

난소 적출 동물모델에서 고흡산 석류 농축액의 갱년기 증상 개선 효과

위지향¹ · 정현정¹ · 정경옥¹ · 성혜미¹ · 신유림² · 박주현³ · 서현영² · 임정민³ · 채한정³ · 이기웅⁴

¹(재)전남생물산업진흥원 식품산업연구원, ²(주)바이오푸드스토리
³전북대학교 의학전문대학원, ⁴순천대학교 농업경제학과

Pomegranate Extract Improves Menopausal Syndrome in Ovariectomized Rats

Ji-Hyang Wee¹, Hyun Jung Jung¹, Kyung Ok Jung¹, Hea Mi Sung¹, Yu-Rim Shin², Ju-Hyun Park²,
Hyeon-Young Seo², Jung-Min Lim³, Han-Jeong Chae³, and Ki Yung Lee⁴

¹Department of Research and Development, Jeonnam Food Research Institute

²BioFoodstory Co., Ltd.

³Chonbuk National University Medical School

⁴Department of Agriculture Economics, Suncheon National University

ABSTRACT In this study, the effect of Goheung pomegranate extract on postmenopausal syndrome was evaluated both *in vitro* and *in vivo* in ovariectomized Sprague-Dawley (SD) rats. Sixty female SD rats were divided into six groups: sham, sham operation and distilled water; OVX, ovariectomized and distilled water; PE1, ovariectomized and pomegranate concentrate (0.75 mL/twice/d); PE2, ovariectomized and pomegranate concentrate (1.5 mL/twice/d); PE3, ovariectomized and pomegranate concentrate (2.2 mL/twice/d); and CE, ovariectomized and commercial pomegranate concentrate (2.2 mL/twice/d). Percent bone volume (bone volume/tissue volume) and trabecular thickness (Tb.Th) improved in a dose-independent manner in PE1, 2, and 3. Especially, bone mineral density was significantly improved in PE3 ($P<0.05$) compared to OVX. Pomegranate extract reduced body weight and visceral fat mass. High density lipoprotein cholesterol (HDL-C) level slightly increased in a dose-independent manner in the experimental group. In addition, HDL-C/total cholesterol level of PE3 significantly increased ($P<0.05$) compared with OVX. These results show that pomegranate concentrate improved blood lipid levels and bone metabolism in ovariectomized rats. Therefore, Goheung pomegranate concentrates are expected to improve cardiovascular and bone-related diseases in menopausal women.

Key words: pomegranate, female menopausal symptom, ellagic acid, serum lipid, bone mineral density

서 론

여성 갱년기란 폐경을 전후하여 점차적으로 난소의 기능이 소실되어가는 기간을 말하며(1), 월경이 완전히 정지된 후 1년이 지난 시기부터 폐경이라고 정의한다. 의학의 발전 및 생활여건의 개선으로 기대수명은 계속 증가하였고 우리나라 여성의 평균수명은 약 84.0세로, 대부분의 여성들은 삶의 1/3 이상을 폐경 상태로 살아가게 되었다. 폐경은 노화로 일어나는 자연스러운 현상으로 폐경에 의한 갑작스러운 호르몬 변화가 원인이며, 이로 인해 일상생활의 유지 방해 및 삶의 질을 저하시킬 수 있어 문제가 되고 있다. 이러한 노화에 의한 에스트로겐 분비 감소는 안면홍조, 생식기 위축, 배뇨장애, 골다공증, 지질대사이상, 우울증, 불안장애,

성기능장애, 피부노화 등 여러 증상을 야기하는데 이러한 증상을 “갱년기 증후군”이라고 한다(2).

갱년기 증상 개선을 위해 일반적으로 호르몬 요법이 사용되고 있는데 이러한 호르몬 요법은 갱년기 여성에게 일어나는 열성호조, 질 위축, 비뇨기 위축 등 신체적 증상의 치료와 갱년기로 인한 심리적 증상의 개선, 골다공증 예방, 콜레스테롤의 대사에 관여하여 심혈관 질환 예방 등의 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 그러나 이러한 치료법은 과량의 에스트로젠으로 인하여 자궁내막암, 심장질환을 비롯하여 유방암의 발생 빈도를 증가시키는 것으로 알려져 있다(3,4). 이와 같은 치료법에 대한 부작용 및 위험성이 부각되면서 최근에는 식물성 estrogen-like 물질이나 천연물 유래 갱년기 증상 개선 물질을 개발하는 연구가 활발히 진행되고 있다(5,6).

석류(*Punica granatum* L.)는 석류나무의 열매로 이란을 중심으로 한 아시아 서남부 및 인도의 북서부가 자생지이며, 국내에는 8세기 전후로 중국에서 들어온 것으로 추정되고

Received 4 December 2014; Accepted 12 January 2015

Corresponding author: Ji-Hyang Wee, Department of Research and Development, Jeonnam Food Research Institute, Naju, Jeonnam 520-330, Korea

E-mail: happywee@lycos.co.kr, Phone: +82-61-339-1210

있으며, 전남 고흥에서 국내 석류 생산량의 약 61.9%가 생산되고 있다. 석류는 그 과즙 및 씨앗에 에스트로겐뿐만 아니라 testosterone, β -sitosterol, campesterol 같은 호르몬을 함유하고 있다고 보고(7)되어 오랫동안 민간요법으로 폐경 증상의 치료에 이용되어 왔다. 석류는 라즈베리, 딸기, 포도와 같은 과일과 함께 ellagic acid 함량이 높은 것으로 알려져 있으며(8) 인체 생리활성에 유익한 효과로 인해 석류의 ellagic acid에 대한 연구가 꾸준히 진행되고 있다. 최근에는 석류의 항산화능, 면역 강화, 항암 효과 등의 기능이 알려지면서(9-11) ellagitannins, ellagic acid가 풍부한 석류의 기능성에 대한 연구자들의 관심이 증가하고 있다.

국내에서 시판되고 있는 석류는 주로 이란, 미국 등에서 수입되고 있는 실정으로 최근에는 이란산 석류 농축액의 여성 갱년기 증상 개선 효과가 입증되어 식품의약품안전처에 기능성 원료로 등재된 바 있다. 국내에서 생산되는 석류는 그 양이 많지 않아서 국내산 석류에 대한 연구개발이 많이 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 국내산 석류는 수입산 석류와 비교할 때 과실의 크기가 더 크고 열매의 껍질이 더 두꺼우며, 익으면 껍질이 갈라지는 특징을 가지고 있으면서 단맛보다는 신맛이 더 강한 품종으로 지금까지 연구된 수입산 석류와는 그 품종의 차이로 인해 기능성에도 차이가 있을 것으로 생각한다. 최근에는 국내산 석류의 높은 약리 효과 및 품질 우수성이 확산되고 있어 국내산 석류를 이용한 고품질의 건강기능식품 개발 육성이 필요한 시기이다. 이에 본 연구에서는 국내에서 재배된 고흥산 석류 농축액의 여성 갱년기 증상 개선 제품개발 가능성을 확인하기 위하여 난소 적출 동물모델을 이용하여 국내(고흥)산 석류 농축액과 기능성 원료로 등재되어 현재 시판 중인 이란산 석류 농축액 제품의 골다공증, 정신장애 증상 및 체지방 관련 바이오마커들을 서로 비교 관찰해 보고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 석류는 2013년에 수확한 전남 고흥산 석류를 사용하였다. 석류 껍질을 벗겨 석류 껍질과 알갱이를 분리한 후 알갱이는 씨가 깨지지 않을 정도로 으깨어 석류 씨와 과육을 분리시켰다. 껍질과 씨가 분리된 석류 과육의 중량 대비 약 3~5배수 정도의 물을 첨가한 후 90°C에서 3~4시간 정도 열수 추출을 실시하였다. 석류 열수 추출물을 10 μ m의 필터로 여과하여 얻어진 여액을 약 60°Bx 정도가 되도록 원심박막농축기(Okawara, Shizuoka, Japan)로 농축한 농축액을 본 실험에 사용하였다.

