

노화로 발생한 남성 생식기능 이상에 白殭蠶이 미치는 영향

¹세명대학교 한의과대학 한방부인과교실, ²세명대학교 한의과대학 해부학교실
³세명대학교 한의과대학 생리학교실
김형준¹, 안상현², 안하영¹, 박선영³

ABSTRACT

Effect of *Bombycis Corpus* on Male Reproductive Dysfunction Caused by Aging

Hyeong-Jun Kim¹, Sang-Hyun Ahn², Ha-Young Ahn¹, Sun-Young Park³
¹Dept. of Gynecology, College of Korean Medicine, Se-Myung University
²Dept. of Anatomy, College of Korean Medicine, Se-Myung University
³Dept. of Physiology, College of Korean Medicine, Se-Myung University

Objectives: This study was designed to investigate the effect of *Bombycis corpus* on reproductive dysfunction caused by aging.

Methods: The experimental group was divided into three groups: a control group consisting of 8-week-old male ICR mice without any treatment, an aging-elicited group (AE group) consisting of 50-week-old ICR male mice without any treatment, and a *Bombycis corpus* treatment group (BC group) consisting of 50-week-old ICR male mice with treatment *Bombycis corpus* extract (0.78 g/kg/day) for 6 months. After 6 months, histochemistry and immunohistochemistry of the testis were performed to investigate the effects of *Bombycis corpus* on the reproductive dysfunction caused by aging.

Results: In the first step, *Bombycis corpus* increased spermatogenesis and distribution of sertoli cells in the seminiferous tubule, increased BrdU positive reaction in the spermatogonium at the basal part of the seminiferous tubule, and decreased the apoptosis of Sertoli cells in the seminiferous tubule. In addition, *Bombycis corpus* increased AR positive in Sertoli cells and 17 β -HSD positive in leydig cells. Finally, *Bombycis corpus* decreased 8-OHdG positive reaction in the spermatids of the seminiferous lumen, caspase-3 positivity in leydig cells, and HDAC1 positive reaction in sertoli cells.

Conclusions: These results suggest that *Bombycis corpus* increases spermatogenesis, decreases apoptosis of leydig cells and Sertoli cells, increases the production and action of testosterone in the testis, and inhibits DNA damages and DNA transcripts decrease in the testis. Thereby improving reproductive dysfunction caused by aging.

Key Words : *Bombycis Corpus* (BC), Reproductive Dysfunction, 17 β -HSD, Androgen Receptor, 8-OHdG

I. 서론

현재 사회는 출산율의 저하와 평균수명의 연장에 따라 고령화 사회로 빠르게 진입 중이며, 증가된 노인인구의 만성질환에 대한 예방, 관리 및 삶의 질 향상에 사회적 관심이 증가하고 있다. 그 중 주로 노화에 대한 규명을 포함한 老人病學에 대한 연구는 오래 전부터 이루어졌는데, 미국인 의사 Ignaz Nascher가 老人病理學이란 용어를 처음 사용한 이래, 1940년에는 Boston에서 최초의 老人病 클리닉이 개설되었고, 1950년에는 미국노인병의학회가 결성되어 老人醫學의 교육, 연구 및 진료에 대한 연구가 진행되어 왔다¹⁾. 하지만 아직까지도 노화에 대한 정확한 원인 및 예방, 치료에 대해 확실히 규명된 바가 없어 이에 대한 추가 연구가 필요한 실정이다.

노화는 생명체의 성장과 동시에 시간 경과에 따른 연속적인 현상으로, 생물학적 과정인 점진적이고 내적인 퇴행성 변화이며, 구조적, 기능적 변화가 초래되어 외부환경에 대해 반응하는 예비력과 적응력이 저하되고 형태적, 기능적으로 퇴축되어 생명력이 감퇴는 현상을 의미한다^{2,3)}. 노화로 인해 나타날 수 있는 현상들은 신체적 증상을 기본으로 정신, 심리적, 성적 증상 등 매우 다양한데, 노화에 대한 연구결과에 의하면 남성에게 발생하는 노화는 일반적으로 남성호르몬의 결핍현상이 동반된다⁴⁾. 남성호르몬인 테스토스테론은 정소 내 leydig 세포에서 생성되는 물질로, 테스토스테론이 감소되면 정자형성과정의 비활성화 등 생식기능에 이상이 발생한다⁵⁻⁷⁾. 즉, 노화에

서 남성호르몬의 감소가 매우 중요한 비중을 차지하고 있고, 남성호르몬의 감소는 생식기능의 이상을 유발하며, 이러한 현상을 노화 현상의 주요 원인으로 보고 있으므로, 남성호르몬 감소에 의한 생식기능 이상의 개선을 통해 노화 현상을 예방할 수 있을 것이라 생각된다.

《黃帝內經》의 上古天真論⁸⁾에서는 “天壽過度, 氣脈常通, 而腎氣有餘也”라고 하여 수명 연장에 腎氣가 중요한 역할을 한다고 하였으니 연령의 증가로 나타나는 노화의 현상도 腎氣의 虛衰로 발생한다고 생각된다. 또한 생식기능은 腎臟의 精氣가 충만할 때 그 精을 바탕으로 형성된 父精과 母血이 相合하면서 이루어지기 때문에 한의학적으로 생식기능은 腎精이 주관하게 되며⁹⁾, 연령이 증가함에 따라 腎精은 점차 虛衰해지고 腎精이 주관하는 생식기능도 점차 저하되게 된다. 따라서 생식기능은 腎氣(腎精)의 盛衰에 따라 좌우되며, 腎精의 충만 여부가 생식기능의 관건이 된다. 이에 따라 노화와 생식기능의 이상은 모두 腎氣虛衰로 생각할 수 있으며 노화로 발생한 생식기능의 이상 또한 補腎 약물을 이용하여 개선시킬 수 있을 것이라 생각하였다.

