

Oroxylin A가 polyinosinic-polycytidylic acid로 유발된 생쥐 서톨리세포 TM4의 hydrogen peroxide 생성증가에 미치는 영향

박완수*

가천대학교 한의과대학 병리학교실

Effect of Oroxylin A on Hydrogen Peroxide Production in Polyinosinic-Polycytidylic acid-induced TM4 Mouse Testis Sertoli Cells

Wan Su Park*

Department of Pathology, College of Korean Medicine, Gachon University

The purpose of this study is to investigate the modulatory effect of oroxylin A on hydrogen peroxide production in TM4 mouse testis sertoli cells induced by the synthetic analog of double-stranded RNA [polyinosinic-polycytidylic acid]. Hydrogen peroxide production was measured by dihydrorhodamine 123 (DHR) assay. Oroxylin A significantly inhibited the polyinosinic-polycytidylic acid (PIC)-induced production of hydrogen peroxide for 0.5, 2, 12, 18, and 24 hr incubation at the concentrations of 5, 10, 25, and 50 μ M in TM4 ($P < 0.05$) in dose dependent manner. These results suggest that oroxylin A has a protective effect against PIC-induced cellular toxicity with its inhibition of hydrogen peroxide production in PIC-induced sertoli cells.

Key words : oroxylin A, sertoli cells, dsRNA, hydrogen peroxide, anti-oxidative

서 론

Oroxylin A(5,7-dihydroxy-6-methoxy-2-phenylchromen-4-one; Fig. 1)은 메틸레이티드 플라본(O-methylated flavone)의 일종으로 한의학에서 폐경(肺經)에 주로 작용하는 황금(黃芩; *Scutellaria Radix*; root of *Scutellaria baicalensis*) 등에 함유되어 있으며¹⁾ 벤조디아제핀결합부위에 리간드로서 결합하여 나타내는 선택적 길항작용을 통한 중추신경 흥분효과가 있는 것으로 보고된 바 있다²⁾. 하이드로젠 퍼옥사이드(hydrogen peroxide; H_2O_2 ; 과산화수소)는 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)의 하나로서, 대식세포(大食細胞 혹은 貪食細胞; macrophage) 혹

은 단핵구(單核球; monocyte)와 같은 탐식세포내에서 발생하는 경우, 포획된 감염성 이물질이나 노후세포잔존물을 파괴하고 분해하는 작용을 일으킨다³⁾. 즉 세균, 진균, 바이러스, 프로토조아 등 인체의부로부터 침입하는 각종의 병원체를 파괴하는 역할뿐만 아니라, 체내에서 발행하는 비정상적인 기형세포와 조직, 기타 노후화된 세포들을 제거하는 역할에도 하이드로젠 퍼옥사이드와 같은 활성산소종이 관여된다⁴⁾. 그러나 체내 조직세포에서 발생하는 과도한 활성산소종은 정상세포를 손상시키는 부작용도 유발하는데, 이러한 과도한 활성산소종이 정상세포에 미치는 작용을 산화적 충격(oxidative stress)라고 하며 정상조직의 파괴, 비정상화 및 암세포 발생의 중요기전으로 인식되고 있다⁵⁻¹³⁾.

새로 생긴 정자의 보호, 정자의 성숙에 필요한 영양의 공급 등 정자형성에 있어서 중요한 부분을 차지하는 서톨리(sertoli) 세포도 활성산소종 과다생성과 같은 산화적 충격(oxidative stress)에 지속적으로 노출되면, 세포의 사멸이 유발되어, 결과적으로는 산화적 스트레스에 의한 정자세포생성감소 및 불임까지

* To whom correspondence should be addressed at : Wan Su Park,

Department of Pathology, College of Korean Medicine, Gachon University,
Bokjeong-dong, Sujeong-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Korea

· E-mail : HANGL98@naver.com, · Tel : 031-750-8821

· Received : 2014/06/17 · Revised : 2014/08/02 · Accepted : 2014/08/13

도 유발될 수 있는 것으로 알려져 있다^{14,15}). 체내세포에 가해지는 이러한 산화적 충격의 원인은 다양하며, 바이러스의 감염도 그 원인중의 하나이다⁴).

