

Detection of Estrogen-like Activities of Hydrothermal and Ethanol Extracts of Oriental Medicines

Dong-Geun Lee^{1,2}, Jung-Kwon Jo² and Sang-Hyeon Lee^{1,2*}

¹Major in Pharmaceutical Engineering, Division of Bioindustry, Silla University, Busan 46958, Korea

²Department of Bioscience, Graduate School, Silla University, Busan 46958, Korea

Received July 9, 2019 / Revised August 16, 2019 / Accepted August 20, 2019

The purpose of this study was to investigate the estrogen-like activities of eight oriental medicines, including red ginseng, fenugreek, and dandelion. Hot water and ethanol extracts were prepared from *Cervus nippon temminck* (Nokgaksang), *Cynanchum wilfordii* (Baeksuo), *Lespedeza cuneata* (Yagwanmun), *Panax ginseng* (red ginseng), *Smilax china* (Toryeong), *Taraxacum platycarpum* (Mindeulre, dandelion), *Tribulus terrestris* (Namgase), and *Trigonella foenum-graecum* (Horopa, fenugreek). Then, estrogen-like activities were verified by the *in vitro* transcriptional activity assay. The extracts showing estrogen-like activities were red ginseng, Baeksuo, fenugreek, Yagwanmun, and dandelion in the ethanol extracts, and red ginseng, fenugreek, and Baeksuo in the hydrothermal extracts. Red ginseng extract showed a higher activity than the standard 10^{-8} M 17β -estradiol in both the hydrothermal and ethanol extract at 500 μ g/ml, while the 50 μ g/ml of the red ginseng ethanol extract and the 500 μ g/ml of the Baeksuo hydrothermal extract showed estradiol activities between 10^{-9} and 10^{-8} M 17β -estradiol. This shows that it would be possible to contribute to the development of functional materials using red ginseng, Baeksuo, fenugreek, and dandelion.

Key words : Estrogen-like activities, *in vitro* transcriptional activity, oriental medicine

서 론

우리나라 사람의 평균수명은 82.36세로 여성은 85.70세이고 남성은 79.70세이다[5]. 우리나라 여성은 50세 전후에 폐경기가 오고 이때 여성호르몬 불균형으로 이어지며 폐경기 이후 30년 이상을 살아간다. 질병관리본부 국립보건연구원은 75.9%에 달하는 폐경기 여성들이 갱년기 증상인 안면홍조, 잦은 발한, 피부의 건조 및 탄력 저하, 골다공증, 비만, 지질대사 이상, 우울증, 불면, 성 기능 장애 등의 증상 중에서 한 가지 이상을 경험하였으며 그 중에 25%가 의학적으로 치료를 요하는 증상이라고 보고하였다[12].

삶의 질 향상과 심신이 건강한 삶을 위하여 갱년기 장애의 완화 및 개선에 대한 요구가 높은 실정이며[9] 갱년기 장애 개선에 대한 연구가 국내외에서 진행 중이다[1, 14]. 여성호르몬의 감소로 인하여 여성갱년기 증상이 나타나고, 여성갱년기 증상을 완화시키기 위하여 여성호르몬 보충요법(estrogen replacement therapy, ERT)을 사용하는데, 주로 동물성

(conjugated equine estrogen, CEE) 혹은 화학합성 의약품이 사용되고 있다. 하지만 갱년기 증상완화나 치료를 위한 여성호르몬 보충요법은 유방암, 심장병, 발작, 혈액응고 등의 부작용이 있어 대체치료제의 개발이 시도되고 있다[6, 13].

특히 부작용이 없거나 낮은 식물성 에스트로겐(phytoestrogens)에 관한 연구가 활발한데, 식물성 에스트로겐은 구조 및 기능의 측면에서 17β -estradiol과 연관되어 있거나 에스트로겐 효과를 나타낸다[8]. 식품의약품안전처에서 발간한 건강기능식품 기능성 원료 인정현황을 확인해보면 갱년기 여성건강 기능성 식품소재는 백수오 등 복합추출물, 식류추출물 및 농축물, 회화나무 열매추출물, 오미자추출물 등이 2016년 현재 허가가 났다[2]. 또한 감초, 황기, 산약, 오미자, 아로니아, 택사, 지황 등의 천연물 유래의 식물성 에스트로겐 유사물질의 보고도 있었다[5, 7, 13].

