



Effects of the mixture of fenugreek seeds and *Lespedeza cuneata* extracts on testosterone synthesis in TM3 cells oxidative stressed with H₂O₂

Kyeong Soo Lee¹ · Eun Kyoung Lee¹ · Yoonhee Seo^{2,3} · Soo Young Choe³

호로파와 야관문 복합추출물이 과산화수소로 산화적 스트레스가 가해진 TM3 세포의 테스토스테론 합성에 미치는 영향

이경수¹ · 이은경¹ · 서윤희^{2,3} · 최수영³

Received: 9 June 2016 / Accepted: 3 August 2016 / Published Online: 31 December 2016
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2016

Abstract This study investigated the effects of a mixture of fenugreek seeds and *Lespedeza cuneata* extracts on testosterone synthesis in TM3 cells that were oxidatively stressed with H₂O₂. In order to oxidatively stress TM3 cells, the cells were treated with 50 μM hydrogen peroxide for 4 hr in serum-free media. Yagwanmun-horopa mixture (YHM) showed neither cytotoxicity nor increment of cell proliferation in the oxidatively stressed TM3 cells in any concentration. When the cells were treated with hydrogen peroxide, testosterone levels decreased, but the testosterone level was returned to that of the control level in the presence of YHM. In order to find out the reasons for the increase of testosterone, the expression of the genes involved in the synthesis or disintegration of testosterone. On the other hand, the levels of 3β-HSD4 and 17, 20-desmase, which are involved in testosterone synthesis, were decreased through the use of hydrogen peroxide and were recovered through YHM treatment. Aromatase and 5α-reductase2, which convert testosterone to

estradiol and dihydrotestosterone, respectively, were increased through the use of hydrogen peroxide, and were returned to control level through YHM treatment. These results suggest that YHM does not affect TM3 cell proliferation. However, YHM increases the expression of testosterone-synthesizing enzyme, which was decreased through oxidative stress, and decreases the expression of testosterone- converting enzyme, which was increased through oxidative stress. Therefore, it is reasonable that YHM has strong recovery activity on testosterone to normal level, even in the oxidatively stressed TM3 cells which mimics the andropause state.

Keywords Fenugreek seeds · Hydrogen peroxide · *Lespedeza cuneata* · Testosterone

Soo Young Choe (✉)
E-mail: schoe@chungbuk.ac.kr

¹DuhanBIO Co. Ltd., Seoul 06774, Republic of Korea

²EBO Co., Ltd, Cheongju 28116, Republic of Korea

³Department of Biology, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 론

정소내 Leydig 세포는 남성형질 및 정소 내에서의 정자형성을 촉진하는 테스토스테론의 주요 근원지이다(Zhang 등, 2008). 연령과 비례하여 Leydig 세포가 감소하면 테스토스테론의 감소가 나타나며(Luo 등, 1996; Wang 등, 2002), 테스토스테론이 감소하면 정자형성과정이 비활성화되고 근육의 강도가 약해지게 된다(Sattler 등, 2011; Trivison 등, 2011). 남자의 노화에 테스토스테론 감소가 아주 주요한 비중을 가지고 있는데, 이러한 현상을 남성갱년기 증상의 주요 원인으로 보고 있다. 남성갱년기란 남성의 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(Bhasin 등, 2006; 2010; Nieschlag 등, 2006; Singh 2013). 남성갱년기에서 남성호르몬 부족을 보충하는 호르몬 보충요법의 유용성에 대한 연구들이 있어 왔으나, 이 방법의 장기적인 효과와 안전성에 대한 논란이 있는 것도 사실이다(Gruenewald와 Matsumoto 2003; Muller 등, 2003). 따라서 남성호르몬 부족을 보완할 수 있는 보다 안전한 천연물에 대한 개발이 필요하게 되었다.

호로과(Fenugreek Seeds)는 알칼로이드, 단백질, 지방 등 약 40여 가지의 성분을 함유하고 있는데(Duru 등, 2013), 예로부터 방광과 신장 등을 치료하는 데 사용되었다. 하지만 최근에는 남성의 정력증진 및 몸 속의 혈당과 인슐린의 균형 유지와 체중 조절에도 효과가 있는 연구결과가 나타나고 있다(Kassem 등, 2006; Aswar 등, 2010). 야관문(*Lespedeza cuneata*)은 콩과의 씨리 속에 속하는 식물로, 한방에서 양기부족, 조루증을 비롯하여 기침, 천식 등에 활용되어 왔다. 특히 야관문이 산화질소-cGMP계를 통한 내피세포 의존성 혈관이완작용이 있고, 토끼의 음경해면체 평활근에 대한 이완효과가 있는 것으로 보고되어 심혈관 질환과 발기부전의 치료에 활용할 수 있는 식물로 알려져 있다(Lee 등, 2012; Park과 Kim, 2013).

