

## 환경호르몬에 의해 유도된 인체 유방암세포의 증식에 대한 당귀로부터 분리한 Decursin 억제효과

박경욱<sup>1</sup> · 최사라<sup>1</sup> · 양희선<sup>1</sup> · 조현욱<sup>2</sup> · 강갑석<sup>3</sup> · 서권일<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>순천대학교 식품영양학과

<sup>2</sup>순천대학교 생명과학전공

<sup>3</sup>부산정보대학 호텔조리과

### Anti-Proliferation Effects of Decursin from *Angelica gigas* Nakai in the MCF-7 Cells Treated with Environmental Hormones

Kyung-wuk Park<sup>1</sup>, Sa Ra Choi<sup>1</sup>, Hee Sun Yang<sup>1</sup>, Hyun Wook Cho<sup>2</sup>,  
Kap Suk Kang<sup>3</sup> and Kwon Il Seo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food Nutrition, Suncheon National University, Suncheon 540-752, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Biology, Suncheon National University, Suncheon 540-752, Korea

<sup>3</sup>Dept. of Culinary Arts, Busan College of Information Technology, Busan 616-737, Korea

#### Abstract

Anti-proliferation effects of decursin from *Angelica gigas* Nakai were investigated in the MCF-7 cells treated with environmental hormones. The proliferation was decreased in a dose-dependent manner at the concentration over 20 µg/mL in the MCF-7 cells treated with decursin of various concentrations. The environmental hormones such as 17β-estradiol and bisphenol increased the growth of MCF-7 cells in the charcoal-treated FBS (cFBS) medium and the proliferation was the highest at 0.1 µM among the tested hormone concentration. Decursin was predicted to inhibit the proliferation in a dose-dependent fashion at tested concentrations (1, 3, 10 or 30 µg/mL) in the MCF-7 cells added environmental hormones; however, the survival rate of the cells was lower than that of control cells that were not treated with decursin at 30 µg/mL concentration. The chromatin condensation and apoptotic body were examined in the decursin treated cells cultured with the cFBS medium added environmental hormones. These results suggest that decursin decreased the proliferation through apoptosis in the MCF-7 cells added environmental hormones.

**Key words:** *Angelica gigas* Nakai, decursin, cytotoxic activity, environmental hormones, apoptosis

#### 서 론

암의 원인으로는 유전, 환경 등이 영향을 미치는 것으로 보고되고 있으며(1), 환경인자 중에서도 식생활이 위암, 대장암 등의 소화기관 암과 유방암, 자궁암, 전립선암 등 호르몬 관련 암발생에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(2). 환경호르몬은 내분비계교란물질이라고 하며 생체 내 호르몬의 합성, 분비, 체내수송, 결합, 작용 또는 분해에 개입하여 생체의 항상성의유지, 생식, 발달 또는 행동에 영향을 주는 외래물질이라고 정의한다(3). 이들 화합물들은 생체 내에서 estrogen과 같은 호르몬 효능을 흉내 내어 인체의 생식과 성 발달 과정을 파괴하고 면역계에 영향을 미치며 특정 암을 유발하는 등 인류의 건강에 심각한 피해를 주는 것으로 여겨

진다(4). 현재까지 보고된 내분비계교란물질은 142종으로 이 중에서도 여성호르몬인 estrogen과 유사한 활성을 가진다고 보고되어진 내분비계교란물질 중 하나인 bisphenol은 체내에서 estrogen과 testosterone의 양을 증가시켜 체내의 호르몬 균형을 잃게 하거나 외에도 영향을 미칠 수 있다고 보고되어졌다(5-7). 이러한 bisphenol은 수지와 식품포장재, 캔 등에 이용되며 태반을 통하여 모체 뿐 아니라 태아, 태반에서도 검출된 것으로 보고되어 인체에 미치는 영향에 대한 관심이 높아지고 있다(8). 또한 estradiol은 대표적인 estrogen으로 골다공증의 예방 및 치료에 가장 널리 사용되며, 폐경 후 골밀도를 연 1~3% 정도로 증가시키는 것으로 알려져 있으나(9,10), 폐경후 관상동맥 질환의 위험도 감소(11,12)와 골절감소(13)의 장점이 있는 반면에 질출혈, 유방

\*Corresponding author. E-mail: seoki@sunchon.ac.kr

Phone: 82-61-750-3655, Fax: 82-61-750-3650

암 및 자궁암의 발생 위험도의 증가를 초래하는 단점 또한 가진다.

한편 당귀는 산형과에 속한 다년생 초본으로 *Angelica gigas* Nakai의 뿌리를 가을에 채취하여 건조한 것으로(14) 예로부터 한약재로 쓰여져 왔으며 지금까지의 연구들은 주로 그 약효에 관한 것이 많다. 그 주요 약효성분으로는 참당귀의 건조 근 및 과실에서 분리된 coumarin유도체인 decursin, decursinol 등이 보고되고 있으나(15,16), 환경호르몬과 관련된 연구에 대하여는 아직까지 보고된 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 estrogen 수용체 양성인 MCF-7 세포를 사용하여 체내에서 estrogen과 유사하게 작용하는 환경호르몬인 17 $\beta$ -estradiol과 bisphenol을 처리하여 환경호르몬에 의해 유도되어진 유방암세포의 증식에 대한 decursin 및 decursin 함유 당귀 추출물의 억제 효과를 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용된 당귀(*Angelica gigas* Nakai)는 경북 영천에서 수확한 것을 순천 지역의 한약 도매 전제상에서 구입하여 사용하였다.

