

옻나무 유래 Flavonoid 처리가 흰쥐 Leydig 세포의 체외배양에서 Testosterone 분비에 미치는 영향

성환후[†] · 최선호 · 장유민 · 민관식 · 우제현 · 장원경 · 정남철¹ · 나천수¹ · 정일정
농촌진흥청 축산기술연구소 유전공학과

Effects of Flavonoid from *Rhus verniciflua* on Testosterone Secretion by Rat Leydig Cells *In Vitro*

Seong. H. H.[†], S. H. Choi, Y. M. Chang, K. S. Min, J. H. Woo, W. K. Chang, N. C. Jung¹,
C. S. Na¹ and I. J. Chung
National Livestock Research Institute

ABSTRACT

This study was performed to report a direct dose dependent stimulatory effect of the Flavonoid(F) on basal testosterone secretion and a dose dependent effect on LH induced testosterone production by Leydig cell of matured rats *in vitro* culture. F was obtained from the *Rhus verniciflua* through acetone extraction and silica gel adsorption column chromatography. Leydig cells (1×10^6 cells/well) from 12 weeks old rats were incubated with or without F(0, 20, 40, 80, 160 ng) or insulin-like growth factor-I(IGF-I) in the presence or absence of LH(10, 100ng).

1. The maximal stimulatory concentrations of testosterone in culture media were showed at 24hr of culture. but these testosterone level were decreased at 36 hr of culture.
2. Flavonoid(80ng) were significantly($P < 0.05$) increased testosterone production compared with control groups for 12 hr culture.
3. Testosterone secretion by Leydig cells stimulated with LH(10, 100ng) for 6 hr and 12hr culture compared with 3 hr culture.
4. LH 10 ng augmented testosterone were increased by addition of F 40 ng for 12 hr culture.
5. F(0 and 40 ng) also enhanced LH 10 ng stimulated testosterone for 3 hr Leydig cells culture.
6. Addition of IGF-I 100 ng to the culture medium for 6 hr were increased the concentration of testosterone by Leydig cells stimulated with 100 ng LH.

These results indicate that Flavonoid has a direct stimulatory effect on basal testosterone secretion in rat Leydig cells, and also modulates LH mediated testosterone. Therefore, Flavonoid may act as a modulator on gonadal development or gonadal steroidogenesis in direct or indirect.

(Key words: Flavonoid(F), Leydig cell, Testosterone, LH, IGF-I)

[†] Corresponding author : Animal Biotechnology Division, National Livestock Research Institute.

¹ (주)생명의 나무(Lifetree Biotech Co. Ltd)

I. 서론

옻나무는 천연도료의 중요한 자원일 뿐만 아니라, 우리 나라 민속의학 분야에서 암치료 약재로 효능이 매우 우수하며, 위장병, 숙취해소에 특효가 있다고 알려져 약용으로 복용되어 왔다. 옻나무 2차 대사산물 중 수피 부위에서는 Urashiol과 Flavonoid(F)성분이 주성분인 유출물이 함께 존재하며, 그 중 F의 주성분으로는 fustin, fisetin, sulfuretin, butein으로 구성되어 있다(정, 1998). 이러한 F는 식물계에 널리 분포되어 있는 폴리페놀계 화합물이며, 특히 옻나무 유래 Flavonoid(F)는 항암 효과, 숙취해소 등의 생리활성이 있다고 한다(정, 1998). 중국 한방에서는 *Cuscuta sinensis* Lam의 종자가 생식과 관련된 신장의 기능을 촉진하여 내분비 질환 등의 치료로도 널리 이용되고 있으나, F가 생식세포에 관련되는 연구보고는 전무한 실정이다. 그러나 생식세포인 Leydig 세포에 관한 연구보고에서 Leydig 세포를 체외배양시 LH첨가에 의해 testosterone분비가 촉진되었으며, GH 혹은 IGF-I가 LH와의 공배양에 의해서도 Leydig 세포의 testosterone분비가 촉진된다는 보고들은 다수 있다(Klinefelter 등, 1987; Dufau 등, 1984; Dafau, 1988; Huhtaniemi, 1993; Huhtaniemi 등, 1992). Onami 등(1996)은 흰쥐 정소의 Leydig 세포의 testosterone 분비는 hCG/LH첨가에 의해 유의적으로 촉진되었으나 비장유래의 macrophage와의 공배양은 오히려 testosterone 분비를 억제하여 정소의 testosterone 분비기능은 뇌하수체의 LH 뿐만 아니라 다양한 조직에서 분비하는 성장인자 등이 feedback 작용에 의해 정소 Leydig 세포의 testosterone 분비가 조절되고 있는 것으로 보고되었다.

