

## 발기부전 처방에 사용되는 鎖陽이 음경해면체 이완에 미치는 영향

신선미<sup>1</sup>, 박선영<sup>2</sup>

<sup>1</sup>세명대학교 한의과대학 내과학교실, <sup>2</sup>세명대학교 한의과대학 생리학교실

### The Relaxation Effects of *Cynomorii herba* in Isolated Corpus Caverosum Tissues

Seon-mi Shin<sup>1</sup>, Sun-young Park<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Se-Myung University

<sup>2</sup>Dept. of Physiology, College of Korean Medicine, Se-Myung University

#### ABSTRACT

**Objective:** This study aimed to examine the relaxation effects and underlying mechanisms of *Cynomorii herba* (CH) extract in isolated rabbit corpus cavernosum tissues.

**Methods:** We experimented with CH extract (0.01-3.0 mg/mL). N $\omega$ -nitro-L-arginine (L-NNA) was experimented before the CH extract to contracted strips induced by phenylephrine (PE, 1  $\mu$ M) and compared with nonexperimented. In addition, we experimented with calcium chloride (Ca<sup>2+</sup>, 1 mM) after pretreatment of the CH extract in Ca<sup>2+</sup>-free Krebs-Ringer solution to contracted strips induced by PE. The cell viability and nitric oxide (NO) concentration of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were measured by an methylthiazol-2-yl-2, 5-diphenyl tetrazoliumbromide (MTT) assay and Griess reagent system. The ratio of smooth muscles to collagen fibers, in addition to eNOS- and PDE-5-positive reactions, was examined by histochemical and immunohistochemical staining.

**Results:** The CH extract significantly induced the relaxation of the cavernous strips, and the pretreatment with L-NNA inhibited CH extract-induced relaxation. The L-NNA pretreatment reduced the increased contraction induced by the addition of Ca<sup>2+</sup> in Ca<sup>2+</sup>-free solution. Furthermore, the NO concentration of the HUVECs increased. When the CH extract was applied to the corpus cavernosum of the penis (CCP) of Sprague Dawley rats, the ratio of smooth muscles to collagen fibers by PE and the formation of eNOS around the helicine artery increased. However, the CH extract treatment decreased PDE-5 positive reactions.

**Conclusions:** These results show that the relaxation effects induced by the CH extract are associated with the suppression of the influx of extracellular Ca<sup>2+</sup> via the production of NO and eNOS and inhibition of PDE-5.

**Key words:** *Cynomorii Herba*, corpus cavernosum, NO, eNOS, PDE5

### 1. 緒 論

鎖陽은 쇠양과의 여러해살이 기생성 육질 식물

쇠양(*Cynomorium songaricum* Rupr.)의 육질 줄기로, 한의학적으로 鎖陽의 藥性은 甘溫하고, 腎, 大腸, 肝經으로 歸經하며, 補腎壯陽, 潤腸通便하는 효능으로 陽痿, 遺精, 遺尿, 便秘 등을 치료하는데 사용되어 왔다<sup>1,2</sup>.

鎖陽의 약리작용으로 위장운동과 장관운동을 촉진하여 通便을 시키는 작용, 면역력 증진작용, 항혈소판 응집 작용<sup>3</sup>, 골다골증 유발 마우스의 골밀

· 투고일: 2016.07.04, 심사일: 2016.09.22, 게재확정일: 2016.09.27

· 교신저자: 박선영 충북 제천시 세명로 65

세명대학교 한의과대학

TEL: 043-649-1345 FAX: 043-649-1702

E-mail: blbee@semyung.ac.kr

도 항상 작용<sup>6</sup> 및 생식능력 증강 작용<sup>4,5</sup> 등이 보고되어 있다. 그 중 鎖陽이 생식능력에 미치는 영향에 대한 연구로는 鎖陽의 투여 기간이 길수록, 또한 투여농도가 높아질수록 수컷 생쥐의 총 정자수, 활동 정자수, 정상형태 정자수를 증가시키고 고환 조직 세정관 사이의 간격과 혈관 증식 및 정자침체 효소인 hyaluronidase activity를 증가시켜 수컷 생쥐의 생식능력을 향상시킨다고 보고되었다<sup>4,5</sup>. 하지만 鎖陽이 補腎壯陽하는 효능으로 음경해면체 혈관 및 평활근에 직접적으로 미치는 영향에 대한 연구는 없다.

