

바이칼레인(Baicalein)이 indomethacin으로 유발된 생쥐 Leydig세포의 일산화질소 생성에 미치는 영향

박완수^{#*}

가천대학교 한의과대학 병리학교실

Effect of Baicalein on Nitric Oxide Production of TM3 Mouse Leydig cells stimulated with indomethacin

Wansu Park^{#*}

Department of Pathology, College of Korean Medicine, Gachon University, Seongnam 13120, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : Baicalein (3,3', 4', 5, 6-pentahydroxyflavone), a type of flavonoid, is a well-known antioxidant and anti-inflammatory ingredient found in *Scutellaria baicalensis* root. The aim of this study is to investigate the effect of baicalein on nitric oxide (NO) production in TM3 mouse Leydig cells stimulated by indomethacin (IN).

Methods : TM3 cells were treated with IN (0.5 μ M) and baicalein at concentrations of 12.5, 25, 50, and 100 μ M for 24 hr, 40 hr, 42 hr, 44 hr, and 64 hr. After treatments, cell viabilities were measured with the modified MTT assay. The production of nitric oxide in cells was measured by Griess reagent assay.

Results : Baicalein showed no cytotoxicity on IN-stimulated TM3. NO production in IN-stimulated TM3 treated for 24 hr with baicalein at concentrations of 12.5, 25, 50, and 100 μ M was 95.8%, 94.86%, 89.97%, and 81.52% of the control group treated with IN only, respectively; NO production for 40 hr was 97.34%, 97.34%, 95.15%, and 87.42%, respectively; NO production for 42 hr was 89.12%, 90.14%, 89.74%, and 90.26%, respectively; NO production for 44 hr was 83.83%, 84.94%, 85.65%, and 86.85%, respectively; NO production for 64 hr was 94.12%, 95.38%, 94.21%, and 94.12%, respectively. Specifically, baicalein at concentrations of 12.5, 25, and 50 have been shown to most efficiently inhibit NO productions in 48 hr of treatment.

Conclusions : Baicalein might have anti-toxicant effect on Leydig cells related with its inhibition of NO production in Leydig cells stimulated with IN.

Key words : Leydig Cell, TM3, Indomethacin, Baicalein, Nitric Oxide

I. 서 론

바이칼레인(baicalein; 5,6,7-trihydroxyflavone ; Figure 1)은 황금(黃芩: *Scutellaria Radix*)의 주요 성분 중 하나로서 분자식은 $C_{15}H_{10}O_5$ 이며 바이칼린(baicalin)의 아글리콘(aglycone)에 해당된다.¹⁾ 바이칼레인은 항산화 및 항염증작용 등 다양한 생리활성을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다. 예를

들면, 2018년에 Kim 등²⁾에 의해 발표된 보고에 의하면, 바이칼레인은 바이러스유사물질이면서 이중가닥알엔에이합성유사체(a synthetic analogue of double-stranded RNA)인 폴리 아이씨(polyinosinic-polycytidylic acid)로 자극받은 마우스 대식세포(RAW 264.7)의 일산화질소(nitric oxide; NO)와 interleukin-1alpha(IL-1 α), IL-6, Granulocyte-Colony Stimulating Factor(G-CSF), Granulocyte-macrophage

*#Corresponding and First author : Wansu Park, Department of Pathology, College of Korean Medicine, Gachon University, Seongnam 13120, Republic of Korea.

· Tel : +82-31-750-8821

· Received : 12 October 2021

· Fax : +82-31-750-8821

· Revised : 05 November 2021

· E-mail : HANGL98@naver.com

· Accepted : 25 November 2021

colony-stimulating factor(GM-CSF), Vascular endothelial growth factor(VEGF), Monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1; CCL2), Interferon gamma-induced protein 10(IP-10; CXCL10), LPS-induced CXC chemokine (LIX; CXCL5), Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted(RANTES; CCL5)의 생성과 세포내 칼슘의 방출을 유의하게 억제하는 항염효과를 나타내었으며, 이러한 항염효과성 염증인자생성억제작용은 Signal transducer and activator of transcription 1(STAT1), STAT3, C/EBP-homologous protein(CHOP; Ddit3), Fas receptor(Fas; apoptosis antigen 1) 등의 염증관련유전자들의 mRNA expression 억제와 관련되는 CHOP/STAT pathway를 통해서 이루어진다. 2013년도에 발표된 Fan 등³⁾의 보고에 의하면, 바이칼레인은 지질다당체(lipopolysaccharide)로 자극된 마우스 대식세포(RAW 264.7)의 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2(COX-2), tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등의 mRNA의 발현과 IL-1beta(IL-1 β), prostaglandin E2(PGE2), TNF- α 의 생성을 억제하였으며, 이러한 억제효과는 transcription factor인 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B)의 활성화억제와 nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha(I κ B α)의 인산화(phosphorylation) 억제를 포함하는 NF- κ B pathway의 조절을 통해서 이루어지는 것이다. 2015년 Lee 등⁴⁾은 지질다당체를 이용한 실험 결과, 바이칼레인이 지질다당체에 의한 혈관성염증반응을 완화한다고 보고한 바 있는데, 이는 바이칼레인이 지질다당체로 유발된 혈관투과성(vascular permeability) 확대, cell adhesion molecules(CAMs)의 발현, 단핵구의 인간내피세포부착 및 transendothelial migration, endothelial cell protein C receptor 유출을 억제하면서 지질다당체로 자극되는 인간제대정맥내피세포(HUVEC)의 TNF- α 와 IL-6의 생성을 감소시키고 NF- κ B 및 extracellular regulated kinases 1/2(ERK 1/2)의 활성화를 억제하고, 지질다당체로 유도되는 치명적 내독소혈증(endotoxemia)을 감소시키는 등 혈관염증성질환의 치료효용성을 가진다는 것이다. 바이칼레인의 연구보고들에서도 확인할 수 있듯이, 대식세포 등 세포의 일산화질소생성에 미치는 시료의 영향확인인 항염효과확인인의 중요한 연구분야이다.⁵⁻⁸⁾

