



욱나무(*Rhus verniciflua* STOKES) Flavonoid 분획 투여가 정자생성 및 생식관련 장기에 미치는 영향

나천수¹ · 최범락¹ · 추동완¹ · 최원일¹ · 김진범¹ · 김현정² · 박영인² · 동미숙²

¹(주) 생명의 나무, ²고려대학교, 생명공학원

Effect of Flavonoid Fractions Extracted from *Rhus verniciflua* STOKES on the Reproductive Parameters in SD Male Rats

Chun-Soo Na¹, Bum-Rak Choi¹, Dong-Wan Choo¹, Won-Il Choi¹, Jin-Bum Kim¹,
Hyun-Chung Kim², Young In Park² and Mi-Sook Dong²

¹Lifetree Biotech Co., Ltd., Kyonggido 441-350

²School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Received November 25, 2005; Accepted December 15, 2005

ABSTRACT. *Rhus verniciflua* Stokes (RVS) has been used as a food supplement and a traditional herbal medicine. In this study, we prepared various flavonoid fractions (RS, RW1, RW2 and RWE) from a hot water extract of RVS and their influence on male reproductive organs and spermatogenesis were studied in rats which were orally administered 200 mg/kg of them for 8 weeks. All experimental groups did not show any significant changes in body weight and blood clinical chemistry for liver function. Plasma testosterone level was elevated about 3.7, 5.2 and 6.3 folds in RW1, RW2 and RWE groups, respectively. The weights of testes and epididymides tended to increase slightly without the statistical significance in RW2 and RWE. The spermatozoon motility and epididymal sperm concentration were significantly increased ($P < 0.05$) in RWE and RW1, respectively, when compared to the control group. There was no significant difference in histology and apparent shape of testes and epididymides among the control and the experimental groups. Collectively, RWE showed effectively the elevation of plasma testosterone level, spermatozoon motility and the epididymal sperm concentration without the significant increase of testis and epididymides weights. When the component HPLC profile among the flavonoids fractions of RVS was compared, the ratio of components were only different. These findings suggest that the *Rhus* flavonoid fraction, particularly RWE, can stimulate the androgen-dependent male sexual function and it can be applied to the material of functional food for enhancing the sexual function.

Keywords: *Rhus verniciflua* Stokes, Flavonoids, Male rat spermatogenesis, Testosterone level.

서 론

욱나무(*Rhus verniciflua* Stokes)는 율나무과(Anacardiaceae)에 속하는 낙엽 활엽 소교목으로 우리나라의 민속의학 분야에서 갖가지 난치병 치료에 탁월한 효과를 나타낸다고 알려져 있다. 한방에서 율나무는 위장의 소화와 간의 어혈, 심장의 정혈 기능을 돕고, 각종 부인병과 항암

효과가 탁월한 것으로 보고되어 있다. 동의보감과 본초강목에는 '참 율은 간에 쌓인 술독과 어혈을 풀어주고 기력을 돋게 하며 혈은 위벽에 새살을 돋우고 아픈 속을 다스리는데 탁월하며 항암효과도 뛰어나다'고 기록되어 있다. 특히 율나무 가지와 닭을 함께 조리한 율닭은 남성들이 자양 강장, 보신을 목적으로 즐기는 음식 중의 한가지이 나 율닭을 섭취한 경우 전신적인 율 알레르기(systemic contact dermatitis)와 함께 독성 간염(toxic hepatitis)이 빈번히 나타나는 부작용이 있다 (안, 2002). 율나무의 이러한 부작용을 나타내는 대표적인 성분은 urushiol로 in

Correspondence to: Mi-Sook Dong, School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea
E-mail: msdong@korea.ac.kr

*vitro*에서 강력한 항암작용이 보고되어 있으나(Hong *et al.*, 1999), 단백질과의 비특이적인 결합 및 피부에 대한 심한 알레르기를 일으키는 독성분으로 알려져 있다(Kalish *et al.*, 1994). 그러나 옷나무의 목질부에는 알레르기작용을 전혀 유발하지 않고 다양한 약리작용을 나타내는 flavonoid가 주로 존재하며(성 등, 2001; Kim *et al.*, 1999), 이러한 옷나무 flavonoid는 fustin, ficetin, sulfretin, butein, garbanzol 등의 flavonoid와 adenosin 외 다수의 물질들로 구성되어 있다(김 등, 1999; 박 등, 2000; Lee *et al.*, 2004). 옷나무의 flavonoid 분획들에 대하여 항산화작용(김 등, 1999; Lim *et al.*, 2001), 암세포들의 apoptosis 유도에 의한 암세포 증식저해(Kitts and Kim, 2001; Son *et al.*, 2005), 항염증효과(Choi *et al.*, 2003) 및 항 rheumatoid arthritis(Choi *et al.*, 2003)를 갖는 것으로 보고되었다.

본 연구팀은 선행연구에서 옷나무 목부를 acetone에 추출하여 얻은 flavonoid 분획을 mouse의 Leydig 세포에 처리하였을 때 testosterone 분비가 증가된 것(성 등, 2001)과 옷나무를 열수 추출하여 얻은 flavonoid 분획을 랫트에 2주간 투여하였을 때 혈중 testosterone level이 약 3배 정도 증가되었으며, 첫 교미행동 시간의 단축과 교미행동의 증가가 나타남을 보고하였다(나 등, 2005). 그러나 옷나무 flavonoid 분획에 의한 혈 중 testosterone level의 증가는 정자생성 및 생식관련 장기들의 변화를 유도할 수 있을 것으로 사료되었으나 아직 이에 대한 연구가 보고된 바 없다. 그리고 옷나무에서 flavonoid 분획의 추출은 여러 용매나 열수 추출 방법으로 가능하므로 분획 방법에 따라 성분 차이가 날 수 있으나 아직 이들 분획 추출법에 따른 약리 효능 차이에 관한 연구 보고가 없다.

본 연구에서는 제조방법에 따른 옷나무 flavonoid 분획들이 웅성 랫트에서 혈중 testosterone level에 미치는 영향과 정자발생단계 및 생식관련 장기들에 미치는 영향을 관찰하였다.

실험방법

실험동물

옷나무 flavonoid 여러 추출물들의 성호르몬 및 간독성에 관한 실험은 실험동물은 6주령 웅성 SPF Sprague-Dawley rat를 (주)샘타코 바이오코리아(한국, 오산)에서 분양받아 1주일간 적응시킨 후 건강한 랫트를 실험에 사용하였다. 실험동물은 polycarbonate cage(260(W)×420(D)×180(H)mm)에 4마리의 동물을 수용하여 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 15\%$, 환기횟수 10~20회/hr로 유지한 동물실에서 조도 150~300 Lux되게 형광등조명으

로 12 hr/day(08:00 점등~20:00 소등) 명암을 조절하였다. 미세여과기와 자외선을 이용하여 소독한 지하수와 방사선 멸균한 설치류용 사료(신촌사료)를 자유 섭취시켰다.

