Journal of The Korea Convergence Society
Vol. 13. No. 4, pp. 573-582, 2022
e-ISSN 2713-6353
DOI : https://doi.org/10.15207/JKCS.2022.13.04.573

난소절제 랫드를 이용한 여성갱년기 동물모델에서 변형 사물탕의 효능평가

황성희[1*], 박선영[2], 신용국[3]
[1]세명대학교 바이오식품영양학부 교수, [2]세명대학교 한의과대학 교수, [3]세명대학교 바이오제약산업학부 교수

Evaluation of the efficacy of modified Samultang in female menopausal animal models using ovarian resection rats

Seonghee Hwang[1*], Sunyoung Park[2], Yong Kook Shin[3]
[1]Professor, School of Biofood and Nutrition, Semyung University
[2]Professor, College of Korean Medicin, Semyung University
[3]Professor, School of Industrial Bio-Pharmaceutical Science, Semyung University

요 약 부작용을 줄인 사물탕을 개발하고자 오미자를 사용한 변형 사물탕을 난소를 절제한 랫드에 경구투여하고 여성갱년기 기능성 효능의 평가지표 변화를 측정하였다. 체중 증가, 자궁과 질의 상대 장기중량, 혈중 지질관련 지표, 혈중 estradiol 의 변화에서 대조군과 비교하여 변형 사물탕이 통계적으로 유의한 개선효과는 나타나지 않았다. 그러나 자궁 조직내 단백질 변화에서 estrogen receptor alpha 와 beta 의 발현이 증가하는 경향성이 관찰되었고 estrogen receptor 신호전달에 관여하는 것으로 알려진 ERK와 AKT에서 활성화에 기여하는 인산화 ERK의 발현량이 유의한 증가를 나타내었고 인산화 AKT의 발현량은 유의하진 않지만 증가하는 경향성을 나타내었다. 난소절제로 유도한 여성갱년기 모델에서 시험물질 변형 사물탕을 비교적 적은 용량 투여했음에도 이러한 결과를 나타내는 것은 시험물질인 변형 사물탕에 estrogen receptor를 활성화시키는 능력이 있는 것으로 판단된다. 추후 위장장애가 적으면서 사물탕의 효능을 나타내고자 할 때 유용한 천연물 배합으로 이용이 가능할 것으로 본다.

주제어 : 변형 사물탕, 여성 갱년기 효능 평가지표, estrogen receptor의 발현, 인산화 ERK의 발현량, 인산화 AKT의 발현량

Abstract In order to develop samultang with reduced side effects, modified samultang using omija was oral administered to rats with ovarian resection, and changes in evaluation indicators of functional efficacy in women's menopause were measured. In weight gain, relative weight of uterus and vagina, blood lipid-related indicators, and changes in blood estradiol, there was no statistically significant improvement effect in modified Samultang compared to the control group. However, the expression of estrogen receptor alpha and beta in intrauterine tissue tended to increase, and the expression of phosphorylated ERK, which is known to be involved in estrogen receptor signaling, showed a significant increase in activation in ERK and AKT. The expression amount of phosphorylation AKT was not significant, but showed an increasing tendency. Even though the test substance was administered in a relatively small dose, it is judged that the test substance modified Samultang has the ability to activate estrogen receptor. In the future, it is expected that it can be used as a useful natural mixture to show the efficacy of samultang with fewer gastrointestinal disorders.I

Key Words : Modified Samultang, the evaluation index of functional efficacy in female menopause, the expression of estrogen receptor, the expression of phosphorylated ERK, the expression of phosphorylated AKT

*This study was conducted by research support from Chungbuk Technopark 2020.
*Corresponding Author : Seonghee Hwang(h2seong@hanmail.net)
Received February 8, 2022 Revised March 15, 2022
Accepted April 20, 2022 Published April 28, 2022

1. 서론

여성의 갱년기는 폐경 이행기, 폐경, 폐경 이후의 시기를 말하며, 이 시기에는 여성 호르몬이 달라지는데 특히 여성호르몬인 에스트로겐의 수준이 감소하게 되는 것이 가장 큰 특징이다. 또한 호르몬의 변화와 함께 다양한 갱년기 증상이 나타날 수 있는데, 경험하는 증상의 종류, 중증도, 기간에는 개인에 따라 차이가 크다. 가장 대표적인 갱년기 증상으로는 비뇨생식기 증상인 질건조증(vaginal dryness)과 안면 홍조(hot flush), 수면 장애, 우울, 불안 등의 혈관, 정신·심리적인 증상이 나타날 수 있고, 심혈관 질환 및 골다공증 등의 만성질환의 위험성이 폐경이 됨에 따라 증가하는 것으로 보고되고 있다[1,2].

이러한 갱년기 증상 혹은 여러 혈액 관련 질병 및 월경 관련 증상에 사용하는 처방으로 사물탕이 사용된다[2]. 빈혈, 월경부조 (月經不調), 하복견통(下腹堅痛), 태동불안(胎動不安), 산후 오로불하(惡露不下), 소변불리(小便不利), 변비, 자궁출혈 등에 사물탕 처방이 사용된다. 중국의 『화제국방』, 『만병회춘』,『득효방』 등에서 사물탕에 대한 기록이 보이고, 우리나라의 기록으로는 『동의보감』, 『제중신편』,『방약합편』, 『의문보감』 등 많은 의학서적에 인용되어 있다.

사물탕 처방은 당귀, 천궁, 백작약, 숙지황 각 5g으로 되어 있으며, 이 처방에다 다른 약재 4가지를 더해 기(氣)와 혈(血)을 보해주는 팔진탕(八珍湯)으로, 사물탕에 황금·황백·감초를 더해 삼황사물탕(三黃四物湯)으로 이용되므로 사물탕은 한방처방 중에서 가장 기본적인 처방으로 널리 사용된다[3].

