

랜드에서 Uterotrophic assay 및 Hershberger assay를 이용한 칡의 에스트로겐/항안드로겐 영향 평가

곽승준¹ · 김순선¹ · 이규식¹ · 손경희¹ · 김희연² · 강길진² · 최요우¹ · 박철훈¹ · 박귀례^{1*}
¹국립독성연구원 특수독성부, ²식품의약품안전청 식품평가부

The Evaluation of Estrogenic/Antiandrogenic Activity of *Puerariae Radix* in Immature Rats Using Uterotrophic Assay and Hershberger Assay

Seung Jun Kwack¹, Soon Sun Kim¹, Gyu Seek Rhee¹, Kyung Hee Sohn¹, Hee-Yun Kim²,
Kil-Jin Kang², Yo Woo Choi¹, Chul Hoon Park¹ and Kui Lea Park^{1*}

¹Division of Specialized Toxicology, National Institute of Toxicological Research,
²Department of Food Evaluation, Korea Food and Drug Administration, Seoul, 122-704, Korea
(Received November 1, 2002)
(Accepted November 15, 2002)

ABSTRACT : This study was carried out to evaluate the estrogenic/antiandrogenic activity of *Puerariae Radix* in Sprague-Dawley rats. It has been known that diverse phytoestrogens were included in some *Puerariae Radix*, especially in *Pueraria mirifica*. The Uterotrophic assay and Hershberger assay were performed to evaluate the estrogenic/antiandrogenic activity of various *Puerariae Radix* (*Pueraria thunbergiana*, *Pueraria mirifica* and *Butea superba*). In Uterotrophic assay, the extracts of *Puerariae Radix* were administered subcutaneously to immature female SD rats from 19 to 21 days of age. The wet uterus and vaginal weights significantly increased in the group only treated with extracts of *Pueraria mirifica*. But, in Hershberger assay, all extracts of *Puerariae Radix* did not show any effects in the castrated rats. These results suggest that *Pueraria mirifica* has not androgenic/antiandrogenic effect but potent estrogenic effect. It is possible that components of *Pueraria mirifica* may act as endocrine disruptor in human body.

Key Words : *Puerariae Radix*, Uterotrophic assay, Hershberger assay, Estrogenic activity, Phytoestrogen, Endocrine disruptors

I. 서 론

사회적으로 논란이 되고 있는 내분비계 장애물질(endocrine disruptors, EDs)은 생체내 항상성 유지와 성장, 발육 및 생식기관의 발달 등을 조절하는 천연호르몬의 생성, 분비, 이동, 대사, 결합, 작용 또는 배설을 간섭하는 외인성 물질로서, 생체내에 유입되면 호르몬과 같이 작용하여 비정상적인 호르몬 유사작용을 나타낸다(Kavlock *et al.*, 1996). 이와 같은 내분비계 장애물질은 농약, 중금속, 플라스틱용 화학물질, 다양한 환경오염물질, 합성에스토로겐뿐만 아니라 식물성 호르몬 유사물질(phytoestrogen) 등도 포함하고 있다.

칡은 온열대에서 자라는 덩굴나무로 *Pueraria thunbergiana*

(*Pueraria lobata*), *Pueraria thomsanii*, *Pueraria omeiensis*, *Pueraria phaseoloides* 그리고 *Pueraria mirifica* 등으로 분류되며, 우리나라에서 자생하는 칡은 주로 *Pueraria thunbergiana*로서 지사, 해월, 관상동맥확장 및 뇌혈류량 증가 등의 약리작용을 가진 약용식품으로 알려져 있다. 그러나 태국에서 자생하는 *Pueraria mirifica*는 여성의 갱년기 장애 및 부인병 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 이러한 효과는 여성호르몬 estrogen의 활성을 증대시키는 phytoestrogen인 miroestrol, deoxymiroestrol, isomiroestrol 성분을 많이 함유하고 있기 때문으로 알려져 있다 (Chansakaow *et al.*, 2000). 칡이나 콩에 함유된 phytoestrogen 또는 isoflavone이라는 물질은 여성호르몬인 estrogen과 비슷한 효과를 가지고 있어 여성의 폐경 증상을 완화시키는 등의 작용이 있는 반면, 태아나 어린이에게는 호르몬 계통을 교란시켜 성장발육장애 등의 위험성을 나타