발기란 음경 해면체 내의 음경세동맥이 부교감 신경계에 의해 확장이 되어 많은 혈액이 발기조직에 응혈되는 것으로 세동맥의 확장으로 혈류가 증가되어 음경 내압이 증가되고 정맥혈은 증가된 음경내압의 압박을 받아 누출되지 못함으로써 유발된다<sup>7,8</sup>. 즉, 혈관확장에 의해 발생하는 음경평활근의 긴장에 의해 발기가 조절되는데, 비아드레날린성, 비콜린성 신경전달물질, 해면체 내피세포에서 분비되는 이완물질들이 음경 해면체혈관과 평활근 이완에 관여하는 것으로 알려졌다. 해면체 내피세포에서 분비되는 이완물질로는 NO(nitrous oxide), prostacyclin, EDHF(endothelium-derived hyperpolarizing factor: 내피유래 과분극 인자)가 가장 널리 알려져 있으며 그 중 NO가 음경발기의 중심인 해면체 혈관 및 평활근 이완에 중요한 역할을 한다<sup>9,10</sup>.

발기부전은 처음부터 성행위를 할 수 있도록 발기가 되지 않거나 발기가 되더라도 성행위가 끝날 때까지 유지되지 못하는 상태를 말하는 것<sup>11</sup>으로 한의학에서는 陽痿, 陰不全 등으로 불리며, 원인은 命門火衰, 肝氣鬱結, 濕熱下注, 心脾虛損, 氣滯血瘀 등으로 다양하지만 주로 腎氣虛衰에 의해 발생하는 경우가 많다<sup>12,13</sup>.

혈관내피세포에서 분비되는 EDHF, NO, prostacyclin에 대해 진행된 鎖陽의 혈관이완효과에 대한 기존 연구<sup>14</sup>에서 鎖陽은 NO-cGMP계 활성화를 통하여 혈관을 이완시키는 것이 입증되었다. 이에 저자는

鎖陽이 이와 비슷한 기전으로 음경해면체 혈관 및 평활근의 이완에도 영향을 미칠 수 있으며, 補腎壯陽하는 효능으로 발기부전을 치료할 수 있을 것으로 판단하였다. 따라서 organ bath study와 면역조직화학적 방법을 통하여 鎖陽이 토끼의 음경해면체 이완에 미치는 영향에 대한 연구를 시행하였고, 이에 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 실험동물

Organ bath study에는 체중 2.0~2.5 kg 사이의 New Zealand white 수컷 토끼(샘타코, 한국)를 사용하였고 면역조직화학적 실험에는 10주령의 Sprague Dawley rat(샘타코, 한국)를 사용하였으며 고형사료와 물을 충분히 공급하면서 1주 이상 실험실 환경에 적응시킨 뒤에 실험에 사용하였다.

본 연구는 세명대학교 동물실험윤리위원회의 승인(smecac 15-06-02)하에 실시되었다.

### 2. 추출물 제조

鎖陽(*Cynomorii Herba*, CH) 200 g을 증류수 2 L과 함께 round flask에 넣고 2시간 동안 가열 추출한 후 rotary evaporator(Eyela, Japan)로 감압 농축하였고, 농축액을 동결건조기로 건조하여 얻은 분말 42.1 g을 실험에 사용하였다.

### 3. 음경해면체 이완효과 측정

#### 1) 해면체절편의 제작

토끼를 chloral hydrate(0.6 g/kg, 정맥주사)로 마취한 후 하복부를 절개하고 음경을 적출하여 4 °C의 modified krebs-ringer bicarbonate solution(NaCl 125.4, KCl 4.9, CaCl<sub>2</sub> 2.8, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 15.8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, glucose 12.2 mM, pH 7.4)에 두었다. 음경 주위 지방 및 백막조직을 제거하고 해면체 조직을 절단, 2×2×6 mm 크기의 해면체절편을 제작하였다.

2) 등장성 수축 측정

해면체절편은 95%의 O<sub>2</sub>와 5%의 CO<sub>2</sub> 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 뒤 micromanipulator(Narishige N2, Japan)를 이용하여 피동장력 1.5 g을 가하고 다시 1시간 안정시킨 다음 실험을 진행하였으며, 연속되는 실험에는 다른 처치 전에 다시 1시간 안정시킨 다음 시행하였다.

3) 鎖陽의 음경해면체 이완효과와 작용기전 검증  
해면체절편에 phenylephrine(PE, 10<sup>-6</sup> M)을 투여하여 수축시킨 후, 鎖陽 추출물을 다음의 농도별(0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 mg/ml)로 투여하여 이완효과를 측정하였다.

이완효과의 기전을 검증하기 위하여 각각 N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine(L-NNA, 10<sup>-4</sup> M)을 15분간 전처치하고 PE로 수축시킨 후, 鎖陽 추출물을 다음의 농도별(0.1, 0.3, 1, 3 mg/ml)로 투여하여 수축의 변화를 측정한 후 L-NNA를 전처치하지 않은 경우와 비교하였다.