Leydig세포(Leydig cell)는 라이디히간질세포(interstitial cell of Leydig)라고도 불리우는 세포로서, 주로 남성 고환의 정세관사이의 간질(間質)에 존재하며 뇌하수체전엽에서 분비되는 간질세포자극호르몬(interstitial cell-stimulating hormone; Luteinizing hormone)의 자극을 통해 남성호르몬들(androgens)을 분비하는데, Leydig세포에서 분비되는 대표적인 남성호르몬이 바로 testosterone이다.⁹⁾ 2008년도에 보고된 nee Pathak 등¹⁰⁾의 연구에 의하면, sodium nitroprusside에 노출된 Leydig세포가 일산화질소의 생성이 증가되었고, 동시에 테스토스테론의 분비가 감소되는 등 Leydig세포의 일산화질소생성증가가 남성호르몬분비 교란을 일으킬 수 있다. 그러므로 Leydig세포의 일산화질소생성증가를 조절할 수 있는 물질은 남성호르몬저하와 관련된 질환의 치료제로의 가능성이 있다고 할 수 있을 것이다.

바이칼레인이 면역세포의 일산화질소를 억제하는 작용을 통해 항염작용을 나타낸다는 보고는 이루어졌지만, 아직까지 바이칼레인이 Leydig세포의 일산화질소 생성에 미치는 영향에 대한 보고는 이루어진 바 없다. 그러므로 본 연구에서는 indomethacin으로 유발된 생쥐 Leydig세포주(TM3)의 일산화질소 생성증가에 미치는 연구를 조사하고 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

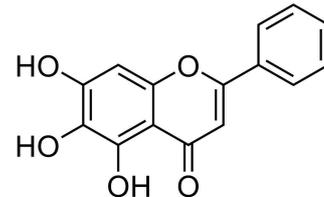


Figure 1. Structural formula of Baicalein.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 baicalein, indomethacin, gallic acid, tetrazolium dye MTT 3-(4,5-di methyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Griess reagent 등은 시그마사(Sigma-Aldrich, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 세포배양을 위해서는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) 등을 써모피셔사이언티픽사(Thermo Fisher Scientific, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Gallic acid가 TM3세포에 세포독성을 나타냄에 대한 기존의 연구보고¹¹⁾가 있었기 때문에 본 연구에서 대조군으로 사용되었다.

2) 기기

실험에 사용된 주요 기기는 CO₂ incubator(NUAIRE, USA), clean bench(Jeiothec, Korea), Inverted Research Microscope(CK2, Olympus, Japan), centrifuge(Gyrozen, Korea), microplate reader(Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 등이다.

2. 방법

1) 세포주

본 연구에서 사용된 세포주는 생쥐 Leydig세포에 해당하는 TM3 cell line이며, 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 구입하였다.

2) 세포 배양

세포의 배양은 선행연구¹²⁻¹⁴⁾의 방법에 따라 실시하였으며,

세포들은 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, penicillin(100 U/mL), streptomycin(100 µg/mL)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다.

3) MTT assay

바이칼레인이 indomethacin으로 자극받은 생쥐 Leydig세포의 세포생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 선행연구¹²⁾의 방법에 따라 MTT assay를 실시하였다.

4) 그리스시약(Griess reagent) 실험법

바이칼레인이 indomethacin으로 자극받은 생쥐 Leydig세포의 일산화질소 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 선행연구¹³⁻¹⁴⁾의 방법에 따라 그리스시약(Griess reagent) 실험법을 다음과 같이 실시하였다. 96 well plate에 well 당 10,000개의 세포들을 분주하고, 24시간 동안 안정화하였다. 안정화가 된 세포에 다양한 농도의 시료들을 배지에 담아 각 well에 처리하고 다시 배양하였다. 대조물질로는 이미 TM3세포에 oxidative stress를 유발함이 보고¹¹⁾된 gallic acid (100 µM)를 사용하였다. 바이칼레인을 TM3에 다양한 시간동안 처리한 후 세포 생존율에 미치는 영향을 확인하였으며, 그 결과에 따라 배양 시간을 24시간, 40시간, 42시간, 44시간, 64시간동안으로 하여 시료를 처리하였다. 계획된 시간의 배양이 끝난 후에는 각 well에서 배양액 100 uL을 채취하여 새로운 96 plate에 옮기고 나서 각 well에 미리 제조된 그리스시약 100 uL을 추가하고 상온에서 15분간 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 540 nm에서의 흡광도를 측정, 각 실험군의 일산화질소의 생성량을 아래와 같이 계산하여 비교하였다.

$$\text{Productions of nitric oxide(\%)} = 100 \times \text{AT/AC}$$

AC: absorbance of control

AT: absorbance of tested extract solution.

Table 1.

The cell viability of indomethacin-stimulated TM3 mouse Leydig cells treated with baicalein.

Treatment Time (hours)	Control (Indomethacin alone)	Concentration (µM) of Baicalein with Indomethacin (0.5 µM)			
		12.5	25	50	100
CV after 24 hr (%)	100.00 ± 0.38	96.88 ± 0.36	96.63 ± 0.35	106.70 ± 0.39	83.18 ± 0.12
CV after 40 hr (%)	100.00 ± 0.06	111.56 ± 0.08*	128.12 ± 0.14*	147.57 ± 0.16*	155.19 ± 0.12*
CV after 42 hr (%)	100.00 ± 0.07	112.20 ± 0.06*	126.79 ± 0.09*	140.55 ± 0.16*	160.17 ± 0.18*
CV after 44 hr (%)	100.00 ± 0.08	113.52 ± 0.08*	126.64 ± 0.15*	141.37 ± 0.11*	162.12 ± 0.16*
CV after 64 hr (%)	100.00 ± 0.19	117.40 ± 0.2*	129.49 ± 0.17*	143.62 ± 0.19*	170.85 ± 0.22*

The cell viabilitie (CV) of indomethacin-stimulated TM3 mouse Leydig cells treated with baicalein were measured after 24, 40, 42, 44, and 64 hr treatment using MTT assay. Con is the control group treated with 0.5 µM of indomethacin only. CV was expressed as a percentage compared to the control group. Values are the mean ± SD of more than three independent experiments.