이중가닥RNA(double stranded RNA; dsRNA)는 체내로 침입한 바이러스성 병원체가 증식하는 과정에서 증가·축적되어 각종의 면역염증반응을 유발하고, 인체조직 및 세포에 산화적 충격을 일으킨다⁴). 그러므로 dsRNA에 의해 유발되는 서톨리 세포의 산화적 스트레스를 방어할 수 있는 물질은 산화적 충격에 의한 서톨리세포의 손상을 방어하는 작용을 할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 생쥐 정소 서톨리세포주(TM4)를 합성이중가닥알엔에이(synthetic double-stranded RNA)의 한 종류인 polyinosinic-polycytidylic acid(PIC)로 자극하여 세포내 하이드로젠 퍼옥사이드(hydrogen peroxide) 생성증가를 유발한 뒤 oroxylin A의 작용을 측정하는 in vitro 실험을 수행하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

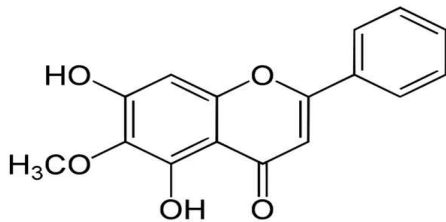


Fig. 1. Structural formula of oroxylin A.

재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약 중 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), heat-inactivated fetal bovine serum(FBS), penicillin and streptomycin, phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)은 Gibco BRL사(Grand Island, NY, USA)에서, oroxylin A, PIC, dihydrorhodamine 123, dimethyl sulfoxide(DMSO) 등은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다⁴). 각 시약의 품질은 분석용 등급 이상의 것으로 하여 사용하였으며 본 실험에 사용된 기기는 CO₂ incubator(NUAIRE, USA), clean bench(Jeiothec, Korea), research microscope(Becton dickinson, USA), centrifuge(Gyrozen, Korea), water bath(Sae Han, Korea), vortex mixer(Vision Scientific Co, Korea), deep freezer(Gudero, Ilshin Lab, Korea), TRIAD LT spectrofluorometer(Dynex, Chantilly, VA, USA), microplate reader(Bio-Rad model 680, Hercules, CA, USA) 등이다¹¹⁻¹³).

2. 방법

1) Cell line

실험에 사용된 세포주는 생쥐 정소 서톨리 세포(mouse sertoli cell TM4)으로서 한국세포주은행(KCLB, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

2) 세포 배양 및 세포생존을 조사

세포의 배양은 이미 보고한 선행연구⁹⁻¹³)의 방법에 따라 다음과 같이 시행하였다. TM4는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, penicillin(100 U/mL), streptomycin(100 µg/mL)이 첨가된 RPMI 배지로 배양되었다. 세포들이 75 cm² flask(Falcon, USA)에서 충분히 증식될 때까지 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline(PBS; Sigma, USA) 용액으로 씻어주고 새로운 배지로 갈아주었으며, 충분히 증식된 후에는 75 cm² flask 당 3 mL의 0.25% trypsin-EDTA용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin용액을 버리고 37°C에서 5분간 보관하여 세포를 탈착한 후 계대 배양하는데, 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 RPMI 배양액 10 mL에 부유시킨 다음 새로운 배양용기에 옮겨 1 : 2의 split ratio로 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다⁹⁻¹³). 세포생존율은 MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 이용하여 조사하였다.

3) Dihydrorhodamine 123(DHR) assay

세포 내의 하이드로젠 퍼옥사이드생성은 Richardson 등¹⁶⁻¹⁹)의 방법을 응용, dihydrorhodamine 123(DHR) assay를 실시하여 측정하였다. DHR은 비형광이지만 세포 내에서 세포 내 hydrogen peroxide에 의하여 산화되어 녹색의 형광을 발현하는 물질인 rhodamine 123로 바뀌게 된다⁸). 그러므로 여러 가지 산화적 반응을 일으키는 물질들로 인해 인간 세포 내에서 발생하는 hydrogen peroxide의 수준을 DHR assay를 이용하여 측정할 수 있으며, 이를 이용하여 본 실험에서는 세포 내 하이드로젠 퍼옥사이드생성에 대한 시료의 영향을 측정하였다⁸). 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 농도로 분주되도록 1×10⁵ cells/mL의 cell을 100 µl씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline 용액으로 씻어주었다⁸). 시료를 처리하기 전에 우선 DHR(10 µM)이 담긴 배지를 30분간 각 well에 처리한 뒤 배지를 제거하고 다양한 농도의 시료들을 배지에 담아 각 well에 처리한 뒤 연속적인 하이드로젠 퍼옥사이드 생성변화 관찰을 위하여 0.5, 2, 12, 18, 24 시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 spectrofluorometer(TRIAD LT; excitation filter 485 nm and emission filter 535 nm)를 이용하여 세포내 하이드로젠 퍼옥사이드 생성량을 측정, 비교하였다^{4,13}).

