

# 山査가 토끼 음경해면체의 수축에 미치는 영향

이한석 · 박선영\*

세명대학교 한의과대학 생리학교실

## Effects of Crataegii fructus on the Contractile Response of Rabbit Corpus Cavernosum

Han Seok Lee, Sun Young Park\*

Department of Physiology, College of Korean Medicine, Semyung University

This study was aimed to evaluate the cavernosal relaxation effect of Crataegii fructus(CF) in the contracted rabbit penile corpus cavernosum by agonists. In order to study the effect of CF on the vasoconstriction of rabbit penile corpus cavernosum, isolated rabbit penile corpus cavernosum tissues were used for the experiment using organ baths containing Krebs solution. To investigate the cavernosal relaxation of CF, CF extract at 0.01 ~ 3.0 mg/ml was added after penile corpus cavernosum were contracted by norepinephrine(NE) 1 μM. To analyze the mechanism of CF's vasorelaxation, CF extract infused into contracted penile tissues by NE after each treatment of indomethacin(IM), Nω-nitro-L-arginine(L-NNA), methylene blue(MB), tetraethylammonium chloride(TEA). To study the effect of CF on influx of extracellular calcium chloride(Ca<sup>2+</sup>) in penile tissues, in Ca<sup>2+</sup>-free krebs solution, Ca<sup>2+</sup> 1 mM infused into contracted penile tissues by NE after pretreatment of CF. Cytotoxic activity of CF on human umbilical vein endothelial cell(HUVEC) was measured by MTT assay, and nitric oxide(NO) production was measured by Griess reagent. CF relaxed cavernosal strip with endothelium contracted by NE, but in the strips without endothelium, CF-induced relaxation was significantly inhibited. The pretreatment of L-NNA, MB, TEA decreased significantly on the cavernosal relaxation than not-treatment of them. But the pretreatment of IM had no significant effect on the cavernosal relaxation. In Ca<sup>2+</sup>-free krebs solution, when Ca<sup>2+</sup> infused into contracted penile tissues by NE, pretreatment of CF inhibit contraction induced by adding Ca<sup>2+</sup>. NO production wasn't increased by treatment of CF on HUVEC. This findings showed that CF is effective for the relaxation of rabbit penile corpus cavernosum, and we suggest that CF relax rabbit corpus cavernosal smooth muscle through multiple action mechanisms that include increasing the release of nitric oxide from corporal sinusoidal endothelium, inhibition of Ca<sup>2+</sup> mobilization into cytosol from the extracellular fluid, and maybe a hyperpolarizing action.

Key words : Patent Trend, Medicinal Herbs, Nonthermal Processing Technologies

### 서 론

山査는 薔薇科에 속한 산사나무의 成熟한 果實로서 消食肉積, 散瘀行滯, 健脾開膈의 효능으로 肉食積滯, 脘腹脹痛, 痢疾, 泄瀉, 高血壓 등의 치료에 응용되고 있다<sup>1-4)</sup>. 그동안 산사에 대한 실험연구로는 주로 고지혈증에 미치는 영향<sup>5)</sup>과 항산화효능<sup>6)</sup>에 대한 연구가 진행되어 왔으며 근래에 와서 산사의 혈관이완효능에

대한 연구가 이루어지고 있다.

산사의 혈관이완효과에 관한 연구로 유 등<sup>7)</sup>은 산사의 butanol 분획이 myosin phosphatase(MP)의 활성증가에 의한 Ca<sup>++</sup> sensitization의 억제와 20 kDa myosin light chains(LC<sup>20</sup>)의 억제를 통하여 혈관을 이완시키고, 채 등<sup>8)</sup>은 산사가 NOS의 활성화에 의한 nitric oxide(NO)의 생성으로 cyclic GMP를 증가시킴으로써 혈관을 이완시키는 것으로, 배 등<sup>9)</sup>은 중국산 산사와 한국산 산사가 NO 의존성 혈관이완효과를 나타내며 cGMP 증가를 통한 세포의 Ca<sup>2+</sup>의 유입을 차단하여 혈관을 이완시키는 것으로 보고 하였다.

\* 교신저자 : 박선영, 충북 제천시 세명로 117 세명대학교 한의과대학

· E-mail : blbee@semyung.ac.kr, · Tel : 043-649-1703

· 접수 : 2013/06/14 · 수정 : 2013/07/06 · 채택 : 2013/07/20

또한 최근 Park 등<sup>10)</sup>은 혈관이완효과가 입증된 산사를 비롯한 9가지 약물의 조합으로 이루어진 SA1이 phenylephrine으로 수축된 토끼의 해면체 혈관에 대한 이완효과가 있음을 보고하여 산사가 발기력 향상을 통한 성능 개선에 활용할 수 있는 가능성을 제시하였다.

발기란 음경 해면체 내의 음경세동맥이 부교감신경계에 의해 확장이 되어 많은 혈액이 발기조직에 응혈되는 것으로 세동맥의 확장으로 인한 혈류의 증가로 음경 내압이 증가되고 정맥혈은 증가된 음경내압의 압박을 받아 누출되지 못함으로써 유발된다<sup>11,12)</sup>. 즉, 혈관확장으로 발생하는 음경평활근의 긴장력에 의해 발기가 조절되는데, 비아드레날린성, 비콜린성 신경전달물질과 해면체 내피세포에서 분비되는 이완물질이 이러한 해면체혈관 및 평활근 이완에 관여한다. 혈관이완물질로 NO와 prostacyclin, EDHF가 가장 잘 알려져 있는데 그 중 NO가 음경 발기의 중심인 해면체 혈관 및 평활근 이완에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>13,14)</sup>.

따라서 앞선 연구에서 산사가 혈관내피세포에서 NO 생성을 통하여 혈관이완작용을 하는 것으로 입증되었기에 음경 해면체 조직에서도 NO의 생성을 통하여 혈관을 확장시킴으로써 성능 개선에 기여할 것으로 예상된다.

이에 저자는 토끼의 음경해면체를 이용한 organ bath study를 통하여 해면체 혈관내피세포에서 분비되는 EDHF, NO, prostacyclin을 중심으로 한 산사의 해면체 혈관이완효과에 대한 연구결과를 보고한 바 있으며<sup>15)</sup>, 본 논문에서 추가적으로 이완효과의 기전과 NO의 생성에 미치는 영향에 대한 연구에서 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

체중 1.5 kg 내외의 New Zealand white 수컷 토끼(샘타코, 한국)를 고형사료와 물을 충분히 공급하면서 1주 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 본 동물실험은 세명대학교 동물실험윤리위원회의 승인(smeac 12-05-04)하에 실시되었다.

### 2. 산사 추출물 제조

산사(Crataegii fructus) 200 g을 증류수 2000 mL과 함께 round flask에 넣고 2시간 동안 가열 추출한 다음 rotary evaporator(Eyela, Japan)로 감압 농축하였다. 농축액을 동결건조기로 건조하여 얻은 27.5 g의 분말을 실험에 사용하였다.

