

## 미성숙 흰쥐에서 누에 번데기 및 한약재 혼합물의 여성호르몬 대체효과

양지원 · 최은미 · 권무길<sup>1</sup> · 구성자<sup>\*</sup>  
경희대학교 식품영양학과, <sup>1</sup>근화제약 중앙연구소

Sex-Hormone Replacement Effect of Silkworm Pupa and Mixture with Herbs

Ji-Won Yang, Eun-Mi Choi, Mu-Gil Kwon<sup>1</sup>, Sung-Ja Koo<sup>\*</sup>  
Department of Food Nutrition, Kyung Hee University, 130-701 Seoul, Korea  
<sup>1</sup>Kunwha Pharmaceutical Co., Ltd. 138-804, Korea

### Abstract

In this study we isolate substances to serve as dietary resources in order to replace the female hormone. Silkworm (*Bombyx mori*) is one of the most attractive hosts for large-scale production of eukaryotic proteins which have been proven safe as a dietary resource. We report on the estrogenicity of a mixture of silkworm pupa and herbs (Ginseng, Ulkeum, and Hasuo) using the immature rat uterotrophic assay *in vivo*. Silkworm pupa aqueousextract (KW) and silkworm oil extract (KO) induced effects on the immature rat uterotrophic assay. KO showed neither positive uterotrophic response nor inhibition on E2 induced effect, while KW and MK (mixture of KW and herbs) showed both of the effects. It is concluded that ethanol extracts from silkworm might be a good, therapeutic, natural product for hormone-deficient diseases.

Key words: Silkworm pupa, herb, immature rat uterotrophic assay

### 1. 서 론

에스트로젠은 표적 세포의 세포질 속에 있는 수용체와 결합하여 세포의 기능을 조절한다. 작용으로는 자궁의 발달, 자궁 내막 및 적체의 발달, 그 밖의 2차 성징의 촉진, 지방 합성의 증가, 간 기능과 골 대사로의 영향 등이 있다. 에스트로젠 수용체(Estrogen receptor; ER)는 steroid/thyroid hormone receptor super family의 일원으로서 전사를 직접 조절하는 target gene의 enhancer region에 존재하는 responsive element에 ligand의존적인 결합을 하여 그 작용을 매개한다(Tsai M과

O'Malley BW 1994). 에스트로젠은 세포 내 ER에 결합하여 gene 발현을 조절하고 이는 여러 표적 조직의 성장, 분화 및 기능에 영향을 준다. 에스트로젠이 ER에 결합할 때 수용체의 dimerization이 발생하고 이는 곧 estrogen-responsive element(ERE)에 결합한다. 결과적으로, ER-ERE complex는 progesterone receptor(PR)와 presenelin-2(pS2)와 같은 에스트로젠이 조절하는 target gene의 전사를 조절하고 결국 세포의 성장과 분화를 자극한다(Saegusa M과 Okayasu I 2000).

1995년까지 에스트로젠은 하나의 수용체(ER $\alpha$ )를 통해 작용한다고 생각했으나 이후 새로운 에스트로젠 수용체 subtype(ER $\beta$ )이 쥐 전립선으로부터 분리되었다(George GJM 등 1996). 이 두 수용체 subtype의 조직 분포는 서로 다르다. ER $\alpha$ 는 자궁에서 다량 발현되고, 고환, 뇌하수체, 난소, 신장, 부고환, 부신에서 소량 발현되는 반면, ER $\beta$ 는 전립선, 난소, 부신, 비장, 폐, 담

Corresponding author: Sung-Ja Koo, Dept. of Food and Nutrition, Kyung-hee University, 1, Hoegi-dong, Dongdaemun-gu, Seoul 130-701, Korea  
Tel: 82-2-961-0709  
Fax: 82-2-968-0260  
E-mail: sjkoo@khu.ac.kr

낭, 뇌, 고환, 유방, 뼈에서 많이 발현된다(Ruff M 등 2000). ER $\alpha$ 와 ER $\beta$  모두는 중추 신경계, 유방, 심 혈관계 및 뼈에 공존한다.

