

## 백수오와 한속단 추출물의 비에스트로젠 효과에 관한 연구

한승희 · 이태희 · 장자영 · 송현경<sup>1</sup> · 홍상근<sup>2</sup> · 김유리<sup>3</sup> · 한범석<sup>1,\*</sup>

호서대학교 안전성평가센터, <sup>1</sup>호서대학교 바이오응용독성학과, <sup>2</sup>(주)파낙산, <sup>3</sup>바이오생명공학연구소

### Mixture of Extracts of *Cynanchum wilfordii* and *Phlomis umbrosa* Turcz. Does Not Have an Estrogenic Effect in Ovariectomized Rats

Song-Hee Han, Tae-Hee Lee, Ja-Young Jang, Hyun-Kyung Song<sup>1</sup>,  
Sang-Keun Hong<sup>2</sup>, Yu-Ri Kim, and Beom-Seok Han<sup>1,\*</sup>

Hoseo Toxicological Research Center, Hoseo University

<sup>1</sup>Department of Bio Applied Toxicology, Hoseo University

<sup>2</sup>Panaxan. Corp

<sup>3</sup>Institute of Life Sciences & Biotechnology

**Abstract** *Cynanchum wilfordii* and *Phlomis umbrosa* Turcz. are known to contain isoflavone, a representative phytoestrogen. This study was performed to determine whether the extract mixture of *C. wilfordii* and *P. umbrosa* Turcz. would induce an estrogenic effect in ovariectomized rats. The extracts were administered to the ovariectomized rats at 30, 60, 120 mg/kg per day for 4 weeks, respectively. They showed no estrogenic effect, which was indicated by the decrease in uterus wall thickness as well as the increase in body weight and the level of cholesterol and triglyceride. The extracts also had no effect on the concentrations of estrogen and growth hormone in the serum. However, the increase in alkaline phosphatase activity, which leads to protection against the bone loss caused by ovariectomy, was noted on administration of the extract. Therefore, it seemed that the extracts of *C. wilfordii* and *P. umbrosa* Turcz. had no estrogenic effect in rats.

**Keywords:** *Cynanchum wilfordii*, *Phlomis umbrosa* Turcz, isoflavone, estrogen, growth hormone ovariectomized rat

## 서 론

성장이란 일반적으로 신장의 증가를 의미하는데 이는 어린이의 건강을 평가하는 일반적인 지표로 인식되고 있다(1). 성장에 영향을 주는 요소로는 유전 등의 선천적 요인과, 사회 경제적 요인과 영양상태로 대표되는 후천적 요인이 있는 것으로 알려져 있는데(2) 최근 경제 수준의 증가로 인한 영양상태 개선으로 인하여 평균 신장이 증가되고 있다(3). 이에 반하여 상대적으로 저성장 어린이들은 대인관계 문제(4), 내성적인 성격(5)과 비관적인 성향을 나타낼 가능성이 높다는 보고가 있다(6). 이러한 이유로 어린이의 성장에 대한 관심이 증가하고 있으며 이를 극복하기 위한 성장호르몬제 처방이 증가하여 최근에는 1000억원 이상의 국내 매출을 나타내고 있다. 그러나 성장호르몬 치료는 발암성에 대한 우려는 줄어들고 있지만 이 외에도 두개내압 증가, 부종, 대퇴골두 골단분리증, 척추추만증의 악화, 여성형 유방, 고혈당증 등의 부작용을 가지고 있으며 치료의 특성상 빈번한 주사로 인한 심리적 부담과 고가의 치료비용 또한 성장호르몬 치료의 단점으로 지적되고 있다(7). 따라서 최근에는 부작용 발생의 위험성이

적으면서도 낮은 치료비용으로 어린이의 성장에 도움을 줄 수 있는 기능성 소재 개발에 대한 관심이 증가하고 있다.

백수오(*Cynanchum wilfordii* Radix)는 다년생식물로 박주가리과(Asclepiadaceae) 은조롱(*Cynanchum wilfordii*)의 뿌리이며 황색의 원뿔모양을 보이는 생약이다. 한방에서는 피로회복, 조혈기능촉진, 동맥경화 등에 사용되어 왔으며(8) 최근에는 불면증, 불안, 빈혈, 노화 및 다양한 노인성 질환에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(9-10). 또한 전문에 걸쳐 다른 생약제제와 같이 사용하여 난소적출 동물 모델에서 골밀도 증가효과를 확인한 논문도 보고되어 있다(11). 한속단(*Phlomis umbrosa*)은 꿀풀과(Lamiaceae)과에 속하는 다년생식물로 진통(12), 염증(13), 알레르기(14-15) 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 이 외에도 골밀도를 증가시키고 골절에 의한 뼈 손상을 돕는다는 연구결과가 알려져 있다(16-17). 최근 연구 결과(18)에 따르면 백수오와 한속단 추출물을 투여한 실험동물에서 유의한 장골길이 증가를 촉진하는 기능성을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 그러나 백수오와 한속단은 식물성 에스트로젠인 아이소플라본(isoflavone)을 함유하고 있는 식품(19-20)으로써 어린이에서 내분비교란을 일으켜 성조숙증을 유발시킬 가능성을 배제할 수 없다. 또한 이전의 연구(18)를 통하여 식물성 물질이 성장호르몬의 생리적 활성화와 많은 부분에서 연관되어 있는 인슐린유사 성장인자(Insulin-like Growth Factor-I, IGF-I)의 생성을 유도한다는 사실이 밝혀진 바 있으나 반복투여에 의한 영향은 아직 확인된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 백수오와 한속단이 생체 내에서 식물성 에스트로젠(phytoestrogen)으로 작용할 가능성을 확인하고 반복투

