홍삼, 천마, 적하수오 병용투여에 의한 고지혈증 랫드에서의 콜레스테롤 및 발기부전 개선효과

이윤정^{1,2#}, 고민철^{1,2}, 담 서^{1,2,3}, 이재윤¹, 황진석¹, 차정단⁴, 최경민⁴, 강대길^{1,2,3*}

1 : 원광대학교 한의과대학 생리학교실, 2 : 한방체액조절연구센터,
3 : Brain Korea (BK) 21 plus team, 원광대학교 4 : 진안홍삼연구소

Beneficial effect of Combination with *Korean Red Ginseng*, *Gastrodia Rhizoma* and *Polygoni Multiflori* on Cholesterol and Erectile Dysfunction in Hyperlipidemia rats

Yun Jung Lee^{1,2#}, Min Chul Kho^{1,2}, Rui Tan^{1,2,3}, Jae Yun Lee¹,
Jin Seok Hwang¹, Jeong Dan Cha⁴, Kyung Min Choi⁴, Dae Gill Kang^{1,2,3*}

1 : College of Oriental Medicine, 2 : Hanbang Body-fluid research center, Wonkwang University,
3 : Brain Korea (BK) 21 plus team, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University,
4 : Institute of JinAn Red Ginseng Korea

ABSTRACT

Objectives : This study was designed to investigate effects of the combination with Korean Red Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer), *Gastrodia Rhizoma* (*Gastrodia elata* Blume) and *Polygoni Multiflori Radix* (*Polygonum multiflorum* Thunberg) on metabolic disorders including cholesterol and erectile dysfunction in hyperlipidemia rats.

Methods : Animals were divided into six groups; Control with normal diet, high fat/cholesterol-diet (HFCD), fluvastatin, Korean Red Ginseng treated (KRG), and the combination treated (*Korean Red Ginseng*, *Gastrodia Rhizoma* and *Polygoni Multiflori Radix*; 1:1:1 for KGP1 and 2:1:1 for KGP2). The experimental groups initially received HFCD for 10 weeks and then treated orally with fluvastatin, KRG, KGP1 and KGP2 during the final 6 weeks. Erectile function was determined by the measurements of intracavernosal pressure (ICP) and maximal arterial pressure (MAP) after electrical stimulation of the cavernosal nerve.

Results : KGP2 decreased the level of total cholesterol and LDL cholesterol in the sera of HFCD rats without no changes of body weights. KRG, KGP1 and KGP2 decreased the level of C-reactive protein (CRP) levels except of fluvastatin, synthetic HMG-CoA reductase inhibitor. KRG, KGP1 and KGP2 significantly increased the ICP, ICP/MAP ratio, area under the curve (AUC) compared with those of normal rat. Morphometric analyses showed that KRG, KGP1 and KGP2 increased the volume of smooth muscle and the regular arrangement of collagen fibers in corpus cavernosum of HFCD rats. The penile expression of eNOS was increased by KRG, KGP1 and KGP2.

Conclusions : Based on these results, we suggest that the combination with *Korean Red Ginseng*, *Gastrodia Rhizoma* and *Polygoni Multiflori* may improve hyperlipidemia through regulating the lipid profiles and erectile dysfunction in rats.

Key words : *Korean Red Ginseng*, *Gastrodia Rhizoma*, *Polygoni Multiflori*, hyperlipidemia, erection

서론

최근 10년 동안 우리나라는 동물성지방의 과다섭취, 고만

수화물 등의 서구화된 식생활로 인한 심혈관계 질환의 발병률이 계속 증가하였다. 전 세계적으로도 동맥경화증과 관련된

*Corresponding author : Dae Gill Kang, College of Oriental Medicine, Wonkwang University
· Tel : +82-63-850-6933 · Fax : +82-63-850-7260 · E-mail : dgkang@wku.ac.kr

#First author : Yun Jung Lee, College of Oriental Medicine, Wonkwang University
· Tel : +82-63-850-6447 · Fax : +82-63-850-7260 · E-mail : shrons@wku.ac.kr
· Received : 13 October 2015 · Revised : 7 November 2015 · Accepted : 9 November 2015

질환인 허혈성 심질환과 뇌혈관 질환에 의한 사망률이 큰 폭으로 증가하고 있다¹⁾. 심혈관계 질환의 위험요인으로는 고지혈증, 고혈압, 당뇨병, 비만, 가족력, 흡연, 스트레스 및 성격 등이 있다고 보고되고 있으며, 특히 고지혈증은 심혈관계 질환 중 관상동맥 질환의 가장 중요한 독립인자로 알려져 있다²⁾. 고지혈증을 유발하는 환경적 요인 중 식이요인의 영향이 크다고 알려져 있으며, 그 요인으로는 고지방, 고당질, 포화지방산 및 콜레스테롤 등이 있다³⁾.

음경발기는 신경계와 혈관계 및 내분비계의 상호작용으로 발생하는 것으로 nitric oxide(NO)-cGMP 또는 AMP작용에 의한 음경해면체와 해면소동맥 평활근의 이완에 의하여 일어나는 생리적인 현상으로 50세 이상의 연령층에서 나타나는 발기부전의 약 절반정도는 혈관계 질환에 의하여 유발되는 것으로 알려져 있다^{4,5)}. 고지혈증에 의해 나타나는 발기부전 초기는 혈관의 내벽을 감싸고 있는 혈관내피의 기능 부전이 발생하여 정상적인 내피 의존적 혈관이완 작용이 손실되고 후기에는 혈관의 내강이 좁아지게 됨으로써 발기에 영향을 미치게 된다⁶⁾.

