

말기부전 환자에서 혈장
Transforming growth factor- β_1 의
농도와 그 진단적 가치

연세대학교 대학원
의과학사업단
류 지 간

발기부전 환자에서 혈장
Transforming growth factor- β_1 의
농도와 그 진단적 가치

연세대학교 대학원
의과학사업단
류 지 간

발기부전 환자에서 혈장
Transforming growth factor- β_1 의
농도와 그 진단적 가치

지도교수 최 형 기, 한 상 원

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2001년 12월 일

연세대학교 대학원
의과학사업단
류 지 간

류지간의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인
심사위원 _____인
심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2001년 12월 일

감사의 글

석사학위논문 작성에 많은 조언과 충고를 주신 최 형기, 한 상원 지도교수님께 진심으로 감사 드리며, 연구주제 선정, 연구계획서 작성, 대상 환자군 모집 및 자료의 해석에 많은 자문을 해주신 서 준규 교수님께 진심 어린 사의를 표합니다.

저 자 씀

차례

그림 및 표 차례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	5
1. 혈관성 발기부전의 진단	5
2. 신경인성 발기부전의 진단	6
3. 심인성 발기부전의 진단	6
4. 혈장 TGF- β_1 농도의 측정	6
가. 시약의 준비	7
나. 검사방법	8
다. TGF- β_1 농도의 계산	9
5. 결과분석	10
III. 결과	11
IV. 고찰	14

V. 결론	18
참고문헌	19
영문요약	23

그림 및 표 차례

그림 차례

그림 1. TGF- β_1 농도 계산을 위한 표준액의 그래프10

표 차례

표 1. 대조군과 발기부전군에서의 혈장 TGF- β_1 농도11

표 2. 발기부전의 원인에 따른 혈장 TGF- β_1 농도12

표 3. 발기능측정설문지(IIEF)의 발기능영역 점수에 의한 발기부전의 정도에 따른 혈장 TGF- β_1 농도12

표 4. 혈관성 발기부전의 위험인자 유무에 따른 혈장 TGF- β_1 농도13

국문요약

발기부전 환자에서의 혈장 Transforming growth factor- β_1 의 농도와 그 진단적 가치

목적: 최근 연구에서, TGF- β_1 의 기작에 의한 해면체 섬유화는 발기부전의 중요한 병인으로 대두되고 있다. 또한 TGF- β_1 은 악성종양, 간, 폐의 섬유화, 동맥경화증 과도 관련이 있다. 현재까지 전립선암, 신세포암, 폐암, 간세포암 등의 악성종양과 흡연, 당뇨병 등에서 혈장 TGF- β_1 농도의 증가를 보고한 바가 있지만, 발기부전에 대해서는 연구된 바가 없다. 이에 본 연구에서는 발기부전의 원인에 따른 혈장 TGF- β_1 농도를 연구함으로써 그 진단적 가치를 알아보고자 했다.

대상 및 방법: 심인성 발기부전 15례, 신경인성 발기부전 16례, 혈관성 발기부전 31례를 포함한 62명의 환자(평균: 51.8세, 분포: 30-72세)와 26명의 정상 대조군(평균: 54.7세, 분포: 28-72세)을 대상으로 했다. 병력조사, 기초혈액검사, 혈중지질검사로 혈관성 발기부전의 위험 인자인 흡연, 고혈압, 당뇨, 고지혈증, 동맥경화증 여부를 조사했고, 발기부전의 정도를 발기능측정 설문지(International Index of Erectile Function: IIEF)의 발기능 영역의 점수에 따라 경증, 중등도, 중증으로 나누었다. ELISA 방법으로 혈장 TGF- β_1 의 농도를 측정했고, 발기부전의 원인 및 정도, 위험인자의 유무에 따른 농도의 차이를 비교, 분석했다.

결과: 혈장 TGF- β_1 농도는 대조군이 $4.04 \pm 2.11 \text{ ng/ml}$, 발기부전군이 $6.67 \pm 4.90 \text{ ng/ml}$ 로서 발기부전군에서 유의 있게 높았다. ($p < 0.01$) 발기부전의 원인에 따른 차이는, 심인성 $3.84 \pm 1.84 \text{ ng/ml}$, 신경인성 $4.82 \pm 3.17 \text{ ng/ml}$, 혈관성 $9.92 \pm 5.53 \text{ ng/ml}$ 로 혈관성 발기부전에서 현저하게 높았다. ($p < 0.01$) IIEF 발기능 영역의 점수에 의한 발기부전 정도에 따른 농도는, 경증 $6.18 \pm 3.70 \text{ ng/ml}$, 중등도 $7.01 \pm 6.04 \text{ ng/ml}$,

중증 $6.07 \pm 4.81 \text{ ng/ml}$ 로 차이가 없었다. 위험 인자의 유무에 의한 농도는, 흡연군과 비흡연군이 각각 $7.54 \pm 4.68 \text{ ng/ml}$, $5.51 \pm 2.75 \text{ ng/ml}$ ($p < 0.05$), 고지혈증이 있는 경우와 없는 경우가 각각 $7.42 \pm 4.42 \text{ ng/ml}$, $4.80 \pm 2.75 \text{ ng/ml}$ ($p < 0.01$)로, 흡연군과 고지혈증군에서 의의 있게 높았다. 동맥경화증 유무에 의한 농도는 각각 $8.99 \pm 5.27 \text{ ng/ml}$, $6.21 \pm 4.69 \text{ ng/ml}$ 로, 동맥경화증이 있는 경우가 높은 경향을 보였다. 고혈압, 당뇨 유무에 의한 농도의 차이는 없었다.

결론: 혈장 TGF- β_1 농도는 혈관성 발기부전에서 상승되었고, 혈관성 발기부전의 위험인자 중에서 흡연, 고지혈증군에서 높게 나타났다. 혈장 TGF- β_1 농도의 측정은 발기부전 특히, 혈관성 발기부전의 진단에 비침습적이고 유용한 검사로 생각되며, 음경해면체의 조직학적 변화를 조기에 예측할 수 있을 것으로 기대된다.

