

金櫻子 抽出物이 陰莖海綿體의 Nitric oxide synthase 活性 및 抗酸化效果에 미치는 影響

東國大學校 韓醫科大學 內科學教室

金敬東 · 鄭智天

I. 緒論

성행위시 남성의 음경이 충분히 발기되지 않거나 되더라도 지속되지 못하는 경우가 전체 성생활 중 25% 이상 일어날 경우를 발기부전이라고 한다¹⁾. 이러한 발기부전은 심인성과 기질성으로 대별되며, 기질성은 크게 내분비성, 신경인성, 혈관성 등으로 구분된다²⁾.

발기의 정도는 음경평활근의 이완 정도에 따라 결정되며, 음경평활근의 이완은 신경전달물질과 비신경전달물질에 의해 이루어 진다³⁻⁶⁾. 최근에는 비신경전달물질인 prostaglandine과 endothelium derived relaxing factor (EDRF)가 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다^{6,7)}.

특히 nitric oxide (NO)가 강력한 EDRF의 하나로 밝혀짐에 따라 NO의 역할에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다⁸⁻¹⁴⁾. Vernet 등¹⁵⁾의 보고에 의하면 streptozotocin (STZ)을 투여하여 당뇨를 유발시킨 실험동물에서 발기부전이 나타났으며 음경해면체의 nitric oxide synthase(NOS) 활성이 현저하게 減少되어진다고 하였다.

韓醫學에서 성욕은 있으나 음경의 발기가 원활하지 않음을 '陽痿', '陰痿', '陰器不用', '陰不起' 등으로 표현하는데, 《素問: 陰陽應象大論篇》에 "年六十 陰痿, 氣大衰, 九竅不利, 下虛上實, 涕泣俱出矣"라 하여 老化에 따라 발생하며, 《素問: 痿論》에 "思想無窮, 所願不得, 意淫於外, 入房太甚, 宗筋弛縱"이라 하여 病理

的으로도 발생한다고 하였다¹⁶⁾.

陽痿의 病因은 命門火衰, 心脾兩虛, 腎精虧虛, 肝氣鬱結, 濕熱下注 등이 있으며¹⁷⁾, 溫腎壯陽, 補腎填精, 疎肝解鬱, 清熱瀉濕, 補益心脾, 理氣活血 등의 治法이 응용되고 있다¹⁸⁻²⁰⁾.

陽痿의 치료에 활용되는 한약제가 발기부전에 미치는 영향에 관한 보고가 없을 뿐 아니라, 특히 NO와 관련된 연구는 볼 수 없었다.

이에 著者는 補腎益肝, 澀精固腸 등의 效能으로 陽痿, 遺精, 遺尿, 崩漏, 帶下, 滑泄, 疝氣 등의 치료에 활용되는 金櫻子²¹⁻²³⁾가 발기부전에 효과가 있는 지를 검토하기 위해 실험동물에 STZ로 당뇨병을 유발시켜 발기부전 모델을 만든 후, 음경해면체내의 NOS 활성과 nitrite 함량 및 항산화 효과에 미치는 영향을 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었으므로 보고하고자 한다.

II. 材料 및 方法

1. 材料

1) 藥材

본 실험에 사용한 金櫻子(*Rosae laevigatae Fructus*)는 동국대학교 부속한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다.

2) 시약

Bovine serum albumin, calmodulin, L-arginine, ethylene diamine tetra sodium salt, glutathione reduced, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced, naphthyl-ethylene diamine, nitroblue tetrazolium, sulfanilamide, streptozotocin, sodium nitrite, sodium citrate, thiobarbituric acid sodium salt, uric acid, xanthine sodium salt는 Sigma사의 제품을, potassium phosphate mono and dibasic는 Wako사의 제품을, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), trichloroacetic acid는 Nakarai사의 제품을 각각 사용하였다. 그의 본 실험에 사용한 시약은 시중에서 구입한 특급품 내지 일급품을 사용하였다.

3) 동물

실험 동물은 동국대학교 한의과대학 동물사육장에서 일정한 조건으로 사육한 외관상 건강한 웅성 Sprague-Dawley系 흰쥐(체중: 200 g 내외)를 대상으로 하였다.

2. 方法

1) 金櫻子 抽出物의 조제 및 투여

金櫻子 200 g을 round flask에 methanol 600 ml와 함께 넣은 뒤 70 °C가 유지되는 항온수조에서 냉각기를 부착하고 16시간씩 3회 반복 추출하여 추출액을 만든 후, 이 추출액을 rotary evaporator로 감압 농축하여 건조시켜 약 22 g의 抽出物을 얻었다.

실험 동물은 아무런 처치도 하지 않은 정상군, STZ(60 mg/kg)을 투여하여 당뇨를 유발시킨 대조군 및 당뇨를 유발시킨 후 金櫻子 抽出物을 투여한 실험군 등 세 군으로 분류하였다.

金櫻子 抽出物을 실험동물의 체중 kg당 60 mg을 1일 1회 15일간 경구 투여하였으며 정상군은 동량의 0.5% CMC 용액을 투여하였다.

2) 흰쥐에서 당뇨 유도 방법

실험 동물의 복강내로 체중 kg당 60 mg 용

량의 STZ를 주사하여 당뇨를 유도하였으며²⁴⁾, 대조군은 동량의 생리식염수를 주사하였다. 당뇨의 발생은 STZ 주입 3일부터 urine strip으로 확인하였다. STZ 주입 1주에 실험을 시행하였으며 실험 동물의 頸動脈에서 채혈하고 혈당을 측정하여 혈당치가 300 mg/dl 이상인 쥐를 실험에 이용하였다. 실험 동물은 도살 전 일에는 16시간 동안 물만 주고 절식시켰다.

3) 효소원의 조제

각 실험 동물은 ether 마취하에 하복부를 절개하여 음경해면체를 적출하였다. 적출한 음경해면체 조직을 생리식염수로 세척한 후, 남아 있는 혈액 및 식염수를 여지로 제거하였다. 조직 g당 4배량의 0.25 M sucrose 용액을 가하여 0-4 °C에서 glass teflon homogenizer (Ultra-Turrax T25, JANKEL, IKA-Labortechnik, Germany)로 마쇄하여 균질액을 만들었다. 이 마쇄균질액을 냉장원심분리기 (Hanil Supra 22K)로 600×g에서 10분간 원심분리한 다음 상정액을 취하여 이것을 과산화지질, nitrite 및 glutathione 함량 측정에 이용하였으며, 이 상정액을 10,000×g로 30분간 원심분리한 뒤 얻은 상정액을 NOS, xanthine oxidase 활성 측정 효소원으로 이용하였다.

