

葫蘆巴 종자 추출물이 난소 절제술을 받은 쥐에서 갱년기 증상 및 골다공증에 미치는 영향

김민주^{1,2#}, 신미래¹, 최학주^{1*}, 노성수^{1*}

1 : 대구한의대학교 한의학과 본초약리학교실, 2 : 대구한의대학교 간질환한약융복합활용연구센터

Trigonella Foenum-Graecum Seed Extract Alleviates Menopausal Symptoms and Osteoporosis in Ovariectomized Rats

Min Ju Kim^{1,2#}, Mi-Rae Shin¹, Hak Joo Choi^{1*}, Seong-Soo Roh^{1*}

1 : Department of Herbology, College of Korean Medicine, Daegu Haany University
2 : Research Center for Herbal Convergence on Liver Disease, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : We proposed the hypothesis that administering *Trigonella foenum-graecum* seed extract (TSE) could alleviate menopausal symptoms and osteoporosis resulting from estrogen deficiency.

Methods : Ovariectomized (OVX) rats were administered TSE at doses of 300 or 600 mg/kg body weight for 8 weeks, followed by measurement of serum lipid profile and serum bone markers using ELISA kits. Additionally, analysis of related genes in the femur and uterus was performed using Western blot and real-time PCR. Additionally, micro-CT analysis was performed to investigate the protective effect of TSE against bone loss due to oophorectomy.

Results : The administration of TSE led to significant reductions in triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, and glucose levels in the serum of OVX rats. Furthermore, TSE increased estradiol levels in the serum and notably improved the levels of biochemical markers associated with bone metabolism. Additionally, TSE exerted significant regulatory effects on the mRNA levels of alkaline phosphatase (ALP) and receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)—genes closely associated with bone metabolism in the femur. TSE also demonstrated pronounced effects on uterine tissue, with improvements observed in gene expression related to estrogen receptors.

Conclusion : Our findings confirm the efficacy of TSE in ameliorating menopause symptoms by modulating elements associated with both bone and lipid metabolism in the serum, uterine tissue, and femur of OVX rats. The present findings suggest that TSE may offer potential therapeutic effects for symptoms related to menopause and osteoporosis in females.

Key words : *Trigonella foenum-graecum* Seed Extract, Menopausal, Osteoporosis, Ovariectomized

*Corresponding author : Seong-Soo Roh, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : ddede@dhu.ac.kr
Hak Joo Choi, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136, Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu, 42158, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : phjchoi@dhu.ac.kr
#First author : Min Ju Kim, Research Center for Herbal Convergence on Liver Disease, Daegu Haany University, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do 38610, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-770-2258 · Fax : +82-53-768-6340 · E-mail : mj8976@naver.com
· Received : 18 April 2024 · Revised : 30 April 2024 · Accepted : 25 May 2024

I. 서론

갱년기 (Menopause)는 여성의 생식 노화로 정의되며, 난소의 난포 활동이 감소하고 월경 주기가 영구적으로 중단되는 자연적인 과정으로, 난소 기능의 저하와 함께 신체적 및 정신적 변화가 나타난다^{1,2)}. 인간의 평균 수명 증가로 여성들이 갱년기를 경험하는 시간이 삶의 약 1/3에서 1/2 정도로 증가하고 있어, 이는 현대 사회에서 주목할 필요가 있는 새로운 사회적 문제로 대두되고 있다³⁾. 폐경으로 인한 증상과 질병은 체내 여성호르몬이 감소함에 따라 발생하기 때문에, 호르몬 대체 요법 (Hormone replacement therapy, HRT)과 비호르몬 요법 등을 통해 부족한 여성호르몬을 보충하여 호르몬 수치를 조절함으로써 폐경기 증상을 완화시킨다⁴⁾. 난소에서 주로 생성되는 호르몬인 estrogen은 에너지 균형, 체온 및 뼈 재구성을 조절하는 다양한 생물학적 기능을 수행하며, 생식 기관의 발달과 유지에도 중요한 역할을 한다⁵⁾. 갱년기가 발생하면 estrogen 분해와 같은 호르몬 수치의 변화를 일으켜 이상지질혈증, 관상동맥질환, 골다공증 등과 같은 대사장애를 일으키게 된다⁶⁾. 이러한 estrogen은 estrogen receptors (ERs)인 ER- α 및 ER- β 에 의해 유전자 발현이 조절된다고 보고되어 있다^{7,8)}. 갱년기 증상, 특정 위험 요인 및 연령 등에 따라 HRT의 장단점은 다양하며, 오랜기간 사용시 유방암에 대한 위험도가 증가하고 체중의 증가, 두통, 유방통 등과 같은 부작용이 나타나기에 새로운 치료법이 필요한 실정이다⁹⁾. 또한, 비호르몬 요법의 경우 다한증, 두통, 변비 등과 같은 부작용을 야기한다^{6,10,11)}. 이에 따라 폐경기 여성에게서 호르몬에 영향을 미치지 않으면서 갱년기 증상 완화에 도움을 주는 천연물 유래 대체 요법 개발은 여전히 시급한 과제로 인식된다¹⁰⁾.

葫蘆巴 종자 (*Trigonella foenum-graecum* seed)는 아시아 여러 지역에서 널리 재배되는 일년생 식물로, 주로 溫腎陽 및 祛寒濕 효능을 지니고 있으며, Aswar 등의 연구 결과에 따르면 근육 합성, 경련 방지, 그리고 강장제에 영향을 미친다고 보고되었다^{12,13)}. 또한,葫蘆巴 종자는 식물성 화학물질인 알칼로이드, 페놀 화합물, 안토시아닌 등과 풍부한 식이섬유로 인해 다양한 생리활성을 나타낸다고 보고되었다¹⁴⁾. 여러 나라에서 호로과종자를 이용한 남성용 건강식품이 시중에 널리 판매되고 있으나, 아직 여성의 건강을 위한 기능성 소재 개발이 미비한 실정이다.

본 연구에서는葫蘆巴 종자 추출물 (*Trigonella foenum-graecum* seed extract, TSE)이 여성 갱년기에 미치는 영향을 확인하기 위하여 난소 적출된 암컷 SD Rat에 TSE를 1일 1회 8주간 경구투여하여 자궁조직 및 대퇴골에서 갱년기 관련 지표들을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료 추출

본 실험서 사용된葫蘆巴 종자 추출물 (*Trigonella foenum-*

graecum seed extract, TSE)은 70% 주정을 사용하여 추출되었다. 주정은 극성, 친수성, 비극성, 소수성 화합물을 모두 용해 시킬 수 있으므로 보편적인 식물추출물 제조 용매로 사용되며, 기존의 논문에 따르면 다양한 농도의 주정을 사용하여 추출한葫蘆巴 종자 추출물의 총 페놀 함량을 측정한 결과, 70% 주정 추출물에서 최대의 함량을 나타내었다¹⁵⁾. 따라서 본 연구에서는 추출물의 효율적인 제조를 위한 용매로써, 70% 주정이 적합하다고 판단하여 70% 주정 추출물을 사용하였다. 먼저葫蘆巴 종자를 분쇄하여 15배수 (1 kg/15 L)의 70% 주정으로 30~35℃에서 12~15시간 추출한 후, 농축 여과한 다음 분무건조 하였다. 최종 원료에는 이산화규소 0.5%가 첨가되었고, 추출 수율은 약 4.5%이며, Trigonelline 17.2 mg ($\pm 20\%$)로 표준화 하였다.

