

# 연자육이 음경해면체 이완에 미치는 영향

박선영 · 김진택<sup>1</sup> · 김호현\*

세명대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 동국대학교 한의과대학 해부학교실

## Relaxation Effects of *Nelumbinis Semen* in Isolated Corpus Cavernosum

Sun Young Park, Jin Taek Kim, Ho Hyun Kim\*

Department of Physiology, College of Korean Medicine, Semyung University,

1: Department of Anatomy, College of Korean Medicine, Dongguk University

This study was conducted to investigate the relaxation effects and its mechanisms of *Nelumbinis Semen*(NS) extract in isolated rabbit corpus cavernous tissues. In order to examine the relaxation effects and its mechanisms of NS, we treated the ethanol extract of NS(0.01–3.0 mg/ml) and indomethacin(IM), tetraethylammonium chloride(TEA), No-nitro-L-arginine (L-NNA), methylene blue(MB) were treated before NS extract to contracted strips induced by PE 1  $\mu$ M. We also treated calcium chloride(Ca) 1 mM after pretreatment of NS extract in  $Ca^{2+}$ -free krebs-ringer solution to contracted strips induced by PE. Cell viability and NO concentration on human umbilical vein endothelial cell(HUVEC) was measured by MTT assay, Griess reagent system. eNOS production was investigated by histochemical and immunohistochemical staining. NS extract was significantly affected on the relaxation of cavernous strips and NS extract-induced relaxation was not different by pretreatment of IM, TEA, MB, but inhibited by the pretreatment of L-NNA. And increase of contraction induced by  $Ca^{2+}$  addition, in a  $Ca^{2+}$ -free solution, was decreased by pretreatment of NS. NO concentration on HUVEC was increased. When NS extract was applied on corpus cavernosum of penis(CCP) in SHR, ratio of smooth muscles to collage fibers by PE was decreased and formation of eNOS around helicine artery was increased. These results suggest that CCP relaxation effects of NS extract are shown by suppressing influx of extracellular  $Ca^{2+}$  through the production of NO and eNOS.

keywords : *Nelumbinis Semen*, Corpus cavernosum, Nitric oxide, eNOS

### 서 론

50세 이상의 남성에게서 노화현상으로 생리기능이 떨어지면서 발생하는 여러 가지 변화 중, 특히 내분비 기능을 포함하는 성기능의 저하가 특징적으로 나타난다<sup>1,2)</sup>. 하지만 현대사회가 서구화된 식생활과 IT산업의 발달로 정신적 stress가 증가하고, 환경오염물질 및 꾸준한 전자파에의 노출, 흡연, 음주, 과로 등에 의해 성기능의 이상, 성기능과 관련된 기관들의 손상이 젊은 남성층에서도 나타나기 시작했다<sup>3)</sup>. 그리하여 성기능 이상으로 대변되는 발기부전은 비단 중년 이상의 남성에게만 국한되는 문제가 아닌 사회 전반적으로 해결해야 될 문제로 떠오르게 되었다.

음경의 발기부전 현상은 심인성, 신경인성, 내분비계, 혈관성 및 음경내 sinusoid 등의 여러 요인에 따라 좌우되는 매우 복합적인 현상으로 과거에는 정신적인 스트레스나 행위불안 등의 정신적인 이상을 원인으로 많이 보았지만 최근에는 기질적인 원인들에 대해 연구가 진행되고 있다<sup>4)</sup>.

발기부전은 음경해면체 조직 중에 정상적으로 혈액 유입이 이루어지지 못하는 현상으로 음경이 충분히 발기되지 않거나 지속되지 못하는 경우가 전체 성생활 중 25%이상 일어날 경우를 말한다<sup>5)</sup>. 즉 음경해면체 조직 내 혈관의 이완여부가 발기 및 발기지속에 직접적으로 영향을 미치고 음경해면체 혈관의 이완에 영향을 줄 수 있는 물질은 발기부전에도 효과가 있을 수 있다는 것이다.

한의학적으로 성기능 장애는 ‘男性不育’을 포함하는 것으로, 陽痿, 強中, 早泄, 遺精, 不射精, 精冷, 精少, 血精 등의 병증에 해당한다<sup>6)</sup>. 이 중 발기부전에 해당하는 陽痿는 性交不能症, 性交無能症으로서 주된 원인은 腎虛<sup>7)</sup>이며 溫補腎陽할 수 있는 약물들이 자주 사용되어왔다.

연자육은 수련과에 속하는 다년생 수생식물인 연꽃의 성숙한 종자를 건조한 것으로 性味が 甘澁하고 平無毒하며, 心, 脾, 腎經에 귀경하고 益腎固精, 養心安神, 補脾止瀉시키는 효능을 가지고 있다<sup>8,9)</sup>.

연자육에 대한 실험적 연구로 혈전 억제 및 뇌허혈 모델 보호 효과에 대한 보고<sup>10,11)</sup>, 염증 억제 및 항산화효과에 대한 보고<sup>12-17)</sup>가

\* Corresponding author

Ho Hyun Kim, Department of Physiology, College of Korean Medicine, Semyung University 65, Semyung-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do, Korea

·E-mail : binbae@semyung.ac.kr ·Tel : +82-43-649-1343

·Received : 2014/12/31 ·Revised : 2015/02/12 ·Accepted : 2015/02/26

© The Korean Society of Oriental Pathology, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2015.04.29.2.180>

Available online at [http://society.kisti.re.kr/sv/SV\\_svjsj03L.do?method=list&poid=ksomp&kojic=DRSRDH&sVnc=v28n5&menuid=1&subid=13](http://society.kisti.re.kr/sv/SV_svjsj03L.do?method=list&poid=ksomp&kojic=DRSRDH&sVnc=v28n5&menuid=1&subid=13)

있고 이외에 항 우울 효과<sup>18-21)</sup>와 멜라닌 합성 저해에 대한 보고<sup>22)</sup>가 있지만 연자육이 음경해면체 혈관의 이완에 미치는 영향에 대해서는 거의 보고된 바가 없다.

이에 본 실험에서는 연자육 추출물이 음경해면체 혈관의 이완에 미치는 영향과 그 기전에 대해서 내피세포성 이완인자를 중심으로 한 organ bath study와 조직화학적 방법을 통하여 확인하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

Organ bath study에는 체중 2.0~2.5 kg 사이의 New Zealand white 수컷 토끼(쌔타코, 한국)를 사용하였고 조직화학적 실험에는 10주령의 SHR/Izm Rat (중앙실험동물센터)를 사용하였으며 고품사료와 물을 충분히 공급하면서 1주 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 본 실험에 사용하였다.

본 동물실험은 세명대학교 동물실험윤리위원회의 승인(smeac 14-10-04)하에 실시되었다.