鎖陽의 음경해면체 이완효과에서 Ca<sup>2+</sup>의 관계 여부를 확인하기 위하여 Ca<sup>2+</sup>-free solution에서 해면체절편을 PE로 수축시킨 후 Ca<sup>2+</sup>(1 mM)을 투여하여 수축의 변화를 측정하였다. 동일한 해면체절편을 1시간 회복시킨 후 鎖陽 추출물(3 mg/ml)을 10분간 전처치하고 PE로 수축시킨 다음 Ca<sup>2+</sup>(1 mM)을 투여하여 수축의 변화를 측정하여 鎖陽을 전처치하기 전과 비교하였다.

4. 음경해면체 조직학적 변화 측정

1) 음경해면체 조직표본 제작

흰쥐를 chloral hydrate(0.6 g/kg, 정맥주사)로 마취시킨 뒤 하복부를 절개하고 음경을 적출하여 4 °C의 modified krebs-ringer bicarbonate solution (NaCl 125.4, KCl 4.9, CaCl<sub>2</sub> 2.8, MgSO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 15.8, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, glucose 12.2 mM, pH 7.4)에 담았다. 음경의 지방을 제거하고 2 mm 두께의 해면체절편을 제작한 다음 정상쥐 대조군과 PE(10<sup>-6</sup> M)를 단독 처리한 PE군, PE(10<sup>-6</sup> M)와 鎖陽(3 mg/ml)을 동시에 처리한 鎖陽군으로 구분하여 제작하였다. 제작된 표본은 실온에서 24시간 동안 10% NBF에 고정하였다. 고정된 조직은 통상적인 방법으로 paraffin에 포매한 후 3 μm 두께의 연속절편으로 제작하였다.

2) 음경해면체 조직화학

음경해면체의 평활근과 아교섬유의 분포 변화 관찰을 위해 Masson trichrome 염색을 실시하였다. 먼저 50-60 °C Bouin 용액에 1시간 동안 매염 처리한 뒤 70% 에탄올에서 picric acid를 제거하였다. Weigert iron hematoxylin에서 10분 동안 처리하여 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. 영상분석으로 음경해면체내 아교섬유와 평활근의 분포비율을 계산하였다.

3) 음경해면체 면역조직화학

음경해면체 발기기전에 영향을 미치는 eNOS와 PDE 분포 변화를 측정하기 위해 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 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, USA)와 mouse anti-PDE(1:100, Santa Cruz Biotech, USA)에 4 °C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰다. 다음 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG2a(1:100, DAKO,

USA)에 실온에서 24시간 처리하였고, 다음 avidin biotin complex kit(Vector Lab, USA)에 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine 과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 염색 하였다. 영상분석을 통해 음경해면체내 eNOS와 PDE의 양성반응을 측정하였다.

### 5. Nitric oxide 측정

#### 1) 세포독성 측정

Endothelial cell basal medium-2(EBM-2) 배지로 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 24시간 배양한 human umbilical vein endothelial cells(HUVEC)에 鎭陽 추출물을 농도별(300, 500, 1,000 µg/ml)로 처리한 다음 24시간 배양하여 세포생존율을 MTT assay로 측정하였다. MTT(methylthiazol-2-yl-2, 5-diphenyl tetrazoliumbromide, 5 mg/ml)를 20 µl 넣고, 세포 배양기에서 2시간 두었다. 상층액 제거 후 formazan 침전물은 DMSO를 200 µl씩 넣어 약 15분간 녹였다. 540 nm의 파장에서 ELISA microplatereader로 흡광도를 측정, 세포생존율을 계산하였다.

#### 2) Nitric oxide 측정

Nitric oxide(NO) 생성 정도는 Griess reaction에 준하여 microplate reader로 NO 생성의 지표인 배지에 생성된 nitrite 양을 측정하여 이를 결정하였다. 鎭陽 처리 24시간 후 배양액 50 µl에 Griess reagent(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamide 및 2.5% 인산)를 동량 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 뒤 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.

### 6. 영상분석과 통계처리

조직화학과 면역조직화학의 결과의 수치화를 위

해 Image pro Plus(Media Cybernetic, USA)를 이용한 영상분석(image analysis)을 실시하였다.

실험결과는 평균과 표준편차로 나타내었고, 해면체 수축의 변화는 실제 수축의 크기와 PE를 투여하여 유발된 최고 수축에 대한 백분율로 표현하였다.

실험결과의 비교는 student's t-test로 유의성을 검증하였다.

## III. 實驗成績

### 1. 鎭陽이 PE-수축 해면체에 미치는 영향

鎭陽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 *Cynomorii Herba* in Isolated Strips of Rabbit Corpus Cavernosum Smooth Muscle Precontracted with PE

Treatment	Contraction (g)	Relaxation (%)
PE	1.19±0.19	0
PE+CH 0.01	1.15±0.21	3.7±4.4
PE+CH 0.03	1.09±0.22	8.3±6.3
PE+CH 0.10	1.04±0.22	12.9±7.5*
PE+CH 0.30	1.02±0.22	14.9±7.2*
PE+CH 1.00	0.94±0.22*	21.4±8.4*
PE+CH 3.00	0.85±0.20*	28.8±7.7*

Values are mean±standard deviation (n=12). CH extract-induced relaxation was expressed as percentage of PE-contraction. CH : *Cynomorii Herba* extract (mg/ml). \* p<0.05 compared with PE.

