

# 三子散이 흰쥐 음경조직의 Nitric Oxide Synthase 활성 및 과산화지질 함량에 미치는 영향

민건우, 위영택, 박종혁, 윤철호, 정지천, 신억섭\*

동국대학교 한의과대학 내과학교실, 동국대학교 의료원 약제과\*

## Effects of the Extract of Samjasan on the Nitric Oxide Synthase Activity and the Level of Lipid Peroxide in Penis of Rats.

Gun-Woo Min, Young-Taek We, Jong-Hyuck Park, Cheol-Ho Yoon, Ji-Cheon Jeong, Uk-Seob Shin\*

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk Univ, Dept. of Pharmacy, Dongguk Medical Center\*

**Objectives** : The following are the results of the experimental studies of Samjasan (SJS) extract on the nitric oxide synthase (NOS) activity and the level of lipid peroxide in the penises of rats.

**Methods** : *Cnidii Fructus*, *Cuscutae Semen*, *Schizandrae Fructus* constitute SJS. 150 g of crushed crude drug was extracted with methyl alcohol, under reflux, for 24 hours, three times; the total extractive was evaporated under reduced pressure to give 28.6 g.

**Results** : *In vitro*, the SJS extract didn't effect the activity of NOS. However, the SJS extract decreased the activities, the ratio of type conversion of xanthine oxidase, the levels of lipid peroxide. *In vitro*, after administration of the SJS extract to rats, the activities and ratio of type conversion of xanthine oxidase decreased, but the activity of NOS and the content of nitrite increased. Also, the levels of the superoxide anion radical and lipid peroxide decreased in the penises of rats. But, after administration of the SJS extract to rats, the levels of glutathione did not increase. The effects of the SJS extract did better as the dosage and the length of treatment increased.

**Conclusions** : These results suggest that the SJS extract decreases the activities of free radical generating enzymes which form lipid peroxide and increases the NOS activity in the penises of rats. Therefore, the SJS extract is capable of improving of sexual ability in rats.

**Key Word** : Samjasan extract, nitric oxide synthase activity, lipid peroxide.

## I. 緒 論

발기부전은 음경이 발기되지 않거나 발기되더라도 질내에 삽입할 수 없을 정도의 강직도를 유지하여 성교를 할 수 없는 상태를 말하는데<sup>1</sup>, 이것은 음경해면체 조직내의 동맥 또는 세동맥 평활근의 이완반응에 이상이 생기거나 음경해면체 근육의 경직 유지 실패에 기인하여 나타나는 일종의 성기능 장애로 세포의 노화와 밀접한 관련이 있다<sup>2,3</sup>.

발기부전의 원인은 다양하나 스트레스성 심인성 요인과 후천적으로 획득되는 기질성으로 크게 구분할 수 있는데, 최근에는 사회전반적인 상황과 성의학에 대한 관심이 높아지면서 이를 호소하는 환자가 증가하는 추세에 있다<sup>4</sup>.

음경의 발기는 음경해면체내의 동맥혈관에 혈액이 정상적으로 충분히 유입될 때 나타나는 생리현상으로, 이러한 혈액의 유입 현상이나 혈관평활근의 이완 현상이 정상적이지 못할 때 발기부

전이 나타나게 된다. 음경해면체 조직중의 혈관 이완반응은 혈관내피세포에 존재하는 일종의 호르몬성 물질인 혈관내피 이완인자 즉 nitric oxide (NO)에 의해서 이루어진다고 알려져 있다. Nitric oxide synthase (NOS)는 NO를 생합성함으로써 혈관 팽창을 유도하고 음경으로의 혈액 유입량을 증가시켜 음경의 팽창을 유발한다<sup>5</sup>.

韓醫學에서 발기부전은 陽痿, 陰痿, 弛縱不收, 宗筋縱, 陽事不舉 등의 범주에 속하는데, 命門火衰로 인한 腎虛를 가장 주된 原因으로 보고, 溫腎壯陽의 治法이 주로 활용되고 있다<sup>6,9</sup>. NO와 관

접수 : 2001년 5월 10일 채택 : 2001년 6월 5일  
교신저자 : 민건우 (서울시 강남구 논현1동 37-21 동국대학교 강남한방병원, 전화 : 02-3416-9792, FAX : 02-3444-9171, E-mail : icalus11@hanmail.net)

런하여 陽痿의 치료에 활용되는 韓藥物에 대한 연구로는 胡蘆巴<sup>10</sup>, 楮實子<sup>11</sup>, 冬蟲夏草<sup>12</sup>, 金櫻子<sup>13</sup> 등이 NOS 활성을 증가시켜 발기부전에 유효하다는 보고가 있으나, 복합 處方에 의한 연구는 보이지 않는다.

三子散은 蛇床子, 菟絲子, 五味子로 구성된 처방으로서 구성 약물이 모두 腎經으로 歸經하고, 補腎壯陽, 益精하는 效能으로 남성의 陽痿를 치료하는 약물로 활용되고 있다<sup>4</sup>.

이에 저자는 三子散 추출물이 NOS 활성 및 항산화 효과와 관련하여 발기부전에 어떠한 효과를 나타내는지 실험을 통하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 재료

#### 1) 약재

동국대학교 부속한방병원에서 구입한 후 精選하여 사용하였으며, 三子散 처방의 구성과 1첩 분량은 男子性功能障礙治療大<sup>14</sup>에 근거하였다.