식품의약품안전평가원에서는 갱년기 여성건강에 도움을 줄 수 있는 건강기능식품의 기능성평가를 위해 바이오마커인 에스트로겐 수용체 시험이나 세로토닌 등의 신경전달물질을 시험관, 동물, 인체적용 시험으로 하도록 하고 있다[4]. 기능성 물질의 잠재적인 효능 파악을 위해 검증시스템이 필요하고 현재 여성호르몬인 에스트로겐을 측정하는 방법은 *in vitro* 방법과 동물이나 인체를 이용하는 *in vivo* 방법이 있다. 아로니아 추출물의 갱년기 증후군에 대한 효과를 실험동물로 파악한 *in vivo* 방법 등이 보고되고 있는데, 이 방법은 실제 동물에서의 효과를 파악하는 장점과 함께 실험 동물의 관리와 사육 등이 추가로 필요하여 많은 시료에 대한 연구는 힘들다[7]. 즉,

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5624 , Fax : +82-51-999-5628

E-mail : slee@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.

in vitro 방법이 난이도, 안전성, 비용, 시간의 측면에서 *in vivo* 방법보다 유리하다. 성호르몬의 *in vitro* 검증법은 첫째 수용체 결합반응 시험법인데 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 또는 효소면역측정법이라고 한다. 이 방법은 고가의 kit를 사용하는 단점이 있다. 둘째 수용체 전사활성 시험법은 여성호르몬이 MCF-7 유방암세포, Ishikawa 자궁내막암세포, SaOS-2 골육종세포 등의 세포막을 통과 후 호르몬 수용체인 ER α 혹은 ER β 와 결합한다. 이후 결합된 복합체가 핵으로 이동하여 전사활성을 촉진하는 것을 리포터 단백질로 파악하거나 Western blotting 방법으로 ER α 내지 ER β 의 단백질 발현량을 조사하거나 역전사-PCR로 mRNA 수준을 측정한다[4].

본 연구진은 *in vitro* 에스트로겐 유사활성 검증시스템으로 CAT (chloramphenicol acetyltransferase) 리포터를 이용하여 구축하였고 산약, 복령, 오미자, 택사, 지황 등의 에스트로겐 유사활성을 검증하였다[5, 13]. 하지만 이 방법은 CAT ELISA Kit가 필요하여 시간과 비용이 많이 들었다. 이후 인체유방암 세포주인 MCF-7를 이용하고 luciferase를 리포터로 활용하는 수용체 전사활성 검증 시스템을 구축한 후 산약, 감초, 황기 등의 에스트로겐 유사활성을 검증하였다[10].

본 연구에서는 이미 구축된 수용체 전사활성을 이용하는 *in vitro* 에스트로겐 유사활성 검증 시스템을 사용하여 전통적인 한약재나 생약재 중에서 여성병을 치료하거나 갱년기 증상을 치료하는데 사용된 홍삼, 백수오, 녹각상, 민들레 등 8종의 동식물 유래 한약재가 에스트로겐 유사활성을 가지는지를 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

한약재 추출 및 에스트로겐 유사활성 측정용 시료 준비

한약재 8종 즉 녹각상(*Cervus nippon temminck*), 백수오(*Cynanchum wilfordii*), 야관문(*Lespedeza cuneata*), 홍삼(*Panax ginseng*), 토령(*Smilax china*), 민들레(*Taraxacum platycarpum*), 남가새(*Tribulus terrestris*), 호로파(*Trigonella foenum-graecum*) 등을 (주삼홍건재약업사(Seoul, Korea)에서 구입하였으며, 분쇄 후 밀봉하여 4°C에서 보관하였다.

한약재 건조분말시료에 10배량(w/v)의 3차 증류수 혹은 80% 에탄올을 첨가한 후, 80°C에서 환류냉각추출기를 사용하여 6시간동안 추출을 진행하여 열수추출액과 에탄올추출액을 준비하였다. 추출액을 지름 185 mm의 여과지(Advantec, Japan)로 여과한 후 rotary vacuum evaporator (R-200, Buchi, Switzerland)로 감압농축하였다. 농축된 추출액을 동결건조기 (Ilshinbiobase, PVTFD 30R, Korea)로 72시간 동안 동결건조한 후 파쇄하여 보관하였다[10].

