

# 淫羊藿의 토끼 음경해면체 평활근 이완효과

김태연 · 김호현<sup>1</sup> · 박선영<sup>1</sup> · 박종필<sup>2</sup> · 김정범\*

세명대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 세명대학교 한의과대학 생리학교실, 2: 세명대학교 한방바이오산업 임상지원센터

## Relaxation Effects of *Epimedium Koreanum* Nakai in Isolated Rabbit Corpus Cavernosum Smooth Muscle

Tae Yeon Kim, Ho Hyun Kim<sup>1</sup>, Sun Young Park<sup>1</sup>, Jong Phil Bak<sup>2</sup>, Jeung Beum Kim\*

Department of Oriental Pathology, 1: Department of Oriental Physiology, College of Korean Medicine,  
2: The Clinical Trial Center for Bio-Industry, Semyung University

This study aimed to investigate the relaxation effects and its underlying mechanisms of *Epimedium koreanum* Nakai(EK) in phenylephrine(PE) treated isolated rabbit corpus cavernosum smooth muscle. The dose-dependent relaxation responses of phenylephrine(PE,  $1 \times 10^{-6}$  M)-precontracted strips to EK at 0.01-3.0 mg/ml were measured and also observed after endothelial denudation using organ bath. To analyze the underlying mechanisms of EK-induced relaxation, N $\omega$ -nitro-L-arginine(L-NNA), methylene blue(MB), tetraethylammonium chloride(TEA), indomethacin(IM) were pretreated before EK extract infused into precontracted strips induced by PE. To investigate cytotoxic activity and nitric oxide(NO) concentration of EK extract on EA.hy926 cells, mitochondrial dehydrogenase activity(MTT) assay and nitric oxide detection kit were used. The cavernous strips were significantly relaxed by EK extract at 0.3 mg/ml, 1.0 mg/ml, 3.0 mg/ml and the relaxation responses of PE-precontracted strips denuded endothelium also inhibited in comparison with intact endothelium. The pretreatment of L-NNA, MB, TEA reduced EK extract-induced endothelium-dependent relaxation, but the pretreatment of IM didn't affect EK extract-induced endothelium-dependent relaxation. When EK extract was applied on EA.hy926 cells, the NO concentration was increased. Our findings have shown that EK extract exerts a relaxing effect on corpus cavernosum in part by suppressing influx of extracellular Ca<sup>2+</sup> through activating the NO-cGMP system.

Key words : *Epimedium koreanum* Nakai(EK), corpus cavernosum, vasorelaxation

### 서 론

최근 인구의 고령화, 생활수준의 향상,性に 대한 사회적 인식 변화 등으로 인하여 발기부전을 비롯한 성기능 장애에 대한 일반인의 관심과 치료 요구가 증대하고 있다<sup>1)</sup>. 그러나 발기부전 치료제 성분인 '실데나필시트르산염', '바데나필염산염', '타다라필', '유데나필', '미로데나필염산염', '아바나필'은 두통·안면홍조·소화불량 등의 흔한 부작용과 더불어 코피·어지러움·복통·안구충혈을 유발하며 심근경색·뇌졸중·협심증·심부전·

\* To whom correspondence should be addressed at : Jeung Beum Kim,  
Department of Oriental Pathology, College of Korean Medicine, Semyung University, Semyeong-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do, Korea

· E-mail : violet805@hanmail.net, · Tel : 043-649-1706

· Received : 2014/01/10 · Revised : 2014/04/07 · Accepted : 2014/04/17

고혈압·저혈압의 기왕력이 있는 경우 심혈관계 질병 발생 위험을 증가시키므로<sup>2)</sup> 효과는 좋으면서 부작용은 적은 한방 발기부전 치료제를 찾으려는 노력들이 시도되고 있다.

韓方 强精劑로 알려져 있는 음양곽은 三枝九葉草의 全草로서 性溫 味甘辛하며 肝腎經으로 歸經하고 補腎壯陽, 祛風除濕의 효능이 있어 腎陽不足 陽痿不舉 淋瀝 風濕痺痛 四肢拘攣痲痺 등의 치료 및 補陽劑로서 腎陽을 强壯케 하는 要藥으로 다수의 처방에서 사용되어 왔다<sup>3,4)</sup>. 최근에는 남성 성호르몬양 효과로 전립선·고환·항문직근의 발달을 촉진하고 정액분비 및 성욕을 향상시켜 발기부전의 치료에 사용되는 것으로 보고<sup>4,10)</sup>되고 있으나, 실제 발기조작인 음경해면체 평활근에 작용하는 음양곽의 효과에 대한 기전 연구는 시행된 바가 없다.

음경발기의 중심인 음경해면체 평활근의 이완은 비아드레날린성 비콜린성 신경전달물질과 해면체 내피세포에서 분비되는

이완물질(endothelium derived relaxing factor, EDRF)에 의해 유발된다<sup>11)</sup>. 음경해면체 평활근 이완의 주 매개체로 알려져 있는 nitric oxide(NO)는 대표적인 EDRF로 내피세포에서 생성된 NO가 평활근 세포에서 cGMP를 증가시키면 세포의 Ca<sup>2+</sup> 유입이 차단되어 평활근 세포의 이완, 즉 발기가 일어나게 된다<sup>12)</sup>. 또 다른 EDRF인 endothelium derived hyperpolarizing factor(EDHF)는 평활근세포에서 세포막 과분극에 의한 칼슘 통로 폐쇄로 평활근 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도 감소를 초래하여 평활근세포의 내피세포의존성 이완을 발생시킨다<sup>13)</sup>. Prostacyclin(PGI<sub>2</sub>)은 해면체 평활근세포에서 cyclic adenosine monophosphate(cAMP)를 생성하는 EDRF로, cAMP는 세포질 내 Ca<sup>2+</sup> 농도 증가를 억제하고, myosin light chain kinase를 억제하므로 해면체 평활근이 이완되고 혈관이 확장되는 작용을 한다<sup>12)</sup>.

이에 저자는 수축된 음경해면체 평활근에 음양곽 추출물을 농도별로 처리하여 이완효과를 관찰하고, EDRF의 활성을 차단시키는 N $\omega$ -nitro-L-arginine (L-NNA), methylene blue(MB), tetraethylammonium chloride(TEA), indomethacin(IM)을 전처리 한 후 음양곽 추출물의 이완효과 변화와 세포수준에서의 NO 생성 촉진 여부를 확인하는 기전 연구를 진행하여 다수의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약제

본 시험에 사용한 음양곽(*Epimedium koreanum* Nakai)은 에이치엠에이엑스(HMAX, 충북 제천)에서 구매하여 사용하였다.

#### 2) 시약

Phenylephrine(PE), Tetraethylammonium chloride(TEA), Indomethacin(IM), Methylene blue(MB), N $\omega$ -nitro-L-arginine(L-NNA)은 Sigma-Aldrich Co. LLC.(USA)의 제품을, Sodium chloride(NaCl), Potassium chloride(KCl) Magnesium sulfate heptahydrate(MgSO<sub>4</sub>), Sodium hydrogen carbonate (NaHCO<sub>3</sub>), D(+)-Glucose anhydrous(C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), Calcium chloride dihydrate (CaCl<sub>2</sub>)는 JUNSEI CHEMICAL Co. Ltd.(JAPAN)의 제품을, Potassium phosphate monobasic(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Urethane은 DAEJUNG CHEMICAL & METALS Co. Ltd.(KOREA)의 제품을 구매하여 사용하였다.

#### 3) 동물

체중 2.0~2.5 kg의 Newzealand white 수컷 토끼(Samtako, Korea)를 사용하였으며, 토끼용 고형사료와 물을 충분히 공급하면서 1주 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 본 동물 실험은 세명대학교 동물실험윤리위원회의 승인(SMEAC 13-02-01)하에 실시되었다.

