

호로파와 야관문 복합추출물의 남성갱년기 개선에 관한 연구

이경수 · 이은경 · 김신연¹ · 김태환¹ · 김현표^{1,*}
(주)두한바이오, ¹중원대학교 의생명과학과

Effect of a Mixed Extract of Fenugreek Seeds and *Lespedeza cuneata* on Testosterone Deficiency Syndrome

Kyeong Soo Lee, Eun Kyung Lee, Shin Yeon Kim¹, Tae Hwan Kim¹, and Hyun Pyo Kim^{1,*}

DuhanBio Co., Ltd.

¹Department of Biomedical Science, Jungwon University

Abstract Testosterone deficiency syndrome (TDS) is normally observed in elderly men and is a clinical and biochemical syndrome, characterized by a decline in plasmic testosterone levels resulting in a significant decrease in quality of life. The aim of this study was to evaluate the effect of a mixed extract of fenugreek seeds and *Lespedeza cuneata* (YHM) on TDS. Rats were divided into three groups: the negative control, YHM-40 (40 mg/kg), and YHM-80 (80 mg/kg) groups. After 4 weeks of YMH administration, an increase was observed in the plasmic testosterone levels, vastus lateralis muscular strength, forced swimming time, total sperm counts, and motile sperm counts in YHM-40 and YHM-80 groups compared to the negative control group. Moreover, sex hormone binding globulin, the epididymal fat pad, total plasmic cholesterol, and triglyceride levels were significantly decreased in the YHM-fed groups. However, prostate specific antigen, aspartate aminotransferase, and alanine aminotransferase levels did not differ among the groups. These results suggest that YHM may enhance testosterone levels in elderly men and alleviate TDS without common side effects.

Keywords: testosterone deficiency syndrome, testosterone, fenugreek seeds, *Lespedeza cuneata*

서 론

최근 들어 사회, 경제적 여건의 향상과 의학의 급격한 발달은 인간의 평균 수명을 획기적으로 증가시켰으며 이로 인해 고령인구의 비율이 증가하면서 노인건강에 관한 인식이 급격하게 바뀌어 가고 있다. 따라서 생명에 위협적인 질환에 대한 관심뿐만 아니라 삶의 질에 영향을 미치는 질환에 대한 인식도 증가하고 있다. 노령화 사회가 초래됨에 따라 건강에 대한 기본적인 욕구뿐만 아니라 중·장년 이후의 활력과 건강을 유지하고 노화를 방지 혹은 지연하여 건강한 삶을 지속하고자 하는 욕구가 증가되고 있다. 또한 연령의 증가로 인해 남성에서 여성의 갱년기와 같은 내분비계의 변화가 초래되며, 이를 남성갱년기로 정의할 수 있다(1-3). 남성갱년기란 남성에서 연령이 증가하면서 경험하게 되는 성적 본능, 활력의 저하와 발기 장애, 근육량과 골밀도 감소, 수동적 태도 등의 전형적인 증상들과 혈중 테스토스테론 농도가 저하되어 있는 임상적, 생화학적 증후군을 의미한다(4-8). 남성갱년기는 1939년 Werner(9)가 50대 남성에서 잦은 피로감, 성기능 감소, 안면 홍조, 기억력 감퇴, 우울증 등의 복합 증상을 ‘male climacteric’이라고 칭한 데서 유래하였다. 최근에는 late onset of

hypogonadism, testosterone deficiency syndrome (TDS)으로 부르고 있다. 남성 갱년기에서 남성호르몬 부족은 전 세계적으로 학술적 관심과 논쟁의 주제가 되고 있다. 지난 십여 년간 남성 성선기능저하증 환자에서 시행된 남성호르몬 보충요법이 신체 장기에 다양한 이득이 있다는 임상적 근거가 확인되었고, 고령화에 따라 60세 이상 남성의 상당수가 20, 30대 젊은 남성의 하한선 이하로 혈중 테스토스테론 농도가 저하되어 있다는 연구 보고들은 중장년기 성선기능저하증 남성에서 호르몬 보충요법이 삶의 질 향상에 기여할 수 있는 가능성을 제시한다(10-13). 하지만 호르몬 보충요법의 유용성에 대한 연구들에도 불구하고 장기적인 효과와 안정성, 그리고 노약을 지연시키는 기능적 이점에 대한 논란이 있는 것도 사실이다(14-16). 따라서 보다 안전한 천연물을 재료로 하여 이러한 남성갱년기 증상을 완화할 수 있는 건강기능성 식품 소재 개발이 요구된다.

호로파(Fenugreek Seeds)는 콩과 식물인 호로파의 여문 씨를 말린 것으로, 예부터 약초로 사용되었으며 알칼로이드, 단백질, 지방 등 약 40여 가지의 성분이 함유되어 있다(17). 호로파는 예로부터 방광과 신장 등을 치료하는 데 사용되었으며, 최근 연구결과에 따르면 남성의 정력증진 및 몸 속의 혈당과 인슐린의 균형을 유지하는 데에도 효과가 있고, 체중조절에도 효과가 있는 것으로 확인되어 활발히 연구가 진행 중에 있다(18-20). 야관문(*Lespedeza cuneata*)은 콩과의 씨리 속에 속하는 식물로 비수리라고도 하며, 명칭에 밤에 빛장을 열어준다는 의미를 가지고 있어 한방에서 양기부족, 조루증을 비롯하여 기침, 천식 등에 활용되어 왔다. 특히 야관문이 산화질소-cGMP계를 통한 내피세포 의존성 혈관이완작용이 있고, 야관문 메탄올 추출물의 *n*-hexane층이 토

*Corresponding author: Hyun Pyo Kim, Department of Biomedical Science, Jungwon University, Goesan, Chungbuk 28024, Korea
Tel: 82-43-830-8606
Fax: 82-43-830-8579
E-mail: khps@jwu.ac.kr
Received January 29, 2015; revised June 4, 2015;
accepted June 6, 2015

끼의 음경해면체 평활근에 대한 이완효과가 있는 것으로 보고되어 심혈관 질환과 발기부전의 치료에 활용할 수 있는 식물로 알려져 있다(21,22).