*p < 0.05 vs Con

3. 통계처리

모든 실험은 3회 이상 반복된 후 평균 ± 표준편차(Mean ± SD)로 표시되었으며, 대조군과 각 실험군의 평균 차이는 아노바검증(ANOVA test)과 스튜던트검증(Student t-test)으로 통계적 유의성을 분석하였으며, 유의수준은 0.05로 설정하였다.

III. 결 과

1. 바이칼레인이 indomethacin으로 자극된 TM3 세포의 세포생존율에 미치는 영향

TM3 세포에 indomethacin(0.5 µM)과 바이칼레인(12.5, 25, 50, 100 µM)을 24시간동안 처리하고, TM3 세포의 세포 생존율을 조사한 결과, 바이칼레인은 유의미한 세포독성을 나타내지 않았으며, 40시간 동안의 처리에서는 12.5, 10, 25, 500 µM의 농도에서 각각 111.56%, 128.12%, 147.57%, 155.19%로서 유의한 증가를 나타내었고, 42시간동안의 처리에서는 112.20%, 126.79%, 140.55%, 160.17%로, 44시간 동안의 처리에서는 113.52%, 126.64%, 141.37%, 162.12%로, 64시간동안의 처리에서는 117.40%, 129.49%, 143.62%, 170.85%로 유의한 증가를 나타내었다. 이러한 결과는 바이칼레인이 마우스 Leydig세포에 독성을 나타내지 않을 뿐만 아니라 indomethacin의 자극으로 인하여 감소되는 마우스 Leydig 세포의 세포생존율을 증가시키는 등 세포보호효과를 가지고 있음을 의미하는 것이다(Table 1).

2. 바이칼레인의 24시간 처리가 indomethacin으로 자극된 TM3 세포의 일산화질소생성증가에 대한 영향

indomethacin(0.5 µM)으로 자극된 TM3 세포에 바이칼레인(12.5, 25, 50, 100 µM)을 24시간 동안 처리한 후 TM3 세포의 일산화질소 생성량을 측정된 결과, 12.5, 25, 50, 100

µM의 농도에서 대조군(indomethacin만 처리한 군) 대비 각각 95.8 ± 0.04%, 94.86 ± 0.04%, 89.97 ± 0.04%, 81.52 ± 0.03%로서 유의한 억제 효과를 나타내었다(Figure 2).

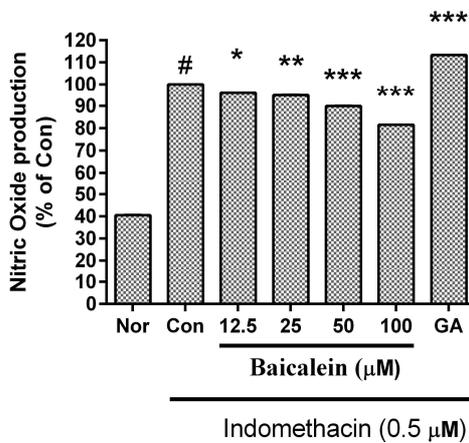


Figure 2. Effect of Baicalein on Nitric Oxide production in TM3 cells stimulated by indomethacin (0.5 μM) for 24 hr treatment. Data represent Mean±SD (n≥3). Nor, the group incubated with media only. Con, the group treated with 0.5 μM of indomethacin alone. GA denotes Gallic acid (100 μM). # represents $p < 0.001$ vs. Nor; * $p < 0.05$ vs. Con; ** $p < 0.01$ vs. Con; *** $p < 0.001$ vs. Con.

3. 바이칼레인의 40시간 처리가 indomethacin 으로 자극된 TM3 세포의 일산화질소생성증가에 대한 영향

indomethacin(0.5 μM)으로 자극된 TM3 세포에 바이칼레인(12.5, 25, 50, 100 μM)을 40시간 동안 처리한 후 TM3 세포의 일산화질소 생성량을 측정된 결과, 12.5, 25, 50, 100 μM의 농도에서 대조군(indomethacin만 처리한 군) 대비 각각 $97.34 \pm 0.02\%$, $97.34 \pm 0.01\%$, $95.15 \pm 0.02\%$, $87.42 \pm 0.01\%$ 로서 유의한 억제를 나타내었다(Figure 3).

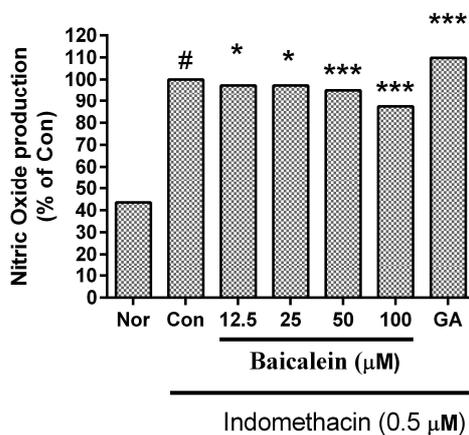


Figure 3. Effect of Baicalein on Nitric Oxide production in TM3 cells stimulated by indomethacin (0.5 μM) for 40 hr treatment. Data represent Mean±SD (n≥3). Nor, the group incubated with media only. Con, the group treated with 0.5 μM of indomethacin alone. GA denotes Gallic acid (100 μM). # represents $p < 0.001$ vs. Nor; * $p < 0.05$ vs. Con; ** $p < 0.01$ vs. Con; *** $p < 0.001$ vs. Con.

4. 바이칼레인의 42시간 처리가 indomethacin 으로 자극된 TM3 세포의 일산화질소생성증가에 대한 영향

indomethacin(0.5 μM)으로 자극된 TM3 세포에 바이칼레인(12.5, 25, 50, 100 μM)을 42시간 동안 처리한 후 TM3 세포의 일산화질소 생성량을 측정된 결과, 12.5, 25, 50, 100 μM의 농도에서 대조군(indomethacin만 처리한 군) 대비 각각 $89.12 \pm 0.04\%$, $90.14 \pm 0.05\%$, $89.74 \pm 0.03\%$, $90.26 \pm 0.02\%$ 로서 유의한 억제를 나타내었다(Figure 4).

