

補骨脂가 남성 생식세포 GC-1의 항산화에 미치는 영향

오명숙 · 김도림 · 김소연 · 장문석¹ · 박성규*

경희대학교 한의과대학 방제학교실, 1: 하버드대학교 의과대학 소아병원

Antioxidant Effects of *Psoraleae Fructus* in GC-1 Cells

Myung Sook Oh, Do Rim Kim, So Yeon Kim, Mun Seog Chang¹, Seong Kyu Park*

Department of Prescriptionology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University.

1: Department of Medicine, Division of Newborn Medicine, Children's Hospital and Harvard Medical School

The purpose of this study is to examine the antioxidant activity in the germ cells of the extract of *Psoraleae fructus*. The extract was studied for dipheny-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity, GC-1 cell viability by a modified MTT assay, the effects on H₂O₂-induced cytotoxicity by MTT assay and lipid peroxidation by malondialdehyde (MDA) formation, respectively. The results showed that the extract scavenged DPPH radical with the IC50 being 0.427 mg/mL. The extract was dose-dependent in growth of GC-1 cell. H₂O₂-induced cytotoxicity (67.7 %) was blocked by the extract concentration- dependently. Furthermore, the extract also displayed a dose-dependent reduction of MDA formation on H₂O₂-induced lipid peroxidation. In conclusion, the extract of *Psoraleae fructus* has potent antioxidant activity.

Key words : *Psoraleae fructus*, *Psoralea corylifolia* L., dipheny-picryl-hydrazyl (DPPH), MTT assay, Hydrogen peroxide (H₂O₂), cytotoxicity, Lipid peroxidation (LPO), GC-1 cells

서 론

補骨脂 (PSORALEAE FRUCTUS)는 콩과 (Leguminosae)에 속한 일년생 초본인 補骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 의 성숙한 과실이다^{1,4)}. 補骨脂는 《雷公炮炙論》에 처음 출전되었으며⁵⁾, 《藥性論》에서 異名으로 破古紙로 기록되어 현재까지 통용되고 있다¹⁾. 약리작용으로는 심혈관 계통에 작용해서 관상동맥의 확장 작용과 혈류량을 현저히 증가시키고^{1,2,7)} 피부색소 증강작용과^{1,6,7)} 항암작용^{1,2,7)}, 항균작용²⁾이 있으며, 면역을 증강시키고^{1,2,7)}, 호흡기 계통에 작용하여 기관지수축을 이완시키며²⁾, 생식계통에 작용하여 마우스의 착상을 억제하는 효과가 있으며 estrogen과 유사한 작용이 보고 되었다^{1,2)}. 그 외 살충작용이 있는 것으로 밝혀졌다²⁾.

補骨脂의性は溫하고味는辛苦하며,腎經과脾經으로歸經한다¹⁻³⁾. 補骨脂는溫腎助陽, 納氣平喘, 溫腎止瀉 효능이 있다¹⁻³⁾.

補骨脂가응용되는방제를분류하면,腰痛과陽痿遺精, 遺尿尿頻 등腎氣不足증상과虛寒咳嗽와五更泄瀉에사용되고있다

¹⁾ 胡桃肉과杜沖을배오한《太平惠民和劑局方》의靑娥丸은腎虛腰痛을치료하고¹⁾,小茴香과가루내어술과함께복용하는《直指方》의茴香酒는打撲腰痛을치료한다¹⁾.小茴香과배오한《聖惠方》의補骨脂散은陽痿遺精, 尿頻遺尿를치료하며¹⁾,鹿角膠, 熟地黃, 兔絲子등과배오한《醫學正傳》의靑囊斑龍丸은陽痿早泄를치료하고¹⁾,小茴香등과배합한《魏氏家藏方》의破故紙丸은腎氣虛冷으로인한小便無道的병증에응용하며^{1,4)} 白茯苓, 益智仁등과배합한《嬰童類萃》의破故紙散은遺尿를다스린다^{1,4)}.

기혼부부의15%가불임부부이며이중50%정도는정자형성의질적양적인문제로말미암은남성불임인것으로보고되고있다⁶⁾.남성불임은최근환경적사회적변화로增加하는추세에있으며심리적,환경적,유전적요인등다양한요인이남성불임을유발하는것으로알려져있으나⁹⁻¹²⁾50%정도는원인이명확하게밝혀지지않은무정자증(azoospermia)또는감정자증(oligozoospermia)을나타내고있다¹³⁾.그러나종종이런그룹에서정자의농도가낮거나정자의운동성이떨어지거나형태적인이상과같은유사한현상이발견된다¹⁴⁾.또한생식세포들은산화스트레스에민감한반응을보이며,심각한경우불임까지초래할수있다는보고가있다¹⁴⁾.