3. 통계처리

실험성적은 평균치 ± 표준편차(Mean ± SD)로 나타내었으며, 대조군과 각 실험군과의 평균 차이는 one-way ANOVA test 혹은 Student t-test로 분석하여 P < 0.05일 때 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다⁴).

결 과

1. Oroxylin A의 30분 배양이 PIC로 유발된 TM4의 하이드로젠 퍼옥사이드 생성증가에 미치는 영향

Oroxylin A를 PIC와 함께 TM4에 30분 동안 처리한 결과

oroxylin A가 5, 10, 25, 50 μM 의 모든 농도에서 PIC에 의해 유발된 TM4의 세포내 하이드로젠 퍼옥사이드 생성증가를 각각 $91.73 \pm 3.03\%$, $89.49 \pm 2.37\%$, $88.74 \pm 3.91\%$, $87.39 \pm 3.46\%$ 로 농도의존적이면서도 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다(Fig. 2).

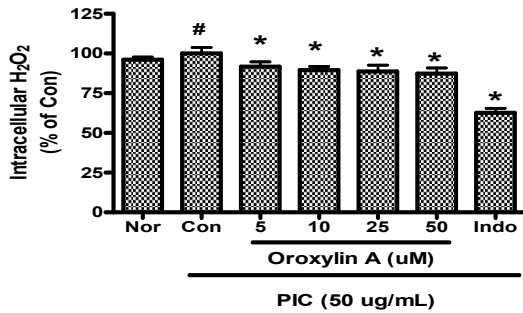


Fig. 2. Effect of Oroxylin A on PIC-induced production of intracellular H₂O₂ in TM4 cells for 30 min incubation. Results are represented as mean \pm SD of more than three independent experiments. Nor : Treatment with media only. Con : Treatment with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PIC only. Indo : Treatment with Indomethacin (0.5 μM) and PIC. # represents $P < 0.05$ compared to Nor. * represents $P < 0.05$ compared to Con.

2. Oroxylin A의 2시간 배양이 PIC로 유발된 TM4의 하이드로젠 퍼옥사이드 생성증가에 미치는 영향

Oroxylin A를 PIC와 함께 TM4에 2시간 동안 처리한 결과 oroxylin A가 5, 10, 25, 50 μM 의 모든 농도에서 PIC에 의해 유발된 TM4의 세포내 하이드로젠 퍼옥사이드 생성증가를 각각 $91.46 \pm 3.1\%$, $89.49 \pm 3.23\%$, $89.61 \pm 3.97\%$, $89.06 \pm 3.62\%$ 로 농도의존적이면서도 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다(Fig. 3).

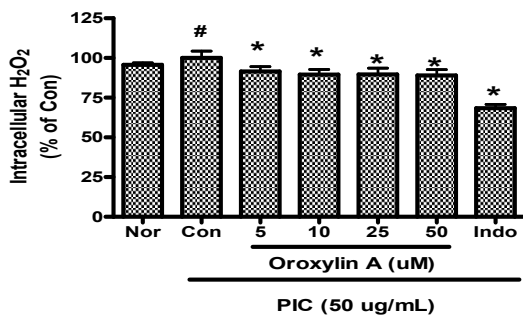


Fig. 3. Effect of Oroxylin A on PIC-induced production of intracellular H₂O₂ in TM4 cells for 2 hr incubation. Results are represented as mean \pm SD of more than three independent experiments. Nor : Treatment with media only. Con : Treatment with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PIC only. Indo : Treatment with Indomethacin (0.5 μM) and PIC. # represents $P < 0.05$ compared to Nor. * represents $P < 0.05$ compared to Con.

