

야관문 (*Lespedeza cuneata* G. Don) 추출물이 토끼 음경해면체 평활근에 미치는 생리활성

정영호 · 임치환

Bioactivity of an Extract of *Lespedeza Cuneata* G. Don to Rabbit Corpus Cavernosum Smooth Muscle Tone

Young-Ho Chung · Chi-Hwan Lim

ABSTRACT

The extracts in n-hexane layer from *Lespedeza cuneata* G. Don exelled at sexual activity according to in vitro experiment using biopsy of rabbit corpus cavernosum to investigate effects on sexual function.

The extracts were injected into 9 samples at 10 μ l. The lowest relaxation was showed at sample C, 4.8 \pm 1.4% and the highest relaxation was showed at sample A, 20.2 \pm 6.0%. The relaxation by every sample, except sample C and G-1, were higher than by 10⁻⁷M ACh, 7.8 \pm 5.1%, and their effects were above 10%.

Also, the extracts were injected into 9 samples at 15 μ l. The lowest relaxation was showed at sample C, 15.4 \pm 1.3% and the highest relaxation was showed at sample J, 54.8 \pm 9.7%. The relaxation by sample A and D was as much as by 10⁻⁶M ACh, 28.0 \pm 20.1%. The relaxation by sample H was 41.9 \pm 7.3%. The relaxation by sample J was 54.8 \pm 9.7% and it was higher than by 10⁻⁵M ACh, 53.9 \pm 25.9%.

Also, the extracts were injected into 9 samples at 20 μ l. The lowest relaxation was showed at sample E, 28.9 \pm 0.6% and it was a little higher than by 10⁻⁶M ACh. The relaxation by sample G was as much as by 10⁻⁵M ACh. The two higher relaxation were showed at sample H, 99.4 \pm 16.0% and J, 95.7 \pm 7.2%, and their relaxation against contraction reaction by PhE were near 100%. Experiment by sample I was not performed for lack of sample amount.

I. 서론

국내에서는 과거부터 많은 한약제들이 분별없이 오·남용되어 발기부전 치료제 또는 강정제로서 사용되어 왔으나 최근 들어 인삼이 음경 발기에 영향을 줄 뿐만 아니라(Jung HC와 Suh JK, 1997; Kim HJ. 등, 1998), 임상적으로도 발기부전에 효과가 있고(Choi HK 등, 1995), 또한 동물 실험 결과 음경발기에 중요한 해면체평활근에 이완작용이 있어(Azadzi KM 등, 1991) 음경 발기에 중요한 역할을 하는 것으로 보고된 바 있다. 현재 Sildenafil(비아그라)은 약물로서 발기부전 환자의 치료에 획기적인 발전을 가지고 왔으며, 사용량도 계속해서 증가추세에 있다(Morales A 등, 1998). 야관문(*Lespedeza cuneata* G. Don)은 밤에 빛장을 열어주는 약초라는 뜻으로 이것을 먹으면 천리 밖에서도 빛이 난다고 하여 천리광, 큰 힘을 낸다하여 대력왕등으로 지방에서 불리기도 한다. 야관문은 콩과에 딸린 여러해살이 풀로 한자로는 절엽철소수, 삼엽초 등의 여러 가지 이름으로 불리 우며, 우리나라와 일본, 중국, 대만 등지에 분포하고 있다. 야관문은 맛이 쓰고 매우며 약성은 따뜻하고, 약간 시원한 성질을 가졌을 뿐만 아니라 독성이 없기 때문에 복용방법도 여러 가지이다.

옛부터 민간요법으로 유정이나 몽정, 조루증

증세에 야관문 전초를 썰어서 돼지고기와 함께 생강을 넣고 푹 고아 먹으면 아주 좋은 효과를 볼 수 있다고 알려지고 있고, 민동본초, 귀주민간약물(貴州民間藥物) 사천중약지(四川中藥誌) 등에서 신허유뇨(腎虛遺尿), 소갈(消渴), 유뇨(流尿) 등을 처방한 예와 구전에 의거하여 사용되고 있는 실정이다. 이에 본 연구에서는 야관문 추출물이 음경 해면체평활근 생리 활성화에 대한 영향을 탐색하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

가. 식물자원 수집

야관문 잎은 강원도의 한약재 시장에서 구입하여 음지에서 건조시킨 후 잎을 따로 분리하여 사용하였다.