이미 유럽과 북아메리카에서는 호로과 및 다양한 허브추출물을 이용한 남성용 건강식품이 시중에 널리 판매되고 있으나, 아직 국내에서는 남성의 건강을 위한 기능성소재가 미비한 실정이다. 특히 우리나라가 빠르게 고령화 사회로 진입함에 따라 중년 남성의 갱년기 증상을 개선시킬 수 있는 소재개발에 대한 요구가 늘고 있음에 따라, 본 연구에서는 이러한 남성건강에 효능이 있는 호로과, 야관문의 복합추출물인 YHM을 가지고, YHM의 투여가 실험동물에서 혈중 테스토스테론, sex hormone binding globulin (SHBG), prostate specific antigen (PSA), 체지방, 혈중지질, 근육량, 운동수행능력, 정자수, 간독성 등의 변화에 미치는 영향을 관찰하여 남성갱년기 개선용 건강기능성 식품원료로서의 YHM의 효용성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

호로과와 야관문의 복합추출물인 YHM은 (주)두한바이오(Seoul, Korea)로부터 분말형태로 공급받아 실험에 사용하였다. 제조공정은 건조한 호로과 종자와 야관문의 잎과 줄기를 각각 70% 에탄올로 가열추출하고 필터프레스로 여과한 후 농축하였고 각각의 농축액은 분무건조기를 이용해 분말로 제조하고 혼합하여 YHM을 제조하였다. 실험에서는 YHM을 식용수에 용해하여 사용하였다.

실험동물의 사육

본 연구에서는 12주령된 Sprague-Dawley계 수컷 흰 쥐를 대한바이오링크(Eumseong, Korea)에서 구입했다. 실험 전 10주 동안 대한바이오링크사의 일반고형사료로 사육하여 22주된 쥐들을 실험에 사용하였고 강제유영운동군과 혈액, 근육, 체지방 및 정자수 측정군으로 나눠 각각 24마리씩 총 48마리를 실험에 사용하였다. 실험동물은 체중이 약 412 g의 것을 군당 8마리씩 임의 배치했다. 실험 동물은 온도 24°C, 상대습도 50±10%, 환기회수 10-20회/시간, 조명 시간 12시간(점등 08:00-소등 20:00)로 설정된 환경에서 cage당 네 마리씩 분리 사육했다. 실험군은 YHM-40 (40 mg/kg), YHM-80 (80 mg/kg)의 각 농도로 두 군이며 oral zonde를 사용하여 실험기간 동안 매일 경구투여를 하였고 실험동물용 저울(Kyungin precision machinery Co., Ltd., Ansan, Korea)을 이용하여 몸무게를 측정하여 4주 동안 주간 별 변화량을 측정했다.

채혈 및 혈장 분리

본 실험에 들어가기 전 에테르로 마취한 다음 꼬리정맥에서 약 400-500 µL 정도 채혈했다. 마찬가지로 실험에 들어가는 매 주 16:00-18:00시 사이에서 에테르로 마취한 다음 꼬리정맥에서 약 400-500 µL 정도 채혈하였고 실험 마지막 주에는 심장에서 채혈했다. Heparin-coated vacutainer로 채혈한 혈액은 얼음에 꽂은 후 신속하게 13,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리하여 혈장만 분리하여 채취했다.

대퇴근 및 내장지방 추출

실험동물을 개복하고 심장채혈을 통해 희생 후 다리를 가위로 절제한 후 대퇴근에서 큰 비중을 가진 외측광근(vastus lateralis)을 분리하여 무게를 측정했고, 내장지방 중 정소상체지방패드(epididymal fat pad, EFP)의 무게를 측정하여 각각의 변화량을 측정했다.

혈중 testosterone 측정

혈중 testosterone 함량은 혈중 testosterone EIA kit (Enzo life sciences, Farmingdale, NY, USA)를 사용하여 측정하였다. Pre-coated microplate에 혈장시료와 표준용액을 넣은 뒤 테스트스테론 항체를 섞어 교반기에서 300 rpm, 상온에서 1시간 동안 배양한 후, conjugate solution을 다시 넣어 교반기에서 300 rpm, 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이를 wash buffer로 세 번 씻은 후, p-nitrophenyl phosphate를 혼합하여 빛을 차단하고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 trisodium phosphate가 함유된 반응정지액을 섞어 즉시 405 nm에서 흡광도를 측정했다.

혈중 SHBG 측정

혈중 SHBG 함량은 혈중 SHBG EIA kit (Cloud-clone Corp, Houston, TX, USA)를 사용하여 pre-coated microplate에 혈장시료와 표준용액을 넣은 뒤 밀봉 후 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 그 후 용액을 제거하고 검출 시약 A를 넣고 밀봉 후 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 wash buffer로 세 차례 씻었다. 그런 후 용액을 제거하고 검출 시약 B를 넣고 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 이를 다섯 차례 씻어준 후 용액을 제거하고 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)를 넣고 37°C에서 20분 동안 빛으로부터 차단 후 반응시켰다. 마지막으로 반응정지액을 넣고 450 nm에서 즉시 흡광도를 측정했다.

혈중 PSA 측정

혈중 prostate specific antigen (PSA) 함량은 혈중 PSA EIA kit (CUSABIO, Wuhan, China)를 사용하여 pre-coated microplate에 혈장시료와 표준용액을 넣은 뒤 밀봉 후 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 그 후 용액을 제거하고 biotin antibody를 넣고 밀봉 후 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 wash buffer로 세 차례 씻어줬다. 그런 후 용액을 제거하고 HRP-avidin를 넣고 밀봉 후 37°C에서 30분 동안 반응시킨다. 이를 다섯 차례 씻어준다. 그런 다음 용액을 제거하고 TMB substrate를 넣고 37°C에서 20분 동안 빛으로부터 차단 후 반응시켰다. 마지막으로 반응 정지액을 넣고 450 nm에서 즉시 흡광도를 측정했다.

강제유영운동

강제유영을 위한 플라스틱 수조(W50×H60×D40 cm)는 약 40 cm 높이까지 멸균수를 채운 후 수중히터(Aquarium Heater, EHEIM GmbH & Co. KG, Deizisau, Germany)를 이용하여 25±2°C의 수온을 유지시켰다. 쥐들의 최대유영능(exhaustive swimming) 측정은 각 시험군당 8마리의 동물에 대하여 생쥐의 꼬가 수면 아래로 2초 이상 가라앉는 회수가 5번 이상일 때(탈진)까지 강제수영운동을 실시하여 시간을 측정했다.

