



Original Article / 원저

右歸飲이 hydrogen peroxide에 의해 유도된 Leydig cell에 미치는 항산화 효과 연구

김수현 · 김도림 · 장문석 · 박성규*

경희대학교 한의과대학 처방제형학교실

Antioxidant effect of Woogyuyeum against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in Leydig cells

Soo Hyun Kim · Do Rim Kim · Mun Seog Chang · Seong Kyu Park*

Department of Prescriptionology, College of Korean Medicine,
Kyung Hee University

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to investigate the antioxidant activity of water extract of Woogyuyeum (WGY) in Leydig cells.

Methods : We investigated the cytoprotective effect of WGY in cultured mouse Leydig cells by MTT assay. Leydig cells treated with WGY were incubated in the presence or absence of 50 μ M hydrogen peroxide at 37°C for 24 h. The protective effects of WGY against hydrogen peroxide-induced oxidative stress, lipid peroxide (LPO), superoxide dismutase (SOD), and catalase activity assays were performed in Leydig cells.

Results : As a result, WGY showed no significant cytotoxicity in Leydig cells. WGY showed cell viability as 103.65% in 5 μ g/ml concentrations. The cytotoxicity induced by hydrogen peroxide in Leydig cells, the antioxidant effects of WGY was increased in 1, 5, 50, 100 μ g/ml concentrations. 100 μ g/ml concentration of WGY showed maximum antioxidant effects. Treatment of cells with 100 μ g/ml WGY significantly reduced the MDA concentration to 0.23 nmoles/mg protein. SOD activity was increased at 1, 100 μ g/ml concentration of WGY and catalase activity was significantly increased at 50, 100 μ g/ml concentrations of WGY, respectively.

© 2015 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study

This paper is available at <http://www.formulastudy.com> which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Conclusions : In conclusion, WGY has antioxidant activities against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in Leydig cells.

Keyword : water extract of Woogyuyeu (WGY), Leydig cells, cytotoxicity, MTT assay, lipid peroxide (LPO), superoxide dismutase (SOD), catalase activity

I. 서 론

右歸飲은 明代 張景岳¹⁾의 『景岳全書 新方八陣補陣』에서 “元陽不足, 先天稟衰, 勞傷過度을 치료한다. 命門의 火가 衰하여 능히 土를 生하지 못하고, 이로써 脾胃가 虛寒해서 飲食을 잘 섭취하지 못하고 嘔惡하고 膨脹하며 怯寒하고 畏冷하고 臍腹이 많이 아프다. 大便이 불편하여 瀉痢가 頻作하고, 小便이 스스로 흐르며 虛冷寒疝하고 寒이 肢節로 침습하여 痺痛하고 下焦가 寒而하여 浮腫이 생긴 것을 치료한다.”라고 기록된 이후 崩漏, 更年期障礙, 不妊症 등 질환에 다용되고 있다.

右歸飲에 대한 선행 연구로서 김 등²⁾은 右歸飲이 hydrocortisone 투여로 유발된 가토부신피질기 능저하에 미치는 영향을, 김 등³⁾은 cyclosporin A의 간독성에 미치는 右歸飲의 영향에 대하여, 임 등⁴⁾은 右歸飲이 백서의 갑상선기능저하증에 미치는 영향, 이 등⁵⁾은 右歸飲이 Zinc에 의한 신경교세포의 고사에 미치는 영향 등에 대하여 보고한 바 있다. 정⁶⁾은 左歸飲과 右歸飲에 의한 활성 산소류의 소거 작용과 항산화 효소계의 활성 증가 효과에 대한 연구를 보고하였다. 이외에도 최 등⁷⁾은 右歸飲이 난소적출 백서의 골다공증에 미치는 영향에 대하여 보고하여 여성 생식과 관련된 연구가 수행되었음을 알 수 있다.

그러나 溫補腎陽 填精養血의 효능으로 腎陽虛證으로 발생하는 각종 불임 질환에 다용되고 있는 右歸飲이 남성생식세포에 미치는 효과에 대하여 보고된 바는 없다. 본 실험에 사용된 Leydig

cell은 고환의 간질에 위치하며 뇌하수체 전엽으로부터 분비되는 luteinizing hormone (LH)에 의해 testosterone을 분비한다. Testosterone은 말초 조직에서 dihydrotestosterone (DHT)와 여성호르몬인 estradiol로 대사되어 남성생식기의 분화, 성숙, 2차 성징의 발현 및 GnRH의 분비조절 등에 관여한다⁸⁾.