에탄올- 혹은 열수-추출물 100 mg을 80% 에탄올 혹은 3차 증류수 1.0 ml에 용해하고 여과막균(pore size 0.20 μ m)한 후에 에스트로겐 유사활성 측정을 위한 시료로 사용하였다.

In vitro 에스트로겐 유사활성 검증 시스템

이전 연구에서 구축된 MCF-7 세포주에 리포터인 luciferase 유전자 등이 stable transfection된 에스트로겐 유사활성 검증용 *in vitro* 에스트로겐 유사활성 검증 시스템을 이용하였다[10]. 간략히 서술하면 에스트로겐과 결합한 수용체(estrogen receptor, ER)가 결합하는 염기서열인 ERE119과 아테노바이러스-2의 주요 후반부 프로모터인 Ad2MLP 염기서열이 결합한 ERE119-Ad2 MLP에 luciferase 유전자를 리포터로 하여 pGL2 플라스미드에 재조합한 pGL2-Neo-ERE119-Ad2MLP 플라스미드를 인체 유방암 세포주인 MCF-7 세포주에 stable transfection하여 kanamycin 계통 항생제인 G418 저항성 및 에스트로겐 유사활성 검증 시스템을 가지는 MCF-7 세포인 MCF-7/pGL2-Neo-ERE119-Ad2MLP 세포를 구축하였다[10].

천연물질 추출물의 에스트로겐 유사활성 측정

김 등의 방법을 따라 에스트로겐 유사활성을 측정하였다[10]. 즉, MCF-7/pGL2-Neo-ERE119-Ad2MLP 세포에 10% Charcoal-stripped FBS (CSF)와 1% Penicillin-streptomycin (100 units/ml, Corning, USA)이 첨가된 DMEM 배지를 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다. 에스트로겐 유사활성 측정을 위한 세포배양에 FBS에 포함되어 있는 스테로이드를 Dextran-coated charcoal (Sigma, USA)로 미리 제거한 CSF를 사용하여 에스트로겐 유사활성 측정에 방해가 없도록 하였다. 모든 배지에 G418이 80 μ g/ml의 농도가 되도록 첨가하여 MCF-7/pGL2-Neo-ERE119-Ad2MLP 세포만 생장하도록 하였다. 배양된 MCF-7/pGL2-Neo-ERE119-Ad2MLP 세포를 60 mm 세포배양용 dish에 3 \times 10⁵ cells/dish로 분주하여 10% CSF 와 1% Penicillin-streptomycin (100 units/ml)을 포함하는 DMEM 배지에서 24시간 배양하였다. 이후 녹각상, 백수오, 야관문, 홍삼, 토령, 민들레, 남가새, 호로파의 열수- 및 에탄올-추출물을 최종농도가 500, 50, 5 μ g/ml가 되도록 첨가하였다. 양성대조군으로는 대표적인 에스트로겐 물질인 17 β - estradiol을 에탄올에 녹여 최종농도가 10⁻⁸ M~10⁻⁹ M이 되도록 첨가하였다. 음성대조군은 17 β -estradiol의 용매인 에탄올만 같은 용량으로 첨가하였다. 그 후 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 48시간 배양하고 PBS로 세척하여 세포를 회수한 후에 1,700 x g에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 세포내의 luciferase 단백질을 얻기 위해 Luciferase Assay System (Promega, USA)에 포함된 1X lysis buffer 200 μ l를 첨가하여 실온에서 30분간 lysis시킨 후에 6,000 x g에서 1분간 원심분리하여 상등액만을 luciferase 활성측정에 이용하였다. Luciferase 활성측정은 lysis된 세포 상등액 20 μ l와 Luciferase assay substrate (Promega, USA) 100 μ l를 혼합한 직후에 Luminometer (TD-20/20, Turner Biosystems, USA)를 이용하여 발광을 측정하였다.

통계처리

모든 결과는 Macintosh용 통계프로그램 Aabel 2.0 (Gigawiz Ltd Co., USA)으로 one-way ANOVA를 수행하였고 Fisher's PLSD의 다중범위 유의성 검증을 실시하였다.

