

## 柏子仁이 수컷 생쥐의 생식세포에 미치는 항산화 효과 연구

김주성, 홍민정, 김도림, 박은화, 장문석, 박성규\*

경희대학교 한의과대학 처방제형학교실

### Study of Antioxidant Effects of Platycladi Semen on Male Reproductive cells

Ju Sung Kim, Min Jung Hong, Do Rim Kim, Eun Hwa Park, Mun Seog 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 is to examine the antioxidant effects on male mouse reproductive cells of the extract of Platycladi Semen.

**Methods :** The extract was studied for diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity, cell viability by a modified MTT assay, the effects on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity by MTT assay, lipid peroxidation by malondialdehyde (MDA) formation and super oxide dismutase (SOD), respectively.

**Results :** The results showed that the extract scavenged DPPH radical in a dose-dependent manner by up to 74.87%. The cell viability of the extract was within 72~96% on Leydig cells and GC-2 cells at concentrations of 1, 5, 10, 50 and 100 ug/ml. The hydrogen peroxide-induced cytotoxicity of Leydig cells was protected to 72.09% by the extract at concentration of 100  $\mu$  g/ml. The hydrogen peroxide-induced lipid peroxidation of MDA formation was decreased to 1.80 and 1.65 nmoles/mg protein by the extract at concentrations of 50 and 100  $\mu$  g/ml. The extract at all concentrations, SOD activity was not significantly changed.

**Conclusions :** In conclusion, the extract of Platycladi Semen has antioxidant effects on Leydig cells and protect male reproductive system against oxidative stress.

**Key words :** Platycladi Semen, diphenyl-picryl-hydrazyl (DPPH), MTT assay, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), lipid peroxidation (LPO), Leydig cells

#### 서론

柏子仁은 性味が 平甘하고 心, 肝, 腎으로 歸經하며, 養心安神, 潤腸通便의 效능으로 虛煩失眠, 心悸怔忡, 陰虛盜汗, 臟燥便秘 등을 치료한다<sup>1,2)</sup>. 柏子仁이 사용된 處方은 『東醫寶鑑』에서 延齡固本丹, 斑龍丸, 神仙不老丸 등이 있으며 延年益壽의 效능과 虛損症을 치료하는 데에 사용되었고<sup>3)</sup>, 『方藥合編』에서는 強陽至神丹, 斑龍固本丹 등의 處方이 있으며 陽痿, 陽道不興 등을 치료하였다<sup>4)</sup>.

柏子仁에 대한 실험적 연구로는 혈소판 응집억제 작용<sup>5,6)</sup>, tyrosine 저해효과<sup>7)</sup>, 항균작용<sup>8)</sup>, 지혈 효과<sup>9)</sup>, 뇌세포에서의 항산화 및 보호 효과<sup>10)</sup>, 활성 산소 제거 효과<sup>11)</sup> 그리고 활성 산소를 발생시키는 지방의 대사와 관련된 효자로 pancreatic lipase 저해 효과<sup>12)</sup>, 콜레스테롤 강하 효과<sup>13)</sup> 등이 보고되었으나

생식 세포에 대한 항산화 효능에 대해서는 보고되지 않았다.

남성불임은 정자가 만들어져 수송되고 사정행위에 의해 배출되어 난자와 결합되는 과정 중에서 한 가지라도 문제가 생길 때 발생한다. 이 중 남성불임의 가장 큰 원인은 정자형성장애로 남성불임환자의 약 80~90%정도가 이에 해당한다. 남성불임은 계속 증가하는 추세에 있으며 1990년 세계 20개국 15,000명을 대상으로 한 정자수 조사에서 1940년에 비해 정액량은 25%, 정자 총수는 56.2%가 감소한 것으로 발표되었다<sup>14)</sup>.

최근 연구의 대표적인 남성 불임의 원인으로는 활성산소종(reactive oxygen species : ROS)에 의한 정자의 손상이 보고되고 있다<sup>15,16)</sup>. 정자는 polyunsaturated fatty acids (PUFA)를 다량 함유하고 있어서 ROS로 인한 손상에 민감하다<sup>17,18,19)</sup>. ROS는 정자 세포막을 손상시키고 정자의 핵 DNA를 파괴할 뿐 아니라, 정자 형성과정 중 생식세포의 apoptosis를 촉진시켜

\*교신저자 : 박성규. 경희대학교 한의과대학 처방제형학교실.