Charcoal treatment FBS 제조(FBS 내의 steroid hormones 제거)

Serum의 estrogen 활성을 최소화하기 위하여 FBS에 5% charcoal을 처리하여 55°C에서 30분 동안 교반한 후 3,000 rpm, 4°C, 20분간 원심분리하여 상층액을 취하였고, 이를 2회 반복하여 얻은 상층액을 0.45  $\mu$ L microfilter로 여과하여 cFBS(charcoal treatment FBS)를 얻은 후 -20°C에서 보관하며 실험에 사용하였다.

### 당귀로부터 decursin의 분리

Decursin은 SiO<sub>2</sub> column chromatography하여 분리하였다. 즉, 당귀 200 g을 20배(w/v)량 정도의 99.5% methanol 4 L와 혼합하여 80°C 환류냉각 추출을 3시간 동안 3회 반복한 후 그 여액을 감압 농축하였다. 그 다음 H<sub>2</sub>O와 methylene chloride(1:3)를 각각 300대 1,200 mL씩 분획여두에 넣고 실온에서 3시간, 3회 반복하여 분획한 후 methylene chloride 층을 취하여 농축하였다. 이를 SiO<sub>2</sub> column chromatography하여 hexane : ethyl acetate(30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1)로 순차적으로 fraction 5번을 취한 후, 다시 column chromatography하여 fraction 30번에서 decursin을 분리하였다(Fig. 1).

### MCF-7 세포의 배양

실험에 사용한 암세포주 MCF-7(human breast adenocarcinoma cell)은 한국세포주은행으로부터 분양받았으며 이때 사용된 배지는 RPMI1640 배양액으로 10% FBS(fetal

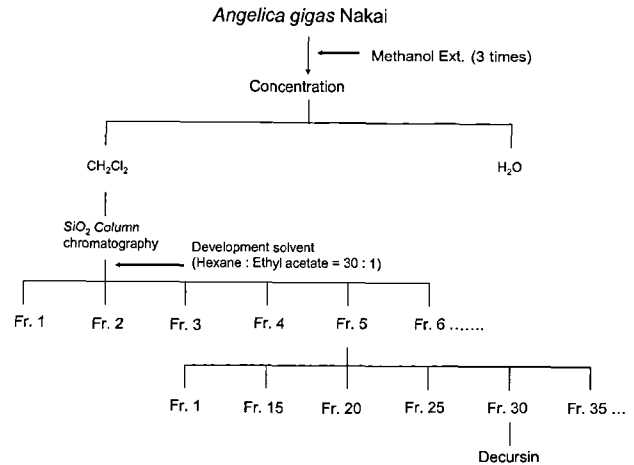


Fig. 1. Isolation of decursin from the root of *Angelica gigas* Nakai.

bovine serum)를 첨가한 후 37°C, 5.5% CO<sub>2</sub> incubator에서 계대 배양하여 실험에 사용하였다. Monolayer로 자란 암세포주를 0.25% trypsin-EDTA용액으로 처리하여 single cell로 만든 후 최종농도가 1 × 10<sup>4</sup> cell/mL 되도록 희석하여 96 well plate에 분주하고 37°C, 5.5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 혈청에 함유된 세포증식인자를 제거한 charcoal 처리 FBS를 1% 함유한 phenol free RPMI1640 배지를 well에 가하고 세포를 37°C, 5.5% CO<sub>2</sub> incubator에서 10분간 안정화시켰다.

### 암세포 증식억제능 측정

MCF-7 세포는 37°C, 5.5% CO<sub>2</sub> incubator에서 계대 배양한 후 각각의 환경호르몬과 각 시료를 농도별로 첨가하여 72시간 반응시킨 MCF-7 세포의 배양액을 제거하고 각 well을 차가운 12% TCA(trichloroacetic acid)를 100  $\mu$ L씩을 가하고 4°C에서 1시간 세포를 고정시켰다. TCA를 버린 후 well을 세척하고 1% acetic acid에 0.4%의 농도로 준비한 SRB 용액을 50  $\mu$ L씩을 가하여 세포를 1시간 동안 염색하였다. 염색 종료 후 1% acetic acid로 well을 세척한 후 차가운 10 mM Tris buffer 100  $\mu$ L를 가하여 SRB를 녹였다. 상층액 50  $\mu$ L를 96-well plate에 옮겨 microplate reader(Titertek multiscan plus, Finland)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 암세포의 형태학적 관찰

유방암(MCF-7) 세포에 환경호르몬과 각 시료를 다양한 농도로 처리하고 72시간 반응시킨 후 위상차 현미경(Diaphot 300, Nikon, Japan)을 이용하여 대조군과 시료처리군의 형태학적 변화를 비교 관찰하였다.

