

# 益智仁, 杜冲, 白僵蚕 혼합추출물이 남성갱년기 증상 개선에 미치는 영향

박선영 · 안상현<sup>1</sup> · 김호현\*

세명대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 해부학교실

## Effects of *Fructus Amomi Amari*, *Eucommiae Cortex*, *Bombyx Batryticatus* Extract on Improving Symptoms of Late-onset Hypogonadism

Sun Young Park, Sang Hyun Ahn<sup>1</sup>, Ho Hyun Kim\*

Department of Physiology, 1: Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Semyung University

In recent times, the number of men with late-onset hypogonadism has increased, and interest on this topic has also increased. This study was conducted to investigate effects of the mixture extract of *Fructus amomi Amari*, *Eucommiae cortex*, *Bombyx batryticatus* on improve late-onset hypogonadism. The experimental subjects consisted of three groups: a control group consisting of 8-week-old male ICR mice that had undergone no treatment, an aging-elicited group (AE group) consisting of 50-week-old ICR male mice that had undergone no treatment, and a Mixed herbal extract treatment group (MT group) consisting of 50-week-old ICR male mice that had undergone the mixture extract of *Fructus amomi Amari*, *Eucommiae cortex*, *Bombyx batryticatus* treatment (0.1 g/kg/day) for 6 months. After the experiment, the mice from all the experimental groups were dissected, and they were analyzed through histochemical and immunohistochemical methods. The mixture extract of *Fructus amomi Amari*, *Eucommiae cortex*, *Bombyx batryticatus* reduces aging-induced cell damage and oxidative stress and increases the secretion of serotonin and B-endorphin in aged mice, and promotes spermatogenesis in seminiferous tubules and reduces apoptosis and oxidative stress, and increases androgen receptor, 17 $\beta$ -HSD and GnRH, increases the ratio of smooth muscle to collagen fibers in the corpus cavernosum, increases eNOS, decreases PDE-5 and oxidative stress in aged mice, so it improves depression, reproductive, sexual problems caused by Late-onset hypogonadism. the mixture extract of *Fructus amomi Amari*, *Eucommiae cortex*, *Bombyx batryticatus* inhibits the induction of osteoporosis by increasing decreased bone matrix distribution due to aging, increasing the activities of OPC and OPN, which are produced in osteoblasts, and decreasing RANKL, MMP-3 activity, increasing OPG activity. It also reduces muscle damage, oxidative stress, inflammation and apoptosis of muscle tissue, and increases Myo-D in the sartorius muscle of aged mice for improving muscle atrophy caused by by Late-onset hypogonadism.

keywords : Late-onset hypogonadism(LOH), Depression, Reproductive function, Sexual function, Osteoporosis, Muscle atrophy

### 서 론

현재 전 세계적으로 노인 인구가 증가하고 있는 상황에서 우리나라는 2000년에 이미 노인 인구가 10%에 들어섰다. 이는 UN에서 정한 노령화 국가에 해당되며, 총 인구 대비 65세 이상 인구가 7% 이상이라는 뜻으로, 2030년에는 노인 인구가 29.8%에 이를 것으로 예상하고 있다. 이렇듯 노인 인구의 비율이 증가함에 따라 사회적으로 질환에 대한 관심도 변화되고 있는데, 기존의 생명과 관계되는

질환에 대한 관심이 삶의 질과 관계되는 질환에 대한 관심으로 점차 옮겨가고 있으며, 그 중 대표적인 질환으로 갱년기장애가 있다.

고령이 되면 생리적으로 신체적인 변화뿐만 아니라 정신적 변화도 초래되어 삶의 질에 많은 악영향을 발생시킨다<sup>1)</sup>. 여성의 경우 폐경기라는 뚜렷한 신체적 변화가 나타나면서 여성호르몬의 급격한 감소로 인해 제반 증상도 뚜렷하게 나타나므로 갱년기장애의 진단이 쉽게 이루어지지만, 남성의 경우 여성의 폐경기와 같은 뚜렷한 신체적 변화가 없고 남성호르몬의 감소도 여성과 달리 서서히 진행

\* Corresponding author

Sun-Young Park, Department of Physiology, College of Korean Medicine, Semyung University 65, Semyung-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do, Korea

E-mail : blbee@semyung.ac.kr Tel : +82-43-649-1345

Received : 2018/12/26 Revised : 2019/04/03 Accepted : 2019/04/26

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2019.04.33.2.89>

Available online at <https://kmpath.jams.or.kr>

되어 이로 인한 증상도 뚜렷하게 나타나지 않기에 질환으로 인식하지 못하고 남성에게는 갱년기라는 것이 존재하지 않는다고 인식되어 왔다. 하지만 최근 들어 남성에게도 갱년기장애가 발생한다는 인식과 함께 사회적 관심이 집중되면서 이에 대한 진단 및 치료에 대한 연구가 필요한 실정이다.

2005년 ISA(International Society of Andrology), ISSAM(International Society for Study of Aging Male) 및 EAU(European Association of Urology)가 공동으로 제안한 권고안에서 남성갱년기장애는 남성에서 연령이 증가하면서 경험하게 되는 전형적인 증상들과 혈청 테스토스테론 결핍을 동반하는 임상적, 생화학적 증후군으로 정의하고 있으며, 남성갱년기의 증상으로는 성욕감소, 발기부전, 지적활동, 인지기능, 공감감지능력 감소, 우울, 피로, 성급함을 수반하는 기분의 변화, 수면장애, 근육량 및 근력감소, 체모감소 및 피부변화, 골밀도 감소와 이에 따른 골다공증, 골절 위험성 증가 등이 있다고 보고하였다<sup>2-6)</sup>. 일찍이 Werner가 여성의 폐경기와 마찬가지로 남성에게 일어나는 내분비계의 변화를 남성갱년기라 정의한 이후로<sup>7)</sup>, 최근 연구에 따르면 남성 호르몬의 저하에 따른 제반 신체 및 정신 변화를 PADAM(partial androgen deficiency of the aging male), ADAM(androgen decline of aging male), 남성갱년기장애(andropause) 등으로 다양하게 부르고 있으며, 현재는 후기 발현 성선기능저하증(late-onset hypogonadism, LOH)이라는 용어로 정의하고 있다<sup>4)</sup>.

남성갱년기장애에 대한 치료는 남성호르몬을 보충하는 방법이 가장 최선의 방법으로 알려져 있다. 남성호르몬 보충요법은 경구용제, 외용제, 주사제 등의 다양한 방법으로 남성갱년기의 치료에 활용하고 있지만<sup>8)</sup>, 전립선암 발생의 증가, 적혈구 증가증, 수면무호흡증, 심혈관계질환의 증가, 심한 무드 변화, 충동적 성향, 여성형 유방, 체내 수분저류로 인한 체중증가 등의 부작용을 가지고 있으며, 남성호르몬 보충요법을 시행하면 안되는 금기도 다수 존재하여<sup>3,4,9-12)</sup> 남성호르몬 이 외의 장기적으로 사용할 수 있는 보다 안전한 남성갱년기 증상 개선 소재 개발이 필요한 실정이다.

한의학에서는 남성의 신체변화를 腎氣의 성쇠에 따라 8세부터 64세까지 단계별로 설명해 놓았다. 이에 따르면 8세에 腎氣가 實해지는 것을 시작으로 32세까지 신체의 성장이 왕성하게 일어나며, 40세부터는 腎氣가 쇠해지면서 신체의 각 부위 기능이 쇠퇴하게 된다<sup>13)</sup>. 즉, 테스토스테론이 20대부터 감소하기 시작하여 거의 절반 수준으로 떨어져서 이른바 남성갱년기 증후군을 경험하게 되는 40세에 이르면 한의학적으로도 腎氣가 쇠해지기 시작하여 신체 제반 기능의 저하가 발생하는 시기와 부합된다. 이를 바탕으로 40세 이후의 남성갱년기 환자에게서 발생하는 증상들을 한의학적으로 腎氣가 허약하여 발생하는 증상을 비교하였을 때 상당히 일치하는 면이 있기에 腎氣를 보충하는 약물을 남성갱년기장애의 증상 개선에 적용할 수 있을 것이라 생각하였다.

따라서 저자는 이미 補腎효과가 있다고 보고된 益智仁<sup>14)</sup>, 杜沖<sup>15,16)</sup>, 白癩蠟<sup>17)</sup> 등을 일정 비율로 혼합한 추출물이 남성갱년기의 정신적 증상인 우울증과 생식기능 저하, 성기능 저하, 골다공증, 근육량 감소 등 신체적 증상들의 개선에 미치는 영향을 알아보기 위해 조직화학과 면역조직화학적 방법을 이용하여 실험을 진행하였으

며, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

본 실험은 8주령의 수컷 ICR계 생쥐(샘타코, 한국)와 50주령 ICR계 수컷 생쥐(중앙실험동물, 한국)를 사용하였다. 실험동물은 구입 후 항온항습실에서 온도 23±2°C, 습도 55±5%에 적응시킨 후 사용하였다.

본 동물실험은 세명대학교 동물실험윤리위원회의 승인(smecae 18-12-04)하에 실시되었다.

### 2. 益智仁, 杜沖, 白癩蠟 혼합추출물 제조

益智仁, 杜沖, 白癩蠟을 2:1:1로 섞은 혼합물 400 g을 증류수 3000 mL과 함께 둥근 플라스크에 넣고 2시간 동안 100°C에서 가열 추출하였다. 추출된 액체는 rotary evaporator(Eyela, Japan)로 감압 농축한 후 동결건조기로 건조하였으며 분말 40.8 g을 얻었다.