동의보감에 나와 있는 천연 자양 강장 식품인 누에 번데기는 한방에서는 잠용자(蠶踊子)라고 부르며 성질이 고르고 맛이 달며 독이 없으니 풍과 여윈 것을 다스린다고 하였다. 그리고 당뇨병이나 회충 없애는 약효도 있다는 것이 기재되어 있다. 누에 번데기의 생활사를 잠깐 살펴보면 다음과 같다. 누에는 완전 탈바꿈을 하는 곤충으로 그 1세대는 알, 유충, 번데기 및 나방의 네 시기를 경과하면 알로 월동한다. 누에는 5령이 되어서 7-8일 정도 뽕잎을 먹으면 가장 크게 자라서 뽕 먹기를 중지하고 토사하기 시작한다. 이때의 누에를 익은 누에라고 한다. 익은 누에는 2-3일 정도에 걸쳐서 누에고치를 짓고, 그 속에 들어가 번데기로 탈바꿈한 다음 번데기는 10-15일 정도 지나서 나방으로 탈바꿈하여 누에고치를 뚫고 나와서 교미 산란을 하고 그 1세대를 마친다.

누에 번데기는 고지혈증을 유발시킨 실험용 쥐에 누에 번데기에서 추출한 불포화 지방산을 먹인 결과 동맥 경화 지수를 30% 정도 감소시키는 효과를 얻었다고 밝혔다. 또 피부의 기름기를 제거해 피부 건조증을 유발시킨 뒤 불포화 지방산을 바른 결과 바르지 않은 것에 비해 피부 보습도가 50% 이상 향상되었다고 보고 된 바 있다. 그리고 수컷 누에 번데기의 성분에서 남성의 발기 촉진 성분의 하나로 알려진 cGMP의 합성을 촉진하는 단백질을 추출 분리해 그 구조를 구명하고 발기 촉진 활성을 강화하는 성분이라는 사실을 실험적으로 입증했다.

본 연구팀은 *in vitro*에서 에스트로젠 활성을 스크리닝한 결과 누에 추출물과 한약재인 인삼, 하수오, 울금은 효과가 우수함을 확인한 바가 있다 (Yang JW 등 2005). 이에 미성숙 ICR 마우스를 대상으로 하여 누에 번데기 수용성과 지용성 추출물 및 한약재를 혼합한 복합체를 경구 투여하여 에스트로젠 증식 관련 인자의 발현을 확인하고, 난소와 자궁의 무게를 측정하여 에스트로젠 활성 효과를 관찰하였다.

## II. 연구 내용 및 방법

### 1. 재료 및 시약

본 실험에 사용된 누에(Silkworms) 번데기는 근화제

약(대전, 한국)에서 제공받았고 인삼, 하수오, 및 울금은 건조된 것으로 경동시장에서 구입하였다. 표준물질로는 17 $\beta$ -estradiol(E2)(Sigma Chem. Co., USA)을 사용하였고, 추출용 에탄올은 Merck Co(Damstadt, Germany)의 제품을 사용하였다.

### 2. 시료의 추출

누에 번데기 추출물은 암·수 구별 없이 12~13일째 번데기를 1 kg을 채취하여 믹서기에 분쇄하고 80% 에탄올에 2시간 동안 1차 추출한 후 여과하여 Evaporator로 농축하였다. 그 다음 정제수로 80℃에서 500 mL씩 두 번 추출 후 여과한 후 얻은 기름 층은 누에 번데기 지용성 추출물이라 하였고 수용성 획분은 누에 번데기 수용성 추출물이라 명명하였으며 동결 건조하여 실험에 사용하였다. 인삼, 하수오, 울금은 잘 건조된 분말 0.2 kg씩을 80% 에탄올에 이틀 동안 실온에 방치한 후에 추출하여 여과하고 여액을 감압 농축한 후 동결 건조하여 시료로 사용하였다.

