

식물추출복합발효물(MP119)이 성기능에 미치는 영향 및 카드뮴 독성에 대한 효과

장영선¹ · 정종문^{2*}

¹(주)벤스랩 중앙연구소

²수원대학교 생명과학과

Effect of Phyto-Extract Fermented Mixture (MP119) on the Sexual Functions and on the Toxicities of Cadmium

Young-Sun Jang¹ and Jong-Moon Jeong^{2*}

¹Technology Research Center, Ben's Lab Co., Ltd., Gyeonggi-do, 445-743, Korea

²Dept. of Life Science, The University of Suwon, Gyeonggi-do, 445-743, Korea

Abstract

This study was aimed to investigate the effect of phyto-extract fermented mixture (MP119) on the male sexual functions. The MP119 was evaluated for anti-impotency and anti-hypertensive effects via ACE (angiotensin converting enzyme) or PDE (phosphodiesterase) inhibition assay. IC₅₀ values of MP119 against ACE and PDE were 241.3±35.5 ppm and 372.2±33.8 ppm, respectively. To investigate the effect of testosterone expression by MP119, we performed cell media test using mouse Leydig-derived TM3 cells. Production of testosterone in TM3 cell was increased by MP119. Also, NO (nitric oxide) production of HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) was increased when MP119 was added to the cultures. Forty male ICR mice were divided into 4 groups. MP119 was orally intubated for 7 days to group 1 and 3, and same volume of vehicle to group 2 and 4 as controls. After that, group 3 and 4 were intraperitoneally injected cadmium chloride at a single dose of 2 mg/kg. On the 8th experimental day, weights of testis, epididymis and seminal vesicle, number of sperm, concentrations of serum testosterone and cGMP were determined. The number of sperm, the concentrations of testosterone and cGMP were significantly increased in two experimental groups (group 1, 3). These results suggest that MP119 enhanced the sexual function of male mice, and could protect the sexual organs from the cadmium chloride as one of the endocrine disrupters.

Key words: MP119, impotency, testosterone, sperm, cadmium

서 론

현대적인 생활환경은 과로, 음주, 스트레스, 환경오염 등으로 생체리듬에 혼란을 주어, 고혈압, 당뇨, 비만 등의 생활 습관병에 노출되는 빈도가 증가함에 따라 한창 왕성해야 할 20~30대부터 기력의 저하, 노화 및 성기능 부진 등의 현상이 나타나는 경우가 허다하며, 40세 이상에서는 보다 심각한 수준으로 나타나고 있다. 성기능 부진 중에는 발기부전 또는 불임이 있으며, 세계적으로 불임환자 발생율은 결혼한 부부 중 약 10~15% 정도로 나타나고, 이중 남성 불임이 약 50%를 차지하는 것으로 보고되었다. 또한 최근 남성의 정자수가 감소하는 경향을 나타낸다는 연구결과가 지속적으로 발표되고 있다(1). 발기부전은 음경해면체 조직 중에 정상적으로 혈액의 유입이 이루어지지 못하는 현상으로서, 음경이 충분히 발기되지 않거나 되더라도 지속되지 못하는 경우가 전체 성생활 중 25% 이상 일어나는 경우를 말한다(2).

이러한 성기능 부진의 원인으로서는 환경오염으로 인해 인체 내로 들어가 호르몬 작용을 방해하거나 교란시키는 내분비계 교란물질(endocrine disrupters)인 환경호르몬의 영향이 심각하다. 환경호르몬으로는 다이옥신류, 잔류성 유기염소계, 농약류, 페놀류 등 68종의 화학물질이 등록되어 있으며, 특히 카드뮴(cadmium)은 매우 유독한 중금속 물질로서 자연 상태에서는 비교적 낮은 농도로 존재하지만, 각종 산업 현장에서 그 이용이 점차로 증가하면서, 대기오염물질로서도 그 농도가 높아지고 있고, 골연화증, 신장기능 저하, 신경장애 및 정소손상을 일으키는 남성불임의 한 원인으로 밝혀져 이에 대한 관심도가 높아지고 있다(3).

음경의 발기는 중추신경계, 말초신경계 및 평활근을 포함하는 생리학적 과정의 복잡한 상호작용으로 인해 발생한다. 특히, 비아드레날린성, 비콜린성 신경 및 내피로부터의 일산화질소(nitric oxide, NO) 방출은 음경해면체 내의 구아닐 사이클라제(guanylate cyclase)를 활성화시키고 세포내

*Corresponding author. E-mail: jmjeong@suwon.ac.kr
Phone: 82-31-222-6514, Fax: 82-31-222-6552

cGMP(cyclic GMP) 수준을 증가시킨다(4). 세포내 cGMP의 증가는 세포내 칼슘 수준을 감소시키고, 이는 주상 평활근 이완을 유발하여 다시 해면체 부피 확장을 통해 음경 발기를 유도한다. cGMP는 PDE(phosphodiesterase)에 의해 분해되므로 그 활성이 억제되어야 cGMP의 농도가 증가되어 발기 기능이 향상된다(5,6). 반면, 인체 내에서 강력한 혈관 수축제인 안지오텐신 II(angiotensin II)의 생성에 관여되는 ACE(angiotensin converting enzyme)의 활성을 억제시켜 혈관을 이완시키면 음경 내 혈류량이 증가하게 되어 음경 발기가 유도되기도 한다(7).

