

蓮鬚가 GC-2 spd(ts) Cell의 항산화에 미치는 영향

박은화¹, 장문석², 길기정¹, 박성규^{2*}

1 : 중부대학교 한방제약과학과

2: 경희대학교 한의과대학 처방제형학교실

The Antioxidant Activity of Nelumbinis Stamen in GC-2 spd(ts) Cells

Eun Hwa Park¹, Mun Seog Chang², Ki-Jeong Kil¹, Seong Kyu Park^{2*}

1 : Dept. of Herbal Pharmaceutical Science, Joongbu University

2: 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 water extract of Nelumbinis stamen (WNS) in GC-2 spd (ts) cells.

Methods : we investigated the effect of WNS in mouse GC-2 spd (ts) cells by MTT assay. The protective effects of WNS against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in GC-2 spd (ts) cells were examined by measuring cell viability. Lipid peroxidation levels and catalase were measured.

Results : WNS showed cell viability as 101.9, 108.9, 111.8, 125.8, 134.5% in 2.5, 5, 10, 25, 50 μ g/ml concentrations, respectively. The protective effect of WNS concentration was 2.5 μ g/ml against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in GC-2 spd (ts) cells. LPO were decreased significantly at 2.5, 5, 25 μ g/ml of WNS concentrations. Catalase activity was significantly increased at 2.5, 5 and 10 μ g/ml of WNS concentrations, respectively.

Conclusions : In conclusion, WNS has antioxidant activities in GC-2 spd(ts) cells against oxidative stress.

Key words : water extract of Nelumbinis stamen (WNS), GC-2 spd(ts) cells, Cell viability, LPO, Catalase

서론

남성불임의 가장 큰 원인은 정자형성장애로서 남성불임 환자 중 약 80~90%가 해당한다. 정자형성장애를 일으키는 원인 중 하나로 oxidative stress로 인한 seminal plasma의 염증반응을 들 수 있는데, 최근 연구들은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 불임의 중요한 요소로 다루고 있다¹⁾. 불임남성의 25~40%의 정액표본에서 고농도의 ROS가 검출되었다는 보고가 있으며, oxidative stress는 정자의 세포막을 손상시키고 정자의 핵 DNA를 파괴할 뿐 아니라 정자형성과정 중 생식세포의 apoptosis를 촉진시켜 불임을 유발시킬 수 있음이 보고되었다²⁾.

蓮鬚는 수련과의 여러해살이 수생 식물 연꽃 *Nelumbo nucifera* GAERTNER의 수술이며, 생약명은 Nelumbinis stamen이다³⁾. 性味는 平無毒하고, 甘澁하여 清心固腎, 澁精

止血的 效能이 있으며, 腎虛滑精, 遺精, 尿意頻數, 遺尿 및 吐血, 崩漏 등 증상을 치료한다⁴⁾.

蓮鬚가 사용된 처방들을 살펴보면 『醫方集解』에서는 補腎澁精의 목적으로 金鎖固精丸이 사용되었으며⁵⁾, 『楊氏家藏方』에서는 夢遺漏精의 치료에 사용된 玉鎖丹이 기록되어 있다⁶⁾. 『醫學正印』에서는 男子의 色慾過度와 無子의 치료에 金鎖思仙丹이 사용되어 있으며⁶⁾, 『集驗良方』에서는 腎虛遺精의 치료에 固精種子羊腎丸이 수록되어 있다⁶⁾.

蓮鬚의 주요성분은 luteolin, quercetin, isoquercitrin, luteolinglucoside 등이 알려져 있다⁶⁾. 蓮鬚는 유행성 감기 바이러스에 대한 억제 작용이 보고되었다⁷⁾. 그러나 蓮鬚가 정자형성과 관계가 있는 생식세포에 대한 oxidative stress의 영향에 관한 연구는 보고되지 않았다.

