

加味腎氣丸이 수컷 노화 생쥐의 생식기능에 미치는 영향

박선영 · 안상현¹ · 김호현*

세명대학교 한의과대학 생리학교실, 1:세명대학교 한의과대학 해부학교실

Effects of Gami-Shinkiwihan on the Reproductive Function of Male Aged Mice

Sun Young Park, Sang Hyun Ahn¹, Ho Hyun Kim*

Department of Physiology, 1: Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Semyung University

This study was performed using histochemical and immunohistochemical methods to investigate the effect of Gami-Shinkiwihan(GS) on reproductive function of male aged mice. 8-weeks-old ICR mice were used as control group, without any treatment, and 15-month-old ICR mice were used as aging elicited group(AE) and Gami-Shinkiwihan treatment group(GS). AE group didn't restrict diets and drinking for 6 months without any treatment. GS was administered 0.56g/kg/day for 6 months. Compared with AE group, the cell division of sertoli cells, spermatids, and spermatogonial cells was increased and the apoptosis of sertoli cells was decreased on GS group. Androgen receptor positive reaction and 17 β -HSD positive reaction were significantly increased in the GS group compared to AE group. In addition, the DJ-1 positive reaction was significantly increased and the HDAC3 positive response was significantly decreased in the GS group compared with AE group. Based on the above results, GS prevented the apoptosis of sertoli cells in the tubules, and increased the production of sertoli cells, spermatozoa and testosterone. Based on this, it is thought that it improves male reproductive dysfunction caused by late-onset hypogonadism.

keywords : Gami-shinkiwihan(GS), Reproductive function, Late-onset hypogonadism, 17 β -HSD, DJ-1, HDAC3

서 론

노화는 시상하부-뇌하수체-성선 축(hypothalamic-anterior pituitary-gonad axis)의 기능 저하로 발생하는 호르몬적, 정신적 그리고 육체적인 변화를 말하는 것으로, 여성에서의 노화는 여성호르몬의 감소가, 남성에서의 노화는 남성호르몬의 감소가 나타난다. 여성호르몬의 감소는 50대 이후에 급격히 진행되는 반면, 남성호르몬의 감소는 20대부터 점진적으로 발생하는데^{1,2)}, 남성에서 연령이 증가하면서 남성 호르몬의 감소로 인해 발생하는 신체적, 정신 및 심리적 변화를 남성 갱년기라 한다³⁾.

일반적으로 여성 갱년기는 폐경과 같은 뚜렷한 신체적 변화가 나타나기 때문에 의학적으로 치료의 대상이라 여겨졌지만, 남성 갱년기는 폐경과 같은 명확한 징후 없이 남성호르몬의 감소가 서서히 진행되면서 발생하므로 지금까지 이를 질병으로 인식하지 못했으며, 이에 대한 진단 기준도 명확하게 확립되지 않은 상태이다. 이에 남성갱년기 증상을 나타내는 사람이 있어도 이를 치료하기 위해 병원을 방문하는 경우는 5% 미만으로 추정될 뿐이다⁴⁾.

남성 갱년기의 증상은 크게 우울증, 기억력 감퇴 등의 정신적 증상, 정자 운동성 감소, 고환 위축 등의 생식기능 감소증상, 성욕

감퇴, 발기감퇴 등의 성기능 감소증상, 골밀도 감소, 근육강도 및 근 질량 감소 등의 뼈와 근육 이상증상으로 나눌 수 있으며, 대표적인 치료법으로는 남성호르몬 보충요법이 있다. 테스토스테론은 1931년 처음으로 합성된 후 초기에는 일차성 저성선증을 보이는 젊은 남성에게만 국한되어 사용되었지만 1992년 노인 남성에게 남성호르몬 보충요법을 시행한 연구가 보고된 이래, 남성 갱년기의 대표적인 치료법으로 사용되어 왔다. 하지만 이 치료법은 전립선 비대증과 심혈관계 질환의 발현을 높이고, 적혈구 증가증을 발생시키는 등의 부작용이 있고, 전립선암이 의심되는 환자나 치료되지 않은 수면 무호흡을 가지고 있는 사람에게는 적용할 수 없다는 단점이 있어^{5,6)} 이를 보완할 수 있는 치료법이나 치료제의 필요성이 대두되고 있다.

加味腎氣丸은 대표적인 補腎처방인 腎氣丸에 補腎의 효과가 있는 것으로 연구 보고된 바 있는 杜冲⁷⁾, 益智仁⁸⁾, 白殭蠶⁹⁾, 五加皮¹⁰⁾, 覆盆子¹¹⁾, 枸杞子¹²⁾ 등 6종의 약물을 加味한 처방으로, 腎의 虛損을 치료하는 腎氣丸의 작용을 더욱 강화할 것으로 생각된다. 加味腎氣丸이 가지는 효과에 대한 연구로 박 등¹³⁾은 加味腎氣丸이 노화로 발생한 성기능 장애를 개선시킨다고 보고하였고, 박 등¹⁴⁾은 加味腎氣丸이 노화로 발생한 골다공증 및 근위축에 효과가 있다고

* Corresponding author

Ho-Hyun Kim, Department of Physiology, College of Korean Medicine, Semyung University 65, Semyung-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do, Korea

E-mail : binbae@semyung.ac.kr ·Tel : +82-43-649-1343

Received : 2017/10/13 ·Revised : 2017/12/06 ·Accepted : 2017/12/14

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

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2017.12.31.6.367

Available online at https://kmpath.jams.or.kr

보고하였다.

