

난소 절제술을 실시한 암컷 쥐에서 석류 단일과 석류 복합 시료의 갱년기 증상 개선 효과

이용혁 · 현선희 · 정세영[#]

경희대학교 약학대학

(Received February 27, 2006; Revised May 1, 2006)

Effect of Singled and Mixed Pomegranate on Postmenopausal Symptoms in Ovariectomized Rats

Yong Hyuk Lee, Sun Hee Hyun and Se Young Choung[#]

Department of Hygienic Chemistry, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Abstract — Women's aging made a functional decline at ovary. This functional problem causes estrogen deficiency and many disorders, such as, sexual dysfunction, obesity, osteoporosis, urinary incontinence, skin and all body's aging, etc. We determined the ameliorative effects of some herbal extracts mixture on postmenopausal symptoms in ovariectomized Sprague Dawley rats. Nine-weeks-old female rats were ovariectomized and treated with singled pomegranate extracts (0.40, 1.20 g/kg/day) and mixed pomegranate extracts (1.08, 3.24 g/kg/day) for 8 weeks. Oral administration of pomegranate extracts for 8 weeks were increased serum estradiol level and improved the serum osteocalcin, ALP activity and bone specific ALP level. And pomegranate extracts were reduced body weight, adipose tissue. Uterus weight in treated group tended to improve. In addition, the concentration of triglyceride and total cholesterol were lower after 8 weeks. HDL-cholesterol levels improved with dose-dependency in treated groups. Collagen level on skin and cartilage showed a slight increase at treatment for 8 weeks. These results showed that both of singular extract treatments and extracts mixture treatments were effective on general postmenopausal symptoms at ovariectomized rats, and especially, the mixture treatments were more effective than singular treatment. In conclusion, these herbal extracts' mixture showed improvement effect in general factors related with postmenopausal disorders.

Keywords □ ovary, pomegranate extracts, postmenopausal symptoms, collagen

갱년기(perimenopause)는 점진적으로 난소의 기능이 소실되어 가는 시기 즉, 폐경 전후 3~4년 간을 말한다.¹⁾ 남성의 경우와 달리, 여성의 폐경은 성호르몬인 estrogen의 분비 감소에 의해 나타나는데, 이는 estrogen의 공급원이 되는 난포의 수가 이미 태생기에 결정이 되고 출생 후 새로운 난포의 생성은 없기 때문이다.²⁾

폐경 후 estrogen의 생성 장소는 난소의 기질(stroma), 부신, 피하지방이며, androstendione의 방향화에 의하여 estrone으로 전환된다. Estrone은 estradiol보다 역가가 떨어지며 폐경 전에는 estradiol과 estrone의 비율이 1:1이지만 폐경 후에는 1:3으로 증가하므로 폐경기에는 생리적으로 필요한 수준 이하의

estrogen이 분비되게 된다. 이러한 estrogen의 분비 감소는 안면 홍조, 생식기 위축, 배뇨 장애, 골다공증, 지질 대사 이상, 우울증, 불면, 성 기능 장애, 피부의 노화 등 여러 증상을 일으키는데, 이러한 증상을 갱년기 증후군이라고 한다.¹⁾

현재 갱년기 장애 개선 및 치료를 위하여 많은 약물 요법들이 개발되고 있으며, 호르몬 대체 요법(hormone replacement therapy)이 많이 사용되고 있다. 이러한 호르몬 대체 요법은 갱년기 여성에게 일어나는 열성 홍조, 질위축, 비뇨기위축 등의 신체적 증상의 치료, 갱년기로 인한 심리적 증상의 개선, 골다공증 예방, 콜레스테롤의 대사에 관여하여 심혈관 질환의 예방 등의 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 그러나, 이러한 대체 요법은 과량의 에스트로젠으로 인하여, 자궁내막암, 심장질환을 비롯하여, 유방암의 발생 빈도를 증가시키는 것으로 알려져 있다.³⁾

삶의 질을 개선하기 위한 노력으로 갱년기 여성이 호르몬 대체 요법에 대한 관심이 높아지고는 있으나, 자궁내막암과 유방

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-961-0372 (팩스) 02-961-0372
(E-mail) sychoung@khu.ac.kr

암, 심장 질환 등의 위험성으로 인하여 안전하고 효율적인 호르몬 대체 요법이 요구되고 있다. 그래서 최근 식물성 estrogen에 대한 관심이 높아지고 있는 실정이다.

현재 식물성 estrogen 중 가장 많이 연구된 것으로 isoflavone 이 있으며, 이러한 isoflavone의 성분들은 어떤 조직에서는 proestrogenic response를 나타내며, 또 다른 조직에서는 반대로 estrogenic effect를 저해한다.⁴⁾ 이러한 isoflavone의 섭취와 관련된 역학 조사에서 대두 식품을 많이 섭취하는 아시아인이 서구인보다 갱년기 증상이 약하게 나타나는 것으로 보고되고 있다.⁵⁾ 또한, isoflavone의 섭취에 의해 estrogen의 전구 물질인, testosterone의 수치가 증가했다는 보고도 있다.⁶⁾