최근 PDE5(phosphodiesterase type V) 저해제인 sildenafil(Viagra®, Pfizer)이 FDA에 의해 발기부전에 대한 효과적인 경구치료제로 승인되었다. PDE5를 저해함으로써 cGMP분해를 억제하여 성적흥분 하에 음경발기를 유도하게 된다. 그러나 sildenafil의 사용은 다양한 조직에 대한 비선택적인 효과로 인한 두통, 홍조 및 색 혼동을 포함하는 몇 가지 바람직하지 못한 부작용과 관련되어 있다. 더불어 발기부전의 원인이 되는 혈액순환, 내분비 기능 등에 관련된 신체의 장애를 개선시키지 않고 일시적인 발기 유도에만 초점을 두고 개발되어 사용함에 따라 내성이 생기거나 여러 가지 부작용이 나타날 수 있어(8), 현재 부작용 없는 발기부전 치료제를 천연물 및 생약에서 탐색하려는 많은 연구가 시도되고 있다(9,10).

본 연구에서는 마카(*Lepidium meyenii*) 추출물, 홍삼(*Panax ginseng*) 추출물 그리고 남가새(*Tribulus alatus*) 추출물로 이루어진 혼합물을 발효시켜 얻은 식물추출복합발효물(MP119)이 성기능 향상에 미치는 영향을 조사하였다. 현대 남성들의 성생활에 장애를 주는 요소들의 근본적인 개선을 위해 스트레스에 대한 저항력과 기력을 증가시키며, 혈액순환 부진을 개선시키고, 호르몬 균형을 이루도록 도와주는지를 ACE, PDE 저해효과 및 testosterone과 NO 분비에 대한 영향을 통해 확인하고자 한다. 또한, 웅성 마우스의 생식기능에 미치는 영향을 평가하여 직접적으로 성기능 개선에 미치는 영향을 알아보고, 더불어 카드뮴에 노출된 마우스의 생식기능에 미치는 영향을 조사하여 MP119의 카드뮴의 독성에 대한 예방효과를 실험하였다.

재료 및 방법

재료 및 기기

Rabbit lung acetone powder, Hippuryl-L-His-L-Leu (HHL), HCl, ethyl acetate, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT), cadmium chloride 등의 시약은 Sigma사(Sigma Chem. Co., St. Louis, USA)로부터, Fetal bovine serum(FBS), Antibiotic antimycrotic solution, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Trypsin-EDTA solution, 1X PBS는 Gibco BRL

사(Gibco-BRL, Grand Island, New York, USA)로부터, Clonetics Endothelial Cell Medium(EGM-2)은 Lonza사(Lonza Walkersville, Inc., Walkersville, Switzerland)로부터 구입하였다. 그 이외의 시약은 1급 또는 특급을 사용하였다.

Testosterone Enzyme Immunoassay kit(900-065, assay designs, Ann Arbor, USA), Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase assay kit(AK-800, BIOMOL international LP, Exeter, UK), Total Nitric Oxide Assay kit(917-020, assay designs), Cyclic GMP Enzyme Immunoassay kit(900-013, assay designs)를 사용하였으며, Human Umbilical Vein Endothelial Cell(HUVEC)은 (주)바이오버드(서울)에서, TM3 cell(KCLB21714)은 한국세포주은행(서울)에서 분양받았다.

흡광도 측정에 사용된 UV-VIS 흡광계는 Spectronic Genesys 5(Milton Roy Co., Ivyland, USA) 모델이며, ELISA microplate reader기는 VersaMax(Molecular Device, Sunnyvale, USA)를 사용하였다.

실험동물과 관리

ICR계 마우스(웅성, 8주령)는 (주)오리엔트 바이오(경기도 가평)에서 구입하여 1주간 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다. 실험 기간 중에 물과 사료는 자유로이 섭취시켰으며, 사육실 온도는 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도는 $55 \pm 5\%$ 및 명암은 12시간 주기로 자동 조절하였다.

식물재료 추출 및 MP119 제조

건조시킨 마카, 홍삼 그리고 남가새를 세척하고 마쇄하여 각각 다음과 같은 방법으로 3회 반복하여 추출하였다. 마카 분말 건조중량 1 kg에 10배에 달하는 물을 첨가하여 60°C 에서 2시간 동안 추출하여 감압농축한 뒤 열풍 건조시켜 분말 형태로 수득하였다. 홍삼분말 건조중량 1 kg에 약 10배에 달하는 물을 첨가한 다음 80°C 에서 2시간 동안 추출하여 추출물을 수득한 후 이를 여과하여 감압농축한 뒤 열풍 건조시켜 분말형태로 수득하였다. 마지막으로 남가새 분말 건조중량 1 kg에 약 10배에 달하는 물을 첨가한 다음 60°C 에서 2시간 동안 열수 추출하여 여과한 뒤 열풍 건조시켜 분말형태로 수득하였다. 위의 방법으로 얻어진 마카추출분말, 홍삼추출분말 그리고 남가새 추출분말 각각을 일정한 무게비율로 혼합하여 유산균(*Lactobacillus* sp.)으로 고체발효 하였다. 고체발효는 식물추출복합물을 습도가 60%가 되도록 물을 첨가하여 20분간 121°C 에서 멸균한다. MRS broth (Difco, Le Pont de Claix, France)에서 30°C , 24시간 배양한 후 $3000 \times g$ 에서 10분간 원심분리 하여 얻은 *Lactobacillus* sp.의 pellet을 식물추출 복합물에 10%(w/w)가 되도록 첨가하여 30°C 에서 4일간 발효한 다음 30분간 121°C 에서 멸균한 뒤 이를 건조시켜 분말형태로 식물추출복합발효물(이하 MP119)을 제조하였다.