### 2. 연자육 추출물 제조

Flask에 연자육(*Nelumbinis Semen*) 200 g과 70% EtOH 1500 ml을 함께 넣고 수욕상에서 24시간 추출한 다음 rotary evaporator(Eyela, Japan)로 감압 농축하였으며, 농축한 용액을 동결건조기로 건조하였다. 위와 같은 방법으로 다시 2회 더 반복하여 총 26.5 g의 분말을 얻었으며 이를 실험에 사용하였다.

### 3. 음경해면체 혈관이완 기전에 관한 실험

#### 1) 해면체절편의 제작

토끼를 urethane(0.6 g/kg, 정맥주사)으로 마취한 다음 음경을 적출하여 modified krebs-ringer bicarbonate solution(125.4 mM NaCl, 4.9 mM KCl, 2.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 15.8 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12.2 mM glucose, pH 7.4)에서 음경해면체 주위의 백막을 제거한 다음 2×2×6 mm 크기의 해면체절편을 만들었다.

#### 2) 등장성 수축 측정

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

실험시작 전 해면체절편을 organ bath에서 1시간 안정시킨 후 micromanipulator(Narishige N<sub>2</sub>, Japan)를 이용하여 피동장력 1.5 g을 가하고 다시 1시간 안정시킨 다음 실험을 진행하였으며, 연속되는 실험에는 다른 처치 전에 다시 1시간 안정시킨 다음 시행하였다.

(1) Phenylephrine(PE)으로 수축된 해면체에서의 수축변화 측정  
해면체절편에 PE 1 μM을 투여하여 수축을 유발시킨 다음 연자육 추출물을 농도별(0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg/ml)로 투여하

여 수축의 변화를 기록하였다.

(2) Indomethacin(IM)이 해면체 이완효과에 미치는 영향

해면체절편을 먼저 IM 10 μM로 15분간 처치하고 PE 1 μM을 투여하여 수축을 유발시킨 다음 연자육 추출물(0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg/ml)을 투여하여 IM을 전처치하지 않은 경우와 수축의 변화를 비교하였다.

(3) Tetraethylammonium chloride(TEA)가 해면체 이완효과에 미치는 영향

해면체절편을 TEA 10 μM로 15분간 전처치하고 PE 1 μM을 투여하여 수축을 유발시킨 다음 연자육 추출물(0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg/ml)을 투여하여 TEA를 전처치하지 않은 경우와 수축의 변화를 비교하였다.

(4) Nω-nitro-L-arginine(L-NNA)이 해면체 이완효과에 미치는 영향

해면체절편을 L-NNA 10 μM로 15분간 전처치하고 PE 1 μM을 투여하여 수축을 유발시킨 다음 연자육 추출물(0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg/ml)을 투여하여 L-NNA를 전처치하지 않은 경우와 수축의 변화를 비교하였다.

(5) Methylene blue(MB)가 해면체 이완효과에 미치는 영향

해면체절편을 MB 1 μM로 15분간 전처치하고 PE 1 μM을 투여하여 수축을 유발시킨 다음 연자육 추출물(0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg/ml)을 투여하여 MB를 전처치하지 않은 경우와 수축의 변화를 비교하였다.

(6) 연자육의 전처치에 따른 Ca<sup>2+</sup> 의존성 수축변화 측정

해면체절편을 Ca<sup>2+</sup>-free solution에서 연자육 추출물(3.0 mg/ml)로 10분간 전처치하고 PE 1 μM을 투여하여 수축을 유발시킨 다음 Ca<sup>2+</sup> 1 mM을 투여하여 연자육을 전처치하지 않은 경우와 수축의 변화를 비교하였다.

### 3) 세포실험

사람의 제대정맥내피세포인 human umbilical vein endothelial cells(HUVEC)은 Clonetics™ and Poietics™ (Lonza, USA)에서 구입하여 passage 3~7번까지 사용하였으며, 세포배양을 위해 endothelial cell basal medium-2(EBM-2) bullet kit (Lonza, USA)을 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였다. EBM-2 배지는 사용 전 EGM-2 SingleQuots(10% fetal bovine serum, hydrocortisone, hFGF-B, vEGF, R3-IGF-I, ascorbic acid, hEGF, GA-1000, heparin)을 넣고 잘 섞어서 사용하였다.

70~80%정도 confluent한 세포는 HEPES-buffered saline solution을 주입하여 씻어내고, trypsin/EDTA solution(2 ml)을 넣어 flask에 부착된 세포를 떼어낸 후 trypsin neutralizing solution을 첨가하여 원심분리(220 xg, 5분)하였다. 침전물에 새로운 배지를 넣어서 cell count하여 세포를 96-well plate(5×10<sup>3</sup> cells/well)에 심은 다음 24시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

#### (1) 세포독성 측정

Endothelial cell basal medium-2(EBM-2) 배지로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 24시간 배양한 human umbilical vein endothelial cells(HUVEC)에 연자육 추출물을 농도별(10, 30, 50, 100, 300 μg/ml)로 처리한 다음 24시간 배양하여 세포생존율을 MTT assay로 측

정하였다<sup>23)</sup>. MTT(methylthiazol-2-yl-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide, 5 mg/ml)를 20  $\mu$ l 넣고, 세포 배양기에서 2시간 방치하였다. 상층액을 제거한 뒤 formazan 침전물은 DMSO를 200  $\mu$ l씩 넣어 약 15분간 녹였다. 540 nm의 파장에서 ELISA microplate reader로 흡광도를 측정하여 세포생존율을 계산하였다.

#### (2) Nitric oxide 측정

Nitric oxide(NO) 생성 정도는 Griess reaction<sup>24)</sup>에 준하여 microplate reader로 NO 생성의 지표인 배지에 생성된 nitrite 양을 측정하여 결정하였다. 연자육 처리 24시간 후에 배양액 50  $\mu$ l에 Griess reagent(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene diamide 및 2.5% 인산)를 동량 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

Nitrite 양의 측정은 sodium nitrite를 농도별로 조제하여 만든 표준곡선을 이용하여 산출하였고, 생성된 nitrite의 양은  $\mu$ M로 환산하여 나타내었으며, 각 실험에서 기본 대조군은 세포 배양액을 사용하였다.

### 4. 음경해면체의 조직화학적 변화관찰

#### 1) 조직 채취 및 사전처리

Rat을 Ether로 마취시킨 다음 음경을 적출하여 modified krebs-ringer bicarbonate solution(125.4 mM NaCl, 4.9 mM KCl, 2.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 15.8 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12.2 mM glucose, pH 7.4)에서 음경해면체 주위의 지방조직을 제거한 다음 2 mm 두께로 잘랐다.

다른 음경조직을 PE 1  $\mu$ M 용액에 10분간 전처리한 다음 연자육 추출물 3.0 mg/ml 용액에 다시 10분간 처리하였다.

