

황칠추출분말이 난소적출 흰쥐의 여성 갱년기 증상에 미치는 영향

오가희^{1,*} · 오성문¹ · 이승식¹ · 김지현² · 오주연² · 박영준³ · 김주은⁴

¹리후헬스케어(주), ²크로엔, ³아주대학교, ⁴대구가톨릭대학교

Effects of *Dendropanax morbifera* extracts on postmenopausal syndrome in ovariectomized rats

Ga-hui Oh^{1,*}, Sung-moon Oh¹, Seung-sik Lee¹, Ji-hyeon Kim², Jueon Oh², Young-joon Park³, and Joo-eun Kim⁴

¹RIHU Healthcare Co.

²CI Bio convergence institute, CROEN, Co.

³Ajou University, ⁴Catholic University of Daegu

Abstract The present study aimed to evaluate the effect of *Dendropanax morbifera* (DM) extract on postmenopausal syndrome and to develop DM extract as an alternative for hormonal therapy. The following seven groups of rats; normal control (sham), ovariectomized (OVX) control, *Punica granatum* (PG)-treated group (770 mg/kg), estradiol treated group (0.5 mg/kg), and three DM-treated groups (200, 500, 1000 mg/kg) were compared. Indicated compounds were administrated once a day for eight weeks. To evaluate the estrogenic effect of DM extract, western blot analysis was performed on the liver tissue to confirm the expression of estrogen receptor (ER- α , ER- β). Our analysis showed that after DM administration, collagen cross-linked C-telopeptide (CTX) value decreased while ER- α protein expression increased in a dose-dependent manner through the MAPK/ERK pathway in OVX rats. These results suggest that *Dendropanax morbifera* exerts estrogenic effect by inducing estrogen receptor expression and activating MAPK/ERK pathway.

Keywords: *Dendropanax morbifera*, phytoestrogen, rutin, ovariectomized rats, menopausal syndrome

서 론

여성은 누구나 폐경을 겪는다. 폐경이란 쉽게 말해 난소의 기능이 점차 저하되어 여성의 월경이 없어지는 상태인데, 세계보건기구에서는 임신이나 수유 같은 명확한 유발 원인 없이 12개월 동안 연속적으로 월경이 없는 상태를 폐경이라 정의하였다. 폐경 이후에 여성의 약 90% 정도가 적어도 한가지 이상의 폐경과 관련한 증상으로 고통받는 것으로 집계된 만큼(Cho, 2013), 폐경으로 인한 크고 작은 증상을 관리하는 것은 여성의 삶의 질 개선에 있어 중요한 문제이다. 2011년 국민건강보험공단 건강보험 통계에 따르면, 한국 여성이 특별한 원인 없이 자연적으로 발생하는 폐경을 겪는 평균 연령은 49.4±3.1세로 집계되었고 이를 고려하면 여성의 인생 후기는 폐경 이후의 삶인 셈이다(Lim, 2013). 호르몬이 불규칙해지기 시작하는 폐경 이행기와 폐경 후 1년을 포함하는 기간을 갱년기라 하는데, 이때 여성의 대다수가 우울감이나 열성 안면홍조, 기억력 감퇴, 어지러움, 두근거림 등의 불편함을 경험하고(Oh, 2006) 골다공증과 심혈관계 질환 같은 만성 증상들의 발생률도 폐경 이전보다 유의하게 증가한다(Cho, 2013; Kim 등, 2017). 이러한 질환들은 이미 병이 한참 진행된 후엔 장

기간의 치료와 관리를 필요로 한다. 질병관리본부의 폐경에 관한 보고서에서 예방차원의 꾸준한 골다공증 관리를 강조하고 있는 것처럼(Kim, 2014), 폐경기에 들어선 초기에 예방 차원의 관리가 이루어지는 것이 중요하다.

갱년기에 발생하는 심혈관 질환, 골다공증 등의 예방 및 치료를 위해 과거에는 주로 호르몬요법을 적용하였지만, 점차 환자가 겪는 증상에 따라 비호르몬요법 등의 다른 치료법도 적용하고 있다. 호르몬 치료 후 유방암, 심혈관질환, 정맥혈전색전증, 뇌졸중 발생 위험이 증가한다는 부작용에 관한 보고들의 영향으로, 환자가 부작용으로 보고된 질환의 고위험군에 해당된다면 비호르몬요법을 사용할 것을 공통적으로 제안하고 있다(Hulley 등, 1998; Oh, 2006; Park, 2016; Rossouw 등, 2002). 이처럼 비호르몬 치료의 적용범위가 넓어지고 있기 때문에, 보다 효율적인 비호르몬요법이 지속적으로 요구되고 있는 실정이다. 에스트로겐의 감소가 폐경의 가장 큰 원인이라는 점에는 아직까지 큰 이견이 없지만(Park, 2016), 유방암, 심혈관질환 같은 호르몬처방 부작용에 관하여 아직 논란이 있는 관계로 경미한 증상에 대해선 비호르몬 치료를 시행한다. 실내온도를 낮추고 식습관을 개선하는 등의 생활 관리법이나 증상의 관리를 위해 OTC 약제나 대체약물을 사용하기도 한다. 현재 비호르몬요법으로는 식품의약품안전처(식약처)로부터 폐경기 장애 치료제로 승인받은 승마 추출액 약제와 식물성 에스트로겐인 대두 이소플라본이 비호르몬요법에 가장 많이 이용되고 있다. 이 밖에도 갱년기에 효과가 있다고 구전된 여러 천연물들이 식약처로부터 갱년기 증상 개선 효과가 있는 기능성 원료로 인정받았고 갱년기 치료를 위한 비호르몬 요법에 이들을 단독 또는 복합적으로 사용하고 있다. 보다 효과적이고 안전한

*Corresponding author: Ga-hui Oh, ¹RIHU Healthcare Co., Seoul, Korea
Tel: +82-2-3142-5775
Fax: +82-2-3142-0351
E-mail: rkgml0214@naver.com
Received April 19, 2019; revised June 12, 2019;
accepted June 13, 2019

비호르몬요법 개발 요구에 따라 이들의 갱년기 만성 증상들에 관한 연구들이 이루어지고 있으며 유의한 효능을 나타내는 연구 결과가 지속적으로 보고되고 있다.

식물성 에스트로겐은 식물에 존재하는 물질로서 구조적, 기능적으로 17- β -estradiol과 연관되어 있거나 혹은 에스트로겐 효과를 나타내는 물질을 일컬으며, 식물성 에스트로겐의 투여는 갱년기 증상을 완화시킨다는 다수의 보고가 있다(Chen 등, 2015; The North American Menopause Society, 2011). 식물성 에스트로겐은 스테로이드류(석류 또는 대추 야자), 사포닌 함유물질(홍삼 등), 페놀류(플라보노이드류), 테르페노이드류(승마, 감초)의 4종류가 있는데, 석류농축액은 갱년기 증상의 측정지표인 쿠퍼만 지수 11가지가 모두 개선되었다는 보고가 있고(Ahn 등, 2010a), 홍삼은 갱년기 여성의 심리적인 불안을 해소시키고(Tode와 Kikuchi, 2003), 저밀도 콜레스테롤과 중성지방을 감소시킨다는 보고가 있으며(Kim 등, 2012), 승마는 갱년기 증상 중 열감, 홍조 등의 혈관운동증상(vasomotor symptoms) 증상의 개선에 효과가 있다는 보고가 있다(Lloyd와 Hornsby, 2009). 이들 중에 플라보노이드류인 이소플라본은 식물성 에스트로겐으로 불리는 물질로 에스트로겐과 분자 구조가 매우 흡사하며 이소플라본의 페놀고리가 에스트로겐 수용체와 결합하여 에스트로겐 효과를 나타낸다고 알려져 있다(Vitale 등, 2012). 이러한 이소플라본 성분으로는 제니스테인, 다이드제인, 포름오노테닌, 플라보노이드 퀴세틴 등이 있고, 플라보노이드 퀴세틴의 배당체인 루틴 또한 에스트로겐 효과를 나타낸다고 알려져 있는데(Vitale 등, 2012), 현재까지 루틴이 함유된 천연물에서의 여성 갱년기 기능성에 대한 연구는 거의 없었던 실정이다.

