



Original Article / 원저

남성생식세포 Sertoli cell에 미치는 覆盆子の 항산화 효과

김영주, 장문석*, 박성규*

경희대학교 대학원 한의과대학 처방제형학교실

Antioxidant Effect of Rubi Fructus on TM4 Sertoli Cells

Young Joo Kim, Mun Seog Chang*, Seong Kyu Park*

Department of Prescriptionology, College of Korean Medicine, Graduate
School, Kyung Hee University

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to examine the antioxidant effects of the extract of Rubi Fructus on TM4 Sertoli cells.

Methods : The extract was studied for diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and cell viability assays on Sertoli cells. In addition, hydrogen peroxide-induced oxidative stress on Sertoli cells were examined by MTT assay. The antioxidant enzyme of Cu/Zn SOD, Mn SOD, catalase protein expression on Sertoli cells were also measured.

Results : The results showed that the extract scavenged DPPH radical dose-dependent manner. The extract showed no cytotoxicity at concentration of 1, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$. The hydrogen peroxide-induced cytotoxicity of Sertoli cells was protected to 88.3% by the extract at concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$. Cu/Zn SOD and Mn SOD protein expression were significantly increased on Sertoli cells, but catalase protein expression was not significantly changed.

Conclusions : In conclusion, the extract of Rubi Fructus has antioxidant effects on Sertoli cells and protect male reproductive system against oxidative stress.

Key words : Rubi Fructus, Sertoli cells, diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH), MTT assay, hydrogen peroxide, Cu/Zn SOD, Mn SOD, catalase.

I. 서론

정자 형성 과정이 이루어지는 기관인 고환은 spermatogonial stem cell, primordial germ cell, spermatogonia, spermatocyte, spermatid, spermatozoa 등 여러 분화 단계의 정세포들과 Sertoli cell, Leydig cell, peritubular cell, myeloid cell 등의 체세포들로 구성되어 있으며¹⁾, 이러한 정세포들의 형성을 조절하는 주요 체세포는 Sertoli cell과 Leydig cell이다. 이 중 Sertoli cell은 기저막의 spermatogonia 단계에서부터 분화가 지속적으로 이루어지고 있는 elongated spermatid 단계에 이르기까지의 모든 단계의 정세포들과 접촉하며 영양분을 분비하고, 정세포들을 지지해주고, 호르몬과 성장 인자들을 분비해주는 등의 다양한 역할을 담당하고 있다²⁾.

覆盆子是 장미과(Rosaceae) 복분자딸기 *Rubus coreanus* Miquel의 채 익지 않은 열매이다³⁾. 覆盆子의 성분은 유기산, 당류와 malic acid, salicylic acid, 소량의 vitamin C 등을 함유하고 있다. 性は 溫하며 無毒하고, 味는 甘酸하다. 歸經은 肝, 腎 膀胱經이다. 益腎, 固精, 縮尿의 효능으로 腎虛遺尿, 小便頻數, 陽痿早泄, 遺精滑精을 치료하는데 사용되었다⁴⁾. 기존 연구로서 覆盆子는 정자의 수와 정자의 운동성 지표를 향상시키며, 정자 형성에 중요한 역할을 하는 cAMP-responsive element modulator(CREM) 발현을 증가시키는 것으로 보고되었다⁵⁾. 그러나 覆盆子가 남성생식세포 중 Sertoli cell에 미치는 항산화 연구는 보고되지 않았다.

이에 覆盆子가 *in vitro* 에서 Sertoli cell에 미치는 영향을 알아보하고자 DPPH radical scavenging activity, cell viability, cytotoxicity, Cu/Zn superoxide dismutase(SOD), Mn SOD, catalase의 단백질 발현량을 측정하여 항산화 효과에 대한 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료 및 기기

1) 약재

본 실험에서 사용된 覆盆子 *Rubi Fructus*는 한국산(*R. coreanus* Miq.)으로 서울특별시 동대문구 제기동 경동약령시장의 본초마루(주)를 통해 구입하여, 경희대학교 한의과대학 처방제형학교실에서 외부형태를 비교 조사하여 확인한 후, 일부는 경희대학교 한의과대학 처방제형학교실(specimen No. 36)에 보관하였다.

