

*In-vitro*와 *In-vivo*에서 산수유의 남성갱년기 개선효과

김태묵# · 정호경# · 장지훈 · 심미옥 · 이무진 · 조정희 · 조현우*
(재)한약진흥재단 한약자원본부

Effect of Corni Fructus on Testosterone Deficiency Syndrome in *In vitro* and *In vivo*

Tae Muk Kim #, Ho Kyung Jung #, Ji Hun Jang, Mi Ok Sim, Mu Jin Lee,
Jung Hee Cho and Hyun Woo Cho*

Division of Traditional Korean Medicine Resource, National Development Institute of Korea Medicine,
288, Woodlandgil, Anyangmyeon, Jangheunggun, Jeollanamdo 59338, Korea

Abstract – This study was carried out to evaluate the preventive effect of the Corni Fructus (SSU) 50 % EtOH extract (SSU-E50) against bisphenol A (BPA) toxicity in Leydig cells and improving testosterone deficiency syndrome in orchidectomized Sprague-Dawley (SD) rats. Antioxidant properties were measured by radical scavenging activity of SSU-E50 in ABTS assay and DPPH assay. Also, real-time polymerase chain reaction(real-time PCR) was performed to quantify the mRNA expression levels of antioxidant enzyme. SD rats were divided into eight group: normal, sham operation (Sham), orchidectomized (ORX), ORX treated with testosterone 1 mg/kg (Tes. 1), ORX treated with SSU water extract 100 mg/kg (SSU-A 100) and 300 mg/kg (SSU-A 300), ORX treated with SSU 50 % EtOH extract 100 mg/kg (SSU-E 100) and 300 mg/kg (SSU-E 300). On a comparative basis, the SSU showed better activity quenching ABTS with an IC50 value of 0.29 mg/ml and DPPH with an IC50 value of 0.33 mg/ml. Cell viability was evaluated by MTS assay as described not cytotoxic at the highest concentration of 500 µg/ml. Cytotoxicity of BPA showed in 200 µM, but definitely survived by treatment with SSU in Leydig cells. In addition, SSU increased the mRNA expression levels of antioxidant enzyme in BPA induced Leydig cells. Superoxide dismutase (SOD) level was slightly increased and malondialdehyde (MDA) level was decreased with SSU-A 100 in *in-vivo*. These results suggest that Corni Fructus extracts have the greatest property as a natural anti-oxidative and improves testosterone deficiency syndrome source.

Key words – Corni Fructus, Leydig cell, Antioxidation, testosterone deficiency syndrome

전 세계에서 가장 많이 생산되고 있는 화학물질 중 하나인 비스페놀 A(bisphenol A, BPA)는 대표적인 환경호르몬으로서 내분비 장애물질(Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs)로 분류 된다. EDCs는 동식물의 생체내에 존재하는 정상호르몬의 수용체와 결합하여 호르몬의 생성을 억제 혹은 증가시킴으로써 생식기능의 이상, 호르몬 분비의 불균형, 신경계 마비, 면역기능 불균형, 간독성, 전립선암 증가 등의 다양한 질환을 초래하는 것으로 알려졌다.¹⁾ 플라스틱 생산 과정에서 폭 넓게 사용되는 BPA는 쉽게 인체에 노출되고 있다. BPA의 장기적인 노출은 정자의 운동성, 난자와 결합

능 및 수정능을 감소시킴으로써 불임의 주요 원인 인자로 알려졌다.²⁾ 정자형성과정에는 고환 내에 높은 수치의 testosterone이 필요하고, 고환 간질 내에 있는 Leydig cell은 정자형성과정에 필요한 testosterone을 분비한다.³⁾ 내분비교란물질은 급격한 환경오염에 따른 Leydig cell에서의 testosterone 생산을 저하시키는 원인이라고 지적되고 있다. 또한 BPA는 여러 종류의 세포들에서 활성 산소(Reactive Oxygen Species, ROS) 증가를 통해 독성을 일으키고, 결국 세포 사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다.⁴⁾

한약재로 사용하는 산수유(*Cornus officinalis* Siebold et Zucc.)는 층층나무과(*Cornaceae*)에 속하는 낙엽 소교목인 산수유나무의 성숙한 과실을 채취하고 씨를 제거한 것을 말하며 늦은 가을과 초겨울에 과피가 홍색으로 변한 것을 따

These authors contributed equally to this work.

*교신저자(E-mail): johw7@nikom.or.kr

(Tel): +82-61-860-2801

서 끓는 물에 약간 삶아 씨를 제거하고 쇠건해서 사용하는 것으로 알려져 있다. 3~4월 잎보다 노란색 꽃이 먼저 개화하고 가을에는 성숙한 열매가 열리며, 열매의 길이는 1.5 cm 내외인 장추원형의 모양으로 한방에서는 산수유의 맛은 시고 떫으며 성질은 약간 따뜻하고 간경(肝經) 및 신경(腎經)에 작용한다고 알려져 있다.⁵⁾ 따라서 본 연구는 마우스의 고환에서 분리한 Leydig cell를 가지고 BPA가 생식세포에 미치는 영향, 산수유의 생식세포 보호 효과와 고환 절제 SD Rat 동물모델에서 남성갱년기 개선효과를 밝히고자 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 추출 - 본 실험에 사용한 산수유는 전남 구례군 산동면에서 수확한 것을 수세하여 씨를 제거 한 건조 과실을 산동농협(전남 구례)에서 구입하여 사용하였다. 산수유 5,000 g을 각각 물과 50% 에탄올로 80°C, 6시간씩 3회 추출한 후 filter paper(Whatman No. 2, Whatman, Maidstone, UK)로 여과하였고, 얻어진 여액은 감압농축기(EYELA, N-1100 series, Tokyo, Japan)에서 농축하여 에탄올을 기화시켜 농축액을 얻었다. 농축액은 동결건조기(Ilsin, Korea)를 이용하여 건조 시료로 제조하였다.