한의학적으로 노화는 腎精 및 腎氣虛損으로 발생한다고 보고¹⁵⁾, 노화로 나타날 수 있는 제반 증상들의 치료에 補腎하는 약물들이 주로 사용되어 왔다. 또한 腎精은 生殖, 氣血生成, 臟腑, 經絡의 滋養, 精神活動의 基礎, 外邪의 防禦 기능을 가지고 있다¹⁶⁾. 따라서 加味腎氣丸이 노화로 인한 생식기능 감소를 강화된 補腎의 작용을 통하여 개선시킬 수 있다고 판단하였고, 加味腎氣丸이 남성 갱년기의 증상 중 성기능 감소증상과 노화 증상에 효과가 있다는 기존 연구를 바탕으로 남성갱년기의 생식기능 감소증상에도 효과가 있을 것이라 생각하였다.

이에 저자는 加味腎氣丸이 남성에게 노화로 인해 나타날 수 있는 남성갱년기의 생식기능 감소 증상에 대한 개선효과를 알아보기 위해 조직화학 및 면역조직화학적 연구방법을 이용하여 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

8주령의 수컷 ICR계 생쥐(샘타코, 한국)를 구입한 후 온도 $23\pm^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$ 의 항온항습실에 적응시킨 후 사용하였고, 실험기간동안 사료와 음수는 자유 섭취케 하였다. 본 동물실험은 세명대학교 동물실험윤리위원회의 승인(smecae 16-05-05)하에 실시되었다.

2. 加味腎氣丸 추출물 제조

加味腎氣丸(Gami-Shinkiwihan, GS) 470 g을 증류수 2000 mL과 함께 round flask에 넣고 2시간 동안 가열 추출하였으며, 추출액은 rotary evaporator(Eyela, Japan)로 감압 농축한 후 동결건조기로 건조하여 분말 28.9 g을 제조하였다.

Table 1. Prescription of Gami-Shinkiwihan per Pack

Name of Herbs	Pharmacognostic Name	Weight(g)
熟地黄	Rhizoma Rehmanniae	16
山藥	Rhizoma Discoraeae	8
山茱萸	Fructus Corni	8
五味子	Schisandra chinensis Fructus	8
澤瀉	Rhizoma Alismatis	6
牡丹皮	Cortex Moutan Radicis	6
白茯苓	Poria Cocas	6
杜冲	Eucommiae Cortex	6
益智仁	Amomi Amari Fructus	6
白僵蠶	Bombycis Batryticatus	6
五加皮	Acanthopanax Cortex	6
覆盆子	Rubus Coreanus	6
枸杞子	Lycii Fructus	6
Total		94

3. 실험군의 설정 및 加味腎氣丸 투여

실험군은 정상군(control group), 노화군(aging-elicited group, AE group), 加味腎氣丸군(Gami-Shinkiwihan treatment group, GS group) 총 3군으로 분류하였다.

정상군은 아무런 처치를 하지 않은 8주령의 ICR계 생쥐로 구

성하였고, 노화군과 加味腎氣丸군은 12개월의 ICR계 생쥐로 구성하였다. 노화군은 6개월 동안 아무런 처치 없이 식이와 음수에 제약을 두지 않았고, 加味腎氣丸군은 加味腎氣丸(0.56g/kg)을 D.W에 녹여 하루 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 $50\text{--}60^{\circ}\text{C}$ Bouin 용액에서 1시간동안 매염 처리한 다음 70% 에탄올에서 picric acid를 제거하였다. Weigert iron hematoxylin에서 10분 동안 반응시켜 핵 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$)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 Biotech), mouse anti-AR (1:100, Santa Cruz Biotech, USA)와 mouse anti-17 β -HSD (1:100, Santa Cruz Biotech), mouse anti-DJ-1 (1:100, Santa Cruz Biotech), 그리고 mouse anti-HDAC3 (1:100, Santa Cruz Biotech)에 4°C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG (1:100, DAKO, USA)에 실온에서 24시간 link 하였고, 그런 다음 avidin biotin complex kit (Vector Lab, USA)에 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 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. 그런 다음 strength TdT enzyme (36 μL TdT enzyme : 72 μL 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 DAB를 처리하였다. Methyl green으로 대조염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

5. 영상 분석 및 통계

면역조직화학학과 TUNEL assay의 결과는 image Pro Plus (Media cybernetics, USA)를 이용한 영상분석을 통해 수치화 (means ± standard error) 했다. 각 군의 표본에서 임의로 선정된 피부를 x200배율에서 촬영한 다음 positive pixels/20,000,000 pixels로 영상분석 하였다. 면역조직화학 결과의 통계는 SPSS software (SPSS 20, SPSS Inc., USA)를 이루어졌으며, one-way ANOVA 시행을 통해 유의성 (p<0.05)을 검증하고 Duncan's multiple range test로 사후 검증하였다.

