

The Effect of Pomegranate Extracts on the Menopausal Syndromes

Hyun Chul Kim^{1,§}, Eun Joo Kum^{2,§}, Do Hyoung Kwon² and Hyeoung Lee^{1,†}

¹Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences, Yonsei University, Kangwon 220-710, Korea, ²Hanilyanghang Co. Ltd. Korea

The present study was set to evaluate the effect of pomegranate extracts on improvement of the menopausal syndromes such as face flushing in ovariectomized rats by carrying out short- and long-term experiments. Pomegranate extracts used to feed rats were prepared from the pulp part which does not contain the rind of the pomegranate, and were dissolved in propylene glycol. From the short-term (16 days) experiment, it was clear that when the 25, 250, 1,250 mg/kg/day concentrations of pomegranate extracts were orally fed to ovariectomized rats, the body temperature of the rats in all the 3 groups were decreased with statistical significance compared to other control groups which were fed with propylene glycol only. Especially, the body temperature decreased by 2.7°C compared to control groups even when the pomegranate extracts were fed at the low concentration of 25 mg/kg/day implying the usefulness of pomegranate extracts in improving face flushing troubles. In addition, the body weight of the groups fed with pomegranate extracts also decreased when compared to groups fed with only propylene glycol, and the results were also statistically significant. In case of the estradiol level in the blood of rats, the levels were somewhat higher in the groups fed with pomegranate extracts than the control groups, even though the difference was not statistically significant. As found from the results of the short-term experiment, in long-term experiment, the groups fed with pomegranate extracts showed statistically significant decrease in the body temperature and the body weight, whereas the increase of the estradiol levels in blood in each groups were statistically insignificant. During the short- and long-term experiments, no sign of toxicity was found in rats fed with pomegranate extracts indicating no toxic side effects of the pomegranate extracts when orally fed. The concentrations of pomegranate extracts 25, 250, 1250 mg/kg/day treated to ovariectomized rats in this study can be estimated to be 1.5, 15, and 75 g/day when treated to women whose body weight is 60 kg which is average for women with menopausal syndromes. Since even the 75 g/day of high concentration of pomegranate extracts did not show any toxicity in short- and long-term experiments, taking 1.5 g/day concentration of pomegranate extracts would be safe dose for not causing any side effects. Therefore, it can be concluded from the results of this study that taking 1.5 g/day of pomegranate extracts for certain period time will improve the menopausal syndromes including face flushing.

Key Words: Pomegranate extracts, Pomegranate, Menopausal syndromes, Estradiol

서 론

우리나라 여성의 평균 수명이 1995년에 77.4세에서 2002년 80.4세로 점차 증가하는 추세이다 (Korea National Statistical Office, 2002). 이는 한국 여성의 평균 폐경 기간

이 약 30년 이상의 상태로 지내게 되며 (Lee, 1993) 폐경 이후의 삶이 늘어남에 따라 여성의 폐경기 건강관리는 의학적, 사회적으로 중요한 관심사로 등장하게 되었다. 폐경을 포함한 갱년기 여성은 폐경으로 일어나는 여러 증상뿐 아니라 여성 호르몬의 감소로 인하여 안면홍조 (hot flash), 식은땀, 우울증, 심혈관 질환, 골다공증 등 다양한 질병 (갱년기 증후군)을 경험하게 되며, 이에 대한 예방책으로 합성 estrogen 호르몬 대체요법이 제시되기도 하였다 (Morishige et al., 2001; Cauley et al., 2001). 그러나 합성 호르몬 대체요법은 재월경 현상, 유방의 연화 및 체중 증가의 부작용과 함께 자궁 내막암과 유방암을 증가시킬 수 있다는 위험성이 보고되었으며, 이러한 보충

*접수일: 2009년 7월 17일 / 수정일: 2009년 8월 7일
채택일: 2009년 8월 13일

†교신저자: 이혜영, (우) 220-710 강원도 원주시 흥업면 매지리 234, 연세대학교 보건과학대학 임상병리학과

Tel: 033-760-2740, Fax: 033-760-2561

e-mail: hyelee@yonsei.ac.kr

§: Equally contributed first authors

Table 1. List of samples for the experiment

No.	Rat status	Sample	Treated Concentration
SG1	Sham operated rat	Propylene glycol (PG)	5 ml/kg/day
SG2	Ovariectomized rat	Propylene glycol (PG)	5 ml/kg/day
SG3	Ovariectomized rat	Maprotiline hydrochloride (MAP)	30 mg/kg/day
SG4	Ovariectomized rat	Pomegranate ext. (PE)	25 mg/kg/day
SG5	Ovariectomized rat	Pomegranate ext. (PE)	250 mg/kg/day
SG6	Ovariectomized rat	Pomegranate ext. (PE)	1,250 mg/kg/day
SG7	Ovariectomized rat	Feramin Q [®]	12 mg/kg/day
LG1	Sham operated rat	Propylene glycol (PG)	5 ml/kg/day
LG2	Ovariectomized rat	Propylene glycol (PG)	5 ml/kg/day
LG3	Ovariectomized rat	Pomegranate ext. (PE)	25 mg/kg/day
LG4	Ovariectomized rat	Pomegranate ext. (PE)	1,250 mg/kg/day

SG1~7: short term experimental group; LG1~4: long term experimental group

제의 사용법, 용량, 오랜 기간 사용 시 안전성에 대한 일치된 결과가 미흡하다 (Clavel-Chapelon, 2000; Ross et al., 2000). 이런 현실에서 천연자원으로부터 에스트로겐 활성을 가지면서도 부작용이 없는 천연 호르몬 대체요법의 대안으로써 여성 호르몬의 대체 물질 및 기능성 물질의 검색 연구가 식품 및 의약품 산업에서 계속되고 있다 (Albertazzi et al., 1999; Coldham and Sauer, 2001; Johnson et al., 2001; Lemay et al., 2002; Weijer and Barentsen, 2002).

최근 석류 과즙 및 씨 추출물 중의 puniceic acid, estrone, estradiol, b-sitosterol의 생리활성 및 섭취 효과가 보고되면서, 석류 추출물에 대한 많은 연구들이 발표되고 있다 (Okamoto et al., 2004). 석류 및 콩과류에서 발견되는 phytoestrogen의 주성분은 isoflavones와 lignans 등의 페놀성 화합물이며 (Aviram et al., 2000; Kim, 2005), 이 중 estrone류는 인체의 성호르몬과 공통성을 갖는 구조를 가지고 있어 암, 심혈관 질환, 골다공증 등의 만성 질환에 대하여 예방 효과가 있다고 보고되고 있다 (Poyranzogle et al., 2002; Shim et al., 2001). 또한 석류씨 기름에 함유된 conjugated fatty acid는 항암작용, 면역증진, 항산화작용, 체지방 감소 등의 작용물질로 보고되면서 석류 과즙 및 석류 추출물에 대한 지속적인 연구가 진행되고 있다 (Longtin, 2003; Nugteren and Christ-Hazelhof, 1987; Okada et al., 1997; Koh et al., 2005; Lee et al., 2006).