ACE(angiotensin converting enzyme) 저해효과 측정

ACE 저해효과 측정은 Do 등(11)의 방법을 응용하여 측정

하였다. 먼저 효소원을 준비하기 위하여 rabbit lung acetone powder 10 g을 50 mM potassium phosphate buffer(pH 8.3) 100 mL에 충분히 섞어준 후에 4°C, 4000×g에서 40분간 원심분리 하여 얻은 상층액을 효소원으로 사용하였다. ACE 저해활성을 측정하기 위해 assay mixture 0.25 mL[100 mM potassium phosphate buffer(pH 8.3), 300 mM NaCl, 5 mM HHL], 효소원 0.15 mL(8 mU), MP119 0.1 mL을 혼합하여 30분간 37°C에서 반응시켰다. 1 N HCl 0.25 mL을 첨가하여 반응을 정지시키고 ethyl acetate 1.5 mL을 넣어준 후 vortexing하고, 1분간 정치하여 상층액을 분리하였다. 상층액을 100°C에서 건조시킨 후 증류수 1 mL을 첨가하여 용해시켜 228 nm에서 흡광도를 측정하여 ACE 저해율을 계산하였다. ACE 저해율은 $(1 - [(A \text{ 시료} - A \text{ 대조군}) / (B \text{ 시료} - B \text{ 대조군})] \times 100)$ 으로 계산하며 A 시료는 MP119와 효소원이 첨가된 반응군의 흡광도, A 대조군은 MP119는 첨가되고 효소원은 첨가되지 않은 반응군의 흡광도, B 시료는 MP119는 첨가하지 않고 효소원이 첨가된 반응군의 흡광도, B 대조군은 MP119와 효소원 모두 첨가되지 않은 반응군의 흡광도를 나타낸다.

PDE(phosphodiesterase) 저해효과 측정

PDE 저해효과는 cyclic nucleotide phosphodiesterase assay kit를 이용하여 측정하였다. 5-GMP를 5-nucleotidase로 처리한 다음 BIOMOL GREEN reagent를 처리하여 620 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 얻고, 3,5-cGMP를 기질로 하여 PDE와 MP119를 첨가하여 반응시킨 다음 5-nucleotidase로 처리하고 BIOMOL GREEN reagent를 처리하여 620 nm에서 흡광도를 측정, 생성된 5-GMP의 양을 대조군과 비교하여 PDE 저해율을 계산하였다.

MTT assay를 이용한 세포독성 측정

MP119에 대한 세포독성을 알아보기 위해 웅성 마우스의 정소세포인 TM3 cell을 사용하여 Sladowski 등(12)의 방법으로 MTT assay를 실시하였다. 96 well plate에 TM3 cell 90 μL (2×10^5 cells)에 MP119 10 μL 를 처리한 후 37°C에서 24시간 배양한 다음 MTT 용액(5 mg/mL) 10 μL 를 첨가하여 37°C에서 3시간 배양하였다. 그 후 상층액을 제거한 뒤 DMSO를 well당 200 μL 씩 넣고 20분간 반응시킨 다음 570 nm에서 흡광도를 측정하여 생존율을 계산하였다.

TM3 cell의 testosterone 농도 측정

TM3 cell line에서 testosterone 농도를 측정하기 위해 testosterone enzyme immunoassay kit를 사용하였다. 96 well plate에 한 well 당 90 μL (2×10^5 cells)를 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 1X PBS 용액으로 washing하였다. 1X PBS에 녹인 MP119를 final 농도가 5, 10, 50, 100, 200, 400, 1000 ppm이 되도록 DMEM에 혼합하여 37°C, 5% CO₂ in-

cubator에서 48시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 배지 100 μL 을 goat anti-mouse IgG microtiter plate에 옮긴 다음 testosterone EIA antibody를 첨가하여 1시간 배양하고 conjugate를 첨가하여 1시간 배양 후 washing solution으로 세척한다. 세척 후 pNpp substrate solution을 첨가하여 1시간 반응 후 stop solution으로 반응을 중지하고 405 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

HUVEC에서 NO 농도 측정

HUVEC에서 NO 농도를 측정하기 위하여 total nitric oxide assay kit를 사용하였다. 12 well plate에 한 well 당 HUVEC 900 μL (1×10^4 cell)씩 넣고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양한 다음 배지를 버리고 배양세포 표면을 1X PBS로 washing하였다. 1X PBS에 녹인 MP119를 final 농도가 400, 600, 800, 1000 ppm이 되도록 EGM-2에 혼합하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양하였다. 배양이 끝난 배지 50 μL 에 NADH 25 μL , nitrate reductase 25 μL 을 혼합한 후 37°C에서 30분간 반응한 뒤, Griess reagent I 50 μL , Griess reagent II 50 μL 을 넣고 잘 섞어 상온에서 10분간 정치하였다. 반응이 끝난 후 550 nm에서 흡광도를 측정하여 nitrate의 농도를 계산하며, nitrate를 NO 생성의 지표로 하여 측정하였다.