### 3. 실험군의 설정 및 益智仁, 杜沖, 白癩蠟 혼합 추출물 투여

실험군은 대조군(control group), 노화군(aging-elicited group, AE group), 혼합추출물 처치군(Mixed herbal extract treatment group, MT group)으로 분류하였다.

대조군은 아무런 처치를 하지 않았으며 8주령의 ICR계 생쥐로 구성하였고, 노화군과 혼합추출물 처치군은 50주령의 ICR계 생쥐로 구성하였다. 노화군은 별다른 처치 없이 증류수 10 mL을 6개월 동안 투여하였고, 혼합추출물 처치군은 혼합추출물(0.1g/kg)을 증류수 10 mL에 녹여 1일 1회씩 6개월 동안 투여하였다.

### 4. 우울증 개선효과 실험

#### 1) 조직 표본 제작

흰쥐를 ether로 마취하여 두개골을 열어 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌는 brain matrix를 이용하여 흑색질(substantia nigra)을 부분 절개하고 실온에서 24시간동안 10% NBF에 고정하였으며, 고정된 조직은 통상적인 방법으로 paraffin에 포매한 후 5 µm 두께의 연속절편으로 제작되었다.

#### 2) 해마(hippocampus)의 조직화학

해마의 C3지역과 치아이랑에서 피라미드신경세포의 변화를 관찰하기 위해 toluidine blue 염색을 실시하였다.

#### 3) 해마와 흑색질의 면역조직화학

해마와 흑색질 절편을 proteinase K (20 µg/mL)에 5분간 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum에서 2시간동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 mouse anti-8-OHdG (1:100, Santa Cruz Biotech, USA), mouse anti-serotonin (1:100, Santa Cruz Biotech, USA) 그리고 mouse anti-β-endorphin (1:100, Santa Cruz Biotech, USA)에 4°C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 그 다음 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG1 (1:100, DAKO, USA)에 하룻동안 실험실 온도에서 link 하였고, 그 다음 avidin

biotin complex kit (Vector Lab, USA)에 실험실 온도에서 1시간 동안 반응시켰다. 0.01% HCl과 0.05% 3,3'-diaminobenzidine이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하였다.

#### 4) 영상분석

면역조직화학의 결과는 image Pro Plus (Media cybernetics, USA)를 이용한 영상분석을 통해 수치화 (means  $\pm$  standard error) 하였다. 각 군의 표본에서 임의로 선정된 해마부위를 x100 배율에서 촬영한 다음 positive pixels/20,000,000 pixels로 영상 분석 하였다. 피부손상점수와 면역조직화학 결과의 통계는 SPSS software (SPSS 20, SPSS Inc., USA)를 활용하였으며, one-way ANOVA 시행을 통해 유의성 ( $P < 0.05$ )을 검증하고 Duncan's multiple range test로 사후 검증하였다.

### 5. 생식기능 개선효과 실험

#### 1) 조직 표본 제작

흰쥐를 ether로 마취하여 하복부를 절개하여 고환을 적출하였다. 적출한 고환은 주위의 지방조직들을 제거한 후 실온에서 24시간 동안 10% NBF에 고정하였으며, 고정된 조직은 통상적인 방법으로 paraffin에 포매한 후 5  $\mu$ m 두께의 연속절편으로 제작되었다.

#### 2) 시상하부 면역조직화학

시상하부절편을 proteinase K (20  $\mu$ g/ml)에 5분간 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum에서 2시간 동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 mouse anti-GnRH (1:100, Santa Cruz Biotec, USA)에 4°C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 그 다음 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG2a (1:100, DAKO, USA)에 실온에서 24시간 link 하였고, 그 다음 avidin biotin complex kit (Vector Lab, USA)에 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하였다.

#### 3) 고환의 조직화학

고환에 분포하는 정세관 변화를 관찰하기 위해 Masson trichrome 염색을 실시하였다. 우선 50-60°C의 Bouin 용액에서 1시간 동안 매염 처리한 다음 70% 에탄올에서 picric acid를 제거하였다. Weigert iron hematoxylin에서 10분 동안 반응시켜 핵을 염색하고, Biebrich scalet-acid fuchsin와 phosphomolybdic-phosphotungstic acid에서 각각 15분간, aniline blue에 5분간 처리한 후 광학현미경 (BX50, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

#### 4) 고환의 면역조직화학

고환절편을 proteinase K (20  $\mu$ g/ml)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum에서 2시간 동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 mouse anti-BrdU (1:100, Santa Cruz Biotec), mouse anti-Caspase-3 (1:100, Santa Cruz Biotec), mouse anti-AR (1:100, Santa Cruz Biotec, USA), mouse anti-17 $\beta$ -HSD (1:100, Santa Cruz

Biotec), 그리고 mouse anti-8-OHdG (1:100, Santa Cruz Biotec)에 4°C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 그 다음 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG (1:100, DAKO, USA)에 실온에서 24시간 link 하였고, 그 다음 avidin biotin complex kit (Vector Lab, USA)에 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하였다.

#### 5) 영상분석

면역조직화학의 결과는 image Pro Plus (Media cybernetics, USA)를 이용한 영상분석을 통해 수치화 (means  $\pm$  standard error) 하였다. 각 군의 표본에서 임의로 선정된 조직을 x200배율에서 촬영한 다음 positive pixels/20,000,000 pixels로 영상분석 하였다. 면역조직화학 결과의 통계는 SPSS software (SPSS 20, SPSS Inc., USA)를 활용하였으며, one-way ANOVA 시행을 통해 유의성 ( $P < 0.05$ )을 검증하고 Duncan's multiple range test로 사후 검증하였다.

### 6. 성기능 개선효과 실험

#### 1) 조직 표본 제작

흰쥐를 ether로 마취하여 하복부를 절개하여 음경을 적출하였다. 적출한 음경은 주위의 지방조직들을 제거한 후 실온에서 24시간 동안 10% NBF에 고정하였으며, 고정된 조직은 통상적인 방법으로 paraffin에 포매한 후 5  $\mu$ m 두께의 연속절편으로 제작되었다.

#### 2) 음경해면체의 조직화학

음경해면체에 분포하는 평활근과 아교섬유의 분포 변화를 관찰하기 위해 Masson trichrome 염색을 실시하였다. 먼저 50-60°C Bouin 용액에서 1시간 동안 매염 처리한 다음 70% 에탄올에서 picric acid를 제거하였다. Weigert iron hematoxylin에서 10분간 반응시켜 핵을 염색하고, Biebrich scalet-acid fuchsin와 phosphomolybdic-phosphotungstic acid에서 각각 15분간, aniline blue에 5분간 처리하여 평활근(적색)과 아교섬유(청색)를 염색하여 광학현미경 (BX50, Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 영상분석을 통해 음경해면체내 아교섬유에 대한 평활근의 분포비율을 계산하였다.

#### 3) 음경해면체의 면역조직화학

음경의 발기에 관여하는 eNOS와 PDE의 분포 변화와 산화스트레스를 관찰하기 위해 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 먼저 음경절편을 proteinase K (20  $\mu$ g/ml)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum에서 2시간 동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 mouse anti-eNOS (1:100, Santa Cruz Biotec, USA), mouse anti-PDE5A (1:100, Santa Cruz Biotec), 그리고 mouse anti-8-OHdG (1:100, Santa Cruz Biotec)에 4°C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 그 다음 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG2a (1:100, DAKO, USA)에 실온에서 24시간 link 하였고, 그 다음 avidin biotin complex kit (Vector Lab, USA)에 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine과 0.01%

HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하였다. 영상분석을 통해 음경해면체내 eNOS, PDE5A 그리고 8-OHdG의 양성반응을 측정하였다.

#### 4) 영상분석

음경해면체내 아교섬유에 대한 평활근의 분포비율과 면역조직화학 결과를 조사하기 위해 Image pro Plus (Media Cybernetic, USA)를 이용한 영상분석 (image analysis)을 실시하여 수치화 (means  $\pm$  standard error) 하였다. 각 군의 표본에서 임의로 선정된 음경해면체를 x40배율에서 촬영한 다음 positive pixels/20,000,000 pixels로 영상분석하였다. 통계는 SPSS software (SPSS 20, SPSS Inc., USA)를 활용하였으며, one-way ANOVA 시행을 통해 유의성 ( $P < 0.05$ )을 검증하고 Duncan's multiple range test로 사후 검증하였다.

### 7. 골다공증 개선효과 실험

#### 1) 조직 표본 제작

흰쥐를 ether로 마취하여 넙다리뼈를 적출하였다. 적출한 넙다리뼈는 주위의 지방 및 근육조직들을 제거한 후 실온에서 24시간 동안 10% NBF에 고정하였으며, 탈회액 (decalcification solution, BBC, UK)에 12시간 처리하고 세척한 후 통상적인 방법으로 파라핀에 포매하여 5  $\mu$ m 두께로 연속절편을 만들었다.

