

## The Effect of HP4060 on the Brain Neurotransmitter and Hot Flushes in the Female Sprague-Dawley Rat

Jin Sook Seo<sup>1</sup>, Eun Joo Kum<sup>1</sup>, Do Hyeong Kwon<sup>1</sup> and Hyeyoung Lee<sup>2,†</sup>

<sup>1</sup>Research Center of Hanil Co., Ltd., Anseong-si Gyeonggi-do 456-825, Korea

<sup>2</sup>Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences, Yonsei University, Wonju-si, Kangwon-do 220-710, Korea

In this study, the effects of HP4060, a pomegranate extract, on Sprague-Dawley (SD) female rats were investigated. SD rats used in the experiment were divided into 3 groups: a control group, 100 mg HP4060/kg rat powder fed group, and 25 mg HP4060/kg rat liquid fed group. After 20 days of administration, the changes of the brain neurotransmitters were measured. The data showed that the concentration of the serotonin and the norepinephrine were increased, whereas that of the epinephrine was decreased in HP4060 administered groups. In addition, the improving effect of HP4060 on depression symptom of menopause women were shown by increased immobility time of the SD rates in a separate experiment. The uterus weight of HP4060 fed groups were also shown to be increased. In order to monitor toxic effect of HP4060, glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic-pyruvic transaminase (GPT) levels were measured, and the results showed that no significant difference in GOT and GPT levels among experimental groups implying no significant toxic side effects of HP4060. According to these results, it seems clear that HP4060 may improve symptoms of hot flush and depression caused by menopause without significant level of toxic effects.

**Key Words:** HP4060, Hot flush, Serotonin, Norepinephrine, Epinephrine, Immobility time, GPT, GOT

### 서 론

안면홍조는 폐경기 여성과 폐경기 전후기 여성에서 가장 흔히 나타나는 초기 증상으로 폐경 여성의 50~85%가 경험하게 된다. 안면홍조는 가슴, 얼굴, 그리고 머리 등 전신에 퍼지는 불쾌한 예감부터 강한 열감을 일으키며, 일반적으로는 식은땀, 오한이 동반되고 어떤 경우에는 심박축진과 불안감이 나타난다 (Kronenberg, 1999). 이와 같은 안면홍조는 폐경기에 가까워진 여성에게서 나타나는 호르몬의 급격한 변화에 기인한 것으로써, 여성 호르몬 양의 감소와 호르몬 주기의 규칙성 혼란으로 인해 유발되는 것으로 알려져 있다.

안면홍조가 일어나는 동안 시상하부의 시색전부에 존

재하는 체온조절중추 영역은 사람의 체온을 정상적으로 유지하기 위해 활성화 된다. 이때 관여하는 대표적인 신경전달물질이 노르에피네프린 (norepinephrine)과 에피네프린 (epinephrine), 세로토닌 (serotonin)이다.

세로토닌은 안면홍조 기작에 있어서 중요한 신경전달물질 중 하나이며, 에스트로겐의 분비 감소로 인하여 혈중의 세로토닌 함량이 감소되며 시상하부의 세로토닌 수용체 중 5-HT<sub>2A</sub> 수용체의 활성화에 관여한다. 5-HT<sub>2A</sub> 수용체의 활성화는 열손실을 일으키며 시상하부의 5-HT<sub>2A</sub> 수용체가 안면홍조를 유도한다 (Muzur et al., 2000).

에스트로겐은 5-HT<sub>2A</sub> 수용체를 억제하여 열손실이 조절되도록 하고 체온조절중추 핵에서 열손실 기작을 억제하여 안면홍조를 예방할 수 있다. 에스트로겐 감소에 따른 내부자극은 카테콜아민을 자극하여 노르에피네프린을 억제하고 에피네프린을 증가시키며 5-HT<sub>2A</sub> 수용체를 자극한다. 이로써 열손실이 증가하게 되고 체온조절중추 핵에서 열손실 기작을 변화시켜 체온이 변화하며 안면홍조가 발생한다. 이와 같은 작용기작으로 인하여 에스트로겐과 엔돌핀 농도를 증가시키거나 시상하부 노르에피네프린 방출을 증가시키는 작용제에 의하여 안면홍조가

\*접수일: 2010년 3월 5일 / 수정일: 2010년 6월 10일  
채택일: 2010년 6월 21일

†Corresponding author: Hyeyoung Lee. Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences, Yonsei University, Kangwon 220-710, Korea.

Tel: 82-33-760-2740, Fax: 82-33-760-2561  
e-mail: hyelee@yonsei.ac.kr

감소되는 것으로 추측되어진다 (Kronenberg et al., 1999).

갱년기 이후의 여성은 생리불순, 안면홍조, 발한, 성교통, 질염, 방광염, 배뇨통, 급뇨, 집중장애, 불안, 신경과민, 근육통, 관절통, 심혈관 질환, 골다공증 등의 위험성이 증가하여 이의 예방책으로 호르몬 대체요법이 제시되고 있으나 (Lee, 1993; Kim et al., 2002), 아직까지 이러한 보충제의 사용법, 용량, 오랜 기간 사용시 안전성에 대한 일치된 결과는 나타나지 않고 있다. 이와 같은 호르몬 대체요법의 이러한 불확실성으로 인하여 천연물을 대상으로, 여성 호르몬의 대체물질을 찾는 연구가 활발하게 진행되고 있다 (Marston et al., 1999).