白蠱蠶는 누에나방과에 속한 곤충인 누에의 유충이 백강균에 감염되어 죽은 잠체로 味는 辛鹹하고 性은 平無毒하며, 風濕을 제거하고 經絡을 소통시켜준다고 하였으며^{10,11)}, 이러한 효능을 바탕으로 頭痛, 眩暈, 咽喉腫痛, 結核 및 腎臟疾患의 치료에도 이용한다고 되어 있다. 또한 白蠱蠶에 대한 연구로 항암효과¹²⁾, 항산화효과¹³⁾, 鎮痙효과¹⁴⁾, 혈당강하효과¹⁵⁾, 미백효과¹⁶⁾, 뇌 보호효과¹⁷⁾ 등 다양한 연구가 보고되었지만, 白蠱蠶이 생식기능

에 미치는 영향에 대한 연구는 아직까지 없다.

이에 저자는 腎臟疾患의 치료에도 이용되는 白僵蠶이 한의학적으로 腎氣가 주관하는 생식기능에 효과가 있을 것이라 생각하여 고환에 대한 조직화학 및 면역조직화학적 실험을 통해 白僵蠶이 노화로 발생한 생식기능 이상에 미치는 영향에 대하여 알아보았다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에는 8주령의 수컷 ICR계 생쥐(샘타코, 한국)와 50주령 ICR계 수컷 생쥐(중앙실험동물, 한국)를 사용하였으며, 실험동물은 구입 후 온도 23 ± 2 °C, 습도 $55 \pm 5\%$ 의 항온항습실에 적응시킨 후 사용하였다.

본 동물실험은 세명대학교 동물실험윤리위원회의 승인(smecae 18-12-04)하에 실시되었다.

2. 白僵蠶 추출물 제조

白僵蠶(Bombycis Corpus, BC) 300 g을 증류수 2000 ml과 함께 round flask에 넣고 2시간 동안 가열 추출하였으며, 추출액은 rotary evaporator(Eyela, Japan)로 감압 농축한 후 동결건조기로 건조하여 분말 37.9 g을 제조하였다.

3. 실험군의 설정 및 白僵蠶 추출물 투여

실험군은 정상군(control group), 노화군(aging-elicited group, AE group), 白僵蠶군(Bombycis Corpus group, BC group) 총 3군으로 분류하였다.

정상군은 아무런 처치를 하지 않은 8주령의 ICR계 생쥐로 구성하였고, 노화군과 白僵蠶군은 50주령의 ICR계 생쥐로 구성하였다. 노화군은 별다른 처치 없이 증류수 0.5 ml를 1일 1회씩 6개월 동안 투여하였고, 白僵蠶군은 白僵蠶 추출물(0.78 g/kg)을 D.W에 녹여 1일 1회씩 6개월 동안 투여하였다.

4. 고환의 조직학적 실험

1) 조직 표본 제작

흰쥐를 ether로 마취하여 하복부를 절개하고 고환을 적출하였다. 고환 주위의 지방을 제거한 고환조직을 실온에서 24시간동안 10% NBF에 고정하였고, 고정된 조직은 통상적인 방법으로 paraffin에 포매한 후 5 µm 두께의 연속절편으로 제작되었다.

2) 고환의 조직화학

고환에 분포하는 정세관 변화를 관찰하기 위해 Masson trichrome 염색을 실시하였다. 우선 50-60 °C Bouin 용액에서 1시간동안 매염 처리한 다음 70% 에탄올에서 picric acid를 제거하였다. Weigert iron hematoxylin에서 10분 동안 반응시켜 핵을 염색하고, biebrich scalet-acid fuchsin와 phosphomolybdic-phosphotungstic acid에서 각각 15분간, aniline blue에 5분간 처리한 후 광학현미경(BX50, Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

3) 고환의 면역조직화학

고환절편을 proteinase K(20 µg/ml)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum에서 2시간 동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 mouse anti-BrdU(1:100, Santa Cruz Biotec), mouse anti-AR(1:100, Santa Cruz

Biotec, USA)와 mouse anti-17 β -HSD (1:100, Santa Cruz Biotec), mouse anti-8-OhdG(1:100, Santa Cruz Biotec), mouse anti-caspase-3(1:100, Santa Cruz Biotec), 그리고 mouse anti-HDAC1(1:100, Santa Cruz Biotec)에 4 °C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 그 다음 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG(1:100, DAKO, USA)에 실온에서 24시간 link 하였고, 그 다음 avidin biotin complex kit(Vector Lab, USA)에 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin 으로 대조염색하였다.

4) TUNEL assay

고환 내 apoptosis 변화를 관찰하기 위해 *in situ* apoptosis detection kit(Apoptag, Intergen, USA)를 이용한 TUNEL(terminal deoxynucleotid transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labelling) 방법을 실시하였다. 먼저 조직 절편을 proteinase K에 5분간 proteolysis 시킨 다음 equilibration buffer에서 20초간 처리하였다. 그 다음 strength TdT enzyme(36 μ l TdT enzyme : 72 μ l reaction buffer)을 처리하여 37 °C 의 humidified chamber에서 1시간 동안 반응시킨 후 strength stop/wash buffer에서 10분 동안 처리하였다. Anti-digoxigenin

-peroxidase에 1시간 동안 반응시킨 후 DAB 를 처리하였다. Methyl green으로 대조 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

5. 영상 분석 및 통계

면역조직화학과 TUNEL assay의 결과는 image Pro Plus(Media cybernetics, USA)를 이용한 영상분석을 통해 수치화 (means \pm standard error) 했다. 각 군의 표본에서 임의로 선정된 부위를 x200 배율에서 촬영한 다음 positive pixels/20,000,000 pixels로 영상분석 하였다. 면역조직화학 결과의 통계는 SPSS software(SPSS 20, SPSS Inc., USA)를 사용하였으며, one-way ANOVA 시행을 통해 유의성($p < 0.05$)을 검증하고 Duncan's multiple range test 로 사후 검증하였다.

