

## Leydig Cell의 항산화에 미치는 별사상자와 사상자의 비교연구

오지훈<sup>1#</sup>, 김도림<sup>1</sup>, 박수연<sup>2</sup>, 장문석<sup>1</sup>, 박성규<sup>1\*</sup>

1 : 경희대학교 한의과대학 처방제형학교실, 2 : 용인대학교 교육대학원

### The Antioxidant Activity of Cnidii Fructus and Torilis Fructus in Leydig cells

Ji Hoon Oh<sup>1#</sup>, Do Rim Kim<sup>1</sup>, Soo Yeon Park<sup>2</sup>, Mun Seog Chang<sup>1</sup>, Seong Kyu Park<sup>1\*</sup>

1 : Dept. of Prescriptionology, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, Seoul, 130-701, Korea

2 : Graduate School of Education, Yong In University

#### ABSTRACT

**Objectives** : The purpose of this study was to estimate the antioxidant activity of water extract of Cnidii Fructus (CF) and Torilis Fructus (TF) in Leydig cells.

**Methods** : Free radical scavenging activity of CF and TF against 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) was determined spectrophotometrically. We investigated the effect of CF and TF in Leydig cells by MTT assay. The protective effects of CF and TF against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in Leydig cells, Superoxide dismutase (SOD), and catalase activity assays were performed in Leydig cells.

**Results** : The results showed that CF scavenged DPPH radical in a dose-dependent manner by up to 81.2%, TF scavenged DPPH radical in a dose-dependent manner by up to 63.8%. CF showed cell viability as 121.0, 132.7, 126.6% in 5, 10, 100 µg/ml concentrations, TF showed cell viability as 127.5, 111.8% in 5, 100 µg/ml concentrations, respectively. The hydrogen peroxide-induced cytotoxicity of Leydig cells were protected to 86.3% by CF at concentration of 10 µg/ml and protected to 83.5% by TF at concentration of 100 µg/ml. Both CF and TF at all concentrations, SOD activity was not significantly changed, Catalase activity was significantly increased at 10, 100 µg/ml concentrations of CF, respectively. TF's catalase activity showed no significant difference from that of the control.

**Conclusions** : These results suggest that CF, as an antioxidant, protects Leydig cells in hydrogen peroxide-induced oxidative stress, know that 『Kwangjebikeup』 played a role in settlement and spreading of foreign knowledge to civilians.

**Key words** : *Cnidium monieri* (L), Cussion, *Torilis japonica* Decandolle, Leydig cells, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Cell viability, Catalase

#### 서론

蛇床子(蛇床子)는 대한약전외한약(생약)규격집에서 산형과(Umbelliferae)에 속한 일년생 초본인 별사상자 *Cnidium monieri* (L), Cussion 또는 사상자 *Torilis japonica* Decandolle의 열매로 기록되어 있다<sup>1)</sup>.

별사상자 *C. monieri* (L.) Cusson는 산형과에 속한 갯사상자속(*Cnidium Cuss.*)의 이년생 초본이며, 사상자 *T. japonica* (HOUTT.) DC,는 산형과에 속한 사상자속(*Torilis*

Spreng)의 이년생 초본으로 우리나라에서는 蛇床子로 사용되고 있다<sup>2)</sup>.

그러나 중국에서는 별사상자 *C. monieri* (L), Cussion의 식물명을 蛇床으로 기록하여 한약명 蛇床子の 기원식물로 규정하고 있으며, 사상자 *T. japonica* Decandolle의 식물명을 小蓟衣로 기록하여 한약명 蓟衣의 기원식물로 구분하여 사용하고 있다<sup>3)</sup>.

蛇床子는 性溫하고 味辛苦하며 脾經과 腎經으로 歸經한다.