### 3. 음경해면체 혈관이완 기전에 관한 실험

#### 1) 해면체절편의 제작

토끼를 urethane(2 mL/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 해면체

절편을 만들었다.

해면체절편은 내피세포가 존재하는 절편과 내피세포가 제거된 절편으로 구분하여 제작하였으며, 내피세포는 손으로 가볍게 문질러 제거하였다.

#### 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 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) norepinephrine(NE)으로 수축된 해면체에서의 수축변화 측정

해면체절편에 NE 1 μM을 투여하여 수축을 유발시킨 다음 산사 추출물을 농도별(0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg/mL)로 투여하여 수축의 변화를 기록하였다.

#### (2) 내피세포 유무에 따른 이완효과의 변화 측정

해면체혈관의 내피세포가 존재하는 해면체절편과 해면체혈관의 내피세포가 제거된 해면체절편에 NE 1 μM을 투여하여 수축을 유발시킨 다음 산사 추출물을 농도별(0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg/mL)로 투여하여 수축의 변화를 비교하였다.

#### (3) Indomethacin(IM)의 전처치에 따른 이완효과의 변화 측정

해면체절편을 IM 10 μM로 10분간 전처치하고 NE 1 μM을 투여하여 수축을 유발시킨 다음 산사 추출물(0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg/mL)을 투여하여 IM을 전처치하지 않은 경우와 수축의 변화를 비교하였다.

(4) Tetraethylammonium chloride(TEA)의 전처치에 따른 이완효과의 변화 측정

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

(5) Nω-nitro-L-arginine(L-NNA)의 전처치에 따른 이완효과의 변화 측정

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

#### (6) Methylene blue(MB)의 전처치에 따른 이완효과의 변화 측정

해면체절편을 MB 1 μM로 10분간 전처치하고 NE 1 μM을 투여하여 수축을 유발시킨 다음 산사 추출물(0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg/mL)을 투여하여 MB를 전처치하지 않은 경우와 수축의 변화를

비교하였다.

#### (7) 산사의 전처치에 따른 $Ca^{2+}$ 의존성 수축변화 측정

해면체절편을  $Ca^{2+}$ -free solution에서 산사 추출물(0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg/ml)로 10분간 전처치하고 NE 1  $\mu$ M을 투여하여 수축을 유발시킨 다음  $Ca^{2+}$  1 mM을 투여하여 산사를 전처치하지 않은 경우와 수축의 변화를 비교하였다.

#### 3) 세포실험

사람의 제대정맥내피세포인 human umbilical vein endothelial cells(HUVEC)은 Clonetics<sup>TM</sup> and Poietics<sup>TM</sup> (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> 건하에서 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( $5 \times 10^3$  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 산사 추출물을 농도별로 처리한 다음 24시간 배양하여 세포생존율을 MTT assay로 측정하였다<sup>16)</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>17)</sup>에 준하여 microplate reader로 NO 생성의 지표인 배지에 생성된 nitrite 양을 측정하여 결정하였다. 산사 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. 통계처리

실험결과는 평균과 표준편차로 나타내었고, 해면체 혈관수축의 변화는 실제 수축의 크기와 NE를 투여하여 유발된 최고 수축에 대한 백분율로 표현하였다. 실험결과의 비교는 student's t-test를 시행하였고, 유의성은  $p < 0.05$ 로 판정하였다.

## 결 과

### 1. NE로 수축된 해면체에서의 수축변화

NE의 투여로  $0.58 \pm 0.21$  g(100%)의 수축을 유발시킨 후 산사 추출물을 투여하였을 때 농도의존적으로 이완효과를 나타냈으며, 1.0 mg/ml에서  $0.40 \pm 0.20$  g(70.0%), 3.0 mg/ml에서  $0.16 \pm 0.20$  g(37.8%)의 수축을 보임으로써 유의성 있는 이완효과를 나타내었다(Table 1, Fig. 1).

Table 1. CF extract-induced concentration-dependent relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum

Treatment	Strength of Contraction(g)	Relative Contraction(%)
NE	$0.58 \pm 0.21$	$100.0 \pm 0.0$
NE + CF 0.01 mg/ml	$0.61 \pm 0.22$	$104.7 \pm 9.3$
NE + CF 0.03 mg/ml	$0.58 \pm 0.22$	$100.8 \pm 11.5$
NE + CF 0.10 mg/ml	$0.54 \pm 0.22$	$92.7 \pm 12.6$
NE + CF 0.30 mg/ml	$0.50 \pm 0.23$	$86.1 \pm 17.5$
NE + CF 1.00 mg/ml	$0.40 \pm 0.20^*$	$70.0 \pm 15.0$
NE + CF 3.00 mg/ml	$0.16 \pm 0.20^{***}$	$37.8 \pm 19.9$

Values were expressed as means  $\pm$  S.D. of 9 independent experiments. CF extract-induced relaxation was expressed as percentage of NE-contraction. NE, norepinephrine 1  $\mu$ M; CF, Crataegii fructus extract; \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  compared with NE.

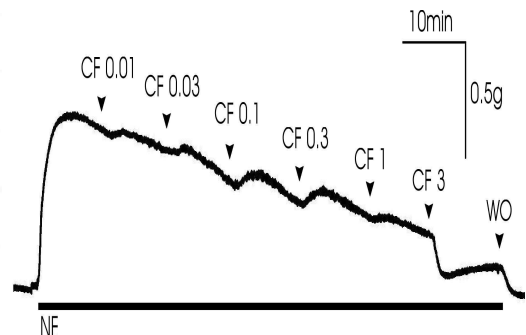


Fig. 1. CF extract-induced concentration-dependent relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum. Representative tracings are shown as the relaxation of corpus cavernosum by cumulative addition of 0.01 mg/ml to 3.0 mg/ml CF extract at the plateau of NE-induced contraction. NE, norepinephrine 1  $\mu$ M; CF, Crataegii fructus extract(mg/ml); W/O, wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