옷나무 flavonoid 분획들의 조제 및 구성 성분비 분석

본 실험에 사용한 옷나무는 강원도 원주 지방에서 10년 이상 된 것을 채취하였다. 옷나무의 껍질 부분을 제거한 뒤 음지에서 약 2달 이상 건조한 후 추출에 사용하였다. 건조된 목부를 작게 파쇄한 뒤, 10배 용량의 물을 첨가하여 3시간 동안 끓여서 추출하였다. 열수 추출물을 열풍건조기(inlet 180°C , outlet 150°C)에서 건조하여 RS를 얻었으며, 열수 추출물을 rotary evaporator(BüCHI R-220, Switzerland)로 농축한 후 동결건조(SamWon SFDSM24L, Korea)하여 RW를 얻었다. RW에 5배의 methanol을 첨가하여 methanol soluble 분획(RW-2)과 methanol insoluble 분획(RW-1)을 분리하여 농축시킨 후 다시 동결 건조 하였다. RWE는 RW-2에 10배의 알콜을 첨가하여 실온에서 1주일간 방치한 뒤, 이를 동결 건조하여 시료를 얻어 실험에 사용하였다.

본 실험에 사용한 옷나무 분획 중 RWE와 RW2의 flavonoids profile을 관찰하기 위하여 각 분획의 구성성분비를 HPLC로 분석하였다. HPLC는 SHIMADZU사 HPLC에 SPD-M10A VP 검출기를 사용하여 254 nm에서 flavonoid 광을 측정하였다. 옷나무 flavonoid 분획의 HPLC 분석은 Phenomenex® synerg I 4μ POLAR-RP 80A column을 사용하였으며 이동상은 A용매(5% Acetonitrile 과 0.025% trifluoroacetic acid)와 B용매(50% Acetonitrile 과 0.025% trifluoroacetic acid)이 각각 70%와 30%로 시작하여 30분 동안에 A용매 40%, B용매 60%가 되도록 gradient를 만든 후 20분간 지속적으로 같은 용매 조성으로 흘러주었다. 유속은 1.0 ml/min, 주입량은 $10\mu\text{l}$ 씩으로 integrator로 계산된 피크면적의 비율로 상대적인 구성비를 측정하였다.

시험물질의 투여

각 실험군은 랫트의 체중을 측정하여 순위화하여 각 시험군 간의 체중 편차가 크지 않게 군당 8 마리씩 분리하였다. 본 실험에 사용한 옷나무 추출물들은 20% ethylene glycol에 녹여 200 mg/ml 액을 조제하고 단계별로 희석하여 각 용량의 투여용 시험물질을 조제하였다. 시험물질은 임상적용 예상경로로서 8주간 1일 1회 경구 투여하였다.

일반 증상

옷나무 flavonoid 추출물을 8주간 투여하는 동안 1일 1회 이상 육안으로 랫트의 이상증상을 관찰하였으며, 모든

동물에 대하여 투여 후 1, 3, 7일 이후 매주 1회 8주간 체중을 측정하였다.

호르몬 및 혈청생화학적 검사

시험물질 투여 8주째 24시간 절식한 랫트를 에테르 마취한 후 복대정맥에서 채혈한 혈액을 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 혈청에서 COATA-COUNT(DPC, USA) kit를 사용하여 RIA method로 혈중 testosterone level을 측정하였다. 그리고 간독성 여부를 관찰하기 위하여 분리된 혈청에서 혈액분석기 Express PLUS(CHIRON, DIAGNOSTIC, USA)를 통해 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase(ALT), albumin(ALB) 및 total protein(TP)를 측정하였다.

부고환 내 정자의 숫자, 운동성 및 형태 검사

남성생식기관에 대한 다양한 실험들은 생식독성 관련 문헌들(이영순, 1998; Lanning *et al.*, 2002; Latendresse *et al.*, 2002; Handbook of toxicologic pathology, 2002)을 참조하여 실시하였다. 부고환 미부 내 정자의 숫자, 형태 및 운동성을 검사하기 위하여, 좌측 부고환 미부를 절제한 후 무게를 측정하였다. 좌측 정관을 절제한 후, 3 ml modified Tyrode's 배지가 들어있는 petri dish에 조직을 넣은 후 10분간 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양액중의 조직을 제거한 다음, 배양액 0.1 ml은 2% eosin과 3% citric acid 혼합액과 1 : 1로 혼합하여 도말검체를 만들어 검체 당 100마리의 정자를 200배 배율의 현미경하에서 운동성이 정자수를 계산하여 총 정자수의 %로 나타내었다. 정자 운동성은 Makler counting chamber를 이용하여 움직이는 정자를 고정시켜 미부나 꼬리의 움직임을 통하여 운동성 여부를 확인하여 움직이는 정자를 양성/움직임이 없는 정자를 음성으로 육안적 검사로 구분하여 총 정자수에서 양성반응을 나타내는 것에 대한 %로 나타내었다. 정자의 형태이상은 두부의 각도이상, 미부의 꼬임 및 접힘 등과 같고리 형태의 정자모양에서 같고리의 각도가 비교적 낮은 경우 등을 정자형태 이상으로 판별하였으며, 이를 전체적으로 두부의 단소로 표현하였다.

고환에서 정자발생단계 산정. 고환내 정세관에서 정자 생성주기(seminiferouse cycle)에 따른 정자발생단계는 Parvinen(1982)의 방법에 따라 산정하였다. 즉, 랫드의 고환내 정세관(seminiferous tubule)의 정자발생단계세포는 총 14 단계의 정자발생단계를 특성별로 크게 4가지(I~VI, VII~VIII, IX~XI, XII~XIV)로 나누어 모든 개체의 고환내 정세관은 단계별로 10개씩 총 40개의 정세관에 대한 stage count를 하였다. 이때 각 정자발생단계에서 산정된

세포는 다음과 같다.

