

益智仁의 음경해면체 평활근 이완효과

박선영*

세명대학교 한의과대학 생리학교실

The Relaxation Effects of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus* on Isolated *Corpus Cavernosum* Smooth Muscle

Sun-Young Park*

Department of Physiology, College of Korean Medicine, Semyung University

ABSTRACT

Objectives : These present study was designed to investigate the relaxation effects of *Alpiniae Oxyphyllae Fructus*(AOF) on isolated corpus cavernosum smooth muscle.

Methods : Rabbit corpus cavernous tissues were prepared in strip. Then relaxation responses of AOF at 0.01-3 mg/ml in contracted strips induced by phenylephrine(PE) were measured. To evaluate mechanisms, indomethacin(IM) tetraethylammonium chloride(TEA), *N ω* -nitro-L-arginine(L-NNA), methylene blue(MB) were treated before AOF extract(0.1-3 mg/ml) infused into precontracted strips induced by PE. And 1 mM Ca²⁺ was infused into precontracted strips after pretreatment of AOF extract(3 mg/ml) in Ca²⁺-free krebs-ringer solution. NO concentration was measured by Griess reagent system. Ratio of smooth muscles to collagen fibers and eNOS positive reaction were measured by histochemical and immunohistochemical process.

Results : The cavernous strips were significantly relaxed by AOF extract 0.1, 0.3, 1, 3 mg/ml and the pretreatment with IM 10 μ M, L-NNA 100 μ M, MB 10 μ M inhibited relaxation of AOF compared to non-pretreatment, but the pretreatment with TEA 100 μ M didn't affect relaxation of AOF. In a Ca²⁺-free solution, pretreatment with AOF reduced increase on contraction of strips by Ca²⁺ supply than non-pretreatment. On HUVEC, NO concentration was increased. On corpus cavernosum of penis in Spontaneous Hypertensive Rat, ratio of smooth muscles to collagen fibers and eNOS positive reaction in AOF group were increased compared to PE group

Conclusions : Taken this results, we can suggest that AOF extract exerts a relaxation effects on rabbit corpus cavernosum smooth muscle in part by suppressing influx of extracellular Ca²⁺ throughout prostacyclin, the NO-cGMP system.

Key words : *Alpiniae Oxyphyllae Fructus*, corpus cavernosum, nitric oxide, prostacyclin

서론

남성호르몬인 테스토스테론이 20대부터 감소하기 시작해서 거의 절반 수준으로 떨어지는 40대 이후의 중년 남성들은 이른바 남성갱년기 증후군을 경험하게 된다. 남성갱년기 증후군의 증상으로는 성욕감퇴, 발기부전, 근육강도 및 근 질량 감소 등의 신체적 증상과 신경과민, 우울 등의 정서적 증상이 있는데, 그 중 가장 두드러진 증상이 발기부전이다¹⁻⁴⁾.

사회가 점차 고령화로 진입함에 따라 중년 남성인구도 증가되었고 이에 남성갱년기 및 발기부전 인구도 증가되고 있다. 이러한 사회적 분위기에 편승하여 발기부전의 치료에 대한 사회의 관심이 높아지고 있지만 기존 발기부전의 치료는 비약물적 치료의 부작용과 외과적 치료의 침습성 등으로 인해 환자들의 욕구를 최대한 충족시키지 못했다⁵⁻⁶⁾. 따라서 한의 약물을 이용한 비침습적이며 부작용이 적은 발기부전 치료제에 대한 연구가 필요한 실정이다.

*Corresponding author : Sun-Young Park, Department of Physiology, College of Korean Medicine, Semyung University 65, Semyung-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do, Korea
· Tel : +82-43-649-1345 · E-mail : sue-7@daum.net
· Received : 22 June 2015 · Revised : 11 July 2015 · Accepted : 12 July 2015

발기부전은 한의학적으로 陽痿, 陰痿, 陰不起 등으로 분류되며 원인으로 腎精虧虛, 命門火衰, 心脾損傷, 肝氣鬱結, 濕熱下注, 過食厚味, 飲酒太過 등이 있으며 그 중에서도 腎精의 虛損이 중요한 원인으로 여겨진다⁷⁻⁹⁾.

益智仁은 대표적인 補腎固精하는 약물로, 性溫味辛하면서 溫脾, 暖腎의 효능¹⁰⁾이 있어 腎精의 虛損이 주된 원인인 발기부전의 치료에 쓰일 수 있을 것으로 생각된다.

이러한 益智仁에 대한 실험적 연구로 이¹¹⁾는 신장동맥의 허혈/재관류에 의해 유발된 급성 신부전 백서에 益智仁 추출물을 경구 투여하여 신기능, 혈액학적 분석 및 조직학적 변화를 관찰하였고, 박 등¹²⁾은 암세포주종 종양을 유발시킨 생쥐의 증완에 益智仁약침액을 주입해서 항암 및 항종양, 면역기능에 미치는 영향을 관찰하였다. 이 밖에도 益智仁의 약리작용으로 항이뇨, 항치매, 항진균의 효과가 있음이 보고¹³⁻¹⁵⁾되었으나 益智仁이 발기부전에 미치는 효과에 대한 보고는 없다.

음경해면체는 스펀지 모양의 느슨한 구조로, 음경해면체 평활근의 이완에 의해 음경내로 혈액이 유입되어 발기현상이 발생한다. 즉, 발기현상은 신경계, 내분비계 또는 혈류에 의한 물리적 자극 등이 서로 독립적인 신호전달체계를 이용하여 일어나는 복잡한 반응의 종합적 결과이지만, 음경해면체 평활근의 이완이 이 복잡한 현상 중 가장 주된 현상으로 나타나며 내피세포는 내피세포 매개성 이완인자의 분비를 통하여 발기에 관여한다고 알려져 있다¹⁶⁻²⁰⁾. 따라서 발기의 유무를 확인하기 위해서는 음경해면체 평활근의 이완 및 내피세포 매개성 이완인자를 관찰해야한다.

이에 본 실험에서는 益智仁의 발기부전에 대한 치료 가능성을 알아보기 위해 음경해면체 평활근에 대한 영향과 기전을 내피세포성 이완인자를 중심으로 한 organ bath study와 조직학적 방법을 통하여 확인하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험동물

Organ bath study에는 체중 2.0~2.5 kg 사이의 New Zealand white 수컷 토끼(שמטאקו, 한국)를 사용하였고 조직학적 실험에는 10주령의 SHR/Izm Rat(שמטאקו, 한국)을 사용하였으며 모든 동물은 고행사료와 물을 충분히 공급하면서 1주 이상 일정한 온도(25 ± 2 °C)와 습도(50 ± 5 %)가 유지되는 실험실 환경에 적응시킨 후 본 실험에 사용하였다.