3. Oroxylin A의 12시간 배양이 PIC로 유발된 TM4의 하이드로젠 퍼옥사이드 생성증가에 미치는 영향

Oroxylin A를 PIC와 함께 TM4에 12시간 동안 처리한 결과 oroxylin A가 5, 10, 25, 50 μM 의 모든 농도에서 PIC에 의해 유발된 TM4의 세포내 하이드로젠 퍼옥사이드 생성증가를 각각 $91.67 \pm 2.94\%$, $87.76 \pm 2.88\%$, $86.49 \pm 3.62\%$, $85.28 \pm 3.38\%$ 로 농도의존적이면서도 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다(Fig. 4).

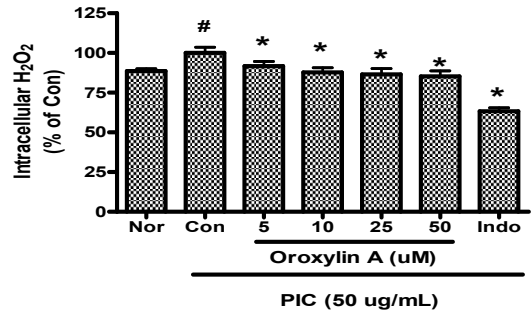


Fig. 4. Effect of Oroxylin A on PIC-induced production of intracellular H₂O₂ in TM4 cells for 12 hr incubation. Results are represented as mean \pm SD of more than three independent experiments. Nor : Treatment with media only. Con : Treatment with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PIC only. Indo : Treatment with Indomethacin (0.5 μM) and PIC. # represents $P < 0.05$ compared to Nor. * represents $P < 0.05$ compared to Con.

4. Oroxylin A의 18시간 배양이 PIC로 유발된 TM4의 하이드로젠 퍼옥사이드 생성증가에 미치는 영향

Oroxylin A를 PIC와 함께 TM4에 18시간 동안 처리한 결과 oroxylin A가 5, 10, 25, 50 μM 의 모든 농도에서 PIC에 의해 유발된 TM4의 세포내 하이드로젠 퍼옥사이드 생성증가를 각각 $91.59 \pm 3.03\%$, $87.29 \pm 2.66\%$, $86.03 \pm 3.54\%$, $84.1 \pm 2.94\%$ 로 농도의존적이면서도 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다(Fig. 5).

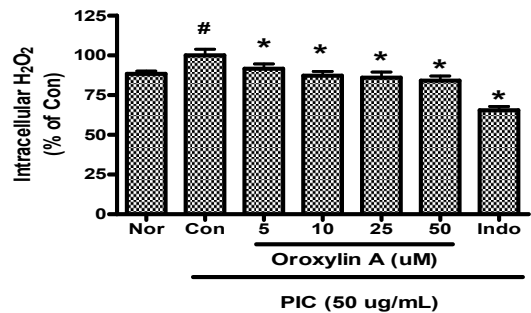


Fig. 5. Effect of Oroxylin A on PIC-induced production of intracellular H₂O₂ in TM4 cells for 18 hr incubation. Results are represented as mean \pm SD of more than three independent experiments. Nor : Treatment with media only. Con : Treatment with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PIC only. Indo : Treatment with Indomethacin (0.5 μM) and PIC. # represents $P < 0.05$ compared to Nor. * represents $P < 0.05$ compared to Con.

5. Oroxylin A의 24시간 배양이 PIC로 유발된 TM4의 하이드로젠 퍼옥사이드 생성증가에 미치는 영향

Oroxylin A를 PIC와 함께 TM4에 24시간 동안 처리한 결과 oroxylin A가 5, 10, 25, 50 μM 의 모든 농도에서 PIC에 의해 유발된 TM4의 세포내 하이드로젠 퍼옥사이드 생성증가를 각각 $92.23 \pm 2.84\%$, $87.6 \pm 2.7\%$, $85.32 \pm 3.59\%$, $83.28 \pm 2.91\%$ 로 농도의존적이면서도 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다(Fig. 6).

7. Oroxylin A와 PIC의 24시간 배양이 TM4의 세포생존율에 미치는 영향

PIC를 단독으로 24시간동안 처리한 결과 TM4의 세포생존율이 유의하게 감소하였으며($P < 0.05$), Oroxylin A를 PIC와 함께

TM4에 24시간 동안 처리한 결과 oroxylin A가 5, 10, 25, 50 μM 의 모든 농도에서 PIC에 의해 유발된 TM4의 세포생존을 감소를 각각 $135.89 \pm 14.88\%$, $143.53 \pm 11.34\%$, $138.98 \pm 9.61\%$, $125.58 \pm 11.76\%$ 로 유의($P < 0.05$)하게 증가시켰으나, indomethacin($0.5 \mu\text{M}$)을 처리한 경우에는 오히려 유의한 감소($P < 0.05$)를 나타내었다(Fig. 7).