이미 항산화 능력과 지질 과산화를 저해하여 동맥 경화를 예방하고, COX(cyclooxygenase) 저해하는 등의 효능을 가진 것으로 알려진 석류는, 최근 씨에 17 mg/kg의 estrogen을 포함하고 있는 것으로 밝혀졌으며, estrogenic compound가 과실의 다양한 부위에 내제되어 있음이 알려지고 있다. 석류 농축액에서 daidzein을 비롯하여, quercetin, catechin, genistein, 2,3-di-MeO-estradiol 등 6종의 식물성 estrogen이 발견되었으며, 콩과 껍질에서는 검출되지 않은 17 β -estradiol이 0.15 ppm이 검출되었다.⁷⁾ 또한, campesterol을 비롯하여 17 β -estradiol과 testosterone이 석류 씨 기름에서 발견되었다.⁸⁾

Junko 등은 석류가 갱년기로 인해서 일어나는 골 소실에 있어, 개선 효과를 나타내었다고 보고하였다.⁹⁾ 하지만, 항진균 효과 및 항산화 효과에 대한 연구를 제외하고 석류를 이용한 갱년기 증상에 대한 전반적인 효과에 대한 연구는 국내외적으로 거의 발표가 전무한 상황이다.

본 연구에서는 최근 갱년기 증상 개선이라는 효능 여부가 의심되고 있는 석류 추출물의 효능을 동물 시험을 통하여 확인함과 동시에, 석류 농축액의 단일 성분과 석류 농축액을 주성분으로 하는 생약 제제를 첨가한 복합물의 개선 효과를 비교하고자 하였다.

실험 재료 및 방법

실험 동물

8주령 암컷 Sprague-Dawley Rat(180~200 g) 30마리를 (주)오리엔트(Seoul, Korea)에서 공급 받았다. 1주일간의 적응 기간을 가진 후, 시험 시료 별로 군당 5마리씩 난괴법으로 나누어 가장 수술 및 난소절제술을 실시하였고, 다시 1주일간의 회복 기간을 가진 후, 8주에 걸쳐 시료를 매일 경구 투여하였다. 각 시험군은 다음과 같다.

- SHAM: 가장 수술 실시 및 saline 투여군
- OVX: 난소절제술 실시 및 saline 투여군

- EO-L: 난소절제술 실시 및 석류 단독 시료의 0.40 g/kg/day 투여군
- EO-H: 난소절제술 실시 및 석류 단독 시료의 1.20 g/kg/day 투여군
- EA-L: 난소절제술 실시 및 석류 복합 시료의 1.08 g/kg/day 투여군
- EA-H: 난소절제술 실시 및 석류 복합 시료의 3.24 g/kg/day 투여군

실험 시료

시료는 다음과 같이 투여하였다.

석류 단독 투여(EO)군:

석류 농축액 (65Brix 100%, NARIRAN Co., Iran)37.13%

석류 복합 투여(EA)군:

석류 농축액 (65Brix 100%, NARIRAN Co., Iran)37.13%

비타민 C 1.86%

가시오가피 (고형분 3% 이상, 북한산) 22.28%

산수유 (고형분 3% 이상, 국내산) 5.53%

당귀 (고형분 3% 이상, 국내산) 5.53%

백작약 (고형분 3% 이상, 국내산) 11.08%

홍화씨 (고형분 3% 이상, 국내산) 5.53%

두충 (고형분 3% 이상, 국내산) 5.53%

진피 (고형분 3% 이상, 국내산) 5.53%

체중 측정 및 혈청의 채취

주 2회 체중의 변화를 조사하였으며, 측정 전 몸무게와 비교하여 체중 증가량을 계산하였다. 8주간의 시험기간이 종료된 동물을 16시간 절식시킨 후, diethyl ether로 마취시켜 개복한 후 심장에서 혈액을 채취하였다. 채취된 혈액은 3,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리하였고, 분리한 혈청은 생화학 분석 전까지 -70°C 냉동고에 보관하였다.

지방 조직 및 자궁, 방광의 적출

혈액을 채취한 후, 복부, 내장, 자궁 지방조직을 적출하여 무게를 측정하였으며 자궁과 방광을 조직이 상하지 않게 조심스럽게 적출하여 무게를 측정하였다.

17 β -estradiol의 혈 중 함량

혈 중 estradiol은 estradiol enzyme immunoassay test kit (BioCheck Inc., USA)로 ELISA reader를 이용하여 650 nm에서 흡광도를 측정하였다.

경골과 대퇴골의 골밀도 측정

경골과 대퇴골의 골밀도 측정은 DEXA(dual energy X-ray

absorptiometer, Lunar Radiation, Madison, WI, USA)를 이용하여 측정하였다.

혈 중 osteocalcin, BSALP(bone specific alkaline phosphase) 함량과 ALP(alkaline phosphatase) activity 측정

혈 중 osteocalcin은 ELISA kit(Biomedical Technologies Inc., USA)를 이용하여 450 nm에서, BSALP는 ELISA kit(Immunodiagnostic Systems Limited Ltd., England)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. ALP activity는 효소를 이용한 분석 kit(Asan Diagnostics, Seoul, Korea)로 비색 정량하였다.

뇨 중 DPD(urinary deoxypyridinoline) 함량

뇨 중 DPD(urinary deoxypyridinoline)의 함량을 competitive enzyme immunoassay법으로 Pylinks-D kit(Metra Biosystem, USA)를 사용한 후 뇨 중 크레아티닌 수치로 보정하였다(nmol/mmol Cr).

