

連翹가 만성 비세균성 전립선염 Rat의 염증발현인자 및 세포조직 변화에 미치는 영향

이진신 · 안영민 · 안세영 · 두호경 · 이병철
경희대학교 한의과대학 신계내과학교실

The Effects of *Forsythiae Frucus* on Inflammatory Genes and Cyto-pathological Alterations in Chronic Non-Bacterial Prostatitis Rat Model

Jin-Sin Lee, 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.

ABSTRACT

Objective : The etiology of chronic prostatitis is likely multifactorial, resulting from either a cascade of events after an initiating factor or from a variety of etiologic mechanisms. There is substantiating evidence to support the role of the inflammatory responses in its pathogenesis, and the clinical value in the evaluation of therapeutic efficacy. *Forsythiae Frucus* has been traditionally used in treatment of inflammatory diseases, including of prostatitis and urinary tract inflammation. In this study, we investigated the effects of *Forsythiae Frucus* on inflammatory cytokines and cyto-pathological alternation in the rat model of chronic non-bacterial prostatitis induced by castration and 17 β -estradiol treatment.

Methods : Two-month-old rats were treated with 17 β -estradiol after castration for induction of experimental non-bacterial prostatitis, which is similar to human chronic prostatitis in histopathological profiles. *Forsythiae Frucus* as an experimental specimen, and testosterone as a positive control, were administered orally. The prostates were evaluated by histopathological parameters including the epithelial score and epithelio-stromal ratio for glandular damage, and the expression of inflammatory cytokine genes including interleukin (IL)-1 β , IL-5, IL-12, tumor necrosis factor (TNF)- α , eotaxin, inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2(cox-2).

Results : While prostates of control rats revealed severe acinar gland atrophy and stromal proliferation, the rats treated with *Forsythiae Frucus* showed a diminished range of tissue damage. Epithelial score was improved in the *Forsythiae Frucus* group over that of the control (P<0.05). The epithelio-stromal ratio was lower in the *Forsythiae Frucus* group when compared to that of the control (P<0.05). In the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) of inflammatory cytokine genes, *Forsythiae Frucus* inhibited the expression of IL-1 β , TNF- α , iNOS, cox-2 genes, while it modulated the expression of IL-5, which is an anti-inflammatory cytokine.

Conclusions : These findings suggest that *Forsythiae Frucus* may protect the glandular epithelial cells and also inhibit stromal proliferation in association with the immune modulation including the suppression of inflammatory cytokines and increase of anti-inflammatory cytokines. From these results, we suggest that *Forsythiae Frucus* could be a useful remedy agents for treating chronic non-bacterial prostatitis.

Key words: chronic non-bacterial prostatitis, *Forsythiae Frucus*, inflammatory cytokine.

1. 서론

· 교신저자: 이병철 서울특별시 동대문구 회기동 1
경희의료원 부속한방병원 한방 6내과
Tel : 02-958-9182 Fax : 02-958-9158
E-mail : hydrolee@korea.com

전립선염은 사춘기 이전에는 드물지만 성인 남
성에서 50%가 평생에 한번은 전립선염 증상을 경

험하게 되고, 비뇨기와 외래환자의 25%가 전립선염으로 추정될 만큼 매우 흔한 질환이다¹. 전립선염은 최근 National Institutes of Health(NIH)에서 제시한 새로운 기준에 따라서 급성 세균성 전립선염, 만성 세균성 전립선염, 만성 비세균성 전립선염, 무증상성 전립선염으로 구분하고 있다^{1,2}. 이 중 발생빈도가 가장 높은 질환은 만성 비세균성 전립선염으로 그 주된 증상은 회음부, 음경 및 고환 부위의 통증이다. 또한 배뇨곤란, 세뇨, 요급, 빈뇨와 같은 배뇨 관련 증상도 흔히 나타나며, 성기능 장애를 유발하기도 한다¹.

만성 비세균성 전립선염의 병인으로는 감염성 물질, 전립선내 요 역류에 의한 화학적 자극, 항원으로 작용하는 세균 잔여물, 자가 면역 반응, 바이러스 감염, 방광경부 및 전립선 요도 근육의 긴장 증가 혹은 골반저의 근육통 등이 제시되고 있으나 정확한 병인은 밝혀져 있지 않고 있으며, 그 발생 기전으로는 내분비계, 면역계, 신경계의 이상 및 정신적인 요인 등이 알려져 있다¹. 이 중 cytokine의 불균형으로 인해 발생한 면역계의 이상이 주된 기전으로 tumor necrosis factor(TNF)- α , interleukin-6(IL-6), IL-8, IL-1 β , interleukin-1 receptor antagonist(IL-1ra), interferon- γ 와 같은 전염증인자(proinflammatory cytokine)는 항진되고 IL-10과 같은 항염증인자(antiinflammatory)는 저하된다. 특히, 염증성 cytokine으로 불리는 IL-1 β 와 TNF- α 는 만성 전립선염환자의 전립선 액에서 증가되어 전립선염의 진단 및 면역학적인 예후를 판단하는 중요한 척도로 인식되고 있다^{2,3}. 또한 만성 비세균성 전립선염에서는 근조직을 포함한 결합조직의 비율이 증가하여 전립선을 구성하는 선포 세포, 선포 상피 세포와 같은 구조물의 위축을 유발하여 정상 전립선 기능에 장애를 초래한다^{2,3}.

連翹(*Forsythiae Fructus*)는 淸熱解毒, 消腫散結의 효능이 있어서 동양의학에서 전립선염에 해당하는 淋病의 치료처방에 많이 사용되고 있다^{4,5}. 최근 連翹와 관련된 세포실험에서 nitric oxide(NO)

와 TNF- α 의 발현 및 inducible nitric oxide synthase(iNOS)의 발현을 억제시켰고, human mast cell을 이용한 세포실험에서도 TNF- α 의 분비를 억제시켜 항염증 효능이 있다는 보고가 있었다⁶⁻⁹. 한편 전염증인자는 항진되고 항염증인자는 저하되는 등의 염증발현이 만성 비세균성 전립선염에 영향을 미치므로, 염증발현을 억제하는 효능이 밝혀진 連翹가 본 질환의 치료에도 영향을 미칠 수 있을 것으로 추정할 수 있다. 하지만 본 질환에 대한 連翹의 항염증 효능에 대한 보고는 현재까지 없는 실정이다.

