

원저

황백이 만성 비세균성 전립선염 모델에서 혈액학적 및 세포조직학적 변화에 미치는 영향

김순일, 안영민, 안세영, 두호경, 이병철
경희대학교 한의과대학 신계내과학교실

The Effects of *Phellodendri Cortex* Treatment on Hematological and Cyto-pathological Alterations in Non-Bacterial Prostatitis Rat Model

Soon-Il Kim, Young-Min Ahn, Se-Young Ahn,
Ho-Kyung Doo, Byung-Cheol Lee

Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine,
Kyung Hee University, Seoul, Korea.

Objective: Although chronic non-bacterial prostatitis is a common disease, it is very difficult to treat effectively. *Lygodium japonicum* has traditionally been used in treatment of urinary tract inflammation and voiding disturbance. In this study, we investigated the therapeutic effects and action mechanism of *Lygodium japonicum* in the rat model of non-bacterial prostatitis induced by castration and testosterone treatment.

Methods: Five-month-old rats were treated with 17β -estradiol after castration for induction of experimental non-bacterial prostatitis, which is similar to human chronic prostatitis in histopathological profiles. *Lygodium japonicum* and testosterone were administered as an experimental specimen and a positive control, respectively. The prostates were evaluated by histopathological parameters including the epithelial score and epithelio-stromal ratio for glandular damage, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) labeling index for cyto-proliferation and a TUNEL (deoxyuridine triphosphate biotin nick end-labeling) assay for cell apoptosis.

Results: While prostates of control rats revealed severe acinar gland atrophy and stromal proliferation, the rats treated with *Lygodium japonicum* showed a lesser range of tissue damage. Epithelial score was improved in *Lygodium japonicum* than that of the control ($P<0.05$). The epithelio-stromal ratio was lower in *Lygodium japonicum* when compared to that of the control ($P<0.05$). Although there was no difference in PCNA and TUNEL positive cells of the glandular epithelia, we found an decreased number of PCNA positive cell and concurrent increase of TUNEL positive cells in the stroma of *Lygodium japonicum* treated rats ($P<0.01$).

Conclusions: These findings suggest that *Lygodium japonicum* may protect the glandular epithelial cells and also inhibit stromal proliferation in association with suppression of cyto-proliferation and stimulation of apoptosis. We concluded that *Lygodium japonicum* may be a useful remedy agent for treating the chronic non-bacterial prostatitis.

Key Words: chronic non-bacterial prostatitis, *Lygodium japonicum*, PCNA, apoptosis.

- 접수 : 2006년 8월 5일 · 논문심사 : 2006년 8월 7일
- 채택 : 2006년 8월 19일
- 교신저자 : 이병철, 서울특별시 동대문구 회기동 1 경희의료원
부속한방병원 한방 6내과
(Tel: 02-958-9182, Fax: 02-958-9158
E-mail: hydrolee@korea.com)
- 본 연구는 2005학년도 경희대학교 교비 연구지원과제 연구비에 의해 수행되었음.

서론

전립선염은 남성 비노 생식기 질환의 약 25%를 차지하고, 특히 50세 이하의 남성에서 호발하는 것으로 보고되고 있다¹⁾. 전립선염 증상을 만성

적으로 호소하는 경우 비교적 난치성인 경우가 많고, 또한 급성 전립선염에 비해 원인, 진단, 치료법이 잘 알려져 있지 못한 실정이다¹⁾.

이러한 전립선염은 전통적으로 급성, 만성 또는 세균성, 비세균성으로 분류해왔으며, 만성 비세균성 전립선염이 전체 전립선염 환자 중 90% 이상을 차지하나²⁾, 그 병인에 대해서는 잘 알려져 있지 않고 특이적인 치료법도 별로 없는 실정이다²⁾.

서양의학적으로 만성 비세균성 전립선염은 아직까지 만족할만한 치료법이 없고, 보조요법으로서 교감신경차단제, 근이완제, 새로운 퀴놀론계 항생제나 테트라사이클린 항생제, 소염제 등의 약물치료와 마사지, 좌욕, 정상적인 성생활을 통한 정액의 배출 등이 시행되고 있으나, 치료 후에도 잦은 재발로 고통을 받아 정신과적 문제까지 야기하는 것으로 보고되고 있다³⁾.

동양의학적으로 전립선염은 蠱病, 尿濁, 淋病 등의 범주에 속하는데, 그 원인은 邪氣入肝, 肝經濕熱, 肝經鬱結, 房勞過多, 陰精內敗, 強忍交接 등으로 인해 발생하는 것으로 보고되어 있고, 치료법으로는 清熱消腫이나 瀉肝涼血 등이 제시되어 있다⁴⁾.

그러나 만성 비세균성 전립선염은 세균성 전립선염과는 달리 그 임상증상이 매우 다양하고 비특이적이기 때문에 진단이 쉽지 않고, 또한 약물이 잘 전달되지 못하는 전립선의 구조적 특징으로 인해 일반적인 약물 치료 역시 쉽지 않다고 할 수 있다⁵⁾.

현재까지 만성 비세균성 전립선염에 대해 임상증상의 측면에서 연구하여 치료의 방향을 제시한 동양의학적 연구들^{6,7)}이 많이 있었으나, 만성 전립선염에 대한 한약의 효과를 검증하기 위해 동물실험으로써 조직학적 소견 및 작용기전을 명확하게 밝힌 연구는 아직 보고된 바 없다.