시약 - Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM)과 fetal bovine serum(FBS), horse serum(HS), penicillin, streptomycin은 Gibco/BRL(Eggenstein, Germany)에서 구입하였고, TRIzol reagent 및 중합효소반응 키트들은 Invitrogen(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium(MTS, CellTiter 96A Queous One Solution Cell Proliferation Assay)은 Promega(Madison, USA)에서 구입하였다. Bisphenol A(BPA), N-Acetyl-L-cysteine(NAC), gallic acid, rutin, Vit. C, 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)(ABTS), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), Folin-Ciocalteu reagent, testosterone은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, Testosterone ELISA kit는 ENZO Life Sciences (Farmindale, NY, USA)에서 구입하였다. Real-time PCR을 위해 Applied Biosystems사에서 판매하는 Taqman Gene Expression Assay를 구입하여 유전자 발현을 확인하였다. Rat Malondialdehyde(MDA) ELISA Kit는 YHbiosearch (Shanghai, China)에서 구입하였다.

DPPH 저해 활성도 측정 - Free radical 활성측정은 96-well plate reader를 사용하여 농도별 시료와 동량의 1 mM DPPH를 가한 후 상온에서 30분간 암소반응 시킨 뒤 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.⁶⁾ 그 활성의 크기는 시료를 넣지 않은 경우를 대조군(control)으로 하고 시료를 넣은 것은

실험군(experiment)으로 하여 다음 식에 의해 DPPH의 활성 저해율을 나타내었다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(A_{\text{control}} - \frac{A_{\text{Experiment}} - A_{\text{Blank}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100$$

ABTS 저해 활성도 측정 - ABTS 용액은 7.4 mM ABTS와 2.45 mM K₂S₂O₈를 섞어 16시간 동안 냉장소에 보관하여 준비하였으며, 흡광도값이 0.7-0.8 사이에 도달하게 50% 에탄올로 희석하여 사용하였다.⁷⁾ 96-well plate에 ABTS용액과 농도별 시료를 혼합하여 실온에서 20분간 반응시킨 후, 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 활성의 크기는 시료를 넣지 않은 경우를 대조군(control)으로 하고 시료를 넣은 것은 실험군(experiment)으로 하여 다음 식에 의해 ABTS의 활성 저해율을 나타내었다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(A_{\text{control}} - \frac{A_{\text{Experiment}} - A_{\text{Blank}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100$$

SOD 유사 활성도 측정 - SOD 유사활성 측정은 Marklund 등의 방법에 따라 시행하였다.⁸⁾ 각 시료 추출물 0.2 ml에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer 3 ml와 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml를 첨가하였다. 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1 N HCl로 반응을 정지시킨 다음 spectrophotometer를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 활성의 크기는 시료를 넣지 않은 경우를 대조군(control)으로 하고 시료를 넣은 것은 실험군(experiment)으로 하여 다음 식에 의해 SOD의 유사활성도를 나타내었다.

$$\text{SOD like activity (\%)} = \left(1 - \frac{A_{\text{Experiment}} - A_{\text{Blank}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100$$

마우스 레디히(Leydig) 세포 분리 및 세포배양 - 6주된 마우스의 고환을 분리하여 고환의 피막 및 잔여지방을 제거하고, 70% 알코올을 이용하여 멸균을 하였다. 실험용 가위를 이용해 고환을 크게 자르고 collagenase(0.25 mg/ml)을 20분간 250 rpm으로 37°C에 반응을 시킨다. strainer로 세포만 있는 상층액을 걸러 3분간 1,700 rpm으로 4°C에 원심분리를 하였다. 이 과정을 총 3번 반복하여 세포를 수확하여 0.1% BSA가 든 PBS에넣고 percoll 농도를 각각 20, 40, 60, 90 % 층을 만들고 20000 g에서 30분간 4°C에 원심분리를 하였다.⁹⁾ 60% 농도에 걸러진 세포를 가지고 2회 PBS 세척을 하고, Trypan blue를 이용하여 세포 수를 세었다. 분리된 Leydig cell을 가지고 DMEM-F12(5% Horse serum과 2.5% FBS, 15 mM HEPES, 1 mg/ml BSA, 365 mg/L glutamine, 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin)에 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

세포 생존율 분석 - 산수유 50% 에탄올 추출물이 Leydig cell에서 Bisphenol A(BPA)에 의한 세포 독성 보호효과를

Table I. TaqMan gene information of antioxidant enzyme for real-time PCR

Gene symbol	Gene description	TaqMan gene expression assay number	Reference sequence
Cat	Catalase	Mm00437992_m1	NM_009804.2
Sod1	Superoxide dismutase 1, soluble	Mm01344233_g1	NM_011434.1
Gsta3	Glutathione S-transferase, alpha 3	Mm01233706_m1	NM_001077353.1
Hprt1	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (reference gene)	Mm01545399_m1	NM_013556.2

측정하기 위해 MTS assay를 실시하였다. 96-well plate에 3×10^5 cells/well로 분주하고 산수유 50% 에탄올 추출물을 농도별로 처리하고, 2시간 후에 BPA 200 μ M을 처리하였다. 24시간 배양한 후에 각각 세포 배양액 용량의 10%의 MTS 용액을 첨가한 후 37°C에서 2 시간 배양한 후 microplate reader(Infinite 200 pro, TECAN, Austria)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

항산화관련 효소 mRNA 발현분석 - Leydig 세포를 6-well plate에 1×10^5 cells/well로 분주한 후 24시간 배양하여 세포를 안정화 시켰다. 산수유 50% 에탄올 추출물을 농도별로 처리하고 2시간 후에 BPA(200 μ M)를 처리하고 24시간 동안 배양하였다. PBS로 2회 wash를 하고 Tripure Isolation Reagent(Roche 11 667 165 001)를 이용하여 RNA를 분리하였다. 5 μ g의 mRNA를 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Applied biosystem 4368814)를 이용하여 cDNA로 합성을 하였다. 합성된 cDNA 1 μ l, taqman primer 1 μ l, Taqman Universal Master Mix II(Applied biosystem) 10 μ l, 3차 증류수 8 μ l를 넣고 real-time PCR을 수행하였다. 정량 중합 효소 반응에 쓰인 TaqMan gene은 <http://www.lifetechnologies.com>에서 검색하여 주문 후 사용하였고 분석하고자 하는 유전자 특이적 gene의 정보는 Table I에 나타내었다. 또한 real-time PCR 반응 조건은 50°C에서 2분 95°C에서 10분 동안 1회 수행하고, 변성 온도 95°C에서 15초, 어닐링 온도 60°C에서 15초인 사이클을 40회 반복 수행하였다.