2. 시약

본 실험에서 사용된 phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 0754)는 Amresco (Solon, OH, USA)에서 구매하였으며, HEPES (cat. H1504)는 Duchefa Biochemie (St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 사용하였다. Potassium chloride (370)와 sodium chloride (81)를 DUKSAN (Ansan-si, Korea)에서 구매하였다. Glycerol (cat. 27210-0330)을 Junsei Chemical Co. (Tokyo, Japan)에서 구매하였으며, phosphate buffered saline solution (PBS, cat. SH30256)를 HyClone (Logan, UT, USA)에서 구매하여 사용하였다. Tween-20 (cat. 0777)과 Ammonium persulfate (APS, cat. 0486)을 GENERAY (Shanghai, China)에서 구매하였고, 1.5M Tris-HCl (ph8.8) (cat. CBTH-9288)과 0.5M Tris-HCl (ph6.8) (cat. CBTH-9168)을 CHEMBio (Hanam-si, Korea)에서 구매하였다. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, cat. 311-90075)와 protease inhibitor mixture (cat. 160-19501)를 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)에서 구매하였고, magnesium chloride (MgCl₂, cat. M8266)와 1,4-dithiothreitol (DTT, cat. 10708984001), sodium dodecyl sulfate (SDS, cat. 11667289001), N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TIMID, cat. T9281), estradiol (cat. E1024)를 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 사용하였다. Acrylamide/Bis Solution (cat. 10687.01)를 SERVA (Heidelberg, German)에서 구매하였다. enhanced chemiluminescence (ECL) Western Blotting Detection Reagents (cat. RPN2109)와 0.45 μ m Nitrocellulose membranes을 Amersham GE Healthcare (cat. 10600002, Buckinghamshire, UK)에서 구매하여 사용하였다.

3. 실험동물

(주)라온바이오 (Yongin, Korea)에서 10주령의 정상 Sprague-Dawley (SD) Rat과 난소를 적출한 SD Rat을 공급받아 실험을 진행하였다. 실험동물은 실험 당일까지 물과 고향

사료를 충분히 공급하며 1주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실은 명암 주기 12시간, 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$ 가 되도록 조절하였다. 본 연구는 대구한의대학교 동물 실험 윤리위원회의 승인(승인 번호: DHU 2023-039)을 얻어 실험을 시행하였으며 동물관리 규정을 준수하였다.

4. 시료 투여 및 부검

실험군은 개복 후 아무런 처치를 하지 않고 다시 봉합한 군 (Sham)과 난소적출과 증류수를 투여한 대조군 (Ovariectomized, OVX), 난소적출과 Estradiol을 0.1 mg/kg/day 투여한 양성 대조군 (OVX+E2), 난소적출과葫蘆巴 종자 추출물을 300 mg/kg/day 경구투여한 군 (OVX+TSE300), 난소적출과葫蘆巴 종자 추출물을 600 mg/kg/day 투여한 군 (OVX+TSE600)으로 Sham 군을 제외한 나머지 군들은 8주간 매일 1회 경구투여를 진행하였다. 기존의 연구결과에 따르면, 투여 농도 300 mg/kg에서 유의적 차이를 확인할 수 있었으며¹⁶⁾, 단회 및 90일 반복 투여 시험을 통해 NOAEL 값이 1,000 mg/kg으로 확인되었다¹⁷⁾. 이러한 선행 연구자료들에 근거하여 본 연구에서는 투여농도를 300, 600 mg/kg로 설정하였다. 투여 8주 후, 부검을 통해 실험동물들의 혈액, 자궁조직 (무게 측정), 대퇴골을 얻었으며, -80°C 에 보관하였다.

5. 혈액학적 분석

실험 종료 후, 마취하여 복대 정맥에서 혈액을 채취하여 1,508 rcf, 4°C 으로 10분간 원심 분리 후 혈청을 분리하였으며, -80°C 에 보관하였다. 분리한 혈청 내 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT, cat. AM103-K, Asanpharm, Seoul, Korea), glutamic pyruvic transaminase (GPT, cat. AM102, Asanpharm, Seoul, Korea), glucose (cat. ab65333, abcam, Cambridge, UK), triglyceride (TG, cat. #632-50991, FUJIFILM Wako, Osaka, Japan), total cholesterol (TC, cat. #635-50981, FUJIFILM Wako, Osaka, Japan), high density lipoprotein-cholesterol (HDL-cholesterol, cat. AM 203-K, Asanpharm, Seoul, Korea), alkaline phosphatase (ALP, cat. GR118176, Genorise Scientific, Berwyn, PA, USA), Osteocalcin (cat. NBP2-68153, Novusbio, Centennial, CO, USA), procollagen type I N-terminal propeptide (PINP, cat. E-EL-R1414, Elabscience, Houston, TX, USA), Calcium (cat. MET-5121, CELL BIOLABS, San Diego, CA, USA), Phosphate (cat. MAK308, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), type I collagen cross-linked C-telopeptide (ICTP, cat. RA0672, NEOBioLab, Cambridge, MA, USA), N-telopeptide fragment (NTX, cat. MBS165137, Mybiosource, San Diego, CA, USA), C-telopeptide fragment (CTX, cat. MBS703743, Mybiosource, San Diego, CA, USA), Estradiol (cat. ARG80755, ARIGO,

Hsinchu City, Taiwan)을 ELISA kit를 사용하여 측정하였다. 이후 측정된 TG, TC 및 HDL-C 수치를 아래의 계산식에 대입하여 low density lipoprotein-cholesterol (LDL-cholesterol)을 산출하였다¹⁸⁾.

$$\text{LDL-cholesterol} = \text{TC} - (\text{HDL-C} + (\text{TC} / 5))$$

6. 조직학적 관찰

부검 후, 적출한 자궁조직의 H&E 염색과 대퇴골의 micro-CT 촬영을 위해 해당 조직들을 중성 원층 포르말린에 고정한 후, OBEN (Suwon, Korea)에 의뢰하여 분석을 시행하였다. 적출한 자궁조직은 10% 포르말린 용액으로 고정한 후 70% 알코올, 95% 알코올, 100% 알코올 순서대로 탈수시키고, 파라핀으로 고정시켰다. 고정된 조직을 microtome를 사용해 $2 \mu\text{m}$ 두께로 절단한 후 H&E 염색을 시행하였다¹⁹⁾. 염색된 슬라이드는 PANNORAMIC 250 Flash III digital slide scanner (3DHISTECH Ltd., Hungary)를 사용하여 이미지 촬영 후 CaseViewer program (3DHISTECH Ltd.)을 사용하여 관찰하였다.

대퇴골의 3D 이미지는 micro-CT (SkyScan1173, Bruker-CT, Belgium)를 사용하여 스캔하였다. 골밀도 (Bone microarchitecture parameters, BMD), 소주 두께 (Trabecular thickness, Tb.Th) 및 소주 분리 (Trabecular separation, Tb.sp), 골 소주 수 (Trabecular number, Tb.N)를 포함한 뼈 미세구조 매개변수는 CtAn software (SkyScan version 1.6, Bruker-CT)를 사용하여 분석되었다.