이에 본 연구진에서 에스트로겐이 함유된 석류 추출물을 조제하였으며, 이를 이용하여 체온, 체중, 에스트라디올 농도를 측정함으로써 안면홍조 개선 및 갱년기 장애의 개선 효과를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료 조제

실험에 사용된 석류 추출물은 (주)한일양행에서 제조하였으며, 제조 시에는 석류피를 제외한 부분을 압착 마쇄한 후 씨를 제거하여 주정 및 물 추출 후 65 brix로 농축하여 실험에 사용하였다. 대조군인 Feramin Q[®] (Dongkook pharm, Korea)는 약국에서 구입하였으며, Maprotiline hydrochloride (MAP)는 Sigma에서 구입하여 사용하였다. 시료는 propylene glycol (Duksan, Korea)에 용해시켜 5 ml/kg/day로 투여하였다.

단기 투여 실험은 4개의 대조군과 3개의 시험군으로 구성되었으며 석류 추출물과 대조 시료를 16일 구강 투여하였다. 장기 투여 실험은 2개의 시험군과 2개의 대조군으로 구성되었으며 시료를 45일간 구강 투여하였다. 단기 투여 실험과 장기 투여 실험의 대조군 및 시험군의 구성은 Table 1에 나타내었다.

2. 실험 동물

1) 단기 투여 실험

8주령의 Sprague-Dawley Rat (암컷)은 난소 적출 및 가상 수술 후 (주)오리엔트 (Seoul, Korea)에서 공급받았다. 1주일 간의 적응 기간을 가진 후 시험군별로 5마리씩, 7그룹으로 나누었다. 실험 시 생육장의 온도는 22±3℃, 습도는 30~70% 유지하였으며 시간 당 15~20번 공기를 주입하였다. 물과 사료는 충분히 제공하였으며 시료는 16일간 매일 오전에 금속제 경구 투여용 존데를 이용하

여 위내에 직접 주입하였다.

2) 장기 투여 실험

9주령의 Sprague-Dawley Rat (암컷)를 (주)오리엔트 (Seoul, Korea)에서 공급 받았으며, 이를 (주)한일양행에서 Fig. 1과 같이 난소 적출하였다. 난소 적출 후 1주일 간의 적응 기간을 가진 후 시험군별로 5마리씩, 4그룹으로 나누어 단기 투여 실험과 동일한 조건으로 48일간 실험을 시행하였다.

3. 체중, 체온 측정 및 혈청의 채취

단기 투여 실험의 시료는 16일간 투여하였으며 6회에 걸쳐 체중, 체온 및 혈액 내 에스트라디올의 농도를 측정하였다. 장기 투여 실험의 시료는 48일간 투여하였으며 11회에 걸쳐 체중, 체온 및 혈액 내 에스트라디올의 농도를 측정하였다. 체온 측정 시 rat 꼬리에서 약 2 cm 부근에서 적외선 온도계 (Alla Inc., Italy)를 사용하여 측정하였다 (Okada et al., 1997). 체중은 정밀저울을 이용하여 중량을 측정하였다. 에스트라디올 분석을 위한 혈청 시료는 쥐의 꼬리 부에서 혈액을 채취한 후 5분간 원심분리 (3,000 rpm, 4°C)하여 혈청만 분리 후 생화학 분석 전

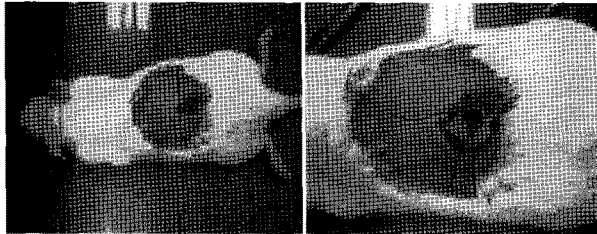


Fig. 1. The process of oophorectomy on Sprague-Dawley Rat.

까지 -70°C에 보관하였다.

4. Estradiol의 분석

혈청 중 에스트라디올은 Rodent Estradiol ELISA Test kit (Endocrine technologies, USA)을 이용하여 EIA (molecular device, Emax, USA)로 450 nm에서 흡광도를 분석하였다 (Song et al., 2007).

5. 통계처리

각 대조군과 시료 투여군의 결과 값은 mean ± SD로 표현하였다. 그룹간의 통계적 유의성은 SPSS 12.0을 이용하여 one way ANOVA로 분석하였으며 $P < 0.05$ 일 때 두 군 사이의 평균에 유의적 차이가 있다고 판단하였다. 그룹간의 차이는 LSD 다중비교법에 의해 비교하였다.

결 과

1. 체중 변화

석류 추출물을 16일간 투여한 후 체중의 변화는 Table 2와 Fig. 2에 나타내었다. 가상 수술을 한 대조군 (SG1)은 181.3±0.9 g에서 217.0±6.0 g으로 실험 기간 동안 34.5 g 체중 증가가 나타났으며, 난소 적출한 대조군 (SG2)의 경우 176.8±4.6 g에서 226.8±6.9 g으로 50 g의 체중 증가를 나타내어 두 그룹간의 통계적인 유의성이 나타났다 (16일, $P < 0.05$). 또한 항우울제 성분인 MAP를 투여한 대조군 (SG3)의 경우 체중의 증가를 나타내었으며 (16일, $P < 0.05$) 이는 Okada et al., 1997의 논문 내용과 유사한 결과이다. 그리고 대조군인 Feramin Q® (SG7)의 투여 시

Table 2. Effect of pomegranate extracts on body weight in the ovariectomized rats

Days	ml/kg/day		mg/kg/day				
	PG (propylene glycol)		MAP (maprotiline hydrochloride)	PE (pomegranate extract)		Feramin Q®	
	5	5	30	25	250	1,250	12
-1	181.3±0.9	176.8±4.6	177.2±4.0	172.4±2.2	172.8±1.6	171.8±2.2	172.2±3.2
3	186.7±2.1	184.4±2.9	181.8±5.0	183.4±5.4	184.6±9.6	181.2±8.4	177.8±2.5
6	192.0±4.5	197.2±5.1	191.6±6.3	181.2±7.2	196.0±5.8	183.0±5.6	179.0±9.5*
10	197.7±6.2	202.0±5.3	206.2±5.2	191.6±10.4	209.0±6.0*	192.6±6.6	192.4±11.8
13	206.5±7.8	213.2±8.4	222.8±8.9	207.0±13.5	228.0±8.9**	212.8±6.8	207.8±11.3
16	217.0±6.0*	226.8±6.9	242.8±6.4**	215.6±13.3	239.6±6.4**	228.4±6.5	216.6±12.5

The value are mean ± SD, n=5 or 6. Statistical significance compared with the control group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (LSD test). Pomegranate extracts were administered continuously for 16 days from 7 days after ovariectomy. PG, propylene glycol; MAP, maprotiline hydrochloride; PE, pomegranate extract; SG1, sham operated rat; SG2-SG7, ovariectomized rat