이에 저자는 만성 비세균성 전립선염의 실험적 모델로 이용되는, 고환절제술 및 17 β -estradiol 투여로 유발된 만성 비세균성 전립선염 모델 rat⁸⁾의

전립선에 황백을 투여하여 관찰되는 혈액학적 변화 및 조직병리학적 형태와 세포증식 및 세포자멸사(apoptosis)의 변화를 분석하여 황백의 약리학적 효능을 검증하고 이를 통해 만성 비세균성 전립선염 환자의 치료에 도움을 주고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험약재의 추출

본 실험에 사용한 황백(*Phellodendri Cortex*)는 경희의료원 약제과에서 구입하여 정선한 후 사용하였다. 총량 200g의 황백을 1,500ml의 증류수에 넣어 4시간동안 가열추출하고 여과한 여액을 Rotary evaporator로 감압 농축한 후 동결건조기로 건조시켰다. 동결 건조된 각 약재의 1차 추출물 1g씩을 10 ml의 증류수로 용해시킨 후 95 $^{\circ}$ C 수조에서 2시간 동안 재차 가열 추출하였고, 이들 추출물을 원심분리용 시험관에 담아 14,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 수거하였다. 이 상층액을 직경 0.2 μ m의 필터에 통과시켜 여과 멸균하였으며, 실험에 사용할 때까지 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 황백의 최종 수거율은 60%였다.

2. 만성 비세균성 전립선염의 유발

5개월 된 수컷 Wistar rat (중양실험동물, Korea)를 구입하여 실온에서의 cage에서 40-70%의 습도를 유지하며 12시간씩 낮과 밤이 교대되는 환경으로 실험 전 1주일간 사육하여 적응기를 거쳤으며, 먹이와 물은 자유롭게 먹도록 하였다. 적응기간을 마친 후 ether 마취하에 rat의 음낭피부를 절개한 후 고환 상위부위의 정관(vas deferense), 혈관 및 신경조직을 봉합사로 묶은 후 고환과 부고환을 절제하였다. 고환절제 후 음낭피부를 봉합하고, 1일간의 회복기를 거치게 하였다. 고환절제술 후 2일째부터 17 β -estradiol (Sigma, USA)를 sesame oil로 희석하여 30일 동안 0.25mg/2ml/kg 용량으로 실험동물의 등에 피하주사하여 만성 비

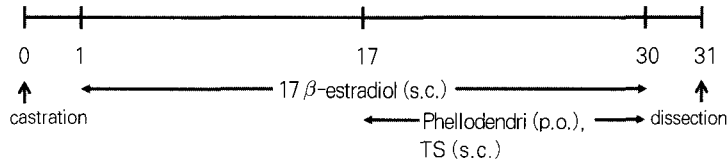


Fig.1. The experimental schedule for this study. TS: testosterone group.

세균성 전립선염을 유발하였다.

3. 실험군의 배정 및 약제의 투여

본 연구의 실험군은 각 군당 6마리씩 정상군 (Normal group), 대조군 (Control group), 황백 0.6g 투여군 (*Phellodendri* 0.6 group), 황백 1.2g 투여군 (*Phellodendri* 2.4 group), 테스토스테론투여군 (testosterone group)의 5군으로 나누어 진행하였다.

정상 대조군은 sham-castration으로 음낭을 절개하여 고환부분을 확인한 후 어떠한 조직의 절제나 결박없이 그대로 봉합하고, 연구기간동안 어떤 약물도 투여하지 않았다. 대조군의 rat에게는 고환 절제술 후 2일째부터 17 β-estradiol을 30일간 피하로 주사하였고 17일째부터 생리식염수 5ml/kg 만을 경구 투여하였다. 황백 투여군은 고환절제술 다음날부터 17 β-estradiol을 30일간 피하로 주사하면서, 17일째부터 황백을 생리식염수에 현탁하여 0.6g/kg (황백 0.6g 투여군) 및 1.2g/kg (황백 1.2g 투여군)의 용량으로 zonde를 이용하여 1일 1회 경구로 주입하였다. 양성 대조군은 고환절제술 다음날부터 17 β-estradiol을 30일간 피하로 주사하면서 17일째부터 testosterone을 corn oil에 2.5mg/2ml의 농도로 2.5mg/kg의 용량으로 피하 주사하였다 (Fig. 1).

4. 간, 신독성검사 및 혈액학적 분석

실험 시작 31일째에 rat의 심장에서 채혈하여 백혈구 (white blood cell), 적혈구(red blood cell), 혈색소 (hemoglobin), 적혈구 용적 (hematocrit)과

혈소판 (platelete) 등의 일반 혈액학 분석과 GOT, GPT, γ-GT, BUN 및 creatinine 등의 생화학적 분석을 시행하였다.

5. 전립선 무게와 조직병리학적 평가

마지막 투약 다음날 체중 측정과 채혈 후 rat를 희생시켜 전립선을 수술로 절제하여 그 무게를 측정하였다. 무게 측정 후 각 전립선을 10% 중성 완충 포르말린 용액에 고정한 후 70%, 80%, 95%, 100% 에탄올에 차례로 담가 탈수시킨 후 파라핀 블록을 만들었다. 이후 microtome을 이용하여 4μm의 두께로 각 전립선조직을 판상으로 절편한 다음 gelatin coated slide에 부착시켰다. 작성된 조직절편들은 조직염색을 위하여 xylene에 담가 파라핀을 제거하고, 100%, 95%, 80%, 70% 에탄올, 증류수에 차례로 담가 재수화 (rehydration)시켰다. 재수화된 조직을 Hematoxyline-Eosin (HE)으로 염색하여 광학현미경하에서 조직학적으로 평가하였다.

6. 세포증식과 세포자연사 (apoptosis)에 대한 면역조직화학

세포 증식과 세포자연사 (apoptosis)에 대한 분석은 proliferating cell nuclear antigen (PCNA)과 deoxyuridine triphosphate biotin nick end-labelling (TUNEL)으로 각각 염색하여 관찰하였다. PCNA 염색은 PCNA staining kit(ZYMED Laboratories, South San Francisco, CA)를 사용하였고, TUNEL 염색은 ApoTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection kit (Intervene, New York, NY)를 사용

Table 1. Common blood count of each study group.