* 교신저자 : 박성규, 서울시 동대문구 회기동1, 경희대학교 한의과대학

· E-mail : cervus@chol.com, · Tel : 02-961-0330

· 접수 : 2004/11/16 · 수정 : 2004/12/18 · 채택 : 2005/01/18

이에 본 연구는 補骨脂가 생식세포의 일종인 germ cell-1 spermatogonia (GC-1) 에 미치는 항산화 효과를 연구하기 위하여, 補骨脂의 DPPH에 의한 radical 소거활성, GC-1 에 대한 생존율, hydrogen peroxide 에 의해 유발된 GC-1 의 산화 스트레스에 대한 항산화효과, hydrogen peroxide에 의한 lipidperoxide (LPO) 함량에 미치는 변화에 대한 실험을 수행하여 보고하는 바이다.

실 험

1. 약재 및 시료의 조제

1) 약재

본 실험에서 사용된 補骨脂는 補骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 중국산으로 서울특별시 동대문구 제기동 경동약령시장의 원광약업사를 통하여 구입하여, 경희대학교 방제학교실에서 외부형태를 비교 조사하여 확인한 후 사용하였으며, 일부는 경희대학교 한의과대학 방제학 교실에 보관하였다.

2) 시료의 조제

補骨脂 50 g을 정확하게 중량을 측정된 뒤 환류추출기에 1차 증류수 1,000 mL와 함께 넣은 뒤 100℃ 가까이 온도가 상승하여 탱액이 끓는 시점으로부터 2시간동안 가열하여 추출한 다음, filter paper로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan)를 이용하여 농축액을 얻었다. 이 농축액을 동결건조기 (Eyela, Japan)를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물은 8.8 g을 얻었으며, 수율은 17.6% 이었다.

2. Cell culture

1) 세포주 및 시약

실험에 사용된 세포주는 GC-1 spg (spermatogonia, mouse)로서 America Tissue Cell Collection (ATCC, USA)에서 구입하였다. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)과 Fetal Bovine Serum (FBS) 및 trypsin-EDTA 등은 GIBCO BRL사 (USA)에서 구입되어 사용되었으며, 2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH)(Sigma, USA), ascorbic acid (Sigma, USA), ethanol (Duksan, Korea), tetrazolium salt 3, [4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, USA), Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, USA), hydrogen peroxide (Sigma, USA), sodium dodecyl sulfate (SDS), 2-thiobarbituric acid (TBA), malondiadehyde (MDA), n-butanol, pyridine 등이 Sigma (USA)에서 구입되어 사용되었다.

2) 세포 배양

GC-1 spg cell line은 37℃, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다. GC-1 은 75 cm² flask (Falcon, USA)에서 충분히 증식된 후 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS, Sigma) 용액으로 씻어준 후 50 mL flask 당 1 mL의 0.25 % trypsin-EDTA용액을 넣고 실온에서 1 분간 처리한 다음 trypsin용액을 버리고 37 °C에서 5분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대배양하였다. 탈착된 세포는 10 % FBS가

첨가된 DMEM배양액 10 mL에 부유시킨 다음 새로운 배양용기에 옮겨 1 : 20의 split ratio로 CO₂ 배양기 (37 °C, 5 % CO₂)에서 배양하였다.

3. DPPH에 의한 radical 소거 작용의 측정(DPPH radical scavenging method)¹⁵⁾

DPPH에 의한 radical scavenging activity를 알아보기 위하여 동결건조 된 시료를 증류수에 녹여서 1, 5, 10, 50, 100, 1000 µg/mL의 농도로 시액을 조제하였다. 양성 대조군으로 ascorbic acid를 사용하였고 시료와 같은 농도로 조제하였다. 96 well microplate (Corning, USA)에 동량의 ethanol에 녹인 0.1mM DPPH와 각 농도의 시액을 첨가한 후 잘 흔들어 섞어 준 후, 실온에서 30 분간 방치한 후 microplate spectrophotometer (Molecular Devices, USA)를 이용하여 517nm에서 흡광도를 측정하였다. Radical scavenging activity는 다음 공식으로 계산되었다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left[\frac{\text{AB}-\text{AT}}{\text{AB}} \right] \times 100$$

AB- absorbance of blank sample,

AT- absorbance of tested extract solution.