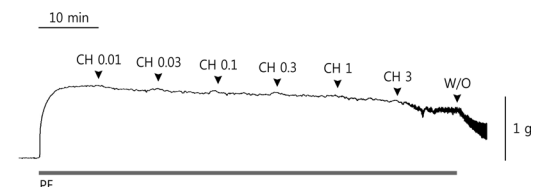


Fig. 1. CH extract-induced concentration-dependent relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum.

W/O : wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

2. L-NNA 전처치가 鎖陽의 해면체 이완효과에 미치는 영향

해면체절편을 PE로 수축시키고 鎖陽 추출물을 농도별로 투여하였을 때, L-NNA를 전처리하지 않

은 경우는 1, 3 mg/ml에서 각각 유의성 있는 이완효과를 나타내었으나, L-NNA를 전처리한 경우는 유의한 이완효과를 관찰할 수 없었다(Table 2, Fig. 2).

Table 2. Effects of Pre-treatment of L-NNA on Relaxation Effects of *Cynomorii Herba* in Isolated Rabbit Corpus Cavernosum Smooth Muscle

Treatment	Non treatment of L-NNA		Treatment of L-NNA	
	Contraction (g)	Relaxation (%)	Contraction (g)	Relaxation (%)
PE	1.21±0.20	0	1.43±0.23	0
PE+CH 0.1	1.14±0.22	5.9±3.7	1.41±0.28	1.6±5.8*
PE+CH 0.3	1.06±0.22	12.6±7.1	1.35±0.25	5.8±5.1**
PE+CH 1.0	1.00±0.22*	17.3±7.1	1.38±0.26	3.3±5.7***
PE+CH 3.0	0.93±0.22**	23.8±7.5	1.36±0.24	5.0±4.4***

Values are mean±standard deviation (n=14). CH extract-induced relaxation was expressed as percentage of PE-contraction. CH : *Cynomorii Herba* extract (mg/ml). \* p<0.05, \*\* p<0.01 compared with PE, † p<0.05, †† p<0.01, ††† p<0.001 compared with PE+CH in non treatment of L-NNA.

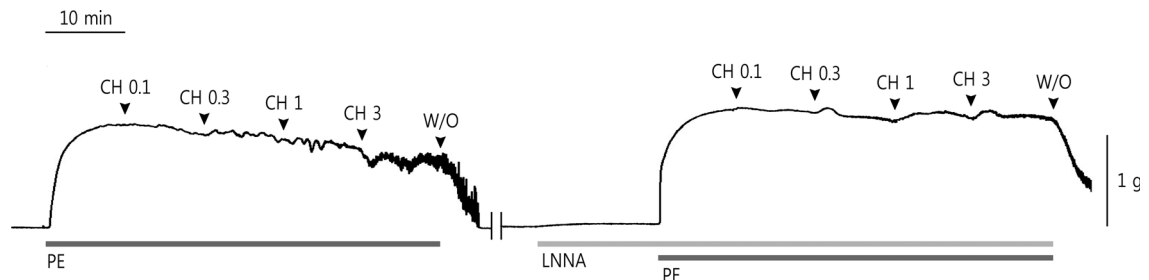


Fig. 2. Effects of CH extract on PE-precontracted rabbit corpus cavernosum in the absence and presence of L-NNA.

3. 鎖陽의 전처치에 따른 Ca<sup>2+</sup> 의존성 수축의 변화

Krebs-ringer solution에서 Ca<sup>2+</sup>을 제거하고 PE를 투여하여 수축을 유발시킨 후 Ca<sup>2+</sup> 1 mM을 투여하였을 때 1.26±0.15 g의 수축을 나타내었으나, 鎖陽 추출물(3.0 mg/ml)을 전처리한 다음 PE를 투여하여 수축을 유발시킨 후 Ca<sup>2+</sup> 1 mM을 투여하였을 때 1.08±0.16 g의 수축을 나타내어 鎖陽 추출물은 Ca<sup>2+</sup> 투여로 인한 수축의 증가를 유의성 있게 억제하였다(Table 3, Fig. 3).

Table 3. Effects of Pre-treatment of *Cynomorii Herba* on Calcium-dependent Contraction of Corpus Cavernosal Strip in Calcium Free Media

Treatment	Non treatment of CH	Treatment of CH
	Contraction (g)	Contraction (g)
PE	0.17±0.10	0.75±0.13
PE+Ca	1.26±0.15	1.08±0.16*

Values are mean±standard deviation (n=12). CH : *Cynomorii Herba* extract 3 mg/ml. Ca : calcium chloride 1 mM. † p<0.05 compared with PE+Ca in non treatment of AOF.

