

누에(*Bombyx mori*) 번데기 및 한약재의 *In Vitro* 에스트로젠 활성

양지원¹ · 최은미¹ · 권무길² · 구성자^{1*}

¹경희대학교 식품영양학과, ²근화제약 중앙연구소

In Vitro Estrogenic Activity of Silkworm (*Bombyx mori*) Pupa and Herbs

Ji-Won Yang¹, Eun-Mi Choi¹, Mu-Gil Kwon² and Sung-Ja Koo[†]

¹Dept. of Food Nutrition, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

²Kunwha Pharmaceutical Co., Ltd., Gongju 314-821, Korea

Abstract

In this study we report on the estrogen activity of silkworm pupa and herb extracts *in vitro*. The estrogenic activity of these resources was investigated by competition binding assays with estrogen receptor α (ER α) or ER β , and viability of MCF-7 cells, a human breast cancer cell line. Saturation ligand-binding analysis of ER α and ER β revealed that all plant extracts competed with estrogen ligand for binding to both ER subtypes with a similar preference and degree and competed stronger with ligand for binding to ER β than to ER α . The highest ER α -binding sample was silkworm pupa aqueous extract. The highest ER β -binding sample was silkworm pupa oil. These samples were further tested for bioactivity based on their ability to regulate cell growth rate in ER(+) breast cancer cell line, MCF-7 cells. Our studies showed that silkworm pupa, soritae, sesame, yam, pueraria, malt, ginseng, *Polygonum multiflorum*, and *Curcuma longa* significantly stimulated the growth of MCF-7 cells ($P < 0.05$). In summary, these results suggested that silkworm pupa and herbs might be useful as potential phytoestrogens.

Key words : Estrogen receptor, MCF-7 cells, silkworm pupa, herb.

서 론

Estrogen은 난소에서 분비되는 스테로이드계 여성 호르몬으로 여러 표적 장기에서 그 기능이나 세포의 성장 및 분화에 관여하는 중요한 호르몬 중의 하나이다(Muldoon TG 1981). 다른 스테로이드 호르몬과 마찬가지로 표적 세포(target cell)의 세포질 속에 있는 수용체와 결합하여 핵으로 옮겨지고 세포의 기능을 조절한다. Estrogen의 표적 장기로는 유선, 자궁, 난소 및 고환과 전립선을 포함한 여성 및 남성의 생식 기관들과 뇌이다(Ruff *et al* 1997). 그 작용으로는 자궁의 발달, 자궁 내막 및 질점막의 발달, 그 밖의 2차 성징의 촉진, 지방 합성의 증가, 간 기능과 골 대사로의 영향 등이 있다(Williams JP 1997). Estrogen은 세포내 estrogen receptor (ER)에 결합하여 gene 발현을 조절하고 이는 여러 target 조직의 성장, 분화 및 기능에 영향을 준다. 1995년까지 estrogen은 하나의 receptor(ER α)를 통해 작용한다고 생각했으나 이후 새로운 estrogen receptor subtype(ER β)이 쥐 전립선으로부터 분리되었다(George *et al* 1996). 이 두 receptor subtype의

조직 분포는 서로 다르다. ER- α 는 자궁에서 다량 발현되고, 고환, 뇌하수체, 난소, 신장, 부고환, 부신에서 소량 발현되는 반면, ER- β 는 전립선, 난소, 부신, 비장, 폐, 담낭, 뇌, 고환, 유방, 뼈에서 많이 발현된다(Ruff *et al* 1997). ER α 와 ER β 모두는 중추 신경계, 유방, 심 혈관계 및 뼈에 공존한다.

최근 연구에서 콩에 존재하는 phytoestrogen이 풍부한 식사가 동양 여성의 압 발생과 hot flash를 감소시킨다고 보고되었고(Ruff *et al* 1997) 신혈관 생성 작용, 항 산화 작용 등 생리적 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Fotsis *et al* 1993). 인삼은 MCF-7 breast cancer cell에서 estrogen-regulated gene인 pS2 발현을 유도한다고 보고되었고 감초는 estrogen 및 anti-estrogen 활성 모두 갖는다고 보고되었다(Tsai & O'Malley 1994). 또한 콩류, 씨앗, 해조류에 대한 estrogen 활성 검색에 대한 연구가 보고된 바 있다(Grandien *et al* 1997). 본 연구에서는 누에 번데기 추출물 및 식용 식물 29 종을 대상으로 MCF-7 cell proliferation assay와 estrogen receptor binding assay를 수행하여 *in vitro*에서 estrogen 활성을 비교하였다.

[†] Corresponding author : Sung-Ja Koo, Tel : +82-2-961-0709, Fax : +82-2-968-0260, E-mail : sjkoo@khu.ac.kr

1. 재 료

본 실험에 사용된 누에 번데기(silkworms) 수용성 추출물 및 지용성 추출물은 근화제약(대전)에서 제공받았고 식용식물 29종은 건조된 것으로 경동시장에서 구입하였다. 표준물질로는 17 β -estradiol(E2)(Sigma Chem. Co., USA)을 사용하였고, 추출용 에탄올은 Merck Co(Damstandt, Germany)의 제품을 사용하였다.