따라서 testosterone 분비에 관여하는 Leydig cell에 대하여 右歸飲이 미치는 영향을 관찰하기 위하여, 산화적 스트레스 모델로서 hydrogen peroxide를 처리한 후 cytotoxicity에 대한 항산화 효과, lipid peroxide (LPO), superoxide dismutase (SOD) activity, catalase activity에 미치는 영향을 연구하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 약제 및 시료의 제조

1) 약제

본 실험에서 사용된 熟地黃, 山藥, 枸杞子, 杜沖, 甘草, 山茱萸, 肉桂, 附子는 각각 서울특별시 동대문구 제기동 경동약령시장의 원광약업사를 통하여 구입하여, 경희대학교 처방제형학 교실에서 외부형태를 비교 조사하여 확인한 후 사용하였으며, 일부는 경희대학교 한의과대학 처방제형학 교실에 보관하였다.

2) 세포주

* Corresponding author : Seong Kyu Park, PhD, Professor, Department of Prescriptionology, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, 1, Hoegi-dong, Dongdaemun-gu, Seoul, 130-701, South Korea.

· Tel : 82-02-961-0330, Fax : 82-02-961-0536

· E-mail : comskp@khu.ac.kr

• Received : May 26, 2015 / Revised : June 09, 2015 / Accepted : June 19, 2015



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 cell 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), superoxide dismutase (SOD) enzyme (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

실험에 사용된 右歸飲의 처방 구성은 方藥合編 上統 46번 처방을 기본으로 문헌에 기록된 1錢의 용량을 4 g으로 환산하여 1첩의 분량을 3배율로 증량하였으며, 한약명 학명 생약명과 용량을 표 1에 명시하였다 (Table 1). 熟地黃 36 g, 山藥(炒) 24 g, 枸杞子 24 g, 杜沖 24 g, 甘草(蜜炙) 12 g, 山茱萸 12 g, 肉桂 12 g, 附子(炮) 12 g을 정확하게 증량을 측정하여 환류추출기에 1차 증류수 3,120 ml와 함께 넣은 뒤 100°C 가까이 온도가 상승하여 탕액이 끓는 시점으로부터 2 시간 동안 가열하여 추출한 다음, filter paper로 감압 여과한 여과액을 얻었다. 이 여과액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용하였다. 동결 건조 추출물은 40.0 g을 얻었으며, 수율은 25.6% 이었다.

2) 세포 배양

Leydig cell line은 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, penicillin (100 µg/ml), streptomycin (100 µg/ml)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다. Leydig cell은 75 cm² flask (Falcon, USA)에서 충분히 증식된 후 배양 3일 간격으로 배양세

Table 1. Constituents of Woogyu yeum(WGY).

Herbs	Scientific Name	Pharmaceutical Name	Family	Dose (g)
Sukjihwang (熟地黃)	<i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch.	Rehmanniae Radix Preparat	Scrophulariaceae	36
Sanyak (山藥)	<i>Dioscorea batatas</i> Decne.	Dioscoreae Rhizoma	Dioscoreaceae	24
Gugija (枸杞子)	<i>Lycium chinense</i> Mill.	Lycii Fructus	Solanaceae	24
Duchung (杜沖)	<i>Eucommia ulmoides</i> Oliv.	Eucommiae Cortex	Eucommiaceae	24
Gancho (甘草)	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.	Glycyrrhizae Radix	Leguminosae	12
Sansuyu (山茱萸)	<i>Cornus officinalis</i> Sieb. et Zucc.	Comi Fructus	Cornaceae	12
Yukgye (肉桂)	<i>Cinnamomum cassia</i> Presl.	Cinnamomi Cortex	Lauraceae	12
Buja (附子)	<i>Aconitum carmichaeli</i> Debx.	Aconiti Lateralis Preparata Radix	Ranunculaceae	12
Total				156

포 표면을 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 2회 씻어준 후 50 ml flask 당 1 ml의 0.25% trypsin-EDTA 용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin용액을 버리고 37°C에서 5분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대 배양하였다. 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 ml에 부유시킨 다음 새로운 배양용기에 옮겨 1 : 20의 split ratio로 CO₂ 배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다.