석류는 폐경기 여성의 장애 완화, 유방암 및 전립선암 예방, 강력한 동맥경화성의 병반 분해 및 항산화 활성 등과 관련된 기능성분은 의학, 치료, 수명, 배란 등의 분야에서 개발 가능성이 널리 제시되어 왔다 (Choi et al., 1999). 석류과육 및 추출물에서 발견되는 식물성에스트로젠 (phytoestrogen)의 주성분은 iso-flavonoid와 lignans 등의 페놀성 화합물이며 (Aviram et al., 2000; Kim, 2005), 이들은 구조적으로 유사하게 에스트로겐의 역할을 하기 때문에 석류에 함유된 천연에스트로젠 섭취 후 체내에서 여성 호르몬과 유사한 형태로 전환된다고 보고되었다 (Aviram et al., 2000; Kim et al., 2005; Song et al., 2007).

Phytoestrogen은 우울증 및 에스트로겐 활성에 관여하며 골감소를 억제 (Ishimi et al., 2000)할 뿐만 아니라 항에스트로겐 활성을 가지고 있어 포유류의 암세포 증식을 억제하기도 한다 (Miodini et al., 1999). Phytoestrogen은 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ER)  $\alpha$ ,  $\beta$ 에 활성을 가지며, ER은 에스트로겐 반응요소 (estrogen response element, ERE)에 결합하여 이들의 결합력에 따라 에스트로겐 및 항에스트로겐 활성으로 결정된다고 보고하였다 (Ikeda et al., 2002). ERE를 가지는 사람의 자궁암 세포에서 ligand 결합시 ER의 활성에 관여하는 luciferase 활성을 측정할 결과, 석류주스를 처리한 시험군은 비처리 대조군과 비교하여 3.12배의 효과가 나타난다고 보고된 바 있다 (Arao et al., 2007). 또한 사람의 에스트로겐 수용체를 발현하는 재조합 효모 (*Saccharomyces cerevisiae* ER + Lys 8127)를 사용하여 에스트로겐 활성을 확인한 결과, 석류과육은  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) 대조군에 비하여 약 5% 수준의 에스트로겐 활성이 나타난 바 있다 (Choi et al., 2005). 석류농축액은 세로토닌을  $11.6 \mu\text{g/g}$  함유하고 있으며 (Badria, 2002),  $17\beta$ -estradiol은 0.15 ppm 함유하고 있다고 보고된 바 있다 (Choi et al., 2002).

**Table 1.** The experimental treatment condition

Group	Treated condition	
	Dose	Oral Ad. vol (0.9% NaCl)
Control	0 mg/kg	1 ml
HP4060 powder	100 mg/kg	1 ml
HP4060 liquid	25 mg/kg	1 ml

이에 본 연구에서는 식물성에스트로젠과 세로토닌이 함유된 석류추출물 HP4060 농축액과 분말을 이용하여 우울증 개선 및 안면홍조에 관여하는 신경전달물질 (세로토닌, 노르에피네프린, 에피네프린)의 함량변화를 측정하였다. 또한, 난소적출 쥐에 HP4060을 경구투여 후 immobility time과 자궁무게를 측정하여 HP4060의 안면홍조 및 우울증 개선 효능을 살펴보고자 하였으며, 독성 시험을 통해 생체내 안전성 자료를 확보하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 연구재료

**시료조제:** 실험에 사용된 HP4060은 석류추출물 (pomegranate extract)이며 (주)한일양행에서 부여한 고유번호이다. HP4060 농축액은 석류피와 씨를 제외한 석류과육을 이용하여 주정, 물로 추출하여 65 brix로 농축한 후 주정으로 정제 후 농축하여 제조하였으며, HP4060 분말은 농축액 25%에 갈락토만난, 포도당, 유당 등의 부형제를 혼합하여 분말화하여 제조하였다.

### 신경전달물질 함량 측정

**실험동물:** 본 연구에 사용된 실험동물은 체중 260~280 g 내외의 15~16주령의 암컷 SD rat을 (주)중앙실험동물 (Seoul, Korea)로부터 분양받아 실험에 사용하였다. 사육장의 온도는  $22\pm 3^\circ\text{C}$ , 상대습도 30~70%로 조절하였으며, 시간당 15~20번 공기를 주입하였다. 20일 간 고형사료와 물을 공급하면서 각각 Cage에 한 마리씩 사육하였으며 1주간은 환경에 적응하도록 하였다.

**시험군의 구성 및 투여방법:** 적응기간을 마친 모든 동물에 대하여 무작위로 대조군은 60마리, 시험군은 각 군당 50마리씩 배정하여 실험을 실시하였다 (Table 1). 시험물질의 인체에서의 적용경로가 경구이므로 경구경로를 선택하였으며 대조군의 투여액량은 0.9% NaCl을 1 ml씩 경구투여 하였고, 군별 투여액량은 rat의 Kg 당 HP4060

농축액의 경우 25 mg, HP4060 분말은 rat의 Kg 당 HP4060 100 mg의 용량을 0.9% NaCl 1ml에 녹여 20일간 매일 오전에 금속제 존데를 이용하여 경구투여 하였다.

**Rat의 뇌 적출:** 실험동물에 대하여 경구투여 2일 전, 투여 후 1, 5, 10, 15, 20일에 diethyl ether를 이용하여 마취 시킨 후 뇌를 적출하고 무게 측정 후 2% TCA 용액 7.5 ml, 0.5 mM EDTA를 함유한 0.33 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 ml씩 가하여 homogenization한 후 4°C, 4,500 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 원심분리 후 상등액을 분리하여 -20°C에 보관하여 실험에 사용하였다 (Jo et al., 2008).

**신경전달물질 함량 측정 (Serotonin, Norepinephrine, Epinephrine):** Brain sample 10 µl와 ELISA Kit의 buffer 90 µl를 혼합하여 serotonin과 norepinephrine 및 epinephrine의 함량을 측정하였다. ELISA kit는 serotonin research ELISA kit™, 2-CAT research ELISA kit™ (LDN Co., Germany)를 사용하였으며, 450 nm에서 ELISA reader (Emax, molecular device Co., USA)로 흡광도를 측정하여 정량하였다.