#### 2) 조직표본 제작

처리된 음경조직을 실온에서 24시간동안 10% NBF에 고정하였다. 고정된 조직은 통상적인 방법으로 paraffin에 포매한 후 3  $\mu$ m 두께의 연속절편으로 제작되었다.

#### 3) 음경해면체 조직화학

음경해면체에 분포하는 민무늬근육과 아교섬유의 분포 변화를 관찰하기 위해 Masson trichrome 염색을 실시하였다. 우선 50-60°C Bouin 용액에서 1시간 동안 매염 처리한 다음 70% 에탄올에서 picric acid를 제거하였다. Weigert iron hematoxylin에서 10분 동안 반응시켜 핵 염색하고, Biebrich scalet-acid fuchsin와 phosphomolybdic-phosphotungstic acid에서 각각 15분간, aniline blue에 5분간 처리하여 민무늬근육(적색)과 아교섬유(청색)를 염색한 다음 광학현미경 (BX50, Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 영상분석을 통해 음경해면체내 아교섬유에 대한 민무늬근육의 분포비율을 계산하였다.

#### 4) 음경해면체 면역조직화학

음경해면체의 발기전에 관여하는 eNOS 분포 변화를 관찰하기 위해 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 음경절편을 proteinase K (20  $\mu$ g/ml)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 blocking serum인 10% normal goat serum에서 2시간 동안 반응시켰다. 그리고 1차 항체인 mouse anti-eNOS (1:100, Santa Cruz Biotech)에 4°C humidified chamber에서 72시간 동안 반응

시켰다. 그런 다음 2차 항체인 biotinylated goat anti-mouse IgG2a (1:100, DAKO, USA)에 실온에서 24시간 link 하였고, 그런 다음 avidin biotin complex kit (Vector Lab, USA)에 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 0.05% 3,3'-diaminobenzidine과 0.01% HCl이 포함된 0.05M tris-HCl 완충용액 (pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하였다. 영상분석을 통해 음경해면체내 eNOS의 반응을 계산하였다.

#### 5) 영상분석

조직화학과 면역조직화학의 결과의 수치화를 위해 Image pro Plus (Media Cybernetic, USA)을 이용한 영상분석 (image analysis)을 실시하였다.

### 5. 통계처리

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

실험결과의 비교는 student's t-test로 유의성을 검증하였다.

## 결 과

### 1. PE로 수축된 해면체에서의 수축변화

PE에 의한 최대수축 0.93  $\pm$  0.16 g(100%)에 비하여 연자육 추출물을 농도별로 투여하였을 때 1.0 mg/ml에서 0.59  $\pm$  0.17 g(62.5%, p<0.01), 3.0 mg/ml에서 0.23  $\pm$  0.10 g(24.5%, p<0.001)의 수축을 나타내어 유의성 있는 이완효과를 확인할 수 있었다(Fig. 1).

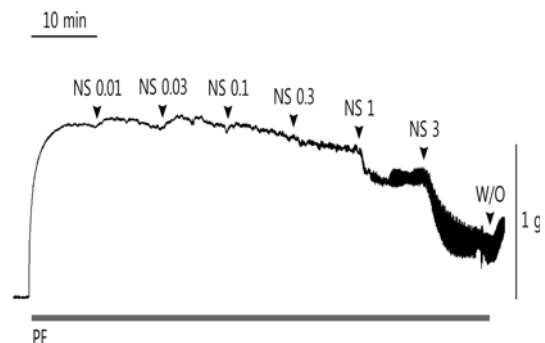


Fig. 1. NS extract-induced concentration-dependent relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum (n=6). Representative tracings are shown as the relaxation of corpus cavernosum strip by cumulative addition of 0.01 mg/ml to 3.0 mg/ml NS extract at the plateau of PE-induced contraction. PE, phenylephrine 1  $\mu$ M; NS, *Nelumbinis Semen* extract (mg/ml); W/O, wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

### 2. IM이 해면체 이완효과에 미치는 영향

IM을 전처리 하지 않은 경우 PE에 의한 최대수축 1.17  $\pm$  0.26 g(100%)에 비하여 연자육 추출물을 농도별로 투여하였을 때 1.0 mg/ml에서 0.70  $\pm$  0.22 g(59.3%, p<0.001), 3.0 mg/ml에서 0.39  $\pm$  0.17 g(32.6%, p<0.001)의 수축을 나타내어 유의성 있는 이완효과를 보였다.

IM을 전처리한 경우 PE에 의한 최대수축 0.87  $\pm$  0.23

g(100%)에 비하여 연자육 추출물을 농도별로 투여하였을 때 0.3 mg/ml에서  $0.63 \pm 0.23$  g(70.9%,  $p < 0.05$ ), 1.0 mg/ml에서  $0.37 \pm 0.14$  g(42.2%,  $p < 0.001$ ), 3.0 mg/ml에서  $0.16 \pm 0.09$  g(17.8%,  $p < 0.001$ )의 수축을 나타내어 유의성 있는 이완효과를 보였다.

실험결과 IM을 전처치 하지 않은 경우와 IM을 전처치한 경우를 비교하였을 때 이완효과의 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 2).

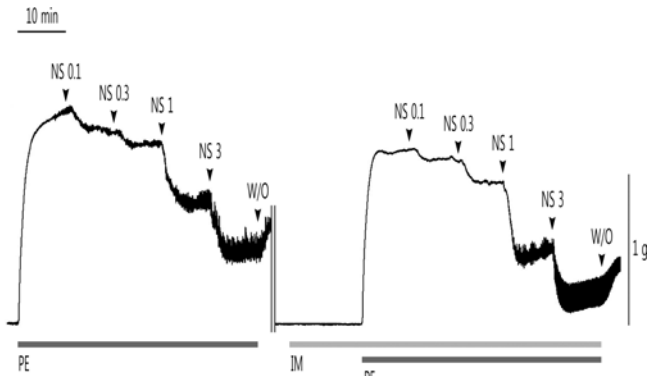


Fig. 2. Effects of NS extract on PE-precontracted rabbit corpus cavernosum in the absence and presence of IM(n=11). Representative tracings are shown as the relaxation of corpus cavernosal strip by NS extract(0.1, 0.3, 1.0 and 3.0 mg/ml) at the plateau of PE-induced contraction in IM treated or IM non-treated corpus cavernosum. PE, phenylephrine 1  $\mu$ M ; NS, *Nelumbinis Semen* extract(mg/ml) ; IM, indomethacin 10  $\mu$ M ; W/O, wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

### 3. TEA가 해면체 이완효과에 미치는 영향

TEA를 전처치 하지 않은 경우 PE에 의한 최대수축  $1.15 \pm 0.18$  g(100%)에 비하여 연자육 추출물을 농도별로 투여하였을 때 1.0 mg/ml에서  $0.74 \pm 0.20$  g(63.7%,  $p < 0.01$ ), 3.0 mg/ml에서  $0.32 \pm 0.14$  g(28.0%,  $p < 0.001$ )의 수축을 나타내어 유의성 있는 이완효과를 보였다.