#### 2) 시약

Bovine serum albumin, cytochrome C reduced, calmodulin, ethylene diamine tetra sodium salt, glutathione reduced, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced (NADPH), nitroblue tetrazolium (NBT), sodium citrate, sulfanilamide,

sodium nitrite, thiobarbituric acid sodium salt (TBA)는 Sigma사의 제품을 사용하였으며, potassium phosphate mono and dibasic는 Wako사의 제품을, 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid), trichloroacetic acid (TCA)는 Nakarai사의 제품을 사용하였다. 그 외 본 실험에 사용한 시약은 특급품을 구입하여 사용하였다.

#### 3) 동물

일정한 조건 아래에서 사육되고 외관상 건강한 체중 220 g 내외의 웅성 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였다.

## 2. 실험 방법

### 1) 檢液의 제조

三子散 150 g을 충분한 양의 methanol과 함께 투명한 등근 flask에 넣은 뒤 60℃로 유지되는 중탕 항온수조에서 냉각기를 부착하고 24시간씩 3회 반복 추출하여 추출액을 만든 다음 실온으로 냉각하여 여과하였다. 이 여과한 추출액을 감압농축기를 사용하여 농축한 다음 건조하여 추출물 28.6 g (수율 19%)을 얻었다.

### 2) 약물의 투여

三子散 추출물을 실험동물의 체중 kg 당 100 mg을 1일 1회 20일간 경구투여 하였으며 대조군은 동량의 생리식염수를 투여하였다. 실험동물은 실험전 24시간 동안 물만 주고 絶食시켰다.

### 3) 효소원의 조제

흰쥐를 ether로 가볍게 흡입하여 마취시킨 후 하복부를 절개하여 음경해면체를 적출하였다. 적출한 음경해면체 조직을 생리식염수로 깨끗하게 세척한 후, 여지로 남아있는 이물질을 제거하였다. 음경해면체 조직 1 g당 4배량의 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.4) 용액을 가하고 glass teflon homogenizer (Ultra-Turrax T25, IKA-Lab, Germany)로 마쇄하여 균질액을 만들었다. 이 마쇄균질액을 냉장원심분리기 (Hanil Supra 22K)로 600×g에서 10분간 원심분리한 다음 상정액을 취하여 이것을 과산화지질의 함량, glutathione, nitrite 및 superoxide anion radical 함량측정원으로 사용하였으며, 이 상정액을 다시 10,000 ×g로 30분간 원심분리한 뒤 얻은 상정액을 nitric oxide synthase 및 xanthine oxidase 활성 측정 효소원으로 이용하였다. 이상의 효소원 조제는 4℃ 이하에서 실시하였다.

### 4) 효소 활성 실험

#### ① Nitric oxide synthase 활성 측정

Nitric oxide synthase의 활성 측정은 비색법 (colorimetric assay)으로 NADPH diaphorase 활성 측정법을 이용하였다<sup>6</sup>. 실험동물의 조직 효소원에 50mM Hepes (ph 7.4) 용액과 L-arginine, NADPH, EDTA, CaCl<sub>2</sub>, dithiothreitol, calmodulin 및 NBT를 가하여, 37℃에서 5분간 반응시켜 585 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. 효소의 활성도는 파장 585 nm에서 측정된 흡광도 수치에 사용한 단백질의 함량을 나눈 값으로 산정하였다.

#### ② Xanthine oxidase 활성 측정

Xanthine oxidase (type O) 활성 측

藥材	用 量
蛇床子 (Cnidii Fructus)	30 g
菟絲子 (Cuscutae Semen)	30 g
五味子 (Schizandrae Fructus)	15 g
총 량	75 g

정은 Stirpe 등의 방법<sup>15</sup>에 준하여 0.1M K.P. buffer (pH 7.5) 일정량에 기질인 xanthine 60 $\mu$ M 및 효소원을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 다음 20% TCA를 가하여 제단백시키고 원심분리하였다. 이때 생성되어진 uric acid를 파장 292nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소의 활성도를 산정하였다. 한편 xanthine dehydrogenase (type D)의 활성은 type O의 활성 측정 반응액에 coenzyme인 NAD<sup>+</sup> 100mM을 첨가해 동일하게 반응시킨 다음 측정하여 나온 활성도 (total type: type D+O)에서 type O의 활성을 감한 값으로 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1 mg의 단백질이 생성시킨 uric acid 양을 nmole로 나타내었다. 한편 xanthine 산화 효소의 형전환비 산출은 xanthine dehydrogenase 및 xanthine oxidase 반응에서 얻어진 효소의 활성도를 이용하여 xanthine dehydrogenase (type D)에서 xanthine oxidase (type O)로 의 형전환 비율을 O/O+D의 비로 산출하였다.

#### 5) Nitrite 함량 측정

조직중의 nitrite (NO<sub>2</sub>)양의 측정은 비색법으로 Griess reaction에 준하여 측정하였다<sup>16</sup>. Griess 시액은 1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene diamine 및 2.5% 인산을 혼합하여 제조하였으며, 효소원 180  $\mu$ 에 2 mM NADPH 및 L-arginine을 각각 10  $\mu$ 씩 가하여 최종 용적이 200  $\mu$ 가 되게 하였다. 반응은 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 지속시킨 후, 반응시킨 상징액 200  $\mu$ 와 동량의 griess 시액을 실온에서 10분간 반응시켜 550 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였으며, L-arginine과 NADPH를 첨가한 상징액에 대조상징액을 보정하

여 산출하였다. Nitrite 양의 측정은 sodium nitrite를 이용한 표준곡선을 이용하여 산출하였고, 흰쥐 조직 g당 nitrite의 양을  $\mu$ mole로 환산하여 나타내었다.

