



## Effect of increasing nitric oxide and dihydrotestosterone by *Taraxacum coreanum* extract

SangJoon Mo<sup>1</sup>

### 포공영(*Taraxacum coreanum*) 추출물에 의한 산화 질소 및 dihydrotestosterone 증가 효과

모 상 준<sup>1</sup>

Received: 24 July 2019 / Accepted: 6 September 2019 / Published Online: 30 September 2019  
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2019

**Abstract** Men's climactic syndrome, andropause, or testosterone deficit syndrome, is one of the new problems with the health of older men in the age of aging. This phenomenon is a natural phenomenon occurring in men as they age, clinically characterized by a decrease in blood testosterone levels and a marked decrease in physical and mental activity. The purpose of this study was to investigate the effect of hydrothermal extract of *Taraxacum coreanum* by comparing the levels of nitric oxide (NO) in the cavernosum and the levels of male hormone in the blood. *Taraxacum coreanum* extract increased NO production in vitro and in vivo in a dose-dependent manner. Levels of dihydrotestosterone and 17-hydroxysteroid dehydrogenases, as well as levels of neurogenic nitric oxide synthase and cGMP, increased significantly in elderly rats (22 weeks) after 4 weeks of daily intake of *Taraxacum coreanum* extract. However, prostaglandin E<sub>2</sub>, testosterone, and sexually-hormone-binding globulin levels were not different among all groups. Furthermore, total sperm and motile sperm counts were also no significant difference. Overall,

these results suggest the possibility of *Taraxacum coreanum* extract as a safe and effective natural substance for enhancing NO, cGMP and free testosterone.

**Keywords** Cyclic guanosine monophosphate · Dihydrotestosterone · Nitric oxide · *Taraxacum coreanum* · Testosterone Deficit Syndrome

### 서 론

사회의 급속한 경제 성장과 의료기술의 발달은 인간의 평균 수명을 증가시키는데 큰 도움을 주었고, 인구의 고령화는 한 나라의 발전이 가져온 성과이다. 영양과 위생, 의료, 보건, 교육, 경제생활이 개선되면서 노인 건강에 많은 관심을 가지게 되었고 그에 따라 건강을 위협하는 질병 치료에 대한 관심뿐만 아니라 노년의 삶 가치를 높이는 것이 더 중요한 의미로 대두되고 있는 실정이다. 그 중 노화로 인하여 대부분의 남녀들이 공통적으로 겪게 되는 대표적인 증상 중에 갱년기를 들 수 있다. 갱년기라고 하면 여성의 문제라고 인식되어 왔지만, 남성들도 남성호르몬의 감소로 인해 나타나는 여성갱년기와 유사한 여러 임상적 증상들이 있으며, 천천히 진행되는 특징으로 인해 이를 인식하지 못하는 경우가 많다. 대부분 남성들은 갱년기 증상을 스트레스나 잠깐의 통증이라 생각하고 넘어가는 사람들이 많지만 갱년기 이후에는 몸이 급격히 쇠약해지고 노화가 촉진되는 단계이기 때문에 중요한 의미를 가진다[1]. 남성 폐경은 남성의 연령 증가에 따라 성적 불안정, 활력 및 발기 부전, 근육 질량 및 골 밀도 감소, 수동적 태도 및 혈청 테스토스테론 수치 감

SangJoon Mo (✉)  
E-mail: sjmo1107@dankook.ac.kr

<sup>1</sup>Medical Laser Research Center, Dankook University, Cheonan 31116, Republic of Korea  
Center for Bio-Medical Engineering Core Facility, Dankook University, Cheonan 31116, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

소와 같은 전형적인 증상을 보이는 임상적 생화학적 증후군이 다[2,3].

특히, 남성의 경우는 여성의 폐경과 같은 내분비계의 변화로 이어져 발기부전(Erectile dysfunction, ED) 및 테스토스테론 결핍증후군(testosterone deficiency syndrome, TDS)을 초래한다[4,5]. 발기기능장애란 혈액이 음경의 해면조직으로 충분히 전달 안돼 만족스러운 성생활을 누리는 데 충분한 발기를 얻지 못하거나, 얻더라도 유지하지 못하는 상태로 정의한다[6]. 최근에 국내에서 이루어진 대규모 역학 연구 결과, 40세 이상 성인의 약 40%에서 발기기능장애를 호소하는 것으로 나타나 현재 약 200만명 이상의 발기기능장애 환자가 있을 것으로 추정된다[7]. 음경 발기를 위한 음경해면체평활근의 이완은 비아드레날린성 비콜린성 신경전달물질과 해면체 내피세포에서 분비되는 이완물질(endothelium derived relaxing factor, EDRF)에 의해 유발된다[8]. 음경해면체평활근 이완의 매개체로 알려져 있는 산화질소(nitric oxide, NO)는 대표적인 EDRF 중 하나로서[9,10] 해면체 혈관내피세포에서는 내피세포 산화질소합성효소(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)에 의해 L-arginine으로부터 합성되는데, NO가 음경해면체 평활근 세포에 있는 guanylate cyclase를 활성화시키고 활성화된 guanylate cyclase가 평활근세포내의 guanosinetriphosphate를 cGMP로 전환시키게 된다. 즉 해면체 내피세포에서 생성된 NO가 평활근 세포에서 cGMP를 증가 시키면 protein kinase G가 활성화되어 세포의 Ca<sup>2+</sup> 유입이 차단되고 평활근 세포의 이완, 즉 발기가 일어나게 된다[11-13]. 반면, 테스토스테론 결핍 증후군은 남성갱년기의 주된 증상으로 피로를 쉽게 느끼게 되고, 기억력 저하, 우울증 같은 증상이 흔하게 나타나며, 근력 저하와 체지방 증가, 뼈가 약해지는 등 여러 문제가 생긴다. 또한 발기부전이 일어나고, 성욕 또한 저하되는 등 다양한 신체적 변화와 정신적 증상과 함께 뇌와 고환이 노화되어 남성호르몬인 테스토스테론의 농도 저하 또한 나타난다[14,15]. 이러한 증상을 완화 시키기 위해 호르몬 대체 요법이 사용되고 있으나, 많은 연구에도 불구하고 테스토스테론 결핍에 의한 노인성 질환을 지연시키는 장기적인 영양, 안전성, 기능적 이점에 대해서는 논란이 있다. 그렇기에 본 실험에서는 인체에 해가 되지 않는 천연추출물을 사용하여 남성갱년기의 증상완화에 도움을 주고자 하였다.