인삼 (*Ginseng Radix Alba*, *Panax ginseng* C.A. Meyer)은 오갈피나무과 (Araliaceae)에 속하는 다년생 초본으로 달면서 쓴맛이 있고, 따뜻한 기운을 가지고 있으며, 원기를 보하고 비장을 보호하며, 폐를 튼튼하게 하고, 진액을 생겨나게 하여 구갈을 멈추게 하고 심장을 편안하게 해주는 효능을 가지고 있다^{7,8)}. 인삼은 수천년 동안 동양에서 민간요법에 의한 경험적 효능에 의해 신비의 명약으로 애용되고 있으며, 최근 인삼의 주요 성분들에 대한 과학적 연구에 따라 면역효과, 중추신경계, 각종 스트레스, 항산화, 심혈관 장애 개선작용 등에 관한 약리작용이 밝혀지고 있다. 인삼의 주요 생리활성 물질은 진세노사이드(ginsenoside)라고도 불리는 사포닌과 정유성분, 폴리아세틸렌(polyacetylene), 페놀성분, 배당체 및 산성 펩티드 등이 있으며, 그 밖에도 비타민, 당류, 무기질과 같은 다양한 성분들이 함유되어 있다⁹⁾. 인삼을 증기로 찌서 건조시킨 홍삼(Korean red ginseng)은 전반적인 강장제(tonic)로서 이용되는데, 노화 억제, 면역 증강, 항스트레스 작용, 항암 작용 등의 약리효과가 알려져 있다^{9,10)}.

천마 (*Gastrodiae Rhizoma*, *Gastrodia elata* Blume)는 난초과 (Orchidaceae)에 속하는 천마의 덩이줄기를 건조한 것으로, 예로부터 한국과 중국 등의 동양권에서 항간질제, 진통제와 현기증에 대한 안정제, 고혈압, 일반적인 마비와 파상풍 등에 사용되어져 왔다¹¹⁾. 최근 천마에 대한 항염증 및 혈관보호효과가 밝혀지면서 많은 관심을 받고 있다^{12,13)}.

적하수오 (*Polygoni Multiflori Radix*, *Polygonum multiflorum* Thunberg)는 다년생 덩굴성 초본으로 마디풀과의 식물에 속한다. 예로부터 간(肝), 신(腎)을 보익하고 혈을 자양하며 풍(風)을 제거하는 효능이 있다고 알려져 있어서 정력 감퇴, 부인과 질병 및 현훈 등을 치료하는데 이용되어 왔다¹⁴⁾. 적하수오에는 anthraquinone 화합물인 chrysophanol, emodin, rhein, physcion 및 이들의 배당체인 2,3,5,4'-tetra-hydroxystibene 2-O-β-D-glucopyranoside 및 2"-O-mongalloyl ester 등과 같이 생리활성 물질이 풍부하게 존재하는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾. 적하수오는 각종 항산화 효과, 항염증 효과, 최종당화산물 (AGEs)의 생성 차단 그리고 신경보호 효과 등 다양한 생리 활성에 대한 효능이 알려져 있다^{16,17)}.

최근 건강관리의 중요성이 높아지면서 독성이 없고 안전하

여 장기간 복용이 가능한 천연물 및 한약재를 이용한 한방 치료 기술 개발에 대한 관심이 증가되고 있다. 또한 단독 물질에 의한 효과보다 복합 추출물의 병용투여를 통한 효과가 더욱 증폭될 것이며 이에 따른 연구가 많이 진행되고 있다.

현재까지 홍삼의 단독효과 뿐만 아니라 홍삼과 천마, 또는 홍삼과 적하수오 등 다양한 배합에 의한 혈관질환 개선효과가 보고되었으나, 홍삼과 천마, 적하수오의 병용투여에 의한 연구는 알려진 바 없다. 따라서 본 연구에서는 고지방과 고콜레스테롤 투여로 고지혈증(hyperlipidemia)이 유발된 랫드(rats)에서 홍삼, 천마, 적하수오 혼합추출물의 지질대사 및 발기부전 개선효과를 평가하였다.

재료 및 방법

1. 시료의 제조

홍삼 및 천마, 적하수오는 (재)진안홍삼연구소에서 제공하였다. 삼각 플라스크에 홍삼, 천마, 적하수오(1:1:1)를 각각 100, 100, 100 g을 증류수 3.0 L에 넣고 냉각기를 설치한 후 120분 간 가열하였다 (voucher specimen; HBN212-01). 또한 홍삼, 천마, 적하수오 (2:1:1)를 차례대로 200, 100, 100 g을 증류수 3.0 L에 넣고 같은 방법으로 가열하였다 (HBN222-01). 추출된 각각의 전탕액을 3,000 rpm으로 30 분간 원심 분리 후 여과지 (Whatmann No. 3)를 이용하여 여과하였다. 여과된 각각의 전탕액을 냉동건조기를 이용하여 동결 건조시킨 후 사용 전까지 -20℃에 보관하였다 (Voucher specimen; HBG181-05). 수율은 각각 18.8%, 18.4%였으며, 각각의 추출물 200 mg/kg/day를 실험에 사용하였다.