실험 동물 작제 - 실험동물은 SD(Sprague Dawley) Rat 6주령 수컷을 Orient Bio(Sung-nam, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 온도 20 \pm 2°C, 습도 55 \pm 5%, 12시간 명암조건에서 사육하였다. 실험동물은 구입 후 1주일 동안 순화한 다음, 각 군당 4마리씩을 배치하여 총 8군으로 분류하였다. 안정화 기간이 경과한 후 시행한 수술에서 마취는 정맥마취로 시행되었다. 정상대조군(Con)을 제외한 실험군은 음낭을 절제하여 양측 고환을 절제하였으며, 가장수술대조군(Shame Con)은 가장수술만 하였다. 수술 후 모든 군은 동일한 방법으로 사육하였고, 제 4군은 남성호르몬 결핍을 상쇄하기 위해 테스토스테론을 1 mg/kg 농도로 주 2회 투여하였다. 나머지 4군은 각각 산수유 물 추출물(SSU-A) 100 mg/kg, 300 mg/

kg, 산수유 에탄올 추출물(SSU-E) 100 mg/kg, 300 mg/kg 농도로 경구투여 하였다. 총 8 주간 사육 후 실험동물을 희생시켜 전립선과 혈액을 취하였다. 혈액은 3000 rpm으로 15분간 원심분리하여 혈장을 취하였다.

Testosterone Level 측정 - Leydig cell 및 고환 절제된 SD Rat에서 testosterone 생성에 미치는 효과를 알아보기 위하여 실험하였다. 6 cm dish에 1×10^6 cells/ml의 cell을 1 ml, 10% FBS, penicillin(100 μ g/ml), streptomycin(100 μ g/ml)이 첨가된 DMEM 배지를 3 ml씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간 동안 배양 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 PBS 용액으로 씻어주었다. PBS에 녹인 시료를 농도 별로 처리를 하고, 2시간 후 FBS free DMEM에 녹인 BPA (200 μ M)를 각각의 well에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 양성대조군은 N-acetyl-L-cysteine(NAC)을 사용하였고, 동일한 양(100 μ l)의 배양액은 Testosterone ELISA kit를 이용하여 testosterone을 정량적으로 측정하였다. 동물모델에서는 실험동물을 희생하여 얻은 혈장 0.1 ml을 0.05 ml의 Assay Buffer와 well에 함께 넣어 상온에서 500 rpm으로 1 시간 동안 반응시킨 후 wash buffer로 3회 세척하였다. Wash buffer를 깨끗하게 제거 후 0.2 ml의 pNpp 기질용액을 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 0.05 ml의 stop solution으로 반응을 정지 시킨 다음 spectrophotometer를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 정량화 하였다.

MDA 측정 - MDA 농도 측정은 ELISA kit를 사용하여 측정하였다. 실험동물을 희생하여 얻은 혈장 0.05 ml을 0.05 ml의 실험 시약과 함께 well plate에 넣어 밀봉한 후 37°C에서 30분간 배양하였다. 배양이 끝난 시료는 wash buffer로 5회 세척하였고, 남은 용액이 없도록 털어서 말렸다. 말린 plate에 0.05 ml의 HRP-기질 용액을 넣은 후 37°C에서 30분간 배양하였다. 배양이 끝난 plate에 Chromogen 용액 A와 B를 각각 0.05 ml 넣어 37°C에서 15분간 반응시킨 후 0.05 ml의 stop solution으로 반응을 정지 시킨 다음 spectrophotometer를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

병리 조직학적 평가 - 채취한 전립선을 10% formalin 용액으로 12시간 동안 고정시킨 다음 통상적인 조직 제작 과정을 거쳐 양측 절단면이 관찰되도록 파라핀 블록을 만들

어 5 µm 두께의 절편을 얻은 다음 hematoxylin과 eosin (H&E) 염색을 실시하였다. H&E 염색 슬라이드를 40배 시야에서 먼저 관찰한 후 정 중앙부가 제대로 관찰되는 절편을 선택하였다.

통계처리 - 본 실험에서 얻은 결과에 대해서는 평균치±표준오차(mean±S.D.)로 나타내었으며, 대조군과 각 실험군과의 평균의 차이는 Student's t-test로 분석하여 p-value 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

ABTS Free Radical의 소거활성 - ABTS와 potassium persulfate를 암소에 방치하면 ABTS^{•+}이 생성되는데 항산화 물질의 항산화력에 의해 ABTS^{•+}이 소거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색된다. 이와 같이 ABTS^{•+}의 탈색 반

응은 이미 생성된 free radical의 제거 정도를 흡광도 값으로 나타내어 ABTS^{•+}의 소거활성을 측정하는 방법으로 소수성과 친수성 모두에 적용 가능한 실험 방법이다. 산수유 50% 에탄올 추출물의 IC₅₀는 0.29 mg/ml로 나왔다(Table II).

DPPH Free Radical의 소거활성 - DPPH는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 free radical로서 항산화제, 방향족 아민류 등에 의해 환원되어 색이 탈색되는데 이것은 다양한 천연소재로부터 항산화물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다. 실험결과 산수유 50% 에탄올추출물 DPPH free radical의 소거활성이 있었고 IC₅₀ 값은 0.33 mg/ml로 나왔다(Table III).

SOD 활성도에 미치는 영향 - 항산화 효소 중의 하나인 SOD는 세포에 해로운 환원산소종(reactive oxygen species: ROS)을 과산화수소로 전환시키는데 촉매작용을 하는 효소이다. 이러한 SOD와 유사한 역할을 하며, superoxide anion

Table II. ABTS radical scavenging capacity of SSU-E50 extracts

	62.5 (µg/ml)	125 (µg/ml)	250 (µg/ml)	500 (µg/ml)	1000 (µg/ml)	IC50 (mg/ml)
SSU-E50 (Inhibition %)	11.03±0.95	19.74±1.17	36.99±0.56	60.66±1.03	92.47±1.03	0.29±0.01
Ascorbic acid (Inhibition %)	99.97±0.04	99.88±0.09	100.07±0.08	100.14±0.09	100.21±0.18	0.01±0.00

Radical scavenging activity of SSU 50% ethanol extracts in ABTS assay. SSU-E50 dissolved in ethanol was added to the reaction mixture containing ABTS radical at specific concentrations. After 30 min of incubation at room temperature, the absorbance was measured at 734 nm, respectively. The results are presented as means±S.D. from three independent experiments.