#### 6) 과산화지질의 함량 측정

과산화지질 함량 측정은 Ohkawa 등의 방법<sup>17</sup>에 준하여 조직 마쇄균질액 일정량에 8.1% sodium dodesyl sulfate, 20% acetate buffer (pH 3.5) 및 0.8% thiobarbituric acid (TBA) 용액을 가해 95 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시키고 실온으로 냉각한 다음 생성된 홍색의 TBA reactive substance를 n-Butanol : Pyridine (15:1) 혼액으로 이행시켜 파장 532nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 정량하였다. 과산화지질의 함량은 조직 g당 MDA의 양을 nmole로 나타내었다.

#### 7) Superoxide anion radical 함량 측정

Superoxide radical 함량 측정은 Azzi등의 방법<sup>18</sup>에 준하여 50 mM K.P. buffer (pH 7.5) 일정량에 기질인 90 mM succinate, 150 mM KCl, 30 mM KCN, 0.3 mM cytochrome C 및 mitochondria 효소원을 첨가하여 최종 반응액이 3.0 ml가 되게 하였다. 이 반응액을 37 $^{\circ}$ C에서 일정시간 동안 반응시키면서 550 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 superoxide radical의 함량을 산정하였다. Superoxide radical의 함량은 1 mg의 단백질이 생성시킨 reduced cytochrome c의 양을 nmole로 나타내었다.

#### 8) Glutathione 함량 측정

조직중 glutathione 함량 측정은

Ellman의 방법<sup>19</sup>에 준하여 조직 마쇄액 일정량에 4% sulfosalicylic acid를 가해 제단백시켜 얻은 상징액 일정량에 0.1mM 5, 5' -dithiobis (2-nitrobenzoic acid)를 함유한 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 8.0) 일정량을 넣고 반응시켜 생성된 p-nitrothiophenol의 흡광도를 파장 412 nm에서 측정하여 농도를 산정하였다. GSH 함량은 조직 1 g당 함유되어 있는 GSH의 양을  $\mu$ mole로 나타내었다.

#### 9) 단백질의 정량 및 통계처리

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법<sup>20</sup>에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 행하였다. 한편 실험 성적의 유의성 검정은 Student's t-test를 이용하여 행하였으며, p value 가 0.05 미만일 때 유의한 것으로 판정하였다.

### III. 成 積

#### 1. 시험관내에서 음경해면체 nitric oxide synthase (NOS) 활성에 미치는 영향

정상 조건에서 관찰한 nitric oxide 활성은 1.49이었고, 三子散 추출물을 첨가시킨 경우의 효소 활성은 첨가농도를 달리하여도 별다른 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 1).

#### 2. 시험관내에서 음경해면체의 xanthine oxidase 활성 및 형전환비에 미치는 영향

정상 조건에서 관찰한 xanthine oxidase type O의 활성이 0.112 moles 이었으나 三子散 추출물을 첨가시킨 경우는 활성이 억제되어 첨가량이 0.2 mg/ml 되게 하였을 때는 0.078 nmoles로서 대조치에 비하여 유의성

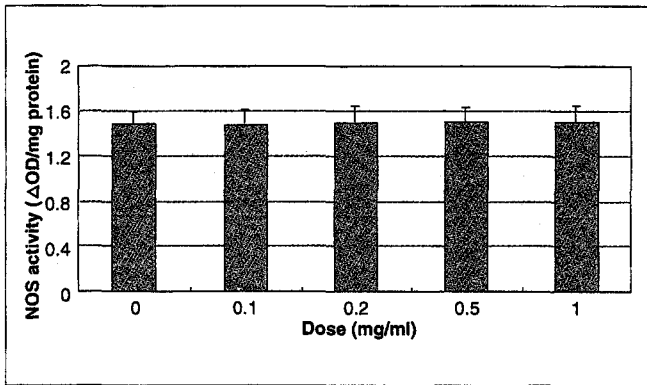


Fig. 1. Effect of the extract of Samjasan (SJS) on the urethral nitric oxide synthase activity *in vitro*. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.E. for 4 separate experiments.

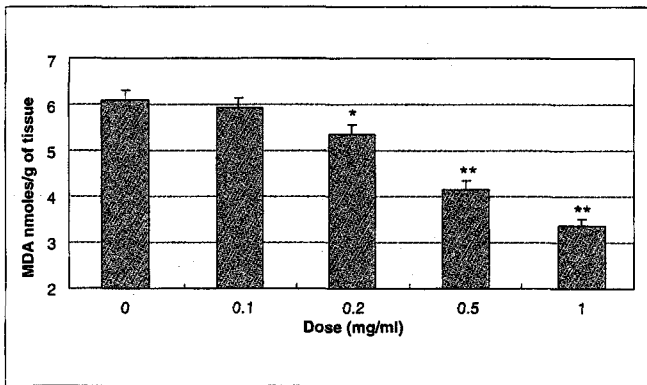


Fig. 3. Effect of the extract of Samjasan (SJS) on the urethral lipid peroxide level *in vitro*. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.E. for 4 separate experiments. Significantly different from control. \* : p<0.05, \*\* : p<0.01