핵심되는 말: 발기부전, plasma transforming growth factor- β_1 진단

발기부전 환자에서의 혈장 Transforming growth factor- β_1 의 농도와 그 진단적 가치

<지도교수 최 형 기, 한 상 원>

연세대학교 대학원 의과학사업단

류 지 간

I. 서론

혈관성 발기부전은 음경해면체의 구조적인 변화와 연관이 있으며, 정상적인 발기를 위해서는 적절한 비율의 해면체 평활근이 필요하다. 만약 음경해면체의 평활근의 양이 기준치 이하이면, 평활근 자체의 이완 정도에 관계없이 정상적인 정맥폐쇄기전에 장애를 일으키게 된다. 동맥경화증의 고 위험인자들 즉, 흡연, 고혈압, 당뇨, 고지혈증 등^{1,2}은 평활근 기능부전을 일으키고, 동시에 혈관성 발기부전의 위험인자로 작용한다. 기능적인 음경해면체 평활근/결체조직 비의 균형을 변화시키는 인자를 이해하는 것은 혈관성 발기부전 환자에서 새로운 치료제의 개발에 중요한 역할을 할 것이다. 최근 여러 연구에서 TGF- β_1 이 발기부전의 병인에 있어서 중요한 분자생물학적 결정인자 중의 하나로 제시되고 있다. 인간의 음경해면체 평활근 세포배양에서 TGF- β_1 은 콜라겐 합성을 증가시켰고,³ 인간 재조합(recombinant human) TGF- β_1 을 가토의 음경해면체 내에 주사했을 때, 농도 의존적으로 음경해면체 평활근/결체조직 비가 감소했고, 이로 인해 음경해면체의 정맥폐쇄부전을 초래했다.⁴ 만약 조기에 TGF- β_1 의 발현을 간단하고 비교적 신속하게 검사할 수 있는 방법이 있다면, 음경해면체의

구조적인 변화를 조기에 예측할 수 있을 것으로 생각되며, 향후 TGF- β_1 에 대한 길항제의 개발시에 조기진단 및 치료에 중요한 역할을 담당할 것으로 사료된다. 그러나 아직까지는 음경해면체 내의 TGF- β_1 의 발현 증가를 조기에 알 수 있는 방법은 없는 실정이다. 직접적으로 이를 확인하기 위해서는 음경해면체 조직이 필요한데, 단순히 진단목적으로 조직검사를 시행하는 것은 대단히 침습적이고 비경제적이다. 최근 신세포암, 전립선암, 폐암, 간세포암, 유방암 등의 악성 종양에서 혈장 TGF- β_1 농도의 상승을 보고한 바 있고, 이들 종양에서 혈장 TGF- β_1 의 진단적 가치 및 종양 치료 후의 예후평가에 이용 가능성을 제시한 바 있다.⁵⁻⁹ 또한 흡연, 당뇨병에서도 혈장 TGF- β_1 농도의 증가를 보고한 바 있지만,^{10,11} 발기부전에 있어서는 아직 연구된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 발기부전의 원인, 즉 심인성, 신경인성, 혈관성 발기부전에 따른 혈장 TGF- β_1 농도의 차이를 조사하고, 또한 평활근의 기능부전과 연관이 있는 동맥경화증의 고 위험인자들, 즉 고혈압, 고지혈증, 흡연, 당뇨 등이 혈장 TGF- β_1 농도에 미치는 영향을 알아보고자 한다.

II. 재료 및 방법

2001년 1월부터 6월까지 인하대병원 비뇨기과에 발기부전을 주소로 내원한 62명의 환자(평균연령: 54.7세, 분포: 30-72세)와 26명의 정상대조군(평균연령: 54.7세, 분포: 28-72세)을 대상으로 했다. 병력조사, 일반혈액검사, 혈액화학검사, 호르몬검사, 혈중지질검사, 음경복합초음파검사 및 음경해면체 생검을 통한 NADPH-diaphorase 염색을 시행해서 발기부전의 원인을 규명하였고, 혈관성 발기부전의 위험인자인 흡연, 고혈압, 당뇨, 고지혈증, 동맥경화증 여부를 조사했다. 고지혈증의 진단은 혈중지질검사에서 총 콜레스테롤 (Total cholesterol), 저비중 지단백 콜레스테롤 (LDL-cholesterol), 중성지방 (Triglyceride) 등의 상승이 있는 경우로 하였고, 동맥경화증은 혈관조영술에서 확진을 받은 경우에만 진단에 포함시켰다. 발기능측정 설문지(International Index of Sexual Function: IIEF)를 작성하여, 발기능 영역(Erectile Function domain)의 점수에 따라 발기부전의 정도를 경증(17이상), 중등도(11-16), 중증(1-10)으로 나누었다. 혈장 TGF- β_1 농도는 QuantikineTM human TGF- β_1 immunoassay(R & D systems Inc., Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다.

1. 혈관성 발기부전의 진단

10 μ g의 Prostaglandin-E₁(PGE₁)을 음경해면체에 주사 후, 10MHz의 색도플러 복합초음파(Diasonics, USA)를 이용하여 발기정도에 따라 20-30분간 양측 음경해면체 동맥의 최고수축기혈류속도(peak systolic velocity: PSV)와 말기이완기혈류속도(end diastolic velocity: EDV)를 측정하였다. PGE₁을 주사한 후 충분한 발기가 유지되면서 PSV가 30cm/sec 이상이고 EDV가 5cm/sec 미만일 때 정상으로 판정하였고, 주사 후 자가자극을 가해도 충분히 발기가 일어나지 않고 PSV가 30cm/sec 미만일 때는 동맥성 발기부전으로, 충분히 발기는 되지

않았으나 PSV는 정상이면서 EDV가 지속적으로 5cm/sec 이상으로 측정될 때는 정맥성 발기부전으로 판정하였다.