TEA를 전처치한 경우 PE에 의한 최대수축  $1.08 \pm 0.22$  g(100%)에 비하여 연자육 추출물을 농도별로 투여하였을 때 1.0 mg/ml에서  $0.72 \pm 0.20$  g(65.9%,  $p < 0.01$ ), 3.0 mg/ml에서  $0.27 \pm 0.09$  g(24.6%,  $p < 0.001$ )의 수축을 나타내어 유의성 있는 이완효과를 보였다.

실험결과 TEA를 전처치 하지 않은 경우와 TEA를 전처치한 경우를 비교하였을 때 이완효과의 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 3).

### 4. L-NNA가 해면체 이완효과에 미치는 영향

L-NNA를 전처치 하지 않은 경우 PE에 의한 최대수축  $0.99 \pm 0.14$  g(100%)에 비하여 연자육 추출물을 농도별로 투여하였을 때 1.0 mg/ml에서  $0.63 \pm 0.09$  g(64.5%,  $p < 0.001$ ), 3.0 mg/ml에서  $0.34 \pm 0.09$  g(34.7%,  $p < 0.001$ )의 수축을 나타내어 유의성 있는 이완효과를 보였다.

L-NNA를 전처치한 경우 PE에 의한 최대수축  $1.20 \pm 0.18$  g(100%)에 비하여 연자육 추출물을 농도별로 투여하였을 때 1.0 mg/ml에서  $1.04 \pm 0.15$  g(88.0%,  $p < 0.05$ ), 3.0 mg/ml에서  $0.74 \pm 0.17$  g(63.2%,  $p < 0.001$ )의 수축을 나타내어 유의성 있는 이완효과

를 보였다.

실험결과 L-NNA를 전처치하지 않은 경우에 비하여 L-NNA를 전처치한 경우 연자육 추출물 0.3, 1.0, 3.0 mg/ml에서 이완효과가 유의성 있게 억제되었다(Fig. 4).

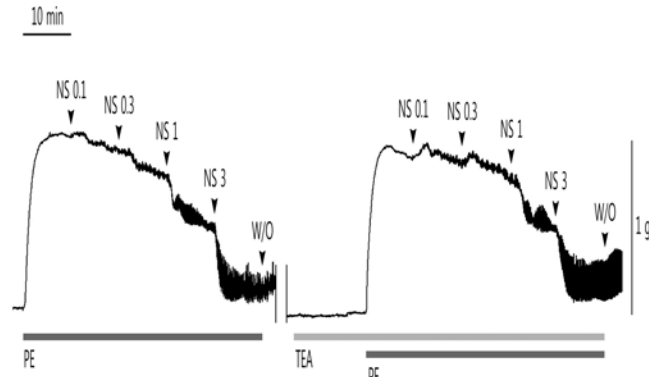


Fig. 3. Effects of NS extract on PE-precontracted rabbit corpus cavernosum in the absence and presence of TEA(n=9). Representative tracings are shown as the relaxation of corpus cavernosal strip by NS extract(0.1, 0.3, 1.0 and 3.0 mg/ml) at the plateau of PE-induced contraction in TEA treated or TEA non-treated corpus cavernosum. PE, phenylephrine 1  $\mu$ M ; NS, *Nelumbinis Semen* extract(mg/ml) ; TEA, tetraethylammonium chloride 10  $\mu$ M ; W/O, wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

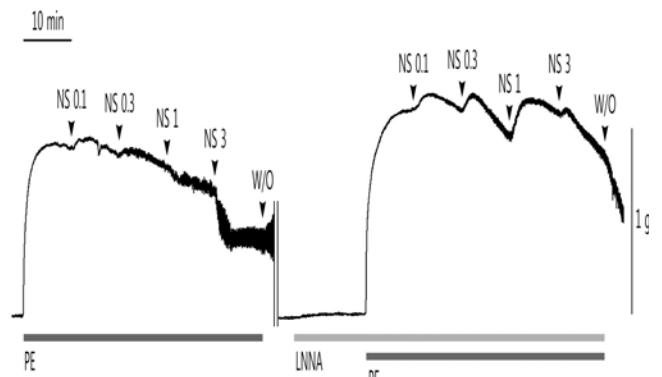


Fig. 4. Effects of NS extract on PE-precontracted rabbit corpus cavernosum in the absence and presence of L-NNA(n=9). Representative tracings are shown as the relaxation of corpus cavernosal strip by NS extract(0.1, 0.3, 1.0 and 3.0 mg/ml) at the plateau of PE-induced contraction in L-NNA treated or L-NNA non-treated corpus cavernosum. PE, phenylephrine 1  $\mu$ M ; NS, *Nelumbinis Semen* extract(mg/ml) ; L-NNA, Nw-nitro-L-arginine 10  $\mu$ M ; W/O, wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

### 5. MB가 해면체 이완효과에 미치는 영향

MB를 전처치 하지 않은 경우 PE에 의한 최대수축  $1.02 \pm 0.15$  g(100%)에 비하여 연자육 추출물을 농도별로 투여하였을 때 0.3 mg/ml에서  $0.80 \pm 0.12$  g(78.4%,  $p < 0.05$ ), 1.0 mg/ml에서  $0.62 \pm 0.15$  g(61.0%,  $p < 0.001$ ), 3.0 mg/ml에서  $0.27 \pm 0.12$  g(26.8%,  $p < 0.001$ )의 수축을 나타내어 유의성 있는 이완효과를 보였다.

MB를 전처치한 경우 PE에 의한 최대수축  $1.04 \pm 0.12$  g(100%)에 비하여 연자육 추출물을 농도별로 투여하였을 때 0.3 mg/ml에서  $0.86 \pm 0.14$  g(82.3%,  $p < 0.05$ ), 1.0 mg/ml에서  $0.65 \pm$

0.16 g(62.4%,  $p < 0.001$ ), 3.0 mg/ml에서  $0.25 \pm 0.12$  g(24.3%,  $p < 0.001$ )의 수축을 나타내어 유의성 있는 이완효과를 보였다.

실험결과 MB를 전처리 하지 않은 경우와 MB를 전처리한 경우를 비교하였을 때 이완효과의 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 5).