랫드를 이용한 동물시험에서(Lee 등, 2015) 호로과와 야관문 추출혼합물이 테스토스테론의 양을 증가시키는 효능이 있는 것으로 나타난 바, 본 연구에서는 이러한 테스토스테론의 증가에 관여하는 효소(β -HSD4, 17,20-desmase) 및 감소에 관여하는 효소(aromatase, 5 α -Reductase2)의 발현에 실제로 호로과와 야관문 추출혼합물이 어떠한 영향을 주는지를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

YHM 제조

호로과 추출물은 호로과 종자를 70% 에탄올로 60~80°C에서 3시간 동안 추출한 후 여과시켜 농축한 다음, 95°C에서 1시간 동안 살균 후 분무건조기를 사용하여 분말로 제조하였다. 야관문 추출물은 잎과 줄기를 사용하였으며 추출방법은 호로과 추출물과 동일하게 실시하였다. 시험에 사용한 호로과 및 야관문 추출혼합물 중 호로과와 야관문 추출분말이 8:2로 혼합한 것을 YHM이라 명명하였다.

세포배양 및 산화적 스트레스 유발

Mus musculus (mouse)의 Leydig cell인 TM3 cell은 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 10% fetal bovine serum 및 antibiotics (Gibco BRL, Life Technologies Co., New York, NY, USA)가 포함된 DMEM 배지(Gibco BRL, Life Technologies Co.)에 3일에 한번씩 계대배양 하였다. 세포는 5% CO₂가 유지되는 37°C 배양기에서 배양하면서 사용하였다. 세포를 분주하고 24시간 후, 50 μ M 과산화수소(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 첨가한 serum free 배지에서 4시간 배양하는 방법으로 세포에 산화적 스트레스를 유발시키고, 이후 시료가 농도 별로 포함된 배양배지에서 추가로 20시간 배양한 뒤 세포 및 배지를 수거하여 사용하였다.

세포생존율 측정

96well에 7.5 \times 10³ cells/0.1 mL/well이 되도록 세포를 분주하고 24시간 후, YHM이 농도별로 포함된 배양배지로 교환하여 24시간 배양하였다. 과산화수소로 유도된 산화적 스트레스에서는 96well에 1 \times 10⁴ cells/0.1 mL/well로 분주하였다. CCK-8 (Dojindo, Kamimashiki-gun, Kumamoto, Japan) 10 μ L을 첨가하고 37°C CO₂ 배양기에서 1시간 추가 배양한 후, ELISA leader (PowerWave XS, BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 용매대조군 대비 세포생존율을 구하여 시험에 사용할 농도를 결정하였다.

$$\text{Survival rate (\%)} = \frac{\text{Absorbance}_{\text{sample}} - \text{Absorbance}_{\text{sample blank}}}{\text{Absorbance}_{\text{Vehicle}} - \text{Absorbance}_{\text{Vehicle blank}}}$$

Testosterone, aromatase 및 5 α -reductase2 측정

호로과 추출물 및 야관문 추출물의 최적의 혼합비율을 결정하기 위해 96well에 7.5 \times 10³ cells/0.1 mL/well이 되도록 세포를 분주하고 24시간 후 추출물 및 여러 가지 비율로 혼합한 추출물이 포함된 배지로 교환하여 24시간 배양하고 배양배지를 수거하여 테스토스테론 농도를 측정하였다. 과산화수소 스트레스를 준 세포에서의 최적 혼합비율 추출물(YHM)의 효능측정을 위해서는 6well에 3 \times 10⁵ cells/3 mL/well로 분주하고 24시간 후, 과산화수소가 50 μ M 포함된 serum free 배지로 교환하였다. 4시간 후 YHM이 농도별로 포함된 배양배지로 교환하여 20시간 배양하고 배양배지를 수거하여 시험에 사용하였다. 테스토스테론은 Enzo Life Sciences의 ELISA kit (Farmingdale, NY, USA)를 aromatase와 5 α -reductase2의 농도는 EIAab Science의 kit (Wuhan, China)를 사용하여 측정하였다.

Real-time PCR

60 mm dish에 6.0 \times 10⁵ cells/5 mL로 분주하고 24시간 후, 과산화수소가 50 μ M 포함된 serum free 배지로 교환하였다. 4시간 후 YHM이 농도별로 포함된 배양배지로 교환하여 20시간 배양하였다. easy-BLUETM (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)를 이용해 RNA를 추출하여 spectrophotometer (UV-2450, SHIMADZU, Nakagyo-ku, Kyoto, Japan)로 흡광도를 측정하여 정량하여 사용하였다. 측정에 사용된 유전자 및 primer는 Table 1에 표시하였다. Total RNA 2 μ g을 RevoScriptTM Reverse Transcriptase premix kit (iNtRON Biotechnology)를 이용하여 총 부피 20 μ L로 반응하여 cDNA로 합성하고, SYBG Green supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 5 μ L, cDNA 1 μ L, 각각의 프라이머(10 pmol/ μ L) 1 μ L 그리고 2 μ L 멸균증류수를 섞어 Chromo 4TM Real-Time Detector (Bio-rad)로 다음 조건으로 real time PCR을 수행하였다: 초기 변성은 95°C에서 30초, Annealing & Extension은 60°C에서 30초 씩 40회 반복시켰다. 모든 반응은 housekeeping 유전자인 β -actin으로 보정하고 과산화수소를 처리하지 않은 control을 기준으로 보정하였다. 보정은 Vandesompele 등(2002)의 방법으로 계산하였다.