본 동물실험은 세명대학교 동물실험윤리위원회의 승인(smeac 14-10-02)하에 실시되었다.

2. 시약

Phenylephrine(PE)과 indomethacin(IM), tetraethylammonium chloride(TEA), *N* ω -nitro-L-arginine(L-NNA), methylene blue(MB)은 시그마 케미칼사(sigma, USA)로부터 구입하였다.

3. 益智仁 추출물 제조

益智仁(*Alpinia Oxyphyllae Fructus*, AOF) 200 g을 증류수 2000 mL과 함께 round flask에 넣고 100 °C에서 2시간

동안 가열 추출한 다음 rotary evaporator(Eyela, Japan)로 감압 농축하였고, 농축액을 동결건조기로 건조하여 얻은 분말 42.19 g을 실험에 사용하였다.

4. 음경해면체 이완효과 측정

1) 해면체절편의 제작

토끼를 urethane(0.6 g/kg, 정맥주사)으로 마취한 후 하복부를 절개하고 음경을 적출하여 4°C의 modified krebs-ringer bicarbonate solution(125.4 mM NaCl, 4.9 mM KCl, 2.8 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 15.8 mM NaHCO₃, 1.2 mM KH₂PO₄, 12.2 mM glucose, pH 7.4)에서 음경해면체 주위의 백막을 제거한 다음 2×2×6 mm 크기의 해면체절편을 만들었다.

2) 등장성 수축 측정

해면체절편은 95%의 O₂와 5%의 CO₂ 혼합가스로 포화된 37 °C의 modified krebs-ringer bicarbonate solution이 peristaltic pump를 통하여 3 mL/min의 속도로 흐르고 있는 organ bath(용량 1.5 mL)에 현수하였다. 해면체절편의 한쪽 끝은 organ bath의 바닥에 고정시키고 다른 쪽은 force transducer에 연결하여 장력을 측정하고 그 결과를 physiograph (PowerLab, Australia)로 기록하였다.

실험시작 전 해면체절편을 organ bath에서 1시간 안정시킨 후 micromanipulator(Narishige N2, Japan)를 이용하여 피동장력 1.5 g을 가하고 다시 2시간 안정시킨 다음 실험을 진행하였으며, 연속되는 실험에는 다른 처치 전에 다시 1시간 안정시킨 다음 시행하였다.

3) 益智仁의 음경해면체 이완효과와 작용기전 검증

(1) Phenylephrine(PE)으로 수축된 해면체에서의 수축변화 측정

해면체절편에 PE 1 μM을 투여하여 수축을 유발시킨 다음 益智仁 추출물을 농도별(0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 mg/mL)로 투여하여 수축의 변화를 기록하였다.

(2) Indomethacin(IM)이 해면체 이완효과에 미치는 영향

해면체절편을 먼저 IM 10 μM로 15분간 처치하고 PE 1 μM을 투여하여 수축을 유발시킨 다음 益智仁 추출물(0.1, 0.3, 1, 3 mg/mL)을 투여하여 IM을 전처치하지 않은 경우와 수축의 변화를 비교하였다.

(3) Tetraethylammonium chloride(TEA)가 해면체 이완효과에 미치는 영향

해면체절편을 TEA 10 μM로 15분간 전처치하고 PE 1 μM을 투여하여 수축을 유발시킨 다음 益智仁 추출물(0.1, 0.3, 1, 3 mg/mL)을 투여하여 TEA를 전처치하지 않은 경우와 수축의 변화를 비교하였다.

(4) *N* ω -nitro-L-arginine(L-NNA)이 해면체 이완효과에 미치는 영향

해면체절편을 L-NNA 10 μM로 15분간 전처치하고 PE 1

μM을 투여하여 수축을 유발시킨 다음 益智仁 추출물(0.1, 0.3, 1, 3 mg/ml)을 투여하여 L-NNA를 전처리하지 않은 경우와 수축의 변화를 비교하였다.

(5) Methylene blue(MB)가 해면체 이완효과에 미치는 영향
해면체절편을 MB 1 μM로 15분간 전처리하고 PE 1 μM을 투여하여 수축을 유발시킨 다음 益智仁 추출물(0.1, 0.3, 1, 3 mg/ml)을 투여하여 MB를 전처리하지 않은 경우와 수축의 변화를 비교하였다.

(6) 益智仁의 전처리에 따른 Ca²⁺ 의존성 수축변화 측정
해면체절편을 Ca²⁺-free solution에서 益智仁 추출물(3.0 mg/ml)로 10분간 전처리하고 PE 1 μM을 투여하여 수축을 유발시킨 다음 Ca²⁺ 1 mM을 투여하여 益智仁을 전처리하지 않은 경우와 수축의 변화를 비교하였다.

5. 음경해면체 조직학적 변화 측정

1) 음경해면체 조직표본 제작

Rat을 Ether로 마취한 후 하복부를 절개하고 음경을 적출하여 4℃의 modified krebs-ringer bicarbonate solution (NaCl 125.4, KCl 4.9, CaCl₂ 2.8, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 15.8, KH₂PO₄ 1.2, glucose 12.2 mM, pH 7.4)에 담았다. 음경 주위의 지방조직을 제거하고 2 mm 두께의 음경절편을 제작한 다음 정상인 대조군과 PE(1 μM)를 단독 처리한 PE군, PE(1 μM)와 益智仁(3 mg/ml)을 동시에 처리한 益智仁군으로 구분하여 제작하였다. 제작된 표본은 실온에서 24시간동안 10% NBF에 고정하였다. 고정된 조직은 통상적인 방법으로 paraffin에 포매한 후 3 μm 두께의 연속절편으로 제작하였다.

2) 음경해면체 조직화학

음경해면체에 분포하는 평활근과 아교섬유의 분포 변화를 관찰하기 위해 Masson trichrome 염색을 실시하였다. 우선 50-60℃ Bouin 용액에서 1시간동안 매염 처리한 다음 70% 에탄올에서 picric acid를 제거하였다. Weigert iron hematoxylin에서 10분 동안 반응시켜 핵을 염색하고, Biebrich scalet-acid fuchsin와 phosphomolybdic-phosphotungstic acid에서 각각 15분간, aniline blue에 5분간 처리하여 평활근(적색)과 아교섬유(청색)를 염색하고 광학현미경(BX50, Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 영상분석을 통해 음경해면체내 아교섬유에 대한 평활근의 분포비율을 계산하였다.