Ellagic acid 함량 측정

석류 농축액에 함유된 ellagic acid 함량은 Acar 등(12)의 방법을 변형하여 사용하였다. 석류 농축액 약 0.5 g을 둥근 바닥플라스크에 취한 후 20% HCl(DUKSAN, Ansan,

Korea) 10 mL를 넣고 잘 녹인다. 이를 90°C에서 5시간 가수분해한 후 실온으로 냉각하여 얻어진 가수분해 용액을 50 mL 메스플라스크에 담고 메탄올로 정용한 후 0.45 μ m PTFE syringe filter로 여과한 용액을 시험용액으로 사용하였다. 표준물질로는 ellagic acid(Fluka, St. Louis, MO, USA)를 적절한 농도로 희석 조제하여 표준곡선을 작성하였다. Ellagic acid 분석은 액체크로마토그래피(HPLC, 1100 series; Agilent, Santa Clare, CA, USA)를 사용하였다. 분석용 칼럼은 Capcellpak C18 UG(4.6 mm×250 mm, 5 μ m; Shiseido, Kyoto, Japan), 검출파장은 254 nm, 이동상으로는 용매 A-0.1% formic acid in water와 용매 B-acetonitrile : methanol(85:15, v/v)을 이용하여 Table 1의 기율기 용매조건으로 분석하였으며, 칼럼 온도는 30°C, 유속은 1 mL/min 속도로 유지시켰고, 시료 주입량은 5 μ L로 하였다 (Table 1).

세포배양 및 세포 성장률 측정

본 실험에 사용된 세포주 MCF-7은 한국세포주은행(KTCC, Seoul, Korea)으로부터 구입하였다. 10% fetal bovine serum(FBS)과 penicillin(100 units/mL), streptomycin(100 g/mL)이 함유된 DMEM/F12 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂, 95% humid air로 조절된 배양기에서 배양하였다. FBS, penicillin, streptomycin, DMEM/F12, PBS는 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였다.

석류 추출물 처리에 따른 MCF-7의 증식 정도는 세포 단 백질의 음이온과 sulforhodamine B(SRB)의 양이온이 결합하여 발색하는 원리를 이용한 SRB assay kit(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하였다(13). 각 세포주는 24 well plate에 3×10⁴ cells/well로 분주하여 24 시간 배양 후, phenol red가 포함되지 않은 DMEM/F12에 10% charcoal-dextran stripped FBS(12)와 석류 추출물

Table 1. HPLC conditions for ellagic acid analysis

Instrument	HPLC system			
Detector	UV detector (254 nm)			
Column	Shiseido Capcell Pak C18 UG (4.6 mm×250 mm, 5 μ m)			
Mobile phase	A-0.1% formic acid in DW B-acetonitrile : methanol=85:15			
	Time (min)	A (%)	B (%)	Flow (mL/min)
	0	85	15	1.0
	24	76	24	1.0
	30	20	80	1.0
	32	85	15	1.0
	40	85	15	1.0
Injection vol.	5 μ L			
Temperature	30°C			
Run time	40 min			

을 첨가하여 처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 배양이 모두 완료된 후에 SRB로 염색하고 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

실험동물

실험동물은 성적으로 성숙한 7주령 암컷 Sprague-Dawley rats 60마리를 주식회사 샘타코(Gyeonggi, Korea)에서 공급받아 1주일간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 실험동물은 온도 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 명암주기 12시간 주기로 일정하게 유지된 사육실에서 표준 케이지에 수용하여 1.2%의 칼슘과 0.8%의 인을 포함하는 표준사료(DAMOO-SCIENCE, Daejeon, Korea)를 먹이하였으며, 본 연구에서의 모든 동물실험은 전북대학교 동물실험 윤리위원회의 승인 하에 수행되었다(CBU2014-00010).

Rats의 양쪽 난소를 절제하여 갱년기를 유도(OVX)하였고, 난소 절제 후 3가지 농도의 석류 농축액(PE1, PE2, PE3)과 시판 제품(이란산 등 복합물, CE)을 투여하였다. 정상대조군(sham)은 개복 후 난소 절제 없이 봉합하였으며 실험동물은 각 군당 10마리씩 사용하였다.

실험동물의 몸무게는 주 1회, 식이섭취량은 매일 측정하였고, 난소 무게와 복부/내장지방은 시료 투여 후 10주에 측정하였다.

시료 투여

난소 절제 2주일 후부터 PE1, PE2, PE3 군은 석류 농축액을 각각 0.75, 1.5, 2.2 mL/2회/일, 시판 제품군(CE)은 2 mL/2회/일 매주 5일(월~금)씩 10주간 경구투여 하였고, sham군과 OVX군은 시료 투여군과 동일부피의 정수물을 경구투여 하였다.

혈액검사

혈청은 시료 투여 10주 후 불안장애 및 우울증 검사 후 혈액을 회수하여 분석하였다. 혈청 칼슘, 인, alkaline phosphatases(ALP), triiodothyronine(T3), thyroxine(T4), osteocalcin, estradiol의 함량은 Modular Analytics E170 (Roche, Mannheim, Germany)을 이용하여 분석하였다. 심혈관계 위험인자로 알려진 혈중 지질치, 고밀도 지단백 콜레스테롤(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C), 저밀도 지단백 콜레스테롤(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C), 중성지방(triglyceride, TG), 총 콜레스테롤(total cholesterol, TC)과 간독성을 확인하기 위한 glutamate oxaloacetate transaminase(GOT), glutamic pyruvic transaminase(GPT) 및 BSALP(bone specific alkaline phosphatase), homocysteine은 ELISA kit(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 측정하였다.

대퇴골의 골밀도 및 골 손실 분석

μ -CT scanner(SkyScan-1076 *in vivo* CT-scanner;

SkyScan, Aartselaar, Belgium)를 이용하여 대퇴골(femur)의 골밀도(bone mineral density, BMD) 및 골 손실을 분석하였다. 대퇴골과 경골을 해부하여 대퇴골에 부착되어 있는 근육을 깨끗하게 제거하고 고정액으로 고정한 후 분석하였다.

불안장애 및 우울증 검사

불안장애 및 우울증 검사는 갱년기의 우울증(menopausal depressive-like state) 모델로 가장 적합하다고 Bekku와 Yoshimura(14)가 제안한 forced swimming test(FST, 강제수영검사)와 elevated plus maze(EPM) 방법을 사용하여 난소 절제 1주일 후 시료 투여 전과 시료 투여 10주 후에 실시하였다. EPM은 검정색의 아크릴로 제작되었으며 바닥에서 50 cm 높이에 설치된 십자형 미로로 4개의 통로 가운데 마주보는 2개(길이 30 cm, 폭 5 cm)는 개방되어 있고 크기가 동일한 다른 2개의 통로는 높이 20 cm의 벽으로 구성되어 있다. 중심 platform은 가로 5×5 cm로 하였고 maze의 중앙부 천정에 비디오카메라를 설치하여 동물의 행동을 기록하였다. 행동은 10분간 관찰하였으며 rat이 open arm과 closed arm에 머무르는 시간, 각 arm의 출입횟수 등을 Etho Vision Program(Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands)으로 각각 측정하였다. 각 arm의 출입횟수는 open arm이나 closed arm의 교차점을 기준으로 어느 쪽으로나 네 발이 완전하게 진입되었을 때를 1회로 하였다. 우울증은 FST를 이용하여 측정하였다.

