

## 우고닌(Wogonin)이 poly I:C로 유발된 TM4세포 내 하이드로젠퍼록사이드 생성에 미치는 영향

박완수<sup>#\*</sup>

가천대학교 한의과대학 병리학교실

### Effect of Wogonin on Intracellular Hydrogen Peroxide Production of TM4 Mouse Sertoli cells stressed with polyinosinic:polycytidylic acid

Wansu Park<sup>#\*</sup>

Department of Pathology, College of Korean Medicine, Gachon University, Seongnam 13120, Republic of Korea

#### ABSTRACT

**Objectives** : The aim of this study is to investigate the effect of wogonin on the production of hydrogen peroxide in polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C)-stimulated TM4 mouse sertoli cells.

**Methods** : TM4 were treated with poly I:C (50 ug/mL) and wogonin at concentrations of 5, 10, 25, and 50  $\mu$ M for 30 min, 2 hr, 12 hr, 18 hr, and 24 hr. The production of intracellular hydrogen peroxide was measured by dihydrorhodamine 123 assay.

**Results** : For 30 min, 2 hr, 12 hr, 18 hr, and 24 hr treatment, wogonin significantly inhibited intracellular hydrogen peroxide productions of TM4 at the concentration of 5, 10, 25, and 50  $\mu$ M ( $p < 0.05$ ). In details, production of hydrogen peroxide in poly I:C-stimulated TM4 treated for 30 min with wogonin at concentrations of 5, 10, 25, and 50  $\mu$ M was 95.67%, 92.69%, 92.05%, and 91.97% of the control group treated with poly I:C only, respectively; the production of hydrogen peroxide for 2 hr was 94.44%, 94.41%, 93%, and 92.98%, respectively; production of hydrogen peroxide for 12 hr was 96.78%, 95.32%, 94.33%, and 93.17%, respectively; production of hydrogen peroxide for 18 hr was 94.7%, 93.4%, 93.38%, and 93.35%, respectively; and production of hydrogen peroxide for 24 hr was 95.75%, 94.77%, 94.58%, and 92.8%, respectively.

**Conclusions** : Wogonin might have anti-viral property related with its inhibition of intracellular hydrogen peroxide production in poly I:C-stimulated TM4 cells.

**Key words** : Sertoli Cell, TM4, poly I:C, Wogonin, Hydrogen Peroxide, Reactive Oxygen Species

## I. 서 론

우고닌(wogonin; 5,7-Dihydroxy-8-methoxyflavone; Figure 1)은 O-methylated flavone(methoxyflavonoids)의 한 종류로서 분자식은  $C_{16}H_{12}O_5$ 이며 황금(黃芩; Scutellaria Radix)의 주요 성분 중 하나이다.<sup>1)</sup> 2002년도에 발표된 Hui

등<sup>1)</sup>의 보고에 의하면, 우고닌은 감마-아미노부트릭산(에이) 수용기복합체(가바수용기복합체, GABA receptor complex)의 벤조디아제핀 자리(benzodiazepine site)에 작용함으로써 가바수용기복합체의 양성적 알로스테릭성 변조를 일으키고, 그를 통하여 항불안작용을 나타내지만, 이러한 항불안작용은 진정 제성부작용(sedative side effect)이나 근이완성부작용

\*#Corresponding and First author: Wansu Park, Department of Pathology, College of Korean Medicine, Gachon University, Seongnam 13120, Republic of Korea.

· Tel : +82-31-750-8821 · Fax : +82-31-750-8821 · E-mail : HANGL98@naver.com  
· Received : 25 August 2021 · Revised : 13 September 2021 · Accepted : 25 September 2021

(myorelaxant side effect)을 수반하지는 않는 것으로 나타났다.<sup>1)</sup> 이와같은 항불안작용 외에도 항염증작용, 항알러지작용 등의 다양한 우고닌의 의학적 효능에 대해 생의학적 실험연구와 임상연구가 지속적으로 이루어져 오고 있다.<sup>2)</sup> 즉, 우고닌에 대해서 항염증작용 이외에도 항산화효과, 항바이러스작용, 항혈전작용을 가지고 있으며 세포자살사와 소포체스트레스(endoplasmic reticulum stress; ER stress)를 완화하고, 심혈관질환치료에 대한 가능성과 당뇨병치료에 대한 가능성도 제기된 바 있다.<sup>2)</sup> 이와 같이 우고닌에 대한 다양한 생의학적 효능·활성에 대한 많은 보고가 이루어져왔지만, 버팀목세포(sertoli cell)에 대한 우고닌의 생리활성에 대한 연구는 아직까지 발표된 바 없다.