혈 중 lipid profiles 측정

혈 중 total cholesterol(TC), high density lipoprotein-cholesterol(HDL-C), triglyceride(TG)는 효소를 이용한 분석 kit(Asan Diagnostics, Korea)로 비색 정량하였다.

피부와 연골 중의 hydroxyproline양 측정

조직을 homogenize한 후, 10% homogenized 수용액을 만들었다. 12 N HCl에 heating block에서 16시간 동안 105°C에서 분해시켰다. 샘플과 표준액에 chloramines T 용액을 가한 후, 10분간 실온 방치 후 Ehrlich 시약을 넣고 50°C에서 90분간 반응시켰다. 상온에서 식힌 후, 560 nm에서 collagen의 잔류물인 hydroxyproline을 Jamall법으로 비색 정량하였다.⁵⁾

통계 처리

각 실험군의 측정값은 평균±표준편차로 표현하였다. 그룹간의 통계적 유의성은 SAS package를 이용하여 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan의 다중비교법에 의해 분석하였다.

결 과

체중, 지방 조직, 자궁 및 방광 측정

동일한 식이로 같은 양의 식이를 공급하면서 8주 동안 시료를 투여한 후, 체중을 측정 결과, 정상 대조군(SHAM)이 실험 전 203.7 ± 12.1 에서 8주 후 289.6 ± 6.2 로 약 85.9 g 증가하였으며, 수술 후 대조군(OVX)은 실험 전 211.2 ± 11.2 에서 351.2 ± 63.2 로 약 140 g 증가하여 SHAM군이 OVX군보다 61.36% 감소하였으

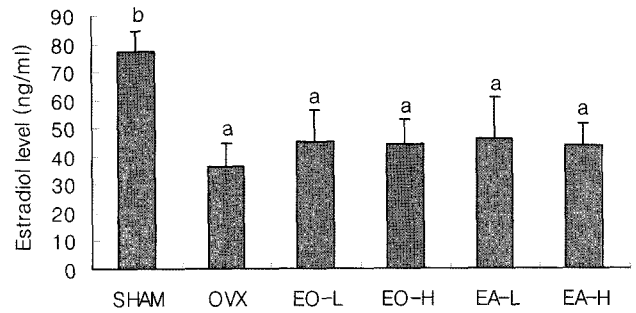
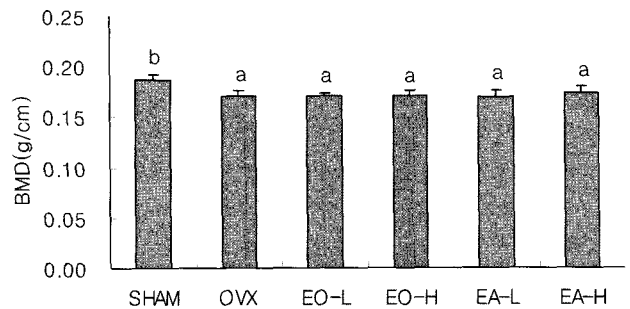
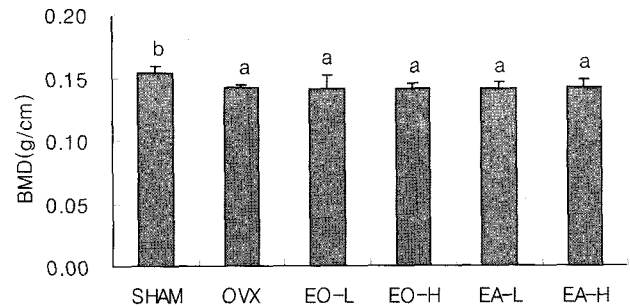


Fig. 1 - Serum estradiol levels after 8-week treatment. Values are mean±SD, n=5. Different letters in the same parameter indicate significant difference ($P < 0.05$) between groups by Duncan's multiple range test.



(a) Bone mineral density(BMD) of Femur



(b) Bone mineral density(BMD) of Tibia

Fig. 2 - Bone mineral density after 8-week treatment. Values are mean±SD, n=5. Different letters in the same parameter indicate significant difference ($P < 0.05$) between groups by Duncan's multiple range test.

며 통계적 유의성($P < 0.05$)을 나타냈다. OVX군에 비하여, 석류 단독 및 복합 투여군 모두 통계적 유의성을 보이지 않았으나, 감소하는 경향을 보였다. 이러한 경향성은 고용량 투여군(EO-H, EA-H)에서 두드러졌으며, 석류 단독 투여군(EO-L, EO-H)에 비하여, 석류 복합 투여군(EA-L, EA-H)에서 두드러졌다.

지방 조직의 무게에서도 같은 경향성을 나타내었다. 복부 지방 조직의 경우, SHAM군(3.3 ± 0.9)에 비해 OVX군(8.5 ± 3.4)이 통계적으로 유의성($P < 0.05$)있게 증가하였으며, OVX군에 비하여 시료 투여군에서 감소하였다. 또한, 저용량 투여군(EO-L, EA-

L)에 비하여, 고용량 투여군에서 이러한 경향성이 현저하였다.