MP119 투여에 따른 웅성마우스의 생식장기, 정자수 및 혈청 내 testosterone, cGMP의 변화 측정

적용기간이 끝난 웅성마우스를 대조군과 MP119투여군으로 나누었으며, 각 군당 10마리씩 사용하였다. MP119 투여군에는 증류수에 녹인 MP119를 각 마리당 1 g/kg으로 1일 1회 7일간 경구투여 하였고, 대조군에는 증류수를 1일 1회 7일간 경구투여 하였다. 마지막 경구투여 24시간 후 마우스를 희생시켜 정소, 부정소, 정낭을 분리하여 각각의 무게를 측정하고, 분리한 부정소는 1 mL 1X PBS에서 homogenization 한 다음, 37°C에서 20분간 shaking incubation하고 1/5로 희석하여 현미경 상에서 정자 수를 측정하였다.

마우스의 혈청 내 testosterone을 측정하기 위해 심장 채혈하여 얻은 혈액을 상온에서 20분간 방치한 뒤 3000×g에서 20분간 원심분리 하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 -20°C에서 보관하며, testosterone enzyme immunoassay kit를 사용하여 같은 방법으로 측정하였다. cGMP를 측정하기 위하여 cyclic GMP enzyme immunoassay kit를 사용하였다. 혈청 100 μL 을 goat anti-mouse IgG microtiter plate에 옮긴 다음 cGMP EIA antibody와 conjugate를 첨가하여 2시간 shaking incubation 후 washing solution으로 세척한다. washing solution을 제거한 well에 pNpp substrate solution을 첨가하여 상온에서 1시간 반응 후 stop solution으로 반응을 중지하고 405 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

MP119를 투여한 웅성마우스에 염화카드뮴을 투여하여 생식장기, 정자수 및 혈청 내 testosterone, cGMP의 변화 측정

적응기간이 끝난 웅성마우스를 대조군과 MP119투여군으로 나누었으며, 각 군당 10마리씩 사용하였다. MP119 투여군에는 증류수에 녹인 MP119를 각 마리당 1 g/kg으로 1일 1회 7일간 경구투여 하였고, 대조군에는 증류수를 1일 1회 7일간 경구투여 하였다. 마지막 경구투여 후 염화카드뮴을 2 mg/kg으로 1회 복강 내 주사하였다. 24시간 후 마우스를 희생시켜 정소, 부정소, 정낭을 분리하여 각각의 무게를 측정하고, 분리한 부정소는 1 mL 1X PBS에서 homogenization 한 다음, 37°C에서 20분간 shaking incubation하고 1/5로 희석하여 현미경 상에서 정자수를 측정하였다.

심장채혈 하여 얻은 마우스의 혈액으로부터 혈청을 분리하여, testosterone enzyme immunoassay kit와 cyclic GMP enzyme immunoassay kit를 사용하여 같은 방법으로 측정하였다.

통계분석

본 연구의 실험 결과는 실험군 당 평균과 표준편차를 계산하였고, SSPS(version 10) 통계프로그램을 이용하여 Student's t-test를 이용하여 p<0.05일 때 유의한 것으로 판정하거나, one-way ANOVA를 실시한 후 p<0.05의 유의수준에서 Duncan's multiple range test에 의하여 각 실험군의 평균치 간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

MP119의 ACE(angiotensin converting enzyme) 저해효과 측정

Renin-angiotensin system은 혈압조절에 매우 중요한 역할을 한다. ACE(angiotensin converting enzyme)는 angiotensin I에서 angiotensin II로 변환하는 단계에 관여하는 효소이며 이렇게 생성된 angiotensin II는 A-II 수용체와 결합하여 동맥과 소동맥을 수축시키고 부신피질을 흥분시켜 알도스테론의 유리를 촉진하게 되고 결과적으로 혈압 상승을 가져온다. 따라서 ACE 저해작용을 통해 혈관의 흐름을 원활하게 하며 더불어 고혈압을 직접적으로 억제할 수 있다(13,14).

본 연구에서 MP119의 ACE 저해효과를 측정한 결과를 Table 1에 나타내었다. MP119를 50, 100, 250, 500, 1000 ppm의 농도로 처리했을 때 각각의 ACE 저해율은 14.9±5.94%, 31.9±9.79%, 61.7±6.98%, 87.2±5.28%, 108.5±13.65%로 나타났다. 이 결과를 통해 ACE가 50% 저해되는 MP119의 농도인 IC₅₀(inhibitory concentration) 값은 241.3±35.5 ppm이며 1000 ppm의 농도에서는 ACE의 활성이 거의 나타나지 않고 있으므로 MP119는 효과적으로 ACE 저해효과를 나타

Table 1. Inhibitory effect of MP119 against ACE

MP119 (ppm)	Inhibition rate (%)
50	14.9±5.94 ¹⁾
100	31.9±9.79
250	61.7±6.98
500	87.2±5.28
1000	108.5±13.65

¹⁾Each value represents the mean±SE (n=3).

내고 있음을 확인하였다.

국내에서는 녹차의 아세톤 추출물 및 녹차로부터 분리한 탄닌의 ACE 저해효과를 측정하였으며 그 결과로 아세톤 추출물의 경우 1000 ppm의 시료 농도일 때 약 73.5%의 저해 활성을 나타낸다고 하였다(15). 또한 물냉이(watervress)의 경우 물 추출물이 1000 ppm의 농도에서 약 67.9%의 저해효과를 보인다고 보고되었다(16). 이와 같은 결과들과 비교해 보았을 때 MP119의 ACE 저해효과가 다른 추출물들에 비해 크기 때문에 혈행의 흐름 개선으로 인한 발기유지 및 혈압강하 효능을 보일 것으로 사료된다.