포공영(*Taraxacum coreanum*)은 국화과(Compositae)에 속하는 민들레의 한방 총 명칭이며, 이른 봄부터 늦가을에 이르기 까지 우리나라 전역에 걸쳐 널리 분포한다. 포공영의 전체를 동양쪽에서는 오랫동안 약으로 사용해 왔는데, 지상부를 건조한 것은 완하제, 강장제 등의 약제로 사용되었고, 뿌리 부위를 건조한 것은 해열, 이뇨, 해독제로 사용되고 있다. 열로 인한 종창, 인후염, 맹장염, 유방염, 황달, 급성간염, 복막염 등에 효과가 있으며, 열로 인해서 소변을 못 누는 증세에도 사용한다[16-18]. 식품의약품안전평가원 자료집에 따르면 HPLC 분석을 통한 포공영 중간 감별 성분패턴을 확인 한 결과 chlorogenic acid, caffeic acid, luteolin-7-O-β-D-glucoside, chicoric acid, 1,5-di-O-caffeoylquinic acid, luteolin 등 6종의 지표성분이 확인되었고[19] 그 외 포공영의 성분은 이전의 다른 연구에 의하면 고미물질인 taraxacin과 inulin이 풍부하고 taraxanthin, carotenoids, taraxaol, taraxasterol 등의 phytosterol 및 quercetin 등의 플라보노이드 유도체가 함유되어 있다[20-22]. 포공영의 성호르몬 관

련 학술 연구로는 포공영이 난소적출 흰쥐의 성호르몬 변화 및 지질대사에 미치는 영향을 조사한 결과[23]와 포공영 발효 추출물의 남성갱년기 개선 효과에 관한 연구가 있고[24] 지적재산권으로는 김도희 등이 민들레 추출물 또는 민들레 함유 복합 추출물을 유효성분으로 하는 갱년기 예방 및 개선용 조성물 연구로 특허를 취득한 상태이나[25], 포공영 자체가 가진 남성갱년기 개선효과에 관한 연구는 없는 실정이다. 본 연구에서는 포공영의 남성갱년기 개선 효과를 알아보기 위해, 포공영 열수추출물을 제조하고, 혈액 간기능 및 신장기능 관련 안전성 검사와 해면체 내의 NO, NOS, cGMP와 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)와 같은 혈관 확장 지표와 혈액내 남성호르몬 관련 지표 수준을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 포공영 추출물

본 실험에서 사용된 포공영은 충남 천안에서 마른 건조를 구입하여 사용하였다. 건조 포공영의 열수추출물은 물 1000 mL와 파쇄된 포공영 100 g을 75~80 °C의 가열 탱크상에서 24시간 추출한 후 filter paper (Whatman No. 1, GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA)로 여과하여 여과된 여액을 감압 농축한 다음 동결건조하여 얻어진 분말을 4 °C 냉장고에 보관하며 사용하였다. 포공영을 실험동물에게 투여하기 전에 정상 식염수(JW 중의제약, Dangjin, Korea)에 용해시켰다.

### 동물관리 및 시료채취

본 연구에서는 12주령된 Sprague-Dawley 수컷(체중 350-380 g) 흰쥐를 오리엔트 바이오(Daejeon, Korea)에서 구입하여 사용하였으며 단국대학교 실험동물윤리위원회 승인하에 표준작업 지침에 따라 수행되었다(DKU-18-008). 실험시작 전 10주 동안 대 한바이오링크사의 일반 고형사료로 적응시키며 22주령까지 사육하며 실험을 진행하였다. 실험동물을 무작위적으로 대조군, kg 당 150 mg의 포공영 추출물 투여군, kg당 300 mg의 포공영 추출물 투여군으로 분류하였으며 각각 10마리씩 총 30마리 3그룹으로 나누어 실험을 수행하였다. 포공영은 1일 1회 같은 시간대에 4주간 경구 투여하였고, 동일한 양의 생리식염수를 대조군에 투여하였다. 실험동물은 온도 24 °C, 상대습도 50±10%, 환기 회수 10-20회/시간, 조명 시간 12시간(점등 08:00-소등 20:00)으로 설정된 환경에서 cage당 두 마리씩 배치하여 관리하였다. 포공영 추출물을 마지막 투여한 다음날에, zoletil (10 mg/kg) 및 rompun (5 mg/kg)를 복강 내 주사하여 실험동물을 마취시켰다. 시료채취를 위해 실험동물의 하복부를 절개하여 복부대동맥에서 혈액을 채취하였고 간, 비장, 고환, 부고환 및 해면체를 회수하였다. 혈청은 혈액을 516×g에서 원심분리하여 채취한 후 간기능, 신장기능, 당대사 및 남성호르몬 지표평가에 사용하였다. 희생 당일에 0.1M 인산 칼륨 완충액(pH 7.4)에 분리한 해면체를 넣고 Ultra Turnax T25 (IKA-Lab, Staufen, Germany)를 사용하여 해면체를 균질화 하였다. 그런 후 4 °C에서 516×g로 원심분리하여, 상등액을 분리 혈관확장기능 평가의 원천으로 사용하였다.

### 안전성 평가

실험동물의 포공영 투여에 따른 안전성 평가를 위해 체중은 일 주일에 한 번씩 측정하였고, 비장 및 고환의 중량은 실험동물 희생 후 측정하여 대조군과 비교하였다. 간기능 시험은 혈액내 아스파르트산아미노전이효소(aspartate aminotransferase, AST, Biovision, Milpitas, CA, USA), 알라닌아미노전이효소(alanine aminotransferase, ALT, Biovision), 감마글루타민아미노전이효소( $\gamma$ -GT, Mybioscience, Beverly, MA, USA) 및 젖산탈수소효소(lactic dehydrogenase, LDH, Mybioscience)를 샌드위치 효소결합면역분석법(ELISA)을 사용하여 제조업체의 지시대로 평가하였다. 신장기능 시험은 혈액요소질소(blood urea nitrogen, BUN, Mybioscience)와 크레아티닌(Creatinine, Cr, Mybioscience)을 간기능 시험과 같은 방법으로 평가하였다. 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 중성지방 측정(Mybioscience)과 glucose은 효소면역측정법(EIA) 키트(Biovision)를 사용하여 평가하였다.

### Nitrite oxide (NO)의 *in vitro* 평가

*In vitro* 연구를 위해 인간제대혈유래혈관내피세포(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)를 LONZA (Walkersville, MD, USA)에서 구입하여 LONZA에서 구입한 2% 소태아혈청(fetal bovine serum), 0.04% hydrocortisone, 0.4% 인간 섬유모세포성장인자-B (human fibroblastic growth factor-B), 0.1% 혈관내피세포성장인자(vascular endothelial growth factor), 0.1% 인슐린유사성장인자-1 (insulin-like growth factor-1), 0.1% 아스코르브산, 0.1% 인간상피세포성장 인자(human epidermal growth factor), 30  $\mu$ g/mL 젠타마이신, 15 ng/mL amphotericin, 및 1% 헤파린이 추가된 EGM-2에서 배양되었다. 모든 배지에 100 units/mL의 페니실린과 100  $\mu$ g/mL의 스트렙토마이신을 보충했다. HUVEC는 well 당  $1 \times 10^6$ 의 농도로 6-well plate 상에 분주한 다음 24시간 후에 새로운 배지로 씻어낸다. 포공영의 농도를 달리하여 처리한 후 24시간 후에 상층액을 채취하여, 같은 양의 Greiss 용액(Sigma, St. Louis, MO, USA)과 혼합한 후, microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite standard의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다.

### NO, nNOS, cGMP 및 PGE<sub>2</sub>의 *in vivo* 평가

혈관확장기능 평가를 위해 NO, NOS, cGMP, 와 PGE<sub>2</sub>를 분석하였다. NO 평가를 위해 균질화한 해면체 상등액을 NO assay kit (Sigma)로 평가하였다. NOS 평가를 위해 균질화 된 해면체를 1  $\mu$ M ionomycin으로 처리하고 2시간 동안 incubation 하였다. 그 후, 상층액을 516 $\times$ g에서 원심분리하여 수집한 다음 새 tube에 옮겨 neuronal nitric oxide synthase (nNOS) 키트(R&D, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 제조업체의 지시대로 측정하였다. cGMP 평가 역시 균질화된 해면체에 에탄올을 1:4 (v/v)의 비율로 첨가하고 516 $\times$ g에서 10분간 원심분리하여 비특이적 단백질을 제거하였다. 비특이적 단백질이 제거된 상등액을 감압 건조 시키고, 동일한 부피의 PBS로 용해시킨 후 cGMP EIA kit (Cayman, Ahn Arbor, MI, USA)를 사용하여 제조업체의 지시대로 측정하였다. PGE<sub>2</sub> 평가를 위해 원심분리 된 해면체 상등액을 취하여 prostaglandin EIA kit (Cayman)로 측정하였다.

