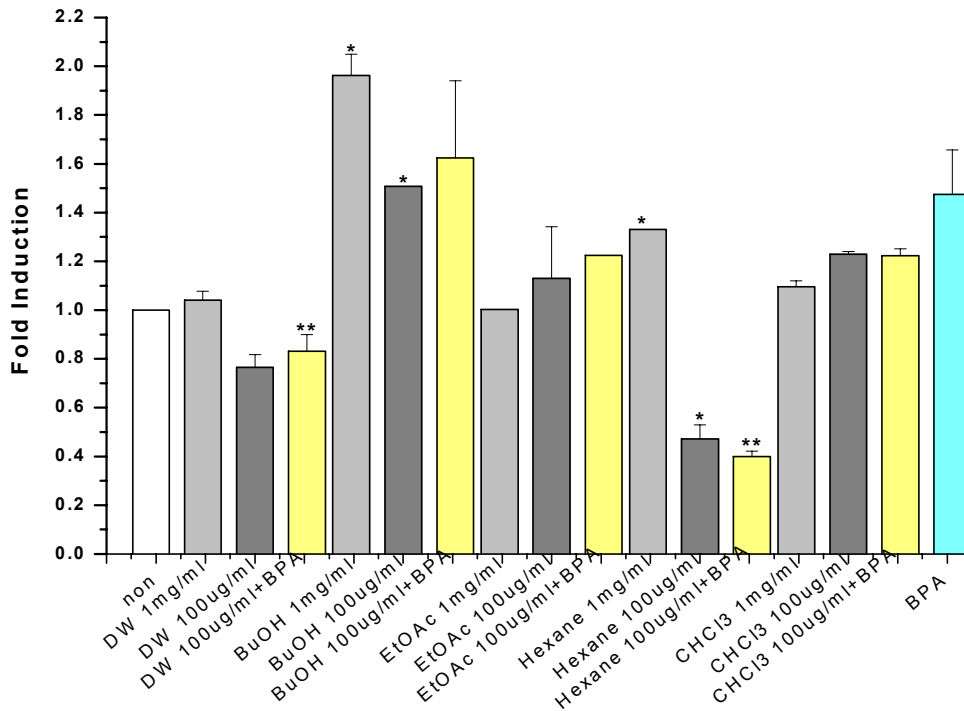
\* Significant difference at p<0.05 level compared with the negative control group.

\*\* Significant difference at p<0.05 level compared with the positive control group.

Figure 4-2. 용매에 따른 초두구fraction의 MCF-7 breast cancer cell과 Bisphenol A 억제효과

### 3. 정향피 fraction의 MCF-7 breast cancer cell과 Bisphenol A 억제효과

DW, BuOH, EtOAc, Hexane, CHCl<sub>3</sub>을 추출용매로 사용하여 추출한 정향피 fraction을 100배 1000배 희석하여 MCF-7 cell과 BPA의 억제효과를 시험하였다. DW-정향피 추출물 100ug/ml와 BPA 동시처리, Hexane-정향피추출물100ug/ml 단독처리와 BPA 동시처리 군에서 유의적인 감소를 보이고 있다(Figure5-1).

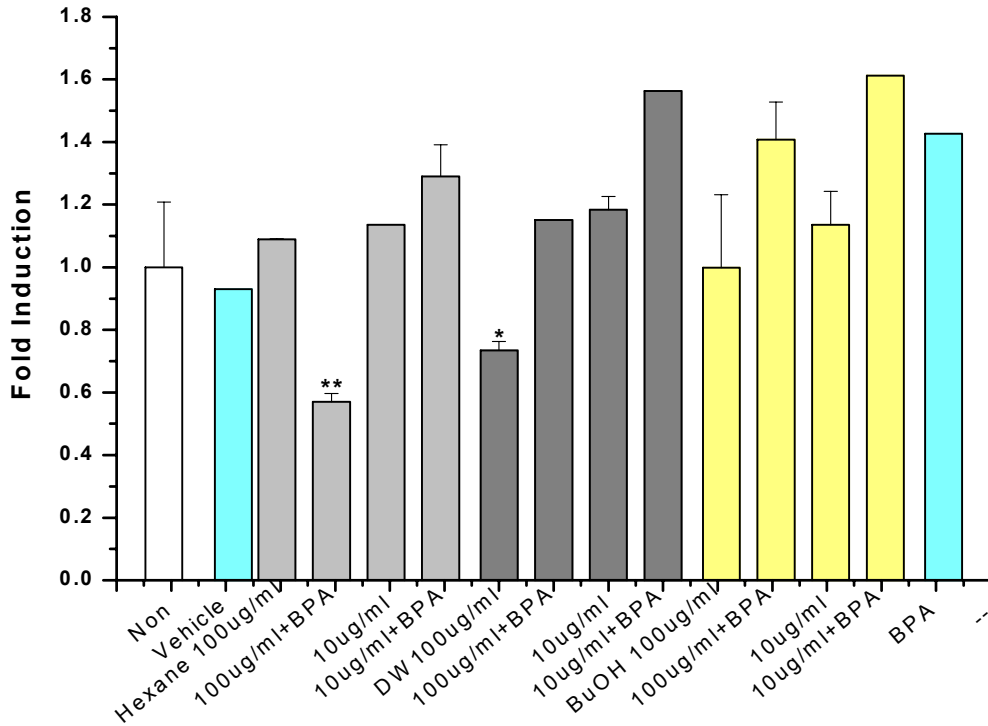


\* Significant difference at p<0.05 level compared with the negative control group.

\*\* Significant difference at p<0.05 level compared with the positive control group.

Figure 5-1. 용매에 따른 정향피fraction의 MCF-7 breast cancer cell과 Bisphenol A 억제효과

DW, BuOH, EtOAc, Hexane, CHCl<sub>3</sub>을 추출용매로 사용하여 추출한 정향피fraction에서 세포변형을 유도한 위 그림의 3가지 시험물질을 10<sup>3</sup>배 10<sup>4</sup>배 희석하여 MCF-7 cell과 BPA의 억제효과를 시험하였다. 10 $\mu$ g/ml의 농도에서는 MCF-7 cell의 유의적인 증감이 보이지 않아 억제효과가 거의 없다는 것을 추측할 수 있다(Figure5-2).



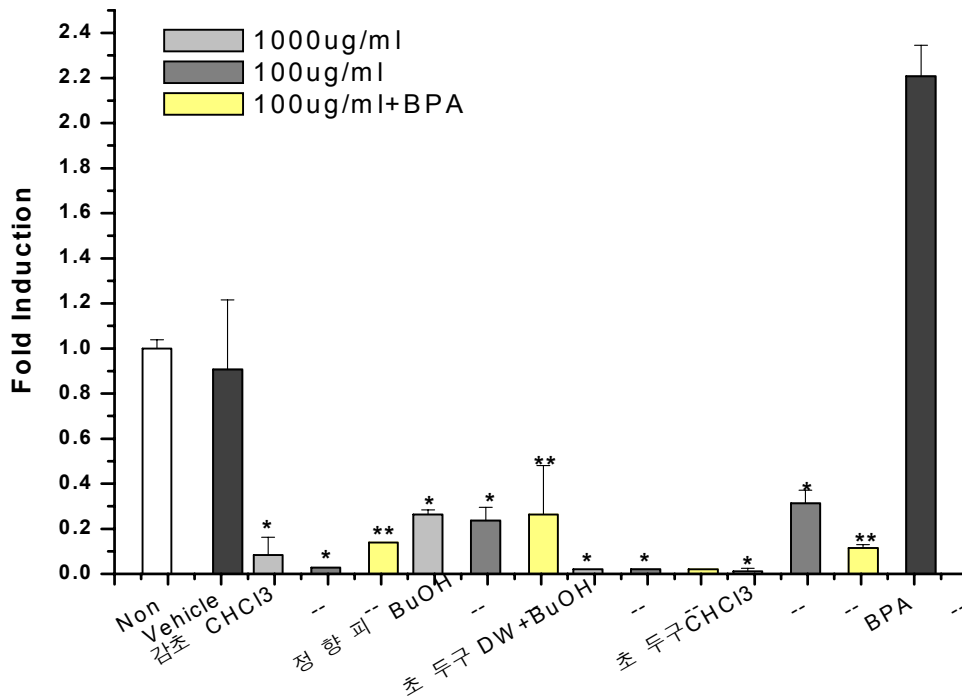
\* Significant difference at p<0.05 level compared with the negative control group.

\*\* Significant difference at p<0.05 level compared with the positive control group.

Figure 5-2. 용매에 따른 정향피fraction의 MCF-7 breast cancer cell과 Bisphenol A 억제효과

4. Trypan blue staining 시험법에 의한 감초, 정향피, 초두구 fraction의 MCF-7 breast cancer cell과 Bisphenol A 억제효과

위의 결과 가운데 시험물질의 특성으로 측정하지 못하였던 감초 CHCl<sub>3</sub>, BuOH, 초두구 DW+BuOH, 정향피CHCl<sub>3</sub> fraction을 Trypan blue staining 시험법을 사용하여 cell counting 으로 MCF-7 cell과 BPA 억제효과를 시험하였다. 감초 CHCl<sub>3</sub>, BuOH, 초두구DW+BuOH, 정향피CHCl<sub>3</sub> 추출물 10배, 100배 희석 시험물질 모두 유의적인 MCF-7 cell 감소를 유도하였다(Figure 6).



\* Significant difference at p<0.05 level compared with the negative control group.

\*\* Significant difference at p<0.05 level compared with the positive control group.

Figure 6. 용매에 따른 감초, 정향피, 초두구 fraction의 MCF-7 breast cancer cell과 Bisphenol A 억제효과



## 시료물질의 정제단계별 내분비계장애물질 억제효과 확인결론

Human breast cancer cell line인 MCF-7 cell을 감초, 초두구, 정향피의 추출물로 BPA와 단독, 동시처치해 Breast cancer와 BPA의 억제효과를 시험하였다. 1mg/ml과 100 $\mu$ g/ml의 고농도 군에서는 EtOH에서 추출한 감초의 fraction이 추출용매의 농도의존적으로 MCF-7 cell과 BPA를 억제하는 경향을 보였다. 그러나 DW를 추출용매로 사용한 감초 fraction은 오히려 estrogenic한 성분이 포함되어 있어 단독처치시 BPA와 비슷한 양상의 세포증식현상을 관찰할 수 있었고, BPA와 동시처치한 결과, BPA에 의해 유도된 세포증식효과를 억제하진 못했다. 이런 결과를 바탕으로 MCF-7 cell과 BPA를 억제하는 성분은 유기용매에 의해 추출이 되며 유기용매의 농도가 높을수록 효과가 있으리라 사료된다. 그리고 그 외 감초의 Hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, 70% MeOH 추출물에서 또한 Breast cancer와 BPA의 억제능력을 50, 10 $\mu$ g/ml에서 관찰할 수 있었다.

초두구와 정향피 fraction의 경우 1mg/ml과 100 $\mu$ g/ml의 고농도 군에서는 감초와 달리 세포독성을 유발하였으며, 10 $\mu$ g/ml 저농도를 처치하였을 때는 에스트로젠성이 나타났다. 따라서 50 $\mu$ g/ml의 정향피와 초두구의 추출물을 이용하여 재시험을 실시하였는데 정향피의 DW 추출물에서만 BPA에 의해서 유도되는 MCF-7 세포증식억제 유효성을 찾을 수 있었다.

## 5. 재조합효모법을 이용한 유효물질의 에스트로젠성 및 안드로젠성 검색시험

재조합효모법을 이용하여 천연추출물의 안드로젠성을 검색한 결과, 시험에 사용된 어떠한 물질에서도 안드로젠성이 나타나지 않는 것으로 확인되었다 (Table3-11, 12, 13, 14 and 15). 반면에 에스트로젠성을 검색한 결과, 148(갈근)의 경우, 100ug/ml에서 가장 높은 에스트로젠성을 나타내었으며, 150(백화사설초)는 대조군과 비교하여 보았을 때 100 $\mu$ g/ml과 1mg/ml에서 농도의존적으로 에스트로젠성을 나타내고 있으며 양성대조군인 Estradiol과 비슷한 수준의 에스트로젠성을 나타냈다. 154(X)는 1mg/ml에서 낮은 수준의 에스트로젠성을 나타냈으며, 155(중국산상백피)는 100 $\mu$ g/ml에서 에스트로젠성이 유의적인 증가를 보였다. 156(한국산상백피)는 처지농도에 반비례적으로 활성도가 증가하였고 151(구지뽕) 또한 반비례적으로 에스트로젠성을 유도하고 있다. 하지만, 이외의 물질들은 어떠한 에스트로젠성 관련 반응을 유도하지 않았다(Figure 7).

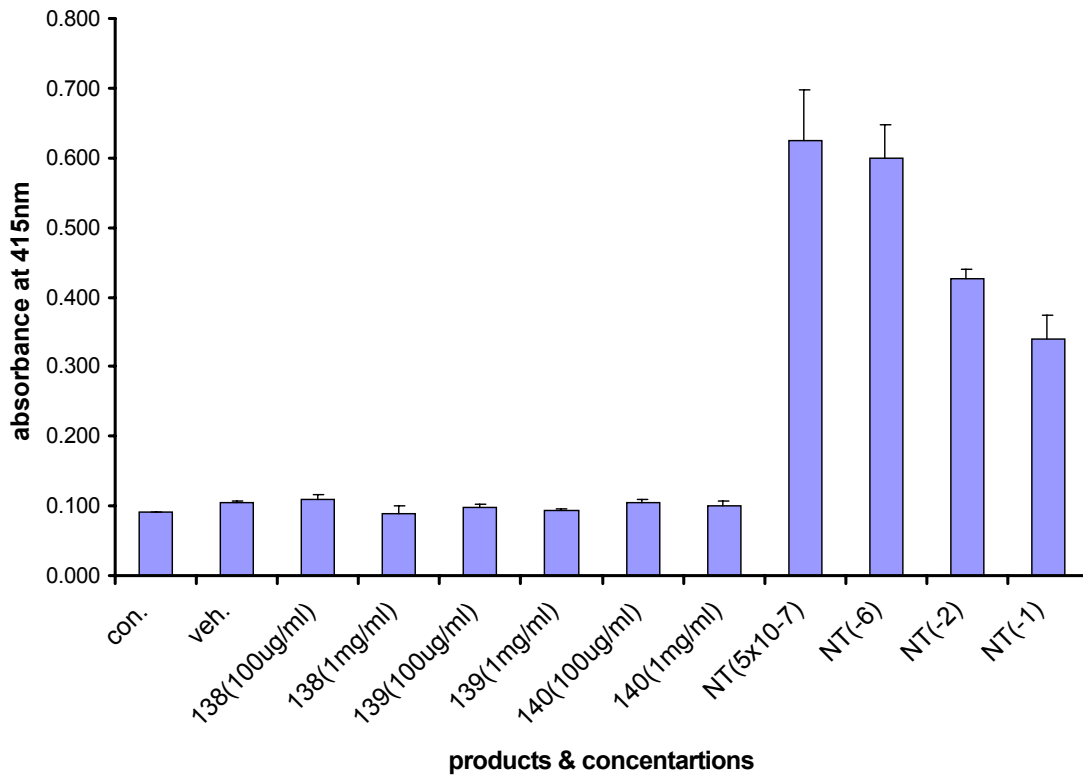


Figure 7-1. 재조합효모법을 이용한 138(천마), 139(앞새버섯), 140(모로훼야)의 안드로젠성 측정

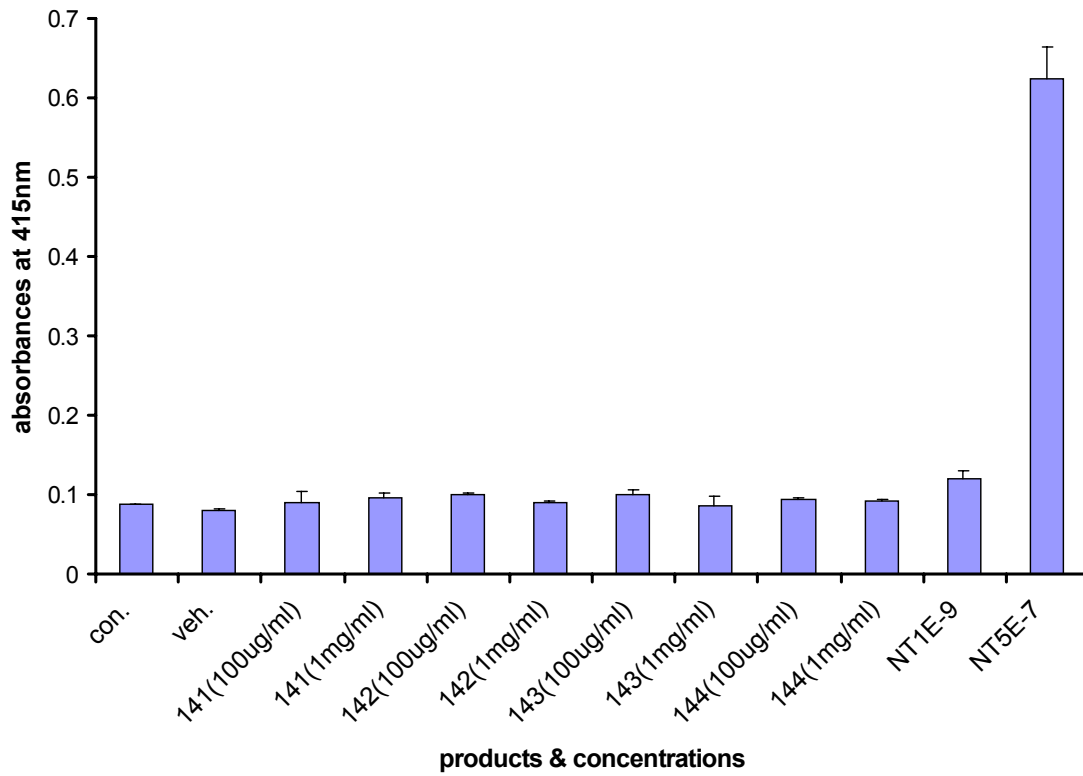


Figure 7-2. 재조합효모법을 이용한 141(비파잎-1), 142(비파잎-2), 143 (oregano), 144(hyssop&ginger)의 안드로젠성 측정

