



Original Article / 원저

Hydrogen peroxide에 의해 유도된 남성 생식 세포 GC-1 cell에 미치는 五子衍宗丸의 효과 연구

장문석¹, 이호철², 이승호², 박성규^{1*}

¹경희대학교 한의과대학 처방제형학교실

²경희대학교 대학원 기초한의과학과

Study of Ojayeonjonghwan on hydrogen peroxide-induced oxidative stress in male reproductive GC-1 germ cell lines

Mun Seog Chang¹, Ho Chul Lee², Seung Ho Lee², and Seong Kyu Park^{1*}

¹Department of Prescriptionology, College of Korean Medicine, Kyung
Hee University

²Department of Science in Korean Medicine, College of Korean
Medicine, Graduate School, Kyung Hee University

ABSTRACT

Objectives : The purpose of this study was to investigate the antioxidant activity of water extract of Ojayeonjonghwan (OYH) in GC-1 germ cell lines.

Methods : DPPH radical scavenging activity and cell viability assays in GC-1 germ cell lines were performed. In addition, the protective effects of OYH against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in GC-1 germ cell lines were examined by measuring cell viability after H₂O₂ treatment. The formation of ROS and the antioxidant enzymes activity such as SOD and catalase were measured in the same condition.

Results : OYH scavenged DPPH radical dose-dependent manner and the IC₅₀ was 63.79 µg/ml. OYH showed no cytotoxicity at concentration of 1, 10, 100 µg/ml. The hydrogen peroxide-induced cytotoxicity of GC-1 germ cell lines was protected to 53.66% by OYH at concentration of 10 µg/ml. OYH effectively inhibited ROS production in GC-1 germ cell lines. Mn SOD and catalase protein expression were significantly increased in GC-1 germ cell lines, but Cu/Zn SOD protein expression was not significantly changed.

Conclusions : In conclusion, OYH has antioxidant activities against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in GC-1 germ cell lines.

Key words : water extract of Ojajeonjonghwan (OYH), GC-1 germ cell lines, cytotoxicity, MTT assay, superoxide dismutase (SOD), catalase activity.

I. 서론

五子衍宗丸은 朱震亨의 『丹溪心法·子嗣』에서 “男子精虛無子 陽事不舉”를 치료한다고 처음 수록되었다¹⁾. 『東醫寶鑑』에서는 『醫學入門』을 인용하였는데 약물 구성은 枸杞子 9兩, 免絲子 7兩, 覆盆子 5兩, 五味子 1兩, 車前子 3兩으로 변화 되었으며 陽脫痿弱, 精冷而薄으로 인한 男子無嗣에 사용하였다²⁾.

五子衍宗丸에 대한 선행 연구로서 五子衍宗丸의 항산화능에 대한 기존 연구에서는 흰쥐에서 활성산소의 생성을 막아 抗酸化能의 증진효과가 있음을 밝힌 바 있으며³⁾, cyclophosphamide로 유발된 수컷 생쥐의 생식 독성의 감소 효과⁴⁾ 및 白鼠에서의 성호르몬인 혈청 중 testosterone, estradiol의 증가 효과가 보고되었다⁵⁾. 또한, 五子衍宗丸과 그 성분인 gomisin-A는 항염증효과를 가지고 있음이 밝혀져서 전립선염 등에 활용이 가능한 임상적 치료근거가 연구된 바 있다⁶⁾. 이외에도 불임 쥐 모델에서의 heat shock protein 70, germ cell apoptosis의 발현에 五子衍宗丸(KH-204)의 효과에 대한 연구⁷⁾ 및 五子衍宗丸(KH-204)의 투여시 안정성 및 정자의 질에 대한 영향 연구⁸⁾, 五子衍宗丸(KH-204)의 androgen-deprived rats의 방광 보호효과에 대한 연구가 보고되었다⁹⁾. 그러나 五子衍宗丸이 남성생식세포를 구성하는 GC-1 cell의 산화적 스트레스에 미치는 효과에 대한 연구는 보고된 바가 없다. 이에 남성생식세포를 구성하는 GC-1 cell에 대하여 五子衍宗丸이 미치는 영향을 관찰하기 위하여 DPPH radical scavenging activity, cell viability, 산화적 스트레스 모델로서 hydrogen peroxide를 처리한 후 cytotoxicity에 대한 항산화 효과, ROS생성 억제효과, superoxide dismutase (SOD) activity, catalase activity에 미치는 영향을