7. Western blot 분석

자궁조직에 세포질 분리용 buffer A (Composed of 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 15 mM CaCl_2 , 1.5 M sucrose, 0.1 M DTT, 2 mM MgCl_2 , 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), protease inhibitor cocktail)와 핵 분리용 buffer C (Composed of 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, 50 mM KCl, 50 mM HEPES, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM PMSF, 10% glycerol)를 사용해 세포질과 핵을 분리하였다²⁰⁾. 단백질 발현을 측정하기 위해 $10 \mu\text{g}$ 의 단백질을 8~12% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 후, nitrocellulose membrane으로 단백질을 이동시켰다. 그다음, membrane에 1차 항체를 처리하여 4°C 에서 overnight 시킨 다음 tween20 이 0.1% 함유된 PBS-T를 사용하여 세척하였다. 그 후, 각각 처리된 1차 항체에 사용되는 2차 항체를 사용하여 상온에서 2시간 반응시키고 PBS-T로 세척한 후, ECL 용액에 노출시킨 다음, Vilber Chemidoc (Marne-la-Vallée, France)으로 단백질 발현을 확인한 후, Vilber Densitograph Software (version 18.12)를 사용하여 해당 밴드를 정량하여 실험군 간에 발현량을 비교하였다 (Fold of Sham). 실험에 사용된 1, 2차 항체는 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Primary and secondary antibodies list

Contents	Company	Cat. No.
AKT	Cell Signaling Technology	#9272
p-AKT	Cell Signaling Technology	#9275
c-Jun	Cell Signaling Technology	#2315
c-Fos	Cell Signaling Technology	#4384
ER α	Santa Cruz Biotechnology	SC-8005
ER β	Santa Cruz Biotechnology	SC-53494
ERK	Santa Cruz Biotechnology	SC-514302
p-ERK	Santa Cruz Biotechnology	SC-7383
Lamin B1	Santa Cruz Biotechnology	SC-374015
GAPDH	Santa Cruz Biotechnology	SC-365062
HRP-conjugated anti-mouse	GeneTex	GTX213110-01
HRP-conjugated anti-rabbit	GeneTex	GTX213111-01

8. Real-time PCR 분석

대퇴골을 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 시약으로 total RNA를 분리하고 nano drop plate (Tecan, Männedorf, ZH, Switzerland)를 사용하여 정량하였다. 그 후, Maxima cDNA Synthesis kit (cat. K1642, Thermo, Waltham, MA, USA)를 이용하여 20°C에서 10분, 42°C에서 60분, 70°C에서 15분 조건으로 1 μ g의 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 유전자들의 상대적 정량은 SYBR Primix Ex Taq (cat. 4309155, Thermo, Waltham, MA, USA)을 이용하여 정량하였다. 상대적 mRNA 수준을 계산하기 위해 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법이 사용되었다²¹⁾. 실험에 사용된 primer 서열은 Table 2에 나열하였다.

Table 2. The sequence of the primers used for PCR.

Gene	Primer	Sequence (5' → 3')
OPG	Forward	TGGCACACAGTGATGAATGCG
	Reverse	GCTGGAAAGTTTGCTCTTGCG
RANKL	Forward	CGCAGATTTGCAGGACTCGAC
	Reverse	TTCGTGCTCCCTCCTTTCATC
ALP	Forward	TCATGTTCCCTGGGAGATGGTATG
	Reverse	GCATTAGCTGATAGGCGATGTCC
COL1	Forward	CATGTTTCAGCTTTGTGGACCT
	Reverse	GCAGCTGACTTCAGGGATGT
GAPDH	Forward	ACCACAGTCCATGCCATCAC
	Reverse	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

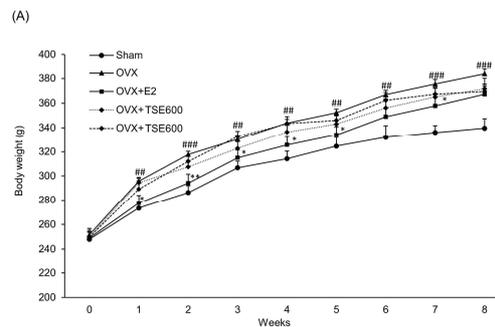
9. 통계분석

실험에 사용된 값들은 Mean \pm SEM으로 표시하였으며, SPSS (Version 26.0, IBM, Chicago, IL, USA)로 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 사용한 후, least-significant differences (LSD) test로 사후 검정을 하여 각 군의 평균 차이에 대한 통계적 유의성을 p<0.05, p<0.01, p<0.001에서 검증하였다.

III. 결 과

1. 체중변화 및 식이섭취량

시료 투여 기간 실험동물들의 체중을 측정한 결과를 Fig.1에 나타내었다. 실험동물들의 체중 증가량 (g) 결과, OVX군이 Sham군보다 44.2% (p<0.001) 유의하게 체중이 증가함으로써 폐경기 증상 중 하나인 체중 증가가 나타났다. 반면에, 투여 군들은 유의하지는 않으나 OVX군보다 OVX+E2군 10.7%, OVX+TSE300군 7.8%, OVX+TSE600군 9.5%씩 감소하는 경향이 나타났다.



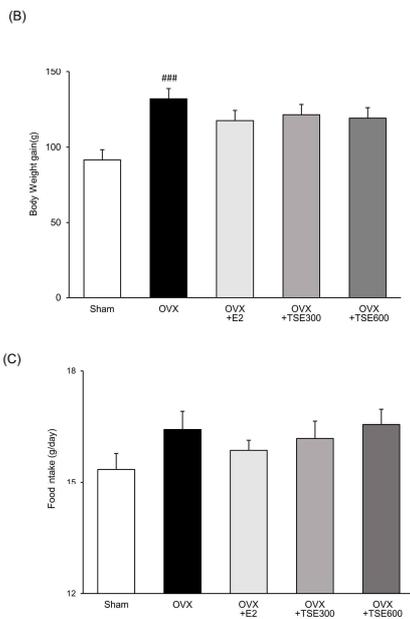


Fig.1. Effects of TSE on body weight, body weight gain, food intake in OVX rats. (A) Body weight and (B) Body weight gain and (C) Food intake. The body weight was recorded weekly during the experimental period. The body weight gain was calculated by the equation: final body weight - initial body weight. Data are mean \pm SEM values. Significance: #p<0.01, ###p<0.001 vs. Sham group and *p<0.05, **p<0.01 vs. OVX group.

감소시키는 것으로 나타났다. GPT의 경우, OVX군에 비하여 유의적이지는 않으나, TSE투여군들이 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다 (Fig.2).

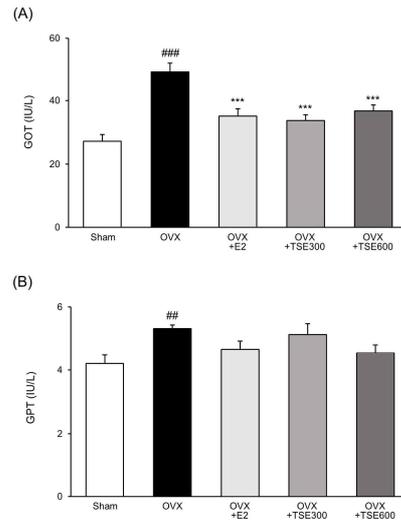


Fig.2. Effects of TSE on serum GOT and GPT levels in OVX rats. Levels of (A) GOT and (B) GPT in serum measured by ELISA. Data are mean \pm SEM values. Significance: ##p<0.01, ###p<0.001 vs. Sham group and **p<0.001 vs. OVX group.

2. 혈액학적 분석 결과

1) 간 손상 지표인자

난소적출로 인하여 OVX군의 혈청 내 GOT 및 GPT 수준은 Sham군보다 유의하게 증가하였다 (GOT p<0.001, GPT p<0.01). 반면에 투여군들은 GOT 수준을 각각 OVX군에 비하여 OVX+E2군 28.9% (p<0.001), OVX+TSE300군 31.7% (p<0.001), OVX+TSE600군 25.6% (p<0.001) 유의적으로

2) 지단백 프로파일 (Lipid profile test)

혈청 내 지단백 프로파일인 TG, TC, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol 및 glucose를 측정한 결과, Sham군보다 난소 적출한 OVX군에서 TG, TC, LDL-cholesterol 및 glucose의 수준을 유의하게 증가시켰다 (p<0.001). 이를 모든 투여군에서 유의하게 개선시켰다. 반면에 HDL-cholesterol의 경우 Sham군과 비교하여 OVX군들과 차이가 나타나지 않았다 (Fig.3).