통계처리

모든 자료들은 평균과 표준편차로 나타내었으며 SPSS 프로그

Table 1 Primers used for Real-time PCR analysis

Gene	Accession No.	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
3β-HSD4	L16919.1	GTGATATGAAGAGGGAGAGGAC	AAGACAAGTTGGACAGAGTGT
17,20-Desmorase	NM_007809.3	ACGCTCATCTTCAAGTCAGTAAT	GGTCTGTATGGIAGTCAGIATCG
Aromatase	NM_007810.3	ACAATAAGATGTATGGAGAGTTCA	GCTTGAGGACTTGCTGATAA
5α-Reductase2	NM_053188.2	GCAAGCCTATTACCTGGTT	AGAAGACACCGACGCTAA
β-Actin	NM_007393.5	AATCGTGC GTGACATCAA	GCTCGTTGCCAATAGTGA

램(ver. 21.0, SPSS INC., Chicago, IL, USA)을 이용하여 통계해석을 실시하였다. One-way analysis of variation (ANOVA)를 실시하여 유의성이 관찰되면 대조군과 유의차가 있는 시험군을 확인하기 위해 Dunnett's t-test를 실시하였다(유의수준 양측 5%).

결과 및 고찰

YHM 추출혼합물 비율의 결정

Leydig 세포인 TM3에서 호르몬 및 야관문 추출물 처리 시 테스토스테론 양을 얼마나 증가시킬 수 있는지를 확인하고, 최대한의 테스토스테론 증가를 얻기 위한 상기 두 추출물의 혼합비율을 5:5, 8:2 그리고 2:8로 다양하게 혼합하여 시험을 실시하였다(Fig. 1). 시험에 사용한 각 시료들의 농도는 20 µg/mL로 통일하여 수행하였다. 호르몬 또는 야관문 추출물 각각을 단독으로 처리했을 때와, 호르몬과 야관문 추출물을 비율별로 혼합하여 처리한 결과를 비교하였을 때, 호르몬과 야관문 추출물을 단독으로 처리한 경우보다, 호르몬과 야관문 추출물의 혼합비율이 8:2인 경우 테스토스테론 양이 가장 많이 증가되는 것으로 나타났다. 따라서 본 실험에서는 이러한 8:2 혼합물을 YHM이라 명하고 실험에 사용하였다.

YHM이 세포생존에 미치는 영향

YHM이 TM3 세포에 미치는 독성을 평가하기 위하여 각 시료를 농도별로 처리한 후 용매대조군(vehicle) 대비 세포의 생존률을 구하였다. YHM의 경우 20 µg/mL에서는 독성을 보이지

않았으며, 40 µg/mL을 처리하였을 때 용매대조군 대비 88.7±13.3%의 세포 생존률을 보이고 60, 80, 100 µg/mL 처리하였을 때 각각 83.4±11.7, 80.2±14.5, 72.4±13.9%의 세포 생존률을 보였다(Fig. 2A).

산화적 스트레스가 가해진 TM3 세포생존에 시료가 미치는 영향을 측정하고자, TM3 세포에 과산화수소를 처리하였다. 과산화수소의 처리 농도는 별도의 농도 설정시험을 통해 50 µM로 설정하였다(data not shown). TM3 세포에 50 µM 과산화수소를 4시간 처리한 후, 시료를 농도 별로 넣어준 배지로 교환하여 20시간 추가 배양하여 세포생존률을 측정하였다. 과산화수소를 처리하지 않은 군에 비해 과산화수소만 4시간 처리한 군은 77.4±5.6%의 세포생존률을 보였으며, 여기에 YHM 10, 20, 40 µg/mL을 추가로 처리하였을 때에도 과산화수소만 처리한 군과 비교했을 때 유사한 세포생존률을 보였다(Fig. 2B). 따라서 YHM은 산화적 스트레스를 받은 TM3 세포의 증식에는 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

YHM이 테스토스테론 분비에 미치는 영향

남성의 Leydig 세포는 중년이 지나면서 다양한 해로운 자극에 지속적으로 노출되어 점차 손상되어 간다. 이로 인해 나이가 먹어감에 따라 생리적 기능이 점차 떨어지게 된다. 그 결과 테스토스테론의 양도 점차 감소하여 남성갱년기의 증상이 나타나게 된다. 본 연구에서는 TM3 세포에 과산화수소를 처리함으로써(Noh 등, 2012) 남성에서 나타나는 남성갱년기(andropause) 현상을 유사하게 만들어 이의 개선 가능성을 보고자 하였다. 남성갱년기에 대한 모델연구에서 남성갱년기의 원인으로 산화적 스트레스를 주요 원인중의 하나로 보고되고 있으며, 이러한 연구에서 *in vitro*의 경우 과산화수소를 이용한 산화적 스트레스 모델이 많이 사용되고 왔다.