이에 임상에서 만성 비세균성 전립선염에 많이 응용되고 있는 連翹의 효능과 안전성을 구체적으로 입증하기 위해 고환절제술 및 17 β -estradiol 투여로 유발된 만성 비세균성 전립선염 모델 Rat^{3,10,11}을 이용하여 전립선의 조직병리학적 형태와 염증관련인자의 변화를 관찰하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 검체의 제조

본 실험에 사용한 連翹(*Forsythiae Fructus*)는 경희의료원 약제과에서 구입하여 정선한 후 사용하였다. 총량 200g의 連翹를 1,500ml의 증류수에 넣어 4시간 동안 가열추출하고 여과한 여액을 Rotary evaporator로 감압 농축한 후 동결건조기(Model FD-1, 東京理化學株式會社, Japan)로 건조시켰다. 동결 건조된 약제의 1차 추출물 1g씩을 10 ml의 증류수로 용해시킨 후 95°C 수조에서 2시간 동안 재차 가열 추출했고, 이 추출물을 원심분리용 시험관에 담아 원심 분리하여 상층액을 수거하였다. 連翹의 최종 수거율은 10.3%이었다.

2. 성호르몬-유발 비세균성 전립선염 동물 모델의 제작

2개월 된 수컷 Wistar rat(중앙실험동물, Korea)

을 ether 마취 하에 rat의 음낭피부를 절개하여 고환 상위부위의 정관(vas deferense), 혈관, 및 신경 조직을 봉합사로 묶은 다음 고환과 부고환을 절제하였다. 고환절제 후 음낭피부를 봉합하고, 1일간의 회복기를 거치게 하였다. 고환절제술 2일째부터 17 β -estradiol(Sigma, USA)을 sesame oil로 희석하여 30일 동안 0.25mg/2ml/kg 용량으로 Rat의 등에 피하주사하여 비세균성 전립선염을 유발하였다.

3. 실험군의 배정 및 연구 과정

본 연구의 실험군은 각 군당 6마리씩 정상군(Normal group), 대조군(Control group), 連翹 1.2g 투여군(Forsythiae 1.2 group), 連翹 2.4g 투여군(Forsythiae 2.4 group), 테스토스테론 투여군(Testosterone group)의 5군으로 나누어 진행하였다.

정상군은 Sham-castration으로 음낭을 절개하여 고환부분을 확인한 후 어떠한 조직의 절제나 결박 없이 그대로 봉합하고, 연구기간 동안 어떤 약물도 투여하지 않았다. 대조군은 고환절제술 다음날부터 17 β -estradiol을 30일간 피하로 주사하였고 17일째부터 생리식염수 5ml/kg만을 경구 투여하였다. 連翹 투여군은 고환절제술 다음날부터 17 β -estradiol을 30일간 피하로 주사하면서 17일째부터 連翹를 생리식염수에 현탁하여 1.2g/kg(連翹 1.2g 투여군) 및 2.4g/kg(連翹 2.4g 투여군)의 용량으로 zonde를 이용하여 1일 1회 경구로 투여하였다. 테스토스테론 투여군은 고환절제술 다음날부터 17 β -estradiol을 30일간 피하로 주사하면서 17일째부터 Testosterone을 corn oil에 2.5mg/2ml의 농도로 희석하여 2.5mg/kg의 용량으로 피하 주사하였다 (Table I).

Table I. Structure of the Experimenta

Group	No. of animals	Inflammatory agent	Treatment
Normal	6	None	No-treatment
Control	6	17 β -estradiol 0.25mg/kg	Saline (p.o.)
Forsythiae 1.2	6	17 β -estradiol 0.25mg/kg	Forsythiae 1.2g/kg(p.o.)
Forsythiae 2.4	6	17 β -estradiol 0.25mg/kg	Forsythiae 2.4g/kg(p.o.)
Testosterone	6	17 β -estradiol 0.25mg/kg	Testosterone 2.5mg/kg(s.c.)

aEach parenthesis represents the route of administration. s.c.subcutaneous injection; p.o.oral administration

4. 혈액학적 분석

실험 시작 31일 째에 rat의 심장에서 채혈하여 GOT, GPT, γ -GT, BUN 및 creatinine 등의 생화학적 분석을 시행하였다.

5. 전립선 무게와 조직병리학적 평가

마지막 투약 다음날 rat를 희생시켜 전립선을 수술로 절제하여 그 무게를 측정하였다. 각 전립선

을 파라핀 블록으로 만들어 4 μ m의 두께로 절편하여 gelatin coated slide에 부착시켰다. 이렇게 만들어진 조직절편들은 조직염색을 위해 재수화(rehydration)시키고 Hematoxyline-Eosin (HE)으로 염색하여 광학현미경 하에서 조직학적으로 평가하였다.

6. 상피 계수(epithelial score)와 상피/결합조직 면

적 비율(epithelio- stromal area 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 2점, 입방형 세포(cuboidal cell)의 경우 1점, 편평양 세포(squamous-like cell)의 경우 0점을 주었으며, 각 표본 당 20개 썩의 선 조직(gland) 내에 존재하는 상피세포를 조사하여 평가하였다. 한편 결합조직 증식을 평가하기 위해서 표본의 전 영역과 분비선 영역의 현미경 사진을 이용하여 상피세포와 결합조직 면적 비율(epithelio-stromal ratio)을 계산하였다.

7. 전립선 조직에서의 RNA 분리

전립선 조직에서의 RNA 분리는 Mini RNA Isolation IITM(ZYMO RESEARCH, CA, USA)을 이용하였다. 마지막 투약 다음날 rat를 희생시켜 전립선을 수술로 절제한 후 신속하게 각 군당 전립선 조직 15mg씩을 분리하여 tube에 넣고 여기에 ZR RNA buffer 300 μ l씩을 분주한 다음 Homogenizer를 이용하여 조직을 분쇄하였다. 분쇄된 조직이 담긴 tube를 1,000rpm에서 원심분리한 후 상층액을 Zymo-Spin III Column에 옮기고 이를 2ml collection tube에 꽂은 다음 2,000rpm으로 1분간 원심 분리하였다. Column에 RNA wash buffer 350 μ l를 분주하고 1분간 원심분리하여 2회 세척한 후 Column을 1.5ml tube에 옮겨 꽂은 다음 RNA-free water 50 μ l를 분주하여 1,000rpm으로 원심 분리하여 최종적으로 RNA를 수거하여 사용하기 전까지 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

8. 전립선 조직의 IL-1 β , IL-5, IL-12, TNF- α , Eotaxin, iNOS 및 COX-2 유전자 발현 측정

전립선 조직의 Interleukin(IL)-1 β , Tumor necrosis factor(TNF)- α , IL-10, inducible nitric oxide synthase(iNOS) 및 Cyclooxygenase-2(cox-2) 유전자의 발현 측정은 반정량(semi-quantitative)