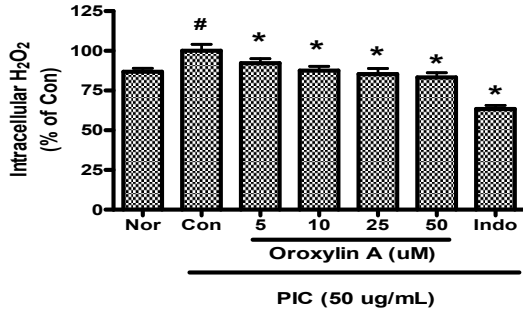


Fig. 6. Effect of Oroxylin A on PIC-induced production of intracellular H₂O₂ in TM4 cells for 24 hr incubation. Results are represented as mean \pm SD of more than three independent experiments. Nor : Treatment with media only. Con : Treatment with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PIC only. Indo : Treatment with Indomethacin ($0.5 \mu\text{M}$) and PIC. # represents $P < 0.05$ compared to Nor. * represents $P < 0.05$ compared to Con.

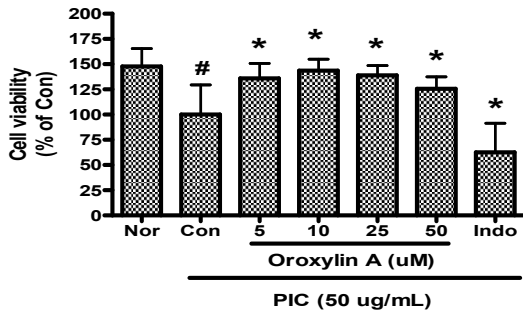


Fig. 7. Effect of Oroxylin A and PIC on Cell viability of TM4 cells for 24 hr incubation. Results are represented as mean \pm SD of more than three independent experiments. Nor : Treatment with media only. Con : Treatment with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PIC only. Indo : Treatment with Indomethacin ($0.5 \mu\text{M}$) and PIC. * represents $P < 0.05$ compared to Con.

고찰

세포 내에서 발생하는 활성산소종의 일종인 hydrogen peroxide는 대식세포나 단핵구의 병원체제거작용에 있어서 중요한 역할을 담당하지만, 과도하게 생성되는 경우에 인체조직의 정상세포를 손상시키는 부작용도 유발한다³⁾. 이러한 활성산소종의 작용을 산화적 스트레스(oxidative stress)라고 하며 정상조직의 파괴, 비정상화 및 암세포 발생의 중요기전으로 설정되어 있다³⁾.

남성 성기능 장애는 발기부전, 정자결핍, 약정자증, 무정자증의 원인이 되며, 산화적 스트레스(oxidative stress)는 성기능 장애에 영향을 줄 수 있는 하나의 요소로 알려져 있다²⁰⁾.

이중가닥RNA(dsRNA)는 체내로 침입한 바이러스성 병원체가 증식하는 과정에서 증가·축적되어 각종의 면역역증반응을 유

발하고, 인체조직 및 세포에 산화적 충격을 일으킨다⁴⁾. 예를 들면, 바이러스성 뇌염과 같이 체내로 침입한 병원성 바이러스들은 뇌손상을 유발하고 신경세포를 파괴할 수 있으며, 이 과정에서 바이러스의 증식에 따라 dsRNA가 체내에 증가·축적되어 각종의 면역역증반응을 유발하게 되는 것이다³⁾. 남성불임과 관련하여서도, 볼거리바이러스(mumps virus)에 의한 고환염은 볼거리질환(mumps)의 주요한 후유장애 중에 하나인데 볼거리바이러스가 고환을 구성하는 레이디세포(Leydig cell)나 서톨리세포에 손상을 유발함으로써 정자형성의 장애를 수반하는 불임증이 발생하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 이중가닥RNA에 의해 유발되는 생식세포의 산화적 스트레스를 방어하는 물질에 대한 탐색을 통하여 산화적 스트레스에 의한 남성 성기능 장애 치료를 위한 약물개발의 단서를 마련할 수 있을 것이다²¹⁾.