측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 약재 및 시료의 제조

1) 약재

본 실험에서 사용된 枸杞子, 免絲子, 覆盆子, 五味子, 車前子는 각각 서울특별시 동대문구 제기동 경동 약령시장의 원광약업을 통하여 구입하여, 경희대학교 처방제형학 교실에서 외부형태를 비교 조사하여 확인한 후 사용하였으며, 일부는 경희대학교 한의과 대학 처방제형학 교실에 보관하였다.

2. Cell line 및 culture

1) 세포주 및 시약

실험에 사용된 세포주는 생쥐의 Spermatogonia (GC-1 spg)로서 America Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하였다. 본 실험을 위해서 fetal bovine serum (FBS; GIBCO BRL, USA), dulbecco's modified eagle medium (DMEM; GIBCO BRL, USA), trypsin-EDTA (GIBCO BRL, USA), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH; Sigma, USA), ascorbic acid (Sigma, 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), Anti-Cu/Zn SOD, Mn SOD (Stressgen, USA)와 Anti-Catalase (Abcam, UK) 등이 사용되었다. 본 실험에 사용된 기기는 rotary evaporatory (Eyela, Japan), freeze dryer (Cooling & Heating Systems,

*Corresponding author: Seong Kyu Park. Department of Prescriptionology, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, 26, Kyunghedae-ro, Dongdaemun-gu, Seoul, 02447, Republic of Korea.

Tel : +82-2-961-0330, Fax : +82-2-961-0536, E-mail : comskp@khu.ac.kr

•Received : November 28, 2020 / Revised : December 2, 2020 / Accepted : December 3, 2020



Korea), deep freezer (Revco, USA), microplate spectrophotometer (Molecular Devices, USA), CO₂ incubator (Sanyo, Japan), Fluorescence plate reader (ThermoFisher Scientific, USA) 등이다.

2. 실험 방법

1) 시료의 제조

五子衍種丸을 구성하는 약재의 비율은 『東醫寶鑑』을 참고하였으며, 한약명 학명 생약명과 용량을 표 1에 명시하였다 (Table 1). 枸杞子 36 g, 免絲子

28 g, 覆盆子 20 g, 車前子 12 g, 五味子 4 g으로 총 100 g을 정확하게 중량을 측정한 뒤 1차 증류수 2,000 ml에 넣어 90 분 동안 냉침하고, 환류추출기를 이용하여 100℃ 가까이 온도가 상승하여 탕액이 끓는 시점으로부터 90 분 동안 가열하여 추출한 다음, filter paper로 감압 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축액을 얻었다. 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 분말을 시료로 사용하였다. 동결건조 추출물(OYH001)은 30.54 g을 얻었으며, 수율은 30.54% 이었다.

Table. 1. Constituents of Ojayeonjonghwan (OYH)

| Botanical Name | Scientific Name | Dose (g) |
|--------------------------|-------------------------------------|----------|
| Fructus Lycii(枸杞子) | <i>Lycium barbarum</i> Linne | 36 |
| Semen Cuscutae(免絲子) | <i>Cuscuta chinensis</i> Lamark | 28 |
| Fructus Rubi(覆盆子) | <i>Rubus coreanum</i> Miquel | 20 |
| Semen Plantaginis(車前子) | <i>Plantago asiatica</i> Linne | 12 |
| Fructus Schisandrae(五味子) | <i>Schisandra chinensis</i> Baillon | 4 |
| Total | | 100 |

2) 세포 배양

GC-1 cell line은 37℃, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, penicillin (100 µg/ml), streptomycin (100 µg/ml)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다. GC-1 cell line은 75 cm² flask (Falcon, USA)에서 충분히 증식된 후 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 씻어준 후 50 ml flask 당 1 ml의 0.25% trypsin-EDTA 용액을 넣고 37℃에서 5 분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대 배양하였다. 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 ml에 부유시킨 다음 새로운 배양용기 (50 ml culture flask)에 옮겨 1 : 10의 split ratio로 CO₂ 배양기 (37℃, 5% CO₂)에서 배양하였다.