### 2. 내피세포 유무에 따른 이완효과의 변화

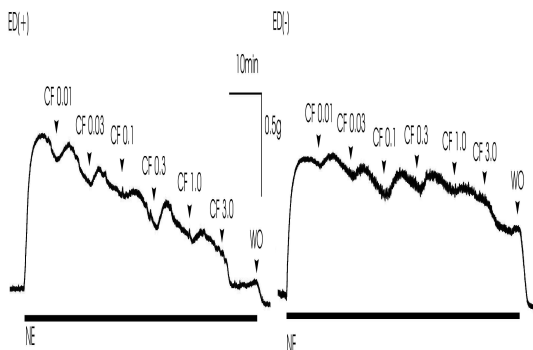
해면체 혈관내피세포가 존재하는 경우 NE에 의한 최대수축  $0.69 \pm 0.14$  g(100%)에 비하여 산사 추출물을 투여하였을 때 농도의존적으로 이완효과를 나타냈으며, 0.01 mg/ml에서  $0.58 \pm 0.12$  g(85.4%), 0.03 mg/ml에서  $0.52 \pm 0.11$  g(75.7%), 0.1 mg/ml에서  $0.39 \pm 0.12$  g(58.5%), 0.3 mg/ml에서  $0.31 \pm 0.10$  g(47.6%), 1.0 mg/ml에서  $0.28 \pm 0.14$  g(44.8%), 3.0 mg/ml에서  $0.07 \pm 0.07$  g(14.9%)의 수축을 나타내어 각각 유의성 있는 이완효과를 나타내었다. 해면체 혈관내피세포가 제거된 경우 NE에 의한 최대수축  $0.90 \pm 0.31$  g(100%)에 비하여 산사 추출물을 투여하였을 때 농도의존적으로 이완효과를 나타냈으며, 0.03 mg/ml에서  $0.67 \pm 0.28$  g(76.1%), 0.1 mg/ml에서  $0.68 \pm 0.30$  g(76.6%), 0.3 mg/ml에서  $0.68 \pm 0.29$  g(76.0%), 1.0 mg/ml에서  $0.62 \pm 0.29$  g(68.7%), 3.0 mg/ml에서  $0.45 \pm 0.30$  g(46.4%)의 수축을 나타내어 각각 유의성 있

는 이완효과를 나타내었다. 그러나 해면체 혈관내피세포가 존재하는 경우에 비하여 해면체 혈관내피세포가 제거된 경우에 산사 추출물의 모든 농도에서 이완효과가 유의하게 억제된 것이 관찰되었다(Table 2, Fig. 2).

**Table 2.** CF extract-induced endothelium-dependent or independent contraction of isolated rabbit corpus cavernosum

Treatment	Intact endothelium		Denuded endothelium	
	Strength of contraction(g)	Relative contraction(%)	Strength of contraction(g)	Relative contraction(%)
NE	0.69±0.14	100.0± 0.0	0.90±0.31	100.0± 0.0
NE+CF 0.01	0.58±0.12*	85.4±10.0	0.82±0.29	92.4± 4.7*
NE+CF 0.03	0.52±0.11***	75.7± 7.0	0.67±0.28*	76.1± 8.3**
NE+CF 0.10	0.39±0.12***	58.5±11.5	0.68±0.30*	76.6± 9.7***
NE+CF 0.30	0.31±0.10***	47.6±12.3	0.68±0.29*	76.0± 9.1***
NE+CF 1.00	0.28±0.14***	44.8±15.3	0.62±0.29*	68.7±11.1***
NE+CF 3.00	0.07±0.07***	14.9± 5.9	0.45±0.30***	46.4±19.2***

Values were expressed as means±S.D. of 10 independent experiments. CF extract(0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0 and 3.0 mg/ml)-induced contraction was expressed as percentage of NE-contraction in endothelium(ED)-intact or ED-denuded corpus cavernosum. NE, norepinephrine 1 μM ; CF, Crataegii fructus extract(mg/ml) ; \* p<0.05, \*\*\* p<0.001 compared with NE. # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 compared with NE+CF in intact endothelium.



**Fig. 2.** CF extract-induced endothelium-dependent relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum. Representative tracings are shown as the contraction pattern of corpus cavernosum by Crataegii fructus extract at the plateau of NE-induced contraction in endothelium(ED)-intact or ED-denuded corpus cavernosum. NE, norepinephrine 1 μM ; CF, Crataegii fructus extract(mg/ml) ; W/O, wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

3. IM의 전처치에 따른 이완효과의 변화

IM을 전처치하지 않은 상태에서 NE의 투여로 0.62 ± 0.18 g(100%)의 수축을 유발시킨 후 산사 추출물을 투여하였을 때 3.0 mg/ml에서 0.32 ± 0.08 g(54.2%)의 수축으로 유의성 있는 이완효과를 보였다. IM을 전처치한 경우 NE의 투여로 0.44 ± 0.05 g(100%)의 수축을 유발시킨 후 산사 추출물을 투여하였을 때 1.0 mg/ml에서 0.36 ± 0.06 g(82.8%), 3.0 mg/ml에서 0.19 ± 0.10 g(44.2%)의 수축으로 유의성 있는 이완효과를 보였다. 실험결과 IM을 전처치하지 않은 경우에 비하여 IM을 전처치하였을 때 산사 추출물 0.1 mg/ml의 농도에서 이완효과가 유의성 있게 억제되었다(Table 3, Fig. 3).

4. TEA의 전처치에 따른 이완효과의 변화

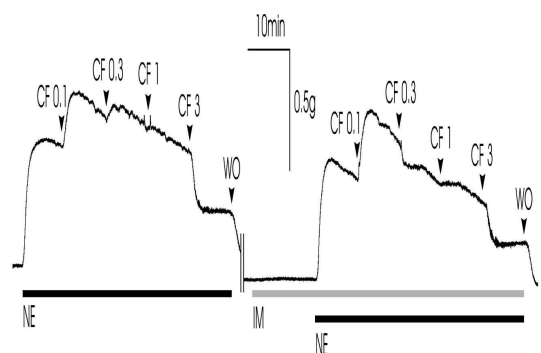
TEA를 전처치하지 않은 상태에서 NE의 투여로 0.76 ± 0.23 g(100%)의 수축을 유발시킨 후 산사 추출물을 투여하였을 때 농

도의존적으로 이완효과를 나타냈으며, 3.0 mg/ml에서 0.33 ± 0.27 g(42.1%)의 수축으로 유의성 있는 이완효과를 보였다. TEA를 전처치한 경우 NE의 투여로 0.70 ± 0.34 g(100%)의 수축을 유발시킨 후 산사 추출물을 투여하였을 때 3.0 mg/ml에서 0.54 ± 0.33 g(79.5%)의 수축으로 이완효과를 보였으나 유의성은 관찰되지 않았다. 그러나 실험결과 TEA를 전처치하지 않은 경우에 비하여 TEA를 전처치하였을 때 산사 추출물 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg/ml의 농도에서 모두 이완효과가 유의성 있게 억제되었다(Table 4, Fig. 4)

**Table 3.** Effects of pretreatment of IM on the endothelium-dependent relaxation induced by CF extract

Treatment	Non treatment of IM		Treatment of IM	
	Strength of contraction(g)	Relative contraction(%)	Strength of contraction(g)	Relative contraction(%)
NE	0.62±0.18	100.0± 0.0	0.44±0.05	100.0± 0.0
NE+CF 0.1	0.79±0.17	130.2±18.6	0.58±0.11	132.4±14.7
NE+CF 0.3	0.69±0.13	113.0±13.4	0.45±0.07	102.1± 6.3
NE+CF 1.0	0.59±0.11	97.8±17.7	0.36±0.06*	82.8±5.9#
NE+CF 3.0	0.32±0.08***	54.2±15.8	0.19±0.10***	44.2±21.3

Values were expressed as means±S.D. of 6 independent experiments. CF extract induced relaxation was expressed as percentage of NE-contraction in IM treated or non-treated isolated corpus cavernosum. IM, indomethacin 10 μM ; NE, norepinephrine 1 μM ; CF, Crataegii fructus extract(mg/ml) ; \* p<0.05, \*\*\* p<0.001 compared with NE ; # p<0.05 compared with NE+CF in non treatment of IM.