#### 2) 골다공증 관찰을 위한 조직화학

넙다리뼈 내 변화를 관찰하기 위해 Masson trichrome 염색을 실시하였다. 먼저 50-60°C Bouin 용액에서 1시간동안 매염 처리한 다음 70% 에탄올에서 picric acid를 제거하였다. Weigert iron hematoxylin에서 10분간 반응시켜 핵을 염색하고, Biebrich scalet-acid fuchsin와 phosphomolybdic-phosphotungstic acid에서 각각 15분간, aniline blue에 5분간 처리하여 광학현미경 (BX50, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

#### 3) 뼈모세포 활성 관찰을 위한 면역조직화학

뼈모세포에서 생성되는 osteocalcin (OPC)과 osteopontin (OPN)의 분포변화를 조사하기 위해 mouse anti OPC와 mouse anti OPN를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 먼저 뼈 조직절편을 proteinase K (20  $\mu$ g/ml)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum에서 2시간 동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 mouse anti OPC (1:50, Santa Cruz Biotec, USA)과 mouse anti OPN (1:50, abcam, USA)에 4°C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 그 다음 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG1 (1:100, DAKO, USA)에 실온에서 24시간 link 하였고, 그 다음 avidin biotin complex kit (Vector Lab, USA)에 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하였다.

#### 4) 골다공증 발병조절 관찰을 위한 조직화학

골다공증 발생에 관여하는 Reaction of activation of nuclear factor kappa B ligand (RANKL, 1:50, Santa Cruz Biotec, USA)와 osteoprotegerin (OPG, 1:50, Santa Cruz

Biotec, USA), Matrix Metalloproteinase-3 (MMP-3, 1:100, Santa Cruz Biotec, USA)의 변화를 관찰하기 위해 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

#### 5) 영상분석

면역조직화학 결과를 조사하기 위해 Image pro Plus (Media Cybernetic, USA)를 이용한 영상분석 (image analysis)을 실시하여 수치화 (means  $\pm$  standard error) 하였다. 각 군의 표본에서 임의로 선정된 지역을 x40 또는 x400배율에서 촬영한 다음 positive pixels/20,000,000 pixels로 영상분석 하였다. 통계는 SPSS software (SPSS 23, SPSS Inc., USA)를 활용하였으며, one-way ANOVA 시행을 통해 유의성 ( $P < 0.05$ )을 검증하고 Duncan's multiple range test로 사후 검증하였다.

### 8. 근위축 개선효과 실험

#### 1) 조직 표본 제작

흰쥐를 ether로 마취하여 넙다리네갈래 근육을 적출하였다. 적출한 넙다리네갈래 근육은 주위의 지방조직들을 제거한 후 실온에서 24시간 동안 10% NBF에 고정하였으며, 통상적인 방법으로 파라핀에 포매하여 5  $\mu$ m 두께로 연속절편을 만들었다.

#### 2) 근위축 관찰을 위한 조직화학

넙다리네갈래근 변화를 관찰하기 위해 Masson trichrome 염색을 실시하였다. 먼저 50-60°C Bouin 용액에서 1시간동안 매염 처리한 다음 70% 에탄올에서 picric acid를 제거하였다. Weigert iron hematoxylin에서 10분간 반응시켜 핵을 염색하고, Biebrich scalet-acid fuchsin와 phosphomolybdic-phosphotungstic acid에서 각각 15분간, aniline blue에 5분간 처리하여 광학현미경 (BX50, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

#### 3) 근육퇴화 조절효과 관찰을 위한 면역조직화학

근육퇴화조절 효과를 관찰하기 위해 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 먼저 근육절편을 proteinase K (20  $\mu$ g/ml)에 5분간 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum에서 2시간동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 mouse anti 8-OHdG (1:100, Santa Cruz Biotec, USA), mouse anti p-IkB (1:100, Santa Cruz Biotec, USA), mouse anti Caspase 3 (1:100, Santa Cruz Biotec, USA), mouse anti-8-OHdG (1:100, Santa Cruz Biotec) 그리고 mouse anti MyoD (1:100, Santa Cruz Biotec, USA)에 4°C humidified chamber에서 72시간동안 반응시켰다. 그 다음 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG2a (1:100, DAKO, USA)에 실온에서 24시간 link 하였고, 그 다음 avidin biotin complex kit (Vector Lab, USA)에 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하였다. 영상분석을 통해 근육 내 Caspase 3의 양성반응을 측정하였다.

#### 4) 영상분석

면역조직화학 결과를 Image pro Plus (Media cybernetics, USA)를 이용한 영상분석을 통해 수치화 (means  $\pm$  standard

error) 하였다. 각 군의 표본에서 임의로 선정된 근육을 x100배율에서 촬영한 다음 positive pixels/20,000,000 pixels로 영상분석하였다. 통계는 SPSS software (SPSS 20, SPSS Inc., USA)를 활용하였으며, one-way ANOVA 시행을 통해 유의성 (P<0.05)을 검증하고 Duncan's multiple range test로 사후 검증하였다.

## 결 과

### 1. 우울증 개선효과

#### 1) 해마에서의 조직화학적 변화

해마의 C3지역과 치아이랑에서 피라미드신경세포의 손상이 대조군에 비하여 AE군에서 증가되었고, AE군에 비하여 MT군에서는 감소되었다(Fig. 1A).

#### 2) 해마에서의 면역조직화학적 변화

해마에서 산화적 손상을 나타내는 8-OHdG 양성반응이 대조군에 비하여 AE군에서 증가되었고, AE군에 비하여 MT군에서는 65% 감소되었다.

해마에서 우울증에 관계되는 serotonin 양성반응이 대조군에 비하여 AE군에서 감소되었고, AE군에 비하여 MT군에서는 93% 증가되었다(Fig. 1B, Table 1).

Table 1. The Image Analysis for 8-OHdG, serotonin in mouse brain

Objective	Group		
	Control	AE	MT
8-OHdG	3,948± 235	52,464±2,233	18,218±1,353***
Serotonin	46,067±1,428	11,146± 769	21,496± 629***

Values are mean±deviation(n=10). Image analysis for 20,000,000 pixel cells. \*\*\* p<0.001 compared with AE.

#### 3) 흑색질에서의 면역조직화학적 변화

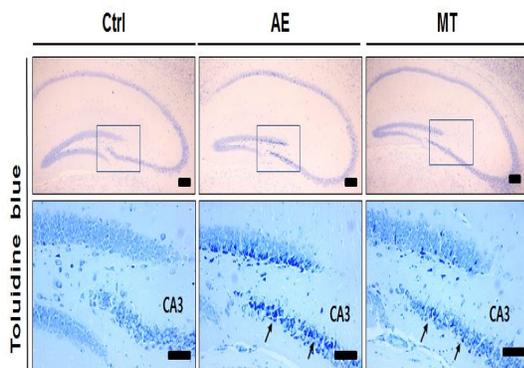
흑색질에서 우울증에 관계되는 β-endorphin 양성반응이 대조군에 비하여 AE군에서 감소되었고, AE군에 비하여 MT군에서는 95% 증가되었다(Fig. 1C, Table 2).

Table 2. The Image Analysis for β-endorphin in mouse brain

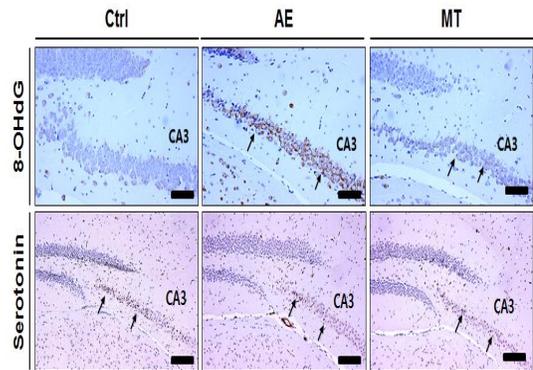
Objective	Group		
	Control	AE	MT
β-endorphin	67,771±2,237	19,871±569	38,766±3,984***

Values are mean±deviation(n=10). Image analysis for 20,000,000 pixel cells. \*\*\* p<0.001 compared with AE.

A



B



C

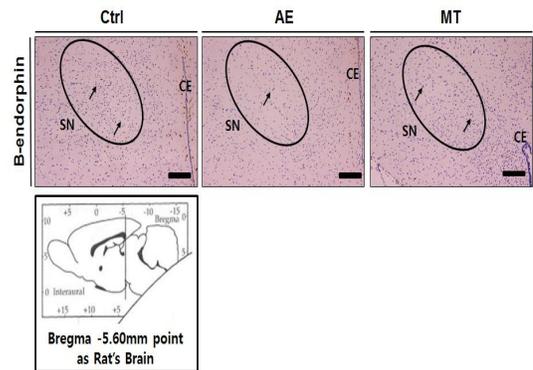


Fig. 1. A: Histochemical changes in hippocampus. Pyramidal neuron damage in the hippocampus C3 area and Dentate Gyrus was increased in the AE group compared to the control group and decreased in the MT group compared to the AE group. Arrow, positive reaction; Ctrl, Control group; AE, Aging-elicited group; MT, Mixed herbal extract treatment group; Bar size, 100 μm. B: Immunohistochemical changes in hippocampus. 8-OHdG positivity was decreased by 65% and serotonin positive response to depression was increased by 93% in the MT group compared to the control group. Arrow, positive reaction; Ctrl, Control group; AE, Aging-elicited group; MT, Mixed herbal extract treatment group; 8-OHdG, 8-OHdG immunohistochemistry; serotonin, serotonin immunohistochemistry; Bar size, 100μm. C: The amelioration of depression in substantia nigra of aging mouse by Mixed herbal extract. The β-endorphin positive response was significantly increased by 95% in the MT group compared to the AE group. Arrow, positive reaction; Ctrl, Control group; AE, Aging-elicited group; MT, Mixed herbal extract treatment group; β-endorphin, β-endorphin immunohistochemistry; SN, substantia nigra (oval shape); lower square, sectional position of brain; Bar size, 50μm;

### 2. 생식기능 개선효과

#### 1) 시상하부에서의 면역조직화학적 변화

시상하부에서 LH 및 FSH를 분비를 자극하는 GnRH 양성반응이 대조군에 비하여 AE군에서 감소되었고, AE군에 비하여 MT군에서는 145% 증가되었다(Fig. 2A, Table 3).