*To whom correspondence should be addressed

내고 있다(Hutchins *et al.*, 1995; Setchell *et al.*, 1997). 본 연구에서는 국내산과 태국산 칡의 에스트로겐/항안드로겐 활성을 평가하기 위하여 Uterotrophic assay와 Hershberger assay를 실시하였다. 실험동물에 대한 호르몬 영향을 배제하기 위하여 Uterotrophic assay에서는 난소를 적출하지 않은 미성숙 암컷 랫드를 이용하였으며, Hershberger assay에서는 고환을 적출한 수컷 랫드를 사용하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 시험물질

Testosterone propionate는 Wako Pure Chemical Industries(Osaka, Japan)으로부터 구입하였으며, 17 β -estradiol(E2) 및 일반적으로 실험에 사용된 화학물질들은 Sigma Chemical(St. Louis, MO)사에서 구입하였다. 국내산 칡(*Pueraria thunbergiana*)은 2001년 4월에서 6월에 걸쳐 강원지역(춘천), 경기지역(중미), 경상지역(대구, 밀양), 전라지역(고창)에서 생칡으로 채취하고, 태국산 칡은 2001년 7월에 현지에서 *Pueraria mirifica*, *Butea superba*를 구입한 것으로 식품의약품안전청 식품평가부로부터 공급받아 사용하였다. 시료는 음건 후 세절, 분쇄한 후 분쇄한 시료 20 g에 95% ethanol 100 ml을 가하여 상온에서 3일간 추출한 후 Whatman 5A, 150 mm filterpaper로 여과시키고 40°C에서 갑압농축 시킨 후 동결건조 하여 동물실험에 이용하였다.

2. 시험동물 및 사육환경

시험동물은 특정 병원체 부재 Sprague-Dawley(SD)계 랫드를 국립독성연구원 실험동물자원실(Seoul, Korea)로부터 공급받아 일정시간 동안 순화시킨 후 시험에 사용하였다. 사육조건은 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 10\%$, 명암은 12시간마다 자동조절되는 환경에서 사육하였다. 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

3. Uterotrophic assay

생후 18일의 미성숙 SD계 암컷 랫드(체중 25~35 g, 출신일을 0일로 산정하였음)를 실험동물자원실로부터 분양 받아 실험실 환경에 적응시킨 후 시험군을 각 군당 6마리 씩 용매대조군, 에스트로겐 양성대조물질인 E2 투여군 및 시험물질 투여군으로 분리하였다. 생후 19일부터 E2 및 시험물질을 각각 absolute ethanol에 용해한 후 corn oil에 혼탁(에탄올의 최종농도가 20%)하여 3일간(19, 20, 21일)

피하투여 하였다. 투여량은 E2 및 시험물질을 각각 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 40 mg/kg으로 하였으며 투여액량은 10 ml/kg으로 조정하였다. 투여액량은 매일 체중을 측정하여 체중에 따라 산출하였으며 시료는 투여 직전에 조제하였다. 투여는 매일 동일한 시간에 실시하였다. 마지막 투여 후 24시간에 모든 동물을 투약 순서대로 사멸하여 자궁 및 질을 적출하여 지방을 제거하고 중량을 측정하였다(OECD, 1999; Chung *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000).

4. Hershberger assay

생후 4주령의 수컷 랫드를 실험동물자원실로부터 분양 받아 실험실 환경에 1주간 적응시킨 후 외과적 수술로 고환을 적출하고 1주간 회복기를 두었다. 정상적으로 회복된 실험동물을 각 군당 6마리씩 용매대조군, testosterone 양성대조군, 시험물질 투여군 및 testosterone/시험물질 복합 투여군으로 분리하였다. 시험물질을 각각 absolute ethanol에 용해한 후 corn oil에 혼탁한 후, testosterone 및 시험물질의 농도를 각각 0.8 mg/ml/kg, 40 mg/10 ml/kg으로 testosterone은 피하로 투여하고 시험물질은 경구로 투여하였다. 투여량은 매일 체중을 측정하여 체중에 따라 산출하였으며 시료는 투여 직전에 조제하였다. 투여는 10일간 연속적으로 매일 동일한 시간에 실시하였다. 마지막 투여 후 24시간에 모든 동물을 투약 순서대로 사멸하여 생식부속 장기(seminal vesicles, coagulating gland, ventral prostate, levator ani and bulbocavernous muscle(LABC), glans penis, cowpers gland)를 적출하여 지방을 제거하고 중량을 측정하였다(Hershberger *et al.*, 1953; EPA, 1998; Chung *et al.*, 2000).