2. 신경인성 발기부전의 진단

음경해면체 생검술에 대한 충분한 설명과 이에 대한 동의를 구한 다음, 음경체부의 증간에서 Biopsy Gun을 이용하여 해면체 조직을 채취하였다. 채취한 해면체 조직을 0.2M phosphate buffer(PB) 용액으로 씻은 다음, 2% paraformaldehyde/0.05M PB 용액으로 2시간 동안 고정한 후, 25% sucrose-PB 용액에 넣어 4°C에서 하룻밤 냉장보관하였다. 다음 날 활주냉동절편기로 7 μ m 두께의 연속 관상절편을 얻은 후, β -NADPH (1mg/ml, Sigma, St. Louis, Missouri, USA), nitroblue tetrazolium(0.1mg/ml, Sigma, St. Louis, Missouri, USA), 0.2% Triton X-100 등이 포함된 용액(pH 8.0)으로 37°C에서 40분간 반응시켜 염색하였다. 400배의 광학현미경 시야에서 4군데의 임의구역으로부터 진청색의 물결모양으로 나타난 NOS 함유 신경섬유의 수를 파악하여 평균치를 구하였다. 신경인성 요인과 비신경인성 요인의 판정은 본 교실의 이전 자료에 근거하여, NADPH-diaphorase 양성인 신경섬유수가 43개 미만인 경우를 신경인성 발기부전으로 판정하였다.¹²

3. 심인성 발기부전의 진단

과거력에서 만성 내과적 질환이나 약물 또는 음주 복용력이 없는 사람으로서, 성 파트너에 따른 반응의 차이를 보이거나 혹은 정신과적으로 특별한 선행 유발요인이 있는 환자 중에서 RiGi scan에서 정상적인 소견을 보이는 경우에 심인성 발기부전으로 판정하였다.

4. 혈장 TGF- β ₁ 농도의 측정

가. 시약의 준비

(1) 사용하기 전에 모든 시약은 상온에 맞춘다.

(2) 세척액의 조제

농축 세척액을 증류수로 20배 희석하여 필요한 양만큼 준비한다. 필요한 세척액 양이 200ml일 경우 농축 세척액 10ml에 증류수 190ml를 넣어 총 부피가 200ml가 되도록 한 다음 잘 섞는다.

(3) 발색 시약 - 발색시약 A, B를 같은 부피로 섞어서 15분 내에 사용하며 각 well에 200 μ l씩 넣을 만큼 준비한다.

(4) TGF- β_1 표준액의 조제

희석액으로 RD6M을 이용한다. 보관된 standard는 2000pg/ml로 만든다. 이 용액은 최소 15분 동안 서서히 흔들어 완전히 녹인다. 500 μ l의 희석용액을 각 polypropylene tube에 넣어둔다. 준비하여 둔 standard 용액을 희석한다. 다음 tube에 넣기 전에 흔들어 완전히 섞어준다. 희석하지 않은 standard 용액의 농도가 최고 높다(2000pg/ml). 희석액을 농도 '0'으로 한다. 사용하고 남은 TGF- β_1 standard는 버린다.

(5) 혈장시료의 준비

EDTA 혈장분리튜브를 사용하여 채혈한 후 3000rpm에서 20분간 원심분리한다. 분리된 두층 중 상등액을 취해서 platelet-poor한 혈장을 준비한다. 이때 하부의 혈구, 혈소판 층의 오염을 피하기 위해 경계면은 회수하지 않는다. 분리된 혈장은 적당량씩 분주하여 분석 전까지는 -70°C에 보관한다.

(6) TGF- β_1 시료의 활성화

혈장 내 비 활성화 형태로 존재하는 TGF- β_1 을 활성화하기 위해 다음의 방법을 이용한다. 준비된 혈장 0.1ml에 2.5N acetic acid/10M urea 용액 0.1ml을 넣고 잘 섞는다. 실온에서 10분간 방치한 다음, 2.7N NaOH/1M HEPES 용액 0.1ml을 넣고 잘 섞어 산성화 된 시료를 중화한다. 활성화된 혈장액 300

μl 에 희석액 0.9ml를 넣어 4배 희석하여 검체로 한다. 전체적으로는 혈장 내 TGF- β_1 을 12배 희석한 결과이며, 최종 TGF- β_1 농도 계산 시에 희석 배수를 곱해주어야 한다. TGF- β_1 표준품은 활성화된 인간재조합 TGF- β_1 이므로 활성화하지 않는다.

나. 검사 방법

모든 시약과 sample은 사용 전 상온에 둔다. 실험시료, 표준시약 모두 2 well 씩 실험한다.

- (1) 모든 시약, 실험할 standard, 활성화한 시료를 실험 전에 준비한다.
- (2) 실험에 필요한 양만큼 strip을 꺼내어 frame에 고정시킨다.
- (3) 플레이트의 각 2 well에 각 농도의 표준액과 검체를 각각 200 μl 씩 분주한다.
- (4) 접착테이프로 덮은 뒤 실온(18-25°C)에서 3시간 둔다. 표준액 및 검체의 반응시간의 편차를 최소화하기 위하여 검사할 때에 표준액 및 검체를 10분 이내에 넣는다.
- (5) 각 well의 내용물을 흡입하고 세척액으로 3회 세척한다. 세척을 마친 후, 희석액이 남아 있지 않도록 완전히 제거한다.
- (6) 세척된 플레이트를 흡습지에 뒤집어 강하게 쳐서 남아있는 세척액을 완전히 제거한 다음 각 well에 TGF- β_1 conjugate 200 μl 씩 넣고 frame을 가볍게 쳐서 잘 혼합하고 실온(18-25°C)에서 90분간 방치한다.
- (7) 각 well의 내용물을 흡입하고 세척액으로 3회 세척한다.
- (8) 세척된 플레이트를 흡습지에 뒤집어 강하게 쳐서 남아있는 세척액을 완전히 제거한 다음, 각 well에 발색시약 200 μl 씩 넣고 frame을 가볍게 쳐서 잘 혼합하고 실온 (18-25°C)에서 20분간 반응시킨다.
- (9) 반응정지액 50 μl 씩 각 well에 넣어 반응을 정지시키고 frame을 가볍게

쳐서 잘 혼합한다. 일률적으로 색이 변하지 않으면 매우 주의하여 서서히 흔들어서 섞어준다.