4. 補骨脂의 GC-1에 대한 cell viability 측정¹⁶⁾

補骨脂가 GC-1 의 증식에 미치는 효과를 알아보기 위하여 Mosmann(1983), Kotnik(1990) 등의 방법을 응용하였다. 96 well plate에 1×10⁵ cells/mL의 cell을 100 µL씩 넣고 37℃, 5% CO₂ incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS, Sigma) 용액으로 씻어 주었다. 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 시료 5, 10, 50, 100, 250, 500 µg/mL을 각 well에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나기 4시간 전에 PBS에 녹인 5 mg/mL tetrazolium salt 3, [4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, USA)를 20 µL씩 각 well에 처리한 후 알루미늄호일로 차광시킨 후 나머지 시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100 µL 처리한 후 37℃에서 2시간 방치 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell Viability는 다음 공식으로 계산되었다.

$$\text{Cell viability (\%)} = 100 \times \text{AT} / \text{AC}$$

AC- absorbance of control,

AT- absorbance of tested extract solution.

5. 補骨脂의 Hydrogen Peroxide-induced Cytotoxicity에 대한 항산화효과 측정

시료의 hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity에 대한 보호효과를 알아보기 위해 Mosmann(1983), Kotnik(1990) 등의 MTT test를 응용하여 다음과 같이 실험하였다. 96 well plate에 1×10⁵ cells/mL 의 cell을 100 µL씩 넣고 37℃, 5% CO₂ incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS, Sigma) 용액으로 씻어 주었다. PBS에 녹인 각각의 시료 10, 50, 100, 250, 500 µg/mL와 동량의 media를 처리 후 20시간동안 배양하였다. 배양액을 모두

제거한 후 FBS free DMEM에 녹인 200 uM H₂O₂을 각각의 well에 처리한 후 4시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 배지를 버리고 PBS로 세척한 후 PBS에 녹인 5mg/mL tetrazolium salt 3, [4,5-dimethylthiazol- 2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma, USA)를 20 μl씩 각 well에 처리한 후 알루미늄호일로 차광 후 4시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100 μl 처리한 후 37°C에서 2시간 방치 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Hydrogen Peroxide에 의한 Lipidperoxide (LPO) 생성에 관한 영향 측정¹⁷⁾

시료의 hydrogen peroxide에 의한 과산화지질의 생성에 대한 효과를 알아보기 위해 다음과 같이 실험하였다. 6 well plate (Corning, USA)에 2×10⁴ cells/mL의 cell을 5 mL 씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS, Sigma) 용액으로 씻어주었다. PBS에 녹인 각각의 시료 10, 50, 100, 250, 500 ug/mL와 동량의 media를 처리 후 18시간동안 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 FBS free DMEM에 녹인 200 uM H₂O₂을 각각의 well에 처리한 후 6시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 세포를 PBS로 2회 수세한 후 스크래퍼를 이용하여 PBS 500 μl를 넣고 긁어냈다. 이것을 1.5mL의 eppendorf tube에 담아 12,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상층액을 제거한 후 potassium phosphate buffer (PPB)를 첨가하여 cell을 풀어주었다. 부유된 cell을 -70 °C에서 5분간, 37 °C에서 5분간 방치 후 vortexing하는 과정을 4번 반복하는 freezing-thawing의 방법으로 cell을 lysis시켰다. 그 후 cell을 원심분리 하여 상층액을 취하고 상층액 중의 1 μl를 취해 Bradford's Method¹⁸⁾로 단백질을 정량하였다. 15 mL conical tube에 각 농도별 시료를 넣고 0.1M PPB (pH7.5), 8.1 % sodium dodecyl sulfate, 20 % acetate buffer (pH3.5), 0.8% 2-thiobarbituric acid (TBA)를 처리하였다. 95 °C에서 1시간 동안 incubation시킨 후 running water에서 식혔다. n-butanol:pyridine (15:1)의 혼합액을 가한 후 vortexing 한 후 3,000 rpm에서 20 분간 원심분리하였다. 532nm에서 상층액의 흡광도를 측정하였다. malondiadehyde(MDA) 농도는 free MDA로 표준선을 구하여 계산하였다.

7. 통계처리

실험성적은 평균치±표준오차 (Mean ± SE)로 나타내었으며, 대조군과 실험군과의 평균의 차이는 Student's t-test로 검정하여 p값이 0.05 미만일 때를 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

실험결과

1. DPPH에 의한 radical 소거 활성 측정

補骨脂의 농도에 따른 DPPH radical 소거 활성을 측정하였

다. 또한 활성은 대표적인 항산화 물질인 ascorbic acid의 활성과 비교하였다. Ascorbic acid와 補骨脂는 모두 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 활성이 증가하였다. 補骨脂는 500 ug/mL의 농도에서 53.5 %의 최대 DPPH radical 소거 활성을 나타냈으며, 100, 500, 1,000 ug/mL의 농도에서 각각 39.4, 53.5, 50.0 %의 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다.

