

정계정맥류 유발 백서에서 고환조직의 변화와 정자 형성에 대한 안토시아닌의 효과

¹가톨릭대학교 의과대학 비뇨기과학교실,
²한국전통의학연구소

장 훈¹ · 김수진¹ · 육승모¹ · 한동석¹ · 하유신¹
홍성후¹ · 이지열¹ · 황태곤¹ · 황성연² · 김세웅¹

The Changes of Testis and the Effects of Anthocyanin on Spermatogenesis in Rat Induced Varicocele

Hoon Jang¹, Su Jin Kim¹, Seung Mo Yuk¹, Dong Seok Han¹, U Syn Ha¹,
Sung Hoo Hong¹, Ji Youl Lee¹, Tae Kon Hwang¹, Sung Yeoun Hwang², Sae Woong Kim¹

¹Department of Urology, The Catholic University of Korea College of Medicine,
²Korea Bio Medical Science Institute, Seoul, Korea

= Abstract =

Purpose: Varicocele is known as a main cause of primary male infertility and it supposed to be associated with oxidative stress. Anthocyanin is known as a natural plant pigment and novel antioxidant. This study was designed to investigate the effects of anthocyanin on a rat model of varicocele.

Materials and Methods: Twenty four male rats, induced varicocele by partial obstruction of left renal vein, were divided into four experimental groups: the group induced varicocele for four weeks without anthocyanin, the group received anthocyanin (80 mg/kg) right after varicocele induction, group induced varicocele for eight weeks without anthocyanin, and the group received anthocyanin (80 mg/kg) after four weeks observation following varicocele induction. After anthocyanin treatment, testes from the rats in all groups were removed, weighed, and subjected to histological examination. Apoptosis in the testes was measured by the TUNEL assay. And the oxidative stress was evaluated by measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG).

Results: Induction of varicocele led to decreasing left testis weight, decreasing spermatogenic cell density significantly ($p < 0.05$). Also it led to increasing apoptotic body counts and increasing concentration of 8-OHdG significantly ($p < 0.05$). However administration of anthocyanin right after varicocele induction prevent this change meaningfully ($p < 0.05$). In group received anthocyanin after four weeks observation following varicocele induction, interestingly, there was no significant difference in testis weight, spermatogenic cell density, apoptotic body count and concentration of 8-OHdG compared to group induced varicocele for eight weeks without anthocyanin administration.

Conclusions: These results suggest that anthocyanin is effective in decreasing the oxidative stress of testis in rat induced varicocele and may be effective in making a healthy sperm in patient of varicocele in early stage. However in patient under way in advanced stage, it is supposed that the anthocyanin cannot help having a protective effect from oxidative stress narrowly unless the condition of oxidative stress by varicocele is corrected. Further studies are needed to better understand the mechanisms and actions of anthocyanin and varicocele, and these studies may lead

to the clinical application of anthocyanin in preventing male infertility by varicocele.

Key Words: Anthocyanin, Antioxidant, Apoptosis, Varicocele, Infertility

서 론

정계정맥류는 고환으로부터 정맥혈이 유입되는 정삭의 덩굴 정맥 열기 (pampiniform plexus)가 늘어나고 구불구불해지는 것으로서 젊은 남성의 약 15%에서 발견된다. 성인의 경우 주로 무증상인 경우가 많지만 원발성 남성불임환자의 35%, 속발성 남성불임환자의 81%를 차지하는 것으로 보고되고 있어¹ 남성 불임의 가장 큰 원인 질환으로 알려져 있다. 하지만 세포수준에서 정계정맥류와 남성 불임의 명백한 관계는 아직 밝혀 지지 않았다. 비정상 정자생성 및 불임에 대한 기전에 관한 연구들을 살펴보면 고환손상이 유발되는 기전으로 세포자멸사, 재활성 산화물질, 저산소증에 의한 허혈성 변화에 의한 것으로 생각되고 있어^{2,4} 산화손상을 감소시키는 항산화제의 치료제로서의 가능성이 제시되고 있고 이를 기본으로 항산화 물질을 이용한 치료관련 연구가 시도되고 있다.

이에 본 연구진은 검정콩 종피로부터 추출한 안토시아닌의 항산화 효과와 다양한 생리 활성을 전립선 비대유발 모델에서 확인⁵하였고 이를 토대로 산화 스트레스와 정계정맥류의 발생 관계 그리고 정계정맥류 유발 모델에서 항산화 물질인 안토시아닌의 효과를 알아보하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 안토시아닌의 추출 및 성분 분석

본 실험에 사용된 검은콩은 농촌진흥청으로부터

Table 1. Total and individual anthocyanin contents of Black Soybean

Cultivar	Anthocyanin contents (μ g/g)			Total
	Dp3glc	Cy3glc	Pt3glc	
Cheongja 3	3049.0	8277.2	791.7	12117.9
% of total	25.2	68.3	6.5	100

Dp3glc: delphinidin-3-O-glucoside, Cy3glc: cyanidin-3-O-glucoside, Pt3glc: petunidin-3-O-glucoside.

제공 받았으며 본 연구진의 이전 연구⁵에서 시행한 방법과 동일한 방법으로 추출 및 성분분석을 시행하였다. Dionex Ultimate 3000 series (Dionex Softron GmbH, Germering, Germany)를 이용하여 High performance liquid chromatography (HPLC)를 시행한 검은콩 종피의 추출물은 delphinidin-3-O-glucoside, cyanidin-3-O-glucoside, 그리고 petunidin-3-O-glucoside 로 확인되었고 각 성분의 구성비는 다음과 같았다 (Table 1).

2. 실험동물 및 사육조건

실험동물은 생후 12주된 380~400 g의 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐(Samtako Bio Korea, Inc., Osan, Korea)를 제공받아 1주일간의 적응기간을 거친 뒤 플라스틱 사육함에 2마리씩 사육하였다. 사육장은 인공조명에 의하여 아침 7시부터 저녁 7시까지 12시간으로 조절하였으며, 실내온도는 18~23°C와 40~60%의 습도를 유지하고 정수된 식수와 사료를 자유롭게 먹게 하였다. 본 연구는 Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of the Catholic University of Korea의 승인하에 진행되었다 (IRB approval no. CUMC-2010-0106-02).