2. 시료의 추출

누에 번데기 추출물은 암·수 구별 없이 12~13일째 번데기를 1 kg을 채취하여 믹서기에 분쇄하고 80% EtOH에 2시간 동안 1차 추출한 후 여과하여 Evaporator로 농축하였다. 그 다음 정제수로 80℃에서 500 mL로 두 번 추출 후 여과하여 동결 건조하여 사용하였다. 식용 식물 29종의 후보물질은 잘 건조된 분말 0.2 kg씩을 80% EtOH에 이틀 동안 실온에 방치한 후에 추출하여 여과하고 여액을 감압 농축한 후 동결 건조하여 시료로 사용하였다. 추출물의 수율은 Table 1과 같다.

Table 1. Yield of samples

No.	Sample name	Scientific name	Yield (w/w, %)
1	Silkworm pupa (aqueous extract)	<i>Bombyx mori</i> (silkworm)	0.9
2	Silkworm pupa oil	<i>Bombyx mori</i>	0.8
3	Soybean	<i>Glycine max</i>	13.6
4	Black soybean	<i>Phaseolus vulgris</i>	17.4
5	Somoktae	<i>Rhynchosia molubilis</i>	12.8
6	Soritae	<i>Phaseolus vulgaris</i>	11.2
7	Yam	<i>Dioscorea batatas</i>	30.3
8	Pueraria root	<i>Pueraria thunbergiana</i> .	25.9
9	Pomegranate	<i>Punica granatum</i>	53.0
10	Malt	<i>Barley malt</i>	9.3
11	White rice	<i>Oryza sativa</i> , white rice	0.7
12	Brown rice	<i>Oryza sativa</i> , brown rice	1.2
13	Black rice	<i>Oryza sativa</i> , black rice	3.4
14	White sesame	<i>Sesamum indicum</i>	14.6
15	Black sesame	<i>Sesamum indicum</i> , black sesame	12.7
16	Walnut	Walnut (<i>Juglans regia</i>)	5.3
17	Sunflower seed	Sunflower (<i>Helianthus annuus</i>) seed	7.9
18	Keaji	<i>Cinnamomum cassia</i>	3.4
19	Bokbunja	<i>Rubus coreanus</i>	10.9
20	Cottonseed	<i>Gossypium indicum</i>	6.0
21	Gukeeja	<i>Lycium chinese</i>	31.9
22	Duchung	<i>Eucommia ulmoides</i>	13.6
23	Ginseng	<i>Panax ginseng</i>	28.4
24	Hasuo	<i>Polygonum multiflorum</i>	9.5
25	Haungkeum	<i>Scutellaria baicalensis</i>	22.2
26	Sohoehyang	<i>Foeniculum vulgare</i>	6.0
27	Sukjihaung	<i>Rehmannia glutinosa</i>	50.6
28	Omija	<i>Schizandra chinensis</i>	26.4
29	Danggui	<i>Angelica acutilobae</i>	30.2
30	Baekchul	<i>Atractylodes japonica</i> Koidz	3.8
31	Ulkeum	<i>Curcuma longa</i>	8.6

3. 세포배양

MCF-7 human breast cancer cell line은 한국 세포주 은행(서울대학교 의과대학)에서 분양 받아 계대배양하여 실험에 사용하였다. MCF-7 세포주는 polystyrene 세포배양 접시에 부착시키고, 5% FBS(Gibco, USA)와 penicillin-streptomycin(Gibco, USA)이 함유된 phenol red-free DMEM(Gibco, USA)을 사용하여 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양하였다. 배양된 세포는 3~4일마다 배양액을 교환하고, 1주일마다 0.25% trypsin으로 세포를 분리하여 원심분리(1,500 rpm, 5 min)한 후 일정 수 분할하여 계속 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

4. Charcoal Dextran 처리된 FBS의 조제

Fetal bovine serum(FBS)는 estrogen 활성을 최소화시키기 위해 charcoal-dextran(CD)로 처리하였다(Kim *et al* 1997). 활성화된 charcoal은 사용하기 전에 차가운 멸균증류수로 씻고 5%량의 charcoal은 유리로 된 원심분리 tube에 넣고 증류된 물은 채운 후 혼합액을 250 rpm으로 2분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 멸균된 증류수를 채웠다. 이 과정을 3회 반복하고 난 후 0.5%의 dextran을 함유한 혼합액을 600 rpm으로 5분간 원심 분리하고 상층액을 제거한 후 suspension과 동일한 양의 FBS를 넣어 37°C에서 한 시간 동안 shaking시켰다. 혼합물을 3,000 rpm에 20분간 원심분리 후 상층액을 새로운 tube에 담아 3,000 rpm에 20분간 원심분리하고 5% charcoal-0.5% dextran이 포함된 FBS를 살균된 0.45 μm, 0.2 μm 필터로 여과하여 -20°C에서 저장한 후 사용하였다.