결과 및 고찰

한약재 추출물의 에스트로겐 유사활성 검증

식물 유래의 에스트로겐 유사물질인 phytoestrogen은 골다공증의 예방과 치료 등 여성갱년기 증상을 완화하거나 치료할 수 있다[8, 10]. 본 연구에서 사용하는 *in vitro* 에스트로겐 유사활성 검증 시스템은 여성호르몬 표준물질에 정량적으로 반응하면서 다양한 한약재에서 에스트로겐 유사활성까지 파악이 가능할 것이다. 에스트로겐에 대한 반응성이 나타나도록 고안된 luciferase 리포터 플라스미드인 pGL2-Neo-ERE119-Ad2MLP가 stable transfection된 인체 유방암 세포주인 MCF-7/pGL2-Neo-ERE119-Ad2MLP를 이용한 *in vitro* 에스트로겐 유사활성 검증 시스템으로 녹각상, 백수오, 야관문, 홍삼, 토령, 민들레, 남가새, 호로과의 열수- 및 에탄올-추출물에 대해 에스트로겐 유사활성을 검증하였다(Fig. 1, Fig. 2).

에탄올 추출물의 에스트로겐 유사활성을 측정한 결과, 음성대조군에 비해 농도별로 약 0.75배에서 4.5배의 에스트로겐 유사활성을 보였고 각 추출물은 농도가 증가함에 따라 에스트로겐 유사활성도 증가하였다(Fig. 1). 동일한 농도에서의 활성을 비교하면 홍삼이 가장 높았고 토령이 가장 낮았다. 음성대조군인 에탄올과 비교하여 에탄올추출물 500 µg/ml의 농도에서는 홍삼이 4.5배, 백수오가 3.5배, 야관문이 2.8배, 호로과는 2.6배, 민들레는 2.5배가 높았다. 이때 홍삼은 10⁸ M 17β-estra-

diol보다 높고 백수오는 10⁹와 10⁸ M 사이의 활성을 보였다. 에탄올추출물 50 µg/ml의 농도에서 음성대조군과 비교하면 홍삼이 3.2배, 백수오가 2.5배, 야관문과 호로과 그리고 민들레가 1.9배 정도의 높은 에스트로겐 유사활성을 나타냈다. 홍삼의 에탄올추출물 5 µg/ml 농도에서의 활성은 백수오를 제외한 다른 한약재 50 µg/ml 농도에서의 활성 보다 높은 활성을 보였고 특히 남가새, 녹각상, 토령의 에탄올추출물 500 µg/ml의 농도에서의 활성보다 높았다.

열수 추출물의 에스트로겐 유사활성을 측정한 결과 음성대조군에 비해 농도별로 약 0.7배에서 4.6배의 에스트로겐 유사활성을 보였고, 각 추출물은 농도가 증가함에 따라 에스트로겐 유사활성도 증가하였다(Fig. 2). 동일한 농도에서의 활성을 비교하면 홍삼이 가장 높았고 녹각상이 가장 낮았다. 열수추출물 500 µg/ml의 농도에서의 에스트로겐 유사활성을 음성대조군의 활성과 비교하면 홍삼이 4.5배, 백수오가 3.4배, 호로과가 2.8배 높았다. 열수추출물은 50 µg/ml의 농도에서 음성대조군과 비교하면 홍삼이 3.2배, 백수오가 2.6배, 야관문과 호로과 그리고 민들레가 약 1.8~1.9배의 에스트로겐 유사활성을 나타냈다. 홍삼의 열수추출물 5 µg/ml의 농도에서의 활성은 백수오를 제외한 다른 한약재 50 µg/ml의 농도에서의 활성보다 높은 활성을 보였고 특히 남가새, 민들레의 열수추출물 500 µg/ml의 농도에서의 활성과 유사하거나 높았다.

홍삼은 열수와 에탄올추출물 모두 500 µg/ml의 농도에서의 활성이 10⁸ M 17β-estradiol의 활성보다 높은 활성을 보였다. 백수오 열수추출물과 호로과 에탄올추출물은 500 µg/ml의 농도에서 10⁹과 10⁸ M 17β-estradiol 사이의 활성을 보였고 백수오 에탄올추출물 500 µg/ml에서의 활성은 10⁹ M 17β-estradiol의 활성과 유사한 활성을 보였다. 한약재에 따른 에스-