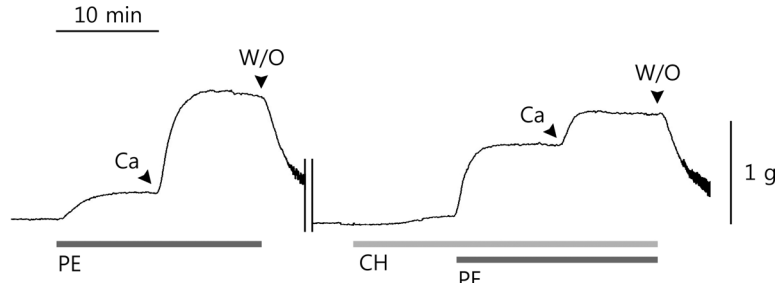


Fig. 3. Effects of CH extract on calcium-dependent contraction of corpus cavernosal strip in calcium free media.

4. 음경해면체 평활근 분포 변화

조직화학결과 아교섬유는 음경해면체 중심부와 가장자리 백색막 주변부에서 관찰되었다. 평활근은 음경해면체에 분포하는 아교섬유 사이공간에서 관찰되었다. 특히 鎖陽군에서는 음경해면체 중심부에 분포하는 아교섬유사이에서 많이 관찰되었다(Fig. 4).

영상분석결과 음경해면체내 아교섬유에 대한 평활근의 분포비율은 대조군에서는 1:0.071, PE군에서는 1:0.034, 鎖陽군에서는 1:0.098로 나타났다.

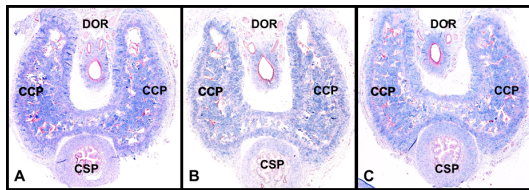


Fig. 4. Results of Masson trichrome's stain for penis (x40).

A : Control group, B : PE group, C : CH (Cynomorii Herba extract 3 mg/ml) group, CCP : corpus cavernosum of penis, CSP : corpus spongiosum of penis, DOR : dorsal region of penis

5. 음경해면체 내 eNOS 분포 변화

면역조직화학 결과 eNOS 양성반응은 음경해면체 중심부 주변의 평활근에서 관찰되었다. 영상분석결과 eNOS 양성반응이 PE군에 비해 鎖陽군은 1021% 증가하였다(Table 4, Fig. 5).

Table 4. The Image Analysis for eNOS Positive Reaction

Objective	Group (image analysis for 100,000,000 pixel cells)		
	Control	PE	CH
eNOS	25,599±1,182	18,250±9,816	186,305±11,844*

Values are mean±standard deviation (n=6). CH : Cynomorii Herba extract 3 mg/ml, \* p<0.05 compared with PE.

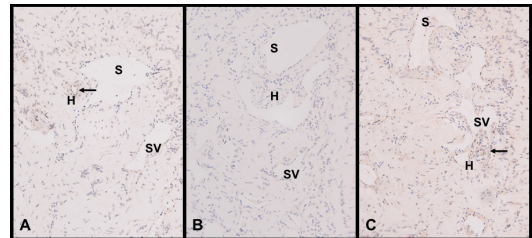


Fig. 5. Immunohistochemistry of eNOS in penis (x200).

A : Control group, B : PE group, C : CH (Cynomorii Herba extract 3 mg/ml) group, H : helicine artery in CCP, S : Sinus in CCP, SV : small vein, arrow : eNOS positive reaction

6. 음경해면체내 PDE 분포 변화

면역조직화학 결과 PDE 양성반응은 음경해면체 중심부 주변의 평활근에서 관찰되었다. 영상분석결과 PDE 양성반응이 PE군에 비해 鎖陽군은 63% 감소하였다(Table 5, Fig. 6).

Table 5. The Image Analysis for PDE Positive Reaction

Objective	Group (image analysis for 100,000,000 pixel cells)		
	Control	PE	CH
PDE	352,232±11,743	419,428±17,787	153,560±13,796*

Values are mean±standard deviation (n=6). CH : *Cynomorii Herba* extract 3 mg/ml. \* p<0.05 compared with PE.

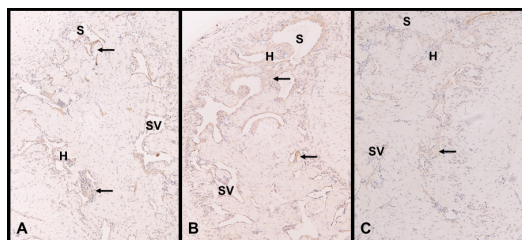


Fig. 6. Immunohistochemistry of PDE in penis (×100).