(10) 표준액과 검체의 흡광도를 microplate reader를 사용하여 450nm의 파장에서 측정한다. 보정 파장은 540nm, 570nm가 가능하다. 보정이 불가능하다면 450nm에서 측정한 흡광도에서 540nm 혹은 570nm에서 측정한 흡광도를 빼준다. 보정이 없이 450nm의 파장에서 바로 측정하면 정확도가 차이가 날 수 있다. 흡광도는 반응 정지액을 넣은 후 30분 이내에 측정한다.

다. TGF- β_1 농도의 계산

(1) 표준액의 그래프 작성

각 농도의 표준액의 흡광도 값을 계산하고 가로축을 TGF- β_1 농도(pg/ml), 세로축을 흡광도(O.D.)로 하여 표준액의 그래프를 작성한다. (그림 1.)

(2) TGF- β_1 농도의 계산

(1)에서 작성된 그래프를 이용하여 세로축의 검체의 흡광도가 표준액의 그래프상에서 만나는 점을 찾아내어 이 점에 해당하는 가로축의 TGF- β_1 농도를 읽음으로써 이를 검체의 농도로 하고, 여기에 희석배수(12배 희석)를 곱하여 최종 농도로 한다. 이종으로 측정된 표준액 및 검체의 농도는 평균값을 구한다.

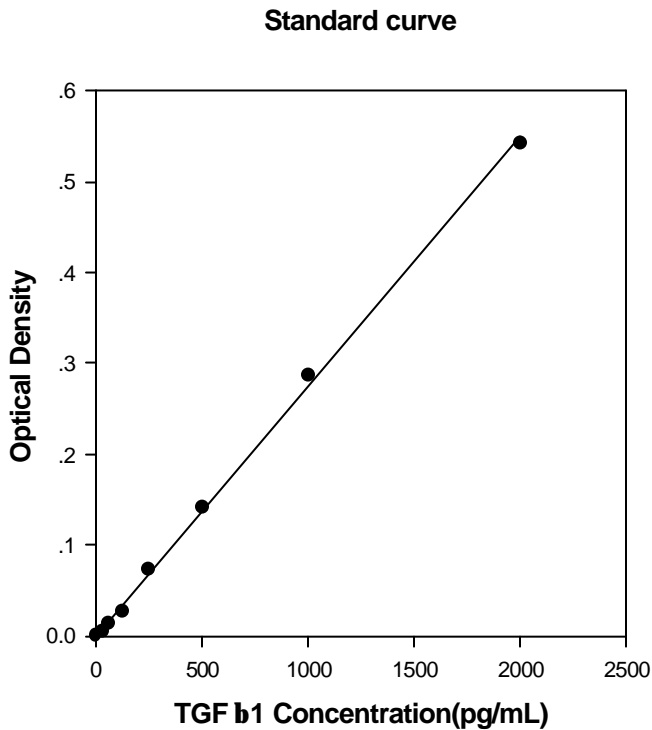


그림 1. TGF- β_1 농도 계산을 위한 표준액의 그래프.

5. 결과 분석

발기부전군과 정상 대조군 사이의 혈장 TGF- β_1 농도의 차이 및 혈관성 발기부전의 위험인자, 흡연, 고혈압, 당뇨, 고지혈증, 동맥경화증 등의 유무에 의한 혈장 TGF- β_1 농도의 차이는 unpaired Student t test로 검증했고, p값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 판정했다. 발기부전의 원인 및 발기능측정설문지 (IIEF)의 발기능 영역의 점수에 의한 발기부전의 정도에 따른 혈장 TGF- β_1 농도의 차이는 ANOVA로 검증했고, p값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 판정했다.

III. 결과

발기부전의 유형은 심인성 발기부전 15례, 신경인성 발기부전 16례, 그리고 혈관성 발기부전이 31례였다. 혈장 TGF- β_1 농도는 대조군이 $4.04 \pm 2.11 \text{ ng/ml}$, 발기부전군이 $6.67 \pm 4.90 \text{ ng/ml}$ 로서 발기부전군에서 유의있게 높았다. (표 1.)

표 1. 대조군과 발기부전군에서의 혈장 TGF- β_1 농도¹

	대조군 (26)	발기부전군 (62)
혈장 TGF- β_1 농도	4.04 ± 2.11	$6.67 \pm 4.90^*$

¹ 단위는 ng/ml이고 그 값은 평균 \pm 표준편차로 나타냄.

()안의 숫자는 대상 환자수를 나타낸 것임, * $p < 0.01$

발기부전의 원인에 따른 차이는, 심인성 $3.84 \pm 1.84 \text{ ng/ml}$, 신경인성 $4.82 \pm 3.17 \text{ ng/ml}$, 혈관성 $9.92 \pm 5.53 \text{ ng/ml}$ 로 혈관성 발기부전에서 현저하게 높았다. (표 2.)

발기능측정설문지(IIEF)의 발기능 영역의 점수에 의한 발기부전 정도에 따른 농도는, 경증 $6.18 \pm 3.70 \text{ ng/ml}$, 중등도 $7.01 \pm 6.04 \text{ ng/ml}$, 중증 $6.07 \pm 4.81 \text{ ng/ml}$ 로 차이가 없었다. (표 3.)