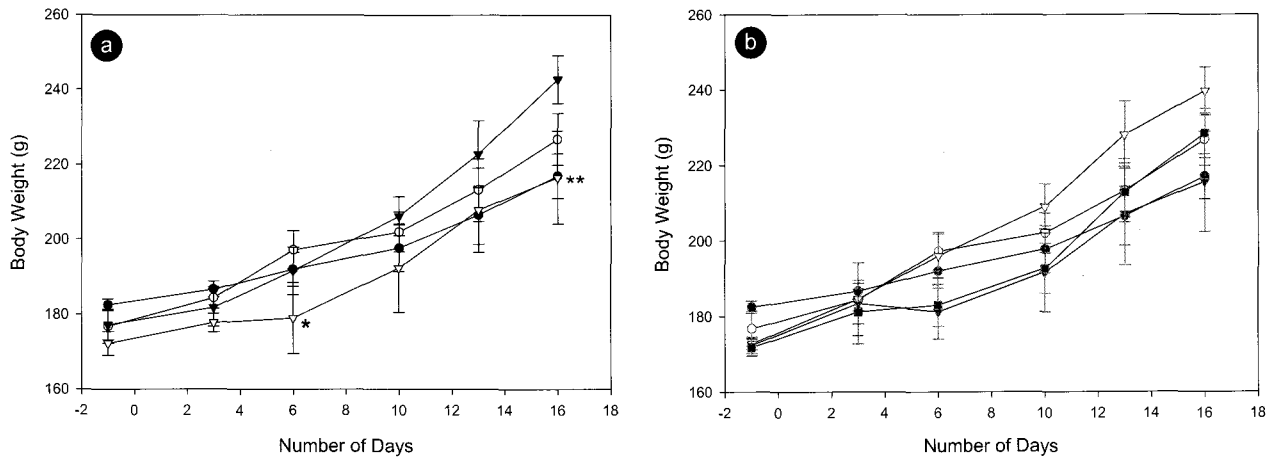


Fig. 2. Effect of pomegranate extract on body weights in female rat. Pomegranate extracts were administered continuously for 16 days from 7 days after ovariectomy. a) -●-, SG1/control (sham); -○-, SG2/control (ovariectomized); -▼-, SG3/MAP 30 mg/kg/day; -▽-, SG7/Feramin Q[®] 12 mg/kg/day; b) -●-, SG1/control (sham); -○-, SG2/control (ovariectomized); -▼-, PE 25 mg/kg/day; -▽-, PE 250 mg/kg/day; -■-, PE 1250 mg/kg/day. The value are presented as mean \pm standard deviation (n=5 for all groups except for the control (sham)). Statistical significance compared with the control group. *P<0.05, **P<0.01 (LSD test)

Table 3. Effect of pomegranate extract on skin temperature ($^{\circ}$ C) in the ovariectomized rats

Days	ml/kg/day		mg/kg/day				
	SG1	SG2	SG3	SG4	SG5	SG4	SG7
	Propylene glycol		Maprotiline hydrochloride	Pomegranate extract			Feramin Q [®]
	5	5	30	25	250	1,250	12
-1	26.78 \pm 0.1	27.26 \pm 0.2	27.74 \pm 0.6	27.88 \pm 1.1	27.92 \pm 0.5	27.68 \pm 0.2	27.72 \pm 0.3
3	27.43 \pm 0.2	27.64 \pm 0.3	27.92 \pm 0.5	28.56 \pm 0.7	26.88 \pm 0.7	28.84 \pm 0.5**	28.80 \pm 0.8
6	27.37 \pm 1.0	28.30 \pm 0.4	28.26 \pm 0.3	27.20 \pm 0.6**	27.52 \pm 0.4**	26.88 \pm 0.6**	27.56 \pm 0.3
10	27.32 \pm 0.5	28.22 \pm 0.5	27.88 \pm 0.4*	26.76 \pm 0.6**	27.00 \pm 0.6**	26.8 \pm 0.4**	27.84 \pm 0.5
13	27.37 \pm 0.6**	28.48 \pm 0.2	28.08 \pm 0.2**	26.42 \pm 0.7**	26.38 \pm 0.3**	26.76 \pm 0.6**	27.76 \pm 0.8
16	27.23 \pm 0.6**	28.52 \pm 0.3	28.10 \pm 0.1**	26.30 \pm 0.5**	26.54 \pm 0.2**	26.64 \pm 0.2**	27.88 \pm 0.5

The value are mean \pm SD, n=5 or 6. Statistical significance compared with the control group. *P<0.05, **P<0.01 (LSD test). Mean on skin temperature ($^{\circ}$ C) for female rats during a 16 day oral gavage study with pomegranate extract. PG, propylene glycol; MAP, maprotiline hydrochloride; PE, pomegranate extract; SG1, sham operated rat; SG2-SG7, ovariectomized rat

체중이 172.2 \pm 3.2 g에서 216.6 \pm 12.5 g으로 44.4 g 증가하여 난소 적출 대조군 (SG2)의 체중 증가보다 적은 것으로 나타났으나 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다.

석류 추출물을 투여한 시험군의 경우 SG5 그룹을 제외한 모든 시험군에서 통계적 유의성이 나타나지 않았다. 석류 추출물을 25, 250, 1,250 mg/kg/day을 투여한 SG4, SG5, SG6 그룹은 투여 초기 대비하여 체중이 43.2, 66.8, 56.6 g로 증가하였다. 이는 난소를 적출한 대조군인 SG2의 체중이 50 g 증가한 것과 대조적이다. 이 중 SG5의 경우 체중의 증가가 많이 되어 대조군 (SG2)과 유의한 차이를 나타내지만, 그보다 1/10의 농도로 처리한 SG4 그룹의 경우 체중이 투여 초기 대비하여 43.2 g 증가하였

다. 이로써 석류 추출물의 투여로 체중의 증가가 둔화되는 것으로 보이며, 석류 추출물을 과량 투여할 경우 석류 추출물 중에 함유된 당 성분으로 인해 체중의 증가가 나타나는 것으로 사료된다. 또한 실험 기간 중 시료 투여와 관련된 사망 동물은 관찰되지 않았다.

2. 체온 변화

석류 추출물을 16일간 투여한 후 체온의 변화는 Table 3, Fig. 3에 나타내었다. 시료를 구강 투여한 후 쥐 꼬리 부위의 온도를 측정된 결과, 난소 적출 대조군 (SG2)의 체온 변화는 가상 수술 대조군 (SG1)과 유의적인 차이를 나타내었다 (P<0.01). 시료를 16일간 투여한 가상 난소 적출 대조군 (SG1)의 체온은 측정 초기보다 0.45 $^{\circ}$ C 정도