A : Control group, B : PE group, C : CH (*Cynomorii Herba* extract 3 mg/ml) group, arrow : PDE positive reaction

### 7. 鎖陽의 세포독성 측정

HUVEC에 鎖陽 추출물을 농도별로 24시간 처치한 후 MTT assay를 통해 세포 생존율을 측정할 결과 鎖陽 추출물의 농도 300, 500, 1,000 µg/ml에서 모두 세포 생존율에 유의한 변화가 없었다(Fig. 7).

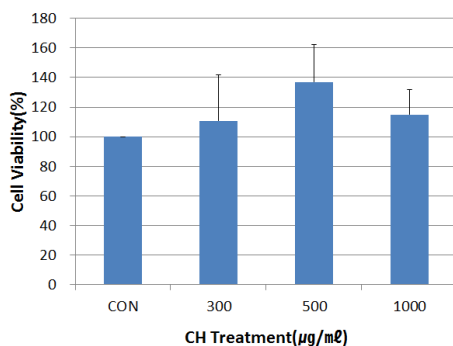


Fig. 7. Effects of *Cynomorii Herba* extract on the viability of HUVEC.

Representative bars are shown as the cell viability in HUVEC treated with CH extract (300, 500 and 1,000 µg/ml) for 24 hr at 37 °C. CH : *Cynomorii Herba* extract

### 8. 鎖陽이 NO의 생성에 미치는 영향

HUVEC에 鎖陽 추출물을 농도별로 24시간 처치한 후 NO 양을 측정하였을 때 control에서 측정된 NO 양인 1.31±0.01 µM에 비하여 鎖陽 추출물 1,000 µg/ml의 농도에서 1.32±0.01 µM의 NO가 측정되어 유의성 있는 증가를 보였다(Fig. 8).

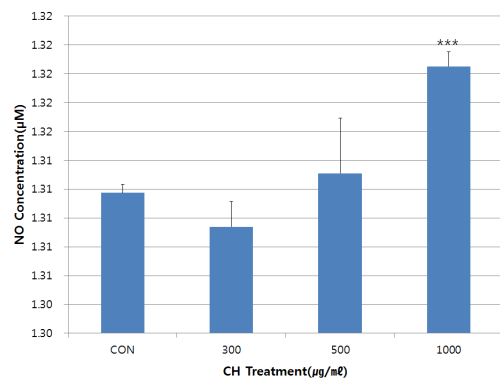


Fig. 8. Effects of *Cynomorii Herba* extract on NO concentration in HUVEC.

Representative bars are shown as the NO concentration in HUVEC treated CH extract (300, 500 and 1,000 µg/ml) for 24 hr at 37 °C. CH : *Cynomorii Herba* extract, NO : nitric oxide, \*\*\* p<0.001 compared with control.

## IV. 考 察

음경의 발기는 신경계, 혈관계, 내분비계 및 정신적 요소의 복잡한 상호작용에 의해 발생된다. 그러나 사회적, 문화적, 경제적 여건의 향상으로 발기부전을 호소하는 환자는 증가하고 있으며, 특히 과거 대부분 심인성으로 간주되었던 발기부전이 진단기술의 발달로 현재는 기질적인 원인에 의한 것으로 밝혀져 기질적 원인에 의한 발기부전의 치료에 관심이 모아지고 있다<sup>15,16</sup>.

발기는 NO-cGMP 또는 AMP작용에 의한 음경해면체와 해면소동맥 평활근의 이완에 의하여 일어나는 생리적인 현상으로 50세 이상의 연령층에서 나타나는 발기부전의 약 절반정도는 혈관계 질환에 의하여 유발되는 것으로 알려져 있다<sup>17,18</sup>.

이러한 발기는 신경계에서 비롯되는 nNOS의 발현과 해면체 혈관계에서 비롯되는 eNOS의 발현으로 생성되는 NO에 의해 일어난다. 해면체 혈관내피세포에서는 L-arginine으로부터 eNOS에 의해 NO가 합성되고, 이 NO가 평활근으로 확산, guanylyl cyclase의 활성화를 통해 GTP를 cGMP로 전환시키게 되며, 활성화된 cGMP가 세포내 Ca<sup>2+</sup> 칼슘 농도를 감소시킴으로써 해면체 평활근과 소동맥을 확장시켜 음경이 발기되는 것이다<sup>18,19</sup>. 그리고 EDHF는 K<sup>+</sup>의 세포외 유출을 일으켜 세포막을 과분극시키고 voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> 통로가 불활성화되어, 평활근 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 농도가 감소됨으로써 해면체 평활근을 이완시킨다<sup>20-22</sup>.

