

## 黑芝麻가 Leydig cell의 항산화에 미치는 영향

장문석, 정규진, 장원규, 박성규\*

경희대학교 한의과대학 처방제형학교실

### The Antioxidant Activity of Sesami Semen Nigrum on Leydig TM3 cells

Mun Seog Chang, Kyujin Chung, Won Kyu Chang, and Seong Kyu Park\*

Dept. of Prescriptionology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Seoul, 130-701, Korea

#### ABSTRACT

**Objectives :** The purpose of this study was to estimate the antioxidant activity of Sesami Semen Nigrum extract (SSN) on mouse Leydig cells, TM3.

**Methods :** Cell viability assays were performed. The protective effects of SSN against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in Leydig cells were examined by measuring cell viability. Lipid peroxidation levels and antioxidant enzyme concentrations such as SOD and catalase were measured.

**Results :** Cell viability of Leydig cells increased with SSN concentration. Cell viability of Leydig cells was 136.66% when SSN concentration was 50  $\mu$ g/ml. Cell viability of the hydrogen peroxide group was statistically decreased ( $p < 0.01$ ) compared with the control group. Antioxidant effect of SSN was measured and the protective effect of SSN concentration were 5, 10, 50  $\mu$ g/ml. LPO were decreased significantly at 5, 50  $\mu$ g/ml of SSN concentrations. SOD activity was increased at 1, 10, 50  $\mu$ g/ml of SSN concentrations. Catalase activity was significantly increased at 123.7, 133.3 and 131.9 units/mg protein when SSN concentrations were 5, 10 and 50  $\mu$ g/ml, respectively.

**Conclusions :** In conclusion, Sesami Semen Nigrum extract has antioxidant activities in Leydig cells against oxidative stress.

**Key words :** Sesami Semen Nigrum extract (SSN), Leydig cells, Cell viability, LPO, SOD, Catalase

## 서론

黑芝麻는 참깨과(胡麻科: Pedaliaceae)에 속한 일년생 초본인 참깨 *Sesamum indicum* L.의 종자이다. 補肝腎, 益精血, 潤腸燥하는 효능이 있어서, 眩暈眼花, 耳鳴耳聾, 鬚髮早白, 病後脫髮, 腸燥便秘 등의 치료에 사용되었다<sup>1)</sup>. 黑芝麻가 사용된 처방들을 살펴보면 『聖濟總錄』에서는 益壽延年, 祛客熱의 목적으로 胡麻散이 사용되었으며<sup>2)</sup>, 『景岳全書』에서는 大便秘結, 胃實能食, 小便積熱者의 치료에 사용된 麻仁丸이 기록되어 있다<sup>3)</sup>. 『醫燈續焰』에서는 백발을 검게 하는데 사용된 巨勝丸이 기록되어 있으며<sup>2)</sup>, 『東醫寶鑑』內經編 精門에서는 精髓를 채우기 위해 黑芝麻를 분말하여 散劑나 丸劑를 만들어 복용하여<sup>4)</sup>, 黑芝麻가 補腎陰 및 潤腸 효능에 활용되었음을 알 수 있다.

흑지마의 물 추출물과 에탄올 추출물 각각에서 모두 유의한

free radical 소거능이 있으며<sup>5)</sup>, 에탄올 추출물의 항산화 효능이 발표되었다<sup>6)</sup>. 흑지마 기름에서 분리한 sesamol 성분에서 free radical 소거능과 항산화 효능이 있음도 발표되었다<sup>7)</sup>. 흑지마의 에탄올 추출물은 동물실험에서 정자의 수와 운동성을 증가시켰으며, 고환 조직의 항산화 지표를 개선하였다<sup>8)</sup>. 그러나 흑지마에 대한 기존의 항산화 연구는 화학적 반응모델 또는 동물의 조직에 대한 모델에 국한되었으며, 생식세포에 대한 흑지마의 항산화 효과는 시도되지 않았다.

