

## Estrogen Activities of Extracts from Various Parts of Pomegranate(*Punica grantum* L.)

Eun-Mi Lee, \*In-Seob Kwak, \*Hyun-Jong Kim, \*\*Yong-Kon Park, \*\*\*Bong-Woo Chung

*Jeonbuk Bioindustry Development Institute*

*\*Department of Bioprocess Engineering, Chonbuk National University*

*\*\*Korea Food Research Institute*

*\*\*\*School of Chemical Engineering, Chonbuk National University*

TEL: +82-63-270-2309, FAX: +82-63-270-2306

### Abstract

Phytoestrogens are non-steroidal compounds found in a variety of plants, which exert estrogenic effects in animals. In this study, the useful compounds of pomegranate as preliminary research for the developing of natural estrogen supplement were determined. The estrogenic activity of phytoestrogens in the pomegranate was estimated by using the Yeast Estrogen Receptor and E-screen assay. Estrogenic activity of all pomegranate extracts in the Yest Estrogen Receptor assay were not significant difference at all concentration. Whereas peel extracts of Iranian and domestic red pomegranate are significantly enhanced in the E-screen assay. When various pomegranate extracts enzyme and acid hydrolyzed, three aglycones of phytoestrogen, kaempferol, quercetin and catechin were detected. Peel extract of domestic red pomegranate contained more than kaempferol(87.0 mg%), quercetin(172.8 mg%) and catechin(956.8 mg%) than other extracts. These differences in concentrations of key phytoestrogens among various extracts seemed to be responsible for their differences in estrogenic activities. Among these three compound, kaempferol showed the highest MCF-7 cell enhancing effect.

### 서론

석류(*Punica grantum* L.)는 이란을 중심으로 한 아시아 서남부 및 인도의 북서부가 자생지로 예로부터 강장제로 알려져 왔으며, 특히 고혈압과 동맥경화 예방에 효과가 있으며 구충제, 설사, 이질, 구내염, 장출혈에 효과가 있는 것으로 알려져 한약재로 많이 쓰여 왔다<sup>(1)</sup>. 석류의 약효에 있어서 주요한 유효성분은 alkaloide인 isopelletierine

이며 그 외 tannin인 punicalin, punicalagin 등과 inuline, mannitol, sorbitol, malic acid 등이 알려져 있다<sup>(2)</sup>. 석류는 phytoestrogen과 phytosterol이 함유되어 있어 여성호르몬 대체요법에 적합하다는 사실이 알려져 있다<sup>(3)</sup>. 본 연구는 국내산 및 수입산 석류를 추출하여 석류의 천연 에스트로겐 대체 제재의 활용을 위한 기초연구로 추출물의 에스트로겐 활성을 분석 확인하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 2-1. 실험재료

본 실험에 사용된 석류는 '03년 수확된 국내산(홍석류, 흑석류)과 수입산(이란, 우즈베키스탄) 석류를 구입하여 부위별(껍질, 씨, 과즙)로 분리한 다음 동결건조하여 부위별 시료를 80% 메탄올로 추출한 다음 감압 농축하여 메탄올을 제거한 후 동결건조하여 시료로 사용하였다.

### 2-2. 에스트로겐 활성 분석

#### 2-2-1. Yeast Estrogen Receptor(YER) assay

*Saccharomyces cerevisiae* ER+LYS 8127(YER)를 성장배지(3.35 g/mL yeast nitrogen base, 2% dextrose, 30  $\mu$ g/mL L-lysine-HCl, 35  $\mu$ g/mL L-histidine-HCl)에서 유지하고 효모가 증식하면 신선한 배지로 적정 희석한 후 500  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>를 첨가한 다음 50 mL 튜브에 적정량을 분주한 후 80% 에탄올 추출한 석류 시료를 농도별로 첨가하여 shaking incubator에서 18시간 배양한 후 신선한 배양액을 동일한 농도로 희석한 후 96-well plate에 100  $\mu$ L씩 분주하였다. 각 well에 Z buffer를 100  $\mu$ L씩 분주하고 20분 후 발색정도를 microplate ELISA reader를 이용하여 420 nm와 590 nm를 이용하여 측정하였다.