5. 자료의 통계학적 해석

시험결과는 대조군과 비교해서 분석하였다. SigmaStat 프로그램을 사용하여 ANOVA(one way analysis of variance)와 Dunnet's test를 실시하여 통계처리 하였으며, $p < 0.05$ 인 경우 유의성이 있다고 판정하였다.

III. 결 과

1. Uterotrophic assay

본 연구에서는 미성숙 암컷 랫드를 이용하여 시험물질의 에스트로겐성 활성을 시험하였다. 미성숙 랫드에 E2 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 3일간 피하로 투여한 후 자궁과 질의 무게를 측정한 결과 대조군에 비해 각각 약 5.2 및 2.0배의 유의적인 증가를 나타내었다($p < 0.01$). 시험물질 중 *Pueraria*

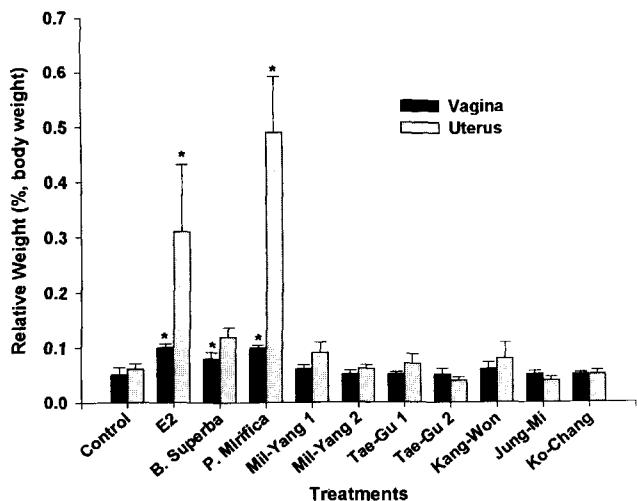


Fig. 1. Effect of extracts of *Puerariae Radix* on the uterine and vaginal weight of immature females S.D. rat in the Uterotrophic assay. Control received corn oil (20% ethanol) only. Data represent group (mean±SD).

*Indicates significantly different from control group ($p < 0.01$).

mirifica 추출물은 자궁 및 질의 무게를 각각 약 8.2 및 2.0 배씩 유의적으로 증가시켰으나($p < 0.01$), *Butea superba* 추출물은 질의 무게만을 유의적으로 약 1.6배 증가시켰으며 ($p < 0.01$) 자궁의 무게는 약 2.0배가 증가하였지만 유의성이 나타나지는 않았다. 국내산 칡의 경우는 대조군과 비교하여 유의적인 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 1). 부검한 결과 모든 투여군에서 병리학적인 이상은 발견되지 않았으며, 투여 기간 동안 시험물질 투여군에서 대조군에 비해 특이적인 사망 예 또는 임상적 이상증상은 발견되지 않았다.

2. Hershberger assay

본 연구에서는 고환을 제거한 수컷 랙드를 이용하여 시

험물질의 안드로겐성/항안드로겐성 활성을 시험하였다. 시험물질 및 testosterone 투여에 의한 체중의 유의적인 변화는 관찰되지 않았으며, 부검결과 및 투여기간 중 관찰에서도 병리학적 이상 또는 대조군에 비해 특이적인 사망 예 또는 임상적 이상증상은 발견되지 않았다. 랙드에 양성대조물질인 testosterone 0.8 mg/kg을 10일간 투여한 후 주요 생식부속장기의 무게를 측정한 결과 seminal vesicles(5.6 배), ventral prostate(6.8배), LABC(2.2배), glans penis(1.7 배)와 cowpers gland(6.9배)의 무게는 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내었으나 칡 추출물은 국내산과 태국산 모두 대조군에 비해 유의적인 차이가 없었다. Testosterone과 *Puerariae Radix* 추출물 병용 투여시에는 생식부속장기의 무게가 testosterone 단독 투여군에 비해 증가하는 경향을 나타내었으나 통계적 유의성은 없었다(Table 1).