최근 남성불임과 관련된 연구들은 활성산소종을 불임의 중요한 요소로 다루고 있으므로, 蓮鬚가 생식세포에 미치는 항

*교신저자 : 박성규, 130-701 서울시 동대문구 회기동 1번지 경희대학교 한의과대학 처방제형학교실
· Tel : 02-961-0330 · Fax : 02-961-0536 · E-mail : comskp@khu.ac.kr
· 접수 : 2012년 08월 01일 · 수정 : 2012년 09월 03일 · 채택 : 2012년 09월 10일

산화 능력을 측정하기 위하여 정자형성 과정에서 생식세포의 일종인 GC-2 spd (ts) cells에 대한 세포 보호 효과를 실험하여 보고하는 바이다.

실 험

1. 재료 및 기기

1) 약재

본 실험에서 사용된 蓮鬚 (Nelumbinis stamen)는 한국산으로 전라남도 무안군 소재 (주)다연을 통하여 구입하였으며, 경희대학교 처방제형학 교실에서 외부형태를 비교 조사하여 확인한 후 사용하였고, 일부는 경희대학교 한의과대학 처방제형학 교실에 보관하였다.

2) 세포주

실험에 사용된 세포주는 GC-2 spd(ts) (spermatocyte, mouse)로서 America Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하였다. GC-2 spd (ts) 세포주는 mouse로부터 유래되었으며, 정자 발생과정상 정모세포 (spermatocyte)에 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), CO₂ incubator (Sanyo, Japan) 등이다.

2. 실험 방법

1) 시료의 제조

연수 25 g을 정확하게 중량을 측정한 뒤 환류추출기에 1차 증류수 500 ml와 함께 넣은 뒤 90 분 간 냉침하고, 10 0℃ 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 3.4 g을 얻었으며, 수율은 13.6% 이었다.

2) 세포 배양

GC-2 spd(ts) cell line은 37℃, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, penicillin (100 μ g/ml), streptomycin (100 μ

g/ml)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다. GC-2 spd(ts) cell line은 75 cm² flask (Falcon, USA)에서 충분히 증식된 후 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 2회 씻어준 후 50 ml flask 당 3 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 CO₂ 배양기 (37℃, 5% CO₂)에서 배양하였다.

3) Cell viability 측정

연수추출물이 GC-2 spd(ts) cell의 증식에 미치는 효과를 알아보기 위하여 Mosmann⁸⁾ 등의 방법을 응용하였다. 96 well plate에 1×10⁵ cells/ml의 cell을 100 μ l씩 넣고 37℃, 5% CO₂ incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 PBS 용액으로 씻어주었다. 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 시료 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 μ g/ml을 각 well에 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나기 4 시간 전에 PBS에 녹인 5 mg/ml MTT를 20 μ l씩 각 well에 처리한 후 알루미늄 호일로 차광시킨 후 나머지 시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100 μ l 처리한 후 37℃에서 2 시간 방치 후 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 다음 공식으로 계산되었다.

$$\text{Cell viability(\%)} = 100 \times A_T/A_C$$

A_C; absorbance of control,

A_T; absorbance of tested extract solution

4) Hydrogen peroxide-induced cytotoxicity 측정

연수추출물의 hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity에 대한 보호효과를 알아보기 위해 Mosmann⁸⁾ 등의 MTT test를 응용하여 다음과 같이 실험하였다. 96 well plate에 1×10⁵ cells/ml의 cell을 100 μ l씩 넣고 37℃, 5% CO₂ incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 PBS 용액으로 씻어주었다. PBS에 녹인 각각의 시료 2.5, 5, 10, 25, 50 μ g/ml와 FBS free DMEM에 녹인 25 μ M H₂O₂ 을 각각의 well에 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 배지를 버리고 PBS로 세척한 후 PBS에 녹인 5 mg/ml MTT 20 μ l와 FBS free DMEM 200 μ l을 각 well에 처리한 후 알루미늄 호일로 차광한 뒤 4 시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 200 μ l 처리한 후 37℃에서 2 시간 방치 후 microplate spectrophotometer를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) Hydrogen peroxide에 의한 LPO 생성에 미치는 영향 측정

연수추출물의 hydrogen peroxide에 의한 과산화지질의 생성에 대한 효과를 알아보기 위해 오⁹⁾ 등의 방법을 응용하여 실험하였다. 100 mm tissue culture dish (BD Falcon,