#### 4) 세포

사람의 제대정맥내피세포(human umbilical vein endothelial cells line)인 EA.hy926은 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하여 passage 3~7번까지 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 음양곽 추출물 제조

2구 flask에 음양곽(*Epimedium koreanum* Nakai) 150 g과 증류수 2000 ml을 함께 넣고 4시간 동안 가열 추출한 다음 rotary evaporator(NE-1001, Eyela, Japan)로 감압 농축한 후 -80℃에서 동결시켰다. 이를 다시 Freeze dryer system(Labconco, USA)을 이용하여 7일간 동결건조 시킨 후 22.1 g의 분말을 얻었다. 음양곽의 수득율은 14.73 %로 -20℃에 보관하였다가 실험 직전 회석하여 사용하였다.

#### 2) 음경해면체 절편의 혈관이완 기전에 관한 실험

##### (1) 해면체 절편의 제작

토끼를 urethane(0.6 g/kg, 정맥주사)으로 마취한 다음 음경을 적출하여 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)에서 음경 주위의 근육과 지방조직을 제거하였다. 실험절편은 음경해면체 주위의 백막을 제거한 다음 2 × 2 × 6 mm 크기의 절편으로 만들었다<sup>14,15)</sup>.

해면체절편은 내피세포가 존재하는 절편과 내피세포가 제거된 절편으로 구분하여 제작하였으며, 내피세포의 제거는 손으로 가볍게 문질러 제거하였다<sup>16)</sup>.

##### (2) 등장성 수축 측정

해면체절편은 95 %의 O<sub>2</sub>와 5 %의 CO<sub>2</sub> 혼합가스로 포화된 37℃의 modified krebs-ringer bicarbonate solution이 peristaltic pump를 통하여 3 ml/min의 속도로 흐르고 있는 organ bath(용량 1.5 ml)에 현수하였다. 해면체절편의 한쪽 끝은 organ bath의 바닥에 고정시키고 다른 쪽은 force transducer에 연결하여 장력을 측정하고 그 결과를 physiograph(PowerLab, Australia)로 기록하였다.

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

##### ① Phenylephrine(PE)으로 수축된 해면체에서의 변화 측정

해면체절편에 PE 1 μM을 투여하여 수축을 유발시킨 다음 음양곽 추출물을 농도별(0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg/ml)로 투여하고 수축의 정도를 기록하였다.

##### ② 내피세포 유무에 따른 이완효과 측정

해면체혈관의 내피세포가 존재하는 해면체절편과 해면체혈관의 내피세포가 제거된 해면체절편에 PE 1 μM을 투여하여 수축을 유발시킨 다음 음양곽 추출물을 농도별(0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg/ml)로 투여하고 수축의 정도를 비교하였다.

##### ③ N $\omega$ -nitro-L-arginine(L-NNA)의 전처치에 따른 이완효과 측정

해면체절편을 L-NNA 10 μM로 10분간 전처리하고 PE 1 μM을 투여하여 수축을 유발시킨 다음 음양곽 추출물(0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg/ml)을 투여하고 L-NNA를 전처리하지 않은 경우와 수축의 차이를 비교하였다.

④ Methylene blue(MB)의 전처치에 따른 이완효과 측정

해면체절편을 MB 1 μM로 10분간 전처치하고 PE 1 μM을 투여하여 수축을 유발시킨 다음 음양곽 추출물(0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg/ml)을 투여하여 MB를 전처치하지 않은 경우와 수축의 차이를 비교하였다.

⑤ Tetraethylammonium chloride(TEA)의 전처치에 따른 이완효과 측정

해면체절편을 TEA 10 μM로 10분간 전처치하고 PE 1 μM을 투여하여 수축을 유발시킨 다음 음양곽 추출물(0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg/ml)을 투여하여 TEA를 전처치하지 않은 경우와 수축의 차이를 비교하였다.

⑥ Indomethacin(IM)의 전처치에 따른 이완효과 측정

해면체절편을 먼저 IM 10 μM로 10분간 처치하고 PE 1 μM을 투여하여 수축을 유발시킨 다음 음양곽 추출물(0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg/ml)을 투여하여 IM을 전처치하지 않은 경우와 수축의 차이를 비교하였다.

3) 세포실험

EA.hy926은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Gibco, USA)을 사용하여 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였다. DMEM은 사용 전 10 % fetal bovine serum(FBS, Gibco, USA)과 1 % penicillin-streptomycin(Gibco, USA)을 넣고 잘 섞어서 사용하였다.

70~80 % 정도 confluent한 세포는 phosphate-buffered saline(PBS, Welgine, Korea)을 주입하여 씻어내고, trypsin/EDTA solution(2 ml)을 넣어 flask에 부착된 세포를 떼어낸 후 trypsin neutralizing solution을 첨가하여 원심분리(220 x g, 5분)하였다. 침전물에 새로운 배지를 넣어서 cell count하여 세포를 96 well plate(1.0 × 10<sup>4</sup> cells/well)에 심은 다음 24시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

(1) 세포독성 측정

DMEM으로 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> 하에서 24시간 배양한 EA.hy926을 다시 serum- free 배지로 음양곽 추출물을 농도별로 처리한 다음 24시간 배양하여 세포생존율을 MTT assay로 측정하였다<sup>17)</sup>. 0.05 % MTT(methylthiazol - 2 - yl - 2,5-diphenyl tetrazolium bromide)를 total volume의 10 %가 되도록 넣고, 37°C에서 4시간 처리하여 상층액을 제거한 뒤 formazan 침전물은 DMSO를 50 μl씩 넣어 약 15분간 녹였다. 570 nm의 파장에서 ELISA microplate reader(BioTek, Synergy II)로 흡광도를 측정하여 세포생존율을 계산하였다.

(2) Nitric oxide(NO) 측정

NO 생성 정도는 NO Detection Kit(INTRON Biotechnology, Korea)를 사용하여 측정하였다. 음양곽 추출물을 농도별로 처리한 다음 24시간 배양된 plate에서 상층액을 100 μl씩 취하여 새로운 96 well plate에 담았다. 상층액에 N1 buffer를 50 μl씩 넣고 10분간 37°C 조건하에서 1차 반응시킨 후 N2 buffer를 50 μl씩 넣고 다시 10분 동안 상온에서 반응시켰다. 이후 ELISA microplate reader(BioTek, Synergy II) 540 nm로 흡광도를 측정하였다.

NO 생성량은 1000 μM NO standard를 순차 희석하여 만든 표준곡선을 이용하여 생성된 NO의 양을 μM로 환산하여 계산하였으며 각 실험에서 기본 대조군은 세포 배양액을 사용하였다.

3. 결과도출 및 통계처리

실험결과는 평균 및 표준편차로 나타내었고, 해면체 혈관 수축의 변화는 실제 음양곽 추출물의 농도별 수축값과, 개체당 PE를 투여하여 유발된 실제 수축 변화 정도를 이완율 0%로 각각 설정한 후 음양곽 추출물 농도에 따른 이완율로 표현하였다.

실험결과의 비교는 Student's t-test를 시행하여, p-value가 0.05 미만인 경우에만 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. PE로 수축된 음경해면체에서 음양곽의 이완효과

음양곽 추출물은 음경해면체 평활근을 농도 의존적으로 이완시켰으며, 0.3 mg/ml, 1 mg/ml, 3 mg/ml의 농도에서는 유의성 있는 이완효과를 나타내었다(Table 1).