· Tel : 02-961-0330. · Fax : 02-961-0536. · E-mail : comskp@khu.ac.kr.

· 접수 : 2012년 2월 9일 · 수정 : 2012년 3월 3일 · 채택 : 2012년 3월 16일

불임을 유발시킬 수 있다<sup>16)</sup>.

남성 불임의 韓醫學적인 원인은 腎精虧虛, 氣血虧虛, 肝鬱內癥, 痰濕內蘊 등으로 요약될 수 있다<sup>20)</sup>. 柏子仁은 주로 老人 虛勞, 陽痿, 陽道不興을 치료하는 處方에서 사용되어 왔으며 최근 항산화 효능이 밝혀지고 있어 항산화기전과 관련된 남성불임연구에 중요한 역할을 할 것으로 사료되어 연구를 진행하였다.

柏子仁이 남성의 정자형성과정에 있어서 산화 스트레스를 억제하는 것을 *in vitro* 상에서 증명하고자, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity를 cell free상태에서 수행하였으며, 생쥐의 남성 생식 세포인 GC-1과 GC-2 cell, Leydig cell, Sertoli cell 등을 이용하여 생존율에 미치는 영향을 측정하였다. 위의 결과를 바탕으로 선택된 세포에 대하여 hydrogen peroxide으로 산화 스트레스를 유발시킨 후 柏子仁을 처리하여 생존율을 측정하였으며, 세포 지질성분의 산화적 손상으로 발생한 lipid peroxide (LPO) 생성량과 super oxide dismutase (SOD)의 활성도를 측정함으로써 柏子仁의 남성 생식세포에 대한 항산화 효과를 연구하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실 험

### 1. 재료 및 기기

#### 1) 약재

본 실험에서 사용된 柏子仁 Platycladi Semen은 중국산으로 서울특별시 동대문구 제기동 경동약령시장의 원광약업을 통하여 구입하여, 경희대학교 처방제형학 교실에서 외부형태를 비교 조사하여 확인한 후 사용하였으며, 일부는 보관하였다.

#### 2) 시료의 조제

柏子仁 150 g을 정확하게 중량을 측정한 뒤 1차 증류수 3,000 ml와 함께 넣어 90 분 동안 냉침하고, 환류추출기를 이용하여 100℃ 가까이 온도가 상승하여 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 33.4 g을 얻었으며, 수율은 22.27% 이었다.

### 2. Cell culture

#### 1) 세포주 및 시약

실험에 사용된 세포주는 생쥐의 GC-1 cell(spermatogonia, mouse), GC-2 cell (spermatocyte, mouse), Leydig cell (Leydig TM3 cell, mouse), Sertoli cell (Sertoli TM4 cell, mouse)로서 America Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하였다. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)과 Fetal Bovine Serum (FBS) 및 trypsin-EDTA 등은 GIBCO BRL사 (USA)에서 구입하였으며, ascorbic acid, 2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl

(DPPH), hydrogen peroxide, tetrazolium salt 3, [4,5-dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Dimethyl sulfoxide (DMSO), sodium dodecyl sulfate (SDS), 2-thiobarbituric acid (TBA), malondialdehyde (MDA), n-butanol, pyridine 등이 Sigma (USA)에서 구입되어 사용되었다.

#### 2) 세포 배양

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

### 3. DPPH에 의한 radical 소거 작용의 측정

DPPH에 의한 radical scavenging activity를 알아보기 위하여 동결건조 된 시료를 증류수에 녹여서 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1,000 μg/ml의 농도로 시액을 조제하고, 양성 대조군으로 ascorbic acid를 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. Cell viability 측정

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, 100 μg/ml을 각 well에 처리하고 24 시간 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 제거한 후 DMSO를 200 μl 처리한 후 37℃에서 2 시간 방치한 후 microplate spectrophotometer를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Cell viability는 다음 공식으로 계산되었다.

$$\text{Cell viability}(\%) = 100 \times \text{AT} / \text{AC}, \quad \text{AC- absorbance of control, AT- absorbance of tested extract solution}$$