#### Immobility time 측정 및 독성시험

**실험동물:** 본 연구에 사용된 실험동물은 8주령의 암컷 SD rat으로 난소적출 및 가상 난소적출 후 (주)오리엔트 바이오 (Seoul, Korea)에서 공급받았다. 실험시 사육장의 온도는 22±3°C, 습도는 30~70%를 유지하였으며 시간당 15~20번 공기를 주입하면서 1주일간 환경에 적응하도록 하였다.

**시험군의 구성 및 투여방법:** Immobility time 측정의 경우 적응기간을 마친 모든 동물에 대하여 무작위로 각 군당 5마리씩 군 분리를 실시하였으며 가상난소적출 대조군과 난소절제 대조군에는 propylene glycol을 5 ml 투여하였으며, 시험군에는 HP4060 농축액과 HP4060 분말을 각각 25 mg/kg 및 100 mg/kg의 용량을 5 ml의 propylene glycol에 녹여서 16일간 매일 오전에 금속제 존데를 이용하여 경구투여 하였다.

독성시험 및 자궁무게 측정 실험에서는 무작위로 각 군당 5마리씩 군 분리를 하였으며 가상난소절제 대조군과 난소절제 대조군에는 propylene glycol을 5 ml 투여하였으며, 시험군에는 HP4060 농축액 25, 250, 1,250 mg/kg 용량을 propylene glycol 5 ml에 녹여 16일간 매일 오전에 경구투여 하였다.

**Immobility time 측정:** Immobility time의 측정 시 높이 50 cm × 직경 20 cm의 아크릴판에 24±1°C 물을 30 cm 가량 채운 후 15분간 자유로이 수영할 수 있도록 한 후 꺼내어 물기를 제거 후 cage에 넣어 둔다. 15분간의 수영으로 인해 쥐는 3°C 가량의 미묘한 저체온을 일으키며, 30분 동안 우울증을 경험한다. 24시간 후 쥐를 다시 물에 넣은 후 6분 동안 쥐의 머리가 수면 위에 머무르기 위해 움직이기까지의 시간을 측정하였다. 쥐는 수동적 움직임으로 인해 물에 빠짐을 기억하고 있기 때문에 최대한 많이 물위에 떠 있기 위해 움직이게 되며, 이러한 움직임의 시간을 시계로 측정하였다 (Mori-Okamoto et al., 2004). Immobility로 평가되는 행동은 움직임, 올라오려는 행동, 수영 등의 행동이 있으며, 이러한 행동이 나오기까지의 시간을 측정하였다 (Codagnone et al., 2007).

**독성시험:** GOT/GPT 측정을 위한 혈액은 대조군과 실험군 모두 투여 전 1일 및 투여 후 3, 6, 10, 13, 16일에 꼬리에서 채혈을 실시하였다. 채혈된 혈액은 4,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. -20°C에서 보관 후 (주)녹십자에서 SGOT/SGPT kit (AST/ALT reagent, Bayer Co., USA)를 사용하여 ADVIA 1650 (Bayer Co., Japan) 분석 장비로 GOT/GPT 함량을 분석하였다.

#### 자궁무게 측정

16일간 경구투여 후 채혈을 마친 rat을 diethyl ether로 마취한 뒤 자궁조직이 상하지 않도록 적출하여 무게를 측정하였다.

#### 통계처리

각 대조군과 시험군의 결과 값은 mean ± SD로 표현하였다. 시험군과 대조군에 대한 유의성 검정은 SPSS 12.0을 이용하여 one way ANOVA (LSD test)로 수행하였다. P값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였고, P값이 0.01 이하인 경우는 따로 표시하였다.

## 결 과

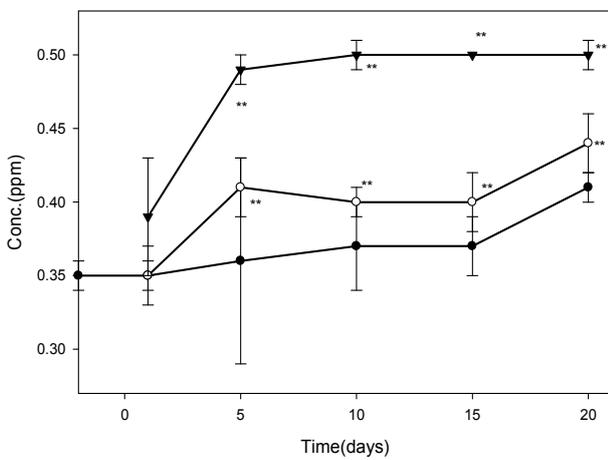
#### 신경전달물질 함량

**세로토닌 함량:** HP4060 분말 및 HP4060 농축액을 경구 투여한 후 뇌를 적출하여 세로토닌의 함량을 ELISA로 측정하였으며 그 결과는 Table 2, Fig. 1에 나타내었다. 대조군에서의 세로토닌의 함량은 0.38±0.01 ppm (20일 경

**Table 2.** The effect of HP4060 on serotonin level

Day	Serotonin concentration (ppm)		
	Control	HP4060 100 mg/kg, powder	HP4060 25 mg/kg, liquid
-2	0.35±0.01	-	-
1	0.35±0.02	0.35±0.01	0.39±0.04
5	0.36±0.01	0.39±0.02**	0.49±0.01**
10	0.37±0.03	0.40±0.01**	0.50±0.01**
15	0.37±0.02	0.40±0.02**	0.50±0.01**
20	0.38±0.01	0.44±0.02**	0.51±0.01**

The value are mean ± SD, statistical significance compare with the control group. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  (one way anova, LSD test).