### DHT, testosterone, SHBG 및 17 $\beta$ -HSD의 *in vivo* 평가

Dihydrotestosterone (DHT), 테스토스테론, sexually-hormone-binding globulin (SHBG)과 17-beta hydroxysteroid dehydrogenases (17 $\beta$ -HSD)를 성기능 평가를 위해 평가하였다. 채혈 된 혈액을 원심분리한 후 각각의 assay buffer로 희석시킨 후 사용하였다. DHT, 테스토스테론 및 17 $\beta$ -HSD의 농도는 Mybioscience에서 구입 한 ELISA 키트로 측정 하였다. SHBG의 농도는 SHBG ELISA 키트(Cusabio, Temecula, CA, USA)에 의해 측정되었다.

### 정자 수 및 운동성 측정

실험동물의 부고환을 해부현미경을 사용하여 적출한 후 수술용 가위로 잘게 자르고 이를 0.5% BSA를 포함하는 M199 media에 넣어 준 후 37 °C 10분간 incubation하여 정자를 채취하였다. 채취된 정자를 체내와 유사한 환경으로 유지하기 위해 32 °C M199 media로 1차 희석하였다. 희석액에서 100  $\mu$ L를 취하고 media 900  $\mu$ L을 넣어 2차 희석을 해주었다. 이후 2차 희석액에서 10  $\mu$ L를 취하여 hemocytometer에서 counting하였다. 정자의 운동성은 위에서 counting한 것에서 활동하는 정자 수의 비율을 측정하여 계산하였다.

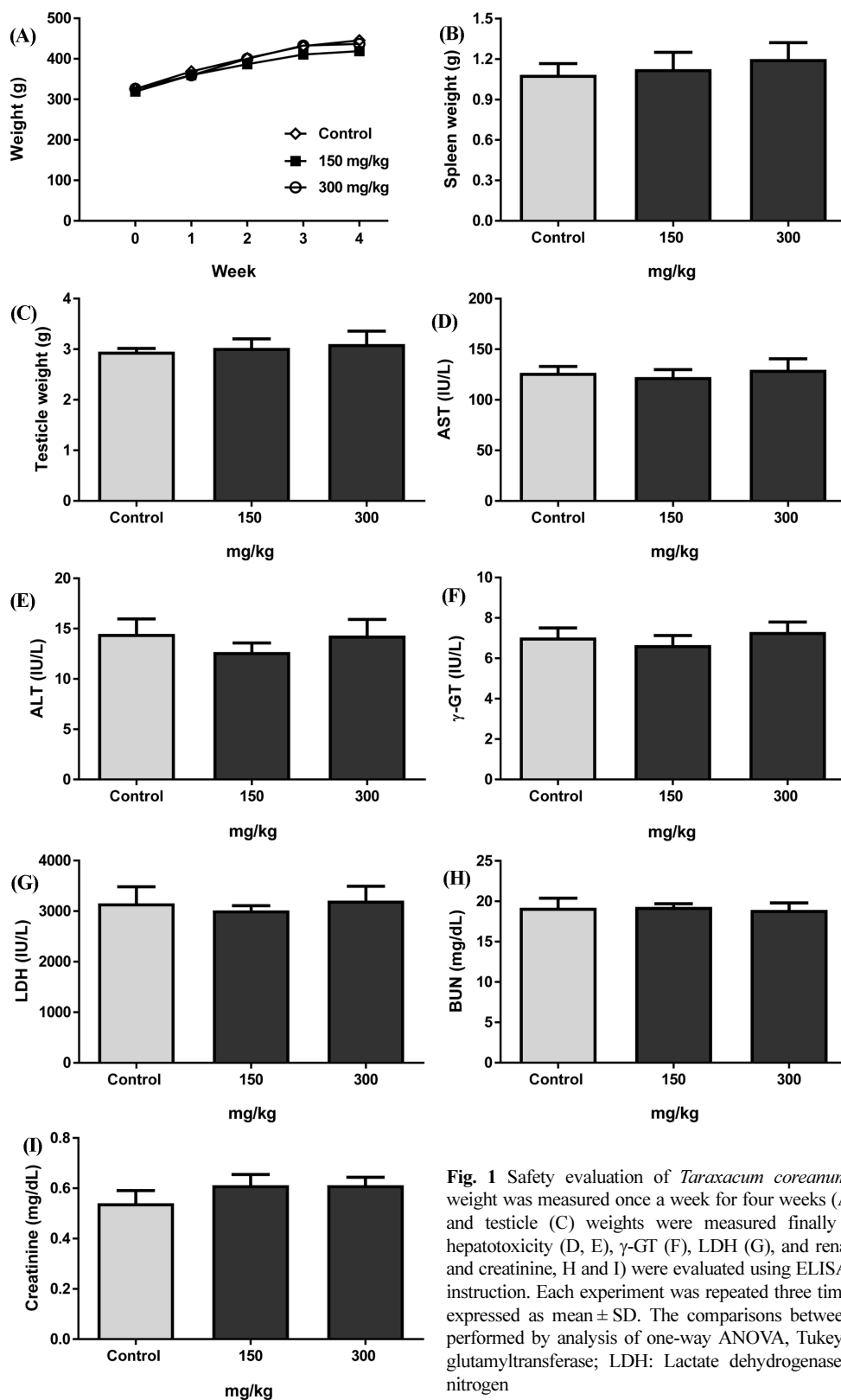
### 통계 분석

모든 분석 자료는 평균  $\pm$  표준오차(mean  $\pm$  SE)로 나타냈으며 실험결과 분석은 Graph pad Prism 5.0 프로그램(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)을 통해 진행하였다. 이번 실험에서 얻은 결과에 대해 일원배치 분산분석(one way ANOVA)을 실시하였으며, Tukey test를 이용하여 대조군과 실험군 간의 유의성을  $p < 0.05$  수준에서 사후 확인하였다.