Dose-response curve로부터 산출된 50 %의 DPPH radical 소거 활성을 나타내는 화합물의 농도(IC50)는 ascorbic acid는 0.009 mg/mL이었으며, 補骨脂는 0.427 mg/mL의 농도에서 유사한 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다.

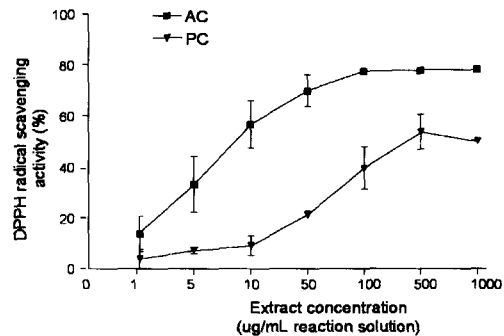


Fig. 1. DPPH radical-scavenging activity of ascorbic acid (AC) and aqueous extract from *Psoralea corylifolia* fructus (PC): Values indicate the mean of three replications. DPPH radical scavenging activity(%) = ((AB-AT)/ (AB-AT)₁₀₀ - AB) × 100. AB- absorbance of blank sample, AT- absorbance of tested extract solution.

2. GC-1 에 대한 cell viability 측정 결과

補骨脂가 GC-1의 성장 및 증식에 미치는 영향을 측정하기 위하여 농도의존적인 실험을 수행하였다. 補骨脂의 농도는 5, 10, 50, 100, 250, 500 ug/mL의 범위에 대하여 측정하였다. 補骨脂를 5 ug/mL 이하의 저농도에서 처리하였을 때 GC-1의 생존율에 변화를 미치지 않았다. 補骨脂를 50, 100, 250 ug/mL의 고농도에서 처리하였을 때 농도의존적으로 GC-1의 생존율을 증가시켰으나, 補骨脂 500 ug/mL의 농도에서는 GC-1의 생존율이 현저하게 저하되었다. 특히 補骨脂 100 ug/mL의 농도에서 GC-1의 생존율은 133 %로서 가장 높았다.

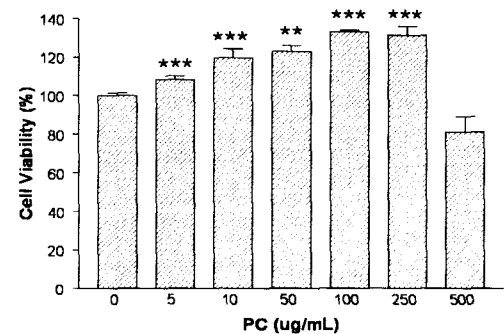


Fig. 2. Effect of aqueous extract from *Psoralea corylifolia* fructus (PC) on GC-1 in culture. GC-1 s were plated at a density of 1*10⁶ cells per plate and grown at 37 °C for 24 h. Response to aqueous extract from PC was dose dependent at 5-250 ug/mL. Values indicate the mean of three replications, expressed as mean ± standard error with respect to 100 % of control. * Significantly different from control (*: p<0.05, **: p<0.01 and ***: p<0.001)

3. Hydrogen peroxide-induced cytotoxicity에 대한 항산화효과 측정

GC-1에 대한 cell viability 결과에 근거하여 hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity를 측정하였다. 補骨脂의 농도는 10, 50, 100, 250, 500 ug/mL의 범위에 대하여 측정하였다. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 GC-1은 정상군에 비하여 67.7 %의 cytotoxicity를 나타내었다.

Hydrogen peroxide에 의해 유도된 GC-1에 대하여 補骨脂 처리군은 10, 50, 100, 250, 500 ug/mL의 농도에서 각각 86.3, 93.3, 118.1, 125.8, 136.9 %의 cell viability가 증가하여 농도의존적으로 H₂O₂-induced cytotoxicity에 대한 항산화 효과가 증가되었다. 특히 補骨脂 500 ug/mL의 농도처리군에서 H₂O₂-induced cytotoxicity에 대하여 가장 현저한 항산화 효과를 나타내었다.