결 과

1. 정세관내 정자와 sertoli 세포의 분포변화

정세관내 정자와 sertoli 세포의 분포 변화를 관찰하기 위해 Masson trichrome 염색을 실시하였다. 노화군의 정세관에서 sertoli 세포의 소실과 정세관 내강 내 생성정자 분포의 감소가 관찰되었으나, 加味腎氣丸은 노화군에 비해 유의하게 많은 수의 sertoli 세포와 생성정자의 분포를 보였다.

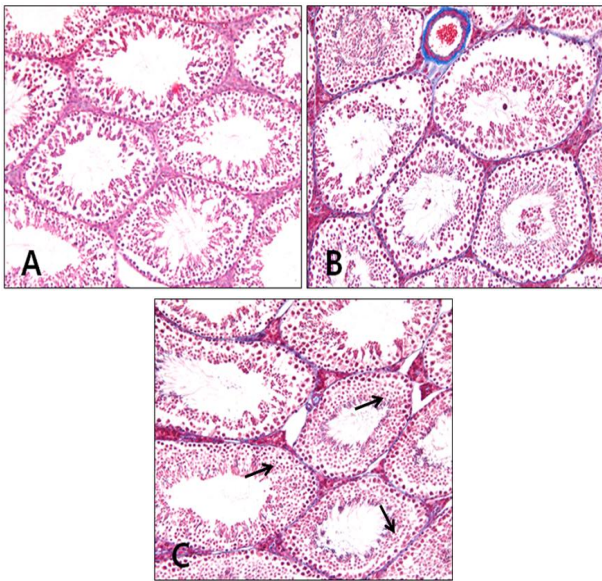


Fig. 1. The Results of Masson trichrome stain in mouse testis(×100). A, Control group; B, Aging-elicited group; C, Gami-Shinkiwihan treatment group.

2. 정조세포의 세포분열 변화

정자생성을 위한 정조세포의 세포분열 변화를 측정하기 위해 항 BrdU를 이용한 면역조직화학을 실시하였다. 노화군의 정세관기저부에서 BrdU양성반응을 보이는 정조세포는 정상군에 비해 72% 감소하였다. 이에 반해 加味腎氣丸군은 노화군에 비해 158%의 유의성 있는 분포 증가를 보였다.

Table 2. The Image Analysis for BrdU stain in mouse testis

Objective	Group		
	Control	AE	GS
AR	97,154±2,285	27,079±1,100	69,832±1,676***

Values are mean±deviation(n=10). Image analysis for 100,000,000 pixel cells. ***p<0.001 compared with AE.

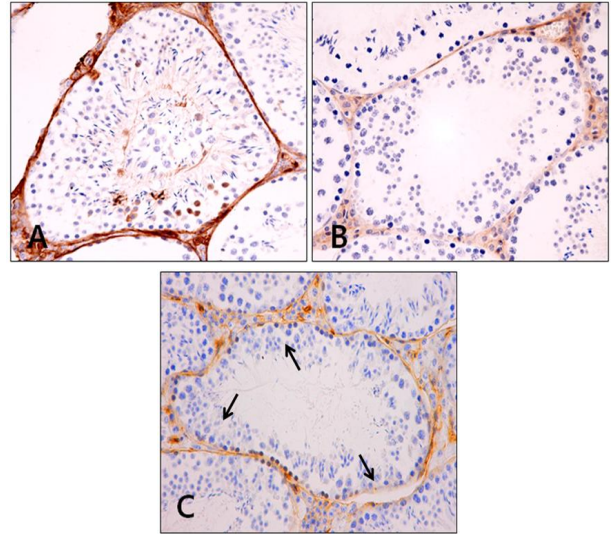


Fig. 2. The Results of BrdU stain in mouse testis(×400). A, Control group; B, Aging-elicited group; C, Gami-Shinkiwihan treatment group.

3. sertoli 세포의 apoptosis 변화

sertoli 세포의 세포자기살해(apoptosis) 변화를 측정하기 위해 TUNEL assay를 실시하였다. 노화군의 정세관에서 apoptosis된 sertoli 세포는 정상군에 비해 710% 증가하였다. 이에 반해 加味腎氣丸군은 노화군에 비해 56%의 유의성 있는 분포 감소를 보였다.

Table 3. The Image Analysis for TUNEL assay in mouse testis.

Objective	Group		
	Control	AE	GS
AR	14,471±1,004	117,287±3,430	51,891±1,745***

Values are mean±deviation(n=10). Image analysis for 100,000,000 pixel cells. ***p<0.001 compared with AE.