사물탕에 들어가는 재료 중 숙지황은 감온(甘溫)한 성질과 후미(厚味)로 새로운 혈을 증보(增補)하지만 만약 혈이 허(虛)하게 되면 혈액이 옹체(壅滯)하게 되어 혈행장애가 오기 때문에 위가 약한 사람 및 담이 많고 소화력이 약한 자는 복용을 금하는 약재이다. 그 안에는 영양분이 많고 기름기가 있어 장기 복용하면 소화장애를 일으켜 설사·복창(腹脹) 등 부작용이 생기기도 한다고 한다[4,5]. 사물탕이 널리 사용되는데 이러한 숙지황의 성질은 제한이 되는 요소이다. 따라서 이러한 숙지황을 대체하면서 사물탕의 효능을 나타낼 대체 한약재를 찾게 되었다.

그 대안 중의 하나인 오미자는 신농본초경 (神農本草經), 일화자제가본초 (日華子諸家本草), 명의별록 (名醫別錄) 등의 기록에, 간기(肝氣)를 수렴하고 위(腎)을 자양하며 진액을 생성하고 한(汗)을 수렴하며 정(精)을 수렴하는 효능을 갖고 있으며 천식과 해수, 입안의 건조, 자한, 도한, 노상이수(勞傷羸瘦), 몽정, 유정, 만성 설사와 만성이질을 치료한다고 한다[6]. 뿐만 아니라 여성건강에 대한 오미자의 효능을 보면 ≪醫方類聚≫에서는 신장을 보하고 열을 내리며 몸을 든든하게 하고 성기능도 높이며, 진액을 생겨나게 하며 원기가 모자랄 때 쓰면 크게 보한다고 기록되어 있다. 또한 ≪醫寶鑑≫에서는 몹시 여윈 것을 보하며 소갈(消渴)과 번열(煩熱)을 낫게 한다고 한다. 따라서 숙지황과 비슷한 효능을 가지면서 숙지황의 단점을 보완해줄 수 있고, 여성건강에도 탁월한 효능을 나타내는 오미자를 숙지황의 대체로 사용하였다.

사물탕이 여성 갱년기 증상 완화에 사용시 그 기능은 유지되면서 숙지황의 위장장애 부작용이 없는 한약재의 조합이 확인된다면 천연 약재가 널리 사용되는데 큰 도움이 될 것으로 사료된다.

따라서 본 연구에서는 숙지황 대신 오미자를 첨가하여 변형 사물탕을 제조하고, 여성 갱년기 증상의 완화에 도움이 되는지 변형 사물탕의 효능을 알아보고자 한다.

2. 재료 및 방법

오미자를 첨가한 변형 사물탕을 실험동물에게 4주간 경구투여하고 혈청생화학적 검사, 혈중 바이오마커 측정, 장기중량 측정 및 자궁조직내 단백질 발현 측정을 통해 여성 갱년기 증상의 감소에 대한 효능이 있는지 알고자 하였다.

2.1 변형 사물탕 제조

2.1.1 변형 사물탕 조합

기존 사물탕 조합인 당귀, 천궁, 백작약, 숙지황 각 5 g에서 숙지황 대신 오미자를 첨가하였다. 오미자의 한방적 특성을 고려하여 10 g을 결정하였다.

2.1.2 변형 사물탕 시료 제조

결정된 배합비율에 따라 약재를 섞어 증류수 3000 ㎖와 함께 round flask에 넣고 3시간동안 가열추출 하였다. 추출액은 rotary evaporator (Eyela, Japan)로 감압농축한 후 동결건조기로 건조하여 분말시료를 제조하였다.

2.2 실험동물

2.2.1 동물윤리

"동물보호법(제16977호 2020년 2월 11일 일부개정)"에 따라 동물실험운영 윤리위원회에 의해 승인되었다.(승인번호: 20R078)

2.2.2 시험계 종 및 계통

특정 병원체 부재(SPF) 랫드인 Sprague -Dawley를 사용하였다. 난소절제(Ovariectomy)를 시행한 랫드(OVX 랫드)와, 정상 대조군으로 개복만 하고 난소절 제를 하지 않은 랫드(Sham 랫드)를 사용하였다.

본 실험은 기존 사물탕과의 비교가 아닌 변형 사물탕의 효능을 확인하고자 하는 목적이므로 Table 1과 같이 디자인되었다.

2.2.3 성별, 동물 수, 주령 및 체중

실험동물은 모두 암컷이고 30주령에 실험실에 도착, 32주령에 실험을 시작하였다. 초기 평균 체중은 250 ~ 350g 이었다.

2.2.4 검역, 순화, 최종검역

입수 시 동물 개체 수를 확인하고, 이상증상을 관찰한 후 체중을 측정하였다. 동물공급업체에서 제공한 검사성적서 등을 시험기초자료로 보관하였다. 모든 동물을 새로운 환경에 적응시키기 위해 약 6일의 순화기간을 두었고 이 기간동안 동물은 매일 1회 일반증상을 관찰하고 순화 종료일에 체중을 측정하였다. 입수 시와 순화종료 시 측정된 체중을 비교하여 이상증상이 나타나지 않은 동물만 사용하였다.

2.2.5 군분리와 잔여동물 처리

순화기간 중 건강하다고 판정된 동물은 체중을 측정하여, 평균체중의 20%를 초과하거나 미달하는 동물은 제외시켰다. 선택된 동물들은 체중에 따라 각 그룹의 평균체중이 균등하도록 분배하여 동물을 군분리하였다. 잔여동물은 군분리 종료 후 시험계로부터 제외시키고 해당 SOP(Standard Operation Procedure)에 따라 처리하였다.