Oroxylin A(5,7-dihydroxy-6-methoxy-2-phenylchromen-4-one)는 플라보노이드(flavonoid)의 일종으로서 청열조습약(淸熱燥濕藥) 중의 하나인 황금(黃芩; Scutellaria Radix; root of Scutellaria baicalensis) 등에 함유되어 있는 것으로 보고되어¹⁾ 있고, 지질다당체에 의한 염증반응을 억제하는 것에 대해서도 보고²²⁾된 바 있다. 최근 Huen 등²³⁾은 oroxylin A가 벤조디아제핀결합 부위에 리간드로서 결합하여 나타내는 선택적 길항작용을 통한 중추신경 흥분효과가 있는 것으로 보고한 바 있다. 그러나 아직까지 oroxylin A가 이중가닥RNA로 자극되어진 서톨리세포의 하이드로젠 퍼옥사이드 생성증가에 미치는 영향에 대한 연구는 보고된 바 없다. 본 연구에서는 oroxylin A가 합성이중가닥RNA의 일종인 polyinosinic-polycytidylic acid로 유발된 TM4의 세포내 하이드로젠 퍼옥사이드 생성증가에 미치는 영향을 알아보기 위하여 in vitro 실험을 수행하였으며, 참고적으로 PIC와 oroxylin A가 TM4의 세포생존율에 미치는 영향에 대해서도 알아보았다. 다른 우수한 항산화물질이 있음에도 불구하고, 양성대조군으로 indomethacin을 설정한 이유는 바이러스성 염증질환에 있어서도 염증완화를 위해 사용되는 대표적인 항염약물군에 indomethacin이 포함되기 때문이다.

Comstock 등³⁾은 PIC가 인간간지상피세포(16HBE14o cells)의 활성산소종 생성을 2배 이상 증가시킨다고 보고 한 바 있으나, 본 연구에서 PIC를 TM4에 처리한 결과에서는 하이드로젠 퍼옥사이드 생성을 유의($P < 0.05$)하게 증가시키기는 하였으나 그 수준은 1.2배 미만으로서 세포의 종류마다 PIC에 의해서 유발되는 활성산소종의 생성증폭비율이 다를 수 있었다.

Oroxylin A를 PIC와 함께 TM4에 30분 동안 처리한 결과 5, 10, 25, 50 μM 의 모든 농도에서 PIC로 유발된 TM4의 하이드로젠 퍼옥사이드 생성증가를 농도의존적으로 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다(Fig. 2). Oroxylin A를 PIC와 함께 TM4에 2시간 동안 처리한 결과에서도 5, 10, 25, 50 μM 의 모든 농도에서 PIC로 유발된 TM4의 하이드로젠 퍼옥사이드 생성증가를 농도의존적으로 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰으며(Fig. 3), 12시간 동안 배양한 결과에서도 oroxylin A가 5, 10, 25, 50 μM 의 모든 농도에서 PIC로 유발된 TM4의 하이드로젠 퍼옥사이드 생성증가를 농도의존적으로 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다(Fig. 4). 또한 Oroxylin A

