

The Effects of *Seaweed Gongjindan* on Estrogen like Activities, Platelet Aggregation and Serum Lipid Levels in Ovariectomized Rats

Myeongjeong Jeon¹, Seoyeon Kim¹, Bo-Kyung Kim¹, Jihyeon Cheon¹, Seong-Hwan Park², Eunjin Oh³, Sang-Hyeon Lee² and Mihyang Kim^{1*}

¹Department Food and Nutrition, Silla University, Busan 617-738, Korea

²Department of Pharmaceutical Engineering, Silla University, Busan 617-738, Korea

³Korea Traditional Food & Medicine, Pukyong National University, Busan 608-739, Korea

Received August 20, 2013 / Revised September 23, 2013 / Accepted September 26, 2013

Estrogen like activities were evaluated using ethanol and hot water extracts of *gongjindan* (GJD) and 3 types of brown algae by an *in vitro* detection system. *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida* represented statistically significant ($p < 0.001$) estrogen like activities, while GJD and *Ecklonia stolonifera* did not. Furthermore, activities of hot water extracts (500 µg/ml) of *Laminaria japonica* and three mixture (*Ecklonia stolonifera* : *Undaria pinnatifida* : *Laminaria japonica* , 1: 1: 1) were stronger than that of 10^{-7} M 17β -estradiol. These results suggest that *Laminaria japonica* contain estrogen like compounds. Based on these results, the prepared *seaweed* GJD were used for animal experiments about the effects on inhibition of platelet aggregation and serum lipid levels in ovariectomized rats. 9-week Old female SD-rats were randomly assigned to 3 groups as sham-operated rats, ovariectomized rats and ovariectomized rats that were treated with GJD. The rats were placed on prescribed diets for 5 weeks following ovariectomy. Total cholesterol and triglyceride contents on serum decreased in the SHAM group compared to the OVX-CON group. 5 weeks feeding of GJD resulted in significant lowering of triglyceride and a decreasing tendency of total cholesterol level. The level of HDL-cholesterol on serum increased significantly by feeding diets containing the GJD. The ability of platelet aggregation of group treated with GJD was less than that of the OVX-CON group. These results suggest that the beneficial effects of *seaweed gongjindan* may be used to improve menopausal syndrome.

Key words : *Seaweed gongjindan*, estrogen like activities, platelet aggregation, serum lipids, ovariectomized rats

서 론

사회적·경제적 수준의 향상과 과학 및 의료기술의 발달로 인해 인간의 평균 수명이 연장되어 여성의 갱년기 이후의 삶이 일생의 1/3 이상을 차지하게 되었다[12]. 여성은 49-51세 전후로 폐경과 함께 갱년기가 시작되어 신체조직의 노화[23]와 더불어 난소의 기능이 저하되고 estrogen의 분비가 체내 요구량에 미치지 못하게 되어 이로 인해 갖가지 신체변화가 일어나게 된다[6]. 이러한 에스트로겐 결핍현상으로 인하여 홍조와 발한, 심계항진에 따르는 수면 장애, 골다공증, 성욕 감퇴, 배뇨장애 등의 증상을 보이며[20], 그 중 골다공증과 심혈관 질환은 폐경기 여성의 주된 사망원인으로 대두되고 있다[19]. 특히 폐경 약 2년 전부터 estrogen 감소로 인하여 혈중

저밀도 지질단백 콜레스테롤(LDL-cholesterol)이 증가하여 허혈성 심장질환의 발생빈도가 증가하게 된다[24]. 이처럼 갱년기에 나타나는 홍조, 발한, 심혈관계 질환, 골다공증의 예방에 효과가 있다고 보고된 바 있는 합성 estrogen을 함유하는 호르몬 보충요법(hormone replacement therapy, HRT)이 이용되고 있으나[4], 이의 부작용으로 유방암의 발병 위험이 증가될 수 있다는 보고[38]가 있으며 치료 전과 비교하여 치료 후에 혈중의 중성지방 상승으로 심혈관계 질환의 발병을 증가시킨다는 연구[31] 등으로 호르몬 보충요법의 위험성에 대한 인식이 깊어지고 있다. 또한, 폐경으로 인한 에스트로겐 부족현상이 지단백의 형태변화를 가져오고, 이는 폐경과 지질대사 관계에 있어서 폐경이나 난소 절제 시 나타나는 estrogen감소에 의해 HDL-cholesterol (high density lipoprotein cholesterol) 및 apolipoprotein A- I 의 감소와 LDL-cholesterol (low density lipoprotein cholesterol)의 증가를 초래하여 심혈관계질환 발병률이 증가한다[13]. 심혈관계질환에서 estrogen은 죽상동맥경화증의 저해작용으로 전 임상적 연구에서 심도있게 다루어졌으며, 임상적 실험 결과들은 폐경기 여성의 경우 estrogen이 lipid profiles, endothelial cell function, vascular reactivity, hemostatic factors 등에 이로운 효과가 있는 것으로 나타났다