3) DPPH radical scavenging activity의 측정

DPPH radical scavenging activity를 알아보기 위하여 Tanaka¹⁰⁾의 방법을 응용하였다. 五子衍種丸의 동결건조된 시료를 증류수에 녹여서 1, 5, 10, 50, 100, 500 µg/ml의 농도로 시액을 제조하였다. 양성

대조군으로 시료와 같은 농도의 ascorbic acid를 사용하였다. 96 well microplate (Corning, USA)에 ethanol에 녹인 0.1 mM DPPH와 각 농도의 시액을 동량 첨가하여 잘 흔들어 섞어준 후, 실온에서 30 분간 방치한 후 microplate spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. Radical scavenging activity는 다음 공식으로 계산되었다. DPPH radical scavenging activity(%) = [(A_B-A_T)/A_B]×100,

4) Cell viability 측정

五子衍種丸이 Germ cell lines의 증식에 미치는 효과를 알아보기 위하여 Mosmann 등¹¹⁾의 방법을 응용하였다. 96 well plate에 1×10⁵ cells/ml의 cell을 100 µl씩 넣고 37℃, 5% CO₂ incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 PBS 용액으로 씻어주었다. 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 시료 1, 10, 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 제거한 후

DMSO를 200 μ l 처리한 후 37°C에서 2 시간 방치한 후 microplate spectrophotometer를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 다음 공식으로 계산되었다. Cell viability(%) = $100 \times A_T / A_C$, A_C : absorbance of control, A_T : absorbance of tested extract solution

5) Hydrogen peroxide-induced cytotoxicity 측정

Hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity에 대한 五子衍種丸의 보호효과를 알아보기 위해 MTT test를 응용하여 실험하였다¹¹⁾. 96 well plate에 1×10^5 cells/ml의 cell을 100 μ l씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 PBS 용액으로 씻어주었다. PBS에 녹인 각각의 시료 1, 10, 100 μ g/ml과 FBS free DMEM에 녹인 100 μ M H₂O₂ 을 각각의 well에 처리한 후 24 시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 배지를 버리고 PBS로 세척한 후 PBS에 녹인 5 mg/ml MTT 20 μ l와 FBS free DMEM 200 μ l을 각 well에 처리한 후 알루미늄호일로 차광한 뒤 4시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양액을 모두 제거 DMSO를 200 μ l 처리한 후 37°C에서 2 시간 방치 후 microplate spectrophotometer를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) Reactive oxygen species (ROS) 생성 측정

五子衍種丸의 hydrogen peroxide에 의한 ROS 생성 억제 효과를 알아보기 위해 ROS detection kit (Cell Biolabs, USA)의 manual을 이용하여 실험하였다. 농도별 五子衍種丸 (1, 10, 100 μ g/ml)과 100 μ M의 H₂O₂ 처리 후 100 μ l (100 μ M)의 DCF-DA를 첨가하여 37°C 조건에서 1시간 배양 하였다. Media를 제거하고 1X PBS 로 2회 세척 한 다음 새로운 serum free media 100 μ l와 2X Cell Lysis buffer 100 μ l를 넣어 상온에서 5분간 배양하였다. Mixture 150 μ l를 96 well plate에 옮겨 fluorescence plate reader (Fluoroskan Ascent 6-96 Well Plate Reader, ThermoFisher Scientific, USA) 485nm excitation, 530 nm emission wavelength에서 측정하였다.

