

五子 추출물이 Leydig 세포 내 testosterone 합성에 미치는 영향

김계엽 · 이홍균 · 김은정*

동신대학교 보건복지대학 물리치료학과

Effects of Extracts from Oja on Testosterone Synthesis in Leydig Cells

Gye Yeop Kim, Hong Gun Lee, Eun Jeong Kim*

Department of Physical Therapy, Collage of Health & Welfare, Dongshin University

Traditionally, 5 kinds of fruits with “ja(子)” in their name, including *Rubus coreanus*, *Schisandra chinensis*, *Lycium chineuse*, *Torilidis fructus*, and *Cuscuta seed*, collectively called *Oja*(五子), are long known to enhance stamina. In the present study, we replaced tosaja with gyeolmyeongja(*Cassiae semen*) and examined the effects of extracts from these fruits on andropause. This study investigated the antioxidant effect and testosterone synthesis of *Oja* water extract on Leydig TM3 cells. To investigate whether hydrogen peroxide induces oxidative stress in Leydig cells, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay, nitric oxide assay, and testosterone assay were performed on mouse Leydig TM3 cells. The results were obtained as follows: Leydig TM3 cells viability was assessed by a modified MTT assay, and the protection effect of *Oja* water extract against hydrogen peroxide-induced cell oxidative stress were examined by mitochondrial activity. *Oja* water extract could efficiently protect cytotoxicity induced by H₂O₂. *Oja* water extract promoted testosterone synthesis. These results suggest that *Oja* water extract has protective roles and promotes steroidogenesis in Leydig cells through its anti-oxidant action.

keywords : *Oja* extract, Leydig cell, Testosterone, NO

서 론

갱년기는 성호르몬의 감소 및 노화로 인한 신체 변화로서 여성의 경우 난소의 에스트로겐 호르몬 감소, 남성은 고환의 테스토스테론 농도 저하가 주된 원인이다. 최근 삶의 질이 높아지고 여성갱년기 뿐 아니라 남성들도 갱년기 증상과 함께 성기능 장애에 대한 관심이 높아져 발기부전 등으로 내원하는 환자가 증가하고 있다. 남성갱년기의 경우, 대표적 임상증상으로, 테스토스테론 호르몬 감소로 인한 발기부전, 근육량 감소, 체력감소, 복부지방 증가, 골밀도 감소, 피로감, 기억력 감소, 우울감 등 여성 갱년기의 신체증상과 유사하다¹⁻³⁾. 이러한 테스토스테론(testosterone) 호르몬의 생성은 고환 내에 있는 사이질세포(interstitial cell)인 Leydig 세포에서 콜레스테롤을 원료로 하여, 황체형성호르몬의 자극에 의해 여러 스테로이드호르몬의 합성 단계를 거쳐 세포 내 미토콘드리아에서 주로 합성된다⁴⁾. 대표적인 남성 호르몬인 테스토스테론은 혈관 확장, 생식기능, 성생활 및 근육량과 피부 등을 조절하며 정신적, 생리적으로 중요한 역할을 한다^{3,5)}. 10대 후반에서 20대 초반에 최고조에 달하게 되고 이후 노화가 진행됨에 따라 Leydig's cell의 감소와 기능

저하, 손상으로 인해 합성량은 서서히 감소하여, 신체 내 여러 문제를 야기시키게 된다⁶⁾. Leydig's cell 내 테스토스테론 합성량 주요 감소의 원인은 생식샘기능저하증(hypogonadism), 비만, 산화적 스트레스, 생활습관, 환경오염물질, 장시간 컴퓨터 사용 등이 언급되고 있다⁷⁻⁹⁾. 또한 테스토스테론은 사회·물리적, 심리적 요인으로 인한 스트레스와 수면에도 많은 영향을 받으며^{10,11)}, 특히 정자의 발생과정에서 생식세포들은 산화 스트레스에 민감한 반응을 보여 항산화 능력이 심각하게 저하될 경우 불임을 유발할 수 있다¹²⁾.

