Original Article

난소를 절제한 마우스에서 갱년기증후군에 대한 오미자의 효과

신다솜¹, 홍성빈², 김정호², 마진열³, 정환석³

¹경희대학교 한의과대학 생리학교실, ²바이오믹스 생명과학연구소, ³한국한의학연구원 한의기술응용센터

Effects of Schisandrae Fructus on menopause symptoms in ovariectomized mice

Dasom Shin¹, Seong Bin Hong², Jeong Ho Geum², Jin Yeul Ma³, Hwan-Suck Chung³

¹Department of Physiology, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, ²BIOMIX Inc.

³Korean Medicine (KM) Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM)

Objectives: The present study aimed at investigating the effects of Schisandrae Fructus (SF) on menopause symptoms in ovariectomized mice.

Methods: 6 weeks old female mice were ovariectomized (OVX), and the OVX mice were fed with a three doses of SF (25, 100, and 400 mg/kg, respectively) or 17 β -estradiol (E2, 0.5 mg/kg) 3 times a week for 6 weeks. Body weight was measured at every week and uterus weight was also measured at the end of experiment. Lipids and osteocalcin levels in serum were analyzed.

Results: The uterine weight was not changed in SF treated group, while E2 intake increased the reduced uterine weight by OVX. Although Body weight was increased since two weeks after ovariectomy compared with sham operated group, there was no change in SF or E2 treated group compared with OVX. But LDL was significantly reduced in SF (400 mg/kg) or E2 fed mice and SF or E2 treatment decreased enhanced osteocalcin level by OVX.

Conclusion: These results indicated that SF would be effective in the improvement of LDL level and osteoporosis on menopause.

Key Words : Menopause, Schisandrae fructus, Ovariectomized mice, Osteoporosis, Osteocalcin

서 론

최근 우리나라는 경제성장과 더불어 여성들의 사회활동이 급격히 증가하는 추세이다. 더욱이 의료기술의 발달로 인하여 사람의 평균 수명도 길어져 사회적으로 갱년기에 대한 관심이 점점 높아지고 있다. 여성의 갱년기는 에스트로겐의 결핍으로 인한 안면홍조, 피로감, 불안감, 우울, 기억력 장애, 수면 장애, 질 건조감, calcitonin 기능 억제에 의하여 골교체를 (bone turnover)증가에 따른 골다공증 등이

대표적인 증상이다^{1,2)}.

이런 갱년기 증상을 완화하기 위해 estrogen이나 progestin을 섭취하는 호르몬보충요법이 많이 사용되며 이는 골다공증으로 인한 골절, 결장암을 억제하는 효과가 있지만 관상동맥질환, 중풍, 혈전 색전증, 담낭염, 유방암, 자궁내막암 등의 부작용을 유발한다는 보고가 있다³⁻⁵⁾. 반면, 우리 주변에서 접할 수 있는 식물자원 중 아마씨, 칩, 석류 등에 함유된 isoflavone, lignan이 phytoestrogen으로 작용하여 여성갱년기에 효과가 있다는 연구는 이미 보고되어있

• Received : 30 August 2016

• Revised : 20 September 2016

• Accepted : 20 September 2016

• Correspondence to : 정환석(Hwan-Suck Chung)

대구광역시 첨단로 70 한국한의학연구원 한의기술응용센터

Tel : +82-53-940-3875, Fax : +8253-940-3849, E-mail : hschung@kiom.re.kr

다⁶⁾. 이런 이유로 부작용이 적은 생약재를 이용한 건강기능식품 및 천연물 신약 개발이 꾸준히 진행되고 있다.