**Fig. 3.** Effects of pretreatment of IM on the endothelium-dependent relaxation induced by CF extract. Representative tracings are shown as the relaxation of corpus cavernosum by CF extract(CF, 0.1, 0.3, 1.0 and 3.0 mg/ml) at the plateau of NE-induced contraction in IM treated or non-treated corpus cavernosum. NE, norepinephrine 1 μM ; CF, Crataegii fructus extract(mg/ml) ; IM, indomethacin 10 μM ; W/O, wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

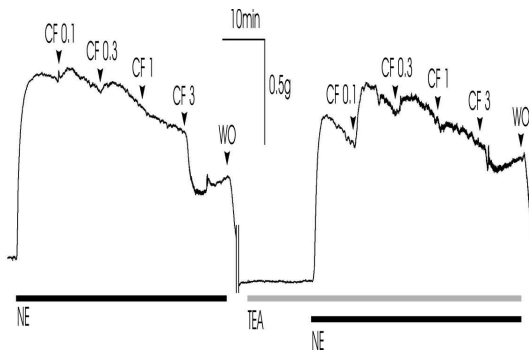
5. L-NNA의 전처치에 따른 이완효과의 변화

L-NNA를 전처치하지 않은 상태에서 NE의 투여로 0.55 ± 0.23 g(100%)의 수축을 유발시킨 후 산사 추출물을 투여하였을 때 농도의존적으로 이완효과를 나타냈으며, 3.0 mg/ml에서 0.16 ± 0.11 g(26.0%)의 수축으로 유의성 있는 이완효과를 보였다. 반면 L-NNA를 전처치한 경우 NE의 투여로 0.85 ± 0.31 g(100%)의 수축을 유발시킨 후 산사 추출물을 투여하였을 때 3.0 mg/ml에서 0.52 ± 0.25 g(59.2%)의 수축으로 유의성 있는 이완효과를 보였다. 그러나 실험결과 L-NNA를 전처치하지 않은 경우에 비하여 L-NNA를 전처치하였을 때 산사 추출물 0.1, 0.3, 3.0 mg/ml의 농도에서 모두 이완효과가 유의성 있게 억제되었다(Table 5, Fig. 5)

**Table 4. Effects of pretreatment of TEA on the endothelium-dependent relaxation induced by CF extract**

Treatment	Non treatment of TEA		Treatment of TEA	
	Strength of contraction(g)	Relative contraction(%)	Strength of contraction(g)	Relative contraction(%)
NE	0.76±0.23	100.0± 0.0	0.70±0.34	100.0± 0.0
NE+CF 0.1	0.75±0.25	98.9±10.5	0.78±0.35	114.1±10.7 <sup>#</sup>
NE+CF 0.3	0.65±0.23	85.7± 9.4	0.77±0.33	112.9±10.3 <sup>###</sup>
NE+CF 1.0	0.51±0.24	65.4±13.7	0.68±0.31	99.2± 7.7 <sup>###</sup>
NE+CF 3.0	0.33±0.27 <sup>**</sup>	42.1±24.2	0.54±0.33	79.5±25.3 <sup>#</sup>

Values were expressed as means±S.D. of 7 independent experiments. CF extract induced relaxation was expressed as percentage of NE-contraction in TEA treated or non-treated isolated corpus cavernosum. TEA, tetraethylammonium chloride 10 μM ; NE, norepinephrine 1 μM ; CF, Crataegii fructus extract(mg/ml) ; \*\* p<0.01 compared with NE ; # p<0.05, ### p<0.001 compared with NE+CF in non treatment of TEA.



**Fig. 4. Effects of pretreatment of TEA on the endothelium-dependent relaxation induced by CF extract.** Representative tracings are shown as the relaxation of corpus cavernosum by CF extract(CF, 0.1, 0.3, 1.0 and 3.0 mg/ml) at the plateau of NE-induced contraction in TEA treated or non-treated corpus cavernosum. NE, norepinephrine 1 μM ; CF, Crataegii fructus extract(mg/ml) ; TEA, tetraethylammonium chloride 10 μM ; W/O, wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

**Table 5. Effects of pretreatment of L-NNA on the endothelium-dependent relaxation induced by CF extract**

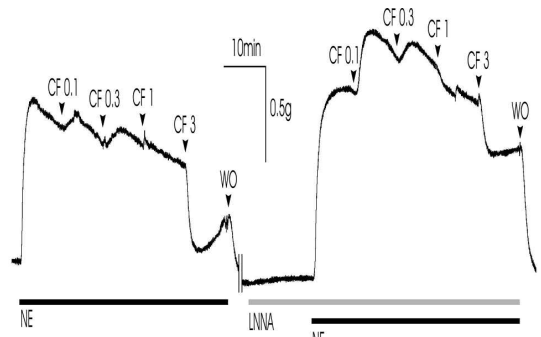
Treatment	Non treatment of L-NNA		Treatment of L-NNA	
	Strength of contraction(g)	Relative contraction(%)	Strength of contraction(g)	Relative contraction(%)
NE	0.55±0.23	100.0± 0.0	0.85±0.31	100.0± 0.0
NE+CF 0.1	0.51±0.17	97.4±12.8	0.95±0.34	111.7± 6.2 <sup>**</sup>
NE+CF 0.3	0.48±0.16	90.2±13.1	0.91±0.34	106.4± 6.7 <sup>**</sup>
NE+CF 1.0	0.45±0.16	84.7±16.2	0.77±0.28	90.9± 5.3
NE+CF 3.0	0.16±0.11 <sup>###</sup>	26.0±13.6	0.52±0.25 <sup>*</sup>	59.2±17.0 <sup>###</sup>

Values were expressed as means±S.D. of 9 independent experiments. CF extract induced relaxation was expressed as percentage of NE-contraction in L-NNA treated or non-treated isolated corpus cavernosum. L-NNA, Nω-nitro-L-arginine 10 μM ; NE, norepinephrine 1 μM; CF, Crataegii fructus extract(mg/ml); \* p<0.05, \*\*\* p<0.001 compared with NE; ## p<0.01, ### p<0.001 compared with NE+CF in non treatment of L-NNA.

6. MB의 전처치에 따른 이완효과의 변화

MB를 전처치하지 않은 상태에서 NE의 투여로 0.59 ± 0.18 g(100%)의 수축을 유발시킨 후 산사 추출물을 투여하였을 때 농도의존적으로 이완효과를 나타냈으며, 1.0 mg/ml에서 0.39 ± 0.13 g(65.4%), 3.0 mg/ml에서 0.19 ± 0.10 g(31.8%)의 수축으로 유의성 있는 이완효과를 보였다. MB를 전처치한 경우 NE의 투여로 0.66 ± 0.18 g(100%)의 수축을 유발시킨 후 산사 추출물을 투여하였을 때 3.0 mg/ml에서 0.54 ± 0.19 g(80.2%)의 수축으로 이완효과를 보였으나 유의성이 관찰되진 않았다. 그러나 실험결과 MB를 전처치하지 않은 경우에 비하여 MB를 전처치하였을 때 산사 추출물 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg/ml의 농도에서 모두 이완효과가

유의성 있게 억제되었다(Table 6, Fig. 6).