\*Corresponding author: Beom-Seok Han, Department of Bio Applied Toxicology, Hoseo university, Asan 31449, Korea  
Tel: 82-41-540-9677  
Fax: 82-41-540-9829  
E-mail: bshan@hoseo.edu  
Received July 21, 2015; revised September 2, 2015;  
accepted October 5, 2015

여에 의한 성장호르몬 변화를 확인하기 위하여 난소가 절제된 동물모델에 4주간 투여한 후 에스트로겐(estrogen) 및 성장호르몬(growth hormone)의 변화와 난소 절제로 유발된 증상의 변화를 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

본 실험에 사용하기 위하여 4주령의 암컷 Sprague-Dawley 쥐(rat) (DaehanBiolink Co., Ltd, Eumseong, Chungbuk, Korea)에서 구입하여 1주간 순화시켰다. 실험동물의 사육은 호서대학교 안전성평가센터 청정동물실에서 실시하였으며 사육케이지에 2마리씩 사육하였다. 시험기간 동안 온도 22±3°C, 상대습도 55±10%, 조명주기 12시간을 유지하였으며 사료와 음수는 자유롭게 섭취도록 하였다. 모든 실험동물은 호서대학교 안전성평가센터 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 적합한 승인(HTRC-14-49)을 받아 실시하였다.

### 시험물질

본 실험에 사용된 백수오는 경북 봉화에서 생산된 것을, 한속단은 경북 영주에서 생산된 것을 구입(KukDong Co., Ltd, Seoul, Korea) 사용하였다. 백수오는 식품의약품안전처의 검사 기준에 따라 공인된 시험기관에서 이염우피소가 혼입되지 않았음을 확인한 후 실험에 사용하였다. 건조된 백수오 200 g을 길이 2-5 mm 정도의 크기로 분쇄한 후 물 2L를 혼합하고 10시간 동안 교반시키면서 가열하였다. 추출 용액을 70°C까지 냉각하고, 백수오 중량 대비 3%의 알파아밀레이스( $\alpha$ -amylase)를 추출액에 첨가하고 70°C에서 6시간 동안 반응시켰다. 추출액의 온도를 95°C로 15분간 가열한 후 곧 바로 급냉시켜 알파아밀레이스의 활성을 정지시켰다. 15,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상층액을 분리한 후, 활성탄소 20 g을 넣고 상온에서 30분간 교반하였다. 0.45 mm 막이 장착된 한외여과장치를 이용하여 잔류물과 투과물로 분리하였다. 투과물은 10°Bx에 도달할 때까지 60°C로 감압 농축하였다. 농축액을 냉동건조하여 추출분말을 제조하였다. 한속단 추출물도 백수오 추출물과 동일한 방법으로 제조하였다. 이렇게 백수오 및 한속단으로부터 제조된 추출물을 1:1의 비율로 동량 혼합하여 시험물질(KGF)로 사용하였다.

### 난소절제 및 시험물질 투여

순화기간 종료 후 이상이 없는 건강한 동물을 선별하여 양측 난소를 절제하였다. 대조군은 난소만 절제하지 않고 모든 과정을 동일하게 하였다. 난소 절제 후 2주간의 회복기간을 둔 후 군 분리를 실시하였다. 시험군으로는 sham 대조군, ovariectomy (OVX) 대조군, 시험물질 저용량(30 mg/kg), 중간용량(60 mg/kg), 고용량(120 mg/kg) 투여군을 두었으며 각 군당 6마리의 동물을 배치하였다. 대조군은 시험물질을 대신하여 용매인 증류수를 투여하였으며 투여 경로는 임상예정경로에 따라 경구로 하였다(Table 1).

### 체중 및 장기무게 측정

시험 기간 중 주당 2회, 10:00-12:00 사이에 체중측정을 실시하였으며 부검 시 자궁에 대한 절대 중량을 측정하였다.

### 혈액 생화학 검사

부검은 하루 전부터 16시간 동안 절식시킨 후 이산화탄소 가스(CO<sub>2</sub> gas)로 심파취 시킨 다음 실시하였다. 마취된 실험동물을 개

**Table 1. Experimental design on phytoestrogenic effect of extracts of *Cynanchum wilfordii* and *Phlomis umbrosa Turcz.* mixture in ovariectomized rat**

|         | Experimental group           | Dosage (mg/kg) | N <sup>4)</sup> |
|---------|------------------------------|----------------|-----------------|
| Group 1 | Sham <sup>1)</sup> control   | 0              | 6               |
| Group 2 | OVX <sup>2)</sup> control    | 0              | 6               |
| Group 3 | Low (OVX+KGF <sup>3)</sup> ) | 30             | 6               |
| Group 4 | Medium (OVX+KGF)             | 60             | 6               |
| Group 5 | High (OVX+KGF 120)           | 120            | 6               |

<sup>1)</sup>Sham operated control

<sup>2)</sup>Ovariectomy

<sup>3)</sup>Extracts of *Cynanchum wilfordii* and *Phlomis umbrosa Turcz.* mixture of equal amounts (=KGF)

<sup>4)</sup>Animal number per group

복하여 복대동맥으로부터 혈액을 채취하였으며, 실온에서 1시간 동안 방치한 후 3,000 rpm, 4°C에서 10분간(2236HR high-speed centrifuge, Gyrozen Co., Ltd, Daejeon, Korea) 원심분리하여 혈청을 채취하였다. 채취된 혈청은 분석 전까지 -70°C에서 보관한 후 자동생화학분석기(HITACHI7020, Hitachi Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 총콜레스테롤(Total cholesterol, T-CHO), 중성지방(Triglyceride, TG), 알칼리성인산가수분해효소(Alkaline Phosphatase, ALP), 칼슘(Calcium, CA), 무기인(Inorganic phosphorus, IP)과 아스파르트산 아미노기전달효소(Aspartate aminotransferase, AST), 알라닌아미노기전달효소(Alanine aminotransferase, ALT), 혈액요소질소(Blood urea nitrogen, BUN), 크레아티닌(Creatinine, CRE)를 분석하였다.