鎖陽은 補腎壯陽, 潤腸通便하는 효능으로 인하여 陽痿, 遺精, 遺尿, 便秘 등을 치료하는데 사용되어 왔다<sup>2</sup>. 鎖陽에 대하여 최근에는 토끼의 경동맥 내피세포와 인간의 제대정맥내피세포를 이용하여 鎖陽의 혈관이완효과를 측정하는 연구<sup>14</sup>가 있었다.

음경해면체 이완에 미치는 영향에 대한 organ bath study 및 면역조직화학적 실험 결과 鎖陽은 PE로 수축된 해면체절편에 대하여 0.1, 0.3, 1, 3 mg/ml에서 각각 유의성 있는 이완효과를 나타내었는데, 이를 통해 鎖陽이 음경해면체를 이완시키는 효과가 있다는 것을 알 수 있다.

또한 L-NNA의 전처치가 鎖陽의 해면체 이완효과에 미치는 영향을 보면, L-NNA를 전처치한 경우는 L-NNA를 전처치하지 않은 경우에 비하여 鎖陽의 음경해면체 이완효과가 억제되었다.

L-NNA는 내피세포의 eNOS 효소를 억제하여 NO의 생성을 막는 inhibitor<sup>24</sup>로, L-NNA의 전처치에 의하여 鎖陽의 음경해면체 이완효과가 억제되었다는 실험결과를 통하여 鎖陽의 음경해면체 이

완효과가 NO의 생성을 증가시키는 기전과 연관되어 있다는 것을 알 수 있다.

鎖陽의 전처치에 따른 Ca<sup>2+</sup> 의존성 수축의 변화를 보면 Krebs-ringer solution에서 Ca<sup>2+</sup>을 제거하고 PE를 투여하여 수축을 유발시킨 후 Ca<sup>2+</sup> 1 mM을 투여하였을 때 鎖陽의 전처치에 의해 Ca<sup>2+</sup> 투여로 인한 수축의 증가는 유의성 있게 억제되었다. 이는 鎖陽이 세포외 Ca<sup>2+</sup> 유입을 억제하여 음경해면체 이완효과를 유발한 것으로 이를 통해 鎖陽의 음경해면체 이완효과는 세포외 Ca<sup>2+</sup> 유입과 관련되어 있다는 것을 알 수 있다.

조직화학적 결과에서는 음경해면체내 아교섬유에 대한 평활근의 분포비율이 대조군에 비해 鎖陽군에서 증가되었는데 이를 통해서도 鎖陽이 음경해면체의 평활근에 작용하여 이완효과를 나타낸다는 사실을 알 수 있다.

eNOS 양성반응은 PE군에 비하여 鎖陽군에서 증가되었고, HUVEC에 鎖陽 추출물을 처치하여 NO량을 측정하였을 때, 대조군에 비하여 鎖陽군에서 NO의 유의성 있는 증가가 나타났다. 이 같은 사실은 鎖陽의 음경해면체 이완작용이 eNOS의 증가를 통한 NO의 생성 증가에 의해 나타난다는 사실을 뒷받침해준다.

반면 PDE-5 양성반응은 PE군에 비하여 鎖陽군에서 감소되어 나타났다. NO가 음경해면체의 평활근에 가서 cGMP의 활성을 증가시켜 발기가 일어나는데 cGMP는 phosphodiesterase(PDE)-5라는 효소에 의해 가수분해되어 비활성화됨<sup>25</sup>으로써 발기가 끝난다. 즉, 鎖陽의 처치에 의해 PDE-5 양성반응이 감소되었다는 사실을 통해 鎖陽이 음경해면체를 이완시키는 기전에서 PDE-5를 억제함으로써 혈관 및 평활근의 이완으로 발기를 지속시킨다는 것을 알 수 있다.

위 실험결과를 종합하여, L-NNA의 전처치 및 면역조직화학적 실험으로 도출된 鎖陽의 음경해면체 이완효과는 eNOS의 증가에 의한 NO의 생성 증가 및 세포외 Ca<sup>2+</sup>의 유입 차단, PDE-5 억제로



인하여 나타나는 것으로 사료된다.

## V. 結論

鎖陽의 음경해면체 이완효과를 알아보기 위하여 organ bath study 및 면역조직화학적 실험을 진행하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 鎖陽은 PE로 수축된 해면체절편에 대하여 0.1, 0.3, 1, 3 mg/ml에서 각각 유의성 있는 이완효과를 나타내었다.
2. 鎖陽의 음경해면체 이완효과는 L-NNA를 전처치한 경우는 L-NNA를 전처치하지 않은 경우에 비하여 유의성 있게 억제되었다.
3. 鎖陽은  $Ca^{2+}$ -free solution에서  $Ca^{2+}$ 의 첨가에 따른 음경해면체 수축의 증가를 유의하게 억제시켰다.
4. 鎖陽은 조직화학적 실험 결과 대조군에 비하여 음경해면체 내 아교섬유에 대한 평활근의 비율을 유의하게 증가시켰다.
5. 鎖陽은 eNOS의 양성반응을 유의하게 증가시켰고 PDE-5의 양성반응은 유의하게 감소시켰다.
6. 鎖陽은 HUVEC에 처치한 후 관찰한 NO 양을 대조군에 비해 유의하게 증가시켰다.