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5620, Fax : +82-51-999-5457

E-mail : mihkim@silla.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

[3, 42]. 이처럼 estrogen의 일정량은 인체 내 유익한 효과를 가지는 반드시 필요한 물질으로써, estrogen 손실은 심혈관계 및 골 대사에 불균형을 가져오기 때문에 최근 이러한 갱년기 장애가 가져오는 부작용을 줄이기 위해 천연소재를 이용한 호르몬 대체품이 개발되어 사용되고 있다[35]. 최근에는 해양 생물자원 유래의 천연물에 대한 기능성 생리활성물질에 대한 관심이 지속적으로 높아지고 있으며, 해양 동물 유래 생리활성 물질 뿐만 아니라 해조류 유래의 생리활성물질의 연구가 영양적인 측면은 물론, 각종 질병 치료, 예방 및 건강 유지 등을 위해 지속적으로 연구가 진행되고 있는 실정이다[8]. 우리나라에 분포하는 해조류는 약 750여 종으로 보고되고 있으며 그 중 식용 등 산업적으로 이용 가능한 해조류는 약 30여 종 이내이다[25]. 한편, 해조류로부터의 추출물은 세계의 많은 지역에서 전통적인 치료제로써 사용되는 등 식물학적, 약물학적인 관심의 대상이 되고 있으며, 항 미생물학적 작용 외의 항균성을 가지는 것으로도 알려져 있다[21]. 질병 치료, 예방 및 건강증진 등 생리활성을 지닌 기능성 물질의 탐색은 식품·의약품 시장에서 높은 성장가능성을 기대하는 산업분야로 떠오르고 있으며, 특히 천연물 유래 기능성 물질은 화학 합성품에 비해 각종 질병에 효과적인 경우가 많고 낮은 독성과 부작용에 대한 인식으로 소비자들에게 높은 선호도를 보이고 있다[27]. 해조류 유래 estrogen 대체효과에 대한 연구는 다양하게 이루어지고 있으나[19, 23, 36, 43], 앞으로도 지속적인 연구가 필요하다.

한류열풍에 힘입어 우리나라의 전통건강식품에 대한 외국인의 관심과 수요가 높아지고 있지만 우리나라를 대표할만한 전통건강식품은 그 수가 한정되어 있고, 이 또한 한정된 기존제품에 원재료의 추가나 혼합비율을 상이하게 하여 신제품을 만드는 등의 단순가공의 한계를 벗어나지 못하고 있는 실정이다. 한편, 공진단은 우황청심환, 경옥고와 함께 3대 보약 중의 하나이며 명약 중의 명약으로 알려져 있다. 최근, 공진단과 관련된 연구로는 선행연구에 간보호 효과[15], 항산화 효과[9], H9c2 심근조직 고사에 미치는 영향[17], Alzheimer's disease에 미치는 영향[16], 생식능력에 미치는 영향[26] 등에 대한 결과가 보고되고 있다. 본 연구에서는 전통 한의약품으로 알려져 있으며 일반적으로 남성이 선호하는 보약인 공진단을 여성이 선호하는 보약으로 만들고자 에스트로겐 활성을 나타내는 성분을 첨가하여 해조공진단을 개발하고자 하였다. 공진단에 estrogen 활성을 가지는 갈조류를 첨가하여 *in vitro* 실험에서 estrogen 유사활성에 대하여 검토한 후, 가장 활성이 뛰어난 해조공진단을 이용하여 *in vivo* 실험을 수행하여 해조공진단의 산업적인 활용을 검토하였다. 이를 위해 인위적으로 갱년기를 유도한 흰쥐를 이용하여 혈중의 지질 농도, 혈소판 응집력 및 혈액 유동성에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

갈조류로부터 추출물의 제조

제주도에서 채집한 다시마(*L. japonica*), 미역(*U. pinnatifida*), 곰피(*E. stolonifera*)의 건조분말시료를 파라제주에서 구입하여 각각 10배량(w/v)의 80% ethanol 혹은 3차 증류수를 첨가한 후, 80°C에서 6시간 동안 추출을 수행하였으며, 추출액을 지름 150 mm의 여과지(Advantec, Japan)를 이용하여 2회 여과한 후, rotary vacuum evaporator (R-200, Buchi, Switzerland)로 농축하여 농축된 추출액을 동결건조장치(FD8518, Ilshin Bio-Base, Korea)를 이용하여 동결건조 후 추출물을 얻었다. 동결건조한 추출물 100 mg을 70% ethanol 혹은 3차 증류수 1 ml에 용해한 후, 필터(0.20 μ m filter)를 통과시켜 멸균하여 사용하였다.

해조공진단 제조

공진단은 한국전통약선에서 제공받았으며, 함유성분으로는 당귀, 산수유, 인삼, 숙지황이 4%, 녹용가수분해물 5.1%, 추출물형태의 당귀, 산수유, 인삼, 숙지황이 28%, 꿀 47.5%, 침향 2%, 유당 1.3%로 구성되어 있으며, 공진단에 각각의 해조류를 5%씩 첨가하여 제조하였다.

에스트로겐 유사활성 측정

본 연구진에 의해 제작된 에스트로겐 유사물질 검정용 세포주 MCF7/pDsCAT-ERE119-Ad2MLP 세포를 10% dextran-coated charcoal stripped FBS (CSF) [37]를 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, BioWhittaker, USA) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

배양된 세포의 세포밀도(confluence)가 약 90% 되었을 때 1X phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 후, 새로운 10% CSF를 포함하는 DMEM배지로 교환하였다. 여기에 각 시료들을 최종농도 5, 50, 500 μ g/ml가 되도록 첨가하였고, 표준물질로 100% 에탄올에 녹인 17 β -estradiol (RBI, Natick, MA, USA)을 최종농도 10⁻⁷ M이 되도록 처리하였다. 그 후, 37°C, 5%, CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양한 다음 세포를 회수하였고, PBS로 2회 세정한 후, 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 이후 lysis buffer 250 μ l를 첨가하여 세포를 현탁하고 실온에서 30분간 방치한 후, CAT-ELISA Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)를 사용하여 각 세포추출물 200 μ l의 chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 단백질의 함량을 측정하였다. CAT 단백질의 함량측정 결과는 BCA protein assay reagent kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용해 측정된 각 추출물의 총 단백질 함량으로 표준화시켰다.

실험동물

체중이 200-300 g인 9주령의 Sprague-Dawley계 암컷 흰

Table 1. Experimental design of animals

Group (No)	Treatment
SHAM (6)	Operated rats
OVX-CON (6)	Ovariectomized rats
OVX-GJD (6)	Ovariectomized rats supplemented diets containing the seaweed <i>gongjinan</i> .