남성 정자의 발생과정에서 정조세포를 비롯한 각 단계의 생식세포들은 산화 스트레스(oxidative stress)에 민감한 반응을 보이며, 산화스트레스에 대하여 세포를 보호하는 세포 내 항산화 능력이 심각하게 저하될 경우 불임이 유발될 수 있다<sup>9)</sup>. 특히 산화 스트레스로 인한 seminal plasma의 염증반응이 정자 형성의 장애를 일으키며, 이는 활성산소종(reactive oxygen species)이 영향을 미친다고 알려져 있다<sup>10)</sup>.

\*교신저자 : 박성규. 경희대학교 한의과대학 처방제형학교실.

· Tel : 02-961-0330. · Fax : 02-961-0536. · E-mail : cervus@chol.com.

· 접수 : 2011년 2월 18일 · 수정 : 2011년 3월 7일 · 채택 : 2011년 3월 10일

최근 남성불임과 관련된 연구들은 활성산소종을 불임의 중요한 요소로 다루고 있으므로, 흑지마가 생식세포에 미치는 항산화 능력을 측정하기 위하여 정자형성 과정에서 생식세포의 일종인 Leydig cell에 대한 세포 보호 효과를 실험하여 보고하는 바이다.

## 실 험

### 1. 재료 및 기기

#### 1) 약재

본 실험에서 사용된 黑芝麻는 국내산으로 경기도 연천군 미산면에서 재배된 것을 다미원을 통하여 구입하여, 경희대학교 처방제형학 교실에서 외부형태를 비교 조사하여 확인한 후 사용하였으며, 일부는 경희대학교 한의과대학 처방제형학 교실에 보관하였다.

#### 2) 세포주

실험에 사용된 세포주는 TM3 (Leydig cell, mouse)로서 America Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하였다. 이 세포주는 고환 내 간질조직 (interstitial tissue)에 있는 Leydig cell에 속한다.

#### 3) 시약 및 기기

본 실험을 위해서 fetal bovine serum (FBS; GIBCO BRL, USA), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; GIBCO BRL, USA), trypsin-EDTA (GIBCO BRL, USA), ethanol 99.9% (Duksan, Korea), tetrazolium salt 3, [4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT; Sigma, USA), dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma, USA), hydrogen peroxide (Sigma, USA), 2-thiobarbituric acid (TBA; Sigma, USA), malondialdehyde (MDA; Sigma, USA), n-butanol (Sigma, USA), pyridine (Sigma, USA) 등이 사용되었다. 본 실험에 사용된 기기는 rotary evaporator (Eyela, Japan), freeze dryer (Cooling & Heating Systems, Korea), deep freezer (Revco, USA), microplate spectrophotometer (Molecular Devices, USA), CO<sub>2</sub> incubator (Sanyo, Japan) 등이다.

### 2. 실험 방법

#### 1) 시료의 제조

흑지마 150.0 g을 정확하게 중량을 측정한 뒤 환류추출기에 1차 증류수 3,000 ml와 함께 넣은 뒤 90 분 간 냉침하고, 100℃ 온도, 즉 탕액이 끓는 시점으로부터 90 분 동안 가열하여 추출한 다음, filter paper로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었다. 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물은 8.3 g을 얻었으며, 수율은 5.5% 이었다.

#### 2) 세포 배양

Leydig cell line은 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 10% FBS, penicillin (100 μg/ml), streptomycin (100 μg/ml)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다. Leydig cell은 75 cm<sup>2</sup> flask (Falcon, USA)에서 충분히 증식된 후 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 2회 씻어준 후 50 ml flask 당 1 ml의 0.25% trypsin-EDTA 용액을 넣고 실온에서 1 분간 처리한 다음 trypsin용액을 버리고 37℃에서 5분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대 배양하였다. 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 ml에 부유시킨 다음 새로운 배양용기 (50 ml culture flask)에 옮겨 1 : 20의 split ratio로 CO<sub>2</sub> 배양기 (37℃, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다.