2. 실험동물 및 식이

실험은 원광대학교 동물실험 윤리위원회의 승인을 얻어 시행하였으며, 동물관리 규정을 준수하였다 (WKU12-13). 8 주령 수컷 SD계통의 흰쥐를 샘타코 (오산, 한국)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 흰쥐는 온도 22 ± 2℃, 습도 50 - 60%의 항온항습 장치에서 12시간씩 암기와 명기를 조절하면서 2주간 적응기 후 다음과 같이 8 마리씩 5개 그룹으로 무작위로 구분하였다. 1) Control (regular diet), 2) HFCD (high fat / cholesterol diet), 3) fluvastatin (HFCD + 3 mg/kg/day fluvastatin), 4) 홍삼 (KRG, HFCD + 200 mg/kg/day KRG), 5) 홍삼 + 천마 + 적하수오 (1:1:1) (KGP1, HFCD + 200 mg/kg/day KGP1), 6) 홍삼 + 천마 + 적하수오 (2:1:1) (KGP2, HFCD + 200 mg/kg/day KGP2). Control group은 10주 동안 regular diet를 시켰으며, HFCD group은 7.5% cocoa butter와 1.25% cholesterol (Research Diet, D12109)을 포함한 high fat / cholesterol diet를 시켰다. 그리고 fluvastatin, KRG, KGP1, KGP2 group은 4주 동안 HFCD를 먹이고, 이 후 6주 동안은 HFCD와 함께 fluvastatin는 3 mg/kg/day, KRG, KGP1, KGP2는 200 mg/kg/day를 각각 투여하였다. Fluvastatin은 statin 계열의 HMG-CoA reductase 억제제로써 양성대조군으로 사용하였다.

3. 혈당 및 콜레스테롤 함량 측정

혈당은 투여기간이 끝난 후 희생시켜 3,000 rpm으로 20 분 동안 원심분리하여 수집하였으며, 공복 시 마우스 혈장 내 glucose, LDL, HDL cholesterol, total cholesterol, total protein 등의 혈액생화학적 수치는 Hitachi 7080 (Hitachi, Tokyo, Japan)을 사용하여 분석하였다.

4. C-reactive protein 측정

10주째 실험이 종료되는 날 동물은 단두로 희생되었고 C-reactive protein (CRP)는 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Biovendor CO., CZECH REPUBLIC)를 구입하여 ELISA reader (BIO-TEK Instruments, Inc., Winooski, Vermont, U.S.A.)에서 450 nm에서 측정하였다.

5. 음경해면체 신경자극

Sodium pentobarbital (50 mg/kg)을 I.P로 주입하여 마취 시킨 랫드의 왼쪽 경동맥에 mean arterial pressure (MAP)를 측정하기 위하여 600 mm 카테터를 삽입하였다¹⁸⁾. Arterial blood pressure는 압력변환기와 생리기록기 (PowerLab/8sp, AD Instruments, Australia)를 연결하여 지속적으로 측정하였다. Intracavernosal pressure (ICP)를 측정하기 위하여 하복부부터 귀두표피까지 정중상으로 피부를 절개하여 복강과 음경해면체까지의 피하조직들을 노출시킨 다음 우측 음경해면체에 23 G 바늘을 삽입하여 폴리에틸렌관을 통해 압력변환기와 생리기록기에 연결하여 전신혈압과 음경해면체 내압을 동시에 측정하였다. 모든 튜브는 250 U/mL의 헤파린 처리를 하여 사용하였다. 노출된 하복부에서 방광과 전립선을 조심스럽게 박리한 다음, 우측 전립선의 후외부에 위치한 골반신경총과 해면체 신경을 확인하여 전기자극을 위해 자극기 (PHIPPS 8 BIRD, INC, RICHMOND, VA, USA)에 연결된 갈고리 모양의 바늘전극을 걸었다. 전기자극은 3 v, 0.1 ms, 3 Hz 및 20 Hz 강도로 5분 간격으로 음경내부압력을 측정하였다. 그룹을 비교하는 주요 발기능의 지표로 ICP, ICP/ MAP와 AUC의 변화를 관찰하였다. 이때 ICP (intracavernosal pressure)는 전기적인 자극을 준 시점으로부터 음경해면체 내부의 압력이 최고치에 달하였을 때의 수치이며, ICP/MAP는 음경해면체 내부의 압력이 최고치에 달하였을 때의 수치를 그에 상응하는 혈압으로 나눈 비율, 그리고 AUC (area under curve of cavernosometry)는 전기적인 자극을 준 1분 동안에 증가된 압력의 면적값을 계산한 수치이다.

6. 조직 염색 및 조직형태학적 분석

음경해면체 평활근의 조직학적 소견을 평가하기 위해 음경해면체 조직을 채취하여 해면체 조직 염색 (Masson's trichrome stainin)을 시행하였다. 4% formaldehyde가 포함된 차가운 PBS 용액에 5시간 동안 고정시킨 음경해면체 조직절편을 PBS로 세척하고 30% sucrose가 포함된 PBS 용액으로 24시간 담가놓았다. Tissue-Tec (Miles Laboratories, Elkhart, Ind., USA)로 조직을 임베딩시키고 isopentane으로 동결시켰다. 동결된 조직은 14 µm 두께로 잘라 glass 슬라이드에

올려 Masson's trichrome 염색을 하여 관찰하였다. 빨간색은 keratin과 muscle fiber를 나타내며, 파란색은 collagen, 검정색은 세포핵을 나타낸다. Masson's trichrome 염색된 슬라이드를 컴퓨터를 이용한 조직형태학적 영상분석기 (Olympus Meta Morph Imaging System)로 분석하였다.