오미자는 구기자, 사상자, 토사자, 복분자와 함께 五子로 불리며 전통적으로 많이 알려진 생약재로서 오미자과 (Schisandraceae)과에 속한 낙엽 목질 등본으로 열매가 붉게 맺히며 주로 열매를 사용한다. 오미자는 신맛, 쓴맛, 매운맛, 짠맛, 단맛 등 다섯 가지의 맛을 가지고 있다고 하여 五味子로 불리며, 性은 溫하고, 味는 酸甘하며 肺, 心, 腎經에 들어가 上으로는 肺氣를 斂하고, 下로는 腎陰을 滋하며 澀精止瀉, 生津, 止汗 등의 작용을 가지고 있다⁷⁾. 예로부터 기침 등의 호흡기 증상과 간질환, 만성 간질환 등에 효과가 있다고 하여 차로 많이 사용되어왔으며 현재에는 식품원료로 사용이 허가되어있을 정도로 無毒하다. 오미자는 schizandrin, gomisin N, gomisin A, deoxyschizandrin 등의 리그난을 주요성분으로 함유하고 있다고 보고되어있으며⁸⁾, 이런 lignan이 약물의 주된 효과를 발휘하는 화합물로 알려져 있다. 오미자 추출물이 in vitro 실험을 통해 파골세포의 분화를 억제하고, estrogen receptor 를 활성화한다는 결과가 보고되어있지만^{9,10)}, in vivo에서 갱년기 증상에 미치는 효능은 아직 알려져 있지 않다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 20-25 g인 6주령 암컷 (C57BL/6J) mice의 난소 절제 모델 (OVX model mice)과 비난소 절제군 (sham-operated mice)를 ㈜오리엔트바이오 (성남)에서 구입해 1주일간 무균실에서 순응시켰다. 순응기간 종료 후 난괴법 (Randomized Complete Block Design)에 의하여 8마리씩 6군 [비 난소절제 정상대조군 (Sham) 즉, 난소절제는 실시하지 않았으나 수술의 스트레스를 동일하게 받은 군, 난소를 절제한 대조군 (OVX-Vehicle), 난소절제 후 17-beta-estradiol 투여한 양성대조군(OVX-E2), 난소절제 후 오미자 추출물 25 mg/kg 투여군 (OVX-SCB25),

난소절제 후 오미자 추출물 100 mg/kg 투여군 (OVX-SCB100), 난소절제 후 오미자 추출물 400 mg/kg 투여군 (OVX-SCB400)]으로 분류하여, 주 3회 오미자 혹은 대조 물질을 존데를 이용하여 일정한 시간에 경구투여로 6주 동안 진행하였다.

실험동물의 체중은 동일한 시간에 측정하였으며 동물실험실의 환경조건은 온도 23±3℃, 상대습도 55±15%, 환기횟수 10-20회/hr, 조명시간 12시간 및 조도 150-300 Lux를 유지하였으며 물과 식이는 자유 공급하였고, 실험시료는 증류수에 용해하여 1마리당 200 µL씩 경구투여 하였으며, 대조군은 동일 용량의 증류수를 투여하였다. 본 연구는 동물보호법 (제정 1991년 05월 31일 법률 제 4379호, 일부개정 2008년 2월 29일 법률 제 8852호)에 근거한 경희대 동물윤리위원회에 의해 승인되었다.

2. 시료의 제조

본 실험에 사용한 오미자 (*Schisandra chinensis* Baillon)추출물은 경북 문경에서 구입하여 수세, 정선 및 탈수 과정을 거쳐 건조된 오미자를 30% 주정으로 3시간 추출 후, 여과하여 분말화 공정을 거쳐 제조되었다. 본 실험에 사용된 시료는 (주)바이오피스에서 제공받아 사용하였다.

3. HPLC에 의한 지표성분 분석

오미자의 지표물질인 Gomisin N 은 한약진흥재단으로부터 구입하였으며 화학구조는 그림 1A와 같다. 제조한 오미자 추출물을 20 ml의 methanol에 녹인 후 30분간 sonication을 시행하였다. 이 용액을 0.45 µm 필터로 여과 후 10 µl의 검액을 HPLC system에 주입하였다. HPLC는 Waters 2695 Alliance HPLC system과 Waters 996 PDA가 검출기로 구성되어 있으며, 컬럼은 Fortis C18 (250 X 4.6 mm, 5µm)을 사용하였다. 이동계는 acetonitrile과 0.1% formic acid (70/30, v/v)에서 40분간, 유속은 1 ml/min로 하였다.