최근에 전세계적인 유행병(pandemic)으로서 인류사회를 크게 괴롭히고 있는 코로나19 바이러스 감염병(COVID-19)의 경우처럼, 바이러스성감염질환은 많은 바이러스치료제의 개발에도 불구하고 여전히 인류의 건강을 심각하게 위협하고 있다. 대부분의 바이러스는 감염이후 숙주세포내에서 증식을 하게 되며, 바이러스의 증식과정에서 자연스럽게 이중가닥알엔에이(double-stranded RNA; dsRNA)가 증가하게 된다. 이렇게 증가된 이중가닥알엔에이는 대식세포 등의 면역세포에서 염증 반응을 일으키게 되면서 바이러스성감염증의 예후를 악화시킨다.<sup>3-5)</sup> 그러므로 많은 연구들이 이중가닥알엔에이의 합성 유사물(a synthetic analog of double-stranded RNA)인 폴리아이씨(polyinosinic:polycytidylic acid, poly I:C)를 이용한 바이러스성감염증실험모델을 이용하여 항바이러스성 물질에 대한 실험결과를 보고하고 있다.<sup>6-7)</sup> 폴리아이씨는 B세포, 대식세포(macrophages), 수지상세포(dendritic cells)의 엔도솜의 막(endosomal membrane)에 있으면서 선천성면역과 관련된되는 중요막단백질 중 하나인 톨유사수용체3(toll-like receptor 3, TLR3)와 작용하여 각종의 면역염증반응을 일으킨다.<sup>8)</sup> 톨유사수용체(TLR)는 감염체-연관 분자패턴(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 또는 세포사멸·손상-연관 분자패턴(damage-associated molecular patterns, DAMPs)을 인지하는 대표적인 패턴인식수용체(patten recognition receptor, PRR) 중 하나로서, 선천성면역의 중요한 역할을 담당하고 있다.<sup>9)</sup> 특히 폴리아이씨로 자극 받은 대식세포의 활성산소종(reactive oxygen species; ROS) 생성과 관련하여 톨유사수용체3의 역할에 대한 연구는 지속적으로 보고되고 있는데, 2003년에 Yang 등<sup>9)</sup>은 폴리아이씨로 자극 받은 대식세포에서 톨유사수용체3신호경로를 통하여 세포내 활성산소종이 급속히 증가되며, 이러한 급속한 세포내 활성산소종의 증가는 핵인자카파비(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- $\kappa$ B)와 인터페론조절인자3(interferon regulatory factor 3, IRF3) 등의 전사인자를 작동시켜 종양괴사인자-알파(tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )와 인터페론-베타(interferon- $\beta$ , IFN- $\beta$ )의 생성을 촉진하고, STAT1의 활성화와 핵내이동을 일으킴으로써 다양한 염증매개인자의 발현을 촉진한다는 것을 밝힘으로써 톨유사수용체3신호경로가 바이러스감염에 대응하는 선천성면역반응과 염증반응에 있어서 중요한 작용을 한다는 것을 발표한 바 있다.<sup>9)</sup>

코로나19 바이러스감염병과 관련하여, 최근의 연구에서

Shen 등<sup>10)</sup>은 코로나19 바이러스감염으로 남성생식장애가 발생할 수 있다는 것에 대하여 보고하였는데, 특히 이러한 남성생식장애가 버팀목세포(sertoli cells)와 생식세포(germ cells)가 발현하는 에이스2(Angiotensin converting enzyme 2, Ace2)와 코로나19바이러스(severe acute respiratory syndrome-coronavirus 2, SARS-CoV-2)의 결합으로 인해 발생함을 밝혀냈다.<sup>10)</sup> 즉 남성생식과 관련된 라이디히세포(Leydig cells)와 버팀목세포(Sertoli cells) 모두 에이스2를 많이 발현하기 때문에 코로나19바이러스와 같은 코로나바이러스와의 결합이 쉽게 일어나고, 결과적으로 남성생식장애 등의 문제점이 코로나19 바이러스감염병의 남성환자에게서 쉽게 발생할 수 있다는 것이다.<sup>11)</sup> 코로나19 바이러스감염병의 심각성을 고려할 때, 에이스2발현세포로 잘 알려져 있는 버팀목세포에 작용하는 이중가닥알엔에이의 산화스트레스를 완화할 수 있는 물질에 대한 연구 또한 의미가 작지 않을 것이다.

본 연구에서는 이중가닥알엔에이(dsRNA)의 합성유사물인 폴리아이씨로 유발된 TM4 mouse sertoli cells의 하이드로젠 퍼록사이드 생성에 미치는 영향에 대하여 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

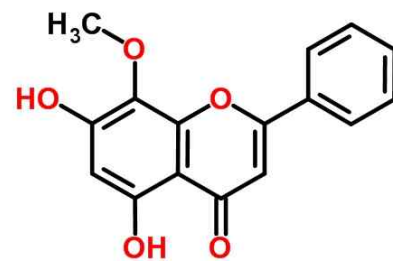


Figure 1. Structural formula of Wogonin.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시약

본 실험에 사용된 시약 중 wogonin, poly I:C와 indomethacin, dihydrorhodamine 123 등은 시그마사(Sigma-Aldrich, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 세포 배양에는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), heat-inactivated fetal bovine serum(FBS) 등을 써뮌피셔 싸이언티픽사(Thermo Fisher Scientific, USA)로부터 구입하여 사용되었다.

#### 2) 기기

실험에 사용된 주요 기기는 CO<sub>2</sub> incubator(NUAIRE, USA), clean bench(Jeiothec, Korea), Inverted Research Microscope(CK2, Olympus, Japan), centrifuge(Gyrozen, Korea), 형광분광기(TRIAD LT spectrofluorometer, Dynex, USA) 등이다.

2. 방법

1) 세포주

실험에 사용된 세포주는 생쥐 버팀목세포에 해당하는 TM4 cell line이며, 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 구입하였다.

2) 세포 배양

세포의 배양은 선행연구<sup>12-13)</sup>의 방법에 따라 실시하였으며, 세포들은 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 10% FBS, penicillin(100 U/mL), streptomycin(100 µg/mL)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다.