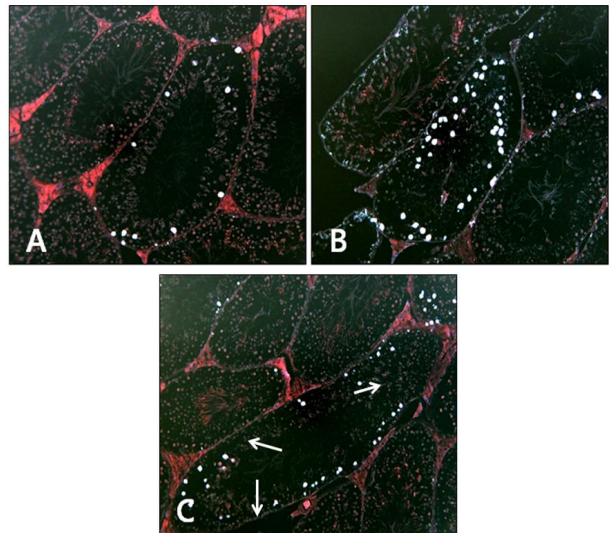


Fig. 3. The Results of TUNEL assay in mouse testis(×400). A, Control group; B, Aging-elicited group; C, Gami-Shinkiwihan treatment group.

4. sertoli 세포의 활성 변화

정자형성에 관여하는 sertoli 세포의 활성 변화를 측정하기 위해 항 androgen receptor(AR)를 이용한 면역조직화학을 실시하였

다. 노화군 정세관의 sertoli 세포에서 AR 양성반응은 정상군에 비해 78% 감소하였다. 이에 반해 加味腎氣丸군은 노화군에 비해 197%의 유의한 양성반응 증가를 보였다.

Table 4. The Image Analysis for AR Positive Reactions.

Objective	Group		
	Control	AE	GS
AR	96,275±2,505	21,482±1,374	63,807±1,906***

Values are mean±deviation(n=10). Image analysis for 100,000,000 pixel cells. *** p<0.001 compared with AE.

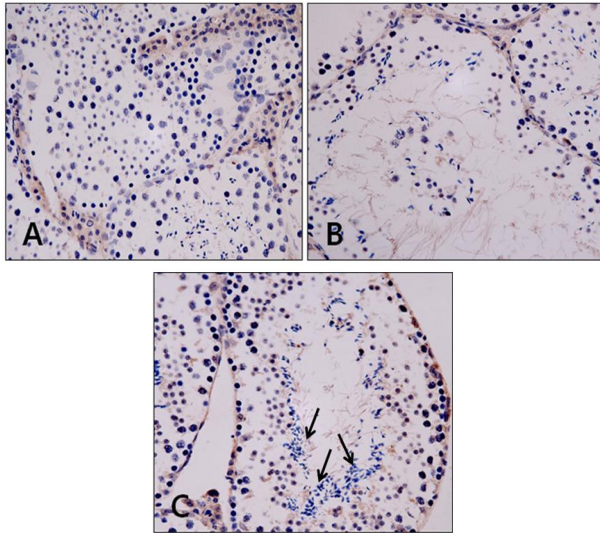


Fig. 4. Immunohistochemistry of AR in mouse testis(×400). A, Control group; B, Aging-elicited group; C, Gami-Shinkiwghan treatment group.

5. Leydig 세포의 testosterone 생성변화

사이질 내 Leydig 세포의 testosterone 생성 변화를 측정하기 위해 항 17β-HSD를 이용한 면역조직화학을 실시하였다. 노화군 사이질의 Leydig 세포에서 17β-HSD 양성반응은 정상군에 비해 79% 감소하였다. 이에 반해 加味腎氣丸군은 노화군에 비해 193%의 유의한 양성반응 증가를 보였다.

Table 5. The Image Analysis for 17β-HSD Positive Reactions.

Objective	Group		
	Control	AE	GS
17β-HSD	81,485±1,641	17,117±1,332	50,095±1,905***

Values are mean±deviation(n=10). Image analysis for 100,000,000 pixel cells. *** p<0.001 compared with AE.

6. 산화스트레스 조절을 통한 정자 형성 변화

加味腎氣丸의 산화스트레스 조절을 통한 정자 형성변화를 조사하기 위해 항 DJ-1를 이용한 면역조직화학을 실시하였다. 노화군의 정세관 내강에서 DJ-1 양성반응을 보이는 정자세포는 정상군에 비해 75% 감소하였다. 이에 반해 加味腎氣丸군은 노화군에 비해 206%의 유의한 분포 증가를 보였다.

Table 6. The Image Analysis for DJ-1 Positive Reactions.

Objective	Group		
	Control	AE	GS
DJ-1	86,490±1,545	21,248±1,371	64,929±1,534***

Values are mean±deviation(n=10). Image analysis for 100,000,000 pixel cells. *** p<0.001 compared with AE.