통계분석

본 실험 결과는 평균±표준오차로 표현하였다. 다만 MCF-7 cell viability 및 bone parameter 측정값의 일부는 평균±표준편차로 표현하였다. 평균 분산분석을 이용하여 결과치들을 비교하였고 군 간의 차이는 Tukey법을 이용하여 분석하였다. 통계처리는 프리즘(Prism, V 5.0, GraphPad, San Diego, CA, USA)을 이용하였고 $P < 0.05$ 수준 이하에서 유의성 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

Ellagic acid 함량 분석

본 연구에서 사용한 고흡산 석류 농축액과 이란산 석류음료 시판 제품을 동일하게 농축하여 ellagic acid 함량을 비교하였다. 고흡산 석류 농축액의 ellagic acid 함량은 1.02 mg/g으로 시판 석류 제품의 1.12 mg/g보다 소량 낮게 검출되었으나 큰 차이는 없었다.

세포 성장에 미치는 영향

MCF-7은 지방암 세포주로 에스트로겐에 의해 지방암의 증식 및 진행, 전이되는 것으로 알려져 있다(15). 따라서 본 연구에서는 MCF-7에서 석류 추출물이 세포의 증식능에 미

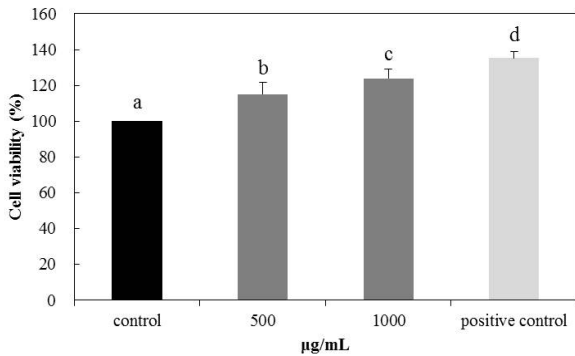


Fig. 1. The effect of pomegranate extract on the proliferation of MCF-7 cells. Control: non-treated control, 500: pomegranate extract 500 µg/mL, 1,000: pomegranate extract 1,000 µg/mL, positive control: commercial product. Values are expressed as the mean±SD (n=3). Different letters (a-c) above the bars are significantly different at $P<0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

치는 영향을 측정하였다. MCF-7에 대한 세포 성장 억제능 검색 결과는 Fig. 1과 같다. 석류 추출물은 500 µg/mL 농도 처리군에서 control군에 비해 세포 성장 억제능(약 10%)을 보였고 1,000 µg/mL 농도 처리군에서는 control군에 비해 약 15%의 세포 성장 억제능을 보이며 모든 석류 추출물 처리군에서 유의적인 차이를 나타냈다. 또한 석류 1,000 µg/mL 농도 처리군은 여성 갱년기 증상 관련 건강기능식품으로 시판 중인 positive control의 세포 성장 억제능과 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났는데 이로써 고흥산 석류 추출물은 시판 제품과 동일한 수준으로 세포 성장 억제능에 효과가 있는 것으로 확인되었다. Kim 등(16)은 석류 추출물이 전립선 암세포주인 PC-3의 세포 성장 억제 효과를 보였으며 이러한 암세포 성장 억제 효과는 석류에 함유된 폴리페놀 물질들이 작용하여 세포 사멸 효과에 좋은 활성을 나타내는 것으로 보고하였다. 또한 Kawaii 등(17)과 Johnson과 Loo(18) 및 Zhang 등(19)은 과일 등에 함유된 기능성 물질인 ellagic acid와 epigallocatechin gallate 등에 의한 암세포 억제 효과를 규명하고 있다. 따라서 본 연구에서도 석류 추출물에 함유된 ellagic acid 등과 같은 물질이 MCF-7 세포주의 성장 억제에 효과를 나타낸 것으로 보인다.

식이섭취량 및 자궁 무게

주별 평균 식이섭취량은 OVX군이 sham군에 비하여 유의하게($P<0.001$) 증가하였다(Fig. 2). 난소 절제 후 시료를 투여하였을 때 CE군에서는 OVX군에 비해 유의한 식이섭취량 감소($P<0.05$) 보였으나 고흥산 석류 농축액 투여에 의한 식이섭취량 변화는 일정한 양상을 나타내지 않았다.

자궁 무게는 난소를 절제한 모든 군에서 sham군에 비해 현저하게($P<0.001$) 감소하였다(Fig. 3). 이는 폐경 후 여성 호르몬의 감소로 인해 비호생식기의 위축이 발생한 것으로(20), 난소 절제로 인한 여성호르몬 변화에서 기인한 결과로 보인다. 이러한 난소 절제에 의한 자궁 무게 감소 현상은

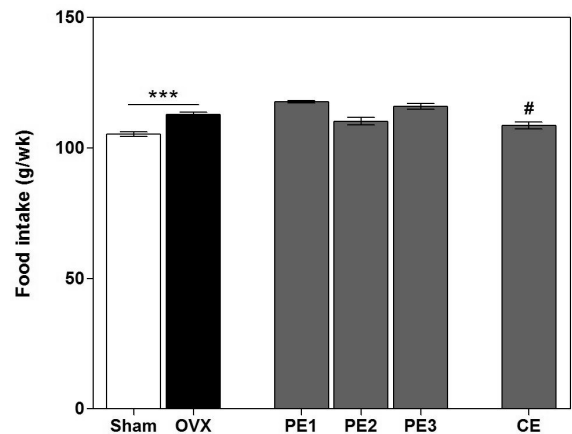


Fig. 2. Food intake in rats. Values are expressed as mean±SEM (n=10/each group). Significantly different at *** $P<0.001$ compared to sham; # $P<0.05$ compared to OVX as determined by t-test.

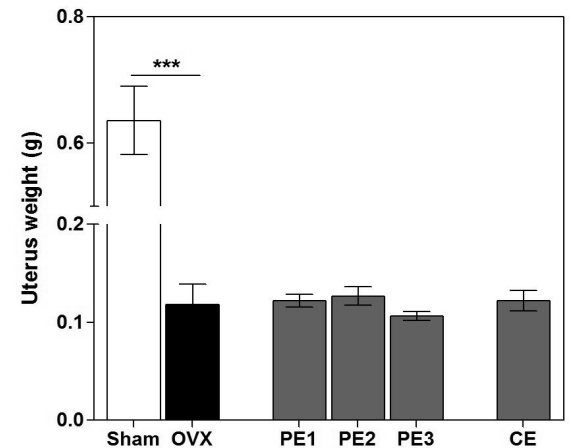


Fig. 3. Uterus weights. Values are expressed as mean±SEM (n=10/each group). Significantly different at *** $P<0.001$ compared to sham as determined by t-test.