2) 세포주

실험에 사용된 세포주는 TM4(Sertoli cell, mouse)으로서 한국세포주은행에서 구입하였다. 이 세포주는 고환 내 세정관(semiferous tubules)에 있는 지지세포에 속한다.

3) 시약 및 기기

본 실험을 위해서 fetal bovine serum(FBS; GIBCO BRL, USA), trypsin-EDTA(GIBCO BRL, USA), ascorbic acid(Sigma, USA), ethanol 99.9%(Duksan, Korea), dulbecco's modified eagle medium(DMEM; GIBCO BRL, USA), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH; Sigma, USA), 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), Anti-catalase(Abcam, UK), Anti-Cu/Zn SOD, Mn SOD(Stressgen, USA) 등이 사용되었다. 본 실험에 사용된 기기는 freeze dryer(C&H, Korea), deep freezer(Revco, USA), microplate spectrophotometer(Molecular Devices, USA), CO₂ incubator(Sanyo, Japan), Fluorescence plate reader(ThermoFisher Scientific, USA) 등이다.

2. 실험 방법

1) 시료의 제조

覆盆子 100 g을 정확하게 중량을 측정된 뒤 1차 증

* Corresponding author : Mun Seog Chang. Department of Prescriptionology, College of Korean Medicine, Graduate School, Kyung Hee University, 26, Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul, 02447, Republic of Korea.

Tel: +82-2-961-0330, Fax: +82-2-961-0536, E-mail: mschang@khu.ac.kr

* Corresponding author : Seong Kyu Park. Department of Prescriptionology, College of Korean Medicine, Graduate School, Kyung Hee University, 26, Kyungheedaero, Dongdaemun-gu, Seoul, 02447, Republic of Korea.

Tel: +82-2-961-0330, Fax: +82-2-961-0536, E-mail: comskp@khu.ac.kr

•Received : April 16, 2018 / Revised : May 25, 2018 / Accepted : May 29, 2018



류수 2,000 ml와 함께 넣은 뒤 90 분 간 냉침하고, 탕액이 끓는 시점부터 90 분 동안 가열하여 추출한다. 다음, filter paper로 감압 여과한 여과액을 얻었다. 이 여과액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물은 17.4 g을 얻었으며, 수율은 17.4% 이었다.

2) 세포 배양

Sertoli cell은 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, penicillin(100 ug/ml), streptomycin(100 ug/ml)이 첨가된 DMEM 배지로 배양하였다. 배양 3일 간격으로 phosphate buffered saline(PBS) 용액으로 씻어준 후 50 ml flask 당 1 ml의 0.25% trypsin-EDTA 용액을 넣고 37°C에서 5 분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대 배양하였다. 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 ml에 부유시킨 다음 새로운 배양용기에 옮겨 1 : 10의 split ratio로 CO₂ incubator(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다.

3) DPPH radical scavenging activity의 측정

覆盆子의 동결 건조된 시료를 증류수에 녹여서 1, 5, 10, 50, 100, 500 ug/ml의 농도로 시액을 제조하였다. 양성 대조군으로 ascorbic acid를 사용하였다. 96 well micro plate(Corning, USA)에 ethanol에 녹인 0.1 mM DPPH와 각 농도의 시액을 동량 첨가하여 잘 흔들어 섞어준 후, 실온에서 30 분간 방치한 후 microplate spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Radical scavenging activity는 다음 공식으로 계산되었다⁶⁾.

DPPH radical scavenging activity(%) = [(A_B-A_T)/A_B] × 100, A_B; absorbance of blank sample/A_T; absorbance of tested extract solution

4) Cell viability 측정

96 well plate에 1×10⁵ cells/ml의 cell을 100 μl 씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간동안 배양한 후, 배양세포 표면을 PBS 용액으로 닦아내었다. 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 시료 1, 5, 10, 50, 100 μg/ml을 각 well에 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나기 4 시간 전에 PBS에 녹인 5 mg/ml MTT를 20 μl씩 각 well에 처리한 후 알

루미늄 호일로 차광시킨 후 나머지 시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 제거한 후 DMSO를 200 μl 처리한 후 37°C에서 2 시간 방치한 후 microplate spectrophotometer를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Cell viability는 다음 공식으로 계산되었다⁷⁾.