### Hoechst 염색을 통한 핵의 관찰

환경호르몬에 의해 유도된 인체 유방암세포주의 세포증식 억제에 있어 decursin의 활성과 세포사멸의 관련성을 알

아보기 위해 bis-benzimide(Hoechst 33258) 염색 후 핵의 형태변화를 관찰하였다. MCF-7 세포에 각각의 환경호르몬과 decursin을 농도별로 처리하고 72시간 동안 반응시킨 후 hoechst 용액(5 µg/mL)으로 염색하고 형광현미경(BH2-BH2-RPL-T3, Olympus optical Co. Ltd., Japan)을 이용하여 핵의 형태변화를 정상군과 비교하였다.

통계처리

실험결과는 3반복에 대한 평균 및 표준편차로 표시하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율에 나타내었다. 각 군간의 통계적 유의성에 대한 검증(17)은 Student's t-test를 이용하였다.

결과 및 고찰

당귀로부터 decursin의 구조동정

Decursin은 methanol을 첨가하여 80°C에서 3시간 환류냉각을 3회 반복한 후 그 여액을 감압 농축한 시료에 H<sub>2</sub>O와 methylene chloride를 1대 3 비율로 분획하여 methylene chloride 층을 취하여 농축하였다. 이를 SiO<sub>2</sub> open column chromatography하여 fraction 5번을 취한 후, 다시 open column chromatography하여 fraction 30번에서 분리하였다.

분리된 단일 화합물의 구조분석은 NMR spectrometer (Bruker, AW500)를 사용하여 <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼과 Mass spectrometer(JMS, DX300)을 이용하여 EI-MS를 측정하였고, 기존 문헌(18)의 측정값과 비교하여 구조를 분석하였다.

Decursin: white crystals from MeOH. <sup>1</sup>H-NMR(500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub>(ppm): 7.57(1H, d, J = 9.5 Hz), 7.15(1H, s), 6.78(1H, s), 6.22(1H, d, J = 9.5 Hz), 5.66(1H, s), 5.08(1H, t, J = 4.9 Hz), 3.17(1H, dd, J = 16.8, 5.0 Hz), 2.86(1H, dd, J = 16.8, 5.0 Hz), 2.14(3H, s), 1.87(3H, s), 1.38(3H, s), 1.36(3H, s); <sup>13</sup>C-NMR(500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>c</sub> (ppm): 165.7, 161.2, 158.4, 156.5, 154.2, 143.2, 128.6, 115.9, 115.6, 113.3, 112.7, 104.6, 76.7, 69.2, 27.9, 27.4, 25.0, 23.2, 20.5; EI-MS: m/z [M]<sup>+</sup>328.

MCF-7 세포의 성장에 대한 decursin 및 decursin 함유 당귀 추출물의 억제 효과

유방암 세포주인 MCF-7에 대한 당귀의 추출물 및 분리 정제물질의 억제효과를 조사하기 위해 각각 20, 40, 60, 80 µg/mL 농도로 처리하고 24시간 배양한 후 암세포 성장억제 효과를 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 당귀의 추출물 및 분리 정제물질은 처리농도에 의존적으로 암세포의 성장을 억제하는 경향을 나타내었다. 특히 정제된 화합물 decursin은 추출물에 비하여 월등히 높은 암세포 성장억제 효과를 나타내었으며 60 µg/mL의 농도로 처리시 90% 이상의 암세포 성장 억제 효과를 나타냈다.

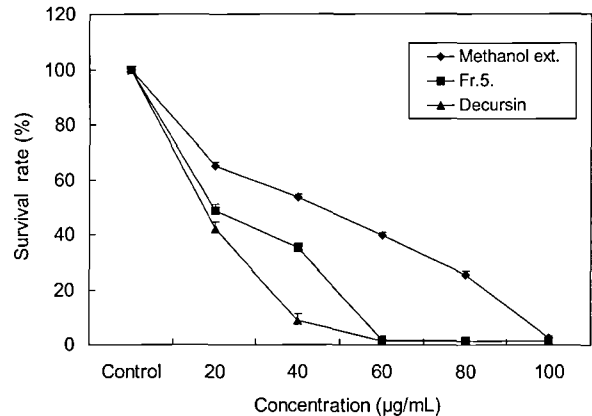


Fig. 2. Cell growth inhibition effects in the MCF-7 cells treated with decursin from *Angelica gigas* Nakai for 24 hrs by SRB assay.

Yim 등(19)은 당귀로부터 분리한 decursin을 인체 전립선 암세포주인 DU145, PC-3 및 LNCaP에 농도별(25, 50, 100 µM)로 24시간 처리 결과 암세포주 억제율이 22~51%, 7~54%, 9~72%의 억제율을 보고하였다. 이는 이전의 연구결과 및 본 실험 결과를 종합하여 볼 때 decursin이 암세포의 성장을 억제하는 것으로 사료된다.