7) SOD, Catalase protein expression 측정

Germ cell lines에 hydrogen peroxide를 처리한

후 농도별 시료를 처리하여 항산화 효소인 SOD Catalase protein 발현에 미치는 영향을 측정하였다. 100 mm tissue culture dish (BD Falcon, USA)에 10% FBS, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml)이 첨가된 DMEM 배지에 현탁된 3×10^5 cells/ml의 cell을 8 ml 씩 넣었다. 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 1X PBS 용액으로 씻어주었다. 1X PBS에 녹인 각각의 시료 1, 10, 100 μ g/ml과 FBS free DMEM에 녹인 100 μ M H₂O₂을 각각의 well에 처리하고 24 시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 세포를 1X PBS로 2 회 수세한 후 lysis buffer를 첨가하고 스크래퍼를 이용하여 긁어냈다. 이것을 1.5 ml의 eppendorf tube에 담아 12,000 \times g에서 10 분간 원심분리 하여 상층액을 취하고 상층액 중의 1 μ l를 취해 Bradford's method¹²⁾로 단백질을 정량하였다. 정량한 단백질 30 μ g을 10% Tris-glycine gel에 SDS-PAGE를 실시하였다. SDS-PAGE후 gel를 nitrocellulose membrane에 120 mA에서 1시간 동안 transfer를 실시한 후 membrane은 5% skim milk를 이용하여 1시간 실온에서 blocking하였다. primary antibody인 Anti-Cu/Zn SOD, Mn SOD (Stressgen, USA)와 Anti-Catalase (Abcam, UK)는 1: 1000의 농도로 4°C에서 overnight하여 반응시킨 후 T-PBS로 membrane을 washing하고 secondary antibody로 실온에서 2시간 반응하였다. 반응이 끝난 membrane을 ECL kit으로 반응 후 X-ray film (Agpa, Belgium)을 이용하여 develop하였다.

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. 결과

1. 五子衍種丸의 DPPH radical 소거 활성

五子衍種丸의 농도에 따른 DPPH radical 소거 활성을 측정한 결과, ascorbic acid와 五子衍種丸은 모두 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 활성이 증가

하였다. 五子衍種丸은 각각 1, 5, 10, 50, 100, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 0, 4.45, 9.8, 47.04, 78.37, 84.93%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다 (Fig. 1). Dose-response curve로부터 산출된 50%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내는 화합물의 농도 (IC_{50})는 ascorbic acid는 4.63 $\mu\text{g/ml}$, 五子衍種丸은 63.79 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.

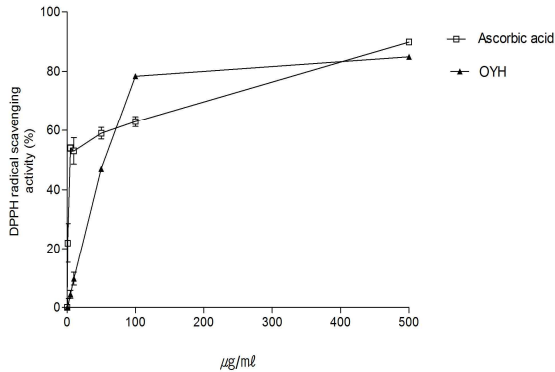


Fig. 1. DPPH radical-scavenging activity of Ojayeonjonghwan (OYH). Values indicate mean \pm S.E. of three replications.

2. 五子衍種丸이 생식세포의 cell viability에 미치는 영향

五子衍種丸이 생식세포의 성장 및 증식에 미치는 영향을 측정하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. 五子衍種丸은 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 GC-1 cell 생존율은 각각 102.71, 117.34, 113.65%로 나타났다. GC-1 세포에서 五子衍種丸의 유의미한 세포독성은 나타나지 않았다 (Fig. 2).