$$\text{Cell viability}(\%) = 100 \times A_T / A_C$$

A_C; absorbance of control/A_T; absorbance of tested extract solution

5) Sertoli cell에 대한 覆盆子의 cytotoxicity 측정

Hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity에 대한 覆盆子의 보호효과를 알아보기 위해 MTT test를 응용하여 실험하였다⁷⁾. 96 well plate에 1×10⁵ cells/ml의 cell을 100 μl씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고, PBS 용액으로 씻어주었다. PBS에 녹인 각각의 시료 1, 5, 10, 50, 100 ug/ml과 FBS free DMEM에 녹인 150 uM hydrogen peroxide를 각각의 well에 처리한 후 24 시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 배지를 버리고 PBS로 세척한 후 PBS에 녹인 5 mg/ml MTT 20 ul와 FBS free DMEM 200 ul을 각 well에 처리한 후 알루미늄호일로 차광한 뒤 4 시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 뒤 DMSO를 200 μl 처리한 후 37°C에서 2 시간 방치 후 microplate spectrophotometer를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) Cu/Zn SOD, Mn SOD와 catalase 단백질 발현 측정

Sertoli cell에 hydrogen peroxide를 처리한 후 농도별 시료를 처리하여 항산화 효소인 Cu/Zn SOD, Mn SOD, catalase 단백질 발현에 미치는 영향을 측정하였다. 100 mm tissue culture dish(BD Falcon, USA)에 10% FBS, penicillin(100 U/ml), streptomycin(100 μg/ml)이 첨가된 DMEM 배지에 현탁된 3×10⁵ cells/ml의 cell을 8 ml 씩 넣었다. 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 PBS 용액으로 씻어주었다. PBS에 녹인 각각의 시료 1, 5, 10, 50 μg/ml과 FBS free DMEM에 녹인 150 μM hydrogen peroxide를 각각의 well에 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 세포를 PBS로 2 회 수세한 후 lysis buffer를 첨가

하고 스크래퍼를 이용하여 긁어냈다. 이것을 1.5 ml의 eppendorf tube에 담아 12,000 × g에서 10분간 원심분리 하여 상층액을 취하고 상층액 중의 1 ul를 취해 Bradford's method로 단백질을 정량하였다⁸⁾. 정량한 단백질 25 ug을 10% Tris-glycine gel에 SDS-PAGE를 실시하였다. Nitrocellulose membrane에 120 mA에서 1 시간 동안 transfer를 실시한 후 membrane은 5% skim milk를 이용하여 1 시간 실온에서 blocking하였다. Primary antibody인 Anti-Cu/Zn SOD, Mn SOD와 Anti-catalase는 각각 1 : 1000의 농도로 4℃에서 overnight하여 반응시킨 후 T-PBS로 membrane을 washing하고 secondary antibody로 실온에서 2 시간 반응하였다. Membrane을 ECL kit(Thermo. USA)으로 반응 후 X-ray film(Agpa, Belgium)을 이용하여 develop하였다.

3. 통계처리

실험성적은 평균치 ± 표준편차(Mean ± S.D.)로 나타내었으며, 대조군과 실험군과의 평균의 차이는 Student's t-test로 검정하여 p < 0.05 일 때를 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

III. 결과

1. 覆盆子의 DPPH radical 소거 효과

覆盆子와 ascorbic acid는 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 활성이 증가하였다. 覆盆子 추출물은 1, 5, 10, 50, 100, 500 ug/ml의 농도에서 각각 4.8, 24.6, 39.0, 40.0, 40.5, 41.8%의 DPPH radical 소거 효과를 나타내었다(Fig. 1).

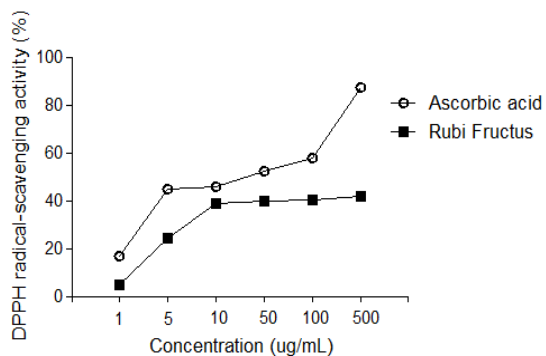


Fig. 1. DPPH radical-scavenging activity of ascorbic acid and water extract of

Rubi Fructus. Values indicate the mean ± S.D. of three replications. 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.