\*Corresponding author : Seong Kyu Park, Dept. of Prescriptionology, College of Korean Medicine, Kyung Hee University  
· Tel : +82-2-961-0330 · FAX : +82-2-961-0536 · E-mail : comskp@khu.ac.kr

#First author : Ji Hoon Oh, Dept. of Prescriptionology, College of Korean Medicine, Kyung Hee University

· Tel : +82-2-961-0330 · FAX : +82-2-961-0536 · E-mail : bremen82@freechal.com

· Received : 10 October 2014 · Revised : 31 October 2014 · Accepted : 3 November 2014

溫腎壯陽의 효능이 있어서 男子의 陽痿, 女子의 子宮寒 不妊, 寒濕帶下를 치료하고 燥濕殺蟲, 祛風止痒의 효능으로 陰囊濕痒, 陰痒腫痛, 風濕癩痛, 濕瘡疥癬을 치료한다<sup>4)</sup>. 蛇床子의 불임과 관련된 문헌으로, 『神農本草經』에서 "男子 陰痿濕痒"이라 기재되었고, 『名醫別錄』에서 "男子陰強, 令人有子"로 기재되어 있다<sup>5)</sup>.

窃衣는 性平하고 味苦辛하며 脾經과 大腸經으로 歸經한다. 殺蟲止瀉, 收濕止痒의 효능으로 蟲積腹痛, 泄痢, 瘡瘍潰爛, 陰痒帶下, 風濕疹의 主治 작용이 있다<sup>3)</sup>.

蛇床子는 『千金要方』에서 免絲子, 蛇床子, 五味子를 等分한 天雄丸에 배오되어 陽痿不起한 증상을 치료하였다. 반면 窃衣는 『福建藥物志』에서 皮膚瘙痒症에 사용된 기록만 남아 있다<sup>3)</sup>.

별사상자 *C. monnieri* (L.) Cusson는 항알려지 작용, 남성보양작용, 항박테리아작용의 효과가 알려져 있으며<sup>6)</sup>, 한편 사상자 *T. japonica* (HOUTT.) DC.도 멜라닌 형성 억제 효과가 보고되었다<sup>7)</sup>. 현재 별사상자 *C. monnieri* (L.) Cusson에 대한 실험연구로는 강 등<sup>8)</sup>은 별사상자 추출물의 DPPH 활성에 대하여 蛇床子의 항산화 효과에 대해 밝혔으며, Chiou 등<sup>9)</sup>에 의해 별사상자 추출물이 토끼의 음경해면체를 혈류량을 증가시킨다고 보고하였다. 사상자 *T. japonica* (HOUTT.) DC.에 대한 실험연구로는 박 등<sup>10)</sup>이 사상자가 testosterone 5 alpha-reductase를 저해한다고 보고하였다.

그러나 한국에서 별사상자 *C. monnieri* (L.) Cusson와 사상자 *T. japonica* (HOUTT.) DC.가 혼용되고 있는 실정에서 별사상자와 사상자의 남성생식세포에 미치는 효과를 비교 연구한 것은 아직 보고된 바 없다. 이에 별사상자 추출물 *Cnidii Fructus* (CF)과 사상자의 추출물 *Torilis Fructus* (TF)을 이용하여 DPPH 방법으로 항산화효과를 측정하였고, 남성불임에 미치는 기전을 비교 연구하고자 Leydig cell에 대한 cell viability, hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity, superoxide dismutase (SOD) 및 catalase activity를 각각 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실험

### 1. 재료 및 기기

#### 1) 약재

본 실험에서 사용된 별사상자 *C. monnieri* (L.) Cusson 열매는 중국산으로, 사상자 *T. japonica* (HOUTT.) DC. 열매는 한국산으로 정도생약을 통하여 구입하여, 경희대학교 처방제형학 교실에서 외부형태를 비교 조사하여 확인한 후 사용하였으며, 일부는 경희대학교 한의과대학 처방제형학 교실에 보관하였다.

#### 2) 세포주

실험에 사용된 세포주는 TM3 (Leydig cell, mouse)로서 America Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하였다. 이 세포주는 고환 내 간질조직 (interstitial tissue)에 있는 Leydig cell에 속한다.