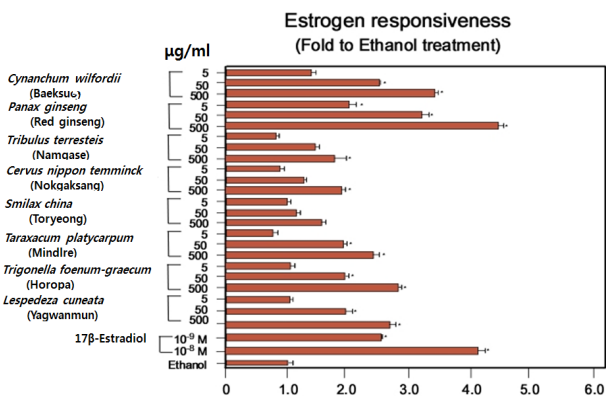


Fig. 1. Estrogen-like activities of ethanol extracts of oriental medicines. MCF-7/pGL2-Neo-ERE119-Ad2MLP2 cells were treated by ethanol extracts of oriental medicines. 17β-estradiol and ethanol were used as positive and negative controls, respectively. ANOVA with Duncan's post-hoc test ($p < 0.001$) compared with ethanol treatment. This experiment was repeated at least twice yielding reproducible results.

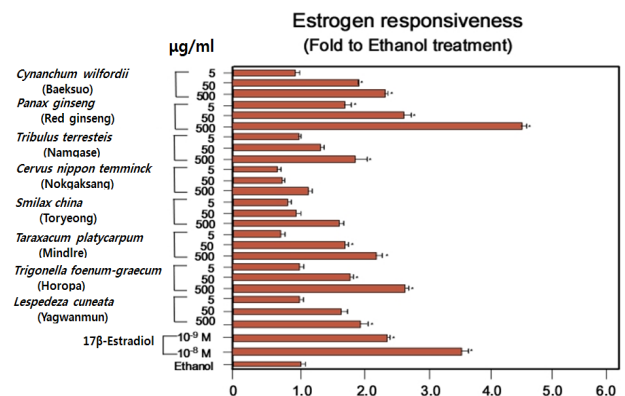


Fig. 2. Estrogen-like activities of hot-water extracts of oriental medicines. MCF-7/pGL2-Neo-ERE119-Ad2MLP2 cells were treated by hot-water extracts of oriental medicines. 17β-estradiol and ethanol were used as positive and negative controls, respectively. ANOVA with Duncan's post-hoc test ($p < 0.001$) compared with ethanol treatment. This experiment was repeated at least twice yielding reproducible results.

트로젠 유사물질 추출에는 홍삼은 열수 혹은 에탄올 추출이 비슷하였고 백수오는 열수 추출이 더 우수한 것을 알 수 있었다.

동일농도에서 열수추출물이 에탄올추출물보다 활성이 높은 천연물질은 백수오와 홍삼(5, 50 µg/ml)이었다. 민들레, 토령, 녹각상, 호로파 등은 열수추출물과 에탄올추출물의 활성이 유사하였다. 녹각상, 토령, 남가새는 열수추출물과 에탄올추출물에서 모두 낮은 에스트로젠 유사활성을 보였다.

다른 연구와 비교하면 감초와 황기의 에탄올-추출물의 경우에 500 µg/ml의 농도에서 $10^8 \sim 10^9$ M 17β-estradiol의 활성 사이의 에스트로젠 유사활성을 나타내었고[11], 감초와 황기의 열수추출물은 500 µg/ml의 농도에서 각각 $10^6 \sim 10^7$ M과 10^8 M 17β-estradiol의 활성 사이의 에스트로젠 유사활성을 나타내어 열수추출물이 에탄올추출물에 비해 더 높은 활성을 나타내었다[10]. 이들은 모두 사용한 추출물이 한가지 종류인데 비해 본 연구에서는 동일한 한약재에 대해 열수추출물과 에탄올추출물을 동시에 제조하고 에스트로젠 유사활성을 검증한 차이가 있다.

본 연구결과는 홍삼, 백수오, 호로파, 민들레 등을 이용한 여성갱년기 증상의 완화 등이 가능한 건강기능성 식품이나 의약품 신소재의 개발에 기여할 수 있을 것이다.