Table 3. The Image Analysis for GnRH in mouse brain

Objective	Group		
	Control	AE	MT
GnRH	23,039±741	4,483±339	11,001±506***

Values are mean±deviation(n=10). Image analysis for 20,000,000 pixel cells. \*\*\* p<0.001 compared with AE.

#### 2) 고환에서의 정자 생성 효과

정세관에서 sertoli 세포의 소실과 정세관내강의 생성된 정자

분포가 대조군에 비하여 AE군에서 감소되었고, AE군에 비하여 MT 군에서는 많은 sertoli 세포와 생성된 정자의 분포가 관찰되었다.

정세관에서 정자생성을 위한 정조세포의 세포분열을 나타내는 BrdU 양성반응이 대조군에 비하여 AE군에서 감소되었고, AE군에 비하여 MT군에서는 64% 증가되었다.

정세관에서 sertoli 세포의 apoptosis 변화를 나타내는 caspase-3 양성반응이 대조군에 비하여 AE군에서 증가되었고, AE 군에 비하여 MT군에서는 36% 감소되었다(Fig. 2B, Table 4).

Table 4. The Image Analysis for BrdU stain, caspase-3 in mouse testis

Objective	Group		
	Control	AE	MT
BrdU	47,125±1,325	17,249± 814	28,228± 523***
Caspase-3	11,552± 672	45,124±1,080	29,096±1,148***

Values are mean±deviation(n=10). Image analysis for 20,000,000 pixel cells. \*\*\* p<0.001 compared with AE.

3) 고환에서의 남성호르몬 및 성장인자 생성효과

정세관에서 테스토스테론이 정세관에 작용하기 위해 필요한 AR 양성반응이 대조군에 비하여 AE군에서 감소되었고, AE군에 비하여 MT군에서는 65% 증가되었다.

사이질 leydig 세포에서 testosterone의 전구물질인 17β-HSD 양성반응이 대조군에 비하여 AE군에서 감소되었고, AE군에 비하여 MT군에서는 63% 증가되었다.

정세관에서 산화스트레스에 의한 손상을 나타내는 8-OHdG 양성반응이 대조군에 비하여 AE군에서 증가되었고, AE군에 비하여 MT군에서는 45% 감소되었다(Fig. 2C, Table 5).

Table 5. The Image Analysis for AR, 17β-HSD, 8-OHdG in mouse testis

Objective	Group		
	Control	AE	MT
AR	71,529±724	21,705± 852	35,730±1,144***
17β-HSD	48,340±984	16,688± 685	27,149±1,104***
8-OHdG	8,531±271	55,617±1,217	30,399± 864***

Values are mean±deviation(n=10). Image analysis for 20,000,000 pixel cells. \*\*\* p<0.001 compared with AE.

3. 성기능 개선효과

1) 음경해면체에서의 평활근 분포 변화

음경해면체에서 아교섬유에 대한 평활근의 비율이 대조군은 1 : 0.077, AE군은 1 : 0.046, MT군은 1 : 0.054로 나타나 AE군에 비하여 MT군에서는 64% 증가되었다(Fig. 3A).

2) 음경해면체에서의 발기조절 효과

음경해면체에서 NO를 합성시키는 eNOS 양성반응이 대조군에 비하여 AE군에서 감소되었고, AE군에 비하여 MT군에서는 80% 증가되었다.

음경해면체에서 발기를 억제하는 PDE-5 양성반응이 대조군에 비하여 AE군에서 증가되었고, AE군에 비하여 MT군에서는 52% 감소되었다.

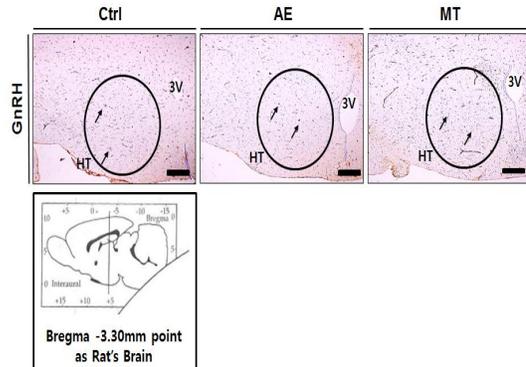
음경해면체에서 산화스트레스에 의한 손상을 나타내는 8-OHdG 양성반응이 대조군에 비하여 AE군에서 증가되었고, AE군에 비하여 MT군에서는 32% 감소되었다(Fig. 3B, Table 6).

Table 6. The Image Analysis for eNOS, PDE-5A, 8-OHdG in carpus cavernosum

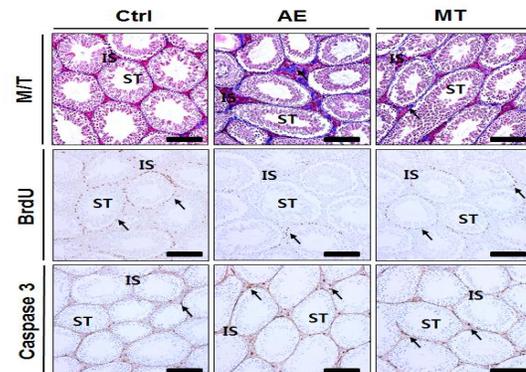
Objective	Group		
	Control	AE	MT
eNOS	65,390±1,041	20,181± 497	36,277±1,081***
PDE-5A	15,072± 651	70,283± 747	33,627±1,124***
8-OHdG	14,758± 912	62,361± 817	42,738± 804***

Values are mean±deviation(n=10). Image analysis for 20,000,000 pixel cells. \*\*\* p<0.001 compared with AE.

A



B



C

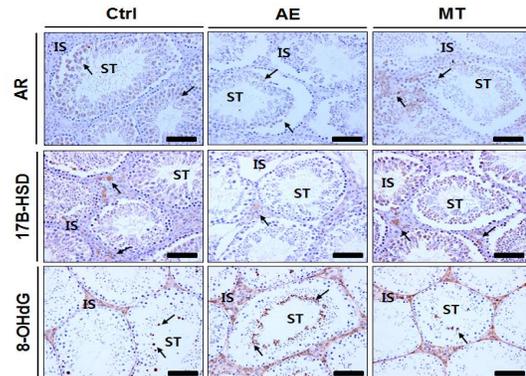


Fig. 2. A: The repair of production of GnRH in hypothalamus of aging mouse by Mixed herbal extract. GnRH positive response to LH and FSH secretion was increased by 145% in the MT group compared to the AE group. Arrow, positive reaction; Ctrl, Control group; AE, Aging-elicited group; MT, Mixed herbal extract treatment group; HT, hypothalamus; 3V, 3th ventricle; circle, hypothalamus region; lower square, sectional position of brain; Bar size, 100µm. B: The repair of spermatogenesis in testis of aging mouse by Mixed herbal extract. The distribution of Sertoli cells and spermatozoa in the MT group was observed compared to the AE group. BrdU-positive cells were increased by 64% in the MT group compared to the AE group. The positive

expression of caspase-3, which indicates the apoptosis of sertoli cells in the seminiferous tubule was decreased by 36% in the MT group compared to the control group. Arrow, positive reaction; Ctrl, Control group; AE, Aging-elicited group; MT, Mixed herbal extract treatment group; M/T, Masson trichrome stain; BrdU, BrdU immunohistochemistry; Caspase-3, Caspase-3 immunohistochemistry; ST, seminiferous tubule; IS, interstitial space; Bar size, 100 $\mu$ m. C: The repair of spermatogenesis intricate hormone in testis of aging mouse by Mixed herbal extract. The AR positive response was increased by 65%, and 17 $\beta$ -HSD, a precursor of testosterone, was increased by 63% in the MT group compared to the AE group. 8-OHdG positive response to oxidative stress was decreased by 45% in the MT group compared to the AE group in testis. Arrow, positive reaction; Ctrl, Control group; AE, Aging-elicited group; MT, Mixed herbal extract treatment group; AR, androgen receptor immunohistochemistry; 17 $\beta$ -HSD, testosterone immunohistochemistry; 8-OHdG, 8-OHdG immunohistochemistry; ST, seminiferous tubule; IS, interstitial space; Bar size, 100 $\mu$ m.