저농도의 석류 농축액 투여군(PE1, PE2)과 시판 제품 투여군(CE)에서 회복되는 것처럼 보였으나 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 이는 본 연구에서 사용한 석류 농축액이 자궁에 영향을 미치지 않은 것으로 판단된다.

체중 및 복부/내장지방

동일한 식이로 같은 양의 식이를 공급하면서 10주 동안 시료를 투여한 후 체중을 측정한 결과(Fig. 4) 난소 절제에 의한 estrogen 분비의 감소로 인해 체중 증가가 나타난다는 다른 연구 결과(21,22)와 마찬가지로 본 실험에서도 난소를 절제한 모든 군(OVX, PE1, PE2, PE3, CE)에서 sham군에 비해 체중이 증가하는 것을 알 수 있었다. 하지만 난소 절제 후 석류 농축액과 시판 제품을 투여한 군 모두 OVX군에 비하여 각각 9.6%, 8.3%, 15.9% 및 10.7%씩 몸무게가 감소되는 경향을 보였으며, 특히 PE1군($P<0.05$), PE3군($P<0.01$)에서 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 이는 mice의

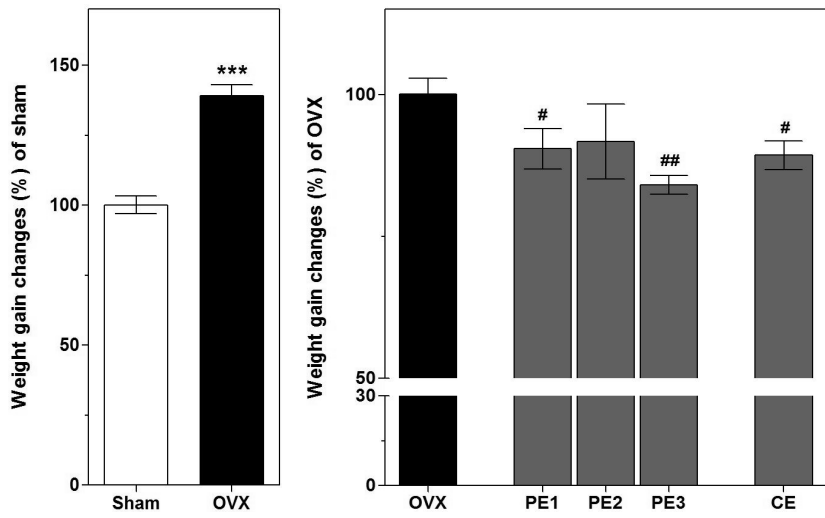


Fig. 4. Body weight gain. Values are expressed as mean±SEM (n=10/each group). Significantly different at ****P*<0.001 compared to sham; ##*P*<0.01, #*P*<0.05 compared to OVX as determined by t-test.

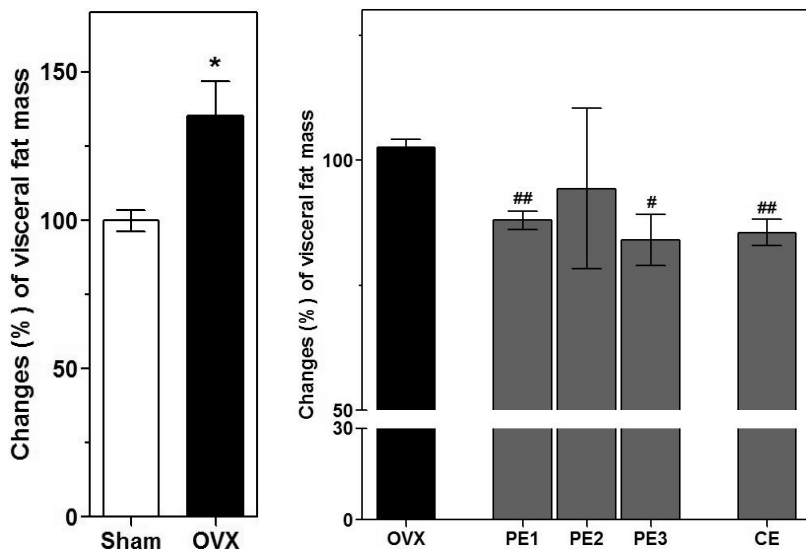


Fig. 5. Changes of visceral fat mass. Values are expressed as mean±SEM (n=10/each group). Significantly different at **P*<0.05 compared to sham; ##*P*<0.01, #*P*<0.05 compared to OVX as determined by t-test.

난소 적출 후 석류 추출물 투여 시 체중 증가를 억제한 것으로 보고한 연구(23)와 일치하는 결과로서 석류 농축액이 난소 절제 동물 모델에서의 체중 개선에 효능이 있음을 다시 한 번 확인하였다.

복부/내장지방은 난소를 절제한 OVX군에서 sham군에 비하여 유의하게 증가하였다(*P*<0.05). 난소 절제 후 석류 농축액과 시판 제품을 투여하였을 때 모두 OVX군보다 복부/내장지방이 감소하는 경향을 보였으나 PE1군, PE3군 및 CE군에서만 통계적인 유의성을 보였다(Fig. 5).

상기 결과와 같이 PE1, PE3 투여군에서 시판 제품을 투여한 CE군보다 체중이 더 감소하고 복부/내장지방에서도 유의적인 차이를 보이며 감소한 것으로 보아 고흡산 석류 농축액은 비만인 갱년기 여성의 체중관리에 효과가 있을 것으로 기대된다.

혈청 분석 결과

혈청 내 생화학적 분석 결과는 Table 2에 나타내었다.

Serum 내 칼슘, 인, ALP, T3, T4 등은 실험군 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 본 연구에서는 심혈관 질환 관련 바이오마커인 lipid profile level(TC, TG, HDL-C, LDL-C)을 평가하였다. 난소 절제는 estrogen 감소를 초래하고 그로 인해 HDL-C는 감소, LDL-C는 증가시켜 심혈관계 질환을 유발한다(24). 본 연구에서도 OVX군에 비해 석류 농축액 투여군(PE1, PE2, PE3)의 HDL-C는 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였다. 이는 고흡산 석류 농축액이 혈중 콜레스테롤 개선에 효과적일 것이라는 가능성을 제시한 결과로 보인다.

LDL-C는 석류 농축액 투여군에서 OVX군에 비해 농도 의존적으로 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다. 석류 씨 오일을 복용한 고지혈증 환자의 지질 개선 여부를 확인한 연구(25) 결과에서 혈중 cholesterol 및 LDL-C의 변화가 없는 것과는 달리 본 연구에서는 석류 농축액 투여로 인한 혈중 지질 개선이 확인되었다. 이는 비만을 유도한 수컷 SD-rat에 석류 씨, 석류 껍질, 석류즙 추출물을 각각 투여한 후

