

白首烏와 啤酒花 복합물의 에스트로겐 활성과 파골세포 분화 억제효과

박동준[#], 이홍구, 민경인, 박형국, 진무현, 조호성^{*}

LG생활건강 기술연구원

Effects of a Mixture of *Cynanchi Wilfordii Radix* and *Humuli Lupuli Flos* Extract on Estrogenic Activities and Anti-Osteoclastogenesis

Dongjun Park[#], Hong Gu Lee, Kyoungin Min, Hyoungkook Park
Mu Hyun Jin, Ho Song Cho^{*}

LG Household and Healthcare ltd, 70, Magokjungang 10-ro, Gangseo-gu, Seoul, 07795, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : This study aimed to investigate the synergistic effect of combining *Cynanchi Wilfordii Radix* extract with *Humuli Lupuli Flos* extract on estrogenic and anti-osteoclastogenic activity.

Methods : Estrogenic effect of a mixture of *Cynanchi Wilfordii Radix* extract and *Humuli Lupuli Flos* extract (CWHL), *Cynanchi Wilfordii Radix* extract, *Humuli Lupuli Flos* extract, caudatin (an active ingredient of *Cynanchi wilfordii Radix* extract) and 8-prenylnaringenin (an active ingredient of *Humuli Lupuli Flos* extract) were examined by proliferation E-screen assay and expression of estrogen inducible gene, pS2 via Real Time-PCR (RT-PCR) in MCF-7 estrogen responsive cells. And their estrogenic activities were investigated how to modulate Estrogen receptor β by binding affinity assay. Inhibitory effect of CWHL, *Cynanchi Wilfordii Radix* extract, *Humuli Lupuli Flos* extract, caudatin and 8-prenylnaringenin on RANKL-induced osteoclast differentiation were tested by TRAP (Tartrate-resistant acid phosphatase) staining in osteoclastogenic RAW 264.7 cells.

Results : CWHL, *Humuli Lupuli Flos* extract and 8-prenylnaringenin accelerated the proliferation of MCF-7 and the expression of pS2 in MCF-7. CWHL, *Cynanchi Wilfordii Radix* extract, *Humuli Lupuli Flos* extract, caudatin and 8-prenylnaringenin bind to estrogen receptor β . CWHL, *Cynanchi Wilfordii Radix* extract, *Humuli Lupuli Flos* extract, caudatin and 8-prenylnaringenin inhibited RANKL-induced osteoclastogenesis in osteoclastogenic RAW 264.7. CWHL is more effective for all markers than *Cynanchi Wilfordii Radix* extract or *Humuli Lupuli Flos* extract alone.

Conclusions : CWHL may a potential therapeutic agent for menopause and osteoporosis as a natural food resource. CWHL as a natural food source has therapeutic potential in cases of menopause and osteoporosis.

Key words : CWHL, *Cynanchi Wilfordii Radix*, *Humuli Lupuli Flos*, Estrogenic Activities, Anti-osteoclastogenesis

*Corresponding author : Ho Song Cho, LG Household & Healthcare ltd, 70, Magokjungang 10-ro, Gangseo-gu, Seoul, 07795, Republic of Korea.

· Tel : +82-2-6980-1711

· Fax : +82-2-6980-1602

· E-mail : hscho@lghnh.com

#First author : Dongjun Park, LG Household & Healthcare ltd, 70, Magokjungang 10-ro, Gangseo-gu, Seoul, 07795, Republic of Korea.

· Tel : +82-2-6980-1710

· Fax : +82-2-6980-1602

· E-mail : djun2@lghnh.com

· Received : 14 June 2022

· Revised : 18 August 2022

· Accepted : 25 September 2022

I. 서론

갱년기에는 여성호르몬인 에스트로젠 분비 감소에 따른 신체 내 호르몬 결핍이 주된 원인으로 혈관 운동 이상, 비노기성 위축, 골다공증, 심혈관 질환, 심리적 불안감 증상이 심신 전반에 두드러지게 나타난다¹⁻²⁾. 한의학에서 갱년기 질환은 여성호르몬인 陰의 기운이 약화되어 陽氣 제어가 어려워지고 虛熱이 얼굴로 올라오는 陰虛火動의 증상으로 볼 수 있다. 양쪽 광대뼈 부근이 붉게 변하는 兩顴潮紅은 안면홍조로, 가슴이 답답해지고 불안감이 가중되는 煩躁易怒, 손, 발, 가슴에 열이 느껴지는 五心煩熱 등과 함께 陰虛火動에 의해 발생하는 대표적 갱년기 증상이다. 더불어 갱년기에는 腎氣의 쇠퇴로 天癸가竭하고 衝任脈이 허해지며 생식과 관련된 臟腑의 기능이 약화되어 신체의 陰陽平衡이 발생하므로 腎虛가 병인의 기본이다³⁾. 갱년기 질환의 원인, 기전 및 증상을 고려할 때 임상적으로 骨痿, 骨痺의 범주에 속하는데, 骨은 腎主骨, 腎生骨髓의 이론으로 腎과 밀접하게 관련되어 있고, 임상에서는 골다공증을 腎虛, 腎陰虛, 腎陽虛, 肝腎虧虛, 脾腎兩虛 등의 변증으로 나눈다⁴⁾. 갱년기 여성들은 주로 에스트로젠 투여를 통해 증상 완화 치료를 받지만, 장기간 주입된 에스트로젠은 유방암, 자궁 내막암, 고혈압, 혈전 생성을 증가시킨다는 보고가 있다⁵⁻⁷⁾. 에스트로젠 주입 치료를 대체하고 폐경 증상을 완화하고자 에스트로젠과 유사한 기능을 가지고 있으면서, 식품으로 사용해온 식물성 에스트로젠에 대한 다양한 연구가 진행된 바 있다⁸⁻⁹⁾.