MP119의 PDE(phosphodiesterase) 저해효과 측정

음경 조직 중에서 주요 혈관 확장자인 cGMP는 PDE(phosphodiesterase)에 의해서 분해되는 것으로 알려져 있다(17). PDE의 활성을 억제시켜 cGMP의 분해 작용을 억제시키면 음경 발기능이 개선될 수 있을 것이다.

본 연구에서 MP119의 PDE 저해효과를 측정하여 Table 2에 나타내었다. MP119를 각각 50, 100, 200, 400 ppm의 농도로 처리하였을 때 PDE의 저해율이 0±4.39%, 3.7±3.48%, 18.5±6.65%, 55.4±6.79%로 나타났다. 이 결과를 통해 PDE가 50% 저해되는 MP119의 농도인 IC₅₀ 값이 372.2±33.8 ppm인 것을 확인하였다. 대표적인 PDE inhibitor로 알려진 sildenafil의 경우 IC₅₀ 값이 4.02 ppm으로 측정되었다(data not shown). MP119가 sildenafil과 비교했을 때 PDE 저해효과가 약 93배 떨어지지만, sildenafil은 단일물질인 반면 MP119는 천연 추출물이기 때문에 보통 천연물에 함유되어 있는 유효성분이 1~5%에 못 미치는 것을 고려하면 MP119가 매우 효율적으로 PDE를 저해하고 있음을 유추할 수 있다.

MP119가 TM3 세포의 cell viability에 미치는 영향

MTT는 살아있는 세포의 미토콘드리아 내막에 존재하는 oxido-reductase의 효소 작용에 의해 환원되어 보라색의 불용성 formazan을 생성하고, 이를 용해한 용해액의 발색정도

Table 2. Inhibitory effect of MP119 against PDE

MP119 (ppm)	Inhibition rate (%)
50	0±4.39 ¹⁾
100	3.7±3.48
200	18.5±6.65
400	55.4±6.79

¹⁾Each value represents the mean±SE (n=3).



Fig. 1. Effect of MP119 on TM3 cell viability. Results represent the mean \pm SE (n=8). *Significantly different from control at $p < 0.05$.

를 흡광도로 측정하여 살아있는 세포수를 계측하는데 자주 이용되는 방법이다(18).

본 연구에서는 MP119가 TM3 cell에 대하여 세포독성을 갖는지 알아보기 위하여 MTT assay를 실시하였다. TM3 cell에 MP119를 농도별로 처리하여 세포 생존율을 측정된 결과를 MP119 처리를 하지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 하여 비교하였다(Fig. 1). 그 결과 세포생존율이 100~120%로 대조군에 비해 비슷하거나 높은 생존율을 나타냈으며 특히 50, 400 ppm의 농도에서는 유의성 있게 높은 세포 생존율을 나타내었다. TM3 cell은 MP119에 의해 세포괴사가 일어나지 않는 것으로 보이며 정소세포에 유의성 있는 독성이 나타나지 않음을 알 수 있었다.

MP119에 의한 TM3 cell의 testosterone 농도 변화

남성의 성적 능력은 testosterone의 분비량과 아주 밀접한 관계를 유지하게 되며 노화가 진행되면서 성적 능력의 저하 현상이 나타나게 되는데 이는 testosterone의 감소로 인해 나타나는 경우가 많다(9).

본 연구에서 MP119의 처리가 TM3 cell의 testosterone 생성에 주는 변화를 측정하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 MP119를 5, 10, 50, 100 ppm으로 처리했을 경우 TM3 cell 배양액의 testosterone 농도 값은 변화가 없지만, 200, 400, 1000 ppm으로 처리했을 때 각각 약 12.43, 12.93, 13.68 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 대조군과 비교하여 유의성 있게 증가하였으며, 최대 20.11% 증가한 것을 확인할 수 있었다.

MP119에 의한 HUVEC의 nitrate의 변화

NO의 생산은 NOS(nitric oxide synthase) 계열의 효소를 매개로 하여 유발되는데, 이들 효소가 L-arginine을 L-citrulline으로 전환시키는 과정에서 NO가 만들어진다. NOS의 isoform에는 유도인자에 의해 발현되는 수동적 NOS(inducible NOS, iNOS)와 유도인자 없이도 수시로 발현되는 능동적 NOS(constitutive NOS, cNOS)가 있으며, cNOS는 혈관 내피세포에서 발현되는 eNOS(endothelial NOS)와 신

Fig. 2. Protective effect of MP119 on testosterone production in TM3 cell. Results represent the mean \pm SE (n=8). *Significantly different from control at $p < 0.05$.

경세포에 존재하는 nNOS(neuronal NOS)를 포함한다. 발기에는 cNOS가 관여하지만, nNOS가 결여된 transgenic mice에서도 골반 신경자극에 의한 발기가 발현된다고 보고되어 있다(19). 이러한 연구결과들로 미루어 보아 cNOS 가운데서도 특히 eNOS가 발기에 관여한다는 것을 알 수 있다(20). 따라서 본 연구에서는 HUVEC을 이용하여 eNOS에 관여된 NO변화를 측정하였다.

MP119가 NO생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 사람 제대동맥세포인 HUVEC에 MP119를 농도별로 처리하여 nitrate 농도를 측정하였다. 그 결과 Fig. 3에서와 같이 MP119를 400, 600, 800, 1000 ppm 처리함에 따라 nitrate의 농도가 약 33.58, 57.51, 82.66, 96.92 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 로 나타났으며 대조군과 비교했을 때 유의성 있게 증가하였다.