#### 3) 시약 및 기기

본 실험을 위해서 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma, USA), ascorbic acid (Sigma, USA), fetal bovine serum (FBS; GIBCO BRL, USA), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; GIBCO BRL, USA), trypsin-EDTA (GIBCO BRL, USA), ethanol 99.9% (Duksan, Korea), tetrazolium salt 3, [4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT; Sigma, USA), dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma, USA), hydrogen peroxide (Sigma, USA), n-butanol (Sigma, USA), pyridine (Sigma, USA), SOD enzyme (Sigma, USA) 등이 사용되었다. 본 실험에 사용된 기기는 rotary evaporator (Eyela, Japan), freeze dryer (Cooling & Heating Systems, Korea), deep freezer (Revco, USA), microplate spectrophotometer (Molecular Devices, USA), CO<sub>2</sub> incubator (Sanyo, Japan) 등이다.

## 2. 실험 방법

### 1) 시료의 제조

별사상자 *C. monnieri* (L.) Cusson 열매 300 g, 사상자 *T. japonica* (HOUTT.) DC. 열매 300 g을 정확하게 중량을 측정 후 환류추출기에 각각 1차 증류수 6,000 ml와 함께 넣은 뒤 90 분 간 냉침하고, 탱액이 끓는 시점으로부터 90 분 동안 가열하여 추출하고, filter paper로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었다. 각각의 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용하였다. 별사상자 추출물 *Cnidii Fructus* (CF)로 표시하며 동결건조 추출물은 54 g을 얻었으며, 수율은 18%이었다. 사상자의 추출물 *Torilis Fructus* (TF)로 표시하며 동결건조 추출물은 63 g을 얻었으며, 수율은 21%이었다.

### 2) 세포 배양

Leydig cell line은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 10% FBS, penicillin (100 µg/ml), streptomycin (100 µg/ml)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다. Leydig cell은 75 cm<sup>2</sup> flask (Falcon, USA)에서 충분히 증식된 후 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 2회 씻어준 후 50 ml flask 당 1 ml의 0.25% trypsin-EDTA 용액을 넣고 실온에서 1 분간 처리한 다음 trypsin용액을 버리고 37°C에서 5분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대 배양하였다. 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 ml에 부유시킨 다음 새로운 배양용기에 옮겨 1 : 20의 split ratio로 CO<sub>2</sub> 배양기 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다.

### 3) DPPH radical 소거 작용의 측정

DPPH radical scavenging activity를 알아보기 위하여 Chang 등<sup>11)</sup>의 방법을 응용하였다. 동결 건조된 시료를 증류수에 녹여서 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1,000 µg/ml의 농도로 시액을 제조하였다. 양성 대조군으로 시료와 같은 농도의 ascorbic acid를 사용하였다. 96-well microplate (Corning, USA)에 ethanol에 녹인 0.1 mM DPPH와 각 농도의 시액을 동량 첨가한 후 잘 흔들어 섞어 준 후, 실온에서 30 분간

방치한 후 microplate spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. Radical scavenging activity는 다음 공식으로 계산되었다. DPPH radical scavenging activity (%) =  $[(A_B - A_T) / A_B] \times 100$ ,  $A_B$ : absorbance of blank sample,  $A_T$ : absorbance of tested extract solution

#### 4) Cell viability 측정

Leydig cell의 증식에 미치는 효과를 알아보기 위하여 Mosmann 등<sup>12)</sup>의 방법을 응용하였다. 96 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/ml의 cell을 100  $\mu$ l씩 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 PBS 용액으로 씻어주었다. 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 시료 1, 5, 10, 50, 100  $\mu$ g/ml을 각 well에 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나기 4 시간 전에 PBS에 녹인 5 mg/ml MTT를 20  $\mu$ l씩 각 well에 처리한 후 알루미늄 호일로 차광시킨 후 나머지 시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100  $\mu$ l 처리한 후 37°C에서 2 시간 방치 후 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 다음 공식으로 계산되었다. Cell viability(%) =  $100 \times AT/AC$ , AC: absorbance of control, AT: absorbance of tested extract solution