3) 음경해면체 면역조직화학

음경해면체의 발기기전에 관여하는 eNOS 분포 변화를 관찰하기 위해 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 음경절편을 proteinase K (20 μg/ml)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum에서 2시간 동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 mouse anti-eNOS (1:100, Santa Cruz Biotech)에 4℃ humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG_{2a} (1:100, DAKO, USA)에 실온에서 24시간 link 하였고, 그런 다음 avidin

biotin complex kit (Vector Lab, USA)에 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하였다. 영상분석을 통해 음경해면체내 eNOS의 반응을 계산하였다.

6. 세포실험

사람의 제대정맥내피세포인 human umbilical vein endothelial cells(HUVEC)은 Clonetics™ and Poietics™ (Lonza, USA)에서 구입하여 passage 3~7번까지 사용하였으며, 세포배양을 위해 endothelial cell basal medium-2(EBM-2) bullet kit (Lonza, USA)을 이용하여 37℃, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다. EBM-2 배지는 사용 전 EGM-2 Single Quots (10% fetal bovine serum, hydrocortisone, hFGF-B, vEGF, R3-IGF-I, ascorbic acid, hEGF, GA-1000, heparin)을 넣고 잘 섞어서 사용하였다.

70~80%정도 confluent한 세포는 HEPES-buffered saline solution을 주입하여 씻어내고, trypsin/EDTA solution (2 ml)을 넣어 flask에 부착된 세포를 떼어낸 후 trypsin neutralizing solution을 첨가하여 원심분리(220 xg, 5분)하였다. 침전물에 새로운 배지를 넣어서 cell count하여 세포를 96-well plate (5 × 10³ cells/well)에 심은 다음 24시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다.

1) 세포독성 측정

Endothelial cell basal medium-2(EBM-2) 배지로 37℃, 5% CO₂ 하에서 24시간 배양한 human umbilical vein endothelial cells(HUVEC)에 益智仁 추출물을 농도별(100, 300, 500, 1000 μg/ml)로 처리한 다음 24시간 배양하여 세포생존율을 MTT assay로 측정하였다¹²⁾. MTT(methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, 5 mg/ml)를 20 μl 넣고, 세포 배양기에서 2시간 방치하였다. 상층액을 제거한 뒤 formazan 침전물은 DMSO를 200 μl씩 넣어 약 15분간 녹였다. 540 nm의 파장에서 ELISA microplate reader로 흡광도를 측정하여 세포생존율을 계산하였다.

2) Nitric oxide 측정

Nitric oxide(NO) 생성 정도는 Griess reaction¹³⁾에 준하여 microplate reader로 NO 생성의 지표인 배지에 생성된 nitrite 양을 측정하여 결정하였다. 益智仁 처리 24시간 후에 배양액 50 μl에 Griess reagent(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene diamide 및 2.5% 인산)를 동량 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

Nitrite 양의 측정은 sodium nitrite를 농도별로 조제하여 만든 표준곡선을 이용하여 산출하였고, 생성된 nitrite의 양은 μM로 환산하여 나타내었으며, 각 실험에서 기본 대조군은 세포 배양액을 사용하였다.

7. 영상분석과 통계처리

조직화학적 실험결과와 수치화를 위해 Image pro Plus(Media Cybernetic, USA)을 이용한 영상분석(image analysis)을 실시하였다. 모든 실험결과는 평균과 표준편차 (means ± SD)로 나타내었고, 해면체 수축의 변화는 실제 수축의 크기와 PE를 투여하여 유발된 최고 수축에 대한 백분율로 표현하였으며, 실험결과의 비교는 student's *t*-test로 유의성을 검증하였다.

결 과

1. PE로 수축된 해면체에서의 수축변화

益智仁은 PE로 수축된 해면체절편에 대하여 0.1, 0.3, 1, 3 mg/ml에서 각각 유의성 있는 이완효과를 나타내었다(Table 1, Fig. 1).

Table 1. The Effects of Alpiniae Oxyphyllae Fructus in isolated strips of rabbit corpus cavernosum smooth muscle precontracted with PE.

Treatment	Contraction(g)	Relaxation(%)
PE	1.11 ± 0.32	0
PE + AOF 0.01	1.03 ± 0.28	6.6 ± 4.0
PE + AOF 0.03	0.94 ± 0.26	14.7 ± 5.8
PE + AOF 0.10	0.80 ± 0.24*	27.9 ± 8.0
PE + AOF 0.30	0.68 ± 0.22**	39.0 ± 9.5
PE + AOF 1.00	0.52 ± 0.19***	53.5 ± 9.4
PE + AOF 3.00	0.23 ± 0.13***	80.4 ± 9.2

Values are means ± SD(*n*=9). AOF extract-induced relaxation was expressed as percentage of PE-contraction, AOF, Alpiniae Oxyphyllae Fructus extract(mg/ml) ; * *p*<0.05, ** *p*<0.01, *** *p*<0.001 significant compared with PE.

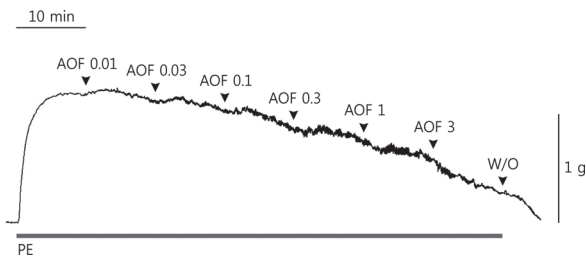


Fig. 1. AOF extract-induced concentration-dependent relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum. W/O, wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

2. IM이 해면체 이완효과에 미치는 영향

해면체절편을 PE로 수축시키고益智仁 추출물을 농도별로 투여하였을 때, IM을 전처치하지 않은 경우는 0.1, 0.3, 1, 3 mg/ml에서 모두 유의성 있는 이완효과를 나타내었고, IM을 전처치한 경우는 0.3, 1, 3 mg/ml에서 각각 유의성 있는 이완효과를 나타내었다. 그러나 IM을 전처치하지 않은 경우에 비하여 IM을 전처치한 경우益智仁 추출물의 이완효과는 0.1, 0.3, 1, 3 mg/ml에서 모두 유의성 있게 억제되었다(Table 2, Fig. 2).