정자 수 및 운동성 측정

정자 수는 좌우의 부고환을 각각 적출하여 잘게 썰어 1차 희석(0.5% BSA를 포함하는 M199 media 4 mL)하여 37°C에서 5분간 배양한 후, 이를 80 µL를 취하고 여기에 배양액 1 mL을 가하여 2차 희석했다. 2차 희석액 10 µL를 취하여 혈구계에서 계산했다. 정자의 운동성은 혈구계에서 계산한 후, 활동하는 정자 수를 전체 정자 수로 나누어 측정했다.

혈장 지질분석

혈중 중성지방의 함량은 혈장 중성지방 측정용 kit (ASAN pharmaceutical Co. Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 분석하였다. 혈

중 총 콜레스테롤 함량 분석은 혈장 총 콜레스테롤 측정용 kit (ASAN pharmaceutical)를 이용하였고, 혈중 high-density lipoprotein (HDL) 콜레스테롤 함량은 혈장 HDL 측정용 kit (ASAN pharmaceutical)를 이용하여 분석하였다.

AST와 ALT 측정

혈중 AST (aspartate aminotransferase)와 ALT (alanine aminotransferase)의 함량은 혈장 AST, ALT 측정용 kit (ASAN pharmaceutical)를 사용하여 Reitman-Frankel법을 이용하여 분석한 후 파장 505 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

모든 분석 자료는 평균±표준오차(mean±SE)로 나타내었으며 실험결과는 Graph pad Prism 5.0 프로그램(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)을 이용하여 분석하였다. 본 실험에서 얻어진 결과에 대해 분산분석(ANOVA)을 실시하였으며, 2-sample Student's *t*-test를 사용하여 대조군과 실험군 간의 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 사후 검증하였다.

결과 및 고찰

YHM 투여 후 혈중 testosterone의 변화

남성호르몬인 testosterone은 주로 고환에서 생성되며 유리된 형태로 존재하거나 혈중 단백질, 알부민 및 성호르몬 결합글로불린과 결합되어 있다(23). Testosterone은 남성의 성적분화와 남성화, 성기능 유지에 중요하며 근육, 뼈, 신장, 피부, 골수, 간, 골단, 중추신경계 등 전신에 걸쳐 다양한 작용을 한다(24). Werner는 여성에서 일어나는 폐경기와 마찬가지로 남성에서 나타나는 내분비계의 변화를 남성갱년기라 정의하였으며(9), 성욕과 발기력 감소, 근육 양 감소, 체지방 증가, 기억력 감퇴, 골 부피 감소, 우울감 등의 남성갱년기 증상이 남성호르몬의 저하와 연관성이 있다고 보고되었다(25). 따라서 임상에서 남성갱년기의 치료를 위해 testosterone 보충요법이 시행되고 있다. 본 연구에서는 YHM이 testosterone의 분비에 영향을 미치는지를 알아보기 위해, rat에 4주간 YHM을 투여한 후 혈중 testosterone level의 변화를 매주 측정하였다(Fig. 1). 투여전(0주) testosterone level의 경우 대조군은 273.50±47.22 pg/mL, YHM-80은 245.26±53.46 pg/mL, YHM-40은 262.39±51.21 pg/mL로 비슷한 수준을 나타냈다. YHM 투여 후 약 3주째부터 투여군의 testosterone level이 상승하기 시작하여 4주째 측정된 결과, 대조군은 278.73±50.97 pg/mL로 투여전과 별다른 차이를 보이지 않았으나, 투여군들은 통계적으로 유의하게 증가하여 YHM-80은 327.35±52.41 pg/mL로 투여전보다 약 33.8% 상승하였고 YHM-40은 361.04±44.48 pg/mL로 약 37.6%의 증가를 나타내었다. 이는 호로과와 마(*Dioscorea tokoro Makino*)에 다량 함유되어 있는 것으로 알려진 생리활성 성분인 diosgenin이 체내에서 DHEA로 전환되어 testosterone의 전구체로 작용할 수 있다는 보고(26-28)와 일치하여, 본 결과에서 혈중 testosterone 농도 증가는 YHM에 함유된 diosgenin에 기인한 것으로 보인다. 이 결과는 4주간의 YHM 투여가 생체 내에서 testosterone 분비를 증가시켰기 때문에 testosterone 감소로 인해 야기되는 남성갱년기의 증상 완화에 도움이 될 수 있음을 보여주는 것으로 판단된다.

YHM 투여에 따른 혈중 SHBG의 변화

SHBG는 성호르몬 결합 글로불린이며 testosterone과 결합하여 testosterone의 실제 작용을 조절하는 역할을 한다(29). 결합하면

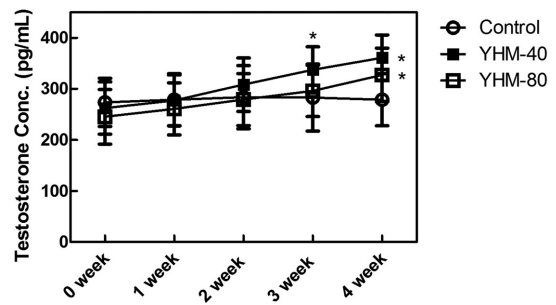


Fig. 1. The increase of plasmic testosterone levels after 4-week YHM administration. Control; no administration of YHM, YHM-40; YHM treated group (40 mg/kg BW), YHM-80; YHM treated group (80 mg/kg BW). Asterisk indicates significant difference by student's *t*-test ($*p < 0.05$).

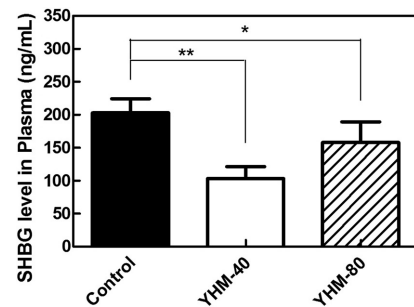


Fig. 2. The decrease of plasmic SHBG levels after 4-week YHM administration. Control; no administration of YHM, YHM-40; YHM treated group (40 mg/kg BW), YHM-80; YHM treated group (80 mg/kg BW). Asterisk indicates significant difference by student's *t*-test ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$).