3. 안토시아닌 비투여군과 안토시아닌 투여군

실험동물 모두에서 정계정맥류를 유발 후 안토시아닌 비투여군 (n=12)과 안토시아닌 투여군 (n=12)으로 나누었다. 안토시아닌 비투여군은 희생도살 시기에 따라 4주군 (n=6)과 8주군 (n=6)으로 나누었고, 안토시아닌 투여군은 투여시기에 따라 정계정맥류 유발 직후 안토시아닌 투여군 (n=6)과 정계정맥류 유발 후 4주간의 관찰기간 이후에 안토시아닌을 투여하는 군 (n=6)으로 나누었다. 안토시아닌 투여군은 흰쥐의 체중당 80 mg/kg을 기준으로 검은콩 종피 추출물을 증류수에 희석하여 4주 동안 매일 1회 경구 투여시켰다.

4. 정계정맥류 유발

정계정맥류 유발은 좌신 정맥에서 생식샘 정맥의 분지부위 보다 근위부에서 결찰을 시행하여 좌신 정맥의 부분 폐색을 일으키는 Saypol 등⁶의 실험방

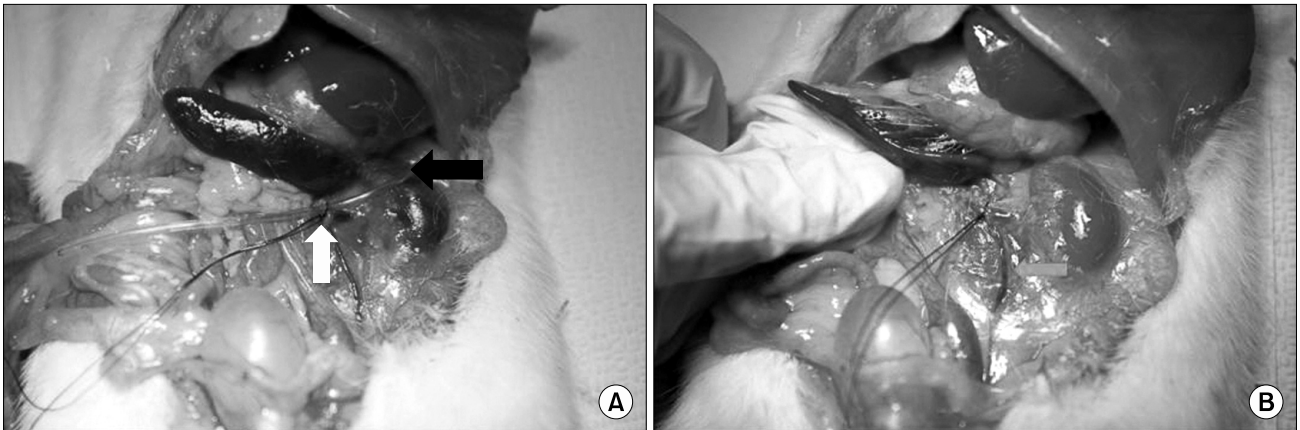


Fig. 1. (A) It shows ligation of proximal renal vein with plastic probe. Black arrow indicates plastic probe and white arrow indicates the engorgement of left gonadal vein and distal renal vein. (B) It shows partial obstruction of proximal renal vein after removal of plastic probe. Gray arrow indicates engorged left gonadal vein.

법을 이용하였다 (Fig. 1).

5. 고환 조직의 획득과 정모세포 밀도 측정

정계정맥류 유발 4주 후 안토시아닌 비투여 4주 군과 정계정맥류 유발 직후 안토시아닌 투여군을 희생 도살하였고 8주 후 안토시아닌 비투여 8주군과 정계정맥류 유발 후 4주간의 관찰기간 이후에 안토시아닌 투여군을 희생 도살하였다. 각 군은 마취 후 하복부 절개를 통해 양측 고환을 절제한 후 무게를 측정하고 조직을 획득하여 10% 중성 포르말린에서 고정한 후 파라핀에 포매하여 절편을 얻어 Hematoxyline-Eosin 염색을 시행하여 광학 현미경으로 관찰하였다. 광학 현미경 400배 시야에서 비교적 원형에 가까운 정세관을 무작위 10곳을 선정하여 정모 세포층의 두께와 정세관의 직경을 측정하여 정모세포 밀도를 구하였다 (Fig. 2).

6. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling) assay 및 세포자멸사의 평가

적출한 고환 조직에서 세포자멸사를 확인하기 위하여 TUNEL assay를 시행하였다. TUNEL assay는 Apop Tag *In Situ* Apoptosis Detection Kits (Millipore Co., Massachusetts, US)을 사용하였고 고환 조직에서 세포자멸사의 평가는 TUNEL assay에 양성을 보이는 세포 수를 측정하여 각 군별 차이를 비교하였다. TUNEL assay에 양성인 세포측정은 각 군의 슬라이드에서 무작위 10부위를 선택하여 광학현미경

200배율에서 관찰되는 TUNEL assay에 양성인 세포 수를 측정하였다.

7. 산화 스트레스의 측정

고환 조직에서 산화 스트레스의 측정은 산화 변형된 DNA를 반영하는 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)를 정량적으로 측정하여 평가하였다. DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 고환조직에서 DNA를 추출하고 DNA oxidation kit (Highly Sensitive 8-OHdG Check ELISA; Japan Institute for the Control of Aging, Fukuroi, Japan)를 이용하여 8-OHdG를 측정하였다. 표준 8-OHdG (0.5~40 ng/ml) 또는 고환조직으로부터 얻어진 DNA를 8-OHdG로 미리 도포된 microtiter plate에서 1시간 동안 8-OHdG에 대한 단일 클론 항체와 배양을 시키고 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine을 첨가하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선과 수정 DNA 농도를 이용하여 조직 표본 농도를 계산하였다.