No: Number of rats.

쥐를 (주)오리엔트 바이오에서 분양 받아 1주일간 환경에 적응시킨 뒤 실험에 사용되었다. 적응 후 난괴법(randomized complete block design)에 의해 군을 나누어 난소절제 수술(ovariectomy)을 하였고 비 난소절제 대조군에게는 sham-operation을 실시하였다. 수술 후 1주일간 고형 사료를 주어 상처가 회복된 후 각 군으로 나누었다. 즉, 실험동물은 비 난소절제 대조군(SHAM), 난소절제 대조군(OVX-CON), 난소절제 후 해조공진단 투여군(OVX-GJD 5 g/kg)으로 각 6마리씩, 3군으로 나누어 매일 식이를 투여하며 5주간 사육하였다(Table 1). 실험기간 동안 식이 섭취량과 체중은 매일 일정한 시간에 측정하였으며 동물실험실의 사육조건으로 온도 24±2℃, 습도 50~55%를 유지시켰고, 광주기 및 암주기를 12시간으로 조절하였다. 실험기간 동안 식이와 물은 모든 군에서 제한 없이 섭취하게 하였다.

난소절제시술

실험동물을 5:1로 혼합한 zolletil과 rompun을 이용하여 마취 후 심마취기에 이르면 복부 절개하여 난소를 제거하고 절개부는 봉합하였다. 수술 후 3일간 모든 군에게 일반 식이를 공급하며 상처를 회복시켰다. 또한 대조군 설정을 위하여 비 난소절제군은 복막 절개 단계까지 난소절제 수술과 같은 방법으로 시행하고, 양측의 난소를 노출하였다가 절제하지 않고 복막 속으로 다시 넣어 난소절제와 같은 스트레스를 주었으며, 다시 봉합하는 모의수술(sham operation)을 시행하여 이들을 대조군으로 사용하였다.

실험 식이

실험 식이는 기본적으로 조단백질 18% 이상, 조지방 6.7% 이상, 칼슘 0.8% 이상, 인 0.6% 이상을 포함하고 있는 실험동물 전형 고형사료(5L79 rat용 사료, Lab Diet사)를 사용하였다. 해조 추출물이 5% 함유된 해조공진단 투여군은 estrogen 유사 활성이 가장 높은 다시마 5%가 함유된 해조공진단을 분쇄된 사료에 첨가하여 성형, 제조한 고형사료 형태로 공급하였다.

혈액 및 장기 채취

흰쥐의 혈액은 희생 전 24시간 절식시킨 후 5:1로 혼합한 zolletil과 rompun을 이용하여 마취 하여 개복한 후 복대정맥에서 채취하였으며, 심장, 신장, 부신, 비장, 자궁, 폐, 간을 적출하여 주위의 지방과 물기를 제거하여 무게를 측정하였다.

혈청 중의 지질농도 분석

채취한 혈액은 실온에서 30분 방치 후 4℃, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청 중의 중성지방, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 분석은 자동 측정용 slide (FUJI FILM, Japan)를 이용하여 Dry chemistry analyzer 3500i (FUJI, Japan)로 측정하였다.

혈소판 응집력 분석

채취한 혈액은 3.2% sodium citrate 용액과 1:9의 비율로 혼합한 뒤 1,100 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층의 PRP (platelet rich plasma)를 취하고, 3,000 rpm에서 10분간 더 원심분리하여 상층 혈장을 제거한 후 EDTA를 포함하는 washing buffer (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0.36 mM NaH₂PO₄, 5.5 mM glucose, 1 nM EDTA, pH 6.5) 5 ml를 가한 후 혼합하여 혈소판을 재 현탁시켰다. 이 혈소판을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 다시 suspending buffer로 현탁시켜 washed platelet을 조제하였다. Washed platelet는 suspending buffer로 희석하여 혈소판 수가 5×10⁸/ml이 되도록 하였고, 응집유도제로 collagen을 2.5 µg 가하여 5분간 반응시켜, Whole blood lumi-aggregometer (Chrono-log, U.S.A)를 사용해 37℃에서 혈소판 응집을 측정하였다. 사용된 모든 용매 및 시약은 Sigma사에서 구입하였으며, 특급시약을 사용하였다.

통계처리

본 실험에 대한 모든 실험의 결과는 mean±SD 치로 나타내었고, 통계적 유의성은 SPSS version 17.0 통계 프로그램을 이용하여 상호비교 하였다. 에스트로젠 유사활성 측정의 사후 검증은 ANOVA를 사용하여 유의수준 p<0.001 수준으로 검증하였으며, 동물실험의 사후 검증은 Tukey HSD test를 사용하여 유의수준 p<0.05 수준으로 검증하였다.

결과 및 고찰

공진단 및 갈조류 추출물의 추출수율

공진단 및 갈조류를 80% 에탄올 혹은 3차 증류수로 80℃에서 8시간 동안 추출하고 농축시킨 후 획득한 에탄올 혹은 열수 추출물의 수율은 Table 2에 나타내었다. 그 결과, 에탄올 추출물의 경우 13~61%의 수율을 나타냈으며, 열수 추출물의 경우

Table 2. Yields (%) of ethanol or hot water extracts of *gongjinan* and brown algae

Materials	Ethanol extracts	Hot water extracts
<i>Gongjinan</i>	61	57
<i>U. pinnatifida</i>	19	18
<i>L. japonica</i>	15	10
<i>E. stolonifera</i>	13	11

10~57%의 수율을 나타내었다. 에탄올 추출물의 경우 공진단 에탄올 추출물에서 61%로 가장 높은 수율의 추출물이 획득되었고, 곰피 에탄올 추출물에서 13%로 가장 낮은 수율의 추출물이 획득되었다. 열수 추출물의 경우 공진단 열수 추출물에서 57%로 가장 높은 수율이 획득되었고, 다시마 열수 추출물에서 10%로 가장 낮은 수율 추출물이 획득되었다.