USA)에 3×10^5 cells/ml의 cell을 8 ml 씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 1X PBS 용액으로 씻어주었다. 1X PBS에 녹인 각각의 시료 2.5, 5, 10, 25 μ g/ml과 FBS free DMEM에 녹인 25 μ M H₂O₂을 각각의 well에 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 세포를 1X PBS로 2 회 수세한 후 스크래퍼를 이용하여 lysis buffer 300 μ l를 넣고 긁어냈다. 그 후 cell을 원심분리 하여 상층액을 취하고 상층액 중의 1 μ l를 취해 Bradford's method¹⁰⁾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

GC-2 spd(ts) cell에 hydrogen peroxide를 처리한 후 시료를 처리하여 superoxide dismutase (SOD) 활성도에 미치는 영향을 Crapo¹¹⁾ 등의 방법에 따라 측정하였다. 100 mm tissue culture dish (BD Falcon, USA)에 10% FBS, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml)이 첨가된 DMEM 배지에 현탁된 3×10^5 cells/ml의 cell을 8 ml 씩 넣었다. 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 1X PBS 용액으로 씻어주었다. 1X PBS에 녹인 각각의 시료 2.5, 5, 10, 25 μ g/ml과 FBS free DMEM에 녹인 25 μ M H₂O₂을 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 μ l를 취해 Bradford's method¹⁰⁾로 단백질을 정량하였다. 50 ml cornical tube에 0.1 M Na₂HPO₄, 0.1 M NaH₂PO₄, 3차 증류수에 EDTA 0.1 M 되도록 첨가하여 pH 7.8의 50 mM phosphate buffer (PB)를 만든 후 0.1 N NaOH에 5 μ M xanthine을 녹여주고, 1 ml PB에 cytochrome C를 첨가하여 solution A를 제조하였다. 또한 0.1 mM EDTA가 첨가된 50 mM phosphate buffer에 0.2 μ /ml xanthine oxidase을 넣어 solution B를 제조하였다. solution A 870 μ l와 농도를 맞춘 sample 20 μ l와 solution B 20 μ 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

GC-2 spd(ts) cell에 hydrogen peroxide를 처리한 후 시료를 처리하여 catalase 활성도를 Aebi 등¹²⁾의 방법에 따라

측정하였다. 100 mm tissue culture dish (BD Falcon, USA)에 10% FBS, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml)이 첨가된 DMEM 배지에 현탁된 3×10^5 cells/ml의 cell을 8 ml 씩 넣었다. 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 1X PBS 용액으로 씻어주었다. 1X PBS에 녹인 각각의 시료 2.5, 5, 10, 25 μ g/ml과 FBS free DMEM에 녹인 25 μ M H₂O₂을 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 μ l를 취해 Bradford's method¹⁰⁾로 단백질을 정량하였다. 50 ml cornical tube에 0.1 M Na₂HPO₄, 0.1 M NaH₂PO₄, 3차 증류수를 넣어 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0) 제조한 후 H₂O₂를 첨가한 후 0.015 M H₂O₂ in 0.01 M phosphate buffer를 제조하였다. 0.015 M H₂O₂가 첨가된 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0) 950 μ l와 50 μ 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. 연수추출물이 GC-2 spd(ts) cell의 cell viability에 미치는 영향

연수추출물이 GC-2 spd(ts) cell의 성장 및 증식에 미치는 영향을 측정하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 연수추출물 2.5, 5, 10, 25, 50 μ g/ml 농도에서 GC-2 spd(ts) cell의 생존율은 101.9, 108.9, 111.8, 125.8, 134.5%로 농도 의존적으로 유의하게 증가하였으며, 연수추출물 50 μ g/ml의 농도에서 GC-2 spd(ts) cell의 생존율은 134.5%로서 가장 높았다(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.001$, Fig. 1).