표 2. 발기부전의 원인에 따른 혈장 TGF- β_1 농도¹

	심인성 (15)	신경인성 (16)	혈관성 (31)
혈장 TGF- β_1 농도	3.84±1.84	4.82±3.17	9.92±5.53*

¹ 단위는 ng/ml이고 그 값은 평균±표준편차로 나타냄. ()안의 숫자는 대상 환자수를 나타낸 것임. * 심인성, 신경인성 발기부전에 비하여 p<0.01

표 3. 발기능측정설문지(IIEF)의 발기능영역 점수에 의한 발기부전의 정도에 따른 혈장 TGF- β_1 농도¹

	경증 (11)	중등도 (19)	중증 (19)
혈장 TGF- β_1 농도	6.18±3.70	7.01±6.04	6.07±4.81

¹ 단위는 ng/ml이고 그 값은 평균±표준편차로 나타냄.
()안의 숫자는 대상 환자수를 나타낸 것임.

혈관성 발기부전에 대한 위험 인자의 유무에 의한 농도는, 흡연군과 비흡연군이 각각 $7.54 \pm 4.68 \text{ ng/ml}$, $5.51 \pm 2.75 \text{ ng/ml}$ ($p < 0.05$), 고지혈증이 있는 경우와 없는 경우가 각각 $7.42 \pm 4.42 \text{ ng/ml}$, $4.80 \pm 2.75 \text{ ng/ml}$ ($p < 0.01$)로, 흡연군과 고지혈증군에서 유의 있게 높았다. 동맥경화증 유무에 의한 농도는 각각 $8.99 \pm 5.27 \text{ ng/ml}$, $6.21 \pm 4.69 \text{ ng/ml}$ 로, 동맥경화증이 있는 경우가 높은 경향을 보였으나 유의성은 없었다. ($p = 0.114$) 고혈압, 당뇨 유무에 의한 농도의 차이는 없었다. (표 4)

표 4 혈관성 발기부전의 위험인자 유무에 따른 혈장 TGF- β_1 농도¹

	흡연	고혈압	당뇨	고지혈증	동맥경화증
유	$7.54 \pm 4.68^*(21)$	$6.52 \pm 3.94(18)$	$6.16 \pm 3.86(15)$	$7.42 \pm 4.42^{**}(24)$	$8.99 \pm 5.27(7)$
무	$5.51 \pm 2.75(16)$	$6.73 \pm 5.29(44)$	$6.83 \pm 5.22(47)$	$4.80 \pm 2.75(22)$	$6.20 \pm 4.69(54)$

¹ 단위는 ng/ml이고 그 값은 평균 \pm 표준편차로 나타냄.

()안의 숫자는 대상 환자수를 나타낸 것임. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

IV. 고찰

발기부전은 크게 기질성과 심인성으로 나눌 수 있고, 기질성 발기부전은 다시 혈관성(동맥성 또는 정맥성), 신경인성, 호르몬성 또는 음경해면체 평활근 이상으로 나눌 수 있다. 대부분의 발기부전 환자에서는 기질성과 심인성 요인이 동시에 존재하는 경우가 많다. 기질성 발기부전의 가장 흔한 원인은 혈관성이고,¹³ 이는 동맥경화증이나 당뇨병과 연관된 경우가 많다.¹⁴ 동맥경화증은 50세 이상의 남성에서 발기부전의 원인의 약 40% 정도를 차지한다. 동맥경화증의 고 위험인자들 즉, 흡연, 고혈압, 당뇨, 고지혈증 등¹²은 평활근 기능부전, 예를 들면 혈관 평활근의 이완장애와도 연관이 있다.^{15,16} 동물실험에서 인위적으로 동맥경화증을 일으켜 골반 허혈을 유도했을 때, 배뇨근과¹⁷ 음경해면체 평활근의¹⁸ 기능적, 구조적 변형을 유발했다. 음경해면체의 허혈성 섬유화의 정확한 병태생리학적 기전은 아직 완전히 밝혀지지 않았지만, 저산소증으로 인한 TGF- β_1 의 과발현이 섬유화에 역할을 하는 것으로 보인다. TGF- β_1 의 과잉생성은 collagen, fibronectin, proteoglycan의 발현을 증가시키는 반면, 평활근 세포의 성장과 콜라겐 분해효소의 활성은 감소시킴으로써 평활근/결체조직 비를 감소시킨다.^{19,20} 세포배양 연구에서 TGF- β_1 은 음경해면체 평활근 세포에서 콜라겐 합성을 기준치보다 25 배에서 45 배까지 증가시켰고, 저산소증을 유발했을 때는 평활근세포에서 TGF- β_1 mRNA 발현을 유도함으로써 콜라겐 합성을 증가시켰다.³ 지속적인 허혈상태에서는 TGF- β_1 이 자기 자신의 mRNA 발현을 '자가유도' 하는 것으로 밝혀 졌는데, 이는 TGF- β_1 합성을 더욱 더 증가시키고 심한 섬유화를 유발하게 된다.¹⁸ Sattar 등²¹은 다양한 원인의 발기부전 환자에서 음경해면체 평활근 비와 음경해면체 내 PGE₁ 주사 후의 산소압을 비교했다. 이완기에는 동맥인성, 정맥인성, 심인성 발기부전 환자 사이의 산소압이 비슷했으나, PGE₁ 주사 후에는 음경해면체 내 산소압의 증가가 동맥인성과 정

맥인성 발기부전 환자에서 심인성 발기부전 환자에 비해 현저히 낮았다. 음경해면체 평활근의 평균 비도 동맥인성이 29.3%, 정맥인성이 34.1%로 심인성 발기부전 환자의 43.3%에 비해 현저히 낮았다. 따라서 음경해면체에서의 저산소압은 TGF- β_1 의 발현을 증가시키고 조직 섬유화의 위험인자가 된다.