### 5. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity에 대한 柏子仁의 보호효과 측정

96 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/ml의 cell을  $100 \mu$ l씩 넣고  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 24 시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 PBS 용액으로 씻어주었다. PBS에 녹인 각각의 시료 1, 5, 10, 50, 100, 500  $\mu$ g/ml과 FBS free DMEM에 녹인 50  $\mu$  M  $\text{H}_2\text{O}_2$ 을 각각의 well에 처리한 후 4 시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 배지를 버리고 PBS로 세척한 후 PBS에 녹인 5 mg/ml MTT 20  $\mu$ l와 FBS free DMEM 200  $\mu$ l을 각 well에 처리한 후 알루미늄 호일로 차광한 뒤 4 시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거 DMSO를 200  $\mu$ l 처리한 후  $37^\circ\text{C}$ 에서 2 시간 방치 후 microplate spectrophotometer를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 6. 柏子仁이 LPO 생성에 미치는 영향 측정

100 mm tissue culture dish (BD Falcon, USA)에  $3 \times 10^5$  cells/ml의 cell을 8 ml 씩 넣고  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 24 시간 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 1X PBS 용액으로 씻어주었다. 1X PBS에 녹인 각각의 시료 1, 5, 10, 50, 100  $\mu$ g/ml과 FBS free DMEM에 녹인 50  $\mu$  M  $\text{H}_2\text{O}_2$ 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. 세포를 원심분리 하여 상층액을 취하고 상층액 중의 1  $\mu$ l를 취해 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.  $95^\circ\text{C}$ 에서 1 시간 동안 incubation 시킨 후 running water에서 식혔다. n-butanol : pyridine (15 : 1)의 혼합액을 가한 후 vortexing 한 후  $3,000 \times g$ 에서 20 분간 원심분리 하였다. 532 nm에서 상층액의 흡광도를 측정하였다. MDA 농도는 free MDA로 표준선을 구하여 계산하였다.

### 7. SOD 활성도 측정

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.  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 24 시간 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 1X PBS 용액으로 씻어주었다. 1X PBS에 녹인 각각의 시료 1, 5, 10, 50, 100  $\mu$ g/ml과 FBS free DMEM에 녹인 50  $\mu$  M  $\text{H}_2\text{O}_2$ 을 각각의 well에 처리하고 24 시간 배양하였다. 배양액을 제거한 세포를 1X PBS로 2 회 수세한 후 lysis buffer를 첨가하고 스크래퍼를 이용하여 긁어냈다. 이것을 1.5 ml의 eppendorf tube에 담아  $12,000 \times g$ 에서 10 분간 원심분리 하여 상층액을 취하고 상층액 중의 1  $\mu$ l를 취해 단백질을 정량하였다. 50 ml cornical tube에 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 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 cychrome 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 SOD 양으로 정하였다.

### 8. 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. 柏子仁의 DPPH radical 소거 활성

柏子仁의 농도에 따른 DPPH radical 소거 활성을 측정한 결과 ascorbic acid와 柏子仁은 모두 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 활성을 증가시켰다. 柏子仁은 각각 5, 10, 50, 100, 500, 1,000  $\mu$ g/ml의 농도에서 0.55, 9.65, 25.65, 38.24, 74.87, 72.23%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다 (Fig. 1). Dose-response curve로부터 산출된 50%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내는 화합물의 농도 ( $\text{IC}_{50}$ )는 ascorbic acid가 0.006  $\mu$ g/ml, 柏子仁은 160.929  $\mu$ g/ml이었다.

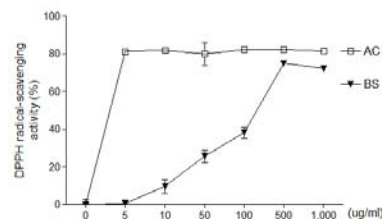


Fig. 1. DPPH radical-scavenging activity of the extract of Platycladi Semen (BS). Values indicate mean  $\pm$  S.E. of three replications.

### 2. 柏子仁이 cell viability에 미치는 영향

柏子仁이 cell line의 성장 및 증식에 미치는 영향을 측정하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 柏子仁의 농도는 1, 5, 10, 50, 100  $\mu$ g/ml의 범위에 대하여 측정하였다.