호르몬의 활성을 잃어버리며, 분리되면 실제로 작용하는 호르몬이 된다. Testosterone의 40-80%는 SHBG와 결합하여 생물학적으로 불활성화 상태로 존재하며 Massachusetts Male Aging Study에서 남성 40-70세 1,156명을 대상으로 조사한 결과 1년에 SHBG가 1.3% 증가하는 것으로 나타났다(24,30). YHM의 투여가 SHBG의 수준에 미치는 영향을 알아보기 위하여 투여 후 4주째에 혈중 SHBG level을 측정하였다(Fig. 2). 대조군(202.77±60.21 ng/mL)과 비교해 봤을 때, YHM-40은 103.01±51.53 ng/mL로 약 49% 감소함을 보였고, YHM-80도 142.39±46.32 ng/mL로 약 30% 감소함을 나타내었다. 고농도를 처리한 YHM-80에서 보다 YHM-40에서 결과가 더 좋은 것은 이 복합물의 경우 농도 의존적으로 효과가 나타나지 않는다는 것을 나타내며, 생리적 활성을 나타내기 위한 최적의 농도가 40 mg/kg이기 때문인 것으로 판단된다. 이 결과에 관한 정확한 기작은 아직 연구되지 않았으나, YHM의 투여로 SHBG가 감소하며 이는 활성화된 testosterone의 수준을 증가시킬 수 있음을 시사한다. 추후 YHM이 SHBG를 감소시키는 기작과 최적 농도 설정에 대한 보다 자세한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

YHM 투여에 따른 혈중 PSA의 변화

PSA는 전립선암의 선별에 유용한 종양표지자로 전립선염, 전립선비대증에서도 증가할 수 있다(31,32). Testosterone 보충요법에서 가장 큰 문제가 될 수 있는 부분은 역시 전립선암 발생의 증가에 대한 것이다(33). 현재까지는 testosterone 보충요법이 장기적으로 전립선암이나 전립선비대증과 같은 전립선 질환에 어떠한

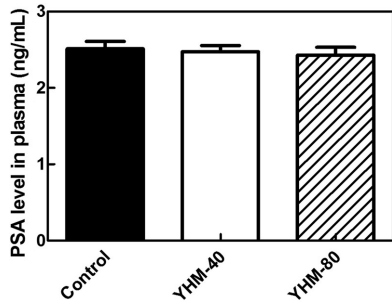


Fig. 3. Plasmic prostate specific antigen (PSA) levels after 4-week YHM administration. Control; no administration of YHM, YHM-40; YHM treated group (40 mg/kg BW), YHM-80; YHM treated group (80 mg/kg BW).

추가적 위험인자가 되는지에 대한 체계적이고 확실한 연구결과는 없다. 그러나 일부 연구에서는 testosterone 보충요법이 전립선암 발생의 증가에 영향이 있는 것으로 보고하고 있으므로 PSA를 포함하는 면밀한 추적조사가 반드시 필요하며, 실제 임상에서 남성호르몬 보충요법 전후에 이러한 검사를 반드시 시행한다(34). 따라서 본 실험에서는 YHM의 투여가 전립선에 미치는 영향이 있는지를 알아보기 위해 혈중 PSA를 측정하였다(Fig. 3). YHM 투여 4주후에 혈중 PSA 농도를 측정한 결과 대조군, YHM-80, YHM-40 각각 1.51 ± 0.27 , 1.43 ± 0.29 , 1.46 ± 0.20 ng/mL로 통계적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 YHM 투여가 전립선에 특별히 부정적 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

YHM 투여에 따른 지방 및 근육의 변화

체지방 증가와 근육량 감소는 남성갱년기의 대표적인 특징이며 이는 근력약화와 무력감의 증상으로 나타난다(35). 이에 체지방과 근육량에 대한 YHM의 영향을 알아보기 위해 부고환지방조직과 대퇴부의 근육량을 측정하였다(Fig. 4). 4주간 YHM을 투여한 결과 부고환지방조직/몸무게의 비율은 대조군에서 0.017 ± 0.003 이었으나 YHM-80에서는 0.015 ± 0.003 로 감소하여 유의적인 차이를 보이지 않았다. 반면 YHM-40에서는 0.011 ± 0.004 로 통계적으로 유의하게 감소함을 나타냈다. 또한 대퇴부근육량/몸무게 비율은 대조군에서 0.019 ± 0.003 , YHM-80에서 0.022 ± 0.001 , YHM-40에서 0.028 ± 0.002 로 각각 나타났으며 투여군에서 모두 유의적으로 증가되었다. 이는 YHM이 체지방은 감소시키며 근육량은 증가시켰음을 나타낸다. Seo 등은 국내 17종 두과식물의 부위별 pinitol 함량에 대한 연구에서 아관문의 총 pinitol 함량이 가장 높았다고 보고하였는데(36), pinitol은 근육 생성에 보조제로 사용되는 크레아틴의 흡수를 증가시키는 것으로 알려져 있다(37). 따라서, 본 결과에서의 근육량 증가는 YHM에 함유 되어 있는 pinitol에 기인한 것으로 보이며, YHM이 남성갱년기에서 흔히 나타나는 복부지방증가와 근육량 감소를 지연시킬 수 있을 것으로 판단된다.