역전사 연쇄중합반응(Reverse transcription-polymerase chain reaction: RT-PCR) 이용하여 측정하였다. 전립선 조직에서 분리한 1 μ g의 RNA에 PCR buffer와 5mM의 MgCl₂, 1mM의 dNTP, 20U의 RNasin, 2.5 μ M의 Oligo(dT), 100U의 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase를 혼합하여 42 $^{\circ}$ C에서 50분, 70 $^{\circ}$ C에서 15분씩 반응시켰다. 역전사를 통해 얻어진 각각의 complementary DNA(cDNA)에 PCR buffer, 2.5 mM dNTP, 2 U Taq polymerase, 5pM의 primers를 혼합하여 Eppendorfs Mastercycler Gradient PCR device(Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 연쇄중합반응을 시행하였다. 사용한 각 primer의 염기 서열은 IL-1 β 의 경우 5'-CATCTTTGAAGAAGAGCCCG-3'과 5'-AACTATGTCCCGACCATTGC-3', TNF- α 의 경우 5'-ACTCCCAGAAAAGCAAGCAA-3'과 5'-TGGAAGACTCCTCCCAGGTA-3', IL-5의 경우 5'-AGACCGGTCATACATGCACA-3'과 5'-TCGTCTCATTGCTCGTCAAC-3', IL-12의 경우 5'-GTGGGAGCTGGAGAAAGATG-3'과 5'-TTGGTGCTTCACACTTCAGG-3', TNF- α 의 경우 5'-ACTCCCAGAAAAGCAAGCAA-3'과 5'-TGGAAGACTCCTCCCAGGTA-3', Eotaxin의 경우 5'-AGGTTCCATCCCACTTCCT-3'과 5'-TGCCGATATTCTCCCATAGC-3', iNOS의 경우 5'-GCATCCCAAGTACGAGTGGT-3'과 5'-GAAGGCGTAGCTGAACAAGG-3', COX-2의 경우 5'-ATCCTGAGTGGGATGACGAG-3'과 5'-CGAAGGTGCTAGGTTTCCAG-3'. 그리고 대조군으로 사용한 β -actin의 경우 5'-CCTCTATGCCAACACAGT-3'과 5'-AGCCACCAATCCACACAG-3'을 각각 사용하였다. 각각의 연쇄중합반응의 주기수(cycle)와 신장단계 온도(annealing temperature)는 IL-1 β , IL-5, IL-12, TNF- α , Eotaxin, iNOS 및 COX-2의 경우 60 $^{\circ}$ C에서 35 cycle, β -actin의 경우 55 $^{\circ}$ C에서

30 cycle로 시행하였으며, 예상 연쇄증합반응 결과물의 염기 크기는 IL-1 β 의 경우 493bp, IL-5의 경우 490bp, IL-12의 경우 326bp, TNF- α 의 경우 688bp, Eotaxin의 경우 308bp, iNOS의 경우 700bp, COX-2의 경우 693bp, 그리고 대조군인 β -actin의 경우 155 bp였다. 이상의 과정을 통해 얻어진 각각의 연쇄증합반응 결과물은 ethidium bromide로 염색하여 2% 아가로스 젤(agarose gel)에서 확인한 후 각각의 발현도는 densitometry를 이용하여 측정하였다. 측정된 발현도는 정상군인 GAPDH를 1로 산정하여 이에 대한 값으로 환산하여 표시하였다.

9. 통계 분석

모든 실험은 두 번 반복하였다. 통계학적 비교분석은 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 \pm 표준편차(mean \pm S.D.)로 표시했으며, 양방 점검 유의도(Two-tailed p value)는 p값이 <0.05 수준일 때를 기준으로 하였다.

III. 결 과

1. 連翹에 의한 체중과 전립선 무게의 변화

고환절제술 및 30일간의 17 β -estradiol 투여후 連翹의 투여가 체중 및 전립선 무게에 미치는 영향을 관찰한 결과, 대조군은 288.2 \pm 21.2g으로 정상군의 349.2 \pm 16.2g 비해 체중감소가 현저하게 나타났다(P<0.001) (Table II). 실험군에서의 연구 종료 후 체중감소는 대조군에 비해 連翹 1.2g투여군, 連翹 2.4g 투여군 및 Testosterone 투여군에서 큰 차이를 나타내지 않았다. 연구 종료 시점에서의 전

립선 무게 역시 대조군은 0.35 \pm 0.12으로 정상군의 1.03 \pm 0.08에 비해 현저하게 위축되었으며(P<0.001), 連翹 1.2g투여군, 連翹 2.4g 투여군 및 Testosterone 투여군에서 대조군에 비해 전립선 무게의 차이는 관찰되지 않았다(Table II).

Table II. Body wight and Prostate weight of each experimental group

Group	Body weight(g)	Prostate weight(g)
Normal	349.2 \pm 16.2	1.03 \pm 0.08
Control	288.2 \pm 21.2 ^{###}	0.35 \pm 0.12 ^{###}
Forsythia 1.2	268.3 \pm 40.7	0.25 \pm 0.07
Forsythia 2.4	282.0 \pm 24.7	0.28 \pm 0.06
Testosterone	391.8 \pm 21.5	0.37 \pm 0.06

###Significantly different from the normal group (### P<0.001)

2. 連翹에 의한 간기능 및 신기능의 변화

고환 절제술 및 17 β -estradiol 투여후 連翹의 투여가 간기능 및 신기능에 미치는 영향을 알아보기 위해 시행한 혈액의 생화학 분석 결과, 연구 종료 시점에서 정상군에 비해 대조군에서 GOT, GPT, γ -GT 등의 항목에서는 경도의 상승이 관찰되었으나 통계학적 유의성은 없었다. 連翹 1.2g투여군, 連翹 2.4g 투여군은 대조군에 비해 GOT, GPT 항목에서 개선 효과를 나타내었으며, 連翹 2.4g의 투여군과 Testosterone 투여군은 대조군에 비해 GOT 항목에서 유의한 개선 효과를 나타내었다 (Table III). 한편, BUN과 creatinine 항목에서는 대조군에서 정상군에 비해 BUN이 유의하게 상승했지만, 連翹 1.2g투여군, 連翹 2.4g 투여군 및 Testosterone 투여군 모두에서 유의한 차이는 관찰되지 않고, creatinine은 모든 군에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다 (Table III).