갈조류 추출물의 에스트로겐 유사활성 측정

생물체내로 유입된 에스트로겐 유사물질은 에스트로겐을 모방하여 세포 내에 있는 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ER)와 결합하고 DNA의 특정 염기서열인 estrogen responsive element (ERE)를 인식하여 결합한다[37]. 이러한 DNA상의 반응인자의 전사를 증대시키고 결국 특정 단백질의 발현을 유도하여 에스트로겐 유사물질에 의한 세포반응을 유도하는 것으로 알려져 있다[37]. 본 연구에서는 에스트로겐 수용체를 발현하는 것으로 알려진 인체 유방암 세포주 MCF7에 에스트로겐에 반응성을 나타내도록 고안된 CAT리포터 플라스미드인 pDsCAT-ERE119-Ad2MLP를 도입한 *in vitro* 검출시스템을 사용하여 에스트로겐 유사활성을 측정된 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 공진단 추출물에 대한 에스트로겐 유사활성을 측정된 결과, 통계적으로 유의한 에스트로겐 유사활성이

나타나지 않았다. 한편, 갈조류 추출물에 대하여 에스트로겐 유사활성을 측정된 결과, 곰피 열수 추출물은 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 에스트로겐 유사활성이 나타나지 않았으나, 다시마 및 미역 열수 추출물의 경우, 통계적으로 유의한 에스트로겐 유사활성을 나타내었다. 한편, 이들 세 추출물을 1:1:1 (w:w:w)로 혼합한 혼합물인 Three mixture (1:1:1)도 500 µg/ml의 농도에서 통계적으로 유의한 에스트로겐 유사활성이 나타났으나, 이러한 결과는 주로 다시마 열수 추출물의 높은 에스트로겐 유사활성에 기인한 것으로 판단되었다. 에탄올만을 처리한 음성 대조군과 비교하여 다시마 열수 추출물은 3.0배, 미역 열수 추출물은 1.5배, three mix (1:1:1)은 3.1배의 에스트로겐 유사활성을 나타냈으며, 다시마 열수 추출물은 양성 대조군인 17β- estradiol의 10⁻⁷ M 농도에서의 활성보다 더 높은 활성을 보였다. 갈조류인 다시마, 미역, 곰피 에탄올 추출물의 에스트로겐 유사활성을 측정된 결과, 모든 농도에서 통계적으로 유의한 에스트로겐 유사활성을 나타내지 않았다. 따라서, 에스트로겐 유사활성이 가장 높게 나타난 다시마 열수 추출물을 공진단 제조의 원료로 첨가하는 방법으로 해조공진단을 제조하여, 갱년기를 인위적으로 유도한 실험 동물에 투여한 후 갱년기에 나타나는 혈소판 응집 및 혈중 지질 조성 변화를 검토하였다.

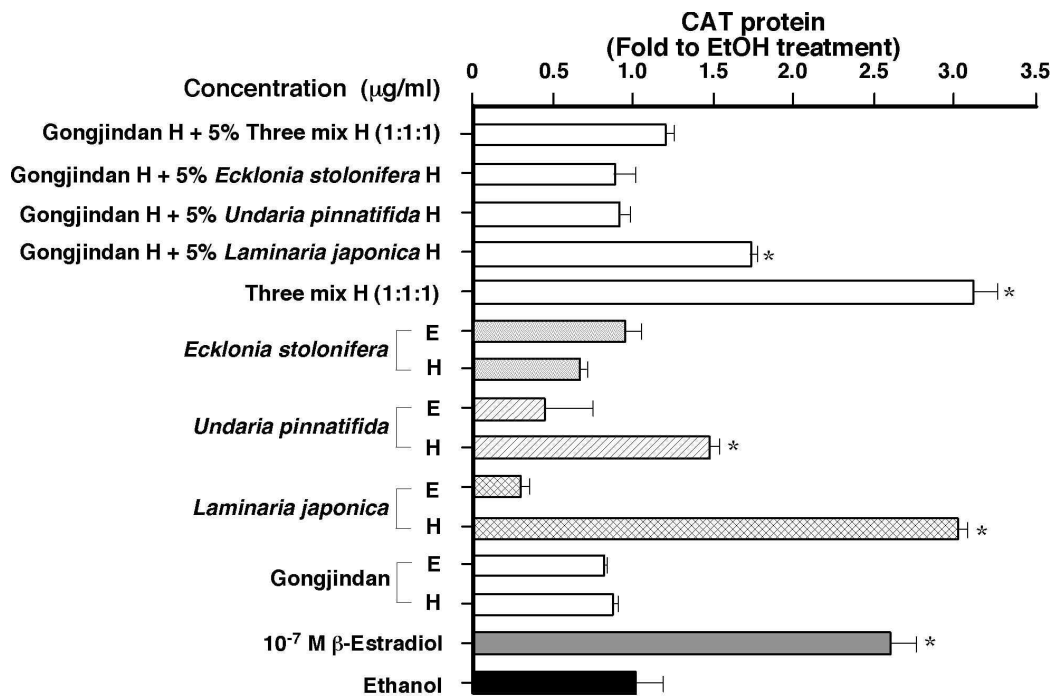


Fig. 1. Estrogen like activities of ethanol or hot water extracts of *gongjindan* and brown algae. MCF7/pDsCAT-ERE119-Ad2MLP cells were treated by extracts of *gongjindan* and brown algae at the 500 µg/ml concentration. 17β-estradiol or ethanol was used as positive and negative control, respectively. E and H in back of each sample name represent ethanol extract and hot water extract, respectively. CAT protein was measured using the CAT-ELISA kit and normalized to protein concentration of cell lysates. Mean±SEM for three plates are shown as fold compared with ethanol treatment. *ANOVA *p*<0.001 was compared with ethanol treatment. This experiment was repeated at least twice yielding reproducible results.