5. MCF-7 세포의 증식 측정

시료 추출물은 dimethylsulfoxide(DMSO, Sigma Chem, CO.)에 최종 농도가 0.05%가 되도록 녹이고 filter(0.22 μm pore size, Millipore)로 여과 멸균하여 사용하였다. 양성 대조군은 17β-estradiol(E2)을 시료 추출물과 마찬가지로 DMSO에 녹여 성인 여성의 estrogen 혈중 농도 40~80 pg/mL(0.15~0.3×10⁻⁹ M)를 기준으로 하여 10⁻⁹~10⁻⁶ M의 농도로 사용하였다. 시료 추출물의 농도는 예비 실험을 통하여 결정한 250, 62.5, 15.6, 3.90 μg/mL로 하여 실험하였다. Phenol red-free DMEM에 5% dextran-coated charcoal-stripped FBS(DCC-FBS)와 penicillin-streptomycin(test media)을 희석시켜 96 well plate에 0.5×10⁴ cell/well의 농도로 분주하고 5% CO₂, 37°C incubator에서 24시간 pre-incubation한 후 시료 추출물, E2를 농도별로 투여하여 5일간 배양하였다. 각각의 well에 MTT시약을 30 μL/well의 농도로 첨가하고 2시간 30분 동안 37°C에서 배양하여 MTT가 formazan으로 분해되도록 하였고 그 양은 ELISA Reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. 흡광도는 MTT가 세포에 의해 formazan

으로 분해된 양을 나타내므로 각 well의 생존 세포 수와 비례한다. 각 시료에 대한 세포 증식 증가 효과는 3회 반복 실험하여 평균값을 취하였고, 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도에 대한 시료군의 흡광도의 비를 백분율로 표시하고 그래프로 비교 분석하였다.

6. Estrogen Receptor Binding 측정

Estrogen Receptor(α, β) Competitor Assays Red Kit (PanVera, USA)를 사용하여 ER binding 측정을 실험하였다. ER competitor assay는 ERα와 ERβ ligand를 screening하는 효율적인 방법으로서 ER이 fluorescent estrogen ligand에 첨가되어 ER/FluormoneTM EL red complex가 형성된 후 시료가 첨가되면 ER에 결합하기 위해 ER/FluormoneTM EL red complex와 경쟁하게 된다. 만일 시료가 ER과의 결합능이 적으면 ER/FluormoneTM EL red complex가 그대로 남아있어 ER/FluormoneTM EL red complex의 형광도는 높은 값을 나타낼 것이고 ER에 경쟁적으로 결합하는 시료는 ER에서 ER/FluormoneTM EL red ligand를 대신하여 결합하게 되어 그 형광도는 빠르게 감소할 것이다. 따라서 시료가 존재할 때 형광도의 변화가 ER에 대한 시료의 상대적인 친화도를 측정하는데 사용된다. Competition curve를 작성하기 위해 희석된 농도별 시료에 ER/FluormoneTM EL red complex를 첨가하고 시료 농도에 따른 형광도 값을 측정한다. 최대 형광도의 절반이 되는 농도를 시료의 IC₅₀으로 정의한다. Sample은 4%가 넘지 않는 DMSO에 섞어 ER Red Assay Buffer에 희석시킨다. 유리 tube에 ERα는 30 nM, ERβ는 60 nM, 그리고 FluormoneTM EL Red는 2 nM 농도로 맞춰 ER Red Assay Buffer로 희석한다. 희석된 sample을 black 384 well plate에 20 μL 넣고 만들어 놓은 ERα, ERβ를 각각 20 μL 섞어서 암실에 37°C, 1~18시간 방치시키고 난 후 535 nm excitation, 590 nm emission의 조건으로 Fluorescence(TECAN, UK)을 측정하였다. 약물 대조군으로는 17β-estradiol을 사용하였다.

7. 통계분석

모든 실험 결과의 통계처리는 SAS 통계 프로그램을 이용하여 분석하였으며, 그 결과는 평균값과 표준오차로 표시하고 통계적 유의성($P < 0.05$)은 ANOVA로 검증하였다.

결과 및 고찰

1. MCF-7 세포 증식 효과

Estrogen 활성을 평가하기 위해 MCF-7 cell에서 세포 증식 효과에 대해 실험한 결과는 Table 2와 같다. 각각의 시료의 농도는 4, 15.6, 62.5, 250 μg/ml로 하여 비교 분석하고 대

