KH-304의 항산화효과 및 Old rat model 에서의 Erectile dysfunction에 미치는 영향

이은정 · 이현지 · 김희석 · 황성완 · 황성연*

주) KMSI 부설 한국의과학연구소

Effect of Water Extract of KH-304 on Anti-oxidant and Erectile dysfunction in Old Rat

Eun Jeong Lee, Hyun Ji Lee, Hee Seok Kim, Sung Wan Hwan, Sung Yeoun Hwang*

Korea Medical Science Institute, Incheon

The fallowing are the result of the experimental studies of KH-304 on the penile nitric oxide synthase (NOS) activity, SOD and the level of blood testosterone in old rat. KH-304 was tested for the expression and activity of eNOS, nNOS, SOD/Mn, caveol in-1, 3 in penis of old-rat. The penile expression level of the five enzyme were increased significantly after oral administration of the KH-304 100mg/kg for 10days and the concentration of testosterone in the blood were increased. In vitro, the effect of SOD and free radical scavenging were increased significantly. Conclusively, KH-304 is capable of improving of sexual ability in old-rat.

Key words : NOS, SOD, Old-rat, testosterone, erectile dysfunction

서 론

인간을 포함한 모든 호기성 생물체는 산소를 이용하여 에너지 대사를 진행하며 그 과정에서 항상 발생하는 활성산소의 상해에 대하여 근본적으로는 자기방어 기구를 구비하고 있지만 조직의 방어능을 초월한 활성산소의 생성은 최근 성인병이라 불려지는 관절염, 순환기장애 뿐만 아니라 암등과 같은 여러질환의 원인이 되고 있다.[1-2] 흔히, 유해산소라 불려지는 활성산소는 안정한 산소인 $^3O_2$가 산화, 환원반응을 거치면서 생긴 짝짓지 않는 불안전한 이온의 상태이기에 운동력이 크며 고온에서 더욱 자유로운 화학물질로서 단백질, DNA, 효소 및 T세포 와 같은 면역계통의 인자를 손상시켜 질환을 일으키고 특히 불포화 지방산을 공격하여 과산화반응을 일으켜 체내과산화 지질을 축적함으로 인해 생체기능이 저하되고 동시에 노화 및 성인병 질환을 유발하는 것으로 알려졌다[3].

현재, 노화와 성인병 질환의 원인이 활성산소에 기인된 것이라는 학설이 있으며[4] 발기 부전은 음경해면체 조직내의 동맥 또는 세동맥 평활근의 이완반응에 이상이 생기거나 음경해면체 근육의 경직 유지실패에 기인하여 나타나는 일종의 성기능 장애로 세포의 노화 와 밀접한 관련이 있는 것으로 보고 되고 있다.[5] 일반적으로 남성은 여성과 달리 노화에 따른 생식기능과 성기능의 갑작스러운 감퇴를 경험하지는 않으나 남성의 노화에 따른 남성호르몬치의 점진적 감소로 인해 남성화와 생식기능의 감소, 성교회수와 성욕감퇴등의 성기능 저하를 경험하게 된다.[6] 활성산소는 직접적으로 발기부전에 관여하지는 않지만, 활성산소에 의한 체내 스트레스의 누적으로 인하여 피로도 경감 및 생체를 보호하는 약리작용을 지니고 있을 것으로 사료된다

따라서, 전보에서 발표한 KH-304를 노화쥐 모델을 선정하여, 일반적으로 성기능에 관련된 NOS측정하였으며, 항산화 효능이 있는 SOD를 western blot을 실시하였으며 남성호르몬 수치를 비교, 유의성 있는 결과를 얻었으므로 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시료의 조제

KH304는 토사자 복분자 음양곽을 각각 다른 비율로 배합하여 총 100g이 되게 하고 증류수로 환류장치를 한 용기에서 4시간

* 교신저자 : 황성연, 인천시 연수구 송도동 7-20 한국의과학연구소

· E-mail : nexia@kmsi.co.kr, · Tel : 032-255-2500

· 접수 : 2006/05/20 · 수정 : 2006/07/05 · 채택 : 2006/07/26

2회씩 수욕상에서 추출한 후 여과한 후, 여액을 감압 농축, 동결건조 과정을 거쳐 갈색분말로 만들어 시료로 사용하였다. 토사자는 경원생약에서 복분자와 음양곽은 각각 옴니허브에서 제공 받았다.