Table 2. Effects of pre-treatment of IM on Relaxation effects of Alpiniae Oxyphyllae Fructus in isolated rabbit corpus cavernosum smooth muscle.

Treatment	Non treatment of IM		Treatment of IM	
	Contraction(g)	Relaxation(%)	Contraction(g)	Relaxation(%)
PE	1.17 ± 0.12	0	1.06 ± 0.14	0
PE + AOF 0.1	1.05 ± 0.10*	10.1 ± 4.3	1.00 ± 0.12	4.5 ± 5.8##
PE + AOF 0.3	0.90 ± 0.09***	23.2 ± 6.0	0.91 ± 0.11**	13.0 ± 7.7##
PE + AOF 1.0	0.66 ± 0.11***	42.9 ± 9.8	0.76 ± 0.10***	27.8 ± 7.0###
PE + AOF 3.0	0.33 ± 0.08***	72.2 ± 5.9	0.41 ± 0.09***	61.5 ± 6.6###

Values are means ± SD(*n*=13). AOF extract-induced relaxation was expressed as percentage of PE-contraction, AOF, Alpiniae Oxyphyllae Fructus extract(mg/ml) ; * *p*<0.05, ** *p*<0.01, *** *p*<0.001 significant compared with PE ; ## *p*<0.01, ### *p*<0.001 significant compared with PE+AOF in non treatment of IM.

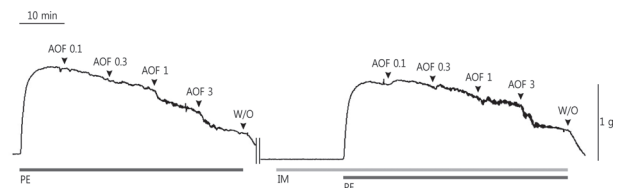


Fig. 2. Effects of AOF extract on PE-precontracted rabbit corpus cavernosum in the absence and presence of IM. W/O, wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

3. TEA가 해면체 이완효과에 미치는 영향

해면체절편을 PE로 수축시키고益智仁 추출물을 농도별로 투여하였을 때, TEA를 전처치하지 않은 경우는 1, 3 mg/ml에서 각각 유의성 있는 이완효과를 나타내었고, TEA를 전처치한 경우도 1, 3 mg/ml에서 각각 유의성 있는 이완효과를 나타내었다. 따라서 TEA를 전처치하지 않은 경우와 TEA를 전처치한 경우益智仁 추출물의 이완효과에 유의한 변화는 없었다(Table 3, Fig. 3).

Table 3. Effects of pre-treatment of TEA on Relaxation effects of Alpiniae Oxyphyllae Fructus in isolated rabbit corpus cavernosum smooth muscle.

Treatment	Non treatment of TEA		Treatment of TEA	
	Contraction(g)	Relaxation(%)	Contraction(g)	Relaxation(%)
PE	0.99 ± 0.16	0	1.02 ± 0.17	0
PE + AOF 0.1	0.93 ± 0.20	6.2 ± 5.5	0.97 ± 0.19	5.9 ± 5.0
PE + AOF 0.3	0.84 ± 0.21	16.2 ± 9.2	0.87 ± 0.19	15.8 ± 6.5
PE + AOF 1.0	0.65 ± 0.21**	35.5 ± 11.7	0.68 ± 0.20*	34.1 ± 10.3
PE + AOF 3.0	0.33 ± 0.12***	67.6 ± 9.1	0.38 ± 0.13***	64.0 ± 7.0

Values are means ± SD(*n*=9). AOF extract-induced relaxation was expressed as percentage of PE-contraction, AOF, Alpiniae Oxyphyllae Fructus extract(mg/ml) ; * *p*<0.05, ** *p*<0.01, *** *p*<0.001 significant compared with PE.

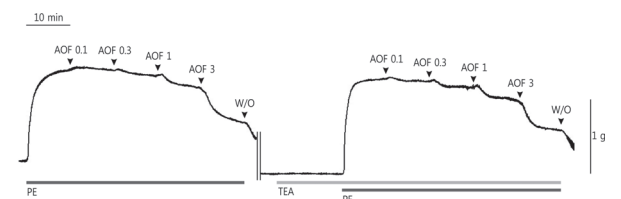


Fig. 3. Effects of AOF extract on PE-precontracted rabbit corpus cavernosum in the absence and presence of TEA. W/O, wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

4. L-NNA가 해면체 이완효과에 미치는 영향

해면체절편을 PE로 수축시키고 益智仁 추출물을 농도별로 투여하였을 때, L-NNA를 전처리하지 않은 경우는 0.3, 1, 3 mg/ml에서 각각 유의성 있는 이완효과를 나타내었고, L-NNA를 전처리한 경우는 1, 3 mg/ml에서 각각 유의성 있는 이완효과를 나타내었다. 그러나 L-NNA를 전처리하지 않은 경우에 비하여 L-NNA를 전처리한 경우 益智仁 추출물의 이완효과는 0.1, 0.3, 1, 3 mg/ml에서 모두 유의성 있게 억제되었다 (Table 4, Fig. 4).

Table 4. Effects of pre-treatment of L-NNA on Relaxation effects of Alpiniae Oxyphyllae Fructus in isolated rabbit corpus cavernosum smooth muscle.

Treatment	Non treatment of L-NNA		Treatment of L-NNA	
	Contraction(g)	Relaxation(%)	Contraction(g)	Relaxation(%)
PE	1.08±0.23	0	1.23±0.22	0
PE + AOF 0.1	0.92±0.20	14.7±3.6	1.20±0.22	1.9±3.0 ^{###}
PE + AOF 0.3	0.80±0.19 ^{**}	25.6±3.4	1.14±0.21	7.3±3.7 ^{###}
PE + AOF 1.0	0.63±0.16 ^{***}	41.8±4.3	1.03±0.20 [*]	16.4±4.5 ^{###}
PE + AOF 3.0	0.28±0.07 ^{***}	74.3±5.6	0.48±0.13 ^{***}	60.8±6.0 ^{###}

Values are means ± SD(n=11). AOF extract-induced relaxation was expressed as percentage of PE-contraction, AOF, Alpiniae Oxyphyllae Fructus extract(mg/ml); * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 significant compared with PE; ### p<0.001 significant compared with PE+AOF in non treatment of L-NNA.

