

생약의 여성호르몬 수용체 조절 활성 검색

이창민 · 강세찬 · 오좌섭 · 최 한 · 이설매 · 이재현 · 이미현 · 정의수 · 곽종환 · 지옥표*
성균관대학교 약학대학

In vitro Screening of Medicinal Plants with Estrogen Receptor Modulating Activity

Chang Min Lee, Se Chan Kang, Joa Sub Oh, Han Choi, Xue Mei Li, Jae Hyun Lee,
Mi Hyun Lee, Eui Su Choung, Jong Hwan Kawk, and Ok Pyo Zee*
College of Pharmacy, SungKyunKwan University, Suwon 440-746, Korea

Abstract – Yeast-based estrogenicity assay is the simplest and useful for the assay and the discovery of novel estrogenic substances in natural specimens. The estrogen receptor (ER) modulating activity of 50% EtOH extracts of 101 traditional medicinal herbs was assessed using a recombinant yeast assay system with both a human estrogen receptor expression plasmid and a receptor plasmid. Among them, 14 species proved to be active. *Puerariae Flos* (flower of *Pueraria thunbergiana* BENTH.) had the highest estrogenic relative potency (7.75×10^{-3}) ($EC_{50} = 9.39 \mu\text{g/ml}$). The EC_{50} value of 17β -estradiol used as the positive control was $0.073 \mu\text{g/ml}$ (Relative Potency=1.00). These results demonstrated that some of the traditional medical herbs may be useful in the therapy of estrogen replacement.

Key words – estrogen receptor (ER), phytoestrogen, yeast-based bioassay, medicinal plants

자연계에 존재하고 있는 천연물 및 식품 등에 함유되어 있는 성분으로부터 다양한 생리활성을 규명하려는 연구가 전세계적으로 활발히 진행되고 있다. 특히 이러한 성분 중에서 phytoestrogen은 성호르몬인 estrogen과 유사한 구조 및 기능을 가지고 있으며, 주로 배당체(glycoside)형태로 발견된다.^{1,4)} Estrogen은 여성에게 estrogen 대체작용을 할 수 있는 것으로 밝혀져 질병예방 차원에서도 연구가 진행되어지고 있다.^{2,5-9)} Phytoestrogen의 효능과 관련하여 심장질환 감소, 전립선암 및 유방암 예방, 항산화, Alzheimer's disease 관련 기억 감퇴 예방 등의 연구가 수행되고 있다.^{2,7,8,10-12)} Phytoestrogen은 estrogen과 유사한 작용을 함으로써 여성의 estrogen 결핍으로 유발되어지는 골다공증 예방, 폐경기 증상의 완화에도 중요한 역할을 한다.¹³⁻¹⁵⁾ 이러한 phytoestrogen은 식물의 줄기, 뿌리, 꽃이나 종자에서 발견되며 크게 네 groups 즉, isoflavones, coumestans, lignans, anthraquinones 등이 잘 알려져 있다.¹⁶⁾ Phytoestrogen이 기존 합성 estrogen의 대체물질로서 많은 연구가 진행되는 것은 estrogen과 구조가 비슷하면서도 부작용은 거의 없어 합성 estrogen (17β -