2. 覆盆子가 Sertoli cell의 cell viability에 미치는 영향

覆盆子 추출물 1, 5, 10, 50, 100 ug/ml의 농도에서 Sertoli cell의 생존율은 89.8, 82.7, 81.6, 71.0, 71.7%로 나타났다(Fig. 2).

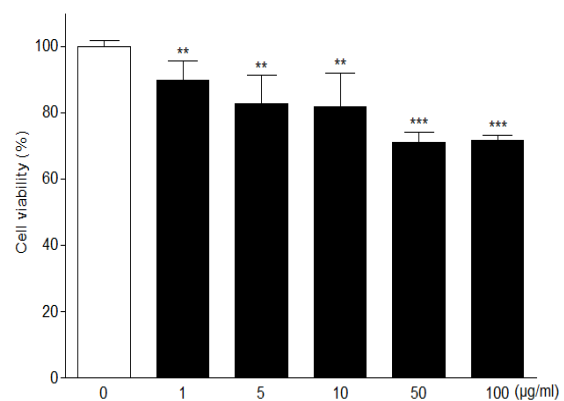


Fig. 2. Effect of water extract of Rubi Fructus on the viability of Sertoli cells. Sertoli cells were treated with Rubi Fructus at 37℃ for 24 h. Each column or point represents the mean ± S.D. (n = 3). * Significantly different from the control (**: p < 0.01, ***: p < 0.001).

3. Hydrogen peroxide로 유도된 cytotoxicity에 대한 覆盆子의 보호효과

Sertoli cell에 대한 cell viability 결과에 근거하여 hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity를 측정하였다. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 Sertoli cell은 정상군에 비하여 56.9%로 유의하게 cell viability가 감소하였다(p < 0.001). Hydrogen peroxide에 의해 유도된 Sertoli cell에 대하여 覆盆子 추출물은 1, 5, 10, 50, 100 ug/ml의 농도에서 각각 77.0, 70.9, 74.0, 86.7, 88.3%로 유의한 보호 효과를 나타내었다(*: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001, Fig. 3).

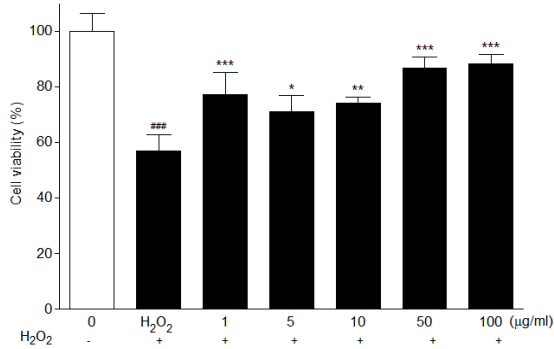


Fig. 3. Protective effect of water extract of Rubi Fructus on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. Sertoli cells treated with Rubi Fructus were incubated in the presence or absence of 150 μ M hydrogen peroxide at 37°C for 24 h. Each column or point represents the mean \pm S.D. (n = 3). # Significantly different from the control (###: p < 0.001) and * significantly different from the cells exposed to hydrogen peroxide alone (*: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001).

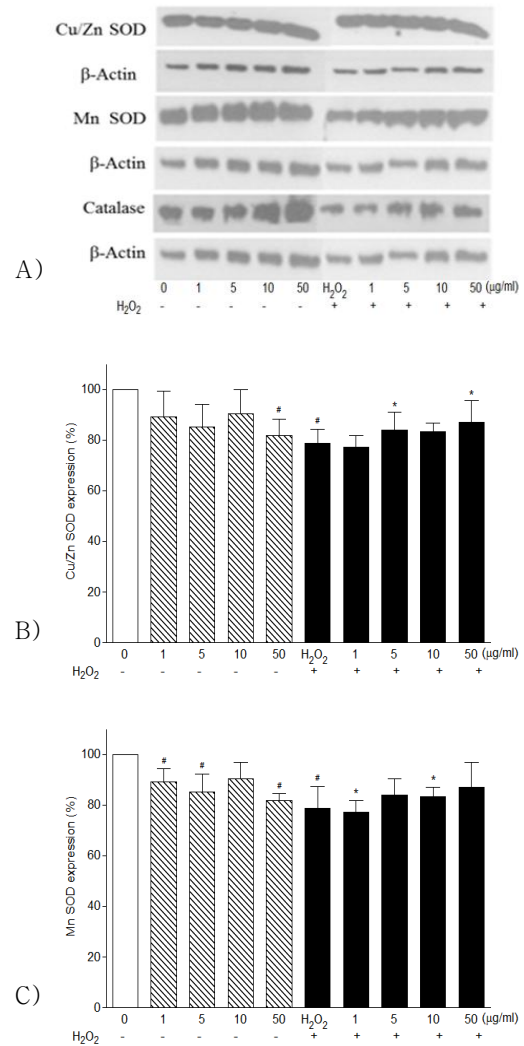
4. 覆盆子が Cu/Zn SOD, Mn SOD, catalase 단백질 발현에 미치는 영향

