

## 유방암 세포주를 이용한 국내 자생 콩과식물의 에스트로겐 활성검색

배지영<sup>1</sup> · 김혜진<sup>2</sup> · 박우성<sup>2</sup> · 안미정<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>제주대학교 약학대학, <sup>2</sup>경상대학교 약학대학

### Estrogenic Activity of Leguminosae Species in Korea using MCF-7 Cells

Ji-Yeong Bae<sup>1</sup>, Hye-Jin Kim<sup>2</sup>, Woo Sung Park<sup>2</sup>, and Mi-Jeong Ahn<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Jeju National University, 102 Jejudaehakro, Jeju 63243, Korea

<sup>2</sup>College of Pharmacy, Gyeongsang National University, 501 Jinjudaero, Jinju 52828, Korea

**Abstract** – Leguminosae plants are known for its phytoestrogen constituents which play a major role in the prevention of osteoporosis, cancer and heart disease. In this study, the estrogenic activity of 158 samples from 58 species, 3 subspecies and 10 varieties of Leguminosae plants growing in Korea was evaluated. An estrogen, 17β-estradiol was used as a reference compound, and the potency of each sample was expressed in relative efficacy (%) compared to that of the reference by a reporter gene assay using MCF-7 cells. As results, the estrogenic activity of methanolic extracts of *Phaseolus vulgaris* var. *humilis*, *Sophora flavescens*, *Lespedeza × robusta*, *Indigofera pseudotinctoria*, *Maackia amurensis*, *Glycine soja*, *Wisteria floribunda*, *Robinia pseudoacacia*, *Astragalus sinicus*, *Pueraria lobata*, *Lespedeza maximowiczii* var. *tomentella*, *Trifolium repens* and *Crotalaria sessiliflora* showed similar to or higher at 100 μg/ml than the positive control at 10 nM. These findings can be a potential evidence for developing estrogen alternatives resolving various types of menopause symptoms with information on proper harvest season and usage plant part. To the best of our knowledge, the estrogenic activity of *Lespedeza × robusta*, *Indigofera pseudotinctoria*, *Wisteria floribunda*, *Robinia pseudoacacia* and *Lespedeza maximowiczii* var. *tomentella* is reported for the first time in this study.

**Keywords** – Leguminosae plants, MCF-7 cells, Estrogenic activity, Phytoestrogen

우리나라에는 약 36속 92종이 자생하고 있는 것으로 알려져 있는<sup>1)</sup> 콩과식물의 잎과 열매, 종자는 식용 또는 약용으로 널리 이용되고 있으며, 질소고정능력을 가지고 있어 녹비작물, 사료작물로도 활용되는 이용가치가 높은 식물군이다.<sup>2)</sup> 한편, 콩과식물은 여성호르몬유사작용을 나타내는 phytoestrogen을 함유하고 있는 것으로 잘 알려져 있어, 예로부터 여성질환과 갱년기질환 등에 쓰여 왔다. 이는 콩류 섭취량이 많은 아시아 여성들이 서양 여성들에 비해 유방암, 갱년기 증상, 골다공증 등의 발생빈도가 낮은 현상을 설명하는 원인이기도 하다.<sup>3)</sup> 콩과식물에서 유래하는 phytoestrogen 성분으로는 isoflavones을 비롯한 chalcones, flavones, stilbenes, coumestans, lignans 계열 물질들이 있다.<sup>3)</sup> 콩과식물 중 에스트로겐효능이 잘 알려진 식물로는 칩, 다릅나무, 감초, 고삼 등이 있으며,<sup>4,5)</sup> 이들의 주요활성성분으로는 daidzein, genistein, formononetin

등이 알려져 있다.<sup>3)</sup>

여성호르몬은 성호르몬으로 난포호르몬인 에스트로겐(estrogen)과 황체호르몬(progesteron)이 있으며, 일반적으로 여성호르몬이라고 하면 에스트로겐을 말하는 경우가 많은데 이는 에스트로겐이 황체호르몬과는 달리 여성의 생리, 임신 및 폐경에 이르기까지 여성의 일생을 조절하는 호르몬일 뿐만 아니라 인체의 뇌, 간장, 뼈, 혈관의 건강에까지 영향을 미치기 때문이다. 에스트로겐은 콜레스테롤로부터 생합성되는 탄소원자 18개의 화합물로 estrone(E1)과 estradiol(E2), estriol(E3)이 있으며, 임신 중에만 생합성되는 estretol(E4)이 있다. 그 중 estradiol이 가장 강력한 에스트로겐으로, 17β-estradiol은 난소에서 분비되는 대표적인 estradiol이다. 폐경기의 여성들은 난소에서 여성호르몬 생성이 줄어들게 되므로 감정 기복, 골다공증, 얼굴홍조, 불면, 우울감 등의 갱년기 증상들을 겪게 된다.<sup>6)</sup> 갱년기증상의 치료방법으로는 부족한 에스트로겐을 보충해주는 호르몬 대체요법이 주로 사용되고 있지만 에스트로겐을 투여함으로써 유

\*교신저자(E-mail): amj5812@gnu.ac.kr  
(Tel): +82-55-772-2425

방암과 난소암의 발생빈도가 증가될 수 있다는 우려가 있다.<sup>7)</sup> 이에 비해 phytoestrogen은 식물유래의 에스트로겐 유사 물질로, 그 구조적 유사성으로 에스트로겐 수용체에 작용하며 큰 부작용 없이 갱년기 증상을 완화시킬 수 있는 장점이 있다.<sup>8)</sup>

에스트로겐 활성을 측정하는 실험방법으로는 직접적으로 생식기관의 반응을 이용하는 방법(Allen-Doisy assay),<sup>9)</sup> 간접적으로 유방암세포의 증식반응을 측정하는 방법(E-screen assay),<sup>10,11)</sup> 에스트로겐 수용체 결합시험(Estrogen receptor binding assay),<sup>12)</sup> 수용체와 수용체 유전자의 발현을 이용하는 방법(estrogen receptor dependent transcriptional expression assay, reporter gene assay),<sup>13-15)</sup> 항체를 이용하는 방법<sup>16)</sup> 등이 있다. 이 중에서 수용체와 수용체 유전자의 발현을 이용하는 방법은 에스트로겐 수용체를 가진 세포에 시료를 직접 처리한 후 reporter gene의 발현정도를 쉽게 측정할 수 있는 장점이 있다.