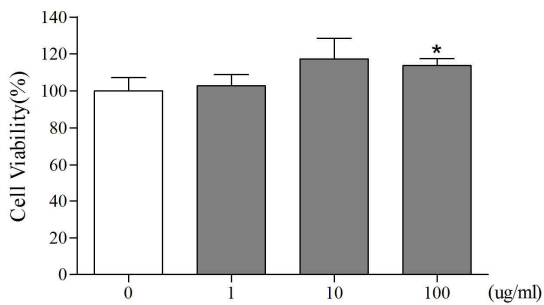


Fig. 2. Effect of Ojayeonjonghwan (OYH) on the viability of GC-1 cell lines. GC-1 cell

lines were treated with OYH at 37°C for 24 h. Each columns or points represent mean \pm S.E. ($n = 3$). * significantly different from the normal value (*: $p < 0.05$).

3. Hydrogen peroxide로 유도된 cytotoxicity에 대한 五子衍種丸의 항산화효과

GC-1 cell에 대한 cell viability 결과에 근거하여 hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity를 측정하였다. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 GC-1 cell은 정상군에 비하여 각각 36.65%로 유의하게 cell viability가 감소하였다 ($p < 0.001$, Fig. 3). Hydrogen peroxide에 의해 유도된 GC-1 cell에 대하여 五子衍種丸은 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 53.66%의 보호 효과를 나타내었다 ($p < 0.05$).

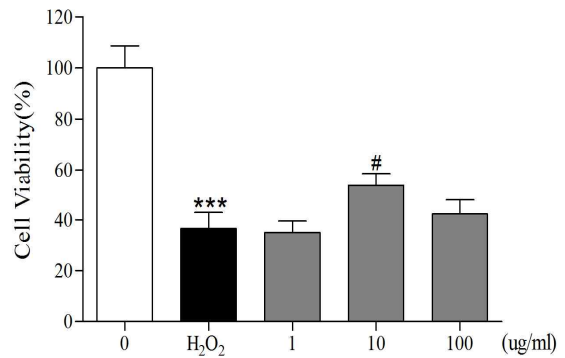


Fig. 3. Effect of Ojayeonjonghwan (OYH) on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity of GC-1 cell lines. GC-1 cell lines treated with OYH were incubated in the presence of 100 μM H_2O_2 at 37°C for 24 h. Each columns or points represent mean \pm S.E. ($n = 3$). * significantly different from the normal value (***: $p < 0.001$). # significantly different from the control value (#: $p < 0.05$).

4. 五子衍種丸이 ROS 생성에 미치는 영향

GC-1 cell에서 정상군에 비해 대조군의 ROS 생성이 유의하게 증가하였으며 (380.6 vs. 553.15 unit, $p < 0.01$) 五子衍種丸은 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에

서 각각 382.86, 461.11, 369.54 unit을 나타내어 대조군에 비해 ROS 생성이 억제됨을 알 수 있었다 ($p < 0.001$, Fig. 4).

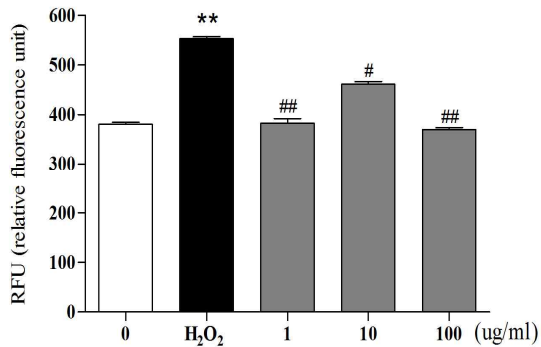


Fig. 4. Effect of Ojayeonjonghwan (OYH) on hydrogen peroxide-induced ROS production of GC-1 cell lines. GC-1 cell lines treated with OYH were incubated in the presence of 100 μ M H₂O₂ at 37°C for 24 h. Total cell lysate from cultured cells were analyzed for ROS production. Each columns or points represent mean \pm S.E. (n = 3). * significantly different from the normal value (**: $p < 0.01$). # significantly different from the control value (: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$).