3) Dihydrorhodamine 123(DHR) assay

우고닌이 세포 내의 hydrogen peroxide 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Crow 등<sup>14-16)</sup>의 방법을 응용, dihydrorhodamine 123(DHR) assay를 실시했다. 96 well plate에 well 당 10,000개의 세포들을 분주하고, 24시간 동안 안정화하였다. 안정화가 된 세포에 DHR(10 µM)이 담긴 배지를 30분간 처리한 뒤 배지를 제거하였다. 그리고 다양한 농도의 시료들을 배지에 담아 각 well에 처리하고 30분과 2 · 12 · 18 · 24시간 동안 배양한 후 형광분광기(excitation filter 485 nm and emission filter 535 nm)를 이용하여 세포내 하이드로젠 퍼록사이드 생성량을 측정하였다.

3. 통계처리

실험적정은 평균±표준편차(Mean±SD)로 표시되었으며, 대조군과 각 실험군의 평균 차이는 ANOVA test와 Student t-test로 통계적 유의성을 분석하였다. 유의성을 분석한 결과 p < 0.05일 때 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 우고닌의 30분 배양이 TM4 세포의 하이드로젠 퍼록사이드 생성 미치는 영향

우고닌(5, 10, 25, 500 µM)으로 30분 동안 처리한 TM4 세포의 하이드로젠 퍼록사이드 생성을 측정한 결과, 5, 10, 25, 500 µM의 농도에서 대조군(poly I:C만 처리한 군) 대비 각각 95.67 ± 4.12%, 92.69 ± 4.53%, 92.05 ± 4.45%, 91.97 ± 4.71%로서 유의한 억제 효과를 나타내었다(Figure 2).

2. 우고닌의 2시간 배양이 TM4 세포의 하이드로젠 퍼록사이드 생성 미치는 영향

우고닌(5, 10, 25, 500 µM)으로 2시간 동안 처리한 TM4 세포의 하이드로젠 퍼록사이드 생성을 측정한 결과, 5, 10, 25, 500 µM의 농도에서 대조군(poly I:C만 처리한 군) 대비 각각 94.44 ± 4.66%, 94.41 ± 4.33%, 93 ± 3.04%, 92.98 ± 3.91%로서 유의한 억제 효과를 나타내었다(Figure 3).

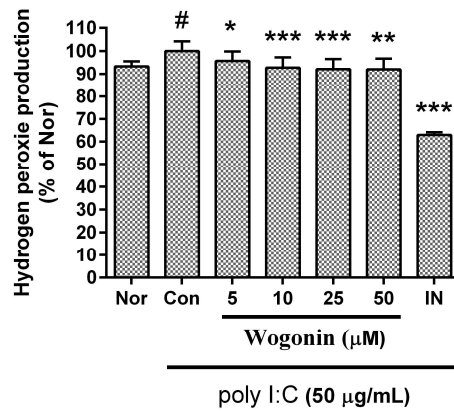


Figure 2. Effect of Wogonin on hydrogen peroxide production of TM4 cells stimulated by poly I:C for 30 min treatment. Data represent Mean±SD (n=3). Nor, the group incubated with media only. Con, the group treated with 50 µg/mL poly I:C alone. IN denotes indomethacin (0.5 µM). # represents p < 0.001 vs. Nor; \* p < 0.05 vs. Con; \*\* p < 0.01 vs. Con; \*\*\* p < 0.001 vs. Con.

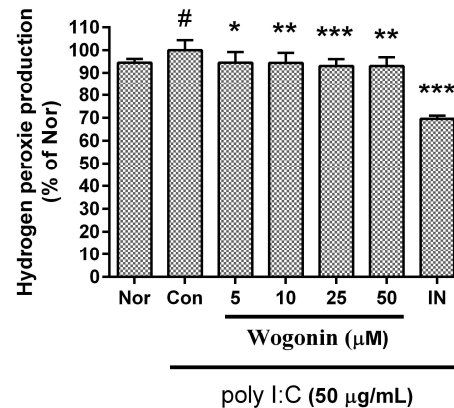


Figure 3. Effect of Wogonin on hydrogen peroxide production of TM4 cells stimulated by poly I:C for 2 hr treatment. Data represent Mean±SD (n=3). Nor, the group incubated with media only. Con, the group treated with 50 µg/mL poly I:C alone. IN denotes indomethacin (0.5 µM). # represents p < 0.001 vs. Nor; \* p < 0.05 vs. Con; \*\* p < 0.01 vs. Con; \*\*\* p < 0.001 vs. Con.

3. 우고닌의 12시간 배양이 TM4 세포의 하이드로젠 퍼록사이드 생성 미치는 영향

우고닌(5, 10, 25, 500 µM)으로 12시간 동안 처리한 TM4 세포의 하이드로젠 퍼록사이드 생성을 측정한 결과, 5, 10, 25, 500 µM의 농도에서 대조군(poly I:C만 처리한 군) 대비 각각 96.78 ± 3.59%, 95.32 ± 3.55%, 94.33 ± 3.09%, 93.17 ± 3.6%로서 유의한 억제 효과를 나타내었다(Figure 4).

4. 우고닌의 18시간 배양이 TM4 세포의 하이드로젠 퍼록사이드 생성 미치는 영향

우고닌(5, 10, 25, 500 µM)으로 18시간 동안 처리한 TM4 세포의 하이드로젠 퍼록사이드 생성을 측정한 결과, 5, 10, 25, 500 µM의 농도에서 대조군(poly I:C만 처리한 군) 대비 각각 94.7 ± 3.79%, 93.4 ± 3.75%, 93.38 ± 2.77%, 93.35 ± 2.82%로서 유의한 억제 효과를 나타내었다(Figure 5).