4) 효소 활성 실험

① Xanthine oxidase 활성 측정

Xanthine oxidase(type O) 활성 측정은 Stirpe 등의 방법²⁵⁾에 준해 0.1 M K.P. buffer (pH 7.5) 일정량에 기질인 xanthine 60μM 및 효소원을 첨가하여 37 °C에서 5분간 반응시킨 다음 20% TCA를 가하여 제단백시키고 원심분리하였다. 이때 생성되어진 uric acid를 파장 292 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소 활성을 산정하였다. 한편 xanthine dehydrogenase(type D)의 활성은 type O의 활성 측정 반응액에 coenzyme인 NAD⁺ 100mM을 첨가해 동일하게 반응시킨 다음 측정하여 나온 활성도 (total type: type D+O)에서 type O의 활성을

감한 값으로 산정하였다. 효소 활성도는 분당 mg의 단백질이 생성시킨 uric acid 양을 nmole로 나타내었다. 한편 xanthine 산화 효소의 형 전환비 산출은 xanthine dehydrogenase 및 xanthine 산화 효소 반응에서 얻어진 효소의 활성도를 이용하여 xanthine dehydrogenase (type D)에서 xanthine oxidase(type O)로의 형 전환 비율을 O/O+D의 비로 산출하였다.

② NOS 활성 측정

NOS 활성 측정은 비색법(colorimetric assay)으로 NADPH diaphorase 활성도 측정법²⁶⁾을 이용하였다. 실험 동물의 조직 효소원에 50 mM Hepes(ph 7.4) 용액과 L-arginine, NADPH, EDTA, CaCl₂, dithiothreitol, calmodulin 및 nitro blue tetrazolium을 가하여, 37 °C에서 5분간 반응시켜 585 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. 효소 활성도는 파장 585 nm에서 측정된 흡광도 수치에 사용한 단백질 함량을 나눈 값으로 산정하였다.

5) Nitrite 함량 측정

조직중의 nitrite(NO₂⁻) 양의 측정은 비색법²⁷⁾으로 Griess reaction에 준하여 측정하였다. Griess시액은 1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene diamine 및 2.5% 인산을 혼합하여 제조하였으며, 효소원 180 μl에 2 mM NADPH 및 L-arginine을 각각 10 μl씩 가하여 최종 용적이 200 μl가 되게 하였다. 반응은 37 °C에서 1시간 지속시킨 후, 반응시킨 상징액 200 μl와 동량의 griess시액을 실온에서 10분간 반응시켜 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, L-arginine과 NADPH를 첨가한 상징액에 대조 상징액을 보정하여 산출하였다. Nitrite 양의 측정은 sodium nitrite를 이용한 표준곡선을 이용하여 산출하였고, 흰쥐 조직 g당 nitrite의 양을 μmole로 환산하여 나타내었다.

6) Glutathione 함량 측정

조직중 glutathione 함량 측정은 Ellman의 방법²⁸⁾에 준해 조직 마쇄액 일정량에 4%

sulfosalicylic acid를 가해 제단백시켜 얻은 상징액 일정량에 0.1 mM 5, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)를 함유한 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 8.0) 일정량을 넣고 반응시켜 생성된 p-nitrothiophenol의 흡광도를 파장 412 nm에서 측정하여 농도를 산정하였다. GSH 함량은 조직 g당 함유되어 있는 GSH의 양을 nmole로 나타내었다.

7) 과산화지질 함량 측정

과산화지질 함량 측정은 Ohkawa 등의 방법²⁹⁾에 준해 조직 마쇄균질액 일정량에 8.1% sodium dodesyl sulfate, 20% acetate buffer (pH 3.5) 및 0.8% thiobarbituric acid(TBA) 용액을 가해 95 °C에서 1시간 동안 반응시키고 실온으로 냉각한 다음 생성된 홍색의 TBA reactive substance를 n-Butanol : Pyridine (15 : 1) 혼액으로 이행시켜 파장 532 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 과산화지질 함량은 조직 g당 MDA의 양을 nmole로 나타내었다.

8) 단백질의 정량 및 통계 처리

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법³⁰⁾에 준해 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 행하였다. 한편 실험 성적의 유의성 검정은 Student's t-test 를 이용하여 행하였으며, p-value가 0.05 미만일 때 유의한 것으로 판정하였다.

Ⅲ. 成績

1. 시험관내에서 음경해면체 NOS 활성에 미치는 金櫻子 抽出物の 영향

金櫻子 抽出物을 첨가시키지 않은 정상 상태의 반응 조건에서는 효소 활성이 1.34 Δ OD/mg protein이었다. 金櫻子 抽出物을 첨가시킨 경우 첨가 농도를 증가시켜도 NOS 활성

은 대조치와 비교하였을 때 유의성이 없었다.(Fig.1)

2. 시험관내에서 음경해면체 xanthine oxidase 활성에 미치는 金櫻子 抽出物の 영향

金櫻子 抽出物을 첨가시키지 않은 정상 조건에서는 type O 활성이 0.092 nmole이었다. 그러나 金櫻子 抽出物을 첨가시킨 경우 첨가 농도 의존적으로 효소 활성이 억제되었으며, 특히 첨가 농도가 0.1 mg/ml이 되게 하였을 때 효소 활성이 0.05 nmole로서 유의한 활성 변화를 보였다. 반면에 type D+O의 경우는 金櫻子 抽出物의 농도를 증가시켜도 별다른 활성 변화를 나타내지 않았다. Xanthine oxidase 형전환비를 관찰하였을 때 정상 상태의 형전환비가 51%이었으나, 金櫻子 抽出物의 첨가에 의하여 형전환비가 억제되었으며 첨가량이 0.1 mg/ml가 되었을 때 형전환비가 약 39%로 유의성 있게 억제되었다.(Fig.2)

3. 시험관내에서 음경해면체 조직중의 지질과산화 반응에 미치는 金櫻子 抽出物の 영향

金櫻子 抽出物을 첨가시키지 않았을 때의 과산화지질 함량은 7.72 nmole이었으나 金櫻子 抽出物의 첨가 용량을 증가시킴에 따라 과산화지질 함량이 감소하였으며, 특히 첨가량이 0.1 mg/ml되게 하였을 경우는 함량이 5.18 nmole로 대조치에 비하여 유의성 있게 억제되었다.(Fig.3)