8. 통계분석방법

각 측정 수치를 평균±표준편차로 표기하였으며 통계는 SPSS for Microsoft Window 프로그램 (ver. 12.0)을 이용하였다. 통계학적 분석은 Kruskal-Wallis test, Mann-Witney U-test를 이용하여 분석하였으며 각 군 간의 비교는 Tukey 검정법을 시행하여 p값이 0.05 미만인 경우에 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.

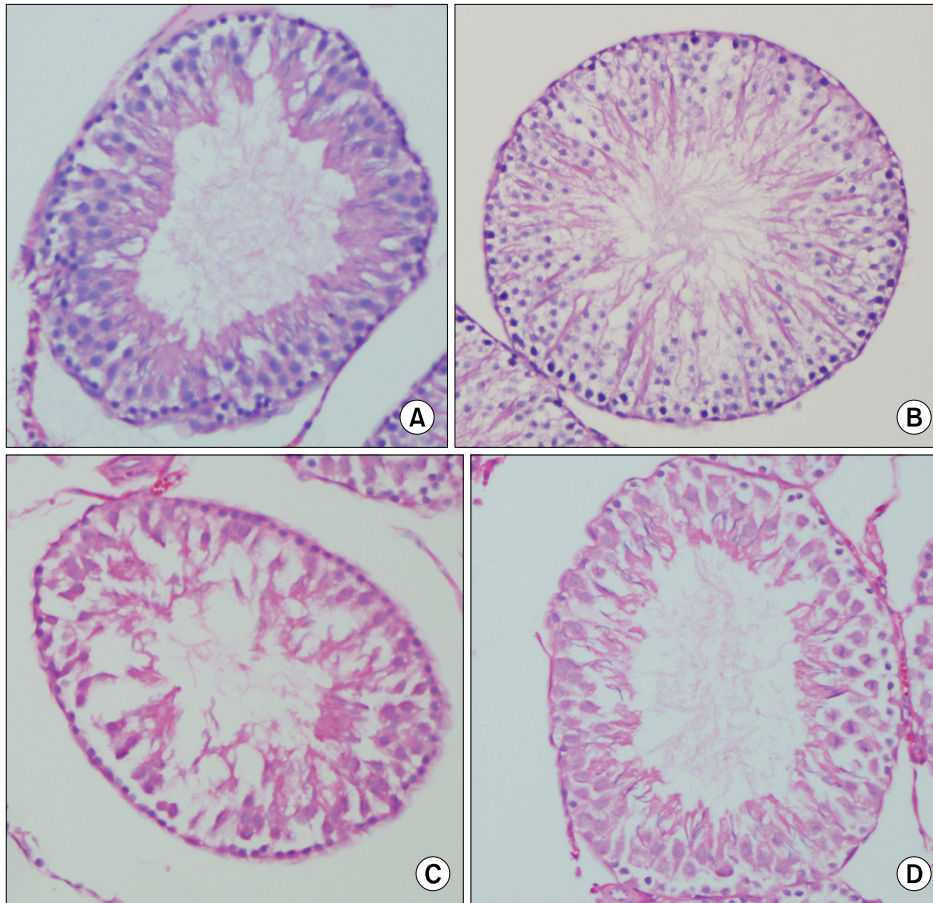


Fig. 2. Histopathologic findings of left testis (H&E stain). The thickness of germinal cell layer (B) is more increased than that (A) statistically ($\times 400$). (C) and (D) necrosis of germinal cells was observed and the thickness of germinal cell layer was more decreased than that (B). And there was no difference in spermatogenic cell density between (C) and (D) statistically ($\times 400$). (A) Group induced varicocele for 4 weeks without anthocyanin administration. (B) Group received oral dose of anthocyanin (80 mg/kg) for 4 weeks right after varicocele induction. (C) Group induced varicocele for 8 weeks without anthocyanin administration. (D) Group received oral dose of anthocyanin (80 mg/kg) for 4 weeks after 4 weeks observation following varicocele induction.

결 과

1. 고환의 무게

안토시아닌 비투여 4주군의 평균 우측 고환 무게는 2.015 ± 0.072 g이었고, 평균 좌측고환 무게는 1.480 ± 0.035 g로 통계학적으로 유의하게 감소한 소견을 보였다 ($p < 0.05$). 한편 정계정맥류 유도 직후부터 안토시아닌을 투여한 군의 평균 좌측 고환 무게는 1.838 ± 0.125 g으로 안토시아닌 비투여 4주군에 비하여 통계학적으로 유의하게 증가한 소견을 보였다 ($p < 0.05$). 한편 안토시아닌 비투여 8주군과 정계정맥류 유발 후 4주간의 관찰기간 이후에 안토시아닌을 투여하는 군의 평균 좌측 고환무게는 1.320 ± 0.065 g과 1.375 ± 0.125 g으로 두 군 사이에 통계학적으로 의미 있는 차이는 관찰되지 않았다 ($p > 0.05$) (Fig. 3).

2. 좌측 고환의 정모세포 밀도 (정모 세포층의 두께/정세관의 직경)

안토시아닌 비투여 4주군에서 좌측 고환의 정모세포 밀도는 0.272 ± 0.026 이었고 반면에 정계정맥류 유도 직후부터 안토시아닌을 투여한 군은 0.347 ± 0.029 으로 나타나 안토시아닌 투여 군에서 정모세포 밀도가 통계학적으로 의미 있게 증가되어 있었다 ($p < 0.05$). 한편 안토시아닌 비투여 8주군과 정계정맥류 유발 후 4주간의 관찰기간 이후에 안토시아닌을 투여한 군에서 좌측고환의 정모세포 밀도는 0.249 ± 0.031 과 0.345 ± 0.071 으로 나타나 두 군 사이에서 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다 ($p > 0.05$) (Fig. 4).