현재까지 국내 자생 콩과식물에 대한 에스트로겐 활성연구로는 28종 8변종에 대하여 에스트로겐 수용체가 있는 자궁내막암세포인 Ishikawa cell을 이용하여, 에스트로겐 수용체의 활성화로 인해 Ishikawa cell 내에서의 활성이 증가하는 alkaline phosphatase의 활성을 측정한 연구결과가 있으며,<sup>17)</sup> 국내 유통 생약재 중 7가지 콩과식물 유래 생약재에 대하여 에스트로겐 수용체가 있는 형질전환 효모균주와  $\beta$ -galactosidase reporter gene(YES assay)을 사용하여 에스트로겐 활성을 측정한 연구결과가 있다.<sup>18)</sup> 이에 본 연구에서는 에스트로겐 수용체가 있는 유방암세포인 MCF-7 cell line에 대하여 luciferase reporter gene을 이용하는 에스트로겐 수용체 유전자 발현법을 사용하여 국내 자생 콩과식물 58종 3아종 10변종에 대하여 부위별, 시기별 시료를 포함하는 총 158종류의 메탄올추출물 시료의 에스트로겐 활성을 검색하여 갱년기증상완화에 부작용 없이 사용할 수 있는 자생 식물 소재를 발굴하고자 하였다. 기존의 연구와는 국내 자생 콩과식물의 종류와 부위별, 시기별 시료의 수를 2배 이상 늘린 데 의의가 있으며, Ishikawa cell과 같이 에스트로겐 수용체 ER $\alpha$ 를 가지고 있으나 에스트로겐과 그 유사물질에 반응하는 transcriptional factor와 super-enhancer의 협조양상이 서로 다르다고 알려진 MCF-7 cell을 사용함으로써 기존에 에스트로겐활성이 알려진 소재의 교차검증과 더불어 새로운 소재발굴이라는 데 본 연구의 의의가 있다.

## 재료 및 방법

**실험재료** - 17 $\beta$ -estradiol과 RPMI, ICI 182,780, Sodium Arsenite(As)는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, fetal bovine serum(FBS), penicillin/streptomycin은 Gibco Invitrogen(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. 플라스

미드의 주입에 사용한 lipofectamine LTX reagent with Plus reagent는 Gibco Invitrogen(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. 한국식물추출물은행(한국생명공학연구원, 청주)에서 분양받은 콩과식물의 메탄올 추출물 158종은 10 mg/ml의 농도로 DMSO에 녹여 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 부위별, 시기별 콩과식물 시료의 목록은 Table I에 나타내었다.

**세포배양** - 유방암 세포주인 MCF-7(Human breast adenocarcinoma cell line, Korea Cell Line Bank, Seoul)은 10% FBS를 함유하는 RPMI에서 배양하였으며, 5% (v/v) CO<sub>2</sub>를 포함하는 습한 대기 조건의 37°C 환경에서 자라도록 하였다. 배지는 1-2일 간격으로 교환하였고 시약을 처리하기 전에 새 배지로 갈아주었으며, 시료를 처리할 때에는 최소 24시간 이상 5% charcoal-dextran으로 처리한 혈청을 사용한 배지에서 배양한 후 시료를 최종농도가 100  $\mu$ g/ml가 되도록 처리하였다. 양성대조군으로는 17 $\beta$ -estradiol을 최종농도가 10 nM이 되도록 처리하였다.

**유방암 세포를 이용한 에스트로겐 활성 측정(Luciferase assay)** - MCF-7 세포를 24-well plate에  $7 \times 10^4$  well이 되도록 분주한 다음 24시간 배양한 후, 플라스미드를 lipofectamine LTX reagent with Plus reagent(Gibco Invitrogen, Grand Island, NY, USA)를 이용하여 transfection시켰다. 24시간 후에 transfection된 세포를 PBS(phosphate-buffered saline)로 세척하고 추출물을 처리한 후, 48시간 배양하였다. Luciferase activity 측정은 luciferase assay kit(Promega Corp., Madison, WI, USA)을 이용하여 AutoLumat LB953 luminometer(Berthold Technologies, Wildbad, Germany)로 측정하였다. 세 번의 실험을 반복하여 결과값을 얻었으며, 그 결과는 mean  $\pm$  standard error of the mean(S.E.M.)으로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

국내 자생 콩과식물추출물 158종에 대한 에스트로겐 활성을 MCF-7 세포를 이용하여 검색한 결과, 최종농도 100  $\mu$ g/ml에서 양성대조군으로 사용한 17 $\beta$ -estradiol(10 nM)과 비슷하거나 높은 에스트로겐활성을 보이는 식물 및 부위는 강낭콩의 전초, 고삼의 지상부, 고양싸리의 줄기, 남아초의 잎과 줄기, 다릅나무의 수피와 열매, 돌콩의 전초, 등의 수피와 잎, 아까시나무의 잎과 줄기, 자운영의 전초, 칩의 줄기와 수피, 꽃, 털조록싸리 잎, 토끼풀의 전초, 활나물의 전초였다(Table I).