Table 2. MCF-7 cell proliferation assay

Sample	Conc.($\mu\text{g/mL}$)	Proliferation (%)	Sample	Conc.($\mu\text{g/mL}$)	Proliferation (%)
Control	0	100.00 \pm 0.68	E2	10 ⁻⁹ M	162.53 \pm 9.19
Silkworm (aqueous)	4	132.56 \pm 0.43*	Brown rice	4	98.442 \pm 1.61
	15.6	128.23 \pm 0.80*		15.6	81.548 \pm 3.24
	62.5	121.87 \pm 1.57		62.5	91.809 \pm 5.33
	250	104.24 \pm 3.69		250	27.547 \pm 2.21
Silkworm (fat soluble)	4	101.76 \pm 1.41	Black rice	4	87.791 \pm 6.47
	15.6	100.49 \pm 0.61		15.6	86.040 \pm 0.78
	62.5	86.720 \pm 0.17		62.5	78.522 \pm 4.64
	250	85.640 \pm 0.26		250	71.855 \pm 3.62
Soybean	4	111.52 \pm 4.00	White sesame	4	97.468 \pm 1.20
	15.6	105.96 \pm 6.02		15.6	96.787 \pm 6.43
	62.5	100.00 \pm 6.69		62.5	117.48 \pm 2.49*
	250	84.280 \pm 3.26		250	27.157 \pm 2.41
Black soybean	4	104.49 \pm 0.43	Black sesame	4	95.128 \pm 4.96
	15.6	103.52 \pm 0.83		15.6	89.654 \pm 1.11
	62.5	100.88 \pm 0.54		62.5	92.382 \pm 2.00
	250	78.030 \pm 6.34		250	95.904 \pm 1.81
Somoktae	4	98.050 \pm 0.54	Walnut	4	82.324 \pm 8.37
	15.6	81.640 \pm 4.48		15.6	100.59 \pm 0.52
	62.5	74.320 \pm 3.87		62.5	57.910 \pm 2.98
	250	66.110 \pm 4.10		250	56.934 \pm 0.87
Soritae	4	117.97 \pm 1.36*	Sunflower seed	4	104.39 \pm 0.52
	15.6	116.21 \pm 0.26		15.6	95.701 \pm 2.54
	62.5	102.44 \pm 0.70		62.5	94.825 \pm 1.25
	250	78.710 \pm 7.83		250	92.994 \pm 0.61
Yam	4	109.18 \pm 0.52	Keaji	4	102.34 \pm 0.85
	15.6	114.06 \pm 1.64*		15.6	93.958 \pm 1.95
	62.5	114.55 \pm 2.64*		62.5	92.195 \pm 0.76
	250	112.79 \pm 5.44		250	83.270 \pm 1.52
Pueraria root	4	117.97 \pm 1.02*	Bokbunja	4	96.884 \pm 2.39
	15.6	106.45 \pm 1.86		15.6	96.780 \pm 1.41
	62.5	103.03 \pm 0.99		62.5	96.392 \pm 3.74
	250	127.73 \pm 5.37		250	85.948 \pm 7.04
Pomegranate	4	100.49 \pm 4.93	Cotton seed	4	112.40 \pm 0.52
	15.6	94.635 \pm 2.22		15.6	91.112 \pm 1.38
	62.5	55.765 \pm 3.47		62.5	88.874 \pm 0.54
	250	83.898 \pm 0.85		250	95.312 \pm 4.05
Malt	4	107.42 \pm 0.43*	Gukeeja	4	100.39 \pm 3.90
	15.6	100.68 \pm 5.47		15.6	95.214 \pm 0.45
	62.5	100.20 \pm 1.03		62.5	95.312 \pm 2.98
	250	101.66 \pm 1.63		250	100.00 \pm 3.48
White rice	4	97.666 \pm 0.68	Duchung	4	97.095 \pm 1.87
	15.6	78.813 \pm 3.01		15.6	109.67 \pm 1.15
	62.5	75.783 \pm 5.19		62.5	108.32 \pm 1.86
	250	43.851 \pm 2.54		250	31.746 \pm 3.65

Table 2. Continued

Sample	Conc.($\mu\text{g/mL}$)	Proliferation (%)	Sample	Conc.($\mu\text{g/mL}$)	Proliferation (%)
Ginseng	4	120.31 \pm 0.70*	Omija	4	96.134 \pm 3.29
	15.6	109.96 \pm 1.87		15.6	101.35 \pm 2.35
	62.5	98.632 \pm 0.45		62.5	102.80 \pm 1.58
	250	97.851 \pm 6.38		250	102.32 \pm 2.19
Hasuo	4	110.94 \pm 2.16	Danggui	4	108.22 \pm 1.65
	15.6	109.38 \pm 2.00*		15.6	107.74 \pm 3.44
	62.5	100.00 \pm 4.31		62.5	108.03 \pm 7.54
	250	92.584 \pm 2.49		250	38.201 \pm 0.84
Haungkeum	4	108.03 \pm 1.65	Baekchul	4	108.20 \pm 3.42
	15.6	102.32 \pm 2.19		15.6	106.05 \pm 4.69
	62.5	57.061 \pm 1.93		62.5	65.145 \pm 5.03
	250	49.235 \pm 0.54		250	58.117 \pm 6.69
Sohochyang	4	78.810 \pm 2.95	Ulkeum	4	118.75 \pm 0.39*
	15.6	73.541 \pm 3.84		15.6	114.65 \pm 1.53*
	62.5	74.413 \pm 4.70		62.5	107.91 \pm 2.30
	250	39.456 \pm 0.85		250	101.76 \pm 5.30
Sukjihaung	4	106.93 \pm 5.42			
	15.6	104.69 \pm 3.05			
	62.5	100.59 \pm 1.70			
	250	92.291 \pm 1.06			

The results are expressed as mean \pm SEM ($n=6$). Statistical analysis was performed using ANOVA followed by Dunnett's *t*-test. *: $p<0.05$.