### 조직병리학적 검사

혈액을 채취한 후 자궁, 간, 신장을 분리한 후 무게를 측정하였다. 무게 측정 후 10% 중성완충포름알린(neutral buffered formalin, NBF)를 사용하여 고정된 후 일반적 조직처리과정(Excelsior ES, Thermo Scientific, California, USA)을 거친 후 4 µm 두께로 박절한 후 Hematoxylin & Eosin (H&E) stain을 실시하였다. 자궁은 자궁벽의 두께를 개체 당 4부위에서 측정하여 그 평균값을 자궁벽 두께로 사용하였으며 간과 신장은 시험물질의 독성을 확인하기 위하여 광학현미경(Olympus BX51, Olympus Co., Ltd., Melville, NY, USA)하에서 관찰하였다.

### 호르몬 검사

부검을 통해 얻어진 혈청을 호르몬 검사에 사용하였다. Estrogen (EIA-5774, DRG instruments GmbH, Germany)과 growth hormone (MBS019990, MyBioSource, USA)은 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)법을 사용하여 측정하였다.

### 통계

실험결과는 평균치±표준편차로 표시하였고, 통계처리는 statistical analysis system (SAS) program (SAS 8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 일원배치 분산분석(one way analysis of variance, ANOVA)와 다중비교(duncan's multiple range test)를 실시하여  $p < 0.05$ 에서 통계학적 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 체중 및 혈중지질의 변화

에스트로겐의 결핍은 골다공증 이외에도 비만, 고지혈증 등 다

**Table 2. Femur length and serum parameter related with bone metabolism in the OVX-rats treated with KGF during 4 weeks**

|               | Length of femur | CA <sup>1)</sup> | IP <sup>2)</sup>      | ALP <sup>3)</sup>         |
|---------------|-----------------|------------------|-----------------------|---------------------------|
|               | mm              | mg/dL            | mg/dL                 | IU/L                      |
| Sham control* | 37.83±1.14      | 10.2±0.3         | 8.9 <sup>a</sup> ±0.3 | 177.8 <sup>a</sup> ±28.1  |
| OVX control   | 38.68±1.60      | 10.2±0.2         | 8.4 <sup>b</sup> ±0.3 | 141.7 <sup>b</sup> ±19.4  |
| Low           | 37.55±1.03      | 10.3±0.2         | 8.5 <sup>b</sup> ±0.2 | 162.7 <sup>ab</sup> ±32.9 |
| Medium        | 38.73±1.34      | 10.3±0.2         | 8.3 <sup>b</sup> ±0.3 | 177.9 <sup>ac</sup> ±21.5 |
| High          | 38.13±1.77      | 10.3±0.2         | 8.4 <sup>b</sup> ±0.2 | 180.7 <sup>ac</sup> ±22.7 |

<sup>1)</sup>Calcium, <sup>2)</sup>Inorganic Phosphorus, <sup>3)</sup>Alkaline phosphatase

\*Sham operated control treated with water, OVX control, ovariectomized treated with water, Low, ovariectomized treated with KGF (Extracts of *Cynanchum wilfordii* and *Phlomis umbrosa* Turcz. mixture of equal amounts) 30 mg/kg. Medium, ovariectomized treated with KGF 60 mg/kg. High, ovariectomized treated with KGF 120 mg/kg. Data represent means±SD. Data values with different superscripts within a row indicate significant difference ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range tests.

양한 신체 변화를 일으킨다. 최근 폐경 전후의 여성을 대상으로 한 연구에서 폐경 후의 여성에서 피하지방, 내장지방 등의 총 지방량이 증가하였다는 연구결과가 발표된 바 있으며(21-22). 동물 실험에서도 에스트로젠은 지방세포의 분화를 촉진하는 PPAR-gamma를 억제함으로써 지방세포 분화를 억제하는 기능을 하며 지방질단백질 라이페이스(lipoprotein lipase, LPL)를 감소시킴으로써 지방 축적을 억제하는 기능을 가지고 있다는 연구결과가 있다(23-24). 또한 에스트로젠은 혈액 내 지질에 대하여 유익한 연관성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 이전의 연구에서 폐경 후 여성에게 경구용 에스트로젠을 투여한 후에 LDL 콜레스테롤은 낮아지고 HDL 콜레스테롤은 높아져 인체에 유익하다는 연구결과를 보고한 바 있다(25). 이러한 결과는 실험동물에서도 유사하게 나타나는데 SD-rats에 Ovariectomy (OVX)를 실시한 결과 에스트로젠 결핍으로 인하여 비만, 고콜레스테롤혈증, 고중성지방혈증이 나타난다는 결과가 보고된 바 있으며(26-27). 또한 이러한 반응은 식물성 에스트로젠 투여를 통하여 완화되는 것으로 알려져 있다(28). 따라서 본 연구에서는 체중, 혈중 총콜레스테롤 농도, 혈중 중성지방 농도를 분석하여 비교함으로써 시험물질이 식물성 에스트로젠으로 작용할 가능성을 확인해 보고자 하였다.