### 3. 동물 실험

실험동물은 ICR계의 3주령 암컷 마우스(Orient Co., Ltd, Korea)를 이용하여 실험하였다. 고형사료(삼양주식회사, 한국)와 물을 충분히 공급하면서 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험을 시작하였다. 실험실 온도는 24 $\pm$ 2℃였으며, 습도는 40~50%, 명암은 12시간 주기로 하였다(Kim JS 등 2002). *In vitro*에서 에스트로젠 활성이 가장 좋았던 누에 번데기 추출물과 여기에 인삼, 울금, 하수오를 첨가한 혼합물을 투여하였다. 투여량은 1인당 임상용량인 2 g의 약 3배인 100 mg/kg BW과 15배인 500 mg/kg BW으로 설정하였다(Han YO 2002). 동물의 군 분리는 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물의 체중을 측정한 후 군별 7마리씩 체중이 균등하게 분배되도록 순위화한 체중을 이용하여 무작위법으로 분배하였다. 실험기간 중 주 1회씩 체중을 측정하였다. 시료물질은 0.2% CMC(cellulose sodium salt)가 함유된 식염수에 녹여서 투여하였다. 투여경로는 경구투여로서 금속제 경구 투여용 존데를 이용하여 위내에 직접 주입하였으며, 1회/일, 7일/주로 하여 약 4주간 투여하였다. 누에 번데기 수용성 추출물 100 mg/kg, 500 mg/kg을 투여한 군을 각각 KW100, KW500이라 하고 누에 번데기 수용성 추출물과 울금, 인삼, 하

수오를 7:1:1:1의 비율로 혼합한 시료를 100 mg/kg, 500 mg/kg으로 투여한 군을 각각 MK100, MK500이라고 하였으며, 누에 번데기 지용성 추출물 100 mg/kg, 500 mg/kg을 투여한 군을 각각 KO100, KO500이라 하였다. 정상 대조군은 0.2% CMC가 함유된 saline을 동량 투여하였으며, 양성대조군은 25일째 17 $\beta$ -estradiol 0.7 mg/kg을 복강 투여하였다.

#### 4. 동물과 조직의 무게 측정

실험동물을 실험 전 24시간 절식시킨 후, ether로 마취시켜 심장에서 전혈을 채취 후 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하고 간과 자궁, 난소를 적출하여 무게를 재었다.

#### 5. 혈중 AST(aspirate aminotransferase), ALT(alanine aminotransferase) 및 Creatinine 측정

실험동물에서 채취한 전혈을 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 serum을 획득하였고 AST, ALT, 및 creatinine은 영동제약의 측정 kit를 사용하여 측정하였다.

#### 6. 단백질 분리

단백질을 추출하기 위하여 균질기로 간 조직을 분쇄한 후 lysis buffer를 첨가하여 얼음에서 30분 방치한 후 4℃에서 10,000×g에서 10분간 원심분리 후 상등액을 취했다. 그리고 Bradford 방법(Bradford TM과 Marion M 1976)을 사용하여 단백질을 정량하였다.

#### 7. Western blot assay

단백질 시료는 10% SDS-PAGE gel에 lane당 15  $\mu$ L씩 loading하여 200V, 25mA에서 60분간 전기영동하였다. 전기 영동 후 분리된 단백질을 Hybond ECL nitrocellulose membrane으로 전이하기 위해 Hofer TE70 Semi-Dry Transfer Unit(Pharmacia, Bucks, UK)을 이용하여 32V, 285mA로 60분간 blotting한 후 단백질이 전이된 membrane을 TTBS(0.1% Tween20가 함유된 Tris buffered saline) buffer로 세척한 다음, 10% skim milk/TTBS에서 하루를 blocking시켰다. 1차 항체(ER $\alpha$ , ER $\beta$ : Santa Cruz Biotech, Inc, USA)를 1% gelatin을 함유한 TTBS에 1:2,000 농도로 희석하여 4℃에서 반응시

킨 후 membrane을 TTBS로 세척하고 1:5,000배로 희석한 2차 항체(goat anti-rabbit IgG-peroxidase: Santa Cruz Biotech, Inc, USA)와 실온에서 2시간 반응시켜 ECL법으로 발색하고 x-ray film에 감광하였다.

#### 8. 통계분석

모든 실험 결과의 통계처리는 SAS 통계 프로그램을 이용하여 분석하였으며, 그 결과는 평균값과 표준오차로 표시하여 유의성을 ANOVA로 검증하였고 이후 Duncan's multiple range test를 수행하였다( $p < 0.05$ ).