조군의 세포 증식을 100%로 환산하여 이에 각 시료군의 성장 비율로 나타내었다. 대조군은 단지 5% 활성탄과 텍스트란을 전처리한 5% 우혈청을 포함하는 배지만을 이용하여 배양하였다. 약물 대조군인 17 β -estradiol은 농도 10⁻⁹ M에서 162.53%로 가장 많은 증식 효과를 가졌다. 누에 번데기 수용성 추출물은 대조군에 비해 모두 유의적으로 세포 증식을 증가시켰으며 증식 증가 최대치는 4 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 132.56%이었다. 누에 번데기 지용성 추출물은 농도 4, 15.6 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 101.76, 100.49% 세포 증식을 시켰으나 농도 62.5, 250 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 세포 증식 억제 효과를 나타내었다. 대두 에탄올 추출물과 흑태 에탄올 추출물은 농도 250 $\mu\text{g/mL}$ 에서 세포 증식 억제 효과를 나타내었고 나머지 농도에서는 세포 증식 효과를 나타내었다. 쥐눈이콩 에탄올 추출물에서는 모든 농도에서 세포 증식 억제 효과를 나타내었다. 서리태 에탄올 추출물은 농도 4, 15.6, 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 에서 세포 증식 효과를 나타내었다. 그 중 농도 4 $\mu\text{g/mL}$ 에서 증식율이 117.97%로 대조군에 비해 유의적으로 세포 증식을 시켰다. 마 에탄올 추출

물에서는 각 농도에서 모두 세포 증식 효과를 나타내었으며 대조군에 비해 농도 15.6 $\mu\text{g/mL}$ 과 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 에서 유의적인 세포 증식 효과를 보였다. 갈근 에탄올 추출물은 모든 농도에서 세포 증식 효과를 나타내었고 농도 4 $\mu\text{g/mL}$ 와 250 $\mu\text{g/mL}$ 에서 대조군에 비해 유의적인 세포 증식 효과를 나타냈다. 석류 에탄올 추출물은 농도 4 $\mu\text{g/mL}$ 에서 세포 증식 효과를 나타내었다. 맥이는 모든 농도에서 세포 증식 효과를 가졌으며 최대 세포 증식 효과는 농도 4 $\mu\text{g/mL}$ 에서 나타났다. 백미, 현미, 흑미 에탄올 추출에서는 모두 세포 증식 억제 효과를 나타내었다. 참깨 에탄올 추출물에서는 대조군에 비해 농도 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 에서 117.48%로 유의적인 세포 증식 효과를 가졌으며 나머지 농도에서는 세포 증식 억제 효과를 나타내었다. 검은깨 에탄올 추출물에서는 모두 세포 증식 억제 효과를 보였으며 호두와 해바라기씨 에탄올 추출물에서는 각각 농도 15.6 $\mu\text{g/mL}$ 과 4 $\mu\text{g/mL}$ 에서 100.59%, 104.39%의 세포 증식 효과를 보였으며 나머지 농도에서는 세포 증식 억제 효과를 보였다. 계지 에탄올 추출물에서는 농도 4 $\mu\text{g/mL}$ 에

서 102.34%의 세포 증식 효과를 보였고 복분자에서는 모든 농도에서 세포 증식 억제 효과를 보였다. 목화씨 에탄올 추출물은 농도 4 $\mu\text{g/mL}$ 에서 112.40%의 세포 증식 효과를 보였다. 인삼 에탄올 추출물의 경우, 농도 4 $\mu\text{g/mL}$ 에서 120.31%으로 대조군에 비해 유의적으로 세포 증식 효과를 보였으며 농도 15.6 $\mu\text{g/mL}$ 에서 109.96%의 세포 증식률을 보였다. 하수오 에탄올 추출물에서 농도 250 $\mu\text{g/mL}$ 를 제외하고 모두 세포 증식 효과를 보였으며 농도 15.6 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 대조군에 비해 유의적이었다. 황금 에탄올 추출물은 농도 4 $\mu\text{g/mL}$ 와 15.6 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 108.03%, 102.32%의 세포 증식 효과를 가졌다. 소회향 에탄올 추출물의 모든 농도에서는 세포 억제 효과를 가졌다. 숙지황 에탄올 추출물의 농도 250 $\mu\text{g/mL}$ 를 제외한 모든 농도에서 세포 증식 효과를 보였으며 오미자 에탄올 추출물은 농도 4 $\mu\text{g/mL}$ 를 제외한 모든 농도에서 세포 증식 효과를 가졌다. 당귀 에탄올 추출물은 250 $\mu\text{g/mL}$ 를 제외한 나머지 농도에서 세포 증식 효과를 보였으며 백출 에탄올 추출물은 농도 4 $\mu\text{g/mL}$ 와 15.6 $\mu\text{g/mL}$ 에서 각각 108.20%, 106.05%의 세포 증식 효과를 가졌다. 울금 에탄올 추출물에서는 모두 세포 증식 효과를 가졌으며 농도 4 $\mu\text{g/mL}$ 와 15.6 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 118.75%와 114.65%로 대조군에 비해 유의적인 세포 증식 효과를 가졌다.