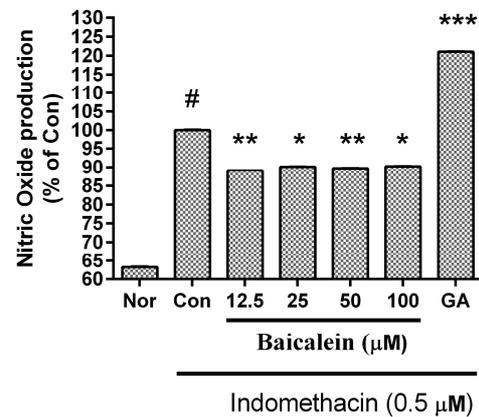


Figure 4. Effect of Baicalein on Nitric Oxide production in TM3 cells stimulated by indomethacin (0.5 μM) for 42 hr treatment. Data represent Mean±SD (n≥3). Nor, the group incubated with media only. Con, the group treated with 0.5 μM of indomethacin alone. GA denotes Gallic acid (100 μM). # represents $p < 0.001$ vs. Nor; * $p < 0.05$ vs. Con; ** $p < 0.01$ vs. Con; *** $p < 0.001$ vs. Con.

5. 바이칼레인의 44시간 처리가 indomethacin 으로 자극된 TM3 세포의 일산화질소생성증가에 대한 영향

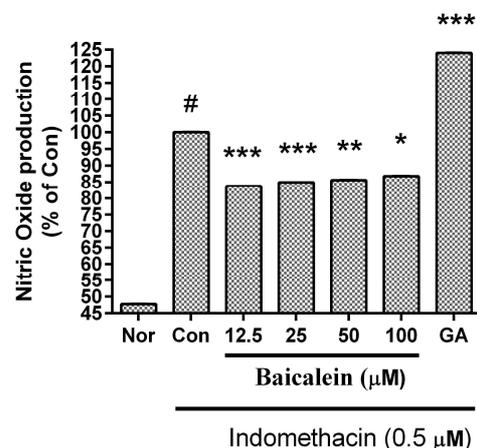


Figure 5. Effect of Baicalein on Nitric Oxide production in TM3 cells stimulated by indomethacin (0.5 μM) for 44 hr treatment. Data represent Mean±SD (n≥3). Nor, the group incubated with media only. Con, the group treated with 0.5 μM of indomethacin alone. GA denotes Gallic acid (100 μM). # represents $p < 0.001$ vs. Nor; * $p < 0.05$ vs. Con; ** $p < 0.01$ vs. Con; *** $p < 0.001$ vs. Con.

indomethacin(0.5 μ M)으로 자극된 TM3 세포에 바이칼레인(12.5, 25, 50, 100 μ M)을 44시간 동안 처리한 후 TM3 세포의 일산화질소 생성량을 측정된 결과, 12.5, 25, 50, 100 μ M의 농도에서 대조군(indomethacin만 처리한 군) 대비 각각 83.83 \pm 0.03%, 84.94 \pm 0.03%, 85.65 \pm 0.04%, 86.85 \pm 0.04%로서 유의한 억제 효과를 나타내었다(Figure 5).

6. 바이칼레인의 64시간 처리가 indomethacin으로 자극된 TM3 세포의 일산화질소생성증가에 대한 영향

indomethacin(0.5 μ M)으로 자극된 TM3 세포에 바이칼레인(12.5, 25, 50, 100 μ M)을 64시간 동안 처리한 후 TM3 세포의 일산화질소 생성량을 측정된 결과, 12.5, 25, 50, 100 μ M의 농도에서 대조군(indomethacin만 처리한 군) 대비 각각 94.12 \pm 0.02%, 95.38 \pm 0.02%, 94.21 \pm 0.02%, 94.12 \pm 0.03%로서 유의한 억제 효과를 나타내었다(Figure 6).

또한 24시간, 40시간, 42시간, 44시간, 64시간 동안 처리하고 조사된 TM3 세포의 일산화질소 생성량을 비교한 결과,

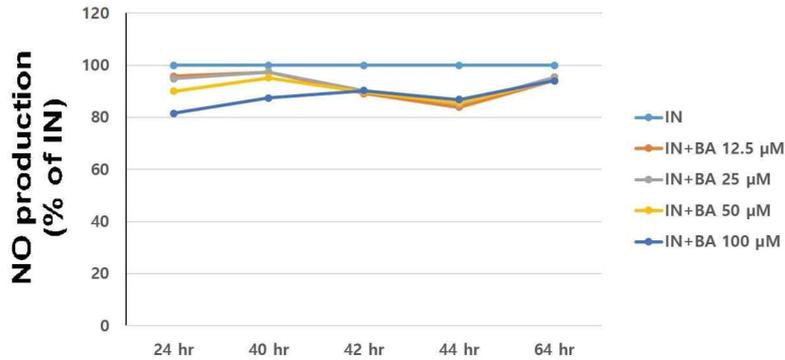


Figure 7. Effect of Baicalein on Nitric Oxide (NO) production in TM3 cells stimulated by indomethacin (0.5 μ M) for 24 hr, 40 hr, 42 hr, 44 hr, and 64 hr treatment. IN, the group treated with 0.5 μ M of indomethacin alone. BA means baicalein.

IV. 고찰

바이칼레인(Baicalein, C₁₅H₁₀O₅)은 황금(黃芩: Scutellaria Radix)의 주요 성분 중 하나로서¹⁾ 다양한 생리활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있는데, 항산화작용(anti-oxidative activity)²⁾, 항염증작용(anti-inflammatory effect)^{3,4)}, 증식억제작용(anti-proliferative effect) 뿐만 아니라, 혈소판 응집 억제작용(anti-platelet aggregation activity), 항혈전 작용(anti-thrombotic activity), 활성산소중제거작용(reactive oxygen species-scavenging activity), 혈관신생억제작용(anti-angiogenic activity) 등에 대한 보고도 이루어져 왔다.¹⁵⁻¹⁹⁾ 예를 들면, Kim 등²⁾은 2018년도의 발표를 통하여, 바이칼레인이 바이러스유사물질인 폴리아이씨로 자극받은 마

44시간 동안 처리한 경우에서 가장 큰 억제효과가 나타남을 알 수 있었다(Figure 7).