柏子仁에 대하여 GC-1 cell과 Sertoli cell은 최저 63.87% 와 67.73%의 cell viability를 나타내었다. GC-2 cell의 cell viability는 각각 95.89, 89.24, 85.73, 75.09, 81.78%로, Leydig cell의 cell viability는 각각 81.25, 77.44, 72.03, 73.14, 83.34%로 나타났다.

Cell viability 실험결과 柏子仁은 GC-2 cell과 Leydig cell에 대하여 세포 독성이 없는 것으로 관찰되었다 (Table 1).

Table 1. Effect of the extract of Platycladi Semen (BS) on cell viability in GC-1, GC-2, Leydig cells and Sertoli cells

Cell type Group (ug/ml)	GC-1 Cell viability (%)	GC-2 Cell viability (%)	Leydig cell Cell viability (%)	Sertoli cell Cell viability (%)
Normal 0 ug/ml	100±1.27	100±7.51	100±4.39	100±0.21
1 ug/ml	83.39±7.59***	95.89±11.16	81.25±6.39***	84.77±0.13**
5 ug/ml	73.42±2.88***	89.24±8.92*	77.44±8.55***	73.94±0.10***
10 ug/ml	63.87±9.02***	85.73±7.78**	72.03±3.48***	71.87±0.07***
BS 50 ug/ml	69.04±8.67***	75.09±8.60***	73.14±2.34***	67.73±0.11***
100 ug/ml	84.83±5.09***	81.78±10.92***	83.34±2.13***	68.45±0.10***

Each cells were treated with BS at 37°C for 24 h. Each values represent mean ± S.E. (n = 6). \* Significantly different from the normal (\* : p < 0.05, \*\* : p < 0.01, \*\*\* : p < 0.001).

### 3. Hydrogen peroxide로 유도된 cytotoxicity에 대한 柏子仁의 항산화효과

GC-2 cell과 Leydig cell에 대한 cell viability 결과에 근거하여 hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity를 측정하였다.

GC-2 cell에서 대조군의 cell viability 57.9%와 비교하여 柏子仁은 각각 47.97, 46.78, 53.52, 48.76, 53.94%의 cell viability를 나타내어 hydrogen peroxide로 유도된 cytotoxicity에 대한 항산화효과를 나타내지 않았다.

Leydig cell에서 hydrogen peroxide를 처리한 대조군은 정상군에 비하여 48.02%로 유의하게 cell viability가 감소하였으며, 柏子仁은 100 ug/ml 농도에서 72.09%로 유의한 보호효과가 있는 것으로 나타났다 (p < 0.001, Fig. 2).

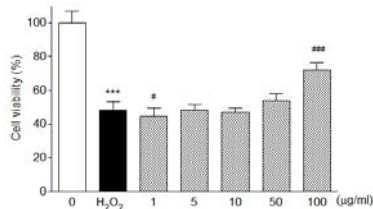


Fig. 2. Effect of the extract of Platycladi Semen (BS) on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity of Leydig cells. Leydig cells treated with BS were incubated in the presence or absence of 50 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 37°C for 24 h. Each columns or points represent mean ± S.E. (n = 6). \* Significantly different from the normal (\*\*\*) : p < 0.001 and # significantly different from the cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone (# : p < 0.05, ### : p < 0.001).

### 4. 柏子仁이 hydrogen peroxide에 의한 LPO 생성에 미치는 영향

Hydrogen peroxide로 유도된 cytotoxicity에 대하여 항산화효과를 나타낸 Leydig cell을 대상으로 柏子仁이 과산화지질의 생성에 미치는 효과를 측정하였다.

Leydig cell에 대하여 정상군의 MDA 함량은 1.45 nmol/mg of protein인데 비하여, hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 대조군은 2.63 nmol/mg protein으로 과산화지질이 증가하였다 (p < 0.05, Fig. 3). Hydrogen peroxide와 柏子仁의 동시처리군은 50, 100 μg/ml의 농도에서 MDA가 각각 1.80, 1.65 nmoles/mg protein으로 대조군에 비하여 LPO 생성이 유의하게 감소하였다 (p < 0.05, Fig. 3).