Table III. DPPH radical scavenging capacity of SSU-E50 extracts

	62.5 (µg/ml)	125 (µg/ml)	250 (µg/ml)	500 (µg/ml)	1000 (µg/ml)	IC50 (mg/ml)
SSU-E50 (Inhibition %)	17.48±1.71	29.37±1.47	43.06±0.03	54.08±0.13	65.48±0.73	0.33±0.02
Ascorbic acid (Inhibition %)	69.96±0.03	79.85±0.01	91.96±0.01	99.84±0.01	99.94±0.02	0.01±0.00

Radical scavenging activity of SSU 50% ethanol extracts in DPPH assay. SSU-E50 dissolved in ethanol was added to the reaction mixture containing DPPH radical at specific concentrations. After 30 min of incubation at room temperature, the absorbance was measured at 517 nm respectively. The results are presented as means±S.D. from three independent experiments.

Table IV. SOD Radical scavenging capacity of SSU-E50 extracts

	62.5 (µg/ml)	125 (µg/ml)	250 (µg/ml)	500 (µg/ml)	1000 (µg/ml)	IC50 (µg/ml)
SSU-E50 (Inhibition %)	17.04±0.82	23.19±1.53	31.53±2.01	35.12±2.65	55.52±1.95	0.84±0.02
Ascorbic acid (Inhibition %)	34.40±3.23	45.44±0.12	63.66±2.76	100.52±1.51	100.64±0.50	0.16±0.01

SOD assay determined using commercial kits by utilizing water-soluble tetrazolium salt, WST-1(2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfo-phenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) that produces a water-soluble formazan dye upon reduction with the superoxide anion. The results are presented as means±S.D. from three independent experiments.

의 활성을 억제시키는 산수유 50% 에탄올 추출물의 SOD 활성도의 반응결과는 Table IV에 나타내었다. 실험결과 산수유 50% 에탄올추출물 SOD 유사 활성도가 있었고 IC₅₀ 값은 0.84 mg/ml로 비교적 낮은 농도에서 높은 SOD 활성도를 나타내었다(Table IV).

Leydig Cell의 세포생존율에 미치는 영향 - 산수유 50% 에탄올 추출물(SSU-E50)을 31.3, 62.5, 125, 250, 500 µg/ml의 농도로 Leydig cell에 처리하고 24시간 후 MTS로 세포생존율을 관찰하였다. 농도의존적으로 농도가 증가함에 따라 생존율을 증가하는 경향을 보였다(Fig. 1). 산수유 50% 에탄올 추출물(SSU-E50)의 농도가 높아질수록 생존율은 의존적으로 증가하였고, 최고농도인 500 µg/ml 농도에서도 세포독성은 나타나지 않았다.

Leydig Cell에서 Bisphenol A로 유도된 독성 보호효과 - Leydig cell에 대한 cell viability 결과에 근거하여 Bisphenol A(BPA)에 의해 유도된 cytotoxicity를 측정하였다. BPA에 의해 유도된 Leydig cell은 정상군에 비하여 61.8%로 유의하게 세포생존율이 감소하였다. 산수유 50% 에탄올 추출물(SSU-E50)을 전처리한 Leydig cell에 대해 BPA에 의한 독성 보호 효과를 조사하기 위해서 31.3, 62.5, 125, 250, 500 µg/ml의 농도로 세포에 처리하여 MTS 분석법을 이용하여 세포생존율을 측정하였다. BPA 단독처리군보다 산수유 50% 에탄올 추출물(SSU-E50)을 125~500 µg/ml 농도에서 처리한 실험군에서 농도의존적으로 세포독성을 완화시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

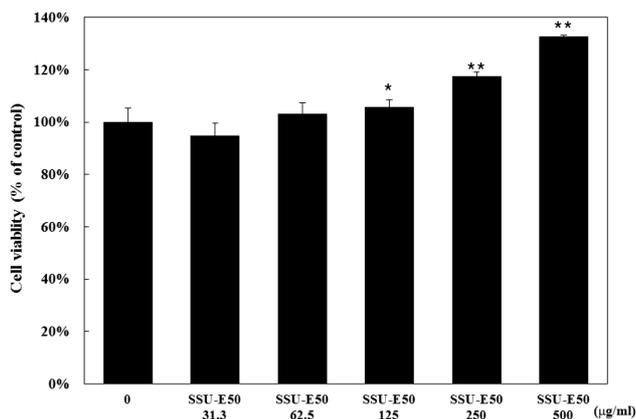


Fig. 1. Effect of Corni Fructus 50% ethanol extracts (SSU-E50) on cell viability in Leydig cells. Leydig cells were incubated for 24 hrs in the presence or absence of SSU-E50 at indicated dose for 24 hours. Cell viability was evaluated by MTS assay as described in materials and methods. Statistical significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ when compared to the normal group. Significant differences between treated groups were determined using the Student's *t*-test. Data represent the mean±S.D. of triplicate determinations from three separate experiments.