4. 金櫻子 抽出物の 투여 기간에 따른 음경해면체의 NOS 활성 변화

정상군의 효소 활성이 1.34 Δ OD/mg protein이었으나, 5일 투여군은 효소 활성이 1.37 Δ OD/mg protein, 10일 투여군은 1.44 Δ

OD/mg protein로 투여 기간 의존적으로 효소 활성이 증가하였으며, 특히 金櫻子 抽出物을 15일간 경구 투여한 실험군의 효소 활성은 1.69 Δ OD/mg protein로 정상군에 비하여 약 26%정도 유의성 있게 효소 활성이 증가되었다.(Fig.4)

5. 金櫻子 抽出物の 투여 용량에 따른 음경해면체의 NOS 활성 변화

정상군의 효소 활성이 1.34 Δ OD/mg protein이었으나 20 mg/kg을 투여한 실험군은 효소 활성이 1.36 Δ OD/mg protein이었으며, 40 mg/kg을 투여한 실험군은 1.48 Δ OD/mg protein로 투여 용량에 비례하여 효소 활성이 증가하였다. 金櫻子 抽出物 60 mg/kg을 15일간 투여한 실험군의 경우는 효소 활성은 1.69 Δ OD/mg protein로 정상군에 비하여 유의성 있게 증가되었다.(Fig.5)

6. 당뇨유발 모델동물의 음경해면체의 NOS 활성에 미치는 영향

정상군의 경우는 1.34 Δ OD/mg protein인데 비하여 당뇨유발 실험군은 효소 활성이 0.85 Δ OD/mg protein로 정상군에 비하여 약 35% 정도 현저하게 효소 활성이 억제되고 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 당뇨유발군에 金櫻子 抽出物을 투여한 실험군의 경우는 효소 활성이 1.30 Δ OD/mg protein으로 유의성 있게 회복되었다.(Fig.6)

7. 당뇨유발 모델동물의 음경해면체 xanthine oxidase 활성과 형전환비에 미치는 영향

당뇨유발 모델동물에게 일주일째부터 金櫻子 抽出物을 60 mg/kg의 용량으로 15일간 경구 투여한 후 도살하여 음경해면체중의 xanthine oxidase 활성 변화를 관찰하였을 때 정

상군은 type O의 활성이 0.092 nmole인데 비하여 당뇨유발 실험군은 효소 활성이 0.155 nmole로 정상군에 비하여 약 68%정도 유의성 있게 효소 활성이 증가하고 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 당뇨유발군에 金櫻子 抽出物을 투여한 실험군의 경우는 효소 활성이 0.104 nmole로 정상군 수준으로 회복되고 있음을 관찰할 수 있었다. Type D+O 활성의 경우는 정상군, 대조군 및 실험군 모두에서 별다른 활성 변화를 나타내지 않았다. 한편 xanthine oxidase 형전환비의 경우는 type O의 활성 변화와 유사한 경향으로 당뇨유발 실험군에서 현저하게 증가되던 형전환비가 金櫻子 抽出物의 투여로 정상 수준으로 유의성 있게 저하되었다.(Fig.7)

8. 당뇨유발 모델동물의 음경해면체의 Nitrite 함량에 미치는 영향

정상군에서 nitrite 함량이 0.55 μ mole/g of tissue인데 비하여 실험군은 0.31 μ mole/g of tissue로 정상군에 비하여 유의하게 nitrite 함량이 감소하였다. 반면 金櫻子 抽出物을 투여한 실험군의 경우는 nitrite 함량이 0.50 μ mole/g of tissue로 유의성 있게 증가되었다.(Fig.8)

9. 당뇨유발 모델동물의 음경해면체의 glutathione 함량에 미치는 영향

정상군에서 glutathione 함량이 2.38 nmoles/g of tissue이었으나 당뇨유발군은 1.33 nmoles/g of tissue로 정상군에 비하여 약 45%정도 현저하게 glutathione 함량 감소 현상이 관찰되었으나, 당뇨유발군에 金櫻子 抽出物을 투여한 실험군의 경우는 glutathione 함량이 2.15 nmoles/g of tissue로 정상 수준으로 유의성 있게 증가되었다.(Fig.9)

10. 당뇨유발 모델동물의 음경해면체

의 과산화지질 함량에 미치는 영향

0.5% CMC만을 투여한 정상군에서는 과산화지질 함량이 7.72 nmoles/g of tissue이었으나, 당뇨유발군은 12.44 nmoles/g of tissue로 정상군에 비하여 유의성있게 과산화지질 함량이 증가되었으며, 金櫻子 抽出物을 투여한 실험군의 경우는 7.79 nmoles/g of tissue로 유의성 있게 저하되었다.(Fig.10)

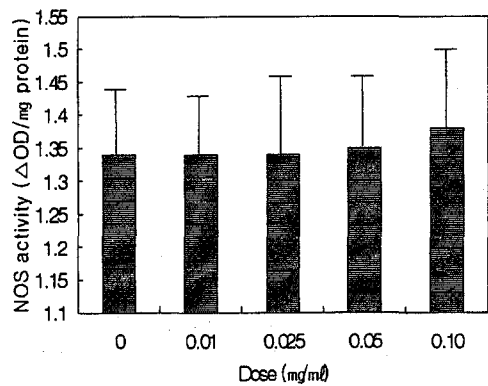


Fig.1 Effect of the methanol extract of *Rosae laevigata* Fructus on the urethral nitric oxide synthase activity *in vitro*.

The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean \pm S.E. for 3 separate experiments.

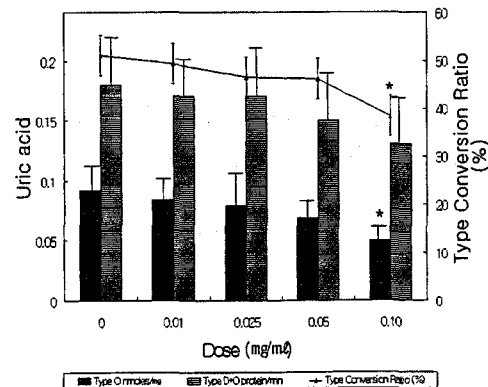


Fig.2 Effect of the methanol extract of

Rosae laevigata Fructus on the urethral xanthine oxidase activity *in vitro*.

The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean±S.E. for 3 separate experiments. Significantly different from control(* : p<0.05).