Table 1. Experimental Design of Animal

Group	Operation	Treatment
Sham	sham-operated	
OVX-Vehicle	ovariectomized	
OVX-E2	ovariectomized	Estradiol 0.5 mg/kg bw/day
OVX-SCB25	ovariectomized	<i>Schisandra chinensis</i> Baillon 25 mg/kg bw/day
OVX-SCB100	ovariectomized	<i>Schisandra chinensis</i> Baillon 100 mg/kg bw/day
OVX-SCB400	ovariectomized	<i>Schisandra chinensis</i> Baillon 400 mg/kg bw/day

4. 혈중 지질 농도 측정

혈청의 생화학적 분석을 위해, 응고된 혈액 표본을 1,500 g, 10 분간 원심분리 하여 혈청을 얻었다. 혈청은 Automated analyser (7080, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 Total cholesterol(TC), Triglyceride(TG), Low density lipoprotein(LDL), High density lipoprotein(HDL)을 측정하였다.

5. 혈중 Osteocalcin 측정

Osteocalcin 측정을 위해 혈청을 수집하였다. 혈중 Osteocalcin은 Takara Bio In.의 효소 면역측정 세트를 이용하여 제조회사의 사용방법에 따라 측정하였다. 96 well microtiter plate는 Anti-mouse Osteocalcin monoclonal antibody가 코팅되어져 있다. 표준물질과 표본을 코팅된 96 well microtiter plate에 넣어준 후, 실온에서 1시간 반응시킨 후 2차 peroxidase-labeled anti-Gla-Osteocalcin monoclonal antibody를 넣어준 후, 실온에서 1시간 반응시켰다. 마지막으로, plate에 Substrate Solution (TMBZ)를 넣어 30분 동안 반응 시킨 후, TMBZ stop solution을 첨가하여 반응을 종결 시켰다. Optical density는 microplate reader (SoftMax PRO, version 3.1 software, CA, USA)를 사용하여 450 nm에서 측정하였다.

6. 통계처리

모든 실험결과는 통계 프로그램 Graphpad Prism software (version 5, CA, USA)를 이용하여 분석하

였으며, 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였다. 정상대조군 (Sham) 대비 오미자 투여군 (OVX-SCB)과 난소절제군 (OVX-Vehicle) 대비 오미자 투여군 (OVX-SCB)과의 차이를 분석하였으며, one-way ANOVA를 이용하여 유의확률 (p-value)이 5% 미만 ($p<0.05$) 일 때 유의한 차이를 나타낸다고 판단하였다.

결 과

1. 지표물질 정량

오미자의 주성분인 Gomisin N을 HPLC 분석으로 정량하여 오미자를 확인하고자 하였다. 표준품 Gomisin N을 이용해 10.417~250 $\mu\text{g/ml}$ (10.417, 15.625, 31.25, 62.5, 125 and 250 $\mu\text{g/ml}$)까지 검량선을 작성하였으며 (Fig. 1B), 오미자의 Gomisin N은 25.085 분의 retention time에서 피크를 확인할 수 있었다. peak area를 계산한 결과 1g의 오미자 추출물에는 902.833 μg 의 Gomisin N을 함유하였다.

2. 자궁무게

난소를 절제하면 자궁 내막을 자라게 하는 에스트로겐이 감소해 자궁무게가 감소하며, 자궁무게 감소는 난소절제술의 성공 여부를 판단하는 잣대가 되기도 한다¹¹⁾. 자궁무게 비교 분석결과, 정상대조군에 비해 난소절제군에서 통계적 유의성 있는 자궁무게 감소를 나타내었다 (** $p<0.001$, one-way ANOVA). 또한, 난소절제군에 비해 양성대조물질 투여군 (OVX-E2)은 유의성 있는 증가를 나타내었

Fig. 1. HPLC analysis of SCB. The structure of Gomisin N(A), Calibration curve of Gomisin N (B), Chromatogram of SCB (C) and Gomisin N (D) using HPLC systems.