최근 연구에서 세포 내에 산화적 스트레스 적용 시 많은 양의 반응성산소종(reactive oxygen species; ROS)을 생성하게 하고, 이는 Leydig 세포 내 세포막을 손상시켜, DNA 파괴 및 정자의 세포사멸(apoptosis)를 촉진시킨다¹³⁻¹⁵⁾. 따라서, 고환 세포의 산화적 스트레스는 일반적으로 불임의 중요한 원인으로 작용하게 된다¹⁶⁾. 이러한 Leydig 세포의 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하여, 고환의 기능을 회복시키기 위해 여러 연구들이 진행 중에 있다. 대부분의 환자들은 갱년기 및 성기능 장애에 치료적 접근으로 비수술적 방법을 선호하고 있으며, 제한적인 경우가 많아 한의학적인 치료 접근에 대해 많은 연구가 필요한 시점이다. Testosterone의

* Corresponding author

Eun-Jeong Kim, Department of Physical Therapy, Collage of Health & Welfare, Dongshin University, 185, Geonjae-ro, Naju-si, Jeonnam, 58245, Republic of Korea

E-mail : ddoosuny@hanmail.net Tel : +82-62-330-3390

Received : 2015/08/13 Revised : 2015/09/22 Accepted : 2015/09/30

© The Korean Society of Oriental Pathology, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2015.10.29.5.403

Available online at http://www.hantopic.com/kjopp/KJOPP.htm

분비가 부족한 경우 testosterone을 인위적으로 주입, 자연소재 물질을 성분으로 만든 약을 복용하게 하는 등의 방법이 있다¹⁷⁻¹⁸⁾. 인체 방어기전으로는 항산화 효소에 의해 활성산소를 제거하는 항산화 방어체계가 있는데 이러한 항산화효소에는 Superoxide dismutase, Catalase, Glutathione peroxidase 등이 있으며, 이러한 효소들은 대사과정에 의해 활성산소를 제거하고, 산화적 스트레스를 저하시키기 위해 그 생성이 증가하게 된다¹⁹⁾. 최근 홍삼, 풍선덩굴 추출물이 남성 성호르몬 분비를 증가시킨다고 보고된바 있었으나, 아직 까지 Leydig 세포 내 산화적 관련 인자와 남성 호르몬 보호 효능에 대한 한약재 연구는 미흡하다^{20,21)}.

예로부터 오자(五子)는 복분자, 오미자, 구기자, 사상자, 토사자 등 자(子)가 들어가는 5가지 약재를 말하며, 이러한 약재 모두 정력을 증강하는데 도움을 준다고 한다. 본 연구는 오자(五子) 중에 토사자 대신 결명자를 이용하여 연구에 사용하였다. 오자의 효능에 대해 丹溪心法에 “治男人精虛無子陽事不舉”라고 수록되었으며²²⁾, 이러한 5가지 열매는 腎陰과 腎陽의 부족으로 인한 음손양허(陰損陽虛), 양위조설(陽痿早泄), 남자무사(男子無嗣) 등의 치료에 활용되어 왔다²³⁾. 이전의 연구보고에 의하면 오자衍宗丸을 투여 시 흰쥐에서 성호르몬을 증가 및 항피로 효과를 나타내었다고 보고되었다²⁴⁾. 이에 오자(五子)가 남성호르몬 합성 및 성기능 저하에도 효능이 있을 것으로 기대하고 그 효과를 규명하기 위하여 오자 혼합추출물을 세포에 처리하여, 세포생존율, nitrite, c-GMP와 testosterone 함량의 활성에 미치는 영향을 관찰하여 오자(五子)의 효능에 대해 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료의 추출

본 연구에 사용된 오자(五子)는 국내산(화순전남생약농업협동조합)으로 복분자, 오미자, 구기자, 사상자, 결명자의 배합비를 2: 2.5 : 2 : 0.5 : 3으로 선정하였다. 전체 1 kg을 증류수 5,000 mL을 가하여 넣고 환류 냉각기를 장치한 후 95~100°C 수욕조에서 12시간 동안 온탕 추출하여 얻은 액을 흡입 여과하여 이를 감압 증류장치로 농축하고, 이를 다시 동결 건조기를 이용하여 완전 건조하여 오자(五子) 열추출물 36.4 g을 얻었다. 얻어진 열추출물을 냉동(-80°C) 보관하면서 실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 세포배양

실험에 사용된 세포주는 TM3(Leydig's cell, mouse)로서 America Type Culture Collection(ATCC, USA)에서 구입하였다. 이 세포주는 고환 내 간질조직(interstitial tissue)에 있는 Leydig cell에 속한다. Leydig cell line은 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, penicillin(100 µg/mL), streptomycin(100 µg/mL)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다. Leydig cell은 75 cm² flask(Falcon, USA)에서 충분히 증식된 후 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline(PBS) 용액으로 2회 씻어준 후 50 mL flask 당 1 mL의 0.25% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid 용액을 넣고 실온에서 1 분간 처리한 다음 trypsin 용액을

버리고 37°C에서 5분간 보관하여 세포를 탈착 하여 계대 배양하였다. 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 mL 부유시킨 다음 새로운 배양용기(50 mL culture flask)에 옮겨 1:20의 split ratio로 CO₂ 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다.