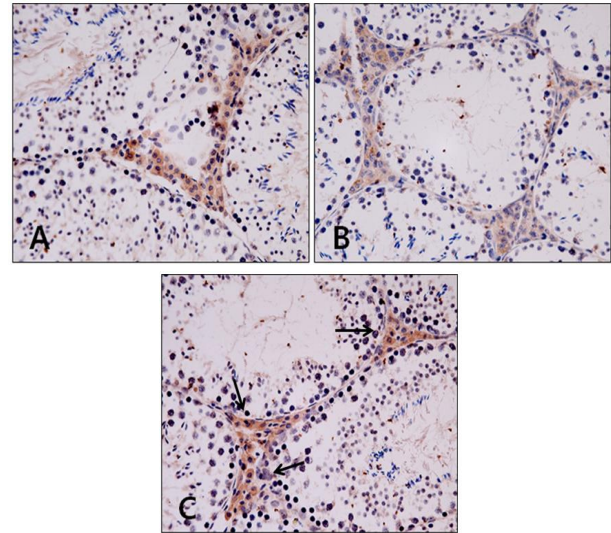


Fig. 5. Immunohistochemistry of 17β-HSD in mouse testis(×400). A, Control group; B, Aging-elicited group; C, Gami-Shinkiwghan treatment group.

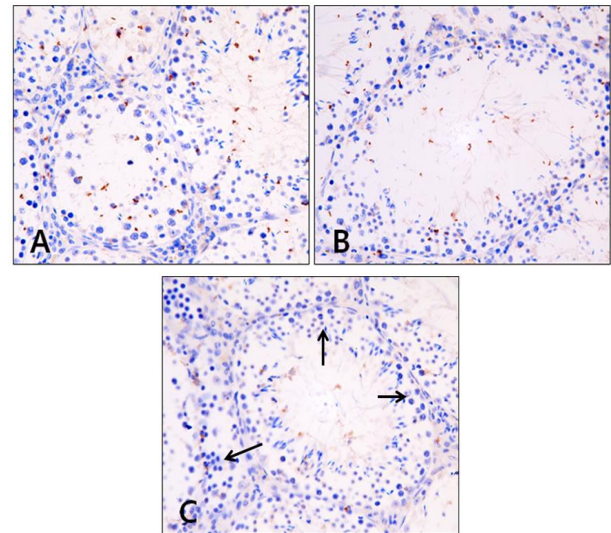


Fig. 6. Immunohistochemistry of DJ-1 in mouse testis(×400). A, Control group; B, Aging-elicited group; C, Gami-Shinkiwghan treatment group.

7. 산화스트레스 조절에 따른 정세관내 sertoli 세포 활성화

산화스트레스 조절에 따른 정세관내 sertoli 세포 활성을 조사하기 위해 항 HDAC3를 이용한 면역조직화학을 실시하였다. 노화군 정세관의 sertoli 세포에서 HDAC3 양성반응은 정상군에 비해 159% 증가하였다. 이에 반해 加味腎氣丸군은 노화군에 비해 38%의 유의한 양성반응 감소를 보였다.

Table 7. The Image Analysis for HDAC3 Positive Reactions.

Objective	Group		
	Control	AE	GS
HDAC3	36,964±1,498	95,797±2,565	59,811±1,746***

Values are mean±deviation(n=10). Image analysis for 100,000,000 pixel cells. *** p<0.001 compared with AE.

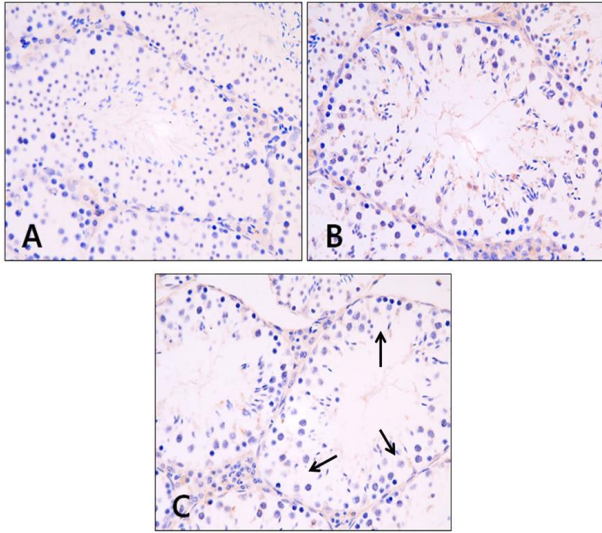


Fig. 7. Immunohistochemistry of HDAC3 in mouse testis(x400). A, Control group; B, Aging-elicited group; C, Gami-Shinkiwon treatment group.

고찰

사회 경제적 풍요와 의학의 눈부신 발전으로 현대인들은 단순히 오래 사는 것을 목표로 하기 보다는 삶의 질에 더 관심을 가지게 되었다. 이전에는 노화라는 것이 어쩔 수 없는 자연현상으로만 생각되어졌지만 노년 인구의 증가 및 사회 경제적 풍요로 삶의 질에 대한 관심이 증가하면서 노화에 대한 인식의 변화가 있었다. 하지만 노화 원인에 대한 연구와 예방, 치료의 분야는 과학과 의학이 발전했음에도 불구하고 아직까지 명확한 결과가 나오지 않고 있다.

노화는 많은 생물학적, 사회 환경 요인들이 작용하는데, 그 중 최근 들어 임상 의학적 측면에서 중노년 이후 남성 노화에 남성 호르몬이 밀접하게 관련되어 있다는 연구결과가 제시되었다^{1,2)}.