황칠(*Dendropanax moribifera* Leveille)은 두릅과에 속하는 상록 활엽수로 분류되며, 중남미와 동남아시아 등(Bernart 등, 1996)과 우리나라의 남부해변과 섬에 자생하고 있다(Lee 등, 2013). 황칠은 예로부터 치료로 이용해오던 식물이지만 최근 항산화 작용, 당뇨, 신장독성, 동맥경화증(atherosclerosis), 항암, 지질대사 개선과 관련된 효능들이 보고되고 있다(Guo 등, 2012; Hyun 등, 2013; Park 등, 2018; Park과 Han, 2016; Seo 등, 2016; Youn 등, 2018). 황칠나무의 잎, 줄기, 가지, 껍질에는 폴리페놀을 비롯하여 루틴, 클로로겐산, 다이드제인, 제니스틴, 제니스테인 같은 플라보노이드 외에도 비플라보노이드인 베타시토스테롤 등이 함유되어 있다(Bou 등, 2003; Kim 등, 2015; Park과 Han, 2016). 이중, 폴리페놀은 우리에게 항산화 효과로 잘 알려져 있으며, 식약처로부터 체지방 감소, 항산화, 혈당조절, 혈중 콜레스테롤 개선, 골건강에 도움을 주는 기능성원료로 인정받은 성분이다. 식약처로부터 혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있는 기능성 원료로 인정받은 베타시토스테롤은 여성호르몬인 에스트로겐과 유사한 구조를 가진 물질로서, 에스트로겐 효과를 통해 혈중지질 개선에 도움을 줄 수 있고 에스트로겐 수용체가 발현된 지방세포의 성장을 억제할 수 있다(Hsu 등, 2017; Sriraman 등, 2015). 이처럼 황칠에는 여성 갱년기 증상 완화에 도움을 줄 수 있는 활성성분들이 다량 함유되어 있을 뿐만 아니라, 에스트로겐 효과를 갖는 루틴 또한 많이 포함되어 있는 것으로 알려져 있음에도 불구하고, 폐경 이후 갱년기 증상 개선과 관련한 황칠의 기능성 연구는 미미한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 황칠추출분말을 이용하여, 그 함유 성분을 분석함으로써 지표성분으로 활용할 수 있는 주요성분을 확인하고, 난소를 적출한 쥐에 황칠추출분말을 투여하여 갱년기 증상 개선에 미치는 영향을 알아보고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 황칠추출분말은 전남 강진에서 재배한 것을 강진다산황칠농장((주)디피라이프, Gangjin, Korea)으로부터 구입하여 사용하였으며, 대조물질의 투여에 사용한 에스트로겐은 Sigma (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)제품을 구입하여 사용하였다. 석류농축액은 65°Bx로 제조된 것(GKNUR GIDA, Ankara, Turkey)을 구입하여 사용하였다.

황칠(잎과 줄기 혼합) 열수 추출분말의 제조

황칠원재료 무게의 10배가 되도록 정제수를 투입한 후 배합탱크에서 95-100°C 조건으로 6시간 동안 1차 추출하였으며, 1차 추출액을 분리한 후 원물 양 대비 8배에 해당하는 정제수를 다시 투입하여 95-100°C 조건에서 6시간 동안 2차 추출하였다. 고형분은 200 mesh 여과체로 걸러내고 추출액만을 취하여 회전 진공농축기로 농축한 후, 90°C 조건에서 10분간 살균과정을 진행하였다. 마지막으로, 살균액을 분무건조기에서 완전히 건조하여 분말화 하였으며, 원재료 대비 분말 수율은 약 14.5%였다.

지표성분 루틴의 함량 분석

황칠추출분말 1g을 15 mL의 메탄올에 녹여 1시간 동안 35°C에서 초음파 추출하였다. 상온에서 식힌 뒤, 메탄올(Sigma-Aldrich Co.)로 표시한 후, 1,000 rpm으로 1시간 동안 교반하였다. 25°C에서 3,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 얻은 상등액을 시험용액으로 사용하였다. 표준품 조제는 루틴(Sigma-Aldrich Co.) 8 mg에 8 mL 메탄올을 넣은 후 5분 동안 초음파를 이용하여 완전히 용해시키고 상온에서 식힌 다음, 메탄올로 10 mL에 맞춰 표시하였다. 이 용액을 단계적으로 희석하고 분석하여 검량선을 작성하고, 황칠추출분말에 함유된 루틴의 함량을 계산하였다.

분석을 위해 액체크로마토그래피(1260 Infinity II LC, Agilent Technologies Co., Santa Clara, CA, USA)와 YMC-Pack ODS-A C18 (250×4.6 mm, 5 μ m) 분석용 컬럼(YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan)을 사용하였고 이동상으로 사용한 0.1% 트리플루오로아세트산과 메탄올은 HPLC 등급(J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, NJ, USA)을 사용하였다. 검출기는 자외부흡광도계(1260 Infinity II DAD, Agilent Technologies Co., Santa Clara, CA, USA)를 사용하였으며, 255 nm의 파장에서의 흡광도를 측정하였다.

실험동물

본 시험에 사용된 동물은 6주령의 암컷 SD 쥐(DaehanBioLink Co., Eumseong, Korea)를 사용하였으며, (주)크로엔의 동물실험윤리위원회(IACUC)의 승인을 받아 수행되었다(승인번호: 18R019). 모든 쥐는 항온(22±3°C), 항습(50±12%) 및 조명주기 12시간의 일정한 환경에서 사료와 음용수를 공급하여 사육하였다. 일주일간 순화시킨 흰쥐의 난소를 절제하기 위해 70 mg/kg의 케타민(Yuhan Ketamine[®] Inj., Yuhan Medica Co., Seoul, Korea)과 10 mg/kg의 자일라진(Rompun inj., Bayer HealthCare, LLC, Tarrytown, NY, USA)을 복강 내에 투여하여 마취하였으며, 실험동물의 수술부위를 10% 베타딘 용액(Betadine Surgical Scrub, Korea Pharma, Seoul, Korea)으로 소독한 후, 측배부 아래쪽에서 약 1.5 cm의 피부, 복막 및 복근을 절개하고, 난소를 노출시켜 난관을 봉합사로 결합한 후 난소를 절제하였다. 양측 난소를 절제한 후에 복근, 복막 및 피부를 나일론사로 봉합하였다(Lee 등, 2006b). 일부 동물

은 개복 후 난소절제 없이 병합하여 정상대조군으로 두었다. 난소절제 수술을 시행한 흰쥐는 2주일 동안 회복기를 거친 후 시험에 사용하였다.