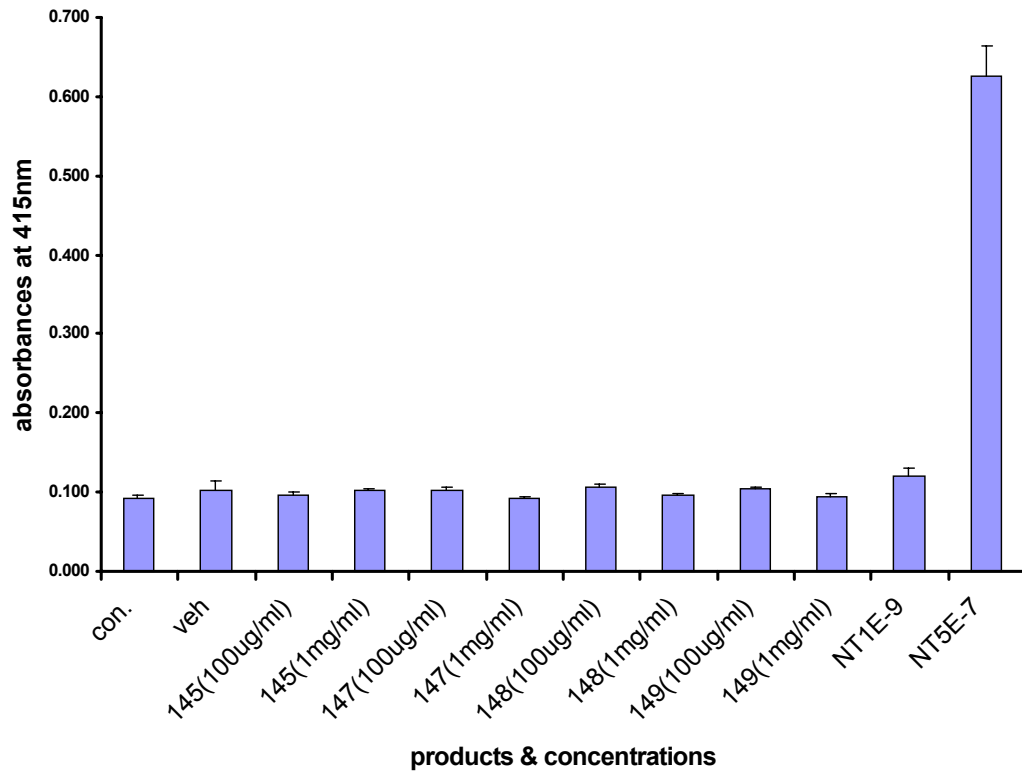


Figure 7-3. 재조합효모법을 이용한 145(음양곽), 147(아가리쿠스), 148 (갈근), 149(누에)의 안드로젠성 측정

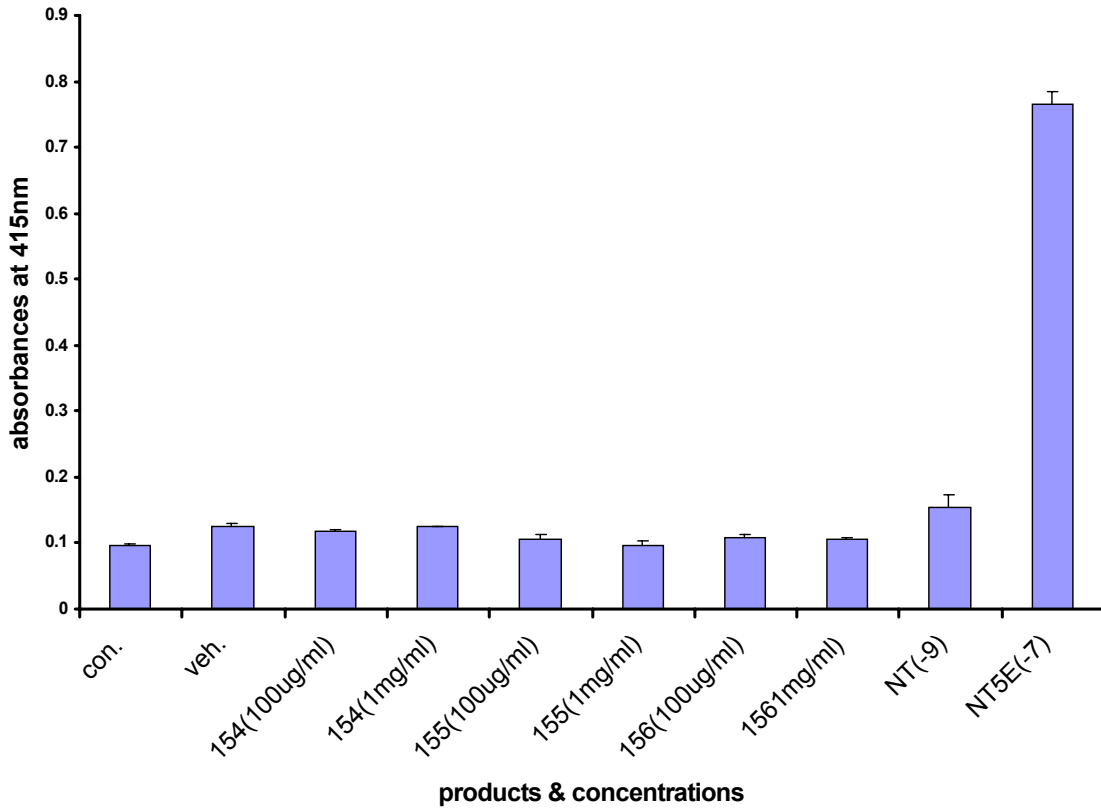


Figure 7-4. 재조합효모법을 이용한 154(?), 155(중국산상백피), 156 (한국산상백피)의 안드로젠성 측정

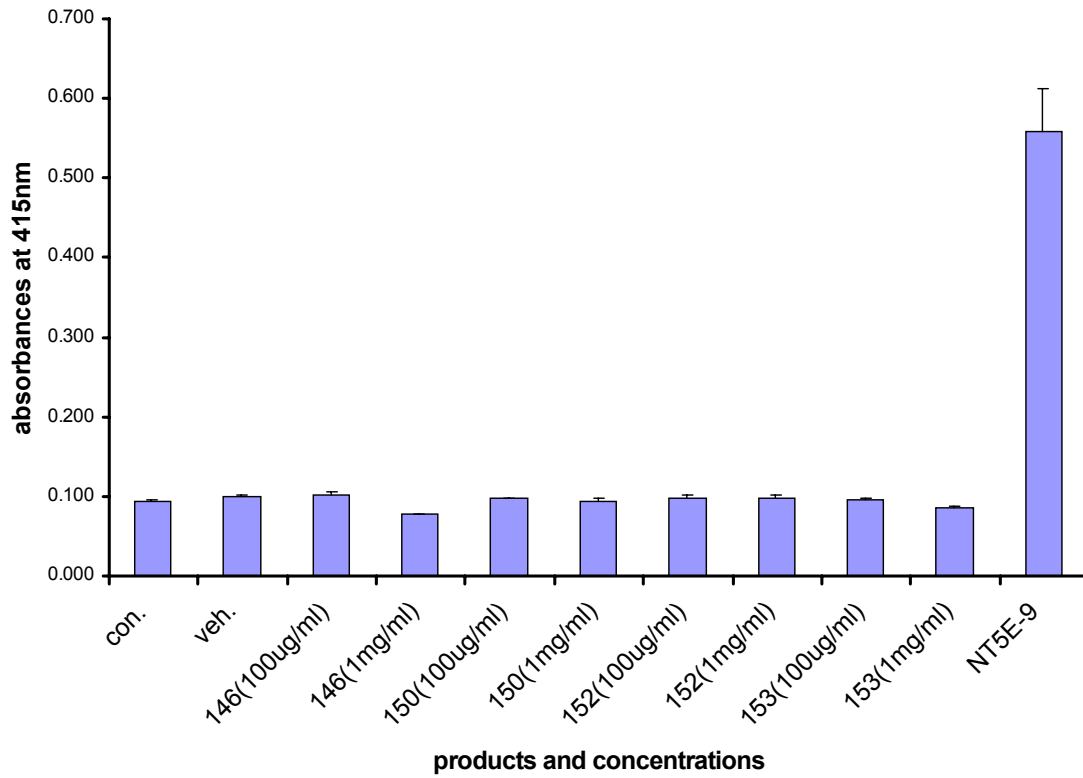


Figure 7-5. 재조합효모법을 이용한 146(길경), 150(백화사설초), 152(어성초), 153(섬오가피)의 안드로젠성 측정

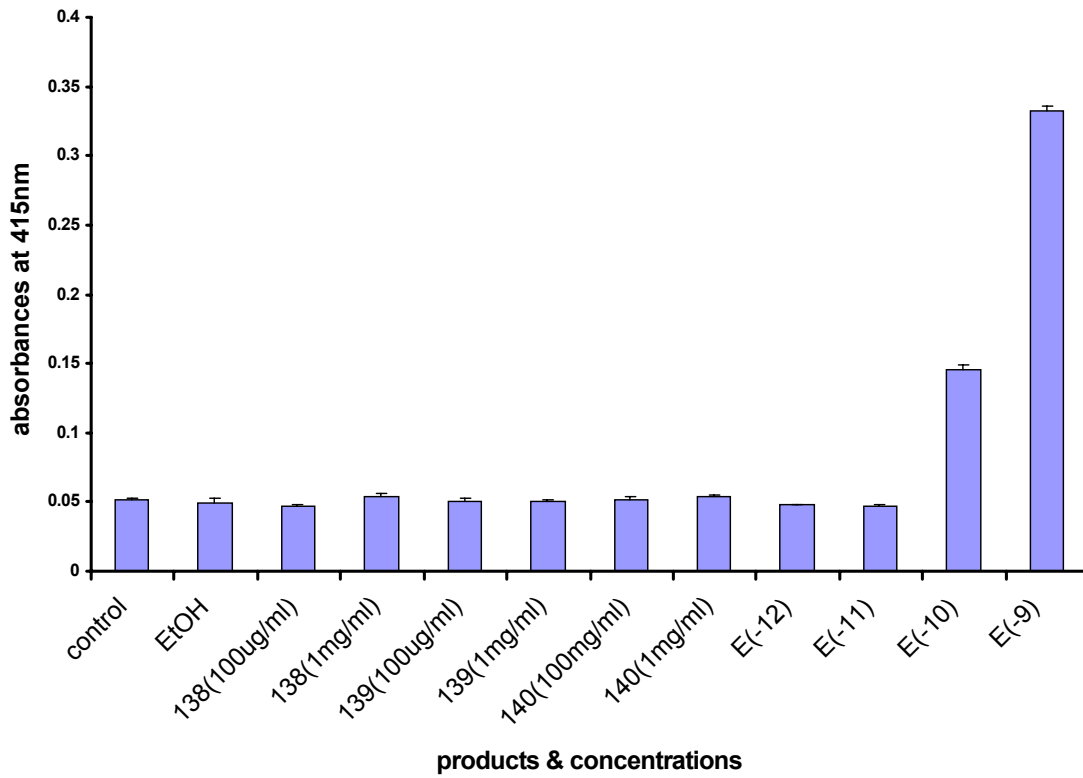


Figure 7-6. 재조합효모법을 이용한 138(천마), 139(앞새버섯), 140(모로헤야)의 에스트로젠성 측정



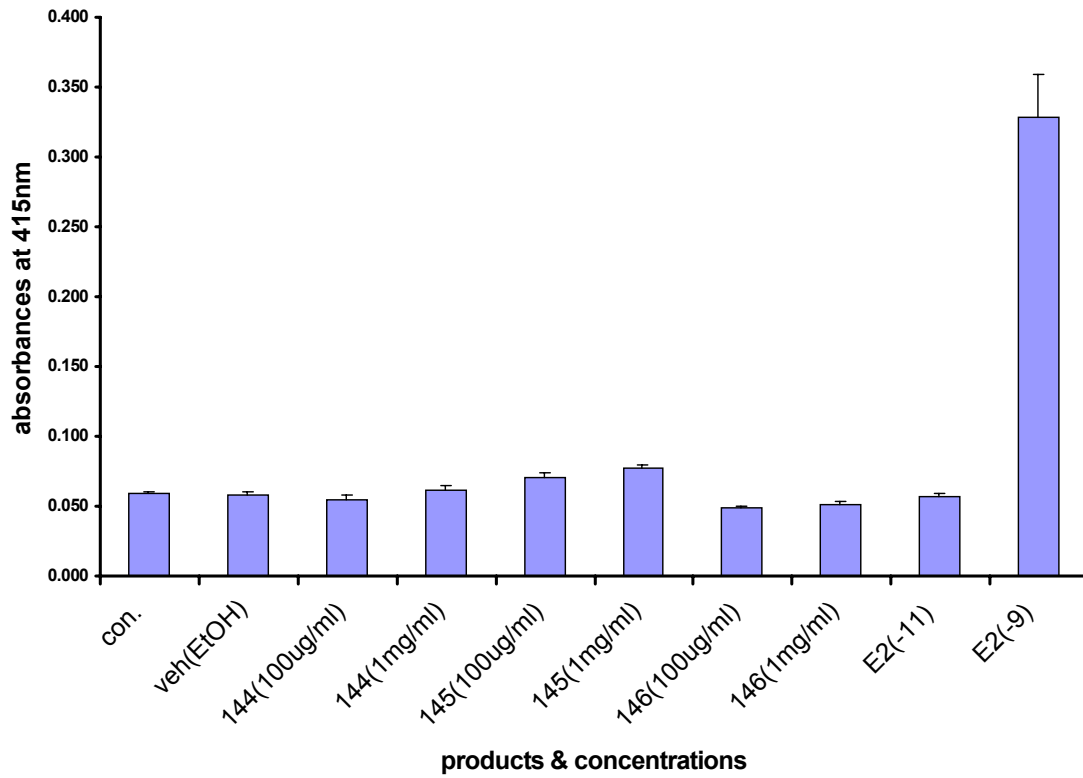


Figure 7-7. 재조합효모법을 이용한 144(hyssop&ginger), 145(음양곽), 146(길경)의 에스트로젠성 측정

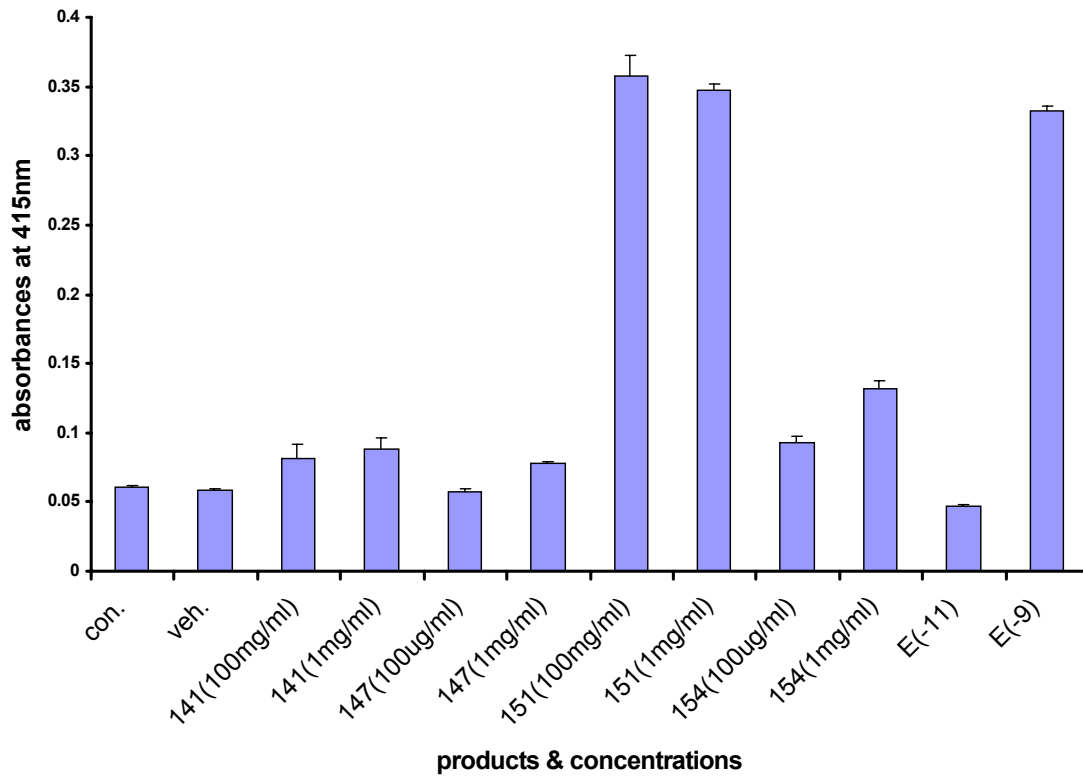


Figure 7-8. 재조합효모법을 이용한 141(비파잎-1), 147(아가리쿠스), 151 (구지뽕), 154(?)의 에스트로젠성 측정

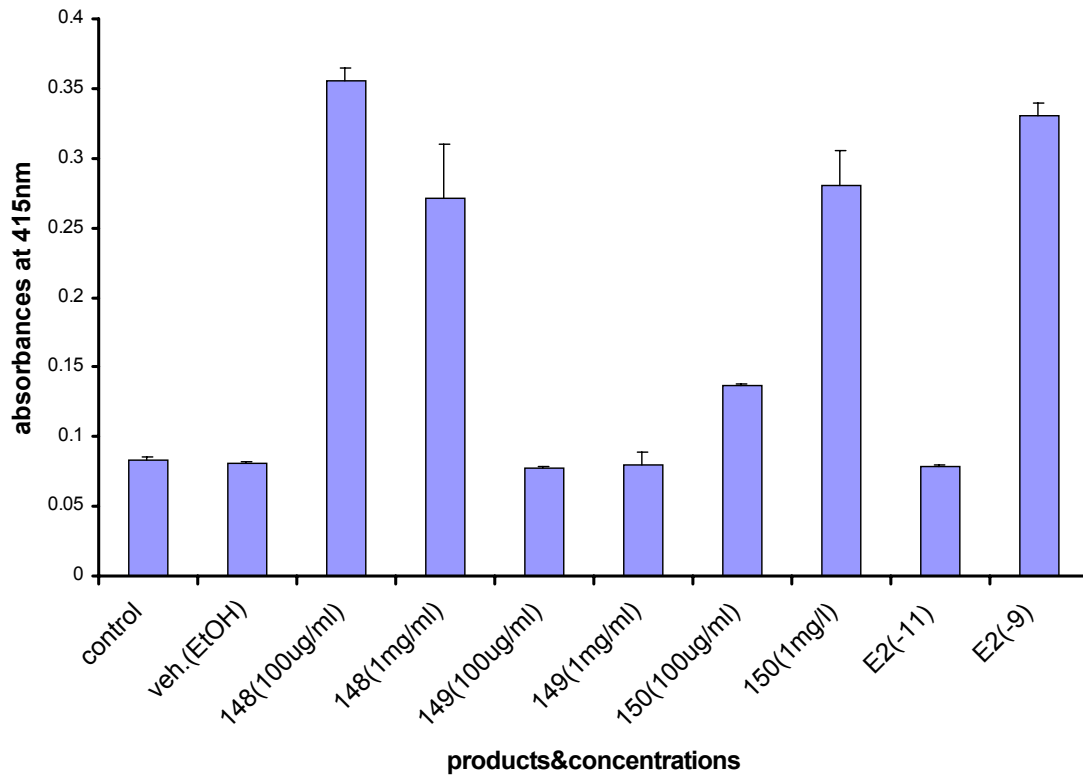


Figure 7-9. 재조합효모법을 이용한 148 (갈근), 149(누에), 150(백화사설초)의 에스트로젠성 측정

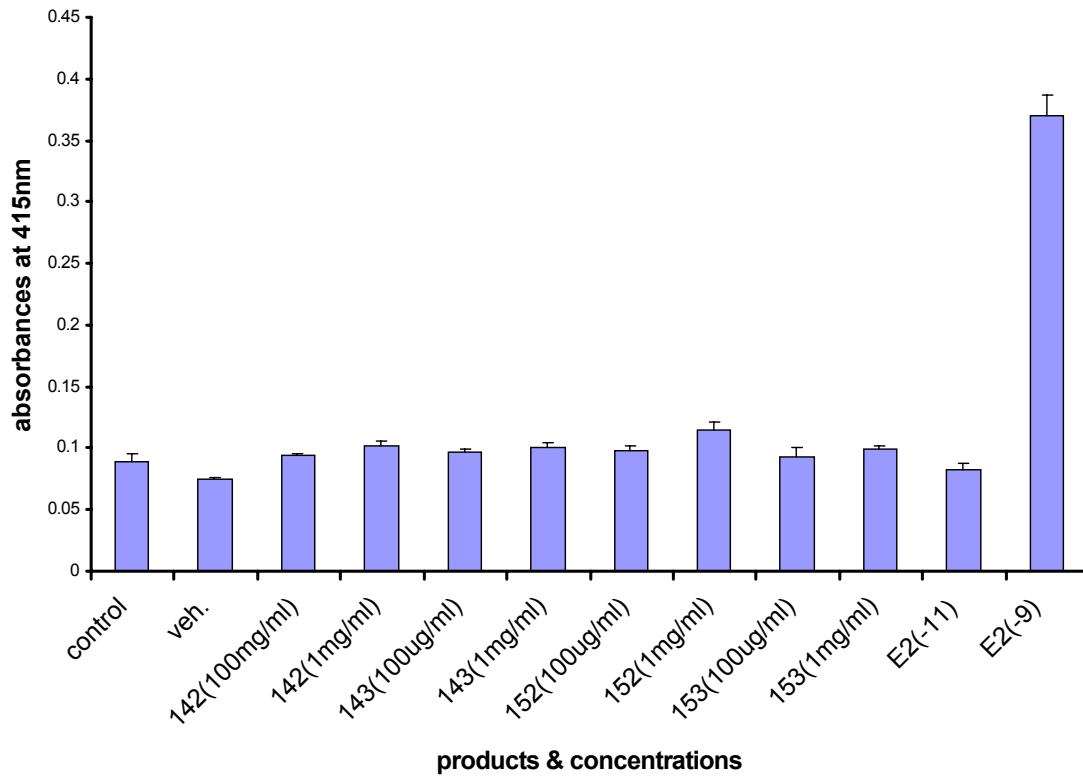


Figure 7-10. 재조합효모법을 이용한 142(비파잎-2), 143 (oregano), 152(어성초), 153(섬오가피)의 에스트로젠성 측정

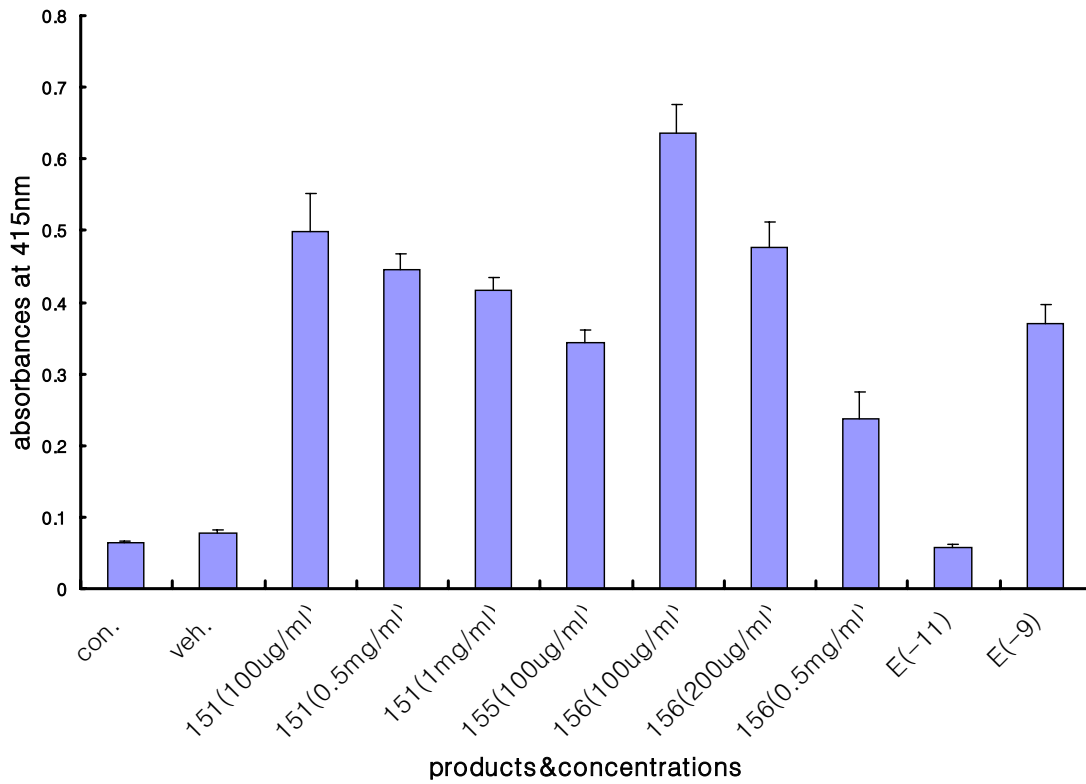


Figure 7-11. 재조합효모법을 이용한 151(구지뿔), 155(중국산상백피), 156(한국산상백피)의 에스트로젠성 측정

## <협동기관>

### 유효물질의 소재화 및 가공 특성 구명

#### 1. 에탄올 추출물 제조

1차년도 이후 수집된 시료 약 40여종의 천연물 소재를 대상으로 80% 에탄올 추출물을 조제하고 초기 시료의 수분함량을 고려한 건물량기준 추출수율을 구하였다. 그 결과 3.8%, 방아잎 21.1%, 천마 24.2%, 잎새버섯 26.1%의 수율을 나타내었으며 전체적으로 국내산 약용작물 또는 버섯류의 경우 오가피의 3.8%~북한산 가시오가피 추출분말 48.4% 정도의 추출수율을 나타내었다. 생약재 13종을 추가로 추출해 본 결과에서는 석곡 4.6%에서 목단의 17.8% 정도의 추출수율을 나타내었다. 그밖에 중국에서 구입한 한방차 8종의 경우 12.2~29.5% 정도의 추출수율을 나타내었다.

#### 2. 최적 추출조건의 검토

증류수 및 80% 에탄올 용액을 이용하여 상온에서 24시간 추출하는 방법과 열수에서 환류냉각장치를 이용하는 방법으로 추출방법을 달리하여 감초추출물을 제조한 후 수율과 활성을 비교 검토하였으며 추출용매의 에탄올 농도를 0, 20, 40, 60, 80, 100%로 달리하여 3종의 생약재 추출물을 제조하여 수율과 활성을 검토하였다. 그 결과 감초의 경우 에탄올 농도가 증가함에 따라 수율은 감소하여 물 추출물의 경우 약 30% 진후에서 80% 에탄올 추출시 20% 수준으로 감소하고 이후 100% 에탄올 추출시에는 9% 까지 급격히 감소하였다. 그러나 대부분의 내분비계 장애물질에 대한 억제활성은 에탄올 농도가 높을수록 높게 나타난 것으로 조사되었다. 따라서 80% 또는 100% 에탄올을 이용한 환류냉각추출법이 가장 바람직한 것으로 판단되었다.

#### 3. 용매 분획법에 의한 정제

3종의 생약시료를 대상으로 메탄올 추출물을 제조한 후 이를 Hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 및 물 분획으로 분리한 후 추출수율 및 활성을 검토하였다. 그 결과 추출수율은 메탄올 추출물을 기준으로 비교해 할때 감초의 경우 물층에 약 65%가 존재하여 가장 높은 수율을 나타내었으며 그 다음은 butanol 층으로 약 20% 정도가 존재하였다. 반면 정향피의 경우 butanol 층에, 초두구의 경우 chloroform 층에 가장 많은 수율을 나타내었다. 활성의 경우 감초는 거의 대부분의 분획에서, 초두구는 chloroform분획에서 정향피는 Hexane 분획에서 높은 활성을 나타내었다. 따라서 전반적으로 시험한 3종의 시료 모

두 활성을 가진 물질이 대부분 비극성의 물질인 것으로 추정되었다.

#### 4. 흡착 크로마토그래피에 의한 정제

현재 활성분획이 대부분 비극성인 점을 이용하여 활성탄, Sep-Pak, PVPP 처리등을 통해 1차 정도와 흡착 크로마토 그래피에 의한 추가 분리, 정제를 수행하였다.