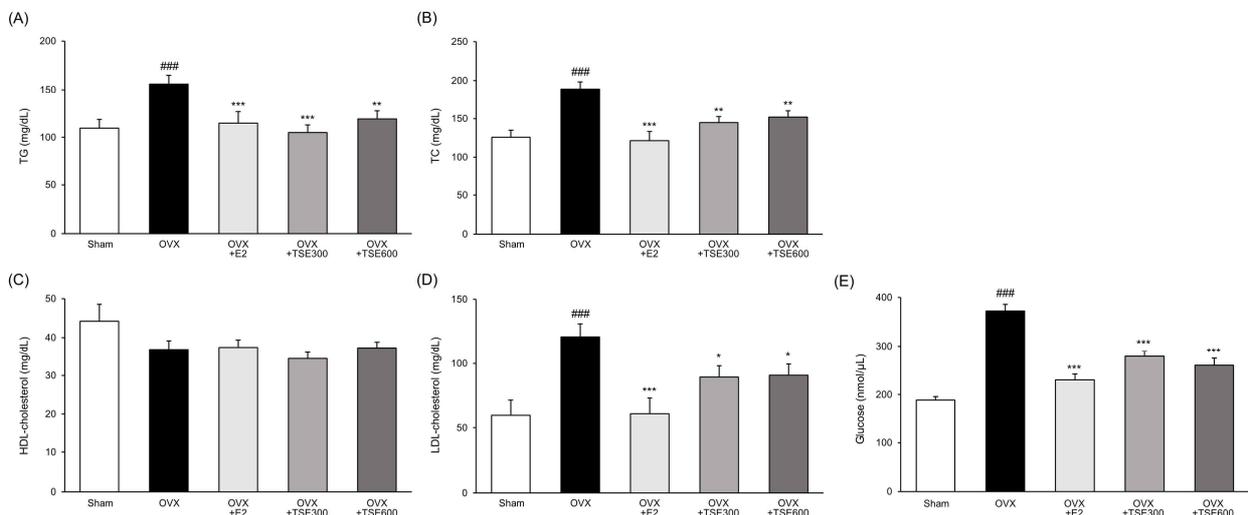


Fig.3. Effect of TSE on the lipid profiles in the OVX rats. Levels of (A) TG, (B) TC, (C) HDL-cholesterol, (D) LDL-cholesterol, and (E) glucose in serum measured by ELISA. Data are mean \pm SEM values. Significance: ###p<0.001 vs. Sham group and *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. OVX group.

3) Estradiol 및 골 대사 관련 생화학적 표지자

OVX군의 혈청 ALP, Osteocalcin, ICTP, CTX, NTX 농도가 Sham군보다 유의적으로 높았으며 (p<0.001), 8주간의 시료 투여는 이를 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 특히, OVX+TSE600군은 ALP, Osteocalcin, ICTP 및 NTX를 OVX군 보다 감소량이 각각 61.6%, 26.0%, 49.0%, 25.5%으로 p<0.001 수준으로 감소하는 것을 확인할 수 있다. 반면에 OVX군은 P1NP, Calcium, Phosphate, Estradiol 수준을

유의적으로 감소시켰으며, 이를 투여군들에서 증가시키는 것으로 나타났다. 특히 OVX+E2군은 Estradiol, Calcium, Phosphate, P1NP를 각각 108.3% (p<0.01), 24.2% (p<0.001), 16.1% (p<0.05), 88.6% (p<0.05) 유의하게 증가시켰으며, OVX+TSE600군은 Calcium, Phosphate, P1NP를 각각 16.0% (p<0.01), 18.9% (p<0.01), 79.9% (p<0.01) 유의적으로 증가시켰다 (Fig. 4).

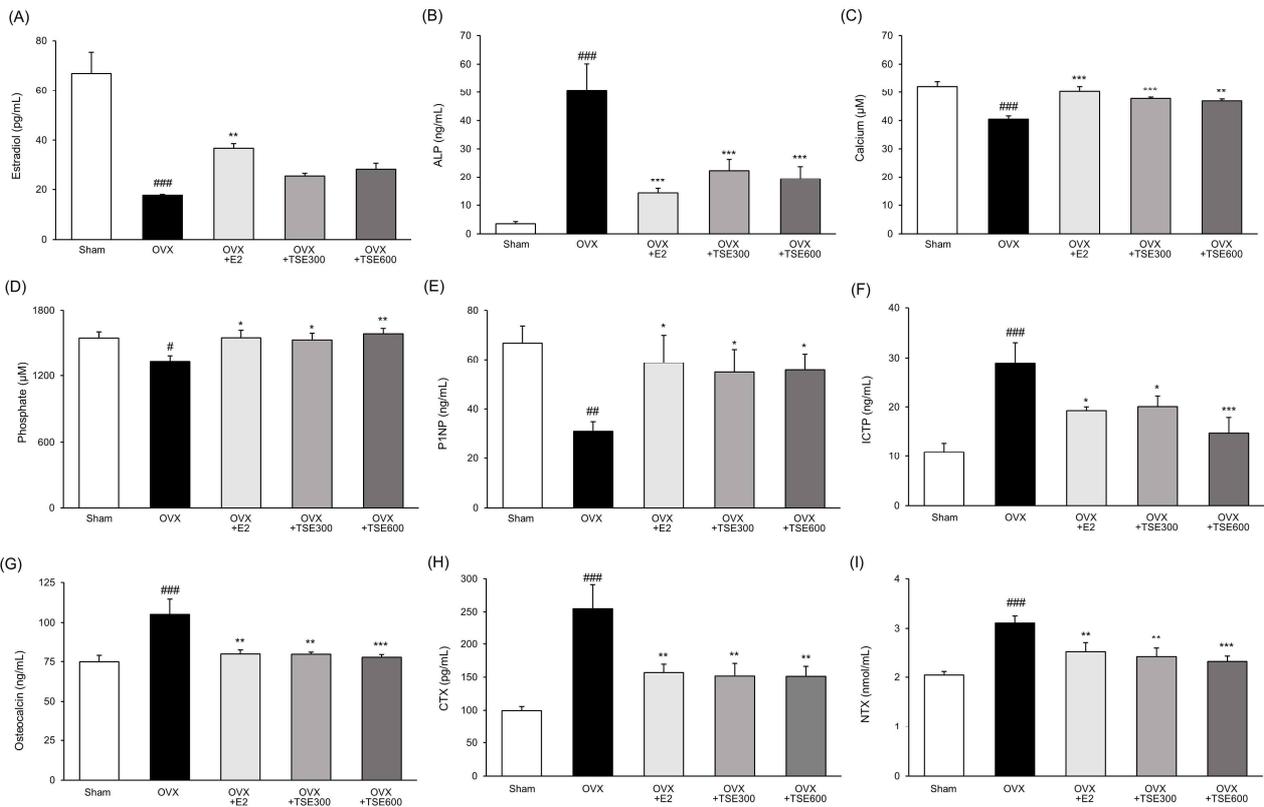


Fig.4. Effects of TSE on serum bone marker and Estradiol concentrations in the OVX rats. Levels of (A) Estradiol, (B) ALP, (C) Calcium, (D) Phosphate, (E) P1NP, (F) ICTP, (G) Osteocalcin, (H) CTX, and (I) NTX in serum measured by ELISA. Data are mean ± SEM values. Significance: #p<0.05. ##p<0.01. ###p<0.001 vs. Sham group and *p<0.05. **p<0.01. ***p<0.001 vs. OVX group.