강낭콩(*Phaseolus vulgaris* var. *humilis*)의 경우, 강낭콩에 함유되어 있는 prenylated isoflavonol 성분인 kievitone과 prenylated pterocarpin 성분인 phaseollin이 MCF-7 세포의 증식을 촉진하며, kievitone은 에스트로겐 수용체 중 ER $\alpha$ 에 높은 결합친화력을 보이는 반면에 phaseollin은 ER $\beta$ 에 높은

**Table I.** Estrogenic effects of Leguminosae plants collected from Korea

Korean Name	Botanical Name	Used Part	Collection Season	Relative luciferase activity (% of E <sub>2</sub> )
	17 $\beta$ -Estradiol (10 nM)			100.0 $\pm$ 5.4
가는갈퀴	<i>Vicia angustifolia</i> var. <i>minor</i> (Bertol.) Ohwi	whole plant	May-09	5.1 $\pm$ 1.2
갈퀴나물	<i>Vicia amoena</i> Fisch. ex DC.	whole plant	Oct-06	19.0 $\pm$ 2.8
			Aug-28	6.0 $\pm$ 1.9
강낭콩	<i>Phaseolus vulgaris</i> var. <i>humilis</i> Alef.	whole plant	Oct-15	110.9 $\pm$ 13.4
개도독놈의갈고리	<i>Desmodium podocarpum</i> DC.	whole plant	Oct-17	30.9 $\pm$ 8.3
개자리	<i>Medicago polymorpha</i> L.	whole plant	Apr-03	19.9 $\pm$ 3.1
갯완두	<i>Lathyrus japonicus</i> Willd.	whole plant	May-18	42.1 $\pm$ 3.3
			Dec-20	22.3 $\pm$ 1.6
			May-16	19.1 $\pm$ 0.7
			Apr-17	6.4 $\pm$ 1.1
고삼	<i>Sophora flavescens</i> Aiton	upper part	Jul-30	88.7 $\pm$ 5.3
			Jun-29	40.9 $\pm$ 3.9
고양짜리	<i>Lespedeza x robusta</i> Nakai	stem	May-08	81.3 $\pm$ 6.2
		leaf	May-08	31.7 $\pm$ 2.9
골담초	<i>Caragana sinica</i> (Buc'hoz) Rehder	leaf	Jun-07	57.4 $\pm$ 8.5
		stem	Mar-11	7.9 $\pm$ 0.6
광릉갈퀴	<i>Vicia venosa</i> var. <i>cuspidata</i> Maxim.	whole plant	Oct-17	7.4 $\pm$ 0.5
꽃짜리	<i>Campylotropis macrocarpa</i> (Bunge) Rehder	lower part	Oct-01	23.2 $\pm$ 5.9
		upper part	Oct-01	15.2 $\pm$ 2.1
나비나물	<i>Vicia unijuga</i> A. Braun	whole plant	Jul-17	59.3 $\pm$ 10.9
			Dec-08	19.7 $\pm$ 1.8
			Sep-03	6.8 $\pm$ 1.4
낭아초	<i>Indigofera pseudotinctoria</i> Matsum.	leaf, stem	Jul-20	89.6 $\pm$ 8.9
		leaf, stem, flower	Jul-21	58.8 $\pm$ 4.6
		whole plant	Sep-19	70.0 $\pm$ 6.0
			Aug-29	50.5 $\pm$ 5.4
		upper part	Jun-17	8.1 $\pm$ 0.2
넓은잎갈퀴	<i>Vicia japonica</i> A. Gray	upper part	Jun-15	50.4 $\pm$ 8.7
녹두	<i>Vigna radiata</i> (L.) R.Wilczek	whole plant	Oct-17	22.8 $\pm$ 2.8
다릅나무	<i>Maackia amurensis</i> Rupr. & Maxim.	fruit	Aug-30	81.3 $\pm$ 5.1
		leaf, stem	Aug-08	67.1 $\pm$ 7.8
		leaf, stem	Jul-30	35.2 $\pm$ 6.6
		leaf	Aug-30	27.7 $\pm$ 4.4
		leaf	May-09	24.6 $\pm$ 0.6
		stem-bark	May-09	14.0 $\pm$ 3.8
		stem-inner bark	Oct-11	131.5 $\pm$ 9.8
		stem	Aug-30	6.8 $\pm$ 0.2
덩굴강낭콩	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	whole plant	Sep-30	53.4 $\pm$ 5.4
덩굴팥	<i>Vigna umbellata</i> (Thunb.) Ohwi & H. Ohashi.	whole plant	Oct-24	65.9 $\pm$ 11.0
도독놈의갈고리	<i>Desmodium podocarpum</i> var. <i>oxyphyllum</i> (DC.) H. Ohashi	whole plant	Jun-28	32.1 $\pm$ 6.3
			Aug-29	13.3 $\pm$ 2.0
돌콩	<i>Glycine soja</i> Siebold & Zucc.	whole plant	Sep-03	132.8 $\pm$ 18.8
			Sep-06	110.9 $\pm$ 14.8
		upper part	Aug-19	61.3 $\pm$ 6.3
			Aug-23	59.9 $\pm$ 0.1
동부	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.	upper part	Aug-28	8.3 $\pm$ 1.1
된장풀	<i>Desmodium caudatum</i> (Thunb.) DC.	whole plant	Nov-29	57.9 $\pm$ 5.4
		leaf, stem	Aug-15	49.3 $\pm$ 11.4
둥근매듭풀	<i>Kummerowia stipulacea</i> (Maxim.) Makino	whole plant	Nov-03	49.1 $\pm$ 5.0
등	<i>Wisteria floribunda</i> (Willd.) DC.	stem-bark	Apr-24	188.6 $\pm$ 3.6
		leaf	Apr-24	116.0 $\pm$ 6.8
		stem	Oct-14	73.0 $\pm$ 7.5
			Apr-24	61.5 $\pm$ 5.7

Table I. (continued)