나. 시약

본 실험에서 사용된 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, ethanol, methanol, n-butanol, 등 용매는 국내 삼전순약 제품을 사용하였다. NMR용 용매는 methanol-d₄(Merck, Germany), (Methyl sulfoxide)-d₆(Aldrich, U.S.A), chloroform-d (Aldrich, U.S.A)를 사용하였으며, HPLC용 시약

은 methanol(삼전순약 ; 정제후 사용), acetonitrile (J.T. Baker, U.S.A.)를 사용하였다. 그리고 Silica gel(70~230 mesh, Merck, Germany), TLC plate (20×20 cm, Kieselgel 60 F254, Merck)를 사용하였고, Sephadex LH-20(25~100 μ m, Pharmacia Biotech, Sweden)을 사용하였다. Acetylcholine (ACh), HEPES, phenylephrine(PhE)는 미국의 Sigma 회사로부터 구입하여 사용하였다.

다. 기기

HPLC는 LC900(JASCO, Japan)을 사용하였고, MPLC는 Combi Flash(ISCO, U.S.A)를 사용하였다. NMR spectrometer는 NMR Bruker (600MHz)를 UV-vis spectrophotometer는 carry 100conc(Varian)을 사용하였다.

2. 실험 방법

가. 야관문으로부터 후보 화합물의 추출·분리 및 정제

1) 추출

야관문의 추출, 분리 및 정제는 Scheme 1과 같이 실시하였다. 음건한 야관문 잎 1Kg을 80% MeOH에 추출·여과하여 감압·농축하였고, 같은 과정을 2회 더 반복하여 얻어진 물층(6ℓ)에 동량의 *n*-hexane을 넣고 3회 분획하여 *n*-hexane 층(15g)을 얻었다. *n*-hexane 분획 후 물층을 다시 동량의 EtOAc를 넣고 5회 분획하여 EtOAc 층(29g)을 얻었으며, 다시 남은 물층과 동량의 *n*-BuOH을 넣고 3회 분획하여 BuOH층(78g)을 얻었다.

2) *n*-Hexane층의 분리 및 정제

야관문에서 얻어진 *n*-hexane, EtOAc 및 *n*-BuOH층을 토끼의 음경 해면체 평활근 활성을

측정한 결과 *n*-hexane층에서 활성이 탁월하여 *n*-hexane층을 Silicagel column chromatography (chloroform:methanol = 10:0→0:10)로 충전하여 극성을 변화시키면서 용출하여 Fr.A, Fr.B, Fr.C, Fr.D, Fr.E, Fr.G, Fr.H, Fr.I 및 Fr.J로 분획하였으며 시료 Fr.B 및 Fr.G의 경우는 침전물 (Fr.B-1, Fr.G-1)을 얻었다. 분획한 시료에 대한 음경 해면체 평활근에 대한 활성 실험결과 시료 Fr.H 및 Fr.J에서 상대적으로 높은 활성을 보여 Fr.H 시료를 prep-HPLC(Develosil Packed column C₁₈ 250×20mm, MeOH:H₂O=60:40, flow rate: 2.5ml/min, detection: 254 nm, injection vol: 250 μ l, chart speed, 0.2 cm)를 이용, Fr.a, Fr.b, Fr.c, 및 Fr.d로 분리하여 Fr.c에서 YK-H3을 얻고 Fr.d에서 YK-H4를 얻었다. Fr.b를 다시 분석용 HPLC(Develosil Packed column C₁₈ 250×20mm, MeOH:H₂O=60:40, flow rate: 2.5ml/min, detection: 254 nm, injection vol: 60 μ l)를 이용 YK-H1 및 YK-H2를 분리 및 정제 하였다.

또한 Fr.J 시료를 prep-HPLC(Develosil Packed column C₁₈ 250×20mm, Acetonitrile:H₂O=80:20, flow rate: 2.5ml/min, detection: 254nm, injection vol: 250 μ l)를 이용, Fr.1, Fr.2, Fr.3 및 Fr.4를 분리하였다. Fr.1에서 백색의 침전물을 얻어 YK-J1를 분리하였다.

Fr.3 및 Fr.4를 다시 분석용 HPLC(Develosil Packed column C₁₈ 250×20mm, Acetonitrile:H₂O =65:35, flow rate: 2.5ml/min, detection: 254 nm, injection vol: 60 μ l)를 이용하여 Fr.3를 분리 정제하여 YK-J3을 얻었고, Fr.4를 분리 정제하여 YK-J4를 얻었다.

나. 동물실험

실험동물은 전북대학교 의과대학 동물 사육장

을 피하였다(Fig. 1).



Fig. 1. Equipment of experiment Organ bath

1) 투여 추출물의 준비

각 시료는 1mL의 HEPES buffer에 200mg을 녹여 sonicator로 분쇄한 후 원심분리하여 하층에 가라앉은 것은 버리고 상층 부유물을 사용하였다.