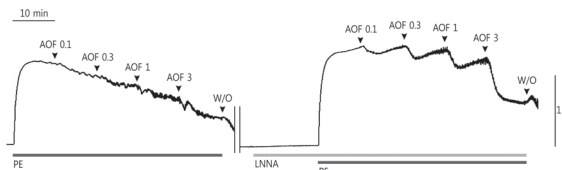


Fig. 4. Effects of AOF extract on PE-precontracted rabbit corpus cavernosum in the absence and presence of L-NNA. W/O, wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

5. MB가 해면체 이완효과에 미치는 영향

해면체절편을 PE로 수축시키고 益智仁 추출물을 농도별로 투여하였을 때, MB를 전처리하지 않은 경우는 0.3, 1, 3 mg/ml에서 각각 유의성 있는 이완효과를 나타내었고, MB를 전처리한 경우도 0.3, 1, 3 mg/ml에서 각각 유의성 있는 이완효과를 나타내었다. 그러나 MB를 전처리하지 않은 경우에 비하여 MB를 전처리한 경우 益智仁 추출물의 이완효과는 0.1, 0.3, 3 mg/ml에서 유의성 있게 억제되었다(Table 5, Fig. 5).

Table 5. Effects of pre-treatment of MB on Relaxation effects of Alpiniae Oxyphyllae Fructus in isolated rabbit corpus cavernosum smooth muscle.

Treatment	Non treatment of MB		Treatment of MB	
	Contraction(g)	Relaxation(%)	Contraction(g)	Relaxation(%)
PE	1.07 ± 0.17	0	1.10 ± 0.12	0
PE + AOF 0.1	0.96 ± 0.19	10.4 ± 5.1	1.05 ± 0.14	4.8±3.2 ^{##}
PE + AOF 0.3	0.83 ± 0.22 ^{**}	23.3 ± 9.5	0.94 ± 0.14 [*]	14.7±5.2 [#]
PE + AOF 1.0	0.64 ± 0.21 ^{***}	41.2 ± 11.3	0.73 ± 0.14 ^{***}	33.8±7.1
PE + AOF 3.0	0.27 ± 0.12 ^{***}	75.6 ± 7.7	0.35 ± 0.11 ^{***}	60.7±7.3 [#]

Values are means ± SD(n=11). AOF extract-induced relaxation was expressed as percentage of PE-contraction, AOF, Alpiniae Oxyphyllae Fructus extract(mg/ml); * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 significant compared with PE; # p<0.05, ## p<0.01 significant compared with PE+AOF in non treatment of MB.

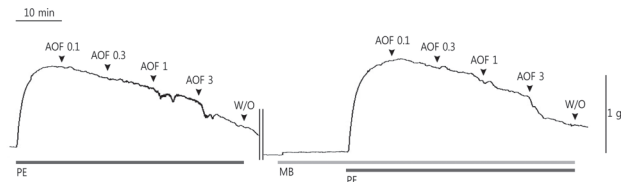


Fig. 5. Effects of AOF extract on PE-precontracted rabbit corpus cavernosum in the absence and presence of MB. W/O, wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

6. 益智仁의 전처리에 따른 Ca²⁺ 의존성 수축의 변화

Krebs-ringer solution에서 Ca²⁺을 제거하고 PE를 투여하여 수축을 유발시킨 후 Ca²⁺ 1 mM을 투여하였을 때 0.88 ± 0.22 g의 수축을 나타내었으나, 益智仁 추출물(3 mg/ml)을 전처리한 다음 PE를 투여하여 수축을 유발시킨 후 Ca²⁺ 1 mM을 투여하였을 때 0.21 ± 0.08 g의 수축을 나타내어 益智仁 추출물은 Ca²⁺ 투여로 인한 수축의 증가를 유의성 있게 억제하였다(Table 6, Fig. 6).

Table 6. Effects of pre-treatment of Alpiniae Oxyphyllae Fructus on calcium-induced contraction of corpus cavernosal strip in calcium free media.

Treatment	Non treatment of AOF		Treatment of AOF	
	Contraction(g)	Contraction(g)	Contraction(g)	Contraction(g)
PE	0.15 ± 0.09	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.02
PE + Ca	0.88 ± 0.22	0.21 ± 0.08 ^{###}	0.21 ± 0.08 ^{###}	0.21 ± 0.08 ^{###}

Values are means ± SD(n=8). AOF, Alpiniae Oxyphyllae Fructus extract 3 mg/ml; Ca, calcium chloride 1 mM; ### p<0.001 significant compared with PE+Ca in non treatment of AOF.

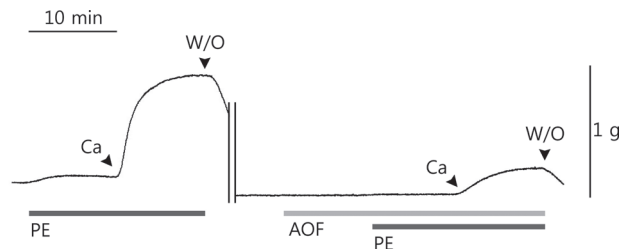


Fig. 6. Effects of AOF extract on calcium induced contraction of corpus cavernosal strip in calcium free media. Ca, calcium chloride 1 mM; W/O, wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

7. 음경해면체 평활근 분포 변화

조직화학적 실험결과 아교섬유는 음경해면체 중심부와 백막주변부에서 관찰되었다. 평활근은 음경해면체에 분포하는 아교섬유 사이 공간에서 관찰되었는데, 특히 益智仁군에서는 음경해면체 중심부에 분포하는 아교섬유사이에서 많이 관찰되었으며(Fig. 7), 영상분석결과 음경해면체내 아교섬유에 대한 평활근의 분포비율은 대조군에서 1 : 0.078, PE군에서는 1 : 0.056 그리고 益智仁군에서는 1 : 0.110 으로 나타났다.

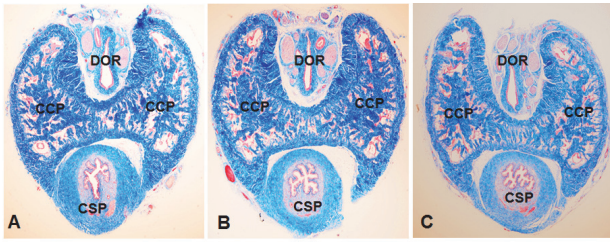


Fig. 7. Results of Masson trichrome's stain for Penis (X40). A, Control group. B, PE group. C, AOF group. CCP, corpus cavernosum of penis; CSP, corpus spongiosum of penis; DOR, dorsal region of penis; AOF, Alpiniae Oxyphyllae Fructus extract(3 mg/ml).