2. 실험 시약 및 기기

전압전류공급기(Thermo EC), Heating Block, Oribital shaker(FINEPCR) 저속 미세 원심 분리기(Hanil) 항온수조용 Shake Incubator(EYELA) Skim milk(DIFCO) Tris base, Tris Hcl, Nacl, Trypsin inhibitor(Sigma) 30% Acrylamide, TEMED, protein assay(Bio-rad), membrane(Hybond), Tween(Daejung), Aprotinin(Fluka), SNAP(Tocris), Dithiothreitol(Acros) ECL(Amersham Biosciences)를 사용 하였으며 기타 본 실험에 사용한 시약은 세포 배양 및 분석용 특급시약을 사용하였다.

3. 실험동물 및 사육조건

노화쥐(평균 21개월)를 중앙 실험 동물에서 분양 받아 최소 일주일간 본 회사 실험 사육장 환경에 적응 시킨 후 사용하였다. 사육장은 인공조명에 의하여 조명시간을 아침 7시부터 저녁 7시 까지 12시간으로 조절하였으며 실내온도는 18-23℃로 유지하였다. 급수는 정수된 물을 사용하였으며, 사료와 급수는 제한하지 않았다.

4. 시료의 투여

KH304 노화백쥐 에서 발기부전 실험은 21개월 된 수컷 흰쥐를 일주일 동안 실험실 환경에서 적응 후 각군당 5마리씩 정상대조군(Normal)과 실험 대조군(Control) 그리고 실험군인 KH304 100, 300mg/kg으로 나누어 7일간 경구투여 하였다. 체중과 식이 섭취량은 실험사육기간 중 매일 오전 9시에 측정하고, 식이 잔량을 산출하였다.

5. 조직채취 및 효소원 제조

사육기간 종료 후 에테르로 채워진 Desicator로 동물을 마취시킨 후 하복부를 절개하여 복부 대동맥으로부터 혈액을 채혈하고 희생시킨 다음 음경과 고환을 적출하였다. 적출한 조직은 0.9%생리식염수로 혈액을 씻고 여과지로 염 용액을 제거한 뒤 무게를 측정한 다음, 즉시 액체 질소에서 급속 동결하였다. 한편 채혈된 혈액은 Heparin처리된 tube로 즉시 옮겨 담고 2500rpm (4℃)에서 15분간 원심 분리하여 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장과 장기는 사용 전 까지 -70℃에서 보관하였다. 조직내 효소원제조는 200nM Hepes, 320mM sucrose, 1mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), 1mM dithiothreitol(DTT), 10ug/mL leupeptin, 2ug/ml aprotinin, 1ug/mL pepstatin, 10ug/mL trypsin inhibitor, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF) 용액에서 균질화 시킨 후 원심분리하여(4℃, 10000 rpm, 15분간) 상층액을 단백질 정량 후 -70℃에 보관하였다.

6. Western blotting

Bovine serum albumin을 사용한 Bradford방법을 이용해 정량한 단백질 30ug을 95℃에서 5분간 변성시킨 후 12% discontinuous sodium dodecylsulfate(SDS-PAGE)-polyacrylamide gel에서 전기영동 하였다. 전기영동된 단백질은 25volt에서 2시간 30분 동안 0.2μm polyvinylidene difluoride(PVDF. Amershambioscience. USA)막에 이동시켰다. 전기영동 된 membrane은 blocking buffer (5% skim milk in TBS-T buffer)으로 30분간실온에서 반응하여 차단하였다. SOD/Mn, Caveolin-1, Caveolin-3, eNOS, nNOS, (BD Biosciences, USA) 각 항체들을 2시간 동안 반응시킨 후 TTBS를 사용하여 10분 간격으로 3회 세척 하였다. 2차 항체 anti-mouse IgG-HRP, anti-goat IgG-HRP(1:2,000 dilution) (Zymed Laboratories, USA)를 실온에서 1시간 동안 반응 시킨 후 세척단계를 거쳐 다시 한번 TTBS로 5분간 6회 세척하였다. ECL 용액으로 2분간 반응하고 Kodac필름에 감광하여 나타난 band의 두께를 비교하여 단백질 발현 유무 및 그 차이를 확인하였다.