**Fig. 1.** The effect of HP4060 on serotonin concentration in the SD female rat brain. ●, Control; ○, HP4060 powder; ▼, HP4060 liquid. The value are mean ± SD, statistical significance compare with the control group. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  (one way anova, LSD test).

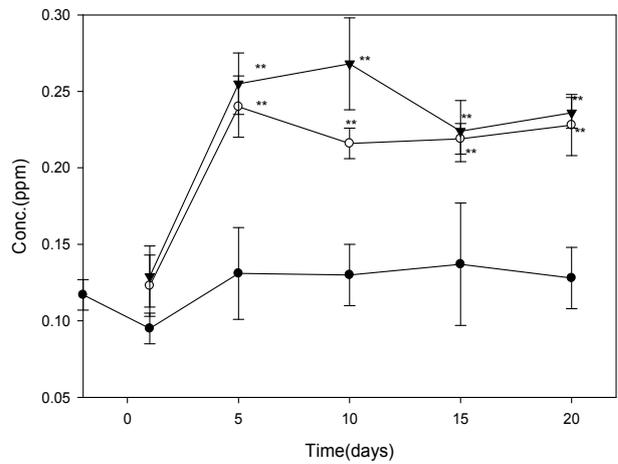
과)이며, HP4060 분말을 투여한 시험군에서는  $0.44 \pm 0.02$  ppm (20일 경과)이었으며, HP4060 농축액을 투여한 시험군에서는  $0.51 \pm 0.01$  ppm (20일 경과)으로 나타났다. 시험물질 투여 20일 후의 세로토닌의 함량은 투여 1일째와 비교하여 HP4060 분말이 평균 0.09 ppm, HP4060 농축액은 0.12 ppm 증가하는 양상을 보였다. 투여 5일째부터 HP4060 분말과 HP4060 농축액을 투여한 시험군은 대조군과 유의적인 차이를 나타내며 세로토닌이 증가한 것을 확인하였다.

**노르에피네프린 함량:** 노르에피네프린 함량을 측정한 결과는 Table 3, Fig. 2에 나타내었다. 대조군에 비해 HP4060 분말 및 HP4060 농축액을 투여한 시험군에서 노르에피

**Table 3.** The effect of HP4060 on norepinephrine level

Day	Norepinephrine concentration (ppm)		
	Control	HP4060 100 mg/kg, powder	HP4060 25 mg/kg, liquid
-2	0.12±0.01	-	-
1	0.10±0.01	0.12±0.02	0.129±0.02
5	0.13±0.03	0.24±0.02**	0.255±0.02**
10	0.13±0.02	0.22±0.01**	0.268±0.03**
15	0.14±0.04	0.22±0.01**	0.224±0.02**
20	0.13±0.02	0.23±0.02**	0.236±0.01**

The value are mean ± SD, statistical significance compare with the control group. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  (one way anova, LSD test).



**Fig. 2.** The effect of HP4060 on norepinephrine concentration in the SD female (15~16 weeks) rat brain. ●, Control; ○, HP4060 powder; ▼, HP4060 liquid. The value are mean ± SD, statistical significance compare with the control group. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  (one way anova, LSD test).

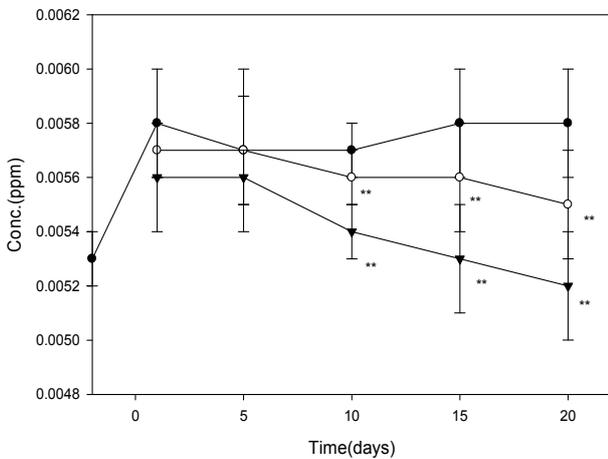
네프린 함량이 높게 나타났다. 대조군의 노르에피네프린 함량은  $0.13 \pm 0.02$  (20일 경과)이었으며, HP4060 분말을 투여한 시험군의 노르에피네프린의 함량은  $0.23 \pm 0.02$  ppm (20일 경과)으로 나타났으며, HP4060 농축액을 투여한 시험군은  $0.24 \pm 0.01$  ppm (20일 경과)으로 나타났다. 노르에피네프린의 함량은 시험물질 투여 20일 후 HP4060 분말은 평균 0.105 ppm, HP4060 농축액은 0.107 ppm 증가하는 양상을 보였다. HP4060 분말 및 HP4060 농축액을 투여한 시험군은 대조군과 대비하여 뇌의 노르에피네프린 함량이 유의적 차이를 나타내며 증가하였음을 확인하였다.

**에피네프린 함량 측정:** 에피네프린의 함량을 측정한 결과

**Table 4.** The effect of HP4060 on epinephrine level

Day	Epinephrine concentration (ppm)		
	Control	HP4060 100 mg/kg, powder	HP4060 25 mg/kg, liquid
-2	0.0053±0.0001	-	-
1	0.0058±0.0002	0.0057±0.0001	0.0056±0.0002
5	0.0057±0.0003	0.0057±0.0002	0.0056±0.0001
10	0.0057±0.0001	0.0056±0.0001**	0.0054±0.0001**
15	0.0058±0.0002	0.0056±0.0002**	0.0053±0.0002**
20	0.0058±0.0002	0.0055±0.0002**	0.0052±0.0002**

The value are mean ± SD, statistical significance compare with the control group. \*,  $P<0.05$ ; \*\*,  $P<0.01$  (one way anova, LSD test).