5. 五子衍種丸이 Cu/Zn SOD, Mn SOD, Catalase protein 발현에 미치는 영향

활성산소들은 분해하는 효소인 Cu/Zn SOD, Mn SOD, catalase의 활성도 측정을 위해 Western blot 을 실시하였다. GC-1 cell에서 五子衍種丸은 10, 100 μ g/ml의 농도에서 hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 대조군에 비해 Mn SOD, catalase 효소의 protein 발현을 증가시켰다.

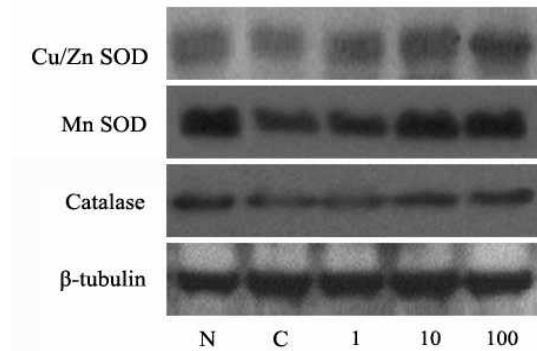


Fig. 5. Effect of OYH on Cu/Zn SOD, Mn SOD and Catalase proteins expression in GC-1 cell lines. Analysis of western blotting was done on Cu/Zn SOD, Mn SOD, Catalase and β -tubulin antibody. Normal is vehicle treated group. Control is hydrogen peroxide (100 μ M) treated group. GC-1 cell lines treated with OYH (1, 10, 100 μ g/ml) were incubated in the presence of 100 μ M H₂O₂ at 37°C for 24 h. β -tubulin was used as internal control.

IV. 고찰

정자형성과정의 장애요인 중 최근 중요하게 다루어 지는 것이 활성산소이며 다양한 연구결과에 의하여 활성산소가 정자의 기능적 이상을 유발하는 다양한 근거가 제시되고 있다. 체내에서는 생화학적 산화반응을 통하여 에너지를 공급받게 되는데, 이 과정에서 free radical을 갖는 활성산소(reactive oxygen species, ROS)가 발생하게 마련이다. 이러한 것들에 대하여 스스로 방어기구로써 superoxide dismutase (SOD), catalase, peroxidase 등의 항산화효소와 함께 vitamin E, vitamin C, glutathione, ubiquinone, 요산 등과 같은 항산화 물질들이 과산화물로부터 신체를 보호하게 된다. 하지만 이와 같은 방어기전에 이상이 생기거나 다른 물리적, 화학적 이유로 인하여 활성산소가 지나치게 생성이 되면 산화적 스트레스(oxidative stress)가 생기는 것이다¹³⁾.

韓醫學에서 남성불임의 원인에 따른 처방을 살펴보



면 腎陽虛에는 五子衍宗丸, 右歸飲, 腎陰虛에는 六味地黃丸, 知白地黃丸, 肝鬱氣滯에 逍遙散, 痰濕內蘊에 蒼朮導痰湯, 萆薢分清飲, 氣血兩虛에 八珍湯, 氣滯血鬱에 小腹逐瘀湯, 脾腎兩虛에 十子六君湯, 脾腎雙補丸 등이 주로 활용되었는데 대체로 腎虛로 인한 不育이 가장 많고 특히 腎陽虛로 인한 不育이 가장 많았다. 腎陽虛와 腎陰虛의 기본 처방은 五子衍宗丸이었으며 그 밖의 不育의 치료에도 五子衍宗丸이 가미되었음을 볼 수 있다¹⁴⁾. 五子衍宗丸은 朱震亨의 『丹溪心法·子嗣』에 처음 수록되었으며¹⁾, 『攝生衆妙方』에는 枸杞子 8兩, 免絲子 8兩, 五味子, 車前子 2兩, 覆盆子 4兩으로 구성되어, 효능은 男服此藥, 積精補髓, 疏利腎氣, 種子라고 하였으며, 『中醫藥典』에 의한 주치는 腎虛腰痛, 尿後余瀝, 遺精早泄, 陰痿不育으로 되어있다¹⁵⁾. 『醫學入門』에서는 枸杞子, 免絲子 각 8兩, 五味子 1兩, 覆盆子 4兩, 車前子 2兩으로 五味子の 용량이 감소하는데 효능은 添精補髓, 疏利腎氣이라 하였다¹⁶⁾. 『東醫寶鑑』에서는 약물 구성이 枸杞子 9兩, 免絲子 7兩, 覆盆子 5兩, 五味子 1兩, 車前子 3兩으로 변화되어 있으며 陽脫痿弱, 精冷而薄으로 인한 男子無嗣에 사용한다고 하였다²⁾.