YHM 투여에 따른 운동수행능력의 변화

근육량의 증가에 따른 운동수행능력의 향상이 있는지를 평가하기 위하여 YHM을 4주간 투여한 후 탈진 때까지 수영하는 강제수영능력을 측정하였다(Fig. 5). 4주간의 YHM 투여 후 수영시간이 대조군은 121 ± 37 초, YHM-80군은 193 ± 24 초, YHM-40군은 214 ± 32 초로 나타났으며, 이는 대조군과 비교했을 때 YHM 투여군에서 각각 60, 77% 만큼 통계적으로 유의하게 증가한 것이다. 이 결과는 YHM가 실험동물의 운동능력향상에 도움을 주었음을 나

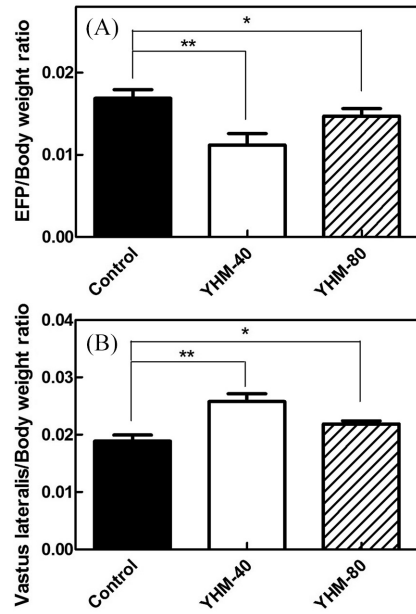


Fig. 4. Changes in epididymal fat pad (EFP) and vastus lateralis (CB) muscle after 4-week YHM administration. Control; no administration of YHM, YHM-40; YHM treated group (40 mg/kg BW), YHM-80; YHM treated group (80 mg/kg BW). Asterisk indicates significant difference by student's *t*-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

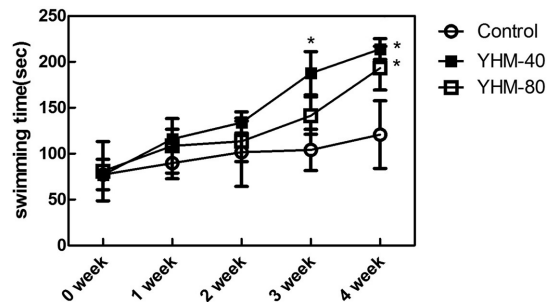


Fig. 5. Effect of YHM on endurance capacity for forced swimming test after 4-week YHM administration. Control; no administration of YHM, YHM-40; YHM treated group (40 mg/kg BW), YHM-80; YHM treated group (80 mg/kg BW). Asterisk indicates significant difference by student's *t*-test (* $p < 0.05$).

타낸 것이다. 이는 남성 호르몬과 같은 steroid계 호르몬이 근육량, 근육의 강도 및 운동수행능력의 향상에 영향을 미친다는 이전 연구와 일치하는 결과이며(38,39), YHM에 의해 발현된 testosterone이 운동수행능력의 향상에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

YHM 투여에 따른 정자수의 변화

Testosterone은 정자형성 및 운동성에 중요한 영향을 미친다(40). YHM의 투여가 testosterone을 증가시킨 Fig. 1에서 확인할 수 있었다. 이를 근거로 YHM의 투여가 정자수에 미치는 영향을 측정하기 위해 총 정자수와 운동성을 가진 정자수를 측정하였다(Fig. 6). Total sperm count에서 대조군은 $5.78 \pm 0.44 \times 10^7$ 로 정자수를 가졌으나 YHM-80에서 $6.60 \pm 0.38 \times 10^7$, YHM-40에서는 $6.91 \pm 0.49 \times 10^7$ 의 총 정자수를 가져 각각 약 14, 20%씩 유의적으로 증가하는 양상을 보였다. 또한 총 정자 중 운동성을 가진 정자수를

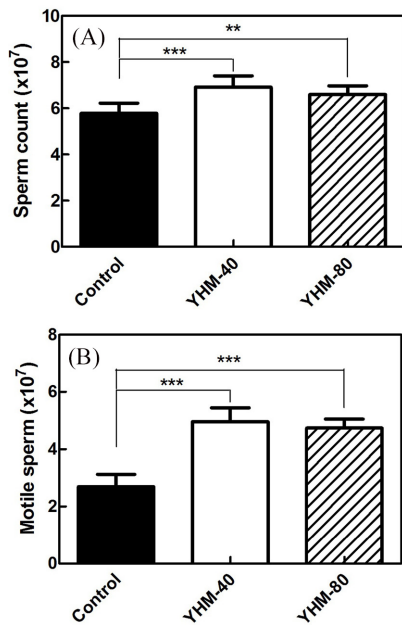


Fig. 6. Changes in total (A) and motile plasmic (B) counts after 4-week YHM administration. Control; no administration of YHM, YHM-40; YHM treated group (40 mg/kg BW), YHM-80; YHM treated group (80 mg/kg BW). Asterisk indicates significant difference by student's *t*-test (* p <0.05; ** p <0.01).

측정한 결과는 대조군에서 $2.69 \pm 0.43 \times 10^7$, YHM-80에서 $4.74 \pm 0.32 \times 10^7$, YHM-40에서 $4.96 \pm 0.49 \times 10^7$ 로 각각 나타났다. 이는 YHM-80에서는 약 76%, YHM-40에서는 84% 상승된 수치이다. 총 정자수 중 운동성을 가진 정자의 비율은 대조군에서 약 47%이었으나 YHM-80, YHM-40 모두에서 약 72%로 증가를 나타내었다. 이 결과는 YHM의 투여가 총 정자수와 정자의 운동성 모두를 증가시키는 것임을 보여주는 것으로 testosterone 분비 증가 및 SHBG 감소에 의한 효과로 판단된다.

YHM 투여에 의한 혈중지질의 변화

비만, 고혈압, 이상지질혈증, 당뇨 등 대사증후군은 testosterone의 감소에서 동반될 수 있다. 많은 역학조사들에 의하면 건강한 남성에서 비만과 낮은 혈중 testosterone치 사이에 밀접한 관계가 있음이 밝혀진 바 있으며, 대사증후군과 2형 당뇨병은 낮은 혈중 testosterone과 연관이 있다(41,42). 이상지질혈증은 심혈관계 질환의 위험도를 증가시킨다. 다양한 연구에서 testosterone의 수치가 저하되어 있을 때 HDL 콜레스테롤도 저하되었고, 반면에 총 콜레스테롤과 중성지방은 증가되었다는 보고가 있다(43,44). 본 실험에서는 YHM의 투여로 인한 혈중지질의 감소효과를 보기 위해 혈중 총 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤, 중성지방 등을 측정하였다(Fig. 7). 총 콜레스테롤의 경우 대조군 62.0 ± 8.3 mg/dL, YHM-80 38.1 ± 10.9 mg/dL, YHM-40 35.4 ± 6.2 mg/dL로 나타났으며, 이는 대조군 대비 YHM-80은 39%, YHM-40은 43%의 감소 효과를 보여주었다. 중성지방의 경우 YHM-80에서 90.9 ± 30.0 mg/dL, YHM-40에서 70.0 ± 10.5 mg/dL로 대조군의 152.9 ± 34.5 mg/dL와 비교했을 때 각각 41, 54%의 감소 효과를 나타냈다. 반면 좋은 콜레스테롤인 HDL 콜레스테롤의 경우 대조군에서는 16.3 ± 3.8 mg/dL, YHM-80 투여군에서 15.9 ± 3.6 mg/dL로 큰 차이를 나타내지 않았으나, YHM-40 투여군에서 24.3 ± 5.9 mg/dL로 대조군에 비해 약 49% 증가되었다. 이는 Singh 등(45)과 Haeri 등(46)의 연구에서