다 (### $p < 0.001$, one-way ANOVA). 그러나 정상대조군 대비 오미자추출물 투여군 (OVX-SCB), 난소절제군 대비 오미자 투여군에서 모두 유의성 있는 자궁 무게의 차이를 보이지 않았다 (Fig. 2).

Fig. 2. Effects of SCB on uterus weight in ovariectomized mice (OVX). Data are shown as mean $\pm$ S.E.M. Statistical analyses were conducted by one-way ANOVA (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs Sham and, *** $p < 0.001$ vs OVX+Vehicle).

3. 체중 및 혈중 지질수준

체중 증가는 폐경기에 나타나는 특징으로, 폐경 후 체내 콜레스테롤이 에스트로겐으로 전환율이 감소하면서 혈중 콜레스테롤이 상승하고, 지방 조직의 증가로 인해 내장지방이 증가하면서 복부지방이 늘어나게 된다¹²⁾. 몸무게 비교 분석결과, 식이 2주 후부터 정상대조군에 비해 난소절제군에서 통계적으로 유의성 있는 몸무게 증가를 나타내었다 (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ one-way ANOVA). 그러나 정상대조군 및 난소절제군 대비 오미자 투여군에서는 모두 유의성 있는 몸무게의 차이를 보이지 않았다 (Fig. 3).

Serum을 이용하여 Total cholesterol (TC), Triglyceride (TG), Low density lipoprotein (LDL), High density lipoprotein (HDL)을 측정하였다. TC와 LDL 분석결과, 정상대조군 대비 난소절제군에서 유의성 있는 증가를 나타내었다(* $p < 0.01$, * $p < 0.05$ one-way ANOVA). LDL은 난소절제군 대비 양성대조물질 투여군

Fig. 3. Effects of SCB on body weight in ovariectomized mice (OVX). Data are shown as mean $\pm$ S.E.M. Statistical analyses were conducted by one-way ANOVA (** p <0.001, ** p <0.01, * p <0.05 vs Sham).

Fig. 4. Effects of SCB on serum lipids in ovariectomized mice (OVX). Data are shown as mean $\pm$ S.E.M. Statistical analyses were conducted by one-way ANOVA (** p <0.01, * p <0.05 vs Sham and, ### p <0.001, # p <0.05 vs OVX+Vehicle).

(OVX-E2)과 오미자 투여군 (OVX-SCB400)에서 통계적 유의성 있는 감소를 나타내었다 (### p <0.001, one-way ANOVA). 반면, TG와 HDL 분석결과, 정상대조군에 비해 난소절제군에서 통계적 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 4).

4. 혈중 Osteocalcin

Osteocalcin은 폐경기에 증가하여 폐경 후 골다공증의 조기진단의 마커로 사용된다¹³⁾. Serum 내 Osteocalcin의 농도 분석결과, 정상대조군 대비 난소절제군에서 유의성 있는 증가를 나타내었다 (** p <0.01, one-way ANOVA). 반면, 양성대조물질 투여군과 오미자 투여군 (OVX-SCB25)은 난소절제군 대비 유의성 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 5,

Fig. 5. Effects of SCB on osteocalcin in ovariectomized mice (OVX). Data are shown as mean $\pm$ S.E.M. Statistical analyses were conducted by one-way ANOVA (** $p < 0.01$ vs Sham and, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ vs OVX+Vehicle).

$p < 0.001$, ## $p < 0.01$, one-way ANOVA).