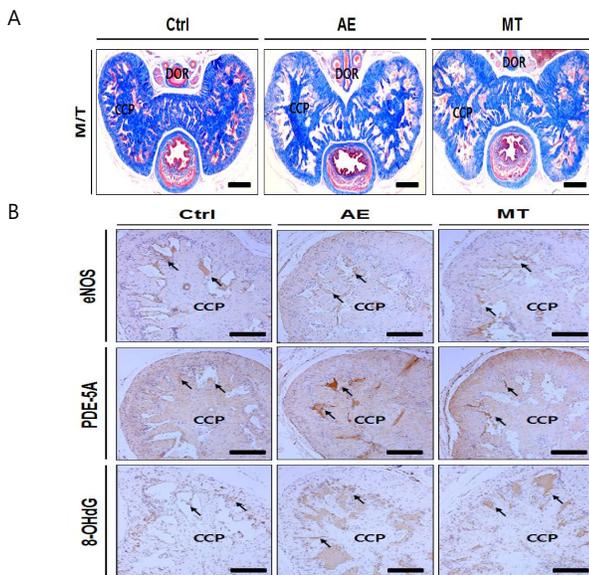


Fig. 3. A: Results of Masson trichrome's stain (M/T) for Penis. The ratio of smooth muscle to collagen fiber in corpus cavernosum was 64% higher in the MT group than in the AE group. Ctrl, Control group; AE, Aging-elicited group; MT, Mixed herbal extract treatment group; CCP, corpus cavernosum of penis. DOR, dorsal region of penis; Bar size, 250 $\mu$ m. B: The repair of penile dysfunction in penis of aging mouse by Mixed herbal extract. eNOS positive reaction to synthesize NO in corpus cavernosum was increased by 80%, PDE-5 positivity, which inhibits erection in the corpus cavernosum was decreased by 52%, 8-OHdG positivity, which indicates oxidative stress-induced damage in the corpus cavernosum was decreased by 32% in the MT group compared to the AE group. Arrow, positive reaction; Ctrl, Control group; AE, Aging-elicited group; MT, Mixed herbal extract treatment group; eNOS, eNOS immunohistochemistry; PDE-5A, PDE-5A immunohistochemistry; 8-OHdG, 8-OHdG immunohistochemistry; Bar size, 100 $\mu$ m

4. 골다공증 개선효과

1) 골다공증 유발 변화

넙다리뼈 내 골다공증 유발영역이 대조군에 비하여 AE군에서 증가되었고, AE군에 비하여 MT군에서는 감소되었다(Fig. 4A).

2) 뼈모세포 활성조절 효과

넙다리뼈에서 골 형성을 나타내는 osteopontin (OPN)과 osteocalcin (OPC) 양성반응이 대조군에 비하여 AE군에서 감소되었고, AE군에 비하여 MT군에서는 OPN 양성반응이 94%, OPC 양성반응이 103% 증가되었다(Fig. 4B, Table 7).

Table 7. The Image Analysis for OPN, OPC in femur

Objective	Group		
	Control	AE	MT
OPN	65,442±2,090	12,773±844	24,802±893***
OPC	76,971±1,339	23,859±918	48,439±861***

Values are mean±deviation(n=10). Image analysis for 20,000,000 pixel cells. \*\*\* p<0.001 compared with AE.

3) 골다공증 유발조절 효과

넙다리뼈 내에서 골 형성을 나타내는 OPG 양성반응이 대조군에 비하여 AE군에서 감소되었고, AE군에 비하여 MT군에서는 99% 증가되었다. 또한 넙다리뼈 내에서 골밀도를 감소시키는 RANKL과 MMP-3 양성반응이 대조군에 비하여 AE군에서 증가되었고, AE군에 비하여 MT군에서는 RANKL 양성반응이 66%, MMP-3 양성반응이 45% 감소되었다(Fig. 4C, Table 8).

Table 8. The Image Analysis for OPG, RANKL, MMP-3 in femur

Objective	Group		
	Control	AE	MT
OPG	63,104±1,166	17,408± 896	34,716± 997***
RANKL	10,943± 681	71,984± 803	24,802± 893***
MMP-3	3,317± 190	66,472±1,175	36,055±1,670***

Values are mean±deviation(n=10). Image analysis for 20,000,000 pixel cells. \*\*\* p<0.001 compared with AE.

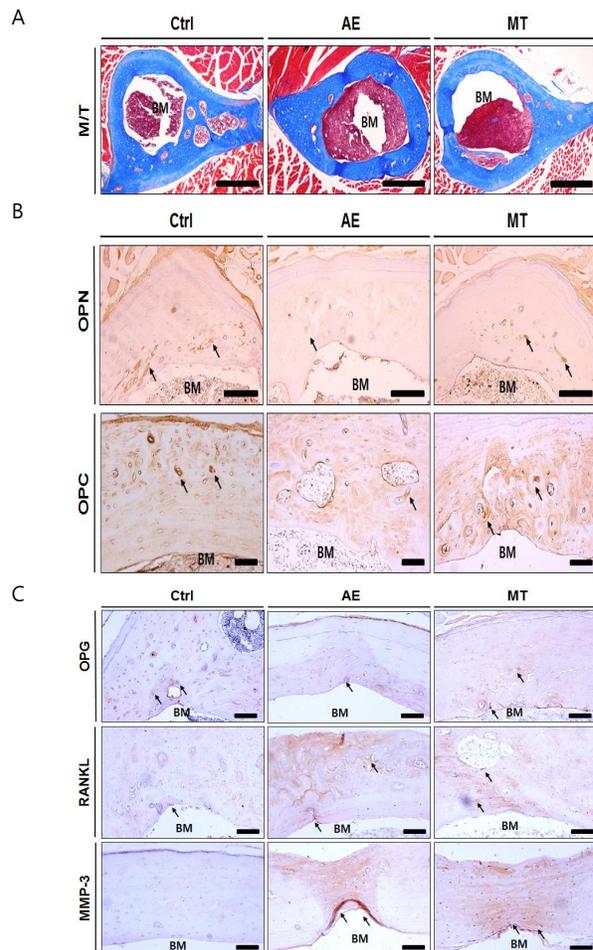


Fig. 4. A: The Results of Masson trichrome stain in femur of mouse. The area of osteoporosis in the femur was decreased in the MT group compared to the AE group. Ctrl, Control group; AE, Aging-elicited group;

MT, Mixed herbal extract treatment group; BM, bone marrow; M/T, Masson's trichrome; Bar size, 50µm. B: Regulatory effects of Mixed herbal extract on osteoblast activity. The osteopontin and osteocalcin positivity were increased in the MT group, the OPN positive response was 94% and the OPC positive response was 103%. Arrow, positive reaction; Ctrl, Control group; AE, Aging-elicited group; MT, Mixed herbal extract treatment group; BM, bone marrow; OPC, osteocalcin; OPN, osteopontin; Bar size, 50µm. C: Regulatory effects of Mixed herbal extract on osteoporosis induction. OPG positivity in the femoral bone was increased by 99%, and RANKL, MMP-3 positivity were decreased by 66% and 45%, respectively in the MT group compared to the AE group. Arrow, positive reaction; Ctrl, Control group; AE, Aging-elicited group; MT, Mixed herbal extract treatment group; BM, bone marrow; RANKL, the receptor for the activation of the nuclear factor kappa B ligand; OPG, osteoprotegerin; MMP-3, Matrix Metalloproteinase- 3; Bar size, 50µm

5. 근위축 개선효과

1) 근육내 지방분포 변화

넙다리내갈래근 내에서 지방의 분포는 대조군에 비하여 AE군에서 증가되었고, AE군에 비하여 MT군에서는 감소되었다(Fig. 5A).

2) 근육내 염증조절 효과

넙다리뼈 근육퇴화가 일어난 근섬유 주변에서 전염증효소인 NF-kB의 활성화에 관여하는 p-IkB 양성반응이 대조군에 비하여 AE군에서 증가되었고, AE군에 비하여 MT군에서는 62% 감소되었다 (Fig. 5B, Table 9).

Table 9. The Image Analysis for p-IkB in muscle

Objective	Group		
	Control	AE	MT
p-IkB	3,287±213	30,128±1,147	11,321±759***

Values are mean±deviation(n=10). Image analysis for 20,000,000 pixel cells. \*\*\* p<0.001 compared with AE.

3) 근육내 apoptosis 유발조절효과

근육내 apoptosis 유발 변화를 관찰하기 위한 실험결과 넙다리뼈에서 근육퇴화가 일어난 근섬유 주변 근위성세포에서 apoptosis 정도를 나타내는 caspase-3 양성반응이 대조군에 비하여 AE군에서 증가되었고, AE군에 비하여 MT군에서는 55% 감소되었다(Fig. 5C, Table 10).

Table 10. The Image Analysis for caspase-3 in muscle

Objective	Group		
	Control	AE	MT
Caspase-3	2,337±114	45,719±1,445	20,569±617***

Values are mean±deviation(n=10). Image analysis for 20,000,000 pixel cells. \*\*\* p<0.001 compared with AE.

4) 근육내 근위성세포의 활성화

근육퇴화가 일어난 근섬유 주변 근위성세포에서 근육생성을 조절하는 Myo-D 양성반응이 대조군에 비하여 AE군에서 감소되었고, AE군에 비하여 MT군에서는 226% 증가되었다(Fig. 5D, Table 11).

Table 11. The Image Analysis for MyoD in muscle

Objective	Group		
	Control	AE	MT
MyoD	63,913±1,324	9,847±524	32,111±1,228***

Values are mean±deviation(n=10). Image analysis for 20,000,000 pixel cells. \*\*\* p<0.001 compared with AE.

5) 근육내 산화스트레스 조절효과

근육내 산화스트레스의 조절을 관찰하기 위한 실험 결과 근육 퇴화가 일어난 근섬유 주변에서 산화스트레스에 의한 손상을 나타내는 8-OHdG 양성반응이 대조군에 비하여 AE군에서 증가되었고, AE군에 비하여 MT군에서는 70% 감소되었다(Fig. 5E, Table 12).

Table 12. The Image Analysis for 8-OHdG in muscle

Objective	Group		
	Control	AE	MT
8-OHdG	3,806±250	50,339±1,559	15,137±983***

Values are mean±deviation(n=10). Image analysis for 20,000,000 pixel cells. \*\*\* p<0.001 compared with AE.