2.2.6. 사료

방사선으로 멸균된 실험동물용 쥐 사료 Charles River Rat and Mouse 18 %(5L79, LabDiet, USA)를 ㈜오리엔트 바이오 (경기도 성남시 중원구 갈마치로 322)로부터 공급받아 자유섭취 시켰다. 사료성분 분석 성적서 및 미생물검사 성적서를 제공받아 적합한지 확인하고 사용하였다(사용 Lot No.: DEC2919/ APR01203).

2.3. 시험군 및 투여

2.3.1 시험군 및 투여량 설정

시험군의 군별 투여물질, 투여용량, 투여액량은 Table 1과 같다. 변형 사물탕의 투여량은 일상적인 사물탕 처방량 20g(변형 사물탕 25g)에 건조시료 제작 시의 수율(22%), 사람체중(여성 50kg)과 실험동물의 체중을 환산하여 2배, 4배, 8배로 비교적 낮게 설정하였다.

양성대조물질로 사용된 β-Estradiol 은 SIGMA 사(순도 98%이상, Product No. E8875)의 제품을 사용하였다.

Table 1. The administered subs, dose, dosage, no. of expermental rats by group

group		administered subs.	dose (mg/kg)	dosage (mL/kg)	No. exp. rats
G1	Control[a)]	sterilized injection water	-	10	8
G2	-Control[b)]	sterilized injection water	-	10	8
G3	+Control[b)]	β-Estradiol	0.5	10	8
G4	Low dose [b)]	modified Samultang	220	10	8
G5	Medium dose [b)]	modified Samultang	440	10	8
G6	High dose[b)]	modified Samultang	880	10	8

a) Sham 랫드(Shame 군, 개복만 하고 난소절제 하지 않은 랫드
b) OVX 랫드(Ovariectomy 군, 난소절제 시행한 랫드)

2.3.2 투여

투여방법, 횟수 및 기간: 1 회/일, 7 회/주, 4 주간 경구 투여하였다.

투여액량 산출: 개체별 투여액량은 최근 측정한 체중을 기준으로 계산되었다.

투여방법: 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주 사기를 이용하여 위내에 1 회 강제 투여하였다. 정상대조군과 음성대조군은 부형제 1인 멸균주 사용수를 투여하였다.

2.4 결과확인

2.4.1 체중 측정

모든 동물에 대하여, 투여직전, 투여 개시 후 주 1 회, 부검 전일(절식전), 부검일 (절식 후)에 체중을 전자저울을 사용하여 측정하였다. 단, 부검일의 체중은 절식을 실시하였으므로, 체중평가에서 제외하고 상대장기중량 평가에 활용하였다.

2.4.2 혈액검사

2.4.2.1 채혈

부검 동물은 채혈 전 약 12시간 이상 동안 절식하였다. 부검일에 isoflurane(Troikaa Pharmaceuticals Ltd., Lot No.: 9021)으로 흡입마취하고 배대정맥에서 주사기를 이용하여 5 mL 채혈하였다.

2.4.2.2 혈청생화학적 검사

부검 및 빈사동물을 대상으로 채혈하여 항응고제가 없는 테스트튜브에 담고 상온에 1 시간 이내 방치시킨 후 3,000 rpm에서 10 분(4 ℃) 원심분리하여 혈청을 분리하고, 아래와 같은 항목을 혈청생화학 분석기(7180, HITACHI, Japan)로 측정하였다.

- 알칼라인포스파타제(Alkaline phosphatase, ALP)
- 총콜레스테롤(Total cholesterol, CHO)
- 트리글리세라이드(Triglycerides, TG)
- 고밀도 지단백 콜레스테롤(High Density Lipoprotein Cholesterol,HDL)
- 저밀도 지단백 콜레스테롤(Low Density Lipoprotein Cholesterol,LDL)

2.4.2.3 혈중 바이오마커 측정

모든 부검 동물을 대상으로 채혈하여 분리한 혈청을 사용하여

- Estradiol(Mybiosource, MBS843353),
- CTX(collagen cross-linked C-telopeptide, Mybiosource,MBS765921),
- Osteocalcin(Mybiosource, MBS161970)

3종의 바이오마커를 ELISA 키트로 분석하고 Micro plate spectrophotometer (Thermo, multiskan sky high)를 이용하여 측정하였다.

2.5 부검

임상병리 및 ELISA 측정을 위한 채혈을 실시한 후 모든 개체는 부검을 위하여 배대동맥 및 후대정맥을 절단하여 방혈/치사시켰다.

2.5.1 자궁과 질 중량 측정

부검을 실시한 동물은 자궁과 질의 중량을 측정하고, 각 장기의 상대장기중량 (장기중량/절식체중 x100)을 산출하였다.

질의 경우는 질관을 포함하여 부검하는 것으로 하였다.

2.5.2 자궁조직내 단백질 발현 측정

부검일에 장기중량을 측정한 후, 자궁조직을 사용하여 Estrogen Receptor-α(Santacruz, sc-8005), Estrogen Receptor-β(Santacruz,sc-53494),Phosphorylated AKT(Cell signaling, 4058), Protein Kinase B(Cell signaling, 9272),Phosphorylated ERK(Cell signaling, 9101), Extracellular-regulated kinase(Cell signaling, 4695), β-actin(Cell signaling, 4970) 총 7 종의 단백질 발현정도를 이미지 분석기(Fujifilm corp, LAS4000 mini)를 통해 확인하였다.