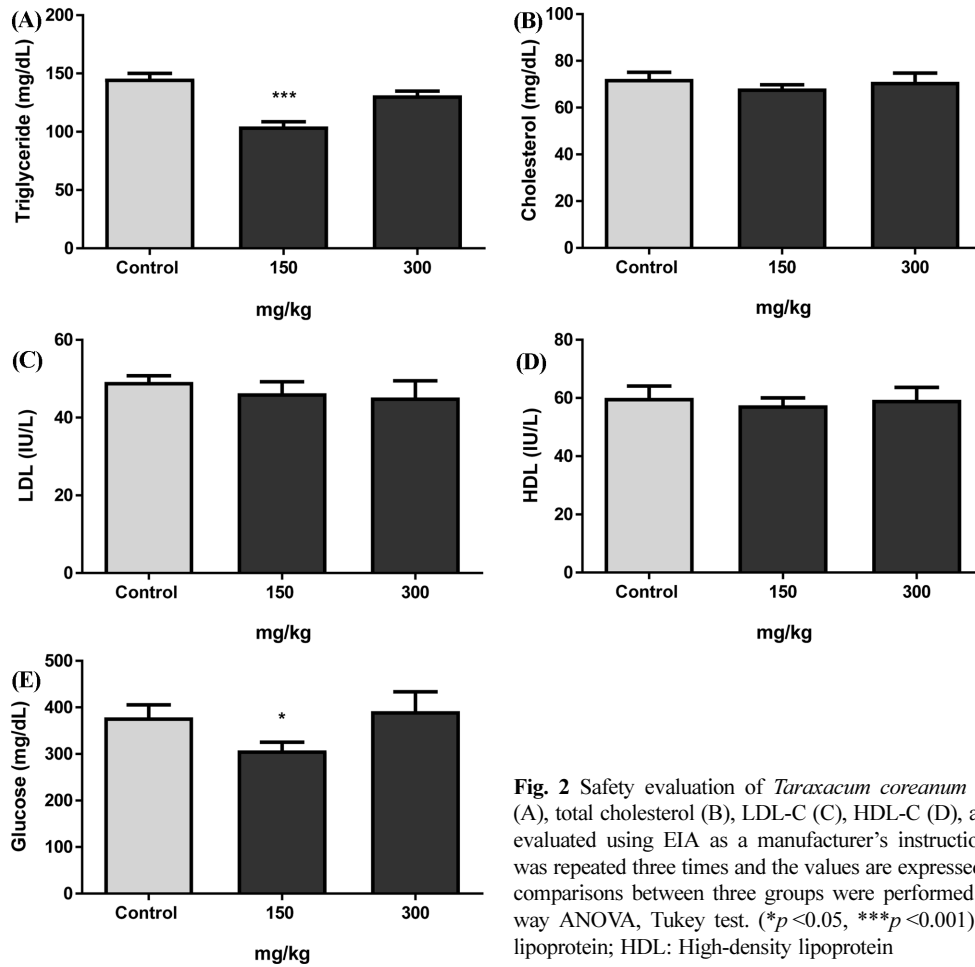
## 결 과

### 포공영 추출물 투여의 안전성 평가

포공영 추출물 투여 후 단기간에 나타나는 생체내 독성을 질적 및 양적 평가하기 위해 안전성 평가를 실시하였다. 우선, 포공영 추출물 투여기간 중 실험동물의 체중 변화를 관찰하기 위해 1주일 간격으로 실험동물의 체중을 확인하였다. 그 결과 대조군과 포공영 추출물 투여군의 체중은 꾸준히 증가하였고 포공영 추출물을 투여한 실험동물에서 특이적 증가 및 감소는 관찰되지 않았다(Fig. 1A). 또한 포공영 추출물 투여가 실험동물의 비장에 미치는 영향을 확인하기 위해 비장의 무게 역시 조사하였다. 대조군(1.08 g)과 비교하여 포공영 추출물 150 mg/kg 투여한 군에서는 무게가 약 4% 증가하였고 300 mg/kg 투여한 군에서는 약 11% 증가하였으나, 통계처리 결과 유의성은 확인할 수 없었다(Fig. 1B). 고환의 무게도 확인하였으나 대조군과 비교하여 차이가 거의 없었다(Fig. 1C). 포공영 추출물의 투여가 실험동물 간 기능에 미치는 영향을 확인하기 위해 혈액검사를 실시하였다. 이를 위해 AST (Fig. 1D), ALT (Fig. 1E),  $\gamma$ -GT (Fig. 1F) 및 LDH (Fig. 1G)의 수준을 평가하였고 그 결과 포공영 추출물을 투여한 실험동물의 혈액내 간 기능 검사 지표 모두 대조군과 비교하여 유의성 있는 변화를 보이지 않았다. 아울러, 포공영 추출물 투여가 실험동물 배설 경로인 신장 기능에 손상을 주는지를 확인 하기위해 실험동물 혈액내 BUN 및 creatinine



**Fig. 1** Safety evaluation of *Taraxacum coreanum* extract. The body weight was measured once a week for four weeks (A) and the spleen (B) and testicle (C) weights were measured finally after sacrifice. The hepatotoxicity (D, E),  $\gamma$ -GT (F), LDH (G), and renal toxicity test (BUN and creatinine, H and I) were evaluated using ELISA as a manufacturer's instruction. Each experiment was repeated three times and the values are expressed as mean  $\pm$  SD. The comparisons between three groups were performed by analysis of one-way ANOVA, Tukey test.  $\gamma$ -GT: Gamma-glutamyltransferase; LDH: Lactate dehydrogenase; BUN: Blood urea nitrogen



**Fig. 2** Safety evaluation of *Taraxacum coreanum* extract. Triglyceride (A), total cholesterol (B), LDL-C (C), HDL-C (D), and glucose (E) were evaluated using EIA as a manufacturer’s instruction. Each experiment was repeated three times and the values are expressed as mean ± SD. The comparisons between three groups were performed by analysis of one-way ANOVA, Tukey test. (\**p* < 0.05, \*\*\**p* < 0.001). LDL: Low-density lipoprotein; HDL: High-density lipoprotein

의 수준을 평가하였다(Fig. 1H, I). 실험결과 포공영 투여가 실험동물의 간 및 신장 기능에 아무런 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다.

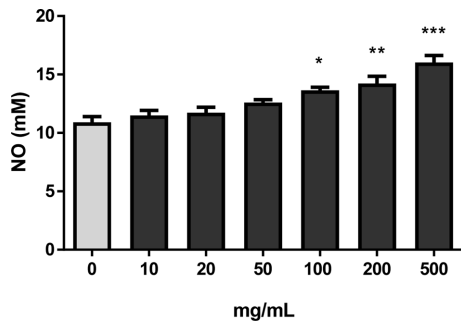
**포공영 추출물 투여에 따른 지질대사 변화**

중년 남성에게서 흔히 나타나는 비만, 지질대사 이상, 내당능 이상, 고혈압, 뇌심혈관계질환 등 대사증후군은 남성호르몬인 테스토스테론의 감소로 인해 나타난다는 보고가 있다[4]. 따라서, 본 실험에서도 포공영 추출물 투여가 남성호르몬 테스토스테론 분비에 영향을 주어 지질대사 및 당대사의 변화를 가져올 수 있는지 확인하기 위해 4주간 추출물을 투여 후 혈중 중성지질, 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 glucose의 변화를 혈액 분석을 통해 확인하였다. 중성지질의 경우 포공영 투여군 모두에서 감소하였다. 특히, 포공영 추출물 150 mg/kg 투여군에서 104.5±9.6 mg/dL로 대조군의 145.3±10.6 mg/dL와 비교했을 때 약 26% 유의적 감소를 보였다. 300 mg/kg 투여군에서는 131.3±8.8 mg/dL로 약 3% 감소를 보였으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 2A). 혈중 총 콜레스테롤의 경우도 대조군이 72.1±6.7 mg/dL인 것에 비해, 150, 300 mg/kg 포공영 투여군에서는 각각 68.2±3.7, 71.1±8.6 mg/dL로 전체적으로 감소를 보였으나, 통계적으로 유의성은 없었다(Fig. 2B). LDL-콜레스테롤은 대조군 49.2±3.6 mg/dL과 비교하였을 포공영 추출물

150, 300 mg/kg 투여군에서는 각각 46.3±6.9, 45.2±9.6 mg/dL로 약간 감소하였으나 유의적인 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 2C). HDL-콜레스테롤의 결과에서도 역시 대조군 값 60.0±9.6 mg/dL와 비교하였을 포공영 추출물 150, 300 mg/kg 투여군에서 각각 57.5±5.6, 59.4±10.5 mg/dL로 감소하였으나 유의적인 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 2D). 반면, 혈중 glucose의 경우 대조군 값 378.4±58.9 mg/dL와 비교하였을 때 포공영 추출물 150 mg/kg 투여군에서 만 307.5±39.3 mg/dL로 대조군 대비 약 18% 감소하는 유의성을 보였다(Fig. 2E).