Table 1. Effects of *Epimedium koreanum* Nakai Extract on the Contraction of Isolated Rabbit Corpus Cavernosum Induced by PE

Treatment	Strength of contraction(g)	Relaxation(%)
PE	0.98 ± 0.23	-
PE + EK 0.01	0.94 ± 0.23	4.7 ± 3.5
PE + EK 0.03	0.91 ± 0.21	6.8 ± 4.2
PE + EK 0.10	0.85 ± 0.21	13.5 ± 4.3
PE + EK 0.30	0.78 ± 0.20*	21.1 ± 5.2
PE + EK 1.00	0.58 ± 0.16***	41.4 ± 7.4
PE + EK 3.00	0.18 ± 0.08***	82.0 ± 6.5

Values were expressed as means ± S.D. of 10 separate experiments. EK induced relaxations were expressed as percentage of PE-contraction. PE, Phenylephrine 1 μM; EK, *Epimedium koreanum* Nakai extract(mg/ml); \* p<0.05, \*\*\* p<0.001 compared with PE.

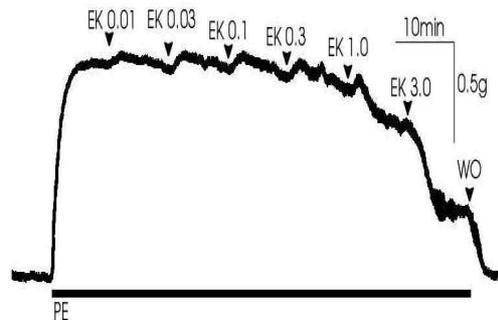


Fig. 1. Representative Recordings of the Effects of *Epimedium koreanum* Nakai Extract on the Contraction of Isolated Rabbit Corpus Cavernosum Induced by PE. PE, Phenylephrine 1 μM; EK, *Epimedium koreanum* Nakai extract(mg/ml); WO, wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

2. 음경해면체 혈관내피세포 제거에 따른 음양곽의 이완효과

음양곽 추출물은 해면체 혈관내피세포가 제거된 음경해면체 평활근을 농도 의존적으로 이완시켰으며, 1 mg/ml, 3 mg/ml 농도에서는 유의성 있는 이완효과를 나타내었다. 음양곽 추출물의 이완효과는 해면체 혈관내피세포가 제거되었을 시 0.1 mg/ml, 0.3

mg/ml, 3 mg/ml의 농도에서 유의성 있게 억제되었다(Table 2).

Table 2. Effects of *Epimedium koreanum* Nakai Extract on the Contraction of Isolated Rabbit Corpus Caverosum with Intact Endothelium or Denuded Endothelium Induced by PE

Treatment	Intact endothelium		Denuded endothelium	
	Strength of contraction(g)	Relaxation(%)	Strength of contraction(g)	Relaxation(%)
PE	0.98 ± 0.23	-	0.92 ± 0.24	-
PE + EK 0.01	0.94 ± 0.23	4.7 ± 3.5	0.91 ± 0.25	1.2 ± 2.5
PE + EK 0.03	0.91 ± 0.21	6.8 ± 4.2	0.89 ± 0.24	3.3 ± 4.6
PE + EK 0.1	0.85 ± 0.21	13.5 ± 4.3	0.86 ± 0.24	6.5 ± 5.5†
PE + EK 0.3	0.78 ± 0.20*	21.1 ± 5.2	0.80 ± 0.24	13.6 ± 7.7†
PE + EK 1.0	0.58 ± 0.16***	41.4 ± 7.4	0.63 ± 0.21*	32.4 ± 10.3
PE + EK 3.0	0.18 ± 0.08***	82.0 ± 6.5	0.32 ± 0.14***	65.7 ± 8.2††

Values were expressed as means ± S.D. of 7 separate experiments. EK-induced relaxations were expressed as percentage of PE contraction in ED-intact or ED-denuded corpus cavernosum. PE, Phenylephrine 1 μM; EK, *Epimedium koreanum* Nakai extract (mg/ml); ED, Endothelium; \* p<0.05, \*\*\* p<0.001 compared with PE; † p<0.05, †† p<0.001 compared with intact endothelium.

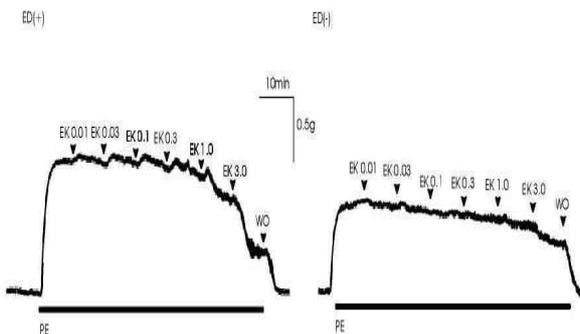


Fig. 2. Representative Recordings of the Effects of *Epimedium koreanum* Nakai Extract on the Contraction of Isolated Rabbit Corpus Caverosum with Intact Endothelium or Denuded Endothelium Induced by PE. PE, Phenylephrine 1 μM; EK, *Epimedium koreanum* Nakai extract(mg/ml); ED, Endothelium; WO, wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

3. L-NNA 전처치에 따른 음양곽의 이완효과

음양곽 추출물은 L-NNA 무처치군에서 농도 의존적으로 음경해면체 평활근을 이완시켰고 1 mg/ml, 3 mg/ml의 농도에서는 유의성이 있는 이완효과를 나타내었다. 음양곽 추출물의 이완효과는 L-NNA 전처치 시에 전 농도(0.1, 0.3, 1, 3 mg/ml)에서 무처치군에 비하여 유의성 있게 억제되었다(Table 3).

Table 3. Effects of Pretreatment of Nω-nitro-L-arginine on the Endothelium-dependent Relaxation Induced by *Epimedium koreanum* Nakai Extract

Treatment	Non treatment of L-NNA		Treatment of L-NNA	
	Strength of contraction(g)	Relaxation(%)	Strength of contraction(g)	Relaxation(%)
PE	0.80 ± 0.26	-	0.90 ± 0.32	-
PE + EK 0.1	0.75 ± 0.26	7.4 ± 7.0	0.97 ± 0.36	- 7.3 ± 7.6†††
PE + EK 0.3	0.71 ± 0.27	12.9 ± 11.6	0.97 ± 0.39	- 6.8 ± 10.4†††
PE + EK 1.0	0.62 ± 0.31**	24.8 ± 23.2	0.93 ± 0.38	- 1.8 ± 11.8††
PE + EK 3.0	0.44 ± 0.25**	46.7 ± 21.2	0.72 ± 0.36	20.4 ± 18.0††

Values were expressed as means ± S.D. of 11 separate experiments. EK-induced relaxations were expressed as percentage of PE contraction in L-NNA treated or L-NNA non-treated corpus cavernosum. L-NNA, Nω-nitro-L-arginine 10 μM; PE, Phenylephrine 1 μM; EK, *Epimedium koreanum* Nakai extract(mg/ml); \*\* p<0.01 compared with PE; † p<0.01, †† p<0.001 compared with L-NNA treated corpus cavernosum.

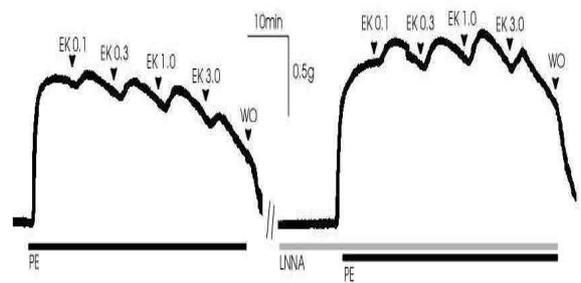


Fig. 3. Representative Recordings of the Effects of Pretreatment of Nω-nitro-L-arginine on the Endothelium-dependent Relaxation Induced by *Epimedium koreanum* Nakai Extract. L-NNA, Nω-nitro-L-arginine 10 μM; PE, Phenylephrine 1 μM; EK, *Epimedium koreanum* Nakai extract(mg/ml); WO, wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

4. MB 전처치에 따른 음양곽의 이완효과

음양곽 추출물은 MB 무처치군과 MB 전처치군 모두에서 농도 의존적으로 음경해면체 평활근을 이완시켰으며, 1 mg/ml, 3 mg/ml의 농도에서는 유의성 있는 이완효과를 나타내었다. 음양곽 추출물의 이완효과는 MB 전처치 시에 전 농도(0.1, 0.3, 1, 3 mg/ml)에서 무처치군에 비하여 유의성 있게 억제되었다(Table 4).