최근 신세포암, 전립선암, 폐암, 간세포암, 유방암 등의 악성 종양과,^{b,4} 흡연, 당뇨병^{10,11}에서 혈장 TGF- β_1 농도 증가를 보고한 바 있다. 많은 세포유형 즉, 섬유아세포, 내피세포, 임파구, 대식세포, 골 및 간세포에서 TGF- β_1 을 생성하는데, 이것이 TGF- β_1 의 혈장농도에 기여를 하게 된다.¹⁹ 혈소판은 많은 양의 TGF- β_1 을 알파 과립 (alpha-granule)에 저장하고 있기 때문에, 순환기 내의 TGF- β_1 의 농도를 측정할 때는 혈소판에 의한 오염을 방지하기 위해 혈장을 사용하는 것이 좋다. Wakefield 등²²은 혈청이 아닌 혈장을 TGF- β_1 의 분석에 사용한 경우에는 혈소판에서 유래한 TGF- β_1 에 의한 오염이 거의 없었다고 보고했고, 또한 오염을 없애기 위해서는 채혈 시에도 tourniquet을 사용하지 않는 등 각별한 주의를 요한다고 했다. 저자들도 채혈 시에 혈소판 손상을 막기 위해 과도한 음압이 걸리지 않도록 주의를 했고, 원심분리된 두층 중에서 하부의 혈구, 혈소판 층의 오염을 피하기 위해서 경계면을 피하고 상등액을 취해서 혈장만 분리하였다.

본 연구에서는 혈관성 발기부전 환자에서 현저한 혈장 TGF- β_1 농도의 상승을 보였는데, 이는 전술한 바와 같이 혈관성 원인으로 인해 음경해면체의 산소압이 감소하게 되고, TGF- β_1 의 생성을 촉진시켜 허혈성 섬유화를 유발하며, 이는 다시 TGF- β_1 의 생성을 증가시키는 악순환 과정을 거쳐서 일어나는 것으로 생각된다. 본원에서 음경해면체 조직검사를 통해 발기부전의 원인에 따른 해면체 섬유화 정도를 본 결과, 혈관성이 72%로 대조군 43%, 심인성 45%, 그리고 신경인성 51%에 비해서 현저하게 높음을 알 수 있었다. (unpublished data)

동맥경화증에 있어서 TGF- β_1 의 역할은 분명치 않은데, 동물실험에서 TGF- β_1 이 혈관 평활근의 증식을 억제 또는 증식시키는 등 상반된 결과가 나온 반면에, 생체 외 실험에서는 TGF- β_1 이 저농도에서는 평활근을 증식시키고, 고농도에서는 증식을 억제한다는 보고가 있다.^{23,24} 한편, Grainer 등은 진행된 동맥경화증 환자에서 정상 대조군에 비해 활성형의 혈장 TGF- β_1 의 농도가 현저하게 감소되어 있음을 보고해서 활성형의 TGF- β_1 이 혈관 평활근의 증식을 억제해서 동맥경화증으로의 이행을 억제함을 보고한 바가 있다.²⁵ 그러나 본 연구에서는 고지혈증, 동맥경화증이 있는 환자군에서 없는 환자군에 비해 혈장 TGF- β_1 의 농도가 높았는데, 이는 두가지로 해석할 수 있다. 첫째, 본 연구에서는 활성형과 비활성형의 혈장 TGF- β_1 을 모두 측정했기 때문에 다른 결과가 나왔을 것으로 생각된다. 실제 사람의 혈장에서 활성형의 TGF- β_1 농도는 50pg/ml 이하로 알려져 있어서 현실적으로 활성형만을 측정하는 것은 많은 어려움이 있다.¹¹ 둘째는 동맥경화증 여부와 관련 없이 음경해면체 섬유화로 인해 음경에서 국소적으로 TGF- β_1 생성이 증가되고, 이로 인해 이차적으로 혈장 TGF- β_1 농도가 상승했을 것으로 추측할 수 있다.

흡연은 니코틴 등의 체내 축적으로 사람의 혈관내피 세포에서 protein kinase C를 활성화 시킴으로서 TGF- β_1 생성을 증가시킨다고 보고되고 있다.²⁶ 본 연구에서도 흡연자에서 비흡연자에 비해 혈장 TGF- β_1 농도의 상승을 관찰할 수 있었다.

당뇨 환자에서 발기부전은 당뇨병의 종류(IDDM 또는 NIDDM)에 관계없이 35-50%로 비교적 흔하게 나타난다. 발기부전의 유병율은 30-34세의 15%에서 60세가 되면 55%로 증가한다.²⁷⁻²⁹ 생체 외 실험에서 당은 여러 세포유형에서 TGF- β_1 생성을 증가시킨다고 보고했고, 이는 특히 diacylglycerol 형성을 통한 protein kinase C의 생성을 촉진함으로써 일어난다고 한다.³⁰⁻³² 또한 advanced glycation end products도 TGF- β_1 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있고,³³

Andreas 등은 2형 당뇨병 환자에서 혈장 TGF- β_1 농도의 상승을 보고한 바가 있다.¹⁰ 그러나 본 연구에서는 당뇨 유무에 따른 혈장 TGF- β_1 농도의 차이는 없었으며, 고혈압 유무에 따른 차이도 없었다.

이상의 결과로 동맥경화증 환자에서 혈장 TGF- β_1 농도가 높은 경향을 보였고, 이의 위험인자 중에서는 고지혈증, 흡연군에서 유의 있는 혈장 TGF- β_1 농도의 상승을 보였다. 혈장 TGF- β_1 농도의 상승이 이들 위험인자에 의해 직접적으로 나타난 결과인지 또는 단순히 발기부전에 의한 이차적인 현상인지는 아직 명확치 않다. 하지만, 현재까지의 보고에 의하면, TGF- β_1 이 동맥경화증을 억제한다는 견해가 지배적인 점과 본 연구에서 혈관성 발기부전에서 혈장 TGF- β_1 농도가 유의 있게 상승했다는 점을 고려해볼 때, 혈장 TGF- β_1 농도의 상승은 동맥경화증 및 이들 위험인자에 의한 전신적인 효과가 아니라, 음경해면체 섬유화 및 음경 내 TGF- β_1 의 발현 증가로 인한 국소 효과로 생각하는 것이 타당할 것으로 사료된다. 그리고 이를 뒷받침하기 위해서는 발기부전이 없는 정상 대조군에서 혈관성 발기부전의 위험인자 유무에 따른 혈장 TGF- β_1 농도의 변화를 알아보는 추가 연구가 필요하리라고 생각된다.