2) 실험과정

해면체 조직은 처음에 1g을 기본 장력을 맞추었으며, 약 60분간 기다려 안정화가 된 후 실험을 하였다. 매 15분마다 산소가 포화된 관류용액으로 바꾸어 주었으며, 실험이 시작되기 전까지 기본 장력을 1g이 되도록 다시 조정하였다. 약물의 투여는 낮은 농도부터 높은 농도로 축적하는 방식으로 하였으며, 최고의 이완점에 도달했을 때 다음 농도의 약물을 투여 하였다. 관류용액을 바꾼 후 새로운 약물을 투여 할 때는 조직의 안정화를 위하여 약 5~10분 정도 기다렸다.

3) 장력의 측정

조직의 절편은 2ml의 organ bath에 수직으로 위치시키고, 조직에서 발생한 장력은 physiograph 용지에 기록하였다. 이때 사용한 용액은 HEPES이며, 이의 조성은 (mM) NaCl 118, KCl 4.7,

CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 2, NaHCO₃ 25, glucose 10.0, HEPES 10이며, 1N NaOH 용액을 이용하여 pH를 7.4로 맞추었다. 실험하는 동안 100% 산소를 투여 하였으며, organ bath의 온도는 37°C를 유지하였다.

4) 장력의 측정과정

장력의 표현은 약물의 투여 시 발생하는 최고 수축점 또는 최저 이완점을 기준으로 하였다. 10⁻⁵M PhE에 의한 수축을 100%로 정하고 투여 시약에 대한 이완 또는 수축반응을 %로 비례표시 하였다. 장력의 측정을 위하여서는 PowerLab data 400 acquisition system(software Chart, version 5, AD Instrument, Castle Hill, Australia)을 사용하였다.

(1) Phenylephrine과 acetylcholine에 대한 반응

10⁻⁵ M Phenylephrine (PhE)에 의한 수축반응을 관찰한 후, PhE에 의하여 수축된 조직에서 acetylcholine(ACh., 10⁻⁷~10⁻⁵ M)에 의한 이완반응을 측정하였다. ACh에 의한 이완반응에 대한 관찰이 끝난 후 organ bath를 관류용액으로 3회 이상 세척하였다.

(2) 시료에 대한 반응

조직이 안정되면, PhE를 다시 투여하여 수축을 시킨 후 야관문에서 추출한 시료를 낮은 농도부터 높은 농도로(10uL, 15uL, 20uL) 점진적으로 투여하여 시료에 의해 일어나는 반응을 관찰하였다.

5) 내피의 존재를 확인하는 방법

PhE(10⁻⁵ M)을 투여하여 수축반응을 관찰한

후 ACh(10^{-5} M)에 의한 이완반응을 측정하여 내피의 손상여부를 확인하였으며 ACh에 의한 이완반응이 40%이상이지 않으면 실험에 사용하지 않았다.

6) 통계처리

마이크로소프트사의 Excel과 Origin 5.0을 이용하였고, paired Student t-test로 검증하였으며 $p < 0.05$ 를 유의있는 것으로 판정하였다. 통계학적인 수식은 평균±표준오차로 표시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 야관문의 추출 및 분리

야관문 잎 1kg을 음건하여 80% MeOH로 추출하여, 감압농축 후 극성에 따라 *n*-hexane, EtOAc, *n*-BuOH 및 water층으로 분획하였다. 4개의 분획층을 성기능 활성 시험 방법 중에 하나인 Organ

bath(동물 음경해면체 절편을 이용한 생체의 실험) 시험 결과 *n*-hexane층이 가장 활성이 높은 것으로 나타났다(Fig. 2).

이에 *n*-hexane층을 다시 Silica gel column을 사용하여 chloroform : MeOH(10:0~0:10)로 극성에 따라 Scheme 1과 같이 10개로 분획하였으며, 분획 시료 B와 G에서는 각각 침전물을 얻었고, 모든 시료에 대한 음경해면체 실험한 결과 유의있는 결과를 얻었다.