Tsai 등(2003)에 따르면 랫드의 leydig 세포에 과산화수소를 처리하면 테스토스테론의 방출이 감소하며, 이러한 결과는 과산화수소 처리시 세포내에서 P450scc와 StAR 단백질 발현이 억제되기 때문이라고 보고하였다. 이 두 단백질은 콜레스테롤을 pregnenolone으로 전환하며, pregnenolone은 progesterone, androstenedione, androstenediol로의 변환 단계를 거쳐, 종래에는 테스토스테론으로 변환된다. 현재까지 많은 연구에서 남성갱년기 *in vitro* 모델의 경우, 과산화수소를 처리한 세포를 사용하여 연구가 진행되고 있다(Tsai 등 2003; Chang 등, 2008; Kim 등, 2012; Noh 등, 2012; Kim 등, 2015a; Kim 등 2015b).

TM3 세포에 4시간동안 과산화수소를 처리하여 산화적 스트레스를 준 경우, 테스토스테론의 양은 33.3±3.8 pg/mL으로, 과산화수소를 처리하지 않은 세포의 44.4±3.1 pg/mL에 비해 25% 감소하였다. YHM 10 µg/mL을 추가로 처리하면 테스토스테론의 양은 30.0±2.1 pg/mL으로 과산화수소만 처리한 군과 차이

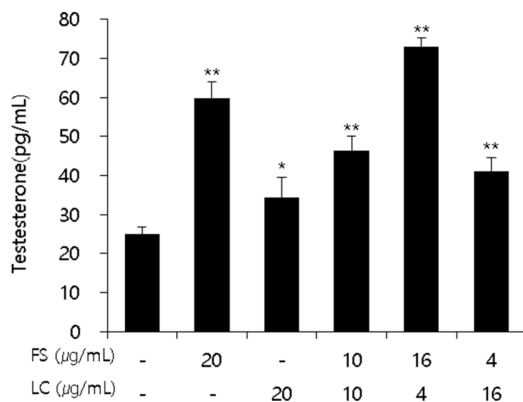


Fig. 1 Effect of Fenugreek seeds, *Lespedeza cuneate* on testosterone level in TM3 cell. The values are mean ± SD, n=3. FS: Fenugreek seeds, LS: *Lespedeza cuneate*. Significant difference from vehicle group by Dunnett's t-test: *p <0.05, **p <0.01

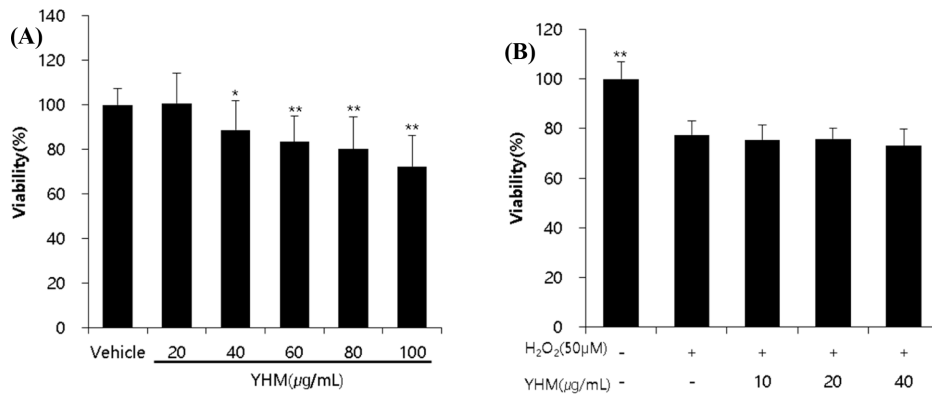


Fig. 2 Effect of YHM on cell viability in TM3 cells. (A) TM3 cells were treated with YHM(20, 40, 60, 80, 100 µg/mL) and (B) TM3 cell were treated with hydrogen peroxide (50 µM) for 4 hours, and replaced with vehicle or medium containing the YHM was incubated for 20 hours. The values are mean ± SD, n=3, (A) Significant difference from vehicle group by Dunnet's t-test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (B) Significant difference from hydrogen peroxide only group by Dunnet's t-test: ** $p < 0.01$

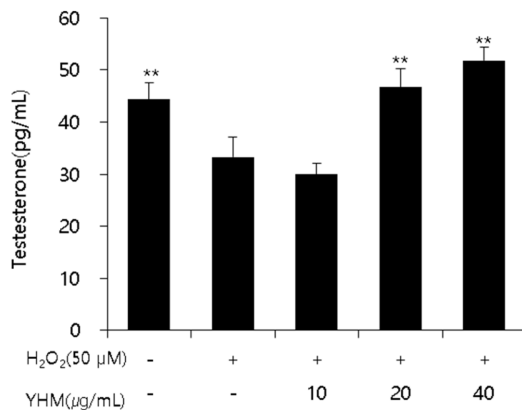


Fig. 3 Effect of YHM on testosterone level in hydrogen peroxide treated TM3 cell. The values are mean ± SD, n=3. Significant difference from hydrogen peroxide only group by Dunnet's t-test: ** $p < 0.01$