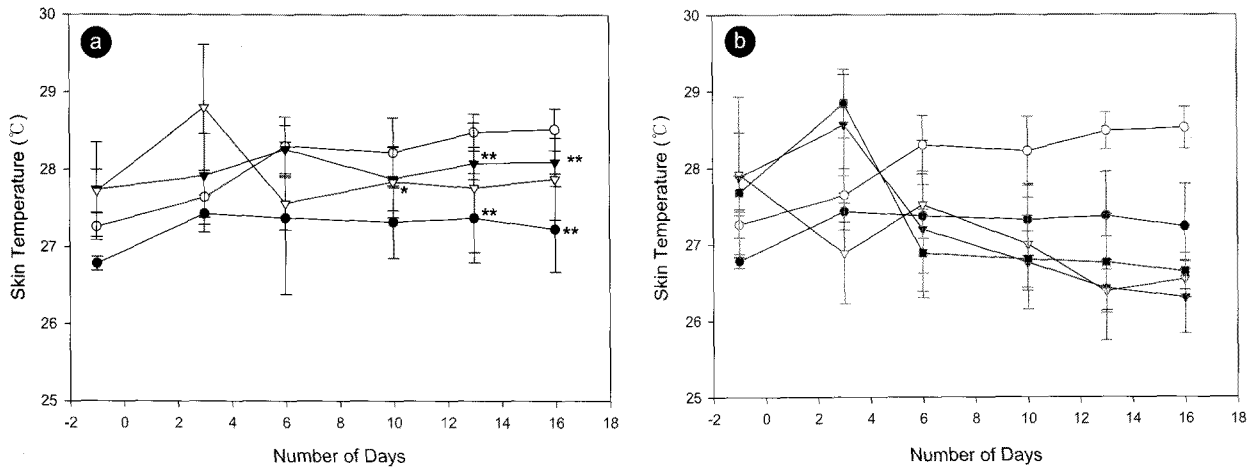


Fig. 3. Effect of pomegranate extract on skin temperature ($^{\circ}\text{C}$) in female rat. Mean on skin temperature ($^{\circ}\text{C}$) for female rats during a 16 day oral gavage study with pomegranate extract. a) \bullet -, SG1/control (sham); \circ -, SG2/control (ovariectomized); ∇ -, SG3/MAP 30 mg/kg/day; ∇ -, SG7/Feramin Q[®] 12 mg/kg/day; b) \bullet -, SG1/control (sham); \circ -, SG2/control (ovariectomized); ∇ -, PE 25 mg/kg/day; ∇ -, PE 250 mg/kg/day; \blacksquare -, PE 1,250 mg/kg/day. The value are presented as mean \pm standard deviation (n=5 for all groups except for the control (sham)). Statistical significance compared with the control group. * P <0.05, ** P <0.01 (LSD test)

Table 4. Effect of pomegranate extract on estrogen concentration in the ovariectomized rats

Days	SG1		SG2		SG3		SG4		SG5		SG6		SG7	
	ml/kg/day		ml/kg/day		mg/kg/day		mg/kg/day		mg/kg/day		mg/kg/day		mg/kg/day	
	Propylene glycol		Propylene glycol		Maprotiline hydrochloride		Pomegranate extract		Pomegranate extract		Pomegranate extract		Feramin Q [®]	
	5	5	5	5	30	25	250	1,250	1,250	1,250	1,250	12	12	12
-1	10.96 \pm 3.1	9.38 \pm 3.2	7.76 \pm 2.2	11.26 \pm 5.0	11.26 \pm 2.2	9.78 \pm 2.6	7.64 \pm 0.9							
3	12.28 \pm 2.9	10.42 \pm 2.2	8.60 \pm 2.6	9.52 \pm 2.8	9.52 \pm 2.2	8.06 \pm 2.8	11.58 \pm 3.1							
6	8.81 \pm 1.9	8.47 \pm 2.6	5.55 \pm 0.4	12.60 \pm 1.9	12.60 \pm 5.0	14.94 \pm 2.4**	11.50 \pm 3.3**							
10	9.53 \pm 2.2	7.95 \pm 1.4	7.87 \pm 1.3	10.02 \pm 1.2	10.02 \pm 0.9	10.15 \pm 3.7	8.70 \pm 3.4							
13	10.46 \pm 4.0	5.30 \pm 0	8.37 \pm 1.4	7.22 \pm 1.7	7.20 \pm 1.3	7.03 \pm 1.5	7.65 \pm 1.5							
16	7.66 \pm 1.7	7.23 \pm 1.1	6.50 \pm 0.8	8.60 \pm 1.8	8.60 \pm 0.7	13.36 \pm 2.1	ND*							

ND*, not detected. The value are mean \pm SD, n=5 or 6. Statistical significance compared with the control group. * P <0.05, ** P <0.01 (LSD test) Mean estradiol concentration for female rats during a 18 day oral gavage study with pomegranate extract; SG1, sham operated rat; SG2-SG7, ovariectomized rat

의 체온이 증가하였으며, 난소를 적출한 대조군 (SG2)의 경우 동일 기간 동안 1.26 $^{\circ}\text{C}$ 의 체온 상승이 나타났다 (16일, P <0.05). 또한 석류 추출물을 투여한 시험군 SG4, SG5, SG6의 체온이 투여 초기보다 오히려 감소하는 경향 (-1.58 $^{\circ}\text{C}$, -1.41 $^{\circ}\text{C}$, -1.04 $^{\circ}\text{C}$)을 나타냈으며 이는 난소 적출 대조군 (SG2)과 유의적인 차이를 나타내었다 (P <0.01). 그 중 SG4의 경우 25 mg/kg/day의 석류 추출물을 투여한 것으로, 체온의 감소가 -1.58 $^{\circ}\text{C}$ 로 나타났으며, 대조군인 난소 적출 쥐의 체온이 1.26 $^{\circ}\text{C}$ 증가한 것을 감안하면 약 2.7 $^{\circ}\text{C}$ 정도의 체온 감소가 나타났다.

그러나 Feramin Q[®]를 투여한 대조군 (SG12)과 항우울제 성분인 MAP을 투여한 시험군 (SG3)은 0.16 $^{\circ}\text{C}$, 0.36 $^{\circ}\text{C}$

의 체온 증가를 나타냈으며 이는 난소 적출 대조군 (SG2)와 유사한 수준으로 그룹간의 유의적 차이는 나타나지 않았다.

3. 에스트라디올의 농도 변화

석류 추출물을 16일간 투여한 후 혈청 내의 에스트라디올 함량의 변화는 Table 4, Fig. 4에 나타내었다. 난소 적출 대조군 (SG2)의 에스트라디올 함량은 석류 추출물의 투여 시간이 경과할수록 감소하는 경향을 나타냈으며, 이는 가상 수술 대조군 (SG1)보다 급격하게 나타났으나 통계적 유의성은 나타내지 않았다. 또한 MAP 투여 대조군 (SG3)은 난소 적출 대조군에 비해 급격한 에스트라