7. 혈장 Testosterone측정

Testosterone 함량은 냉동 보관된 혈장을 4℃에서 녹인 다음 혈장 내 steroid displacement reagent를 처리 후 immunoassay kit(R&D Systems, USA)를 이용하여 측정하였다.

8. Free radical scavenging측정

에탄올로 용해시킨 DPPH용액을 247.5ul씩 96-well plate에 Multi-channel pipette으로 분주하고 여기에 시료를 2.5ul씩 첨가하여 최종 반응용액이 250ul가 되도록 하였다. 이를 30분 동안 반응시킨 후 Microplatereader를 사용하여 520nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH용 액의 농도는 $1.5*10^{-4}$ M 로 하였으며 대조약물은 ascorbic acid를 사용하 였고 각 Sample 의 ED 50 값을 구하여 free radical소거 능력을 측정하였다.

9. Superoxide dismutase 측정

SOD(Superoxide dismutase)의 활성 측정은 hematoxylin 을 이용한 Martin 의 방법을 사용하였다. Hematoxylin은 자연상태에서 붉은색인 hematin으로 자가 산화한다. 이러한 과정에 SOD가 관여하면 자동산화를 억제하게 된다. 0.1mM EDTA가 함유된 50mM potassium phosphate buffer(pH 7.5)1ml 에 각각의 sample 50ul 씩 가하고 5분동안 preincu bation 시킨다. 여기에 5mM hematoxylin을 30ul을 가한 후 phosphate buffer 를 Blank로 하여 UV/visible spectrophotometer를 사용해 568nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

10. 통계처리

측정된 결과는 평균값과 표준 편차(mean±SD)로 표시 되었다. 대조군 간의 비교를 위해서는 Student t-test 를 사용하였으며 $p < 0.05$인 경우 유의한 차이로 간주 하였다

결 과

1. Old-rat에서의 NOS 단백질 발현

KH-304 열수추출물의 음경조직 내 단백질 발현 증가 양상

변화를 측정하기 위하여 노화쥐에서 100, 300mg/kg 농도로 10일간 경구투여하여 western blot 실험하였다. Fig. 1은 eNOS, nNOS 의 단백질 발현정도를 나타내는 것으로 노화 대조군(control) 과 비교해 볼 때 KH304 투여군에서 효과적으로 증가하였으며, 100, 300mg/kg 두 그룹간 차이는 보이지 않았다.

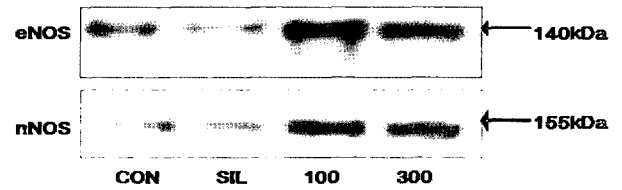

Fig. 1. After old-rat oral administration of the KH-304 water extract, 100mg, 300 mg per 1kg of body weigh for 10 days. We examined the expression and activity of two enzyme: neuronal NO synthase (nNOS), endothelial NO synthase (eNOS)
- SIL:Sildenafil - CON:Control

2. Old-rat에서의 SOD 단백질발현

Fig. 2는 KH304를 노화쥐에게 100, 300mg/kg 경구투여 하였을 경우 항산화에 관련된 SOD/Mn, NOS 와 길항작용을 하는 caveolin -1,3에 대한 단백질 발현 정도를 나타낸 것이다. KH304 투여군이 노화대조군에 비교하여 의미있는 발현증가를 보였으며 KH-304농도 의존적 효과가 있음을 확인하였다.

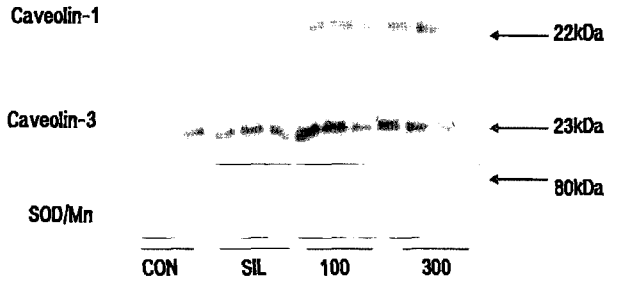

Fig. 2. After old-rat oral administration of the KH-304 water extract, 100mg, 300 mg per 1kg of body weigh for 10 days. We examined the expression and activity of three enzyme: Caveolin-1,3, Sod/Mn.
- SIL:Sildenafil - CON:Control