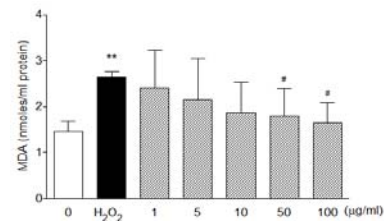


Fig. 3. Effect of the extract of Platycladi Semen (BS) on hydrogen peroxide-induced lipid peroxidation. Leydig cells treated with BS were incubated in the presence or absence of 50 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 37°C for 24 h. Each columns or points represent mean ± S.E. (n = 3). \* Significantly different from the normal (\*\* : p < 0.01) and # significantly different from the cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone (# : p < 0.05).

### 5. 柏子仁의 SOD 활성도에 미치는 영향

Leydig cell에 대하여 정상군의 SOD 활성도는 9.54 units/mg protein인데 비하여 hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 대조군은 8.43 units/mg protein으로 SOD 활성도가 유의하게 감소하였다 (p < 0.01). Hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 Leydig cell은 柏子仁 1, 5, 10, 50, 100 μg/ml의 농도에서 SOD 활성도가 각각 8.64, 8.57, 8.62, 8.92, 8.82 units/mg protein으로 증가하였으나 유의성은 보이지 않았다 (Fig. 4).

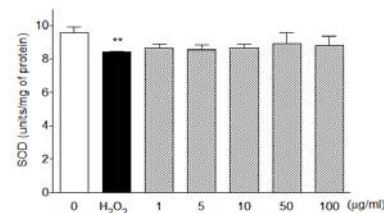


Fig. 4. Effect of the extract of Platycladi Semen (BS) on hydrogen peroxide-induced SOD activity. Leydig cells treated with BS were incubated in the presence or absence of 50 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 37°C for 24 h. Each columns or points represent mean ± S.E. (n = 3). \* Significantly different from the normal (\*\* : p < 0.01).

## 고찰

韓醫學에서는 남성불임을 絕子, 無子, 無嗣 등으로 기록하고 있으며 病因은 복잡하지만 대개 腎, 肝, 脾 등의 장부와 관련이 있으며 특히 腎과 가장 관련이 많다. 역대 문헌에서 살펴보면 『素問 · 上古天真論』에서는 노화에 따른 生殖機能의 衰退現狀으로 남성불임에 대해 언급하였다. 그 후 五不男 (天, 漏, 隄, 怯, 變)에서는 선천, 후천의 기질적 이상을 六病 (精寒, 氣衰, 精少, 痰多, 相火, 氣鬱)에서는 기능적 이상을 구체화하여 표현하였으며<sup>21)</sup>, 五勞, 七傷, 虛羸 등의 虛勞病症과 陽痿, 遺精, 早泄, 白濁 등을 포괄하는 것으로 인식해왔다<sup>22,23,24)</sup>. 한의학적 病理은 腎精虧虛, 氣血虧虛, 肝鬱內瘀, 痰濕內蘊으로 분류된다. 腎精虧虛는 補腎益精하여 贊育丹, 五子衍宗丸 合 六味地黃湯 등을 사용하고, 氣血虧虛는 氣血雙補하는 八物湯, 大補元煎이 사용되어 왔으며, 肝鬱內瘀는 疏肝行氣 活血通絡하는 柴胡疎肝散 등을, 痰濕內蘊은 燥濕化痰 利氣通竅하는 導痰湯加減 처방 등이 사용되었다<sup>20)</sup>.

柏子仁은 槲寄生과 (Curpessaceae)에 속하는 槲寄生의 종자이며, 초겨울 성숙했을 때 채취해서 햇볕에 말린 후 종피를 제거한 종인을 취하여 그늘에 말린다. 槲寄生의 학명은 *Thuja orientalis* L. 또는 *Biota orientalis* (L.) Endl.

등이 한국과 중국에서 혼용되었으나, 최근 *Platycladus orientalis* (L.) Franco 로 수정되어 표기되고 있다<sup>2)</sup>. 난원형의 긴 타원구형이거나 또는 긴 원주형이고 길이 3-5 mm, 지름 2-3 mm이다. 바깥면은 엷은 황색-황백색이고 오래된 것은 점차 변하여 황갈색이며 기름이 나온다<sup>1)</sup>. 柏子仁은 五臟을 안정시키고 益氣益血하고 濕痺를 제거하며<sup>25)</sup> 止汗하고 驚悸, 恍惚, 呼吸困難, 歷節, 腰痛을 치료한다<sup>26)</sup>. 또한 心을 保養하고 정신을 안정시키며 남자의 陽氣를 강하게 하고 腸을 潤하게 하는 通便의 효능이 있어 驚悸, 不眠, 遺精, 盜汗, 便秘를 치료한다<sup>2)</sup>.