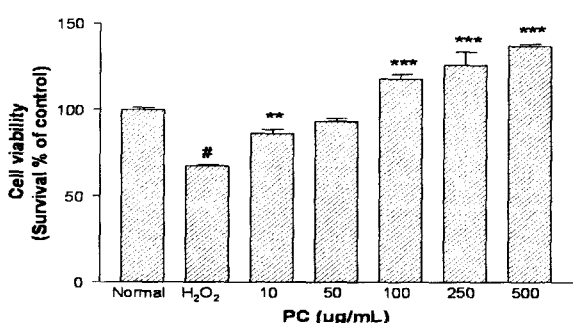


Fig. 3. The protection effect by aqueous extract from *Psoralea corylifolia fructus* (PC) on H₂O₂-induced cytotoxicity. Dose-dependent effect of PC on 200 uM H₂O₂-induced cytotoxicity. The effect of 10, 50, 100, 250, 500 ug/mL PC on H₂O₂-induced cytotoxicity in control cells. GC-1 spg cells were incubated with H₂O₂ in the presence or absence of PC at 37 °C for 20 h. Cells were exposed to H₂O₂ for 4 h. Each column or point represents the mean value ± S.E (n=12). # Significantly different from the normal value (#; p<0.05) and * Significantly different from the cells exposed to H₂O₂ alone (**; p<0.01 and ***; p<0.001), using Student's t-test.

4. Hydrogen Peroxide에 의한 Lipidperoxide(LPO) 함량 변화

본 연구의 결과 GC-1에 대하여 정상군의 과산화지질 함량은 6.41 MDA (nmol/mg protein) 인데 비하여, hydrogen peroxide에 의해 유도된 대조군은 10.60 MDA (nmol/mg protein)으로 유의성있게 증가하였다(p<0.002). 補骨脂 처리군은 50, 100, 250 ug/mL의 농도에서 각각 7.48, 7.08, 5.75 MDA (nmol/mg protein)으로 대조군에 비하여 농도의존적으로 유의성있게 감소하였다.

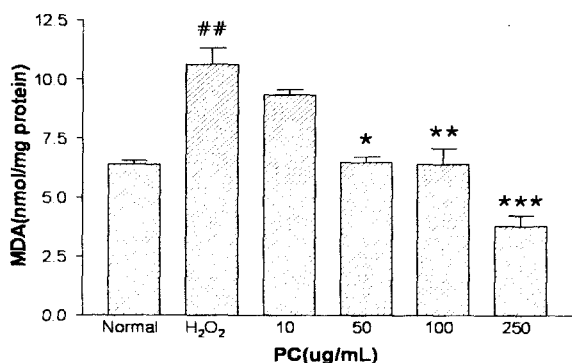


Fig. 4. The protection effect by aqueous extract from *Psoralea corylifolia fructus* (PC) on H₂O₂-induced lipid peroxidation. GC-1 spg cells were treated with H₂O₂ alone, or aqueous extract from PC for 24 hours. Total cell lysate from cultured cells were analyzed for MDA formation. Each column or point represents the mean value ± S.E (n=6). # Significantly different from the normal value (#; p<0.01) and * Significantly different from the cells exposed to H₂O₂ alone (**; p<0.05, ***; p<0.001), using Student's t-test.

고찰

기혼부부의 15%가 불임부부이며 이중 50% 정도는 정자형성의 질적 양적인 문제로 말미암은 남성불임인 것으로 보고되고 있다⁸⁾. 남성불임은 최근 증가하는 추세에 있으며, 심리적요인, 생식기의 감염, 주변환경으로부터 내분비 교란물질에 대한 노출, 유전적 요인 등으로 매우 다양한 요인이 남성불임을 유발하는 것으로 알려져 있으나⁹⁻¹¹⁾, 50% 정도는 그 원인이 명확하게 밝혀지지 않은 상황이다. 그러나 이런 그룹들에도 종종 유사한 현상이 발견되는데, 정자의 농도가 낮거나 정자의 운동성이 떨어지거나 형태적인 이상이 발견되는 경우들이다¹⁴⁾. 특히, 정자의 변형이나 형성 장애와 관련하여 흥미로운 보고는 이들 샘플에서 고농도의 reactive oxygen species (ROS)가 관찰되는 경우가 있다는 점이다. 전립선염을 포함하여 다른 감염 질환 등은 염증을 초래하게 되는데 이들은 정자의 질이나 생존력에 영향을 줌으로서 불임의 원인이 될 수 있으며¹⁹⁾, 특히 oxidative stress로 인한 seminal plasma의 염증반응이 정자형성장애의 원인이 될 수 있다²⁰⁾. 이러한 요인들은 정자의 운동성 및 acrosome membranes에 손상을 가져 오며, 몇몇의 환자의 경우는 seminal plasma에서 antioxidant scavengers가 결핍되어 있는 것으로 보고되었다²⁰⁾