3. 세포생존율(MTT assay) 측정

오자(五子)가 Leydig cell의 증식에 미치는 효과를 알아보기 위하여 Mosmann²⁵⁾ 등의 방법을 응용하였다. MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay를 이용하여 다음과 같이 실험하였다. 96 well plate에 1 × 10⁵ cells/mL의 cell을 100 µL씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후 PBS 용액으로 처리하였다. 이후 PBS에 녹인 각각의 시료 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL와 FBS, free DMEM에 녹인 100 µM H₂O₂을 각각의 well에 처리한 후 24 시간 동안 배양하였다. 이후, PBS로 세척한 후 PBS에 녹인 5 mg/mL MTT 20 µL와 FBS free DMEM 200 µL을 각 well에 처리한 후 빛을 차단 후 동일한 조건에서 4시간 동안 배양하였다. 4시간 후 배양액을 제거하고, DMSO(dimethyl sulfoxide)를 100 µL 처리한 후 37°C에서 2 시간 방치 후 microplate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 다음 공식으로 계산되었다.

$$\text{Cell viability(\%)} = 100 \times \text{AT} / \text{AC}$$

AC: absorbance of control, AT: absorbance of tested extract solution

4. 산화질소(Nitric oxide assay) 측정

96-well plate에 1 × 10⁶ cells/well의 세포를 넣고 37°C 5% CO₂의 조건으로 12시간 배양하여 농도별로 시료를 처리 후 24시간 배양한 후 배지를 회수하여 NO를 측정하였다. 즉 회수된 배지 100 µL를 96-well plate에 넣은 후 nitrate reductase cofactor와 nitrate reductase mixture를 첨가하여, 1시간 반응시킨 후 각 well에 4°C에 저장된 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride, 2% phosphoric acid)를 첨가하여 최종 반응액을 실온에서 약 10분간 방치하여 발색을 유도하였으며, 540 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다²⁶⁾.

5. 테스토스테론(Testosterone) 측정

Hydrogen peroxide와 시료를 처리한 Leydig cell line에서 testosterone level을 enzyme immunoassay kit(assay designs, USA)를 사용하여 측정하였다. 6 well plate에 1 × 10⁶ cells/mL의 cell을 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24 시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 PBS 용액으로 처리하였다. PBS에 처리 후 각각의 시료를 농도별 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL와 FBS free DMEM에 녹인 200 µM H₂O₂을 각각의 well에 동시처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 배지 100 µL를 goat anti-mouse IgG microtiter plate(assay designs, USA)에 옮긴다. 그런 다음, testosterone

EIA antibody를 첨가 후 1 시간 배양 후 washing 용액으로 세척하였다. 세척 후 stop solution 첨가한 후 반응을 중지하고 405 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정한다.

6. 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 SPSS 21.0 ver. for Windows®을 사용하였다. 각 측정 시간 및 농도에 따른 군간 유의성 검정은 Student's t-test를 통해 유의성을 분석하였으며, 분석 시 유의수준은 $\alpha < 0.05$ 로 설정하여 검정하였다.

결 과

1. 세포생존율 측정

TM3 cell에 선정된 5가지 복분자, 오미자, 구기자, 사상자, 결명자의 배합비를 2: 2.5 : 2 : 0.5 : 3으로 하여, 오자가 TM3 cell의 성장 및 증식에 미치는 영향을 측정하기 위하여 추출한 오자 추출액의 0 μg , 1 μg , 10 μg , 50 μg , 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도별 MTT 분석을 통해 세포 생존율을 측정하였다. 오자 추출물 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 100.00 \pm 0.00%, 130.10 \pm 16.81%, 133.50 \pm 21.18%, 123.84 \pm 11.14%, 123.25 \pm 11.26%로 세포 생존율이 농도의존적으로 증가하였다 ($p < 0.05$)(Fig. 1).