柏子仁과 남성불임과의 연관성을 유추해볼 수 있는 문헌으로 『東醫寶鑑』에서는, 求嗣의 道는 男子의 神이 足한 것을 要求하며 또 感心이 적고 마음이 맑은 것이 上策이 된다고 하여 求嗣하는 경우에서 安神이 남성 불임에서 중요한 요소임을 언급하였다<sup>27)</sup>. 즉 한의학적으로 볼 때 腎을 補하는 것과 더불어 性慾을 억제하고 마음을 깨끗하게 가지는 것이 불임을 치료하는 데에 좋은 방법이 된다고 것을 의미하며 柏子仁의 安神養心하는 효능이 이러한 역할을 할 수 있을 것으로 기대되었다. 『藥性論』에서는 陽道不興과 함께 腰中冷을 치료한다고 하였으며<sup>2)</sup> 『東醫寶鑑』과 『方藥合編』에 柏子仁이 포함된 處方들을 살펴보면 延年益壽의 효과를 가진 처방들과 陽痿, 陽道不興을 치료하는 處方들이 있어, 柏子仁이 노화를 억제하는 항산화 효능과 남성 불임 치료 효능이 있을 것으로 기대되었다.

남성의 정자는 활성산소의 자극에 취약하며 이로 인해 발생한 지질과산화에 의해 불임이 유도된다. 최근에는 산화적 스트레스로부터 정자의 손상을 보호하여 불임을 치료하고자 하는 시도가 많았다. 활성산소는 특정상황에서만 등장하여 정자의 과산화수소와 침체반응을 유도하는 것으로 알려져 있는데 반감기가 짧고 확산능력이 약하므로 필요한 생리적 역할만 담당하고 사라진다. 그러나 병적인 상황에서는 정액의 superoxide와 과산화수소 등의 활성산소가 지질과산화과정을 통해 정자의 기능을 변화시키고 불임을 유도하는 것으로 알려져 있다<sup>28)</sup>.

柏子仁의 생식세포에 대한 항산화 효능을 알아보기 위해 다음과 같은 실험을 단계별로 수행하였다.

DPPH는 517 nm에서 특징적인 광흡수성을 나타내는 보라색 화합물로 이 radical은 알코올 등의 유기용매에서 매우 안정하며, 특히 여러 가지 항산화 기작 중 proton-radical scavenger에 의하여 탈색되기 때문에 항산화 활성을 육안으로도 쉽게 관찰할 수 있는 장점이 있다<sup>29)</sup>. 柏子仁의 농도에 따른 DPPH radical 소거 활성을 측정한 결과 柏子仁은 농도의 의존적으로 활성이 증가하였고 500  $\mu$  g/ml의 농도에서는 74.87%의 소거 활성을 보였다.

남성 생식세포인 GC-1과 GC-2 cell, Leydig cell, Sertoli cell의 성장 및 증식에 미치는 영향을 측정한 결과, 柏子仁 1, 5, 10, 50, 100  $\mu$  g/ml 범위에서 GC-2 cell과 Leydig cell의 viability는 72~96% 범위 내로 나타나 항산화 효과를 측정하기에 적합한 세포주로 확인되었다.

柏子仁이 GC-2 cell과 Leydig cell에 미치는 항산화 효과를 측정하기 위하여 hydrogen peroxide로 산화적 손상을 유도하여 다음 단계의 실험을 수행하였다. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 Leydig cell의 cytotoxicity에 대해 柏子仁 처리군은 최대 72%의 생존율을 보여 대조군에 비해 유의한 항산화효과가 확인되었으므로, Leydig cell을 대상으로 항산화의 기전과 관련된 LPO 생성과 SOD 활성도에 미치는 영향을 측정하기로 하였다.