3. 세포자멸사 확인 및 평가

세포자멸사가 발생한 세포는 세포고사체를 형성하여 TUNEL assay에서 검정색 또는 짙은 갈색으로 관찰되었다 (Fig. 5). 안토시아닌 비투여 4주군, 정

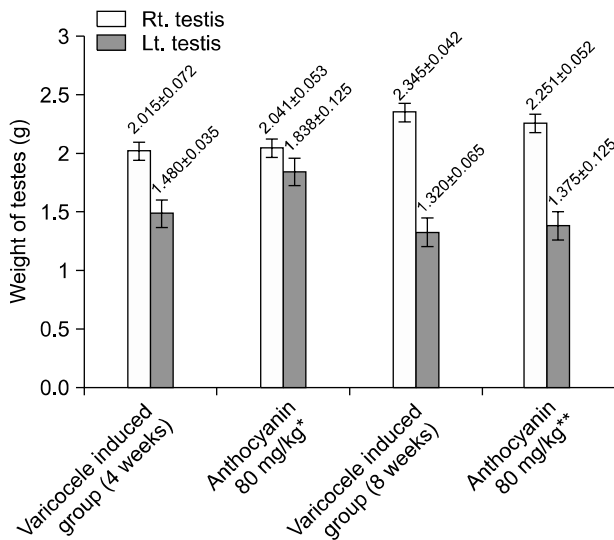


Fig. 3. Mean weight of testes in each groups. Left testis weight of group received anthocyanin right after varicocele induction is significantly higher than group induced varicocele for 4 weeks without anthocyanin administration statistically ($p < 0.05$). But there was no difference between group induced varicocele for 8 weeks without anthocyanin and group received anthocyanin after 4 weeks observation following varicocele induction statistically ($p > 0.05$). *Anthocyanin 80 mg/kg: group received oral dose of anthocyanin (80 mg/kg) right after varicocele induction. **Anthocyanin 80 mg/kg: group received oral dose of anthocyanin (80 mg/kg) after 4 weeks observation following varicocele induction.

계정맥류 유도 직후부터 안토시아닌을 투여한 군, 안토시아닌 비투여 8주군 그리고 정계정맥류 유발 후 4주간의 관찰기간 이후에 안토시아닌을 투여한 군에서 TUNEL assay에 양성을 보이는 세포 수는 각각 14.52 ± 2.25 , 6.30 ± 1.10 , 17.25 ± 2.05 , 그리고 15.15 ± 3.15 으로 안토시아닌 비투여 4주군에 비하여 정계정맥류 유발 후부터 안토시아닌을 투여한 군에서 TUNEL assay 양성 세포수가 통계학적으로 유의하게 감소하였음을 확인하였다 ($p < 0.05$) (Fig. 6). 하지만 안토시아닌 비투여 8주군과 정계정맥류 유발 후 4주간의 관찰기간 이후에 안토시아닌을 투여한 군은 두 군 사이에 통계학적으로 유의한 차이는 보이지 않았다 ($p > 0.05$).

4. 고환 조직에서 산화스트레스의 측정

고환 조직에서 산화 스트레스는 고환 조직의 8-OHdG를 ELISA를 이용하여 정량적으로 측정하여 농도를 구하였다. 안토시아닌 비투여 4주군, 정계정맥류 유도 후부터 안토시아닌을 투여한 군, 안토

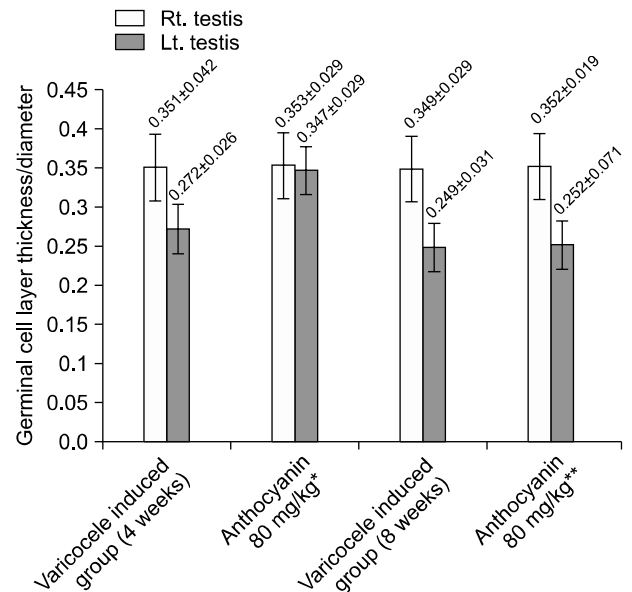


Fig. 4. Spermatogenic cell density (germinal cell layer thickness/diameter of seminiferous tubule). Spermatogenic cell density of group received anthocyanin right after varicocele induction is significantly higher than group induced varicocele varicocele for 4 weeks without anthocyanin administration statistically ($p < 0.05$). But there was no difference between group induced varicocele for 8 weeks without anthocyanin administration and group received anthocyanin after 4 weeks observation following varicocele induction statistically ($p > 0.05$). *Anthocyanin 80 mg/kg: group received oral dose of anthocyanin (80 mg/kg) right after varicocele induction. **Anthocyanin 80 mg/kg: group received oral dose of anthocyanin (80 mg/kg) after 4 weeks observation following varicocele induction.

시아닌 비투여 8주군 그리고 정계정맥류 유발 후 4주간의 관찰기간 이후에 안토시아닌을 투여한 군에서 ELISA를 이용하여 측정한 8-OHdG의 농도는 각각 1.496 ± 0.165 , 0.582 ± 0.105 , 1.542 ± 0.215 , 그리고 1.516 ± 0.114 으로 안토시아닌 비투여 4주군에 비하여 정계정맥류 유발 후부터 안토시아닌을 투여한 군에서 8-OHdG의 농도가 통계학적으로 유의하게 감소하였음을 확인하였다 ($p < 0.05$) (Fig. 7). 하지만 안토시아닌 비투여 8주군과 정계정맥류 유발 후 4주간의 관찰기간 이후에 안토시아닌을 투여한 군은 두 군 사이에 통계학적으로 유의한 차이는 보이지 않았다 ($p > 0.05$).