활성산소를 분해하는 효소인 Cu/Zn SOD, Mn SOD 및 catalase의 단백질 발현량에 대한 영향을 조사하기 위하여 Western blot을 실시하였다(Fig. 4A). Sertoli cell에서 Cu/Zn SOD 단백질 발현량은 覆盆子 추출물 50 ug/ml의 농도에서 정상군에 비하여 81.8%로 유의하게 감소하였다(p < 0.05). Hydrogen peroxide를 단독으로 처리한 대조군의 Cu/Zn SOD 단백질 발현량은 정상군에 비해 78.7%로 유의하게 감소하였고(p < 0.05), hydrogen peroxide와 覆盆子 추출물을 동시 처리한 5, 50 ug/ml의 농도에서 대조군에 비해 80.4, 86.9%로 유의하게 증가하였다(Fig.4B).

Sertoli cell에서 Mn SOD 단백질 발현량은 覆盆子 추출물 1, 5, 50 ug/ml의 농도에서 정상군에 비하여 86.8, 81.1, 85.2%로 유의하게 감소하였다(p < 0.05). Hydrogen peroxide를 단독으로 처리한 대조군의 Mn SOD 단백질 발현량은 정상군에 비해 69.6%로 유의하게 감소하였고(p < 0.05), hydrogen

peroxide와 覆盆子 추출물을 동시 처리한 1, 10 ug/ml의 농도에서 대조군에 비해 Mn SOD 단백질 발현량이 77.8, 82.9%로 유의하게 증가하였다(Fig. 4C).

Sertoli cell에서 覆盆子 추출물을 1, 5, 10, 50 ug/ml의 농도에서 처리한 결과 catalase 단백질 발현량은 정상군에 비하여 유의한 차이를 보이지 않았다. Hydrogen peroxide를 단독으로 처리한 대조군에서 catalase 단백질 발현량이 75.7%로 정상군에 비하여 감소하였으나 유의성은 나타나지 않았으며, hydrogen peroxide와 覆盆子 추출물을 동시 처리한 1, 5, 10, 50 ug/ml의 농도에서 대조군에 비해 catalase 단백질 발현량이 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 4D).



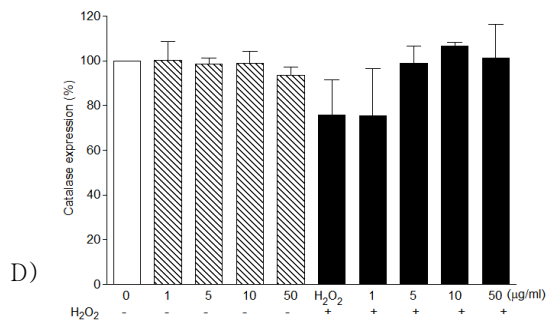


Fig. 4. Effect of water extract of Rubi Fructus on Cu/Zn SOD, Mn SOD and catalase protein expression in Sertoli cells. A) Analysis of Western blotting was done using Cu/Zn SOD, Mn SOD and catalase and β -actin antibody respectively. B) Cu/Zn SOD protein expression C) Mn SOD protein expression D) catalase protein expression. Normal is vehicle treated group. Control is hydrogen peroxide (150 μ M) treated group. Sertoli cells treated with Rubi Fructus (1, 5, 10, 50 μ g/ml) were incubated in the presence of 150 μ M hydrogen peroxide at 37°C for 24 h. β -actin was used as internal control. # Significantly different from the normal value (#: $p < 0.05$) and * significantly different from the cells exposed to hydrogen peroxide alone (*: $p < 0.05$).