#### 5. 유효물질 추출물의 가공적성 검토

감초를 제외한 나머지 2종의 시료의 경우 대개 비극성 분획에서 활성이 검출됨에 따라 초기 추출단계에서의 가공적성을 우선 검토해 보고자 하였다. 우선 각 추출물을 추출한 후 농축도를 달리하여 저장하면서 활성 변화를 살펴보고 있으며 이들 추출물의 가열처리 조건 등을 검토 중에 있다. 아울러 이들 추출물의 가용화를 위한 시험을 수행하였다.

# 제 3절 내분비계 장애물질에 대한 억제물질의 이화학적 특성, 기작 규명 및 제품화

## <주관연구기관>

### 활성물질의 작용기작 규명

#### 1. 유방암과 전립선암의 성장 억제 기작 규명

##### (1) MCF-7 유방암세포에서의 감초 추출물에 의한 세포사과정의 관찰

유효활성 성분 검색에서 검색된 감초 추출물을 MCF-7 유방암 세포에 여러 유효시간으로 처치한 후 성장억제의 기작을 연구하였다. MCF-7 유방암 세포는 이전 시험과 마찬가지로 5% fetal bovine serum(FBS)를 공급한 D-media에서 배양한다.

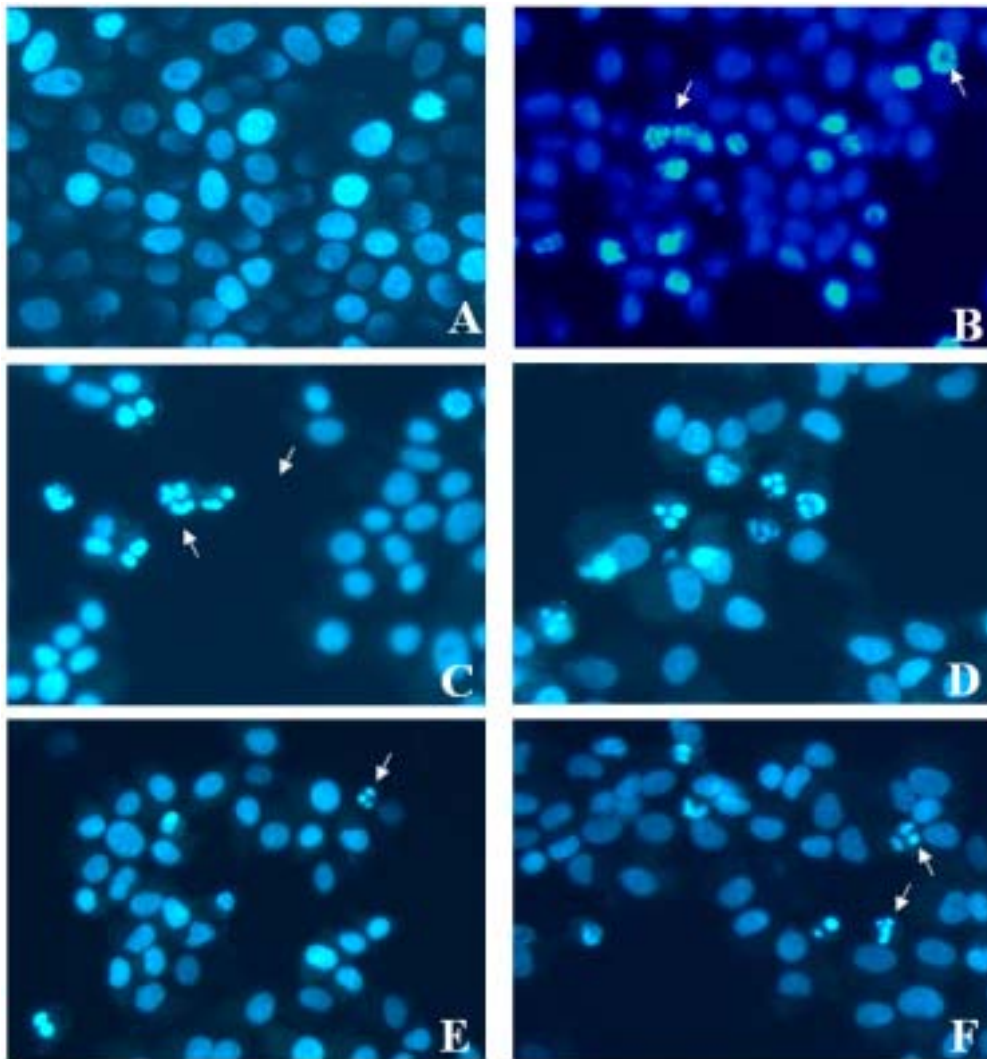
세포의 사멸 형태 중 가장 빈번히 발생하는 핵의 손상과 사멸을 알아보기 위한 방법으로 대표적인 Hoechst 33258 staining과 cell cycle analysis를 실시하여 세포사멸을 관찰하고 Western blotting을 실시하여 억제기작을 연구하여 보았다.

##### 가. Hoechst 33258 staining

세포의 사멸 형태 중 가장 빈번히 발생하는 핵의 손상과 사멸을 알아보기 위한 방법으로 대표적인 Hoechst 33258 staining을 실시하여 세포사멸을 관찰하였다. 스크리닝을 거쳐 탐색된 유방암세포의 성장을 억제하고 동시에 내분비계장애물질인 BPA의 활성을 생체 내에서 차단하는 감초의 80% EtOH, Hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, 70% MeOH 추출물을 Hoechst 33258으로 염색하였더니 그림과 같이 대조군 (A)과 유의적인 차를 보였다. 감초의 다섯가지 추출물은 개별적인 차는 있지만 육안적으로 유방암세포의 proliferation이 줄어들고 동시에 세포사멸이 일어나면서 핵의 분절이 관찰되었다. 그림에서 화살표로 표시해 된 부분이 정상세포와는 달리 유방암세포 핵의 fragmentation을 나타내고 감초의 80% EtOH 추출물은 다른 추출물과는 달리 핵의 분절 이전에 관찰되는 핵의 condensation이 관찰되었다. BPA를 동시에 감초 추출물과 유방암세포에 처치하였을때에도 감초 추출물을 단독으로 처치하였을 경우와 동일한 반응을 보였다(data not shown). 따라서, 감초추출물은 내분비계 장애물질인 BPA를 세포사멸을 유도하는 동일한 메커니즘으로 생리활성을 저해



하는 것으로 판단되어졌다.



**Figure 8. Hoechst 33258 staining을 이용한 세포 핵내의 morphology 관찰**

(A : 대조군(무처리군) B : 감초 80% EtOH 추출물 100ug/ml, C : 감초 Hexane 추출물 50ug/ml, D : 감초 CHCl<sub>3</sub> 추출물 50ug/ml, E : 감초 EtOAc 추출물 50ug/ml, F : 감초 70% MeOH 추출물)

#### 나. cell cycle analysis

Hoechst 33258 staining으로 관찰한 유방암에서 감초가 유도하는 세포사멸의 정도를 알아보기 위하여 PI staining 후 FACScan 시험법으로 세포사멸의 정도와 동시에 세포성장의 억제 요인중의 하나인 cell cycle arrest를 동시에 알아보았다.

그림을 보면 감초의 80% EtOH, Hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, 70% MeOH 추출물은 개별적으로 차이는 있지만 시간에 의존적으로 세포사멸을 유도하는 것으로 관찰되었다. 72시간 유방암에서 감초의 처치 후 80% EtOH 추출물의 경우 32.78%, Hexane 추출물의 경우 47.15%, CHCl<sub>3</sub> 추출물의 경우 55.43%, EtOAc 추출물은 27.91%, 그리고 70% MeOH 추출물은 34.57%의 세포사멸을 유도하였다. Hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, 70% MeOH 감초 추출물은 세포의 성장 억제정도를 관찰한 수치와 비슷한 양상을 보여 대부분의 억제 기전이 세포사멸에 의해 이루어지지만 80% EtOH 추출물의 경우 약 20%의 유방암세포가 cell cycle arrest에 의해 성장이 억제되는 것으로 판단되었다. 실제 48시간 이후의 감초 80% EtOH 추출물의 FACScan 결과를 보면 G1 phase의 cell 수치가 유의적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 이 결과는 다음의 Western blotting 시험법을 통해 다시 확인할 수 있었다.

따라서 FACScan을 통해 Hoechst 33258 staining 시험법에서 관찰한 감초의 세포사멸이 확인되었다.