혈장 TGF- β_1 농도의 측정은 발기부전, 특히, 혈관성 발기부전의 진단에 있어서 비침습적이며 간편하고 효율적인 검사라고 생각되며, 음경해면체의 병적인 변화를 조직검사 없이 조기에 예측하는 데에도 중요한 역할을 담당할 것으로 사료된다.

V. 결론

혈장 TGF- β 1 농도는 혈관성 발기부전에서 상승되었고, 혈관성 발기부전의 위험인자 중에서 흡연, 고지혈증군에서 의의 있게 높았고, 동맥경화증에서도 높은 경향을 보였다. 이러한 혈장 TGF- β 1 농도의 상승은 동맥경화증 및 흡연, 고지혈증에 의한 전신적인 효과라기 보다는 혈관성 발기부전으로 인한 해면체 섬유화와 음경 내의 TGF- β 1의 발현증가로 인한 국소적인 효과로 사료된다. 혈장 TGF- β 1 농도의 측정은 발기부전 특히, 혈관성 발기부전의 진단에 비침습적이고 유용한 검사로 생각되며, 음경해면체의 조직학적 변화를 조기에 예측할 수 있는 효율적인 방법으로 생각된다.

참고문헌

1. Rose G, Epidemiology of atherosclerosis, Br Med J 1991; 303: 1537-9.
2. Bierman BL, Atherosclerosis and other forms of arteriosclerosis, In: Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, editors, Harrison's Principles of Internal Medicine, 12th ed, New York: McGraw-Hill Press; 1991, p. 992-1001.
3. Moreland RB, Traish AM, McMillin MA, Smith B, Goldstein I, Tejada I, PGE1 suppress the induction of collagen synthesis by transforming growth factor- β_1 in human corpus cavernosum smooth muscle, J Urol 1995; 153: 826-34.
4. Nehra A, Gettman MT, Nugent M, Bostwick DG, Barrett DM, Goldstein I, et al, Transforming growth factor- β_1 is sufficient to induce fibrosis of rabbit corpus cavernosum in vivo, J Urol 1999; 162: 910-5.
5. Wunderlich H, Steiner T, Junker U, Knofel B, Schlichter A, Schubert J, Serum transforming growth factor- β_1 in patients with renal cell carcinoma, J urol 1997; 157: 1602-3.
6. Ivanovic V, Melman A, Davis JB, Valcic M, Geliebter J, Elevated levels of TGF- β_1 in patients invasive prostate cancer, Nature Med 1995; 1: 282-3.
7. Kong FM, Washington MK, Jirtle RL, Anscher MS, Plasma transforming growth factor- β_1 reflects disease status in patients with lung cancer after radiotherapy: a possible tumor marker, Lung Cancer 1996; 16: 47-59.
8. Murawaki Y, Ikuta Y, Nishimura Y, Koda M, Kawasaki H, Serum markers for fibrosis and plasma transforming growth factor- β_1 in patients with hepatocellular carcinoma in comparison with patients with liver

cirrhosis, *J Gastroenterol Hepatol* 1996; 11: 443-50.

9. Kong FM, Anscher MS, Murase T, Abbott BD, Ighlehart JD, Jirtle RL. Elevated plasma transforming growth factor- β_1 levels in breast cancer patients decrease after surgical removal of the tumor. *Ann Surg* 1995; 222: 155-62.

10. Pfeiffer A, Middelberg BK, Drewes C, Schatz H. Elevated plasma levels of transforming growth factor- β_1 in NIDDM. *Diabetes Care* 1996; 19: 1113-7.

11. Esmatjes E, Flores L, Lario S, Claria J, Cases A, Inigo P, et al. Smoking increases serum levels of transforming growth factor- β in diabetic patients. *Diabetes Care* 1999; 22: 1915-6.

12. 류동수, 서준규, 문기학, 최연일, 한지영. 발기부전 환자에서 NADPH-diaphorase 염색법을 이용한 신경인성 요인의 진단. 대한비뇨기과학회 초록집 1998; 39: A65.

13. Donatucci CP, Lue TF. Erectile dysfunction in men under 40: etiology and treatment. *Int J Impotence Res* 1993; 5: 97-103.

14. Kayigil O, Atahan O, Metin A. Multifactorial evaluation of diabetic erectile dysfunction. *Int Urol Nephrol* 1996; 28: 717-22.

15. Egashira K, Inou T, Hirooka Y. Impaired coronary blood flow response to patients with coronary risk factors and proximal atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1993; 91: 29-37.

16. Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA. Impaired endothelium dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 1993; 88: 2510-6.

17. Taracan T, Siroky MB, Krane RJ, Edelstein RA, Azadzi KM.

Atherosclerosis-induced chronic ischemia causes bladder fibrosis and non-compliance: the role of growth factors, *J Urol* 1998; 159: 135A.

18. Azadzi KM, Siroky MB, Goldstein I. Study of etiologic relationship of arterial atherosclerosis to corporal veno-occlusive dysfunction in the rabbit, *J Urol* 1996; 155: 1795-800.

19. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor- β in tissue fibrosis, *New Engl J Med* 1994; 331: 1286-92.

20. Morisaki N, Kawano M, Koyama N. Effect of transforming growth factor- β_1 on growth of aortic smooth muscle cells. Influences of interaction with growth factors, cell state, cell phenotype, and cell cycle, *Atherosclerosis* 1991; 88: 227-34.