가 없었으나, YHM을 20, 40 µg/mL로 농도를 높여 처리하면 46.69±3.6, 51.85±2.5 pg/mL으로 높아져 control 세포에서의 양과 비슷하거나 증가되는 것으로 나타났다(Fig. 3). 이러한 결과는 TM3 세포에서 산화적 스트레스에 의해 감소된 테스토스테론을 YHM이 정상으로 회복시킬 수 있음을 보여주는 것인데, 이러한 결과는 남성갱년기 모델 세포에서 YHM이 저하된 테스토스테론 양의 회복 개선에 효과가 있음을 시사한다고 볼 수 있다.

YHM이 테스토스테론 합성과 관련된 유전자 발현에 미치는 영향
산화적 스트레스로 인해 감소된 테스토스테론 분비가 YHM 처리 시 다시 정상상태로 회복되는 결과(Fig. 3)에 관여하는 효소를 확인하기 위해, 테스토스테론 합성에 관여하는 유전자들의 발현을 real-time PCR로 확인하였다. Pregnenolone과 androstenediol을 progesterone과 테스토스테론으로 변환시키는 3β-HSD4는 과산화수소를 처리하였을 때 control에 비해 46%가 감소하였다. 반면 3β-HSD4의 발현은 YHM을 20 µg/mL 처리하였을 때 control 수준으로 회복되고 40 µg/mL을 처리하면

control에 비해 1.9배까지 증가하였다(Fig. 4A). 또한 17-OH progesterone를 dehydroepiandrosterone (DHEA)과 androstenediol로 변환시키는 17,20-desmase의 경우 과산화수소를 처리하였을 때 control에 비해 30% 감소하였는데, YHM을 20 µg/mL 처리하면 control 수준으로 회복되고 40 µg/mL을 처리하면 control에 비해 1.7배까지 증가하였다(Fig. 4B).

이러한 결과는 Fig. 3에서 산화적 스트레스에 의해 감소되었던 테스토스테론이 YHM 처리 시 다시 증가하여 정상수준 이상으로 회복된 이유를 잘 설명해주고 있다. 즉 산화적 스트레스로 인해 발현이 감소되었던 테스토스테론 합성 유전자들이 YHM에 의해 그 발현이 다시 왕성해질 수 있도록 해주는 역할을 하고 있음을 의미하는 것이다.

YHM이 테스토스테론 분해에 관련된 유전자 발현에 미치는 영향
산화적 스트레스를 받은 TM3 세포에서 감소된 테스토스테론의 양을 YHM이 다시 회복시킬 수 있는 가능성의 하나로, 테스토스테론을 다른 물질로 전환시켜 테스토스테론의 양을 감소시키는 효소에 대한 영향을 분석하였다. 본 연구에서는 테스토스테론과 androstenedione를 estradiol로 분해하는 aromatase와 testosterone을 dihydrotestosterone (DHT)로 전환시키는 5α-reductase2의 발현을 조사하였다. aromatase 유전자의 발현은 과산화수소를 처리하였을 때 control 보다 2.8배 증가되는데, YHM을 10, 20, 40 µg/mL을 처리하면 과산화수소만 처리하였을 때보다 76.5, 77.1, 79.0% 감소하였다. 또한 control에 비해서는 각각 33.7, 35.3, 40.6% 감소하였다(Fig. 5A). 또한 aromatase 효소의 양은 산화적 스트레스를 주었을 경우 549.5±56.0 pg/mL로 control의 295.4±76.8 pg/mL 보다 약 1.9배 증가하였다. 하지만 YHM 처리군에서는 과산화수소에 의해 증가된 aromatase의 양이 control 수준으로 감소하였다(Fig. 5C).

테스토스테론을 DHT로 전환시키는 5α-Reductase2의 경우, 과산화수소에 의해 mRNA의 발현이 control에 비해 2.7배 증가한 반면 YHM을 10, 20, 40 µg/mL 처리하였을 때는 과산화수소만 처리하였을 때보다 각각 46.2, 60.6 그리고 68.9% 감소하였으며, 20, 40 µg/mL 처리 시의 값은 control 수준으로 회복되는 것으로 나타났다(Fig. 5B). 또한 5α-Reductase2 효소의 양은