3) Cell viability 측정

Leydig cell의 증식에 미치는 효과를 알아보기 위하여 Mosmann 등⁹⁾의 방법을 응용하였다. 96 well plate에 1×10⁵ cells/ml의 cell을 100 µl씩 넣고 37°C, 5% CO₂ 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 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°C에서 2 시간 방치 후 microplate reader를 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

4) Hydrogen peroxide-induced cytotoxicity 측정

Hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity에 대한 보호효과를 알아보기 위해 Mosmann 등⁹⁾의 MTT test를 응용하여 다음과 같이 실험하였다. 96 well plate에 1×10⁵ cells/ml의 cell을 100 µl씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 PBS 용액으로 씻어주었다. PBS에 녹인 각각의 시료 1, 5, 10, 50, 100 µg/ml과 FBS free DMEM에 녹인 50 µM H₂O₂을 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°C에서 2 시간 방치 후 microplate spectrophotometer를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) Hydrogen peroxide에 의한 lipid peroxide (LPO) 생성에 미치는 영향 측정

右歸飲의 hydrogen peroxide에 의한 과산화지질의 생성에 대한 효과를 알아보기 위해 오 등¹⁰⁾의 방법을 응용하여 실험하였다. 6 well plate에 2×10⁴ cells/ml의 cell을 5 ml 씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 1X PBS 용액으로 씻어주었다. 1X PBS에 녹인 각각의 시료 1, 5, 10, 50, 100 µg/ml과 FBS free DMEM에 녹인 50 µM H₂O₂을 각각의 well에 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 세포를 1X PBS로 2 회 수세한 후 스크래퍼를 이용하여 lysis buffer 150 µl를 넣고 긁어냈다. Cell을 원심분리 하여 상층액을 취하고 상층액 중의 1 µl를 취해 단백질을 정량하였다. 15 ml conical 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 × g에서 20 분간 원심분리 하였다. 532 nm에서 상층액의 흡광도를 측정하였다. MDA 농도는 free MDA로 표준선을 구하여 계산하였다.

6) Superoxide dismutase (SOD) 활성도 측정

Leydig cell에 hydrogen peroxide를 처리한 후 시료를 처리하여 superoxide dismutase (SOD) 활성도에 미치는 영향을 Crapo 등¹¹⁾의 방법에 따라 측정하였다. 100 mm tissue culture dish (BD Falcon, USA)에 10% FBS, penicillin (100 U/ml),



streptomycin (100 µg/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 1, 5, 10, 50, 100 µg/ml과 FBS free DMEM에 녹인 50 µM 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 × g에서 10 분간 원심분리 하여 상층액을 취하고 상층액 중의 1 µl를 취해 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 buffer를 만든 후 0.1 N NaOH에 5 µM xanthine을 녹여주고, 1 ml phosphate buffer에 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 µl와 농도를 맞춘 sample 20 µl와 solution B 20 µl를 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 등¹²⁾의 방법에 따라 측정하였다. 100 mm tissue culture dish에 10% FBS, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/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 1, 5, 10, 50, 100 µg/ml과 FBS free DMEM에 녹인 50 µM H₂O₂

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 × g에서 10 분간 원심분리 하여 상층액을 취하고 상층액 중의 1 µl를 취해 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 µl와 50 µl의 sample을 섞은 후 240 nm에서 1 분 동안의 흡광도 변화를 측정하였다.

3. 통계처리

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

III. 결 과

1. Leydig cell의 cell viability에 대한 영향 비교

右歸飲 처리군은 1, 5, 10, 50, 100 µg/ml의 농도 범위에서 Leydig cell의 생존율에 유의한 변화를 미치지 않았다. 右歸飲 처리군 50 µg/ml의 농도에서 Leydig cell의 생존율은 103.65%로 가장 높게 나타났다 (Fig. 1).