Table 2. Effects of pomegranate extract on biochemical levels of rats

Parameters ²⁾	Sham ¹⁾	OVX	PE1	PE2	PE3	CE
ALP (U/L)	49.25±12.97 ³⁾	74.00±18.40	154.67±69.04	85.00±11.30	109.00±14.00	77.00±19.47
P (mg/dL)	8.85±2.30	7.95±1.89	8.90±2.97	8.25±1.96	8.87±2.74	8.17±1.36
Ca ²⁺ (mg/dL)	9.45±0.17	9.40±0.42	10.03±0.49	9.27±0.14	9.13±0.23	9.37±0.25
T3 (mg/mL)	0.61±0.15	0.75±0.16	0.76±0.06	0.71±0.09	0.66±0.09	0.67±0.07
T4 (µg/dL)	4.13±0.12	4.43±0.85	4.13±0.12	3.83±0.73	3.47±0.87	3.87±0.64
TC (mg/dL)	118.29±11.97	121.27±24.10	120.46±14.70	111.94±11.94	108.32±20.26	109.46±13.50
TG (mg/dL)	125.92±14.26	109.34±25.99	114.29±15.67	109.13±10.74	98.46±113.18	113.18±3.94
HDL-C (mg/dL)	28.75±2.77	28.18±1.73	30.64±3.06	32.14±5.80	38.84±10.60	27.36±3.29
LDL-C (mg/dL)	66.50±19.15	76.84±22.33	77.58±17.53	70.43±22.64	66.66±20.05	71.14±8.69
HDL-C/TC	0.24±0.08	0.23±0.06	0.25±0.04	0.28±0.09	0.36±0.04*	0.29±0.05
E2 (pg/mL)	30.68±5.60	12.08±1.19 ^{**4)}	12.29±1.32	11.88±1.80	15.17±1.42	16.47±1.82
Homocysteine (µM/L)	16.73±3.95	13.71±1.89	12.34±2.91	11.62±2.41	10.94±1.96	10.36±2.01
GPT (UI/L)	2.68±0.20	2.64±0.20	2.57±0.14	2.47±0.20	2.55±0.30	2.49±0.30
GOT (UI/L)	5.71±1.90	5.28±1.30	4.79±1.00	4.08±1.40	4.61±1.30	4.46±2.50
Osteocalcin (ng/mL)	14.23±4.49	22.32±2.05*	24.00±5.53	24.90±6.22	23.94±4.20	23.95±8.50

¹⁾Rats groups include sham, sham operation and distilled water; OVX, ovariectomized and distilled water; PE1, ovariectomized and pomegranate concentrates 0.75 mL/twice/d; PE2, ovariectomized and pomegranate concentrates 1.5 mL/twice/d; PE3, ovariectomized and pomegranate concentrates 2.2 mL/twice/d; CE, ovariectomized and commercial pomegranate concentrates 2.2 mL/twice/d.

²⁾ALP: alkaline phosphatases, P: phosphorus, T3: triiodothyronine, T4: thyroxine, TC: total cholesterol, TG: triglycerides, HDL-C: high density lipoprotein-cholesterol, LDL-C: low density lipoprotein-cholesterol, E2: estradiol, GPT: glutamate pyruvate transaminase, GOT: glutamic oxaloacetic transaminase.

³⁾Values are expressed as mean±SEM (n=10/each group).

⁴⁾Significantly different at ** $P<0.01$, * $P<0.05$ compared to sham as determined by t-test.

혈중 지질을 확인한 연구(26)에서 석류즙에서만 HDL-C가 유의하게 증가한 결과와 같이 석류 씨와 석류 과즙의 성분 차이로 인해 혈중 콜레스테롤에 미치는 영향이 다르기 때문에 나타난 것으로 판단된다.

HDL/TC level에서는 석류 농축액 투여군에서 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였고, 통계적 유의성은 PE3군에서만 확인되었다. 이로써 고흥산 석류 농축액은 난소 절제 동물모델에서 HDL-C 증가, LDL-C 감소를 통해 TC의 질적 변화를 유도하여 혈중 콜레스테롤을 개선할 수 있을 것으로 보인다.

또 다른 심혈관계 위험인자로 알려진 homocystein의 농도는 석류 농축액 투여군에서 OVX군에 비해 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다.

여성 호르몬 중 가장 강력하고 대표적인 에스트로겐에 해당하는 estradiol level(E2)은 sham군에 비하여 난소를 절제한 모든 군에서 현저히 억제되었으나 석류 농축액(PE1, PE2, PE3)과 시판 제품군(CE) 간의 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다.

시료 투여로 인한 간 독성을 확인해 볼 수 있는 혈청 내의 GPT와 GOT level은 석류 투여 전후 및 CE 투여군에서 군 간에 차이가 없는 것으로 나타나 시료 투여로 인한 간 손상은 없는 것으로 보인다.

골아 세포로부터 분비되어 무기화와 칼슘 이온의 항상성에 관여하는 osteocalcin은 조골세포의 활성지표로서 sham군에 비해 난소 절제군에서 유의하게 증가되었으나($P<0.05$) 난소 절제에 의한 osteocalcin의 함량에 대해 석류 농축액(PE1, PE2, PE3)과 시판 제품군(CE)의 투여가 영향을 미치

지는 않는 것으로 확인되었다.

대퇴골의 골밀도 및 골 손실 분석 결과

갱년기 여성에게 나타나는 대표적이 증상으로는 골 대사 이상에 따른 골다공증이 있다. 이는 폐경기 이후 조골세포 기능은 저하되고 파골세포 기능은 활발해져서 골흡수가 가속화되는 현상으로(27), 특히 여성의 골다공증은 폐경으로 인한 estrogen 감소가 가장 큰 원인인 것으로 알려져 있어(28,29) 골밀도 등 뼈 건강은 갱년기 여성 건강의 주요 지표로 사용된다. 본 연구에서는 μ -CT를 이용하여 대퇴골과 경골의 골밀도를 분석하였고 그 결과 sham군에 비해 OVX군은 percent bone volume(BV/TV), bone surface density(BS/TV), trabecular thickness(Tb.Th) 등이 유의하게 감소되었다(Table 3, Fig. 6). 난소 절제에 의한 뼈의 부피와 해면골 두께 등의 감소 현상은 석류 농축액(PE1, PE2, PE3)과 시판 제품군(CE)의 투여에 의해 회복되는 경향을 보였으며, 특히 PE3군에서 Tb.Th가 통계적 유의성을 보여 고흥도의 석류 농축액 투여는 대퇴골의 두께를 현저하게 개선하는 것으로 나타났다.

골밀도(BMD)는 난소 절제 시 sham군에 비하여 유의적으로 낮아졌고(Fig. 7) 석류 농축액 투여군에서 농도 의존적으로 회복되는 경향을 보였으며, 고흥도 석류 농축액 투여군(PE3)에서는 통계적으로 유의한 증가를 나타냈다($P<0.05$). 골밀도의 회복은 μ -CT를 통해 촬영한 사진을 통해 육안으로도 확인되었는데, 특히 PE3군과 CE군은 골밀도의 양적 증가가 현저하게 나타났다(Fig. 7). 난소를 절제한 rat에 e-lagic acid가 다량 함유된 블루베리를 투여한 결과 골 소실

