

山茱萸가 남성 생식세포 GC-1의 항산화에 미치는 영향

오명숙 · 김도림 · 성은진 · 장문석¹ · 박성규*

경희대학교 한의과대학 방제학교실, 1: 하버드대학교 의과대학 소아병원

Antioxidant Effects of Corni Fructus in GC-1 Cells

Myung Sook Oh, Do Rim Kim, Eun Jin Sung, 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 Corni fructus. The extract was studied for diphenyl-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 200 µg/mL. The extract at concentrations of 10-500 µg/ml showed dose-dependent in growth of GC-1 cell. H₂O₂-induced cytotoxicity (63.0%) was blocked by the extract (10, 50, 100, 250 and 500 µg/ml) concentration-dependently. Furthermore, the extract (50, 100 and 250 µg/ml) also displayed a dose-dependent reduction of MDA formation on H₂O₂-induced lipid peroxidation. In conclusion, the extract of Corni fructus has potent antioxidant activity.

Key words : Corni fructus, Cornus officinalis Sieb. et Zucc., diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH), MTT assay, hydrogen peroxide (H₂O₂), cytotoxicity, lipid peroxidation (LPO), GC-1 cells

서 론

山茱萸(Corni fructus)는 산수유과(Cornaceae)의 落葉小喬木인 산수유나무 *Cornus officinalis* SIBE. et. Zucc.의 성숙한 과실이다¹⁾. 山茱萸는 肝 腎經으로 入하고 味가 酸, 性은 微溫하며²⁾, 《神農本草經》에 “溫中, 逐寒濕痺, 久服輕身”이라 최초로 기재되었으며³⁾, 《名醫別錄》에는 “主治強陰, 益精, ... 久服 明目, 強力, 長年”이라 기재되었고⁴⁾, 《本草綱目》에는 “補腎氣, 興陽道, 堅陰莖, 添精髓, 止老人尿不節”이라 기재되어⁵⁾, 生殖機能 強化 및 抗老化에 일정한 효과가 있음을 제시해 주고 있다.

山茱萸의 약리작용은 면역계통에 있어 비특이성 면역기능을 증진시키는 작용이 있으며, 혈당강하 작용, 항혈소판응집 작용, 항염 작용, 이뇨강압 작용 등이 있는 것으로 알려졌다⁶⁾.

산수유에 대한 최근의 연구보고로 Jeng 등⁷⁾은 산수유 열추출물이 사람 정자의 motility를 증가시킨다고 보고하였고, Seeram 등⁸⁾은 산수유의 성분 중의 하나인 anthocyanins이 항

산화 활성을 나타낸다고 보고 하였으며, 송 등⁹⁾은 국내에서 생산된 약용작물들을 대상으로 항산화 활성물질을 탐색한 결과 홍화씨, 황금 등과 함께 산수유가 항산화 활성이 높은 약재라고 보고하였다.

남성불임의 가장 큰 원인은 정자 형성 장애로서 남성불임 환자 중 약 80~90%가 여기에 해당 한다¹⁰⁾.

특히 정자의 변형이나 형성 장애와 관련하여 고농도의 reactive oxygen species (ROS)가 관여되어 있는데, 여러 감염질환 등에 의한 염증은 정자의 질이나 생존력에 영향을 줌으로서 불임의 원인이 될 수 있으며¹¹⁾, 특히 oxidative stress로 인한 seminal plasma의 염증반응이 정자형성장애의 원인이 될 수 있다고 보고되고 있다¹²⁾.

이에 본 연구는 補益肝腎, 澀精의 효능으로 활용되고 있는 山茱萸가 생식세포의 일종인 germ cell-1 spermatogonia (GC-1)에 미치는 항산화 효과를 연구하기 위하여, 山茱萸의 DPPH에 의한 radical 소거활성, GC-1에 대한 생존율, hydrogen peroxide에 의해 유발된 GC-1의 산화 스트레스에 대한 항산화효과, hydrogen peroxide에 의한 lipidperoxide (LPO) 함량에 미치는 변화에 대한 실험을 수행하여 보고하는 바이다.

* 교신저자 : 박성규, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 한의과대학

· E-mail : cervus@chol.com, · Tel : 02-961-0536

· 접수 : 2005/09/06 · 수정 : 2005/10/10 · 채택 : 2005/11/04

실 험

1. 약재 및 시료의 조제

1) 약재

본 실험에서 사용된 山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 는 한국 구례산으로 서울특별시 동대문구 제기동 경동약령시장의 원광약업사를 통하여 구입하여, 경희대학교 방제학교실에서 외부형태를 비교 조사하여 확인한 후 사용하였으며, 일부는 경희대학교 한의과대학 방제학 교실에 보관하였다.