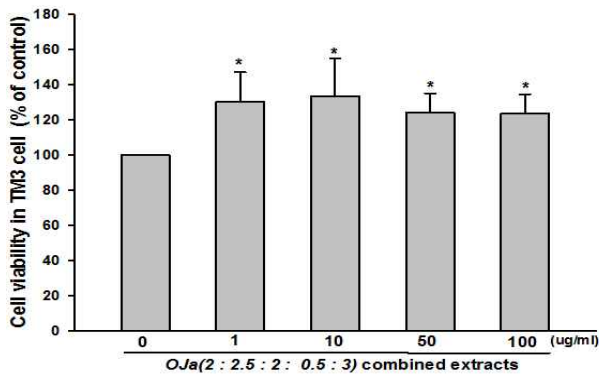


Fig. 1. Effect of water extract of *Oja* on Leydig TM3 cells. Values were represented as Mean \pm S.D. * $P < 0.05$ was statically significant as determined by independent sample t-test for the mean values different from the control group.

2. H₂O₂로 유도한 세포독성 억제효과

Leydig TM3 cells에 대한 cell viability 결과에 근거하여 hydrogen peroxide에 의해 유도되어진 세포생존율을 측정하였다. Hydrogen peroxide는 0 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM 농도에 대해 24시간 처리 후 측정하였으며, Leydig TM3 cells에서 99.75 \pm 0.61%, 104.53 \pm 8.16%, 98.75 \pm 12.07%, 94.21 \pm 12.46%, 79.13 \pm 8.88%, 76.93 \pm 4.89%로 세포 생존율이 농도의존적으로 감소하였으며, 0 μM 에 비해 50과 100 μM 에서 산화적 스트레스 유도 시 한 감소를 보여 세포 독성을 나타냄을 알 수 있었다 ($p < 0.05$)(Fig. 2). 100 μM Hydrogen peroxide에 의해 산화적 스트레스를 유도한 TM3 세포에 대한 오자 추출물을 1, 10, 50, 100

$\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 24시간 처리하여 cell viability을 측정하였다. 99.74 \pm 1.11%, 76.93 \pm 4.89 %, 80.19 \pm 10.20 %, 79.97 \pm 6.41 %, 97.03 \pm 8.88%, 105.65 \pm 7.52%로 Hydrogen peroxide에 의해 유도된 세포독성에 대해 오자 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 군에서 세포 독성 억제 효과가 나타났다($p < 0.05$)(Fig. 3).

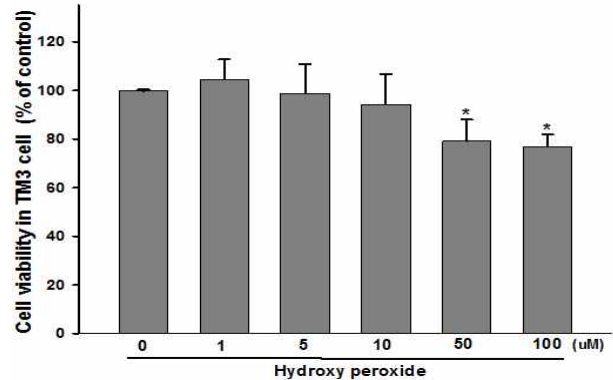


Fig. 2. The change of cell viability by various concentration of hydrogen peroxide in TM3 cells. Values were represented as Mean \pm S.D. * $P < 0.05$ was statically significant as determined by independent sample t-test for the mean values different from the control group.

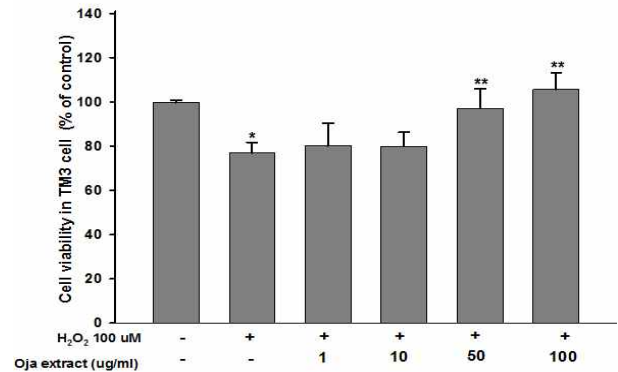


Fig. 3. The protective effect of water extract of *Oja* on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in TM3 cells. Values were represented as Mean \pm S.D. * $P < 0.05$ was statically significant as determined by independent sample t-test for the mean values different from the control group. ** $P < 0.05$ was statically significant as determined by independent sample t-test for the mean values different from the H₂O₂ treated group.