**포공영 추출물 투여에 따른 혈관 내피세포의 NO 평가**

NO 합성효소인 NOS는 L-arginine으로부터 NO 합성의 촉매작용을 한다. 신경에서 분비되는 nNOS와 혈관내피세포에서 분비되는 eNOS는 음경 발기를 증대하는 것으로 알려져 있다[12]. 본 실험에서도 포공영 추출물 투여에 따른 내피세포 내 NO 생성 효과를 평가하기 위해 다양한 농도의 포공영 추출물을 HUVEC에 첨가하고 24시간 배양 후 NO 수준을 측정하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 NO의 수준은 포공영 농도 의존적인 수준으로 포공영 100 mg/mL에서 13.64±0.47 mM, 200 mg/mL에서 14.23±1.0 mM, 500 mg/mL에서 16.02±1.03 mM으로 대조군(10.91±0.80 mM) 대비 각각 약 25, 30, 46%로 유의한 증가를 보였다(Fig. 3).



**Fig. 3** Effect of *Taraxacum coreanum* on the level of NO in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). NO evaluation in vitro; the various concentration of ALC was added to the HUVECs and the level of NO was measured after 24 h incubating. Each experiment was repeated three times and the values are expressed as mean  $\pm$  SD. The comparisons between three groups were performed by analysis of one-way ANOVA, Tukey test. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ )

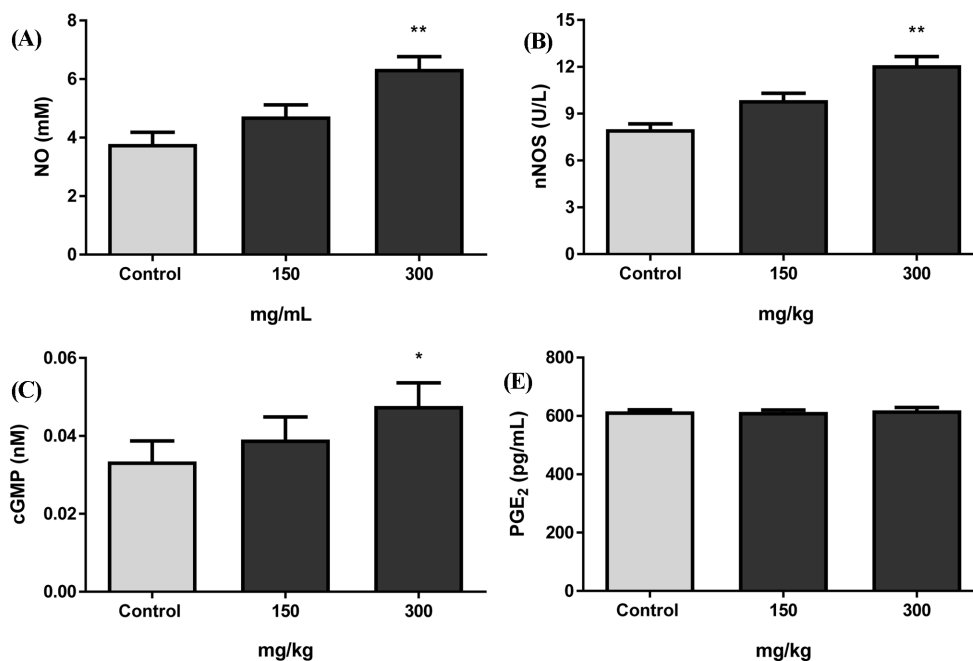
#### 포공영 추출물 투여에 따른 실험동물 해면체내 혈관확장 지표 변화

실험동물 해면체내 혈관확장 관련 지표의 변화를 알아보기 위해 해면체내 NO, nNOS, cGMP, 및 PGE<sub>2</sub>의 농도를 확인하였다. 포공영 추출물 투여군에서 NO의 수준은 대조군(3.78 $\pm$ 0.73 mM)과 비교하여 포공영 150, 300 mg/kg 투여군에서 각각 4.72 $\pm$ 0.72, 6.35 $\pm$ 0.75 mM으로 약 24, 67%씩 유의하게 증가했다(Fig. 4A). 해면체내 nNOS 수준의 경우는 포공영 추출물을

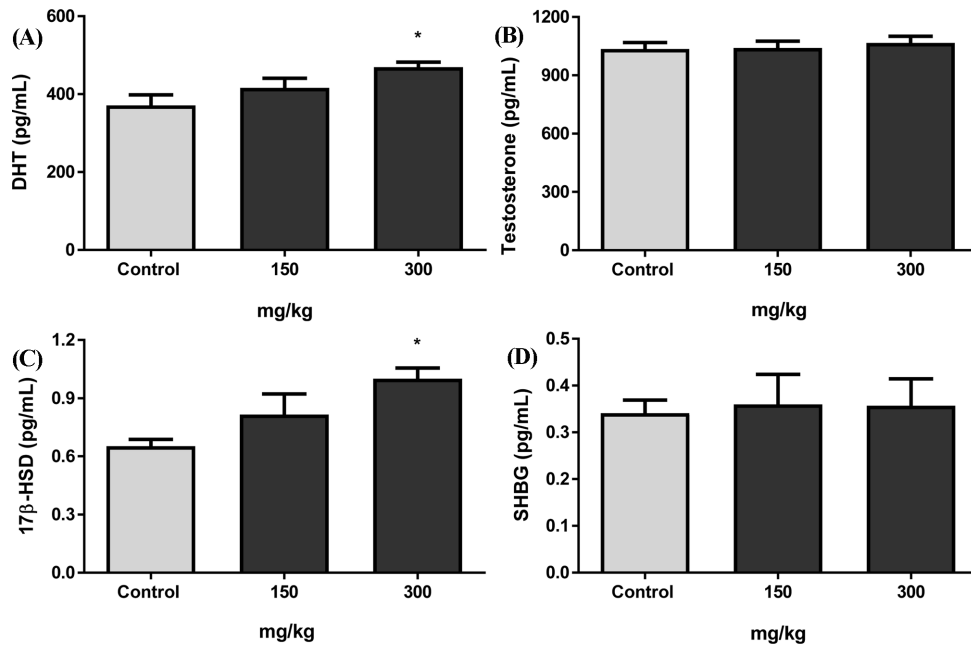
150, 300 mg/kg 투여한 군에서 각각 9.87 $\pm$ 0.74, 12.10 $\pm$ 0.89 U/L로 대조군(8.01 $\pm$ 0.58 U/L) 대비 각각 약 23, 50% 증가하는 결과를 보였고 300 mg/kg만 통계적 유의성을 나타냈다(Fig. 4B). 한편, 실험동물 해면체내 cGMP의 수준은 대조군(0.033 $\pm$ 0.009 nM)과 비교하여 포공영 150, 300 mg/kg 투여 군에서 각각 0.039 $\pm$ 0.011, 0.047 $\pm$ 0.011 nM으로 각각 약 18, 42%씩 증가를 했으나, 300 mg/kg 투여군에서만 통계적 유의성이 나타났다(Fig. 4C). 또한, 해면체내 PGE<sub>2</sub>의 농도는 포공영 투여군 모두 대조군 대비 어떠한 변화도 확인할 수 없었고 유의성도 찾을 수 없었다(Fig. 4D).