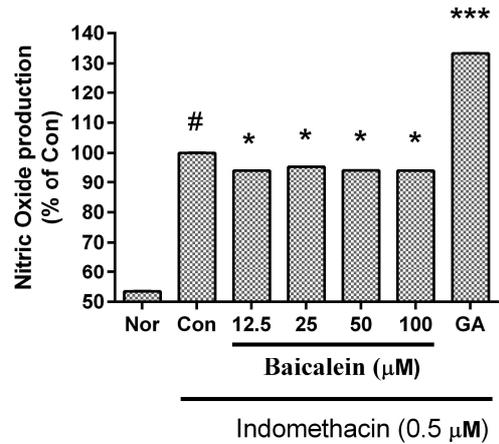


Figure 6. Effect of Baicalein on Nitric Oxide production in TM3 cells stimulated by indomethacin (0.5 μ M) for 64 hr treatment. Data represent Mean \pm SD (n \geq 3). Nor, the group incubated with media only. Con, the group treated with 0.5 μ M of indomethacin alone. GA denotes Gallic acid (100 μ M). # represents $p < 0.001$ vs. Nor; * $p < 0.05$ vs. Con; ** $p < 0.01$ vs. Con; *** $p < 0.001$ vs. Con.

우스 대식세포의 일산화질소(NO), IL-1 α , IL-6, G-CSF, GM-CSF, VEGF, MCP-1, IP-10, LIX, RANTES의 생성 증가를 유의하게 억제하면서 세포내 칼슘의 방출을 감소와 STAT1 · STAT3 · CHOP · Fas mRNA발현억제로 이루어지는 CHOP/STAT pathway를 통해서 이루어짐에 대하여 보고한 바 있다. Fan 등³⁾은 2013년도의 발표를 통해서, 바이칼레인이 LPS로 자극되어진 마우스 대식세포에 대하여 NF- κ B pathway 조절/I κ B α phosphorylation 억제를 통한 iNOS · COX-2 · TNF- α 등의 mRNA 발현 억제와 IL-1 β · PGE2 · TNF- α 의 생성을 감소시키는 효과를 가진다고 보고한 바 있다. 2015년, Lee 등⁴⁾의 보고에 의하면, 바이칼레인이 지질다당체에 의한 혈관성염증반응을 완화한다고 보고한 바 있는데, 구체적으로 살펴보면, 생쥐를 이용한 실험의 결과 바이칼레인은

지질다당체로 유발된 vascular permeability의 확대 · CAMs의 발현 · 단핵구의 인간내피세포부착 및 경내피세포이동(transendothelial migration) · endothelial cell protein C receptor의 혈중유출 등을 유의하게 억제하였고, 실험관내 실험을 통하여서는, 지질다당체로 자극되는 인간제대정맥내피세포(HUVEC)의 TNF- α 와 IL-6의 생성을 감소시키고 NF- κ B 및 ERK 1/2의 활성화를 억제하는 등, LPS로 유도되는 치명적 endotoxemia를 감소시키는 효과를 밝혀내었는데, 이러한 실험결과는 곧 바이칼레인이 혈관염증성질환의 치료효용성을 가진다는 것이다. 2019년 박 등²⁰⁾에 의한 보고에 의하면, 바이칼레인은 house dust mite와 ovalbumin으로 발작 유발되는 생쥐모델에서 thymic stromal lymphopoietin 신호경로를 차단함으로써 eosinophil의 침투를 효과적으로 억제하여 천식과 아토피성 피부염의 치료를 위한 항알러지약물로서의 가능성이 있다. Bai 등²¹⁾은 2021년도에 바이칼레인의 osteoarthritis 예방효과에 대해 보고했는데, 이는 골관절염 흰쥐모델에서의 연골대사효소(cartilage catabolism enzymes)의 억제와 nucleotide-binding oligomerization-like receptor family pyrin domain containing protein 3(NOD-like receptor protein 3; NLRP3) inflammasome의 활성화를 억제함으로써 나타나는 항염작용에 의한 것이다. He 등²²⁾은 2021년도의 보고에서 바이칼레인이 생쥐유방암모델과 생쥐피부암모델에서 tumor-associated macrophages (TAMs)의 침투를 촉진하고 중앙관련대식세포의 염증성표현형(M1-like phenotype)으로의 분극화를 유도함으로써 종양의 성장을 억제하는데, 이러한 효과는 NF- κ B신호경로를 통한 TNF- α , IL-1 β , monokine induced by gamma interferon (MIG; CXCL9), Interferon gamma-induced protein 10 (IP-10; small-inducible cytokine B10; CXCL10) 등의 전염증성인자들의 발현을 증가시킴에 의한 것이고, 또한 바이칼레인의 phosphoinositide 3-kinase mRNA/protein의 발현 감소작용과 같이 나타나는 것인데, 결과적으로는 바이칼레인이 이노시톨3-인산화효소감마억제제의 새로운 후보가 될 수 있다는 것이다. Chen 등²³⁾도 2021년에 바이칼레인이 파킨슨병 흰쥐모델실험에서 미토콘드리아 자가포식을 증가하고 miR-30b 억제와 NIX/BNIP3 경로의 활성화를 통하여 신경활동을 회복시킴으로써 파킨슨병으로부터 보호하는 효과를 가지고 있다고 보고한 바 있다. Cai 등²⁴⁾도 2021년에 바이칼레인이 글루코코르티코이드로 유발된 쥐의 뼈형성세포주(murine osteoblastic cell line MC3T3-E1) 골다공증현상을 Protein kinase B(PKB; AKT)의 억제 · FOXO1의 증가 · 골전환지표인자들(ALP, OCN, Runx2, Col 1)의 발현증가 · 세포외기질의 무기화작용(mineralization)을 통하여 억제함에 대하여 보고한 바 있다. 최근의 발표에서 Zandi 등²⁵⁾은 바이칼레인이 코로나 19바이러스(SARS-CoV-2)에 대하여 의미있는 항바이러스 효과를 나타내었다고 발표한 바 있다. Yang 등(2021)은 바이칼레인이 phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway의 비활성화를 통하여 신경교종세포(glioma cells)의 침윤성을 낮추고 세포자멸사를 유도하는 등의 항종양효과가 있다고 보고²⁶⁾한 바 있다. Zhu 등(2021)은 바이칼레인이 흥선기질상 림포포이에틴/흥선기질상 림포포이에틴수용체 경로(TSLP/TSLPR pathway) 억제를 통하여 생쥐 *Aspergillus*