Group	WBC ($\times 10^3$)	RBC ($\times 10^6$)	Hb (mg/dl)	Hct (%)	PLT ($\times 10^3$)
Normal	8.1 \pm 1.6	8.2 \pm 0.3	15.3 \pm 0.4	45.3 \pm 1.2	721.2 \pm 63.9
Control	5.9 \pm 1.4 [#]	7.2 \pm 0.3 ^{###}	13.2 \pm 0.5 ^{###}	39.1 \pm 1.4 ^{###}	816.7 \pm 48.4
P 0.6	9.0 \pm 1.8 [*]	7.0 \pm 0.4	12.7 \pm 0.5	38.5 \pm 1.6	841 \pm 127.0
P 1.2	7.6 \pm 2.5	6.7 \pm 0.5	12.4 \pm 0.7	37.1 \pm 2.3	837 \pm 70.8
TS	7.1 \pm 1.3	7.0 \pm 0.4	13.1 \pm 0.5	40.1 \pm 1.9	795.8 \pm 139.0

P 0.6: *Phellodendri* 0.6 group; P 1.2: *Phellodendri* 1.2 group; TS: testosterone group.

[#] Significantly different from the normal group at P<0.05. ^{###} P<0.001.

^{*} Significantly different from the control group at P<0.05

Table 2. Blood chemistry of each study group.

Group	GOT	GPT	γ -GT	BUN	Cr
Normal	117.0 \pm 22.2	45.0 \pm 3.2	1.0 \pm 0.0	21.3 \pm 1.9	0.6 \pm 0.1
Control	165.0 \pm 59.4	70.0 \pm 17.3 [#]	1.5 \pm 0.4	20.4 \pm 2.6	0.7 \pm 0.1
P 0.6	117.8 \pm 37.9	56.4 \pm 13.4	1.2 \pm 0.4	23.9 \pm 2.8	0.7 \pm 0.1
P 1.2	90.7 \pm 15.2 [*]	50.7 \pm 9.8	1.3 \pm 0.4	24.0 \pm 2.2	0.6 \pm 0.1
TS	98.8 \pm 29.7 [*]	56.0 \pm 33.4	1.2 \pm 0.5	22.9 \pm 1.6	0.7 \pm 0.1

P 0.6: *Phellodendri* 0.6 group; P 1.2: *Phellodendri* 1.2 group; TS: testosterone group.

[#] Significantly different from normal group at P<0.05.

^{*} Significantly different from the control group at P<0.05.

하였다.

1) PCNA 염색

조직절편에 blocking solution을 조직위에 떨어뜨려 20분간 반응시키고, 다시 PCNA primary antibody solution을 떨어뜨려 1시간 반응시킨 후 0.05M phosphate buffer saline (PBS) 용액으로 3차례 세척하였다. 이후 streptavidin - peroxidase solution을 떨어뜨려 30분간 반응시킨 다음 PBS로 3차례 세척후 DAB chromogen이 포함된 용액을 떨어뜨려 5분간 반응시킨 후 hematoxylin 용액을 떨어뜨려 대조염색하였다. 이후 조직을 PBS와 증류수에 각각 담가 세척 및 탈수한 후 Histomount를 이용하여 coverglass로 덮어 광학현미경으로 관찰하였다.

2) TUNEL 염색

4 μ m의 두께로 절편된 파라핀 조직을 상기 방법으로 재수화시킨 후 100mg/ml proteinase K solution을 조직에 떨어뜨려 20분간 반응시킨 후 PBS용액

으로 3차례로 세척하였다. Enzyme solution과 label solution을 각각 1:9의 비율로 혼합한 용액을 떨어뜨려 humidified chamber에 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 PBS로 3차례로 세척하였다. 세척 후 건조된 조직에 coverter-POD 용액 50 μ l을 떨어뜨려 다시 humidified chamber에 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 다음 PBS로 3회 세척 후 DAB substrate 50 μ l를 첨가하여 염색하였다. 이후 조직을 PBS와 증류수에 각각 담가 세척 한 후 Histomount를 이용하여 coverglass로 덮어 광학현미경하에서 관찰하였다.

3) PCNA와 TUNEL의 평가

표본에서 현미경상으로 상피세포와 결합조직세포 5000개씩을 카운트하여 이중 염색된 세포의 숫자를 환산하여 세포증식과 apoptosis 정도를 파악하였다.

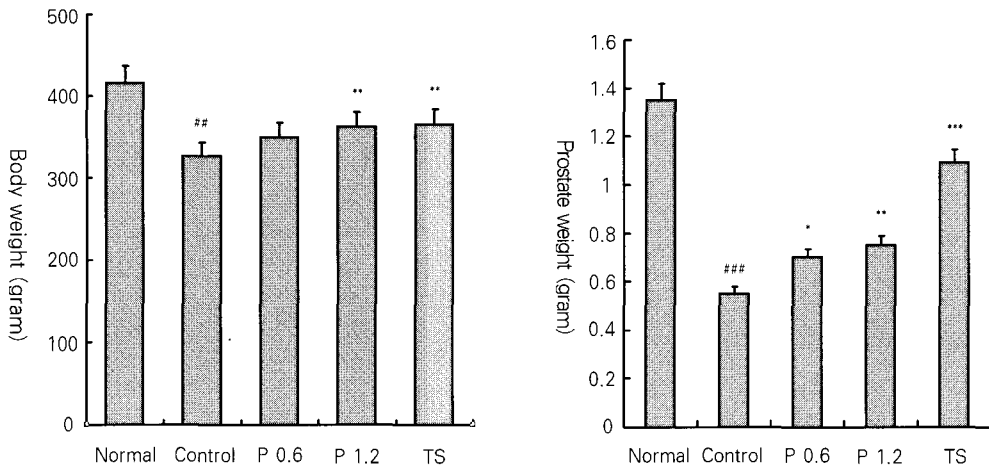


Fig. 2. Prostate weight of each study group.