고 찰

五味子は 收斂固澁, 益氣生津, 補腎寧心 등의 효과가 있어 임상에서 久嗽虛喘, 夢遺滑精, 遺尿頻尿, 久瀉不止, 自汗, 盜汗, 津傷口渴, 心悸失眠 등의 증상에 응용되어 왔다¹⁴⁾. 여성의 50%는 안면홍조, 빈맥, 발한과 같은 갱년기 증상을 보이며 일부는 피로감, 불안감, 우울, 기억력 장애를 동반하기도 한다. 이러한 갱년기 증상과 관련된 오미자의 효능을 보면 《醫方類聚》에서는 腎을 보하고 열을 내리며 渴症을 멈추고 몸을 든든하게 하고 성기능도 높이며, 진액을 생겨나게 하며 元氣가 모자랄 때 쓰면 크게 보한다고 기록되어 있다. 《醫寶鑑》에서는 몹시 여윈 것을 보하며 消渴과 煩熱을 낮게 한다고¹⁵⁾ 한다. 최근 연구 결과에 의하면, 갱년기 모델인 난소절제군은 oestrogen 부족으로 인해 인지능력이 감소하게 되는데, 오미자의 주성분인 Schizandrin이 스냅스 전달과 항산화 활성이 보고되었다¹⁶⁾.

본 연구는 오미자추출물이 난소 절제술로 갱년기를 유도한 마우스에서 여성갱년기 증상 개선정도를 평가하고자 실시하였다. 체중 증가는 갱년기의 증상 중 하나로 호르몬 불균형에 의한 현상이며¹⁷⁾ 일반적인 에너지 섭취 과량 혹은 소비 저하로 인한 대사성 질환과는 성격이 다르다. 난소절제술을 시행하여 갱

년기를 유도한 후 6주간 정상식이한 결과 정상대조군에 비하여 체중이 증가하는 전형적인 갱년기 증상을 보였고, 오미자추출물 투여군 역시 정상대조군에 비하여 체중이 증가하였다. 하지만, 혈중 지질이 정상대조군에 비하여 난소절제술을 시행한 마우스는 Total cholesterol이 상승하고, LDL도 증가하였다. 하지만 오미자추출물을 투여한 결과, 혈중 LDL 수치를 감소시켜 혈중 지질대사에 유익한 변화를 보였음을 확인하였다.

난소를 절제하면 여성호르몬 부족에 의한 자궁 위축현상이 발생하여 자궁의 무게가 줄어들며, 정상대조군에 대비하여 난소절제군과 오미자 투여군에서의 자궁무게가 감소되는 경향을 보였다. 반면, 호르몬 치료요법의 하나인 17-beta-Estradiol를 투여받은 양성대조물질 투여군은 자궁무게 증가현상을 보였다.

갱년기 증상의 하나인 골다공증은 지속적인 뼈 재형성과정 중 뼈를 생성시키는 조골세포와 흡수시키는 파골세포의 불균형에 의하여 발생하는 질환이다. 정상적인 뼈는 재형성(bone remodeling)과정으로 인한 골 손실이 없지만, 폐경기 여성의 경우 불균형에 의한 골 교체율(bone turnover)이 증가하면서 혈청 내 osteocalcin의 농도가 증가한다. Osteocalcin은 골 조직에서 발견되는 단백질이며 파골세포의 작용으로 인하여 혈중으로 방출된다. 따라서 체내 estrogen이 부족해지면 골 교체율이 증가하여 혈청 내 osteocalcin이 증가됨이 보고된바 있다¹²⁾. 본 실험에서 난소절제로 갱년기를 유도시킨 동물모델에서도 정상대조군에 비하여 혈청 내 높아진 osteocalcin 농도가 확인되었으며, 오미자를 투여한 군에서 난소절제군 대비 통계적으로 유의성 있게 감소된 결과를 확인할 수 있었다. 즉 폐경기 모델에서의 골세포 불균형의 예방을 의미하며 나아가 골다공증 예방에 효과를 지닌다고 말할 수 있다.

결 론

난소절제로 유도된 갱년기 마우스 모델에서 오미

자추출물의 효능을 평가한 결과 혈중 LDL 수치를 낮추주고, 골 교체율을 저하시켜 골다공증을 경감시킬 수 있지만, 자궁에는 특정 효과를 나타내지 않는 선택적인 phytoestrogen effect를 가지는 것으로 평가되었다. 이러한 효능은 genistein나 daidzein이 자궁에는 영향을 미치지 않으며, 골 교체율을 감소시키는 선택적인 phytoestrogens으로 작용한다는 이전의 보고와 유사하다¹¹⁾. 결론적으로 오미자는 호르몬 치료제인 Estradiol처럼 자궁에 직접적인 영향을 미치지 않으면서 LDL 수치를 낮추며 골다공증을 개선하는 효과가 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

This work was supported by a grant (K16281) awarded to the KIOM from the Ministry of Science, ICT and Future Planning (MISP), Republic of Korea.