Table 4. Effects of Pretreatment of Methylene Blue on the Endothelium-dependent Relaxation Induced by *Epimedium koreanum* Nakai Extract

Treatment	Non treatment of MB		Treatment of MB	
	Strength of contraction(g)	Relaxation(%)	Strength of contraction(g)	Relaxation(%)
PE	0.80 ± 0.18	-	0.81 ± 0.14	-
PE + EK 0.1	0.75 ± 0.19	7.5 ± 4.7	0.84 ± 0.17	- 3.0 ± 4.0†††
PE + EK 0.3	0.70 ± 0.18	14.1 ± 4.8	0.81 ± 0.16	1.3 ± 4.7†††
PE + EK 1.0	0.57 ± 0.17***	30.2 ± 9.3	0.66 ± 0.15**	19.3 ± 9.1††
PE + EK 3.0	0.30 ± 0.13***	63.2 ± 11.6	0.37 ± 0.13***	54.6 ± 11.7†

Values were expressed as means ± S.D. of 17 separate experiments. EK-induced relaxations were expressed as percentage of PE contraction in MB treated or MB non-treated corpus cavernosum. MB, Methylene blue 1 μM; PE, Phenylephrine 1 μM; EK, *Epimedium koreanum* Nakai extract(mg/ml); \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 compared with PE; † p<0.05, †† p<0.01, ††† p<0.001 compared with MB treated corpus cavernosum.

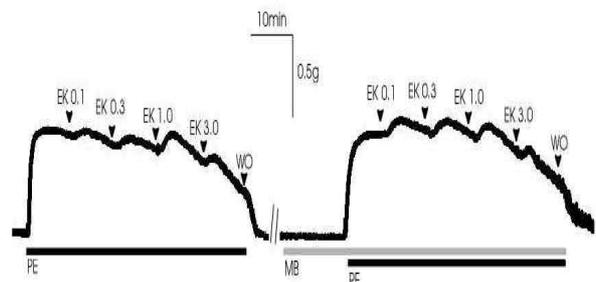


Fig. 4. Representative Recordings of the Effects of Pretreatment of Methylene Blue on the Endothelium-dependent Relaxation Induced by *Epimedium koreanum* Nakai Extract. MB, Methylene blue 1 μM; PE, Phenylephrine 1 μM; EK, *Epimedium koreanum* Nakai extract(mg/ml); WO, wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

5. TEA 전처치에 따른 음양곽의 이완효과

음양곽 추출물은 TEA 무처치군과 TEA 전처치군 모두에서 농도 의존적으로 음경해면체 평활근을 이완시켰으며, 1 mg/ml, 3

mg/ml의 농도에서는 유의성 있는 이완효과를 나타내었다. 음양곽 추출물의 이완효과는 TEA 전처리 시에 3 mg/ml 농도에서 무처리군에 비하여 유의성 있게 억제되었다(Table 5).

Table 5. Effects of Pretreatment of Tetraethylammonium Chloride on the Endothelium-dependent Relaxation Induced by *Epimedium koreanum* Nakai Extract

Treatment	Non treatment of TEA		Treatment of TEA	
	Strength of contraction(g)	Relaxation(%)	Strength of contraction(g)	Relaxation(%)
PE	0.93 ± 0.22	-	0.87 ± 0.21	-
PE + EK 0.1	0.91 ± 0.25	3.1 ± 5.5	0.85 ± 0.23	3.1 ± 5.5
PE + EK 0.3	0.88 ± 0.27	6.6 ± 11.5	0.84 ± 0.21	3.4 ± 6.6
PE + EK 1.0	0.80 ± 0.27**	15.9 ± 16.9	0.73 ± 0.20***	16.5 ± 8.6
PE + EK 3.0	0.52 ± 0.21***	45.7 ± 14.6	0.57 ± 0.14***	33.7 ± 6.9†

Values were expressed as means ± S.D. of 10 separate experiments. EK-induced relaxations were expressed as percentage of PE contraction in TEA treated or TEA non-treated corpus cavernosum. TEA, Tetraethylammonium chloride 10 μM ; PE, Phenylephrine 1 μM ; EK, *Epimedium koreanum* Nakai extract(mg/ml) ; \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 compared with PE ; † p<0.05 compared with TEA treated corpus cavernosum.

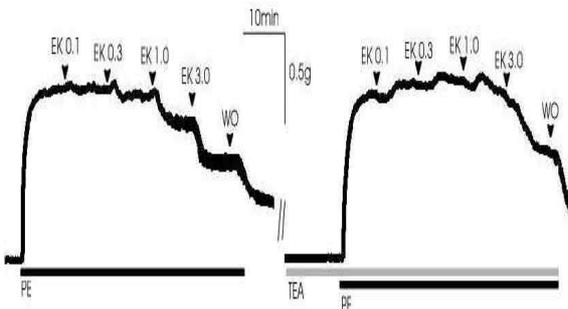


Fig. 5. Representative Recordings of the Effects of Pretreatment of Tetraethylammonium Chloride on the Endothelium-dependent Relaxation Induced by *Epimedium koreanum* Nakai Extract. TEA, Tetraethylammonium chloride 10 μM ; PE, Phenylephrine 1 μM ; EK, *Epimedium koreanum* Nakai extract(mg/ml) ; WO, wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

6. IM 전처치에 따른 음양곽의 이완효과

음양곽 추출물은 IM 무처리군과 IM 전처리군 모두에서 농도 의존적으로 음경해면체 평활근을 이완시켰으며, 1 mg/ml, 3 mg/ml의 농도에서는 유의성 있는 이완효과를 나타내었다. 음양곽 추출물의 이완효과는 IM 전처리 시에 0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml의 농도에서 무처리군에 비하여 유의성 있게 억제되었다(Table 6).

Table 6. Effects of Pretreatment of Indomethacin on the Endothelium-dependent Relaxation Induced by *Epimedium koreanum* Nakai Extract

Treatment	Non treatment of IM		Treatment of IM	
	Strength of contraction(g)	Relaxation(%)	Strength of contraction(g)	Relaxation(%)
PE	1.13 ± 0.22	-	1.42 ± 0.27**	-
PE + EK 0.1	1.06 ± 0.24	6.5 ± 4.9	1.39 ± 0.26**	1.7 ± 3.6†
PE + EK 0.3	0.96 ± 0.22	14.8 ± 5.2	1.30 ± 0.24**	8.0 ± 2.5††
PE + EK 1.0	0.70 ± 0.17***	38.0 ± 9.1	0.94 ± 0.18***	33.4 ± 4.1
PE + EK 3.0	0.33 ± 0.10***	70.4 ± 8.6	0.43 ± 0.10***	69.7 ± 5.1

Values were expressed as means ± S.D. of 8 separate experiments. EK-induced relaxations were expressed as percentage of PE contraction in IM treated or IM non-treated corpus cavernosum. IM, Indomethacin 10 μM ; PE, Phenylephrine 1 μM ; EK, *Epimedium koreanum* Nakai extract(mg/ml) ; \*\*\* p<0.001 compared with PE ; † p<0.05, †† p<0.001 compared with IM treated corpus cavernosum.