2) 시료의 조제

산수유 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 16.0 g을 얻었으며, 수율은 32% 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), malondialdehyde (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-EDTA 용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin 용액을 버리고 37 °C에서 5분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대 배양하였다. 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 측정¹³⁾

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 0.1 mM DPPH와 각 농도의 시액을 첨가한 후 잘 흔들어 섞어 준 후, 실온에서 30 분간 방치한 후 microplate spectrophotometer (Molecular Devices, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. Radical scavenging activity는 다음 공식으로 계산되었다. DPPH radical scavenging activity (%) = [(AB-AT)/ AB] × 100, AB- absorbance of blank sample, AT- absorbance of tested extract solution.

4. 산수유의 GC-1에 대한 cell viability 측정¹⁴⁾

산수유가 GC-1의 증식에 미치는 효과를 알아보기 위하여 Mosmann(1983), Kotnik(1990) 등의 방법을 응용하였다. 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 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 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 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 다음 공식으로 계산되었다. Cell viability (%) = 100 × AT/ AC, AC- absorbance of control, AT- absorbance of tested extract solution.

5. 산수유의 Hydrogen Peroxide-induced Cytotoxicity에 대한 산화효과 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 1×10⁴ cells/well의 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 18시간동안 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 FBS free DMEM에 녹인 200 µM H₂O₂을 각각의 well에 처리한 후 6시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나기 4시간 전에 5 mg/mL PBS에 녹인 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℃에서 2시간 방치 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Hydrogen Peroxide에 의한 Lipidperoxide (LPO) 생성에 관한 영향 측정¹⁵⁾

시료의 hydrogen peroxide에 의한 과산화지질의 생성에 대한 효과를 알아보기 위해 다음과 같이 실험하였다. 6 well plate

(Corning, USA)에 1×10^5 cells/well 의 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 ug/mL 와 동량의 media를 처리 후 18시간동안 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 FBS free DMEM에 녹인 200 uM H₂O₂ 5 mL 을 각각의 well에 처리한 후 6시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 세포를 PBS로 2회 수세한 후 스크래퍼를 이용하여 PBS 500 μ l를 넣고 긁어냈다. 이것을 1.5 mL의 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 μ l를 취해 Bradford's Method¹⁶⁾로 단백질을 정량하였다. 15 mL cornical 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. 532 nm에서 상층액의 흡광도를 측정하였다. malondiadehyde(MDA) 농도는 free MDA 로 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.

결 과

1. DPPH에 의한 radical 소거 활성 측정

산수유의 농도에 따른 DPPH radical 소거 활성을 측정하였다. 또한 활성은 대표적인 항산화 물질인 ascorbic acid의 활성과 비교하였다. Ascorbic acid와 산수유는 모두 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 활성이 증가하였다.

산수유는 1,000 ug/mL의 농도에서 72.1%의 최대 DPPH radical 소거 활성을 나타냈으며, 100, 500 ug/mL의 농도에서 각각 41.2, 60.3%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다.

Dose-response curve로부터 산출된 50 %의 DPPH radical 소거 활성을 나타내는 화합물의 농도(IC50)는 ascorbic acid는 9 μ g/ml이었으며, 산수유는 200 μ g/ml의 농도에서 유사한 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다(Fig. 1).

2. GC-1 에 대한 cell viability 측정 결과

산수유가 GC-1 의 성장 및 증식에 미치는 영향을 측정하기 위하여 농도의존적인 실험을 수행하였다.

산수유의 농도는 5, 10, 50, 100, 250, 500 ug/mL의 범위에 대하여 측정하였다. 산수유를 10, 50, 100, 250 ug/mL의 농도에서 처리하였을 때 농도의존적으로 GC-1 의 생존율을 증가시켰으며, 특히 산수유 500 ug/mL의 농도에서 GC-1의 생존율이 171.5%로서 가장 높았다(Fig. 2).

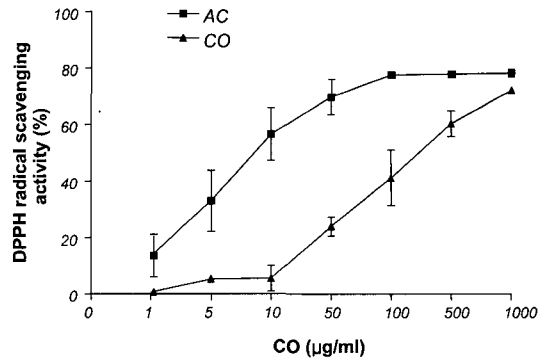


Fig. 1. DPPH radical-scavenging activity of ascorbic acid (AC) and Corni fructus (CO): Values (N=3) indicate mean \pm S.E and DPPH radical scavenging activity (%) = [(AB-AT)/ AB]x100, AB- absorbance of blank sample, AT-absorbance of tested extract solution.