MP119 투여에 따른 웅성마우스의 생식장기 및 정자수 변화

중류수 또는 MP119를 7일간 경구투여 한 마우스로부터 생식장기인 정소, 부정소, 정낭을 적출하여 무게를 측정하였다. MP119의 투여에 따른 생식장기의 무게 변화를 측정할 결과 대조군과 비교할 때 다소 증가된 경향을 보였지만, 유

Fig. 3. Effect of MP119 on NO production of HUVEC cells. Results represent the mean \pm SE (n=8).

Table 3. Effect of MP119 on the weights of testis, epididymis and seminal vesicle of male ICR mice injected with cadmium

	Weight (mg)			
	Control ¹⁾	MP119 ²⁾	Cadmium ³⁾	MP119+Cd ⁴⁾
Testis	232.0±11.3 ^{a5)}	220.9±18.8 ^a	198.3±37.9 ^b	227.9±27.5 ^a
Epididymis	107.1±12.4 ^{NS6)}	105.3±30.8	102.1±13.6	112.1±5.6
Seminal vesicle	345.8±31.6 ^a	354.5±46.4 ^a	277.2±51.6 ^c	283.3±23.8 ^b

¹⁾Control: Oral intubation of vehicle for 7 days.

²⁾MP119: Oral intubation of MP119 for 7 days.

³⁾Cadmium: Cadmium injection after oral intubation of vehicle for 7 days.

⁴⁾MP119+Cd: Cadmium injection after oral intubation of MP119 for 7 days.

⁵⁾Values with different letters within a column differ significantly (p<0.05), mean±SE (n=10).

⁶⁾NS: not significant.

의적인 차이는 관찰되지 않았다(Table 3). 그러나 분리한 부 정소로부터 정자수를 측정 한 결과 MP119를 투여한 마우스 의 정자수는 마리당 약 3.51×10^7 세포로 대조군 약 3.11×10^7 세포와 비교하여 약 12.9% 증가된 것을 확인하였다 (Fig. 4). 본 연구를 통해 MP119는 정자수 증가에 도움을 준다는 것을 확인하였다.

MP119 투여 후 염화카드뮴을 투여한 음성마우스의 생 식장기 및 정자수 변화

증류수 또는 MP119를 7일간 경구투여한 뒤 염화카드뮴 을 투여한 마우스로부터 생식장기인 정소, 부정소, 정낭을 적출하여 무게를 측정하였다. 염화카드뮴을 투여함으로써 정소와 정낭의 무게가 감소하였지만 MP119를 투여한 후 염 화카드뮴을 투여한 군은 염화카드뮴을 투여하지 않은 대조 군과 비교하여 비슷한 무게를 유지하고 있음이 확인되었다 (Table 3). 또한 정자수를 측정 한 결과 염화카드뮴을 투여한 마우스는 마리당 정자수가 일반 대조군에 비교하여 약 23% 감소한 2.39×10^7 세포로 나타났지만 MP119를 투여한 후 염화카드뮴을 투여한 군은 염화카드뮴만 투여한 군에 비교 하여 약 50% 증가한 3.59×10^7 세포이며, 이 결과는 일반대 조군과 비교했을 때도 약 15.3%가 증가한 수치이다(Fig. 4). 염화카드뮴의 투여는 정소의 위축 및 정자수 감소를 두드러 지게 야기하였으나 MP119를 투여한 후 염화카드뮴을 투여 했을 때는 일반 대조군의 결과보다도 증가하는 것으로 보아 MP119가 염화카드뮴의 독성에 예방 및 치료적 효과를 갖고 있음을 알 수 있었다.

실험 마우스의 혈청 내 testosterone 농도 변화

증류수 및 MP119를 7일간 경구투여한 마우스군과 증류 수 혹은 MP119를 7일간 경구투여한 뒤 염화카드뮴을 투여 한 마우스군의 혈청으로부터 혈청 내 testosterone 농도를 측정하였다(Fig. 5). 일반 대조군의 혈청 내 testosterone의 농도는 40.19 ng/mL, MP119를 투여한 군은 60.3 ng/mL로 일반대조군에 비교하여 약 50% 증가하였다. 염화카드뮴만 투여한 군의 혈청 내 testosterone이 35.44 ng/mL로 일반대 조군보다 약 13.4% 감소되었지만, MP119를 투여한 후 염화 카드뮴을 투여한 군은 51.62 ng/mL로 염화카드뮴만 투여한 군보다 약 45.6%, 일반대조군보다 약 28.4% 증가하였다. 본