IV. 고 칠

본 연구에서는 phytoestrogen을 함유하고 있는 칡에 대하여 국내산과 태국산의 에스트로겐 및 항안드로겐 활성을 비교 평가하였다. Uterotrophic assay는 에스트로겐 활성과 직접적으로 관련이 있는 자궁의 증식 정도를 측정하는 방법으로 에스트로겐 유사물질들에 대한 검색법으로 많이 이용된다(Reel et al., 1996). 가장 일반적으로 사용되는 자궁 증식에 대한 반응은 습중량(wet weight)의 변화이며, 기타 세포 또는 조직에 대한 반응 및 생화학적 변화도 이용된다. 본 실험에서는 미성숙 암컷 랙드를 이용하여 각 에스트로겐 양성대조물질인 E2와 칡 추출물을 용량 및 투여경로를 동일하게 하여 활성을 비교하였다. 태국산 칡 중 *Pueraria mirifica*는 자궁과 질의 무게를 각각 8.2 및 2.0배씩 유의적으로 증가시켜 강력한 에스트로겐 활성을 갖고 있는 것으로 나타났다. *Butea superba*의 경우도 자궁과 질의 무게를 증가시켰으나 *Pueraria mirifica*에 비해서

Table 1. Hershberger assay response to extracts of *Puerariae Radix* in SD castrated male rats by 10 days consecutive treatments

Groups	Age at castration (week)	Route of Injection	Initial BW (g)	Final BW (g)	Seminal vesicles ^a (mg)	Ventral prostate (mg)	LABC (mg)	Glans penis (mg)	Cowpers glands (mg)
Control	5	p.o.	248.4±9.8	303.1±13.2	34.0±7.2	9.5±3.3	156.2±18.6	34.5±6.2	2.8±1.2
Testosterone (0.8 mg/kg)	5	s.c.	247.5±7.5	315.3±8.2	189.5±37.7*	65.0±20.1*	339.0±41.5*	57.3±12.5*	19.2±3.9*
<i>Pueraria mirifica</i> (40 mg/kg)	5	p.o.	245.7±15.8	279.1±32.7	32.3±5.2	6.6±4.0	144.9±26.0	35.0±5.2	3.5±0.9
<i>Butea superba</i> (40 mg/kg)	5	p.o.	244.5±11.8	301.3±18.1	30.8±3.6	8.9±3.5	156.8±29.2	34.4±7.3	4.5±1.3
Testosterone + <i>Pueraria mirifica</i>	5	s.c. + p.o.	245.5±14.7	288.9±13.8	244.2±42.9*	71.6±15.7*	373.8±45.1*	57.4±8.4*	21.3±5.1*
Testosterone + <i>Butea superba</i>	5	s.c. + p.o.	249.5±10.7	312.7±14.4	216.8±35.8*	74.3±14.0*	350.7±78.2*	64.9±6.2*	18.2±4.6*

*Indicates significantly different from control group ($p < 0.01$).

^aSeminal vesicles were measured together with coagulating gland.

는 낮은 활성을 나타내었다. 국내산 칡의 경우는 대조군과 비교해서 유의적인 차이를 나타내지 않아 에스트로겐 활성이 거의 없는 것으로 관찰되었다. 안드로겐 및 항안드로겐 활성에 대한 *in vivo* 검색법으로는 Hershberger assay가 예전부터 실시되었다(Solo *et al.*, 1975). 최근에는 수컷의 생식기에 미치는 영향을 평가하기 위한 방법으로 이용되며, 특히 안드로겐 agonist 및 antagonist를 검색하는 방법으로 자주 응용되고 있다(Paris *et al.*, 1994). 본 실험에서는 고환을 제거한 수컷 랫드에 양성대조물질인 testosterone과 칡 추출물을 단독 또는 병용 투여한 결과, testosterone은 랫드의 생식부속장기의 무게를 유의적으로 증가시켰으나 칡 추출물은 국내산과 태국산 모두 유의적인 변화를 나타내지 않았다. 병용 투여 실험에서도 장기 무게의 증가 또는 감소 양상이 나타나지 않았다. 따라서 칡 추출물은 안드로겐/항안드로겐 활성을 갖지 않는 것으로 관찰되었다.