2. ACh와 시료에 의한 이완반응의 비교

실험한 전례(n=9)의 음경 해면체 평활근 절편이 PhE(10^{-5} M)에 수축반응을 보였으며, 평균 수축력은 2.1 ± 0.7 g이었다. PhE로 발생한 수축반응에 대한 ACh의 이완반응과 시료(A, C, D, E, G, G1, H, I, J)에 대한 반응을 PhE에 의한 수축반응에 대해 %로 비교하였다. ACh에 의한 이완반응은 해면체 내부 공간을 둘러싸고 있는 내피가 손상되지 않았음을 의미하였다. ACh에 의한 이

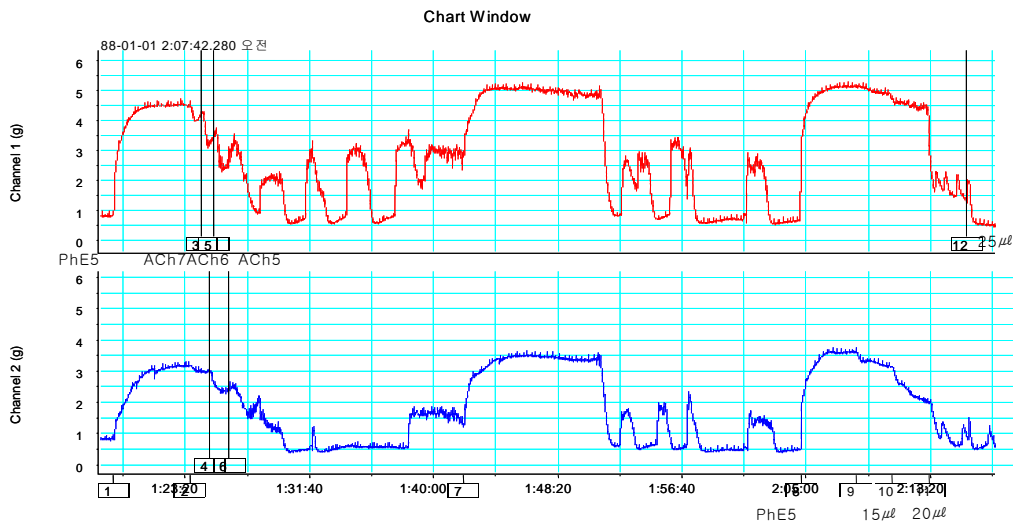


Fig. 2. Dependent relaxation by hexane layer after strip contracted for 10^{-5} M phenylephrine.

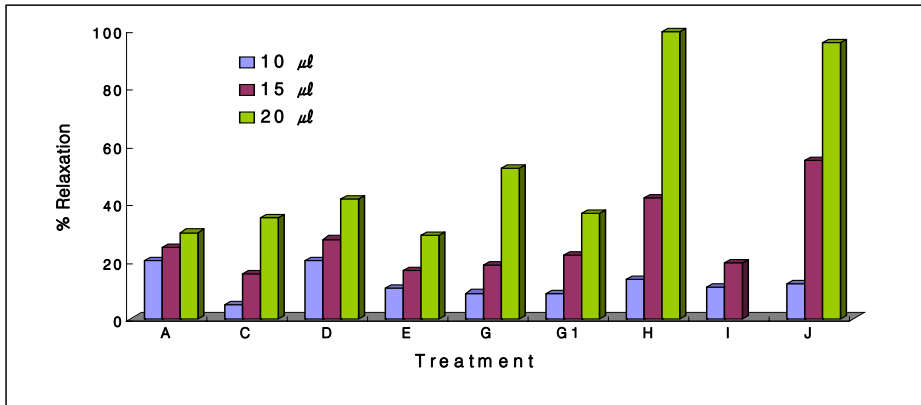


Fig. 3. Dependent relaxation of each samples for *Lespedeza cuneata* G. Don

완반응은 10^{-7} M에서 $7.8 \pm 5.1\%$, 10^{-6} M에서 $28.0 \pm 20.1\%$ 및 10^{-5} M에서 $53.9 \pm 25.9\%$ 를 나타냈다.

야관문 *n*-hexane층에서 추출하여 분획한 9개 모든 시료에서 정도의 차이는 있으나 이완반응을 보였다(Fig. 3).

각 시료를 10µl씩 투여하였을 때 C시료의 최저 이완 작용($4.8 \pm 1.4\%$)을 보인 반면 A시료는 최고 이완작용($20.2 \pm 6.0\%$)을 보였다. 시료 C와 G-1를 제외한 모든 시료에서 ACh 10^{-7} M에 의한 이완반응 즉 7.8%보다 높은 10%이상의 이완 반응 효과를 보였다. 또한 15µl를 투여하였을 경우에는 C시료가 최저 반응($15.4 \pm 1.3\%$)을 보인 반면 J시료가 최고의 반응($54.8 \pm 9.7\%$)을 보인 것으로 나타났다. 15µl를 투여한 시료중에는 A와 D는 ACh 10^{-6} M에 의한 이완반응은 $28.0 \pm 20.1\%$ 에 비슷한 정도의 이완반응을 나타냈으며, H시료는 훨씬 높은 $41.9 \pm 7.3\%$ 의 이완 반응이 나타났다. J시료의 경우 54.8%로 ACh 10^{-5} M에 의한 이완반응 53.9%보다 더 강한 경향을 보였다. 한편 야관문 추출물의 농도를 제일 많은 량 20µl를 투여한 시료들 중에서 E시료가 최저반응인 ($28.9 \pm 0.6\%$)을 보였으며, 모든 시료에서 ACh에 의한

이완반응 10^{-6} M정도 이상의 이완 반응을 보였다. G시료 경우에는 ACh 10^{-5} M에 의한 이완반응 53.9%와 유사한 효과를 보였다.