白首烏는 큰조롱(*Cynanchum wilfordii* (Maxim.) Hemsl.)의 덩이뿌리로 性味는 苦甘澁, 苦澁, 苦鹹, 微溫하고, 작용부위는 肝, 膀胱, 脾, 腎, 胃이다. 健脾和氣, 益氣補虛, 益精血의 효능이 있어, 자양강장, 보혈, 강근골, 신경쇠약 증상에 처방한다¹⁰⁾. 白首烏는 고지혈증 및 당뇨병발주의 혈청지질성분 및 효소 활성에 도움을 준다는 연구 결과도 있다¹¹⁾. 白首烏는 acetophenone과 polyoxypregnane 배당체가 주성분이라는 보고가 있으며¹²⁾, phosphatidyl choline, phosphatidyl inositol 등 인지질 성분과 wilforside와 caudatin, penupogenin이 함유되어 있다는 선형 연구가 있다. Caudatin (CD)은 항비만, 간염 바이러스 억제, 항암 효과가 연구된 바 있다¹³⁻¹⁶⁾.

啤酒花는 호프(*Humulus lupulus* L.)의 꽃으로, 性味が 苦, 微涼하고 安神 효과가 있어 膽氣虛, 膽熱로 발생하는 陽氣躁動, 心悸, 失眠, 驚癇에 작용해 정서적 안정감을 준다고 알려져 있다¹⁷⁾. 啤酒花에는 phloroglucinol계 대표 화합물로서 α -acid에 속하는 humulone, β -acid에 속하는 lupulone이 있다¹⁸⁾. 啤酒花의 isoxanthohumol은 식물성 에스트로젠으로 사람의 장내 미생물에 의해 대사된다¹⁹⁾. 대사체 중 8-prenylnaringenin (PN)은 항암, 항산화, 항염증 효과가 있다고 알려져 있다²⁰⁻²⁴⁾. 따라서 본 연구를 통해 골다공증에 효과가 있다고 알려져 있는 白首烏열수추출물(CW)과 식물성 에스트로젠을 함유하고 있는 啤酒花추출물(HL)을 복합 처리했을 시 단독 대비 세포 수준의 상승효과가 있는지 확인했고, 그 결과를 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 시료

白首烏는 (주)휴먼허브(Daegu, Korea)에서 구입하여 대동고려삼(Geumsan, Korea)에서 제조하였다. 10배의 열수(100℃)로 1차는 3일간 추출, 2차는 1일간 추출하였다. 추출물은 농축하여 건조분말화하였고 수율은 44%였다. HL (Lifenol[®], GA502090)은 NATUREX (Avignon, France)에서 구입하였다. CWHL 제조를 위해 CW와 HL을 2:1로 혼합하였으며 대동고려삼(Geumsan, Korea)에서 제조하였다(혼합 시 수득율 100%). 각 추출물은 DMSO에 녹여서 실험을 수행했다.

2. 액체 크로마토그래피 질량분석기(LC-MS) 분석

白首烏는 caudatin을, 호프는 8-prenylnaringenin을 함유하고 있다. 본 시험에서 사용한 CW와 HL의 성분을 분석하고자 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하였다. 분석 표준품은 Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd. (Sichuan, China)와 Sigma-Aldrich (Burlington, USA)에서 구입했다. 추출물 100 mg을 메탄올 100 ml로 정용하여 60 분간 초음파 추출하였다. Caudatin 분석은 추출물을 0.2 μ m syringe filter를 사용하여 필터 후 이를 시료로 하였고, 8-prenylnaringenin은 추가로 5배 희석하여 이를 실험에 이용하였다. 성분분석을 위해 TSQ Quantum Access Max (Thermo Fisher Scientific) 시스템을 이용하였고, 분석 컬럼은 Agilent POROSHILL 120 EC-C18 (C18, 2.7 μ m, 4.6 mm X 50 mm)를 사용하였다. 0.1% 포름산이 함유된 정제수(용매 A)와 0.1% 포름산이 함유된 acetonitrile(용매 B)을 이동상으로 사용하였다. 이동상 조건은 A:B = 42:58 (0min)에서 5분 동안 유지, 이후 6분부터 10분 동안 이동상 B, 17분부터 27분간 A:B = 43:58 으로 0.5 ml/min 유속으로 분석하였다. Caudatin은 2.8 min, 8-prenylnaringenin은 2.08 min에 확인되었고 각각 모분자(m/z) 490,840, 338,794 중 308,697, 218,792를 정량이온으로 하여 분석을 진행하였다. 그 결과 본 CW의 caudatin 함량은 0.28 mg/g, HL의 8-prenylnaringenin 함량은 2.21 mg/g, CWHL은 caudatin과 8-prenylnaringenin을 각각 0.19 mg/g, 0.73 mg/g 함유하였다.

3. 세포 배양

사람 유방암 세포주 MCF-7 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA)에서 분양받았으며, 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, New York, USA)를 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, New York, USA)으로 2-3일 간격으로 배양하였다. 쥐 유래 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)으로부터 분양받았으며, 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, New York, USA)를 함유한 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco,

New york, USA)으로 2-3일 간격으로 배양하였다.

4. MCF-7 증식능 평가

MCF-7 세포주를 24-well plates에 7×10^4 cell/well이 되도록 분주하였다. 24시간 후 5% charcoal-stripped FBS (Gibco, New york, USA)를 포함한 phenol red-free DMEM (Gibco, New york, USA)으로 교체하였으며 CWHL (10, 15, 20, 30 $\mu\text{g/ml}$), HL (5, 10 $\mu\text{g/ml}$), CW (5, 10, 15, 20 $\mu\text{g/ml}$), 8-prenylnaringenin (PN 4, 8, 16 ng/ml) 또는 17β -estradiol (E2 3 ng/ml) 처리 후, 3일 간 배양하여 CCK-8 (Cell Counting Kit-8, Dojindo Molecular Technologies, Rockville, USA)용액을 처리하여 흡광도(450 nm)를 측정하였다.