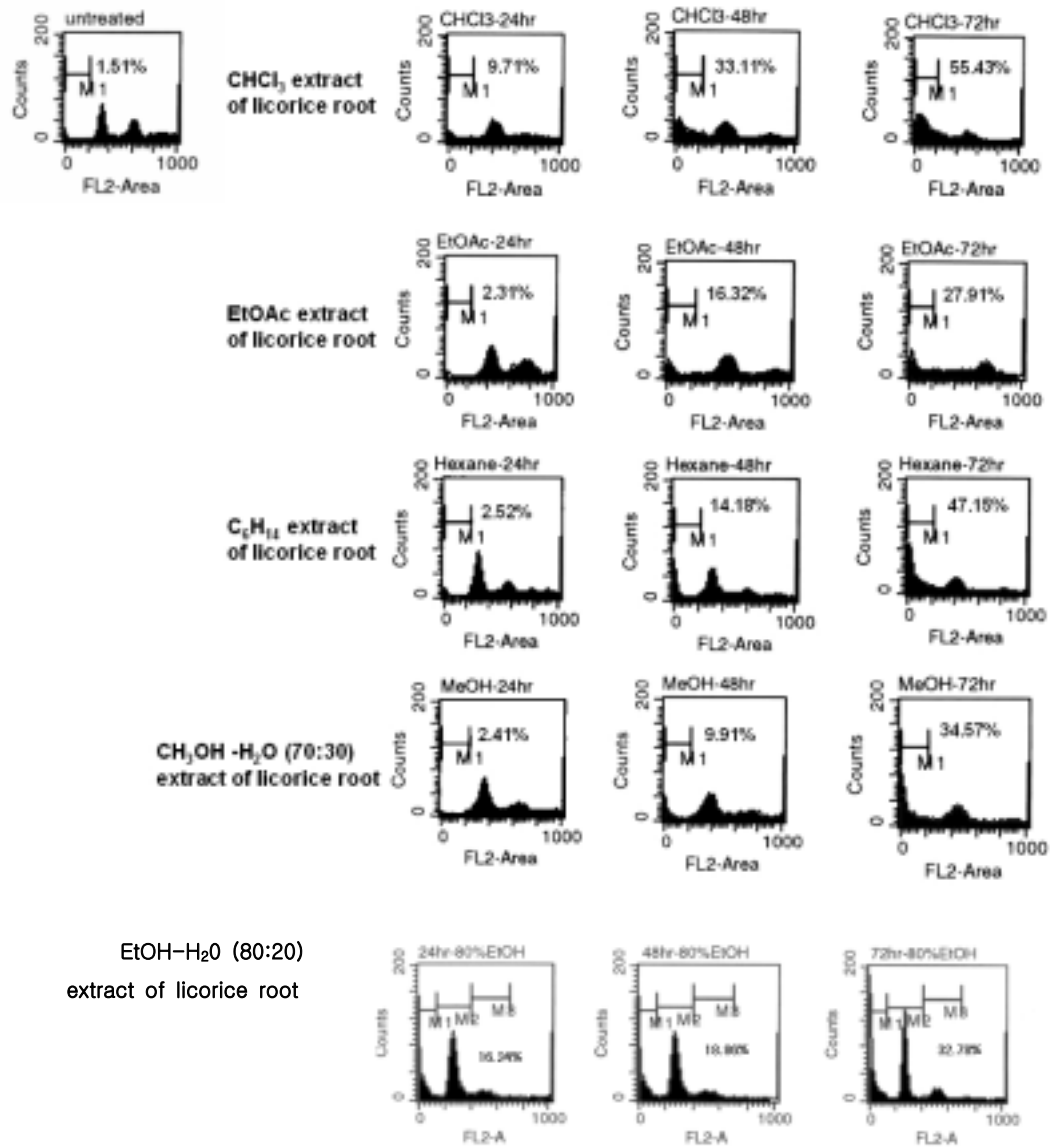


Figure 9. FACScan 이용한 세포 cycle analysis 관찰

#### 다. Western blotting

세포사멸에 대한 중앙억제 단백질인 p53 단백질과 세포내 항산화 단백질인 Bcl-2의 변화를 Western blotting을 통하여 관찰하였다. 최근에 apoptosis에 의한 세포사멸기작에서 caspase로 이름 붙여진 interleukin-1- $\beta$ -converting enzyme (ICE) family cystein protease가 사멸 과정의 중심 역할을 하고 이 효소가 poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) 같은 기질을 분해하는 것으로 알려져 있다. 감초의 CHCl<sub>3</sub>, EtOAc 추출물의 경우 유방암에서 단독으로 처치하였을 때와 내분비계 장애물질인 BPA를 동시에 처치하였을 때 그림과 같이 모두 PARP 기질을 분해시켜 세포사멸로 이끌어 가는 것이 관찰되었다. 세포 사멸을 조절하는 세포 안밖의 여러 가지 인자들이 밝혀져 있는 데, 그 중에서 Bcl-2 family 단백질들은 세포 사멸 촉진하거나 (Bad, Bax) 억제하는 것 (Bcl-2, Bcl-XL)으로 알려져 있으며, 이 단백질들이 서로 어떻게 결합하는가에 따라 세포 사멸 억제 또는 촉진한다고 밝혀졌다. 감초의 CHCl<sub>3</sub>, EtOAc 추출물은 세포사멸을 촉진하는 Bax의 발현을 증가시키고 세포사멸을 억제하는 Bcl-2의 cleavage를 유도하여 활성을 저해시켜 세포사멸 기작이 일어나는 것으로 판단되었다. BPA 억제 기작 또한 그림에서처럼 BPA를 동시에 처치하였을 때 도 같은 메커니즘으로 일어나는 것으로 관찰되었다.

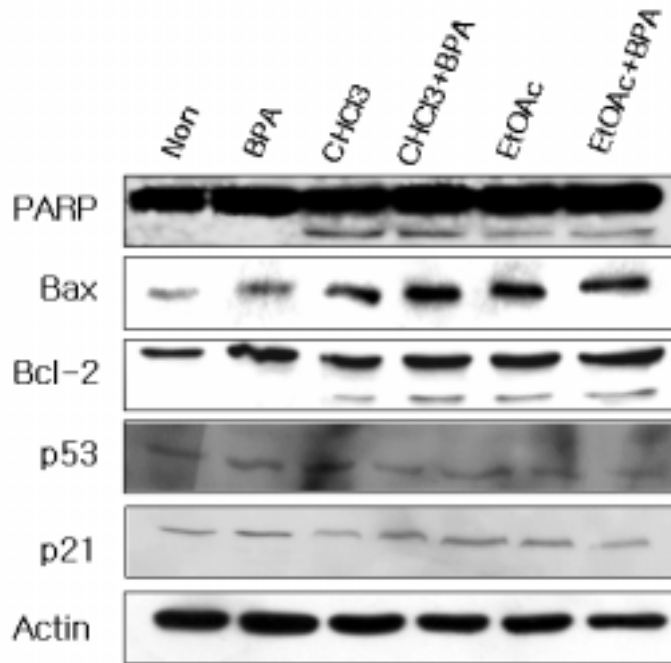


Figure 10. Western blotting을 이용한 감초 CHCl<sub>3</sub>, EtOAc 추출물의 세포내의 기전연구

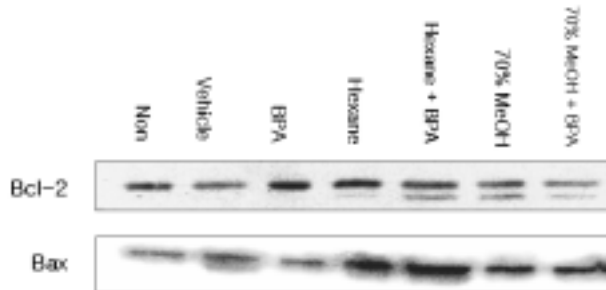


Figure 11. Western blotting을 이용한 감초 Hexane, 70% MeOH 추출물의 세포내의 기전연구

감초의 Hexane, 70% MeOH 추출물의 세포사멸기전 또한  $\text{CHCl}_3$ , EtOAc 추출물의 기전과 동일하게 관찰되었다. PARP의 cleavage 현상이 우선 관찰되어서 유방암에서의 세포사멸이 확인되었다(data not shown). 그리고 그 세포사멸 기전에 관련되는 단백질 또한 동일하였는데 세포사멸을 촉진하는 Bax의 발현을 증가시키고 세포사멸을 억제하는 Bcl-2의 cleavage를 유도하여 활성을 저해시켜 세포사멸 기작이 일어나는 것으로 판단되었다.

위와 같은 감초의 네가지 Hexane,  $\text{CHCl}_3$ , EtOAc, 70% MeOH 감초 추출물은 정도는 각기 다르지만 동일한 메커니즘으로 유방암세포의 성장억제와 BPA의 활성억제를 유도하는 것으로 사료되었다. 이와 같은 사실을 아래의 모식도로 정리할 수 있다.

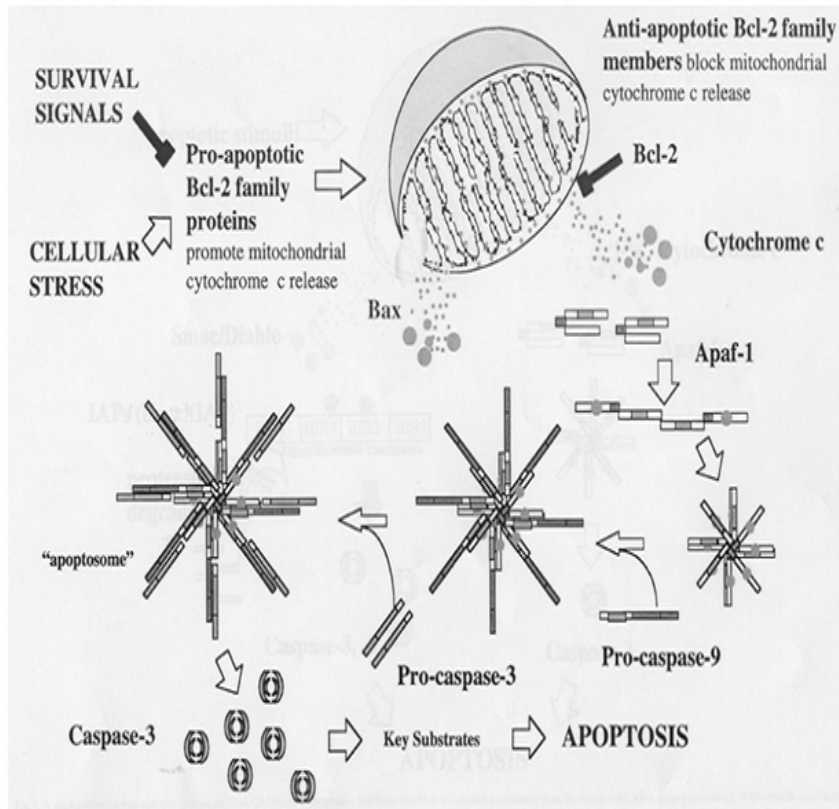


Figure 12. 감초추출물의 유방암에서 억제기전 모식도

감초의 80% EtOH 추출물은 FACScan 시험법으로 관찰된 것처럼 G1 cell cycle arrest 를 유도하는 것으로 판단되어 세포사멸에 관련된 단백질 의 발현뿐만 아니라 cell cycle regulation에 관련지어진 단백질의 발현여부도 시간 의존적으로 Western blotting을 통하여 시험해 보았다. 이 물질 또한 PARP의 degradation을 통해 세포사멸이 확인되었으며 그 기전은 위의 네가지 감초 Hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, 70% MeOH 추출물과는 달리 적은양이 기는 하지만 Bcl-2의 degradation과 Bax의 발현 증가를 통해 일어나는 것으로 관찰되었다. 물질 처치 후 발현의 양상이 크게 유의적이지 않는데에는 이물질이 CdK2, Cyclin E같은 cell cycle arrest에 관련된 단백질의 발현이 줄어들음으로서 G1 phase arrest가 동시에 진행 되기 때문에 사료된다. 즉 감초의 80% EtOH 추출물은 유방암에서 세포사멸과 세포주기 억제제가 같이 일어나는 multi-mechanism을 유도하는 것으로 결론지을 수 있다. BPA의 억제 기전은 다음과 같다.



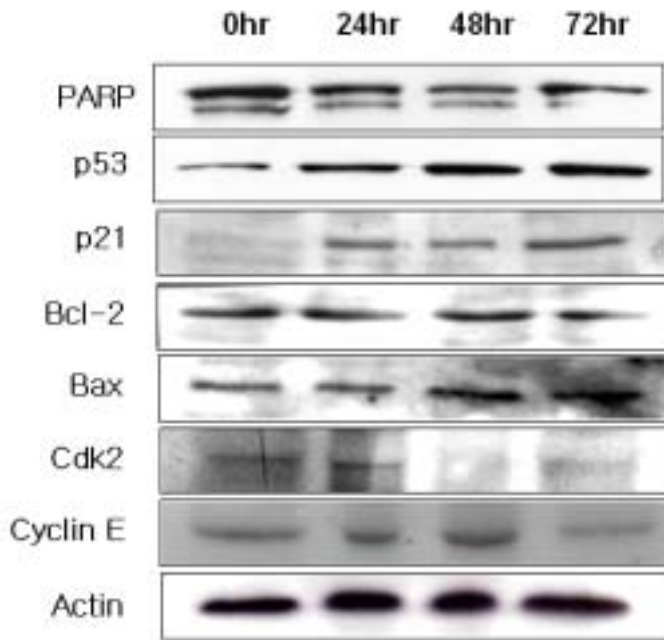


Figure 13. Western blotting을 이용한 감초 80% EtOH 추출물의 세포내의 기전연구

위의 감초의 80% EtOH 추출물을 BPA와 동시에 처리하여 시간 의존적으로 단백질의 발현 정도를 관찰해 보았다. 우선 세포사멸에 관련된 단백질의 발현을 살펴보면 PARP의 degradation이 48시간까지 관찰되어 세포사멸을 유도하는 것을 확인할 수 있었고 p53의 증가되어 tumor suppress gene이 감초 80% EtOH 추출물에 의해 변화되는 것을 관찰할 수 있었다. 80% EtOH 추출물 감초 추출물과 동일하게 Bcl-2의 degradation과 Bax의 발현 증가를 통해 세포사멸을 유도하는 것을 확인할 수 있었다.

세포주기 억제제의 경우 48시간까지 p21, CdK2, Cyclin E같은 cell cycle arrest에 관련된 단백질의 발현이 줄었지만 72시간 처리 후에는 다시 증가되는 것이 관찰되어 좀 더 다양한 연구의 필요가 요구되었다.

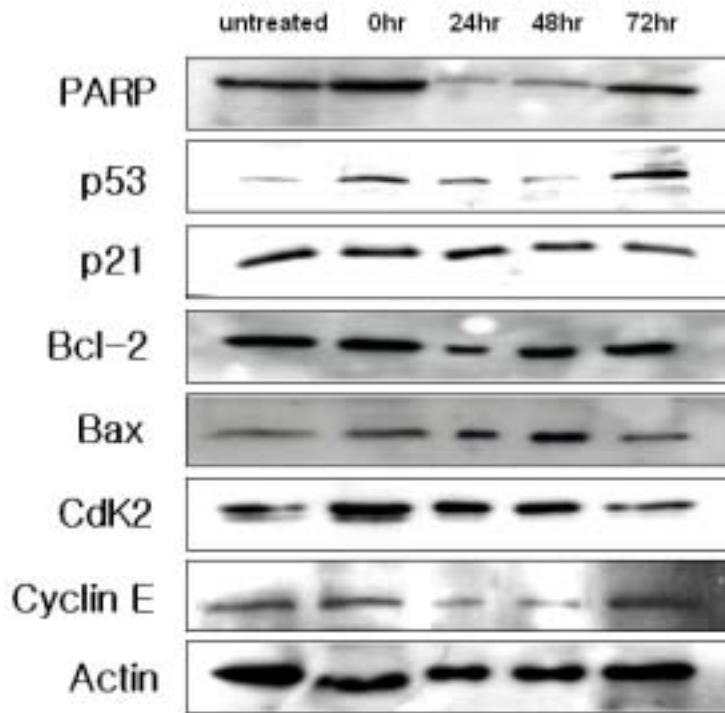


Figure 14. Western blotting을 이용한 감초 80% EtOH 추출물의 BPA 억제기전연구

(2) MCF-7 유방암세포에서의 정향피 추출물에 의한 세포사멸 과정의 관찰

가. Hoechst 33258 staining

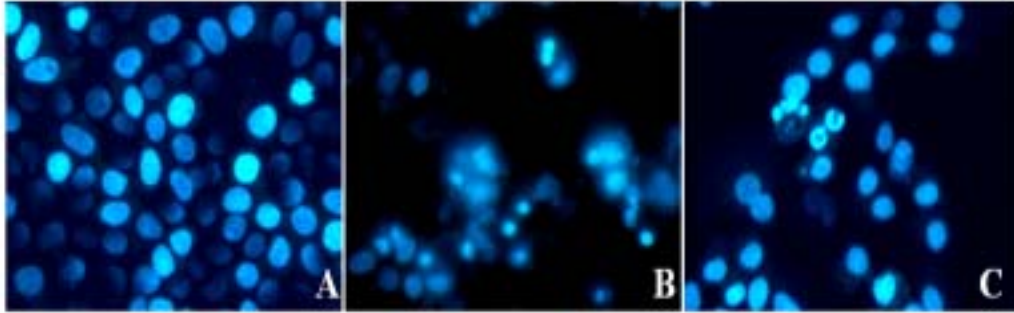


Figure 15. Hoechst 33258 staining을 이용한 세포 핵내의 morphology 관찰

정향피의 추출물 가운데 유방암 세포의 성장억제와 BPA의 생체내 활성이 동시에 일어나는 추출물은 DW로 추출한 것이었다. 이 물질에 의한 세포의 morphology변화와 세포내 핵의 변화를 관찰해 보기 위하여 Hoechst 33258 staining을 실시하였다. 그림을 보면 정향피 DW 추출물에 의하여 세포의 증식이 줄어들었고 세포 내 핵의 분절이 일어나는 것을 단독 처치군과 BPA를 동시에 처치했을 때 동시에 일어나는 것을 확인 할 수 있었다. 이와 같은 결과를 확인해보기 위하여 아래의 실험을 실시하였다.

#### 나. cell cycle analysis

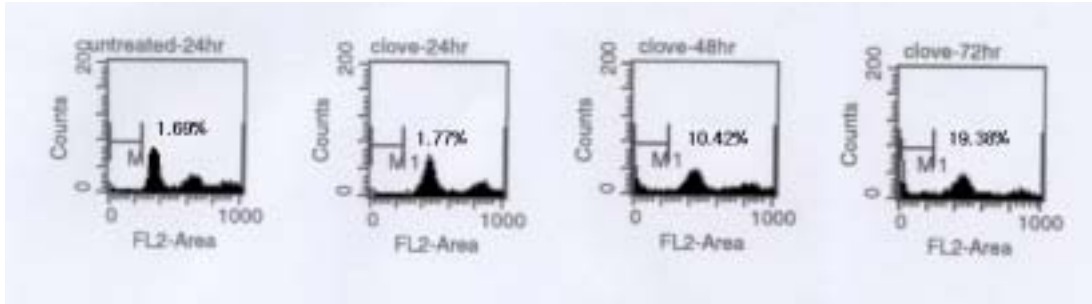


Figure 16. FACScan을 이용한 정향피 DW 추출물의 cell cycle analysis

정향피 또한 감초 추출물과 마찬가지로 세포사멸의 정도와 세포 주기의 억제가 일어나는지의 여부를 확인해보기 위하여 FACScan을 실시하였다. 시험 결과 세포주기의 변화는 일어나지 않았었고 시간 의존적으로 72시간 후에는 19.38%까지 세포사멸이 일어나는 것으로 확인할 수 있었다.