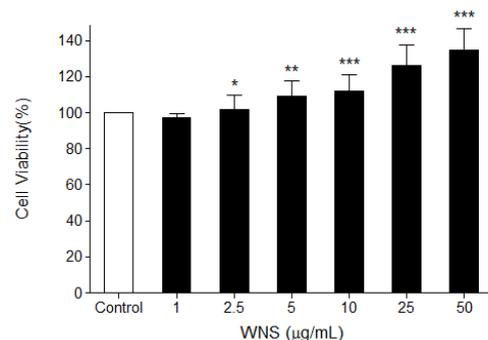


Fig. 1. Effect of water extract of Nelumbinis stamen (WNS) on GC-2 spd(ts) cells. GC-2 spd(ts) cells were treated with WNS at 37°C for 24 h. Each column or point represents the mean \pm

S.E. (n = 6). * Significantly different from the control value (*: p < 0.05, **: p < 0.01 and ***: p < 0.001)

2. 연수추출물의 hydrogen peroxide에 대한 항산화효과

Hydrogen peroxide에 의해 유도된 GC-2 spd(ts) cell은 정상군에 비하여 41.85%로 유의하게 cell viability가 감소하였다 (p < 0.001). Hydrogen peroxide 에 의해 유도된 GC-2 spd(ts) cell에 대하여 연수추출물 처리군은 2.5 μg/ml의 농도에서 53.4%로 hydrogen peroxide로 유도된 cytotoxicity에 대하여 유의한 보호 효과를 나타내었다(p < 0.05, Fig. 2).

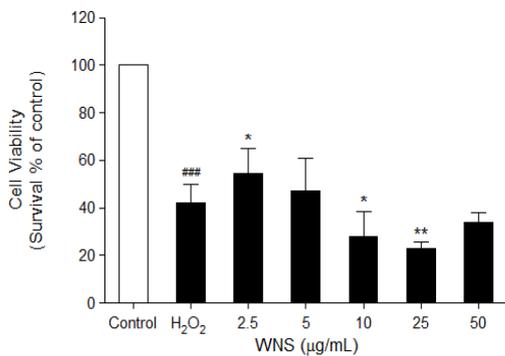


Fig. 2. Protective effect of water extract of Nelumbinis stamen (WNS) on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity. GC-2 spd(ts) cells treated with WNS were incubated in the presence or absence of 25 μM H₂O₂ at 37°C for 24 h. Each column or point represents the mean ± S.E. (n = 6). # Significantly different from the control (###: p < 0.001) and * Significantly different from the cell exposed to H₂O₂ alone (*: p < 0.05 and **: p < 0.01).

3. 연수추출물의 hydrogen peroxide에 의한 LPO 생성에 미치는 영향

GC-2 spd(ts) cell에 대하여 정상군의 MDA 함량은 1.37 nmol/mg of protein 인데 비하여, hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 대조군은 2.00 nmol/mg protein으로 과산화지질이 유의하게 증가하였음을 확인하였다 (p < 0.05).

Hydrogen peroxide와 연수추출물 동시처리군은 2.5, 5, 25 μg/ml의 농도에서 MDA가 각각 1.14, 1.11, 0.83 nmoles/mg protein으로 대조군에 비하여 LPO 생성이 유의하게 감소하였다(p < 0.05, Fig. 3).

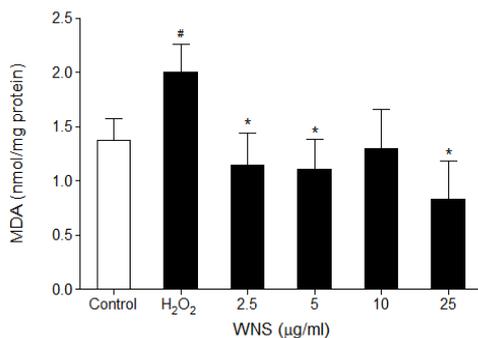


Fig. 3. Effect of water extract of Nelumbinis stamen (WNS) on

hydrogen peroxide-induced lipid peroxidation. GC-2 spd(ts) cells treated with WNS were incubated in the presence or absence of 25 μM 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 ± S.E. (n = 3). # Significantly different from the control (#: p < 0.05) and * significantly different from the cells exposed to hydrogen peroxide alone (*: p < 0.05).