estradiol; E2)의 대체물질로서 이용이 가능하기 때문이다.¹⁷⁾ Phytoestrogen은 식물에 함유된 페놀화합물로서 구조적으로는 estrogen과 유사성이 있으며, target site에 따라 estrogen 효과 또는 anti-estrogen 효과를 나타내는 물질이다. Estrogen 활성을 가진 식물은 현재 수백 종에 이르며 이중 최근에 관심은 식이원에 포함되어 있는 phytoestrogen에 집중되어 있다. Phytoestrogen에는 대두 등에 주로 함유된 isoflavone류 뿐만 아니라 곡류 및 종자류, 과채류에 광범위하게 함유된 lignans 및 coumestans류가 있으며, 현재까지의 연구에서는 대두 외 많은 식물자원 및 식이원에 함유된 phytoestrogen들로 연구가 진행되고 있다. 따라서 본 연구에서는 우수한 phytoestrogen이 함유된 생약자원을 발굴하여, 그 생리작용 기전을 규명함으로써 호르몬 의존성 질환 및 만성 고령화 질환 예방 및 치료에 활용하는데 이용하고자 하였다. Estrogen receptor modulating activity assay 탐색 시험방법으로는 reproductive tract responses를 이용하는 방법(Allen-Doisy assay), non-reproductive tract target tissue responses를 이용하는 방법(E-screen assay), estrogen 수용체 결합시험, 항체를 이용하는 방법 및 수용체와 수용체 유전자 발현을 이용하는 방법(estrogen receptor dependent transcrip-

*교신저자(E-mail) : opzee@skku.ac.kr
(FAX) : 031-290-7778

tional expression assay) 등이 있다.¹⁸⁻²²⁾ 이 중에서 estrogen receptor dependent transcriptional expression assay는 직접 세포 또는 재 조합된 효모에 처리함으로써 중요한 생물학적 효과를 반영해 주고, 수용체와 estrogen 복합체에 의한 reporter gene의 발현 정도를 쉽게 측정 할 수 있다.^{23,24)}

본 연구에서는 중국 및 국내에서 광범위하게 사용되고 있는 생약의 여성호르몬 수용체 조절활성 검색을 목적으로 인체 estrogen receptor(ER) 및 ER-binding site(ERE) downstream reporter gene으로써 lacZ 유전자가 도입되어 있는 형질전환 효모균주를 이용하여 101가지 생약의 50% EtOH 추출물로부터 ER에 ligand로 작용하여 ER-modulating activity를 갖는 생약을 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용된 생약 EtOH 추출물은 자생 식물 이용기술사업단의 한국식물추출물은행 (한국생명공학연구원, 대전)으로 부터 구입하여 사용하였으며, dimethyl sulfoxide (DMSO)에 10 mg/ml 농도로 조정하여 사용시 까지 -20°C에 보관하였다.

형질전환 효모균주 및 배양 - 본 연구에 사용된 ER 및 ERE-lacZ 형질전환 효모균주는 *S. cerevisiae* strain BJ3505 [MAT α , pep4::HIS3, prb1- Δ 1, 6R, his9- Δ 200, lys2-801, trp1- Δ 101, ura3-52(can 1)]로써 미국 Duke 대학의 McDonnell 박사로부터 분양 받았다.²³⁾ 형질전환효모균주의 배양은 YNB 최소배지 (bacto yeast nitrogen base without amino acids 6.7 g/L, Difco, USA)에 dextrose (20 g/L), lysine (50 mg/L), 그리고 histidine (20 mg/L)를 가한 선택 배지를 이용하여 30°C에서 300 rpm의 회전속도로 early mid-log phase (OD₆₀₀≒1)까지 배양하였다.

β -Galactosidase assay - 배양한 효모균을 OD₆₀₀=0.1이 되도록 선택배지로 희석한 다음 96 well microtiter plate에 100 μ L씩 분주하고 준비된 생약의 50% EtOH 추출물을 각각 1 mg/ml, 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml로 처리하여, 30°C, 24 hr동안 배양한 후, 원심분리 (3000 rpm, 10 min)하여 상등액을 버리고, Z-buffer (Na₂HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄ 40 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ · 7H₂O 1 mM, β -mercaptoethanol)를 100 μ L씩 가해준 후, lysozyme (200 Unit/ml), 0.1% SDS를 가하여 freeze-thawing 3회로 lysis 하였다. 진탕배양기 28°C에서 5분간 방치 및 ONPG (2-nitrophenyl- β -D-galactosidase, 2 mg/ml) 첨가·반응을 시킨 후 충분히 발색 되었을 때 stop buffer(2 M Na₂CO₃) 50 μ L를 넣어 반응을 정지 시켰다. 이때 효모균주가 발현시킨 β -Galactosidase에 의해 기질로 사용한 ONPG의 분해산물인 orthonitrophenol의 정색반응을 microtiter plate reader (SPECTRAMax 340PC³⁸⁴, Sunnyvale, California, USA)를