정자 발생단계	산정된 세포
I~VI	정자지지세포(sertoli cell), 구형정모세포(round spermatocyte)/10 tubules
VII~VIII	정자지지세포(sertoli cell), 구형정모세포(round spermatocyte), 비사기 정모세포(pachytene spermatocyte)/10 tubules
IX~XI	정자지지세포(sertoli cell), 구형정모세포(round spermatocyte), 세사기 정모세포(leptotene spermatocyte)/10 tubules
XII~XIV	정자지지세포(sertoli cell), 구형정자세포(round spermatid)/10 tubules

산정된 세포로 다음과 같은 식을 사용하여 값을 구하였다.

$$\text{Cell counts of round spermatocyte or spermatid (\%)} = \frac{\text{No. of round spermatocyte or spermatid}}{\text{No. of sertoli cell}} \times 100$$

$$\text{Pachytene spermatocyte (\%)} = \frac{\text{No. of pachytene spermatocyte}}{\text{No. of sertoli cell}} \times 100$$

$$\text{Leptotene spermatocyte (\%)} = \frac{\text{No. of leptotene spermatocyte}}{\text{No. of sertoli cell}} \times 100$$

장기의 무게 측정 및 조직병리학적 검사. 부검시 모든 개체별로 고환(testis; 좌, 우)과 부고환을 적출하여 장기를 육안적으로 검사한 후 중량을 측정하고 사진촬영을 실시하였다. 장기는 Davidson's solution에 약 4시간 고정 후 10% 중성포르말린용액(neutral phosphate buffered formalin)에 옮긴 후 충분히 고정을 시켰다. 10% 중성포르말린(neutral phosphate buffered formalin) 용액에 고정한 장기조직의 일부분을 취하여 일정한 두께(3 mm)로 삭정한 다음, 일반적인 조직처리과정을 거쳐 파라핀 포매하여 4 μm의 조직절편을 제작하였다. 이후 일반적인 염색방법인 Hematoxylin & Eosin 염색(H&E stain)을 하여 광학현미경(Olympus BX50, Olympus Optical Co., Japan)으로 관찰하였다.

통계학적 방법. 얻은 자료에 대한 부형제 대조군과 시험물질 투여군 간의 비교는 일반적인 모수적인 다중비교인 student's t-test를 사용하여 대조군과 시험물질 투여군 간의 차이를 검정하였다. 유의성의 인정은 P < 0.05로 하였으며, 일반적으로 사용하는 통계 package인 SPSS 10.1을 이용하였다. 자료 중 이상치와 극단치를 제외하여 데이터의 신뢰도를 높였다.

실험결과

일반 증상 및 체중의 변화에 율나무 추출물이 미치는 영향
 율나무 추출물을 8주간 투여하는 동안 1일 1회 이상 육

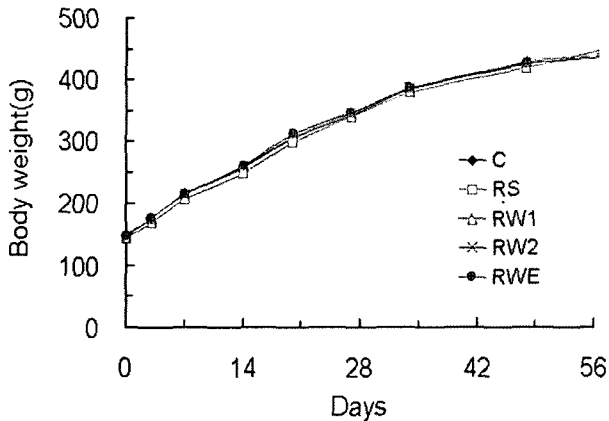


Fig. 1. Body weight changes in SD male rats administered orally flavonoid fractions extracted from the bark of *Rhus verniciflua* Stokes for 56 days. Values are presented as means \pm SD. for 8 rats.

안으로 시험동물의 이상증상을 관찰하였을 때 시험물질 투여와 관련된 이상증상은 관찰되지 않았다. 율나무 flavonoid 추출 분획들을 8주간 투여하는 동안 체중의 변화는 Fig. 1에서와 같이 대조군과 유사하게 증가하여 부검 전의 체중은 대조군 439 ± 34.5 g, RS군 447 ± 29.1 g, RW1 443 ± 29.4 g, RW2 436 ± 43.0 g 및 RWE군 436 ± 20.8 g 이었다.

율나무 추출물 투여 후 혈 중 testosterone 농도 및 혈액 생화학적 변화

율나무추출물을 8주간 투여 후 각 실험군의 랫트로부터 얻은 혈액에서 testosterone level을 관찰하였을 때 Fig 2와 같이 대조군의 혈중 testosterone level은 $92.7 \pm$

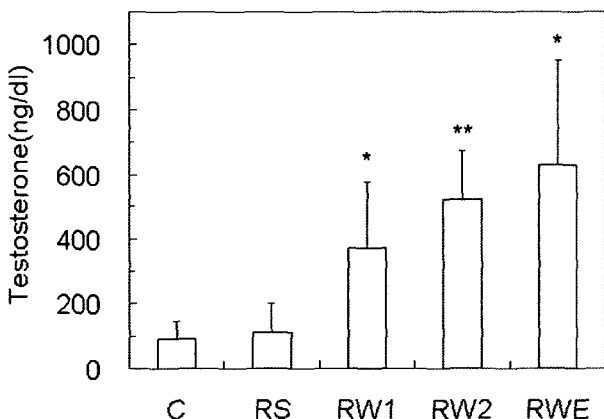


Fig. 2. The changes of blood testosterone level in male SD rats administered orally flavonoid fractions extracted from the bark of *Rhus verniciflua* Stokes for 56 days. Data are expressed as mean \pm SD (n = 4).

Table 1. Effect of *Rhus verniciflua* extracts on the blood biochemical markers related to liver function in rats

Group	ALT (U/l)	AST (U/l)	ALB (g/dl)	TP (g/dl)
Control	133.3 \pm 21.6	32.1 \pm 7.0	4.4 \pm 0.2	6.1 \pm 0.5
RS	110.5 \pm 12.0	29.5 \pm 5.6	4.1 \pm 0.1	6.0 \pm 0.1
RW1	125.0 \pm 9.4	35.0 \pm 3.8	4.6 \pm 0.3	6.2 \pm 0.2
RW2	106.0 \pm 17.3	32.5 \pm 4.8	4.3 \pm 0.2	6.3 \pm 0.1
RWE	107.6 \pm 14.1	31.5 \pm 3.9	4.7 \pm 0.1	6.5 \pm 0.3

Values are presented as mean \pm SD (n = 8).

54.2이었으며, RS군은 112.5 ± 88.2 , RW1 371.3 ± 208 , RW2 520.4 ± 154.2 및 RWE는 629.4 ± 443.5 ng/dl로 RW1, RW2 및 RWE군에서 대조군에 비하여 각각 4.0배, 5.6배 및 6.8배가 증가되었다.

그리고 혈청 내 AST, ALT, ALB, TP를 측정하였을 때, Table 1에서와 같이 대조군의 AST, ALT, ALB 및 TP의 level은 각각 32.1 ± 7 U/l, 113.3 ± 21.6 U/l, 4.4 ± 0.2 g/dl, 및 6.1 ± 0.5 g/dl로 나타났다. 이는 정상적인 SD 랫트의 혈액생화학적 결과 범위 내에 존재하였다. 율나무 추출물 투여군에서 혈액생화학적 수치는 AST, ALT, ALB 및 TP의 level이 각각 $106 \sim 125$ U/l, $30 \sim 35$ U/l, $4.1 \sim 4.7$ g/dl 및 $6.0 \sim 6.5$ g/dl로 시험물질의 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다.