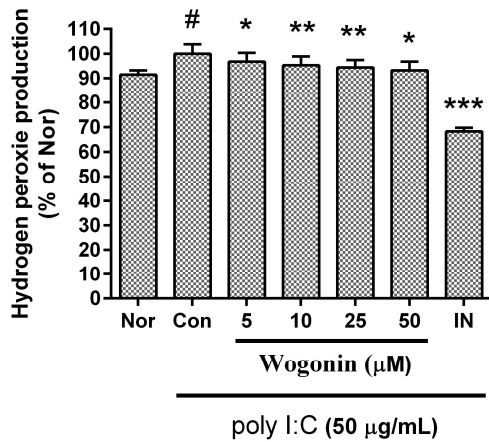


Figure 4. Effect of Wogonin on hydrogen peroxide production of TM4 cells stimulated by poly I:C for 12 hr treatment. Data represent Mean±SD (n=3). Nor, the group incubated with media only. Con, the group treated with 50 μg/mL poly I:C alone. IN denotes indomethacin (0.5 μM). # represents  $p < 0.001$  vs. Nor; \*  $p < 0.05$  vs. Con; \*\*  $p < 0.01$  vs. Con; \*\*\*  $p < 0.001$  vs. Con.

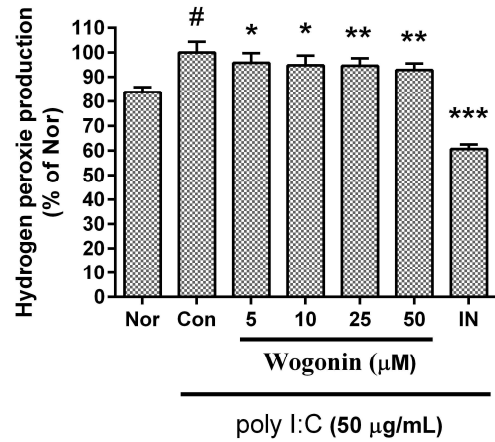


Figure 6. Effect of Wogonin on hydrogen peroxide production of TM4 cells stimulated by poly I:C for 24 hr treatment. Data represent Mean±SD (n=3). Nor, the group incubated with media only. Con, the group treated with 50 μg/mL poly I:C alone. IN denotes indomethacin (0.5 μM). # represents  $p < 0.001$  vs. Nor; \*  $p < 0.05$  vs. Con; \*\*  $p < 0.01$  vs. Con; \*\*\*  $p < 0.001$  vs. Con.

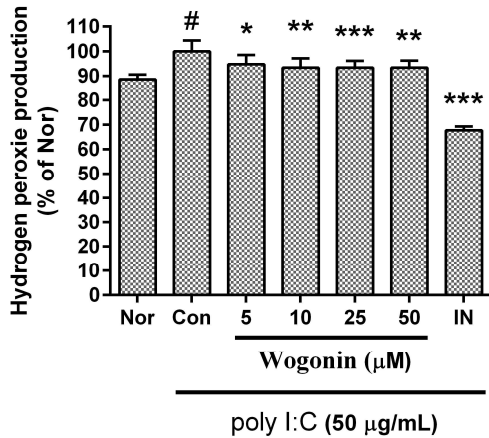


Figure 5. Effect of Wogonin on hydrogen peroxide production of TM4 cells stimulated by poly I:C for 18 hr treatment. Data represent Mean±SD (n=3). Nor, the group incubated with media only. Con, the group treated with 50 μg/mL poly I:C alone. IN denotes indomethacin (0.5 μM). # represents  $p < 0.001$  vs. Nor; \*  $p < 0.05$  vs. Con; \*\*  $p < 0.01$  vs. Con; \*\*\*  $p < 0.001$  vs. Con.

### 5. 우고닌의 24시간 배양이 TM4 세포의 하이드로젠 퍼옥사이드 생성 미치는 영향

우고닌(5, 10, 25, 500 μM)으로 24시간 동안 처리한 TM4 세포의 하이드로젠 퍼옥사이드 생성을 측정된 결과, 5, 10, 25, 500 μM의 농도에서 대조군(poly I:C만 처리한 군) 대비 각각 95.75 ± 3.94%, 94.77 ± 3.95%, 94.58 ± 2.98%, 92.8 ± 2.67%로서 유의한 억제 효과를 나타내었다(Figure 6).

## IV. 고찰

황금(黃芩)의 주요성분으로, O-methylated flavone (methoxyflavonoids)의 한 종류인 우고닌(wogonin)에 대한 생리학적 많은 연구들이 진행되어 왔다.<sup>1)</sup> 2002년도에 Hui 등<sup>1)</sup>에 의해 우고닌의 항불안작용에 대한 보고가 이루어졌으며,