3. 대퇴골 분석 결과

1) 대퇴골 Micro-CT

난소적출로 인한 골 손실에 대한 TSE의 보호 효과를 조사하기 위해 micro-CT 분석을 하였다. 그 결과, OVX군은 Fig. 5에 표시된 것처럼 대퇴골의 소주의 손실이 나타났다. OVX군은 난소적출로 인하여 Sham군보다 Tb.sp 수치가 유의하게 증가하였으며, BMD, Tb.Th 및 Tb.N을 유의하게 감소 시킴으로 골밀도를 떨어뜨리는 것으로 나타났다. 반면에 투여군들은 유의하지는 않으나 OVX군과 비교하여 BMD, Tb.sp, Tb.Th 및 Tb.N 수치를 개선시키는 것을 확인할 수 있었다.

2) 대퇴골 Real-time PCR 분석

시료 투여 8주 후 골 대사의 관련 유전자들 (ALP, COL1, RANKL, OPG)의 발현을 대퇴골에서 분석하였다. 그 결과 난소적출이 OVX군의 대퇴골 내 ALP, COL1, RANKL 발현 수준을 유의적으로 증가시켰으며, OPG의 경우 OVX군에서 감소하는 경향이 나타났다. 이를 호로파 추출물에서 농도 의존적으로 개선시켰으며, 특히 TSE600군에서 ALP와 RANKL mRNA 수준을 OVX군 대비 각각 0.71배, 0.58배로 유의하게 감소시키는 것을 확인하였다 (p<0.05) (Fig. 6).

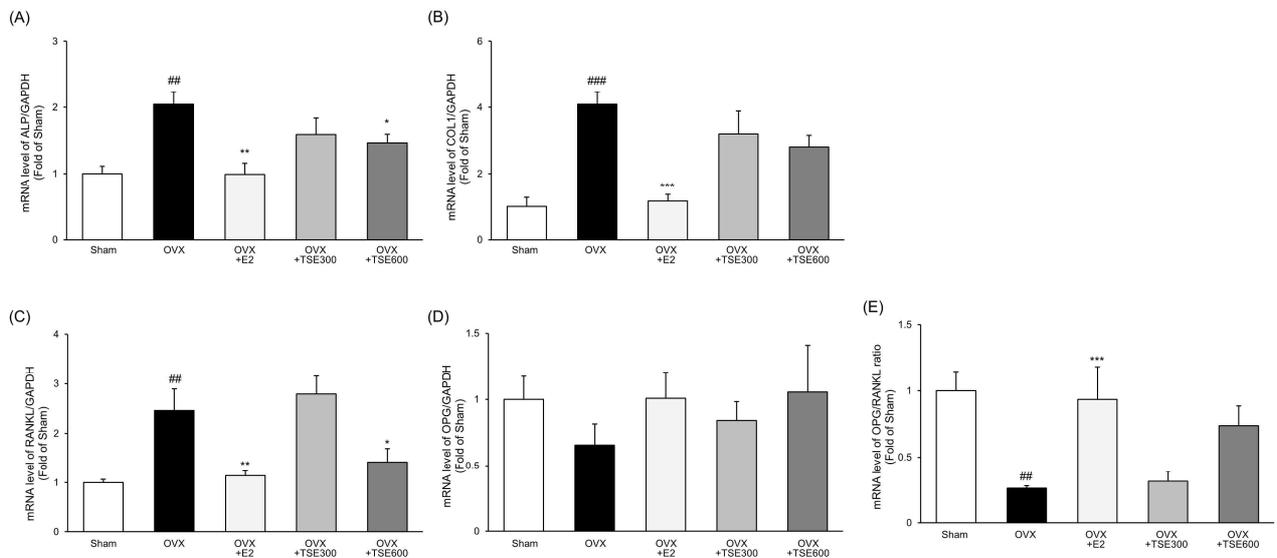


Fig.6. Effects of TSE on mRNA expression related to bone markers in OVX rats. The mRNA levels of (A) ALP, (B) COL1, (C) RANKL, (D) OPG, and (E) OPG/RANKL ratio were quantified. Results were normalized by GAPDH. Data are mean \pm SEM values. Significance: ^{##}p<0.01, ^{###}p<0.001 vs. Sham group and ^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001 vs. OVX group.

4. 자궁조직 분석 결과

1) 자궁조직 무게

실험동물들의 자궁조직 무게를 측정된 결과, 난소적출로 인하여 Sham군보다 OVX군의 자궁 무게가 84.1% ($p<0.001$) 유의적으로 감소하였으며, 이를 투여군들은 유의적이지는 않지만, 각각 OVX군에 비하여 OVX+E2군 35.3%, OVX+TSE300군 19.6%, OVX+TSE600군 5.9% 증가시키는 것으로 나타났다 (Fig. 7).

2) 자궁조직 H&E 염색

8주간 실험 종료 후 자궁조직을 H&E 염색한 결과, 난소적출로 인하여 Sham군보다 OVX군의 자궁 두께가 55.1% ($p<0.001$) 더 얇아진 것이 확인되었으며, 투여군들은 유의적이지는 않지만, 각각 OVX군에 비하여 OVX+E2군 23.5%, OVX+TSE300군 8.4%, OVX+TSE600군 14.7% 두꺼워지는 것으로 나타났다 (Fig. 7). 또한, 마지막 투여 날로부터 2주 후, 실험동물들에서 가역반응을 확인하기 위해 자궁조직을 H&E 염색한 결과, OVX군이 Sham군 보다 자궁조직의 두께가 56.7%

($p<0.001$) 더 얇은 것으로 나타났으며, 투여군들은 OVX군에 비하여 OVX+E2군 29.1%, OVX+TSE300군 22.9%, OVX+TSE600군 22.5% 증가시키는 것으로 나타났으며, 투여를 종료 후에도 시료의 효능으로 자궁의 두께가 유의적이지는 않지만 두꺼워지는 것으로 확인되었다 (Fig. 8).

3) 자궁조직 Western blot 분석

자궁조직 내 $ER\alpha$, $ER\beta$, p-AKT, c-Jun, c-Fos 및 p-ERK의 발현을 western blot으로 분석하였다. 그 결과, 난소적출은 OVX군의 자궁조직 내 $ER\alpha$ ($p<0.01$), $ER\beta$ ($p<0.01$), p-AKT ($p<0.001$), p-ERK ($p<0.001$)의 발현을 Sham군 대비 유의적으로 감소시켰으며, c-Jun ($p<0.001$), c-Fos ($p<0.05$) 발현을 유의하게 증가시켰다. 반면에 모든 투여군은 c-Fos를 제외하고 모든 인자의 발현을 유의하게 조절하는 것으로 나타났으며, 특히 p-AKT의 경우 OVX군 수치의 OVX+E2군 2.02배, OVX+TSE300군 1.79배, OVX+TSE600군 1.76배로 Sham군 수준까지 유의하게 개선시키는 것을 확인하였다 ($p<0.001$) (Fig. 9).

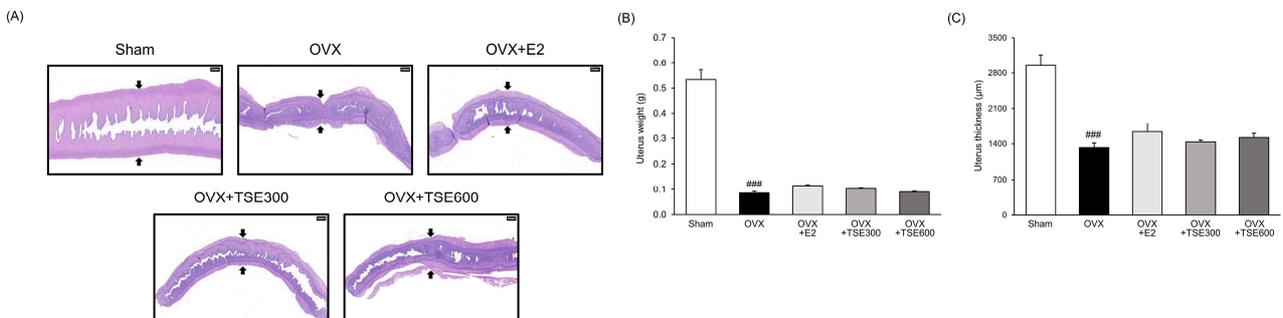


Fig.7. Effects of TSE on uterus weight and uterus histomorphology in OVX rats. (A) A representative image of the uterus H&E stain, (B) Uterus weight, and (C) Uterus thickness. The uterus was dissected, washed with saline, and immediately weighed for analysis. The representative image of the H&E stain was captured at a magnification 20x(scale bar 500 μ m). The arrows in the image indicate the location for measuring uterine thickness. Data are mean \pm SEM values. Significance: ^{###}p<0.001 vs. Sham group.