연구에서 MP119의 투여에 의해 혈청 내 testosterone의 농 도가 증가되었으며 생식관련 장기들의 무게는 큰 차이를 보

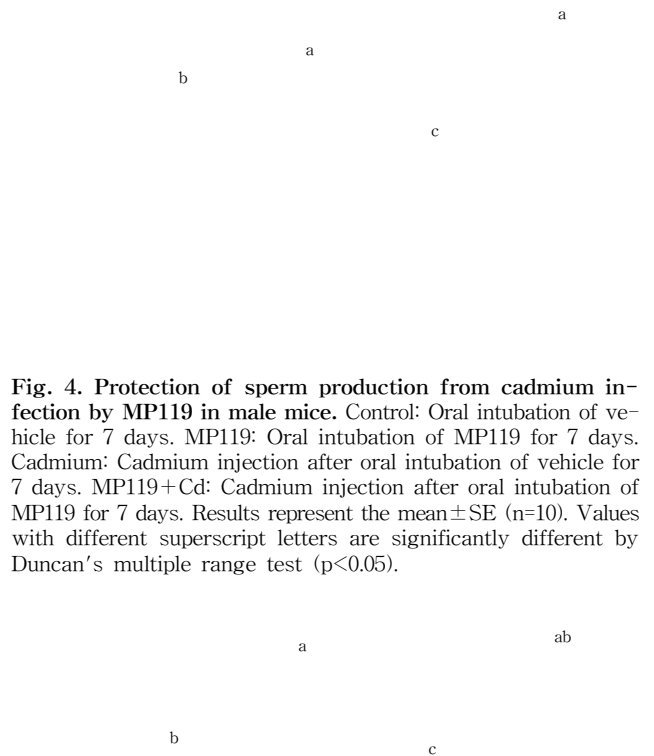


Fig. 4. Protection of sperm production from cadmium in- fection by MP119 in male mice. Control: Oral intubation of ve- hicle for 7 days. MP119: Oral intubation of MP119 for 7 days. Cadmium: Cadmium injection after oral intubation of vehicle for 7 days. MP119+Cd: Cadmium injection after oral intubation of MP119 for 7 days. Results represent the mean±SE (n=10). Values with different superscript letters are significantly different by Duncan’s multiple range test (p<0.05).

Fig. 5. Effect of the MP119 on the serum testosterone in male mice. Control: Oral intubation of vehicle for 7 days. MP119: Oral intubation of MP119 for 7 days. Cadmium: Cadmium injection af- ter oral intubation of vehicle for 7 days. MP119+Cd: Cadmium injection after oral intubation of MP119 for 7 days. Results repre- sent the mean±SE (n=10). Values with different superscript let- ters are significantly different by Duncan’s multiple range test (p<0.05).

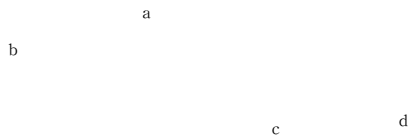


Fig. 6. Effect of the MP119 on the serum cGMP in male mice. Control: Oral intubation of vehicle for 7 days. MP119: Oral intubation of MP119 for 7 days. Cadmium: Cadmium injection after oral intubation of vehicle for 7 days. MP119+Cd: Cadmium injection after oral intubation of MP119 for 7 days. Results represent the mean \pm SE (n=10). Values with different superscript letters are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

이지 않았다.

일반적으로 testosterone 등의 안드로젠 작용물질의 직접적인 투여는 남성생식관련 장기들의 무게를 증가시키는 것으로 알려져 있다(21). 더불어 전립선암을 비롯한 남성 생식관련 장기들의 암유발 가능성이 문제가 되고 있다(22). 이러한 결과를 보았을 때, MP119는 testosterone 농도의 증가에 따른 성기능 향상을 나타내면서 남성생식 장기에 대한 암유발 위험이 적을 것으로 예상된다.

실험 마우스의 혈청 내 cGMP 농도 변화

증류수 및 MP119를 7일간 경구투여한 마우스 군과 증류수 혹은 MP119를 7일간 경구투여한 뒤 염화카드뮴을 투여한 마우스군의 혈청으로부터 혈청 내 cGMP 농도를 측정하였다(Fig. 6). 그 결과 MP119를 투여한 군은 9.8 μ g/mL로 일반대조군의 cGMP 농도인 7.7 μ g/mL과 비교하여 약 27.3% 증가하였다. 염화카드뮴만 투여한 마우스 군은 일반대조군과 비교하여 약 41.5% 감소한 4.5 μ g/mL의 cGMP 농도를 나타내었다. MP119를 투여한 후 염화카드뮴을 투여한 군은 일반대조군보다는 약간 감소하였지만 염화카드뮴만 투여한 군과 비교하여 28.9% 증가한 5.8 μ g/mL의 혈청 내 cGMP 농도 값을 나타내었다. 이 결과는 MP119가 NO생성에 미치는 영향과 연결되는 결과로 NO가 평활근세포에서 GTP(guanosine triphosphate)를 cGMP로 변환시키는 구아닐 사이클라제(guanylate cyclase)의 형성을 촉진시켜 cGMP 수준을 증가시켰거나, cGMP의 분해에 관여하는 PDE의 활성을 억제시켜 cGMP 함량이 증가되었을 가능성 등 몇 가지 가능성을 생각할 수 있다.