#### 3) Cell viability 측정

흑지마가 Leydig cell의 증식에 미치는 효과를 알아보기 위하여 Mosmann<sup>11)</sup> 등의 방법을 응용하였다. 96 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/ml의 cell을 100 μl씩 넣고 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 PBS 용액으로 씻어주었다. 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 시료 1, 5, 10, 50 μg/ml을 각 well에 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나기 4 시간 전에 PBS에 녹인 5 mg/ml MTT를 20 μl씩 각 well에 처리한 후 알루미늄 호일로 차광시킨 후 나머지 시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100 μl 처리한 후 37℃에서 2 시간 방치 후 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 다음 공식으로 계산되었다.

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

AC; absorbance of control, AT; absorbance of tested extract solution

#### 4) Hydrogen peroxide-induced cytotoxicity 측정

흑지마의 hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity에 대한 보호효과를 알아보기 위해 Mosmann<sup>11)</sup> 등의 MTT test를 응용하여 다음과 같이 실험하였다. 96 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/ml의 cell을 100 μl씩 넣고 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 PBS 용액으로 씻어주었다. PBS에 녹인 각각의 시료 1, 5, 10, 50 μg/ml과 FBS free DMEM에 녹인 50 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>을 각각의 well에 처리한 후 4시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 배지를 버리고 PBS로 세척한 후 PBS에 녹인 5 mg/ml MTT 20 μl와 FBS free DMEM 200 μl을 각 well에 처리한 후 알루미늄호일로 차광한 뒤 4 시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 200 μl 처리한 후 37℃에서 2 시간 방치 후 microplate spectrophotometer를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 5) Hydrogen peroxide에 의한 LPO 생성에 미치는 영향 측정

흑지마의 hydrogen peroxide에 의한 과산화지질의 생성에

대한 효과를 알아보기 위해 오 등<sup>12)</sup>의 방법을 응용하여 실험하였다. 100 mm tissue culture dish (BD Falcon, USA)에  $3 \times 10^5$  cells/ml의 cell을 8 ml 씩 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 1X PBS 용액으로 씻어주었다. 1X PBS에 녹인 각각의 시료 1, 5, 10, 50  $\mu$ g/ml과 FBS free DMEM에 녹인 50  $\mu$  M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>을 각각의 well에 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 세포를 1X PBS로 2 회 수세한 후 스크래퍼를 이용하여 lysis buffer 300  $\mu$ l를 넣고 긁어냈다. 그 후 cell을 원심분리 하여 상층액을 취하고 상층액 중의 1  $\mu$ l를 취해 Bradford's method<sup>13)</sup>로 단백질을 정량하였다. 15 ml cornical tube에 각 농도별 시료를 넣고 0.1 M PPB (pH 7.5), 8.1% SDS, 20% acetate buffer (pH 3.5), 0.8% TBA를 처리하였다. 95°C에서 1 시간 동안 incubation 시킨 후 running water에서 식혔다. n-butanol : pyridine (15 : 1)의 혼합액을 가한 후 vortexing 한 후 3,000  $\times$  g에서 20 분간 원심분리 하였다. 532 nm에서 상층액의 흡광도를 측정하였다. MDA 농도는 free MDA로 표준선을 구하여 계산하였다.