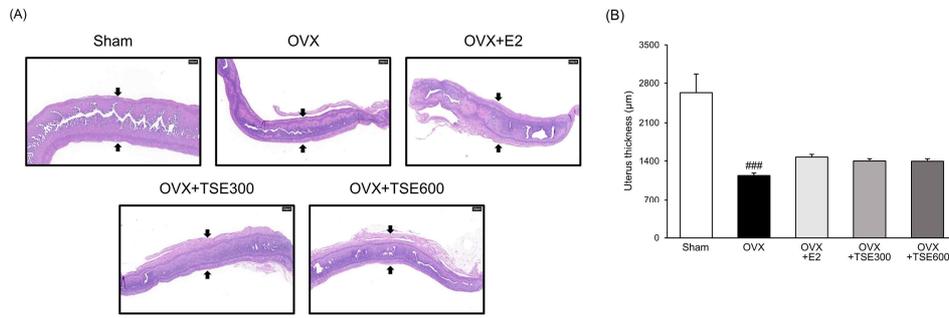


Fig.8. Effects of TSE on uterus histomorphology in OVX rats two weeks after discontinuation of administration. (A) A representative image of the uterus H&E stain and (B) Uterus thickness. The uterus was dissected, washed with saline, and immediately weighed for analysis. The representative image of the H&E stain was captured at a magnification 20x(scale bar 500 µm). Data are mean ± SEM values. Significance: ###p<0.001 vs. Sham group.

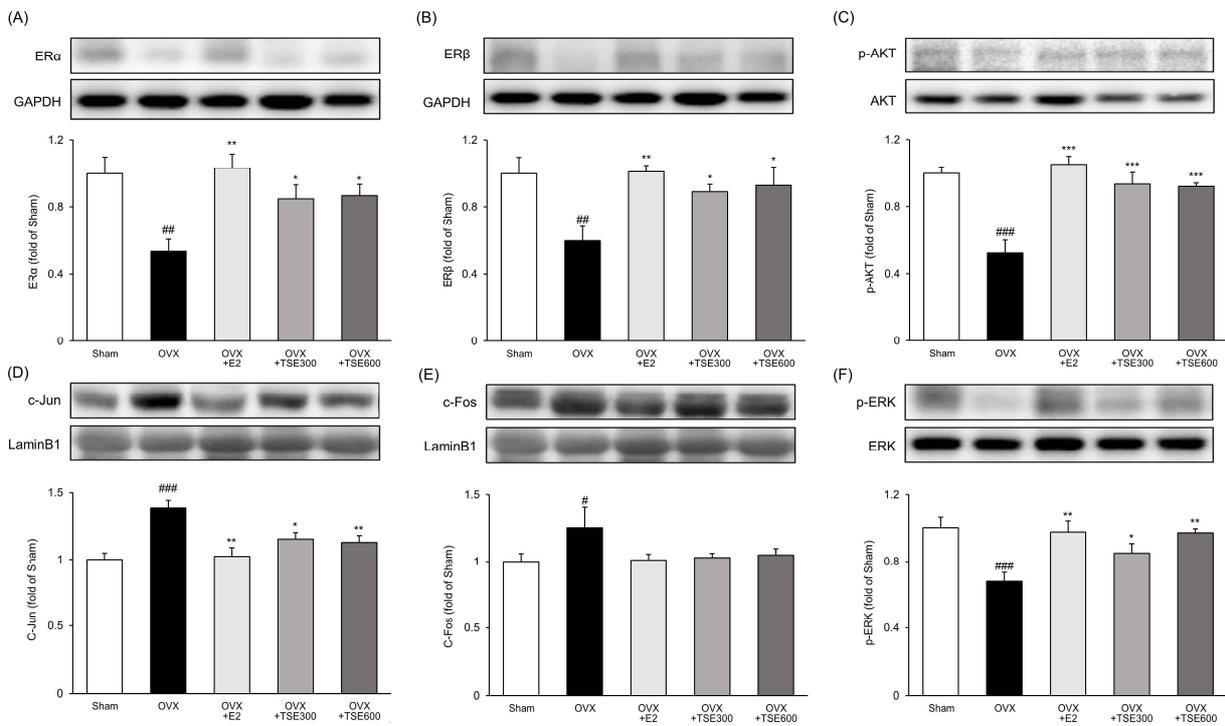


Fig.8. Effects of TSE on uterus histomorphology in OVX rats two weeks after discontinuation of administration. (A) A representative image of the uterus H&E stain and (B) Uterus thickness. The uterus was dissected, washed with saline, and immediately weighed for analysis. The representative image of the H&E stain was captured at a magnification 20x(scale bar 500 µm). Data are mean ± SEM values. Significance: ###p<0.001 vs. Sham group.

IV. 고찰

OVX는 Rat의 난소를 제거하여 혈청 내 estrogen 수준을 감소시켜 쥐의 폐경을 인위적으로 유도하는 표준적인 방법으로, 여성 갱년기와 관련된 생리학적 변화 및 질병 메커니즘을 연구하는데 매우 유용한 동물 모델로 활용된다^{22,23}. 이에 본 연구에서는 OVX Rat 모델에 8주간 TSE를 투여한 후, 갱년기 증상에 미치는 영향을 조사하였다.

이전 연구들에 따르면 갱년기로 인하여 GOT 및 GPT 증가와 대사성 비만이 나타날 수 있다고 알려져 있다²⁴⁻²⁶. TSE 투여는 OVX로 인한 체중 증가를 감소시키는 경향이 나타났다

(Fig.1). 그리고 난소적출로 인해 증가된 간 손상 지표인 GOT와 GPT의 수치를 TSE가 감소시켰으며, 특히 GOT의 경우 유의적으로 개선시켰다. 혈청 내 지단백 프로파일의 수치의 경우, 난소적출로 인하여 증가한 TG, TC, LDL-cholesterol 및 glucose 수치를 TSE가 유의적으로 감소시키는 것을 확인하였다 (Fig.3). 이 결과는 TSE가 갱년기로 인한 대사장애, 심혈관 질환 및 이상지질혈증 개선에 도움이 될 수 있는 가능성을 시사한다.