2. Hydrogen peroxide-induced cytotoxicity에 대한 항산화 효과 비교

Hydrogen peroxide에 의해 유도된 Leydig cell은 정상군에 비하여 77.52%로 유의하게 cell viability가 감소하였다 (p < 0.001). Hydrogen peroxide에 의해 유도된 Leydig cell에 대하여 右歸飲 처리군은 1, 5, 10, 50, 100 µg/ml의 농도에서 각각 79.52, 79.92, 85.32, 85.50, 86.62%로 항산화 효과를 나타내었다. 右歸飲 처리군 100 µg/ml의 농도에

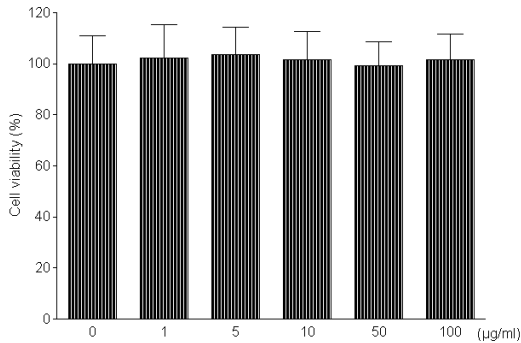


Fig. 1. Effect of water extract of *Woogyuyeum* (WGY) on the viability of Leydig cells. Leydig cells were treated with WGY at 37°C for 24 h. Each column represents the mean ± S.E. (n = 3).

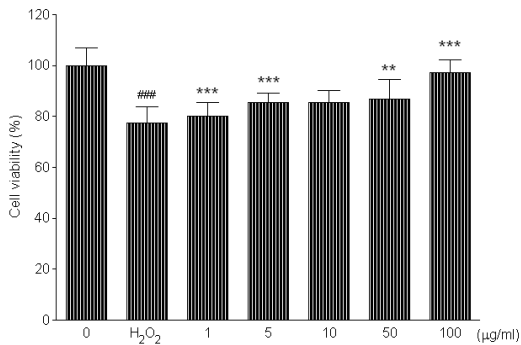


Fig. 2. Protective effect of water extract of *Woogyuyeum* (WGY) on H₂O₂-induced cytotoxicity. Leydig cells treated with WGY were incubated in the presence or absence of 50 µM H₂O₂ at 37°C for 24 h. Each column represents the mean ± S.E. (n = 3). # Significantly different from the control (###: p < 0.001) and · significantly different from the cells exposed to H₂O₂ alone (**: p < 0.01 and ***: p < 0.001).

서 H₂O₂-induced cytotoxicity에 대하여 가장 유의성 있는 항산화 효과를 나타내었다 (p < 0.001, Fig. 2).

3. hydrogen peroxide에 의한 lipid peroxide (LPO) 생성에 미치는 영향

Leydig cell에 대하여 정상군의 MDA 함량은 0.22 nmol/mg protein 인데 비하여, hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 대조군은 0.32 nmol/mg protein으로 과산화지질이 증가하였다. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 Leydig cell에

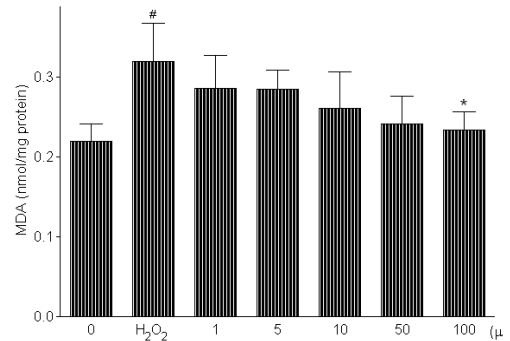


Fig. 3. Protective effect of water extract of *Woogyuyeum* (WGY) on H₂O₂-induced lipid peroxidation. Leydig cells treated with WGY were incubated in the presence or absence of 50 µM H₂O₂ at 37°C for 24 h. Total cell lysate from cultured cells were analyzed for MDA formation. Each column represents the mean ± S.E. (n = 3). # Significantly different from the control (#: p < 0.05) and · significantly different from the cells exposed to H₂O₂ alone (*: p < 0.05).

대하여 右歸飲 처리군은 100 µg/ml의 농도에서 MDA가 0.23 nmoles/mg protein으로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다 (p < 0.05, Fig. 3).