내장 지방조직의 경우, SHAM군(3.5±0.6)에 비해 OVX군(7.2±3.7)에서 통계적으로 유의성($P<0.05$)있게 증가하였으며, 석류 단독 및 복합 시료를 투여함으로써 감소하였다.

이러한 경향성은 석류 단독 고용량 투여군과 석류 복합 저용량, 고용량 투여군에서 현저하게 나타났다.

자궁 지방 조직 무게의 경우, SHAM군(4.7±2.0)에 비해 OVX군(9.1±1.3)에서 증가였으며, 시료 투여에 의해 감소하였다. 특히, 고용량 석류 복합군(7.0±2.8)은 OVX군에 비해 23.1% 감소하였다.

자궁 무게를 측정된 결과, SHAM군(0.68±0.25)에 비하여 OVX군(0.16±0.15)에서 통계적 유의성($P<0.05$)을 나타내며 뚜렷한 감소를 보여 주었다. OVX군에 비하여, 고용량 석류 단독(0.33±0.26) 및 저용량 석류 복합 투여군(0.35±0.23), 고용량 석류 복합 투여군(0.45±0.22)에서 개선되는 경향을 보였으며, 특히, 고용량 석류 복합 투여군에서 통계적 유의성($P<0.05$)을 나타내며 증가하였다.

혈 중 17β-estradiol 함량

SHAM군(77.24±7.52)에 비해 OVX군(36.26±8.44)에서 통계적으로 유의성($P<0.05$) 있게 감소하였으며 시료 투여에 의해 개선되는 경향을 보였다.

대퇴골과 경골의 골밀도

대퇴골과 경골의 골밀도는 SHAM군에 비해 OVX군에서 통계적으로 유의성($P<0.05$)있게 감소하였다.

대퇴골의 경우 SHAM군(0.187±0.006)에 비해 OVX군(0.171

±0.006)이 유의성있게 낮았다($P<0.05$). OVX군에 비해 고용량 석류 복합 투여군(0.174±0.006)은 약간의 개선 효과를 보였으나 나머지 시료 투여군에서는 거의 효과를 보이지 않았다.

경골의 경우 SHAM군(0.154±0.005)에 비해 OVX군(0.142±0.002)이 유의성 있게 낮았다($P<0.05$). OVX군에 비해 시료를 투여함으로써 개선효과는 보이지 않았다.

조골세포 및 파골세포의 혈 중 활성지표

Osteocalcin 함량이 SHAM군(12.1±7.4)에 비하여, OVX군(20.3±8.0)에서 유의적($P<0.05$)으로 증가되었다(Table II). 시료 투여군은 OVX군에 비하여 통계적 유의성은 없으나, 감소하는 경향을 보였으며, 저용량 투여군에 비하여 고용량 투여군에서 감소하였다. 또한, 고용량 석류 단독 투여군(16.3±7.5)에 비하여, 고용량 석류 복합 투여(12.7±5.0)에서 감소하는 경향이 더욱 두드러지게 나타났다.

BSALP 함량의 경우, SHAM군(10.7±0.1)에 비하여, OVX군(11.5±0.2)에서 통계적 유의성($P<0.05$)을 나타내며 증가하였고, OVX군에 비하여 모든 시료 투여군에서 통계적 유의성($P<0.05$)을 나타내며 감소하였다. 저용량 투여군에 비하여 고용량 투여군에서 감소 경향이 더욱 크게 나타났으며, 고용량 석류 단독 투여군(10.9±0.1)에 비하여, 고용량 석류 복합 투여군(10.5±0.1)에서 감소하는 경향이 더욱 두드러지게 나타났다.

ALP activity는 SHAM군(16.4±4.0)을 비롯하여, OVX군 (19.8±8.6)과 모든 시료 투여군에서 통계적 유의성($P<0.05$)을 보이지 않았으나, SHAM군에 비하여 OVX군에서 증가하는 경향을 보였으며, OVX군에 비하여 고용량 석류 단독 투여군(17.6±1.8), 석류 복합 투여군(17.7±4.1)에서 감소하는 경향을 보였다.

Table I – Body weight, adipose tissues weight, uterus, urinary bladder and total urinogenital organs weight after 8-week treatment

	SHAM	OVX	EO-L	EO-H	EA-L	EA-H
Body weight (0th week) (g)	203.7±12.1	211.2±11.2	208.3±11.1	208.0±11.9	210.8±10.4	210.4±9.3
Body weight (8th week) (g)	289.6±6.2 ^b	351.2±63.2 ^a	348±35.5 ^a	335.2±25.9 ^{ab}	327.2±23.9 ^{ab}	321.6±41.8 ^{ab}
Abdominal adipose tissue (g)	3.3±0.9 ^b	8.5±3.4 ^a	7.4±3.3 ^a	5.5±2.0 ^{ab}	6.4±2.9 ^{ab}	5.5±3.2 ^{ab}
Intestinal adipose tissue weight (g)	3.5±0.6 ^b	7.2±3.7 ^a	6.8±3.3 ^{ab}	4.7±0.9 ^{ab}	4.6±1.6 ^{ab}	4.5±1.9 ^{ab}
Uterus adipose tissue weight (g)	4.7±2.0 ^b	9.1±1.3 ^{ab}	12.2±7.9 ^a	8.4±2.4 ^{ab}	7.1±2.3 ^{ab}	7.0±2.8 ^b
Uterus weight (g)	0.68±0.25 ^a	0.16±0.15 ^c	0.14±0.07 ^{bc}	0.33±0.26 ^{bc}	0.35±0.23 ^{bc}	0.45±0.22 ^{ab}

The values are mean±SD, n=5. Different letters in the same parameter indicate significant difference ($P<0.05$) between groups by Duncan's multiple range test.