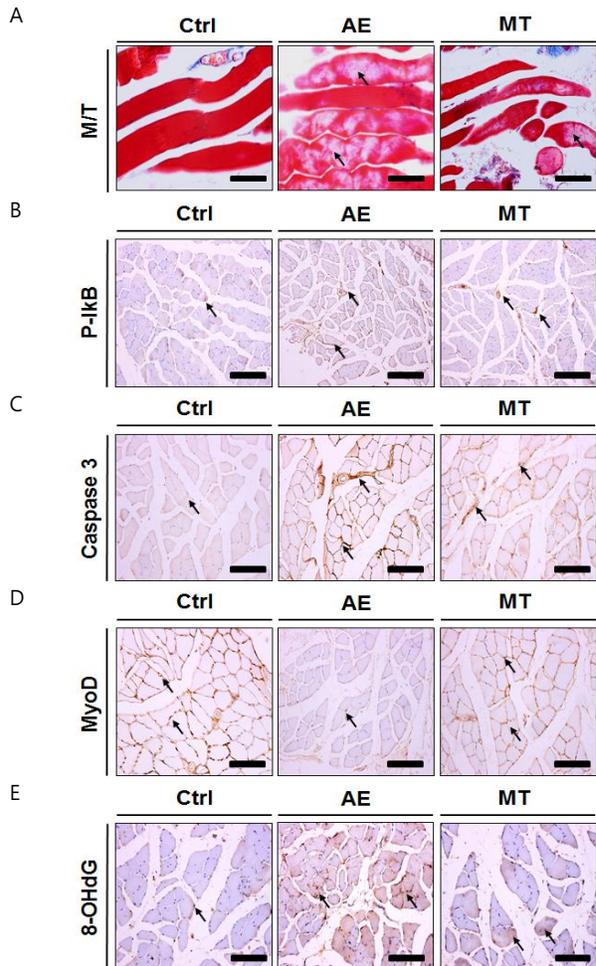


Fig. 5. A: The Results of Masson trichrome stain in quadriceps femoris of mouse. The distribution of fat in quadriceps femoris decreased in the MT group compared to the AE group. Ctrl, Control group; AE, Aging-elicited group; MT, Mixed herbal extract treatment group; M/T, Masson's trichrome; Bar size, 100µm. B: Regulatory effects of Mixed herbal extract on inflammation in quadriceps femoris. The p-IkB positivity, which is involved in the activation of the proinflammatory enzyme NF-kB, was decreased by 62% in the MT group compared with the AE group. Arrow, positive reaction; Ctrl, Control group; AE, Aging-elicited group; MT, Mixed herbal extract treatment group; p-IkB, p-IkB immunohistochemistry; Bar size, 50µm. C: Regulatory effects of Mixed herbal extract on apoptosis induction in quadriceps femoris. caspase-3 positive response to apoptosis in the proximal muscle cells of the muscle fibers, which developed muscle degeneration in the femur, was decreased by 55% in the MT group compared with the AE group. Arrow, positive reaction; Ctrl, Control group; AE, Aging-elicited group; MT, Mixed herbal extract treatment group;

Caspase-3, caspase-3 immunohistochemistry; Bar size, 50 $\mu$ m. D: Changes in activity of satellite cells. Myo-D positivity was increased by 226% in the MT group compared to the AE group. Arrow, positive reaction; Ctrl, Control group; AE, Aging-elicited group; MT, Mixed herbal extract treatment group; Myo-D, Myo-D immunohistochemistry; Bar size, 50 $\mu$ m. E: Regulatory effects of Mixed herbal extract on oxidative stress. 8-OHdG positivity, which is caused by oxidative stress, was reduced by 70% in the MT group compared to the AE group. Arrow, positive reaction; Ctrl, Control group; AE, Aging-elicited group; MT, Mixed herbal extract treatment group; 8-OHdG, 8-OHdG immunohistochemistry; Bar size, 50 $\mu$ m

## 고찰

최근 단순한 수명 연장이 아닌 건강하고 활기찬 삶을 영위하려는 욕구가 증가함에 따라 남성갱년기를 질환으로 자각하게 되었고, 40대에서 50대 사이 중년 남성에서 나타나는 가장 두드러지는 변화 현상으로 인식하며 중요한 인생의 전환기로 보는 관점이 대두되고 있다<sup>18,19</sup>.

남성갱년기는 남성호르몬인 테스토스테론의 저하가 가장 큰 원인으로 알려져 있으며<sup>20</sup>, 40-50대에 분비가 감소되면서 우울, 짜증, 성에 대한 흥미 감소, 발기부전, 골다공증, 복부비만, 근육량 감소, 근위축 및 안면홍조 등의 증상이 나타나게 된다<sup>7,21,22</sup>. 이러한 남성갱년기의 증상은 남성갱년기의 정신적 증상인 우울, 짜증과 생식기능 저하, 발기부전 등의 성기능 저하, 골다공증, 근육량 감소 등 신체적 증상으로 나누어 볼 수 있다.

현재까지 남성호르몬 보충요법이 대표적인 남성갱년기 치료법이며, 남성갱년기로 인해 발생하는 신체 증상에 다양한 이득이 있다는 임상적 근거가 많이 보고되었다<sup>23,24</sup>. 하지만 호르몬 보충요법의 유용성에 대한 연구들이 많이 보고되었음에도 불구하고 장기적인 효과와 안정성, 안전성에 대한 논란이 있는 것도 사실이다<sup>25-27</sup>. 또한 호르몬 보충요법은 사용할 수 없는 여러 가지 금기들도 존재하여 활용이 자유롭지 못하다. 따라서 장기적으로 사용할 수 있는 보다 안전한 남성갱년기 증상 개선 소재 개발이 요구된다.

갱년기에 대한 연구는 대부분 여성갱년기를 중심으로 이루어지고 있으며, 남성갱년기에 대한 연구는 미비한 실정이다. 또한 남성갱년기 관련 연구도 주로 남성갱년기와 호르몬과의 관계 또는 남성갱년기로 인해 발생하는 개별 증상에 대한 연구들이 주를 이루고 있다. 하지만 최근 들어 남성갱년기의 제반증상을 대상으로 하는 연구가 증가하고 있으며, 특히 천연물 소재를 이용한 남성갱년기 연구가 활발히 진행 중이다<sup>28-30</sup>. 그러나 이러한 연구들도 생식기능 및 성기능에 중점을 두고 있거나 일부 신체적 증상 개선을 중심으로 한 연구들이 대부분으로, 남성갱년기의 정신적 및 신체적 증상을 포괄적으로 개선하고자 하는 연구는 없다.

한의학적으로 남성갱년기에 대한 표현은 없지만男性的 신체변화를 나타낸 素問의 上古天真論을 바탕으로 살펴보면 남성갱년기 증상이 발현되기 시작하는 40세에 한의학적으로는 腎氣虛衰로 인해 남성 신체 기능의 쇠퇴가 나타난다고 언급되어 있다<sup>13</sup>. 이로 미루어보아 남성갱년기로 인해 발생하는 증상이 腎氣虛衰가 원인일 가능성이 있으며, 補腎 약물이 남성갱년기의 증상을 개선시킬 수 있을 것으로 판단하였다.

益智仁은 性이 溫하고 味가 辛하면서 溫脾胃攝涎, 溫腎固精

縮尿의 효능으로 남자가 허약하여 大小便不禁이 나타나거나 소아의 夜尿症 등에 효과를 나타내고<sup>31</sup>, 杜沖은 性이 溫하고 味가 甘微辛하면서 주로 肝腎經으로 귀경하여 補肝腎, 強筋骨, 安胎의 효능으로 腰酸酸疼, 小便餘瀝, 陰下濕痒 등에 많이 사용하며<sup>32-34</sup>, 白僵蠶은 性이 平無毒하고 味가 辛鹹하면서 除風濕, 清熱, 活絡의 효능으로 頭痛, 眩暈, 腎臟疾患의 치료에 활용된다<sup>35,36</sup>. 또한 益智仁, 杜沖, 白僵蠶 등이 각각 이미 성기능개선 효능을 가지는 것으로 보고되었기에<sup>14-17</sup> 이들을 일정 비율로 혼합한 추출물도 남성갱년기 개선 효능을 가질 것으로 생각된다.

이에 저자는 益智仁, 杜沖, 白僵蠶 혼합추출물이 남성갱년기에 미치는 영향을 조직화학 및 면역조직화학적 방법을 이용하여 우울증, 생식기능 저하, 성기능 저하에 대한 효과 및 골다공증과 근위축에 미치는 효과를 중심으로 연구하여 유의한 결과를 얻었다.

우울증 개선효과 실험에서 해마의 C3지역과 치아이랑에서 피라미드신경세포의 손상이 MT에서 AE군에 비해 감소하였다.

해마는 대뇌변연계의 측두엽에 위치하는 부위로 학습 및 기억, 감정 및 공격성 등을 담당하며<sup>37</sup>, 다수의 연구에서 우울증 환자의 해마용적이 감소되었다고 보고되었고, 특히 재발성 우울증과 조기 발병된 우울증 등에서는 해마의 용적이 비교적 일관되게 감소되었다는 보고가 있다<sup>38,39</sup>. 해마는 치상회를 구성하는 과립세포와 암몬각에 존재하는 CA1, CA3 피라미드신경세포로 구성되어 있는데 益智仁, 杜沖, 白僵蠶 혼합추출물의 투여로 이 신경세포의 손상이 감소된 결과는 혼합추출물이 우울증에 관계된 해마부위의 세포 손상을 예방함으로써 남성갱년기로 인해 발생하는 우울증을 개선시킬 수 있을 것이라 생각된다.