4. Superoxide dismutase (SOD) 활성도에 미치는 영향 비교

정상군의 SOD activity는 8.31 units(of SOD/mg of protein)인데 비하여 hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 대조군은 7.88 units로 SOD activity가 유의하게 감소하였다. Hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 右歸飲 처리군은 1, 100 µg/ml의 농도에서 SOD activity가 각각 8.41, 8.18 units로 SOD activity가 증가하였다 (p < 0.05, Fig. 4).

5. Catalase 활성도에 대한 영향 비교

정상군의 catalase 활성도는 718.2 units/mg protein인데 비하여, hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 대조군은 519.8 units/mg protein으로 catalase activity가 감소하였다. Hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 右歸飲 처리군은 50, 100µg/ml의 농도에서 catalase activity가 각각 762.7, 661.3units/mg protein으로 대조군에 비하여 catalase activity가 증가하였다 (p < 0.05, Fig. 5).

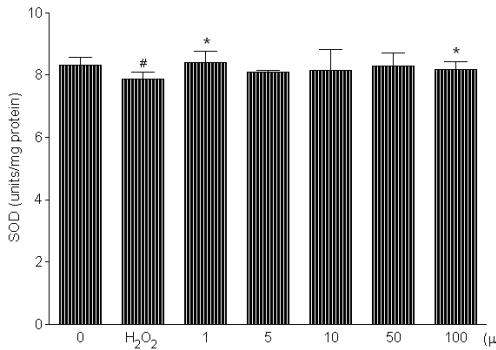


Fig. 4. Protective effect of water extract of Woogyuyeuem (WGY) on H₂O₂-induced SOD activity. Leydig cells treated with WGY were incubated in the presence or absence of 50 μM H₂O₂ at 37°C for 24 h. Total cell lysate from cultured cells were analyzed for SOD activity formation. Each column represents the mean ± S.E. (n = 3). # Significantly different from the control (#; p < 0.05) and * significantly different from the cells exposed to H₂O₂ alone (*; p < 0.05).

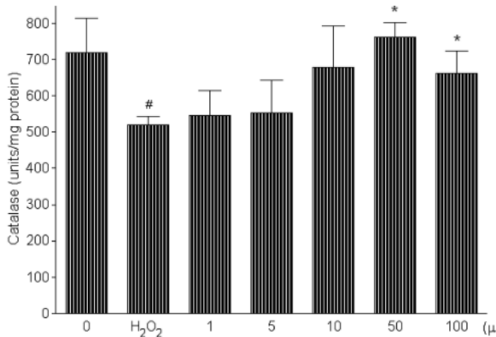


Fig. 5. Protective effect of water extract of Woogyuyeuem (WGY) on H₂O₂-induced catalase activity. Leydig cells treated with WGY were incubated in the presence or absence of 50 μM H₂O₂ at 37°C for 24 h. Total cell lysate from cultured cells were analyzed for catalase activity formation. Each column represents the mean ± S.E. (n = 3). # Significantly different from the control (#; p < 0.05) and * Significantly different from the cells exposed to H₂O₂ alone (*; p < 0.05).

IV. 고찰 및 결론

활성 산소류들(oxygen free radicals)은 분자상태의 효소가 생체 내 산화환원 반응의 전자수용체로 이용되기로서 지속적으로 환원되어 가는 중에

생성되는 불안정한 산소의 환원 형태로 superoxide anion(-O₂) 및 hydroxyl radical(-OH), hydrogen peroxide(H₂O₂) 등이 있다¹³. 활성산소는 생리적인 농도에서는 선택적이며 각종 생체현상에 유익한 역할을 담당한다. 그러나 고농도에서는 비선택적으로 생체내의 모든 고분자, 즉 막성질, 단백질, 핵산, 탄수화물 등과 반응을 하므로 생리적으로 악영향을 미쳐 치매, 신부전, 불임, 암 등 많은 질병을 일으킨다¹¹. 활성 산소류들은 superoxide dismutase(SOD), catalase 및 glutathione peroxidase 등의 효소에 의해 분해되어진다.