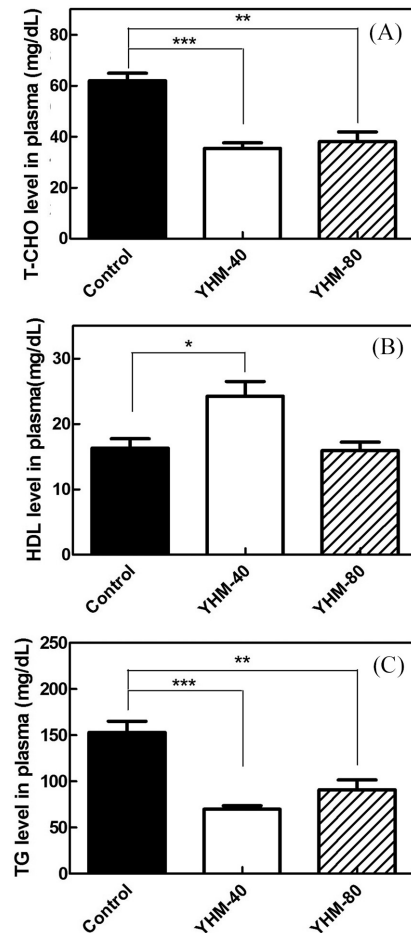


Fig. 7. Effect of YHM on plasmic lipids after 4-week YHM administration. Control; no administration of YHM, YHM-40; YHM treated group (40 mg/kg BW), YHM-80; YHM treated group (80 mg/kg BW). T-CHO: total cholesterol (A), HDL: high density lipoprotein cholesterol (B), TG: triglyceride (C). Asterisk indicates significant difference by student's *t*-test (* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001).

호로과의 생리활성 성분인 4-hydroxy-isoleucines가 혈중 중성지방과 LDL 콜레스테롤을 감소시키고 HDL는 증가시켰다는 보고와 일치함에 따라, 본 결과에서의 혈중 지질함량 변화는 YHM에 함유된 4-hydroxy-isoleucines에 기인한 것으로 보인다. 따라서, 이들 결과로 YHM의 투여가 혈중지질개선에 좋은 영향을 미치는 것으로 판단된다.

간독성 평가

AST와 ALT는 생체 내 아미노산 합성에 관여하는 효소로서 간에 많은 양이 존재하며 혈중 AST와 ALT의 증가는 간독성으로 인한 간세포의 괴사와 간조직의 파괴가 진행됨을 의미하므로 간손상의 지표로 널리 사용되는 효소이다(47). 본 실험에서 사용된 YHM은 독성 및 안전성 평가에 대해 잘 알려져 있지 않으므로 이를 실험동물에 섭취시킬 때 간 기능에 영향을 없는지 알아보고자 4주간의 YHM 투여 후 혈중 AST, ALT 수치를 측정하였다(Fig. 8). 대조군과 YHM 투여군을 비교했을 때 AST, ALT 모두에서 별다른 차이를 보이지 않았다. 따라서 4주간의 YHM 투여가 간독성을 나타내지 않았고 간기능에 특별한 변화를 일으키지 않은 것으로 판단된다.

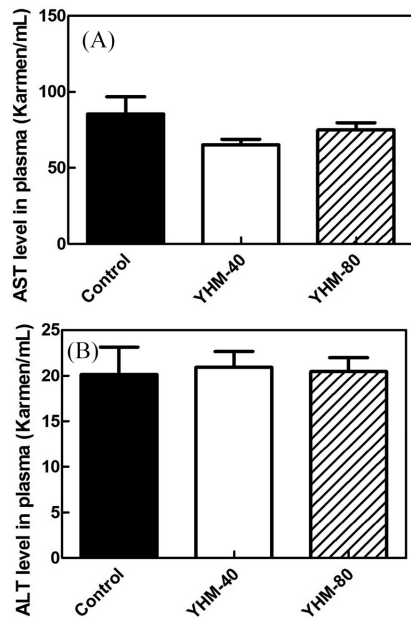


Fig. 8. Plasmic levels of AST (A) and ALT (B) after 4-week YHM administration. Control; no administration of YHM, YHM-40; YHM treated group (40 mg/kg BW), YHM-80; YHM treated group (80 mg/kg BW).