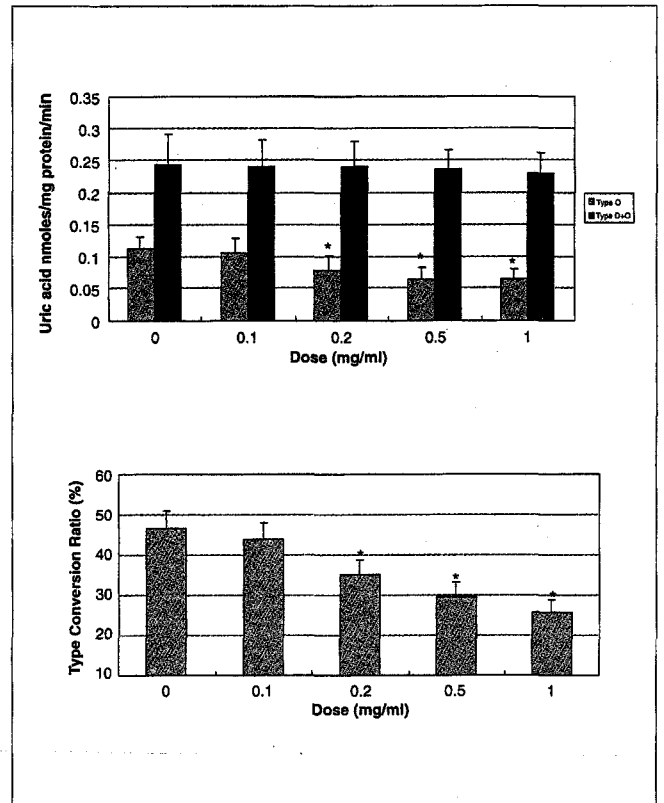


Fig. 2. Effect of the extract of Samjasan (SJS) on the urethral xanthine oxidase activity and type conversion *in vitro*. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.E. for 4 separate experiments. Significantly different from control. \* : p<0.05

있게 억제되었다. 그 이상의 용량에서는 활성의 억제 정도가 더욱 강력하게 나타났다. 반면 type D+O의 경우는 三子散 추출물의 첨가용량과 관계없이 유의성 있는 활성 변화는 관찰할 수 없었다. Xanthine oxidase 형전환비를 관찰한 실험에서는 type O의 활성 변화와 유사한 경향으로 三子散 추출물의 첨가 농도 의존적으로 형전환비를 억제시켰으며 첨가 용량이 0.2mg/ml 이상의 농도에서 유의성 있는 변화를 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

### 3. 시험관내에서 음경해면체의 지질과산화 반응에 미치는 영향

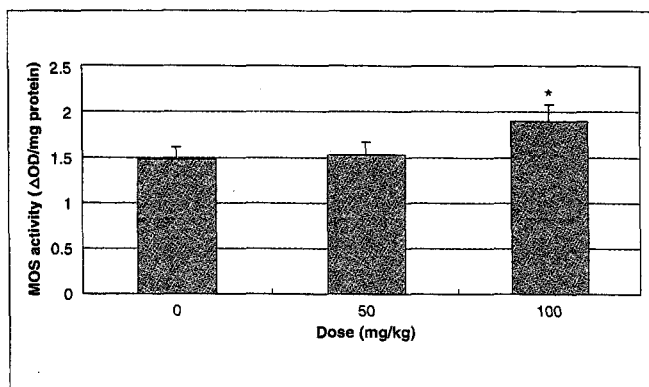
정상 조건에서 음경해면체 조직중의 과산화지질 함량은 6.12 nmole이었으나 三子散 추출물을 0.2mg/ml 되게 첨가하였을 때는 5.35 nmole로서 정상치에 비하여 약 25% 정도 유의성 있게 감소되었고, 0.5mg/ml 이상의 첨가량에서는 더욱 현저한 감소 효과가 관찰되었다(Fig. 3).

### 4. 투여 용량에 따른 nitric oxide synthase 활성 변화

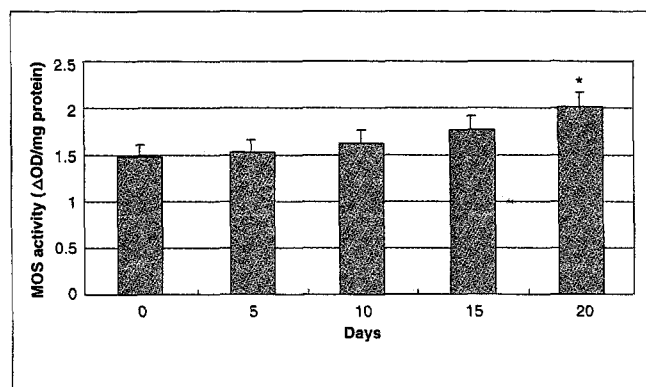
대조군의 음경해면체 조직중 nitric oxide synthase 활성을 관찰하였을 때 1.49이었으나 三子散 추출물을 투여한 실험군의 활성은 1.93으로 30 %정도 증가하였다(Fig. 4).

### 5. 투여 기간에 따른 nitric oxide synthase 활성 변화

대조군에서는 음경해면체 조직중의 nitric oxide synthase 활성이 1.49이었



**Fig. 4.** Dose response of the extract of Samjasan (SJS) on the urethral nitric oxide synthase activity in rats. Rats were received the extract of Samjasan (0-100 mg/kg, p.o) daily for 20days. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.E. for 5 animals. Significantly different from control. \* : p<0.05



**Fig. 5.** Time course of the treatment of Samjasan (SJS) extract on the urethral nitric oxide synthase activity in rats. Rats were received the extract of Samjasan (100 mg/kg, p.o) daily for 0-20days. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.E. for 5 animals. Significantly different from control. \* : p<0.05