2019년도에는 Khan 등이 우고닌의 항혈전작용을 보고한 바 있다.<sup>2)</sup> 2017년에 Khan 등은 우고닌이 인터루킨-1β (interleukin-1β)에 의해 자극된 인간골관절염연골세포 (human osteoarthritis chondrocytes)에서의 인터루킨-6(IL-6), 콕스-2(COX-2), 프로스타글린딘E2, 유도성 산화질소 합성효소(iNOS), 일산화질소(NO)와 같은 염증매개인자의 발현과 생성을 유의하게 억제함과 동시에 연골세포관련 산화스트레스, 염증, 기질분해와 관련된 일련의 분자적 사건들을 억제함으로써 연골보호효과를 나타낸다고 하였다.<sup>17)</sup> 2019년도 Khan 등의 발표<sup>18)</sup>에 의하면 우고닌이 AKT/GLUT4 경로를 통하여 결과적으로 포도당 수송체 타입 4(GLUT4)의 원형질막으로 이동을 증가시키면서 포도당의 세포내 유입을 촉진함으로써 고혈당완화작용과 항당뇨병작용을 나타낸다.<sup>18)</sup> 2020년도에는 Huynh 등이 우고닌의 항바이러스효능(anti-viral infection), 신경보호작용(neuroprotection), 항경련작용(anticonvulsant)에 대하여 보고하였다.<sup>19)</sup> Koh 등은 우고닌이 활성산소종관련 기전을 통하여 줄기세포관련 유전자들의 발현을 억제함으로써 CD133<sup>+</sup> Cal72 골육종(osteosarcoma) 줄기세포들의 줄기세포능(stemness)을 억제하는 효능이 있다고 하였다.<sup>20)</sup> Hong 등은 우고닌이 간세포암종(hepatocellular carcinoma)세포에서 Cyclin D1의 발현을 억제하고 GSK3beta의 인산화를 촉진함으로써 종양세포의 성장을 억제함에 대하여 보고한 바 있다.<sup>21)</sup> Yang 등은 우고닌이 삼중음성유방암(TNBC) 세포주(MDA-MB-231)의 세포증식을 억제함에 대해서 뿐만 아니라, P16 발현, 베타-갈락토사이드(β-galactosidase)의 활동성, 세포노화관련 노쇠관련분비표현형(SASP), 노쇠관련 이색염색질병소(SAHP), 활성산소종을 증가시키면서, 핵인자 카파비(NF-κB)의 활성화·TXNRD2 발현 억제·STAT3 억제 등을 통하여 세포의 노화성을 증가시킴으로써 결과적으로 종양세포의 성장을 억제한다고 보고한 바 있다.<sup>22)</sup> Fan 등은 2020년도의 보고서에서 우고닌이 면역세포에 대한 작용을 설명하면서, 우고닌이 면역억제T세포를 저해함과 효과T세포의 기능들을 조절함, 대식세포의 면역기능을 증대함뿐만 아니라 지질다당체에 의해서 활성화된 B세포들내에서 STAT3과 ERK의

인산화를 억제하고 전사인자 Hif-1 $\alpha$ 의 발현을 억제함으로써, 결과적으로 B세포의 인터루킨-10 생성을 억제한다고 발표한다. <sup>23)</sup> Zhuang 등<sup>24)</sup>은 최근의 연구에서 우고닌이 뇌내출혈(intracerebral hemorrhage)로 인한 혈종(hematoma)의 제거를 촉진하고 혈종주변 미세아교세포(microglia)의 Axl · MerTK · CD36 · LAMP2 발현을 향상시킴으로써 뇌내출혈로 손상된 신경기능을 회복시킨다고 보고하였다. <sup>24)</sup> 또한 Zhuang 등<sup>24)</sup>은 우고닌이 뇌내출혈의 쥐모델에서 퍼록시좀 증식활성화 수용체-감마(peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ ) 의존적 형식으로 종양괴사인자알파 · 인터루킨-1 $\beta$  · 유도형 산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthase, iNOs)의 발현을 억제하는 등의 항염 · 항산화효과를 나타냄에 대해서도 보고하였다. <sup>24)</sup> 2020년도 Wang 등<sup>25)</sup>의 보고에 의하면 우고닌은 인간정상배아신장세포주인 HEK-293 세포주에서보다 신장암세포주인 786-O 세포주와 OS-RC-2 세포주에서 훨씬 강한 세포독성을 유발하였는데, 이는 신장암 세포들의 증식, 이동, 침습을 강력하게 억제할 뿐만아니라, CDK4-RB경로를 억제하는 효과와 같이 나타남으로써, 신장암환자의 임상관리에 우고닌의 적용가능성을 보여주는 것이다. <sup>25)</sup> 감마선 조사로 인한 신경손상에 대한 우고닌의 보호효과에 대해서도 보고가 되었는데, Wang 등<sup>26)</sup>은 우고닌(30 mg/kg)의 15일간 경구복용이 감마선조사를 받아서 상승한 흰 쥐의 말론디알데히드(malondialdehyde; MDA), 종양괴사인자-알파, 인터루킨-1베타, 인터루킨-6의 수준과 핵인자 카피비의 mRNA와 단백질 발현을 저하시켰으며, 반면에 감마선조사로 저하된 글루타치온(glutathione, GSH), 초과산화물불균등화효소(superoxide dismutase, SOD), 카탈라아제(catalase, CAT), 글루타티온과산화효소(glutathione peroxidase, GPX)의 수준과 엔알아프2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) · 헴산화효소-1(heme oxygenase-1, HO-1)의 mRNA와 단백질의 발현을 유의하게 상승시킴으로써 감마선조사로 인한 신경손상에 대한 보호효과를 나타낸다고 보고한 바 있다. <sup>26)</sup> Zheng 등<sup>27)</sup>은 우고닌이 스트렙토조토신(streptozotocin)으로 유발된 당뇨병콩팥병증 생쥐모델의 신장염증(renal inflammation)과 신장섬유화(renal fibrosis)를 핵인자카피비와 TGF- $\beta$ 1/Smad3 신호경로를 억제함으로써 개선한다고 발표하였다. <sup>27)</sup> Guo 등<sup>28)</sup>은 우고닌이 카이네이트(kainate)에 의해서 유발되는 측두엽뇌전증(temporal lobe epilepsy)흰쥐모델에 있어서 흰쥐 뇌의 인터루킨-1베타 · 종양괴사인자-알파 · 핵인자카피비와 같은 염증인자의 mRNA 발현증가와 흰쥐 해마(hippocampus)의 Bax와 caspase-3의 발현증가에 대해서 의미있게 완화시키고, 해마의 Bcl-2 발현저하를 유의하게 회복시키는 등의 신경보호효과를 나타낸다고 하였다. <sup>28)</sup> 우고닌의 항바이러스효과에 대한 보고도 다양하게 이루어져왔는데, 최근 Xia 등<sup>29)</sup>이 2019년에 발생하여 현재까지 전세계적으로 유행하며 심각한 문제를 일으키고 있는 코로나19 바이러스감염병과 관련하여 우고닌의 적용가능성에 대해 보고한 바 있다. 즉, Xia 등의 보고에 의하면, 네트워크 약리학(Network pharmacology)적인 연구방법을 통하여 중국에서 코로나19감염병치료에 많이 사용되고 있는 連花清瘟캡슐(Lianhua Qingwen capsule)의 주요 유효성분 중 하나인 우고닌이 코로나19감염병과 관련된