III. 결 과

1. 정자 생성효과

1) 정세관내 정자와 sertoli 세포의 분포변화

대조군에 비하여 노화된 AE군 생쥐의 정세관 내강에 생성된 정자 분포가 감소되었고, sertoli 세포의 소실이 나타났으나, 白蠶蠶를 투여한 BC군은 AE군에 비하여 생성된 정자 분포가 증가와 sertoli 세포의 분포가 관찰되었다.

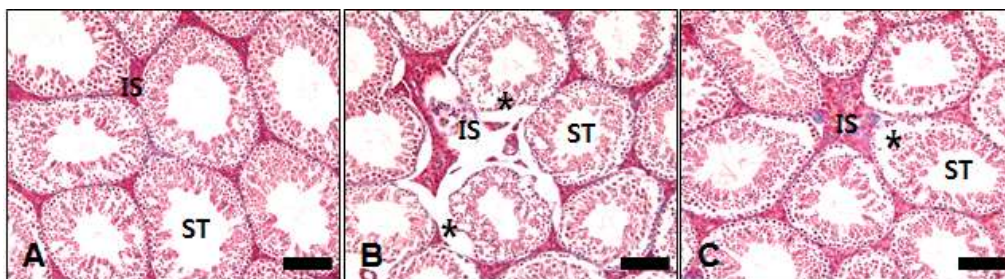


Fig. 1. Changes in distribution of spermatids and sertoli cells in the in seminiferous tubule. A : control group, B : aging-elicited group, C : *Bombycis Corpus* group, ST : seminiferous tubule, IS : interstitial space, Arrow : positive reaction, * : atrophied region in seminiferous tubule, Bar size : 100 μ m

2) 정조세포의 세포분열 변화
 대조군에 비하여 노화된 AE군 생쥐의 정세관기저부에서 BrdU 양성반응을 보이는 정조세포가 63% 감소되었으나, 白

僵蠶를 투여한 BC군은 AE군에 비하여 BrdU 양성반응을 보이는 정조세포가 48% 증가되었다.

Table 1. The Image Analysis for BrdU Stain in Mouse Testis

Objective	Group		
	Control	AE	BC
BrdU	47,125±1,325	17,249±814	25,600±672***

Values are mean±deviation (n=8). Image analysis for 20,000,000 pixel cells. *** $p < 0.001$ compared with AE.

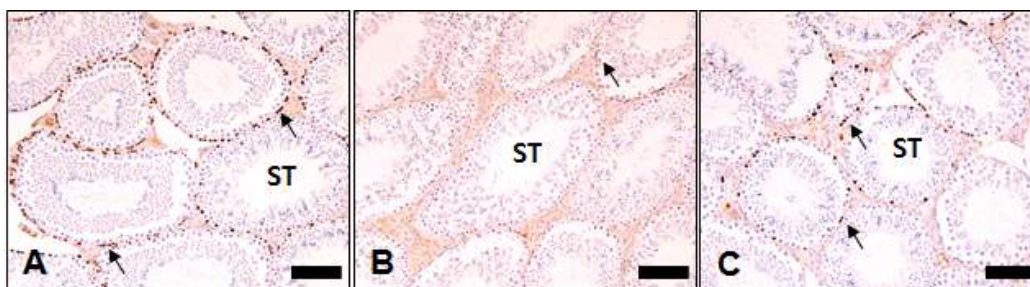


Fig. 2. Changes in cell division in spermatogonium. A : control group, B : aging-elicited group, C : *Bombycis Corpus* group, ST : seminiferous tubule, Arrow : positive reaction, Bar size : 100 μ m

3) Sertoli 세포의 세포자멸사(apoptosis) 변화
 대조군에 비하여 노화된 AE군 생쥐의 정세관에서 세포자멸사한 sertoli 세포가

1.054% 증가되었으나, 白僵蠶를 투여한 BC군은 AE군에 비하여 세포자멸사한 sertoli 세포가 34% 감소되었다.

Table 2. The Image Analysis for TUNEL Assay in Mouse Testis

Objective	Group		
	Control	AE	BC
TUNEL	6,198±325	71,523±1,640	47,499±1,348***

Values are mean±deviation (n=8). Image analysis for 20,000,000 pixel cells. *** $p < 0.001$ compared with AE.

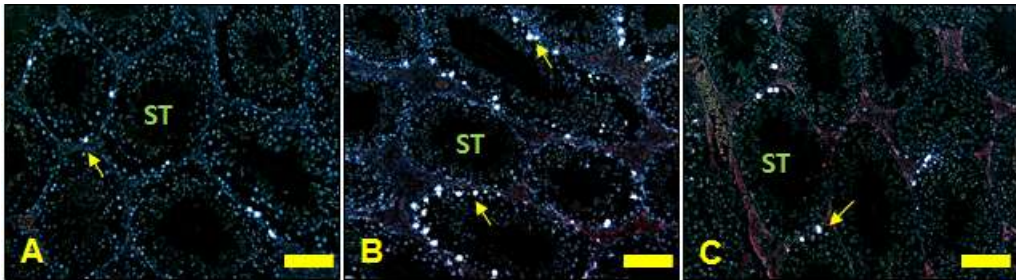


Fig. 3. Changes in apoptosis of sertoli cells.