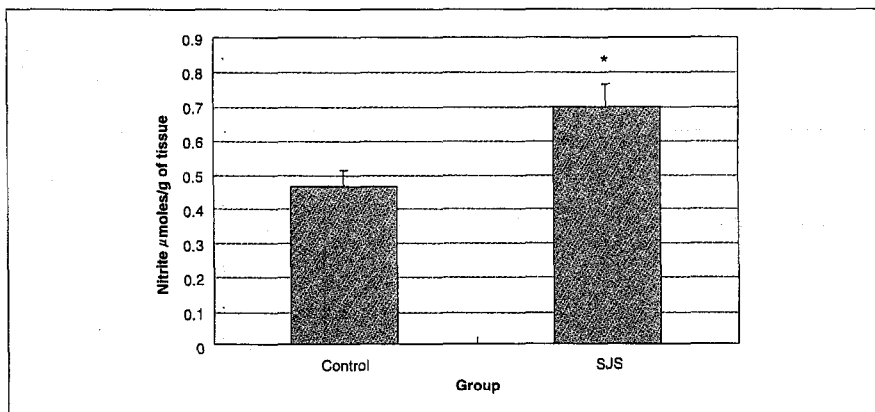
으나 三子散 추출물을 5일간 투여한 실험군의 경우는 1.51, 10일간 투여한 경우는 1.60, 15일간 투여한 경우는 1.72, 20일간 투여한 경우는 1.96으로서 각각 1%, 7%, 15%, 32% 정도 증가하였다. 투여 기간 의존적으로 효소 활성이 증가하였으며 특히 20일 투여한 실험군의 경우는 유의성 있는 변화를 관찰할 수 있었다 (Fig. 5).

### 6. Nitrite 함량에 미치는 영향

대조군의 음경해면체 조직중의 nitrite 함량이 0.46μmole/g 인데 비하여 실험군의 경우는 0.69μmole/g으로 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Fig. 6).

### 7. Xanthine oxidase 활성에 미치는 영향

대조군의 음경해면체 조직중의 xanthine oxidase type O의 활성은 0.112 nmoles이었으나 실험군의 경우는 0.072 nmoles로 정상군에 비하여 36% 정도 감소하였다. type D+O의 경



**Fig. 6.** Effect of the extract of Samjasan (SJS) on the urethral nitrite level in rats. Rats were received the extract of Samjasan (100 mg/kg, p.o) for 20days. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean ±S.E. for 5 animals. Significantly different from control. \* : p<0.05

우는 대조군과 실험군 간에 별다른 활성 차이를 나타내지 않았다. 한편 xanthine oxidase 형 전환비를 관찰한 성적에서는 대조군보다 실험군에서 유의성 있게 감소되었다(Fig. 7).

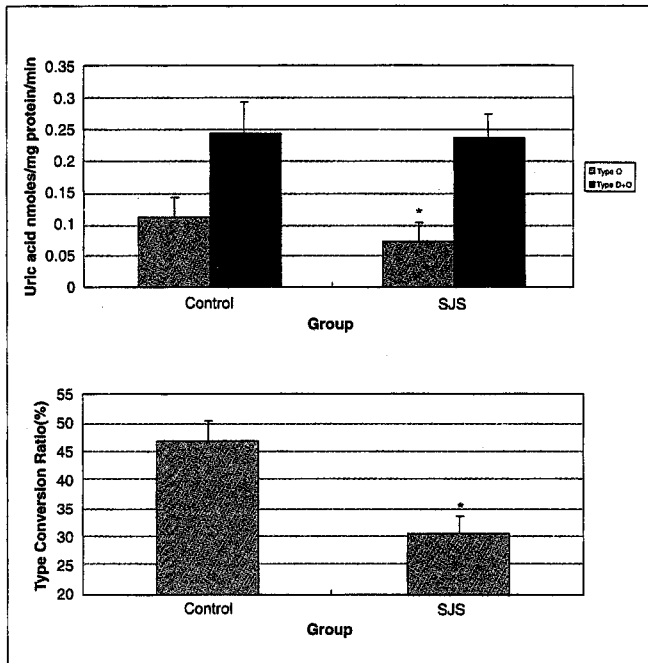
### 8. Superoxide anion radical 함량에 미치는 영향

대조군의 음경해면체 조직중의 superoxide radical 함량이 2.68 nmoles 이었으나 실험군의 경우는

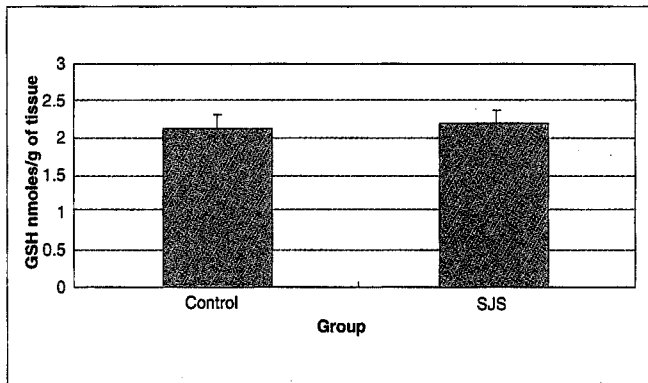
2.04 nmoles로 정상군에 비하여 24% 정도의 현저한 감소를 나타내었다(Fig. 8).

### 9. 과산화지질의 함량에 미치는 영향

대조군의 음경해면체 조직중의 과산화지질의 함량이 6.12 nmoles/g인데 비하여 실험군의 경우는 4.45 nmoles/g로 정상군에 비하여 27% 정도 유의성 있는 감소를 보였다(Fig. 9).