유전자 중 폐손상, 폐섬유화, 그리고 바이러스감염과 관련되는 Akt1과의 분자적 결합가능성이 높다는 것을 확인하였고 그와 같은 결합을 통해 치료효과를 나타낼 수 있다는 것이다. <sup>29)</sup> 우고닌이 폴리아이씨로 흥분된 대식세포의 염증인자와 잉생성을 유의하게 억제함으로써 바이러스성 염증반응을 완화한다는 보고는 이미 2015년에 보고된 바<sup>30)</sup> 있다.

위와 같이 항바이러스효과를 포함한 우고닌에 대한 다양한 생의학적 효능 · 활성에 대해 많은 보고가 이루어져 왔지만, 버팀목세포(sertoli cell)에 대한 우고닌의 생리활성에 대한 연구는 아직까지 발표된 바 없다. 더욱이 버팀목세포가 코로나19바이러스의 세포진입매개인자인 에이스2(Ace2)를 발현하는 특징적 세포종의 하나라는 것이 알려져 있기 때문에, 바이러스감염유사체인 폴리아이씨로 유발되는 버팀목세포의 산화스트레스에 대한 우고닌의 작용을 조사하는 것도 의미있는 연구가 될 수 있을 것이다.

대부분의 바이러스는 감염이후 숙주세포내에서 증식을 하게 되어 자연스럽게 이중가닥알엔에이(dsRNA)가 증가하게 되므로, 이중가닥알엔에이의 합성유사물질인 폴리아이씨(poly I:C)는 바이러스성감염반응을 유도하는데 사용되는 대표적인 물질이다. <sup>6-7)</sup> 폴리아이씨는 B세포, 대식세포, 수지상세포의 엔도솜막에 있는 톨유사수용체3(TLR3)와 작용하여 세포내 활성산소종(ROS)의 증가를 유발하는 등 각종의 면역염증반응을 일으킨다. <sup>8)</sup> 본 연구에서도 폴리아이씨가 버팀목세포내의 하이드로젠 퍼록사이드(hydrogen peroxide)의 생성을 유의하게 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 하이드로젠 퍼록사이드(hydrogen peroxide)는 대표적인 활성산소종(ROS)의 하나로서 과잉생성시 산화스트레스로 인한 세포의 노화와 기능손상 등 병리적 상황을 유발하기 때문에 폴리아이씨로 유발되는 버팀목세포의 하이드로젠 퍼록사이드 과잉생성을 조절할 수 있는 물질은 바이러스성 감염으로 야기되는 남성생식장장애 개선할 수 있을 것이다. 한편, 최근 대유행하고 있는 코로나19 바이러스감염병과 관련하여, Shen 등<sup>10)</sup>은 코로나19 바이러스감염으로 남성생식장장애가 발생할 수 있다는 것에 대하여 보고한 바 있는데, 특히 이러한 장애가 버팀목세포(sertoli cells)가 발현하는 에이스2(Ace2)와 코로나19 바이러스의 결합으로 인해 발생한다고 설명하였다. <sup>10)</sup> 즉 남성생식과 관련된 라이디히세포(Leydig cells)와 버팀목세포(Sertoli cells) 모두 에이스2를 많이 발현하기 때문에 코로나19바이러스와 같은 코로나바이러스와의 결합이 쉽게 일어나고, 결과적으로 남성생식장애 등의 문제점이 코로나19 바이러스감염병 남성환자에게서 쉽게 발생할 수 있다는 것이다. <sup>11)</sup>

본 연구에서는 우고닌이 폴리아이씨로 유발되는 생쥐 버팀목세포(TM4)의 하이드로젠 퍼록사이드 과잉생성에 미치는 영향을 조사하였는데, 실험결과 우고닌이 폴리아이씨만 처리한 군에 비해서 폴리아이씨와 우고닌(5, 10, 25, 50  $\mu$ M)을 함께 처리하고 30분, 2시간, 12시간, 18시간, 24시간동안 배양한 모든 경우에서 세포내 하이드로젠 퍼록사이드의 생성을 통계적으로 유의한( $p < 0.05$ ) 감소를 나타내었다. 이는 우고닌이 바이러스유사체로 인한 버팀목세포의 산화스트레스를 완화함으로써 바이러스감염으로 인한 남성생식장장애를 완화할 수 있다는 것을 의미한다. 이러한 결과는 향후 바이러스감염병으로 인한 남성생식장장애에 대한 우고닌의 적용가능성을 제시하는

것이다. 또한 코로나19 바이러스감염병의 심각성을 고려할 때, 에이스2를 특징적으로 발현하는 버팀목세포에서의 바이러스성 산화스트레스를 완화할 수 있는 우고닌과 같은 물질에 대한 연구는 코로나19 바이러스감염병 치료를 위한 새로운 접근법을 제시할 수 있을 것이기 때문에 본 연구의 발견과 관련된 좀 더 세밀한 연구도 필요할 것으로 판단되는 바이다.