Table 3. Body weight gain, food intake and food efficiency ratio of rats supplemented with *seaweed gonggindan* for 5 weeks

Group	Final body weight (g)	Body weight gain (g/day)	Food intake (g/day)	Food efficiency ratio (FER)
SHAM	245.3±3.17	1.9±1.58	58.2±9.24	0.03±0.17
OVX-CON	259.5±13.41	2.96±9.06	62.9±10.15	0.04±0.89
OVX-GJD	253±9.18	3.15±2.52	56.1±10.98	0.05±0.20

See the legend of Table 1.

FER: Weight gain / food intake (g/day).

실험동물의 체중 증가량, 식이효율 및 장기중량

난소절제 및 해조 첨가 공진단 식이 투여에 따른 체중변화와 식이 섭취량은 Table 3과 같다. 난소 절제 및 해조공진단의 급여에 따른 체중 변화와 식이 섭취량 변화에서는 난소를 절제한 군(OVX-CON)이 난소를 절제하지 않은 군(SHAM)에 비하여 체중의 증가를 보였으며, 이는 흰 쥐에서 난소를 제거하면 성장속도가 증가하여 체중이 증가하는 것이고 체중 증가의 대부분은 체내 지방의 축적에 기인하는 것으로 보인다[44]. 한편 난소절제군에서의 체중 증가는 여러 연구 결과[32, 33, 39, 40]가 보고되었고, Gale와 Sclafani는 난소절제는 식이 섭취량과 식이효율을 증가시켜 거식증(hyperphagia)과 비만을 야기한다고 보고[14]하고 있으며, 이 등[28]은 난소절제한 쥐들의 체중과 체지방 무게의 증가를 보고하였다. 본 연구에서도 난소를 절제 후 해조공진단 첨가 식이를 투여한 군 또한 SHAM 군에 비해 통계적 유의성은 나타나지 않았으나 최종 체중량이 증가하였으며, 난소절제 대조군과 비교하여 비슷한 수준을 나타내었다. 따라서 난소절제 시에는 여성호르몬의 부족으로 체내 지방조직이 증가하게 되나, 해조공진단이 체중 감소에는 크게 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 식이효율은 비만을 나타내는 하나의 척도로 이용되고 있으며, 그 수치가 적을수록 비만조절 효과가 있다고 할 수 있다.

Table 4는 각 실험동물의 장기 중량을 나타낸 것이다. 간, 신장, 폐, 비장, 부신, 심장의 무게는 각 군 간의 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 각 군의 자궁 무게를 비교 해 보면, 난소를 절제한 OVX-CON군과 해조공진단 첨가 식이를 투여한 군에서 SHAM군에 비해 감소하는 경향을 볼 수 있다. 이는 난소절제 시 estrogen의 감소로 자궁의 성장이 억제된 것으로 보이며, 식물 추출물의 자궁 보호 효과에 대해서는 연구는 계속되고 있으나 아직 명확한 결과는 밝혀지지 않은 실정이다 [40].

혈청 중 중성지방 및 총 콜레스테롤 함량

고콜레스테롤혈증과 고혈압과 같은 관상동맥은 내피세포 기능장애(endothelial dysfunction), 콜레스테롤의 침착 및 변화를 통해 관상동맥경화증을 촉진시킨다[29]. Bonithon-Kopp 등[5]의 연구에서 폐경 전에 비해 폐경 후 저밀도 지단백, 콜레스테롤과 아포지단백 B 농도는 약 25% 증가하는 것으로 나타났다. 정상상태에서 식이성 중성지방과 콜레스테롤은 조직세포에서 합성된 지질과 균형을 이루나, 유전적 요인과 환경적 요인에 의해 체내 지질의 균형이 깨어질 수 있으며, 그 결과 혈장 lipoprotein인 LDL 농도의 증가와 HDL 농도의 감소가 유발되었을 때, 동맥경화증, 고혈압 및 심혈관계 질환을 일으키게 된다[34]. HDL-콜레스테롤의 증가는 내피세포의 혈관조절기능 장애를 방지한다고 알려져 있으며[10], NF-κB의존성 경로에 의해 내피세포 내의 접착물질(adhesion molecule)의 발현을 감소시킨다고 보고된 바 있다[45]. 한편 폐경에 이르러 중성지방과 HDL-콜레스테롤은 대체로 변화가 없으나 총 콜레스테롤이 증가되어 폐경기 이후 혈관 관련 질환의 발병률이 높아지는 원인으로 작용하고 있다[7].

해조공진단을 첨가한 사료를 섭취시킨 흰쥐의 혈청 중 총 콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 5와 같다. 총 콜레스테롤 함량의 경우, 난소를 절제하여 인위적인 갱년기를 유도한 OVX-CON군은 SHAM군에 비해 증가하였으며, OVX-GJD군은 OVX-CON군과 비교하여 감소하는 경향은 나타났지만 통계적인 유의성은 나타나지 않았다. 혈청 중 중성지방 함량의 경우 SHAM군에 비해 OVX-CON군이 난소 절제로 인해 중성지방 함량이 증가하였다. 해조공진단을 첨가한 사료를 섭취시킨 OVX-GJD 군의 경우, OVX-CON군과 비교하여 중성지방 함량이 유의적으로 감소하는 결과가 나타났다. 혈청 중 HDL-콜레스테롤 농도는 난소를 절제한 OVX-CON군에 비해 SHAM군이 증가하였

Table 4. Organ weight of rats on supplemented with *seaweed gonggindan* for 5 weeks

Group	Liver	Heart	Lung	Spleen	Adrenal	Kidney	Uterus
SHAM	9.41±0.62	0.93±0.12	1.38±0.25	0.55±0.10	0.1±0.00	2.05±0.24	0.64±0.08*
OVX-CON	8.96±1.93	0.98±0.13	1.25±0.36	0.68±0.21	0.1±0.00	1.85±0.20	0.4±0.18
OVX-GJD	10.03±1.37	0.93±0.09	1.51±0.56	0.65±0.13	0.1±0.00	1.83±0.17	0.56±0.11

See the legend of Table 1.