A : control group, B : aging-elicited group, C : *Bombycis Corpus* group, ST : seminiferous tubule, Arrow : positive reaction, Bar size : 100 μm

2. 남성호르몬 생성효과

1) Sertoli 세포내 androgen receptor의 변화
대조군에 비하여 노화된 AE군 생쥐의

정세관내 sertoli 세포에서 AR 양성반응이 70% 감소되었으나, 白殭蠶을 투여한 BC군은 AE군에 비하여 AR 양성반응이 39% 증가되었다.

Table 3. The Image Analysis for AR Positive Reactions

Objective	Group		
	Control	AE	BC
AR	71,529±724	21,705±852	30,153±490***

Values are mean±deviation (n=8). Image analysis for 20,000,000 pixel cells. *** $p < 0.001$ compared with AE.

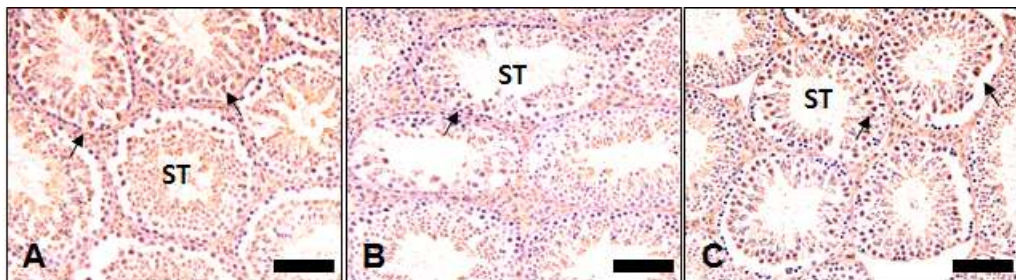


Fig. 4. Changes of androgen receptor in sertoli cells.

A : control group, B : aging-elicited group, C : *Bombycis Corpus* group, ST : seminiferous tubule, Arrow : positive reaction, Bar size : 100 μm

2) Leydig 세포내 17β-HSD의 변화
대조군에 비하여 노화된 AE군 생쥐의
고환 leydig 세포에서 17β-HSD 양성반

응이 66% 감소되었으나, 白僵蠶를 투여
한 BC군은 AE군에 비하여 17β-HSD 양
성반응이 43% 증가되었다.

Table 4. The Image Analysis for 17β-HSD Positive Reactions

Objective	Group		
	Control	AE	BC
17β-HSD	48,340±984	16,688±685	23,877±690***

Values are mean±deviation (n=8). Image analysis for 20,000,000 pixel cells. *** $p < 0.001$ compared with AE.

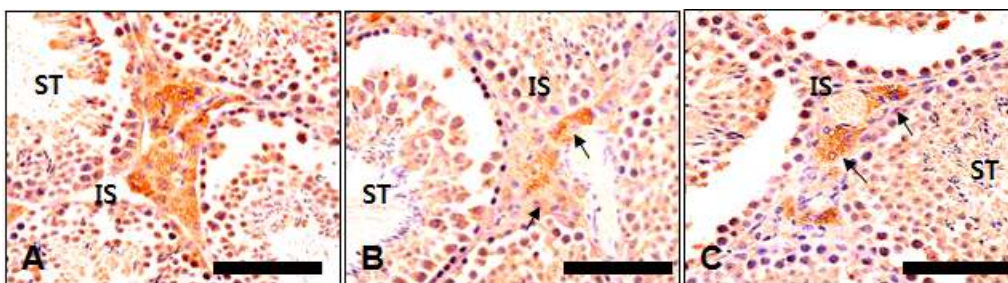


Fig. 5. Changes of 17β-HSD in Leydig Cells.

A : control group, B : aging-elicited group, C : *Bombycis Corpus* group, ST : seminiferous tubule, IS : interstitial space, Arrow : positive reaction, Bar size : 100 μm

3. 산화스트레스 조절효과

1) 산화스트레스 손상 완화효과
대조군에 비하여 노화된 AE군 생쥐의
정세관 내강에서 8-OHdG 양성반응을 보

이는 정자세포가 552% 증가되었으나, 白
僵蠶를 투여한 BC군은 AE군에 비하여
8-OHdG 양성반응이 34% 감소되었다.

Table 5. The Image Analysis for 8-OHdG Positive Reactions

Objective	Group		
	Control	AE	BC
8-OHdG	8,531±271	55,617±1,217	36,795±635***

Values are mean±deviation (n=8). Image analysis for 20,000,000 pixel cells. *** $p < 0.001$ compared with AE.