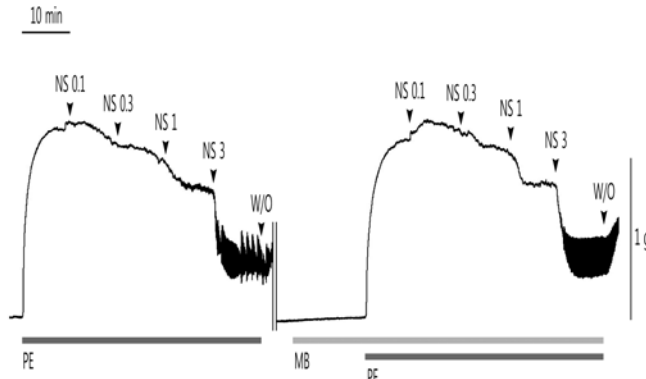


Fig. 5. Effects of NS extract on PE-precontracted rabbit corpus cavernosum in the absence and presence of MB(n=11). Representative tracings are shown as the relaxation of corpus cavernosal strip by NS extract(0.1, 0.3, 1.0 and 3.0 mg/ml) at the plateau of PE-induced contraction in MB treated or MB non-treated corpus cavernosum. PE, phenylephrine 1  $\mu$ M ; NS, *Nelumbinis Semen* extract(mg/ml) ; MB, methylene blue 1  $\mu$ M ; W/O, wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

6. 연자육의 전처치에 따른  $Ca^{2+}$  의존성 수축의 변화

$Ca^{2+}$ 이 제거된 상태의 krebs-ringer solution에서 PE의 투여로 수축을 유발시킨 후  $Ca^{2+}$  1 mM을 투여하였을 때  $1.32 \pm 0.4$  g의 수축을 나타내었다.

반면  $Ca^{2+}$ 이 제거된 상태의 krebs-ringer solution에서 연자육 추출물(3.0 mg/ml)을 전처리한 다음 PE의 투여로 수축을 유발시킨 후  $Ca^{2+}$  1 mM을 투여하였을 때  $0.81 \pm 0.2$  g( $p < 0.01$ )의 수축을 나타내어,  $Ca^{2+}$  투여로 인한 수축의 증가는 연자육 추출물의 전처치에 의해 유의성 있게 감소되었다(Fig. 6).

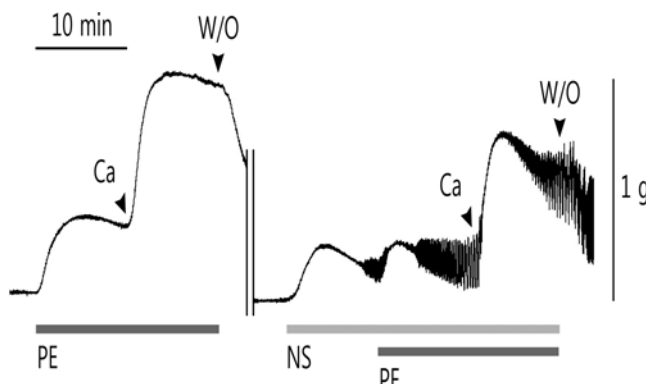


Fig. 6. Effects of NS extract on calcium induced contraction of corpus cavernosal strip in calcium free media(n=8). Representative tracings are shown as the contraction of corpus cavernosal strip by calcium chloride at the plateau of PE-induced contraction in NS treated or NS non-treated corpus cavernosum in  $Ca^{2+}$ -free krebs-ringer solution. PE, phenylephrine 1  $\mu$ M ; Ca, calcium chloride 1 mM ; NS, *Nelumbinis Semen* extract 3.0 mg/ml ; W/O, wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

7. 연자육의 세포독성 측정

Human umbilical vein endothelial cell(HUVEC)에 연자육 추출물을 농도별로 24시간 처치한 후 MTT assay를 통해 세포 생존율을 측정한 결과 연자육 추출물의 농도 10, 30, 50, 100, 300  $\mu$ g/ml에서 모두 세포 생존율에 변화가 없었다(Fig. 7).

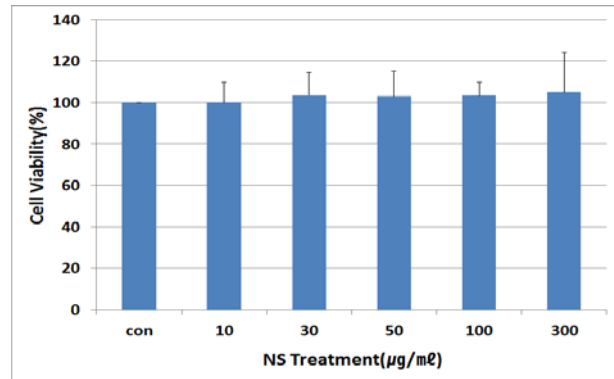


Fig. 7. Effects of NS extract on the viability of human umbilical vein endothelial cell(HUVEC). Representative bars are shown as the cell viability in HUVEC treated with NS extract(10, 30, 50, 100 and 300  $\mu$ g/ml) for 24 hr at 37°C. NS, *Nelumbinis Semen* extract.

8. 연자육이 NO의 생성에 미치는 영향

Human umbilical vein endothelial cell(HUVEC)에 연자육 추출물을 농도별로 24시간 처치한 후 NO 량을 측정하였을 때 control에서 측정된 NO 량인  $4.18 \pm 0.02$   $\mu$ M에 비하여 연자육 추출물 10  $\mu$ g/ml의 농도에서  $4.25 \pm 0.01$   $\mu$ M, 30  $\mu$ g/ml의 농도에서  $4.27 \pm 0.15$   $\mu$ M, 50  $\mu$ g/ml의 농도에서  $4.28 \pm 0.03$   $\mu$ M, 100  $\mu$ g/ml의 농도에서  $4.30 \pm 0.01$   $\mu$ M, 300  $\mu$ g/ml의 농도에서  $4.30 \pm 0.03$   $\mu$ M의 NO가 측정되어 유의성 있는 증가를 보였다(Fig. 8).

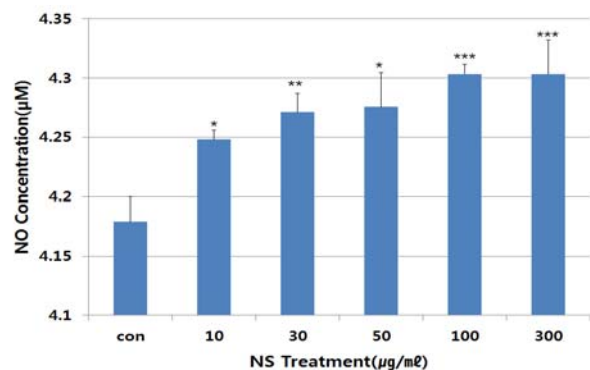


Fig. 8. Effects of NS extract on nitric oxide concentration in human umbilical vein endothelial cell(HUVEC). Representative bars are shown as the nitric oxide concentration in HUVEC treated NS extract(10, 30, 50, 100 and 300  $\mu$ g/ml) for 24 hr at 37°C. NS, *Nelumbinis Semen* extract ; NO, nitric oxide ; \*\*\*  $p < 0.001$  ; \*\*  $p < 0.005$  ; \*  $p < 0.05$  compared with Control

9. 음경해면체내 민무늬근 분포 변화

조직화학적 실험결과 아교섬유는 음경해면체 중심부와 가쪽 백색막 주변부에서 관찰되었다, 민무늬근육은 음경해면체에 분포하는 아교섬유 사이공간에서 관찰되었는데, 특히 연자육처리군에서는 음



경해면체 중심부에 분포하는 아교섬유사이에서 많이 관찰되었다 (Fig. 9).