2.6 통계처리

통계분석은 분산분석(ANOVA)을 이용하여 F 분포값을 먼저 계산한 후, Student t-test를 하였다. Student t-test 의 변수는 F 분포값에 따라 등분산 혹은 이분산 표본의 유형을 적용하여 유의성 검정을 실시하였다. 통계적 분석은 널리 사용되고 있는 MS Office 의 Excel 프로그램을 이용하였고, $P<0.05$ 인 경우 통계적인 유의성이 있다고 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 체중 변화

모든 투여군을 대상으로 4 주간, 주 1 회 측정한 체중을 Fig. 1에 표시하였다.

체중 측정 결과, 정상대조군과 비교하여 Day 8 부터 양성대조물질 β-Estradiol 투여군을 제외한 모든 군에서 유의적인 체중증가율을 나타내었다.

갱년기 여성은 난소의 활동이 부진하여 체중이 증가하기 쉽다는 보고[7,8]와 같은 결과이다. 음성대조군과

비교하여 Day 8 부터 정상대조군과 양성대조물질 β-Estradiol 투여군에서 유의적 으로 낮은 체중증가율을 나타내었고, 시험물질 변형 사물탕 투여군에서는 유의적인 체중변화를 보이지 않았다. 실험군 G4, G5, G6는 β-Estradi -ol 투여군이 보여주는 체중의 증가억제 효과를 나타내지 않았다.

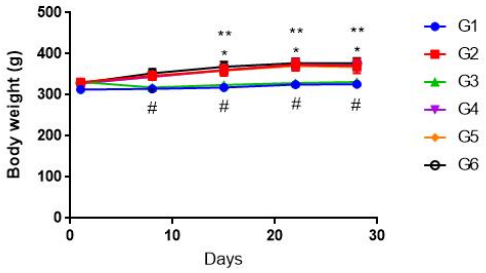


Fig. 1. Weight change for 4 weeks

Compared to the control group: ***(p<0.001), **(p<0.01), *(p<0.05)
Compared to the -control group: ###(p<0.001), ##(p<0.01), #(p<0.05)
G1: control group, G2: -control group, G3: β-Estradiol 0.5mg/kg,
G4: 220mg/kg dose group, G5: 440mg/kg dose group ,
G6: 880mg/kg dose group.

3.2 혈청생화학 검사

시험종료시, 혈중에서 간, 담낭 및 골대사 지표인 알칼라인 포스파타제(Alkaline phospha -tase, ALP)와 지질관련지표인 total cholesterol, triglyceride, HDL, LDL에 대한 검사를 실시하였다 (Fig. 2).

정상 및 음성대조군과 비교하여 양성대조물질 β-Estradiol 투여군에서는 ALP가 증가하는 경향을 나타내었다. 시험물질 변형 사물탕 투여군에서는 용량에 따라 증가하는 경향이 보였으며 특히, 고용량 투여군에서는 통계적으로 유의한 증가를 나타내었다.

지질관련 지표에서는 정상대조군과 비교하여 음성대조군에서 총콜레스테롤(Total cholesterol CHO)과 HDL, LDL이 통계적으로 유의하게 증가하였고, TG는 상승하는 경향을 나타내었다.

시험물질 투여시, 음성대조군과 비교하여 시험물 질 중용량 투여군에서 LDL이 유의적으로 증가 하였고, 시험물질 고용량 투여군에서는 TG와 HDL이 통계적으로 유의성 있는 증가를 나타내었다. 양성대조물질 투여시, 음성대조군과 비교 하여 CHO과 HDL, LDL이 유의적으로 감소하였다. 이는, 고농도의 에스트로겐을 투여하면 Hepatic LDL 수용체가 up-regulation 되어 LDL이 감소(LDL lowering effect) 한다고 알려져 있지만 [6]랫드의 HDL은 사람과 달리 많은 apoprotein E로 조성되어 있다.

이러한 apo -protein E는 랫드의 LDL수용체와 친화력이 매우 높기 때문에 에스트로겐 투여시, 증가한 LDL수용체 활성으로 인해 HDL clearing 현상이 일어나기 때문에 HDL이 감소한 것으로 보인다.

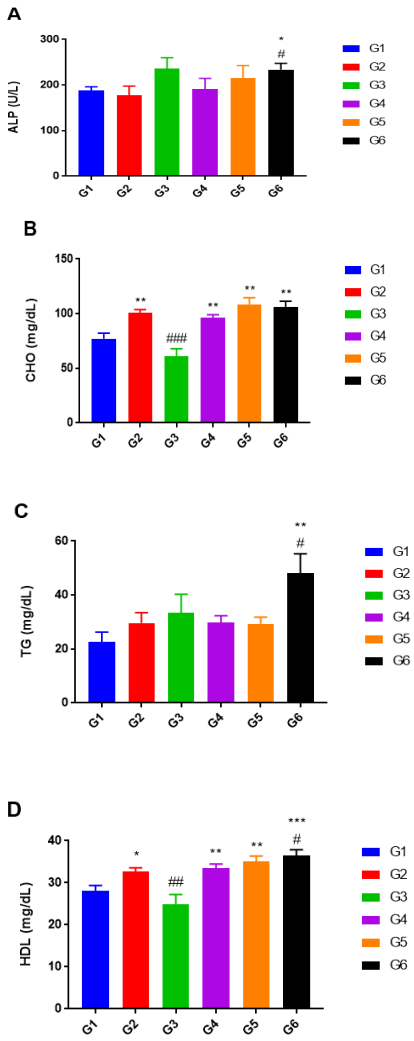


Fig. 2. Blood chemistry values

A: ALP, B: total cholesterol, C: triglyceride, D: HDL, E: LDL
Compared to the control group: ***(p<0.001), **(p<0.01), *(p<0.05)
Compared to the -control group: ###(p<0.001), ##(p<0.01), #(p<0.05)G1: control group, G2: -control group, G3: β-Estradiol 0.5mg/kg,
G4: 220mg/kg dose group, G5: 440mg/kg dose group,
G6: 880mg/kg dose group.