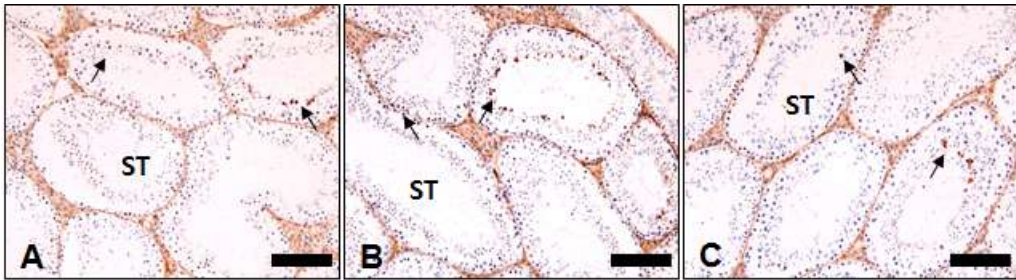


Fig. 6. Effect to reduce oxidative stress damage.
 A : control group, B : aging-elicited group, C : *Bombycis Corpus* group, ST : seminiferous tubule, Arrow : positive reaction, Bar size : 100 μm

2) 산화스트레스에 따른 세포자멸사 (apoptosis) 변화
 대조군에 비하여 노화된 AE군 생쥐 정세관의 leydig 세포에서 caspase-3 양

성반응이 290% 증가되었으나, 白殭蠶을 투여한 BC군은 AE군에 비하여 caspase-3 양성반응이 23% 감소되었다.

Table 6. The Image Analysis for Caspase-3 Positive Reactions

Objective	Group		
	Control	AE	BC
Caspase-3	11,552±672	45,124±1,080	34,909±866***

Values are mean±deviation (n=8). Image analysis for 20,000,000 pixel cells. *** $p < 0.001$ compared with AE.

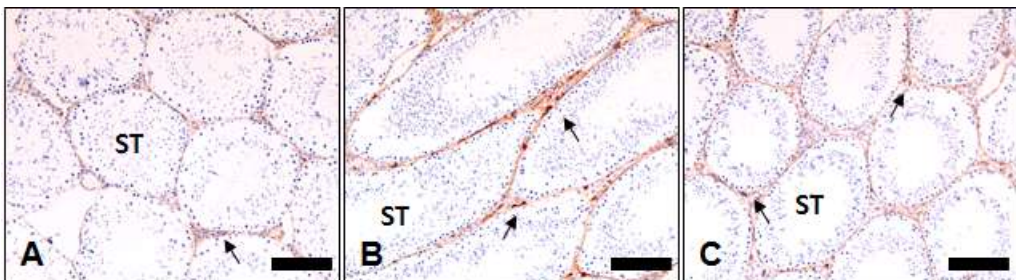


Fig. 7. Changes in apoptosis due to oxidative stress.
 A : control group, B : aging-elicited group, C : *Bombycis Corpus* group, ST : seminiferous tubule, Arrow : positive reaction, Bar size : 100 μm

3) 산화스트레스 조절에 따른 sertoli 세포의 활성 변화
 대조군에 비하여 노화된 AE군 생쥐 정세관의 sertoli 세포에서 HDAC1 양성

반응이 1.240% 증가되었으나, 白殭蠶을 투여한 BC군은 AE군에 비하여 HDAC1 양성반응이 38% 감소되었다.

Table 7. The Image Analysis for HDAC1 Positive Reactions

Objective	Group		
	Control	AE	BC
HDAC1	5,438±282	72,849±1,476	44,852±946***

Values are mean±deviation (n=8). Image analysis for 20,000,000 pixel cells. *** $p < 0.001$ compared with AE.

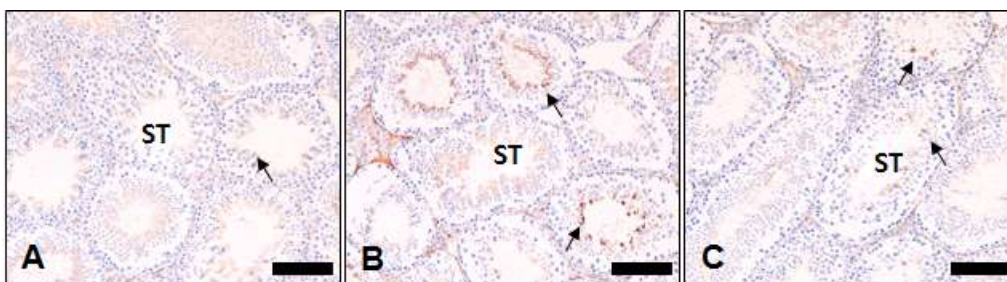


Fig. 8. Changes on the activity of sertoli cells due to oxidative stress. A : control group, B : aging-elicited group, C : *Bombycis Corpus* group, ST : seminiferous tubule. Arrow : positive reaction, Bar size : 100 μ m

IV. 고찰

노화는 생물학적 과정에서 형태적, 기능적 퇴축, 예비력과 적응력의 저하로 사망에 귀착되는 보편적인 생리적 현상으로 발생된다. 이는 질병이 없고 이상적인 환경에 있어도 성숙 후에 자연적으로 퇴축 사망하는, 시간 경과에 따라 피할 수 없는 항상적 보편적 노화인 生理的 노화와 필연적이 아닌 질병환경조건 등의 Stress로 인해 노인기에 호발하는 노화인 病的 노화로 구분되는데, 일반적으로 노화라고 하면 生理的 노화를 뜻한다¹⁸⁾.