Table II – Serum osteocalcin, BSALP levels, ALP activity, UDPD levels after 8-week treatment

	SHAM	OVX	EO-L	EO-H	EA-L	EA-H
Osteocalcin (ng/ml)	12.1±7.4 ^b	20.3±8 ^a	18.4±4.6 ^{ab}	16.3±7.5 ^{ab}	20.2±2.8 ^a	12.7±5.0 ^{ab}
BSALP (ng/ml)	10.7±0.1 ^c	11.5±0.2 ^a	11.1±0.2 ^b	10.9±0.1 ^c	10.7±0.1 ^{cd}	10.5±0.1 ^{de}
ALP (K-A unit)	16.4±4.0	19.8±8.6	20.4±5.2	17.6±1.8	18.2±2.0	17.7±4.1
UDPD (nM/mM Cr.)	9.61±2.0 ^a	17.45±3.0 ^c	16.62±2.0 ^{bc}	15.59±2.9 ^{bc}	15.94±1.8 ^{bc}	13.98±2.2 ^b

The values are mean±SD, n=5. Different letters in the same parameter indicate significant difference ($P<0.05$) between groups by Duncan's multiple range test.

UDPD는 SHAM군(9.61±1.99)에 비해 OVX군(17.45±3.01)이 유의성($P<0.05$) 있게 증가하였으며 시료 투여군은 OVX군 비교하여 감소하는 경향을 보였다. 특히, 고용량 석류 복합 투여군(13.98±2.24)은 OVX군에 비해 유의성 있게 감소하였다($P<0.05$).

혈 중 lipid profiles

Serum TG, TC을 측정 한 결과, 각각 SHAM군(43.2±10.2, 98.0±12.5)에 비하여 OVX군(55.2±13.6, 118.5±15.1)에서 증가하는 경향을 보였으며, OVX군에 비해 고용량 석류 단독, 석류 복합 투여군에서 감소하는 경향을 보였다(Table III).

TG의 경우, OVX군에 비하여 고용량 석류 단독 투여군(48.0±11.3)를 비롯하여, 저용량 석류 복합 투여군(54.1±7.3), 고용량 석류 복합 투여군(48.7±10.3)에서 감소되는 경향을 보였으며, TC의 경우, OVX군에 비하여 시료 투여군에서 감소하는 경향을 보였다.

HDL-C 함량의 경우, SHAM군(55.8±9.9)에 비하여, OVX군(39.4±5.9)에서 통계적 유의성($P<0.05$)을 나타내며 감소하였고, OVX군에 비하여 시료 투여군에서 증가하는 경향성을 보였고, 특히, 고용량 석류 복합 투여군(51.0±6.8)에서 통계적 유의성($P<0.05$)을 보이며 증가하였다.

HDL-C과 TG의 비를 구해 본 결과, SHAM군(57.9±15.1)에 비하여, OVX군(33.7±6.4)에서 통계적 유의성($P<0.05$)을 나타내며 감소하였으며, OVX군에 비하여 고용량 투여군에서 통계적 유의성($P<0.05$)을 나타내며 증가하였다.

피부 및 연골 중의 hydroxyproline 양

피부의 hydroxyproline의 함량(Table IV)은 SHAM군(49.8±4.42)에 비하여 OVX군(35.88±5.29)에서 통계적으로 유의성($P<0.05$) 있게 감소하였다. 고용량 석류 단독 투여군(38.18±

6.38)과 저용량 석류 복합 투여군(38.62±3.73), 고용량 석류 복합 투여군(42.7±6.99)들은 증가하는 경향을 보였다.

연골의 hydroxyproline 함량을 측정한 결과, SHAM군(289.68±13.27)에 비하여 OVX군(265.86±21.01)에서 감소되었으며, 고용량 석류 단독 투여군(270.7±25.69)과 저용량 석류 복합 투여군(267.58±21.28), 고용량 석류 복합 투여군(278.44±14.76)은 증가하는 경향을 보였다.

고 찰

본 연구에서는 동물 시험을 통하여, 석류 농축액의 단일 성분과 석류 농축액을 주성분으로 하는 생약 제제를 첨가한 복합물의 개선 효과를 몇 가지 지표로 이용하여 비교하고자 하였다.

난소 절제에 의한 estrogen 분비감소가 체중 증가를 가져온 여러 보고와 마찬가지로,¹⁰⁻¹³ 본 실험에서도 난소를 절제한 OVX군이 난소를 절제하지 않은 SHAM에 비해 체중이 증가하였다. 일반적으로 난소절제로 인한 estrogen 분비 부족은 지방조직의 lipoprotein lipase의 활성을 저하시키고 hormone sensitive lipase 활성을 증가시켜 체 지방 축적을 억제한다고 알려져 있다.^{14,15}

이러한 결과는 지방 조직의 무게에서도 비슷한 경향성을 나타내었다.