Each column represents the mean ± SD.

P 0.6: *Phellodendri* 0.6 group; P 1.2: *Phellodendri* 1.2 group; TS: testosterone group.

^{##} Significantly different from the sham-operated group at P<0.01, ^{###} at P<0.001.

^{*} Significantly different from the control group at P<0.05, ^{**} at P<0.01, ^{***} at P<0.001.

7. 상피 계수 (epithelial score)와 상피/결합 조직 면적 비율 (epithelio-stromal ratio) 선(腺)조직의 손상정도에 대한 평가는 상피 세포 (epithelial cell)의 형태에 따라 점수를 매겨 시행하였다. 각각의 상피 세포의 형태가 원주형 세포 (columnar cell)일 경우 2점을, 입방형 세포(cuboidal cell)의 경우 1점, 편평양 세포(squamous-like cell)의 경우 0점을 매겼으며, 각 표본 당 20개씩의 선 조직 (gland)내에 존재하는 상피세포를 조사하여 평가하였다.

결합조직 증식을 평가하기 위해서 표본의 전 영역과 분비선영역의 현미경 사진을 이용하여 상피세포와 결합조직 면적 비율 (epithelio-stromal ratio)을 계산하였다.

8. 통계 분석

모든 실험은 두 번 반복하였다. 통계학적 비교 분석은 GraphPad PRISM statistical package (ver 2.00, Graphpad software inc., San Diego, USA)를 이용하여 실험군과 대조군간의 비교는 one-way

analysis of variance (ANOVA)에 이어 Tuckey's post-hoc test로 사후 검증하였으며, 정상군과 대조군 사이의 비교에는 Mann-Whitney U test를 시행하였다.

각각의 수치는 평균 ± 표준편차 (mean ± S.D.)로 표시하였으며, 양방 검정 유의도 (Two-tailed p value)는 p값이 <0.05 수준일 때를 기준으로 하였다.

결 과

1. 황백이 체중과 전립선 무게에 미치는 영향
고환절제술 및 30일간의 17 β-estradiol 투여, 그리고 황백의 투여가 체중 및 전립선 무게에 미치는 영향을 관찰한 결과, 연구 종료후 체중의 경우 정상군에서는 412.2±48.8g인데 비해 대조군에서는 327.4±24.8g(P<0.01)으로 유의성 있게 감소하였다(Table 2). 황백 0.6g 투여군에서는 체중이 350.2±25.7g으로 대조군에 비해 증가하였으나 통계학적 유의성은 없었고, 황백 1.2g 투여군에서는 361.8±12.2g(P<0.01), testosterone 투여군에서도

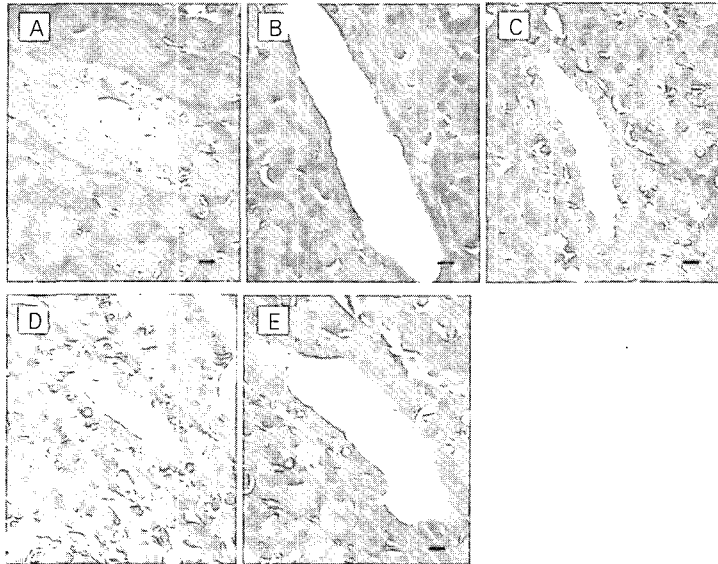


Fig. 3. HE staining of the prostate in experimental non-bacterial prostatitis rat.

- (A) Normal group: acinar epithelial cells are cylindrical. A few fibrous tissues are found in the stroma.
 - (B) Control group: acinar epithelial cells are flattened, similar to squamous cells. The stroma shows severe proliferation with many lymphocyte and monocyte infiltrations and remarkable fibrosis with fibroblasts.
 - (C) *Phellodendri* 0.6 group: acinar epithelial cells are cuboidal. The stroma shows mild proliferation with a few lymphocytes, monocytes and fibroblasts.
 - (D) *Phellodendri* 1.2 group: acinar epithelial cells are relatively cuboidal. Stromal proliferation is relatively mild without severe inflammatory cells.
 - (E) Testosterone group: acinar epithelial cells are cuboidal, and a few fibrous tissues are found in the stroma.
- ×400. The bar indicates 20 μ m.

365.8±9.3g(P<0.01)으로 대조군에 비해 유의한 증가를 보였다(Fig. 2).

연구 종료 후 전립선 무게의 경우 대조군에서는 0.55±0.1g(P<0.001)으로 정상군의 1.35±0.2g에 비해 유의성 있게 감소하였고, 황백 0.6g 투여군에서는 0.70±0.04g(P<0.05), 황백 1.2g 투여군에서도 0.75±0.06g(P<0.01)으로 대조군에 비해 유의한 증가를 보였다. Testosterone 투여군 역시 1.09±0.2g(P<0.001)으로 대조군에 비해 유의한 증가를 보였다(Fig. 2).