정자형성과정 (spermatogenesis)은 체세포 분열과 감수분열 단계, 그리고 정자로의 분화 (spermiogenesis) 등을 포함하는 복잡한 과정을 포함하고 있다. 세포 내 항산화성 능력과 redox potential은 oxidative stress로부터 세포를 보호하는데 필수적임을 알 수 있는데, 정자형성과 밀접한 관계가 있는 정원세포 및 sertoli 세포 등 생식세포들도 산화 스트레스에 민감한 반응을 보이며, 심각한 경우 불임까지 초래 할 수 있다는 보고가 있다¹⁴⁾. 그밖에도 O₂ 등에 의한 ROS 생성과 이에 대항하는 세포 내 방어체계로서 항산화 효소 및 glutathione (GSH)과 같은 thiol redox potential이 세포사멸을 방지하는데 중요하다는 많은 보고가 있다^{21,22)}. 세포수준에서 산화물에 의한 손상은 세포 분열에서부터 성장 억제, 세포 노화 및 세포 사멸에 이르기까지 다양한 반응을 유도한다. 최근의 보고들에 의하면 oxidative stress를 야기하는 oxidant들이 세포 내 신호전달 체계 (signal transduction)를 통해 유전자 발현에 영향을 미치며 세포는 이러한 산화적 독성으로부터 적응을 위해 다양한 반응성을 나타낸다²³⁾. 실제로 H₂O₂는 cytochrome C-의존적 인 방법과 lysosome을 매개로 하는 경로, 그리고 poly (ADP-ribose) polymerase-p53 pathway를 통해 Jurkat T lymphocytes, HL60 cells, human airway epithelial cells 등에서 apoptosis를 유발한다고 보고 되었다²⁴⁾. 또한 전사조절인자인 AP-1이 세포내의 redox balance 및 oxidative stress에 민감하게 반응하는 매개체 역할을 함이 다양한 세포 형태에서 입증되었다²⁵⁾.

補骨脂는 《雷公炮炙論》에 처음 출전되었으며⁵⁾, 異名으로 《南州記》의 胡非子, 《藥性論》의 婆固脂, 破古紙, 《本草圖經》의 補骨脂, 《中藥志》의 胡故子, 黑故子, 《江西中藥》의 吉固子로 기록되어 있다¹⁾. 補骨脂가 응용되는 방제를 분류하면, 腰痛과 陽痿遺精, 遺尿頻數 등 腎氣不足 증상에 사용되고 있다¹⁾.

胡桃肉과 杜冲을 배운 《太平惠民和劑局方》의 青娥丸은 腎虛腰痛을 치료한다¹⁾. 小茴香과 배운 《聖惠方》의 補骨脂散은 陽痿遺精, 尿頻遺尿를 치료하며¹⁾, 鹿角膠, 熟地黃, 兔絲子 등과 배운 《醫學正傳》의 青囊斑龍丸은 陽痿早泄를 치료한다¹⁾. 小茴香 등과 배운 《魏氏家藏方》의 破故紙丸은 腎氣虛冷으로 인한 小便無道의 병증에 응용하며^{1,4)} 白茯苓, 益智仁 등과 배운 《嬰童類萃》의 破故紙散은 遺尿를 다스린다^{1,4)}. 따라서 補骨脂는 胡桃肉, 杜冲, 小茴香, 鹿角膠, 熟地黃, 兔絲子, 白茯苓, 益智仁 등의 약물과 함께 조성되어 남성불임증 및 성기능 개선의 효과가 있음을 유추할 수 있다.

고²⁶⁾ 등은 補骨脂 추출물이 항산화효과 및 NO생성억제효과가 있다는 것을 밝혔으며, Tang과 Haraguchi는 補骨脂 추출물에서 항산화물질에 대해 밝혔으나^{27,28)}, 補骨脂의 GC-1에 대한 항산화 효과는 아직 보고되어 있지 않다. DPPH는 그 자체가 매우 안정한 free radical로서 517 nm에서 특징적인 광흡수성을 나타내는 보라색 화합물이다. 이 radical은 알코올 등의 유기용매에서 매우 안정하며, 특히 여러 가지 항산화 기작 중 proron-radical scavenger 에 의하여 탈색되기 때문에 항산화활성을 육안으로도 쉽게 관찰할 수 있는 장점이 있다²⁹⁾. 일반적으로 반응성이 강한 DPPH radical 은 항산화제로부터 전자 혹은 수소원자를 얻음으로써 안정한 형태의 생성물인 DPPH-H로 전환하는 것으로 알려져 있다. 補骨脂의 농도는 저농도와 고농도의 차이를 비교하기 위하여 1, 5, 10, 50, 100, 1000 ug/mL의 농도 범위에서 측정하였다. 실험 결과 補骨脂 추출물은 DPPH radical에 대하여 농도의존적인 radical 소거 효과를 나타내었다.