Table III. Blood chemistry of each experimental group

Group	GOT(u/l)	GPT(u/l)	γ-GT(u/l)	BUN(mg/dl)	Cr(mg/dl)
Normal	135.5±24.4	38.3±5.2	1.2± 0.4	16.5±2.5	0.6±0.1
Control	140.0±20.0	30.6±1.7 [#]	1.4±0.9	18.1±1.8 [#]	0.5±0.1
F 1.2	108.0±40.8	24.0±6.6	2.5±1.9	17.75±5.3	0.6±0.1
F 2.4	76.2±11.9 ^{***}	28.6±4.5	1.0±0.0	19.68±1.2	0.5±0.2
TS	78.8±17.4 ^{***}	29.3±2.9	1.3±0.5	19.67±2.9	0.5±0.8

#Significantly different from the normal group (P<0.05)***Significantly different from the control group (P<0.001)

3. 連翹에 의한 전립선의 조직병리학적 변화

連翹 투여가 전립선의 조직학적 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 시행한 H&E 염색 표본의 광학 현미경상 관찰에서 정상군은 선포 세포(acinar gland)가 둥근 형태로 위축없이 잘 유지되고 있었고, 도관상피 세포(duct epithelial cell) 역시 원주형의 형태로 정상 세포핵과 분비선들이 정상 형태를 유지하고 있었으며, 결합 조직의 증식이나 섬유화 및 임파구와 단핵구의 침윤은 관찰되지 않았다. 고환 절제술과 17 β-estradiol을 투여한 대조군에서는 정상군에 비해 광범위한 선조직의 위축이 관찰되었고, 선포 세포는 타원형 및 선형의 형태로 위축되어 불규칙하게 분포되어 있으며, 도관 세포 역시 편평세포의 형태로 위축되어 있었고, 결합조직은 심한 세포증식과 임파구 및 단핵구의 침윤과 함께 여러 부위에서 섬유성 변성이 관찰되었다. 連翹 투여군에서는 선포 세포는 대조군보다 비교적 둥근 형태로 정도의 위축이 관찰되었고, 도관 세포는 입방형으로 세포핵과 분비선들의 형태 및 공간이 대조군에 비해 정상군에 가까운 형태를 유지하고 있었으며, 결합 조직은 정도의 증식과 함께 임파구, 단핵구의 침윤이 감소되었고, 섬유화 변성 역시 대조군에 비해 감소된 양상을 보였다. 이러한 조직학적 변화 양상은 連翹 1.2g 투여군보

다 2.4g 투여군에서 더 뚜렷하게 관찰되었다. Testosterone 투여군에서는 선포 세포는 대조군에 비해 비교적 둥근 형태로 정상군에 가까운 형태를 보였고, 도관 세포 역시 원주모양으로 유지되었으며, 결합 조직은 정도의 증식과 섬유화가 連翹 2.4g 투여군과 유사한 정도로 관찰되었다(Fig. 1).

4. 連翹에 의한 상피 계수(epithelial score)의 변화

連翹가 상피세포의 선(腺)조직 손상정도에 미치는 영향을 알아보기 위해 상피세포의 형태에 따라 원주형(columnar)의 경우 2점, 입방형(cuboidal)의 경우 1점, 편평양(squamous-like)의 경우 0점을 매겨 세포지수를 분석하였다. 대조군에서는 정상군에 비해 현저한 상피 계수의 감소가 관찰되었으므로 (P<0.001), 고환절제술과 17β-estradiol의 투여로 유발된 만성 비세균성 전립선염에서 전립선 선조직의 손상이 유발됨을 확인할 수 있었다. 連翹 1.2g 투여군의 상피 계수는 1.0±0.3, 連翹 2.4g 투여군은 1.2±0.4로 대조군의 0.8±0.2에 비해 유의하게 증가하여(P<0.05), 連翹가 전립선 선조직의 손상을 보호하는 작용이 있음을 보였다. Testosterone 투여군 역시 상피 계수가 1.3±0.2으로 유의하게 증가하였다(P<0.05) (Fig. 2).

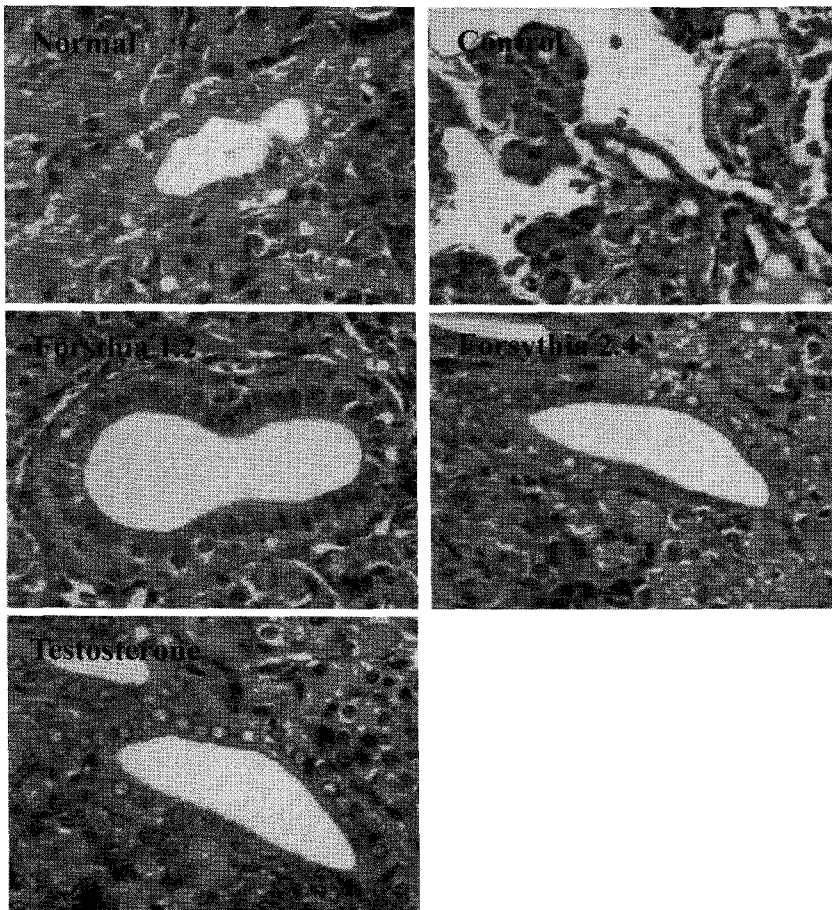


Fig. 1. Morphological profiles of the prostate tissues from the rats with non-bacterial prostatitis. Normal prostate: Duct cells were long columnar in shape and fibrous tissues were poorly developed in the surrounding stroma. Control group: Duct cells were flattened to low cuboidal or squamous type. The stroma showed a severe infiltration of lymphocyte and monocyte and remarkable fibrosis. Forsythia 1.2 group: Duct cells demonstrated a typical cuboidal feature and the mild proliferation of the acinar cells were seen in the periductal area. A few lymphocytes, monocytes and fibroblasts were infiltrated in the stroma of the tissue. Forsythia 2.4 group: Duct cells were recovered to high cuboidal profile. Testosterone group: Duct cells showed cuboidal appearance and fibrous tissues were poorly developed in the stroma. $\times 400$.