**Fig. 7.** Effect of the extract of Samjason (SJS) on the urethral xanthine oxidase activity and type conversion in rats. Rats were received the extract of Samjason (100 mg/kg, p.o) for 20days. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.E. for 5 animals. Significantly different from control. \* : p<0.05

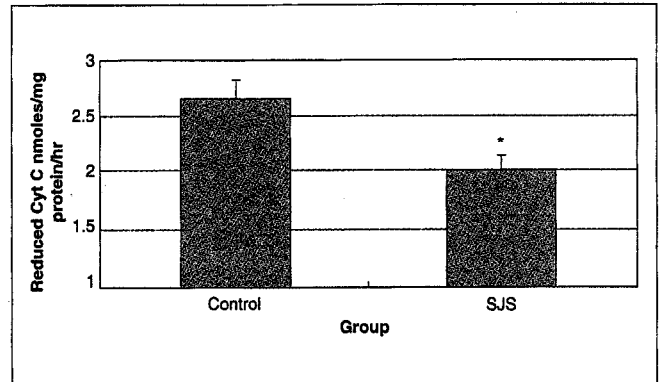


**Fig. 10.** Effect of the extract of Samjason (SJS) on the urethral glutathione level in rats. Rats were received the extract of Samjason (100 mg/kg, p.o) for 20days. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.E. for 5 animals.5

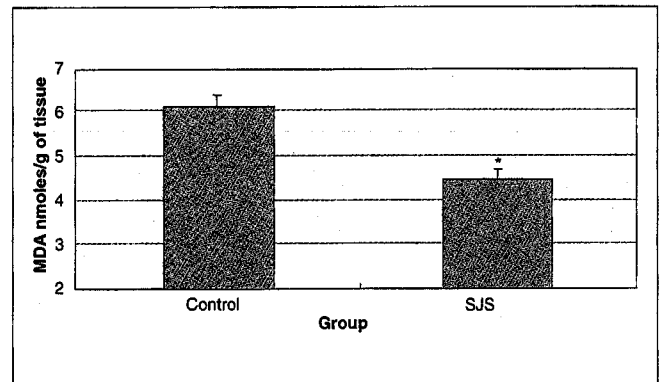
### 10. Glutathione 함량에 미치는 영향

대조군의 음경해면체 조직중 glutathione 함량이 2.13 nmol/g이었 고 실험군의 경우는 2.22 nmol /g로

대조군에 비하여 4% 감소하여 유의성 있는 변화를 관찰할 수가 없었다(Fig. 10).



**Fig. 8.** Effect of the extract of Samjason (SJS) on the urethral superoxide anion radical level in rats. Rats were received the extract of Samjason (100 mg/kg, p.o) for 20days. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.E. for 5 animals. Significantly different from control. \* : p<0.05



**Fig. 9.** Effect of the extract of Samjason (SJS) on the urethral lipid peroxide level in rats. Rats were received the extract of Samjason (100 mg/kg, p.o) for 20days. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.E. for 5 animals. Significantly different from control. \* : p<0.05

## IV. 考 察

발기부전은 음경해면체 조직내의 동맥 또는 세동맥 평활근의 이완반응에 이상이 생기거나 음경해면체 근육의 경직유지 실패에 기인하는 일종의 성기능 장애이다. 이러한 발기부전은 세포의 노화와 관련이 있고, 세포의 노화는 곧 바로 기관의 기능저하로 이어지며 각 기관의 기능을 현저하게 떨어뜨릴 수가

있다. 모든 세포는 세포생성 시점부터 성장기가 진행되며 시간이 흐를수록 노화가 나타나게 되는데, 생명체를 구성하는 세포의 노화가 진행되면 생체를 구성하는 모든 장기의 고유기능이 저하되거나 또는 기능저하에 의해서 질병이 발생할 수도 있다<sup>21</sup>.

남성이 나이가 들어감에 따라 생체 전반적으로 노화반응이 진행되지만 이때 나타나는 가장 대표적으로 나타나는 노화현상 중의 하나가 성기능 저하에 따른 발기부전증상이다. 발기부전은 심인성 요인과 기질성으로 대별되고, 최근에는 사회전반적인 상황과 성의학에 대한 관심이 높아지면서 이를 호소하는 환자가 증가하는 추세에 있다<sup>4</sup>.

三子散은 蛇床子, 菟絲子, 五味자로 구성되어 있으며, 補腎壯陽 益精하는 效能으로 남성의 陽痿를 치료한다<sup>4</sup>. 구성약물 모두 腎經으로 歸經하고 辛味 혹은 溫性이 있으며, 溫腎補陽 補腎益精 澀精止瀉 斂肺滋腎 등의 效能이 있다<sup>22</sup>.

따라서 저자는 남성들에게 가장 많은 빈도로 나타나는 성기능 장애 현상인 발기부전의 치료에 도움을 줄 수 있는 한방 효능을 개발하고자 임상에서 사용빈도가 많은 三子散을 이용하여 발기부전 개선효과를 관찰하였다.

음경의 발기증상은 음경해면체내의 동맥혈관에 혈액이 정상적으로 충분히 유입될 때 나타나는 생리현상으로, 이러한 혈액의 유입 현상이나 혈관평활근의 이완 현상이 정상적이지 못할 때는 발기부전 증상이 나타나게 된다. 음경해면체 조직중의 혈관 이완반응은 혈관내피 세포에 존재하는 일종의 호르몬성 물질인 혈관내피 이완인자 즉 nitric oxide에 의해서 강력하게 이루어진다고 알려져 있고<sup>5</sup>, 이외에 여러종류의 prostanoids가 관여할 것으로 생각된다<sup>4</sup>. Nitric

oxide는 대기 중에 불안정한 형태로 존재하는 기체로써 인체 내에서 중추신경계 및 말초신경계에서 nonadrenergic noncholinergic (NANC) 신경의 강력한 신경전달체로 알려져 있으며 이 물질은 체내에서 nitric oxide synthase의 생화학적 작용에 의해서 생합성된다<sup>23,24</sup>. 따라서 우선 三子散 추출물이 발기유발과 밀접한 관련이 있는 parameter인<sup>5</sup> nitric oxide synthase 활성화에 미치는 효과를 검토하고자 하였다.