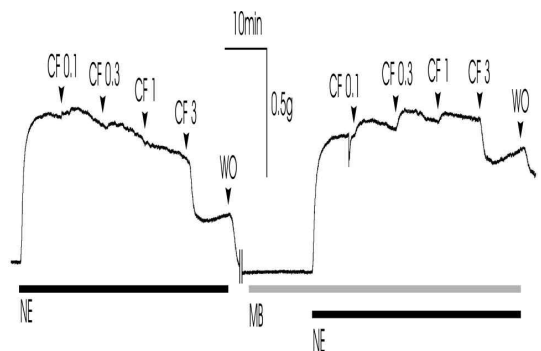


**Fig. 5. Effects of pretreatment of L-NNA on the endothelium-dependent relaxation induced by CF extract.** Representative tracings are shown as the relaxation of corpus cavernosum by CF extract(CF, 0.1, 0.3, 1.0 and 3.0 mg/ml) at the plateau of NE-induced contraction in L-NNA treated or non-treated corpus cavernosum. NE, norepinephrine 1 μM ; CF, Crataegii fructus extract(mg/ml) ; L-NNA, Nω-nitro-L-arginine 10 μM ; W/O, wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

**Table 6. Effects of pretreatment of MB on the endothelium-dependent relaxation induced by CF extract**

Treatment	Non treatment of MB		Treatment of MB	
	Strength of contraction(g)	Relative contraction(%)	Strength of contraction(g)	Relative contraction(%)
NE	0.59±0.18	100.0± 0.0	0.66±0.18	100.0± 0.0
NE+CF 0.1	0.58±0.17	98.7±16.1	0.74±0.21	111.9± 8.1 <sup>#</sup>
NE+CF 0.3	0.56±0.19	94.3±13.8	0.78±0.20	118.9±12.6 <sup>###</sup>
NE+CF 1.0	0.39±0.13 <sup>**</sup>	65.4± 8.7	0.73±0.21	109.5± 9.3 <sup>###</sup>
NE+CF 3.0	0.19±0.10 <sup>###</sup>	31.8± 8.5	0.54±0.19	80.2±14.0 <sup>###</sup>

Values were expressed as means±S.D. of 13 independent experiments. CF extract induced relaxation was expressed as percentage of NE-contraction in MB treated or non-treated isolated corpus cavernosum. MB, methylene blue 1 μM ; NE, norepinephrine 1 μM ; CF, Crataegii fructus extract(mg/ml) ; \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 compared with NE ; # p<0.05, ### p<0.001 compared with NE+CF in non treatment of MB.



**Fig. 6. Effects of pretreatment of MB on the endothelium-dependent relaxation induced by CF extract.** Representative tracings are shown as the relaxation of corpus cavernosum by CF extract(CF, 0.1, 0.3, 1.0 and 3.0 mg/ml) at the plateau of NE-induced contraction in MB treated or non-treated corpus cavernosum. NE, norepinephrine 1 μM ; CF, Crataegii fructus extract(mg/ml) ; MB, methylene blue 1 μM ; W/O, wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

7. 산사의 전처치에 따른 Ca<sup>2+</sup> 의존성 수축의 변화

Ca<sup>2+</sup>이 제거된 상태의 krebs-ringer solution에서 산사를 전처치하지 않고 NE의 투여로 수축을 유발시킨 후 Ca<sup>2+</sup> 1 mM을 투여하였을 때 0.55 ± 0.1 g의 수축을 나타내었다. Ca<sup>2+</sup>이 제거된 상태의 krebs-ringer solution에서 산사를 전처치한 다음 NE의

투여로 수축을 유발시킨 후  $Ca^{2+}$  1 mM을 투여하였을 때  $0.41 \pm 0.1$  g의 수축을 나타내었다.  $Ca^{2+}$  투여로 인한 수축의 증가는 산사 추출물의 전처치에 의해 유의성 있게 감소되었다(Table 7, Fig. 7).

Table 7. Effects of CF extract on influx of extracellular  $Ca^{2+}$  in isolated rabbit corpus cavernosum

Treatment	Non treatment of CF	Treatment of CF
	Strength of contraction(g)	Strength of contraction(g)
NE	$0.01 \pm 0.0$	$0.19 \pm 0.1$
NE + $Ca^{2+}$	$0.55 \pm 0.1$	$0.41 \pm 0.1^{##}$

Values were expressed as means±S.D. of 16 independent experiments. CF, Crataegii fructus extract 3.0 mg/ml; NE, norepinephrine 1 μM;  $Ca^{2+}$ , calcium chloride 1 mM; ## p<0.01 compared with NE+ $Ca^{2+}$  in non treatment of CF.

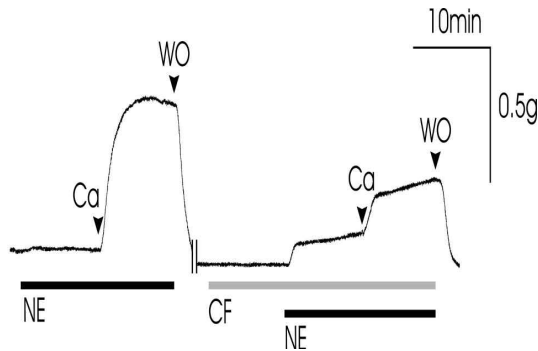


Fig. 7. Effects of CF extract on influx of extracellular  $Ca^{2+}$  in isolated rabbit corpus cavernosum. Representative tracings are shown as the in  $Ca^{2+}$ -free krebs-ringer solution, contraction of corpus cavernosum by adding  $Ca^{2+}$  at the plateau of NE-induced contraction in CF extract treated or non-treated corpus cavernosum. NE, norepinephrine 1 μM;  $Ca^{2+}$ , calcium chloride 1 mM; CF, Crataegii fructus extract 3.0 mg/ml; W/O, wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

8. 산사의 세포독성 측정

Human umbilical vein endothelial cell(HUVEC)에 산사 추출물을 농도별로 24시간 처치한 후 MTT assay를 통해 세포 생존율을 측정된 결과 산사 추출물의 모든 농도에서 세포 생존율의 유의한 감소는 관찰되지 않았다(Table 8, Fig. 8).

Table 8. Effects of CF extract on the viability of human umbilical vein endothelial cell(HUVEC).

Treatment	Cell viability(%)
Control	$100.0 \pm 0.0$
CF 10 μg/ml	$105.0 \pm 6.0$
CF 100 μg/ml	$109.7 \pm 1.8$
CF 500 μg/ml	$112.7 \pm 2.6$
CF 1000 μg/ml	$89.3 \pm 3.0$

Values were expressed as means±S.D. of 3 independent experiments. HUVEC were treated with various concentrations of CF extracts for 24 hr at 37°C. Cell viability was measured by MTT assay. CF, Crataegii fructus extract.