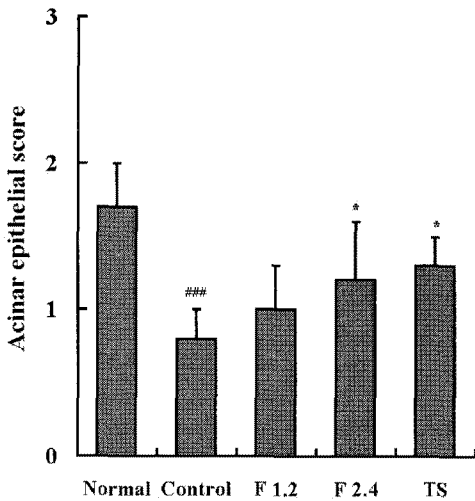


Fig. 2. Effects of Forsythia Fructus on acinar epithelial score of the prostate. Each column represents the mean \pm SD. ###Significantly different from the normal group(###P<0.001) * Significantly different from the control group(*P<0.05)

5. 連翹에 의한 상피/결합 조직 면적 비율 (epithelio- stromal area ratio)의 변화

連翹 투여가 고환절제술 및 17 β -estradiol 투여로 유발된 비세균성 전립선염에서의 전립선 결합조직 증식에 미치는 영향을 평가하기 위해서 결합조직 대 결합조직을 제외한 선포 조직 간의 비율을 계산하였다. 정상군은 결합조직 면적 비율이 34 \pm 8%로 나타난 반면, 대조군에서는 67 \pm 12%로 결합조직 면적 비율이 현저하게 증가하여(P<0.001) 고환절제술과 17 β -estradiol의 투여로 유발된 만성 비세균성 전립선염에서 전립선 세포의 과다증식이 주로 결합 조직에서 발생함을 확인하였다. 連翹 1.2g 투여군에서는 결합조직 면적 비율은 55 \pm 11%로 나타났지만 連翹 2.4g 투여군에서는 48 \pm 12%로 결합조직 증식이 현저하게 억제되었으며(P<0.01). Testosterone 투여군에서의 결합조직 면적 비율도

45 \pm 9%로 감소하였다(P<0.01) (Fig. 3).

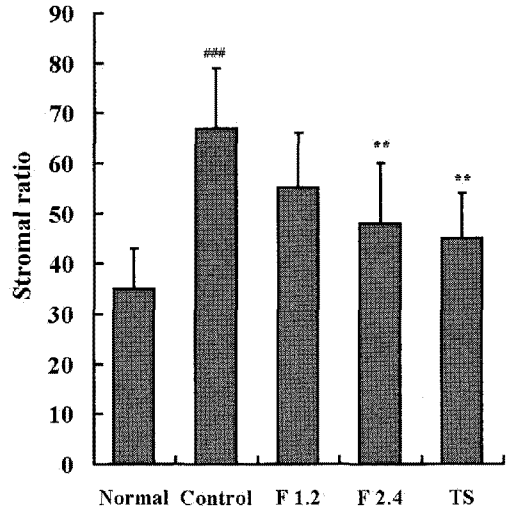


Fig. 3. Effects of Forsythia Fructus on epithelio-stromal ratio in the prostate. Each column represents the mean \pm SD. ###Significantly different from the normal group(### P<0.001) ** Significantly different from the control group(** P<0.01)

6. 連翹에 의한 염증관련 인자의 변화

連翹 투여가 고환절제술 및 17 β -estradiol 투여로 유발된 비세균성 전립선염에서의 전립선 조직에서 염증관련 인자인 IL-1 β , IL-5, IL-12, TNF- α , Eotaxin, iNOS 및 COX-2의 발현 정도에 미치는 영향을 알아보기 위해 각각의 유전자에 대한 역전사 연쇄 증합반응을 시행하였다. 정상군에 비해 대조군에서의 유전자 발현이 상승된 염증인자는 IL-1 β , TNF- α 이었고, IL-5는 저하되었으며, IL-12는 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 4).