요약

본 연구에서는 아관문, 호로과 복합추출인 YHM이 남성갱년기 증상의 완화에 영향을 미치는 지를 알아보기 위해 흰쥐에게 YHM을 4주간 투여한 후, testosterone, SHBG, PSA, 체지방, 혈중지방, 근육량, 운동수행능력, 정자수, 간독성 등에 미치는 영향을 조사하였다. YHM 투여 후 남성갱년기의 지표로 사용되는 남성호르몬인 testosterone이 유의적으로 증가하였고, testosterone과 결합하여 기능을 저하시키는 SHBG의 농도는 감소하였다. 또한 남성호르몬 보충요법에서 나타날 수 있는 전립선 관련 부작용을 알아보기 위해 PSA를 측정하였으나, 대조군과 별다른 차이를 나타내지는 않았다. 지방조직과 근육량을 측정한 결과 지방 조직은 줄고 근육량은 늘리는 것으로 나타나 남성갱년기에서 흔히 있는 근육량 감소 및 체지방 증가를 완화시킬 수 있을 것으로 생각된다. 아울러 혈중지질농도에 있어서도 YHM 투여군이 대조군에 비해 총 콜레스테롤과 중성지방은 감소한 반면 고밀도 콜레스테롤은 증가하였음을 관찰하였다. 강제수영을 통한 운동수행능력 측정에서도 YHM 투여군이 대조군에 비하여 수영시간이 길었고 이는 YHM의 투여가 운동수행능력 향상에 도움을 준 것으로 볼 수 있다. 총 정자수와 활동성 정자수를 측정된 결과에서도 YHM 투여군이 유의적으로 증가한 것으로 나타났고 이는 정자형성과 활동성에 영향을 주는 testosterone 농도의 증가에 기인한 것으로 생각된다. 마지막으로 YHM의 투여가 간독성을 가지는지를 알아보기 위해 AST와 ALT를 측정된 결과 대조군과 별다른 차이를 나타내지 않으므로써 간독성을 가지지는 않는 것으로 판단하였다. 또한, 실험결과 전반적으로 저농도 투여군인 YHM-40에서 고농도 투여군인 YHM-80에서 보다 긍정적인 효과를 나타냈다. 이는 YHM의 효과가 농도 의존적이지 않다는 것을 의미하며, 최적의 생체 이용률을 나타내는 농도가 YHM 40mg/kg인 것으로 판단된다. 결론적으로 YHM의 투여는 남성갱년기에 나타나는 여러 가지 지표들을 개선시키는 것으로 나타났고, 이를 활용

하여 남성갱년기 개선에 도움을 줄 수 있는 건강기능성식품 소재로 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

References

1. Becker HWG. Testicular dysfunction in systemic diseases. pp. 1150-1156. In: Principles and practice of endocrinology and metabolism, Backer KL (ed). Lippincott Co., Philadelphia, PA, USA (2000)
2. Araujo AB, Esche GR, Kupelian V, O'Donnell AB, Travison TG, Williams RE, Clark RV, McKinlay JB. Prevalence of symptomatic androgen deficiency in men. *J. Clin. Endocr. Metab.* 92: 4241-4247 (2007)
3. Buvat J, Maggi M, Gooren L, Guay AT, Kaufman J, Morgentaler A, Schulman C, Tan HM, Torres LO, Yassin A, Zitzmann M. Endocrine aspects of male sexual dysfunctions. *J. Sex. Med.* 7: 1627-1656 (2010)
4. Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, Matsumoto AM, Snyder PJ, Swerdloff RS, Montori VM. Testosterone therapy in adult men with androgen deficiency syndromes: An endocrine society clinical practice guideline. *J. Clin. Endocr. Metab.* 91:1995-2010 (2006)
5. Nieschlag E, Swerdloff R, Behre HM, Gooren LJ, Kaufman JM, Legros JJ, Lunenfeld B, Morley JE, Schulman C, Wang C, Weidner W, Wu FCW. Investigation, treatment, and monitoring of late-onset hypogonadism in males: ISA, ISSAM, and EAU recommendations. *J. Androl.* 27: 135-137 (2006)
6. Wang C, Nieschlag E, Swerdloff R, Behre HM, Hellstrom WJ, Gooren LJ, Kaufman JM, Legros JJ, Lunenfeld B, Morales A, Morley JE, Schulman C, Thompson IM, Weidner W, Wu FCW. ISA, ISSAM, EAU, EAA and ASA recommendations: Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males. *Aging Male* 12: 5-12 (2009)
7. Singh P. Andropause: Current concepts. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 17 (Suppl 3): S621-629 (2013)
8. Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, Matsumoto AM, Snyder PJ, Swerdloff RS, Montori VM. Testosterone therapy in men with androgen deficiency syndromes: An Endocrine Society clinical practice guideline. *J. Clin. Endocr. Metab.* 95: 2536-2559 (2010)
9. Werner AA. The male climacteric: Report of two hundred and seventy-three cases. *J. Amer. Med. Assoc.* 132: 188-194 (1946)
10. Shores MM, Matsumoto AM. Testosterone, aging and survival: biomarker or deficiency. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 21: 209-216 (2014)
11. Gray A, Feldman HA, McKinlay JB, Longcope C. Age, disease, and changing sex hormone levels in middle-aged men: Results of the Massachusetts male aging study. *J. Clin. Endocr. Metab.* 73: 1016-1025 (1991)
12. Harman SM, Metter EJ, Tobin JD, Pearson J, Blackman MR. Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J. Clin. Endocr. Metab.* 86: 724-731 (2001)
13. Wu FCW, Tajar A, Pye SR, Silman AJ, Finn JD, O'Neill TW, Bartfai G, Casanueva F, Forti G, Giwercman A, Huhtaniemi IT, Kula K, Punab M, Boonen S, Vanderschueren D. Hypothalamic-pituitary-testicular axis disruptions in older men are differentially linked to age and modifiable risk factors: The European male aging study. *J. Clin. Endocr. Metab.* 93: 2737-2745 (2008)
14. Gruenewald DA, Matsumoto AM. Testosterone supplementation therapy for older men: Potential benefits and risks. *J. Am. Geriatr. Soc.* 51: 101-115 (2003)
15. Rhoden EL, Morgentaler A. Risks of testosterone-replacement therapy and recommendations for monitoring. *New Engl. J. Med.* 350: 482-1492 (2004)
16. Muller M, van der Schouw YT, Thijssen JHH, Grobbee DE. Endogenous sex hormones and cardiovascular disease in men. *J. Clin. Endocr. Metab.* 88: 5076-5086 (2003)
17. Duru M, Erdoğan Z, Duru A, Küçükgül A, Düzgüner V, Kaya DA, Şahin A. Effect of seed powder of a herbal legume fenugreek (*Trigonella foenum-graceum* L.) on growth performance, body components, digestive parts, and blood parameters