다. Western blotting

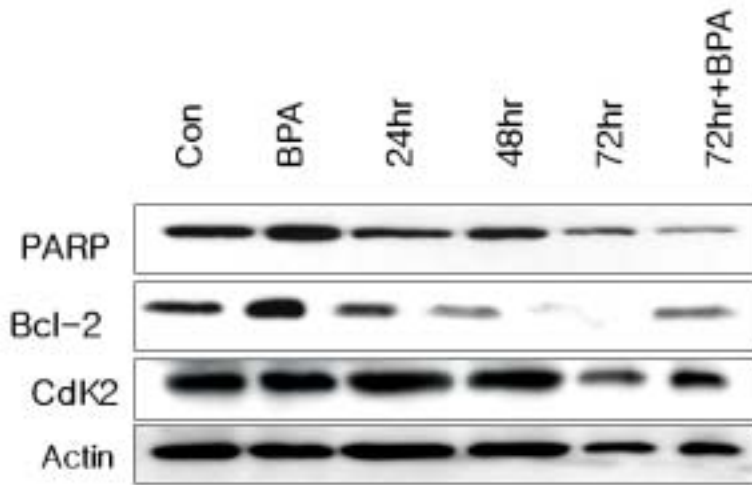


Figure 17. Western blotting을 이용한 정향피 DW추출물의 세포내의 기전연구

위의 Hoechst 33258 staining 과 FACScan 결과를 확인하고 세포사멸의 기전을 알아보기 위하여 Western blotting을 실시하였다. 그 결과 PARP의 발현이 줄어들어 정향피에 의한 세포사멸을 확인해 주었고 세포사멸을 억제하는 Bcl-2의 degradation이 관찰되었지만 세포사멸을 유도하는 Bax의 발현은 변화가 없었다(data not shown). 세포주기에 관련된 CdK2의 발현정도는 Actin의 발현과 비교하여 보면 유의적인 변화가 없는 것으로 사료되어 정향피 DW 추출물은 세포사멸을 통해 유방암의 증식과 BPA의 활성을 억제하는 것으로 결론지을 수 있다.

(3) PC-3 전립선암세포에서의 감초추출물에 의한 성장억제와 세포사과정의 관찰

가. PC-3 전립선암세포에서의 성장 억제

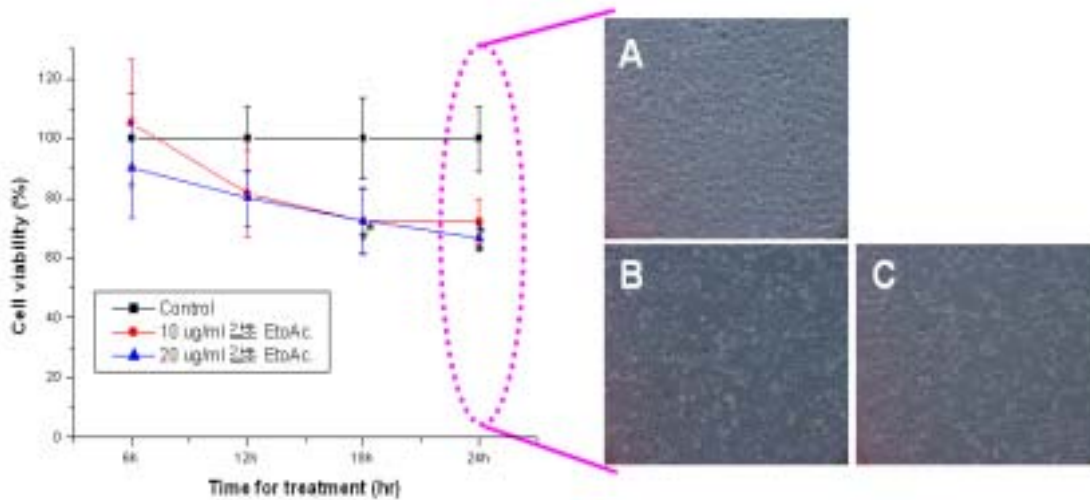


Figure 18. PC-3 전립선암 세포에서 감초 EtOAc 추출물의 증식억제 관찰

감초EtOAc 추출물이 장기간 동안 세포 증식에 미치는 영향을 조사하기 위해서 세포들을 multi-well plate에 plate한 다음 세포수는 6시간마다 MTT assay 방법으로 측정하였다. PC-3 전립선 암세포는 직선을 그리며 감소하다가 18시간째에서 plateau density에 도달하여 평형적으로 유지하였다.

전립선 암세포에 미치는 감초의 장기간의 성장억제 작용을 조사하기 위해서 10µg/ml 과 20µg/ml의 물질을 serum-free medium에 첨가하여 세포를 배양하였다. 시험 후 6시간째부터 현저히 줄어들기 시작하여 24시간째에는 세포수의 약 70%의 감소를 보였고 저농도에서는 그 감소의 정도가 고농도에서 보다 낮았으나 크게 유의적이지는 않았다. 옆의 세포 morphology를 관찰하여 보면 전립선 암세포에서 감초 EtOAc 추출물이 apoptosis, 즉 세포사멸을 유도한다고 추측되어 Hoechst staining을 실시하였다.

나. PC-3 전립선암세포에서의 감초추출물에 의한 세포사멸

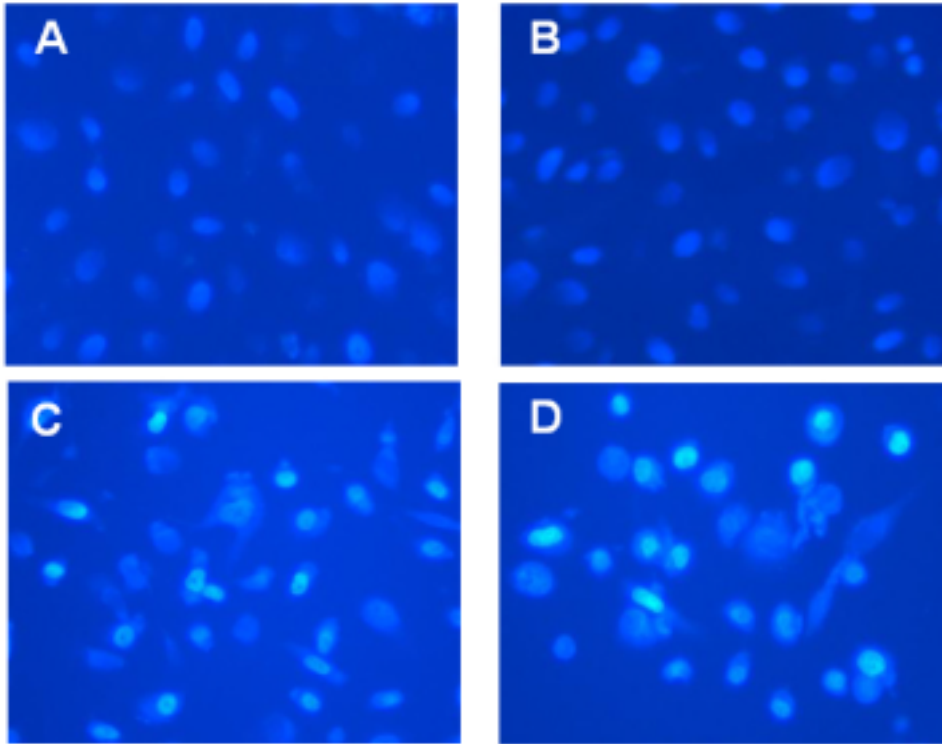


Figure 19. Hoechst 33258 staining을 이용한 세포 핵내의 morphology 관찰



감초 EtOAc 추출물이 PC-3 전립선암 세포에서 세포사멸을 유도하는 것을 확인하기 위하여 Hoechst staining을 실시하였다. 위의 세포증식 시험과 동일한 물질을 처리하였을 때 10 $\mu$ g/ml과 20 $\mu$ g/ml의 농도는 두배의 차이가 있음에도 불구하고 세포증식 억제 정도가 같았던 것처럼 세포 내 핵의 손상 정도도 비슷하였다. 세포사멸은 세포의 팽창, 핵의 분해, 염색 세포의 유입등과 같은 특성을 보이며, 세포가 응축되고, 핵의 분절이 그 과정이다. 두 농도의 감초 EtOAc 추출물을 전립선 암세포에 처리하였을 때 핵 분절은 찾아보기 어려웠지만 그 전단계인 세포의 응축이 관찰되었다.

다. PC-3 전립선암세포에서의 감초추출물에 의한 세포사멸 기전연구

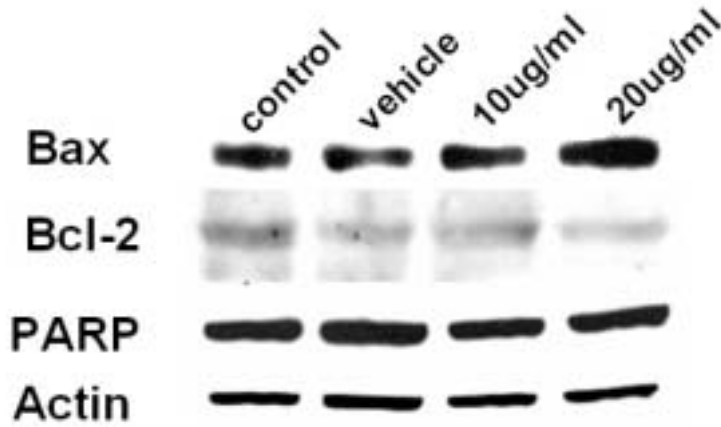


Figure 20. Western blotting을 이용한 감초 EtOAc 추출물의 세포내의 기전연구

감초 EtOAc 추출물의 전립선 암에서의 활성 기작을 관찰하기 위하여 여러 단백질의 발현 양상을 시험해 보았다. 유방암에서의 결과와는 달리 PARP의 발현이 감초 추출물에 의해 크게 유의적인 결과를 보이지 않았다. 약간의 감소를 보이긴 하였지만 DNA ladder와 FACScan의 결과에서도 유의적인 변화를 보기 어려워 전립선 암세포에서는 유방암세포에 서처럼 효과적인 세포사멸 또는 증식을 유도하지 못함을 알 수 있다. 세포사멸을 유도하는 Bax의 발현이 약간의 증가를 보였지만 세포사멸을 억제하는 Bcl-2 단백질은 변화가 없었다.

(4) PC-3 전립선암세포에서의 정향피추출물에 의한 성장억제와 세포사과정의 관찰

가. PC-3 전립선암세포에서의 성장 억제

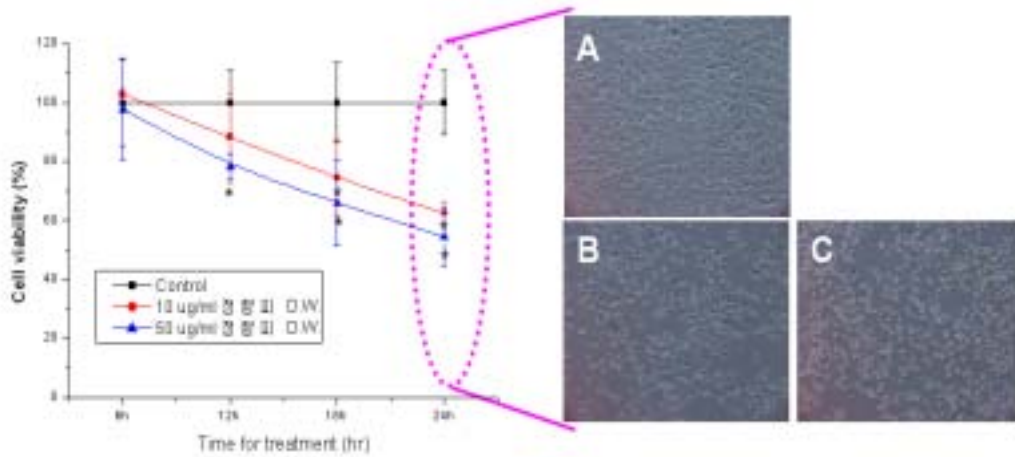


Figure 21. PC-3 전립선암 세포에서 정향피 DW추출물의 증식억제 관찰

정향피 DW 추출물이 장기간 동안 세포 증식에 미치는 영향을 조사하기 위해서 세포들을 multi-well plate에 plate한 다음 세포수는 6시간마다 MTT assay 방법으로 측정하였다.

전립선 암세포에 미치는 정향피의 장기간의 성장억제 작용을 조사하기 위해서 10µg/ml과 50µg/ml의 물질을 serum-free medium에 첨가하여 세포를 배양하였다. 시험 후 6시간째부터 현저히 줄어들기 시작하여 24시간째에는 10µg/ml에서는 약 60%, 50µg/ml에서는 약 50%의 감소를 보였다. 옆의 세포 morphology를 관찰하여 보면 전립선 암세포에서 정향피 DW 추출물이 apoptosis, 즉 세포사멸을 유도한다고 추측되어 Hoechst staining을 실시하였다.

나. PC-3 전립선암세포에서의 정향피추출물에 의한 세포사멸

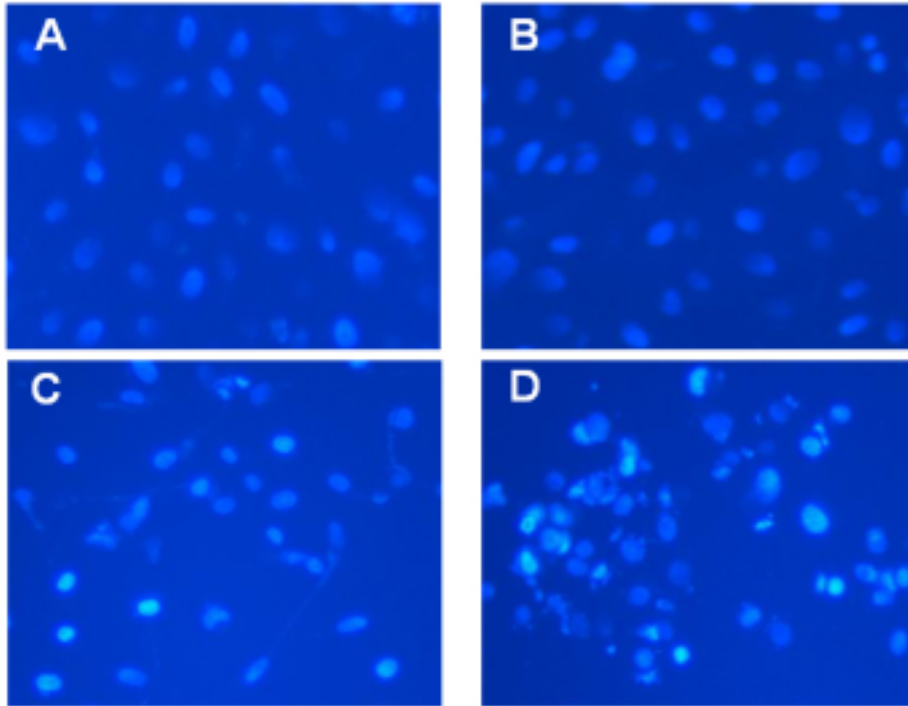


Figure 22. Hoechst 33258 staining을 이용한 세포 핵내의 morphology 관찰

정향피 DW 추출물이 PC-3 전립선암 세포에서 세포사멸을 유도하는 것을 확인하기 위하여 Hoechst staining을 실시하였다. 위의 세포증식 시험과 동일한 물질을 처리하였을 때 10 $\mu$ g/ml과 50 $\mu$ g/ml의 농도에서 고농도에서 세포 내 핵의 손상 정도가 크게 유의적으로 관찰되었다. 저농도에서는 핵의 응축을 보였으며, 고농도에서는 핵의 분절이 관찰되었다.

다. PC-3 전립선암세포에서의 정향피추출물에 의한 세포사멸 기전연구

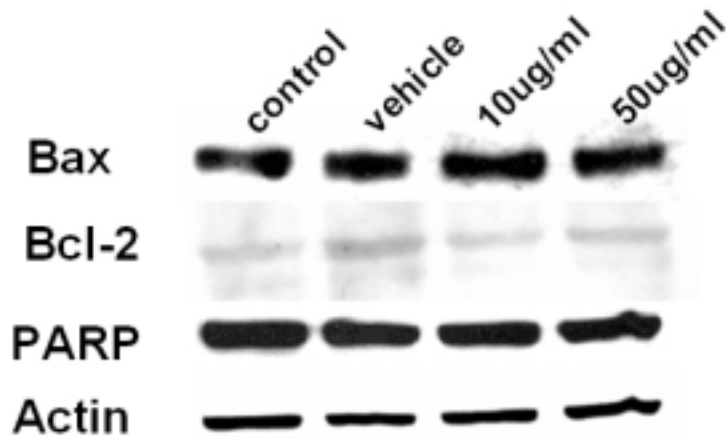


Figure 23. Western blotting을 이용한 정향피 DW추출물의 세포내의 기전연구

정향피 DW 추출물의 전립선 암에서의 활성 기작을 관찰하기 위하여 여러 단백질의 발현 양상을 시험해 보았다. 감초 추출물의 결과와 같이 PARP의 발현이 정향피 추출물에 의해 크게 유의적인 결과를 보이지 않았다. 약간의 감소를 보이긴 하였지만 DNA ladder와 FACScan의 결과에서도 유의적인 변화를 보기 어려워 전립선 암세포에서는 유방암세포에서처럼 효과적인 세포사멸 또는 증식을 유도하지 못함을 알 수 있다. 세포사멸을 유도하는 Bax의 발현과 세포사멸을 억제하는 Bcl-2 단백질 또한 변화가 없었다.

<협동기관-1>

유효물질의 이화학적 특성 구명

1. 용매 분획법에 의한 정제

용매분획법을 이용하여 감초추출물을 Hexane, ethyl acetate, chloroform, butanol, 물층으로 분획한 후 각 분획의 수율 및 활성을 비교해 보았다.

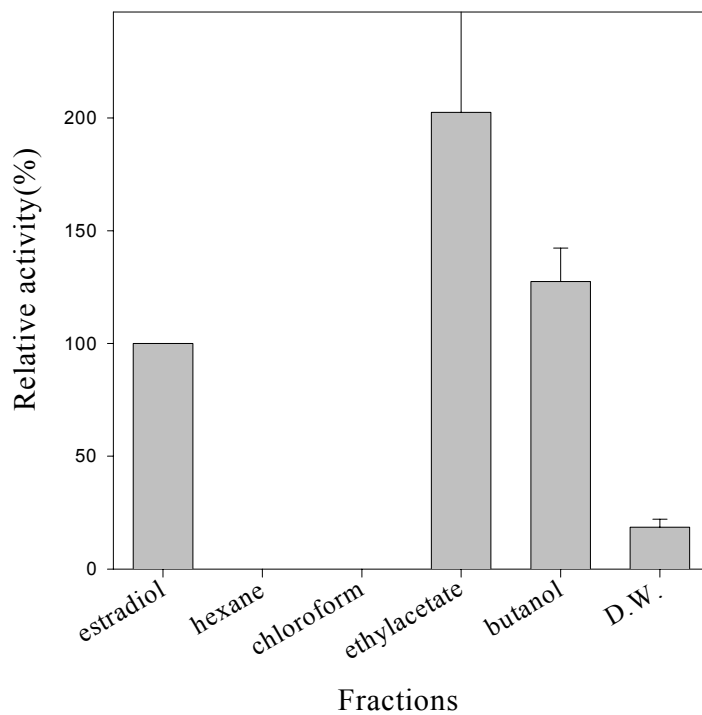


Figure 24. Estrogenic activities of solvent fractions from licorice extract.