본 연구에서는 난소를 절제하여 에스트로젠 분비를 차단한 동물(OVX)에서 대조군(sham)과 비교하여 체중증가(224.5±8.2 g vs 307.2±18.8 g,  $p<0.01$ ), 혈중 총콜레스테롤 증가(96.8±12.8 mg/dL vs 124.8±13.3 mg/dL,  $p<0.01$ ), 혈중 중성지방 증가(29.0±3.5 mg/dL vs

46.1±7.8 mg/dL,  $p<0.01$ )를 보였다. 시험물질을 투여한 군에서는 OVX 군과 비교하여 모든 항목에서 유의한 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 4주간 투여된 시험물질이 에스트로젠 유사 작용을 일으키지 않았다는 것을 의미하는 것으로 판단된다(Table 3, Fig. 1).

**대퇴골의 길이와 혈청분석**

시험물질의 생리활성을 확인하기 위하여 대퇴골의 길이와 혈청에서 CA, IP, ALP를 분석하였다(Table 2).

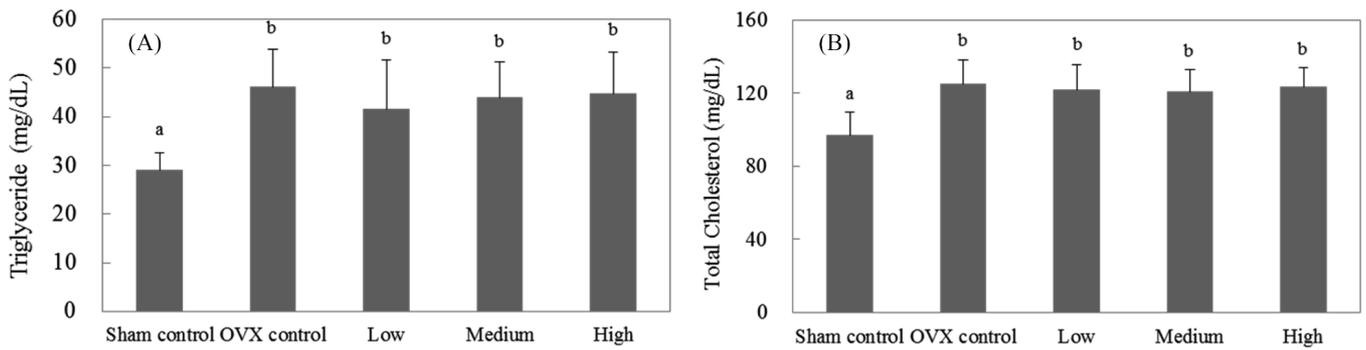
대퇴골의 길이는 설치류의 길이성장을 확인할 수 있는 유용한 지표로서(29) 시험물질이 생체 내에서 뼈 성장에 미치는 영향을 확인하고자 측정된 결과 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 같은 시험물질을 사용한 이전 연구결과(2)와 차이가 있는데 이러한 차이는 이전 연구에서는 정상동물을 사용한 반면에 이번 연구에서는 난소절제 동물을 사용했다는 점과 투여기간이 비교적 짧았다는 점 때문인 것으로 판단된다.

난소가 제거되어 에스트로젠의 결핍이 발생하면 뼈 교체율이 증가되어 혈중 CA의 함량이 증가되게 되며(30) 뼈 대사가 활발할 때 IP는 혈중에서 증가하는 것으로 알려져 있어(31) CA와 IP는 뼈 대사 상태를 확인하는데 유용한 지표가 된다. 본 연구에서는 OVX 군에서 sham군과 비교하여 CA에서는 유의한 차이를 나타내지 않았지만 IP에서는 유의성 있는 감소(8.9±0.3 mg/dL vs 8.4±0.3 mg/dL,  $p<0.01$ )를 나타내었으며 시험물질 투여군에서는 모든 용량에서 sham군과 비교하여 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.

**Table 3. Change of body weight in the OVX-rats treated with KGF during 4 weeks**

| Group         |      | 0 day              | 7 day              | 14 day             | 21 day             | 28 day             | Weight gain        |
|---------------|------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Sham control* | Mean | 168.7 <sup>a</sup> | 185.4 <sup>a</sup> | 198.8 <sup>a</sup> | 212.6 <sup>a</sup> | 224.5 <sup>a</sup> | 55.8 <sup>a</sup>  |
|               | SD   | 3.5                | 4.9                | 7.0                | 8.5                | 8.2                |                    |
| OVX control   | Mean | 203.9 <sup>b</sup> | 232.3 <sup>b</sup> | 260.0 <sup>b</sup> | 282.9 <sup>b</sup> | 307.2 <sup>b</sup> | 103.2 <sup>b</sup> |
|               | SD   | 11.7               | 13.8               | 17.8               | 19.3               | 18.8               |                    |
| Low           | Mean | 202.2 <sup>b</sup> | 233.9 <sup>b</sup> | 259.4 <sup>b</sup> | 283.6 <sup>b</sup> | 307.8 <sup>b</sup> | 105.6 <sup>b</sup> |
|               | SD   | 16.0               | 18.5               | 22.1               | 25.0               | 25.2               |                    |
| Medium        | Mean | 203.4 <sup>b</sup> | 235.5 <sup>b</sup> | 263.1 <sup>b</sup> | 286.9 <sup>b</sup> | 310.9 <sup>b</sup> | 107.5 <sup>b</sup> |
|               | SD   | 15.3               | 16.2               | 22.4               | 23.4               | 22.8               |                    |
| High          | Mean | 203.0 <sup>b</sup> | 234.8 <sup>b</sup> | 262.4 <sup>b</sup> | 285.6 <sup>b</sup> | 309.5 <sup>b</sup> | 106.5 <sup>b</sup> |
|               | SD   | 14.0               | 18.9               | 22.3               | 25.1               | 25.3               |                    |