5. pS2 유전자 발현 평가

MCF-7을 24-well plates (2.5×10^5 cell/well)에 배양한 후 새로운 배지에 CWHL (15, 30 $\mu\text{g/ml}$), HL (5, 10 $\mu\text{g/ml}$), CW (10, 20 $\mu\text{g/ml}$), 8-prenylnaringenin (PN 10, 20 ng/ml), Caudatin (CD 3, 6 ng/ml) 또는 17β -estradiol (E2 3 ng/ml) 24시간 처리하고 RT-PCR을 실시하였다. RNeasy Mini Kit (Qiagen, Maryland, USA)를 사용해 RNA를 분리하고, cDNA 합성 Kit (Phile Korea, Daejeon, Korea)로 cDNA를 합성하였다. 그 후, pS2 (Hs00907239_m1) 또는 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, Hs02758991_g1)에 대한 TaqMan probe (Waltham, Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 수행하였으며 데이터는 GAPDH로 보정된 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 값과 vehicle 처리 군과 비교하여 유의차를 분석하였다.

6. 에스트로겐 베타 수용체 결합 친화도 평가

에스트로겐 베타 수용체 결합 친화도를 평가하기 위해 Human ER β Reporter Assay System kit (IB00411-32, Indigo Biosciences, State College, USA)를 구매해서 사용했다. 양성대조군으로 E2를 사용했고, 제조사에서 제시하는 사용법에 따라 실험을 진행했다. 발광도는 microplate reader (Synergy H1MF, Biotek, Winooski, USA)로 측정했고 측정 시간은 500 ms 였다.

7. 파골세포 분화 유도 및 억제 실험

RAW 264.7 세포를 96-well plates (1×10^4 cells/well)에 분주한 뒤, RANKL (Receptor activator of nuclear factors κB ligand) 50 ng/ml을 처리해 파골세포 분화를 유도하였으며, CWHL 30 $\mu\text{g/ml}$, CW 20 $\mu\text{g/ml}$, HL 10 $\mu\text{g/ml}$, CD 6 ng/ml, PN 20 ng/ml 혹은 CD와 PN 복합 26 ng/ml 처리 후 3일마다 배지와 시료를 재처리하며 12일 배양한 후, TRAP

kit (tartrate-resistant acid phosphatase, MK300, Takara, Kusatsu, Japan)를 활용해 세포를 염색하여 현미경으로 관찰하였다.

8. 통계분석

각각의 실험군은 3번 이상 반복 수행하였고 결과는 평균 \pm 표준 편차로 나타내었다. 결과 사이의 통계적 유의성은 R program (ver 4.2.1, R-foundation, Vienna, Austria)을 이용했다. 일원배치 분산분석법(One-way ANOVA)을 이용해 통계적 유의성을 검증했으며, 군 간 다중 비교는 Tukey HSD 방법으로 사후 검증 하였다. $p < 0.05$ 에서 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

III. 결 과

1. CWHL의 MCF-7 세포 증식 효과

Isoxanthohumol와 같은 식물성 에스트로겐은 MCF-7 세포의 에스트로겐 수용체에 결합하여 세포 성장을 촉진하고 pS2 유전자 발현을 증가시킨다²⁵⁾. 따라서 CWHL, CW 그리고 HL을 농도 별로 MCF7 세포에 처리해 증식 촉진 여부를 확인했다. CW 단독 처리에 의한 효과는 없었고 HL 단독 처리 시 MCF-7 세포 증식이 무처리군 대비 유의미하게 증가하였다. 비록 CWHL 15 $\mu\text{g/ml}$ (복합비 2 : 1) 일 때 HL 5 $\mu\text{g/ml}$ 단독 대비 MCF-7 세포 증식 효과가 유의미한 차이는 없었지만($p = 0.08$), 10 $\mu\text{g/ml}$ (1 : 1)($p = 1.00$), 20 $\mu\text{g/ml}$ (3 : 1) ($p = 0.85$) 대비 높은 경향을 보였다(Fig. 1A). 따라서 CW와 HL의 복합비를 2 : 1 고정된 후 농도 별로 실험한 결과, 농도 의존적으로 효과가 유의미하게 증가했는데($p < 0.05$), 특히 CWHL 고농도 30 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 HL 10 $\mu\text{g/ml}$, CW 20 $\mu\text{g/ml}$ 단독 대비 통계적으로 유의미한 군 간 차이를 보였다(Fig. 1B). HL의 성분인 8-prenylnaringenin (PN)도 농도 의존적으로 효과가 상승했고 8 ng/ml 이상에서 무처리군 대비 유의미한 효과를 보였다(Fig. 1C). 그러나 CW 성분 caudatin (CD)은 효과가 없었다(Fig. 1D).

2. CWHL의 MCF-7 세포의 pS2 유전자 발현 증진 효과

CWHL의 MCF7 내 에스트로겐 반응성 유전자인 pS2 발현 증진 효과를 확인하고자 했다. CW (10, 20 $\mu\text{g/ml}$), HL (5, 10 $\mu\text{g/ml}$) 단독 처리 대비 CWHL 각각 복합(10+5, 20+10 $\mu\text{g/ml}$) 처리 시 통계적으로 유의미하게 상승했다(Fig 2A). PN 0.02 $\mu\text{g/ml}$ 처리 시 무처리군 대비 유의미하게 pS2 발현을 증가시켰으나 CD는 모든 실험 농도에서 pS2 발현에 영향이 없었다(Fig 2B).