고 찰

정계정맥류는 남성 불임 환자의 35%, 속발성 남성 불임 환자의 81%를 차지하고 있어 비뇨기와 임

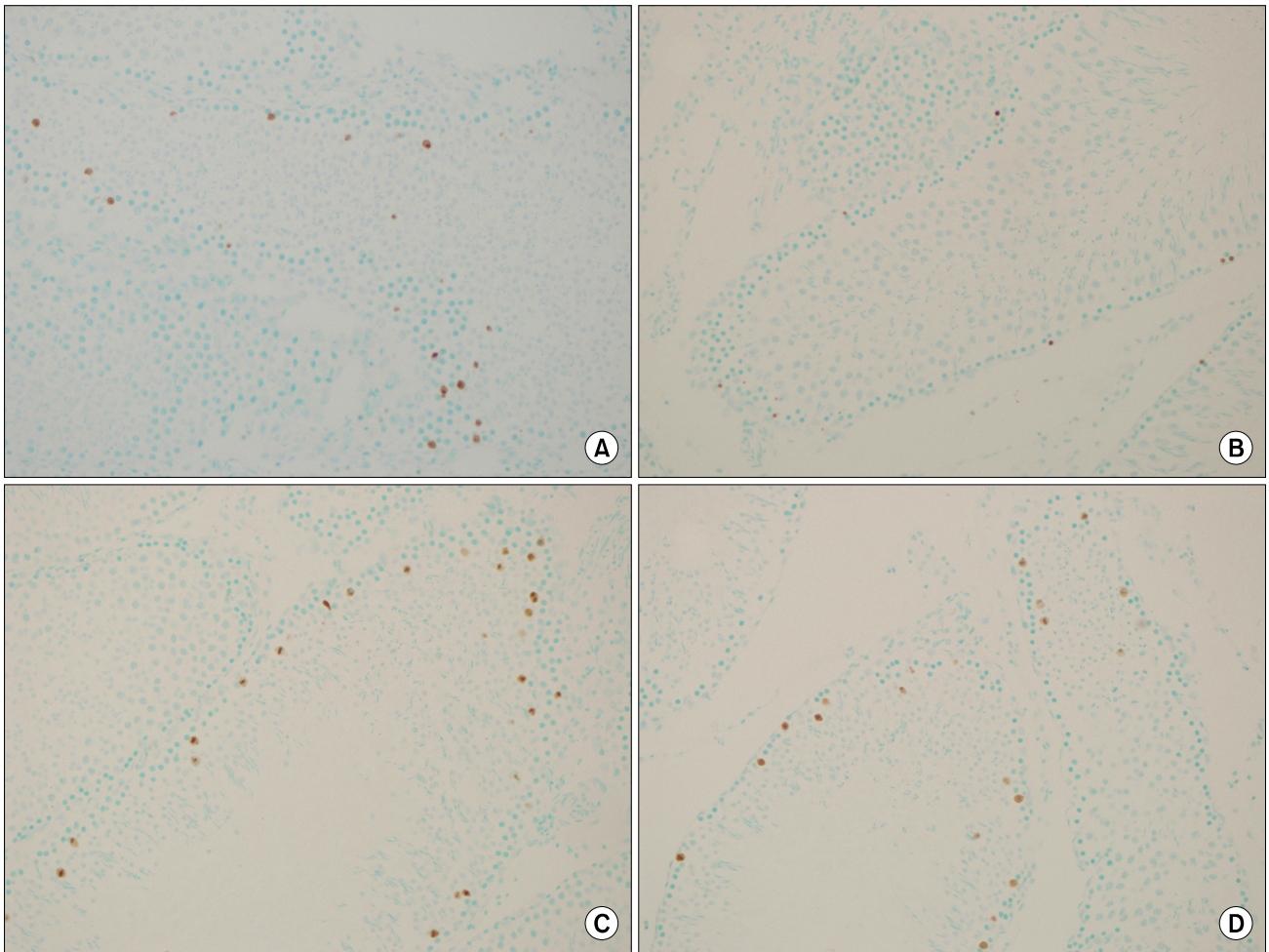


Fig. 5. Apoptotic bodies in TUNEL stain of left testis. Positive TUNEL stain cell called apoptotic body was showed in dark brown or black color in TUNEL stain ($\times 200$). (A) Counts of apoptotic bodies was more increased than that (B). (C) and (D) apoptotic bodies were more increased than that (A). But there was no difference in counts of apoptotic bodies between (C) and (D) statistically ($\times 200$). (A) Group induced varicocele for 4 weeks without anthocyanin administration. (B) Group received oral dose of anthocyanin (80 mg/kg) for 4 weeks right after varicocele induction. (C) Group induced varicocele for 8 weeks without anthocyanin administration. (D) Group received oral dose of anthocyanin (80 mg/kg) for 4 weeks after 4 weeks observation following varicocele induction.

상에서 주된 관심사 중의 하나이다. 현재까지 정계정맥류 환자에서 확장된 덩굴 정맥 열기를 개복⁷ 및 복강경하⁸⁻¹⁰에서 수술적으로 결찰 하거나 혈관 조영을 통하여 혈관을 폐쇄¹¹시키는 수술 및 술기는 비정상 정액검사 소견을 가진 환자에게서 정액검사 소견의 호전과 임신율 증가를 보이고 있어 현재의 치료법을 적용할 환자의 선택이 임상에서 중요하다 할 수 있다. 하지만 세포 수준에서 정계정맥류와 남성 불임의 명백한 관계는 아직 밝혀지지 않았다. 성선 자극 호르몬 또는 남성 호르몬 분비의 감소,^{12,13} 음낭 내 온도의 상승, 그리고 정맥혈 저류에 의한 신정맥에서 정계정맥으로의 부신 및 신독

성 물질의 이동에 의한 저산소증 등의 가설들이 정계정맥류 환자에서 정모세포 기능부전의 발생기전으로 생각되고 있다.² 정확한 원인 및 발생기전을 밝히기 위하여 가임 남성에서 정계정맥류의 유무에 따라 순차적 정액검사 및 고환 조직검사가 가장 이상적이지만 윤리적인 이유 등으로 본 연구진은 연구에 필요한 충분한 조직을 얻을 수 있는 동물 실험을 계획하였고 세포 수준에서의 결과를 얻었다.