생식장기 중량 및 조직병리학적 변화에 율나무 flavonoid 추출물이 미치는 영향

율나무 추출물 투여 후 전 개체의 계획 부검에서 육안적 특이한 소견은 모두 관찰되지 않았으며, 고환과 부고환은 정상적인 색조, 크기, 모양, 경도를 지녔다. 각 군 간의 고환과 부고환의 중량변화를 관찰하였을 때 Table 2에서와 같이 RS에서는 고환과 부고환의 중량이 대조군에 비하여 감소된 경향이 나타났다. 그러나 RW1, RWE의 경우 고환의 중량이 다소 증가된 경향이 관찰되었으나 통계적 유의성은 없었다. 그리고 고환과 부고환의 조직검사를 실시하였을 때 Fig. 3에서와 같이 율나무 flavonoid 추출물 투여에 의하여 특이한 조직병리학적 소견은 관찰되지 않았다.

Table 2. Effect of *Rhus verniciflua* extracts on the reproductive organ weight in rats

Group	Testis (g)		Epididymides (g)	
	Left	Right	Left	Right
Control	1.61 \pm 0.14	1.64 \pm 0.11	0.54 \pm 0.04	0.54 \pm 0.04
RS	1.51 \pm 0.13	1.47 \pm 0.13	0.53 \pm 0.02	0.51 \pm 0.02
RW1	1.72 \pm 0.12	1.70 \pm 0.11	0.57 \pm 0.03	0.56 \pm 0.01
RW2	1.71 \pm 0.05	1.67 \pm 0.04	0.52 \pm 0.03	0.50 \pm 0.02
RWE	1.75 \pm 0.21	1.79 \pm 0.22	0.54 \pm 0.05	0.55 \pm 0.04

Values are presented as mean \pm SD (n = 8).

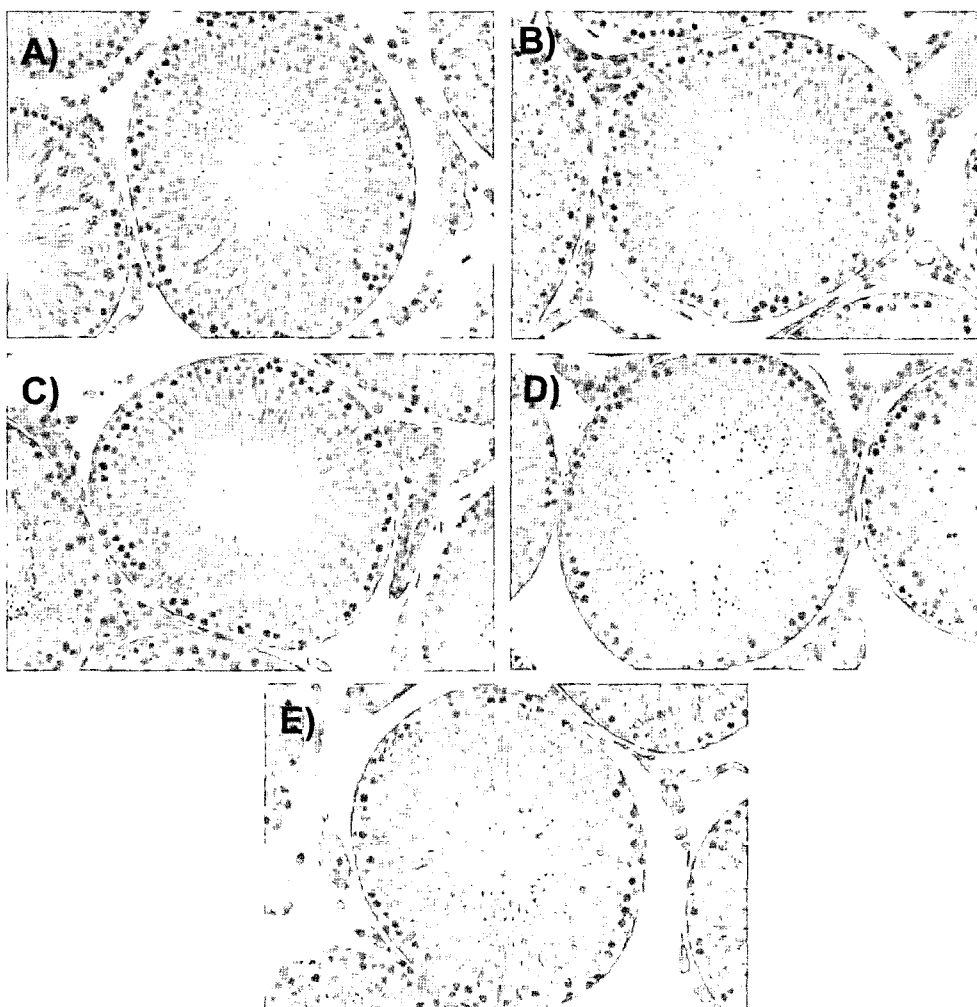


Fig. 3. Representative photomicrographs of cross sections of the testis from rats administered orally flavonoid fractions extracted from the bark of *Rhus verniciflua* Stokes for 56 days. All panels of A) Control, B) RS, C) RW1, D) RW2 and E) RWE were shown normal contents of spermatogenesis cells.

욱나무 추출물이 부고환내의 정자수, 운동성 및 정자의 형태에 미치는 영향

욱나무 flavonoid 추출물 투여가 생식능에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 욱나무 추출물을 8주간 랫트에 투여

Table 3. Effect of *Rhus verniciflua* extracts on the sperm counts, motility and morphology

Group	Sperm counts ($\times 10^6$)	Motility (%)	Deformity (%)
Control	840 \pm 235	47 \pm 17	1 \pm 1
RS	964 \pm 305	60 \pm 6	2 \pm 1
RW1	1,446 \pm 231*	49 \pm 24	1 \pm 1
RW2	899 \pm 375	59 \pm 7	1 \pm 1
RWE	1,138 \pm 384	66 \pm 8*	1 \pm 1

Sperm count expresses the number of sperm per 1 g of left Caudal Epididymis.

Each value represents the mean \pm SD of 8 rats.

* Significantly different from each control with $P < 0.05$.