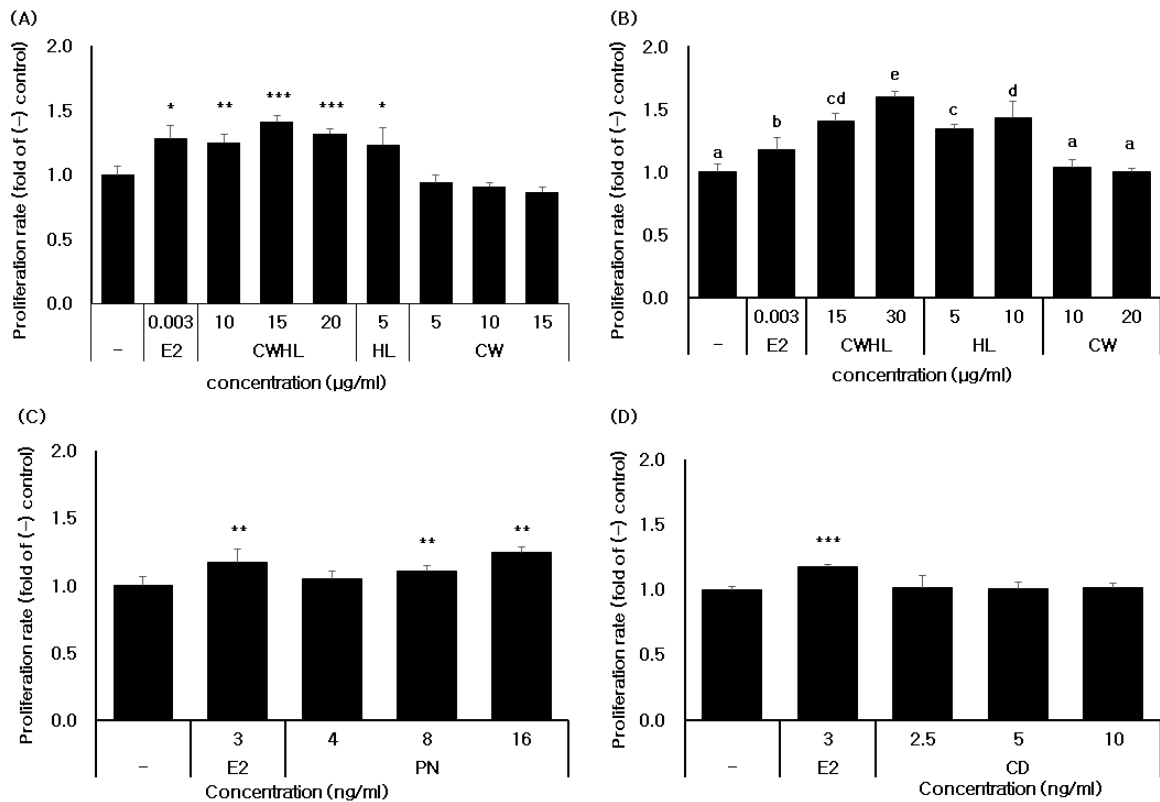


Fig. 1 Effect of estrogenic activity on proliferation of MCF-7 cells. Bars mean relative absorbance at 450 nm vs (-) control and present the mean \pm SD. E2; 17 β -estradiol, CWHL; Mixture of Cynanchi Wilfordii Radix and Humuli Lupuli Flos extract, HL; Humuli Lupuli Flos extract, CW; Cynanchi Wilfordii Radix extract, PN; 8-prenylnaringenin, CD; Caudatin. Statistical significance; (A, C and D), * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 vs (-) control. (B) Each alphabet groups were significantly different, p < 0.05.

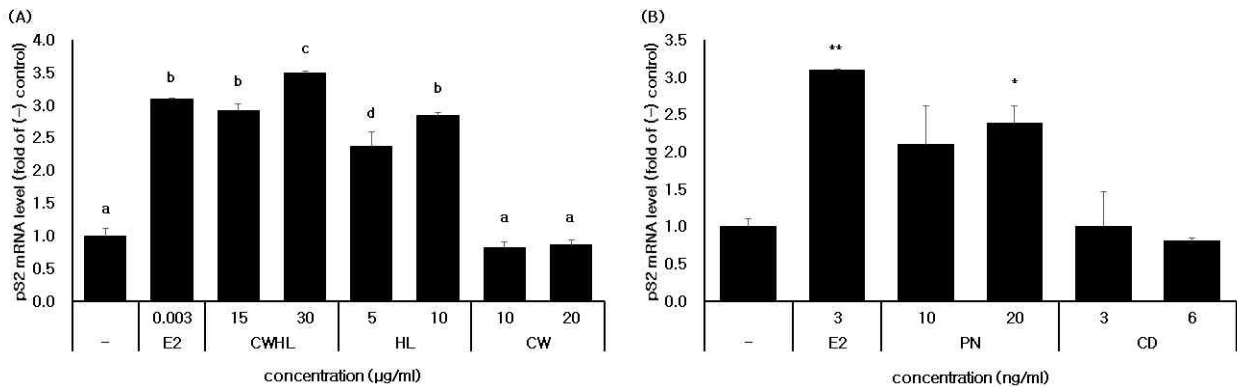


Fig. 2 Effect of CWHL on pS2 mRNA expression in MCF-7 cells. Bars mean relative pS2 mRNA level vs (-) control and present the mean \pm SD. E2; 17 β -estradiol, CWHL; Mixture of Cynanchi Wilfordii Radix and Humuli Lupuli Flos extract, HL; Humuli Lupuli Flos extract, CW; Cynanchi Wilfordii Radix extract, PN; 8-prenylnaringenin, CD; Caudatin. Statistical significance; (A) Each alphabet groups were significantly different, p < 0.05. (B) * p < 0.05, ** p < 0.01 vs (-) control.

3. CWHL의 에스트로겐 베타 수용체(ER β) 결합 친화도

에스트로겐은 세포질 내 ER에 결합해 핵 내로 이동해 관련 유전자 상 전자조절인자 내 에스트로겐 수용체 연관서열 (ERE)에 결합하여 표적 유전자 발현을 전사 수준에서 조절한다²⁶⁾. 따라서 CWHL의 에스트로겐 베타 수용체(ER β) 결합 친화도를 알아보기 위해 ER β /ERE/luciferase 유전자가 삽입된 벡터가 도입되어 있는 중국햄스터 난소세포(Chinese hamster

ovary cell, CHO)에 CWHL, CW, HL을 처리해 ER β 결합을 통해 유도되는 발광도를 평가하였다. CWHL 처리 결과, ER β 결합 친화도는 농도에 따라 증가해 24 μ g/ml에서 무처리군 대비 최대 19배 상승효과를 보였다(Figure 3A). CW (4, 8, 16 μ g/ml), HL (2, 4, 8 μ g/ml) 단독 처리 시에도 농도 증가에 따라 활성 증가를 보였는데 상대적으로 HL의 활성이 CW

대비 높았으며, CWHL (CW+HL 4+2, 8+4, 16+8 $\mu\text{g/ml}$) 처리 시 개별 소재 대비 통계적으로 유의미한 상승 효과를 보였다(Fig. 3A). 또한 앞서 MCF-7 증식 촉진 및 pS2 발현에 효과가 있는 PN 또한 농도의존적으로 친화도를 증가시켰다

(Figure 3B). CW의 성분 CD 또한 농도의존적 효과가 있긴 하나 상대적으로 PN 대비 높은 농도를 처리해야 무처리군 대비 유의미한 증가 효과를 보였다(Figure 3C).