#### 2-2-2. E-screen assay를 이용한 에스트로겐 활성 측정<sup>(4)</sup>

인간 유선(human mammary gland) 유래의 상피세포로 에스트로겐 수용체를 가진 MCF-7(30022, KCLB)은 CO<sub>2</sub> incubator(5% CO<sub>2</sub>, 37°C)에서 10% FBS와 0.01 mg/mL의 bovine insulin, 항생제(100 unit/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin)을 첨가한 RPMI 1640 배지를 사용하였다. 각각의 석류추출물은 DMSO로 용해시켜 사용하였으며 세포에 첨가하는 DMSO의 최종 농도는 0.1%가 넘지 않게 하였다. 대조군은 용매로 사용한 DMSO만을 처리한 군으로 하였다. 세포 증식 효과를 측정하기 위하여

MTT(3-[4, 5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide)를 well당 0.1 mg 가 해주고 37°C에서 4시간 더 배양하여 생긴 insoluble purple formazan crystal에 DMSO 와 glycine buffer(0.1 M glycine, 0.1 M NaCl, adjusted to pH 10.5 with 1 M NaOH)로 solubilization을 유도한 후 microplate ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2-3. Phytoestrogen 물질 분석

메탄올 추출 분말을 효소 가수분해와 산 가수분해를 시킨 후 가스크로마토그래피-질량분석기 (GC-MS)을 이용하여 농도를 정량하였다. 사용된 분석기기는 Hewlett-Packard 5890 PLUS gas chromatography에 direct interface로 연결된 5970 mass selective detector (MSD)를 사용하였다. 이 때 사용된 표준품은 Sigma사 특급 시약을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 3-1. 재조합 효모법 (YER)에 의한 석류의 에스트로젠 활성 평가

석류 estrogenic activity를 알아보기 위하여 국내산 홍석류와 흑석류, 이란, 우즈베키스탄산 홍석류의 씨, 과피, 과즙을 80% 메탄올로 추출한 추출물을 YER assay로 처리한 결과는 Fig. 1과 같다. 각 추출물을 농도별로 YER에 처리했을 때  $\beta$ -galactosidase의 유도는 일어나지 않았다. 에스트로젠 활성이 있는 시료의 경우 흡광도 0.2~0.5 이상의 발색을 나타내게 되는 데 산지별 및 부위별 시료를 대상으로 한 에스트로젠 활성 평가에서 YER assay에서는 석류 자체의 에스트로젠 활성은 거의 없는 것으로 나타났다.

### 3-2. MGF-7 유방암 세포를 이용한 에스트로젠 활성 (E-screen 법)

석류 추출물을 농도별로 MCF-7에 처리하여 144시간 뒤 세포 증식정도를 MTT의 환원 정도로 측정하였으며 결과는 Fig. 2와 같다. 산지별 석류씨와 과즙은 MCF-7 세포의 증식에 효과가 없는 것으로 나타난 반면 이란산과 국내산 홍석류의 과피 추출물에서는 MCF-7 세포의 증식 촉진 효과가 나타나 에스트로젠성이 있는 것으로 확인되었다.

### 3-3. 석류추출물의 Phytoestrogens 함량

각 석류 추출물을 효소 및 산 가수분해 후 GC-MS로 phytoestrogens을 측정된 결과

quercetin, catechin 및 kaempferol이 검출되었으며 특히 각 시료의 껍질에서 그 함량이 높게 나타났으며 특히 국내산 홍석류에서 kaempferol, quercetin 및 catechin이 87.0, 172.8 및 956.8 mg%로 높게 측정되었으며 이러한 성분 차이가 MGF-7 유방암 세포를 이용한 에스트로겐 활성화에 영향을 준 것으로 추정되어진다(Table 1). 따라서 이들 성분간의 활성화 능력을 측정하기 위해서 표준품인 quercetin, catechin 및 kaempferol과 비교 화합물인 equol과 함께 농도별로 MCF-7 cell에 투여한 후 144시간 동안 배양 후 세포 증식율을 MTT assay 방법으로 측정하였다 (Fig. 3). 그 결과 Kaempferol은  $10^{-5}$  M에서 equol과 유사한 MCF-7 세포 증식 촉진효과를 나타냈으나 quercetin과 catechin은 그 효과가 미미하였다. 이러한 결과는 석류껍질에 함유되어 있는 kaempferol의 aglycones 또는 배당체 형태의 물질이 에스트로겐 활성화에 관여할 것으로 사료된다.