IV. 고찰

최근 생식분야 기술의 발달로 불임과 관련한 여성 요인은 대체로 해결이 되어가고 있으며 이에 따라 불임 원인에 대한 관심과 연구는 남성 불임으로 옮겨가고 있는 추세이다⁹⁾. 남성불임은 최근 증가하는 추세에 있으며, 심리적 요인, 생식기의 감염, 주변 환경으로부터 내분비 교란물질에 대한 노출, 유전적 요인 등으로 매우 다양한 요인이 남성불임을 유발하는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾. 남성불임의 50% 정도는 원인이 명확하게 밝혀지지 않은 상황이다¹¹⁾. 그러나 남성불임 환자들에게 유사한 현상이 발견되는데 정자의 농도가 낮거나 운동성이 떨어지거나 형태학적 이상이 발견되는 경우들이다. 특히 정자의 변형이나 형성 장애와 관련하여 흥미로운 보고는 이들 샘플에서 고농도의 활성산소종이 관찰되는 경우가 있다는 점이다

¹²⁾. 정자형성과정의 장애요인 중 최근 중요하게 다루어지는 것이 활성산소이며 다양한 연구결과에 의하여 활성산소가 정자의 기능적 이상을 유발하는 다양한 근거가 제시되고 있다¹³⁾. 체내에서 생화학적 산화반응을 통하여 에너지를 공급받는 과정에서 free radical을 갖는 활성산소종이 발생한다¹⁴⁾. 이러한 작용들이 고환의 간질세포 및 지지세포에서 일어난다면 정자의 발생과정 및 정자의 운동성, 생존능력에 영향을 미치게 된다. 이에 대하여 스스로 방어기구로서 superoxide dismutase(SOD), catalase, peroxidase 등의 항산화효소와 vitamin E, vitamin C, glutathione, ubiquinone, 요산 등과 같은 항산화 물질들이 과산화물로부터 보호 작용을 나타낸다. 이러한 방어기전에 이상이 생기거나 다른 물리적, 화학적 이유로 인하여 활성산소종이 지나치게 생성되면 산화스트레스(oxidative stress)가 유발된다.

覆盆子에 대한 기존 연구로는 비만이 유발된 흰쥐에 覆盆子 추출물을 투여한 결과 몸무게와 cholesterol, LDL, ALT 등이 감소하여 비만의 치료나 예방 효과가 있음이 보고되었다¹⁵⁾.

토종 복분자(*R. coreanus*)가 외래종 복분자(*R. occidentalis*)에 비하여 항산화능이 우수하다는 보고가 있었지만¹⁶⁾, 정자형성 과정 중 Sertoli cell에 대한 覆盆子 추출물의 항산화 효과는 아직 보고되지 않았다.

Sertoli cell은 세정관내에 속하는 지지세포이며 정자형성에 관여하고 있다. DPPH는 그 자체가 매우 안정한 free radical로서 흡광도 517 nm에서 특징적인 광 흡수성을 나타내는 보라색 화합물이다. 대표적인 항산화 물질인 ascorbic acid와 覆盆子 추출물의 농도에 따른 DPPH radical 소거 활성을 비교하였다. 실험 결과 ascorbic acid는 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 활성이 증가하였고, 覆盆子 추출물은 각각 1, 5, 10, 50, 100, 500 μ g/ml의 농도에서 4.8, 24.6, 39.0, 40.0, 40.5, 41.8%의 DPPH radical 소거 효과를 나타내었다. 覆盆子 추출물 500 μ g/ml 농도에서 최대 41.8%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다. 김 등¹⁶⁾의 보고에서 覆盆子 추출물이 1,000 μ g/ml의 농도에서 70% 미만의 DPPH radical 소거 활성을 나타낸 것과 비교하면, 50%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내는 覆盆子 추출물의 농도는 660 μ g/ml 보다 높을 것으로 추정된다.

覆盆子 추출물이 Sertoli cell의 성장 및 증식에 미



치는 영향을 측정하기 위한 MTT assay 결과 1, 5, 10, 50, 100 ug/ml의 농도에서 Sertoli cell의 생존율에 유의한 변화를 미치지 않았다. Sertoli cell에 대한 cell viability 결과에 근거해 hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity를 측정하였다.