3.3 혈중 바이오마커 측정

시험종료시, 모든 투여군을 대상으로 혈중에 존재하는 Estradiol, CTX(collagen cross-linked C-telopeptide), Osteocalcin을 측정하였다(Fig. 3).

3.3.1 Estradiol

Estradiol의 경우, 정상대조군과 비교하여 음성 대조군에서 난소절제로 인해 유의적으로 감소하였다. 음성대조군과 비교하여 양성대조물질 β-Estradiol 투여군에서 통계적으로 유의한 증가를 보였으며, 시험물질 변형 사물탕 투여군에서는 음성대조군과 비교하여 유의적인 차이를 나타내지 않았다. Estradiol의 특성상 천연물질인 변형 사물탕의 투여는 체내 Estradiol 의 농도에 전혀 영향을 주지 않았다. Estradiol은 기능성 식품이 갱년기 여성건강에 도움을 주는지 확인하는 바이오마커 중 안전성에 관한 지표로서 Estradiol이 높아지지 않았음은 변형 사물탕에 안전하다는 증거가 된다[2].

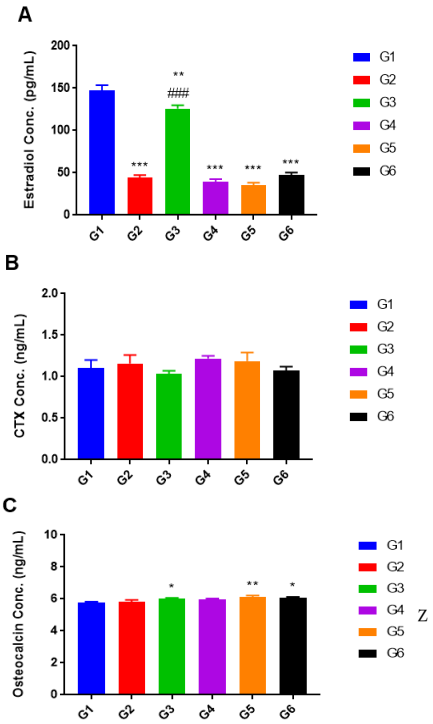


Fig. 3. ELISA in serum

A: estradiol, B: collagen cross-linked C-telopeptide, C: osteocalcin
Compared to the control group: ***(p<0.001), **(p<0.01), *(p<0.05)
Compared to the -control group: ###(p<0.001), ##(p<0.01), #(p<0.05)
G1: control group, G2: -control group, G3: β-Estradiol 0.5mg/kg,
G4: 220mg/kg dose group, G5: 440mg/kg dose group ,
G6: 880mg/kg dose group.

3.3.2. CTX(collagen cross-linked C-telopeptide)

골흡수에 특이적인 표지자로 사용되는 CTX 의 경우, 양성대조물질 β-Estradiol 투여군과 정상대조군과 비교하여 음성대조군에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 시험물질 변형 사물탕 투여군에서도 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 갱년기 나타나는 골흡수인자의 증가 현상이 본 실험에서는 모든 군에서 나타나지 않았는데 이는 뼈에 대한 영향이 모든 군에서 천천히 진행되기 때문인 것으로 파악된다[9-11].

3.3.3 Osteocalcin

Osteocalcin은 비 collagen성 단백질로 뼈속의 osteocalcin은 신체일부의 석회화 조절을 하거나 뼈와 체액간의 Ca2+의 움직임을 제어하는 등 뼈의 대사에 있어서 중요한 생리적 역할을 하는 것으로 알려져 있다.[9,10,12] Osteocalcin의 경우, 정상대조군과 비교하여 음성대조군에서 유의적인 차이는 보이지 않았지만 양성대조물질 β-Estradiol 투여군과 시험물질 변형 사물탕 중 용량 및 고용량 투여군에서 통계적으로 유의하게 증가하였다. 음성대조군과 비교하여 양성대조 물질 β-Estradiol 투여군과 시험물질 변형 사물탕 투여군에서는 유의한 차이를 보이지 않았다.

3.4 장기 중량

시험종료시에 모든 투여군을 대상으로 자궁과 질(+질관)의 중량을 측정하여 개체별 체중에 비례해 상대중량으로 Fig. 4 에 표시하였다. 정상대조군과 비교하여 양성대조물질 β-Estradiol 투여군 이외, 난소절제를 시행한 모든 군에서 자궁의 상대중량이 통계적으로 유의한 수준의 감소를 나타내었고, 질의 상대중량에 있어 정상대조군과 비교하여 난소절제를 시행한 모든 시험군에서 유의적인 감소가 관찰되었다. 자궁내막을 자라게하는 에스트로겐의 감소가 생식기의 위축을 가져온다는 보고[11]와 일치하는 결과이다.

음성대조군과 비교하여 양성대조물질 β-Estradiol 투여군에서는 자궁의 상대중량이 증가하는 경향성을 보였지만 유의적이지는 않았고 시험물질 변형 사물탕 투여군에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 질의 상대중량에서는 양성대조 물질 β-Estradiol 투여군과 시험물질 변형 사물탕 투여군 모두에서 유의한 차이를 보이지 않았다.