3. Old-rat 혈청에서의 Testosteron의 농도 측정

노화쥐에서 KH304를 10일간 100, 300mg/kg경구투여 한 후 남성 호르몬에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈장 내 testosterone 농도변화를 측정하였다.(Fig. 3) 노화흰쥐의 실험 대조군의 혈청 내 testosterone농도는 343.2±11.5 pmole/ml이었고, KH-304 100, 300mg/kg투여군에서는 각각 560±15.3 pmole/ml, 615±1 7.6 pmole/ml로 유의있게 증가하였다.($P< 0.05$)

4. Free radical scavenging 에 미치는 영향

KH-304열수추출물을 1, 10, 50, 100, 500ug/ml으로 희석하여 Free radical scavenging 능력을 측정하였다. 각 군별로 KH304추출물은 농도 의존적으로 유의하게 증가 ($P<0.05$) 하였으며 KH304 500ug/ml는 8.88±0.12 pmole/m로 소거능력을 보였다. 대조군인 ascorbic acid는 50ug/ml로 처리하였을 경우 9.98±0.12 pmole/ml농도를 나타내었다. (Fig. 4)

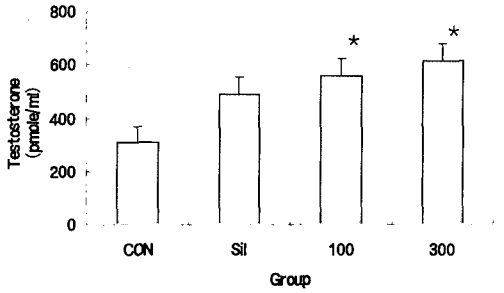

Fig. 3. Effect of the extract of KH-304 on the level of blood testosteron in old-rat. rats were received with KH-304 extract (100, 300mg/kg) daily for 10days. All values are mean±SD. p<005: significantly different from control group

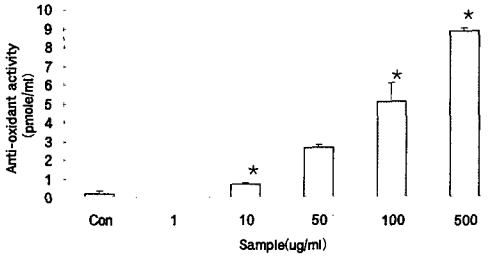

Fig. 4. Effect of the extract of KH-304 on DPPH free radical scavenging activity. All values are mean±SD. p<005: significantly different from control group

5. Superoxide anion radical 함량에 미치는 영향

KH-304 열수추출물을 1, 10, 50, 100ug/ml 으로 희석하여 약물 처리 하였을 경우 SOD 함량이 농도 의존적으로 증가하였다. (Fig. 5) KH304 10, 100ug/ml은 2.17±0.1 pmole/ml, 3.49±0.1 pmole/ml 로 유의성을 있는 결과를 보였으며 이는 oxygen free radical의 생성을 억제시켜 Oxidative stress를 해소함으로써 저하된 성기능을 회복시킬 것으로 사료된다.

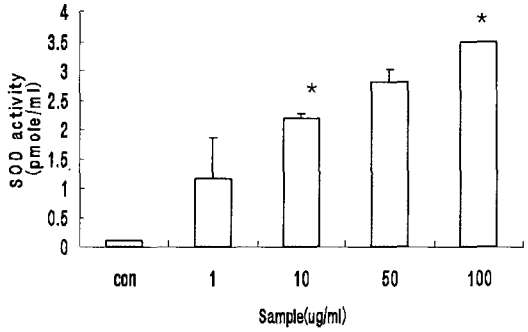

Fig. 5. Effect of the extract of KH-304 on Superoxide dismutase level. All values are mean±SD. p<005: significantly different from control group.