정상군의 Sertoli cell에 비하여 hydrogen peroxide 처리한 대조군은 cell viability가 56.9%로 유의하게 감소하였다. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 Sertoli cell에 대하여 覆盆子 추출물은 모든 실험 농도에서 유의한 보호 효과를 나타내었으며, 특히 覆盆子 추출물 100 ug/ml 농도에서 88.3%로 가장 유의성 있는 항산화 효과를 나타내었다.

생체내의 정상적인 대사 과정 중에 완전히 소비되지 않은 전자들은 몸속에 녹아있는 산소 분자를 환원시켜서 매우 독성이 강한 O_2^- 라디칼을 만들어 낸다. 생체는 이러한 O_2^- 로부터 세포를 보호하는 superoxide dismutase(SOD)라는 중요한 효소를 가지고 있다¹⁷⁾.

SOD는 cellular pathway에서 free radical들을 비활성화 시키는 필수적인 효소이다. SOD는 O_2^- 를 기질로 하여 H_2O_2 와 O_2 로 변환시키며, Catalase는 H_2O_2 를 H_2O 와 O_2 로 환원시키는 작용을 한다¹³⁾. 인체 내에는 두 가지 종류의 SOD가 있다고 알려져 있는데 하나는 Cu/Zn SOD(SOD-1)이고 다른 하나는 Mn SOD(SOD-2)이다. Cu/Zn SOD는 광범위한 종류의 세포에서 존재한다¹⁸⁾. Spermatozoa는 free radical damage로부터 손상받기 쉬우며, Cu/Zn SOD는 산화 손상을 방지하는데 중요한 역할을 한다¹³⁾.

Cu/Zn SOD는 세포내 미토콘드리아 외부에서 O_2 를 H_2O_2 로 환원시켜주는 작용을 한다¹⁹⁾. 覆盆子 추출물의 항산화 방어기전을 알아보기 위해 Cu/Zn SOD 단백질 발현량을 측정하였다. Sertoli cell에서 대조군에 비하여 覆盆子 추출물의 Cu/Zn SOD 단백질 발현량이 증가하였으며, 특히 覆盆子 추출물 50 ug/ml 농도에서 86.9%로 유의하게 증가하였다. 따라서 覆盆子 추출물은 hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 Sertoli cell에서 Cu/Zn SOD 단백질 발현량을 증가시켜 항산화 효과가 있음을 확인하였다.

Mn SOD는 세포내 미토콘드리아 내부에서 O_2 를 H_2O_2 로 환원시켜주는 작용을 한다²⁰⁾. 覆盆子 추출물의 항산화 방어기전을 알아보기 위해 Mn SOD 단백질 발현량을 측정하였다. Sertoli cell에서 대조군에 비하여 覆盆子 추출물의 Mn SOD 단백질 발현량이

증가하였으며, 특히 覆盆子 추출물 10 ug/ml 농도에서 82.9%로 유의하게 증가하였다. 따라서 覆盆子 추출물은 hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 Sertoli cell에서 Mn SOD 단백질 발현량을 증가시켜 항산화 효과가 있음을 확인하였다.

Catalase는 많은 환경적인 돌연변이 유발물질(mutagen)을 비활성 시키는 작용에 중요한 작용을 한다. 또한 염색체 변이를 감소시키는 것으로 알려져 있다. Sertoli cells에서 覆盆子 추출물의 항산화 작용을 측정하기 위해 catalase 단백질 발현량을 측정하였으나 유의한 차이를 보이지 않았다.

이상에서 覆盆子 추출물이 Sertoli cell에 미치는 항산화효과의 구체적인 기전을 확인하기 위해 실험을 수행하였다. 실험 결과 覆盆子 추출물은 Sertoli cell에 대한 세포독성이 나타나지 않았으며 DPPH radical 소거 활성과 hydrogen peroxide에 의해 유발된 Sertoli cell의 산화 스트레스에 대한 유의한 보호 효과를 나타내었다. 또한 覆盆子 추출물은 Sertoli cell의 Cu/Zn SOD, Mn SOD 단백질 발현량을 증가시킴으로써 항산화 방어 효과가 있음이 확인되었다. Sertoli cell에서 覆盆子 추출물은 catalase 단백질 발현량에 영향을 미치지 않았다.