#### 포공영 추출물 투여에 따른 실험동물 혈중 남성호르몬 관련 지표 변화

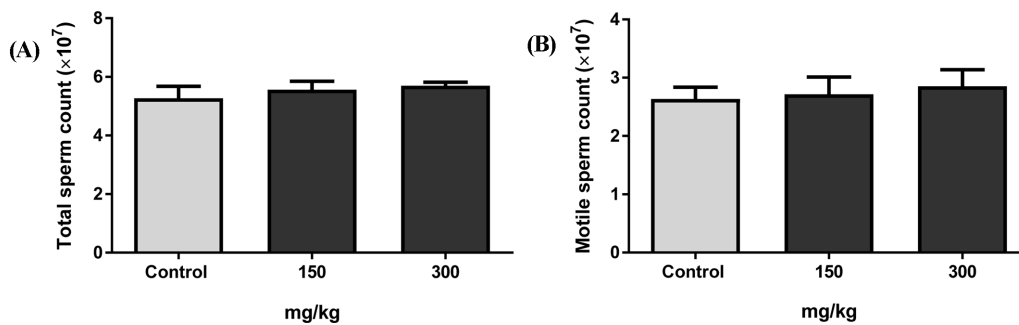
포공영 투여가 남성생식 기능을 조절하는 남성호르몬 및 그와 관련된 다양한 지표들의 변화 유발을 조사하기 위하여 농도별 포공영 투여 4주 후 실험동물 혈액 분석을 실시하였다. 그림 5A는 실험동물 혈중에 존재하는 DHT의 농도를 조사한 그림이다. 포공영을 150, 300 mg/kg 투여군에서 각각 416.4 $\pm$ 41.5, 469.1 $\pm$ 22.3 pg/mL로 대조군 371.2 $\pm$ 42.9 pg/mL과 비교하여 각각 약 12, 26% 증가하는 결과를 보였고 300 mg/kg 포공영 투여군에서는 통계적 유의성을 보였다(Fig. 5A). 반면, 테스토스테론은 대조군과 비교하여 포공영 추출물 투여군 모두 혈중 농도 변화 및 통계적 유의성을 확인할 수 없었다(Fig. 5B). 17 $\beta$ -HSD의 농도는 포공영 150, 300 mg/kg을 투여한 실험동물의 혈중 농도가 각각 0.816 $\pm$ 0.184, 1.000 $\pm$ 0.097 pg/mL로 대조군(0.653 $\pm$ 0.061 pg/mL) 대비 각각 약 25, 53%의 증가하였고 300 mg/kg



**Fig. 4** Effect of *Taraxacum coreanum* on the level of NO, NOS, cGMP, and PGE<sub>2</sub> in cavernosum. (A) NO evaluation in vivo; NO evaluation was assessed by NO assay kit using homogenized cavernosum supernatant. (B) NOS evaluation was assessed by nNOS kit using the homogenized cavernosum after 1  $\mu$ M ionomycin treatment for 2 h. (C) cGMP evaluation was assessed using cGMP EIA by kit. (D) PGE<sub>2</sub> evaluation was assessed by prostaglandin EIA kit. Each experiment was repeated three times and the values are expressed as mean  $\pm$  SD. The comparisons between three groups were performed by analysis of one-way ANOVA, Tukey test (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ )



**Fig. 5** Effects of *Taraxacum coreanum* on the level of DHT, testosterone, SHBG, and 17β-HSD in serum. The centrifuged serum was diluted 3 times with each assay buffer. The concentration of DHT (A), testosterone (B), 17β-HSD (C), and SHBG (D) was measured by ELISA kit as manufacturer’s instructions. Each experiment was repeated three times and the values are expressed as mean ± SD. The comparisons between three groups were performed by analysis of one-way ANOVA, Tukey test (\**p* < 0.05)



**Fig. 6** Effects of *Taraxacum coreanum* on the change of total sperm (A) and motile sperm (B) counts. The crushed epididymis was incubated in M199 medium for 2 h, diluted 2 times, and total sperm and motile sperm counts were counted on a hemacytometer. Each experiment was repeated three times and the values are expressed as mean ± SD. The comparisons between three groups were performed by analysis of one-way ANOVA, Tukey test

포공영 투여군에서 통계적 유의성을 보였다(Fig. 5C). SHBG의 경우 포공영 150, 300 mg/kg을 투여한 실험동물의 혈중농도가 0.356±0.182, 0.357±0.162 ng/mL로 대조군(0.341±0.102 ng/mL)로 투여군 모두 약 4% 정도 증가했으나 유의성은 확인할 수 없었다(Fig. 5D).

**포공영 추출물 투여에 따른 정자 수의 변화**

포공영 추출물 투여로 증가된 유리 테스토스테론의 결과를 바탕으로 추출물의 투여가 정자수와 운동성에 어떠한 영향을 미치는지 측정하였다. 포공영 추출물을 마지막 투여한 후 실험동물 부고환을 적출하였고 일정한 크기로 자른 후 정자를 채취하였다. 그 결과 총 정자수에서 대조군은 5.27±0.70×10<sup>7</sup>의 정자수를 가졌고, 포공영 150, 300 mg/kg을 투여한 실험동물에서는 각각 5.56±0.49×10<sup>7</sup>과 5.69±0.40×10<sup>7</sup>로 약간 증가하였으나 통계적

으로 유의하지는 않았다(Fig. 6A). 운동성을 지닌 정자수에 대한 측정 결과에서 대조군은 2.63±0.29×10<sup>7</sup>, 포공영 추출물 150 mg/kg 투여군은 2.72±0.49×10<sup>7</sup>, 300 mg/kg 투여군은 2.86±0.49×10<sup>7</sup>으로 미미하게 증가하는 모습을 보였으나 통계적인 유의성은 확인할 수 없었다(Fig. 6B).

**고찰**

남성 갱년기란 나이가 들어 감에 따라 남성이 경험하게 되는 성적 본능 및 활력의 저하, 발기장애, 음경위축, 근육량과 골밀도 감소, 수동적 태도 등의 임상적 증상들과 혈중 남성호르몬 테스토스테론 농도의 저하되어 있는 생화학적 증후군을 의미한다[4,26].