## V. 결 론

본 연구에서는 폴리아이씨(poly I:C)로 자극된 마우스 버팀목세포 TM4에 우고닌(wogonin)을 다양한 농도(5, 10, 25, 50  $\mu$ M)로 30분, 2시간, 12시간, 18시간, 24시간동안 처리한 후 세포내 하이드젠 퍼옥사이드 생성에 대해 조사하고, 폴리아이씨만 처리한 대조군(control group)과 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. TM4세포들에 wogonin을 5, 10, 25, 50  $\mu$ M의 농도로 폴리아이씨와 함께 30분간 처리한 결과, 대조군에 비해 각각 95.67%, 92.69%, 92.05%, 91.97%의 유의한 감소를 나타냈다.
2. 폴리아이씨와 함께 2시간 처리한 결과에서는 wogonin 5, 10, 25, 50  $\mu$ M의 농도에서 대조군에 비해 각각 94.44%, 94.41%, 93%, 92.98%의 유의한 감소를 나타냈다.
3. 폴리아이씨와 함께 12시간 처리한 결과에서는 wogonin 5, 10, 25, 50  $\mu$ M의 농도에서 대조군에 비해 각각 96.78%, 95.32%, 94.33%, 93.17%의 유의한 감소를 나타냈다.
4. 폴리아이씨와 함께 18시간 처리한 결과에서는 wogonin 5, 10, 25, 50  $\mu$ M의 농도에서 대조군에 비해 각각 94.7%, 93.4%, 93.38%, 93.35%의 유의한 감소를 나타냈다.
5. 폴리아이씨와 함께 24시간 처리한 결과에서는 wogonin 5, 10, 25, 50  $\mu$ M의 농도에서 대조군에 비해 각각 95.75%, 94.77%, 94.58%, 92.8%의 유의한 감소를 나타냈다.

이 결과는 우고닌(5, 10, 25, 50  $\mu$ M)이 폴리아이씨(poly I:C)로 유발된 생쥐 버팀목세포들(TM4)의 하이드로젠 퍼옥사이드(hydrogen peroxide) 과잉생성을 유의하게 억제함으로써 바이러스감염으로 유발되는 버팀목세포내 산화스트레스를 완화하고, 결과적으로 정자의 생성과 성숙, 보호하는 버팀목세포의 기능을 유지·보존함으로써 남성생식장애와 남성불임을 예방 및 치료할 수 있음을 의미하는 것이다. 향후 우고닌이 바이러스감염성 남성생식장애의 치료제로서 사용될 수 있는 가능성을 규명하기 위하여 보다 자세한 연구가 필요한 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국연구재단(No. 2017R1A2B4004933)의 지원에 의해 수행되었습니다.

## References

1. Hui KM, Huen MS, Wang HY, Zheng H, Sigel E, Baur R, Ren H, Li ZW, Wong JT, Xue H. Anxiolytic effect of wogonin, a benzodiazepine receptor ligand isolated from *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochem Pharmacol.* 2002;64(9):1415–24.
2. Khan S, Kamal MA. Can Wogonin be Used in Controlling Diabetic Cardiomyopathy? *Curr Pharm Des.* 2019;25(19):2171–77.
3. Sawicki SG, Sawicki DL. A new model for coronavirus transcription. *Adv Exp Med Biol.* 1998;440:215–9.
4. Kang SS, Kim AR, Yun CH, Han SH. *Staphylococcus aureus* lipoproteins augment inflammatory responses in poly I:C-primed macrophages. *Cytokine.* 2018;111:154–61.
5. Katoh S, Shimizu H, Obase Y, Oomizu S, Niki T, Ikeda M, Mouri K, Kobashi Y, Hirashima M, Oka M. Preventive effect of galectin-9 on double-stranded RNA-induced airway hyperresponsiveness in an exacerbation model of mite antigen-induced asthma in mice. *Exp Lung Res.* 2013;39(10):453–62.
6. Sharma D, Malik A, Packiriswamy N, Steury MD, Parameswaran N. Poly(I:C) Priming Exacerbates Cecal Ligation and Puncture-Induced Polymicrobial Sepsis in Mice. *Inflammation.* 2018;41(1):328–36.
7. Fortier ME, Kent S, Ashdown H, Poole S, Boksa P, Luheshi GN. The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;287(4):R759–66.
8. Li Y, Xu XL, Zhao D, Pan LN, Huang CW, Guo LJ, Lu Q, Wang J. TLR3 ligand Poly IC Attenuates Reactive Astroglia and Improves Recovery of Rats after Focal Cerebral Ischemia. *CNS Neurosci Ther.* 2015;21(11):905–13.
9. Yang CS, Kim JJ, Lee SJ, Hwang JH, Lee CH, Lee MS, Jo EK. TLR3-triggered reactive oxygen species contribute to inflammatory responses by activating signal transducer and activator of transcription-1. *J Immunol.* 2013;190(12):6368–77.
10. Shen Q, Xiao X, Aierken A, Yue W, Wu X, Liao M, Hua J. The ACE2 expression in Sertoli cells and germ cells may cause male reproductive disorder after SARS-CoV-2 infection. *J Cell Mol Med.* 2020;24(16):9472–77.