8. 음경해면체내 eNOS 분포 변화

면역조직화학적 실험결과 eNOS 양성반응은 음경해면체 중심부 주변의 나선동맥의 평활근에서 관찰되었으며(Fig. 8), 영상분석결과 대조군은 6,747 ± 232/1,000,000 pixel, PE군은 4,849 ± 393/1,000,000 pixel 그리고益智仁군은 35,690 ± 1,643/1,000,000 pixel로 나타났다.

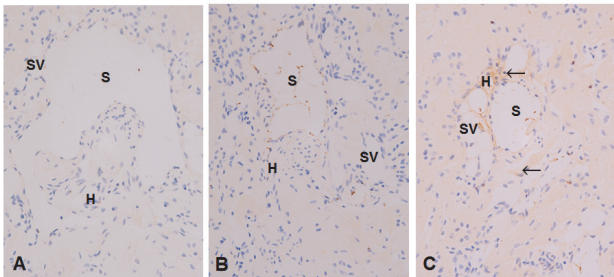


Fig. 8. Immunohistochemistry of eNOS in Penis (x400). A, Control group. B, PE group. C, AOF group. H, helicine artery in CCP; S, Sinus in CCP; SV, small vein; AOF, Alpiniae Oxyphyllae Fructus extract(3 mg/ml); arrow, eNOS positive reaction.

9.益智仁의 세포독성 측정

Human umbilical vein endothelial cell(HUVEC)에益智仁 추출물을 농도별로 24시간 처치한 후 MTT assay를 통해 세포 생존율을 측정한 결과益智仁 추출물의 농도 100, 300, 500, 1000 µg/ml에서 모두 세포 생존율에 변화가 없었다(Fig. 9).

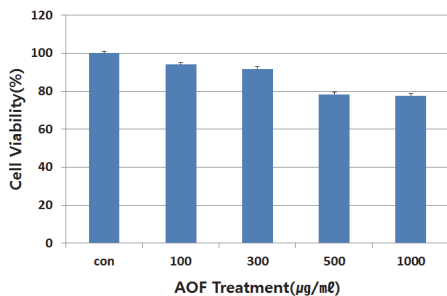


Fig. 9. Effects of AOF extract on the viability of human umbilical vein endothelial cell(HUVEC). Representative bars are shown as the cell viability in HUVEC treated with AOF extract(100, 300, 500 and 1000 µg/ml) for 24 hr at 37°C. AOF, Alpiniae Oxyphyllae Fructus extract.

10.益智仁이 NO의 생성에 미치는 영향

Human umbilical vein endothelial cell(HUVEC)에益智仁 추출물을 농도별로 24시간 처치한 후 NO 양을 측정하였을 때 control에서 측정된 NO 량인 3.42 ± 0.01 µM에 비하여益智仁 추출물 500 µg/ml의 농도에서 3.45 ± 0.02 µM, 1000 µg/ml의 농도에서 3.63 ± 0.08 µM의 NO가 측정되어 유의성 있는 증가를 보였다(Fig. 10).

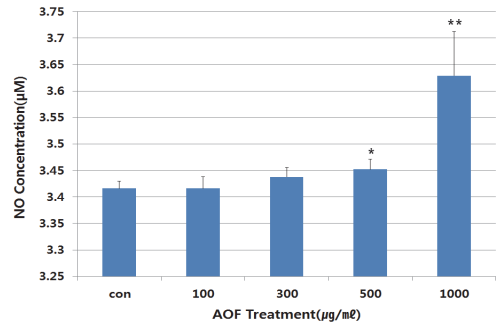


Fig. 10. Effects of AOF extract on nitric oxide concentration in human umbilical vein endothelial cell(HUVEC). Representative bars are shown as the nitric oxide concentration in HUVEC treated AOF extract(100, 300, 500 and 1000 µg/ml) for 24 hr at 37°C. AOF, Alpiniae Oxyphyllae Fructus extract ; NO, nitric oxide ; * ρ < 0.05, ** ρ < 0.01 significant compared with Control

고찰

평상시 음경의 혈류와 해면체 내압은 각각 5 ml/min, 5-8 mmHg이며, 발기시 급격히 증가되어 혈류는 50-80 ml/min, 해면체 내압은 거의 수축기 혈압의 수준으로 상승하게 된다. 이렇듯 발기현상은 각각 해면체 평활근의 이완과 수축에 의하여 조절되는 혈류역동학적 현상이라고 할 수 있다^{18,19}.

음경해면체 평활근의 이완은 주로 신경계에 해당하는 nNOS (nitric oxide synthase) 발현과 혈관계에 해당하는 eNOS 발현을 통한 nitric oxide(NO)의 생성으로 이루어진다. 먼저, 신경에서 유리되는 NO는 guanylate cyclase(GC)를 활성화시키고, 세포내 cyclic GMP(cGMP)를 축적시킨다²¹⁻²⁷. 다음으로 혈관내피세포에서 분비되는 NO는 산소분자와 L-arginine 으로부터 NOS에 의하여 생산된 후 평활근으로 확산되어 GTP를 cGMP로 전환시키는데, 이 NO는 생체내 요구에 의하여 합성될 뿐 타 부위에 이를 저장하는 기전은 없는 것으로 알려져 있다²⁸⁻³⁰.

NO 이외에도 분비되는 이완물질에는 endothelium derived hyperpolarizing factor(EDHF), prostacyclin(PGI₂) 등이 있으며, 이러한 내피세포 매개성 이완물질 생성의 이상으로 해면체 평활근의 긴장도 증가나 내인성 이완기전의 장애가 발생하고, 불안정한 평활근 이완의 결과로 발기부전이 초래된다^{23,31}. 따라서 해면체 평활근의 조절기전을 이해함으로써 발기부전의 병인 파악과 이에 효과적인 치료제 개발에 도움이 될 수 있다.

益智仁은 溫脾開胃攝涎, 溫腎固精縮尿의 효능으로 남자가 虛弱하여 항상 소변을 지리며 참지 못하거나, 또는 대변을 힘 없이 보는 증상에 쓰이고, 소아의 夜尿症과 부인의 妊娠 중

子宮出血에도 현저한 효과를 나타낸다³²⁾.

이에 본 실험은 益智仁 추출물이 음경해면체의 이완에 미치는 영향과 그 작용기전을 내피세포성 이완인자를 중심으로 organ bath study와 조직화학적 방법을 통하여 연구하였다.