Table 3. Bone parameters after 10 weeks of administration with PE and CE

Parameters	Sham ¹⁾	OVX	PE1	PE2	PE3	CE
TV (mm ³) ²⁾	19.834±2.76 ³⁾	21.628±1.45	19.944±0.22	22.452±2.04	23.949±4.36	22.872±3.66
BV (mm ³)	6.377±1.96	1.188±0.55 ^{**4)}	0.643±0.29	1.439±0.50	1.869±0.34	1.449±0.42
BV/TV (%)	31.622±6.61	5.409±2.21 ^{***}	3.230±1.46	6.464±2.34	7.904±1.53	6.524±2.29
TS (mm ²)	49.207±3.73	52.271±1.59	50.241±0.30	54.184±2.80	55.980±6.62	54.314±4.90
BS (mm ²)	175.325±36.25	42.927±19.48 ^{***}	28.854±9.97	55.914±12.69	70.521±17.42	57.713±16.00
BS/BV (1/mm)	28.341±3.72	43.224±3.94 ^{**}	46.146±5.39	39.831±4.39	37.462±2.60	40.012±1.99
BS/TV (1/mm)	8.780±0.86	2.280±0.77 ^{***}	1.450±0.51	2.506±0.62	2.957±0.56	2.586±0.84
Tb.Pf (1/mm)	1.733±2.52	14.918±2.29 ^{**}	15.996±1.75	12.729±2.66	11.338±1.55	13.263±2.04
Tb.Th (mm)	0.122±0.01	0.095±0.01 ^{**}	0.091±0.01	0.102±0.01	0.104±0.01 [#]	0.105±0.00
Tb.N (1/mm)	2.563±0.11	0.561±0.21 ^{***}	0.348±0.13	0.625±0.18	0.761±0.14	0.618±0.21
Tb.Sp (mm)	0.373±0.13	1.210±0.13 ^{**}	1.521±0.18	1.273±0.06	1.185±0.18	1.306±0.24

¹⁾Rats groups are the same as Table 2.

²⁾TV, tissue volume; BV, bone volume; BV/TV, percent bone volume; TS, tissue surface; BS, bone surface; BS/BV, bone surface/volume ratio; BS/TV, bone surface density; Tb.Pf, trabecular pattern factor; Tb.Th, trabecular thickness; Tb.N, trabecular number; Tb.Sp, trabecular separation.

³⁾Values are expressed as the mean±SD.

⁴⁾Significantly different at ^{***} $P<0.001$, ^{**} $P<0.05$ compared to sham; [#] $P<0.05$ compared to OVX as determined by t-test.

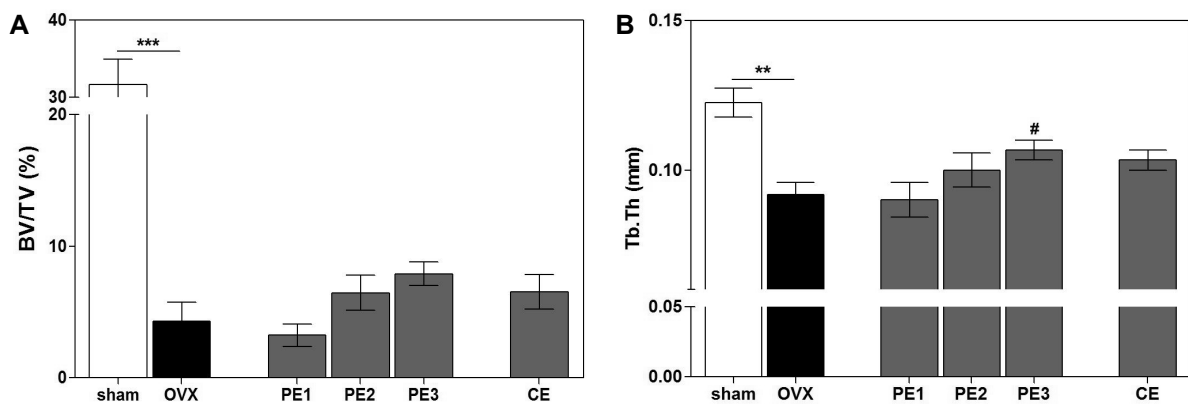


Fig. 6. A, percent bone volume (BV/TV); B, trabecular thickness (Tb.Th) after 10 weeks of administration. Values are expressed as mean±SEM (n=10/each group). Significantly different at ^{***} $P<0.001$, ^{**} $P<0.01$ compared to sham; [#] $P<0.01$ compared to OVX as determined by t-test.

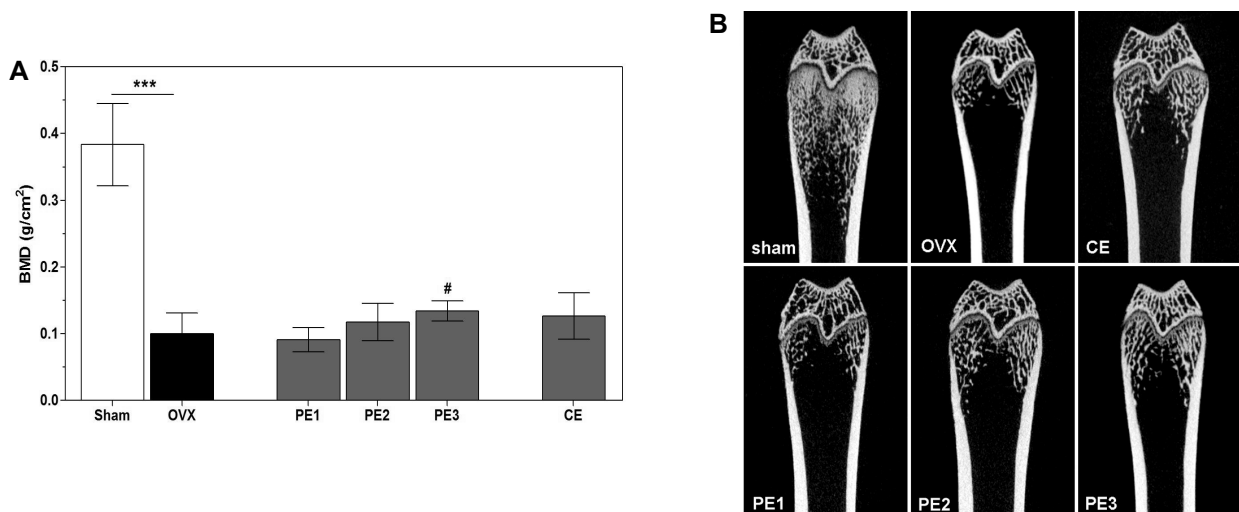


Fig. 7. A, bone mineral density (BMD); B, coronal image of rat's distal-femur taken by μ -CT after 10 weeks of administration. Values are expressed as mean±SEM (n=10/each group). Significantly different at ^{***} $P<0.001$ compared to sham; [#] $P<0.01$ compared to OVX as determined by t-test.

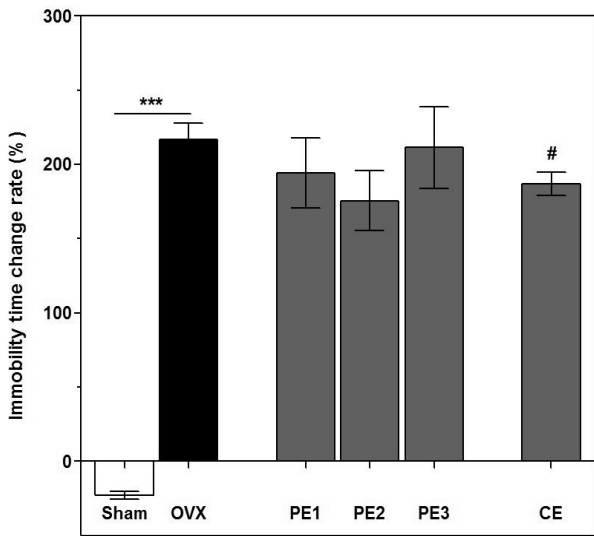


Fig. 8. Forced swimming test. Values are expressed as mean±SEM (n=10/each group). Significantly different at *** $P<0.001$ compared to sham; # $P<0.05$ compared to OVX as determined by t-test.