#### 5) Hydrogen peroxide-induced cytotoxicity 측정

Hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity에 대한 보호효과를 알아보기 위해 Mosmann 등<sup>12)</sup>의 MTT test를 응용하여 다음과 같이 실험하였다. 96 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/ml의 cell을 100  $\mu$ l씩 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 PBS 용액으로 씻어주었다. PBS에 녹인 각각의 시료 1, 5, 10, 50, 100  $\mu$ g/ml과 FBS free DMEM에 녹인 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>을 각각의 well에 처리한 후 4시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 배지를 버리고 PBS로 세척한 후 PBS에 녹인 5 mg/ml MTT 20  $\mu$ l와 FBS free DMEM 200  $\mu$ l을 각 well에 처리한 후 알루미늄호일로 차광한 뒤 4 시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 200  $\mu$ l 처리한 후 37°C에서 2 시간 방치 후 microplate spectrophotometer를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 6) Superoxide dismutase (SOD) 활성도 측정

Leydig cell에 hydrogen peroxide를 처리한 후 시료를 처리하여 superoxide dismutase (SOD) 활성도에 미치는 영향을 Crapo 등<sup>13)</sup>의 방법에 따라 측정하였다. 100 mm tissue culture dish (BD Falcon, USA)에 10% FBS, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100  $\mu$ g/ml)이 첨가된 DMEM 배지에 현탁된  $3 \times 10^5$  cells/ml의 cell을 8 ml 씩 넣었다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 1X PBS 용액으로 씻어주었다. 1X PBS에 녹인 각각의 시료 1, 5, 10, 50, 100  $\mu$ g/ml과 FBS free DMEM에 녹인 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>을 각각의 well에 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 세포를

1X PBS로 2 회 수세한 후 lysis buffer를 첨가하고 스크랩퍼를 이용하여 긁어냈다. 이것을 1.5 ml의 eppendorf tube에 담아 12,000  $\times$  g에서 10 분간 원심분리 하여 상층액을 취하고 상층액 중의 1  $\mu$ l를 취해 Bradford's method<sup>14)</sup>로 단백질을 정량하였다. 50 ml cornical tube에 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3차 증류수에 EDTA 0.1 M 되도록 첨가하여 pH 7.8의 50 mM phosphate buffer (PB)를 만든 후 0.1 N NaOH에 5  $\mu$ M xanthine을 녹여주고, 1 ml PB에 cytochrome C를 첨가하여 solution A를 제조하였다. 또한 0.1 mM EDTA가 첨가된 50 mM phosphate buffer에 0.2  $\mu$ /ml xanthine oxidase을 넣어 solution B를 제조하였다. solution A 870  $\mu$ l와 농도를 맞춘 sample 20  $\mu$ l와 solution B 20  $\mu$ l를 섞은 후 550 nm에서 3 분 동안의 흡광도 변화를 측정하였다. 시료중의 SOD 활성은 0.05-12.5 units/mg SOD protein을 사용하여 만든 표준곡선을 이용하여 산출하였다. SOD 활성도 1 unit은 동일한 반응 조건하에서 3 분 동안 측정하여 chromogen의 생성을 50% 감소시키는 SOD양으로 정하였다.

#### 7) Catalase 활성도 측정

Leydig cell에 hydrogen peroxide를 처리한 후 시료를 처리하여 catalase 활성도를 Aebi 등<sup>15)</sup>의 방법에 따라 측정하였다. 100 mm tissue culture dish (BD Falcon, USA)에 10% FBS, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100  $\mu$ g/ml)이 첨가된 DMEM 배지에 현탁된  $3 \times 10^5$  cells/ml의 cell을 8 ml 씩 넣었다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 1X PBS 용액으로 씻어주었다. 1X PBS에 녹인 각각의 시료 1, 5, 10, 50, 100  $\mu$ g/ml과 FBS free DMEM에 녹인 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>을 각각의 well에 동시처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 세포를 1X PBS로 2 회 수세한 후 lysis buffer를 첨가하고 스크랩퍼를 이용하여 긁어냈다. 이것을 1.5 ml의 eppendorf tube에 담아 12,000  $\times$  g에서 10 분간 원심분리 하여 상층액을 취하고 상층액 중의 1  $\mu$ l를 취해 Bradford's method<sup>14)</sup>로 단백질을 정량하였다. 50 ml cornical tube에 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3차 증류수를 넣어 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0) 제조한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가한 후 0.015 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.01 M phosphate buffer를 제조하였다. 0.015 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 첨가된 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0) 950  $\mu$ l와 50  $\mu$ l의 sample을 섞은 후 240 nm에서 1 분 동안의 흡광도 변화를 측정하였다.