3. 산화질소(Nitric oxide) 합성에 미치는 영향

Leydig TM3 cells에 대해 세포 내 생성되는 산화질소의 양을 측정하였다. 산화적 스트레스 유도 시 세포 내 NO 생성이 3.88 \pm 0.59 μM 에서 5.61 \pm 1.03 μM 로 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$). 오자 열수추출물을 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 첨가한 경우, 5.20 \pm 1.35 μM , 4.70 \pm 1.14 μM , 4.12 \pm 0.50 μM , 3.90 \pm 0.68 μM 로 나타났으며, 특히 50 μM 과 100 μM 에서 NO 생성율이 유의하게 감소하였다($p < 0.05$)(Fig. 4).

4. TM3 cell의 testosterone level 변화

100 μM Hydrogen peroxide에 의해 산화적 스트레스를 유도한 TM3 세포에 대한 오자 추출물을 0, 1, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을

처리하여 testosterone level을 측정하였다. 아무것도 처리하지 않은 대조군에서는 10.02 ± 1.16 pg/ml, 100 μ M Hydrogen peroxide을 처리한 군에서는 7.40 ± 1.00 pg/ml로 유의한 감소를 보였으며($p < 0.05$), 오자 1, 10, 50, 100 μ g/ml 처리 시 7.78 ± 1.27 pg/ml, 8.12 ± 0.46 pg/ml, 9.91 ± 1.41 pg/ml, 11.74 ± 2.06 pg/ml로 오자 처리한 군 중 50, 100 μ g/ml에서 유의하게 증가하였다($p < 0.05$)(Fig. 5).

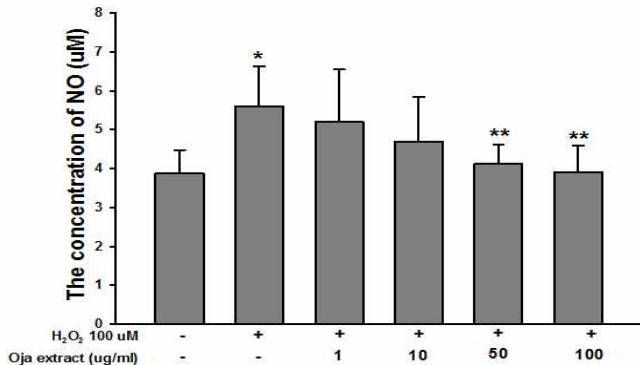


Fig. 4. The change of nitric oxide concentration by various concentration of *Oja* water extract in TM3 cells. Values were represented as Mean \pm S.D. * $P < 0.05$ was statically significant as determined by independent sample t-test for the mean values different from the control group.

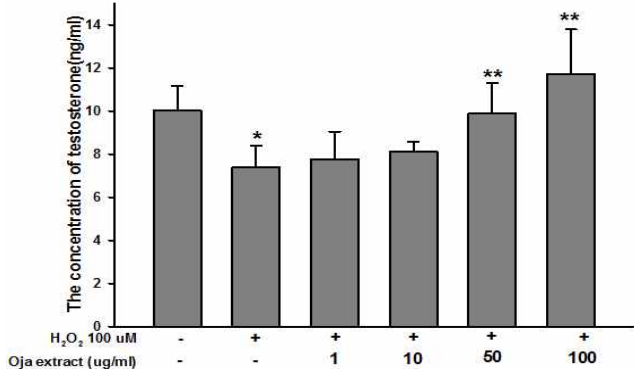


Fig. 5. The change of testosterone concentration by various concentration of *Oja* water extract in TM3 cells. Values were represented as Mean \pm S.D. * $P < 0.05$ was statically significant as determined by independent sample t-test for the mean values different from the control group.

고찰

일반적으로 전통의학에 기반하여 성기능 장애 치료에 대한 약 물이나 건강기능식품 개발에 주력하고 있는 실정이다. 갱년기 증상으로 인한 성기능 장애는 정신적 스트레스와도 밀접한 연관성이 있어, 한의학의 경우 신체적 요인과 정신적 요인까지 고려하는 특징으로 한의학적 치료가 기존 양방의학에 비해 비수술적 방법으로 환자에게 접근하기가 더욱 용이할 것으로 사료되며²⁷⁾, 이에 성기능 장애 대한 한의학적 체계적 연구가 적극적으로 이루어질 필요가 있다. 따라서 본 연구는 오자(五子)가 라이디히 세포 내 산화적스트레

스에서 NO 제거와 testosterone 합성에 어떠한 영향이 있는지 검토하고자 하였다.