fumigatus 각막염(keratitis)에 대하여 진균의 성장 · 생체막 형성 · 부착 등의 염증반응을 억제함으로써 개선효과를 나타낸다는 보고²⁷⁾ 한 바 있다. 바이칼레인은 치주염에 대한 효과에 대해서도 보고되었는데, 2020년도의 Ren 등²⁸⁾의 발표에 의하면, 바이칼레인은 100 μ M의 농도까지 인간 치주인대세포(Human periodontal ligament cells)에 독성을 나타내지 않으면서 지질다당체에 의하여 자극받은 인간 치주인대세포의 IL-1 β , TNF- α , matrix metalloproteinase(MMP)-1, MMP-2, MCP-1 생성증가를 단백질과 mRNA 수준 모두에서 유의하게 감소시키며 이러한 감소효과는 extracellular signal regulated kinases(ERK), c-Jun N-terminal protein kinase(JNK), P38 MAPK와 mitogen activated protein kinase(MAP kinase; MAPK) 경로 억제를 통해서 이루어지는 것이며, 또한 골생성 maker들(runt-related transcription factor 2, collagen-I, osterix)의 유전자발현과 단백질생성을 눈에 띄게 증가시킴으로써 치주염관리에 도움을 줄 수 있다는 것이다. 이러한 연구들에도 알 수 있듯이 바이칼레인은 다양한 세포들의 염증매개인자생성조절효능을 가지고 있다. 그러나 아직까지 바이칼레인의 Leydig세포에서의 염증매개인자생성에 미치는 영향에 대한 보고는 이루어진 바 없다.

Free radical의 하나인 일산화질소는 중요한 생체신호전달자로서²⁹⁾, 다양한 nitric oxide synthase enzymes에 의해서 L-arginine으로부터 만들어지며, vasodilation, inflammation, neurotransmission 작용에 있어서 중요한 역할을 한다.³⁰⁾ 생식세포에 대한 일산화질소의 작용에 대해서도 보고들이 이루어져왔으며³¹⁾, Leydig세포와 관련된 일산화질소의 작용에 대해서도 보고되었다. 예를 들면, 남성의 2차성징발달, 근육 발달 및 생식기능을 원활하게 하는 기능을 가진 테스토스테론 등 남성호르몬들을 분비하는 역할을 하는 Leydig세포가 알코올, 독성물질, 약물 등에 의해 자극을 받아 일산화질소의 생성이 증가하게 되고, 그로인해 남성호르몬 분비가 감소 및 교란된다면, 결과적으로는 여러 가지 남성호르몬저하성 장애, 예를 들면 테스토스테론저하로 인한 남성성기능장애, 포도당지질 대사(glucose and lipid metabolism)장애, 심혈관계기능(cardiometabolic function)장애, 골밀도(bone mineral density)이상, 근력감소 등이 발생할 수 있다.³²⁻³⁵⁾

Sodium nitroprusside에 노출된 Leydig세포가 일산화질소의 생성이 증가되었고, 동시에 테스토스테론의 분비가 감소된다는 2008년도의 nee Pathak 등¹⁰⁾의 보고를 통해서도 알 수 있듯이, 약물이나 독성물질에 자극받은 Leydig세포에서는 일산화질소의 생성이 증가되고, 동시에 테스토스테론과 같은 남성호르몬의 분비가 저하됨으로써 남성호르몬분비교란이 발생할 수 있다. 그러므로 독성물질 등으로 자극받은 Leydig세포의 일산화질소 생성증가를 억제할 수 있는 물질은 남성호르몬저하로 인한 질환치료에 응용될 수 있을 것이다.

본 연구에서는 바이칼레인이 대표적인 비스테로이드성염해인 indomethacin으로 자극받은 생쥐 Leydig세포(TM3)의 일산화질소 과잉생성에 미치는 영향을 조사하였는데, 실험결과 바이칼레인이 indomethacin만 처리한 군에 비해서 indomethacin과 바이칼레인(12.5, 25, 50, 100 μ M)을 함께 처리하고 24시간, 40시간, 42시간, 44시간, 64시간 동안 배양한 모든 경우에서 indomethacin으로 증폭된 세포내 일산화

질소의 생성을 유의하게 감소시켰다. 특히 대부분의 농도에서 44시간의 배양이 가장 큰 감소효과를 나타내었고, 64시간의 배양에서는 감소효과가 축소되는 것으로 나타났다. 이와 함께 indomethacin과 바이칼레인(12.5, 25, 50, 100 μM)을 함께 처리하고 24시간, 40시간, 42시간, 44시간, 64시간 동안 배양한 모든 경우에서 Leydig세포의 세포생존율이 감소하지 않는다는 결과를 통하여, 바이칼레인이 Leydig세포에 세포독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 바이칼레인이 약물독성작용에 의해 자극 받은 Leydig세포의 일산화질소 생성증가를 유의하게 억제함으로써 Leydig세포의 남성호르몬분비교란으로 인한 각종의 질환치료에 응용될 수 있음을 의미한다. 앞으로 남성호르몬저하질환의 치료를 위한 바이칼레인의 적용가능성을 탐색하고, Leydig세포의 남성호르몬분비장애를 개선하는 효과에 대한 자세한 기전규명을 위하여 보다 많은 연구가 필요한 것으로 판단되는 바이다.