五子衍種丸의 DPPH radical 소거 활성을 측정된 결과 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 활성이 증가하였다. 50%의 DPPH radical 소거 활성을 나타내는 화합물의 농도(IC₅₀)는 五子衍種丸은 63.79 μg/ml를 나타냈으며 100 μg/ml 농도에서는 78.37%의 높은 소거율을 나타내었는데 이는 기존의 연구에서 김의¹⁷⁾ 右歸飲, 최의¹⁸⁾ 八味地黃丸와 같은 腎虛로 인한 불임증에 사용된 처방보다 높은 소거율을 보여주었다. 五子衍種丸이 생식세포의 cell viability에 미치는 효과를 알아보기 위하여 MTT assay를 수행한 결과 GC-1 세포에서 五子衍種丸의 세포독성은 나타나지 않았다. GC-1 cell에 대한 cell viability 결과에 근거하여, hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity를 측정된 결과 hydrogen peroxide에 의해 유도된 GC-1은 정상군에 비하여 36.65%로 유의하게 cell viability가 감소하였으나, hydrogen peroxide에 의해 유도된 GC-1 cell에 대하여 五子衍種丸은 10 μg/ml의 농도에서 cell viability가 53.66%의 유의한 보호 효과가 있는 것으로 나타났다. GC-1 cell에서 정상군에 비해 대조군의 ROS 생성이 유의하게 증가하였으며 (380.6 vs. 553.15 unit, p < 0.01), 대조군에 비

해 五子衍種丸은 1, 10, 100 μg/ml의 농도에서 각각 382.86, 461.11, 369.54 unit을 나타내어 ROS 생성이 억제됨을 알 수 있었다. 활성산소들은 분해하는 효소인 Cu/Zn SOD, Mn SOD, catalase의 활성도 측정을 위해 Western blot을 실시하였다. Cu/Zn SOD에서 정상군과 대조군의 protein 발현이 명확하게 나타나지 않았으므로 五子衍種丸의 효과를 비교할 수 없었다. GC-1 cell에서 Mn SOD 및 catalase 효소의 protein 발현은 정상군에 비해 대조군에서 유의하게 감소하였으며, 五子衍種丸은 10, 100 μg/ml의 농도에서 대조군에 비해 Mn SOD 및 catalase 효소의 protein 발현이 증가하였다.

이상의 실험결과 五子衍宗丸은 DPPH radical 소거 활성이 있으며, GC-1 cell에 대한 세포독성이 나타나지 않았고, hydrogen peroxide에 의해 유발된 GC-1 cell의 산화 스트레스에 대하여 유의한 cell viability 보호 효과와 ROS 생성을 억제하였으며, Mn SOD 및 catalase 효소의 protein 발현이 증가하였다. 이로써 五子衍宗丸은 산화물질로부터 남성 생식세포를 보호하는 기전이 확인되었다.