오자(五子)는 복분자, 오미자, 구기자, 토사자, 사상자, 여실자, 결명자 등의 자(子)로 끝나는 열매를 의미한다. 구성 약재인 복분자는 탄수화물, 유기산, 기타 미량 성분 등이 들어 있고, 유기산으로는 Malic acid, Tartaric acid, Isocitric acid, Astragalinal, Isoquercitrin 등이 들어 있으며, 비타민 C를 다량 함유하고 있다. 색소성분으로는 폴리페놀, 안토시아닌 등을 함유하고 있으며, 항암, 항산화, 항염 및 항비만 효과를 가지고 있다^{28,29)}.

오미자는 Schizandrin, Gomisin, Citric acid, Malic acid, β -chamigrene 등을 주요 성분으로 세포 내 염증 및 조직 손상을 개선하는 효과를 보이며³⁰⁾, 구기자는 batatine, Vitamin A, B, physalein, carotene, kukoamine A 등의 성분으로 항산화, 항균 활성이 보고되었다³¹⁾.

사상자는 Cnidioside, Cnidiol B, Torilin 등의 물질이 함유되어 있으며, 이는 혈관신생 억제 및 종양 성장을 억제하며, 5α -reductase 억제 효과도 보고되고 있다³²⁾. 결명자 Kaempferol, Linoleic acid, Emodin, Rubrofusarin, Cassiaside, Oleic acid, carotin 등이 함유되어 있으며, 항산화 효과 및 항균 효과 등이 보고되고 있다^{33,34)}.

고환 세포의 산화적 스트레스는 주로 노화, 염증, 방사선, 화학 물질이나 독성물질 노출 등이 있으며, 스트레스성 물질은 혈구세포에 의해 생성될 수 있다³⁵⁾. 정자 형성장애 및 남성호르몬 합성 저하에 대해 고농도의 산화적 스트레스와 관련이 있고, 특히 반응성 산소종의 경우 정자의 질이나 생존에도 영향을 미쳐 남성불임의 원인이 될 수 있으며, 산화적 스트레스로 인해 seminal plasma의 염증반응에도 정자형성에 장애를 가져온다³⁶⁾. 본 연구에서도 산화적 스트레스를 유도 시 남성호르몬의 합성이 감소 되는 것을 확인할 수 있었다. 비정상적인 정자의 기능에 대한 증거로, 고환 내 superoxide(O_2^-), hydroxyl radical($\cdot OH$), peroxy radical(RO_2), hydrogen peroxide(H_2O_2)의 농도가 높을수록 세포에 손상을 주며, 이러한 물질들이 많을수록 고환 내 세포 노화를 촉진한다³⁷⁾. 또한 최근 고환 내 Caspase 활성화 역시 사정된 정자의 활성도를 감소하는데 관여하는 것으로 나타났다. Nitric Oxide(NO)는 세포막을 쉽게 확산하여 다른 활성산소들과 반응할 수 있는데, 특히 superoxide(O_2^-)과 쉽게 반응하여 반응성이 매우 높은 산화제인 peroxynitrite ($ONOO^-$)를 생성한다고 알려져 있다. 오자환은 peroxynitrite($ONOO^-$) 및 그 전구체인 superoxideanion radical ($\cdot O_2^-$)와 NO를 소거시켜 세포를 보호하는 효과를 나타내었으며³⁸⁾, 복분자추출물이 항산화 효과와 관련하여, 간 손상에 있어서도 간보호 효과를 나타낸다고 보고된 바 있다³⁹⁾. 본 연구에서 산화적 스트레스로 유도된 NO의 생성량이 오자(五子) 추출물 처리 시 유의하게 감소하였으며, 이러한 결과는 오자(五子) 추출물이 고환 내 라이디히 세포의 산화적스트레스를 억제 하는 것으로 보여지며, 이러한 산화적 스트레스 억제로 인해, 세포내 호르몬 합성량이 증가됨을 관찰할 수 있었다. 오자(五子) 관련 연구에서, 오자지황음자를 노화 쥐에게 투여한 결과 인체 내 활성산소 생성과 SOD와 catalase를 억제하여, 항산화 효과가 있다고 보고하였다⁴⁰⁾.