### 6) SOD 활성도 측정

Leydig cells에 hydrogen peroxide를 처리한 후 시료를 처리하여 superoxide dismutase (SOD) 활성도에 미치는 영향을 Crapo 등<sup>14)</sup>의 방법에 따라 측정하였다. 100 mm tissue culture dish (BD Falcon, USA)에 10% FBS, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100  $\mu$ g/ml)이 첨가된 DMEM 배지에 현탁된  $3 \times 10^5$  cells/ml의 cell을 8 ml 씩 넣었다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 1X PBS 용액으로 씻어주었다. 1X PBS에 녹인 각각의 시료 1, 5, 10, 50  $\mu$ g/ml과 FBS free DMEM에 녹인 50  $\mu$  M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>을 각각의 well에 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 세포를 1X PBS로 2 회 수세한 후 lysis buffer를 첨가하고 스크래퍼를 이용하여 긁어냈다. 이것을 1.5 ml의 eppendorf tube에 담아 12,000  $\times$  g에서 10 분간 원심분리 하여 상층액을 취하고 상층액 중의 1  $\mu$ l를 취해 Bradford's method<sup>13)</sup>로 단백질을 정량하였다. 50 ml cornical tube에 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3차 증류수에 EDTA 0.1 M 되도록 첨가하여 pH 7.8의 50 mM phosphate buffer (PB)를 만든 후 0.1 N NaOH에 5  $\mu$  M xanthine을 녹여주고, 1 ml PB에 cytochrome C를 첨가하여 solution A를 제조하였다. 또한 0.1 mM EDTA가 첨가된 50 mM phosphate buffer에 0.2  $\mu$  /ml xanthine oxidase을 넣어 solution B를 제조하였다. solution A 870  $\mu$ l와 농도를 맞춘 sample 20  $\mu$ l와 solution B 20  $\mu$ l를 섞은 후 550 nm에서 3 분 동안의 흡광도 변화를 측정하였다. 시료중의 SOD 활성은 0.05–12.5 units/mg SOD protein을 사용하여 만든 표준곡선을 이용하여 산출하였다. SOD 활성도 1 unit은 동일한 반응 조건하에서 3 분 동안 측정하여 chromogen의 생성을 50% 감소시키는 SOD양으로 정하였다.

### 7) Catalase 활성도 측정

Leydig cell에 hydrogen peroxide를 처리한 후 시료를

처리하여 catalase 활성도를 Aebi 등<sup>15)</sup>의 방법에 따라 측정하였다. 100 mm tissue culture dish (BD Falcon, USA)에 10% FBS, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100  $\mu$ g/ml)이 첨가된 DMEM 배지에 현탁된  $3 \times 10^5$  cells/ml의 cell을 8 ml 씩 넣었다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 1X PBS 용액으로 씻어주었다. 1X PBS에 녹인 각각의 시료 1, 5, 10, 50  $\mu$ g/ml과 FBS free DMEM에 녹인 50  $\mu$  M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>을 각각의 well에 동시처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 세포를 1X PBS로 2 회 수세한 후 lysis buffer를 첨가하고 스크래퍼를 이용하여 긁어냈다. 이것을 1.5 ml의 eppendorf tube에 담아 12,000  $\times$  g에서 10 분간 원심분리 하여 상층액을 취하고 상층액 중의 1  $\mu$ l를 취해 Bradford's method<sup>13)</sup>로 단백질을 정량하였다. 50 ml cornical tube에 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3차 증류수를 넣어 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0) 제조한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가한 후 0.015 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.01 M phosphate buffer를 제조하였다. 0.015 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 첨가된 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0) 950  $\mu$ l와 50  $\mu$ l의 sample을 섞은 후 240 nm에서 1 분 동안의 흡광도 변화를 측정하였다.

## 3. 통계처리

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

## 결 과

### 1. 흑지마가 Leydig cell의 cell viability에 미치는 영향

흑지마가 Leydig cell의 성장 및 증식에 미치는 영향을 측정하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 흑지마 1, 5, 10, 50  $\mu$ g/ml 농도에서 Leydig cell의 생존율은 118.79, 121.34, 126.10, 136.66%로 농도 의존적으로 유의하게 증가하였다 ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , Fig. 1).