이용하여 OD₄₂₀ 및 OD₅₅₀에서 측정하였다. β -galactosidase의 활성은 음성 대조군으로 DMSO를 사용하여 Miller unit로 나타내었다.²⁵⁾

$$\beta\text{-galactosidase activity} = \frac{1000 \times [\text{OD}_{420} - (1.75 \times \text{OD}_{550})]}{t \times v \times \text{OD}_{600}}$$

t = time (min)

v = volume of culture (ml)

결과 및 고찰

Estrogen receptor는 서양 여성의 암 중 발병률 1위인 유방암과 밀접한 관계가 있으며, 유방암 발병과 콩의 isoflavones 섭취량 사이의 상관관계 및 isoflavones이 estrogen 길항제로 작용하여 유방암 예방효과를 발휘한다는 것에 근거한 연구가 진행되고 있다. 또한 화학적으로 종양유도 된 랫드에서 genistein에 의한 발암억제가 보고된 바 있다.²⁶⁻²⁸⁾ 따라서 본 연구에서는 101종의 생약의 50% EtOH 추출물로부터 여성호르몬 수용체 조절 활성을 검색하기 위하여, DMSO를 용매로 10 mg/ml 생약추출물 용액을 제조하여 BJ3505 배양액에 1 mg/ml~10 ng/ml로 처리하여 24시간 배양한 후 β -galactosidase activity를 측정하였다.

그 결과 현재 여성호르몬 활성이 있는 것으로 알려진 콩과 (*Leguminosae*) 및 생강과 (*Zingiberaceae*)를 포함하는 총 14종의 생약이 여성호르몬 수용체 (ER) 조절 활성이 나타났다 (Table I). 또한 EC₅₀(μ g/ml)을 기준으로 갈화(9.39), 사인(58.35)이 가장 우수하였고, 감초(76.40), 건강(77.26), 대황(80.91), 강황(85.18), 비파엽(92.90), 고삼(152.0)이 그 다음으로 나타났으며, 지모(384.60), 적하수오(663.60), 갈근(697.30), 도인(840.50), 사삼(873.0), 택란(935.30) 등은 갈화에 비하여 약 30~100배 정도로 비교적 약한 활성이 관찰되었다. 이들 생약은 daidzein, daidzin, puerarin, glycyrrhizin, gingerone, shogaol, emodin, curcumin등의 성분이 함유되어 있는 생약으로 기존에 보고된²⁹⁻³²⁾ 것과 일치 하였으며, 비파엽 등은 관련성분이 보고된 바 없다. 따라서 본 연구 결과를 토대로 갈화 및 감초 등의 콩과 (*Leguminosae*)식물과 사인 및 건강 등의 생강과 (*Zingiberaceae*)식물 등 활성성분이 보고 되어 있는 생약 외에 비파엽 등의 성분에 대한 분리, 구조 및 작용기전에 대한 연구를 진행 해야 할 것으로 사료된다. 또한, 17 β -estradiol을 control로 하여 (Relative Potency=1.00) 상대적 여성호르몬 수용체 조절 활성을 비교한 결과, 갈화 (7.75 $\times 10^{-3}$), 사인 (1.25 $\times 10^{-3}$) 감초 (9.5 $\times 10^{-4}$), 건강 (9.4 $\times 10^{-4}$), 대황 (9.0 $\times 10^{-4}$), 강황 (8.5 $\times 10^{-4}$), 비파엽 (7.8 $\times 10^{-4}$), 고삼 (4.8 $\times 10^{-4}$), 지모 (1.9 $\times 10^{-4}$), 적하수오 (1.1 $\times 10^{-4}$), 갈근 (1.0 $\times 10^{-4}$), 도인 (9.0 $\times 10^{-5}$), 사삼 (8.0 $\times 10^{-5}$), 택란 (8.0 $\times 10^{-5}$)으로 나타났다 (Table II).