를 PIC와 함께 TM4에 18시간 동안 처리한 결과에서 5, 10, 25, 50 μM 의 모든 농도에서 PIC로 유발된 TM4의 하이드로젠 퍼록사이드 생성증가를 농도의존적으로 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰으며(Fig. 5), 24시간 동안 배양한 결과에서도 oroxylin A가 5, 10, 25, 50 μM 의 모든 농도에서 PIC로 유발된 TM4의 하이드로젠 퍼록사이드 생성증가를 농도의존적으로 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다(Fig. 6). 특히 24시간동안 처리한 결과에서도 농도의존적인 (5 μM 에서 $92.23 \pm 2.84\%$, 10 μM 에서 $87.6 \pm 2.7\%$, 25 μM 에서 $85.32 \pm 3.59\%$, 50 μM 에서 $83.28 \pm 2.91\%$) 유의한 감소를 보인 것은 하이드로젠 퍼록사이드와 같은 활성산소종의 발생이 충분히 이루어질 수 있는 시간이 경과된 후 측정된 결과이기 때문에 더욱 의미있는 결과라고 할 수 있다. 그리고 oroxylin A의 농도가 25 μM 인 경우에는 2시간에서 $89.61 \pm 3.97\%$, 12시간에서는 $86.49 \pm 3.62\%$, 18시간에서는 $86.03 \pm 3.54\%$, 24시간에서는 $85.32 \pm 3.59\%$ 로 시간의존적인 유의한 감소를 나타내었으며, oroxylin A의 농도가 50 μM 인 경우에도 2시간에서 $89.06 \pm 3.62\%$, 12시간에서는 $85.28 \pm 3.38\%$, 18시간에서는 $84.1 \pm 2.94\%$, 24시간에서는 $83.28 \pm 2.91\%$ 로 시간의존적인 유의한 감소를 나타낸 것을 알 수 있었다. 한편, PIC와 Oroxylin A(5, 10, 25, 50 μM)을 함께 24시간동안 처리한 결과에서는 5, 10, 25, 50 μM 의 모든 농도에서 PIC에 의한 생존율감소를 유의하게 변화시켜, TM4의 세포생존율이 증가하는 것으로 나타났으며, PIC와 indomethacin을 동시에 처리한 결과에서는 오히려 세포생존율이 유의하게 더욱 감소하는 것으로 나타났다($P < 0.05$, Fig. 8). 이는 oroxylin A에 의한 TM4의 하이드로젠 퍼록사이드 생성억제가 TM4세포사멸억제와 관련됨을 의미한다. PIC에 의해서 유발되는 TM4의 하이드로젠 퍼록사이드 생성증가를 oroxylin A가 어떠한 기전을 통해서 억제하는지와 다른 종류의 ROS생성에 미치는 영향, 그리고 하이드로젠 퍼록사이드가 세포생존율변화를 유발하는 작용기전 등에 대한 실험은 본 연구에서 이루어지지 않았다. 향후 oroxylin A가 산화적 스트레스와 관련된 생식기능 손상현상에 대한 조절작용이 있는지에 대한 조사연구도 의미있는 것으로 판단된다.

즉, 위와 같은 실험결과는 oroxylin A가 PIC에 의해서 유발된 TM4의 하이드로젠 퍼록사이드 과잉생성을 억제함으로써 활성산소종생성과 관련된 정자생성감소현상을 완화할 수 있는 물질로서의 응용가능성이 있음을 나타내는 것이며, 앞으로 oroxylin A의 생식능보호효능에 대해 보다 심도 깊은 연구가 필요한 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 oroxylin A가 synthetic double-stranded RNA의 일종인 polyinosinic-polycytidylic acid로 유발된 생쥐 서틀리세포 TM4의 세포내 하이드로젠 퍼록사이드 생성증가에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

Oroxylin A를 PIC와 함께 TM4에 30분, 2시간, 12시간, 18시

간, 24시간 동안 처리한 결과 5, 10, 25, 50 μM 의 모든 농도에서 PIC로 유발된 TM4의 세포내 하이드로젠 퍼록사이드 생성증가를 농도의존적으로 유의($P < 0.05$)하게 감소시켰다.

이러한 실험결과는 oroxylin A가 PIC에 의해서 유발된 생쥐 TM4의 하이드로젠 퍼록사이드의 과잉생성을 억제함으로써 활성산소종 과잉생성과 관련된 바이러스감염관련 생식능손상질환의 증상을 완화할 수 있는 물질로서 개발될 가능성이 있음을 나타내는 것이다. 앞으로 oroxylin A의 생식능보호효과에 대한 보다 심도 깊은 연구가 필요한 것으로 판단된다.