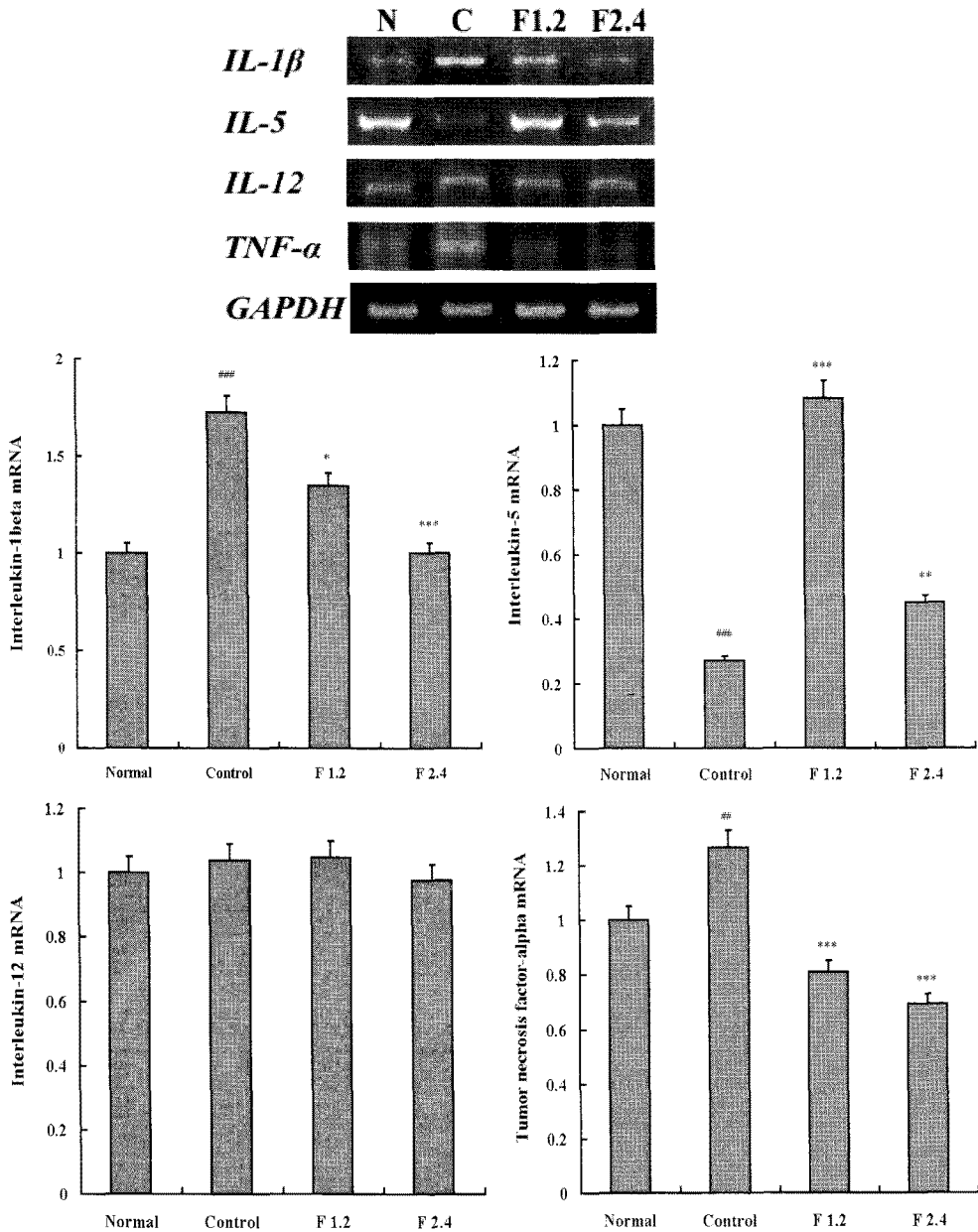


Fig. 4. Effects of Forsythia Frucus on expression of proinflammatory cytokine mRNA in the prostate. Each column represents the mean \pm SD. ##Significantly different from the normal group (## P<0.01, ### P<0.001) * Significantly different from the control group (* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001)

連翹가 만성 비세균성 전립선염 Rat의 염증발현인자 및 세포조직 변화에 미치는 영향

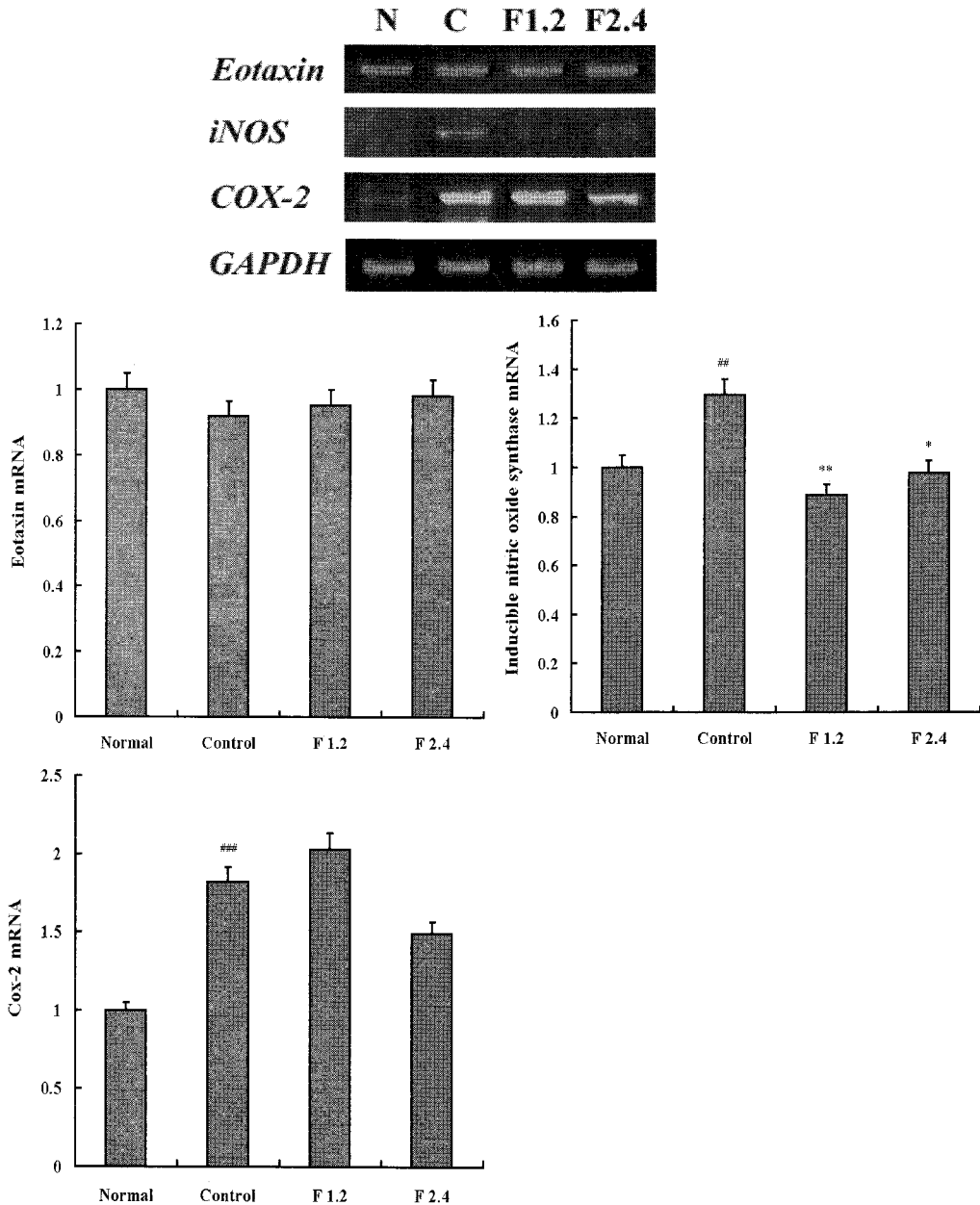


Fig. 5. Effects of Forsythia Frucus on expression of cytokine-inducible chemokine mRNA in the prostate. Each column represents the mean \pm SD. ##Significantly different from the normal group (## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$) * Significantly different from the control group (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

또한 cytokine 유도 염증인자로는 iNOS 및 COX-2는 상승하였고 Eotaxin에서는 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 5). 連翹 투여군에서의 IL-1 β , TNF- α 는 용량 의존적으로 대조군에 비해 유의한 감소효과를 나타냈고, IL-5는 유의하게 증가하였다(Fig. 4). 또한 cytokine 유도 염증인자는 iNOS의 경우 連翹 1.2g 투여군, 連翹 2.4g 투여군에서 대조군에 비해 유의한 억제효과를 나타내었으며, COX-2의 경우 連翹 2.4g 투여군에서 억제효과를 보였지만, 통계적으로 유의성은 관찰되지 않았다. 이밖에 IL-12 및 Eotaxin에서는 대조군에 비해 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 5).