9. 산사가 NO의 생성에 미치는 영향

Human umbilical vein endothelial cell(HUVEC)에 산사 추출물을 농도별로 24시간 처치한 후 NO 량을 측정하였을 때 control에서 측정된 NO 량인  $2.10 \pm 0.38$  μM에 비하여 산사 추출물의 모든 농도에서 유의성 있는 증가는 관찰되지 않았다(Table 9, Fig. 9).

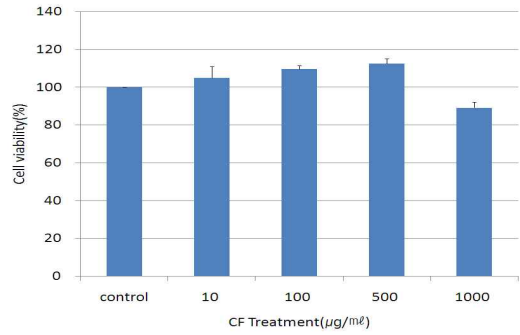


Fig. 8. Effects of CF extract on the viability of human umbilical vein endothelial cell(HUVEC). Representative bars are shown as the cell viability in HUVEC treated with CF extract for 24 hr at 37°C. CF, Crataegii fructus extract.

Table 9. Effects of CF extract on nitric oxide concentration in Human umbilical vein endothelial cell(HUVEC)

Treatment	NO Concentration(μM)
Control	$2.10 \pm 0.38$
CF 10 μg/ml	$1.95 \pm 0.06$
CF 100 μg/ml	$1.97 \pm 0.05$
CF 500 μg/ml	$2.11 \pm 0.11$
CF 1000 μg/ml	$2.30 \pm 0.08$

Values were expressed as means±S.D. of 4 independent experiments. HUVEC were treated with CF in a dose-dependent manner for 24 hr at 37°C. Nitric oxide was measured by the Griess reagent method. CF, Crataegii fructus extract; NO, nitric oxide.

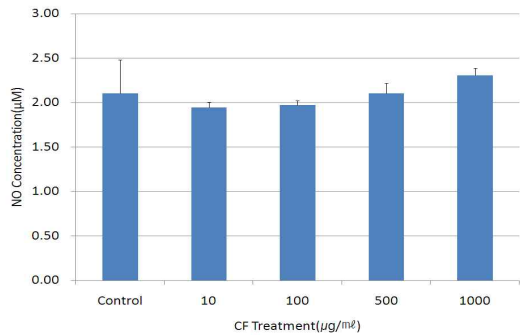


Fig. 9. Effects of CF extract on nitric oxide concentration in human umbilical vein endothelial cell(HUVEC). Representative bars are shown as the nitric oxide concentration in HUVEC treated with CF extract for 24 hr at 37°C. CF, Crataegii fructus extract; NO, nitric oxide.

고 찰

山査의 性味는 酸, 甘, 微溫, 無毒이고, 歸經은 주로 脾胃肝의 三經이며 消食肉積, 散瘀行滯 健脾開膈의 效능으로 脾胃의 기능을 보조하여 소화를 촉진하는 要藥이라고 하였다. 主治는 食肉積滯, 腹痛, 泄瀉, 産後瘀血腹痛, 惡露不盡, 一切 瘀滯出血이며 임상적으로는 消化不良, 肉滯, 癥瘕, 痰飲, 痞滿, 吞酸, 瀉痢, 腦風, 腰痛, 疝氣, 産後兒枕痛, 惡露不盡, 小兒乳食停滯 등에 응용되어 왔다.<sup>3,18,19)</sup>

그동안 산사의 效능과 관련하여 고지방식이에 있어 지질대사를 개선<sup>5)</sup>시키고, linoleic acid에 의한 지질과산화 억제와 free radical 소거<sup>6)</sup>가 있으며, 백서의 비만모형에서 전지방세포의 증식과 분화를 억제하여 비만치료 효과<sup>20)</sup>를 나타내고, 콜린성 신경계와 관련되어 기억력 개선 및 인지능력을 향상시키는 效능<sup>21)</sup>

등 주로 지질대사를 중심으로 한 비만과 항산화효과에 대한 연구가 주를 이루고 있다.

최근에는 산사의 散瘀行滯 효능을 심혈관계 기능에 적용한 연구가 이루어지고 있는 바, 산사가 MP의 활성을 증가시키고  $Ca^{2+}$ 에 대한 LC20 인산화의 sensitization을 감소시키고<sup>7)</sup> 또한 혈관 내피세포 내에서 NO/cGMP 경로의 활성화를 통한 세포의  $Ca^{2+}$ 의 유입을 차단하여 혈관을 이완시키는 것으로 보고되었으며<sup>8,9)</sup>, 특히 산사의 혈관이완효과를 활용한 처방이 토끼의 해면체 혈관에 대한 이완효과가 있다는 것이 밝혀져 산사를 성기능 개선을 위한 약물로 개발할 필요성도 제기되고 있다.

음경이 발기하기 위해서는 음경해면체 동맥과 음경평활근이 완전하게 이완되어야 한다. 즉, 동맥 및 평활근의 이완으로 음경해면체 내에 존재하는 동상혈관강(sinusoidal space)에 많은 양의 혈액이 주입되며 음경 내압의 상승으로 정맥혈은 밖으로 빠져나가지 못하여 발기가 유발되는 것이다<sup>22,23)</sup>. 그리고 발기의 과정 중 가장 중요한 단계라고 할 수 있는 음경해면체 동맥과 평활근의 이완작용은 해면체 내피세포에 존재하는 NO, endothelium-derived hyperpolarizing factor(EDHF), prostacyclin과 같은 혈관이완인자에 의해 이루어진다<sup>24,27)</sup>.

해면체내 혈관내피세포성 이완인자 중 prostacyclin은 cyclooxygenase에 의해 arachidonic acid에서 생성되어 혈관내피세포에서 cyclic 3',5'-adenosine monophosphate(cAMP)를 증가시킴으로써  $Ca^{2+}$ 의 유입이 차단되고 혈관을 이완시킨다<sup>28,29)</sup>.

NO는 내피세포에서 endothelial NO-synthase III(eNOS)에 의해 L-arginine으로부터 형성되고, 혈관 평활근세포 내에서 cyclic 3',5'-guanosine monophosphate(cGMP)를 활성화시켜 혈관을 이완시킨다<sup>30,32)</sup>.

EDHF는 평활근에서  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$ -channel(KCa-channel)의 활성화를 통한 막전압의 과분극을 유발하여 혈관을 이완시키는 작용을 한다<sup>22,33)</sup>.

따라서 산사가 한의학적으로 혈류의 개선 및 瘀血을 제거하는 活血散瘀 효능과 관련하여 혈관이완 효과를 입증한 이전의 연구결과를 볼 때 음경해면체에서도 내피세포성 이완인자의 작용 통하여 해면체 평활근의 긴장성 조절에 영향을 미칠 가능성이 있는 것으로 보인다.