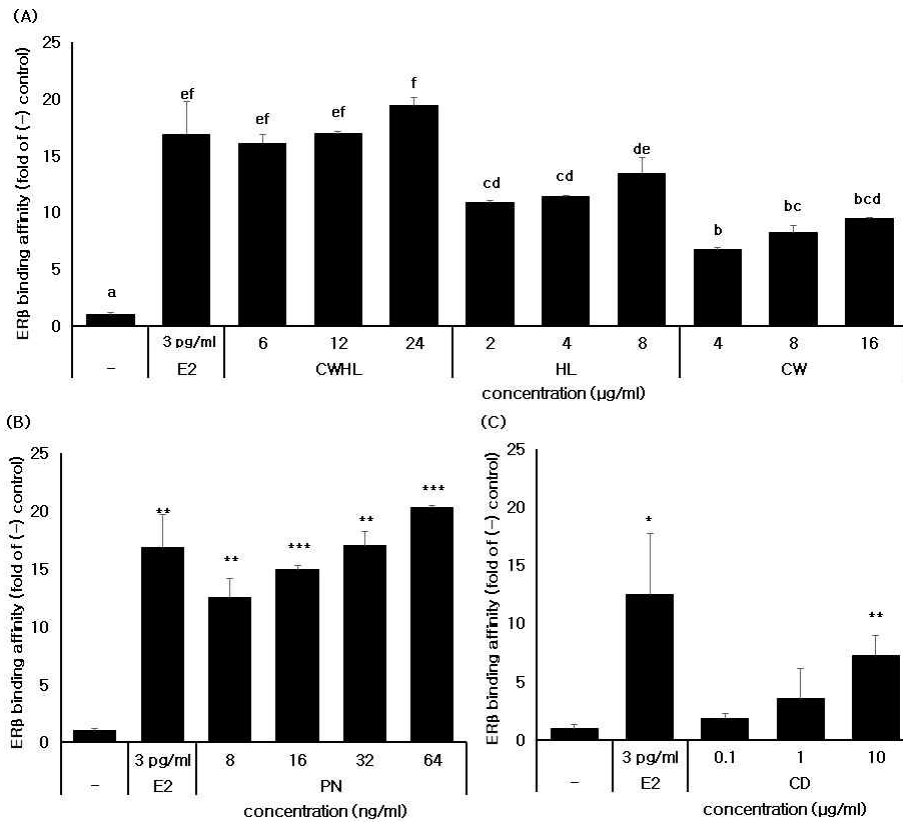


Fig. 3 Induction of the ER β binding affinity assays. Bars mean relative ER β binding affinity level vs (-) control and present the mean \pm SD. E2; 17 β -estradiol, CWHL; Mixture of Cynanchi Wilfordii Radix and Humuli Lupuli Flos extract, HL; Humuli Lupuli Flos extract, CW; Cynanchi Wilfordii Radix extract, PN; 8-prenylnaringenin, CD; Caudatin. Statistical significance; (A) Each alphabet groups were significantly different ; $p < 0.05$. (B, C) * ; $p < 0.05$. ** ; $p < 0.01$. *** ; $p < 0.001$ vs (-) control.

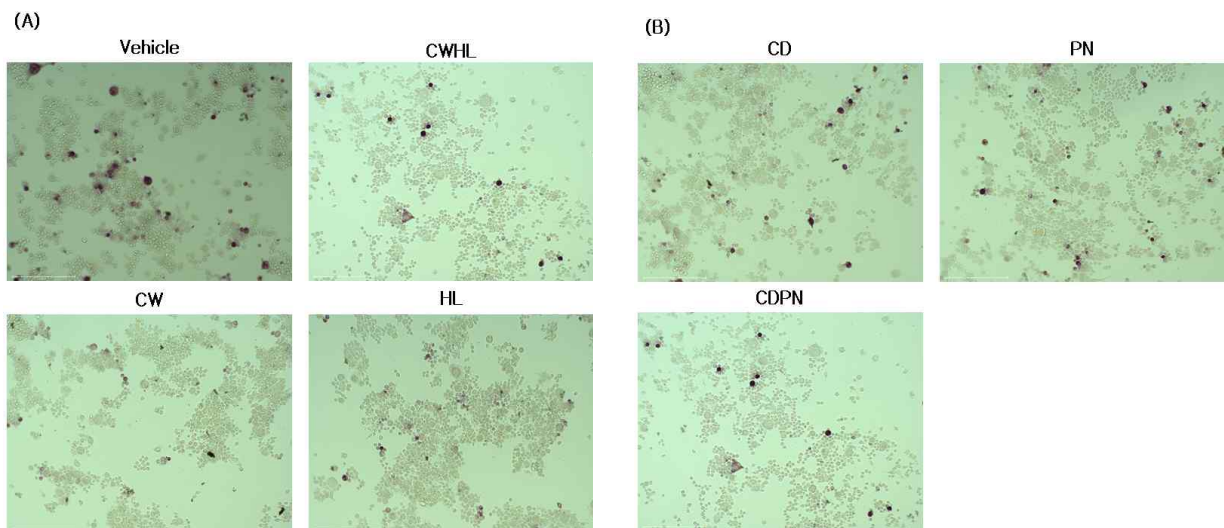


Fig. 4 The effect of CWHL on Inhibition of osteoclast differentiation in RANKLE induced osteoclastogenic RAW 264.7. CWHL; mixture of Cynanchi Wilfordii Radix and Humuli Lupuli Flos extract 30 $\mu\text{g/ml}$, HL; Humuli Lupuli Flos extract 10 $\mu\text{g/ml}$, CW; Cynanchi Wilfordii Radix extract 20 $\mu\text{g/ml}$, PN; 8-prenylnaringenin 20 ng/ml , CD; Caudatin 6 ng/ml , CDPN; mixture of caudatin and 8-prenylnaringenin 26 ng/ml . The osteoclast differentiation was observed through TRAP staining (Scale bar= 200 μm).