7. 조직면역염색을 통한 eNOS 발현

적출된 음경해면체를 4% paraformaldehyde 용액에 담가 4℃에서 5시간 고정하고, 30% sucrose 용액에 조직을 침적시켰다. 조직을 optimal cutting temperature (OCT) compound (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Torrance, CA, USA)에 넣고 영하 20℃에서 동결한 다음, cryotome SME (Thermo Electron Corporation, Pittsburg, PA)를 이용하여 4 µm의 두께로 평행하게 횡단절편을 만든 후 poly-L-lysine 용액으로 코팅한 슬라이드글라스 위에 각각 부착시켰다. Histostain®-SP kit (Invitrogen Inc, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 통상적인 peroxidase labeled-[strept] avidin-biotin (LAB-SA) 방법을 이용하여 염색을 진행하였다¹⁹⁾. 슬라이드를 실온에 1시간 정도 건조시킨 후 PBS로 세척한 다음, 내인성 과산화효소의 활성을 방지하기 위해 3% hydrogen peroxide 용액에 넣어 1분 간 실온에 방치하였다. 이후 조직을 세척한 다음, 10% non-immune goat serum을 사용하여 20분 동안 반응시켜 항체의 비특이적 결합을 방지하였다. Blocking antibody를 제거한 후 eNOS에 결합하는 mouse monoclonal IgG (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA)를 4℃에서 하룻밤 동안 방치하였다. 이후 이차항체인 biotinylated secondary antibody에 20분 동안 실온에서 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. Horseradish peroxidase-conjugated streptavidin에 30분 동안 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) chromogen과 hematoxylin (Zymed, Carlsbad, CA)을 이용하여 일정시간 동안 발색시킨 다음 슬라이드를 흐르는 물에 씻어 반응을 중지시킨 후 봉입제로 봉입하였다. 각각의 발현정도는 광학현미경으로 200배 시야에서 관찰한 후 사진을 촬영하였다 (B × 41, Olympus, Tokyo, Japan).

8. 통계처리

실험 결과는 각 군별 평균 ± 표준오차 (mean ± SE)로 표시하고, 각 군 별 유의성은 Systat사의 SigmaPlot version 10.0을 이용하여 Students *t*-test나 one-way ANOVA test를 통하여 *p*가 0.05 미만인 경우 유의한 차이로 판정하였다.

결 과

1. 홍삼, 천마, 적하수오 병용투여에 의한 콜레스테롤 개선 분석

랫드에 총 10주간 고지방/고콜레스테롤 식이를 실시하여 콜레스테롤 수치 등 대사지표를 분석하였다(Table 1). 지질 함량 분석 결과, 고지방/고콜레스테롤 식이군에서 총콜레스테롤 함량이 유의적으로 증가하였으며, 200 mg/kg/day 홍삼/천마/적하수오 (2:1:1) 병용투여군에서 유의적으로 감소하였

다 ($p < 0.05$). 그러나 3 mg/kg/day fluvastatin 투여군을 포함한 홍삼 단독투여, 홍삼/천마/적하수오 (1:1:1) 투여군에서는 변화가 보이지 않았다. 저밀도 콜레스테롤 (LDL-c) 수치는 고지방/고콜레스테롤 식이군에서 매우 높게 나타났으며 fluvastatin 및 홍삼/천마/적하수오 (2:1:1) 병용투여군에서 정상수준으로 회복되지는 못하였으나 55.27% 정도 현저하게 중성지방 수치가 감소함을 보여주었다. 고밀도 콜레스테롤 (HDL-c)에서는 고지방/고콜레스테롤 식이군에서는 감소하는 경향을 보였으나 모든 군에서 유의성 있는 변화가 나타나지 않았다. 본 논문에 제시하지 못하였으나 체중의 변화 역시 유의성 있는 변화가 나타나지 않았다. 그러므로 죽상경화 모델에서 홍삼/천마/적하수오 병용투여에 의한 고지혈증 개선 효과를 확인할 수 있었다.

Table 1. Effect of combination with Korean Red Ginseng, *Gastrodia Rhizoma* and *Polygoni Multiflori* on metabolic parameters.

	Cont.	HFCD	+Fluvastatin	+KRG	+KGP1	+KGP2
T-Cholesterol (mg/dl)	62.13±1.77	139.5±8.86*	134.83±4.51	147.57±13.32	185.29±11.37	94.67±3.50*
LDL-c (mg/dl)	13.09±2.76	114.13±9.99**	84.92±6.90*	124.14±13.85	120.56±15.44	63.08±5.31**
HDL-c (mg/dl)	21.14±0.70	17.83±1.66	19.33±0.95	21.43±1.74	20.43±0.10	16.86±2.28
Glucose (mg/dl)	138.2±4.53	140.5±4.49	169.43±8.60	169.15±25	187±13.35	135.71±6.30
BUN (mg/dl)	20±1.48	20.5±0.92	20.6±1.24	19.2±2.75	22.57±2.14	19.63±1.97
T-protein (mg/dl)	6.15±0.18	6.55±0.62	7.1±0.30	7.91±0.47	7.87±0.50	5.79±0.35

Cont. (regular diet), HFCD (high fat/cholesterol diet), +fluvastatin (HFCD + 3 mg/kg/day of fluvastatin), +KRG (HFCD + 200 mg/kg/day Korean Red Ginseng), +KGP1 (HFCD + 1:1:1 combination of *Korean Red Ginseng*, *Gastrodia Rhizoma* and *Polygoni Multiflori*), +KGP2 (HFCD + 2:1:1 combination of *Korean Red Ginseng*, *Gastrodia Rhizoma* and *Polygoni Multiflori*). Values are expressed as mean ± S.E. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Control; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, vs. HFCD (n=8, each group).