본 연구에서 정계정맥류 유발 후 안토시아닌 비투여 4주군은 우측 고환에 비하여 좌측 고환의 용적이 유의하게 감소하였으며 좌측 고환에서의 정모세포 밀도가 우측 고환의 정모세포 밀도에 비하

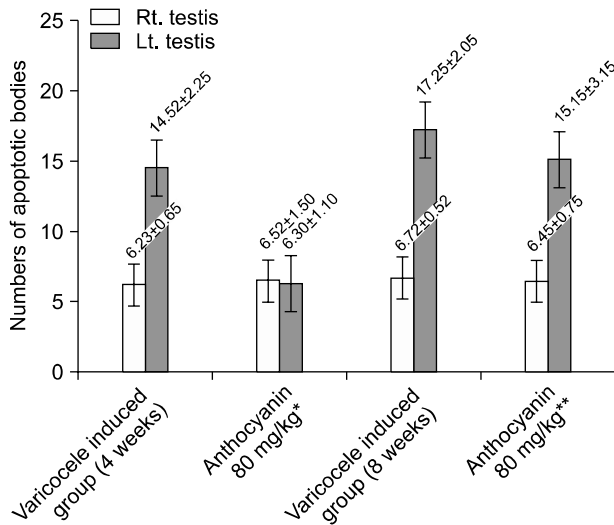


Fig. 6. Numbers of apoptotic bodies. In group received anthocyanin right after varicocele induction, count of apoptotic bodies is significantly lower than that of group induced varicocele for 4 weeks without anthocyanin administration statistically ($p < 0.05$). But there was no difference between group induced varicocele for 8 weeks without anthocyanin administration and group received anthocyanin after 4 weeks observation following varicocele induction statistically ($p > 0.05$). *Anthocyanin 80 mg/kg: group received oral dose of anthocyanin (80 mg/kg) right after varicocele induction. **Anthocyanin 80 mg/kg: group received oral dose of anthocyanin (80 mg/kg) after 4 weeks observation following varicocele induction

여 통계학적으로 의미 있게 감소되었다. 이를 통하여 Saypol 등⁶의 연구방법을 통한 정계정맥류 유발은 실험적으로 정계정맥류 유발이 가능하며 본 연구에 적합한 방법이라고 생각한다. 청소년기에 고환용적의 감소는 정계정맥류와 밀접하게 연관되어 있음¹⁴은 이미 잘 알려져 있으며 Lyon 등¹⁵은 심한 경우 고환 위축과 정자생성 정체가 나타날 수 있다고 보고하였다. Park 등¹⁶은 정계정맥류 유발 백서에서 4주째 좌측 고환의 의미 있는 용적 감소와 정세관의 퇴행성 변화 증가를 보고하였고 고환 용적의 감소는 정계정맥류 환자에서 치료의 적응증에 해당되므로 본 연구모델에서 관찰된 고환 무게의 감소와 정모세포 밀도의 감소는 정계정맥류에 의한 고환 손상의 결과라고 생각한다.

활성 산소 (Reactive oxygen species, ROS)와 불임과의 연관성에 대한 연구가 시작 된 것은 그리 오래 되지 않았다 하지만 초기 연구자들은 ROS가 불임과 연관되어 있다고 추정하였다 Sharma와 Agarwal¹⁷과

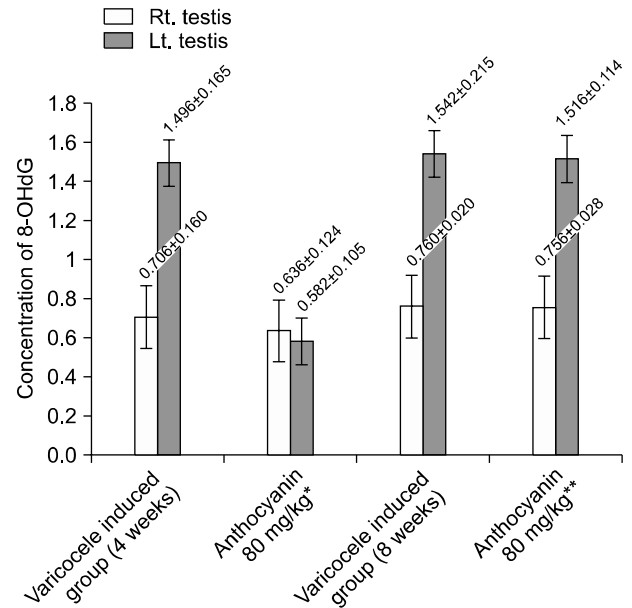


Fig. 7. Concentration of 8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine). In group received anthocyanin right after varicocele induction, concentration of 8-OHdG is significantly lower than that of group induced varicocele for 4 weeks without anthocyanin administration statistically ($p < 0.05$). But there was no difference between group induced varicocele for 8 weeks without anthocyanin administration and group received anthocyanin after 4 weeks observation following varicocele induction statistically ($p > 0.05$). *Anthocyanin 80 mg/kg: group received oral dose of anthocyanin (80 mg/kg) right after varicocele induction. **Anthocyanin 80 mg/kg: group received oral dose of anthocyanin (80 mg/kg) after 4 weeks observation following varicocele induction

Aitken 등¹⁸은 불임 환자에서 정액 내 ROS가 높게 측정됨을 보고하였고 특히 정계정맥류를 가진 환자에서 활성 산소의 생성이 증가되어 있으며 이러한 증가가 적어도 불임 발생과 관련되어 있다고 보고하였다. 또한 정계정맥류 절제술을 받은 환자는 정계 정맥류가 없는 가임 남성과 동일한 수준의 산소 자유 유리기를 보이고 있어 ROS가 정계정맥류에 의한 불임에 관련되어 있음을 제시하였다.³