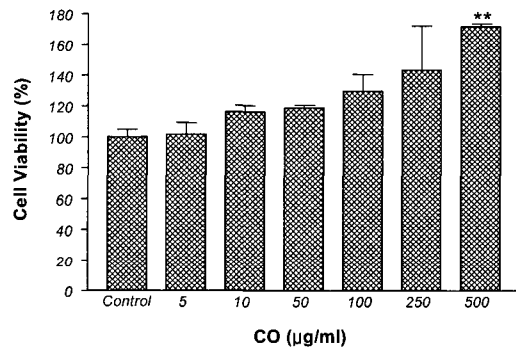


Fig. 2. Effect of Corni fructus (CO) on GC-1 spg cells. GC-1 spg cells were seeded at a density of 1×10^5 cells/ml and grown at 37°C for 24 h. Response to aqueous extract from Corni fructus was dose-dependent. Each column represents mean \pm S.E. (n=6) with respect to 100% of control. * indicates the mean is significantly different from the control (**: p<0.01).

3. Hydrogen peroxide-induced cytotoxicity에 대한 항산화효과 측정

GC-1 에 대한 cell viability 결과에 근거하여 hydrogen peroxide 에 의해 유도된 cytotoxicity를 측정하였다. 산수유의 농도는 10, 50, 100, 250, 500 ug/mL의 범위에 대하여 측정하였다. Hydrogen peroxide 에 의해 유도된 GC-1 은 정상군에 비하여 63.0%의 cytotoxicity를 나타내었다.

Hydrogen peroxide 에 의해 유도된 GC-1 에 대하여 산수유 처리군은 10, 50, 100, 250, 500 ug/mL의 농도에서 각각 88.4 \pm 3.6%, 109.2 \pm 6.1%, 120.6 \pm 1.2%, 130.9 \pm 4.6% 및 133.9 \pm 4.5% 의 cell viability가 증가하여 농도의존적으로 H₂O₂-induced cytotoxicity에 대한 항산화 효과가 증가되었다(Fig. 3).

4. Hydrogen Peroxide에 의한 Lipidperoxide(LPO) 함량 변화

본 연구의 결과 GC-1 에 대하여 정상군의 과산화지질 함량은 6.1 MDA (nmol/mg protein) 인데 비하여, hydrogen peroxide

에 의해 유도된 대조군은 10.5 MDA (nmol/mg protein) 으로 유의성있게 증가하였다(p<0.01).

산수유 처리군은 50, 100, 250 ug/mL의 농도에서 각각 8.2, 7.0, 5.6 MDA (nmol/mg protein) 으로 대조군에 비하여 농도의존적으로 유의성있게 감소하였다(p<0.05, p<0.05 및 p<0.001). 특히 산수유 250 ug/mL의 농도처리군에서 MDA 형성이 현저하게 변화하였다(Fig. 4).

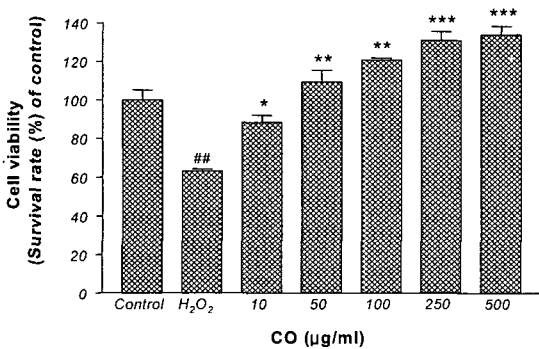


Fig. 3. Protective effect of aqueous extract from Corni fructus (CO) on H₂O₂-induced cytotoxicity. Equal volumes of predetermined concentrations of CO (10, 50, 100, 250 ug/ml in PBS) and medium were added to each well and the plate was incubated for 18 h at 37°C in a CO₂ incubator. Then 5 ml of 200 μM H₂O₂ in FBS-free DMEM was added to each well and the plate was incubated for 6 h. All values are represented as mean ± SE (n=3) ## indicates the mean is significantly different from the control (##: p(0.01) and * indicates the mean is significantly different from the cells exposed to H₂O₂ alone (*: p<0.05, **: p<0.01 and ***: p<0.001).