시험군 구성

회복기간이 지나고 각 군간 평균 체중 및 표준편차가 균일하도록 군 분리를 실시하였다. 실험군은 정상대조군(sham), 난소절제대조군(OVX), 석류추출물 투여군(OVX+PG 770 mg/kg), 에스트로겐 투여군(OVX+ β -estradiol 0.5 mg/kg), 황칠추출분말 저용량 투여군(OVX+DM 200 mg/kg), 황칠추출분말 중용량 투여군(OVX+DM 500 mg/kg), 황칠추출분말 고용량 투여군(OVX+DM 1,000 mg/kg)의 7군으로 구성하였으며, 각 실험군은 10마리의 흰쥐를 사용하였다. 황칠추출분말, 석류추출물, 에스트로겐 등의 시험물질은 1일 1회씩 8주간 경구투여 하였고 정상대조군과 난소절제대조군은 멸균 증류수를 경구투여 하였다.

석류추출물은 25-1,250 mg/kg의 용량을 45일까지 경구투여하였을 때에도 독성 징후가 나타나지 않았다는 보고(Kim 등, 2009)와 250-7,200 mg/kg/day의 용량을 경구투여하였을 때 갱년기 증상의 개선 효과를 보였다는 여러 보고(Ahn 등, 2010b; Kim 등, 2009; Wee 등, 2015)에 따라 안전한 유효용량으로 추정되는 770 mg/kg을 설정하였다. 황칠추출분말은 500 mg/kg의 용량을 13주간 반복투여시에도 간독성과 관련된 혈청 생화학 지표 및 간의 조직병리 소견에서도 독성의 징후가 나타나지 않았다는 보고(Yun 등, 2019)에 따라, 적절한 유효 용량을 탐색하고자 200, 500 및 1,000 mg/kg의 용량을 설정하였다. 에스트로겐으로 선정된 에스트라디올은 염의 형태에 따라 경구투여시 2,000-10,000 mg/kg 이상의 용량이 반수치사량으로 알려져 있다(Material Safety Data Sheet, Pfizer). 또한 에스트라디올 용액을 10 μ g/kg의 용량으로 주사하였을 때, 골다공증의 개선 효과를 보였다는 보고가 있고(Sun 등, 2015), 에스트라디올의 생체내 이용률은 0.1-12%인 것으로 알려져 있으므로 경구투여 용량은 500 μ g/kg으로 설정하였다.

체중측정 및 부검

실험기간동안 주1회씩 8주간 개체의 체중을 측정하였고 8주간의 시험물질 투여 후, 동물을 이소플루란(Terrell isoflurane, Piramal, Bethlehem, PA, USA)으로 마취하고 개복하여 복대동맥에서 채혈한 후 부검을 실시하였다. 복대동맥에서 채혈한 혈액은 항응고제가 없는 튜브에 담고 4°C에서 30분 이상 방치한 후, 5,000 rpm (4°C)으로 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 바이오마커 측정을 위해 -80°C에 냉동보관 하였으며, 반복적인 해동 및 재동결로 인한 혈청내 단백질의 손상을 막기 위해 소분하여 보관하였다. 부검시에 생식기계 장기인 질과 자궁을 적출하여 중량을 측정하고, 또한 간을 적출하여 -80°C에 보관하였다.

혈중 바이오마커 측정

혈청 분리 후 즉시, 총 콜레스테롤(T-Chol), 중성지방(TG), 고밀도 콜레스테롤(HDL-C)와 저밀도 콜레스테롤(LDL-C) 등의 지질 관련 지표를 혈청 생화학 검사(HITACHI 7180, HITACHI, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였고, 골 관련 지표인CTX (MBS703743, Mybiosource, San Diego, CA, USA)와 오스테오칼신(MBS288743, Mybiosource)은 ELISA 키트를 이용하여 측정하였다.

간 조직내 단백질 발현 측정

간 조직내 에스트로겐 수용체의 발현과 ERK 단백질의 활성을

측정하기위해 웨스턴 블롯을 수행하였다. 간 조직 내 ERK (#4695, Cell signaling, Danvers, MA, USA), p-ERK (#137F5, Cell signaling), β -actin (#4970, Cell signaling), 에스트로겐 수용체 알파형(ER- α) (ab75635, Abcam, Cambridgeshire, England), 에스트로겐 수용체 베타형(ER- β) (05-824, Merk millipore, Burlington, MA, USA)를 측정하였다. 간 조직으로부터 단백질을 추출하기 위해 다음과 같은 조성의 혼합액(20 mM Tris, 100 mM NaCl, 2 mM NaEDTA, 1% Igepal CA-630, protease inhibitor cocktail, phosphatase inhibitor cocktail)을 첨가하여 조직을 분쇄한 후 원심분리하여 상층액을 취하였다. 단백질 정량시약(Pierce™ BCA protein Assay kit, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)으로 상층액의 단백질 농도를 정량하였고, 5 \times SDS 샘플 버퍼를 첨가하여 동량의 단백질을 포함하는 분석샘플을 만들었다. 10% 폴리아크릴아마이드 겔(SDS-Acrylamide gel)에 전기영동 후 단백질을 전이시키고(PVDF, 0.45 μ m) TBS-T (tris-buffered saline-tween 20, 0.05% tween 20)로 5분간 3회 세척하고 5% BSA에 상온에서 1 시간 동안 교반한 후 TBS-T로 5분간 3회 세척하였다. 일차항체(ER- α , ER- β , ERK, p-ERK, β -actin; 1:1000)를 처리한 후 4°C에서 하루동안 교반하고, 이차항체(anti-Rabbit-HRP, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. ECL (enhanced chemiluminescence) 용액(SuperSignal™ West Pico Plus, Thermo Scientific)을 처리하여 1분 정도 반응시킨 후 LAS-4000 mini (Fuji Photo Film Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다.

통계분석

모든 실험결과는 평균치 \pm SD (standard deviation)로 나타냈고, 통계분석은 분산분석(ANOVA)을 실시하여 F 값을 먼저 확인한 후, student t-test를 실시하였다. Student t-test 시의 매개변수는 F 값에 따라 단측성 혹은 양측성 분산표본의 type을 적용하여 유의성을 검정하였다. 통계학적 분석은 상용으로 널리 사용되고 있는 MS Office 2016의 Excel 프로그램을 이용하여 실시하였다. 각 그룹간의 비교에 있어서, $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결과 및 고찰

황칠추출분말의 루틴 함량분석

루틴 함량 분석을 위해 액체크로마토그래피에 의한 기기분석을 실시한 결과, 해당 분석조건에서 15.5분대에 루틴이 검출되었으며, 동일한 분석조건에서 황칠추출분말의 기기분석 결과 15.5분대의 루틴이 주요성분인 것으로 분석되었다. 황칠추출분말 분석 크로마토그램상의 피크면적에 의하면, 주요 성분 중 루틴이 36% 정도를 차지하는 것으로 나타났으며, 황칠추출분말 1g에 포함되어 있는 루틴의 함량은 평균 11.19 mg (10.89-12.08 mg)으로 나타났다(Fig. 1). 그러므로 루틴은 본 황칠추출분말의 주요성분으로 보이며, 지표성분으로 루틴을 사용하는 것이 적절하다고 판단하였다.