IV. 고 찰

連翹는 개나리(*Forsythia koreana* Nakai), 의성 개나리(*F. viridissima* Lindl.), 중국개나리(*F. suspensa* Vahl.)의 열매이다. 性味는 微寒 苦한데 그 苦味는 入心하여 瀉心火하고, 寒性은 清熱한다. 또한 質이 輕淸하여 上浮하므로서 表裏에 透達케 하여 清心瀉火에 特長이 있으므로 清熱解毒 消腫 散結한다. 한편, 우리 몸의 모든 瘡瘍은 心火에 속하니, 瀉心の 要劑인 連翹는 十二經 瘡家의 聖藥이 된다. 따라서 連翹는 神農本草經에 기재된 이후 消炎, 利尿, 清熱解毒의 효과를 목표로 많이 응용되어 왔다⁴⁵. 連翹에 함유된 성분으로는 Lignan계 성분으로는 arctiin, arctigenin, phillyrin, matairesinol, matairesinoside, pinoresinol, pinoresinol glucose 등이 있고, Caffeic acid glycoside계 성분으로는 forsythiaside, acteoside, suspensoside, viridissimaside가 함유되어 있으며, Triterpenoids계로는 betulinic acid, oleanolic acid, ursolic acid 등이 있다. 또한 Flavonoid 성분인 rutin을 함유하고 있다. Lignan계인 pinoresinol, matairesinol 등에는 염증발생시 활성이 증가하는 cyclic AMP phosphodiesterase의 저해작용이 있고⁶,

배당체인 forsythiaside, suspensoside에 황색포도상 구균에 대한 항균작용이 있으며⁷, phillyrin은 혈압 강하작용이 있다고 보고되었다⁸. 또한 3 β -acetoxy-20와 25-epoxydammarane-24-ol은 항염증 효과가 있고, phenylpropanoid glycosides는 항균작용이 있는 것으로 알려져 있다⁹. 아울러 최근 連翹와 관련된 연구를 보면 activated macrophage-like cell line인 RAW 264.7 cells을 이용한 세포실험에서는 NO와 TNF- α 의 발현 및 iNOS의 발현을 억제시켰고, human mast cells을 이용한 세포실험에서는 TNF- α 의 분비를 억제시켜 항염증효능이 있다고 보고되고 있다⁹.

만성 비세균성 전립선염의 병리기전 및 약물의 유효성을 검증하기 위한 실험동물로는 대부분 Lewis rat과 Wistar rat, 그리고 Copenhagen rat 등이 이용되고 있다. 이들 rat은 자발적 비세균성 전립선염의 발생률이 높는데, 이들의 자발적 비세균성 연령-연관성 전립선염에서의 조직병리학적 소견은 인간의 만성 전립선염과 유사성을 나타내는 것으로 보고되어 있다¹⁰. 또한 고령의 Wistar rat에게 외부에서 17 β -estadiol을 투여하고, 고환 절제술을 시행한 경우에는 조직병리학적으로 자발적 비세균성 전립선염과 매우 유사하게 발현되어, 전립선염에 대한 유용한 실험적 모델이 된다^{11,12,13,14}. 따라서 본 연구에서는 고령의 Wistar rat에 17 β -estadiol을 투여하고, 고환 절제술을 실시하여 조직 병리학적으로 선 조직과 선 상피세포의 위축과 이행성 및 결합조직의 증식과 섬유화를 일으켜 인간의 비세균성 전립선염 형태와 유사한 모델을 만들었는데, 連翹의 전립선염에 대한 치료효과 및 작용기전을 관찰하기에 유용한 모델이라고 할 수 있다^{15,16,17}. 또한 최근에 이와 동일한 모델을 이용한 염증관련 인자에 대한 역전사 연쇄중합반응 연구에서 전염증인자인 IL-1 β , TNF- α , IL-6 및 cytokine-inducible chemokine인 inducible nitric oxide synthase (iNOS)가 항진되고, 항염증 인자인 IL-10은 감소되었다는 보고가 있었다¹⁸.

본 연구에서 17 β -estadiol의 투여와 고환 절제술을 시행한 대조군에서는 정상군에 비해 IL-1 β , TNF- α , iNOS, cox-2 등의 염증관련인자가 상승하였고, 항염증인자인 IL-5는 감소되었는데, 이는 성호르몬 유발 전립선염 모델에서의 염증관련인자에 관한 기존 실험실 연구와 일치하며, 동시에 인간의 만성 전립선염 병리소견과도 상응하는 결과이다. 또한 連翹는 IL-1 β 와 TNF- α 등의 전염증인자의 억제효과와 함께 항염증인자인 IL-5의 상승효과를 보였으며, cytokine-inducible chemokine인 iNOS의 상승을 억제하는 효능을 보였다. 이러한 결과는 기존의 連翹에 대한 타 질환관련 연구에서 나타난 TNF- α 와 iNOS의 억제효능과 일치하는 결과인 동시에 전립선염에서도 유사한 효능을 가지고 있음을 보여주는 결과이다. 또한 비록 통계학적 유의성은 관찰되지 않았지만, 連翹의 cox-2 억제 효능은 cox-2 발현의 전단계에 해당하는 PGE2에 대한 조절 작용에 의한 것임을 유추할 수 있다. 이러한 결과는 連翹가 전염증인자뿐 아니라 이로 인해 매개되는 chemokine 등의 발현을 동시에 조절할 수 있는 복합적인 효능을 지니고 있음을 의미하며, 連翹를 만성 전립선염의 임상치료에 응용함에 있어서 객관적인 근거가 될 수 있다. 따라서 連翹는 만성 전립선염의 치료에 있어 그 주된 병리 원인에 해당하는 면역체계의 불균형과 이로 인해 발현되는 국소적인 염증반응의 조절에 관여할 뿐 아니라 신경계의 작용도 조절하는 치료효능이 있음을 알 수 있다.

전립선 상피-결합조직 면적 비율 지수(epithelio-stromal area ratio)는 전립선 상피세포에 대한 결합조직의 면적 비율을 정량화한 수치로서, 정상 전립선 조직에서는 그 지수가 40%의 근조직(smooth muscle)과 20%의 과립형 상피세포의 비율로 구성되고, 전립선 비대 및 만성 전립선염과 같은 비후성 질환에서는 근 조직의 비율이 전체의 60%로 증가하게 된다^{2,3}. 이러한 근조직을 포함한 결합조직의 비율 증가는 전립선을 구성하는 다른 조직, 특

히 전립선 선포세포, 선포 상피 세포와 같은 구조물의 위축을 유발하여 정상 전립선 기능에 장애를 초래하게 된다^{2,3}.