Leydig Cell에서 Testosterone 생성에 미치는 영향 - Bisphenol A(BPA)에 산화가 유도된 Leydig cell에서 testosterone 분비를 측정하였다. BPA에 의해 산화가 유도된 대조군은 정상군보다 유의성 있게 낮은 농도의 testosterone을 분비하는 것을 확인할 수 있었고, NAC를 처리한 양성대조군에서는 BPA에 의해 감소되는 testosterone양을 정상군과 유사한 수치를 확인할 수 있었다. 산수유 50% 에탄올 추출물이 BPA에 의해 감소되는 testosterone양을 완화시키는지 확인한 결과, 농도의존적으로 testosterone양이 증가되는 현상을 관찰하였고, 31.3, 62.5 µg/ml 농도에서 대조군과 비교하여 유의적으로 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

항산화 관련효소 mRNA 발현에 미치는 영향 - 산수유 50% 에탄올 추출물이 Leydig cell에서 BPA로 인해 감소되는 각종 항산화효소들의 발현에 대한 영향을 조사하기 위하여 항산화효소들의 mRNA 발현에 대한 산수유 50% 에탄올 추출물의 영향을 관찰하였다. 산수유 50% 에탄올 추출물을 전처리한 후 BPA로 자극하여 24시간 후에 세포를 수집하고 세포 내 mRNA를 추출 분리하여 real time-PCR 방법을 이용하여 SOD1, Gsta3, CAT mRNA 발현량을 확인해 보았다. 그 결과 정상군보다 Bisphenol A(BPA)를 처리한 군에서 SOD1과 CAT가 감소하였고, 반면에 Gsta3는 증가하는 양상을 보였다. 산수유 50% 에탄올 추출물에서 SOD1은 BPA 단독처리군에 비하여 SOD1이 증가하는 양상

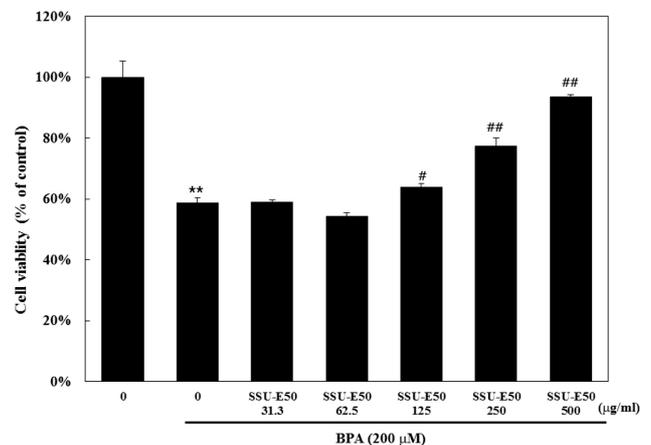


Fig. 2. Effect of Corni Fructus 50% ethanol extracts (SSU-E50) on bisphenol A-induced cytotoxicity in Leydig cells. Leydig cells were pretreated with the indicated concentration of SSU-E50 for 2 hr before being incubated with BPA 200 µM (bisphenol A) for 24 hours. Cell viability was evaluated by MTS assay as described in materials and methods. Statistical significance: * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$, when compared to the normal group; # $p < 0.05$ ## $p < 0.01$, when compared to the BPA alone treated group. Significant differences between treated groups were determined using the Student's *t*-test. Values shown are the mean±S.D. of triplicate determinations from three separate experiments.

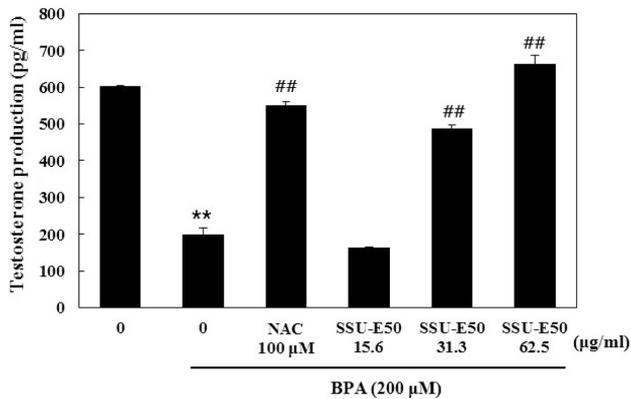


Fig. 3. Effect of Corni Fructus 50% ethanol extracts (SSU-E50) on testosterone level in Leydig cells. Leydig cells were pretreated with the indicated concentration of SSU-E50 for 2 hr before being incubated with BPA 200 μM (bisphenol A) for 24 hours. The culture supernatant was subsequently isolated and analyzed for testosterone level. **p<0.01, when compared to the normal group; ##p<0.01, when compared to the BPA alone treated group. Significant differences between treated groups were determined using the Student's t-test. Values shown are the mean±S.D. of triplicate determinations from three separate experiments.

을 보였으며, 62.5 μg/ml 농도에서는 유의성 있게 SOD1이 증가하는 것을 관찰할 수 있었고, CAT 또한 비슷한 양상을 보였으며, 62.5 μg/ml 농도에서는 유의성 있게 CAT가 증가하는 양상을 보였다. Gsta3는 BPA에 의해 증가 되었고, 산수유 50% 에탄올 추출물에서 농도의존적으로 대조군과 비교하여 감소하는 것을 확인할 수 있었고, 31.3 62.5 μg/ml에서는 유의성 있게 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 항산화 작용을 하는 효소들 중 가장 하위 효소인 GSTA3가 BPA에 의해 CAT, SOD1의 유전자 발현감소에 의해 감소된 항산화 작용을 상쇄하려는 것으로 보인다(Fig. 4).

혈중 내 SOD, MDA 농도 - 항산화효소 중의 하나인 SOD는 세포에 해로운 환원산소종(reactive oxygen species: ROS)을 과산화수소로 전환시키는데 촉매작용을 하는 효소이며, MDA는 신체세포의 쇠약 및 산화 스트레스 수준을 보여주는 생체 지표에 해당한다. 혈청 내 SOD의 농도는 산수유 물 추출물 100 mg/kg에서 SOD의 농도가 높았으나 높은 농도인 300 mg/kg 의 경우 유의적 차이를 보이지 않았다. MDA의 경우 산수유 물 추출물 100 mg/kg을 투여한 군에서 정상군과 유의성이 있게 나타났다(Fig. 5).