황칠에는 항산화 효과가 있다고 알려진 클로로겐산과 카페산 등의 폴리페놀 성분이 많이 함유되어 있을 뿐만 아니라(Hyun 등, 2013; Park과 Han, 2016), 본 성분 분석 결과에서 알 수 있듯이 플라보노이드류인 루틴이 다량 함유되어 있다. 플라보노이드의 상당수는 페닐 고리를 가졌다는 점에서 에스트로겐과 구조적으로 유사하고(Fig. 2), 이 때문에 에스트로겐 효과를 나타내며, 루틴 또한 난소 기능 상실로 인해 감소된 혈중 에스트로겐 농도를

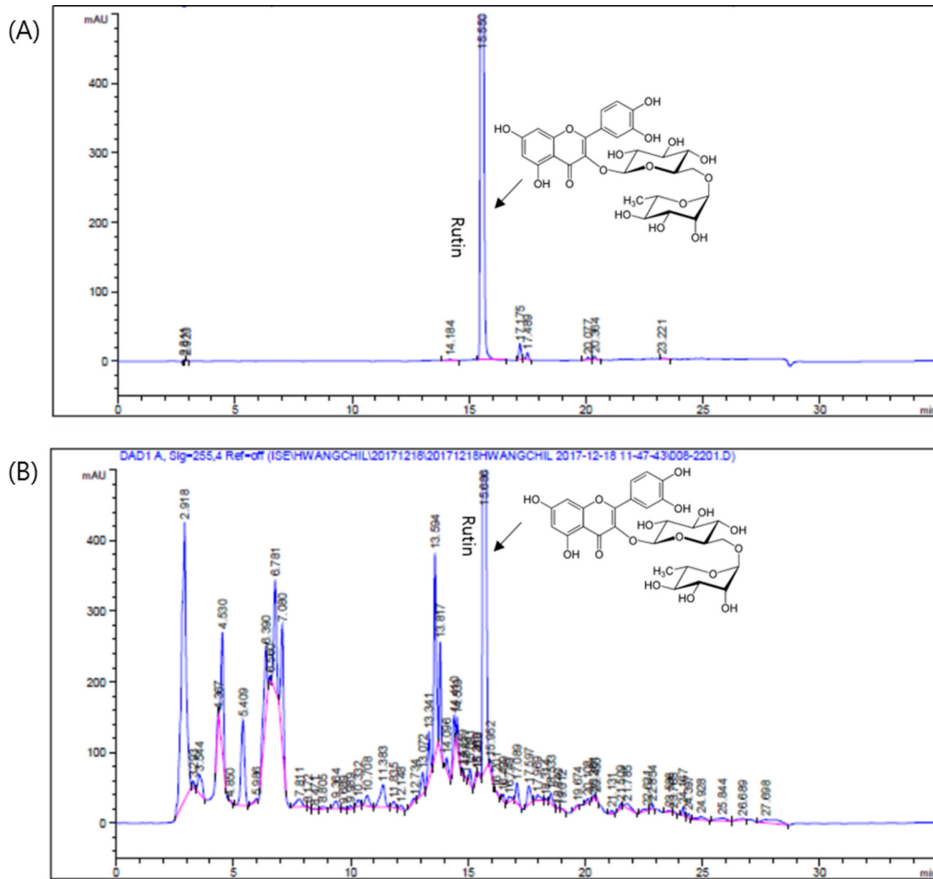


Fig. 1. Representative LC chromatogram of (A) rutin standard sample, (B) extract of *Dendropanax morbifera*. (A) HPLC chromatogram of 1 mg/mL standards of rutin (15.5 min). (B) HPLC chromatogram of *Dendropanax morbifera* extract. Each peak represent each component of *Dendropanax morbifera* extract. *Dendropanax morbifera* extract eluted with 0.1% trifluoroacetic acid through a column at a flow rate of 1.0 mL/min and analyze absorbance 255 nm.

항상시킨다고 알려져 있다(Choi 등, 2015; Guo 등, 2012).

체중 변화 및 장기증량

동물에서 여성 갱년기를 유도하는 방법으로 난소절제를 시행하는 방법은 이미 잘 알려진 방법이다(Brinton, 2012). 갱년기 여성은 혈중 여성호르몬 농도의 변화로 인한 체지방량의 변화와 생식기의 위축을 겪는데(Cho, 2013), 난소를 절제한 설치류에서도 체내 콜레스테롤의 에스트로겐 전환율이 감소하면서 혈중 콜레스테롤 상승과 지방조직 증가로 인해 체중이 증가한다고(Lee 등, 2006a) 알려져 있다. 또한 여성호르몬의 농도가 감소하며, 생식기 위축이 관찰된다고 알려져 있다(Babaei 등, 2017; Bonilla-Becerra 등, 2017; Choi 등, 2011; Zhu 등, 2013).

난소절제 쥐에 황칠추출분말을 8주간 투여한 결과, 일반증상 관찰 시에 특이적 소견이 관찰되지 않아, 장기간 복용시에도 부작용이 없는 안전한 물질일 것으로 추측된다. 또한 체중변화의 관찰 결과, 앞서의 보고들과 유사하게 난소절제대조군은 정상대조군에 비해 체중이 유의한 차이를 보이며 증가하였다. 에스트로겐으로서 베타 에스트라디올을 투여한 경우에는 투여 1주일 후부터 난소절제대조군에 비하여 유의적으로 낮은 체중증가율을 보였지만, 석류추출물 투여시에는 난소절제대조군과 차이가 없는 것으로 나타났다. 한편 황칠추출분말 투여시에는 난소절제대조군보다 약간 더 낮은 체중증가율을 나타냈지만 유의적이지는 않았다. 황칠추출분말이 갱년기 여성의 체중증가율을 낮추는 데에 유

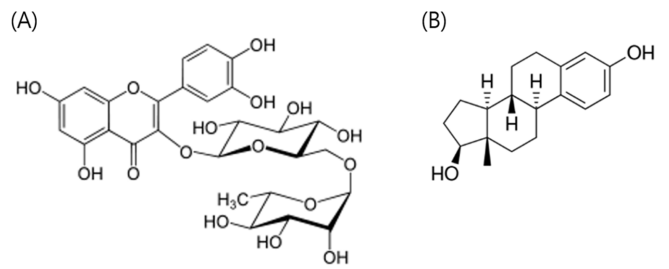


Fig. 2. Structure of (A) rutin, (B) 17-β-estrogen.

의적인 영향을 주지는 않는 것으로 보이지만, 투여 후반으로 갈수록 증가폭이 줄어드는 것으로 보아, 장기간 황칠추출분말을 투여한다면 체중증가율 폭을 조금 더 줄일 수 있을 것으로 기대된다(Fig. 3).

부검시 모든 투여군을 대상으로 자궁, 질의 장기증량을 측정하여 체중에 비례한 상대증량을 확인하였다(Table 1). 정상대조군과 비교하여 에스트로겐 투여군을 제외한 난소절제를 시행한 모든 시험군에서 통계적으로 유의한 수준의 자궁, 질의 상대 무게 감소가 관찰되었다. 에스트로겐 투여군에서는 난소절제대조군과 같은 장기증량의 감소가 없었지만, 석류추출물과 황칠추출분말 저용량 및 중용량 투여군에서는 난소절제대조군과 유사한 수준의 장기증량 감소를 나타내었다. 한편 황칠추출분말 고용량 투여군

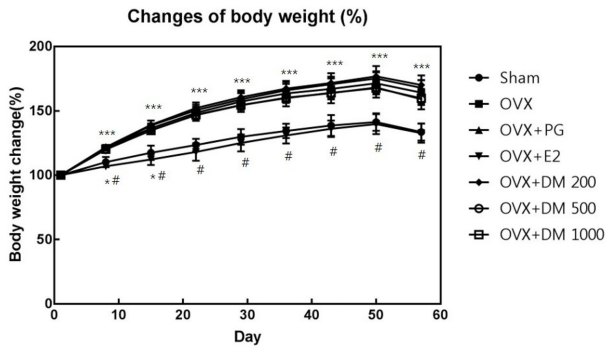


Fig. 3. Changes of body weight in ovariectomized rats. Rates of body weight changes for 8 weeks. Body weight in every week was measured and compared to weight of starting point (Day 0). Data represent the mean and error bars represent the SD. #*p*<0.001 vs Sham, **p*<0.05 vs OVX, ***p*<0.01 vs OVX, ****p*<0.001 vs OVX. OVX: Ovariectomized rat; PG: *Punica granatum*; E2: β-estradiol; DM: *Dendropanax morbifera*.