유기용매인 methanol을 사용하여 三子散 추출물을 조제한 다음 시험관내에 농도를 증가시켜 가면서 음경해면체 조직중의 nitric oxide synthase 활성화에 미치는 영향을 검토하였을 때 농도변화에 관계없이 호소활성에는 별다른 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. 三子散 추출물은 직접적으로 nitric oxide synthase의 활성화에 영향을 미치지 않고 1차 대사과정을 거친 다음 nitric oxide synthase에 대하여 생리활성을 나타내는 것으로 생각할 수 있다.

발기부전의 심인성 요인으로 주목받는 스트레스는 체내에서 많은 생리기능의 저하현상을 나타낼 수 있는 데 이때 free radical이 밀접하게 관여한다고 한다<sup>25</sup>. Free radical은 다양한 경로를 통해서 만들어지지만 체내에서 free radical이 생합성되는 대표적인 경우 중의 하나가 xanthine oxidase의 작용에 의해서 superoxide anion radical이나 hydroxyl radical이 생합성되는 경우이다<sup>26,27</sup>. 이때 만들어진 free radical이 조직의 손상을 유발시켜 기능을 저하시키게 된다. 三子散 추출물을 시험관내에 용량을 달리하면서 첨가시키고 free radical 생성효소인 xanthine oxidase 활성화에 미치는 효과를 검토하였을 때 첨가용량에 비례하여 xanthine oxidase

활성을 억제시켰으며 이와 병행하여 과산화지질의 함량도 저하시켰다. 과산화지질은 free radical에 의해서 조직손상을 입게되면 나타나는 일종의 독성 반응으로서<sup>28,29</sup> 과산화지질의 함량 증가는 결과적으로 세포손상과 조직의 기능저하를 의미하게 된다. 三子散 추출물은 xanthine oxidase 활성을 억제하므로써 free radical의 생성을 저하시켜 조직손상을 어느 정도 예방할 수 있으므로 과산화지질의 생성을 저해한 것으로 사료되어진다.

三子散 추출물은 시험관내 실험에서 음경해면체중의 nitric oxide synthase 활성화에 별다른 반응을 나타내지 않았으나, 실험동물에 경구투여하였을 때 투여기간 및 용량에 의존적으로 활성 증가현상을 관찰할 수 있었다. 이는 三子散 추출물이 체내에서 혈관확장인자인 nitric oxide의 생합성을 증가시켜 음경의 발기능을 증가시킬 수 있을 것으로 생각되나 체내에서 생성된 nitric oxide는 매우 불안정하고 소실 속도가 빨라<sup>23,24</sup> 직접적으로 정량하기는 불가능하며 nitric oxide의 산화물인 nitrite의 함량을 측정하여 간접적인 방법으로 확인할 수 밖에 없다<sup>16</sup>. 음경해면체 조직중 nitrite 함량은 실험동물에 三子散 추출물을 투여하였을 때 현저하게 증가함을 알 수 있었다. 이러한 실험성적으로 보아 三子散 추출물이 체내에서 nitric oxide synthase 활성을 조절하여 혈관 이완인자인 nitric oxide를 생합성을 촉진시키고 결과적으로 혈관의 이완작용에 의해서 혈액의 유입량이 증가되어 발기부전을 치료할 수 있을 것으로 사료된다.

스트레스에 의해서 체내 생성량이 증가하는 독성인자의 일종인 free radical을 생성시키는 인자인 xanthine oxi

dase 활성에 미치는 三子散 추출물의 효과를 검토하고자 하였다. 실험군의 음경해면체 조직중의 xanthine oxidase 활성을 비교 관찰하였을 때 정상군에 비해 현저한 활성 억제효과가 관찰되었다.

아울러 대표적인 free radical의 하나인 superoxide anion radical<sup>26</sup> 함량 변화를 관찰하였을 때도 三子散 추출물 의해서 유의성 있게 감소함을 알 수 있었다. 또한 free radical의 세포막 손상에 의해서 생성되는 반응산물인 과산화지질의 함량 변화를 관찰하였을 때도 三子散 추출물의 투여가 현저하게 과산화지질의 생성을 감소시켰다. 이는 三子散 추출물이 free radical의 생성인자를 저해함으로써 free radical의 생성을 억제시켜서 나타난 결과라고 생각할 수 있다. 생체의 많은 생리적인 고유기능이 free radical이나 외부 공격인자 같은 독성물질에 의해서 비정상화되어 질 수 있다. 따라서 이러한 독성물질의 해독을 촉진시키는 방법이 저하된 생체 기능을 정상화시키는 하나의 방편이 될 수도 있다.

체내에서 간에서 주로 생합성되며 외부로부터 유입된 독성물질의 해독반응을 촉진하는 대표적인 물질로는 glutathione을 들 수 있다<sup>30,31</sup>. 정상적인 조건에서 실험동물에 三子散 추출물을 투여한 후 대조군과 비교하였을 때 음경해면체 조직중의 glutathione 함량에는 별다른 차이를 관찰할 수 없었다. 이는 三子散 추출물이 정상 상태에는 해독 반응에 크게 관여하지 않음을 나타낸다고 생각되어진다.

#### IV. 結 論

三子散 추출물이 흰쥐 음경해면체 조직에서 NO 및 항산화 효과와 관련하여

발기부전에 개선 효과가 있는지를 관찰하였다.