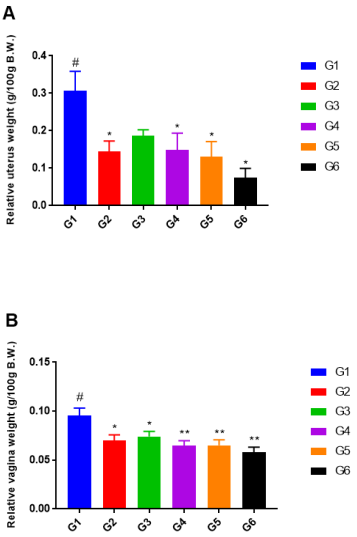
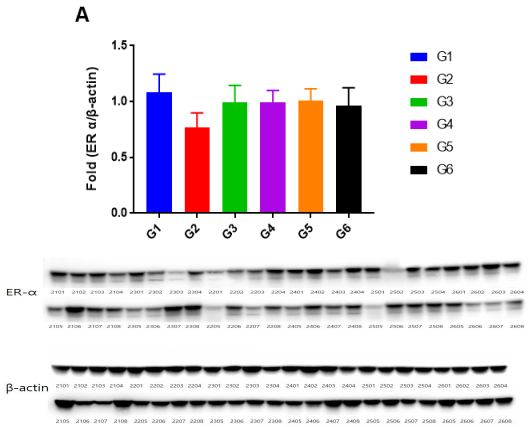


Fig. 4. Relative organ weights

A: uterus, B: vagina
Compared to the control group: ***(p<0.001), **(p<0.01), *(p<0.05)
Compared to the -control group: ###(p<0.001), ##(p<0.01), #(p<0.05)
G1: control group, G2: -control group, G3: β-Estradiol 0.5mg/kg,
G4: 220mg/kg dose group, G5: 440mg/kg dose group ,
G6: 880mg/kg dose group.

3.5 자궁조직내 단백질 발현 측정

시험종료시에 모든 투여군을 대상으로 적출한 자궁에 존재하는 Estrogen Receptor alpha (ER-α), Estrogen Receptor beta(ER-β)의 발현 정도를 β-actin과의 ratio로 비교하여 나타내었고, phosphorylated ERK(pERK), phosphorylated AKT(pAKT)의 발현정도는 각각의 Extracellular-Regulated Kinase(ERK)와 Protein Kinase B (AKT)의 ratio로 비교하였다(Fig. 5).



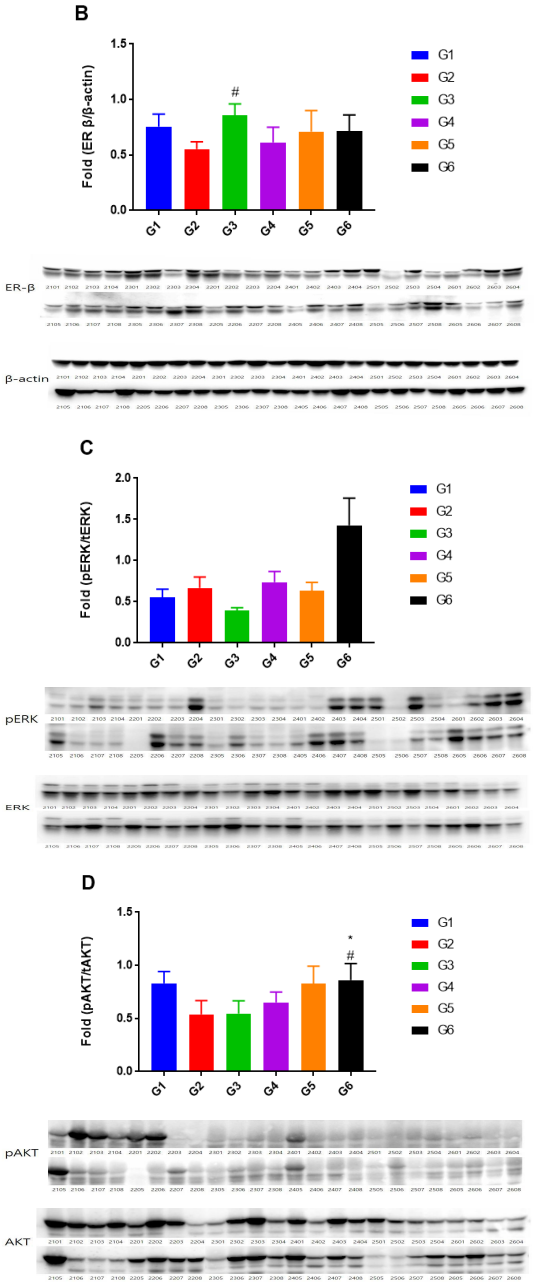


Fig. 5. Protein expression in uterus

A: estrogen receptor alpha, B: estrogen receptor beta,
C: extracellular-Regulated Kinase, D: protein Kinase B
Compared to the control group: ***(p<0.001), **(p<0.01), *(p<0.05)
Compared to the -control group: ###(p<0.001), ##(p<0.01), #(p<0.05)
G1: control group, G2: -control group, G3: β-Estradiol 0.5mg/kg,
G4: 220mg/kg dose group, G5: 440mg/kg dose group ,
G6: 880mg/kg dose group.

3.5.1 Estrogen Receptor alpha(ER-α)

여성 자궁 성숙의 지표로 사용되는 ER-α의 경우, 정상대조군과 비교하여 음성대조군에서 감소하는 경향을 나타내었지만 유의적이지는 않았다($p>0.05$). 음성대조군과 비교하여 양성대조물질 β-Estradiol 투여군과 시험물질 변형 사물탕 투여군에서 높은 발현을 보였지만 통계적으로 유의한 차이는 나타내지 않았다.