폐경 후 estrogen 결핍은 ALP의 활성을 증가시켜 골다공증을 일으키게 된다²⁷. 또한, estrogen 결핍은 신장을 통한 칼슘 배설을 증가시키고 장내 칼슘 흡수를 감소시킴으로써 골

에서 혈액으로 방출되는 칼슘에 영향을 줄 수 있다^{28,29}). 이러한 이유로 폐경으로 인한 골다공증에서 골 대사와 관련된 생화학적 표지자들을 확인하는 것이 필요하다³⁰). 이에 estrogen 중 하나인 Estradiol과 골 대사 관련 생화학적 표지자들의 수치를 혈청 내에서 측정하였다. 그 결과, TSE는 Estradiol을 제외한 골 대사의 생화학적 표지자들의 수치를 유의하게 개선하였다 (Fig. 4). Micro-CT는 골 연구에 많이 사용되는 방법으로 골의 손상이 적고 이미지 부문을 사용하기에 재구성이 쉽다는 장점이 있다^{31,32}). BMD는 골의 미네랄 함량과 골의 강도를 나타내고, Tb.Th과 Tb.sp는 해면골의 3D 이미지 구조를 평가하는데 사용되는 지표이다^{33,34}). 그렇기에 BMD, Tb.Th 및 Tb.sp는 OVX Rat 모델 평가 시 중요한 요인들로 볼 수 있다. 대퇴골의 micro-CT 분석 결과, TSE가 BMD, Tb.sp, Tb.Th 및 Tb.N 수치를 개선시키는 것으로 나타났다 (Fig. 5). 또한, TSE는 대퇴골 내 골 대사의 관련 유전자 (ALP, COL1, RANKL, OPG)의 발현을 농도 의존적으로 개선시켰으며, 특히 고농도 투여군인 OVX+TSE600군의 경우 ALP와 RANKL을 유의적으로 조절하였다 (Fig. 6). 이러한 결과는 TSE가 OVX Rat 모델의 골 교체율, 골 흡수 및 칼슘 손실 등을 개선시킬 수 있음을 시사한다.

OVX Rat 모델의 경우 난소적출로 인하여 자궁조직의 무게와 두께가 줄어들게 된다³⁵). 이에 실험이 종료된 후 자궁조직의 무게와 H&E 염색을 통해 두께를 측정하였다. 그 결과, TSE가 유의적이지는 않지만, 자궁조직의 무게와 두께를 증가시키는 것으로 나타났다 (Fig. 7). 또한, 투여 종료 2주 후 자궁 두께를 측정된 결과, 남아있는 TSE의 효능으로 자궁조직의 두께가 두꺼워지는 것으로 확인되었다 (Fig. 8). 자궁조직에서 estrogen은 estrogen receptor에 결합하여 주요한 구조 변화를 유도함으로써 ER α , ER β 와 같은 유전자를 조절하게 되는데, 갱년기가 나타나면 이를 감소시키게 된다^{36,37}). 이러한 변화로 인하여 자궁조직 내의 세포증식, 염증 발생 과정 등에 영향을 미치는 유전자들의 발현이 변할 수 있다. 이에 자궁조직 Western blot 분석 결과, TSE가 ER α , ER β , p-AKT, c-Jun, c-Fos 및 p-ERK의 발현을 농도 의존적으로 개선시키며, 특히 c-Fos를 제외하고 모든 인자의 발현 수준을 유의적으로 개선시키는 것을 보여주었다 (Fig. 9).

이러한 결과들을 종합해보면, TSE는 OVX Rat 모델에서 지단백 프로파일 및 골 대사 관련 요인들의 수치를 조절함으로써 여성의 갱년기 및 골다공증 관련 증상에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다. 그러나 본 실험은 주로 생리학적 지표에 초점을 맞추었으며, 다양한 생화학적 및 생리학적 지표를 고려한 종합적인 분석이 부족하다. 이에 분석된 효과의 원인과 결과 사이의 관계를 보다 명확히 파악하기 위해 추가적인 기전 연구가 필요할 것으로 보인다.

였다.

1. 실험 기간 체중을 측정한 결과, 모든 투여군에서 유의하지는 않지만, 체중이 감소하는 경향이 나타났다.
2. 실험 종료 후, 혈청 내 간 손상 지표인 GOT, GPT를 측정한 결과, 갱년기로 인해 증가한 GOT의 수치를 TSE가 유의적으로 감소하였으며, GPT의 경우 유의적이지는 않지만, 농도 의존적인 감소하는 것을 확인하였다.
3. 혈청 내 지단백 프로파일의 수치를 측정한 결과, TSE가 갱년기로 인하여 증가한 TG, TC, LDL-cholesterol 및 glucose 수치를 유의적으로 감소하였다.
4. 혈청 내 골 대사의 생화학적 표지자들의 수치를 측정한 결과, TSE가 Estradiol과 골 대사의 생화학적 표지자들의 수치를 유의하게 개선시키는 것을 확인하였다.
5. 자궁조직 H&E 염색 결과, 난소적출로 줄어든 자궁 두께를 TSE가 개선시켰다. 또한, 투여 종료 2주 후 자궁 두께를 측정한 결과, 남아있는 시료의 효능으로 자궁의 두께가 두꺼워지는 것으로 확인되었다.
6. 자궁조직 Western blot 분석 결과, TSE가 ER α , ER β , p-AKT, c-Jun, c-Fos 및 p-ERK의 발현을 농도 의존적으로 개선되었으며, 특히 c-Fos를 제외하고 모든 인자의 발현 수준을 유의적으로 개선시키는 것을 확인하였다.
7. 대퇴골 micro-CT 분석 결과, 난소적출로 손실된 대퇴골을 TSE가 유의적이지는 않지만 개선하는 경향을 확인하였다.
8. 대퇴골 내 골 대사의 관련 유전자들 (ALP, COL1, RANKL, OPG)의 발현을 분석한 결과, TSE가 농도 의존적으로 개선하는 것을 확인하였으며, 특히 고농도 투여군인 OVX+TSE600군은 ALP와 RANKL을 유의적으로 조절하였다.

결론적으로 TSE가 OVX 모델의 혈청, 자궁조직 및 대퇴골에서 농도 의존적으로 골 대사 관련 요인들을 조절함으로써 갱년기 증상을 개선하였다. 또한, TSE 투여 시 갱년기로 증가한 체중을 미약하게 감소시켰지만, 혈청 내 지단백 프로파일의 수치를 유의하게 조절함으로써 골다공증, 심혈관 질환 및 갱년기 증상 완화에 도움을 주는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 성과물은 2024년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단(No. 2018R1A5A2025272)과 주영엔에스(주)의 지원에 의해 수행되었습니다.