우선 각 분획별로 고형물량을 구한 후 상대적인 함량%로 비교해 보면 우선 물층에 가장 많은 65.9%의 고형물이 분획되었으며 butanol 분획이 두 번째로 높은 29.4%의 고형물량을 나타내었다. 그밖에 Hexane, ethyl acetate, chloroform 분획에서는 각각 4.4, 4.3, 7.9% 정도의 고형물량을 나타내었다.

Estrogenic activity를 측정해 본 결과에서는 ethyl acetate 분획에서 가장 높은 활성을 나타내었으며 물이나 butanol 등과 극성 용매 분획에서도 상대적으로 높은 활성을 나타내었다. 반면 Hexane이나 chloroform 같은 비극성 용매 분획에서는 거의 활성이 검출되지 않았다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 감초중에서 내분비 장애물질에 대한 억제효과를 나타내는 물질의 경우 에탄올과 같은 알코올류에서도 높은 용해도를 나타내지만 약간 중간 정도의 극성을 가진 물질인 것으로 판단되었다.



2. Gel filtration에 의한 정제

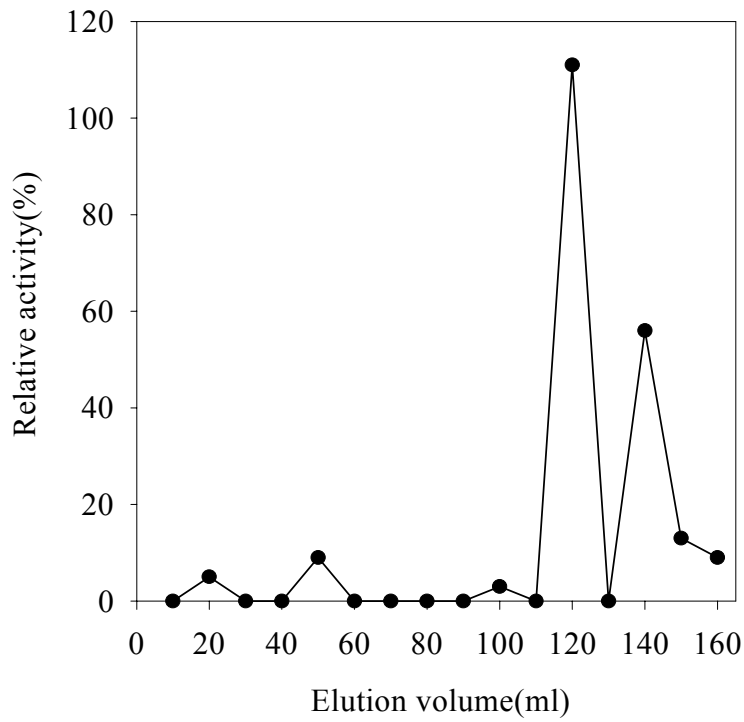


Figure 25. Sephadex LH-20에서 gel filtration에 의해 감초 추출물의 활성물질 정제

Sephadex LH-20 resin을 50 ml 정도 컬럼에 주입하고 20°Bx 농도로 희석한 감초농축액 2 ml을 주입한 후 80% 에탄올로 용출시켜 정제하였다. 용출액은 10 ml씩 분획하였으며 각 분획의 estrogenic activity를 측정하여 본 결과는 Figure 25와 같다.

그 결과 bed volume의 2.4배되는 120 ml 용출시에 가장 높은 활성을 가진 물질이 분리되었으며 140 ml 용출시에 또하나의 활성 물질이 분리되었다. 이상의 결과로 볼 때 감초 추출물중에는 하나이상의 활성물질이 존재하는 것으로 판단되었으나 이들 물질이 단순히 유사한 구조를 가지면서 단순히 side chain만 다른 물질들인지 전혀 다른 두 개의 물질인지는 정확히 판단할 수 없었다.

### 3. 흡착크로마토그래피에 의한 정제

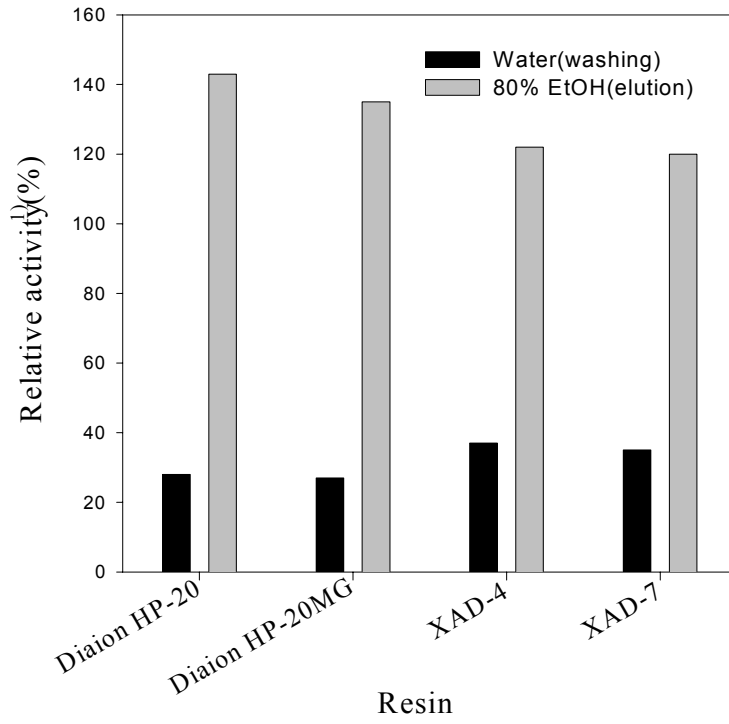


Figure 26. 다양한 resin을 사용하였을 때 감초추출물의 adsorption 능력 비교

흡착크로마토그래피용 수지로 Diaion HP-20, Diaion HP-20MG 등과 amberite 계열의 XAD-4, XAD-7을 각각 컬럼에 충전한 후 증류수로 희석된 감초추출물을 주입하고 증류수 세척액과 80% 에탄올 용출액중의 estrogenic activity를 비교해본 결과는 Figure 26과 같다.

전반적으로 80% 에탄올 용출액중의 활성을 비교해 본 결과, 흡착크로마토그래피용 수지에 따른 차이는 크지 않은 것으로 나타났으나 Diaion 계열이 amberite 계열에 비해 다소 높은 흡착능을 나타내는 것으로 판단되었다. 따라서 본 연구에서는 Diaion HP-20 수지를 이용하여 이후 정제시험을 수행하였다.

Diaion HP-20을 이용한 감초추출물중의 활성물질을 정제하기 위한 적정 용출조건을 검토해 보기 위하여 증류수로 희석한 감초농축액을 컬럼에 주입하고 0, 20, 40, 60, 80, 100% 에탄올 용액을 이용하여 각각 수지용량의 2배 정도 용출시킨 후 용출액 중의 활성을 비교해 본 결과는 Figure 27과 같다.

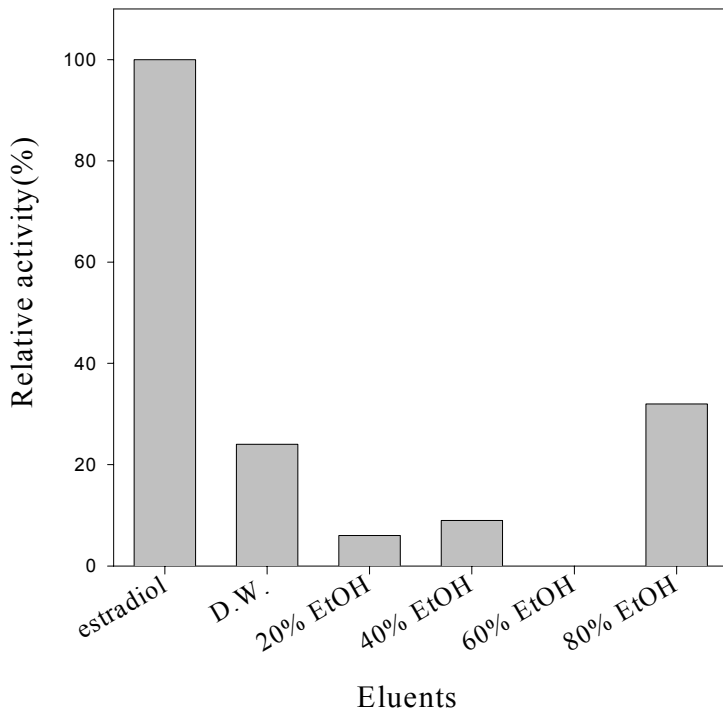


Figure 27. Diaion HP-20을 이용해 정제시 감초 추출물의 estrogenic activity

초기 증류수 세척액중에 일부 검출된 활성은 감초추출물의 과량 주입에 따라 일부 활성물질이 흡착되지 않고 바로 용출된 것으로 생각되며 수지에 흡착된 활성물질의 경우 60%이상의 에탄올용액에서 용출되기 시작하여 80% 에탄올용액에서 거의 대부분 용출되는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 초기 시료주입시 용해도를 증가시키기 위해 감초농축액을 40% 정도의 에탄올로 희석하여 주입한 후 바로 40% 에탄올로 세척하는 것이 보다 효과적인 정제방법일 것으로 판단되었으며 수지 역시 초기 40% 에탄올로 현탁하여 충전하는 것도 고려해 볼 수 있을 것으로 판단되었다.

Diaion HP-20을 이용한 흡착크로마토그래피시 적정 시료주입량을 살펴보기 위하여 5 ml 수지가 충전된 컬럼에 40% 에탄올로 희석한 감초농축액(고형물량 4.6%)의 주입량을 1~12 ml 로 달리하여 컬럼에 주입한 후 40% 에탄올 세척액 중의 활성을 측정하여 적정 시료주입량을 살펴본 결과는 Figure 28과 같다.

그 결과, 8 ml 이상의 감초추출물을 주입시에 초기 세척액중에서 활성이 검출되었다. 이상의 결과로 미루어볼 때 본 연구에서 사용한 HP-20의 경우 정제의 효율성을 위해서는 수지 ml 당 1.2~1.6 ml 정도의 감초추출물을 주입하여 정제하는 것이 바람직한 것으로 판단되었다.

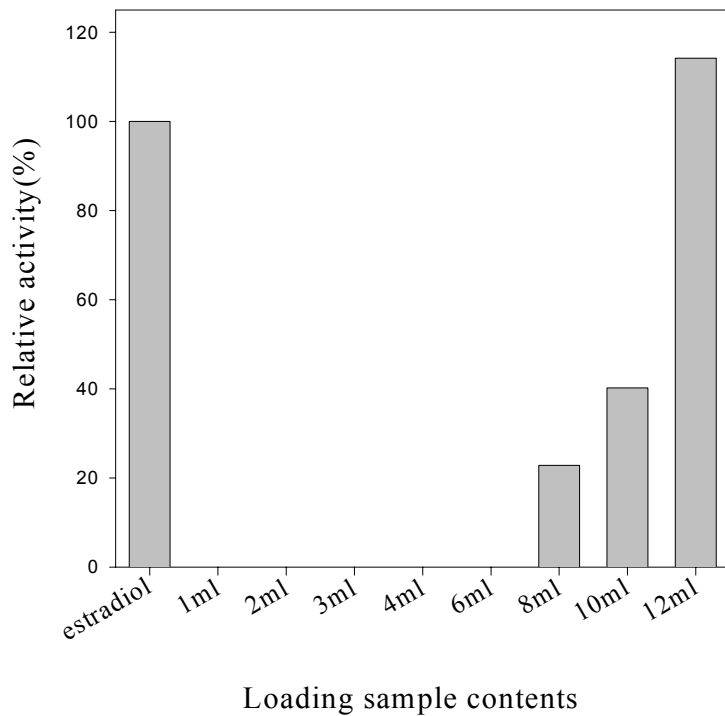


Figure 28. Diaion HP-20에 의해 측정된 적정 시료주입량

#### 4. 한외여과법에 의한 정제

한외여과막(MWCO 5000)을 이용하여 분자량 5000 이상과 이하로 감초추출물을 분획한 후 활성을 측정해본 결과, 대체로 분자량이 5000이상인 분획에서 활성이 검출되었다. 따라서 본 연구에서 사용한 감초의 경우, 내분비장애물질에 대해 억제활성을 나타내는 물질의 분자량은 5000이상이거나 또는 다른 고분자물질에 결합되어 있는 저분자물질일 것으로 추정되었다.

#### 5. pH 안정성

내분비 장애물질에 대한 억제효과가 입증된 감초 추출물을 이용한 식품첨가시험 또는 다양한 가공식품 개발시에 다양한 pH 조건에 노출될 수 있으므로 이러한 다양한 pH 조건이 감초추출물의 활성에 어떠한 영향을 미치는지 살펴볼 필요가 있을 것이다. 따라서 본 연구에서는 산성, 중성 알카리성 식품을 모델로 pH 3.0, 6.0, 9.0의 buffer를 제조하고 여기에 감초추출물을 일정시간 방치한 후 감초의 estrogenic activity를 살펴보았으며 그 결과는 Figure 29와 같다.

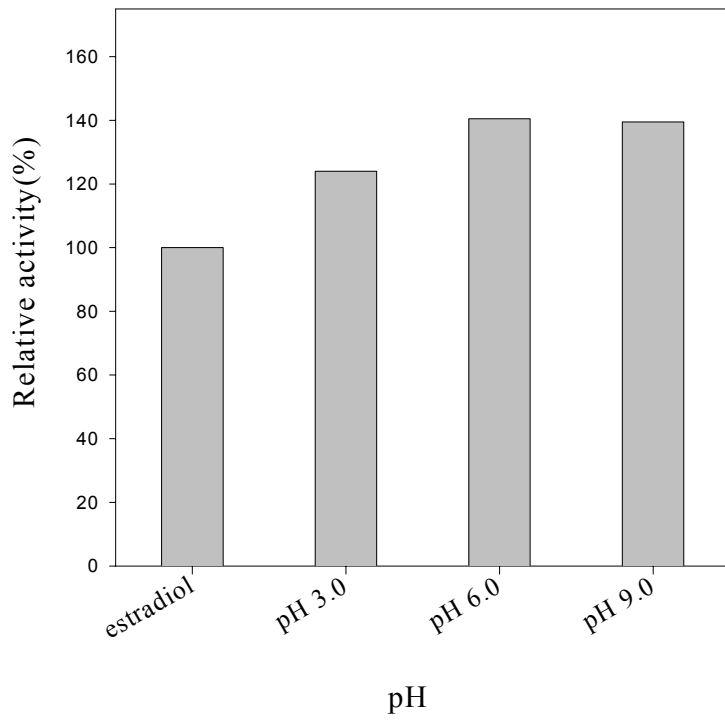


Figure 29. 감초 추출물의 estrogenic activity에서 pH의 영향



## 6. 열안정성

음료 등과 같은 가공제품의 경우 최종적으로 대개 상업적살균 또는 가압살균을 거치게 되므로 감초추출물이 첨가된 제품의 살균 후의 활성변화도 살펴볼 필요가 있을 것이다. 따라서 본 연구에서는 감초추출물을 95°C에서 15, 30분 가열처리하거나 121°C에서 15분간 가압살균처리한 후 활성변화를 살펴보았으며 그 결과는 Figure 30과 같다.

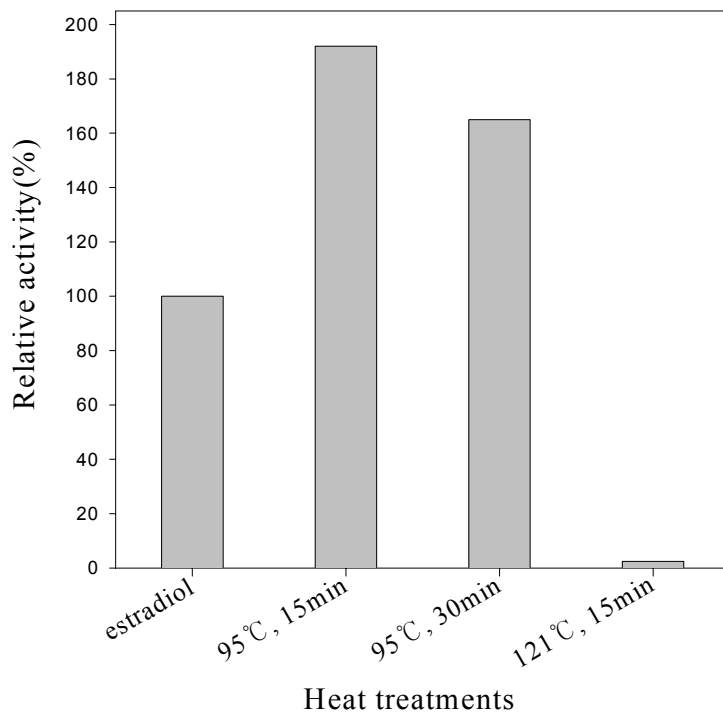


Figure 30. 감초 추출물의 estrogenic activity에서 열의 영향

## 7. 농축에 따른 감초추출물의 활성 변화

감초와 같은 생약재 추출물의 경우 대개 저장의 편의성 및 가공식품 제조를 위한 중간 단계로 농축공정을 거치게 된다. 따라서 이러한 농축공정중 감초추출물의 활성변화를 살펴보기 위하여 초기 감초추출물(10°Bx)을 30, 60°Bx로 농축한 후 다시 10°Bx로 환원하여 활성변화를 살펴보았으며 그 결과는 Figure 31과 같다.

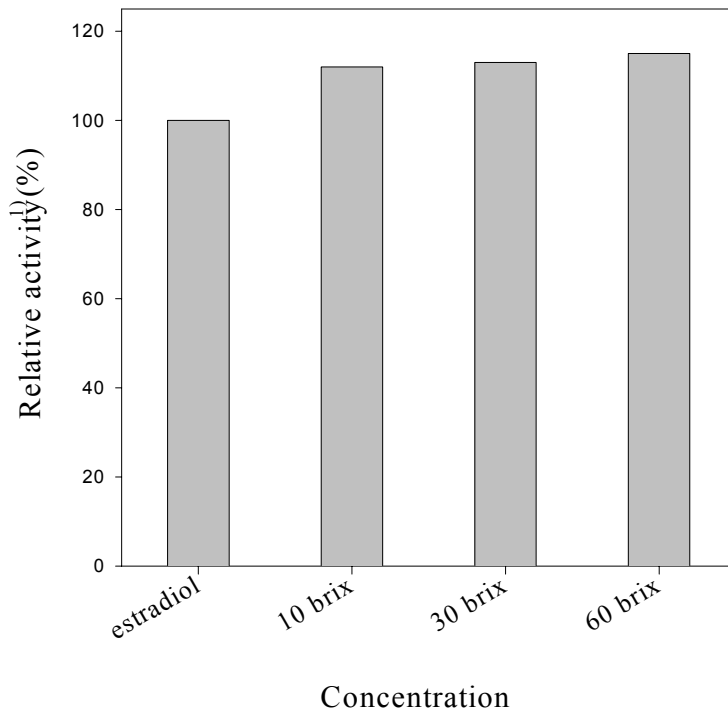


Figure 31. 감초 추출물의 estrogenic activity에서 농축의 영향

## <협동기관-2>

### 내분비계장애물질 억제효과가 있는 유효성분 및 중간소재를 이용한 기능성식품 개발

#### 1. 식품 첨가시험

일반적으로 시중에서 많이 소비되고 있는 식품중에서 종이컵사용, 포장용기 등으로부터 환경호르몬에 노출될 가능성이 큰 주스, 컵라면 스프, tea bag 형태의 녹차를 선정하여 감초 농축액(67°Bx)의 적용가능성 및 적정 첨가농도를 살펴보았다.