ROS는 정모 세포를 포함한 생존하고 있는 모든 세포의 정상적인 대사 과정에서 생성된다. 그러나 정자 자체,^{19,20} 생체 이물의 합성^{21,22}에 의해 또는 면역 억제제²³에 의하여 ROS가 과도하게 생성되는 경우 독성 지질 과산화물 (toxic lipid peroxide)이 생성된다. 또한 ROS가 축적되는 경우 세포는 다양한 항산화 효소를 사용하여 방어기전을 보이는데 주된 해독 작용은 Catalase (CAT)와 Glutathione (GSH)에

의하여 이루어진다. 그 외에 페놀성 화합물,^{24,25} 비타민 C²⁶ & E, 멜라토닌,²⁷ 라이코펜²¹⁻²³ 등이 다양한 지질 과산화물로 인한 손상을 예방하기 위하여 항산화제로서 사용된다. 본 연구에서 사용한 안토시아닌은 식물체에서 적색, 자색 및 청색을 내는 수용성 자연색소이면서 flavonoid 성분을 함유하고 있어 자유 유리기에 의한 세포 공격 이전에 자유 유리를 안정화 시키거나 비활성화 시키는 항산화 작용을 하는 것으로 알려져 있다. Wang과 Jiao²⁸은 superoxide ($O_2^{\cdot-}$), singlet oxygen (1O_2), peroxide (O_2^{2-}), hydrogen peroxide (H_2O_2), 그리고 hydroxyl radical (OH)와 같은 ROS를 제거하는 안토시아닌의 항산화 작용은 안토시아닌의 phenolic 구조에 기인하고 있음을 보고하였고 Shih 등²⁹은 산화 스트레스를 받는 과정에서 정상세포방어에 매우 중요한 anti-oxidant response element (ARE)-regulated Phase II enzyme를 안토시아닌이 촉진시킴을 보고하였다. 현재까지 안토시아닌의 생체 내 작용기전은 명확하게 밝혀지지 않았지만 본 연구진은 안토시아닌의 항산화 작용과 다양한 생체 활성이 산화스트레스와 관련한 정계정맥류에서도 효과가 있을 것으로 추정하고 연구를 진행하였다.

ROS는 고반응성이며 많은 세포내 분자들과 반응할 수 있다. 특히 불포화 지방산 (인지질, 당지질, 글리세리드, 스테롤)과 산화될 수 있는 아미노산으로 된 세포막 단백질의 산화는 세포막 투과성을 증가시킨다. ROS는 과반응의 결과물로서 과산화물과 알코올 알데히드 및 지질 알데히드의 발생으로 자가촉매 과정을 통하여 세포막 지질의 불포화 결합을 공격할 수 있다. 그 결과로 세포 내 증가한 자유 유리는 고도 불포화 지방산의 산화 파괴에 의하여 지질 과산화물을 증가시킬 수 있다.^{30,31} 특히 정자의 경우 세포막에 불포화 지방산을 많이 함유되어 있어 ROS의 공격을 보다 쉽게 받을 수 있으며 세포막 지질의 과산화와 세포막 투과성의 증가로 세포자멸사를 초래하며 활성 산소는 직접적으로 정자 DNA 손상을 일으키거나 세포 내 Ca^{2+} 의 농도를 변화시켜 결국 세포자멸사를 유도하는 것으로 알려져 있다.³²⁻³⁴

본 연구에서 8-OHdG는 고환 조직 DNA의 산화 손상을 반영하는 지표로서 정계정맥류 유발 후 안토시아닌 비투여군의 좌측 고환에서 측정된 8-OHdG는 우측 고환에 비하여 통계학적으로 의미 있는 증가 소견을 보여주고 있으며 이는 정계정맥류에 의한

ROS의 증가가 정자 DNA에 산화 손상을 일으켜 나타난 것으로 생각한다. 또한 정계정맥류 유발 직후 안토시아닌 투여군의 좌측 고환조직에서 측정된 8-OHdG가 안토시아닌 비투여 4주군에 비하여 의미 있게 감소한 소견은 안토시아닌의 강력한 항산화 작용에 의한 것이라고 연구진은 생각한다. 또한 안토시아닌 비투여군의 좌측 고환에서 관찰된 TUNEL assay에 양성으로 나타난 세포 즉 세포고사체 숫자의 증가 역시 정계정맥류에 의한 과도한 ROS의 증가가 정세관 세포의 세포자멸사를 유도하였다고 연구진은 생각하며 정계정맥류 유발 직후 안토시아닌 투여군에서 세포고사체의 감소는 안토시아닌의 항산화 작용에 의한 세포자멸사 예방의 결과라고 연구진은 생각한다.

본 연구에서 정계정맥류 유발 후 4주간의 관찰기간을 가지고 안토시아닌을 투여한 군은 정계정맥류 유발 직후 안토시아닌을 투여한 군과는 달리 고환의 무게와 정모세포 밀도의 감소, 세포고사체 숫자 증가, 그리고 고환조직 내 8-OHdG 농도 증가를 보였고 이 결과는 8주 동안 정계정맥류를 유발한 군의 결과와 유사 하였다. 정계정맥류로 인한 남성 불임 환자에서 수술적 및 비수술적 치료로 정액 검사 소견의 호전과 임신율 증가가 관찰되는 점과는 다르게 안토시아닌 투여에도 불구하고 상기의 결과가 관찰된 것에 대하여 본 연구진은 정계정맥류로 인한 산화손상의 초기단계에서 항산화제인 안토시아닌은 산화손상으로부터 고환 조직의 정모세포 손상을 예방하는데 효과적일 수 있으나 산화손상으로 정모세포가 손상되고 또한 산화 스트레스가 지속되는 상황에서 안토시아닌의 항산화 작용 및 다양한 생리 활성은 정상적인 정자의 생성과정에 제한적으로 작용할 것으로 추정하며 안토시아닌의 투여만으로 정계정맥류로 인한 산화 스트레스를 모두 예방할 수는 없을 것으로 생각한다.