MCF-7 세포의 증식에 대한 FBS 및 cFBS의 영향

FBS와 charcoal 처리된 FBS를 MCF-7 세포에 다양한 농도별, 시간별로 처리하여 세포의 성장정도를 측정된 결과를 Fig. 3에 나타내었다. FBS 첨가군은 농도와 시간에 비례하여 MCF-7 세포의 증식이 증가하는 반면 charcoal 처리된 FBS의 경우는 1%보다 5%와 10%가 MCF-7 세포의 증식을 증가시켰으나 유의적인 변화가 없었다.

Yamada 등(20)은 MCF-7에 다양한 농도(1, 3, 5%)의 FBS와 cFBS를 처리하여 세포의 성장정도를 측정된 결과

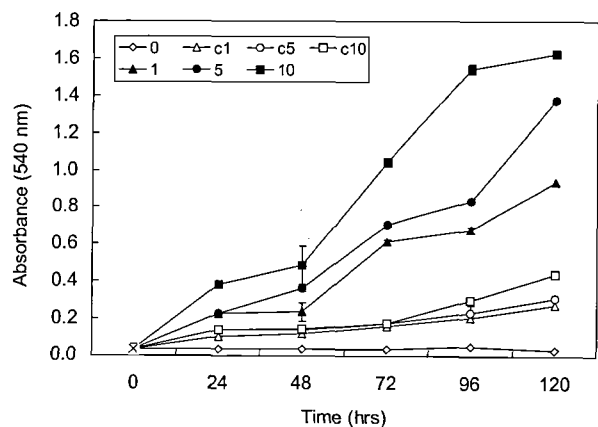
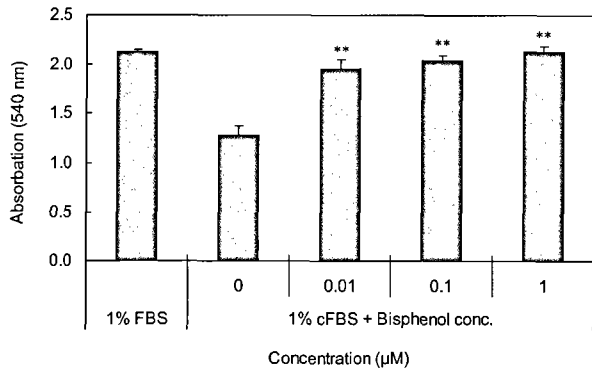


Fig. 3. Effects of serum on proliferation of MCF-7 cells. 0: without FBS, c1: with cFBS of 1%, c5: with cFBS of 5%, c10: with cFBS of 10%, 1: with FBS of 1%, 5: with FBS of 5%, 10: with FBS of 10%, cFBS means charcoal treatment FBS.



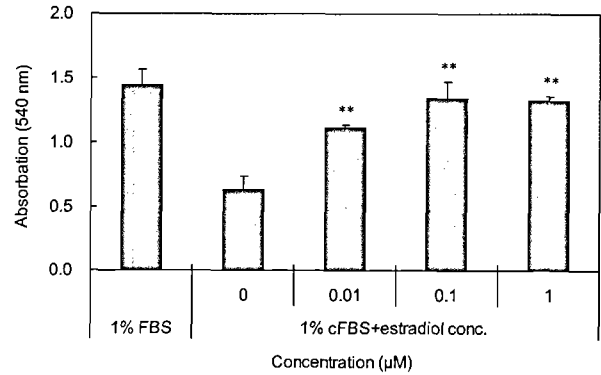
**Fig. 4. Effect of environment hormone on proliferation of MCF-7 cells.**

Cells were treated different concentrations of bisphenol in medium supplemented with 1% cFBS for 72 hrs. Data values are expressed as mean ±SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with control at \*\*p<0.01 by Student t-test.

FBS 첨가군은 농도에 비례하여 MCF-7 세포의 증식이 증가하는 반면 cFBS의 경우는 1, 3, 5%가 MCF-7 세포의 증식을 증가시켰으나 유의적인 변화가 없었다. 이상의 결과를 종합하여 charcoal 처리 FBS의 농도는 1%로 하였다.

**MCF-7 세포의 증식에 대한 환경호르몬의 영향**

실험에 사용할 환경호르몬의 농도를 측정하기 위해서 다양한 농도(0~1 μM)의 bisphenol과 17β-estradiol을 각각 1% cFBS가 첨가된 배지에 넣고 72시간 배양한 후 MCF-7 세포의 성장을 비교한 결과를 Fig. 4와 Fig. 5에 나타내었다. Bisphenol과 17β-estradiol 모두 호르몬이 제거된 배지로 배양한 세포에 비해 세포의 성장을 증가시켰다. Yamada 등 (21)은 다양한 농도(0~1 μM)의 E2(17β-estradiol)을 1% cFBS가 첨가된 배지에 넣고 72시간 배양한 후 MCF-7 세포의 성장을 비교한 결과 0.1 μM의 농도에서 세포의 성장을 상당히 증가시켰다. 따라서 본 실험 결과를 바탕으로 환경호르몬에 의한 암세포의 성장억제 효과를 측정하기 위해 bisphenol과 17β-estradiol 각각 환경호르몬의 농도를 0.1 μM로 하였다.