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 미성숙 흰쥐에서의 체중 및 난소와 자궁의 무게 측정

미성숙 흰쥐에서 시료의 에스트로젠 활성을 연구한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같다. 집단간에 몸무게의 변화는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 실험군의 자궁의 무게는 정상대조군에 비해 KW500을 제외하고는 모두 유의적인 차이를 보였다. 몸무게에 대한 자궁의 비율도 정상대조군에 비해 KW500을 제외하고는 모두 유의적 차이를 나타내었다. 자궁무게/몸무게의 비율(%)은 E2군은 0.6527%로 가장 높은 비율로 나타났고 누에 번데기 수용성 추출물 100 mg/kg 섭취군(KW100)과 500 mg/kg 섭취군(KW500)은 각각 0.4849%, 0.3385%이었고, 한약재(인삼 10%, 하수오 10%, 울금 10%)가 첨가된 누에 번데기 수용성 추출물(70%) 100 mg/kg 섭취군(MK100)과 500 mg/kg 섭취군(MK500)은 각각 0.4435%, 0.4157%의 비율을 보였으며, 누에 번데기 지용성 추출물 100 mg/kg 섭취군(KO100)과 500 mg/kg 섭취군(KO500)은 각각 0.3874%, 0.4903%의 비율로 나타났다. 난소 무게/몸무게의 비율(%)은 정상대조군과 비교하여 MK100과 MK500은 유의적 변화를 보이지 않았다. E2는 0.0787%, KW100은 0.0733%, KW500은 0.0682%, KO100과 KO500은 각각 0.682%와 0.675%의 비율을 나타내었다.

Yamasaki K 등 (2002)은 genistein을 섭취한 rat의 경우 대조군에 비해 유의적으로 난소 무게가 높게 나타났고 자궁무게는 변화가 없다고 보고하였으며 Tiep NB(2003)은 상백피 추출물 투여군이 자궁무게/체중 비율이 대조군에 비해 증가했다고 보고하였다. 본 실험

에서는 체중에 대한 자궁무게의 비율은 대조군에 비해 KW500을 제외하고는 모두 유의적 차이를 나타내었으며 E2는 0.0787%, KW100은 0.0733%, KW500은 0.0682%, KO100과 KO500은 각각 0.682%와 0.675%의 비율을 나타내었다. 체중에 대한 자궁과 난소 무게의 비율이 정상대조군에 비해 증가한 것으로 보아 누에 번데기 수용성 추출물과 한약재를 첨가한 누에 번데기 수용성 추출물은 모두 에스트로젠 효과가 나타나는 것으로 사료된다.

## 2. 혈청 내 AST, ALT 활성과 creatinine level

에스트로젠 효과를 가진 시료들이 간 장애에 미치는 영향은 Table 2와 같다. 정상대조군의 AST 활성은  $0.182 \pm 0.028$  unit/mg이었으며, 약물대조군은  $0.175 \pm 0.017$  unit/mg, KW100군은  $0.183 \pm 0.012$  unit/mg, KW500군은  $0.201 \pm 0.073$  unit/mg, MK100군은  $0.216 \pm 0.009$  unit/mg, MK500군은  $0.232 \pm 0.002$  unit/mg이었고 KO100군과 KO500군은 각각  $0.266 \pm 0.071$  unit/mg,  $0.282 \pm 0.036$  unit/mg으로 나타났다. AST 활성을 정상대조군에 대한 %로 나타내었을 때 약물대조군은 96%, KW100, KW500, MK 100, MK500, KO100, KO 500 군은 각각 100.6, 110.2, 118.5, 127.33, 145.8, 154.7%의 값을 나타내었으나 통계적으로 군 간의 차이는 없었다. 한편 ALT 활

**Table 2. Serum AST activity, ALT activity and creatinine level in immature mouse.**

	AST (unit/mg)	ALT (unit/mg)	Creatinine (mg/dL)
Control	$0.182 \pm 0.028^a$	$0.078 \pm 0.032^a$	$0.408 \pm 0.015^a$
E2	$0.175 \pm 0.017^a$	$0.062 \pm 0.013^a$	$0.306 \pm 0.050^a$
KW100	$0.183 \pm 0.012^a$	$0.082 \pm 0.026^a$	$0.335 \pm 0.029^a$
KW500	$0.201 \pm 0.073^a$	$0.093 \pm 0.045^a$	$0.364 \pm 0.039^a$
MK100	$0.216 \pm 0.009^a$	$0.069 \pm 0.004^a$	$0.408 \pm 0.073^a$
MK500	$0.232 \pm 0.002^a$	$0.082 \pm 0.025^a$	$0.393 \pm 0.025^a$
KO100	$0.266 \pm 0.071^a$	$0.100 \pm 0.002^a$	$0.364 \pm 0.064^a$
KO500	$0.282 \pm 0.036^a$	$0.104 \pm 0.017^a$	$0.451 \pm 0.039^a$

Results are mean $\pm$ SE (n=7).