혈중 테스토스테론 농도 - 남성호르몬 중 중요한 호르몬인 테스토스테론은 전립선 성장에 가장 중요한 인자로 작용한다. 산수유 물 추출물과 50% 에탄올 추출물이 고환이 절제된 SD Rat에서 테스토스테론의 변화를 조사하기 위하여 ELISA kit를 이용하여 혈장 내 테스토스테론 농도를 확인하였다. 산수유 물 추출물 100 mg/kg을 투여한 군의 혈장

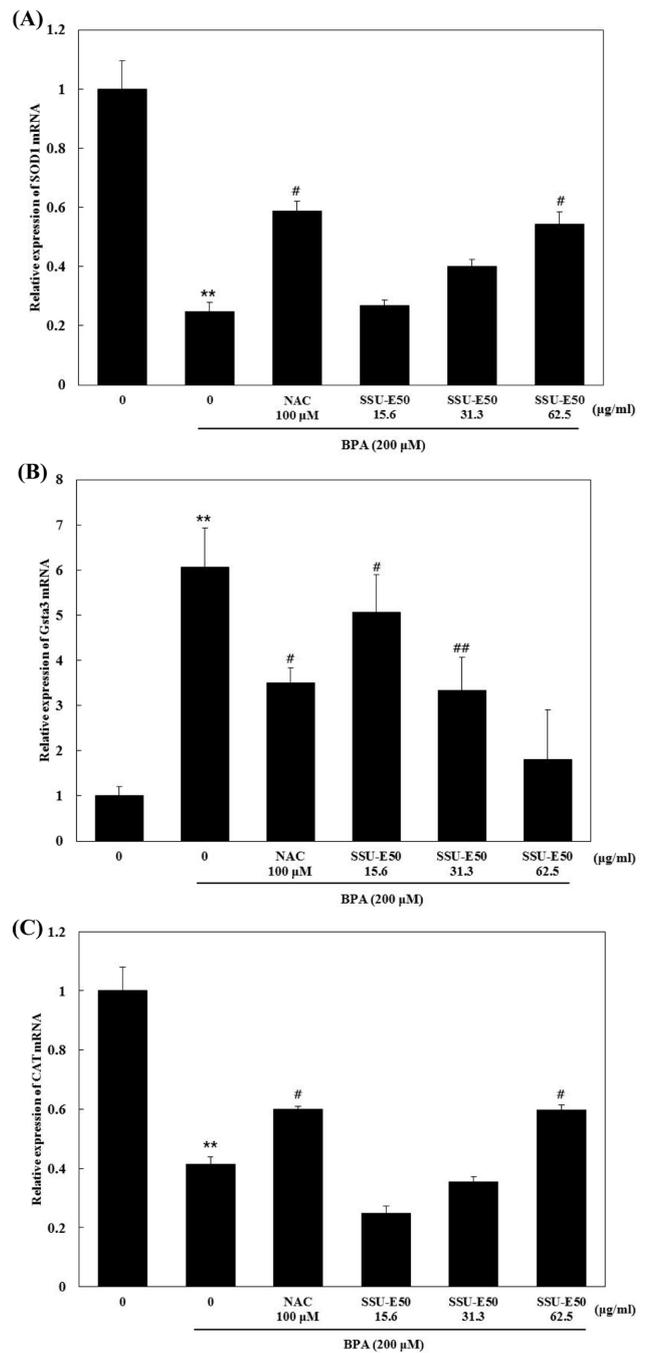


Fig. 4. Effect of Corni Fructus 50% ethanol extracts (SSU-E50) of SOD1 mRNA (A), Gata3 mRNA (B) and CAT mRNA (C) in BPA-induced Leydig cells. Cells were pretreated with the indicated concentrations of SSU-E50 for 2 hr before being incubated with BPA 200 μM (bisphenol A) for 24 hours. Gene expressions of SOD1, Gata3 and CAT were measured by real time PCR. *p<0.05 **p<0.01, when compared to the normal group; #p<0.05 ##p<0.01, when compared to the BPA alone treated group. Significant differences between treated groups were determined using the Student's t-test. Values shown are the mean±S.D. of triplicate determinations from three separate experiments.

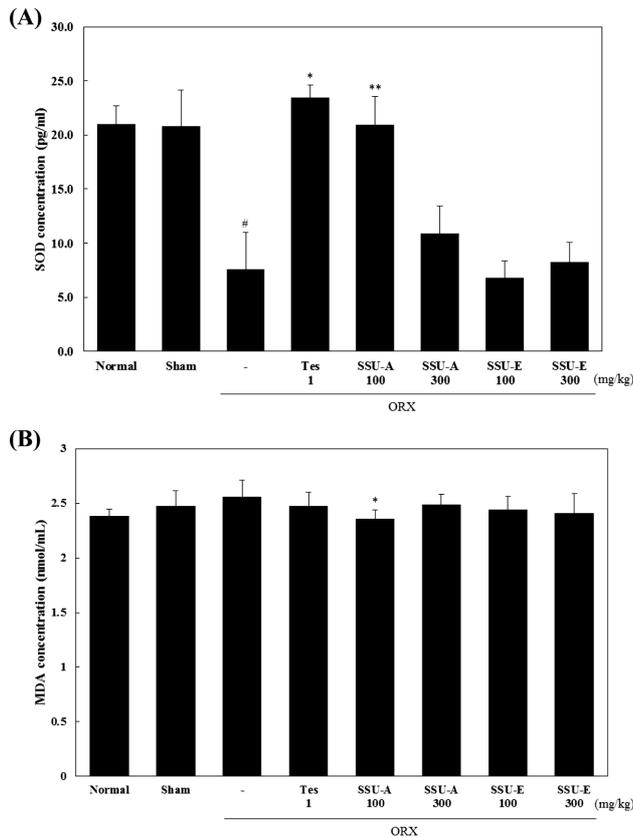


Fig. 5. Effect of Corni Fructus, water extract and 50% ethanol extract on plasma SOD (A) and MDA (B) levels in orchidectomized rats. Normal; normal group, Sham; shame-operated group, - ; orchidectomized group, Tes 1; ORX treated with testosterone 1 mg/kg, CO-A100; ORX treated with Corni Fructus water extract 100 mg/kg, SSU-A300; ORX treated with Corni Fructus water extract 300 mg/kg, SSU-E100; ORX treated with Corni Fructus ethanol extract 100 mg/kg, SSU-E300 Corni Fructus ethanol extract 300 mg/kg, Values are significantly different between groups according to Student's t-test. *p<0.05 orchidectomized group versus ORX treated with testosterone or water extract.