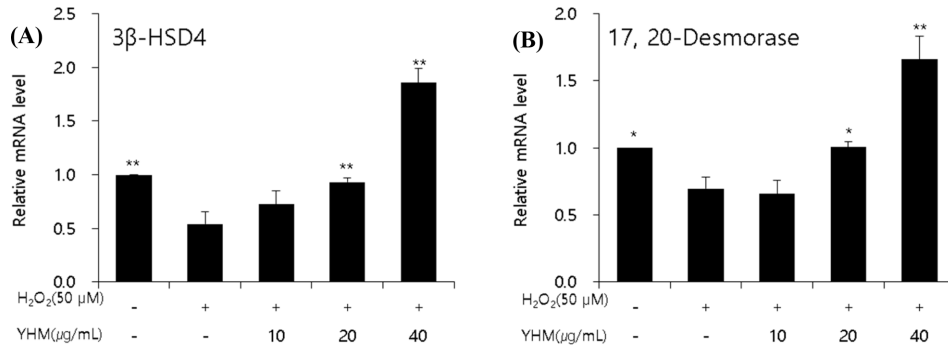


Fig. 4 Effect of YHM on expression of testosterone synthesis genes in hydrogen peroxide treated TM3 cell. (A) 3β-HSD4 (B) 17, 20-desmorase. The values are mean ± SD, n=3. Significant difference from hydrogen peroxide only group by Dunnet’s t-test: **p* <0.05, ***p* <0.01

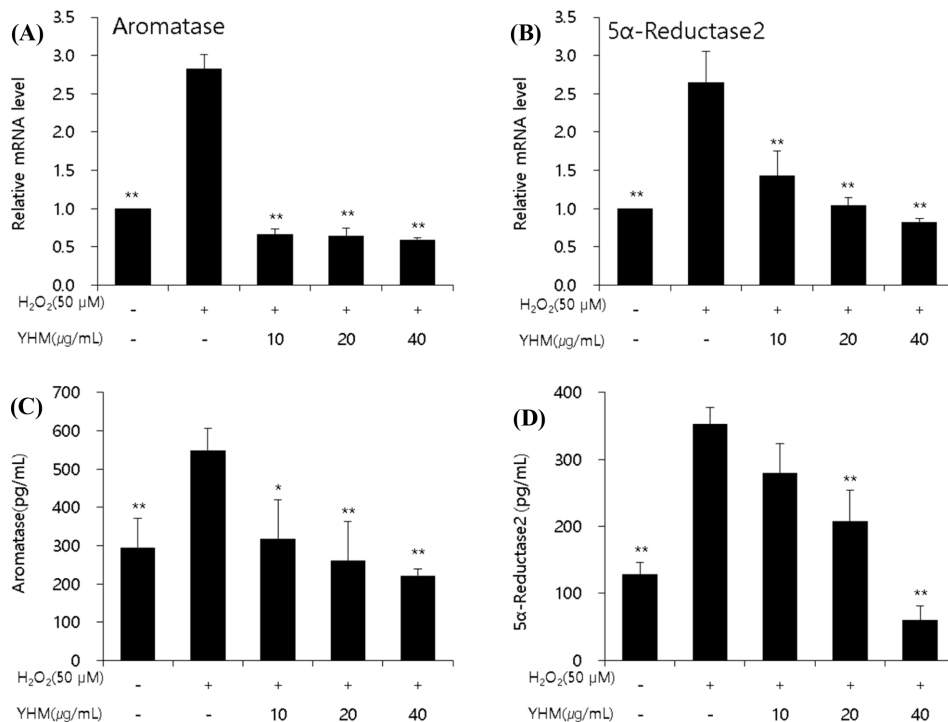


Fig. 5 Effect of YHM on expression of testosterone degradation genes and enzyme in hydrogen peroxide treated TM3 cell. (A, C) mRNA and protein level of aromatase, respectively. (B, D) mRNA and protein level of 5α-reductase2, respectively. The values are mean ± SD, n=3. Significant difference from hydrogen peroxide only group by Dunnet’s t-test: **p* <0.05, ***p* <0.01

과산화수소를 처리하였을 때 352.9±24.4 pg/mL로 control의 129.0±17.5 pg/mL에 비해 2.7배로 증가하였고, YHM을 10, 20, 40 μg/mL 처리하였을 때는 각각 280.0±43.7, 207.9±46.6, 60.4 ±21.0 pg/mL로 농도 의존적으로 감소하였으며, 특히 40 μg/mL 처리하였을 때는 control 보다 약 50 % 감소한 것으로 나타났다(Fig. 5D).

이러한 결과는 Fig. 3에서 본 것처럼 스트레스에 의해 발현이 감소된 테스토스테론 합성관련 유전자를 YHM이 원상태로 회복시킬 뿐만 아니라, YHM은 스트레스에 의해 발현이 증가된 테스토스테론 전환관련 유전자를 원상태로 다시 감소시키는 작용을 하여 양적으로 이상이 생긴 테스토스테론의 양을 원상태로 되돌리는 탁월한 역할을 해주는 것으로 보인다.