4. CWHL의 파골세포 형성 억제 효과

체내 에스트로겐 결핍이 발생하는 갱년기 여성은 점차 골 파괴는 증가하고, 골 생성은 감소하므로 골다공증에 걸릴 가능성이 매우 높다²⁷⁻²⁸⁾. 따라서 에스트로겐 활성 및 ER β 활성효과가 높았던 CWHL, CW, HL의 Receptor activator of nuclear factor kappa- B ligand (RANKL)로 유도한 파골세포 분화 억제 여부를 확인하고자, RAW 264.7 쥐 대식세포주에 각 소재를 RANKL 50 ng/ml 와 함께 12일 간 처리하였다. 12일 후, RANKL 50 ng/ml만 처리한 군에서는 분화된 다핵 파골세포가 다수 관찰되었으나 CWHL 30 μ g/ml, CW 20 μ g/ml, HL 10 μ g/ml을 처리한 경우 다핵 파골세포 수가 적었고, 특히 CWHL에서 더욱 그 수가 적었다(Fig. 4A). CD 6 ng/ml과 PN 20 ng/ml을 각각 처리했을 시 다핵 파골세포 생성이 억제되었는데, 복합 처리할 경우 그 수가 단독 대비 적게 관찰되었다(Fig. 4B).

IV. 고찰

갱년기 여성은 체내 에스트로겐 생성이 감소하면서 안면홍조, 불면, 우울증 증상이 발생되는데, 그 중 골다공증은 병세가 어느 정도 진행된 이후에야 통증이 발생하므로 통증을 인지한 시점엔 정상 수준의 복원이 어렵다. 골다공증 치료엔 Bisphosphonate류 약제가 보편적으로 사용 중이나²⁹⁾ 부정맥, 하악골 괴사와 같은 부작용³⁰⁾과 지속적 사용 시 신체 적응에 따른 효능 저하³¹⁾ 등과 같은 문제점이 있다. 따라서 장기복용에 따른 안전성과 효과를 담보할 수 있는 식품 유래 천연물 소재 연구가 활발하게 진행되고 있고 실제로 숙지황, 녹각, 산수유 등의 파골세포 분화조절효과와 난소적출 동물모델에서 골다공증 억제기능이 보고된 바 있다³²⁻³⁴⁾.

본 연구의 천연물 소재의 갱년기 효능을 한의학적으로 접근하자면 白首烏는腎에 작용하고 補血의 기능이 있어 골다공증 개선에 효과가 있고 啤酒花는安神 작용을 통한心悸, 煩躁易怒 등 안면홍조 증상 개선 가능성을 예측해볼 수 있는데, 세포 수준에서 에스트로겐 활성과 파골세포 분화억제 모델을 활용해 CWHL 복합물의 개별 소재 대비 유의미한 상승효과를 검증하고자 했다.

여성호르몬인 에스트로겐은 세포질의 유리 ER에 결합하면 복합체 형태로 핵으로 이동하여 염기 서열 내 ERE에 작용한 하위 표적 유전자 발현을 조절한다. 또한 에스트로겐은 세포막에 있는 ER 및 G protein coupled receptor에 결합해 PI3K 신호전달회로를 통해 세포 증식을 유도한다³⁵⁾. 따라서 본 저자는 CWHL, HL, PN을 MCF-7 세포에 처리함으로써 농도 증가에 따른 세포 증식 촉진 효과 증가를 확인했고, 추가적으로 CWHL, HL, PN의 pS2 유전자 발현 촉진 효과 및 ER β 결합 친화도를 확인함으로써 CWHL, HL, PN이 ER β 와 결합하고, 그에 따른 에스트로겐 활성이 있다는 걸 유전자 발현

및 세포 수준에서 확인했다. 그러나 CW와 CD는 ER β 에는 결합하나 MCF-7 세포 증식 및 pS2 발현에는 영향이 없었는데 이는 사용한 MCF-7 세포 내 ER 발현 수준의 차이로 판단된다. MCF7 세포주의 경우, ER β 발현이 상대적으로 적은 세포주이고³⁶⁾, CW의 경우 ER β 에 선택적으로 결합하는 촉진자로 선행 연구된 바 있다³⁷⁾. 본 실험에서 사용한 Human ER β Reporter Assay System kit는 ER β /ERE/Luciferase가 CHO 세포주 속에서 안정적으로 발현될 수 있도록 과발현 상태로 도입되어 상대적으로 낮은 CW의 에스트로겐 활성에도 민감하게 잘 반응했던 것과 달리, MCF-7 세포 내 상대적으로 적은 ER β 수준은 CW, CD 단독으로 세포 증식 활성효과를 유발하기에 불충분했을 가능성이 있다. 세포 내 ER이 존재하는 MCF-7에 Charcoal stripped FBS가 함유된 phenol-red free 배지에 적용시켜 호르몬 자극을 배제한 후 천연물 처리를 통한 증식능을 확인하는 E-screen assay는 간단하게 천연물의 에스트로겐 활성을 가늠할 수 있는 방법이다³⁸⁾. 다만 MCF7 세포주는 사람의 유방암세포주로, 증식을 증가시키는 천연물의 활성의 안전성에 대해 파악하고자 추가로 CWHL을 자궁적출 쥐에 7주 간 섭취케 한 결과, 질 또는 자궁의 무게가 유의미하게 증가하지 않았다(data not shown).

CW, HL과 CWHL의 RANKL 유도 다핵 파골세포의 분화 억제에 대한 효과를 확인하고자 TRAP 염색법을 실시한 결과, CW와 HL 개별 처리 시 파골세포 전구세포의 분화를 억제하였는데, CWHL 복합 처리 시 확실히 파골세포 분화 억제 상승효과가 있었다. CW의 성분 CD, HL의 성분 PN 역시 단독 처리 시 효과가 있었고, CDPN 복합 처리에 따른 상승효과가 있었다.