컵라면(농심 신라면)의 경우 감초농축액을 넣어서 감초맛이 거의 느껴지지 않는 최소인 농도를 알아보기 위하여 컵라면에 감초농축액을 넣고 300ml의 뜨거운 물을 부은 후 3분간 방치하고 컵라면 국물을 분리하여 관능평가하였다. 그 결과 0.1%의 감초농축액을 넣은 경우 감초의 맛이 많이 느껴졌으며 0.05% 첨가시에도 감초의 단맛과 감초취가 느껴졌다. 그러나 감초농축액을 0.01~0.02% 정도 첨가할 경우에는 감초맛을 느끼는 경우와 느끼지 못하는 경우가 유사하여 컵라면 스프의 경우 최소인농도가 0.01~0.02% 정도인 것으로 판단되었다.

일반적으로 종이컵을 많이 이용하는 녹차의 경우에는 녹차 tea bag 당 70℃의 물 100ml를 넣은 후 2분간 침출한 다음 감초추출물을 첨가하여 최소인 농도를 알아보았다. 그 결과 녹차의 경우에도 라면 스프와 마찬가지로 0.01~0.02%가 최소인농도인 것으로 판단되었다. 오렌지주스의 경우에는 주스 특유의 신맛 때문에 감초맛이 잘 느껴지지 않아 최소인농도는 다소 높은 0.03~0.05% 인 것으로 판단되었다.

이상의 결과에 따라 컵라면스프, 녹차, 오렌지주스에 각각 감초농축액을 0.01, 0.03, 0.05%씩 첨가하고 첨가하지 않은 대조구를 기준으로 감초첨가가 제품의 관능적 품질에 미치는 영향을 살펴본 결과는 Table 5와 같다.

Table 5. 감초첨가가 제품의 관능적 품질에 미치는 영향

(% of respondents)

Content(%) Scope <sup>1)</sup>	Green tea			Orange juice			<i>Cup Lamyeon</i> soup		
	0.01	0.03	0.05	0.01	0.03	0.05	0.01	0.03	0.05
1	-	-	13.3	-	-	6.7	-	-	20.0
2	6.7	20.0	<b>20.0</b>	-	-	13.3	-	6.7	<b>26.7</b>
3	13.3	6.7	13.3	-	13.3	6.7	13.3	6.7	20.0
4	20.0	<b>26.7</b>	<b>20.0</b>	20.0	33.3	33.3	-	<b>46.7</b>	-
5	<b>33.3</b>	20.0	-	<b>80.0</b>	<b>40.0</b>	<b>40.0</b>	<b>46.7</b>	13.3	6.7
6	13.3	13.3	13.3	-	6.7	-	26.7	13.3	20.0
7	13.3	6.7	6.7	-	6.7	-	6.7	6.7	6.7
8	-	6.7	6.7	-	-	-	6.7	-	-
9	-	-	6.7	-	-	-	-	6.7	-

<sup>1)</sup> 9 point : much better than control(non addition), 5 points : same as control, 1 point : much worse than control.

녹차의 경우 대체로 0.1~0.3% 수준에서는 대조구와 유사하거나 약간 관능적인 기호성이 다소 떨어지는 것으로 나타났으며 0.05% 수준이상에서는 대조구보다 관능적인 기호성이 저하된 것으로 응답한 비율이 크게 증가하였다. 반면 오렌지 주스의 경우에는 전반적으로 0.01~0.05% 수준에서 대조구와 큰 차이가 없는 것으로 응답하였으나 감초 농축액의 첨가량이 증가할수록 관능적 기호성이 떨어진다고 응답한 비율이 점차 증가되는 추세이었다. 컵라면 수프의 경우 0.01% 첨가시에는 대조구와 유사하거나 기호성이 약간 좋아진 것으로 응답자의 비율이 높은 반면 0.03%에서 0.05%로 감초농축액 첨가량을 늘일 경우 점차 관능적인 기호성이 뚜렷한 저하경향을 나타내었다.

앞서 감초농축액 첨가시의 최소인지 첨가량과 기호성에 대한 관능적 평가결과를 종합해 볼 때 컵라면 수프에 0.01% 첨가시 일부 패널들이 다소 기호성이 향상된 것으로 평가한 것이 외에는 컵라면 수프, 주스, 녹차 모두 감초농축액 첨가에 관능적인 품질을 향상시키지는 못하는 것으로 판단되었으며 단지 0.01% 정도 첨가하는 것이 관능적인 품질에 큰 영향을 미치지 않고 첨가 가능한 적정 첨가량인 것으로 판단되었다.

## 2. 감초추출물을 이용한 음료제품 개발

### (1) 감초농축액의 적정 첨가량

감초음료 제조시 첨가되는 감초의 적정첨가량을 검토해 보기 위하여 초기 음료의 농도를 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05°Bx로 조정 한 후 관능평가해본 결과 1~0.2°Bx 수준에서는 감초의 맛과 향이 너무 강하였으며 음료제조가 어려울 것으로 판단되었다. 반면 0.05~0.1% 수준에서는 감초맛이나 향이 약간 느껴지지만 다른 부재료 사용시에 이를 완화시킬 수 있을 것으로 판단되었다.

### (2) 당류

감초농축액을 0.05% 농도로 희석한 후 고과당을 이용하여 최종 당도를 2, 4, 6, 8, 10, 12°Bx로 조정 한 후 관능적 품질을 평가해본 결과 8~10°Bx 수준이 적정한 당도인 것으로 판단되었으며 최종 당도를 10°Bx로 맞추기 위한 고과당 첨가량은 약 12% 정도이었다. 한편 고과당의 일부를 올리고당으로 대체해보기 위한 배합비조정시험 결과, 고과당을 2% 정도 줄이고 대신 올리고당을 2% 정도 대체하여 첨가하는 것도 제품의 기능성을 향상시키고 단맛의 질을 다소 개선하는 효과가 있었다.

### (3) 과일농축액

감초음료의 관능적 품질을 개선하기 위하여 감초농축액 0.05%, 고과당 12%을 첨가한 음료 base에 복숭아, 사과, 배, 포도, 매실, 대추, 레몬 농축액 등의 과일농축액을 2% 씩 첨가하고 관능적 품질을 비교해 본 결과, 사과와 포도농축액이 비교적 좋은 관능적 품질을 나타내는 것으로 판단되었으며 이들 두 과일농축액을 농도를 달리하여 함께 첨가해본 결과에서는 사과농축액 3%, 포도농축액 1.5%를 함께 첨가하여 제조한 음료의 관능적 품질이 가장 우수한 것으로 판단되었다. 이때 음료제품의 최종 당도는 10.5°Bx 수준이었다.

### (4) 구연산 및 비타민 C

감초음료에 청량감과 약간의 신맛을 부여하고자 구연산 및 비타민 C 등의 적정 첨가량을 살펴보았다.

우선 구연산의 경우 각각 0.1, 0.08, 0.05% 수준으로 첨가한 후 신맛에 대한 관능적 품질을 평가해본 결과 0.1% 수준이 가장 적당한 것으로 판단되었다. 최근 다양한 기능성으

로 소비자들로부터 많은 관심을 받고 있는 비타민 C를 첨가해 보고자 적정 구연산 첨가량인 0.1%수준을 0.08% 수준으로 낮추고 대신 비타민 C를 각각 0.02, 0.05, 0.08%씩 첨가하여 관능평가해 본 결과, 비타민 C의 적정 첨가량은 0.05% 수준인 것으로 판단되었다. 이상의 결과에서 청량감과 신맛을 부여하기 위한 적정 산의 종류 및 첨가량은 구연산 0.08%, 비타민 C 0.05% 인 것으로 판단되었으며 이 경우 최종제품의 pH는 3.0 수준이었다.

#### (5) 향과 비타민 B군

앞서 시험한 결과에 따라 감초농축액, 당, 산, 과실농축액 등이 첨가된 감초음료의 향을 다소 개선시켜보고자 체리, 살구, 복숭아, 파인애플, 딸기, 사과, Fruit Mix, 레몬향 등을 각각 음료 100 ml 당 20  $\mu$ l씩 첨가하여 관능평가한 결과 체리, 살구, 파인애플, 딸기향 등이 비교적 감초음료와 잘 어울리는 향을 나타내었으며 그 중에서도 체리향이 가장 우수한 관능적 품질 개선 효과를 나타내었다. 체리향의 첨가량을 음료 100 ml 당 5, 10, 15, 20  $\mu$ l로 달리하여 음료를 제조한 후 관능평가해본 결과 체리향의 적정 첨가량은 음료 100 ml 당 5  $\mu$ l 수준이 가장 적당하였다.

비타민 B<sub>1</sub>과 B<sub>2</sub>의 경우 모두 감초 음료 100ml 당 1 mg 전후의 농도로 첨가하는 것이 바람직하였다.

#### (6) 감초음료의 최종배합비 및 관능평가

이상의 모든 결과를 종합하여 Table 6과 같이 3종류의 배합비를 최종적으로 결정하였으며 이들 배합비에 따라 음료 시제품을(Figure 32) 제조하고 관능적 품질을 비교해본 결과는 Table 7와 같다.

Table 6. 감초음료의 최종배합비

(unit : %)

	recipe 1	recipe 2	recipe 3
<i>Gamcho</i> conc(67°Bx)	0.05	0.05	0.1
High fructose syrup	10	10	10
Oligosaccharide	2	2	2
Apple conc.	3	3	3
Grape conc.	1.5	1.5	1.5
Citric acid	0.08	0.08	0.08
Vitamin C	0.05	0.05	0.05
Cherry flavor	0.005	0.005	0.005
Vitamin B <sub>1</sub>	-	0.001	-
Vitamin B <sub>2</sub>	-	0.001	-
°Bx	11.6	11.7	11.5
pH	3.09	3.05	3.06





Figure 32. 감초 음료

**Table 7. 감초음료의 관능적 품질비교**

	recipe 1	recipe 2	recipe 3
Color	5.20	5.27	6.40 <sup>1)</sup>
Flavor	5.73	3.33	6.00
Taste	6.00	3.47	6.40
Overall preference	6.00	3.87	6.73

<sup>1)</sup> 9 point ; very good, 7 point; good, 5 point ; so-so, 3 point ; poor, 1 point ; very poor

감초음료의 관능평가결과 비타민 B군이 첨가된 드링크 형태의 음료는 다소 낮은 관능적 품질을 나타낸 반면 일반 감초 음료제조용 배합비인 recipe 1, recipe 3의 경우 대체로 6점 전후의 관능적 품질을 내었다. 그 중에서도 감초농축액이 0.1% 첨가된 recipe 3의 경우 색, 맛, 향 모두 6.0점이상의 관능적 품질을 나타내었고 전반적인 기호도 역시 6.73점으로 가장 높은 값을 나타내었다.

이상의 결과로 볼 때 전반적인 관능적 품질치가 7.0점보다 낮아 다소 품질개선의 여지는 있지만 감초의 기능적인 측면에 대한 홍보와 관능적 품질 개선 연구가 뒤따른다면 상품화 성공가능성이 클 것으로 판단되었다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에 의 기여도

### 제 1절 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 ( 2000 )	국내 농산물 및 가공식품 으로부터 내분비계장애물 질 저해 활성물질을 탐색	<p>□ 농산물 및 원료 농산물의 내분비계장애물질 억제물질의 추출</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 환류냉각장치를 이용하여 농산물 및 원료 농산물의 80% 메탄올 추출물 제조</li> </ul> <p>□ 유전자재조합 Yeast를 이용한 내분비장애물 질 억제효과 탐색</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 양성대조물질인 17<math>\beta</math>-estradiol(E2)와 비교 하여 보았을 때 약콩, 감초, 결명자, 초두구, 대두, 정향피, 감잎, 동규자잎, 황기 그리고 팥에서 높은 estrogenicity가 관찰</li> <li>- 양성대조물질인 testosterone(T)과 비교하 여 보았을 때 감초, 정향피 그리고 밤에서 비교적 높은 androgenicity가 관찰</li> <li>- 감초와 정향피의 경우 높은 estrogenicity와 androgenicity가 관찰</li> </ul> <p>□ MCF-7 세포를 이용한 내분비장애물질 억제 활성물질 탐색</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 감초, 당귀, 죽엽, 오미자의 경우 단독 처치 하거나 BPA와 함께 처치하였을 때 세포의 증식수준은 non-treated수준보다 훨씬 적은 치가 관찰</li> </ul>

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 ( 2000 )	국내 농산물 및 가공식품으로부터 내분비계장애물질 저해 활성물질을 탐색	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 오가피, 지구자씨, 홍화씨, 현미, 보리, 옥수수, 메밀, 수수, 흑미의 경우 최고농도에서 억제하는 결과</li> <li>- 정향피, 초두구, 오가피의 경우 100 ug/ml에서 세포의 증식이 감소되고 또한 BPA와 함께 처치하였을 때 감소하는 경향이 관찰</li> <li>- 백모근의 경우 단독처치군에서는 영향이 나타나지 않았으나 BPA와 함께 처치하였을 때 세포의 증식을 억제하는 경향</li> </ul> <p>□ 유효물질의 분리, 정제 및 정제 단계별</p>
2차 년도 ( 2001 )	내분비계 장애물질의 억제물질의 분리, 정제 및 식품소재화	<p>□ 내분비계장애물질 억제효과 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 증류수 및 80% 에탄올 용액을 이용하여 상온에서 24시간 추출하는 방법과 열수에서 환류냉각장치를 이용하는 방법으로 추출방법을 달리하여 감초추출물을 제조한 후 수율과 활성을 비교 검토</li> <li>- 시료를 대상으로 메탄올 추출물을 제조한 후 이를 Hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, BuOH 및 물 분획으로 분리한 후 추출수율 및 활성을 검토</li> <li>- 감초를 제외한 정향피 초두구의 경우 대개 비극성 분획에서 활성이 검출</li> </ul> <p>□ Uterotrophic assay를 이용한 유효물질의 내분비장애물질 억제효과 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 감초와 정향피의 경우 BPA의 유의적인 억제효과 관찰</li> <li>- 감초의 경우 Virgina와 Uterus에서 정향피보다 높은 억제효과를 나타내어 무처치군과 비슷한 수치가 관찰</li> </ul>

<p>2차 년도 ( 2001 )</p>	<p>내분비계 장애물질의 억제 물질의 분리, 정제 및 식품 소재화</p>	<p>□Dioxin 유전자가 도입된 HepG2 cell line을 이용한 유효물질의 활성확인 - 갈근, 한국산상백피에서 XRE와 반응하여 다이옥신과 같은 활성을 나타냈으며, 다이옥신 과 동시 처치했을 때, 유의적으로 다이옥신의 활성억제현상을 관찰</p> <p>□유효물질의 소재화 및 가공 특성 구명 - 농축된 액상 중간소재 제조공정 확립하여 동결건조 등을 통한 분말소재 제조공정을 통 해 Tablet 형태의 제제화 시험을 통한 중간소 재화</p>
<p>3차 년도 ( 2002 )</p>	<p>내분비계 장애물질에 대한 억제물질의 이화학적 특성, 기작 규명 및 제표화</p>	<p>□유효물질의 이화학적 특성 구명 - 감초의 pH, 열, 농축정도에 따라 특성을 규 명하고 활용</p> <p>□유효물질의 사람유방암 세포에서 기작 구명 - 감초와 정향피추출물은 Bcl-2 family의 조 절을 통해 세포사멸을 유도하는 것을 관찰 - 감초와 정향피는 내분비계 장애물질인 BPA 또한 세포사멸과 비슷한 기전으로 억제</p> <p>□유효물질의 사람전립선암 세포에서 기작 구 명 - 감초와 정향피 추출물은 전립선에서 세포 증식억제를 유도하지만 그 정도와 기작이 미 비한 것으로 관찰</p>

<p>3차 년도 ( 2002 )</p>	<p>내분비계 장애물질에 대한 억제물질의 이화학적 특성, 기작 규명 및 제품화</p>	<p>□ 내분비계장애물질 억제효과가 있는 유효성 분 및 중간소재를 이용한 기능성식품 개발 - 관능평가결과를 통해 여러 배합비를 시험 해 감초음료를 개발 - 음료이 외에 감초의 적정 음식 첨가량을 개발</p>
---------------------------	---	---

## 제 2절 연구평가의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도		
	착 안 사 항	척 도 (점수)	달성도
1차년도( 2000년 )	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 활성탐색을 위한 농산물 및 가공식품의 범위</li> <li>○ 추출물의 유효활성 확인</li> <li>○ 추출물의 유효활성도</li> </ul>	40%(40)  30%(30) 30%(30)	100%
2차년도( 2001년 )	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유효물질 분리정제의 효율성</li> <li>○ Uterotrophic assay를 이용한 유효물질의 내분비장애물질 억제효과 확인</li> <li>○ dioxin 유전자가 도입된 HepG2 cell line을 이용한 유효물질의 활성확인</li> <li>○ 유효물질의 가공특성 구명 및 소재화</li> </ul>	30%(30) 20%(20) 20%(20) 30%(30)	100%
3차년도( 2002년 )	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 활성물질의 이화학적 특성구명</li> <li>○ 활성물질의 작용기작 구명</li> <li>○ 활성물질의 제품화</li> </ul>	30%(30) 40%(40) 30%(40)	100%
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 원료농산물 및 가공식품중의 환경호르몬 억제물질 확인</li> <li>○ 활성물질의 이화학적 특성 및 작용기작</li> <li>○ 활성물질의 소재화 및 제품화</li> </ul>	40%(40) 30%(30) 30%(30)	100%

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

식품활성성분의 추출법과 생물학적 분석법을 이용하여 내분비계 장애물질의 대사를 억제시키고, 동시에 내분비계에 관련된 성인병을 예방가능한 농산물 및 원료농산물의 추출물을 특허출현한다. 또한 본 연구과제에서 사용된 추출법과 분석법을 첨가하여 그 농산물의 제조과정의 균일화와 표준화 작업에 활용하고 특허출현까지 할 수 있을 것으로 생각된다.

위의 연구결과를 바탕으로 감초등을 국내 농산물 산업에 적극 재배를 권장함으로써 수출증진 및 농가소득 증대에 기여한다. 그리고 응용된 기술로 벤처기업 창출을 도모하고 지속적인 기술관리로 국내 및 해외 시장을 개척하여 국제적인 수출 촉진에도 활용될 수 있다.