**Fig. 3.** The effect of HP4060 on epinephrine concentration in the SD female rat brain. ●, Control; ○, HP4060 powder; ▼, HP4060 liquid. The value are mean±SD, statistical significance compare with the control group. \*,  $P<0.05$ ; \*\*,  $P<0.01$  (one way anova, LSD test).

는 Table 4, Fig. 3에 나타내었다. 대조군에 비해 HP4060 분말 및 HP4060 농축액을 투여한 시험군에서 에피네프린 함량이 감소하는 것으로 나타났다. 에피네프린은 노르에피네프린과의 상호 길항작용을 함으로 증가된 노르에피네프린과 반대의 양상을 나타내었다. 시험물질을 투여한 20일 동안 감소 추이를 지속적으로 나타내었다. HP4060 분말 및 HP4060 농축액을 투여한 시험군은 대조군과 대비하여 뇌의 에피네프린 함량이 유의적인 차이를 나타내며 감소하였음을 확인하였다.

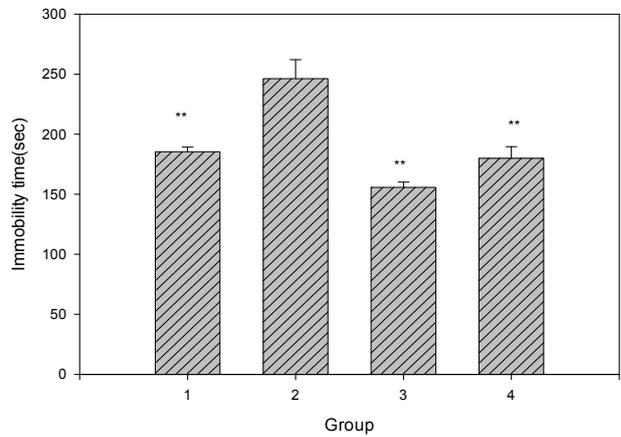
#### Immobility time

**Immobility time 측정:** 실험동물을 대상으로 immobility time 측정된 결과 HP4060 분말 및 HP4060 농축액을 투

**Table 5.** The effect of HP4060 on immobility time

No.	Immobility time (sec)			
	Sham ovariectomized	Ovariectomized	HP4060 25 mg/kg, liquid	HP4060 100 mg/kg, powder
1	181.0	255.0	161.0	186.0
2	191.0	261.0	153.0	192.0
3	185.0	253.0	152.0	181.0
4	183.2	241.0	153.0	173.0
5	187.3	221.0	160.0	168.0
ave.	185.4 ±3.85*	246.2 ±15.85	155.8 ±4.32**	180.0 ±9.67**

The value are mean ± SD, statistical significance compare with the control group. \*,  $P<0.05$ ; \*\*,  $P<0.01$  (one way anova, LSD test).



**Fig. 4.** The effect of HP4060 on the immobility time in forced swimming. 1, Sham ovariectomy control group; 2, ovariectomy control group; 3, HP4060; 4, HP4060 powder. The value are mean ± SD, statistical significance compare with the control group. \*,  $P<0.05$ ; \*\*,  $P<0.01$  (one way anova, LSD test).

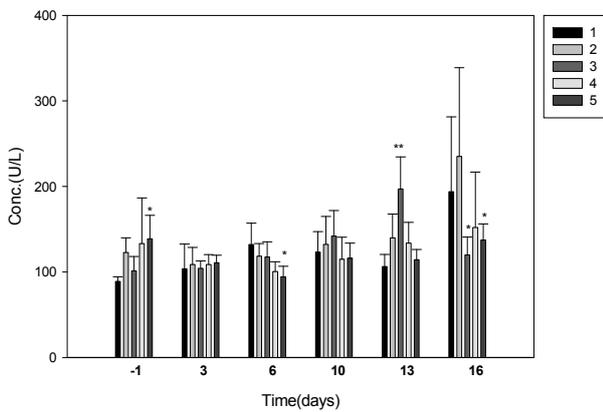
여한 시험군에서는 대조군과 대비하여 immobility time 이 짧아짐을 확인하였다. 난소를 적출한 대조군의 경우 immobility time이 246.20±15.85 sec로 나타난 반면, 가상 난소적출군의 경우 185.40±3.85 sec, HP4060 분말을 투여한 시험군은 180.00±9.67 sec, HP4060 농축액을 투여한 시험군에서는 155.80±4.32 sec로 난소적출 대조군에 비해 immobility time이 짧게 나타나는 것을 확인하였다. 따라서 HP4060 분말 및 HP4060 농축액이 동물에서 우울증 개선에 도움을 줄 수 있다는 것을 실험결과로 확인하였다 (Table 5, Fig. 4).

**독성시험 및 자궁무게:** HP4060 농축액을 16일간 투여한

**Table 6.** The effect of HP4060 on serum glutamic-oxaloacetic transaminase, GOT level

Day	GOT (U/L)				
	Sham ovariectomized	Ovariectomized	HP4060 liquid		
			25 mg/kg	250 mg/kg	1,250 mg/kg
-1	88.8±5.5	122.7±17.1	101.2±16.9	133.2±53.3	138.7±27.5*
3	103.7±28.8	108.6±20.2	104.2±8.7	108.8±11.5	110.8±8.7
6	132.0±25.0	118.4±14.7	117.4±17.9	100.4±11.4	94.4±12.2*
10	123.0±4.0	132.2±32.7	142.0±29.8	114.8±25.8	116.0±17.8
13	106.3±14.2	139.8±27.8	197.0±37.4**	133.8±24.1	114.4±11.9
16	193.8±87.4	235.0±103.9	119.8±20.9*	152.0±64.8	137.2±18.9*

The value are mean ± SD, statistical significance compare with the control group. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  (one way anova, LSD test).