약 40%의 불임환자의 정액에서 활성산소가 발견된 데 비해 무정자증이나 가임력이 있는 사람의 정액에서는 활성산소를 발견할 수 없었다고 보고하여 불임환자에서 활성산소의 증가가 있으며 이것이 불임의 원인일 가능성이 있음을 주장하였다¹⁴. 정액의 활성산소는 백혈구 또는 정자에 의해 발생하며 특히 정자는 생리적 조건에서 정상운동성을 지닐 때는 활성산소를 생성하지 않으나 형태학적 이상이 있거나 잔여세포질이 있는 기형정자는 활성산소의 생성이 일어난다는 주장이 있는 반면⁹ 정상인의 정자에서는 지속적으로 superoxide 이온과 과산화수소의 생성이 나타난다는 주장이 있기도 하다¹⁵.

한의학의 역대문헌에서는 불임을 不産, 斷續, 無子, 不孕 등으로 칭하였고, 남성불임증에 대해서는 『素問 上古天真論』에서 최초로 “八八이면 則 齒髮이 去하고, 今 五臟이 모두 衰하여 筋骨이 解墮하고 天癸가 盡한다. 故로 鬚髮이 白하고 身體가 重하며, 行步가 不正하니 無子라.”하여 인체의 노화에 따른 生殖機能의 衰退現狀으로 보았다. 그 후 五不男(天漏 隄 怯 變)과 六病(精寒, 氣衰, 精少, 痰多, 相火, 氣鬱) 등으로 구체화되었으며¹⁶, 五勞, 七傷, 虛羸 등의 虛勞病症 및 陽痿, 遺精, 早泄, 白濁 등을 포괄하는 것으로 인식해왔다¹⁷.

남성불임증의 處方으로는 腎精不足에 贊育丹, 六味地黃湯, 補腎益精方, 腎陽不足에 八味地黃湯, 右歸飲, 陽起石丸, 暖肝煎, 氣血虧損에 大補元煎, 八物湯, 肝鬱血瘀에 柴胡疏肝散, 痰濕內鬱에 導痰湯, 二陳湯合腎氣湯, 濕熱下注에 龍膽瀉肝湯 등을

사용하였다¹⁸⁾.

이렇게 남성불임증의 치료는 腎虛에 대하여 이루어지고 있으니, 溫補腎陽의 효능을 증강시킨 腎陽虛가 비교적 중한 경우에 사용되는 右歸飲에 대한 연구는 남성불임 치료에 중요한 역할을 할 수 있다.

右歸飲은 명대 張景岳이 益火의 목적으로 創案하여 命門의 陽이 衰弱하고 陰이 勝한 경우에 사용한 처방으로, 八味地黃湯에서 牡丹皮, 茯苓, 澤瀉의 涼, 滲, 瀉 하는 세가지 약물을 제거하고, 補腎益精의 枸杞子, 杜沖과 補中益氣의 甘草를 가하여, 補하면서 瀉하지 않고, 溫養補腎의 효능을 증강시켜 命門의 陽이 쇠하고 陰이 盛한 腎陽虛證에 응용되고 있는 처방이다.

右歸飲이 Leydig cell의 성장 및 증식에 미치는 영향을 측정하기 위한 MTT assay 결과 1, 5, 10, 50, 100 µg/ml 범위에서 Leydig cell의 생존율에 유의한 변화를 미치지 않았다.

Leydig cell에 대한 cell viability 결과에 근거해 hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity를 측정하였으며, hydrogen peroxide에 의해 유도된 Leydig cell에 대해 右歸飲 처리군은 100 µg/ml의 농도에서 가장 유의성 있는 항산화 효과를 나타내었다.

Leydig cell에 대해 右歸飲 처리군은 100 µg/ml 농도에서 MDA가 각각 0.23 nmoles/mg protein으로 hydrogen peroxide에 의해 유도된 대조군에 비하여 LPO 생성이 감소하였다.

독성이 강한 superoxide anion을 보다 독성이 약한 hydrogen peroxide로 전환시키는 효소인 SOD의 활성 변화를 살펴보면, hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 Leydig cell에 대해 右歸飲 처리군은 1, 100 µg/ml 농도에서 SOD activity가 각각 8.41, 8.18, units로 SOD activity가 증가하였다.