V. 결 론

본 연구에서는 indomethacin으로 자극된 생쥐 Leydig세포(TM3)에 바이칼레인(baicalein)을 다양한 농도(12.5, 25, 50, 100 μM)로 24시간, 40시간, 42시간, 44시간, 64시간 동안 처리한 후 세포생존율을 확인하고, 세포내 일산화질소 생성에 대하여 조사하여 indomethacin만 처리한 대조군(control group)과 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 생쥐 Leydig세포에 indomethacin과 바이칼레인(12.5, 25, 50, 100 μM)을 24시간, 40시간, 42시간, 44시간, 64시간 동안 처리한 후 세포생존율을 확인한 결과, 바이칼레인은 모든 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다.
2. 생쥐 Leydig세포에 indomethacin과 바이칼레인(12.5, 25, 50, 100 μM)을 24시간 동안 처리한 후 일산화질소 생성량을 측정된 결과, 12.5, 25, 50, 100 μM 의 농도에서 대조군 대비 각각 $95.8 \pm 0.04\%$, $94.86 \pm 0.04\%$, $89.97 \pm 0.04\%$, $81.52 \pm 0.03\%$ 로서 유의한 억제를 나타내었다.
3. 생쥐 Leydig세포에 indomethacin과 바이칼레인(12.5, 25, 50, 100 μM)을 40시간 동안 처리한 후 일산화질소 생성량을 측정된 결과, 12.5, 25, 50, 100 μM 의 농도에서 대조군 대비 각각 $97.34 \pm 0.02\%$, $97.34 \pm 0.01\%$, $95.15 \pm 0.02\%$, $87.42 \pm 0.01\%$ 로서 유의한 억제를 나타내었다.
4. 생쥐 Leydig세포에 indomethacin과 바이칼레인(12.5, 25, 50, 100 μM)을 42시간 동안 처리한 후 일산화질소 생성량을 측정된 결과, 12.5, 25, 50, 100 μM 의 농도에서 대조군 대비 각각 $89.12 \pm 0.04\%$, $90.14 \pm 0.05\%$, $89.74 \pm 0.03\%$, $90.26 \pm 0.02\%$ 로서 유의한 억제를

나타내었다.

5. 생쥐 Leydig세포에 indomethacin과 바이칼레인(12.5, 25, 50, 100 μM)을 44시간 동안 처리한 후 일산화질소 생성량을 측정된 결과, 12.5, 25, 50, 100 μM 의 농도에서 대조군 대비 각각 $83.83 \pm 0.03\%$, $84.94 \pm 0.03\%$, $85.65 \pm 0.04\%$, $86.85 \pm 0.04\%$ 로서 유의한 억제를 나타내었다.
6. 생쥐 Leydig세포에 indomethacin과 바이칼레인(12.5, 25, 50, 100 μM)을 64시간 동안 처리한 후 일산화질소 생성량을 측정된 결과, 12.5, 25, 50, 100 μM 의 농도에서 대조군 대비 각각 $94.12 \pm 0.02\%$, $95.38 \pm 0.02\%$, $94.21 \pm 0.02\%$, $94.12 \pm 0.03\%$ 로서 유의한 억제를 나타내었다.

이러한 결과는 바이칼레인(12.5, 25, 50, 100 μM)이 Leydig세포에 세포독성을 나타내지 않으면서도, indomethacin으로 유발된 Leydig세포(TM3)의 일산화질소 생성증가를 유의하게 감소시킴으로써 약리적 화학물질로 인한 Leydig세포의 세포손상 및 호르몬생성교란을 완화하고, 결과적으로 남성호르몬부족질환의 예방 및 치료에 사용될 수 있음을 의미하는 것이다. 향후 바이칼레인이 화학적 독성물질로 인한 Leydig세포의 세포손상 및 호르몬분비장애를 개선하는 약물로 적용되기 위해 보다 자세한 연구가 필요한 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단(No. 2017R1A2B4004933)의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Liao JF, Wang HH, Chen MC, Chen CC, Chen CF. Benzodiazepine binding site-interactive flavones from *Scutellaria baicalensis* root. *Planta Med.* 1998 ;64(6):571-2.
2. Kim YJ, Kim HJ, Lee JY, Kim DH, Kang MS, Park W. Anti-Inflammatory Effect of Baicalein on Polyinosinic Polycytidylic Acid-Induced RAW 264.7 Mouse Macrophages. *Viruses.* 2018 ;10(5):224.
3. Fan GW, Zhang Y, Jiang X, Zhu Y, Wang B, Su L, Cao W, Zhang H, Gao X. Anti-inflammatory activity of baicalein in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages via estrogen receptor and NF- κ B-dependent pathways. *Inflammation.* 2013; 36(6):1584-91.