따라서, 鎖陽은 음경해면체 내의 eNOS 생성과 NO 생성을 증가시키고 세포외  $Ca^{2+}$ 의 유입을 차단하며, PDE-5를 억제함으로써 음경해면체를 이완시키는 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2015학년도 세명대학교 교내학술연구비 지원에 의해 수행된 연구입니다.

## 參考文獻

1. Kim CM. Complete translation Dictionary of Chinese medicine. Seoul: Jeongdam; 1997, p. 2499-500.
2. Bensky D, Clavery S, Stoger E, Gamble A. Chinese Herbal Medicine: Materia Medica Revised ed. Seattle: Eastland Press; 2003, p. 340-1.
3. Wang BS. Modern Pharmacology. Tianjin: Tianjin Science and Technology Press; 1997, p. 1272-3.
4. Lee JM, Lee CH, Cho JH, Jang JB, Chol EM. Administration Duration Dependent Effects of Cynomorii Herbs Extract Solution on the Reproductive Capacities in the Mice. *J Oriental Obstet Gynecol* 2007;20(1):16-31.
5. Lee CH, Cho JH, Jang JB, Lee GS, Han JY. Effects of Cynomorii Herba Extract Solution on Reproductive Capacities in Mice. *J Oriental Obstet Gynecol* 2006;19(2):62-76.
6. Choi HS. The Efficacy of Cynomorii Herba and Eucommiae Cortex on Treatment of Osteoporosis in Ovariectomized Rats. *Kor J Herbol* 2008; 23(2):19-24.
7. Sherwood L. Human physiology : from cells to systems. Seoul: Life science; 2011, p. 755-6.
8. Choi HG, Choi YD, Adaikan PG, Yu J. Effectiveness of Korea Red Ginseng in Erectile Dysfunction-Multi-National Approach. *Journal of ginseng research* 1999;23(4):247-56.
9. Feelisch M, Noack E. Nitric oxide(NO) formation from nitrovasodilators occurs independently of hemoglobin/non-heme iron. *Eur J Pharmacol* 1987;142:465-9.
10. Furchgott RF. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res* 1983;53:557-73.

11. Kim SC. Diagnosis and treatment of male sexual dysfunction. Seoul: Iljgagak; 1995, p. 36.
12. Choi HS, Kim CJ. Literatual Study on the Yang Wei. *Medical Hyehwa* 1996;5(1):212-35.
13. Song BK. Study on the treatment of erectile dysfunction in oriental medicine. *KOMS* 1996; 17(2):73-87.
14. Park SY. The Endothelium-Dependent Vasorelaxation Effect of Cynomorii Herbal. *Kor J Herbol* 2015; 30(6):25-32.
15. Lee MD, Jeong JC. Effects of Albizzia Julibrissin on Chronic Ethanol-treated Erectile Dysfunction in Rats. *Journal of Korean Medicine* 2006;27(2):232-43.
16. Shin HS, Choi HG. Causes of Erectile Dysfunction in Diabetic. *Korean J Urol* 1990;31(3):442-5.
17. Lusis AJ. Genetic factors effecting blood lipoproteins. *J Lipid Res* 1988;29:397-429.
18. De Mey JG, Vanhoutte PM. Role of the intima in cholinergic and purinergic relaxation of isolated canine femoral arteries. *J Physiol* 1981;316:347-55.
19. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox activated forms. *Science* 1992;258:1898-902.
20. Lee SW, Wang HZ, Zhao W, Ney P, Brink PR, Christ GJ. Prostaglandin, E.1. activates the large-conductance K-Ca channel in human corporal smooth muscle cells. *Int J Impot Res* 1999;11: 189-99.
21. Wang HZ, Lee SW, Christ GJ. Comparative studies of the maxi-K(K(Ca)) channel in freshly isolated myocytes of human and rat corpora. *Int J Impot Res* 2000;12:9-18.
22. 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.
23. Jang MS, Yang WM, Kim DR, Park EH, Park SY, Park SK. Antioxidant Effect of Cynomorii Herba on HepG2 Cells and Diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Activity. *Herb Formula Sci* 2007;15(2):139-45.
24. 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. *Br J Pharmacol* 2003;138(1):63-70.
25. Lee SW. The latest trends in erectile dysfunction medication. *Korean J Health Promot Dis Prev* 2004;S245-S253.