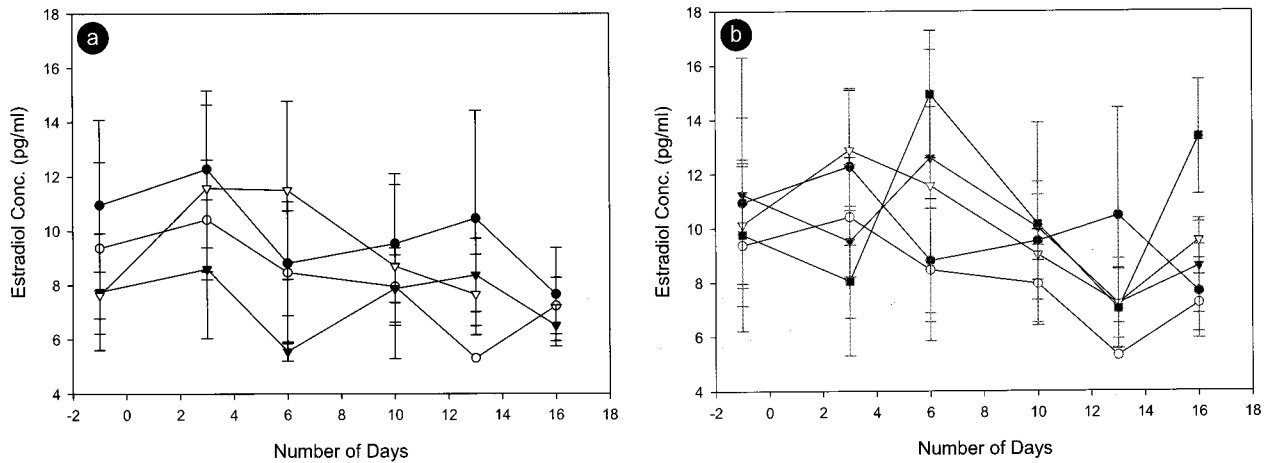


Fig. 4. Effect of pomegranate extract on estradiol concentration in female rat. Mean estradiol concentration for female rats during a 18 day oral gavage study with pomegranate extract. a) -●-, SG1/control (sham); -○-, SG2/control (ovariectomized); -▼-, SG3/MAP 30 mg/kg/day; -▽-, SG7/Feramin Q[®] 12 mg/kg/day; b) -●-, SG1/control (sham); -○-, SG2/control (ovariectomized); -▼-, PE 25 mg/kg/day; -▽-, PE 250 mg/kg/day; -■-, PE 1,250 mg/kg/day. The value are presented as mean \pm standard deviation (n=5 for all groups except for the control (sham)). Statistical significance compared with the control group. * P <0.05, ** P <0.01 (LSD test)

Table 5. Effect of pomegranate extract on body weight in the ovariectomized rats for 45 days

Days	Propylene glycol (ml/kg/day)		Pomegranate extract (mg/kg/day)	
	5	5	25	1,250
-3	197.5 \pm 2.5	198.12 \pm 3.7	201.68 \pm 4.3**	196.30 \pm 6.2
1	206.0 \pm 14.2	204.26 \pm 3.4	213.12 \pm 2.4	205.28 \pm 1.0
5	210.5 \pm 7.5	214.48 \pm 3.5	219.00 \pm 6.2**	210.66 \pm 0.4
10	217.4 \pm 5.3**	228.74 \pm 4.4	227.92 \pm 2.9**	222.02 \pm 1.7**
15	225.6 \pm 2.1**	251.70 \pm 5.2	239.8 \pm 2.5**	233.34 \pm 1.7**
20	232.7 \pm 1.5**	265.16 \pm 5.6	251.46 \pm 2.4**	248.54 \pm 1.6**
25	237.9 \pm 2.9**	279.96 \pm 4.5	257.26 \pm 3.7**	269.06 \pm 5.1**
30	246.3 \pm 4.3**	295.04 \pm 5.9	264.98 \pm 4.5**	285.28 \pm 2.4**
35	258.6 \pm 1.3**	316.92 \pm 5.4	275.96 \pm 4.6**	299.64 \pm 2.4**
40	269.0 \pm 2.6**	330.98 \pm 7.9	286.88 \pm 5.0**	313.82 \pm 4.3**
45	279.3 \pm 5.3**	344.46 \pm 7.7	298.18 \pm 5.2**	332.40 \pm 3.5**

Pomegranate extracts were administered continuously for 45 days from 6 days after ovariectomy. The value are mean \pm SD, n=5 or 6. Statistical significance compared with the control group (LG2). * P <0.05, ** P <0.01 (LSD test). LG1, sham operated rat; LG2-LG4, ovariectomized rat

다음의 감소 경향을 나타내지 않았다. 그러나 위 결과는 생체 시료 중의 농도를 측정된 것으로, 안정적인 값을 얻지 못하여 통계적 유의성을 나타내지는 않았다. 대조군인 Feramin Q[®]를 투여한 경우, 투여 6일째는 대조군 대비 유의적인 증가를 나타내었다 (P <0.05). 또한 투여 13일까지 이러한 증가 추세가 유지됨을 확인하였다.

석류 추출물을 투여한 시험군에서 통계적으로 유의성 있는 결과를 나타내지 못하였으나, 석류 추출물을 고농도로 처리한 그룹일수록 SG4~SG6의 에스트라디올 함량

이 증가하는 경향성을 보여주었다. 시료 투여 6일째에는 석류 추출물 1,250 mg/kg/day를 투여한 경우, 시료 투여 1일 전의 에스트라디올 함량에 대비하여 유의적인 증가를 나타내었다 (P <0.01). 또한 이러한 에스트라디올의 증가는 실험 종료 시까지 유지됨을 확인하였으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다.

이로써 석류 추출물의 효능에 관한 단기 실험 결과, 석류 추출물은 체중 및 체온의 증가를 둔화시키며, 체내 에스트라디올의 함량을 증가시키는 것으로 나타났다. 특

히, 석류 추출물을 25 mg/kg/day의 농도로 구강 투여한 결과, 난소 적출 대조군 대비하여 7 g 정도의 체중 증가가 둔화되었으며, -2.7°C의 체온 감소가 나타났으며, 이러한 결과는 통계적으로 유의성을 나타내었다. 그리고 체내의 에스트라디올의 함량은 난소 적출 대조군 대비하여 증가하였으나, 통계적인 유의성을 나타내지는 않았다.

석류 추출물을 45일간 구강 투여한 후 체중 변화는 Table 5과 Fig. 5a에 나타내었다. 난소를 적출한 대조군인 LG2는 시료 투여 3일 전과 비교하여 146.34 g의 체중이 증가하였다. 난소를 적출하지 않은 가상 난소 적출 대조군인 LG1은 시료 투여 3일 전과 비교하여 81.8 g의 체중이 증가하였다. 난소를 적출한 그룹의 체중은 난소를 적출하지 않은 그룹의 체중과 통계적 유의한 차이를 나타내었다 ($P<0.01$). 석류 추출물 투여한 LG3, LG4의 체중은 투여 전보다 96.5, 136.1 g의 체중이 증가되었다. 석류 추출물을 투여한 LG3와 LG4의 경우, 석류 추출물의 처리 농도가 많아 질수록 체중 증가의 둔화가 적어졌으며 이는 석류 추출물을 과량 투여할 경우 석류 추출물 내에 함유된 당 성분으로 인해 체중 증가의 나타난 것으로 사료된다. 따라서 석류 추출물을 소량인 25 mg/kg/day의 농도로 처리할 경우, 난소 적출로 인한 체중 증가를 둔화시키는 것을 확인할 수 있다.