### 3. 통계처리

실험성적은 평균치  $\pm$  표준오차 (Mean  $\pm$  S.E.)로 나타내었으며, 대조군과 실험군과의 평균의 차이는 Student's *t*-test로 검정하여  $p < 0.05$  일 때를 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. 별사상자 추출물 (CF)과 사상자의 추출물

**(TF)의 DPPH radical 소거 활성 비교**

별사상자 추출물은 5, 10, 50, 100, 500 µg/ml의 농도에  
서 각각 31.5, 35.7, 55.3, 70.6, 81.2%의 DPPH radical  
소거 활성을 나타내었다. 사상자 추출물은 5, 10, 50, 100,  
500 µg/ml의 농도에서 각각 23.7, 28.0, 35.9, 44.4, 63.8%  
의 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다. Dose-response  
curve로부터 산출된 50%의 DPPH radical 소거 활성을 나타  
내는 화합물의 농도(IC<sub>50</sub>)는 ascorbic acid는 1 µg/ml, 별사  
상자 추출물은 16 µg/ml, 사상자 추출물은 150 µg/ml이었  
다(Fig. 1).

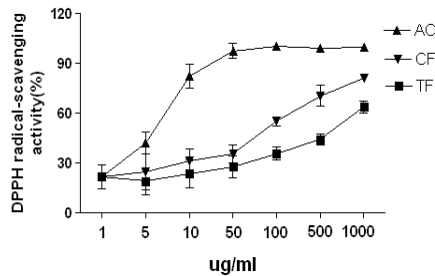


Fig. 1. DPPH radical-scavenging activity of ascorbic acid (AC) and water extract of Cnidii Fructus (CF) and Torilis Fructus (TF) : Values indicate the mean±S.E. of four independent experiment, DPPH radical scavenging activity (%) = [(AB-AT)/AB] × 100, AB; absorbance of blank sample, AT; absorbance of tested extract solution.

**2. Leydig cell의 cell viability에 대한 영향 비교**

별사상자 추출물 5, 10, 100 µg/ml의 농도에서 Leydig cell  
의 생존율은 각각 121.0, 132.7, 126.6%로 유의성 있게 증  
가하였다 ( $p < 0.001$ , Fig. 2). 사상자의 추출물은 5, 100  
µg/ml의 농도에서 Leydig cell의 생존율이 127.5, 111.8%  
로 유의성 있게 상승하였다( $p < 0.05$ , Fig. 2).

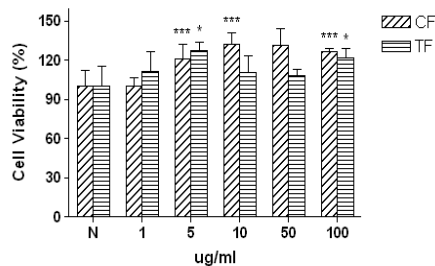


Fig. 2. Effect of water extract of Cnidii Fructus (CF) and Torilis fructus (TF) on Leydig cells. Leydig cells were treated with CF and TF at 37°C for 24 h. Each column or point represents the mean±S.E. (n=6). \* Significantly different from the normal group (\*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

**3. Hydrogen peroxide-induced cytotoxicity에 대한 항산화효과 비교**

Hydrogen peroxide에 의해 유도된 Leydig cell은 정상군  
에 비하여 70.8%로 유의하게 cell viability가 감소하였다 ( $p < 0.05$ ). Hydrogen peroxide에 의해 유도된 Leydig cell에

대하여 별사상자 추출물은 10, 100 µg/ml의 농도에서 각각  
86.3, 84.1%로 항산화 효과를 나타내었다 ( $p < 0.05$ , Fig. 3).  
사상자 추출물은 10, 50, 100 µg/ml의 농도에서 각각 79.9,  
81.4, 83.5%로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity에 대하여 항산  
화 효과가 증가되었다( $p < 0.001$ , Fig. 3).