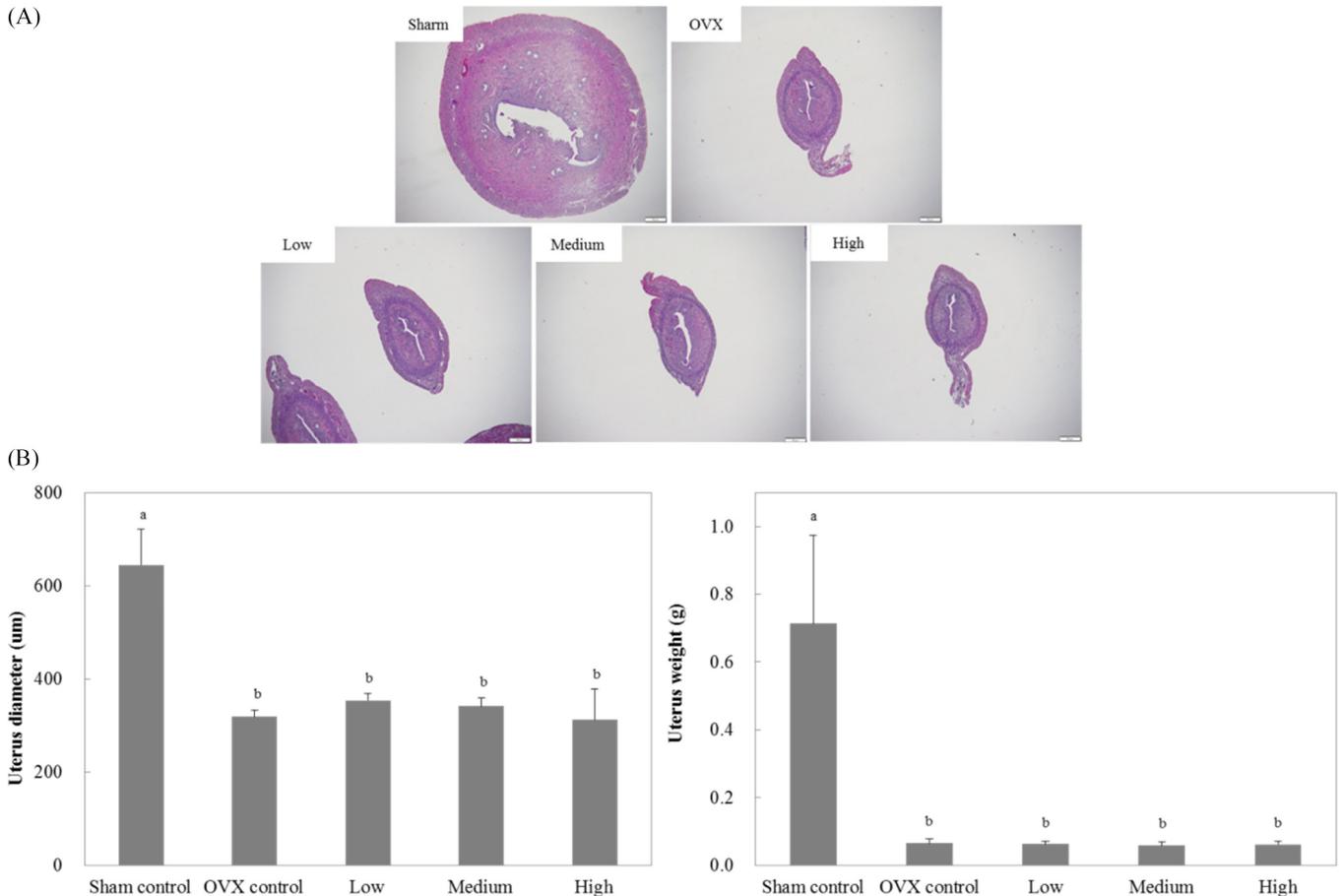
\*Sham operated control treated with water, OVX control, ovariectomized treated with water, Low, ovariectomized treated with KGF (Extracts of *Cynanchum wilfordii* and *Phlomis umbrosa* Turcz. mixture of equal amounts) 30 mg/kg. Medium, ovariectomized treated with KGF 60 mg/kg. High, ovariectomized treated with KGF 120 mg/kg. Data represent means±SD. Data values with different superscripts within a row indicate significant difference ( $p<0.05$ ) by Duncan's multiple range tests.