최근 YHM을 4주간 투여한 동물실험의 경우(Lee 등, 2015)

대조군에 비해 약 30 % 정도 혈중 테스토스테론이 증가한다는 보고가 있다. 상기의 논문에서는 YHM에 의한 혈중 테스토스테론 증가의 원인으로 호르몬에 다량 함유되어 있는 것으로 알려진 생리활성 성분인 diosgenin이 체내에서 DHEA로 전환되어 테스토스테론의 전구체로 작용할 수 있다는 보고(Murakami 등, 2000; Taylor 등, 2000; Sato와 Fujita 2014)에 기인한다고 추정하였으나, 본 연구의 결과에 의하면 YHM이 테스토스테론의 합성과 전환에 관여하는 유전자의 발현을 조절하는 요인으로 보인다. 이 결과는 YHM 투여가 생체 내에서도 감소된 테스토스테론의 분비를 다시 회복시킬 수 있음을 시사함으로써, 테스토스테론 감소로 인해 야기되는 남성갱년기의 증상 완화에 도움이 될 수 있을 것으로 판단된다.

초 록

본 연구는 야관문과 호로과 복합추출물인 YHM이 과산화수소 (H_2O_2)로 산화적스트레스를 가한 TM3 세포의 테스토스테론 발현에 미치는 영향을 확인하고자 수행되었다. 세포독성 시험을 수행하여 YHM의 경우 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 최고 농도로 중농도 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 저농도 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리군을 설정하였고, TM3 세포에 산화적 스트레스를 주기 위해서는, serum free 배지에 50 μM 의 과산화수소를 4시간 동안 처리하였다. 산화적 스트레스가 가해진 TM3 세포에 YHM 시료를 처리하여 세포 생존률에 미치는 영향을 평가하였을 때 모든 농도 처리군에서 세포증식이나 독성이 없었다. 테스토스테론은 과산화수소를 처리하였을 때 감소하였다가 YHM 시료를 처리하였을 때 control 수준으로 회복되거나, control 보다 더 증가하였다. 또한 시료에 의한 테스토스테론 양의 증가원인을 확인하기 위하여, 테스토스테론 합성 및 분해에 관여하는 효소들의 발현량을 ELISA와 Real-time PCR을 통해 알아보았다. 테스토스테론 합성에 관여하는 $3\beta\text{-HSD4}$ 와 $17,20\text{-desmase}$ 는 과산화수소 처리 시 감소하였다가, YHM을 처리하였을 때는 control 수준으로 회복하였다. 테스토스테론을 estradiol 및 dihydrotestosterone로 변환시키는 aromatase와 $5\alpha\text{-reductase2}$ 는 과산화수소를 처리하였을 때 증가하였다가 YHM 시료를 처리하면 control 수준이나 그 이하로 감소하였다. 이 결과들로 보았을 때 YHM 시료는 TM3 세포의 증식에는 영향을 미치지 못 하지만, 산화적 스트레스에 의해 감소된 테스토스테론 합성 효소의 발현을 증가시키고, 반대로 증가되는 테스토스테론 분해 효소의 발현을 감소시켜, 결국 산화적 스트레스에 의해 저하된 테스토스테론의 양을 회복시키거나 증가시키는 효과가 있는 것으로 판단된다.