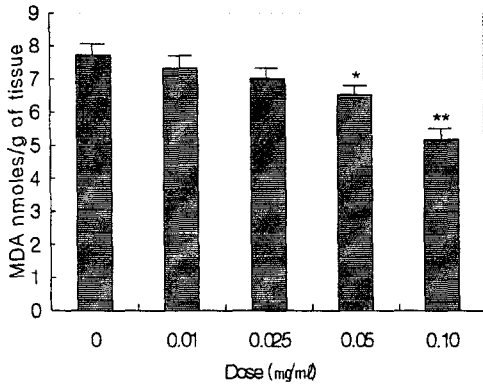


Fig.3 Effect of the methanol extract of *Rosae laevigata* Fructus on the urethral lipid peroxide level *in vitro*.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.E. for 3 separate experiments. Significantly different from control(* : p<0.05, ** : p<0.01).

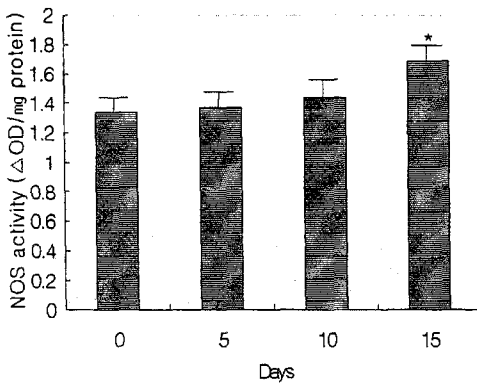


Fig.4 Effect of the methanol extract on the urethral nitric oxide synthase activity in rats.

Time course of the treatment of *Rosae laevigata* Fructus. Rats were received the methanol extract of *Rosae laevigata* Fructus (60mg/kg, p.o) daily

for 0-15 days.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.E. for 10 animals. Significantly different from control(* : p<0.05).

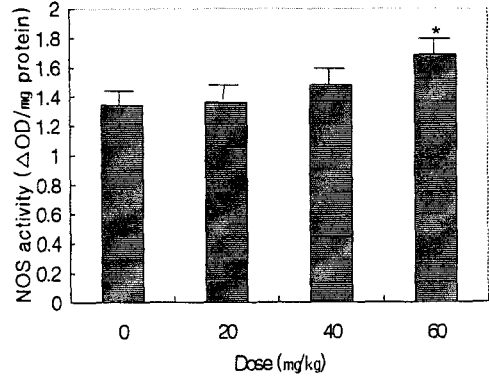


Fig.5 Dose response of the extract of *Rosae laevigata* Fructus on the urethral nitric oxide synthase activity in rats.

Rats were received the methanol extract of *Rosae laevigata* Fructus (0-60 mg/kg, p.o) daily for 15 days.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.E. for 10 animals. Significantly different from control(* : p<0.05).

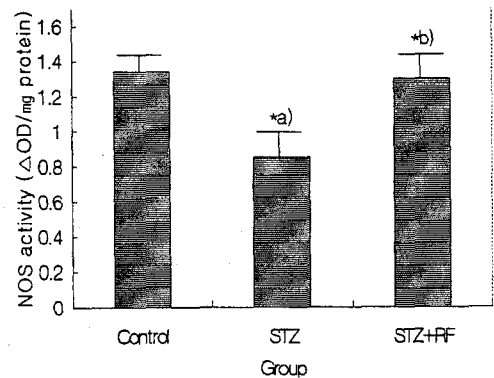


Fig.6 Effect of the extract of *Rosae laevigata* Fructus on the urethral nitric oxide synthase activity in STZ-induced diabetic rats.

Rats were injected intraperitoneally with 60mg/kg of STZ, and the methanol extract of *Rosae laevigata* Fructus (60 mg/kg, p.o) treated to rats for 15 days. The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean±S.E. for 10 animals. a) significantly different from control, b) significantly different from STZ-treated group(*: p<0.05). STZ: streptozotocin, RF:*Rosae laevigata* Fructus extract.

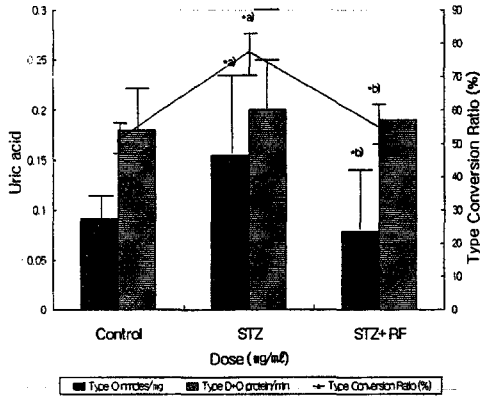


Fig.7 Effect of the extract of *Rosae laevigata* Fructus on the urethral xanthine oxidase activity in STZ-induced diabetic rats.

Rats were injected intraperitoneally with 60 mg/kg of STZ, and the methanol extract of *Rosae laevigata* Fructus(60 mg/kg, p.o) treated to rats for 15 days. The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean±S.E. for 10 animals. a) significantly different from control, b) significantly different from STZ-treated group(*: p<0.05).

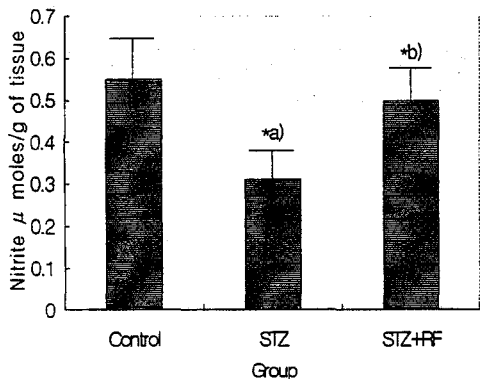


Fig.8 Effect of the extract of *Rosae laevigata* Fructus on the urethral nitrite level in STZ-induced diabetic rats.

Rats were injected intraperitoneally with 60 mg/kg of STZ, and the methanol extract of *Rosae laevigata* Fructus(60 mg/kg, p.o) treated to rats for 15 days.

The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean±S.E. for 10 animals. a) significantly different from control, b) significantly different from STZ-treated group(*: p<0.05).