결 론

정계정맥류 유발 백서 모델에서 정계정맥류 유발 초기의 안토시아닌 투여는 ROS 생성 억제와 산화 스트레스를 감소시켜 고환 용적과 정모세포 밀도의 증가 그리고 고환 조직 내 8-OHdG와 세포고사체 숫자의 감소를 유도하였다. 이 결과를 토대로 본 연구진은 정계정맥류 초기 환자에서 안토시아닌은 건강한 정자를 형성하는데 효과적일 수 있다

고 생각한다. 한편 정계정맥류 유발 후 4주 관찰 기간 이후에 안토시아닌의 투여는 안토시아닌 비투여 8주군과 비교하여 의미 있는 차이가 없었다. 이 같은 결과를 명확하게 설명하기 위해서는 정계정맥류와 안토시아닌에 대한 추가적인 실험이 필요하며 이러한 실험 및 연구는 정계정맥류에 의한 남성 불임 환자에서 안토시아닌의 임상적 적용을 가능하게 할 것으로 연구진은 생각한다.

REFERENCES

- 1) Gorelick JJ, Goldstein M. Loss of fertility in men with varicocele. *Fertil Steril* 1993;59:613-6
- 2) Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum Reprod Update* 2001;7:473-81
- 3) Hendin BN, Kolettis PN, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Varicocele is associated with elevated spermatozoa reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *J Urol* 1999;161:1831-4
- 4) Fujisawa M, Hiramane C, Tanaka H, Okada H, Arakawa S, Kamidono S. Decrease in apoptosis of germ cells in the testes of infertile men with varicocele. *World J Urol* 1999;17:296-300
- 5) Jang H, Ha US, Kim SJ, Yoon BI, Han DS, Yuk SM, et al. Anthocyanin extracted from black soybean reduces prostate weight and promotes apoptosis in the prostatic hyperplasia-induced rat model. *J Agric Food Chem* 2010;58:12686-91
- 6) Saypol DC, Howards SS, Turner TT, Miller ED Jr. Influence of surgically induced varicocele in testicular blood flow, temperature, and histology in adult rats and dogs. *J Clin Invest* 1981;68:39-45
- 7) Goldstein M. Surgical management of male infertility and other scrotal disorders. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, editors. *Campbell's urology*. 7th ed. Philadelphia: Saunders; 1998;1384-71
- 8) Hagood PG, Mehan DJ, Worischek JH, Andrus GH, Parra RO. Laparoscopic varicocelectomy: preliminary report of a new technique. *J Urol* 1992;147:73-6
- 9) Ralph DJ, Timoney AG, Parker C, Pryor JP. Laparoscopic varicocele ligation. *Br J Urol* 1993;72:230-3
- 10) Jarow JP, Assimos DG, Pittaway DE. Effectiveness of laparoscopic varicocelectomy. *Urology* 1993;42:544-7
- 11) Turek PJ, Lipshultz LI. The varicocele controversies II: diagnosis and management. *AUA Update Series* 1995;14:114-9
- 12) Cohen MS, Plaine L, Brown IS. The role of internal spermatic vein plasma catecholamine determination in sub-fertile men with varicoceles. *Fertil Steril* 1975;26:1243-9
- 13) Goldstein M, Eid JF. Elevation of intratesticular and scrotal temperature in men with varicocele. *J Urol* 1989;142:743-5
- 14) Shin JW, Kim SW, Paick JS. Effect of varicocele treatments in adolescents: changes of semen parameters after early varicocelectomy. *Korean J Urol* 2005;46:481-6
- 15) Lyon RP, Marshall S, Scott MP. Varicocele in childhood and adolescence implication in adulthood infertility? *Urology* 1982;19:641-4
- 16) Park SP, Nam HJ, Park HJ, Park NC. Correlation between duration of varicocele and testicular damage in an experimental rat model. *Korean J Androl* 2009;27:18-24
- 17) Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996;48:835-50
- 18) Aitken RJ, Buckingham D, West K, Wu FC, Zikopoulos K, Richardson DW. Differential contribution of leukocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates oligozoospermic patients and fertile donors. *J Reprod Fertil* 1992;94:451-62
- 19) de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 1997;2:48-54
- 20) Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1987;81:459-69
- 21) Atessahin A, Karahan I, Türk G, Gür S, Yılmaz S, ÇeribasI AO. Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reprod Toxicol* 2006;21:42-7
- 22) Ateşşahin A, Türk G, Karahan I, Yılmaz S, Ceribaşı AO, Bulmuş O. Lycopene prevents adriamycin-induced testicular toxicity in rats. *Fertil Steril* 2006;85:1216-22

- 23) Türk G, Ateşşahin A, Sönmez M, Yüce A, Ceribaşı AO. Lycopene protects against cyclosporine A-induced testicular toxicity in rats. *Theriogenology* 2007; 67:778-85
- 24) Sumner MD, Elliott-Eller M, Weidner G, Daubenmier JJ, Chew MH, Marlin R, et al. Effects of pomegranate juice consumption on myocardial perfusion in patients with coronary heart diseases. *Am J Cardiol* 2005;96:810-4
- 25) Rosenblat M, Hayek T, Aviram M. Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis* 2006;187:363-71
- 26) Sönmez M, Türk G, Yüce A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. *Theriogenology* 2005;63:2063-72
- 27) Sönmez M, Yüce A, Türk G. The protective effects of melatonin and vitamin E on antioxidant enzyme activities and epididymal sperm characteristics of homocysteine treated male rats. *Reprod Toxicol* 2007; 23:226-31
- 28) Wang SY, Jiao H. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *J Agric Food Chem* 2000;48:5677-84
- 29) Shih PH, Yeh CT, Yen GC. Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. *Food Chem Toxicol* 2005;55:1557-66
- 30) de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 1997;2:48-54
- 31) Henkel R. The impact of oxidants on sperm functions. *Andrologia* 2005;37:205-6
- 32) Agarwal A, Allamaneni SS. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertil Steril* 2005;84:850-3
- 33) Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Said TM, Sikka SC, Thomas AJ Jr. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 2003;80:1431-6
- 34) Agarwal A, Said TM. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU Int* 2005;95:503-7