2. 황백의 간, 신독성 및 혈액학적 분석에 미치는 영향

일반 혈액학 분석에서 대조군에서는 정상군에

비해 백혈구와 적혈구, 혈색소 및 적혈구 비율 등이 모두 유의성 있게 감소하였다(P<0.001). 황백 0.6g 투여군에서 백혈구가 대조군에 비해 유의성 있게 증가한 외에는(P <0.05), 다른 실험군에서는 대조군과 비교시 모든 항목에서 유의성 있는 차이가 발견되지 않았다.(Table 1).

독성 여부를 알고자 간기능 및 신기능에 미치는 영향을 확인한 결과 대조군에서는 GPT가 정상군에 비해 유의성 있게 상승하였고(P<0.05), 기타 GOT, γ -GT 등은 대조군에 비해 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. 황백 0.6g 투여군에서는 GPT, γ -GT, GOT 모두 대조군과 비교시 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았고, 황백 1.2g 투여군과 testosterone 투여군에서는 GOT가 대조군에 비해

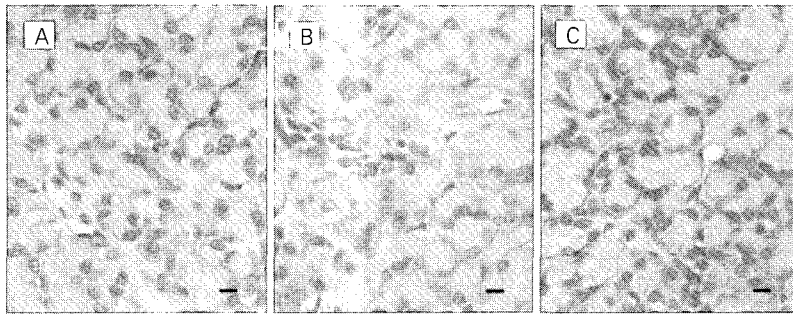


Fig. 4. PCNA immunohistochemical findings of the prostate stromal region in experimental nonbacterial prostatitis rats.

(A) Normal group: a few PCNA positive cells are shown.

(B) Control group: PCNA positive cells markedly increased.

(C) *Phellodendri* 1.2 group: PCNA positive cells lower compared with the Control groups.

×400 The bar indicates 20 μ m.

유의성 있게 호전되었으나 두 군 모두에서 GPT, γ -GT는 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다(Table 3). BUN과 Creatinine은 정상군, 대조군, 황백 0.6g 투여군, 황백 1.2g 투여군 및 testosterone 투여군 모두에서 유의성 있는 차이가 관찰되지 않았다(Table 2).

3. 황백이 전립선의 조직병리학적 변화에 미치는 영향

황백이 전립선의 조직병리학적 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해 시행한 H&E 염색 후 광학현미경 하 관찰에서 정상군은 다른 군에 비해 전립선의 크기가 크고, 포상선(acinar gland)이 등근 형태로 위축 없이 잘 유지되며, 선포 상피세포(acinar epithelial cell) 역시 원주형의 정상적인 형태로 유지되고 있었고, 결합조직의 증식이나 섬유화는 관찰되지 않았다.

고환 절제술 후 17 β -estradiol을 투여한 대조군에서는 포상선이 불규칙한 형태로 관찰되었고, 선포 상피세포는 편평세포형의 위축된 상태로 관찰되었으며, 결합조직은 심한 증식과 임파구 및 단핵구의 침윤이 관찰되었고, 아울러 섬유화가 같이 관찰되었다.

황백 투여군에서는 포상선이 대조군보다 더 등

근 형태로 약간의 위축이 관찰되었고, 선포 상피세포는 입방형으로 세포핵과 분비선들의 형태 및 공간이 대조군에 비해 정상적인 형태로 유지되었으며, 결합조직은 경도의 증식과 함께 임파구, 단핵구의 침윤이 감소된 양상을 보였으며, 섬유화 역시 대조군에 비해 감소된 양상을 보였다. 이러한 양상은 황백 0.6g 투여군보다 황백 1.2g 투여군에서 보다 뚜렷이 관찰되었다.

Testosterone 투여군에서는 포상선이 등근 형태로 정상군과 유사한 형태를 보였고 선포 상피세포는 원주형으로 잘 유지되었으며 결합조직은 경도의 증식과 섬유화가 관찰되었는데, 황백 1.2g 투여군과 유사한 양상이었다(Fig. 3).

4. 황백이 전립선의 세포증식에 미치는 영향

황백이 전립선 세포의 증식에 미치는 영향을 관찰하기 위해 PCNA 면역화학 염색 검사 후 광학현미경 하 관찰을 시행한 결과, 대조군에서는 정상군에 비해 결합조직내 PCNA 양성 세포가 유의성 있게 증가하였으나($P < 0.01$), 선포 세포 및 선포 상피세포내 PCNA 양성 세포는 두 군 사이에 유의성 있는 차이가 관찰되지 않았다.

황백 0.6g 투여군에서 결합조직내 PCNA 양성

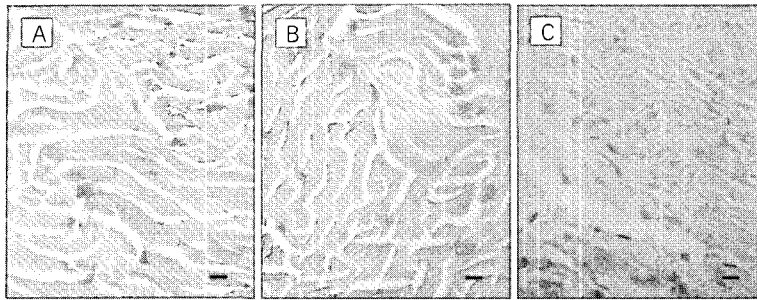


Fig. 5. TUNEL Immunohistochemical findings of the prostate.