이에 저자는 organ bath study를 통해 내피세포성 이완인자인 prostacyclin, NO, EDHF를 중심으로 山査가 음경해면체 혈관의 수축에 미치는 영향에 대하여 연구하였다.

실험결과 NE에 의한 최대수축에 대하여 산사 추출물 3.0 mg/ml을 투여하였을 때 음경해면체가 유의성 있는 이완효과를 나타내었으며, 해면체 혈관내피세포를 제거하여 실험하였을 때 해면체 혈관내피세포가 존재하는 경우에 비하여 산사 추출물의 모든 농도에서 이완효과가 유의하게 억제되었다. 이를 통해 산사가 음경해면체 혈관에 대해 이완효과가 있으며 산사의 혈관이완효과가 내피세포 의존성임을 확인할 수 있었다.

내피세포성 이완인자와 산사의 혈관이완작용의 관계를 규명하고자 NO와 EDHF에 영향을 주지 않으면서 prostacyclin의 생성을 차단하는 것으로 알려져 있는 IM<sup>34,35)</sup>을 이용하여

prostacyclin의 생성을 차단시킨 후 수축된 해면체에 산사를 투여하였다.

실험 결과 IM을 전처치하지 않은 경우와 IM을 전처치한 경우의 해면체 이완효과에 유의한 차이를 나타내지 않았으며, 이는 산사의 해면체혈관이완효과에 prostacyclin이 관계하지 않는 것을 나타낸다.

EDHF 작용을 차단으로 막전압의 과분극을 억제하는 TEA<sup>36)</sup>를 이용하여 EDHF의 작용을 차단시킨 후 수축된 해면체에 산사를 투여하였을 때, TEA를 전처치한 경우가 TEA를 전처치하지 않은 경우보다 이완효과가 유의하게 억제되었다.

이 결과는 산사가 해면체혈관의 KCa-channel의 활성화를 통한 막전압의 과분극을 유발하여 이완효과를 나타낼 가능성이 있다는 것은 의미한다.

내피세포에서 NOS의 작용 억제로 NO의 생성을 차단시키는 L-NNA<sup>37)</sup>를 전처치하여 NO의 생성을 차단시킨 후 수축된 해면체에 산사를 투여한 경우, L-NNA를 전처치하였을 때가 전처치하지 않은 경우에 비하여 이완효과가 유의하게 억제되었다. 이를 통하여 산사의 해면체 평활근의 이완효과에는 NO의 생성이 직접적으로 관계된다는 것을 알 수 있다.

또한 내피세포에서 생성된 NO가 해면체 혈관평활근으로 확장되어 cGMP를 활성화시키는 기전을 차단하는 작용을 하는 MB<sup>38)</sup>를 이용하여 cGMP의 활성을 차단시킨 후 수축된 해면체에 산사를 투여하였을 때, MB를 전처치한 경우가 MB를 전처치하지 않은 경우보다 이완효과가 유의성 있게 억제되었다. 이로써 산사의 작용은 해면체 평활근내에서 cGMP의 활성화에 의존한다는 것을 알 수 있다.

$Ca^{2+}$ 은 해면체 내피세포 및 평활근에서 수축 및 이완을 결정하는 중요한 인자로, 수축에 필요한 세포내  $Ca^{2+}$ 은 평활근 세포내의 sarcoplasmic reticulum(SR)과 mitochondria 등 세포내  $Ca^{2+}$ 의 저장고에서 유리되는  $Ca^{2+}$ 과 세포 외에서 유입되는  $Ca^{2+}$ 으로 이루어진다<sup>39)</sup>.

음경해면체에 대한 산사의 혈관이완작용에서 산사가 세포외  $Ca^{2+}$ 의 유입에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Krebs-Ringer solution에서  $Ca^{2+}$ 을 제거함으로써 세포외에서 유입되는  $Ca^{2+}$ 을 차단하고 NE로 수축시킨 후  $Ca^{2+}$  1 mM을 투여하였을 때 해면체 평활근의 수축이 증가되었다. 그러나 동일한 조건에서 산사를 전처치 한 후 NE로 수축시킨 다음  $Ca^{2+}$ 을 투여하였을 때는 산사를 전처치하지 않은 경우보다 수축의 증가가 억제되었다. 이를 통해 산사가 세포외  $Ca^{2+}$ 의 유입을 차단한다는 것을 알 수 있다.

Human umbilical vein endothelial cell(HUVEC)에 산사 추출물을 농도별로 24시간 처치한 후 NO량을 측정하였을 때 control에 비하여 산사 추출물 투여 시 유의성 있는 증가는 관찰되지 않았다. 이는 HUVEC의 세포외 NO 생성량만을 측정할 결과로 세포내 NO 생성량을 고려하지 않았으므로 좀 더 민감도가 높은 NO 측정 방법, 즉 probe를 이용한 fluorescence 측정 방법을 통한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

이상의 결과들로 보았을 때 산사의 해면체의 혈관을 이완시키는 효과는 EDHF의 작용 및 해면체 내피세포에서 NO의 생성

에 의존하며, 생성된 NO가 해면체평활근으로 확산되어 cGMP를 활성화시키고 세포외 Ca<sup>2+</sup> 유입을 차단함으로써 해면체 혈관을 이완시키는 것으로 판단된다.

## 결론

산사의 음경해면체 혈관수축에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈관수축 및 이완과 관련된 기전을 내피세포성 이완인자를 중심으로 실험하였으며 다음의 결과를 얻었다.

산사는 NE에 의해 수축된 해면체에서 유의성 있는 이완효과를 나타내었다. 해면체에 혈관내피세포가 존재하는 경우에 비하여 해면체 혈관내피세포를 제거한 후 산사 추출물을 투여하였을 때 모든 농도에서 이완효과가 유의하게 억제되었다. 음경해면체에 대한 산사의 혈관이완효과는 IM을 전처치하지 않은 경우와 IM을 전처치한 경우에서 이완효과에 유의한 차이를 나타내지 않았다. 음경해면체에 대한 산사의 혈관이완효과는 TEA, L-NNA와 MB의 전처치 하였을 때 전처치하지 않은 경우에 비하여 이완효과가 유의하게 감소되었다. Ca<sup>2+</sup>이 제거된 Krebs-Ringer solution에서 산사를 전처치하지 않은 경우보다 산사를 전처치한 경우에서 Ca<sup>2+</sup>의 첨가에 의한 수축의 증가가 유의하게 억제되었다. Human umbilical vein endothelial cell(HUVEC)에 산사 추출물을 농도별로 24시간 처치한 후 NO 량을 측정하였을 때 control에 비하여 산사 추출물 투여 시 유의성 있는 증가는 관찰되지 않았다.