고 찰

자유라디칼이란 하나 또는 여러 개의 홀수 전자를 지닌 분

자를 의미하며 생체내의 분자들과 활발히 반응 하여 여러 병적 상태를 유발하는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 활성산소들의 수와 활성의 증가로 세포손상과 변성이 활발히 일어나는 단계를 산화성 자극이 증가하였다고 하며 건강상태에서도 기저수준의 산화성 자극이 존재하나 만성질병, 노화, 중독, 손상 등 에서는 병적으로 산화성 자극이 증가하여 세포손상과 고사를 유도하는 것으로 알려져 있다. 인체는 이를 예방하기 위한 다양한 항산화 기전을 가지고 있으나 이를 초과하는 산화성 자극의 증가는 필연적으로 질병의 발생과 진행을 가져오게 된다.[7]

생체에서 생리적으로 발생하는 활성산소를 조절하는 기전은 두 개의 방법이 있는데 하나는 활성산소의 발생과 확산범위를 제한하는 것이며 다음으로는 항산화제를 이용하여 제거하는 것이다. 그러나 병적 상태에서는 활성산소가 항산화제에 비해 많으며 그로 인한 과산화물의 증가로 산화성 자극이 증가하게 된다.

발기부전은 성관계의 50%이상에서 강직성 발기가 일어나지 않거나 일어나더라도 유지가 안되는 경우로 심인성과 기질성으로 대별된다.[8] 기질성 발기부전은 다시 그 원인에 따라 신경인성, 혈관성, 배분비성 발기부전 증으로 분류되지만 기능장애의 유형에 따라 유도장애, 충만장애, 저장장애 등으로 분류할 수 있다. 음경의 발기는 신경정신적인 자극에 의해서 해변체 내의 동맥과 동상 혈관공내의 혈관 확장에 의해서 일어나고 동상 혈관공 이완은 일차적으로 비아드레 날린성,비콜린성 신경전달물질과 EDRF의 분비에 의해 이루어진다.[9] 이들은 nitric oxide의 유사물질로서 NO 제거제 및 NO 합성 억제와 관련이 있다. NO는 혈관 평활근의 이완인자로서 혈관팽창을 유도하여 혈액유입량을 증가시킴으로써 음경의 팽창을 유발시키는 내인성 물질로 nitric oxide synthase에 의해서 생합성 되어지고 생합성된 nitric oxide는 직접적으로 혈관 평활근의 확장에 관여하게 된다.[10,11] 따라서 음경의 혈액유입량의 감소로 인한 발기부전 증상은 nitric oxide의 생성을 촉진시키는 factor의 조절로 개선 할 수 있을 것으로 생각된다.

특히, 노화가 진행되면서 음경발기에서 중요한 nNOS활성은 감소하고 혈관속 Caveolin과 eNOS 가 계속 감소함으로 혈관의 탄력성 및 혈액의 유입량이 적어짐에 따라 치료 목적으로는 nNOS및 관련 NOS의 단백질을 촉진시켜야 한다. old rat모델에서 KH-304를 100, 300mg/kg을 투여 했을 경우 nNOS와 eNOS가 증가 하였고, eNOS와 길항작용을 하는 Caverolin-1, 3또한 단백질 함량을 증가 시켰다.(Fig. 1) NO는 Free radical인 Superoxide anion과 반응하여 독성중간 물질인 Peroxynitrite를 형성하게 된다. Peroxynitrite는 염증시에 생성되며 주로 마크로파지, 호중구, 내피세포에서 생성되는 데 이는 thiol산화, 지질과산화등을 야기하며, 세포독성을 가지고 tyrosine, lysine, arginine등의 아미노산을 변형시키며, 에너지 대사, DNA 손상등의 강력한 조직 손상작용을 가진다. 일부 NO의 반응으로 생긴 peroxynitrite형성하는 것을 세포내에 Cu/SOD, 사립체 안의 Mn/SOD가 조절 함으로써 세포내 단백질 변성 및 세포내 신호전달 장애를 예방할 수 있다.[12] 따라서 SOD/Mn는 NO와 밀접한 관계가 있으며 KH-304를 경구투여 한 후 노화쥐 Penis에서 단백질 발현을 측정한 결과 300mg일때 가장 뚜렸하였다.