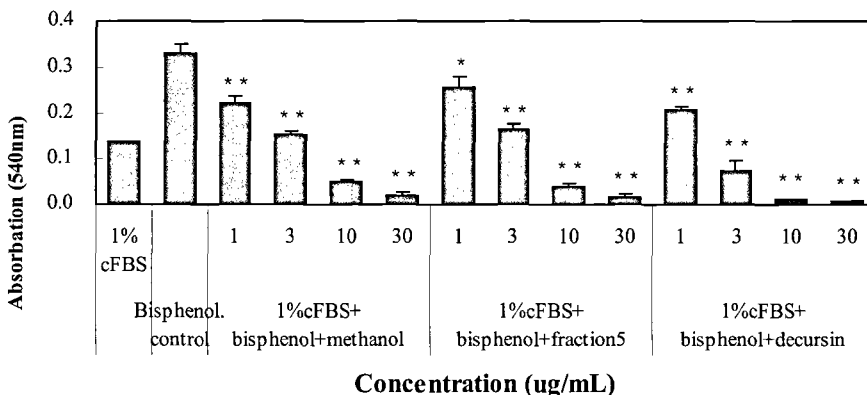


**Fig. 5. Effect of environment hormone on proliferation of MCF-7 cells.**

Cells were treated different concentrations of 17β-estradiol in medium supplemented with 1% cFBS for 72 hrs. Data values are expressed as mean ±SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with control at \*\*p<0.01 by Student t-test.

**환경호르몬에 의해 유도된 MCF-7 세포의 증식에 대한 decursin 및 decursin 함유 당귀 추출물의 억제효과**

MCF-7 세포에 환경호르몬인 bisphenol과 17β-estradiol을 0.1 μM의 농도로 처리하여 암세포의 증식을 유도한 반면 당귀로부터 정제한 화합물 즉, methanol 추출물, fraction 5, decursin을 다양한 농도로 첨가하여 72시간 동안 화합물에 의한 암세포의 성장 억제능을 측정된 결과를 Fig. 6과 Fig. 7에 나타내었다. 환경호르몬을 첨가하지 않은 1% cFBS control은 세포의 성장이 거의 이루어지지 않았지만 환경호르몬이 첨가된 호르몬 control군의 경우는 1% cFBS control군의 2배 정도의 세포 증식을 보였다. 농도별로 처리한 당귀 추출물의 경우는 methanol 추출물, fraction 5, decursin 모두에서 1, 3 μg/mL의 농도에서 환경호르몬에 의해 유도된 암세포의 증식을 억제하였으며 10, 30 μg/mL의 고농도에서는 세포사멸을 통해 증식을 억제하는 것으로 나타났다. 이는 광학현미경을 통한 세포의 형태학적 관찰(Fig. 8과 Fig. 9)에서도 당귀추출물이 환경호르몬에 의해 유도된 암세포의 증식을 억제함을 확인할 수 있었다.



**Fig. 6. Anti-proliferation effects of methanol extrate, fraction 5 and decursin from *Angelica gigas* Nakai in the MCF-7 cells treated with 0.1 μM bisphenol.**

Data values are expressed as mean ±SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with control at \*p<0.05 and \*\*p<0.01 by Student t-test.

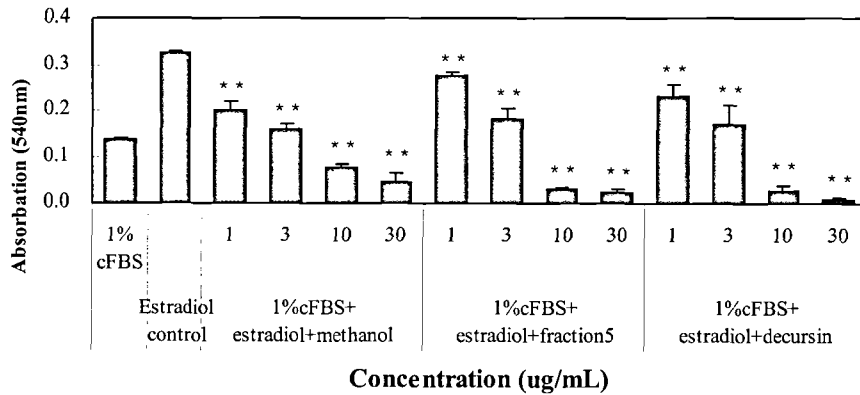


Fig. 7. Anti-proliferation effects of methanol extract, fraction 5 and decursin from *Angelica gigas* Nakai in the MCF-7 cells treated with 0.1  $\mu$ M 17 $\beta$ -estradiol.

Data values are expressed as mean  $\pm$ SD of triplicate determinations. Significant differences were compared with control at \*\*p<0.01 by Student t-test.