11. Wang Z, Xu X. scRNA-seq Profiling of Human Testes Reveals the Presence of the ACE2 Receptor, A Target for SARS-CoV-2 Infection in Spermatogonia, Leydig and Sertoli Cells. *Cells*. 2020;9(4):920.
12. Park W. Effect of Oroxylin A on Hydrogen Peroxide Production in Polyinosinic-Polycytidylic acid-induced TM4 Mouse Testis Sertoli Cells. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2014;28(4):384-9.
13. Park W. Study on Biological Effect of Multi-Herbal Drug KOCO-P1 on Mouse Macrophage Raw 264,7 Cells. *The Korean Journal of Herbology*. 2008;23(2):151-7.
14. Crow JP. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide*. 1997;1(2):145-57.
15. Park W. Effect of Water Extract from Artemisiae Argi Folium on Mouse Macrophage Stimulated by LPS. *The Korean Journal of Herbology*. 2009;24(1):151-7.
16. Park W. Effect of Scutellariae Radix Water Extract on Hydrogen Peroxide Production in RAW 264.7 Mouse Macrophages. *The Korean Journal of Herbology*. 2009;26(1):53-8.
17. Khan NM, Haseeb A, Ansari MY, Devarapalli P, Haynie S, Haqqi TM. Wogonin, a plant derived small molecule, exerts potent anti-inflammatory and chondroprotective effects through the activation of ROS/ERK/Nrf2 signaling pathways in human Osteoarthritis chondrocytes. *Free Radic Biol Med*. 2017;106:288-301.
18. Khan S, Kamal MA. Wogonin Alleviates Hyperglycemia Through Increased Glucose Entry into Cells Via AKT/GLUT4 Pathway. *Curr Pharm Des*. 2019;25(23):2602-06.
19. Huynh DL, Ngau TH, Nguyen NH, Tran GB, Nguyen CT. Potential therapeutic and pharmacological effects of Wogonin: an updated review. *Mol Biol Rep*. 2020;47(12):9779-89.
20. Koh H, Sun HN, Xing Z, Liu R, Chandimali N, Kwon T, Lee DS. Wogonin Influences Osteosarcoma Stem Cell Stemness Through ROS-dependent Signaling. *In Vivo*. 2020;34(3):1077-84.
21. Hong M, Almutairi MM, Li S, Li J. Wogonin inhibits cell cycle progression by activating the glycogen synthase kinase-3 beta in hepatocellular carcinoma. *Phytomedicine*. 2020;68:153174.
22. Yang D, Guo Q, Liang Y, Zhao Y, Tian X, Ye Y, Tian J, Wu T, Lu N. Wogonin induces cellular senescence in breast cancer via suppressing TXNRD2 expression. *Arch Toxicol*. 2020;94(10):433-47.
23. Fan L, Qiu D, Huang G, Chen J, Wu Q, Xiong S, Wu C, Peng Y, Zhang Q. Wogonin Suppresses IL-10 Production in B Cells via STAT3 and ERK Signaling Pathway. *J Immunol Res*. 2020;2020:032425.
24. Zhuang J, Peng Y, Gu C, Chen H, Lin Z, Zhou H, Wu X, Li J, Yu X, Cao Y, Zeng H, Fu X, Xu C, Huang P, Cao S, Wang C, Yan F, Chen G. Wogonin Accelerates Hematoma Clearance and Improves Neurological Outcome via the PPAR- $\gamma$  Pathway After Intracerebral Hemorrhage. *Transl Stroke Res*. 2021;12(4):660-75.
25. Wang Y, Chen S, Sun S, Liu G, Chen L, Xia Y, Cui J, Wang W, Jiang X, Zhang L, Zhu Y, Zou Y, Shi B. Wogonin Induces Apoptosis and Reverses Sunitinib Resistance of Renal Cell Carcinoma Cells via Inhibiting CDK4-RB Pathway. *Front Pharmacol*. 2020;11:1152.
26. Wang L, Li C, Sreeharsha N, Mishra A, Shrotriya V, Sharma A. Neuroprotective effect of Wogonin on Rat's brain exposed to gamma irradiation. *J Photochem Photobiol B*. 2020;204:111775.
27. Zheng ZC, Zhu W, Lei L, Liu XQ, Wu YG. Wogonin Ameliorates Renal Inflammation and Fibrosis by Inhibiting NF- $\kappa$ B and TGF- $\beta$ 1/Smad3 Signaling Pathways in Diabetic Nephropathy. *Drug Des Devel Ther*. 2020;14:4135-48.
28. Guo X, Wang J, Wang N, Mishra A, Li H, Liu H, Fan Y, Liu N, Wu Z. Wogonin preventive impact on hippocampal neurodegeneration, inflammation and cognitive defects in temporal lobe epilepsy. *Saudi J Biol Sci*. 2020;27(8):2149-56.
29. Xia QD, Xun Y, Lu JL, Lu YC, Yang YY, Zhou P, Hu J, Li C, Wang SG. Network pharmacology and molecular docking analyses on Lianhua Qingwen capsule indicate Akt1 is a potential target to treat and prevent COVID-19. *Cell Prolif*. 2020;53(12):12949.
30. Lee JY, Park W. Anti-Inflammatory Effect of Wogonin on RAW 264,7 Mouse Macrophages Induced with Polyinosinic-Polycytidylic Acid. *Molecules*. 2015;20(4):6888-900.