시험관내에서 三子散 추출물의 첨가 농도를 달리하였을 때 음경해면체 조직중의 nitric oxide synthase 활성에 별다른 영향을 미치지 않았고, xanthine oxidase 활성 및 형전환비는 첨가 농도에 비례하여 억제되었으며, 지질과산화 반응 또한 첨가 농도에 비례하여 억제되었다. 실험동물에 三子散 추출물을 투여하였을 때 투여 기간과 투여 용량에 비례하여 음경해면체 조직중의 nitric oxide synthase 활성이 증가되었고, nitrite 함량도 유의성 있게 증가되었다. 또한, xanthine oxidase 활성과 형전환비 그리고 superoxide anion radical 함량은 유의성 있게 억제되었다. 三子散 추출물을 투여한 흰쥐의 음경조직 중 과산화지질 함량은 대조군에 비해 현저하게 감소되었으며, glutathione 함량에는 별다른 변화가 없었다.

이러한 결과는 三子散 추출물이 free radical의 생성을 억제하여 음경조직의 기능을 보호하고 nitric oxide synthase 활성을 증강시켜 발기부전에 효과를 나타낼 것으로 여겨진다.

#### V. 參 考 文 獻

1. 송봉근. 발기부전 치료의 한의학적 접근 방법에 관한 연구. 대한한의학회지 1996;17(2):74.
2. Palmer JDK, Fink S, Burger RH. Neuropathic factor as measured by peripheral motor nerve conduction. In: Diabetic secondary impotence. *Urology*. 1986;28(3):197-200.
3. Milan L, Jozef R, Vilian K, Peter P and Ladislav V. Free radicals in chemistry and biology. CRC Press;1989, p. 29-31, 283.
4. 김세철. 남성성기능장애의 진단과 치료. 서울:일조각;1995, p. 36, 70, 184-209.

5. Palmer RMJ, Ferrige AG and Moncada S. Nitric oxide release accounts for the Obiologic activity of endothelial-derived relaxant factor. *Nature* 1987; 327:524-6.
6. Chung HC. Role of nitric oxide in penile erection. Ph. D. thesis, Yeungnam Univ. 1995.
7. 최훈섭 김철중. 陽痿에 대한 文獻의 考察. *해화학* 1996;5(1):212-35.
8. 두호경. 東醫醫系學. 서울:東洋醫學研究院;1991, p. 610-6.
9. 徐平 外. 實用中醫醫病學. 서울:一中社;1992, p. 475-7.
10. 김광진. 胡蘆巴 抽出物이 발기부전 개선 효과에 관한 실험적 연구. *한방성인병학회지* 1998;4(1):210-22.
11. 강경준, 정지천, 신억섭. 楮實子 抽出物이 음경해면체의 Nitric oxide synthase 활성 및 Nitrite 함량에 미치는 영향. *대한한의학회지* 1998;19(2):112-24.
12. 민건우, 박종혁, 윤철호, 정지천, 신억섭, 한영환. 冬蟲夏草가 Hydrocortisone을 투여한 흰쥐의 Nitric Oxide Synthase 활성 및 Testosterone 함량에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 2000;21(3): 389-98.
13. 김경동, 정지천. 金櫻子 抽出物이 음경해면체의 Nitric oxide synthase 활성 및 항산화효과에 미치는 영향. *대한한방내과학회지* 1998;19(1):452-65.
14. 王敬 杜傑懸 編著. 男子性功能障礙治療大全. 북경:中國醫藥科技出版社;1992, p. 45.
15. Stirpe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase : Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J. Biol. Chem.* 1969; 244:3855-63.
16. Tracey WR, Linden J, Michael JP and Roger AJ. Comparison of spectrophotometric and biological assay for nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) : Neurospecificity of the diazotiazation reaction for NO and failure to detect EDRF. *J. Pharmacol.* 1990;252:922-8.
17. Ohkawa H, Ohishi N, Yaki K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 1979;95:351-8.
18. Azzi A, Montecucco C, Richter C. The



- use of acetylated ferricytochrome c for the detection of superoxide radicals produced in biological membranes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1975; 65:597-603.
19. Ellman GL. Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys* 1959;82:70-7.
  20. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;193:265-75.
  21. Larry WO, Terry BO. Free radicals, aging and degenerative disease. Alan R. Liss. Inc. 1986:325-71.
  22. 이상인, 안덕균, 신민교. 漢藥臨床應用. 서울:成輔社;1990, p. 348, 387, 509.
  23. Bredt DS, Ferris CD and Snyder SH. Nitric oxide synthase regulatory sites. *J. Biol. Chem.* 1992;267(16):1976-81.
  24. Bredt DS, Hwang PM and Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990;347:768-70.
  25. David R. Mechanistic toxicology : A radical perspective. *J.Pharm. pharmacol.* 1989;41:505-11.
  26. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol.* 1988;255: 1269-75.
  27. Beauchamp C and Fridovich I. A mechanism for the production of ethylene from methional : The generation of the hydroxyl radical by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 1970;245:4641-6.
  28. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postschismic tissue injury. *N. Engl.: J. Med.* 1985;312(3):159-63.
  29. Barry H. Oxidants and human disease : Some new concepts. *FASEB. J.* 1987; 1:358-64.
  30. Ross D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents : Mechanism of free radical induced toxicity and glutathione dependent protection. *Pharmacol. Ther.* 1988;37(2):231-9.
  31. Reed DJ and Farris MW. Glutathione depletion and susceptibility. *Pharmacol. Rev.* 1984;36(2):25-33.