(A) Normal group: a few TUNEL positive cells are shown.

(B) Control group & (C) *Phellodendri* 1.2 group: the findings are basically identical to these of the Normal group.

×400 The bar indicates 20 μ m.

세포의 발현이 대조군에 비해 억제되었고($P<0.05$), 이러한 양상은 황백 1.2g 투여군에서 더욱 현저하게 관찰되었다($P<0.01$). 그러나 황백 투여군에서 선포 세포와 선포 상피세포내 PCNA 양성 세포의 수는 대조군과 차이가 없었다. Testosterone 투여군에서는 선포 세포 및 결합조직내 PCNA 양성 세포의 수가 대조군에 비해 적게 관찰되었으나, 유의성 있는 차이는 없었다(Fig. 4).

5. 황백이 전립선 세포의 세포자연사(apoptosis)에 미치는 영향

황백이 전립선 세포의 세포자연사(apoptosis)에 미치는 영향을 관찰하기 위해 TUNEL 면역화학 염색 후 광학현미경하 관찰을 시행한 결과, 정상군에서는 TUNEL 양성 세포가 거의 관찰되지 않았고, 대조군에서도 TUNEL 양성 세포의 수가 정상군에 비해 뚜렷한 차이를 보이지 않았다.

황백 0.6g 투여군에서는 결합조직내 TUNEL 양성 세포의 수가 대조군에 비해 증가하였고($P<0.01$), 이러한 증가는 황백 1.2g 투여군에서 보다 뚜렷하였다($P<0.001$). 그러나 선포 세포와 선포 상피세포에서의 TUNEL 양성 세포수는 대조군과 차이가 없었다. Testosterone 투여군에서는 결합조직 및 선포 세포, 선포 상피세포 모두에서 TUNEL

양성 세포수가 정상군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 5).

6. 황백이 상피계수(epithelial score) 및 결합조직 면적 비율(stromal area ratio)에 미치는 영향

황백이 선포 상피세포의 선(腺)조직 손상 정도에 미치는 영향을 알아보기 위해 시행한 상피계수 분석상 대조군에서는 정상군에 비해 현저한 상피계수의 감소가 관찰되었다($P<0.001$). 황백 0.6g 투여군과 황백 1.2g 투여군에서는 상피계수가 각각 1.3 ± 0.3 ($P<0.05$)과 1.4 ± 0.4 ($P<0.05$)로 대조군의 상피계수 0.7 ± 0.2 에 비해 유의성 있게 증가하였다. Testosterone 투여군에서는 상피계수가 1.7 ± 0.2 ($P<0.01$)로 유의성 있게 증가하였다(Fig. 6).

전립선 결합조직 증식 평가를 위해, 결합조직과 결합조직을 제외한 선포 조직 간의 비율을 계산한 결과, 정상군에서는 결합조직 면적 비율이 $35\pm 8\%$ 로 나타난 반면 대조군에서는 $65\pm 12\%$ ($P<0.001$)로 결합조직 면적 비율이 유의성 있게 증가하였다. 결합조직 면적 비율이 황백 0.6g 투여군에서는 $54\pm 12\%$ ($P<0.05$), 황백 1.2g 투여군에서는 $48\pm 12\%$ ($P<0.05$)로 유의성 있게 감소하였고, testosterone 투여군에서는 $40\pm 9\%$ ($P<0.01$)로 감소하였다(Fig. 6).

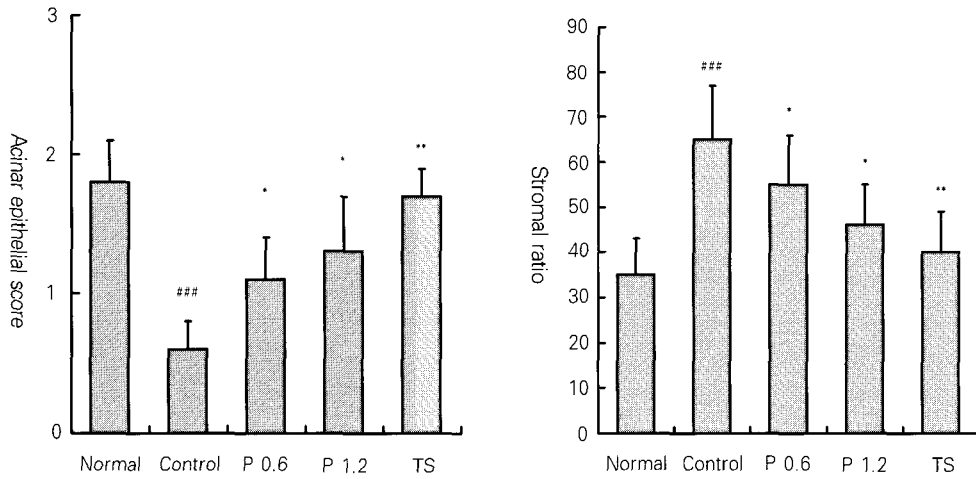


Fig. 6. Effects of Phellodendri Cortex on acinar epithelial score and stromal ratio of the prostate.

Each column represents the mean \pm SD.

Significantly different from the normal group at $P < 0.001$.

* Significantly different from the control group at $P < 0.05$, ** at $P < 0.01$.