4. 연수추출물의 SOD 활성도에 미치는 영향

GC-2 spd(ts) cell에 대하여 정상군의 SOD activity는 10.90 units/mg protein인데 비하여 hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 대조군은 8.92 units/mg protein 으로 SOD activity가 감소하였다. Hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 처리군은 연수추출물 처리군 2.5, 5, 10, 25 μg/ml의 농도처리군에서 SOD activity가 각각 9.36, 10.24, 10.24, 8.92 units/mg protein으로 대조군에 비하여 SOD activity가 증가하는 경향이었으나 유의성은 없었다(Fig. 4).

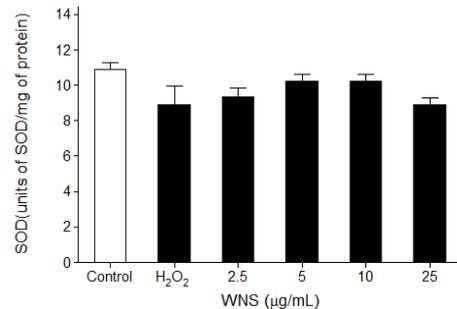


Fig. 4. Effect of water extract of Nelumbinis stamen (WNS) on hydrogen peroxide-induced SOD activity. GC-2 spd(ts) cells treated with WNS were incubated in the presence or absence of 25 μM hydrogen peroxide at 37°C for 24 h. Total cell lysate from cultured cells were analyzed for SOD activity. Each column or point represents the mean ± S.E. (n = 3).

5. 연수추출물의 catalase 활성도에 미치는 영향

GC-2 spd(ts) cell에 대하여 정상군의 catalase activity는 99.40 units/mg protein인데 비하여 hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 대조군은 74.40 units/mg protein 으로 catalase activity가 유의하게 감소하였음을 확인하였다 (p < 0.05). Hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 처리군은 연수추출물 처리군 2.5, 5, 10 μg/ml의 농도 처리군에서 catalase activity가 각각 92.85, 92.85, 92.85 units/mg protein으로 유의하게 증가하였다(p < 0.05, Fig. 5).

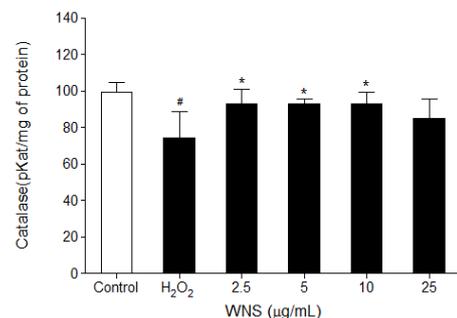


Fig. 5. Effect of water extract of Nelumbinis stamen (WNS) on hydrogen peroxide-induced catalase activity. GC-2 spd(ts) cells treated with WNS were incubated in the presence or absence of 25 μ M hydrogen peroxide at 37°C for 24 h. Each column or point represents the mean \pm S.E. (n = 4). # Significantly different from the control (#: p < 0.05) and * significantly different from the cells exposed to hydrogen peroxide alone (*: p < 0.05).

고찰 및 결론

남성생식세포의 발생은 stem cell인 정원세포로부터 발생을 시작하여 체세포분열, 감수분열 등의 세포분열과 극적인 형태학적, 기능적 분화 과정을 거쳐 반수체인 정자로 분화한다. 생식세포는 정세관 (seminiferous tubule)의 기저막으로부터 정세관의 내강을 향하여 정세포의 분열발전 순서대로 정열되어 있다. 즉 정조세포 (spermatogonia: 2n)는 기저막에 붙어있고, 정세관의 내강을 향하여 일차 정모세포 (primary spermatocyte: 2n), 이차 정모세포 (secondary spermatocyte: n), 정자세포 (spermatid: n) 순으로 발전된다. 정조세포는 증식단계를 거친 후 유사분열에 의하여 일차 정모세포로 분열한다. 일차 정모세포는 다시 감수분열에 의하여 다배체 (haploid)인 두 개의 이차 정모세포로 변화하고, 이차 정모세포는 두 개의 정자세포로 분열한다¹³⁾. 이 실험에 사용된 세포주는 GC-2 spd(ts) (secondary spermatocyte)로서 정자 발생과정상 이차 정모세포에 속하며, mouse로부터 유래되었다. 이들 정자세포는 형태적 기능적 변화인 정자로의 분화과정 (spermiogenesis)을 거쳐서 정자 (spermatozoa)가 된다. 생식세포의 발생에는 다양한 유전자들이 복합적으로 참여하며 이 유전자들은 내재되어있는 프로그램에 따라 혹은 외부의 신호에 의해 적절한 순간에 발현되고 조절된다. 그러므로 남성생식세포의 복잡한 발생 및 조절 기작에 참여하는 유전자들의 결합은 결국 남성불임을 초래하게 된다¹⁴⁾.