자궁의 무게를 측정한 결과, 시료 투여를 통해 다소 증가하는 경향을 보였다. 방광의 무게 또한, 자궁의 무게에서와 같은 경향성을 보였다.

이러한 결과를 통하여, 시료 투여가 갱년기로 인한 비노생식기 위축에 있어, 뚜렷한 개선 효과를 나타내지는 못하였지만, 인간의 비노생식기 위축에 대하여 장기 투여 시 개선 효과가 있으리라 기대된다.

Estrogen의 부족은 골절이 쉽게 일어날 수 있는 조건이 되며,

Table III – Serum lipid profiles after 8-week treatment

	SHAM	OVX	EO-L	EO-H	EA-L	EA-H
Triglyceride (mg/dl)	43.2±10.2	55.2±13.6	57.9±11.3	48.0±11.3	54.1±7.3	48.7±10.3
Total cholesterol (mg/dl)	98.0±12.5	118.5±15.1	112.5±20.5	105.8±20.9	106.2±9.2	101.5±11.1
HDL-cholesterol (mg/dl)	55.8±9.9 ^a	39.4±5.9 ^c	37.5±6.2 ^c	47.1±5.8 ^{abc}	43.6±5.0 ^{bc}	51.0±6.8 ^{ab}
HDL-C/TC (%)	57.9±15.1 ^a	33.7±6.4 ^c	34.2±8.1 ^c	48.4±11.9 ^{ab}	41.1±4 ^{bc}	50.8±8.9 ^{ab}

The values are mean±SD, n=5.

Different letters in the same parameter indicate significant difference ($P<0.05$) between groups by Duncan's multiple range test.

Table IV – Hydroxyproline contents in skin and cartilage after 8-week treatment

	SHAM	OVX	EO-L	EO-H	EA-L	EA-H
Skin (mg/100 g body weight)	49.8±4.42 ^c	35.88±5.29 ^{ab}	34.59±3.12 ^a	38.18±6.38 ^{ab}	38.62±3.73 ^{ab}	42.7±6.99 ^b
Cartilage (mg/100 g body weight)	289.68±13.27	265.86±21.01	262.78±21.63	270.7±25.69	267.58±21.28	278.44±14.76

The values are mean±SD, n=5.

Different letters in the same parameter indicate significant difference ($P<0.05$) between groups by Duncan's multiple range test.

이 경우 estrogen 투여는 골의 무기질 성분의 증가와 함께 교원 섬유질의 조성에도 영향을 끼쳐서 골질의 예방에 효과를 지닌다고 보고되어 있다.¹⁶⁾ 본 실험에서 혈 중 estradiol 양을 측정된 결과, SHAM군에 비해 OVX군에서 통계적으로 유의성($P < 0.05$) 있게 감소하였다. OVX군에 비해 시료 투여군에서 개선되는 경향을 보였다. 이는 본 연구에서 사용한 시료가 estradiol의 지방 조직 및 기타 조직에서의 분비를 촉진하여 감소된 estradiol에 대하여 개선하는 효과가 있는 것으로 판단된다. 이것은 사람에게 isoflavone을 투여하였을 때, estradiol의 증가를 가져왔다는 Han 등¹⁷⁾의 보고와 일치하였다.

폐경기 여성에게 문제되는 또 다른 질환은 골 대사 이상에 따른 골다공증이다. 골다공증은 동일 연령과 성별의 정상인에 비해 골량(단위 부피 당 골 질량)이 현저히 감소된 상태로 골의 구성 성분의 양적 감소를 주 병변으로 하는 대사성 골 질환이다.¹⁸⁾ 노년기에 있어서 골격손실은 골 형성과 골 흡수의 불균형에 의한 것이며 또한 그 원인은 명확하지 않지만 내분비학적, 영양학적, 유전학적 인자들이 관여하고 있는 것으로 알려지고 있다.¹⁹⁾

골은 개체의 평생을 통하여 지속적으로 흡수(resorption) 및 재형성(reformation)의 과정을 반복하여 연속성을 유지하며, 여러 가지 호르몬과 cytokine은 파골세포(osteoclast)와 조골세포(osteoblast)의 기능적 활성화에 직접적인 영향을 끼쳐서 골의 흡수 및 형성의 균형 유지에 기여하고 있다. 이와 관련된 대표적인 질환인 골다공증(osteoporosis)은 골의 균형이 파괴되는 모든 조건에서 유발될 수 있으나, 여성에서 폐경에 의한 혈 중 estrogen의 감소가 가장 일반적인 원인으로 알려져 있다.²⁰⁾

시료투여 후 경골과 대퇴골의 골밀도를 측정된 결과, 고용량 석류 복합 투여군에서 약간의 개선 효과를 보였다.

조골세포의 활성 지표인 혈 중 osteocalcin은 SHAM군에 비하여, OVX군과 시료 투여군에서 통계적으로 유의성($P < 0.05$) 있게 증가하였으며 시료 투여로 인해 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 경향성은 혈 중 osteocalcin과 함께 조골세포의 활성 지표인 혈 중 bone specific alkaline phosphatase(BSALP) 함량, ALP activity에서도 나타났다.