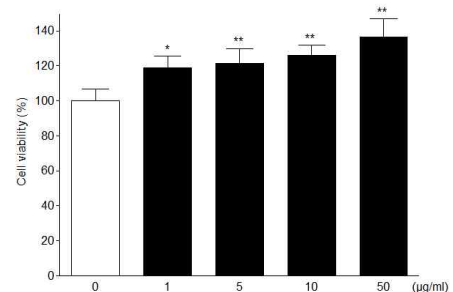


Fig. 1. Effect of water extract of Sesami Semen Nigrum (SSN) on the viability of Leydig cells. Leydig cells were treated with SSN at 37°C for 24 h. Each column or point represents the mean  $\pm$  S.E. (n = 3). \* Significantly different from the control (\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ ).

## 2. 흑지마의 hydrogen peroxide-induced cytotoxicity에 대한 항산화효과

Hydrogen peroxide에 의해 유도된 Leydig cell은 정상군에 비하여 63.80%로 유의하게 cell viability가 감소하였다 ( $p < 0.01$ ). Hydrogen peroxide에 의해 유도된 Leydig cell에 대하여 흑지마 처리군은 5, 10, 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 75.64, 78.24, 73.49%로 hydrogen peroxide-induced cytotoxicity에 대하여 유의한 보호 효과를 나타내었으며, 10  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도처리군에서 가장 높은 보호 효과를 나타내었다 ( $p < 0.05$ , Fig. 2).

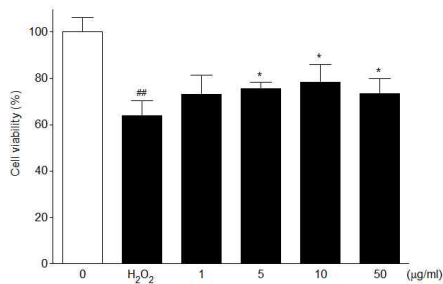


Fig. 2. Protective effect of water extract of Sesami Semen Nigrum (SSN) on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. Leydig cells treated with SSN were incubated in the presence or absence of 50  $\mu\text{M}$  hydrogen peroxide at 37°C for 24 h. Each column or point represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). # Significantly different from the control (## :  $p < 0.01$ ) and \* significantly different from the cells exposed to hydrogen peroxide alone (\* :  $p < 0.05$ ).

## 3. 흑지마의 hydrogen peroxide에 의한 LPO 생성에 미치는 영향

Leydig cell에 대하여 정상군의 MDA 함량은 0.36 nmol/mg of protein 인데 비하여, hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 대조군은 0.43 nmol/mg protein으로 과산화지질이 유의하게 증가하였음을 확인하였다 ( $p < 0.05$ ). Hydrogen peroxide와 흑지마의 동시처리군은 5, 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 MDA가 각각 0.39, 0.37 nmoles/mg protein으로 대조군에 비하여 LPO 생성이 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.01$ , Fig. 3).

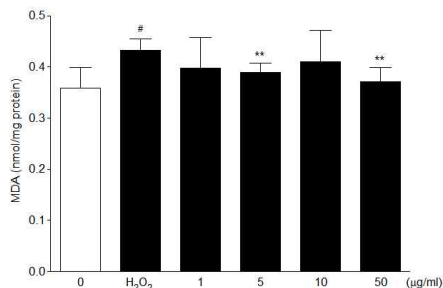


Fig. 3. Effect of water extract of Sesami Semen Nigrum (SSN) on hydrogen peroxide-induced lipid peroxidation. Leydig cells treated with SSN were incubated in the presence or absence of 50  $\mu\text{M}$  hydrogen peroxide at 37°C for 24 h. Total cell lysate from cultured cells were analyzed for MDA formation. Each column or point represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). # Significantly different from the control (# :  $p < 0.05$ ) and \* significantly different from the cells exposed to hydrogen peroxide alone (\*\* :  $p < 0.01$ ).

## 4. 흑지마의 SOD 활성도에 미치는 영향

Leydig cell에 대하여 정상군의 SOD activity는 9.53 units/mg protein인데 비하여 hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 대조군은 7.93 units/mg protein으로 SOD activity가 유의하게 감소하였음을 확인하였다 ( $p < 0.01$ ). Hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 처리군은 흑지마 1, 10, 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도처리군에서 SOD activity가 각각 8.50, 8.60, 9.08 units/mg protein으로 유의하게 증가하였다 ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , Fig. 4).