참고문헌

1. Archer DF, Sturdee DW, Baber R, de Villiers TJ, Pines A, Freedman RR, et al. Menopausal hot flushes and night sweats: where are we now? *Climacteric*. 2011; 14:515-28.
2. Body JJ. Calcitonin for the long-term prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Bone*. 2002; 30(5 Suppl):75S-79S.
3. Ross RK, Paganini-Hill A, Wan PC, Pike MC. Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(4): 328-32.
4. Ziel HK. Estrogen's role in endometrial cancer. *Obstet Gynecol* 1982;60:509-15.
5. Nelson HD, Humphrey LL, Nygren P, Teutsch SM, Allan JD. Postmenopausal hormone replacement therapy: scientific review. *JAMA*. 2002;288(7):872-81.
6. Ahn KH, Kim SM, Yi KW, Park HT, Shin JH, Kim YT, et al. The Effect of Pomegranate on Postmenopausal Syndrome: A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trial. *J Korean Soc Menopause*. 2010;16(2):99-106.
7. Herbology Association of Korea's Colleges of Oriental Medicine. Textbook of Herbology. Younglimsa. 2011:683-684.
8. Koo DC, Suh WS, Baek SY, Shim SH. Quantitative Determination of Lignans from Schizandra chinensis by HPLC. *Kor. J. Pharmacogn*. 2011;42(3):233-9 .
9. Lee Y, Lee HS, Jang SJ, Song JH. Effect of Water Extract of Schisandra Chinensis on Osteoclast Differentiation. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology* 2010; 24(5):848-53.
10. Lee YJ, Cho JY, Kim JH, Park WK, Kim DK, Rhyu MR. Extracts from Schizandra chinensis Fruit Activate Estrogen Receptors: A Possible Clue to Its Effects on Nitric Oxide-Mediated Vasorelaxation. *Biol Pharm Bull*. 2004;27(7): 1066-9.
11. Picherit C, Coxam V, Bennetau-Pelissero C, Kati-Coulibaly S, Davicco MJ, Lebecque P, et al. Daidzein Is More Efficient than Genistein in Preventing Ovariectomy-Induced Bone Loss in Rats. *J Nutr*. 2000;130(7):1675-81.
12. So H, Ahn S, Song R, Kim H. Relationships among Obesity, Bone Mineral Density, and Cardiovascular Risks in Post-menopausal Women. *Korean J Women Health Nurs*. 2010; 16(3): 224-33.
13. Garnero P, Sornay-Rendu E, Claustrat B, Delmas PD. Biochemical Markers of Bone Turnover, Endogenous Hormones and the Risk of Fractures in Postmenopausal Women: The OFELY Study. *J Bone Miner Res*. 2000;15(8):

- 1526-36.
14. Han JH. Oriental Pharmacology. Euisungdang. 2004:529-532.
 15. Lee JY, Lee GY, Yang CH, Roh SS. The study on chemical components and oriental medical effects of Schizandrae Fructus. J A OM. 2013; 13(2) : 61-66.
 16. Jiang ZJ, Wang CY, Xie X, Yang JF, Huang JN, Cao ZP, et al. Schizandrin ameliorates ovariectomy-induced memory impairment, potentiates neurotransmission and exhibits antioxidant properties. Br J Pharmacol. 2015; 172(10):2479-92.
 17. Hankinson SE, Willett WC, Manson JE, Hunter DJ, Colditz GA, Stampfer MJ, et al. Alcohol, height, and adiposity in relation to estrogen and prolactin levels in postmenopausal women. J Natl Cancer Inst. 1995;87(17):1297-302.