Korean Name	Botanical Name	Used Part	Collection Season	Relative luciferase activity (% of E <sub>2</sub> )				
등	<i>Wisteria floribunda</i> (Willd.) DC.	leaf	Oct-14	40.2 ± 9.5				
		insect sac	Oct-31	24.5 ± 2.0				
등갈퀴나물	<i>Vicia cracca</i> L.	whole plant	Oct-16	24.7 ± 5.1				
땅비싸리	<i>Indigofera kirilowii</i> Maxim. ex Palib.	upper part	Jun-09	11.1 ± 0.2				
		whole plant	Aug-06	30.3 ± 2.8				
땅콩	<i>Arachis hypogaea</i> L.	fruit	Oct-27	33.9 ± 5.0				
		leaf, stem	Oct-27	35.1 ± 1.4				
매듭풀	<i>Kummerowia striata</i> (Thunb.) Schindl.	whole plant	Sep-09	63.3 ± 5.9				
			Sep-18	54.7 ± 7.3				
			Jul-10	49.0 ± 7.1				
박태기나무	<i>Cercis chinensis</i> Bunge	leaf, stem	Jul-27	26.2 ± 0.6				
		root	Dec-27	6.7 ± 1.1				
별노랑이	<i>Lotus corniculatus</i> var. <i>japonica</i> Regel	whole plant	Jul-18	66.5 ± 8.3				
			Jul-08	40.0 ± 8.1				
			Apr-17	32.1 ± 4.0				
벧지	<i>Vicia villosa</i> Roth	whole plant	Aug-29	7.0 ± 0.6				
			Jun-28	50.5 ± 2.5				
붉은토끼풀	<i>Trifolium pratense</i> L.	whole plant	May-18	43.8 ± 5.2				
			Sep-11	32.0 ± 5.0				
			Jul-07	31.4 ± 0.9				
비수리	<i>Lespedeza cuneata</i> G.Don	whole plant	Oct-04	23.8 ± 3.2				
살갈퀴	<i>Vicia angustifolia</i> var. <i>segetilis</i> (Thuill.) K.Koch	whole plant	Apr-04	57.1 ± 3.8				
			May-14	8.1 ± 0.6				
			May-18	4.8 ± 0.5				
새완두	<i>Vicia hirsuta</i> (L.) Gray	whole plant	Mar-25	22.3 ± 4.0				
			Apr-27	20.6 ± 1.4				
새콩	<i>Amphicarpaea bracteata</i> subsp. <i>edgeworthii</i> (Benth.) H.Ohashi	whole plant	Sep-05	52.1 ± 1.9				
새팥	<i>Vigna angularis</i> var. <i>nipponensis</i> (Ohwi) Ohwi & H.Ohashi	upper part	Aug-23	43.4 ± 8.9				
솔비나무	<i>Maackia fauriei</i> (H.Lév.) Takeda	leaf	May-31	49.2 ± 7.6				
		stem-core	May-31	10.2 ± 2.1				
		stem-bark	May-31	7.0 ± 0.3				
		leaf, stem	May-18	7.9 ± 0.5				
실거리나무 싸리	<i>Caesalpinia decapetala</i> (Roth) Alston <i>Lespedeza bicolor</i> Turcz.	leaf, stem, flower	Sep-19	61.6 ± 8.0				
			stem	Feb-25	60.7 ± 6.0			
			leaf	Aug-28	60.1 ± 4.0			
			leaf, stem	Aug-08	52.0 ± 5.0			
			lower part	Apr-28	35.2 ± 3.0			
			flower	Aug-28	31.0 ± 2.2			
			leaf, stem	Jul-23	30.8 ± 3.3			
			stem	Aug-28	21.0 ± 2.3			
			아까시나무	<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	leaf, stem	Aug-09	100.7 ± 6.7	
						stem-bark	May-08	66.7 ± 15.2
						leaf	May-08	54.6 ± 13.7
leaf, stem	May-18	32.1 ± 6.0						
leaf, stem	Sep-08	28.5 ± 3.1						
여우콩	<i>Rhynchosia volubilis</i> Lour.	whole plant	May-18	39.0 ± 0.7				
			Apr-26	11.9 ± 0.6				
여우팥	<i>Dunbaria villosa</i> (Thunb.) Makino	leaf, stem	Oct-04	37.8 ± 3.3				
			Oct-04	30.8 ± 2.1				
완두	<i>Pisum sativum</i> L.	whole plant	Apr-28	7.5 ± 0.5				
자귀나무	<i>Albizia julibrissin</i> Durazz.	whole plant	Dec-14	30.7 ± 1.8				
			leaf	Jun-28	26.5 ± 5.7			
			leaf, stem	Aug-31	16.0 ± 1.2			
			Jul-19	23.9 ± 0.2				

Table I. (continued)