**Fig. 5.** The effect of HP4060 on GOT in SD rats. 1, Sham ovariectomy control group; 2, Ovariectomy control group; 3, HP4060 25 mg/kg; 4, HP4060 250 mg/kg; 5, HP4060 1,250 mg/kg. The data represent the mean ± SD of 5 rats. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  (one way anova, LSD test).

후 혈청 내의 GOT/GPT 함량의 변화를 Table 6, 7에 나타내었다. HP4060 농축액을 25, 250, 1,250 mg/kg로 실험동물에 경구투여한 후 혈청을 분리하여 GOT, GPT를 측정된 결과, 난소적출 대조군과 비교하여 시간과 농도의존적으로 유의한 독성은 나타나지 않았다. 16일 동안 HP4060 농축액 투여에 의한 혈청 중 GOT 활성도를 살펴보면, 난소적출 대조군이 235.0±103.9 U/L (16일)인 것에 비하여 HP4060 25 mg를 투여한 시험군은 119.8±20.9 U/L (16일), HP4060 250 mg를 투여한 시험군은 152±64.8 U/L (16일), HP4060 1250 mg를 투여한 시험군은 137.2±18.9 U/L (16일)로 GOT 수치가 나타났다 (Table 6, Fig. 5).

HP4060 농축액 투여에 의한 혈청 중 GPT의 활성도는 난소적출 대조군 (PG2)이 61.0±8.6 U/L (16일)에 비하여 HP4060 25 mg를 투여한 시험군은 51.0±9.1 U/L (16일), 250 mg를 투여한 시험군은 51.8±6.4 U/L (16일), 1,250 mg

를 투여한 시험군은 53.8±2.8 U/L (16일)로 나타났다 (Table 7, Fig. 6).

**자궁무게 측정:** HP4060 농축액을 16일간 투여한 후 자궁무게를 측정된 결과는 Fig. 7과 같다. 난소적출 대조군은 0.12±0.01 g인 것에 비해 가상난소적출 대조군의 자궁무게는 0.48±0.01 g으로 나타났고, HP4060 농축액 25 mg 경구투여한 시험군은 0.14±0.01 g, 250 mg 경구투여 실험군은 0.21±0.01 g, 1,250 mg 경구투여 시험군은 0.24±0.01 g이었다. 이로써 난소적출 대조군에 비하여 HP4060 농축액을 경구투여한 시험군의 자궁무게가 증가하는 것이 확인되었으며, 이는 통계적으로도 유의한 차이를 나타내었다 (Fig. 7).

## 고 찰

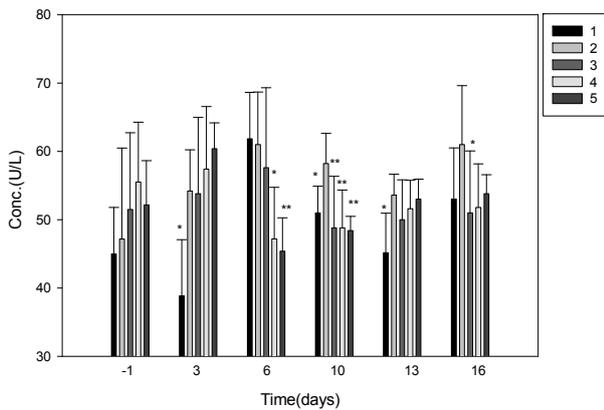
석류에 관한 연구자료는 punicic acid, estradiol,  $\beta$ -sitosterol의 활성 (Okada et al., 1997), 미생물의 생육억제 효과, 석류추출물의 항산화 및 항균활성 및 phytoestrogen (Choi et al., 2005; Song et al., 2007)에 관한 연구 등이 있다. 폐경기 증상을 완화시키는 phytoestrogen은 최근 연구가 활발한 분야이며 또한 호르몬 대체요법으로서 주목받고 있다.

Phytoestrogen은 약한 에스트로젠 agonist로 작용하며 낮은 에스트로젠 농도에서도 강력한 영향을 미친다. Phytoestrogen이 효과를 발휘하는 기작은 명확하게 밝혀 지지 않았으나, 에스트로젠 수용체를 매개로 하는 약한 길항작용이 일련의 세포내 반응을 유도하고 세포주기 활성 조절에 관여한다는 것과 세포막 수용체를 매개로 한 효능 및 가능성이 제시된 바 있다 (Kim et al., 2003).

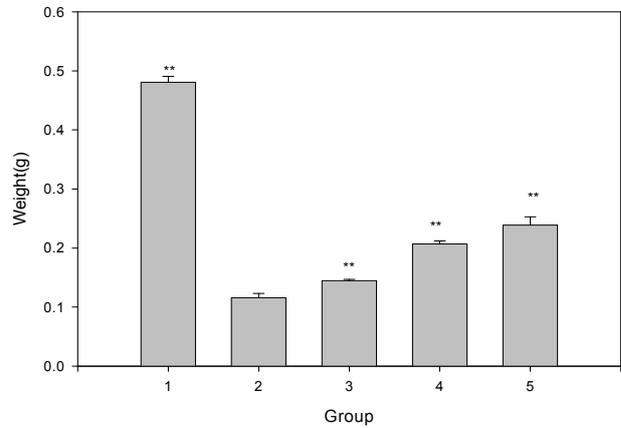
**Table 7.** The effect of HP4060 on serum glutamic-pyruvic transaminase, GPT level