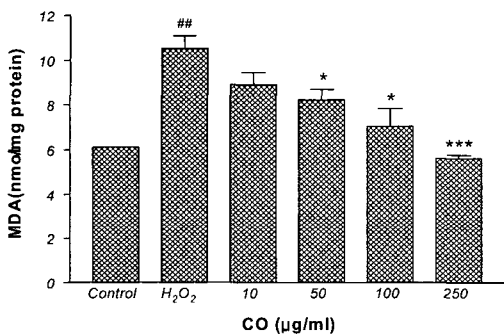


Fig. 4. Effect of aqueous extract from Corni fructus (CO) on H₂O₂-induced MDA formation in GC-1 spg cells. Equal volumes of predetermined concentrations of CO (10, 50, 100, 250 ug/ml in PBS) and medium were added to each well and the plate was incubated for 18 h at 37°C in a CO₂ incubator. Then 5 ml of 200 μM H₂O₂ in FBS-free DMEM was added to each well and the plate was incubated for 6 h. Each column or point represents the mean ± SE (n=6). # indicates the mean is significantly different from the normal value (##: p<0.01) and * indicates the mean is significantly different from the cells exposed to H₂O₂ alone (*: p<0.05 and ***: p<0.001).

고찰

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 필수적인 역할을 할 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 있다¹⁷⁾. 이러한 요인들은 정자의 운동성 및 acrosome membranes에 손

상을 가져 오며, 몇몇의 환자의 경우는 seminal plasma에서 antioxidant scavengers가 결핍되어 있는 것으로 보고되었다¹⁸⁾.

DPPH는 그 자체가 매우 안정한 free radical로서 517 nm에서 특징적인 광흡수성을 나타내는 보라색 화합물이다¹⁹⁾. 일반적으로 반응성이 강한 DPPH radical은 항산화제로부터 전자 혹은 수소원자를 얻음으로써 안정한 형태의 생성물인 DPPH-H로 전환하는 것으로 알려져 있다.

산수유의 농도는 저농도와 고농도의 차이를 비교하기 위하여 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 ug/mL의 농도 범위에서 측정하였다. 실험 결과 산수유 추출물은 DPPH radical에 대하여 농도의존적인 radical 소거 효과를 나타내었다. 산수유가 GC-1의 성장 및 증식에 미치는 영향을 측정하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 그 결과 산수유를 5 ug/mL의 저농도에서 처리하였을 때 GC-1의 생존율은 각각 101.7%로 변화하였으며, 10, 50, 100, 250, 500 ug/mL에서 처리하였을 때 각각 116.4, 118.8, 129.7, 143.4, 171.5%로서 농도의존적으로 GC-1의 생존율을 증가시켰다.

이와 같이 GC-1에 대한 안전한 cell viability 결과에 근거하여 산수유가 GC-1의 산화적 손상을 보호할 수 있는가를 관찰하기 위하여 hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity를 측정하였다. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 GC-1은 정상군에 비하여 63.0%의 cytotoxicity를 나타내었다. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 GC-1에 대하여 산수유 처리군은 10, 50, 100, 250, 500 ug/mL의 농도에서 각각 88.4, 109.2, 120.6, 130.9, 133.9%로서 농도의존적으로 H₂O₂-induced cytotoxicity에 대한 항산화 효과가 증가되었다. 특히 산수유 500 ug/mL의 농도처리군에서 H₂O₂-induced cytotoxicity에 대하여 가장 유의성 있는 항산화 효과를 나타내었다. 세포막의 지질성분이 독성 물질들에 의해서 손상을 받게되면 지질성분의 산화반응이 촉진되어 나타나는 반응산물인 Lipidperoxide (LPO) 함량은 생체 조직 중에서 생화학적 조직 손상의 척도로 널리 이용되며 조직의 산화적 손상에 의해 야기되는 병리현상의 척도로도 활용되어 진다²⁰⁾. 지질과산화 억제 활성을 측정하기 위하여 사용되는 지질로는 불포화지방산을 다량으로 함유하고 hydrogen peroxide에 의하여 산화가 용이하게 일어나 지질과산화물인 malondialdehyde (MDA)를 잘 생성하는 GC-1의 protein을 분리하여 사용하였다²¹⁾.

본 연구의 결과 GC-1에 대하여 정상군의 과산화지질 함량은 6.1 MDA (nmol/mg protein)인데 비하여, hydrogen peroxide에 의해 유도된 대조군은 10.5 MDA (nmol/mg protein)으로 유의성있게 증가하여 지질성분의 산화반응이 촉진되었음을 확인하였다. 그러나 산수유 처리군은 고농도인 50, 100, 250 ug/mL의 농도에서 MDA 함량은 각각 8.2, 7.0, 5.6 (nmol/mg protein)으로 대조군에 비하여 농도 의존적으로 유의성있게 감소하였다. 특히 최대 농도인 250 ug/mL의 농도에서 가장 강력한 항산화 효과를 나타내었다.