영상분석결과 음경해면체내 아교섬유에 대한 민무늬근육의 분포비율은 대조군에서는 1 : 0.06, PE처리군에는 1 : 0.02 그리고 연자육처리군에서는 1 : 0.08로 나타났다.

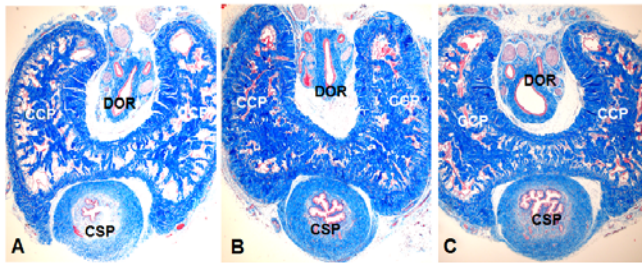


Fig. 9. Results of Masson trichrome's stain for Penis (X40). A. Control group. B. PE group. C. NS group. CCP, corpus cavernosum of penis; CSP, corpus spongiosum of penis; DOR, dorsal region of penis.

10. 음경해면체내 eNOS 분포 변화

면역조직화학적 실험결과 eNOS 양성반응은 음경해면체 중심부 주변의 나선동맥의 민무늬근육에서 관찰되었다(Fig. 10).

영상분석결과 대조군은 2,238±162/1,000,000 pixel, PE처리군은 1,398±77/1,000,000 pixel 그리고 연자육처리군은 55,052±2,398/1,000,000 pixel로 나타났다.

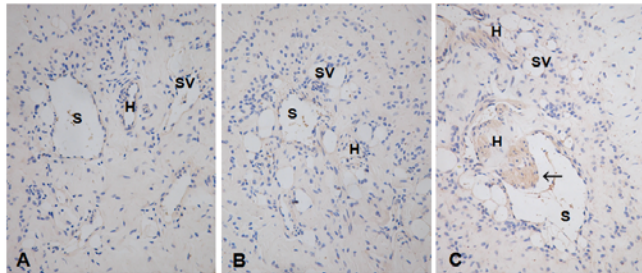


Fig. 10. Immunohistochemistry of eNOS in Penis (x400). A. Control group. B. PE group. C. NS group. H, helicine artery in CCP; S, Sinus in CCP; SV, small vein; arrow, eNOS positive reaction.

고찰

발기부전은 성기능 장애 중에서 가장 많은 부분을 차지하고 있으며 이러한 증상의 치료를 원하는 환자들이 점차 늘어나고 있어 이에 대한 효과적인 진단과 치료가 필요하다.

현재 발기부전의 치료로 정신치료, 약물요법, 음압 팽창기구, 혈관수술, 음경보형물의 삽입 등이 있는데, 이 중 수술이나 주사 등의 침습적인 방법보다는 비침습적인 약물을 복용하는 치료가 절실히 요구되고 있다<sup>4,25)</sup>. 이에 따라 생약의 특성인 부작용을 최소화하는 경우용 성기능 장애 치료약물에 대한 관심이 높아지고 있다.

음경평활근의 이완에는 EDRF 중 하나인 NO가 중요한 역할<sup>26)</sup>을 하는데, 해면체혈관계에 해당되는 eNOS 발현으로 NO가 합성되며 이 NO가 평활근 세포 내로 확산되어 세포내 칼슘 농도를 감소시키고, 해면체 평활근과 소동맥을 이완 및 확장시켜 발기가 유발

<sup>27-30)</sup>된다. 그러므로 음경해면체 혈관의 이완효과를 관찰하기 위해서는 eNOS와 NO의 생성을 관찰해볼 필요가 있다.

발기부전에 대한 실험적 연구로 리 등<sup>31)</sup>은 석창포 에탄올 추출물의 음경해면체 평활근 이완효과 및 그 기전을 규명하기 위해 방사면역분석법을 이용하여 cGMP와 cAMP를 측정하였고, 병태동물모델의 음경해면체 내압을 직접 측정하는 방법을 사용하였다. 또한 백 등<sup>32)</sup>은 蜈蚣의 성기능 개선 효능을 규명하기 위해 ethanol로 발기부전을 유도한 흰쥐의 혈액 및 음경해면체를 적출하여 cGMP 및 guanylate cyclase 활성 등을 측정하고 해면체 신경 절제 실험과 같은 방법을 이용하여 음경 발기능도 측정하였으며, 손 등<sup>33)</sup>도 覆盆子の 성기능 개선 효과에 대해 알기 위해 음경해면체내 NOS 활성과 nitrite 함량을 측정하였다. 이상의 연구들은 모두 음경해면체내 효소활성 및 내압의 증가로써 발기부전에 대한 효과를 규명하는 방법을 사용하였고, 직접적인 이완을 측정하지는 못하였다.

이에 본 실험은 연자육 추출물이 음경해면체의 이완에 직접적으로 미치는 영향과 그 작용기전은 organ bath study를 통하여, eNOS의 생성은 조직화학적 방법을 통하여 연구해보았다.

실험 결과 PE에 의한 최대수축에 대하여 연자육 추출물을 농도별로 투여하였을 때 1.0, 3.0 mg/ml에서 이완효과가 유의하게 나타났으며, 이를 통해 음경해면체 평활근에 대한 연자육 추출물의 이완효과를 확인할 수 있었다.

또한 indomethacin(IM), tetraethylammonium chloride (TEA), methylene blue(MB)를 전처리 하지 않은 경우와 이들을 전처리한 경우를 비교하였을 때 모두 이완효과에 유의성 있는 변화를 관찰할 수 없었으며, *no*-nitro-L-arginine(L-NNA)의 경우, L-NNA를 전처리하지 않은 경우에 비하여 L-NNA를 전처리한 경우 이완효과가 유의성 있게 억제되어 나타났다.

해면체 평활근을 이완시키는 인자로 prostacyclin, endothelium-derived hyperpolarizing factor(EDHF), nitric oxide(NO)가 있고, IM<sup>34)</sup>은 prostacyclin의 생성을 차단하여 이완을 억제시키는데, IM의 전처치가 음경해면체의 이완효과에 영향을 미치지 않았으므로 연자육 추출물의 음경해면체 이완효과는 prostacyclin의 작용과 관련이 없음을 알 수 있다.