최근, Qin 등(2000)의 보고에 의하면 흰쥐에게 매일 300mg/kg, 1주일 구강투여 하여 뇌하수체, 정소 및 정소상체를 조사한 결과, 각 조직의 중량이 대조구에 비해 유의적으로 증가하였으며, 혈중 testosterone 농도 및 LH 농도 또한 유의적으로 증가하였다고 하였다. 또한 동일개체의 흰쥐의 뇌하수체세포를 적출하여 체외배양하였을 때 대조구에

비해 F처리구는 배양액 중 LH 농도가 유의적으로 증가되었다고 보고하여, F가 적어도 흰쥐의 생식기능에 중요하게 작용하는 것으로 추측된다. 그러나 F가 직접 생식세포에 미치는 영향에 대한 정확한 정보에 대해서는 극히 미흡하며 국내에서는 이에 대한 연구가 전무한 실정이다.

본 연구팀은 예비실험으로 성숙 흰쥐에게 F를 30일간 5mg씩 구강투여하여 정소 중량 및 혈액 내 testosterone 농도를 분석한 결과, 정소 중량이 증가되고 혈중 testosterone의 농도가 대조구에 비해 유의적으로 높은 결과를 얻었다.

따라서, 본 연구는 옻나무 유래 F가 성숙 수컷 흰쥐의 생식기능에 직접 미치는 영향을 알아보고자, 흰쥐 Leydig 세포를 분리, 회수하여 체외배양에서 F 단독 혹은 LH와의 공배양을 실시하여 testosterone 분비에 대해 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물은 SD계 흰쥐 약 12 주령 된 체중 250g 전후인 건강한 수컷을 사용하였다.

2. Leydig 세포의 회수 및 배양

흰쥐로부터 정소를 적출하여, Leydig 세포의 회수는 Dufau와 Catt(1975)의 방법에 준하였다. 즉 정소를 buffer A(0.1M NaCl, 5mM KCl, 0.69mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, pH 7.3)에 2번 세척한 후, 0.25% collagenase가 든 enzyme(buffer A와 0.4% BSA 첨가)용액에 넣어 34°C 진탕 수조에서 15분간 배양하였다. 배양된 정소조직은 70 μm 의 여과기로 여과를 실시하였으며 2~3회 원심분리를 실시하여 멸균 D-MEM 배양액(Dulbecco's Modified Eagle Medium Cat. No. 4300-1600EA, GIBCO, USA ; 10% FCS, 2.5g Sodium bicarbonate와 antibiotics 첨가)으로 세척하였다. 세척된 세포는 신선 배양액으로 희석하여 0.25% trypan blue용액으로 생사감별을 실시한 결과 약 98%의 생존율이 확인되었다.

3. Flavonoid, LH 및 IGF-I의 처리

회수된 각 Leydig세포는 D-MEM 배양액 1ml 에 세포수를 1×10^6 cell로 조정하여, 24 well plate(Corning, USA) 각 well당 1ml씩 분주하였다. 각 세포는 대조구인 무처리구와 LH(Sigma, L-5259) 10ng, 100ng 첨가구로 구분하였으며, F의 각 처리구는 20ng, 40ng, 80ng, 160ng 씩을 단독 혹은 LH와 공동 첨가하여 37°C의 CO₂ incubator(Vision Sci. Co. Ltd, Model VS-9108 MS)에서 3, 6, 12, 24 시간 각각 배양하였다. 또한, human IGF-I(Gibco, 3245SA)는 50, 100ng 각각 첨가하여 6시간 배양하였다. 본 실험에 사용한 옷나무 유래 F는 아세톤 추출 및 silica gel 흡착 크로마토그래피로 정제된 F를 (주)생명의 나무에서 제공받아 50% glycerol에 용해하여 사용하였다.