Catalase는 free radical에 의한 세포독성 시초기에 반응하는 중요한 항산화 효소로 hydrogen peroxide를 분해함으로써 hydrogen peroxide 증가에 따른 조직 손상을 방지하는 효과가 있다. Hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 Leydig cell에 대해 右歸飲 처리군은 50, 100 µg/ml 농도에서 각

각 762.7, 661.3 units/mg protein으로 유의성 있는 효과가 나타났다.

右歸飲이 Leydig cell에 미치는 항산화효과를 실험한 결과, hydrogen peroxide에 의해 유도된 Leydig cell에 대해 右歸飲 처리군은 유의성 있는 항산화 효과를 나타내었으며, 右歸飲 처리군은 100 µg/ml 농도에서 대조군에 비하여 LPO 생성이 감소하였으며, SOD activity와 catalase activity는 증가하여 유의성 있는 결과가 나타났다.

이로써 溫腎填精 효능으로 腎陽不足證의 치료에 활용되어 온 右歸飲은 남성생식세포 중 Leydig cell에 대하여 항산화효과를 가지며, 산화작용에 의한 남성불임의 치료에 응용할 수 있는 처방으로 지속적인 연구가 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2014년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(NRF-2014R1A2A1A11050419).

References

1. Jang GB. Gyeongakjeonseo. Daereung:Dongyang jonghaptongsingyoyugwon. 1982;642,678,980,981.
2. Kim YM, Jeon BH, Woo WH, Jeong WY. Effect of WooGyuYeum on the Depression of Adrenocortical Functions in Rattits Treated by Hydrocortisone. Kor J Ori Med Physiol Pathol. 1989;4:142.
3. Kim HH, Shin HM, Kim GW. Effect of WoogyuYeum on the hepatotoxicity of Cyclosporin A. Dongguk Journal of the Institute of Oriental Medicine. 1993;2(2):1-15.
4. Lim BS, Kim CJ. The Effects of Woogwi-yeum(Yougui-yin) on the Hypothyroidism of Rats. J Korean Med. 2000;21(4):26-36.
5. Lee YG, Moon BS. Protective Effects of

- Ukyium(Yougui-yin) in Zinc-induced Apoptosis of C6 Glial Cells. *J Korean Med.* 2001;22(3): 63-73.
6. Jeong JC. Increased antioxidant enzyme activities and scavenging effect of oxygen free radicals by Jwagyuyeu and Woogyu yeum. *J Korean Med.* 1996;17(1):21-36.
 7. Choe CM, Lee SJ, Park KH, Kim SB, Cho HB. Effects of Woogwiyeum on the Ovariectomized Rat Model of Postmenopausal Osteoporosis. *J Korean Obstet Gynecol.* 2006;19(4):77-92.
 8. The Korean Urological Association. *Urology* 3rd rev. Seoul:KOMB. 2001:508.
 9. 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.
 10. Oh MS, Kim DR, Kim SY, Chang MS, Park SK. Antioxidant Effects of Psoraleae Fructus in GC-1 Cells. *Kor J Ori Med Physiol Pathol.* 2005;19(1):81-6.
 11. Crapo JD, McCord JM, Fridovich I. Preparation and assay of superoxide dismutases. *Methods Enzymol.* 1978;53:382-3.
 12. Aebi H. Catalase in vitro, *Methods. Enzymol.* 1984:105-21.
 13. Batteli NG, Lorenzoni E, Stirpe F. Milk xanthine oxidase type D (dehydrogenase) and type O(oxidase):Purification and interconversion and some properties. *Biochem J.* 1973;131: 91-198.
 14. Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril.* 1992;57:409-16.
 15. Choo MS, Paick JS, Park CW, Kim MS, Kim SW. Effects of reactive oxygen species on hyperactivation of human sperms. *Korean J Urol.* 1996;37:739-46.
 16. Jin ST. Seoksilbirok. Bukgyeong:Inminwisaeng chulpansa. 1984:162.
 17. Son SM. Bigeupcheongeumyobang. Bukgyeong: Inminwisaengchulpansa. 1982:16.
 18. Du HG. Donguisingyehak. Seoul:Dongyanguihag yeonguwon. 1992:712-26.
 19. Park SK et al. Cheobangjehyeonghak. Seoul: Younglimsa. 2006:224-7.