본 연구에서 활용된 白首烏와 啤酒花는 함께 섭취할 시 寒熱往來의 발현 주증상인 안면홍조에 대처할 수 있는 가능성을 가지고 있다. 두 소재는 갱년기에 나타나는 호르몬 역조현상의 결과인 골다공증 증상을 개선해줄 가능성 역시 지니고 있다. 본 연구의 실험 결과와 본초학 이론 견해의 상관성을 살펴보면, 白首烏는腎에 작용하고 補血의 기능이 있어 골다공증 개선에 효과가 있고, 啤酒花는安神 작용을 통해 에스트로겐 결핍으로 인한 陰虛火動 대표 증상인 兩顳潮紅, 煩躁易怒, 五心煩熱 개선에 효과가 있다.

에스트로겐 활성 효과가 있는 啤酒花와 啤酒花와 복합 시 ER β 선택적 촉진 효과에 따른 에스트로겐 활성의 유의미한 상승효과가 있고 파골세포 분화 억제 효과가 있는 白首烏로 구성된 CWHL은 전통적으로 사용되어온 생약 소재들로, 본 연구를 통해 부작용 우려가 큰 호르몬치료요법을 대체할 수 있는 생약 기원 건강기능식품원료로 활용되어 갱년기 여성의 에스트로겐 감소 및 결핍으로 인한 다양한 증상을 완화시킬 수 있을 것으로 기대된다.

V. 결 론

갱년기 여성의 골다공증 완화와 예방에 효과적으로 사용될 수 있는 白首烏추출물, 啤酒花추출물 그리고 白首烏, 啤酒花 복합물의 에스트로겐 활성 및 파골세포 분화 억제에 대한 영향을 알아본 결과는 다음과 같다.

1. 白首烏, 啤酒花복합물과 啤酒花추출물의 처리는 MCF-7 세포를 대조군 대비 통계적으로 유의미하게 증가시켰는데, 특히 白首烏추출물 : 啤酒花추출물 2 : 1 복합 시, 비록 통계적 유의차는 없었지만, 1 : 1, 3 : 1 대비 증식율이 높았고, 2 : 1 복합 저농도 대비 2 : 1 복합 고농도에서 MCF7 증식율이 통계적으로 유의미하게 상승했다. 白首烏, 啤酒花복합물 고농도 30 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 啤酒花추출물 10 $\mu\text{g/ml}$, 白首烏추출물 20 $\mu\text{g/ml}$ 단독 대비 통계적 군 간 유의차가 있었다. 啤酒花추출물 성분 8-prenylnaringenin은 8 ng/ml 부터 대조군 대비 통계적 유의미한 차이를 보였고 16 ng/ml 에서 최대 효과를 보였다. 白首烏, 啤酒花복합물, 啤酒花추출물 치료로 에스트로겐 반응성 유전자 pS2 발현이 최대 3.5배 증가 되었으므로, 에스트로겐 활성을 확인하였다.
2. 白首烏, 啤酒花복합물 처리에 따른 ER- β 결합친화도는 대조군 대비 통계적 유의차는 물론, 처리 농도 증가에 따라 농도 별 유의미한 차이를 보였고, 각 단독처리군 대비 유의미한 차이를 보여 복합에 따른 유의미한 상승 효과를 확인할 수 있었다.
3. 白首烏, 啤酒花복합물 30 $\mu\text{g/ml}$, 白首烏추출물 20 $\mu\text{g/ml}$, 啤酒花추출물 10 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 경우, RANKL 50 ng/ml 처리한 RAW 264.7의 다핵 파골세포로의 분화가 억제 되었으며, 白首烏추출물, 啤酒花추출물 단독 대비 白首烏, 啤酒花복합물 복합 처리 시 다핵 파골세포의 수가 더 적게 관찰되었다.

References

1. Neugarten BL, Kraines RJ. "Menopausal symptoms" in women of various ages. *Psychosom Med.* 1965 ; 27 : 266-73.
2. Grady D. Management of menopausal symptoms. *N Engl J Med.* 2006 ; 355 : 2338-47.
3. Cho HS, Kim HG, Ahn S, Yoo GN. A case report of the effects of Jia Wei Si Wu Tang (augmented four-substance decoction) on a menopausal disorder patient. *J Korea Instit Orient Med Diagn.* 2011 ; 15(2) : 215-222
4. Du HK. *Oriental kidney system internal medicine.* Seoul:Sungbosa, 2003 : 1241-50.
5. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SAA, 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.* 2002 ; 288 : 321-33.
6. Lobo RA. Benefits and risks of estrogen replacement therapy. *Am J Obstet Gynecol.* 1995 ; 173 : 982-9.
7. Wallach EE, Gambrell Jr RD. The menopause benefits and risks of estrogen - progestogen replacement therapy. *Fertil Steril.* 1982 ; 37 : 457-74.
8. Kronenberg F, Fugh-Berman A. Complementary and alternative medicine for menopausal symptoms : a review of randomized, controlled trials. *Ann Intern Med.* 2002 ; 137 : 805-13.
9. Han KK, Soares Jr JM, Haidar MA, De Lima GR, Baracat EC. Benefits of soy isoflavone therapeutic regimen on menopausal symptoms. *Obstet Gynecol.* 2002 ; 99 : 389-94.
10. Chung MH, Kim GW, Lee BJ, Um KJ. Studies on efficacy of Polygoni multiflori Radix and Cynanchi wilfordii Radix. *Kor. J. Pharmacogn.* 1991 ; 22(1) : 67.
11. Kim HJ. Effects of Cynanchum wilfordii extract on serum lipid components and enzyme activities in hyperlipidemic and streptozotocin induced diabetic rats. *Korean J. Human. Ecology.* 2004 ; 7(2) : 1-11.
12. Kim HK, Kim YA, Lee AY, Ko BS. Pattern analysis of Cynanchi wilfordii radix and Polygoni multiflori radix. *Kor J Pharmacogn.* 2003 ; 34(4) : 278-81
13. Qiu S, Cho JS, Kim JT, Moon JH, Zhou Y, Lee SB, Park HJ, Lee HJ. Caudatin suppresses adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and reduces body weight gain in high-fat diet-fed mice through activation of hedgehog signaling. *Phytomedicine.* 2021 ; 92 : 153715
14. Wang LJ, Chen H, Ma YB, Huang XY, Geng CA, Zhang XM, Chen JJ. Design, synthesis and biological evaluation of caudatin analogs as potent hepatitis B virus inhibitors. *Med Chem.* 2015 ; 11(2) : 165-79.
15. Zhen X, Choi HS, Kim JH, Kim SL, Liu R, Ko YC, Yun BS, Lee DS. Caudatin isolated from Cynanchum auriculatum inhibits breast cancer stem cell formation via a GR/YAP Signaling. *Biomolecules.* 2020 18 ; 10(6) : 925.
16. Song J, Ding W, Liu B, Liu D, Xia Z, Zhang L, Cui L,