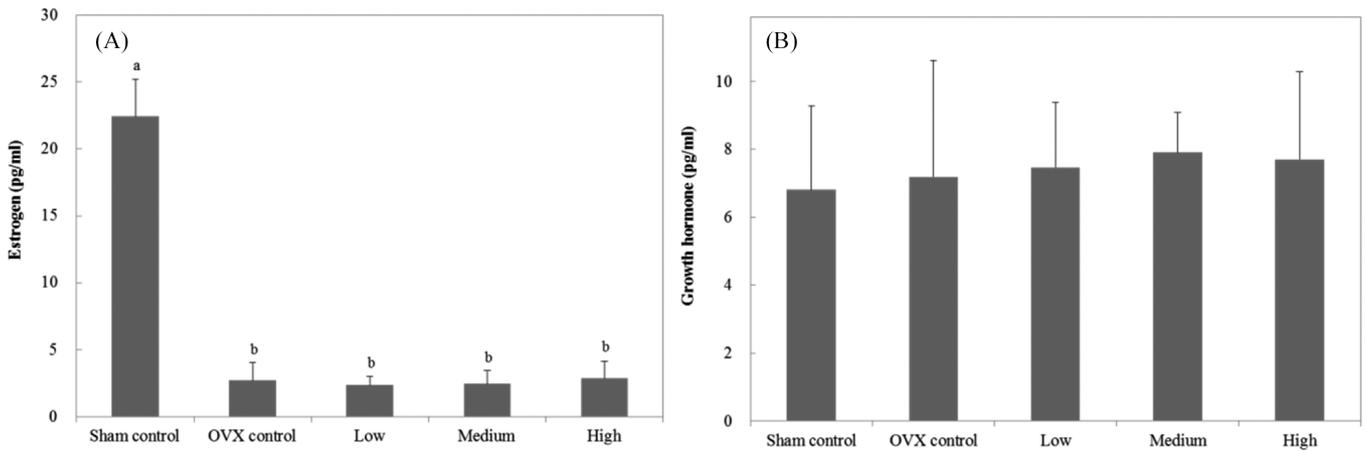
**Fig. 1. Effect of KGF on total cholesterol (A) and triglyceride (B) in ovariectomized rat.** Data represent means $\pm$ SD. Different letters above the error bar indicate significant difference at  $p<0.05$ . Sham control, sham operated control treated with water, OVX control, ovariectomized treated with water, Low, ovariectomized treated with KGF (Extracts of *Cynanchum wilfordii* and *Phlomis umbrosa* Turcz. mixture of equal amounts) 30 mg/kg. Medium, ovariectomized treated with KGF 60 mg/kg. High, ovariectomized treated with KGF 120 mg/kg.

ALP는 연골의 형성과 뼈의 무기질화에 중요한 역할을 하는 효소로서 골모세포의 활성도를 반영하는 지표로 알려져 있으며 골대사가 활발하게 이루어지는 경우에 혈중에서 농도가 증가한다(32). 본 실험에서는 난소적출로 인한 에스트로겐 결핍으로 인하여 OVX군에서의 ALP 활성이 sham군과 비교하여 감소(177.8 $\pm$ 28.1

IU/L vs 141.7 $\pm$ 19.4 IU/L,  $p<0.05$ )되었음을 확인할 수 있었다. 이와 비교하여 시험물질 투여군에서는 중간용량군(177.9 $\pm$ 21.5 IU/L,  $p<0.05$ )과 고용량군(180.7 $\pm$ 22.7 IU/L,  $p<0.01$ )에서 증가하는 결과를 나타냈다. 이러한 결과는 시험물질의 투여에 의하여 골모세포의 활성도가 증가하였음을 의미하는 것으로 판단된다.



**Fig. 2. Effect of KGF on the uterus endometrium diameter (B, left) and weight (B, right) in ovariectomized rat treated with KGF during 4 weeks by histological examination (A).** Data represent means $\pm$ SD. Different letters above the error bar indicate significant difference at  $p<0.05$ . Sham control, sham operated control treated with water, OVX control, ovariectomized treated with water, Low, ovariectomized treated with KGF (Extracts of *Cynanchum wilfordii* and *Phlomis umbrosa* Turcz. mixture of equal amounts) 30 mg/kg. Medium, ovariectomized treated with KGF 60 mg/kg. High, ovariectomized treated with KGF 120 mg/kg. Uterus was stained with hematoxylin and eosin for the measurement of endometrium diameter. The stained tissues were observed by bright microscopy (scale bar=500  $\mu$ m).



**Fig 3. Effect of KGF on serum estrogen level (A) and growth hormone (B) in ovariectomized rat treated with KGF during 4 weeks.** Data represent means±SD. Different letters above the error bar indicate significant difference at  $p < 0.05$ . Sham control, sham operated control treated with water, OVX control, ovariectomized treated with water, Low, ovariectomized treated with KGF (Extracts of *Cynanchum wilfordii* and *Phlomis umbrosa* Turcz. mixture of equal amounts) 30 mg/kg. Medium, ovariectomized treated with KGF 60 mg/kg. High, ovariectomized treated with KGF 120 mg/kg.

**자궁 무게 및 자궁내막 두께**

자궁 주기 중 자궁 내막(endometrium)에서 일어나는 두께의 변화는 난소로부터 분비되는 에스트로겐과 프로그스테론(progesterone)에 의해서 조절되는 것으로 알려져 있다(33-34). 본 연구에서는 난소가 절제된 실험동물에 시험물질을 4주간 투여한 후 자궁 무게의 변화, 자궁 내막의 두께 변화를 측정함으로써 시험물질이 식물성 에스트로겐으로 작용하는지 여부를 확인하고자 하였다. 그 결과(Fig. 3) sham군과 비교하여 OVX군에서 자궁벽의 두께가 감소( $644.8 \pm 76.5 \mu\text{m}$  vs  $318.4 \pm 15.1 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.01$ )되었음을 확인할 수 있었으며 자궁의 무게 또한 감소( $0.713 \pm 0.216 \text{ g}$  vs  $0.065 \pm 0.013 \text{ g}$ ,  $p < 0.01$ ) 되었음을 확인할 수 있었다. 시험물질 투여군에서는 모든 용량에서 OVX군과 비교하여 의미있는 차이를 나타내지 않았다. 이러한 결과는 시험물질이 에스트로겐으로 작용하고 있지 않다는 것을 증명하는 강력한 지표 중 하나인 것으로 판단된다.