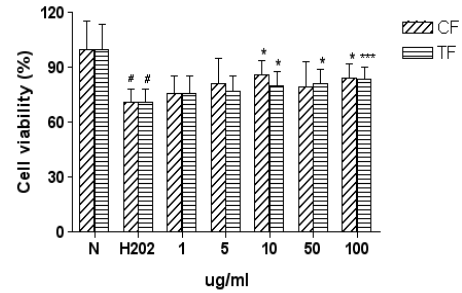


Fig. 3. Protective effect of water extract of Cnidii Fructus (CF) and Torilis fructus (TF) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity. Leydig cells treated with CF and TF were incubated in the presence or absence of 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 37°C for 24 h. Each column or point represents the mean±S.E. (n=6). # Significantly different from the normal group (#:  $p < 0.05$ ), \* Significantly different from the cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone (\*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

**4. Superoxide dismutase (SOD) 활성도에 미치는 영향 비교**

정상군의 SOD activity는 9.2 units(of SOD/mg of protein)  
인데 비하여, 별사상자 추출물은 1, 5, 10, 50, 100 µg/ml  
의 농도에서 SOD activity가 각각 9.6, 10.4, 10.6, 10.1,  
9.6 units으로 증가하였다. 사상자 추출물은 1, 5, 10, 50,  
100 µg/ml의 농도에서 SOD activity가 각각 9.8, 9.0,  
9.78, 9.43, 9.61 units으로 비슷한 수준을 유지하였다. 각  
각의 추출물 모두 통계적 유의성은 나타나지 않았다(fig. 4).

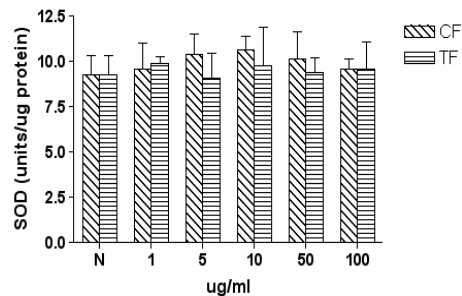


Fig. 4. Effects of water extract of Cnidii Fructus (CF) and Torilis fructus (TF) on SOD activity. Leydig cells treated with CF and TF were incubated at 37°C for 24 h. Total cell lysate from cultured cells were analyzed for SOD activity formation. Each column or point represents the mean±S.E. (n=3).

**5. Catalase 활성도에 대한 영향 비교**

Leydig cell에 대하여 정상군의 catalase 활성도는 70.6  
units/mg(of protein)인데 비하여, 별사상자 추출물은 10,  
100 µg/ml의 농도에서 catalase 활성도가 각각 98.8, 108.3  
units/mg으로 정상군보다 높은 catalase 활성을 보였다 ( $p < 0.05$ , Fig. 5). 사상자 추출물은 모든 농도에서 유의성이

나타나지 않았다(Fig. 5).

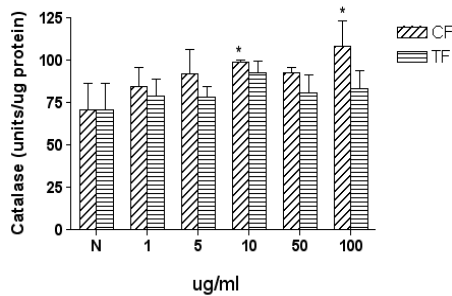


Fig. 5. Effects of water extract of *Cnidii Fructus* (CF) and *Torilis fructus* (TF) on catalase activity. Leydig cells treated with CF and TF were incubated at 37°C for 24 h. Total cell lysate from cultured cells were analyzed for catalase activity formation. Each column or point represents the mean  $\pm$  S.E. (n=3). \* Significantly different from the normal group (\*:  $p < 0.05$ ).