Control : animals not treated with sample.

E2 : animals treated with  $17\beta$ -estradiol (0.7 mg/kg)

KW100: animals treated with silkworm aqueous extract (100 mg/kg)

KW500: animals treated with silkworm aqueous extract (500 mg/kg)

MK100: animals treated with 100 mg/kg mixture of silkworm aqueous extract, ginseng, *Polygonum multiflorum* Thunb and *Curcuma longa* L (7:1:1:1)

MK500: animals treated with 500 mg/kg mixture of silkworm aqueous extract, ginseng, *Polygonum multiflorum* Thunb and *Curcuma longa* L (7:1:1:1)

KO100 : animals treated with silkworm fat soluble extract (100 mg/kg)

KO500 : animals treated with silkworm fat soluble extract (500 mg/kg).

Groups with different letters in the same column are significantly different from each other by analysis of variance ( $p < 0.05$ ).

**Table 1. Immature mouse uterotrophic assay**

	BW (g)	Uterus wet weight(mg)	Uterus/BW ratio	Ovary wet weight (mg)	Ovary/BW ratio
Control	$25.26 \pm 0.51^a$	$87.60 \pm 2.11^b$	$0.3469 \pm 0.0102^f$	$17.78 \pm 0.01^{de}$	$0.0704 \pm 0.0007^{cd}$
E2	$25.38 \pm 0.60^a$	$165.65 \pm 0.76^a$	$0.6527 \pm 0.0036^a$	$19.96 \pm 0.01^a$	$0.0787 \pm 0.0008^b$
KW100	$25.32 \pm 1.07^a$	$122.79 \pm 0.22^c$	$0.4849 \pm 0.0013^b$	$18.55 \pm 0.14^c$	$0.0733 \pm 0.0007^b$
KW500	$25.80 \pm 0.93^a$	$87.33 \pm 0.22^b$	$0.3385 \pm 0.0012^f$	$17.61 \pm 0.19^e$	$0.0682 \pm 0.0010^c$
MK100	$26.50 \pm 0.92^a$	$117.53 \pm 0.10^d$	$0.4435 \pm 0.0005^c$	$18.27 \pm 0.13^c$	$0.0682 \pm 0.0007^{de}$
MK500	$25.75 \pm 0.43^a$	$107.04 \pm 0.31^e$	$0.4157 \pm 0.0016^d$	$18.32 \pm 0.09^c$	$0.0711 \pm 0.0005^c$
KO100	$26.56 \pm 1.34^a$	$102.90 \pm 0.17^f$	$0.3874 \pm 0.0009^c$	$18.11 \pm 0.14^{cd}$	$0.0682 \pm 0.0006^c$
KO500	$28.15 \pm 1.43^a$	$138.03 \pm 0.40^b$	$0.4903 \pm 0.0018^b$	$19.00 \pm 0.08^b$	$0.0675 \pm 0.0004^c$

Results are mean $\pm$ SE (n=7). BW: body weight

Control : animals not treated with sample

E2 : animals treated with  $17\beta$ -estradiol (0.7 mg/kg)

KW100: animals treated with silkworm aqueous extract (100 mg/kg)

KW500: animals treated with silkworm aqueous extract (500 mg/kg)

MK100: animals treated with 100 mg/kg mixture of silkworm aqueous extract, ginseng, *Polygonum multiflorum* Thunb and *Curcuma longa* L (7:1:1:1)

MK500: animals treated with 500 mg/kg mixture of silkworm aqueous extract, ginseng, *Polygonum multiflorum* Thunb and *Curcuma longa* L (7:1:1:1)

KO100 : animals treated with silkworm fat soluble extract 100 mg/kg

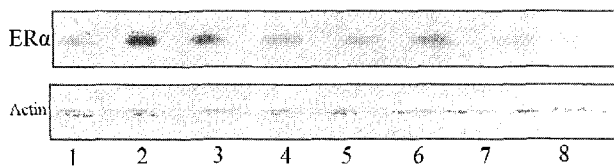
KO500 : animals treated with silkworm fat soluble extract 500 mg/kg

Groups with different letters in the same column are significantly different from each other by analysis of variance ( $p < 0.05$ ).