각 처리 후 배양시간에 따라 배양액을 회수하여 3,500rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 -20°C에서 보관하였다.

4. 배양액내의 Testosterone 분석

Testosterone 분석은 COAT-A-COUNT(DPC, USA) kit로 사용하여 RIA법에 의해 측정하였다. 실험결과에 대한 통계학적 분석은 Duncan의 다중 검정법으로 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

Leydig 세포를 36시간까지 체외 배양하여 배양액의 testosterone 농도를 조사한 결과는 Fig. 1에서 나타난 바와 같다. Testosterone 분비는 24시간에서 가장 높은 농도를 나타내었으며($P < 0.05$), 그 이후 36시간에는 감소되었다. 이와 같은 결과는 미성숙 흰쥐의 Leydig 세포의 체외배양에서 testosterone 분비의 최고치의 배양시간(3시간)과 다소 차이가 있으며(Onami 등, 1996), 이러한 차이는 배양 전 세포의 조건에 따라 testosterone의 분비양상이 다르게 나타나는 것으로 사료된다.

F를 단독 첨가하여 12시간 배양한 실험의 결과는 Fig. 2에서 나타난 바와 같이, F의 용량이 증가함에 따라 testosterone 농도가 증가하며, 특히 F

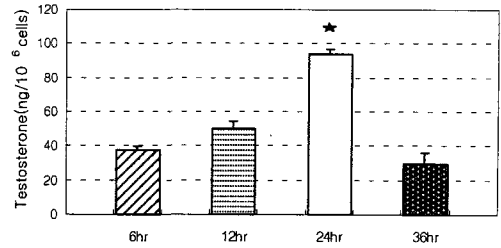


Fig. 1. Effects of culture time on basal testosterone production by matured rat Leydig cells *in vitro*. *: $p < 0.05$ vs 6hr culture.

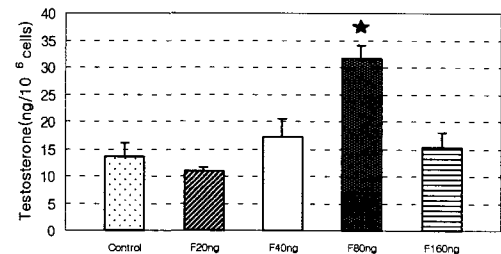


Fig. 2. Changes of a direct dose dependent stimulatory effect of Flavonoid on basal testosterone secretion by matured rat Leydig cells culture for 12hr. *: $p < 0.05$ vs control.

80ng 첨가구에서 대조구에 비해 유의적으로($P < 0.05$) 높은 농도를 보였으나, 160ng 처리구의 경우에는 오히려 감소되어 F단독 처리시의 적정량은 80ng으로 사료된다. 본 연구와 관련되는 연구로서 Qin 등(2000)은 *Cuscuta sinensis* Lam 유래 F처리가 흰쥐 Leydig 세포의 체외배양에서 무처리구에 비해 testosterone이 유의적으로($P < 0.05$) 증가하였으며, 또한 hCG+F처리구가 hCG 처리구에 비해 촉진되었다고 보고하여 유사한 결과를 확인할 수 있었다. 따라서 F의 적정량의 처리는 적어도 정소의 Leydig 세포의 testosterone의 분비에 직접 촉진하는 작용을 하는 것으로 사료된다.