## 고찰

溫腎助陽의 효능으로 사용되는 蛇床子를 기원식물의 차이에 따라 별사상자 *C. monnieri* (L.) Cusson와 한국에서 사용되는 사상자 *T. japonica* (Houtt.) Dc.의 추출물에 대하여 남성불임에 미치는 기전을 비교 연구하기 위하여, 생식세포 중 고환의 간질세포인 Leydig cell에 미치는 항산화작용을 비교하였다.

활성산소는 산소가 가지는 화학적 특성으로 인하여 생성되는 산소 프리라디칼 및 이것으로부터 유래된 일군의 산소화합물을 일컫는다. 이 활성산소족 (reactive oxygen species : ROS)의 생성과 제거가 불균형을 나타낼때 oxidative stress가 발생하게 된다. 고환세포내에서 ROS는 대식세포나 중성구 등에 의해 발생할 수 있으며 정자세포에 의해서도 발생할 수 있다. DPPH radical 소거 활성에 대하여 IC<sub>50</sub>값은 별사상자 추출물이 16  $\mu$ g/ml, 사상자 추출물이 150  $\mu$ g/ml로서 별사상자 추출물의 DPPH radical 소거능력이 높았다. Leydig cell은 고환의 간질 세포에 해당하는 생식세포주이며, 남성불임 연구에 널리 활용되고 있다. 별사상자 추출물은 10  $\mu$ g/ml의 농도에서 Leydig cell의 생존율이 132.8%로 유의성 있게 증가하였고, 사상자 추출물은 5  $\mu$ g/ml의 농도에서 Leydig cell의 생존율을 127.6%로 유의성 있게 증가하였다. 별사상자와 사상자 추출물은 각각 Leydig cell에 대해 세포 독성을 나타내지 않았다. 또한 별사상자 추출물이 사상자 추출물보다 높은 세포 증식효과를 나타내었다.

별사상자와 사상자 추출물은 각각 hydrogen peroxide에 의해 유도된 Leydig cell에 대하여 항산화 효과를 나타내었으며, 별사상자 추출물이 15.6%, 사상자추출물은 12.8% 회복시켜 별사상자 추출물의 항산화 효과가 우수하였다.

SOD는 초산화물을 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 O<sub>2</sub>로 전환시키며, 반응성이 큰 superoxide ion을 불균등화시킴으로써 활성산소에 대한 방어 역할을 하는 항산화효소이다. Leydig cell에 대하여 별사상자 추출물은 정상군에 비하여 SOD의 활성도가 증가하였고, 사상자 추출물은 정상군과 비슷한 수준을 유지하였으나 각각의 추출물은 통계적 유의성이 나타나지 않았다.

Catalase는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 H<sub>2</sub>O와 O<sub>2</sub>-로 환원시키는 작용을 한

다. catalase는 많은 환경적인 돌연변이 유발물질을 비활성화시키는 중요한 작용을 한다. 또한 염색체 변이를 감소시키는 것으로 알려져 있다. 별사상자 추출물은 Leydig cell에 대하여 53.3%의 유의한 catalase 활성도 증가 효과를 나타내었으나, 사상자 추출물은 유의한 효과가 나타나지 않았다.

이상의 결과 별사상자와 사상자 추출물은 산화 스트레스로부터 남성 생식세포를 보호하였다. 특히 별사상자는 DPPH radical 소거 능력, Leydig cell의 생존율 증가 효과, hydrogen peroxide에 의해 유도된 Leydig cell에 대한 항산화 효과, catalase 활성도 증가 효과를 통하여 사상자 추출물보다 우수한 항산화 효과를 나타내었다.