* $p < 0.05$, significantly different from OVX-CON group.

Table 5. Contents of total cholesterol, triglyceride and HDL-cholesterol in serum of ovariectomized rats with seaweed gongjindan (mg/dl)

Groups	Total Cholesterol	Triglyceride	HDL-cholesterol
SHAM	83.00±10.44*	65.00±7.78*	60.25±2.98
OVX-CON	98.50±11.21	106.00±31.22	54.50±8.11
OVX-GJD	97.33±5.13	82.66±33.17*	66.20±6.26*

See the legend of Table 1.

**p*<0.05, significantly different from OVX-CON group.

Table 6. Effect of seaweed gongjindan against collagen induced platelet aggregation in ovariectomized rats

Groups	Amplitude (%)	Slop (Ω/min)	Lag time (sec)
SHAM	75.00±9.69	86.50±9.26	0:36±0:07*
OVX-CON	87.07±8.06	95.50±10.70	0:26±0:07
OVX-GJD	75.20±3.81	79.37±5.12*	0:28±0:06

See the legend of Table 1.

**p*<0.05, significantly different from OVX-CON group.

으며, 해조공진단을 첨가한 사료 섭취군은 OVX-CON군에 비해 다소 증가하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 Anderson 등[1]이 연구한 대두 단백질 섭취가 고콜레스테롤 혈증 환자의 혈중 총 콜레스테롤 및 중성지방 농도를 감소시켰다는 효과와 유사한 것으로 해조공진단은 심혈관 질환의 예방 소재로써 활용 가능할 것으로 판단된다.

혈소판 응집에 미치는 영향

관상동맥 질환 및 뇌혈관 질환을 포함한 순환계 질환은 우리나라 사람의 사망원인의 대부분을 차지한다. 심혈관계 질환은 남성과 마찬가지로 여성들에 있어서도 주요한 사망원인으로 작용하고 있으며, 특히 폐경 후에는 폐경 전에 비해 심혈관계 질환의 위험성이 두 배 이상 증가될 수 있다고 보고되었다[18]. 혈관이 손상되었을 때 혈소판은 collagen, thrombin, ADP 등과 같은 각종 agonists의 자극에 응답해서 활성화되어 점착 반응(adhesion), 방출반응(secretion) 및 응집반응(aggregation)을 일으켜 인체의 혈관이 손상을 받아 출혈이 일어난 후 혈액이 혈관 또는 조직 내에서 응고됨으로서 혈전이 생성된다[11, 41]. 혈소판은 혈관손상에 반응하여 혈액손실을 막아주는 결정적인 역할을 하지만, 병리적인 혈전에 반응하여 급성 혈관죽상동맥혈전증을 일으키며 이는 심근경색을 포함하는 급성관상동맥증후군, 허혈성 뇌졸중, 허혈성뇌발작 등의 원인이 되기도 한다[30]. 이러한 심각한 병증을 예방·치료할 수 있는 약물들은 현재 혈전 용해제, 항응고제 및 항혈소판제 등이 있으나, 내출혈 또는 전신성 출혈 등의 부작용이 나타나 장기적인 치료 목적으로는 부적합하기 때문에[2] 천연물 유래 예방·치료 소재 개발이 시급하다. 난소 절제로 인해 estrogen이 결핍되어 혈청 중 지질 함량이 증가한 상태에서 해조공진단 첨가 사료의 섭취로 인한 혈소판 응집 억제효과를 검토하기 위해 washed platelet를 분리하고 collagen 2 μg로 혈

소판 응집을 유도하였다. 그 결과, 해조공진단 첨가 사료를 섭취한 군에서 OVX-CON군에 비해 혈소판 응집을 억제하는 효과를 나타냈다(Table 6). Amplitude (%)는 각 실험동물의 혈액에서 정제된 혈소판만을 분리하여 응집유도제를 첨가하였을 때 일어나는 최대 응집 정도를 나타내는 것으로 난소절제 한 OVX-CON군에 비해 해조공진단 첨가 사료를 투여한 OVX-GJD군에서 감소하는 결과가 나타났다. Slop (Ω/min)은 응집 유도제인 콜라겐을 첨가한 직후부터 1분 동안의 응집곡선의 기울기를 말하며 응집의 진행과 함께 혈소판이 platinum electrodes에 부착됨으로써 발생하는 전기저항의 크기를 혈소판 응집치로 나타낸 것이다. 난소절제를 한 OVX-CON군이 난소를 절제하지 않은 SHAM군과 비교하여 slop이 증가하여 혈소판 응집이 촉진되었으나 해조공진단 첨가 사료를 투여한 OVX-GJD군에서는 OVX-CON군에 비해 감소하여 혈소판 응집이 억제되었다. 이상의 실험결과 해조공진단은 에스트로겐 유사활성을 나타내고 있으며, 난소절제로 갱년기를 유도한 실험 동물에게 이를 섭취시킨 결과 혈중 지질 개선 및 혈소판 응집 저해 효과가 나타나 갱년기 증상 완화에 활용 될 수 있는 소재로 기대된다.

References

- Anderson, J. W., Johnstone, B. M. and Cook-newell, M. E. 1995. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med* **33**, 276-282.
- Badimon, L., Badimon, J. J., Penny, W., Webster, M. W., Chesebro, J. H. and Fuster, V. 1992. Endothelium and atherosclerosis. *J Hypertens* **10**, 43-50.
- Barrett-Connor, E. and Bush, T. L. 1991. Estrogen and coronary heart disease in women. *JAMA* **265**, 1861-1867.
- Belchetz, P. E. 1994. Hormonal treatment of postmenopausal women. *N Engl J Med* **14**, 1062-1071.