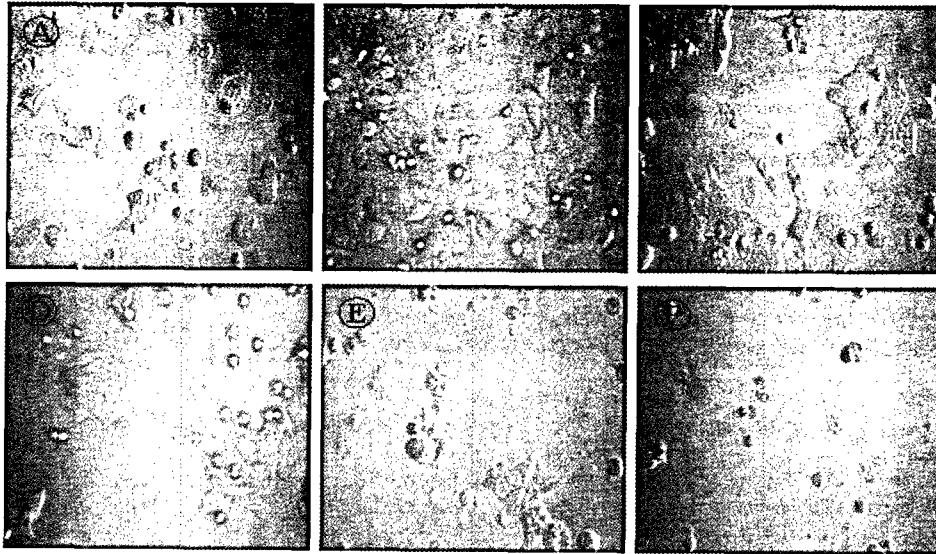


Fig. 8. Photomicrographs ( $\times 200$ ) of MCF-7 treated with decursin in medium supplemented with 1% cFBS and 0.1  $\mu$ M bisphenol.

A: control (1% cFBS), B: 0.1  $\mu$ M bisphenol, C: 0.1  $\mu$ M bisphenol+1  $\mu$ g/mL decursin, D: 0.1  $\mu$ M bisphenol+3  $\mu$ g/mL decursin, E: 0.1  $\mu$ M bisphenol+10  $\mu$ g/mL decursin, F: 0.1  $\mu$ M bisphenol+30  $\mu$ g/mL decursin.

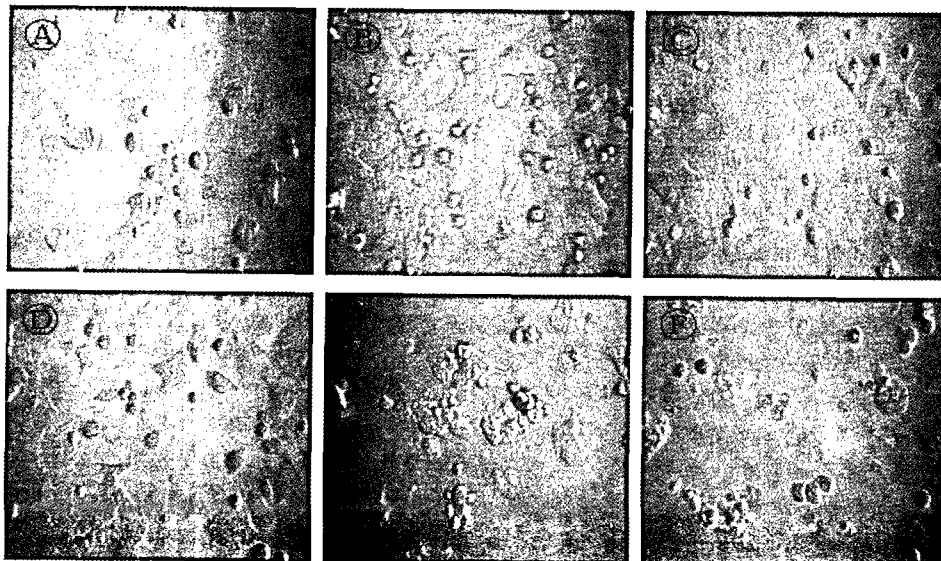
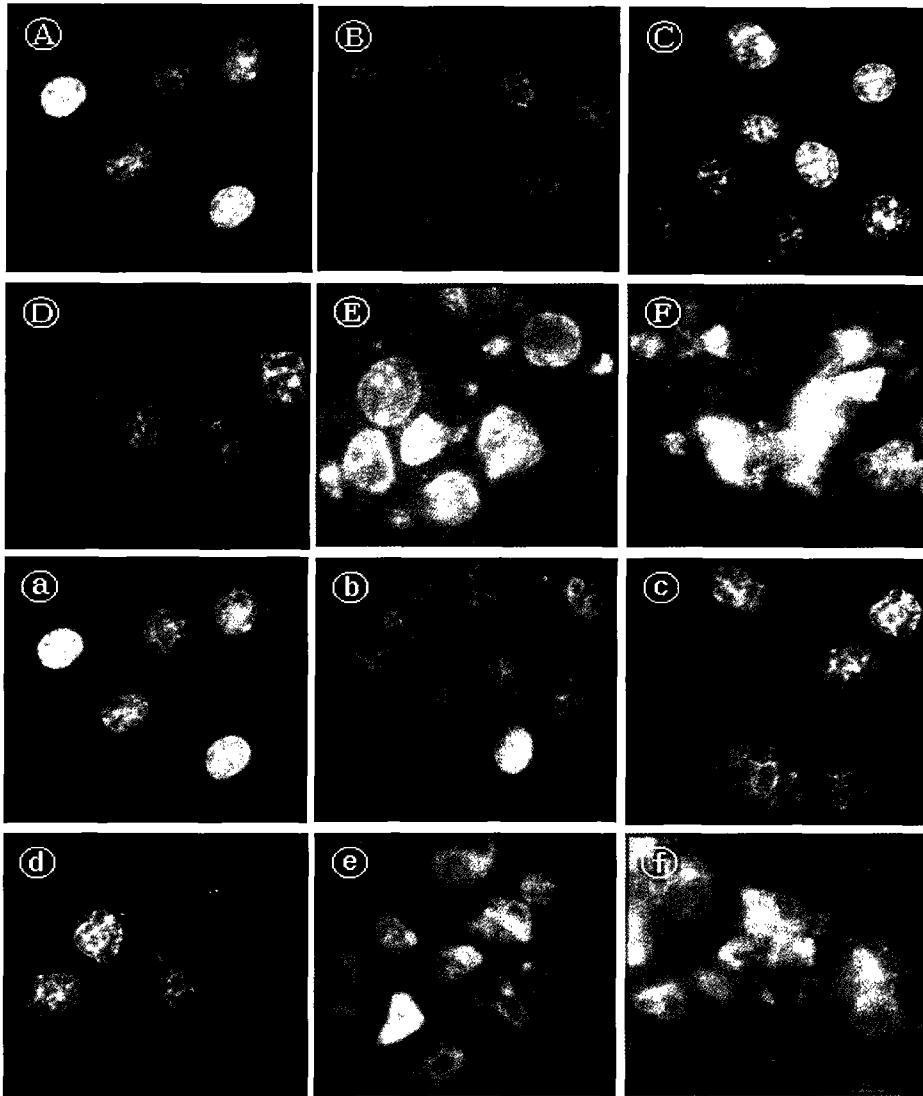