성은 정상 대조군의 경우  $0.078 \pm 0.032$  unit/mg, 약물 대조군은  $0.062 \pm 0.013$  unit/mg, KW100 섭취군은  $0.082 \pm 0.026$  unit/mg, KW500 섭취군은  $0.093 \pm 0.045$  unit/mg, MK100 섭취군은  $0.069 \pm 0.004$  unit/mg, MK500 섭취군은  $0.082 \pm 0.025$  unit/mg, KO100 섭취군은  $0.100 \pm 0.002$  unit/mg, KO500 섭취군은  $0.104 \pm 0.017$  unit/mg이었다. ALT 활성을 정상대조군에 대한 %로 나타내었을 때 약물대조군이 79%, MK100은 88.1%, 나머지 KW100, KW500, MK500, KO100, KO500은 각각 104.8, 119.0, 105.7, 122.5, 133.3%였으나 역시 정상대조군과 비교하여 유의적 차이를 보이지 않았다.

에스트로젠의 효과를 가진 시료들이 신장 장애에 미치는 영향을 알아본 결과, 정상대조군의 creatinine 농도는  $0.408 \pm 0.015$  mg/dL, 약물대조 섭취군은  $0.306 \pm 0.050$  mg/dL, KW100 섭취군은  $0.335 \pm 0.029$  mg/dL, KW500 섭취군은  $0.364 \pm 0.039$  mg/dL, MK100 섭취군은  $0.408 \pm 0.073$ , MK500 섭취군은  $0.393 \pm 0.025$ , KO100 섭취군은  $0.364 \pm 0.064$ , KO500 섭취군은  $0.451 \pm 0.039$  mg/dL이었다.

#### A. Western Blotting



#### B. Densitometer Analysis

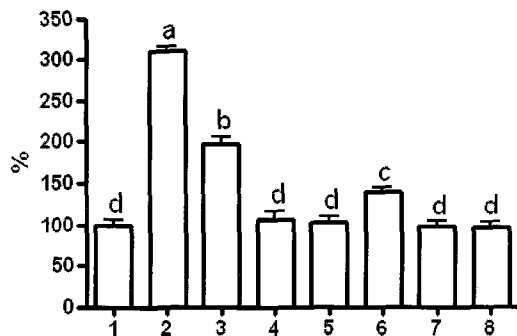


Fig. 1. Expression of estrogen receptor  $\alpha$  in the liver tissue of immature mouse.

A. SDS-PAGE and Western blot assay with ER $\alpha$  specific antibodies. (1) Control, (2) E2, (3) KW100, (4) KW500, (5) MK100, (6) MK500, (7) KO100, (8) KO500

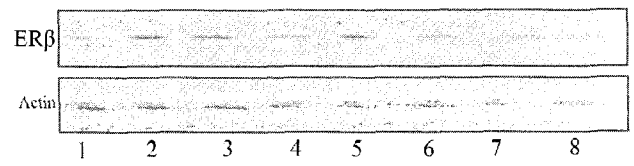
B. The signal intensity from experiment A was quantified and the integrated area were percentaged to the signal observed in control tissues (100%). Results are mean  $\pm$  SE (n=7). Bars without a common letter differ,  $p < 0.05$ .

dL이었다. 정상 대조군의 creatinine 농도를 100%로 환산하면 약물대조군이 75%로 가장 낮은 활성치를 보였다. KW100, KW500, MK 100, MK500, KO100, KO 500 군은 각각 82.1, 89.3, 100, 96.4, 89.3, 110.7%였다. 모든 실험군은 정상대조군에 비해 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 이에 본 실험에서 AST와 ALT의 활성 및 creatinine 농도가 군 간에 유의적인 차이가 없는 것으로 보아 모든 시료들이 간과 신장에 독성이 없는 것으로 사료되었다.