결론적으로 태국산 칡 중 *Pueraria mirifica*는 매우 높은 에스트로겐 활성을 갖고 있으며, 이러한 효과는 사람에 있어서 호르몬 계통에 위해성을 나타낼 수도 있다. *Pueraria mirifica*는 다른 콩과 식물에 비해 강한 에스트로겐 활성을 나타내는 miroestrol과 deoxymiroestrol을 많이 함유하고 있는 것으로 알려져 있으며, 본 연구에서 나타난 강력한 에스트로겐 활성도 이에 기인한 것으로 판단된다. 반면 국내산 칡의 경우는 에스트로겐 및 안드로겐 활성에 대하여 어떠한 영향도 미치지 않았다. 최근 기능성 식품에 칡 등 식물성 성분을 함유한 제품의 유통이 증가하는 만큼 각 성분에 대한 안전성 평가가 필요하다고 생각된다.

참고문헌

- Chansakaow, S., Ishikawa, T., Seki, H., Sekine, K., Okada, M. and Chaichantipyuth, C. (2000): Identification of deoxy miroestrol as the actual rejuvenating principle of "Kwao Keur", *Pueraria mirifica*. The known miroestrol may be an artifact. *J. Nat. Prod.*, **63**, 173-175.
- Chansakaow, S., Ishikawa, T., Sekine, K., Okada, M., Higuchi, Y., Kudo, M. and Chaichantipyuth, C. (2000): Isoflavonoides from *Pueraria mirifica* and their estrogenic activity. *Planta Med.*, **66**, 572-575.
- Chung, M.K., Lim, K.H., Kim, J.C., Kim, Y.H., Suh, J.E. and Ha, C.S. (2000): Uterotrophic activity of ethinyl estradiol by gavage and subcutaneous administration in immature female rats. *J. Toxicol. Pub. Health*, **16**, 201-209.
- Chung, M.K., Kim, J.C. and Suh, J.E. (2000): The antiandrogenic effects of di(*n*-butyl) phthalate in immature male rats: Establishment of Hershberger assay for endocrine disruptors. *J. Toxicol. Pub. Health*, **16**, 33-37.
- EPA. (1998): US Environmental Protection Agency 'Integrated risk information system' on-line.
- Hershberger, L., Shipley, E. and Meyer, R. (1953): Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **83**, 175-180.
- Hutchins, A.M., Slavin, J.L. and Lampe, J.W. (1995): Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. *J. Am. Diet. Assoc.*, **95**, 545-551.
- Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, D., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G. and Luster, M. (1996): Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Perspect.*, **104**[Suppl 4], 715-740.
- Kim, H.S., Han, S.Y., Han, S.K., Shin, J.H., Moon, H.J., Kim, S.H., Park, K.S., Kim, K.B., Lee, R.D., Jang, S.J. and Park, K.L. (2000): Evaluation of *in vitro* and *invivo* screening methods for estrogenic activity of endocrine disruptors. *J. Toxicol. Pub. Health*, **16**, 109-116.
- OECD. (1999): Validation management committee: Endocrine disruptors screening and testing, Agenda Item 5, Validation protocol for the uterotrophic assay.
- Paris, F., Weinbauer, G.F., Blum, V. and Nieschlag, E. (1994): The effect of androgens and antiandrogens on the immunohistochemical localization of the androgen receptor in accessory reproductive organs of male rats. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **48**, 129-137.
- Reel, J.R., Lamp, J.C. and Neal, B.H. (1996): Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **34**, 288-305.
- Setchell, K.D., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J. and Heubi, J.E. (1997): Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *Lancet*, **350**, 23-27.
- Solo, A.J., Bejba, N., Hebborn, P. and May, M. (1975): Synthesis and biological activity of some esters of testosterone. *J. Med. Chem.*, **18**, 165-168.