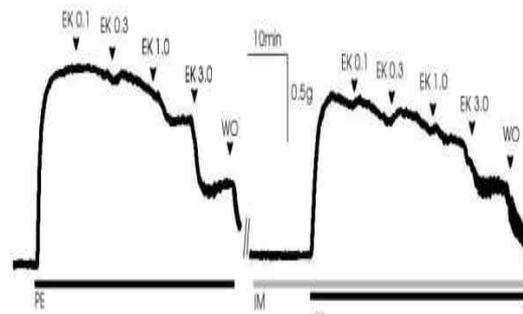


Fig. 6. Representative Recordings of the Effects of Pretreatment of Indomethacin on the Endothelium-dependent Relaxation Induced by *Epimedium koreanum* Nakai Extract. IM, Indomethacin 10 μM ; PE, Phenylephrine 1 μM ; EK, *Epimedium koreanum* Nakai extract(mg/ml) ; WO, wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

7. 음양곽의 세포독성 측정

EA.hy926 cells에 음양곽 추출물을 농도별로 24시간 처리한 결과 전 농도(10, 30, 50, 100, 300, 500 μg/ml)에서 유의성 있는 세포생존율의 변화는 관찰할 수 없었다(Table 7).

Table 7. Effects of *Epimedium koreanum* Nakai Extract on the Cell Viability of EA.hy926 Cells

Treatment	Cell viability(%)
Control	100.0 ± 4.5
EK 10 μg/ml	95.9 ± 4.3
EK 30 μg/ml	100.3 ± 3.0
EK 50 μg/ml	105.8 ± 1.1
EK 100 μg/ml	106.3 ± 2.5
EK 300 μg/ml	110.2 ± 2.2
EK 500 μg/ml	110.2 ± 2.2

Values were expressed as means ± S.D. of 8 separate experiments. EA.hy926 cells were treated with various concentrations(10, 30, 50, 100, 300, 500 μg/ml) of EK for 24 hr at 37°C. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods. EK, *Epimedium koreanum* Nakai extract.

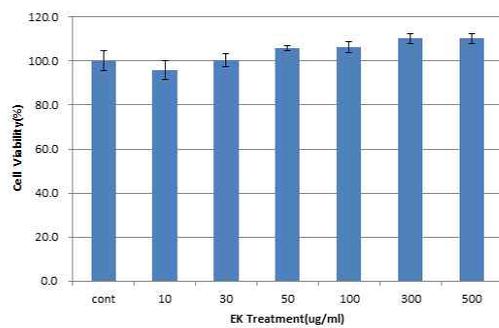


Fig. 7. Effects of *Epimedium koreanum* Nakai Extract on the Cell Viability of EA.hy926 Cells. Representative sticks show that cell viability in EA.hy926 cells by EK(10, 30, 50, 100, 300, 500 μg/ml) treated for 24 hr at 37°C. EK, *Epimedium koreanum* Nakai extract.

8. 음양곽이 NO의 생성에 미치는 영향

EA.hy926 cells에 음양곽 추출물을 24시간 처리한 결과, NO량이 농도 의존적으로 증가하였으며, 대조군과 비교 시 100 μg/ml, 300 μg/ml, 500 μg/ml의 농도에서 유의성 있게 증가되었다.

Table 8. Effects of *Epimedium koreanum* Nakai Extract on Nitric Oxide Concentration in EA.hy926 Cells

Treatment	NO concentration(μM)
Control	1.24 ± 0.11
EK 10 μg/ml	1.33 ± 0.16
EK 30 μg/ml	1.44 ± 0.17
EK 50 μg/ml	1.53 ± 0.20
EK 100 μg/ml	1.81 ± 0.23*
EK 300 μg/ml	2.18 ± 0.24**
EK 500 μg/ml	3.02 ± 0.40***

Values were expressed as means ± S.D. of 6 separate experiments. EA.hy926 cells were treated with EK in a dose-dependent manner(10, 30, 50, 100, 300, 500 μg/ml) for 24 hr at 37°C. Nitrite oxide was measured by microplate reader at 540 nm. EK, *Epimedium koreanum* Nakai extract ; NO, nitric oxide ; \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 compared with control.

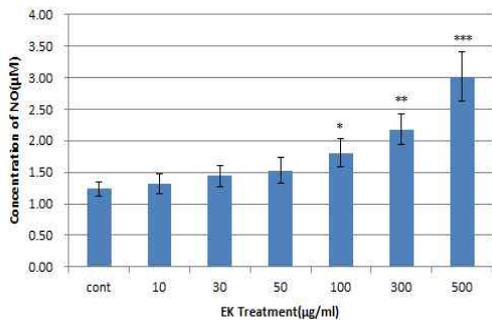


Fig. 8. Effects of *Epimedium koreanum* Nakai Extract on Nitric Oxide Concentration in EA.hy926 Cells. Representative sticks show that nitric oxide concentration in EA.hy926 cells by EK(10, 30, 50, 100, 300, 500 μg/ml) treated for 24 hr at 37°C. EK, *Epimedium koreanum* Nakai extract ; NO, nitric oxide ; \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 compared with control.

## 고찰

일반적으로 발기부전은 노화의 한 징후로 인식되고 있다. 실제로 발기부전 증상은 40세 이상의 남성들에게서 주로 나타나고, 발생률 또한 연령대가 높아질수록 증가한다는 것이 통례이다<sup>18)</sup>. 하지만 2010년에 발표된 연구에 의하면 발기부전 치료제 복용을 통해 도움 받기를 원하는 남성 4명 가운데 1명은 연령대가 40세 이하인 것으로 조사<sup>19)</sup>되어 현대 사회에서 발기부전은 성인 남성 전체의 문제로 확산되어 가는 추세이다.

식품의약품안전처의 '2012년 국내의약품 생산실적 분석'에 따르면, 한국화이자제약의 오리지널 발기부전 치료제인 '비아그라정' 수입은 1108억원, 동일성분 제네릭(generic) 의약품 시장은 1000억원 대에 육박하고 있다<sup>20)</sup>. 최근 인구의 고령화, 생활수준의 향상, 성에 대한 사회적 인식 변화 등으로 인하여 발기부전을 비롯한 성기능 장애에 대한 일반인의 관심과 치료 요구가 증대하는<sup>1)</sup> 것을 고려할 때, 이러한 발기부전 치료제 시장 규모는 더욱 성장할 것으로 보인다.

국내에서는 총 6가지 성분(실데나필시트르산염, 바데나필염산염, 타다라필, 유데나필, 미로데나필염산염, 아바나필)의 발기부전 치료제가 판매되고 있는데, 두통 · 안면홍조 · 소화불량 등의 부작용이 흔히 초래되고 코피 · 현훈 · 복통 · 안구충혈 · 시각 이상 또한 발생할 수 있어<sup>2)</sup> 효과는 좋으면서도 부작용이 적은 발기부전 치료제 개발을 위한 한약재 연구가 시도되고 있다. 이러

한 추세에 발맞추어 한의학계에서도 발기부전 치료에 대한 가능성을 모색하고 치료 효과를 제고하기 위한 더욱 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

한의학적으로 발기부전은 '陽痿', '陰痿', '陰器不用', '陰不起' 등으로 표현되는데<sup>21)</sup>, 『素問·陰陽應象大論』에서는 "年六十陰痿, 氣大衰, 九竅不利, 下虛上實, 涕泣俱出矣"라 하여 생리적인 노화로 유발된다고 하였으며, 『素問·痿論』에서는 "思想無窮, 所願不得, 意淫於外, 入房太甚, 宗筋弛縱"이라 하여 病的으로 발생한다고 하였다<sup>22)</sup>. 病因으로는 命門火衰, 心脾兩虛, 腎精虧虛, 肝鬱不舒, 濕熱下注가 있으며<sup>23)</sup>, 溫腎壯陽, 補腎填精, 疏肝解鬱, 清熱燥濕, 補益心脾, 理氣活血의 治法이 응용되고 있다<sup>24,25)</sup>.