### 3. 누에 번데기 추출물에 의한 estrogen 수용체 발현

에스트로젠 수용체(ER)  $\alpha$  발현은 Fig. 1의 A에 나타난 바와 같다. ER $\alpha$ 의 발현을 densitometer로 수치화하고 정상대조군을 기준으로 발현의 증가와 억제를 백분율로 표시하여 Fig. 1의 B에 나타내었다. 0.7 mg/kg 농도의 E2 투여에 의한 ER $\alpha$ 의 발현은 대조군( $100 \pm 5.8\%$ )에 비해  $311 \pm 5.2\%$ 로 증가되었고, KW100(100 mg/kg) 투여에 의해  $197 \pm 8.7\%$ , MK500(500 mg/kg) 투여에 의해

#### A. Western Blotting



#### B. Densitometer Analysis

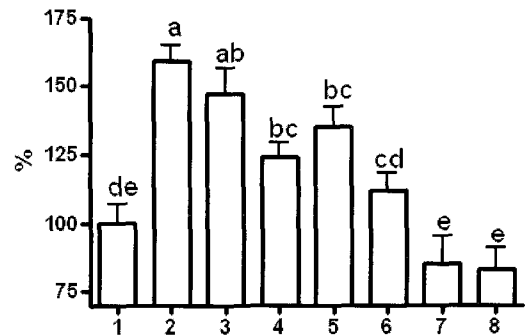


Fig. 2. Expression of estrogen receptor  $\beta$  in the liver tissue of immature mouse.

A. SDS-PAGE and Western blot assay with ER $\beta$  specific antibodies. (1) Control, (2) E2, (3) KW100, (4) KW500, (5) MK100, (6) MK500, (7) KO100, (8) KO500

B. The signal intensity from experiment A was quantified and the integrated area were percentaged to the signal observed in control tissues (100%). Results are mean  $\pm$  SE (n=7). Bars without a common letter differ,  $p < 0.05$ .

139±6.4%로 증가되었으며 나머지 군은 유의한 차이가 없었다. 이와 같이 KW100과 MK500군은 대조군에 비해 유의적인 증가를 나타내었으나 KO는 ERα의 발현에 영향을 주지 못하였다.

에스트로젠 수용체(ER) β 발현은 Fig. 2의 A에 나타난 바와 같다. ERβ의 발현을 densitometer로 수치화하고 정상 대조군을 기준으로 발현의 증가와 억제를 백분율로 표시하여 Fig. 2의 B에 나타내었다. 0.7 mg/kg 농도의 E2 투여에 의한 ERβ의 발현은 대조군(100±6.9%)에 비해 159±5.8%로 증가되었으나 ERα 발현 증가에 비해 그 정도가 약하였다. KW100(100 mg/kg) 및 KW500(500 mg/kg) 투여에 의해 각각 147±9.2%, 124±5.2%, MK100(100 mg/kg) 투여에 의해 135±7.5%로 유의하게 증가되었으나, MK500(500 mg/kg), KO100(100 mg/kg) 및 KO500(500 mg/kg) 투여에 의한 변화는 없었다. 약콩 및 대두 처리에 의한 조골세포주의 *in vitro* 에스트로젠 수용체 발현을 관찰한 Cho Y(2002)의 실험결과에서 ERα는 대두 추출물 0.001 mg/mL 투여시 500% 증가하였고 ERβ는 대두 추출물 0.1 mg/mL에서 200%로 가장 높은 발현을 보였다.

본 연구 결과 ERα와 ERβ의 수용체 발현은 누에번데기 수용성 추출물을 100 mg/kg 투여한 군(KW100)에서 유의적인 증가 효과를 나타내었고 단위 체중 당 자궁과 난소의 무게도 증가되었다. 따라서 누에번데기 수용성 추출물은 다른 한약재(하수오, 인삼, 울금)와 복합하여 사용하는 것보다 단독으로 저농도(100 mg/kg) 섭취하였을 때가 더 높은 에스트로젠 활성을 나타낸다는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과에서 볼 수 있듯이, 누에 번데기 수용성 추출물 및 한약재(인삼, 하수오, 울금)를 첨가한 누에 번데기 수용성 추출물이 높은 에스트로젠 활성을 가지고 있는 것으로 사료되어, 차후 본 연구에서 사용된 시료들을 대상으로 성호르몬과 관련된 질병을 예방할 수 있는 기능성 식품 개발이 가능할 것으로 보인다.