Fig. 3은 Leydig 세포의 testosterone 분비에 대한 LH 촉진효과를 검토하기 위해 LH 10ng 및 100ng 첨가구의 시간별 변화를 검토하였다. 그 결과, LH 10ng 첨가구에서는 배양 6~12시간 이후, LH

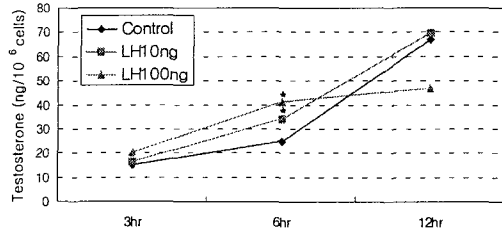


Fig. 3. Changes of dose dependent (10, 100ng) stimulatory effect of LH by matured rat Leydig cells *in vitro* culture for 3, 6 or 12 hr., respectively. * $p < 0.05$ vs 3hr culture.

100ng 첨가구에서는 3~6시간 사이에서 유의적으로 ($p < 0.05$) 증가를 보였으며, 특히 배양 6시간에서는 배양 3시간에 비해 두 처리 모두 유의성 ($P < 0.05$)으로 testosterone 분비를 증가시켰다. 이와 같이 Leydig 세포의 testosterone 분비는 LH작용에 의해 주로 조절하는 것으로 사료되며, 배양시간도 과립막세포나 다른 생식세포에 비해 짧은 배양시간에 스테로이드 호르몬 분비현상이 나타나는 것으로 본 실험결과에서 확인할 수 있었다.

또한, LH 100ng 처리구에서 12시간 이후 대조구와 LH 10ng에 비해 더 이상 증가하지 못한 현상은 signal을 받은 세포가 testosterone의 분비를 발현치 못하고 포화 상태이거나 세포내 aromatase의 변화로 인한 것으로 사료된다(Dafau, 1988; Huhtaniemi 등, 1992; Huhtaniemi, 1993).

Fig. 4는 LH 10ng 혹은 LH 10ng + F 40ng의 첨가가 Leydig 세포의 testosterone의 분비효과에 대한 결과로서, LH 10ng와 LH 10ng+F 40ng 첨가

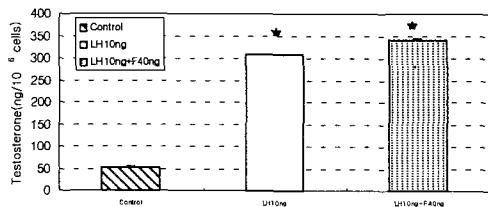


Fig. 4. Effects of LH 10ng or LH 10ng+F 40ng on testosterone secretion by matured rat Leydig cells *in vitro* culture for 12hr. * $p < 0.05$ vs control.

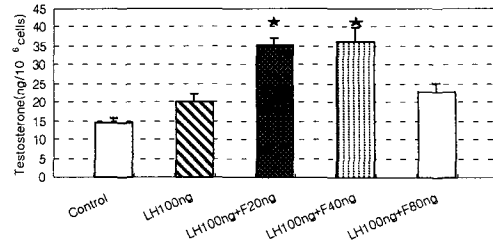


Fig. 5. Effect of dose dependent of F(20, 40, 80ng) on LH(100ng) in testosterone secretion by Leydig cells *in vitro* culture for 3hr. * $p < 0.05$ vs control.

구가 대조구에 비해 유의적 ($P < 0.05$)으로 높은 testosterone 분비를 확인하였다.

또한, Fig. 5는 LH 100ng 단독처리와 LH 100ng에 F를 20, 40 및 80ng을 각각 첨가하여 3시간 배양 시에 나타난 결과이다. 그 결과 Fig. 5에서 나타난 바와 같이 LH 100ng+F 20ng과 LH 100ng+F 40ng에서 대조구에 비해 유의성 ($P < 0.05$)을 나타내었다.