## 결론

溫腎壯陽의 대표적인 약물인 蛇床子를 별사상자 *C. monnieri* (L.) Cusson와 한국에서 사용되는 사상자 *T. japonica* (Houtt.) Dc.에 대하여 남성생식세포에 미치는 항산화 효과를 비교하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DPPH radical 소거 활성에 대하여 별사상자 추출물의 radical 소거능력이 높았다.
2. 별사상자와 사상자 추출물은 각각 Leydig cell에 대해 세포 독성을 나타내지 않았다.
3. 별사상자와 사상자 추출물은 각각 hydrogen peroxide에 의해 유도된 Leydig cell에 대하여 항산화 효과를 나타내었으며, 별사상자 추출물의 항산화 효과가 우수하였다.
4. Leydig cell에 대한 SOD 활성도에 대하여 별사상자와 사상자 추출물은 모두 유의성이 없었다.
5. 별사상자 추출물은 Leydig cell에 대하여 유의한 catalase 활성도 증가 효과를 나타내었으나, 사상자 추출물은 유의한 효과가 나타나지 않았다.

이로써 溫腎助陽 효능으로 男子陽痿의 치료에 활용되어 온 蛇床子の 기원식물로서 별사상자 *C. monnieri* (L.) Cusson가 Leydig cell에 대하여 우수한 항산화효과 및 세포보호효과가 있음이 확인되었고 남성불임의 치료에 응용할 수 있는 약물임이 확인되었다.

## References

1. Ministry of Food and Drug Safety. The Korean Herbal Pharmacopoeia, Retrieved Sep. 26, 2014, from <http://www.mfds.go.kr/herbmed/index.do?nMenuCode=7&code=KHP-053&includeUrl=/herbmed/view.jsp>
2. Lee YN. Flora of Korea. 3rd. seoul : Kyo-Hak Publishing. 1998 : 553, 557.

3. State Administration of Traditional chinese medicine of the People's Republic of China, Zhonghuabencao, Vol. 5, Shanghai : Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999 : 928–33, 1035–6.
4. Herbology Editorial Committee of College of Korean Medicine, Herbalogy, 1st, Seoul : Young-Lim Press, 2004 : 630.
5. Do HG, Myeonguibyeollok, Bukgyeong : Inminwisaengchulpansa, 1986 : 47–8.
6. Matsuda H, Tomohiro N, Ido Y, Kubo M, Anti-allergic Effects of Cnidii Monnieri Fructus (Dried Fruits of Cnidium monnieri) and Its Major Component, Osthol, Biol Pharm Bull, 2002 ; 25(6) : 809–12.
7. Yun CY, Kim D, Lee WH, Park YM, Lee SH, Na M, Jahng Y, Hwang BY, Lee MK, Han SB, Kim Y, Torilin from *Torilis japonica* inhibits melanin production in alpha-melanocyte stimulating hormone-activated B16 melanoma cells, Planta Med, 2009 ; 75(14) : 1505–8.
8. Oh MS, Kim DR, Kang JU, Kim S, Yu TW, Park JY, Kim DM, Park WS, Chang MS, Park SY, Park SK, Study on Antioxidant Potency of Cuscutae Semen, Psoraleae Fructus, Cnidii Fructus and Epimedii Herba by DPPH Method, Herbal Formula Sci, 2005 ; 13(2) : 101–10.
9. Chiou WF, Huang YL, Chen CF, Chen CC, Vasorelaxing effect of coumarins from Cnidium monnieri on rabbit corpus cavernosum, Planta Med, 2007 ; 67 : 282–4.
10. Park WS, Son ED, Nam GW, Kim SH, Noh MS, Lee BG, Jang IS, Kim SE, Lee JJ, Lee CH, Torilin from *Torilis japonica*, as a new inhibitor of testosterone 5 alpha-reductase, Planta Med, 2003 ; 69(5) : 459–61.
11. Chang MS, Oh MS, Yang WM, Park W, Kim do R, Lee HK, Kim WN, Park SK, Effects of Rubus coreanus on sperm parameters and cAMP-responsive element modulator (CREM) expression in rat testes, J Ethnopharmacol, 2007 ; 114(3) : 463–7.
12. Mosmann T, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxicity assays, J Immunol Methods, 1983 ; 65(1–2) : 55–63.
13. Crapo JD, McCord JM, Fridovich I, Preparation and assay of superoxide dismutases, Methods Enzymol, 1978 ; 53 : 382–3.
14. Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal Biochem, 1976 ; 72 : 248–54.
15. Aebi H, Catalase in vitro, Methods Enzymol, 1984 ; 105 : 121–6.