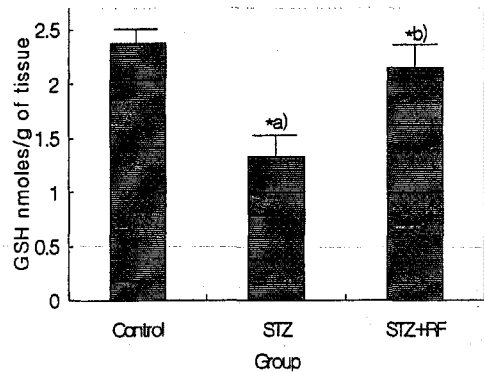


Fig.9 Effect of the extract of *Rosae laevigata* Fructus on the urethral glutathione level in STZ-induced diabetic rats.

Rats were injected intraperitoneally with 60 mg/kg of STZ, and the methanol extract of *Rosae laevigata* Fructus(60 mg/kg, p.o) treated to rats for 15 days.

The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean±S.E. for 10 animals. a) significantly different from control, b) significantly different from STZ-treated group(*: p<0.05).

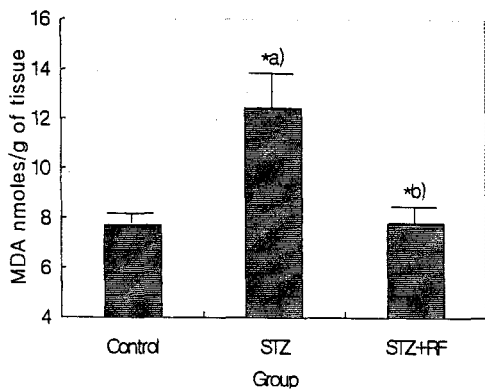


Fig.10 Effect of the extract of *Rosae laevigata* Fructus on the urethral lipid peroxide level in STZ-induced diabetic rats.

Rats were injected intraperitoneally with 60 mg/kg of STZ, and the methanol extract of *Rosae laevigata* Fructus(60 mg/kg, p.o) treated to rats for 15 days.

The assay procedure was described in the experimental methods.

Values are mean±S.E. for 10 animals. a) significantly different from control, b) significantly different from STZ-treated group(* : p<0.05).

IV. 考察

발기부전의 발생빈도는 미국 NIH(National Institutes of Health)의 보고에 의하면 미국에서는 전 성인 남성 인구의 11.9%, 유럽에서는 12.8%, 라틴 아메리카에서는 8.4%, 아시아-태평양지역에서는 8.7%로 추산하고 있다. 우리나라에서도 산업재해와 교통사고가 늘어나며 복잡한 현대 생활로 육체적인 피로와 정신적 스트레스가 연속됨에 따라 발기장애환자가 증가 추세에 있다.^{1,31)}

음경이 발기하기 위해서는 음경평활근의 완전한 이완 이후 음경해면체내로 혈류유입의 증가가 있어야 하고 다음에 이완된 육주평활근(trabecular smooth muscle)이 탄력성백막

(tunica albuginea)을 압박하여 음경해면체내 동상 혈관강(sinusoidal space)에 혈액이 소실되지 않고 축적되어야 한다^{32,33)}. 음경평활근의 이완 정도는 발기의 정도를 결정하는데, 이러한 음경평활근 이완에 작용하는 물질로 콜린성 및 비아드레날린성 비콜린성(NANC : nonadrenergic noncholinergic) 신경 전달물질과^{3-4,32)} 비신경 전달물질인 prostaglandine과 endothelium derived relaxing factor (EDRF)가 있다. 특히 최근에는 비신경전달물질이 음경해면체내 평활근의 조절이 발기에 중요한 역할을 하고 있음이 밝혀졌다^{6,7)}. 최근 연구에서 Palmer 등에 의해 NO가 강력한 EDRF의 하나로 밝혀짐에 따라, 음경해면체 평활근 이완에 대한 NO의 역할에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다⁸⁻¹⁵⁾.

NO는 대기중에 존재하는 불안정한 기체로서, 체내에서 NOS의 생화학적 작용에 의해서 생합성된다³⁴⁾. NO는 혈관의 내피세포에서 유리되어지는데, 이때 혈관평활근에 작용하여 혈관을 이완시키는 강력한 물질로 알려져 있다³⁵⁾

韓醫學에서는 男性 陰莖의 勃起가 원활하지 않음을 ‘陽痿’, ‘陰痿’, ‘陰器不用’, ‘陰不起’ 등으로 표현한다. 病因은 命門火衰, 心脾兩虛, 腎精虧虛, 肝虛不舒, 濕熱下注 등이 있으며¹⁷⁾, 각기 溫腎壯陽, 補腎填精, 疎肝解鬱, 清熱瀉濕, 補益心脾, 理氣活血 등의 治法을 활용하고 있다¹⁸⁻²⁰⁾.

陽痿를 일으키는 原因 疾患으로 泌尿生殖器疾患, 慢性肝疾患, 神經系疾患, 內分泌疾患 등이 있으며, 특히 糖尿病 患者의 약 50%에서 陽痿가 發生한다³⁶⁾. 糖尿病은 韓醫學의 消渴의 範疇에 屬하며 上·中·下消로 나눈다. 下消에서 陽事不舉의 症狀이 나타나며 滋腎溫陽의 治法을 사용한다³⁷⁾.

金櫻子は 藥性이 平하고, 味는 酸澁하며 肝, 腎, 脾, 膀胱, 肺, 大腸經에 歸經하여 補腎益肝, 澁精固腸 등의 效能으로 遺精, 遺尿, 崩漏, 帶下, 陽痿, 滑泄, 疝氣 등에 활용되고 있다²¹⁻²³⁾.

臨床에서 腎虛遺精, 早泄 등의 治療에 사용 되는 金櫻子膏³⁸⁾, 金櫻子片³⁹⁾, 九龍丹⁴⁰⁾, 鎖精丸⁴¹⁾, 太乙金鎖丹⁴²⁾, 金鎖丸⁴³⁾ 등의 處方에는 金櫻子が 들어 있으며³⁸⁻⁴³⁾, 陽痿의 治療에도 有效할 것으로 기대된다.

이에 著者는 金櫻子를 대상으로 인위적으로 만든 발기부전 모델동물에서 발기부전 개선효과를 관찰하고자 본 실험을 시도하였다.