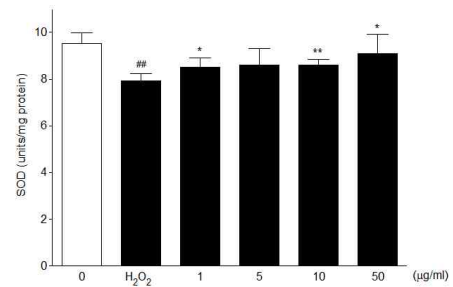


Fig. 4. Effect of water extract of Sesami Semen Nigrum (SSN) on hydrogen peroxide-induced SOD activity. Leydig cells treated with SSN were incubated in the presence or absence of 50  $\mu\text{M}$  hydrogen peroxide at 37°C for 24 h. Total cell lysate from cultured cells were analyzed for SOD activity. Each column or point represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). # Significantly different from the control (## :  $p < 0.01$ ) and \* significantly different from the cells exposed to hydrogen peroxide alone (\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ ).

## 5. 흑지마의 catalase 활성도에 미치는 영향

Leydig cell에 대하여 정상군의 catalase activity는 150.6 units/mg protein인데 비하여 hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 대조군은 93.6 units/mg protein으로 catalase activity가 유의하게 감소하였음을 확인하였다 ( $p < 0.01$ ). Hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 처리군은 흑지마 5, 10, 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도처리군에서 catalase activity가 각각 123.7, 133.3, 131.9 units/mg protein으로 유의하게 증가하였다 ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , Fig. 5).

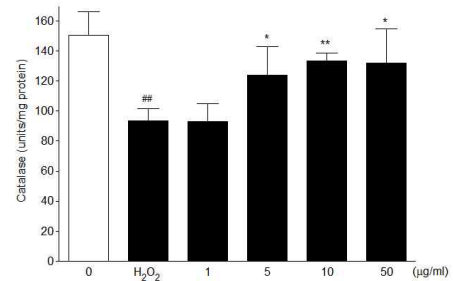


Fig. 5. Effect of water extract of Sesami Semen Nigrum (SSN) on hydrogen peroxide-induced catalase activity. Leydig cells treated with SSN were incubated in the presence or absence of 50  $\mu\text{M}$  hydrogen peroxide at 37°C for 24 h. Total cell lysate from cultured cells were analyzed for catalase activity. Each column or point represents the mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). # Significantly different from the control (## :  $p < 0.01$ ) and \* significantly different from the cells exposed to hydrogen peroxide alone (\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ ).

## 고찰 및 결론

흑지마는 동양에서 전통적인 식품의 원료이며 의학적인 목적으로 사용되기도 하였다. 흑지마는 胡麻散에서 黑芝麻, 白伏苓, 生乾地黄, 天門冬과 함께 益壽延年의 목적으로 사용되었으며<sup>2)</sup>, 麻仁丸에서 黑芝麻, 杏仁, 大黃, 梔子로 구성되어 大便秘結의 치료에 사용되었다<sup>3)</sup>. 巨勝丸은 黑芝麻, 白伏苓, 甘菊으로 구성되어 백발을 검게 하는 효능으로 사용되었다<sup>2)</sup>.

인도의학에서도 흑지마는 호홉기질환의 진통제 또는 유아의 콜레라, 설사, 이질, 소화기질환, 방광질환에 사용되었으며, 무월경, 월경곤란, 출혈성 치질에 사용되었다<sup>5)</sup>. 흑지마는 sesamol, sesamolol, sesamin, butylated hydroxytoluene, sesaminol triglucoside, sesaminol diglucoside 등의 항산화 성분을 함유하고 있다<sup>16)</sup>.