Fig. 9. Photomicrographs ( $\times 200$ ) of MCF-7 treated with decursin in medium supplemented with 1% cFBS and 0.1  $\mu$ M 17 $\beta$ -estradiol.

A: control (1% cFBS), B: 0.1  $\mu$ M estradiol, C: 0.1  $\mu$ M estradiol+1  $\mu$ g/mL decursin, D: 0.1  $\mu$ M estradiol+3  $\mu$ g/mL decursin, E: 0.1  $\mu$ M estradiol+10  $\mu$ g/mL decursin, F: 0.1  $\mu$ M estradiol+30  $\mu$ g/mL decursin.



**Fig. 10. Nuclear fragmentation induced by decursin from *Angelica gigas* Nakai in MCF-7 cells.** Cells were cultured in medium supplemented with 1% cFBS and bisphenol (A~F) or 1% cFBS and 17β-estradiol (a~f). A: control (1% cFBS), B: 0.1 μM bisphenol, C: 0.1 μM bisphenol+1 μg/mL decursin, D: 0.1 μM bisphenol+3 μg/mL decursin, E: 0.1 μM bisphenol+10 μg/mL decursin, F: 0.1 μM bisphenol+30 μg/mL decursin. a: control (1% cFBS), b: 0.1 μM 17β-estradiol, c: 0.1 μM 17β-estradiol+1 μg/mL decursin, d: 0.1 μM 17β-estradiol+3 μg/mL decursin, e: 0.1 μM 17β-estradiol+10 μg/mL decursin, f: 0.1 μM 17β-estradiol+30 μg/mL decursin.

Decursin 및 decursin 함유 당귀 추출물 처리에 따른 MCF-7 세포 핵의 변화

환경호르몬에 의해 유도되어진 MCF-7 세포 증식에서 당귀 추출물인 decursin의 세포 증식 억제 효과가 세포사멸과 관련 하는지를 알아보기 위해 hoechst 염색을 통해 얻은 결과를 Fig. 10에 나타내었다. 1% cFBS control에 비해 환경호르몬인 0.1 μM bisphenol과 17β-estradiol control의 경우 세포 증식이 이루어짐을 알 수 있었다. 당귀 추출물인 decursin을 농도별 처리했을 때 1과 3 μM의 농도에서는 세포사멸 없이 세포증식을 억제함을 확인할 수 있었으며 10과 30 μM의 고 농도에서는 세포사멸을 유도하여 세포의 증식을 억제하였

다. 이는 환경호르몬에 의해 유도된 유방암세포의 증식에 있어 당귀로부터 정제된 화합물의 암세포 증식억제 효과를 확인한 상기의 실험들과 일치하는 것으로 보인다.