실험에 사용된 Leydig cell은 고환의 간질에 위치하며 뇌하수체 전엽으로부터 분비되는 luteinizing hormone (LH)에 의해 콜레스테롤로부터 testosterone을 합성하는 세포이다. Testosterone은 말초조직에서 dihydrotestosterone (DHT)와

여성호르몬인 estradiol로 대사되어, 남성생식기의 분화, 성숙, 2차 성징의 발현 및 GnRH의 분비조절 등에 관여한다<sup>30)</sup>.

정자의 세포막은 다량의 불포화 지방산을 함유하고 있으므로 LPO 생성의 감소는 지질과산화 억제를 통한 항산화효과를 의미한다. 세포의 지질성분은 독성물질에 의해 손상을 받으면 지질성분의 산화반응으로 지질과산화물인 MDA와 같은 산물이 생성된다<sup>31)</sup>. Leydig cell에 hydrogen peroxide을 처리하여 조직손상을 유도하고 柏子仁을 처리하여 MDA의 생성량을 측정하였다. 그 결과 柏子仁 50, 100  $\mu$  g/ml의 농도에서 LPO 생성이 유의하게 감소하였다.

생체는 대사과정 중에  $O_2^-$  radical 즉 활성 산소를 만들어 내는데 이러한 활성산소로부터 인체는 세포를 보호하는 효소를 가지고 있으며 SOD가 대표적이다. 柏子仁은 Leydig cell에 대하여 SOD 활성도를 증가시켰으나 유의성은 없었다.

이상에서 살펴본 바와 같이 주로 心, 肝, 腎經에 작용하여 安神養心의 효능으로 陽痿, 陽道不興을 치료하는 處方에서 사용되어 왔던 柏子仁이 남성불임에 미치는 영향을 확인하기 위하여 실험을 수행한 결과 농도의존적으로 DPPH radical의 소거활성을 증가시켰으며, Leydig cell에서 hydrogen peroxide로 유발된 산화 스트레스에 대해 생존율을 증가시켰다. 또한 hydrogen peroxide의 산화적 손상으로 발생한 지질과산화물인 MDA의 생성을 억제하였다.

## 결론

安神養心의 효능으로 陽痿症의 치료에 사용되고 있는 柏子仁이 남성 생식세포에 미치는 항산화작용을 비교하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DPPH radical 소거 활성을 측정한 결과 柏子仁의 IC<sub>50</sub> 값은 160.929  $\mu$ g/ml로 나타났다.
2. 柏子仁은 1, 5, 10, 50, 100  $\mu$  g/ml 범위에서 Leydig cell의 생존율에 유의한 변화를 미치지 않았다.
3. 柏子仁은 Leydig cell에 hydrogen peroxide로 유도된 cytotoxicity에 대하여 유의한 보호효과가 나타났다.
4. 柏子仁은 Leydig cell에서 LPO의 지표 물질인 MDA 함량을 측정한 결과 유의한 감소효과가 나타났다.
5. 柏子仁은 Leydig cell에서 SOD 활성도에 대하여 유의한 변화가 나타나지 않았다.