4. Lee W, Ku SK, Bae JS. Anti-inflammatory effects of Baicalin, Baicalein, and Wogonin in vitro and in vivo. *Inflammation*. 2015;38(1):110–25.
5. Lee JY, Park W. Anti-Inflammatory Effect of Wogonin on RAW 264.7 Mouse Macrophages Induced with Polyinosinic–Polycytidylic Acid. *Molecules*. 2015;20(4):6888–900.
6. Kim HJ, Kim YJ, Park W. Berberine modulates hyper-inflammation in mouse macrophages stimulated with polyinosinic–polycytidylic acid via calcium–CHOP/STAT pathway. *Sci Rep*. 2021;11(1): 11298.
7. DH, Lee JY, Kim YJ, Kim HJ, Park W. Rubi Fructus Water Extract Alleviates LPS–Stimulated Macrophage Activation via an ER Stress–Induced Calcium/CHOP Signaling Pathway. *Nutrients*. 2020 ;12(11):3577.
8. Kim YJ, Lee JY, Kim HJ, Kim DH, Lee TH, Kang MS, Park W. Anti-Inflammatory Effects of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels Water Extract on RAW 264.7 Induced with Lipopolysaccharide. *Nutrients*. 2018 ;10(5):647.
9. Svechnikov K, Landreh L, Weisser J, Izzo G, Colón E, Svechnikova I, Söder O. Origin, development and regulation of human Leydig cells. *Horm Res Paediatr*. 2010;73(2):93–101.
10. nee Pathak ND, Lal B. Nitric oxide: An autocrine regulator of Leydig cell steroidogenesis in the Asian catfish, *Clarias batrachus*. *Gen Comp Endocrinol*. 2008 Sep 1;158(2):161–7.
11. Park WH, Chang MS, Yang WM, Bae H, Kim NI, Park SK. Cytoprotective effect of Panax ginseng on gallic acid-induced toxicity in TM3 mouse Leydig cells. *Fitoterapia*. 2007;78(7–8):577–9.
1. Park WS. Study on Biological Effect of Multi-Herbal Drug KOCO–P1 on Human Hepatocytes (HepG2). *The Korean Journal of Herbology*. 2008;23(3):149–54.
2. Park WS. Effect of Water Extract from Artemisiae Argi Folium on Mouse Macrophage Stimulated by LPS. *The Korean Journal of Herbology*. 2009;24(1):151–7.
3. Lee JY, Lee YJ, Park WS. Anti-inflammatory Effects of Fermented Houttuyniae Herba Water Extract on LPS-induced Mouse Macrophage. *The Korean Journal of Herbology*. 2010;25(3):27–34.
12. Gao D., Sakurai K., Chen J., Ogiso T. Protection by baicalein against ascorbic acid-induced lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol*. 1995;90:103–114.
13. Huang H.C., Wang H.R., Hsieh L.M. Antiproliferative effect of baicalein, a flavonoid from a Chinese herb, on vascular smooth muscle cell. *Eur. J. Pharmacol*. 1994;251:91–93.
14. Michibayashi T. Platelet aggregating response to platelet activating factor participates in activation of the 12-lipoxygenase pathway in platelets from rabbits. *Int. Angiol*. 2002;21:260–267.
15. Kimura Y., Okuda H., Ogita Z. Effects of flavonoids isolated from scutellariae radix on fibrinolytic system induced by trypsin in human umbilical vein endothelial cells. *J. Nat. Prod*. 1997;60:598–601.
16. Wartenberg M., Budde P., De Marees M., Grunheck F., Tsang S.Y., Huang Y., Chen Z.Y., Hescheler J., Sauer H. Inhibition of tumor-induced angiogenesis and matrix-metalloproteinase expression in confrontation cultures of embryoid bodies and tumor spheroids by plant ingredients used in traditional chinese medicine. *Lab. Investig*. 2003;83:87–98.
17. Park BB, Choi JW, Park D, Choi D, Paek J, Kim HJ, Son SY, Mushtaq AU, Shin H, Kim SH, Zhou Y, Lim T, Park JY, Baek JY, Kim K, Kwon H, Son SH, Chung KY, Jeong HJ, Kim HM, Jung YW, Lee K, Lee KY, Byun Y, Jeon YH. Structure–Activity Relationships of Baicalein and its Analogs as Novel TSLP Inhibitors. *Sci Rep*. 2019;9(1):8762.
18. Bai H, Yuan R, Zhang Z, Liu L, Wang X, Song X, Ma T, Tang J, Liu C, Gao L. Intra-articular Injection of Baicalein Inhibits Cartilage Catabolism and NLRP3 Inflammasome Signaling in a Posttraumatic OA Model. *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:6116890.
19. He S, Wang S, Liu S, Li Z, Liu X, Wu J. Baicalein Potentiated M1 Macrophage Polarization in Cancer Through Targeting PI3K γ / NF- κ B Signaling. *Front Pharmacol*. 2021;12:743837.
20. Chen M, Peng L, Gong P, Zheng X, Sun T, Zhang X, Huo J. Baicalein Mediates Mitochondrial Autophagy via miR-30b and the NIX/BNIP3 Signaling Pathway in Parkinson's Disease. *Biochem Res Int*. 2021 ;2021:2319412.
21. Cai P, Lu Y, Yin Z, Wang X, Zhou X, Li Z. Baicalein ameliorates osteoporosis via AKT/FOXO1 signaling. *Aging (Albany NY)*. 2021;13(13):17370–17379.
22. Zandi K, Musall K, Oo A, Cao D, Liang B, Hassandarvish P, Lan S, Slack RL, Kirby KA, Bassit L, Amblard F, Kim B, AbuBakar S, Sarafianos SG, Schinazi RF. Baicalein and Baicalin Inhibit SARS–CoV-2 RNA-Dependent-RNA Polymerase. *Microorganisms*. 2021;9(5):893.
23. Yang Y, Song Y, Nie Q, Tian R, Huang J, Mao G. Baicalein inhibits invasion and promotes apoptosis in glioma cells through the PI3K/Akt pathway. *J BUON*. 2021;26(2):395–401.
24. Zhu Y, Peng X, Zhang Y, Lin J, Zhao G. Baicalein Protects Against *Aspergillus fumigatus* Keratitis by Reducing Fungal Load and Inhibiting TSLP–Induced Inflammatory Response. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2021;62(6):26.

25. Ren M, Zhao Y, He Z, Lin J, Xu C, Liu F, Hu R, Deng H, Wang Y. Baicalein inhibits inflammatory response and promotes osteogenic activity in periodontal ligament cells challenged with lipopolysaccharides. *BMC Complement Med Ther.* 2021;21(1):43.
26. Hou YC, Janczuk A, Wang PG. Current trends in the development of nitric oxide donors. *Curr Pharm Des.* 1999;5(6):417-41.
27. Tsopka IC, Hadjipavlou-Litina D. Hybrids as NO Donors. *Int J Mol Sci.* 2021;22(18):9788.
28. Lue Y, Sinha Hikim AP, Wang C, Leung A, Swerdloff RS. Functional role of inducible nitric oxide synthase in the induction of male germ cell apoptosis, regulation of sperm number, and determination of testes size: evidence from null mutant mice. *Endocrinology.* 2003;144(7): 3092-100.
29. Su X, Lin D, Luo D, Sun M, Wang X, Ye J, Zhang M, Zhang Y, Xu X, Yu C, Guan Q. Cyclophilin D participates in the inhibitory effect of high-fat diet on the expression of steroidogenic acute regulatory protein. *J Cell Mol Med.* 2019; 23(10):6859-6871.
30. Bianchi VE, Locatelli V. Testosterone a key factor in gender related metabolic syndrome. *Obes Rev.* 2018;19(4):557-575.
31. DM, Jones H. Testosterone: a metabolic hormone in health and disease. *J Endocrinol.* 2013;217(3): R25-45.
32. Peterson MD, Belakovskiy A, McGrath R, Yarrow JF. Testosterone deficiency, weakness, and multimorbidity in men. *Sci Rep.* 2018;8(1):5897.