포공영의 대표적 지표물질은 뿌리에 들어 있는 베헨산(behenic acid)과 같은 지방산과 이눌린(inulin)이 들어 있고 타락세롤(taraxerol) 베타시토스테롤( $\beta$ -sitosterol) 카페산(caffeic acid)이 있다. 이눌린은 칼슘 흡수율이 낮은 젊은 여성과 젊은 남성의 칼슘 흡수를 증가시키는 것으로 보고되었고[27], 타락세롤(taraxerol)은 염증 매개체의 발현을 억제함으로써 효소 MAP3K7 (TAK1), 단백질 키나제 B (PKB 또는 Akt) 및 NF- $\kappa$ B의 활성화를 방해하여 항염증 효과를 갖는 것으로 보고되었다[28]. 특히, 베타시토스테롤( $\beta$ -sitosterol)은 양성 전립선 비대증 및 혈중 콜레스테롤 수치를 감소시킬 수 있는 잠재력에 대해 연구되고 있습니다[29,30]. 본 실험에서는 포공영 추출물 투여의 혈관내 NO 생성 효과를 평가하기 위해 다양한 농도의 포공영 추출물을 HUVEC에 첨가하고 24시간 배양 후 NO 수준을 측정하였다. 혈관내피세포를 이용한 본 실험에서 NO의 수준은 포공영 투여 농도의존적인 수준으로 대조군 대비 유의하게 증가하였다 (Fig. 3). 혈관내피세포를 이용한 실험결과가 실험쥐에도 동일하게 관찰되는지 확인하기 위해 포공영 추출물을 4주간 투여 후 실험쥐 음경해면체 내의 혈관확장 관련 여러지표들의 변화를 측정하였다. 실험결과 포공영 추출물을 투여한 실험쥐의 음경해면체 내 NO, nNOS, cGMP 농도 증가가 확인되었고 특히, 300 mg/kg 농도로 4주간 투여한 실험쥐의 경우 통계적 유의성 확인되었다. 이러한 결과는 포공영 추출물이 음경해면체평활근 이완과 관계 있는 NO-cGMP 신호전달 기전에 영향을 줄 수 있는 가능성 있음을 확인하는 결과였다. 그러나, prostaglandin (PG) 수용체가 해면체, 음경동맥 및 음경 평활근의 발기기능과 연관이 있음에도 불구하고[31,32] 상대적으로 PGE<sub>2</sub>의 농도는 변하지 않았다(Fig. 4D). 이러한 결과는 포공영 추출물이 phosphodiesterase의 생성을 억제하고 PG 수용체와 무관하게 cGMP의 생산을 유지 또는 증가시킬 수 있음을 보여준다.

테스토스테론은 남성생식 기능을 조절하는 대표적인 스테로이드성 호르몬으로 유리된 형태로 존재하거나 성호르몬 결합글로블린, 혈중 단백질, 및 알부민과 결합하여 존재한다[33]. 그러나, 성기능은 테스토스테론 수준과 무관하다고 알려져 있지만, 테스토스테론의 감소로 인한 심리적 성기능장애증후군 유발은 심리적 성기능 장애를 일으킨다[34]. 일반적으로 유리 테스토스테론 수치가 70 ng/dL 미만이거나 총 테스토스테론 수치가 300 ng/dL 미만인 경우 성선기능저하증으로 분류된다[34,35]. 이 연구에서 포공영 투여군의 총 테스토스테론 수치는 변하지 않았지만 안드로겐 활성에 관여하는 DHT와 17 $\beta$ -HSD이 증가했다 [36,37].

1998년 처음 먹는약으로 소개된 실테나필(Viagra)은 Phosphodiesterase type V (PDE5)를 억제해 cGMP 농도를 올림으로써 자연스런 발기효과를 나타내는 효능을 가진 약으로 전 세계적으로 주목을 받았다[38,39]. 그러나, 실테나필과 같은 PDE5 억제제들은 혈관확장 부작용으로 두통, 홍조 같은 증상이 나타나고 있다[40,41]. 이러한 이유로 산사나무속[42], 소목[43] 등의 재료로부터 부작용을 최소화할 수 있는 발기부전 치료제를 찾기 위한 연구가 많이 진행되고 있다. 그러나 이들의 심리적 성기능개선 증후군에 관한 연구는 미비한 상태이다. 포공영 추출물을 이용한 성호르몬관련 연구는 서론에서 제시한 연구 외에는 확인할 수 없는 상태이며 본 연구에서 처음으로 포공영 추출물 자체의 혈관기능 및 남성호르몬 연구를 처음으로 보고하

였다. 또한 포공영 추출물의 안전성 평가 결과, 비장 이상, 체중 감소, 고환 이상은 없었다. 생화학적 혈액 검사에서도 300 mg/kg의 고농도에서도 간기능, 신장기능 및 지질 대사에 이상이 없음이 확인되었다. 결론적으로, 본 연구는 포공영 추출물이 음경해면조직에서 NO, cGMP, nNOS 및 혈중 유리 테스토스테론의 생산과 분비를 증가시킬 잠재력이 있음을 실험적으로 증명했다.

## 초 록

남성의 클라이맥스 증후군, 남성갱년기, 또는 테스토스테론 결핍 증후군은 고령화시대 남성노인들의 건강에 새로운 문제 중 하나이다. 이 현상은 나이가 들수록 남성에게서 나타나는 자연 현상으로 혈중 테스토스테론 수치의 감소와 신체적 및 정신적 활동의 현저한 감소를 특징으로 한다. 이 연구의 목적은 해면체내 일산화질소(NO)와 혈액 내 남성호르몬의 수준을 비교하여 포공영(*Taraxacum coreanum*) 열수 추출물의 효과를 조사하였다. 포공영 추출물은 생체외 및 생체내에서 NO 생산량을 용량 의존적으로 증가시켰다. 포공영 추출물을 4 주간 섭취 한 나이든 쥐(22주)에서 다이하이드로 테스토스테론과 17-하이드록시 스테로이드 탈수소효소의 수준과 신경 인산화 질소 합성효소와 cGMP의 양은 유의하게 증가했다. 그러나 프로스타글란딘 E<sub>2</sub>, 테스토스테론 및 성 호르몬 결합 글로블린 수치는 모든 군에서 차이가 없었다. 또한, 총 정자 수 및 운동성 정자 수 또한 유의한 차이가 없었다. 전반적으로, 이러한 결과는 NO, cGMP 및 유리 테스토스테론을 향상시키기 위한 안전하고 효과적인 천연 물질로서 *Taraxacum coreanum* 추출물의 가능성을 시사한다.

**Keywords** Cyclic guanosine monophosphate · Dihydrotestosterone · Nitric oxide · *Taraxacum coreanum* · Testosterone Deficit Syndrome

**감사의 글** 본 연구는 2019년도 교육부의 재원으로 한국기초과학지원연구원 국가연구시설장비진흥센터의 지원을 받은 기초과학연구역량강화사업 핵심연구지원센터 조성 지원 과제에서 바이오의료공학핵심연구지원센터를 조성하여수행된 연구결과임(과제관리번호: 2019R1A6C1010033).

## References

- Hofer HG (2011) Men in a critical age: Kurt Mendel and the controversy over the male climacterium. *Urologe A* 50: 839–845
- Burnett AL (2006) Nitric oxide in the penis-science and therapeutic implications from erectile dysfunction to priapism. *J Sex Med* 3: 578–582
- Jouannet P, Wang C, Eustach F, Kold-Jensen T, Auger J (2001) Semen quality and male reproductive health: the controversy about human sperm concentration decline. *APMIS* 109: 333–344
- Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, Matsumoto AM, Snyder PJ, Swerdloff RS, Montori VM (2010) Testosterone therapy in men with androgen deficiency syndromes: An Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocr Metab* 95: 2536–2559
- Wang C, Nieschlag E, Swerdloff R, Behre HM, Hellstrom WJ, Gooren LJ, Kaufman JM, Legros JJ, Lunenfeld B, Morales A, Morley JE, Schulman C, Thompson IM, Weidner W, Wu FCW (2009) ISA, ISSAM,