補骨脂가 GC-1의 성장 및 증식에 미치는 영향을 측정하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 그 결과 補骨脂를 5 ug/mL 및 10 ug/mL의 저농도에서 처리하였을 때 GC-1의 생존율은 각각 108.5% 및 119.7%로 유의성 있게 변화하였으며 (p=0.001, p=0.0001), 고농도에 속하는 50, 100, 250 ug/mL에서 처리하였을 때 각각 122.9, 133.2, 131.2%로서 농도의존적으로 GC-1의 생존율을 증가시켰다. 특히 補骨脂 100 ug/mL의 농도에서 GC-1의 생존율은 133%로서 가장 높았다. 반면 補骨脂 500 ug/mL의 농도에서는 GC-1의 생존율이 81.2%로 현저하게 저하되었다. 이와 같이 GC-1에 대한 안전한 cell viability 결과에 근거하여 補骨脂가 GC-1의 산화적 손상을 보호할 수 있는가를 관찰하기 위하여 hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity를 측정하였다. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 GC-1은 정상군에 비하여 67.7%의 cytotoxicity를 나타내었다. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 GC-1에 대하여 補骨脂 처리군은 10, 50, 100, 250, 500 ug/mL의 농도에서 각각 86.3, 93.3, 118.1, 125.8, 136.9%로서 농도의존적으로 H₂O₂-induced cytotoxicity에 대한 항산화 효과가 증가되었다. 특히 補骨脂 500 ug/mL의 농도처리군에서 H₂O₂-induced cytotoxicity에 대하여 가장 유의성 있는 항산화 효과를 나타내었다. Lipidperoxide (LPO)는 세포막의 지질성분이 독성 물질들에 의해서 손상을 받게되면 지질성분의 산화반응이 촉진되어 나타나는 반응산물이다³⁰⁾. 이러한 LPO 함량은 생체 조직 중에서 생화학적 조직 손상의 척도로 널리 이용되며

조직의 산화적 손상에 의해 야기되는 병리현상의 척도로도 활용되어진다. 지질과산화 억제 활성을 측정하기 위하여 사용되는 지질로는 불포화지방산을 다량으로 함유하고 hydrogen peroxide에 의하여 산화가 용이하게 일어나 지질과산화물인 malondiadehyde (MDA)를 잘 생성하는 GC-1의 protein을 분리하여 사용하였다³¹⁾.

본 연구의 결과 GC-1에 대하여 정상군의 과산화지질 함량은 6.41 MDA (nmol/mg protein) 인데 비하여, hydrogen peroxide에 의해 유도된 대조군은 10.60 MDA (nmol/mg protein)으로 유의성있게 증가하여 지질성분의 산화반응이 촉진되었음을 확인하였다 (p=0.002). 그러나 補骨脂 처리군은 고농도인 50, 100, 250 ug/mL의 농도에서 각각 7.48, 7.08, 5.75 MDA (nmol/mg protein)으로 대조군에 비하여 농도 의존적으로 유의성있게 감소하였다. 특히 최대 농도인 250 ug/mL의 농도에서 가장 강력한 항산화 효과를 나타내었다.

결론

溫腎助陽의 효능으로 활용되고 있는 補骨脂가 남성불임에 미치는 기전을 밝히기 위하여, 정자 발생과정 상 B type의 정원세포 (spermatogonia)와 제 1정모세포 (primary spermatocytes) 사이에 속하는 GC-1에 미치는 항산화작용을 비교하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

DPPH radical 소거 활성에 대하여 補骨脂는 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 활성이 증가하여 최대 53.5%의 강한 소거 효과를 보였으며, 50%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내는 補骨脂의 IC50 값은 0.427 mg/mL로 나타나 비교적 높은 활성을 나타내었다. GC-1에 대한 성장 및 증식에 미치는 영향을 측정하기 위하여 cell viability를 측정된 결과 補骨脂는 농도의존적으로 GC-1의 생존율을 증가시켰으며, 특히 補骨脂 100 ug/mL의 농도에서 GC-1의 생존율은 133%로서 가장 높았다. GC-1에 대한 hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity를 측정된 결과 補骨脂는 농도의존적으로 항산화 효과가 증가되었으며, 특히 補骨脂 500 ug/mL의 농도처리군에서 가장 유의성 있는 항산화 효과를 나타내었다. GC-1에 대한 hydrogen peroxide에 의해 유도된 lipidperoxide (LPO)를 측정된 결과 補骨脂는 농도의존적으로 MDA 함량이 감소하였으며, 특히 補骨脂 250 ug/mL의 농도처리군에서 가장 유의성 있는 항산화 효과를 나타내었다.