Ashamu 등의 연구에 의하면 흑지마의 에탄올 추출물과 비타민 C를 병행 투여하여 Wister계 흰쥐에서 정자의 수와 운동성의 개선 효과가 있음이 보고되었다<sup>9)</sup>.

『東醫寶鑑』에서도 흑지마 분말을 복용하면 精髓를 보충하는 것으로 기록되었고<sup>4)</sup>, 補腎陰의 효능으로 耳鳴耳聾, 鬚髮早白, 病後脫髮 등 腎虛로 인한 증상을 치료하므로<sup>1)</sup>, 남성불임증에 대한 흑지마의 효과를 기대할 수 있다. 흑지마가 동물 실험에서 고환조직의 항산화 효과가 있음에 착안하여<sup>8)</sup>, 고환에 존재하는 4종의 생식세포에 미치는 흑지마의 항산화 작용을 측정하고자 하였다.

생식세포인 GC-1, GC-2, Sertoli, Leydig cell을 대상으로 흑지마의 세포독성에 대한 예비실험을 수행한 결과 Leydig cell이 가장 적합한 것으로 밝혀졌으며 (Data not shown), 이후 Leydig cell에 대한 다음 실험을 진행하였다.

흑지마가 Leydig cell의 성장 및 증식에 미치는 영향은 MTT assay로 측정하였다. 흑지마는 1, 5, 10, 50 ug/ml의 모든 농도에서 용량 의존적으로 Leydig cell의 생존율을 유의하게 증가시켰으며 최대 136.66%의 생존율을 나타내어 세포독성이 없음을 확인하였다. Leydig cell에 대한 안전한 cell viability 결과에 근거하여 산화적 손상으로부터 Leydig cell에 미치는 흑지마의 보호 효과를 실험하였다. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity를 측정한 결과 흑지마 처리군은 5, 10, 50  $\mu$ g/ml의 농도에서 각각 75.64, 78.24, 73.49%로 유의하게 산화적 손상을 보호하였다.

LPO는 세포막의 지질성분이 독성 물질들에 의해서 손상을 받게 되면 지질성분의 산화반응이 촉진되어 나타나는 반응산물이다<sup>17)</sup>. 이러한 LPO는 생체 조직 중에서 생화학적 조직 손상의 척도로 널리 이용되며 조직의 산화적 손상에 의해 야기되는 병리현상의 척도로도 활용되어 진다. 정자의 세포막은 다량의 불포화 지방산을 함유하고 있으므로 흑지마의 항산화 작용을 관찰하기 위하여 지질과산화 억제 활성을 측정하였다. Leydig cell에 hydrogen peroxide에 의한 산화가 용이하게 일어나 지질과산화물인 malondialdehyde (MDA)를 생성하도록 유도하고 protein을 분리하여 사용하였다. Hydrogen peroxide와 흑지마의 동시처리군은 대조군에 비하여 LPO 생성이 유의성 있게 감소하였다.

Superoxide dismutase (SOD)는 O<sub>2</sub>-를 기질로 하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 O<sub>2</sub>를 만든다. 인체 내에는 두 가지 종류의 SOD가 있다고 알려져 있는데 하나는 Cu/Zn-SOD이고 다른 하나는

Mn-SOD이다. 측정원리는 xanthine이 xanthine oxidase에 의하여 uric acid로 전환될 때 부산물로 생성되는 O<sub>2</sub>-가 cytochrome C를 환원시키는데 SOD가 O<sub>2</sub>-를 소거하여 cytochrome C 환원량이 감소되므로 이 억제된 cytochrome C 환원량으로서 활성을 측정하는 것이다. Catalase는 생체내의 대사과정에서 생성된 유독한 활성산소로부터 생체조직을 보호한다. 하나의 catalase 분자는 1분 동안 500만 분자가 움직이는 속도로 과산화수소를 분해하는데 이는 효소반응 중 최대로 과산화수소를 물과 산소로 분해시키는 작용을 한다. Leydig cell에 대한 흑지마의 SOD와 catalase의 발현량이 농도 의존적으로 증가하였다.