Keywords 과산화수소 · 테스토스테론 · Fenugreek seeds · *Lespedeza cuneata*

References

- Aswar U, Bodhankar SL, Mohan V, Thakurdesai PA (2010) Effect of furostanol glycosides from *Trigonellafoenum graecum* on the reproductive system of male albino rats. *Phytother Res* 24: 1482–1488
- Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, Matsumoto AM, Snyder PJ, Swerdloff RS, Montori VM (2006) Testosterone therapy in adult men with androgen deficiency syndromes: An endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocr Metab* 91: 1995–2010
- Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, Matsumoto AM, Snyder PJ, Swerdloff RS, Montori VM (2010) Testosterone therapy in men with androgen deficiency syndromes: An endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocr Metab* 95: 2536–2559
- Chang MS, Kim WN, Yang WM, Kim HY, Oh JH, Park SK (2008) Cytoprotective effects of *Morinda officinalis* against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in Leydig TM3 cells. *Asian J Androl* 10: 667–674
- Duru M, Erdoğan Z, Duru A, Kucukgul A, Duzguner V, Kaya DA, Şahin A (2013) Effect of seed powder of a herbal legume fenugreek (*Trigonellafoenum graecum* L.) on growth performance, body components, digestive parts, and blood parameters of broiler chicks. *Pakistan J Zool* 45: 1007–1014
- Gruenewald DA, Matsumoto AM (2003) Testosterone supplementation therapy for older men: Potential benefits and risks. *J Am Geriatr Soc* 51: 101–115
- Kassem A, Al-Aghbari A, AL-Habori M, Al-Mamary M (2006) Evaluation of the potential antifertility effect of fenugreek seeds in male and female rabbits. *Contraception* 73: 301–306
- Kim GY, Lee HG, Kim EJ (2015b) Effects of Extracts from Oja on Testosterone Synthesis in Leydig Cells. *J Physiol & Pathol Korean Med* 29: 403–408
- Kim JS, Hong MJ, Kim DR, Park EH, Chang MS, Park SK (2012) Study of Antioxidant Effects of Platycladi Semen on Male Reproductive cells. *Kor J Herbology* 27: 37–42
- Kim SH, Kim DR, Chang MS, Park SK (2015a) Antioxidant effect of Woogyuyum against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in Leydig cells. *Herbal Formula Science* 23: 111–119
- Lee JK, Kang DG, Lee HS (2012) Vascular relaxation induced by aqueous extract of *Lespedeza cuneata* via the NO-cGMP pathway. *J Nat Med* 66: 17–24
- Lee KS, Lee EK, Kim SY, Kim TH, Kim HP (2015) Effect of a Mixed Extract of Fenugreek Seeds and *Lespedeza cuneata* on Testosterone Deficiency Syndrome. *Korean J Food Sci Technol* 47: 492–498
- Luo L, Chen H, Zirkin BR (1996) Are Leydig cell steroidogenic enzymes differentially regulated with aging? *J Androl* 17: 509–515
- Muller M, van der Schouw YT, Thijssen JHH, Grobbee DE (2003) Endogenous sex hormones and cardiovascular disease in men. *J Clin Endocr Metab* 88: 5076–5086
- Murakami T, Kishi A, Matsuda H, Yoshikawa M (2000) Medicinal foodstuffs XVII. Fenugreek seed. (3): Structures of new furostanol-type steroid saponins, trigoneosidesXa, Xb, XIb, XIIa, XIIb, and XIIIa, from the seeds of egyptian *Trigonellafoenum graecum* L. *Chem Pharm Bull* 48: 994–1000
- Nieschlag E, Swerdloff R, Behre HM, Gooren LJ, Kaufman JM, Legros JJ, Lunenfeld B, Morley JE, Schulman C, Wang C, Weidner W, Wu FCW (2006) Investigation, treatment, and monitoring of late-onset hypogonadism in males: ISA, ISSAM, and EAU recommendations. *J Androl* 27: 135–137
- Noh YH, Kim DH, Kim JY, Park J, Kim OH, Han D, Kim WY, Kim SS, Lee MY, Heo SH, Kim M, Lee WB, Jeong Y, Myung SC (2012) Improvement of andropause symptoms by dandelion and rooibos extract complex CRS-10 in aging male. *Nutr Res Pract* 6: 505–512
- Park SY, Kim HH (2013) Effect of *Lespedeza cuneata* on the contraction of rabbit common carotid artery and corpus cavernosum. *Korean J Orient Physiol Pathol* 27: 809–817
- Sato K, Fujita S, Iemitsu M (2014) Acute administration of diosgenin or dioscorea improves hyperglycemia with increases muscular steroidogenesis in STZ-induced type I diabetic rats. *J Steroid Biochem* 143: 152–159
- Sattler F, Bhasin S, He J, Chou CP, Castaneda-Sceppa C, Yarasheski K, Binder E, Schroeder ET, Kawakubo M, Zhang A, Roubenoff R, Azen S (2011) Testosterone threshold levels and lean tissue mass targets needed to enhance skeletal muscle strength and function: the HORMA trial. *J Gerontol A BiolSci Med Sci* 66: 122–129
- Singh P (2013) Andropause: Current concepts. *Indian J EndocrinolMetab* 17 (Suppl 3): S621–629
- Taylor WG, Elder JL, Chang PR, Richards KW (2000) Microdetermination of diosgenin from fenugreek (*Trigonellafoenum graecum*) seeds. *J Agr Food Chem* 48: 5206–5210
- Travison TG, Basaria S, Storer TW, Jette AM, Micic R, Farwell WR, Choong K, Lakshman K, Mazer NA, Coviello AD, Knapp PE, Ullloor J, Zhang A, Brooks B, Nguyen AH, Eder R, LeBrasseur N, Elmi A, Appleman E, Hede-Brierley L, Bhasin G, Bhatia A, Lazzari A, Davis S, Ni P, Collins L, Bhasin S (2011) Clinical meaningfulness of the changes in muscle performance and physical function associated with testosterone administration in older men with mobility limitation. *J Gerontol A BiolSci Med Sci* 66: 1090–1099
- Tsai SC, Lu CC, Lin CS, Wang PS (2003) Antisteroidogenic Actions of Hydrogen Peroxide on Rat Leydig Cells. *J Cellul Biochem* 90: 1276–

1286

- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3(7): research 0034.1–0034.11
- Wang C, Hikim AS, Ferrini M, Bonavera JJ, Vernet D, Leung A, Lue YH, Gonzalez-Cadavid NF, Swerdloff RS (2002) Male reproductive ageing: using the brown Norway rat as a model for man. *Novartis Found Symp* 242: 82–97
- Zhang Y, Ge R, Hardy MP (2008) Androgen-forming stem Leydig cells: identification, function and therapeutic potential. *Dis Markers* 24: 277–286