Korean Name	Botanical Name	Used Part	Collection Season	Relative luciferase activity (% of E <sub>2</sub> )
자귀나무	<i>Albizia julibrissin</i> Durazz.	fruit	Oct-29	9.7 ± 0.7
		stem-bark	Mar-24	4.7 ± 1.8
		stem	May-17	3.6 ± 0.2
자귀풀	<i>Aeschynomene indica</i> L.	leaf, stem	Jul-31	20.8 ± 2.4
자운영	<i>Astragalus sinicus</i> L.	whole plant	Apr-28	136.8 ± 10.5
			Apr-04	31.6 ± 0.9
자주개자리	<i>Medicago sativa</i> L.	upper part	Jun-23	24.4 ± 1.5
작두콩	<i>Canavalia ensiformis</i> DC.	bean chaff	Nov-19	45.1 ± 5.5
		leaf, stem	Nov-19	30.8 ± 2.2
잔개자리	<i>Medicago lupulina</i> L.	whole plant	Mar-27	35.3 ± 5.3
전동싸리	<i>Melilotus suaveolens</i> Ledeb.	whole plant	Nov-02	44.0 ± 2.1
		upper part	Jun-23	32.2 ± 3.9
조록싸리	<i>Lespedeza maximowiczii</i> C.K.Schneid.	leaf, stem	May-17	21.7 ± 1.2
죽제비싸리	<i>Amorpha fruticosa</i> L.	leaf, stem	Jul-20	43.1 ± 3.2
		leaf, stem	Jun-09	16.1 ± 1.0
		stem	Jul-10	6.0 ± 1.1
		leaf	Jul-10	5.6 ± 0.5
		pericarp	Nov-29	14.3 ± 1.5
		leaf	Jul-20	12.2 ± 1.1
주엽나무	<i>Gleditsia japonica</i> Miq.	stem-core	Jul-20	9.6 ± 1.2
		stem-bark	Jul-20	3.8 ± 0.3
		whole plant	Aug-08	39.9 ± 2.7
			Jul-21	17.5 ± 1.7
차풀	<i>Chamaecrista nomame</i> (Siebold) H.Ohashi		Aug-07	8.7 ± 0.5
		leaf	Aug-30	37.3 ± 5.1
		leaf, stem	May-21	11.5 ± 1.5
참싸리	<i>Lespedeza cyrtobotrya</i> Miq.	stem	Aug-30	4.3 ± 0.3
		stem	Aug-06	131.6 ± 8.8
		stem-bark	Apr-20	103.9 ± 10.0
췌	<i>Pueraria lobata</i> (Willd.) Ohwi	flower	Aug-30	97.5 ± 4.5
		leaf	Aug-06	69.9 ± 9.6
		leaf, stem	Aug-09	38.4 ± 4.3
		branches and leaves	Jul-02	37.3 ± 1.4
		whole plant	Oct-17	24.8 ± 2.2
		leaf, stem	Oct-08	31.3 ± 3.7
큰도독눔의갈고리	<i>Desmodium oldhami</i> Oliv.	whole plant	Oct-08	5.6 ± 1.3
큰땅비싸리	<i>Indigofera kirilowii</i> var. <i>coreana</i> Craib	whole plant	Jul-12	151.2 ± 11.2
털갯완두	<i>Lathyrus japonicus</i> var. <i>aleuticus</i> Fernald ex Nakai	leaf, stem	May-09	73.8 ± 2.3
털조록싸리	<i>Lespedeza maximowiczii</i> var. <i>tomentella</i> Nakai	stem	Jul-12	43.0 ± 3.4
		whole plant	Jun-11	139.2 ± 9.3
			May-14	37.8 ± 0.6
도끼풀	<i>Trifolium repens</i> L.	whole plant	Nov-24	50.4 ± 11.4
팔	<i>Vigna angularis</i> (Willd.) Ohwi & H.Ohashi	whole plant	Nov-24	50.4 ± 11.4
		leaf, stem	Jul-04	36.1 ± 4.2
풀싸리	<i>Lespedeza thunbergii</i> subsp. <i>formosa</i> (Vogel) H.Ohashi		May-09	32.0 ± 2.9
		pericarp	Oct-30	12.6 ± 0.9
해녀콩	<i>Canavalia lineata</i> (Thunb.) DC.	pericarp	Oct-30	12.6 ± 0.9
활나무	<i>Crotalaria sessiliflora</i> L.	whole plant	Sep-04	80.1 ± 13.6
			Sep-18	84.6 ± 7.1
		upper part	Sep-10	36.4 ± 4.2
활랑나무	<i>Lathyrus davidii</i> Hance	root	Sep-10	12.7 ± 1.5
		leaf, stem	Jun-03	63.4 ± 11.7
회화나무	<i>Styphnolobium japonicum</i> L.	leaf, stem	Jun-03	63.4 ± 11.7
흰전동싸리	<i>Melilotus officinalis</i> subsp. <i>alba</i> (Medik.) H.Ohashi & Tateishi	upper part	Jun-23	30.3 ± 5.3

결합친화력을 보인다는 기존의 연구결과가 있다.<sup>19)</sup> 고삼(*Sophora flavescens*)의 경우, 7월에 채집한 지상부의 활성이 6월에 채집한 시료보다 높았으며, Ishikawa 세포를 이용한 기존의 연구에서도 전초에서 에스트로겐 활성을 보였다. 한편, 고삼 뿌리의 에스트로겐 활성은 잘 알려져 있으며, 뿌리로부터 분리된 kurarinone에 에스트로겐 활성이 있음이 밝혀졌다.<sup>5,20-23)</sup>

고양싸리(*Lespedeza × robusta*)의 경우, Ishikawa 세포를 이용한 기존의 연구에서는 고양싸리의 전초에서 에스트로겐 활성이 관찰되지 않았으나,<sup>17)</sup> 본 연구에서 사용한 고양싸리의 줄기에서는 양성대조군에 비해 상대적인 luciferase 활성이 81.3±6.2%로 유의미한 에스트로겐 활성이 관찰되었다. 이는 사용부위나 채집시기, 활성검색법에 있어서의 차이로 인한 것으로 볼 수 있다. 남아초(*Indigofera pseudotinctoria*)의 잎과 줄기의 경우에도 Ishikawa 세포를 이용한 기존의 연구에서는 활성이 관찰되지 않았으나,<sup>17)</sup> 본 연구에서는 luciferase 활성이 89.6±8.9%로 유의미한 에스트로겐 활성이 관찰되었다. 이 역시 채집시기나 활성 검색법에 있어서의 차이로 인한 것으로 볼 수 있다. 활성검색법에 있어서는 사용한 세포에 있어서도 차이가 있었지만, 기존의 연구에서는 시료의 처리 최종농도를 10 µg/ml로 하여 측정하였으나 본 연구에서는 천연물 추출물의 세포활성실험에 일반적으로 적용되는 최종농도인 100 µg/ml로 시료를 처리하여 활성감도를 증가시킨 것도 이러한 차이를 나타낸 원인이 될 수 있다.

다릅나무(*Maackia amurensis*)의 경우, 열매와 잎, 줄기, 잎, 수피(stem-bark), 코르크층을 제거한 수피(stem-inner bark) 가운데 열매가 81.3±5.1%, 코르크층을 제거한 수피가 131.5±9.8%의 활성을 보였다. 이는 열매와 수피에서 활성을 보였던 기존의 연구결과와는 일치하지만 기존의 연구결과와는 달리 잎에서는 유의미한 활성이 관찰되지 않았다.<sup>17)</sup> 본 연구팀은 다릅나무에서 분리된 tectoridin이 다릅나무 수피의 주요 에스트로겐 활성성분이며 tectoridin이 갑상선호르몬 유사활성도 나타낸다는 것을 밝힌 바 있다.<sup>4)</sup> 또한, 다릅나무 추출물이 에스트로겐 수용체인 ERα보다 ERβ에 더 친화력을 보인다는 연구결과가 있다.<sup>24)</sup>