골형성의 지표로서 BALP치를 이용하려는 연구는 1984년 Rosalki와 Foo²¹⁾에 의해서 체내 여러 기관과 조직세포에서 분비되는 ALP중 골아세포에서 분비되는 ALP치만을 분리 측정할 수 있는 방법이 보고되면서 시작되었다. ALP는 phosphomonoesterase, phosphodiesterase, phosphoric anhydrase 등으로 분류할 수 있는데 phosphomonoesterase의 경우 십이지장이나 장의 점막에 상당히 많은 양이 있으나 신장, 고등동물의 선(gland), 뼈, 정상적인 혈액에서는 적은 농도로 존재하고 있다. 따라서 이러한 정상적인 조직에서 이상이 생기거나 osteocarcoma의 경우 혈청 내에서 ALP 활성이 증가하게 된다.^{22,23)} 본 실험에서 BALP 수치와 혈 청 ALP의 활성을 측정된 결과, 시료 투여에 의해 감

소하였다. 이는 본 실험에 사용한 시료는 난소를 절제한 쥐에서 BALP의 수치와 ALP의 활성을 저하시킴을 알 수 있었다.

Urinary deoxypridinoline(UDP)는 파골세포인 osteoclast의 활성 지표로서, 시료 투여군은 OVX군에 비해 통계적으로 유의성 있게 감소하였다.

에스트로겐의 부족은 직접 골세포(조골세포, 파골세포)에 작용하여 골회전을 증가시키는 것으로 알려지고 있다.²⁴⁾ 이러한 골회전의 증가는 조골세포와 파골세포의 활성의 증가를 의미하며, 본 실험에서 사용한 시료는 조골세포와 파골세포의 과도하게 증가된 활성을 감소시킴으로써, 골 회전을 조절한 것으로 사료된다.

폐경과 지질대사 관계에 있어서 폐경이나 난소 절제 시 estrogen의 감소는 HDL-cholesterol 및 apolipoprotein A-I의 감소를 초래하고 LDL-cholesterol(low density lipoprotein cholesterol)은 증가하여 심혈관계질환의 발병률이 증가한다고 한다.^{25,26)} 혈 중 triglyceride의 경우, OVX군에 비해 시료 투여군에서 감소하였다. Total cholesterol의 함량도 시료를 투여함으로써 OVX군에 비해 시료 투여군에서 감소하는 경향을 보였다. 반면, 혈 중 HDL-cholesterol의 경우, 시료를 투여함으로써 개선되는 경향을 보였다. 이러한 total cholesterol과 HDL-cholesterol의 경향성을 백분율(%)로 나타내었을 때, OVX군에 비하여 SHAM군과 고용량 시료 투여군(EO-H, EA-H)에서 통계적으로 유의성($P < 0.05$)을 띄며 증가하였다. 따라서 본 실험에 사용한 시료는 estrogen의 양을 증가시켜 혈 중 지질함량을 개선하는 것으로 사료된다.

Collagen은 인체 각 결합 조직에 분포하는 중요한 단백질로서 골의 비무기질 부분은 주로 type I collagen으로 이루어져 있고,²⁷⁾ 피부 섬유 아세포 중의 collagen은 estrogen에 의하여 생성량이 증가한다고 알려져 있으며,²⁸⁾ 조직 내 collagen의 손상은 연골조직의 노화와 골 관절염, 골다공증 병인의 원인이 된다고 한다.²⁹⁾

본 실험에서 피부와 연골의 collagen 함량을 측정된 결과, 피부의 경우 난소를 절제하지 않은 SHAM군에 비해 난소를 절제한 OVX군은 난소 절제에 의해 collagen 함량이 낮아졌으나, 난소 절제 후 8주간 시료를 투여함으로써 증가하는 경향을 보였다. 연골의 경우 또한 난소 절제로 인하여 OVX군은 난소를 절제하지 않은 SHAM군에 비해 감소하는 경향을 보였고 난소 절제 후 시료를 투여함으로써 증가하는 경향을 보였다.

결론적으로, 석류 농축액의 단일 성분과 석류 농축액을 주성분으로 하는 생약 제제의 복합물 모두 난소절제로 인하여 나타난 갱년기 증상을 개선함을 확인하였고, 석류 단독 투여에 비하여, 석류 복합 투여에 있어 개선 효과가 뚜렷하였음을 알 수 있다.

감사의 말씀

이 논문은 2005년 (주)건강사랑 학술연구비의 지원을 받아 연

구되었음을 감사드립니다. 또한 실험에 많은 도움을 준 이 해연 사장님께 감사를 드립니다.