2. 홍삼, 천마, 적하수오 병용투여에 의한 혈액 내 CRP 농도 변화

혈관염증을 반영해주는 표식인자로 간에서 합성되는 C-reactive protein (CRP) 농도를 분석하였다(Fig. 1). 고지방/고콜레스테롤 식이군에서 혈중 CRP 농도는 정상식이군보다 44% 정도 유의성 있게 증가하는 것으로 나타났으며, fluvastatin 투여군을 제외한 홍삼 단독투여군과 홍삼/천마/적하수오 병용투여군에서 유의성 있게 감소하였다. 특히, 홍삼/천마/적하수오 (1:1:1) 병용투여군에서 가장 높은 감소효과를 보여주었다 ($p < 0.01$).

Fig. 1. Effect of the combination with KGP on plasma C-reactive protein (CRP) levels in high fat/cholesterol rats. Cont. (regular diet), HFCD (high fat/cholesterol diet), +fluvastatin (HFCD + 3 mg/kg/day of fluvastatin), +KRG (HFCD + 200 mg/kg/day Korean Red Ginseng), +KGP1 (HFCD + 1:1:1 combination of *Korean Red Ginseng*, *Gastrodia Rhizoma* and *Polygoni Multiflori*), +KGP2 (HFCD + 2:1:1 combination of *Korean Red Ginseng*, *Gastrodia Rhizoma* and *Polygoni Multiflori*). Each value shows mean ± S.E. (n=8). ** $p < 0.01$ vs. Control; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. HFCD (n=8, each group).

3. 홍삼, 천마, 적하수오 병용투여에 의한 음경해면체 내압의 변화

고지방/고콜레스테롤 식이군에 홍삼/천마/적하수오를 병용 투여하였을 때 음경해면체 내부의 압력 변화를 관찰하였다. 고지방/고콜레스테롤 식이군에서 음경해면체 내부압력 (ICP)은 정상식이군과 비교해서 다소 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다. 또한 fluvastatin 투여군을 제외한 모든 실험군에서 고지방/고콜레스테롤 식이군과 비교해서 유의하게 증가하였다. 특히 전기자극 3 Hz를 주었을 때와 20 Hz를 주었을 때 모두에서 홍삼 단독투여군보다 홍삼/천마/적하수오 병용투여군 모두에서 ICP 증가폭이 더욱 크게 나타났다. 최대해면체 내압을 전신동맥압으로 보정한 ICP/MAP 값은 3 Hz에서 홍삼/천마/적하수오 (1:1:1) > 홍삼/천마/적하수오 (2:1:1) > 홍삼 단독투여의 순으로 뚜렷한 증가를 보였다. 20 Hz에서는 홍삼/천마/적하수오 (2:1:1) > 홍삼/천마/적하수오 (1:1:1) > 홍삼 단독투여의 순으로 뚜렷한 증가를 보였다. AUC 값 역시 유사한 결과를 보여주었다(Fig. 2).

발기부전 환자의 80% 이상이 콜라겐 증가와 평활근 감소를 보이고 있으므로 Masson's trichrome 염색을 시행하여 음경해면체 평활근 상태를 관찰하였다. 홍삼 단독투여를 비롯한 홍삼/천마/적하수오 병용투여군에서 파란색으로 보이는 음경해면체 콜라겐 조직의 발현부위보다 빨간색으로 보이는 평활근 조직의 발현된 부위가 넓게 분포되어 평활근 조직의 감소를 회복시켜주었다(Fig. 3).

Fig. 2. Effect of the combination with KGP on ICP, ICP/MAP, and AUC in the diabetic rats: peak ICP in response to electrical stimulation of cavernous nerve of diabetic rats. 1, Cont.; 2, HFCD; 3, +fluvastatin; 4, +KRG; 5, +KGP1; 6, +KGP2. Each value shows mean ± S.E. (n=8). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. HFCD (n=8, each group).

Fig. 3. Masson's trichrome staining of corpus cavernosum in control (a), HFCD (b), fluvastatin treatment (c), KRG alone (d), KGP1 (e), KGP2 (f). In the HFCD group, corpus cavernosum showed reduction of smooth muscles and irregular, distorted arrangement of collagen fibers. In the KRG and KGP1/2 treatment group, corpus cavernosum showed increases volume of smooth muscles and the regular arrangement of collagen fibers. Smooth muscle in red and collagen in blue (× 50).

4. 홍삼, 천마, 적하수오 병용투여에 의한 음경해면체 eNOS 발현의 변화

많은 심혈관계의 연구에서 내피세포 의존형 eNOS의 억제 는 결국 NO의 결핍을 유도하여 음경해면체 평활근의 이완 기능 장애를 초래한다. 고지방/고콜레스테롤 식이군에서 음경해면체에서 eNOS 발현을 보기 위해 immunohistochemistry를 진행한 결과, 홍삼 단독투여를 비롯한 홍삼/천마/적하수오 병용투여군에서 eNOS의 발현이 증가되었다(Fig. 4). 그러므로 고지방/고콜레스테롤 식이에 따른 죽상경화 동물모델에서 홍삼 뿐만 아니라 홍삼/천마/적하수오 병용투여에 의한 발기부전 개선효과를 확인하였다.

Fig. 4. Immunohistochemical expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in cavernosal tissue. eNOS was expressed as a brown color in the intracavernosal endothelial and smooth muscle cells of the KRG and KGP1/2 group (x200).