Table I. Estrogen receptor modulating activities of medicinal plants

NO	일반명	라틴생약명	원산지	Activity
1	가시오가피	Acanthopanax Cortex	중국산	-
2	갈근	Puerariae Radix	중국산	++
3	갈화	Puerariae Flos	중국산	+++
4	감국	Chrysanthemi Flos	중국산	-
5	감초	Glycyrrhizae Radix	중국산	+++
6	강활	Angelicae koreanae Radix	국산	-
7	강황	Curcumae longae Rhizoma	국산	++
8	건강	Zingiberis Rhizoma	중국산	++
9	건울	Castanae Semen	국산	-
10	건지황	Rhemaniae Radix	중국산	-
11	결명자	Cassiae Semen	중국산	-
12	계지	Cinnamomi Ramulus	중국산	-
13	계피	Cinnamomi Cortex	중국산	-
14	고련피	Meliae Cortex	중국산	-
15	고삼	Sophorae Radix	중국산	++
16	구절초	Chrysanthemi sibirici Herba	국산	-
17	귤피	Citri unshiu Pericarpium	국산	-
18	금은화	Lonicerae Flos	중국산	-
19	나복자	Raphani Semen	중국산	-
20	남성	Arisaematis Rhizoma	중국산	-
21	단삼	Salviae Radix	중국산	-
22	당귀	Angelicae Sinensis Radix	중국산	-
23	대추	Zizyphi Fructus	국산	-
24	대풍자	Hydnocarpus Semen	중국산	-
25	대황	Rhei Rhizoma	중국산	++
26	도인	Persicae Semen	중국산	+
27	독활	Araliae Cordatae Radix	국산	-
28	둥규자	Malvae Semen	중국산	-
29	두충	Eucomiae Cortex	국산	-
30	마황	Ephedrae Herba	중국산	-
31	맥문동	Liriopsis Tuber	중국산	-
32	목단피	Moutan Cortex Radicis	중국산	-
33	목통	Akebiae Caulis	국산	-
34	목향	Saussureae Radix	중국산	-
35	박하	Menthae Herba	중국산	-
36	반하	Pinelliae Tuber	중국산	-
37	방풍	Ledebouriellae Radix	중국산	-
38	백두옹	Pulsatillae Radix	중국산	-
39	백작약	Paeoniae Radix alba	중국산	-
40	백지	Angelicae Dahuricae Radix	국산	-