본 연구의 결과로서 흑지마 추출물이 Leydig cell에 대해 항산화 작용이 있음을 확인되었다. 이 결과는 기존의 동물 실험에서 보고된 흑지마 에탄올 추출물의 고환 조직에 대한 SOD, catalase 및 LPO 등 항산화 지표 개선 효과와 일치하였으며<sup>8)</sup>, 고환 조직의 항산화 기전은 흑지마 추출물이 고환내의 Leydig cell에 대한 항산화 작용과 밀접한 연관이 있음이 입증되었다.

이로써 補肝腎, 益精血 효능으로 腎陰虛證, 精清不育의 치료에 활용되어 온 黑芝麻가 Leydig cell에 대한 항산화효과 및 세포보호효과가 있음이 확인되었고 남성불임의 치료에 응용할 수 있는 약물임이 확인되었다.

## 감사의 글

This research was supported in part by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (2010-0013296).

## 참고문헌

1. 전국한의학대학교 공동교재편찬위원회 편저. 본초학. 서울 : 영림사. 2008 : 663-4.
2. 國家中醫葯管理局《中華本草》編委會 編. 中華本草. 上海 : 上海科學技術出版社. 1998 : 1771-5.
3. 張介賓. 景岳全書. 서울 : 한미의학. 2006 : 1578.
4. 許浚. 東醫寶鑑. 서울 : 南山堂. 1994 : 86.
5. Visavadiya NP, Soni B, Dalwadi. Free radical scavenging and antiatherogenic activities of Sesamum indicum seed extracts in chemical and biological model systems. N Food Chem Toxicol. 2009 ; 47(10) : 2507-15.
6. Nahar L, Rokonzaman. Investigation of the analgesic and antioxidant activity from an ethanol extract of seeds of Sesamum indicum. Pak J Biol Sci., 2009 ; 12(7) : 595-8.
7. Joshi R, Kumar MS, Satyamoorthy K, Unnikrisnan MK, Mukherjee T. Free radical reactions and antioxidant activities of sesamol : pulse radiolytic

- and biochemical studies. *J Agric Food Chem*. 2005 ; 53(7) : 2696-703.
8. Ashamu E, Salawu E, Oyewo O, Alhassan A, Alamu O, Adegoko A. Efficacy of Vitamin C and ethanolic extract of *Sesamum indicum* in promoting fertility in male Wister rats. *J Hum Reprod Sci*. 2010 ; 3(1) : 11-4.
  9. Reddi PP, Shore AN, Acharya KK, Herr JC. Transcriptional regulation of spermiogenesis : insights from the study of the gene encoding the acrosomal protein SP-10. *J Reprod Immunol*. 2002 ; 53(1-2) : 25-36.
  10. Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom WJ. Role of Oxidative stress and Antioxidents in male infertility. *J Androl*. 1995 ; 16(6) : 464-8.
  11. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 ; 65(1-2) : 55-63.
  12. 오명숙, 김도림, 김소연, 장문석, 박성규. 보골지(補骨脂)가 남성 생식세포 GC-1의 항산화에 미치는 영향. *동의생리병리학회지*. 2005 ; 19(1) : 81-6.
  13. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 ; 72 : 248-54.
  14. Crapo JD, McCord JM, Fridovich I. Preparation and assay of superoxide dismutases. *Methods Enzymol*. 1978 ; 53 : 382-93.
  15. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984 ; 105 : 121-26.
  16. Kizhiyedathu PS, Ananthasankaran J, Chami A. *In vitro* studies on antioxidant activity of lignans isolated from sesame cake extract. *J Sci of Food and Agri*. 2005 ; 85 : 1779-83.
  17. Rao B, Soufir JC, Martin M, David G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to mid-piece abnormality and motility. *Gamate Res*. 1989 ; 24 : 127-33.