5. Bonithon-Kopp, C., Scarabin, P. Y., Darme, B., Malmejac, A. and Guize, L. 1990. Menopause-related changes in lipoproteins and some other cardiovascular risk factors. *Int J Epidemiol* **19**, 42-48.
6. Campagnoli, C., Biglia, N., Peris, C. and Sismondi, P. 1995. Potential impact on breast cancer risk of circulating insulin-like growth factor I modifications induced by oral HRT in menopause. *Gynecol Endocrinol* **9**, 67-74.
7. Campos, H., Wilson Peter, W. F., Jimenez, D., Mcnanara, J. R., Ordovas, J. and Schaefer, E. J. 1990. 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- 1038.
8. Cha, S. H., Ahn, G. N., Heo, S. J., Kim, K. N., Lee, K. W., Song, B. S., Cho, S. K. and Jeon, Y. J. 2006. Screening of extracts from marine green and brown algae in Jeju for potential marine angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **35**, 307-314.
9. Choi, G. H. 2007. (An) analysis of the Gongjindan;s ingredients and its efficacy on anti-oxidation. *Ph D Dissertation*. Daegu Haany University.
10. Clarkson, T. B. 2002. Soy phytoestrogens a cardiovascular disease. *J Nutr* **132**, 566-569.
11. Furie, B. and Furie, B. C. 1988. The molecular basis of blood coagulation. *Cell* **53**, 505-518.
12. Gavey, D. A. 1986. The menopause and climacteric. In : Whitfield, C. R. ed. Dewhurst's text-book of obstetrics and gynecology for postgraduates. 4th eds., Oxford: Blackwell scientific publications, 646-676.
13. Grodstein, F., Stampfer, M. S., Manson, J. E. 1996. Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med* **335**, 453-461.
14. Gale, S. K. and Sclakani, A. 1977. Comparison of ovarian and hypothalamic obesity syndromes in the female rat: effect of diet palatability on food intake and body weight. *J Comp Physiol Psychol* **91**, 381-392.
15. Hwang, S. M. 2004. The Effects of KongJin-Dan (KJD) on the Alzheimer's Disease Model Induced by CT105 and β -amyloid. *MS Thesis*. Daegu Haany University.
16. Hur, H. 2008. Hepatoprotective Effects of GongJinDan, on Ethanol-mediated Experimental Liver Damage in Rats. *Ph D Dissertation*. Daegu Haany University.
17. Im, E. Y. 2006. Protective Effects of Gongjindan on Adriamycin - Induced Apoptosis in H9c2 Cardionmyoblast Cells. *Ph D Dissertation*. Wonkwang University.
18. Jang, H. K. and Cha, B. K. 2003. Influencing factors of climacteric women's depression. *J Korean Acad Nurs* **33**, 972-980.
19. Jeon, M. H. 2011. Effect of *Hijikia fusiforme* fractions on proliferation and differentiation in osteoblastic MC3T3-E1 Cells. *J Life Sci* **21**, 300-308.
20. Je, S. Y. and Park, W. H. 1998. The Relationship of Cardiopulmonary Fitness to Plasma Fibrinogen, Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 (PAI-1), and Lipoprotein (a) [LP(a)] in Healthy Postmenopausal Women. *J Korean Sports Med* **16**, 282-291.
21. Kim, J. Y. and Kim, M. H. 2005. The Effects of *Hijikia fusiforme* on Serum Lipid Levels in Ovariectomized Rats. *J Life Sci* **15**, 242-247.
22. Kim, S. N. 2007. Effect of rose essential oil on female hormones in menopausal women. MS Thesis. Chung-Ang University.
23. Kim, Y. K., Jeon, M. H., Park, Y. S., Hwang, H. J., Lee, S. H., Kim, S. G., Kim, Y. Y. and Kim, M. H. 2010. The Effect of *Ecklonia stolonifera* extracts on blood flow and serum lipid level in ovariectomized rats. *J Life Sci* **20**, 1851-1858.
24. Lee, H. S. 2001. Experiences of postmenopausal women about hormone replacement therapy. *MS Thesis*, Graduate School of Chungang University, Korea.
25. Lee, I. K. and Gang, S. W. 1986. A check list of marine algae in Korea. *Algae* **2**, 311-325.
26. Lee, L. Y., Cheorun, J. and Byun, M. W. 2005. Application of irradiation technology for development of functional natural materials. *Food Indus Nutr* **10**, 26-31.
27. Lee, J. M. 2003. Effects of Yangyigongjindan on the Reproductive Competence of Aged Mice. *Ph D Dissertation*. Kyunghee University.
28. Lee, S. S. and Park, J. H. 1989. Long-term effect of ovariectomy on body composition. *Korean J Nutr* **22**, 102-107.
29. Levine, G. N., Keaney, J. F. and Vita, J. A. 1995. Cholesterol reduction cardiovascular disease; Clinical benefits and possible mechanisms. *N Engl J Med* **33**, 512-521.
30. Lisa, K. 2009. Mechanisms of platelet activation: Need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost* **2**, 248-257.
31. Manolio, T. A., Pearson, T. A., Wenger, N. K., Barrett-Connor, E., Opayne, G. H. and Harlan, W. R. 1992. Cholesterol and heart disease in older persons and women. Review of an NHLBI workshop. *Ann Epidemiol* **2**, 161-176.
32. Mook, D. G., Kenney, N. J., Roberts, S. and Nussbaum, A. I. 1972. Ovarian-adrenal interactions in regulation of body weight by female rats. *J Comp Physiol Psychol* **81**, 192-211.
33. Mueller, K. and Hsiao, S. 1980. Estrus and ovariectomy-induced body weight changes: evidenced for two estrogenic mechanisms. *J Comp Physiol Psychol* **5**, 1126-1134.
34. Park, Y. S. 2011. Effects of eisenia bicyclis extracts on lipids and bone turnover in ovariectomized rats. *MS Thesis*. Silla University.
35. Park, Y. S. and Kim, M. H. 2012. The effect of eisenia bicyclis extracts on antioxidant activity and serum lipid level in ovariectomized rats. *J Life Sci* **22**, 1407-1414.
36. Park, S. H., Jang, M. J., Hong, J. H., Rhee, S. J. and Choi, K. H. 2007. Effects of mulberry leaf extract feeding on lipid status of rats fed high cholesterol diets. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **36**, 3-50.
37. Ponglikitmongkol, M., White, J. H. and Chambon, P. 1990. Synergistic activation of transcription by the human estrogen receptor bound to tandem responsive elements. *EMBO J* **9**, 2221-2231.
38. Rossouw, J. E., Anderson, G. L., Prentice, R. L., LaCroix, A. Z., Kooperberg, C., Stefanick, M. L., Jackson, R. D.,