요 약

마카, 홍삼, 남가새 추출물을 일정한 무게 비율로 혼합하

여 발효시켜 얻어진 식물추출복합발효물(MP119)이 성기능에 미치는 영향을 조사하였다. ACE(angiotensin converting enzyme)과 PDE(phosphodiesterase)에 대한 저해효과를 통해 혈액순환부진 개선 및 cGMP 농도에 의한 발기능 개선에 미치는 효과를 측정하였다. MP119의 ACE 저해효과를 측정한 결과 IC_{50} 값이 241.3 \pm 35.5 ppm, PDE 저해효과를 측정한 결과 IC_{50} 값이 372.2 \pm 33.8 ppm으로 나타나 혈관확장으로 인한 혈류량 증가 및 cGMP농도 증가에 영향을 줄 수 있을 것으로 예상된다. MP119는 마우스 정소세포인 TM3 cell에 유의성 있는 독성이 나타나지 않았으며, TM3 cell에 농도별로 처리했을 때 세포배양액으로부터 대조군과 비교하여 최대 20.11% 증가한 testosterone 농도를 확인하였다. 또한 HUVEC에 농도별로 처리했을 때 NO생산량이 MP119 처리 농도가 증가할수록 유의성 있게 증가하였다. 웅성마우스에 MP119를 7일간 경구투여 후 생식장기의 무게와 정자수를 측정하고, MP119를 경구투여한 후 염화카드뮴을 투여하여 생식장기의 무게와 정자수를 측정하였다. 또한 실험쥐로부터 혈청을 분리하여 혈청 내 testosterone과 cGMP를 측정하였다. 그 결과 MP119의 투여를 통해 생식장기의 무게 변화 없이 정자수 증가에 도움을 준다는 것을 확인하였으며, 더불어 혈청 내 testosterone 및 cGMP의 농도 역시 증가하였다. MP119를 투여한 후 염화카드뮴을 투여한 실험군에서 역시 정자수 및 혈청 내 testosterone, cGMP 농도 증가를 나타내었으므로 결과적으로 MP119가 염화카드뮴의 독성예방 및 치료에 효과적임을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 중소기업 산학협력지원사업 중 산학협력실지원사업의 일환으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Jouannet P, Wang C, Eustache F, Kold-Jensen T, Auger J. 2001. Semen quality and male reproductive health: The controversy about human sperm concentration decline. *APMIS* 109: 333-344.
- Goldstein I, Lue TF, Harin PN, Rosen RC, Steers WD, Wicker PA. 1998. Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. *New Engl J Med* 338: 397-404.
- Kim WS, Myung PK, Yang EJ, Cho KJ. 2000. Histological and biochemical study on the effect of cadmium chloride on the rat testis. *Korean J Anat* 33: 29-40.
- Lee EJ, Kim HS, Kim BC, Hwang SW, Hwang SY. 2007. Effect of KH-305 on the nitric oxide synthase activity and erectile dysfunction in young rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 305-310.
- Ignarro LJ, Bush PA, Buga GM. 1990. Nitric oxide and c-GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem Biophys Res Comm* 170: 843-850.
- Lincoln TM. 1989. Cyclic GMP and mechanism of

- vasodilation. *Pharmacol Ther* 41: 479-483.
7. Feelisch M, Noack E. 1987. Nitric oxide (NO) formation from nitrovasodilators occurs independently of hemoglobin or non-hem iron. *Eur J Pharmacol* 142: 465-469.
 8. Milman N, Burton CM, Iversen M, Videbaek R, Jensen CV, Carlsen J. 2008. Pulmonary hypertension in end-stage pulmonary sarcoidosis: therapeutic effect of sildenafil? *J Heart Lung Transplant* 27: 329-334.
 9. An TG, Jeong JC. 2005. Effects of Ojawan on the ethanol-induced erectile dysfunction in rats. *Korean J Orient Int Med* 26: 605-614.
 10. Min GW, Park JH, Yoon CH, Jung JC, Shin US, Han YH. 2000. Effects of *Cordyceps militaris* on the penile nitric oxide synthase activity and the level of blood testosterone in hydrocortisone acetate-treated rats. *Korean J Orient Int Med* 21: 389-398.
 11. Do JR, Heo IS, Jo JH. 2006. Effect of antihypertensive peptides originated from various marine protein on ACE inhibitory activity and systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Korean J Food Sci Technol* 38: 567-570.
 12. Sladowski D, Steer SJ, Clothier RH, Balls M. 1993. An improved MTT assay. *J Immunol Methods* 157: 203-207.
 13. Ma SJ. 2000. Inhibitory effect of onion seasoning on angiotensin converting enzyme. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 395-400.
 14. Vermeirssena V, Campb JV, Verstraetea W. 2002. Optimization and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *J Biochem Biophys Methods* 51: 75-87.
 15. Cho YJ, An BJ, Choi C. 1993. Inhibition effect of against angiotensin converting enzyme of flavan-3-ols isolated Korean green tea. *Korean J Food Sci Technol* 25: 238-242.
 16. Park EJ, Lee HG, Park HH, Kwon IB, Shin HK, Yang CB. 2000. Purification and identification of angiotensin- I converting enzyme inhibitory compounds from watercress (*Nasturtium officinale*). *Food Sci Biotechnol* 9: 163-167.
 17. Bravo JA, Reifsnnyder DH. 1990. Primary sequence of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes and the design of selective inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* 11: 150-155.
 18. Denizot F, Rita L. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 22: 271-277.
 19. Burnett AL. 1997. Nitric oxide in the penis: Physiology and pathology. *J Urol* 157: 320-324.
 20. Shin SJ, Lee JH. 2006. Improving effect of evening primrose oil on the sexual functions of male mice. *Kor J Pharmacogn* 37: 85-91.
 21. Kwon KB, Kim BR, Hwang IJ, Kim EK, Kim GH, Ko KH, Choi YS, Zhang GG, Rho SI, Han DW, Cha S, Park DY, Ryu DG. 2004. Effects of Gamimajeonjohwan extract on the sexual function in male rats. *Korean J Oriental Physiol Pathol* 18: 1410-1417.
 22. Na CS, Choi BR, Choo DW, Choi WI, Kim JB, Kim HJ, Chung YJ, Park YI, Dong MS. 2005. The effect of flavonoid fraction extracted *Rhus verniciflua* Stokes on sexual behavior in SD male rats. *Yakhak Hoeji* 29: 471-476.

(2009년 8월 17일 접수; 2009년 9월 10일 채택)