한의학에서 시행된 음경해면체 조직에 대한 발기부전 관련 실험 연구를 살펴보면, 복분자, 석창포, 산사 추출물의 NO-cGMP 계와 K<sup>+</sup> 통로 차단에 의한 음경해면체 평활근 이완 효과와<sup>16,26,27)</sup> 胡蘆巴, 金櫻子, 楮實子, 黃精, 覆盆子, 冬蟲夏草, 三子散, 養生活力丹, 五子丸, 青娥丸, 合歡皮, KH-304, 雙和湯, 蜈蚣, 桑螵蛸의 흰쥐 음경조직 내 NOS 활성화와 nitrite 함량 증가 및 과산화지질의 생성 감소를 통한 발기부전 개선 효과에 대한 연구<sup>28-42)</sup>가 진행되었다. 또한 養生活力丹, 五子丸, 青娥丸, 合歡皮, KH-304, 蜈蚣, 桑螵蛸은 음경해면체 내압 측정상 발기력 향상 효과<sup>35-39,41,42)</sup>, 金櫻子, 三子散, 合歡皮는 항산화 작용을 통한 음경조직의 피로 경감 효과<sup>29,34,38)</sup>, KH-304, 雙和湯은 cGMP 상승을 통한 발기 지속 효과<sup>39,40)</sup>가 확인되었다. 그리고 발기력 향상 및 발기 지속시간 연장 효과를 보인 遠志<sup>43)</sup>, 음경해면체 유사발기반응을 유도하는 加味歸脾湯<sup>44)</sup>, 桂枝茯苓丸<sup>45)</sup>에 관한 연구도 있었다.

음양곽은 대표적 補陽藥으로서 命門의 要藥이라 불리며<sup>3,4)</sup> 補腎壯陽 祛風除濕의 효능으로 腎陽不足 陽痿不舉의 치료에 사용되어 왔다. 최근 연구에서 흉부 대동맥 혈관의 평활근 이완 효과가 보고<sup>7)</sup>되었으나 음경해면체 혈관에서 이루어진 실험은 아직까지 보고된 바가 없다. 이에 음양곽을 발기부전 치료제로 임상에 이용하기 위한 기초 자료를 마련하고자 토끼 음경해면체 평활근을 이용하여 연구를 진행하였다.

우선 음경 발기에 관여되는 조직과 발기 과정을 살펴보면 다음과 같다.

음경(penis)은 세 개의 발기조직(erecile tissue)으로 구성되는데, 위쪽에는 한 쌍의 음경해면체(corpora cavernosa)가 있고 아래쪽에는 한 개의 요도해면체(corpus spongiosum)가 자리 잡고 있다. 이 중 음경해면체의 발기조직인 해면체 동굴(carvenous sinus)을 이루는 trabecula들은 collagen fiber, elastic fiber, smooth muscle fiber로 이루어져 해면체의 탄탄한 내부를 구성하며 얇은 endothelial cell로 덮여 있다<sup>46)</sup>.

음경의 혈액공급은 dorsal artery of penis와 deep artery of penis로부터 이루어진다. Dorsal artery는 백색막을 뚫고 해면체 동굴로 들어가거나 모세혈관 그물을 이루며, deep artery는 나선동맥(helicine artery)으로 평소에는 꼬여 있으며 속막이 속공간으로 나와서 부분적으로 혈액의 흐름을 막지만, 성적 자극이 있을 경우에는 나선동맥과 해면체 동굴의 평활근이 이완되어 나선동맥이 곧은 상태가 되고 속공간이 커지면서 혈액이 급속히 들

어차 커지게 된다<sup>46)</sup>.

음경 발기에 관여하는 음경해면체 평활근과 나선동맥은 평소 그 주변의 교감신경 말단에서 지속적으로 분비되는 알파-아드레날린성 신경전달물질인 norepinephrine에 의해 수축 상태에 있다. 그러나 성적 흥분이나 자극이 있으면 음경해면체 평활근과 나선동맥 주위의 음경 해면체 신경 말단부위의 콜린성 신경으로부터 acetylcholine이 분비되어 norepinephrine의 분비를 억제시켜 음경해면체 평활근의 긴장을 감소시키며, 아울러 비아드레날린성 비콜린성 신경 및 해면체동굴 벽에 도열해 있는 혈관 내피세포로부터 NO를 비롯한 몇몇 신경전달물질을 분비시켜 음경해면체 평활근 및 나선동맥을 이완·확장시킴으로써 정상시보다 5-10배나 많은 혈액이 유입되고 발기를 일으킨다<sup>47)</sup>.

Phenylephrine(PE)은 선택적  $\alpha_1$ -adrenergic receptor agonist로 임상에서 저혈압환자의 혈압을 상승시키는 혈관수축제로서 사용되고 있다. PE는  $\alpha_1$ -receptor와 결합하여 세포 소기관인 endoplasmic reticulum(ER)으로부터  $Ca^{2+}$ 을 유리시키며 평활근 세포에서 receptor operated calcium channel(ROCC)과 세포막전위의 변화에 의해 개폐되는 voltage dependent calcium channel(VGCC)을 활성화하여  $Ca^{2+}$ 을 세포 내로 유입시킴으로써 말초혈관의 평활근을 수축시킨다<sup>48)</sup>. 이러한 기전에 근거하여 음양곽의 음경해면체 평활근 이완에 대한 효과를 알아보고자 PE로 해면체를 수축시킨 후 농도별로 약물을 처리하고 측정된 결과, 음양곽이 음경해면체 혈관 평활근을 농도 의존적으로 이완시킴을 관찰하였다.

혈관내피세포(vascular endothelial cell, VEC)는 수동적 장벽으로만 작용하는 것이 아니라  $O_2$  감소와 같은 화학적인 변화나 혈관벽의 긴장과 같은 물리적인 변화에 대한 반응으로 세동맥 혈관 반지름의 국소조절에 매우 중요한 역할을 하는 화학전령물질을 국소적으로 분비하는데, 이러한 국소적 혈관작용 매개물질들은 혈관 평활근에 작용한다<sup>49)</sup>. 실험에서 음양곽의 음경해면체 평활근 이완효과가 내피세포에 의한 것인지 알아보기 위하여 내피세포 부착군과 제거군으로 나누어 수축 정도를 측정된 결과, 내피세포 부착군이 제거군에 비해 유의성 있는 이완효과를 나타내었다. 따라서 음양곽의 이완효과는 내피세포 의존성임을 알 수 있었다.

Endothelium derived relaxing factor(EDRF)는 혈관내피세포에서 분비되는 혈관작용 매개물질로서 대표적으로 NO, endothelium derived hyperpolarizing Factor(EDHF), prostacyclin( $PGI_2$ )이 있는데, 이들은 근수축에 관여하는  $Ca^{2+}$ 이 평활근 세포 내로 유입되는 것을 억제하거나 myosin light chain kinase를 억제하여 혈관 평활근의 이완을 야기한다<sup>12)</sup>.

NO는 신체의 주요 신호 전달물질 중 하나로서 해면체 혈관 내피세포에서는 endothelial nitric oxide synthases(eNOS)에 의해 L-arginine으로부터 합성되는데, NO가 음경해면체 평활근 세포에 있는 guanylate cyclase를 활성화시키고 활성화된 guanylate cyclase가 평활근 세포 내의 guanosine triphosphate(GTP)를 cyclic guanosine monophosphate(cGMP)로 전환시키게 된다. 즉 해면체 내피세포에서 생성된 NO가 평활

근 세포에서 cGMP를 증가시키면 proteinkinase G (PKG)가 활성화되어 세포외  $Ca^{2+}$  유입이 차단되고 평활근 세포의 이완, 즉 발기가 일어난다<sup>50,51)</sup>. 내피세포의 eNOS 효소를 억제하여 NO 생성을 막는 inhibitor인 L-NNA<sup>52)</sup>와 평활근 세포에서 NO에 의한 cGMP 활성화를 막는 inhibitor인 MB<sup>53)</sup>를 처리한 뒤 수축 정도를 측정된 결과, 무처리군에 비하여 각각 유의성 있게 이완이 억제됨을 확인할 수 있었다. 따라서 음양곽의 음경해면체 평활근 이완효과가 내피세포에서의 NO 생성 및 평활근 세포에서의 cGMP 활성 촉진 기전에 의한 것임을 알 수 있었다.