한 후 부고환을 적출하여 정자의 숫자, 운동성 및 형태학적 변화를 관찰하였다. 정자수는 대조군과 비교 시 RW1군에서 72% ($P < 0.05$)와 RWE군에서 35%가 증가되었으며, RS와 RW2는 15% 이내의 증가만이 나타났다(Table 3). 반면에 정자 운동성의 경우 RWE군에서 약 42% 정도가 증가되었으며 ($P < 0.05$), 전 시험군에서 가장 높은 운동성을 보였다. 정자의 형태학적 변화를 현미경 하에서 관찰하였을 때 전체적으로 약 1% 내외가 두부단소 이상이 있었으나 욱나무 추출물을 투여한 군과 대조군 간의 차이는 관찰되지 않았다.

욱나무 flavonoid 추출물이 고환의 정자생성주기에 미치는 영향

Table 4에서와 같이 각 군에서 관찰된 정세관내 구성 세포 간 변화에서 RW1에서 stage VII-VIII의 spermatid

Table 4. Effect of *Rhus verniciflua* extracts on the seminiferous cycle stage in rats

Group	Round spermatocyte or spermatid (%)				Leptotene spermatocyte (%)	Pachytene spermatocyte (%)
	I~VI	VII~VIII	IX~XI	XII~XIV		
Control	1,060.6 ± 112.3	1,209.0 ± 124.4	1,069.8 ± 178.6	1,035.2 ± 109.8	278.1 ± 30.7	327.0 ± 23.1
RS	1,044.1 ± 147.1	1,043.9 ± 146.1	847.6 ± 202.1	1,029.3 ± 109.4	213.4 ± 56.9	280.8 ± 67.8
RW1	976.5 ± 73.0	1,004.3 ± 39.4*	1,013.9 ± 69.1	993.9 ± 47.1	250.7 ± 69.6	266.7 ± 14.8
RW2	1,086.7 ± 47.4	1,140.8 ± 45.6	1,133.0 ± 25.9	1,088.0 ± 7.1	319.7 ± 21.2	304.8 ± 12.5
RWE	1,074.4 ± 32.0	1,127.7 ± 18.4	1,074.6 ± 13.4	1,062.3 ± 31.8	260.6 ± 30.8	310.2 ± 43.0

Each value represents the mean ± SD of 8 rats.

* Significantly different from each control with P < 0.05.

%가 낮은 것을 제외하고는 모두 통계학적 유의성은 관찰되지 않았으나 대조군과 비교하였을 때 RW2 및 RWE에서 구형정모세포 및 정자세포, 세사기 및 비사기 정모세포수가 다소 많은 경향이 관찰되었다.

욱나무 flavonoid 분획들의 조제 방법에 따른 구성 성분 비 분석

욱나무 flavonoid 분획의 추출방법에 따른 효능이 상기와 같이 다른 것을 관찰함에 따라 그 구성 성분들의 비율을 관찰하였다. HPLC를 이용하여 분석한 윅나무 flavonoid 분획들 즉, RS, RW1, RW2 및 RWE 구성 성분들의

HPLC profile은 Fig. 4와 같이 측정되었다. 본 연구에 사용된 윅나무 flavonoid 분획의 주성분은 gallic acid, 2,3',4',6-tetrahydroxy-2-benzylcoumaranone, 2,4-dihydroxybenzoic acid, fustin 및 ficetin 및 25.6분과 27.9분에 분리된 밝혀지지 않은 두 성분으로 나타났으며, 이들 주성분이 각 윅나무 flavonoid 분획들에서 차지하는 구성비율은 Table 5와 같다. RW1은 주로 methanol 불용성물질들로 이들은 주로 다당류나 단백질들과 같은 고분자물질들로 구성되어 있을 것으로 예상되었으며, 이를 HPLC 분석을 했을 때 저분자 물질들의 함유량이 다른 분획들 보다는 1/20 수준으로 매우 낮았다. RS나

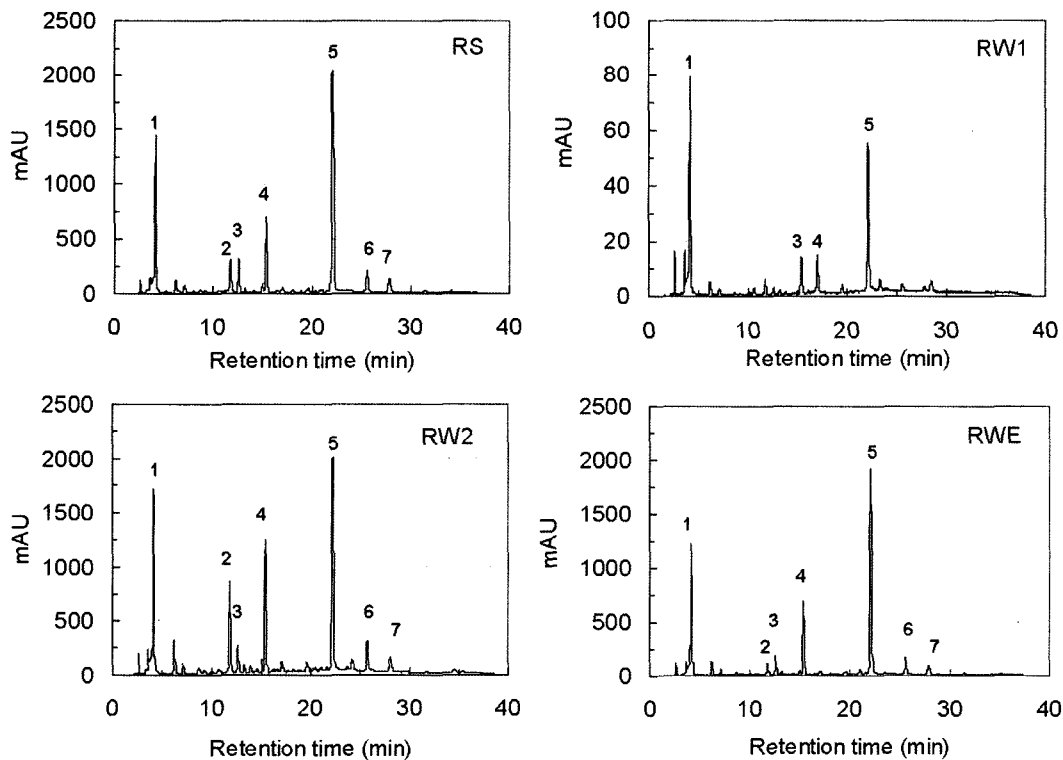


Fig. 4. HPLC chromatograms of Flavonoid fractions (RS, RW1, RW2 and RWE) extracted from the bark of *Rhus verniciflua* Stokes recorded at 254 nm: (1) gallic acid, (2) 2,3',4',6-tetrahydroxy-2-benzylcoumaranone, (3) 2,4-dihydroxybenzoic acid, (4) fustin, (5) ficetin, (6) unknown1, (7) unknown2.