또한 본 과제에서 감초에 의한 사람의 유방암 및 전립선암의 세포사멸에 의한 세포증식억제와 그 기전은 화학적 암예방 효과의 연구의 보고를 한 단계 진보시킨 것으로서, 이 과제를 기능성 보조식품 또는 의약품에 적용하면 평소에 우리가 쉽게 섭취하던 식품으로 부작용의 걱정없이 바로 산업화로의 활용이 가능하다.



## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

내분비계장애물질이란 내분비계의 정상적인 기능을 방해하는 화학물질로서 환경중 배출된 화학물질이 체내에 유입되어 마치 호르몬처럼 작용한다고 하여 환경호르몬으로 불리기도 한다. 내분비계장애물질로 알려진 물질의 대부분은 산업용 화학물질이 차지하고 있으며, 그밖에 에스트로젠 기능약물, 식물에서 생산되는 식물성에스트로젠 등이 포함된다.

이들 내분비계장애물질은 생태계 및 인간의 생식기능저하, 기형, 성장장애, 암 등을 유발하는 물질로 추정되고 있으며 생태계 및 인간의 호르몬계에 영향을 미쳐 전세계적으로 생물종에 위협이 될 수 있다는 경각심을 일으켜 오존층 파괴, 지구온난화 문제와 함께 세계 3대 환경문제로 등장하였다. 현재 수많은 화학물질중 명확하게 내분비장애물질로 밝혀진 것은 극히 일부분이며, 대부분의 물질이 잠재적 위험성이 있는 것으로만 알려져 있다.

내분비계 장애와 관련해 연구결과 및 그 사례가 보고된 대표적 물질로는 식품이나 음료수캔의 코팅물질 등에 사용되는 비스페놀A와 과거 농약이나 변압기절연유로 사용되었으나 현재 사용이 금지된 DDT와 PCB, 소각장에 주로 발생하는 다이옥신류, 합성세제원료인 알킬페놀, 플라스틱 가소제로 이용되는 프탈레이트 에스테르 및 그밖에 스티로폴의 성분인 스티렌다량체 등이 내분비계장애물질로 의심을 받고 있다.

이러한 주위에서 쉽게 노출이 가능한 내분비계 장애물질에 대한 독성에 대한 연구는 조금씩 진행되어 가고 있는 반면 그것에 대응할 수 있는 억제 방법 즉 우리가 대처해야하는 방법에 대해서는 연구가 전무후무한 실정이다.

이번 과제에서는 내분비계 장애물질 중 가장 많이 알려져 있고 주변에서 많이 검출되는 비스페놀A와 다이옥신을 억제할 수 있는 물질을 우리가 평소에 섭취하는 농산물 및 원료농산물을 통하여 찾아보았다. 결과 중에서 가장 억제 활성도가 높았던 감초는 동양에서는 약재로 많이 쓰이지만 서양에서는 감미원료 또는 식품으로 많이 사용되고 있다. 감초는 주로 그 뿌리를 쓰는데 달콤한 맛의 성분인 글리사이리진은 전립선암의 성장을 부추기는 테스토스테론 부산물이 형성되는 것을 막아준다고 알려져 있다. 이 성분은 또한 DNA가 손상되지 않도록 보호해주는 것으로 추정되고 있고 발암물질에 노출된 쥐들에 글리사이리진을 탄 물을 마시게 했더니 종양의 성장이 현저히 감소된 것으로 밝혀지기도 했다. 또한 동양의학에서는 피부나 조직에 생긴 암과 위암 등에는 감초를 달여서 만든 약을 응용해서 사용하고 있다고 한다.

농산물 등의 식품을 이용한 기능성 식품의 개발은 현재 세계적으로 활발하게 진행되고 있다. 대부분이 정상 세포의 유전자 변이를 막거나, 비정상 세포의 암세포 전환 및 증식을

억제할 수 있는 물질을 찾아내 암 예방에 활용하려는 ‘화학적 암예방’ (Cancer Chemoprevention) 연구이다. 화학적 암예방은 암이 이미 발생한 뒤에 항암제로 치료하는 기존의 화학요법과는 다른 개념이다. 전통식품에 들어 있는 성분 처럼 독성이 없는 안전한 화학물질이나 그 혼합물들을 이용하여 정상세포의 암화를 억제, 지연 또는 역전시킴으로써 암 발생을 미리 막으려는 새로운 암퇴치 전략인 것이다. 대표적인 예방 성분으로는 녹차의 떫은 맛과 관련된 카테킨류의 하나인 이지시지(EGCG), 토마토의 붉은 색소인 리코펜, 마늘의 향 성분인 알릴 설파이드, 브로콜리의 향 성분인 설파라판 등을 꼽을 수 있다. 이지시지와 리코펜은 맹독성의 활성산소를 중화시킴으로써 활성산소가 정상세포의 유전자를 공격하는 것을 막고 알릴 설파이드는 발암물질이 세포내 대사를 통해 활성화되는 것을 억제하고, 설파라판은 세포내 해독효소를 활성화해 발암물질을 세포 밖으로 배출시키도록 한다고 알려져 있다.

그러나 아직 내분비계 장애물질의 생체내 활성을 억제하거나 동시에 암예방까지 하는 성분에 대한 연구는 보고된 적이 없다. 따라서 농산물의 정제 및 활용과 화학적 암예방 연구를 통하여 적절한 시험법을 사용하여 유효성분의 식품소재화와 제품화에 기여하는 것이 바람직하다.

## 제 7 장   참고문헌

1. 原田政敏 : 천연물질의 생물활성 연구법, Natural products for medicinal uses, ed. by Shibata, S., Itokawa, U., Shoji, J. and Takido, M., Nanzando Co., Ltd., Tokyo, pp 67-68, 1982
2. 강경선, 이영순; 내분비계 장애물질에 대한 국외 대응현황. 식품과학과 산업, 32(2) : 29-42, 1999
3. 우원식 : 천연물화학연구법, 민음사, 서울, pp 16-20, 1984
4. 윤혜숙, 장일무 : 전통약물로부터 신약개발 연구법, 신동의약 개발사업 총괄 연구기관, 서울대학교 천연물과학 연구소, pp9-15, 1992
5. Kang KS, Park JS, Lee BJ, Inoue T and Lee YS. Hormonal Effects of Several Chemicals Using Recombinant Yeast, MCF-7 Cells and Uterotrophic Assay in Mice. JMB, 2000
6. Kang KS, Li GX, Park JS, Lee BJ, Che JH, Lee DS, Lee YS. Effect of Green Tea on the Male Reproductive System of Rats Exposed to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin, JMB, 2000
7. Kwak HI, Bae MO, Cho MH, Lee MH, Lee YS, Lee BJ, Kang KS, Chae CH, Kwon OK, Lee YJ, Mar WC, Sheen YY, Lee YW. Effects of Nonylphenol, Bisphenol A and Their Mixture on Viviparous Fish, Swordtail (*Xiphophorus helleri*). Enviromental Health Perspectives, 2000
8. Kang KS, Li GX, Che JH, and Lee YS. Impairment of Reproductive Development in F1 Offspring Rats from Dams Exposed to 2-Bromopropane During Gestation and Lactation Periods. Toxicology and Applied Pharmacology, 2000

9. Kang KS, Kang BC, Lee BJ, Che JH, Li GX, Trosko JE and Lee YS. Preventive effect of Epicatechin and Ginsenoside Rb2 on the Inhibition of Gap Junctional Intercellular Communication by TPA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Cancer Lett.*, 1999
10. Kwon YB, Yang IS, Kang KS, Han HJ, Lee YS, Lee JH. Effects of Dizocilpine Pretreatment on Parvalbumin Immunoreactivity and Fos Expression after Cerebral Ischemia in the Hippocampus of the Mongolian Gerbil, *The Journal of Veterinary Medical Science*, 1999
11. Na, HK., Wilson MR., Kang KS., Chang CC, Grunberger D., and Trosko JE. Restoration of gap junctional intercellular communication by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in a ras-transformed rat liver epithelial cell line. *Cancer Lett*, 1999
12. Sun W, Kang KS, Morita I, Trosko JE, Chang CC. High Susceptibility of a human breast epithelial cell type with stem cell characteristics to telomerase activation and immortalization. *Cancer Res.*, 59 : 6118-6123, 1999
13. Kang KS and Lee, YS. Proliferation/reporter assay using MCF-7 cells for detecting estrogenic endocrine disruptors. Book Chapter In *Toxicological Methods for endocrine Disrupting Chemicals*. 2000
14. Lee, B.J., Kang, K.S., Nam SY, Park JH, Lee YS, Yun YW and Cho, M.H. Effect of Carnosine and related compounds on monosaccharide autoxidation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation. *Kor. J. Physiol Pharmacol.* 3 : 251-261, 1999
15. Lee, B.J., Lee, Y.S., Kang, K.S., Cho, M.H. and Hendricks, D.G. Carnosine and related compounds protect copper-induced damage of biomolecules. *J. Biochem. Mol. Biol.* 32(4) : 350-357, 1999
16. Lee, BJ., Kang, KS., Lee, YS., Nam SY., Kim YC., and Cho, MH. A comparison for antioxidant activity of Carnosine and related compounds in several model systems.

J. of Toxicology and Public Health 15(3):297-306, 1999

17. Inoue, T. and Kang, K.-S.; Endocrine disrupting chemicals: their possible mechanism of actions and the testing methods. *J. of Toxicological Sciences*, 23(5):191-199, 1998
18. Kang, K.-S., Y.-S. Lee and K.-S. Shin, Estrogenicity of genistein and bisphenol A *J. Food Hygiene and Safety*, 13(2):106-111,1998
19. Kang, K.-S., Saitoh, M., Cruz, A, and Chang, C.-C., Cho, J.-J.; BRCA1 protein was not expressed in a normal human breast epithelial cell type with stem cell and luminal characteristics. *J. Toxicology and Public Health*, 14(2):123-127, 1998
20. K. Sai, B. Upham, K.-S. Kang, R. Hasegawa, T. Inoue, and J. E. Trosko.; Inhibitory effect of pentachlorophenol on gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells *in vitro*. *Cancer Letters*, 129:1-9,1998
21. Kang, K.-S., Cruz, A., Morita, I., Trosko, J.E., and Chang, C.-C., Involvement of tyrosine phosphorylation of p185c-erbB2/neu in cancer development by x-rays and *neu* oncogene in breast epithelial cells, *Molecular Carcinogenesis*, 21:225-233, 1998
22. Kang K.-S., Chang C.C and Trosko J.E.; Modulation of Gap Junctional intercellular communication during human breast stem cell differentiation and immortalization, *In Gap Junctions*, pp.347-351, Ed. IOS press, Amsterdam, 1998
23. Wilson M. R., Ifeanyi U., Kang K.-S. Trosko J.E.; A role for Mitogen Activated Protein Kinase(MAKP) during RAS-induced down regulation of gap junctional intercellular communication, *In Gap Junctions*, pp.239-243, Ed. IOS press, Amsterdam, 1998
24. Hayashi T., Matesic, DF., Nomata K., Kang K.-S., Chang C.-C., and Trosko, JE.,

- Stimulation of cell proliferation and inhibition of gap junctional intercellular communication by linoleic acid, *Cancer Lett.*, 112: 103-111, 1997
25. Upham, B.L., Kang, K.-S., Cho, H-Y and Trosko, J.E.; Hydrogen peroxide inhibits gap junctional intercellular communication via hyper-phosphorylation of Connexin 43 in glutathione sufficient but not glutathione defficient cells, *Carcinogenesis*, 18(1): 37-42, 1997
  26. Kang, K.-S., Morita, I., Cruz, A. , Jeon Y. J., Trosko, J.E., and Chang, C.-C., Expression of estrogen receptors in a normal human breast epithelial cell type with luminal and stem cell characteristics and its neoplastically transformed cell lines, *Carcinogenesis*, 18(2): 251- 257, 1997
  25. Kang, K.-S., and Lee, YS., Involvement of the enhancement of natural killer cell activity on the anticancer effect of Red Ginseng during rat hepatocarcinogenesis, *Korean J. of Toxicology*, 13(1) 23-37, 1997
  26. Y.-S. Lee, K.-S. Kang, D.-J. Shin, H.-O. Kim, J.-J. Cho and B.-H. Kim, Fertility and general reproductive ability test of LBD-009 in Rats, *Kor. J. Lab. Ani. Sci.*,13(1): 93-94, 1997
  27. Y.-S. Lee, K.-S. Kang, D.-J. Shin, H.-O. Kim, J.-J. Cho and B.-H. Kim, Teratological study of LBD-009 in Rats, *Kor. J. Lab. Ani. Sci.*,13(1): 95-99, 1997
  28. Y.-S. Lee, K.-S. Kang, D.-J. Shin, H.-O. Kim, J.-J. Cho and B.-H. Kim, Teratological study of LBD-009 in Rabbit. *Kor. J. Lab. Ani. Sci.*,13(1):101-103, 1997
  29. Kang, K.-S., Wilson, M.R., Hayashi, T., Chang, C.-C., Trosko, J.E.; Inhibition of gap junctional intercellular communication in normal human breast epithelial cells after treatment with several pesticides, PCBs and PBSs, alone or in mixtures, *Environmental Health Perspectives*, 104:192-200, 1996

30. Koichiro, N., Kang, K.-S., Hayashi, T., Matesic, D.F., Lockwood, B., Chang, C.-C., Trosko, J.E.; Inhibition of gap junctional intercellular communication in normal human breast epithelial cells treated with Heptachlor and heptachlor epoxide, *Cell Biology and Toxicology*, 12: 69-78, 1996
31. Vanden Berghe, D.A., Vlietinck, A.J. and Van Hoof, L.: Plant products as potential antiviral agents. *Bull. Inst. Pasteur*, 84, 101-147, 1984
32. 原田政敏 : 천연물질의 생물활성 연구법, Natural products for medicinal uses, ed. by Shibata, S., Itokawa, U., Shoji, J. and Takido, M., Nanzando Co., Ltd., Tokyo, pp 67-68 (1982)
33. Suffness, M., Newman, D.J. and Snader, K. : Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources, *Biorganic marine chemistry*, vol 3 Springer-Verlag, Berlin, pp 131-168
34. 윤혜숙, 장일무 : 전통약물로부터 신약개발 연구법, 신동의약 개발사업 총괄 연구기관, 서울대학교 천연물과학 연구소, pp9-15 (1992)
35. SL Parker, T Tong, S Bolder PA Wingo. *Cancer Statistics. CA Cancer J Clin*, 48: 629, 1998
36. A Decensi, A Costa. Recent advances in cancer chemoprevention, with emphasis on breast and colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, 36: 694-709, 2000
37. Grube BJ, Eng ET, Kao YC, Kwon A, Chen S. White button mushroom phytochemicals inhibit aromatase activity and breast cancer cell proliferation. *J Nutr*, 131(12): 3288-93, 2001
38. Hu H, Ahn NS, Yang X, Lee YS, Kang KS. *Ganoderma lucidum* extract induces

- cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell. *Int J Cancer*, 102(3): 250-3, 2002
39. Cho JH, Cho SD, Hu HB, Kim SH, Lee YS, Kang KS. The roles of ERK1/2 and p38 MAP Kinases in the preventive mechanisms of mushroom phellinus linteus against the inhibition of gap junctional intercellular communication by hydrogen peroxide. *Carcinogenesis*, 23(7): 1163-9, 2002
40. Wang ZY, Nixon DW. Licorice and cancer. *Nutr Cancer*, 39: 1-11, 2001
41. Demizu S, Kajiyama K, Takahashi K, Hiraga Y, Yamamoto S, Tamura Y et al. Antioxidant and antimicrobial constituents of licorice: Isolation and structure elucidation of a new benzofuran derivative. *Chem Pharm Bull*, 36: 3474-3479, 1988
42. Friis-Møller Alice, Chen Ming, Fuursted Kurt, Christensen Søren Brøgger, Kharazmi Arsalan. *In Vitro* Antimycobacterial and Antilegionella Activity of Licochalcone A from Chinese Licorice Roots. *Planta Medica*, 68: 416-419, 2002
43. Belinky PA, Aviram M, Fuhrman B, Rosenblat M, Vaya J. The antioxidative effects of the isoflavan glabridin on endogenous constituents of LDL during its oxidation. *Atherosclerosis*, 137: 49-61, 1998
44. Vaya J, Belinky PA, Aviram M. Antioxidant constituents from licorice roots: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation. *Free Radical Biol Med*, 23: 302-313, 1997
45. Kobayashi S, Miyamoto T, Kimura I, Kimura M. Inhibitory effect of isoliquiritin, a compound in licorice root, on angiogenesis in vivo and tube formation in vitro. *Biol Pharm Bull*, 18(10): 1382-6, 1995



46. Shibata S, Inoue H, Iwata S, Ma RD, Yu LJ, Ueyama H et al. Inhibitory effects of licochalcone A isolated from *Glycyrrhiza inflata* root on inflammatory ear edema and tumour promotion in mice, 57: 221-4, 1991
47. Mohamed M Rafi, Bret C Vastano, Nanquan Zhu, Chi-Tang Ho, Geetha Ghai, Robert T Rosen et al. Novel Polyphenol Molecule Isolated from Licorice Root (*Glycyrrhiza glabra*) Induces Apoptosis, G2/M Cell Cycle Arrest, and Bcl-2 Phosphorylation in Tumor Cell Lines. *J Agric Food Chem*, 50(4) : 677 - 684, 2002
48. Rafi MM, Rosen RT, Vassil A, Ho CT, Zhang H, Ghai G et al. Modulation of bcl-2 and cytotoxicity by licochalcone-A, a novel estrogenic flavonoid. *Anticancer Res*, 20(4): 2653-8, 2000
49. Soto AM, Chung KL, Sonnenschein C et al. The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environ Health Perspect* 102: 380-383
50. Kang KS, Sun W, Nomata K, Morita I, Cruz A, Liu CJ et al. Involvement of tyrosine phosphorylation of p185(c-erbB2/neu) in tumorigenicity induced by X-rays and the neu oncogene in human breast epithelial cells. *Mol Carcinog*, 21(4): 225-33, 1998
51. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther*, 92(1): 57-70, 2001
52. Sun SY. Apoptosis induction by chemopreventive agents. *Drug News Perspect*, 14(2): 75-80, 2001
53. Rafi MM, Vastano BC, Zhu N, Ho CT, Ghai G, Rosen RT et al. Novel polyphenol molecule isolated from licorice root (*Glycyrrhiza glabra*) induces apoptosis, G2/M cell cycle arrest, and Bcl-2 phosphorylation in tumor cell lines. *J Agric Food Chem*,

50(4): 677-84, 2002

54. Lin H, Zhang XM, Chen C, Chen BD, Apoptosis of Mo7e Leukemia cells Is associated with the cleavage of Bcl-2 into a shortened fragment that is not functional for heterodimerization with Bcl-2 and Bax. Exp Cell Res, 261: 180-6, 2000

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.