따라서 補骨脂는 DPPH에 의한 free radical에 대하여 강한 소거 활성이 있으며 생식세포의 일종인 GC-1의 생존율을 증가시키는 효과를 확인하였고, hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity 및 lipidperoxide (LPO)에 대하여 유의성 있는 개선 작용이 있음을 확인하였다.

참고문헌

1. 國家中醫藥管理局中華本草編委會, 中華本草, 北京, 上海科學技術出版社, pp.3348-3349, 1999.

2. 現代中國藥文庫 編輯委員會, 中藥現代研究與應用, 北京, 學院出版社, 제3권, pp.2467-2488, 1998.
3. 鄭虎占, 董澤宏, 余靖 主編, 中藥現代研究與臨床應用 I, 北京, 學院出版社, pp.382-387, 1994.
4. 전국한의과대학 공동교재편찬위원회 편저, 本草學, 서울, 永林社, pp.609-610, 2004.
5. 雷駁, 雷公炮子論, 上海, 上海中醫學院出版社, pp.71-72, 1986.
6. 黃泰康 主編, 常用中藥成分與藥理手冊 하권, 북경, 中國醫藥科技出版社, pp.1114-1115, 1999.
7. 안덕균, 原色韓國本草圖鑑, 서울, 교학사, 1998, p.673
8. Mosher WD. Reproductive impairments in the United States. 1965-1982. *Demography*. 22:415-430, 1985.
9. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decrasing quality of semen during past 50 years. *Br Med J*. 305:609-613, 1992.
10. Lamb DJ. Hormonal disruptors and male infertility: Are men at serious risk. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 26:30-33, 1997.
11. Okabe M, Ikawa M, Ashkenas J. Male infertility and the genetics of spermatogenesis. *Am J HuM Genet*. 62:1274-1281, 1998.
12. 이경호, 이정민, 이건수, 남성불임의 유전적 요인 및 불임유전자 현황, *대한내분비학회지*, 16(6):550-561, 2001.
13. Foresta C, Moro E, Ferlin AZ. Y chromosome mocrodeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev*. 22:226-239, 2001.
14. Reddi PP. Transcriptional regulation of spermiogenesis: insights from the study of the gene encoding the acrosomal protein SP-10. *J Reprod Immunol*. 53(1-2):25-36, 2002.
15. Tanaka N, Nishikawa K, Ishimaru K. Antioxidative capacity of extracts and constituents in *Cornus capitata* adventitious roots. *Agric Food Chem*. 51(20):5906-5910, 2003.
16. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65(1-2):55-63, 1983.
17. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 95(2):351-358, 1979.
18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72: 248-254, 1976.
19. Ludwig M. Impact of intracytoplasmic sperm injection on the activation and fertilization process of oocytes. *Reprod Biomed Online*. 3(3):230-240, 2001.
20. Pasqualotto FF. Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. *Urology*. 55(6):881-885, 2000.
21. Smith R, Vantman D, Ponce J, Escobar J, Lissi E. Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Hum Reprod*. 11(8):1655-1660, 1996.
22. Aitken RJ, Baker MA. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Mol Cell Endocrinol*. 216(1-2):47-54, 2004.
23. Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol*. 192(1):1-15, 2002.
24. Hampton MB, Orrenius S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett*. 414(3):55255-6, 1997.
25. Pinkus R. Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-kappaB, and glutathione S-transferase gene expression. *J Biol Chem*. 271(23):13422-13429, 1996
26. 곽용석, 補骨脂의 생리활성성분연구, 원광대학교대학원, 2000.
27. Tang SY, Whiteman M, Peng ZF, Jenner A, Yong EL, Halliwell B. Characterization of antioxidant and antiglycation properties and isolation of active ingredients from traditional chinese medicines. *Free Radic Biol Med*. 36(12):1575-1587, 2004.
28. Haraguchi H, Inoue J, Tamura Y, Mizutani K. Antioxidative components of *Psoralea corylifolia* (Leguminosae). *Phytother Res*. 16(6):539-544, 2002.
29. Blois MS. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature*. 181:1199-1200, 1958.
30. David R. Mechanisitic toxicology; A radical perspective. *J.P harm. pharmacol*. 41:505-511, 1989.
31. 이상준, 정하열, 이인경, 유익동, 쑥의 에탄올 추출물에 함유된 Flavonoid 들의 분리 및 동정과 이들의 항산화 효과, *Korean J. Food SCI. Technol*. 31(3):815-822, 1999.