Table I. Continued

NO	일반명	라틴생약명	원산지	Activity
41	백출	<i>Atractylodis Rhizoma alba</i>	중국산	-
42	백화사설초	<i>Hedyotidis Diffusae Herba</i>	중국산	-
43	복령	Hoelen	중국산	-
44	복분자	<i>Rubi Fructus</i>	중국산	-
45	비파엽	<i>Eriobotriae Folium</i>	중국산	++
46	사삼	<i>Adenophorae Radix</i>	국산	+
47	사인	<i>Amomi Semen</i>	중국산	+++
48	산사	<i>Crataegi Fructus</i>	중국산	-
49	산수유	<i>Corni Fructus</i>	국산	-
50	산약	<i>Dioscoreae Rhizoma</i>	중국산	-
51	삼백초	<i>Saururi Herba</i>	중국산	-
52	삼칠	<i>Notoginseng Radix</i>	중국산	-
53	상기생	<i>Loranthi Ramulus</i>	중국산	-
54	상백피	<i>Mori Radicis Cortex</i>	중국산	-
55	상심자	<i>Mori Fructus</i>	중국산	-
56	상엽	<i>Mori Folium</i>	중국산	-
57	석창포	<i>Acori Graminei Rhizoma</i>	중국산	-
58	소엽	<i>Perillae Folium</i>	국산	-
59	승마	<i>Cimicifugae Rhizoma</i>	중국산	-
60	시호	<i>Bupleuri Radix</i>	중국산	-
61	신곡	<i>Massa Medicata Fermentata</i>	국산	-
62	연교	<i>Forsythiae Fructus</i>	중국산	-
63	오가피	<i>Acanthopanax Cortex</i>	중국산	-
64	오미자	<i>Schizandrae Fructus</i>	중국산	-
65	옥죽	<i>Polygonati Officinalis Rhizoma</i>	국산	-
66	우슬	<i>Achuranthis Radix</i>	국산	-
67	울금	<i>Curcumae longae Rhizoma</i>	중국산	-
68	원지	<i>Polygalae Radix</i>	중국산	-
69	유근피	<i>Salicis Radicis Cortex</i>	중국산	-
70	의이인	<i>Coicis Semen</i>	국산	-
71	익모초	<i>Leonuri Herba</i>	중국산	-
72	인삼	<i>Ginseng Radix</i>	국산	-
73	적복령	Hoelen rubra	중국산	-
74	적하수오	<i>Polygoni Multiflori Radix</i>	중국산	+
75	정력자	<i>Drabae Semen</i>	중국산	-
76	정향	<i>Caryophylli Flos</i>	중국산	-
77	조구등	<i>Uncariae Ramulus et Uncus</i>	중국산	-
78	죽엽	<i>Bambusae Folium</i>	중국산	-
79	지모	<i>Anemarrhenae Rhizoma</i>	중국산	++
80	지실	<i>Ponciri Fructus</i>	중국산	-

Table I. Continued

NO	일반명	라틴생약명	원산지	Activity
81	진피	Aurantii Nobilis Pericarpium	국산	-
82	차전자	Plantaginis Semen	중국산	-
83	창출	Atractylodis Rhizoma	중국산	-
84	천궁	Ligustici Rhizoma	중국산	-
85	천마	Gastrodiae Rhizoma	중국산	-
86	초두구	Alpiniae Katsumadaii Semen	중국산	-
87	측백	Biotae Orientalis Folium	국산	-
88	택란	Lycopi Herba	국산	+
89	택사	Alismatis Rhizoma	중국산	-
90	토사자	Cuscutae Semen	중국산	-
91	포공영	Taraxaci Herba	중국산	-
92	포도근	Vitidis Viniferae Radix	국산	-
93	포도등	Vitidis Viniferae Caulis	국산	-
94	합환피	Albiziae Cortex	중국산	-
95	현삼	Scrophulariae Radix	중국산	-
96	형개	Nepetae Spica	중국산	-
97	홍화	Cartami Flos	중국산	-
98	황금	Scutellariae Radix	중국산	-
99	황기	Astragali Radix	중국산	-
100	황백	Phellodendri Cortex	중국산	-
101	후박	Magnoliae Cortex	중국산	-
합성여성호르몬		17 β -estradiol (E2)		+++

Activity: β -galactosidase activity, +++: high effect, ++: middle effect, +: low effect, -: no effect.

Table II. Relative potency of estrogenic oriental herbs for 17 β -estradiol (E2)