3.5.2 Estrogen Receptor beta(ER-β)

ER-β의 경우, 정상대조군과 비교하여 음성대조 군에서 유의적이지는 않지만 감소하는 경향을 나타내었다. 음성대조군과 비교하여 양성대조물질 β-Estradiol 투여군에서 유의적으로 증가하였고 시험물질 변형 사물탕 투여군에서는 통계적 유의성은 없었으나 용량의존적으로 증가하는 경향을 나타내었다.

체내에서 에스트로겐에 대한 생물학적인 반응은 특별히 높은 친화력을 갖는 ER가 발현되는 세포에서만 일어나므로[13,14], 정상적인 생식기능의 척도로 이용되는 ER-α, ER-β[15]에서 용량의존적 반응을 보였다는 것은 변형 사물탕이 여성에서 갱년기 증상 개선 기능성을 일부 기대해볼 수 있다고 사료된다.

3.5.3 Phosphorylated ERK /tERK(Extracellular-Regulated Kinase)

ERK는 정상 및 병리학적 조건에서 세포 신호 조절에 관여하는 물질로, 정상적인 세포의 발달 진단에 이용된다. Total ERK 대비 ERK 인산화 발현을 비교한 경우, 정상대조군과 비교하여 음성대조군에서 유의한 차이를 나타내지 않았지만 시험물질 변형 사물탕 고용량 투여군에서는 유의적으로 증가하였다. 음성대조군과 비교하여 양성대조물질 β-Estradiol 투여군에서 감소하는 경향을 나타내었고 시험물질 변형 사물탕 고용량 투여군에서는 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다. 변형 사물탕의 투여가 에스트로겐 수용체를 통한 생리활성을 회복할 수 있다는 결과를 확인할 수 있었다.

3.5.4. Phosphorylated AKT / tAKT(Protein Kinase B)

갱년기 여성건강 기능성을 확인하기 위한 에스트로겐 신호전달 바이오마커인 Total AKT 대비 AKT 인산화 발현을 비교하였다. 정상대조군과 비교하여 음성대조군에서 감소하는 경향을 보였지만 유의적이지는 않았다. 음성대조군과 비교하여 양성대조물질 β-Estradiol 투여군에서는 음성대조군과 유사한 수준의 발현을 나타내었고 시험물질 변형 사물탕 투여군에서는 유의적이지는 않았으나 용량 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었다.

이또한 변형 사물탕이 여성에서 갱년기 증상 개선 기능성을 일부 기대해볼 수 있다고 사료된다.

4. 요약 및 결론

본 시험조건 하에서 난소를 절제한 랫드를 이용하여 시험물질 변형 사물탕을 경구투여하고 여성갱년기 기능성 효능의 평가지표 변화를 측정하여 얻은 결론은 아래와 같다.

1. 난소 절제시, 체내 콜레스테롤이 에스트로겐으로 전환되는 비율이 감소하므로 혈중 콜레스테롤이 상승하고 지방조직이 증가함으로 인해 체중이 증가한다고[6] 알려진 것과 유사하게 정상대조군과 비교하여 음성대조군에서 유의적인 체중 증가율을 나타내었다. 음성대조군과 비교하여 시험물질 변형 사물탕 투여군에서 유의적인 체중 감소를 나타내지 않았다.

2. 혈중 지질관련 지표에서 정상대조군과 비교하 여 음성대조군에서 전반적으로 유의한 증가를 나타내었다. 음성대조군과 비교하여 시험물질 변형사물탕 투여군에서 통계적으로 유의한 지질지표 개선효과는 나타나지 않았다.

3. 혈중 estradiol 의 변화에서 정상대조군과 비교하여 음성대조군에서 유의적으로 감소하였고 시험물질 변형 사물탕 투여시, 음성대조군과 비교하여 유의한 차이를 나타내지 않아 안전성이 입증되었다.

4. 자궁과 질의 상대 장기중량에서도 자궁내막을 자라게 하는 에스트로겐이 감소하여 비뇨생식기 위축이 발생한다는 보고[10]와 같이 음성대조군에서 유의하게 감소하였다. 음성대조군과 비교하여 시험물질 변형 사물탕 투여군에서 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않았다.

5. 자궁 조직내 단백질 변화에서 정상대조군과 비교하여 음성대조군에서 estrogen receptor alpha 와 beta 의 발현이 유의적이지는 않지만 감소하는 경향성을 나타내었고 시험물질 변형 사물탕 투여시, 음성대조군과 비교하여 증가하는 경향성이 관찰되었지만 통계적으로 유의하지 않았다. 또한, estrogen receptor 신호전달에 관여하는 것으로 알려진 ERK와 AKT에서 활성

화에 기여하는 인산화 ERK의 발현량이 유의한 증가를 나타내었고 인산화 AKT의 발현량은 유의하진 않지만 증가하는 경향성을 나타내었다.

이상으로 난소절제로 유도한 여성갱년기 모델에서 시험물질 변형 사물탕을 비교적 적은 용량 투여했음에도 음성대조군과 비교하여 자궁 조직내 estrogen receptor alpha와 beta의 발현이 증가하는 경향성을 나타내었고 ERK와 AKT의 인산화 발현을 증가시키는 것을 통해 시험물질인 변형 사물탕에 estrogen receptor를 활성화시키는 능력이 있는 것으로 판단된다. 변형 사물탕은 에스트로겐 수용체의 발현을 증가시키면서 에스트로겐 수용체가 관여하는 세포내 신호전달경로를 활성화시킴으로써, 갱년기 에스트로겐의 감소로 인한 다양한 현상들을 개선시킬 수 있을 것으로 추정된다. 본 실험은 기존 사물탕과의 비교가 아닌 변형 사물탕의 효능을 확인하고자 하는 목적으로 실시되었으나 추후 기존 사물탕과의 효과를 비교하는 연구, 변형 사물탕의 안전성에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