金櫻子를 유기 용매로 추출하여 건조시켜 抽出物을 만든 후 시험관내 실험과 동물 실험을 병행하여 발기부전 개선 효과를 검토하고자 하였다. 시험관내에 金櫻子 抽出物을 농도별로 첨가시켜 NOS 활성에 미치는 영향을 검토하였을 때 농도 변화에 따른 효소 활성은 관찰할 수 없었다. 金櫻子 抽出物을 실험 동물에 일정 기간 경구 투여한 후 NOS 활성 변화를 관찰하였을 때 金櫻子 抽出物의 투여 용량 및 투여 기간 의존적으로 NOS 활성 증가를 관찰할 수 있었다. 이러한 성적은 金櫻子 抽出物 자체가 직접적으로 생체 기능에 영향을 미치는 것이 아니라, 체내에서 일차적으로 대사를 받은 다음 대사산물이 생체기능에 영향을 미칠 가능성이 있음을 시사해 주고 있다.

시험관내에 金櫻子 抽出物을 용량을 달리하면서 첨가시킨 후 활성산소 생성효소인^{44,45)} xanthine oxidase 활성 변화를 관찰하였을 때 金櫻子 抽出物의 첨가 농도에 비례하여 효소 활성을 억제시켰으며, 또한 형전환비도 효소 활성과 유사한 경향으로 억제되었다. 지질과산화 반응을 측정하는 반응액중에 金櫻子 抽出物을 농도별로 첨가시키고 과산화지질 함량을 검토하였을 때 xanthine oxidase 활성 변화와 마찬가지로 과산화지질의 함량 억제 현상이 관찰되었다. 이러한 실험 성적은 金櫻子 抽出物이 활성산소의 생성을 억제시키므로서 활성산소에 의한 일련의 연쇄화학반응⁴⁶⁾ 지질과산화 반응을 억제시켜 과산화지질의 함량 억제 효과를 나타낸 것으로 생각할 수 있는데, 이것은 金櫻子 성분 중에는 강력한 항산화물질이 포함되어 있으며 이로 인해 활성산소로

부터 생체를 보호하는 약리작용을 지니고 있을 것으로 생각할 수 있다.

金櫻子 抽出物의 효과를 직접적으로 임상에 적용시킬수 있을 지를 확인할 목적으로 인위적으로 당뇨를 유발시켜 발기부전 모델동물을 만든 후 金櫻子 抽出物을 투여하여 효과를 검토하고자 하였다. Vernet 등의 보고¹⁵⁾에 의하면 STZ를 투여하여 당뇨를 유발시킨 실험 동물에서 발기부전 증상이 나타났으며 음경해면체에서 NOS 활성이 현저하게 감소되어진다고 하였다. 저자는 이러한 보고¹⁵⁾를 참조하여 STZ로 당뇨를 유발시켜 발기부전 모델동물을 만든 후 金櫻子 抽出物을 15일 동안 투여하여 NOS 활성 변화를 검토하였을 때 당뇨유발군에서 현저하게 감소하던 NOS 활성이 金櫻子 抽出物 투여에 의해 정상 수준으로 개선되어지는 결과를 확인할 수 있었다.

또한 NO를 간접적으로 정량할 수 있는 방법인 nitrite의 조직중 함량 변화도 NOS 활성 변화와 유사한 경향을 보이고 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 실험 결과는 金櫻子 抽出物이 체내에서 NOS 활성을 증가시키므로서 혈관이완인자인 NO의 생합성을 촉진시킨다. 그 결과로 혈관평활근을 이완시켜 혈액의 유입량이 증가되므로 발기부전 증상을 치료할 수 있을 것으로 예상할 수 있다.

활성산소에 의한 생체의 스트레스는 많은 질병 유발과 관련이 있으며 스트레스에 의한 손상을 차단하면 질병의 치료에 도움이 된다고 한다. 발기부전 증상도 활성산소에 의한 체내 스트레스의 누적으로 인해서 생기는 경우가 많으므로 활성산소를 제거할 수 있으면 이러한 증상들도 개선되어질 것으로 예상된다.

金櫻子 抽出物을 실험 동물에 일정 기간 동안 투여한 후 활성산소 생성계 효소의 일종인^{44,45)} xanthine oxidase 활성과 형전환을 관찰하였을 때 STZ에 의해 현저하게 증가되던 효소 활성과 형전환비가 金櫻子 抽出物 투여에 의해 정상 수준으로 회복되는 현상을 관찰할 수 있었다. 이 성적은 金櫻子 抽出物이 활성산

소의 생성을 억제시켜 활성산소에 의한 생체 내 스트레스 해소에 많은 도움을 주므로써 발기부전 증상을 개선시킬 수 있을 것으로 사료된다.

Glutathione은 간장에서 생성되어지며 여러 장기에 널리 분포하는 일종의 생체방어인자이면서 해독반응에 관여하는 물질이다⁴⁷⁾. Glutathione은 생체외부에서 들어온 독성물질이나 체내에서 생성되어지고 반응성이 강하여 생체 기능을 저하시켜 독성반응을 나타내는 강한 생리활성물질로 부터 생체를 보호하는 기능을 담당하고 있다⁴⁸⁾. 생체방어인자로서 작용하는 생화학적 기능을 지니고 있는 조직중의 glutathione 함량을 측정하므로써 독성물질에 대한 생체보호능력을 간접적으로 측정할 수 있을 것이다. 발기부전 모델동물을 만들기 위하여 독성물질로 STZ를 투여하여 당뇨를 유발시킨 후 金櫻子 抽出物을 15일간 투여하여 음경해면체 조직중의 glutathione 함량 변화를 검토하였을 때 STZ를 투여한 발기부전 모델동물에서 현저하게 감소하던 조직중의 glutathione 함량이 金櫻子 抽出物을 투여하였을 때 정상군 수준으로 함량이 조절되고 있음을 확인할 수 있었다. 이는 金櫻子 抽出物이 glutathione의 생합성을 촉진시켜 독성유발 물질의 체내 농도를 저하시키므로써 독성물질의 작용을 차단시킨 결과로 생각할 수가 있다.