에서는 난소절제대조군에 비해 장기 중량의 감소폭이 줄었지만 유의적인 수준은 아니었다.

혈중 지질 관련 지표의 변화

갱년기 후기의 만성증상으로는 심혈관 질환과 비만이 대표적이다. 폐경 이후 여성은 폐경 이전에 비해 체지방량과 체중이 유의하게 증가하는데, 이는 이차 성징 이후 여성호르몬의 주요 공급자가 난소였으나 폐경 이후엔 지방조직으로 바뀌기 때문이다. 호르몬이 생식기능뿐만 아니라 몸의 다양한 대사에도 관여하기 때문에 폐경 이후에는 혈중 에스트로겐의 감소를 보상하기 위해 체지방량이 증가한다(Purohit와 Reed, 2002).

본 연구에서는 황칠추출분말이 심혈관 질환의 치료 및 예방에 도움을 줄 수 있는지 그 가능성을 평가하기 위해 난소절제모델에서 황칠추출분말을 투여한 후 대표적인 혈중 지질지표인 총 콜레스테롤과 중성지방, 고밀도 콜레스테롤, 저밀도 콜레스테롤의 변화를 관찰하였다(Table 2).

황칠추출분말 투여군에 있어서, 총 콜레스테롤, 중성지방, 고밀도 콜레스테롤, 저밀도 콜레스테롤의 혈중 수치 모두가 저용량(OVX+DM 200)을 투여하였을 때와 비교하여 고용량(OVX+DM 1000)을 투여한 군에서 용량 의존적으로 감소하였다. 고용량군 대비 저용량군의 총 콜레스테롤 수치는 117.61±18.11 mg/dL에서 104.76±9.62 mg/dL로 낮은 경향을 보였으며, 혈중 중성지방 수치는 45.68±13.07 mg/dL에서 39.23±13.74 mg/dL로, 고밀도콜레스테롤 수치는 28.18±3.52 mg/dL에서 25.67±2.19 mg/dL로, 저밀도콜레스테롤 수치는 8.22±1.20 mg/dL에서 7.28±1.39 mg/dL로 더 낮은 수치를 보였다. 이는 난소절제대조군 대비 유의한 감소는 아니지만, 황칠추출분말이 용량 의존적으로 지질지표들이 감소하는 경향을 보였다는 것에 의의가 있다. 비록 황칠추출분말 투여군에서 난소절제대조군에 비해 지질수치가 감소하지는 않았지만, 황칠추출분말 투여군 각 그룹간 지질수치를 비교하면, 용량의존적 지질 지표의 감소를 나타내는 것으로 보인다. 이를 통해 황칠추출분말 투여군에서 난소절제대조군 대비 유의한 감소를 나타내지 않은 이유에서, 황칠추출분말 속 일부 성분에 기인한 비의도적인 지질지표 상승 때문에 에스트로겐 효과를 가진 성분들의 지질 개선효과가 가려졌을 가능성을 배제할 수 없을 것으로 판단된다. 추후에 황칠추출분말의 성분분리 후, 각 성분별 지질지표 변화를 관찰하여 유효한 성분을 찾아내는 것도 의미있을 것으로 생각된다.

혈중 골 관련 지표의 변화

갱년기 후기에 발병율이 높은 또 하나의 질환은 골다공증이다. 폐경이 여성의 골다공증 유발인자임에는 큰 이견이 없으며, 한 보고에 따르면 폐경 전에 비해 폐경 후 골다공증의 유병율은 폐경의 진행에 따라 유의하게 증가한다(Kim 등, 2017). 이는 혈중 에스트로겐 농도가 골밀도의 변화와 밀접한 연관이 있기 때문이며, 폐경기 여성에서 에스트로겐의 감소는 골다공증 유병률이 증가하는 주된 원인으로 꼽힌다.

난소절제 시 에스트로겐 감소로 인해 뼈의 생성과 관련된 조골세포와 뼈의 재흡수와 관련된 파골세포 사이에 불균형이 일어나고, 이로 인해 골 교체율이 증가하여 골다공증이 발생할 수 있다고 알려져 있다(Kim, 2008; Park과 Kang, 2007). 그러므로 본

Table 1. Relative weight of organs in ovariectomized rats after *Dendropanax morbifera* administration

Organ	Sham	OVX					
		Control	PG	E2	DM 200	DM 500	DM 1000
Uterus	0.254±0.0724	0.034±0.0035 [#]	0.033±0.0055	0.184±0.0392***	0.033±0.0033	0.035±0.0043	0.037±0.0182
Vagina	0.076±0.0104	0.037±0.0079 [#]	0.034±0.0092	0.077±0.0104***	0.040±0.0100	0.035±0.0109	0.043±0.0144

Data represent the mean±SD.

[#]*p*<0.001 vs Sham, **p*<0.05 vs OVX, ***p*<0.01 vs OVX, ****p*<0.001 vs OVX.

OVX: Ovariectomized rat; PG: *Punica granatum*; E2: β-estradiol; DM: *Dendropanax morbifera*.

Table 2. Plasma lipid profiles in ovariectomized rats after *Dendropanax morbifera* administration

Lipid	Sham	OVX					
		Control	PG	E2	DM 200	DM 500	DM 1000
T-Cho	75.25±10.72	102.90±15.87 ^{##}	101.14±6.67	47.71±16.97***	117.61±18.11	110.71±9.02	104.76±9.62
TG	19.24±6.08	40.26±13.48 [#]	47.75±13.92	33.65±9.62	45.68±13.07	40.99±11.48	39.23±13.74
HDL-C	19.97±2.09	25.44±3.02 ^{##}	25.57±1.87	14.11±5.04***	28.18±3.52	26.93±2.33	25.67±2.19
LDL-C	6.09±1.50	6.91±1.04	7.28±2.01	3.42±1.25***	8.22±1.20*	8.03±1.66	7.28±1.39

Data represent the mean±SD.

[#]*p*<0.05 vs Sham ^{##}*p*<0.001 vs Sham, **p*<0.05 vs OVX, ***p*<0.01 vs OVX, ****p*<0.001 vs OVX.

OVX: Ovariectomized rat; PG: *Punica granatum*; E2: β-estradiol; DM: *Dendropanax morbifera*.