## 결 론

본 실험에서 산지별과 부위별에 따른 석류 추출물의 에스트로겐 효과를 측정한 결과 국내산과 이란산 홍석류의 껍질에서 MCF-7 세포의 증식 촉진 효과가 있었으며 이들 추출물을 효소 및 산 가수분해 후 각 aglycones의 성분을 GC-MS로 측정한 결과 kaempferol, quercetin 및 catechin이 주요 phytoestrogen 물질임을 확인할 수 있었으며 특히 석류의 껍질에 이들 함량이 높게 측정되었다. 이들 성분간의 에스트로겐 활성을 측정한 결과 kaempferol이 에스트로겐 활성이 있음을 시사하였다.

## 참고문헌

1. 남산당, 1989, 원색천연약물대사전
2. Artik N, Murakami H, Mori T. 1998. Determination of phenolic compounds in pomegranate juice by using HPLC. *Fruit Processing* 12: 492-499.
3. Heftmann E, Ko ST, Bennet RD. 1966. Identification of estron in pomegranate seeds. *Phytochem* 5: 1337-1340.
4. 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 Res Treat* 71: 203-217.

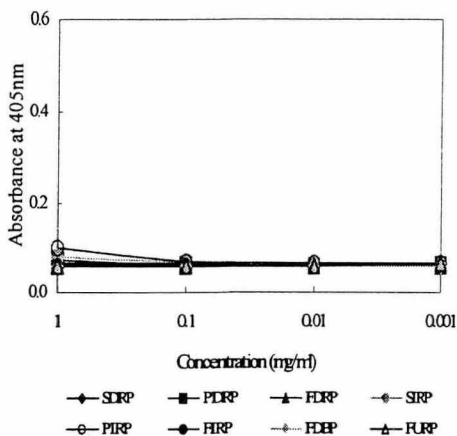


Fig. 1. Estrogenic effect of extracts from various parts of pomegranate(*Punica grantum L.*) by using the YER assay.

SDRP: Seed of domestic red pomegranate;  
 PDRP: Peel of domestic red pomegranate;  
 FDRP: Flesh of domestic red pomegranate;  
 SIRP: Seed of iranian red pomegranate;  
 PIRP: Peel of iranian red pomegranate;  
 FIRP: Flesh of iranian red pomegranate;  
 FDBP: Flesh of domestic black pomegranate;  
 FURP: Flesh of uzbekistan red pomegranate.

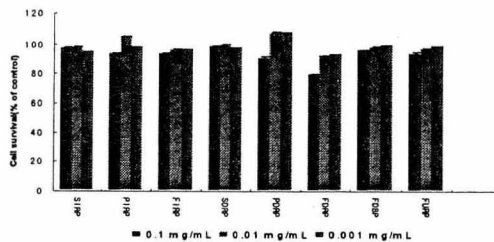


Fig. 2. Estrogenic effect of extracts from various parts of pomegranate(*Punica grantum L.*) by using the E-screen assay.

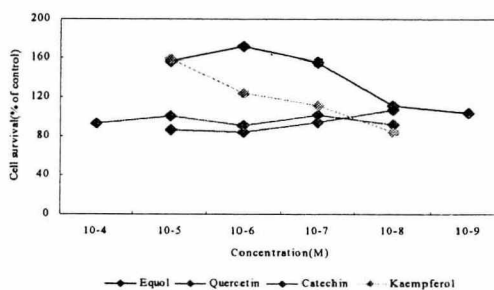


Fig. 3. Estrogenic effect of authentic compounds by using the E-screen assay.

Table 1. Phytoestrogen contents of extracts from various parts of pomegranate

| Classification             |       | (mg%, dry basis) |              |              |
|----------------------------|-------|------------------|--------------|--------------|
|                            |       | Kaempfero        | Quercetin    | Catechin     |
| Domestic black pomegranate | Peel  | 8.15             | 13.46        | 427.33       |
|                            | Seed  | 0.46             | 0.78         | 21.63        |
|                            | Flesh | not detected     | not detected | 2.62         |
| Domestic red pomegranate   | Peel  | 87.04            | 172.88       | 956.82       |
|                            | Seed  | not detected     | not detected | 16.41        |
|                            | Flesh | not detected     | not detected | not detected |
| Iranian red pomegranate    | Peel  | 16.01            | 4.23         | 572.29       |
|                            | Seed  | not detected     | not detected | 2.487        |
|                            | Flesh | not detected     | not detected | not detected |
| Uzbekistan red pomegranate | Peel  | 24.74            | 14.96        | 63.12        |
|                            | Seed  | not detected     | not detected | 1.34         |
|                            | Flesh | not detected     | not detected | not detected |