노화의 일반적 신체 증상으로는 손상 및 질병으로부터 회복되는데 오래 걸리고, 신체 활동이 저하되며, 체중의 증가 혹은 살이 찌는 느낌, 식욕 저하, 불면 증세 등이 있고, 성행위 도중의 발기 문제, 체모의 소실 혹은 감소, 골다공증, 근

력 저하 등이 있다. 그리고 심리적 및 정신적 증상으로는 예민해지고, 과감하게 결단을 내리지 못하며, 막연한 불안감 및 두려움을 호소하고, 그 외에도 우울한 기분이나 자신감 및 즐거움의 결여, 삶의 목적과 방향의 소실, 혼자이며 남들에게 사랑 받지 못한다는 느낌, 집중력 저하, 전망증 증가, 성적 욕구의 감소, 성행위의 대한 불안감 및 두려움, 성기능의 자신감 결여 등이 나타날 수 있다. 이렇듯 노화에 대한 증상은 신체적 증상 이외에 정신, 심리적 증상 등이 다양하게 나타나는데, 노화로 인해 발생하는 증상에 대한 현재까지의 연구결과를 보면 남성과 여성 모두에게서 연령의 증가에 따른 성호르몬 감소가 나타났다^{19,20)}. 여성의 경우 성호르몬 감소가 급격하게 발생하면서 폐경이라는 신체증상이 나타나기 때문에 이를 질병으로 인식, 연구하여 이에 대한 진단, 치료법이 많이 제

시되어 있지만, 남성은 성호르몬 감소가 20대부터 서서히 발생하기 때문에 성호르몬 감소로 발생하는 증상들을 질병으로 인식하지 못하였다. 하지만 최근 들어 이를 질병으로 인식하기 시작하면서 이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있지만, 아직까지 부족한 실정이다.

노화와 남성 호르몬과의 관계에 대해 일반적으로 연령 증가에 따른 고환의 leydig 세포의 기능 감소와 시상하부-뇌하수체-성선 축의 감수성 감소가 혈중 테스토스테론의 감소를 보상하지 못하여 남성호르몬의 결핍이 발생한다⁴⁾. 즉, 연령 증가에 따라 발생하는 신체 기능의 저하 중 생식기능에 관계하는 고환과 시상하부-뇌하수체-성선 축의 이상으로 남성호르몬 결핍이 발생하고 이로 인해 노화가 더욱 진행된다는 것이다. 또한 이미 노화를 예방하는 한 방법으로 폐경 이후 여성들에게 시행 중인 여성호르몬 치료처럼 노화가 진행 중인 40대 이후의 중노년 남성들에게 노화로 인한 생식기능 개선을 위해 남성호르몬 치료가 시행되고 있다는 사실로도 노화와 남성 호르몬이 밀접한 관계가 있다는 것을 확인할 수 있다. 이렇듯 노화의 진행으로 생식기능의 이상이 나타나고 있으며 노화에 대한 치료를 통해 생식기능 이상의 개선도 확인되었기에 이를 노화로 인한 생식기능 개선에 활용할 수 있을 것이라 생각하였다.

한의학적으로 《素問》의 上古天真論에 “天壽過度, 氣脈常通, 而腎氣有餘也”라 하였고⁸⁾, 虞는 “腎元盛則 壽延, 腎元衰則 壽夭”라 하여 腎氣와 수명의 연관성을 언급하고 있으며²¹⁾, 이후의 문헌들에서도 노화의 방지 및 수명연장의 원리

로 補益扶正, 補脾腎, 補腎益元, 調心補腎 등의 치료원칙을 제시하고 있다²²⁻⁴⁾. 즉, 한의학적 관점에서 보면 노화의 원인은 腎精不足, 腎氣虛로 볼 수 있고, 생식기능은 腎主藏精하여 腎精(腎氣)이 주관하는 기능이므로 노화와 생식기능의 이상 모두 腎精不足, 腎氣虛로 인해 발생한다고 할 수 있다.

白蠶蠶은 腎臟疾患의 치료^{10,11)}에 사용되었다고 알려져 있으므로, 腎精不足이나 腎氣虛로 인해 발생하는 생식기능 이상에도 효과가 있을 것이라 생각하였다. 따라서 白蠶蠶이 노화에 따른 생식기능 이상에 미치는 영향을 검증하기 위해 고환의 조직화학, 면역조직화학적 방법을 이용하여 실험을 진행하였다.

고환은 정세관 고리(loops of seminiferous tubule)로 구성되어 있고, 그 벽은 원시생식세포와 sertoli 세포로 구성되며, 정세관 사이에는 지방과립 및 leydig 세포가 존재한다. 정세관 벽에 위치하는 sertoli 세포는 생식세포에 필요한 성장조절인자들을 생산하고, 여러 hormone의 합성을 통해 정소가 정상적으로 발육하며 정소 내에서 정자형성과정이 원활하게 이루어지도록 하고, 정세관 사이에 위치하는 leydig 세포는 남성의 대표적 성스테로이드 호르몬인 테스토스테론을 합성하는 역할을 담당하고 있다²⁵⁾.

정자는 정세관 고리에서 원시생식세포로부터 형성되는데, 정세관의 기저판에 붙어있는 초기 생식세포인 정조세포가 청소년기에 제 1정모세포로 성숙되고, 제 1정모세포는 감수분열을 통해 제 2정모세포로 분화되며, 이어 정자세포를 거쳐 정자가 된다. 이러한 정자형성과정은 시상하부에서 분비된 생식선자극호르몬 방

출호르몬(gonadotropin releasing hormone)의 영향 하에 뇌하수체에서 합성 분비되는 난포자극호르몬(follicle stimulating hormone)과 황체화호르몬(luteinizing hormone)에 의해 조절된다. 이 때 LH는 leydig 세포에 주로 작용하여 테스토스테론의 분비를 자극하고, FSH는 sertoli 세포에 주로 작용하며 고환의 정자생성 기능을 유지시킨다²⁵⁻⁷⁾.