일반명	라틴 생약명	EC ₅₀ (μ g/mL)	Relative potency
갈근	Puerariae Radix	697.30	1.00 \times 10 ⁻⁴
갈화	Puerariae Flos	9.39	7.75 \times 10 ⁻³
감초	Glycyrrhizae Radix	76.40	9.50 \times 10 ⁻⁴
강황	Curcumae longae Rhizoma	85.18	8.50 \times 10 ⁻⁴
건강	Zingiberis Rhizoma	77.26	9.40 \times 10 ⁻⁴
고삼	sophorae Radix	152.00	4.80 \times 10 ⁻⁴
대황	Rhei Rhizoma	80.91	9.00 \times 10 ⁻⁴
도인	Persicae Semen	840.50	9.00 \times 10 ⁻⁵
비파엽	Eriobotriae Folium	92.90	7.80 \times 10 ⁻⁴
사삼	Adenophorae Radix	873.00	8.00 \times 10 ⁻⁵
사인	Amomi Semen	58.35	1.25 \times 10 ⁻³
적하수오	Polygoni Multiflori Radix	663.60	1.10 \times 10 ⁻⁴
지모	Anemarrhenae Rhizoma	384.60	1.90 \times 10 ⁻⁴
택란	Lycopi Herba	935.30	8.00 \times 10 ⁻⁵
합성여성호르몬	17 β -estradiol (E2)	0.073	1.00

본 연구의 결과를 종합해 볼 때 기존에 알려진 바와 같이 콩과 (*Leguminosae*)에서 가장 우수한 여성호르몬 수용체 조절활성이 나타났으며, 콩과의 isoflavonoids 및 flavonoids 외에 여성호르몬 수용체 조절 활성이 더욱 우수한 생약 및 성분들에 대한 연구를 통하여 폐경기 여성 질환에 대한 HRT (hormone replacement therapy)로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 경기도 지역협력연구사업비 지원으로 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

인용문헌

- Brzezinski, A. and Debi, A. (1999) Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **85**: 47-51.
- Lissin, L. W. and Cooke, J. P. (2000) Phytoestrogens and cardiovascular health. *J. Am. Col. Cardiol.* **35**: 1403-1410.
- Song, Y. S., Jin, C., Jung, K. J. and Park, E. H. (2002) Estrogenic effects of ethanol and ether extracts of propolis. *J. Ethnopharmacol.* **82**: 89-95.
- Strauss, L., Santi, R., Saarinen, N., Streng, T., Joshi, S. and Makela, S. (1998) Dietary phytoestrogens and their role in hormonally dependent disease. *Toxicol. Lett.* **102**: 349-354.
- Anthony, M. S., Clarkson, T. B., Hughes, C. L., Morgan, T. M. and Burke, G. L. (1996) Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J. Nutr.* **126**: 4350.
- Kurzer, M. S. and Xu, X. (1997) Dietary phytoestrogens. *Ann. Rev. Nutr.* **17**: 353-281.
- Simpkins, J. W., Green, P. S., Gridley, K. E., Singh, M., de Fiebre, N. C. and Rajakumar, G. (1997) Role of estrogens replacement therapy in memory enhancement and the prevention of neuronal loss associated with Alzheimer's disease. *Am. J. Med.* **103**: 19S-25S.
- Tikkanen, M. J., Wahala, K., Ojala, S., Vihma, V. and Adlercreutz, H. (1998) Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 3106-3110.
- Yang, N. N., Venugopalan, M., Hardikar, S. and Glasebrook, A. (1996) Identification of an estrogen response element activated by metabolites of 17 β -estradiol and raloxifene. *Science* **273**: 1222-1225.
- Ingram, D., Sanders, K., Kolybaba, M. and Lopez, D. (1997) Case-control study of phyto-oestrogens and breast cancer. *Lancet* **350**: 990-994.
- Makela, S., Davis, V. L., Tally, W. C., Korkman, J., Salo, L., Vihko, R., Santti, R. and Korach, K. S. (1994) Dietary estrogens act through estrogen receptor-mediated processes and show no antiestrogenicity in cultured breast cancer cells. *Environ. Health Perspect.* **102**: 572-578.
- Landstrom, M., Zhang, J. X., Hallmans, G., Aman, P., Bergh, A., Damber, J. E., Mazur, W., Wahala, K. and Adlercreutz, H. (1998) Inhibitory effects of soy and rye diets on the development of dunning R3327 prostate adenocarcinoma in rats. *Prostate* **36**: 151-161.
- Santell, R. C., Chang, Y. C., Nair, M.G. and Helferich, W. G. (1997) Dietary genistein exerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland and the hypothalamic/pituitary axis in rats. *J. Nutr.* **127**: 263-269.
- Albertazzi, P. and Purdie, D. W. (2002) The nature and utility of the phytoestrogens : A review of the evidence. *Maturitas* **42**: 173-185.
- Anderson, J. J. and Garner, S. C. (1998) Phytoestrogen and bone. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* **12**: 543-557.
- Murkies, A. L., Wilcox, G., and Davis, S. R., Clinical review 92: Phytoestrogens. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**: 297-303.
- Wuttke, W., Jarry, H., Westphalen, S., Christoffel, V. and Seidiovva-Wuttke, D. (2003) Phytoestrogens for hormone replacement therapy? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **83**: 133-147.
- Reel, J. R., Lanb, V. and Neal, B. H. (1996) Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fund. Appl. Toxicol.* **34**: 288-305.
- Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K. L., Fernandez, M. F., Olea, N. and Serrand, F. O. (1995) The E-screen assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.* **103**: 113-122.
- Kuiper, G. G. J. M., Lemmen, J. G., Carsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Sasg, P. T., van der Burg, B. and Gustafsson, J.-A. (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* **139**: 4252-4263.
- Lapcik, O., Hampl, R., Hill, M., Wahala, K., Maharik, N. A. and Adlercreutz, H. (1998) Radioimmunoassay of free genistein in human serum. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **64**: 261-268.
- Miksicek, R. J. (1993) Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. *Mol. Pharmacol.* **44**: 37-43.
- Gaido, K. W., Leonard, L. S., Lovell, S., Gould, J. C., Babai, D., Portier, C. J. and McDonnell, D. P. (1997) Evaluation of chemicals with endocrine modulation activity in a yeast-based hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **143**: 205-212.
- Allan, G. F., Hutchins, A. and Clancy, J. (1999) An ultrahigh-throughput screening assay for estrogen receptor ligands. *Anal. Biochem.* **275**: 243-247.
- Miller, J. H. (1972) Experiments in genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