- Luo Y, Jia X, Feng L. Anticancer effect of caudatin in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Mol Med Rep.* 2020 ; 22(2) : 697–706.
17. 한국한의학연구원. 비주화(啤酒花) [Internet]. 특허청; 2007. Available from: <https://doi.org/10.20929/KTKP.MED.0000078189>
 18. Cleemput MV, Cattoor K, Bosscher KD, Haegeman G, Keukeleire DD, Heyerick A. Hop (*Humulus lupulus*)-derived bitter acids as multipotent bioactive compounds. *J. Nat. Prod.* 2009 ; 72 : 1220–1230.
 19. Wang J, Li D, Dangott LJ, Wu G. Proteomics and Its Role in Nutrition Research. *The Journal of Nutrition.* 2006 ; 136(7) : 1862–1867.
 20. Effenberger KE, Johnsen SA, Monroe DG, Spelsberg TC, Westendorf JJ. Regulation of osteoblastic phenotype and gene expression by hop-derived phytoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005 ; 96 : 387–99.
 21. Hümpel M, Isaksson P, Schaefer O, Kaufmann U, Ciana P, Maggic A, Schleuning WD. Tissue specificity of 8-prenylnaringenin: protection from ovariectomy induced bone loss with minimal trophic effects on the uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005 ; 97 : 299–305.
 22. Diel P, Thomae RB, Caldarelli A, Zierau O, Kolba S, Schmidt S, Schwab P, Metz P, Vollmer G. Regulation of gene expression by 8-prenylnaringenin in uterus and liver of Wistar rats. *Planta Med.* 2004 ; 70 : 39–44.
 23. Pepper MS, Hazel SJ, Humpel M, Schleuning WD. 8-Prenylnaringenin, a novel phytoestrogen, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *J Cell Physiol.* 2004 ; 199 : 98–107.
 24. Zierau O, Morrissey C, Watson RWG, Schwab P, Kolba S, Metz P, Vollmer G. Antiandrogenic activity of the phytoestrogens naringenin, 6-(1,1-dimethylallyl)naringenin and 8-prenylnaringenin. *Planta Med.* 2003 ; 69 : 856–8
 25. Sathyamoorthy N, Wang TTY, Phang JM. Stimulation of pS2 expression by diet-derived compounds. *Cancer Res.* 1994 ; 54 : 957–61.
 26. Loven MA, Wood JR, Nardulli AM. Interaction of estrogen receptors α and β with estrogen response elements. *Mol Cell Endocrinol.* 2001 ; 181 : 151–63.
 27. Lindsay R. The menopause and osteoporosis. *Obstet Gynecol.* 1996 ; 87 : 16S–9S.
 28. Oursler MJ. Direct and indirect effects of estrogen on osteoclasts. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2003 ; 3 : 363–6.
 29. Nishikawa M, Akatsu T, Katayama Y, Yasutomo Y, Kado S, Kugal N, Yamamoto M, Nagata N. Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures. *Bone.* 1996 ; 18 : 9–14.
 30. Abrahamsen B. Bisphosphonate adverse effects, lessons from large databases. *Curr Opin Rheumatol.* 2010 ; 22(4) : 404–9.
 31. Silverman SL, Lane NE. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Curr Osteoporosis Rep.* 2009 ; 7(1) : 23–6.
 32. Cho SI. Effects of the *Rehmanniae radix* preparat on ovariectomized rats. *Kor J Herbology.* 2005 ; 20(4) : 61–7.
 33. Kim JH, Kim JY, Ann JY, Park HJ, Kim HJ, Kwak HB, Oh JM, Kim YK. Inhibitory effects of *Achyranthis bidentatae radix* on osteoclast differentiation and bone resorption. *Kor J Herbology.* 2010 ; 25(1) : 65–74.
 34. Hwang JS, Seo BI, Park JH, Roh SS, Kim MY, Kim SM, Goo JS. Effect of *Cervi cornu* on treatment of osteoporosis in ovariectomized rats. *Kor J Herbology.* 2010 ; 25(2) : 1–10.
 35. Velarde MC. Pleiotropic actions of estrogen: a mitochondrial matter. *Physiological Genomics.* 2013 ; 45(3) : 106–9.
 36. Hu P, Kinyamu HK, Wang L, Martin J, Archer TK, Teng C. Estrogen induces estrogen-related receptor alpha gene expression and chromatin structural changes in estrogen receptor (ER)-positive and ER-negative breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2008 ; 283(11) : 6752–63.
 37. Lee E, Jang M, Lima TG, Kim T, Ha H, Lee JH, Hong HD, Cho CW. Selective activation of the estrogen receptor- β by the polysaccharide from *Cynanchum wilfordii* alleviates menopausal syndrome in ovariectomized mice. *Int J Biol Macromol.* 2020 ; 165(Pt A) : 1029–37.
 38. Rasmussen TH, Nielsen, JB. Critical parameters in the MCF-7 cell proliferation bioassay (E-Screen). *Biomarkers.* 2002 ; 7(4) : 322–36.