정자생성 효과를 알아보기 위한 실험 결과, 白僵蠶를 투여한 노화 생쥐에서는 白僵蠶를 투여하지 않은 노화 생쥐의 정세관보다 많은 생성정자와 sertoli 세포의 분포 증가가 관찰되었다. 이러한 결과는 白僵蠶이 고환의 정세관에서 정자 및 sertoli 세포의 생성을 증가시킴으로써 노화에 의한 생식기능 이상을 개선시킨다는 사실을 나타낸다. 이러한 사실은 정세관의 기저부에서 BrdU 양성반응을 보이는 정조세포가 白僵蠶의 투여로 인해 증가되었고, 정세관내에서 세포자멸사가 발생한 sertoli 세포는 白僵蠶의 투여로 감소되었다는 결과를 통해서도 확인할 수 있다.

Testosterone은 leydig 세포내 콜레스테롤과 부신피질로부터 분비되는 안드로스테네다이온으로부터 합성되는데²⁵⁾, Testis 내에서 testosterone은 17β -HSD 효소를 통한 androstenedione에서 testosterone으로의 전환이라는 마지막 단계를 거쳐서 최종 합성된다²⁸⁻³⁰⁾. 라이디히 세포에서 합성 분비된 테스토스테론은 정세관 내로 침투하고 세르톨리 세포에 존재하는 수용체에 작용함으로써 정자형성과정에서 매우 결정적인 역할을 담당하는데, 이 수용체를 androgen receptor(AR)라고 한다²⁵⁾.

白僵蠶의 남성호르몬 생성 효과를 알아보기 위해 실시한 실험에서 sertoli 세포내 AR 양성반응은 白僵蠶의 투여로 인해 白僵蠶를 투여하지 않은 생쥐에 비해 유의한 증가가 나타났고, leydig 세포에서 17β -HSD 양성반응도 白僵蠶의 투여로 인해 증가가 관찰되었다. 이는 白僵蠶이 testosterone의 생성과 작용을 증가시킴으로써 노화로 인한 생식기능 이상을 개선시키는 효과를 나타낸다는 사실을 보여준다.

보통 체내에 있는 활성산소가 노화의 주된 원인이 된다고 하는데, 활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 세포의 정상적인 산소대사 산물로, ROS의 생성과 제거기능 사이의 부조화로 몸에서 산화스트레스가 발생하게 된다. 또한 과도한 ROS의 생성은 세포의 단백질과 지방질 및 DNA를 손상시키는 산화적 손상을 초래하며^{31,32)}, 이 산화적 손상이 고환에서 발생하면 정자의 단백질 발현을 변형시키고, 정자의 DNA를 손상시켜 생식기능 이상을 발생하게 한다.

정세관 내강의 정자세포에서 관찰된 8-OHdG는 산화적 손상의 중요한 기전 중 하나인 세포핵과 미토콘드리아의 DNA 손상에 관여하는 물질이고³¹⁾ sertoli 세포에서 관찰된 Histone deacetylase(HDAC)는 chromatin 구조를 밀집시키고, DNA 전사수준을 감소시키는 효소이다³³⁾. 실험결과 白僵蠶의 투여로 고환의 정세관내에서 8-OHdG 양성반응과 sertoli 세포에서 HDAC1 양성반응이 각각 감소하였는데, 이는 白僵蠶이 고환에서 일어나는 DNA 손상 및 DNA 전사감소를 억제하여 산화스트레스를 감소시킴으로써 노화로 인한 생식기능 이상을 개선시킨다는 것을

나타낸다.

그리고 leydig 세포에서 관찰된 caspase는 세포자멸사에 관여하는 인자로, 지금까지 확인된 14종 중 caspase-3가 세포자멸사에 가장 중추적인 역할을 한다고 알려져 있다^{34,35}). 따라서 leydig 세포에서 caspase-3 양성반응이 白僵蠶에 의해 감소되었다는 것은 白僵蠶이 testosterone의 합성을 담당하고 있는 leydig 세포의 세포자멸사를 감소시켜 노화에 따른 생식기능의 이상을 개선시킨다는 사실을 나타낸다.

이상의 결과에 따르면, 白僵蠶은 고환 정세관에서 정자 생성을 증가시키고, leydig 세포와 sertoli 세포의 세포자멸사를 감소시키며, 고환내 testosterone의 생성 및 작용을 증가시키고, 고환의 DNA 손상 및 DNA 전사가 감소되는 것을 억제함으로써 노화로 인한 생식기능 이상을 개선시키는 것으로 생각된다.

V. 결 론

白僵蠶이 노화로 발생한 생식기능 이상에 미치는 영향을 알아보기 위해 조직화학 및 면역조직화학적 방법을 이용하여 연구를 진행하였다.

먼저 정자생성 효과를 알아보기 위한 실험결과, 白僵蠶을 투여한 노화 생쥐에서는 白僵蠶을 투여하지 않은 노화 생쥐의 정세관보다 많은 생성정자와 sertoli 세포의 분포 증가가 관찰되었고, 정세관의 기저부에서 BrdU 양성반응을 보이는 정조세포는 白僵蠶의 투여로 인해 증가되었으며, 정세관내에서 세포자멸사가 발생한 sertoli 세포는 白僵蠶의 투여로 감

소되었다.

또한 白僵蠶의 남성호르몬 생성 효과를 알아보기 위한 실험결과, sertoli 세포내 AR 양성반응은 白僵蠶의 투여로 인해 白僵蠶을 투여하지 않은 생쥐에 비해 유의하게 증가되었고, leydig 세포에서 17 β -HSD 양성반응도 白僵蠶의 투여로 인해 증가되었다.

마지막으로 白僵蠶이 고환의 산화스트레스에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험결과, 정세관 내강의 정자세포에서 8-OHdG 양성반응과 leydig 세포에서 caspase-3 양성반응, sertoli 세포에서 HDAC1 양성반응이 白僵蠶을 투여함으로써 노화된 생쥐에서보다 감소되었다.