Table 5. Content of major components in *Rhus* flavonoids fractions analyzed by HPLC

Retention time (min)	Compound name	RS	RW1	RW2	RWE
		% of Content			
4.2	gallic acid	22.4	7.37	16.7	22.3
11.8	2,3',4',6-tetrahydroxy-2-benzylcoumaranone	4.7	-	9.4	3.2
12.6	2,4-dihydroxybenzoic acid	5.5	-	2.8	3.8
15.4	fustin	11.2	13.34	13.6	13.3
22.1	fisetin	41.3	52.43	31.4	41.0
25.6	unknown1	3.4	-	3.1	3.2
27.9	unknown2	3.0	-	2.0	2.7

RW2 및 RWE의 경우 모두에서 fisetin이 가장 많이 함유되어 있는 것으로 나타났으나, 그 밖의 물질들은 분리 방법에 따라서 함량이 달리 나타났다. RS나 RWE의 경우 그 물질 구성비가 매우 유사하였으며, RW2의 경우에는 2,3',4',6-tetrahydroxy-2-benzylcoumaranone이 9.4%를 차지하여 RS나 RWE의 4.7, 3.2% 보다 높은 것으로 나타났다.

고찰

남성은 여성과 같이 50세를 전후로 하여 생식선기능의 갑작스러운 감퇴를 경험하지는 않으나 나이가 들면서 고환이나 부신으로부터 생산되는 혈청 남성호르몬치의 점진적인 감소에 따라 남성화와 생식능력의 감소를 느낀다고 알려졌다(안, 2005; Gray *et al.*, 1991). 남성들의 성기능 향상은 삶의 질 향상 및 자신감과 연결되어 고대로부터 민속의학에서는 옷땀, 음양곽, 복분자 등이 성기능 향상을 위한 식품으로 널리 알려져 있다. 우리나라에서는 예로부터 남성들의 자양강장, 보신용으로 옷나무를 닭과 함께 조리하여 보양식으로 섭취하여 왔으며, 본 연구진은 선행실험에서 우르시올을 함유하지 않은 옷나무의 flavonoid 층을 분리하여 rat에 투여하여 옷나무에 의한 성기능 향진효과를 관찰한 바 있다(Na *et al.*, 2005). 옷나무의 성기능 향진효과는 혈 중 testosterone 증가에 기인할 것으로 예상되었으며, 옷나무 flavonoid 분획을 2주간 투여하였을 때 혈 중 testosterone level이 3배 정도가 증가되었다. 이러한 testosterone level의 증가는 정자생성주기 및 성기능 관련 생식장기들의 비대와 함께 전립선암의 증가 위험을 내포하고 있어 이에 대한 연구를 실시하였다.

포유동물에서 정자형성주기는 약 35일~75일 정도로 랫트에서는 출기세포에서 완전한 성숙정자로 되기까지는 약 56일이 필요하므로(Leblond and Clermont, 1952; 손 등, 2003), 본 연구에서는 추출법을 달리한 옷나무 flavonoid 분획들 즉, RS, RW1, RW2 및 RWE를 웅성

랫트에 200 mg/kg 용량으로 8주간(56일) 투여하였다. 8주간 옷나무 flavonoid 분획을 투여하였을 때 체중의 변화나 혈액 내의 간독성 지표들 및 육안으로 내부 장기를 관찰하였을 때 유의적인 변화가 관찰되지 않았으며, 이는 옷나무 flavonoid 분획들이 투여한 용량에서는 독성을 나타내지 않는 것으로 사료되었다. 일반적으로 rat에서 혈 중 testosterone level은 그 편차가 매우 커서 보고된 결과들은 대부분이 그 평균값이 1.0~4.5 ng/ml 수준으로 보고되고 있다(Zanoli *et al.*, 2003; Ren *et al.*, 2005). 혈중 testosterone level을 관찰하였을 때 대조군의 혈중 평균 level은 0.92 ng/ml 수준으로 일반적으로 보고된 수준보다는 약간 낮은 결과를 나타내었으나, RWE 투여군이 약 6.8배 정도 증가되었고 다음에는 RW-2 투여군 5.6배, RW-1 투여군 4.0배가 증가되었다. 이러한 혈중 testosterone level의 증가는 *Panax quinquefolium* (Murphy *et al.*, 1998), *Ferula hermonis*(Gauthaman *et al.*, 2002), *Tribulus terrestris* extract(Zanoli *et al.*, 2003) 등의 추출물 투여에 의하여도 관찰되었으며, Fig. 2에서와 같이 옷나무 투여군 중 혈중 testosterone level이 크게 올라간 균일수록 개체간의 차이가 매우 크게 나타나는 것은 이들 논문의 결과들과 유사하였다. 이 대조군이나 이러한 옷나무 flavonoid 분획의 투여에 의하여 혈중 testosterone level의 증가는 선행연구들의 결과와 일치하였으며, RWE를 8주간 투여하였을 때 2주간 투여하였을 때 약 3배 증가한 것(나 등, 2005) 보다 많이 증가된 것으로 보아 옷나무를 오랜 기간 투여하면 혈 중 testosterone level이 더 많이 올라 갈 것으로 사료되었다. 옷나무 flavonoid 분획 투여 후 혈중 testosterone level이 많이 올라간 RW2군이나 RWE군의 경우 고환의 중량이 증가되는 경향을 나타냈으나 통계적 유의성을 나타내지 않았으며, 고환과 부고환의 조직검사에서도 병리학적 소견이 관찰되지 않아 이들의 장기 투여에 의한 생식장기들의 무게나 조직에서 유의적인 변화는 거의 없을 것으로 사료되었다.

일반적으로 남성호르몬인 androgen들은 적절한 성적

분화 및 정상적인 정자생성을 유지하는 데 필요하다 (Holdcraft and Braun, 2004). 본 연구에서는 spermatological parameter로 정자수, 정자운동성, 정자형태 이상 및 정자 발생단계 등을 관찰하였다. 대조군에서 정자 운동성이 47%로 타 논문의 경우보다 매우 낮게 나타났는데 이는 같은 군의 랫트 8마리를 모두 부검한 후 정자 운동성을 관찰하였기 때문에 시간이 많이 지난 후 시험을 한 것이 원인일 것으로 사료되었다. 그러나 각 군당 부검 후 정자 운동성 관찰까지 걸리는 시간은 차이가 없어 각 군 간의 결과 비교에는 영향이 없을 것으로 사료되었다. 율나무 flavonoid 분획들을 투여한 후 spermatological parameter 들을 비교하였을 때 정자수는 15~72% 정도 증가되었으며, 정자운동성은 RW1을 제외한 나머지 군에서 약 27~42% 증가율을 나타내었다. 이러한 결과들은 율나무 flavonoid 투여한 군에서 정자수나 정자운동성이 증가하는 경향을 나타내었으나 이들의 증가는 혈 중 testosterone level과 비례하지는 않았다. 이는 본 연구에서 사용한 실험모델이 정상 랫트에 율나무 flavonoid 분획들을 투여한 것으로 대조군 자체가 정상 testosterone level을 갖고 있어 혈중 testosterone level의 증가에 따른 상관관계가 크지 않은 것으로 사료되었다.