고 찰

본 연구는 고지방/고콜레스테롤 식이 랫드에서 홍삼, 천마, 적하수오 병용투여에 의한 지질대사 및 발기부전 개선효과를 알아보기 위하여 진행되었다. 현재까지 홍삼의 단독효과 뿐만 아니라 홍삼과 천마, 또는 홍삼과 적하수오 등 다양한 배합에 의한 대사기능 개선이 시도되고 있으나 홍삼과 천마, 적하수오의 세가지 병용투여에 의한 지질대사 및 발기부전 개선효과를 보고하지는 않았다. 그러므로 최근 심혈관계 질환이 꾸준히 증가하고 있고 발기부전이 심혈관 질환과 밀접한 연관이 있는 바, 식이성 고지혈증 랫드 모델을 선택하게 되었고 홍삼, 천마, 적하수오를 1:1:1 또는 2:1:1 비율로 투여하여 효과를 비교하였다.

정상상태에서 식이성 중성지방과 콜레스테롤은 조직세포에서 합성된 지질과 균형을 이루며 혈관 내 순환 lipoprotein들의 농도는 항상성에 의해 적절하게 조절되나, 유전적 요인과 환경적 요인에 의해 체내 지질의 균형이 깨지게 되면 혈장 lipoprotein인 LDL-콜레스테롤 농도가 증가하고, HDL-콜레스테롤 농도가 감소하여 동맥경화증, 고혈압 및 심혈관계 질환을 유발하게 된다고 알려져 있다²⁰. 총 10주간 실시한 고지방/고콜레스테롤 식이는 총콜레스테롤 및 LDL 콜레스테롤의 급격한 증가를 보여주었다. 여기에서 홍삼, 천마, 적하수오 (2:1:1) 투여군에서 유의성 있는 감소를 나타냈다. 그러나 HDL 콜레스테롤의 수치는 변화가 없었는데 이는 양성대조군인 fluvastatin 투여군에서도 같은 결과를 보여주었다. 또한 체중 증가면에서도 모든 군에서 체중의 증가는 안정되게 증가하였으나 모든 실험군에서 체중의 감소효과는 보이지 않았다.

High-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP)는 심혈관계 질환의 강력한 예측인자로 알려져 있으며, 최근에는 CRP와 동맥경화 인자인 대동맥의 stiffness간에 연관이 있으며, CRP와 복대동맥 및 신동맥까지의 동맥경화 간의 연관관계를 보고하였다^{21,22}. 본 연구에서는 고지방고콜레스테롤 식이군에서 혈청 CRP 수준이 현저하게 증가하였고, 홍미롭게도 fluvastatin을 제외한 홍삼 단독투여군, 그리고 홍삼, 천마, 적하수오 병용투여군에서 혈청 CRP 수준은 유의적으로 감소하였다. 최근 고지혈증 동물모델에서 홍삼과 천마는 CRP 농도를 감소시켜 혈관 염증을 개선시킨다는 보고가 있다²³. 그러므로 고지혈증 유발 동물모델에서 홍삼 단독효과보다는 홍삼, 천마, 적하수오 병용투여시 LDL 콜레스테롤 감소 및 체내 염증지표의 개선효과가 나타남을 확인하였다.

고지혈증지표와 발기부전과의 상관도에 대해서 LDL 콜레스테롤이 고지혈증으로 인한 기질성 발기부전에 가장 중요한 역할을 한다고 보고되었고, 고지혈증 환자 중 혈중 총 콜레스테롤이 높거나 HDL 콜레스테롤이 낮은 경우 발기부전의 위험도가 높게 나타나는 것으로 보고한 바 있다^{24,25}. 따라서 총 cholesterol과 HDL-C과 LDL-C이 고지혈증으로 인한 발기부전을 예측하는 좋은 인자가 될수 있을 것이라 판단된다. 본 연구에서도 총 콜레스테롤 및 LDL 콜레스테롤 농도의 증가로 인한 발기부전에 예상되었으며, 음경발기에 직접적인 영향이 있는지 확인하고자 전기자극으로 발기를 유도한 후 분석한 결과, 홍삼 단독투여군 및 홍삼, 천마, 적하수오 병용투여군에서 고지방/고콜레스테롤 식이군보다 주요 발기능 지표인 음경해면체 최대내압, ICP/MAP, AUC의 유의성 있는 증가를 보였다. 이는 홍삼 단독투여 뿐만 아니라 홍삼, 천마, 적하수오 병용투여가 실제로 음경 내에서 작용하고 있고 음경해면체 최대내압과 밀접한 관계를 가지고 있다는 직접적인 증거라고 할 수 있다. 이와 유사한 결과로 고콜레스테롤 식이군은 정상식이를 시행한 군에 비해 발기 시 음경해면체 평활근 이완이 정상적으로 일어나지 않았음이 보고되었다²⁶. 또한 Lee 등은 복분자, 산수유, 토사자의 배합이 고지혈증 랫드에서 ICP를 증가시키며 음경해면체 조직에서 eNOS 및 nNOS의 발현을 증가시켜 발기부전을 개선시킨다고 보고하였다²⁷. 음경발기는 해면체 평활근의 긴장력에 의해 조절되는데 비아드레날린성 비콜린성 신경전달물질과 해면체 내피세포에서 분비되는 이완물질이 음경발기의 중심인 해면체평활근의 이완에 중요한 역할을 한다. NO가 해면체평활근 이완의 주 매개체로 알려져 있으며 음경해면체와 음경동맥의 내피에 존재하는 eNOS와 nonadrenergic noncholinergic nerve의 말단에서 분비되는 nNOS에 의해 발생한다^{28,29}. 따라서 음경에서 NO의 생체이용성(bioavailability)을 높이는 것이 발기부전의 예방과 치료에 있어서 가장 효과적인 방법이라 생각한다. 본 연구에서도 혈관내피세포의 NO 발현을 증가시키기 위한 eNOS 발현이 홍삼 단독투여 뿐만 아니라 홍삼, 천마, 적하수오 병용투여군에서 유사하게 나타났다. Masson's trichrome 염색에서 홍삼, 천마, 적하수오 병용투여군이 고지방/고콜레스테롤 식이군에 비해 음경내 평활근 양의 증가와 함께 섬유화 진행의 감소를 관찰할 수 있었으며, 이러한 결과로 볼 때 홍삼, 천마, 적하수오 병용투여는 eNOS 단백질발현을 증가시키고 섬유화를 억제시켜 혈관 내피세포의 기능을 회복시킴으로써 고지혈증에 의한 발기부전을 개선시킨다고 볼 수 있다.