이 감소하였다는 연구(30) 및 골다공증을 유발한 rat에 ellagic acid가 함유된 말린 자두를 투여했을 때 여성(31,32) 및 남성(33) 모두에게 강력한 뼈 보호 효과를 보인 연구 결과와 같이 석류 농축액의 ellagic acid가 골밀도 회복에 영향을 준 것으로 판단된다. 본 연구 결과는 석류가 갱년기에 나타나는 골 소실을 개선한다는 기존 연구 결과(21)를 증명하였을 뿐 아니라 뼈 건강에 있어서 이란산 석류보다 고흥산 석류의 효능이 더 높은 것을 확인한 의미 있는 결과라 할 수 있다.

항우울증과 항불안 장애 효과

석류 추출물은 항우울 효과를 나타내는 것으로 알려져 있어(23) 본 연구를 통해 석류 농축액의 항우울 효과를 확인하고자 하였다. 우울증 검사(FST)에서 난소를 절제한 동물은 sham군에 비해 immobility 시간이 증가하였고 석류 농축액

및 시판 제품의 투여로 immobility 시간이 감소되는 경향을 보였으나 시판 제품군(CE)에서만 통계적 유의성($P<0.05$)이 확인되었다(Fig. 8). 고흥도의 석류 농축액(PE3) 투여 시에는 immobility 시간이 PE1, PE2보다 오히려 증가하였는데 석류 추출물이 상대적으로 높은 농도에서는 암컷 설치류의 불안 정도를 증가시키고 낮은 농도의 석류 추출물을 이용한 지속적인 치료가 불안을 감소시킨다는 연구(34,35)가 이러한 결과를 설명할 수 있을 것으로 보인다.

불안장애 검사(EPM)에서 난소의 절제는 폐쇄구역 진입 횟수 및 시간을 증가시켰으나 고흥산 석류 농축액이 폐쇄구역 및 개방구역에 머무는 시간에 유의적으로 영향을 주지는 않았다(Fig. 9). 다만 시판 제품군(CE)은 통계적으로 유의하게($P<0.05$) 폐쇄구역 진입 횟수를 감소시키고 개방구역 진입 횟수를 증가시켜 불안 장애 개선에 효과가 있는 것으로 확인되었다.

석류의 항우울 작용은 genistein, daidzein과 같은 이소플라본이 아닌 estrogen에 의해 나타나는 것으로 보인다는 연구 결과(19)에 따라 국내산 석류와 이란산 석류의 성분 차이에 의한 결과인지 확인하기 위해 각각의 성분 및 임상시험을 통한 후속 연구가 필요할 것으로 보인다.

요 약

본 연구는 난소 적출 동물 모델을 이용하여 고흥산 석류 농축액 시험군과 함께 이란산 석류 농축액을 주성분으로 하는 시판 제품의 혈청 생화학적 지표, 골밀도 등 몇 가지 지표를 분석하여 갱년기 증상 개선 효과를 비교하였다. 고흥산 석류 농축액과 시판 제품은 난소 절제 동물 모델의 골밀도(bone mineral density, BMD) 및 percent bone volume(bone volume/tissue volume), bone surface density(bone surface/tissue volume)를 증가시켰으며, 특히 고흥량의 고흥산 석류 농축액(PE3)은 통계적으로 유의하게 골밀도 및 골 볼륨을 증가시켰다. 시판 제품을 투여한 군도 골밀도를 증가시키는 양상을 보였으나 통계적 유의성은 없어 고흥산 석류

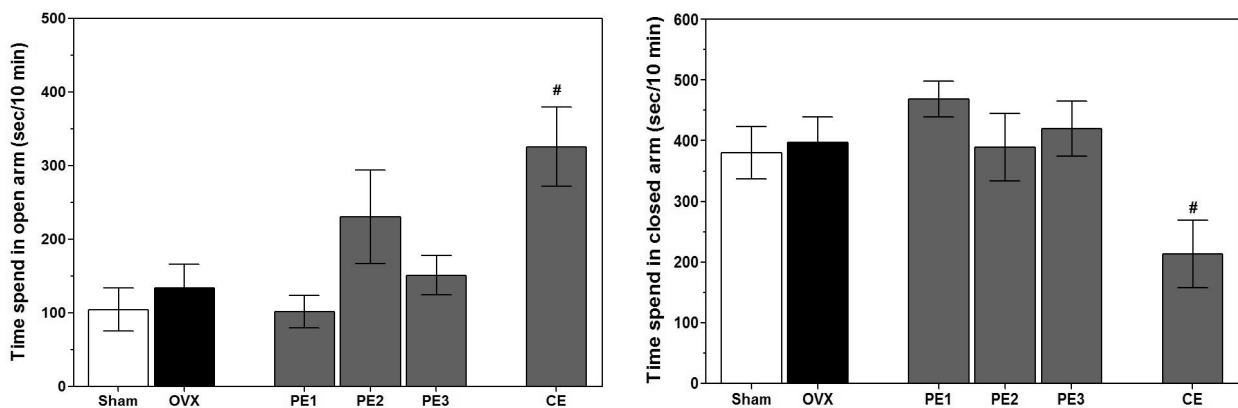


Fig. 9. Elevated plus maze test. Values are expressed as mean±SEM (n=10/each group). Significantly different at # $P<0.05$ compared to OVX as determined by t-test.