또한 TEA는 KCa-channel blocker<sup>35,36)</sup>로서, K<sup>+</sup> 통로를 활성화시키고 세포막의 과분극을 유발하는 EDHF의 작용을 차단하여 음경해면체 이완을 억제시키는데, TEA의 전처치가 음경해면체의 이완효과에 영향을 미치지 않았으므로 연자육 추출물의 음경해면체 혈관이완효과는 EDHF의 작용과도 무관하다는 것을 알 수 있다.

MB는 cGMP 억제제로 해면체 혈관내피세포에서 생성된 NO가 평활근에서 cGMP 농도를 증가시키는 기전을 차단하여 이완을 억제시키는데<sup>37,38)</sup>, MB의 전처치가 음경해면체의 이완효과에 영향을 미치지 않았으므로 연자육의 이완효과가 cGMP를 활성화시키는 기전과 관련이 없다고 생각할 수 있다. 하지만 NO의 생성으로 cGMP가 활성화되므로 이 실험결과에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

반면, L-NNA<sup>39,40)</sup>는 eNOS 선택적 억제제로 내피세포의 L-arginine으로부터 eNOS에 의해 NO가 생성되는 것을 차단하여 음경해면체의 이완을 억제시키는데, L-NNA의 전처치에 의해 연자

육의 음경해면체 이완효과가 유의하게 억제된 것은 연자육 추출물이 eNOS에 의한 NO의 생성과정을 통하여 음경해면체 혈관을 이완시킨다는 것을 의미한다.

세포의  $Ca^{2+}$  유입을 차단한  $Ca^{2+}$ -free solution에서 연자육 추출물의 전처치에 의해 수축의 증가가 유의성 있게 감소되었는데, 이 결과는 연자육 추출물이  $Ca^{2+}$  유입을 차단시킴으로써 음경해면체 혈관이완에 관여하는 것으로 판단된다.

HUVEC에 연자육 추출물을 처치한 후 NO 량을 측정하였을 때 control에 비하여 유의성 있는 증가를 보였다.

또한 조직화학적 실험결과, 대조군에 비하여 PE처리군에서 아교섬유에 대한 민무늬근육의 분포비율이 줄고 연자육처리군에서는 증가되어 나타났는데, 이는 PE의 처리로 인해 음경해면체 내 혈관이 수축되었다가 연자육을 처리함으로써 다시 확장된 것을 알 수 있다. 그리고 연자육처리군에서는 대조군에 비해 eNOS 양성반응도 뚜렷이 관찰되었는데 이는 연자육 추출물이 eNOS의 생성을 촉진시킨 것을 나타낸다.

이렇듯 HUVEC 및 조직화학적 실험의 결과는 L-NNA의 전처치 여부로 알게된, 연자육 추출물의 음경해면체 혈관이완효과가 eNOS에 의한 NO의 생성과정에 관여함으로써 나타난다는 사실을 뒷받침해주는 근거로 판단할 수 있다.

즉, 본 실험을 통해 연자육 추출물은 내피세포 내에서 eNOS의 생성 및 NO의 생성을 증가시켜 세포의  $Ca^{2+}$ 의 유입을 차단하는 경로를 통하여 음경해면체 혈관을 이완시키는 것으로 생각된다.

## 결 론

연자육 추출물이 음경해면체 혈관의 이완에 미치는 영향을 검증하고자 organ bath study와 조직화화학적 방법을 통해 아래와 같은 결과를 얻었다.

연자육 추출물은 PE로 최대 수축시킨 후 농도별로 투여되었을 때 1.0, 3.0 mg/ml에서 유의성 있는 이완효과를 나타냈다.

연자육 추출물은 IM과 TEA, MB를 전처치한 음경해면체에서는 이완효과에 영향을 미치지 않았으나, L-NNA를 전처치한 음경해면체에서는 이완효과를 유의하게 억제시켰다.

연자육 추출물은  $Ca^{2+}$ -free solution에서  $Ca^{2+}$ 의 첨가에 따른 음경해면체 수축의 증가를 유의하게 억제시켰다.

연자육 추출물은 HUVEC에 처치한 후 관찰한 NO 량을 control에 비해 유의하게 증가시켰다.

연자육 추출물은 SHR의 음경해면체 조직에 처치하였을 때 PE처리군에 비하여 민무늬근의 비율과 eNOS의 양성반응을 증가시켰다.

이상의 결과, 연자육 추출물은 내피세포 내에서 eNOS의 생성 및 NO의 생성을 증가시켜 세포의  $Ca^{2+}$ 의 유입을 차단하는 경로를 통하여 음경해면체 혈관을 이완시키는 것으로 생각된다.

## References

- Kim, J.H., Klyachkin, M.L., Svendsen, E., Davies, M.G., Hagen, P.O., Carson, C.C. Experimental

- hypercholesterolemia in rabbits induces cavernosal atherosclerosis with endothelial and smooth muscle cell dysfunction. *Journal of Urology* 151(1):198-205, 1994.
- Azadzi, K.M., Saenz de Tejada, I. Hypercholesterolemia impairs endothelium-dependent relaxation of rabbit corpus cavernosum smooth muscle. *Journal of Urology* 146(1):238-240, 1991.
- Kwon, K.B., Kim, B.R., Hwang, I.J., Kim, E.K., Kim, G.H., Ko, K.H., Choi, Y.S., Zhang, G.G., Rho, S.I., Han, D.W., Cha, S., Park, D.Y., Ryu, D.G. Effects of Gamimajeonjahan extract on the sexual function in male rats. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology* 18(5):1410-1471, 2004.
- Lee, H.Y. *Andrology*. Seoul, Publishing department of Seoul National University, p 232, 1987.
- Maas, R., Schwedhelm, E., Albsmeier, J., Boger, R.H. The pathophysiology of erectile dysfunction related to endothelial dysfunction and mediators of vascular function. *Vascular Medicine* 7(3):213-225, 2002.
- Kim, S.K. *Urology*. Seoul, Korea Medical Book Publisher, p 264, 1991.
- Doo, H.K. *Urology of Oriental Medicine*. Seoul, Institute of Oriental medicine, p 1152, 1992.
- Shin, M.K. *Clinic Herbology*. Seoul, Younglim press, p 505, 1997.
- The Jointly Published Textbook Compilation Committee of Oriental College of Medicine Nationwide Department. *Herbology*. Seoul, Younglim press, p 684, 2004.
- Birgitte, L.C., Per, M., Zhao, Y. Traditional chinese medicine in treatment of hyperlipidaemia. *Journal of Ethnopharmacology* 46: 125-159, 1995.
- Kim, J.H., Kang, M.K., Cho, C.W., Chung, H.S., Kang, C.W., Parvez, S., Bae, H.S. Effects of Nelumbinis Semen on contractile dysfunction in ischemic and reperfused rat heart. *Archives of Pharmacal Research* 29(9):777-785, 2006.
- Kim, T.H. Effects of Nelumbinis semen on LPS-induced NO production by BV2 microglial cells. *Graduate School of Kyunghee University*. 2006.
- Park, J.H., Lee, B.G., Byun, G.I., Kim, D.W. Antioxidant activities and inhibitory effect on oxidative DNA damage of Nelumbinis Semen extracts. *Korean Journal of Herbology* 25(4):55-59, 2010.
- Mukherjee, P.K., Pal, S.R., Saha, K., Saha, B.P. Hypoglycemic activity of Melumbo nificera rhizome(methabolic extract) in streptozotocin induced diabetic rats. *Phytotherapy Research* 9: 522-524, 1995.
- Mukherjee, P.K., Das, J., Balasubramanian, R., Saha, K.,