최근 대사증후군 랫드에서 홍삼 투여에 의한 총콜레스테롤 및 혈압 강하 등을 포함한 대사기능 개선효과 및 발기부전 개선효과가 보고되었다. 그러나 LDL 콜레스테롤의 감소와 같은 직접적인 고지혈증 개선지표는 제시된 바 없다³⁰⁾. 또한 적하수오는 고지방식이 랫드 모델에서 지질대사 개선효과가 보고되었으나 발기부전에 대한 관련성은 직접적으로 제시되어 있지 않다³¹⁾. 따라서 홍삼 단독투여보다는 고지혈증을 개선시키면서 발기능에 효과가 있는 홍삼, 천마, 적하수오를 병용투여하면 고지혈증과 발기부전에 더욱 효과적이며, 투여 유효용량은 200 mg/kg 이상인 것으로 나타났다. 추후에 testosterone 농도, NO 활성도와와의 연관성 등의 실험이 좀 더 수행된다면 이들 약물의 병용투여가 고지혈증 개선 뿐 만 아니라 음경해면체 평활근의 내피의존성 이완반응에 장애를 일으키는 고지혈증형 발기부전에 효능이 있는 약물로 활용 수 있을 것으로 사료된다. 또한 향후 홍삼, 천마, 적하수오의 병용투여에 대한 적정 배합비와 생리활성 성분 분석 및 약리기전에 대한 연구가 추가되어야 할 것으로 사료된다.

결론

고지방/고콜레스테롤 식이-유도 고지혈증 랫드에서 홍삼, 천마, 적하수오 병용투여에 의한 지질대사 및 발기부전 개선효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 고지혈증 랫드에 6주간 홍삼, 천마, 적하수오를 병용투여 하였을 때 총콜레스테롤 및 LDL 콜레스테롤 농도가 감소하는 것으로 나타났다.
2. 고지혈증 랫드에 홍삼, 천마, 적하수오를 병용투여 하였을 때 체내 항염증 지표인 C-reactive protein 수치가 감소하는 것으로 나타났다.
3. 고지혈증 랫드에 홍삼, 천마, 적하수오의 병용투여는 음경해면체 내압을 증가시키고, 섬유화 진행을 억제하였으며, eNOS의 발현을 증가시킴으로써 발기부전을 개선시키는 것으로 나타났다.

따라서 홍삼 단독투여 보다 홍삼, 천마, 적하수오의 병용투여가 고지혈증 및 발기부전 치료에 보다 효과적이며, 이는 새로운 치료 방향을 설정하는데 유용할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다 (MKE-R0002038).

References

1. Kreuzer J, Viedt C, Brandes RP, Seeger F, Rosenkranz AS, Sauer H, Babich A, Nürnberg B, Kather H, Krieger-Brauer HI. Platelet-derived growth factor activates production of reactive oxygen species by NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells through Gi1,2. *FASEB J*. 2003 ; 17 : 38-40.
2. Krauss RM. Triglycerides and atherogenic lipoproteins: rationale for lipid management. *Am J Med*. 1998 ; 105 : 58S-62S.
3. Janes PJ, Leith CA, Pederson RA. Meal-frequency effects on plasma hormone concentrations and cholesterol synthesis in human. *Am J Clin Nutr*. 1993 ; 57 : 868-74.
4. Lusis AJ. Genetic factors effecting blood lipoproteins. *J Lipid Res*. 1988 ; 29 : 397-429.
5. De May JG, Vanhoutte PM. Role of the intima in cholinergic and purinergic relaxation of isolated canine femoral arteries. *J Physiol*. 1981 ; 316 : 347-55.
6. Azadzi KM, Saenz de Tajade I. Hypercholesterolemia impairs endothelium-dependent relaxation of rabbit corpus cavernosum smooth muscle. *J Urol Res*. 1991 ; 146 : 238-40.
7. Hong MH, Lim HK, Park JE, Jun NJ, Lee YJ, Cho MJ, Kim SM. The Antihypertensive and Vasodilating Effects of Adventitious Root Extracts of Wild Ginseng. *J Korean Soc Appl Biol Chem*. 2008 ; 51 : 102-7.
8. Mizuno M, Yamada J, Terai H, Kozukue N, Lee YS, Tsuchide H. Differences in immunomodulating effects between wild and cultured Panax ginseng. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 ; 200 : 1672-8.
9. Kwon KR, Park WP, Kang WM, Jeon EY, Jang JH. Identification and analysis of differentially expressed genes in mountain cultivated ginseng and mountain wild ginseng. *J Acupunct Meridian Stud*. 2011 ; 4 : 123-8.
10. Liu CX, Xiao PG. Recent advances on ginseng research in China. *J Ethnopharmacol*. 1992 ; 36 : 27-38.
11. Liu J, Mori A. Antioxidant and free radical scavenging activities of *Gastrodia elata* Bl. and *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Jacks. *Neuropharmacology*. 1992 ; 31 : 1287-98.
12. Lee YJ, Hwang SM, Kang DG, Kim JS, Lee HS. Effect of *Gastrodia elata* on tumor necrosis factor- α -induced matrix metalloproteinase activity in endothelial cells. *J Nat Med*. 2009 ; 63 : 463-7.
13. Hwang SM, Lee YJ, Kang DG, Lee HS. Anti-inflammatory effect of *Gastrodia elata* rhizome in human umbilical vein endothelial cells. *Am J Chin Med*. 2009 ; 37 : 395-406.
14. Wang W, Cao CY, Wang DQ, Zhao DZ. Effect of prepared polygonum multiflorum on striatum extracellular acetylcholine and choline in rat of intracerebral perfusion with sodium azide. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2006 ; 31 : 751-3.