한편, Fig. 6은 LH를 촉진하는 성장인자로서 잘 알려져 있는 IGF-I를 이용하여 Leydig 세포의 LH 촉진효과를 상승시키는 작용을 확인하고 F의 LH 기능 촉진과 비교 검토하기 위해 실시한 결과를 나타내었다. 그 결과 LH 단독처리는 대조구에 비해 유의적으로 testosterone 분비를 촉진하였으며 LH 100ng+IGF-I 100ng구에서 LH 단독과 유의차는 없으나, Leydig 세포의 testosterone 분비를 다소 촉진시키는 것을 확인하였다. IGF-I이 Leydig 세포의 testosterone 분비를 촉진하거나 LH 기능을 촉

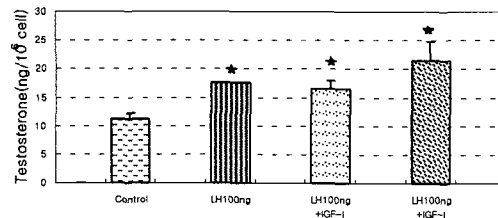


Fig. 6. Effect of IGF-I on LH in testosterone secretion rat Leydig cell *in vitro* for 6 hr. * $p < 0.05$ vs control.

진하는 연구보고로서 Ohyama 등(1995)은 미성숙 흰쥐에게 GH와 IGF-I을 처리하였을 때 대조구에 비해 높은 Testosterone 농도를 보고하였으며, IGF-I은 LH receptor뿐만 아니라, adenylate cyclase를 증가시키므로 GH는 IGF-I을 증가시키고 Leydig 세포의 IGF-I은 steroidogenic 능력을 증가시키며, 특히 GH는 Leydig 세포내의 aromatase activity를 증가시킨다고 하였다(Hattori 등, 1984; Horikawa 등, 1989; Chatelaine 등, 1991; Maran 등, 2000).

한편, Qin 등(2000)은 뇌하수체세포를 체외배양하였을 때 GnRH, F 단독처리구보다 F+GnRH 처리가 LH 분비를 촉진시킨 결과를 보고하여, F는 Leydig 세포뿐만 아니라 뇌하수체의 LH 합성에도 중요한 기능을 하는 것으로 사료된다.

이상과 같은 결과로서, 옷나무 유래 F는 F 단독으로 Leydig 세포의 testosterone 분비를 촉진할 뿐만 아니라, LH(10,100ng)와의 공 배양 시 유의적인 testosterone 증가를 나타내어 공동으로 상승작용을 하는 것으로 나타났으며, 이러한 상승작용은 LH 기능을 촉진하여 생식기능에 중요한 성장인자로 알려져 있는 IGF-I의 작용과 비슷하거나 혹은 그 이상의 촉진기능을 하는 것으로 사료된다.

IV. 요약

본 연구의 목적은 옷나무 유래 F가 성숙 수컷 흰쥐의 생식 기능에 직접 미치는 영향을 알아보고자, 흰쥐 Leydig 세포를 분리, 회수하여 체외배양에서 F 단독 혹은 LH와의 공배양하여 배양액의 testosterone 농도를 조사하였다.

1. Leydig 세포를 36시간까지 체외 배양하여 testosterone의 농도를 조사한 결과, 6시간 배양구에 비해 24시간 배양구가 가장 높은 농도($P < 0.05$)를 나타내었으며 36시간 배양에는 감소되었다.
2. F를 단독 첨가하여 12시간 배양한 실험에서 F 80ng 첨가구에서 유의적으로($P < 0.05$) 높은 testosterone 분비를 보였다.
3. LH 10ng 및 100ng 첨가구의 시간별 testosterone 분비의 변화로는, LH 10ng 첨가구에서

는 6~12시간 이후, LH 100ng 첨가구에서는 3~6시간 사이에서 증가를 보였으며, 6시간에는 두 처리구 모두 유의차를 보였다.

4. LH 10ng 첨가 실험에서는 LH 10ng+F 40ng에서 12시간 배양 시, 유의적으로 높은 testosterone 분비를 확인하였다.
5. LH 100ng과 F의 공배양실험에서 3시간 배양한 결과, F20ng 및 F40ng처리구가 대조구에 비해 유의적으로($P < 0.05$) 높은 testosterone의 분비를 보였다.
6. Leydig 세포에 LH+IGF-I 첨가효과를 비교 검토한 결과, IGF-I 50ng과 100ng 첨가구에서는 대조구에 비해 높게 나타났으나, LH 100ng 단독처리와 유의차는 없었다.