Werner에 의해 50대 이후의 남성들도 주기적 발한과 성적 활력의 저하, 쉽게 피로함, 예민함, 안면홍조, 우울감, 집중력 저하, 기억력 장애, 불면 등과 같은 증상을 호소한다는 사실이 보고된 후¹⁷⁾ 이에 대한 관심이 증가되었으며, 연구도 많이 진행되어 왔다. 지금까지의 보고에 의하면 일반적으로 남성의 노화는 50대 이후 남성 호르몬 결핍으로 시작되어, 먼저 신체적 변화가 나타나며 이를 따라 정신 및 심리적 변화와 함께 대인관계 및 사회생활 전반에 걸친 변화가 나타나는 것이라고 생각되고, 노화에 따라 나타나는 일반적 신체증상의 발현을 여성갱년기와 비교하여 남성갱년기라고 한다³⁾.

남성갱년기는 혈장 남성호르몬이 정상 하한값 이하 또는 정상 범위이지만 낮은 경계에 속하거나, 남성호르몬 수치가 감소하는 특별한 질병이 없고, 남성갱년기가 원인이 되어 생긴 것으로 판단되는 임상증상 혹은 이학적 소견이 있을 경우 의학적으로 진단한다¹⁸⁾.

남성갱년기의 증상은 크게 정신적 증상, 생식기능 감소증상, 성기능 감소증상, 뼈와 근육이상 증상의 4가지로 분류할 수 있는데, 발기부전과 같은 성기능 감소증상과 우울증, 기억력 감퇴와 같은 정신적 증상, 골다공증, 근력 감소와 같은 뼈와 근육이상 증상에 대한 연구는 지금도 활발히 진행되고 있는 반면, 생식기능 감소

증상에 대한 연구는 없다.

加味腎氣丸은 六味地黃元에 五味子を 加한 腎氣丸에 杜冲, 益智仁, 白朮, 五加皮, 覆盆子, 枸杞子 등 6종의 한약재를 加味한 처방으로, 본래 腎氣丸이 가지고 있던 腎의 虛損을 치료하는 작용에 補腎 작용을 하는 것으로 보고된 6종의 한약재를 加함으로써 補腎의 작용을 강화한 처방이다. 加味腎氣丸에 대한 연구로 박 등¹³⁾은 加味腎氣丸이 음경해면체의 이완을 통하여 성기능 장애를 개선하는 효과가 있다고 보고하였고, 박 등¹⁴⁾은 加味腎氣丸이 대퇴골내 해면질을 치밀하게 하고, 뼈모세포에서 생성되는 OPN의 활성을 증가시키며, 대퇴사두근의 지방침적을 감소시킴으로써 노화로 인한 골다공증과 근위축을 억제하는 효과가 있다고 보고하였다. 이렇듯 加味腎氣丸은 노화로 발생한 남성갱년기의 성기능 감소증상과, 뼈와 근육이상 증상에 효과가 있었기 때문에 생식기능 감소증상에도 효과가 있을 것이라고 생각된다.

또한 한의학에서 연령에 따른 남성과 여성의 신체변화를 腎氣의 盛衰로 설명한 것을 바탕으로 노화는 腎氣 및 腎精 不足으로 인해 나타나는 현상이라는 것을 알 수 있으며¹⁵⁾, 노화로 인한 제반 증상의 치료에도 補腎약물을 사용해 온 것으로 미루어보아, 補腎의 기능을 강화시킨 加味腎氣丸이 노화로 인해 나타나는 남성갱년기 증상에 효과가 있을 것으로 생각하였다.

이에 저자는 加味腎氣丸이 수컷 노화 생쥐의 생식기능에 미치는 영향을 알아보기 위해 조직화학 및 면역조직화학적 방법을 이용하여 정자생성효과, 남성호르몬 생성효과, 산화스트레스 조절효과로 나누어 연구를 진행하였다.

일반적으로 정소(고환)는 다수의 소엽으로 구성되어 있으며 백막으로 둘러싸여 있다. 소엽들 내에는 정세관이 존재하는데, 정세관 상피는 정조세포, 정모세포, 정자세포로 구성되어 있으며 이들이 변화과정을 거쳐 정조세포로부터 정자를 형성한다^{19,20)}.

정자형성과정은 시상하부-뇌하수체-leydig 세포 축과 시상하부-뇌하수체-sertoli 세포 축, 2개에 의해 조절된다. 시상하부에서 gonadotropin releasing hormone(GnRH)가 분비되어 뇌하수체를 자극하면 뇌하수체에서 LH 및 FSH가 분비되는데, LH는 leydig 세포에 작용하여 testosterone의 합성 및 분비를 유도하고, 정자형성 과정을 촉진한다²¹⁾.