고찰

전립선염은 남성 비뇨생식기 질환의 약 25%를 차지하며, 50세 이하의 남성에서 가장 흔한 비뇨기과 질환으로, National Institutes of Health (NIH)의 분류에 따라 급성 세균성 전립선염, 만성 세균성 전립선염, 만성 골반통 증후군(만성 비세균성 전립선염), 무증상성 염증성 전립선염으로 분류된다³⁾. 이 중 만성 비세균성 전립선염은 전립선염 중 가장 흔한 유형으로 만성 세균성 전립선염보다 약 8배 이상 높은 발생빈도를 나타낸다³⁾. 그러나 이러한 만성 비세균성 전립선염의 병인에 대해서는 정확히 알려져 있는 것이 거의 없고, 클라미디아나 유레아플라즈마 감염, 전립선내 요역류에 의한 화학적 자극³⁾, 항원으로 작용하는 세균 잔여물⁹⁾, 자가면역 반응³⁾, 바이러스 감염¹⁰⁾, 방광경부 및 전립선 요도 근육의 긴장 증가 혹은 골반저의 근육통¹¹⁾ 등의 여러 가지 가설들이 제기되었다.

서양의학적 치료에 있어서는 항생제나 α -교감 신경 차단제, 항콜린제, 근이완제, 소염제 등의 약

물치료와 골반근 이완훈련, 전립선 마사지, 온수 좌욕, 주기적인 성생활을 통한 정액의 배출 등이 시행되고 있고, 최근 외과적으로 경요도 초단파온열요법이나 레이저 치료법 등도 그 치료에 응용되고 있다¹²⁾. 그러나, 이러한 다양한 치료법에도 불구하고 대부분의 경우 치료가 만족스럽지 못하고, 잦은 재발로 정신과적인 문제까지 야기한다고 알려져 있다¹³⁾.

동양의학적으로 만성 비세균성 전립선염은 蠱病, 尿濁, 淋病 등의 범주에 속하고, 邪氣入肝, 肝經濕熱, 肝經鬱結, 房勞過多, 陰精內敗, 強忍交接 등이 그 발생 원인으로 여겨지고 있으며, 치료에 있어서는 清熱消腫이나 瀉肝涼血을 원칙으로 龍膽瀉肝湯이나 連翹敗毒散 등을 가감하여 사용하는 것으로 보고되고 있다⁴⁾.

본 연구에서 사용한 황백의 性은 寒 無毒하고, 味는 苦하여 瀉膀胱火, 除濕清熱, 療下焦虛, 骨蒸勞熱 등의 효능이 있어 주로 腸風下血, 淋濁 등의 치료에 응용되며¹⁴⁾, 황백의 주요 구성성분은 berberine, palmatine, jatrorrhizine 등이고, 항균, 혈압강하,

항염양, 항염증, 인슐린 분비 촉진 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾.

고령의 Wistar rat에게 고환 절제술 후 외부에서 17 β -estadiol을 투여하면, 100% 자발성 전립선염을 일으키는 것으로 보고되었고, 이렇게 17 β -estradiol 및 고환 절제술로 유발된 전립선염은 만성 비세균성 전립선염과 매우 유사한 조직병리학적 변화가 발생되는 것으로 알려져 있다¹⁶⁾. 따라서 고령의 Wistar rat에 대한 고환 절제술 후 17 β -estadiol의 투여는 자발성 비세균성 전립선염에 대한 실험적 모델인 동시에, 아울러 인간에서의 전립선염에 대한 유용한 실험적 모델이 된다¹⁷⁾.

본 연구에서 황백은 PCNA 분석상 결합조직의 세포분열과 세포증식을 억제하였으며, 전립선 분비선의 손상정도를 의미하는 전립선 선포 상피세포 지수(Acinar epithelial score) 및 전립선 상피세포에 대한 결합조직의 비율을 정량화한 전립선 결합조직 면적 비율(Stromal area ratio)을 호전시켜 전립선 분비조직에 대한 기능 및 형태적 보호작용을 나타내었다. 또한 황백의 투여로 전립선 무게를 현저히 증가시키는 효능을 나타내었다. 17 β -estadiol의 투여로 인한 전립선염에서는 염증에 의해 매개된 임파구, 중성구, 대식세포들의 침윤과 이들이 분비한 Interleukin-8(IL-8), TNF- α , IL-1 β , IL-6, Interferon- γ 등의 cytokine과 prostaglandin E2를 매개하는 cyclooxygenase-2, basic Fibroblast growth factor(bFGF) 등에 의해 결합조직 증식이 유발되는 것으로 알려져 있다^{17,18)}. 또한 황백의 주요 구성 성분인 berberine은 cyclooxygenase-2를 억제함으로써 염증 매개체인 prostaglandin E2의 생성을 감소시키며 IL-8의 생산을 억제한다는 보고가 있다^{19,20)}. 이러한 결과를 볼 때 황백의 투여로 염증 과정의 매개체가 저해되어 임파구, 중성구, 대식세포들 같은 염증 세포의 선강을 포함한 전립선내 침윤과 축적이 억제되어 결합조직 증식이 감소되고, 선상피의 손상이 억제되어 선상피의 분비 기능을 정상으로 유지시켜 전립선 무게의

증가를 나타낸 것을 여겨진다.