본 연구에서 전립선염을 유발하기 위해 시행한 고환절제술 및 17 β -estadiol의 투여는 심각한 상피-결합조직 면적 비율의 증가를 초래하여 인간의 전립선염과 유사한 병태를 나타냄을 관찰할 수 있었다. 이러한 결합조직 면적 비율의 증가가 連翹의 투여로 감소하였는데, 이러한 결과는 連翹가 전립선 선포 상피세포의 보호작용과 더불어 결합조직의 증식 억제 작용을 동시에 갖는다는 것을 의미한다. 따라서 連翹는 기능적으로 전립선의 분비기능을 유지시킬 수 있을 뿐 아니라, 구조적으로 결합조직의 과다 증식을 억제하는 작용이 있어 전립선염에서 나타나는 조직의 병리학적 손상을 억제하는 효능을 가졌다고 할 수 있다.

전립선 상피계수(epithelial score)는 전립선 분비선의 손상정도를 의미하는데^{11,19}, 본 연구에서 連翹 투여군은 대조군에 비해 상피 계수가 상승하였으며, 이는 전립선 분비조직에 대한 기능 및 형태적 보호작용이 있음을 나타낸다. 그러나 본 연구에서 連翹의 투여와 testosterone의 투여가 대조군에 비해 전립선 무게에 별다른 영향을 미치지 않았다는 결과와 전립선의 무게는 잔존 분비액의 양에 의해 결정된다는 사실을 고려할 때, 본 연구에 이용한 rat가 완전 성장한 상태가 아닌 성장기에 있었기 때문에 치료약재의 효과 보다는 고환절제술과 17 β -estadiol투여로 인한 전립선의 성장억제가 보다 주된 원인으로 작용했던 것으로 사료된다. 따라서 향후 고령의 rat을 이용한 연구를 통해 連翹가 선조직의 형태학적 보호에 대한 효능뿐 아니라 기능적인 효능에 대한 검증이 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에서 連翹를 kg당 2.4g까지 투여했는데, 이런 다량의 連翹투여가 간기능과 신기능에 별다른 악영향을 미치지 않았고, 오히려 대조군에 비해 간수치의 개선 효과를 나타내었다. 전립선의 혈류역학적 구조상 약물이 치료농도에 도달하기 위해

서는 고용량의 약물 투여가 요구되는데, 다량의 連翹투여가 간독성 및 신독성을 유발하지 않았다는 사실은 連翹의 임상적 응용에 있어서 그 안전성을 확인했다는 의의가 있다.

V. 결 론

連翹가 Wistar rat에 고환 절제술과 17 β -estradiol의 투여로 유발된 비세균성 전립선염에 미치는 영향을 알아보기 위해 시행한 본 연구에서 連翹는 전립선의 선조직의 보호작용과 결합조직의 증식억제하며, 이는 IL-1 β , TNF- α , iNOS의 발현 억제 및 IL-5의 상승을 통한 항염증 기전이 관여하는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 대한비뇨기과학회. 비뇨기과학. 제3판. 서울. 고려의학. 2001:150-161.
2. Angwafo FF 3rd, Zaher A, Befidi-Mengue R, Wonkam A, Takougang I, Powell I, Murphy G. The National Health Survey Team for The National Epidemiology Board of Cameroon. High-grade intra-epithelial neoplasia and prostate cancer in Dibombari, Cameroon. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2003; 6:34-8.
3. Andriole VT. Use of quinolones in treatment of prostatitis and lower urinary tract infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1991;10:342-50.
4. Effects of androgen deprivation on chronic bacterial prostatitis in a rat model. Int J Urol. 2003;10:485-91.
5. Harris MT, Feldberg RS, Lau KM, Lazarus NH, Cochrane DE. Expression of proinflammatory genes during estrogen-induced inflammation of the rat prostate. Prostate. 2000;44(1):19-25.
6. 본초학교실. 본초학. 서울. 영림사. 1992:199-201.
7. 양길상. 淋濁煎劑로 만성 전립선염을 치료한 임상적 연구. 대전. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 1995;3(2):307-13.
8. Nikaido T, Ohmoto T, Kinoshita T, Sankawa U, Nishibe S, Hisada S. Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase by lignans. Chem. Pharm. Bull. 1981;29(12):3586-3592.
9. Nishibe S, Okabe K, Tsukamoto H, Sakushima A, Hisada S, Baba H, Akisada T. Studies on the Chinese crude drug "Forsythiae Fructus." VI. The structure and antibacterial activity of suspensaside isolated from Forsythia suspensa. Chem Pharm Bull (Tokyo). 1982;30(12):4548-53.
10. Lee, E.B., Keum.H.J. Pharmacological studies on Forsythiae Fructus. Kor. J. Pharmacogn. 1988;19(4):262-9
11. Ozaki Y, Rui J, Tang YT. Antiinflammatory effect of Forsythia suspensa V(AHL) and its active principle. Biol Pharm Bull. 2000;23(3):365-7.
12. Naslund MJ, Strandberg JD, Coffey DS. The role of androgens and estrogens in the pathogenesis of experimental nonbacterial prostatitis. J Urol. 1988;140:1049-53.
13. Robinette CL. Sex-hormone-induced inflammation and fibromuscular proliferation in the rat lateral prostate. The Prostate. 1988;12:271-86.
14. Seethalakshmi L, Bala RS, Malhotra RK, Austin-ritchie T, Menon M, Miller-Graziano C, Lubner-Narod J. 17 β -Estradiol induced prostatitis in the rat is an autoimmune disease. J Urol. 1996;156: 1838-42.

15. Lundgren R, Holmquist B, Hesselvik M, Muntzig J. Treatment of prostatitis in the rat. *The Prostate*. 1984;5:277-84.
16. McNeal JE. Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol*. 1988;12: 619-633.
17. Muntzing J, Sufrin G, Murphy GP. Prostatitis in the rat. *Scand J Urol Nephrol*. 1979;13:17-22.
18. Steenkamp V, Gouws MC, Gulumian M, Elgorashi EE, van Staden J. Studies on antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant activity of herbal remedies used in the treatment of benign prostatic hyperplasia and prostatitis. *J Ethnopharmacol*. 2005;22.
19. Turner JA, Ciol MA, Von Korff M, Berger R. Prognosis of patients with new prostatitis/pelvic pain syndrome episodes. *J Urol*. 2004;172:538-41.