농축액이 이란산 석류 제품보다 골밀도 등 뼈 건강에 관련한 갱년기 증상 개선에 더 효과적이라고 사료된다. 고흡산 석류 농축액은 난소 절제에 의한 체중 증가 및 복부/내장지방 축적을 개선하였으며, 농도 의존적으로 HDL-C(high density lipoprotein cholesterol)는 증가시키고 low density lipoprotein cholesterol은 감소시켰다. 또한 고흡산 석류 농축액(PE3)의 HDL-C/total cholesterol이 통계적으로 유의하게 증가하여 고흡산 석류 농축액이 갱년기 여성의 비만 및 혈중지질을 개선할 수 있을 것으로 기대된다. 불안장애 실험에서는 고흡산 석류 농축액 투여로 인해 불안장애가 개선되는 경향을 보였으나 통계적 유의성이 없었고, 이란산 시판 제품 투여 시에는 대조군에 비해 유의하게 개선시키는 것으로 나타났다. 우울증 또한 시판 제품 투여군에서는 대조군에 비해 유의하게 개선 효과를 나타내었으나 고흡산 석류 농축액 투여군에서는 우울증 개선 효과가 확인되지 않았다. 이상과 같은 결과를 통해 고흡산 석류 농축액은 난소를 적출한 rat의 골 소실을 현저히 개선하고 복부/내장지방 및 혈중지질을 농도 의존적으로 개선하여 골다공증, 비만 및 심혈관 질환과 같은 갱년기 증상에 효과가 있음을 확인하였다. 그러나 고흡산 석류 농축액 투여군에서 대표적인 갱년기 증상인 우울증과 불안장애 개선에 유의성 있는 효과가 나타나지 않는 것은 동물실험 모델에서 사람에게 나타나는 다양한 갱년기 증상을 모두 평가하기에 한계가 있는 바, 향후 추가적인 연구를 통해 고흡산 석류 농축액이 갱년기 여성에게 나타나는 여러 가지 증상 중 특정 증상에 대해 선택적으로 효과를 나타내는지에 대해 임상시험을 통해 검증할 필요가 있겠다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 지역연고산업육성사업(과제번호: R0001986)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Avraham Y, Nachum S. 2013. Management of obesity in menopause: lifestyle modification, medication, bariatric surgery and personalized treatment. In *Current Topics in Menopause*. Volodymyr Dvornyk, ed. Bentham Science, Oak Park, IL, USA. p 143-162.
- Gosden RG. 1987. Follicular status at the menopause. *Human Reprod* 2: 617-621.
- Lee JY. 1994. Estrogen replacement therapy in postmenopausal women. *Obstet Gynecol Sci* 37: 1333-1337.
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, 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.
- Park MR, Kim MH. 2007. Effects of *Punica granatum* L. extracts on serum lipids in ovariectomized rats. *J Life Sci* 18: 46-51.
- Abidov M, Ramazanov Z, Seifulla R, Grachev S. 2010. The effects of Xanthigen in the weight management of obese premenopausal women with non-alcoholic fatty liver disease and normal liver fat. *Diabetes Obes Metab* 12: 72-81.
- Choi OK, Chung KS, Cho GS, Hwang MO, Yoo YS. 2002. Proximate compositions and selected phytoestrogens of Iranian black pomegranate extract and its products. *Korean J Food & Nutr* 15: 119-125.
- Lee JH, Kim SD, Lee JY, Kim KN, Kim HS. 2004. Quantitation of ellagic acid in concentrated pomegranate extracts and their juices. *Food Sci Biotechnol* 13: 381-383.
- Devipriya N, Srinivasan M, Sudheer AR, Menon VP. 2007. Effect of ellagic acid, a natural polyphenol, on alcohol-induced prooxidant and antioxidant imbalance: a drug dose dependent study. *Singapore Med J* 48: 311-318.
- Shukla M, Gupta K, Rasheed Z, Khan KA, Haqqi TM. 2008. Bioavailable constituents/metabolites of pomegranate (*Punica granatum* L) preferentially inhibit COX2 activity *ex vivo* and IL-1beta-induced PGE₂ production in human chondrocytes *in vitro*. *J Inflamm (Lond)* 5: 9.
- Aggarwal BB, Shishodia S. 2006. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol* 71: 1397-1421.
- Uzuner S, Acar J. 2012. Hydrolytic properties of ellagic acid in commercial pomegranate juices. 2012. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 6: 717-720
- Ahn KH, Lee KA, Kim BH. 2004. Optimazation of the assement and apoptosis of endocrine-bisphenol A disruptors. *J Environ Toxicol* 3: 251-259.
- Bekku N, Yoshimura H. 2005. Animal model of menopausal depressive-like state in female mice: prolongation of immobility time in the forced swimming test following ovariectomy. *Psychopharmacology (Berl)* 183: 300-307.
- Altundag K, Ibrahim NK. 2006. Aromatase inhibitors in breast cancer: An overview. *Oncologist* 11: 553-562.
- Kim MS, Yun SH, Na HS, Park HJ, Choi GC, Yang SI, Lee JH. 2013. Chemical compositions and functional characteristics of Korean and imported pomegranate (*Punica granatum* L.). *Korean J Food Preserv* 20: 342-347.
- Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M. 1999. Quantitation of flavonoid constituents in citrus fruits. *J Agric Food Chem* 47: 3565-3571.
- Johnson MK, Loo G. 2000. Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. *Mutat Res* 459: 211-218.
- Zhang T, Chen HS, Wang LF, Bai MH, Wang YC, Jiang XF, Liu M. 2014. Ellagic acid exerts anti-proliferation effects via modulation of Tgf-β/Smad3 signaling in MCF-7 breast cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 15: 273-276.
- Ettinger B. 1986. Preventing postmenopausal osteoporosis with estrogen replacement therapy. *Int J Fertil* 31: 15-20.
- Ahn KH, Yi KW, Park HT, Shin JH, Hur JY, Kim YT, Kim SH, Lee KW, Kim SH, Bae CS, Kim T. 2010. The effect of pomegranate on depression, anxiety, and food intake in ovariectomized rats. *J Korean Soc Menopause* 16: 39-45.
- Lee YH, Hyun SH, Choung SY. 2006. Effect of singled and mixed pomegranate on postmenopausal symptoms in ovariectomized rats. *Yakhak Hoeji* 50: 177-183.
- Mori-Okamoto J, Otawara-Hamamoto Y, Yamato H, Yoshimura H. 2004. Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. *J Ethnopharmacol* 92: 93-101.
- Ross RK, Paganini-Hill A, Mark TM, Henderson BE. 1989.

- Cardiovascular benefits of estrogen replacement therapy. *Am J Obstet Gynecol* 160: 1301-1306.
25. Mimiran P, Fazeli MR, Asghari G, Shafiee A, Azizi F. 2010. Effect of pomegranate seed oil on hyperlipidaemic subjects: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *Br J Nutr* 104: 402-406.
 26. Jeon BG, Jeong HW. 2007. The experimental effects of pomegranate on the cerebral blood flow and obesity in rats. *Korean J Food & Nutr* 20: 143-149.
 27. Han MY, Oh YL, Lee TH, Choi JY, Kim HY. 2004. The effects of low dose estrogen replacement therapy on the bone mineral densities and bone metabolism of postmenopausal women. *J Menopausal Med* 10: 34-42.
 28. Odell WD, Heath H 3rd. 1993. Osteoporosis: pathophysiology, prevention, diagnosis, and treatment. *Dis Mon* 39: 789-867.
 29. Emans SJ, Grace E, Hoffer FA, Gundberg C, Ravnkar V, Woods ER. 1990. Estrogen deficiency in adolescents and young adults: impact on bone mineral content and effects of estrogen replacement therapy. *Obstet Gynecol* 76: 585-592.
 30. Devareddy L, Hooshmand S, Collins JK, Lucas EA, Chai SC, Arjmandi BH. 2008. Blueberry prevents bone loss in ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Nutr Biochem* 19: 694-699.
 31. Arjmandi BH, Lucas EA, Juma S, Soliman A, Stoecker BJ, Khalil DA, Smith BJ, Wang C. 2001. Dried plums prevent ovariectomy-induced bone loss in rats. *JANA* 4: 50-56.
 32. Ethridge A, Lucas E, Stoecker BJ, Wei CI, Arjmandi BH, Smith BJ. 2003. Alterations in vertebral bone with hind limb unloading and effect of dried plum and parathyroid hormone during recovery. *J Bone Miner Res* 18: S267.
 33. Bu SY, Lucas EA, Franklin M, Marlow D, Brackett DJ, Boldrin EA, Devareddy L, Arjmandi BH, Smith BJ. 2007. Comparison of dried plum supplementation and intermittent PTH in restoring bone in osteopenic orchidectomized rats. *Osteoporos Int* 18: 931-942.
 34. Tomihara K, Soga T, Nomur, M, Korach KS, Gustafsson JÅ, Pfaff DW, Ogawa S. 2009. Effect of ER- β gene disruption on estrogenic regulation of anxiety in female mice. *Physiol Behav* 96: 300-306.
 35. Shansky RM, Glavis-Bloom C, Lerman D, McRae P, Benson C, Miller K, Cosand L, Horvath TL, Arnsten AF. 2004. Estrogen mediates sex differences in stress-induced prefrontal cortex dysfunction. *Mol Psychiatry* 9: 531-538.