실험결과 PE의 투여로 유발된 최대수축에 대하여 益智仁 추출물을 농도별로 투여하였을 때 0.1, 0.3, 1, 3 mg/ml에서 이완효과가 유의하게 나타난 사실을 바탕으로 음경해면체 평활근에 대한 益智仁 추출물의 이완효과를 확인할 수 있었다.

해면체를 이완시키는 기전을 알아보기 위하여 IM을 전처치하였을 때 IM을 전처치하지 않은 상태보다 음경해면체에 대한 益智仁 추출물의 이완효과가 유의하게 억제되는 것을 확인할 수 있었다. IM³³⁾은 내피세포성 이완인자 중 prostacyclin의 생성을 차단하여 이완을 억제시키므로 益智仁 추출물이 prostacyclin에 의해 음경해면체를 이완시키는 것으로 생각된다.

내피세포성 이완인자 중 EDHF의 작용을 차단하여 음경해면체 이완을 억제시키는 TEA^{34,35)}는 전처치하지 않은 상태와 전처치한 상태를 비교하였을 때 음경해면체에 대한 유의한 이완효과의 차이를 나타내지 않았다. 따라서 음경해면체에 대한 益智仁 추출물의 이완효과는 EDHF의 작용과 관련이 없음을 알 수 있다.

L-NNA와 MB의 전처치에 의해서는 전처치하지 않은 상태와 비교하였을 때 유의하게 이완효과가 억제되었다. 앞서 언급하였듯 혈관내피세포에서 분비되는 NO는 eNOS에 의해 L-arginine으로부터 합성되어 평활근으로 가서 cGMP의 농도를 증가시킨다. 증가된 cGMP는 Ca²⁺의 유입을 차단하여 혈관 이완을 유도하고, 혈관 이완으로 혈액유입량이 증가되어 음경이 팽창된다³⁶⁻³⁸⁾.

이 과정 중 L-NNA^{39,40)}는 eNOS를 억제하여 내피세포의 L-arginine으로부터 NO가 생성되는 것을 차단한다. 따라서 L-NNA를 전처치한 상태에서 전처치하지 않은 상태에 비해 음경해면체의 이완이 억제되었다는 사실은 益智仁 추출물이 eNOS에 의한 NO의 생성과정을 통하여 음경해면체를 이완시킨다는 것을 의미한다.

MB^{41,42)}는 생성된 NO가 평활근으로 가서 cGMP를 생성하는 과정을 억제시키는 inhibitor로 MB의 전처치에 의해 이완효과가 유의하게 억제되었다는 사실을 통해 益智仁 추출물의 음경해면체 이완효과는 평활근에서 NO에 의한 cGMP 농도 증가기전으로 나타난다는 것을 알 수 있다.

또한 Ca²⁺을 제거한 krebs-ringer solution에서 益智仁 추출물의 전처치에 의해 Ca²⁺ 투여로 인한 수축의 증가가 유의성 있게 감소된 실험결과를 보면, 이는 益智仁 추출물이 세포의 Ca²⁺ 유입을 차단하는 기전을 통하여 음경해면체 평활근을 이완시키는 것으로 생각된다.

HUVEC에 益智仁 추출물을 농도별로 처치한 후 NO 량을 측정된 결과 control에서 측정된 NO 량에 비해 益智仁 추출물을 처치하였을 때 NO의 유의성 있는 증가를 보였고, 조직화학적 실험결과에서는 PE군에 비해 益智仁군에서 아교섬유에 대한 평활근의 분포비율과 eNOS 양성반응이 뚜렷이 증가되었다. 즉, 이를 통하여 益智仁 추출물은 음경해면체내 평활근을 이완시키며, 익지인 추출물의 이러한 이완효과가 eNOS에 의한 NO의 생성을 증가시킴으로써 나타난다는 사실을 알 수 있다.

이상의 실험결과를 통해 益智仁 추출물은 prostacyclin과,

eNOS를 통한 NO의 생성 증가로 평활근에서의 cGMP 농도를 증가시키고, 세포의 Ca²⁺의 유입을 차단하는 경로를 통하여 음경해면체 이완효과를 나타내는 것으로 생각된다.

결론

益智仁 추출물이 음경해면체의 이완에 미치는 영향을 알아보고자 내피세포성 이완인자를 중심으로 organ bath study를 실시하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 益智仁 추출물은 PE로 유발된 최대 수축에 대해 0.1, 0.3, 1, 3 mg/ml에서 유의성 있는 이완효과를 나타냈다.
2. 益智仁 추출물은 TEA를 전처치한 다음 투여되었을 때는 이완효과에 유의한 변화를 보이지 않았으나, IM, L-NNA, MB를 전처치한 다음 투여되었을 때는 이완효과를 유의하게 억제시켰다.
3. 益智仁 추출물은 Ca²⁺이 제거된 krebs-ringer solution에서 Ca²⁺의 첨가에 따른 음경해면체 수축의 증가를 유의하게 억제시켰다.
4. 益智仁 추출물은 HUVEC에서 관찰된 NO 량을 control에 비해 유의하게 증가시켰다.
5. 益智仁 추출물은 PE군에 비하여 평활근의 비율과 eNOS 양성반응을 증가시켰다.

이상의 실험결과를 통해 益智仁 추출물은 prostacyclin과, eNOS를 통한 NO의 생성 증가로 평활근에서의 cGMP 농도를 증가시키고, 세포의 Ca²⁺의 유입을 차단하는 경로를 통하여 음경해면체 이완효과를 나타냄으로써 발기부전에 대한 효과적인 치료제로 가능성이 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2014학년도 세명대학교 교내학술연구비 지원에 의해 수행된 연구임

References

1. Lee YJ. A study on korean male climacteric experiences. Korea Univ. 2003.
2. Tenover JS. Androgen deficiency in the aging male: When, who, and how to investigate and treat. Urol Clin N Am, 2002 ; 29 : 975-82.
3. Werner AA. The male climacteric. JAMA, 1939 ; 112 : 1441-3.
4. Lauralee Sherwood, Human Physiology. 7th. Seoul : Life Science Publishing co. 2011 : 746-58.