남성갱년기 유발 요인 중의 하나로 대두되는 활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 세포의 정상적 산소대사의 산물이며, ROS의 생성과 제거의 부조화를 유발하여 산화적 스트레스를 발생시키며, 과도한 ROS의 생성은 세포의 단백질과 지방질 및 DNA를 손상시키는 산화적 손상을 초래한다<sup>40-42</sup>. 8-OHdG는 산화적 손상의 중요한 기전 중 하나인 세포핵과 미토콘드리아의 DNA에 대한 손상을 일으키는 물질로, 혼합추출물에 의해 8-OHdG 양성반응이 감소된 결과는 해마조직의 DNA 손상을 유의하게 억제시켰다는 것을 보여준다.

또한 serotonin의 이용률 저하가 우울증, 불안장애, 자살 등과 관련이 있는 것으로 알려졌다<sup>43</sup>,  $\beta$ -endorphin은 통증이나 기쁨과 같은 상황에서 뇌하수체에서 분비되는 엔돌핀 중 가장 강력한 것으로 뇌하수체에서 만들어진다<sup>44,45</sup>. 혼합추출물에 의해 serotonin과  $\beta$ -endorphin 양성반응이 유의하게 증가된 결과는 해마에서 serotonin 및 흑색질에서  $\beta$ -endorphin의 분비를 자극하여 남성갱년기의 우울증 개선에 효과를 나타낼 것으로 예상된다.

한편 시상하부에서 분비되는 gonadotropin releasing hormone(GnRH)은 뇌하수체를 자극하여 LH 및 FSH를 분비시킨다. 이 때 분비된 LH는 leydig 세포에 작용하여 testosterone의 합성 및 분비를 유도하여 정소세포에서 정자형성을 촉진하고, FSH는 sertoli 세포에 작용하여 다양한 방법으로 정소세포로부터 정자형성과정을 유도하며 생식세포들을 보호한다<sup>46,47</sup>.

본 실험에서 GnRH 양성반응이 AE군에 비하여 MT군에서 증

가된 것은 혼합추출물이 시상하부에서 GnRH 분비를 자극하여 생식기능 저하를 개선시킨 것으로 보인다.

또한 AE군에 비하여 MT군의 정세관에서 많은 sertoli 세포와 생성된 정자 분포가 관찰되었고, BrdU 양성반응을 보이는 정조세포의 분포가 유의하게 증가되었으며, caspase-3 양성반응이 감소되었다. 이것은 혼합추출물이 고환에서 정조세포의 세포분열을 활발하게 하고, sertoli 세포의 apoptosis를 감소시켜 정자 형성을 증가시키며, 이를 통해 남성갱년기의 생식기능 저하를 개선시키는 것으로 생각된다.

Androgen receptor(AR)는 테스토스테론이 정세관에 작용하기 위해 필요한 수용체이고, 17 $\beta$ -HSD는 테스토스테론의 전구물질로<sup>48)</sup>, AE군에 비하여 MT군에서 AR와 17 $\beta$ -HSD 양성반응이 증가된 것은 혼합추출물이 테스토스테론의 생성에 관여하여 남성갱년기의 생식기능 저하를 예방하는 것으로 보인다.

고환에서 8-OHdG 양성반응이 AE군에 비하여 MT군에서 감소되었는데, 이것은 높은 수준의 ROS는 정자의 운동성을 감소시키므로<sup>49)</sup> 혼합추출물이 고환 내 산화스트레스를 감소시키는 경로를 통해서도 남성갱년기 생식기능 저하를 개선시킨다는 사실을 알 수 있다.

성기능과 관련하여 음경해면체에서 아교섬유에 대한 평활근의 비율이 AE군에 비하여 MT군이 증가되었고, eNOS 양성반응은 증가, PDE-5 양성반응은 감소되었다. eNOS는 발기에 중요한 역할을 하는 NO를 합성시키는 물질이고<sup>50)</sup>, PDE-5는 NO가 음경해면체 평활근에서 cGMP를 활성화시키는 작용을 방해함으로써 발기를 억제하는 물질이다<sup>51)</sup>. 즉, 혼합추출물이 음경해면체 평활근에 작용하여 NO의 생성을 증가시키고 PDE-5의 작용을 억제시킴으로써 남성갱년기 성기능 감퇴를 개선시킨다는 것을 알 수 있다.

음경해면체에서도 산화스트레스 손상지표인 8-OHdG 양성반응이 AE군에 비하여 MT군에서 감소되어 혼합추출물이 음경해면체에서 발생하는 산화스트레스를 감소시켜 남성갱년기 성기능 개선에 기여하는 것으로 생각된다.

다음으로 골다공증 유발영역 비율이 AE군에 비하여 MT군에서 감소되었고, OPN과 OPC 및 OPG 양성반응이 모두 MT군에서 증가되었으며, RANKL과 MMP-3 양성반응은 감소되었다.

뼈모세포에서 생성되는 osteocalcin (OPC)과 osteopontin (OPN)은 골 흡수를 저하시키고 골 형성을 나타내는 지표이며<sup>52,53)</sup>, OPG도 조골세포를 활성화시키고, 파골세포를 억제하여 골 형성을 증가시키는 작용을 하며, RANKL(receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand)은 골밀도를 감소시키고<sup>54,55)</sup>, MMP-3은 연골기질의 미란, 균열 등을 초래하는 인자이다<sup>56)</sup>. 따라서 혼합추출물이 뼈모세포에서 골형성을 증가시키고 골흡수를 억제하여 남성갱년기 골다공증을 예방하는 것으로 생각된다.

또한 근육내 지방분포 비율이 AE군에 비하여 MT군에서 감소되어 혼합추출물의 남성갱년기로 인한 근위축 개선효과를 확인할 수 있었다.

근육퇴화가 일어난 근섬유 주변에서 염증효소전사인자인 NF- $\kappa$ B의 활성을 나타내는 p-I $\kappa$ B 양성반응과 apoptosis의 정도를 나타내는 caspase 3 양성반응이 모두 AE군에 비하여 MT군에서

감소되었다. 이는 혼합추출물이 근육 내 염증발생 및 apoptosis를 감소시킴으로써 남성갱년기에 발생하는 근위축을 개선시키는 효과를 나타낸다는 것을 보여준다.

Myo-D는 근위성세포에서 근육생성을 조절하는 인자이고<sup>57)</sup>, 8-OHdG는 근육에서도 산화적 손상 정도를 반영하는 인자로, AE군에 비하여 MT군에서 Myo-D 양성반응은 증가되었고 8-OHdG 양성반응은 감소되었다. 이 결과는 혼합추출물이 근육에서의 산화스트레스를 감소시키고 근육 생성을 자극함으로써 남성갱년기로 인해 발생하는 근위축을 예방한 것으로 보인다.

이상의 결과를 종합해보면 혼합추출물은 남성갱년기의 증상인 우울증, 생식기능과 성기능 감퇴, 뼈와 근육 이상을 개선시키는 효과가 있는 것으로 생각되며, 이를 바탕으로 남성갱년기 개선 소재로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

## 결론

益智仁, 杜冲, 白僵蚕 혼합추출물이 남성갱년기 증상 전반에 대한 개선효과를 검증하기 위하여 우울증, 생식기능 저하, 성기능 저하, 골다공증 및 근위축에 미치는 영향을 중심으로 연구를 진행하였다.

益智仁, 杜冲, 白僵蚕 혼합추출물은 해마의 C3지역과 치아이라에서 피라미드신경세포의 손상을 감소시켰고, 해마에서 8-OHdG 양성반응 감소시키고 serotonin 양성반응은 증가시켰으며, 흑색질에서  $\beta$ -endorphin 양성반응을 증가시켜 우울증과 관련된 지표가 개선되었다.

시상하부에서 GnRH 양성반응이 증가되었고, 정세관에서 sertoli 세포와 생성된 정자 분포 및 BrdU양성반응을 보이는 정조세포가 증가되었다. 또한 AR과 17 $\beta$ -HSD 양성반응은 증가되었고, caspase-3 양성반응은 감소되어 고환의 손상과 정자생성기능이 개선되었다.

음경해면체에서 eNOS 양성반응은 증가된 반면 PDE-5 양성반응은 감소되었고, 아교섬유에 대한 평활근의 비율이 증가되어 음경의 발기에 관계된 지표들이 개선되었다.

뱀다리뼈에서 OPN, OPC, OPG의 양성반응은 증가되었고, RANKL과 MMP-3의 양성반응은 감소되어 골형성 촉진과 골흡수 억제를 통하여 골다공증을 감소시켰다.

뱀다리네갈래근에서 Myo-D 양성반응은 증가되었으나 p-I $\kappa$ B, caspase-3, 8-OHdG 양성반응은 모두 감소되어 근육손상을 방지하고 근육생성을 촉진하여 근위축을 개선시켰다.

이상의 결과 益智仁, 杜冲, 白僵蚕 혼합추출물은 우울증, 생식기능 저하, 성기능 저하, 뼈와 근육 이상을 개선시키는 효과가 있는 것으로 생각되며, 남성갱년기의 전반적 증상 개선을 위한 소재로 활용할 수 있을 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 충청북도와 제천시의 지원으로 이루어진 생활밀착형 천연물소재 제품 연구개발 과제에 일환으로 진행됨.