Chiu *et al* (2003)은 누에똥 25~400 $\mu\text{g/mL}$ 에서 세포 증식 효과를 보이고 Bodinet *et al* (2004)은 320 mg의 대두 추출물이 들어있는 약물을 10^3 배 희석하였을 때 가장 높은 세포 증식 효과를 보였다고 보고하였다. Rowlands *et al* (2002)은 soyasapogenol A가 농도 10 μM 에서 250%의 세포 증가 효과를 가졌다고 하며 Burow *et al* (2001)은 대두 추출물이 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 96%의 세포 증가율을 보였다고 하였다. Gilbert *et al* (1995)은 gossypol이 10 μM 에서 120%의 세포 증가 효과를 나타내었다고 보고하였다. Amato *et al* (2002)은 당귀 (1:500, 1/1000 희석 농도)와 인삼(1/500 희석 농도)이 정상대조군에 비해 세포 증식이 유의적으로 증가하였고 black cohosh와 licorice root는 유의적 변화가 없었다고 하였다. Duda *et al* (1999)은 인삼이 200 mg 농도에서 101%의 세포 증식 효과를 나타내었고 Budine *et al* (2002)은 black cohosh extract가 낮은 농도(10^{-8} ~ 10^{-6} g/mL)에서 세포 증식 효과를 가졌다고 하였으며 Kim *et al* (2002)은 석류씨 오일이 24시간 cell culture 후 높은 농도(320 $\mu\text{g/mL}$)에서 유의적으로 세포 증식이 증가되었다고 밝혔다. Stephen *et al* (2003)은 kudzu root, red clover blossom, sprout, mung bean sprout, alfalfa sprout extracts(100 $\mu\text{g/mL}$)가 positive control(17 β -Estradiol 0.1 nM)보다 높은 증식 효과를 보였다고 보고하였다. 송윤선(2000)은 프로폴리스 에탄올 추출물이 세포 증식을 0.8~4 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 증가시켰다고 보고하였다. 김인영

(2002)은 피레스로이드계 화합물(pyrethrum에서 나온 합성된 물질)이 10^{-7} M에서 세포 증식에 유의성을 가진다는 보고를 하였다. Tjep NB (2003)은 꾸지뽕나무가 20, 200 ng/mL에서 상백피는 200 ng/mL에서 세포 증식 효과를 가졌다고 하였다. 김경배(2002)는 *Puearia mirifica* 추출물이 2.5×10^3 ng/mL에서 가장 높은 세포 증식을 보였다고 보고하였다.

2. Estrogen Receptor Binding 효과

본 연구에서는 시료의 ER α 의 결합능을 estrogen Receptor Competitor Assays Red Kit를 사용하여 측정하였다. ER α 와 ER β 에 대한 시료의 결합능이 적으면 ER/FlurmononeTM EL red complex가 그대로 남아있어 ER/FlurmononeTM EL red complex의 형광도는 높은 값을 나타낼 것이고 ER α 와 ER β 에 경쟁적으로 결합하는 시료는 ER에서 ER/FlurmononeTM EL red ligand를 대신하여 결합하게 되어 그 형광도는 빠르게 감소하게 되는 원리를 바탕으로 희석된 농도별 시료에 ER/FlurmononeTM EL red complex를 첨가하고 시료 농도에 따른 형광도 값을 측정하여 최대 형광도의 절반이 되는 농도 시료의 IC₅₀ 값을 Table 3에 나타냈다. 시료의 ER α 결합능은 누에 번데기 지용성 추출물, 누에 번데기 수용성 추출물, E2, 백출, 석류, 해바라기씨, 인삼, 참깨, 백태, 서리태, 오미자, 하수오, 울금, 흑깨, 소회향, 현미, 목화씨, 당귀, 두충, 백미, 쥐눈이콩, 흑태, 맥아, 구기자, 황금, 숙지황, 흑미, 복분자, 계지, 호두, 마, 갈근의 순으로 IC₅₀ 값이 작게 나타났다. ER α 의 결합능은 누에 번데기 지용성 추출물이 IC₅₀ 8.6 $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 효과적으로 나타났으며 다음이 누에 번데기 수용성 추출물로 IC₅₀ 8.7 $\mu\text{g/mL}$ 이다. Boue *et al* (2003)의 연구에서 Kudzu root의 ER α binding assay 결과 IC₅₀이 110 $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었다고 하였으며 Gray *et al* (2004)의 실험에서는 고려 인삼 메탄올 추출물은 미국 인삼 수용성 추출물보다 높은 ER 결합력을 가졌다고 보고하였다. 송윤선(2001)의 실험에 따르면 프로폴리스 에탄올 추출물의 ER α binding 결합력을 살펴본 결과 IC₅₀이 9.14 $\mu\text{g/mL}$ 였다.