Leydig 세포보다 다양한 방법으로 sertoli 세포는 정자형성과정을 유도하고 생식세포들을 보호하는데, 먼저 sertoli 세포는 물리적으로 생식세포들을 외부환경으로부터 완벽히 차단하고 연접복합체들을 통해 생식세포들을 지지하는 역할을 한다. 또한 뇌하수체에서 분비된 FSH가 sertoli 세포의 G protein 수용체와 결합하면 cAMP를 활성화시키고, FSH에 의해 활성화된 cAMP는 phospholipase A2(PLA2), phosphoinositol 3 kinase(PI3K), calcium channel, mitogen-activated protein(MAP) kinase, protein kinase A(PKA)의 활성을 변화시킴으로써 세포내 칼슘이온 농도와 생식세포에 필수물질들의 합성을 증가시켜 정자형성 과정을 촉진한다²²⁾.

먼저, 정세관내 정자와 sertoli 세포의 분포 변화를 관찰하기 위해 Masson trichrome 염색을 실시한 결과, 加味腎氣丸군이 노화군에 비해 많은 sertoli 세포와 생성정자의 분포를 보였다. 정자

생성을 위한 정조세포의 세포분열 변화를 측정하기 위해 실시한 항 BrdU를 이용한 면역조직화학 결과, BrdU양성반응이 노화군에 비해 加味腎氣丸군에서 증가되어 나타났다. 이는 加味腎氣丸이 고환에서 sertoli 세포와 생성정자를 증가시킨다는 의미이며 이를 통해 노화로 인해 발생한 남성갱년기의 정자생성의 감소를 개선하는 효과가 있다는 것을 알 수 있다. 그리고 이는 sertoli 세포의 apoptosis를 측정하기 위해 실시한 TUNEL assay에서 sertoli 세포의 apoptosis가 AE 군에 비해 GS 군에서 감소되어 나타난 결과를 통해서도 확인할 수 있다.

테스토스테론은 17 β -HSD에 의해 DHEA에서 전환되고²³⁾, 인체에 작용하기 위해서는 androgen receptor(AR)에 결합되어야 한다. AR 양성반응과 17 β -HSD 양성반응이 加味腎氣丸군에서 노화군에 비해 증가되었다는 결과는 곧 加味腎氣丸으로 인해 testosterone 생성이 증가되었다는 의미로, 이를 통해 加味腎氣丸이 노화로 인한 남성갱년기의 testosterone 감소를 개선하는 효과를 가진다는 것을 알 수 있다.

다음으로 산화스트레스의 조절을 통한 정자 형성변화 및 sertoli 세포의 활성 조사실험에서 加味腎氣丸군은 노화군에 비해 DJ-1 양성반응은 유의하게 증가하였고, HDAC3 양성반응은 감소하였다.

DJ-1은 세포 내에서 항산화성 사페론의 기능을 통해 세포를 사멸로부터 보호하고 미토콘드리아의 전자전달계를 조절하여 세포의 항상성을 유지시키는 단백질이다²⁴⁾. 따라서 정세관에서의 DJ-1 양성반응 증가는 정세관 내의 세포가 항산화성 사페론의 기능을 통해 사멸로부터 보호받았다는 것으로, 加味腎氣丸이 산화스트레스를 조절함으로써 정세관내 세포의 사멸을 방지하여 생식기능을 개선시킨다는 사실을 알 수 있다.

Histone deacetylase(HDAC)는 histone을 탈 아세틸화시키는 효소로 chromatin 구조를 밀집시키고, DNA 전사수준을 감소시킨다²⁵⁾. HDAC이 sertoli 세포에서 어떻게 작용하는지에 대한 구체적인 기전은 아직 밝혀진 바가 없지만, sertoli 세포에서 HDAC3 양성반응이 감소되었다는 사실로써 HDAC이 sertoli cell의 유전자 전사에 관여한다는 사실을 알 수 있으며, 이는 HDAC3의 작용 억제제로 인해 정자형성과정에 관여하는 sertoli 세포의 유전자 전사가 영향을 받아 sertoli 세포의 생성이 증가된 것으로 생각할 수 있다. 즉, 加味腎氣丸이 sertoli 세포의 생성에 관여함으로써 노화로 인한 생식기능을 개선시킨다는 사실을 알 수 있다.

위의 결과를 종합해 보면, 加味腎氣丸은 정세관내 정세관내 세포와 sertoli 세포의 사멸을 방지하고, sertoli 세포와 생성정자를 증가시키며, testosterone의 생성을 증가시킴으로써 노화로 인해 발생하는 남성갱년기의 생식기능 장애를 개선시키는 것으로 생각된다.

결 론

대표적인 補腎 처방인 腎氣丸에 6종의 한약재를 가미한 加味腎氣丸이 노화로 인해 발생하는 남성갱년기의 생식기능 감소증상에 미치는 영향을 검증하고자 정자생성효과, 남성호르몬 생성효과, 산화스트레스 조절효과에 대하여 실험하였다.

노화군에 비해 加味腎氣丸군에서 sertoli 세포와 생성정자, 정조세포의 세포분열은 증가하였고, sertoli 세포의 apoptosis는 감소되었다.

AR 양성반응과 17 β -HSD 양성반응은 노화군에 비해 加味腎氣丸군에서 유의하게 증가되었다.

또한 DJ-1 양성반응은 노화군에 비해 加味腎氣丸군에서 유의하게 증가되었으며, HDAC3 양성반응은 유의하게 감소되었다.