EDHF는 arachidonic acid(AA)로부터 P-450 pathway를 통해 형성된 불안정한 대사산물로서 평활근세포에서 K<sup>+</sup> 통로를 개방하여 K<sup>+</sup>의 세포외 유출로 인한 과분극을 유발한다. 세포막이 과분극되면 VDCC를 폐쇄시키고 평활근 세포내  $Ca^{2+}$  농도를 초래하여 평활근세포의 내피세포의존성 이완을 발생시킨다. EDHF는 특히 소형 혈관에 가장 많이 기여한다. 내피세포에서 EDHF의 분비는 세포질 내 칼슘 농도의 영향을 받으며 calmodulin antagonist의 억제를 받는다<sup>13)</sup>. 실험에서 비특이적 K<sup>+</sup> 통로 차단제인 tetraethylammonium chloride(TEA)<sup>54)</sup>를 처리한 후 음양곽 추출물의 이완효과를 살펴본 결과, 무처리군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. 따라서 음양곽의 음경해면체 평활근 이완효과는 EDHF로 인한 K<sup>+</sup> 통로 개방과 관련이 있을 것으로 추정된다.

$PGI_2$ 는 내피세포의 AA로부터 cyclooxygenase(COX)와 prostacyclin synthase를 통해 합성·분비되며 해면체 평활근 세포에서 adenylate cyclase를 활성화시켜 cAMP를 생성하는데, cAMP는 세포질 내  $Ca^{2+}$  농도 증가를 억제하고, proteinkinase A(PKA)를 활성화하여 myosin light chain kinase를 억제하므로 해면체 평활근이 이완되고 혈관이 확장되는 작용을 한다<sup>12)</sup>. Indomethacin(IM)은 COX inhibitor로서  $PGI_2$ 의 생성을 차단하는데<sup>55)</sup> 본 실험에서 IM 처리군과 무처리군 간의 이완효과를 비교하였을 때 유의성 있는 해면체 이완효과를 나타내지 않았던 0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml의 농도에서는 IM의 전처리로 인해 음양곽의 이완효과가 무처리군에 비하여 유의성 있게 억제되었으나, 유의성 있는 해면체 이완효과를 나타내었던 1 mg/ml, 3 mg/ml의 농도에서는 IM 처리 여부에 따른 유의성 있는 이완효과 변화를 관찰할 수 없었다. 따라서  $PGI_2$ 와 음양곽의 해면체 이완효과와의 상관성에 대하여 향후 보완 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Human umbilical vein endothelial cell line인 EA.hy926은 primary human umbilical vein cells과 human lung carcinoma에서 유래된 permanent human cell line인 A549를 융합하여 만든 permanent human cell line<sup>56)</sup>으로 혈관생성(Angiogenesis), 혈전 항상성(homeostasis/thrombosis), 혈압, 염증 등의 차별화된 내피세포 기능 연구에 이용된다<sup>56,57)</sup>. 실험에서 EA.hy926에 음양곽을 농도별로 처리한 후 NO assay를 시행한 결과, 농도 의존적인 증가 효과가 관찰되었다. 이를 통해 음양곽이 내피세포에서 NO 생성을 촉진시킨다는 것을 알 수 있었다. 이상의 실험 결과를 종합하면, 음양곽은 음경해면체 혈관 평활근 이완효과를 가지고 있으며, 그 기전상 내피세포 의존성 이완자인 NO 생성 촉

진 및 평활근 세포에서의 cGMP 활성, K<sup>+</sup> 통로 개방에 의한 세포의 Ca<sup>2+</sup> 유입 차단으로 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 농도 저하를 유발함으로써 평활근 세포를 이완시키는 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

## 결 론

음양곽 추출물이 수축된 토끼 음경해면체 평활근에 미치는 영향에 대하여 알아보기 위하여 organ bath study를 통한 음양곽의 해면체 평활근 이완 효과 및 약리기전을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

음양곽 추출물은 PE로 수축된 음경해면체 평활근을 유의성 있게(0.3, 1, 3 mg/ml) 이완시켰다. 해면체 혈관내피세포 제거 시, 음양곽 추출물의 평활근 이완효과가 유의성 있게(0.1, 0.3, 3 mg/ml) 억제되었으며 L-NNA와 MB를 각각 전처리 하였을 시에도 음양곽 추출물의 평활근 이완효과가 유의성 있게(0.1, 0.3, 1, 3 mg/ml) 억제되었다. 또한 TEA 전처리 시에도 음양곽 추출물의 평활근 이완효과가 유의성 있게(3 mg/ml) 억제되었다. 그러나 IM을 전처리 했을 시에는 음양곽 추출물의 평활근 이완효과는 억제되지 않았다. EA.hy926 cells에서 음양곽 추출물은 NO 생성을 유의성 있게(100, 300, 500 µg/ml) 증가시켰다.

이상의 결과 음양곽은 내피세포 의존성 이완인자인 NO의 생성 촉진, 평활근 세포에서의 NO-cGMP 활성, EDHF로 인한 K<sup>+</sup> 통로 개방 기전에 영향을 줌으로써 음경해면체 혈관 평활근 이완효과를 나타내는 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 지식경제부 지역혁신센터사업으로 수행되었음 (RIC-07-06-01).

## References

- Kim, Y.S. Prevalence and screening of male sexual dysfunction in family medicine clinic. J Korean Acad Fam Med 21: 62-73, 2000.
- 식품의약품안전처. 경구용 발기부전 치료제. Available from: URL: <http://mfds.go.kr>
- 신민교. 원색임상분초학. 서울, 영림사, pp 196-197, 1992.
- 江蘇新醫學院. 중약대사전. 서울, 정담, pp 4400-4406, 1998.
- Huang, K.C. The pharmacology of Chinese herbs, Florida. CRC Press Inc, pp 91-92, 1993.
- 黃泰康. 常用中藥成分與藥理手冊. 北京, 中國醫藥科技出版社, pp 1631-1639, 1994.
- 김승현, 조정훈, 장준복, 이경섭.淫羊藿이 흰쥐 정자의 운동성에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지 17(2):52-63, 2004.
- 이창훈, 조정훈, 장준복, 이경섭. 농도별淫羊藿 투약이 수컷 생쥐의 생식능력에 미치는 영향. 대한한방부인과학회지 18(1):142-155, 2005.
- 최정은, 이창훈, 조정훈, 장준복, 이경섭. 淫羊藿의 수컷 생쥐 생식능력에 대한 投藥期間別 效果. 대한한방부인과학회지 19(3):55-68, 2006.
- 김거용. 淫羊藿이 평활근 이완과 iNOS 발현에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 석사학위논문. 2000.
- Rajfer, J., Aronson, W.J., Bush, P.A., Dorey, F.J., Ignarro, L.J. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. N. Engl. J. Med 326: 90-94, 1992.
- Vanhoutte, P.M., Boulanger, C.M., Mombouli, J.V. Endothelium derived relaxing factors and converting enzyme inhibition. The American Journal of Cardiology 76: 3E-12E, 1995.
- Luksha, L., Agewall, S., Kublickiene, K. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. Atherosclerosis 202(2):330-344, 2009.
- Cho, E.Y., Chung, S.H., Kim, J.H., Kim, D.H., Jin, C.B. Effects of a new selective phosphodiesterase type 6 inhibitor, KJH-1002, on the relaxation of rabbit corpus cavernosum tissue. The Journal of Applied Pharmacology 11: 232-237, 2003.
- Gin, C.H., Alyssa, B.O., Robert, B.M., James, P.S., Jorge, D.B. YC-1 potentiates the nitric oxide/cyclic GMP pathway in corpus cavernosum and facilitates penile erection in rats. European Journal of Pharmacology 458: 183-189, 2003.
- 박선영. 覆盆子의 토끼 음경해면체 평활근 이완효과. 세명대학교 대학원. 박사학위논문. 2013.
- Carmichael, J., DeGraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Mitchell, J.B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay : Assessment of chemosensitivity testing. Cancer Research 47: 936-942, 1987.
- 조유장, 황환식, 박훈기, 정재길. 가정의학과 의원 방문환자의 발기부전 유병률 및 성상담 진료 이용 현황과 관련 요소. 대한가정의학회학회지 30(8):617-625, 2009.
- Capogrosso, P., Colicchia, M., Ventimiglia, E., Castagna, G., Clementi, M.C., Suardi, N., et al. One patient out of four with newly diagnosed erectile dysfunction is a young man-worrisome picture from the everyday clinical practice. The Journal of Sexual Medicine 10(7):1833-1841, 2013.
- 식품의약품안전처. 2012년 國內의약품 생산실적 분석. Available from: URL: <http://mfds.go.kr>
- 杜鎬京. 東醫腎系學. 서울, 동양의학연구원, pp 610-616, 1991.
- 배병철 역. 금석황제내경소문. 성보사, 성남, p 316, 580, 1994.
- 徐平. 實用中醫腎病學. 서울, 일중사, pp 475-477, 1992.
- 최훈섭, 김철중. 양위에 대한 문헌적 고찰. 혜화의학 5(1):212-235, 1996.
- 江海身, 康力生. 中醫男科講座. 북경, 중의의약과기출판사, pp 94-111, 1992.