남성갱년기 개선 관련하여 임상에서 치료적으로 조절할 수 있는 약제를 많이 탐색 하고 있으며, 본 연구 결과로 볼 때 라이디히 세포의 산화적 손상에 대해 오자(五子) 추출물이 고환 내 세포의 산화적 손상에서 NO 생성 조절을 통해 테스토스테론 합성을 증가시키는 것으로 생각되어진다. 따라서, 오자(五子) 추출물이 남성 고환 내 정자 형성 및 호르몬 대사 기전에 어떤 영향을 주는지는 알아봄으로서 남성 갱년기 개선 관련 소재 개발에 도움이 될 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 오자(五子) 추출물을 대상으로 in vitro에서의 남성 호르몬 합성 효과를 다음과 같이 확인하였다. 오자는 TM3 세포의 세포 생존율에는 영향을 미치지 않았으나, 산화적 스트레스 시에 생존율의 유의한 감소를 나타내었다. 이러한 산화적 스트레스에서 오자는 세포 보호 효과를 나타내었으며, 또한 오자(五子) 추출물은 라이디히 세포의 산화적 손상으로 인한 NO 생성을 유의하게 억제 하며, 남성호르몬의 합성을 증가시키는 효과를 나타내었다. 이상의 결과들은 오자(五子)의 효능 평가를 위한 기초자료로 사용할 수 있을 것으로 사료된다. 이와 같은 결과는 향후 오자(五子) 추출물을 이용한 남성 갱년기 개선을 위한 연구의 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

References

1. Singh, P. Andropause: Current concepts. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* 17(3):621-629, 2013.
2. Staerman, F., Léon, P. Andropause (androgen deficiency of the aging male): diagnosis and management. *Minerva Medica* 103(5):333-342, 2012.
3. Krysiak, R., Okopień, B. Pol Merkur Lekarski. Pathogenesis and clinical presentation of andropause. *32(187):70-73*, 2012.
4. Payne, A.H., Hales, D.B. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine Reviews* 25(6):947-970, 2004.
5. Corrigan, F.E. 3rd, Al Mheid, I., Eapen, D.J., Hayek, S.S., Sher, S., Martin, G.S., Quyyumi, A.A. Low testosterone in men predicts impaired arterial elasticity and microvascular function. *International Journal of Cardiology* 194: 94-99, 2015.
6. Hassan, M.A., Killick, S.R. Negative life style is associated with a significant reduction in fecundity. *Fertility and sterility* 81(2):384-386, 2004.
7. Magnusdottir, E.V., Thorsteinsson, T., Thorsteinsdottir, S., Heimisdottir, M., Olafsdottir, K. Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. *Human reproduction* 20(1):208-215, 2005.
8. Jung, A., Schuppe, H.C. Influence of genital heat stress on semen quality in humans. *Andrologia* 39(6):203-215, 2007.
9. Sheynkin, Y., Jung, M., Yoo, P., Schulsinger, D., Komaroff, E. Increase in scrotal temperature in laptop computer users. *Human reproduction* 20(2):452-455, 2005.
10. Alvarenga, T.A., Hirotsu, C., Mazaro-Costa, R., Tufik, S., Andersen, M.L. Impairment of male reproductive function after sleep deprivation. *Fertility and sterility* 103(5):1355-1362, 2015.
11. Hafez, B., Hafez, E.S. Stress/aging: endocrine profiles/reproductive dysfunction in men. *Archives of andrology* 50(4):207-238, 2004.
12. Menezo, Y., Evenson, D., Cohen, M., Dale, B. Effect of antioxidants on sperm genetic damage. *Advances in experimental medicine and biology* 791: 173-789, 2014.
13. Guerriero, G., Trocchia, S., Abdel-Gawad, F.K., Ciarcia, G. Roles of reactive oxygen species in the spermatogenesis regulation. *Front Endocrinol(Lausanne)*. 22:5:56, 2014.
14. Agarwal, A., Saleh, R.A. Role of oxidants in male infertility : rationale, significance, and treatment. *The Urologic clinics of North America* 29(4):817-827, 2002.
15. Agarwal, A., Saleh, R.A., Bedaiwy, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and sterility* 79(4):829-843, 2003.
16. Turner, T.T., Lysiak, J.J. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *Journal of Andrology* 29(5):488-498, 2008.
17. Morgunov, Llu., Vertkin, A.L., Pushkar', Dlu. Safety of long-term replacement hormonal therapy in patients with erectile dysfunction and androgen deficiency. *Urologia* 5: 49-51, 2007.
18. Crimmel, A.S., Conner, C.S., Monga, M. Withered Yang: a review of traditional Chinese medical treatment of male infertility and erectile dysfunction. *Journal of andrology* 22(2):173-182, 2001.
19. Agarwal, A., Hamada, A., Esteves, S.C. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 1. *Nature reviews Urology* 9(12):678-690, 2012.
20. Jung, S.W., Kim, H.J., Lee, B.H., Choi, S.H., Kim, H.S., Choi, Y.K., Kim, J.Y., Kim, E.S., Hwang, S.H., Lim, K.Y., Kim, H.C., Jang, M., Park, S.K., Cho, I.H., Nah, S.Y. Effects of Korean Red Ginseng extract on busulfan-induced dysfunction of the male reproductive system. *Journal of ginseng research* 39(3):243-249, 2015.