활성산소종이나 free radical들의 과생성은 고환을 포함한 여러 장기에서 산화적 스트레스를 유발하며, 고환에서의 산화적 스트레스는 정자를 손상시켜 남성 생식능을 저하시킬 수 있는 것으로 보고되었다(Sharma and Agarwal, 1996). 그리고 랫트에서 항산화제인 lipoic acid는 adriamycin으로 유도한 정자생성 및 남성생식기능 손상을 회복시켰다는 보고도 있다(Prahalathan *et al.*, 1995). Cao 등은(2004) 과량의 산화적 스트레스는 Leydig cell에서 중요한 효소적, 비효소적 항산화제들의 수준을 저하시켜 testosterone 분비를 감소시킨다고 하였다. Sonmez 등(2005)은 숫컷 Wister 랫트에 ascorbic acid를 250과 500 mg/kg으로 8주간 물에 섞어 투여하였을 때 체중, 고환, 부고환, 정낭 및 전립선의 무게는 변화가 없었으나 이들 기관의 lipid peroxidation이 크게 감소하였으며, 부고환의 정자 농도와 혈중 testosterone level이 유의적으로 증가하였음을 보고하였다. 율나무의 flavonoid 분획의 항산화작용은 매우 큰 것으로 보고되었으며(김 등, 1999; Lim *et al.*, 2001), 본 연구에 사용한 율나무 flavonoid 분획들의 항산화능을 DPPH법으로 측정하였을 때 실제로 RW1의 경우는 항산화작용이 매우 낮았으나, RS, RW2 및 RWE가 vitamine C나 vitamine E 보다 항산화작용이 매우 크게 나타났(data not shown). 이러한 항산화작용 결과와 정자운동성과의 결과들 즉, RW-1 군의 정자운동성은 대조군과 유사하였으나 RS, RW2 및 RWE는 대

조군에 비하여 약 42~27% 정도의 증가된 것을 비교하였을 때 이들 분획들의 항산화능이 정자운동성 증가와 일부 관련이 있을 것으로 예상되었다.

일반적으로 flavonoid 유도체는 수용성 용매보다는 유기용매에 좀 더 잘 용해되며, acetone이나 ethanol이 flavonoid와 같은 식물 중의 페놀성 물질들을 분리하는 용매로서 널리 사용되고 있다(Lee *et al.*, 2004). 율나무의 대표적인 flavonoid 성분들은 fustin, ficetin, sulfretin, protocatechuic acid, butein 등을 acetone으로 조추출한 추출물로부터 Lee *et al.*(2004)이 분리하였으며, Park *et al.*(2000)은 율나무의 목질부를 methanol로 가열추출한 조추출물로부터 garbanzol, sulfuretin, fisetin 및 fustin을 분리하였다. 그러나 본 연구에서 사용한 율나무 flavonoid 분획은 성기능 향상용 건강기능식품으로 개발하고자 유기 용매 추출보다는 열수 추출하였으며, 건조방법을 열풍건조(RS) 또는 동결건조(RW)를 실시하였다. 좀 더 정제된 flavonoid 분획을 얻기 위하여 methanol로 층분리를 하였고(RW1, RW2), methanol의 잔사를 제거하기 위하여 ethanol로 처리한 것(RWE) 등의 다양한 분획을 제조하여 실험에 사용하였다. 건조방법 및 다양한 방법으로 제조한 율나무의 flavonoid 분획은 혈중 testosterone level의 증가를 비롯한 여러 생식기에 미치는 작용이 flavonoid 전체적인 경향은 유사하였으나 각각의 효능 정도는 달리 나타났다. 이를 각각 구성성분과 비교하여 효능을 나타내는 대표적인 물질을 찾고자 각 flavonoid 분획들을 본 연구팀이 구조를 밝힌(논문 준비 중) 대표적인 물질 7종을 선정하여 HPLC profile 분석을 실시하였다(Table 5). 본 연구팀이 율나무 목부를 acetone으로 추출한 조추출물에는 sulfuretin과 butein이 다량 존재하였으나(data not shown), 열수추출물에서는 이들 물질을 측정할 수 없었으며, 이는 추출과정에서 다른 물질로 전환되었던 지 또는 깨져서 그랬을 것으로 사료되었다. 율나무 목부의 열수 추출물을 methanol로 다시 분리하여 methanol 불용성 분획인 RW1은 대부분이 고분자물질로 구성되어 있을 것으로 예상되었으며, Fig. 4에서와 같이 저분자물질이 매우 적게 포함되어 측정할 수 있는 물질이 fisetin, fustin 및 gallic acid 이었으며, 분리된 성분 중 이들 물질은 약 73% 정도를 차지하고 있었다. RS, RW2 및 RWE의 주성분은 gallic acid, fustin, ficetin이었으며, 이들 간의 구성 물질의 차이점은 RW2가 RS나 RWE에 비하여 fisetin 량이 10% 정도 적었으며, 총 물질 중에서 7종의 분석물질들이 차지하는 비율이 79% 정도로 RS 91.5%와 RWE 89.5%에 비하여 역시 10% 정도 적게 나타났다. 그러나 RS나 RWE 간의 차이는 크게 나타나지 않아 RS와 RWE 간의 효능 차이가 주성분의 차이에 기

인하기 보다구성물질들의 비율이나 소량 존재하는 물질들에 의할 것으로 사료되어 이에 대한 추가 연구가 필요할 것이다.

본 연구에서는 제조방법에 따른 율나무 flavonoid 분획들이 웅성 랫트에서 혈중 testosterone level에 미치는 영향과 정자발생단계 및 생식관련 장기들에 미치는 영향을 관찰하였다. 율나무 flavonoid 분획들은 혈중 testosterone level을 증가시켰고 정자수와 정자의 운동성은 향상시켰으나 남성생식관련 장기무게들은 증가시키지 않았으며, 조직검사에서도 특이한 병리소견을 나타내지 않았다. 제조방법에 따른 flavonoid 분획의 구성성분에는 큰 차이가 없었으나, 그 구성비가 달리 나타나 구성비가 성호르몬 증가 정도에 영향을 끼치는 것으로 사료되었다. 특히 여러 flavonoid fraction 중에 RWE가 혈중 testosterone level과 정자 운동성 및 정자수를 가장 효율적으로 증가시켰으나 고환이나 부고환의 무게나 조직학적 변화는 유의적으로 나타나지 않아 이를 남성호르몬 증진 즉, 남성 갱년기장애를 위한 건강기능식품으로 개발할 수 있을 것으로 사료되었다.