시료의 ER β 결합능은 누에 번데기 지용성 추출물, E2, 복분자, 누에 번데기 수용성 추출물, 계지, 흑태, 황금, 백출, 울금, 참깨, 백미, 숙지황, 해바라기씨, 석류, 인삼, 두충, 흑미, 갈근, 소회향, 목화씨, 맥아, 백태, 하수오, 호두, 흑깨, 쥐눈이콩, 당귀, 오미자, 마, 현미, 구기자, 서리태 순으로 ER β 결합능을 보였다. Gray *et al* (2004)의 실험에서는 고려 인삼이 메탄올과 물 추출물에서 둘 다 가장 높은 결합력을 보였고 Stephen *et al* (2003)의 실험 결과에서는 alfalfa sprout, red clover sprout, soybean, red clover blossom, kudzu root의 추출물의 경우 ER β binding 결합력의 IC₅₀값이 198, 130, 100, 37, 22 $\mu\text{g/mL}$ 의 순으로 높은 결합능을 가졌다고 한다. 본 연

Table 3. Estrogen receptor affinity assay of samples

Sample	IC ₅₀ * (μg/mL)		Sample	IC ₅₀ (μg/mL)	
	ERα	ERβ		ERα	ERβ
E2	9.13	0.17	Walnut	57.90	0.51
Slikworm water	8.70	0.27	Sunflower seed	13.58	0.47
Silkworm lipid	8.60	0.14	Keaji	54.57	0.32
Soybean	16.23	0.50	Bokbunja	42.66	0.23
Blacksoybean	30.36	0.37	Cotton seed	24.91	0.50
Somoktae	29.42	0.51	Gukeeja	33.46	2.67
Soritae	18.06	3.39	Duchung	26.00	0.48
Yam	77.63	0.53	Ginseng	15.41	0.48
Pueraria root	90.52	0.48	Hasuo	19.02	0.51
Pomegranate	13.27	0.47	haungkeum	33.57	0.40
Malt	33.43	0.50	Sohochyang	19.78	0.50
White rice	28.15	0.42	Sukjihaung	35.44	0.45
Brown rice	23.89	1.70	Omija	18.49	0.52
Black rice	35.94	0.48	Danggui	25.25	0.52
White sesame	16.13	0.42	Baekchul	12.52	0.41
Black sesame	19.51	0.51	Ulkeum	19.06	0.42

* The concentration of samples resulting in a half-maximal shift in polarization value equals its IC₅₀.

구의 결과 누에 번데기 추출물의 estrogen 활성이 다른 식용 식물에 비해 크다는 것을 알 수 있었다.

본 연구로부터 가장 우수한 estrogen 활성을 보인 누에 번데기 추출물은 생체 내에서 성호르몬의 주요 표적장기(생식 기관, 유방, 뼈, 뇌)에서 estrogen과 비슷한 작용을 나타내어 폐경 후 estrogen 결핍으로 인한 호르몬 불균형을 정상으로 회복할 뿐 아니라 미성숙한 여성의 estrogen 작용을 도와 유방 발육 및 성기능 정상화에 기여할 것으로 기대된다. 앞으로 누에번데기 추출물을 생체 내에 투여하여 그 기능과 작용 기전을 더 깊이 있게 연구할 필요가 있다.

요약 및 결론

누에 번데기 및 식용자원에서 제조한 에탄올추출물의 *in vitro* estrogen 활성을 측정한 결과는 다음과 같다. MCF-7 cell proliferation assay를 수행한 결과 시료 중 누에 번데기 수용성 추출물이 4 μg/mL 농도에서 132.56%로 정상 대조군에 비해 유의적으로 가장 높은 세포 증식 효과를 보였고 인삼은 4 μg/mL 농도에서, 하수오는 15.6 μg/mL 농도에서 울금은 4 μg/mL, 15.6 μg/mL 농도에서 대조군에 비해 유의적인 세포 증식 효과를 보였다. Estrogen receptor α와 β에 대한 시료의 상대

적인 친화도를 측정하기 위해 ER competitor assay를 수행한 결과 ERα와 ERβ에 대한 상대적인 친화도가 가장 높은 시료는 누에 번데기 지용성 추출물로서 ERα와 ERβ에 대한 IC값이 각각 8.6 μg/mL과 0.14 μg/mL로 나타났다. 그 다음으로 활성이 높은 시료는 누에 번데기 수용성 추출물로 ERα와 ERβ에 대한 IC값이 각각 8.7 μg/mL와 0.27 μg/mL로 나타났다. 이상의 *in vitro* assay 결과를 통하여 다양한 식용자원 중에서 누에 번데기 추출물이 비교적 높은 estrogen 활성을 가진 것으로 사료되었다.