건강한 남성의 노화과정에서 일어나는 호르몬의 변화가 발기부전에 미치는 영향에 대한 정확한 연구 결과나 정설도 아직 확립되어 있지 않지만 성선기능 저하증에 관한 동물실험이나 남성 호르몬 보충요법의 결과, 남성호르몬은 성적욕구 및 흥미의 증가, 야간발지의 감지 증가, 성적 자극에 대한 또한 무의식 증가, 강직도 등 발기의 질적 향상, 발기지속시간의 연장 및 사정기능을 증대시키는 등 남성호르몬은 성기능의 유지와 발현에 필수적이다.[13] 남성은 해마다 총 테스토스테론치의 0.4%,유리형 테스토스테론치의 1.2%가 감소하며 총 테스토스테론치의 감소는 55~6세에 이르러 유의하게 나타나고 75세에는 30세의 60%정도로 감소된다.[14] 노화로 인하여testosteron치가 상대적으로 낮은 old rat모델에서 KH-304를 투여한 결과 100, 300mg/kg 그룹에서 control보다 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다

Oxygen free radical은 세포막의 불포화 지방산을 쉽게 과산화 시킴으로써 세포막을 손상하고 비정상적인 체내 반응과 생리활동을 유발할수 있는데 KH-304의 Free radical scavenging 능력을 조사한결과 농도의존적으로 소거를 시키는 능력을 보였다. 따라서, 이상의 실험결과들을 종합하여 볼 때 KH-304는 Oxygen free radical 의 생성을 억제시음경조직의 oxidative stress를 해소함으로써 저하된 성기능을 회복시키고 동시에 음결발기인자인 Nitric oxide의 생성을 증가시켜 발기부전 증상을 회복시킬 수 있을 것이라 사료 된다.

결 과

저자들은 전보에서 일반 쥐에서 발기부전에 효과를 보인 KH304를 old rat 모델에 적용하여 해면체 이완에 관련된 세포내 신호전달체계 NO-c GMP pathway에 관여하는 NOS 의 단백질 발현 정도를 측정, Testosteron, 항 산화 테스트를 해 본 결과 노화와 관련된 모든 수치에서 뛰어난 활성을 나타내었다. 따라서, 실험동물을 이용한 다양한 발기부전 효능 검색 등의 좀 더 구체적인 작용기전 연구가 수행된다면 발기부전 치료제 천연물 신약 후보 물질이 될 수 있으리라 생각된다.

참고문헌

1. Halliwell, B. Drug antioxidant effects. Drugs. 42, 569-605, 1991.
2. Fukuzawa, K., Takaishi, Y. Antioxidants, J. Act. Oxyg. Free Rad, 1, 55-70, 1990
3. 차배천, 이성규, 이혜원, 이은, 최무영, 임태은, 박희준. 국내 유용식물의 항산화효과. 생약학회지 28(1):15-20, 1997.
4. Kitahara, K., Matsumoto, Y., Ueda, H., Ueoka, R. A remarkable antioxidation effect of natural phenol derivatives on the autoxidation of r-irradiated methyl linolete. Chem. Pharm. Bull, 40, 2208-2209, 1992.
5. 김제종. 남성노화에 따른 성기능의 변화. 18(1):1-5, 2000.
6. Bancroft, J.W., Wu, F.C. Changes in erectile responsiveness

during androgen therapy. Arch Sex Behav, 12(2):59-66, 1983.
7. Masaki, H., Sakaki, S., Atsumi. T. Active-oxygen scavenging activity of plant extracts. Chem. Pharm. Bull, 18(1):162-166, 1995.
8. 이종욱. 비뇨기과학. 서울, 고려의학, pp 462-463, 1996.
9. Kurt, J. 내과학. 서울, 정담, pp 287-288, 1997.
10. Chung, H.C. Role of nitric oxide in penile erection, Ph .D. Thesis. Yeungnam Univ. 1995.
11. Schmidt, H.W., Smith, R.M., Nakzne, M., Murad, F. Ca^{2+}/ calmodulin dependent NO synthase Type-1 : A biopteroflavo-protein with Ca^{2+}/ calmodulin in dependent diaphorase and reductase activities. Biochem., 32(4):3243-3249, 1992.
12. Bruce N.A., Mark K.S., Tory M.H. Oxidants, anti oxidants and the degenerative diseases of aging. Proc. Natl.Acad.Sci 90(4):7915-7922, 1993.
13. Davidson, J.M, Chen, J.J. Crapo, L, Gray, G.D., Greenleaf, W.J, Hormonal changes and sexual function in aging male, J Clin Endocrinol Metabol, 57(2):557-562, 1983.
14. Carani, C.M., Scutery, A., Marrama, P., Bancroft, J. The effects of testosterone administration and visual erotic stimuli on nocturnal penile tumiscince in normal young men. Horm Behav 24(2):435-441, 1990.