- Beresford, S. A., Howard, B. V., Johnson, K. C., Kotchen, J. M. and Ockene, J. 2002. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. *JAMA* **288**, 321-333.
39. Stampfer, M. J. and Colditz, G. A. 1991. Estrogen replacement therapy and coronary heart disease : a quantitative assessment of the epidemiologic evidence. *Prev Med* **20**, 47-63.
40. Schemmel, R. A. and Teague, R. T. 1982. Obesity in Osborne mendel and S 4B/P1 rats: effects of sucrose solution, castration and treatment with estradiol or insulin. *Am J Physiol* **243**, 347-352.
41. Shimizu, H. and Shimomura, Y. 1992. Colonic temperature was not changed in the development of obesity after ovariectomy. *Exp Clin Endocrinol* **2**, 99-101.
42. Siess, W. 1989. Molecular mechanism of platelet activation. *Physiol Rev* **69**, 58-178.
43. Kim, O. S. 2004. Verification of estrogen-like activities in products of pomegranate extract using *in vitro* test system. *College of Natural Sciences, Silla University*. **13**, 107-111.
44. Yamazaki, I. and Yamaguchi, H. 1989. Characteristics of an ovariectomized osteogenic rat model. *J Bone Miner Res* **4**, 13-22.
45. Zeher, A. M., Schachlinger, V. and Hohnlosr, S. H. 1994. Coronary atherosclerotic wall thickening and vascular reactivity in humans: Elevated high-density lipoprotein levels ameliorate abnormal vasoconstriction in early atherosclerosis. *Circulation* **25**, 2525-2532.

초록 : 해조공진단의 에스트로겐 유사활성 및 난소를 절제한 흰쥐의 혈소판 응집과 혈청 내 지질 조성에 미치는 영향

전명정¹ · 김서연¹ · 김보경¹ · 천지현¹ · 박성환² · 오은진³ · 이상현² · 김미향^{1*}
 (¹신라대학교 식품영양학과, ²신라대학교 제약공학과, ³한국전통약선)

갱년기의 여성에는 여러 폐경 증후들이 나타나는데, 특히 에스트로겐의 감소로 인한 혈중의 지질 조성의 변화 등으로 골다공증 및 심혈관계 질환의 발병율이 높아지게 된다. Estrogen의 감소는 다양한 생리적 변화를 초래하며 특히 심혈관계 질환을 빠르게 진행시킨다고 보고되고 있다. 본 연구에서는 에스트로겐 유사활성이 뛰어난 갈조류를 선정하여 해조공진단을 제조하였으며, 실험동물인 흰쥐의 난소를 절제하여 인위적으로 갱년기를 유도한 후 해조공진단이 혈소판 응집능 및 혈중 지질 함량에 미치는 영향을 검토하였다. 에스트로겐 검출시스템을 사용하여 공진단 및 갈조류 추출물의 에스트로겐 유사활성을 검증한 결과, 다시마 및 곰피 열수 추출물에서는 통계적으로 유의한 에스트로겐 유사활성이 나타났으며, 특히 다시마 열수 추출물에서 가장 높은 활성이 나타났다. 이러한 *in vitro* 실험 결과를 통해 다시마 추출물을 첨가한 해조공진단을 제조한 후, 갱년기를 유도한 실험동물에 투여하여 혈소판 응집능 및 혈청 내 지질 조성에 미치는 영향을 검토하였다. 총 콜레스테롤 함량은 해조공진단 투여로 인해 OVX-CON군에 비해 감소하는 경향을 나타내었으나 유의적인 결과가 나타나지 않은 반면, 혈청 중 중성지방 함량의 경우, 해조공진단을 투여한 OVX-GJD군은 OVX-CON군과 비교하여 중성지방 함량이 유의적으로 감소하는 결과가 나타났다. 혈청 중 HDL-콜레스테롤 농도는 정상군인 SHAM군에 비해 난소를 절제한 OVX-CON군이 유의적으로 감소하였으나, 해조공진단을 첨가한 사료 섭취군(OVX-GJD)은 OVX-CON군에 비해 유의적으로 증가하는 결과를 나타내었다. 또한, 혈소판 응집 저해능을 검토한 결과에서 OVX-CON군에 비해 OVX-GJD군의 혈소판 응집이 유의적으로 감소하여 저해하는 경향을 나타내었다. 따라서 본 연구를 통해 제조된 해조공진단이 에스트로겐 유사활성을 가지고 있으며, 난소절제로 갱년기를 유도한 실험동물에게 이를 섭취시킨 결과 혈중 지질 개선 및 혈소판 응집 저해 효과가 나타나 갱년기 증상 완화에 활용 될 수 있는 소재로 기대된다.