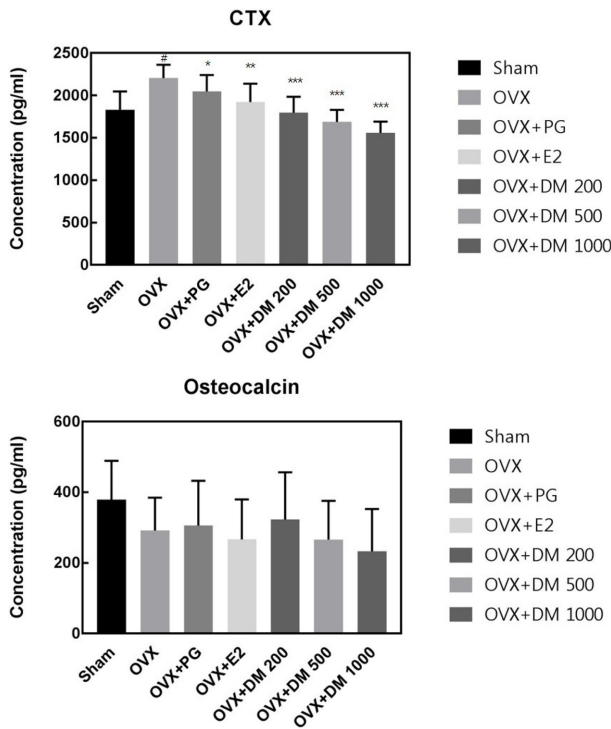


Fig. 4. Quantitative analysis of biochemical bone turnover markers after *Dendropanax morbifera* administration in serum of ovariectomized rats. ELISA assay was carried out after each material (PG, E2, DM) administration for 8 weeks. (A) Analyze amounts of CTX sequences and (B) osteocalcin proteins in serum. Data represent the mean and error bars represent the SD. [#] $p < 0.001$ vs Sham, ^{*} $p < 0.05$ vs OVX, ^{**} $p < 0.01$ vs OVX, ^{***} $p < 0.001$ vs OVX. OVX: Ovariectomized rat; PG: *Punica granatum*; E2: β -estradiol; DM: *Dendropanax morbifera*.

연구에서는 난소절제 쥐에서 황칠추출분말 투여시의 골 대사 관련 지표의 변화를 확인하고자 하였다. 골 교체를 관련 지표로서

폐경기 여성에서 높다고 알려진 오스테오칼신 및 CTX의 혈중 농도를 확인하였다. 오스테오칼신과 CTX는 골 교체를 반영하는 지표로서, CTX는 골 재흡수가 일어날 때 증가하고, 오스테오칼신은 골의 형성이 일어날 때 증가하며 두 지표의 상승은 골의 재흡수와 형성이 활발하게 일어남을 암시한다.

본 시험조건 하에서 황칠추출분말의 투여가 CTX와 오스테오칼신의 혈중 농도를 낮추는 것으로 나타났다(Fig. 4). 정상대조군의 혈중 CTX농도 $1,832 \pm 214$ pg/mL에 비해 난소절제대조군은 $2,206 \pm 155$ pg/mL으로 유의적인 차이로 상승하였으나, 황칠추출분말 투여군은 저용량 투여 시 $1,796 \pm 189$ pg/mL, 중용량 투여 시 $1,686 \pm 145$ pg/mL, 고용량 투여 시 $1,557 \pm 133$ pg/mL로 난소절제대조군에 비하여 용량 의존적으로 유의한 감소를 나타냈다. 한편 혈중 오스테오칼신의 농도는 황칠추출분말의 투여시에 용량의존적으로 감소하는 경향을 나타냈다. 즉 골 재형성에 관여하는 오스테오칼신이 난소절제대조군과 비교하여 황칠추출분말 투여군에서 감소하는 경향을 보이고, 파골세포에 의해 콜라겐 분자의 말단부분이 분해되어 혈액 내로 방출되는 현상을 반영하는 골 흡수 지표인 CTX가 난소절제대조군과 비교하여 황칠추출분말 투여군에서 유의적인 감소를 나타내는 점으로 미루어 황칠추출분말이 갱년기 여성의 골다공증 예방 혹은 개선에 도움을 줄 수 있는 것으로 사료된다.

간 조직내 단백질 발현

간 조직에도 에스트로겐 수용체가 많이 분포되어 있는 것이 알려져 있고, 간조직은 많은 샘플량을 확보할 수 있다는 장점이 있으므로, 간조직 내의 에스트로겐 수용체의 발현과 ERK 단백질의 활성을 웨스턴 블롯을 통해 확인하였다. 여성호르몬에 의한 영향은 에스트로겐 수용체를 통해 각 조직으로 전달되며, 에스트로겐 수용체의 발현은 조직마다 차이가 있다(Mohamed와 Abdel-Rahman, 2000). 플라보노이드와 같이 에스트로겐과 유사한 구조를 가진 물질들의 에스트로겐 효과는 에스트로겐 수용체에 의한 것으로 추정되며, 이러한 에스트로겐 수용체에 의한 영향은 ER- α 를 통하여 활성화되는 MAPK/ERK 활성경로의 신호전달에 의해 이루어지는 것으로 알려져 있다(Bulayeva 등, 2004).

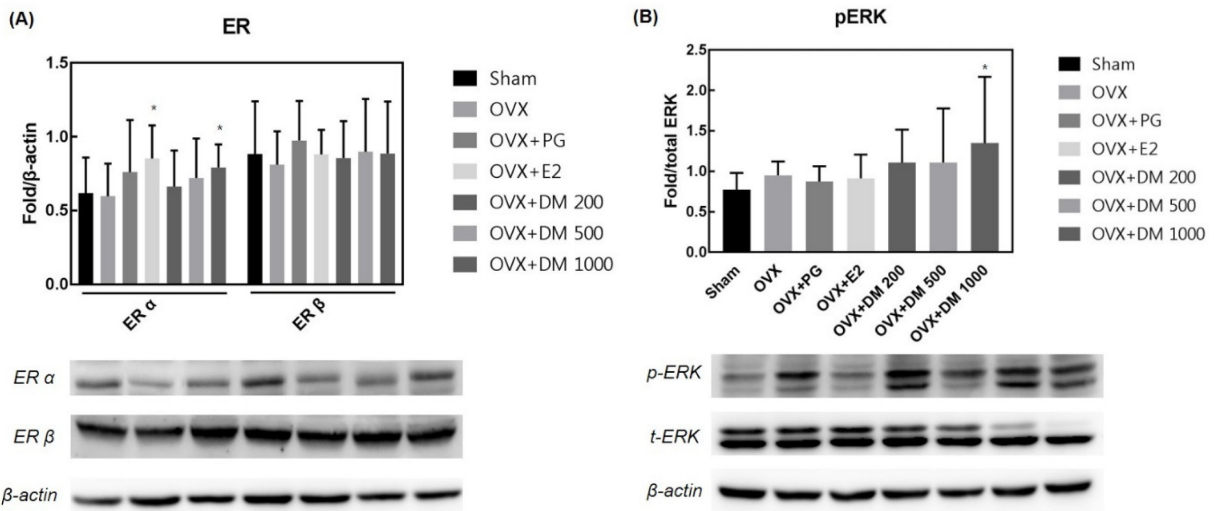


Fig. 5. Expression levels of (A) ER- α and ER- β and (B) p-ERK after *Dendropanax morbifera* administration in liver of ovariectomized rats. Western blot was carried out after each material (PG, E2, DM) administration for 8 weeks. (A) Analyzed amounts of estrogen receptor alpha and beta in liver tissue. (B) Analyzed amounts of total ERK and phosphorylated ERK (p-ERK). Data represent the mean and error bars represent the SD. [#] $p < 0.001$ vs sham, ^{*} $p < 0.05$ vs OVX. OVX: Ovariectomized rat; PG: *Punica granatum*; E2: β -estradiol; DM: *Dendropanax morbifera*.