#### IV. 요 약

미성숙 흰쥐에서 누에 번데기 수용성과 지용성 추출물 및 한약재가 첨가된 누에 번데기 수용성 추출물을 투여하여 에스트로젠 증식 관련 인자의 발현을 확인한 결과는 다음과 같다. 미성숙 흰쥐에서 누에 번데기 수

용성 추출물(KW), 누에 번데기 지용성 추출물(KO) 및 KW에 하수오, 인삼, 울금을 7:1:1의 비율로 첨가한 복합체(MK)를 각각 100 mg/kg와 500 mg/kg의 농도로 30일간 경구투여한 결과 체중은 유의적인 변화를 나타내지 않았다. 체중에 대한 자궁의 무게는 정상 대조군에 대하여 실험군에서 KW500을 제외하고는 모두 유의적인 증가를 나타내었으며 KO500, KW100, MK100 순으로 각각 0.49%, 0.48%, 0.44%의 높은 값을 나타내었다. 체중에 대한 난소의 무게는 정상 대조군에 대해 MK군을 제외하고 모두 유의적인 변화를 보였으며 KW100군이 가장 높은 값을 나타내었다. 미성숙 흰쥐의 혈청 내 AST와 ALT 활성 및 creatinine 농도는 모두 군 간에 유의적인 변화는 보이지 않았다. 즉 모든 시료가 간과 신장에 독성을 나타내지 않은 결과이다. ERα와 ERβ의 발현을 densitometer로 수치화하여 정상 대조군을 기준으로 발현의 증가와 억제를 백분율로 표시한 결과 KW100(100 mg/kg)와 MK500(500 mg/kg) 군이 ERα의 발현을 유의적으로 증가시켰으며 KW100(100 mg/kg), KW500(500 mg/kg), 및 MK100(100 mg/kg) 군이 ERβ의 발현을 유의적으로 증가시켰다. 따라서 누에 번데기 수용성 추출물 및 한약재(인삼, 하수오, 울금)를 첨가한 누에 번데기 수용성 추출물이 생체에서 높은 에스트로젠 활성을 가지고 있는 것으로 사료된다.

#### 감사의 글

이 논문은 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(R08-2004-000-10006-0).

#### 참고문헌

- Bradford TM, Marion M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72 : 248-254
- Cho Y. 2002. Black bean extracts a prominent estrogenic effect on the proliferation of human MG-63 osteoblastic cells. Master's degree, Kyung Hee University.
- George GJM, Kuiper EVAE, Markku PH, Stefan N, Jan-ke G. 1996. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 :

5925-5930

- Han YO. 2002. Decreasing effects of Kakkalide from the flowers of *pueraria thunbergiana*, on blood alcohol concentration and partial purification of xylosidase from *bifidobacterium breve* K-110. M.S. Thesis University of Kyung Hee.
- Kim JS, Park HJ, Cho HS, Park JS, Hong EK. 2002. Effect of plant extract (FGF271) on estrogen replacement. Korean J Biotechnol Bioeng 17(4) : 409-415
- Ruff M, Gangloff M, Wurtz JM, Moras D. 2000. Estrogen receptor transcription and transactivation: Structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors. Breast Cancer Res 2 : 353-359
- Saegusa M, Okayasu I. 2000. Changes in expression of estrogen receptors alpha and beta in relation to progesterone receptor and pS2 status in normal and malignant endometrium. Jpn J Cancer Res 91(5) : 510-518
- Tiep NB. 2003. Estrogenic activity of ethanol extracts from *Cudrania tricuspidata* and *Cortex mori* using in vitro and in vivo assays. Master's degree, Seoul National University.
- Tsai M, O'Malley BW. 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. Annual Review of Biochemistry 63 : 451-486
- Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Takaharu W, Takatsuki M. 2002. Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given diets of different phytoestrogen content and the ovarian changes with ICI 182,780. Arch Toxicol 76 : 613-620
- Yang JW, Choi EM, Kwon MK, Koo SJ. 2005. *In vitro* estrogenic activity of silkworm (*Bombyx mori*) pupa and herbs. J East Asian Soc Dietary Life 15(3) : 315-322

---

(2005년 7월 19일 접수, 2005년 11월 7일 채택)