결론

補益肝腎, 滋精의 효능으로 활용되고 있는 山茱萸가 남성불임

에 미치는 기전을 밝히기 위하여, 정자 발생과정 상 B type의 정원 세포 (spermatogonia)와 제 1정모세포 (primary spermatocytes) 사이에 속하는 GC-1 에 미치는 항산화작용을 비교하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

DPPH radical 소거 활성에 대하여 산수유는 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 활성이 증가하여 최대 72.1%의 강한 소거 효과를 보였으며, 50%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내는 산수유의 IC50 값은 200 ug/mL로 나타나 비교적 높은 활성을 나타내었다. GC-1 에 대한 성장 및 증식에 미치는 영향을 측정하기 위하여 cell viability를 측정 한 결과 산수유는 농도의존적으로 GC-1 의 생존율을 증가시켰으며, 특히 산수유 500 ug/ml의 농도에서 GC-1 의 생존율은 171.5%로서 가장 높았다. GC-1 에 대한 hydrogen peroxide 에 의해 유도된 cytotoxicity를 측정 한 결과 산수유는 농도의존적으로 항산화 효과가 증가되었으며, 특히 산수유 500 ug/mL의 농도처리군에서 가장 유의성 있는 항산화 효과를 나타내었다. GC-1 에 대한 hydrogen peroxide 에 의해 유도된 lipidperoxide (LPO) 를 측정 한 결과 산수유는 농도 의존적으로 MDA 함량이 감소하였으며, 특히 산수유 250 ug/ml의 농도 처리군에서 가장 유의성 있는 항산화 효과를 나타내었다.

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

감사의 글

이 연구는 2005년도 경희대학교 지원에 의한 결과임 (KHU-20050426)

참고문헌

1. 全國韓醫科大學本草學共同教材編纂委員會. 本草學. 서울, 영림사. p 690, 2004.
2. 國家中醫藥管理局《中華本草》編委會. 中華本草. 상해, 상파과학기술출판사. p 4931, 1998.
3. 孫星衍. 神農本草經. 臺北, 文光圖書有限公司. pp 173-174, 1979.
4. 陶弘景. 名醫別錄. 北京, 人民衛生出版社. pp 230-231, 1986.
5. 李時珍. 本草綱目. 北京, 人民衛生出版社. 3, 2094, 1978.
6. 김호철. 한약약리학. 서울, 집문당. pp 495-496, 2001.
7. Jeng, H., Wu, C.M., Su, S.J., Chang, W.C. A substance isolated from *Cornus officinalis* enhances the motility of human sperm. *Am J Chin Med* 25(3-4):301-306, 1997.
8. Seeram, N.P., Schutzki, R., Chandra, A., Nair, M.G. Characterization, quantification, and bioactivities of anthocyanins in *Cornus* species. *J Agric Food Chem* 50(9):2519-2523, 2002.
9. 송정춘, 박남규, 허한순, 방면호, 백남인. 국내산 약용식물의 항산화물질 탐색 및 분리. *한국약용작물학회지* 8(2):94-101, 2000.
10. 이복희. 남성의 불임에 영향을 미치는 제요인 분석. *Chung-Ang Journal of Human Ecology* 15, 193-202, 2002.
11. Ludwig, M., Dimitrakov, J., Diemer, T. Prostatitis syndrome. Changes in the ejaculate and effects on fertility. *Der Urologe A* 40, 18-23, 2001.
12. Pasqualotto, F.F., Sharma, R.K., Potts, J.M. Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. *Urology* 55(6): 881-885, 2000.
13. 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.
14. 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
15. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95(2):351-358, 1979.
16. Bradford, M.M. 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.
17. Reddi, P.P., Shore, A.N., Acharya, K.K., Herr, J.C. 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.
18. Smith, R., Vatman, D., Ponce, J. Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Biology of Reproduction* 30, 323-332, 1984.
19. Blois, M.S. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature* 181, 1199-1200, 1958.
20. David, J.R. Mechanistic toxicology; A radical perspective. *J.P harm. pharmacol* 41, 505-511, 1989.
21. 이상준, 정하열, 이인경, 유익동, 송의. 에탄올 추출물에 함유된 Flavonoid 들의 분리 및 동정과 이들의 항산화 효과. *Korean J Food SCI Technol* 31(3):815-822, 1999.