따라서 본 연구에서는 황칠추출분말의 에스트로겐 수용체를 통한 생리활성을 확인하기 위해 ER- α 의 활성화와 MAPK/ERK 활성화 경로에 관여하는 ERK 단백질의 활성을 확인하였다. 그 결과, 황칠추출분말을 투여한 실험군에서 ER- α 와 ERK 단백질의 활성이 증가하는 경향을 보였다. ER- α 의 발현량은 난소절제대조군 대비 용량 의존적으로 증가하였는데, 에스트로겐 투여군이 1.3배 증가한데 비해 황칠추출분말 저용량 투여군은 1.1배, 중용량 투여군은 1.16배, 고용량 투여군은 1.28배 증가하였고, 특히 고용량 투여군은 통계적으로 유의한 증가를 나타냈다. pERK의 발현량 또한 음성대조군에 비하여 황칠추출분말 투여시에 증가하는 경향을 나타냈고, 고용량 투여군은 통계적으로 유의한 증가를 보였다 (Fig. 5).

이와 같은 결과로 미루어, 황칠추출분말의 투여는 ER- α 의 단백질 발현을 증가시키고 MAPK/ERK 신호전달 경로를 활성화하는 것으로 보인다. 황칠추출분말의 투여가 에스트로겐 수용체의 발현을 증가시키는 동시에 에스트로겐 수용체가 매개하는 세포 내 신호전달경로를 활성화함으로써, 에스트로겐의 감소로 인한 현상들을 개선할 수 있을 것으로 추정된다.

에스트로겐은 지질대사 및 골대사와 밀접한 관련이 있고, 폐경 여성에서의 에스트로겐 고갈은 심혈관계 질환 및 골다공증 같은 만성 질환의 위험인자로 간주될 수 있다. 루틴을 비롯한 플라보노이드 성분은 구조적 유사성으로 인해 에스트로겐 효과를 나타낼 수 있을 것으로 추정된다. 실제로 오일 카테일을 섭취시켜 고콜레스테롤혈증을 유발시킨 쥐에서 루틴의 투여가 지질지표들을 개선하였고(Ziaee 등, 2009), 당뇨병자의 루틴 섭취가 지질지표들을 개선한다는 보고들이 있다(Sattanathan 등, 2010). 본 연구에서 난소절제 쥐에 황칠추출분말을 투여시에 골교체를 관련 지표인 CTX 및 오스테오칼신의 감소라든지, ER- α 단백질 발현의 증가 및 ERK인산화의 증가와 같은 결과에, 황칠추출분말 성분분석시 주요 성분으로 확인된 루틴에 의한 에스트로겐 효과가 큰 영향을 미쳤을 가능성이 있다고 추정할 수 있다.

요 약

황칠추출분말은 여성호르몬인 에스트로겐과 구조적 유사성을 가진 루틴을 다량 함유하고 있다(황칠추출분말 1g당 11.19mg의 루틴 함유). 루틴은 식물성 여성호르몬이라고 불리는 플라보노이드 성분의 일종으로, 에스트로겐 수용체를 통한 신호전달을 증가시킨다. 특히 ER- α 로부터 세포내로 전달되는 MAPK/ERK 신호전달 경로를 활성화시킴으로써, 갱년기의 대표적인 만성증상들을 개선할 수 있는 가능성이 있다고 여겨진다. 본 연구는 루틴이 다량 함유된 황칠추출분말을 폐경의 유도를 위해 난소를 절제한 쥐에 투여하여 여성갱년기 증상의 개선에 미치는 영향을 평가하였다. 그 결과 골교체를 관련 지표로서 폐경기 여성에서 높다고 알려진 오스테오칼신이 감소하는 경향성을 나타냈고, CTX는 유의적인 감소를 나타냈을 뿐만 아니라, 에스트로겐 수용체의 활성화를 증가시키는 경향성을 나타냈다. 이를 통해, 황칠추출분말은 골다공증의 예방 및 개선 효과를 나타내는 갱년기 여성 건강에 도움을 줄 수 있는 기능성 원료로서의 가능성을 보여준다.

감사의 글

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 고부가가치식품기술개발사업의 지원을 받아 연구되었습니다(116029-3-CG000).

References

- Ahn KH, Kim SM, Yi KW, Park HT, Shin JH, Kim YT, Hur JY, Kim SH, Lee KW, Kim T. The effect of pomegranate on postmenopausal syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Menopausal Med.* 16: 99-107 (2010a)
- Ahn KH, Yi KW, Park HT, Shin JH, Hur JY, Kim YT, Kim SH, Lee KW, Kim SH, Bae CS, Kim T. The effect of pomegranate on depression, anxiety, and food intake in ovariectomized rats. *J. Menopausal Med.* 16: 39-45 (2010b)
- Babaei P, Dastras A, Tehrani BS, Pourali RS. The effect of estrogen replacement therapy on visceral fat, serum glucose, lipid profiles and apelin level in ovariectomized rats. *J. Menopausal Med.* 23: 182-189 (2017)
- Bernart MW, Cardellina JH, Balaschak MS, Alexander MR, Shoemaker RH, and Boyd MR. Cytotoxic falcarinol oxylipins from *Dendropanax arboreus*. *J. Nat. Prod.* 59: 748-753 (1996)
- Bonilla-Becerra SM, de Oliveira MG, Calmasini FB, Rojas-Moscoco JA, Zanesco A, Antunes E. Micturition dysfunction in four-month old ovariectomized rats: effects of testosterone replacement. *Life Sci.* 179: 120-129 (2017)
- Bou SM, Wiese TE, Nehls S, Burow ME, Elliott S, Carter-Wientjes CH, Shih BY, McLachlan JA, Cleveland TE. Evaluation of the estrogenic effects of legume extracts containing phytoestrogens. *J. Agric. Food Chem.* 51: 2193-2199 (2003)
- Brinton RD. Minireview: translational animal models of human menopause: challenges and emerging opportunities. *Endocrinology.* 153: 3571-3578 (2012)
- Bulayeva NN, Gametchu B, Watsona CS. Quantitative measurement of estrogen-induced ERK 1 and 2 activation via multiple membrane-initiated signaling pathways. *Steroids* 69: 181-192 (2004)
- Chen MN, Lin CC, Liu CF. Efficacy of phytoestrogens for menopausal symptoms: A meta-analysis and systematic review. *Climacteric.* 18: 260-269 (2015)
- Cho JH. Assessment of women's health during menopausal periods. Korea Center for Disease Control and Prevention. (2013)
- Choi JH, Kim DW, Park SE, Lee HJ, Kim KM, Kim KJ, Kim MK. Anti-thrombotic effect of rutin isolated from *Dendropanax morbifera leveille*. *J. Biosci. Bioeng.* 120: 181-186 (2015)
- Choi SY, Park D, Yang G, Lee SH, Bae DK, Hwang SY, Lee PK, Kim YB, Kim IH, Kang HG. Effects of sigma anti-bonding molecule calcium carbonate on bone turnover and calcium balance in ovariectomized rats. *Lab. Anim. Res.* 27: 301-307 (2011)
- Guo XD, Diao QY, Wang YY, Tu Y, Deng KD, Wang XJ, Fu T, Yan GL. The effect of administration of rutin on plasma levels of estrogen, prolactin, growth hormone and gene expression of their receptors in mammary glands in ovariectomized rats. *J. Intergr. Agr.* 11: 1700-1706 (2012)
- Hsu CC, Kuo HC, Huang KE. The effects of phytosterols extracted from *Dioscorea alata* on the antioxidant activity, plasma lipids, and hematological profiles in Taiwanese menopausal women. *Nutrients* 9: 1320 (2017)
- Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. heart and estrogen & progestin replacement study (HERS) research group. *JAMA.* 280: 605-613 (1998)
- Hyun TK, Kim MO, Lee H, Kim Y, Kim E, Kim JS. Evaluation of anti-oxidant and anti-cancer properties of *Dendropanax morbifera leveille*. *Food Chem.* 141: 1947-1955 (2013)
- Kim MH. Effect of Platycodon Grandiflorum A. extract in bone metabolism in ovariectomized rats. *Korean Soc. Orien. Med. Physiol.* 22: 183-188 (2008)
- Kim YN. Osteoporosis or low bone mass in adults aged 50 years old and above in republic of korea, 2008-2011. Vol. 7, pp. 939-942. In: Public Health Weekly Report. Cheongju, Korea (2014)
- Kim YJ, Cho AR, Chang YS, Cho JH, Ryu SH, Seul Koo, Park HY. Prospective observational study on the risk factors for chronic disease in menopausal transition women. Vol.10, pp. 814-820. In: Public Health Weekly Report. Cheongju, Korea (2017)
- Kim W, Kim DW, Yoo DY, Jung HY, Kim JW, Kim DW, Choi JH, Moon SM, Yoon YS, Hwang IK. Antioxidant effects of *Dendro-*