## References

1. Araujo AB, Esche GR, Kupelian V, O'Donnell AB, Travison TG, Williams RE, et al. Prevalence of symptomatic androgen deficiency in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Nov;92(11):4241-7.
2. Morales A, Lunenfeld B. Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males. Official recommendations of ISSAM. International Society for the Study of the Aging Male. *Aging Male.* 2002 Jun;5(2):74-86.
3. Nieschlag E, Swerdloff R, Behre HM, Gooren LJ, Kaufman JM, Legros JJ, et al. Investigation, treatment, and monitoring of late-onset hypogonadism in males: ISA, ISSAM, and EAU recommendations. *J Androl.* 2006 Mar-Apr;27(2):135-7.
4. Nieschlag E, Swerdloff R, Behre HM, Gooren LJ, Kaufman JM, Legros JJ, et al. Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males. ISA, ISSAM, and EAU recommendations. *Eur Urol.* 2005 Jul;48(1):1-4.
5. Nieschlag E, Swerdloff R, Behre HM, Gooren LJ, Kaufman JM, Legros JJ, et al. Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males: ISA, ISSAM, and EAU recommendations. *Int J Androl.* 2005 Jun;28(3):125-7.
6. Lunenfeld B, Saad F, Hoese CE. ISA, ISSAM and EAU recommendations for the investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males: scientific background and rationale. *Aging Male.* 2005 Jun;8(2):59-74.
7. Werner AA. The male climacteric. *J Am Med Assoc.* 1946 Sep 28;132:188-94.
8. Min KS, Kang DI. Testosterone replacement therapy and monitoring for the male patients with testosterone deficiency syndrome. *J Korean Med Assoc.* 2011 Feb;54(2): 197-20.
9. Calof OM, Singh AB, Lee ML, Kenny AM, Urban RJ, Tenover JL, et al. Adverse events associated with testosterone replacement in middle-aged and older men: a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2005 Nov;60(11):1451-7.
10. Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, Matsumoto AM, Snyder PJ, Swerdloff RS, et al. Testosterone therapy in men with androgen deficiency syndromes: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Jun;95(6):2536-59.
11. Wang C, Nieschlag E, Swerdloff RS, Behre H, Hellstrom WJ, Gooren LJ, et al. ISA, ISSAM, EAU, EAA and ASA recommendations: investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males. *Aging Male.* 2009 Mar;12(1):5-12.
12. Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, Matsumoto AM, Snyder PJ, Swerdloff RS, et al. Testosterone therapy in men with androgen deficiency syndromes: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Jun;95(6):2536-59.
13. Lee KW. *Huangjenaegyeongsomun*, Seoul: Yeogang press; 2001. p. 31-8.
14. Park SY. The Relaxation Effects of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* on Isolated *Corpus Cavernosum Smooth Muscle*. *Kor J Herbol.* 2015;30(4):61-9.
15. Park SY. Relaxation Effects of *Eucomiae Cortex* in Isolated Rabbit *Corpus Cavernosum Smooth Muscle*. *J Physiol & Pathol Korean Med.* 2015;29(6):485-91.
16. Wang YS. *Pharmacological applications of chinese medicine*. Beijing: People's medical publishing house; 1983. p. 485-6.
17. Whang KT, Han JH, Kang SY. Effect of *Batryticatus bombycis* on the cerebral hemodynamics of rats. *KOMP* 1999;7(2):121-30.
18. Kim JJ. *Andropause*. *KU today.* 2003;autumn:32-3.
19. Diamond J. *Male menopause*. Illinois: Sourcebooks; 1997.
20. Shores MM, Matsumoto AM. Testosterone, aging and survival: biomarker or deficiency. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2014 Jun;21(3):209-16.
21. Juul A, Skakkebaek NE. Androgens and the ageing male. *Hum Reprod Update.* 2002 Sep-Oct;8(5):423-33.
22. Kabir MR, Al-Amin MA, Siddique MA. *Andropause: The Male Climacterium*. *TAJ* 2008; 21(1): 87-92.
23. Gray A, Feldman HA, McKinlay JB, Longcope C. Age, disease, and changing sex hormone levels in middle-aged men: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991 Nov;73(5):1016-25.
24. Harman SM, Metter EJ, Tobin JD, Pearson J, Blackman MR. Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Feb;86(2):724-31.
25. Gruenewald DA, Matsumoto AM. Testosterone supplementation therapy for older men: potential benefits and risks. *J Am Geriatr Soc.* 2003 Jan;51(1):101-15.
26. Rhoden EL, Morgentaler A. Risks of testosterone-

- replacement therapy and recommendations for monitoring. *N Engl J Med.* 2004 Jan 29;350(5):482-92.
27. Muller M, van der Schouw YT, Thijssen JH, Grobbee DE. Endogenous sex hormones and cardiovascular disease in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Nov;88(11):5076-86.
  28. Lee KS, Lee EK, Kim SY, Kim TH, Kim HP. Effect of mixed extract of Fenugreek seeds and *Lespedeza cuneata* on testosterone deficiency syndrome. *Korean J Food Sci Technol.* 2015;47(4):492-8.
  29. Kim TM, Jung HK, Jang JH, Sim MO, Lee MJ, Cho JH, et al. Effect of Corni Fructus on testosterone deficiency syndrome in *In vitro* and *In vivo*. *Kor J Pharmacogn.* 2016;47(3):264-72.
  30. Lee HS, Baek YS, Kim YS, Kim HP. Effects of Fermented dandelion(*Taraxacum coreanum*) extract on male climacteric syndrome. *J Life Science.* 2016;26(9):1063-73.
  31. Shin MK. *Clinical Herbology*. 2nd ed. Seoul: Younglim press; 2002. p. 224-5.
  32. Heo J. *Donguibogam*. Seoul: Namsandang; 1966. p. 741.
  33. Ho SR. *Local medicine of Chinese*. Heilongjiang: Heilongjiang science and technology press; 1989. p. 270-3.
  34. Lee SJ. *Bonchogangmok*. 2nd ed. Beijing: People's medical publishing house; 1982. p. 1986-7.
  35. Shin MK. *Clinical traditional herbology*. 1st ed. Seoul: Younglim press; 1992. p. 663-4.
  36. Kim CM, Shin MK, Lee KS, Ahn DK. *The encyclopedia of oriental herbal medicine*. Seoul: Jungdam books; 1998. p. 2015-9.
  37. Lee JG, Kim EH, Lee JH. Effect of *Gentianae Radix* on Neurogenesis and Apoptosis in Hippocampus of Ethanol-induced Newborn Rats. *J orient Neuropsychiatr.* 2010;21(2):29-44.
  38. Lorenzetti V, Allen NB, Fornito A, Yücel M. Structural brain abnormalities in major depressive disorder: a selective review of recent MRI studies. *J Affect Disord.* 2009;117(1-2):1-17.
  39. McKinnon MC, Yucel K, Nazarov A, MacQueen GM. A meta-analysis examining clinical predictors of hippocampal volume in patients with major depressive disorder. *J Psychiatry Neurosci.* 2009;34(1):41-54.
  40. Eo J, Lim H. Effects of Bisphenol A on Gene Expression and Apoptosis of Leydig Cells in the Mouse Testis. *Korean J Reprod Med.* 2008 Sep;35(3):181-91.
  41. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
  42. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006 Mar 10;160(1):1-40.
  43. Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med.* 2009;60:355-66.
  44. Bloom FE. Neuropeptides. *Sci Am.* 1981 Oct;245(4):148-68.
  45. Restak R. *The mind*. Newyork: Bantam Books; 1988. p. 275-314.
  46. Gazouli M, Yao ZX, Boujrad N, Corton JC, Culty M, Papadopoulos V. Effect of peroxisome proliferators on Leydig cell peripheral-type benzodiazepine receptor gene expression, hormone-stimulated cholesterol transport, and steroidogenesis: role of the peroxisome proliferator-activator receptor alpha. *Endocrinology.* 2002 Jul;143(7):2571-83.
  47. Meroni SB, Riera MF, Pellizzari EH, Cigorruga SB. Regulation of rat sertoli cell function by FSH: possible role of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Endocrinol.* 2002 Aug;174(2):195-204.
  48. Labrie F, Luu-The V, Lin SX, Labrie C, Simard J, Breton R, et al. The key role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids.* 1997 Jan;62(1):148-58.
  49. Kim JH, Kim JK, Do BR, Lee CJ, Yoon YD. Evaluation of Bisphenol a Induced Apoptosis in Sertoli Cell-lines. *Dev Reprod.* 2005;9(2):115-21.
  50. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988 Jun 16;333(6174):664-6.
  51. Cirino G, Sorrentino R, di Villa Bianca Rd, Popolo A, Palmieri A, Imbimbo C, et al. Involvement of beta 3-adrenergic receptor activation via cyclic GMP- but not NO-dependent mechanisms in human corpus cavernosum function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr 29;100(9):5531-6.
  52. Kasugai S, Todescan R Jr, Nagata T, Yao KL, Butler WT, Sodek J. Expression of bone matrix proteins associated with mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells *in vitro*: inductive effects of dexamethasone on the osteoblastic phenotype. *J Cell Physiol.* 1991 Apr;147(1):111-20.
  53. Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover. *J Bone Miner Res.* 1993 Dec;8 Suppl 2:S549-55.
  54. Jones DH, Kong YY, Penninger JM. Role of RANKL and RANK in bone loss and arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2002 Nov;61 Suppl 2:ii32-9.

55. McClung M. Role of RANKL inhibition in osteoporosis. *Arthritis Res Ther.* 2007; 9(Suppl 1): S3.
56. Woessner JF Jr, Gunja-Smith Z. Role of metalloproteinases in human osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl.* 1991 Feb;27:99-101.
57. Brack AS, Bildsoe H, Hughes SM. Evidence that satellite cell decrement contributes to preferential decline in nuclear number from large fibres during murine age-related muscle atrophy. *J Cell Sci.* 2005 Oct 15;118(Pt 20):4813-21.