21. Peiris LD, Dhanushka MA, Jayathilake TA. Evaluation of Aqueous Leaf Extract of *Cardiospermum halicacabum*(L.) on Fertility of Male Rats. *BioMed research international* 2015;175726.
22. Ju, D.G. *DanGyeSimBeop*. Seoul, Daesungpress, pp 763-770, 1990.
23. No, S.J. *IkSuYeonNyeon*. Beijing, Chinese Medicine Publishers: p 168, 1991.
24. Jung, I.M., Kang, S.B. The Effects of "Ojayeonjonghwan" on the Secretion of Sex hormones and the Antifatigue in Rats. *Jae-Han Oriental Medical Academy* 3(1):216-231, 1998.
25. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65(1-2):55-63, 1983.
26. Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical biochemistry* 126(1):131-138, 1982.
27. Song, B.K.. Study on the Treatment of Erectile Dysfunction in Oriental Medicine. *Journal of Korean Medicine* 17(2):74, 1996.
28. JiaoShu-De, Ten lectures on the use of medicinals from the personal experience of JiaoShu-De. Brookline. MA: Paradigm Publications. MA 2003.
29. Jeong, M.Y., Kim, H.L., Park, J., An, H.J., Kim, S.H., Kim, S.J., So, H.S., Park, R., Um, J.Y., Hong, S.H. Rubi Fructus(*Rubus coreanus*) Inhibits differentiation to adipocytes in 3T3-L1 Cells. *Evidence-based complementary and alternative medicine* 2013:475386.
30. Bae, H., Kim, R., Kim, Y., Lee, E., Jin Kim, H., Pyo Jang, Y., Jung, S.K., Kim, J. Effects of *Schisandra chinensis* Baillon(*Schizandraceae*) on lipopolysaccharide induced lung inflammation in mice. *Journal of ethnopharmacology* 142(1):41-47, 2012.
31. Mocan, A., Vlase, L., Vodnar, D.C., Bischin, C., Hanganu, D., Gheldiu, A.M., Oprean, R., Silaghi-Dumitrescu, R., Crişan, G.. Polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of *Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill. leaves. *Molecules*. 19(7):10056-10073, 2014.
32. Park, W.S., Son, E.D., Nam, G.W., Kim, S.H., Noh, M.S., Lee, B.G., Jang, I.S., Kim, S.E., Lee, J.J., Lee, C.H. Torilin from *Torilis japonica*, as a new inhibitor of testosterone 5 alpha-reductase. *Planta Medica*. 69(5):459-461, 2003.
33. Park, K.H., Kim, S.J., Hyun, K.H. Brassinosteroid in immature *Cassia tora* seeds. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology* 36(2):99-104, 1993.
34. Jang, D.J., Joo, H.K. and Cho, Y.J. The protective effect of the seeds of *Cassia tora* L. against carbon tetrachlorideinduced hepatic injury on rats. *Analytical Science & Technology* 2: 331-335, 1989.
35. Turner, T.T., Lysiak, J.J. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *Journal of Andrology* 29(5):488-498, 2008.
36. Conrad, M., Ingold, I., Buday, K., Kobayashi, S., Angeli, J.P. ROS, thiols and thiol-regulating systems in male gametogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1850(8):1566-1574, 2015.
37. Warren, J.S., Johnson, K.J., Ward, P.A. Oxygen radicals in cell injury and cell death. *Pathology and Immunopathology Research*. 6(5-6):301-315, 1987.
38. Kim, H.J., Jeong, J.C. Peroxynitrite scavenging mechanism of Ojawan. *Journal of korean oriental internal medicine* 26(1):107-118, 2005.
39. Chae, H.J., Yim, J.E., Kim, K.A., Chyun, J.H. Hepatoprotective effects of *Rubus coreanus* miquel concentrates on liver injuries induced by carbon tetrachloride in rats. *Nutr Res Pract*. 8(1):40-45, 2014.
40. Sea, K.S., Lee, S.Y. The antioxidant effects of Ojajiwchangeumja on the serum & brain tissues of rats—including the effects of Ojajiwchangeumja on the variation of the blood of rat. *The Korean Society of Oriental Neuropsychiatry*. 10(1):79-93, 1999.