9월에 채집한 돌콩(검은콩, *Glycine soja*)의 전초는 대조군보다 높은 에스트로겐 활성을 보였는데, 돌콩의 경우 돌콩의 추출물이 난소를 제거한 쥐에서 혈중 estradiol을 높인다는 보고가 있다.<sup>25)</sup> 등(*Wisteria floribunda*)의 경우, 수피의 에스트로겐 활성이 188.6±3.6%로 본 연구에 사용된 158종의 국내 자생 콩과식물의 추출물 중에서 가장 높았다. 부위별로는 등의 수피, 잎, 줄기, 총상부위 중 수피의 활성이 가장 높았고 다음으로 4월에 채집한 잎의 활성이 116.0±6.8%로 높았다. 이에 비해 10월에 채집한 잎의 활성은 40.2±9.5%로 채집시기에 따라 큰 차이를 보였다. 줄기의 경우에는 4월과 10월에 채집한 시료의 활성이 각각 61.5±5.7%와 73.0±7.5%

로 유의적인 차이를 보이지 않았으며 총상의 활성이 24.5±2.0%로 가장 낮았다. Ishikawa 세포를 이용한 기존의 연구에서는 등의 잎과 수피의 에스트로겐 활성이 관찰되지 않았다.<sup>17)</sup>

8월에 채집한 아까시나무(*Robinia pseudoacacia*)의 잎과 줄기의 혼합추출물에서도 100.7±6.7%의 활성이 관찰되었는데, 5월과 9월에 채집한 잎과 줄기의 혼합시료의 활성은 각각 32.1±6.0과 28.5±3.1%로 약한 활성을 보이는 데 그쳤다. Ishikawa 세포를 이용한 기존의 연구에서는 아까시나무의 꽃과 잎, 수피의 에스트로겐 활성이 관찰되지 않았다.<sup>17)</sup> 자운영(*Astragalus sinicus*)의 경우, 4월 4일에 채집한 전초와 4월 28일에 채집한 시료의 에스트로겐 활성차이가 약 4배 정도로 4월 28일에 채집한 시료의 활성이 높았다. 이는 자운영의 에스트로겐 활성을 처음 밝힌 연구에서 자운영의 개화가 완료된 시점에서의 시료가 개화가 시작되는 시점에서의 시료보다 어린 생쥐의 자궁무게를 더 많이 늘린다는 기존의 연구결과와 일치한다.<sup>26)</sup>

쑥(*Pueraria lobata*)의 줄기와 수피, 꽃의 추출물이 유의미한 에스트로겐 활성을 보였고, 이 중에서 줄기의 활성은 131.6±8.8%로 전체 시료 중 세 번째로 높은 활성을 나타내었으며, 돌콩의 전초, 자운영의 전초, 토끼풀의 전초의 활성과 유사하였다. 부위별로는 줄기>수피>꽃>잎>잎과 줄기, 지엽의 순으로 활성이 높았다. 국내 자생 쑥의 부위별 에스트로겐 활성을 보고한 기존의 연구결과, 에스트로겐 활성을 나타내는 genistein과 daidzein의 함량은 뿌리>>줄기>>잎, 꽃>줄기 순으로 높았고, genistin의 함량은 뿌리>>줄기, 꽃>잎의 순으로 높았다.<sup>27)</sup> 식물성 에스트로겐의 유방암 억제 효과에 대한 화학구조기반 기전연구결과, 콩과식물의 주요 isoflavone인 daidzein과 genistein은 두 수산화기 간의 거리가 14.5 Å로 에스트로겐의 화학구조와 유사하여 에스트로겐 수용체에 결합할 수 있고, 이로 인해 부분적 에스트로겐 작용제 또는 길항제로 작용하여 남성호르몬으로부터 여성호르몬으로의 합성을 촉진하는 것으로 알려져 있다.<sup>3)</sup> 쑥의 뿌리에서 분리된 isoflavonoid 화합물의 유방암 세포주 증식억제작용과 에스트로겐 활성이 보고되어 있으며, 그 중에서 *n*-BuOH 분획에서 분리된 genistein의 에스트로겐 유사활성이 가장 높았다.<sup>28)</sup> 쑥의 꽃인 갈화의 에스트로겐 활성을 나타내는 성분은 kakkalide과 tectoridin이며, 이들 성분은 체내에서 장내 미생군에 의해 irisolidone과 tectorigenin으로 각각 대사된 후 혈액으로 흡수되어 에스트로겐 활성을 나타낸다고 알려져 있다.<sup>29)</sup> 한편, 쑥과 토이 3:1의 비율로 구성된 조성물이 골밀도 저하, 체중증가, 고지혈증, 골다공증 등을 포함하는 갱년기증상의 완화를 보였다는 임상결과가 있다.<sup>30)</sup>

털조록싸리(*Lespedeza maximowiczii* var. *tomentella*) 잎의 에스트로겐 활성은 151.2±11.2%로 검색한 시료 158종 중에서 두 번째로 높은 활성을 보였다. 이에 비해 같은 시기에 채집한 줄기의 활성은 43.0±3.4%로 약한 활성이 관찰되었다.