요 약

당귀로부터 분리한 decursin을 환경호르몬에 의해 증식을 유도한 인체 유방암세포(MCF-7)에 처리한 후 그 억제효과를 조사하였다. 인체 유방암세포주인 MCF-7은 20, 40, 60, 80 및 100 μg/mL 농도로 decursin의 처리 시 20 μg/mL 이상에서 농도 의존적으로 그 증식이 억제되었다. 호르몬이 제거

된 배지로 배양한 세포에 0, 0.01, 0.1 및 1  $\mu\text{M}$ 의 농도로 환경 호르몬 17 $\beta$ -estradiol과 bisphenol을 처리한 결과 호르몬이 제거된 배지로 배양한 세포에 비해 세포의 증식을 유도하였으며, Yamada(21)와 본 실험 결과가 유사한 세포성장을 보여 암세포의 성장억제 효과를 측정하기 위한 환경호르몬의 농도를 0.1  $\mu\text{M}$ 로 하였다. 환경호르몬에 의해 증식이 유도된 MCF-7 세포에 당귀 메탄올추출물 및 decursin을 1, 3, 10 및 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리한 결과 농도에 비례하여 세포의 증식을 억제하였으며, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 이상에서는 대조구의 증식보다도 낮은 생존율을 나타내어 강한 세포독성을 나타내었다. 또한 hoechst 염색을 통하여 세포 핵의 변화를 알아본 결과 decursin 처리군에서 핵의 응축과 apoptic body가 관찰되어 decursin은 apoptosis를 유도함으로써 환경호르몬이 처리된 MCF-7 세포의 증식을 억제하는 것으로 판단된다. 이들 결과는 decursin이 환경호르몬에 의해 증식이 유도되는 MCF-7 세포의 성장을 apoptosis에 의해 억제한다는 것을 나타낸다.

## 문 헌

- Kim HY, Yang EJ. 1993. A study on dietary related to the incidence of stomach cancer and colon cancer in Korea. *Kor J Nutr* 26: 603-614.
- Doll P. 1981. The cause of cancer. *J Nut Can Inst* 66: 1191-1308.
- 이카타 요시토. 1999. 환경호르몬. 아카데미서적, 서울. p 13-14.
- Swanson GM, Ratcliffe HE, Fischer LJ. 1995. Human exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs): a critical assessment of the evidence for adverse health effects. *Regul Toxicol Pharmacol* 21: 136-150.
- Dechaud H, Ravard C, Claustrat F, de la Perriere, Pugeat M. 1999. Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG). *Steroids* 64: 328-334.
- Farabollini F, Porrini S, Seta DD, Bianchi F, Dessi-Fulgheri F. 2002. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on sociosexual behavior of female and male rats. *Environmental Health Perspect* 110: 409-414.
- Krishnan AV, Starhis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D. 1993. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrine* 132: 2279-2286.
- Kang J, Kondo F. 2002. Determination of bisphenol A in canned pet foods. *Res Vet Sci* 73: 177-182.
- Conference report. 1987. Consensus development conference prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Br Med J* 295: 914-915.
- Conference report. 1993. Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 94: 646-650.
- Nabulsi AA, Folsom AR, White A, Patsch W, Heiss G, Wu KK, Szklo M. 1993. Association of hormone-replacement therapy with various cardiovascular risk factors in postmenopausal women. The Atherosclerosis Risk in Communities Study Investigators. *N Engl J Med* 328: 1069-1075.
- Stampfer M, Colditz GA. 1991. Estrogen replacement therapy in coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence. *Prev Med* 20: 47-63.
- Ettinger B, Genant HK, Cann CE. 1985. Long-term estrogen replacement therapy prevent bone loss and fractures. *Ann Intern Med* 102: 319.
- Ahn DK. 1998. *Hankukbonchodokam*. Kyuhaksa, Seoul, Korea. p 670-671.
- Chi HJ, Kim HS. 1988. Studies on essential oils of plants of *Angelica genus* in Korea ( I ) essential oils of *Angelica gigantis* radix. *Kor J Pharmacogn* 19: 239-247.
- Ryu KS, Hong ND, Kim NJ, Kong YY. 1990. Studies on the coumarin constituents of the root of *Angelica gigas* Nakai. Isolation of decursinol angelate and assay of decursinol angelate and decursin. *Kor J Pharmacogn* 21: 64-68.
- Ha EH, Choi KR. 1995. Statistical techniques and misuse of statistical methods in the ewha medical journal. *Ewha Med J* 18: 343-356.
- Lee SH, Lee YS, Jung SH, Shin KH, Kim BK, Kang SS. 2003. Antioxidant activities of decursinol angelate and decursin from *Angelica gigas* roots. *Nat Prod Sci* 9: 170-173.
- Yim D, Singh RP, Agarwal C, Lee S, Chi H, Agarwal R. 2005. A novel anticancer agent, decursin, induces G1 arrest and apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Cancer Res* 65: 1035-1044.
- Yamada K, Han DL, Miyazaki Y, Tachibana H. 2000. Optimization of estrogenic activity detection method using human breast cancer MCF-7 cells. *J Fac Agr Kyushu Univ* 44: 339-348.
- Yamada K, Chujo H, Yamasaki M, Nou S, Koyanagi N. 2003. Effect of conjugated linoleic acid isomers on growth factor-induced proliferation of human breast cancer cells. *Cancer Lett* 202: 81-87.

(2007년 4월 4일 접수; 2007년 5월 17일 채택)