에서 테스토스테론의 ORX 군과 비교하여 테스토스테론 농도는 유의적 차이를 보이는 것으로 나타났다(Fig. 6).

병리 조직학적 변화 - 남성호르몬인 테스토스테론의 분비가 저하되면 전립선은 퇴축하며, 전립선의 무게가 줄어든다. 고환 절제된 SD Rat에서 전립선의 조직병리학적 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해 동물을 희생하여 얻은 전립선을 H&E 염색하여 관찰하였다. 고환을 제거한 ORX군의 경우 정상군과 비교하였을 때 전립선이 퇴축되어 lumen area가 없는 것으로 확인되었다. 산수유 물 추출물과 50% 에탄올 추출물을 투여한 군의 경우 전립선이 퇴축되었지만 lumen area형태를 유지 하고 있는 것을 확인하였다(Fig. 7).

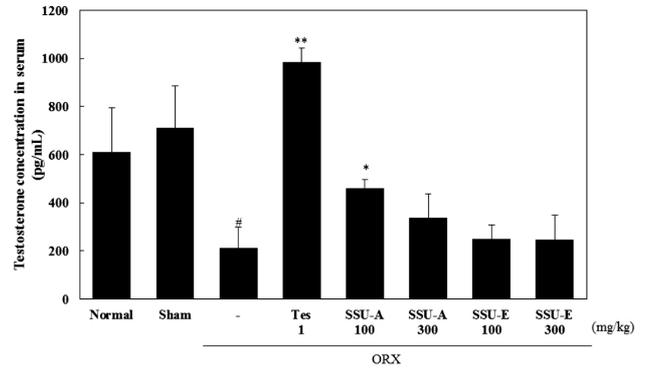


Fig. 6. Effect of Corni Fructus water extract and 50% ethanol extract on testosterone level in plasma. Normal: normal group, Sham: shame-operated group, ORX: orchidectomized group, Tes. 1: ORX treated with testosterone 1 mg/kg, SSU-A: ORX treated with Corni Fructus water extract, SSU-E: ORX treated with Corni Fructus 50% ethanol extract. The results are presented as means±S.D. from three independent experiments. (*p<0.05, **p<0.01).

고 찰

남성갱년기 의학적 정의는 남성에서 연령이 증가하면서 경험하게 되는 전형적인 증상들과 혈청 테스토스테론 결핍을 동반하는 임상적 생화학적 증후군이다.¹⁰⁾ 남성갱년기의 원인중의 주요요인은 내분비계 교란작용이나 활성산소인데 활성산소는 중년남성에게 노화를 촉진하는 것으로 알려져 있다.¹¹⁾ 이러한 활성산소는 환원산소종(reactive oxygen species: ROS)를 생성하고, SOD에 의해 세포에 해로운 ROS를 과산화수소로 전환시킨다.¹²⁾ 또한 ROS는 뇌 조직 지질을 손상시켜 MDA의 농도를 증가시키게 되고, 이렇게 발생한 MDA는 우울증, 신체세포의 쇠약 및 산화 스트레스 수준을 보여주는 생체 지표로 활용되고 있다.¹³⁾ 내분비계 장애물질은 호르몬적 역할을 하며 생식기관에 작용하여 정자와 난자의 생성 및 성장에 이상을 유발한다. 내분비계 장애물질 중 하나인 bisphenol A는 알킬페놀 중 하나로서,¹⁴⁾ 정소의 발달을 방해하고 남성의 생식능력을 방해하는 xenoestrogens으로써 세포자연사를 통해 칼슘 의존적 세포사를 일으킨다고 추정하고 있다.¹⁵⁾ 이러한 성교란 물질은 세포사를 일으키고 손상을 받은 spermatozoa는 ROS를 생성할 수 있으며,¹⁶⁾ 높은 수준의 ROS는 정자의 운동성을 감소시키고,¹⁷⁾ 특발성으로 발생된 ROS는 남성불임의 독립적 진단의 평가 기준으로 사용되고 있다.¹⁸⁾ 이러한 사실에 기초하여 산수유 50% 에탄올 추출물이 Leydig cell에서 BPA에 의해 유도된 독성 억제와 항산화 효과를 확인하여 보았다. 산수유 50% 에탄올 추출물이 cell viability에 미치는 영향을 측정할 결과, 농도의존적으로 Leydig cell의 생존율을 증가시켰다. Leydig cell에 대한 안전한 cell viability를 바탕으

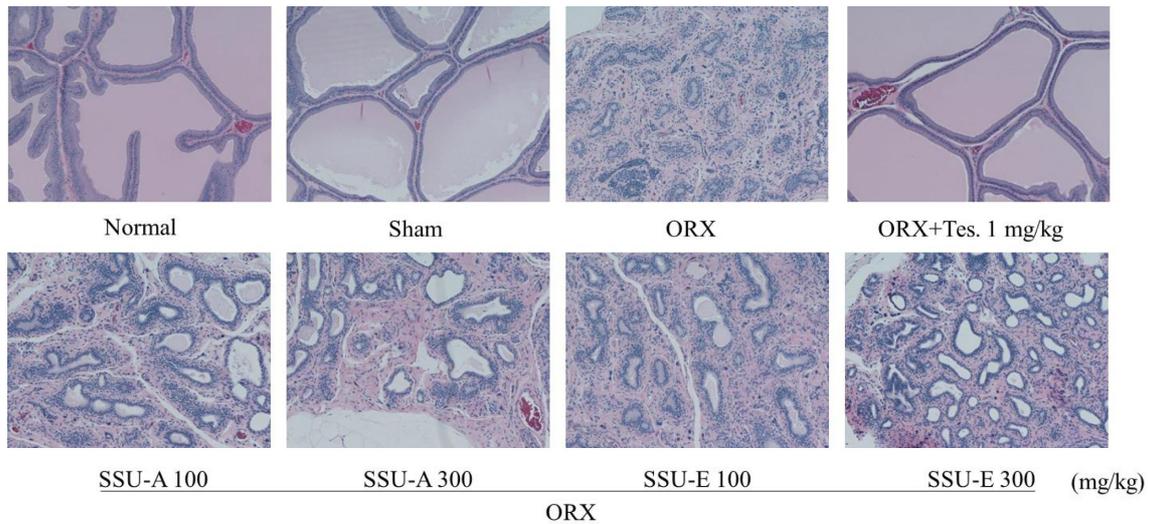


Fig. 7. Effect of Corni Fructus water extract and 50 % ethanol extract on histological changes of the prostate tissues. Normal: normal group, Sham: shame-operated group, ORX: orchidectomized group, Tes. 1: ORX treated with testosterone 1 mg/kg, SSU-A: ORX treated with Corni Fructus water extract, SSU-E: ORX treated with Corni Fructus 50% ethanol extract. Representative photomicrograph of H&E stained prostate tissues (magnification $\times 200$).