5. Lakin MM, Montague DK, VanderBrug MS, Tesar L, Schover LR. Intracavernous injection therapy: analysis of results and complications. *J Urol*, 1990 ; 143(6) : 1138-41.
6. Fallon B. Intracavernous injection therapy for male erectile dysfunction. *Urol Clin N Am*, 1995 ; 22(4) : 833-45.
7. Doo HK. *Urology of oriental medicine*. 1st. Seoul : Institute of Oriental Medicine, 1991 : 610-6.
8. Kang HS, Kang RS. *Andrology course of chinese medicine*. 1st. Beijing : Chinese medicine science and technology publisher, 1992 : 94-111.
9. So WB. *Treatise on the Pathogenesis and Manifestations of All Diseases*. 1st. Beijing : People's health publishing, 1982 : 26.
10. The Jointly Published Textbook Compilation Committee of Oriental College of Medicine Nationwide Department. *Herbology*. 3rd. Seoul : Younglim press, 2004 : 610-2.
11. Lee H. Renoprotective effect of *Alpiniae oxyphyllae Fructus* on ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Wonkwang Univ*, 2009.
12. Park SY, Lee BR. Study on the anti-cancer, anti-metastasis and immune response improvement of aqua-acupuncture with *amomum amarum lourerio* infusion solution. *J Korean Acupe Mox Soc*, 2001 ; 18(3) : 79-93.
13. Han DS. *saengyakhak(Pharmacognosy)*. 2nd. Seoul : Dongmyungsa, 1988 : 292-3.
14. Kashgarian M, Biemesderfer D, Caplan M. Monoclonal antibody to Na,K-ATPase: immunocytochemical localization along nephron segments. *Kidney Int*, 1985 ; 28(6) : 899-913.
15. Miyazawa M, Nakamura Y, Ishikawa Y. Insecticidal sesquiterpene from *Alpiniae oxyphylla* against *Drosophila melanogaster*. *J Agric Food Chem*, 2000 ; 48 : 3639-41.
16. Mills TM, Wiedmeier VT, Stopper VS. Androgen maintenance of erectile function in the rat penis. *Biol Reprod*, 1992 ; 46 : 342-8.
17. Gillon G, Barnea O. Erection mechanism of penis: a model based analysis. *J Urol*, 2002 ; 168(8) : 2711-5.
18. Lue TF, Tanagho EA. Physiology of erection and pharmacological management of impotence. *J Urol*, 1987 ; 137 : 829-36.
19. Lue TF, Takamura T, Schmidt RA, Tanagho EA. Hemodynamics of erection in the monkey. *J Urol*, 1983 ; 130 : 1237-41.
20. Newman HF, Northup JD. Mechanism of human penile erection: an overview. *Urology*, 1981 ; 17 : 399-408.
21. Tracey WR, Linden J, Michae IJP, 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 Pharm*, 1990 ; 252 : 922-8.
22. Krane RJ, Goldstein I, Saenz de TI. Impotence. *N Engl J Med*, 1989 ; 321 : 168-59.
23. Lerner SE, Melman A, Christ GJ. A review of erectile dysfunction : new insights and more more question. *J Urol*, 1993 ; 149 : 1246-55.
24. Raifer J, Aronson WJ, Bush PA, Dorey FJ, Ingarro LJ. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *New Engl J Med*, 1992 ; 326 : 90-4.
25. Diederichs W, Stief CG, Lue TF, Tanagho EA. Norepinephrine involvement in penile detumescence. *J Urol*, 1990 ; 143 : 1264-6.
26. Saenz de TI, Goldstein I, Azadzi K, Krane RJ, Cohen RA. Impaired neurogenic and endothelium-dependent relaxation of human penile smooth muscle from diabetic men with impotence. *N Engl J Med*, 1989 ; 320 : 1025-30.
27. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox activated forms. *Science*, 1992 ; 258 : 1898-902.
28. De May JG, Vanhoutte PM. Role of the intima in cholinergic and purinergic relaxation of isolated canine femoral arteries. *J Physiol*, 1981 ; 316 : 347-55.
29. Bush PA, Aronson WJ, Buga GM, Rajfer J, Ignarro LJ. Nitric oxide is a potent relaxant of human and rabbit corpus cavernosum. *J Urol*, 1992 ; 147 : 1650-5.
30. Andersson KE, Wagner G. Physiology of penile erection. *Physiol Rev*, 1995 ; 75 : 1590-5.
31. Vila E, Salaices M. Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005 ; 288 : 1016-21.
32. Shin MK. *Clinical Herbology*. 2nd. Seoul : Younglim press, 2002 : 224-5.
33. Lee SW, Wang HZ, Zhao W, Ney P, Brink PR, Christ GJ. Prostaglandin E1 activates the large-conductance KCa channel in human corporal smooth muscle cells. *Int J Impot Res*, 1999 ; 11 : 189-99.
34. Lee SW, Wang HZ, Christ GJ. Characterization of ATP-sensitive potassium channels in human corporal smooth muscle cells. *Int J Impot Res*, 1999 ; 11 : 179-88.
35. Ko FN, Huang TF, Teng CM. Vasodilatory action mechanism of apigenin isolated from *Apium graveolens* in rat thoracic aorta. *Biochemica et Biophysica*

- Acta, 1991 ; 1115 : 69-74.
36. Lincoln TM, Cornwell TL, Taylor AE. cGMP-dependent protein kinase mediates the reduction of Ca^{2+} by cAMP in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1990 ; 258 : 399-407.
 37. Lincoln TM, Cornwell TL. Towards an understanding of the mechanism of action of cyclic GMP in smooth muscle relaxation. *Blood Vessels*. 1991 ; 28 : 129-37.
 38. Cornwell TL, Arnold E, Boerth NJ, Lincoln TM. Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol*. 1994 ; 267 : 1405-13.
 39. Chen J, Wollman Y, Chernichovsky T, Iaina A, Sofer M, Matzkin H. Effect of oral administration of high-dose nitric oxide donor L-arginine in men with organic erectile dysfunction: result of a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *BJU Int*. 1999 ; 83 : 269-73.
 40. Angulo J, Cuevas P, Fernandez A, Gabancho S, Allona A, Marin-Morales A. Activation and potentiation of the NO/cGMP pathway by NG-hydroxyl-L-arginine in rabbit corpus cavernosum under normoxic and hypoxic conditions and ageing. *British J Pharm*. 2003 ; 138 : 63-70.
 41. Akingba AG, Burnett AL. Endothelial nitric oxide synthase protein expression, localization, and activity in the penis of the alloxan-induced diabetic rat. *Molecular Urology*. 2001 ; 5 : 189-97.
 42. Gonzalez CM, Brannigan RE, Bervig T, Zelner D, Podlasek CA, Mckenna KE. Protein and gene expression of nitric oxide synthase isoforms I and III in the rat penile shaft. *J Androl*. 2001 ; 22 : 54-61.