이로써 覆盆子가 산화 스트레스로부터 남성 생식세포 Sertoli cell을 보호하는 기전을 통하여 남성 불임 증 치료에 응용될 수 있는 약물임이 확인되었다.

V. 결론

益腎固精의 효능으로 활용되는 覆盆子가 남성생식세포인 Sertoli cell에 작용하는 효과를 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 覆盆子는 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 활성을 증가시켰다.
2. Sertoli cell에 대한 cell viability를 측정된 결과 覆盆子 추출물은 최대 100 ug/ml의 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다.
3. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity에 대하여 覆盆子是 유의하게 Sertoli cell의 생존율을 증가시켰다.
4. 覆盆子是 hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 Sertoli cell에서 Cu/Zn SOD와 Mn SOD의 단백질 발현량을 증가시켰으며, catalase의 단백질

발현량은 유의한 변화가 나타나지 않았다.

이에 覆盆子는 남성생식세포 중 Sertoli cell에 대하여 항산화효과를 가지며, 산화작용에 의한 남성불임의 치료에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2014년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (NRF-2014R1A2A1A11050419)"

References

1. Cooper HJ, Saunders PT. Mouse models of male infertility. *Nat Ganet.* 2002;3(10):790-801.
2. Im G, Park C, Yun GA, Yun EJ, Park JI, Park SG, Hwang BD. Specialized Functions and Hormonal Regulation of Sertoli Cell. *Endocrinology and Metabolism.* 2003;18(2):120-36.
3. Available from:URL:<https://www.mfds.go.kr/herbmed/index.do?nMenuCode=7&code=KHP-N137&includeUrl=/herbmed/view.jsp>
4. Herbology Editorial Committee of Korean Medicine School. *Herbology.* Seoul:Younglimsa. 2004:694-5.
5. Oh MS, Yang WM, Chang MS, Park W, Kim DR, 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.
6. Tanaka N, Nishikawa K, Ishimaru K. Antioxidative capacity of extracts and constituents in *Coruns capitata* adventitious root. *Journal of Agricultural and food Chemistry.* 2003;51(20):5906-10.
7. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
8. Bradfor MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 1976;72:248-54.
9. Lee BH. Various factors related to male infertility. *Chung-Ang Journal of human ecology.* 2002;15:193-202.
10. Lamb D J. Hormonal disruptors and male infertility: Are men at serious risk. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 1997;26:30-3.
11. Reddi PP, Shore AN, Acharya KK, Herr JC. Transcriptional regulation of spermiogenesis: insights from the study of the gene encoding the acrosomal protein SP-10. *J Reprod Immunol.* 2002;53:25-36.
12. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *The New England Journal of Medicine.* 1995;332(5):281-5.
13. Gu W, Morales C, Hecht NB. In male mouse germ cells, copper-zinc superoxide dismutase utilizes alternative promoters that produce multiple transcripts with different translation potential. *J Biol Chem.* 1995;270(1):236-43.
14. Maiorino M, Ursini F. Oxidative Stress, Spermatogenesis and Fertility. *Biol Chem.* 2002;383(3-4):591-7.
15. Jeong MY, Kim HL, Park J, Jung Y, Youn DH, Lee JH, Jin JS, So HS, Park R, Kim SH, Kim SJ, Hong SH, Um JY. *Rubi Fructus* (*Rubus coreanus*) activates the expression of thermogenic genes in vivo and in vitro. *International Journal of Obesity.* 2015;39:456-64.
16. Kim LS, Youn SH, Kim JY. Comparative Study on Antioxidant Effects of Extracts from *Rubus coreanus* and *Rubus occidentalis*. *J Korean Soc of Food Sci Nut.* 2014;43(9):1357-62.
17. Rao B, Soufir JC, Martin M, David G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to mid-piece abnormality and motility. *Gamete Res.* 1989;24:127-3.
18. Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang

- LY. Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1992;89(21):10405-9.
19. Inoue N, Ramasamy S, Fukai T, Nerem RM, Harrison DG. Shear stress modulates expression of Cu/Zn superoxide dismutase in human aortic endothelial cells. Circ Res. 1996;79(1):32-7.
20. De Moraes C, Davel AP, Rossoni LV, Antunes E, Zanesco A. Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. BMC Physiol. 2008;8:12.