석류 추출물을 45일간 구강 투여한 후 체온 변화는 Table 6, Fig. 5b에 나타내었다. 석류 추출물을 45일 장기간으로 구강 투여한 결과, 난소 적출 대조군 LG2의 체온 증가는 투여 전 3일 대비하여 1.7°C 증가하였으며, 가상 난소 적출 대조군인 LG1의 체온 증가는 석류 추출물 투여 3일 전 대비하여 0.96°C 증가하였으며 두 그룹간의 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다 ($P<0.01$). 석류 추출물을 투여한 LG3, LG4 시험군의 체온은 석류 추출물 투여 3일 전 대비하여 -1.28°C, -1.8°C 감소하였다. 난소 적출 대조군인 LG2의 체온이 1.7°C 증가한 것을 감안하면 체온의 감소가 확연히 나타난 것이며 석류 추출물 투여 5일 후부터는 난소 적출 대조군과의 통계적으로 유의한 차이를 확인할 수 있었다 ($P<0.01$).

석류 추출물을 45일 장기간으로 구강 투여한 결과 체내 에스트라디올의 농도 변화는 Table 7과 Fig. 5c에 나타내었다. 체내 에스트라디올의 농도는 그룹간의 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 투여 기간이 경과할수록 석류 추출물을 투여한 LG3, LG4의 체내 에스트라디올의 함량이 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 값들의 편차가 크게 나타나 그 양상을 명확히 판단할 수는 없으나, 석

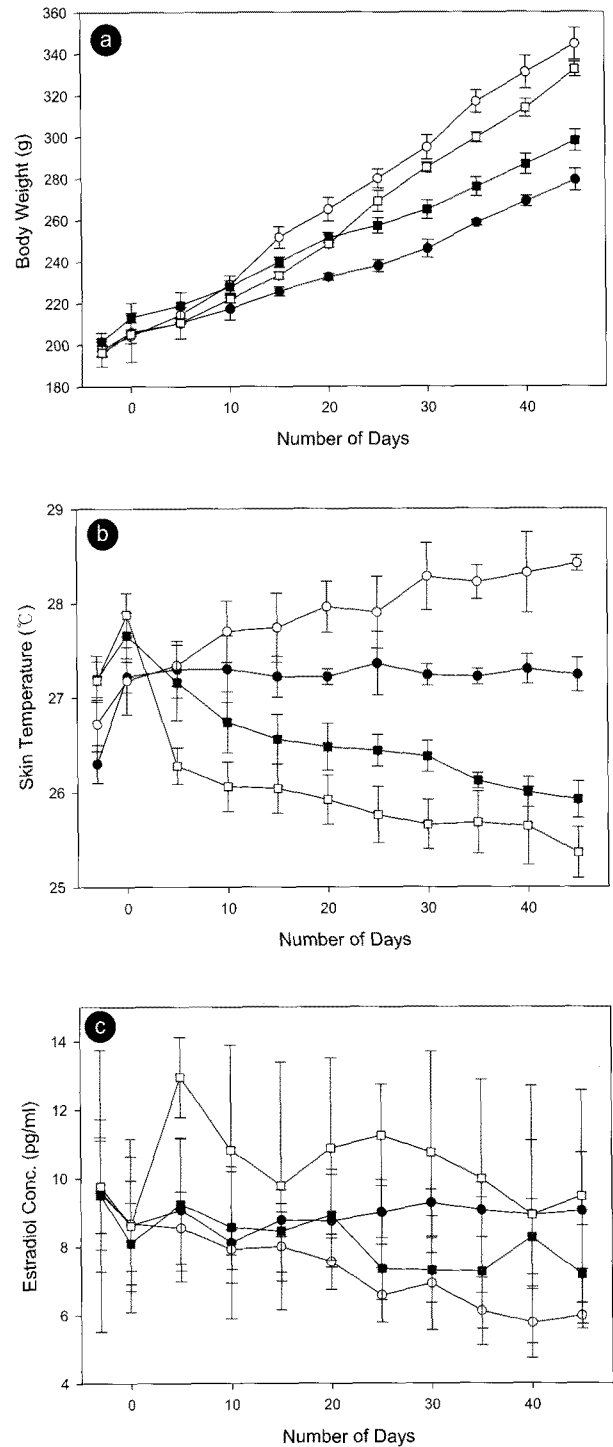


Fig. 5. Effect of pomegranate extract on body weight (a), skin temperature (b), and estradiol concentration (c) in female rats. Pomegranate extracts were administered continuously for 45 days from 3 days after ovariectomy. The value are presented as mean \pm standard deviation (n=5). Statistical significance compared with the cont group (LG2). * $P<0.05$, ** $P<0.01$ (LSD test). Symbol: -●-, LG1/control (sham); -○-, LG2/control (ovariectomized); -■-, PE 25 mg/kg/day; -□-, PE 1,250 mg/kg/day.

Table 6. Effect of pomegranate extract on skin temperature (°C) in the ovariectomized rats for 45 days

Days	LG1	LG2	LG3	LG4
	Propylene glycol (ml/kg/day)		Pomegranate extract (mg/kg/day)	
	5	5	25	1,250
-3	26.30±0.2	26.72±0.3	27.20±0.2	27.18±0.2
1	27.22±0.2**	27.18±0.4	27.66±0.2	27.88±0.2
5	27.30±0.3**	27.34±0.2	27.16±0.2**	26.28±0.2**
10	27.30±0.4	27.7±0.3	26.74±0.3**	26.06±0.3**
15	27.22±0.2	27.74±0.4	26.56±0.3**	26.04±0.3**
20	27.22±0.1**	27.96±0.3	26.48±0.2**	25.92±0.3**
25	27.36±0.3	27.9±0.4	26.44±0.2**	25.76±0.3**
30	27.24±0.1**	28.28±0.4	26.38±0.2**	25.66±0.3**
35	27.22±0.1**	28.22±0.2	26.12±0.1**	25.68±0.3**
40	27.30±0.2**	28.32±0.4	26.00±0.2**	25.64±0.4**
45	27.24±0.2**	28.42±0.1	25.92±0.2	25.36±0.3**

Pomegranate extracts were administered continuously for 45 days from 6 days after ovariectomy. The value are mean ± SD, n=5 or 6. Statistical significance compared with the control group (LG2). **P*<0.05, ***P*<0.01 (LSD test). LG1, sham operated rat; LG2-LG4, ovariectomized rat

Table 7. Effect of pomegranate extract on estradiol conc. in the ovariectomized rats for 45 days

Days	LG1	LG2	LG3	LG4
	Propylene glycol (ml/kg/day)		Pomegranate extract (mg/kg/day)	
	5	5	25	1,250
-3	9.63±4.1	9.56±1.6	9.50±2.2	9.76±1.4
1	8.63±2.5	8.68±2.0	8.10±1.2	8.62±1.3
5	9.08±2.1	8.55±1.0	9.24±2.0	12.95±1.7
10	8.12±2.2	7.92±0.6	8.57±1.6	10.82±3.1
15	8.78±0.5	8.00±1.0	8.45±1.2	9.77±3.6
20	8.75±1.4	7.55±0.8	8.92±1.3	10.87±2.6
25	9.00±1.0	6.58±0.8	7.35±0.9	12.85±1.5
30	9.28±0.4	6.93±1.4	7.30±0.9	10.75±2.9
35	9.06±0.8	6.12±0.5	7.27±2.2	9.97±2.89
40	8.93±2.2	5.78±1.0	8.27±1.1	8.92±3.8
45	9.04±1.7	5.98±0.4	7.18±1.4	9.46±3.1**

Pomegranate extracts were administered continuously for 45 days from 6 days after ovariectomy. The value are mean ± SD, n=5 or 6. Statistical significance compared with the control group (LG2). **P*<0.05, ***P*<0.01 (LSD test). LG1, sham operated rat; LG2-LG4, ovariectomized rat

류 추출물을 투여한 시험군 LG3, LG4는 난소 적출 대조군인 LG2보다 더 높은 에스트라디올 함량을 유지하는 것은 확인할 수 있다.