- of broiler chicks. Pakistan J. Zool. 45: 1007-1014 (2013)
18. Yadav UC, Baquer NZ. Pharmacological effects of *Trigonella foenum-graecum* L. in health and disease. Pharm. Biol. 52: 243-254 (2014)
 19. Kassem A, Al-Aghbari A, AL-Habori M, Al-Mamary M. Evaluation of the potential antifertility effect of fenugreek seeds in male and female rabbits. Contraception 73: 301-306 (2006)
 20. Aswar U, Bodhankar SL, Mohan V, Thakurdesai PA. Effect of furostanol glycosides from *Trigonella foenum-graecum* on the reproductive system of male albino rats. Phytother. Res. 24: 1482-1488 (2010)
 21. Lee JK, Kang DG, Lee HS. Vascular relaxation induced by aqueous extract of *Lespedeza cuneata* via the NO-cGMP pathway. J. Nat. Med. 66: 17-24 (2012)
 22. Park SY, Kim HH. Effect of *Lespedeza cuneata* on the contraction of rabbit common carotid artery and corpus cavernosum. Korean J. Orient. Physiol. Pathol. 27: 809-817 (2013)
 23. Isidori AM, Giannetta E, Gianfrilli D, Greco EA, Bonifacio V, Aversa A, Isidori A, Fabbri A, Lenzi A. Effects of testosterone on sexual function in men: Results of a meta-analysis. J. Clin. Endocrinol. 63: 381-394 (2005)
 24. Derby CA, Zilber S, Brambilla D, Morales KH, McKinlay JB. Body mass index, waist circumference and waist to hip ratio and change in sex steroid hormones: The Massachusetts male ageing study. J. Clin. Endocrinol. 65 :125-131 (2006)
 25. Morales A, Schulman CC, Tostain J, Wu FC. Testosterone deficiency syndrome (TDS) needs to be named appropriately: The importance of accurate terminology. Eur. Urol. 50: 407-409 (2006)
 26. Taylor WG, Elder JL, Chang PR, Richards KW. Microdetermination of diosgenin from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds. J. Agr. Food Chem. 48: 5206-5210 (2000)
 27. Sato K, Fujita S, Iemitsu M. Acute administration of diosgenin or dioscorea improves hyperglycemia with increases muscular steroidogenesis in STZ-induced type 1 diabetic rats. J. Steroid Biochem. 143: 152-159 (2014)
 28. Murakami T, Kishi A, Matsuda H, Yoshikawa M. Medicinal foodstuffs XVII. Fenugreek seed. (3): Structures of new furostanol-type steroid saponins, trigoneosides Xa, Xb, XIb, XIIa, XIIb, and XIIIa, from the seeds of egyptian *trigonella foenum-graecum* L. Chem. Pharm. Bull. 48: 994-1000 (2000)
 29. Shea JL, Wong PY, Chen Y. Free testosterone: Clinical utility and important analytical aspects of measurement. Adv. Clin. Chem. 63: 59-84 (2014)
 30. Hammond GL. Diverse roles for sex hormone-binding globulin in reproduction. Biol. Reprod. 85: 431-441 (2011)
 31. Duffy MJ. PSA in screening for prostate cancer: More good than harm or more harm than good? Adv. Clin. Chem. 66: 1-23 (2014)
 32. Rick FG, Schally AV. Bench-to-bedside development of agonists and antagonists of luteinizing hormone-releasing hormone for treatment of advanced prostate cancer. Urol. Oncol.-Semin. O. I. 33: 270-274 (2015)
 33. Barqawi A, Crawford ED. Testosterone replacement therapy and the risk of prostate cancer. Is there a link? Int. J. Impot. Res. 18: 323-328 (2006)
 34. Calof OM, Singh AB, Lee ML, Kenny AM, Urban RJ, Tenover JL, Bhasin S. Adverse events associated with testosterone replacement in middle-aged and older men: A meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. J. Gerontol. A-Biol. 60: 1451-1457 (2005)
 35. Schubert M, Jockenhövel F. Late-onset hypogonadism in the aging male (LOH): definition, diagnostic and clinical aspects. J. Endocrinol. Invest. 28: 23-27 (2005)
 36. Seo SM, Jeong YS, Hari DK, Shin DH, Lee IJ, Park ES, Lee JD, Hwang YH. Variation of pinitol content for domestic legume species in Korea. Korean J. Crop. Sci. 56: 50-56 (2011)
 37. Kerksick CM, Wilborn CD, Campbell WI, Harvey TM, Marcello BM, Roberts MD, Parker AG, Byars AG, Greenwood LD, Almada AL, Kreider RB, Greenwood M. The effects of creatine monohydrate supplementation with and without D-pinitol on resistance training adaptations. J. Strength Cond. Res. 23: 2673-2682 (2009)
 38. Schroeder, ET, Terk M, Sattler FR. Androgen therapy improves muscle mass and strength but not muscle quality: Results from two studies. Am. J. Physiol.-Endoc. M. 285: E16-E24 (2003)
 39. Schroeder ET, Vallejo AF, Zheng L, Stewart Y, Flores C, Nakao S, Martinez C, Sattler FR. Six-week improvements in muscle mass and strength during androgen therapy in older men. J. Gerontol. A-Biol. 60: 1586-1592 (2005).
 40. Moss JL, Crosnoe LE, Kim ED. Effect of rejuvenation hormones on spermatogenesis. Fertil. Steril. 99: 1814-1820 (2013)
 41. Kovac J, Pastuszak AW, Lamb DJ, Lipshultz LI. Testosterone supplementation therapy in the treatment of patients with metabolic syndrome. Postgrad. Med. 126: 149-156 (2014)
 42. Grober ED. Testosterone deficiency and replacement: Myths and realities. Cuaj-Can. Urol. Assoc. 8: S145- S147 (2014)
 43. Kelly DM, Jones TH. Testosterone and cardiovascular risk in men. Front. Horm. Res. 43: 1-20 (2014)
 44. Volpato S, Vigna GB, Fellin R. The benefit and risk of testosterone replacement therapy in older men: Effects on lipid metabolism. Acta Biomed. 81: 95-99 (2010)
 45. Singh AB, Tamarkar AK, Narender T, Srivastava AK. Antihyperglycaemic effect of an unusual amino acid (4-hydroxyisoleucine) in C57BL/KsJ-db/db mice. Nat. Prod. Res. 24: 258-265 (2010)
 46. Haeri MR, Limaki HK, Branford White CJ, White KN. Non-insulin dependent anti-diabetic activity of (2S, 3R, 4S) 4-hydroxyisoleucine of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) in streptozotocin-induced type I diabetic rats. Phytomedicine 19: 571-574 (2012)
 47. Vinken M. The adverse outcome pathway concept: A pragmatic tool in toxicology. Toxicology 4: 158-165 (2013)