실험결과 산사는 EDHF의 생성에 관여하며, 음경해면체 내피세포 및 평활근세포에서 NO pathway에서 NO의 생성 및 NO의 cGMP 활성화를 촉진시키며, 나아가 세포외 Ca<sup>2+</sup>의 유입 또한 억제함으로써 음경해면체내 혈관의 이완으로 혈류량을 증가시켜 발기시키는 작용을 할 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. 許浚. 東醫寶鑑. 서울, 南山堂, p 714, 1983.
2. 김재길. 東洋天然藥物原色圖鑑. 서울, 영림사, pp 231-232, 1995.
3. 신문에출판공사. 중약대사전. 신문에출판공사, pp 215-217, 1981.
4. 李時珍. 本草綱目. 서울, 고문사, p 1014, 1980.
5. 박성혜, 김영희, 전정우, 송유진, 한중현. Medicinal food로 활용하기 위한 산사에 관한연구(2)-산사발효액이 고지방식이에 있어 지질대사 개선에 미치는 기능성 평가-. 동의생리병리학회지 19(5):1272-1280, 2005.
6. 손창우, 채종구, 김길훤, 신흥묵. 산사의 혈관이완 효과와 항산화 작용. 동의생리병리학회지 16(1):67-71, 2002.
7. 유가량, 최호정, 김길훤, 신흥묵. 산사 Butanol 분획이 PGF2a-유도 혈관평활근 수축의 억제에 미치는 신호전달 연구. 동의생리병리학회지 17(2):461-466, 2003.
8. 채종구, 김길훤, 신흥묵. 내피세포 nitric oxide 유리를 통한 산사의 혈관이완 작용. 동의생리병리학회지 17(1):146-150, 2003.
9. 배명효, 김호현. 산사의 내피세포 의존성 혈관이완효과 기전에 대한 연구. 대한본초학회지 18(3):169-180, 2003.
10. Park, S.W., Lee, C.H., Shin, D.H., Bang, N.S., Lee, S.M. Effect of SA1, a herbal formulation, on sexual behavior and penile erection. Biological and Pharmaceutical Bulletin 29(7):1383-1386, 2006.
11. Lauralee Sherwood. 인체생리학. 서울, 라이프사이언스, pp 755-756, 2011.
12. 최형기, 최영득, Adaikan P.G., Yu J. 발기부전환자에서의 홍삼의 효능에 관한 연구-동남아시아의 다국적 연구. 고려인삼학회지 23(4):247-256, 1999.
13. Feelisch, M., Noack, E. Nitric oxide(NO) formation from nitrovasodilators occurs independently of hemoglobin or non-heme iron. European Journal of Pharmacology 142: 465-469, 1987.
14. Furchgott, R.F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. Circulation Research 53: 557-573, 1983.
15. 이한석, 김호현, 신선미, 박선영. 山査가 토끼의 음경해면체의 수축에 미치는 영향. 세명대학교 한의학연구소 논문집 15: 17-34, 2012.
16. 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.
17. Tracey, W.R., Linden, J., Michael, 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.
18. 신민교. 原色臨床本草學. 서울, 영림출판사, pp 421-422, 1992.
19. 육창수, 現代本草學, 서울, 고문사, p 320, 1975.
20. 고팡재, 송용선. 산사추출액이 白鼠의 肥滿模型에 미치는 영향. 한국전통의학지 8(1):1-8, 1998.
21. 왕수빈, 안은미, 정지욱. 기억력 감퇴모델에서 산사의 기억력 개선 효과에 관한 연구. 대한본초학회지 24(4):165-171, 2009.
22. Christ, G.J. The penis as a vascular organ. Urologic Clinics of North America 22(4):727-745, 1995.
23. 송봉근. 발기부전 치료의 한의학적 접근 방법에 관한 연구. 대한한의학학회지 17(2):74-76, 1996.
24. Andersson, K.E., Wagner G. Physiology of penile erection. Physiology Research 75: 191-236, 1995.
25. Wagner, G., Willis, E.A., Bro-Rasmussen, F., Nielsen, M.H. New theory on the mechanism of erection involving hitherto undescribed vessels. Lancet 20(1):416-418, 1982.



26. Banya, Y., Ushiki, T., Takagane, H., Aoki, H., Kubo, T., Ohhori T., Die C. Two circulatory routes within the human corpus cavernosum penis: A scanning electron microscopic study of corrosion casts. *Journal of Urology* 142: 879-883, 1989.
27. Montorsi, F., Sarteschi, M., Maga, T., Guazzoni, G., Fabris, G.F., Rigatti, P., Pizzini, G., Miani, A. Functional anatomy of cavernous helicine arteries in potent subjects. *Journal of Urology* 159: 808-810, 1998.
28. FitzGerald, G.A., Smith B., Pedersen, A.K., Brach, A.R. Increased prostacyclin biosynthesis in patients with severe atherosclerosis and platelet activation. *The New England Journal of Medicine* 310: 1065-1068, 1984.
29. Traish, A.M., Moreland, R.B., Huang, Y.H., Goldstein, I. Expression of functional alpha2-adrenergic receptor subtypes in human copus cavernosum and in cultured trabecular smooth muscle cells. *Recept Signal Transduct* 7: 55-67, 1997.
30. Andersson, K.E., Erectile physiological and pathophysiological pathways involved in erectile dysfunction. *Journal of Urology* 170: 6-13, 2003.
31. Stamler, J.S., Singel, D.J., Loscalzo, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox activated forms. *Science* 258: 1898-1902, 1992.
32. Vanhoutte, P.M. Endothelial control of vasomotor function: from health to coronary disease. *Circulation journal* 67(7):572-575, 2003.
33. Hecker, M. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Fact or Fiction?. *News in physiological sciences* 15(1):1-5, 2000.
34. Juliana, S.B., Cleber, E.T., Cristina, E.O., Fernanda, B.M.P., Renato, F., Edson, A., Gilberto, D.N. Relaxing effects induced by the soluble guanylyl cyclase stimulator BAY 41-2272 in human and rabbit corpus cavernosum. *European Journal of Pharmacology* 477: 163-169, 2003.
35. Gokce, G., Bagcivan I., Kilicarslan, H., Yildirim, S., Gultekin, Y.E., Sarioglu, Y. Relaxation effects of adrenomedullin in isolated rabbit corpus cavernosum smooth muscle. *British Journal of International* 93: 859-862, 2004.
36. Yang, Q., Shigemura, N., Underwood, M.J., Hsin, M., Xue, H.M., Huang, Y., He, G.W., Yu, C.M. NO and EDHF pathways in pulmonary arteries and veins are impaired in COPD patients. *vascular pharmacology* 57: 113-118, 2012.
37. Van der Zyppe A., Majewski H. Effect of cGMP inhibitors on the actions of nitrodilators in rat aorta. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 25: 38-43, 1998.
38. Ignarro, L.J. Biological actions and propeties of endothelium derived nitric oxide formaed and released from artery and vein. *Circulation Research* 65(1):1-21, 1989.
39. Jin, L., Teixeira, C.E., Webb, R.C., Leite, R. Comparison of the involvement of protein kinase C in agonist-induced contractions in mouse aorta and corpus cavernosum. *European Journal of Pharmacology* 590: 363-368, 2008.