20µl를 투여시에는 H시료가 15µl 투여시와 마찬가지로 최고 반응(99.4%)을 보였으며 J시료도 95.7%의 높은 이완 반응을 보였다. I시료의 경우에는 시료 부족으로 인하여 20µl 투여 시험을 수행하지 못했다.

3. 활성 물질의 구조 확인

시료중 최고 활성을 나타난 시료 H를 사용하여 prep-HPLC를 이용, Fr.a, Fr.b, Fr.c 및 Fr.d등 4개의 시료를 분리하였으며, Fr.c에서 YK-H3을 얻었고 Fr.d에서 YK-H4를 얻었다. Fr.b를 다시 분석용 HPLC를 이용 YK-H1과 YK-H2를 분리 및 정제하여 $^1\text{H-NMR}$ 측정 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 등의 기기분석을 통하여 구조를 구명중에 있다.

또한 시료 J를 prep-HPLC를 이용, Fr.1, Fr.2, Fr.3 및 Fr.4등 4개의 시료를 분리하였다. Fr.1에서 백색의 침전물을 얻어 YK-J1를 분리하였다.

Fr.3과 Fr.4를 다시 분석용 HPLC를 이용하여 Fr.3를 분리 정제하여 YK-J3을 얻었고, Fr.4를

분리 정제하여 YK-J4를 얻어 $^1\text{H-NMR}$ 측정 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 을 이용하여 구조를 구명 중에 있다.

V. 적 요

야관문에서 추출한 *n*-hexane층을 음경해면체 평활근의 활성물질 탐색한 결과 극성 별로 분리한 9개 모든 시료에서 정도의 차이는 있으나 음경해면체 평활근의 이완 반응을 일으켰으며, 추출물 10 μl 투여한 9개 시료 중 A시료(20.2 \pm 6.0%)가 최고의 이완 반응을 보였으며, 15 μl 를 투여한 시료 중에서는 J시료(54.8 \pm 9.7%)가 최고의 이완 반응이 나타났다. 한편 야관문 추출물의 농도를 제일 많은 량 20 μl 를 투여한 시료들 중에서는 H시료와 J시료가 95% 이상의 높은 이완 반응을 보였다. 시료중 최고 활성을 나타난 시료 H를 prep-HPLC 및 분석용 HPLC를 이용, YK-H1, YK-H2, YK-H3 및 YK-H4등 4개의 물질을 분리하였으며, 또한 시료 J를 prep-HPLC 및 분석용 HPLC를 이용하여 YK-J1, YK-J3 및 YK-J4 등 세 개의 물질을 분리하였다. 분리된 7개의 물질들의 구조 결정에 대한 연구를 진행하고 있다.

인용문헌

1. Azadzi KM., Goldstein I, Tejada IS, Kim N. 1991 A nitric oxide-like factor mediate nonadrenergic-noncholinergic neurogenic relaxation of penile corpus cavernosum smooth muscle. *J. Clin. Invest.* 88, 112-118
2. Choi HK, Seong DH, Rha KH. 1995 Clinical efficacy of Korean red ginseng for erectile dysfunction. *Int. J. Impotence.* 7, 181-186
3. Jung HC, Suh JK. 1997 Effect of Total Saponin on Penile Erection: A Combined in Vitro and in Vivo Study. *J. Urol.*, 38, 866-872
4. Kim HJ, Lee GH, Kim JJ. 1998 The Effects of Ginseng Saponin on Rabbit cavernosal Smooth Muscle Relaxation in Vitro. *J. Urol.*, 39, 443-449
5. Morales A, Gingell C, Collins M, Wicker PA. 1998 Osterloh IH. Clinical safety of oral sildenafil citrate (VIAGRA) in the treatment of erectile dysfunction. *Int J Impot Res.* 10, 69-73
6. Park JK, Kim SH, Park YK, Cho KW. 1997 Renin angiotensin system in rabbit corpus cavernosum : functional characterization of angiotensin II receptors. *J. Urol.*, 8, 158-653