Day	GPT (U/L)				
	Sham ovariectomized	Ovariectomized	HP4060 liquid		
			25 mg/kg	250 mg/kg	1,250 mg/kg
-1	45.0±6.8	47.2±13.3	51.5±11.2	55.5±8.8	52.2±6.5
3	38.8±8.2*	54.2±6.0	53.8±11.2	57.4±9.2	60.4±3.8
6	61.8±6.8	61.0±7.7	57.6±11.7	47.2±7.5*	45.4±4.9**
10	51.0±3.9*	58.2±4.4	48.8±7.5**	48.8±5.5**	48.4±2.1**
13	45.2±5.8*	53.6±3.0	50.0±5.8	51.6±4.2	53.0±2.9
16	53.0±7.5	61.0±8.6	51.0±9.1*	51.8±6.4	53.8±2.8

The value are mean ± SD, statistical significance compare with the control group. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  (one way anova, LSD test).



**Fig. 6.** The effect of HP4060 on GPT in SD rats. 1, Sham ovariectomy control group; 2, Ovariectomy control group; 3, HP4060 25 mg/kg; 4, HP4060 250 mg/kg; 5, HP4060 1,250 mg/kg. The data represent the mean ± SD of 5 rats. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  (one way anova, LSD test).



**Fig. 7.** The effect of HP4060 on the uterus weight in SD rats. 1, Sham ovariectomy control group; 2, Ovariectomy control group; 3, HP4060 25mg/kg; 4, HP4060 250mg/kg; 5, HP4060 1,250 mg/kg. The data represent the mean ± SD of 5 rats. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  (one way anova, LSD test).

또한 난소적출 쥐에 propylene glycol을 투여한 대조군의 꼬리 체온이 증가한 반면, 난소적출 쥐에 석류추출물을 투여한 실험군의 꼬리 체온이 증가되지 않은 것은 기존의 논문에서도 확인하였다 (Kim et al., 2009).

에스트로젠은 모노아민 옥시다아제 (monoamine oxydase) 활성을 감소시키고, 노르에피네프린은 열손실을 낮춘다. 안면홍조 치료법으로 사용되는 에스트로젠 요법 (medroxyprogesteron)은 부족한 에스트로젠을 보충할 뿐만 아니라 에스트로젠의 감소로 나타나는 노르에피네프린의 감소도 제어함으로써 체온 손실을 예방한다. 이에 HP4060에 함유된 에스트로젠과 유사한 phytoestrogen 성분은 에스트로젠을 보충함으로써 에스트로젠 감소로 인해 유발되는 안면홍조의 과정을 제어할 수 있으리라 생각된다.

세로토닌은 안면홍조의 발생과 관련이 있으며, 선택적

세로토닌 섭취억제제로 안면홍조를 감소시키기 위한 대안으로 떠오르고 있다. 에스트로젠의 감소는 세로토닌의 감소로 이어지며, 일정한 양의 세로토닌 수용체는 열손실을 조정하고 뇌하수체의 있는 이러한 수용체의 활성화로 인하여 안면홍조를 일으킬 수 있다. 스트레스, 매운 음식, 알코올 등은 체내의 serotonin 함량을 감소시키며, 이는 5-HT<sub>2C</sub> receptor를 억제하여 5-HT<sub>2A</sub> receptor를 활성화 시키며, 이로써 체온의 thermoregulatory set point 안정 범위를 좁게 만들고 발한의 역치를 낮춤으로써 심부의 체온이 상승하여 열손실을 유발하게 된다. 열손실을 가속화하기 위하여 혈관의 확장과 발한이 활성화 되면 결론적으로 안면의 혈관이 확장되어 안면홍조가 나타난다 (Shanafelt et al., 2002).

본 연구에서는 HP4060 분말 및 농축액의 경구투여 후 뇌의 신경전달물질 함량의 변화를 측정하였으며, 대

조균에 비해 투여기간이 길어질수록 세로토닌의 함량 및 노르에피네프린의 함량은 통계적으로 유의하게 증가함을 확인하였다. 또한 에피네프린의 함량은 투여기간이 길어질수록 유의하게 감소하였다. 에스트로겐은 5-HT<sub>2A</sub> receptor를 억제하여 열손실을 조절하게 되고 체온조절 중추 핵에서 열손실 기작을 억제하여 안면홍조의 발생을 예방할 수 있을 것이다 (Kronenberg et al., 1999). 세로토닌의 감소로 인해 유발되어지는 이러한 과정은 세로토닌을 함유한 HP4060 분말 및 HP4060 농축액을 섭취함으로써, 체내에 일정수준의 세로토닌 함량을 유지하게 되어, 세로토닌 감소로 유발되어지는 일련의 과정이 차단되고 결국 안면홍조 개선에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

우울증의 척도를 판단하는 하나의 기준으로 사용되는 immobility time의 변화는 HP4060 분말 및 농축액을 투여한 시험군은 난소적출 대조군에 대비하여 투여일수가 길어질수록 유의적으로 immobility time이 짧아진 것을 확인하였고, 우울증개선에 효과가 있을 것으로 사료된다.

난소적출한 대조군과 HP4060 농축액의 농도별 투여 시험군의 자궁무게 변화를 측정된 결과, HP4060 투여군에서 자궁무게가 증가하는 경향을 보였다. 이는, Lee 등이 2006년에 보고한 결과와도 유사한 것이며, 이러한 결과를 통하여 HP4060은 갱년기로 인한 생식기 위축에 있어, 일정수준 섭취할 경우 개선효과가 있으리라 기대된다.