- EAU, EAA and ASA recommendations: Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males. *Aging Male* 12: 5–12
6. Bivalacqua TJ, Champion HC, Mehta YS, Abdel-Mageed AB, Sikka SC, Ignarro LJ, Kadowitz PJ, Hellstrom WJ (2000) Adenoviral gene transfer of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) to the penis improves age-related erectile dysfunction in the rat. *Int J Impot Res* 12: S8–S17
  7. Jung WS (2008) Pharmacological management of male sexual dysfunction. *J Korean Med Assoc* 51:770–778
  8. Rajfer J, Aronson WJ, Bush PA, Dorey FJ, Ignarro LJ (1992) Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N Engl J Med* 326: 90–94
  9. Vanhoutte PM, Boulanger CM, Mombouli JV (1995) Endothelium-derived relaxing factors and converting enzyme inhibition. *Am J Cardiol* 76: 3E–12E
  10. Nimmegeers S, Sips P, Buys E, Decaluwé K, Brouckaert P, Van de Voorde J (2008) Role of the soluble guanylyl cyclase alpha1-subunit in mice corpus cavernosum smooth muscle relaxation. *Int J Impot Res* 20: 278–284
  11. Lowenstein CJ, Snyder SH (1992) Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* 70: 705–707
  12. Bredt DS, Ferris CD, Snyder SH (1992) Nitric oxide synthase regulatory sites. phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J Biol Chem* 267: 10976–10981
  13. Choi B, Kumar S, Zhao C, Zhang L, Kim C, Lee S, Jeon J, So I, Kim S, Park N (2015) Additive effects of *Artemisia capillaris* extract and scopoletin on the relaxation of penile corpus cavernosum smooth muscle. *Int J Impot Res* 27: 225–232
  14. Cunningham GR (2013) Andropause or male menopause? Rationale for testosterone replacement therapy in older men with low testosterone levels. *Endocr Pract* 19: 847–852
  15. Staerman F, Loné P (2012) Andropause (androgen deficiency of the aging male): diagnosis and management. *Minerva Med* 103: 333–342
  16. Bae KH (2000) The medical plants of Korea. Kynhak Pub. Cp., Seoul Korea.
  17. Lee EB, Kim JK, Kim OK (1993) The antigastric effect of *Taraxaci Herba*. *Kor J Pharmacogn* 24: 313–318
  18. Kang MJ, Kim KS (2001) Current trends of research and biological activities of dandelion. *Food Ind Nutr* 6: 60–67
  19. Shon YW (2017) Discrimination of *Taraxaci Herba*. Sung RS, Sim YH, Kim JH, Kang IH, Hyun SY, Lee GH, Lee JJ, Hwang DS, Kim GY, Kim SH (Ed.), Cheongju, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation
  20. Williams CA, Goldstone F, Greenham J (1996) Flavonoids, cinnamic acids and coumarins from the different tissues and medicinal preparations of *Taraxacum officinale*. *Phytochemistry* 42: 121–127
  21. Schütz K, Carle R, Schieber A (2006) *Taraxacum-A* review on its phytochemical and pharmacological profile. *J Ethnopharmacol* 107: 313–323
  22. Budzianowski J (1997) Coumarins, caffeoyltartaric acids and their artifactual methyl esters from *Taraxacum officinale* leaves. *Planta Med* 63: 288–289
  23. Kim J-E, Yang S-J, Cho S-H, Park K-M (2015) Effects of *Taraxaci Herba* on the Sex Hormon Changes and Lipid Metabolism in the Ovariectomized Rats. *J Korean Obstet Gynecol* 28: 1–12
  24. Lee HS, Baek YS, Kim YS, Kim HP (2016) Effects of Fermented Dandelion (*Taraxacum coreanum*) Extract on Male Climacteric Syndrome. *J Life Sci* 26: 1063–1073
  25. Kim DH, Jung YH, Lee JW, Rho YH, Park JE, Lee SA (2014) Korea Patent No. 1014601260000. Daejeon: Korean Intellectual Property Office
  26. Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, Matsumoto AM, Snyder PJ, Swerdloff RS, Montori VM (2006) Testosterone therapy in adult men with androgen deficiency syndromes: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 1995–2010
  27. Roberfroid MB (2003) Introducing inulin-type fructans. *Br J Nutr* 93: 13–26
  28. Yao X, Li G, Bai Q, Xu H, L C (2013). Taraxerol inhibits LPS-induced inflammatory responses through suppression of TAK1 and Akt activation. *Int Immunopharmacol* 15: 316–324
  29. Wilt T, Ishani A, MacDonald R, Stark G, Mulrow C, Lau J (2000) Beta-sitosterols for benign prostatic hyperplasia. *The Cochrane Library* (2): CD001043.
  30. Kim TH, Lim HJ, Kim MS, Lee MS (2012) Dietary supplements for benign prostatic hyperplasia: An overview of systematic reviews. *Maturitas* 73: 180–185
  31. Dashwood MR, Crump A, Shi-Wen X, Loesch A (2011) Identification of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in human penis: a potential role of reduced neuronally-derived nitric oxide in erectile dysfunction. *Curr Pharm Biotechnol* 12: 1316–1321
  32. Fukuhara S, Tsujimura A, Okuda H, Yamamoto K, Takao T, Miyagawa Y, Nonomura N, Okuyama A (2011) Vardenafil and resveratrol synergistically enhance the nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway in corpus cavernosal smooth muscle cells and its therapeutic potential for erectile dysfunction in the streptozotocin-induced diabetic rat: preliminary findings. *J Sex Med* 8: 1061–1071
  33. Regis L, Planas J, Celma A, de Torres IM, Ferrer R, Morote J (2014) Behavior of total and free serum testosterone as a predictor for the risk of prostate cancer and its aggressiveness. *Actas Urol Esp* 39: 573–581
  34. Efesooy O, Cayan S, Akbay E (2018) The effect of testosterone replacement therapy on penile hemodynamics in hypogonadal men with erectile dysfunction, having veno-occlusive dysfunction. *Am J Men's Health* 12: 634–638
  35. Ho CH, Wu CC, Chen KC, Jaw FS, Yu HJ, Liu SP (2016) Erectile dysfunction, loss of libido and low sexual frequency increase the risk of cardiovascular disease in men with low testosterone. *Aging Male Off. J Int Soc Study Aging Male* 19: 96–101
  36. Celik O, Yucel S (2013) Testosterone replacement therapy: should it be performed in erectile dysfunction? *Nephro Urol Mon* 5: 858–861
  37. Kataoka T, Hotta Y, Ohno M, Maeda Y, Kimura K (2013) Limited effect of testosterone treatment for erectile dysfunction caused by highestrogen levels in rats. *Int J Impot Res* 25: 201–205
  38. Aslan Y, Guzel O, Balci M, Tuncel A, Yildiz M, Atan A (2014) The impact of metabolic syndrome on serum total testosterone level in patients with erectile dysfunction. *Aging Male Off. J Int Soc Study Aging Male* 17: 76–80
  39. Greenspan MB, Barkin J (2012) Erectile dysfunction and testosterone deficiency syndrome: the “portal to men’s health”. *Can J Urol* 19: 18–27
  40. An TG, Jeong JC (2005) Effect of Ojawan on the ethanol-induced erectiledysfunction in rats. *Korean J Orient Int Med* 26: 605–614
  41. Milman N, Burton CM, Iversen M, Videback R, Jensen CV, Carlsen J (2008) Pulmonary hypertension in end-stage pulmonary sarcoidosis: therapeutic effect of sildenafil? *J Heart Lung Transpl* 27: 329–334
  42. Kim SH, Kang KW, Kim KW, Kim ND (2000) Procyanidins in crataegus extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. *Life Sci* 67: 121–131
  43. Xie YW, Ming DS, Xu HX, Dong H, But PPH (2000) Vasorelaxing effect of *Caesalpinia sappan* involvement of endogenous nitric oxide. *Life Sci* 67: 1913–1918