References

- Li, H.B., and Feng, Chen. Isolation and purification of baicalein, wogonin and oroxylin A from the medicinal plant *Scutellaria baicalensis* by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1074(1-2):107-110, 2005.
- Huen, M.S., Leung, J.W., Ng, W., Lui, W.S., Chan, M.N., Wong, J.T. and Xue, H. 5,7-Dihydroxy-6-methoxyflavone, a benzodiazepine site ligand isolated from *Scutellaria baicalensis* Georgi, with selective antagonistic properties. *Biochem. Pharmacol.* 66: 125-132, 2003.
- 이지영, 김영진, 박완수. Emodin이 polyinosinic-polycytidylic acid로 유발된 인간 신경모세포종 SH-SY5Y의 hydrogen peroxide 생성증가에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 25(6):1039-1043, 2011.
- 박완수. Wogonin이 polyinosinic-polycytidylic acid로 유발된 인간 신경모세포종 SH-SY5Y의 hydrogen peroxide 생성증가에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 26(4):491-496, 2012.
- Fila, L., Musil, J. Examination of exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *Cas Lek Cesk.* 149(4):173-177, 2010.
- 박완수. Nicotine 등으로 유발된 인간 간조직세포 내 hydrogen peroxide 생성억제에 대한 호모균발효에업 추출물의 영향. *동의생리병리학회지* 24(1):96-101, 2010.
- 박완수. Nicotine으로 유발된 대식세포의 hydrogen peroxide와 Nitric Oxide 생성억제에 대한 호모균발효고삼 추출물의 영향. *동의생리병리학회지* 23(5):1049-1054, 2009.
- 박완수. EtOH 등으로 유발된 대식세포 내 hydrogen peroxide 생성억제에 대한 호모균발효에업 추출물의 영향. *동의생리병리학회지* 23(3):608-612, 2009.
- 박완수. 白蓼과 紅蓼이 포함된 理中湯의 마우스 대식세포 내 hydrogen peroxide 생성에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 25(1):78-83, 2011.
- 박완수. 黃芩 물추출물이 마우스 대식세포의 hydrogen peroxide 생성에 미치는 영향. *대한본초학회지* 26(1):53-58, 2011.
- 박완수. 黃芩 물추출물이 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 hydrogen peroxide 생성에 미치는 영향. *경락경혈학회지*

- 28(3):33-41, 2011.
12. 이지영, 박완수. 白蓼이 포함된 理中湯약침액의 LPS로 유발된 마우스 대식세포의 nitric oxide 및 hydrogen peroxide 생성에 미치는 영향. *경락경혈학회지* 28(1):61-69, 2011.
 13. 이지영, 박완수. 紅蓼理中湯이 LPS로 유발된 마우스 대식세포 RAW 264.7의 nitric oxide 및 hydrogen peroxide 생성에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 25(2):294-299, 2011.
 14. 정규진, 仙茅의 Sertoli TM4 Cell에 대한 항산화 효과 연구, 경희대학교 대학원, 2011.
 15. 최진호, 팔미지황환이 남성관련 생식세포의 항산화에 미치는 영향, 경희대학교 대학원, 2010.
 16. Richardson, M.P., Ayliffe, M.J., Helbert, M., Davies, E.G. A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *J Immunol Methods*. 219(1-2):187-193, 1998.
 17. Jirapongsananuruk, O., Malech, H.L., Kuhns, D.B., Niemela, J.E., Brown, M.R., Anderson-Cohen, M., Fleisher, T.A. Diagnostic paradigm for evaluation of male patients with chronic granulomatous disease, based on the dihydrorhodamine 123 assay. *J Allergy Clin Immunol*. 111(2):374-379, 2003.
 18. Shankaran, H., Chrisler, W.B., Sontag, R.L., Weber, T.J. Inhibition of ERK oscillations by ionizing radiation and reactive oxygen species. *Mol Carcinog*. 50(6):424-432, 2011.
 19. Goodwin, A.C., Murray-Stewart, T.R., Casero, R.A. Jr. A simple assay for mammalian spermine oxidase: a polyamine catabolic enzyme implicated in drug response and disease. *Methods Mol Biol*. 720: 173-181, 2011.
 20. 유성광, 영경퀴로부터 분리한 아피게닌의 과산화수소-유발 고환세포 독성 방어효과 : Protective effect of apigenin isolated from *Carduus crispus* against H₂O₂-induced testicular cell damage, 건국대학교 대학원, 2012.
 21. Wang, X.X., Ying, P., Diao, F., Wang, Q., Ye, D., Jiang, C., Shen, N., Xu, N., Chen, W.B., Lai, S.S., Jiang, S., Miao, X.L., Feng, J., Tao, W.W., Zhao, N.W., Yao, B., Xu, Z.P., Sun, H.X., Li, J.M., Sha, J.H., Huang, X.X., Shi, Q.H., Tang, H., Gao, X., Li, C.J. Altered protein prenylation in Sertoli cells is associated with adult infertility resulting from childhood mumps infection. *J Exp Med*. 210(8):1559-1574, 2013.
 22. Chen, Y., Yang, L., Lee, T.J. Oroxylin A inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 gene expression via suppression of nuclear factor-kappaB activation. *Biochem Pharmacol*. 59(11):1445-1457, 2000.