HP4060의 섭취에 있어서 독성시험을 통하여 생체 내 안전성 자료를 확보하기 위해 난소를 적출한 SD 쥐에 HP4060 농축액을 경구투여한 결과, HP4060 투여 시험군의 GOT와 GPT의 수치는 대조군보다 낮은 결과를 얻어 유의적인 독성은 나타나지 않았다.

이상의 연구 결과에 의하여 phytoestrogen을 함유한 HP4060을 투여할 경우 에스트로겐과 유사하게 작용하여 세로토닌 및 노르에피네프린의 함량을 증가시켜 안면홍조의 발생빈도 및 정도가 감소될 수 있을 것이고, 또한 우울증 개선에도 효과적일 것으로 사료된다.

## REFERENCES

- Arao Y, Kanamori N, Kikkawa E, Otsuka H, Arimoto Y, Ikeda K, Inakuma T, Kayama F. Two-step screening method, using estrogen receptor-mediated transactivation to measure estrogenicity in edible plants. *Food Chem.* 2007. 104: 1288-1294.
- Aviram M, Dornfeld L, Reosenblar M, Volkova N, Kplan M, Coleman R, Hay DA T, presse D, Fuhman B. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein e-deficient mice. *Am J Clin Nutr.* 2000. 71: 1062-1076.
- Badria FA. Melatonin, Serotonin, and Tryptamine in Some Egyptian Food and Medicinal Plants. *J Med Food* 2002. 5: 153-158.
- Codagnone FT, Consoni FT, Rodrigues ALS, Vital MABF, Andreatini R. Veratrine blocks the lamotrigine-induced swimming increase and immobility decrease in the modified forced swimming test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007. 31: 1307-1311.
- Choi OK, Chung K, Cho GS. Proximate compositions and selected phytoestrogens of Iranian black pomegranate extract and its products. 2002. *Korean J Food Nutr.* 15: 119-125.
- Choi SJ, Lee HY, Cho A, Yang SD, Lee HS, Song CW, Han SS. Effect of green tea extract and its components on the brain neurotransmitters in ICR mice. *Korean J Lab Animal Sci.* 1999. 15: 251-255.
- Choi SY, Lim SH, Kim JS, Ha TY, Kim SR, Kang KS, Hwang IK. Evaluation of the estrogenic and antioxidant activity of some edible and medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol.* 2005. 37: 549-556.
- Ikeda K, Arao Y, Otsuka H, Nomoto S, Horiguchi H, Kato S. Terpenoids found in the Umbelliferae family act as agonists/antagonists for ER alpha and ER beta: Differential transcription activity between ferutinine-liganded ER alpha and ER beta. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002. 291: 354-360.
- Ishimi Y, Arai N, Wang X, Wu J, Umegaki K, Miyaura C. Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000. 274: 697-701.
- Jo WS, Nam BH, Oh SJ, Choi YJ, Kang EY, Hong SH, Lee SH, Jeong MH. Hepatic protective effect and single-dose toxicity study of water extract of *Cordyceps militaris* grown upon *protaetia dreujtarsis*. *Korean J Food Sci Technol.* 2008. 40: 106-110.
- Kim SH, Kim IH, Cha TY, Lee JH, Rim So, Song KS, Sokn BH, Kim JG, Lee JM. Analysis of extraction characteristics of phytoestrogen components from *punica granatum* L. *Korean J Soc Appl Biol Chem.* 2005. 48: 352-357.

- Kim HC, Kum EJ, Kwon DH, Lee HY. The effect of pomegranate extracts on the menopausal syndrom. *J Exp Biomed Sci.* 2009. 15: 217-227.
- Kim ND, Mehta R, Yu W, Neeman I, Livney T, Amichay. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2002. 71: 203-217.
- Kim SR, Choi SY, Ahn JY, Ha TY. Biological activities of phytoestrogens in plant and foodstuff. *Korean J Crop Sci.* 2003. 48: 31-40.
- Kronenberg F. Hot flushes: epidemiology and the menopause. *Menopause* 1999. 6: 209-215.
- Lee JY. Hormone replacement therapy in postmenopausal women. *J Klima.* 1993. 12: 27-36.
- Lorraine A. Alternatives to estrogen. *Med Clin N Am.* 2003. 87: 1091-113.
- Marston A, Hostettmann K. Biological and chemical evaluation of plant extracts and subsequent isolation strategy. In: *Bioassay methods in natural product research and drug development.* Bohlin L, Bruhn JG. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands. 1999. 67-80.
- Mori-Okamoto J, Otawara-Hamamoto Y, Yamato H, Yoshimura H. Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. *J Ethnopharmacol.* 2004. 92: 93-101.
- Miodini P, Fioravanti L, Fronzo GD, Cappelletti V. The two phyto-oestrogens genistein and quercetin exert different effects on oestrogen receptor function. *Br J Cancer* 1999. 80: 1150-1155.
- Muzur and Herman A. Overview of naturally occurring endocrineactive substances in the human diet in relation to human health. *Nutrition* 2000. 16: 654-658.
- Okada M, Hayashi N, Kometani M, Nakao K and Inukai T. Influences of ovariectomy and continuous replacement of  $\beta$ -estradiol on the tail skin temperature and behavior in the forced swimming test in rats. *Jpn J Phamacol.* 1997. 73: 93-96.
- Song BH, Hoang NT, Soo YB. Pomegranate as resources of phytoestrogen and anticancer substances. *Kor J Microbiol Biotechnol.* 2007. 35: 81-97.
- Shanafelt TD, Barton DL, Adjei AA, Loprinzi CL. Pathophysiology and treatment of hot flashes. *Mayo Clin Proc.* 2002. 77: 1207-1218.
-