로 BPA독성에 감소된 cell viability를 산수유 50% 에탄올 추출물이 농도의존적으로 증가시켰고, BPA에 의한 독성 보호효과를 확인할 수 있었다. Leydig cell에서 분비되는 Testosterone은 정자형성과정의 유지에 중요하며 생식세포가 세포사멸을 막는 작용을 한다. 산수유 50% 에탄올 추출물이 testosterone 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 BPA가 처리된 상태에서 testosterone 수치는 15.6 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 변화가 없었지만 그 이상의 농도에서 정상세포군과 비슷한 testosterone 수치를 확인할 수 있었다. 앞의 실험을 바탕으로 항산화 기전에 중요한 역할을 하고 있는 효소인 catalase, SOD1, Gata3의 mRNA 발현양을 Real-time PCR을 통해 관찰하였을 때 BPA 처리에 의해 감소한 항산화 관련효소 유전자가 정상군과 유사한 발현양을 보이는 것을 확인할 수 있었다. SD Rat 갱년기 동물모델로 수행한 동물실험에서는 혈청 내 SOD 수치와 MDA 수치가 산수유 물 추출물 100 mg/kg를 투여한 군에서 정상군과 유의성이 있는 것으로 나타났고, 전립선 조직의 경우 산수유 물 추출물과 50% 에탄올 추출물을 투여한 lumen area를 유지하는 모습을 확인하였다.

결론

산수유 추출물이 높은 항산화 활성과 남성갱년기유도 동물모델에서 남성갱년기 증후군을 완화시키는 것을 확인할 수 있었다. 이를 토대로 산수유 추출물이 남성갱년기 질환 예방에 효과적으로 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

사사

이 연구는 산업통상자원부에서 시행한 지역연구(전통)산업육성사업의 지원에 의해 이루어진 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Degen, G. H. and Bolt, H. M. (2000). Endocrine disruptors: Update on xenoestrogens. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **73**: 433-441.
2. Kho, M. J., Bae, M. J. and Yang, M. (2010). Chemopreventive effects of Korean red ginseng on urinary bisphenol and malondialdehyde. *Cancer Prev. Res.* **15**: 231-235.
3. Zirkin, B. R. and Chen, H. (2000). Regulation of Leydig cell steroidogenic function during aging. *Biol. Reprod.* **63**: 977-981.
4. Patisaul, H. B. and Adewale, H. B. (2009). Long-term effects of environmental endocrine disruptors on reproductive physiology and behavior. *Front Behav. Neurosci.* **3**: 10 (doi: 10.3389/neuro.08.010.2009).
5. 이창복 (2003) 원색 대한식물도감. 향문사. 서울.
6. Sreejayan, N. and Rao, M. N. A. (1996). Free radical scavenging activity of curcuminoids. *Arzneimittel-Forschung* **46**: 169-171.
7. Shirwaikar, A., Rajendra, K. and Kumar, C. D. (2004). *In vitro* antioxidant studies of *Annona squamosa* Linn. leaves. *Indian J. Exp. Biol.* **42**: 803-807.
8. Marklund, S. and Marklund, Gudrun. (1974). Involvement of

- the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**: 469-474.
9. Chang, Y. F., Lee-Chang, J. S., Panneerdoss. S., MacLean, J. A. 2nd and Rao, M. K. (2011). Isolation of Sertoli, Leydig, and spermatogenic cells from the mouse testis. *BioTechniques* **51**: 341-344.
 10. Kim, K.-M. (2013) Late-Onset Hypogonadism. *Korean J. Fam. Pract.* **3**: 245-254.
 11. Eo, J, and Lim, H. (2008). Effects of bisphenol A on gene expression and apoptosis of leydig cells in the mouse testis. *Korean J. Reprod. Med.* **35**: 181-191.
 12. Mancini, A., Leone, E., Festa, R., Grande, G., Silvestrini, A. and de Marinis, L. (2008) Effects of testosterone on anti-oxidant systems in male secondary hypogonadism. *J. Androl.* **29**: 622-629.
 13. Gawel, S., Wardas, M., Niedworok, E. and Wardas, P. (2004) Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiad. Lek.* **57**: 453-455.
 14. Lecomte, H. A. and Liggat, J. J. (2008) Commercial fire-retarded PET formulation- relationship between thermal degradation behaviour and fire-retardant action. *Polym. Deg. Stab.* **93**: 498-506.
 15. vom Saal, F. S., Cooke, P. S., Buchannan, D. L., Palanza, P., Thayer, K. A., Nagel, S. C., Parmigiani, S. and Welshons, W. V. (1998). A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behaviour. *Toxicol. Ind. Health.* **14**: 239-260.
 16. Iida H, Maehara K, Doiguchi M, Mori, T. and Tamada, F. (2003). Bisphenol A-induced apoptosis of cultured rat sertoli cells. *Reprod. Toxicol.* **17**: 457-464.
 17. Kim, J. H., Kim, J. K., Do, B. R., Lee, C. J. and Yoon, Y. D. (2005). Evaluation of bisphenol a induced apoptosis in sertoli cell-lines. *Dev. Reprod.* **9**: 115-121.
 18. Xu, J., Osuga Y., Yano, T., Morita, Y., Tang, X., Fujiwara, T., Takai, Y., Matsumi, H., Koga K., Taketani, Y. and Tsutsumi, O. (2002). Bisphenol A induces apoptosis and G2-to-M arrest of ovarian granulosa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **292**: 456-462.
- (2016. 6. 10 접수; 2016. 7. 11 심사; 2016. 8. 26 게재확정)