이상의 결과 柏子仁은 DPPH에 의한 free radical 소거 활성이 있으며, Leydig cell에 대하여 세포보호효과 및 hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity에 대한 항산화효과와 LPO 감소효과를 통하여 항산화효과가 있음이 확인되었고 향후 남성불임 치료에 응용할 수 있는 약물로서 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 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. The whole country a college of Oriental medicine. The joint textbook publish commission compilation, Herbalogy, Seoul : Younglimsa, 2008 : 534-5.
2. Gukgajunguiyakgwalliguk 《Junghwaboncho》 Pyeonwihoepyeon, Junghwaboncho, Sanghae : Sanghaegwahakgisulchulpansa, 1999 : 2, 325-7.
3. Heo J. Donguibogam, Seoul : Namsandang, 2004 : 954.
4. Hwang DY, Daeyeok Jeungmaek Bangyakhappyeon, Seoul : Namsandang, 1987 : 193, 352.
5. Yang HO, Suh BY, Han BH, Isolation and characterization of platelet-activating factor receptor binding antagonist from Biota orientalis, Planta Med, 1995 ; 61(1) : 37-40.
6. Yang HO, Kang YH, Suh DY, Kim YC, Han BH, Biological and pharmacological effects of pinusolide, a novel platelet activating factor antagonist, Planta Med, 1995 ; 61(6) : 519-22.
7. Lee JY, Choi SW, Isolation and Purification of Tyrosinase Inhibitors from the Seeds of Thuja orientalis L, Korean J Postharvest Sci Technol, 2000 ; 7(4) : 409-13.
8. Berlin J, Witte L, Formation of mono- and diterpenoids by cultured cells of Thuja occidentalis, Phytochemistry, 1988 ; 27(1) : 127-32.
9. Kosuge T, Yokota M, Suqiyama K, Saito M, Iwata Y, Nakura M, Yamamoto T, Studies on anticancer principles in Chinese medicines. II, Cytotoxic principles in Biota orientalis (L.) Endl, and Kaempferia galanga L, Chem Pharm Bull, 1985 ; 33(12) : 5565-67.
10. Kim HG, Shim JS, Ju MS, Cho SH, Oh MS, Protective Effects of Thujae Semen against Neurotoxicity Induced by 6-hydroxydopamine in PC12 Cells, Kor. J. Herbology, 2008 ; 23(3) : 19-25.
11. Guang-Hua Xu, In-Ja Ryoo, Young-Hee Kim, Soo-Jin Choo, Ick-Dong Yoo, Free radical scavenging and antielastase activities of flavonoids from the fruits of Thuja orientalis, Arch Pharm Res, 2009 ; 32(2) : 275-82.
12. Kim MS, Kim BY, Park CS, Yoon BD, Ahn SC, Oh WK, Ahn JS, Inhibitory Effect of Thujae orientalis Semen Extract on Pancreatic Lipase Activity, Journal of Life Science, 2006 ; 16(2) : 328-32.
13. Ikuo Ikeda, Takayuki Oka, Kazunori Koba, Michihiro Sugano, Marcel S.F. Lie Ken Jie, 5c, 11c, 14c-Eicosatrienoic acid and 5c, 11c, 14c, 17c-Eicosatetraenoic acid of Biota orientalis seed oil affect lipid metabolism in the rat, 1992 ; 27(7) : 500-4.
14. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 4th edition, Cambridge university press, Cambridge, England, 1999.
15. Agarwal A, Saleh RA, Role of oxidants in male infertility : rationale, significance, and treatment, Urol Clin North Am 2002 ; 29 : 817-27.
16. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA, Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction, Fertil Steril, 2003 ; 79 : 829-43.
17. Esfandiari N, Sharma RK, Saleh RA, Thomas AJ Jr, Agarwal A, Utility of the nitro-bluetetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa, J Androl, 2003 ; 24 : 862-70.
18. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM, Role of antioxidants in treatment of male infertility : an overview of the literature, Reprod Biomed Online, 2004 ; 8 : 616-27.
19. Sanocka D, Kurpisz M, Reactive oxygen species and sperm cells, Reprod Biol Endocrinol, 2004 ; 2 : 12.
20. Du HK, Donguisingyeonguhak, Seoul : KyuHee University Press, 1994 : 368-70.
21. Chin ST, Seoksilbirok, Beijing : Inminwisaengchulpansa, 1984 : 162.
22. Son SM, Bigeupcheongeumyobang, Beijing : Inminwisaengchulpansa, 1982 : 16.
23. Yeo YB, Junguichiryonaebunbidaesabyeong, Jeolgan g : Jeolgangwahakgisul chulpansa, 1992 : 120-45.
24. Shin CH, Seonggineungjangaewa burimjeung, Seoul : Jeontonguihagyeonguso, 1993 : 110-210.
25. Oh B, Sinnongbonchogyong, Seoul : Uiseongdang, 2003 : 110.
26. Do HK, Myeonguibyeollok, Beijing : Inminwisaengchulpansa, 1986 : 19.
27. Heo J, Gugyeokjeungbodonguibogam, Seoul : Beobinmunhwasa, 1991 : 954.
28. Paick JS, Role of Reactive Oxygen Species in Male Infertility, Kor J Androl, 2003 ; 21(1) : 1-11.
29. David R, Mechanisitic toxicology, A radical perspective, J Pharm, pharmacol, 1989 ; 41 : 505-11.
30. The Korean Urological Association, Textbook of Urology, 3rd, Seoul : Goryeouihak, 2001 : 508.
31. 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.