REFERENCES

[1] I. Overlie, L. Mørkrid, A.M. Andersson, N. E Skakkebaek, M. H. Moen & A. Holte. (2005). Inhibin A and B as markers of menopause : a five-year prospective longitudinal study of hormonal changes during the menopausal transition. *Acta Obstet Gynecol Scand, 84(3), 281-285.*
DOI : 10.1111/j.0001-6349.2005.00490.x

[2] National Institute of Food & Drug Safety Evaluation. (2019) The health functional food functional evaluation guide, "It can help menopausal women's health." [online].
https://www.mfds.go.kr/brd/m_1060/view.do?seq=14374&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=41

[3] Encyclopedia of Korean culture (2022). Samultang.[online].
http://encykorea.aks.ac.kr/Contents/Item/E0025608

[4] Encyclopedia of Korean culture (2022). Zihwang.[online].
http://encykorea.aks.ac.kr/Contents/Item/E0054475

[5] G. Wölkart, A. Schrammel, C. N. Koyani, S. Scherübel, K. Zorn-Pauly, E. Malle, B. Pelzmann, M. Andrä, A. Ortner & B. Mayer. (2017). Cardioprotective effects of 5-hydroxymethylfurfural mediated by inhibition of L-type Ca 2+ currents. *Br. J. pharmacol. 174(20), 3640-3653.*
DOI : 10.1111/bph.13967

[6] Encyclopedia of Korean culture (2022). Omiza.[online].
http://encykorea.aks.ac.kr/Contents/Item/E0038247

[7] Y. H.Lee, S. H.Hyun & S. Y.Choung. (2006). Effect of singled and mixed pomegranate on postmenopausal symptoms in ovariectomized rats. *Yakhak Hoeji, 50(3), 177-183.*

[8] Z. E. Zadeh, J. S. Kim, P. B. Chase & B. H. Arjmandi. (2017). The Cooccurrence of Obesity, Osteoporosis, and Sarcopenia in the Ovariectomized Rat: A Study for Modeling Osteosarcopenic Obesity in Rodents. *J Aging Res.* 1454103.
DOI ;10.1155/2017/1454103

[9] C. Y. Hsiao, T. H. Chen, T. H. Chu, Y. N. Ting, P. J. Tsai & J. F. Shyu. (2020). Calcitonin Induces Bone Formation by Increasing Expression of Wnt10b in Osteoclasts in Ovariectomy-Induced Osteoporotic Rats. *Front Endocrinol (Lausanne) 8(11),* 613.
DOI : 10.3389/fendo.2020.00613

[10] P. H. Andersen, L. T. Thomas, L. Andersen & S.C hristgau. (2004). Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis validation and application. *Arthritis Res Ther, 6(2), 169-180.*
DOI : 10.1186/ar1152

[11] S. M. Bonilla-Becerra, M. G. Oliveira, F. B. Calmasini, J. A. Rojas-Moscoso, A. Zanesco & E. Antunes. (2017). Micturition dysfunction in four month old ovariectomized rats: Effects of testosterone replacement. *Life Sci. 179,* 120-129.
DOI : 10.1016/j.lfs.2017.05.006

[12] H. Liu, H. Zhang, H. Fan, S. Tang & J. Weng. (2020). The preventive effect of Cuscutae Semen polysaccharide on bone loss in the ovariectomized rat model. *Biomedicine & Pharmacotherapy. 130,* 110613.
DOI : 10.1016/j.biopha.2020.110613

[13] J. Wu, Y. Zhu & J. Wu. (2008). Effects of estrogen and estrogenic compounds on cognition in ovariectomized rats. *Climacteric, 11(3),* 212-220.
DOI : 10.1080/13697130802162855

[14] S. Christgau, L. Tankó. P. A. Cloos, U. Mouritzen, C. Christiansen, J. M. Delaissé & P. Andersen. (2004). Suppression of elevated cartilage turnover in postmenopausal women and in ovariectomized rats by estrogen and a selective estrogen-receptor

modulator. *Menopause 11(5),* 508-518.
DOI : 10.1097/01.wcb.0000121484.18437.98

[15] T. Toda, Y. Sugioka & T. Koike. (2020). Soybean isoflavone can protect against osteoarthritis in ovariectomized rats. *J. of Food Science and Technology, 57,* 3409-3414.
DOI : 10.1016/0140-6736(92)91174-7

황 성 희(Seonghee Hwang) [정회원]

· 1986년 2월 : 서울대학교 식품영양학과(이학사)
· 1988년 2월 : 서울대학교 환경보건학과(보건학석사)
· 2001년 2월 : 서울대학교 보건학과(보건학박사)
· 2013년 3월 ~ 현재 : 세명대학교 바이오식품영양학부 교수
· 관심분야 : 식품위생, 보건영양
· E-Mail : h2seong@hanmail.net

박 선 영(Sunyoung Park) [정회원]

· 2008년 2월 : 세명대학교 한의과대학(한의학사)
· 2010년 2월 : 세명대학교 한의학대학원 (한의학석사)
· 2013년 2월 : 세명대학교 한의학대학원 (한의학박사)
· 2014년 3월 ~ 현재 : 세명대학교 한의과대학 교수
· 관심분야 : 생리학
· E-mail : blbee@semyung.ac.kr

신 용 국(Yong Kook Shin) [정회원]

· 1985년 2월 : 부산대학교 미생물학(이학사)
· 1988년 3월 : 동경대학교 농예화학(농학석사)
· 1993년 3월 : 동경대학교 농예화학(농학박사)
· 2013년 3월 ~ 현재 : 세명대학교바이오제약산업학부교수
· 관심분야 : 미생물, 바이오제약
· E-mail : shinella@semyung.ac.kr