감사의 글

이 논문은 교육인적자원부의 지원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임. (R08-2004-000-10006-0)

문헌

- Amato P, Christophe S, Pamela L. Mellon (2002) Estrogenic activity or herbs commonly used as remedies for menopausal symptoms. *Menopause* 9: 145-150.
- Bodinet C, Freudenstein J (2002) Influence of *Cimicifuga*

- racemosa* on the proliferation of estrogen receptor-positive human breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* 76: 1-10.
- Bodinet C, Freudenstein J (2004) Influence of marketed herbal menopause preparations on MCF-7 cell proliferation. *Menopause* 11: 281-9.
- Boue SM, Wiese TE, Nehls S, Burow ME, Elliott S, Carter-Wientjes CH, Shih BY, McLachlan JA, Cleveland TB (2003) Evaluation of the estrogenic effects of legume extractse containing phytoestrogens. *J Agric Food Chem* 51: 2193-2199.
- Bunone G, Briand PA, Miksick RJ, Picard D (1996) Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pahtway and direct phosphorylation. *EMBO J* 15: 2174-2183.
- Burow ME, Boue SM, Collins-Burow BM, Melnik LI, Duong BN, Carter-Wientjes CH, Li S, Wiese TE, Cleveland TE, McLachlan JA (2001) Phytochemical glyceollins, isolated from soy, mediate antihormonal effects through estrogen receptor alpha and beta. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 1750-8.
- Chiu LC, Kong CK, Ooi VE (2003) Antiproliferative effect of chlorophyllin derived from a traditional Chinese medicine *Bombyx mori* excreta on human breast cancer MCF-7 cells. *Int J Oncol* 23: 729-35.
- Duda RB, Zhong Y, Navas V, Li MZ, Toy BR, Alavarez JG (1999) American ginseng and breast cancer therapeutic agents synergistically inhibit MCF-7 breast cancer cell growth. *J Surg Oncol* 72: 230-9.
- Fotsis PM, Adlercreutz H, Flerischmann G, Hase T, Montesano R, chweigerer L (1993) Genistein a dietaryderived inhibition of *in vitro* angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 2690-2694.
- George GJM, Kuiper EE, Markku PH, Stefan N, Jan-ake G (1996) Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5925-5930.
- Gilbert NE, O'Reilly JE, Chang CJ, Lin YC, Brueggemeier RW (1995) Antiproliferative activity of gossypol and gossypolone on human breast cancer cells. *Life Sci* 57: 61-7.
- Grandien K, Berkenstam A, Gustaffsson J (1997) The estrogen-receptor gene: Promoter organization and expression. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 1343-1369.
- Gray SL, Lackey BR, Tate PL, Riley MB, Camper ND (2004) Mycotoxins in root extracts of American and Asian ginseng bind estrogen receptors alpha and beta. *Exp Biol Med* 229: 560-8.
- Kim IY (2002) Effects of pyrethroid compounds on cell proliferation andestrogen sensitive molecular parameters in estrogen receptor positive humanbreast cancer cells. Duksung Womens University, Master's degree.
- Kim KB (2002) *Pueraria mirifica* may have estrogenic activity by metabolicactivation, but have no modifying effects on carcinogenesis. Seoul National University, Master's degree.
- Kim ND, Mehta R, Yu W, Neeman I, Livney T, Amichay A, Poirier D, Nicholls P, Kirby A, Jiang W, Mansel R, Ramachandran C, Rabi T, Kaplan B, Lansky E (2002) Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Researchand Treatment* 71: 203-217.
- Kim SH, Jung KK, Kang SY, Kim TG, Kim CO, Moon A, Ryu KZ, Lee SD, Ryeu HM (1997) The effect of Jackyagamcho-tang on follicular maturation and estrogen production in the immature rat. *Kor J Pharmacogen* 28: 104-111.
- Muldoon TG (1981) Interplay between estradiol and prolactin in the regulation of steroid hormone receptor levels, nature, and functionality in normal mouse mammary tissue. *Endocrinology* 109: 1339-1346.
- Rowlands JC, Berhow MA, Badger TM (2002) Estrogenic and anti-proliferative properties of soy sapogenols in human breast cancer cells *in vitro*. *Food Chem Toxicol* 40: 1767-74.
- Ruff M, Gangloff M, Wurtz JM, Moras D (2000) Estrogen receptor transcription and transactivation: Structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors. *Breast Cancer Res* 2: 353-359.
- Song YS (2001) Pharmacological Characterization of Propolis: Anti-inflammatoryand Estrogenic Effects. Sook-myung Womens University, *Doctor's degree*.
- Tiep Nguyen Ba (2003) Estrogenic activity of ethanol extracts from *Cudrania tricuspidata* and *Cortex mori* using *in vitro* and *in vivo* assays. *Master's degree*. Seoul National University.
- Tsai M, O'Malley BW (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annual Review of Biochemistry* 63: 451-486.
- Williams JP (1997) Ovaries. In *Basic & Clinical Endocrinology*. 5th Ed. (2005년 4월 16일 접수. 2005년 5월 31일 채택)