고 찰

본 연구에서는 난소를 적출한 실험 동물 쥐에 석류 추출물의 구강 투여 시 체중, 체온 및 체내 에스트라디올 함량의 변화를 확인하고자 하였다. 동물 및 사람의 난소 적출은 estrogen 분비를 감소시켜 체중 증가를 가져온다

는 여러 보고 (Wronski et al., 1988; Abe et al., 1993; Aitken et al., 1972)와 같이 본 연구에서도 난소 적출 쥐의 경우 가상 적출 쥐에 비해 체중이 증가함을 두 실험을 통해 확인하였다. 가상 난소 적출 쥐 대비 난소 적출 쥐의 체중 증가는 1.44배 (16일 경과 시)와 1.79배 (45일 경과 시)로 나타났으며 이는 Lee et al., 2006의 논문에서 나타난 1.6배 (16일 경과 시)와 유사한 결과이다. 이러한 결과는 난소절제로 인한 에스트로젠 분비 부족이 지방조직의 lipoprotein lipase의 활성 저하 및 hormone sensitive lipase 활성을 증가시켜 체지방의 축적을 증가되기 때문이다

(Song et al., 2007; Chatteraj, 1976).

이에 석류 추출물을 구강 투여한 SG4의 경우, 체중 감소 효과가 나타났으며, 이는 석류 추출물이 난소 적출 쥐의 체중 증가를 억제한다는 보고 (Okamoto et al., 2004)와 같이 투여된 석류 추출물이 지질 대사에 관여한 것으로 생각된다. 그러나 과량의 석류 추출물을 투여한 경우, 오히려 체중의 증가가 더 확연히 나타났으며 이는 석류 추출물 중 다량 함유된 당 성분으로 인해 체중의 증가가 나타난 것으로 사료된다. Feramin Q® 처리 대조군의 경우 송마 추출물과 요한초 추출물을 함유하고 있어 이러한 생약제제에 의한 체중 증가가 둔화된 것으로 사료된다. 그러나 그룹간의 명확한 연관성이 나타나지 않아 어떠한 물질에 의한 것인지는 농도별, 물질별로 검증을 해야 더 명확한 사실을 확인할 수 있을 것이라 사료된다. 명확한 확인을 위해서는 체중뿐 아니라 지질 대사와 관련된 여러 지표 (HDL cholesterol, LDL cholesterol, triglyceride, leptin)의 확인이 추가적으로 이루어져야 할 것으로 판단된다.

갱년기 여성의 주요 증상인 안면홍조, 식은땀, 불안 증 일상 생활의 많은 불편을 주는 안면홍조 개선에 석류 추출물의 효능을 확인하고자 난소 적출 쥐의 체온을 측정하였다. 그 결과, propylene glycol만을 투여한 대조군에 비해 석류 추출물 투여한 시험군의 경우 $-1.6 \sim -2.8^\circ\text{C}$ 의 체온 감소 효과를 나타냈다. 이는 석류 추출물 중 함유된 에스트로겐의 효능에 의한 것으로 예측되며, 이러한 결과는 17β -estradiol의 투여로 인해 체온의 감소 효과 (Patel et al., 2008)가 나타난다는 보고와 유사한 것으로 사료된다. 또한 석류 추출물을 투여한 경우, 갱년기 관련 여러 증상 중 골다공증, 에스트라디올 함량, 식은땀 등의 갱년기 장애 개선에 관한 보고가 되고 있다.

여성이 폐경기가 가까워지면 난소에서 난포가 성선자극호르몬들에 대한 반응의 감소 및 성선자극호르몬들의 분비에도 변화가 생겨 난포의 성숙 장애로 난소 호르몬 분비가 감소하며 이로써 폐경의 증상이 유발된다 (Kim et al., 1985). 두 실험을 통하여 이러한 난소 호르몬의 생성에 중대한 역할을 하는 난소를 적출함으로써 갱년기 증상을 유발하였고 이로써 체내의 에스트라디올의 함량이 감소함을 확인하였다. 이에 17β -estradiol을 함유한 석류 추출물을 투여함으로써 체내 에스트라디올의 보충으로 인해 감소폭의 둔화됨을 확인하였다 (Fig. 4, Fig. 5c). 난소 적출 쥐에 석류 추출물을 투여할 경우 체내의 에스트라디올 함량이 투여 전 대비하여 증가함을 확인할 수

있었으며 ($P < 0.01$) 이는 에스트라디올과 유사 물질을 함유한 석류 추출물이 에스트라디올 보충 효과가 있음을 유추할 수 있다 (Song et al., 2007; Moneam et al., 1988; Kim et al., 2002). 그러나 동일 시험군이라 하더라도 실험 동물간의 차이가 나타나 그 추이를 명확히 확인하기 어려우므로 좀 더 안정적인 실험값을 측정하기 위한 방법의 모색이 필요하리라 생각된다.

위의 단기간 및 장기간의 실험 결과를 토대로 석류 추출물의 체온 및 체중의 감소, 에스트라디올의 보충 효과를 확인하였다. 25, 250, 1,250 mg/kg/day의 농도로 투여된 석류 추출물은 난소 적출 쥐의 체온을 대조군 대비하여 2.84°C , 2.67°C , 2.30°C 로 감소시켰으며, 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다. 또한 난소 적출 쥐에 석류 추출물을 25 mg/kg/day로 투여한 결과, 난소 적출 대조군 대비하여 체중의 증가가 둔화되었으며 체내 에스트라디올의 함량 또한 일부 보충되는 경향을 나타내었으나, 통계적으로 유의한 차이를 나타내지는 않았다. 난소 적출 쥐에 투여된 석류 추출물 25, 250, 1,250 mg/kg/day의 양을 갱년기 성인 여성의 평균 체중인 60 kg을 기준으로 환산할 경우, 1.5, 15, 75 g/day로 환산할 수 있으며 1일 최소 1.5 g의 석류 추출물을 섭취할 경우 갱년기 여성의 안면홍조 및 갱년기 증상이 개선될 것으로 생각된다.