21. Sattar AA, Salpigides G, Vanderhaegen JJ, Scheulman CC, Wespes E. Cavernous Oxygen tension and smooth muscle fibers: relation and function, *J Urol* 1995; 154: 1736-9.

22. Wakefield LM, Letterio JJ, Chen T, Daniepour D, Allison RSH, Pai LH et al. Transforming growth factor- β_1 circulates in normal human plasma and is unchanged in advanced metastatic breast cancer, *Clin Cancer Res* 1995; 1: 129-36.

23. Mikhail N, Fukuda N, Tremblay J, Harnet P. Platelets, growth factors, and vascular smooth muscle cells in hypertension and diabetes, *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22(Suppl. 6): S64-S74.

24. Bategay EJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF, Ross R. TGF- β induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop, *Cell* 1990; 63: 515-24.

25. Grainer DJ, Kemp PR, Metcalfe JC, Liu AC, Lawn RM, Williams NR et

- al. The serum concentration of active transforming growth factor- β is severely depressed in advanced atherosclerosis. *Nature Med* 1995; 1: 74-9.
26. Shen Y, Rattan V, Sultana CH, Kalra V. Cigarette smoke condensate-induced adhesion molecule expression and transendothelial migration of monocytes. *Am J Physiol* 1996; 270: H1624-33.
27. Rubin A, Babbott D. Impotence and diabetes mellitus. *JAMA* 1958; 168: 496-500.
28. Schiavi RC, Stimmel BB, Mandeli J, Rayfield EJ. Diabetes mellitus and male sexual dysfunction: a controlled study. *Diabetologia* 1993; 36: 145-51.
29. Murray FT, Geisser M, Murphy TC. Evaluation and treatment of erectile dysfunction. *Am J Med Sci* 1995; 309: 99-109.
30. Hocco MV, Chen Y, Goldfarb S, Ziyadeh FN. Elevated glucose stimulates TGF- β gene expression and bioactivity in proximal tubule. *Kidney Int* 1992; 41: 107-14.
31. Ziyadeh FN, Sharma K, Ericksen M, Wolf G. Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor- β . *J Clin Invest* 1994; 93: 536-42.
32. Wolf G, Sharma K, Chen Y, Ericksen M, Ziyadeh FN. High glucose-induced proliferation in mesangial cells is reversed by autocrine TGF- β . *Kidney Int* 1992; 42: 647-56.
33. Yang CW, Vlassara H, Peten EP, He CJ, Striker GE, Striker LJ. Advanced glycation end products up-regulate gene expression found in diabetic glomerular diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9436-40.

Abstract

Diagnostic values of plasma transforming growth factor- β_1 in
patients with erectile dysfunction

Ji Kan Ryu

Brain Korea 21 Project for Medical Sciences

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Hyung Ki Choi, Sang Won Han)

Introduction: Recently, cavernous fibrosis via action of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) and its signaling pathway play a important role in the pathogenesis of erectile dysfunction (ED). Plasma levels of TGF- β_1 have been reported to be elevated in patient with diabetes, smoking and malignancies, such as prostate cancer, renal cell carcinoma, lung cancer and hepatocellular carcinoma, but no studies were performed in erectile dysfunction (ED). So, we evaluated the levels of plasma TGF- β_1 in ED patients with various causes and also verified the effect of risk factors of vasculogenic ED, such as, smoking, hypertension, diabetes mellitus, hyperlipidemia and atherosclerosis on plasma TGF- β_1 levels.

Materials and methods: Sixty-two impotent men (Mean age: 51.8 years, Range: 30-72 years) and twenty-six normal potent men (Mean age: 54.7 years, Range: 28-72 years) were included. Detailed history, physical examinations, and routine blood examination including lipid profile were performed to verify the risk factors for vaculogenic ED. The severity of ED were graded as mild, moderate and severe on the basis of erectile function domain scores of

International Index of Sexual Function (IIEF). Plasma TGF- β_1 levels were measured by ELISA using QuantikineTM human TGF- β_1 immunoassay.

Results: Of the 62 impotent patients, 15 were diagnosed as having psychogenic, 16 as having neurogenic, and 31 as having vasculogenic impotence. ED group showed significantly high plasma TGF- β_1 level compared to control group. (Control vs ED: 4.04 ± 2.11 , 6.67 ± 4.90 ng/ml, $p < 0.01$) The level of plasma TGF- β_1 were significantly increased in ED patients with vasculogenic cause compared to patients with psychogenic or neurogenic causes. (Psychogenic: 3.84 ± 1.84 ng/ml, Neurogenic: 4.82 ± 3.17 ng/ml, Vasculogenic: 9.92 ± 5.53 ng/ml, $p < 0.01$) Plasma TGF- β_1 levels with regard to ED severity on the basis of IIEF showed no differences between groups. Among the vascular risk factors, smoking and hyperlipidemia group showed significantly increased plasma TGF- β_1 level. (Smoker vs non-Smoker: 7.54 ± 4.68 , 5.51 ± 2.75 ng/ml, $p < 0.05$, Hyperlipidemia (+) vs (-): 7.42 ± 4.42 , 4.80 ± 2.75 ng/ml, $p < 0.01$). Patients with atherosclerosis showed increased plasma TGF- β_1 level, but, not statistically significant. (Atherosclerosis (+) vs (-): 8.99 ± 5.27 , 6.21 ± 4.69 ng/ml, $p = 0.114$). Patients with hypertension or diabetes mellitus showed no differences in plasma TGF- β_1 levels compared to patients without these risk factors.

Conclusions: Plasma TGF- β_1 levels were elevated in patients with vasculogenic ED. Among the vascular risk factors, smoking and hyperlipidemia group showed elevated plasma TGF- β_1 level. We think measurement of plasma TGF- β_1 level is non-invasive and useful tool in the diagnosis of ED, especially vasculogenic cause, and it may enables us to predict the cavernous fibrosis early in its course.

Key Words: erectile dysfunction, plasma transforming growth factor- β_1 , diagnosis