감사의 말씀

본 연구는 21C프론티어연구개발사업 자생식물이용기술개발사업단과제(PF0320402-00)에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

Cao, L., Leers-Sucheta, S. and Azhar, S. (2004): Aging alters the functional expression of enzymatic and non-enzymatic anti-oxidant defense systems in testicular rat Leydig cells. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, **88**, 61-67.

Choi, J., Yoon, B.J., Han, Y.N., Lee, K.T., Ha, J., Jung, H.J. and Park, H.J. (2003): Antirheumatoid arthritis effect of *Rhus verniciflua* and of the active component, sulfuretin. *Planta Med.*, **69**, 899-904.

Choi, J.W., Yoon, B.J., Han, Y.N., Lee, S.K., Lee, K.T. and Park, H.J. (2003): Sulfuretin, an antinociceptive and anti-inflammatory flavonoid from *Rhus verniciflua*. *Nat. Prod. Sci.*, **9**, 97-101.

Gauthaman, K., Adaikan, P.G. and Prasad, R.N.V. (2002): Aphrodisiac properties of *Tribulus terrestris* extract (Protodioscin) in normal and castrated rats. *Life Sci.*, **71**, 1385-1396.

Gray, A., Feldman, H.A., McKinlay, J.B. and Longcope, C. (1991): Age, disease, and changing sex hormone levels in middle-aged men: results of the massachusetts male aging study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **73**, 1016-1025.

Handbook of toxicologic pathology, 2nd edition, Vol. 2, academic press, 2002, pp. 785-844.

Holdcraft, R.W. and Braun, R.E. (2004): Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int. J. Androl.*, **27**, 335-342.

Kalish, R.S., Wood, J.A. and Laporte, A. (1994): Processing of urshiol hapten by both endogenous and exogenous pathways for presentation to T cells *in vitro*. *J. Clin. Invest.*, **93**, 2039-2047.

Kitts, D.D. and Lim, K.T. (2001): Antitumorigenic and cytotoxic properties of an ethanol extract derived from *Rhus verniciflua* Stokes (RVS). *J. Toxicol. Environ. Health A*, **64**, 357-371.

Lanning, L.L., Creasy, D.M., Chapin, R.E., Mann, P.C., Barlow, N.J., Regan, K.S. and Goodman, D.G. (2002): Recommended approaches for the evaluation of testicular and epididymal toxicity. *Toxicol. Pathol.*, **30**, 507-520.

Latendresse, J.R., Warbritton, A.R., Jonassen, H. and Creasy, D.M. (2002): Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.*, **30**, 524-533.

Leblond, C.P. and Clermont, Y. (1952): Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique. *Am. J. Anat.*, **90**, 167-215.

Lee, J.C., Lee, K.Y., Kim, J., Na, C.S., Jung, N.C., Chung, G.H. and Jang, Y.S. (2004): Extract from *Rhus verniciflua* Stokes is capable of inhibiting the growth of human lymphoma cells. *Food Chem. Toxicol.*, **42**, 1383-1388.

Lim, K.T., Hu, C. and Kitts, D.D. (2001): Antioxidant activity of a *Rhus verniciflua* Stokes ethanol extract. *Food Chem. Toxicol.*, **39**, 229-237.

Murphy, L.L., Cadena, R.S., Cha'vez, D. and Ferraro, J.S. (1998): Effect of American Ginseng (*Panax quinquefolium*) on male copulatory behavior in the rat. *Physiol. Behav.*, **164**, 445-450.

Parvinen, M. (1982): Regulation of the seminiferous epithelium. *Endoc. Rev.*, **3**, 404-417.

Prahalathan, C., Selvakumar, E. and Varalakshmi, P. (2005): Lipoic acid modulates adriamycin-induced testicular toxicity. *Reprod. Toxicol.*, in press.

Ren, J.C., Banan, A., Keshavarzian, A., Zhu, Q., Lapaglia, N., McNulty, J., Emanuele, N.V. and Emanuele, M.A. (2005): Exposure to ethanol induces oxidative damage in the pituitary gland. *Alcohol*, **35**, 91-101.

Sharma, R.K. and Agarwal, A. (1996): Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, **48**, 835-850.

Son, Y.O., Lee, K.Y., Lee, J.C., Jang, H.S., Kim, J.G., Jeon, Y.M. and Jang, Y.S. (2005): Selective antiproliferative and apoptotic effects of flavonoids purified from *Rhus verniciflua* Stokes on normal versus transformed hepatic cell lines. *Toxicol. Lett.*, **155**, 115-125.

Sonmez, M., Turk, G. and Yuce, A. (2005): The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. *Theriogenology*, **63**, 2063-2072.

Zanoli, P., Benelli, A., Rivasi, M., Baraldi, C., Vezzadini, F. and Baraldi, M. (2003): Opposite effect of acute and sub-chronic treatments with *Ferula hermonis* on copulatory behavior of male rats. *Int. J. Impot. Res.*, **15**, 450-455.

김인원, 신동화, 백남인 (1999): 율나무 에탄올 추출물로부터 항산

- 화 활성 물질의 구조동정. 식품과학회지, **31**, 1654-1660.
- 나천수, 최법락, 추동완, 최원일, 김진범, 김현정, 정연준, 박영인, 동미숙 (2005): 율나무 플라보노이드가 수컷 백서의 성행동에 미치는 영향. 약학회지, **49**, 471-476.
- 독성병리학, 이영순 편저, 수컷 생식기계 편, 도서출판 샤론, 1998, pp. 218-235.
- 박희준, 권상혁, 김갑태, 이경태, 최정혜, 최종원, 박건영 (2000): 율나무 목질부에서 분리된 플라보노이드의 이화학적 및 생물학적 특성. 생약학회지, **31**, 345-350.
- 성환후, 최선호, 장유빈, 민관식, 우제현, 장원경, 정남철, 나천수, 정일정 (2001): 율나무 유래 flavonoid 처리가 흰쥐 leydig 세포의 체외배양에서 testosterone 분비에 미치는 영향. *Korean J. Animal Reprod.*, **25**, 125-131.
- 손우찬, 김종춘, 유일재 (2003): 정자생성주기법을 이용한 고환독성 평가 필요성과 정량적인 고환독성 평가방법에 대한 고찰. *J. Toxicol. Pub. Health*, **19**, 83-90.
- 안병민 (2002): 간과 관련된 한국의 민간요법 비평 (7): 율나무. *대한간학회지*, **8**, 245-247.
- 안태영 (2005): 남성갱년기의 진단과 치료. *대한내과학회지*, **68**, 123-126.