본 연구에서 고환절제술 및 17 β -estadiol의 투여로 유발된 비세균성 전립선염에서 나타나는 결합조직의 과다 증식을 억제하기 위한 apoptosis 기전을 밝히기 위해 TUNEL 분석 결과, 대조군 및 정상군에서는 TUNEL 양성 세포의 수가 큰 차이를 보이지 않았는데, 이는 대조군에서 과다한 세포의 증식에도 불구하고 apoptosis 기전이 제대로 작동하지 않아 결국 세포수 조절에 실패하였고, 이로 인해 결합조직 세포의 병리적 증식이 발생된 것으로 여겨진다. 반면 황백 투여로 인한 결합조직내 TUNEL 양성 세포의 증가는 황백이 apoptosis 기전을 촉진한다는 것을 의미한다. 또한 testosterone 투여군에서 나타난 TUNEL 양성세포 수가 대조군 및 정상군에 비해 큰 차이가 없다는 것은 앞서 PCNA 분석에서 나타난 결과 및 황백의 prostaglandin E2 억제기전과 연계하여 고려할 때 황백의 결합조직 증식 억제 작용이 testosterone의 작용과는 다른 세포주기의 조절, 염증억제, 성장인자 억제 및 apoptosis 조절 기전에 의해 이루어졌다는 것을 의미한다.

본 연구에서 kg당 1.2g까지 황백을 투여한 결과 간기능과 신기능에 별다른 악영향을 미치지 않았고 GOT 항목에서는 오히려 대조군에 비해 정도의 개선 효과를 나타내었으므로, 황백은 과량 투여시에도 인체내에서 간독성 및 신독성을 유발하지 않을 것으로 여겨진다. 전립선의 혈류역학적 구조상 약물 치료농도에 도달하기 위해서는 고용량의 약물 투여가 요구된다는 점을 고려할 때, 황백의 임상적 응용에 있어 그 안전성을 확인했다는 의의가 있다고 할 수 있다.

황백이 고령의 Wistar rat에 고환 절제술과 17 β -estadiol의 투여로 유발된 비세균성 전립선염에 미치는 영향을 알아보기 위해 시행한 연구에서, 황백은 전립선 선조직의 형태 및 기능보호 작용과 결합조직의 증식억제 작용을 가지는 것으로 나타났다으며, 이러한 작용에 관여하는 기전으로 황백이

PCNA의 억제와 apoptosis의 활성화 및 Prostaglandin E2와 IL-8의 억제작용이 관여한 것으로 사료된다. 또한 고용량의 황백 투여로도 간신독성을 유발하지 않아, 향후 임상 응용에 있어 그 안전성을 확보하였다. 따라서 황백은 만성 비세균성 전립선염의 치료에 있어 안전하게 사용할 수 있는 유용한 치료제로 기대되며, 향후 이에 대한 임상 연구가 필요하리라 사료된다.

참고 문헌

1. National Center for Health Statistics. Advance data from vital and health statistics. Vital Health Stat. 1993;16(7):61-70.
2. The National Institutes of Health chronic prostatitis symptom index: development and validation of a new outcome measure. Chronic Prostatitis Collaborative Research Network. J Urol. 1999;162(2):369-375.
3. 김동선, 김세철, 김진일 등. 대한 비뇨기과학회. 비뇨기과학. 제3판. 서울. 고려의학. 2001 ;150-161.
4. 두호경. 東醫腎系學, 서울:東洋醫學研究院. 1993 ;1056-1059.
5. Myers RP, Goellner JR, Cahill DR. Prostate shape, external striated urethral sphincter and radical prostatectomy: The aical dissection. J Urol. 1987;138:543.
6. 육현석, 안세영, 조동현, 두호경. 만성전립선염에 관한 동서의학적 고찰. 대한한의학회지. 1994;15(1):211-230.
7. 임범수, 조충식, 김철중. 만성전립선염 환자에 대한 임상적 고찰. 대한한방내과학회지. 2001 ;22(4):519-525.
8. Seethalakshmi L, Bala RS, Malhotra RK, Austin-ritchie T, Miller-Graziano C, Menon M, Lubner-Narod J. 17β-Estradiol induced prostatitis in the rat is an autoimmune disease. J Urol 1996;156:1838-1842.
9. Doble A. Chronic prostatitis. Br J Urol. 1994 ;74:537-541.
10. Uehling DT. Abacterial prostatitis: more about what it isn't but what is it. J Urol. 1989;141 :367-368.
11. De la Rosette JJMCH, Karthaus HFM, Van Kerrebroeck PE, de Boo T, Debruyne FM. Research in "prostatitis syndromes": the use of Alfuzosin(a new α-receptor blocking agent) in patients mainly presenting with micturition complaints of an irritative nature and confirmed urodynamic abnormalities. Eur Urol. 1992;22 :222-227.
12. Krieger JN. The problem with prostatitis. What do we know? What do we need to know? J Urol. 2004;172:432-433.
13. Kochetov AG, Golubchikov VA, Ivanov AO, Sitnikov NV, Groshilin SM, Glinskii VM. Psychophysiological characteristics of patients with chronic prostatitis. Urologiia. 2003;5 :26-31.
14. 이상인. 본초학. 제2판. 서울. 수서원. 1981 ;507-509.
15. 이경순, 안덕균, 신민교, 김창민. 완역중약대사전. 서울. 도서출판정담. 1997;5052-5063.
16. Robinette CL. Sex-hormone-induced inflammation and fibromuscular proliferation in the rat lateral prostate. The Prostate 1988;12:271-286.
17. C. Lee Robinette. Sex-hormone-induced inflammation and fibromuscular proliferation in the rat lateral prostate. The prostate. 1988;12 :271-286.
18. Bauer H.W, Bach D: Prostaglandin E2 in prostatitis and prostatic adenoma. Urol Int. 1996;41:139.

19. Fukuda K, Hibiya Y, Mutoh M, Koshiji M, Akao S, Fujiwara H. Inhibition by berberine of cyclooxygenase-2 transcriptional activity in human colon cancer cells. *J Ethnopharmacol.* 1999;66(2):227-233.
20. Haiyan Zhou, Satoru Mineshita. The effect of berberine chloride on experimental colitis in rats in vivo and in vitro. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;294(3):822-829.