독성물질에 의한 생체조직이나 장기의 손상을 나타내는 일종의 지표로 과산화지질을 들 수 있다⁴⁹⁾. 과산화지질은 세포막의 지질성분이 독성물질들에 의해서 손상을 받게되면 지질성분의 산화반응이 촉진되어 나타나는 반응산물이다⁵⁰⁾. 세포의 손상정도와 지질과산화 반응의 정도는 비례한다고 할 수 있다. 음경해면체 조직에 지질과산화 반응이 많이 생기면 조직의 세포들이 고유기능을 상실할 가능성이 많으므로 음경해면체 조직의 과산화반응과 발기부전 증상과는 상당히 관련이 있을 것으로 예상할 수 있다. STZ를 투여하여 발기부전 모델동물을 만든 후 金櫻子 抽出物을 투여하여 음경해

면체 조직중의 과산화지질의 함량을 관찰하였을 때 STZ를 투여한 발기부전 모델동물에서 현저하게 증가하던 과산화지질 함량이 金櫻子 抽出物을 투여로 정상군 수준으로 감소되고 있음을 볼 수 있었다. 이러한 실험 결과는 金櫻子 抽出物이 음경해면체조직에서 지질의 과산화반응을 억제시켜 과산화지질에 의해서 나타날 수 있는 독성작용을 억제시켜 STZ의 투여에 의해서 나타날 수 있는 발기부전 증상¹⁵⁾을 치료할 수 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과들을 종합하여 볼 때 당뇨는 음경해면체에서 신경원 NOS 활성도를 감소시키고 이와 병행하여 혈관평활근 이완인자인 NO의 생성이 저해되어지므로 음경해면체 평활근의 이완장애를 야기하여 발기부전을 일으키는 것으로 사료되어지는데 이러한 발기부전 증상을 金櫻子 抽出物이 개선시키는 약리작용을 지니고 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 실험 결과는 향후 신경인성 발기부전의 병인 규명과 진단에 기여할 것으로 생각되며 추후 계속적인 연구를 수행할 예정이다.

V. 結 論

韓醫學에서 補腎益肝, 滋精固腸 효능으로 遺精, 遺尿, 崩漏, 帶下, 陽痿, 滑泄, 疝氣 등의 치료에 활용되는 약재인 金櫻子의 발기부전 개선효과를 관찰하고자 본 실험을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 시험관내에서 nitric oxide synthase 활성은 金櫻子 抽出物 첨가에 의해 별다른 영향을 받지 않았다.
2. 시험관내에서 xanthine oxidase 활성과 형전환비, 과산화지질 함량을 관찰하였을 때 金櫻子 抽出物의 첨가 농도 의존적으로 억제되었다.
3. 실험동물에 金櫻子 抽出物을 투여하였을

때 투여 기간과 투여 용량 의존적으로 nitric oxide synthase 활성을 증가시켰다.

4. 발기부전 모델동물에서 현저하게 억제되던 nitric oxide synthase 활성이 金櫻子 抽出物 투여에 의해 유의성 있게 증가되었다.

5. 발기부전 모델동물에서 현저하게 억제되던 음경해면체 조직중의 nitrite 함량이 金櫻子 抽出物の 투여에 의해 증가되었다.

6. 발기부전 모델동물에서 현저하게 증가하던 음경해면체 조직중의 xanthine oxidase 활성과 형전환비가 金櫻子 抽出物 투여에 의해 정상 수준으로 감소되었다.

7. 발기부전 모델동물에서 유의성 있게 감소하던 음경해면체 조직중의 glutathione 함량이 金櫻子 抽出物 투여에 의해 정상 수준으로 증가 되었다.

8. 발기부전 모델동물에서 현저히 증가하던 과산화지질 함량이 金櫻子 抽出物 투여에 의해 정상 수준으로 감소하였다.

參考文獻

- 1) 김세철 : 남성성기능장애의 진단과 치료, 서울, 일조각, p. 36, 70, pp. 184-162, 1995.
- 2) 신호승, 최형기 : 당뇨병 발기부전의 原因, 대한비뇨기과학회지, 31(3):442-445, 1990.
- 3) Saenz de Tejada, I., Blanco, R., Goldstein, L., Azadzi, K., Morenas, A., Krane, R.J. and Cohen, R. A. : Cholinergic neurotransmission in human corpus cavernosum. I. Responses of isolated tissue. *Am. J. Physiol.*, 254: H459-H467, 1988.
- 4) Adaekan, P. G. and Ratnam, S. S. : Pharmacology of penile erection in humans. *Cardiovasc. Intervent. Radiol.*, 11:191-194, 1988.
- 5) Saenz de Tejada, I., Goldstein, I. and Krane, R. J. : Local control of penile erection. *Urol. Clin. N. Amer.*, 15.1:9-15, 1988.
- 6) Hedlund, H. and Andersson, K. E. : Contraction and relaxation induces by some prostanoids in isolated human penile erectile tissue and cavernous artery. *J. Urol.*, 15.1:9-15, 1988
- 7) Saenz de Tejada, I., Goldstein, I., Azadoi, K., Krane, R. I. and Cohen, R. H. : Impaired neurogenic and endothelium mediated relaxation of penile smooth muscle from diabetic men with impotence. *New Engl. J. Med.* 320: 1025-1030, 1989.
- 8) Palmer, R. M. J., Ashton, D. S. and Moncada, S. : Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 333:664-666, 1989.
- 9) Rajfer, J., Arosen, W. J., Bush, P. A., Dorey, F. J. and Ignarro, L. J. : Nitric