문 헌

- 1) 오정렬 : 폐경기 증후군의 치료. 가정의학회지 **22**, 366 (2001).
- 2) 여에스터 : 폐경기, 노화와 비만. 대한비만학회지 **11**, 289 (2002).
- 3) 이진용 : 폐경기 여성의 에스트로젠 보충요법. 대한폐경학회 **37**, 1333 (1994).
- 4) Paech, K., Webb, P. and Kuiper, G. : Differential ligand activation of estrogen receptors ER-alpha and ER-beta at AP1 site. *Science* **277**, 1508 (1997).
- 5) Guthrie, J. R., Ball, M. and Murkies, A. : Dennerstein L. Dietary phytoestrogen intake in mid-life Australian-born women: relationship to health variables. *Climacteric*. **3**, 254 (2000).
- 6) 원형재, 이병석, 이수경, 최 윤, 윤 선, 박기현, 조동제, 송찬호 : 이소플라본 섭취 수준이 폐경기 여성의 갱년기 증상 및 혈청 내 호르몬 변화에 미치는 영향. 대한폐경학회 **7**, 54 (2001).
- 7) 최원균, 정교순, 조규성, 황명오, 유영숙 : 이란산 흑석류 농축액 과 그 제품의 성분 및 함유된 Phyto 에스트로겐류에 관한 연구 . 한국 식품영양학회 **15**, 119 (2002).
- 8) Danny, A. E., Uwe, P. S., Ephraim, P. L., Hubertus, I. and Jan, G. : Rapid dereplication of estrogenic com pounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. *Phytochemistry* **65**, 233 (2004).
- 9) Junko, M. O., Yoko, O. H., Hideyuki, Y. and Hiroyuki, Y. : Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. *Journal of Ethnopharmacology* **92**, 93 (2004).
- 10) Woessner, J. F. : The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch. Biochem. Biophys* **93**, 440 (1961).
- 11) Wronski, T. J., Cintron, M. and Dann, L. M. : Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif. Tissue. Int.* **43**, 179 (1988).
- 12) Abe, T., Chow, J. W. M., Lean, J. M. and Chambers, T. J. : estrogen does not restore bone list after ovariectomy in the rat. *J. Bone. Miner. Res.* **8**, 831 (1993).
- 13) Aitken, J. M., Armstrong, E. and Anderson, J. B. : Osteoporosis of estrogen and/or progesterone replacement therapy i its prevention. *J. Endocrinol.* **55**, 79 (1072).
- 14) Ramirez, M. E., Mc Murry, M. P., Wiebke, G. A., Felton, K. J. and Ren, K. : Evidence for sex steroid inhibition of lipoprotein lipase in men: comparison of abdominal and femoral adipose tissue. *Metabolism* **46**, 179 (1997).
- 15) Valette, A., Meignen, K. M., Mercier, L., Liehr, J. G. and Boyer, J. : Effects of 2-fluroestradiol on lipid metabolism in the ovariectomized rat. *J. Steroid. Biochem.* **25**, 578 (1986).
- 16) Clark, A. P. and Schutting, J. A. : Targeted estrogen/progesterone replacement therapy for osteoporosis : calculation of health care cost savings. *Osteoporosis Int.* **2**, 195 (1992).
- 17) Han, K. K., Soares, J. M., Jr. Haidar, M. A., de Lima, G. R. and Baracat, E. C. : Benefits of soy isoflavone therapeutic regimen on menopausal symptoms. *Obstetrics and Gynecology* **99**, 389 (2002).
- 18) Lee, E. L., Studd, J. W. and Mansell, J. P. : Biochemical bone markers in postmenopausal women. *Korean Soc. Obstetrics & Gynecology* **40**, 1450 (1994).
- 19) Jeffcoat, M. K. and Chesnut, C. H. : Systemic osteoporosis and oral bone loss, evidence shows increased risk factors. *Jadas* **124**, 49 (1993).
- 20) Odell, W. D. and Heath, H. 3rd. : Osteoporosis : pathophysiology, prevention, diagnosis, and treatment. *Dis. Mon.* **39**, 789 (1993).
- 21) Rosalki, S. B. and Foo, A. Y. : Two new methods for seperating and quantifying bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes in plasma. *Clin. Chem.* **7**, 1182 (1984).
- 22) Park, Y. H. and Yoo, T. M. : The effect of isoflavone supplementation on bone metabolism in ovariectomized SD rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **30**, 657 (1984).
- 23) Kim, I. G., Kim, S. B., Kim, J. G. and Kim, K. C. : Serum enzymes as indicator of radiation exposure in rats. *Korean Association for Radiation Protection* **18**, 37 (1993).
- 24) Prince, R. L. : Estrogen effects on calcitropic hormones and calcium homeostasis. *Endocr. Rev.* **15**, 301 (1984).
- 25) Ross, R. K., Pagamm-Hill, A., Mark, T. M. and Henderson, B. E. : Cardiovascular benefits of estrogen replacement therapy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **160**, 1301 (1989).
- 26) Campos, H., Wilson Peter, W. F., Jimenez, D., Mcnanara, J. R., Ordovas, J. and Schaefer, E. J. : Differences in apolipoproteins and low density lipoprotein subfractions in postmenopausal women on and off estrogen therapy: Results from the Framingham off spring study. *Metabolism* **39**, 1033 (1990).
- 27) Lubec, B., Steinert, I., Breier, F., Jurecka, W., Pillwein, K. and Fang-Kircher, S. : Skin collagen defects in a patient with juvenile hyaline fibromatosis. *Arch. Dis. Child.* **73**, 246 (1995).
- 28) Kim, M. Y. : The effects of Sedum sarmentosum bunge on collagen content of connective tissues in ovariectomized rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nur.* **32**, 1114 (2003).
- 29) Tiku, M. L., Allison, G. T., Naik, K. and Karry, S. K. : Malondialdehyde oxidation of cartilage collagen by chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* **11**, 159 (2003).