개화가 한창인 시기인 6월에 채집한 토끼풀(*Trifolium repens*) 전초의 에스트로겐 활성은  $139.2 \pm 9.3\%$ 로 칩의 줄기와 유사한 활성을 보였다. 이에 비해 5월에 채집한 시료의 활성은 1/3의 활성에 그쳤다. 한편, 토끼풀에 함유된 coumestrol 이 에스트로겐과의 구조적 유사성으로 인하여 에스트로겐 활성이 있다는 기존의 연구결과가 있다.<sup>31)</sup> 활나물(*Crotalaria sessiliflora*) 지상부에서 분리된 isoflavone계열 물질인 trihydroxyisoflavone-4'-O- $\beta$ -D-glucopyranoside가 MCF-7 세포의 증식을 촉진하며 여성호르몬 저해제인 tamoxifen에 의하여 에스트로겐 활성이 차단된다는 보고가 있다.<sup>32)</sup>

자귀나무의 수피인 합환피 추출물은 본 연구에서 에스트로겐 활성을 나타내지 않았는데, 이는 에스트로겐수용체가 있는 형질전환 효모균주와  $\beta$ -galactosidase reporter gene을 사용한 기존의 활성검색에서도 에스트로겐 활성이 관찰되지 않은 결과와 일치한다.<sup>5)</sup> 갯완두와 털갯완두의 전초, 골담초의 잎과 줄기, 동부의 지상부, 땅비싸리의 전초, 박태기나무의 뿌리, 뱀지의 전초, 비수리의 전초, 살갈퀴의 전초, 실거리나무(이명: *Caesalpinia japonica* Siebold & Zucc.)의 잎과 줄기, 여우콩의 잎과 줄기, 자귀풀의 잎과 줄기, 조록싸리의 잎과 줄기, 죽제비싸리의 줄기와 잎, 주엽나무의 잎과 심재, 수피, 과피의 추출물, 차풀[이명: *Cassia mimosoides* var. *nomame*(Siebold) Makino]의 전초, 참싸리의 잎과 줄기에서는 유의미한 에스트로겐 활성이 관찰되지 않았고 매듭풀(*Kummerowia striata*)의 전초에서는 약한 활성이 관찰되었는데, 이는 Ishikawa cell을 사용하여 alkaline phosphatase activity를 측정된 기존의 연구결과와 일치한다.<sup>17)</sup>

한편, 도둑놈의 갈고리와 여우팍의 전초, 싸리의 줄기, 솔비나무의 심재와 수피에서는 에스트로겐 활성이 관찰되지 않거나 낮은 활성이 관찰되었는데 Ishikawa cell을 이용한 기존의 연구결과에서는 유의미한 활성이 관찰되었다. 골담초의 잎, 7월에 채집한 별노랑이의 전초, 6월에 채집한 붉은 토끼풀의 전초에서는 약한 에스트로겐 활성이 관찰되었는데 Ishikawa cell을 이용한 기존의 연구결과에서는 유의미한 활성이 관찰되지 않았다. 이러한 차이는 앞서 언급한 바와 같이 채집시기나 활성검색법의 차이에 의한 것으로 볼 수 있다. 또한, 전반적으로 콩과식물의 개화기에 채집한 시료의 에스트로겐 활성이 높게 관찰되는 양상을 보였다.

## 결 론

국내 자생 콩과식물 58종 3아종 10변종의 채집시기별, 부위별로 제작된 메탄올추출물 총 158종류의 시료에 대하여 MCF-7 cell과 luciferase reporter gene을 이용하는 에스트로겐 수용체유전자발현법을 사용하여 에스트로겐 활성을 검색한 결과, 양성대조군으로 사용한  $17\beta$ -estradiol(10 nM, Relative Luciferase Activity 100%)과 비교했을 때 강낭콩의

전초(110.9%), 다릅나무의 수피(131.5%), 돌콩의 전초(132.8%), 등의 수피(188.6%)와 잎(116%), 자운영의 전초(136.8%), 칩의 줄기(131.6%), 털조록싸리의 잎(151.2%), 토끼풀의 전초(139.2%)가 양성대조군보다 높은 활성을 보였고, 남아초의 잎과 줄기(89.6%), 고삼의 지상부(88.7%), 고양싸리의 줄기(81.3%), 아까시나무의 잎과 줄기(100.7%)가 양성대조군과 유사한 활성을 보였다. 이들 천연물소재 중에서 고양싸리의 줄기와 남아초의 잎과 줄기, 등, 아까시나무의 잎과 줄기, 털조록싸리 잎의 에스트로겐 활성은 처음으로 보고되는 것으로, 본 연구에서 높은 에스트로겐 활성을 보인 콩과식물의 소재와 함께 해당 유효성분과 작용기전의 규명 등의 추가 연구가 필요하다.

## 사 사

이 논문은 산업통상자원부 및 한국산업기술진흥원의 재원으로 광역경제권연계협력사업(A004500005)의 지원과 한국연구재단의 개인연구지원사업(NRF-2017 R1A2B4008859), 제주대학교 기초과학연구소 자율운영중점연구지원사업에서 수행된 기초연구사업(2019R1A6A1A10072987)의 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

1. Kang, H.-K., Yi, J.-Y. and Song, H.-S. (2014) Germination characteristics and maturity by production time of *Chamaecrista nomame*, *Lespedeza cuneata* and *Lespedeza bicolor* seed in Fabaceae plant. *Korean J. Plant Res.* **27**: 359-364.
2. Kim, J. D., Kim, S. G. and Kwon, C. H. (2004) Grassland and forages: Comparison of forage yield and quality of forage legume. *J. Anim. Sci. & Technol.* **46**: 437-442.
3. Tanwar, A. K., Dhiman, N., Kumar, A. and Jaitak, V. (2021) Engagement of phytoestrogens in breast cancer suppression: Structural classification and mechanistic approach. *Eur. J. Med. Chem.* **213**: 113037.
4. Shim, M., Bae, J. Y., Lee, Y. J. and Ahn, M. J. (2014) Tectoridin from *Maaackia amurensis* modulates both estrogen and thyroid receptors. *Phytomedicine.* **21**: 602-606.
5. Lee, C. M., Kang, S. C., Oh, J. S., Choi, H., Li, X. M., Lee, J. H., Lee, M. H., Choung, E. S., Kwak, J. H. and Zee, O. P. (2006) *In vitro* screening of medicinal plants with estrogen receptor modulating activity. *Kor. J. Pharmacog.* **37**: 21-27.
6. Overk, C. R., Yao, P., Chen, S., Deng, S., Imai, A., Main, M., Schinkovitz, A., Farnsworth, N. R., Pauli, G. F. and Bolton, J. L. (2008) High-content screening and mechanism-based evaluation of estrogenic botanical extracts. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **11**: 283-293.
7. Thongon, N., Boonmuen, N., Suksen, K., Wichit, P., Chairoungdua, A., Tuchinda, P., Suksamrarn, A., Winuthayanon,