26. Dai, Q., Shu, X.-O., Jin, F., Potter, J. D., Kushi, L. H., Teas, J., Gao, Y.-T. and Zheng, W. (2001) Population-based case-control study of soyfood intake and breast cancer risk in Shanghai. *Br. J. Cancer* **85**: 372-378.
27. Clemons, M. and Goss, P. (2001) Estrogen and the risk of breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **344**: 276-285.
28. Lamartiniere, C. A., Murrill, W. B., Manzillo, P. A., Zhang, J. X., Barnes, S., Zhang, X., Wei, H. and Brown, N. M. (1998) Genistein alters the ontogeny of mammary gland development and protects against chemistry-induced mammary cancer in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **217**: 358-364.
29. Kumagai, A., Nishino, K., Shimomura, A., Kin, T. and Yamamura, Y. (1967) Effect of glycyrrhizin on estrogen action. *Endocrinol. Jpn.* **14**: 34-38.
30. Zhang, C. Z., Wang, S. X., Zhang, Y., Chen, J. P. and Liang, X. M. (2005) *In vitro* estrogenic activities of Chinese medicinal plants traditionally used for the management of menopausal symptoms. *J. Ethnopharmacol.* **98**: 295-300.
31. Verma, S. P., Salamone, E. and Goldin, B. (1997) Curcumin and genistein, plant natural products, show synergistic inhibitory effects on the growth of human breast cancer MCF-7 cells induced by estrogenic pesticides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**: 692-696.
32. Sathyamoorthy, N. and Wang, T. T. Y. (1997) Differential effects of dietary phyto-oestrogens daidzein and equol on human breast cancer MCF-7 cells. *Eur. J. Cancer* **33**: 2384-2389.

(2006년 1월 6일 접수)