이상의 결과로, 옷나무 유래 Flavonoid는 흰쥐 정소 Leydig 세포의 testosterone 분비를 촉진하는 작용을 하는 것으로 사료되며, 특히 LH+F구에서 testosterone 분비를 더욱 향상시킴으로써 옷나무 유래 F는 포유동물의 생식기능에 중요하게 작용하는 것으로 사료된다.

V. 인용문헌

1. Chatelaine, P. G., Sanchez, P. and Saez, J. M. 1991. Growth hormone and insulin-like growth factor I increase testicular luteinizing hormone receptors and steroidogenic responsiveness of growth hormone deficient dwarf mice. *Endocrinology*, 128:1857-1862.
2. Dufau, M. L. and Catt, K. J. 1975. Gonadotrophic stimulation of interstitial cell function of rat testis *in vitro*. In: Colowick S. P. and N. O. Kaplan(eds) *Methods in Enzymology* Vol. XXX IX 252-271.
3. Dafau, M. L., Winters, C. A., Hattori, M., Aquilano, D., Baranao, J. L. S., Nozu, K., Baukal, A. and Catt, K. J. 1984. Hormoneal regulation of androgen production by the Leydig cell. *J. Steriod. Biochem.*, 20:161-173.
4. Dafau, M. L. 1988. Endocrine regulation and

- communicating functions of the Leydig cell. *Ann. Rev. Physiol.*, 50:483-508.
5. Hattori, M., Aquilano, D. R. and Dufau, M. L. 1984. An early steroidogenic defect in hormone-induced Leydig cell desensitization. *J. Steroid. Biochem.*, 21:265-277.
 6. Horikawa, R., Asakawa, K., Hizuka, N., Takano, K. and Shizume, K. 1989. Growth hormone and insulin-like growth factor I stimulate Leydig cell steroidogenesis. *Eur. J. Pharmacol.*, 166:87-94.
 7. Huhtaniemi, I. and Pelliniemi, L. J. 1992. Fetal Leydig cells : Cellular origin, morphology, life span and special functional features. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 201:125-140.
 8. Huhtaniemi, I. 1993. Hormonal control mechanisms of Leydig cells. In : DeKretser D.(ed) *Molecular Biology of Male Reproduction*. Academic Press, San Diego, 383-410.
 9. Klinefelter, G. R., Hall, P. F. and Ewing, L. L. 1987. Effect of luteinizing hormone deprivation *in situ* on steroidogenesis of rat Leydig cells purified by multistep procedure. *Biol. Reprod.*, 36:769-783.
 10. Maran, R. R. M., Sivakumar, R., Ravisankar, B., Valli, G. Ravichandran, K., Arunakaran, J. and Aruldhas, M. M. 2000. Growth Hormone directly stimulates testosterone and oestradiol-secretion by rat Leydig cells *in vitro* and modulates the effects of LH and T₃. *Endocrine Journal*, 47(2):111-118.
 11. Ohyama, K., Ohta, M., Nakagomi, Y., Yamori, T., Sano, T., Shimura, Y., Sato, K. and Nakazawa, S. 1995. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on testosterone secretion in premature male rats. *Endocrine Journal*, 42(6):817-820.
 12. Onami, S., Matsuyama, S., Nishihara, M. and Takahashi, M. 1996. Splenic macrophage can modify steroidogenesis of Leydig cells. *Endocrine Journal*. 43(5):477-485.
 13. Qin, D. N., She, B. R., She, Y. C. and Wang, J. H. 2000. Effects of flavonoid from semen cuscatae on the reproductive system in male rats. *Asian J. Androl.*, Jun: 2 (2):99-102
 14. 정남철. 1998. 윗나무의 Urashiol과 Flavonoid의 생리활성. 전남대학교 박사학위 논문. (접수일자: 2001. 3. 27. / 채택일자: 2001. 4. 16.)