1. Kreuzer J, Viedt C, Brandes RP, Seeger F, Rosenkranz AS, Sauer H, Babich A, Nürnberg B, Kather H,

15. Na MK, Park JY, An RB, Lee SM, Kim YH, Lee JP, Seong RS, Lee KS, Bae KH. Quality evaluation of *Polygoni multiflori Radix*. J Pharmacogn. 2000 ; 31 : 335-9.
16. Lv L, Shao X, Wang L, Huang D, Ho CT, Sang S. Stilben glucoside from *polygonum multiflorum* thunb.: a novel natural inhibitor of advanced glycation end product formation by trapping of methylglyoxal. J Agric Food Chem. 2010 ; 58 : 2239-45.
17. Qin R, Li X, Tao L, Li Y, Sun J, Kang X, Chen J. Protection by tetrahydroxystilbene glucoside against neurotoxicity induced by MPP+: the involvement of PI3K/Akt pathway activation. Toxicol Lett. 2011 ; 202 : 1-7.
18. Pankey EA, Lasker GF, Gur S, Hellstrom WJ, Kadowitz PJ. Analysis of Erectile Responses to Imatinib in the Rat. Urology. 2013 ; 253 : 17-24.
19. Lee YJ, Choi DH, Kim EJ, Kim HY, Kwon TO, Kang DG, Lee HS. Hypotensive, hypolipidemic, and vascular protective effects of *Morus alba* L. in rats fed an atherogenic diet. Am J Chin Med. 2011 ; 39 : 39-52.
20. Park SH, Jang MJ, Hong JH, Rhee SJ, Choi KH, Park MR. Effects of mulberry leaf extract feeding on lipid status of rats fed high cholesterol diets. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2007 ; 36 : 43-50.
21. Duprez DA, Somasundaram PE, Sigurdsson G, Hoke L, Florea N, Cohn JN. Relationship between C-reactive protein and arterial stiffness in an asymptomatic population. J Hum Hypertens. 2005 ; 19 : 515-9.
22. Hommels MJ, van der Ven AJAM, Kroon AA, Kessels AGH, Van Diejen-Visser MP, Van Engelshoven JAM, Bruggeman CA, De Leeuw PW. C-reactive protein, atherosclerosis and kidney function in hypertensive patients. J Hum Hypertens. 2005 ; 19 : 521-6.
23. Lee YJ, Kim HY, Yoon JJ, Lee SM, Kho JH, Lee HS, Choi KM, Kang DG. Combination with *Korean Red Ginseng* and *Gastrodia Rhizoma* Enhances Vascular Protective Effects in Hyperlipidemic Rats. Korean J Orient Med Pre. 2012 ; 20 : 1-11.
24. Ahn TY, Azadzi KM, Saenz de Tejada I. Effects of oxidatively modified low density lipoprotein on corpus cavernosum smooth muscle tone. Int J Impot Res. 1995 ; 4 : 52-5.
25. Juenemann KP, Auenanger J, Konrad T, Pill J, Berle B, Persson-Juenemann C. The effect of impaired lipid metabolism on the smooth muscle cells of rabbits. Urol Res. 1991 ; 19 : 24-8.
26. Kim JH, Klyachkin ML, Svendsen E, Davies MG, Hagen PO. Experimental hypercholesterolemia in rabbits induces cavernosal atherosclerosis with endothelial and smooth muscle cell dysfunction. J Urol. 1994 ; 151 : 198-205.
27. Lee EJ, Kim HS, Kim BC, Hwang SW, Hwang SY. The Effect of Herbal Formula KH-305 on Erectile Dysfunction in Hyperlipidemic Rat. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2007 ; 36 : 548-53.
28. Podlasek CA, Zelter DJ, Bervig TR, Gonzalez CM, McKenna KE, McVary KT. Characterization and localization of nitric oxide synthase isoforms in the BB/WOR diabetic rat. J Urol. 2001 ; 166 : 746-55.
29. Rajfer J, Aronson WJ, Bush PA, Dorey FJ, Ignarro LJ. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. N Engl J Med. 1992 ; 326 : 90-4.
30. Kim SD, Kim YJ, Huh JS, Kim SW, Sohn DW. Improvement of erectile function by Korean red ginseng (*Panax ginseng*) in a male rat model of metabolic syndrome. Asian J Androl. 2013 ; 15 : 395-9.
31. Li N, Chen Z, Mao X, Yu J, Zhao R. Effects of lipid regulation using raw and processed radix *polygoni multiflori* in rats fed a high-fat diet. Evid Based Complement Alternat Med. 2012 ; 2012 : 329171.