**시험물질에 의한 호르몬 변화**

백수오와 한속단의 동량 혼합물이 생체 내에서 식물성 에스트로겐으로 작용할 가능성을 확인하고 반복투여에 의한 성장호르몬 변화를 확인하기 위하여 난소가 절제된 동물모델에 4주간 투여한 후 에스트로겐 및 성장호르몬의 혈중 농도 변화를 확인하였다. 그 결과 혈중 에스트로겐 농도는 sham군과 비교하여 OVX군에서 농도가 크게 감소( $22.4 \pm 2.8 \text{ pg/mL}$  vs  $2.7 \pm 1.3 \text{ pg/mL}$ ,  $p < 0.01$ ) 되었으나 시험물질을 투여한 모든 군에서는 변화가 관찰되지 않았다. 성장호르몬의 혈중 농도는 난소 절제에도 불구하고 유의한 차이가 관찰되지 않았으며 시험물질을 투여한 모든 군에서도 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 백수오와 한속단의 동량 혼합물이 생체 내에서 식물성 에스트로겐으로 작용하지 않는다는 것을 의미하며 반복투여에 의한 성장호르몬 이상을 일으키지 않는다는 것을 의미하는 것으로 판단된다.

**요 약**

저성장 어린이들을 대상으로 하는 성장호르몬 치료는 다양한 부작용과 투여과정의 스트레스로 인한 환자 순응도 감소, 고가의 치료 비용 등의 단점을 가지고 있다. 이러한 이유로 부작용 발생

의 위험성이 작고 낮은 비용으로 어린이의 성장에 도움을 줄 수 있는 천연물 유래 기능성 소재 개발에 대한 관심이 증가하고 있다. 그러나 성적으로 미성숙 상태인 어린이를 대상으로 한다는 점, 에스트로겐에 의한 뼈 성장과 성조숙증 발병기전 연관성, 천연물에 존재하는 다양한 식물성 에스트로겐의 영향으로 안전성에 대한 우려가 존재하는 것이 사실이다. 따라서 본 연구에서는 앞선 연구를 통하여 뼈 성장 촉진 효과가 확인된 시험물질의 안전성을 확인하기 위하여 난소를 절제한 실험동물에 시험물질을 4주간 투여한 후 시험물질이 식물성 에스트로겐으로 작용하여 성조숙증과 성장호르몬 이상을 일으킬 가능성을 확인하고자 하였다. 실험 결과 난소 절제로 인한 체중증가, 혈중 지질 농도의 증가, 자궁 벽 두께의 감소 등이 나타남을 확인하였으며 시험물질의 4주 투여가 이러한 변화에 영향을 끼치지 않음을 확인할 수 있었다. 또한 혈중 에스트로겐 농도, 혈중 성장호르몬 농도를 분석한 결과 시험물질 투여가 아무런 영향을 주지 않음을 확인하였다. 이러한 결과는 백수오와 한속단 동량 혼합물이 생체 내에서 식물성 에스트로겐으로 작용하지 않는다는 것을 의미하며 반복투여에 의한 성장호르몬 이상을 일으키지 않는 것으로 판단된다.

**References**

1. Kurokawa N, Nakai K, Suzuki K, Sakurai K, Shimada M, Kameo S, Nakatsuka H, Satoh H. Trends in growth status among school children in Sendai, Japan, 1994-2003: Leveling-off of mean body height and weight. *J. Exp. Med.* 216: 371-375 (2008)
2. Steckel RH. Biological measures of the standard of living. *J. Econ. Perspect.* 22: 129-152 (2008)
3. Hong CH, Cho HR, and Park KS. The secular trend of menarcheal age in Korea. *Korean J. Pediatr.* 36: 239-243 (1993)
4. Holmes CS, Karlsson JA, Thompson RG. Social and school competencies in children with short stature: Longitudinal patterns. *J. Dev. Behav. Pediatr.* 6: 263-267 (1985)
5. Wiklund I, Albertsson-Wikland K, Wires L. How should the psychosocial impact of short stature and response to growth hormone treatment be assessed in children? *Acta. Paediatr.* 377: 174-175 (1991)
6. Kim MJ, Rho YI, Yang ES, Moon KR, Park SK, Park YB, Kim EY. The relationship between the perception of height and self-esteem in children. *Korean J. Pediatr.* 47: 258-263 (2004)