26. 김호태. 石菖蒲 에탄올 추출물이 음경해면체 평활근 이완에 미치는 영향. 원광대학교 한의학전문대학원. 석사학위논문. 2011.
27. 이한석. 山查가 토끼 음경해면체의 수축에 미치는 영향. 세명대학교 대학원. 박사학위논문. 2013.
28. 김광진, 강정모, 신현철, 윤철호, 정지천, 서종은 외. 胡蘆巴 抽出物の 勃起不全 改善效果에 關한 實驗의 研究. 대한한방성인병학회지 4: 210-222, 1998.
29. 김경동, 정지천. 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. 대한한방내과학회지 19(1):452-465, 1998.
30. 강정준, 정지천, 신억섭. 楮實子 抽出物이 Streptozotocin에 의한 糖尿病 흰쥐 陰莖海綿體의 Nitric oxide synthase 活性 및 Nitrite 含量에 미치는 影響. 대한한의학회지 19(2):112-124, 1998.
31. 이상현, 신현철, 정지천. 黃精 抽出物이 흰쥐의 陰莖海綿體 組織에서 NOS 活性 및 Nitrite 含量에 미치는 影響. 대한한방성인병학회지 5(1):163-176, 1999.
32. 서종은, 강정준, 정지천. 覆盆子 抽出物の 勃起不全 改善效果에 關한 研究. 대한한방성인병학회지 6(1):241-250, 2000.
33. 민건우, 박종혁, 윤철호, 신억섭, 한영환, 정지천. 冬蟲夏草가 Hydrocortisone을 투여한 흰쥐의 Nitric Oxide Synthase 활성 및 Testosterone 함량에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 21(3):389-398, 2000.
34. 위영택, 박종혁, 윤철호, 정지천, 신억섭, 민건우. 三子散이 흰쥐 음경조직의 Nitric Oxide Synthase 활성 및 과산화지질 함량에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 22(1):53-61, 2001.
35. 이철호, 윤철호, 민건우, 신현철, 정지천. 養生活力丹 추출물이 흰쥐의 음경발기에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 25(2):258-267, 2004.
36. 안태건, 정지천. 五子丸이 ethanol로 발기부전을 유도한 흰쥐의 성기능 개선에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 26(3):605-614, 2005.
37. 정형철. 靑娥丸이 ethanol로 발기부전을 유도한 흰쥐의 성기능 개선에 미치는 영향. 동국대학교 대학원. 석사학위논문. 2005.
38. 이민동, 정지천. Ethanol에 의해 발기부전을 유도한 흰쥐의 성기능 개선에 미치는 合歡皮의 영향. 대한한의학회지 27(2):232-243, 2006.
39. 이은정, 이현지, 김희석, 황성연. KH-304 투여가 흰쥐 음경조직의 Nitric Oxide Synthase 활성 및 Erectile dysfunction에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 20(3):680-684, 2006.
40. 김중길, 심하나, 이승희, 유관석, 송봉근. 산화질소 합성효소 활성화와 산화질소 생성과 관련된 한약 雙和湯에 의한 평활근의 이완. 대한한의학회지 27(4):74-83, 2006.
41. 백기범, 신현철, 정지천. Ethanol로 발기부전을 유도한 흰쥐의 성기능 개선에 蜈蚣 추출물이 미치는 영향. 동의생리병리학회지 22(1):176-182, 2008.
42. 김민수, 정지천, 신현철. 桑螵蛸가 Cimetidine으로 발기부전을 유도한 흰쥐의 성기능 개선에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 25(2):234-241, 2011.
43. 한진. 수컷 흰쥐에서 遠志의 발기력 향상 효과. 경희대학교 대학원. 박사학위논문. 2010.
44. 황주민, 강동윤, 변성희, 김은하, 김상찬, 박중현. 加味歸脾湯이 環境호르몬(p,p-DDE)에 의한 勃起不全 및 腎山 Apomorpine의 penile erection에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 17(4):980-990, 2003.
45. 김재우, 손수근, 사은호, 김철호, 박원환. 고콜레스테롤혈증 쥐의 eNOS, nNOS, Caveolin-1, bFGF 단백질 발현, 음경해면체의 내피세포에 있어서 계지복령환의 효과. 동의생리병리학회지 20(1):174-180, 2006.
46. 고정식, 길영기 외. 조직학 제 4판. 서울, 법문사, p 209, 583, 584, 585, 2000.
47. 김세철. 음경발기의 해부와 생리. 병원약사회지 16(2):165-168, 1999.
48. Cooper, B.E. Review and Update on Inotropes and Vasopressors. AACN Advanced Critical Care 19: 5-15, 2008.
49. Sherwood Lauralee. 생리학 제5판. 라이프사이언스, 서울, p 268, 269, 319, 321, 322, 694, 2005.
50. Lowenstein, C.J., synder, S.H. Nitric oxide, a novel biologic messenger. Cell 72: 705-707, 1992.
51. Bredt, D.S., Ferris, C.D., Snyder, S.H. Nitric oxide synthase regulatory sites. J Bio Chem. 267(16):10976-10981, 1992.
52. Moody, J.A., Vernet, D., Laidlaw, S., Rajfer, J., Gonzales-Cadavid, N.F. Effects of long-term oral administration of L-arginine on the rat erectile response. Journal of Urology 158: 942-947, 1997.
53. Akingba, A.G., Burnett, A.L. Endothelial nitric oxide synthase protein expression, localization, and activity in the penis of the alloxan-induced diabetic rat. Molecular Urology 5: 189-197, 2001.
54. Imaizumi, Y., Watanabe, M. The effect of tetraethylammonium chloride on potassium permeability in the smooth muscle cell membrane of canine trachea. J Physiol 316: 33-46, 1981.
55. Matthias, S., Anna, LB., Lawrence, JM., Evamarie, H.H. Synthesis and Evaluation of Carbaborane Derivatives of Indomethacin as Cyclooxygenase Inhibitors. Bioorg Med Chem 19(10):3242-3248, 2011.
56. Edgell, C.J., McDonald, C.C., Graham, J.B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. Proc Natl Acad Sci USA 80(12):3734-3737, 1983.
57. Edgell, C.J., Haizlip, J.E., Bagnell, C.R., Packenham, J.P., Harrison, P., Wilbourn, B. et al. Endothelium specific Weibel-Palade bodies in a continuous human cell line, EA.hy926. In Vitro Cell. Dev. Biol 26(12):1167-1172, 1990.