수련과의 여러해살이 수생 식물 연꽃 *Nelumbo nucifera* GAERTNER은 다양한 한약재로 활용되고 있다. 연꽃의 종자와 열매는 蓮子肉, 종자 안의 녹색 배아는 蓮子心, 수술을 蓮鬚라고 한다³⁾. 蓮子肉은 補脾止瀉, 養心安神의 효능과 益腎滋精의 작용이 있으며, 蓮子心은 清心除煩의 효능과 함께 遺精 증상을 치료한다. 蓮鬚는 清心益腎, 滋精, 止血의 효능이 있다. 蓮子肉, 蓮子心과 蓮鬚는 공통적으로 遺精 증상의 치료에 활용되었으며, 그 중에서도 蓮鬚는 甘澁한 性味로서 대표적인 固澁劑에 해당하는 金鎖固精丸의 구성 약물로서 收斂 固精의 妙品으로 활용되어 왔다⁵⁾.

男性不好症에 蓮鬚가 활용된 처방으로는 『醫學正印』에서 蓮鬚, 石蓮子, 鷄頭實, 金櫻子가 배합된 金鎖思仙丹이 男子의 精氣不固로 인한 無子 증상을 치료하는 것으로 기록되어 있다⁶⁾.

『本草求真』에서는 蓮鬚는 甘溫하면서도 澁한 性味가 있어 蓮子肉과 효능이 비슷하지만, 澁性이 매우 많으며 龍骨의 寒澁한 성미와 구분되는 한약이라 하였다¹⁵⁾. 章穆은 『調疾飲食辨』에서 蓮鬚와 蓮子肉의 효능이 동일하다고 기록한 本草綱目的 오류를 지적하며, 蓮子肉은 溫澁하지만 蓮鬚는 寒澁한 性味の 차이가 있다고 주장하였다⁶⁾. 蓮鬚의 주의 사항을 기록한 『本草逢原』에서는 蓮鬚가 精薄者에게 적합하지만, 陽氣가 亢盛되어 제어하지 못하는 자에게 사용하면 高환 (兜)이 澁하게 되는 질환이 발생할 수 있음을 지적하였다¹⁶⁾. 이는 蓮

鬚가 精子の 형성에 관여하여 精薄症을 치료하고, 蓮鬚의 작용 부위는 음낭 내부의 高환으로 유추할 수 있다.

이상의 문헌에 따라 蓮鬚가 遺精 증상에 효과가 있음에 착안하여, 高환에 존재하는 생식세포의 하나인 GC-2 spd(ts) cell에 미치는 蓮鬚의 항산화 작용을 측정하고자 하였다.

蓮鬚가 GC-2 spd(ts) cell의 성장 및 증식에 미치는 영향은 MTT assay로 측정하였다. 蓮鬚는 2.5, 5, 10, 25, 50 μ g/ml의 모든 농도에서 용량 의존적으로 GC-2 spd(ts) cell의 생존율을 유의하게 증가시켰으며 최대 134.5%의 생존율을 나타내어 세포독성이 없음을 확인하였다. 산화적 손상으로부터 GC-2 spd(ts) cell에 미치는 蓮鬚의 보호 효과를 측정하기 위하여 hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity를 측정된 결과 蓮鬚 처리군은 2.5 μ g/ml의 농도에서 유의하게 산화적 손상을 보호하였다. 그러나 蓮鬚 처리군은 본 실험군내에서 비교적 고농도에 해당하는 10, 25, 50 μ g/ml의 농도에서 cytotoxicity가 증가되었으므로, 향후 2.5 μ g/ml 농도 이하의 저용량 蓮鬚 처리군에 대한 항산화 실험이 보완되어야 할 것이다.