이상의 결과를 토대로 할 때, 加味腎氣丸은 정세관내 정세관내 세포와 sertoli 세포의 apoptosis를 방지하고, sertoli 세포와 생성정자, testosterone의 생성을 증가시킴으로써 노화로 인해 발생하는 남성갱년기의 생식기능 장애를 개선하는 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부의 재원으로 한국보건산업진흥원의 보건 의료기술연구개발사업 지원에 의하여 이루어진 것임(HI16C-0469-010016)

References

1. Cohen PG. Aromatase, adiposity, aging and disease. The hypogonadal-metabolic-atherogenic-disease and aging connection. *Med. Hypotheses* 2001;56(6):702-8.
2. Kaufman JM, Vermeulen A. The decline of androgen levels in elderly men and its clinical and therapeutic implications. *Endocr Rev.* 2005;26(6):833-76.
3. Diamond J. Male menopause. Illinois: SourceBooks; 1997.
4. Morales A, Heaton JP, Carson CCIII. Andropause: a misnomer for a true clinical entity. *J. Urol.* 2000;163(3):705-12.
5. Seo JT. Management of late-onset hypogonadism. *JKMA* 2006;49(1):48-52.
6. Holmäng S, Mårin P, Lindstedt G, Hedelin H. Effect of long-term oral testosterone undecanoate treatment on prostate volume and serum prostate-specific antigen concentration in eugonadal middle-aged men. *Prostate* 1993;23(2):99-106.
7. Wang YS. Pharmacological applications of chinese medicine. Beijing: People's medical publishing house; 1983. p. 485-6.
8. Park SY. The Relaxation Effects of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* on Isolated *Corpus Cavernosum Smooth Muscle*. *Kor. J. Herbol.* 2015;30(4):61-9.
9. Whang KT, Han JH, Kang SY. Effect of *Batryticatus bombycis* on the cerebral hemodynamics of rats. *KOMP* 1999;7(2):121-30.
10. Shin MK. Clinical Herbology. Seoul: Younglim press; 2002. p. 224-5.

11. Park SY, Lee PJ, Shin SM, Kim HH. Relaxation effects of *rubus coreanus* in isolated rabbit corpus cavernosum smooth muscle. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology* 2013;27(4):400-8.
12. Jung SH, Kim JH, Oh HG, Shin EH, Lee BG, Park SH, et al. Effects of *Lycii fructus* extracts on the erectile dysfunction by chronic ethanol consumption in rats. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology* 2013;27(5):625-30.
13. Park SY, Kim KB, Ahn SH, Kim TY, Kim HH. Relaxing Mechanism of Gami-Shinkiwihan in corpus cavernosum smooth muscle. *IJST* 2016;9(39):1-10.
14. Park SY, Kim KB, Ahn SH, Kim HH. The effects of Gami-Shinkiwihan on aging-related osteoporosis and muscle atrophy. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2017;Special Issue(2):1-7.
15. Lee KW. *Huangjenaegyongsomun*, Seoul: Yeogang press; 2001. p. 31-8.
16. Kim HH, Park SY.. *Human Physiology in Korean medicine*. Jecheon: Department of Physiology, Semyung University of Korean Medicine; 2017. p. 145-53.
17. Werner AA. The male climacteric. *J. Am. Med. Assoc.* 1946;132:188-94.
18. Wang C, Nieschlag E, Swerdloff R, Behre HM, Hellstrom WJ, Gooren LJ, et al. ISA, ISSAM, EAU, EAA and ASA recommendations: investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males. *Int. J. Impot. Res.* 2009;21(1):1-8.
19. Kerr JB, Mayberry RA, Irby DC. Morphometric studies on lipid inclusions in sertoli cells during the spermatogenic cycle in the rat. *Cell Tissue Res.* 1984;236(3):699-709.
20. Rodman TC, Litwin SD, Romani M, Vidali G. Life history of mouse sperm protein. Intratesticular stages. *J. Cell Biol.* 1979;80(3):605-20.
21. Gazouli M, Yao ZX, Boujrad N, Corton JC, Culty M, Papadopoulos V. Effect of peroxisome proliferators on Leydig cell peripheral-type benzodiazepine receptor gene expression, hormone-stimulated cholesterol transport, and steroidogenesis: role of the peroxisome proliferator-activator receptor alpha. *Endocrinology* 2002;143(7):2571-83.
22. Meroni SB, Riera MF, Pellizzari EH, Cigorraga SB. Regulation of rat sertoli cell function by FSH: possible role of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J. Endocrinol.* 2002;174(2):195-204.
23. Labrie F, Luu-The V, Lin SX, Labrie C, Simard J, Breton R, et al. The key role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids* 1997;62(1):148-58.
24. Giroto S, Cendron L, Bisaglia M, Tessari I, Mammi S, Zanotti G, Bubacco L. DJ-1 is a copper chaperone acting on SOD1 activation. *J. Biol. Chem.* 2014;289(15):10887-99.
25. Momparler RL. Cancer epigenetics. *Oncogene* 2003;22(42):6479-83.