- Pal, M., Saha, B.P. Antidiarrhoeal evaluation of *Nelumbo nucifera* rhizome extract. *Indian Journal of Pharmacology* 27: 262–364, 1995.
16. Mukherjee, P.K., Giri, S.N., Saha, K., Pal, M., Saha, B.P. Antifungal screening of *Nelumbo nucifera* (Nymphaeaceae) rhizome extract. *Indian Journal of Pharmacology* 35: 327–330, 1995.
17. Mukherjee, P.K., Balasubramanian, R., Saha, K., Pal, M., Saha, B.P. Antibacterial efficiency of *Nelumbo nucifera*(Nymphaeaceae) rhizome extract. *Indian Drugs* 32: 274–276, 1995.
18. Song, G.S., Ahn, B.Y., Lee, K.S., Maeng, I.K., Choi, D.S. Effect of hot water extracts from medical plants on the mutagenicity of indirect mutagens. *Journal of Food Science and Technology* 29: 1288–1294, 1997.
19. Lee, J.W., Hong, M.C., Shin, M.K., Bae, H.S. Comparison of *Nelumbinis Semem* extract with *hypericum perforatum* and fluoxetine in animal model of depression. *Korean Journal of Oriental Physiology and Pathology* 20(4):830–843, 2006.
20. Jang, C.G., Kang, M.K., Cho, J.H., Lee, S.B., Kim, H.T., Park, S.K., Lee, J.W., Park, S.K., Hong, M.C., Shin, M.K., Shim, I.S., Bae, H.S. *Nelumbinis Semen* reverses a decrease in 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding induced by chronic mild stress, a depression-like symptom. *Archives of Pharmacal Research* 27: 1065–1072, 2004.
21. Kang, M.K., Shin, D.W., Oh, J.W., Cho, C.W., Lee, H.J., Yoon, D.W., Lee, S.M., Yun, J.H., Choi, H., Park, S.K., Shin, M.K., Hong, M.C., Bae, H.S. The antidepressant effect of *Melumbinis Semen* on rats under chronic mild stress induced depression-like symptoms. *The American Journal of Chinese Medicine* 33: 205–213, 2005.
22. Lee, J.Y., Im, K.R., Jung, T.K., Yoon, K.S. The inhibitory effects of *Nelumbo nucifera* Gaertner extract on melanogenesis. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal* 28(2):137–145, 2013.
23. 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.
24. Tracey, W.R., Linden, J., Michae, I.J.P., 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. *Journal of Pharmacology* 252: 922–928, 1990.
25. Steers, W.D., McConnell, J., Benson, G.S. Some pharmacologic effects of yohimbine on human and rabbit penis. *Journal of Urology* 131(4):799–802, 1984.
26. Palmer, R.M.J., Ashton, D.S., Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664–666, 1989.
27. Stamler, J.S., Singel, D.J., Loscalzo, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox activated forms. *Science* 258: 1898–1902, 1992.
28. De May, J.G., Vanhoutte, P.M. Role of the intima in cholinergic and purinergic relaxation of isolated canine femoral arteries. *Journal of Physiology* 316: 347–355, 1981.
29. 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.
30. Chen, J., Wollman, Y., Chernichovsky, T., Iaina, A., Sofer, M., Matzkin, H. Effect of oral administration of high-dose nitric oxide donor L-arginine in men with organic erectile dysfunction: result of a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *British Journal of Urology International* 83: 269–273, 1999.
31. Li, S., Kim, H.T., Lee, Y.J., Shin, H.K., Kang, D.G., Lee, H.S. Effect of *acorus gramineus* on the relaxation of *Corpus Cavernosum* smooth muscle. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology* 25(5):863–869, 2011.
32. Baek, B.K., Jeong, J.C., Shin, H.C. Effects of *Scolopendra* on ethanol-induced erectile dysfunction in rats. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology* 22(1):176–182, 2008.
33. Son, H.J., Jeong, J.C. Effects of the extract of *Rubi Fructus* on urethral nitric oxide synthase activity and nitrite level in chronic ethanol-treated rats. *The Journal of the Korea Institute of Oriental Medical Informatics* 6(1):46–56, 2000.
34. Lee, S.W., Wang, H.Z., Zhao, W., Ney, P., Brink, P.R., Christ, G.J. Prostaglandin E<sub>1</sub> activates the large-conductance K<sub>Ca</sub> channel in human corporal smooth muscle cells. *International Journal of Impotence Research* 11: 189–199, 1999.
35. Lee, S.W., Wang, H.Z., Christ, G.J. Characterization of ATP-sensitive potassium channels in human corporal smooth muscle cells. *International Journal of Impotence Research* 11: 179–188, 1999.
36. Ko, F.N., Huang, T.F., Teng, C.M. Vasodilatory action mechanism of apigenin isolated from *Apium graveolens* in rat thoracic aorta. *Biochimica et Biophysica Acta* 1115: 69–74, 1991.



37. 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.
38. Gonzalez, C.M., Brannigan, R.E., Bervig, T., Zelner, D., Podlasek, C.A., Mckenna, K.E. Protein and gene expression of nitric oxide synthase isoforms I and III in the rat penile shaft. *Journal of Andrology* 22: 54–61, 2001.
39. Chen, J., Wollman, Y., Chernichovsky, T., Iaina, A., Sofer, M., Matzkin, H. Effect of oral administration of high-dose nitric oxide donor L-arginine in men with organic erectile dysfunction: result of a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *British Journal of Urology International* 83: 269–273, 1999.
40. Angulo, J., Cuevas, P., Fernandez, A., Gabancho, S., Allona, A., Marin-Morales, A. Activation and potentiation of the NO/cGMP pathway by NG-hydroxyl-L-arginine in rabbit corpus cavernosum under normoxic and hypoxic conditions and ageing. *British Journal of Pharmacology* 138: 63–70, 2003.