7. Lee KH. Growth hormone therapy in Short Stature Children. J. Korean Med. Assoc. 51: 849-855 (2008)
8. Lee DW, Kim CH, Lee DU. Effect of culture conditions on the biosynthesis of gagaminine, a Potent antioxidant from the roots of *cynanchum wilfordii*. Biol. Pharm. Bull. 24: 1451-1453 (2001)
9. Yoon DW, Cho SM, Kim SJ, Kim JH, Kim DS, Lee SH, Yun CH, Shin C. Effects of *cynanchum wilfordii hemsley* extract on the sleep-wake architectures in rats. Sleep Med. Res. 2: 16-20 (2011).
10. Zenk MH, el-Shagi H, Schulte U. Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. Planta. Med. Suppl: 79-101 (1975)
11. Kim SN, Li YC, Xu HD, Yi DG, Kim MS, Lee SP, Yi KT, Lee JK, Kim JS, Kwon MS, Chang PS, Kwak BY. Phytoestrogenic effects of combined plant extracts on the change of bone metabolism of OVX rats. Korean J. Food Sci. Technol. 40: 316-320 (2008)
12. Shang X, Wang J, Li M, Miao X, Pan H, Yang Y, Wang, Y. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Phlomis umbrosa* Turcz extract. Fitoterapia 82: 716-721 (2011)
13. Liu P, Yao Z, Zhang W, Takaishi Y, Duan HQ. Novel norriterpenes from *Phlomis umbrosa*. Chem. Pharm. Bull. 56: 951-955 (2008)
14. Shin TY, Kim SH, Kim DK, Lee KH, Park JS. *Phlomis umbrosa* root inhibits mast cell-dependent allergic reactions and inflammatory cytokine secretion. Phytother. Res. 22: 153-158 (2008).
15. Shin TY, Lee JK. Effect of *Phlomis umbrosa* root on mast cell-dependent immediate-type allergic reactions by anal therapy. Immunopharm. Immunot. 25: 73-85 (2003)
16. Wong RWK, Rabie ABM, Hagg EUO. The effect of crude extract from *Radix dipsaci* on bone in mice. Phytother. Res. 21: 596-598 (2007)
17. Lee YJ, Choi HI, Kim YC, You HK, Shin HS. Effects of dichloromethane fraction of *Phlomis radix* on bone formation in human fetal osteoblasts J. Periodontol. Implant Sci. 33: 259-269 (2005)
18. Kang YK, Hong SK. Effects of *Cynanchum wilfordii* and *Phlomis umbrosa* extracts on bone growth and serum insulin like growth factor-I. Korean J. Microbiol. Biot. 42: 139-144 (2014)
19. Chang A, Kwak BY, Yi KT, Kim JS. The effect of herbal extract (EstroG100) on pre, peri and postmenopausal women: A randomized doubleblind, placebocontrolled study. Phytother. Res. 26: 510-516 (2012)
20. Lee NJ, Kim GS, Kwak BY, Yi KT, Lee JK, Jeong YR, Lin CM, Kim JS, Kang JK. Anti-menopausal effect of the newly-developed phytoestrogen, FGF271, *in vitro* and *in vivo*. Lab. Anim. Res. 24: 167-172 (2008)
21. You T, Ryan AS, Nicklas BJ. The metabolic syndrome in obese postmenopausal women: Relationship to body composition, visceral fat, and inflammation. J. Clin. Endocr. Metab. 89: 5517-5522 (2004)
22. Kaaja RJ. Metabolic syndrome and the menopause. R. Soc. Med. J. 14: 21-25 (2008)
23. Wellman GC, Bonev AD, Nelson MT, Brayden JE. Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide, and Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels. Circ. Res. 79: 1024-1030 (1996)
24. Lee YS, Asai M, Choi SS, Yonezawa T, Teruya T, Nagai K, Woo JT, Cha BY. Nobiletin prevents body weight gain and bone loss in ovariectomized C57BL/6J mice. Pharmacol. Phar. 5: 959-965 (2014).
25. Kuller LH. Women's Health Initiative. Hormone replacement therapy and risk of cardiovascular disease: Implications of the results of the women's health initiative. Arterioscl. Throm. Vas. 23: 11-16 (2003)
26. Giles ED, Jackman MR, Johnson GC, Schedin PJ, Houser JL, MacLean PS. Effect of the estrous cycle and surgical ovariectomy on energy balance, fuel utilization, and physical activity in lean and obese female rats. Am. J. Physiol.-Reg. I. 299: R1634-R1642 (2010)
27. Liu ML, Xu X, Rang WQ, Li YJ, Song HP. Influence of ovariectomy and 17 $\beta$ -estradiol treatment on insulin sensitivity, lipid metabolism and post-ischemic cardiac function. Int. J. Cardiol. 97: 485-493 (2004)
28. Bhathena SJ, Velasquez MT. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. Am. J. Clin. Nutr. 76: 1191-1201 (2002)
29. Chen H, Wu M, Kubo KY. Combined treatment with a traditional Chinese medicine, Hachimi-jio-gan (*Ba-Wei-Di-Huang-Wan*) and alendronate improves bone microstructure in ovariectomized rats. J. Ethnopharmacol. 142: 80-85 (2012)
30. Yeh JK, Aloia JF, Barilla ML. Effects of 17 $\beta$ -estradiol replacement and treadmill exercise on vertebral and femoral bones of the ovariectomized rat. Bone Miner. 24: 223-234 (1994)
31. McGuigan JE. Peptic Ulcer in Harrison's Principles of Internal Medicine. 13th ed. McGraw-Hill. London, UK. p. 1363 (1994)
32. Delmas PD. Biological markers of bone metabolism. Presse Med. 22: 263-268 (1993)
33. Ojeda SR. Textbook of Endocrinology. 3rd ed. Oxford University Press, Oxford, UK. pp. 164-200 (1995)
34. Kim SR. The Effects of ovarian steroid hormones on the alkaline phosphate activity in the luminal epithelial and stromal cells of early pregnancy rat uterus. J. Korean Res. Inst. Better Living 37: 183-193 (1986)