위의 결과를 종합해보면, 白僵蠶은 고환 정세관에서 정자 생성을 증가시키고, leydig 세포와 sertoli 세포의 세포자멸사를 감소시키며, 고환내 testosterone의 생성 및 작용을 증가시키고, 고환의 DNA 손상 및 DNA 전사가 감소되는 것을 억제함으로써 노화로 인한 생식기능 이상을 개선시키는 것으로 생각된다.

Received : Dec 28, 2018

Revised : Jan 11, 2019

Accepted : Feb 22, 2019

감사의 글

이 논문은 2016학년도 세명대학교 교내학술연구비 지원에 의해 수행된 연구임.

References

1. Bae CY. Introduction to geriatrics.

1. Korean J Fam Med. 1990;11(2):1-7.
2. Korean Society of Dermatology Textbook Compilation Committee. Dermatology. Seoul:Ryomoongak. 1994:23-5.
3. Chopra D. Ageless body Timeless mind. Seoul: Mind book. 1994:21-2, 102-3.
4. Kang YG. The change of serum concentration of testosterone according to age and health behavior. Graduate school of health science and management Yonsei university. 2002.
5. Luo L, Chen H, Zirkin BR. Are Leydig cell steroidogenic enzymes differentially regulated with aging? J Androl. 1996; 17(5):509-15.
6. Wang C, et al. Male reproductive ageing: using the brown Norway rat as a model for man. Novartis Found Symp. 2002: 242:82-95.
7. Zhang Y, Ge R, Hardy MP. Androgen-forming stem Leydig cells: identification, function and therapeutic potential. Dis Markers. 2008;24(4-5):277-86.
8. Medical College of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine. Interpretation of the Yellow Emperor's Internal Classics. Shanghai:Shanghai Science and Technology Press. 1983:4-5.
9. Professor of physiology professor at Oriental Medical University. Human Physiology on Korean medicine. Seoul:Jipmoondang. 2016:290-2.
10. Shin MK. Clinical traditional herbology. Seoul:Younglimsa. 1992:663-4.
11. Kim CM, et al. The encyclopedia of oriental herbal medicine. Seoul:Jungdam books. 1998:2015-9.
12. Kwen IH, et al. Effect of Batryticatus bombycis extract on apoptosis in B16F10 cells. Korean J Oriental physiology & pathology. 2005;19(3):765-71.
13. Lee MH, Yoon CH, Jeong JC. Antioxidant action of Bombycis corpus extraction in renal tissues. Dongguk J the institute of oriental medicine. 1998;7(1):97-8.
14. Jang IJ, Koh HK, Kim CH. Studies of th effect of Aqua-acupuncture with gastrodiae rhizoma and bombycis corpus extract solution on the convulsion in mice. KH Univ o Med J. 1988;11 :175-82.
15. Jeong BM, et al. Effects of Bombycis corpus on streptozotocin-induced diabetic rats. Korean J Orient Int Med. 2004: 25(2):288-97.
16. Oh HC, et al. A study on the melanin synthesis inhibition and whitening effect of bombysis corpus. Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2007;20(3):1-13.
17. Whang KT, Han JH, Kang SY. Effect of batryticatus bombycis on the cerebral hemodynamics of rats. KOMP. 1999: 7(1):121-30.
18. Seo JG. Geriatric disease Geriatric pathology. Seoul:Korea medical book publishing company. 1992:10-4, 18-9.
19. Kaufman JM, Vermeulen A. Declining gonadal function in elderly men. Baillieres Clin Endocrinol Metab. 1997; 11(2):289-309.
20. Vermeulen A. Clinical review 24: Androgens in the aging male. J Clin Endocrinol

- Metab. 1991;73(2):221-4.
21. Wu B. Medical biography. Seoul: Seongbosa. 1986:9.
 22. Editorial Board of China Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine. Prevention of aging and principle of life extension. Chinese Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine. 1993;13(5):101-2.
 23. Kim KH. Preventive medicine of Oriental medicine. Seoul:Department of Preventive Medicine, College of Oriental Medicine, Kyunghee University. 1995:57-60, 139-46, 240-4.
 24. Lee CB. Traditional geriatrics. Hunan: Hunan Science and Technology Press. 1988:212-5.
 25. Translated by professors from national medical university. Review of medical physiology. Seoul:Hanwoori. 2002:456-66.
 26. Kim JM. Germ cell degeneration during mammalian spermatogenesis. Proceedings of the Korean Society of Animal Reproduction Conference. 2001;1:11-3.
 27. de Kretser DM, et al. The role of activin, follistatin and inhibin in testicular physiology. Mol Cell Endocrinol. 2004;225(1-2):57-64.
 28. Geissler WM et al. Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3. Nat Genet. 1994;7(1):34-9.
 29. O'Shaughnessy PJ, et al. Localization of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase /17-ketosteroid reductase isoform expression in the developing mouse testis-androstenedione is the major androgen secreted by fetal/neonatal leydig cells. Endocrinology. 2000;141(7):2631-7.
 30. O'Shaughnessy PJ, Baker PJ, Johnston H. The foetal Leydig cell-- differentiation, function and regulation. Int J Androl. 2006;29(1):90-5.
 31. Valko M, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(1):44-84.
 32. Valko M, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact. 2006;160(1):1-40.
 33. Momparler RL. Cancer epigenetics. Oncogene. 2003;22(42):6479-83.
 34. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. Biochem J. 1997;326(Pt 1):1-16.
 35. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007;35(4):495-516.