LPO는 세포막의 지질성분이 독성 물질들에 의해서 손상을 받게 되면 지질성분의 산화반응이 촉진되어 나타나는 반응산물이며, 생체 조직 중에서 생화학적 조직 손상의 척도로 널리 이용되어 조직의 산화적 손상에 의해 야기되는 병리현상의 척도로도 활용되어 진다. Hydrogen peroxide와 蓮鬚의 동시처리군은 대조군에 비하여 LPO 생성이 유의성 있게 감소하였다.

蓮鬚 처리군은 실험된 모든 농도에서 대조군에 비하여 SOD activity가 증가하는 경향이었으나 유의성은 없었으므로, 蓮鬚의 항산화 기전에 SOD는 직접적인 연관이 없음을 알 수 있다.

Catalase는 생체내의 대사과정에서 생성된 유독한 활성산소로부터 생체조직을 보호하며, 하나의 catalase 분자는 1분 동안 500만 분자가 움직이는 속도로 과산화수소를 분해한다. GC-2 spd(ts) cell에 대하여 蓮鬚 처리군은 catalase의 발현량을 유의하게 증가시켰다.

본 연구의 결과로서 蓮鬚 추출물은 정자 발생과정상 이차 정모세포에 속하는 GC-2 spd(ts) cell에서 hydrogen peroxide에 의해 유도된 산화적 손상에 대하여 보호효과가 있으며, 蓮鬚의 항산화 기전은 LPO 생성과 catalase 활성화 증가와 밀접한 관련이 있음이 입증되었다.

이로써 清心固腎, 澁精止血의 효능으로 腎虛滑精, 遺精의 치료에 활용되어 온 蓮鬚가 GC-2 spd(ts) cell에 대한 항산화 효과 및 세포보호효과가 있음이 확인되었고 남성불임의 치료에 응용할 수 있는 약물임이 확인되었다.

참고문헌

1. Sanocka D, Kurpisz M. Reactive Oxygen Species and Sperm Cells, *Reprod Biol Endocrinol*, 2004 ; 2 : 12.
2. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*, 2003 ; 79(4) : 829-43.

3. Ahn DK, Illustrated Book of Korean Medicinal Herbs, Seoul : Kyohak Publishing Co.,LTD, 1998 : 684.
4. The whole country a college of Oriental medicine, The joint textbook publish commission compilation, Herbalogy, Seoul : Younglimsa, 2008 : 623-4.
5. Park SK, Kim YK, Oh MS, Cheobangjehyeonghak, Seoul : Yeongnimsa, 2006 : 255-6.
6. Gukgajunguiyakgwalliguk 《Junghwaboncho》 Pyeonwihoebyeon, Junghwaboncho, Shanghai : Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1998 : 404-5.
7. Zheng HZ, Dong ZH, She J. Modern Study of Traditional Chinese Medicine, Beijing : Xue Yuan Press, 1997 ; 4 : 3590-1.
8. 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.
9. Oh MS, Kim DR, Kim SY, Chang MS, Park SK, Antioxidant Effects of *Psoraleae Fructus* in GC-1 Cells, J. Orient Physiol Korean Pathol, 2005 ; 19(1) : 81-6.
10. 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.
11. Crapo JD, McCord JM, Fridovich I, Preparation and assay of superoxide dismutases, Methods Enzymol, 1978 ; 53 : 382-93.
12. Aebi H, Catalase in vitro, Methods Enzymol, 1984 ; 105 : 121-6.
13. The Korean Urological Association, Textbook of Urology, 3rd, Seoul : Goryeouihak, 2001 : 507-22.
14. Okabe M, Ikawa M, Ashkenas J, Male infertility and the genetics spermatogenesis? Am J Hum Genet, 1998 ; 62(6) : 1274-81.
15. Hwanggungsu, Bonchogujin, Beijing : Junggukjunguiyakchulpansa, 1997 : 77-8.
16. Jangno, Bonchobongwon, Beijing : Junggukjunguiyakchulpansa, 1996 : 170-1.