- oxides as mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N. Engl. J. Med.*, **326**:90-94, 1992.
- 10) Knispel, H. H., Goessl, C. and Beckmann, R. : Basal and acetylcholine-stimulated nitric oxide formation mediates relaxation of rabbit cavernous smooth muscle. *J. Urol.*, **146**:1429-1433, 1991.
- 11) Azadzo, K. M., Kim, N., Brown, M. L., Goldstein, I., Cohen, R. A. and Saenz de Tezada, I. : Endothelium derived nitric oxide and cyclooxygenase products modulate corpus cavernosum smooth muscle tone. *J. Urol.*, **147**:220-225, 1992.
- 12) Kim, N., Azdzo, K. M., Goldstein, I. and Saenz de Tezada, I. : A nitric oxide-like factor mediates nonadrenergic-noncholinergic neurogenic relaxation of penile corpus cavernosum smooth muscle. *J. Clin. Invest.*, **88**:112-118, 1991.
- 13) Bush, P. A., W. J., Buga, G. M., Razfer, J. and Ignarro, L. J. : Nitric oxide is a potent relaxant of human and rabbit corpus cavernosum. *J. Urol.*, **147**:1650-1655, 1992.
- 14) Pickard, R. S., Powel, P. H. and Zar, M. A. : The effect of inhibitors of nitric oxide biosynthesis and cyclic GMP formation on nerve-evoked relaxation of human cavernosal muscle. *Br. J. Pharmacol.*, **104**:755-759, 1991.
- 15) Vernet, D., Cai, L., Garban, H., Babbitt, M. L., Murray, F. T., Rajfer, J. and Gonzalez, N. F. : Reduction of penile nitric oxide synthase in diabetic BB/WORdp(Type I) and BBZ/WORdp (Type I I) rats with erectile dysfunction. *Endocrinology*, **136**(12), 5709-5717, 1995.
- 16) 杜鎬京 : 東醫腎系學, 서울, 東洋醫學研究院, pp. 610-616, 1991.
- 17) 徐平 : 實用中醫腎病學, 서울, 一中社, pp. 475-477, 1992.
- 18) 최훈섭, 김철중 : 陽痿에 대한 문헌적 고찰, *혜화의학*, **5**(1): 212-235, 1996.
- 19) 江海身, 康力生 : 中醫男科講座, 북경, 中國醫藥科技出版社, pp. 94-111, 1992.
- 20) 林蘭 主編 : 糖尿病的中西醫結合論治, 北京科學技術出版社, p. 328, 1992.
- 21) 李尙仁 : 本草學, 醫藥社, 서울, p.185, 1975.
- 22) 申佶求 : 申氏本草學, 壽文社, p.204, 1982.
- 23) 李彪 主編 : 中國傳統性治療學, 三環出版社, p.413, 1991.
- 24) H. C. Chung : Role of nitric oxide in penile erection, Ph. D. thesis, Yeungnam Univ., 1995.
- 25) Stirpe, F. and Della Corte, E. : The regulation of rat liver xanthine oxidase : Conversion *in vitro* of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J. Biol. Chem.*, **244**, 3855-3863, 1969.
- 26) Schmidt, H. W., Smith, R. M., Nakzue, M. and Murad, F. : Ca²⁺/Calmodulin-dependent NO synthase Type-1: A bipteroflavoprotein with Ca²⁺/Calmodulin-independent diaphorase and reductase Activities. *Biochem.*, **31**, 3243-3249, 1992.
- 27) Tracey, W.R., Linden, J., Michael, J.P. and Roger. A.J.: 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. Pharmacol.*, **252**, 922-928, 1990.

- 28) Ellman, G. L. : Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77, 1959.
- 29) Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaki, K. : Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358, 1979.
- 30) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
- 31) 李鶴松 : 泌尿器科學, 서울, 東明社, pp. 426-428, 1975.
- 32) Chirist, G. J. : The penis as a vascular organ, *Urol Clin North Am.*, **22**(4): 727-745, 1995.
- 33) 송봉근 : 발기부전 치료의 한의학적 접근 방법에 관한 연구, 대한한의학학회지, **17**(2):74-76, 1996.
- 34) Brecht, D. S., Ferris, C. D. and Snyder, S. H. : Nitric oxide synthase regulatory sites. *J. Biol. Chem.*, **267**(16), 1976-1981, 1992.
- 35) Dawson, T. M., Dawson, V. L. and Snyder, S. H. : A novel neuronal messenger molecule in brain : The free radical, nitric oxide. *Ann. Neurol.*, **32**, 297-311, 1992.
- 36) 余永譜 : 中醫治療內分泌代謝病, 浙江科學技術出版社, p.184, 1992.
- 37) 楊思澍 外 : 中醫臨床大全, 醫聖堂, 서울, p.534, 1993.
- 38) 盧祥之 編著 : 益壽延年 二百方, 中國中醫藥出版社, p. 170, 1991.
- 39) 許國振 編著 : 男科中成藥便覽, 學院出版社, pp.2-3, 1993.
- 40) 許俊 : 東醫寶鑑, 南山堂, 서울, p.23, 1992.
- 41) 張景岳 : 景岳全書, 人民衛生出版社, 北京, p.1574, 1995.
- 42) 李時珍 : 本草綱目, 醫聖堂, 5권 부록, 1993.
- 43) 周王朱楠 撰 : 普濟方, 人民衛生出版社, 北京, p.837, 1982.
- 44) Beauchamp, C. and Fridovich, I. : A mechanism for the production of ethylene from methional : The generation of the hydroxyl radical by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **245**, 4641-4646, 1970.
- 45) Kreintsky, T. A., Tuttle, J. V., Cattau, E. L. and Wang, P. : A comparison of the distribution and electron acceptor specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. *Comp. Biochem. Physiol.*, **49B**, 687-703, 1974.
- 46) Pryor, W. A., Stanley, T. P. and Blair, E. : Autoxidation of polyunsaturated fatty acids(II), *Lipids*, **11**, 370-379, 1976.
- 47) Ross, D. : Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents : Mechanism of free radical induced toxicity and glutathione dependent protection. *Pharmacol. Ther.*, **37**(2), 231-239, 1988.
- 48) Boyland, E. and Chasseud, L. F. : The role of glutathione and glutathione S-transferase in mercapturic acid biosynthesis. *Adv. Enzymol.*, **32**, 173-219, 1969.
- 49) David, R. : Mechanistic toxicology: A radical perspective. *J. Pharm. pharmacol.*, **41**, 505-511, 1989.
- 50) Barry, H. : Oxidants and human disease : Some new concepts. *FASEB. J.*, **1**, 358-364, 1987.

ABSTRACT

Effect of the *Rosae laevigatae Fructus* extract on the nitric oxide synthase activity and antioxidan action in Rat's corpus cavernosum penis.

Kyung-dong Kim, Ji-cheon Jeong
Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine,
Dongguk University

Rosae laevigatae Fructus extract (RLF) was tested for the effects on the urethral nitric oxide synthase (NOS) activity and Antioxidation in streptozotocin (STZ) induced diabetic rats. RLF was treated firstly into samples, and then STZ induced diabetic rats were set with them.

In vitro, the urethral NOS activity was not noted but the type O activity and type conversion ratio of xanthine oxidase and the level of urethral lipid peroxide were decreased in the level of Dose of extract prepared from RLF.

In vivo, after the extract was administered to the animal model for fifteen days, the urethral NOS activity increased in STZ induced diabetic rats to the level of normal rats.

The content of urethral nitrite and glutathione followed by RLF pre-medicating administration, increased as highly as normal group in compare with the group treated with STZ. The type O activity and type conversion ratio of xanthine oxidase and the level of urethral lipid peroxide followed by RLF pre-medicating administration, decreased as lowly as normal group in compare with the group treated with STZ.

In conclusion, the extract of RLF will be able to restore erectile dysfunction of STZ induced diabetic rats.

Key Words : *Rosae laevigatae Fructus*, nitric oxide synthase, nitrite, lipid peroxide, xanthine oxidase, erectile dysfunction.