V. 결론

男子精虛無子, 陽事不舉의 치료에 활용되고 있는 五子衍種丸이 남성불임에 미치는 기전을 밝히기 위하여, 정자 발생과정 상 B type의 정원세포 (spermatogonia)와 제 1정모세포 (primary spermatocytes) 사이에 속하는 GC-1 spg cell에 미치는 항산화작용을 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 五子衍種丸은 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 활성을 증가시켰다.
2. GC-1 spg cell에 대한 cell viability를 측정한 결과 五子衍種丸은 최대 100 μg/ml의 농도에서 세포독성이 나타나지 않았다.
3. Hydrogen peroxide에 의해 유도된 cytotoxicity에 대하여 五子衍種丸은 유의하게 GC-1 spg cell의 생존율을 증가시켰다.
4. Hydrogen peroxide에 의해 산화가 유도된 GC-1 spg cell에서 五子衍種丸은 ROS 생성을 억제하였다.
5. 五子衍種丸은 hydrogen peroxide에 의해 산화가

유도된 GC-1 spg cell에서 Mn SOD와 catalase의 단백질 발현량을 증가시켰으며, Cu/Zn SOD의 단백질 발현량은 유의한 변화가 나타나지 않았다.

이에 五子衍種丸은 남성생식세포 중 GC-1 spg cell에 대하여 항산화효과를 가지며, 산화작용에 의한 남성불임의 치료에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

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

References

1. Ju D. Dangyesimbeop(Buyeo). Daeseongmunhwasa. 1990:763-770.
2. Huh J. Donguibogam. Namsandang. 1994:603.
3. Kim KH, Ding GX, Kim KH, Ko SG. Effect of Ojayeonjonghwan on Antioxidant Capacity in D-galactose Induced Aging Rats. The Journal of Oriental Medical Preventive. 2005;09(1):49-63.
4. Yoon J. Effects of Ojayeonjong-hwan on Cyclophosphamide-induced Reproductive Toxicity in Male Mice. Kyung Hee University Graduate School. 2013.
5. Chung IM, Kang SB. The Effects of "Ojayeonjonghwan" on the Secretion of Sex hormones and the Antifatigue in Rats. The journal of Jehan Oriental Medical Academy. 1998;3(1):16-231.
6. Kim KY. Anti-inflammatory Effects of Ojayeonjonghwan And Its Component, Gomisin-A. Kyung Hee University Graduate School. 2010.
7. Bae WJ, Ha US, Kim KS, Kim SJ, Cho HJ, Hong SH, Lee JY, Wang Z, Hwang SY, Kim SW. Effects of KH-204 on the expression of heat shock protein 70 and germ cell apoptosis in infertility rat models. BMC Complement Altern Med. 2014;14:367.
8. Kim SJ, Kim MR, Hwang SY, Bae WJ, Kim S, Hong SH, Lee JY, Hwang TK, Wang Z, Kim SW. Preliminary Report on the Safety of a New Herbal Formula and Its Effect on Sprerm Quality. World J Mens Health. 2013;31(3):254-261.
9. Bae WJ, Ha US, Choi JiB, Kim KS, Kim SJ, Cho HJ, Hong SH, Lee JY, Wang Z, Hwang SY and Kim SW. Protective Effects of KH-204 in the Bladder of Androgen-Deprived Rats. World J Mens Health. 2015;33(2):73-80.
10. Tanaka N, Nishikawa K, Ishimaru K. Antioxidative capacity of extracts and constituents in Cornus capitata adventitious roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003;51(20):5906-5910.
11. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
12. Bradfor MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72:248-254.
13. Yagi K. Lipid peroxide, free radicals and disease. In:Yagi K, editor.: Active oxygens, lipid peroxides and antioxidants. Boca Raton: CRC Press. 1993:1-38.
14. Kim GS, Seo UK, Jeong JC. Studying documents & papers on the cure of male sterility. The Journal of Dong Guk Oriental Medicine. 1994;3:151-162.
15. Namgyeongjunguihagwon. Junguibangjedaesajeon(2). Bukgyeong: Inminwisaengchulpansa. 1994:415.
16. Ri C. Singyopyeonjuuihagimmun. Daeseongmunhwasa. 1996:568.
17. Kim SH. The antioxidant activity of Woogyuyeum on leydig TM3 cell . Kyung Hee University Graduate School. 2010.
18. Choi JH. Antioxidant effect of Palmijihwangtang on male reproductive cells. Kyung Hee University Graduate School. 2010.