References

- Hong, E. K., Kim, J. S., Park, S. J., Cho, H. S., Han, I. K. and Lee, D. J. 2004. Effect and safety of replacement therapy for PMS. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **19**, 83-87.
- <https://www.khsa.or.kr/user/info/InfoHealthFood.do?menuNo=225>.
- http://www.index.go.kr/potal/info/idxKoreaView.do?idx_cd=2758.
- http://www.nifds.go.kr/brd/m_15/view.do?seq=10044
- Jang, M. K., Lee, O. H., Kim, M. H., Lee, Y. A., Kang, S. R. and Lee, S. H. 2008. Evaluation of the estrogenic activities of natural products. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **43**, 145-148.
- Joo, S. S., Won, T. J., Lee, Y. J., Park, S. Y., Hwang, K. W. and Lee, D. I. 2005. Anti-oxidant effect and enhancement of menopausal signs by sophorae fructus-derived isoflavones in ovariectomized rats and cytoprotective effect in neuro-2a. *Yakhak Hoeji* **49**, 317-322.
- Kang, A. R., Jung, K. I. and Kim, M. H. 2018. Effects of *Aronia melanocarpa* extracts on menopause symptoms in ovariectomized rats. *J. Life Sci.* **47**, 1217-1224.
- Kim, B. K. and Kim, M. H. 2018. Bone metabolism and estrogenic effect of phytochemicals. *J. Life Sci.* **28**, 874-883.
- Kim, K. M. 2013. Late-onset hypogonadism. *Korea J. Fam. Pract.* **3**, 245-254.
- Kim, M. H., Kim, B. K., Kim, J. D., Kang, A. R., Lee, C. E., Seo, J. M., Lee, D. G., Jo, J. K., Kim, Y. Y., Yu, K. H. and Lee, S. H. 2017. The effects of medicinal herbs extracts on estrogen-like activities and osteoblast proliferation and differentiation. *J. Life Sci.* **27**, 456-463.
- Lee, S. H. 2003. Verification of estrogenic activities in ethanol extracts of oriental herbal medicines using *in vitro* detection system. *Kor. J. Orient. Physiol. Pathol.* **17**, 1054-1058.
- Park, H. S., Lee, Y. M. and Cho, G. Y. 2002. A study on climacteric symptoms, knowledge of menopause, menopause; management in middle-aged women. *Kor. J. Women Health Nurs.* **8**, 521-528.
- Park, S. H., Jeon, M. J., Jang, M. K., Lee, S. J., Kim, B. K., Jeon, M. J., Kim, S. Y., Kim, M. H., Lee, D. G., Lee, T. H., Nam, J. S., Hur, W. J. and Lee, S. H. 2013. Verification of estrogen like activities of herbal medicines using an *in vitro* detection system. *Kor. J. Ori. Physiol. Pathol.* **27**, 752-758.
- Wielogorska, E., Blaszczyk, K., Chevallier, O. and Connolly, L. 2019. The origin of *in-vitro* estrogen-like activity in oregano herb extracts. *Toxicol. In Vitro* **56**, 101-109.

초록 : 한약재 열수 및 에탄올 추출물의 여성호르몬 유사활성 검증

이동근^{1,2} · 조정권² · 이상현^{1,2*}

(¹신라대학교 의생명과학대학 제약공학전공, ²신라대학교 일반대학원 바이오과학과)

본 연구에서는 홍삼, 호로파, 민들레, 백수오, 남가새, 녹각상, 토복령, 호로파, 야관문 등의 8개 한약재의 에스트로젠 유사활성을 파악하고자 하였다. 이를 위하여 한약재의 열수- 및 에탄올-추출물을 제조하였고 *in vitro* 전사 활성 시험법을 이용하여 에스트로젠 유사활성을 검증하였다. 에탄올추출물에서는 홍삼, 백수오, 호로파, 야관문, 민들레가 에스트로젠 유사활성을 나타냈고, 열수추출물에서는 홍삼, 호로파, 백수오가 에스트로젠 유사활성을 나타냈다. 홍삼추출물은 500 µg/ml의 농도에서의 활성은 열수추출물과 에탄올추출물 모두 10^8 M 17β-estradiol의 활성보다 높은 활성을 보였고, 홍삼 에탄올추출물 50 µg/ml과 백수오 에탄올추출물 500 µg/ml에서의 활성은 10^9 와 10^8 M 17β-estradiol에서의 활성 사이의 활성을 보였다. 이 연구를 통해 홍삼, 백수오, 호로파, 민들레 등을 이용한 식물성 여성호르몬 유사물질을 함유하는 기능성소재의 개발에도 기여할 수 있을 것이며 천연물 유래 여성호르몬 유사물질의 대량 탐색 등이 가능할 것이다.