V. 결 론

본 연구에서는 OVX Rat 모델에 TSE를 투여하여 갱년기 개선 효과를 확인했으며, 다음과 같은 유의한 결과를 확인하

References

1. Koebele SV, Bimonte-Nelson HA. Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. *Maturitas*. 2016;87:5–17. doi: 10.1016/j.maturitas.2016.01.015.
2. Seo TS, Jang EJ, Kim JJ, Kim HS, Koo JS. Evaluation of Efficacy for Menopausal Syndrome with Natural Dyed Apparel. *Kor. J. Herbol*. 2006;21(3):97–102. doi: 10.6116/kjh.2017.32.6.31.
3. Hybholt M. Psychological and social health outcomes of physical activity around menopause: A scoping review of research. *Maturitas*. 2022;164:88–97. doi: 10.1016/j.maturitas.2022.07.014.
4. Yang XP, Reckelhoff JF. Estrogen, hormonal replacement therapy and cardiovascular disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2011;20(2):133–8. doi: 10.1097/MNH.0b013e3283431921.
5. Lee JH, Lee S, Nguyen QN, Phung HM, Shin MS, Kim JY, Choi H, Shim SH, Kang KS. Identification of the Active Ingredient and Beneficial Effects of *Vitex rotundifolia* Fruits on Menopausal Symptoms in Ovariectomized Rats. *Biomolecules*. 2021;11(7):1033–45. doi: 10.3390/biom11071033.
6. Kang EY, Kim HK, Jung JY, Kim JH, Woo TK, Choi JI, Kim JH, Ahn C, Lee HG, Go GW. Combined Extract of *Leonurus japonicus* Houtt, *Eclipta prostrata* L., and *Pueraria lobata* Ohwi Improved Hot Flashes and Depression in an Ovariectomized Rat Model of Menopause. *Foods*. 2021;10(1):180–92. doi: 10.3390/foods10010180.
7. Roepke TA, Ronnekleiv OK, Kelly MJ. Physiological consequences of membrane-initiated estrogen signaling in the brain. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011;16(4):1560–73. doi: 10.2741/3805.
8. Hua H, Zhang H, Kong Q, Jiang Y. Mechanisms for estrogen receptor expression in human cancer. *Exp Hematol Oncol*. 2018;7:24–34. doi: 10.1186/s40164-018-0116-7.
9. Colditz GA, Hankinson SE, Hunter DJ, Willett WC, Manson JE, Stampfer MJ, Hennekens C, Rosner B, Speizer FE. The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med*. 1995;332(24):1589–93. doi: 10.1056/NEJM199506153322401.
10. Flores VA, Pal L, Manson JE. Hormone Therapy in Menopause: Concepts, Controversies, and Approach to Treatment. *Endocr Rev*. 2021;42(6):720–52. doi: 10.1210/edrv/bnab011.
11. Hashemzadeh M, Haseefa F, Peyton L, Park S, Movahed MR. The effects of estrogen and hormone replacement therapy on platelet activity: a review. *Am J Blood Res*. 2022;12(1):33–42. PMID: 35291255.
12. Aswar U, Bodhankar SL, Mohan V, Thakurdesai PA. Effect of furostanol glycosides from *Trigonella foenum-graecum* on the reproductive system of male albino rats. *Phytother Res*. 2010;24(10):1482–8. doi: 10.1002/ptr.3129.
13. Seo BI. A Efficacy of *Trigonellae Semen* On Treatment of Osteoporosis In Ovariectomized Rats. *Kor. J. Herbol*. 2006;21(3):97–102.
14. Kadaikunnan S, Rejiniemon TS, Alharbi NS, Khaled JM, Agastian P. Identification and quantification of phenolic compounds from *Trigonella foenum-graecum* L and its in-vitro antioxidant, anticancer and antimicrobial activities. *Fresenius Environ Bull*. 2015;24(8A):2643–49.
15. Lohvina H, Sándor M, Wink M. Effect of Ethanol Solvents on Total Phenolic Content and Antioxidant Properties of Seed Extracts of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) varieties and determination of phenolic Composition by HPLC–ESI–MS. 2022; 14(1):7–27. doi:10.3390/d14010007.
16. Kim H, Cha K, Kim D, Kim H, Koo N, Oh SH. Ameliorating effect of *Trigonella foenum-graecum* seed extract on andropause symptoms via increased testosterone. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2019; 48(2):161–9. doi:10.3746/jkfn.2019.48.2.161.
17. Deshpande P, Mohan V, Ingavale D, Mane J, Pore M, Thakurdesai PhD P. Preclinical Safety Assessment of Furostanol Glycoside-Based Standardized Fenugreek Seed Extract in Laboratory Rats. *J Diet Suppl*. 2017;14(5):521–41. doi: 10.1080/19390211.2016.1272659.
18. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18(6):499–502. PMID: 4337382.
19. Lillie RD, Pizzolato P, Donaldson PT. Nuclear stains with soluble metachrome metal mordant dye lakes. The effect of chemical endgroup blocking reactions and the artificial introduction of acid groups into tissues. *Histochemistry*. 1976;49(1): 23–35. doi: 10.1007/BF00490123.
20. Komatsu S. Extraction of nuclear proteins. *Methods Mol Biol*. 2007;355:73–7. doi: 10.1385/1-59745-227-0:73.
21. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001;25(4):402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
22. Lee S, Jung DH, Park M, Yeon SW, Jung SH, Yun SI, Park HO, Yoo W. The Effect of *Lactobacillus*

- gasseri BNR17 on Postmenopausal Symptoms in Ovariectomized Rats. *J Microbiol Biotechnol*. 2021; 31(9):1281–7. doi: 10.4014/jmb.2105.05032.
23. Kim MR, Yang CH, Seo BI. Effects of Safflower Seeds on Bone Mineral Density in Ovariectomy – Induced Postmenopausal Osteoporotic Rats. *Kor. J. Herbol*. 1998;13(2):37–43.
 24. Lee GH, Hoang TH, Lee HY, Lim YJ, Kim JH, Jung SJ, Chae SW, Rashid MMU, Chae HJ, Yoon SJ. Ramie leaf Extract Alleviates Bone Loss in Ovariectomized Rats–The Involvement of ROS and Its Associated Signalings. *Nutrients*. 2023;15(3): 745–58. doi: 10.3390/nu15030745.
 25. Katsuta O, Hiratsuka H, Matsumoto J, Tsuchitani M, Umemura T, Marumo F. Ovariectomy enhances cadmium–induced nephrotoxicity and hepatotoxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1993;119(2): 267–74. doi: 10.1006/taap.1993.1068.
 26. Gouda HN, Sagoo GS, Harding AH, Yates J, Sandhu MS, Higgins JP. The association between the peroxisome proliferator–activated receptor–gamma2 (PPARG2) Pro12Ala gene variant and type 2 diabetes mellitus: a HuGE review and meta–analysis. *Am J Epidemiol*. 2010;171(6):645–55. doi: 10.1093/aje /kwp450.
 27. Mukaiyama K, Kamimura M, Uchiyama S, Ikegami S, Nakamura Y, Kato H. Elevation of serum alkaline phosphatase (ALP) level in postmenopausal women is caused by high bone turnover. *Aging Clin Exp Res*. 2015;27(4):413–8. doi: 10.1007/s40520–014– 0296–x.
 28. Ji MX, Yu Q. Primary osteoporosis in postmenopausal women. *Chronic Dis Transl Med*. 2015;1(1):9–13. doi: 10.1016/j.cdtm.2015.02.006.
 29. Houillier P, Froissart M, Maruani G, Blanchard A. What serum calcium can tell us and what it can't. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(1):29–32. doi: 10.1093/ndt/gfi268.
 30. Shih HY, Lu JH, Xiong AH, Tse JM, Wong BS. Topical application of the plant extract SDDL–E in ovariectomized rats: A potential new approach for treating osteoporosis. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:988235. doi: 10.3389/fmed.2022.988235.
 31. Ito M. Recent progress in bone imaging for osteoporosis research. *J Bone Miner Metab*. 2011; 29(2):131–40. doi: 10.1007/s00774–010–0258–0.
 32. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldborg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro–computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010; 25(7):1468–86. doi: 10.1002/jbmr.141.
 33. Parkinson IH, Fazzalari NL. Interrelationships between structural parameters of cancellous bone reveal accelerated structural change at low bone volume. *J Bone Miner Res*. 2003;18(12):2200–5. doi: 10.1359/jbmr.2003.18.12.2200.
 34. Park SB, Lee YJ, Chung CK. Bone mineral density changes after ovariectomy in rats as an osteopenic model : stepwise description of double dorso–lateral approach. *J Korean Neurosurg Soc*. 2010;48(4): 309–12. doi: 10.3340/jkns.2010.48.4.309.
 35. Zingue S, Michel T, Nde CBM, Njuh AN, Cisilotto J, Ndinteh DT, Clyne C, Fernandez X, Creczynski–Pasa TB, Njamen D. Estrogen–like and tissue–selective effects of 7–methoxycoumarin from *Ficus umbellata* (Moraceae): an in vitro and in vivo study. *BMC Complement Altern Med*. 2017;17(1): 383–95. doi: 10.1186/s12906–017–1895–9.
 36. Sun W, Sun Y, Zhu M, Wang Z, Zhang H, Xin Y, Jiang G, Guo X, Zhang Z, Liu Y. The role of plasma cell–free DNA detection in predicting preoperative chemoradiotherapy response in rectal cancer patients. *Oncol Rep*. 2014;31(3):1466–72. doi: 10.1245/ s10434–011–1638–y.
 37. Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, Gray J, Tan EM. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp Cell Res*. 1986;166(1):209–19. doi: 10.1016/0014–4827(86) 90520–3.