- W. and Piyachaturawat, P. (2017) Selective estrogen receptor modulator (SERM)-like activities of diarylheptanoid, a phytoestrogen from *Curcuma comosa*, in breast cancer cells, pre-osteoblast cells, and rat uterine tissues. *J. Agric. Food Chem.* **65**: 3490-3496.
8. Cazzaniga, M. and Bonanni, B. (2012) Breast cancer chemoprevention: old and new approaches. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**: 985620.
  9. Reel, J. R., Lamb IV, J. C. and Neal, B. H. (1996) Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundam. Appl. Toxicol.* **34**: 288-305.
  10. Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K. L., Fernandez, M. F., Olea, N. and Serrano, F. O. (1995) The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.* **103**(Suppl 7): 113-122.
  11. Gea, M., Toso, A. and Schilirò, T. (2020) Estrogenic activity of biological samples as a biomarker. *Sci. Total Environ.* **740**: 140050.
  12. Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, 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.
  13. Miksicek, R. J. (1993) Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. *Mol. Pharmacol.* **44**: 37-43.
  14. 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.
  15. 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 modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **143**: 205-212.
  16. Lapcik, O., Hampl, R., Hill, M., Wähälä, K., Maharik, N. A. and Adlercreutz, H. (1998) Radioimmunoassay of free genistein in human serum. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **64**: 261-268.
  17. Yoo, H. H., Kim, T., Ahn, S., Kim, Y. J., Kim, H. Y., Piao, X. L. and Park, J. H. (2005) Evaluation of the estrogenic activity of Leguminosae plants. *Biol. Pharm. Bull.* **28**: 538-540.
  18. Kim, I. G., Kang, S. C., Kim, K. C., Choung, E. S. and Zee, O. P. (2008) Screening of estrogenic and antiestrogenic activities from medicinal plants. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **25**: 75-82.
  19. Boué, S. M., Burow, M. E., Wiese, T. E., Shih, B. Y., Elliott, S., Carter-Wientjes, C. H., McLachlan, J. A. and Bhatnagar, D. (2011) Estrogenic and antiestrogenic activities of phytoalexins from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* **59**: 112-120.
  20. De Naeyer, A., Vanden Berghe, W., Pocock, V., Milligan, S., Haegeman, G. and De Keukeleire, D. (2004) Estrogenic and anticarcinogenic properties of kurarinone, a flavandulyl flavanone from the roots of *Sophora flavescens*. *J. Nat. Prod.* **67**: 1829-1832.
  21. Kang, S. C., Lee, C. M., Choi, H., Lee, J. H., Oh, J. S., Kwak, J. H. and Zee, O. P. (2006) Evaluation of oriental medicinal herbs for estrogenic and antiproliferative activities. *Phytother. Res.* **20**: 1017-1019.
  22. An De Naeyer, A. D., Berghe, W. V., Pocock, V., Milligan, S., Haegeman, G. and Keukeleire, D. D. (2004) Estrogenic and anticarcinogenic properties of kurarinone, a flavandulyl flavanone from the roots of *Sophora flavescens*. *J. Nat. Prod.* **67**: 1829-1832.
  23. Pablo, I. H. and Michael, W. (2005) Binding of flavonoids from *Sophora flavescens* to the rat uterine estrogen receptor. *Planta Med.* **71**: 1065-1068.
  24. Kareva, E., Tikhonov, D., Mironov, S., Fedoreyev, S., Kulesh, N. and Shimanovskii, N. (2019) Binding constants of *Maackia amurensis* whole extract and its separate flavanoids to estradiol receptors. *Pharm. Chem. J.* **52**: 855-589.
  25. Yuliawati, D., Astuti, W. W. and Yuniarti, F. (2020) Effects of black soy phytoestrogens (*Glycine soja*) on elevated levels of estradiol in rat blood (*Rattus norvegicus*) ovariectomy. *Nus. Biosci.* **12**: 55-58.
  26. Wada, H. (1963) Estrogenic activity in fresh and dried forages. *Japanese Journal Zootechnical Science* **34**: 248-252.
  27. Kim, S.-J., Park, C., Kim, H.-G., Shin, W.-C. and Choe, S.-Y. (2004) A study on the estrogenicity of Korean arrowroot (*Pueraria thunbergiana*). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **33**: 16-21.
  28. Ahn, S. Y., Jo, M. S., Lee, D., Baek, S. E., Baek, J., Yu, J. S., Jo, J., Yun, H., Kang, K. S., Yoo, J. E. and Kim, K. H. (2019) Dual effects of isoflavonoids from *Pueraria lobata* roots on estrogenic activity and anti-proliferation of MCF-7 human breast carcinoma cells. *Bioorg. Chem.* **83**: 135-144.
  29. Shin, J. E., Bae, E. A., Lee, Y. C., Ma, J. Y. and Kim, D. H. (2006) Estrogenic effect of main components kakkalide and tectoridin of *Puerariae Flos* and their metabolites. *Biol. Pharm. Bull.* **29**: 1202-1206.
  30. Lee, M., Park, S. J., Moon, Y. J., In, G., Kim, J. H., Kim, S. W., Lee, M. H. and Kim, O. K. (2020) Combination of *Sargassum fusiforme* and *Pueraria lobata* extracts alleviates postmenopausal symptoms in ovariectomized rats. *J. Med. Food* **23**: 735-744.
  31. Miksicek, R. J. (1994) Interaction of naturally occurring non-steroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **49**: 153-160.
  32. Mun'im, A., Isoda, H., Seki, M., Negishi, O. and Ozawa, T. (2003) Estrogenic and acetylcholinesterase-enhancement activity of a new isoflavone, 7,2',4'-trihydroxyisoflavone-4'-O- $\beta$ -D-glucopyranoside from *Crotalaria sessiliflora*. *Cyto-technology* **43**: 127-134.
- (2021. 6. 13 접수; 2021. 6. 22 심사; 2021. 6. 23 게재확정)