- panax moribifera leveille* extract in the hippocampus of mercury-exposed rats. BMC Complement Altern. Med. 15: 247 (2015)
- Kim HC, Kum EJ, Kwon DH, Lee HY. The effect of pomegranate extracts on the menopausal syndromes. J. Exp. Biomed. Sci. 15: 217-227 (2009)
- Kim SY, Seo SK, Choi YM, Jeon YE, Lim KJ, Cho SH, Choi YS, Lee BS. Effects of red ginseng supplementation on menopausal symptoms and cardiovascular risk factors in postmenopausal women: A double-blind randomized controlled trial. Menopause 19: 461-466 (2012)
- Lee YH, Hyun SH, Choung SY. Effect of singled and mixed pomegranate on postmenopausal symptoms in ovariectomized rats. Yakhak hoeji. 50: 177-183 (2006a)
- Lee JE, Kim SH, Kim KJ. Effects of climbing exercise training and statin or alendronate supplementation on bone metabolism in ovariectomized rats. J. Exerc. Nutrition Biochem. 10: 107-115 (2006b)
- Lee MK, Lee IS, Lee JS. For the utilization of native plant resources as high-value materials; evaluation on demelanizing activity of *Dendropanax moribifera bogildo*. J. Korean Island. 25: 227-240 (2013)
- Lim KY. The study of menopause-related quality of life and management of climacteric in a middle-aged female population in Korea. Public Health Weekly Rep. 6: 609-613 (2013)
- Lloyd KB, Hornsby LB. Complementary and alternative medications for women's health issues. Nutr. Clin. Pract. 24: 589-608 (2009)
- Mohamed MK, Abdel-Rahman AA. Effect of long-term ovariectomy and estrogen replacement on the expression of estrogen receptor gene in female rats. Eur. J. Endocrinol. 142: 307-314 (2000)
- Oh HJ. Perspectives for managing menopause: general introduction. J. Korean Med. Assoc. 49: 4-10 (2006)
- Park SY. Menopausal symptoms treatment trend 2015. pp. 227-230. In: The 2016 Spring Conference of The Korean Association of Internal Medicine. April 22-23, Bexco, Busan, Korea. The Korean Association of Internal Medicine, Seoul, Korea (2016)
- Park YM, Han JS. A study on the utilization of *Dendropanax moribifera* lev. leaf extract for material of functional cosmetics and hair growth products. Asian J. Beauty Cosmetology. 14: 277-288 (2016)
- Park MH, Kang SR. Effect of codium fragile extract on collagen content and collagen cross-link formation in ovariectomized rats. J. life Sci. 17: 931-936 (2007)
- Park SY, Karthivashan G, Ko HM, Cho DY, Kim JS, Cho DJ, Ganesan P, Kim IS, Choi DK. Aqueous extract of *Dendropanax moribifera* leaves effectively alleviated neuroinflammation and behavioral impediments in MPTP-induced parkinson's mouse model. Oxid. Med. Cell Longev. 2018: 3175214 (2018).
- Purohit A, Reed MJ. Regulation of estrogen synthesis in postmenopausal women. Steroids. 67: 979-983 (2002)
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J. 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 (2002)
- Sattanathan K, Dhanapal CK, Manavalan R. LDL Lowering properties of rutin in diabetic patients. Int. J. Pharma Bio Sci. 1: 467-473 (2010)
- Seo JS, Yoo DY, Jung HY, Kim DW, Hwang IK, Lee JY, Moon SM. Effects of *Dendropanax moribifera leveille* extracts on cadmium and mercury secretion as well as oxidative capacity: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Biomed. Rep. 4: 623-627 (2016)
- Sriraman S, Ramanujam GM, Ramasamy M, Dubey GP. Identification of beta-sitosterol and stigmasterol in *Bambusa bambos* (*L.*) *voss* leaf extract using HPLC and its estrogenic effect in vitro. J. Pharm. Biomed. Anal. 115: 55-61 (2015)
- Sun X, Liang J, Wang C, Cao S, Hu Y, Xu X. Ovariectomized rats accompanied with unilateral disuse in the early phase. Int. J. Med. Sci. 12: 423-431 (2015)
- The North American Menopause Society. The role of soy isoflavones in menopausal health: report of The North American Menopause Society/Wulf H. Utian Translational Science Symposium in Chicago, IL (October 2010). Menopause 18: 732-53 (2011)
- Tode T, Kikuchi Y. Effect of Korean red ginseng on psychological functions in patients with severe climacteric syndromes: a comprehensive study from the viewpoint of traditional KAMPO-medicine and western medicine. Int. J. Gynaecol. Obstet. 27: 110-114 (2003)
- Vitale DC, Piazza C, Melilli B, Darago F, Salomone S. Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 38: 15-25 (2012)
- Wee JH, Jung HJ, Jung KO, Sung HM, Shin YR, Park JH, Seo HY, Lim JM, Chae HJ, Lee KY. Pomegranate extract improves menopausal syndrome in ovariectomized rats. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 44: 506-515 (2015)
- Youn JS, Kim MS, Na HJ, Jung HR, Song CK, Kang YS, Kim JY. Screening test for *Dendropanax moribifera leveille* extracts: in vitro comparison to ox-LDL-induced lipid accumulation, ethanol-induced fatty liver and HMG-CoA reductase inhibition. Appl. Biol. Chem. 61: 1-8 (2018)
- Yun JW, Kim SH, Kim YS, Choi EJ, You JR, Cho EY, Yoon HJ, Kwon EN, Kim HC, Jang JJ, Park JS, Che JH, Kang BC. Pre-clinical study of safety of *Dendropanax moribifera leveille* leaf extract: general and genetic toxicology. J. Ethnopharmacol. (2019)
- Zhu L, Brown WC, Cai Q, Krust A, Chambon P, McGuinness OP, Stafford JM. Estrogen treatment after ovariectomy protects against fatty liver and may improve pathway-selective insulin resistance. Diabetes 62: 424-34 (2013)
- Ziaee A, Zamansoltani F, Nassiri-Asl M, Abbasi E. Effects of rutin on lipid profile in hypercholesterolaemic rats. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 104: 253-8 (2009)