또한 실험 동물에 투여한 석류 추출물의 독성을 확인하고자 사망 동물 및 독성 징후를 육안으로 살펴 보았으나 실험 기간 동안 사망 동물 및 독성의 징후는 나타나지 않았다. 또한 기존 보고에 따르면, 석류를 ethylalcohol 추출액으로 마우스 처리시 LD_{50} 이 731 mg/kg으로 나타나 (Patel et al., 2008) 허용량을 565~945 mg/kg으로 보고하였다. 또 다른 석류 과실 전체 추출물의 급성 독성 및 아급성 독성 자료를 살펴 보면 석류 추출물을 쥐의 구강에 투여할 경우, LD_{50} 은 5 g/kg 이상인 것을 나타냈으며, 복강 투여 시에는 LD_{50} 은 217~187 mg/kg으로 나타났다. 또한 아급성 독성 실험을 한 결과, 석류 추출물의 1일 허용량은 600 mg/kg 이상인 것으로 확인되었다 (Vidal et al., 2003). 따라서 위의 실험 결과 및 독성 보고를 통해 살펴본 결과, 체온의 감소를 나타내는 석류 추출물 25~1,250 mg/kg/day를 섭취할 경우, 60 kg 여성을 기준으로 1일 1인이 1.5~75 g에 달하는 양이며, 그 중 효과가 가장 뛰어난 25 mg/kg/day를 투여할 경우 성인 여성 1인이 1일 섭취해야 하는 양은 1.5 g이며, 이는 위의 보고와 실험 결과로 유추해볼 때 독성이 나타나지 않는 안전한 농도일 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Abe T, Chow JWM, Lean JM, Chamber TJ. Estrogen does not restore bone lost after ovariectomy in the rat. *J Bone Miner Res.* 1993. 8: 831-838.
- Aitken JM, Armstrong E, Anderson JB. Osteoporosis after oophorectomy in the mature female rat and the effect of oestrogen and/or progestogen replacement therapy in its prevention. *J Endocrinol.* 1972. 55: 79-87.
- Albertazzi, Pansini F, Bottanuzzi M, Bonaccorsi G, De AD, Morton MS. Dietary soy supplementation and phytoestrogen levels. *Obstetrics Gynecol.* 1999. 94: 229-231.
- Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, Hayek T, Presser D, Fuhrman B. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr.* 2000. 71: 1062-1076.
- Cauley JA, Zmuda JM, Ensrud KE, Bauer DC. Timing of estrogen replacement therapy for optimal osteoporosis prevention. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001. 86: 5700-5705.
- Chattoraj SC. Endocrine function in fundamentals of clinical chemistry. NW Tietz eds WB Saunders Chap. 1976. 13: 699-823.
- Clavel-Chapelon F. Hormone replacement therapy and risk of breast cancer. *Press Med.* 2000. 21: 1688-1693.
- Coldham NG, Sauer MJ. Identification, quantitation and biological activity of phytoestrogens in dietary supplement for breast enhancement. *Food Chem Toxicol.* 2001. 39: 1211-1224.
- Johnson EB, Muto MG, Yanushpolsky EH, Mutter GL. Phytoestrogen supplementation and endometrial cancer. *Obstetrics Gynecol.* 2001. 98: 947-950.
- Kim JS, Cho JC, Choi CO, Kim WH. Studies on climacteric symptoms and serum concentrations of LH, FSH, and Estradiol-17 β in early postmenopausal woman. *The Keimyung univ Med J.* 1985. 4: 248-253.
- Kim SH, Kim IH, Kang BH, Cha TY, Lee JH, Rim SO, Song KS, Song BH, Kim JG, Lee JM. Analysis of extraction characteristics of phytoestrogen components from punica granatum L. *J Korean Soc Appl Biol Chem.* 2005. 48: 352-357.
- Kim JS, Park JH, Cho HS, Park JS, Hong EK. Effect of plant extract (FGF271) on estrogen replacement. *Korean J Biotechnol Bioeng.* 2002. 17: 409-415.
- Koh, JH, Hwang MO, Moon JS, Hwang SY, Son JY. Antioxidative and antimicrobial activities of pomegranate seed extracts. *Korean J Food Cookery Sci.* 2005. 21: 171-179.
- Kurachi H, Murata Y. Clinical features affecting the results of estrogen replacement therapy on bone density in Japanese postmenopausal women. *Gynecol Obstet Invest.* 2001. 52: 223-226.
- Lee JY. Hormone replacement therapy in postmenopausal women. 1993. *J Klima.* 12: 27-36.
- Lee YH, Hyun SH, Choung SY. Effect of single and mixed pomegranate on postmenopausal symptoms in ovariectomized rats. *Yakhak Hoeji.* 2006. 50: 177-183.
- Morishige K, Matsumoto K, Ohmichi M, Nishio Y, Adachi K, Hayakawa J, Nukui K, Tasaka K, Kurachi H, Murata Y. Clinical features affecting the results of estrogen replacement therapy on bone density in Japanese postmenopausal women. *Gynecol Obstet Invest.* 2001. 52: 223-226.
- Lemay A, Dodin S, Kadri N, Jacques H, Forest JC. Flaxseed dietary supplement versus hormone replacement therapy in hypercholesterolemic menopausal women. *Obstetrics Gynecol.* 2002. 100: 495-504.
- Life-table. 2002. Korea National Statistical Office. Dea-jeon, Korea.
- Longtin R. The pomegranate: nature's power fruit?. *J Natl Cancer Inst.* 2003. 95: 346-348.
- Moneam NMA, Sharaky ASE, Badreldin MM. Oestrogen content of pomegranate seeds. *J Chromatography* 1988. 438: 438-442.
- Nugteren DH, Christ-Hazelhof E. Naturally occurring conjugated octadecatrienoic acid are strong inhibitors of prostaglandin biosynthesis. *Prostaglandins* 1987. 33: 403-417.
- Okada M, Hayashi N, Kometani M, Nakao K, Inukai T. Influences of ovariectomy and continuous replacement of β -estradiol on the tail skin temperature and behavior in the forced swimming test in rats. *Jpn J Pharmacol.* 1997. 73: 93-96.
- Okamoto JM, Yoko OH, Hideyuki Y, Hiroyuki Y. Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. *J Ethnopharmacol.* 2004. 92: 93-101.
- Patel C, Dadhaniya P, Hingorani L, Soni MG. Safety assessment of pomegranate fruit extract: Acute and subchronic toxicity studies. *Food Chem Toxicol.* 2008. 46: 2728-2735.
- PH van de Weijer, Barentsen R. Isoflavones from red clover significantly reduce menopausal hot flush symptoms compared with placebo. *Maturitas.* 2002. 42: 187-193.
- Poyranzogle E, Gokmen V, Artjk N. Organic acids and phenolic compounds in pomegranates Grown in turkey. *J Food*

- composition analysis 2002. 15: 567-575.
- Ross RK, Anllia PH, Wan PC, Pike MC. Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogens versus estrogen plus progestin. *J Natl Cancer Institute* 2000. 92: 328-332.
- Shim SM, Choi SW, Bae SJ. Effect of *Punica granatum* L. fractions on quinone reductase induction and growth inhibition on several cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2001. 30: 80-85.
- Song BH, Tran NA, Bae SY. Pomegranate as resource of phytoestrogen and anticancer substances. *Kor J Microbiol Biotechnol*. 2007. 35: 81-97.
- Vidal A, Fallarero A, Pena BR, Medina ME, Gra B, Rivera F, Gutierrez Y, Vuorela PM. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *J Ethnopharmacol*. 2003. 89: 295-300.
- Wronski TJ, Cintron M, Dann LM. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*. 1988. 43: 179.
-